

李夏莹,刘鹏程,梁晋刚,等. 非授权转基因作物检测方法[J]. 江苏农业科学,2019,47(11):82-85.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.11.017

非授权转基因作物检测方法

李夏莹, 刘鹏程, 梁晋刚, 王颢潜, 张旭冬, 张秀杰
(农业农村部科技发展中心, 北京 100176)

摘要:目前的转基因生物(GMOs)检测流程在检测非授权转基因生物方面存在很大的局限。基于下一代测序(NGS)技术提出了一个新的工作程序,来克服存在的问题。利用下一代测序技术高通量获取 DNA 的序列信息,可以区分授权和非授权的 GMOs。考虑新检测流程在官方实验室的可操作性,还讨论了这一创新流程的局限性及其随时间推移的可持续性。

关键词:非授权转基因生物;创新方法;下一代测序技术;全基因组测序;DNA 步移法;NGS 诱捕方法

中图分类号: S188 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)11-0082-04

为了保证食品和饲料链安全、可追溯以及消费者的选择自由,世界上的一些国家已开始为转基因生物立法。大多数转基因的法律框架,目的是规范食品和饲料链中转基因生物(GMOs)的引入。为了获得官方转基因授权,申请者必须对转基因生物进行一对一的环境风险分析,提供准确的使用、保存、标识信息。然而,有些立法要求在不同的国家是有差异的,如标识阈值(0.9%~5%)。未经授权的 GMOs 指的是 GMOs 释放到某一国家的市场,但没有经过事先的授权。

市场上可能发现 2 种主要的未经授权的转基因生物。第一种情况是非同步审批,转基因生物在一些国家已经得到批准(如美国、加拿大、日本),但在其他国家(如欧盟)还没有被批准,或者批准时限已经过期,没有继续申请^[1]。这类 GMOs 被认为是安全的,因为利用官方实验室发布的转化体特异性检测方法可以对其进行监测的。相比之下,另一种情况更应该引起关注,即偶然或故意导致未经许可的 GMOs 在市场上出现。比如从实验室或现场试验释放出来的转基因产品(例如 BT10 玉米、601 水稻、Bt63 水稻、PRSV 木瓜、mon71800 小麦等)^[2]。这一类型的非授权 GMOs 通常在任何国家都没有得到任何监管机构的批准,所以它们可以被认为是不安全的和未知的。此外,这一类 GMOs 通常没有建立特异性的检测方法来确定它们在食品和饲料中的可追溯性。本研究所讨论的未经授权的转基因生物特指第 2 类未经批准的转基因生物。

许多国家对非授权 GMOs 管理实行零容忍政策(比如欧盟和日本)或阈值管理政策(比如俄罗斯、韩国和瑞士)。不同于授权的 GMOs 转基因作物,一个未经授权批准的 GMOs 的主要问题是主管机关,如欧盟的欧洲食品安全局(EFSA)没有评估 GMOs 及其衍生产品的生物安全性。此外,官方实验

室很少制定针对此类 GMOs 的检测方法(比如 T35S pCambia, gat - tpinll, RYK 木瓜和黄金大米 2)^[3-16]。因此,检测非授权 GMOs 的高通量方法是保证 GMOs 在食品和饲料链安全可追溯性的关键。

欧盟官方实验室目前使用的检测方法是针对欧盟授权 GMOs 的实时定量 PCR(qPCR)。首先,转基因生物构建时常用的元件 p35S 和 tNOS 可以覆盖大多数的 GMOs。筛选步骤针对的是特异性的标记物,能够鉴别不同的 GMOs,筛选标记物的组合在官方实验室中各不相同。鉴于大多数筛选元件来自于自然界,检测结果只能表明测试样本中 GMOs 的潜在存在。在许多国家如欧盟列出授权 GMOs 清单,根据转化体特异性的检测方法明确是否存在 GMOs。但是,目前定量筛查的工作程序中不包含转化体特异性检测方法^[3-5,9,11,16-18]。此外,由于非授权 GMOs 和授权 GMOs 含有相同的转化元件,通过 qPCR 筛查检测确定 GMOs 可能会遗漏可能存在的非授权的 GMOs。例如,含有 p35S 和 tNOS 的 GTS-40-3-2 大豆,这 2 个元件是 GMOs 中最常见的,如果筛查这 2 个元件很难鉴别出授权和非授权的 GMOs。因此,目前的转基因检测系统在检测非授权的转基因作物方面存在很高的错误率。

为了克服以上问题,借助下一代测序(NGS)技术可以尝试新的 GMOs 检测工作程序(图 1、图 2、图 3)^[3,19-20]。

1 下一代测序(NGS)

NGS 允许大量样本的并行 DNA 测序,这和后续的生物信息学分析是不同的,生物信息学分析依赖于 DNA 文库^[21]。此外,NGS 也不同于传统的 Sanger 技术,NGS 可以实现高通量的检测,同时会减少基因克隆技术的使用^[22]。目前,有 2 种主要的 NGS 策略可用于 GMOs 的检测。

1.1 全基因组测序(WGS)

WGS 适用于序列信息未知的样本,因此称为无目标 NGS。WGS 最近有很多在 GMOs 分子特征描述方面取代 Southern blot 的成功案例,比如转基因大豆 MON17903 和 MON87704,转基因水稻 LLRICE62、TT51-1 和 T1c-19^[21,23-26]。

收稿日期:2018-02-24

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。

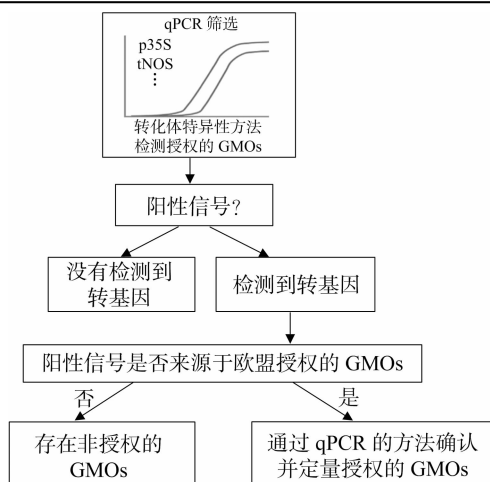


图1 目前转基因生物检测流程

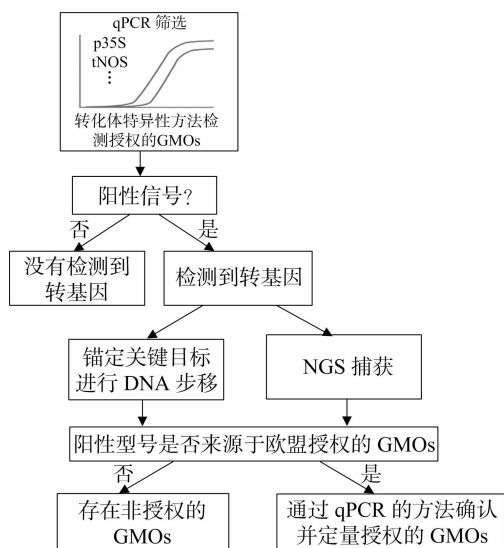


图2 转基因生物检测新流程(NGS)

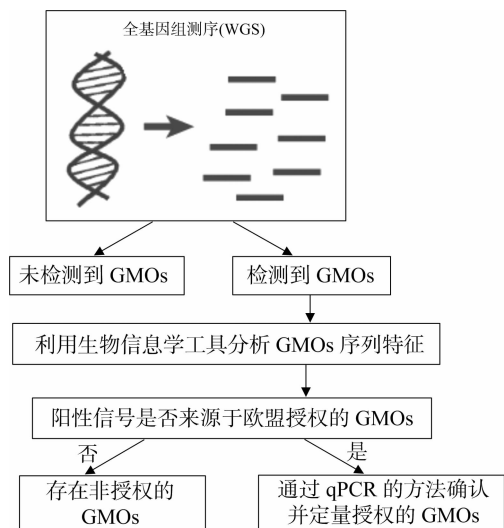


图3 转基因生物检测新流程(WGS)

助特异性探针的杂交(磁性小球或芯片),分离的目的片段用于确认是否是授权的 GMOs^[3,21]。

根据 NGS 平台的不同,后续使用的生物信息学分析方法不同。在 Illumina 平台,随机剪切特定大小的 DNA 片段用于建立 DNA 文库(200 ~ 500 bp),用于筛选特定片段的 DNA (100、125、150、300 bp)。为明确外源插入的元件和目的基因旁侧序列,以证明检测样本中 GMOs 的存在。对产生短片段从头测序之后,与筛选片段进行比较,找到重叠区域。利用 Pacific Biosciences 或 Oxford Nanopore,不需要从头测序,因为这项技术可以处理基因库(不同大小的 DNA 片段),也可以处理长的 DNA 片段(60 kbp 或 200 kbp),不需要从 DNA 文库中分离 NGS 的目标片段^[3,21-27]。

2 非授权 GMOs 检测方法

为了更广泛地检测 GMOs 是否是欧盟授权,qPCR 筛选分析只能作为一个最初的步骤。针对转基因筛选元件的分析存在很大的局限,因为筛选可能同时存在授权和非授权的 GMOs 中,比如 p35S、tNOS、t35S pCambia。检测 t35S pCambia 可以在一定范围内检测出样本中欧盟非授权 GMOs 的存在,因为这个元件在授权 GMOs 中不存在,但在非授权 GMOs 中的存在概率是 30%。使用特异性标记物检测非授权 GMOs 是非常有必要的,遗憾的是,没有发现任何筛选元件可以完全覆盖非授权 GMOs。检测 p35S、tNOS 等通用元件很难判断非授权 GMOs 的存在,因为这些元件在 GMOs 中是普遍存在的,与是否授权无关^[28]。

通过 qPCR 筛选,如果关键的转基因元件出现阳性信号,就要获取筛选元件旁侧序列信息。这些序列信息会与欧盟已经授权的 GMOs 进行对比,以确认样本中是否含有非授权的 GMOs,目前有 2 种 NGS 策略可以实现该目标。

2.1 DNA 步移法

锚定在检测转基因元件的 DNA 步移法,通过 NGS 方法对 PCR 终产物进行测序,锚定在 p35S、tNOS、t35S pCambia 和 VIP3A 上的 DNA 步移法,已经成功应用于 GMOs 检测中。包括痕量水平的 GMOs、GMOs 加工品等^[13]。在 NGS 平台中,可考虑 2 种 NGS 方法。一是 Illumina 系统,可以产生数以百万计的小片段(例如 100 ~ 300 bp);二是利用 Pacific Biosciences 或 Oxford Nanopore,这项技术可以处理基因库(不同大小的 DNA 片段),可以处理长的 DNA 片段(60 kbp 或 200 kbp),应用这种方法,生物信息学分析的复杂度会显著降低,因为整个序列的信息会被直接获取,而不需要重新将小片段重组为长片段。第 2 种 NGS 的特点对于混合有多个含有相同元件的 GMOs 的样品很有优势。此外,最近有试验数据表明,DNA 步移法结合 Pacific Biosciences 在食品和饲料市场被广泛应用^[29]。但是,考虑到成本的问题,更为经济的 NGS Illumina 平台将会是一个好的选择^[30]。然而,在常规转基因分析中使用不同的转基因样品需要额外的支持实验数据。更重要的是,成功地应用该项技术依赖于数据库,数据库应包含欧盟授权的 GMOs 的转化元件以及旁侧序列,但是目前还没有这样的数据库。因此,开发一个尽可能完整的数据库是最重要的。然而,某些 GMOs 序列的机密性可能会使数据库的可访问性变得更加复杂。

1.2 针对目标片段的 NGS

该方法适用于对目的片段有一定了解的样本,因此,被称为有目标 NGS。目的片段的分离可以通过 PCR 扩增或者借

2.2 NGS 诱捕方法

NGS 诱捕方法通过特定的杂交探针来捕获 GMOs 中常见的元件^[31-34]。然而,据笔者所知,该方法除了在比利时主管当局资助的一项研究项目内进行了初步的试验外还未被广泛应用。然而,无论是否有一些令人鼓舞的结果,试验和数据分析仍然需要通过官方实验室进行优化。

杂交探针用于未经授权的转基因生物的筛选,必须考虑 2 个重要方面。首先,使用针对未获授权的转基因生物的杂交探针依赖于探针序列的可用性,必须保证捕获的 DNA 片段足够长(至少 > 500 bp),才便于了解目的片段的旁侧序列^[35]。即使 NGS 捕获方法可以单独执行,仍建议使用 qPCR 筛选以提高其有效性,保证快速而廉价地检测到 GMOs。然而,考虑到 qPCR 筛选的限制,qPCR 标记物应是在 GMOs 中广泛存在的(如 p35S 和 tNOS)。对于后续的 NGS 诱捕分析,杂交探针的设置应至少包括 qPCR 筛选为阳性的元件。

考虑到欧盟非授权的 GMOs 可能含有 qPCR 筛选不到的转化元件,NGS 全基因组测序可能更方便,因为前期不需要任何信息^[20,36-38]。然而,尽管这种方法可以用于样本中 GMOs 含量为 100% 和 10%,但是对于痕量的 GMOs 或者 GMOs 的混合物还是不适用^[36]。例如,有研究数据表明,确认转基因大豆含量为 0.1% 的样本,从理论上说,须要产生 450 亿的配对读数,对应的是使用 Illumina HiSeq 系统运行大约 20 次。此外,生物信息学分析对专业知识的要求也很高^[20,36]。因此,须要开发便于官方实验室使用的分析工具。在这些不方便的情况下,WGS 方法代表了一种很有前途的策略,可以在市场上监控转基因生物,包括在 GMOs 常规分析中所遇到的大多数样品,是没有任何关于目标序列的背景信息的。

3 结束语和展望

新的工作流程有望改进目前针对非授权 GMOs 的检测流程,工作流程有 2 个主要的优点:一是该检测流程有助于官方实验室更好地检测非授权 GMOs。序列信息被确认的欧盟非授权 GMOs 可以在前期的 qPCR 筛选中被覆盖。另一方面,NGS 技术的高通量性能可以大幅度增加每次测试的样本数量。通过这种方式,检测市场产品中非授权 GMOs 是可以负担得起的,这与目前的转基因检测系统不一样。

目前,生物技术作物可以通过基因编辑技术研发,但欧盟主管部门还未确定这些生物的监管方法,美国、澳大利亚、新西兰、阿根廷等国提出使用新的工作程序来监控此类生物。可考虑通过 WGS 去检测 qPCR 筛选不到的欧盟非授权 GMOs,如基因组发生了很小的修饰(比如改变 1 个或几个碱基对)的 GMOs。最近通过使用 CRISPR/Cas9 方法获得了抗褐变白蘑菇、耐除草剂玉米以及抗猪繁殖和呼吸综合征病毒的猪;2016 年初,美国主管部门裁定,通过该技术获得的菌菇不受美国农业部法规的约束^[39-44]。

因此,由于新检测程序的众多优点,它可以灵活应用于转基因生物和新技术研发的生物。在欧盟,常规的转基因检测主要用于评估食品链和饲用链中欧盟授权的转基因食品标识的正确性。然而,考虑到公众健康和消费者的自由选择权,检测非授权的 GMOs 应具有更高的优先权,因为非授权 GMOs

没有经过权威机构的生物安全评估,对人、动物的健康以及环境存在潜在的风险。因此,应该尽更大的精力研究非授权 GMOs,在欧盟当局和世界范围内认真讨论这个问题是很重要的。欧盟的主管部门已将非授权 GMOs 的检测作为重点工作,已经发布的“Decision 2013/287/EU”建立了检测食用链和饲用链中非授权转基因水稻的检测方法。此外,允许食用链和饲用链中非授权 GMOs 检测信息快速交流的食品和饲料快速警报系统(RASFF)也在欧盟被广泛应用^[5,19]。

这些创新的工作程序很有可能在未来的几年变成现实。然而,在官方实验室推广使用这项技术存在难度。因为大多数官方实验室都是使用 qPCR 的方法,一些新技术比如 NGS 须要投入专业的人才和计算机设备^[19-20,45],预计创新的检测程序只能在少数具有代表性的官方实验室执行。

参考文献:

- [1] ISAAA. Global status of commercialized Biotech/GM crops; 2016 [J]. ISAAA Brief, 2016(52): 1-15.
- [2] Price B, Cotter J. The GM contamination register: a review of recorded contamination incidents associated with genetically modified organisms (GMOs), 1997—2013 [J]. International Journal of Food Contamination, 2014, 1: 5.
- [3] Fraiture M A, Herman P, Taverniers I, et al. Current and new approaches in GMO detection: challenges and solutions [J]. BioMed Research International, 2015, 14(2): 392867-392872.
- [4] Broeders S, Keersmaecker S, Roosens N, et al. al how to deal with the upcoming challenges in GMO detection in food and feed [J]. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2012, 12(1): 402410-402418.
- [5] Busch U, Pecoraro S, Posthoff K, et al. Detecting un - authorized genetically modified organisms (GMOs) and derived materials [J]. Biotechnology Advances, 2012, 30(3): 1318-1335.
- [6] Devos Y, Aguilera J, Diveki Z, et al. EFSA's scientific activities and achievements on the risk assessment of genetically modified organisms (GMOs) during its first decade of existence: looking back and ahead [J]. Transgenic Research, 2014, 23(1): 1-25.
- [7] de Faria R N, Wieck C. Regulatory differences in the approval of GMOs: extent and development over time [J]. World Trade Review, 2016, 15(3): 85-108.
- [8] Yang Y T, Chen B. Governing GMOs in the USA: science, law and public health [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2016, 96(2): 1851-1855.
- [9] Randhawa G, Singh M, Sood P. DNA - based methods for detection of genetically modified events in food and supply chain [J]. Current Science, 2016, 110(5): 1000-1009.
- [10] Rosa S F, Gatto F, Angers - Loustau A, et al. Development and applicability of a ready - to - use PCR system for GMO screening [J]. Food Chemistry, 2016, 201: 110-119.
- [11] Milavec M, Dobnik D, Yang L T, et al. GMO quantification: valuable experience and insights for the future [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014, 406(26): 6485-6497.
- [12] Nakamura K. Identification and detection method for genetically modified papaya resistant to papaya rings pot virus YK strain [J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2011, 34(3): 1648-1651.
- [13] Fraiture M A, Herman P, Taverniers I, et al. An innovative and integrated approach based on DNA walking to identify unauthorised

- GMOs[J]. Food Chemistry, 2014, 147(3): 60–69.
- [14] Punt M, Ebata A, Wesseler J, et al. For the approval process of GMOs; the Japanese case[J]. Ag Bio Forum, 2013, 16(5): 140–160.
 - [15] 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.
 - [16] Broeders S, Fraiture M A, Vandermassen E, et al. New qualitative trait – specific SYBRGreen qPCR methods to expand the panel of GMO screening methods used in the CoSYPS[J]. European Food Research and Technology, 2015, 241(3): 275–287.
 - [17] Wu Y H, Wang Y L, Li J, et al. Development of a general method for detection and quantification of the p35S promoter based on assessment of existing methods[J]. Scientific Reports, 2014, 4(5): 7358–7369.
 - [18] Angersloustau A, Petrillo M, Bonfini L, et al. JRC GMO – Matrix: a web application to support genetically modified organisms detection strategies[J]. BMC Bioinformatics, 2014, 15(8): 417–435.
 - [19] Arulandhu A J, van Dijk J P, Dobnik D A, et al. DNA enrichment approaches to identify unauthorized genetically modified organisms (GMOs) [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2016, 408(17): 4575–4593.
 - [20] Arne H J, Bjørn S, Arulandhu A J, et al. Application of whole genome shotgun sequencing for detection and characterization of genetically modified organisms and derived products[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2016, 408(8): 4595–4614.
 - [21] Buermans H P, den Dunnen J T. Next generation sequencing technology: advances and applications[J]. Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease, 2014, 1842(6): 1932–1941.
 - [22] Escalona M, Rocha S, Posada D. A comparison of tools for the simulation of genomic next – generation sequencing data[J]. Nature Reviews Genetics, 2016, 17(8): 459–469.
 - [23] Yang L T, Wang C M, Holst – Jensen A, et al. Characterization of GM events by insert knowledge adapted re – sequencing approaches [J]. Scientific Reports, 2013, 3(5): 2839–2855.
 - [24] Kovalic D, Garnaat C, Guo L, et al. The use of next generation sequencing and junction sequence analysis bioinformatics to achieve molecular characterization of crops improved through modern biotechnology[J]. The Plant Genome, 2012, 5(3): 149–163.
 - [25] Wahler D, Schauser L, Bendiek J, et al. Next – generation sequencing as a tool for detailed molecular characterisation of genomic insertions and flanking regions in genetically modified plants: a pilot study using a rice event unauthorised in the EU[J]. Food Analytical Methods, 2013, 6(6): 1718–1727.
 - [26] Young L, Hammerlindl J, Babic V, et al. Genetucs, structure, and prevalence of FP967 (CDC triffid) T – DNA in flix [J]. SpringerPlus, 2015, 4(1): 146–158.
 - [27] Schatz M C, Witkowski J, McCombie W R. Current challenges in de novo plant genome sequencing and assembly[J]. Genome Biology, 2012, 13(4): 243–266.
 - [28] Fraiture M A, Roosens N, Taverniers I, et al. Biotech rice: current developments and future detection challenges in food and feed chain [J]. Trends in Food Science & Technology, 2016, 52(7): 66–79.
 - [29] Fraiture M A, Herman P, Papazova N, et al. An integrated strategy combining DNA walking and NGS to detect GMO [J]. Food Chemistry, 2017, 232(7): 351–358.
 - [30] Liang C J, van Dijk J P, Scholtens I M, et al. Detecting authorized and unauthorized genetically modified organisms containing vip3A by real – time PCR and next – generation sequencing[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014, 406(11): 2603–2611.
 - [31] Zhou L C, Holliday J A. Targeted enrichment of the black cottonwood (*Populus trichocarpa*) gene space using sequence capture[J]. BMC Genomics, 2012, 13(8): 703–723.
 - [32] Dubose A J, Lichtenstein S T, Narisu N A, et al. Use of microarray hybrid capture and next – generation sequencing to identify the anatomy of a transgene[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(6): 70–86.
 - [33] Clarke W E, Isobel A P, Humberto A G, et al. Genomic DNA enrichment using sequence capture microarrays: a novel approach to discover sequence nucleotide polymorphisms (SNP) in *Brassica napus* L. [J]. PLoS One, 2013, 8(9): 81992–82007.
 - [34] Dasgupta M G, Dharanishanthi V, Agarwal I, et al. Development of genetic markers in eucalyptus species by target enrichment and exome sequencing [J]. PLoS One, 2015, 10(1): e0116528 – e0116541.
 - [35] Dapprich J, Ferriola D, Mackiewicz K, et al. The next Generation of target capture technologies – large DNA fragment enrichment and sequencing determines regional genomic variation of high complexity [J]. BMC Genomics, 2016, 17(6): 486–501.
 - [36] Willems S, Fraiture M A, Deforce D, et al. Statistical framework for detection of genetically modified organisms based on next generation sequencing[J]. Food Chemistry, 2016, 192(7): 788–798.
 - [37] Yang L T, Wang C M, Holst – Jensen A, et al. Characterization of GM events by insert knowledge adapted re – sequencing approaches [J]. Scientific Reports, 2013, 3(6): 2839–2854.
 - [38] Guo B F, Guo Y, Hong H L, et al. Identification of genomic insertion and flanking sequence of G2 – EPSPS and GAT transgenes in soybean using whole genome sequencing method[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7(9): 1009–1023.
 - [39] Lusser M, Parisi C, Plan D, et al. New plant breeding techniques: state – of – the – art and prospects for commercial development[R]. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2011.
 - [40] Waltz E. Gene – edited CRISPR mushroom escapes US regulation [J]. Nature, 2016, 532(7599): 293.
 - [41] Wolt J D, Wang K, Yang B. The regulatory status of genome – edited crops[J]. Plant Biotechnology Journal, 2016, 14(2): 510–518.
 - [42] Svitashv S, Young J K, Schwartz C, et al. Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site – specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA[J]. Plant Physiology, 2015, 169(2): 931–945.
 - [43] Whitworth K M, Rowland R R, Ewen C L, et al. Gene – edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. Nature Biotechnology, 2016, 34(5): 20–22.
 - [44] Araki M, Nojima K, Ishii T. Caution required for handling genome editing technology [J]. Trends in Biotechnology, 2014, 32(5): 234–237.
 - [45] Pauwels K, Keersmaecker S, Schrijver A D, et al. Next – generation sequencing as a tool for the molecular characterization and risk assessment of genetically modified plants: added value or not? [J]. Trends in Food Science & Technology, 2015, 4(9): 4319–326.