

转基因植物检测方法及标准化概述

张晓磊^{1,2} 章秋艳³ 熊炜¹ 沈平^{1*}

(1. 农业农村部 科技发展中心,北京 100122;

2. 黑龙江省农业科学院 农产品质量安全研究所,哈尔滨 150086;

3. 农业农村部 环境保护科研监测所,天津 300191)

摘要 针对如何更加科学精准地检测转基因植物的问题,采用比较研究的方法,对国内外转基因植物的检测方法及其标准化进行研究。结果表明:1)转基因植物及其产品的检测,主要包括转基因植物的产品成分检测、环境安全检测、食用安全检测3个方面;2)目前国内外转基因植物检测方法均处于先进水平,但随着不断涌现的转基因植物及产品,检测技术仍需更新换代;3)转基因植物检测技术研发必须与其标准化及安全管理协调进行,从而保证转基因植物及其产品在我国长期有效的安全监管。综上,转基因植物检测技术及其标准化仍需要不断开发和创新,为国家对转基因产品的安全监管提供更有力的技术保障。

关键词 转基因植物;检测方法;标准化

中图分类号 Q943.2

文章编号 1007-4333(2020)09-0001-12

文献标志码 A

Overview of detection methods and standardization for transgenic plants

ZHANG Xiaolei^{1,2}, ZHANG Qiuyan³, XIONG Wei¹, SHEN Ping^{1*}

(1. Development Center for Science and Technology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100122, China;

2. Safety and Quality Institute of Agriculture Products, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China;

3. Agro-Environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Tianjin 300191, China)

Abstract In view of how to more scientifically and accurately detect transgenic plants, a comparative research method is used to study the detection methods and standardization of transgenic plants in China and abroad. The results show that: 1) There are three detection aspects for transgenic plants and their products, which including component detection, environmental safety detection and food safety detection; 2) At present, the detection methods of transgenic plants in China and abroad are at an advanced level. However, it still needs to be updated with the continuous emergence of transgenic plants and products; 3) In order to ensure the long-term effective safety supervision of transgenic plants and their products in China, it is necessary to coordinate the detection methods development of transgenic plants with its standardization and safety management. In conclusion, the detection technology and standardization of transgenic plant still need to be continuously developed and innovated to provide more powerful technical guarantee for the national safety supervision of transgenic products.

Keywords transgenic plants; detection approach; standardization

1 转基因植物概述

转基因植物(transgenic plant)是指将带有目标性状的基因通过基因工程技术的改良,然后导入到受体植物基因组中的植物。这些外源转入的目的基

因不仅能够后代中稳定遗传,同时还可以使转基因植物产生新的农艺性状,如抗虫、耐除草剂、抗逆、抗病、改善作物营养和品质等^[1]。转基因作物自1996年商业化以来,种植面积从最初的170万hm²增加到2018年的1.917亿hm²,增长了112倍。目

收稿日期:2020-06-04

第一作者:张晓磊,博士,主要从事转基因动植物检测方法 & 标准研究,E-mail:zxlnyz@126.com

通讯作者:沈平,研究员,主要从事转基因动植物检测方法 & 标准研究,E-mail:kjzxxmc@126.com

前全球共有 70 个国家/地区的转基因安全监管机构允许转基因作物用于粮食、饲料以及商业化种植。此外,已经上市的转基因作物除了大豆、玉米、棉花和油菜以外,还有其他转基因作物如苜蓿、甜菜、木瓜、南瓜、茄子等,因此给全球消费者呈现了越来越多的选择。具有防止褐变、丙烯酰胺含量低等性状的马铃薯以及防褐变的 Arctic 苹果已经开始在美国和加拿大进行种植。此外,巴西还批准了一种抗虫甘蔗,并于 2018 年进行商业化种植^[2]。全球转基因作物的种植和进口量持续激增,进一步证明了转基因作物带来了一系列的农业、经济和环境效益。随着生物技术的不断发展,复合性的转基因植物不断增加,因此对其安全监管和精准检测也有了更高的要求。因此,转基因检测技术的开发和不断创新显得尤为重要,也能够为国家对转基因产品的安全监管提供更有力的技术保障。

2 转基因植物安全评估

转基因植物从实验室研发到进行安全评估,再到商业化是一个比较漫长、投入较大,同时技术要求

比较高的过程。“实质等同性”原则是目前国际上公认的转基因生物安全评价的可行性原则,指的是转基因生物与自然存在的传统生物在相同条件下进行可行性比较,如果实质相同,就应该同样对待,即认为该转基因生物安全^[3]。我国在国际上的转基因监管经验的基础之上,建立了适应我国国情的农业转基因生物技术安全监管的法律法规体系、技术支撑体系和政府行政管理体系。在建立的转基因生物安全评价监管体系中主要分为 5 个阶段,分别是实验研究、中间试验、环境释放、生产性试验和申请安全证书,而且我国要求对转基因产品实施强制标识制度。在安全评价过程中,主要是对转基因植物分子特征方面进行分析和鉴定,分子特征的识别主要是从核酸水平和蛋白质水平评估外源基因插入片段的整合和表达情况及其在代际间遗传稳定性,明确外源基因的插入位点、插入的具体碱基序列、表达的产物及发挥的特性、稳定性等^[4]。在确定转基因植物分子特征的基础上,建立有效的转基因身份确认方法,从而用于转基因作物的日常安全监管和消费者知情权告知等^[3]。转基因植物的分子特征分析过程具体见图 1。

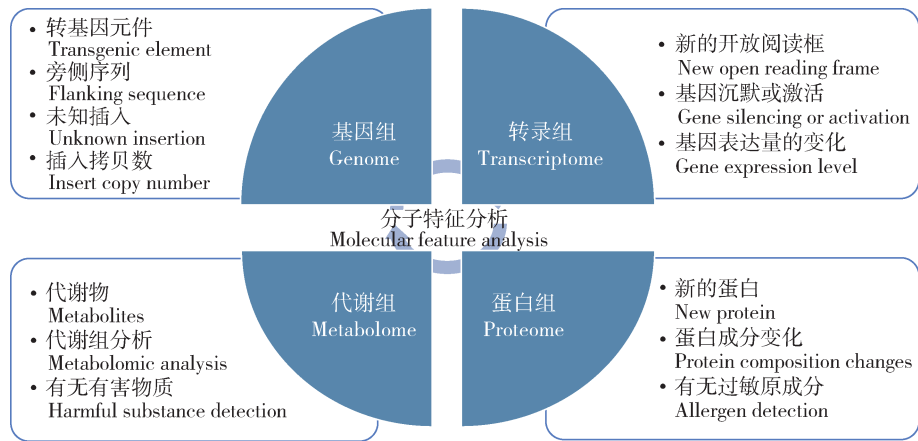


图 1 转基因植物安全评估的分子特征分析

Fig. 1 Molecular characteristics analysis of the safety assessment of transgenic plants

3 转基因植物及其产品检测方法

随着转基因技术的不断发展,转基因检测技术的研究和开发成为全球转基因安全监管和安全评价的重要组成部分。目前转基因植物检测和安管理工作主要体现在 3 个方面:一是出入境检验检疫,即进出口转基因产品的货证相符检验检疫;二是法律监管,即对转基因植物及其产品进行市场监管与行政执法同时监督检验;三是身份验证,即对转基因植

物及其产品安全评价指定对象的身份确认及分子特征信息鉴定^[5]。

转基因植物及其产品的检测,主要包括转基因植物的产品成分检测、环境安全检测、食用安全检测 3 个方面。

3.1 转基因植物及其产品成分检测

转基因植物的产品成分检测主要是针对其转入的外源基因的特异性 DNA 序列及其表达的蛋白质展开的。因此,转基因植物及其产品的检测

方法主要是基于核酸水平和基于蛋白质水平的检测。

3.1.1 基于PCR技术的检测方法

核酸分子,尤其是DNA分子稳定性强,加工过程中不易降解,因此基于DNA水平的检测方法已成为转基因植物检测的主流手段^[6]。PCR方法是目前最准确的应用于转基因植物检测的方法,可用于单重、多重筛选检测或转基因品系鉴定,也是目前大多数转基因高通量检测中靶标扩增方法之一。基于PCR的检测方法主要包括定性PCR和定量PCR,定量PCR又包括最常用的定量PCR(quantification PCR)和数字PCR(digital PCR)。定量PCR是在PCR扩增中实时收集荧光信号,通过荧光信号-Ct值-靶基因的起始浓度三者之间的关系,从而确定靶基因的拷贝数或转基因含量^[7]。数字PCR是近些年发展起来的一种比较精确的核酸绝对定量方法,该方法是将微量样品进行极度稀释和分液,直到每个细分的待测样品中所含有的待测分子数不超过1个后,再将所有细分的待测样品进行PCR扩增,然后对扩增反

应的样品逐一计数,从而判断待测样品的最初浓度^[8]。数字PCR的优势在于不需要依赖Ct值和标准曲线,就能够实现对起始样品的绝对定量。目前,主流的数字PCR平台有3种:第一种是基于集成流体通路(IFC)芯片技术的数字PCR(chamber digital PCR);第二种是微滴式数字PCR(droplet digital PCR);第三种是基于微流体芯片和通道的数字PCR平台-OpenArray系统。不同的数字PCR平台均已经应用于转基因生物及其产品的检测,并且在转基因标准物质的量值测定方法中得到了很好的应用^[9-10]。

转基因植物及产品根据检测靶标的不同,主要包括筛选元件序列(如CaMV35S启动子、NOS终止子)、靶标特异性序列(如Cry1Ab、CP4-EPSPS)、构建特异性区域序列(如NOS终止子和NPT II基因之间连接的序列)、品系特异性序列(基因组和外源插入基因整合位点的重组序列)。近年来,已有大量研究报道了定性PCR、定量PCR以及数字PCR技术在不同转基因植物品种、转基因成分检测上的应用,具体信息见表1^[11]。

表1 已报道或验证转基因生物检测方法

Table 1 Reported or validated test methods for genetically modified organisms

检测靶标 Test target	定性PCR Qualitative PCR	实时荧光定量PCR Real time fluorescence quantitative PCR	数字PCR Digital PCR	参考文献 Reference
筛选元件序列 Element sequence	CaMV35S启动子、FMV35S启动子、NOS终止子、Ubiquitin启动子、NOS启动子、CaMV35S终止子	CaMV35S启动子、NOS启动子、FMV35S启动子、NOS终止子、CaMV35S终止子	CaMV35S启动子、NOS启动子	[12-15]
靶标特异性序列 Target specific sequence	Cry1Ab、cry1F、cry2Ab、epsps、bar、cry1Ac、pat	Cry1Ab、Cry1Ab/c、cry1Ac、cry2Ab、cp4-epsps、bar、pat	Cry1c	[16-20]
构建特异性区域序列 Construct region sequence	MON531、KMD、GA21、GTS40-3-2	华番1号番茄	玉米(MON810)	[21-23]
品系特异性序列 Event specific sequence	玉米(MON810、MON89034、Bt11)、大豆(A5547-127、MON89788、GTS-40-3-2)、棉花(MON1445、MON531、MON15985)、油菜(MS8、RF1、RF2)、水稻(TT51-1、KMD、KF6)	玉米(MON810、MON89034、Bt11、MON88017)、大豆(A5547-127、MON89788、GTS-40-3-2)、棉花(MON1445、MON531、MON15985)、油菜(MS8、RF1、RF2、T45、Oxy235)、水稻(TT51-1、LLRICE62)	玉米(Bt11、Bt176、MON810、NK603、MON89034、MON88017、MIR162、MIR604)、大豆(A5547-127、MON89788)、水稻(KMD、LL62、T1C-19)	[24-27]

3.1.2 等温核酸扩增技术

等温扩增技术是近些年快速发展起来的快速核酸检测技术,因其扩增过程不需要特殊仪器和温度循环就能快速、高效地实现扩增,并且还有成本低、特异性强、灵敏度高等优点。核酸等温扩增技术有很多种,如环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)、依赖核酸序列的扩增(nucleic acid sequenced-based amplification, NASBA)、滚环扩增检测技术(rolling circle amplification, RCA)、重组酶聚合酶扩增技术(recombinase polymerase amplification, RPA)等^[28-29]。

在转基因检测领域中,环介导等温扩增技术(LAMP)已经得到较多的应用^[30]。该方法通过设计的引物能特异性地识别靶标序列6个区域,在链置换性聚合酶(*Bst* 酶)作用下,在恒温(60~65 °C)条件下大约40~60 min即可完成核酸扩增^[31]。在转基因植物检测领域中,LAMP在转基因筛选元件(如P-CaMV35S、T-NOS、P-NOS、P-FMV35S)、特异性基因(如*cry1Ab*、*cry2Ab*、*cry3A*、*Phytase gene*)、转基因事件特异性(TT51-1、Bt176、BT11、MON863、MON89788、MS8)等方面都有所应用^[32-37]。Wang等^[38]建立了7种常见转基因元件(CaMV35S启动子,FMV35S启动子,NOS终止子,*bar*,*cry1Ac*,*CP4 epsps*,*pat*和*nptII*)的LAMP检测方法,并进行了国内外协同验证,为建立该方法的国家标准建立了良好的基础^[39]。Chen等^[36]用LAMP方法实现了转基因产品可视化检测。Kiddle等^[40]报道了一种提高LAMP检测灵敏度的方法,将一种荧光报告基因BART与LAMP方法结合,使其在转基因含量检测中灵敏度可达到0.1%。

核酸序列依赖性扩增(nucleic acid sequenced-based amplification, NASBA)也是一种在PCR基础上发展起来的新扩增技术。该反应主要依赖3种酶,即AMW逆转录酶(起到DNA聚合酶的作用)、T7 RNA聚合酶和RNA酶H。除此之外,该方法的关键在于引物的设计,其中一条引物的5'端含有T7 RNA多聚酶的启动子,3'末端与靶序列互补,这一引物是用于合成cDNA的。另一条引物的碱基序列与cDNA的5'末端互补。这种方法最初主要用来进行RNA扩增,但同样也适用于DNA扩增^[41]。Dobnik等^[42]建立了一种基于NASBA多重扩增方法对转基因事件MON810和MON863进行定量

分析和复合检测,同时能够跟芯片杂交技术结合进行转基因检测。于常海等^[43-44]发明了用NASBA方法检测转基因大豆A2704-12和MON89788的专利。

滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)是一种效仿自然界中病原微生物环状DNA分子滚环复制方式而建立的检测方法^[45]。RCA在扩增时由单链DNA引物在DNA聚合酶的作用下,沿着环状DNA模板由5'端向3'端方向合成一段线状单链DNA产物。徐君怡等^[46]发明的专利,首次探索了锁式探针RCA技术与实时荧光PCR技术相结合,即实时荧光RCA法,是可以同步检测10种转基因玉米品系的高通量、高特异性、高灵敏的检测技术。郝振明等^[47]开发了一种结合超分枝滚环扩增技术的试纸检测法,能够实现对食品中的转基因成分进行初步的定性检测。

重组酶聚合酶扩增技术(recombinase polymerase amplification, RPA),主要是利用重组酶和单链结合蛋白在常温下共同作用,从而实现引物与模板的特异结合,该方法最大的特点是不需要核酸解链和退火的过程,只需一对引物,在37 °C恒温条件下进行模板核酸的扩增^[48]。目前,邓婷婷等^[49]建立了基于RPA技术,建立了转基因水稻*Cry1Ab/c*基因的快速检测方法,特异性较好,尤其适用在基层实验室及现场快速检测转*Cry1Ab/c*基因水稻及其制品。金芜军等^[50-51]发明了转基因抗虫水稻华恢一号(TT51-1)、科丰6号品系特异性的RPA检测方法。徐潮等^[52]建立了基于RPA技术对玉米、水稻、棉花和豆类等作物中的转基因成分进行了检测。RPA技术的优势在于不需要依赖复杂的仪器设备,因此即使在经济条件不好,资源匮乏的区域也能够具有很好的应用前景,更为以后的现场田间检测提供了更多的选择。

3.1.3 基于蛋白水平的检测方法

蛋白质水平的检测是根据免疫学的原理,即利用转基因产品中表达的特定蛋白作为抗原和抗体特异性结合的原理对转基因产品进行快速检测。目前,酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)和侧向流动免疫测定(lateral flow devices, LFD)是2种最主要的基于蛋白水平的转基因产品检测方法^[53]。

目前已经有很多基于不同蛋白的ELISA及LFD检测方法应用在不同的转基因作物中,具体见表2。

表 2 转基因植物基于蛋白水平的检测方法

Table 2 Detection method of transgenic plants based on protein level

检测方法 Test method	外源目的蛋白 Exogenous target protein	参考文献 Reference
ELISA	CP4-EPSPS	[54-55]
	Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2A, Cry3A, Cry9C	[56]
	Pat, nptII	[57]
	Bar, NPT II	[58]
	CpTI	[59]
LFD	Cry1Ac	[60]
	p35S	[61]
	tNOS	[61]

3.1.4 基于二代测序的转基因植物检测技术

随着转基因生物越来越多地出现在人们生活中,快速、高通量、灵敏、自动化的转基因检测方法成为了重要的发展趋势,也成为了转基因生物及其产品检测的重点方向。目前已有的转基因检测方法主要是基于免疫学原理及 PCR 技术,而且这样的转基因检测方法需要提前知道部分转基因生物转入的外源基因的序列信息,否则无法对其进行检测。然而对于某些只知其部分序列或者完全不知道其序列的转基因植物来说,对这样的转基因生物进行监管及检测仍然存在很大的挑战。二代测序技术(next generation sequencing, NGS)是近些年来提出的一种新技术,它可以大规模地对 DNA 片段进行测序,从而实现数百次的测序读数,因此在转基因植物检测领域有着很好的应用前景^[62]。相比于传统的 Sanger 测序技术,NGS 在测序速度、测序通量及测序规模上占据了绝对的优势。目前将二代测序技术(NGS)应用在转基因植物检测领域,主要存在 2 种策略:一种是已知部分序列信息,将其进行富集后进行测序分析,也称为靶标富集法;另一种是完全不知样品信息,需要对其进行全基因组重测序来进行分析,称为全基因组测序(whole genome sequencing, WGS)方法^[63]。随着近些年 NGS 的快速发展,该项技术已经运用在了不同的领域中,转基因植物检测及鉴别也包括在其中,具体见表 3。

靶标富集策略可以从复杂基因组中获得需要的目的基因序列,这点对基因组比较复杂的植物来说

更有意义。因为即使只有部分已知序列,想要捕获更多目标区域的序列,二代测序技术不管在时间还是成本上,都有绝对的优势和能力。对于靶标富集策略主要有 2 种方法:一种是利用 PCR 扩增的产物建立 DNA 文库;另一种是从整个基因组文库中选择特定 DNA 片段进行测序。Liang 等^[64]通过富集靶标基因 *vip3Aa20*,并用 2 种不同的二代测序平台(Illumina 或 Pacific Biosciences 平台)对富集产物进行测序,研究表明 2 种不同测序平台都能够对产物进行分析。与 Illumina 技术相比,Pacific Biosciences 系统并不总是对基因组 DNA 进行剪切,因此在许多情况下可以避免从头组装。而且,对于不同大小片段的 DNA,包括长达 40 kbp 片段都有一定的优势。2014 年,Song 等^[65]从不同浓度的玉米及大豆样本中通过 PCR 扩增子测序鉴定出了是否是玉米或是大豆,不仅鉴定出了不同的转基因 *Bt11*、*Bt176*,同时也鉴定出了不同的转基因元件如 *CP4-EPSPS*、*p35S* 启动子和 *tNOS* 终止子。

全基因组重测序(whole genome sequencing, WGS)策略能够在对样本信息完全未知的情况下对转基因成分进行分析。这种测序策略是将基因组 DNA 剪切成小片段,构成 DNA 文库,然后连上接头进行测序。将生成的 reads 通过生物信息工具与已知的转基因生物信息进行比对。当对外源插入序列未知时,插入片段及旁侧序列是通过能够比对上或未比对上植物内源参考基因组的 contig 来鉴别的。WGS 方法已经应用在了转基因水稻 LLRICE62 事件的分子特征分析中,其以粳稻基因

组(*Oryza sativa* ssp. *Japonica*)作为水稻参考基因组进行比对,与研发者提供的信息相一致并找到了未知的插入位点^[66]。此外,WGS也同样应用在转基因亚麻 FP967 及转基因水稻 TT51-1 和 T1c-19 的分子特征分析中^[4,67]。因此,在转基因检测领域,尤其是对未经过认证的转基因生物及未知转基因生物,二代测序(NGS)技术发挥了极大的优势,可以通过鉴定其序列,直接证明转基因生物在食物/饲料

基质中的存在。然而在日常的转基因检测中实施NGS仍然是困难的,因为其成本相对较高,并且需要足够的计算机基础设施和专业的生物信息人员来处理数据。尽管如此,二代测序技术依然能够在转基因检测领域中具有广阔的应用前景,更为样本成分复杂、样本信息未知的转基因检测提供了一种可能,更为转基因生物的安全评价提供了有力的技术支持和保障。

表3 现有的二代测序技术在转基因植物检测上的应用

Table 3 Application of current second-generation sequencing technology in detection of transgenic plants

二代测序策略 Second generation sequencing strategy	NGS 平台 NGS platform	靶标基因 Target gene	靶标基因大小 Target gene size	参考文献 Reference	
靶标富集 Target enrichment	454 system (Roche Applied Science)	Hiseq	<i>vi</i> β 3Aa2 from MIR162	150 bp to 2 Kbp	[64]
		PacBio RS (Pacific Biosciences)	<i>vi</i> β 3Aa2 from MIR162	150 bp to 2 Kbp	[64]
			zssIIb	157 bp	[65]
			Bt11 gene	324 bp	[65]
			Bt176 gene	206 bp	[65]
			p35S/CTP4	171 bp	[65]
			CP4-EPSPS	498 bp	[65]
			p35S	195 bp	[65]
			tNOS	180 bp	[65]
		基因组重测序 Whole genome resequencing	HiSeq (Illumina)	LLRICE62 rice	385 Mbp
FP967 flax	373 Mbp			[67]	
TT51-1 rice	385 Mbp			[4]	
T1c-19 rice	385 Mbp			[4]	
MON17903 soybean	1 115 Mbp			[68]	
MON87704 soybean	1 115 Mbp			[68]	

3.2 转基因植物的环境安全检测

转基因植物会影响其周围的生存环境,主要表现在:1)对其生长土壤的影响,比如促进或妨碍土壤中一些微生物的生长与繁殖,改变土壤中的营养成分等;2)对周围环境中生物多样性的影响,比如实现自主性授粉的部分转基因植物会导致该地区蝴蝶、蜜蜂等昆虫数量的减少;3)对周围植物生存竞争能力的影响,比如由于环境的选择性,会导致最适应植物的大量繁殖等^[69]。因此,需要对转基因植物的环境安全进行检测及评估。

目前转基因作物中,抗虫、耐除草剂的性状应用最多。含有耐除草剂性状的转基因植物的使用大大减少了草甘膦、草铵膦除草剂的使用,抗虫转基因作物的应用也减少了化学杀虫剂的使用。因此,对于目前转基因植物的环境安全检测,最主要从以下这些方面进行检测及评估:1)靶标除草剂耐受性检测;2)非靶标除草剂耐受性检测;3)抗虫性检测;4)生存竞争能力检测;5)花粉活力检测;6)对生物多样性的影响检测;7)对非靶标生物(如二斑叶螨、家蚕、蚯蚓、蜜蜂等生物)影响检测。

3.3 转基因植物的食用安全检测

转基因植物的食用安全性一直是政府、群众关心的焦点话题。随着转基因技术的发展,影响转基因食品安全性的主要因素主要包括2类,即转入的基因及外源基因表达的蛋白,这2个因素也是评价转基因食品安全性的主要对象。转基因植物的食用安全检测主要考虑以下几方面因素:1)该蛋白是不是长期安全食用的;2)该蛋白的结构与功能是否与长期安全食用的蛋白有联系;3)该蛋白在生物功能上的安全性;4)在氨基酸序列上评估该蛋白是否与已知过敏原、抗营养因子及毒蛋白等具有同源性;5)评估该蛋白在理化特性上是否与过敏蛋白相同;6)该蛋白是否容易被胃、肠道蛋白消化;7)转基因食品的非预期效应^[70]。此外,对于转基因安全性检测及评价存在的诸多不确定性,为了尽可能最大程度保证转基因植物的经济与社会效益,各国政府组织、科研人员和国际组织秉承着依据科学、实质等同性、个案评估、逐步评估等原则制定出较完善的评价体系^[71]。

基于影响转基因植物食用安全检测的因素及评估转基因植物安全性的原则,根据CAC《重组DNA植物及其食品安全性评价指南》(CAC/GL 45-2003)的规定,目前对转基因植物的食用安全性评价主要从如下这些方面进行评估:1)营养成分;2)抗营养因子;3)毒性;4)过敏性;5)抗生素抗性等。在转基因产品的食用安全性评价中,对其营养价值的评估是很重要的部分,其次对其关键成分,要利用动物喂养试验评估转基因与非转基因食品的安全性^[71]。

我国对转基因植物的食用安全性检测,以实质等同性原则为基础,结合个案分析、逐步评估和预先防范的原则等制定,主要包括4个部分:1)评估转基因植物及其产品的基本信息,包括受体与供体的食用安全情况、实际外源插入信息及目的基因及载体构建图谱等;2)营养学评估,包括关键营养成分、抗营养因子等;3)毒理学评估,包括急性毒理实验、亚慢性及慢性毒性测试等;4)依据FAO/WHO的过敏原评估标准进行过敏性评估;5)其他包括抗生素标记基因安全性、非预期效应及其在加工过程中的安全性等。

4 转基因植物检测技术的标准化

4.1 转基因植物检测技术标准化的必要性

转基因植物的安全问题一直以来是全球关注和

争论的焦点。大多数国家及国际组织一直都高度重视转基因的安全性问题,不仅制定了相关法律法规,实施转基因生物标识制度,同时不断加强检测技术研究及其标准化,并出台一系列检测技术标准和规范^[72]。在标准化组织机构的组织下,通过标准化程序及标准化体系制定的转基因植物检测技术标准可以为转基因产品的监管及转基因管理政策的实施提供强有力的技术支持和依据。

4.2 国外转基因植物检测技术标准化的现状

目前,世界各国及国际组织也相继建立了专门的机构或部门负责转基因检测技术标准工作的制定,我们所熟知的部门主要有联合国粮农组织/世界卫生组织(FAO/WHO)、国际食品法典委员会(CAC)、国际标准化委员会(ISO)、欧洲标准化委员会(CEN)等。不同国家为转基因检测技术标准制定成立专门的工作小组,主要负责检测技术研究、检测方法验证、检测技术标准制定及审核发布等(<https://www.antpedia.com/standard/sp/633873.html>)。例如,欧洲标准化委员会食品分析技术委员会(CEN/TC275)成立负责转基因食品检测标准制定的工作小组。在标准化体系建设中,欧盟针对转基因植物检测,从样品抽取、核酸提取、核酸检测、蛋白检测等方面开展了一系列的研究,制定了相对比较完善的检测方法及技术体系,并对已建立的检测方法开展系列验证。目前,国际标准化委员会(ISO)已经发布过7个标准,欧盟也有相应的标准,比如欧洲标准化委员会(CEN)关于转基因检测方法发布了4项标准,其中德国标准化学会、法国标准化协会、英国标准学会关于转基因检测和核酸检测发布的标准均与ISO与CE检测标准一致,具体信息可见表4。

4.3 我国转基因植物及其产品检测技术标准化体系的现状

我国政府也十分重视转基因生物安全管理工作,建立了《农业转基因生物安全管理条例》、《农业转基因生物安全评价管理办法》等配套管理办法,组织制定了转基因生物安全检测标准体系框架和标准修订规划^[73]。我国从事转基因检测机构主要分布在国家质检系统和农业系统,质检系统主要负责进出口的转基因检测工作。国内转基因生物标准主要是由农业部和质检总局制定和发布,全国农业转基因生物安全管理标准化技术委员会秘书处设在农业部科技发展中心。质检总局发布的标准形式为国标(GB)及其行业标准(SN),农业部发布的标准形式

表4 国际组织/机构发布的转基因检测技术标准

Table 4 Technical standards for genetic modification testing issued by international organizations/institutions

组织/机构名称 Organization/ Institution	标准号 Standard number	标准名称 Standard name
国际标准化委员会(ISO)	ISO/TS 21569-4-2016	检测转基因生物和衍生产品的分析方法. 第4部分:检测 P-nos 和 P-nos-nptII DNA 序列的实时 PCR 筛选法
	ISO/TS 21569-5-2016	检测转基因生物和衍生产品的分析方法. 第5部分:检测 FMV 启动子(P-FMV) DNA 序列的实时 PCR 筛选法
	ISO/TS 21569-5-2016	检测转基因生物和衍生产品的分析方法. 第6部分:检测 cry1Ab/Ac 和 Pubi-cry DNA 序列的实时 PCR 筛选法
	ISO 21570 AMD 1-2013	食品.转基因有机物和衍生产品检测的分析方法.定量核酸碱基法.修改件 1
	ISO 24276 AMD 1-2013	食品.检测转基因生物和衍生产品的分析方法.一般要求和定义.修改件 1
	ISO 21569 AMD 1-2013	食品.转基因有机物和衍生产品检测的分析方法.定性核酸碱基法.修改件 1
	ISO/TS 21569-2-2012	转基因生物和衍生产品检测用分析方法.第2部分:FP967 事件中亚麻籽和亚麻籽产品的检测用特定概念实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)方法
欧洲标准化委员会(CEN)	CEN/TS 16707-2014	食品.转基因生物和衍生产品的检测分析方法.聚合酶链反应(PCR)为基础的筛选策略
	CEN/TS 15568-2006	食品.检测转基因生物体和衍生产品的分析方法.取样方式
	EN ISO 21571-2005	食品.转基因生物及其产品检测分析方法.核酸提取 ISO 21571-2005
	EN ISO 21572-2004	食品.转基因有机物和衍生产品的检测方法.基于蛋白质的方法;合并勘误表 2005 年 2 月

有农业行业标准(NY)和农业部公告两种。

目前我国已制定了关于转基因生物检测方法的农业标准、行业标准和国家标准有 128 项,其中农业标准有 89 项,行业标准有 26 项和国家标准有 13 项。这些标准主要分为 3 类,分别为环境安全评价标准、食用安全评价标准和产品成分检测标准(<https://www.antpedia.com/standard/sp/633873.html>)。标准中覆盖了大部分已经商业化的转基因大豆、水稻、玉米、油菜、棉花、小麦、苜蓿、甜菜、番茄等含有的抗病毒、抗虫及耐除草剂基因、报告基因、内标准基因等检测项目,但不足的是,转基因花卉、水果和转基因林木等仍然缺乏相关的检测技术标准,还有待后续不断研究和开发^[74]。

与发达国家相比,我国转基因生物安全管理、转基因检测技术和标准化研究还存在一定的问题和不足,仍有提升的空间^[75]。目前我国转基因植物检测标准常见的问题有:标准中部分引物特异性不高、定

性检测方法中部分扩增片段太短、未根据基因组复杂性规定 DNA 用量、标准制定滞后于转基因植物培育、未商业化转基因植物缺乏相关检测标准、定量标准未覆盖大部分商业化的转基因植物等。对于上述提出的不足,对于转基因植物检测技术标准化的工作来说,还需进一步的探讨和完善^[76]。

为了促进我国转基因植物及产品检测技术标准化进程,首先需要在转基因植物安全性和检测技术研究上投入更多的人力和财力;其次整合优势资源,构建我国转基因生物检测技术网络平台,形成与国际接轨的转基因植物检测技术研究及其标准化体系;此外,随着新的转基因植物品种的出现,努力使标准完全覆盖商业化转基因品种。

5 总结与展望

随着转基因植物新品种的不断研发和培育以及新的基因编辑技术和产品的出现,使得转基因植物

及产品的生物标识管理和检测变得日益重要,因此需要科研人员开发更多、更有效的新技术、新方法用于转基因检测。快速、高通量的检测方法在未来将成为转基因植物及其产品检测技术研发的主要方向,为我国甚至世界各国的转基因生物标识和监管提供强有力的工具。此外,我国仍需完善转基因植物的安全监管检测体系,进一步加快检测技术标准化研究进程。从长远角度考虑,转基因植物检测技术研发必须与其标准化及安全管理协调进行,从而保证转基因植物及其产品在我国长期有效的安全监管。有效的技术标准及安全监管可以保障技术研究快速发展,研究技术的发展有助于促进转基因植物安全监管能力的提高,两者协同进行,能够更好地为我国转基因检测技术及其标准化研究工作提供有力的技术支持和保障。

参考文献 References

- [1] Enikeev A G. Transgenic plants: New biological system or new properties of plant-Agrobacterium symbiosis? [J]. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2018, 65(5): 621-627
- [2] 国际农业生物技术应用服务组织. 2018 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, 2019, 39(8): 1-6
International Agricultural Biotechnology Application Service Organization. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2018[J]. *China Biotechnology*, 2019, 39(8): 1-6 (in Chinese)
- [3] Li R, Quan S, Yan X F, Biswas S, Zhang D B, Shi J X. Molecular characterization of genetically-modified crops: Challenges and strategies[J]. *Biotechnology Advances*, 2017, 35(2): 302-309
- [4] Yang L T, Wang C M, Holst-Jensen A, Morisset D, Lin Y J, Zhang D B. Characterization of GM events by insert knowledge adapted re-sequencing approaches [J]. *Scientific Reports*, 2013, 3: 2839
- [5] 桂国春, 李克彬, 畅荣妮, 舒伟. 出入境转基因产品及其分子检测现状与展望[J]. 生物技术通讯, 2014, 25(2): 290-294
Gui G C, Li K B, Chang R N, Shu W. Status and perspective of the genetically modified organisms product and its molecular detection[J]. *Letters in Biotechnology*, 2014, 25(2): 290-294 (in Chinese)
- [6] Fraiture M, Herman P, Taverniers I, de Loose M, Deforce D, Roosens N H. Current and new approaches in GMO detection: Challenges and solutions [J]. *BioMed Research International*, 2015, 2015: 392872
- [7] Klein D. Quantification using real-time PCR technology: Applications and limitations [J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2002, 8(6): 257-260
- [8] Demeke T, Dobnik D. Critical assessment of digital PCR for the detection and quantification of genetically modified organisms[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2018, 410(17): 4039-4050
- [9] 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 J Y, Yang L T. Estimating the exogenous genes copy number of genetically modified organisms by droplet digital PCR [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2014, 22(10): 1298-1305 (in Chinese)
- [10] 胡佳莹, 姜羽, 杨立桃. 利用 QuantStudio™ 3D 数字 PCR 分析转基因玉米 MON863 含量[J]. 农业生物技术学报, 2016, 24(8): 1216-1224 (in Chinese)
Hu J Y, Jiang Y, Yang L T. Quantification of genetically modified maize (*Zea mays*) MON863 by QuantStudio™ 3D digital PCR [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2016, 24(8): 1216-1224(in Chinese)
- [11] 王荣谈, 姜羽, 韦娇君, 张大兵, 杨立桃. 转基因生物及其产品的标识与检测[J]. 植物生理学报, 2013, 49(7): 645-654
Wang R T, Jiang Y, Wei J J, Zhang D B, Yang L T. The labeling and detection of genetically modified organisms and their derivatives[J]. *Plant Physiology Communications*, 2013, 49(7): 645-654 (in Chinese)
- [12] Brunnert H J, Spener F, Borchers T. PCR-ELISA for the CaMV-35S promoter as a screening method for genetically modified Roundup Ready soybeans [J]. *European Food Research and Technology*, 2001, 213(4-5): 366-371
- [13] Hardegger M, Brodmann P, Herrmann A. Quantitative detection of the 35S promoter and the NOS terminator using quantitative competitive PCR[J]. *European Food Research and Technology*, 1999, 209(2): 83-87
- [14] Pan L W, Chen J H, Hu Y Q, Shen Y F. Research on detection of FMV 35S promoter in genetically modified roundup-tolerant rapeseed [J]. *Life Science Research*, 2001, 11(7): 1198-1204
- [15] 徐俊锋, 王鹏飞, 李玥莹, 汪小福, 陈笑芸, 彭城, 缪青梅. 转基因植物中 CaMV35S 和 tNOS 元件的 4 种定性 PCR 检测方法的比较[J]. 农业生物技术学报, 2015, 23(3): 397-407
Xu J F, Wang P F, Li Y Y, Wang X F, Chen X Y, Peng C, Miao Q M. Comparison of four qualitative PCR-based detection methods of CaMV35S and tNOS elements in transgenic plants[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2015, 23(3): 397-407 (in Chinese)
- [16] 汪小福, 陈笑芸, 张小明, 周育, 张焕春, 缪青梅, 方敬, 徐俊锋. 转 *CryIAb* 基因水稻分子特征及其特异性 PCR 检测方法[J]. 遗传, 2012, 34(2): 208-214
Wang X F, Chen X Y, Zhang X M, Zhou Y, Zhang H C, Miao Q M, Fang J, Xu J F. Molecular characteristics and specific PCR detection of transgenic rice containing *CryIAb*

- [J]. *Hereditas*, 2012, 34(2): 208-214 (in Chinese)
- [17] Gouffon C, van Vliet A, van Rie J, Jansens S, Jurat-Fuentes J L. Binding sites for *Bacillus thuringiensis* Cry2Ae toxin on heliothine brush border membrane vesicles are not shared with Cry1A, Cry1F, or Vip3A toxin [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(10): 3182-3188
- [18] Dinon A Z, Prins T W, van Dijk J P, Arisi A C M, Scholtens I M J, Kok E J. Development and validation of real-time PCR screening methods for detection of *cry1A.105* and *cry2Ab2* genes in genetically modified organisms [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011, 400(5): 1433-1442
- [19] Ao J X, Li Q Z, Gao X J, Yu Y B, Li L, Zhang M H. A multiplex nested PCR assay for the simultaneous detection of genetically modified soybean, maize and rice in highly processed products [J]. *Food Control*, 2011, 22(10): 1617-1623
- [20] Barbau-Piednoir E, Lievens A, Vandermassen E, Mbongolo-Mbella E G, Leunda-Casi A, Roosens N, Sneyers M, van den Bulcke M. Four new SYBR® Green qPCR screening methods for the detection of Roundup Ready®, LibertyLink®, and CryIAb traits in genetically modified products [J]. *European Food Research and Technology*, 2012, 234(1): 13-23
- [21] Sawazaki H E, Duarte A P, Fuzatto M G, Sawazaki E, Grandi S H R, de Ponte J F, Nogueira L. Identification and quantification of corn, soybean and cotton genetically modified by real time PCR [J]. *American Journal of Molecular Biology*, 2015, 5(3): 84-93
- [22] Shin K S, Lim M H, Woo H J, Lim S H, Ahn H I, Lee J H, Cho H S, Kweon S J, Suh S C. Event-specific qualitative and quantitative polymerase chain reaction methods for detection of insect-resistant genetically modified Chinese cabbage based on the 3'-junction of the insertion site [J]. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 2012, 55(3): 367-375
- [23] 梁利霞, 宛焯嵩, 金芜军. 利用复合 PCR 方法同时检测三种转基因水稻 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2014, 33(1): 16-21
- Liang L X, Wan Y S, Jin W J. The event-specific multiplex PCR detection method for three genetically modified rice [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2014, 33(1): 16-21 (in Chinese)
- [24] Burns M J, Burrell A M, Foy C A. The applicability of digital PCR for the assessment of detection limits in GMO analysis [J]. *European Food Research and Technology*, 2010, 231(3): 353-362
- [25] Köppel R, Bucher T. Rapid establishment of droplet digital PCR for quantitative GMO analysis [J]. *European Food Research and Technology*, 2015, 241(3): 427-439
- [26] Dobnik D, Štebih D, Blejec A, Morisset D, Želj J. Multiplex quantification of four DNA targets in one reaction with Bio-Rad droplet digital PCR system for GMO detection [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 35451
- [27] Fu W, Zhu P Y, Wang C G, Huang K L, Du Z X, Tian W Y, Wang Q, Wang H Y, Xu W T, Zhu S F. A highly sensitive and specific method for the screening detection of genetically modified organisms based on digital PCR without pretreatment [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 12715
- [28] Craw P, Balachandran W. Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: A critical review [J]. *Lab on a Chip*, 2012, 12(14): 2469-2486
- [29] Hoser M J. Isothermal nucleic acid amplification. United States Patent, EP1866434, 2011-05-26
- [30] Li R, Wang C, Ji L L, Zhao X X, Liu M, Zhang D B, Shi J X. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for GMO on: Recent progresses and future perspectives [J]. *Open Access Library Journal*, 2015, 2(1): 1-8
- [31] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(12): E63
- [32] Randhawa G J, Singh M, Morisset D, Sood P, Zel J. Loop-mediated isothermal amplification: Rapid visual and real-time methods for detection of genetically modified crops [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(47): 11338-11346
- [33] Lee D, la Mura M, Allnut T, Powell W. Detection of genetically modified organisms (GMOs) using isothermal amplification of target DNA sequences [J]. *BMC Biotechnology*, 2009, 9(1): 7
- [34] Li Q C, Fang J H, Liu X, Xi X, Li M J, Gong Y F, Zhang M Z. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of *cry1Ab* gene in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *European Food Research and Technology*, 2013, 236(4): 589-598
- [35] Li F W, Yan W, Long L K, Qi X, Li C C, Zhang S H. Development and application of loop-mediated isothermal amplification assays for rapid visual detection of *cry2Ab* and *cry3A* genes in genetically-modified crops [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(9): 15109-15121
- [36] Chen L L, Guo J C, Wang Q D, Kai G Y, Yang L T. Development of the visual loop-mediated isothermal amplification assays for seven genetically modified maize events and their application in practical samples analysis [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(11): 5914-5918
- [37] Chen X Y, Wang X F, Jin N, Zhou Y, Huang S N, Miao Q M, Zhu Q, Xu J F. Endpoint visual detection of three genetically modified rice events by loop-mediated isothermal amplification [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 13(11): 14421-14433
- [38] Wang C, Li R, Quan S, Shen P, Zhang D B, Shi J X, Yang L T. GMO detection in food and feed through screening by visual loop-mediated isothermal amplification assays [J]. *Analytical*

- and Bioanalytical Chemistry*, 2015, 407(16): 4829-4834
- [39] Li R, Shi J X, Liu B, Zhang D B, Zhao X X, Yang L T. International collaborative ring trial of four gene-specific loop-mediated isothermal amplification assays in GMO analysis[J]. *Food Control*, 2018, 84: 278-283
- [40] Kiddle G, Hardinge P, Buttigieg N, Gandelman O, Pereira C, McElgunn C J, Rizzoli M, Jackson R, Appleton N, Moore C, Tisi L C, Murray J A. GMO detection using a bioluminescent real time reporter (BART) of loop mediated isothermal amplification (LAMP) suitable for field use [J]. *BMC Biotechnology*, 2012, 12(1): 15
- [41] Malek L, Sooknanan R, Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA™)[M]. United States: Humana Press, 2008
- [42] Dobnik D, Morisset D, Gruden K. NAIMA as a solution for future GMO diagnostics challenges [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 396(6): 2229-2233
- [43] 于常海, 刘乐庭, 杨滨. 转基因大豆 A2704-12 转化事件的检测方法和试剂盒. 中国, CN102634595A[P]. 2012-08-15
Yu C H, Liu L T, Yang B. Detection methods and kits for transformation events of transgenic soybean A2704-12. China, CN102634595A[P]. 2012-08-15 (in Chinese)
- [44] 于常海, 杨滨, 张明, 李飞武, 刘乐庭. 转基因大豆 MON89788 转化事件的检测方法和试剂盒. 中国, CN103409498A[P]. 2013-11-27
Yu C H, Yang B, Zhang M, Li F W, Liu L T. Detection method and kit of transformation events of transgenic soybean MON89788. China, CN103409498A [P]. 2013-11-27 (in Chinese)
- [45] 张斌. 基于滚环扩增技术的核酸分析[D]. 上海: 上海大学, 2015
Zhang B. Nucleic acid analysis based on the technique of rolling ring amplification[D]. Shanghai: Shanghai University, 2015 (in Chinese)
- [46] 徐君怡, 曹际娟, 赵昕, 曹冬梅. 同步检测 10 种转基因玉米品系的试剂盒, 及其使用方法. 中国, CN102719533A[P]. 2012-10-10
Xu J Y, Cao J J, Zhao X, Cao D M. Kit for simultaneous detection of 10 transgenic maize lines and its application. China, CN102719533A[P]. 2012-10-10 (in Chinese)
- [47] 郝振明, 赵鑫, 吴孝槐. 超分枝滚环扩增技术结合试纸法检测食品中多种转基因组分[J]. *食品科学*, 2010, 31(6): 263-266
Hao Z M, Zhao X, Wu X H. HRCA-based strip test for detection of transgenic components in food[J]. *Food Science*, 2010, 31(6): 263-266 (in Chinese)
- [48] Wang J C, Zhang Y N, Zhang R X, Han Q G, Wang J F, Liu L B, Li R W, Yuan W Z. Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of porcine circovirus 3 [J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2017, 36: 58-61
- [49] 邓婷婷, 黄文胜, 程奇, 李新实, 陈颖. 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 T T, Huang W S, Cheng Q, Li X S, Chen Y. Detection of *Cry1Ab/c* gene in genetically modified rice by recombinase polymerase amplification[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2015, 15(3): 187-193 (in Chinese)
- [50] 金芃军, 宛煜嵩, 徐潮, 苗朝华, 张秀杰, 黄卫红. 应用 RPA 技术对转基因水稻华恢 1 号品系特异性鉴定. 中国, CN103451292A[P]. 2013-12-18
Jin W J, Wan Y S, Xu C, Miao C H, Zhang X J, Huang W H. Specific identification of transgenic rice Huahui 1 by RPA. China, CN103451292A[P]. 2013-12-18 (in Chinese)
- [51] 金芃军, 宛煜嵩, 徐潮, 李亮, 苗朝华, 黄卫红. 应用 RPA 技术对转基因水稻科丰 6 号品系特异性鉴定. 中国, CN103525936A[P]. 2014-01-22
Jin W J, Wan Y S, Xu C, Li L, Miao C H, Huang W H. Specific identification of transgenic rice Kefeng 6 by RPA. China, CN103525936A[P]. 2014-01-22 (in Chinese)
- [52] 徐潮, 李亮, 金芃军, 宛煜嵩. 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 W J, Wan Y S. Event-specific Real-time RPA detection of transgenic rice Kefeng 6 [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2014, 12(5): 875-880 (in Chinese)
- [53] Salisu I B, Shahid A A, Yaqoob A, Ali Q, Bajwa K S, Rao A Q, Husnain T. Molecular approaches for high throughput detection and quantification of genetically modified crops: A review[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1670
- [54] Rogan G J, Dudin Y A, Lee T C, Magin K M, Astwood J D, Bhakta N S, Leach J N, Sanders P R, Fuchs R L. Immunodiagnostic methods for detection of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in Roundup Ready® soybeans[J]. *Food Control*, 1999, 10(6): 407-414
- [55] 郭文芳, 王楠, 李刚强, 许芳芳, 杨彩峰, 刘德虎. CP4-EPSPS 转基因棉花植株鉴定方法比较分析[J]. *生物技术通报*, 2017(4): 114-118
Guo W F, Wang N, Li G Q, Xu F F, Yang C F, Liu D H. Comparative analysis of identification methods of CP4-EPSPS transgenic cotton plants[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2017(4): 114-118 (in Chinese)
- [56] Stave J W. Protein immunoassay methods for detection of biotech crops: Applications, limitations, and practical considerations[J]. *Journal of AOAC International*, 2002, 85(3): 780-786
- [57] Jang H J, Cho I H, Kim H S, Jeon J W, Hwang S Y, Paek S H. Development of a chemiluminometric immunosensor array for on-site monitoring of genetically modified organisms[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2011, 155(2): 598-605
- [58] Kim H, Lee S M, Kim J K, Ryu T H, Suh S C, Cho H S. Expression of PAT and NPT II proteins during the developmental stages of a genetically modified pepper developed in Korea[J]. *Journal of Agricultural and Food*

- Chemistry, 2010, 58(20): 10906-10910
- [59] Tan G Y, Nan T G, Gao W, Li Q X, Cui J J, Wang B M. Development of monoclonal antibody-based sensitive sandwich ELISA for the detection of antinutritional factor cowpea trypsin inhibitor[J]. *Food Analytical Methods*, 2013, 6(2): 614-620
- [60] Allen R C, Rogelj S, Cordova S E, Kieft T L. An immun-PCR method for detecting *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin [J]. *Journal of Immunological Methods*, 2006, 308(1-2): 109-115
- [61] Santiago-Felipe S, Tortajada-Genaro L A, Puchades R, Maquieira A. Recombinase polymerase and enzyme-linked immunosorbent assay as a DNA amplification-detection strategy for food analysis[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2014, 811: 81-87
- [62] Willems S, Fraiture M A, Keersmaecker S D, Roosens N H. Next generation sequencing to identify GMO in food and feed products[EB/OL]. *Labinfo*, 2015, 13: 18-20
- [63] Fraiture M A, Herman P, De Loose M, Debode F, Roosens N H. How can we better detect unauthorized GMOs in food and feed chains? [J]. *Trends in Biotechnology*, 2017, 35(6): 508-517
- [64] Liang C J, van Dijk J P, Scholtens I M J, Staats M, Prins T W, Voorhuijzen M M, da Silva A M, Arisi A C M, den Dunnen J T, Kok E J. Detecting authorized and unauthorized genetically modified organisms containing *vip3A* by real-time PCR and next-generation sequencing [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2014, 406(11): 2603-2611
- [65] Song Q X, Wei G J, Zhou G H. Analysis of genetically modified organisms by pyrosequencing on a portable photodiode-based bioluminescence sequencer [J]. *Food Chemistry*, 2014, 154: 78-83
- [66] Spalinskas R, van den Bulcke M, van den Eede G, Milcamps A. LT-RADE: An efficient user-friendly genome walking method applied to the molecular characterization of the insertion site of genetically modified maize MON810 and rice LLRICE62[J]. *Food Analytical Methods*, 2013, 6(2): 705-713
- [67] Young L, Hammerlindl J, Babic V, McLeod J, Sharpe A, Matsalla C, Bekkaoui F, Marquess L, Booker H M. Genetics, structure, and prevalence of FP967 (CDC Triffid) T-DNA in flax[J]. *SpringerPlus*, 2015, 4: 146
- [68] Kovalic D K, Garnaat C W, Guo L, Yan Y P, Groat J, Silvanovich A, Ralston L, Huang M Y, Tian Q, Christian A T, Cheikh N, Hjelle J, Padgett S R, Bannon G A. The use of next generation sequencing and junction sequence analysis bioinformatics to achieve molecular characterization of crops improved through modern biotechnology [J]. *The Plant Genome*, 2012, 5(3): 149-163
- [69] 汤沂, 向东, 裴芳, 李秀国, 于莹滢. 转基因植物的环境及食品安全性研究[J]. *食品安全*, 2019, 15(4): 126-130
- Tang Y, Xiang D, Qiu F, Li X G, Yu Y Y. Study on the environment and food safety of transgenic plants [J]. *Food Safety*, 2019, 15(4): 126-130
- [70] 金芫军. 转基因作物环境与食品安全性研究: 基因漂流、毒蛋白、转基因产品标识管理政策及标准化检测技术[D]. 北京: 中国农业科学院, 2003.
- Jin W J. Studies on environment & food safety of GMC: Gene flow of gm rice, toxin protein database, labeling policy & detection methods of gm products [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2003 (in Chinese)
- [71] 许文涛, 贺晓云, 黄昆仑, 罗云波. 转基因植物的食品安全性问题及评价策略[J]. *生命科学*, 2011, 23(2): 179-185
- Xu W T, He X Y, Huang K L, Luo Y B. Food safety and its assessment strategies of genetically modified plant[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2011, 23(2): 179-185 (in Chinese)
- [72] 张大兵, 郭金超. 转基因生物及其产品检测技术和标准化[J]. *生命科学*, 2011, 23(2): 195-204
- Zhang D B, Guo J C. The development and standardization of testing approaches for genetically modified organisms and their derived products[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2011, 23(2): 195-204 (in Chinese)
- [73] 农业部科技发展中心. 农业转基因生物安全标准: 2011版[M]. 北京: 中国农业出版社, 2012
- Development Center for Science and Technology of the Ministry of Agriculture. *Safety Standard for Agricultural Genetically Modified Organisms: 2011 Edition*[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2012 (in Chinese)
- [74] 宋君, 王东, 刘勇, 雷绍荣. 转基因产品检测技术标准存在的问题及建议[J]. *中国测试*, 2009, 35(6): 88-90
- Song J, Wang D, Liu Y, Lei S R. Disadvantages and proposal of standards for detecting genetically modified products[J]. *China Measurement & Testing*, 2009, 35(6): 88-90 (in Chinese)
- [75] 中国农业大学, 农业部科技发展中心. 国际转基因生物食用安全检测及其标准化[M]. 北京: 中国物资出版社, 2010
- China Agricultural University, Science and Technology Development Center of Ministry of Agriculture. *International Food Safety Testing and Standardization of Genetically Modified Organisms* [M]. Beijing: China Materials Press, 2010 (in Chinese)
- [76] 杜绍菊. 农业转基因生物安全管理模式探索[J]. *农业与技术*, 2018, 38(8): 62
- Du S J. Safety management model of agricultural genetically modified organisms[J]. *Agriculture and Technology*, 2018, 38(8): 62 (in Chinese)