广东农业科学 2017，44（2）：32–38
Guangdong Agricultural Sciences doi：10.16768/j.issn.1004–874X.2017.02.006

李夏莹，张秀杰，宋贵文 . 转基因生物检测方法研究进展［J］. 广东农业科学，2017，44（2）：32–38.

转基因生物检测方法研究进展

李夏莹，张秀杰，宋贵文
（农业部科技发展中心，北京 100176）

摘 要：随着转基因技术在农业领域的迅速应用与发展，转基因产品的种类与数量逐渐增加，转基因产品的安全性也越来越被社会公众广泛关注，转基因检测技术体系也迫切需要持续的创新与发展。简要介绍了转基因作物尤其是非授权转基因作物的成分分析检测思路及方法，目前转基因检测主要是基于外源蛋白和核酸成分的检测技术及方法，如酶联免疫吸附技术、PCR 技术、等温扩增技术等，另外还有一些检测新技术如指纹识别，微阵列、高通量测序等，希望对我国转基因生物安全管理工作有所启发。

关键词：转基因生物；生物安全；检测方法；基因型；PCR 技术
中图分类号：Q785 **文献标识码：**A **文章编号：**1004–874X（2017）02–0032–07

Research progress detection methods of genetically modified organisms（GMOs）

LI Xia–ying, ZHANG Xiu–jie, SONG Gui–wen
（*Development Center of Science and Technology*, *Ministry of Agriculture*, *Beijing* 100176, *China*）

Abstract: With the rapid application and development of transgenic technology in agriculture, the categories and quantities of transgenic products progressively increased, the safety of genetically modified organisms（GMOs）has attracted more and more extensive concern of the public. Accordingly, it is very urgently needed constant innovation and development for the transgenic detection technique systems. The article briefly reviewed the common detection technology and method of GMO, especially the un–authorized GMO both in China and abroad, the existing primary detection technology and method of GMO mainly based on detection of exogenous protein and nucleic acid, such as ELISA, PCR, isothermal amplification technology and so on, there were also a number of new technologies such as fingerprint identification, microarray, high–throughput sequencing. The paper may have some inspiration to the safety management of genetically modified organisms in our country.

Key words: GMO; bio–safety; detection method; genotype; PCR

从 1996 年至今，转基因生物（GMO）已经商业化 20 年，在此期间全球转基因作物累计种植面积达到 20 亿 hm^2，相当于中国国土面积的 2 倍，农民累计获益超 1 500 亿美元[1]。商业化种植的转基因作物主要有大豆、玉米、棉花和油菜 4 种[2]。随着科技的发展，转基因生物的田间试验和商业化速度不断加快，转基因涉及的物种、国家、遗传元件的种类、国际贸易也日益增加，这就大大增加了 GMO 准确检测的复杂性，故对转基因检测技术的研究和跟踪显得尤为重要[3–4]。

目前转基因成分的检测方法主要有以下四大类：一是基于核酸的检测方法，包括基因芯片和 PCR，根据原理不同 PCR 方法又分为普通 PCR、多重 PCR、巢式 PCR、竞争 PCR、实时荧光 PCR、数字 PCR，以及包含交叉引物扩

收稿日期：2016–10–09
作者简介：李夏莹（1986–），女，博士，农艺师，E–mail：esmacloed006@163.com
通讯作者：宋贵文（1965–），男，高级农艺师，E–mail：songguiwen@agri.gov.cn

增、LAMP、滚环扩增、依赖核酸扩增的恒温扩增的方法[5]。二是基于蛋白的检测方法，包括蛋白质印迹法（Western blot）、酶联免疫吸附法（ELISA）、免疫层析法，但这些方法都依赖于目标蛋白抗体的获得，故存在一定难度。三是基于代谢物的检测方法，包括直接分析检测物成分的高效液相色谱法，以及双向电泳法。四是其他的检测方法，包括蛋白和核酸试纸条等快速检测的方法。虽然方法很多，但是目前检测中最常用的还是普通 PCR 和实时荧光 PCR 的方法。

GMO 的检测方法，包含非授权 GMO 的检测方法，许多国家，包括欧盟，在法律上区分授权的（合法）和非授权的（非法）GMOs。目前已有的检测方法和筛选元件并不能涵盖非授权的 GMOs，从而会出现漏检的情况。针对这个问题，一些国际组织也作了一些积极的尝试，如 OECD Biotrack 主动分享数据库里转基因事件的相关信息，但信息的不全面仍然给 GMOs 的检测和鉴定带来了挑战，特别是非授权的 GMOs[6]。本文主要阐述转基因作物的检测方法，为 GMO 的检测提供参考。

1　GMO 基因型和表型的检测

目前大多数的 GMO 都是插入了一个外源的基因[7]，如果转入的基因都是来源于受体物种本身，或者是能够发生基因互换的物种，称为基因顺化。如果插入基因内部的元素发生了重排[8]，插入的部分或全部的 DNA 来源于其他物种，或者受体生物不能自发基因重排，GMO 被分类为转基因[9-10]。所有 GM 植物的基因修饰，都是由 DNA 序列信息的改变来定义的[11]。基因修饰也会发生在转录水平，但转录水平的调控很容易受到外界环境的影响，如年龄、成长阶段、器官、组织、细胞类型、时间（昼夜、季节）的影响。故通过转录分析来检测 GMO 并不是普遍适用的[12]，而直接对目的 DNA 序列的分析才可以有效区分假阳性和假阴性。外源基因翻译产生的蛋白质也被认为是 GMO 的目标标签，但由于密码子存在简并性不同的转录本会翻译成相同的蛋白，且其稳定性不好，故不太适合于转基因检测。此外，也可以根据生物的表型辨别 GMO，比如某种生物获得转基因特性之后可以耐受除草剂。但表型识别的应用范围受到限制，以耐除草剂植物为例，植物在自然环境中生长，对除草剂产生抗性必须要区分好转基因的表型和自然突变。

2　GMO 分析的现代方法

2.1　模块化的定义

在欧洲和其他很多国家，转基因的分析有一个完整的程序（图 1）。

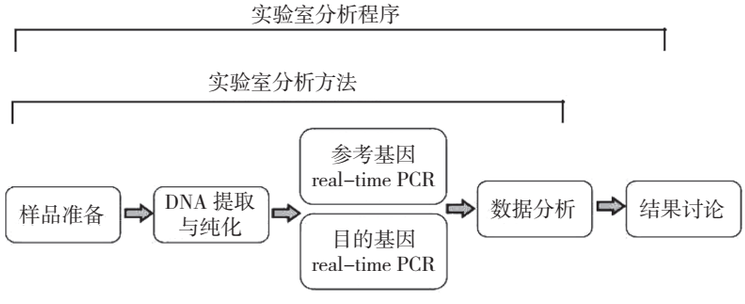

图 1　GMO 分析程序

分析方法是分析程序的核心，被认为是有一系列的步骤。Holst-Jensen[13]和 Trapmann 等[12]指出：在欧盟的转基因检测体系中，DNA 是唯一具有法律效应的被分析物。GMO 检测的程序包括样品准备、DNA 提取和纯化、PCR 扩增、数据分析[15]。目前通用的是根“模块方法”，对于任何一个目标序列均包括：样品准备、DNA 提取、PCR。因此，一个模块可以被定义为一个独立的操作，输入材料后，生成一个改变了的输出

材料或数据。例如：（1）在样品准备模块：输入的是谷物，输出的是粉末；（2）在 DNA 提取和纯化模块，输入的是粉末，输出的是溶于水的纯化 DNA；（3）在 real-time PCR 模块，输入的是纯化的 DNA，输出的是荧光度和目的基因的拷贝数；（4）数据分析模块，则将有效的数据加工成为最终的测量结果。

2.2 GMO 检测的模块

模块方法的优点在于增加了灵活性，是一种 Ad Hoc 设计合理的和成本有效的验证和测试策略。模块方法目前主要集中于用 PCR 的方法分析 DNA，当然从理论上来讲该方法还可以应用于别的目标不仅仅限于 DNA。本文主要考察 PCR 模块，因为该模块是公认的应用于转基因分析的模块。

每一个分析模块最显著的特性是其特异性，对于 PCR 模块在 GMO 检测中有 4 个水平可区分其特异性（图 2）。

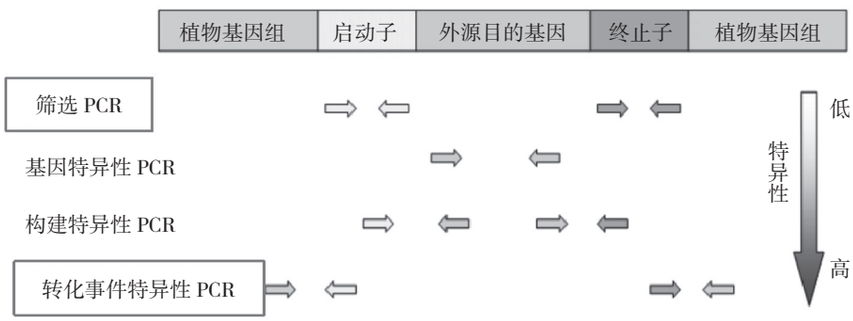

图 2　转化过程中 4 个层次明确 DNA 序列特异性的方法

3　检测非授权 GMOs 的方法

3.1　直接检测注册非授权 GMO

最简单的情况是个别样品存在特定的未经授权转基因，如 2006 年拜耳作物公司由美国向欧洲出口的大米中存在未经授权 LL601 事件，之后该公司紧急宣布此事件为无意释放[14]。欧盟和挪威的官方实验室使用构建特异性的检测方法分析了此次事件中的所有大米，并很快确定了目标，详见 EURL-GMFF[16]。2010 年，一份来自于美国的大米接受了挪威兽医研究所的检测，不同于直接检测 LL601 大米，样品接受了更为广泛的筛选分析。分析结果显示：可能存在其他非授权的大米，即 Bt63。但 Bt63 转基因水稻是迄今为止只追溯到中国水稻，并且从未在亚洲以外的地方发现该水稻的起源。进一步的分析发现：该样品中包含 Bt63（RASFF reference no. 2010.0853），之后对该事件做出了澄清：来自 USA 的大米在来到欧洲之后混合了来自中国的大米。所以，样品中 Bt63 的真正来源是亚洲，而不是 USA。如果仅仅分析材料来源，Bt63 大米将永远不会被检测到。对于非授权 GMOs 的检测和分析，要综合考虑各种因素，才可能得到准确的判断。

3.2　基于筛选由单个或少量转基因成分的产品测试

以 PCR 方法为基础的筛选方法能否覆盖所有的授权 GMOs 是需要考虑的问题。依据最近的情况，很有必要筛选更为广泛的 PCR 检测方法进行 GMO 筛选。如果法律规定只有官方认定的成分应该被考虑，那么非认定的成分存在于样品中也将被认定为无关的，但这并不意味着它们不会干扰分析和混淆结果[17]。

检测极限（LOD）是一个关键的参数。LODabs 通常是目标基因的 5 ~ 10 个拷贝。对于每一次试验，接近于 LOD 的浓度通常具有假阴性的风险。这是在分析结果时必须要考虑进去的。如果两个筛查的目标都存在 GMOs，只是插入的拷贝数不同，那么相应的 LOD 也会不同。完善的方法是不仅可以确定 GMO 是否存在，还可以确定检测目标的浓度。浓度可以由标准曲线外推，但这样的推算有一定的误差。基于公开

获得的数据做出一个合理的假设，绝大多数的GMOs插入目的基因的拷贝数的比值表现在1∶1至1∶5的范围。

3.3 基于多重筛选方式的GMO检测方法

成分复杂的样品和（或）DNA很容易降解的样品会给检测带来很大的困难。DNA降解会显著降低GMOs的可检测度，因为在材料中目的序列的拷贝数会减少[18]。多种组分混合会减少特定组分的相对比例，导致目的序列在总DNA中的比例也会降低[19]。LODpract对于任何一个GMO来说，都是组分中DNA的完全数量，可以通过PCR分析获得[20]，LODpract此受到过程和多种成分混合的影响。

检测过程中存在3个难点：一是在低浓度的目的DNA，二是样品成分复杂，三是不同品种的GMOs含有相同的筛选目标。如果一个样品中存在来自3个品种（物种）的3个筛选元件或者1个样品中是不同GMOs杂交的品种，这就意味着筛选的结果将很难解释[21]。故转基因生物的筛选方法，有必要明确筛选PCR是否可以检测出现有品种中所有的GMOs[17]，或任何1个品种中的GMOs是否包含检测元件。

4 应用于检测的可选、先进的技术

分子生物学技术的进步，增加了插入不包含任何的遗传元件的转基因生物的数量。因此，一个生物样品中存在着检测模块检测不出来的GMO是真正的风险，建立合作专家网络和研究新的检测方法或许可以下降低风险。

4.1 指纹识别技术

Raymond等[22]概括了可用于GMO检测和定性的有效分析工具，并探讨了DNA指纹作为鉴定转基因产品的一种替代方法[23]。从生物样品中提取DNA，可运用PCR技术扩增出高可变位点（如VNTR系统，串联重复的小卫星DNA等）或者完整的基因组DNA，然后将扩增出的DNA酶切成DNA片断，经琼脂糖凝胶电泳，按分子量大小分离后，转移至尼龙滤膜上，然后将已标记的小卫星DNA探针与膜上具有互补碱基序列的DNA片段杂交，用放射自显影获得DNA指纹图谱。

4.2 多重PCR结合微阵列技术

多重PCR从单一反应中一次性检测到多个目的基因，减少了反应次数。但多重PCR反应的引物、探针设计难度较大。此外，多重PCR的承载量还受到发射光和吸收光光谱的限制，因为不同荧光的组合会增加荧光的背景，影响结果的判定，且重叠信号是不能被使用的。目前为止，最多可以实现六个荧光信号成功的标记在同一个反应中。在多重PCR反应的基础上再结合基因芯片的方法，就可以达到高通量检测的目的[24-25]。基因芯片（gene chip），是一块带有DNA微阵列（micorarray）涂层的特殊玻璃片，在数平方厘米之面积上安装数千或数万个核酸探针，经由一次测验，即可提供大量基因序列相关资讯。研究人员应用基因芯片就可以在同一时间定性、定量的分析大量（成千上万个）的基因表达的水平，具有快速、精确、低成本之生物分析检验能力[26-27]。

4.3 第三代测序技术

2008年，美国Harris等发明了一种单分子测序技术，并成功对M13病毒的基因组进行了重测序，因此也拉开了以单分子测序为标志第三代测序帷幕。目前，引领第三代测序的主要有通过检测标记荧光获得序列信息的Helicos的HeliScope遗传分析系统和PacBio的SMRT技术，以及Oxford Nanopore公司的纳米孔测序技术（Nanopore）等[28-30]。2011年春季在欧洲引起大量人死亡的大肠杆菌定性方面测序技术起了重要作用[31]，2015年也有文献报道：测序技术有效识别未授权的GMO（高表达维生素B2的枯草芽孢杆菌）[32]。

4.4 数字PCR

数字PCR（Digital PCR-dPCR）技术是一种新的核酸检测和定量方法，与传统定量PCR（qPCR）技术不同，数字PCR采用绝对定量的方式，不依赖于标准曲线和参照样本，直接检测目标序列的拷贝数。该方法的原理是将核酸模板进行稀释，分配到大量独立的反应空间中，理论上使每个空间中只有一个DNA，然后进行PCR扩增反应，扩增结束后对荧光信号进行统计学分析，来计算目的DNA拷贝数。数字PCR

采用先扩增后定量，因此不依赖扩增曲线的循环阈值（Ct），准确度高、重现性好，实现了绝对定量分析。有研究表明：一次数字 PCR 反应中可以同时准确定量分析了 8 个不同的目标基因（包括 7 个转基因玉米转化事件和玉米内标准基因）[33]。

4.5 生物传感器

转基因作物的杂交品种（即堆叠式转基因生物）因其生产效率的提高和功能的改善而日益流行，而堆叠式转基因生物的检测是一个亟待解决的难题。近年来，有研究表明：多标记的电化学生物传感器可以同时检测含多种转基因成分的产品[34]。

4.6 替代 PCR 的前瞻性

考虑经济效益，无论是高密度微阵列还是下一代测序都不适合于常规的转基因检测。然而，在不久的将来，这些技术将变得更便宜，对人员技能的要求也会降低，设备应用越来越广泛。因此，替代和先进的工具逐渐将找到自己的方式，也为转基因检测提供新的技术手段。

5 展望

随着转基因技术的发展，新的基因编辑技术（如 Talen 和 CRISPR-cas9）和产品的出现，使转基因的检测和监测越来越困难。目前，转基因成分检测方法是主要以目的 DNA 为检测对象的 PCR 技术。PCR 扩增技术有两个关键点：模板 DNA 的质量和引物的特异性。随着转基因产品加工技术水平和加工精度的提高，模板 DNA 在加工过程中破坏更为严重，加工过程引入的物理、化学或生物性的 PCR 反应抑制因子，给转基因检测带来了困难。因此，为提高转基因成分检测的特异性及灵敏度，需大力发展复杂样品的核酸提取和纯化技术，同时也应发展特异性和灵敏度更高、重复性更好、检测更快速、结果更可靠的新型核酸检测技术，如高通量测序技术。随着转基因产品商业化加快，要求在短时间内同时完成大量样品的各种转基因成分检测，因此，高通量、自动化、微型化、低成本、高灵敏度、高特异性、快速简便、准确高效的转基因检测技术及技术组合将是未来转基因检测技术研究与应用的发展方向。

参考文献：

[1] James C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2015[R]. ISAAA Briefs—Executive summary, 2015.

[2] Clive J. 2012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，2013，33（2）：l-8.

[3] Broeders SR1, De Keersmaecker SC, Roosens NH. How to deal with the upcoming challenges in GMO detection in food and feed[J]. J Biomed Biotechnol, 2012, 33(2): 402-418.

[4] Nascimento VE1, Von Pinho ÉV, Von Pinho RG. Detection limits of the strip test and PCR for genetically modified corn in Brazil[J]. Genet Mol Res, 2012, 11(3): 2497-2505.

[5] Xu J, Zheng Q, Yu L. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of genetically modified maize T25[J]. Food Sci Nutr, 2013, 1(6): 432-440.

[6] Arulandhu AJ, Dijk JP, Dobnik D. DNA enrichment approaches to identify unauthorized genetically modified organisms (GMOs)[J]. Anal Bioanal Chem, 2016: 22-38.

[7] BCH. Living Modified Organism (LMO) Registry—Biosafety Clearing-House[EB/OL]. http: //bch. cbd. int/database/lmo-registry/ 2011.

[8] Lusser M, Parisi C, Plan D, et al. New plant breeding techniques. State-of-the-art and prospects for commercial development[R]. European Commission, EUR 24760 EN, 2011: 22-36.

[9] European Commission. Directive 2001/18/EC of the European Parliament and the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC, L106[J]. Official Journal of the European Communities, 2001: 1-38.

[10] Frizzi A, Huang S. Tapping RNA silencing

pathways for plant biotechnology[J]. Plant Biotechnol J, 2010, 8: 655–677.

[11] Holst–Jensen A, Berdal K G. The modular analytical procedure and validation approach and the units of measurement for genetically modified materials in foods and feeds[J]. J AOAC Int, 2004, 87: 927–936.

[12] Mukherji S, Ebert MS, Zheng GXY, et al. van Oudenaarden A. MicroRNAs can generate thresholds in target gene expression[J]. Nat Genet, 2011, 43: 854–869.

[13] IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997) [R]. XML on–line corrected version: http: //goldbook.iupac.org (2006–) created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; updates compiled by A. Jenkins, 1997: 223–225.

[14] European Commission. Regulation (EC) No 1981/2006 of 22 December 2006 on detailed rules for the implementation of Article 32 of Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council as regards the Community reference laboratory for genetically modified organisms[J]. Off J Eur Union, 2006, 368 (1): 99–109.

[15] EURL–GMFF. Addendum to the report on the verification of an event–specific detection method for identification of rice GM–event LLRICE601 using a real–time PCR assay[J]. European Union's Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed, 2006, 11 (5): 1–10.

[16] European Commission. Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed[R]. Off J Eur Union, 2003, 5 (1): 1–23.

[17] Berben G, Debode F, Janssen E. The problem of botanical impurities and GMO detection. Co–Extra Project[J]. Deliverable Report, 2012, 6 (2): 4–11.

[18] Ruttink T, Demeyer R, Van Gulck E, et al. Molecular toolbox for the identification of unknown genetically modified organisms[J]. Anal Bioanal Chem, 2010, 396 (1): 73–89.

[19] Gryson N. Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR–based GMO analysis: a review[J]. Anal Bioanal Chem, 2010, 396 (2): 2003–2022.

[20] Holst–Jensen A, Rønning SB, Løvseth A, et al. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs) [J]. Anal Bioanal Chem, 2003, 375 (6): 985–993.

[21] Wu Y, Li J, Wang Y. Development and application of a general plasmid reference material for GMO screening[J]. Plasmid, 2016, 8 (1): 1–6.

[22] Raymond P, Gendron L, Khalf M, et al. Detection and identification of multiple genetically modified events using DNA insert fingerprinting[J]. Anal Bioanal Chem, 2010, 396 (1): 91–102.

[23] Weber G, Shendure J, Tanenbaum DM, et al. Identification of foreign gene sequences by transcript filtering against the human genome[J]. Nat Genet, 2002, 30 (2): 141–142.

[24] Tengs T, Kristoffersen AB, Berdal KG, et al. Microarray–based method for detection of unknown genetic modifications[J]. BMC Biotechnol, 2007, 7: 91–95.

[25] Brod FC, van Dijk JP, Voorhuijzen MM. A high–throughput method for GMO multi–detection using a microfluidic dynamic array[J]. Anal Bioanal Chem, 2014, 406 (5): 1397–1410.

[26] Nesvold H, Kristoffersen AB, Holst–Jensen A, et al. Design of a DNA chip for detection of unknown genetically modified organisms (GMOs) [J]. Bioinformatics, 2005, 21: 1917–1926.

[27] Tengs T, Kristoffersen AB, Berdal KG, et al. Microarray–based method for detection of unknown genetic modifications[J]. BMC Biotechnol, 2007, 7 (2): 91–95.

[28] Darrasse A, Kotoujansky A, Bertheau Y. Isolation by genomic subtraction of DNA probes specific

for Erwinia carotovora subspatroseptica[J]. Appl Environ Microbiol, 1994, 60: 298–306.

[29] Mardis ER. The impact of next-generation sequencing technology on genetics[J]. Trends Genet, 2007, 24: 133–141.

[30] Mellmann A, Harmsen D, Cummings CA, et al. Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic Escherichia coli O104: H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology[J]. PLoS One, 2011: 6–15.

[31] Dobnik D, Štebih D, Blejec A. Multiplex quantification of four DNA targets in one reaction with Bio-Rad droplet digital PCR system for GMO detection[J]. Scientific Report, 2016, (14)6: 35451–35556.

[32] Cheng N, Shang Y, Xu W. On-site detection of stacked genetically modified soybean based on event-specific TM-LAMP and a DNAzyme-lateral flow biosensor[J]. Biosens Bioelectron, 2016, 91: 408–416.

[33] Barbau-Piednoir E, Keersmaecker SC, Delvoye M. Use of next generation sequencing data to develop a qPCR method for specific detection of EU-unauthorized genetically modified Bacillus subtilis overproducing riboflavin[J]. BMC Biotechnol, 2015, 11(15): 103–110.

[34] Huang L, Zheng L, Chen Y. A novel GMO biosensor for rapid ultrasensitive and simultaneous detection of multiple DNA components in GMO products[J]. Biosens Bioelectron, 2015, 15 (66): 431–447.

（责任编辑　杨贤智）