

转基因苜蓿草 J163 品系特异性 LAMP 检测方法的建立

刘二龙¹, 卢丽², 吕英姿¹, 蒋湘¹, 张旺², 林惠娇¹, 郑高彬¹, 唐婕^{3*},
林学勤¹, 秦焯敏¹

(1. 黄埔出入境检验检疫局, 广州 510730; 2. 广东出入境检验检疫局, 广州 510623;
3. 陕西省动物研究所, 西安 710032)

摘要: 目的 建立针对我国农业部未颁发农业转基因生物安全证书的转基因苜蓿草品系 J163 品系特异性等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)检测方法。**方法** 根据转基因苜蓿草品系 J163 5' 端外源插入片段与苜蓿草基因组 DNA 之间的邻接区序列设计 6 条引物, 建立了转基因苜蓿草 J163 品系特异性 LAMP 检测方法, 并对本方法的特异性、灵敏度进行了测定。**结果** 建立的检测方法特异性于转基因苜蓿草 J163 成分检测, 检测最低 DNA 浓度为(limit of detection, LOD)为 16 pg, 相当于 10 拷贝转基因苜蓿草 J163 基因组 DNA。**结论** 本研究建立的转基因苜蓿草 J163 品系特异性 LAMP 检测方法特异性好, 灵敏度高, 能够快速、准确、稳定地对转基因苜蓿草 J163 成分进行检测分析。

关键词: 等温扩增; 转基因苜蓿 J163; 品系特异性

Establishing an event-specific loop-mediated isothermal amplification detection method for genetically modified alfalfa events J163

LIU Er-Long¹, LU Li², LV Ying-Zi¹, JIANG Xiang¹, ZHANG Wang², LIN Hui-Jiao¹,
ZHENG Gao-Bin¹, TANG Jie^{3*}, LIN Xue-Qin¹, QIN Zhuo-Min¹

(1. Huangpu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510730, China; 2. Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510623, China; 3. Shaanxi Institute of Zoology, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT: Objective To establish a loop-mediated isothermal amplification(LAMP) detection method for genetically modified (GM) Roundup Ready Alfalfa Events J163, which has not been authorized by the Ministry of Agriculture of China. **Methods** The specific primer pairs based on the 5' junction sequence spanning the alfalfa DNA and inserted fragment of J163 were designed and then the LAMP detection system was established. The specificity and sensitivity were analyzed. **Results** The LAMP method was specific for GM alfalfa J163 detection, the limit of detection(LOD) were 16 pg J163 genomic DNA or 10 copies of alfalfa J163 haploid genomic DNA. **Conclusion** The established event-specific LAMP method for GM alfalfa J163 detection had a high specificity and good sensitivity, and was suitable for quantification of J163 samples quickly and accurately.

KEY WORDS: loop-mediated isothermal amplification; genetically modified alfalfa J163; event-specific

*通讯作者: 唐婕, 副研究员, 主要研究方向为微生物与分子生物学。E-mail: 22223520@qq.com

*Corresponding author: TANG Jie, Associate Researcher, Shaanxi Institute of Zoology, Xi'an 710032, China. E-mail: 22223520@qq.com

1 引言

抗草甘膦转基因苜蓿草 J163(商品名 Roundup Ready Alfalfa Events J163)是由美国孟山都公司研制开发一种转基因苜蓿草品系, 2005 年美国 and 加拿大批准环境释放和作为饲料应用^[1], 目前我国尚未批准其进口, 国内外还没有转基因苜蓿草 J163 品系特异性 LAMP 检测方法的报道。

2000 年, Notomi 等^[2,3]开发了环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP), 其原理是针对目的核酸片段的设计一组特异性引物, 利用一种链置换 DNA 聚合酶在约 62 °C 进行等温扩增。该方法具有灵敏度高, 特异性好, 反应时间短, 扩增完成后, 加入特殊的染料, 可通过肉眼判定结果, 可以实现可视化的检测, 广泛应用于病毒、细菌、寄生虫的诊断。目前未见到有转基因苜蓿草 J163 该作物品系特异性 LAMP 可视化检测方法相关文献。

为了对转基因苜蓿草 J163 监管提供必要的技术支持, 本研究基于转基因苜蓿草 J163 5'端外源插入片段与苜蓿草基因组 DNA 之间的邻接区序列列建立了转基因苜蓿草 J163 品系特异性 LAMP 可视化检测方法。

2 材料与方 法

2.1 材料、试剂与仪器

转基因苜蓿草 J163, 转基因玉米品系 MIR162, 转基因玉米品系 89034, 转基因玉米品系 NK63, 转基因玉米品系 BT11, 转基因大米 cry IA(a/b), 非转基因大叶苜蓿, 非转基因小麦, 非转基因油菜籽, 为本实验室储备, 转基因苜蓿草 J163 由重庆出入境检验检疫局惠赠。

主要试剂: Bst DNA polymerase large fragment, 10×Thermopol buffer、MgCl₂ 均购自 New England Biolabs 公司; dNTPs 为天根生化科技公司产品; SYBR green I(10000×)荧光染料为 Invitrogen 公司产品; 植物基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; 引物由英潍捷基公司合成。

主要仪器: CT15RE 高速冷冻离心机(HITACHI); ND2000C 微量分光光度计(Thermo Scientific); S1000PCR 仪(Bio-Rad); Tanon 4200 凝胶成像系统(上海天能); 通用型电泳仪(Bio-Rad); 微量分光光度

计(nanodrop2000c, 美国)、研磨机(IKA, 德国)。

2.2 实验方法

2.2.1 植物材料以及混合样品基因组 DNA 的提取与纯化

称取 100 mg 左右研磨成干粉的样品, 使用天根植物基因组 DNA 提取试剂盒并按照其操作说明书提取基因组 DNA。提取的基因组 DNA 用微量分光光度计 nanodrop2000c 测定浓度。提取的 DNA 溶液在 -20 °C 保存备用。

2.2.2 引物和探针设计

经查找美国专利中查找得到 J163 品系转基因片段部分序列^[4], 其外源插入片段元件组成见图 1。

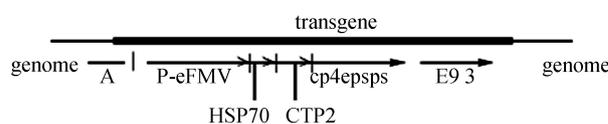


图 1 转基因苜蓿 J163 品系外源插入片段示意图

Fig. 1 The sketch map of inserted exogenous fragment in Roundup Ready alfalfa event J163

genome: 苜蓿草基因组 DNA; P-eFMV: 增强的玄参花叶病毒(FMV35s)启动子; HSP70: 热休克 70kDa 蛋白; CTP2: 叶绿体转运肽基因 2; cp4epsps: 来源于农杆菌 CP4 的莽草酸羟基乙酰转移酶基因(5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸酯合成酶基因); E93: 终止子; A 为引物设计位置

genome: alfalfa genome DNA; P-eFMV: enhanced version of the Figwort Mosaic Virus (FMV)35S Promoter; HSP70: Heat shock 70 kDa protein HSP70; CTP2: the chloroplast transit peptide 2; cp4epsps: 5-enolpyruyl -shikimate-3-phosphate synthase obtained from *Agrobacterium* sp.strain CP4; E93: E93 terminator; A: the location of the primer pair

基于苜蓿基因组 DNA 的 5'端外源启动子插入片段与苜蓿基因组 DNA 之间的邻接区序列分析, 使用 Primer Exploer V4 引物设计软件设计一套特异性的 LAMP 引物, 包括外引物 F3、B3 和内引物 FIP(F1c+F2)、BIP (B1c+B2)、以及环引物 Loop F、Loop B 共六条, 引物碱基序列见表 1。引物委托英潍捷基公司合成。

2.2.3 LAMP 反应体系

LAMP 检测反应体系为 25 μL: 10×Thermopol buffer 2.5 μL、F3 和 B3 各 0.5 μL(10 μmol/L)、FIP 和 BIP 各 1 μL(40 μmol/L)、LF 和 LB 各 0.5 μL(40 μmol/L)、dNTPs 4 μL (10 mmol/L)、MgSO₄ 1 μL(100 mmol/L)、

表1 J163品系特异性 LAMP 引物
Table 1 LAMP primer sets for specific amplification of J163

引物	引物序列(5'→3')
FIP(F1c+F2)	AATTAGCTTCCACTCGAGCAGGAAGTGAAGTGTTCCGGTG
BIP(B1c+B2)	AAAGCCTCAACAAGGTCAGGGTTCTTCATTGATCTCCTGTAGC
F3	CTTCTTTGCCGGGACAAG
B3	CATGTGCTGGAACAGTAGTT
LoopF	ACCTGCAGAAGCTTGATGG
LoopB	GAGTCTCCAAACCATTAGCCA

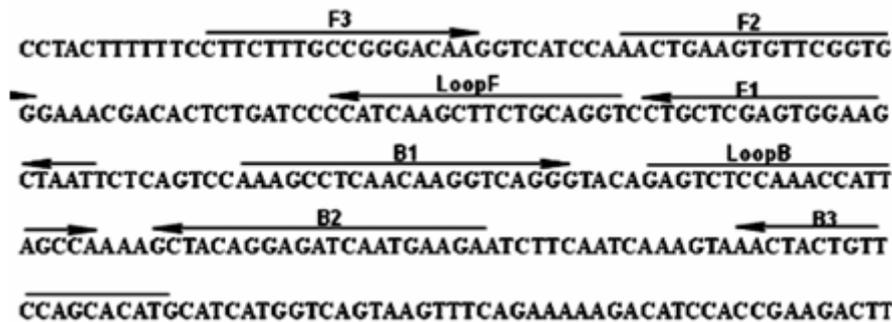


图2 六条引物在5'邻接区序列对应的位置

Fig. 2 Locations of the six primers in 5' flanking sequence

Bst DNA polymerase 1 μL (8 U/ μL)、Template DNA 1 μL 和 11.5 μL ddH₂O。

反应程序为: 63 $^{\circ}\text{C}$ 恒温反应 60 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 加热 2 min 使酶失活, 反应即结束;

检测结果的判定, 采用以下两种方法之一进行结果判定:

1) 颜色变化: 向反应终体系加入 0.2 μL SYBR green I, 1 min 观察结果, 阳性反应呈现黄绿色, 而阴性的反应保持橙色;

2) 电泳检测: LAMP 法扩增的产物是各种不同长度的茎-环状结构 DNA, 因此阳性反应的产物经过 1.5% 琼脂糖电泳检测呈梯形条带, 而阴性反应则没有梯形扩增条带出现。

2.2.4 LAMP 检测方法的特异性

利用 8 种常见植物材料转基因苜蓿草 J163 品系、转基因玉米品系 MIR162、转基因玉米品系 89034、转基因玉米品系 BT11、转基因大米 cry IA(a/b)、非转基因油菜籽、非转基因小麦、非转基因大叶苜蓿的

基因组 DNA 为模板, 采用已建立的转基因苜蓿 J163 品系特异性 LAMP 方法进行扩增, 检测本文建立的方法的特异性。

2.2.5 LAMP 方法的灵敏度

将提取的转基因苜蓿草 J163 基因组 DNA 溶液用 TE 缓冲液梯度稀释至 16 ng、1.6 ng、0.16 ng、0.08 ng、0.016 ng、0.008 ng 和 0.0016 ng 测定建立的检测方法的检测下限(limit of detection, LOD)。

3 结果与分析

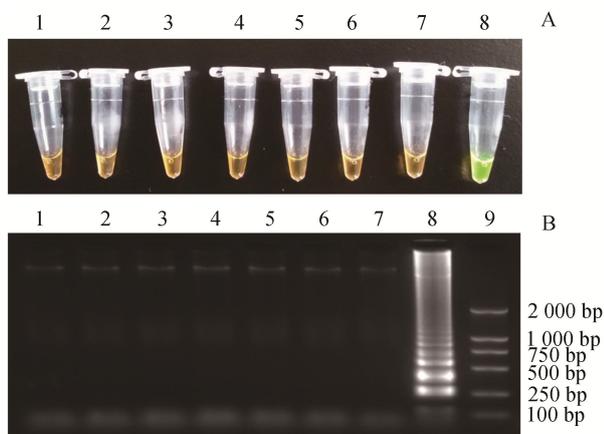
3.1 引物和探针设计

本研究根据转基因苜蓿草 J163 品系的 5' 端外源插入片段和苜蓿草基因组 DNA 邻接区序列进行分析, 设计了多套品系特异性引物, 对引物扩增效果进行筛选和分析, 并对 LAMP 的各组分浓度进行优化, 最终建立转基因苜蓿草 J163 品系特异性 LAMP 检测方法(引物见表 1)。

3.2 特异性测试

为了测试建立的转基因苜蓿草 J163 品系特异性检测方法的特异性, 以 8 种常见作物基因组 DNA 为模板进行 LAMP 扩增。

采用转基因苜蓿草 J163 品系特异性 LAMP 引物进行 LAMP 扩增后, 扩增产物加入 0.2 μ LSYBR green I 后的仅转基因苜蓿 J163 品系 DNA 为模板的扩增产物显黄绿色(图 3 A), 对扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 仅转基因苜蓿 J163 模板的反应有梯状带出现(图 3 B)。表明本研究建立的 LAMP 检测方法特异于转基因苜蓿草 J163 品系的检测。



1-7 为非转基因苜蓿草 J163 作物; 8 为转基因苜蓿草 J163
Lane 1-7: non- Roundup Ready alfalfa event J163 crops; Lane 8: Roundup Ready alfalfa event J163

图 3 建立的 LAMP 检测方法的特异性测试
Fig. 3 Specificity test of the established LAMP assay

3.3 灵敏度测试

在本文中, 提取的转基因苜蓿草 J163 基因组 DNA 浓度为 200 ng/ μ L, DNA 溶液用 TE 缓冲液梯度稀释至 16 ng/ μ L、1.6 ng/ μ L、0.16 ng/ μ L、0.08 ng/ μ L、0.016 ng/ μ L、0.008 ng/ μ L 和 0.0016 ng/ μ L 的 J163 基因组 DNA 模板进行检测, 以大于等于 0.016 ng/ μ L (16 pg/ μ L) 基因组 DNA 为模板时, 扩增后产物经电泳有特征性梯状带, 加入 SYBR green I 会有黄绿色产生。而以 0.008 ng/ μ L 和 0.0016 ng/ μ L 的 J101 基因组 DNA 模板时, 则无上述反应结果(图 4A 和图 4B)。表明该 LAMP 体系可以检测转基因苜蓿草 J163 基因组 DNA 的最低检测限为 0.016 ng (16 pg/ μ L), 由于苜蓿草的基因组 DNA 的估算为 1510 Mbp, 相应的, 重量

大约估算为 1.6 pg^[5], 即本方法可检测到 10 个拷贝的 J163 基因组 DNA。

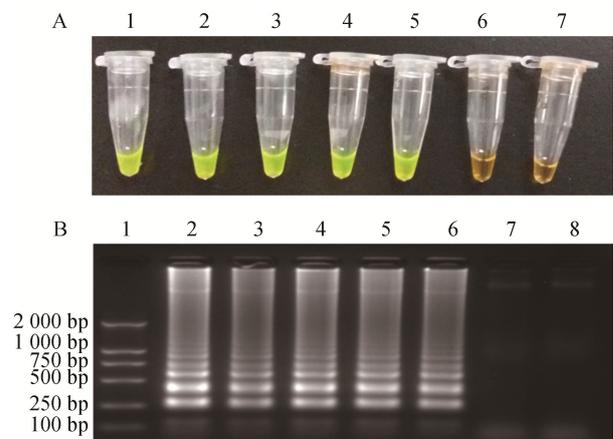


图 4 转基因苜蓿草 J163 品系 LAMP 方法灵敏度测试
Fig. 4 Sensitivity tests for the established LAMP method for Roundup Ready alfalfa event J163
从左到右转基因苜蓿草 J163 基因组 DNA 分别为 16 ng、1.6 ng、0.16 ng、0.08 ng、0.016 ng、0.008 ng、0.0016 ng
The quantities of the J163 genome in each dilution from left to right were 16 ng, 1.6 ng, 0.16 ng, 0.08 ng, 0.016 ng, 0.008 ng and 0.0016 ng per reaction, respectively.

4 讨论

目前我国奶牛存栏数为 1500 万头, 对优质饲草需求量非常大。转基因苜蓿通过饲料进入动物养殖的食物链, 可能对于人的健康产生影响。根据《农业转基因生物安全管理条例》等法规, 为保障消费者的知情权, 转基因产品标识制度在 30 多个国家和地区应用^[6]。目前各国强制标识的转基因限量各不相同。欧盟和俄罗斯为 0.9%^[7,8], 韩国和日本分别是 3%和 5%^[9,10]。中国目前实施无阈值的强制性标识制度^[11]。

对转基因产品标识需要检测方法的支撑, 国内外已建立了多种转基因作物的检测方法^[6,12,13]。目前, 国内转基因苜蓿草检测策略大多采用检测启动子、终止子或 EPSPS 基因等筛查检测从而确定是否转基因苜蓿草, 但对于不同品系的转基因苜蓿草不能进行鉴别性检测, 无法满足转基因产品身份验证等检测、监测和安全管理的需求。品系特异性检测方法是基于外源插入片段和宿主基因接合区的边界序列建立特异性的检测方法, 可以对转基因产品品系进行判定, 被认为是最适合转基因标识的检测判定方法^[6,14]。

本文通过转基因苜蓿草 J163 品系的 5' 端外源插

入片段(P-eFMV启动子端)与苜蓿草基因组DNA之间的邻接区序列,结合序列信息的分析,设计并筛选一组共6条LAMP引物,建立特异性强、灵敏度高的转基因苜蓿草J163品系特异性LAMP可视化检测方法。相较其他方法,有以下特点:本文设计和筛选的一组共6条LAMP引物对靶序列的8个特异序列区的识别,保证了LAMP扩增的高度特异性;环引物的加入扩增效率大大提高,耗时短,在1h可将靶序列扩增至 10^9 倍^[2];此外,在等温条件下(63℃)采用特异性酶进行扩增,对实验仪器要求低,检测成本低,操作简便;扩增产物通过加入显色染料,无需仪器,可通过肉眼快速观察结果,利于现场的临床样品实现快速可视化检测。

结果表明,本文建立的转基因苜蓿草J163品系特异性LAMP检测方法可满足转基因苜蓿草J163产品身份验证等检测需求,可为我国出入境口岸机构对进境转基因苜蓿草的监管提供有力的技术支撑。

参考文献

- [1] Alexander TW, Reuter T, McAllister TA. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction assays for an alfalfa (*Medicago sativa*)-specific reference gene to use in monitoring transgenic cultivars [J]. *Agric Food Chem*, 2007, 8(55): 2918–2922.
- [2] Mori Y, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A rapid accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases[J]. *J Infect Chemother*, 2009, 15(2): 62–69.
- [3] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12): E63.
- [4] Beazley KA, Ferreira KL, Fltzepamck SN, *et al.* Glyphosate tolerant alfalfa events and methods for detection[P]. United States patent, US 7,566,817 B2, Jul. 28, 2009.
- [5] Arumuganthan K, Earle ED. Nuclear DNA content of some important plant species[J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1991, 9: 208–218.
- [6] Wu G, Wu YH, Xiao L, *et al.* Event-specific qualitative and quantitative PCR detection of genetically modified rapeseed Topas 19/2 [J]. *Food Chem*, 2008, (1): 232–238.
- [7] European Commission (2003a). Commission regulation (EC) No. 1829/2003. Concerning on genetically modified food and feed [S].
- [8] Chief Medical Officer of the Russian Federation. Sanitary-epidemiological rules SanPiN 2.3.2.2227-07, Additions and changes #5 to SanPiN 2.3.2.1078-01 'Hygiene requirements to safety and nutrition value of food products'. The Resolution of the Chief Medical Officer of the Russian Federation of June 25, 2007, # 42.
- [9] Matsuoka, T. GMO labeling and detection methods in Japan. APEC-JIRCAS Joint Symposium and Workshop on Agricultural Biotechnology, 2001
- [10] Ministry of Agriculture and Forestry of South Korea. Guidelines for labeling of genetically modified agricultural products. MAF Notification, 31, 2000.
- [11] 中华人民共和国农业部,第10号令《农业转基因生物标识管理办法》,2002.
Ministry of Agriculture of the People's Republic of China, Order 10 Administration of Agricultural Genetically Modified Organisms Labeling, 2002.
- [12] 杨立桃,蒋玲曦,沈恺琳,等.转基因棉花MON88913转化体特异性定性、定量PCR检测方法[J].食品安全质量检测技术, 2009, 1: 10–19.
Yang LT, Jiang LX, Shen KL, *et al.* Event-specific qualitative and quantitative PCR detection methods for genetically modified cotton MON88913 [J]. *Food Saf Qual Detect Technol*, 2009, 1: 10–19.
- [13] 汪秀秀,杨捷琳,宋青,等.转基因棉花GHB119品系特异性定量PCR检测方法的建立[J].农业生物技术学报, 2014, 3: 380–388.
Wang XX, Yang JL, Song Q, *et al.* Establishment of a Novel Event-specific Quantitative PCR Method for genetically Modified Cotton(*Gossypium sp.*)GHB119 Detection [J]. *J Agric Biotechnol*, 2014, 22(3): 380–388.
- [14] Zimmermann A, Lüthy J, Pauli U. Event specific transgene detection in Bt11 corn by quantitative PCR at the integration site [J]. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 2000, 33: 210–216.

(责任编辑:白洪健)

作者简介



刘二龙,工程师,主要研究方向为微生物与分子生物学。
E-mail: erlongliu@126.com

唐婕,副研究员,主要研究方向为微生物与分子生物学。
E-mail: 22223520@qq.com