

# 环介导等温扩增技术检测转基因组分的研究进展

邢宇俊, 吴季荣, 徐剑宏, 史建荣\*

(江苏省农业科学院食品质量安全与检测研究所, 江苏省食品质量安全重点实验室—省部共建国家重点实验室培育基地, 农业部农产品质量安全控制技术重点实验室, 江苏省转基因安全评价公共服务中心 南京 210014)

**摘要:** 随着越来越多的转基因作物获得商业化生产和种植, 转基因农产品的安全问题一直都有异议, 因此, 无论对消费人群还是政府监管部门, 快速检测转基因组分都是非常必要。转基因组分的检测通常以核酸为基础进行检测, 而环介导等温扩增技术(LAMP)是一种等温条件下核酸扩增技术, 具有高特异性、高灵敏度、操作简单、成本低廉、结果可视化及不需要专用设备的特点, 已逐渐用于转基因组分的检测中。本文针对 LAMP 技术的原理、优点、关键技术及其在转基因大豆、玉米、水稻等农产品中的应用做一综述, 从而为其更广泛的用于转基因组分的检测提供理论依据。

**关键词:** 环介导等温扩增技术; 转基因组分; 检测应用

## Research progress of LAMP technology in detection of genetically modified component

XING Yu-Jun, WU Ji-Rong, XU Jian-Hong, SHI Jian-Rong\*

(Institute of Food Quality Safety and Detection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Lab of Food Quality and Safety of Jiangsu Province-State Key Laboratory Breeding Base/Key Laboratory of Control Technology and Standard for Agro-product Safety and Quality, Ministry of Agriculture, Jiangsu Center for GMO Evaluation and Detection, Nanjing 210014, China)

**ABSTRACT:** As more and more genetically modified (GM) crops are approved for commercialization and planting, transgenic product security issues have been to the objection, therefore, regardless of the consumer or government regulators, the development of rapid detection method for genetically modified components is required. Detection of genetically modified component are usually based on nucleic acid detection, and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is one isothermal nucleic acids amplification technique. It has the characteristics of high specificity, sensitivity, operator simple, low cost, visualization results and does not require special equipment. This technology has been increasingly used to detect genetically modified component. In this paper, we reviewed the LAMP technology principle, characteristics, key technology and its application in the main genetically modified soybeans, corn, rice etc, so it provides theoretical basis for its application in the detection of genetically modified component.

**KEY WORDS:** loop-mediated isothermal amplification; genetically modified component; application in detection

基金项目: 国家自然科学基金项目(31301488)、转基因生物新品种培育重大专项(2013ZX08011-003)

**Fund:** Supported by the National Natural Science Foundation of China(31301488), and The national Transgenic Plant Special Fund (2013ZX08011-003)

\*通讯作者: 史建荣, 研究员, 主要研究方向为生物毒素与转基因安全。E-mail: shiji@jaas.ac.cn

\*Corresponding author: SHI Jian-Rong, Researcher, Mainly engaged in bio-toxin and transgenic safety, Institute of Food Safety and Detection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, No.50, Zhongling Road, Xuanwu District, Jiangsu 210014, China. E-mail: shiji@jaas.ac.cn

自 1996 年转基因番茄大规模商业化生产后, 全球转基因作物的种植面积飞速发展, 转基因农产品也从田间来到市场再到人们的餐桌, 而当前对于转基因产品的安全性问题, 一直有许多争议, 比如转基因食品的安全性、对环境的危险和伦理道德等等。因此, 全球超过 40 个国家颁布了转基因产品标识制度, 不同国家标准各异, 其中美国、加拿大、中国香港采用自愿标识的标识管理<sup>[1]</sup>, 而欧盟、日本、澳大利亚等国家所采用的是强制性标识的标识管理, 标识阈值处于 0.9%至 5%之间<sup>[2-5]</sup>, 我国对部分转基因产品实施零阈值标识制度, 在规定标识的产品范围内, 只要含有转基因成分必须标识。而转基因检测工作是实现对转基因作物安全监管的关键环节, 因此, 建立灵敏、快速、简便的检测技术是十分必要的。

目前对于转基因产品的检测主要基于核酸水平上的 PCR 检测, 主要有定性、定量 PCR 检测<sup>[6-11]</sup>, 但是 PCR 方法需要热循环设备, 并且需要专业人员操作, 限制了该方法在基层检测中的应用。在 2000 年, 日本学者 Notomi 等<sup>[12]</sup>建立环介导等温扩增技术, 简称为 LAMP(loop-mediated isothermal amplification), 该技术具有高灵敏度、等温扩增、不受仪器限制等优点, 弥补了转基因组分检测中以 PCR 为基础的核酸检测技术的不足。它利用靶序列上 6 个位点设计 4 个特异性引物, 添加一种具有链置换活性的 DNA 聚合酶及 dNTP, 在 60~65℃恒温条件下, 1 h 内达到特异、高效、快速扩增核酸, 该技术已成功用于细菌微生物<sup>[13,14]</sup>、病毒<sup>[15-17]</sup>及寄生虫<sup>[18-20]</sup>等检测中。随着越来越多的转基因产品问世, 转基因组分检测工作量加大, 而快速简便的 LAMP 技术被用于农产品中转基因组分的检测中, 本文主要通过对 LAMP 技术及其应用的讨论, 旨在促进该技术在转基因组分检测领域中更广泛地应用。

### 1 LAMP 技术原理

LAMP 技术同 PCR 反应不同, PCR 需要通过热变性来将双链 DNA 变成单链。而 LAMP 技术中双链 DNA 在 65℃左右处于动态平衡状态, 任何一条引物与双链 DNA 的互补部位进行碱基互补配对, 并进行延伸时, 另一条链就会脱落变成单链<sup>[12, 21]</sup>。LAMP 方法正是利用这一特点进行反应。

基本原理是利用一种具有链置换活性的 DNA 聚合酶(Bst DNA polymerase), 针对靶序列 6 个特异性区域设计内引物(FIP 和 BIP: 分别包含靶标 DNA 上正义链和反义链两部分序列)和外引物(F3 和 B3)(见图 1), 在等温条件下(通常 60~65℃), 保温 60 min 左右, 将靶 DNA 片段扩增 10<sup>9</sup>~10<sup>10</sup> 倍, 达到大量扩增核酸的目的<sup>[7, 22-27]</sup>。扩增结果比普通 PCR 高 2~3 个数量级<sup>[28]</sup>, 极大地提高了检测极限, 且 LAMP 结果可以直接添加 SYBR Green 荧光染料, 使其由橙色变为绿色, 肉眼可以分辨, 从而结果实现可视化<sup>[29]</sup>, 或添加 HNB(羟基萘酚兰, Hydroxy naphthol blue)荧光染料, 结果由浅蓝变为深蓝, 结果实现可视化<sup>[30]</sup>。

当目的基因和其他反应试剂在 60~65℃恒定温度下孵育, 进行以下的反应步骤。具体的 LAMP 反应过程包括哑铃状模板合成阶段、循环扩增阶段、伸长和再循环阶段<sup>[12]</sup>。LAMP 哑铃状模板合成阶段(图 2)。内引物 FIP 的 F2 序列结合到模板 DNA 的 F2c 上, 引导合成互补的 DNA 链。同时, 外引物 F3 结合到模板 DNA 的 F3c 上引导合成模板 DNA 的互补链, 并通过置换反应, 释放出由 FIP 引导合成的互补链。被释放出的互补链, 其末端的 F1c 和 F1 进行碱基配对, 形成了一个环状结构; 引物 BIP 结合到其另一端, 引导

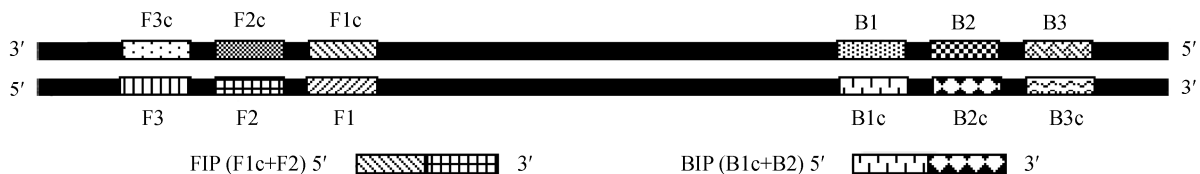


图 1 LAMP 反应中引物设计  
Fig. 1 Primer design of the LAMP reaction

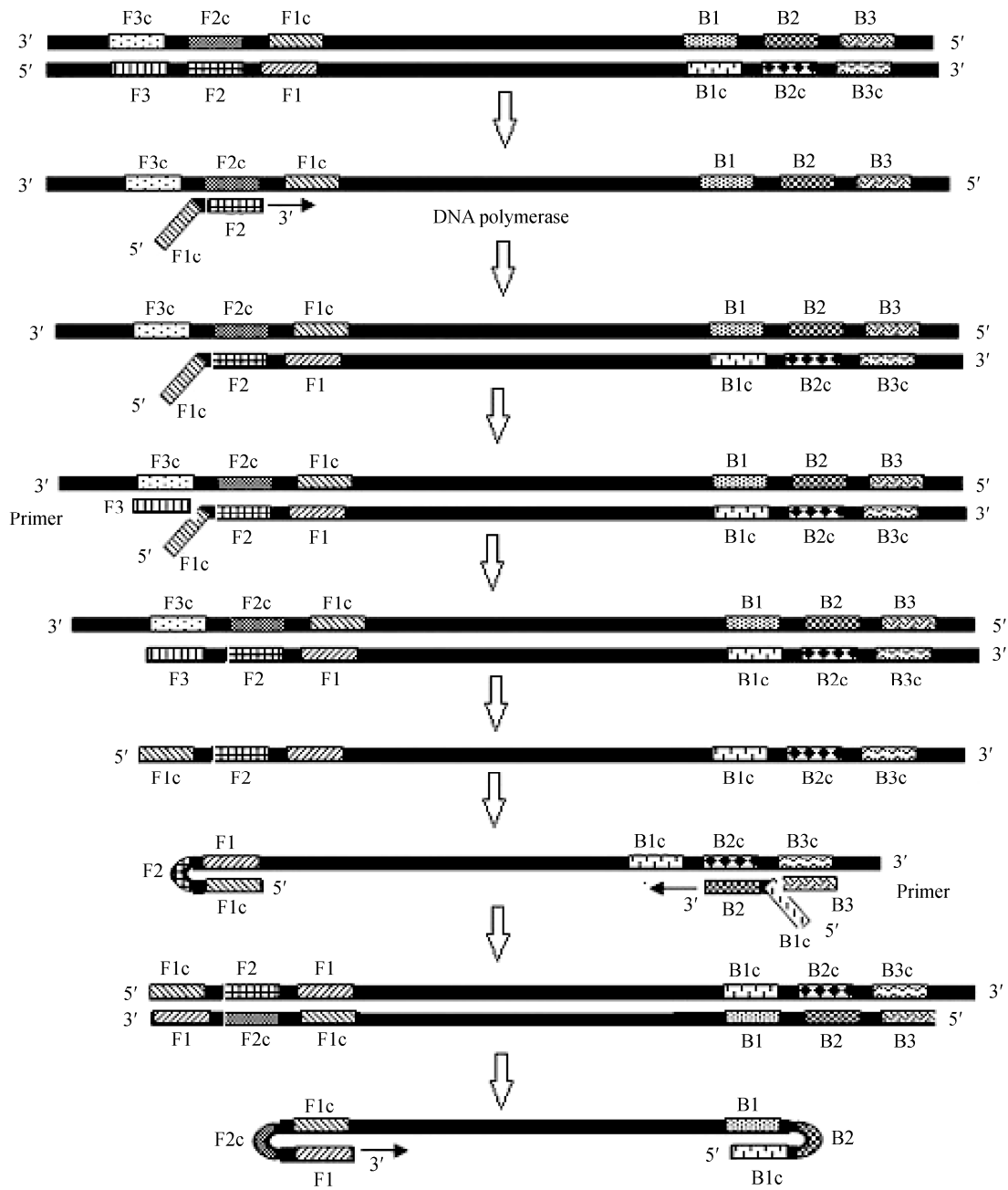


图 2 LAMP 反应中哑铃结构的形成

Fig. 2 Dumbbell-like structure producing of the LAMP reaction

合成该链的互补链, 并且外引物 B3 也引导合成该链的互补链, 同时置换出 B1P 引导合成的互补链。由 B1P 引导合成的互补链被置换后两端自动成环, 形成了一条两端环状的单链(哑铃结构)结构。

随后的 LAMP 反应都以这种哑铃结构的 DNA 原料进行循环扩增及伸长和再循环反应(图 3)。通过此

过程, 结果在同一条链上互补序列周而复始形成大小不一的结构, 最终电泳检测可见扩增产物是大小不等的 DNA 片段组成, 呈现梯度条带。

## 2 LAMP 技术特征

LAMP 技术是以核酸为模板进行扩增反应, 同

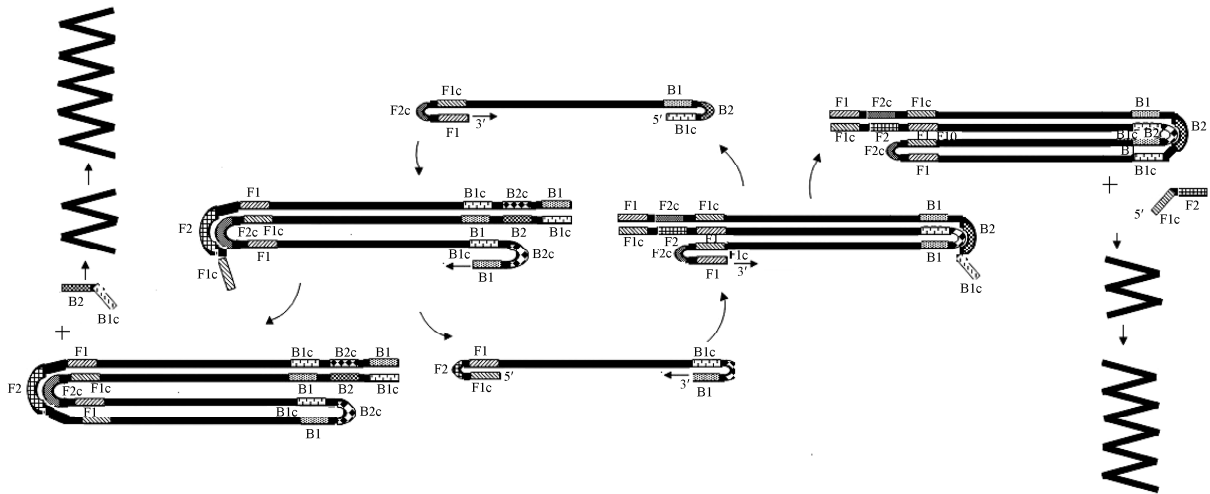


图 3 LAMP 反应过程中循环扩增阶段

Fig. 3 Cycling amplification step of the LAMP reaction

PCR 技术相比, 具有快速、特异、简便等优点, 具体表现在:

### 2.1 特异性

LAMP 技术通过 6 个不同部位的 4 对引物相互作用来产生扩增效应, 反应要求四对引物完全匹配才能进行扩增, 这就需要严格设计靶序列上的 6 个独立区域, 获得比 PCR 更高的特异性; 并有研究表明, LAMP 反应受非特异性(比如 DNA 纯度、生物杂质等)影响比 PCR 少<sup>[31,32]</sup>。

### 2.2 快速、高效

LAMP 不需要加热变性, 省去 PCR 的热循环步骤, 在 60~65 °C 恒温条件下, 30~60 min 即可完成扩增反应。Nagamine 等<sup>[33]</sup>对 LAMP 方法进行优化, 缩短了反应时间, 整个反应在 30 min 内完成, 提高了检测效率。

### 2.3 高灵敏度

LAMP 反应在 60 min 内将模板 DNA 扩增  $10^9$  倍, 比 PCR 技术高 2~3 个数量级<sup>[15,28]</sup>, LAMP 与巢式 PCR 技术相比, 高 1 个数量级, 反应时间仅需要 70 min, 而巢式 PCR 需要 300 min<sup>[34]</sup>。

### 2.4 简单恒温设备

LAMP 是在等温状态下进行的, 不需要 PCR 反应中热变性要求, 因此, 在反应过程中, 可借助普通水浴锅或其他具有稳定热源的设备可完成反应, 而

PCR 反应需要专用仪器设备。

### 2.5 结果可视化

普通 PCR 产物需要进行凝胶电泳, 在紫外灯下观察扩增产物呈一定大小的条带, 而 LAMP 凝胶电泳检测时观察到梯状条带; 除利用电泳检测外, 可以观察扩增管的浊度, 因为 LAMP 反应后形成副产品焦磷酸镁, 反应体系的浑浊度与扩增的目的基因量成正比<sup>[28]</sup>; Norihiro 等<sup>[35]</sup>利用 LAMP 反应产物的浑浊度定量研究目的基因; 最为简便的检测方法是在反应产物中添加荧光染料(SYBR Green I<sup>[36,37]</sup> 或者 HNB<sup>[20]</sup>)直接肉眼判定结果; 添加 SYBR Green I, 如果含有扩增产物, 反应混合物变绿; 如果没有, 保持 SYBR Green I 的橙色不变; 添加 HNB, 如果含有扩增产物, 反应混合物变淡蓝; 如果没有, 保持 HNB 的深蓝色不变。

## 3 LAMP 技术的关键点

虽然 LAMP 技术广泛用于核酸检测中, 但 LAMP 技术同 PCR 技术相比, 除去反应程序不同外, 最主要的不同是引物, LAMP 反应需要两条内引物和两条外引物, 其中内引物分别包含正义链和反义链中一段序列, 正确设计引物对基因的扩增效率是非常重要的。目前, LAMP 引物设计软件由专门的在线引物设计网站完成 (<http://primerexplorer.jp/e/>)<sup>[12,35]</sup>; 在设计引物时还需要注意以下几点<sup>[35]</sup>。

3.1 内引物两端不能富含 AT;

3.2  $T_m$  值应在 55~65 °C;

3.3 F2 位点的 5'到 F1 的 5'距离与 B2 位点的 5'到 B1 的 5'距离有 40~60 bp;

3.4 扩增 DNA 的长度应小于 200 bp(F2 到 B2 距离,包含 F2 和 B2);

3.5 引物纯度对扩增结果非常重要,推荐使用 HPLC 纯化 FIP 和 BIP 引物。

#### 4 LAMP 技术在转基因组分检测中的应用

由于 LAMP 技术具有上述优点,已作为实验室快速诊断疾病的一种有效工具,同时也用于食物中病原菌的检测。随着转基因产品大规模商业化生产,转基因组分的快速检测也受到广泛关注,LAMP 用于转基因大豆<sup>[34,38]</sup>、棉花<sup>[39]</sup>、番木瓜<sup>[11]</sup>、水稻<sup>[30]</sup>等作物和动物<sup>[40]</sup>中的检测越来越多,并且 LAMP 技术也同其他技术结合进行转基因组分的检测<sup>[41-43]</sup>。现分别讲述 LAMP 技术在转基因组分快速检测中的应用。

##### 4.1 LAMP 技术对转基因组分检测的灵敏度

作为 DNA 扩增可替换的方法,LAMP 技术在很多核酸检测中得到快速、广泛的应用。而在农产品中转基因组分检测的应用,需要了解在转基因组分检测中的灵敏度问题。2009 年, Lee 等<sup>[37]</sup>对 LAMP 灵敏性进行了研究,主要通过两种途径评价:拷贝数的检测和含有 10 个拷贝数靶标的样品检测。通过梯度稀释质粒 pGreenII(含 NOS 启动子)作为模板进行 LAMP 反应,发现 LAMP 检测出 0.6 个拷贝数的质粒中含有的转基因组分;同时以转基因油菜 MS8/RF3 的基因组为模板,以 RF3 结合处的序列设计 LAMP 引物进行灵敏性比较,发现 RF3 靶标中含有 0.8 个拷贝数时被检测出,而 Weng 等<sup>[44]</sup>对转基因油菜 GT73 进行检测时发现,定性 PCR 和定量 PCR 可以检测 13 pg DNA(大约 10 单倍体)和 1.3 pg DNA(大约 1 个单倍体),可见,LAMP 技术的灵敏度高于 PCR 技术。

##### 4.2 LAMP 技术检测转基因组分 35S 启动子

花椰菜花叶病毒 35S 启动子,经常作为转基因转化载体中的基因元件<sup>[45]</sup>。2004 年, Fukuta 等<sup>[38]</sup>利用 LAMP 技术检测转基因大豆中 35S 启动子,分别以含 0.5%~5%的转基因大豆为检测对象,筛选 35S 启动子的 LAMP 引物,建立 LAMP 技术检测转基因组

分 35S 启动子方法,并用此方法对含 5%、2%、1%、0.5%、0%的转基因大豆进行检测,发现含 5%转基因大豆的基因组 DNA 在 32min 时扩增开始指数上升,其他 2%、1%、0.5%分别在 35 min、41 min、47 min 时开始指数上升。Randhawa 等<sup>[46]</sup>也利用 LAMP 技术对转基因棉花中 p-35S、P-FMV、aadA、nptII、uidA 外源基因进行检测,建立了快速、简便的 LAMP 检测棉花中转基因组分方法。并且国内已授权 LAMP 技术检测转基因组分 35S 启动子的三项发明专利。

##### 4.3 LAMP 技术对大豆中转基因组分检测中的应用

自转基因农产品大规模商业化生产以来,转基因大豆占有比例最大,随着各国对转基因产品出台的相关各种法律法规,对转基因产品的检测技术要求也越来越高。Guan 等<sup>[36]</sup>建立检测转基因大豆 GTS40-3-2 和 MON89788 的可视 LAMP 方法,筛选出针对 GTS40-3-2 和 MON89788 的 LAMP 专用引物,并对 LAMP 技术检测这两种转基因大豆品种的检测限进行比较,发现可视化 LAMP 技术最低可检测 4 个单倍体大豆基因组,而传统的 PCR 技术检测 GTS40-3-2 的 LOD 为 40 个拷贝<sup>[47]</sup>,MON89788 的 LOD 为 8 个单个体基因组拷贝数<sup>[36]</sup>。同时 Liu 等<sup>[34]</sup>对转基因大豆中 35S、EPSPS 等基因进行不同方法的比较,发现:LAMP 技术敏感性比巢式 PCR 技术高 10 倍,并且花费时间段。可见,LAMP 技术可快速灵敏地检测大豆中转基因成分。

##### 4.4 LAMP 技术对玉米中转基因组分检测中的应用

目前商业化生产的转基因玉米种类繁多,比如:T25、BT11、BT176、MON863、MIR162、MIR604、NK603、LY038 等,这些转基因玉米主要用于饲料加工生产中,然而,为明确转基因玉米的具体品系,转基因组分的检测是必不可少的。利用 LAMP 技术快速简便的检测转基因玉米的研究也越来越多。Xu 等<sup>[48]</sup>建立 LAMP 检测转基因玉米 T25 的特异性方法,检测限达 5 g/kg。王清华等<sup>[49]</sup>建立检测转基因玉米 BT 11 品系的 LAMP 方法,可特异性检测出转基因玉米 BT11 品系并且检测灵敏度可达 0.5%,并且稳定性良好。闫兴华等<sup>[50]</sup>建立快速检测转基因玉米 LY038 中外源 cordapA 基因的 LAMP 技术,结果可检测到 0.01%的样本,是常规 PCR 方法的 5 倍。Chen 等<sup>[51]</sup>

分别对转基因玉米 DAS-59122-7、T25、BT176、TC1507、MON810、BT11 和 MON863 建立 LAMP 检测方法, 分别对含有 0 到 2% 转基因样品进行检测, 结果稳定可靠。该方法不需要特殊仪器、快速简便, 在基层和现场检测中有很好的应用前景。

#### 4.5 LAMP 技术对水稻中转基因组分检测中的应用

随着全球转基因作物的品种和种植面积逐年扩大, 转基因产品也越来越多地进入我们的生活中。而转基因抗虫水稻(TT51-1)自 2009 授予安全证书后, 并没有进入商业化生产阶段, 因此对市场中水稻开展转基因成分检测是非常有必要的。Chen 等<sup>[30]</sup>建立了对我国转基因水稻 TT51-1、KMD1 和 KF6 快速检测的 LAMP 技术。该研究优化了检测转基因水稻 TT51-1、KMD1 和 KF6 的 LAMP 方法, 并与传统的 PCR 技术进行比较, 发现 LAMP 技术的敏感性达到 0.01%~0.005% GM, 比传统的 PCR 检测技术高 1~2 个数量级, 并且同时比较了 SYBR Green 和 HNB 两种染料对可视化结果的效果。

#### 4.6 LAMP 技术在转基因动物检测中的应用

目前转基因动物的主要应用于分子生物学、免疫学、药品制造业和器官移植等领域。转基因动物的安全性也是社会监管很重要的一部分。除常规 PCR 检测外, LAMP 技术也用于转基因动物外源基因的检测中。Zhai 等<sup>[40]</sup>利用 LAMP 技术对转基因牛中外源基因 hLTF 和 hLALBA 进行检测, 添加 SYBR Green I 后直接肉眼观察, 与传统 PCR 技术相比, LAMP 技术灵敏度提高 10~100 倍, 可最低检测靶标基因 10 个拷贝数。该快速检测方法可用于实验室和田间, 尤其是分子检测设备匮乏的实验室和研究机构。

### 5 未来展望

LAMP 技术自发展到现在已有 10 多年, 已成功用于核酸相关的检测中。相比传统的 PCR 技术, 该技术具有反应时间短、费用低、操作简单、特异性、结果易检测及不需要精密设备等优点。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, 食品中转基因组分的检测需求也会越来越大, 同时, 转基因组分检测还要求检测方法必须具有高灵敏度、高特异性、易操作, 便于在基层检测工作中推广使用, 因此将 LAMP 快速检测技术运用到作

物转基因检测中具有重要意义。

#### 参考文献

- [1] Querci M, Van den Bulcke M, Zel J, *et al.* New approaches in GMO detection[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 396(6): 1991–2002.
- [2] Michelini E, Simoni P, Cevenini L, *et al.* New trends in bioanalytical tools for the detection of genetically modified organisms: an update[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2008, 392(3): 355–367.
- [3] No N. 31 Ministry of Agriculture and Forestry of Korea, Seoul, Korea, 2000, 22.
- [4] Gruère GP, Rao S. A review of international labeling policies of genetically modified food to evaluate India's proposed rule[J]. 2007.
- [5] No N. Food and Marketing Bureau. Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan, Tokyo, Japan, 1775.
- [6] Matsuoka T, Kuribara H, Takubo K, *et al.* Detection of recombinant DNA segments introduced to genetically modified maize (*Zea mays*) [J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(7): 2100–2109.
- [7] Dorries HH, Remus I, Gronewald A, *et al.* Development of a qualitative, multiplex real-time PCR kit for screening of genetically modified organisms (GMOs) [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 396(6): 2043–2054.
- [8] Grohmann L, Brunen-Nieweler C, Nemeth A, *et al.* Collaborative trial validation studies of real-time PCR-based GMO screening methods for detection of the bar gene and the ctp2-cp4epsps construct[J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(19): 8913–8920.
- [9] Shrestha HK, Hwu KK, Wang SJ, *et al.* Simultaneous detection of eight genetically modified maize lines using a combination of event- and construct-specific multiplex-PCR technique[J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(19): 8962–8968.
- [10] Liu J, Guo J, Zhang H, *et al.* Development and in-house validation of the event-specific polymerase chain reaction detection methods for genetically modified soybean MON89788 based on the cloned integration flanking sequence[J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(22): 10524–10530.
- [11] Guo J, Yang L, Liu X, *et al.* Characterization of the exogenous insert and development of event-specific PCR detection methods for genetically modified Huanong No. 1 papaya[J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(16): 7205–7212.
- [12] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12): E63.
- [13] Endo S, Komori T, Ricci G, *et al.* Detection of gp43 of Paracoc-

- cidoides brasiliensis by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 234(1): 93–97.
- [14] Osawa R, Yoshida A, Masakiyo Y, *et al.* Rapid detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* using a loop-mediated isothermal amplification method [J]. *Oral Microbiol Immunol*, 2007, 22(4): 252–259.
- [15] Fukuta S, Kato S, Yoshida K, *et al.* Detection of tomato yellow leaf curl virus by loop-mediated isothermal amplification reaction[J]. *J Virol Methods*, 2003, 112(1–2): 35–40.
- [16] Poon LL, Leung CS, Chan KH, *et al.* Detection of human influenza A viruses by loop-mediated isothermal amplification[J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(1): 427–430.
- [17] Chen Q, Li J, Deng Z, *et al.* Comprehensive detection and identification of seven animal coronaviruses and human respiratory coronavirus 229E with a microarray hybridization assay[J]. *Intervirology*, 2010, 53(2): 95–104.
- [18] Kuboki N, Inoue N, Sakurai T, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes[J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(12): 5517–5524.
- [19] Han ET, Watanabe R, Sattabongkot J, *et al.* Detection of four *Plasmodium* species by genus- and species-specific loop-mediated isothermal amplification for clinical diagnosis[J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(8): 2521–2528.
- [20] Karanis P, Thekisoe O, Kiouptsi K, *et al.* Development and preliminary evaluation of a loop-mediated isothermal amplification procedure for sensitive detection of cryptosporidium oocysts in fecal and water samples[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(17): 5660–5662.
- [21] Hong TC, Mai QL, Cuong DV, *et al.* Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus[J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(5): 1956–1961.
- [22] Yoshikawa T, Ihira M, Akimoto S, *et al.* Detection of human herpesvirus 7 DNA by loop-mediated isothermal amplification[J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(3): 1348–1352.
- [23] Torres C, Vitalis EA, Baker BR, *et al.* LAVA: an open-source approach to designing LAMP (loop-mediated isothermal amplification) DNA signatures[J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12: 240.
- [24] Tani H, Teramura T, Adachi K, *et al.* Technique for quantitative detection of specific DNA sequences using alternately binding quenching probe competitive assay combined with loop-mediated isothermal amplification[J]. *Anal Chem*, 2007, 79(15): 5608–5613.
- [25] Reddy AK, Balne PK, Reddy RK, *et al.* Development and evaluation of loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and inexpensive detection of cytomegalovirus DNA in vitreous specimens from suspected cases of viral retinitis[J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(6): 2050–2052.
- [26] Nagai S, Yamamoto K, Hata N, *et al.* Study of DNA extraction methods for use in loop-mediated isothermal amplification detection of single resting cysts in the toxic dinoflagellates *Alexandrium tamarense* and *A. catenella*[J]. *Mar Genomics*, 2012, 7: 51–56.
- [27] Fu S, Qu G, Guo S, *et al.* Applications of loop-mediated isothermal DNA amplification[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2011, 163(7): 845–850.
- [28] Mori Y, Nagamine K, Tomita N, *et al.* Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 289(1): 150–154.
- [29] Rostamkhani N, Haghazari A, Tohidfar M, *et al.* Rapid Identification of Transgenic Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Plants by Loop-mediated Isothermal Amplification[J]. *Czech J Genet Plant Breed*, 2011, 47(4): 140–148.
- [30] Chen X, Wang X, Jin N, *et al.* Endpoint visual detection of three genetically modified rice events by loop-mediated isothermal amplification[J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(11): 14421–14433.
- [31] Kaneko H, Iida T, Aoki K, *et al.* Sensitive and rapid detection of herpes simplex virus and varicella-zoster virus DNA by loop-mediated isothermal amplification[J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(7): 3290–3296.
- [32] Nagamine K, Watanabe K, Ohtsuka K, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification reaction using a non-denatured template[J]. *Clin Chem*, 2001, 47(9): 1742–1743.
- [33] Nagamine K, Hase T, and Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers[J]. *Mol Cell Probes*, 2002, 16(3): 223–229.
- [34] Liu M, Luo Y, Tao R, *et al.* Sensitive and rapid detection of genetic modified soybean (Roundup Ready) by loop-mediated isothermal amplification[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2009, 73(11): 2365–2369.
- [35] Tomita N, Mori Y, Kanda H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products[J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(5): 877–882.
- [36] Guan X, Guo J, Shen P, *et al.* Visual and rapid detection of two genetically modified soybean events using loop-mediated isothermal amplification method[J]. *Food Anal Methods*, 2010, 3(4):

- 313–320.
- [37] Lee D, La Mura M, Allnutt TR, *et al.* Detection of genetically modified organisms (GMOs) using isothermal amplification of target DNA sequences[J]. *BMC Biotechnol*, 2009, 9: 7.
- [38] Fukuta S, Mizukami Y, Ishida A, *et al.* Real-time loop-mediated isothermal amplification for the CaMV-35S promoter as a screening method for genetically modified organisms[J]. *Euro Food Res Technol*, 2004, 218(5): 496–500.
- [39] Rostamkhani N, *et al.* rapid identification of transgenic cotton plants by LAMP [J]. *Czech J Genet Plant Breed*, 2011, 47(4): 140–148.
- [40] Zhai S, Liu C, Zhang Q, *et al.* Detection of two exogenous genes in transgenic cattle by loop-mediated isothermal amplification[J]. *Transgenic Res*, 2012, 21(6): 1367–1373.
- [41] Zhang M, Liu Y, Chen L, *et al.* One simple DNA extraction device and its combination with modified visual loop-mediated isothermal amplification for rapid on-field detection of genetically modified organisms[J]. *Anal Chem*, 2013, 85(1): 75–82.
- [42] Kiddle G, Hardinge P, Buttigieg N, *et al.* GMO detection using a bioluminescent real time reporter (BART) of loop mediated isothermal amplification (LAMP) suitable for field use[J]. *BMC Biotechnol*, 2012, 12: 15.
- [43] Ahmed MU, Saito M, Hossain MM, *et al.* Electrochemical genosensor for the rapid detection of GMO using loop-mediated isothermal amplification[J]. *Analyst*, 2009, 134(5): 966–972.
- [44] Weng H, Yang L, Liu Z, *et al.* Novel reference gene, High-mobility-group protein I/Y, used in qualitative and real-time quantitative polymerase chain reaction detection of transgenic rapeseed cultivars[J]. *J AOAC Int*, 2005, 88(2): 577–584.
- [45] Zhang D and Guo J. The development and standardization of testing methods for genetically modified organisms and their derived products[J]. *J Integr Plant Biol*, 2011, 53(7): 539–551.
- [46] Randhawa GJ, Singh M, Morisset D, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification: rapid visual and real-time methods for detection of genetically modified crops[J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(47): 11338–11346.
- [47] Rott ME, Lawrence TS, Wall EM, *et al.* Detection and quantification of roundup ready soy in foods by conventional and real-time polymerase chain reaction[J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(16): 5223–5232.
- [48] Xu J, Zheng Q, Yu L, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of genetically modified maize T25[J]. *Food Sci & Nutri*, 2013, 1(6): 432–438.
- [49] 王清华, 徐君怡, 曹冬梅, 等. 转基因玉米 BT11 品系环介导等温扩增 (LAMP) 检测方法的建立[J]. *食品安全质量检测学报*, 2013, 4(3): 868–872.
- Wang QH, Xu JY, Cao DM, *et al.* Establishing a loop-mediated isothermal amplification(LAMP) detection method for genetically modified maize BT11[J]. *J Food Safe Qual*, 2013, 4(3): 868–872.
- [50] 闫兴华, 许文涛, 商颖, 等. 环介导等温扩增技术 (LAMP) 快速检测转基因玉米 LY038[J]. *农业生物技术学报*, 2013, 21(5): 621–626.
- Kan XH, Xu WT, Shang Y, *et al.* Loop-Mediated Isothermal Amplification Method(LAMP) for the Rapid Detection of Transgenic Maize(*Zea mays* L.) LY038[J]. *J Agric Biotechnol*, 2013, 21(5): 621–626.
- [51] Chen L, Guo J, Wang Q, *et al.* Development of the visual loop-mediated isothermal amplification assays for seven genetically modified maize events and their application in practical samples analysis[J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(11): 5914–5918.

(责任编辑: 邓伟)

## 作者简介



邢宇俊, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为转基因组分检测。  
E-mail: xingyujun106@126.com



史建荣, 博士, 研究员, 主要研究方向为生物毒素与转基因安全。  
E-mail: shiji@jaas.ac.cn