

复合性状转基因作物及产品检测与溯源技术研究进展

李鑫星¹ 周 婧¹ 许文涛² 焦伟华³ 刘恒一¹ 张领先¹

(1. 中国农业大学信息与电气工程学院, 北京 100083; 2. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083;

3. 山东财经大学农业与农村经济研究中心, 济南 250014)

摘要: 随着农业育种水平的进步与发展, 现有的单一性状转基因作物已经不能满足农业的需求, 聚合多种优良性状的复合性状转基因作物已成为转基因作物发展的趋势。在总结和整理国内外研究文献的基础上, 阐述了复合性状转基因作物的检测方法。基于蛋白质的检测技术, 包括免疫试纸检测技术和 ELISA 检测技术。基于核酸的检测技术, 包括 PCR 检测技术、基因芯片技术、等温扩增技术和第二代测序技术。除此之外, 还阐述了转基因作物及产品的溯源技术。综述结果表明, 转基因检测技术逐渐向高通量、高准确度和高灵敏度方向发展, 同时一些新的检测技术也开始出现并发展; 构建溯源系统需要将计算机技术与信息技术相结合; 为了综合多种技术的优点, 溯源系统的开发势必需要将多种信息技术结合起来使用。

关键词: 复合性状转基因作物; 安全评价; 检测; 溯源

中图分类号: X826; Q788 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2017)05-0117-11

Research Progress on Detection and Traceability Technology of Stacked Transgenic Plants and Their Products

LI Xinxing¹ ZHOU Jing¹ XU Wentao² JIAO Weihua³ LIU Hengyi¹ ZHANG Lingxian¹

(1. College of Information and Electrical Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

2. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

3. Center for Agricultural and Rural Economy, Shandong University of Finance and Economics, Jinan 250014, China)

Abstract: As the development of breeding technology, the transgenic crops of single-character were not able to meet the demands of modern agriculture, and the stacked transgenic plants that combine different characters have gradually raised the public's attention. Based on the literature review, some detection methods of stacked transgenic plants were introduced. The first detection technology was based on the protein, including lateral flow strip detection technique and ELISA detection technology; the second one was based on nucleic acid detection technology, including PCR detection technology, gene-chip technology, isothermal amplification technology and next-generation sequencing technology. In addition, the traceability technology of genetically modified crops and their products was also introduced. The results indicated that the transgenic detection technology was gradually developing to high throughput, high accuracy and high sensitivity and some new detection technologies had appeared and developed; the integration of computer technology and information technology would contribute to the traceability system building; the developing trend of the traceability technology would inevitably need to combine a variety of information technologies in order to integrate the advantages of them.

Key words: stacked transgenic plants; safety evaluation; detection; traceability

引言

复合性状转基因作物是利用基因工程技术或

杂交育种技术将两个或者两个以上的外源基因整合到同一植物的基因组中, 使植物能够表达出来, 并在后代可稳定遗传的新特性^[1-2]。随着基因工

收稿日期: 2016-09-13 修回日期: 2016-10-26

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项(2014ZX0801202B)

作者简介: 李鑫星(1983—), 男, 副教授, 主要从事农业信息化技术研究, E-mail: lxxcau@cau.edu.cn

通信作者: 张领先(1970—), 男, 副教授, 博士, 主要从事农业信息化技术研究, E-mail: zlx131@163.com

程技术的不断发展与进步,可以利用的外源基因种类逐渐增多,因而转基因作物的类型也变得越来越丰富。

复合性状转基因作物相对单一性状转基因作物来说,具有某些特殊优势。它能够多个具有优良性状的基因聚集在同一作物中,使其满足农业发展的多方面需求^[3-5],它将传统育种模式与现代先进的生物技术相结合,形成一种新的育种方式。但是复合性状转基因作物也存在一些潜在风险。复合性状转基因作物牵涉到多个转基因,不同转基因之间可能发生非关联、关联、代谢等相互作用,还可能引发协同效应^[6-8],产生不同于单一性状转基因植物的食用安全问题,引起中毒、过敏等危害以及一些非预期效应^[9-11]。所以,与单一性状转基因植物的安全性评价相比,复合性状转基因作物的安全性评价标准应该更加严格,并且应将检测的重点放在对复合转基因相互作用的检测上^[12-14]。同时,为了实现对转基因作物的追溯,需要建立一个溯源系统。溯源系统能够记录产品供应过程中的相关信息,在出现产品质量问题时,能够快速有效地查询到问题的来源,实现对生产过程的有效监督和查询。必要时可召回产品,并对其生产者实施相应的惩罚措施,这样有助于提高产品的质量水平^[15]。本文综述国内外对于转基因作物的态度与相关政策规定,以及转基因产品检测与溯源技术的相关研究,然后进行总结并展望其未来发展方向。

1 复合性状转基因作物及产品概述

1.1 复合性状转基因作物及产品发展现状

自从单一性状转基因作物出现以来,转基因技术已逐渐成熟。在 2010—2015 年期间,全球转基因作物的种植面积呈现逐年上涨的趋势,我国转基因作物种植面积相对稳定,始终保持全球第六转基因作物种植大国的地位(表 1)^[16-21]。现今,为满足农业多元化需求,复合性状转基因作物已成为新的发展趋势。复合性状转基因作物在近几年发展较为迅猛。据统计,截止 2009 年,美国、加拿大、澳大利亚、墨西哥、南非等 11 个国家种植的复合性状转基因作物总面积已超过 $2.87 \times 10^7 \text{ hm}^2$ 。据 ISAAA^[22]统计,2013 年全球转基因作物种植面积达 $1.73 \times 10^8 \text{ hm}^2$,较 2012 年增长 3%,其中复合型转基因作物种植面积占全部转基因作物种植面积 27%,约有 $4.7 \times 10^7 \text{ hm}^2$ 。2014 年,复合性状转基因作物种植面积持续增加,全球种植面积已达 5 140 万 hm^2 ,增长约 9%,占转基因作物种植面积总比重达 28%。2015 年,全球复合性状转基因作物的种植面积是 5 850 万 hm^2 ,相比 2014 年增长了 14%,约占全球转基因作物种植面积的 1/3^[23]。2010 年已经培育了具有 8 种新型编码基因的转基因玉米作物,呈现为 3 种性状的复合。由此可见,转基因作物种植国家中,复合型转基因作物的种植量逐年增加,复合性状转基因作物的复合类型更加多样化。

表 1 2010 年到 2015 年中国与全球转基因作物的种植情况
Tab.1 Planting conditions of genetically modified crops in China and globe from 2010 to 2015

年份	中国种植面积排名	中国种植作物	中国种植面积/ hm^2	全球种植面积/ hm^2
2010	6	棉花、木瓜、白杨等	3.50×10^6	1.480×10^8
2011	6	棉花、木瓜、白杨等	3.90×10^6	1.600×10^8
2012	6	棉花、木瓜、白杨等	4.00×10^6	1.703×10^8
2013	6	棉花、木瓜、白杨等	4.20×10^6	1.753×10^8
2014	6	棉花、木瓜、白杨等	3.90×10^6	1.815×10^8
2015	6	棉花、木瓜、白杨等	3.70×10^6	1.797×10^8

1.2 复合性状转基因作物及产品安全性评价

与单性状转基因作物相比,复合性状的转基因作物优势明显,它能将传统的育种方式和现代的基因育种方式相结合,既能满足多元化的育种需求,又能利用现有的转基因作物进行育种,以提高资源利用效率,实现育种创新。然而,因为复合性状的转基因作物涉及到的基因序列不止一组,不同基因序列的作用类型不同,这些基因序列单独使用可能没有影响,但是多组基因序列复合到一起使用就可能会产生一些不良反应。

因受到相关技术发展水平、经济效益、公众普及程度等方面的影响,世界各国对复合性状转基因作物的态度也有所不同。按照监管的严厉程度可以分为宽松型、适中型和严格型^[24],其代表性国家和地区分别如下:

(1)宽松型有美国、加拿大、澳大利亚、新西兰等。其监管特点是依赖于单性状转基因作物的安全评价结果。通常情况下,如果每一单性状基因的亲本都已经通过审批并且成功进行商业化运用,并且有证据显示各基因亲本之间没有相互影响,那么相

应的复合性状转基因作物则无需提交完整的安全评价材料就可通过审批。若存在单性状基因表达互相影响的情况,则按照“个案处理”原则补充安全评价材料。其内容主要为涉及目的蛋白的表达情况及对非靶生物的影响。

(2)适中型有日本、韩国、阿根廷、菲律宾等。适中型国家以日本为例进行分析。相对于宽松型国家,其主要区别在于不仅依靠单一性状转基因亲本进行安全评价,还需要提交相应的蛋白表达对宿主代谢影响的相关资料。日本将转基因作物的性状分为 3 级,第一级表示插入的基因序列不会对宿主的代谢途径做出改变,第二级表示插入的基因序列会对宿主代谢途径产生促进或抑制作用,第三级表示插入的基因序列的表达会为宿主带来一个新的代谢途径^[24]。若复合性状转基因作物仅含有第一级的单独亲本,则可以豁免审批,只需提供能够证明相关基因不会相互作用的文件即可。而若是含有二、三级单性状基因亲本,则需进行严格的“个案分析”。在适中的安全评价体系中,评价材料不一定必须来自于本国,世界其他各地的安全评价亦可被接受认可。

(3)严格型的代表为欧盟。欧盟对复合性状转基因作物的安全评价十分严格,将其视为一个新的性状的转基因作物个体,依据重新评价的原则进行审批。其基本程序是将复合性状转基因作物分为 A

与 B 两类。A 类是由已经得到授权的或者正在进行安全评价的转基因作物杂交得到的新品种,B 类则是由未获得授权的转基因作物作为亲本杂交得到的品种。A 类的安全性评价基于其亲本的安全评价材料,其考虑的重点在于插入的外源基因是否完整,基因的表达是否稳定,转入的多性状间是否有潜在的相互作用这 3 方面。B 类的安全评价将复合性状作为一个新性状进行评价。欧盟对复合性状转基因作物的安全评价流程分为 4 个层面,即分子特征评价、对比分析、环境安全评价、毒性过敏性与营养评价。分子特征评价主要检测插入外源基因的完整性,表达的稳定性。对比分析则是按照实质同等效应原则,将作物与参照作物进行比较,得出其非期望效应。对于分子特征层次的评价,其结果若显示有异,则必须进行环境安全影响评价、毒性过敏性评价及营养评价^[25]。

通过分析不同国家对于转基因作物及其产品的态度以及政策,可以发现转基因作物尤其是复合性状转基因作物由于其潜在的安全隐患不能确定,导致一些国家比较谨慎,对它的要求比较严格,而有些国家比较开放,政策相对宽松(表 2)^[26]。本团队对复合性状转基因作物安全性评价进行过相关研究,柳晓丹等^[27]分析对比了各国制定的复合性状转基因作物监管制度,综述了复合性状转基因作物安全性评价研究进展。

表 2 世界主要国家对待转基因作物技术的政策比较
Tab.2 Comparison of policies on genetically modified crops in major countries of the world

领域	国家					
	美国	巴西	欧盟	日本	中国	印度
公共投资	促进型	促进型	促进型	促进型	促进型	促进型
生物安全	认可型	谨慎型	谨慎型	谨慎型	谨慎型	谨慎型
食品安全	促进型	谨慎型	谨慎型	谨慎型	谨慎型	谨慎型
国际贸易	促进型	促进型	谨慎型	谨慎型	谨慎型	禁止型
知识产权	促进型	促进型	促进型	促进型	认可型	禁止型

2 复合性状转基因作物及产品检测技术

对于转基因作物及其产品的检测技术,目前还没有专门用于复合品系的,现阶段的技术都是用于单一品系的,主要包括两类:一类是基于蛋白质的检测技术,包括免疫试纸检测技术和 ELISA 检测技术;另一类是基于核酸的检测技术,包括 PCR 检测技术、基因芯片技术、等温扩增技术和第二代测序技术。

2.1 基于蛋白质的检测技术

通常可以通过检测外源基因表达的蛋白质来定

性或者定量地检测转基因产品。建立这些检测方法通常需要将外源结构基因表达的蛋白产物制备特异性抗体,然后利用抗体与目的蛋白(抗原)特异性结合,通过偶联抗体与抗原抗体复合物作用产生的信号进行检测^[28]。

2.1.1 免疫试纸检测技术

免疫试纸条(Lateral flow strip)检测技术的依据是抗原与抗体的特异性结合原理,以硝化纤维代替聚苯乙烯反应板为固相载体,将固定有抗体的试纸条或固相带浸入到蛋白提取液中,如果样品中含有外源目的蛋白,试纸条上抗体可与目的蛋白发生反

应,产生颜色变化^[29]。FAGAN等^[30]在评估田间试验中使用免疫试纸条法实现了对抗除草剂转基因大豆的检测。

免疫试纸条检测方法的优点是操作简单,检测速度快,一般5~10 min就能够得到检测结果。它的缺陷是一种免疫试纸条只能检测一种目的蛋白质,无法识别出具体的转基因品系,且检测灵敏度较低,为0.15%^[29,31]。

2.1.2 ELISA 检测技术

酶联免疫吸附检测检测技术(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)的原理是将抗原或者抗体与某种固相载体表面相结合,把受检标本(测定其中的抗体或抗原)和酶标抗原或抗体与固相载体表面的抗原或抗体反应,加入底物后发生显色反应,根据反应后颜色的深浅进行定性或定量分析^[32]。WANG等^[33]基于抗PAT蛋白单克隆抗体和兔多克隆抗体建立了双抗夹心酶联免疫分析方法(Sandwich ELISA),并使用该方法测定了5个转基因抗虫棉和2个非转基因棉花品种叶片中PAT蛋白的含量。刘光明等^[34]将纯化的Bt1杀虫晶体蛋白质作为标准蛋白和免疫抗原,通过抗体-抗原-酶标抗体反应,建立了间接酶联免疫吸附测定法(ELISA),这种方法能够快速对转基因抗虫玉米中Bt1表达蛋白进行检测。

ELISA技术的优点是操作简便、特异性强、灵敏度高和费用低,因此它已成为食品检测中应用最广泛的检测技术之一^[35-36]。但是ELISA技术也有其缺点,主要表现在对蛋白表达情况有较高要求,具体如下:某些应用在农产品上的化学物质基团对测定有一定的干扰;并非所有的植物组织都能表达导入的基因片段;蛋白质遇到某些特殊环境会发生性状改变,甚至降解,因此经过加工的产品不适合用此方法检验;如果导入的DNA未能稳定表达,则不能应用该技术^[37]。

2.2 基于核酸的检测技术

基于核酸的检测技术包括PCR检测技术、基因芯片技术、等温扩增技术、第二代测序技术。

2.2.1 PCR 检测技术

聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)是一种体外酶促合成,扩增特定DNA片段的方法^[38],是一种快速灵敏的核酸检测技术,在转基因产品检测上已得到广泛应用。本文分析了多重PCR检测法、定量PCR检测法、数字PCR检测法的特点及其应用。

多重PCR是在普通PCR的基础上进行改进的,通过在一个PCR反应体系中加入多对特异性引

物,以多个DNA模板或同一模板的不同区域扩增多个目的片段。RASHMI等^[39]使用定性与定量PCR技术对9种已批准的印度转基因棉花进行检测,其中多重定性PCR检测法的LOD达到0.1%。陈贞^[40]以大豆、玉米、油菜和棉花4种转基因作物为检测对象,以多重PCR引物设计方法为基础,建立多重PCR检测体系。

定量PCR检测可用来检测样品中GMO的百分比。目前定量PCR检测技术主要包括竞争性定量PCR(QC-PCR)和实时荧光定量PCR(Real-time PCR)。HOLCK等^[41]以DAS59122、LY038、MON88017、MIR604和3272 5种转基因玉米作为试验对象,研制了一种简单而准确的毛细管电泳多重QC-PCR技术,该技术简易且敏感度高。REONA等^[42]开发了一种新型的实时荧光定量PCR技术,能够定量地检测转基因玉米3272的品系特异性。仇有文等^[43]采用实时荧光定量PCR技术检测耐除草剂转基因大豆A5547-127,并对其精确度和准确度指标进行了评估。

数字PCR(dPCR)是近年来被引起重视并迅速发展起来的一种突破性的核酸定量分析技术。该技术先将核酸模板进行稀释,分配到大量独立的反应单元中,使每个反应单元中只有单个模板分子,然后进行PCR扩增反应,扩增结束后对每个反应室的荧光信号进行统计学分析,定量DNA拷贝数^[44-46]。任怡菲等^[47]基于转基因水稻LL62品系外源插入片段和水稻基因组DNA的3端旁侧序列设计了数字PCR检测体系,建立了精准定量检测方法。

普通PCR技术通常有一些缺点,它容易受很多因素的影响,致使检测结果不准确,会出现假阳性与假阴性结果等。针对这些缺陷,许多学者对普通PCR进行了改进,形成了一些新的PCR技术。例如,多重PCR具有节省时间、降低成本和提高效率等优点^[48-49];QC-PCR方法简易且敏感度高;荧光定量PCR具有特异性好、灵敏度高、线性关系好、线性范围宽、操作简单安全、自动化程度高等优点^[50-51];数字PCR准确度高,重现性好,可以实现绝对定量分析^[52-53]。

本团队在PCR检测技术方面研究较多。XU等^[54]提出一个高效可溯源的PCR策略,该方法采用随机破碎的片段,将5端作为基因组步移的起始端,克服了基于PCR技术的染色体步移技术重现性差、效率低和非特异性缺陷。SHANG等^[55]运用两种自编译软件,并依据PCR检测技术分析了5种典型生物体中常见的13种限制性内切酶,并获得了酶切割点。ZHU等^[56-57]和FU等^[58]以GA21为试验

对象,利用数字 PCR 检测法对其动态范围、定量极限、敏感性和特异性进行评估,结果表明,定量极限为 0.5%,敏感性为 0.1%;使用数字 PCR 检测技术对 7 种转基因过程进行检测,检测结果表明定量极限、检测极限与特异性这种组合方式被证明是最好的;以 CaMV35s 启动子和 NOS 终止子作为分析模板,利用数字 PCR 技术分析 MON810、MON863、TC1507、MIR604、MIR162、GA21、T25、NK603 和 Bt176 9 种转基因过程来确定使用方法的特异性,结果表明,该方法的定量极限是 0.1%。

2.2.2 基因芯片检测技术

基因芯片最初是由核酸的分子杂交衍生而来的,即应用已知序列的核酸探针对未知顺序的核酸序列进行杂交检测^[59]。黄迎春等^[60]制备了转基因作物检测型基因芯片,并利用该芯片对 4 种转基因水稻、木瓜、大豆、玉米进行检测,结果表明,该芯片能对转基因作物做出快速、准确的检测。NISHIZAWA 等^[61]以转基因油菜的环境风险评估为前提,为了简化其检测方法,使用基因芯片技术对拟南芥 ATH1 基因序列进行了检测。BAI 等^[62]利用基因芯片技术检测出 6 种转基因玉米品系(Bt11、Bt176、GA21、MON810、NK603、T25)。

目前,基因芯片检测技术并未得到广泛应用,受限制的主要因素为:检测装置成本昂贵;需要对收集到的信息进行大规模数据处理、分析;需要较高的处理能力。

2.2.3 等温扩增技术

等温扩增(Isothermal amplification)是扩增反应保持反应温度不变的广义 PCR 技术。等温扩增最大的特点在于不需要温度变化,简易加热装置即可满足要求。目前主要的等温扩增技术包括环介导等温扩增(Loop mediated isothermal amplification, LAMP)、链置换扩增(Strand displacement amplification, SDA)、解旋酶依赖性等温扩增(Helicase-dependent amplification, HDA)等。

环介导等温扩增技术通过识别靶序列上 6 个特异区域的引物和一种具有链置换的 DNA 聚合酶,在恒温条件下能特异、高敏、快速地扩增靶序列^[63]。SHEN 等^[64]运用快速环介导等温扩增法来检测转基因棉花和大米中的 cry1A 基因,使用 5 株含有或者没有 cry1A 基因的 Bt 菌株,通过 15 个试验来分析 LAMP 和 PCR 2 种技术的区别。本团队在环介导等温扩增技术方面取得了一定的研究进展,HUANG 等^[65]运用定量环介导等温扩增技术检测了转基因玉米 MON863。

SDA 是一种基于酶促反应的 DNA 体外等温扩

增技术。其基本系统包括一种限制性核酸内切酶、一种具有链置换活性的 DNA 聚合酶、两对引物、dNTP 以及钙、镁离子和缓冲系统。其基本过程包括准备单链 DNA 模板、生成两端带酶切位点的目的 DNA 片段、SDA 循环 3 个阶段^[66]。

HDA 法的原理是:先用解旋酶解开双链 DNA;再依靠单链 DNA 结合蛋白(SSB)与模板单链结合,使模板单链处于单链状态,完整性不被破坏;最后引物与模板杂交,在 DNA 聚合酶催化下扩增,新生的 dsDNA 产物作为底物进入下一轮扩增^[67]。ZAHRADNIK 等^[68]通过研究表明 HDA 试验能够准确地检测出低至 0.5% 的转基因玉米中 linesMON810、NK603 和 Bt11 的含量。章晶晶等^[69]以 CaMV35S、NOS 与 CP4-EPSPS 3 种外源基因和内源基因 Lectin(大豆凝集素基因)为目的片段,设计了 4 对特异引物,建立反应体系,通过 HDA 方法对内源基因和 3 种外源基因的检测特异性和灵敏度进行试验,并对结果进行同源性分析。

通过比较,可以发现这 3 种等温扩增技术各具特点。与普通 PCR 相比,LAMP 具有特异性强、灵敏度高、反应时间短、设备简单及产物检测方便等优点^[70-71]。其缺点是:由于 LAMP 扩增是链置换合成,靶序列长度最好在 300 bp 以内,长度大于 500 bp 的序列扩增则较困难,即不能进行长链 DNA 的扩增。LAMP 由于其灵敏度极高,因此容易因受到污染而产生假阳性结果;在产物的回收鉴定、克隆、单链分离方面不如传统的 PCR 技术。SDA 技术的优点是扩增效率高,反应时间短,目标基因能 15 min 内扩增 109~1 010 倍^[72]。SDA 存在的缺陷是:SDA 产物不唯一,由于在 SDA 循环中总要产生一些不同的单、双链产物,这使得用电泳法检测 SDA 扩增产物时必然会出现拖尾现象。SDA 产物的两端必然带有所用核酸内切酶的识别序列或其残端,因而 SDA 产物不可能直接用于克隆。只用电泳法检测,尚不够如意^[66]。HDA 的优点是反应时间短,同时该技术采用 BstDNA 聚合酶,该酶耐高温、反应进行性高、极好的条带均一性及准确性高,与其他恒温基因扩增技术相比,HDA 是一种真正做到在恒温下进行反应的扩增技术^[73]。HDA 的缺点是目前对于该技术的研究较少,且发展不够成熟,还没有在基因扩增等方面的应用。

2.2.4 第二代测序技术

第二代测序技术(Next-generation sequencing, NGS),又叫高通量测序技术,其应用原理是边合成边测序^[74]。第二代测序技术通过基因组破碎、末端补平、接头连接、扩增测序等步骤获得片段两侧的序

列信息,从而获得序列的重测序结果。FRITSCH 等^[75]比较了第二代测序技术与竞争性荧光 PCR,结果发现第二代测序技术比竞争性荧光 PCR 更加快捷。WAHLER 等^[76]利用第二代测序技术分析了欧盟已批准上市的转基因水稻外源基因插入位点,并且使用重测序拼接的新基因组分析了外源基因的全部信息。

第二代测序技术的优点是检测快速,效率高,能够降低成本^[77-78]。它不仅可以检测常规分子,还可以分析多倍体基因组,能够解决多倍体基因组序列信息不全及工作量大的难题,该技术将来可用于多倍体基因组转基因插入位点的检测^[79]。其缺点是数据量大,过程繁琐,故没有被广泛应用。

2.3 其他检测技术

纳米技术与生物学、免疫学等技术结合应用于转基因食品快速检测是近年来的研究趋势。目前国内外在该领域的研究以磁分离技术在生物分子的快速分离、富集以及快速检测领域的应用研究为主^[80]。磁性分离技术(MS)是指利用磁性纳米材料的超顺磁性,通过对纳米颗粒的表面修饰,使功能化磁性纳米粒子的表面配体与受体之间的特异相互作用来实现对靶向生物目标的快速分离^[81],是一种基于固相载体的综合分离生物分子的新型分离技术。磁性纳米微粒是指含有磁性金属或金属氧化物的超细粉末且具有磁响应性的纳米级粒子,具有独特的超顺磁性能^[82]。

目前,纳米技术只限于检测小片段的 DNA 或 RNA 分子,对于深加工转基因食品中存在的小片段有很好的检测效果。对于普通转基因食品中的作物成分,则需要更长的可检测的模板长度,这仍需要进行进一步研究。虽然这些技术还处于研究初期,没有广泛用于转基因食品检测,但这些新技术能够克服现有荧光试剂在特异性、准确性及高背景值等方面的不足,因此,应用新材料辅助的定量方法具有更好的应用前景^[83]。

3 复合性状转基因作物及产品溯源技术

溯源系统(Traceability system)是在产品供应整个过程中对产品的各种相关信息进行记录存储的质量保障系统^[84],其目的是在产品质量出现问题时,能够快速有效地查询到产生问题的原料或加工环节,必要时进行产品召回,实施有针对性的惩罚措施,由此来提高产品质量水平^[85]。农产品溯源系统是追踪农产品(包括食品、饲料等)进入市场各个阶段(从生产到流通的全过程)的系统,有助于质量控制和保障食品安全^[86-87]。我国农产品溯源体系正

处于起步阶段,现有的许多溯源系统存在不少问题,主要有:溯源过程中责任主体过于庞大以至于溯源精度不够细致;溯源广度较窄,只涉及从生产环节到消费环节中的一个或几个环节,无法实现全过程溯源;一般在溯源系统中使用条码技术来标识不同的追溯主体,但条码存在易污染、耐久性差、读取时间长、距离短等一系列问题^[88]。

3.1 物联网技术

物联网(Internet of things)将相关物品通过信息传感设备,如射频识别装置、红外感应器、全球定位系统和激光扫描器等,与互联网结合起来,实现了智能化识别和管理^[89-90]。物联网由感知层、网络层和应用层 3 部分构成^[91]。感知层实现物联网全面感知的核心能力,实现物理世界信息的采集、自动识别和智能控制;网络层也称网络传输层,主要负责传输和处理由感知层获取的信息;应用层也称应用处理层,主要功能包括对业务的分析整合、共享、智能处理和管理等,同时与行业需求相结合,实现物联网的智能应用^[92]。在现代农业领域,物联网可用来监视农作物灌溉情况、空气温湿度、畜禽的环境状况以及大面积的地表检测,自动收集温度、湿度、风力、大气、降雨量等数据,为研究人员进行科学分析提供基础数据^[93-94]。

近年来,射频识别技术(Radio frequency identification,RFID)作为一种操作简单、便捷实用的应用技术,已经被广泛应用于交通管理、物流运输、医药及食品生产等行业,它在食品溯源系统中的应用已成为食品安全的重要保障^[95-96]。一个 RFID 一般由阅读器和能够附着于标识对象上的 RFID 标签(电子标签)组成,其原理是利用电磁耦合,通过无线射频信号把存储在 RFID 标签中的信息发送到阅读器中^[97-98]。目前,国内外学者已在价值较高的畜禽产品如鸡蛋、生猪、水产品、水果等上开展了基于 RFID 技术的应用研究,而目前我国的蔬菜供应链主要是由众多分散的彼此独立的中小企业组成,现有集中溯源系统还难以满足统一溯源的需求^[99-100]。

无线射频技术的优点是:操作过程不受环境因素干扰、不需人工查找,可录入容量大且结构复杂的数据。目前看来,虽然 RFID 技术应用于食品安全追溯领域中的优势突出,但仍存在一些问题,如制定统一标准问题、成本过高问题,数据传输分析问题等^[101-102]。

3.2 转基因作物及产品数据库构建

据资料显示,目前已有许多国家和国际组织在筹划建设转基因生物与食品数据库,目前数量已达

到数十个。其中内容比较完整的有美国食品药品监督管理局(FDA)获得商品化生产许可的 GMO 数据库、加拿大的农业与生物技术网转基因作物数据库、国际组织如经济合作发展组织(OECD)的转基因植物田间试验数据库与生物技术产品数据库。SCOTT 等^[103]构建了转基因植物监测(TPM)数据库,该数据库能够有效地记录、监控和分析在植物组织培养和转换试验中产生的大量复杂的数据。TPM 数据库以 Access 数据库引擎为基础,能够让其他用户使用。

基于 RFID、物联网技术构建可溯源系统的研究逐渐增多,但是这些研究大多数针对食品安全检测,而对转基因作物溯源系统的研究并不多,关于复合性状转基因作物的可溯源系统的研究则几乎没有。究其原因,可能是构建一个复合性状转基因可溯源系统比较复杂,而现在的技术还不够成熟。

3.3 溯源系统开发及本团队研究基础

随着转基因生物技术的不断发展,它已经逐渐渗透到社会的各个领域,尤其在农业育种方面,做出了巨大的贡献。到目前为止,全球已经研制了 200 多种复合性状转基因作物,这些作物可能存在一些不安全因素,为了防止人们食用这些转基因作物及其产品时受到危害,有必要建立一个溯源系统,以便找出问题出现的环节,从而为这些产品的质量把关。

对于溯源系统的设计与开发,可以通过不同的技术来实现。雍凌^[104]使用 Microsoft SQL Server 2000 系统,基于 JDK 1.5 环境的 JAVA 语言和 hibernate + spring + struts 开发框架,建立起一个数据库和软件系统,再将现有的转基因作物相关信息填充到数据库中,开发了溯源和直报软件。该数据库目前已收集到世界上关于已上市和已获批准证书的多种转基因作物比较全面的信息。转基因作物信息数据库与溯源和直报软件可以通过注册用户、提交信息来对数据库中的信息进行更新。姜志刚^[105]以浙江省舟山口岸转基因农产品为研究对象,建立了基于 WebGIS 的转基因农产品溯源系统,该系统主要实现了转基因农产品的产地溯源、转基因作物基因风险评估、专题图的制作与数据库查询四项功能。

本团队在食品溯源系统的构建方面取得了一些研究进展。张领先等^[106-109]采用 B/S(浏览器/服务器)模式结构体系,基于 RFID 技术构建了肉牛养殖可追溯系统;提出了建设基于 3G 技术的蔬菜可追溯系统;设计了基于 Web 的可追溯系统,并利用 RFID、二维码、asp. net、组件开发等技术实现了可追溯;建立了基于 Web 的蔬菜质量安全可追溯系统。李鑫星等^[110]以转基因玉米为例,构建出完善的转

基因作物及产品全程溯源模型,并设计开发了转基因作物及产品全程溯源系统。

4 研究趋势与展望

随着转基因工程技术的发展,转基因分析检测技术也在不断地进步。一些新兴的检测技术不断出现并发展,检测的准确度和灵敏性也不断地提高。同时,转基因溯源技术也在不断地发展,在溯源系统开发方面的研究越来越多,使用的开发技术也多种多样。

(1)目前,单一品系转基因作物检测技术逐渐向高通量、高准确度和高灵敏度方向发展。而对于复合性状转基因作物的检测方法主要有单粒多重法和多元统计定量 PCR。其中,单粒多重法目前还无法实现混合样品中各组分的绝对定量;而多元统计定量法虽可以对混合样品中的复合性状组分进行绝对定量,但是样品基质的复杂性决定了该方法会存在一定的组间偏差,另外本试验的工作量会随复合性状品系复杂程度的提高而升高。因此,与传统单一性状转基因作物检测技术相比,复合性状转基因作物的检测技术现在还不够成熟,还没有一套完整的检测技术体系。无法实现对复合性状转基因作物的快速田间检测,另外,对复杂混合样品中复合性状转基因作物的定量分析还缺少系统深入的研究。与此同时,一些新型的检测方法正在发展,如基因芯片技术、纳米技术、生物传感器技术等。虽然现阶段还不够成熟,但随着研究的不断深入,在未来也可能成为检测复合性状转基因作物的重要方法。

(2)溯源系统已经不再只是基于单纯的计算机技术开发,更多是与信息技术相结合。目前,基于物联网和 RFID 技术的溯源系统开发的研究逐渐增多,同时,还有一些基于二维码技术、Android 系统、WebGIS 等开发的溯源系统也开始出现,但是这些研究相对较少。由于 RFID 技术在追溯领域中的应用优势突出,所以在未来一段时间 RFID 技术会成为溯源系统开发的一种主要技术,但由于它也有一些固有缺陷,因此可以与其他技术相结合使用,做到取长补短。

(3)现在溯源系统的开发越来越倾向于将几种信息技术融合在一起使用,这样能够更好地发挥这些技术的优势,避开它们的缺点,这些技术趋势也同样适用于转基因作物及产品。例如:将 RFID 与二维码结合使用,既能够保留 RFID 自身的优点,又能够避免 RFID 成本高的缺陷,效果会比只使用其中一种更好;对于涉及地理位置的溯源系统,可以把物联网技术与 GIS 相结合,实现对空间地理信息的查

询;为了方便用户的使用,可以将溯源系统做成手机 APP,目前基于 Android 系统的溯源系统 APP 已有研究人员做过相关研究和开发。随着转基因技术的

日新月异和转基因农产品种类的日益增多,这些技术将来在转基因作物及其产品溯源系统开发中的应用也会越来越多。

参 考 文 献

- 1 HALPIN C. Gene stacking in transgenic plants-the challenge for 21st century plant biotechnology[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2005, 3(2):141-155.
- 2 HALPIN Claire, BARAKATE Abdellah, ASKARI B M, et al. Enabling technologies for manipulating multiple genes on complex pathways[J]. *Plant Molecular Biology*, 2001, 47(1-2): 295-310.
- 3 MUWONGEA Abubaker, TRIPATHIC Jaindra, KUNERT Karl, et al. Expression stacked HRAP and PFLP genes in transgenic banana has no synergistic effect on resistance to *Xanthomonas* wilt disease[J]. *South African Journal of Botany*, 2016,104: 125-133.
- 4 GUO Mei, RUPE Mary A, WEI Jun, et al. Maize ARGOS1 (ZAR1) transgenic alleles increase hybrid maize yield[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(1): 249-260.
- 5 MICHAEL Groszmann, REBECA Gonzalez-Bayona, REBECCA L, et al. Hormone-regulated defense and stress response networks contribute to heterosis in Arabidopsis F1 hybrids[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015,112(46): E6397-E6406.
- 6 KUIPER H A, KÖNIG A, KLETER G A, et al. Safety assessment, detection and traceability, and societal aspects of genetically modified foods. European Network on Safety Assessment of Genetically Modified Food Crops (ENTRANSFOOD). Concluding remarks[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2004, 42(7): 1195-1202.
- 7 KANG Qing, VAHL Christopher I. Statistical analysis in the safety evaluation of genetically-modified crops: equivalence tests[J]. *Crop Science*, 2014, 54(5): 2183-2200.
- 8 VAHL C I, KANG Q. Equivalence criteria for the safety evaluation of a genetically modified crop: a statistical perspective[J]. *Journal of Agriculture Science*, 2016, 154(3): 383-406.
- 9 STEIJVEN Karin, STEFFAN-DEWENTER Ingolf, HAERTEL Stephan. Testing dose-dependent effects of stacked Bt maize pollen on in vitro-reared honey bee larvae[J]. *Apidologie*, 2016, 47(2): 216-226.
- 10 HUANG Yao, LI Jikun, QIANG Sheng, et al. Transgenic restorer rice line T1c-19 with stacked *cry1C**/*bar* genes has low weediness potential without selection pressure[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2016, 15(5): 1046-1058.
- 11 LADICS Gregory S, BARTHOLOMAEUS Andrew, BREGITZER Phil, et al. Genetic basis and detection of unintended effects in genetically modified crop plants[J]. *Transgenic Research*, 2015, 24(4): 587-603.
- 12 刘柳, 向钱, 李宁, 等. 复合性状转基因植物安全性评价[J]. *中国食品卫生杂志*, 2011, 23(2): 177-180.
- 13 BARTHOLOMAEUS A, PARROTT W, BONDY G, et al. The use of whole food animal studies in the safety assessment of genetically modified crops: limitations and recommendations[J]. *Critical Reviews in Toxicology*, 2013, 43(2): 1-24.
- 14 SNELL C, BERNHEIM A, BERGÉ J B, et al. Assessment of the health impact of GM plant diets in long-term and multigenerational animal feeding trials: a literature review[J]. *Food & Chemical Toxicology*, 2011, 50(3-4):1134-1148.
- 15 陈红华, 田志宏. 国内外农产品可追溯系统比较研究[J]. *商场现代化*, 2007(2): 5-6.
- 16 中国稻米编辑部. 2010 年转基因作物种植国家种植品种及面积[J]. *中国稻米*, 2011, 17(6): 65.
- 17 农业工程编辑部. 2011 年全球转基因作物种植面积继续扩大[J]. *农业工程*, 2012, 2(2): 100.
- 18 ISAAA. 2012 年转基因作物种植面积再创新高[J]. 吕聪, 译. *中国农药*, 2013(7): 13-19.
- 19 中国经济网. 2013 年中国转基因作物种植面积位居世界第 6 [J]. *福建农业科技*, 2014(1): 59.
- 20 JAMES Clive. 2014 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*, 2015, 35(1): 1-14.
- 21 JAMES Clive. 2015 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*, 2016, 36(4): 1-11.
- 22 JAMES Clive. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2011[R]. ISAAA. Brief 43-2011.
- 23 吴廖. 转基因作物全球商业化 20 年[J]. *科学新闻*, 2016(6): 71-73.
- 24 朱鹏宇, 黄昆仑, 商颖, 等. 全球复合性状转基因作物监管制度的比较分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2014, 5(8): 2538-2543.
- ZHU Pengyu, HUANG Kunlun, SHANG Ying, et al. The comparison and analysis of global stacked transgenic plant ruling regulations[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2014, 5(8):2538-2543. (in Chinese)
- 25 刘培磊, 李宁, 程金根. 不同国家和地区复合性状转基因作物安全评价管理的比较[J]. *农业科技管理*, 2008, 27(3): 23-26.
- 26 王宇, 沈文星. 国内外转基因作物发展状况比较分析[J]. *江苏农业科学*, 2014, 42(6): 6-9.
- 27 柳晓丹, 许文涛, 黄昆仑, 等. 复合性状转基因植物安全性评价的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2016, 32(6): 1-6.
- 28 左泽彦, 孙端方. 转基因玉米检测技术评价[J]. *山东化工*, 2015, 44(4): 58-64.
- 29 王荣谈, 张建中, 刘冬儿, 等. 转基因产品检测方法研究进展[J]. *上海农业学报*, 2010, 26(1): 116-119.
- 30 FAGAN J, SCHOEL B, HAEGERT A, et al. Performance assessment under field conditions of a rapid immunological test for transgenic soybeans[J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2001, 36(4): 357-367.
- 31 TESHIMA Hiroshi, YANO Kazuyoshi, MOROZUMI Satoshi. A detection method of CryIAC protein for identifying genetically modified rice using the lateral flow strip assay[J]. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 2006, 47(3): 111-114.
- 32 水小溪, 蔡乐, 赵宝华. ELISA 技术在食品安全检测中的应用[J]. *生命科学仪器*, 2008, 6(10): 51-54.

33 WANG Min, ZHANG Liang, ZHANG Wei, et al. Development of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for phosphinothricin acetyl transferase protein of genetically modified crops [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2013, 41(10): 1555–1560.

34 刘光明, 苏文金. 应用间接 ELISA 方法定量检测转基因抗虫玉米 [J]. 无锡轻工大学学报, 2003, 22(1): 49–52, 60. LIU Guangming, SU Wenjin. Quantitative detection of genetically modified insecticidal maize by ELISA [J]. Journal of Wuxi University of Light Industry, 2003, 22(1): 49–52, 60. (in Chinese)

35 CHOI Jongmin, PHAT Chanvorleak, KIM Eunji, et al. Improved detection of cucumber mosaic virus coat protein (CMV-CP) in genetically modified pepper (*Capsicum annuum*) using a polyclonal antibody to a synthetic CP peptide [J]. Horticulture, Environment, and Biotechnology, 2015, 56(3): 316–323.

36 秦崇涛. 转基因水稻中 Bt 蛋白 ELISA 检测方法的建立及检测 [D]. 福州: 福建农林大学, 2002.

37 龚宏伟. 转基因农产品检测前沿技术及应用 [J]. 甘肃农业, 2010(12): 34–35, 40.

38 林梅, 宋璐璐, 毛国军. PCR 技术的研究进展 [J]. 大众科技, 2007(11): 109–110.

39 RASHMI Chhabra, GURINDER Jit Randhawa, RAJESH Bhoge K, et al. Qualitative and quantitative PCR-based detection methods for authorized genetically modified cotton events in India [J]. Journal of AOAC International, 2014, 97(5): 1299–1309.

40 陈贞. 转基因作物的多重 PCR 检测体系的研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2011.

41 HOLCK Askild Lorentz, PEDERSEN Brit Opegard. Simple, sensitive, accurate multiplex quantitative competitive PCR with capillary electrophoresis detection for the determination of genetically modified maize [J]. European Food Research and Technology, 2011, 233(6): 951–961.

42 REONA Takabatake, TOMOKO Masubuchi, SATOSHI Futo, et al. Selection of suitable DNA extraction methods for genetically modified maize 3272, and development and evaluation of an event-specific quantitative PCR method for 3272 [J]. Food Hygiene and Safety Science, 2016, 57(1): 1–6.

43 仇有文, 张明辉, 于艳波, 等. 实时荧光定量 PCR 技术在转基因大豆 A5547–127 检测中的应用 [J]. 东北农业大学学报, 2013, 44(7): 6–10. QIU Youwen, ZHANG Minghui, YU Yanbo, et al. Application of real-time PCR technique in detection of genetically modified soybean A5547–127 [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2013, 44(7): 6–10. (in Chinese)

44 李春勇. 数字 PCR 技术原理及应用 [J]. 生物技术世界, 2014(11): 10–12.

45 林彩琴, 姚波. 数字 PCR 技术进展 [J]. 化学进展, 2012(12): 2415–2423.

46 詹成, 燕丽, 王琳, 等. 数字 PCR 技术的发展和应 [J]. 复旦学报, 2015, 42(6): 786–789. ZHAN Cheng, YAN Li, WANG Lin, et al. The development and application of digital PCR [J]. Fudan University Journal of Medical Sciences, 2015, 42(6): 786–789. (in Chinese)

47 任怡菲, 高琴, 邓婷婷, 等. 基于数字 PCR 的转基因水稻 LL62 品系精准定量检测方法建立 [J]. 生物技术通报, 2016, 32(8): 69–76. REN Yifei, GAO Qin, DENG Tingting, et al. Establishment of precisely quantitative method of genetically modified rice LL62 based on digital PCR [J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(8): 69–76. (in Chinese)

48 LI Yongjin, XIONG Tao, WU Huawei, et al. Visual DNA microarray coupled with multiplex-PCR for the rapid detection of twelve genetically modified maize [J]. BioChip Journal, 2016, 10(1): 42–47.

49 LU J, JI G Z, LI G, et al. Development of a multiplex event-specific PCR assay for detection of genetically modified rice [J]. Cereal Research Communications, 2016, 44(1): 47–56.

50 HEID Christian A, STEVENS Junko, LIVAK J, et al. Real time quantitative PCR [J]. Genome Research, 1996, 6(10): 986–994.

51 PENG Cheng, WANG Pengfei, XU Xiaoli, et al. Development of a qualitative real-time PCR method to detect 19 targets for identification of genetically modified organisms [J]. Springer Plus, 2016, 5(1): 889.

52 AZUKA Iwobi, LARS Gerdes, ULRICH Busch, et al. Droplet digital PCR for routine analysis of genetically modified foods (GMO)—a comparison with real-time quantitative PCR [J]. Food Control, 2016, 69: 205–213.

53 马路遥. 环介导等温扩增技术检测转基因油菜 RT73 [D]. 长春: 吉林大学, 2013.

54 XU Wentao, SHANG Ying, ZHU Pengyu, et al. Randomly broken fragment PCR with 5′end-directed adaptor for genome walking [J]. Scientific Reports, 2013, 3: 3465.

55 SHANG Ying, ZHANG Nan, ZHU Pengyu, et al. Restriction enzyme cutting site distribution regularity for DNA looping technology [J]. Gene, 2014, 534(2): 222–228.

56 ZHU Pengyu, WANG Chenguang, HUANG Kunlun, et al. A novel pretreatment-free duplex chamber digital PCR detection system for the absolute quantitation of GMO samples [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(3): 1–15.

57 ZHU Pengyu, FU Wei, WANG Chenguang, et al. Development and application of absolute quantitative detection by duplex chamber-based digital PCR of genetically modified maize events without pretreatment steps [J]. Analytica Chimica Acta, 2016, 916: 60–66.

58 FU Wei, ZHU Pengyu, WANG Chenguang, et al. 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.

59 张骞, 盛军. 基因芯片技术的发展和应 [J]. 中国医学科学院学报, 2008, 30(3): 344–347. ZHANG Qian, SHENG Jun. Development and application of gene chip technology [J]. Acta Academiae Medicinae Sinicae, 2008, 30(3): 344–347. (in Chinese)

- 60 黄迎春,孙春昀,冯红,等. 利用基因芯片检测转基因作物[J]. 遗传,2003,25(3): 307-310.
HUANG Yingchun, SUN Chunyun, FENG Hong, et al. Detection of transgenic crop with gene chip[J]. Hereditas, 2003, 25(3): 307-310. (in Chinese)
- 61 NISHIZAWA Toru, TAMAOKI Masanori, KANEKO Yukio, et al. High-throughput capture of nucleotide sequence polymorphisms in three brassica species (brassicaceae) using DNA microarrays[J]. American Journal of Botany, 2012, 99(3): E94-E96.
- 62 BAI S, ZHANG J, LI S, et al. Tetection of six genetically modified maize lines using optical thin-film biosensors chips[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2010, 58(15): 8490-8494.
- 63 NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): E63.
- 64 SHEN Peili, GENG Fengzhen, YU Yan, et al. A rapid loop-mediated isothermal amplification method for detection of the modified GM cry1A gene in transgenic insect-resistant cotton and rice[J]. Food Control, 2016, 62: 357-364.
- 65 HUANG Sicong, XU Yuancong, YAN Xinghua, et al. Development and application of a quantitative loop mediated isothermal amplification method for detecting genetically modified maize MON863[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2015, 95(2): 253-259.
- 66 蒋天伦,赵树铭,府伟灵. 链置换扩增术(SDA)及其进展[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册,1999,20(5): 196-198.
- 67 陈云芳,詹国辉,高渊. 核酸恒温扩增技术的原理及其应用[J]. 西南林学院学报,2010,30(增刊): 30-40.
CHEN Yunfang, ZHAN Guohui, GAO Yuan. Principle and application of isothermal DNA amplification[J]. Journal of Southwest Forestry University, 2010, 30(Supp.): 30-40. (in Chinese)
- 68 ZAHRADNIK Celine, KOLM Claudia, MARTZY Roland. Detection of the 35S promoter in transgenic maize via various isothermal amplification techniques: a practical approach[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014, 406(27): 6835-6842.
- 69 章晶晶,王赞,张翠侠,等. 应用依赖解旋酶 DNA 扩增技术检测转基因大豆[J]. 食品科学,2016, 37(4): 164-168.
ZHANG Jingjing, WANG Zan, ZHANG Cuixia, et al. Detection on genetically modified soybean by helicase-dependent isothermal DNA amplification assay[J]. Food Science, 2016, 37(4): 164-168. (in Chinese)
- 70 黄火清,郁昂. 环介导等温扩增技术的研究进展[J]. 生物技术,2012,22(3): 91-94.
HUANG Huoqing, YU Ang. Advances of loop-mediated isothermal amplification[J]. Biotechnology, 2012, 22(3): 91-94. (in Chinese)
- 71 朱琳峰,彭焕,黄文坤,等. 抗草甘膦转基因大豆 Cp4-epsps 基因快速简便的 LAMP 检测方法[J]. 植物保护,2015, 41(3):86-92.
- 72 GUO Q, YANG X, WANG K, et al. Sensitive fluorescence detection of nucleic acids based on isothermal circular strand-displacement polymerization reaction[J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37(3):E20.
- 73 贾辉,胡兰,马晓威. 依赖解旋酶 DNA 等温扩增技术的研究进展[J]. 新农业, 2015(9):9-10.
- 74 SHENDURE J, JI H. Next-generation DNA sequencing[J]. Nature Biotechnology, 2008, 26(10): 1135-1145.
- 75 FRITSCH L, FISCHER R, WAMBACH C, et al. Next-generation sequencing is a robust strategy for the high-throughput detection of zygosity in transgenic maize[J]. Transgenic Research, 2015, 24(4):1-9.
- 76 WAHLER D, SCHAUSER L, BENDIEK J, et al. Next-generation sequencing as a tool for detailed molecular characterisation of genomic insertions and flanking regions in genetically modified plants: a pilot study using a rice event unauthorised in the EU[J]. Food Analytical Methods, 2013, 6(6):1718-1727.
- 77 GUTTIKONDA Satish K, MARRI Pradeep, MAMMADOV Jafar, et al. Molecular characterization of transgenic events using next generation sequencing approach[J]. PLoS ONE, 2016, 11(2): 23-46.
- 78 KOVALIC David, GARNAAT Carl, GUO Liang, et al. The use of next generation sequencing and junction sequence analysis bioinformatics to achieve molecular characterization of crops improved through modern biotechnology[J]. Plant Genome, 2012, 5(3): 149-163.
- 79 BRENCHELEY R, SPANNAGL M, PFELFER M, et al. Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing[J]. Nature, 2012, 491: 705-710.
- 80 翁仕强,潘迎捷,赵勇,等. 纳米技术在食品安全快速检测中的应用[J]. 渔业现代化,2009,36(3): 56-59.
WENG Shiqiang, PAN Yingjie, ZHAO Yong, et al. Application of nanotechnology to rapid detection of food safety[J]. Fishery Modernization, 2009, 36(3): 56-59. (in Chinese)
- 81 ŠAFARÍK I, ŠAFARÍKOVÁ M. Magnetic nanoparticles and biosciences[J]. Monatshefte Fuer Chemie-Chemical Monthly, 2002, 133(6):737-759.
- 82 LIU Z L, WANG H B, LU Q H, et al. Synthesis and characterization of ultrafine well-dispersed magnetic nanoparticles[J]. Journal of Magnetism & Magnetic Materials, 2004, 283(2-3):258-262.
- 83 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 Chenguang, XU Wentao, HUANG Kunlun, et al. Recent progress in techniques for the detection and analysis of genetically modified foods[J]. Food Science, 2014, 35(21):297-305. (in Chinese)
- 84 SMITH G C, TATUM J D, BELK K E, et al. Traceablity from a US perspective[J]. Meat Science, 2005, 71: 174-193.
- 85 白红武,孙爱东,陈军,等. 基于物联网的农产品质量安全溯源系统[J]. 江苏农业学报,2013,29(2): 415-420.
BAI Hongwu, SUN Aidong, CHEN Jun, et al. Agricultural products traceability system for quality and safety based on internet of things[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2013, 29(2): 415-420. (in Chinese)

86 VELANDIA Diana M Segura, KAUR Navjot, WHITTOW William G, et al. Towards industrial internet of things: crankshaft monitoring, traceability and tracking using RFID[J]. Robotics and Computer-Integrated Manufacturing, 2016, 41: 66 – 67.

87 AMENTA M, FABRONI S, COSTA C, et al. Traceability of ‘Limone di Siracusa PGI’ by a multidisciplinary analytical and chemometric approach[J]. Food Chemistry, 2016, 211: 734 – 740.

88 王祖乐,宋波,肖瑜,等. 农产品质量溯源系统的研究[J]. 成都信息工程学院学报,2011,26(1): 77 – 80.
WANG Zule, SONG Bo, XIAO Yu, et al. Research on the tracing system of agricultural products[J]. Journal of Chengdu University of Information Technology, 2011, 26(1): 77 – 80. (in Chinese)

89 查贵庭,胡以涛,陆天珺. 物联网技术在农业专家工作站中的应用[J]. 江苏农业科学,2012,40(3): 351 – 353.

90 BORGIA Eleonora, GOMES Danielo G, LAGESSE Brent. Special issue on “internet of things: research challenges and solutions” [J]. Computer Communications, 2016, 89 – 90: 1 – 4.

91 葛文杰,赵春江. 农业物联网研究与应用现状及发展对策研究[J/OL]. 农业机械学报,2014,45(7):222 – 230. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?flag=1&file_no=20140735&journal_id=jcsam. DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2014.07.035.

GE Wenjie, ZHAO Chunjiang. State-of-the-art and developing strategies of agricultural internet of things[J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2014, 45(7):222 – 230. (in Chinese)

92 戴克锋. 基于物联网的蔬菜质量安全溯源系统研究[D]. 长沙:中南林业科技大学,2013.

93 LEE I G, KIM Myungchul. Interference-aware self-optimizing WiFi for high efficiency internet of things in dense networks[J]. Computer Communications, 2016, 89 – 90: 60 – 74.

94 WU Minning, ZHANG Xingli, ZHANG Yongheng, et al. Mutton traceability method based on internet of things[J]. Journal of Sensors, 2014, 2014: 1 – 8.

95 蒲皎月,张海辉. 基于 RFID 技术的中小型企业蔬菜溯源系统设计[J]. 农机化研究,2015(4): 207 – 210.
PU Jiaoyue, ZHANG Haihui. Design of modest-size enterprises vegetable traceability system based on RFID technology[J]. Journal of Agricultural Mechanization Research, 2015(4): 207 – 210. (in Chinese)

96 WANG S J, WANG W L, HUANG C T, et al. Improving inventory effectiveness in RFID-enabled global supply chain with grey forecasting model[J]. The Journal of Strategic Information Systems, 2011, 20(3): 307 – 322.

97 王鹏. RFID 阅读器基带处理模块的研究与设计[D]. 南京:南京理工大学,2013.

98 孙明. 基于物联网的食品溯源设计及实现[D]. 北京:中国科学院大学,2015.

99 侯春生,夏宁. RFID 技术在中国农产品质量安全溯源体系中的应用研究[J]. 中国农学通报,2010,26(3): 296 – 298.
HOU Chunsheng, XIA Ning. Applied research on RFID technology in China’s agricultural products quality and safety traceability system[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2010, 26(3): 296 – 298. (in Chinese)

100 钱建平,邢斌,解菁,等. 基于条码溯源电子秤的社区菜店交易管理与追溯系统[J]. 农业机械学报,2015,46(5):273 – 278. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?flag=1&file_no=20150539&journal_id=jcsam. DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2015.05.039.

QIAN Jianping, XING Bin, XIE Jing, et al. Transaction management and traceability system of community vegetable shop based on barcode traceability scales[J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2015, 46(5): 273 – 278. (in Chinese)

101 张榆辉,余永成,蔡水狮. RFID 技术在食品安全溯源方面的应用[J]. 现代食品,2015(19): 54 – 56.

102 ALAVI Seyed Mohammad, BAGHERY Karim, ABDOLMALEKI Behzad, et al. Traceability analysis of recent RFID authentication protocols[J]. Wireless Personal Communications, 2015, 83(3): 1663 – 1682.

103 SCOTT R, CLARK C, MATHEWS A, et al. Transgenic plant monitor (TPM): a relational database for the management and analysis of information in plant tissue culture and transformation laboratories[J]. Molecular Breeding, 2003, 11(2): 121 – 125.

104 雍凌. 食品中转基因作物溯源体系及相关检测技术研究[D]. 北京:中国疾病预防控制中心,2011.

105 姜志刚. 基于 WebGIS 的转基因农产品溯源系统研究——以舟山口岸为例[D]. 杭州:浙江大学,2016.

106 施亮,傅泽田,张领先. 基于 RFID 技术的肉牛养殖质量安全可追溯系统研究[J]. 计算机应用与软件,2010,27(1): 40 – 43.

107 王磊,傅泽田,张领先. 基于 3G 的蔬菜可追溯系统的设计[J]. 微计算机信息,2010,26(36): 96 – 98.

108 李辉,傅泽田,付骁,等. 基于 Web 的蔬菜可追溯系统的设计与实现[J]. 江苏农业学报,2008,24(5): 716 – 719.
LI Hui, FU Zetian, FU Xiao, et al. Design and realization of vegetable traceability system based on Web[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2008, 24(5): 716 – 719. (in Chinese)

109 付骁,傅泽田,张领先. 基于 Web 的蔬菜质量安全可追溯系统[J]. 计算机工程与设计,2009,30(1): 85 – 87,128.
FU Xiao, FU Zetian, ZHANG Lingxian. Vegetable traceability system based on Web[J]. Computer Engineering and Design, 2009, 30(1): 85 – 87, 128. (in Chinese)

110 李鑫星,姚久彬,许文涛,等. 基于工作流网的转基因作物及产品全程溯源系统[J/OL]. 农业机械学报,2016,47(增刊): 366 – 373. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?flag=1&file_no=2016s056&journal_id=jcsam. DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2016.S0.056.

LI Xinxing, YAO Jiubin, XU Wentao, et al. Full traceability system for transgenic crops and products based on workflow net[J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2016, 47(Supp.):366 – 373. (in Chinese)