

国内外转基因玉米检测方法研究概况

肖 一争, 唐 咏

(1. 沈阳农业大学 生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 根据国内外转基因玉米研究与产业化概况, 分析了转基因玉米及其产品检测的意义。由于国外转基因玉米进入我国, 国内的转基因玉米试验日益增多, 可能会带来一定的生态风险、环境问题以及作为食品加工原料影响人体健康的问题。因此, 加大对转基因玉米及其产品的检测监管非常必要。目前, 国内外转基因玉米及其产品的检测方法很多, 根据转基因玉米检测技术的发展情况, 提出了转基因玉米检测技术的研究趋势。

关键词: 转基因玉米; 检测方法; 研究概况

中图分类号: S513 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2007)05-0005-07

随着转基因技术的日渐成熟, 转基因作物产业化已呈现出较好的势头。转基因作物在给人类带来巨大经济效益和社会效益的同时, 也存在潜在的环境和食用安全风险。由于转基因玉米及其产品对人类健康和生态环境可能存在潜在的不利影响, 在转基因玉米及其产品是否有害没有定论之前, 转基因玉米及其产品的检测是非常重要的。

1 国内外转基因玉米研究与产业化概况

转基因玉米是目前全世界种植最多的 4 种转基因作物之一^[1]。2006 年, 全球转基因玉米种植面积仅次于转基因大豆, 达到 2300 万 hm^2 , 占转基因作物总面积的 22.5%。目前, 国外至少有 40 种转基因玉米已被批准产业化(表 1)。这些品种主要在加拿大、美国和阿根廷等国家通过安全评估并批准释放, 分别用做食品和饲料的原材料。

我国转基因玉米研究进展较快, 分布在山东、吉林、黑龙江、山西、河北和安徽等地, 这些转基因玉米有的已经进入环境释放、中间试验和生产性试验不同阶段, 转移的基因涉及抗虫、抗病和品质改良等(表 2)。

2 转基因玉米及其产品检测技术的发展状况

转基因产品的检测要求快速、准确、灵敏、适应样品量大、目标基因种类繁多等特点。虽然国外对转基因作物检测方法研究已有十几年, 但由于转基

因作物的种类多、数量大, 一些转基因产品经过深加工、各种条件处理与保存后, 转基因成分部分或完全降解, 所以检测难度大。因此, 需要根据科学技术的发展不断更新检测方法。

2.1 基于蛋白质的检测方法

转基因作物中外源蛋白可以利用基于免疫学原理的酶联免疫吸附法(ELISA)、试纸条检测、Western 杂交等方法检测, 主要从待测样品中按照一定的程序抽提含有目的蛋白的基质, 利用抗体与目的蛋白(抗原)特异结合的特性, 通过偶联抗体与抗原抗体复合物的作用产生可检测的信号。

2.1.1 酶联免疫吸附法(ELISA) ELISA 是抗原抗体的免疫反应和酶的高效催化反应有机结合。该方法有 2 个特点, 一是抗原抗体免疫反应在固体表面进行, 二是用酶作为标记物进行蛋白质的测定。转基因作物表达的外源蛋白的抗体与被检测样品中的外源蛋白结合, 再结合酶标抗体或酶标抗抗体, 加入底物后通过酶促反应形成有色物质, 根据颜色的深浅或酶联仪检测的结果判断是否为阳性。例如, 用纯化的 Bt1 杀虫晶体蛋白质作为标准蛋白和免疫抗原, 通过抗体—抗原—酶标抗体反应, 建立了间接酶联免疫吸附测定法, 快速检测转基因玉米中 Bt1 表达蛋白^[2]。

ELISA 检测法直接检测 Bt 杀虫蛋白, 可定量检测, 具有所需样品少, 操作标准, 检测极限高, 可对大量样品检测, 但需要制备特异性高的抗体, 还需要

收稿日期: 2006-12-10

作者简介: 肖一争(1981-), 女, 天津人, 在读硕士研究生, 研究方向: 植物生物化学。

表 1 国外商业化生产的转基因玉米概况

改良性状	转基因玉米种类	插入基因	研发公司
抗虫和耐除草剂特性	MON809	<i>Cry1Ab</i>	Pioneer Hi-Bred International Inc.
	MON802	<i>Cry1Ab</i>	Monsanto Company
	SYN—EV176—9 (176)	<i>Cry1Ab</i>	Syngenta Seeds Inc
	Bt11	<i>Cry1A</i> or <i>pat</i>	Syngenta Seeds Inc
	CBH—351	<i>Cry9C</i> & <i>bar</i>	Aventis CropScience
	DBT418	<i>Cry1Ac</i> & <i>bar</i>	Dekalb Genetics Corporation
	TC1507	<i>Cry1Fa2</i> & <i>pat</i>	Mycogen; Pioneer
	DAS—59122—7	<i>Cry34Ab1</i> & <i>cry35Ab1</i> & <i>pat</i>	DOW AgroSciences LLC
	MON 88017	<i>Cry 3Bb1 gene</i> & <i>cp4 epsps</i>	Monsanto Company
	T25×MON810	<i>Cry1A</i> or <i>pat</i>	Bayer CropScience
	DAS—59122—7×NK603	<i>cry34Ab1/ cry35Ab1</i> & <i>pat</i> & <i>CP4 EPSPS</i>	DOW AgroSciences LLC & Pioneer Hi-Bred International Inc.
	DAS—59122—7×TC1507 ×NK603	<i>cry34Ab1/ cry35Ab1</i> & <i>pat</i> & <i>CP4 EPSPS</i> & <i>cry1F</i>	DOW AgroSciences LLC & Pioneer Hi-Bred International Inc.
	TC1507×NK603	<i>pat</i> & <i>CP4 EPSPS</i> & <i>cry1F</i>	DOW AgroSciences LLC
	NK603×MON810	<i>Cry1Ab</i> & <i>CP4 EPSPS</i>	Monsanto Company
	MON863×NK603	<i>cry3Bb1</i> & <i>CP4 EPSPS</i>	Monsanto Company
	MON863 × MON810 × NK603	<i>cry3Bb1</i> & <i>CP4 EPSPS</i> & <i>Cry1Ab</i>	Monsanto Company
	GA21×MON810	<i>EPSPS</i> & <i>Cry1Ab</i>	Monsanto Company
	MON810×MON88017	<i>cry3Bb1</i> & <i>CP4 EPSPS</i> & <i>Cry1Ab</i>	Monsanto Company
	BT11×GA21	<i>Cry1Ab</i> & <i>pat</i> & <i>EPSPS</i>	Syngenta Seeds Inc
	TC1507×DAS—59122—7	<i>Cry34Ab1/ cry35Ab1</i> & <i>pat</i> & <i>cry1F</i>	DOW AgroSciences LLC & Pioneer Hi-Bred International Inc.
	DAS—59122—7	<i>Cry34Ab1/ cry35Ab1</i> & <i>pat</i>	DOW AgroSciences LLC & Pioneer Hi-Bred International Inc.
	MON80100	<i>CP4 EPSPS</i> & <i>Cry1Ab</i>	Monsanto Company
	MON802	<i>CP4 EPSPS</i> & <i>Cry1Ab</i>	Monsanto Company
	MON809	<i>CP4 EPSPS</i> & <i>Cry1Ab</i>	Pioneer Hi-Bred International Inc.
	CBH—351	<i>Bar</i> & <i>cry9c</i>	Aventis CropScience
	DBT418	<i>Bar</i> & <i>Cry1Ac</i>	Dekalb Genetics Corporation
抗虫特性	TC1507	<i>Cry3Bb1</i>	Monsanto Company
	Bt176	<i>Bar</i> & <i>Cry1Ab</i>	Syngenta Seeds Inc
	MON810	<i>Cry1Ab</i>	Monsanto Company
	MON863	<i>Cry3Bb1</i>	Monsanto Company
	MIR604	<i>mcry3A</i>	Syngenta Seeds Inc
	DK404SR	<i>ACCase</i>	BASF Inc.
	DAS—06275—8 (TC— 6275)	<i>cry1F</i>	DOW AgroSciences LLC
	GA21	<i>epsps</i>	Monsanto Company
	MON832	<i>epsps</i> & <i>goxv247</i>	Monsanto Company
	NK603	<i>epsps</i>	Monsanto Company
耐除草剂特性	EXP1910IT	<i>als</i>	
	Syngenta Seeds Inc.		
	T14, T25	<i>pat</i>	Bayer CropScience
	B16	<i>bar</i>	Dekalb Genetics Corporation
	3751IR	<i>als</i>	Pioneer Hi-Bred International Inc.
	IT	<i>als</i>	Pioneer Hi-Bred International Inc.
	MS3	<i>pat</i> & <i>nase</i>	Bayer CropScience
	MS6	<i>pat</i> & <i>nase</i>	Bayer CropScience
耐除草剂特性和育性改变	676, 678, 680	<i>pat</i> & <i>am</i>	Pioneer Hi-Bred International Inc.
	MON810×LY038	<i>Cry1Ab</i>	Monsanto Company
抗虫和品质改良	LY038	<i>cordapA</i>	Monsanto Company

从样品中完全提取杀虫蛋白,同时易受其他因素影响,出现假阳性。

2.1.2 免疫试纸条法 免疫试纸条法是以免疫层

析技术为基础,将1对单克隆抗体中的1个在试纸条下游的NC膜(硝酸纤维素膜)上以带状固定,另一抗体(带有标记)涂在试纸条上游的玻璃纤维上,

表 2 国内转基因玉米安全性申报概况

基因特性与功能	单位	目的基因	研究阶段
品质改良	中国农业大学	高赖氨酸蛋白基因	环境释放
	中国农科院生物技术研究所	植酸酶基因	中间试验
	北京大学	四海藻糖-6-磷酸合成酶 TPS 基因	中间试验
	大连理工大学	甜菜碱醛脱氢酶基因	中间试验
抗虫	中国农业大学	Bt 蛋白基因	生产性试验
	吉林农业大学生物技术中心	慈姑蛋白酶抑制剂 API 基因	中间试验
抗病	北京市农林科学院	转玉米矮花叶病毒外壳蛋白基因	中间试验
	中国农科院植物保护研究所	缺失型 PAP 基因	中间试验
抗除草剂	山东大学	betA 和抗除草剂绿黄隆基因 <i>als</i> 基因	中间试验
	山东大学	NHX1 和抗除草剂绿黄隆基因 <i>als</i> 基因	中间试验
品质改良和抗除草剂	山东大学	磷脂酰肌醇合成酶 PIS 和抗除草剂绿黄隆基因 <i>als</i>	中间试验

当试纸条侵入有抗原的溶液中,由于毛细管作用,溶液携带玻璃纤维上的带有标记的抗体向试纸下游运动,溶液中抗原就会与标记抗体结合,随层析液面向上迁移,当遇到在膜上固定的另一抗体时,就会形成标记抗体—抗原—抗体夹心结构,形成肉眼可见的条带。美国 Monsanto 公司已研制出了快速检测毒蛋白的试纸条,只要将试纸条直接插入种子或组织的匀浆中,阳性反应立即显示出红色条带。中国农业科学院生物技术研究所研究出的金杯免疫检测试纸条可以一步快速检测出植物样本中的 BT—Cry IAb 蛋白和 BT—Cry IAe 蛋白。

2.1.3 Western 杂交 Western 杂交是通过抗体与抗原在硝酸纤维素膜上的特异结合,检测外源基因表达的蛋白。该方法是将蛋白质电泳、印迹免疫测定融为一体的特异蛋白质检测的方法。先将提取分离的蛋白转移到固相膜上,再与一抗、二抗结合,然后通过二抗上的标记化合物的性质进行检测。

Western 杂交具有很高的灵敏性,可从转 Bt 基因棉总蛋白质中检测 50ng 的特异蛋白质,若是提纯蛋白,可检测到 1~5ng。例如,用 Western blot 方法可以检测到种子中 0.25% 的转基因含量和加工的食物中 1% 的转基因含量^[3]。但 Western blot 方法涉及到提取、电泳等过程,技术要求高,操作复杂,不太适用于日常检测。

2.2 基于核酸的检测方法

转基因作物的核酸检测方法主要有 3 种:核酸分子杂交技术(southern blot)、PCR 检测技术、基因芯片技术。目前,PCR 检测方法是最主要、最准确地检测转基因作物的方法,包括定性 PCR 方法、复合 PCR 方法、巢式 PCR 方法、竞争性定量 PCR 方法、荧光定量 PCR 方法等。

2.2.1 定性 PCR 检测方法 PCR 技术的基本原理类似于 DNA 的天然复制过程,其特异性依赖于与靶序列两端互补的寡核苷酸引物。通过聚合酶的

作用,在体外快速特异地扩增目的片段,使微量、特定的目的 DNA 片段在几小时内迅速扩增到百万倍。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳、溴化乙锭染色后很容易观察,因而具有快速、灵敏等优点。

转基因作物及产品检测过程一般为:通过常用植物的内标准基因检测样品的来源,然后检测转基因样品中普遍存在的 3 种通用元件:启动子、终止子和标记基因。如果结果为阳性则进一步对外源结构基因进行检测。例如,根据 35S 启动子、NOS 终止子、NPTII 基因设计引物,检测大豆 Roundup—Ready、抗虫 Bt 玉米种子及深加工产品,并采用了 Southern blot 和限制性内切酶酶切对实验结果进行证明^[4]。

2.2.2 复合定性 PCR 检测方法 复合 PCR 检测就是将 2 对或者将 2 对以上的引物在同一个反应管里进行扩增,达到同时检测 2 个或 2 个以上目的 DNA 片段的目的。复合 PCR 检测的优点是 PCR 检测的效率高,实际检测时间短、费用低,且具有很高的检测灵敏度。复合 PCR 检测方法建立的难点在于 PCR 引物的设计和 PCR 反应条件的优化和每对引物反应效率的不一致。因此,在建立复合 PCR 检测体系时必须考虑以上因素。例如,通过在一个 PCR 反应中最多可以同时检测 8 种转基因玉米(Bt11, Event176, GA21, MON810, MON863, NK603, T25, TC1507)^[5]。

2.2.3 巢式 PCR 巢式 PCR 有 2 对引物:一对引物在目的模板 DNA 片段外侧,称为外引物,另一对引物对应的序列在同一模板 DNA 的外引物的内侧,成为内引物,即外引物的扩增产物中含有内引物的互补序列,外引物扩增后的产物成为内引物的模板,这样经过 2 次 PCR 扩增可以大大地提高 PCR 检测的灵敏度,从而实现对微量模板 DNA 样品的分析和检测。同时,此方法还减少了引物非特异性退火,从而增加了特异性扩增,提高了扩增效率,也

提高了检测的灵敏度。

2.2.4 基因芯片检测方法 基因芯片又称为 DNA 芯片, DNA 微矩阵。该方法是在固相支持物如硅片、尼龙膜表面, 有规律地合成数万个代表不同基因的寡核苷酸“探针”或液相合成探针后由点阵器有规律地点样于固相支持物表面, 然后将要研究的目的材料中的 DNA, RNA 或 cDNA 用同位素或荧光物质标记后, 与固相支持物表面的探针进行杂交, 通过放射自显影或荧光共聚焦显微镜扫描, 利用计算机对每一个探针上的杂交信号作检测、分析, 从而反映所用的材料中大量基因表达图谱。

目前, 欧盟就转基因产品的基因芯片检测启动了一个专门的项目, 该项目名称为“New technology in food sciences facing the multiplicity of new released”, 涉及的转基因植物有甜菜、玉米、棉花、亚麻、土豆、油菜、大米、大豆、南瓜和西红柿, 而且该项目主要放在鉴定转基因作物品系上, 特别是美国已经批准和欧盟尚未批准的一些作物上。

我国也利用基因芯片技术开发多种转基因植物检测芯片, 包括普通筛选型芯片(主要针对 CaMV35S 启动子, Nos 终止子, Bar, PAT1, PAT2 和 NPTII 等)、综合检测芯片(检测转基因大豆、玉米、棉花、油菜等样品)和品系检测鉴定芯片(鉴定哪些品系是我国已批准的, 有 GTS40-3-2 大豆, Bt176, Bt11, MON810, GA21, T25, CBH351 等品系)。

2.2.5 竞争性定量 PCR 检测方法 竞争性定量 PCR 方法的实验原理是采用构建的竞争 DNA 与样品 DNA 互相竞争相同底物和引物, 并根据电泳结果作出工作曲线图, 从而得到可靠的定量分析结果。例如, 利用竞争性定量 PCR 检测 TC1507, 能检测到 0.1% 的转基因含量^[9]。

2.2.6 实时荧光定量 PCR 检测方法 实时荧光定量 PCR 的基本原理是在 PCR 反应体系中加入荧光基团, 利用荧光信号累积实时监测整个 PCR 进程, 最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。荧光定量 PCR 方法根据采用的荧光基团发光原理的不同又可以分很多种, 例如, SYBR Green I 荧光染料、FRET 技术、TaqMan 探针、Molecular Beacon、sunrise、scorpion、self-quenched 技术和 UT-PCR 等。其中, TaqMan 荧光定量 PCR 方法由于其探针的简单和高度特异性得到最为广泛的应用。例如, 利用 TaqMan 荧光定量 PCR 方法特异性检测 GA21 玉米品系^[7]。

2.3 其他检测方法

2.3.1 PCR-ELISA 检测方法 PCR-ELISA 检测方法是用免疫学方法检测 PCR 产物, 将 PCR 高效性和 ELISA 的高特异性结合在一起。该方法是用一种特殊的管经过处理后共价交联结合诱捕分子, 诱捕分子是与扩增的目的 DNA 分子互补的一段寡核苷酸分子, 以诱捕到的目的 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 其中, 大部分扩增得到的 DNA 分子以共价键固定在管上, 经变性去掉互补链, 清洗后只有互补分子保留在管上, 用生物素或地高辛标记的探针进行杂交, 用碱性磷酸酯酶标记的抗生物素或抗地高辛进行 ELISA 检测, 颜色反应通过酶标仪读数。例如, 针对 CaMV35S 启动子和 T-NOS 终止子的序列特点设计特异性引物和探针, 应用 PCR-ELISA 检测技术, 建立了转基因大豆和玉米中常用外源基因的快速检测体系^[8]。

2.3.2 免疫 PCR 方法 免疫 PCR 是用 PCR 检测免疫学反应。将一段已知序列的 DNA 片段标记到抗原抗体复合物上, 再用 PCR 方法将这段 DNA 扩增, 然后用常规方法检测 PCR 产物, 特异性 PCR 产物的存在表明有该 DNA 片段标记的抗体所针对的特异性抗原存在。因此免疫 PCR 即为 DNA 标记免疫测定技术。

3 转基因玉米检测技术的研究趋势

在所有的商品化的转基因作物中, 转基因玉米的品系最多, 共有 40 个品系。其中有 15 个品系并不是由 DNA 重组技术获得的品系(3751IR, T25×MON810, EXP1910IT, IT, DK404SR, DAS-59122-7×NK603, DAS-59122-7×TC1507×NK603, TC1507×NK603, NK603×MON810, MON863×NK603, MON863×MON810×NK603, GA21×MON810, MON810×MON88017, BT11×GA21, TC1507×DAS-59122-7); 7 个品系具有抗虫特性; 8 个品系具有耐除草剂特性; 26 个品系兼具抗虫和耐除草剂特性; 1 个品系改良品质; 1 个品系改良品质和具有抗虫特性; 3 个品系雄性不育和具有耐除草剂特性(表 1)。在 40 个转基因玉米品系中, 其中 Monsanto Company 生产的 MON863, Monsanto Company 生产的 NK603, DOW AgroSciences LLC and Pioneer Hi-Bred International Inc. 生产的 DAS-59122-7, Monsanto Company 生产的 MON810, DOW AgroSciences LLC and Pioneer Hi-Bred International Inc. 生产的 TC1507, Syngenta Seeds Inc. 生产

的 Bt11 (或称 X4334CBR, X4734CBR), Syngenta Seeds Inc. 生产的 Bt176, Monsanto Company 生产的 GA21, AventisCropScience (formerly AgrEvo) 生产的 T14/ T25

是目前用于加工食品和饲料最多的品系。对于这些转基因玉米及其产品根据检测目的的不同检测方法也有所不同 (表 3)。

表 3 国内外转基因玉米 PCR 检测方法研究概况

转基因玉米及其产品	检测方法	资料来源
M on 810	5'- 核苷酸 PCR (事件特异性)	Askild Holck, 2002
	常规 PCR (构建特异性)	Cao jijuan, 2003
	复合定量 PCR	Knut Rudi, 2003
	实时荧光定量 PCR (事件特异性)	Marta Hernandez, 2003
	实时荧光定量 PCR	Chen ying, 2004
	复合 PCR 结合实时荧光 PCR (事件特异性)	Huang H. Y, 2004
	复合 PCR	Jin Wujun, 2005
	复合 PCR 结合连接检测反应/ 通用芯片技术	C Peanoa, 2005
	复合 PCR (筛选检测)	VT Forte, 2005
	复合 PCR (事件特异性)	Marta Hernandez, 2005
Bt176	实时荧光定量 PCR	Pan liangwen, 2002
	复合定量 PCR	Knut Rudi, 2003
	实时荧光定量 PCR	Chen ying, 2004
	复合 PCR	Jin Wujun, 2005
	复合 PCR 结合连接检测反应/ 通用芯片技术	C Peanoa, 2005
	复合 PCR (筛选检测)	VT Forte, 2005
	复合 PCR 结合基因芯片检测	XiaoDan Xu, 2005
	实时荧光定量 PCR (事件特异性)	Taverniers I. , 2005
	实时荧光定量 PCR	Cao jijuan, 2003
	复合 PCR	Knut Rudi, 2003
GA21	实时荧光定量 PCR (事件特异性)	Marta Hernandez, 2004
	复合 PCR	Jin Wujun, 2005
	复合 PCR 结合连接检测反应/ 通用芯片技术	C Peanoa, 2005
	复合 PCR (事件特异性)	Marta Hernandez, 2005
	复合 PCR (事件特异性)	Isabel Taverniers, 2005
	实时荧光定量 PCR (事件特异性)	Taverniers I. , 2005
	复合 PCR	Knut Rudi, 2003
	实时荧光定量 PCR (事件特异性)	Ronning S. B. , 2003
	复合 PCR	Jin Wujun, 2005
	复合 PCR 结合连接检测反应/ 通用芯片技术	C Peanoa, 2005
Bt11	复合 PCR (筛选检测)	VT Forte, 2005
	复合 PCR 结合基因芯片检测	XiaoDan Xu, 2005
	复合 PCR (事件特异性)	Marta Hernandez, 2005
	实时荧光定量 PCR (事件特异性)	Taverniers I. , 2005
	复合定量 PCR	Knut Rudi, 2003
	实时荧光定量 PCR	Cao jijuan, 2004
	复合 PCR (构建特异性)	Jin Wujun, 2005
	复合 PCR (事件特异性)	Marta Hernandez, 2005
	实时荧光定量 PCR (事件特异性)	Collonnier C. , 2005
	实时荧光定量 PCR (事件特异性)	Christer R. Nielsen, 2004
T25	复合 PCR 结合实时荧光 PCR (事件特异性)	Huang H. Y, 2004
	复合 PCR	Jin Wujun, 2005
	常规 PCR	Matsuoka T, 2001
NK603	常规 PCR (构建特异性)	Cao jijuan, 2002
	复合定量 PCR	Knut Rudi, 2003
	实时荧光定量 PCR (事件特异性)	Windels P, 2003
CBH351	常规 PCR	Chowdhury EH, 2003
	常规 PCR (筛选检测)	Monma K, 2006
	常规 PCR (事件特异性检测)	Litao Yao, 2005
MON863	复合 PCR	Onishi M, 2005
	TaqMan 实时定量 PCR	Yang L, 2005

3.1 品系 特异性检测 (event specific PCR) 可以 确定转基因 作物的 品系

检测转基因作物及其产品, 目前最常用的方法

是 PCR 技术。转基因作物的外源基因 DNA 片段分为通用元件、目的基因、外源载体序列 3 类。根据不同的外源 DNA 片段, PCR 检测可分为 4 个水平,

即通用元件筛选检测(screening PCR detection methods), 基因特异性检测(gene specific PCR detection methods), 构建特异性检测(construct specific PCR detection methods), 品系特异性检测(event specific PCR detection methods)。4 个水平的检测灵敏度从低到高依次为: 筛选检测、基因特异性检测、构建特异性检测、品系特异性检测。

筛选检测通常是检测 CaMV35S 启动子和 NOS 终止子, 因为外源基因在转入到作物中为了加强其表达通常会携带 35S 启动子和 NOS 终止子, 但因为这 2 种 DNA 元件在植物的新鲜叶片和周围环境中都天然存在, 检测结果很容易出现假阳性。

基因特异性检测是检测外源目的基因, 构建特异性检测是检测外源目的基因与启动子或终止子连接处的片段, 但同样的结构基因会用在不同的作物中, 检测结果也很容易出现假阳性, 不能区分使用相同结构基因的不同作物。

品系特异性检测方法是根据外源基因与旁侧的基因组 DNA 序列连接处设计引物, 扩增的片段只出现在一种转基因作物中。目前在大豆 GTS-40-3-2、棉花 MON531 和 MON1445, 玉米 MON810, BT11, Starlink, GA21, NK603, T25, Event176 和 MON863 的检测中都建立了事件特异性定量 PCR 检测方法。

3.2 复合 PCR 可以提高检测效率、减少检测成本

复合 PCR(multiplex PCR)是一种能同时扩增 2 个或多个基因产物的反应。例如, 通过复合 PCR 方法, 利用特异性引物同时检测出了 5 种转基因玉米^[9]。利用复合 PCR 方法检测了不同品种的转基因作物, 包括大豆、玉米和油菜^[10]。这些研究表明, 复合 PCR 是一种简便、可靠和有效的转基因检测方法。如果我们在一个反应中加入更多的检测引物, 将减少试剂的使用量, 大大的降低检测的成本, 而且也能提高检测的效率。

3.3 基因芯片(gene chip)可以提高检测效率、检测灵敏度

目前, 对于复合 PCR 产物的检测大多数是采用琼脂糖凝胶电泳经溴化乙啶(EB)染色后观察, 如果扩增产物的大小相似就很难区分。随着检测技术的发展, 越来越多的检测方法出现, 其中, 将复合 PCR 与基因芯片结合的检测技术是一种灵敏度高、结果可靠的检测技术。例如, 利用复合 PCR 与连接检测反应(LDR)/通用芯片(UA)结合的技术检测出了转基因大豆, 转基因玉米 MON810, BT176, BT11

和 GA21, 具有很高的灵敏度和特异性^[11]。

4 小结

品系特异性检测、复合 PCR 检测以及基因芯片的应用都是转基因作物及其产品检测的发展趋势。转基因作物及其产品检测的最终目的就是确定作物的品系, 高的检测效率和灵敏度, 3 种转基因检测技术分别具有这 3 个特点, 因此, 将 3 种技术结合起来不仅能满足检测的要求, 同时对于检测技术的发展也提供了一个新的领域。

参考文献:

- [1] Clive James, Global status of commercialized biotech / GM [DB/OL] <http://www.isaaa.org/>.
- [2] 刘光明 苏文金. 应用 ELISA 定量检测转基因玉米中 Bt1 蛋白的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(8): 217—221.
- [3] Vollenhofer S, Burg K, Schmidt J, *et al*, Genetically modified organisms in food screening and specific detection by polymerase chain reaction[J]., Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1999, 47(12): 5038—5043.
- [4] Onishi M, Matsuoka T, Kodama T, *et al*, Development of a multiplex polymerase chain reaction method for simultaneous detection of eight events of genetically modified maize[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2005, 53(25): 9713—9721.
- [5] La Paz J L, Garcia-Muniz N, Nadal A, *et al*., Interlaboratory transfer of a real-time polymerase chain reaction assay for quantitative detection of genetically modified maize event TC-1507[J]. Journal of AOAC International, 2006, 89(5): 1347—1352.
- [6] 曹际娟, 朱水芳, 曹远银. GA21 转基因玉米实时荧光 PCR 检测方法的建立[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(8): 87—95.
- [7] 刘光明, 徐庆研, 龙敏南, 等. 应用 PCR-ELISA 技术检测转基因产品的研究[J]. 食品科学, 2003, 24(1): 101—105.
- [8] 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.
- [9] James D, Schmidt A M, Wall E, *et al*., Reliable detection and identification of genetically modified maize, soybean, and canola by multiplex PCR analysis[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2003, 51(20): 5829—5834.
- [10] C Peano, R Bordon, M Gulli, *et al*., Multiplex polymerase chain reaction and ligation detection reaction/universal array technology for the traceability of genetically modified organisms in foods[J]. Analytical Biochemistry, 2005, 346(1): 90—100.