

转基因食品检测方法的现况与进展

周萍萍 吴永宁 张建中

(中国疾控中心营养与食品安全所, 北京 100050)

摘要:为给转基因食品检测提供参考,介绍包括除草剂生物分析法(herbicide bioassays)、western 印迹法(Western blot)、酶联免疫吸附试验法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、southern 印迹法(Southern blot)、聚合酶链反应法(Polymerase Chain Reaction, PCR)在内的蛋白质检测和 DNA 检测方法。一些新的方法如近红外光谱法(near-infrared spectroscopy)、DNA 微阵列技术法(Microarray)等略做介绍。对这些方法的基本原理、优缺点和应用范围以及存在的问题进行了分析,可供转基因食品检测研究选择分析方法时借鉴。

关键词:转基因;食品;研究技术

The advances in the detection method of GMO foods

Zhou Pingping, et al.

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100050)

Abstract: A number of protein or DNA methods for detection of genetically modified organisms (GMO) are discussed in this review, including herbicide bioassays, Western blot, enzyme-linked immunosorbent assay, Southern blot and polymerase chain reaction. Several new methods have been developed to detect genetically modified foods, such as capillary gel electrophoresis, near-infrared spectroscopy and microarray. Discussions were made on various detection methods in terms of their principle, advantage and disadvantage, application and problems.

Key Words: Transgenes; Food, Investigative Techniques

转基因食品(genetically modified food)的迅速发展,引发了民众、各国政府和国际组织对转基因食品的安全性及其对生态环境影响的广泛关注和争论。欧盟、美国、日本、加拿大等国先后出台了相应的法律和管理办法,对转基因食品实行强制标识或自愿标识,让消费者自己选择是否使用转基因食品。我国农业部在《农业转基因生物安全管理条例》基础上,颁布了《农业转基因生物标识管理办法》。

为满足强制标识的需求,目前已发展了许多不同的检测方法。总的来说,对来自转基因农作物的未加工材料(如谷类)和加工产品(如食品)可以通过检测外源 DNA 或是检测外源 DNA 编码表达的新蛋白质来识别。

1 基于除草剂活性的生物分析法(Herbicide Bioassays)

基于除草剂活性的生物分析法是检测未加工材料的某种特定性征的存在或缺失(如抗除草或耐除草性征)的方法。该方法对可发芽的种子和谷粒的性征识别非常准确,是种子公司的一种精确、廉价、有用的初步预防性检测方法。该方法对每个样品的检测包括阴性性征和阳性性征的对照准确性取决于发芽情况,发芽数目越高检测可信限水平越高。除草剂生物分析法只能用来检测可发芽的种子或谷粒,不能检测加工食品。每个检测需 7 d 时间完成。^[1]

2 蛋白质的免疫分析法(immunoassays for detection of proteins) 免疫分析技术的优点主要在于免疫反

基金项目:国家重点基础研究发展规划(2001CB10901)和国家高技术研究发展计划(2002AA212041)。

作者简介:周萍萍 女 硕士生

通讯作者:吴永宁 男 研究员

This work was supported by National Basic Research Program of China (2001CB10901) and National High Tech Research Program of China. (2002AA212041)

应的高度特异性,即使有干扰性的化合物存在时,也能准确地识别抗原性物质。常用的检测转基因食品的免疫方法有蛋白质印迹法和酶联免疫吸附试验(ELISA)方法。

2.1 蛋白质印迹法(Western blot) 蛋白质印迹法将电泳的较高的分离能力、抗体的特异性和显色酶反应的灵敏性结合起来,是检测复杂混合物中特异蛋白质的最有力的工具之一,普遍用于分离、检测特异的目的蛋白质,灵敏度为1~5 ng。它可确定一个样品中是否含有低于或超过预定限值水平的目的蛋白质,特别用于不可溶蛋白质的分析。van Duijn 等人用蛋白质印迹法检测 Roundup Ready 大豆中的 CP4 合成酶,检测限在 0.5%~1%。经验证这种方法可以应用于转基因 Roundup Ready 大豆原材料和大豆蛋白质产品的检测。^[2]

2.2 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) Rogan 等人用 ELISA 法检测出传统大豆加工产品中混有 2% Roundup Ready 大豆中的 CP4 EPSPS 蛋白质。^[3] 这种蛋白质检测方法具有商业可利用性并具有高度选择性和灵敏性。

免疫测定的主要缺点之一是复杂基质对它的准确性和精确度有干扰,如加工的蔬菜和食品。实际上,许多存在于食物基质中的物质,如表面活性剂(皂苷)、酚化物、脂肪酸、内源磷酸(酯)酶,均可以抑制特异的抗原-抗体相互作用。此外,外源基因表达的蛋白质在较低水平时或热处理变性时,免疫方法的检测能力下降。某些导入蛋白质并不是在植物的所有组织中均有表达,例如在玉米中一些蛋白质大部分表达在叶子中,而不在谷粒中。特别需要指出的是,在加工过程中蛋白质会发生降解,因此这种技术只适合未加工的原材料的检测。而且如果导入的 DNA 的蛋白质没有表达,也不能应用这种技术。DNA 比起蛋白质具有更多的热稳定性,能够在食物加工过程中存留。^[4]

3 DNA 检测法 由于 DNA 是相当稳定的分子,因此 DNA 检测法适合多数种类的样品(原材料、食品配方组成成分、加工产品)的检测。转基因食品的 DNA 检测方法的基础原理是互补的 DNA 双螺旋的两条链的序列特异性杂交。转入作物中的 DNA 构成了具有某种功能的元件,它们通常是启动子序列、结构基因和基因的终止子序列。欧盟当前使用的基因修饰物大多是三个基因元件:Camv35S 启动子、NOS 终止子及 Npt II 等报告基因。但是由于这些元件也天然存在于一些植物和土壤微生物中,因此用 PCR 检测有可能呈假阳性结果。应用于转基因食品

检测的特异性 PCR 方法可防止假阳性,该方法采用一套成对引物,这些引物横跨两个毗邻的基因元件或特异地结合目的基因序列。尽管目前有几种可以应用的检测技术如毛细管凝胶电泳法(CGE)、^[5] 高效液相色谱(HPLC)法、^[6] 和质谱法,^[7] 但常见的是核酸印迹法(Southern blot)和聚合酶链反应法(PCR)。DNA 芯片技术是目前有待发展的 DNA 检测技术。

3.1 核酸印迹法(Southern blot) Wu 等人用核酸印迹法判断西红柿的假定的转化株的基因组 DNA 中是否含有转入的 DNA。^[8] Jennings 等用核酸印迹法杂交判断 Bt 玉米中 cry1Ab 基因的 211 bp 片段和玉米内源基因 sh2(编码 ADP 葡萄糖焦磷酸化酶)的 213 bp 片段的存在。^[9]

3.2 定性 PCR 法 PCR 法是最常用的 DNA 检测方法,非常灵敏。在实验室里只需要 100~350 mg 的待测样品就足够进行 DNA 抽提(在 PCR 反应前抽提的 DNA 必须要稀释,因为通常一个反应体系仅需 5~50 ng)。

该方法的一个关键的限速步骤是 DNA 抽提与纯化。对 9 种 DNA 抽提方法进行了比较分析,目前有两种方法被广泛应用:CTAB 方法和 Wizard 方法。这两种方法都可以分离出令人满意的 DNA,较少出现 DNA 的降解并且成本较低,在 GMO 检测中被广泛应用。^[10] 从加工食物中分离出的 DNA 通常是高度降解的(一般片段小于 400 bp),而且还要从食物中的蛋白质、脂肪、聚多糖和聚苯酚等能抑制 DNA 聚合酶的活性的化学物质纯化出来。确定抽提 DNA 产物的方法有:(1)用限制性内切酶对扩增产物特异性剪切;^[11] (2)用一个 DNA 探针和目的基因特异性杂交;^[8,9] (3)对 PCR 产物直接测序;^[12] (4)巢式 PCR 法。抽提出的 DNA 质量可以用 260 nm 紫外光谱来评估。^[12]

PCR 方法已经检测了许多种食物(如大豆、土豆、玉米和西红柿等),在油菜籽的 GMO 检测中不仅可以用于定性检测,还可以用来检测掺入不同类型的 GMO 的菜籽油。^[13] Hupfer 等人用 PCR 方法检测了 Bt 玉米的热加工产品中的基因修饰物。^[14] 潘良文等人对进口转基因抗草甘膦油菜籽和大豆中 CP4-EPSPS 基因的检测进行了比较,发现抗草甘膦油菜籽和抗草甘膦大豆中转入的外源 CP4-EPSPS 基因 DNA 序列存在较大差异,难以根据其相应的同源序列设计出一对共同的引物进行 PCR 扩增(除非设计兼并性引物),所以检测抗草甘膦油菜籽和大豆应使用相应的不同引物。^[15] 在涉及 13 个国家 29 个实验室的协同性验证研究中,以定性 PCR 检测转基因

大豆、玉米和其他加工产品中的 35S 启动子和 NOS 终止子,结果显示所有的实验室均能明确地检测出 2 % GMO 大豆和玉米的样品,能可靠检测出 0.5 % GMO 大豆中的 CaMV35S 启动子对转基因食品和非转基因食品进行 100 % 的区分。然而对 NOS 终止子的灵敏度较低,有略高的假阴性结果。从检测多达 105 个样品的假阴性结果中发现,由于玉米基因组的片段比较大,这种定性的 PCR 方法对转基因玉米原材料的灵敏度比转基因大豆原材料略低(如检测 0.1 % 的转基因玉米中的 35S 启动子的假阴性数量是 14 个而相应的转基因大豆的 35S 启动子的假阴性数量是 5 个)。^[11] PCR 方法已经发展为检测转基因 Roundup Ready 大豆的方法,呈现高度特异性和敏感度(0.01 % GMO),适用于从大豆到豆制品、大豆蛋白质、卵磷脂及豆油的半成品和终产品样品。^[2]

3.3 多重 PCR 法(Multiplex PCR) 多重 PCR 可以同时针对几个靶位点进行 PCR 技术检测。陶震等^[16]利用其设计的多重 PCR 方法对 5 个大豆和 6 个豆粕样品进行实际检测,结果表明该方法不仅可以检测完整的大豆样品,而且对整体结构已经遭到严重破坏的豆粕同样可以进行有效检测,并可用于其它植物材料的检测。Permingeat 等仅用两对引物就可同时检测出转基因玉米 Bt176、MON810、Bt11 和 T25 的 CryIA(b) 和 pat 基因。多重 PCR 也可同时准确地扩增出 Roundup Ready 大豆的 NOS 和 epsps 序列片段。^[17]

3.4 定量 PCR 法 尽管采用特异 DNA 片段的定性 PCR 筛选方法已广泛应用于 GMO 食品的检测,^[18]一些国家将此作为本国有关食品法规的标准检测方法,但是随着各国有关 GMO 标签法的建立和不断完善,对食品中的 GMO 含量的下限已有所规定。定性筛选 PCR 本身具有的局限性(如因其高敏感性常伴有假阳性现象,而操作上的误差加上一些反应抑制因素亦可带来假阴性现象)显现出来,其最大的不足是无法对 GMO 进行定量分析。为此,研究者在定性筛选 PCR 方法的基础上,发展了不同的定量 GMO 的 PCR 检测方法。研究人员在实验设计中引入内部参照反应以消除检测时的干扰,并与已知含量的系列 GMO 标准样品的 PCR 结果进行比较,从而可以半定量地检测待测样品中的 GMO 含量。目前定量检测方法如竞争性定量 PCR 方法(QC - PCR)和实时定量 PCR 方法(real - time PCR)已被一些国家的政府实验室采用。

3.4.1 竞争性定量 PCR 法 构建理想的内标是竞争性定量 PCR 法的关键。前提是假定内标具有和靶基因相同的动力学特点和扩增效率,并且要求

DNA 片段大于 100 bp。^[19]目前,内标法构建的方法有:靶基因扩增产物的突变;限制性片段的插入或缺失;含靶基因引物结合位点的非同源性 DNA 序列等。其中通过 PCR 方法构建的探针结合位点核苷酸直接突变构建内标物是目前应用最多、最方便的方法。单竞争性 PCR 因为没有考虑样品分析中可能发生的 DNA 降解,通常被用来进行半定量测定,适合于原材料和未加工食品的分析。双竞争性 PCR 法则同时考虑了 DNA 的断裂和扩增两个因素,并且有应用设备成本相对较低的优点。其主要问题是异源双链核酸分子的构成会改变 PCR 反应中靶基因和内标扩增产物的比率,而异源双链核酸分子有相似的电泳特性也会使随后的扩增产物的电泳分析复杂化。^[19]3 个欧洲食物控制实验室在确认这些方法时比较了定量 PCR 检测方法的实验操作特性。用 QC - PCR 测定 Bt176 玉米,平均值偏离真实值的 -7 % ~ 18 % 左右。平均偏离 2 % ± 10 %。能够确定大豆 DNA 中 0.3 % ~ 36 % Roundup Ready 大豆的含量, RSD 为 25 % 左右。^[20]

3.4.2 实时定量 PCR 法 来自日本、韩国和美国等的 13 个实验室参加的针对 5 个品种转基因玉米 Bt11、T25、MON810、GA21、Event176 和 1 种转基因大豆 Roundup Ready 的研究结果显示,实时定量 PCR 方法能特异定量检测 GMO,测定限 Bt11、T25 和 MON810 为 0.5 %,而对 GA21、Event176 和 Roundup Ready 大豆的为 0.1 %;盲样测试结果表明这种方法可以应用于转基因作物标识制度的实际检测。^[21]Vaitilingam M 等^[22]应用实时定量 PCR 方法可以在 DNA 抽提出 3 h 后检测出含 2 pg 的基因修饰物质或 1 g 待测样品中的基因组 DNA,并可以在已确认的代表性的食物产品中检测出“Maximizer”玉米和“Roundup Ready”大豆的含量。在实时定量 PCR 方法检测 Roundup Ready 大豆加工食品的实验中,179 个含大豆的不同的加工食品如婴儿食品、减肥食品中有 30 个样品检出 GMO,其中 8 个 GMO 的含量超过了 1 %。^[23]实时定量 PCR 特异测定 GMO 的检测限(LOQ),在实验上达到了 30 ~ 50 个目的分子,接近理论预期值。用 200 g 植物基因组 DNA 为模板的 PCR,其测定限从大米的 0.02 % 到小麦的 0.7 %,主要取决于目的植物基因组的大小。^[20]实时定量 PCR 方法的主要缺点是荧光标记探针会在一些食物基质中水解。另外,操作的仪器较贵。^[19]

3.5 微阵列技术(Microarray) 检测转基因食物工作者们在将来所面对的一个挑战是以新的和多个基因调节元件为特征的转基因作物的快速发展,需要有新的技术和设备满足高通量和日益增加的各种

GMO 的低成本检测。Microarray 技术(又称为基因芯片)是转基因食品检测的有前途的方法。它具有 PCR 方法的相同优点,可以精确地进行 GMO 的定性检测。不同之处为可在固体表面固定上千个特定的探针,能够一次单独分析样品中的大量的不同种类的 GMO,进行筛查、定性、定量,具有高通量、集成化和自动化的特点。此外,微阵列技术非常灵活,当有新的 GMO 出现时可以在阵列中增加布点,将新的基因序列包括在筛查程序中。

微阵列技术已用于表达分析。^[7]同其它新兴的技术一样,微阵列技术也存在一些问题,其中主要的问题是如何提高寡核苷酸或 cDNA 在玻片表面固定的效率,降低高背景的干扰,减少自动杂交的消耗成本,保证相似条件下同一实验操作的结果重现性。微阵列技术作为一种新兴技术,随着技术的完善必将会得到更广泛的应用。

4 可供选择的其它转基因检测技术 近红外光谱(Near-infrared spectroscopy, NIR)是常规非破坏性分析谷物的湿度、蛋白含量、脂肪含量、纤维和淀粉含量的一种常规方法,^[24]近来,此项技术用来检测转基因作物。Lowa 州立大学谷物质量实验室已经成功地利用 Roundup Ready 大豆和传统种植的大豆光谱在 910 nm 至 1 000 nm 波长附近的一个偏移,用 NIR 区分 Roundup Ready 大豆和传统种植的大豆。Infratec 近红外光谱仪对 20 个非 Roundup Ready 大豆的正确检出率为 95%,而对 19 个 Roundup Ready 大豆的正确检出率为 84%。NIR 的突出优点是不需要进行样品的前处理,非常简单、快速(在 15~90 s),能实行自动化。缺点是不能检测食物混合物。此外,尽管它对大部分有机成分敏感但准确性有限。^[25]

5 总结 根据欧盟的规则,可以用定性 PCR 检测 GMO,如果有效的定性 PCR 方法没有检测出 GMO,也可以检测食品中的新表达的蛋白质。如果没有检测出新表达的蛋白质,那么就可以认为该食品不是转基因食品。如果定性 PCR 方法结果阳性,则用有效的定量 PCR 方法检测食品中的 GMO 含量。如果 GMO 超过 1%,就应对该食品标识;如果 GMO 的含量低于 1%,则该食品不用标识。值得注意的是 DNA 检测方法也和蛋白质检测方法一样具有某种不确定性,即有的转基因食品的加工产品(如精制油)中只含有少量的 DNA。此外,加热和其它加工方法也会降解食物中的 DNA。可以预见,在转基因食品检测领域,高通量、高灵敏度、自动化和低成本

的检测技术是未来的发展趋势。

参考文献:

- [1] Mette L. Ueck. Detection of genetically modified plants - methods to sample and analyze GMO content in plants and plant products [EB/OL]. <http://www.sns.dk/erhvogadm/biotek/detection.htm>, 2003 - 08 - 01.
- [2] Cert van Duijn, Ria van Biert, Henriëtte Bleeker-Marcelis, et al. Detection methods for genetically modified crops [J]. Food Control, 1999, 10:375—378.
- [3] Rogan GJ, Dudin YA, Lee TC, et al. Immunodiagnostic methods for detection of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in Roundup Ready[®] soybeans[J]. Food Control, 1999, 10:407—414.
- [4] Joint FAO/WHO food standards programme codex committee on methods of analysis and sampling twenty-fourth session 18-22 November 2002, Budapest, Hungary [EB/OL]. <http://flairflow4.vscht.cz/al03-23e.pdf>, 2003 - 08 - 01.
- [5] V Garc ía-Cañas, R González, A Cifuentes. Ultrasensitive detection of genetically modified maize DNA by capillary gel electrophoresis with laser-induced fluorescence using different fluorescent intercalating dyes[J]. J Agric Food Chem, 2002, 50(16):4497—4502.
- [6] Le Gall G, DuPont MS, Mellon FA, et al. Characterization and content of flavonoid glycosides in genetically modified tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits [J]. J Agric Food Chem, 2003, 51(9):2438—2446.
- [7] Joung J Y, Kasthuri GM, Park J Y, et al. An overexpression of chalcone reductase of pueraria montana var. lobata alters biosynthesis of anthocyanin and 5-deoxyflavonoids in transgenic tobacco [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 303(1):326—331.
- [8] Wu K, Tian L, Hollingsworth J, et al. Functional analysis of tomato *Pti4* in arabidopsis[J]. Plant Physiol, 2002, 128:30—37.
- [9] Jennings J C, Albee L D, Kolwyck D C, et al. Attempts to detect transgenic and endogenous plant DNA and transgenic protein in muscle from broilers fed YieldGard corn Borer corn [J]. Poul Sci, 2003, 82(3):371—380.
- [10] Zimmermann A, L üthy J, Pauli U. Quantitative and qualitative evaluation of nine different extraction methods for nucleic acids on soya bean food samples[J]. Z Lebensm Unters Forsch A, 1998, 207:81—90.
- [11] Lipp M, Brodmann P, Pietsch k, et al. IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soybeans and maize in dried powder[J]. J AOAC int, 1999, 82:923—928.
- [12] Kiriara J A, Petri J B, Messing J. Isolation and sequence of a gene encoding a methionine-rich 10-Kda zein protein from maize[J]. Gene, 1988, 71:359—370.
- [13] Hellebrand M. Determination of DNA traces in rapeseed oil

- [J]. Z Lebensm Unters Forsch A, 1998, 206:83—87.
- [14] Hupfer C, Hotzel H, Sachse K, et al. Detection of the genetic modification in heat-treated products of Bt maize by polymerase chain reaction[J]. Z Lebensm Unters Forsch A, 1998, 206:203—207.
- [15] 潘良文,陈家华,沈禹飞,等. 进口转基因抗草甘膦油菜籽和大豆中 CP4 EPSPS 基因的检测比较研究[J]. 生物技术通讯, 2001, 12(3): 175—207.
- [16] 陶震,杨胜利,龚毅. 利用 MPCR 方法快速检测植物转基因背景[J]. 生物技术通报, 2000, (6): 37—41.
- [17] Pemingeat H R, Reggiardo M I, Vallejos R H. Detection and quantification of transgenes in grains by multiplex and real-time PCR[J]. J Agric Food Chem, 2002, 50(16): 4431—4436.
- [18] Allmann M, Hofelein C, Köppel E, et al. Polymerase chain reaction (PCR) for detection of pathogenic microorganisms in bacteriological monitoring of dairy products[J]. Res Microbiol, 1995, 146(1): 85—97.
- [19] Wiseman G. State of the art and limitations of quantitative polymerase chain reaction[J]. Journal of AOAC Int, 2002, 85:792—796.
- [20] Hubner P, Waiblinger H U, Pietsch K, et al. Validation of PCR methods for quantitation of genetically modified plants in food[J]. J AOAC Int, 2001, 84(6): 1855—1864.
- [21] Shindo Y, Kuribara H, Matsuoka T, et al. Validation of real-time PCR analyses for line-specific quantitation of genetically modified maize and soybean using new reference molecules[J]. J AOAC Int, 2002, 85(5): 1119—1126.
- [22] Vaitilingom M, Pijnenburg H, Gendre F, et al. Real-time quantitative PCR detection of genetically modified Maximizer maize and Roundup Ready soybean in some representative foods[J]. J Agric Food Chem, 1999, 47(12): 5261—5266.
- [23] Hagen M. Detection of genetically modified soy (Roundup Ready) in processed food products[J]. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 2000, 113(11-12): 454—458.
- [24] Brian G. Osborne Near-infrared spectroscopy in food analysis encyclopedia of analytical chemistry [EB/OL]. <http://www.deanet.it/Vetrina-editori/Wiley%20Site/EAC/pdf/A1018-W.PDF>.
- [25] Charles R. Hurburgh Jr, Connie L Hardy, et al. Identification of genetically modified grains by near-infrared spectroscopy. <http://qaru.ars.usda.gov/IDRC2000/page1.htm>, 2003-08-01.
- [收稿日期: 2004-03-12]

中图分类号: R15; Q753 文献标识码: E 文章编号: 1004-8456(2004)03-0000-00

肠出血性大肠埃希菌 O157:H7 基因组和质粒 pO157 致病因子

朱淑萍¹ 李 蓉²

(1. 哈尔滨医科大学公共卫生学院, 黑龙江 哈尔滨 150001;

2. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100021)

摘 要: 为推动 O157:H7 致病机制的深入研究, 介绍了近年来对 EHEC O157:H7 的基因组和特异性大质粒 pO157 上与细菌致病性有关的主要致病因子的研究进展。

关键词: 大肠杆菌 O157; 基因组; 质粒; pO157

The *Escherichia coli* O157: H7 genome and virulent agents in pO157

Zhu Shuping, et al.

(Department of Nutrition and Food Hygiene, Public Health College of Harbin Medical University, Heilongjiang Harbin 150001, China)

Abstract: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157: H7 is an important pathogen which endangers human health. The severity of disease, the lack of effective treatment and the potential for large-scale epidemic outbreaks from contaminated food supplies have propelled researches on the pathogenesis of O157: H7. This article reviews the recent developments in the research of *Escherichia coli* O157: H7 genome and major plasmid pO157 which are related to its virulence.

作者简介: 朱淑萍 女 硕士生

通讯作者: 李蓉 女 教授