

食用植物油中转基因成分检测技术研究进展

李允静,肖芳,邵林,武玉花,万丹凤,吴刚*

(中国农业科学院油料作物研究所,农业部油料作物生物学与遗传育种重点实验室;
农业部转基因植物环境安全监督检验检疫测试中心,湖北武汉,430062)

摘要:本文概述了转基因作物商业化种植现状和转基因产品标识管理情况;综述了食用植物油中 DNA 抽提技术及影响因素、转基因成分检测方法及优缺点,为系统开展食用植物油中转基因成分检测研究提供指导。

关键词:食用植物油;转基因成分;DNA 提取方法;检测技术;标识

中图分类号:TS225.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1007 – 9084(2017)05 – 0714 – 07

Research progress in detection of genetically modified ingredients in edible vegetable oil

LI Yun – jing, XIAO Fang, SHAO Lin, WU Yu – hua, WAN Dan – feng, WU Gang*

(Oil Crops Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of

Biology and Genetic Improvement of Oil Crops, the Ministry of Agriculture; Supervision and Test Center

for Environmental Safety of Genetically Modified Plants, Ministry of Agriculture, Wuhan 430062, China)

Abstract: Edible vegetable oils are necessary to maintain the nutrition ingredients for human health, the safety of these oils has been highly concerned by consumers. As the number of commercial varieties of genetically modified oilseed crops was constantly increased, presence of genetically modified organisms (GMOs) became another problem besides adulteration in edible vegetable oils. This article summarized the situation of commercial plant of genetically modified crops in the world and GMO labeling in major countries or regions. The paper reviewed DNA extraction methods and influence factors, GMO detection technology with the advantage comparison. This work would provide references for systematical studying of GMO detection in edible oils in the future.

Key words: edible vegetable oil; genetically modified ingredients; DNA extraction methods; detection technique; labeling

植物油是人类主要食品之一,为人体提供多种维持健康所必需的营养成分;植物油还广泛地应用于化工、制药和化妆品行业以及作为可再生能源原料^[1,2]。由于全球转基因油料作物商业化种植面积不断增加,食用植物油中转基因成分成为继掺假、掺杂问题之后,值得人们关注的又一重大课题。2010年我国发布了行业标准《食用油脂中转基因植物成分实时荧光 PCR 定性检测方法》(SN/T1203 – 2010),给出了食用油 DNA 提取方法,以及采用实时荧光定量 PCR 检测转基因成分的参数。但是,2014年12月24日,国家认监委发布通知,由于该标准使用专用试剂盒,来源单一,文本中有诸多错误等原

因,将该标准废止。因此,我国当前在食用植物油转基因检测方面并没有统一的标准。

1 转基因作物应用概况

随着现代科学飞速发展,转基因技术在培育耐除草剂、抗虫、抗病、抗逆和优质的转基因品种上发挥了重要的作用。自第一株转基因烟草问世以来^[3],转基因作物的应用越来越广泛,转基因作物商业化所带来的巨大经济效益、社会效益和生态效益,不断推动着转基因技术及其应用迅猛发展。2015年,全球转基因作物种植面积达1.797亿公顷,比1996年种植面积增长了100多倍。世界上

收稿日期:2017-02-20
基金项目:转基因生物新品种培育重大专项(2016ZX08012 – 005,2016ZX08012 – 003);国家自然科学基金(31601581)
作者简介:李允静(1982 –),女,河南濮阳人,硕士,助理研究员,主要从事转基因生物安全与检测技术研究,E – mail:liyuning@caas.cn
* 通讯作者:吴刚(1976 –),男,湖北武汉人,研究员,硕士生导师,主要从事基因工程与转基因安全评价研究,E – mail:wugang@caas.cn

99%的转基因作物种植在美国、巴西、阿根廷、印度、加拿大、中国等 13 个国家,其中美国种植面积达 70.9 百万公顷,占世界的 39.5%,居世界第一。我国转基因作物种植面积达 3.71 百万公顷,位居全球第六。40 个国家和地区中有 3 418 项监管获得审批,其中,包含 26 种转基因作物、363 个转化体,获批事件最多的转基因作物依次是玉米、棉花、马铃薯、油菜和大豆^[4]。

我国已经批准商业化种植转基因植物有棉花、牵牛花、番茄、甜椒、杨树和木瓜等。2009 年底,1 个转植酸酶玉米和 2 个转基因水稻(华恢 1 号和 Bt 汕优 63)获得了生产应用安全证书^[5],2014 年底这三个转基因品种再次获得生产应用安全证书(但尚无转基因水稻品种获审批)。自 2004 年以来,我国先后批准进口国外转基因大豆、玉米、油菜、棉花、甜菜等用作加工原料,截至 2015 年我国审批通过,用作进口加工原料转基因生物共计 45 个(<http://www.moa.gov.cn/ztlz/zjyqwgz/spxx/>)。为了提高我国农业科技水平,降低对国外农产品的依赖,2008 年我国启动了转基因生物新品种培育重大专项,推动了我国转基因生物的研发进程。截至目前,转基因大豆、玉米、水稻、棉花、小麦等新品种不断出现,部分转基因大豆、玉米、棉花等已进入生产性试验阶段。

2 转基因产品标识管理

随着转基因作物商业化迅猛发展,转基因生物及其产品带来的生态环境和食用安全等问题引起了公众的高度关注^[6],同时受到国际政治和经济因素的影响,许多国家纷纷出台了相应管理法规。目前,世界上近 70 个国家和地区制定了转基因产品标识管理制度^[7-9]。中国是目前唯一采用定性标识的国家,而其他国家则施行定量标识,即阈值管理。为了方便转基因标识制度的实施,增加制度的可操作性,各国根据转基因产品的应用情况,制定标识目录。欧盟、澳大利亚、新西兰和巴西等国家和地区实施全面标识,日本、韩国、泰国、以色列、印度尼西亚、中国及中国台湾地区等实施目录标识^[10]。2002 年,我国农业部颁布了《农业转基因生物标识管理办法》,列入第一批转基因标识管理目录的有 5 类 17 种产品,其中食用植物油中的大豆油、玉米油和菜籽油要进行标识。农业转基因生物或用含有农业转基因生物成份的产品加工制成的产品,即使在最终销售产品中已不再含有或检测不出转基因成份的产品,仍然需要强制性标识^[11]。我国批准的转基因进口加工原料中,大豆、玉米和油菜主要用于制油、饲料等,

其中食用植物油等加工食品经过复杂的加工过程后,蛋白质的含量极低,且 DNA 降解十分严重^[12,13]。部分实施转基因标识制度的国家认为在精炼油中没有 DNA 和蛋白质,因而不需要对油脂类产品进行标识^[8]。然而,精炼油中是否存在转基因成分仍然是人们关注的焦点,因此许多研究者开展了对食用植物油中转基因成分检测及其方法的研究。

3 食用植物油中 DNA 提取方法及其影响因素

3.1 DNA 提取方法

食用植物油一般是经过原材料压榨,获得初级毛油,毛油经过滤、脱胶、脱酸、脱色、脱臭等加工环节精炼而成,在加工环节需要经过 240℃ 高温、高压、蒸汽、强碱等处理^[14,15],DNA 严重降解且破坏成小分子。由于食用植物油经各种工艺加工后,蛋白质分子变性且被分离,其转基因成分主要集中在 DNA 水平的检测。

利用 PCR 方法检测加工食品中的转基因成分,主要依赖于分离 DNA 质量、纯度和总量^[13]。因此,能否从食用植物油中分离符合质量的 DNA,是成功检测转基因成分的关键技术环节。Hellebrand 等针对商业化冷榨菜籽油,将 200mL 菜籽油同 100mL 双蒸水充分混合,利用分离漏斗萃取,微浓缩设备浓缩样品后,采用 SDS 方法成功提取浓缩液中的 DNA,但是 PCR 法扩增不出 1 005bp 长度油菜内标准基因 PEP,利用巢式 PCR 法成功扩出了 350 bp 和 248 bp 的油菜内标准基因^[16],这是较早开展食用植物油中 DNA 提取和检测的报道。Pauli 等采用 Wizard DNA 提取方法,提取了大豆毛油中的 DNA,并同商业化大豆油混合后,DNA 提取量差异不大,巢式 PCR 检测不到大豆内标准基因,认为在大豆毛油 and 商业化大豆油中已经不存在大豆 DNA 成分了,因此提出新西兰转基因大豆油可以不标识^[17]。Wurz 等从大豆卵磷脂中提取了少量 DNA,并分别从野生型和转基因大豆中扩增出了 *lectin* 基因和抗农达基因,之后 Debode 等改良了其 DNA 提取方法,在抽提缓冲液中添加了正己烷作为溶剂,并用糖原作为助沉剂沉淀小片段 DNA,对不同级别(毛油、中和油、脱色油和精炼油)的菜籽油、大豆油、玉米油、亚麻油提取 DNA 后,利用普通 PCR 和实时荧光定量 PCR,发现高拷贝基因 5.8S、*rbcL* 比低拷贝基因 *ACOAC*、*Lectin*、*Invertase*、*Conlinin* 扩增效果好,在橄榄油、榛子油、芝麻油、葵花籽油中扩增效果一致,但是高拷贝的基因

不适用于转基因定量检测^[15]。Costa 等在零售店或超市购买了 8 份精炼大豆油或调和油,分别取 200g 进行前处理浓缩后,用 Wizard 法、CTAB 法、试剂盒 Wizard Magnetic 法和 Nucleospin 法抽提 DNA,比较发现试剂盒 Nucleospin 法提取精炼油中的 DNA 扩增效果最好,购买的标准品绘制标准曲线后,检测到 2 种大豆油中含有转基因大豆成分,但是含量极少都在检测限以下^[18]。Zorica 等利用 100g 大豆毛油同正己烷按照 1:10 的比例混合 2h,过夜抽滤蒸发正己烷后,通过离心分离浓缩毛油沉淀,然后分别采用 CTAB 法和商业化试剂盒法 (Qiagen GmbH) 提取 DNA,比较了浓度测定和定性 PCR 扩增内标准基因 *Lectin* 的结果,发现试剂盒法比 CTAB 法效果好,并成功应用于转基因成分定量检测^[19]。

覃文等在 Wizard® Genomic DNA Purification Kit 试剂盒法基础上,在沉淀 DNA 之前加入植物基因组 DNA 作为担体,并用 TE 最终溶解 DNA,从 1mL 转基因大豆和玉米食用植物油中,成功提取 DNA,采用 GeneScan 的方法检测到了大豆和玉米成分,以及外源转基因片段 *CryIA(b)* 和 *EPSPS*^[20]。金红等同样在试剂盒法的基础上,通过延长乳化和核酸沉淀时间、反复沉淀以富集小片段 DNA 等措施,从大豆色拉油中提取到 DNA,可用于凝胶电泳和 PCR 检测^[21]。栾凤侠等与 CTAB 法比较后,发现改良的试剂盒法需要食用植物油的样品量仅 6mL,后采用实时荧光定量成功检测了内标基因和外源基因^[22]。程红梅等开发了离心柱法提取精炼大豆油中的 DNA,该方法通过将 10mL 油同正己烷充分乳化,将 DNA 交换到缓冲液中,然后利用开发的离心柱试剂盒纯化富集 DNA,成功提取了 0.4μg 的高纯度 DNA^[23]。王德莲等比较了 CTAB 法、SDS 法、标准方法和试剂盒法提取精炼大豆油中的 DNA,发现试剂盒法需要样品量最少 (160mL),且能够快速高效提取高质量的 DNA,利用实时荧光定量 PCR 法对 52 份样品进行扩增,发现 35 份检测到内标基因 *Lectin* 和外源基因 *CP4-EPSPS*^[24]。许冬倩等在 SDS 法的基础上,省去了酚/氯仿纯化步骤,减少了 DNA 的损失,DNA 的质量高于普通 CTAB 法和 SDS 法提取的,保证了定性 PCR 检测的要求^[25]。王彭等直接在大豆食用植物油中加入 TE 进行乳化,分离水相后,用无水乙醇沉淀 DNA 时直接加入东北大豆黑衣 33 号的基因组 DNA 作为担体,从而提高了 DNA 的得率,保证了转基因检测的结果^[26]。

白立群等以大豆精炼油为研究对象,建立了一种有效的提取 DNA 的方法,即冷冻干燥法,并用线

性丙烯酸酯作为助沉剂,同进口试剂盒方法比较,发现冷冻干燥法提取的 DNA 浓度更高、灵敏度更好,利用实时荧光定量 PCR 方法,从 5 种市售一级大豆油中检测出大豆内源 *Lectin* 基因、外源 *CaMV35S* 启动子、NOS 终止子^[27]。姚芹等在冷冻干燥法的基础上,向大豆油中加入 2μg 大豆基因组 DNA,成功提取了精炼大豆油中的 DNA,PCR 检测结果同改良的试剂盒法基本一致^[28]。付晓华等比较了 5 种提取棉籽油 DNA 的方法,发现上清重复离心法效果最佳^[29]。蔡翠霞等以硅膜吸附柱为介质,结合鲑鱼精子 DNA 作为担体,开发了硅膜吸附柱法,能够稳定、高效地从 2mL 食用植物油中提取 DNA,经过二轮 PCR 和多重 PCR 扩增,分别从不同的油中检测到了内标准基因^[30]。邹继浩等通过向分离的水相溶液中添加核酸共沉剂辅助提取大豆油中 DNA,定性 PCR 检测大豆内标准基因 *Lectin* 结果良好,能够满足凝胶电泳检测的要求^[31]。

3.2 DNA 提取的影响因素

由上可知,采用不同 DNA 提取方法,针对同种食用植物油中的 DNA 提取效率不同;采用同样的 DNA 提取方法,针对不同的食用植物油 DNA 提取效率也不同。食用植物油中 DNA 残留量与制取食用植物油的原料及原料处理、加工工艺和食用植物油储存条件以及储存时间等因素密切相关。市售食用植物油主要有压榨食用植物油和浸出食用植物油^[32],压榨油加工工艺是“物理压榨法”,其要求原料精选,经去杂、去石后进行破碎、蒸炒、挤压,让油脂从油料中分离出来,得到毛油。研究发现,采用冷压榨技术生产的食用植物油由于不包括离心和过滤步骤更有利于 DNA 提取,且提取的 DNA 更有利于 PCR 检测技术的应用^[33]。浸出油采用食用级溶剂从油料中抽提出油脂,浸出油被认为是最优质安全的食用植物油^[34]。只经过压榨或浸出这第一步加工工艺得到的油叫毛油,毛油经过精炼后方可成为食用的成品油。食用植物油精炼过程主要有过滤、脱胶、脱酸、脱色、脱臭、脱蜡和脱致癌物等^[35]。第一步为过滤或者离心等分离方法,除去食用植物油中不溶性杂质(如细胞或组织),绝大部分 DNA 随着沉淀被分离除去,仅残留微量的 DNA。Pauli 等发现对大豆毛油离心后提取 DNA,巢式 PCR 扩增大豆内标 *Lectin* 基因结果为阴性,离心几乎除去了油中的全部 DNA^[17]。脱胶是将毛油中的胶溶性杂质(如磷脂和部分蛋白质)脱除的工艺过程,是向毛油中加入热水或通水蒸汽,加热脂肪并在 50℃ 下搅拌混匀,然后静置分层,分离水相^[35]。脱胶过程使得

食用植物油中微量 DNA 再次随着极性水在高温下大量丢失。Gryson 等从离心后的大豆毛油中检测到大豆 *Lectin* 基因,但脱胶后检测不到 DNA,表明脱胶是去除毛油中 DNA 的重要步骤^[36]。除了脱胶,脱酸也是水油分离过程,是向油相中加入碱溶液和游离脂肪酸混匀,然后油水分离,再用热水洗涤中性油,静置离心,分离除去残留的皂脚。其他精炼过程,脱色、脱臭、脱蜡或脱致癌物,都会不同程度地降解或去除食用植物油中的 DNA。虽然,整个加工工艺过程会不同程度地使得食用植物油中的 DNA 受到破坏或者丢失,但是基于 DNA 提取技术不断发展和研究者对新的提取方法的不断探索,根据报道,从植物毛油甚至植物精炼食用油中能够提取到微量 DNA,并成功开展核酸检测。

食用植物油中 DNA 的含量及片段大小同样受到储存过程诸多因素的影响,如温度、光照、储存时间等,这些因素都会加速食用植物油氧化。Pafundo 等发现橄榄油在超出储存期一个月后,提取的 DNA 质量显著下降^[37]。随着储存时间的延长, DNA 降

解越严重,且提取的 DNA 溶液的 PCR 抑制效应也越大^[16,38]。

4 食用植物油中转基因成分检测方法及其优缺点比较

能否成功开展食用植物油中转基因成分检测,检测方法和目的基因的选择是关键技术环节。食用植物油中转基因成分以残留 DNA 的形式存在,在 DNA 水平上主要是基于 PCR 检测方法,针对不同的外源序列,其检测策略分为通用元件筛选 PCR、基因特异性 PCR、构建特异性 PCR、品系特异性 PCR 四种方法^[39,40],见图 1。在植物毛油中,植物内标基因(如 *Lectin*、*PEP*)能够有效扩增,因此在毛油中能够很好开展转基因成分检测^[16,36]。有些研究者认为,毛油经过第一步精炼之后,内标基因很难扩增,或者只能扩增到小片段 DNA 的微弱条带。针对食用植物油转基因成分检测方法主要采用了普通 PCR、巢式 PCR 和实时荧光定量 PCR。

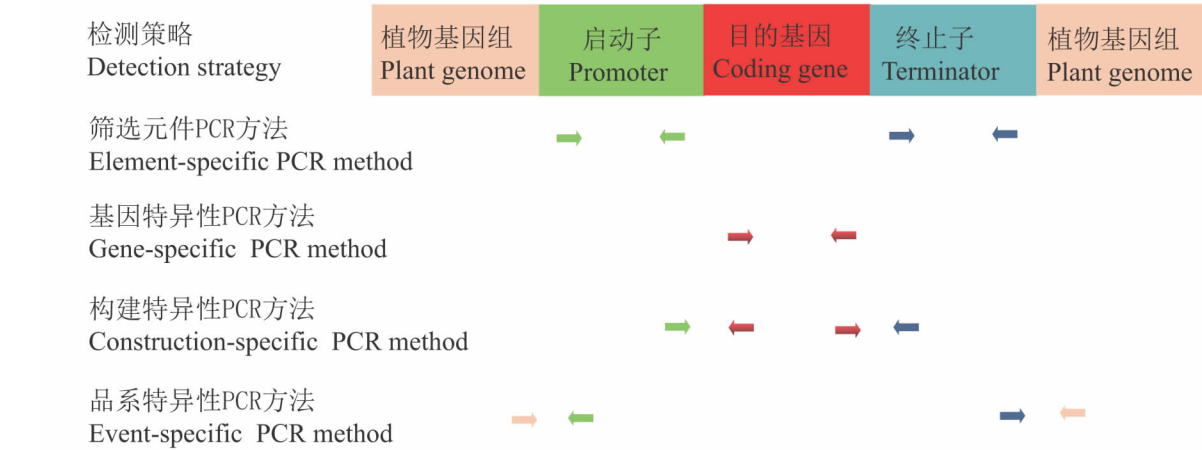


图 1 转基因成分 PCR 检测策略
Fig. 1 PCR detection strategy of genetically modified ingredients

4.1 普通 PCR 方法

普通 PCR 是转基因检测中常用的关键技术,目前被广泛地应用于转基因植物及其产品成分标准化检测以及新的转基因成分的鉴定研究^[41,42]。金红、程红梅等在成功提取 DNA 的基础上,利用定性 PCR 方法,成功检测到大豆成分(*Lectin* 基因)、*CaMV35S* 启动子、*NOS* 终止子和 *EPSPS* 基因^[21,23]。王彭等采用两轮定性 PCR 方法,检测到 35S 启动子序列、T-nos 和 *CP4-EPSPS*^[26]。徐伟丽等利用 Wizard 试剂盒提取大豆色拉油 DNA,虽然凝胶电泳没有检测到 DNA,但是利用定性 PCR 方法检测到内标基因 *Lectin*、*CaMV35S* 启动子和 *EPSPS* 基因^[43]。该技术

检测灵敏度较高,但是模板 DNA 质量要求高,反应过程中 PCR 抑制因子种类多及结果的准确性易受假阳性和假阴性影响,因此对于量少、干扰成分复杂及被严重破坏的 DNA 样品的检测往往难以得到理想的结果。因此,普通 PCR 检测技术在很大程度上难以满足精炼食用植物油中转基因成分检测需求。

4.2 巢式 PCR 方法

为实现对微量、干扰成分复杂和被严重破坏的 DNA 样品的分析与检测,在普通 PCR 基础上发展起来的巢式 PCR 方法,其基本原理相同。利用两对嵌套引物,外引物对 DNA 模板进行扩增后,外引物扩

增产物作为内引物的模板进行第二轮扩增。闻伟刚等采用巢式 PCR 和半巢式 PCR 检测出大豆原油中 *Lectin* 基因、*CaMV35S* 基因和 *CP4-EPSPS* 基因,检测灵敏度达 10^{-6} ng/ μ L,但是在一级大豆油中未检测到内标基因和外源基因^[44]。吴姗等以大豆毛油为研究对象,普通 PCR 方法未检测到外源基因 *CaMV35S* 和 *CP4-EPSPS*,利用巢式 PCR 方法检测到了这两种元件^[45]。姚芹等运用单管巢式 PCR 方法检测出精炼大豆油中含有 *CaMV35S* 和 *CP4-EPSPS* 外源基因^[28]。同普通 PCR 方法相比,巢式 PCR 既提高了扩增效率,又提高了检测的灵敏度和特异性,因此在深加工产品转基因检测中得到广泛应用。

4.3 实时荧光定量 PCR 方法

随着各国转基因标识制度的实施,转基因定量检测成为转基因标识制度实施的关键技术,实时荧光定量 PCR 检测方法具有检测靶标较短、特异性强、重复性好、可靠性高及操作时间短等优点,在转基因检测领域得到迅速发展和应用。针对食用植物油中 DNA 含量极低、DNA 序列片段短、破坏严重等问题,实时荧光定量 PCR 方法检测转基因成分具有一定的优势。Vodret 等从意大利市场上购置了 45 种大豆食品,包含大豆油在内的 12 种食品采用普通 PCR 筛查检测出 *CaMV35S* 元件,实时荧光定量 PCR 检测发现 Roundup Ready soybean 转基因大豆成分占 0.1%^[46]。Gryson 等针对毛油经过不同温度、时间、添加水分或酸脱胶处理后,样品量由 2g 提高到 5g,用 Wurzburg 食用植物油 DNA 提取方法,定量 PCR 结果发现精炼油中磷残留影响转基因成分检测,加大取样量是成功检测转基因成分的关键^[47]。Zorica 等在成功提取了大豆毛油 DNA 基础上,采用实时荧光定量 PCR 方法对转基因大豆比例为 0%、1%、5%、10% 和 100% 的毛油进行定量分析,发现利用试剂盒法提取的 DNA 的结果更接近真值,在大豆油初加工阶段,能够检测其中的转基因成分含量^[19]。邓鸿铃等采用实时荧光定量 PCR 方法检测出一级大豆油、大豆食用油和混合油中检测出大豆内标基因 *Lectin* 和 *EPSPS* 基因的 Ct 值均小于 34^[48]。蔡翠霞等在成功提取食用植物油中 DNA 的基础上,同时采用二轮 PCR 方法、LAMP 法和实时荧光定量 PCR 方法,检测到 7 种植物油中含有 *CaMV35S* 启动子^[30]。该技术也存在成本昂贵、检测通量相对不足等问题,但可以通过构建多重实时荧光定量 PCR 检测体系、自行配置反应体系等改进措施来提高检测通量和降低成本,促进该技术在转基因成分定量检测中的应用与发展。

5 问题与展望

食用植物油中转基因成分检测主要采用的技术手段是普通 PCR、巢式 PCR 和基于 TaqMan 的实时荧光定量 PCR 方法,检测序列片段至少在 70bp 以上;Zhang 等研发了一种新型无探针双引物标记荧光能量共振转移定量 PCR 方法,将扩增的靶标序列降低到大约 40bp 左右,在 15 种玉米渣、豆奶等深加工产品中的扩增效率高于 TaqMan 实时荧光定量检测方法^[49]。由此可见,缩短检测靶标开展食用植物油中转基因成分检测是今后研究的一个方向。针对食用植物油中转基因成分含量低、核酸片段降解破坏严重、提取 DNA 和检测转基因成分困难等问题,系统研究不同类型、不同等级食用植物油中 DNA 富集和提取方法,研制检测靶标小于 50bp 的转基因成分定性定量检测方法十分必要,最终建立通用的、操作性强、适用性广的检测标准,为我国食用植物油的转基因成分标识管理提供技术支撑。

参考文献:

- [1] 金青哲,王兴国,厉秋岳.直面油脂营养认识误区,大力发展“健康”食用油[J].中国油脂,2007,32(2):12-16.
- [2] Costa J, Mafra I, Oliveira M B P P. Advances in vegetable oil authentication by DNA-based markers[J]. Trends in Food Science and Technology, 2012, 26: 43-55.
- [3] Horsch R B, Fraley R T, Rogers S G, et al. Inheritance of functional foreign genes in plants[J]. Science, 1984, 223(4 635): 496-498.
- [4] James C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2015[M]. New York: International service for the acquisition of agri-biotech application (ISAAA), 2016.
- [5] Kou J P, Tang Q L, Zhang X F. Agricultural GMO safety administration in China[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2015, 14(11): 2157-2165.
- [6] Bawa A S, Anilakumar K R. Genetically modified foods: safety, risks and public concerns a review[J]. J Food Sci Technol, 2013, 50(6): 1035-1046.
- [7] Hudson B K. 64 countries around the world label GE food[J]. Sound Consumer, 2013, 479: 12.
- [8] 金芳军,贾士荣,彭于发.不同国家和地区转基因产品标识管理政策的比较[J].农业生物技术学报,2004, 12(1): 1-7.
- [9] Gruère G P, Rao S R. A review of international labeling policies of genetically modified food to evaluate India's

- proposed rule[J]. *Aghioforum*,2007,10;51 - 64.
- [10] 徐琳杰,刘培磊,熊 鹏,等. 国际上主要国家和地区农业转基因产品的标识制度[J]. *生物安全学报*,2014,23(3):301 - 304.
- [11] 农业部. 农业转基因生物标识管理办法[S]. 2002.
- [12] Gawienowski M C, Eckhoff S R, Yang P, et al. Fate of maize DNA during steeping, wet - milling, and processing[J]. *Cereal Chemistry*,1999,76(3):371 - 374.
- [13] Nicolas G. Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR - based GMO analysis: a review[J]. *Anal Bioanal Chem*,2010,396:2 003 - 2 022.
- [14] Costa J, Mafra I, Amaral J S, et al. Monitoring genetically modified soybean along the industrial soybean oil extraction and refining processes by polymerase chain reaction techniques [J]. *Food Research International*,2010,43:301 - 306.
- [15] Debode F, Janssen E, Marien A, et al. DNA detection by conventional and real - time PCR after extraction from vegetable oils [J]. *J Am Oil Chem Soc*,2012,89:1 249 - 1 257.
- [16] Hellebrand M, Nagy M, MoÈrsel J T. Determination of DNA traces in rapeseed oil[J]. *Z Lebensm Unters Forsch A*,1998,206:237 - 242.
- [17] Pauli U, Liniger M, Zimmermann A. Detection of DNA in soybean oil[J]. *Z Lebensm Unters Forsch A*,1998,207:264 - 267.
- [18] Costa J, Mafra I, Amaral J S, et al. Detection of genetically modified soybean DNA in refined vegetable oils [J]. *Eur Food Res Technol*,2010,230:915 - 923.
- [19] Zorica N, Ivana V, Gordana Z, et al. Detection of genetically modified soybean in crude soybean oil [J]. *Food Chemistry*,2014,145:1 072 - 1 075.
- [20] 覃 文,董 洁,邓鸿铃,等. PCR 法定性检测食用油脂中转基因成分[J]. *中国油脂*,2002,27(2):4 - 6.
- [21] 金 红,程 奕,赵 昕,等. 大豆色拉油中转基因成分检测技术研究[J]. *华北农学报*,2004,19(1):24 - 27.
- [22] 栾凤侠,张洪祥,白 月. 食用油脂中 DNA 高效快速提取方法及实时荧光 PCR 检测技术的研究[J]. *中国油脂*,2005,30(7):41 - 43.
- [23] 程红梅,彭于发,金芜军,等. 一种快速、简便提取大豆油 DNA 的方法及转基因大豆油的检测[J]. *中国农业科学*,2007,40(5):1 069 - 1 072.
- [24] 王德莲,刘冬虹,黄宇锋,等. 大豆油中 DNA 提取方法及 PCR 检测技术研究[J]. *检验检疫学刊*,2014,24(1):34 - 37.
- [25] 许冬倩,郝义波. 一种有效的油脂 DNA 的提取方法[J]. *食品研究与开发*,2008,29(10):42 - 45.
- [26] 王 澎,金丽晨,耿志明,等. 食用大豆油中 DNA 的快速提取和转基因成分定性检测[J]. *江苏农业学报*,2008,24(6):940 - 943.
- [27] 白立群,吴亚君,韩建勋,等. 一种有效的大豆精炼油 DNA 提取新方法——冷冻干燥法[J]. *食品与发酵工业*,2009,35(12):155 - 159.
- [28] 姚 芹,宋 浩,陈 枫. 食用精炼大豆油 DNA 提取及单管巢式 PCR 检测[J]. *食品工业科技*,2013,34(21):183 - 186.
- [29] 付晓华,张 岩,张 薇,等. 棉籽油中 DNA 不同提取方法的比较研究[J]. *中国粮油学报*,2014,29(3):43 - 46.
- [30] 蔡翠霞,肖维威,吴慧慧,等. 植物油 DNA 的高效提取方法研究[J]. *中国油脂*,2014,39(1):69 - 72.
- [31] 邹继浩,李 洁,石 瑞,等. 核酸共沉剂辅助提取法抽提大豆油 DNA 的研究[J]. *种子世界*,2013,10:32 - 33.
- [32] 丁福祺. 食用油压榨法和浸出法工艺的区别[J]. *中国油脂*,2005,30(1):5 - 6.
- [33] Busconia M, Foronib C, Corradib M, et al. DNA extraction from olive and its use in the identification of the production cultivar [J]. *Food Chemistry*,2003,83:127 - 134.
- [34] 王瑞元. 浸出法是先进的制油工艺,浸出油是优质安全的食用油[J]. *中国油脂*,2004,29(2):5 - 6.
- [35] 阚健全. 食品化学[M]. 北京:中国农业大学出版社,2002. 135 - 136.
- [36] Gryson N, Ronsseb F, Messensa K, et al. Detection of DNA during the refining of soybean oil [J]. *JAOCs*,2002,79(2):171 - 174.
- [37] Pafundo S, Busconi M, Agrimonti C, et al. Storage time effects on olive oil DNA assessed by amplified fragments length polymorphism [J]. *Food Chemistry*,2010,123:787 - 793.
- [38] Spaniolas S, Bazakos C, Ntourou T, et al. Use of lambda DNA as a marker to assess DNA stability in olive oil during storage [J]. *European Food Research and Technology*,2008,227:175 - 179.
- [39] Nelson M, Elena M, Mariolina G, et al. Methods for detection of GMOs in food and feed [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*,2008,392:369 - 384.
- [40] Arulandhu A J, van Dijk J P, Dobnik D, et al. DNA enrichment approaches to identify unauthorized genetically modified organisms (GMOs) [J]. *Anal Bioanal Chem*,2016,408(17):4 575 - 4 593.
- [41] 姚 涓,潘志文,陈伟庭,等. 土壤磷素高效利用转基因大豆特异性 PCR 检测方法[J]. *中国油料作物学报*,2012,34(2):152 - 156.
- [42] 李飞武,李葱葱,刘 娜,等. 转基因玉米 MON89034 定性 PCR 检测技术研究[J]. *玉米科学*,2010,18(4):

40 – 44.

[43]

徐伟丽,杜明,徐德昌. 色拉油中转基因成分的PCR检测[J]. 生物信息学,2009,7(3):238 – 240.

[44]

闻伟刚,崔俊霞,赵秀玲. 大豆油中转基因成分的Nested PCR 和 Semi – nested PCR 检测方法研究[J]. 生物技术通报,2005,6:84 – 87.

[45]

吴 珊,鲍晓霞,张晓峰,等. 大豆、油菜籽及大豆油中外源基因检测的灵敏度、准确度研究[J]. 食品科学,2008,29(1):177 – 184.

[46]

Vodret B, Milia M, Orani M G, et al. Detection of genetically modified organisms in food: comparison among three different DNA extraction methods[J]. Veterinary Research Communications,2007,31(1):385 – 388.

[47]

Gryson N, Messens K, Dewettinck K. Influence of different oil – refining parameters and sampling size on the detection of genetically modified DNA in soybean oil[J]. JAOCS,2004,81(3):231 – 234.

[48]

邓鸿铃,覃芳芳,郭新东,等. 食用大豆油中转基因成分的检测[J]. 中国油脂,2007,32(8):79 – 81.

[49]

Zhang L, Wu Y H, Li J, et al. A self – probing primer PCR method for detection of very short DNA fragments[J]. Analytical Biochemistry,2016,514:55 – 63.

(责任编辑:肖唐华)