

转基因植物的检测策略和检测技术

张莹^{1,2}, 张永军^{1*}, 吴孔明¹, 赵奎军², 彭于发¹, 郭予元¹

(1. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100094;

2. 东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030)

摘要 目前转基因植物的安全性在全球范围内引起激烈的争论与普遍关注。一些国家正在努力制定相应的法律和法规,对转基因产品实行标识制度,加强对转基因植物及其产品的管理。为了在世界贸易活动中保证本国经济利益不受侵害,加强转基因植物及其产品的检测技术研究是必不可少的。转基因植物的检测主要有两种方法:一种是DNA水平上的检测,另一种是蛋白质水平上的检测。

关键词 转基因植物; 检测策略; 检测方法

中图分类号

Detection strategies and techniques for genetically modified organisms

Zhang Ying^{1,2}, Zhang Yongjun¹, Wu Kongming¹, Zhao Kuijun², Peng Yufa¹, Guo Yuyuan¹

(1. *China State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China;*

2. *College of Agronomy, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China*)

Abstract With rapid development of the genetically modified organisms (GMOs), the safety of the GMOs has drawn drastic arguments and popular attentions globally. Some countries have constituted relevant laws to strengthen the management and labeling of the GMOs and its manufacturing. To protect economic benefits, it is necessary for them to improve the research on GMOs detection. So far, there are two major methods in GMO detection, including both DNA and protein detection.

Key words GMOs; strategy of detection; methods of detection

1 引言

转基因生物体或遗传工程体 GMOs (genetically modified organisms) 是借助于基因工程技术实现其在动物、植物、微生物之间转移而获得的一种具有优良特性的生物体。随着转基因技术的开发,全球转基因植物田间试验数量超过万例,转基因作物品种达 100 多个,由转基因作物产品加工的转基因食品和食品成分达 4 000 余种。全球转基因产品占该作物种植面积的比例从大到小依次为:大豆、棉花、玉米、油菜。然而,转基因作物在带来巨大效益的同时也潜在许多问题,转基因作物的安全性在全球范围内引起了激烈的争论与普遍关注,主要集中在环境安全性和食品安全性两方面。世界各国正在努力制定相应的法律和法规。欧盟、日本及大多数第三世界国家则极力主张限

制 GMOs 的进口。我国于 2001 年 5 月 23 日颁布农业转基因生物安全管理条例,2002 年 3 月 20 日开始实行的《农业转基因生物标识管理办法》规定,国家对农业转基因生物实行检验检疫和标识制度,凡是在中国境内销售的大豆、玉米及其制品若属转基因生物,必须进行标识。由于食品标识以及食品制造商、销售商、消费者等多方面需要,将转基因食品与常规食品区别开,迫切需要一套可行的检测方法以满足社会需要。各检验检疫口岸应进口国的要求都早已相继开展了转基因产品的检测工作,随着标识制度的逐步实行,转基因产品检测工作将日益增多。

2 外源基因的检测策略

外源基因中的目的基因是转基因植物及其产品开发中的研究重点,随着转基因植物及其产品的种

收稿日期: 2006-05-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(30270902); 国家重点基础研究发展规划项目(001CB109004)

* 通讯作者 E-mail: yjzhang@ippcaas.cn

类不同,所使用的目的基因也不相同,因此通过检测外源基因中的目的基因来鉴别转基因植物及其产品的难度较大。然而即使在含有不同目的基因的转基因植物及其产品中往往使用相同或相似的启动子、终止子或标记基因,这些启动子、终止子和标记基因的 DNA 序列具有特异性,并且大多来自微生物,非植物本身固有,因此通过检测样品是否含有特定的启动子、终止子或标记基因序列作为鉴别转基因植物及其产品的依据是一种可行的方法^[1]。常用的根癌农杆菌胭脂碱合成酶启动子(NOS)来源于细菌,花椰菜花叶病毒(*Cauliflower mosaic virus*, CaMV)、玄参花叶病毒(*Figwort mosaic virus*, FMV) 35S 启动子均来源于植物病毒,标记基因如 neo 来源于大肠杆菌。

根据检测的不同阶段区分,有 DNA 检测法, RNA 检测法及蛋白质检测法。DNA 检测法只能检测到外源基因是否已经整合到植物基因组中,而后两种检测方法检测的是外源基因是否能在受体植物中表达;根据 RNA 检测法得到的结果可判定外源基因是否转录,蛋白质检测法则可检测出外源基因是否翻译。

3 检测方法

3.1 血清学检测

目前较常用的主要有两种,一种是酶联免疫吸附分析(enzyme-linked immunosorbent assay)简称 ELISA,另一种是试纸条法。ELISA 法就是抗原抗体的免疫反应和酶的高效催化反应有机的结合,根据酶作用于底物后的显色反应,当抗原与抗体结合时,会形成有色物质,颜色的深浅与样品中抗原的含量成正比,据此可定性判断样品是否为阳性。若想进行定量检测,需要做出已知转基因蛋白成分浓度与 OD 值的标准曲线,然后根据标准曲线由未知样品的 OD 值来确定样品中转基因成分的含量。Lipp 等使用 ELISA 方法,通过抗体特异性地与 CP4-EPSPS(烯醇丙酮酰莽草酸—3—磷酸合酶,来源于农杆菌 CP4)结合,检测抗农达转基因大豆(roundup ready soybean,RRS)^[2]。现在已有外源蛋白检测试剂盒研制成功,已经广泛应用于定量检测 Bt 转基因水稻、棉花、玉米、大豆。赵红盈等用此试剂盒检测了 *cry1Ac/CpTI* 双价抗虫水稻不同时期,不同部位中 Bt 杀虫蛋白的含量^[3]。另一种利用血清学原理检测的试纸条法,是将特异抗体交联到试纸条和有

颜色的物质上,当纸上抗体和特异抗原结合后,试纸条上就有颜色反应,如果没有抗原,则没有颜色。

以上两种方法优点是检测快速,具有一定的灵敏度,而且能进行定量检测,尤其是试纸条法,简便快捷,在现场检验或初筛中具有较好的应用前景。ELISA 法具有抗原抗体反应的特异性,但易出现本底高的问题,缺乏标准化,而且操作方法上出现的差异会引起试验效果的不同。

3.2 PCR 检测

PCR 是聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)的英文简称,是一种在体外对特定区段的 DNA 复制的方法。此方法具有直接、简便、快速、灵敏等特点,随着 PCR 技术的迅速发展,国外许多科研单位及机构将 PCR 技术应用于 GMOs 检测。PCR 检测可分为定性和定量检测两种,目前以定性 PCR 居多。最初检测食品中 GMOs 采用的是定性 PCR 方法。可以通过对特殊序列基因(启动子、终止子、遗传标记基因)和目的基因(靶基因)进行检测。在瑞典 GMOs 标识制度中,PCR 定性检测方法起着决定作用。IUPAC 在内的 13 个国家 29 个实验室合作研究,用 35S-PCR 和 NOS-PCR 方法检测食品中 GMOs。结果表明,当玉米和大豆中含 2% GMOs 成份时,可以用 35S-PCR 和 NOS-PCR 方法正确的检测。然而,当样品中含 0.5% GMOs 时,只有用 35S-PCR 方法检测结果才 100%正确^[4]。定量 PCR 方法可用于确定样品中 GMOs 成份百分含量。定量 PCR 检测为确定转基因植物及其产品中 GMOs 含量提供了切实可行的方法。随着人们对转基因植物及其产品重视程度和量化要求的提高,定性检测方法已经不能满足需要,加上定性筛选 PCR 方法本身具有局限性,常伴有假阳性或假阴性结果。为此研究者在定性筛选 PCR 方法的基础上,发展了不同的定量转基因生物的 PCR 检测方法。目前转基因成分的准确定量检测在国际贸易中日趋重要。实时定量 PCR(real-time PCR)方法是普遍使用的一种定量 PCR 方法。如德国推荐的转基因玉米定量检测方法就是采用实时定量 PCR 技术检测抗虫玉米(Bt176 玉米)。欧盟推荐的转基因大豆和玉米的 PCR-RFLP 检测方法也是一种定量检测方法^[5],此法能正确检测大豆和玉米样品中的 2%GMOs 含量。对于 GMOs 含量为 0.5%的大豆样品,通过 35S 启动子的分析也能百分之百地正确

检出。而且该方法也是欧美等国家对转基因食品进行标识的常采用的检测方法^[5]。

3.3 复合 PCR

近年来,复合 PCR(multiplex PCR, MPCR) 技术得到了较广泛的应用,在细菌检测、病毒检测中应用已有报道。MPCR 即是在同一反应管中含有一对以上引物,可以同时针对几个靶序列进行检测,模板可以为单一的也可以是几种不同的。在优化 MPCR 反应条件时,如果要优化的因素较多,可考虑采用正交设计法筛选出最佳组合。正交设计法在农业上已较常用,当完全组合的数目众多时,按一套编好的正交表,选出代表性很强的少数几个条件做试验,找出较好的条件。这种方法与按常规组合来安排试验的方法相比,大大减少试验组数,缩短试验时间。MPCR 在转基因产品检测已经得到了应用。Matsuoka 等建立一种 MPCR 方法来区分转基因玉米 5 个不同品系^[6]。陶震等选用 NOS 终止子、CaMV35S 启动子、NOS 启动子的 3 对引物,利用 MPCR 技术对 5 个大豆样品和 6 个豆粕样品进行检测,同时利用普通 PCR 方法对上述样品进行复核验证,两者的结果完全符合^[7]。珠海出入境检验检疫局的谢为龙等利用复合 PCR 法以转基因大豆、玉米、油菜、番木瓜为材料在同一反应管中可以同步检测 35S、NOS 及 CP4-EPSPS 基因^[8],明显提高了检测效率。MPCR 方法是针对多个靶位点进行同时检测,其检测结果较之普通 PCR 更为可信,同时简化了手续,节约了昂贵的试剂。

3.4 电化学发光 PCR 技术

电化学发光(electrochemiluminescence, ECL)是指通过电化学方法产生一些特殊的物质,然后这些电生物质之间或电生物质与其他物质之间进一步反应产生的一种发光现象。它是化学发光与电化学方法相互结合的产物。其工作原理如下:化学发光剂三联吡啶钌 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ 和电子供体三丙胺(TPA)在阳极表面分别被氧化成 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{3+}$ 和 TPA^+ 。TPA⁺很不稳定,失去一个质子(H⁺),形成强还原剂 TPA·。这两个反应基团($[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{3+}$ 和 TPA⁺·在电极表面迅速反应,三价的 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{3+}$ 被还原形成激发态的二价 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ·, TPA·自身被氧化成二丙胺和丙醛。接着激发态的 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ·衰减成基态的 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$,同时发射一个波长为 614nm 的光子,这

一过程在电极表面周而复始地进行,产生许多光子,使电信号得以增强,从而使检测灵敏度大大提高。

电化学发光 PCR 方法首次将电化学发光技术、PCR 技术和双探针杂交技术结合起来,用于检测 CaMV 35S 启动子。目前,大约 75% 的转基因植物中使用 CaMV35S 启动子。检测样品中是否含有 CaMV35S 启动子,可判定样品是否含有转基因成份。PCR 产物与生物素标记的探针杂交,可以起到筛选的作用;与三联吡啶钌标记的探针杂交则可用于电化学发光检测。两种探针同时与转基因样品 PCR 产物杂交,使结果避免假阳性的影响而更加准确。该方法灵敏度高,可靠性强,操作简便,结果准确,有望成为一种高效的转基因检测方法。华南师范大学激光生命科学研究所的刘晋峰等应用电化学发光 PCR 技术检测转基因番木瓜叶片,通过观察电化学发光信号的强度,来判断植物样品中是否含有转基因的成份,从而实现转基因植物的检测^[9]。

3.5 HRCA 技术

滚环扩增技术(rolling cycle amplification, RCA)在近几年中逐渐引起人们的注意,并越来越多地用于基础研究和转基因实际检测中。RCA 反应可以简单的分为锁式探针(padlock probe)的连接和连接后的扩增两部分。锁式探针由 5'端和 3'端特异性序列部分和它们之间的连接序列组成;5'端和 3'端特异性序列部分同靶 DNA 上的互补区域结合,结合后锁式探针的 5'端和 3'端是紧密相邻的,可以在连接酶的作用下形成环型 DNA 分子;成环后的锁式探针在一个引物和合适的 DNA 聚合酶作用下可以进行滚环复制,对环型探针进行扩增。滚环复制是自然界中许多质粒和病毒的复制方式,目前在实验室的人工体系中可以模拟这种 DNA 复制方式对环形 DNA 进行复制。超分支滚环扩增(hyper-branched rolling cycle amplification, HRCA;也有文献将其称为级联滚环扩增,cascade rolling cycle amplification, CRCA)是在滚环复制的基础上增加一个序列同锁式探针中部分序列相同的引物,即在两个引物存在下产物以超分支形式扩增,可在 1 h 内对 10 个靶分子进行扩增,扩增倍数达 10 倍。利用复合 PCR 对植物进行转基因背景检测时,要求在同一个反应管中含有多对引物,在相同的条件下对多个靶位点进行同时检测;多对引物的存在,在实际反应中很可能会相互干扰,而且在引物设计时很难

使得各引物的复性动力学完全一致,这些都会增加确定反应条件时的工作量,而且随着引物的增多,工作量呈指数增加。从理论上讲,HRCA 可以完全避免复合 PCR 方法中遇到的麻烦;其一,锁式探针只同相应的靶位点进行互补结合,即便有多个锁式探针同时存在于一个检测体系中也不会相互干扰;其二,探针中的连接段部分对不同的锁式探针可以完全相同,并不影响对靶位点的检测;可以针对这段共同序列设计一对通用引物,用于所有锁式探针的扩增,因此无需考虑多对引物复性动力学一致性问题。中国科学院上海生命科学研究院生物工程研究中心的陶震等根据 4 种转基因植物中常用的外源基因或 DNA 片段设计了 4 条锁式探针,利用质粒 pPK232-8 中的一段序列作为锁式探针中的共同连接部分,并根据该共同的连接部分序列设计一对通用的 HRCA 引物,对该技术在转基因植物检测中的应用情况作了较全面的探索,对 HRCA 反应时间、酶用量及不同连接产物量 HRCA 的方法进行了研究^[10]。在上述研究的基础上,对转基因烟草进行实际检测,取得了与预期一致的理想结果。研究表明,HRCA 方法完全可以用于转基因植物及其产品的检测,而且其使用比 MPCR 技术更方便,效率更高。

3.6 基因芯片检测技术

血清学和 PCR 检测技术,大部分情况下一次实验只能检测一种目标分子,在少数情况下能同时检测两三种目标分子。但是在未来的转基因产品检测中,这两种检测技术已越来越不能胜任一次处理上万种基因的特殊需要,尤其是大数量的转基因产品进入商品化生产时,需要更有效的、快速的检测方法。最近几年出现的基因芯片技术能较好地解决这一矛盾。

基因芯片,又称 DNA 芯片(或 DNA 微阵列),是指将许多特定的核苷酸片段或基因片段作为探针,有规律地固定于支持物上形成的 DNA 分子阵列,然后与待测的荧光标记样品的基因按碱基配对原理进行杂交,再通过激光共聚焦荧光检测系统等对其表面进行扫描即可获取样品分子的数量和序列信息。

国内外一些公司(百奥生物信息科技有限公司等)已生产了转基因产品检测基因芯片^[11],我国首个转基因植物检测基因芯片在上海博星基因芯片技术公司诞生,用于检测转基因植物及其产品中常用的启动子、终止子、筛选基因、报告基因以及常见的目标基因(抗虫、耐除草剂基因)。基因芯片技术,具

有所需样品的用量极少、自动化程度高和被测目标 DNA 密度高的优点。目前基因芯片在实际检测中应用并不普遍,主要受一些因素的限制,如需要昂贵的检测杂交微弱信号的装置,芯片的制作成本高则使用的成本也较高,需要具有对杂交信号及相关信息、数据的大规模处理和分析的能力。

随着转植物基因工程的发展,新型的外源基因不断被发掘,外源基因导入方法上不断改进,转基因植物新品系的将不断问世,转基因植物及其产品的检测策略和方法也将相应地不断提高和发展。

参考文献

- [1] 徐茂军. 转基因植物食品的检测策略[J]. 食品与发酵工业, 2002,27(12):69-71.
- [2] LIPP M, BRODMANN P, PIETSCH K, et al. IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soybeans and maize in dried powder[J]. J AOAC Int, 1999,82(4): 923-928.
- [3] 赵红盈,张永军,吴孔明,等. 转 *cry1Ac/CpTI* 双价抗虫水稻 *Cry1Ac* 杀虫蛋白的表达特性及其对二化螟的毒杀效果[J]. 农业生物技术学报, 2004,12(1):76-79.
- [4] 潘良文,陈家华,沈禹飞. 进口转基因抗草甘膦油菜籽和大豆中 CP4-EPSPS 基因的检测比较研究[J]. 生物技术通讯, 2001,12(3):175-177.
- [5] 王品,王林,黄晓蓉. 食品安全快速检测技术[M]. 北京:化学工业出版社,45-53.
- [6] MATSUOKA T, KURIBARA H, AKIYAMA H, et al. A multiplex PCR method of detecting recombinant DNAs from five lines of genetically modified maize[J]. Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 2001,42(1):24-32.
- [7] 陶震,杨胜利,龚毅. 利用 MPCR 方法快速检测转基因植物背景[J]. 生物技术通报,2000(6):37-41.
- [8] 谢为龙,陈其文,喻国泉,等. 转基因植物快速检测方法的研究[J]. 生物技术通报,2002(4):39-46.
- [9] 刘晋峰,邢达,沈行燕,等. 电化学发光 PCR 技术检测转基因植物[J]. 生物化学与生物物理进展, 2004,31(4):375-378.
- [10] 陶震,蔡兴锋,颜志强,等. HRCA 技术在转基因植物检测中的应用[J]. 生物工程学报,2003,19(3):294-299.
- [11] 邵碧英,陈文炳,李寿菴,等. 转基因产品检测方法建立的基础及应用[J]. 检验检疫科学, 2002,12(3):14-19.
- [12] OECD. Safety evaluation of foods produced by modern biotechnology: concepts and principles[M]. Paris: Organization for Economic Cooperation and Development, 1991:1-10.
- [13] 李利红,李常青,黄秀梨,等. 转基因植物中 Bt 杀虫蛋白的重组噬菌体辅助检测[J]. 生物化学与生物物理进展,2001,28(5):728-731.
- [14] 吕山花,邱丽娟,陶波. 转基因植物食品检测技术研究进展[J]. 生物技术通报,2002(4):34-38.