

转基因检测微流控恒温扩增芯片的研制

周杰^{1,2}, 黄文胜¹, 邓婷婷¹, 陈颖¹, 李敏³, 欧阳兆槐³, 吴亚君¹, 王永贵³

(1. 中国检验检疫科学研究院农产品安全研究中心, 北京 100176)

(2. 南京财经大学食品科学与工程学院, 江苏南京 210003) (3. 北京博奥晶典生物技术有限公司, 北京 100176)

摘要:近年来环介导等温扩增技术(Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP)越来越多地应用于转基因农作物、微生物等的基因检测中。为了提高相关检测机构的转基因产品检测效率, 加快进出口食品农产品的通关速度, 本文首次使用碟式芯片环介导恒温扩增技术, 在 65 °C 恒温条件下, 对样品中的 P-CaMV35S、T-NOS、NPT II、BAR、PAT、Cry1Ac、EPSPS I、EPSPS II、FMV35S 和 GM-HRA 等转基因靶标进行同步检测, 检出限可达到 0.5% (m/m), 实现一次上样即可完成样品的转基因成分筛查。该方法特异性和灵敏度良好、检测时间较短, 可实时读取扩增结果。对实际样品的检测结果表明, 该方法的检测结果与实时荧光 PCR 方法的完全一致。本文开发的转基因检测微流控恒温扩增碟式芯片, 可用于常见农产品(大豆、玉米、大米和棉花等)的转基因成分筛查, 为转基因产品的定性检测提供了新的快速、灵敏、高通量技术平台。

关键词: 转基因检测; 微流控芯片; 恒温扩增; 检出限

文章编号: 1673-9078(2017)6-293-302

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.6.043

Development of a Microfluidic Chip for Detection of Genetically Modified Organisms by Loop-mediated Isothermal Amplification

ZHOU Jie^{1,2}, HUANG Wen-sheng¹, DENG Ting-ting¹, CHEN Ying¹, LI Min³, OU YANG Zhao-huai³, WU Ya-jun¹, WANG Yong-gui³

(1. Agricultural Products Safety Research Center, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China)

(2. College of Food Science and Engineering, Nanjing University of Finance & Economics, Nanjing 210003, China)

(3. Beijing Capital Bio-Technology Co., Ltd., Beijing 100176, China)

Abstract: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) has been increasingly applied in the genetic detection of transgenic crops and microorganisms in recent years. In order to improve the detection efficiency of related inspection agencies for transgenic products and speed up the clearance of imported and exported agricultural products and foods, LAMP was combined with a microfluidic chip for the first time to simultaneously detect ten genetic recombinant elements, including P-CAMV35s, T-NOS, NPT, BAR, PAT, Cry1Ac, EPSPSI, EPSPSII, FMV35s, and GA-Hra, in samples at 65°C. The limit of detection could reach 0.5% (m/m), and the detection of transgenic ingredients in the sample could be completed with one sample loading. This method had a good specificity, a high sensitivity, and a short detection time, and the amplification signals could be acquired in real time using software. The detection results for actual samples indicated that all the results were consistent with those obtained by the real-time polymerase chain reaction (PCR) standard method. The microfluidic chip developed in this study for LAMP can be used for the inspection of transgenic ingredients in common agricultural products (soybean, corn, rice, cotton, etc.), and provides a rapid, sensitive, and high-throughput technical platform for the qualitative detection of transgenic products.

Key words: detection of genetically modified organisms; microfluidic chip; loop-mediated isothermal application; limit of detection

近 30 年里, 转基因技术已广泛应用于农作物育种和生产当中, 国际农产品贸易中大豆、玉米、棉花、油菜籽基本都是转基因产品。据国际农业生物技术组织 (ISAAA) 最近发布的报告, 2015 年在全球 28 个

收稿日期: 2016-10-26

基金项目: 国家转基因重大专项项目 (2014ZX08012-001)

作者简介: 周杰 (1992-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学

通讯作者: 陈颖 (1972-), 女, 研究员, 研究方向: 食品生物安全

国家包括玉米、棉花、大豆、油菜和甜菜等转基因作物的种植面积达 1.797 亿 hm², 转基因作物的种植率再创历史新高, 发展速度在农业技术史上前所未有^[1]。然而公众一直关注转基因作物对健康和环境的影响。为保障消费者知情权, 确保转基因相关管理法规的顺利执行, 对转基因食品农产品进行快速、灵敏、高通量的准确检测至关重要。目前常用的转基因检测方法包括基于蛋白的免疫学法和基于核酸的基因扩增法。

免疫层析试纸条和酶联免疫吸附技术是转基因蛋白检测的常用方法^[2-5]，但只能检测未经加工且种子中含有足量转基因蛋白的产品，适用范围不能完全满足要求。目前实时荧光PCR技术在转基因检测中应用广泛，已在相关国家和行业标准^[6]以及商业试剂中得到采用。实时荧光PCR具有灵敏、特异的优点，但需要精密仪器及有经验的检测人员，在某种程度上限制了其在企业及基层检测机构中的应用。2000年Notomi T等^[7]开发了环介导恒温扩增检测技术（Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP），该技术针对靶基因序列的6个区域设计了3对特异性引物（包括上游引物F3/B3、下游引物FIP/BIP和环引物LF/LB），利用具有链置换活性的*Bst* DNA聚合酶（*Bst* DNA polymerase），在恒温条件（60℃~65℃）下反应20~60 min可将靶基因扩增到10⁹个拷贝^[8]。检测结果可通过肉眼观察反应液浊度（反应副产物焦磷酸镁沉淀）直接进行判断，不像PCR一样需数十次的温度循环及电泳、紫外观察等繁琐过程，是一种特异性强、灵敏度高、反应快速、操作简单的核酸检测方法，目前已应用于转基因大豆、玉米、大米、棉花及油菜等常见农作物的检测^[9,10]。2014年，我国发布并实施了针对出口食品中多种转基因产品的出入境检验检疫行业标准-出口食品中转基因成分环介导等温扩增（LAMP）检测方法^[11]。然而常规LAMP检测方法每次只能检测一种转基因靶标，难以对样品的转基因掺杂状况进行全面分析。

微流控恒温扩增碟式芯片是通过微加工构建的微型生化分析系统，可在一片芯片上同时进行数十个基因检测反应。本文在芯片的微反应池中按照一定的浓度比例预先固化11套经过特异性、灵敏度及检出限优化的检测指标LAMP引物，通过加入总体积为52 μL的反应体系，在微流控芯片恒温扩增仪中进行扩增，并通过软件实时分析反应中产生的荧光信号来确定各种靶基因的检测结果，实现一次加样对多种转基因元件的快速筛查。本芯片便于我国食品企业及基层检测机构在日常食品农产品转基因检验中使用，能在一定程度上加快进出口食品的通关速度，有助于提高我国转基因产品的检测能力。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

转基因大豆标准品 GTS40-3-2、MON89788、CV127、DP-356043-5、FG72、DAS68416-4、DAS81419-2、A2704-12、MON87705、MON87769、

MON87708、A5547-127、DAS44406-6及转基因玉米标准品 NK603、Bt11、TC1507、MON87640、MON863、MON810、MIR162、GA21、DAS40278、BT176、98140、59122、3272、MON89034、MIR604、MON88017、T25 购自美国油料协会（AOCS）；50份样本由厦门出入境检验检疫局提供，转基因大米 KF6、Cry1C，以由本实验室保存。非转基因大豆、非转基因玉米及大米、小麦、油菜、棉花、白菜、红薯、芋头、香菇、芝麻、黄瓜、绿豆、黑豆和蚕豆等常见非转基因农作物购于北京超市。

1.2 试剂与设备

MN植物基因组DNA提取试剂盒（MN Genomic DNA from NucleoSpin® Food 上海浩然生物技术有限公司，上海）；QIAGEN植物基因组抽提试剂盒（DNeasy plant minikit QIAGEN 生物技术有限公司，德国）；TIANGEN植物基因组DNA提取试剂盒（Plant Genomic DNA Kit 天根生化科技(北京)有限公司，北京）；荣研恒温扩增试剂、EvaGreen染料购自北京博奥晶典生物技术有限公司；TissueLyser-II高通量组织研磨机，德国QIAGEN生物技术有限公司；Vortex-Genie 2 搅拌器，美国Scientific Industries公司；Venticell精密烘箱，德国MMM公司；DU 640核酸蛋白分析仪，美国Beckman公司；BS电子天平，德国Sartorius公司；各种量程微量移液器，德国Eppendorf公司；7500实时荧光定量PCR仪，美国ABI公司；RTisochip™-A恒温扩增微流控芯片分析仪，北京博奥晶典生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 样品DNA提取

称取大豆、大米和玉米样品颗粒约20 g，洗净后分别放入研磨机中。将样品均质为直径约0.5 mm大小的粉末。取0.1 g样品粉末，使用试剂盒MN（Nucleo Spin®Food）、QIAGEN基因组抽提试剂盒DNeasy plant minikit、TIANGEN植物基因组DNA提取试剂盒等三种试剂盒进行核酸抽提，具体步骤参照相应试剂盒说明。提取的样品DNA置于-20℃保存备用。

以三种试剂盒抽提的转基因大豆GTS40-3-2标准品（100%）的DNA为模板，按照LAMP反应体系：LAMP Master Mix 26 μL，*Bst* DNA聚合酶3 μL，EvaGreen染料2.6 μL，DNA模板大于500 ng，ddH₂O调节总体积至52 μL，混合后加入碟式芯片中，使用RTisochip™-A恒温扩增微流控芯片分析仪进行扩增检测，测试三种试剂盒提取的DNA模板能否满足碟

式芯片的检测要求。

1.3.2 LAMP 引物设计

根据 NCBI GeneBank 公布的序列, 采用 LAMP 引物在线设计软件 primer explorer 4 对 10 个转基因成分筛选元件和植物通用检测指标分别设计 LAMP 引物 (表 1), NPT II 引物来自出入境行业标准。所有引物由英潍捷基生物技术有限公司合成。检测指标包括: 植物核酸通用检测指标 (18S rDNA)、花椰菜花

叶病毒的 35S 启动子 (P-CaMV35S)、胭脂碱合成酶基因终止子 (T-NOS); 新霉素磷酸转移酶基因 (NPT II) 来自两种细菌的磷丝菌素乙酰转移酶基因 (BAR、PAT)、苏云金芽孢杆菌杀虫晶体毒蛋白基因 (Cry1Ac)、5-烯醇丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶基因 (EPSPS I)、密码子优化的 EPSPS 基因 (EPSPS II)、玄参花叶病毒 35S 启动子 (FMV35S) 和乙酰乳酸合成酶基因 (GM-HRA)。

表 1 LAMP 扩增引物序列

Table 1 Primers for LAMP detection of genetically modified organisms

名称	编号	序列
18S rDNA	18S rDNA-F3	ATCGGCTAACTCTGTGCCAGCA
	18S rDNA-B3	ATTCCCTCTGCCCCACCGTA
	18S rDNA-FIP	AAGCCACCTACAGACGCTTTACGCCGCGGTAATACAGAGGATGCAAG
	18S rDNA-BIP	AAGTCCGCCGTCAAATCCCAGACTCCAGCTTGGTAGTTCCACCG
	18S rDNA-Lf	CCCAATCATTCCGGATAACG
	18S rDNA-Lb	GGGCTCAACCCTGGACAGG
P-CaMV35S	P-CaMV35S-F3	CTCCTCGGATTCCAATTGC
	P-CaMV35S-B3	GTCTTGCGAAGGATAGTGG
	P-CaMV35S-FIP	GGCAGAGGCATCTTCAACGAGGAAGGTGGCTCCTACAA
	P-CaMV35S-BIP	CACGAGGAGCATCGTGGAAAGTCAGTGGAGATATCACATC
	P-CaMV35S-Lf	TTTCCTTTATCGCAATGATGGC
	P-CaMV35S-Lb	AGAAGACGTTCCAACCACG
T-NOS	T-NOS-F3	GATCGTTCAAACATTTGGCA
	T-NOS-B3	GATGACACCGCGTGCATAA
	T-NOS-FIP	CATGCTTAACGTAATTCAACAGAACTTAAGATTGAATCCTGTTGCCGG
	T-NOS-BIP	TGGGTTTTATGATTAGAGTCCCACAATTTATCCTAGTTTGCGCGCTATA
	T-NOS-Lf	TTATATGATAATCATCGCAAGACCG
	T-NOS-Lb	CGCAATTATACATTTAATACGCGATAG
NPT II	NPT II -F3	CTCGACGTTGTCACTGAAG
	NPT II -B3	TGATGCTCTTCGTCCAGA
	NPT II -FIP	TAGCCGGATCAAGCGTATGCTCATCTCACCTTGCTCCT
	NPT II -BIP	CCATTTCGACCACCAAGCGACATCCTGATCGACAAGACC
	NPT II -Lf	TTGCATCAGCCATGATGGATA
	NPT II -Lb	CGTACTCGGATGGAAGCC
BAR	BAR-F3	CCGAGTCGACCGTGTACGTCTCC
	BAR-B3	GGGCATATCTGAGCGCCTCGT
	BAR-FIP	GTGCTCCAGGGACTTCAGCAGTTACCACCAGCGGACGGGACTG
	BAR-BIP	GGGCTTCAAGAGCGTGGTCGCAAGCGCACGTTCCGGGTCGTTG
	BAR-Lf	GTGGGTGTAGAGTGTGGAGC
	BAR-Lb	GTCATCGGGCTGCCAA
PAT	PAT-F3	GCCACAAACACCACAAGAGTGGA
	PAT-B3	GCGCTCCATAGACTTAAGCAAA
	PAT-FIP	GCCCAGCGTAAGCAATACCAGCAAGATAGATACCCTTGGTTGGTTG

转下页

接上页

	PAT-BIP	CTGGAAGGCTAGGAACGCTTACGAGGCCCAACCTTTGATGCCTATG
	PAT-Lf	GCCACAACACCCCTCAACCTCA
	PAT-Lb	TGGACAGTTGAGAGTACTGTTTACG
Cry1Ac	Cry1A-F3	GAGCAGCTGATCAACCAGCGGATCGA
	Cry1A-B3	GGAACCTGGTAGTTCTGGACTGCGA
	Cry1A-FIP	TCGGCTTCCCCTCTCGGAAGAGTTCCGCCAGGAACCAGGCCATC
	Cry1A-BIP	AACCCAGCCCTCCGCGAGGATAGCTGTGGTCAAGGCGCTGTTC
	Cry1A-Lf	CTCTGCGTAGATTTGGTAGAGATTGCT
	Cry1A-Lb	ATGCGTATCCAATTCAACGACAT
	EPSPS I	EPSPS I-F3
EPSPS I-B3		CCATTGAGCTTGAGGCCATTGG
EPSPS I-FIP		CTTCCGCGAAGGCGGCGTTTTTCGCCTCCGATGATCGACGAA
EPSPS I-BIP		GGCGACCGTGATGAACGGTTTTCCGAGAGGCGGTTGCTTTCC
EPSPS I-Lf		GCGACAGCGAGAATCGGATA
EPSPS I-Lb		GGAAGAACTCCGCGTCAAGG
EPSPS II	EPSPS II-F3	CTATGCAAGCTATGGGTGCCAGA
	EPSPS II-B3	CGACCCATTGGACGCTTAGTGA
	EPSPS II-FIP	CGAGAGGAGCCTCAGGAGCAAGGTCCGTAAGGAAGGTGATACTTGG
	EPSPS II-BIP	GTAACGCTGCAACTGGTTGCCGTGCGTCACCAATGAAAGTGCTATCG
	EPSPS II-Lf	AGTCCACCGTTACCAACATCATCA
	EPSPS II-Lb	TGGGICTTGTGGTGTTTACGA
FMV35S	FMV35S-F3	CGAAGACTTAAAGTTAGTGGGCATC
	FMV35S-B3	GAGTGGGCTGTCAGGACAGCTC
	FMV35S-FIP	GCCTAACAATTCTGCACCATTCTTTGTCAACATCGAGCAGCTGGCT
	FMV35S-BIP	GCACCTACCAAAAGCATCTTTGCCTTTCCACGTTATTTGTTCCCCAC
	FMV35S-Lf	TTTGTCTGGTCCCCACAAGC
	FMV35S-Lb	GCAAAGATAAAGCAGATTCTCTAG
GM-HRA	GM-HRA-F3	AGGTACTAACTCTAGGCTTGTGTGC
	GM-HRA-B3	GAGAGCGTGGTTGGGTTTGG
	GM-HRA-FIP	CGGGTGGTTCTGGAAGCGTTGCAGTTTTTGAAGTATAACCATGCCAC
	GM-HRA-BIP	CTTCCTCTTACACCCACCTTCCCTTGAGGGTTTGTGATGAGAGAGAGGGAG
	GM-HRA-Lf	TGGCCGCCATTGTGTTGT
	GM-HRA-Lb	CCAAACGCATTACTAGATCCACC

1.3.3 碟式芯片 LAMP 扩增

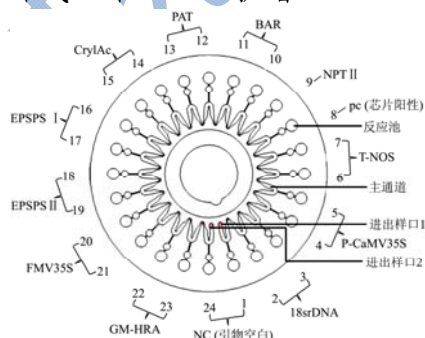


图1 微流控恒温扩增碟式芯片

Fig.1 Microfluidic detection chip for LAMP

碟式芯片(图1所示)共有24个样品检测孔,每孔体积为2.2 μL。将经过特异性、灵敏度验证的11个检测指标的LAMP引物,各自按照浓度比例混合后,分别固定于碟式芯片的不同反应池内,固定顺序如表2所示,待引物干燥后,将碟式芯片保存于-20℃备用。LAMP反应体系为:LAMP Master Mix 26 μL, Bst DNA聚合酶3 μL, EvaGreen染料2.6 μL, DNA模板大于500 ng, ddH₂O调节总体积至52 μL,保证反应体系模板的终浓度大于11 ng/μL。样品检测时,预先将碟式芯片放置到室温,然后将样品DNA与LAMP扩增试剂充分混匀,并用低速离心机瞬时离心。用移液器将

配制好的反应体系注入碟片主通道中,然后将碟片置于恒温扩增微流控芯片分析仪(北京博奥晶典生物技术有限公司,型号 RTisochip™-A)内,仪器自动旋转将反应液离心至样品检测孔中进行检测。LAMP 反应时实时收集样品反应体系的荧光值。产生典型荧光跃升扩增曲线的反应孔为阳性扩增,反之则为阴性。

1.3.4 碟式芯片内固定 LAMP 引物浓度优化

依据引物自身的扩增灵敏度、反应试剂对引物量的要求及碟片本身的物理特性,参考黄国亮^[12,13]等的报道,对两种引物固定浓度体系进行对比实验,体系 I 中的外引物、环引物、内引物终浓度分别为 0.2 μmol/L、0.4 μmol/L 和 1.6 μmol/L,体系 II 中的外引物、环引物、内引物终浓度分别为 0.3 μmol/L、1.2 μmol/L 和 2.4 μmol/L。以 Nucleo Spin®Food 试剂盒提取的浓度为 11 ng/μL 转基因大豆 GTS40-3-2、MON89788,转基因玉米 Bt11、NK603,转基因大米 Cry1C、KF6 等样品核酸为模板进行测试,确定适用于微流控恒温扩增碟式芯片引物固定浓度。

1.3.5 碟式芯片特异性实验

以阳性转基因大豆、玉米、大米的基因组 DNA 和非转基因大豆、玉米、大米、小麦、油菜、棉花、白菜、红薯、芋头、香菇、芝麻、黄瓜、绿豆、黑豆、蚕豆的基因组 DNA 为模板,与荣研恒温扩增试剂混合后加入碟式芯片中,基因组 DNA 终浓度为 11 ng/μL,在 RTisochip™-A 恒温扩增微流控芯片分析仪中进行扩增检测,验证碟式芯片的检测特异性。

1.3.6 碟式芯片灵敏度实验

分别取转基因大豆 GTS40-3-2、MON89788 标准品(100%),转基因玉米 Bt11、NK603 标准品(100%),转基因大米 Cry1C、KF6 标准品(100%)的 DNA 溶液,按照说明书提供芯片最低上样量梯度稀释为 44 ng/μL、33 ng/μL、22 ng/μL 和 11 ng/μL,与荣研恒温扩增试剂混合后加入碟式芯片中进行 LAMP 实时荧光扩增检测,测试微流控恒温扩增碟式芯片的绝对灵敏度。

以非转基因大豆、玉米、大米粉末为基质,分别掺入转基因大豆 GTS40-3-2、MON89788 标准品(100%)、转基因玉米 Bt11、NK603 标准品(100%)和转基因大米 Cry1C、KF6 标准品(100%),配制成转基因质量分数为 0.1%、0.5%、1%和 5% (m/m) 的模拟样品,用 NucleoSpin®Food 试剂盒提取 DNA。将模拟样品 DNA 浓度稀释为 11 ng/μL,与 LAMP 试剂混合后加入碟式芯片中进行扩增检测,测定碟式芯片的相对灵敏度。

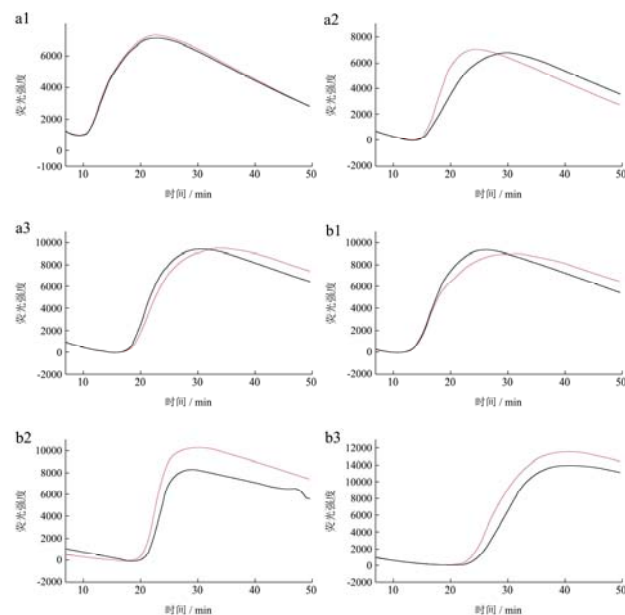
1.3.7 碟式芯片检测准确性实验

取 50 份实际样本,包括大豆 30 份、玉米 10 份、大米 5 份以及棉花 5 份,每份称取 20 g,用高速粉碎机研磨成粉末,用 MN 植物基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA。取 2 μL 样品 DNA,与 LAMP 试剂混合后加入碟片中,对样品中的转基因成分进行检测。以非转基因大豆、玉米、大米 DNA 为阴性对照,以含模板序列的质粒 DNA 作为阳性对照。同时应用出入境行业标准方法^[14]对这 50 份实际样本进行检测,对比两种方法检测结果的一致性,测定碟式芯片在实际样品检测中的准确性。

2 结果与分析

2.1 样品 DNA 提取

三种核酸提取试剂盒(MN、QIAGEN 及 TIANGEN)所提取的核酸模板质量存在差异,MN 试剂盒提取的浓度与纯度稍高于 QIAGEN 试剂盒和 TIANGEN 试剂盒。对三种试剂盒所提取的 DNA 模板进行微流控恒温扩增碟式芯片检测,结果如图 2 所示。三种试剂盒所提取的 DNA 模板虽然浓度与纯度存在差异,但均能满足碟式芯片扩增的需要,且扩增结果之间差异较小,MN 植物基因组提取试剂盒提取的 DNA 模板阳性结果扩增时间稍短于 QIAGEN 试剂盒和 TIANGEN 试剂盒,扩增反应均能在 30 min 以内完成。上述结果表明,微流控恒温扩增碟式芯片试剂盒对 DNA 模板质量无特别要求,普通核酸提取试剂盒能够满足,符合装备普通核酸提取设备的基层单位的检测需要。



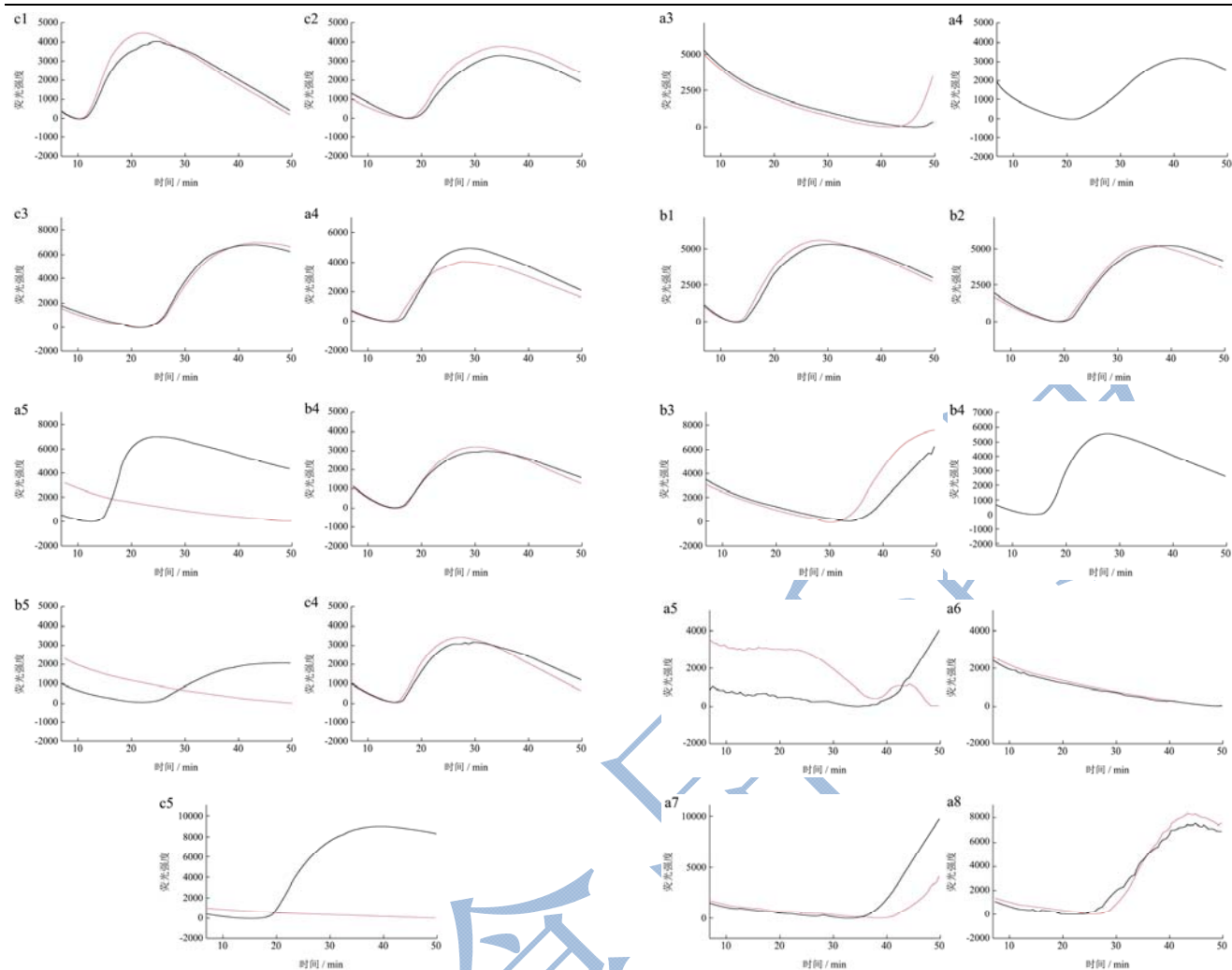


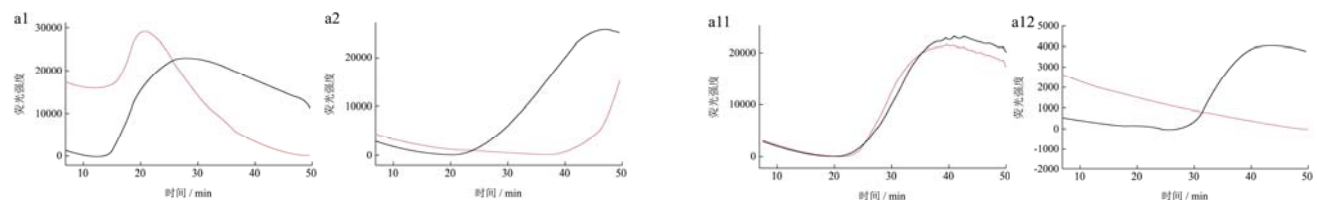
图 2 3 种 DNA 提取试剂盒扩增结果比较图

Fig.2 Comparison of the amplification results of three DNA extraction kits

注: a 表示 MN 植物基因组 DNA 提取试剂盒; b 表示 QIAGEN 植物基因组 DNA 提取试剂盒; c 表示 TIANGEN 植物基因组 DNA 提取试剂盒; 1 表示 18S rDNA; 2 表示 P-CaMV35S; 3 表示 T-NOS; 4 表示 EPSPS I; 5 表示“S”型曲线为阳性对照, 直线为阴性对照; 纵坐标为荧光强度, 横坐标为反应时间。

2.2 碟式芯片内固定 LAMP 引物浓度优化

以 MN 试剂盒所提取的转基因大豆 GTS40-3-2、MON89788 标准品 (100%)、转基因玉米 Bt11、NK603 标准品 (100%)、转基因大米 Cry1C、KF6 标准品 (100%) 核酸为模板, 对碟式芯片的两种引物固定浓度体系来进行对比检测, 所测得实验结果如图 3 所示。



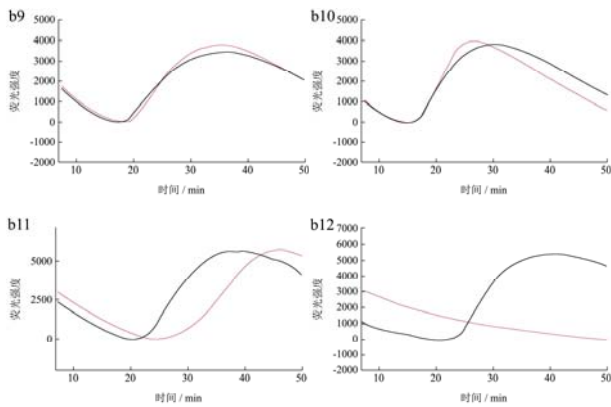


图3 引物固定终浓度检测结果图

Fig.3 Plots of the detection results using the chip with primers at fixed final concentrations

注: a 表示浓度体系 I; b 表示浓度体系 II; 1 表示 18S rDNA; 2 表示 P-CaMV35S; 3 表示 T-NOS; 4 表示 NPTII; 5 表示 BAR; 6 表示 PAT; 7 表示 Cry1Ac; 8 表示 EPSPS I; 9 表示 EPSPS II; 10 表示 FMV35S; 11 表示 GM-HRA; 12 表示“S”型曲线为阳性对照, 直线为阴性对照; 纵坐标为荧光强度, 横坐标为反应时间。

应用引物固定浓度体系 I, 仅 NPTII、EPSPS I 和 GM-HRA 等 3 个靶标产生典型的“S”形扩增曲线, 其余引物未扩增或扩增结果重复性较差; 而引物固定浓度体系 II, 所有基因均能产生重复性较好的“S”形曲线。对比扩增结果, 引物固定浓度体系 II 的扩增稳定性更好, 因此, 在后续实验中选择体系 II 的引物浓度制备微流控恒温扩增碟式芯片。

2.3 碟式芯片特异性实验结果

将阳性转基因大豆、玉米、大米的基因组 DNA 和非转基因大豆、玉米、大米、小麦、油菜、棉花、白菜、红薯、芋头、香菇、芝麻、黄瓜、绿豆、黑豆、蚕豆的基因组 DNA 作为模板, 使用荣研 LAMP 扩增试剂进行检测, 结果如图 4 所示。转基因大豆、玉米、大米的相应检测指标及阳性对照反应池的 LAMP 扩增结果呈阳性, 荧光曲线具有典型的“S”形, 而非转基因样品及无相应靶标的样品均为阴性, 碟式芯片特异性扩增结果与预期一致, 没有出现假阳性结果, 表明转基因检测微流控恒温扩增碟式芯片具有良好的特异性。

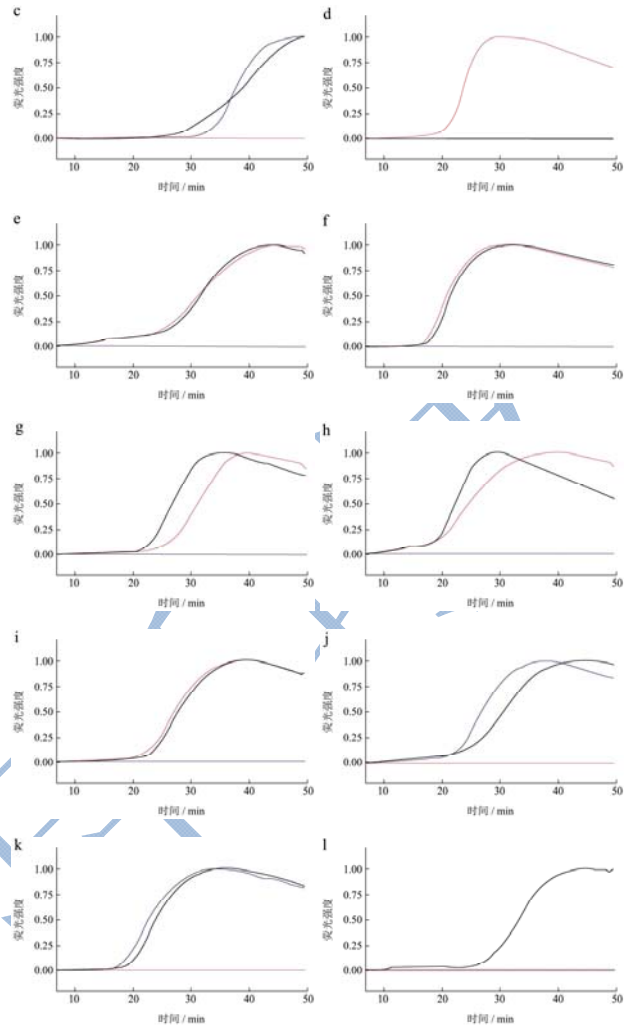
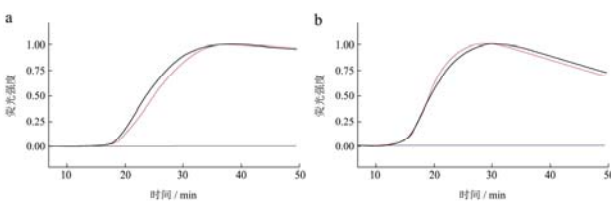
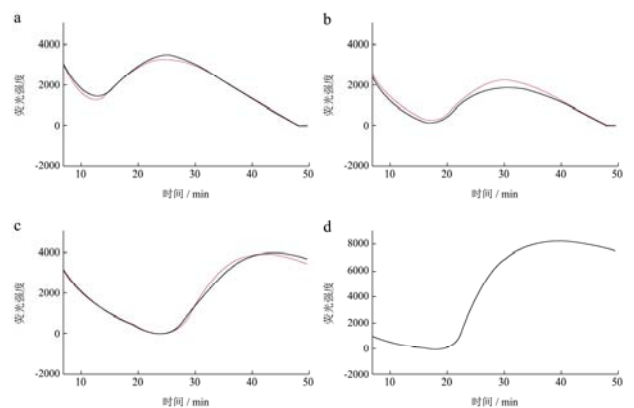


图4 碟式芯片的特异性检测图

Fig.4 Plots of specificity test results for the chip

注: a 表示 18S rDNA; b 表示 P-CaMV35S; c 表示 T-NOS; d 表示 NPTII; e 表示 BAR; f 表示 PAT; g 表示 Cry1Ac; h 表示 EPSPS I; i 表示 EPSPS II; j 表示 FMV35S; k 表示 GM-HRA; l 表示“S”型曲线为阳性对照, 直线为阴性对照; 纵坐标为荧光强度, 横坐标为反应时间。

2.4 碟式芯片灵敏度实验结果



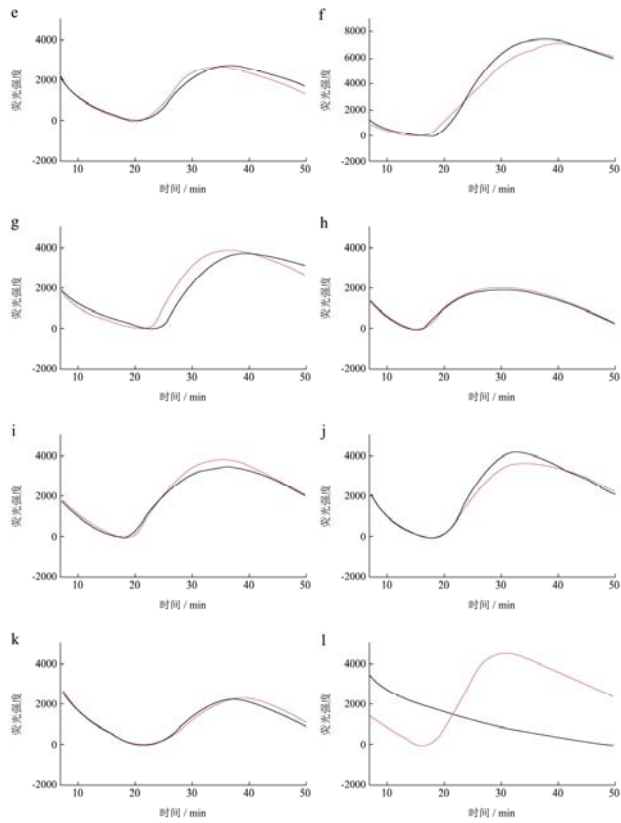


图5 碟式芯片的绝对灵敏度为 11 ng/μL 检测图

Fig.5 Plots of the detection results using the chip at the absolute limit of detection of 11 ng/μL

注: a 表示 18S rDNA; b 表示 P-CaMV35S; c 表示 T-NOS; d 表示 NPT II; e 表示 BAR; f 表示 PAT; g 表示 Cry1Ac; h 表示 EPSPS I; i 表示 EPSPS II; j 表示 FMV35S; k 表示 GM-HRA; l 表示“S”型曲线为阳性对照, 直线为阴性对照; 纵坐标为荧光强度, 横坐标为反应时间。

采用终浓度为 44 ng/μL、33 ng/μL、22 ng/μL 和 11 ng/μL 的转基因大豆 GTS40-3-2、MON89788 标准品 (100%), 转基因玉米 Bt11、NK603 标准品 (100%), 转基因大米 Cry1C、KF6 标准品 (100%) 的 DNA 溶液作为模板, 进行碟式芯片绝对灵敏度检测, 结果如图 5 所示。DNA 模板终浓度为 11 ng/μL~44 ng/μL 范围内碟式芯片各检测指标扩增结果均为阳性, DNA 模板终浓度仅为 11 ng/μL 时, 各检测指标出峰时间仍在 30 min 以内, 且扩增结果重复性良好, 两个重复样品的出峰时间差异较小, 证明微流控恒温扩增芯片的转基因检测灵敏度 (LOD) 可达到 11 ng/μL。

以质量分数分别为 0.1%、0.5%、1%和 5% (m/m) 的模拟阳性样品的 DNA 溶液作为模板进行 LAMP 扩增。结果表明: 5%、1%和 0.5%含量的转基因样品各检测指标均能产生阳性扩增, 扩增时间较短, 30 min 以内即可完成检测 (图 6), 表明本文研制的转基因检测微流控恒温扩增芯片各指标的检出限均可达到

0.5% (m/m)。目前对转基因出口产品的标识阈值一般在 0.9% (欧盟) 和 5% (日本) 左右, 因此该检出限能够满足检测机构及相关执法部门对于转基因产品快速检测的要求。

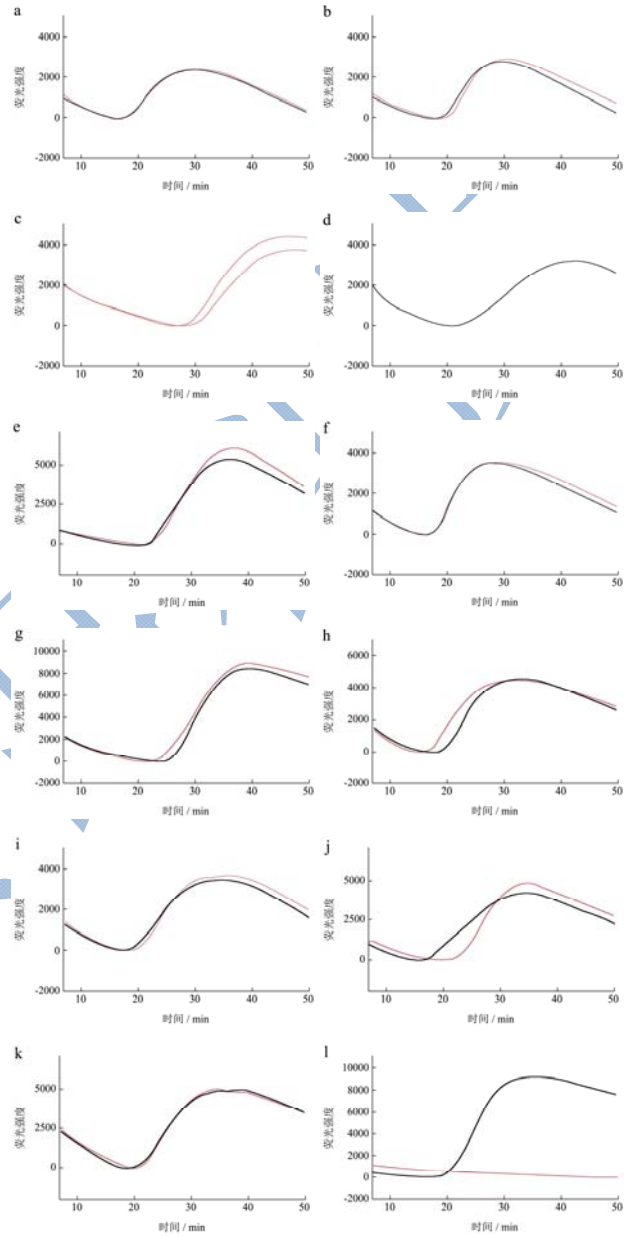


图6 碟式芯片的相对灵敏度为 0.5%检测图

Fig.6 Plots of the detection results using the chip at the relative limit of detection of 0.5%

注: a 表示 18S rDNA; b 表示 P-CaMV35S; c 表示 T-NOS; d 表示 NPT II; e 表示 BAR; f 表示 PAT; g 表示 Cry1Ac; h 表示 EPSPS I; i 表示 EPSPS II; j 表示 FMV35S; k 表示 GM-HRA; l 表示“S”型曲线为阳性对照, 直线为阴性对照; 纵坐标为荧光强度, 横坐标为反应时间。

2.5 碟式芯片检测准确性实验结果

对 2015 年进口的 50 份实际样品进行碟式芯片检

测, 并与出入境行业标准方法的检测结果进行比较, 结果如表 4 所示。转基因检测微流控恒温扩增芯片的检测结果与标准方法的实时荧光 PCR 检测结果完全

一致, 准确率为 100%, 无假阳性和假阴性。表明转基因检测微流控恒温扩增芯片可以准确检测出上述 10 种转基因靶标。

表 4 碟式芯片准确性检测结果
Table 4 Results of the accuracy test of the chip

样品 编号	样品 类型	LAMP 检测方法										与标准方 法相符性
		CaMV35s	T-NOS	NPT	BAR	PAT	CryI Ac	EPSPS I	EPSPS II	FMV 35s	GM- Hra	
1	大豆	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	一致
2	大豆	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	一致
3	大豆	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	一致
4	大豆	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	一致
5	大豆	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	一致
6	大豆	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	一致
7	大豆	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	一致
8	大豆	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	一致
9	大豆	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	一致
10	大豆	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	一致
11	大豆	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	一致
12	大豆	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	一致
13	大豆	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	一致
14	大豆	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	一致
15	大豆	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	一致
16	大豆	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	一致
17	大豆	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	一致
18	大豆	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	一致
19	大豆	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	一致
20	大豆	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	一致
21	大豆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	一致
22	大豆	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	一致
23	大豆	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	一致
24	大豆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	一致
25	大豆	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	一致
26	大豆	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	一致
27	大豆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	一致
28	大豆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	一致
29	大豆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	一致
30	大豆	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	一致
31	棉花	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	一致
32	棉花	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	一致
33	棉花	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	一致
34	棉花	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	一致
35	棉花	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	一致
36	大米	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	一致

转下页

接上页

37	大米	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	一致
38	大米	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	一致
39	大米	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	一致
40	大米	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	一致
41	玉米	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	一致
42	玉米	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	一致
43	玉米	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	一致
44	玉米	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	一致
45	玉米	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	一致
46	玉米	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	一致
47	玉米	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	一致
48	玉米	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	一致
49	玉米	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	一致
50	玉米	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	一致

注：“+”号表示阳性扩增；“-”号表示阴性扩增。

3 结论

相对于转基因蛋白检测方法,核酸受产品加工的影响较小,转基因核酸检测方法应用更广泛。同时转基因成分的 LAMP 检测也比实时 PCR 等技术更加快速、便捷。本研究基于环介导恒温扩增技术,应用所开发的转基因成分检测微流控芯片,首次实现了一次上样同步检测 10 个常见转基因元件,可以进行转基因快速、高通量的准确筛查,在 30 min 以内即可得到检测结果,检出限达到 0.5%;且本试剂盒所消耗 LAMP 试剂量仅为普通反应的 1/2~1/3,大大降低了检测成本,可广泛应用于常见转基因作物(80%大豆、85%玉米,90%大米、100%油菜和 90%棉花等)的转基因成分检测,为转基因成分筛查提供了快速、灵敏的高通量检测平台。但本试剂盒主要用于转基因定性筛查,尚不能用于转基因成分定量。并且在用于深加工产品转基因成分检测时,需针对目标样本中转基因成分核酸的抽提做进一步的优化,以便满足本试剂盒对模板浓度的要求。

参考文献

- [1] Clive James. 2015 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, 2016, 36(4): 1-11
Clive James. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2015 [J]. China Biotechnology, 2016, 36(4): 1-11
- [2] Cantelmo N F, Von Pinho R G, Von Pinho I V, et al. Detection of transgenic events in maize using immunochromatographic strip test and conventional PCR [J]. Ciência E Agrotecnologia, 2013, 37(5): 404-409

- [3] Tao C, Zhang Q, Na F, et al. Development of a colloidal gold immunochromatographic strip assay for simple and fast detection of human α -lactalbumin in genetically modified cow milk [J]. Journal of Dairy Science, 2015, 99(3): 1773-1779
- [4] Kamle S, Ojha A, Kumar A. Development of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bt protein in transgenic cotton [M]. Humana Press, 2011, 2(2): 118-125
- [5] 吕雪飞,周晓萍,满燕,等. 定量检测转基因植物蛋白 Cry1Ac 的双抗体夹心 ELISA 方法建立[J]. 现代食品科技, 2014, 10: 257-262
LV Xue-fei, ZHOU Xiao-ping, MAN Yan, et al. Double-antibody sandwich elisa for the quantitative detection of Cry1Ac protein in transgenic plants [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(10): 257-262
- [6] SN/T 2705-2010, 调味品中转基因植物成分实时荧光 PCR 定性检测方法[S]
SN/T 2705-2010, Protocol of the Real-time Fluorescence qualitative polymerase chain reaction for detecting genetically modified plant components in condiments [S]
- [7] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): 63
- [8] Randhawa G J, Singh M, Morisset D, et al. Loop-mediated isothermal amplification: Rapid visual and real-time methods for detection of genetically modified crops [J]. Agric. Food Chem., 2013, 61(47): 11338-11346
- [9] Li F, Yan W, Long L, et al. Development and application of loop-mediated isothermal amplification assays for rapid

- visual detection of cry2Ab and cry3A genes in genetically-modified crops [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(9): 15109-21
- [10] 朱琳峰,彭焕,黄文坤,等.抗草甘膦转基因大豆 Cp4-epsps 基因快速简便的 LAMP 检测方法[J].*植物保护*,2015,41(3): 86-92
- ZHU Lin-feng, PENG Huan, HUANG Wen-kun, et al. Rapid and simple detection of Cp4-epsps gene in glyphosate-resistant soybean by loop-mediated isothermal amplification [J]. *Plant Protection*, 2015, 41(3): 86-92
- [11] SN/T 3767-2014,出口食品中转基因成分环介导等温扩增(LAMP)检测方法[S]
- SN/T 3767-2014, Loop-mediated isothermal amplification detection method for genetically modified components in food for export [S]
- [12] 黄国亮,田浩,李志永,等.痕量样品高灵敏度快速测量方法与便携式系统研究[J].*光学学报*,2012,32(2):213-220
- HUANG Guo-liang, TIAN Hao, LI Zhi-yong, et al. Study of high sensitive and fast detection to trace sample and portable system [J]. *Acta Optica Sinica*, 2012, 32(2): 213-220
- [13] Huang G, Deng C, Zhu J S, et al. Digital imaging scanning system and biomedical applications for biochips [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2008, 13(3): 034006
- [14] SN/T 1204-2003,植物及其加工产品中转基因成分实时荧光 PCR 定性检验方法[S]
- SN/T 1204-2003, Protocol of the real-time PCR for detecting genetically modified plants and their derived products [S]