

转基因生物成分快速检测技术研究进展

王颢潜¹, 高鸿飞², 王梦雨³, 王晨尧¹, 刘鹏程¹, 张秀杰^{1*}

(1. 农业农村部科技发展中心, 北京, 100176;

2. 中国农业科学院油料作物研究所, 湖北 武汉, 430062;

3. 中国农业科学院生物技术研究所, 北京, 100081)

摘要:近年来,随着转基因技术的快速发展和我国转基因产业化应用的不断推进,对我国农业转基因生物安全监管工作提出了更高的要求。为更好地满足监管工作需求,转基因快速检测技术的研究与应用尤为重要。本文从基于核酸水平的快速检测技术、基于蛋白水平的快速检测技术和其它快速检测技术三个方面,介绍了核酸快速提取技术、核酸恒温扩增技术、核酸试纸条技术、免疫层析试纸条技术和生物传感器等重要技术的原理、研究进展、优缺点及应用情况。总结分析了转基因生物成分快速检测技术发展趋势、应用前景以及亟需解决的难点问题,以期促进我国转基因产品快速检测技术发展,为我国农业转基因生物安全监管工作提供有效支撑。

关键词:转基因;检测技术;核酸;蛋白质

中图分类号:Q78

文献标识码:A

文章编号:1007-9084(2022)03-0491-06

Research progress on the rapid detection technologies for composition of genetically modified organisms

WANG Hao-qian¹, GAO Hong-fei², WANG Meng-yu³, WANG Chen-yao¹, LIU Peng-cheng¹, ZHANG Xiu-jie^{1*}

(1. Development Center of Science and Technology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100176, China; 2. Oil Crops Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430062, China; 3. Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: In recent years, with the rapid development of genetically modified technology and industrialization in China, the safety supervision of agricultural genetically modified organisms has faced higher requirements and challenges. The research and application of genetically modified rapid detection technology is particularly important to our supervision work. In this article, we divide genetically modified rapid detection technologies into 3 categories: rapid detection technologies based on nucleic acid levels and protein levels respectively, and other rapid detection technologies. The principles, research progress, advantages and disadvantages and applications of important technologies were introduced, such as nucleic acid rapid extraction, nucleic acid isothermal amplification, nucleic acid test strip, immunochromatographic test strip and biosensors. The development trend, application prospects and bottleneck problems of rapid detection technology for genetically modified products were also summarized and discussed, to promote the development of rapid detection technologies and to provide effective support for the safety supervision of agricultural genetically modified organisms in China.

Key words: genetically modified organisms; detection technology; nucleic acid; protein

随着转基因技术的快速发展,全球转基因作物商业化势头迅猛,根据国际农业生物技术应用服务组织(ISAAA)2020年最新统计数据,2019年全球转基因作物种植面积为1.904亿公顷,比1996年增长

了112倍,占全球耕地面积的12%,转基因种植国家达到29个,转基因进口国家有42个^[1]。2019年,我国进口大豆10032.82万吨,基本上为转基因大豆,主要来自巴西、美国、阿根廷和加拿大。我国也是

收稿日期:2021-03-05

基金项目:转基因生物新品种培育科技重大专项(2016ZX08012003)

作者简介:王颢潜,男,农艺师,硕士,研究方向:转基因检测技术,E-mail: 648368941@qq.com

* 通讯作者:张秀杰,女,副研究员,博士,研究方向:转基因检测技术,E-mail: zhxj7410@sina.com

转基因生物研发和应用大国,目前我国依托转基因重大专项的实施,建立了集重要功能基因发掘、转基因新品种培育及产业化应用等上中下游技术于一体的研发平台,成为全球仅有的几个拥有转基因核心技术的国家之一。截止2020年12月,我国新批准4个转基因玉米和3个转基因大豆的生产应用安全证书。随着全球转基因作物大规模种植和全球一体化下频繁的贸易流通,加之我国转基因产业化进程的不断推进,转基因监管的任务将越来越重。转基因检测作为监管工作的技术支撑和保障,对其要求也将越来越高。PCR等常规转基因检测技术应用广泛、准确可靠,但无法满足转基因大规模快速筛查的监管需求。2021年中央一号文件指出“尊重科学,加强监管,有序推进生物育种产业化应用”。为落实文件要求,做好转基因监管工作,提升转基因监管能力,建立简便、快捷、准确、经济的转基因现场快速检测方法势在必行。

目前,常见的转基因检测技术主要是基于核酸水平和蛋白水平。基于核酸水平的检测技术主要包括定性PCR技术、定量PCR技术、等温扩增技术和基因芯片技术等,基于蛋白水平的检测技术主要包括ELISA技术、Western blot检测技术和免疫层析试纸条技术等^[2]。基于核酸水平的检测技术主要针对整合进受体植物基因组上的外源基因进行检测,根据靶序列的不同,按特异性由低到高依次为筛选特异性检测、外源基因特异性检测、转基因构建特异性检测和转化事件特异性检测^[3]。基于核酸的快速检测方法一般都是以核酸扩增技术为核心,包括核酸提取、核酸扩增、扩增产物检测3个步骤。这3个步骤缺一不可,且操作较为繁琐,对仪器设备要求较高。基于蛋白水平的检测技术主要依据免疫分析的原理针对外源表达蛋白进行检测,操作较为简便,外源蛋白较为稳定,在现场快速检测领域应用较为广泛。本文就转基因快速检测技术的研究与应用进展做一简要概述,旨在明确转基因快速检测技术发展方向及应用策略,为转基因监管提供技术支撑,做好技术储备。

1 基于核酸水平的快速检测技术

1.1 核酸提取技术

核酸提取是核酸扩增前不可或缺的一个步骤,对检测结果的准确度有重要影响。核酸提取的方法有很多,如CTAB法、改良CTAB法、SDS法、SDS-PVP法及试剂盒法等^[4]。但是这些方法都需要组织

裂解破碎、核酸提取、纯化等步骤,非常耗时,且提取成本较高,依赖许多大型仪器。因此,传统的核酸提取方法难以满足大规模现场快速检测。

为了满足转基因快速检测和现场检测的需求,一些新型快速高效的核酸提取方法得到开发和应用。碱裂解法是一种有效的DNA快速提取方法,通过设置合适的碱性环境,使细胞裂解,染色体DNA变性分离,从而获得DNA^[5]。该方法无需水浴和离心,操作简便、快速,已广泛用于玉米、大豆、水稻等的转基因成分检测、SSR鉴定等领域^[6,7]。磁性微球DNA提取方法是在磁场作用下对DNA进行特异性吸附和脱附,无需离心分离和使用有机溶剂即可获得纯度较高的DNA^[8]。王柳^[9]通过水热法和TEOS水解法合成了磁性微球,并将其用于大米基因组DNA的提取,比传统方法节约时间近70%。赵晓丽等^[10]制备了纳米磁性微球用于提取转基因大豆基因组DNA,结果证明DNA浓度明显高于植物基因组提取试剂盒(Plant genomic DNA kit,北京天根)。气压法提取DNA是利用正压代替离心,达到快速、简便、现场提取植物基因组DNA的一种方法。陈丽丽^[11]利用注射器搭配过滤器和硅胶膜柱研制了DNA提取装置,完成单个样品的DNA纯化仅需15 min,且减少了对离心机的依赖。基因组DNA直接提取法是利用EDTA、表面活性剂等物质混合成裂解液,高温孵育10 min即可完成DNA提取,并可直接作为PCR模板进行扩增^[12]。纤维素滤纸提取纯化方法是基于纤维素的滤纸可快速结合核酸,经快速洗涤去除污染物并将其保留,然后将其直接洗脱到扩增反应中。Zou等^[13]研制了一种纤维素过滤器,可在不到30秒的时间内从多种植物、动物和微生物样品中纯化核酸,而无需任何专用设备。Wang等^[14]采用PVC塑料板做支撑,研制了EZ-D核酸提取试纸条,提取更加高效和稳定。

1.2 核酸扩增技术

PCR是最常用的核酸扩增方法,通过变性、退火、延伸三个步骤,结合凝胶电泳或荧光检测等方法进行分析。但PCR方法对温控设备、检测设备和操作人员有较高的要求,且非常耗时,限制了该技术在现场快速检测领域的发展和应用。

核酸等温扩增技术是近年来新兴的分子诊断技术,可实现恒温下核酸快速扩增,无需依赖温控设备,能够在现场实现核酸的快速准确检测。目前,应用较为广泛的是环介导等温扩增技术(LAMP),并已经发布相关标准。其基本原理是依

赖链置换 DNA 聚合酶和 4 条不同的引物,通过自动循环的链置换反应实现指数扩增。王嘉钰等^[15]基于 LAMP 技术,以中性红染料作为比色试剂,建立了玉米内标基因和 *cryIAb* 基因的可视化快速检测方法,既快速又简便且尤其适用于现场检测。Chen^[16]等基于 LAMP 反应,使用终点检测法,实现了对三种转基因大米样品的鉴定,灵敏度可达到 0.005%。Cheng 等^[17]将 LAMP 与横向流动检测试纸条技术结合,用于检测 DP305423×GTS 40-3-2 复合性状转基因大豆。Wu 等^[18]开发了一种实时荧光 LAMP 方法,利用便携式仪器检测荧光信号,30 min 内可以现场检测出含有 0.1% 的转基因大豆制品。与传统 PCR 相比,虽然 LAMP 技术摆脱了传统扩增方法对精密温控设备的要求,但反应体系配置和扩增时间并没有明显的优势,依然有开盖操作,也存在非特异性扩增。整体来看,还需进一步优化。

近几年出现的重组酶聚合酶扩增技术(RPA)可以在 37℃~42℃条件下,通过重组酶和链置换聚合酶的作用,实现模板 DNA 的快速扩增,扩增结束后可采用电泳、Twist Amp™ exo 探针和核酸检测试纸条进行可视化检测^[19,20]。与其它等温扩增技术相比:一是 RPA 无需热变性,反应时间更短,20 min 内即可实现核酸准确检测,是最快的扩增技术之一;二是可以在相对较低的温度下进行,如 37℃反应;三是即使样品中含有某些杂质也不会影响检测,可省去 DNA 纯化过程,因此该技术更加便捷;四是 RPA 体系中的酶呈冻干态,运输时不需要冷藏,更加便于运输。目前,RPA 技术已经成功应用于转基因检测。谢石龙等^[21]建立了转基因大豆 MON89788 的实时荧光 RPA 技术,相对检测限为 0.05%,检测在 39℃,10 min 内完成;Li 等^[22]将 RPA 技术与测流层析试纸相结合构建了一种三重转基因成分的检测方法,整个过程仅需要 30 min,该方法无需任何大型仪器,即可完成可视化、快速、灵敏的检测。Tian 等^[23]通过磷酸基团标记的引物进行 RPA 扩增,实现靶标的恒温可视化检测,并且该方法成功应用于转基因玉米 MON810 的检测中,在试剂盒开发方面具有广泛前景。但该技术的应用研究仍处于起步阶段,在实际应用中还存在一些问题,如 RPA 与试纸条联用时需对产物进行稀释,否则会出现假阳性结果;RPA 的引物探针需研发专业软件进行设计。

1.3 扩增产物检测技术

核酸扩增产物可以采用多种方法进行检测,如凝胶电泳、实时荧光、核酸试纸条和显色、生物传感

器等。核酸试纸条法是通过引物或探针进行生物素、地高辛等标记,核酸扩增结束后使用带有相应抗体的核酸试纸条检测扩增产物,根据条带的显色情况进行分析^[24,25]。汪琳等^[26]利用核酸试纸条技术显示 LAMP 扩增结果,建立了一种可视化、快速、灵敏、特异的转 EPSPS 基因作物检测方法,检测限可达到 10 个拷贝。Huang 等^[27]基于 CPA 扩增开发了核酸试纸条产品,用于高灵敏度现场检测 CaMV 35S 启动子。Liu 等^[28]开发了一种更有效的基于 RPA 和核酸试纸条的平台,可以灵敏、特异且稳定地检测 9 种转基因材料中的 P-35S 和 T-nos。核酸试纸条可以代替电泳仪等大型仪器,与蛋白试纸条一样快速、便携。但是存在引物二聚体和气溶胶产生假阳性现象,需要搭配密封装置。

在核酸扩增过程中,会生成副产物焦磷酸,可以通过检测焦磷酸达到检测的目的,操作简单、用时少,大大降低了成本。钙黄绿素作为金属离子指示剂,可与锰离子结合,导致钙黄绿素荧光猝灭,而核酸扩增过程中产生的焦磷酸根可以竞争结合锰离子,使钙黄绿素恢复荧光,因而可通过荧光信号进行检测^[29]。Mori 等^[30]在反应体系中加入镁离子,与焦磷酸产生白色沉淀,设计了一种通过浊度定性、定量判断 LAMP 扩增结果的装置。翟景波等^[31]研制了一种试剂盒,其中的试剂与焦磷酸反应生成红色的甲胂,根据显色现象进行定性判断或通过测定吸光度实现定量分析。然而,该方法也会因为一些非特异性扩增显色,导致假阳性结果。

2 基于蛋白水平的快速检测技术

基于蛋白的转基因快速检测技术是以免疫分析为基础的对转基因产品中外源表达蛋白进行定性和定量检测的一种技术,操作相对简便、快速、成本低,国内外均已研制出相关的快速检测产品,在实验室和现场检测中都得到了广泛应用^[2]。

2.1 免疫层析试纸条技术

免疫层析试纸条技术是目前应用最为广泛和成熟的现场快速检测技术。在国家和地方农业主管部门的转基因督查监管工作以及海关部门的口岸转基因检测工作中,都使用免疫层析试纸条进行初筛检测。该技术基于三明治夹心式技术原理,将抗体耦合到胶体金试纸条上,当抗体和样品中的抗原结合后,试纸条上就会发生显色反应来显示检测结果。蛋白试纸条检测无需仪器和专业技术人员,就可直接进行检测,用时短且成本低廉,是目前最

常用的快速检测方法之一。Zeng 等^[32]研制了一种胶体金免疫层析试纸条,用于同时检测 CP4 EPSPS、Cry1Ab 和 Cry1Ac 三种蛋白,其中 CP4 EPSPS 蛋白的检测灵敏度达到了 0.1%。

目前,在政府监管、企业进口加工、筛查检测等方面应用最广泛的产品是 cry1Ab/Ac、bar、Cp4-epsps 等转基因检测蛋白试纸条,其检测范围可以覆盖大部分常见转化体。为了更好地满足监管和市场需求,G10 EPSPS、VIP3A、Cry1F 等新蛋白检测试纸条以及多重试纸条陆续被研制出来。但是,免疫层析试纸条技术存在一定的局限性。它只能检测有无外源蛋白存在,仅做定性分析,无法通过检测转化体特异性序列确定具体的转基因品种。此外,这种检测法灵敏度较低,存在假阴性的情况,只适合田间种植作物的快速筛查,不适于外源蛋白已发生降解或者经深加工的转基因产品检测。

2.2 纳米增强 ELISA 技术

酶联免疫吸附(ELISA)技术是一种通过抗原和抗体的可视免疫反应来检测和鉴定目标蛋白的技术,也是目前转基因靶标蛋白定量分析的主要技术手段,具有设备需求低、易于读取结果和应用成熟的突出优点。但该方法需要多步孵育和清洗步骤以及存在灵敏度不足等缺点,限制了其在现场快速检测中的应用。金纳米颗粒具有较高的比表面积和独特的理化性质,与 DNA、抗体、酶和其它生物分子结合,可以增强反应信号以应用于生化检测。近年来,基于纳米颗粒和酶联免疫吸附法(ELISA)的高灵敏度蛋白质检测方法,即纳米增强 ELISA 技术(Nano-ELISA)被开发出来。Jia 等^[33]用目标蛋白 p53 的单克隆抗体修饰微磁珠,用另一种单克隆检测器抗体和辣根过氧化物酶(HRP)修饰金纳米颗粒(AuNPs),通过抗体与抗原之间的相互作用形成夹心结构,AuNPs 表面的 HRP 催化氧化底物并产生反映目标蛋白数量的光信号,用这种方法在不到 2h 的时间内即可检测到低至 5 pg/mL 的蛋白质。高鸿飞^[34]开发了一种简易、灵敏的 Nano-ELISA 便携装置,可以在 1.5 h 内完成外源蛋白一步式定量分析,以实现可视化检测,未来该技术可能在转基因现场定量检测中得到应用。

3 其它快速检测技术

生物传感器是一种新型分析技术,基于目标化合物和识别元件之间的选择性相互作用,如碱基互补配对和抗原抗体识别等,分析产生电或光信号进

行检测识别^[35]。生物传感器主要包括识别元件和信号转换元件两部分,识别元件主要是核酸、蛋白等生物材料,信号转换元件主要是光、电、磁、热等^[36]。生物传感器具有灵敏度高、分析速度快、通量高等优点,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^[25]。Volpe 等^[37]使用磁珠作为固定载体研发了一种免疫磁电化学传感器(IMES),用以检测转基因玉米粉中 Cry1Ab / Ac 蛋白的含量。高鸿飞^[34]合成了新型碳纳米粒子,将其和转基因靶标抗体结合修饰在工作电极上,首次构建了无需标记任何信号分子的电化学发光免疫传感器用于转基因作物的快速定量分析,该方法检测 Cry1Ab 蛋白时分析灵敏度达 3.0 pg/mL,检测 PAT/bar 蛋白分析灵敏度达 0.05 ng/mL,高于绝大多数已报道的转基因靶标蛋白分析方法,目前已成功应用于转基因油菜 RF3,转基因水稻 BT63 和转基因玉米 MON810 的定量分析。在上述方法学研究的基础上,该研究团队进一步研制了微型电极芯片,开发了手持式检测设备,操作简易,可以直接读取含量数值而无需进行数据分析处理,非常适合非专业人员使用,能够在 30 min 以内完成定量分析^[34]。

表面等离子体共振(SPR)技术是一种基于物理光学原理的新型生化分析技术。近年来,因其具有检测用量少、高灵敏度、高特异性、实时和快速等优势而广泛应用于各个领域,如临床诊断、转基因成分定性及定量检测、病毒鉴定、环境微生物检测等^[38]。程志强等^[39]利用表面等离子共振成像技术,分析了玉米的 6 种转基因序列和 6 种调控元件,将探针与靶序列结合的信号放大 40 倍左右,且省去了复杂的 PCR 扩增环节。Jang 等^[40]研制了一种高灵敏的 LSPR 生物传感芯片,能够高度灵敏地现场检测转基因作物。

4 总结与展望

基于核酸水平的转基因快速检测技术,需要在核酸提取、扩增和检测三个步骤同时优化提速。首先,对于核酸提取,要加快便携简易的研磨装置,特别是对于种子材料,如何在现场快速研磨,是提速的关键。DNA 直接提取法和核酸提取试纸条等可以省略核酸纯化步骤,将细胞裂解液作为模板直接进行扩增可大大缩短时间,简化操作。但是,如何克服细胞内离子、蛋白等抑制剂对核酸扩增的不利影响,是将快速核酸提取应用于核酸检测需要解决

的问题^[41]。其次,对于核酸扩增环节,核酸恒温扩增技术摆脱了传统PCR技术对大型仪器的依赖,具有较好的应用前景。其中,RPA扩增是特异性最好、最为快速的方法。但如何降低RPA酶的成本,提升酶的运输保存稳定性,优化引物设计,这些问题仍需进一步研究。第三,对于扩增产物检测阶段,一般分为实时检测和终点检测两种类型。终点检测更加贴近快速、可视的检测需求。核酸试纸条和显色法均属于终点检测,如何避免气溶胶污染,保证灵敏度和特异性,是应用的关键。总的来说,基于核酸的快速检测技术检测靶标更加广泛,可以检测非目标蛋白表达的序列如载体构建特异性序列、转化体特异性序列、筛选元件等,也可以确认转化体身份,更加真实、全面地反映产品的特征,是最接近实验室检测的手段,具有更广阔的应用价值。目前,优化三个步骤的相关技术和产品,建立一体化、全流程的检测策略,做好三个步骤的有效衔接,实现核酸快速提取技术、RPA技术和试纸条检测技术或可视化检测技术联用,需要探索和突破。

基于蛋白水平的转基因快速检测技术无需进行核酸提取步骤,样品只需要简单研磨即可进行检测,操作简便,成本低廉,非常适合转基因现场快速筛查。特别是免疫层析试纸条,国内外已经研发出了很多成熟的产品,在转基因快速检测领域应用最为广泛。但是该技术无法进行转化体身份确认和定量分析,是其进一步应用的局限所在。而且,随着转基因外源蛋白种类和数量的不断增多,如何制备高质量转基因蛋白靶标抗体是现今亟待解决的重点技术问题。特别是对于某些结构高度相似的转基因蛋白,如Bt系列蛋白,研制特异性抗体是当前一大难点。应加强对这类蛋白的跟踪、分析和研究,建立相关数据库和生产线。

目前,世界上许多国家或地区对转基因产品实行强制定量标识制度,且规定了较低的标识阈值,如欧盟阈值为0.9%,巴西和澳大利亚定量标识阈值为1%。我国目前施行的是定性标识,但不可否认定量标识管理将是未来发展的趋势。因此,发展精准、快速的定量检测技术迫在眉睫。生物传感器技术非常容易实现高度自动化、微型化和集成化,为基于蛋白水平的现场快速定量分析提供了一个可行的技术方案^[34]。将纳米材料合成技术、等离子共振技术等与生物传感器技术结合,发展多组分免疫传感分析研究,进一步提升检测效率,研发便携式设备,加强应用推广,将是转基因高灵敏、现场快

速定量分析的发展方向。

参考文献:

- [1] 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. DOI: 10.13523/j.cb.20170401.
- [2] 王颢潜, 陈锐, 李夏莹, 等. 转基因产品成分检测技术研究进展[J]. 生物技术通报, 2018, 34(3): 31-38. DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.20170-0814.
- [3] 杨雄年. 转基因政策[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2018.
- [4] 中华人民共和国农业部. 转基因植物及其产品成分检测 DNA 提取和纯化: 农业部 1485 号公告-4-2010 [S]. 北京: 中国农业出版社, 2011.
- [5] 王涛, 王超楠, 张红, 等. 大白菜基因组 DNA 快速提取方法的研究[J]. 华北农学报, 2017, 32(6): 67-72. DOI: 10.7668/hbxb.2017.06.010.
- [6] 蒋超, 黄璐琦, 袁媛, 等. 使用碱裂解法快速提取药材 DNA 方法的研究[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(7): 1081-1090. DOI: 10.16155/j.0254-1793.2013.07.005.
- [7] Bellstedt D U, Pirie M D, Visser J C, et al. A rapid and inexpensive method for the direct PCR amplification of DNA from plants [J]. Am J Bot, 2010, 97(7): e65-e68. DOI: 10.3732/ajb.1000181.
- [8] 蒋娜, 汪崇文, 周标, 等. 一种高性能磁性复合微球的制备及其在 DNA 提取中的应用[J]. 军事医学, 2016, 40(6): 520-524. DOI: 10.7644/j.issn.1674-9960.2016.06.017.
- [9] 王柳. 用于食品的核酸扩增检测技术研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2018.
- [10] 赵晓丽, 梁新苗, 槐硕, 等. 磁性纳米粒子的制备及在转基因大豆检测中的应用[J]. 植物检疫, 2017, 31(4): 31-33.
- [11] 陈丽丽. 转基因作物核酸快速提取和检测方法研究[D]. 上海: 上海师范大学, 2011.
- [12] 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.
- [13] Zou Y, Mason M G, Wang Y, et al. Nucleic acid purification from plants, animals and microbes in under 30 seconds [J]. PLoS Biol, 2017, 15(11): e2003916. DOI: 10.1371/journal.pbio.2003916.
- [14] Wang Q, Shen X, Qiu T, et al. Evaluation and application of an efficient plant DNA extraction protocol for laboratory and field testing[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2021, 22(2): 99-111. DOI: 10.1631/jzus.b2000465.
- [15] 王嘉钰, 董娟, 唐卓. 基于环介导等温扩增法可视化检测玉米转基因成分[J]. 应用与环境生物学报, 2019, 25(6): 1497-1502. DOI: 10.19675/j.cnki.1006-687x.2019.04020.
- [16] Chen X, Wang X, Jin N, et al. Endpoint visual detec-

- tion of three genetically modified rice events by loop-mediated isothermal amplification[J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(11): 14421–14433. DOI: 10.3390/ijms131114421.
- [17] Cheng N, Shang Y, Xu Y, et al. On-site detection of stacked genetically modified soybean based on event-specific TM-LAMP and a DNAzyme-lateral flow biosensor[J]. Biosens Bioelectron, 2017, 91: 408–416. DOI: 10.1016/j.bios.2016.12.066.
- [18] Wu H, Zhang X J, Wu B Q, et al. Rapid on-site detection of genetically modified soybean products by real-time loop-mediated isothermal amplification coupled with a designed portable amplifier[J]. Food Chem, 2020, 323: 126819. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.126819.
- [19] Euler M, Wang Y, Nentwich O, et al. Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of Rift Valley fever virus[J]. J Clin Virol, 2012, 54(4): 308–312. DOI: 10.1016/j.jcv.2012.05.006.
- [20] Nair G, Rebolledo M, White A C, et al. Detection of *Entamoeba histolytica* by recombinase polymerase amplification[J]. Am J Trop Med Hyg, 2015, 93(3): 591–595. DOI: 10.4269/ajtmh.15-0276.
- [21] 谢实龙, 汪小福, 丁晨露, 等. 转基因大豆 MON89788 实时荧光重组酶聚合酶扩增检测方法的建立[J]. 农业生物技术学报, 2019, 27(7): 1301–1310.
- [22] Li K, Luo Y, Huang K, et al. Single universal primer recombinase polymerase amplification-based lateral flow biosensor (SUP-RPA-LFB) for multiplex detection of genetically modified maize[J]. Anal Chim Acta, 2020, 1127: 217–224. DOI: 10.1016/j.aca.2020.06.001.
- [23] Tian J J, Zhang Y, Zhu L J, et al. dsDNA/ssDNA-switchable isothermal colorimetric biosensor based on a universal primer and λ exonuclease[J]. Sens Actuat B: Chem, 2020, 323: 128674. DOI: 10.1016/j.snb.2020.128674.
- [24] Takalkar S, Baryeh K, Liu G. Fluorescent carbon nanoparticle-based lateral flow biosensor for ultrasensitive detection of DNA[J]. Biosens Bioelectron, 2017, 98: 147–154. DOI: 10.1016/j.bios.2017.06.045.
- [25] 崔丹丹, 翟彬彬, 文璐珂, 等. 基于便携式生物传感器设备的转基因现场快速分析研究[J]. 中国油料作物学报, 2021, 43(1): 22–30. DOI: 10.19802/j.issn.1007-9084.2020346.
- [26] 汪琳, 罗英, 周琦, 等. 核酸试纸条在检测转 *EPSPS* 基因作物中的应用[J]. 生物技术通讯, 2011, 22(2): 238–242. DOI: 10.3969/j.issn.1009-0002.2011.02.021.
- [27] Huang X, Zhai C, You Q, et al. Potential of cross-priming amplification and DNA-based lateral-flow strip biosensor for rapid on-site GMO screening[J]. Anal Bioanal Chem, 2014, 406(17): 4243–4249. DOI: 10.1007/s00216-014-7791-y.
- [28] Liu H, Wang J B, Li P, et al. Rapid detection of P-35S and T-nos in genetically modified organisms by recombinase polymerase amplification combined with a lateral flow strip[J]. Food Control, 2020, 107: 106775. DOI: 10.1016/j.foodcont.2019.106775.
- [29] Zhang X, Lowe S B, Gooding J J. Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP)[J]. Biosens Bioelectron, 2014, 61: 491–499. DOI: 10.1016/j.bios.2014.05.039.
- [30] Mori Y, Kitao M, Tomita N, et al. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA[J]. J Biochem Biophys Methods, 2004, 59(2): 145–157. DOI: 10.1016/j.jbbm.2003.12.005.
- [31] 翟景波, 霍万学, 包桂兰, 等. 焦磷酸显色法检测 PCR 产物及酶活性[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2016, 32(4): 466–472. DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2016.04.17.
- [32] Zeng H, Wang J, Jia J, et al. Development of a lateral flow test strip for simultaneous detection of BT-Cry1Ab, BT-Cry1Ac and CP4 EPSPS proteins in genetically modified crops[J]. Food Chem, 2021, 335: 127627. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.127627.
- [33] Jia C P, Zhong X Q, Hua B, et al. Nano-ELISA for highly sensitive protein detection[J]. Biosens Bioelectron, 2009, 24(9): 2836–2841. DOI: 10.1016/j.bios.2009.02.024.
- [34] 高鸿飞. 基于免疫传感新方法的外源蛋白分析研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2020.
- [35] Uniyal S, Sharma R K. Technological advancement in electrochemical biosensor based detection of Organophosphate pesticide chlorpyrifos in the environment: a review of status and prospects[J]. Biosens Bioelectron, 2018, 116: 37–50. DOI: 10.1016/j.bios.2018.05.039.
- [36] 张玉昆. 基于 SPR 和电化学的转基因检测 DNA 传感器研究[D]. 长春: 长春理工大学, 2020.
- [37] Volpe G, Ammid N H, Moscone D, et al. Development of an immunomagnetic electrochemical sensor for detection of BT-CRY1AB/CRY1AC proteins in genetically modified corn samples[J]. Anal Lett, 2006, 39(8): 1599–1609. DOI: 10.1080/00032710600713339.
- [38] 安娜, 郑子繁, 董美, 等. 基于表面等离子体共振的核酸传感器研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2019, 21(5): 55–61. DOI: 10.13304/j.nykjdb.2018.0422.
- [39] 程志强, 宋炉胜, 韩琪, 等. 基于表面等离子共振成像的转基因样本高灵敏检测方法的研究[C]//中国化学会第28届学术年会论文集. 成都, 2012: 67.
- [40] Jang H, Kwak C H, Kim G, et al. Identification of genetically modified DNA found in Roundup Ready soybean using gold nanoparticles[J]. Microchimica Acta, 2016, 183(9): 2649–2654. DOI: 10.1007/s00604-016-1899-z.
- [41] 王瑞. 快速核酸扩增及可视化策略用于食源性致病菌和转基因作物检测[D]. 杭州: 浙江大学, 2019.

(责任编辑:胡志勇)