
食品中转基因成分检测

第 2 章

手册说明、工作方法和课程介绍

M. Querci



目 录

第 2 章

手册说明、工作方法和课程介绍

如何检测转基因生物	3
DNA 和蛋白质检测方法的优点和局限性	4
手册的总体设想和介绍	7
参考文献	11

如何检测转基因生物

如前所述，转基因植物的特点就是在其基因组中插入了一个新基因（或一组新基因）。这个/些新基因进行翻译而表达出新的蛋白质，从而使植物获得新的特性，如对某些昆虫的抗性或对除草剂的耐性。每种转基因作物检测技术的根本目的都是为了找出转基因植物与非转基因品种之间的差别。因此，可以检测新插入的外源 DNA 或表达出的新蛋白质，而如果蛋白质是一种酶的话，还可以通过化学分析法检测酶促反应的产物以达到检测的目的。

现有两种比较常用的方法用来检测大豆、玉米、棉花及其它农作物中转基因成分的存在。一种是酶联免疫吸附测定法 (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA)，该法利用表达抗原和目标抗体间结合的特异性来检测特定蛋白的存在；另一种是聚合酶链反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR)，该法是基于对插入农作物基因组的新 DNA 序列进行检测的方法。这些方法不仅能确定样品中是否存在转基因物质，还可以对检测样品给出量化的结果 (百分比形式)。

经欧盟验证的第一个检测方法是基于 PCR 的筛选检测法，该法能够检测绝大多数目前获准销售的转基因生物 (Lipp *et al.*, 1999)。该法由 Pietsch 等 (1997) 建立，是基于检测新导入基因两侧的调控序列，也就是 35S 启动子和 *nos* 终止子。该法的验证工作由 IHCP 的食品和生活消费品部以及联合研究中心 (JRC) 协调，并与 JRC 的参考物质和测量研究所 (Institute for Reference Materials and Measurements, IRMM) 共同实施，IRMM 主要负责合适的有证参考物质 (Certified Reference Materials, CRM) 的制备。

如前面提到的，研究人员同样做了相当大的努力来发展基于蛋白的检测方法。一种利用 ELISA 高特异性检测转基因大豆 Roundup Ready®的方法已经通过验证 (Lipp *et al.*, 2000)，针对其它作物的检测方法也在研究中 (<http://biotech.jrc.it/methodsdatabase.htm>)。

DNA 和蛋白质检测方法的优点和局限性

DNA 检测方法

基于 PCR 技术的分析方法正越来越多地应用于检测转基因生物的 DNA 序列。

PCR 能够从混有其它 DNA 序列的复杂样品中选择性地扩增低浓度存在的特定 DNA 片段。在 PCR 反应中，互补的 DNA 小片段作为引物成对出现。这些引物与目的基因两条链上的互补序列识别位点相结合。DNA 聚合酶通过一系列重复进行的差异热循环使引物对之间的序列能够复制和进行指数扩增。最后这些扩增得到的片段根据大小的不同，通过凝胶电泳进行检测分析。

现已发展出多种用于对农业食品和饲料作物中转基因成分进行检测和量化的 PCR 检测方法。另外，通过基因身份鉴定可以实现对整个转基因作物供应链上转基因产品的隔离和溯源（身份保留）。

转基因生物检测的一个基本要求是要了解转基因作物遗传修饰的方式，也就是导入基因和两侧的调控元件（启动子和终止子）的分子组成。为了分析的需要，样品材料的最小取样量要在完整 DNA 中包含目标基因。

PCR 是一种实验室技术，因此需要训练有素的实验人员和特定的仪器设备。

PCR 检测的主要特征如下：

- PCR 极为灵敏，可以检测出生物有机体整套遗传物质或基因组中某个基因或待测目的序列的单拷贝或几个拷贝。作为高灵敏度的代价，极小的无意污染都能产生假阳性。因此，必须极为小心以免发生交叉污染。
- PCR 相对于免疫学试验而言仅需极少的制备试剂时间（合成引物与制备抗体相比）。
- PCR 中所有用到的试剂几乎都可以买到，而且可以很容易的通过多种渠道获得。然而，其中一些试剂用于商业检测时则需要有许可证。
- 样品分析大约需要一天时间。

- 如果应用得当，PCR 能够区分不同类型的遗传改变 (也叫做转基因事件)。对特定转基因事件进行鉴定时，需要花费更多的时间，付出更多的努力对分析方法进行验证。

蛋白质检测方法

蛋白质检测方法主要应用特异结合目标蛋白的抗体。通过酶联免疫吸附测定法检测或估量样品中目标蛋白的含量，而样品中可能同时会含有多种其它蛋白。ELISA 是应用一个抗体与特定蛋白相结合，第二抗体将检测信号放大 (可选择)，然后抗体与特定的酶偶联，该酶的产物会产生显色反应而使结果可视化，并通过与目标蛋白的标准曲线对比进行结果的量化。

检测的正确实施同样需要训练有素的实验人员和特殊的仪器设备。

ELISA 检测的主要特征包括:

- 其灵敏度低于 PCR，因此小量污染引起假阳性的可能低于 PCR。
- 实验体系的建立、抗体和蛋白标准品的制备造成前期成本高。
- 一旦试剂配制成功，则每一样品的测试耗费很低。
- 当不同的转基因事件表达具有相似特性的蛋白时，该方法无法辨别它们之间的不同的表达模式。
- 蛋白质检测法需要花费大量时间进行前期准备工作，包括试剂的配制和体系的建立。
- 当检测蛋白表达后，蛋白检测法就可以提供一个实用且有效的检测过程。但是，遗传修饰基因的产物可能仅在特定发育阶段或在某些植物部位表达，那么这种转基因作物可能不易用 ELISA 法进行检测。另外，加工处理易造成蛋白质变性，使得用 ELISA 检测加工食品样品时会产生很多问题。

鉴于这些事实，毫无疑问 ELISA 法和 PCR 法应该相互补充而不是相互排斥。

表 2. ELISA 法和 PCR 法的全面对比

方 法	测试对象	持续时间	操作难度	结果
酶联免疫吸附测定 (ELISA)	蛋白质	2-8 小时	中等难度；需要熟悉实验操作；检测涉及作物和特异品种	可确定特异的遗传改变；并可以定量
聚合酶链反应 (PCR)	DNA	1-3 天	难度大；需要专业的设备，并需要进行培训	高灵敏度；易产生假阳性；可确定转基因 DNA 的存在并可以定量

手册的总体设想和介绍

方法验证对实验室和管理部门都是至关重要的。理论上，每种方法应该进行操作过程的验证，可通过由少数几个专业实验室提供的重复性、灵敏度和特异性方面的实验结果得到确证。欧洲委员会下属的联合研究中心是第一个对方法进行验证的机构，他们对转基因 Roundup Ready®大豆样品进行 ELISA 和 PCR 检测时使用的方法进行了验证，也对适用于转基因 Maximizer 玉米 (Bt-176) 的 PCR 检测方法以及适用于转基因 Roundup Ready®大豆和转基因 Maximizer 玉米 (Bt-176) 加工食品样品 PCR 检测的方法进行了验证 (Lipp *et al.*, 1999, 2000 和 2001)。此后，发展出了各种不同的定性和定量分析方法，并得到了验证。经验证的转基因生物检测和定量方法的最新信息，请在线查阅 <http://biotech.jrc.it/methodsdatabase.htm>。**样品**制备对于应用 DNA 和蛋白质为基础的检测和/或定量都是十分关键的，了解每一种检测方法的局限性也是非常重要，具体应用哪种方法取决于研究的目的 (比如是定量还是定性)。无论采用哪种检测方法，其取样量和取样方法都会极大的影响实验结果。

对于任何一种检测方法来说，获得合适的**有证参考物质** (Certified Reference Materials, CRM) 都是最基本的要求。在实验过程中使用的是 JRC 下属的 IRMM 生产的有证参考物质 (Trapmann *et al.*, 2002 and 2001)。其特征和相应的标准物质将在第 3 章中介绍。另一个关键步骤虽然不在课程中讲述，但也相当重要，那就是**样品均匀性**。

图 1 总结了课程讲述中的不同步骤。优化的**DNA 提取方法**是确保提取出高质量、适宜 PCR 扩增 DNA 的基本保障。对大部分由市场上深加工的大豆和玉米制成的食品，这一点特别重要。众所周知，在食品加工，特别是在水中进行热处理过程中，DNA 会发生大量降解。因此，在加工过程中，那些仍保持足够长度、并包含完整目标基因、可用于加工食品中转基因成分检测的 DNA 片段量就会相应减少，食品的加工程度越高，DNA 降解的就越严重。另外，正确且适当的 DNA 提取方法可以保证除去样品中的抑制物。这一问题将在第 4 章中讨论。现今已经研究出几种 DNA 提取方法，并且很多商业公司也生产出随时可以使用的专用 DNA 提取试剂盒。

在培训课程中我们将讨论现有的各种 DNA 提取方法的可操作性和有效性。然而，为

了避免与商业公司有直接牵连，我们决定采用所谓的 CTAB 法进行 DNA 提取，这是一种有效和通用的方法，实践证明该法适用于各种不同样品混合物的提取。

DNA 提取完成之后，样品（和 PCR 产物）将用琼脂糖凝胶电泳法（第 5 章）进行分析。

聚合酶链反应（Polymerase Chain Reaction, PCR）的原理及其优缺点将在第 6 章中介绍。

正如前面提到的，现代技术在转基因生物检测中的有效使用依赖于精确信息的获得。转基因生物检测至少需要部分的了解目标基因序列和转基因的类型。关于转基因玉米品系 MON810、Bt-176 和转基因大豆品系 Roundup Ready® 的详细特征将在第 7 章中介绍。

已经发展出很多不同的 PCR 方法用于检测已获审批的转基因生物。PCR 方法的特异性依赖于引物的准确选择。PCR 引物可以直接对应转化事件中存在的不同基因元件。“大范围” PCR 检测体系一般称为“筛选法”，可针对转化事件中最常用的序列来设计特定的引物进行检测。这些序列一般是调控元件（启动子和终止子）。转基因植物也可以根据转入的结构基因来划分种类。另一种特异性更强的方法是将引物选择在不同基因元件的 DNA 序列上（例如：启动子—结构基因、结构基因—终止子）。最后，如果已知转化事件的完整特异性序列信息，为了找到针对某一转基因植物真正特异的检测方法，“品系特异性”（转化事件特异性）体系发展起来，该法是通过选择仅在特定转化事件中存在的、“唯一”结合区序列进行检测。这种方法通常是将引物设计在跨越基因整合连接区的位点。插入 DNA (T-DNA) 和宿主 DNA 间的连接区具有独特的核酸序列，这个区域是高度特异性 PCR 检测的理想目标。培训课程中使用的方法总结于图 1 中，细节描述请见第 8 章。实验方法和操作过程见第 9 章。

正如前面指出的，由于需要对样品中存在的转基因成分进行量化而发展出很多基于 PCR 的检测方法，这些方法不但可以给出定性结果（存在与否），而且可以确定给定样品中存在的转基因成分的相对含量（relative quantity）（精确程度取决于选择的方法）。两种最常用的基于 DNA 的定量检测法是竞争性 PCR 和实时 PCR (Real-time PCR)（见第 10 章）。实时 PCR 需要在特定的专业仪器进行，现在仅有少数几家商业公司拥有。培训课程中使用的实验方案和操作见第 11 章。

最后，第 12 章对血清法检测转基因生物的相关问题作了简要介绍。这一部分特别对 ELISA 技术进行讲述，并提供了适合于转基因大豆品系 Roundup Ready®特异性 ELISA 检测的实验方案和步骤。

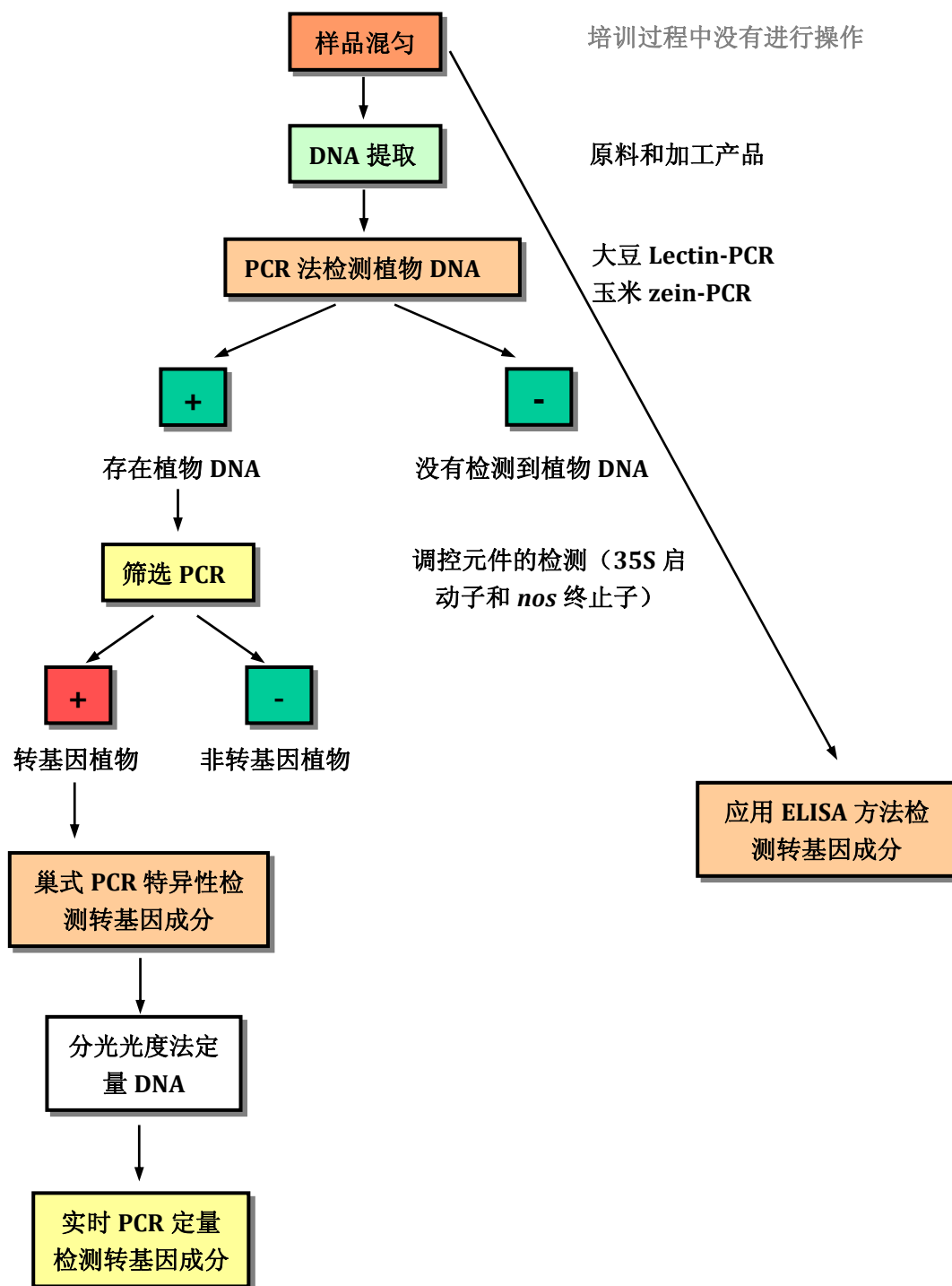


图 1. 检测过程操作方法流程图

参考文献

- Lipp, M., Anklam, E. and Stave, J.W. (2000). Validation of an immunoassay for detection and quantification of a genetically modified soybean in food and food fractions using reference materials: Interlaboratory study. *Journal of AOAC International* 83, 919–927.
- Lipp, M., Bluth, A., Eyquem, F., Kruse, L., Schimmel, H., Van den Eede, G. and Anklam, E. (2001). Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. *European Food Research Technology* 212, 497-504.
- Lipp, M., Brodmann, P., Pietsch, K., Pauwels, J. and Anklam, E. (1999). IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder. *Journal of AOAC International* 82, 923–928.
- Pietsch, K., Waiblinger, H.-U., Brodmann, P. and Wurz, A. (1997). Screening-Verfahren zur Identifizierung gentechnisch veränderter pflanzlicher Lebensmittel. *Deutsche Lebensmittel Rundschau* 93, 35–38.
- Trapmann, S., Catalani, P., Conneely, P., Corbisier, P., Gancberg, D., Hannes, E., Le Guern, L., Kramer, G. N., Prokisch, J., Robouch, P., Schimmel, H., Zeleny, R., Pauwels, J., Van den Eede, G., Weighardt, F., Mazzara, M. and Anklam, E. (2002). The certification of reference materials of dry-mixed soya powder with different mass fractions of Roundup Ready™ soya. Certified Reference Materials IRMM-410S. (<http://www.irmm.jrc.be/rm/irmm-410S.pdf>)
- Trapmann, S., Le Guern, L., Prokisch, J., Robouch, P., Kramer, G. N., Schimmel, H., Pauwels, J., Querci, M., Van den Eede, G. and Anklam, E. (2001). The certification of reference materials of dry mixed maize powder with different mass fractions of MON810 maize. Certified Reference Materials IRMM-413. (<http://www.irmm.jrc.be/rm/irmm-413.pdf>)