

## 转基因农作物检测技术及其应用与发展

兰添颖<sup>1</sup>, 宋文芹<sup>1\*</sup>, 张守攻<sup>2</sup>, 齐力旺<sup>2</sup>, 韩素英<sup>2</sup>

(1. 南开大学 生命科学学院, 天津 300071; 2. 中国林业科学院 林业科学研究所, 北京 100091)

**摘要:** 常用的转基因检测方法可分为两个方向, 一是以检测外源基因为目标, 如多聚酶链式反应分析法(PCR), 二是以检测外源蛋白为目标, 如酶联免疫分析法(ELISA)。此外, 近年来, 随着世界各国对转基因生物安全问题的日益关注, 还涌现出了一批新的检测方法, 如微阵列分析法(microarray), 色谱分析法(chromatography), 表面等离子共振(surface plasmon resonance, SPR)生物传感器分析法以及近红外线光谱分析法(near infrared spectroscopy, NIR)等。将对各种转基因检测方法的原理、特点及研究现状做一个扼要介绍。

**关键词:** 转基因产品; 检测; 方法

**中图分类号:** Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2006)05-0483-05

## Detection of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived products

LAN Tian-ying<sup>1</sup>, SONG Wen-qin<sup>1\*</sup>, ZHANG Shou-gong<sup>2</sup>,  
QI Li-wang<sup>2</sup>, HAN Su-ying<sup>2</sup>

(1. *College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China*; 2. *Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China*)

**Abstract:** Detection of genetically modified organisms(GMOs) is current issue that is gaining worldwide interest due to the ever-increasing global diffusion and the related socio-economical implications. Current methodologies for the analysis of genetically modified organisms can be classified into two ways: DNA-based analytical methods, e. g. polymerase chain reaction, and protein-based analytical methods, e. g. enzyme linked immunosorbent analysis. Recent years, new methodologies are developed, including microarrays, chromatography, near infrared spectroscopy and surface plasmon resonance biosensor. This review will give a summary to the status of the most widely used GMOs analysis technologies.

**Key words:** genetically modified organisms; detection; methodology

20世纪80年代以来,植物基因工程技术的飞速发展,为全世界的农业生产开创了新的局面。自1994年第一例转基因产品 Flavr Savr<sup>TM</sup>西红柿在美国上市以来,全球转基因植物的种植已遍布18个国家和地区,约6770万hm<sup>2</sup>,并且全球种植面积以每年15%的增长率持续增长(James, 2003)。随着大量转基因植物被批准商业化生产,由此衍生的转基因

产品的数量也在迅速增加。由于转基因植物体内的DNA分子被人为地修饰改造,遗传性状也发生了改变,其安全性成为了人们关注的话题。为了消除转基因产品的安全隐患和消费者对转基因产品安全性方面的疑虑,世界许多国家对转基因产品的研究开发、生产销售及其在自然环境里的代谢降解等各个环节都制订了严格的法规条例。1998年欧盟

收稿日期: 2005-03-30 修回日期: 2005-10-22

基金项目: 国家转基因植物研究与产业化专项(J2002-B-005)[Supported by the China Transgenic Plant Research and Commercialization Project(J2002-B-005)]

作者简介: 兰添颖(1982-),女,四川泸州人,博士研究生,从事分子细胞遗传学研究。

\* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: songwq@mail.nankai.edu.cn)

签署了第一个法案 Directive 79/112, 要求对转基因产品进行标签说明, 2000年, 要求出口到欧盟的非转基因产品不得含有1%转基因产品污染, 否则就必须施加标识。随后美国、日本等国也将转基因食品的标识作为一种强制性措施。我国于2001年6月公布并实施了《农业转基因生物安全管理条例》, 并于次年1月公布了农业转基因生物安全评价、标识和进口安全管理三个配套管理办法。

各国转基因标识制度的相继建立, 对转基因检测技术的灵敏度和准确性提出了严格的要求, 各种转基因检测技术也成为了研究热点。常用的转基因检测方法大致分为两个方向, 一是以检测外源基因为目标, 二是以检测外源蛋白为目标。此外, 对于一些特殊的转基因产品, 如油类等只能通过色谱分析和近红外线光谱分析等方法进行检测。本文将对各种转基因检测方法的原理、特点及研究现状做一个概述并对转基因检测的前景作一展望。

## 1 外源基因检测技术

转基因技术的核心是对植物遗传物质进行人为改造, 因此检测改造过的遗传物质是转基因检测最直接的方法。外源基因检测方法适用范围广、准确性高, 其它的检测方法, 如外源蛋白检测法对于含不表达、或表达量低得不可测的目的基因的转基因产品以及深加工产品则无法检测, 故检验机构的实际检测中多采用外源基因检测, 包括定性检测和定量检测。

### 1.1 定性 PCR

定性 PCR 技术一般用于转基因产品的筛选和鉴定。瑞士和德国的科学家首先发明了利用 PCR 检测植物中是否有 35S 启动子和 Nos 终止子来筛选转基因植物的方法 (Anklam 等, 2002)。其后, 该方法迅速发展成为筛选转基因植物的主要方法, 在转基因大豆、玉米、番茄、烟草等多种作物中得到了应用。Vollenhofer 等 (1999) 设计了针对 35S 启动子、Nos 终止子、npt II 基因检测的特异性引物, 用 PCR 检测了转基因大豆和玉米。Hupfer 等 (1998) 用 PCR 方法检测了转基因 Bt 玉米热加工产品中的基因修饰物。随着转基因技术所使用的启动子、终止子及各种选择标记的增加, 研究者将多重 PCR (Multiplex PCR) 应用到转基因植物筛选中, 如 Permingeat 等 (2002) 利用多重 PCR 仅用两对引物就

可同时检测出五种转基因玉米中的 Cry1A(b) 和 pat 基因, Germini 等 (2004a) 建立了一种同时检测七种目标序列的多重 PCR 方法, 在大豆和玉米中获得了成功。

近年来, 由于同一外源基因经常在不同的作物或同一作物的不同品种中使用, 因而培育出许多含有相同外源基因的不同品种。因此, 建立一种针对品种特异性的鉴定方法是非常重要的。研究发现, 外源基因在重组过程中以特有的机制整合到基因组的单一序列中, 并且结合位点 (integration site) 和边界序列是唯一的。因而可以将边界序列作为品种特异性鉴定的靶序列。Askild 等 (2002) 采用的 5' nuclease PCR 技术成功地对 'Mon810 大豆转基因重组区 DNA 进行了鉴定。Windels 等 (1999) 提出的锚式 PCR (anchored-PCR) 也是一种针对品种特异性的转基因鉴定方法。

### 1.2 定量 PCR

各国转基因标签法对非转基因产品中的转基因成分的含量制定了限量值 (threshold limit)。定性 PCR, 由于其每个循环的扩增效率都不相同, 无法实现准确的定量。因此, 研究者在定性 PCR 的基础上发展了定量 PCR 检测法。目前最常用的方法是定量竞争 PCR (quantitative competitive PCR, QC-PCR) 和实时 PCR (real-time PCR)。其它方法, 如内参照法、PCR-ELISA 法等也有报道, 但假阳性污染较高且定量的准确度也不够, 应用较少。

最先建立的定量检测方法是 QC-PCR。QC-PCR 采用构建的竞争 DNA 与样品 DNA 相互竞争相同底物和引物, 并根据电泳结果作工作曲线图, 从而得到可靠的定量分析结果。Hubner 等 (1999) 使用 QC-PCR 对含 0.5% 和 1% 转基因成分的大豆样品进行检测, 定量检测的误差分别为 9% 和 2%, 而定性检测的误差为 0, 即没有假阳性或假阴性结果。欧盟一些实验室也对 QC-PCR 定量检测的灵敏度进行了测定, 普遍认为 QC-PCR 适用于衡量样品转基因成分含量是否达到或者高于 1% 限量值而非对转基因成分含量进行精确测定。QC-PCR 检测误差的一个重要来源是 PCR 的后处理过程, 因此优化 PCR 产物检测方法有助于提高 QC-PCR 的灵敏度, 如 Garcia-Canas 等 (2004) 用毛细管电泳 (CGE) 与荧光检测 (LIF) 相结合对转基因玉米 QC-PCR 产物进行分离检测, 降低了交叉污染, 提高了灵敏度。

real-time PCR 是在 PCR 体系中加入荧光基

团,利用荧光信号积累实时监控 PCR 过程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量的方法。real-time PCR 技术是 Higuchi 等 1992 年发明的,其灵敏度高、污染小,很快就得到了认同和推广,成为了目前最有效的转基因植物产品的定量检测方法(Holstjensen 等,2003)。来自美国、日本等 13 个实验室针对 5 种转基因玉米和 1 种转基因大豆进行检测,其中玉米的三个品种 Bt11、T25 和 MON810 的检测限为 0.5%,而 GA21、Event176 和 RR 大豆的检测限为 0.1% (Shindo 等,2002)。Vaitilingom 等(1999)用 real-time PCR 检测转基因大豆和玉米,试验表明 real-time PCR 灵敏度至少是 QC-PCR 的 10 倍,可以检测到每克含有 2 pg 的转基因成分。multiplex real-time PCR 是 multiplex PCR 与 real-time PCR 的结合,Hernandez 等(2003)用这种方法对多种转基因成分混合的样品进行了检测。

### 1.3 Southern 杂交

这是将经酶切的 DNA 转移到杂交膜上与探针杂交的技术。既可直接用基因组 DNA 进行酶切杂交,也可与 PCR 技术相结合,对 PCR 产物进行酶切分析。如 Jennings 等(2003)用 Southern 杂交判断转基因玉米中 *Cry1A* 基因和玉米内源基因 *sh2* 的存在。Southern 杂交不受操作过程中的污染影响,且准确度高、特异性强,是目前植物产品中转基因成分筛选的常用方法之一。

## 2 外源蛋白检测技术

绝大多数转基因植物都以外源结构基因表达出蛋白为目的,因此可以通过对外源蛋白的定性定量检测来达到转基因检测的目的。目前常用的蛋白质检测方法均以免疫分析技术为基础。免疫分析技术具有高度特异性,即便有其它干扰化合物的存在,特异性抗原抗体也能准确地结合。但由于蛋白质容易变性,蛋白质检测方法只适用于未加工的产品。另外有的转基因作物外源基因未表达或表达低下,蛋白质检测方法也不适用。常用的外源蛋白检测方法有酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)和 Western 印迹法。

### 2.1 ELISA

ELISA 是免疫反应和酶高效催化反应的有机结合。一般为定性检测,但若作出已知转基因成分浓度与 OD 值的标准曲线,也可根据标准曲线,由未

知样品的 OD 值来确定此样品的转基因成分的含量,达到半定量测定的目的。研究者利用 ELISA 法从不同作物中检测到了 Bt、PAT、EPSPS 等蛋白(Urbanek-Karlowaska 等,2003; Rogan 等,1999; Lipp 等,2000)。ELISA 还可应用于检测报告基因表达的蛋白,如 *npt II*,这样改进使得 ELISA 可用作转基因产品的初步筛选并且效率高、特异性强。欧盟 13 个国家 38 个实验室用 ELISA 对转基因成分为 2% 的 RR 大豆样品中的 EPSPS 进行检测,准确率高达 99%,检测限为 0.35% (Lipp 等,2000)。目前常用的转基因检测方法是将 PCR 与 ELISA 结合起来的 PCR-ELISA 法,此方法将 PCR 高效性与 ELISA 高特异性结合在一起,灵敏度高达 0.1%。

### 2.2 Western 印迹

此技术是利用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离植物中各种蛋白质,随后将其转移到固相膜上进行免疫学测定,据此得知目的蛋白表达与否、大致浓度及分子量。具有很高的灵敏性,可从植物细胞总蛋白中检出 50 ng 的特异蛋白质,若是提纯后的蛋白质,可检出 1~5 ng。Van Duijn 等(1993)用 Western 印迹法检测 RR 大豆中的 EPSPS,检测限在 0.5%~1%。但操作烦琐,费用较高,不适于检验机构批量检测。

## 3 其它检测技术

### 3.1 微阵列技术

即基因芯片,是将大量的探针按特定方式固定和支持物上,与标记的样品进行杂交,通过检测每个探针杂交信号的强度,可以判断该样品是否含有转基因的成分。微阵列技术可以同时数以千计的样品进行处理分析,大大提高了检测效率,降低了检测成本。Germini 等(2004b)利用 peptide nucleic acids 基因芯片对转基因大豆进行了检测,Bordoni 等(2004)将 ligation detect reaction 技术与微阵列技术结合起来对转基因玉米的 *Cry1A* 基因进行了检测。目前,欧洲 GeneScan 公司已经推出了商品化的转基因检测芯片试剂盒(GMOchip kit),该试剂盒可以对指定的转基因作物中的几种转基因成分作定性检测。欧盟的转基因芯片研究小组正致力于将基因芯片技术应用于转基因成分鉴定及定量检测。

### 3.2 色谱分析

当转基因产品的化学成分较非转基因产品有很

大变化时,可以用色谱技术对其化学成分进行分析从而鉴别转基因产品。再有一些特殊的转基因产品,如转基因植物油等,无法通过传统的外源基因或外源蛋白检测方法来进行转基因成分的检测,但可以借助色谱技术对样品中脂肪酸或甘油三酸酯的各组分进行分析以此达到转基因检测的目的。Byrdwell等(1996)用高压液相色谱与质谱技术相结合对三种 Canola 植物油中的甘油三酸酯的各组分进行分析,发现转基因 Canola 菜籽油中的甘油三酯含量明显比其它品种高且抗氧化能力也较强。该方法是一种定性检测方法,对转基因与非转基因混合的产品进行检验时准确性有限。

### 3.3 SPR 生物传感器技术

SPR 生物传感器是将探针或配体固定于传感器芯片的金膜表面,含分析物的液体流过传感片表面,分子间发生特异性结合时可引起传感片表面折射率的改变,通过检测 SPR 信号改变而监测分子间的相互作用。Feriotto等(2002)将这种方法与 PCR 相结合,将生物素标记的 PCR 产物固定于传感器表面并用相应的探针进行杂交,成功检测到了 RR 大豆。SPR 生物传感器检测方法实时快捷,所需分析物量小且对分析物的纯度要求不高,因此研究者正将其逐步应用在转基因检测领域。

### 3.4 近红外线光谱分析法

有的转基因过程会使植物的纤维结构发生改变,通过对样品的红外光谱分析可对转基因作物进行筛选。Hurburgh等(2000)用近红外线光谱分析法成功地区分了 RR 大豆和非转基因大豆,对 RR 大豆的正确检出率为 84%。近红外线光谱分析法的优点是不需要对样品进行前处理,并且简单快捷,但它不能对转基因与非转基因混合的产品进行检验,且准确性有限。

## 4 总结

随着基因工程的发展,转基因植物产品越来越多地充斥着消费市场。转基因植物及其产品的安全性问题正日益受到社会各界的关注,而各国政府建立的转基因标识制度能否顺利实行的关键就在于能否建立准确可靠的转基因检测技术。

PCR 方法检测灵敏度高,操作简单,既能定性又能定量,在目前转基因检测中应用最为广泛,在未来一段时间内也仍将是转基因检测的主要方法。目

前,对于 PCR 方法的改进,研究者的重点放在提高定量 PCR 的测量限度(LOQ)和定性 PCR 的检测限度(LOD)。此外,对于 PCR 扩增产物检测的方法也在不断改进,如用生物传感器代替费时且易污染的电泳等。免疫分析技术由于其高特异性和高灵敏度也一直是研究者关注的目标,其研究的重点在于如何用免疫分析技术进行转基因成分的定量检测以及如何降低免疫分析技术的成本。微阵列、生物传感器等微型、高通量、自动化的技术可以满足日益增加的转基因产品,如何提高它们的灵敏度并应用于定量检测也是目前的研究热点。总之,高灵敏度、高通量、自动化、低成本是转基因检测技术将来的发展趋势。

### 参考文献:

- Anklam E F, Gadani P, Heinze, *et al.* 2002. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products[J]. *Eur Food Res Tech*, **214**:3-26.
- Anklam E P, Heinze S, Kay, *et al.* 2002. Validation studies and proficiency testing of methods for the detection and quantification of genetically modified organisms [J]. *J AOAC Int*, **85**(3):809-816.
- Askild Holck, Marc Va, Luc Didierjean, *et al.* 2002. 5'-Nuclease PCR for quantitative event-specific detection of the genetically modified Mon810 MaisGard maize[J]. *Eur Food Res Tech*, **214**:449-454.
- Bordoni R, Mezzelani A, Consolandi C, *et al.* 2004. Detection and quantitation of genetically modified maize(Bt-176 transgenic maize) by applying ligation detection reaction and universal array technology[J]. *J Agric Food Chem*, **52**(5):1 049-1 054.
- Byrdwell W C, Emken E A, Neff W E, *et al.* 1996. Quantitative analysis of triglycerides using atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry[J]. *Lipids*, **31**(9): 919-935.
- Feriotto G, Borgatti M, Mischiati C, *et al.* 2002. Biosensor technology and surface plasmon resonance for real-time detection of genetically modified Roundup Ready soybean gene sequences[J]. *J Agric Food Chem*, **50**(5):955-962.
- Garcia-Canas V, Cifuentes A, Gonzalez R, *et al.* 2004. Quantitation of transgenic Bt event-176 maize using double quantitative competitive polymerase chain reaction and capillary gel electrophoresis laser-induced fluorescence [J]. *Anal Chem Apr*, **76**(8):2 306-2 313.
- Germini A, Mezzelani A, Lesignoli F, *et al.* 2004a. Detection of genetically modified soybean using peptide nucleic acids (PNAs) and microarray technology [J]. *J Agric Food Chem*, **52**(14):4 535-4 540.
- Germini A, Zanetti A, Salati C, *et al.* 2004b. Development of a seven-target multiplex PCR for the simultaneous detection of transgenic soybean and maize in feeds and foods[J]. *J Agric Food Chem*, **52**(13):4 350.

- Hernandez M, Rodriguez-Lazaro D, Esteve T, *et al.* 2003. Development of melting temperature-based SYBR Green I polymerase chain reaction methods for multiplex genetically modified organism detection[J]. *Anal Biochem*, **323**(2): 164—170.
- Holst-Jensen A, Ronning S B, Lovseth A, *et al.* 2003. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs) [J]. *Anal Bioanal Chem*, **375**(8): 985—993.
- Hubner P, Studer E, Luthy J. 1999. Quantitation of genetically modified organisms in food[J]. *Nat Biotechnol*, **17**(11): 1 137—1 138.
- Hupfer C, Hotzel H, Sachse K, *et al.* 1998. Detection of the genetic modification in heat-treated products of Bt maize by polymerase chain reaction[J]. *Z Lebensm Unters Forsch A*, **206**: 203—207.
- Hurburgh C R, Roussel S A, Hardy C L, *et al.* 2000. Identification of Genetically Modified Grains using NIR Spectroscopy [C]//10th International Diffuse Reflectance Conference (IDRC 2000), Chambersburg, PA. USA: Prix du meilleur poster.
- James C. 2003. Global review of commercialized transgenic crops. ISAAA Brief No. 30—2003, The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, Ithaca, N. Y.
- Jennings J C, Albee L D, Kolwyck D C, *et al.* 2003. Attempts to detect transgenic and endogenous plant DNA and transgenic protein in muscle from broilers fed YieldGard corn Borer corn[J]. *Poult Sci*, **82**(3): 371—380.
- Lipp M, Anklam E, Stave J W, *et al.* 2000. Validation of an immunoassay for detection and quantitation of a genetically modified soybean in food and food fractions using reference materials: interlaboratory study[J]. *J AOAC Int*, **83**(4): 919—927.
- Perningeat H R, Reggiardo M I, Vallejos R H. 2002. Detection and quantification of transgenes in grains by multiplex and real-time PCR[J]. *J Agric Food Chem*, **50**(16): 4 431—4 436.
- Rogan G J, Dudin Y A, Lee T C, *et al.* 1999. Immunodiagnostic methods for detection of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in Roundup Ready soybeans[J]. *Food Control*, **10**: 407—414.
- Shindo Y, Kuribara H, Matsuoka T, *et al.* 2002. Validation of real-time PCR analyses for line-specific quantitation of genetically modified maize and soybean using new reference molecules[J]. *J AOAC Int*, **85**(5): 1 119—1 126.
- Urbanek-Karłowska B, Sawilska-Rautenstrauch D, Jedra M, *et al.* 2003. Detection of genetic modification in maize and maize products by ELISA-test[J]. *Rocz Panstw Zakl Hig*, **54**(4): 345—353.
- Vaitilingom M, Pijnengurg H, Gendre F, *et al.* 1999. Real-time quantitative PCR detection of genetically modified maximizer maize and Roundup Ready soybean in some representative foods[J]. *Agric Food Chem*, **47**, 5 261—5 266.
- Vollenhofer S, Burg K, Schmidt J, *et al.* 1999. Genetically modified organisms in food-screening and specific detection by polymerase chain reaction[J]. *J Agric Food Chem Dec*, **47**(12): 5 038—5 043.
- Windels P, Theuns I, Dendaauw J, *et al.* 1999. Development of a line specific GMO detection method; a case study[J]. *Meded Fac Landbouwwet Rijksuniv Gent*, **64**/5b.

(上接第 491 页 Continue from page 491)

### 参考文献:

- 李如亮. 1998. 生物化学实验[M]. 武汉: 武汉大学出版社: 57—58.
- 刘祖祺, 王洪春. 1989. 植物耐寒性及防寒技术[M]. 北京: 农业出版社: 93—115.
- 刘祖祺, 张石城. 1994. 植物抗性生理学[M]. 北京: 中国农业出版社: 84—195.
- 汤章城. 1999. 现代植物生理学指南[M]. 北京: 科学出版社: 302.
- 范月仙, 李生泉, 冯文新. 1995. 棉花抗冷性与其可溶性糖含量变化关系的研究[J]. *棉花学报*, **7**(2): 126—127.
- 范月仙, 张述义, 李生泉. 1995. 棉花苗期抗冷性与可溶性蛋白质含量增加关系的研究[J]. *山西农业大学学报*, **15**(1): 56—58.
- 金博闻, 戴亚. 1994. 烟草化学[M]. 北京: 清华大学出版社.
- Ai XZ(艾希珍), Yu XC(余贤昌), Wang SH(王绍辉), *et al.* 1999. Changes of some substances of grafted and own root cucumber seedlings under low temperature stress(低温胁迫下黄瓜嫁接苗与自根苗某些物质含量的变化)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), **35**(1): 26—29.
- Guan SY(关世英), Su WA(苏维埃). 1995. Approach of mechanism of plant chilling resistance related with phosphatidyl-glycerol(与磷脂酰甘油有关的植物抗冷机理研究)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), **31**(3): 167—173.
- Chen YZ(陈贻竹). 1988. The effect of chilling temperature on the level of superoxide dismutase, catalase and hydrogenperoxide in some plant leaves(低温对植物叶片超氧化物歧化酶、过氧化物酶和过氧化氢酶水平的影响)[J]. *Acta Phytophysiol Sin*(植物生理学报), **14**(4): 323—328.
- Chen SN(陈善娜), Liang B(梁斌), Zhang SJ(张蜀君). 1995. The relationship between the cold resistance of rice seedlings in Yunnan Plateau and the scavenging systems of activated oxygen(云南高原水稻幼苗的抗冷性与其活性氧清除系统的关系)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), **17**(4): 452—458.
- Giannopolitis C N, Ries S K. 1977. Superoxide dismutase I: occurrence in higher plant[J]. *Plant Physiol*, **59**: 309—314.
- Lyons J K, Chapman E A. 1971. Membrane phase changes in chilling-sensitive *I'igna radiata* and their significance to growth[J]. *Aust J Plant Physiol*, **3**: 291.
- Mead J F. 1976. Freeradical mechanism of lipid damage, a consequence for cellular membranes[A]. In: proyor W A(ed). *Free radicals in Biology*[C]. New York: Academic Press: 185—210.