

转基因速测卡的现场应用性能及其可行性研究

何景^{1,2}, 李慧^{1,2*}, 蔡军^{1,2}, 欧静堃^{1,2}, 黄河舟³, 曾祥荣⁴

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

摘要: **目的** 对快速、灵敏、适用于现场检测的转基因速测卡的现场实际应用性能进行评估, 并对其方案设计进行探索性研究。**方法** 选取国内外3家公司的转基因速测卡对含 Cry1Ab/1Ac *Bt* 蛋白的转基因水稻的检测性能(如灵敏度和交叉反应性)进行评估, 并与 Real-time PCR 方法同时对5种模拟实际样品进行检测分析。**结果** 转基因速测卡的灵敏度最低可达0.25%, 且无交叉反应性, 与 Real-time PCR 法检测模拟实际样品的检测结果一致, 此外, 转基因速测卡具有良好的现场操作性能。**结论** 转基因速测卡具有良好的实际现场应用性能, 当实际应用检测时, 应根据检测目的与目标蛋白抗原, 设计相应的实验方案, 达到准确检测的目的。因此, 转基因速测卡具有良好的市场推广前景。

关键词: 转基因; 检测; 速测卡; *Bt* 蛋白

Field application and feasibility of genetically modified dipstick

HE Jing^{1,2}, LI Hui^{1,2*}, CAI Jun^{1,2}, OU Jing-Kun^{1,2}, HUANG He-Zhou³, ZENG Xiang-Rong⁴

(1. Nutrition & Health Research Institute, COFCO Corporation, Beijing 100020, China; 2. Beijing Key Laboratory of Nutrition, Health & Food Safety, Beijing 102209, China; 3. Quality & Safety Management Department, COFCO Rice Division, Beijing, 100020, China; 4. Quality & Safety Department, COFCO Rice (Xiantao) Co., Ltd., Xiantao 433000, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the performance of the field application and design of experimental scheme of rapid, sensitive transgenic dipstick. **Methods** In this study, the detection performance of the transgenic dipsticks from 3 companies were evaluated with transgenic rice Cry1Ab/Cry1Ac *Bt* protein, such as sensitivity and cross reactivity, and 5 different samples were detected by the transgenic dipsticks and real time PCR. **Results** The results showed that the minimum limit of detection was up to 0.25% and there was no cross reactivity. The results of the detection of 5 different samples with the transgenic dipsticks were consistent with the real-time PCR method. In addition, transgenic dipsticks had a good performance in field operation. **Conclusion** The transgenic dipstick shows a good practical application performance. When used for actual application testing, it should be designed corresponding experimental scheme to achieve accurate detection, according to the testing purpose and target protein antigens. Therefore, the transgenic dipstick will have a good market prospect.

KEY WORDS: genetically modified organism; detection; dipstick; *Bt* protein

*通讯作者: 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

*Corresponding author: LI Hui, Senior Engineer, Nutrition & Health Research Institute, COFCO Corporation, 2nd Floor, NHRI Main Building, Future Science and Technology Park South NO.4 Road, Beiqijia, Changping, Beijing 102209, China. E-mail: lhui@cofco.com

1 引言

2014年,全球转基因种植面积已持续以3%~4%(约630万公顷)的速度增长19年,已达到了18150万公顷^[1]。但在转基因种植产业如此快速发展的形势下,转基因作物及其产品的安全性依然是消费者最关注的问题之一。世界各国为了保护消费者的知情权,对转基因产品的标识做出了明确的法律规定,而转基因成分检测是监督管理及正确标识的有力手段。

目前转基因检测技术主要采用聚合酶链式反应(PCR),在基因水平上利用不同转基因品种的特异性基因对转基因品系进行监督鉴定,该技术灵敏度好、特异性强、稳定性好,但由于该技术检测需要价格昂贵的PCR扩增仪、需专业技术人员操作、对操作环境要求高等特点,所以只能在实验室对转基因进行检测,并不适用于田间、物流、储藏、加工等环节进行现场快速检测抽查。转基因速测卡利用转基因特异性蛋白的抗原抗体反应对转基因成分进行检测,该技术检测仅需5~15 min,且不需要专业人员操作、对环境要求低、适用于各种场合的现场监督检测^[2-4],尤其适用于原料产品的转基因检测,因此转基因速测卡具有良好的市场应用前景,可实现转基因成分的现场即时筛查检测。本文对转基因速测卡的现场应用性能进行初步研究。

2 材料与amp;方法

2.1 材料与试剂

Cry1Ac/Cry1Ab转基因速测卡为国内两个厂家的产品(A和B)和国外一个厂家产品(C);Cry1C转基因速测卡和Cry2A转基因速测卡均为国内厂家产品;转基因阳性质控样品为本实验室实验粉末样品。

2.2 仪器与设备

Milli-Q, Academic 纯水器(美国 Millipore 公司); MS3

涡旋仪(美国 IKA 公司); ME2002 天平(德国梅特勒-托利多公司)。

2.3 方法

2.3.1 DNA 提取方法

采用天跟生化科技(北京)有限公司的植物基因组DNA提取试剂盒(型号: DP305)提取水稻种子的DNA。

2.3.2 引物

本研究 Real-time PCR 方法采用的引物序列见下表。

2.3.3 PCR 扩增体系与程序

实时荧光定量扩增采用 25 μ L 扩增体系,含 SYBR Green 的预混液 12.5 μ L,正向引物 0.75 μ L,反向引物(10 μ mol/L)0.75 μ L,模板(~50 ng/ μ L)2 μ L,用双蒸水(ddH₂O)补足 25 μ L,每次反应设置阴性对照和阳性对照。

反应程序为预变性 95 $^{\circ}$ C, 5 min, 30 个扩增循环(95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 68 $^{\circ}$ C 延生 30 s), 在每个循环后采集荧光信号。

2.3.4 提取转基因成分蛋白

根据不同的产品说明提取蛋白,转基因试纸条(A)采用蒸馏水提取,其他两家公司的试纸条(B和C)都配置了蛋白提取液。3家公司的转基因试纸条的蛋白提取程序一致,为向粉碎的水稻样品中加入定量的提取液(样品:提取液质量比为 1:3),盖好提取管的盖子,用力上下震荡提取管 20~30 s,确保样品与缓冲液充分混匀。静置 30 s 以上,等待固体物质沉淀在管底,上清即可作为测试液。提取样品时要操作小心,避免交叉污染。

2.3.5 转基因速测卡检测

首先将 2.3.4 中得到的测试液转移至样品槽中,然后将速测卡从试纸桶中取出,直接插入样品槽中,开始计时。结果在 10~15 min 读取,其他时间判读无效。用速测卡检测样品时,从包装袋中取出速测卡后要尽快使用,避免环境对速测卡性能产生不利影响。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

检测基因	引物名称	引物序列(5'-3')	PCR 产物大小(bp)
SPS	SPS-F	TTGCGCCTGAACGGATAT	277
	SPS-R	GGAGAAGCACTGGACGAGG	
CaMV 35S	CaMV 35S-F	GCTCCTACAAATGCCATCATTGC	195
	CaMV 35S-R	GATAGTGGGATTGTGCGTCATCCC	
NOS	NOS-F	GAATCCTGTTGCCGGTCTTG	180
	NOS-R	TTATCCTAGTTTGC GCGCTA	

3 结果与讨论

3.1 转基因水稻

本研究以转 *Bt* 基因水稻为原材料评价转基因速测卡的现场应用性能及其可行性。水稻是世界上重要的粮食作物之一, 全球转基因技术平台已将多种外源基因导入到水稻中^[5]。目前, 共报道了 500 多个 *Bt* 杀虫晶体蛋白的基因^[6], 但是只有很少一部分被导入转基因植物中进行过杀虫性实验^[7]。其中转 *Bt* 基因水稻使用较多的主要有 *Cry1A* 基因, 如 *Cry1Ab* 基因^[8,9], *Cry1Ac* 基因^[10,11], *Cry1Ab/Cry1Ac* 融合基因^[12,13], 其他转 *Bt* 基因水稻还有转 *Cry1C* 基因和 *Cry2A* 基因^[14,15]。2009 年, 在我国获得生产应用安全证书的华恢 1 号及其杂交稻组合 *Bt* 汕优 63 即为转 *Cry1Ab/Cry1Ac* 融合基因的抗虫性转基因水稻, 其对二化螟、三化螟和稻纵卷叶螟有高度的杀虫活

性。转 *Cry1C* 基因和转 *Cry2A* 基因的水稻也是对螟虫表现出高度抗性。所以本研究选取 *Cry1Ab/Cry1Ac* 蛋白速测卡、*Cry1C* 蛋白速测卡和 *Cry2A* 蛋白速测卡检测转基因水稻样品, 以评价转基因速测卡的现场应用性能及其可行性。

3.2 转基因速测卡灵敏度

分别配置含 0.25%、0.5% 和 1% 转基因成分的样品, 采用 A、B 和 C 转基因速测卡对三份样品同时进行检测。由图 1 可知, 当国内两种 *Cry1Ab/Cry1Ac* 转基因速测卡(A 和 B)检测 0.25% 转基因成分样品时, C 线和 T 线都可清晰可见, 所以其检测限可达 0.25%, 而当国外 *Cry1Ab/Cry1Ac* 转基因速测卡(C)检测 0.25% 转基因成分样品时, C 线清晰可见, 未见 T 线, 检测 0.5% 转基因样品时, C 线和 T 线都清晰可见, 所以其检测限为 0.5%。可见, 我国自主研发的 *Cry1Ab/Cry1Ac* 转基因速测卡具有优良的市场竞争力。

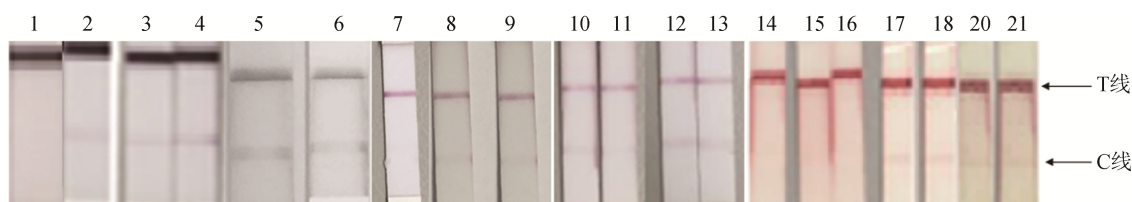


图 1 *Cry1Ab/Cry1Ac* 试纸条灵敏度结果图

Fig. 1 The results of the sensitivity of *Cry1Ab/Cry2Ac* dipstick

1~6 为转基因速测卡 A; 7~13 为转基因速测卡 B; 14~20 为转基因速测卡 C

1,7,14 为阴性样品; 2,3,8,9,15,16 为 0.25% 的转 *Cry1Ab/Cry1Ac* 样品; 4,10,11,17,18 为 0.5% 的转 *Cry1Ab/Cry1Ac* 样品; 5,6,12,13,19,20 为 1% 的转 *Cry1Ab/Cry1Ac* 样品

1~6: transgenic dipstick A; 7~13: transgenic dipstick B; 14~20: transgenic dipstick C

1,7,14: non-transgenic samples; 2,3,8,9,15,16: samples with a transgenic content of 0.25%; 4,10,11,17,18: samples with a transgenic content of 0.5%; 5,6,12,13,19,20: samples with a transgenic content of 1%

3.3 转基因速测卡特异性

由图 2 可知, 3 家公司的 *Cry1Ab/Cry1Ac* 转基因速测卡检测 100% 的 *Cry1C* 和 *Cry2A* 转基因水稻的 *Bt* 蛋白时, C 线清晰可见, 未见 T 线, 说明 *Cry1Ab/Cry1Ac* 转基因速测卡与 *Cry1C* 和 *Cry2A* 转基因 *Bt* 蛋白没交叉反应性。

通过 NCBI protein 数据库分析, *Cry1Ab/Cry1Ac* 转基因 *Bt* 蛋白、*Cry2A* 转基因 *Bt* 蛋白和 *Cry1C* 转基因 *Bt* 蛋白的特定的保守结构域见图 3~图 5, 从图中可知 3 个蛋白的保守结构域都有相互完全不同的结构域。所以抗转基因 *Bt* 蛋白抗体之间的交叉反应性为 0%, 这也奠定了免疫学检测技术成功应用于转基因蛋白成分检测的基础。

3.4 转基因速测卡和标准方法检测实际样品的比对验证

本研究选取 Real-time PCR 检测方法为标准方法, 对转基因速测卡的实际应用性能进行评价。用转基因样品和

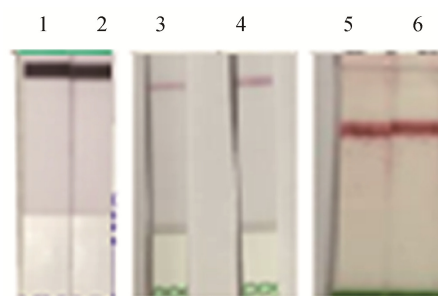


图 2 *Cry1Ab/Cry1Ac* 试纸条交叉反应性结果图

Fig. 2 The results of the cross reactivity of *Cry1Ab/Cry2Ac* dipstick
1 和 2 为转基因速测卡 A; 3 和 4 为转基因速测卡 B; 5 和 6 为转基因速测卡 C;

1,3,5 为 100% 的转 *Cry1C* 样品; 2,4,6 为 100% 的转 *Cry2A* 样品;
1,2: transgenic dipstick A; 3,4: transgenic dipstick B; 5,6: transgenic dipstick C

1,3,5: samples with *Cry1C* transgenic content of 100%; 2,4,6: samples with *Cry2A* transgenic content of 100%

非转基因样品随机制备 5 份实际检测样品, 其中有 4 份样品经 Real-time PCR 方法确定为转基因阳性样品, 1 份为转基因阴性样品。选取 Cry1Ab/Cry1Ac 转基因速测卡(A)、Cry2A 转基因速测卡、Cry1C 转基因速测卡同时检测 5 份样品。从图 6 和表 2 可知, 经 3 种转基因速测卡同时检测, 1 份转基因阴性样品不含转基因蛋白成分; 3 份转基因阳性样品含 Cry1C 和 Cry2A 蛋白, 而不含 Cry1Ac/Cry1Ab 蛋白; 1 份转基因样品仅含有 Cry2A 蛋白, 而不含其他两种蛋白。所以 5 份样品的转基因成分检测, 基于蛋白的转基因速测卡和基于核酸的标准方法 Real-time PCR 方法的检测结果一致。

目前, 由于转基因品系多种多样, 所以在选用转基因速测卡检测转基因成分时, 应根据检测地区、检测样品、检测目的等信息设计实验方案, 选取多种转基因速测卡进行检测。如为确定检测样品是否为转基因样品, 为减少检测成本, 可优先选取市场上流通量大的转基因品系所含蛋白的转基因速测卡。在检测中国种植的水稻样品时, 可根据地域、样品名称等关键信息选取转基因速测卡。已获得

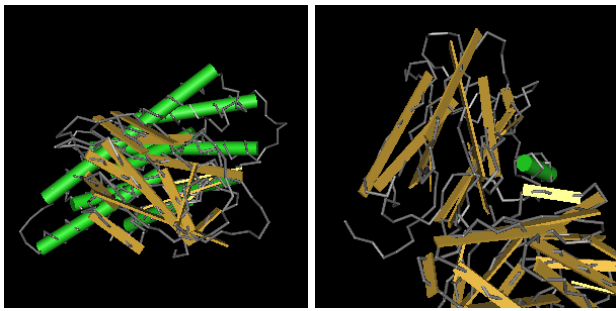


图 3 Cry1Ab/Cry1Ac 转基因 *Bt* 蛋白的 NCBI 上两个保守区 3D 结构图

Fig. 3 The 3D structure of two conservative area of Cry1Ab/Cry1Ac transgenic protein from NCBI

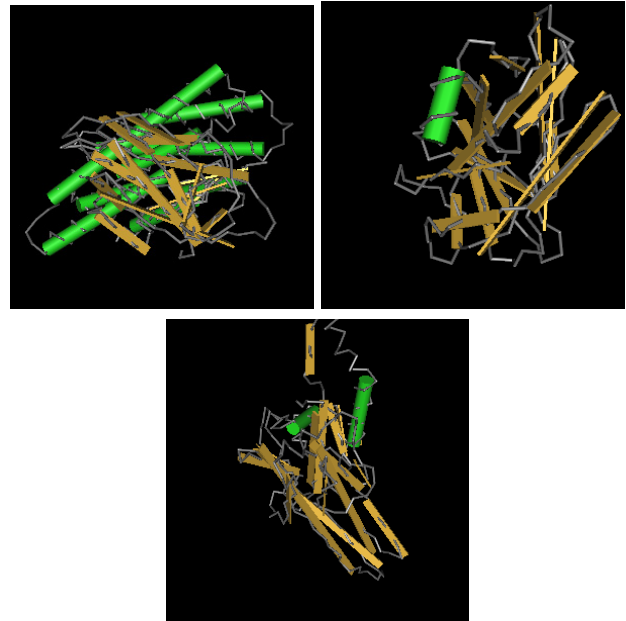


图 4 Cry2A 转基因 *Bt* 蛋白的 NCBI 上 3 个保守区 3D 结构图
Fig. 4 The 3D structure of 3 conservative area of Cry2A transgenic protein from NCBI

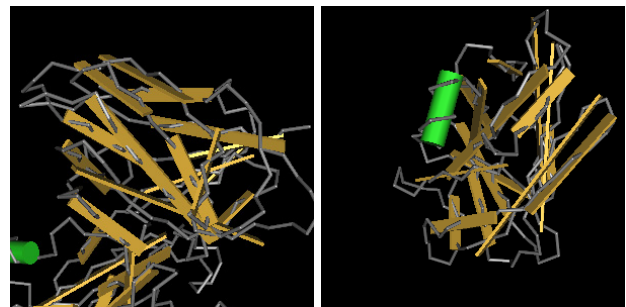


图 5 Cry1C 转基因 *Bt* 蛋白的 NCBI 上 2 个保守区 3D 结构图
Fig. 5 The 3D structure of 2 conservative area of Cry1C transgenic protein from NCBI

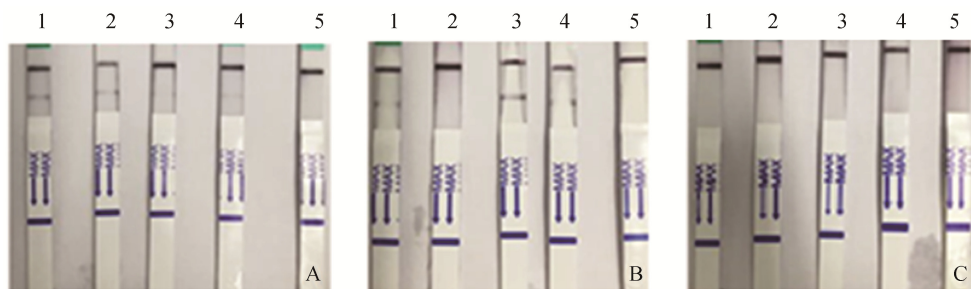


图 6 转基因速测卡检测实际样品结果图

Fig. 6 The results of the detection of real samples with transgenic dipsticks

A: Cry1C 转基因速测卡; B: Cry2A 转基因速测卡; C: Cry1Ac/Cry1Ab 转基因速测卡

1-5 分别为: 样品 1、样品 2、样品 3、样品 4、样品 5

A: Cry1C transgenic dipsticks; B: Cry2A transgenic dipsticks; C: Cry1Ac/Cry1Ab transgenic dipsticks

1~5: sample 1, sample 2, sample 3, sample 4, sample 5

表 2 转基因速测卡和标准方法检测实际样品结果
Table 2 The results of transgenic dipsticks and GB real-time PCR

样品号	Cry1Ac/Cry1Ab	Cry1C	Cry2A	标准方法
1	阴性	阳性	阳性	阳性
2	阴性	阴性	阳性	阳性
3	阴性	阳性	阳性	阳性
4	阴性	阳性	阳性	阳性
5	阴性	阴性	阴性	阴性

官方认证证书的转基因水稻有 7 种品系^[16], (1)7Crop#10(日本认证, 含修饰的 cry j 1 和 cry j 2 蛋白和潮霉素 B 磷酸转移 (hph) 酶)、(2)GM Shanyou 63(中国认证, 含 Cry1Ac/Cry1Ab 蛋白)、(3)Huahui-1/7751-1(中国认证, 含 Cry1Ac/Cry1Ab 蛋白)、(4)LLRICE06(美国认证, 含 N-乙酰基转移(PAT)酶)、(5)LLRICE0601(哥伦比亚和美国认证, 含 PAT 酶)和(6)LLRICE62(澳大利亚、加拿大、哥伦比亚、洪都拉斯、墨西哥、新西兰、菲律宾、俄罗斯、南非和美国认证, 含 PAT 酶)、(7)Tarom molai+cry1Ab(伊朗认证, 含 hph 酶和 Cry1Ab 蛋白), 和我国转基因水稻种植试验田研究还涉及其他抗虫水稻, 如含 Cry1C、Cry2A 转基因蛋白, 抗病转基因水稻, 抗旱转基因水稻等, 所以应用转基因速测卡检测转基因成分时, 应根据地区和实验目的等信息, 选择相应的转基因速测卡; 当检测水稻进出口贸易时, 则选择多种转基因速测卡, 尤其重点选择外国转基因品系对应的转基因蛋白速测卡。

4 结 论

转基因速测卡具有优良的检测性能、操作简便和体积小等优点, 使其非常适用于转基因成分的现场快速检测。目前, 转基因速测卡的灵敏度可达 0.25%且没有交叉反应性, 如成功开发出更灵敏的显色系统(如其他纳米材料)与之结合, 其检测灵敏度可会继续提高^[17,18]。由于转基因品种众多, 其转基因蛋白结构也随之变化, 所以采用转基因速测卡检测转基因成分时, 应根据检测目的具体分析, 确定相应的检测目标蛋白抗原, 开发或选择相应的转基因速测卡, 以达到准确检测的目的。此外, 转基因速测卡检测样品仅需 10~15 min、操作简单、无需专业人员操作、对检测环境无要求、检测稳定、结果准确, 所以转基因速测卡具有良好的现场应用性能和市场推广前景。

参考文献

- [1] Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2014 (ISAAA Brief 49)[Z].
- [2] 程楠, 何景, 董凯, 等. 试纸法在食品安全快速检测中的研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(1): 256-261.

- Cheng N, He J, Dong K, *et al.* A review on research progress of test strips for rapid food safety detection [J]. Food Sci, 2015, 36(1): 256-261.
- [3] 蔡军, 李慧, 胡梦龙, 等. 转基因成分分析检测技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(2): 706-714.
- Cai J, Li H, Hu ML, *et al.* Research progress in techniques for the detection and analysis of genetically modified ingredients [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(2): 706-714.
- [4] 王晨光, 许文涛, 黄昆仑, 等. 转基因食品分析检测技术研究进展[J]. 食品科学, 2014, 35(21): 297-305.
- Wang CG, Xu WT, Huang KL, *et al.* Recent progress in techniques for the detection and analysis of genetically modified foods [J]. Food Sci, 2014, 35(21): 297-305.
- [5] 周琳. 转基因水稻、大豆对根际微生物的影响[D]. 北京: 中国农业科学院, 2010.
- Zhou L. Effects of transgenic rice and soybean on rhizosphere microbes [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2010.
- [6] 孟志刚. *Bt* 杀虫基因的结构改造与功能研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2012.
- Meng ZG. Structure optimization and function study of *Bt* gene [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2012.
- [7] 陈浩, 林拥军, 张启发. 转基因水稻研究的回顾与展望[J]. 科学通报, 2009, 54: 2699-2717.
- Chen H, Lin YJ, Zhang QF. Retrospect and prospect of research about transgenic rice [J]. Sci Bull, 2009, 54: 2699-2717.
- [8] Ye GY, Shu QY, Yao HW, *et al.* Field evaluation of resistance of transgenic rice containing a synthetic cry1Ab gene from *Bacillus thuringiensis* Berliner to two stem borers [J]. J Econ Entomol, 2001, 94: 271-276.
- [9] Wu G, Cui H, Ye G, *et al.* Inheritance and expression of the cry1Ab gene in *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) transgenic rice [J]. Theor Appl Genet, 2002, 104: 727-734.
- [10] Khanna HK, Baina SK. Elite India transgenic rice plants expressing modified Cry1Ac endotoxin of *Bacillus thuringiensis* show enhanced resistance to yellow stem borer (*Scirpophaga incertulas*)[J]. Transgenic Res, 2002, 11: 411-423.
- [11] Loc NT, Tinjuangjun P, Gatehouse AMR, *et al.* Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate transgenic rice plants which accumulate higher levels of proteins conferring insect resistance [J]. Mol Breed, 2002, 9: 231-244.
- [12] Tu J, Zhang G, Datta K, *et al.* Field performance of transgenic elite commercial hybrid rice expressing *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin [J]. Nat Biotechnol, 2000, 18: 1101-1104.

- [13] Ramesh S, Nagadhara D, Pasalu IC, *et al.* Development of stem borer resistant transgenic parental lines involved in the production of hybrid rice [J]. *J Biotechnol*, 2004, 111: 131–141.
- [14] Tang W, Chen H, Xu CG, *et al.* Development of insect-resistant transgenic indica rice with a synthetic cry1C gene [J]. *Mol Breed*, 2006, 18: 1–10.
- [15] Chen H, Tang W, Xu CG, *et al.* Transgenic indica rice plants harboring a synthetic cry2A gene of bacillus thuringiensis exhibit enhanced resistance against lepidopteran rice pests [J]. *Theor Appl Genet*, 2005, 111: 1330–1337.
- [16] ISAAA. Rice (*Oryza sativa* L.) GM Events (7 Events)[EB/OL]. <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/crop/default.asp?CropID=17&Crop=Rice>. 2016-4-1
- [17] 谢艳君, 杨英, 孔维军, 等. 基于不同纳米材料的测流免疫层析技术在真菌毒素检测中的应用[J]. *分析化学评述与进展*, 2015, 43(4): 618–628.
Xie YJ, Yang Y, Kong WJ, *et al.* The application of flow immune chromatographic technique based on different nano materials in mycotoxin detection [J], *Chin J Anal Chem*, 2015, 43(4): 618–628.
- [18] 苏会岚. 纳米及生物放大技术用于构建高灵敏电化学免疫分析方法的

研究[D]. 重庆: 西南大学, 2012.

Su HL. Studies on the application of nanotechnology and biotechnology in amplified electrochemical immunoassay [D]. Chong Qing: Southwest University, 2012.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



何 景, 硕士, 主要研究方向为食品安全。

E-mail: hejing1@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