

# LAMP 实时浊度法快速检测转基因玉米 MON810

王小玉<sup>1,2</sup>, 邝筱珊<sup>2</sup>, 胡松楠<sup>2</sup>, 余以刚<sup>1</sup>, 成晓维<sup>2</sup>, 冯家望<sup>2</sup>, 张璜<sup>3</sup>, 肖性龙<sup>1</sup>

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640) (2. 珠海出入境检验检疫局技术中心, 广东珠海 519015) (3. 广州迪澳生物科技有限公司, 广东广州 510663)

**摘要:** LAMP 实时浊度法是采用环介导等温扩增 (Loop Mediated Isothermal Amplification, LAMP) 技术通过实时浊度仪实时检测反应过程中所产生的白色沉淀, 从而实现对扩增全过程的监控, 弥补了显色法只能观看反应终点的缺陷, 使引物筛选和反应体系的优化有数据可依。本研究以转基因玉米 MON810 为研究对象, 针对外源基因苏云金芽孢杆菌杀虫毒蛋白 *CryIA(b)* 与内源基因边界序列设计 6 条特异性引物, 通过实时浊度法在 63 °C 的恒温条件下完成检测, 对检测的灵敏度、特异性、稳定性进行了评价。建立了转基因玉米 MON810 的 LAMP 实时浊度检测方法, 该方法最低检出限为 0.5%, 与 LAMP 显色法和实时荧光 PCR 法进行结果比对, 符合率为 100%, 经评价具有特异性高、稳定性强、准确简便等优点, 非常适合转基因玉米 MON810 的快速检测, 有较好的应用价值。

**关键词:** 环介导等温扩增技术; 实时浊度仪; 转基因玉米; MON810; 检测

文章编号: 1673-9078(2013)12-3002-3005

## A Real-time Turbidimeter-based Loopmediated Isothermal Amplification Assay for Rapid Detection of Genetically Modified Maize MON810

WANG Xiao-yu<sup>1,2</sup>, KUANG Xiao-shan<sup>2</sup>, HU Song-nan<sup>2</sup>, YU Yi-gang<sup>1</sup>, CHENG Xiao-wei<sup>2</sup>, FENG Jia-wang<sup>2</sup>, ZHANG Huang<sup>3</sup>, XIAO Xing-long<sup>1</sup>

(1. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. The Inspection Technical Center of Zhuhai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhuhai 519015, China)

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

**Abstract:** LAMP real-time turbidity method is based on the loop-mediated isothermal amplification, detecting a white precipitate generated during the reaction by a real-time turbidimeter, in order to monitor the whole process of amplification. This technique overcomes the defects of LAMP chromomeric method which could only monitor the end of reaction, therefore becomes more scientific for primers screening and the reaction optimization. Six specific primers were designed for the junction sequences of exogenous gene *CryIA(b)* and endogenous gene of genetically modified maize MON810. Detection conducted by real-time turbidity method at 63 °C, the detection sensitivity, specificity and stability were verified. The results indicated that the lowest detection limit of this method was 0.5%, and the coincidence rate compared with the LAMP chromomeric method and the real-time PCR method was 100%. The method had high specificity, stability, accuracy and convenience which was suitable for the rapid detection of genetically modified maize MON810 and has good application value.

**Key words:** loop-mediated isothermal amplification; real-time turbidimeter genetically-modified Maize; MON810; detection

转基因玉米 MON810 是由孟山都公司研发, 国内较为常见的进口的转基因玉米品系, 常用于动物饲

收稿日期: 2013-07-02

基金项目: 国家质检总局科研基金项目 (20111K255); 国家自然科学基金项目 (31101279); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金项目 (20110172120034)

作者简介: 王小玉 (1973-), 女, 高级工程师, 研究方向食品安全检验  
通讯作者: 肖性龙 (1977-), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向食品安全检测与控制

料, 因其转入苏云金芽孢杆菌杀虫毒蛋白 *CryIA (b)* 基因而具有抗虫特性<sup>[1]</sup>。然而, 人们对转基因玉米的安全性仍然存在着巨大的争论。欧盟、美国、日本等国家先后出台了相应的法律和管理办法, 对转基因食品实行强制标识或自愿标识<sup>[2]</sup>。我国于 2002 年 7 月开始实施《转基因食品卫生管理条例》, 对转基因食品产品进行标识管理。转基因食品安全问题成为目前人类在发展过程中必须面对的一个棘手的环境问题<sup>[3]</sup>, 加上生物基因工程技术对我国经济利益带来的冲击和国

外转基因产品对生态环境和消费者可能带来的风险,对转基因玉米进行检测具有重要的现实意义<sup>[4]</sup>。目前国际上常用的转基因产品检测方法主要有酶联免疫检测(ELISA)、定性PCR、荧光定量PCR检测等技术。ELISA方法针对外源蛋白进行检测,当外源蛋白不表达或者因加工造成破坏时便无法检出;定性PCR法灵敏度低,操作繁琐。荧光定量PCR法是目前使用最广泛的方法,灵敏度高却需要高成本的试剂及仪器设备<sup>[5]</sup>。

环介导等温扩增法是针对靶基因的6个区域设计4种特异的引物,利用链置换DNA聚合酶在恒温条件保温几十分钟,完成核酸扩增反应<sup>[6]</sup>。该技术具有反应时间短、不需要PCR仪、加染料或直接通过肉眼即可判断结果等特点,大大缩短了检测时间。而LAMP实时浊度法有别于一般的LAMP显色法,显色法只能通过反应终点是否显色判断有无扩增,无法区分特异性扩增与非特异性扩增,而LAMP实时浊度法可实时监测反应过程中所产生的白色沉淀,从而实现LAMP整个反应过程的实时监控,有效的排除非特异性扩增,在方法建立时尤为重要<sup>[7-10]</sup>。本研究旨在针对转基因玉米MON810的*CryIA(b)*基因与玉米内源基因的边界序列设计特异性LAMP引物,建立LAMP实时浊度快速检测方法,并对该方法的特异性、灵敏度和稳定性进行评价。

## 1 材料和方法

### 1.1 仪器

LAMP实时浊度仪LA-320C,日本荣研化学株式会社;高速冷冻离心机3K18型,德国Sigma公司;超纯水处理器milli-Q plus,法国密理博公司;高速离心机5430,德国Eppendorf公司;紫外分光光度计NanoDrop,美国Thermo公司;金属浴D1100-230V,美国labnet公司;实时荧光定量PCR仪7500Fast,美国ABI公司;漩涡混合器MS 2,德国IKA公司;移液器1000  $\mu$ L、200  $\mu$ L、100  $\mu$ L、10  $\mu$ L、2.5  $\mu$ L,德国Eppendorf公司;分析天平AL104,梅特勒-托利多仪器有限公司。

### 1.2 材料和试剂

转基因标准品:转基因玉米MON810、NK603、MON863、GA21、MON88017、CBH351、BT11、BT176、MON89034、MIR604、MM88、T25,转基因大豆GTS40-3-2、MON89788、DP356043,转基因油菜GT73、转基因甜菜H7-1、转基因小麦B73-6-1,购于

上海惠诚生物科技有限公司。转基因水稻KF6、BT63、KMD1,由中国检验检疫科学研究院馈赠。非转基因植物及食品样品实验室留样或超市购得。

DNA提取试剂盒Biosprint 15 DNA plant kit, QIAGEN公司。Bst DNA polymerase large fragment, New England Biolabs公司;甜菜碱(Betaine), 10 $\times$  ThermolPol缓冲液, Sigma公司; dNTPs, 宝生物工程(大连)有限公司; SYBR Green I 荧光染料, 厦门致善生物科技有限公司; LAMP引物, 宝生物工程(大连)有限公司。

### 1.3 LAMP引物设计和合成

根据LAMP引物设计和品系鉴定基因选定的原则,针对GenBank公布的转基因玉米MON810外源基因*CryIA(b)*与玉米内源基因的边界序列(Accession no. AF490398.1),使用在线设计软件Primer Explorer version4和LAMP Designer软件设计特异引物,设计多套LAMP引物,经筛选获得一套特异性引物,共6条分别为外引物1,外引物2,内引物1和内引物2,环引物1和环引物2。引物序列见表1。

表1 转基因玉米MON810 LAMP引物序列

Table 1 LAMP primers sequences for MON810

引物名称	序列信息
外引物1(F3,5'-3')	GGGCTACATCGAAGACAGC
外引物2(B3,5'-3')	GCAAGCAAATTCGGAAATGA
内引物1(FIP,5'-3')	GCCAGAGGGAACCAAGTACCGATT TACCTGATCCGCTACAA
内引物2(BIP,5'-3')	AAGTGTGCCCAACACAGCGAAA GTCCTCGTTCAGGTC
环引物1(LF,5'-3')	TTGACGGTCTCGTGCTTG
环引物2(LB,5'-3')	CACCACTTCTCCTTGGACAT

### 1.4 样品DNA提取

将样品置粉碎机中碾磨至粉末状,商品化粉末标准品直接取样,称取100 mg样品进行DNA提取。DNA提取步骤按试剂盒的说明书进行,所提取的DNA经紫外分光光度计检测浓度并稀释至100 ng/ $\mu$ L,于-20  $^{\circ}$ C保存备用。

### 1.5 LAMP扩增反应

配制LAMP反应体系25  $\mu$ L,包括:内引物FIP和BIP各1.6  $\mu$ mol/L,外引物F3和B3各0.2  $\mu$ mol/L,环引物LF和LB各0.8  $\mu$ mol/L,10 $\times$ Thermol Pol缓冲液2.5  $\mu$ L,1 M甜菜碱,6  $\mu$ mol/L MgSO<sub>4</sub>,1.6  $\mu$ mol/L dNTP,8 U Bst大片断DNA聚合酶、DNA模板2  $\mu$ L

(约 200 ng)。混匀离心后将 1 μL 的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。最后参照 LAMP 浊度仪使用说明书，将混合物置于反应孔中，于 63 °C 恒温反应 90 min，80 °C 下保温 5 min 以结束反应。如果发生扩增反应，则会产生白色焦磷酸镁沉淀，倒转离心管，让管盖的显色液加入到混合液中，则显色液从橙色变成绿色。

### 1.6 特异性实验

利用建立的 LAMP 实时浊度法，分别对多种常见转基因植物及加工产品、非转基因植物及加工产品进行检验，并与 LAMP 显色法和实时荧光 PCR 法的结果作比对，以评价该方法的特异性。

### 1.7 灵敏度试验

取 10% 转基因玉米 MON810 标准品，与非转基因玉米以不同比例充分混合均匀，制备成添加浓度分别为 0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1% 和 5% 的 MON810 阳性模拟样品，按照 LAMP 实时浊度法进行检测，以评价该方法的灵敏度。

### 1.8 稳定性实验

利用建立的 LAMP 实时浊度法，分别对 3 个不同浓度（空白样品 0%、添加浓度 0.5%、1%）的 MON810 阳性模拟样品及 10% MON810 标准品进行检测，每个样品重复 20 次，并与 LAMP 显色法和实时荧光 PCR 法的结果作比对。

## 2 结果与分析

### 2.1 LAMP 引物筛选结果

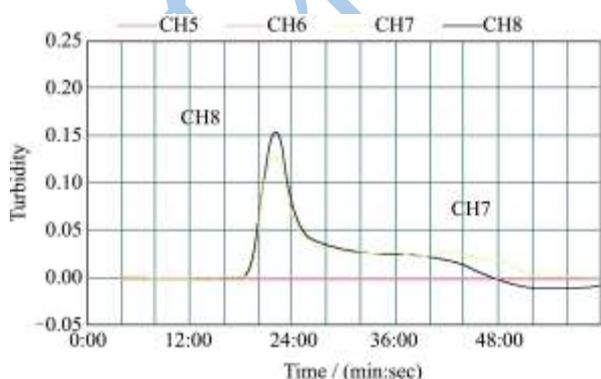


图 1 MON810-2 引物引入环引物的 LAMP 实时浊度法检测结果

Fig.1 Results of LAMP detection of primers with ring

注：CH5-6: MON810 阴性样品，CH7-8: MON810 阳性

样品。

用 10% 的转基因玉米 MON810 标准品作为阳性模板进行引物的初步筛选，结果显示引物 MON810-2 发生了扩增反应，出峰时间为 45 min 左右，峰高为 0.13，出峰时间和峰高值都适中。进而引入环引物对反应进行优化，MON810-2 引物引入环引物的 LAMP 实时浊度法检测结果见图 1。由图 1 可知，MON810-2 引入环引物后，出峰时间提早到 20 min 左右，可以初步将反应时间定在 60 min 进行后续实验。

### 2.2 特异性实验结果

LAMP 实时浊度法特异性检测结果见表 2。由表 2 可知，LAMP 实时浊度法对多种类型样品的检验结果与 LAMP 显色法及实时荧光 PCR 法的结果符合率为 100%，表明该方法特异性良好。

### 2.3 灵敏度实验

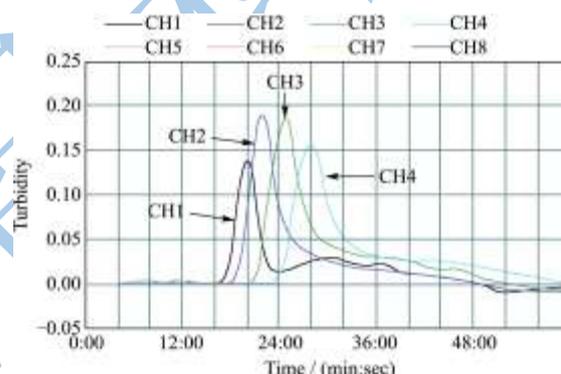


图 2 MON810-2 引物的灵敏度结果

Fig.2 Sensitivity result of LAMP primers MON810-2

注：CH1: 10%；CH2: 5%；CH3: 1%；CH4: 0.5%；CH5: 0.1%；CH6: 0.05%；CH7: 0.01%；CH8: 阴性对照。

LAMP 实时浊度实验结果见图 2。LAMP 实时浊度法结果显示转基因玉米 MON810 的 10% 标准品、5% 模拟样品、1% 模拟样品、0.5% 模拟样品出现阳性扩增，且反应管出现显色反应，即与显色法结果一致。表明该方法可以检测出转基因含量低至 0.5% 的玉米 MON810，灵敏度较高。

### 2.4 稳定性实验

LAMP 实时浊度法稳定性实验结果见表 3。采用本方法分别对 10% 的标准品和 3 个不同浓度（空白样品 0%、添加浓度 0.5%、1%）的模拟样品进行检测，每个样品重复 20 次。结果显示 4 个浓度的 LAMP 实时浊度法实验结果重复性好，与 LAMP 显色法的结果

一致。

表 2 LAMP 实时浊度法特异性检测结果

Table 2 Specificity result of LAMP

样品类别	样品名称	转基因特征	LAMP 实时浊度法		
			时浊度法	显色法	实时荧光 PCR 法
非转基因植物样品 (5份)	玉米(D1)	非转基因	-	-	-
	玉米(D2)	非转基因	-	-	-
	玉米(D3)	非转基因	-	-	-
	玉米(D4)	非转基因	-	-	-
	玉米(D5)	非转基因	-	-	-
非目的转基因成分的转基因样品(10份)	玉米(211)	NK603	-	-	-
	玉米(212)	MON863	-	-	-
	玉米(213)	MIR604	-	-	-
	玉米(214)	CBH351	-	-	-
	玉米(215)	MON89034	-	-	-
	玉米(216)	GA21	-	-	-
	玉米(217)	MON88017	-	-	-
	玉米(218)	BT11	-	-	-
	玉米(219)	BT176	-	-	-
	玉米(220)	T25	-	-	-
其他植物样品(9份)	大豆(1331)	GTS-40-3-2	-	-	-
	大豆(1332)	MON89788	-	-	-
	大豆(1333)	DP356043	-	-	-
	小麦(1338)	B73-6-1	-	-	-
	油菜(1339)	RT73	-	-	-
	甜菜(1340)	H7-1	-	-	-
	水稻(1355)	Bt63	-	-	-
	水稻(1356)	KF6	-	-	-
	水稻(1357)	KMD1	-	-	-
其他植物加工产品 (5份)	豆浆(1567)	非转基因	-	-	-
	米粉(1568)	非转基因	-	-	-
	麦片(1569)	非转基因	-	-	-
	薯片(1570)	非转基因	-	-	-
	米线(1571)	非转基因	-	-	-
含目的转基因成分的植物样品(5份)	玉米(B1)	MON810	+	+	+
	玉米(B2)	MON810	+	+	+
	玉米(B3)	MON810	+	+	+
	玉米(B4)	MON810	+	+	+
	玉米(B5)	MM88 (MON863× MON810)	+	+	+
含目的转基因成分的加工产品(5份)	玉米粉(C1)	MON810	+	+	+
	玉米羹(C2)	MON810	+	+	+
	玉米球(C3)	MON810	+	+	+
	饲料(C4)	MON810	+	+	+
	玉米片(C5)	MON810	+	+	+

注：“+”表示检出，“-”表示未检出。

表 3 LAMP 实时浊度法稳定性实验结果

Table 3 Stability result of LAMP

检测方法	阳性样品数/实验样品数			
	标准品 /10%	模拟样品 /1%	模拟样品 /0.5%	空白样品 /0%
LAMP 实时浊度法	20/20	20/20	20/20	0/20
LAMP 显色法	20/20	20/20	20/20	0/20
实时荧光 PCR 法	20/20	20/20	20/20	0/20

### 3 结论

本研究建立了转基因玉米 MON810 的 LAMP 实时浊度检测方法。该方法检测转基因玉米 MON810 品系较常规的 PCR 法更快速、简便，不需要昂贵的仪器设备，1 h 内即可完成检测，对其它转基因植物和非转基因植物均无扩增信号，检测结果与实时荧光 PCR 法一致。可见该 LAMP 实时浊度法检测转基因玉米 MON810 具有较高的特异性，且检测低限为 0.5%，完全满足现行的欧盟和其他国家转基因检测要求（欧盟要求农产品中含有获批准转基因成分 0.9% 即为转基因产品）<sup>[10]</sup>。LAMP 实时浊度法在方法开发时，弥补了 LAMP 显色法由于只能看到终点显色无法判断是否为非特异性扩增的缺点，同时又具有 LAMP 法的优点，即操作简单、耗时短、结果判定简单、特异性和灵敏度高，能满足转基因检测的要求，尤其适合在基层检验检疫机构和实验室推广和应用。随着商品化试剂盒的不断开发，该法将具有更广阔的发展前景。

### 参考文献

- [1] Zambryski P, Joos H, Genetello C, et al. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity [J]. The EMBO Journal, 1983, 2(12): 2143
- [2] 黄锡生,许珂.论我国转基因食品安全的法律完善[J].现代食品科技,2007,3:190-192  
Huang Xi-sheng, Xu Ke. Discussion on Perfecting the Legislation for the Safety of GM Food [J]. Modern Food Science and Technology, 2007, 3: 190-192
- [3] Clive James.2011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.2012,32(1):1-14  
Clive James. The Development Situation of the global biotechnology/Commercial Genetically Modified Crops in 2011 [J]. China Biotechnology, 2012, 32(1): 1-14
- [4] 郭桦,郭祀远.转基因食品安全性的探讨[J].现代食品科技, 2007,8:71-73

- GUO Hua, GUO Si-Yuan. Discussion of the Security of Genetically Modified Foods [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2007, 8: 71-73
- [5] Livak K J, Flood S J A, Marmaro J, et al. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization[J]. *PCR Meth. Appl.*, 1995, 4: 357-362
- [6] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(12): e63
- [7] Parida M, Santhosh S, Dash P, et al. Development and evaluation of reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and real-time detection of Japanese encephalitis virus [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, 44(11): 4172-4178
- [8] 杨秋林,张如胜,伍和平,等.环介导等温扩增技术检测卡氏肺孢子虫的研究[J].*中华微生物学和免疫学杂志*,2008, 28(6):565-567
- YANG Qiu-lin, ZHANG Ru-sheng, WU He-ping, et al. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA by loop-mediated isothermal amplification [J]. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 2008, 28(6): 565-567
- [9] Song T, Toma C, Nakasone N, et al. Sensitive and rapid detection of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* by a loop-mediated isothermal amplification method [J]. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2005, 243(1): 259-263
- [10] 李德康.转基因食品的发展及安全性初探[J].*科技信息*, 2011,18:77
- LI De-kang. Development and Safety Preliminary Study Genetically Modified Foods [J]. *Science and Technology Information*, 2011, 18: 77