

环介导等温扩增法检测转基因玉米 MON89034

张隽^{1,2}, 李志勇², 叶宇鑫³, 黄韵¹, 刘津², 余以刚¹, 高东微², 石磊¹

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510641) (2. 广东检验检疫技术中心, 广东广州 510623)

(3. 广州迪澳生物科技有限公司, 广东广州 510663)

摘要: 根据MON89034外源插入片段与植物基因组序列设计特异性引物, 筛选最佳引物并对反应体系和反应条件进行优化, 最终建立转基因玉米MON89034转化体特异性LAMP检测方法。对该方法进行了特异性、灵敏度、稳定性和重复性测试。结果表明: 该方法能够特异性检测出MON89034玉米; 检测其灵敏度达到1 pg; 以转基因玉米MON89034 DNA标准品质量分数为1.00%, 0.10%, 0.05%的样品为模板, 其稳定性好、重复性高, 假阴性率为0。本试验设计的LAMP方法适用于特异性检测转基因玉米MON89034。

关键词: 环介导等温扩增法; 转基因玉米MON 89034; 检测

文章篇号: 1673-9078(2012)4-469-472

A Specific Loop-mediated Isothermal Amplification Method for Detection of Transgenic Maize MON89034

ZHANG Jun^{1,2}, LI Zhi-yong², YE Yu-xin³, HUANG Yun¹, LIU Jin², YU Yi-gang¹, GAO Dong-Wei², SHI Lei¹

(1. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, 510641, Guangzhou)

(2. Guangdong Inspection and Quarantine Technology Center, 510623, Guangzhou)

(3. Guangzhou DIAO Bio-technology Co., Ltd. 510663, Guangzhou)

Abstract: According to MON89034 exogenous insert sequences connection with the plant genome sequences, the best specific primers were designed, the reaction system and reaction conditions were optimized, and finally a loop-mediated isothermal amplification method for detecting transgenic maize MON89034 was established. Specificity, sensitivity, stability and repeatability of this method were tested. The results showed that the method can specifically detect maize MON89034, and the detection sensitivity of the method was up to 1pg. With the maize MON89034 DNA samples of 1.00%, 0.10%, 0.05% concentration as templates, stability and repeatability testing was conducted, false negative rate was 0. The results showed that the LAMP method is suitable for specifically detecting transgenic maize MON89034.

Key words: loop-mediated isothermal amplification; transgenic maize MON89034; detection

自1996年以来,全球转基因作物种植面积以年均10%以上的速率增长,其中种植面积最大的转基因作物依次为大豆、玉米、棉花、油菜^[1]。关于转基因植物的安全性问题已在全球范围内引起激烈的争论与普遍关注。为规范转基因生物安全管理,保障消费者的知情权和选择权,一些国家已制定相应的法律和法规,对转基因产品实行标识制度。我国也于2001年相继颁布了一系列法律法规和管理办法。抗虫玉米MON89034是美国孟山都公司的转基因玉米新品种,

收稿日期: 2011-12-28

基金项目: 广东省科技计划项目(2009B0627); 食品转基因成分快速检验能力建设(粤科函财字[2009]627号)

作者简介: 张隽,男,工程师,硕士研究生,研究方向为食品工程

通讯作者: 高东微,女,高级工程师,博士,研究方向食品质量与安全

2007~2009年相继在美国、日本、韩国、加拿大等国家获准进行商业化种植或作为加工原料进口,并于2009年申请进口我国用作加工原料。

对转基因生物及其产品进行精准检测,是保证这些制度顺利实施的技术支撑^[2]。目前转基因产品检测方法主要有两大类:一类是DNA水平的检测,如PCR、Southern杂交、基因芯片等,另一类是蛋白质水平的检测,如ELISA、侧向流动免疫试纸条等^[3]。根据检测靶序列不同,DNA水平的检测策略分为筛选、基因特异性、构建特异性、转化体特异性等4类^[4]。转基因生物RRS、Bt11、MON810、MON863、NK603、Bt176、GA21、T25、GT73、MON531、MON1445等已经建立了转化体特异性检测方法^[5-10]。

环介导等温扩增(LAMP)是对靶基因的6个特

异部位设定 4 种引物, 利用具有链置换活性的 *Bst* DNA 聚合酶在恒温条件下催化新链合成, 从而使靶基因高效扩增的一种核酸扩增技术^[11-13]。本研究旨在建立转基因玉米 MON89034 的转化体特异性 LAMP 检测方法, 并对该方法的特异性、灵敏度和重现性进行测试。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

转基因玉米 MON89034、BT176、Mon810、转基因大豆 Mon89788、GTS40-3-2、转基因水稻 KF6、克暎稻以及非转基因大豆均由广东检验检疫技术中心提供。

CTAB、Tris、EDTA 等购自北京鼎国生物技术有限公司, rTaq DNA 聚合酶、dNTPs、DNA 分子量 Marker 等购自宝生物工程(大连)有限公司; 甜菜碱、*Bst* DNA 聚合酶购自 Sigma 公司; SYBR Green I 购于厦门百维信生物科技公司。

LAMP 检测实时浊度仪 (LA-320C): 购自日本荣研化学株式会社。

1.2 DNA 的提取

转基因玉米 MON89034 及其他的转基因玉米、大豆、水稻、棉花和非转基因大豆的 DNA 均采用 CTAB 法提取纯化样品 DNA。

1.3 引物设计及合成

根据 MON89034 玉米转化体特异性序列, 采用 LAMP 专用引物设计软件设计 3 套 LAMP 引物, 经过引物筛选比较试验, 最终确定一套特异性引物, 分别为 FIP、BIP、F3 和 B3, 由上海生工生物工程有限公司合成。其中, 外引物 F3 和 B3 的序列分别为:

5'-TTCGACGTGTCTACATTCAC-3'和

5'-TCCATCTTTGGGACCACT-3'; 内引物 FIP 和

BIP 的序列分别为:

5'-TGAAGTGACAGGTAGGATCGGAGATGAG

AAACTTCACGATTTGG-3 和

5'-AGGAAGGTGGCTCCTACAAATGAGAGGC

ATCTTCAACGATG-3'。

1.4 LAMP 方法的建立

根据已有的文献^[6], 初步确定反应体系为 25 μ L, 其中包含: 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8), 1.6 mmol/L dNTP (各 400 μ M), 4 mmol/L (NH₄)₂SO₄, 10 mmol/L MgSO₄, 10 mmol/L KCl, 1 mol/L 甜菜碱, 0.8 μ mol/L FIP, 0.8 μ mol/L BIP, 0.2 μ mol/L F3, 0.2 μ mol/L B3, 0.1% Triton X-100, 8 U *Bst* DNA 聚合酶, DNA 模板 2 μ L, 加 ddH₂O 至 25 μ L, 在反

应管中加入 1 滴石蜡油, 管盖内壁加入 1 μ L 0.1% 的 SYBR Green I。浊度仪 63 $^{\circ}$ C 反应 1 h。然后将其置于 80 $^{\circ}$ C 5 min 终止反应。浊度仪实时观察反应管中是否发生扩增, 如果发生反应, 产生焦磷酸镁沉淀, 浊度增加, 浊度仪上会出现相应的峰段。反应结束后, 将反应管盖内壁的 SYBR Green I 离心, 观察反应管中液体颜色, 进一步验证是否发生扩增反应, 如发生扩增, 溶液为绿色, 否则保持 SYBR Green I 橙色不变。

1.5 LAMP 引物的筛选优化

引物的特异性决定了检测方法的特异性。本研究针对 MON89034 玉米中 3 个插入位点区段的特异性序列, 设计了 3 对 LAMP 检测引物, 进行筛选优化。

1.6 LAMP 反应体系和反应条件的优化

在 60~65 $^{\circ}$ C 范围内取 6 个温度点, 分别为 60、61、62、63、64 和 65 $^{\circ}$ C。在这 6 个温度下进行 LAMP 反应。通过浊度仪结果, 选取适宜的温度。在适宜的温度下, 就 Mg²⁺浓度、*Bst* 聚合酶用量和反应时间进行试验, 根据结果, 确定最佳反应体系和反应条件。

1.7 特异性实验

利用建立的 LAMP 方法对转基因玉米 MON89034 及其他转基因玉米、大豆、水稻和非转基因大豆等样品 DNA 进行扩增, 用浊度仪实时监测, 并加入 SYBR Green I 观察颜色进行验证特异性。同时用 PCR 进行验证, PCR 引物为 LAMP 反应的外引物。

1.8 灵敏度实验

用 CTAB 的方法提取 MON89034 基因组 DNA, 用分光光度计测 DNA 浓度。并以 100 ng/管作为原液浓度, 然后 10 倍比稀释 DNA 原液至 10⁻¹~10⁻⁶, 取 2 μ L 作为模板分别进行 LAMP 扩增和 PCR 实验。

2 结果与分析

2.1 引物筛选优化

本研究针对 MON89034 玉米中的特异性序列, 设计了 3 对 LAMP 检测引物, 进行筛选优化。结果表明 3 套引物均能从 MON89034 样品中特异性地扩增出预期产物。经比较分析, 最终选择第 2 套引物用于后续研究。

2.2 反应体系和反应条件的优化

就不同跟的 Mg²⁺浓度、*Bst* 聚合酶用量在不同的反应温度和反应时间下进行试验, 根据结果, 确定最佳反应体系和反应条件。结果表明: 25 μ L 反应体系中, 当 MgSO₄ 浓度为 10 mmol/L, *Bst* DNA 聚合酶为

8 U 时, 在 63 °C 下反应 90 min, 转基因玉米 MON89034 的特异性扩增效果最好。

2.3 特异性实验

利用建立的 LAMP 方法对转基因玉米 MON89034 及其他转基因玉米、大豆、水稻和非转基因大豆等样品 DNA 进行特异性扩增。结果表明: 仅在 MON89034 玉米有峰值出现, 且 SYBR Green I 显色为绿色。而在其他样品中均未得到任何扩增产物, 表明建立的 LAMP 检测方法对转基因玉米 MON89034 具有严格的特异性, 结果见图 1。同时进行的 PCR 实验也验证了引物的特异性。

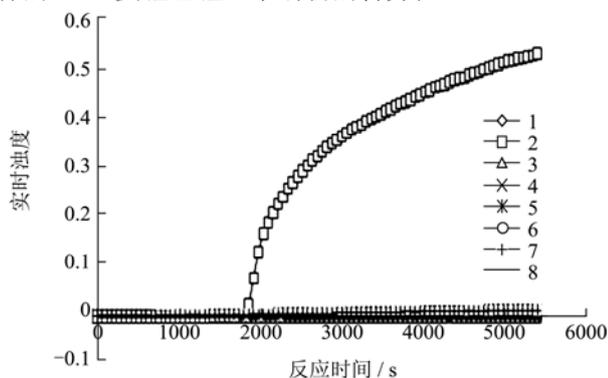


图 1 LAMP 特异性实验

Fig.1 The specificity detection by LAMP method

注: 1~8 号分别为非转基因大豆、转基因玉米 MON89034、BT176、Mon 810、转基因大豆 Mon 89788、GTS40-3-2、转基因水稻 KF6、克螟稻。

2.4 灵敏度实验

将 MON89034 标准品 DNA 从 100 ng/管开始稀释, 原液经 10^5 倍稀释 (即 1 pg) 后, 浊度仪上仍出峰, 加入荧光染料后, 在白光下可观察到溶液为绿色, 因而 LAMP 扩增有效, 表明本 LAMP 方法的检测限为 1 pg (见图 2)。采用普通 PCR 法检测, DNA 原液经 10^4 倍稀释 (即 10 pg) 后, 电泳可见颜色较浅的条带, 其灵敏度约为原 DNA 浓度的 10^{-4} (见图 3)。

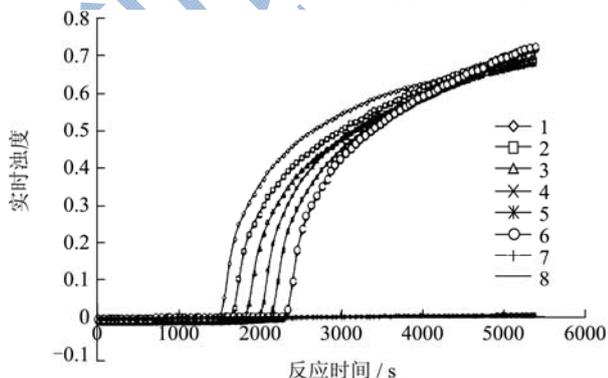


图 2 LAMP 灵敏度实验

Fig.2 The sensitivity detection by LAMP method

注: 1~8 号分别代表浓度为 100 ng、10ng、1 ng、100 pg、

10 pg、1 pg、100 fg、0 fg 的 MON89034 标准品。

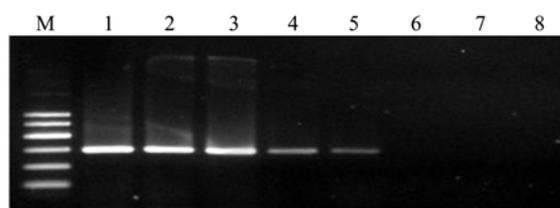


图 3 PCR 检测 MON89034 标准品灵敏度

Fig.3 The specificity of MON89034 standard sample detection by PCR method

注: M 为 DNA Marker; 1~8 号分别代表浓度为 100 ng、10ng、1 ng、100 pg、10 pg、1 pg、100 fg 和 0 fg 的 MON89034 标准品。

2.5 稳定性和重复性测试

采用 LAMP 检测方法, 对质量分数为 1%, 0.1%, 0.05% 的 3 个 MON89034 样品进行扩增, 每个样品重复 15 次, 同时以 DW 为阴性对照, 重复 15 次, 用以测试本试验设计方法的稳定性和重复性。在所有样品和各次重复中, 均能得到准确的检测结果, 假阳性率为 0, 表明该方法具有良好的稳定性和重复性。

3 结论

3.1 本研究建立了 MON89034 玉米转化体特异性水平的 LAMP 检测方法, 该方法 LAMP 方法具有特异性高、灵敏度好、快速、简便、易判读等优点, 并且成本低廉。

3.2 LAMP 方法是 2000 年由 Notomi 等发明的一种新颖的恒温核酸扩增方法^[16], 除特异性高、灵敏度好之外, 它最大的优点在于恒温扩增, 省却了温度循环所需的时间和能量, 达到快速检测的目的, 并大大降低了成本。该方法具有很高的特异性和灵敏度, 检测限能达到 1 pg/管, 高于普通 PCR。本研究采用实时浊度仪对实验结果进行实时监测, 因而能更好地知道反应的进度。LAMP 方法是一种快速、特异性强、灵敏度高的新型核酸检测技术。其技术参数能够满足我国转基因生物安全管理过程中对 MON89034 玉米的检测需求, 具有广泛的实用性和良好的应用前景。

参考文献:

[1] Clive James.2009 年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势[J].中国生物工程杂志,2010,30(2):1-22
 [2] 李飞武,李葱葱,邢珍娟,等.第二代抗草甘膦大豆 PCR 检测方法研究[J].大豆科学,2009,28(2):296-300
 [3] 张莹,张永军,吴孔明,等.转基因植物的检测策略和检测技术[J].植物保护,2007,11:11-14

- [4] Anklam E, Gadani F, Heinze P, et al. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products [J]. *European Food Research and Technology*, 2002, 214: 3-26
- [5] Huang H Y, Pan T M. Detection of genetically modified maize MON810 and NK603 by multiplex and real-time polymerase chain reaction methods [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52: 3264-3268
- [6] Pan A H, Yang L T, Xu S C, et al. Event-specific qualitative and quantitative PCR detection of MON863 maize based on the 3'-transgene integration sequence [J]. *Journal of Cereal Science*, 2006, 43: 250-257
- [7] Taverniers I, Windels P, Vaitilingom M, et al. Event specific plasmid standards and real-time PCR methods for transgenic Bt11, Bt176, and GA21 maize and transgenic GT73 canola [J]. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2005, 53: 3041-3052
- [8] Hernandez M, Esteve T, Prat S, et al. Development of real-time PCR systems based on SYBR® Green I, Amplifluor™ and TaqMan® technologies for specific quantitative detection of the transgenic maize event GA21 [J]. *Journal Cereal Science*, 2004, 39: 99-107
- [9] Collonnier C, Schattner A, Berthier G, et al. Characterization and event specific-detection by quantitative real-time PCR of T25 maize insert [J]. *Journal of AOAC International*, 2005, 88: 536-546
- [10] Yang L T, Pan A H, Zhang K, et al. Qualitative and quantitative PCR methods for event specific detection of genetically modified cotton MON1445 and MON531 [J]. *Transgenic Research*, 2005, 14(6): 817-831
- [11] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12): E63
- [12] 刘芳,王丽,李琳,等.环介导等温核酸扩增技术快速检测产毒亚历山大藻[J].*现代食品科技*,2007,23(11):71-74
- [13] 袁瑛娜,单潇潇,王宗德,等.应用 LAMP 实时浊度法检测转基因大豆[J].*现代食品科技*,2011,27(10):1264-1267