



FQ-PCR 与 IMSA 检测转基因豆奶外源基因的比较研究

乐振穹¹, 许泽仰², 张细玲¹, 陈慧国¹, 祖新³

(1. 福建达利食品集团有限公司, 福建 惠安 362100; 2. 广州迪澳生物科技有限公司, 广东 广州 510507; 3. 甘肃省食品检验研究院, 甘肃 兰州 730030)

摘要:为比较实时荧光定量 PCR (FQ-PCR) 与等温多自配引发扩增 (IMSA) 技术检测转基因豆奶中外源基因 (*CaMV35S*、*NOS*、*EPSPS*) 的灵敏度和特异性。合成 *CaMV35S*、*NOS* 以及 *EPSPS* 基因的质粒, 通过 FQ-PCR 与 IMSA 检测定量的质粒, 比较质粒灵敏度; 按 0.50%、0.10%、0.05% 以及 0.01% 的比例制作转基因豆奶, 通过 FQ-PCR 与 IMSA 检测转基因大豆标准品制成的豆奶, 比较样品灵敏度和特异性。结果表明: IMSA 检测 *CaMV35S*、*NOS*、*EPSPS* 基因的质粒灵敏度分别为 31.01, 31.01, 3.10 cps·μL⁻¹, FQ-PCR 检测 *CaMV35S*、*NOS*、*EPSPS* 基因的质粒灵敏度皆为 31.01 cps·μL⁻¹; IMSA 检测 *CaMV35S*、*NOS*、*EPSPS* 基因的样品灵敏度分别为 0.05%、0.05%、0.01%, FQ-PCR 检测 *CaMV35S*、*NOS*、*EPSPS* 基因的样品灵敏度皆为 0.10%; FQ-PCR 非特异性检出 DP356043 的 *NOS* 以及 MON87701 的 *CaMV35S* 与 *EPSPS*。说明 IMSA 方法检测转基因豆奶外源基因 (*CaMV35S*、*NOS*、*EPSPS*) 的灵敏度与特异性优于 FQ-PCR。

关键词: FQ-PCR; IMSA; 豆奶; 外源基因; 灵敏度; 特异性

Comparison of FQ-PCR and IMSA for Detecting Exogenous Genes in Genetically Modified Soymilk

LE Zhen-qiao¹, XU Ze-yang², ZHANG Xi-ling¹, CHEN Hui-guo¹, ZU Xin³

(1. Fujian Dali Food Group Co. LTD., Huian 362100, China; 2. Guangzhou DIAO Bio-technology Co. LTD., Guangzhou 510507, China; 3. Gansu Province Food Inspection Institute, Lanzhou 730030, China)

Abstract: In order to compare the sensitivity and specificity between real-time fluorescent quantitative PCR (FQ-PCR) and isothermal multiple self-matching-initiated amplification (IMSA) detecting exogenous gene (*CaMV35S*, *NOS*, *EPSPS*) of genetically modified soymilk. The sensitivity of plasmids which were constructed with *CaMV35S*, *NOS* and *EPSPS* gene between FQ-PCR and IMSA were compared. The genetically modified soymilk was made at a ratio of 0.50%, 0.10%, 0.05% and 0.01% to compare sample detection sensitivity and specificity between FQ-PCR and IMSA. The results showed that the plasmid sensitivity of *CaMV35S*, *NOS* and *EPSPS* gene in genetically modified soymilk detected by IMSA were 31.01, 31.01, 3.10 cps·μL⁻¹ respectively. And the plasmid sensitivity of the three genes detected by FQ-PCR was 31.01 cps·μL⁻¹. The sample sensitivity of *CaMV35S*, *NOS* and *EPSPS* gene in genetically modified soymilk detected by IMSA were 0.05%, 0.05%, 0.01% respectively. And the sample sensitivity of the three genes detected by FQ-PCR was 0.1%. False positive of *NOS* in DP305423 and *CaMV35S*, *EPSPS* in MON87701 by FQ-PCR. It indicated that the sensitivity and specificity of IMSA on detecting exogenous gene (*CaMV35S*, *NOS*, *EPSPS*) of genetically modified soymilk was much better than FQ-PCR.

Keywords: FQ-PCR; IMSA; Soymilk; Exogenous genes; Sensitivity; Specificity

随着民众生活水平的提高以及饮食观念的改变, 天然、绿色的健康饮品迅速崛起, 以豆奶为代表的植物营养饮品受到广大消费者的青睐^[1]。豆奶是以大豆为主要原料的优质植物蛋白饮料, 能提供人体自身无法合成的多种氨基酸以及多种微量元素^[2]; 豆奶中无乳糖, 且含有易被人体吸收的不饱和脂肪酸, 含有大豆异黄酮、低聚糖、皂角苷以及大豆卵磷脂等生物活性物质, 为人体健康提供保障^[3-6]。

我国从 2000 年开始大量进口大豆, 至 2013 年进口大豆达 6 338 万 t, 全部用于加工原料的制作, 美

国、巴西、阿根廷等国家是我国大豆进口的主要来源地, 而这些国家绝大部分种植的都是转基因大豆^[7-8]。因此我国市场上的大豆制品中转基因成分较高, 且由于转基因食品存在着危害人类健康的风险, 如产生新毒素和过敏原, 抗性基因的漂移等, 因此转基因食品的检测显得尤为重要^[9], 豆奶作为主要的大豆加工产品也备受关注。

近年来各种免疫学方法与 PCR 方法被应用于转基因产品的检测, 由于豆奶的制作需经过 100℃ 加热, 因此无法通过免疫学方法进行检测。而 PCR 方法的模板是 DNA, DNA 在 100℃ 环境中也不会破

收稿日期: 2018-08-24

基金项目: 甘肃省食品药品监督管理局科研项目 (2018GSFDA013)。

第一作者简介: 乐振穹 (1978 -), 男, 学士, 工程师, 主要从事食品安全管理研究。E-mail: zhenqiaole@daligroup.com。

通讯作者: 祖新 (1973 -), 男, 学士, 高级工程师, 主要从事食品安全检验研究。E-mail: zuxin66@aliyun.com。

坏其结构,因此适合豆奶产品的转基因检测。了解被检测产品的转入基因的序列信息是进行核酸检测的前提,通常转基因作物的外源 DNA 包括启动子、功能基因和终止子 3 个部分^[10]。转基因大豆中常用的启动子是花椰菜花叶病毒 35S 启动子(35S promoter from cauliflower mosaic virus, *CaMV35S*)^[11],终止子是胭脂碱合酶基因终止子(terminator of nopaline synthase gene, *NOS*)^[12],功能基因是 5-莽草酸-3-磷酸合酶基因(5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase gene, *EPSPS*)^[13],大豆转基因核酸初筛检测主要是针对以上 3 个元件的检测。

FQ-PCR 的应用非常广泛,是公认的灵敏度较高和特异性较好的分子检测方法,但其成本高且需要高精密仪器进行精准的温度控制,不适合基层机构的推广。而 IMSA 是近年来新兴的等温核酸扩增技术,只需在等温(60~65℃)条件下进行扩增反应,且反应时间在 1 h 以内,其灵敏度以及特异性受到广泛认可^[14]。目前还未见到比较 FQ-PCR 与 IMSA 检测液态转基因产品外源基因的灵敏度与特异性的相关报道,本研究通过这两种方法检测豆奶的外源基因(*CaMV35S*、*NOS*、*EPSPS*),对其灵敏度与特异性进行比较,为转基因豆奶的监管工作提供有力的技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

转基因大豆标准品 GTS 40-3-2、MON89788、DP305423、DP356043、A5547-127、MON87701 与非转基因大豆(克山 1 号)均取自广州迪澳生物科技有限公司;植物基因组提取试剂盒购自广州迪澳生物科技有限公司;2×*Taq* PCR MasterMix 购自天根生化科技(北京)有限公司;*Bst* 聚合酶及 buffer 购自纽英伦生物技术(北京)有限公司;NanoDrop 2000 超微量分光光度计、QuantStudio 6 Flex 实时荧光定

量 PCR 系统购自 Thermo Scientific。其中转基因大豆标准品外源基因情况见表 1^[15]。

表 1 转基因大豆标准品外源基因
Table 1 Exogenous genes in genetically modified soybean standard

序号 Number	名称 Name	<i>CaMV35S</i>	<i>CP4-EPSPS</i>	<i>NOS</i>
1	GTS 40-3-2	+	+	+
2	MON89788	-	+	-
3	DP305423	-	-	-
4	DP356043	-	-	-
5	A5547-127	+	-	-
6	MON87701	-	-	-

“+”表示携带该基因,“-”表示不携带该基因。
“+” indicates that the gene is carried,“-” indicates that the gene is not carried.

1.2 方法

1.2.1 豆奶的制备 将大豆清洗干净,加入 3 倍体积的水在 20℃ 浸泡 10 h,煮沸 10 min 后进行磨浆,过滤豆渣,将豆奶 100℃ 煮沸 10 min,其间不断搅拌防止糊底,10 min 后制得无添加纯豆奶^[16]。

1.2.2 豆奶总 DNA 提取 将豆奶摇匀,取 1 mL 豆奶于 2 mL 离心管中,加入 600 μL 异丙醇涡旋混匀,-20℃ 放置 10 min,10 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,弃上清,加入 1 mL 无水乙醇,上下颠倒数次,10 000 r·min⁻¹ 离心 2 min,弃上清,纸上倒置晾干 5 min,正置挥发 10 min,使用广州迪澳生物科技有限公司的植物基因组提取试剂盒提取豆奶 DNA,洗脱液为 50 μL,-20℃ 保存。

1.2.3 引物的设计与合成 FQ-PCR 引物引用于中华人民共和国出入境检验检疫行业标准 SN/T 1202-2010^[17],IMSA 引物通过 Primer Explorer V4 在线软件设计之后手动修改(表 2),由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 2 引物序列
Table 2 Primer sequence

PCR 类型 PCR type	靶基因 Target gene	引物 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')
FQ-PCR	<i>CaMV35S</i>	CaMV35S-F	CGACAGTGGTCCCAAAGA
		CaMV35S-R	AAGACGTGGTTGGAACGTCTTC
		CaMV35S-P	TGGACCCCCACCCACGAGGAGCATC
	<i>EPSPS</i>	EPSPS-F	CCGACGCCGATCACCTA
		EPSPS-R	GATGCCGGCGGTGTTGAG
		EPSPS-P	CCGCGTGCCGATGGCCTCCGCA
	<i>NOS</i>	NOS-F	ATCGTTCAAACATTGGCA
		NOS-R	ATTGCGGGACTCTAATCATATA
		NOS-P	CATCGCAAGACCGGAACAGG

续表 2

PCR 类型	靶基因	引物	引物序列(5′→3′)
PCR type	Target gene	Primer	Primer sequence(5′→3′)
IMSA	<i>Lectin</i>	Lectin-F	CCTCCTCGGGAAAGTTACAA
		Lectin-R	GGGCATAGAAGGTGAAGTT
		Lectin-P	CCCTCGTCTCTTGGTCGCGCCCTCT
	<i>CaMV35S</i>	CaMV35S-DsF	TCCTTTATCGCAATGATGGCCCAGCTATCTGTCACITTTAT
		CaMV35S-FIT	ATCTTTGGGACCACTGTGCGCGTGGA AAAAGGAAGGTGGC
		CaMV35S-SteF	TCCTTTATCGCAATGATGGC
		CaMV35S-SteR	GAGGAGCATCGTGGA AAAAG
		CaMV35S-RIT	CCCCACACTGCTCCAAAAGATCTGGAGATATCACATCAATCC
		CaMV35S-DsR	GAGGAGCATCGTGGA AAAAGGATAGTGGGATTGTGCGTC
	<i>AroA-CP4-EPSPS</i>	EPSPS-1-DsF	TACCAACACCATCAATGAGTTATCAACACTGGTAAGG
		EPSPS-1-FIT	GAGCCTCAGGAGCAAGGAGTCTACCAACACCATCAATGA
		EPSPS-1-SteF	TACCAACACCATCAATGA
		EPSPS-1-SteR	TCGGTAACGCTGCAACTGG
		EPSPS-1-RIT	GACTCCTTGCTCCTGAGGCTCCAAGACCCATAGTCAAAC
		EPSPS-1-DsR	TCGGTAACGCTGCAACTGGCACC AATGAAAAGTGTAT
	<i>CP4-EPSPS</i>	EPSPS-2-DsF	GAGACCGCCGAACATGAACAAATCCTCTGCGCCTTTC
		EPSPS-2-FIT	ACGTCCTCGCCTTCCAGAAGGTCCCGGCGACAAGTCGATCT
		EPSPS-2-SteF	GAGACCGCCGAACATGAA
		EPSPS-2-SteR	CCAGGATCCGTAAGGAAG
		EPSPS-2-RIT	CCTTCTGGAAGCGGAGGACGTAGGCCGCCATTGCCGACGCCA
		EPSPS-2-DsR	CCAGGATCCGTAAGGAAGCATTTGCCGAAATCGAGCGG
	<i>NOS</i>	NOS-DsF	GCTTAACGTAATTCAACAGGTTCAAACATTTGGCAAT
		NOS-FIT	GACTCTAATCATAAAAACCCCTGTGTGCCGGTCTTTGCG
		NOS-SteF	GCTTAACGTAATTCAACAG
		NOS-SteR	CGCGATAGAAAAACAAAATAT
		NOS-RIT	GGGTTTTTATGATTAGAGTCGATAATTTATCCTAGTTTG
		NOS-DsR	CGCGATAGAAAAACAAAATATCCCTCGACAGATGACACCG
	<i>Lectin</i>	EPSPS-2-DsF	GGGTGCCGTTTTTCGTCAACCGCGGAAGCAACCAAACATG
		EPSPS-2-FIT	CTTTGTCCCAAATGTGGATGGGACCTCCTCGGGAAGTTAC
		EPSPS-2-SteF	GGGTGCCGTTTTTCGTCAACC
		EPSPS-2-SteR	CTTCGCCGCTTCCTTCAAC
		EPSPS-2-RIT	CCATCCACATTTGGGACAAAGGCAAGCCTTTTTGTGTCAGG
		EPSPS-2-DsR	CTTCGCCGCTTCCTTCAACGTGGCTTAGTGTC AATTGGTG

1. 2. 4 FQ-PCR 扩增反应 在 QuantStudio 6 Flex 仪器上进行,反应体系:2 × *Taq* PCR MasterMix 12. 5 μL,引物(10 μmol·L⁻¹)各 0. 5 μL,超纯水 6 μL,模板 5 μL; 反应条件:95℃ 10 min,95℃ 15 s、60℃ 1 min、40 个循环。

1. 2. 5 IMSA 扩增反应 在 QuantStudio 6 Flex 仪器上进行,反应体系:10 × ThermoPol 缓冲液(200 mmol·L⁻¹ Tris·HCl pH8. 8、20 mmol·L⁻¹ MgSO₄、100 mmol·L⁻¹ KCL、100 mmol·L⁻¹ (NH₄)₂SO₄、1% TritonX-100) 2. 5 μL,10 mmol·L⁻¹ dNTPs 4 μL,5 mol·L⁻¹ 甜菜碱 5 μL,150 mmol·L⁻¹ 硫酸镁 1 μL,8 U·μL⁻¹ *Bst* 聚合酶 1 μL,10 μmol·L⁻¹ DsF/DsR 0. 5 μL,40 μmol·L⁻¹

FIT/RIT 1 μL,20 μmol·L⁻¹ SteF/SteR 1 μL,超纯水 7 μL,模板 2 μL;反应条件:63℃ 1 h。

1. 2. 6 FQ-PCR 与 IMSA 检测灵敏度比较分析

(1)质粒灵敏度检验比较分析 在 NCBI 中查找靶基因序列: *CaMV35S* (GenBank ; KJ608131. 1), *NOS* (GenBank : AJ007624. 1), *CP4-EPSPS* (GenBank : AF464188. 1), *AroA-CP4-EPSPS* (GenBank : JN400383. 1),为了方便质粒灵敏度的对比,将各基因靶序列截短为 300 bp,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成并构建质粒。将质粒进行定量,浓度为 100 ng·μL⁻¹,根据公式计算拷贝数:质粒拷贝数 = [质粒浓度 (ng·μL⁻¹) × 10⁻⁶ / (324. 5 × 2 × 质粒长

度] $\times 6.023 \times 10^{23}$,并梯度稀释作为扩增模板,待扩增质粒拷贝数分别为: $3.10 \times 10^6, 3.10 \times 10^5, 3.10 \times 10^4, 3.10 \times 10^3, 3.10 \times 10^2, 31.01, 3.10 \text{ cps}\cdot\mu\text{L}^{-1}$,阴性对照为超纯水。以这些拷贝数的 DNA 作为模板进行 FQ-PCR 与 IMSA 的检测,每个试验 2 次重复,比较两种检测方法的质粒灵敏度。

(2)样品灵敏度检验比较分析 将转基因豆奶(GTS 40-3-2)与非转基因豆奶按比例进行梯度混样,比例分别为 0.50%,0.10%,0.05%,0.01%,提取基因组 DNA,取 200 ng 作为模板,通过 FQ-PCR 与 IMSA 检测 *CaMV35S*、*NOS* 与 *EPSPS* 基因,同时检测内源基因 *Lectin* 作为参照基因,每个试验 3 次重复,比较两种检测方法的样品灵敏度。

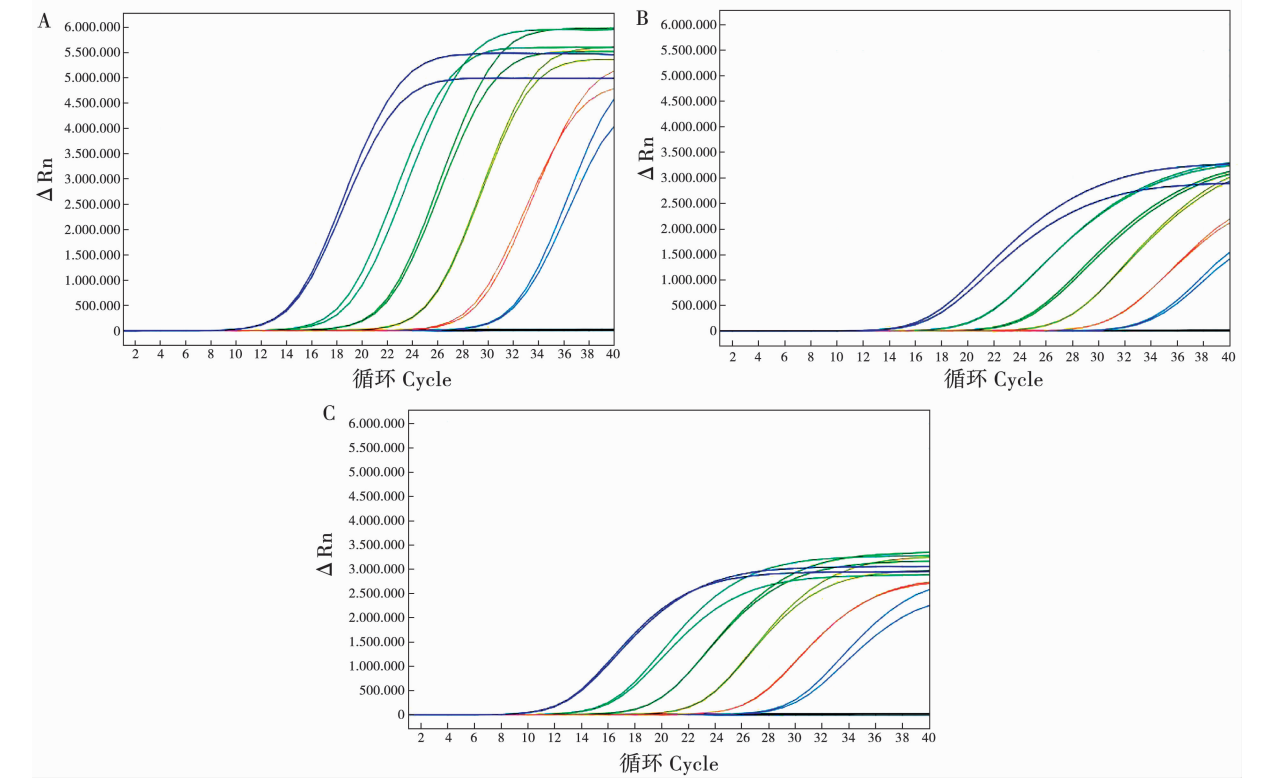
1.2.7 FQ-PCR 与 IMSA 检测特异性比较分析 将转基因标准品大豆分别制作成豆奶并提取 DNA 作为扩增模板,模板量 200 ng,分别使用 FQ-PCR 与 IMSA 的方法检测 *CaMV35S*、*NOS*、*EPSPS* 基因以及内源基因 *Lectin*,每个试验 3 次重复,分析两种方法检测结果。标准品是否携带这 3 个基因如表 1 所示,将结果有差异的 FQ-PCR 扩增产物送往生工生

物工程(上海)股份有限公司进行测序分析。

2 结果与分析

2.1 灵敏度检测

2.1.1 质粒灵敏度 由图 1 可知,FQ-PCR 的 *CaMV35S*、*NOS* 以及 *EPSPS* 引物检测浓度为 $3.10 \times 10^6 \sim 31.01 \text{ cps}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的质粒的 Ct 值小于 36,根据中华人民共和国出入境检验检疫行业标准 SN/T 1202-2010,可判定为阳性,说明 FQ-PCR 的 *CaMV35S*、*NOS* 以及 *EPSPS* 引物的质粒灵敏度为 $31.01 \text{ cps}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。由图 2 可知,IMSA 的 *CaMV35S* 与 *NOS* 引物检测浓度为 $3.10 \times 10^6 \sim 31.01 \text{ cps}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的相应质粒的出峰时间小于 60 min,可判定为阳性,说明 IMSA 的 *CaMV35S* 与 *NOS* 引物的质粒灵敏度为 $31.01 \text{ cps}\cdot\mu\text{L}^{-1}$;同样可知 *EPSPS* 引物的质粒灵敏度能够达到 $3.10 \text{ cps}\cdot\mu\text{L}^{-1}$,而这引物是由两套引物(*AroA* 与 *CP4-EPSPS*)混合而成,前期试验曾拆开 *EPSPS* 两套引物分别进行灵敏度检测,发现两者最低质粒灵敏度只能达到 $31.01 \text{ cps}\cdot\mu\text{L}^{-1}$,说明两套引物的合并使用提高了 *EPSPS* 引物的检测灵敏度。



图中扩增曲线从左到右依次为 $3.10 \times 10^6, 3.10 \times 10^5, 3.10 \times 10^4, 3.10 \times 10^3, 3.10 \times 10^2, 31.01, 3.10 \text{ cps}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的检测模板浓度。下同。

The amplification curve from left to right in the figure represents the template concentration of $3.10 \times 10^6, 3.10 \times 10^5, 3.10 \times 10^4, 3.10 \times 10^3, 3.10 \times 10^2, 31.01$ and $3.10 \text{ cps}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. The same below.

图 1 FQ-PCR 检测 *CaMV35S* (A)、*NOS* (B)、*EPSPS* (C) 基因的质粒灵敏度

Fig. 1 Plasmid sensitivity for *CaMV35S* (A)、*NOS* (B)、*EPSPS* (C) gene detection by FQ-PCR

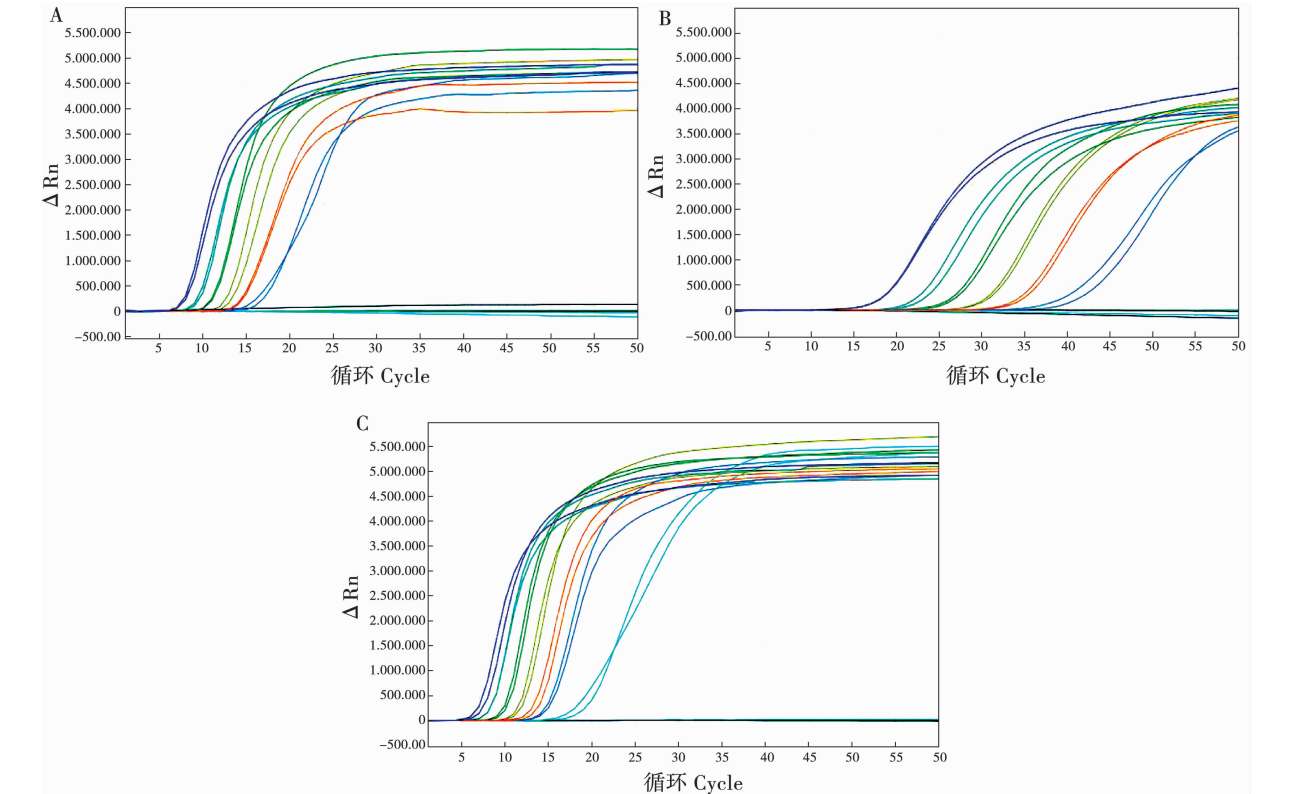


图2 IMSA 检测 *CaMV35S*(A)、*NOS*(B)、*EPSPS*(C) 基因的质粒灵敏度

Fig. 2 Plasmid sensitivity for *CaMV35S*(A)、*NOS*(B)、*EPSPS*(C) gene detection by IMSA

2.1.2 样品灵敏度比较 样品基因组 DNA 不同于质粒 DNA,除了本身含有大量非目的基因对 PCR 的特异性扩增造成干扰以外,在提取基因组 DNA 的过程中也可能会残留影响 PCR 扩增的因素,而深加工产品愈加严重,因此样品灵敏度才是检验引物灵敏度的重要指标。由表 3 可知,FQ-PCR 能够检测到

CaMV35S、*NOS*、*EPSPS* 的样品 DNA 灵敏度皆为 0.10%,IMSA 能够检测到的 *CaMV35S*、*NOS*、*EPSPS* 的灵敏度分别为 0.05%,0.05%,0.01%。与质粒灵敏度的区别在于 IMSA 的 *CaMV35S* 与 *NOS* 引物的样品灵敏度高于 FQ-PCR,说明 IMSA 更适于检测豆奶样品灵敏度。

表 3 IMSA 与 FQ-PCR 对豆奶外源基因的检测结果

Table 3 Detection results of exogenous genes in soymilk by IMSA and FQ-PCR									
序号 Number	样品名称 Sample name	IMSA 出峰时间平均值 IMSA threshold time average/min				FQ-PCR 循环数平均值 FQ-PCR Ct average			
		<i>CaMV35S</i>	<i>NOS</i>	<i>EPSPS</i>	<i>Lectin</i>	<i>CaMV35S</i>	<i>NOS</i>	<i>EPSPS</i>	<i>Lectin</i>
1	100% 转基因豆奶	7.3	13.0	12.5	9.6	21.3	22.9	23.1	23.4
2	0.50% 转基因豆奶	10.1	25.4	16.9	10.2	30.5	32.8	33.1	23.4
3	0.10% 转基因豆奶	14.2	34.6	20.4	10.5	34.3	34.3	35.3	23.2
4	0.05% 转基因豆奶	18.9	41.6	24.7	10.3	\	\	\	23.6
5	0.01% 转基因豆奶	-	-	24.9	9.5	\	\	\	23.3
6	非转基因豆奶	-	-	-	10.5	\	\	\	23.4

“ - ”表示出峰时间大于 60 min,“ \ ”表示循环数大于 40。下同。

“ - ” indicates that the threshold time is more than 60 min, “ \ ” indicates that the Ct is more than 40. The same below.

2.2 IMSA 与 FQ-PCR 的特异性比较

由表 4 可知,IMSA 与 FQ-PCR 出现不一致的结果,如 DP356043 的 *NOS* 以及 MON87701 的 *CaMV35S* 与 *EPSPS*。将该扩增产物送往生工生物工程(上

海)股份有限公司测序,然后将结果与靶序列进行 blast 比对分析,确定为非特异性扩增产物。将测序序列单独进行 blast 比对,结果如表 5 所示,DP356043 的 *NOS* 扩增产物为曲霉菌过氧化物酶体膜蛋白的

部分基因,MON87701的 *EPSPS* 扩增产物为大豆一个未知蛋白的部分基因,MON87701的 *CaMV35S* 扩增产物为番木瓜磷酸酯酶的部分基因。反复试验证实 DP305423 样品存在曲霉菌污染,引起 FQ-PCR 的 *NOS* 引物的非特异性扩增;MON87701 存在一段

内源基因与 FQ-PCR 的 *EPSPS* 引物有几率错配,引起非特异性扩增;而 MON87701 的 *CaMV35S* 引物的非特异性扩增原因不明,有待下一步试验验证。同时这证明了 IMSA 的特异性优于 FQ-PCR。

表 4 IMSA 与 FQ-PCR 对转基因标准品豆奶外源基因的检测结果

序号 Number	样品名称 Sample name	IMSA 出峰时间平均值 IMSA threshold time average/min				FQ-PCR 循环数平均值 FQ-PCR Ct average			
		<i>CaMV35S</i>	<i>NOS</i>	<i>EPSPS</i>	<i>Lectin</i>	<i>CaMV35S</i>	<i>NOS</i>	<i>EPSPS</i>	<i>Lectin</i>
1	GTS 40-3-2	13. 3	18. 5	16. 7	9. 8	24. 5	23. 3	27. 4	23. 0
2	MON89788	—	20. 1	—	10. 5	\	27. 5	\	22. 9
3	DP305423	—	—	—	9. 6	\	\	\	23. 2
4	DP356043	—	—	—	10. 0	\	37. 2	\	23. 0
5	A5547-127	15. 6	—	—	9. 9	22. 5	\	\	23. 6
6	MON87701	—	—	—	9. 5	37. 4	\	38. 3	23. 3

表 5 FQ-PCR 扩增产物测序结果

Table 5 Sequencing results of amplification products by FQ-PCR				
序号 Number	靶基因 Target gene	扩增产物编码基因 Amplification product gene	基因编号 Gene ID	序列在基因中的位置 Position of the sequence in its gene/bp
1	<i>CaMV35S</i>	番木瓜磷酸酯酶	XM_022038091. 1	303 ~ 433
2	<i>NOS</i>	曲霉菌过氧化物酶体膜蛋白	XM_025699757. 1	785 ~ 902
3	<i>EPSPS</i>	大豆未知蛋白	NR_146298	379 ~ 490

3 讨 论

在大豆加工成豆奶的过程中,磨浆的物理机械作用会对部分细胞造成破坏,导致核酸释放并部分降解断裂^[18-19],加大了豆奶核酸提取难度,影响 PCR 检测转基因成分的灵敏度。大量研究表明,0. 6 V 的异丙醇能够沉淀核酸^[20],在本试验中,使用异丙醇预处理豆奶后再提取核酸,其浓度以及纯度得到明显的提升与改善,更加符合 PCR 检测模板的要求。

在查找靶序列时发现 *EPSPS* 存在 *CP4-EPSPS* 与 *AroA-CP4-EPSPS* 两种序列,两者仅有 83% 的相似度,只针对一种序列设计检测的引物会对部分转基因产品的 *EPSPS* 基因造成漏检。因此本试验设计两套 *EPSPS* 扩增引物,并将两套引物合并检测,提高检测范围,结果检测效果良好,甚至在灵敏度方面较 FQ-PCR 高 1 个数量级。

FQ-PCR 技术通过实时分析 PCR 过程中荧光信号的变化,能够获得样品中 DNA 模板含量的定量结果,其检测灵敏度比常规 PCR 技术约高 100 倍,本

文的 FQ-PCR 使用的是探针法,有上下游两条引物以及一条荧光探针,具有实时性、特异性与灵敏度高等特点^[21-22];但是也存在着一一定的缺陷: 1. 检测成本高,需要特殊热循环仪器; 2. 检测时间长(1. 5 ~ 2. 5 h); 3. 很多因素可能导致假阳性,如探针比例、同源与异源 DNA 背景、dNTP 的浓度、酶活性、靶序列的长度、仪器边缘效应以及模板的质量等^[23-24]。

IMSA 技术可在约 63℃ 的温度下实现 PCR 扩增,其原理是通过特异性地识别靶序列上的 7 个区域的 6 条引物,将扩增反应步骤分为 C 环样结构的形成与循环扩增 2 个部分进行,具有检测灵敏度高、检测特异性强、操作简单、快速高效的优点;不足之处是: 1. 灵敏度过高,需要严格分成配液室、加样室以及扩增室 3 个区域防止交叉污染; 2. 引物设计复杂; 3. 产物复杂,难以进行后续的回收克隆鉴定^[25-26]。

与 FQ-PCR 相比 IMSA 具有以下优点: 1. IMSA 不需要花费时间在变性复性过程中,因此反应时间低于 1 h; 2. IMSA 引物有 6 条,识别区域为 7 个,特

异性更强; 3. IMSA 对模板杂质的容忍性较好, 在本文的特异性试验中, IMSA 与 FQ-PCR 检测的是同一模板, 但后者更容易受到杂质的干扰, 导致假阳性的出现^[27]。

4 结 论

本试验使用 FQ-PCR 与 IMSA 的方法对转基因豆奶中的 *CaMV35S*、*NOS* 以及 *EPSPS* 3 个外源基因进行了灵敏度以及特异性的检测。IMSA 与 FQ-PCR 检测 *CaMV35S*、*NOS* 基因的质粒灵敏度皆为 31. 10 cps·μL⁻¹, 但前者检测 *EPSPS* 的质粒灵敏度为 3. 10 cps·μL⁻¹, 高于后者 1 个数量级, 这是由于双引物相互叠加所带来的灵敏度提高, 也可作为以后提高引物灵敏度的参考途径; IMSA 检测 *CaMV35S*、*NOS*、*EPSPS* 基因的样品灵敏度皆高于 FQ-PCR, 证明 IMSA 在检测豆奶样品 DNA 外源基因的灵敏度方面更有优势; 在特异性方面, IMSA 检测 6 例标准品的结果与标准品携带的外源基因一致, 而 FQ-PCR 非特异性检出 DP356043 的 *NOS* 以及 MON87701 的 *CaMV35S* 与 *EPSPS*, 说明 IMSA 多引物多识别位点的设计使其特异性更为优越。

综上所述, IMSA 检测转基因豆奶外源基因的灵敏度与特异性皆优于 FQ-PCR, 且操作简单, 快速高效, 目前国内已自主研制出多类低成本恒温扩增检测仪, 可以直接读取结果, 操作方便简单, 更适合于基层检测机构的使用, 为转基因豆奶的监管工作提供了一种灵敏度高、特异性强的新途径。

参考文献

[1] 利乐. 豆奶和植物蛋白饮料市场的无限潜力[J]. 食品安全导刊, 2017, 31: 43-46. (Li L. Unlimited potential for soy milk and vegetable protein beverage markets [J]. China Food Safety Magazine, 2017, 31 :43-46.)

[2] 孟晶山, 杨静. 大豆多肽的功能特性及开发前景[J]. 中国科技投资, 2017, 26: 357-358. (Meng J S, Yang J. Functional properties and development prospects of soybean peptide[J]. China Venture Capital, 2017, 26:357-358.)

[3] Biscola V, de Olmos A R, Choiset Y, et al. Soymilk fermentation by enterococcus faecalis VB43 leads to reduction in the immunoreactivity of allergenic proteins beta-conglycinin (7S) and glycinin (11S)[J]. Beneficial Microbes, 2017, 8(4): 635-643.

[4] 张丽华. 豆奶与人体健康[J]. 食品研究与开发, 2002, 23 (5): 69-70. (Zhang L H. Soymilk and human health[J]. Food Research and Developent, 2002, 23 (5): 69-70.)

[5] Rathi M, Upadhyay N, Dabur R S, et al. Formulation and physico-chemical analysis of whey-soymilk dahi [J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 52(2): 968-975.

[6] 周志, 汪兴平, 莫开菊, 等. 姜汁豆奶复合饮料的加工工艺研究[J]. 食品科技, 2004(8): 56-58, 61. (Zhou Z, Wang X P, Mo K J, et al. Study on processing technology of compound soymilk beverage with ginger juice[J]. Food Science and Technology, 2004(8): 56-58, 61.)

[7] 张丽君. 转基因大豆进口对中国资源环境和食品安全的可能风险[J]. 粮食科技与经济, 2008, 33(4): 4-5. (Zhang L J. Possible risks of genetically modified soybean imports to China's resource environment and food safety [J]. Grain Science and Technology and Economy, 2008, 33(4): 4-5.)

[8] 李劲松. 我国粮食安全与粮食自给率的思考[J]. 黑龙江粮食, 2014(2): 15-16. (Li J S. Thoughts on China's food security and food self-sufficiency rate[J]. Heilongjiang Grain, 2014(2): 15-16.)

[9] 宋欢, 王坤立, 许文涛, 等. 转基因食品安全性评价研究进展[J]. 食品科学, 2014, 13(15): 248-252. (Song H, Wang L K, Xu W T, et al. Review of food safety evaluation on genetically modified food[J]. Food Science, 2014, 13(15): 248-252.)

[10] 陈颖, 王媛. PCR 法检测大豆加工食品中的转基因成分[J]. 中国食品学报, 2003, 3(1): 61-66. (Chen Y, Wang Y. Detection of genetically modified components in soybean processed foods by PCR[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2003, 3(1): 61-66.)

[11] Li Y, Sun L, Liu Q, et al. Photoelectrochemical CaMV35S biosensor for discriminating transgenic from non-transgenic soybean based on SiO₂@ CdTe quantum dots core-shell nanoparticles as signal indicators[J]. Talanta, 2016, 161: 211-218.

[12] Meric S, Cakir O, Turgut-Kara N, et al. Detection of genetically modified maize and soybean in feed samples [J]. Genetics and Molecular Research, 2014, 13(1): 1160-1168.

[13] Wang C, Zhu Y. Investigation of transgenic soybean components in soybean from an area of China[J]. Journal of The Science of Food and Agriculture, 2016, 96(9): 3169-3172.

[14] 崔玉伟, 牟颖, 马莉, 等. 人乳头病毒 16 和 52 型双荧光等温多自配引发扩增的检测方法[J]. 吉林大学学报(理学版), 2018, 56(4): 1017-1023. (Cui Y W, Mou Y, Ma L, et al. Detection method human papilloma virus HPV16 and HPV52 by dual fluorescence isothermal multiple-self-matching initiated amplification[J]. Journal of Jilin University(Science Edition), 2018, 56 (4): 1017-1023.)

[15] 国家质量监督检验检疫总局. 出口食品中转基因成分环介导等温扩增(LAMP)检测方法第 1 部分: 通用要求和定义: SN/T 3767. 31-2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014. (State Administration for Quality Supervision and Inspection and Quarantine. Loop-mediated isothermal amplification detection method for genetically modified components in food for export-Part 1: General requirements and definitions: SN/T 3767. 31-2014[S]. Beijing: China Standards Press, 2014.)

[16] 彭元怀, 陈贵红, 吴正银. 豆奶制作工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(3): 87-90. (Peng Y H, Chen G H, Wu Z Y. Investigation on the production of soy milk[J]. Food Research and Development, 2012, 33(3): 87-90.) (下转第 954 页)

2018, 39(4): 289-295. (Zhao X, Li G J, Hu Y Y, et al. Impromtent effects and mechanism research of polyphenol extracts from Kudingcha on carbon tetrachloride induced hepatic damage in mice[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39 (4): 289-295.)

[13] 王妍琪. 茶多酚、VE 对肉用仔鸡热应激时生产性能和抗氧化性能的影响[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2004. (Wang Y Q. Effect of tea polyphenols and vitamin E on broilers performance and antioxidant on under heat-stress conditions [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2004.)

[14] Zhong R Z, Tan C Y, Han X F, et al. Effect of dietary tea catechins supplementation in giats on the quality of meat kept under refrigeration[J]. Small Ruminant Research, 2009, 87 (1): 122-125.

[15] 蔡海莹, 徐晓娟, 张磊, 等. 日粮中添加茶多酚对肉鸡抗氧化性能及免疫器官指数的影响[J]. 中国家禽, 2010, 32(13): 11-14. (Cai H Y, Xu X J, Zhang L, et al. Effect of tea polyphenol on antioxidation capacity and immune organs index of broilers [J]. China Poultry, 2010, 32(13): 11-14.)

[16] Kurt Ö, Demirci H, Ozturk K, et al. Severe serum amylase elevation, with only chronic kidney disease[J]. Renal Failure, 2015, 37(5):915.

[17] 曹友德, 陈玮, 李浩. 急性胰腺炎患者脂肪酶的检测与临床意义[J]. 中国现代医学杂志, 2001, 11(6): 90-91. (Cao Y D, Chen W, Li H. Detection and clinical significance of lipase in patients with acute pancreatitis[J]. China Journal of Modern Medicine, 2001, 11(6): 90-91.)

[18] 蒋品. 淀粉酶在胰腺炎诊断中的作用[J]. 实用医技杂志, 2004, 11(12): 2636-2637. (Jiang P. The role of amylase in the diagnosis of pancreatitis[J]. Journal of Practical Medical Techniques, 2004, 11(12): 2636-2637.)

[19] 杨志刚, 王宝维, 王雷. 大豆胰蛋白酶抑制因子的研究进展 [J]. 饲料博览, 2005(12): 31-33. (Yang Z G, Wang B W, Wang L. Research progress of soybean trypsin inhibitor[J]. Feed Review, 2005(12): 31-33.)

[20] Liang H H, Huang H H, Kwok K C. Properties of tea polyphenol complexed bromelain[J]. Food Research International, 1999, 32 (8): 545-551.

[21] 赵自刚, 牛春雨, 侯亚利, 等. 兔急性肾功能衰竭时胰腺形态与功能及自由基的变化[J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21 (8): 1599-1601. (Zhao Z G, Niu C Y, Hou Y L , et al. Pancreatic morphology and function and free radicals in rabbits with acute renal failure[J]. Chinese Journal of pathophysiology, 2005, 21 (8): 1599-1601.)

[22] 唐亚丽, 卢立新, 王军. 生长抑素与消化系统的氧化损伤 [J]. 饲料工业, 2009, 30 (23): 48-51. (Tang Y L, Lu L X, Wang J. Somatostatin and oxidative damage of digestive system [J]. Feed Industry, 2009, 30 (23): 48-51.)

(上接第 949 页)

[17] 中华人民共和国广东出入境检验检疫局,中国检验检疫科学研究院. 食品中转基因植物成分定性 PCR 检测方法:SN/T 1202-2010[S]. 北京:中国标准出版社,2011. (Guangdong Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau of the People's Republic of China, Chinese Academy of Inspection and Quarantine. Protocol of the qualitative polymerase chain reaction for detecting genetically modified plant components in food:SN/T 1202-2010 [S]. Beijing: China Standards Press,2011.)

[18] Malaki Nik A, Tosh S M, Poysa V, et al. Protein recovery in soymilk and various soluble fractions as a function of genotype differences, changes during heating, and homogenization [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56 (22): 10893-10900.

[19] 王媛. 转基因大豆内、外源基因在食品加工过程中变化规律的研究[D]. 北京:中国农业大学, 2005. (Wang Y. Degradation of endogenous and exogenous genes of transgenic roundup ready soybean during its processing[D]. Beijing: China Agricultural University, 2005.)

[20] 何雪娇, 郑涛, 苏金强, 等. 改良 CTAB 法提取野牡丹科 7 种植物 DNA[J]. 热带农业科学,2011, 31(10): 73-77. (He X J, Zheng T, Su J Q, et al. DNA extraction of 7 species plants of melastomaceae using modified CTBA method [J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2011, 31(10): 73-77.)

[21] 焦红, 翁文川, 王方金, 等. 食品中副溶血弧菌 FQ-PCR 快速检测方法的研究[J]. 卫生研究, 2005, 34(4): 457-460. (Jiao H, Weng W C, Wang F J, et al. Faster detection of *Vibrio parahaemolyticus* in foods by FQ-PCR technique[J]. Journal of Hygiene Research, 2005, 34(4): 457-460.

[22] 谢华, 谭桂芳, 程颂. 荧光定量聚合酶链反应在尖锐湿疣诊断中的应用[J]. 四川大学学报(医学版), 2003, 34(1): 155-157. (Xie H, Tan G F, Cheng S. The use of FQ-PCR in detecting condyloma acuminata [J]. Journal of Sichuan University (Medical Science Edition), 2003, 34(1): 155-157.)

[23] 李勤, 盛占武, 孙志高, 等. 实时荧光定量技术在食品微生物检测和研究中的应用[J]. 食品与机械, 2006, 42(6): 118-120. (Li Q, Sheng Z W, Sun Z G, et al. Application of real-time fluorescent quantitative PCR for detection of microbes in foods[J]. Food and Machinery, 2006, 42(6): 118-120.)

[24] 郑卫东, 袁仕伟. 荧光定量 PCR 仪的边缘效应与实验误差分析[J]. 医疗卫生装备, 2013, 34(2): 113-115. (Zheng W D, Yuan S W. Edge effect and experiment error of fluorescence quantitative PCR instrument[J]. Quality Control and Safety, 2013, 34 (2): 113-115.)

[25] 梁海燕, 刘文鑫, 杨志刚. 等温核酸扩增技术进展[J]. 中国医学创新, 2017, 14(16): 145-148. (Liang H Y, Liu W X, Yang Z G, et al. Progress in isothermal nucleic acid amplification technology[J]. Medical Innovation of China, 2017, 14(16): 145-148.)

[26] 李鑫娜, 聂凯, 王估, 等. 埃博拉病毒扎伊尔亚型多引物自配引发等温扩增方法的建立[J]. 病毒学报, 2016, 32(1): 1-6. (Li X N, Nie K, Wang J, et al. Detection of the Zaire subtype of the Ebola virus by isothermal multiple self-matching initiated amplification[J]. Chinese Journal of Virology, 2016, 32(1): 1-7.)

[27] 丁雄. 新型等温核酸扩增技术 (IMSA) 的建立及其对产染病病原 EV71、CVA16、H7N9 和 HIV-1 的快速检测应用[D]. 广东:华南农业大学, 2014. (Ding X. Development of a novel isothermal multiple-self-matching-initiated amplification (IMSA) and its application on rapid detection of infectious pathogens of EV71, CVA16, H7N9, and HIV-1 [D]. Guangdong: South China University of Technology, 2014.)