



# 大豆制品转基因检测中 PCR 技术的应用进展及展望

郭梦茹, 夏义苗, 陈复生

(河南工业大学 粮油食品学院, 河南 郑州 450001)

**摘要:**近年来,世界范围内转基因大豆的应用率已高达 78% 左右,转基因大豆主要用于大豆油生产,其制品已越来越广泛地参与到消费者的饮食生活中。我国自产大豆量不足进口大豆量的 20%,进口大豆以转基因大豆为主。为规范转基因大豆的流通、加工和消费等环节,我国对转基因制品采用按目录强制性标识管理,这就对转基因大豆制品的检测技术提出了较高要求。目前广泛采用的检测方法是核酸扩增检测技术,其中聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)技术应用最普遍,主要包括普通定性 PCR、巢式 PCR、实时荧光定量 PCR、多重 PCR、数字 PCR 等。本文对不同 PCR 技术在大豆制品转基因检测中的应用进行综述,对其优缺点进行了对比,对不同加工程度大豆制品适用的 PCR 技术进行了探究,最后对大豆制品相关 PCR 技术未来潜在的研究方向进行了展望,以期提高 PCR 检测效率,助力我国转基因大豆制品生物安全管理工作的推进实施。

**关键词:**聚合酶链式反应(PCR); 转基因大豆; 大豆制品; 转基因检测; 标识

## Application Progress of PCR Technology in Transgenic Detection of Soybean Products

GUO Meng-ru, XIA Yi-miao, CHEN Fu-sheng

(Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

**Abstract:** In recent years, the application rate of genetically modified soybeans in the world has reached about 78%. Genetically modified (GM) soybeans are mainly used for soybean oil production, and their products have been more and more widely involved in consumers' dietary life. The quantity of Chinese self-produced soybeans is less than one-fifth of the quantity of imported soybeans, and the imported soybeans are mainly GM soybeans. In order to standardize the circulation, processing and consumption of GM soybeans, China adopts mandatory labeling management for GM soybean products, which puts forward higher requirements for the detection technology of GM products. At present, the most commonly used detection method is nucleic acid amplification detection technology, of which the polymerase chain reaction (PCR) technology is the most widely used, mainly including ordinary qualitative PCR, nested PCR, real-time fluorescent quantitative PCR, multiplex PCR, digital PCR, etc. This paper reviewed the application of different PCR technologies in the detection of GM soybean products, and compared their advantages and disadvantages. The applicability of PCR technologies to GM soybean products with different processing degrees was explored, and the future development direction of PCR technology for GM soybean products was prospected. This paper aims to provide a theoretical reference for the selection of the most suitable PCR technology in the detection of GM soybean products, and to help promote the implementation of the biosafety management of GM soybean products in China.

**Keywords:** polymerase chain reaction(PCR); genetically modified soybean; soybean products; transgenic detection; label

我国是传统豆制品消费大国,随着我国大豆制品消费需求越来越强,近年来从国外进口至我国的大豆量巨大,整体呈现上升趋势<sup>[1]</sup>。2020 年我国大豆自产量约为  $1.96 \times 10^3$  万 t,大豆进口量约为  $9.97 \times 10^3$  万 t;2021 年我国大豆自产量约为  $1.64 \times 10^3$  万 t,进口大豆量高达  $1.00 \times 10^4$  万 t<sup>[2]</sup>。我国已成为世界上最大的大豆净进口国,进口至我国的大豆主要是转基因大豆,主要用于制取食用豆油,相应豆粕用于饲料加工,或者用作其它产品的加工原料。

我国农业农村部转基因生物安全管理办公室

颁布的《农业转基因生物标识管理办法》第三条指出“在中华人民共和国境内销售列入农业转基因生物标识目录的农业转基因生物,必须遵守本办法。凡是列入标识管理目录并用于销售的农业转基因生物,应当进行标识;未标识和不按规定标识的,不得进口或销售”,其中标识目录中就含有转基因大豆及其制品<sup>[3]</sup>。为规范转基因大豆的加工、消费等行为,需要对大豆及其制品进行转基因标识<sup>[4]</sup>,因此必须建立灵敏度高、准确性好、稳定可靠的转基因检测技术。

收稿日期:2022-01-29

基金项目:国家自然科学基金区域创新发展联合重点基金(U21A20270)。

第一作者:郭梦茹(1998—),女,硕士研究生,主要从事植物蛋白质资源开发与利用研究。E-mail:gmr2455990731@163.com。

通讯作者:陈复生(1963—),男,博士,教授,主要从事植物蛋白质资源开发与利用研究。E-mail:fushenge@haut.edu.cn。

目前,国内外转基因检测工作主要依赖于对外源基因或者外源基因表达蛋白的识别,相应的检测方法主要有两种<sup>[5]</sup>:一是以核酸为靶标的检测方法;二是以特定表达蛋白为靶标的检测方法。蛋白检测方法,如酶联免疫印迹技术等,主要基于其高级结构,而蛋白质在加工过程中易发生变性、降解,其高级空间构象被破坏,蛋白检测方法便会失效;相较而言核酸的一级结构存在更稳定,因此依赖于核酸一级结构的核酸扩增检测方法更准确、可靠<sup>[6]</sup>。核酸扩增检测技术主要包含 3 个阶段:核酸提取、核酸扩增和扩增产物检测。其中,核酸扩增采用以聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)技术为主的方法,即使特定 DNA 片段数量指数增加,该步骤是核酸检测的重要组成部分,是扩增产物得以成功检测的必要前提。鉴于 PCR 技术对于核酸检测的重要性,本文对大豆及其制品转基因检测常用的几种 PCR 技术进行对比研究,对其优劣和适用性进行探究,以期为实践应用中最适 PCR 技术的选择提供理论参考,提高大豆及其制品转基因检测的准确性,促进我国转基因标识制度的实施。

## 1 普通定性 PCR

### 1.1 原理

普通定性 PCR 是最常见的一种 PCR 检测技术,其原理是以 DNA 为模板,在引物与模板 DNA 以碱基互补配对原则特异性结合后,在 *Taq* DNA 聚合酶催化作用下,以脱氧核糖核苷酸三磷酸(dNTP)为原料,按照半保留复制原则合成一条新的 DNA 双链,随着扩增次数  $n$  的增加,模板 DNA 数量以  $2^n$  递增,最终实现目标 DNA 片段数量的百万倍放大,为后续目的 DNA 片段的检测提供便利。普通定性 PCR 目前已广泛应用于转基因作物及其制品的鉴定。

### 1.2 应用范围及优缺点分析

普通定性 PCR 在检测时常依据 *Lectin*、*CaMV35s* 启动子、*NOS* 终止子、*CP4-EPSPS* 等基因设计引物,进而对大豆及其制品中的 DNA 进行扩增检测,外源基因扩增结果为阳性则说明被测物中可能含有转基因成分。普通定性 PCR 的扩增结果无法直观给

出,需要借助于琼脂糖凝胶电泳来定性表征,但当待测样品中的 DNA 含量较低或者转基因含量较低时,电泳结果易造成假阴性误判,如吴姗等<sup>[7]</sup>在对大豆外源基因进行普通定性 PCR 检测时,用阿根廷转基因大豆粉和国产非转基因大豆粉制备了 4 个转基因含量为 1% ~ 10% 的样品,结果发现这 4 个样品的外源基因 *CP4-EPSPS* 均未被检出。在实际应用中,针对转基因大豆深加工制品或者转基因含量较低的大豆制品,研究者应考虑定性 PCR 检测可能带来的假阴性结果,并采用更高灵敏度的 PCR 技术来规避该误判。

相较于其它 PCR 技术,普通定性 PCR 应用最普遍,但也存在诸多不足。对模板 DNA 要求较高,对于那些 DNA 含量少、破坏严重且基质成分复杂的转基因大豆制品难以达到理想的检测效果;多用于目标 DNA 片段的定性鉴定,对目标 DNA 片段的定量鉴定应用较局限;只能针对单个靶标进行单次扩增,难以满足当前对多靶标同步检测的现实需求。

## 2 巢式 PCR

### 2.1 原理

巢式 PCR(Nested PCR)是一种变异的 PCR 检测技术,是用两对或两对以上的 PCR 引物进行两轮或多轮 PCR 扩增,其原理与普通 PCR 类似,区别在于第  $n$  轮 PCR 产物为第  $n+1$  轮 PCR 扩增反应的模板,模板长度往往大于产物长度,因此扩增轮数越多,产物片段就会越短,扩增终产物片段最短,多小于 200 bp。假如巢式 PCR 第一轮扩增出错,那么第二轮扩增用引物与异常片段配对的概率极低,第二轮 PCR 进行扩增的概率也极低,巢式 PCR 反应将不能正常进行,且巢式 PCR 可辨别特异性和非特异性信号<sup>[8]</sup>,这就决定了巢式 PCR 技术具备较高的特异性,这也是巢式 PCR 相较于普通定性 PCR 的一个优点。

依据扩增轮数,巢式 PCR 可分为两轮巢式 PCR 和多轮巢式 PCR,其中两轮巢式 PCR 的应用最广泛,其扩增示意图如图 1 所示,两轮巢式 PCR 要用到两对不同的引物,且第一轮 PCR 扩增产物即为第二轮 PCR 扩增的模板。

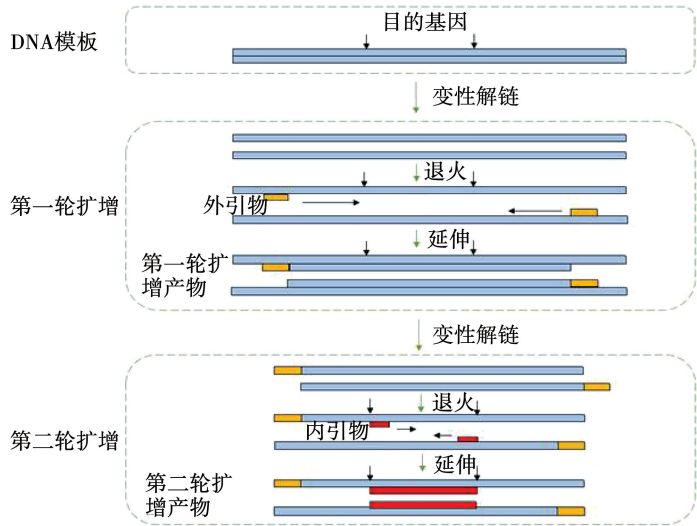


图1 两轮巢式PCR扩增示意图

Fig. 1 Flow chart of two rounds of nested PCR amplification

2.2 应用范围及优缺点分析

巢式PCR不仅特异性强,还具有灵敏度高的优点,如 Qiu 等<sup>[9]</sup>对4种转基因大豆品系 A2704-12、A5547127、MON89788 和 GTS-40-3-2 分别建立巢式PCR检测体系,对转基因含量分别为 10%、5%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、0.01%、0.005% 和 0.001% 的样品进行巢式PCR扩增,结果发现第一轮PCR的检出限为 0.1%,第二轮PCR的检出限可低至 0.005%。Brod 等<sup>[10]</sup>为检测巴西市场上的市售大豆粉、婴儿配方奶粉和豆奶粉中的 *CP4-EPSPS* 基因,建立巢式PCR检测体系,该体系可识别转基因含量为 0.01% ~ 10% 的大豆粉混合样品。姚芹等<sup>[11]</sup>对压榨大豆毛油和脱胶油中的DNA进行普通定性PCR扩增和巢式PCR扩增,结果发现普通定性PCR可在毛油中扩增得到 200 bp 以下的内外源基因片段,但无法在加工程度更深的脱胶油中检测到相应基因片段的存 在,而利用巢式PCR则在脱胶油中成功扩增到 *CP4-EPSPS* 基因 147 bp 的片段。这说明相较于普通定性PCR,巢式PCR具备更高的检测灵敏度,其在低含量转基因大豆或者深加工大豆制品的转基因检测中适用性更好。食品加工过程中的复杂工序会不同程度地破坏食品中的DNA,导致PCR扩增反应可有效利用的模板数量有限,易引发由于PCR扩增产物不足而出现的假阴性现象<sup>[12]</sup>;巢式PCR检测灵敏度更高,可有效减少这种假阴性的出现。

相较于普通定性PCR,巢式PCR特异性更好,灵敏度更高,尤其适用于加工程度较深、DNA降解严重、转基因含量较低的大豆及其制品的转基因检

测。也应注意到,与普通定性PCR相似,巢式PCR的扩增结果亦需要借助于琼脂糖凝胶电泳来表征,且无法对模板DNA精确定量;两轮巢式PCR第二轮扩增时也易引起交叉污染,如果第一轮扩增时引物过量导致第二轮扩增产生对应的产物,过量的产物对于第二轮扩增反应而言就是非特异性的;巢式PCR扩增轮数更多,较普通定性PCR成本更高。

3 实时荧光定量PCR

3.1 原理

实时荧光定量PCR (Quantitative Real-time-PCR, qPCR) 属于定量PCR的一种,是在传统PCR体系中加入可与DNA双链结合的荧光染料或者荧光标记的特异性探针,染料或者探针的荧光强度随双链DNA(dsDNA)数量的增加而增强,可通过荧光信号的变化实时监测整个PCR进程;其中模板DNA荧光信号达到阈值时的循环数(Ct值)与模板初始拷贝数的对数存在线性关系,即定量PCR的定量依据<sup>[13]</sup>。与定性PCR相比,qPCR可直观地显示模板DNA的浓度和拷贝数。

qPCR包括染料法和探针法。染料法qPCR中的SYBR荧光染料与dsDNA结合后可以发出较强荧光,可根据荧光信号的强度对扩增产物进行检测;探针法qPCR中惯用的探针是TaqMan探针,它是一种带荧光的双标记水解探针,可实现产物的生成与荧光信号的累积同步,从而直观地给出产物的拷贝数。qPCR的扩增示意图如图2所示,染料法所用的SYBR荧光染料与dsDNA的结合没有特异性(图2A),探针法所用的探针只能与目标序列的dsDNA进行结合(图2B)。

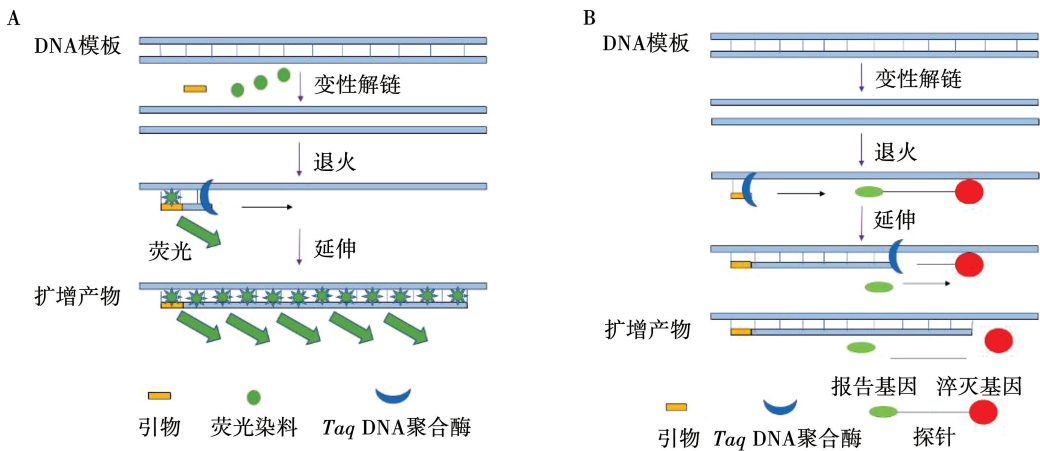


图 2 染料法 qPCR(A) 和探针法 qPCR(B) 扩增示意图

Fig. 2 Flow chart of dye-based qPCR(A) and probe-based qPCR(B) amplification

3.2 应用范围及优缺点分析

染料法 qPCR 和探针法 qPCR 在转基因检测中的应用均较普遍,其优缺点对比详见表 1,染料法操作简便,还可获取溶解曲线,实现对扩增产物的特异性分析和验证,但荧光染料与非特异性的 dsDNA 结合后会产生非特异性条带,影响结果的准确性<sup>[14]</sup>。探针法特异性强,但探针设计较复杂。此

外,染料法 qPCR 成本远低于探针法 qPCR,虽然两种 qPCR 所用的 mix 价位差别不大,但探针法 qPCR 所需的引物和探针价位(约 1 202.00 元,Sangon 公司)远高于染料法 qPCR(约 116.00 元,Sangon 公司)。虽然探针法的特异性和准确性均优于染料法,但在实际应用中,探针较高的价格往往让人望而却步,染料法则应用更普遍。

表 1 染料法 qPCR 和探针法 qPCR 的优缺点对比

Table 1 Advantages and disadvantages of dye-based qPCR and probe-based qPCR

方法 Method	优点 Advantage	缺点 Shortcoming
染料法 qPCR Dye-based qPCR	成本低;适用范围广;操作简单;可获取溶解曲线;灵敏度高	特异性、准确度低于探针法
探针法 qPCR Probe-based qPCR	特异性强,可在一定程度上避免假阳性;灵敏度高;准确度高	探针设计复杂、要求高;成本高

染料法 qPCR 和探针法 qPCR 的转基因检测灵敏度均较高。对于染料法 qPCR 来说, Ma 等<sup>[15]</sup>报道该法对 A2704-12 转基因大豆的检测限可低至 0.01%;对大豆卵磷脂、大豆蛋白粉、巧克力饮料、婴儿米粉、玉米蛋白粉、玉米淀粉和玉米果酱中的 *RBCL*、*CP4-EPSPS*、*BAR* 和 *PAT* 基因的检测灵敏度均可达到 0.1%<sup>[16]</sup>;对混合油中的转基因大豆油检测比例可达到 5%<sup>[17]</sup>。对于探针法 qPCR 来说, Song 等<sup>[18]</sup>采用该法对来自中国成都的 101 份豆腐中的 *CP4-EPSPS* 基因进行检测,结果发现该法的检测灵敏度可低至 5 copies·μL<sup>-1</sup> DNA;Park 等<sup>[19]</sup>采用

该法对 17 种转基因大豆和 23 种从韩国、日本、泰国收集的深加工大豆食品(如大豆粉、豆腐、豆奶、果仁、干麦片等)进行转基因检测,检测灵敏度可低至 0.01%~0.05%。

当前,我国国家标准、国家出入境检验检疫局标准、地方标准、农业农村部公告等针对大豆及其制品转基因检测所用的 qPCR 方法均为探针法,暂未有染料法的定量标准(部分详见表 2)。考虑到染料法成本低、适用范围广的优点,未来建立染料法定量的标准将极具现实意义。



表2 部分转基因大豆及其制品 qPCR 检测标准

Table 2 Some standards for qPCR detection of genetically modified soybeans and their products

标准分类	标准号	标准名称	检测方法	参考文献
Standard classification	Standard number	Standard name	Detection method	Reference
国家标准 National standard	GB/T 38505-2020	转基因产品通用检测方法	探针法	[20]
	GB/T 19495.4-2018	转基因产品检测 实时荧光定性聚合酶链式反应(PCR)检测方法	探针法	[21]
	GB/T 19495.5-2018	转基因产品检测 实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)检测方法	探针法	[22]
国家出入境检验检疫局 State Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau	SN/T 1204-2016	植物及其加工产品中转基因成分实时荧光PCR 定性检验方法	探针法	[23]
	SN/T 1201-2014	饲料中转基因植物成份 PCR 检测方法	探针法	[24]
	SN/T 2705-2010	调味品中转基因植物成分实时荧光 PCR 定性检测方法	探针法	[25]
	SN/T 2668-2010	转基因植物品系特异性检测方法	探针法	[26]
地方标准 Local standard	DB12/T 651-2016	转基因耐除草剂大豆 GTS40-3-2 及其衍生品种定量检测实时荧光 PCR 方法	探针法	[27]
	DB12/T 652-2016	转基因耐除草剂大豆 DAS-68416-4 及其衍生品种定性检测实时荧光 PCR 法	探针法	[28]
农业农村部公告 Announcement of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs	农业农村部公告 第323号-10-2020	转基因植物及其产品成分检测 耐除草剂大豆 GTS40-3-2 及其衍生品种定量 PCR 方法	探针法	[29]

4 多重 PCR

4.1 原理

多重 PCR(Multiplex Polymerase Chain Reaction, mPCR)又称多重引物 PCR,其基本原理与普通 PCR 相似,区别在于它是在同一个反应体系中加入多对特异性引物,实现多目标片段同时扩增的 PCR 技术。以三重 PCR 为例,其扩增示意图如图 3 所示。

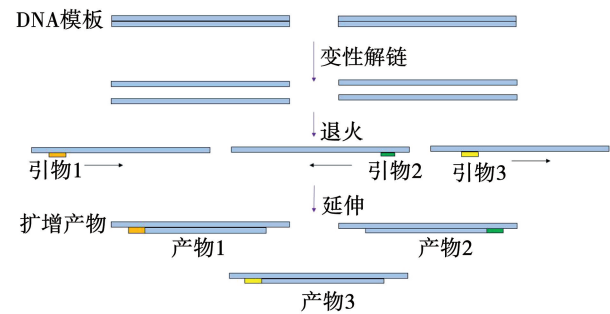


图3 三重 PCR 扩增示意图

Fig. 3 Schematic diagram of triplex PCR amplification

4.2 应用范围及优缺点分析

多重 PCR 可实现对同一基因上的多个位点同时进行筛选。如 Park 等<sup>[30]</sup>针对 CP4-EPSPS 基因上的 P35S、T-nos、T-35S 等多个片段分别设计引物,建立了多重 PCR 扩增体系来对分别来自韩国、日本、

中国和美国的大酱、包饭酱、豆腐、豆奶、大豆粉、婴儿配方奶粉、麦片等大豆制品进行转基因检测,发现检测灵敏度范围为 0.03% ~ 0.5%。Zhou 等<sup>[31]</sup>在用多重 PCR 和 CGE 荧光法对转基因大豆粉标准物质进行检测时,针对 CP4-EPSPS 基因 的 NOS、CaMV35s 和 CTP4 等多片段设计多对引物,检测灵敏度可达到 0.025%,满足欧盟对转基因食品标识 0.9% 的要求,继而将建立的多重 PCR 扩增体系应用于大豆蛋白粉、锅巴、大豆饮料、大豆色拉油、混合油的检测,灵敏度也均可低至 0.025%。

多重 PCR 也可实现对多种基因 的同步检测。如 Nikolić 等<sup>[32]</sup>建立用于同时检测抗草甘膦大豆和转基因玉米的多重 PCR 检测体系,涉及基因包括 35S 启动子、NOS 终止子、ZEIN,检测灵敏度可达 0.1%。董立明等<sup>[33]</sup>针对 5 种转基因大豆品系 GTS40-3-2、356043、305423、MON89788、CV127 建立六重 PCR 检测体系,根据 Lectin 基因和 5 种转基因大豆事件的边界序列设计特异性引物,检测灵敏度可达 0.1%。

多重 PCR 通过一次扩增反应就可实现对单个基因多位点或者多个基因的同步筛选,打破了常规 PCR 针对特定基因单一 位点检测的局限性,还可节约试验时间和样品用量,降低试验成本。此外,多重 PCR 还可与巢式 PCR、实时荧光定量 PCR 等技术有机结合进行转基因检测,将不同种 PCR 技术的

优点集于一体<sup>[34]</sup>。但多重 PCR 对引物的要求较高,引物设计较麻烦,此外 *Taq* DNA 聚合酶的浓度过高将会导致扩增不平衡和非特异性条带的扩增<sup>[35]</sup>。多重 PCR 用于大豆及其制品转基因检测时容易出现引物二聚体<sup>[36]</sup>,造成假阳性现象。

高质量的 DNA 模板是多重 PCR 顺利进行的前提保障,值得注意的是,转基因大豆主要用于制取食用豆油,在该过程中,大豆需经历破碎轧胚、挤压膨化、浸提、脱胶、脱酸、脱色和脱臭等工序,经破碎、挤压、高温加热、有机溶剂浸提、碱处理、吸附等处理后,精炼油中的 DNA 质量浓度极低,且降解严重,这导致多重 PCR 并不适用于精炼大豆油的转基因检测。

## 5 数字 PCR

### 5.1 原理

数字 PCR(Digital PCR, dPCR)是将样品划分为数万份并分配到不同的反应单元,在每个反应单元中分别进行 PCR 扩增,扩增完成后含有模板的微滴会发出荧光信号,最后结合泊松分布原理和阳性微滴的比例对目的基因实现绝对定量。目前市场上使用的数字 PCR 技术有微滴式数字 PCR(ddPCR)和芯片式数字 PCR(cdPCR)<sup>[37]</sup>。

### 5.2 应用范围及优缺点分析

数字 PCR 反应在多个不同的单元中进行,对抑制剂的敏感性相对较小,因而 dPCR 具有比 qPCR 更高的灵敏度<sup>[38]</sup>。与实时荧光定量 PCR 相比,数字 PCR 较明显的优点是准确度和灵敏度较高、可重复性好、不依赖标准物质就可对模板 DNA 进行绝对定量<sup>[39]</sup>,如 Demeke 等<sup>[40]</sup>利用双重 ddPCR 对转基因大豆和油菜进行检测,该方法对转基因大豆品系 DP305423 的阳性检测限低至 0.001%,而采用 qPCR 对该转基因大豆品系的转基因成分的检测限为 0.01%,表明 ddPCR 具备更高的灵敏度。

此外,dPCR 对样本 DNA 质量要求低,这对于蛋白、油脂含量高、加工工艺复杂的大豆及其制品的转基因检测适用性较好。dPCR 可用于单个或者多个基因的筛选,近年来发展迅速,具有很好的应用前景<sup>[41]</sup>。但是 dPCR 受操作规范性不强影响,它的稳定性和精密度没有 qPCR 好,且处于初步发展阶段,成本极高,应用并不广泛。

## 6 其他 PCR 技术

还有一些文献报道较少的 PCR 检测技术,如串联式 PCR、热不对称交错 PCR 等。如魏霜等<sup>[42]</sup>在对转基因大豆 GTS40-3-2 进行检测时,建立基于串联式 PCR 的基因碟片技术,与普通荧光定量 PCR

对比后发现串联式 PCR 的灵敏度高一个数量级,灵敏度可达  $0.001 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。杨清华等<sup>[43]</sup>在研究 T-DNA 侧翼序列分析时,采用高效热不对称交错 PCR 对 T-DNA 侧翼序列进行整合分析后,发现转 *GmWRKY70* 基因大豆均可测得阳性,实现利用热不对称交错 PCR 对转基因大豆的识别。这些 PCR 检测技术虽有报道,但在大豆及其制品的转基因检测中应用较少。

## 7 结语与展望

基于 PCR 技术的检测方法已被广泛应用于大豆及其制品的转基因检测工作,不同种 PCR 技术各有优劣,如普通定性 PCR 应用最广泛,成本低,但灵敏度不足,当原料加工程度深、油脂含量高时,极易出现假阴性误判;巢式 PCR 扩增灵敏度高,特异性强,但第二轮扩增时易引起交叉污染,需要探究第一轮引物的最适浓度;qPCR 定量灵敏度高,应用范围广,但针对大豆制品的染料法 qPCR 相关标准还有待建立;多重 PCR 可实现对多基因的同时检测,但对引物和 DNA 模板质量要求较高;数字 PCR 定量灵敏度极高,准确度高,但成本也高,发展时间短,应用并不广泛。

随着人们对饮食质量的要求越来越高,未来大豆制品的加工必然向精细化、长产业链化方向发展,加工程度越高,DNA 降解便越严重,考虑到食品基质的复杂性,从原料中获取的 DNA 质量浓度可能极低,DNA 片段也较短,这些因素均阻碍着后续 PCR 技术的应用,为转基因检测工作带来了极大挑战。本文在对几种常用的 PCR 扩增技术进行综述和对比研究后,结合它们在大豆及其制品转基因检测中的应用情况,对不同 PCR 技术未来具有潜力的研究方向提出如下:巢式 PCR 扩增灵敏度较高,尤其适用于深加工产品的定性检测,大豆深加工制品多种多样,加工方式不同,基质中 DNA 的存在特征便不同,需针对特定大豆制品建立适用的扩增体系;高效的染料法 qPCR 方法的开发和相关标准的制定将极大降低转基因检测成本,丰富大豆制品转基因检测相关标准体系,提升转基因检测的应用深度和广度;随着新型转基因事件的研发、批准和商业应用,多重 PCR 单次扩增即可实现多基因同步检测的优势将被充分发挥;数字 PCR 具有优异的灵敏度和准确度,抗杂质干扰能力强,在深加工大豆制品的转基因检测中应用潜力巨大,如能从技术层面降低其运行成本,提高其应用广泛性,则将极大助力于大豆制品的转基因检测。高通量 DNA 快检方法亦将成为未来 PCR 技术发展的重要分支。PCR 技术的发展无疑将推动转基因大豆制品的检

测进程,不仅有利于转基因大豆标识制度的实施,亦将为我国转基因大豆市场的健康发展提供有力的技术保障。

参考文献

[1] 陈元春. 中国大豆国际贸易及其影响因素研究[D]. 北京:中国社会科学院研究生院, 2020. (CHEN Y C. Research on China's soybean international trade and its influencing factors [D]. Beijing: Graduate School of Chinese Academy of Social Sciences, 2020. )

[2] Foreign Agricultural Service and United States Department of Agriculture. Oilseeds: World markets and trade [EB/OL]. (2022-03-9) [2022-03-22]. <https://www.fas.usda.gov/data/oilseeds-world-markets-and-trade>.

[3] 农业部农业转基因生物安全管理办公室. 农业转基因生物标识管理办法[EB/OL]. (2017-11-30) [2022-01-26]. <http://www.moa.gov.cn/ztl/zjyqwgz>. (Agricultural GMO Safety Management Office of the Ministry of Agriculture. Measures for the administration of agricultural GMO labels[EB/OL]. (2017-11-30). [2022-01-26]. <http://www.moa.gov.cn/ztl/zjyqwgz>.)

[4] LOU Y Y, CHEN C X, LONG X L, et al. Detection and quantification of chimeric antigen receptor transgene copy number by droplet digital PCR versus Real-Time PCR[J]. The Journal of Molecular Diagnostics, 2020, 22(5): 699-707.

[5] 孟静, 孙潇慧, 钟立霞, 等. 豆制品中转基因成分检测的研究进展[J]. 大豆科学, 2019, 38(1): 148-152. (MENG J, SUN X H, ZHONG L X, et al. Research progress on detection of genetically modified components in soy products [J]. Soybean Science, 2019, 38(1): 148-152.)

[6] 王柳. 用于食品的核酸扩增检测技术研究[D]. 浙江: 浙江大学, 2018. (WANG L. Research on nucleic acid amplification and detection technology for food [D]. Zhejiang: Zhejiang University, 2018.)

[7] 吴姗, 吴志毅, 张晓峰, 等. 普通 PCR 法、荧光定量 PCR 法及微流控芯片法检测大豆产品中外源基因灵敏度的比较[J]. 中国食品学报, 2009, 9(2): 176-186. (WU S, WU Z Y, ZHANG X F, et al. Comparison of the sensitivity of ordinary PCR, fluorescence quantitative PCR and microfluidic chip method for detecting foreign genes in soybean products [J]. Chinese Journal of Food Science, 2009, 9(2): 176-186.)

[8] ANKLAM E, GADANI F, HEINZE P, et al. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products[J]. European Food Research & Technology, 2002, 214(1): 3-26.

[9] QIU Y W, ZHANG M H, YU Y B, et al. The construction of pMD18-HT-soybean as a calibrator plasmid and nested PCR assay for herbicide-tolerant soybeans[J]. European Food Research and Technology, 2014, 238(3): 375-386.

[10] BROD F C A, FERRARI C D S, VALENTE L L, et al. Nested PCR detection of genetically modified soybean in soybean flour, infant formula and soymilk [J]. LWT-Food Science and Technology, 2005, 40(4): 748-751.

[11] 姚芹, 徐泽鹏, 曹灿灿, 等. 食用大豆油加工过程 DNA 降解及检测研究[J]. 食品科技, 2018, 43(4): 184-188. (YAO Q, XU Z P, CAO C C, et al. Study on DNA degradation and detection during edible soybean oil processing[J]. Food Science

and Technology, 2018, 43(4): 184-188. )

[12] PAULI U, LINIGER M, ZIMMERMANN A. Detection of DNA in soybean oil [J]. Zeitschrift Für Lebensmitteluntersuchung Und -Forschung A, 1998, 207(4): 264-267.

[13] BUBNER B, BALDWIN I T. Use of real-time PCR for determining copy number and zygosity in transgenic plants[J]. Plant Cell Reports, 2004, 23(5): 263-271.

[14] 王小花, 李建祥, 王国卿, 等. SYBR Green 实时荧光定量 PCR 检测大豆转基因成分[J]. 食品科学, 2009, 30(8): 171-176. (WANG X H, LI J X, WANG G Q, et al. SYBR Green real-time fluorescent quantitative PCR for detection of genetically modified soybean components[J]. Food Science, 2009, 30(8): 171-176.)

[15] MA H, LI H, LI J, et al. High-throughput, low-cost, and event-specific polymerase chain reaction detection of herbicide tolerance in genetically modified soybean A2704-12 [J]. Genetics & Molecular Research, 2014, 13(1): 696-703.

[16] ZHEN Z, LV W, TANG Z F, et al. SYBR® Green qPCR screening methods for detection of anti-herbicide genes in genetically modified processed products[J]. Journal of Northeast Agricultural University(English Edition), 2016, 23(1): 57-64.

[17] XIA Y M, CHEN F S, JIANG L Z, et al. Development of an efficient method to extract DNA from refined soybean oil[J]. Food Analytical Methods, 2021, 14(1): 1-12.

[18] SONG J, SONG Q C, WANG D, et al. Monitoring the prevalence of genetically modified soybeans in tofu in Chengdu, China using real-time and conventional PCR[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2018, 67: 172-177.

[19] PARK S B, KIM J Y, LEE D G, et al. Development of a systematic qPCR array for screening GM soybeans [J]. Foods, 2021, 10(3): 610.

[20] 国家市场监督管理总局、国家标准化管理委员会. 转基因产品通用检测方法: GB/T 38505-2020[S]. 北京: 全国生化检测标准化技术委员会, 2020. (State Administration for Market Regulation, National Standardization Administration. General testing methods for genetically modified products: GB/T 38505-2020[S]. Beijing: National Biochemical Testing Standardization Technical Committee, 2020.)

[21] 国家市场监督管理总局、中国国家标准化管理委员会. 转基因产品检测 实时荧光定性聚合酶链式反应 (PCR) 检测方法: GB/T 19495.4-2018[S]. 北京: 全国植物检疫标准化技术委员会, 2018. (State Administration for Market Regulation, China National Standardization Administration. Detection of genetically modified products. Real-time fluorescent qualitative polymerase chain reaction (PCR) detection method: GB/T 19495.4-2018 [S]. Beijing: National Phytosanitary Standardization Technical Committee, 2018.)

[22] 国家市场监督管理总局、中国国家标准化管理委员会. 转基因产品检测 实时荧光定量聚合酶链式反应 (PCR) 检测方法: GB/T 19495.5-2018[S]. 北京: 全国植物检疫标准化技术委员会, 2018. (State Administration for Market Regulation, China National Standardization Administration. Detection of genetically modified products-real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR) detection method: GB/T 19495.5-2018 [S]. Beijing: National Phytosanitary Standardization Technical Committee, 2018.)

[23] 国家质量监督检验检疫总局. 植物及其加工产品中转基因成



分实时荧光 PCR 定性检验方法: SN/T 1204-2016[S]. 北京: 国家认证认可监督管理委员会, 2016. (General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine. Real-time fluorescent PCR qualitative detection method for transgenic components in plants and their processed products: SN/T 1204-2016 [S]. Beijing: National Certification and Accreditation Administration Commission, 2016. )

[24] 国家质量监督检验检疫总局. 饲料中转基因植物成分 PCR 检测方法: SN/T 1201-2014[S]. 北京: 国家认证认可监督管理委员会, 2014. (General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine. PCR detection method of genetically modified plant components in feed: SN/T 1201-2014 [S]. Beijing: 国家认证认可监督管理委员会, 2014. )

[25] 国家质量监督检验检疫总局. 调味品中转基因植物成分实时荧光 PCR 定性检测方法: SN/T 2705-2010[S]. 北京: 国家认证认可监督管理委员会, 2010. (General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine. Real-time fluorescent PCR qualitative detection method for transgenic plant components in condiments: SN/T 2705-2010[S]. Beijing: National Certification and Accreditation Administration Commission, 2010. )

[26] 国家质量监督检验检疫总局. 转基因植物品系特异性检测方法: SN/T 2668-2010[S]. 北京: 国家认证认可监督管理委员会, 2010. (General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine. Strain-specific detection method of transgenic plants: SN/T 2668-2010[S]. Beijing: National Certification and Accreditation Administration Commission, 2010. )

[27] 天津市市场和质量技术监督委员会. 转基因耐除草剂大豆 GTS40-3-2 及其衍生品种定量检测实时荧光 PCR 方法: DB12/T 651-2016[S]. 天津: 天津市农业标准化技术委员会, 2016. (Tianjin Municipal Market and Quality Supervision and Administration Commission. Tianjin Municipal Bureau of Quality and Technical Supervision. Real-time PCR method for quantitative detection of transgenic herbicide-tolerant soybean GTS40-3-2 and its derivatives: DB12/T 651-2016 [S]. Tianjin: Tianjin Agricultural Standardization Technical Committee, 2016. )

[28] 天津市市场和质量技术监督委员会. 转基因耐除草剂大豆 DAS-68416-4 及其衍生品种定性检测实时荧光 PCR 法: DB12/T 652-2016[S]. 天津: 天津市农业标准化技术委员会, 2016. (Tianjin Municipal Market and Quality Supervision and Administration Commission. Real-time PCR method for qualitative detection of transgenic herbicide-tolerant soybean DAS-68416-4 and its derivatives: DB12/T 652-2016 [S]. Tianjin: Tianjin Agricultural Standardization Technical Committee, 2016. )

[29] 农村农业部. 转基因植物及其产品成分检测 耐除草剂大豆 GTS40-3-2 及其衍生品种定量 PCR 方法: 农业农村部 公告第 323 号 10-2020[S]. (Ministry of Rural Agriculture. Detection of components of genetically modified plants and their products: Quantitative PCR method for herbicide-tolerant soybean GTS40-3-2 and its derivatives: Ministry of Agriculture and Rural Affairs Announcement No. 323 10-2020[S]. )

[30] PARK S B, KIM H Y, KIM J H. Multiplex PCR system to track authorized and unauthorized genetically modified soybean events in food and feed[J]. Food Control, 2015, 54: 47-52.

[31] ZHOU Y, LI Y, PEI X. Determination of genetically modified soybean by multiplex PCR and CGE with LIF detection[J]. Chromatographia, 2007, 66(9-10): 691-696.

[32] NIKOLIĆ Z, MILOŠEVIĆ M, VUJAKOVIĆ M, et al. Qualitative triplex PCR for the detection of genetically modified soybean and maize[J]. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2008, 22(3): 801-803.

[33] 董立明, 李葱葱, 邢珍娟, 等. 利用多重 PCR 技术快速检测五个转基因大豆品系[J]. 大豆科学, 2016, 35(6): 1002-1007. (DONG L M, LI C C, XING Z J, et al. Rapid detection of five transgenic soybean lines using multiplex PCR[J]. Soybean Science, 2016, 35(6): 1002-1007. )

[34] XIAO B, NIU C, SHANG Y, et al. A 'Turn-on' ultra-sensitive multiplex real-time fluorescent quantitative biosensor mediated by a universal primer and probe for the detection of genetically modified organisms[J]. Food Chemistry, 2020, 330(5): 127247.

[35] 周方永, 李岩, 薄新文, 等. 单因子和正交设计法建立分枝杆菌多重 PCR 体系[J]. 石河子大学学报: 自然科学版, 2013, 31(4): 449-456. (ZHOU F Y, LI Y, BO X W, et al. Establishment of mycobacterium multiplex PCR system by single factor and orthogonal design[J]. Journal of Shihezi University: Natural Science Edition, 2013, 31(4): 449-456. )

[36] LIU W W, WANG X N, TAO J, et al. A multiplex PCR assay mediated by universal primers for the detection of adulterated meat in mutton[J]. Journal of Food Protection, 2019, 82(2): 325-330.

[37] DEMEKE T, DOBNIK D. Critical assessment of digital PCR for the detection and quantification of genetically modified organisms[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2018, 410(17): 4039-4050.

[38] MARGARET E H, ROBERT M D, JOHN S S B, et al. Detection limits of quantitative and digital PCR assays and their influence in presence-absence surveys of environmental DNA[J]. Molecular Ecology Resources, 2017, 17(2): 221-229.

[39] 斯能武, 李俊, 武玉花, 等. 数字 PCR 在转基因定量检测中的研究进展[J]. 中国油料作物学报, 2021, 43(1): 40-50. (SI N W, LI J, WU Y H, et al. Research progress of digital PCR in quantitative detection of transgenes[J]. Chinese Journal of Oil Crops, 2021, 43(1): 40-50. )

[40] DEMEKE T, GRÄFENHAN T, HOLIGROSKI M, et al. Assessment of droplet digital PCR for absolute quantification of genetically engineered OXY235 canola and DP305423 soybean samples[J]. Food Control, 2014, 46: 470-474.

[41] KOSIR A B, DEMSAR T, STEBIH D, et al. Digital PCR as an effective tool for GMO quantification in complex matrices[J]. Food Chemistry, 2019, 294: 73-78.

[42] 魏霜, 周广彪, 刘津, 等. 多重串联式 PCR 基因芯片技术检测转基因大豆 GTS 40-3-2[J]. 中国食品学报, 2018, 18(2): 244-249. (WEI S, ZHOU G B, LIU J, et al. Detection of genetically modified soybean GTS 40-3-2 using multiple tandem PCR gene disc technology[J]. Chinese Journal of Food Science, 2018, 18(2): 244-249. )

[43] 杨清华, 董德坤, 操晶, 等. 转 *GmWRKY70* 基因大豆的 PCR 检测及其 T-DNA 侧翼序列分析[J]. 农业生物技术学报, 2020, 28(7): 1203-1210. (YANG Q H, DONG D K, CAO J, et al. PCR detection and T-DNA flanking sequence analysis of *GmWRKY70* transgenic soybean [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2020, 28(7): 1203-1210. )