

基因修饰食品的检测方法

叶富根 李汴生 赵秋艳

(华南理工大学食品与生物工程学院 广州 510640)

摘 要 介绍了基因修饰食品定义、特点以及可能存在的安全问题,概述了基因修饰食品检测的策略和方法的研究发展情况,阐述了基因修饰食品的检测方法和技术,特别是 PCR 技术的关键问题,介绍了几种具体基因修饰食品的检测技术。探讨了人类在检测基因修饰食品方面所面临的巨大挑战。

关键词 基因修饰食品 检测 PCR 技术

基因修饰食品(简称 GMF)又被称为转基因食品或基因工程食品。在欧盟新型食品条例中将基因修饰食品定义为:“一种由经基因修饰的生物体(genetically modified organisms, GMO)生产的或该物质本身的食物。”具体包括两类:(1)包含基因修饰组分的食品和食品基料;(2)由基因修饰生物生产,但并不包含基因修饰组分的食品^[1,2]。

可作为食品或食品基料的基因修饰生物体包括基因修饰的植(作)物、动物和微生物^[3]。其中以植物基因工程发展最快,目前至少已有 27 种基因工程农作物由美国政府机构及其他一些国家批准允许使用,对生物体进行的基因修饰主要达到以下目的:提高产量和质量;提高抗病虫害能力;改善生产工艺、降低生产成本^[3,4]。

基因重组技术的应用对传统农业生产产生巨大的影响,被认为是解决世界人口剧增所导致的食品资源匮乏的最有前途的良方。但是目前国际上对基因修饰食品还存在着很大的争议,各国对该新型食品的态度不一致,人们对基因修饰食品的生物安全方面和生物伦理方面存有忧虑,人们主要担心:引入基因本身或所表达的物质有毒害作用;引入基因所表达的蛋白质会引致过敏;引入基因可能以人们目前还不甚了解的方式破坏食物中的营养成分;引入基因通过人体将抗药性基因

转移给致病微生物;摄入基因修饰微生物可能导致人体内微生物体系失衡;引入基因提高作物的抗病虫害能力,对环境生态平衡造成威胁。

目前人类已经获得了大量的基因修饰生物,不少已作为食品或食品基料加工成为制品在市场上流通,鉴于上述人类对基因修饰食品的忧虑,很有必要区分基因修饰食品与非基因修饰食品。但是相对于基因修饰食品的迅速发展,基因修饰食品检测方法和技术的发展较为滞后。基因修饰食品的检测方法是 1996 年以后逐渐发展起来的,至今仍面临着一些严峻的挑战。

1 基因修饰食品检测的方法

总体上说,基因修饰食品的检测方法都是基于 DNA、食品中新增的蛋白质或脂肪酸等。以下对基因修饰食品的几种检测方法作一些概要性的介绍。

1.1 基于 DNA 检测

DNA 存在于生物体的大部分细胞内,无组织依赖性。而且由于非编码基因的存在以及密码子的简并性, DNA 提供了更为详细的信息。此外, DNA 分子相对稳定性好,受食品加工的影响小。因此,基于 DNA 的检测方法特异性高,被认为是最有前途的检测基因修饰食品的方法。

基于 DNA 的检测的方法可以分为两类,即 DNA 杂交法和基于 PCR 的检测方法。DNA 杂交法相对比较耗时,需要考虑标记探针的比活性,限制了其操作和应用,而且需要纯净 DNA 的量比较多,对于基因序列相近的品种难以鉴别。适用于检测小于 100 个碱基对的短链 DNA。目前主要用于检测几种肉类中已经部分降解的 DNA^[5,6]。基于 PCR 的检测方法近几年发展很快,目前已经开发了多种可行的方法,它们分别适用于不同的情况。

(1) 线粒体 DNA 的 PCR 扩增物的序列分析法 线粒体 DNA 含量相对比较丰富,拷贝数大大超过核 DNA,而且线粒体 DNA 都是来自单方的基因,避免了杂合基因型序列的模糊性。但是线粒体 DNA 突变率高,点突变充分积累后易与相邻近的物种混淆。同时线粒体 DNA 表现出单碱基多态性。此法耗时较多,技术要求比较高,但是所提供的信息也比较多,一般用于分析细胞色素 b 基因。

(2) PCR 扩增物的限制性消化:均一性高的序列难以用其他方法进行检测,采用限制性酶消化的方法将 DNA 酶解成大小不同的片段,由于不同的物种的酶切位点不同,消化产物也不同,再利用琼脂糖凝胶电泳而得到检测。

(3) 特异性 PCR 引物:在合适的严格控制的反应条件下,特异性的引物使得其中的一部分 DNA 实现扩增,这种方法还可以预测产物的大小。如果采用非选择性的特异性引物,还可以同时检测多种样品。但是这种方法需要一些基因序列的信息才能设计相关的引物。而且要控制合适的条件才能减少假阳性结果,尤其是检测线粒体 DNA。

(4) 单链构象的多态性 DNA(SSCP)分析:双链 DNA 变性形成单链 DNA,单链 DNA 根据其序列特征形成一定的二级结构,在合适的条件下进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,由于不同的二级结构,它们有不同的电泳移动性和不同的电泳图谱。可以检测单碱基序

列的不同样品。这种方法需要选择敏感性高的限制性酶,可以同时检测多种品种。但这种方法极大的依赖于反应条件,特别是温度条件,结果的可重复性将至关重要。可能会出现 DNA 完全消化、特异性消失或者产生了新的限制性酶切位点,阻碍了这种方法的应用。

(5) 随机扩增多态性 DNA(RAPD)分析:引物和要扩增的多态性 DNA 编码基因都是随机的,采用 10 个碱基左右的短引物,在合适的 PCR 条件下进行扩增,再经过电泳产生大小不同的电泳带,对应不同的品种。采用不同的引物进行时,产生的电泳带也会不同,可由经验来判断。RAPD 方法的可重复性也受到了人们的极大的关注。反应条件特别是所用的 DNA 聚合酶的类型对最后的指纹谱产生影响。通过 RAPD 法进行分析时,样板 DNA 的存在状况极为重要。如果 DNA 发生严重降解,影响扩增产物的大小。

(6) actin 基因家族基因序列检测法: actin 基因家族具有编码基因高度保守区,在不同的品种中所含的内含子的大小和位置也不同。利用 actin 基因家族基因序列可以获得特异性的指纹谱。并可以同时扩增几种 actin 基因。

(7) 竞争性 PCR 技术:竞争性 PCR 技术主要有 2 种,即双重竞争性 PCR 技术和在线 PCR 检测技术。Wurz 等采用双重竞争性 PCR 技术通过大豆凝集素基因检测了 RRS 的含量;采用 TaqMan 在线检测技术检测了 RRS 的初始含量及其在样品中所占的比例^[7]。双重竞争性 PCR 技术适用于阈值检测。在线检测技术具有以下方面的优点:应用于基因修饰食品含量的检测,并适合于自动化;检测的信号序列特异性强,可应用于原物料、加工食品和混合性食品。竞争性 PCR 技术不需要特别的装置,采用已经标准化和较为成熟的检测系统,消除了实验中存在的抑制效应的影响,降低了实验的错误率,增强了这种方法的敏感性,因此各个实验室

竞相采用。

1.2 蛋白质的检测

基于蛋白质的检测方法主要有电泳法和免疫组织化学法,在基因修饰食品方面广泛使用的有等电聚焦法和各种不同形式的 ELISA 试剂盒(酶联免疫法)的方法。由于蛋白质受热变性,蛋白质的热不稳定性是这类方法在应用上的最主要的障碍,而采用抗热性蛋白抗体会有所改善。此外供检测样品存在外源性污染时可能造成假性的结果。

免疫组织化学法在检测基因修饰食品时必须依赖于在基因修饰食品中新蛋白质得到表达(且表达水平不能太低)以及抗体抗性,这使得这种方法的应用受到限制。基因修饰番茄中包含一种人工引入的基因,该外源基因转录成信使 mRNA 与由编码半乳糖醛酸酶基因转录而成的信使 mRNA 相结合,这 2 种分子碱基对互补导致了基因表达的抑制,所表达的 PG 酶反而戏剧性地减少,用免疫组织化学法难以检测。

免疫组织化学法的检测方法有 2 种:定量检测法和限定阈值法。其中定量检测法较为成熟并已经标准化,对每一种新型蛋白质都严格定义了这类方法的正确性、敏感性、特异性、精确性、基质效应和提取效率等因素。美国食品与药品管理局(FDA)和环保局(EPA)等立法机构已开发出相关应用方法的数据包。限定阈值法对基因修饰食品的测定是通过将其与一种已知含量的特定参考物进行比较而实现的,对每种食品片段和新型蛋白质的检测方法并不都需要进行严格的定义、证实和批准,任何一项独立的测定都可以通过与特定参考物的比较得到确切的结果。采用这种方法时,必须对阴性参照物(不含 GMO)和阈值参照物(例如含 1% GMO)以同样的方式制备样品、测试分析。将测试的结果通过数理统计的方法来证实该检测方法的有效性,这样才有足够的灵敏度来检测阈值浓度。对于样品中 GMO 浓度的测定,可以通过类似的方法来确定其是高于阈值还是低

于阈值。一般来说,要保证结果的正确性需要进行多次实验,但这种方法所需的时间和资金仍相对较少。Stave 采用 ELISA 的检测方法对 IRMM Roundup Ready™大豆进行限定阈值法检测^[8]。

免疫学的检测方法特异性强,从而降低了样品制备的复杂性;灵敏度高,ELISA 检测方法检测的最低阈值约为 $10^{-12} \sim 10^{-13}$ mol/L,采用化学荧光法时检测的最低阈值达到 10^{-14} mol/L^[9],这类方法还具有简单灵活、成本低、不需要专业人员的特点,是一种较为理想的定量检测的方法,目前已被人们广泛使用。使用这种方法时参考物要做到统一管理,使得在不同实验室可以得到同样检测结果,此外选用参考物还应遵循有利于实验的原则。目前在参考物的确定上面临很大的挑战:在大量物料系统检测时需要的标准参考物太多而难以满足;食品混合物体系检测时的标准参考物难以确定,不可能找到一种适用于各种基因修饰食品的参考物。一种较为可行的方法是找到一种适用于检测某些组分和这些组分主要贮存组织部位的参考物,并加强检测时对关键控制点的控制。

1.3 脂肪酸的检测

酶解甘油酸酯二位上的酯键后,通过气相色谱检测脂肪酸同分异构体,可以根据样品中的一些脂肪酸以鉴定部分肉类品种。但是这种方法难以应用于混合物及其加工过的食品。

2 PCR 方法检测基因修饰食品的关键问题

由于引物设计、反应成分浓度、热力循环参数(温度、时间和循环次数)的因素使得 PCR 实验技术更趋多样性和复杂性,要取得扩增的特异性和扩增效率间的平衡。引物设计以及 DNA 样品的制备成为 PCR 实验的关键。此外,控制好 DNA 变性温度是关系成败的关键之一。

2.1 样品的制备

供分析的样品必须具有代表性,在 DNA 分析中仅仅需要 100~300 mg 的样品,而食品原料往往是公斤级或吨级的,只占很小比例。基因修饰生物必须均匀地分散到全部的原料中,获得均一性的样品是进行 DNA 分析的关键。同时还要考虑到交叉受精(如玉米花粉)以及运输和加工过程中灰尘的污染。

样品的均质方法在一些资料上有所介绍。一般对于固体样品可加入无菌水恒温培养 20 h,再充分搅拌。对于湿料可以直接进行均质。对于液体样品应充分振荡后再称重。需要单独的样品制备区以防交叉污染。

2.2 DNA 的提取

分离 DNA 的纯度和产量是 PCR 检测 DNA 的 2 个关键。加工食品的 DNA 一般都已很大程度上降解成低于 400bp 的小片段。食品中含有蛋白质、脂肪和多糖类物质,尤其是其中的多糖类物质、多酚类化合物(如单宁)和其他一些微量成分是食品中分离 DNA 的主要障碍,它们与蛋白质、核酸相互作用,很难将它们与 DNA 分离开来,而且多糖类物质对 DNA 聚合酶具有抑制作用。

目前有 2 种 DNA 的分离方法应用于基因修饰食品原料。(1)CTAB 法:食品样品在含有表面活性剂(如十六烷胺溴化物)的培养基中恒温培养后,用氯仿浓缩,再用异丙醇沉淀 DNA。(2)食品样品先经酶作用(如蛋白酶 K)及化学处理(SDS),再直接通过键合 DNA 的硅胶树脂净化 DNA,这种方法可应用于 DNA 含量很低的食物原料(如卵磷脂)。为了提高产量,建议对食品样品进行浓缩、富集和纯化。

目前 DNA 的提取和纯化方法已经有较大的发展,现在已经能够在较短的时间内制备好用作扩增的 DNA,商业上也出现了可靠性比较好的 PCR 试剂盒,改良的“CTAB”方法以及两者相结合的方法都已有报道,现简要说明如下:Zimmermann 等评估了 9 种不同的提取大豆核酸的方法表明,DNA 键合树脂或“CTAB”方法提取的 DNA 质量好,但是

产量低,而采用 Rose、Alkali 或 Chelex-100 (Bio Rad)等方法得到的 DNA 质量差,但产量高^[10]。Necleon Rhytopure 试剂盒法已经成功应用于许多蔬菜和加工食品的检测,特别是从样品中分离多糖类物质。Wurz 等报道了一种适用于卵磷脂的改良方法。10 mL 己烷、1 mL 胍硫氰酸和 2 g 卵磷脂加入到缓冲溶液中并充分搅拌,经过 2 次离心分离,再以异丙醇沉淀 DNA,滤菌胶纯化^[11]。Meyer 报道了一种改良的“CTAB”法,他们用 QIA quickTM DNA 纯化剂替代氯仿,采用这种方法待测样品增加到 2 g,特别适合于低 DNA 含量的食品原料。而对于凝胶性样品可加入 α -淀粉酶恒温培养以增加溶液的流动性^[12]。

经浓缩、提纯的 DNA 可通过紫外分光光度法 UV-260nm,试剂(如 PicoGreen)诱变荧光法(分子探针),溴化乙锭染色凝胶光密度法和荧光核酸凝胶染色法等进行检测。一般情况下样品中含有 RNA 和核苷酸,如果样品未经核酸酶处理而直接测定 DNA 时含量会偏高,此外 DNA 的组成(基因组 DNA、线粒体 DNA、叶绿体 DNA)及含量取决于细胞组织类型,一般来说,提取的 DNA 须经过稀释(稀释到 5~50 ng)才能用于 PCR。

2.3 PCR 检测

PCR 检测技术的特异性依赖于引物和 PCR 参数的选择,目前已经有相应的引物设计的软件,如“OLIGO5.0 Primer Analysis Software”(NBI, Plymouth, MN, USA)。

模型检测系统:德国 BgVV 研究小组已经开发出 3 种标准方法,其中之一用于检测基因修饰番茄柿,另一种用于检测发酵液中基因修饰微生物(*Lactobacillus curvatus*),还有一种是用于检测酸乳酪的酵母发酵所用的基因修饰菌。特异性检测系统:第一种特异性检测方法是检测基因修饰番茄,后来又开发了几种特异性的检测方法,如 Roundup ReadyTM大豆的检测,Bt-176 玉米的检测;而对 Yield Gard 玉米和 T25 玉米的检测方法仍有待开发。如果特异性的检测方法,甚至

3种基因元件(P-35S、nos3和npt)都不能使用时,放影PCR检测方法则可以应用于大多数基因修饰食品,例如已用于检测基因修饰大豆和玉米。

无论是采用特异性检测方法还是放影检测方法,其PCR扩增产物都需要进行鉴定。已有几种方法用于鉴定PCR的扩增产物,它们各自的可靠性、精度和成本各不相同。限制性核酸内切酶作用使扩增产物裂解,35S-启动子的195bp片段被限制性核酸内切酶裂解成115bp和80bp的2个片段。Southern印迹法更为耗时,但更具特异性。分离的PCR产物转移到膜上,再与对目标序列特异性的DNA分子探针杂交。还可以对PCR扩增产物直接进行序列分析。除了电泳的方法进行分析外,探针技术和碎片技术已经开发出来,但是目前还处于雏形阶段,使用成本很高,应用受到限制。而包括荧光技术等新型技术更有可能取得突破。封闭试管法可以对PCR反应进行实时检测。与传统的检测方法相比,新型方法检测时间短,潜在污染小,而且容易获得量化性数据。如果同时采用特异性的引物和探针则具有更高的特异性。目前已有多种荧光检测技术用于分析特异性的PCR产物,所用的引物包括:Fluorescent、TqManTM、Molecular Beacons、ScorpionTM和Light CyclerTM。

PCR产物可以直接进行测序,这种方法适用于多数基因修饰食品。也可以采用套式PCR技术,这种方法具有更高的特异性和敏感性,可以检测出原料以及终产品中低水平的DNA。

3 几种典型基因修饰食品的检测

目前人们已对多种基因修饰食品如小麦^[13]、大豆^[14]、芹菜^[15]、肉类^[16,17]、鱼类^[18]的检测进行了大量探索性的研究。以下介绍几种比较成熟的基因修饰食品的检测:

(1)基因修饰番茄的检测:最早检测的基因修饰食品是Flavr SavrTM番茄,这种番茄

包含编码PG酶的基因,卡那霉素抗性基因,病毒启动子CaMV35S,这3种外源基因可以通过2种PCR技术来实现检测。第一个引物加强了抗卡那霉素的基因上的173bp的DNA片段。第二个引物是与启动子序列杂交的一段低聚核苷酸^[18]。

(2)基因修饰大豆的检测:Roundup ReadyTM大豆已经在美国批准使用,这种植物的基因组中包含一种新的从土壤杆菌*Tumefaciens*中获得的EPSPS基因,表达后产生一种酶——3-烯醇式丙酮酸-5-磷酸合成酶,该细菌来源的酶不受甘磷酸抑制,对除草剂具有抗性。Hoppel等设计了一种用于Roundup ReadyTM大豆的套式引物PCR模式的检测方法,这种检测方法具有很高的特异性和灵敏度,其检测阈为20pg DNA,相当于常规原料中0.01%~0.1%基因修饰大豆^[19]。

(3)基因修饰玉米的检测:基因修饰的玉米含有合成肉毒素cryIA(b)基因,其中65%是来源于*Bacillus thuringiensis*的野生菌的cryIA(b)基因的类似物。Studer等将引物插入到cryIA(b)基因处,检测阈值与上述方法相近。为增加浓缩DNA的扩增,另一种基于玉米醇溶蛋白质缺陷的特异性的PCR检测技术已经开发出来^[20]。

4 结 语

尽管目前对于基因修饰食品的安全性还存在着很大的争议,但认识到基因修饰食品对人类社会将可能产生的巨大影响以及种种不确定因素的存在,世界各国都在基因修饰食品的立法以及发展相关检测方法和技术方面投入了大量的人力、物力和财力。在这些方面,欧洲走在世界的前头,为使检测技术和新型食品的立法跟上基因修饰食品的发展,欧洲每隔5a要求对其法规进行修订。除了各国的研究计划外,由欧盟提供大量资金支持的一项旨在加强基因修饰食品研究的“基因修饰食品的检测方法的发展”的研究计划。

主要有以下 4 个方面的研究活动 (1) 研究基于 PCR 的检测方法及其发展 (2) 开发自动检测系统,以提高常规基因修饰食品检测的效率 (3) 开发其他的测试方法,如基于蛋白质的检测方法,基于 RNA 的检测方法和基于扩增片段长链高聚物的方法 (4) 建立一个市场上基因修饰食品的数据库及各基因修饰食品的检测方法^[21~23]。我国在 2001 年 6 月公布实施的《农业转基因生物安全管理条例》规定,对基因修饰食品生产的全过程进行管理,并启动有关生物安全的研究计划项目。我国已加入 WTO,将有更多的基因修饰食品进入我国市场,因此必须制订、完善相应的法规,建立相关的机构,研究、确定基因修饰食品的标准检测方法。

参 考 文 献

- 1 邓郁琼. 食品科学, 2000, 11: 6~9
- 2 Lindgren S. International Dairy Journal, 1999, 9: 37~41.
- 3 李汴生, 李琳. 广东省第 2 届青年科学家论坛论文集, 2000, 12
- 4 Hemmer W. BATS Report 2/97: Foods Derived from Genetically Modified Organisms and Detection Methods. 1997, 12: 1~16
- 5 Hunt D J et al. Food Chem., 1997, 60: 437~442
- 6 Buntler J A et al. J. Food Sci. Agri., 1999, 79: 53~57
- 7 Wurz A et al. Food Control, 1999, 10: 385~389
- 8 Stave J W. Food Control, 1999, 10: 367~374
- 9 Khalil O S. Photophysics of Heterogeneous Immunoassays. In Butler J E, Immunochemistry of Solid-phase Immunoassay. Boca Raton, FL: CRC Press, 1991. 232~248
- 10 Zimmermann A. Z. Lebensm. Unters. Forsch., A, 1998, 207: 81~89
- 11 Wurz A. Deutsche Lebensmittel Rundschau, 1998, 94: 159~161
- 12 Meyer R. Authenticity and Adulteration of Food the Analytical Approach, 1997, 24~26 (9): 23~28
- 13 Allmann M. Z. Lebensm. Unters. Forsch., 1993, 196: 248~251
- 14 Meyer R. Z. Lebensm. Unters. Forsch., 1996, 203: 339~344
- 15 Jankiewicz A. Authenticity and Adulteration of Food - the Analytical Approach. 1997, 24~26 (9): 131~136
- 16 Meyer R. J. AOAC int., 1994, 77: 617~622
- 17 Hubner P. Authenticity and Adulteration of Food - the Analytical Approach. 1997, 24~26 (9): 49~54
- 18 Meyer R. J. AOAC Int., 1995, 78: 1542~1551
- 19 Koppel E. Gebiete Lebensm. Hyg., 1997, 88: 164~175
- 20 Studer E. Gebiete Lebensm. Hyg., 1997, 88: 515~524
- 21 Meyer R. Food Control, 1999, 10: 391~399
- 22 Jurguthy L. Food Control, 1999, 10: 359~361
- 23 Lockley A K et al. Trends in Food Science and Technology, 2000, 11: 67~77

Methods to Detect Genetically Modified Foods

Ye Fugen Li Biansheng Zhao Qiuyan

(College of Food and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou, 510640)

ABSTRACT The definition, properties and possible safety problems of genetically modified foods (GMF) were introduced. The paper summarised the development of strategies and methods to detect genetically modified foods. It introduced the key problems of detecting methods and technology of GMF, especially the PCR. The challenge of detection of GMF were also discussed.

Key words genetically modified food(GMF), detection, PCR technique