

实时 LAMP 法快速检测食用植物油中的转基因成分 CaMV-35S

李向丽¹, 谭贵良², 刘焱², 林霖³, 赖心田³

(1. 中山火炬职业技术学院生物医药系, 广东中山 528436) (2. 广东省中山市质量计量监督检测所, 广东中山 528403) (3. 深圳市计量质量检测研究院, 广东深圳 518109)

摘要: 环介导等温扩增技术 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 是一项新的 DNA 扩增技术, 近年来已被成功应用于转基因作物中外源基因的检测分析。本文针对花椰菜花叶病毒 35 S 启动子(CaMV-35S)设计引物以及有效提取目标 DNA 后, 首次建立了食用植物油中 CaMV-35S 启动子的 LAMP 检测方法。通过在 DNA 提取过程中加入正己烷乳化和加入共沉淀剂, 获得了可以进行 LAMP 扩增的 DNA 片段, 采用 LAMP 实时浊度法和染色法对扩增产物进行比较分析。着重对 FIP/BIP 引物、甜菜碱和 Mg^{2+} 浓度等反应参数进行了优化。结果表明, LAMP 方法能够在 56 min 内特异性地检测到 CaMV-35S 启动子, 检测灵敏度比常规 PCR 高 10 倍, 而且不需要特别的仪器设备, 扩增产物可通过观察实时浊度曲线或通过 SYBR Green I 染色后借助肉眼对检测结果进行判断。该方法快速高效、操作简便、灵敏度高、检测结果准确, 适合食用植物油中转基因成分的快速检测。

关键词: 环介导等温扩增技术; 植物油; 转基因; CaMV-35S; 核酸提取

文章编号: 1673-9078(2014)2-244-248

Rapid Detection of CaMV-35S Promoter in Vegetable Oils by Loop-mediated Isothermal Amplification Method

LI Xiang-li¹, TAN Gui-liang², LIU Yao², LIN Lin³, LAI Xin-tian³

(1. Department of Biomedicine, Zhongshan Torch Technology College, Zhongshan 528436, China)

(2. Zhongshan Supervision Testing Institute of Quality & Metrology, Zhongshan 528403, China)

(3. Shenzhen Academy of Metrology & Quality Inspection, Shenzhen 518109, China)

Abstract: The Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay is a novel and alternative DNA amplification method, which amplifies DNA with high specificity and efficiency, and has been successfully used to screen genetically modified (GM) crops (e.g., soybean, maize). In the present study, a LAMP assay for the detection of exogenous cauliflower mosaic virus 35 S promoter (CaMV-35S) in vegetable oils was firstly developed. The genomic DNA of vegetable oils was effectively extracted by adding hexane and co-precipitant. In the LAMP assay, and the reactions were optimized, involving different concentrations of FIP/BIP primer, betaine and Mg^{2+} . Two different platforms of measurement (real-time turbidity and fluorescence dyes) were compared. Results indicated that LAMP method was rapid (within 56 min) and sensitive, and the detection sensitivity was ten fold higher than that of the conventional PCR. Without specialized PCR or electrophoresis instruments, the target DNA was amplified under isothermal conditions (63 °C) and visualized by accumulated curve of turbidity or staining inspection (SYBR Green I) for naked-eye. The CaMV-35S promoter was successfully detected in vegetable oil samples (soybean oils and rapeseed oils) by this method. The LAMP approach was rapid, sensitive, and available for the monitoring of transgenic elements in GM vegetable oils.

Key words: Loop-mediated isothermal amplification; vegetable oils; genetically modified crops; CaMV-35S; DNA extraction

收稿日期: 2013-09-15

基金项目: 国家质检总局科技计划项目(2013QK274); 广东省质监局科技计划项目(2009ZZ11)

作者简介: 李向丽(1979-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品药品检测

通讯作者: 谭贵良(1977-), 男, 博士, 高级工程师, 研究方向: 食品分子检测技术

据最近的国际农业生物技术应用服务组织 (ISAAA) 统计, 目前全世界共有24个转基因作物获得商业化种植^[1], 转基因作物的种植面积在2011年就超过1.6亿公顷^[2]。然而转基因作物在带来巨大社会和经济效益的同时也存在许多问题, 主要集中在转基因食品的安全性及对生态环境的影响。鉴于其安全性及伦理方面的考虑, 目前世界上很多国家和地区对含有转基因成分的食品均有严格的食品标签要求。例如, 欧盟及我国均要求必须在预包装食品上明确标识是否含有转基因成分。因此, 食品中转基因成分的检测已成为食品卫生与食品安全检测的重点内容, 尤其是转基因成分的快速检测是当前一个重要的研究方向。检测的外源基因包括CaMV-35S启动子、NOS终止子和功能基因 (如抗病虫害、抗农药等基因) 等。目前转基因成分的检测方法主要有两种: 一是建立在蛋白质水平上的Western印记^[3]、SDS-PAGE^[4]、ELISA^[5]等; 二是基于核酸扩增的PCR方法 (如多重PCR^[6]、竞争PCR^[7]、实时荧光PCR^[8])。特别是荧光PCR检测方法, 一直作为转基因成分检测的标准方法在使用。虽然其检测灵敏度较高, 但需要昂贵的荧光定量PCR仪, 检测成本也极高。因此, 建立一种普适性好、简便易操作、低成本快速检测方法对于实际检测工作意义极为重要。

环介导等温扩增技术 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 是2000年由Notomi等^[9]发明的一项新的DNA扩增技术, 具有常规PCR技术无法具备的简单、快速、特异性强的特点。该技术利用具有链置换活性 *Bst* (*Bacillus stearothermophilus*) DNA聚合酶和根据靶序列设计的两对特异性内、外引物, 特异识别靶序列上的六个独立区域, 启动循环链置换反应, 同时还可引入环引物以缩短反应时间。LAMP技术克服了传统PCR反应需要通过反复的热循环扩增的缺点, 避免了反复升降温的耗时过程, 可实现恒温条件下的连续快速扩增, 具有更高的灵敏度 (低于10个拷贝) 和扩增效率。针对靶基因6个区域的4条特殊引物的设计和具有链置换活性的*Bst* DNA聚合酶的应用是该技术的核心。目前已有LAMP技术应用于大豆^[10-11]、玉米^[12-13]、棉花^[14]和水稻^[15]等作物中转基因成分检测方面的报道。然而采用LAMP技术对植物油转基因成分的检测研究在国内外尚属空白。本研究基于LAMP方法, 建立了大豆油和菜籽油中转基因成分CaMV-35S启动子的检测方法, 旨在为植物油中转基因成分的快速检测提供依据。

1 材料与amp方法

1.1 实验材料、仪器

标有含转基因原料的大豆油和菜籽油购自本地超市。其中, 来自不同品牌的转基因大豆油样品三个 (编号: sample 1、sample 2、sample 3); 转基因菜籽油一个 (编号: sample 4)。非转基因大豆油和非转基因菜籽油作为实验提取对照。抗草甘膦大豆 (Roundup ready) 标准品、非转基因大豆由河北农业大学惠赠。*Bst* DNA聚合酶购自NEB公司; CTAB、Tris、NaCl、Na₂EDTA、甜菜碱等购自Sigma公司; Taq酶、dNTP等购自大连宝生物工程有限公司。

LAMP浊度仪 (LA-320C): 购自日本荣研化学株式会社; ABI 9700 DNA PCR扩增仪 (Applied Biosystems); JS-380A型自动凝胶图像分析仪 (上海培清科技有限公司); Synergy UV超纯水系统: 购自美国MILLIPORE公司。

1.2 LAMP引物设计与合成

以GenBank发布的转基因大豆的CaMV-35S启动子序列作为扩增模板, 根据其序列结构和相似性比对分析, 利用专门设计LAMP引物的在线设计软件Premier Explorer Version 4 (<http://primerexplorer.jp/lamp4.0.0/index.html>) 设计LAMP反应引物。引物由大连宝生物工程有限公司合成, PAGE纯化, 引物序列见表1。

表1 LAMP反应引物

Table 1 LAMP primers

引物	引物序列 (5'~3')
F3	GGTGGCTCCTACAAATGC
B3	GTCTTGCGAAGGATAGTGG
FIP	GTCCATCTTTGGGACCACTGTC CATCATTGCGATAAAGGAAAGG
BIP	CACGAGGAGCATCGTGGAAC GTCAGTGGAGATATCACATC
FLP	AGAGGCATCTTCAACGATGG
BLP	AGAAGACGTTCCAACCACG

1.3 DNA的提取

植物油: 取100 mL油, 加入到500 mL三角瓶中; 然后加入200 mL正己烷和20 mL TE, 在摇床上振荡 (120 rpm) 提取3 h (25 °C); 小心去除上层油相; 如此反复4次; 最后将下层的TE水相 (约15 mL) 转移到50 mL离心管; 依次加入1~2 μg担体 (carrier) (鲑鱼精DNA, sigma公司), 0.6倍体积的预冷的异丙醇, 0.1倍

体积的3 mol/L的乙酸钠；轻轻来回颠倒混匀后置于-20 ℃沉淀DNA；沉淀过夜后离心（12000×g，10 min，4 ℃）；小心弃上清液；用预冷的70%的乙醇洗涤沉淀，转移到1.5 mL离心管；离心（12000×g，10 min，4 ℃）后用70%的乙醇洗涤沉淀两次；室温空干DNA；加入50 μL的TE溶解DNA。每个样品做三个提取重复，合并DNA后置于-20 ℃保存。

大豆粉末：参考袁瑛娜等的报道^[11]。具体如下：取转基因和非转基因大豆粉末至无菌EP管，加CTAB提取缓冲液，混合均匀后于63 ℃水浴30 min~50 min，12000 r/min离心5 min，转移上层液至EP管，加入0.1倍体积的3 mol/L乙酸钠溶液和0.7倍体积的预冷异丙醇，离心取沉淀，沉淀加入200 μL 10% Chelex-100，12000 r/min离心3 min，取上清用于LAMP和PCR扩增。

1.4 LAMP 及 PCR 检测

LAMP反应体系（25 μL）含有1.2~2.4 μmol/L FIP、1.2~2.4 μmol/L BIP、0.2 μmol/L F3、0.2 μmol/L B3、0.8~1.6 mol/L 甜菜碱、4~10 mmol/L MgSO₄、1.6 mmol/L dNTP、2.5 μL 10×Thermo pol Buffer、8 U Bst DNA聚合酶及2 μL DNA模板。反应条件为63 ℃反应，1 h。以双蒸水作为阴性对照。打开LA-320C的分析软件，实时浊度仪每6 s自动对浊度进行一次测定。测定数值实时显示在电脑中，实时监控扩增反应。通过向LAMP产物中加入1 μL稀释100倍的SYBR Green I染料肉眼观察扩增情况，颜色变绿表明发生了扩增，橙色表明未发生扩增。

PCR反应体系（25 μL）含有40 μmol/L F2、40 μmol/L B2、10 mmol/L dNTP、2.5 μL 10×PCR Buffer、1.25 U Taq DNA聚合酶及2 μL DNA模板。反应条件为：94 ℃预变性5 min，94 ℃变性15 s，52 ℃退火30 s，72 ℃延伸30 s，共35个循环。PCR扩增产物在2%的琼脂糖凝胶电泳进行分离（加样量3 μL），然后置于1 μg/mL的EB中染色，在凝胶成像系统下观察。

2 结果与分析

2.1 引物设计

LAMP反应最少需要四条引物，这些引物分别是F3、B3、FIP和BIP。本研究针对CaMV-35S启动子基因序列[GenBank: GU734659.1]分别设计了F3、B3、FIP和BIP四条引物，为了缩短检测时间，同时设计FLP和BLP两条环引物（表1）。

2.2 反应条件优化

2.2.1 FIP/BIP 引物浓度的优化

FIP/BIP引物与模板DNA的杂交可以启动LAMP反应。本研究首先优化了不同浓度的FIP和BIP对反应的影响，共设1.2 μmol/L、1.6 μmol/L、2.0 μmol/L和2.4 μmol/L四个梯度。研究发现，当引物FIP和BIP浓度为1.6 μmol/L时较早出峰，扩增产物从反应30分钟后开始增多（图1）。因此后续试验中选定该浓度作为LAMP反应的引物浓度。

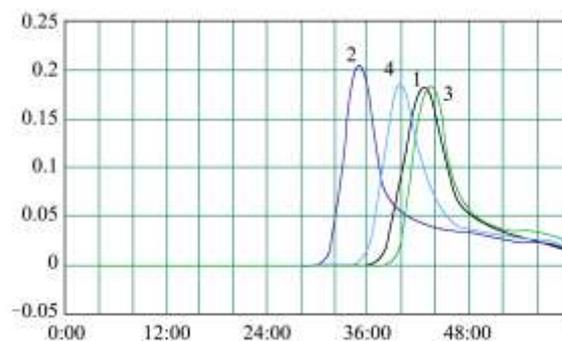


图1 不同FIP/BIP引物浓度对LAMP反应的影响

Fig.1 Different concentrations of FIP and BIP primer

注：1：1.2 μmol/L；2：1.6 μmol/L；3：2.0 μmol/L；4：2.4 μmol/L。

2.2.2 甜菜碱浓度优化

试验中研究了不同甜菜碱浓度（0.8 mol/L、1.0 mol/L、1.2 mol/L、1.6 mol/L）对LAMP扩增效率的影响。结果发现，当甜菜碱浓度为1.0 mol/L时出峰最早，降低或增加甜菜碱浓度均会延迟出峰（图2）。

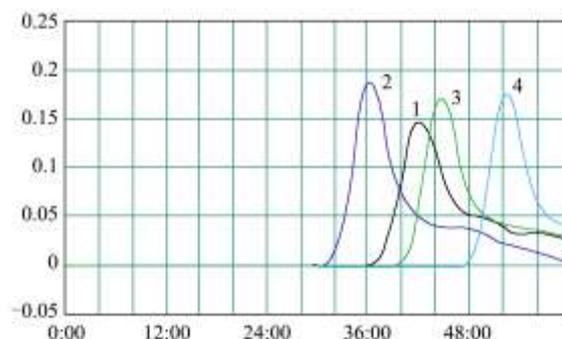


图2 不同甜菜碱浓度对LAMP反应的影响

Fig.2 Different concentration of betaine

注：1：0.8 mol/L；2：1.0 mol/L；3：1.2 mol/L；4：1.6 mol/L。

2.2.3 Mg²⁺浓度优化

试验中还研究了不同Mg²⁺浓度（4 mmol/L、6 mmol/L、8 mmol/L、10 mmol/L）对LAMP扩增效率的影响。结果发现，当Mg²⁺浓度为8 mmol/L时出峰最早，扩增产物从反应30 min后开始增多。当Mg²⁺浓度升高或降低，出峰时间出现延迟，36 min后才开始出峰（图3）。

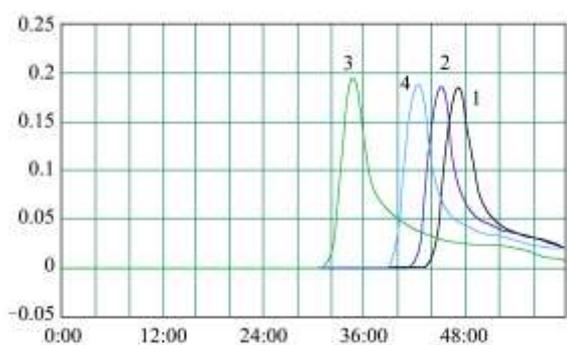


图3 不同 Mg²⁺浓度对 LAMP 反应的影响

Fig.3 Different concentrations of Mg²⁺

注: 1: 4 mmol/L; 2: 6 mmol/L; 3: 8 mmol/L; 4: 10 mmol/L.

2.3 LAMP 实时浊度法与 LAMP 染色法结果比较

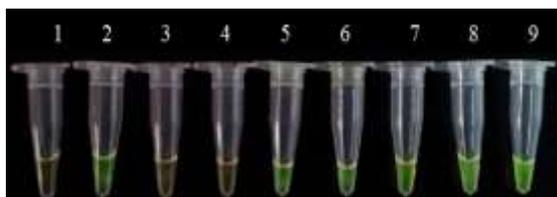


图4 LAMP 不同反应时间染色结果图

Fig.4 Staining results at different reaction time

注: 1: 阴性对照; 2: 阳性对照; 3: 15 min; 4: 20 min; 5: 25 min; 6: 30 min; 7: 35 min; 8: 40 min; 9: 45 min.

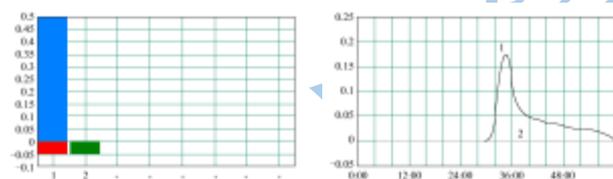


图5 LAMP 浊度仪实时检测图

Fig.5 Accumulated curves of turbidity for the CaMV-35S gene

注: 1: 模板 DNA; 2: 阴性对照。

由图4、图5可以看出, LAMP 染色法在 25 min 显出肉眼清晰可辨的阳性结果, LAMP 浊度法则在 31 min 开始出现浊度累积, 在 36 min 系统自动判断为阳性扩增。因此, LAMP 染色法相对 LAMP 实时浊度法所需反应时间短, 出现明显绿色的阳性显色时间比 LAMP 浊度法的开始出峰时间节省约 10 min。

2.4 LAMP 实时浊度法与 PCR 检测灵敏度结果分析

取转基因成分含量分别占100%、10%、1.0%、0.5%、0.2%、0.1%、0.01%、0%的大豆标准品提取DNA后,

分别进行LAMP与PCR扩增检测, 结果见图6、图7。

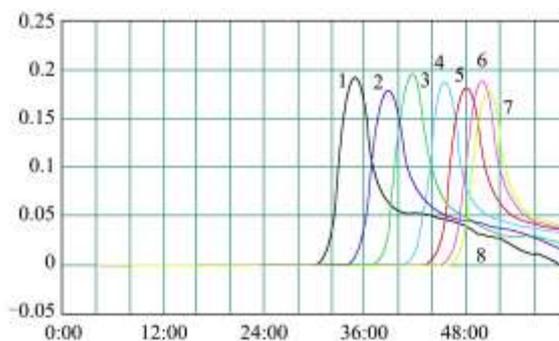


图6 LAMP 灵敏度图

Fig.6 Sensitivity analysis of LAMP reaction

注: 1: 100%; 2: 10%; 3: 1%; 4: 0.5%; 5: 0.2%; 6: 0.1%; 7: 0.01%; 8: 阴性对照。

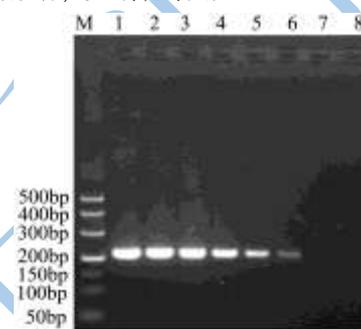


图7 PCR 灵敏度图

Fig.7 Sensitivity analysis of PCR reaction

注: M: DNA maker; 1: 100%; 2: 10%; 3: 1%; 4: 0.5%; 5: 0.2%; 6: 0.1%; 7: 0.01%; 8: 阴性对照。

由图6、图7可知, LAMP浊度法可以检测到0.01%的转基因成分, 而PCR法可以检测到0.1%的转基因成分。在LAMP浊度法检测过程中, 随着转基因成分含量的逐渐增大, 其出峰时间逐步提前, 这表明出峰时间与模板DNA浓度成线性相关, 由此可制作标准曲线实现对样品的定量检测。

2.5 样品检测

采用上述新建的方法对标注含有转基因原料的大豆油和菜籽油中的 CaMV-35S 启动子进行了检测分析, 并与采用标准方法 (SN/T 1203-2010 食用油脂中转基因植物成分实时荧光 PCR 定性检测方法) 所得数据进行了比较。由图8可以看出, LAMP 方法可以成功地检测到转基因植物油中的 CaMV-35S 启动子, 扩增信号在反应后 30~36 min 后出现。除其中一个转基因大豆油样品 (sample 1) 和一个转基因菜籽油样品 (sample 4) 未能检测到 CaMV-35S 启动子外, 其他样品均检测到该外源基因成分, 新建 LAMP 方法与现有荧光 PCR 标准检测方法的检测结果完全一致 (表

2)。

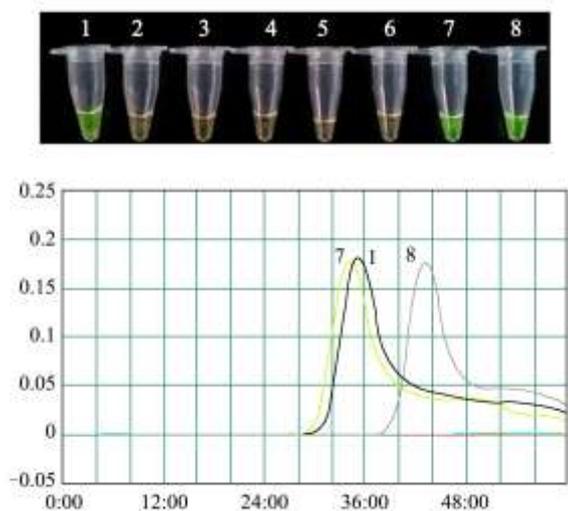


图8 食用油样品的LAMP检测结果

Fig.8 Detection of CaMV-35S in vegetable oils by LAMP

注：1：阳性对照；2：阴性对照；3：提取对照1；4：提取对照2；5：转基因大豆油(sample 1)；6：转基因菜籽油(sample 4)；7：转基因大豆油(sample 2)；8：转基因大豆油(sample 3)。

表2 转基因食用油中CaMV-35S启动子检测结果对比

Table 2 Comparison analysis between developed LAMP with standard method

样品	LAMP 法	标准方法 (SN/T 1203-2010)
转基因大豆油(sample 1)	未检出	未检出
转基因大豆油(sample 2)	检出	检出
转基因大豆油(sample 3)	检出	检出
转基因菜籽油(sample 4)	未检出	未检出

3 结论

本研究通过设计特异性的两对 LAMP 内外引物和两条环引物，建立了利用 LAMP 法检测转基因植物油中外源基因 CaMV-35S 启动子的新方法。通过在植物油基因组 DNA 提取过程中加入正己烷充分乳化和加入共沉淀剂与目标 DNA 进行共沉淀是本实验可以获得用于进行 LAMP 扩增的 DNA 片段的关键。通过对实验参数的优化研究后本研究最终确定的 LAMP 反应条件为：LAMP 反应体系 (25 μL) 含有 1.6 μmol/L FIP、1.6 μmol/L BIP、0.2 μmol/L F3、0.2 μmol/L B3、0.8 μmol/L FIP、0.8 μmol/L BIP、1 mol/L 甜菜碱、8 mmol/L MgSO₄、8 U *Bst* DNA 聚合酶、1.6 mmol/L dNTP、2.5 μL 10×Thermo pol Buffer 及 2 μL DNA 模板。反应条件为 63℃ 条件下反应 1 h。同常规 PCR 检测技术相比，LAMP 技术具有较高的灵敏度、检测耗时少、扩增效率高的优点。更重要的是，该技术对仪器的要

求不高，操作及结果判断简便，能够在保证检测结果准确的同时，减少检测成本、缩短检测周期。

参考文献

[1] James C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2008. ISAAA Brief No. 39. ISAAA: Ithaca NY 2008

[2] CERA (2012) GM crop database. center for environmental risk assessment (CERA). ILSI Research Foundation, Washington DC. http://cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database

[3] Ahmed FE. Detection of genetically modified organisms in foods [J]. Trends Biotechnol, 2002, 20(5): 215-223

[4] de Luis R, Lavilla M, Sánchez L, et al. Pepsin degradation of Cry1A(b) protein purified from genetically modified maize (*Zea mays*) [J]. J. Agric. Food Chem., 2010, 58(4): 2548-2553

[5] Petit L, Baraige F, Balois AM, et al. Screening of genetically modified organisms and specific detection of Bt176 maize in flours and starches by PCR-enzyme linked immunosorbent assay [J]. Eur. Food Res. Technol., 2003, 217(1): 83-89

[6] Ao JX, Li QZ, Gao XJ, et al. A multiplex nested PCR assay for the simultaneous detection of genetically modified soybean, maize and rice in highly processed products [J]. Food Control, 2011, 22: 1617-1623

[7] Shimizu E, Kato H, Nakagawa Y, et al. Development of a Screening Method for Genetically Modified Soybean by Plasmid-Based Quantitative Competitive Polymerase Chain Reaction [J]. J. Agric. Food Chem., 2008, 56(14): 5521-5527

[8] Barbau-Piednoir E, Lievens A, Mbongolo-Mbella G, et al. SYBR®Green qPCR screening methods for the presence of “35S promoter” and “NOS terminator” elements in food and feed products [J]. Eur. Food Res. Technol., 2010, 230: 383-393

[9] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucl. Acids. Res., 2000, 28: e63

[10] Lee D, La Mura M, Allnutt TR, et al. Detection of genetically modified organisms (GMOs) using isothermal amplification of target DNA sequences [J]. BMC Biotechnology, 2009, 9: 7-12

[11] 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

YUAN Ying na, SHAN Xiao xiao, WANG Zong de, et al.

- Development of a real-time turbidimeter-based loop-mediated isothermal amplification assay for detection of transgenic soybean [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2011, 27(10): 1264-1267
- [12] [Chen](#) LL, [Guo](#) JC, [Wang](#) QD, et al. Development of the visual Loop-Mediated Isothermal amplification assays for seven genetically modified maize events and their application in practical samples analysis [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2011, 59: 5914-5918
- [13] 陈金松,黄丛林,张秀海,等.环介导等温扩增技术检测含有CaMV35S的转基因玉米[J].*华北农学报*,2011,26(4): 8-14
- CHEN Jin song, HUANG Cong lin, ZHANG Xiu hai, et al. Loop-mediated isothermal amplification for the detection of CaMV35S promoter in genetically modified maize [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2011, 26(4): 8-14
- [14] 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: 140-148
- [15] Li QC, Fang JH, Liu X, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of *cry1Ab* gene in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Eur. Food Res. Technol.*, 2013, 236: 589-598