

转基因产品分析方法的研究进展

张文珠, 史剑浩, 肖 铭

(大连理工大学 化工与环境生命学部 化学学院, 辽宁 大连 116024)

摘要: 简要介绍了转基因产品的发展历程、优缺点以及对转基因产品进行检测分析的迫切性, 着重综述了近期基于 DNA、蛋白质、生物传感器以及联用技术检测转基因产品的分析方法, 最后对转基因产品的分析方法进行了展望。

关键词: 转基因生物; 分析方法; DNA; 蛋白质; 生物传感器

中图分类号: O657.2

文献标志码: A

文章编号: 1006-3757(2015)04-0191-08

转基因生物 (genetically modified organisms, GMOs) 是指利用转基因技术将某些外源性基因转移到动物、植物或微生物体内, 与生物体自身的基因进行重组后得到的满足人类不同需求的新的生命体。

早在 1971 年, Chakrabarty^[1] 发现了具有高效分解浮油的假单胞菌, 拉开了转基因生物研究的序幕。1982 年转基因动物转基因超级鼠出现, 被誉为分子生物学发展的里程碑^[2]。1983 年第一例转基因植物烟草在美国问世, 自此人类转基因技术的研究逐步走向深入^[3]。1994 年美国 Calgene 公司开发的延熟番茄 Flav r-SaV rTM 被批准进行商业化生产^[4], 成为全球首次批准的可进行商业化生产的转基因植物, 转基因作物开始批量种植。截至 2009 年底, 全球已有 25 个国家批准了 24 种转基因作物的商业化应用。目前全球转基因生物主要以转基因经济作物为主, 四大转基因作物分别是大豆、玉米、棉花和甜菜。从转基因作物的种植面积看, 2013 年全球已达到 1.75 亿公顷, 相当于总耕地面积的 11%。而中国对转基因项目的研究始于上世纪 80 年代后期的“863”计划, 目前转基因作物的种植面积为 420 万公顷, 居全球第六位^[5-6]。

转基因作物能够广泛种植和被食用, 主要因为它具有自身独特的优势。从性状上讲, 转基因可大幅改良作物的性状, 提高抗病抗虫性, 减少农药的使用, 节约生产成本, 提高农产品的市场竞争力, 有效地保护农田环境, 丰富农田的生物多样性。另一方

面, 某些优良特性如抗冻、抗旱性也使得育种突破了地域和季节的限制, 通过转基因技术可提高育种速度, 作物增产增收, 从而更好地利用土地资源, 缓解粮食短缺问题, 减少发展中国家的贫穷, 缓解当前的环境压力^[7]。随着转基因技术的发展, 转基因作物的种植面积显著增加, 商业化趋势日益明显, 每年会有大量的转基因作物流入市场。

但是, 人们对转基因食品的安全性仍抱有怀疑态度。1998 年普斯泰向公众发布转基因马铃薯会使大鼠体重和器官重量减轻、免疫系统遭到破坏的消息^[8]。虽经证实其实验数据不足, 但“普斯泰事件”唤起了人们对转基因生物安全性的深度思考。通过长期的试用发现: 在环境方面, 转基因作物本身可能变成杂草, 若干年后可能对环境造成危害, 威胁生物多样性^[9]。转基因产生的新性状可能会导致生态系统中关系链的新变化, 破坏生态平衡^[10]。另外, 产物基因表达的改变, 可能会改变宿主体内的代谢途径, 从而使营养成分间的相互作用发生改变。植物病毒间存在着异源重组现象, 一部分抗病毒转基因作物可能与其他基因重组形成新的病毒^[11]。此外转基因作物很可能通过基因漂流对近缘物种产生潜在威胁^[12]。因此, 各国开始对转基因作物的推广采取控制措施, 甚至颁发禁令。2000 年, 全球有 131 个国家签署了有关转基因食品安全的《生物安全议定书》^[13]。

不论是对转基因产品进行标识管理, 或是对转基因与非转基因原料的分别输送, 对转基因原料和

收稿日期: 2015-09-30; 修订日期: 2015-11-11

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 21205009)

作者简介: 张文珠 (1973-), 女, 博士, 副教授, 主要从事色谱分离和生物分子的检测, E-mail: wzhzhang@dlut.edu.cn.

食品的检测都是必不可少的。因此,寻找快速有效、准确可靠检测转基因产品的分析方法具有十分重要的意义。本文重点综述了近年来各种检测技术在转基因产品检测中的研究进展。

1 转基因产品的检测方法

当前针对 GMOs 的分析方法主要可以分为基于 DNA 的检测方法、基于蛋白质的检测方法和一些新的检测方法。

转基因生物的嵌入物包括 3 种基因单元^[14]: 启动子、性状基因和终止子。启动子需在植物体内得到大量的表达,而终止子是基因转录的终止信号, CaMV 35S 和 NOS 分别是最常用的启动子和终止子。性状基因介于启动子和终止子之间,可使植物表现出特殊的性状,如抗旱性、抗病性等,虽然有很多的性状基因经授权嵌于转基因生物中,但对转基因生物进行检测时最常用的性状基因如下:

(1) CP4-EPSPS 基因,该基因可编码合成具有抗草甘膦特性的 5-烯醇丙酮酸-3-磷酸酶;(2) Bar 基因和 PAT 基因,均负责编码合成具有抗草丁膦特性的草丁膦乙酰转移酶;(3) Bt、Cry1Ab 和 Cry1Ac 基因,均负责编码合成抗虫性蛋白^[14]。

1.1 基于 DNA 的检测方法

1.1.1 聚合酶链式反应法 (polymerase chain reaction, PCR)

PCR 法利用聚合酶链式反应,以外源性的核酸序列为检测对象,可以快速识别物种中是否含有转基因成分,其检测灵敏度高、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^[15]。近年来 PCR 方法发展迅速,已衍生出巢式/半巢式 PCR 方法、复合扩增 PCR、定量 PCR 等多种方法^[16]。

巢式 PCR 利用两对引物、通过两轮常规 PCR 可实现对靶标序列的高特异性、高灵敏度扩增,若巢式 PCR 的其中一条引物既做外引物,又当内引物,即只用一对半引物,则称为半巢式 PCR^[17]。Ao 等^[18]在 2011 年利用多重巢式 PCR 方法对转基因大豆、玉米、水稻中的 CP4-EPSPS、Cry 1Ab、Bar 和 PAT 等 4 种外源基因进行了检测,灵敏度为 0.005%。闫伟等^[19]在 2015 年采用单管半巢式 PCR 方法对转基因大豆、玉米和棉花中的 CaMV 35S 启动子和 NOS 终止子进行了检测,检测灵敏度分别为 0.01% 和 0.05%,该方法具有便捷、准确、灵敏等

特点。

复合扩增 PCR (Multiplex PCR) 是在同一 PCR 体系中加入两对以上引物,可同时扩增产生多个靶序列的 PCR 反应,比常规 PCR 方法节约时间,减少费用。2015 年 Wang 等^[20]在反向斑点杂交系统里 (reverse dot blot, RDB) 采用复合扩增 PCR-不对称超分支滚环扩增联用技术对转基因大豆进行了检测,对 DNA 的检测限为 0.5 ng/L,此法可快速、廉价地检测转基因生物。

定量 PCR 法可以对待测样品中的 GMO 含量进行半定量地检测,其又分为定量竞争 PCR 法 (quantitative competitive PCR, QC-PCR)、实时定量 PCR 法 (quantitative real-time PCR) 和差分定量 PCR 法 (differential quantitative PCR)。1999 年 Hübner 等^[21]利用定量竞争 PCR 法成功地对转基因大豆和玉米进行了检测,证明此法具有较高的灵敏度。Nakamura 等^[22]利用实时定量 PCR 技术对转基因木瓜及其各类木瓜制品进行了有效地检测,证明其具有可行性和准确性。Cankar 等^[23]在 2008 年利用差分定量 PCR 技术检测了转基因玉米中的 CaMV 序列和 P35S 启动子,此法可快速、简单地对转基因生物进行检测,并且在经济上具有可行性。

此外, Li 等^[24]在 2009 年利用连续流动式 PCR 微流控芯片对转基因大豆进行了检测,可在 9 min 内实现 P35S 和 Tnos 序列的扩增,检测限为 0.005 ng/ μ L,是一种快速又经济的方法。Ha 等^[25]在 2015 年用官能化后的聚碳酸酯微型装置作 PCR 反应器,成功地对转基因大豆叶片中的 35S 启动子序列和 Bar 基因进行了检测,该装置的检测速度约是传统热循环仪的 3 倍。

1.1.2 核酸印迹法 (Southern blot)

该技术于 1975 年由英国科学家 Southern 创建,已成为检测特定 DNA 片段的经典方法^[26]。核酸印迹法以放射性或荧光标记的外源目的基因的同源序列作为探针,与待测样品的总 DNA 进行杂交。首先用限制酶消化受体的总 DNA,通过凝胶电泳按大小分离所得的片断,随后使 DNA 在原位变性,并从凝胶转移至另一固相载体上。DNA 转移至固相载体的过程中,各个 DNA 片断的相对位置保持不变,用放射性或荧光标记的探针与各个 DNA 片断杂交,经放射自显影 (autoradiography) 确定与探针互补的电泳条带的位置^[16]。

Southern 杂交技术特异性强,灵敏度高,可应用

于检测样品中 DNA 及其含量,了解基因的状态. Miao 等^[27]在 2011 年成功地用 Southern blot 技术检测了携带 Thanatin 基因的转基因小鼠. Zabelina 等^[28]在 2015 年用该技术成功地对转基因蚕进行了检测.

1.1.3 DNA 环介导等温扩增技术 (Loop Mediated Isothermal Amplification, LAMP)

LAMP 技术通过一对能特异性识别一段正义链序列和一段反义链序列的内引物和一对链置换引物,在无外切酶活性的 Bst DNA 聚合酶作用下,恒温条件下即可实现对外源转基因的扩增,在反应结束后加入显色液,即可用肉眼观察到反应结果^[29]. Huang 等^[30]在 2014 年利用 LAMP 技术成功地检测了转基因玉米中的肌醇六磷酸酶基因. 该方法可在 20 min 内实现目标基因的检测且不用凝胶电泳即可见到扩增现象,灵敏度是传统 PCR 方法的 33 倍,是一种可视性强、灵敏度高、装置简单的快速检测手段. Zhou 等^[31]根据转基因甘蔗的选择标记基因 Cry1Ac 的序列,设计特异性 LAMP 引物,利用实时浊度仪对反应体系中扩增产物的实时监控筛选出最佳引物,建立转基因甘蔗 Cry1Ac 基因的 LAMP 检测方法. 该方法能直接看出结果,不需要复杂的仪器和操作、所需时间比 PCR 方法快 10 倍、灵敏度高、特异性强.

1.1.4 PCR 与其他技术联用

Liu 等^[32]在 2004 年用 PCR-酶联免疫吸附测定联用技术对转基因大豆和玉米进行了检测,是一种可快速、准确、特异性检测 GMO 成分的方法.

Zhang 等^[33]研究采用多重 PCR 技术同时扩增 6 对引物 (GA21、Bt11、NK603、Bt176、Mir604、Mon810),仅一次反应就可进行筛选和鉴定,扩增产物用毛细管电泳-激光诱导荧光联用快速检测,灵敏度达 0.1 ng.

微流控芯片又称芯片实验室 (lab-on-a-chip),是将生物和化学样品的制备、生物与化学反应、分离、检测等基本操作单元集成到一块几平方厘米 (甚至更小) 的芯片上,由微通道形成网络,以可控流体贯穿整个系统,用以取代常规生物或化学实验室功能的一种技术. 微流控芯片系统在定量的准确性、客观性和操作的简易性等方面有明显优越性^[34]. Obeid 等^[35]自行组装的微流控芯片系统可对转基因大豆进行快速的分析和鉴定, NOS 终止子、35S 启动子和大豆内源基因 lectin 3 个片段的

PCR 产物在玻璃芯片上经电泳分离后用激光诱导荧光 (LIF) 技术检测,仅需 60 s 即可完成分析,产物检出限低至 0.1%.

1.2 基于蛋白质的转基因检测方法

目前通过蛋白质检测转基因的方法主要分为以下 4 种.

1.2.1 酶联免疫吸附测定法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)

ELISA 方法将抗原抗体的特异性免疫反应与酶的高效催化作用相结合,可实现对抗原或抗体的测定. 当抗原与抗体结合时,根据显色反应,借助比色或荧光反应鉴定转基因成分,由于酶与底物反应的信号强度与样品中抗原的含量成正比,可以定量检测转基因成分. 1999 年, Rogan 等^[36]将此法应用于转基因大豆中 CP4-EPSPS 基因的检测. 之后, Giovannoli 等^[37]将毛细管电泳免疫竞争法结合量子点,通过酶联免疫吸附实验,采用荧光法,发展了针对 Cry1Ab 的新的检测方法. 2013 年, Santiago-Felipe 等^[38]用重组聚合酶扩增 (recombinase polymerase amplification, RPA)-ELISA 联用方法,检测了转基因 promoter-P35S 和 terminator TNOs,发现该方法具有灵敏度高、温度影响小、扩增时间短、操作简便易行、经济可行等特点. 王敏等^[39]利用双抗体夹心酶联免疫检测方法成功地对转基因抗虫棉 pat 蛋白进行了检测,此法避免了直接包被提取物易受样品中油脂等干扰物影响的缺点,具有更好的灵敏度、稳定性和特异性.

1.2.2 免疫试纸条法 (immune lateral flow strip, ILFS)

ILFS 方法采用硝化纤维试纸条对蛋白质进行定量检测. 将特异抗体交联到试纸条和有色物质上,当抗体和特异抗原结合后,再和带有颜色的特异抗体进行反应,就形成了带有颜色的三明治结构,并且固定在试纸条上. 如果没有颜色,则表明没有相应的检测抗原. 此法在 5~10 min 内即可完成,成本低、方法简单,可用于现场检测,也适合于样品的早期筛选.

Fagan 等^[40]在 2001 年应用免疫试纸条法成功地检测了抗草甘膦大豆中的转基因成分. 2005 年阚贵珍等^[41]用该方法检测了抗草甘膦大豆中的外源基因. 郭嘉等^[42]在 2013 年利用叶片喷雾法和叶片离体平板培养法处理样品后用该方法成功地检测了玉米 Pa91 和丹 340 叶片.

1.2.3 蛋白质十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳方法 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

蛋白质 SDS-PAGE 方法仅根据蛋白质亚基分子量的不同就可以分开蛋白质,体系中外来因素少,检测结果较稳定,重复性好,找到能区别转基因、非转基因作物的蛋白质表达带,即可较稳定地利用蛋白质检测转基因作物。相对酶联免疫法检测转基因作物中的蛋白质时需要被测蛋白质的抗体,蛋白质 SDS-PAGE 方法具有明显的优势。金红等^[43]用蛋白质 SDS-PAGE 方法成功地对转基因大豆进行了检测,具有体系中外来影响因素少、检测结果较稳定、重复性好的特点。此外,在此基础上发展出的双向电泳(2-DE)技术是目前检测蛋白质组差异的一种常用技术,其利用蛋白质组的差异来检测转基因植物中的外源基因,可通过低成本操作获得较高的蛋白分辨率,但是在分离具有极端等电点和分子量的疏水性蛋白质时受到限制^[44]。

1.2.4 Western 印迹法(Western blot)

Western 印迹法是利用 SDS-PAGE 分辨蛋白质样品,再转移至醋酸纤维或聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)吸附膜上,以酶标记的特异抗体直接或间接检测特异性蛋白质的表达,并分析其相对含量^[45]。此法可普遍用于分离、检测特异的目标蛋白质,尤其适用于样品中低含量或超低含量目标蛋白质的分析,因此可通过分析转基因产品中的特异性蛋白实现对转基因作物的检测。Duijn 等^[46]用此法检测 Roundup Ready 大豆中的 CP4 合成酶,检测限在 0.5%~1%。王莉江等^[47]在 2002 年成功用此法对转基因水稻进行了检测,证明其对稻瘟病菌侵染具有抗性。Emmerling 等^[48]在 2011 用 Western 印迹法分析了转基因 BT 玉米中的 Cry 1Ab 蛋白经蚯蚓消化后的含量变化。

通过蛋白质检测转基因的方法种类较多,但是还有较大的局限性。首先,蛋白质在加工过程中易受外界影响而变性或失活,因而只能用于天然、未加工食品的检测。其次,该方法所能检测的对象较少,需要转基因食品中含有待测基因。另外,需要较多的抗原和抗体,检测成本比较高。因此,如何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是免疫分析法研究的重点。

1.3 生物传感器方法(biosensors)

生物传感器是把生物信号转化成可测量信号的分析装置。转基因生物的特异性探针与目的基因杂交时,会进行分子识别并产生信号,而生物传感器就是将这些杂交信号转换成可检测的各种物理信号的装置。根据检测信号的不同可将 DNA 生物传感器分为光学传感器、压电传感器和电化学传感器^[49-50]。

1.3.1 光学传感器

靶基因与固定探针杂交时,光学传感器通过检测在不同材料界面处折射率的变化来显示分析物的结合程度。Feriotto 等^[51]最早将表面等离子体共振技术(SPR)应用于转基因作物的扫描与检测。薄金层包被的棱镜与流动的分析液界面处发生着各种各样的生物分子相互作用,SPR 技术可以有效地对这些相互作用进行检测。随后 Gambari 以 SPR 技术为基础实现了对转基因大豆快速又简便的自动分析^[52]。Chen 等^[53]利用表面增强拉曼光谱仪条形码探针检测了转基因大米中的 Cry 1Ab 和 Cry 1Ac 基因,具有较好的灵敏度和准确度,避免了假阳性结果的出现。Zhu 等^[54]使用基于磁珠的电化学发光 DNA 生物传感器对转基因烟草中的 CaMV 35S 进行了检测,灵敏度为 5 nmol/L,具有快速、简便、安全可靠、可重复使用、低成本等诸多优点。表面增强拉曼光谱仪与磁分离技术相结合是另一种新颖的检测 CaMV 35S 的方法,线性范围为 25~100 nmol/L,检测时间不超过 40 min,检测限低至 11 nmol/L^[55]。Qiu 等^[56]利用荧光生物传感器检测了转基因菜花中的 CaMV 35S 启动子,证明此法可用于定性定量检测转基因作物,检测限为 2 nmol/L,线性范围为 5~900 nmol/L。

1.3.2 压电传感器

基于可以检测纳克级质量变化的石英制成的石英微天平分析仪(QCM)是一种质量灵敏的压电装置。压电生物传感器利用压电装置,以标记目的基因序列与探针杂交时的质量增加来实现对转基因作物的检测。Karamollaoglu 等^[57]在 2009 年利用基于 QCM 的生物传感器成功地对转基因烟草进行了检测,结果显示该方法可在无标记的情况下对转基因生物进行实时、直接的检测。Lien 等^[58]基于吡咯掺杂的多壁碳纳米管,利用电阻抗光谱(EIS)与石英微分析天平(QCM)研究 DNA 的杂交状况,发现 QCM 方法具有高度的灵敏性,可检测目标物中低至

4 pmol/L 的浓度。

1.3.3 电化学传感器

电化学传感器的建立通常分为以下几步:电极表面 DNA 探针的固定,探针与目的基因杂交,标记和电化学信号的读取。其中 DNA 探针的固定起决定性作用,直接影响到电化学传感器的性能好坏。设计电化学传感器时,需要充分考虑传感器、目的基因、探针固定方式的选择,并最后对标记和检测进行性能评估。DNA 探针的固定有多种方法,例如吸附、共价键合、自组装单层膜、电聚合等^[14]。Ulianas 等^[59]用电化学生物传感器和纳米金颗粒成功地检测了转基因大豆中的 CaMV 35S 基因,且反应可在 4 °C 的条件下稳定 45 天,用 NaOH 再生后可重复利用 7 次,具有较好的重现性和再生性、较低的检测限。Liao 等^[60]利用电化学传感器对转基因作物中的 DNA 进行了复合扫描,非转基因 DNA 的存在也不会对检测产生干扰,该方法具有快速、廉价、高保真扫描 DNA 的特点。Nan 等^[61]利用多通道微流控芯片电泳法高效地对转基因大米进行了检测,发现该方法比传统的平板凝胶电泳法快 15 倍,可同时对多个转基因样品进行平行检测,具有再现性好、灵敏性高的特点。Tian 等^[62]利用共价自组装的多壁碳纳米管和金纳米颗粒,结合循环伏安分析法与差分脉冲伏安法测定了转基因谷物中的 DNA 序列,此种方法具有较高的灵敏性和选择性,其检测限可达到 0.403 nmol/L。Tam 等^[63]利用基于单壁碳纳米管(single-walled carbon nanotube, SWCNT)的电化学生物传感器对转基因大豆进行了检测,检测的灵敏度为 0.32 nA/nM,结果表明可有效地对转基因生物进行检测。

1.3.4 其它传感器

Huang 等^[64]成功地用基于 DNA 的防污染带状传感器(contamination-proof strip biosensor),结合交叉启动放大技术(cross-priming amplification)对 CaMV 35S 基因进行了检测,可以检测低至 0.05% 的浓度。方法具有简单快速、高灵敏性、应用前景广阔等特点。

Kalogianni 等^[65]用一种干试剂试纸对转基因大豆成功地进行了可视化检测。该试纸为一次性使用,具有成本低廉、简单等优点,可检测转基因生物及其深加工制品。

2 问题与展望

转基因生物的检测方法分为 DNA 方法、蛋白质

方法、生物传感器方法等。DNA 方法中,高灵敏和特异性的 PCR 方法是应用最广、最基本的检测手段,且常用于验证其他检测方法的有效性和准确性^[14],现也已发展出多种基于标准 PCR 的方法,如巢式/半巢式 PCR、复合扩增 PCR、定量 PCR 等^[16]。基于蛋白质的检测方法中 ELISA 方法应用最广泛,此外利用电泳方法分离蛋白质也常作为转基因生物分析的辅助手段。生物传感器是新兴的检测手段,近年来发展迅速,尤以电化学生物传感器为最^[49],预计在未来,研究用于固定 DNA 探针的载体材料和新型固定方式将成为一大热点。此外,各种技术之间的交叉联用也将更加多样和广泛。但是在实际检测中,并非任何一种方式对某种转基因生物的检测都有效,因此,应根据生物的种类、相应生物制品的加工方式、生物体内可能含有的转基因片段的不同选择相应的检测方法^[66]。

应该注意的是,目前所报道的检测手段主要是以转基因大豆、棉花、玉米等常见作物为检测对象,而转基因生物多种多样,因此具体到其它生物的检测,我国的科研工作者可以做相关方面的研究工作来完善并拓展转基因生物的检测方法。

参考文献:

- [1] Chakrabarty A M, Mylroie J R, Friello D A, et al. Transformation of pseudomonas putida and Escherichia coli with plasmid-linked drug-resistance factor DNA [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1975, 72: 3647-3651.
- [2] Palmiter R D, Brinster R L, Hammer R E, et al. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes [J]. Nature, 1982, 300:611-615.
- [3] 高玉龙,焦芳婵,徐照丽,等.多重 PCR 在烟草转基因检测中的应用[J].生物技术通报,2008,2:140-142.
- [4] 高蓝,傅建熙,王建华.转基因番茄研究进展[J].西北农业大学学报,2000,3:90-95.
- [5] Qiu J. Controversy of GM crops in China [J]. National Science Review, 2014, 1: 466-470.
- [6] Clive J. Globalstatus of commercialized biotech/GM crops[EB/OL]. ISAAA Brief 43,2011, <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/43/>.
- [7] 陈洁君,张维,宛煜嵩,等.全球转基因作物发展现状及趋势[J].农业生物技术学报,2011,2:369-

- 374.
- [8] 朱娉,王德强. 论传媒舆论引导法律制度的完善—基于对转基因生物安全性争议典型案例的分析[J]. 华中农业大学学报(社会科学版), 2011, 6: 18-23.
- [9] 苏旭. 转基因作物对生态环境的潜在风险[J]. 环境与健康杂志, 2013, 30:463-467.
- [10] 王伟伟. 转基因植物对环境生态平衡的影响[J]. 林业调查规划, 2007, 32:61-64.
- [11] 潘建红,刘加顺. 转基因作物的风险与伦理评价[J]. 北京科技大学学报(社会科学版), 2009, 25(2):164-168.
- [12] 王明媛,张曦,贾俊静,等. 国内外转基因食品现状及其利弊分析[J]. 当代畜牧, 2014, 30:50-53.
- [13] 万霞. 生物安全的国际法律管制—《卡塔赫纳生物安全议定书》的视角[J]. 外交学院学报, 2003, 1: 68-74.
- [14] Manzanares-Palenzuela C L, Martín-Fernández B, López M S-P, et al. Electrochemical genosensors as innovative tools for detection of genetically modified organisms [J]. Trends in Analytical Chemistry, 2015, 66:19-31.
- [15] 郭斌,祁洋,尉亚辉. 转基因植物检测技术的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30:120-126.
- [16] 王广印,范文秀,陈碧华,等. 转基因食品检测技术的应用与发展 I. 主要检测技术及其特点[J]. 食品科学, 2008, 10:698-705.
- [17] 黄昆仑,罗云波. 用巢式和半巢式 PCR 检测转基因大豆 Roundup Ready 及其深加工食品[J]. 农业生物技术学报, 2003, 11(5): 461-466.
- [18] Ao J X, Li Q Z, Gao X J, et al. A multiplex nested PCR assay for the simultaneous detection of genetically modified soybean, maize and rice in highly processed products [J]. Food Control, 2011, 22:1617-1623.
- [19] 闫伟,徐桢惠,龙丽坤,等. 应用单管半巢式 PCR 技术筛查转基因食品[J]. 食品科学, 2015, 36(02):194-197.
- [20] Wang X M, Teng D, Guan Q F, et al. Detection of genetically modified crops using multiplex asymmetric polymerase chain reaction and asymmetric hyperbranched rolling circle amplification coupled with reverse dot blot [J]. Food Chemistry, 2015, 173: 1022-1029.
- [21] Hübner P, Studer E, Lüthy J. Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified organisms in food [J]. Food Control, 1999, 10: 353-358.
- [22] Nakamura K, Akiyama H, Takahashi Y, et al. Application of a qualitative and quantitative real-time polymerase chain reaction method for detecting genetically modified papaya line 55-1 in papaya products [J]. Food Chemistry, 2013, 136: 895-901.
- [23] Cankar K, Chauvensy-Ancel V, Fortabat M N, et al. Detection of nonauthorized genetically modified organisms using differential quantitative polymerase chain reaction; application to 35S in maize [J]. Analytical Biochemistry, 2008, 376: 189-199.
- [24] Li Y Y, Xing D, Zhang C S. Rapid detection of genetically modified organisms on a continuous-flow polymerase chain reaction microfluidics[J]. Analytical Biochemistry, 2009, 385: 42-49.
- [25] Ha M L, Lee N Y. Miniaturized polymerase chain reaction device for rapid identification of genetically modified organisms[J]. Food Control, 2015, 57:238-245.
- [26] Southm E M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis [J]. Journal of Molecular Biology, 1975, 98: 503-508.
- [27] Miao X Y, Zhang X. Production of transgenic mice carrying the Thanatin gene by intratesticular injection [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011, 415: 429-433.
- [28] Zabelina V, Uchino K, Mochida Y, et al. Construction and long term preservation of clonal transgenic silkworms using a parthenogenetic strain[J]. Journal of Insect Physiology, 2015, 81: 28-35.
- [29] 熊槐,吴凡,冯雪梅,等. 改良 LAMP 法检测转基因作物[J]. 食品安全质量检测学报, 2012, 3:177-181.
- [30] 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.
- [31] Zhou D G, Guo J L, Xu L P, et al. Establishment and application of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) system for detection of cryIAC transgenic sugarcane[J]. Scientific Reports, 2014, 4:4912.
- [32] Liu G, Su W, Xu Q, et al. Liquid-phase hybridization based PCR-ELISA for detection of genetically modified organisms in food [J]. Food Control, 2004, 15:303-306.
- [33] Zhang C J, Xu W T, Zhai Z F, et al. Universal Primer-Multiplex-Polymerase Chain Reaction (UP-M-PCR) and Capillary Electrophoresis-Laser-Induced Fluorescence Analysis for the Simultaneous Detection of

- Six Genetically Modified Maize Lines [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59: 5188 - 5194.
- [34] 操丽丽. 杀虫晶体蛋白和低聚异麦芽糖的毛细管电泳分析[D]. 华中农业大学硕士论文, 2004.
- [35] Obeid P J, Christopoulos T K, Ioannou P C. Rapid analysis of genetically modified organisms by in-house developed capillary electrophoresis chip and laser-induced fluorescence system [J]. *Electrophoresis*, 2004, 25(6): 922-930.
- [36] Rogan G J. Immunodiagnostic methods for detection of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in Roundup Ready Soybeans [J]. *Food Control*, 1999, 10: 407-414.
- [37] Giovannoli C, Afossi L, Baggiani C, et al. Binding properties of a monoclonal antibody against the Cry1Ab from *Bacillus Thuringensis* for the development of a capillary electrophoresis competitive immunoassay [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, 392: 385-393.
- [38] Santiago-Felipe S, Tortajada-Genaro L A, Puchades R, et al. Recombinase polymerase and enzyme-linked immunosorbent assay as a DNA amplification-detection strategy for food analysis [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2014, 811: 81-87.
- [39] 王敏. 转基因作物 pat 蛋白的双抗体夹心酶联免疫检测方法研究 [J]. *分析化学*, 2013, 41(10): 1555-1560.
- [40] Fagan J, Schoel B, Haegert A, et al. Performance assessment under field conditions of a rapid immunological test for transgenic soybeans [J]. *Food science and technology international*, 2001, 36: 1-11.
- [41] 阚贵珍, 喻德跃. 试纸条法和 PCR 法检测抗草甘膦转基因大豆的外源基因 [J]. *中国油料作物学报*, 2005, 27(4): 18-21.
- [42] 郭嘉, 孙传波, 姜志磊, 等. 抗除草剂转基因玉米快速有效鉴定方法的建立 [J]. *分子植物育种*, 2013, 4: 595-599.
- [43] 金红. 利用蛋白质 SDS-PAGE 电泳方法检测转基因大豆的初步研究 [J]. *食品研究与开发*, 2010, 31(5): 148-150.
- [44] Valdés A, Simó C, Ibáñez C, et al. Foodomics strategies for the analysis of transgenic foods [J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2013, 52(1): 2-15.
- [45] 王尧尧, 税朝祥, 方秋红. Western 印迹中蛋白质定量分析的替代方法 [J]. *细胞生物学杂志*, 2007, 29: 296-298.
- [46] Duijn G, Biert R, Bleeker - Mar - celis H, et al. Detection methods for genetically modified crops [J]. *Food Control*, 1999, 10: 375-378.
- [47] 王莉江, 明小天, 安成才, 等. 籼稻明恢 63 成熟种子愈伤组织的诱导及转基因水稻的抗性检测 [J]. *生物工程学报*, 2002, 3: 323-326.
- [48] Emmerling C, Strunk H, Schöbinger U, et al. Fragmentation of Cry1Ab protein from Bt - maize (MON810) through the gut of the earthworm species *Lumbricus terrestris* L [J]. *European Journal of Soil Biology*, 2011, 47(2): 160-164.
- [49] Arugula M A, Zhang Y Y, Simonian A L. Biosensors as 21st century technology for detecting genetically modified organisms in food and feed [J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86: 119-129.
- [50] Sassolas A, Leca - Bouvier B D, Blum L J. DNA Biosensors and Microarrays [J]. *Chemical Reviews*, 2008, 108: 109-139.
- [51] Feriotta G, Borgatti M, Mischiati C, et al. Biosensor technology and surface plasmon resonance for real-time detection of genetically modified roundup ready soybean gene sequences [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50: 955-962.
- [52] Gambari R, Feriotta G. Surface plasmon resonance for detection of genetically modified organisms in the food supply [J]. *Journal of AOAC International*, 2006, 89: 893-897.
- [53] Chen K, Han H Y, Luo Z H, et al. A practicable detection system for genetically modified rice by SERS-barcode nanosensors [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2012, 34(1): 118-124.
- [54] Zhu D B, Liu J F, Tang Y B, et al. A reusable DNA biosensor for the detection of genetically modified organism using magnetic bead - based electrochemiluminescence [J]. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2010, 149(1): 221-225.
- [55] Guven B, Boyaci I H, Tamer U, et al. A rapid method for detection of genetically modified organisms based on magnetic separation and surface - enhanced Raman scattering [J]. *Analyst*, 2012, 137: 202-208.
- [56] Qiu B, Zhang Y S, Lin Y B, et al. A novel fluorescent biosensor for detection of target DNA fragment from the transgene cauliflower mosaic virus 35S promoter [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 41(15): 168-171.
- [57] Karamollaoglu İ, Öktem H A, Mutlu M. QCM-based DNA biosensor for detection of genetically modified

- organisms (GMOs) [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2009, 44:142-150.
- [58] Lien T T N, Lam T D, An V T H, et al. Multi-wall carbon nanotubes (MWCNTs)-doped polypyrrole DNA biosensor for label-free detection of genetically modified organisms by QCM and EIS [J]. *Talanta*, 2010, 80(3):1164-1169.
- [59] Ulianas A, Heng L Y, Ahmad M, et al. A regenerable screen-printed DNA biosensor based on acrylic microsphere-gold nanoparticle composite for genetically modified soybean determination [J]. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2014, 190:694-701.
- [60] Liao W C, Chuang M C, Ho J A A. Electrochemical sensor for multiplex screening of genetically modified DNA: Identification of biotech crops by logic-based biomolecular analysis [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 50(15):414-420.
- [61] Nan H, Lee S W, Kang S H. Fast screening of rice knockout mutants by multi-channel microchip electrophoresis, [J]. *Talanta*, 2012, 97:249-255.
- [62] Tian L, Zhang J M, Chen G P, et al. Covalent self-assembly of multi-walled carbon nanotubes and gold nanoparticles for detecting DNA sequences of genetically modified corn [J]. *Asian Journal of Chemistry*, 2013, 25(18):10535-10540.
- [63] Tam P D. Genetically modified organism (GMO) detection by biosensor based on SWCNT material [J]. *Current Applied Physics*, 2015, 15:397-401.
- [64] Huang X, Zhai C C, You Q M, et al. Potential of cross-priming amplification and DNA-based lateral-flow strip biosensor for rapid on-site GMO screening [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2014, 406:4243-4249.
- [65] 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, 21:1069-1076.
- [66] 陈碧华, 张建伟, 王广印, 等. 转基因食品检测技术的应用与发展 II. 检测技术的分类、比较、应用及检测步骤 [J]. *食品科学*, 2008, 29:705-711.

Research Progress in Analytical Methods of Genetically Modified Organisms

ZHANG Wen-zhu, SHI Jian-hao, XIAO Ming

(*Chemical, Environmental and Biological Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning China*)

Abstract: By the use of transgenic technology, some of exogenous genes can be transferred into the body of organisms (including animal, plant, and microorganism) and recombine the initial gene of the organism with itself to meet human's various needs, which can eventually produce the so-called genetically modified organisms (GMOs). GMOs develop rapidly due to their advantages and characteristics. However, with the continuous marketing of transgenic organisms, people hold suspicious and even hostile attitude to their development. The need to monitor and testify the presence and the amount of GMOs in transgenic organisms has boosted various analytical methods for the rapid, effective, accurate and reliable detection of these organisms. In this article the development process, advantages and disadvantages of GMOs, and the urgency to detect and analyze them are introduced. And the recent methods based on DNA, protein, biosensor, and multiple techniques for the detection of genetically modified products are reviewed, and the prospect for the detecting methods of transgenic products in the future is also put forward.

Key words: GMOs; detection; DNA; protein; biosensors

Classifying number: O657.2

