

转基因玉米 BT11 品系环介导等温扩增 (LAMP)检测方法的建立

王清华¹, 徐君怡², 曹冬梅², 刘宇², 曹际娟^{2*}

(1. 大连工业大学生物工程学院, 大连 116034; 2. 辽宁出入境检验检疫局, 大连 116001)

摘要: **目的** 建立转基因玉米 BT 11 品系的环介导等温扩增(LAMP)检测方法。**方法** 根据转基因玉米 BT 11 品系特有序列(AY123624.1 和 AY629236)设计引物, 优化建立 LAMP 反应体系, 对该体系进行特异性、灵敏度、稳定性分析。**结果** 本研究设计的引物具有很好的特异性, 可特异性检测出转基因玉米 BT 11 品系; 检测灵敏度可达 0.5%; 经精密度实验分析, 该方法的稳定性良好。**结论** LAMP 方法检测转基因玉米品系 BT 11 具有特异性高、稳定性好、快速灵敏、过程可视等优点, 具有广阔的应用前景。

关键词: 转基因玉米 BT 11; 环介导等温扩增(LAMP); 品系鉴定检测

Establishing a loop-mediated isothermal amplification(LAMP)detection method for genetically modified maize BT11

WANG Qing-Hua¹, XU Jun-Yi², CAO Dong-Mei², LIU Yu², CAO Ji-Juan^{2*}

(1. School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China; 2. Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001, China)

ABSTRACT: Objective To establish a loop-mediated isothermal amplification(LAMP)detection method for BT 11. **Methods** The primers were designed according to the specific sequence(AY123624.1, AY629236)of BT 11, and then the LAMP reaction system was established. The specificity, sensitivity and stability of the system were analyzed. **Results** The primers in this research specifically detected the BT 11. The detection sensitivity was up to 0.5%, and the precision of the experimental analysis was proved to be of high stability. **Conclusion** The results showed that LAMP was a specific, stable, rapid, sensitive and visible way for the detection of BT 11, and it would have broad prospects for application.

KEY WORDS: genetically modified maize BT 11; LAMP; identification of lines

1 引言

作为全球重要的粮食作物之一, 玉米的单位面积产量位居世界榜首^[1]。近年来, 基因技术飞速发展, 新品种的转基因植物在改善农作物性状中发挥着显

著作用。转基因玉米 BT 11 具有抗草铵膦除草剂的特性, 是目前用于加工食品和饲料较多的转基因玉米品系之一^[2]。由于转基因产品在环境安全和食品安全两方面都存在着一定的风险, 人们对其安全性也越发关心。因此, 在转基因产品商业化之前, 进行转基

基金项目: 国家转基因重大专项(2013ZX08012-001)

Fund: Supported by Major Program of National Genetically Modified Foundation of China (2013ZX08012-001)

*通讯作者: 曹际娟, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测与研究。E-mail: cjj0909@163.com

*Corresponding author: CAO Ji-Juan, Professor, Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No. 60, Changjiang East Road, Dalian 116001, China. E-mail: cjj0909@163.com

因成分的品系鉴定和定量检测, 具有十分重要的现实意义^[3]。

随着分子生物学理论和技术的快速发展, 以聚合酶链式反应(PCR)为基础的新型鉴定技术已得到广泛应用。2000 年, 日本学者 Notomi 等^[4]公开了一种新的基因诊断技术—DNA 环介导的恒温扩增法(loop-mediated isothermal amplification of DNA, LAMP)。LAMP 检测技术是一种新型的体外等温扩增特异核酸片段的技术, 该技术主要依赖于能够识别靶 DNA 上 6 个特异区域的 4 条特异引物和一种具有链置换活性的 Bst DNA 聚合酶, 使反应中模板两端引物结合处循环出现环状单链结构, 从而实现了恒温条件下引物便可与模板进行连续的快速扩增^[5]。LAMP 检测技术具有特异性高、快速灵敏、高效廉价、操作简便等特点, 在基因芯片、医疗卫生及食品检测等领域都具有广阔的应用前景^[6]。

2 材料与方法

2.1 实验材料

转基因玉米 BT 11 标准样品(ERMBF 412F, sigma)、BT 176 标准样品(ERMBF 411F, sigma)、GA 21 标准样品(0407-B, AOCS)、MON 810 标准样品(ERMBF 413EK, sigma)、MIR 604 标准样品(0607-A2, AOCS)、MON 88017 标准样品(0406-D, AOCS)、MON 89034 标准样品(0906-E, AOCS)、转基因玉米 EVENT 98140、转基因玉米 MON 863; 转基因水稻 BT 63、科丰 6 号、科丰 8 号; 转基因土豆 EH 92-527-1(0806-C, AOCS); 转基因大豆 A 5547-127(0707-C3, AOCS)、GTS 40-3-2、DP 305423、DP 356043、MON 89788; 转基因油菜 GT 73(0304-B, AOCS); 非转基因豌豆、扁豆、大米、羽扇豆、土豆、玉米、大豆、螃蟹、绿豆、

核桃、胡萝卜、小麦, 均来源于辽宁出入境检验检疫局食品检测中心留存样品。

2.2 基因组 DNA 的提取

选取 2.1 中实验材料, 在液氮中研成粉末后, 使用 DNA Extraction Kit for GMO Detection Ver.2.0 (TaKaRa Code No.D9093)进行基因组 DNA 的提取。提取的 DNA 溶于 100 μ L TE 溶液中, 经超微量分光光度计(NanoDrop)对基因组 DNA 进行质量检测和浓度测定。通过 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值来评价提取 DNA 的质量, 本研究中所用 DNA 的 OD 值均在 1.8 左右。

2.3 LAMP 引物设计

查阅相关文献^[7-10], 利用 NCBI 比对找到 BT 11 品系特有序列(AY123624.1 和 AY629236), 该目的片段覆盖于玉米基因组和外源序列的接头部分。使用在线软件 Primer Explorer version 4(<http://primerexplorer.jp/e/>)和 LAMP Designer 设计特异引物。LAMP 引物包括 2 条外引物和 2 条内引物, 能特异性结合靶序列上的 6 个特异区域。内引物 FIP 包含 F1c(与 F1 区域互补)和 F2 序列, 内引物 BIP 包含 B1c(与 B1 区域互补)和 B2 序列; 外引物为 F3 序列和 B3 序列。本研究在内、外引物的基础上又加入了 2 条环状引物 FLP 和 BLP, 极大缩短了反应时间。引物的具体信息见表 1。

2.4 LAMP 反应体系的建立

采用 25 μ L 的 LAMP 反应体系, 其成分包括: 1 \times ThermoPol 缓冲液、外引物 F3 和 B3 各 0.2 μ mol/L、内引物 FIP 和 BIP 各 1.6 μ mol/L、1.4 mmol/L dNTPs、0.8 mmol/L 甜菜碱、6 mmol/L 硫酸镁、0.32 U/ μ L Bst DNA 聚合酶、DNA 模板 200 ng。将除模板外的其他试剂配制成均匀的混合液后, 每管分装 23 μ L, 加入

表 1 转基因玉米 BT11 品系的 LAMP 引物
Table 1 LAMP primers for genetically modified maize BT11

引物名称	引物序列(5'→3')
F3	GCTGTAGCTGGCCTAATC
B3	GGCCAAGGTATCTAATCAGC
FIP(F1c+F2)	TATCTGTCTCAGGGCAGACTCTCAACTGGTCTCCTCTCC
BIP(B1c+B2)	GCCAAGAAGGCGCAAGTCCATCCCATTGTGATCTTTGTC
FLP	GTGTTCCCTCGGATCTCG
BLP	ACCGCGAGTTGTTGTATCATA

20 μL 密封液, 再分别加入 2 μL 模板 DNA 或阴、阳性对照模板, 混匀离心后将 1 μL 显色液点在管盖中间, 小心盖紧管盖, 避免显色液掉入反应液中。参照 LAMP 浊度仪使用说明书, 将混合物置于反应孔中, 65 $^{\circ}\text{C}$ 恒温反应 60 min, 最后 80 $^{\circ}\text{C}$ 下灭活 5 min 结束反应。

2.5 LAMP 引物特异性实验

用转基因玉米 BT 11 品系 DNA 和豌豆、扁豆、大米、羽扇豆、土豆、玉米、大豆、螃蟹、绿豆、核桃、胡萝卜、小麦、转基因水稻 BT 63、科丰 6 号、科丰 8 号、转基因玉米 BT 176、EVENT 98140、GA 21、MON 863、MON 810、MIR 604、MON 88017、MON 89034、转基因土豆 EH 92-527-1、转基因大豆 A 5547-127、GTS 40-3-2、DP 305423、DP 356043、MON 89788、转基因油菜 GT 73 的 DNA 作为 LAMP 反应模板, 表 1 中的引物作为 LAMP 引物, 进行 LAMP 反应, 63 $^{\circ}\text{C}$ 下运行 60 min, 以验证 LAMP 反

应的特异性, 并利用 LAMP 浊度仪观察反应结果。

2.6 LAMP 检测灵敏度实验

将含量为 5% 的转基因玉米 BT 11 品系 DNA (100 ng/ μL) 用非转基因玉米 DNA (100 ng/ μL) 分别稀释至转基因成分含量为 2%、1%、0.5%、0.1% 的 4 个梯度, 每个稀释度分别取 2 μL 进行 LAMP 实验, 用 ddH₂O 作为阴性对照, 转基因玉米 BT 11 品系 DNA (5%, 100 ng/ μL) 作为阳性对照, 表 1 中的引物作为 LAMP 引物, 进行 LAMP 反应, 63 $^{\circ}\text{C}$ 下运行 60 min, 以确定 LAMP 检测的灵敏度, 并根据最低灵敏度的出峰时间及假阳性的最早出峰时间, 确定反应时间。

3 结果

3.1 LAMP 引物特异性

根据 2.5 中 LAMP 引物特异性实验的方案, 进行 LAMP 反应, 结果如图 1 所示。

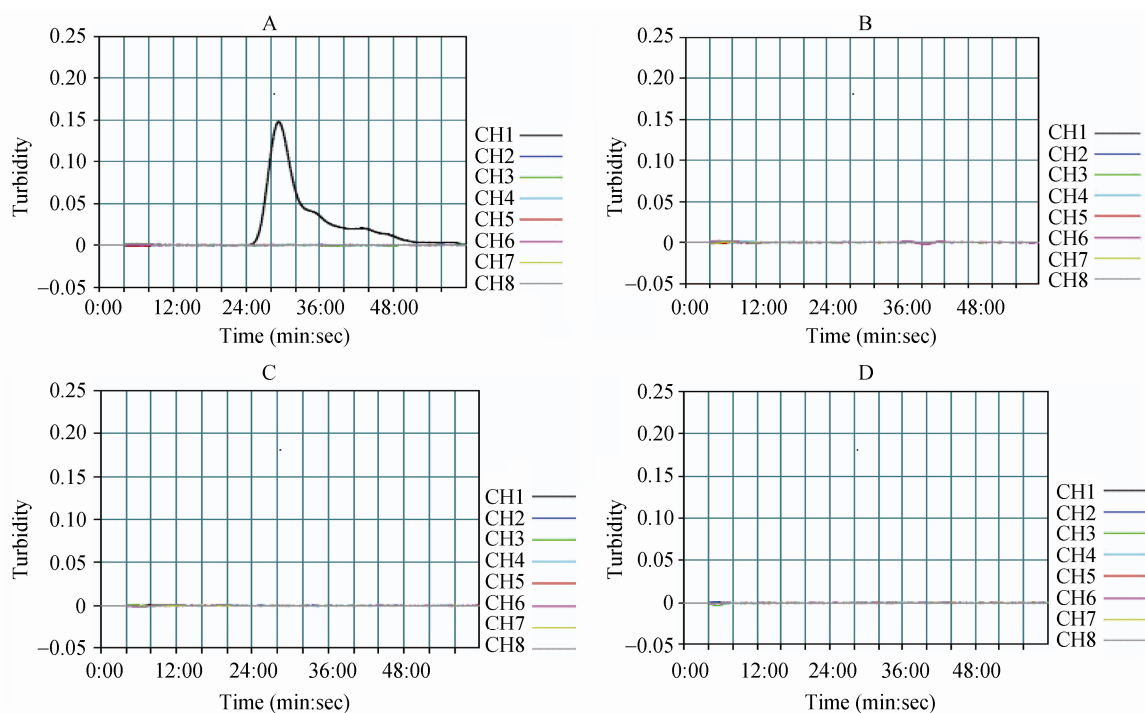


图 1 LAMP 引物特异性检测图

Fig. 1 The LAMP primers specific detection figure

注: 图 1A. CH1: 阳性对照(BT 11), CH2: 阴性对照(超纯水), CH3: DP 356043, CH4: RT 73, CH5: MON 89034, CH6: MON 89788, CH7: MON 88017, CH8: MON 863; 图 1B. CH1: MIR 604, CH2: A 5547-127, CH3: DP 305423, CH4: GTS 40-3-2, CH5: EVENT 98140, CH6: BT 176, CH7: MON 810, CH8: GA 21; 图 1C. CH1: BT 63, CH2: 科丰 6 号, CH3: 科丰 8 号, CH4: EH 92-527-1, CH5: 绿豆, CH6: 核桃, CH7: 胡萝卜, CH8: 小麦; 图 1D. CH1: 豌豆, CH2: 扁豆, CH3: 大米, CH4: 羽扇豆, CH5: 土豆, CH6: 玉米, CH7: 大豆, CH8: 螃蟹

由图 1 可见, 除图 1A 中的 CH1(转基因玉米 BT 11 品系 DNA)外, 其余 30 种样品均未出现阳性峰。这说明本研究设计的引物只对转基因玉米 BT 11 品系有特异性检出, 且特异性良好。

3.2 LAMP 检测灵敏度

根据 2.6 中 LAMP 检测灵敏度实验的方案, 进行 LAMP 反应, 结果如图 2 所示。

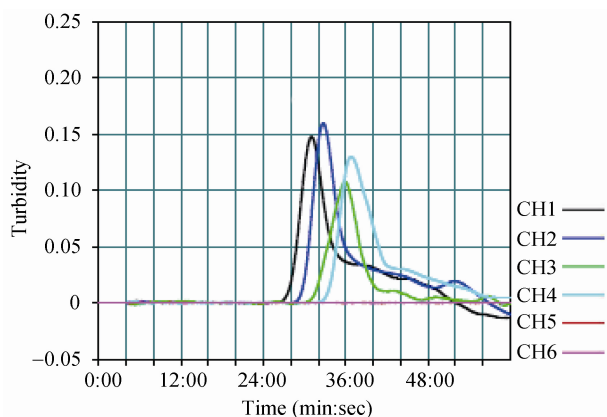


图 2 LAMP 引物检测的灵敏度

Fig. 2 The sensitivity of the LAMP detection

注: CH1: 5% BT 11 标准样品; CH2: 2% BT 11 模拟样品; CH3: 1% BT 11 模拟样品; CH4: 0.5% BT 11 模拟样品; CH5: 0.1% BT 11 模拟样品; CH6: 阴性对照(超纯水)

由图 2 可见, 不同浓度的转基因玉米 BT 11 品系 DNA 进行 LAMP 扩增时, 出峰时间和浓度呈明显的梯度变化, 检测灵敏度可达 0.5%; 此外, 最低检出限 0.5% 约在 36 min 出峰, 且未出现假阳性结果, 故可将 LAMP 反应的时间确定为 60 min。

3.3 方法的稳定性

将转基因玉米 BT 11 品系 DNA(5%, 100 ng/ μ L) 用非转基因玉米 DNA 稀释至 0.5% 作为模板, 取 20 份模板作为平行样品, 以 ddH₂O 作为阴性对照, 转基因玉米 BT 11 品系 DNA(5%, 100 ng/ μ L) 作为阳性对照。表 1 中的引物作为 LAMP 引物, 进行 LAMP 反应, 63 下运行 60 min, 结果如图 3 所示。

由图 3 可见, 20 份 0.5% 转基因玉米 BT 11 品系 DNA 平行样品的平均出峰时间前后偏差均在 5 min 内。结果表明, 本方法检测精密度的稳定性良好。

4 结 论

目前, 转基因玉米成分的检测方法主要为 TaqMan

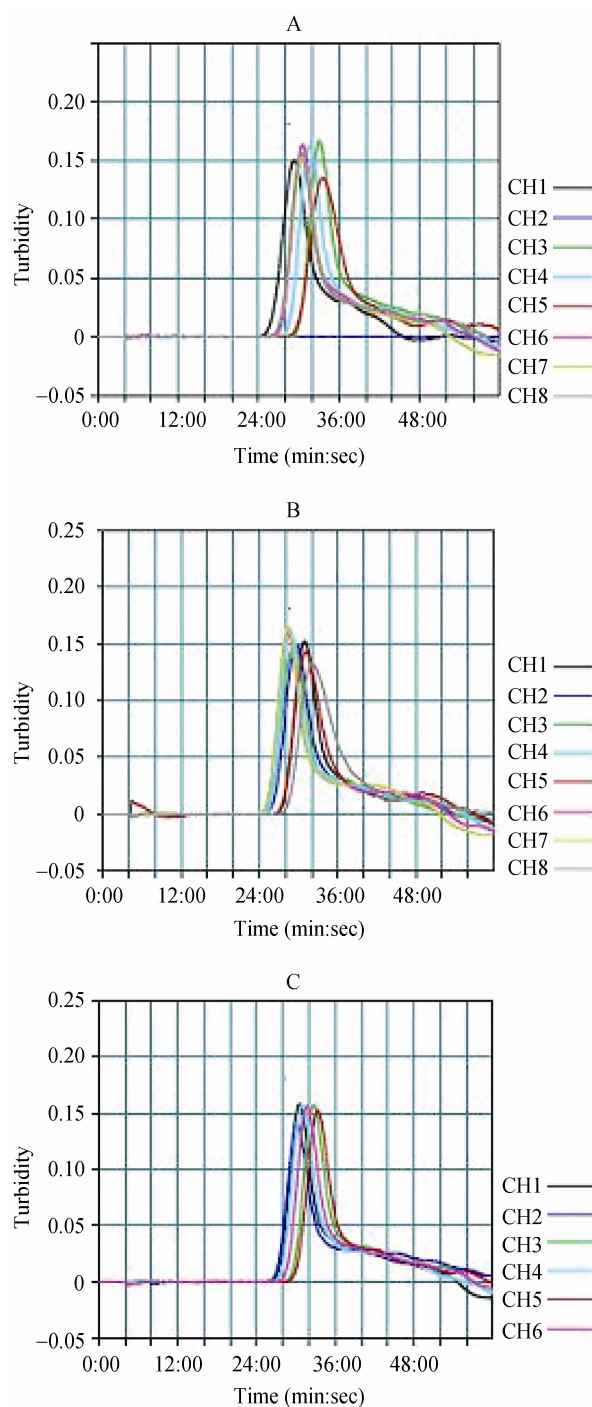


图 3 0.5%转基因玉米 BT11 品系 DNA 的精密实验图

Fig. 3 0.5% BT11 DNA precision experimental figure

注: 图 3A. CH1: 阳性对照(5% BT11 DNA), CH2: 阴性对照(超纯水), CH3-8: 0.5% BT11 DNA; 图 3B. CH1-8: 0.5% BT11 DNA; 图 3C. CH1-6: 0.5% BT11 DNA

实时荧光 PCR 检测法和普通 PCR 检测法。普通 PCR 检测法由于操作繁琐、污染环境、灵敏度低等不足已被 TaqMan 实时荧光 PCR 检测法取代。但是, TaqMan

实时荧光 PCR 检测法对技术的要求较高,且成本昂贵,所以急需制定出适用于基层实验室的安全、快速、简便、准确的检测方法。

由于 LAMP 检测法只有在 4 条引物完全与靶序列匹配的情况下才能顺利进行,因此比传统 PCR 检测法具有更高的特异性。同时,高活性的 Bst DNA 聚合酶在 60 左右的恒温条件下便可扩增核酸,保证了反应的高效性^[11]。由于 LAMP 反应时核酸大量合成,生成的副产物为白色焦磷酸镁沉淀,所以可直接通过肉眼判断或进行浊度检测。也可用结合双链 DNA 的荧光染料 SYBR Green I 染色,在紫外灯或日光下通过肉眼进行判定。若含有扩增产物,反应混合物变绿,反之,则保持 SYBR Green I 的橙色不变。利用这一特性,日本已研制出专门用于 LAMP 检测的实时监控浊度仪,实现了对 LAMP 扩增过程的全程监控^[12-14]。

本研究建立的检测转基因玉米 BT 11 品系的 LAMP 方法,具有很好的特异性和稳定性。该方法简便、灵敏、结果可视、成本低廉,弥补了传统 PCR 检测方法的不足,具有很好的推广和应用前景。

参考文献

- [1] 曹际娟,曹远银.PCR 对转基因玉米 MON 810 的鉴定检测[J].玉米科学,2003,11(1):19-21.
Cao JJ, Cao YY. PCR on detection and identification of GM maize MON 810 [J]. Maize Sci, 2003, 11(1): 19-21.
- [2] 覃文,曹际娟,朱水芳.加工产品中转基因玉米 BT 11 成分实时荧光 PCR 定量(性)检测[J].生物技术通报,2003,6:46-50.
Qin W, Cao JJ, Zhu SF. Quantitative/identified detection of the genetically modified maize BT11 components in processed products [J]. Biotechnol Bull, 2003, 6: 46-50.
- [3] 阎小艳,晋小婷,王青,等.转基因玉米的生物安全性问题[J].山西农业科学,2010,38(012):12-13.
Yan XY, Jin XT, Wang Q, et al. The biosecurity of genetically modified maize [J]. Shanxi Agr Sci, 2010, 38(012): 12-13.
- [4] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): e63-e63.
- [5] 江迎鸿,刘焱,谭贵良,等.LAMP 技术及其在食品安全检测中的应用[J].广东农业科学,2010,37(007):220-222.
Jiang YH, Liu Y, Tan GL, et al. LAMP technology in food safety detection [J]. Guangdong Agr Sci, 2010, 37(007): 220-222.
- [6] 吴阳升,罗淑萍.一种新的高效快速核酸恒温扩增方法—LAMP 法[J].生物技术,2004,14(4):76-78.
Wu YS, Luo SP. A novel high efficiency, rapid, isothermal nucleic acid amplification-lamp method [J]. Biotechnol, 2004, 14(4): 76-78.
- [7] 兰青阔,王永,赵新,等.转基因玉米 LAMP 检测体系的建立及应用[J].华北农学报,2010,25(004):49-52.
Lan QK, Wang Y, Zhao X, et al. Development and application of loop-mediated isothermal amplification for detection of GM maize [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2010, 25(004): 49-52.
- [8] 兰青阔,王永,赵新,等.环状等温扩增技术快速检测转基因玉米 MON 863 的研究[J].玉米科学,2011,19(1):31-34.
Lan QK, Wang Y, Zhao X, et al. Study on rapid detection of transgenic maize MON 863 by LAMP [J]. Maize Sci, 2011, 19(1): 31-34.
- [9] 张隽,李志勇,叶宇鑫,等.环介导等温扩增法检测转基因玉米 MON 89034[J].现代食品科技,2012,28(4):469-472.
Zhang J, Li ZY, Ye YX, et al. A specific loop-mediated isothermal amplification method for detection of transgenic maize MON 89034 [J]. Mod Food Sci Technol, 2012, 28(4): 469-472.
- [10] 查磊,蔡欣,应晓敏,等.BioSunLAMP: 一个用于环介导等温扩增的引物设计软件[J].军事医学,2012,36(3):230-233.
Cha L, Cai X, Ying XM, et al. BioSunLAMP: A software system for loop-mediated isothermal amplification (LAMP) primer design [J]. Mil Med Sci, 2012, 36(3): 230-233.
- [11] 徐芊,孙晓红,赵勇,等.副溶血弧菌 LAMP 检测方法的建立[J].中国生物工程杂志,2007,27(12):66-72.
Xu Q, Sun XH, Zhao Y, et al. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of vibrio parahaemolyticus [J]. China Biotechnol, 2007, 27(12): 66-72.
- [12] Dukes JP, King DP, Alexandersen S. Novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of foot-and-mouth disease virus [J]. Arch Virol, 2006, 151(6): 1093-1106.
- [13] Mori Y, Kitao M, Tomita N, et al. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA [J]. Biochem Biophys meth, 2004, 59(2): 145-157.
- [14] Parida M, Posadas G, Inoue S, et al. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile Virus [J]. Clin Microbiol, 2004, 42(1): 257-263.

(责任编辑:佟丽)

作者简介



王清华, 硕士, 主要研究方向为微生物学与分子生物学。

E-mail: wqhnana@qq.com



曹际娟, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测与研究。

E-mail: cjj0909@163.com