

李夏莹,高鸿飞,刘鹏程,等. 转基因作物快速检测技术的研究进展[J]. 江苏农业科学,2018,46(3):5-9.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.03.002

转基因作物快速检测技术的研究进展

李夏莹¹, 高鸿飞², 刘鹏程¹, 王颢潜¹, 梁晋刚¹, 张旭冬¹, 李文龙¹, 张秀杰¹

(1. 农业部科技发展中心, 北京 100176; 2. 中国农业科学院油料作物研究所, 湖北武汉 430062)

摘要:近年来,转基因作物的种植面积以及相关国际贸易的不断增加,对于转基因生物安全管理提出了更高的要求,而发展转基因作物现场检测和快速筛查技术对于实现转基因的有效监管十分重要。本文通过对转基因作物外源蛋白和外源基因快速检测技术的研究进展进行综述,重点介绍了 ELISA、免疫层析分析、生物传感器技术、基因组 DNA 快速提取技术以及核酸等温扩增技术等转基因作物快速检测中的最新应用情况,并对不同技术的优缺点进行比较。同时对于转基因快速检测技术研究的发展趋势、发展方向以及目前亟待解决的重点问题做了分析。

关键词:转基因作物;快速检测;研究进展

中图分类号: Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)03-0005-05

转基因生物(genetically modified organism, GMO)一般是指通过基因工程技术将具有特殊功能的外源基因转入生物体内,使其表达,从而使生物体获得它本身不具有的新特性,这样一类获得外源基因的生物称之为转基因生物^[1-4]。当前转基因技术主要成功应用于转基因农作物领域。据统计,自1996年转基因作物被允许商业化种植以来,截至2016年,全

球转基因作物的种植面积从170万hm²增加到1.851亿hm²,增加了110倍。21年间(1996—2016年),全球转基因作物累计种植面积达到空前的21亿hm²^[5]。目前有美国、阿根廷、加拿大等26个国家种植了转基因作物,其中19个为发展中国家,7个发达国家。发展中国家的种植面积占全球转基因作物种植面积的54%,而发达国家的种植面积占46%。已经商业化大面积种植的转基因作物种类主要是玉米、大豆、棉花和油菜。除此之外,转基因作物也扩展到了甜菜、木瓜、茄子、马铃薯以及2017年刚上市的苹果等。

转基因作物的迅速普及,为农民乃至为全社会带来了巨大的农业、经济和社会效益,但同时也引发了转基因产品对人体健康和生态环境的广泛争论。为了满足广大消费者的知情权和选择权以及国际贸易的需求,许多国家或地区相继出台

收稿日期:2017-10-19

基金项目:国家科技重大专项(编号:2016ZX08012003)。

作者简介:李夏莹(1986—),女,云南玉溪人,博士,农艺师,主要从事转基因检测技术研究。E-mail:esmaclod006@163.com。

通信作者:张秀杰,硕士,副研究员,主要从事转基因检测技术研究。E-mail:zhxj7410@sina.com。

- [23] 杨飞,吴根义,诸云强,等. 中国各省区未来主要畜禽养殖量及耕地氮载荷的预测[J]. 水土保持研究,2013,20(3):289-294.
- [24] 耿维,胡林,崔建宇,等. 中国区域畜禽粪便能源潜力及总量控制研究[J]. 农业工程学报,2013,29(1):171-179.
- [25] 张田,卜美东,耿维. 中国畜禽粪便污染现状及产沼气潜力[J]. 生态学杂志,2012,31(5):1241-1249.
- [26] 马定涓,邹冬生,喻夜兰,等. 中国农业生态环境现状与恢复对策[J]. 湖南农业大学学报(社会科学版),2003(4):5-9.
- [27] 张北赢,陈天林,王兵. 长期施用化肥对土壤质量的影响[J]. 中国农学通报,2010,26(11):182-187.
- [28] 刘兆辉,薄录吉,李彦,等. 氮肥减量施用技术及其对作物产量和生态环境的影响综述[J]. 中国土壤与肥料,2016(4):1-8.
- [29] 彭佩钦. 湖南省农业生态环境建设的问题与对策[J]. 生态环境,2003,12(1):33-36.
- [30] 苏玉萍,李忠水,郑达贤. 农用化学品对福建省农业生态环境的影响及其防治[J]. 福建地理,2002,17(4):4-7.
- [31] 白璐,雷昊,赵海燕,等. 基于种养关系重构的畜禽养殖污染治理政策设计——以江苏省太湖流域为例[J]. 农业科学研究,2016,37(2):39-47.
- [32] 常维娜,周慧平,高燕. 种养平衡:农业污染减排模式探讨[J]. 农业环境科学学报,2013(11):2118-2124.
- [33] 周洁红,胡剑锋. 蔬菜加工企业质量安全管理行为及其影响因

素分析——以浙江为例[J]. 中国农业经济,2009(3):45-56.

- [34] 闫实,张静,梁彦秋. 不同种类蔬菜农药残留检出率的规律性研究[J]. 安徽农业科学,2008,36(35):15670-15672.
- [35] 周宝梅. 稻农农药使用心态与行为研究——基于对泰州市稻农的问卷调查的分析[D]. 扬州:扬州大学,2007.
- [36] 王瑞,魏源送. 畜禽粪便中残留四环素类抗生素和重金属的污染特征及其控制[J]. 农业环境科学学报,2013,32(9):1705-1719.
- [37] 杨曙辉,宋天庆,欧阳作富,等. 我国农产品食品质量安全问题:特点、症结及对策[J]. 农业现代化研究,2013(3):293-297.
- [38] 李浩,白玉瑞. 当前农产品安全问题及解决途径探讨[J]. 决策探索,2008(4):72.
- [39] 张桃林. 加强土壤和产地环境管理促进农业可持续发展[J]. 中国科学院院刊,2015,30(4):435-444.
- [40] 沈贵银. 关于推进江苏农业供给侧结构性改革的若干问题[J]. 江苏农业科学,2016,44(8):1-4.
- [41] 张振都,吴景贵. 畜禽粪便的资源化利用研究进展[J]. 广东农业科学,2010,37(1):135-138.
- [42] 李书田,刘荣乐,陕红. 我国主要畜禽粪便养分含量及变化分析[J]. 农业环境科学学报,2009,28(1):179-184.
- [43] 原伟鹏,王华,刘新平,等. 农户对耕地面源污染的防治意愿及其影响因素——以新疆玛纳斯县为例[J]. 江苏农业科学,2016,44(8):549-553.

了转基因生物安全管理相关法律法规。目前已有 65 个国家或地区对转基因产品实行强制标志管理制度,如日本和韩国等国家的转基因产品标志制度要求产品中转基因成分含量超过 5% 或者 3% 的必须实施标志,而欧盟的要求更为严格,要求 0.9% 以上必须标志。我国于 2001 年也公布并实施了《农业转基因生物安全管理条例》,并于同年公布了《农业转基因生物标识管理办法》等 3 个配套管理办法,要求对农业转基因生物目录的产品进行严格的标志管理制度^[6]。然而,近年来转基因产品非法进口、污染及安全事故等事件不断增加,因此,加大对转基因产品的检测监管十分必要。随着转基因作物的种植面积以及相关国际贸易的不断增加,建立简单便捷的转基因现场检测和快速筛查方法对于实现转基因的有效监管十分关键。

目前对转基因作物的检测方法主要分为 2 类:第一类是基于外源基因检测的 PCR 方法,该方法是通过 PCR 技术和核酸探针的杂交检测技术来准确、快速地检测外源基因;二是基于外源基因表达的特异性蛋白检测的免疫方法,这类方法是利用制备的特异性抗体和转基因作物中表达的外源蛋白的免疫结合来实现特异、快速的转基因分析。对于外源蛋白的快速检测主要采用酶联免疫吸附分析、免疫层析分析和生物传感器分析等方法。对于外源基因的快速检测方法主要采用基因组 DNA 直接提取法、核酸等温扩增法以及核酸试纸条等方法。现将目前广泛使用的几种转基因作物快速检测技术综述如下:

1 酶联免疫吸附法

酶联免疫吸附法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 指将抗原或者抗体结合到固相载体上,利用抗原抗体特异性反应将待测物与酶连接,最后通过酶与底物显色来进行定性或者定量的检测方法^[7]。

这一方法的基本原理是:(1)首先将抗原或者抗体结合到聚苯乙烯等固相载体表面,该过程在温和条件下进行以利于保持免疫吸附剂的免疫活性。(2)同时将酶标记相应的抗原或者抗体以制备信号探针,该信号探针分子既保留免疫物质的免疫活性,又保留酶的活性。(3)在测定中,待测物和信号探针按照不同的步骤与固相载体表面的抗原或者抗体发生免疫反应,经过洗涤等理化步骤使固相载体上结合的免疫复合物与溶液中游离的免疫物质分离,此时固定的酶量与待测物的量成一定的比例。(4)最后向固相载体上加入酶反应的底物,底物被酶催化而发生颜色变化,根据产物的颜色深浅对待测物进行定性或定量分析。

根据操作步骤的不同,该法通常可分为夹心法、竞争法和间接法 3 种类型。

相比于其他方法,该测定法是基于抗原抗体的特异性反应,因此具有高度的特异性并且无需复杂的样品前处理。同时在该测定法中酶标记物较稳定,试剂保存期长;产生的信号用普通的可见-紫外分光光度计就可测定,不需要昂贵的仪器设备,因此检测成本低廉。此外该方法还具有操作简单,检测快速,易于标准化操作等优点。基于以上特点,ELISA 已广泛应用于生物学、医学研究和临床实验诊断工作等领域中,并成为商业化程度最高的免疫分析方法。

目前应用于转基因产品检测的 ELISA 试剂盒已被成功开发,如 EnviroLogix 公司的 Cry1Ab/Cry1Ac 定量检测试剂盒

和 CP4-EPSPS 定量检测试剂盒等。

Tan 等利用豌豆种子提取的 CpT1 蛋白制备相应的单抗,随后与辣根过氧化物酶标记,建立了双抗夹心式 ELISA 法,可实现快速、有效的转基因抗虫棉花检测^[8]。

值得注意的是在 ELISA 法中标记酶不像同位素/荧光标记物那样能直接产生信号,而必须要和其他试剂,如酶底物、辅酶的参与,才能完成酶反应,引起吸光谱等变化后方可进行测定;同时由于采用肉眼可见的比色法检测,使得其灵敏度受到一定的限制。

2 试纸条法

试纸条 (test strip) 是近年来兴起的一种基于薄层层析膜的分析方法。试纸条通常是由样品垫、结合垫、反应膜和吸收垫组成。反应膜上存在检测线和质控线。该分析方法的基本原理是样品加入样品垫后,在反应膜毛细管作用下和结合垫上的示踪分子一起流经固定有生物识别分子的检测线,并与固定的生物识别分子发生反应形成复合物,继而在检测区域显示示踪分子的颜色,实现对待测样品的检测。

在试纸条中,反应膜的功能是利用其对生物大分子的吸附特性而固定抗体等物质,同时驱使样品以及示踪分子流向反应区域。因此该反应膜需具备良好的蛋白吸附能力,并且需要具有一定的孔隙度和湿润性以保证水溶性样品的毛细迁移,目前应用最广泛的是硝酸纤维素膜。

根据检测物质的种类不同,试纸条可分为免疫层析试纸条 (immunochromatographic test strip) 和核酸试纸条 (nucleic acid test strip)。

2.1 免疫层析试纸条法

免疫层析试纸条是将薄层层析分析与传统的免疫分析相结合而发展的一种新型分析方法^[9-12]。

免疫层析试纸条的基本原理是将特异性抗体预先固定在硝酸纤维素膜的检测区域,当膜的一端浸入样品后,在毛细管作用下,样品将沿着该反应膜向前迁移。当移动至固定有抗体的区域时,样品中待测的抗原即与该抗体发生特异性结合。若用免疫胶体金示踪或者免疫酶染色可使该区域显示一定的颜色,从而实现快速简便的免疫分析。

相比于传统的免疫分析,如 ELISA 法等,免疫层析试纸条无需较长的孵育时间和多步清洗步骤,因此可以显著简化分析流程,缩短分析时间,已成为体外快速诊断领域发展的趋势性方法。

目前在免疫层析试纸条中应用最为广泛的是胶体金免疫层析技术 (gold immunochromatographic assay, GICA)^[13-16]。该技术具有操作简单快速、结果容易判定、安全无污染等优点。GICA 的基本原理是以硝酸纤维素膜为固相载体,以胶体金作为示踪标记物来标记抗体,在反应膜毛细管作用下,基于抗原抗体的特异性反应和胶体金特有的颜色对金标抗体与抗原的免疫结合进行示踪,显示肉眼可见的红色条带,从而实现对待测物的现场快速检测。

根据胶体金标记目标物的不同通常可分为夹心法和竞争法。夹心法主要针对大分子待测物,而对于小分子待测物因其分子量比较小,空间结构简单,一般采用竞争法。

在夹心法中,当检测线和质控线均出现肉眼可见的色带

时,表明结果判读为阳性。仅质控线出现肉眼可见的色带,则结果判读为阴性。在竞争法中,结果判读与之相反。值得说明的是无论哪种分析类型,若质控线未出现肉眼可见的色带,则表明试纸条变质失效。

胶体金免疫层析试纸条在转基因成分检测中发挥了日益重要的作用。如美国检测 StarLink 玉米中的 Cry9C 蛋白的试纸条已成为美国官方的检测方法。在国内,由中国农业科学院油料作物研究所研制的 Cry1Ab/Ac 蛋白检测试纸条等产品已经量化生产并得到农业部的推荐使用。

此外,Kumar 等合成营养期杀虫蛋白(Vip)的重组抗原,并制备相应的抗体,将胶体金标记抗体作为信号探针,继而制备免疫层析试纸条。该方法基本无交叉干扰,可实现快速、灵敏、特异的转基因检测^[17]。

免疫层析试纸条是一种快速简便的定性检测方法,将试纸条放在待测样品抽提物中,5~10 min 就可得出结果,不需要特殊仪器和熟练技能。转基因蛋白快速检测试纸条的成功研制,为转基因作物的筛查和监管提供了有力的技术支持平台。这类试纸条非常适用于可以强表达外源蛋白的 Cry1Ab/Ac、CP4 EPSPS 和 bar 等基因的快速筛查。按照合适的采样步骤,免疫层析试纸条可以在给定的一批样品中以 99% 的置信水平检测出少于 0.15% 的转基因成分。

但是目前大多数商业化的转基因蛋白试纸条只能检测 1 种蛋白质,并且无法有效地检测外源蛋白发生降解或者结构改变的深加工的转基因产品等。同时蛋白检测试纸条只能检测有无外源蛋白存在而不能识别不表达蛋白的特异转化元件,以及区分具体的转基因品种。

2.2 核酸试纸条法

核酸试纸条是将聚合酶链反应与试纸条技术结合而发展的一种分析方法^[18-19]。

核酸试纸条的基本原理通常是利用一对分别修饰有荧光素和生物素的特异性引物扩增待测核酸。扩增产物无需纯化,加入试纸条后,在毛细管作用下向前迁移。当有扩增产物存在时,一端修饰有生物素的扩增产物首先与结合垫上标记链霉素和素的示踪分子结合,继而被捕获在固定有荧光素抗体的检测线上,产生示踪分子的颜色条带。无论扩增产物存在与否,修饰有亲和素的示踪分子都会被固定在质控线上的生物素所捕获,以完成对核酸试纸条的质控。

核酸试纸条技术在转基因检测方面已经有了成功的报道。如 Kalogiani 等首次构建了基于胶体金作为示踪标记物的核酸试纸条,用于检测转基因大豆中特异转化元件 CaMV35s 和 NOS。该方法灵敏度高、操作简单、检测快速、结果能够用肉眼判读、无需特殊检测仪器^[20]。

最近,Cheng 等利用 DNA 酶增强的胶体金作为示踪物质,建立基于多标记环介导等温扩增技术的多组分核酸试纸条,用于检测多个转化事件堆积的转基因大豆(DP305423 × GTS 40-3-2)。该方法能够灵敏、特异、简单、快速地实现具有复合性状的转基因作物的现场检测^[21]。

核酸试纸条可以不依赖较为繁琐耗时的电泳检测技术或者较为昂贵的荧光检测仪,能够大大缩短核酸扩增产物的检测时间,降低分析成本,并能准确识别特异性转化元件,尤其适用于深加工的转基因产品或者具有复合性状的转基因产品

的快速检测。但是由于修饰的特异性引物在扩增过程中会产生引物间二聚体,因此会导致核酸试纸条出现假阳性现象。同时扩增产物易受到交叉污染,因此核酸试纸条常需要配置防污染封闭式装置,从而提高了试纸条成本。

3 转基因生物传感器检测

生物传感器(biosensor)是生物、化学、物理、电子信息技术等多种学科互相渗透而发展的一种高新技术^[22-24]。生物传感器由生物敏感膜和理化换能器组成,其基本原理是分析物扩散进入固定化生物敏感膜层,经分子识别,发生生物学反应产生响应信号,该信号继而由相应的理化换能器转变成可处理的光电信号,再经检测放大器放大并输出,从而实现对待测分析物的检测。生物敏感膜又称分子识别元件,是生物传感器的关键元件,可以由酶、抗体、抗原、微生物、细胞、组织和核酸等生物活性物质组成。换能器又称信号转换元件,其作用是将各种生化和物理的信息转换成光电信号,通常包括电化学电极、光敏元件、热敏元件、半导体和压电装置等。

根据使用的识别元件的不同,生物传感器可分为酶传感器、免疫传感器、微生物传感器、细胞生物传感器和组织生物传感器等。根据信号转化方式的不同又可分为电化学生物传感器、光学生物传感器、热生物传感器、压电生物传感器和磁生物传感器等。

生物传感器具有灵敏度高、选择性好、分析速度快、分析通量高、成本低以及在复杂体系中进行在线连续监测等突出优点。特别是非常容易实现高度自动化、微型化和集成化,使得生物传感器在多个研究领域获得广泛的关注和蓬勃的发展。生物传感器非常适合转基因的现场检测和快速筛查,并已在相关转基因产品研究中取得了突破性进展。

目前,应用于转基因产品检测研究的生物传感器主要有光学生物传感器如表面等离子共振传感器、压电生物传感器如石英晶体微天平传感器、电化学生物传感器等。

Mariotti 等构建了转基因检测表面等离子共振传感器。能够识别 35S 启动子或 NOS 终止子序列的单链 DNA 探针首先被固定在传感器芯片表面,继而与转基因大豆中提取并扩增的目标转基因片段发生杂交反应。通过监控杂交前后信号的变化可以实现简单、特异和快速的转基因检测^[25]。该研究团队同时开发了转基因检测石英晶体微天平传感器。将寡核苷酸探针固定在传感器表面,同时提取并扩增转基因作物的基因组 DNA,再经热变性、磁分离和酶作用获得单链 DNA 片段,通过检测目标 DNA 分子与固定的核酸探针杂交后的信号变化实现转基因成分分析^[26]。

最近,Zhou 等提出了一种电化学传感器,用于检测转基因外源蛋白。在研究中,特异性的纳米抗体作为识别元件并修饰在电极上,通过 $\pi-\pi$ 交联的石墨烯/硫磺复合物作为电化学信号探针并标记纳米二抗。该复合探针不仅可以提供大量的抗体结合位点而且具有高效的电子转移效率,因此能够实现高特异、高灵敏分析^[27]。

然而,由于传感器中生物识别元件具有不稳定性和易变性等缺点,使生物传感器的稳定性和重现性较差。目前大量研究工作还处于针对转基因生物传感器检测方法学的初步建立阶段,离传感器的商业化应用还有较长的距离。

4 基因组 DNA 直接提取法

在核酸分析中,常常涉及一系列操作步骤,包括样品研磨、核酸提取、PCR 扩增、扩增产物的电泳分析或者荧光检测。DNA 提取的方法有很多,如 CTAB 法、核酸提取试剂盒法等。但是这些方法需要繁琐的核酸抽提、沉淀、洗脱等多个步骤以及数个小时的提取时间,并且 CTAB 法需要用到氯仿等有毒试剂,而试剂盒提取成本较高。因此,传统的核酸提取方法不利于大量样品的分析和检测,难以满足建立在核酸分析基础上开展的大规模现场快速检测分析的要求。

为了克服以上技术难题,基因组 DNA 直接提取法(genomic DNA direct-extraction assay)近年来被开发出来。该方法的基本原理是利用 EDTA、表面活性剂、蛋白变性剂以及缓冲液等物质混合成裂解液,在适宜温度下,10 min 内即可一步完成样品中基因组 DNA 的提取,提取的 DNA 无需纯化即可直接作为 PCR 模板进行有效扩增。与已有的 DNA 提取方法相比,该直接提取法可大大缩短 DNA 提取时间,减少操作的繁琐性,实现核酸分析法的快速检测和大量筛查。

基因组 DNA 直接提取法已成功应用于动物组织 DNA 提取、植物侵染病毒检测以及病原菌监测等领域。目前,该方法也开始应用于转基因检测,如中国农业科学院油料作物研究所研制的转基因直扩检测试剂盒等。

然而这类直接快速提取试剂盒在 DNA 纯度、分析灵敏度等方面要逊色于传统的核酸提取方法。转基因直扩试剂盒能够检测大部分研磨后的转基因作物种子和叶片样品,但是对于含油脂较多的油菜等样品,其分析性能需要进一步提高。

5 核酸等温扩增技术

核酸等温扩增技术(nucleic acid isothermal amplification)是能在某一特定的温度下扩增特定的 DNA 或者 RNA 的一类分子生物学技术的总称。与 PCR 技术相比,核酸等温扩增对仪器的要求大大简化,反应时间大大缩短,更能满足快速简便检测的需求。

核酸等温扩增可分为环介导等温扩增技术(LAMP),依赖于核酸序列的扩增技术(NASBA),滚环扩增技术(RCA),单引物等温扩增技术(SPIA),依赖于解旋酶的等温扩增技术(HAD),链替代扩增技术(SDA),快速等温检测放大技术(RIDA),切割内切酶核酸恒温扩增技术(NEMA)。

应用较为广泛的是 LAMP 技术^[28-31]。该技术的基本原理是利用 2 对特殊设计的引物和具有链置换活性的 DNA 聚合酶,使反应中在模板两端引物结合处循环出现环状单链结构,从而保证引物可以在等温条件下顺利与模板结合,并进行链置换扩增反应。扩增产物可以通过荧光定量 PCR 仪或者利用核酸扩增过程中产生的焦磷酸镁沉淀反应用浊度仪进行检测。

LAMP 核酸扩增在等温条件下进行,不需要预先的双链 DNA 热变性、温度循环,同时使用 4 种特异性引物,产物检测用肉眼即可判定,因此具有操作简单、快速高效、特异性高、灵敏度高等特点。

LAMP 技术已经越来越多地被用于核酸分析,包括病原菌监测、基因型分析和转基因检测。最近,Shen 等建立了 1

种快速可视化检测转基因抗虫水稻和棉花中 *CryIA* 基因的环介导等温扩增方法。该 LAMP 分析在能够识别 *CryIA* 基因序列的 6 个区域的 4 种特异性引物的存在,在 65 °C 恒温条件下,1 h 内即可以完成扩增。该方法的灵敏度可以达到 0.01%,比传统的 PCR 方法提高了 10 倍^[32]。

Shao 等设计了 1 种基于 LAMP 技术的毛细管阵列平台,可简单、快速、可视化地同时检测多组分转基因靶基因。在所开发的微阵列中,LAMP 引物被预先固定在毛细管内壁。LAMP 反应混合物装载至微阵列后能够自行分离到每根毛细管中,继而平行发生等温扩增,扩增产物可以在手持 UV 装置的照射下进行可视化检测。该方法已经成功地实现 4 种常见转基因特异转化元件和 5 种不同转基因作物的检测,具有较为广阔的应用前景^[33]。

值得注意的是 LAMP 是一种链置换扩增反应,要求合适长度的靶基因序列,当靶序列长度大于 500 bp 时较难扩增,故不能进行长链 DNA 的扩增。该方法灵敏度较高,但是容易污染而产生假阳性结果。LAMP 技术需要多种特异性引物,这些引物设计较为复杂。

6 结论与展望

目前常用的转基因作物快速检测方法是基于外源蛋白或者外源基因检测的分析方法。基于蛋白质的分析方法无需较为繁琐的样品前处理和较为昂贵的检测仪器,尤其是免清洗的免疫层析试纸条技术,能够显著缩短分析时间,非常适合转基因作物的田间地头的快速筛查。但是对于不表达外源蛋白的一些外源基因,如 *CaMV35s*、*NOS* 等转化元件,传统的蛋白快速检测试纸条无法完成有效检测,需要构建基于核酸分析的快速检测方法,对目前已有的转基因蛋白质快速检测方法做有效补充,从而构建完整的转基因快速检测体系,以有效支撑转基因相关产业发展和管理。

在转基因 PCR 分析中,需要繁琐耗时的核酸提取步骤,同时扩增产物的检测高度依赖较昂贵的荧光检测仪器或者较复杂的电泳检测技术,这些方面显著限制了 PCR 方法的现场快速简便检测。近年来发展的基因组 DNA 直接提取法,可以在几分钟内一步完成转基因作物粉末样品中 DNA 的提取,大大缩短核酸的提取时间,但是其分析适用性有待进一步提高。另一项技术 LAMP 技术对仪器要求不高且结果可视,但是对引物设计的要求很高。

随着转基因作物品系的不断增加,现有的常规检测方法已不能满足灵敏、快速、定量及高通量的要求,从而对转基因检测技术提出了更高的要求。如何将各种已有的检测技术结合起来,建立高效、快速、简便及低成本的检测方法,将成为今后转基因快速检测技术研究的发展趋势。近年来兴起的转基因生物传感器检测,有望实现转基因高度自动化、微型化和集成化检测;同时,具有大规模、高通量、高灵敏等优势质谱技术有望解决转基因蛋白准确定量比较的难题,这些方法是转基因快速检测技术今后发展的方向。以具有产业化应用前景的转基因新品系和带有复合性状的转基因作物为研究对象,探索免疫层析试纸条同时检测多种转基因成分的方法和条件,实现高通量转基因检测的目的,提高检测效率,是现今转基因快速检测技术亟待解决的重点技术问题。

参考文献:

- [1] Deisingh A K, Badrie N. Detection approaches for genetically modified organisms in foods[J]. Food Research International, 2005, 38(6): 639–649.
- [2] 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 and Technology, 2002, 214(1): 3–26.
- [3] 姚文国, 朱水芳. 转基因食品检验分析技术概述[J]. 粮油食品科技, 2003, 11(1): 26–28.
- [4] 杨铭铎, 张春梅, 华庆, 等. 转基因食品快速检测技术的研究进展[J]. 食品科学, 2004, 25(11): 424–427.
- [5] 国际农业生物技术应用服务组织. 2016 年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势[J]. 中国生物工程杂志, 2017, 37(4): 1–8.
- [6] 中华人民共和国农业部. 农业转基因生物标识管理办法[Z]. 北京: 中华人民共和国农业部, 2002.
- [7] Xu W, Huang K, Deng A, et al. Enzyme linked immunosorbent assay for PAT protein detection in genetically modified rape[J]. Chinese Journal of Agricultural Biotechnology, 2006, 3: 177–181.
- [8] Tan G Y, Nan T G, Gao W, et al. Development of monoclonal Antibody – Based sensitive sandwich ELISA for the detection of antinutritional factor cowpea trypsin inhibitor[J]. Food Analytical Methods, 2013, 6(2): 614–620.
- [9] Zou Z X, Du D, Wang J, et al. Quantum dot – based immunochromatographic fluorescent biosensor for biomonitoring trichloropyridinol, a biomarker of exposure to chlorpyrifos [J]. Analytical Chemistry, 2010, 82(12): 5125–5133.
- [10] Du D, Wang J, Wang L M, et al. Integrated lateral flow test strip with electrochemical sensor for quantification of phosphorylated cholinesterase; biomarker of exposure to organophosphorus agents [J]. Analytical Chemistry, 2012, 84(3): 1380–1385.
- [11] Liu C Y, Jia Q J, Yang C H, et al. Lateral flow immunochromatographic assay for sensitive pesticide detection by using Fe₃O₄ nanoparticle aggregates as color reagents [J]. Analytical Chemistry, 2011, 83(17): 6778–6784.
- [12] Lin Y Y, Wang J, Liu G D, et al. A nanoparticle label/ immunochromatographic electrochemical biosensor for rapid and sensitive detection of prostate – specific antigen[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2008, 23(11): 1659–1665.
- [13] Xu Y, Huang Z B, He Q H, et al. Development of an immunochromatographic strip test for the rapid detection of deoxynivalenol in wheat and maize[J]. Food Chemistry, 2010, 119(2): 834–839.
- [14] Tang Y, Zhai Y F, Xiang J J, et al. Colloidal gold probe – based immunochromatographic assay for the rapid detection of lead ions in water samples[J]. Environmental Pollution, 2010, 158(6): 2074–2077.
- [15] Zhou S H, Cui S J, Chen C M, et al. Development and validation of an immunogold chromatographic test for on – farm detection of PRRSV [J]. Journal of Virological Methods, 2009, 160(1/2): 178–184.
- [16] van den Bulcke M, de Schrijver A, de Bernardi D, et al. Detection of genetically modified plant products by protein strip testing: an evaluation of real – life samples[J]. European Food Research and Technology, 2007, 225(1): 49–57.
- [17] Kumar R, Singh C K, Kamle S, et al. Development of nanocolloidal gold based immunochromatographic assay for rapid detection of transgenic vegetative insecticidal protein in genetically modified crops[J]. Food Chemistry, 2010, 122: 1298–1303.
- [18] Takalkar S, Baryeh K, Liu Guodong. Fluorescent carbon nanoparticle – based lateral flow biosensor for ultrasensitive detection of DNA[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2017, 98: 147–154.
- [19] Liu W J, Zhang M F, Liu X Y, et al. A Point – of – Need infrared mediated PCR platform with compatible lateral flow strip for HPV detection[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2017, 96: 213–219.
- [20] Kalogianni D P, Koraki T, Christopoulos T K, et al. Nanoparticle – based DNA biosensor for visual detection of genetically modified organisms[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2006, 21(7): 1069–1076.
- [21] Cheng N, Shang Y, Xu Y C, et al. On – site detection of stacked genetically modified soybean based on event – specific TM – LAMP and a DNAzyme – lateral flow biosensor [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2017, 91: 408–416.
- [22] Huang L, Zheng L, Chen Y J, et al. A novel GMO biosensor for rapid ultrasensitive and simultaneous detection of multiple DNA components in GMO products [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2015, 66: 431–437.
- [23] Kalogianni D P, Koraki T, Christopoulos T K, et al. Nanoparticle – based DNA biosensor for visual detection of genetically modified organisms[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2006, 21(7): 1069–1076.
- [24] Li Y Q, 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.
- [25] Mariotti E, Minunni M, Mascini M. Surface plasmon resonance biosensor for genetically modified organisms detection[J]. Analytica Chimica Acta, 2002, 453(2): 165–172.
- [26] Mannelli I, Minunni M, Tombelli S, et al. Quartz crystal microbalance (QCM) affinity biosensor for genetically modified organisms (GMOs) detection [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2003, 18(2/3): 129–140.
- [27] Zhou Q, Li G H, Zhang Y J, et al. Highly selective and sensitive electrochemical immunoassay of cry1C using nanobody and $\pi - \pi$ stacked graphene oxide/thionine assembly [J]. Analytical Chemistry, 2016, 88(19): 9830–9836.
- [28] Zhang M, Liu Y N, Chen L L, et al. One simple DNA extraction device and its combination with modified visual loop – mediated isothermal amplification for rapid on – field detection of genetically modified organisms[J]. Analytical Chemistry, 2013, 85(1): 75–82.
- [29] Zhen Z, Zhang M H, Yu Y B, et al. Establishment of a loop – mediated isothermal amplification (LAMP) detection method for genetically modified maize MON88017 [J]. European Food Research and Technology, 2016, 242(10): 1787–1793.
- [30] Wang C, Li R, Quan S, et al. GMO detection in food and feed through screening by visual loop – mediated isothermal amplification assays[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2015, 407(16): 4829–4834.
- [31] Huang X, Chen L L, Xu J M, et al. Rapid visual detection of phytase gene in genetically modified maize using loop – mediated isothermal amplification method[J]. Food Chemistry, 2014, 156: 184–189.
- [32] Shao N, Chen J W, Hu J Y, et al. Visual detection of multiple genetically modified organisms in a capillary array [J]. Lab on a Chip, 2017, 17(3): 521–529.
- [33] Shen P L, Geng F Z, Yu Y, et al. A rapid loop – mediated isothermal amplification method for detection of the modified GM cry1A gene in transgenic insect – resistant cotton and rice[J]. Food Control, 2016, 62: 357–364.