

转基因成分分析检测技术研究进展

蔡军^{1,2#}, 李慧^{1,2##}, 胡梦龙^{1,2}, 傅洋^{1,2}, 汪磊³, 王璐⁴

(1. 中粮营养健康研究院有限公司, 北京 102209; 2. 营养健康与食品安全北京市重点实验室, 北京 102209;
3. 中粮米业(仙桃)有限公司质量安全部, 仙桃 433000; 4. 中粮集团大米单元质量与安全管理部, 北京 100020)

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, 世界各国有关转基因产品标识制度不断建立和完善, 一些国家规定了转基因成分的最低含量阈值, 因此相应的转基因检测技术体系也迫切需要持续的创新与发展。本文简要介绍了国内外常用转基因成分分析检测技术及方法, 目前转基因检测主要是基于外源蛋白靶标和外源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、基因芯片技术及数字 PCR 技术等, 并对相应检测技术及方法在国内外转基因成分检测中应用新进展进行了概述, 同时对各检测技术的优缺点进行了相应的总结, 使人们对于转基因检测技术的现状及发展趋势能够有较为清晰和全面的了解。

关键词: 转基因; 检测技术; 研究进展

Research progress in techniques for the detection and analysis of genetically modified ingredients

CAI Jun^{1,2#}, LI Hui^{1,2##}, HU Meng-Long^{1,2}, FU Yang^{1,2}, WANG Lei³, WANG Lu⁴

(1. *Nutrition & Health Research Institute, COFCO Corporation, Beijing 102209, China*; 2. *Beijing Key Laboratory of Nutrition, Health & Food Safety, Beijing 102209, China*; 3. *Quality & Safety Department, COFCO Rice (Xiantao) Co. Ltd., Xiantao 433000, China*; 4. *Quality & Safety Management Department, COFCO Rice Division, Beijing 102209, China*)

ABSTRACT: With the rapid application and development of transgenic technology in agriculture, the categories and quantities of transgenic products are progressively increased, the safety of genetically modified organisms (GMOs) has attracted more and more extensive concern of the public, the genetically modified productions labeling systems all over the world has been gradually established and improved, and some countries have provided a minimum threshold of genetically modified ingredients (GMIs) content. 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 GMIs both in China and abroad, the existing primary detection technology and method of GMIs mainly based on detection of exogenous protein and nucleic acid, such as ELISA, PCR, isothermal amplification technology, gene chip technology, digital PCR and so on. It also summarized the application progress of the corresponding in the detection of GMIs, meanwhile summarized the advantages and disadvantages of each corresponding methods, in order to be aware clearly and completely in public about the current situation of global

#蔡军、李慧为共同第一作者

#CAI Jun and LI Hui are co-first authors.

*通讯作者: 李慧, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品生物检测及研发。E-mail: lhui@cofco.com

*Corresponding author: LI Hui, Ph.D., Senior Engineer, Nutrition & Health Research Institute, COFCO Corporation, Beijing 102209, China. E-mail: lhui@cofco.com

detection technologies of GMO and their future development trend.

KEY WORDS: genetically modified organisms; common detection technique; research progress

1 引言

自 1994 年转基因番茄在美国首次商业化种植以来, 转基因技术在农业生产领域得到了快速的应用与发展, 转基因作物的种植面积逐年扩大, 已经对现代农业产生了巨大的冲击和深刻的影响。据国际农业生物技术应用服务组织统计, 2014 年种植转基因作物的国家达到 28 个, 并且全球转基因作物种植面积由 1996 年的 170 万公顷增加到 2014 年的 1.81 亿公顷, 转基因作物的种植面积增加超过 100 倍^[1]。随着转基因作物种植的迅猛发展, 关于转基因生物及其产品成分食用和环境安全性的争议也与日俱增, 相应的争议事件也频频出现。巴西坚果过敏事件^[2]、帝王蝶事件^[3]、墨西哥玉米转基因污染事件^[4]、转基因玉米 MON863 对小鼠肝肾毒性事件^[5]、食用转基因玉米 Mon810 后小鼠免疫表型异常事件^[6]及孕妇胎儿血液 CryAb1 毒素 (Bt 蛋白) 事件^[7]等。虽然以上种种争议事件后续都被证实缺乏实验设计、统计或结论的科学性, 或者缺少官方正面申明, 但是关于对转基因生物及其产品成分食用和环境安全性的怀疑从未停息, 还有愈演愈烈的趋势。因此, 世界各国都在不同程度上制订了相应的管理制度, 主要包括安全性评价制度和转基因成分标识制度等。由于不同国家和地区在转基因产品的阈值范围、标识方式等管理制度上的差异, 直接关系到转基因产品的进出口检疫、国际贸易互认等诸多问题, 加之转基因生物及其产品成分食用和环境安全性越来越被社会公众所广泛关注, 直接推动了转基因检测技术近年来的快速发展和广泛应用^[8-10]。目前国内外对转基因作物及其相关制品的检测主要是基于外源蛋白靶标和外源核酸成分的检测来展开的, 建立了一系列常见的快速、灵敏的转基因定性和定量检测技术, 如酶联免疫吸附技术 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、PCR 技术、等温扩增技术 (isothermal amplification)、基因芯片技术 (gene chip) 及数字 PCR 技术 (digital PCR, d PCR) 等, 本文将对国内外常见转基因检测技术方法及其相应的特点进行概述。

2 常见转基因检测技术

2.1 基于外源蛋白靶标的检测技术

基于外源蛋白靶标的检测技术主要是以免疫分析技术为基础, 利用转基因作物产生的特定的外源蛋白与抗体的特异性识别进行检测和定量的技术。常见基于外源蛋白靶标的转基因检测技术包括酶联免疫吸附技术 (ELISA)、蛋白印迹 (Western blot) 检测技术、免疫层析试纸条技术及蛋白质芯片技术 (protein chip) 等。

2.1.1 酶联免疫吸附技术

酶联免疫吸附技术是基于外源蛋白靶标检测的主要检测技术。该技术将抗原抗体识别的特异性、酶促反应快速灵敏高效等优点相结合, 已被广泛用于转基因作物及其相关制品外源蛋白的检测和定量分析。Kim 等^[11]采用酶联免疫吸附技术对转基因胡椒中 PAT 及 NPT II 的不同时效表达进行了准确定量比较研究; Kamle 等^[12]建立了定量测定转基因棉花 Bt 蛋白的双抗体夹心酶联免疫吸附法; Tan 等^[13]建立了定量检测 CpT1 基因表达蛋白的双抗体夹心酶联免疫吸附法, 检测限可达 0.21 ng/mL。

2.1.2 Western blot 检测技术

Western blot 技术是基于外源蛋白靶标检测的一种经典技术。其基本原理是将制备的蛋白质样品通过 SDS-PAGE 电泳区分不同的组分, 转移至固相支持物, 与对应的抗体发生免疫反应, 再与酶或同位素标记的第二抗体发生反应, 通过底物显色或放射自显影来检测电泳分离的特异性目的蛋白组分。该技术将电泳的高分辨能力、抗原抗体结合的强特异性和均一性等优点相结合, 在转基因作物及其相关制品外源蛋白的检测和定量分析中也有相应的应用。周兴虎等^[14]采用 Western blot 技术研究了储层过程中不同温度和时间对转基因大豆外源 EPSPS 蛋白的影响。田芳等^[15]建立了转基因饲料产品的 Western Blot 检测系统, 能够实现外源 CP4-EPSPS 蛋白的快速灵敏检测, 检出限达 0.5%, 并应用 Western blot 技术研究了挤压膨化处理对转基因大豆 (TSM) 外源 EPSPS 蛋白的影响。Wang 等^[16]应用 Western blot 技术在转基因烟草植株叶片中成功检测到完整外源 EPSPS 蛋白的表达。

2.1.3 免疫层析试纸条技术

免疫层析试纸条技术是基于外源蛋白靶标检测的一种简便技术。该技术具有操作简便快速、仪器设备简单、特异性强、灵敏度高等特点, 在转基因作物及其相关制品外源蛋白的检测中得到迅速开发和应用。丁耀魁等^[17]以 CP4 EPSPS 蛋白为检测靶标, 实现了快速检测试纸条在大豆转基因检测中的应用, 聂新辉等^[18]建立了转 Bt 基因棉花的金标 Bt-Cry1Ab/Ac 试纸条定性检测技术, 中国农业科学院油料作物研究所研制的“Cry1Ab/Cry1Ac 快速检测试纸条”成为农业部推荐使用的首选产品^[19]。

2.1.4 蛋白质芯片技术

蛋白质芯片技术是基于外源蛋白靶标检测的一种高通量技术。该技术既有免疫分析技术快速、灵敏及特异等特点, 又有芯片技术高通量、低成本及平行化等优势, 具备大规模推广应用的市场前景。汪琳等^[20]研制成功了一种可同时检测 3 种转基因成分 BT Cry1Ac 蛋白、植酸酶蛋白、

BT Cry1Ah 蛋白的蛋白芯片, 沙莎^[21]成功构建了转基因成分高通量检测的微流体蛋白质芯片检测体系。

2.2 基于外源核酸成分的检测技术

核酸, 特别是 DNA, 由于具有较高的稳定性及以 DNA 为靶标的检测技术具有较高灵敏度和特异性, 被广泛应用于转基因成分检测实践中。依据所检测转基因核酸成分的靶序列位置及序列特征, 将基于外源核酸成分的转基因检测技术按特异性由高到低分为核酸成分筛查技术、基因特异性检测技术、构建特异性检测技术及转化事件特异性检测技术。核酸成分筛查技术以导入的外源基因的通用元件或特性基因为靶序列进行检测, 基因特异性检测技术直接以导入的外源基因为靶序列进行检测, 构建特异性检测法直接以导入的转化载体上具有完整表达能力的目的基因的基因盒为靶序列进行检测, 转化事件特异性检测技术直接以导入的外源 DNA 与寄主 DNA 结合位点的边界序列为靶序列进行检测, 可以鉴定出转基因成分的品系, 是目前特异性最高的检测技术^[22]。常见的基于外源核酸成分的转基因检测技术主要包括定性 PCR 检测技术、定量 PCR 检测技术、等温扩增技术、基因芯片技术和数字 PCR 技术等。

2.2.1 定性 PCR 检测技术

定性 PCR 检测技术是基于 PCR 扩增的一种最常见的 DNA 检测技术。该检测技术具有灵敏度高、特异性强等特点, 因此成为国家标准、农业部公告及出入境检验检疫行业标准等推荐的主要的转基因检测技术被广泛采用。常见的定性 PCR 检测技术主要包含普通 PCR、实时荧光 PCR 检测技术、巢式和半巢式 PCR(nested and semi-nested PCR)、多重 PCR 检测技术(multiplex PCR)及多重实时荧光 PCR 技术(multiplex real-time PCR)等。

(1) 普通 PCR 检测技术

普通 PCR 技术是转基因检测中常用的定性检测技术。目前, 除被广泛应用于转基因植物及其产品转基因成分标准化检测外, 还被应用于新的转基因成分的鉴定研究中^[23,24]。该技术检测灵敏度较高, 但模板 DNA 质量要求高、PCR 抑制因子种类多及结果的准确性易受假阳性和假阴性影响, 因此对于量少、干扰成分复杂及被严重破坏的 DNA 样品的检测往往难以得到理想的结果。此外, 普通 PCR 技术单次反应仅能针对一个靶序列, 难以满足现行转基因成分快速检测的需求。

(2) 实时荧光 PCR 检测技术

实时荧光 PCR 技术是目前用于转基因检测的一类成熟和广泛的 PCR 检测技术。其是在普通 PCR 基础上, 在反应体系中添加荧光染料或荧光标记的特异性的探针, 通过荧光信号积累实时在线监控反应过程, 然后通过与参考物质比对对未知样本进行定性分析。常用的荧光染料主要有 SYBR Green、SYTO9、LC Green 及 Evagreen 等, 常用的

荧光探针主要有 Taqman、分子信标及 Dual Probes 等, 其中 Taqman 探针应用最为广泛。Taqman 实时荧光 PCR 技术通过特异的探针荧光信号实现了整个 PCR 过程的实时闭管检测, 省去了普通 PCR 中电泳、测序等后续处理过程, 具有避免产物污染、特异性强、重复性好、可靠性高及操作时间短等优点, 是目前一种最为主流的转基因检测技术^[25]。Dinon 等^[26]开发了针对 *cry1A.105* 及 *cry2Ab2* 基因的实时荧光 PCR 筛选技术, 检出限均达 0.01 ~ 0.05 ng; Moor 等^[27]建立了针对 FMV DNA 的实时荧光 PCR 检测体系, 有助于对转基因常用元件 FMV 34S 启动子的筛选; Grohmann^[28]对 *bar* 和 *ctp2-cp4epsps* 基因的实时荧光 PCR 筛选技术进行了协同试验验证, 检出限均达 0.02%。实时荧光 PCR 技术的应用与推广, 基本上已经解决了转基因成分定性检测对灵敏、准确和快速等的要求, 并且特异性高、结果重现性好。但是成本昂贵、检测通量相对不足等在一定程度上抑制了该技术在转基因检测中的应用与发展。

(3) 巢式和半巢式 PCR 检测技术

为实现对量少、干扰成分复杂和被严重破坏的 DNA 样品的准确检测, 研发提高 PCR 检测灵敏度就尤为关键。巢式和半巢式 PCR 是在普通 PCR 基础上发展起来的两种 PCR 技术, 其基本原理相同, 都是针对同一模板, 利用两对引物, 两次 PCR 扩增进行检测。同普通 PCR 技术相比, 该技术既提高了检测灵敏度, 又提高了检测的特异性, 因此在转基因检测中也得到了广泛应用与发展。闻伟刚等^[29]采用半巢式 PCR 技术建立了食品中痕量及微量转基因大米成分的检测方法, 检出限达 0.001% ~ 0.01%, 姚芹等^[30]运用单管巢式 PCR 技术实现了对精炼大豆油中转基因成分的检测, 闫伟等^[31]建立了转基因作物中常见的 CaMV35S 启动子和 Nos 终止子的单管半巢式 PCR 方法, 检出限分别达到 0.01% 和 0.05%。

(4) 多重 PCR 检测技术

多重 PCR, 又称复合 PCR, 是在同一 PCR 反应体系中同时加入 2 对及以上的引物, 能够同时扩增出多个靶序列的 PCR 反应, 其反应原理、反应试剂及操作过程等同普通 PCR 相同。该技术具有快速灵敏、准确可靠、特异性高、操作简便、成本低廉、产物污染风险低等优势, 因此, 成为一种快速准确的转基因检测技术。Yoke-Kqueen 等^[32]开发了以 *EPSPS* 和 *Cry1Ab* 为检测靶基因的大豆和玉米转基因成分的多重 PCR 检测方法, 魏霜等^[33]建立了能够有效检测水稻及其他作物转基因成分的 7 重 PCR 检测体系, 白卫滨等^[34]建立了转基因番木瓜农一号的多重 PCR 检测技术, 检出限达 0.2 ng, 余婧等^[35]建立了烤后烟叶中 3 种外源基因成分的多重 PCR 检测技术体系, 能够有效地检测出转基因烤后烟叶百分比含量为 0.9%(V/V)的转基因成分。

(5) 多重实时荧光 PCR 技术

为解决实时荧光 PCR 技术成本昂贵、检测通量相对

不足等问题, 实现在同一反应体系中多个靶系列的实时荧光 PCR 检测, 故又建立了多重实时荧光 PCR 技术。多重实时荧光 PCR 技术兼具实时荧光 PCR 检测技术和多重 PCR 检测技术的优点, 同时又互补克服了这两种检测技术的不足, 成为转基因检测一种最具有研发和应用前景的检测技术。Bahrdt 等^[36]建立了一种食品、饲料和种子转基因成分的 6 重实时荧光 PCR 筛选技术, 检出限达 1000 拷贝; Hans-Henno 等^[37]建立了一种针对 *CaMV35S* 启动子、*NOS* 终止子、*FMV35S* 启动子和 *bar* 基因的转基因成分多重实时荧光 PCR 筛选技术, 检出限达 10 拷贝; Cottenet 等^[38]建立了一种针对 47 个检测目标的转基因成分 24 重实时荧光 PCR 筛选技术, 检出限达 1~16 拷贝; Chaouachi 等^[39]建立了一种检测 4 种转基因玉米品系(Bt11, Bt176, Mon810 和 T25)转基因成分的多重实时荧光 PCR 检测技术; Köppel 等^[40]建立了两种食品转基因成分的多重实时荧光 PCR 筛选技术, 检出限达 0.1%。

2.2.2 定量 PCR 检测技术

随着世界各国有关转基因产品标识制度的建立和不断完善, 一些国家规定了转基因成分的最低含量阈值, 如欧盟为 0.9%(转基因成分来源获得欧盟批准)和 0.5%(转基因成分来源未获欧盟批准)^[41], 巴西为 1%^[42], 韩国(前 5 种含量最高的食品原料的转基因成分含量)为 3%^[43], 日本(前 3 种含量最高的食品原料的转基因成分含量)为 5%^[44], 中国台湾地区为 5%^[45]等。此外, 定性 PCR 技术在转基因检测中本身具有一定的技术局限性, 如准确性易受假阳性和假阴性影响、产物检测环境污染风险高等, 因此, 需要建立和发展转基因产品定量检测技术。目前定量 PCR 技术主要分为 3 大类: 基于终点检测的传统定量 PCR 技术、定量竞争 PCR 技术(quantitative competitive PCR, QC-PCR)和实时荧光定量 PCR 技术(real-time fluorescence quantitative PCR)。

(1) 基于终点检测的传统定量 PCR 检测技术

基于终点检测的传统定量 PCR 检测技术主要包括内参照法、竞争法及 PCR-ELISA 法等, 都采用终点检测, 即 PCR 进入扩增平台期后进行检测, 检测重现性相对较差。其中, PCR-ELISA 技术应用和开发较为广泛。PCR-ELISA 技术将 PCR 的高效性和 ELISA 的高特异性相结合, 可用于转基因的快速定性筛选, 也可进行转基因的半定量检测。赵文军等^[46]建立了一种基于 PCR-ELISA 技术的转基因快速检测方法, 刘光明等^[47]建立了基于 PCR-ELISA 技术的转基因大豆与玉米中常用外源基因快速检测体系, 单宏等^[48]建立了一种基于 PCR-ELISA 技术的转基因大豆快速检测方法等。虽然 PCR-ELISA 技术具备成为成本较高的实时荧光定量 PCR 技术替代技术的前景, 但由于其影响因素较多, 如 DNA 的产量与纯度、杂交程度及批次间差异等, 导致该技术在转基因成分检测的应用中受到局限。

(2) 定量竞争 PCR 技术

定量竞争 PCR 技术是基于内标法发展的一种定量 PCR 检测技术, 其基本原理是人工构建与靶基因具有相同扩增效率和引物结合位点的竞争 DNA, 将不同稀释度的竞争 DNA 同样本靶基因 DNA 竞争相同底物和引物共同扩增, 依据竞争 DNA 不同稀释度的电泳结果做标准曲线, 定量分析样本靶基因 DNA 的含量。Eri 等^[49]建立了一种基于质粒的转基因大豆定量竞争 PCR 筛选技术。Anastasia 等^[50]研究证明竞争性 PCR 比实时 PCR 具有灵敏度高、探针价格低廉等优势。该技术对仪器要求不高, 但实验的关键技术-竞争 DNA 的设计对于一般实验室来说难度较大^[51]。

(3) 实时荧光定量 PCR 技术

实时荧光定量 PCR 技术是目前用于转基因检测的最成熟和广泛的一种定量 PCR 检测技术。其是在实时荧光定性 PCR 技术的基础上, 加入已知浓度梯度的标准模板进行扩增绘制标准曲线, 然后通过与标准曲线比对对未知模板进行定量分析。其具有实时荧光定性 PCR 技术避免产物污染、特异性强、重复性好、可靠性高及操作时间短等优点, 具有较强的研发和应用前景。宋君等^[52]建立了转基因玉米 59122 及产品的实时荧光定量 PCR 检测方法, 汪秀秀等^[53]建立了转基因棉花 GHB119 品系特异性的 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法, 检测限达 10 拷贝, 苏慧慧等^[54]应用实时荧光定量 PCR 技术成功检测了转基因樱桃番茄外源基因拷贝数。同实时荧光定性 PCR 技术类似, 该技术也存在成本昂贵、检测通量相对不足等不足, 但可以通过构建多重实时荧光定量 PCR 检测体系、自行配置反应体系等改进来提高检测通量和降低成本, 促进该技术在转基因成分定量检测中的应用与发展。

2.2.3 等温扩增技术

等温核酸扩增技术近年来发展的一大类核酸扩增的检测技术。同 PCR 检测技术相比, 该类检测技术具有特异性强、等温高效、操作简单、耗时较短、产物易检测及设备要求低等优势, 在快速检测中具有良好的前景。常见等温扩增技术包括环介导等温扩增技术(LAMP)、交叉引物扩增技术(cross priming amplification, CPA)、链替代扩增技术(strand displacement amplification, SDA)、滚换扩增技术(rolling circle amplification, RCA)、依赖解旋酶 DNA 等温扩增技术(helicase-dependent isothermal DNA amplification, HDA)、依赖核酸序列的扩增技术(nucleic acid sequence-based amplification, NASBA)、快速等温检测放大技术(rapid isothermal detection and amplification, RIDA)、切刻内切酶核酸恒温扩增技术(nicking endonuclease mediated amplification, NEMA)、转录介导的扩增技术(transcription mediated amplification)、等温多自配引发扩增技术(isothermal multiple self-matching-initiated amplification, IMSA)等。常用于转基因检测的主要有环介导等温扩增技术(LAMP)和交叉引物扩增技术(CPA)等。

(1) 环介导等温扩增技术(LAMP)

环介导等温扩增技术是2000年由日本学者Notomi等^[55]研发提出的一种“简便、快速、准确、廉价”的基因扩增技术,其基本原理是针对靶基因6个区域设计的4条不同的特殊引物,再依赖具有链置换活性的Bst DNA聚合酶利用链置换反应在一定温度下进行反应,循环不断地产生环状单链结构,使得引物在等温条件下引发新链合成,使靶基因高效扩增,然后依据扩增反应产物的有无来实现对靶基因序列存在与否的判断。同PCR扩增技术相比,该技术具有等温扩增、灵敏度高、特异性强、扩增效率高、反应耗时短、产物易判断、仪器设备要求低、操作过程简便等技术特点,因此在临床疾病的诊断、流行性细菌或病毒的定性定量检测、动物胚胎性别鉴定及基因芯片开发等领域^[56]。近年来,在转基因检测领域也得到了一定程度的应用与发展,成为出入境检验检疫行业标准推荐的转基因成分检测技术中的一种。王清华等^[57]建立了转基因玉米BT11品系的环介导等温扩增检测方法,检出限达0.5%;肖维威等^[58]建立了CaMV35S启动子基因的环介导等温扩增快速检测的方法,检出限达200拷贝/ μL ;闫兴华等^[59]建立了转基因玉米LY038外源基因的环介导等温扩增检测方法,检出限达0.01%;邵碧英等^[60]建立了转基因大豆A2704-12品系的环介导等温扩增检测方法,检出限达0.1%;刘二龙等^[61]建立了转基因苜蓿草J163品系的环介导等温扩增检测方法,检出限达16 pg。环介导等温扩增技术在转基因检测中有众多优点,然而由于假阳性较高、引物设计要求高、检测通量不高等不足,该技术在转基因成分检测应用中受到局限。

(2) 交叉引物扩增技术(CPA)

交叉引物扩增技术是一种新型的核酸恒温扩增技术。其基本原理同环介导等温扩增技术类似,针对靶基因设计特异的扩增引物和交叉引物,然后再依赖Bst DNA聚合酶的高活性的链置换特性在一定温度下进行反应,使得扩增模板不断的延长,也使得交叉引物的结合位点不断的增加,最后依据扩增反应产物的有无来实现对靶基因序列存在与否的判断。同PCR扩增技术相比,该技术具有等温扩增、扩增效率高、反应耗时短、产物易判断、仪器设备要求低、操作过程简便等技术特点,因此在分子诊断、动植物检疫、生物医学研究、个体化治疗等领域得到迅速应用。翟聪聪等^[62]建立了转基因水稻Bt63品系的交叉引物扩增技术检测方法,检出限达0.1%;黄新等^[63]建立了CaMV35S启动子基因的交叉引物扩增技术快速检测方法,检出限达0.05%;张芳等^[64]建立了一种快速检测NOS终止子基因的交叉引物扩增技术检测方法,检出限达0.05%。同环介导等温扩增技术类似,交叉引物扩增技术也存在由环境污染导致假阳性、引物设计要求高、检测通量不高等不足。

(3) 其他等温扩增技术

此外,还有一些其他类型的等温扩增技术在转基因

检测中也得到一定程度的研究与发展。周小明等^[65]发明了基于滚环扩增技术的转基因物种检测方法;徐潮等^[66]建立了转基因抗虫水稻科丰6号及其衍生品种转化体特异性荧光RPA检测方法,检出限达500拷贝;邓婷婷等^[67]建立了转基因水稻CryIAb/c基因的RPA检测方法,检出限达0.1%。由于具有操作简单、耗时较短、产物易检测及设备要求简单等优势,等温扩增检测技术在转基因现场快速检测中具有十分广泛的应用基础和前景。

2.2.4 基因芯片(gene chip)技术

基因芯片又称DNA芯片或DNA微阵列(DNA microarray),是基于核酸杂交原理于20世纪80年代中期提出的一项DNA高通量检测技术。其基本原理是采用点样法、显微印刷或光导原位合成等方法将大量特定DNA序列的探针分子密集、有序地固定于经过相应处理的硅片、玻片、硝酸纤维素膜等载体上,然后加入标记的待测样品,进行多元杂交,通过杂交信号的强弱及分布,来分析目的DNA分子的有无、数量及序列,从而获得受检样品的遗传信息。基因芯片具备高通量、集成化及自动化等优点,因此被广泛应用于疾病诊断和治疗、药物筛选、农作物的优良优选、司法鉴定、食品卫生监督、环境检测、国防、航天等许多领域。Turkec等^[68]开发了一种针对12种不同转基因品系的定量筛选基因芯片,对于其中10种转基因品系的检测限1%;Seong-Hun^[69]开发了一种针对大豆、玉米、棉花和油菜的转基因筛选基因芯片,检测限达0.5%;成晓维等^[70,71]开发了一种同时检测大米、大豆和玉米转基因成分的可视基因芯片,检测限达0.1%。尽管基因芯片技术已经取得了长足的发展,然而也存在一些需要被克服的问题,如成本较高、探针的合成与固定较复杂、灵敏度较低、背景干扰严重、重复性差、分析范围狭窄等,从而限制了基因芯片技术在转基因检测领域的大规模应用与发展。

2.2.5 数字PCR(digital PCR, dPCR)技术

数字PCR技术又称单分子PCR技术,是近年来迅速发展起来的一种核酸绝对定量技术。该技术主要包括两部分内容,即PCR扩增和荧光信号分析。在PCR扩增阶段,一般需要将样品稀释到单分子水平,并平均分配到几十至几百个单元中进行反应;PCR扩增结束后,对每个反应单元的荧光信号进行采集,然后通过直接计数或泊松分布公式计算得到样品的原始浓度或含量。到目前为止,已有包括Fluidigm、Life Technologies、Bio-Rad及RainDance等几家公司相继推出了数字PCR产品,并已经在基因表达研究、microRNA研究、基因组拷贝数鉴定、癌症标志物稀有突变检测、致病微生物鉴定、转基因成分鉴定、NGS测序文库精确定量和结果验证等诸多领域显示出广阔的应用前景。隋志伟等^[72]应用数字PCR技术成功研制了转基因水稻TT51-1标准物质;Dany等^[73]应用微滴数字PCR技术对食品和饲料中的转基因成分进行了精确定量分析;姜羽等^[74]建立了基于数字PCR技术的转基因成分外源基因拷贝

数分析方法; Dobnik 等^[75]应用微滴数字 PCR 技术, 建立了针对欧盟授权的 12 种转基因玉米品系转基因成分多重定量分析方法; Köppel 等^[76]建立了基于微滴数字 PCR 技术的转基因成分快速定量分析方法。与荧光定量 PCR 技术相比, 数字 PCR 采用终点定量, 不依赖扩增曲线的循环阈值 (Ct), 受扩增效率的影响较小且对 PCR 反应抑制物的耐受较强, 也无需采用内参基因和标准曲线, 准确度高、重现性好, 可以实现绝对定量分析。虽然目前数字 PCR 技术存在一些缺陷, 在转基因检测的研究方面还处于起步阶段, 但其综合了荧光定量 PCR 的准确性及基因芯片的高通量, 并且不依赖标准物质定量, 有望成为核酸绝对定量新标准, 在转基因成分检测方面具有广阔的应用前景。

3 展 望

目前, 国内外针对转基因成分的检测主要以 DNA 为检测对象的核酸扩增检测技术为主, 特别是 PCR 检测技术。从检测原理考虑, 以核酸扩增为基础的转基因检测技术面临两大主要的挑战, 即特异性检测引物设计及高质量模板 DNA 的获取。一方面, 随着转基因研究的深入与发展, 越来越多的新技术, 如以 Talen 和 CRISPR 为代表的基因组定点突变(编译)技术, 在转基因研发中得以应用与发展, 转基因产品呈现出多样化发展的趋势。为维护自己的商业利益, 研发单位往往不愿将相应的遗传改造信息, 特别是基因序列信息对外公布, 造成遗传改造的基因序列信息难以获取, 从而给转基因成分检测带来了很大的困难。另一方面, 随着加工技术水平和加工精度的提高, 原料 DNA 在加工过程中破坏更为严重; 同时, 精细化的加工过程往往容易引入更多的物理、化学或生物性的 PCR 抑制因子, 造成了模板 DNA 的质量降低, 客观上又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(如深加工食品样品、干扰成分复杂样品等)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(high throughput sequencing)、生物传感器技术(biosensor)、毛细管电泳技术(capillary electrophoresis)及纳米刻度技术(nanoscale)等; 同时需依据相应的技术特点对不同检测技术进行组合使用, 形成行之有效的检测技术; 在实际检测中, 应依据食品种类和加工类型及程度的差异, 选择最有效的检测技术或技术组合, 如 PCR-ELISA 技术、免疫 PCR 技术(immuno-PCR)、PCR-DHPLC 技术、多重实时荧光定量 PCR 技术、多重环介导等温扩增技术、PCR-毛细管电泳技术及恒温扩增技术与酶联技术相结合等。可以预见, 随着各种商业化转基因产品种类和数量加速推出, 必然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] Clive J. 2014 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, 2015, 1(1): 1-10.
Clive J. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2014 [J]. China Biotech, 2015, 1(1): 1-10.
- [2] Nordlee JA, Taylor SL, Townsend JA, *et al.* Identification of a Brazil-nut allergen in transgenic soybeans [J]. *New Engl J Med*, 1996, 334(11): 688-692.
- [3] Losey JE, Rayor LS, Carter ME. Transgenic pollen harms monarch larvae [J]. *Nature*, 1999, 399(6733): 214.
- [4] Quist D, Chapela IH. Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico [J]. *Nature*, 2001, 414(6863): 541-543.
- [5] Seralini GE, Cellier D, de Vendomois JS. New analysis of a rat feeding study with a genetically modified maize reveals signs of hepatorenal toxicity [J]. *Arch Environ Con Tox*, 2007, 52(4): 596-602.
- [6] Finamore A, Roselli M, Britti S, *et al.* Intestinal and peripheral immune response to MON810 maize ingestion in weaning and old mice [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(23): 11533-11539.
- [7] Aris A, Leblanc S. Maternal and fetal exposure to pesticides associated to genetically modified foods in Eastern Townships of Quebec, Canada [J]. *Reprod Toxicol*, 2011, 31(4): 528-533.
- [8] 朱鹏宇, 商颖, 许文涛, 等. 转基因作物检测和监测技术发展概况[J]. *农业生物技术学报*, 2013, 21(12): 1488-1497.
Zhu PY, Shang Y, Xu WT, *et al.* The development of the detection methodology of genetic modified organism [J]. *J Agric Biotech*, 2013, 21(12): 1488-1497.
- [9] 翟聪聪, 陈洪俊, 李志红, 等. 转基因产品检测技术研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2013, 41(5): 1900-1901.
Zhai CC, Chen HJ, Li ZH, *et al.* Research progress of genetically modified organisms detection technique [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2013, 41(5): 1900-1901.
- [10] 王林, 韩飞, 李爱科, 等. 转基因检测技术研究进展[J]. *粮油食品科技*, 2012, 19(6): 47-50.
Wang L, Han F, Li AK, *et al.* Research progress on detection of transgenic crops [J]. *Sci Technol Cereals Oils Foods*, 2012, 19(6): 47-50.
- [11] Kim HJ, Lee SM, Kim JK, *et al.* Expression of PAT and NPT II proteins during the developmental stages of a genetically modified pepper developed in Korea [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(20): 10906-10910.
- [12] Kamle S, Ojha A, Kumar A. Development of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of Bt protein in transgenic cotton [J]. *Method Mol Boil*, 2013, 958: 131-138.
- [13] Tan GY, Gao W, Li QX, *et al.* Development of monoclonal antibody-based sensitive sandwich ELISA for the detection of antinutritional factor cowpea trypsin inhibitor [J]. *Food Anal Meth*, 2013, 6(2): 614-620.
- [14] Zhou XH, Zhu CQ, Wu HH, *et al.* Effects of the storage temperature and time on cp4-epsps gene and protein in genetically modified soybean [J]. *J Nanjing Agric Univ*, 2012, 35(6): 131-136.
- [15] Tian F, Guan QF, Wang XM, *et al.* Influence of different processing treatments on the detectability of nucleic acid and protein targets in transgenic soybean meal [J]. *Appl Biochem Biotech*, 2014, 172(7):

- 3686–3700.
- [16] Wang XJ, Jin X, Dun BQ, *et al.* Gene-splitting technology: a novel approach for the containment of transgene flow in *Nicotiana tabacum* [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e99651.
- [17] 丁耀魁, 沈娟, 马黎黎. 快速检测试纸条法在大豆转基因检测中的应用[J]. *粮油食品科技*, 2010, 18(2):45–46.
Ding YK, Shen J, Ma LL. Application of test paper in detecting transgenic soybean [J]. *Sci Technol Cereals Oils Foods*, 2010, 18(2): 45–46.
- [18] 聂新辉, 尤春源, 陈惠瑜, 等. 金标 Bt-CryIAb/Ac 试纸条定性检测转 Bt 基因棉花的方法研究[J]. *中国棉花*, 2013, 40(1): 15–17.
Nie XH, You CY, Chen HY, *et al.* Study on detecting methods using lateral flow strip of Bt-CryIAb/Ac [J]. *China Cotton*, 2013, 40(1): 15–17.
- [19] 中国农科院推出新型转基因快速检测试纸[J]. *中国食品学报*, 2015, 15(3): 81.
Chinese Academy of Agricultural Sciences launched a new transgenic rapid test strip [J]. *J Chin Inst Food Sci Tech*, 2015, 15(3): 81.
- [20] 汪琳, 邢佑尚, 周琦, 等. 3 种转基因成分检测蛋白芯片的研制[J]. *植物检疫*, 2011, 3: 1–6.
Wang L, Xing YS, Zhou Q, *et al.* Development of protein chip for detection three elements of GMO [J]. *Plant Quarant*, 2011, 25(3): 1–6.
- [21] 沙莎. 转基因成分高通量检测体系-微流体蛋白质芯片的构建[D]. 杭州: 浙江大学, 2013.
Sha S. Construction of microfluidic protein chip for high throughput detection of genetically modified components [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2013.
- [22] Lingxi J, Litao Y, Jun R, *et al.* Development and in house validation of the event specific qualitative and quantitative PCR detection methods for genetically modified cotton MON15985 [J]. *J Sci Food Agric*, 2010, 90(3): 402–408.
- [23] 姚涓, 潘志文, 陈伟庭, 等. 土壤磷素高效利用转基因大豆特异性 PCR 检测方法[J]. *中国油料作物学报*, 2012, 34(2): 152–156.
Yao J, Pan ZW, Chen WT, *et al.* Event -specific qualitative and quantitative PCR detection methods for high phosphate-efficient transgenic soybean [J]. *Chin J Oil Crop Sci*, 2012, 34(2): 152–156.
- [24] 李飞武, 董立明, 李葱葱, 等. 转基因玉米 MON89034 定性 PCR 检测技术研究[J]. *农产食品科技*, 2010, 3: 22–25.
Li FW, Dong LM, Li CC, *et al.* Event -specific qualitative PCR method for detection of transgenic maize MON89034 [J]. *Agric Food Prod Sci Tech*, 2010, 4(3): 22–25.
- [25] Broeders S, Huber I, Grohmann, L, *et al.* Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods [J]. *Trends Food Sci Tech*, 2014, 37(2): 115–126.
- [26] Dinon AZ, Prins TW, Dijk, JPV, *et al.* Development and validation of real-time PCR screening methods for detection of *cryIA.105* and *cry2Ab2* genes in genetically modified organisms [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 400(5): 1433–1442.
- [27] Moor D, Liniger M, Grohmann L, *et al.* Real-time PCR method for the detection of figwort mosaic virus (FMV) to complement the FMV 34S promoter-specific PCR assay used for screening of genetically modified plants [J]. *Eur Food Res Technol*, 2012, 235(5): 835–842.
- [28] Grohmann L. Collaborative trial validation studies of real-time PCR-based GMO screening methods for detection of the *bar* gene and the *ctp2-cp4epsps* construct [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(19): 8913–8920.
- [29] 闻伟刚, 盛蕾, 张吉红, 等. 痕量及微量转基因大米成分半巢式 PCR 检测方法的建立[J]. *食品科学*, 2008, 29(12): 622–626.
Wen WG, Sheng L, Zhang JH, *et al.* Establishment of semi-nested PCR detection method for trace transgenic rice materials [J]. *Food Sci*, 2008, 29(12): 622–626.
- [30] 姚芹, 宋浩, 陈枫. 食用精炼大豆油 DNA 提取及单管巢式 PCR 检测[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(21): 183–186.
Yao Q, Song H, Chen F. DNA extraction from soybean oil and detection of genetically-modified components by single-tube nested PCR [J]. *Sci Tech Food Ind*, 2013, 34(21): 183–186.
- [31] 闫伟, 徐楨惠, 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, 02 期:194–197.
Yan W, Xu ZH, Long LK, *et al.* Screening of genetically modified foods by single-tube semi-nested PCR [J]. *Food Sci*, 2015, 36(2): 194–197.
- [32] Yoke-Kqueen C, Yee-Tyan C, Siew-Ping K, *et al.* Development of multiplex-PCR for Genetically Modified Organism (GMO) detection targeting EPSPS and Cry1Ab genes in soy and maize samples [J]. *Int Food Res J*, 2011, 18(2): 515–522.
- [33] 魏霜, 陈贞, 芦春斌, 等. 多重 PCR 检测转基因水稻的转基因成分[J]. *食品科学*, 2012, 33(12): 159–162.
Wei S, Chen Z, Lu CB, *et al.* Multiplex PCR detection of transgenic components of genetically modified rice [J]. *Food Sci*, 2012, 33(12): 159–162.
- [34] 白卫滨, 曹春廷, 朱翠娟, 等. 采用多重 PCR 技术检测转基因番木瓜华农一号[J]. *食品与发酵工业*, 2015, 330(41): 165–169.
Bai WB, Cao CT, Zhu CJ, *et al.* Detection of transgenic papaya Huanong No.1 by universal multiple-primer PCR [J]. *Food Ferment Ind*, 2015, 330(41): 165–169.
- [35] 余婧, 郭玉双, 林世锋, 等. 多重 PCR 技术快速检测烤后烟叶转基因成分[J]. *生物技术通报*, 2015, 31(7): 64–68.
Yu J, Guo YS, Lin SF, *et al.* A multiplex PCR for rapid detection of genetically modified ingredient in flue-cured tobacco [J]. *Biotechnol Bulletin*, 2015, 31(7): 64–68.
- [36] Bahrtdt C, Krech AB, Wurz A, *et al.* Validation of a newly developed hexaplex real-time PCR assay for screening for presence of GMOs in food, feed and seed [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 396(6): 2103–2112.
- [37] Hans-Henno D, Ivonne R, Astrid, G, *et al.* Development of a qualitative, multiplex real-time PCR kit for screening of genetically modified organisms (GMOs) [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 396(6): 2043–2054.
- [38] Cottenet G, Blanpain C, Sonnard V, *et al.* Development and validation of a multiplex real-time PCR method to simultaneously detect 47 targets for the identification of genetically modified organisms [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405(21): 6831–6844.
- [39] Chaouachi M, Zellama M, Nabi N, *et al.* Molecular identification of four genetically modified maize (Bt11, Bt176, Mon810 and T25) by duplex quantitative real-time PCR [J]. *Food Anal Meth*, 2014, 7(1): 224–233.
- [40] Köppel R, Sendic A, Waiblinger H. Two quantitative multiplex real-time PCR systems for the efficient GMO screening of food products [J]. *Eur Food Res Technol*, 2014, 239(4): 653–659.
- [41] Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed [Z]. *Official J European Communities* 2003, L268: 1–23.

- [42] 张忠民: 转基因食品标识阈值问题研究[J]. 食品科学, 2015, 36(9): 254–259.
Zhang ZM. Studies on labeling threshold of genetically modified foods [J]. Food Sci, 2015, 36(9): 254–259.
- [43] Seung AC, Michael GF, Kathryn T. 韩国农业生物技术年报(2011 年)[J]. 生物技术进展, 2013, 1: 57–68.
Seung AC, Michael GF, Kathryn T. Annual report of agricultural biotechnology in South Korea (2011) [J]. Curr Biotechnol, 2013, 1: 57–68.
- [44] Jeffrey Nawn, Suguru Sato. 日本农业生物技术年报(2011 年)[J]. 生物技术进展, 2012, 6(6): 441–455.
Jeffrey Nawn, Suguru Sato. Annual report of agricultural biotechnology in Japan (2011) [J]. 2012, 6(6): 441–455.
- [45] 池敏青. 台湾农业生物技术发展概况与生物安全管理[J]. 台湾农业探索, 2012, (3): 1–4.
Chi MQ. The overview of agricultural biotechnology development and biosafety management in Taiwan [J]. Taiwan Agric Res, 2012, (3): 1–4.
- [46] 赵文军, 陈红运, 黄文胜, 等. PCR-ELISA 在转基因产品检测中的应用[J]. 植物检疫, 2001, 15(5): 297–299.
Zhao WJ, Chen HY, Huang WS, *et al.* The application of PCR-ELISA for detection of transgenic products [J]. Plant Quarant, 2001, 15(5): 297–299.
- [47] 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.
Liu GM, Xu QY, Long MN, *et al.* Study on PCR-ELISA for the detection of genetically modified organisms products [J]. Food Sci, 2003, 24(1): 101–105.
- [48] 单宏. PCR-ELISA 方法在转基因大豆检测中的应用[J]. 大豆科技 2006, 1: 37–38.
Shan H. Application of PCR - ELISA in the analysis and detection of transgenic soybean [J]. Soybean Bull, 2006, 1: 37–38.
- [49] Eri S, Hisashi K, Yuki N, *et al.* Development of a screening method for genetically modified soybean by plasmid-based quantitative competitive polymerase chain reaction [J]. J Agric Food Chem, 2008, 56(14): 5521–5527.
- [50] Mavropoulou AK, Theodora K, Ioannou PC, *et al.* High-throughput double quantitative competitive polymerase chain reaction for determination of genetically modified organisms [J]. Anal Chem, 2005, 77(15): 4785–4791.
- [51] 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, 29(10): 698–705.
Wang GY, Fan WX, Chen BH, *et al.* Application and development of detection technology of genetically modified foods (GMFs) I. main detection technologies of GMFs and their characteristics [J]. Food Sci, 2008, 29(10): 698–705.
- [52] 宋君, 郭灵安, 雷绍荣, 等. 实时荧光定量 PCR 检测转基因玉米 59122 的方法建立及测量不确定度评估[J]. 食品科学, 2014, 35(24): 259–264.
Song J, Guo LA, Lei SR, *et al.* An accurate quantitative assay for genetically modified maize event 59122: method establishment and assessment of its measurement uncertainty [J]. Food Sci, 2014, 35(24): 259–264.
- [53] 汪秀秀, 杨捷琳, 宋青, 等. 转基因棉花 GHB119 品系特异性定量 PCR 检测方法的建立[J]. 农业生物技术学报, 2014, 22(3): 380–388.
Wang XX, Yang JL, Song Q, *et al.* Establishment of a novel event-specific quantitative PCR method for genetically modified cotton (*Gossypium sp.*) GHB 119 detection [J]. J Agric Biotechnol, 2014, 22(3): 380–388.
- [54] 苏慧慧, 李涛, 谢雯琦, 等. 基于实时荧光定量 PCR 对转基因樱桃番茄外源基因拷贝数的检测[J]. 分子植物育种, 2015, 2: 345–354.
Su HH, Li T, Xie WQ, *et al.* Detecting exogenous gene copy numbers of exogenous gene in transgenic tomato based on fluorescent quantitative Real-time PCR [J]. Mol Plant Breeding, 2015, 13(2): 345–354.
- [55] Notomi T, Okayama H, Yonekawa T, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): E63–E63.
- [56] 肖璐, 邬旭龙, 王印, 等. 环介导等温扩增技术及其应用[J]. 动物医学进展, 2015, 36(7): 113–117.
Xiao L, Wu XL, Wang Y, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification and its application [J]. Progress Vet Med, 2015, 36(7): 113–117.
- [57] 王清华, 徐君怡, 曹冬梅, 等. 转基因玉米 BT11 品系环介导等温扩增 (LAMP) 检测方法的建立[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 3: 868–872.
Wang QH, Xu JY, Cao DM, *et al.* Establishing a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) detection method for genetically modified maize BT11 [J]. J Food Saf Qual, 2013, (3): 868–872.
- [58] 肖维威, 周琳华, 吴永彬, 等. LAMP 技术检测食品中转基因成分 CaMV35S 启动子的研究[J]. 中国食品学报, 2013, 04 期(4): 149–155.
Xiao WW, Zhou LH, Wu YB, *et al.* The research on the detection of CaMV35S promoter from genetically modified food by LAMP technology [J]. J Chin Inst Food Sci Tech, 2013, 13(4): 149–155.
- [59] 闫兴华, 许文涛, 商颖, 等. 环介导等温扩增技术(LAMP)快速检测转基因玉米 LY038[J]. 农业生物技术学报, 2013, 21(5): 621–626.
Yan XH, Xu WT, Shang Y, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification method(LAMP) for the rapid detection of transgenic maize(Zea mays L.) LY038 [J]. J Agric Biotechnol, 2013, 21(5): 621–626.
- [60] 邵碧英, 陈文炳, 曾莹, 等. LAMP 法检测转基因大豆 A2704-12 品系[J]. 食品科学, 2014, 34(24): 202–207.
Shao BY, Chen WB, Zeng Y, *et al.* Detection of genetically modified soybean line A2704-12 in soybean and its products by LAMP [J]. Food Sci, 2013, 34(24): 202–207.
- [61] 刘二龙, 卢丽, 吕英姿, 等. 转基因苜蓿草 J163 品系特异性 LAMP 检测方法的建立[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 3: 1028–1032.
Liu EL, Lu L, Lv YZ, *et al.* Establishing an event-specific loop-mediated isothermal amplification detection method for genetically modified alfalfa events J163 [J]. J Food Saf Qual, 2013, (3): 1028–1032.
- [62] 翟聪聪, 黄新, 朱水芳, 等. 一种交叉引物扩增技术检测转基因水稻品系 Bt63 方法的建立[J]. 植物检疫, 2014, 28(1): 61–66.
Zhai CC, Huang X, Zhu SF, *et al.* Cross priming amplification method for detection of the transgenic rice [J]. Plant Quarant, 2014, 28(1): 61–66.
- [63] 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.
- [64] Zhang F, Wang L, Fan K, *et al.* The detection of T-Nos, a genetic element present in GMOs, by cross-priming isothermal amplification with real-time fluorescence [J]. Anal Bioanal Chem, 2014, 406(13): 3069–3078.
- [65] 周小明, 朱德斌, 达那. 基于滚环扩增技术检测转基因物种的方法: CN, CN101260431 A[P]. 2008.
Zhou XM, Zhu DB, Xin D. Method for detection of genetically modified species based on rolling ring amplification: CN, CN101260431 A [P]. 2008.

- [66] 徐潮, 李亮, 金芑军, 等. 荧光 RPA 技术检测转基因水稻科丰 6 号[J]. 分子植物育种, 2014, 12(5): 875-880.
Xu C, Li L, Jin WJ, *et al.* Event-specific Real-time RPA detection of transgenic rice Kefeng 6 [J]. Mol Plant Breeding, 2014, 12(5): 875-880.
- [67] 邓婷婷, 黄文胜, 程奇, 等. 重组酶聚合酶扩增技术检测转基因水稻中的 Cry1Ab/c 基因[J]. 中国食品学报, 2015, 15(3): 187-193.
Deng TT, Huang WS, Cheng Q, *et al.* Detection of Cry1Ab/c Gene in genetically modified rice by recombinase polymerase amplification [J]. J Chin Inst Food Sci Tech, 2015, 15(3): 187-193.
- [68] Turkec A, Lucas SJ, Karacanli B, *et al.* Assessment of a direct hybridization microarray strategy for comprehensive monitoring of genetically modified organisms (GMOs) [J]. Food Chem, 2016, 194: 399-409.
- [69] Seong-Hun L. Screening DNA chip and event-specific multiplex PCR detection methods for biotech crops [J]. J Sci Food Agric, 2014, 94(14): 2856-2862.
- [70] 成晓维. 生物芯片检测食品中转基因成分的研究[J]. 食品工业, 2014, 10: 193-197.
Chen XW. Study on the detection of genetically modified components in food by biological chip [J]. Food Ind, 2014, 10: 193-197.
- [71] 成晓维, 王小玉, 胡松楠, 等. 可视芯片检测大豆、水稻和玉米中的转基因成分[J]. 现代食品科技, 2013, 29(3): 654-659.
Chen XW, Wang XY, Hu SN, *et al.* Detection for genetically modified composition of soybean, rice and corn by thin-film biosensor chips [J]. Mod Food Sci Technol, 2013, 29(3): 654-659.
- [72] 隋志伟, 余笑波, 王晶, 等. 转基因水稻 TT51-1 标准物质的研制[J]. 计量学报, 2013, 33(5): 467-471.
Sui ZW, Yu XB, Wang J, *et al.* Development of genetically modified rice TT51-1 seed powder reference materials [J]. Acta Metrologica Sin, 2012, 33(5): 467-471.
- [73] Dany M, Dejan T, Mojca M, *et al.* Quantitative analysis of food and feed samples with droplet digital PCR [J]. PloS One 2013, 8(5): e62583-e62583.
- [74] 姜羽, 胡佳莹, 杨立桃. 利用微滴数字 PCR 分析转基因生物外源基因拷贝数[J]. 农业生物技术学报, 2014, 22(10): 1298-1305.
Jiang Y, Hu JY, Yang LT. Estimating the exogenous genes copy number of genetically modified organisms by droplet digital PCR [J]. J Agric Biotechnol, 2014, 22(10): 1298-1305.
- [75] Dobnik D, Spilsberg B, Bogožalec A, *et al.* Multiplex quantification of twelve EU authorized GM maize lines with droplet digital PCR [J]. Anal Chem, 2015, DOI: 10.1021/acs.analchem.5b01208
- [76] Köppel R, Bucher T. Rapid establishment of droplet digital PCR for quantitative GMO analysis [J]. Eur Food Res Tech, 2015, 241(3): 1-13.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



蔡 军, 博士, 主要研究方向为食品分子生物学检测与研发。
E-mail: cai_jun@cofco.com



李 慧, 高级工程师, 主要研究方向为食品生物检测及研发。
E-mail: lhui@cofco.com