

改良 LAMP 法检测转基因作物

熊槐¹, 吴凡¹, 冯雪梅¹, 黄昱阳¹, 杜正平¹, 周毅¹, 田文武¹, 曹以诚^{1,2*}

(1. 广州华峰生物科技有限公司, 广州 510663; 2. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510006)

摘要: **目的** 建立简易的可视化环介导等温扩增(LAMP)检测转基因作物的方法。**方法** 通过一对特异的能识别一段正义链和一段反义链的内引物和一对链置换引物, 在 Bst DNA 聚合酶作用下, 以等温条件实现对外源转基因成分的扩增, 反应液和高浓度的显色液 SYBR GREEN I 同时置于特殊设计的反应管中, 反应后可实现闭管可视化检测。**结果** 对转基因作物中常见的外源基因元件胭脂碱合成酶终止子(*T-NOS*)和烟草花叶病毒 35S 启动子(*P-CaMV35S*)进行了 LAMP 检测。*T-NOS* LAMP 对大米品系 BT63, 玉米品系 BT11, MON810, 大豆品系 GTS40-3-2 的检测结果显示呈阳性, *P-CaMV35S* LAMP 对大米品系 BT63, 玉米品系 BT11, MON810, MON863, 大豆品系 GTS40-3-2 的检测结果显示呈阳性, 二者对非转基因大米, 玉米, 大豆的检测结果显示均呈阴性。上述结果表明, 本文中建立的 *T-NOS* 和 *P-CaMV35S* LAMP 检测方法特异性高。另外, 通过对大豆品系 GTS40-3-2 模拟样品的检测, 证明 *T-NOS* LAMP 能检出转基因成分含量为 0.5% 的样品, *P-CaMV35S* LAMP 能检出转基因成分含量为 0.1% 的样品, 检测灵敏度较高。**结论** 改良 LAMP 法灵敏度高, 特异性好, 能用于快速初筛转基因作物。**关键词:** LAMP; 转基因作物; Bst DNA 聚合酶; CaMV35S 启动子; NOS 终止子

Detection of transgenic crops using improved loop-mediated isothermal amplification method

XIONG Huai¹, WU Fan¹, FENG Xue-Mei¹, HUANG Yu-Yang¹, DU Zheng-Ping¹, ZHOU Yi¹, TIAN Wen-Wu¹, CAO Yi-Cheng^{1,2*}

(1. HF Biotech., Inc., Guangzhou 510663, China;

2. Biological Science and Engineering School, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT: Objective To establish a simple visual loop-mediated isothermal amplification (LAMP) detection method for genetically modified (GM) crops. **Methods** Under an isothermal condition, Bst DNA polymerase amplified the target sequences utilizing a pair of inner primers that contained sequences of sense and antisense strands of target DNA and a pair of displacement primers. The reaction mixture and a high concentration of fluorescent dye SYBR GREEN I were placed together in a specially designed reaction tube and the reaction results could be visually detected in the closed tube. **Results** In this experiment, the exogenous elements nonpaline synthase terminator (*T-NOS*) and tobacco mosaic virus 35S promoter (*P-CaMV35S*), which are common in GM crops, were detected by LAMP method. Rice event BT63, maize events BT11, MON863 and soybean event GTS40-3-2 gave *T-NOS* positive results, rice event BT63, maize event BT11, MON810, MON863 and soybean event GTS40-3-2 showed *P-CaMV35S* positive results. The *T-NOS* LAMP and *P-CaMV35S* LAMP results of non-GM rice, maize and soybean were negative. These results indicate that the *T-NOS* and *P-CaMV35S* LAMP detection methods established in this paper were highly specific. In addition, through the detection of GM soybean event GTS40-3-2 simulation samples, it was shown that the sensitivity of

*通讯作者: 曹以诚, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 广州华峰生物科技有限公司总经理兼董事长。

T-NOS LAMP was 0.5%, and the sensitivity of *P-CaMV35S* LAMP was 0.1%. The detection sensitivity was high. **Conclusion** The improved LAMP method has high sensitivity and good specificity, which can be used for rapid screening of GM crops.

KEY WORDS: loop-mediated isothermal amplification; genetically modified crops; Bst DNA polymerase; *CaMV35S* promoter; NOS terminator

1 引言

到目前为止,转基因农作物已在世界多个国家大面积种植,并且还有继续扩大的趋势。国际农业生物技术应用服务组织(ISAAA)公布的数据显示,2011年全球转基因作物种植面积达到1.6亿公顷,比2010年增长了8%,种植转基因作物的国家达到29个,据ISAA预测,到2015年,将有40个国家种植2亿公顷转基因作物^[1]。中国转基因作物种植面积位居全球第六,只有690万公顷^[1],但是还存在非法种植转基因作物的现象。

一方面转基因作物的种植面积逐渐扩大,另一方面,社会对转基因安全性的争论愈演愈烈。转基因作物具有品质好、产量高、营养丰富和抗病虫害等优点,但是有些转基因作物品种对生态环境和食品安全存在潜在的风险。因此,在转基因作物的种植和粮食的进口方面必须加强监管,提高对转基因作物的甄别能力。

LAMP(loop-mediated isothermal amplification)是近些年发展起来的一种恒温核酸扩增技术^[2],通过一对特异的能识别一段正义链序列和一段反义链序列的内引物和一对链置换外引物,在无5'→3'外切酶活性的Bst DNA聚合酶作用下,以恒温条件实现对靶标基因成分的扩增,并且肉眼即可实现对反应结果的判读。正因为LAMP法具有检测特异性高,灵敏度高,不依赖PCR仪,等温即可实现扩增等优点,近些年,世界各地的研究人员都在尝试将LAMP运用于不同检测项目。目前,通过LAMP法已能实现对沙门氏菌、百日咳杆菌、鸭I型肝炎病毒、SARS冠状病毒等多种致病微生物的检测^[3-6],而且,商业化的LAMP检测试剂已经进入市场,部分LAMP产品已经申请国内的相关行业标准(<http://www.hfbiotech.cn/index.php?categoryid=28>)。LAMP在转基因检测方面的运用也有文献报道, Lee等通过LAMP法鉴定了转基因油菜中的外源基因^[7],国内,柳毅等^[8],王永等^[9]也通过LAMP方法对转基因作物进行了检测。

在增加LAMP的应用性方面, Tomita等人利用钙

黄绿素与镁离子结合后能够产生绿色荧光的特点,成功建立简易的LAMP可视化检测方法^[10],避免了反应后的开管检测。本文通过对LAMP方法改良,将LAMP反应液和高浓度的SYBR GREEN I在反应前同时置于特殊设计的反应管中,反应后也能实现闭管的可视化检测,并将此改良LAMP法运用于转基因作物的检测。

2 材料与方法

2.1.1 材料

转基因大豆品系GTS 40-3-2以及转基因玉米品系BT11、MON810均为标准样品,其中转基因大豆品系GTS 40-3-2转基因成分含量为3.15%(W/W,标准偏差0.16),转基因大米品系BT63由广东CIQ提供,转基因玉米品系MON863由上海CIQ提供。

2.1.2 主要仪器和试剂

恒温金属浴,实时荧光PCR仪(ABI StepOne Plus), Bst DNA聚合酶(广州华峰生物科技有限公司), SYBR GREEN I (Invitrogen), 高速离心机, HF管(广州华峰生物科技有限公司,图1)等。

2.1.3 DNA提取

转基因植物材料基因组DNA采用磁珠法植物基因组DNA提取试剂盒(广州华峰生物科技有限公司)。

2.1.4 阳性重组质粒的构建

使用LAMP外引物对转基因大豆品系GTS 40-3-2基因组DNA进行PCR扩增,克隆基因片段,*T-NOS*基因片段与*P-CaMV35S*基因片段分别与pMD 18-T载体(TAKARA)连接,转化大肠杆菌DH5 α 菌株,阳性转化子送公司测序(Invitrogen),测序正确的阳性转化子用于后续实验研究。菌液扩增后使用试剂盒(Omega)提取质粒用作阳性对照。质粒溶液稀释至约10 ng/ μ L,使用紫外分光光度计(岛津UV-1800)测量浓度,按照公式: $\text{copies}/\mu\text{L} = (6.02 \times 10^{23}) \times (\text{ng}/\mu\text{L} \times 10^{-9}) / (\text{碱基数} \times 660)$ 计算质粒拷贝数。

2.1.5 LAMP引物设计及合成

LAMP反应引物由Invitrogen公司合成,序列见表1和表2。

表 1 *T-NOS* LAMP 反应引物

<i>T-NOS</i> LAMP 反应引物	序列
B3	5'-gatctagtaacatagatgacacc-3'
BIP	5'-cgcaattatatacatttaatacgcgtttgctgcgcgataatt atcc-3'
LB	5'-gaaaacaaaatatagcgcgcaaac-3'
F3	5'-ataaagtttcttaagattgaatcc-3'
FIP	5'-accatctcataaataacgcatgctttgcccgtcttcg gatgattac-3'
LF	5'-gcttaacgtaattcaacagaaatt-3'

表 2 *P-CaMV35S* LAMP 反应引物

<i>P-CaMV35S</i> LAMP 反应引物	序列
B3	5'-ataaaggaaagccatcg-3'
BIP	5'-tcacgatgctcctcgtttctctgccacagtgg-3'
LB	5'-ggggtccatctttggg-3'
F3	5'-aggaagggtcttcg-3'
FIP	5'-gtcttcaaaagcaagtgttttgatagtgaggattgt gcg-3'
LF	5'-tccactgacgtaagg-3'

2.2 LAMP 反应

LAMP 反应体系为 25 μL , 体系中含有 0.8 mol/L betaine, 20 mmol/L Tri-HCl(pH 8.8), 10 mmol/L KCl, 10 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 8 mmol/L MgSO_4 , 0.1% Triton X-100, 1.6 mmol/L dNTP, 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 外引物, 1.6 $\mu\text{mol/L}$ 内引物, 0.8 $\mu\text{mol/L}$ 环引物, 8 U Bst DNA 聚合酶(广州华峰生物科技有限公司), 体系中加入 200 ng 植物基因组 DNA 或一定量的阳性重组质粒作为模板。LAMP 反应在恒温金属浴上进行, 65 $^\circ\text{C}$ 恒温反应 60 min, 反应液置于 HF 管(图 1)反应液区, 显色液区含有 2 μL 1000 $\times$ SYBR GREEN I, 并加入 50 μL 石蜡和石蜡油混合液进行密封, 反应结束后, 颠倒混匀反应液区和显色液区液体进行显色, 肉眼即可判读反应结果, 反应液呈绿色, 即某基因检测结果呈阳性, 反应液呈橙色, 则某基因检测结果呈阴性。Real-Time LAMP 在实时荧光 PCR 上进行, 体系中加入 0.5 $\times$ SYBR GREEN I 作为荧光染料, 并在 FAM 通道检测荧光信号, RT-LAMP 反应程序是 65 $^\circ\text{C}$, 1 min, 60 个循环。

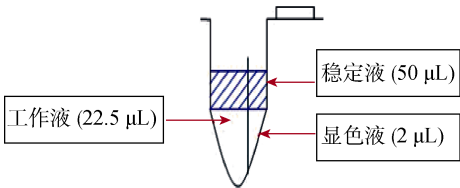


图 1 HF 管示意图。
Fig. 1 Schematic diagram of HF tube.

3 结果与分析

3.1 特异性分析

多数转基因作物中都含有 NOS 终止子序列和 CaMV35S 启动子序列, *T-NOS* 和 *P-CaMV35S* 是作物转基因筛查的重要检测靶标。根据 *T-NOS* 和 *P-CaMV35S* 序列设计合成 LAMP 检测引物(表 1 和表 2), 配制 LAMP 反应液, 对多个转基因样品和非转基因样品进行检测, 同时设置空白对照和阳性对照, 空白以无菌水作为模板, 阳性对照以阳性重组质粒为模板。*T-NOS* LAMP 检测了非转基因大米、玉米、大豆以及转基因大米品系 BT63、转基因玉米品系 BT11、MON810、转基因大豆品系 GTS 40-3-2, 非转基因样品均呈阴性结果, 转基因样品均呈阳性结果(图 2)。*P-CaMV35S* LAMP 检测了非转基因大米、玉米、大豆以及转基因大米品系 BT63、转基因玉米品系 BT11、MON810、MON863、转基因大豆品系 GTS 40-3-2, 非转基因样品均呈阴性结果, 转基因样品均呈阳性结果(图 3)。上述阳性结果均与 GM Crop Database(http://cera-gmc.org/index.php?action=gmc_crop_database)公布的数据相符, 表明引物特异性较好。

3.2 检出限分析

将转基因大豆品系 GTS40-3-2 标准品粉末与非转基因大豆粉末烘干至恒重, 按照转基因大豆重量比为 1%、0.5%、0.1%, 将标准品与非转基因大豆粉末混合成模拟样品, 提取 DNA, 用于 *T-NOS* 和 *P-CaMV35S* LAMP 检测检出限分析。*T-NOS* LAMP 检测的检出限是 0.5%, *P-CaMV35S* LAMP 检测的检出限是 0.1%(图 4), 灵敏度与 PCR 方法相同或接近^[11,12]。

为了进一步分析 *T-NOS* LAMP 反应体系和 *P-CaMV35S* LAMP 反应体系检测灵敏度, 将梯度稀释的阳性重组质粒作为模板进行 LAMP 检测(图 5 和图 6), 从实时扩增曲线可以看出, 两个 LAMP 反应体系均能检出 8,000 拷贝阳性重组质粒(图 5 和图 6)。

4 讨论

目前较常用的转基因检测方法是 Q-PCR 法, Q-PCR 法检测转基因具有检测灵敏度高的优点, 但是同时也具有需要控温精确的热循环仪以及检测人员需要专门培训等缺点。LAMP 法是近些年发展起来



图2 外源基因元件 *T-NOS* 的 LAMP 特异性检测。

1: 从左至右依次为空白对照, 阳性重组质粒; 2: 非转基因大米, 大米品系 BT63; 3: 非转基因玉米, 玉米品系 BT11、MON810; 4: 非转基因大豆, 大豆品系 GTS40-3-2。

Fig. 2 LAMP specificity detection of exogenous gene element *T-NOS*.

1: from left to right, negative control, positive recombinant plasmid; 2: non GM rice, rice event BT63; 3: non GM maize, maize events BT11, MON810; 4: non GM soybean, soybean event GTS40-3-2.

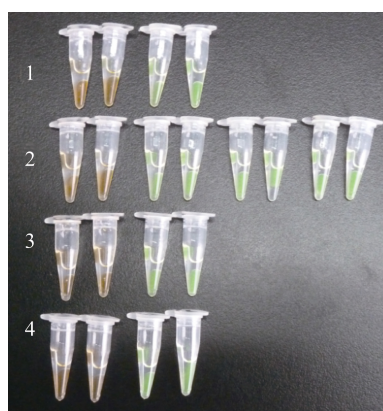


图3 外源基因元件 *P-CaMV35S* 的 LAMP 特异性检测。

1: 从左至右依次为空白对照, 阳性重组质粒; 2: 非转基因玉米, 玉米品系 BT11、MON810、MON863; 3: 非转基因大豆, 大豆品系 GTS 40-3-2; 4: 非转基因大米, 大米品系 BT63。

Fig. 3 LAMP specificity detection of exogenous gene element *P-CaMV35S*.

1: from left to right, negative control, positive recombinant plasmid; 2: non GM maize, maize events BT11, MON810, MON863; 3: non GM soybean, soybean event GTS40-3-2; 4: non GM rice, rice event BT63.

的一种核酸检测方法^[2], 该方法具有对靶标基因进行恒温扩增的特点, 摆脱了对精密仪器的依赖, 同时

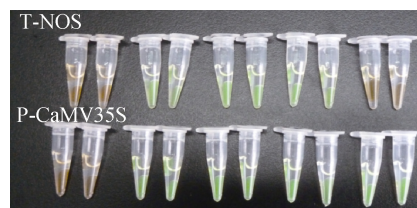


图4 检出限检测。

第一行为 *T-NOS* LAMP 检出限检测, 第二行为 *P-CaMV35S* LAMP 检出限检测。反应管从左至右依次为空白对照, 转基因大豆品系 GTS 40-3-2 含量为 3.15%, 1%, 0.5%, 0.1%。

Fig. 4 The detection limit of the LAMP.

The first line is *T-NOS* LAMP, the second line is *P-CaMV35S* LAMP. The templates of the test are negative control, soybean event GTS40-3-2 component content of 3.15%, 1%, 0.5%, 0.1%, from left to right.

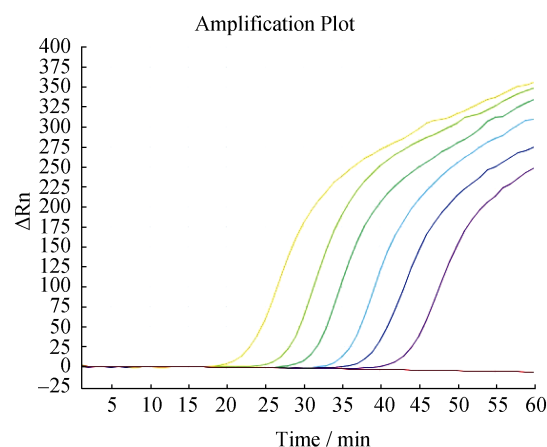


图5 外源基因元件 *T-NOS* 的 Real-Time LAMP 灵敏度检测。

用 10 倍梯度稀释的阳性重组质粒进行检测限测试, 扩增曲线从左至右加入的质粒拷贝数依次为 8×10^8 至 8×10^3 , 水平直线为阴性对照。

Fig. 5 Real-Time LAMP sensitivity detection of exogenous gene element *T-NOS*.

The 10 times gradient dilution of positive recombinant plasmid was used in this detection. Curves separately represent the positive plasmid copy number of 8×10^8 to 8×10^3 , and negative control, from left to right.

LAMP 法检测还具有特异性好、灵敏度高等特点。使用 HF 管进行 LAMP 反应不但能实现肉眼直接观察反应结果, 还降低了反应产物对实验室环境的污染, 有助于降低假阳性的发生率。随着转基因作物种植面积的增加和人们对粮食转基因的关注度越来越高, 作物转基因检测的需求也会越来越大, 与此同时, 转基因检测还要求检测方法必须具有高灵敏度和高特异性, 日益繁重的检测任务也要求检测方法必须简便, 因此将 LAMP 法运用到作物转基因检测中具有重要意义。

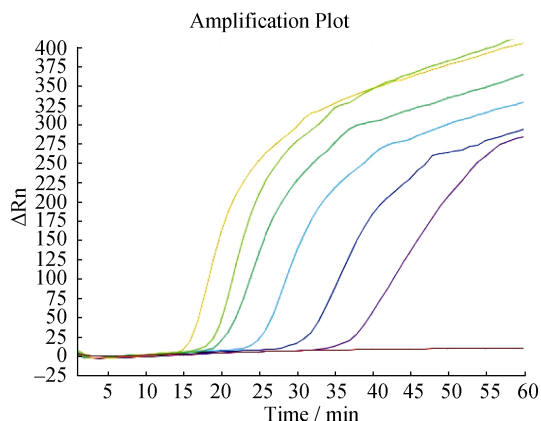


图6 外源基因元件 *P-CaMV35S* 的 Real-Time LAMP 灵敏度检测。

用 10 倍梯度稀释的阳性重组质粒进行检测限测试, 扩增曲线从左至右加入的质粒拷贝数依次为 8×10^8 至 8×10^3 , 水平直线为阴性对照。

Fig.6 Real-Time LAMP sensitivity detection of exogenous gene element *P-CaMV35S*.

The 10 times gradient dilution of positive recombinant plasmid was used in this detection. Curves separately represent the positive plasmid copy number of 8×10^8 to 8×10^3 , and negative control, from left to right.

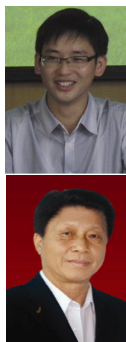
本文中使用 HF 管进行 LAMP 反应, 方便、快捷, 同时还摆脱了对精密仪器的依赖, 但是 HF 管进行 LAMP 反应只能作为终点检测, 为了更清晰地分析 LAMP 反应, 我们引入了 Real-Time LAMP 对整个反应过程进行实时监控, Real-Time LAMP 具有类似于 Real-Time PCR 的实时扩增曲线(图 5 和图 6)。在 LAMP 方法建立过程中, Real-Time LAMP 能更好地进行引物筛选、体系优化。

参考文献

- [1] International Service For The Acquisition Of Agri-Biotech Applications. Global status of commercialized biotech/gm crops: 2011[EB/OL]. (2012-01-11)[2012-07-06]. <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/43/executivesummary/default.asp>
- [2] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12): e63.
- [3] Ohtsuka K, Yanagawa K, Takatori K, *et al.* Detection of *Salmonella enterica* in naturally contaminated liquid eggs by loop-mediated isothermal amplification, and characterization of *Salmonella* isolates[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(11): 6730–6735.
- [4] Kamachi K, Toyozumi-Ajisaka H, Toda K, *et al.* Development and evaluation of loop-mediated isothermal amplification method for rapid diagnosis of *Bordetella pertussis* infection[J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(5): 1899–1902.
- [5] Thai H T C, Le M Q, Vuong C D, *et al.* Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus[J]. *J Clinical Microbiol*, 2004, 42(5): 1956–1961.
- [6] Song C, Wang H, Yu S, *et al.* Rapid detection of duck hepatitis virus type-1 by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification[J]. *J Virol Methods*, 2012 (Epub ahead of print).
- [7] Lee D, Mura M L, Allnutt T R, *et al.* Detection of genetically modified organisms (GMOs) using isothermal amplification of target DNA sequences[J]. *BMC Biotechnol*, 2009, 9(7): 1472.
- [8] 柳毅, 张军方, 张会彦, 等. 改良环介导等温扩增技术快速检测转基因大豆[J]. *大豆科学*, 2009, 28(4): 706–711.
- [9] 王永, 兰青阔, 赵新, 等. 转基因作物外源转基因成分环介导等温扩增技术检测方法的建立及应用[J]. *中国农业科学*, 2009, 42(4): 1473–1477.
- [10] Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products[J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(5): 877–882.
- [11] 白月, 梁凤霞, 王珣. 小麦中转基因成分 PCR 与实时荧光 PCR 的定性检测极限[J]. *麦类作物学报*, 2009, 29(2): 199–205.
- [12] 黄东东, 翁少萍, 吕玲, 等. TaqMan MGB 实时荧光 PCR 对转基因大豆定量检测的研究[J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 2008, 47(3): 140–142.

(责任编辑: 孙媛媛)

作者简介



熊槐, 男, 硕士, 华南师范大学生命科学院植物细胞工程专业毕业, 现就职于广州华峰生物科技有限公司, 负责转基因检测项目。

E-mail: 13640274364@126.com。

曹以诚, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 广州华峰生物科技有限公司总经理兼董事长。