

# 环介导等温扩增法检测转基因玉米 NK603

## Loop-mediated isothermal amplification method for detection of transgenic maize NK603

杨丽霞

YANG Li-xia

(长沙市食品质量监督检测中心, 湖南 长沙 410013)

(Changsha Centre of Supervision & Inspection on Food Quality Safety, Changsha, Hunan 410013, China)

**摘要:**针对转基因玉米的特异基因(GenBank accession number AX342369)设计引物,建立转基因玉米 NK603 品系特异性基因环介导等温扩增方法。对该方法进行特异性、灵敏度分析。结果表明:LAMP 法检测转基因玉米 NK603 品系成分特异性强、灵敏度高、定性检出限为 0.1%。该方法快速、简便,可在作物转基因筛查中推广使用。

**关键词:**转基因;玉米;NK603 品系,环介导等温扩增

**Abstract:** The specific LAMP primers of genetically modified maize NK603 were designed on the basis of the published sequence (GenBank accession number AX342369). Established the specific loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for the detection of the transgenic maize line NK603 strains. The specificity and sensitivity of this method were evaluated. The results showed that LAMP could detect the transgenic maize NK603 from several GM events specifically and effectively with LOD of 0.1%. Since this method is rapid, simple, it could be applied in GMO detection.

**Keywords:** genetically modified organism (GMO); maize; NK603 strains; loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

转基因玉米品系 NK603 是由美国孟山都公司(Monsanto Company)研制开发,将耐除草剂基因 CP4 EPSPS 导入玉米中,这一基因编码的 CP4 EPSPS 蛋白,可以使玉米抗草铵膦<sup>[1]</sup>。目前该转基因玉米虽已经欧盟正式批准用于食品和饲料,但其安全性仍然备受关注。

2002 年,中国卫生部出台了《转基因食品卫生管理办法》。该《办法》规定:对“以转基因动植物、微生物或者其直接加工品为原料生产的食品 and 食品添加剂”必须进行标识。因此建立一套方便、快捷的转基因产品检测技术是贯彻标识制度的重要前提。

**基金项目:**湖南省科技计划重点项目(编号:2013WK2003)

**作者简介:**杨丽霞(1981—),女,长沙市食品质量监督检测中心高级工程师,博士。E-mail: yanglixia612@163.com

**收稿日期:**2015-11-24

目前对转基因产品的检测主要是基于核酸水平的 PCR 检测,包括多重 PCR(Multiplex PCR)<sup>[2]</sup>、实时定量 PCR(Real-time PCR)<sup>[3]</sup>等,但是这些方法需要热循环设备,存在操作步骤繁琐,检测时间较长,不适合于现场实时检测以及跟踪检测。Notomi 等<sup>[4]</sup>开发了一种新颖的恒温核酸扩增方法——环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP),该方法针对靶基因的 6 个区域设计 4 种特异引物,提高了检测的特异性,同时其扩增效率较普通 PCR 高,很大程度地提高了灵敏度。LAMP 技术具有简单、快速、特异性强等优点,已用于致病菌<sup>[5-6]</sup>、病毒<sup>[7]</sup>、寄生虫<sup>[8]</sup>、过敏原<sup>[9-11]</sup>、物种鉴定<sup>[12-14]</sup>等检测中。随着越来越多的转基因产品大规模商业化生产,转基因组分的快速检测受到广泛关注,而快速简便的 LAMP 已成功应用于转基因大豆<sup>[15]</sup>、棉花<sup>[16]</sup>、玉米<sup>[17]</sup>、水稻<sup>[18-19]</sup>等作物的检测。本研究拟根据 LAMP 技术原理,建立转基因玉米 NK603 的品系特异性 LAMP 快速检测方法,适合在基层检测单位及现场快检工作中的推广使用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

转基因标准品:转基因玉米 NK603、MON863、MON810,国家标准物质信息中心;

转基因水稻 Bt63 和转基因玉米混合样品(含有 MIR604、Bt11、GA21、59122、Bt176):湖南省出入境检验检疫局。

### 1.2 主要试剂和仪器

通用型 Real-time LAMP 试剂盒:广州华峰生物科技有限公司;

DNA 抽提试剂盒、100 bp DNA ladder、Premix Taq™:宝生物工程(大连)有限公司;

超微量核酸蛋白分析仪:BD1000 型,北京五洲东方科技发展有限公司;

实时荧光定量 PCR 仪:7500 FAST 型,美国应用生物系统公司。

### 1.3 DNA 提取

转基因玉米 NK603 及其他的转基因玉米、水稻的 DNA 提取均参照 DNA 抽提试剂盒中的试验操作步骤。

### 1.4 引物序列

根据转基因玉米 NK603 品系特异性基因序列(GenBank accession number AX342369),采用 LAMP 专用引物设计软件设计 3 套 LAMP 引物(表 1),由上海生工生物工程(上海)股份有限公司合成。经过引物筛选试验,最终确定一套特异性引物,引物设计情况见图 1,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Sequences of primers

引物	序列(5'→3')
NK603-F3	GACCAGGTAATCTTACCTTTGT
NK603-B3	TGAAACCGCTTTCAAGAGAA
NK603-FIP (F1C+F2)	GGCCGCGTTAACAAGCTTAC-TTTTTGGAC- TATCCCGACTCTCT
NK603-BIP (B1C+B2)	CTTGGTACCACGCGACACA-TTTTCTGT- TATGGTTCGAGAAGAGAT
NK603-LF	TCGAGGTCATTCATATGCTTGA
NK603-LB	AGTGTTTGAGTGGATCCTGTT

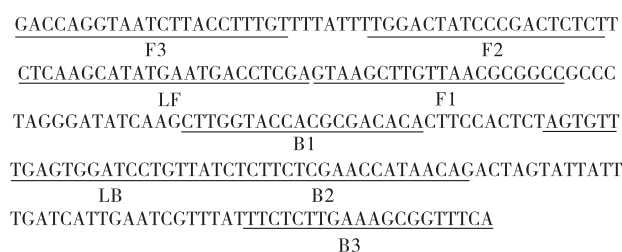


图 1 用于引物设计的部分 NK603 序列及引物位置

Figure 1 Partial sequences of NK603 for the primer design and location of primers

### 1.5 LAMP 方法的建立

25  $\mu$ L LAMP 反应体系中外引物 F3 和 B3 浓度为 0.2  $\mu$ mol/L,内引物 FIP 和 BIP 浓度为 1.6  $\mu$ mol/L,环引物 LF 和 LB 浓度为 0.3  $\mu$ mol/L,8 U Bst DNA 聚合酶 0.5  $\mu$ L、2 $\times$  LAMP reaction mixture 12.5  $\mu$ L、显色液 0.25  $\mu$ L 及 DNA 模板 100 ng,反应条件:63  $^{\circ}$ C,60 min,80  $^{\circ}$ C,10 min,在荧光定量 PCR 仪上完成反应。

### 1.6 LAMP 引物的筛选

用 5% 的转基因玉米 NK603 标准品作为阳性对照,用非转基因玉米作为阴性对照,每组对照分别设置 2 个平行,进行 LAMP 反应。通过扩增曲线结果,根据起始扩增时间、扩增曲线的重复性等指标对引物进行筛选。

### 1.7 特异性分析

分别提取转基因玉米 NK603、MON863、MON810、转基因水稻 Bt63 和转基因玉米混合样品(含有 MIR604、Bt11、

GA21、59122、Bt176)基因组 DNA,用于确定引物的特异性。25  $\mu$ L LAMP 反应体系中外引物(NK603-F3、NK603-B3)浓度为 0.2  $\mu$ mol/L,内引物(NK603-FIP、NK603-BIP)浓度为 1.6  $\mu$ mol/L,环引物(NK603-LB、NK603-LF)0.3  $\mu$ mol/L,8 U Bst DNA 聚合酶 0.5  $\mu$ L、2 $\times$  LAMP reaction mixture 12.5  $\mu$ L、显色液 0.25  $\mu$ L 及 DNA 模板 1  $\mu$ L,反应条件:63  $^{\circ}$ C,45 min,80  $^{\circ}$ C,10 min,在荧光定量 PCR 仪上完成反应。

### 1.8 灵敏度分析

为确定本方法的检测灵敏度,采用不同梯度浓度(5%,1%,0.5%,0.1%,0.05%,0%)的转基因玉米 NK603 标准品进行 LAMP 扩增,每个浓度设置 2 个平行,用荧光定量 PCR 仪进行监测。

常规 PCR 采用 Premix Taq<sup>TM</sup>,用引物对(NK603-F3/NK603-B3)对不同浓度梯度的转基因玉米 NK603 基因组 DNA 模版进行扩增,该对引物可扩增出 232 bp 的核酸片段。常规 PCR 反应体系包括:2 $\times$  Premix Taq 12.5  $\mu$ L,0.5  $\mu$ L 上游引物 NK603-F3(10  $\mu$ M),0.5  $\mu$ L 下游引物 NK603-B3(10  $\mu$ M),100 ng DNA 模版,无菌蒸馏水调整体积至 25  $\mu$ L。PCR 反应条件:94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94  $^{\circ}$ C 变性 30 s、55  $^{\circ}$ C 退火 30 s、72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s,进行 35 个循环,72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

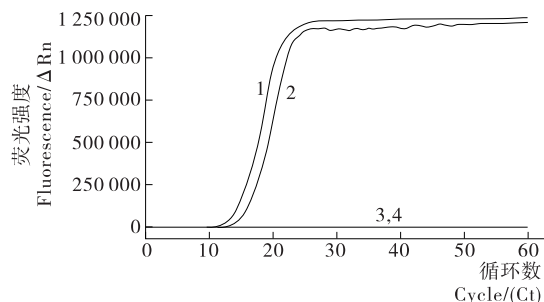
## 2 结果与分析

### 2.1 引物筛选优化

针对 NK603 转基因玉米品系的特异性基因序列,设计了 3 套 LAMP 检测引物,通过 LAMP 反应实时荧光结果显示,第 2 套引物只有 1 个阳性对照出现扩增曲线,起始扩增时间是 39 min,第 3 套引物未发生扩增反应,只有第 1 套引物的 2 个阳性对照出现了扩增曲线,起始扩增时间是 9 min,起始扩增时间、重复性较好,见图 2。

### 2.2 特异性试验

采用转基因玉米 MON863、MON810、转基因水稻 Bt63 和转基因玉米混合样品(含有 MIR604、Bt11、GA21、59122、Bt176)等样品 DNA,确定 LAMP 法检测转基因玉米 NK603 的特异性。在特异性试验中,100 ng 基因组 DNA 作为 LAMP 反应的模版。结果表明仅 NK603 玉米有峰值出现,

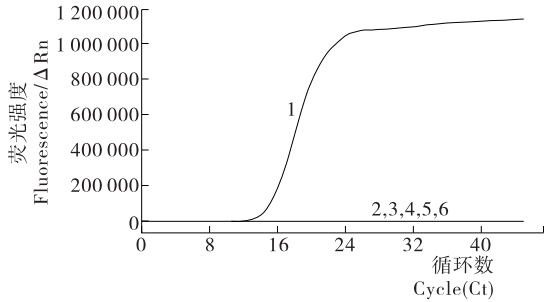


1、2. 阳性对照(5%转基因玉米 NK603)  
3、4. 阴性对照(非转基因玉米)

图 2 第 1 套引物筛选的 LAMP 检测结果

Figure 2 LAMP amplification result of the first set of primers

而其他样品中均没有得到任何扩增产物,说明建立的 LAMP 检测方法对转基因玉米 NK603 的特异性较好,结果见图 3。



1. 转基因玉米 NK603 2. MON863 3. MON810 4. 转基因水稻 Bt63 5. 转基因玉米混合样品(含有 MIR604、Bt11、GA21、59122、Bt176) 6. 空白对照

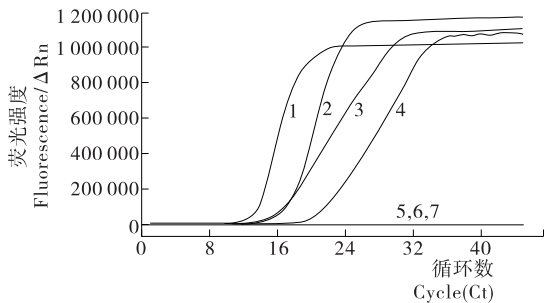
图 3 转基因玉米 LAMP 特异性扩增图谱

Figure 3 LAMP specific amplification pattern of transgenic maize

### 2.3 灵敏度试验

用 5%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05%, 0% 的转基因玉米 NK603 标准品进行灵敏度试验, LAMP 扩增图谱见图 4。灵敏度试验表明, LAMP 法检测下限可达 0.1%。

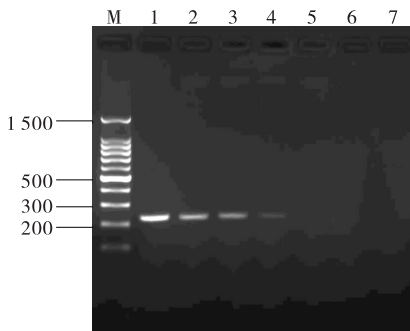
图 5 为普通 PCR 灵敏度检测结果, 根据引物的设计, 扩增的目的基因为 232 bp, 通过电泳图可看出最低也可检测到 0.1% 含量的转基因玉米 NK603 成分。



1~6. 分别为 5%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05%, 0% 的转基因玉米  
7. 空白对照

图 4 转基因玉米 LAMP 灵敏度检测结果

Figure 4 Results of sensitivity test of LAMP method



M. 100 bp DNA ladder 1~6. 分别为 5%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05%, 0% 的转基因玉米 7. 空白对照

图 5 转基因玉米 PCR 灵敏度检测结果

Figure 5 Results of sensitivity test of PCR

## 3 讨论

多重 PCR 和实时荧光 PCR 已运用于转基因玉米 NK603 品系的鉴定<sup>[1,20]</sup>。多重 PCR 可在同一个反应中检测多个基因,但多重 PCR 的特异性和灵敏度可能受限或者优先扩增某个片段。由于在一个反应中含有多对引物,可能形成引物二聚体而导致非特异性扩增产物。实时荧光定量 PCR 比普通 PCR 有更多优点:快速、灵敏度高、易标准化。但是操作要求高,且需要昂贵的试剂盒。

本研究通过实时荧光 PCR 仪器,建立了转基因玉米 NK603 的 LAMP 实时荧光检测法。LAMP 实时荧光检测法属于闭管检测,对操作人员要求低。同 PCR 技术相比, LAMP 技术具有极高的特异性和高效性,该方法的最大优势在于恒温扩增,几十分钟即可产生大量目标片段,实现核酸的高效扩增<sup>[4]</sup>,节省了温度循环需要的时间,达到了快速检测目的。同时避免了 PCR 对温度循环特殊要求带来的不便。

本研究建立了转基因玉米 NK603 特异性水平的 LAMP 检测方法,该 LAMP 方法具有特异性高、灵敏度好、快速、简便、成本低廉等优点。其技术参数能够满足中国转基因生物安全管理过程中对转基因玉米品系 NK603 检测的需求,定性检出限为 0.1%,具有在基层检测单位及现场快检工作中推广使用的前景。

### 参考文献

- [1] 宋君, 雷绍荣, 刘勇, 等. 转基因玉米 NK603 品系特异定量 PCR 检测方法的建立[J]. 生物技术通讯, 2012, 23(2): 238-241.
- [2] Matsuoka T, Kuribara H, Akiyama H, et al. A multiplex PCR method of detecting combinant DNAs from five lines of genetically modified maize[J]. Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 2001, 42(1): 24-32.
- [3] Chaouachi M, El Malki R, Berard A, et al. Development of a real-time PCR method for the differential detection and quantification of four solanaceae in GMO analysis: potato (*Solanum tuberosum*), tomato (*Solanum lycopersicum*), eggplant (*Solanum melongena*), and pepper (*Capsicum annuum*) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(6): 1 818-1 828.
- [4] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): e63.
- [5] Misawa Y, Yoshida A, Saito R, et al. Application of loop-mediated isothermal amplification technique to rapid and direct detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in blood cultures[J]. J. Infect Chemother, 2007, 13(3): 134-140.
- [6] 张淑红, 吴清平, 徐晓可, 等. LAMP 法在阪崎肠杆菌快速检测中的应用[J]. 食品与机械, 2011, 27(5): 111-114.
- [7] Chen Qin, Li Jian, Deng Zhi-rui, 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.

(下转第 80 页)

表2 不同处理时长下的功耗

Table 2 Power dissipation under different treatment duration

处理时长/ h	处理室功耗/ (kW·h <sup>-1</sup> )	其他器件功耗/ (kW·h <sup>-1</sup> )	能量利用率/ %
2	4.21	0.75	84.87
4	8.43	1.42	85.58
6	12.66	2.11	85.71
8	16.89	2.79	85.82
10	21.12	3.49	85.81

其温度是逐渐上升的,电导率增加,导致能量利用有所提高。

#### 2.4 能量利用率的综合分析

根据 2.2 和 2.3 分析可知,0.05%和 0.20%的盐水下波形能量利用率分别为 85.53%和 94.90%,处理室在 0.05%和 0.2%的盐水下能量利用率分别为 77.21%和 87.63%,则计算其综合能量利用率为 66.04%和 83.16%。由此可见,处理高电导率物料的能量利用率要明显高于处理低电导率物料的。根据表 1 分析得出,处理室的功率越高,能量利用率越高。在相同影响处理效果的情况下,增加高压脉冲的频率或通过增加处理位置的个数,或增加并联处理室的个数,均可提高处理室的功率,能量利用率也相应得到提高。

### 3 结束语

通过理论上波形能量利用分析和实验验证对 PEF 杀菌设备的能量利用率进行分析,结果表明:波形的上升时间及下降时间越长,能量利用率越低;电导率越高,能量利用率越高。在实际应用中由于电导率本身是受处理物料决定的,只有提高处理室功率才能尽量提高能量利用率。

#### 参考文献

- [1] 李梦颖,李建科,何晓叶,等. 食品加工中的热杀菌技术和非热杀菌技术[J]. 农产品加工, 2013(16): 109-113.
- [2] Castro A J, Barbosa-Cánovas G V, Swanson B G. Microbial inactivation of foods by pulsed electric fields[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 1993, 17(1): 47-73.
- [3] Sanchez-Moreno C, De Ancos B, Plaza L, et al. Nutritional approaches and health-related properties of plant foods processed by high pressure and pulsed electric fields[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2009, 49(6): 552-576.
- [4] Sampedro F, McAloon A, Yee W, et al. Cost analysis of commercial pasteurization of orange juice by pulsed electric fields[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2013(17): 72-78.
- [5] De Haan S W H, Willcock P R. Comparison of the energy performance of pulse generation circuits for PEF[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2002, 3(4): 349-356.
- [6] 金伟,平雪良,吉祥,等. 高压脉冲电场杀菌系统的研究进展[J]. 食品与机械, 2012, 28(1): 247-249.
- [7] 吴为民,李树杰. 脉冲高电压液体灭菌技术的研究[J]. 高电压技术, 1994, 20(4): 3-7.
- [8] Min S, Jin Z T, Zhang Q H. Commercial scale pulsed electric field processing of tomato juice[J]. Journal of agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(11): 3 338-3 344.
- [9] Roche S. Solid state pulsed power systems[J]. Physique & Industrie, 2003(17):1-11.
- [10] Roodenburg B, Morren J, Berg H E, et al. Metal release in a stainless steel pulsed electric field (PEF) system; Part I. Effect of different pulse shapes; theory and experimental method[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2005, 6(3): 327-336.
- [8] Han Eun-taek, 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): 2 521-2 528.
- [9] 刘昊,黄文胜,邓婷婷,等. LAMP法检测食品中开心果过敏原成分[J]. 食品科学, 2013, 34(22): 128-132.
- [10] 张舒亚,李富威,于翠,等. 环介导等温扩增法检测食品过敏原大豆成分[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(2): 451-456.
- [11] 李一鸣,王宇珂,叶宇鑫,等. 环介导等温扩增技术检测花生过敏原[J]. 现代食品科技, 2012, 28(1): 126-130.
- [12] Vaagt F, Haase I, Fischer M. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-based method for rapid mushroom species identification[J]. J. Agric. Food Chem., 2013, 61(8): 1 833-1 840.
- [13] Focke F, Haase I, Fischer M. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): Methods for plant species identification in food[J]. J. Agric. Food Chem., 2013, 61(12): 2 943-2 949.
- [14] 杨丽霞,付淑君,彭新凯. 环介导等温扩增法检测牛羊肉中的猪肉成分[J]. 食品与机械, 2013, 29(5): 63-65.
- [15] Guan Xiao-yan, Guo Jin-chao, Shen Ping, 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.
- [16] 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.
- [17] Chen Li-li, Guo Jin-chao, Wang Qi-di, et al. Development of the visual LAMP assays for seven genetically modified maize events and their application in practical samples analysis[J]. J. Agric. Food Chem., 2011, 59(11): 5 914-5 918.
- [18] Chen Xiao-yun, Wang Xiao-fu, Jin Nuo, et al. Endpoint visual detection of three genetically modified rice events by loop-mediated isothermal amplification[J]. Int. J. Mol. Sci., 2012, 13(11): 14 421-14 433.
- [19] 吴少云,唐大运,李琳,等. LAMP实时浊度法检测转基因水稻 Bt63 品系[J]. 食品与机械, 2012, 28(5): 79-82.
- [20] Onishi M, Matsuoka T, Kodama T, et al. Development of a multiplex polymerase chain reaction method for simultaneous detection of eight events of genetically modified maize[J]. J. Agric. Food Chem., 2005, 53(25): 9 713-9 721.

(上接第 58 页)