

转基因大豆 GTS40-3-2 成分现场可视化检测方法的建立

王永^{1,2}, 兰青阔¹, 朱珠¹, 赵新^{1,3}, 陈锐¹, 郭永泽¹, 程奕¹

(1. 天津市农业质量标准与检测技术研究所, 天津 300381; 2. 河北农业大学 植物保护学院, 河北 保定 071001; 3. 天津大学 化工学院, 天津 300072)

摘要:转基因大豆 GTS40-3-2 转化体是种植面积最广的转基因大豆品种, 根据 GTS40-3-2 转化体特异性序列设计引物, 应用可视化环介导等温扩增技术, 对其进行快速扩增及可视化判断; 同时建立转基因成分人工污染的食品模型, 比较了 LAMP 法与定性 PCR 方法检测的敏感性。结果表明: 该方法仅对 GTS40-3-2 转化体产生特异性扩增, 灵敏度高达 0.001%。所建立的 GTS40-3-2 转化体特异性现场可视化筛查方法具有较高的特异性和灵敏度, 操作简单、快速, 可用于转基因大豆 GTS40-3-2 成分污染的现场可视化检测。

关键词:转基因大豆 GTS40-3-2; 转化体特异性; 环状等温扩增技术; 现场可视化检测

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.11861/j.issn.1000-9841.2014.04.0570

Development of Visual Loop-Mediate Isothermal Amplification Assay for Herbicide-resistant Soybean GTS40-3-2 and Its Derivates

WANG Yong^{1,2}, LAN Qing-kuo¹, ZHU Zhu¹, ZHAO Xin^{1,3}, CHEN Rui¹, GUO Yong-ze¹, CHENG Yi¹

(1. Tianjin Institute of Agricultural Quality Standard and Testing Technology, Tianjin 300381, China; 2. College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China; 3. School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 4. Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China)

Abstract: It is important to detect herbicide-resistant soybean GTS40-3-2 and its derivates in food or food materials in order to prevent the illegal diffusion. A rapid visual loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method assay for GTS40-3-2 event-specific detection was developed. A set of primers were designed according to the nucleotide sequence of the target, 8 genetically modified organisms (GMO) were detected by LAMP for method specificity, and meanwhile the mode of artificially contaminated food was constructed to evaluate the sensitivity of LAMP assay and qualitative PCR method. The results showed that the GTS40-3-2 event had specific amplification, but the non-CpTI GMO submitted negative reactions. Sensitivity of LAMP assay for GTS40-3-2 was 0.001%. In conclusion, the LAMP assay developed in the present study is a specific, sensitive, simple and convenient method for the rapid screening of GTS40-3-2 in contaminated foods.

Key words: Herbicide-resistant soybean GTS40-3-2; Event specific; Loop-mediated isothermal amplification; Visualization technology

据国际农业生物技术应用服务组织 (ISAAA) 报道, 2012 年全球种植转基因作物 1.7 亿 hm^2 , 全球种植的大豆 81% 为转基因品种^[1]。转基因大豆 GTS40-3-2 转化体是由美国孟山都公司研发的第一代抗草甘膦大豆 (Roundup Ready[®] Soybean), 获得 22 个国家和欧盟 27 个成员国监管机构的批准, 是种植面积最广的转基因大豆品种, 中国每年都进口大量该转基因大豆用于食用油的加工原料。为预防含转基因大豆 GTS40-3-2 转化体特异性转基因成分非法扩散, 亟需建立快速的检测方法。目前我国农业部和质检总局已经颁布实施转基因大豆 GTS40-3-2 转化体特异性定性 PCR 检测方法标准^[2-3], 但是该检测方法耗时较长, 而且需要昂贵的

热循环仪, 不适用于加工车间或市场抽查的现场快速检测。

环状等温扩增技术 (loop-mediate isothermal amplification, LAMP)^[4] 是一种新颖的核酸扩增技术, 它依赖于识别靶 DNA 上 6 个特定区域的 6 条引物和具有链置换活性的 *Bst* DNA 聚合酶, 在恒温条件下高效扩增靶标序列, 反应结果可通过肉眼观察, 具有高特异性、快速、灵敏、操作简单等特点。自 2000 年 LAMP 技术产生以来, 在引物设计^[5]、反应速度^[6-7] 和产物检测^[8-9] 方面都有较大改进, 在临床疾病的诊断、流行性细菌以及病毒的检测等方面应用广泛^[10-12]。本研究针对转基因大豆 GTS40-3-2 转化体特异性序列设计筛选出一套 LAMP 引物, 优化

收稿日期: 2013-12-10

基金项目: 农业科技成果转化资金项目 (2011GB2A100011); 科技部国际合作项目 (2006DFA32380)。

第一作者简介: 王永 (1977-), 男, 硕士, 副研究员, 主要从事转基因生物安全分子检测技术研究。E-mail: wyz2007@gmail.com。

通讯作者: 程奕 (1963-), 女, 研究员, 主要从事农产品安全质量分子检测技术研究。E-mail: cychengyi99@126.com。

其反应条件,验证其特异性和灵敏度,并应用于食品的检测,建立了含转基因大豆 GTS40-3-2 转化体特异性成分的现场可视化检测方法,从快速筛查环节完善我国转基因大豆检测技术,为转基因生物安全管理提供快检技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料包括转基因大豆 GTS40-3-2、转基因水稻科丰 6 号、转基因玉米 MON810、MON863、Bt176、Bt11、NK603 和转基因抗虫棉,所有材料均为本实验室收集保存。

1.2 主要试剂及仪器

新型核酸快速提取试剂盒(自制),转基因多功能快速检测试剂盒(自制)、dNTP Mixture、10 × PCR

buffer、*Taq* DNA 聚合酶等 PCR 试剂(宝生物),LA-320CE 实时浊度仪(日本荣研),ABI Veriti 96 PCR 仪、金属加热块(Labnet)、核酸蛋白测定仪(ND-1000)。

1.3 引物设计与合成

根据 GenBank 公布的转基因大豆 GTS40-3-2 转化体 5'端特异性序列(登录号:AJ308514.1),设计 2 套特异性的 LAMP 候选引物,每套包括 2 条外引物 F3 和 B3,2 条内引物 FIP 和 BIP,2 条环引物 LF 和 BF。引物由 Invitrogen 公司合成,纯度为 HPLC 级,引物序列见表 1。将每条引物配制成浓度为 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的母液,取外引物 F3、B3 各 1 μL ,内引物 FIP、BIP 各 8 μL ,环引物 LoopF、LoopB 各 1 μL 充分混合,即为引物混合溶液。

表 1 转基因大豆 GTS40-3-2 转化体特异性 LAMP 引物设计

Table 1 LAMP primer information of soybean GTS40-3-2 event-specific assay

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
A	F3:AACATAGGGAACCCAAATGG
	B3:GTCTTGCGAAGGATAGTGG
	FIP:GGCAGAGGCATCTTGAACGAGGAAGGTGGCTCCTACAA
	BIP:CACGAGGAGCATCGTGAAACGTCAGTGGAGATATCACATC
	LoopF:TTCCTTTATCGCAATGATGGC
	LoopB:AGAAGACGTTCCAACCACG
B	F3:AACATAGGGAACCCAAATGG
	B3:TCCACTTGCTTTGAAGACG
	FIP:GGCAGAGGCATCTTGAACGAGGAAGGTGGCTCCTACAA
	BIP:GACACTGGTCCCAAAGATGGACTGGTTGGAACGCTCTCTTT
	LoopF:TTCCTTTATCGCAATGATGGC
	LoopB:ACGAGGAGCATCGTGAA

1.4 试验方法

1.4.1 DNA 提取 DNA 提取使用新型核酸快速提取试剂盒。取样品粉末 100 mg,加入 500 μL CTAB 裂解液,95℃裂解 5 min,离心取上清,加入核酸结合液混匀 2 min,离心后用清洗液 500 μL 清洗 2 次,再用 100 μL TE 溶液洗脱即可获得 DNA,用核酸蛋白测定仪检测 DNA 质量,并稀释至约 50 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 备用。

1.4.2 PCR 扩增 引物、反应体系和 PCR 程序参照农业部 1861 号公告-2-2012^[2] 中规定的条件进行。

1.4.3 LAMP 反应及结果判定 LAMP 反应使用转基因多功能快速检测试剂盒进行。反应体系总体积为 25 μL ,其中 2 × LAMP Master mix 12.5 μL [1 ×

Thermo Pol Buffer (New England Biolabs),甜菜碱(Sigma)1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,硫酸镁 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,dNTPs (Promega)1.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,链置换活性的 DNA 聚合酶(New England Biolabs)0.64 $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$],引物混合溶液 1 μL ,DNA 模板(50 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)1 μL ,用灭菌去离子水补齐到 25 μL ,充分混匀后,置于 LA-320CE 浊度仪,于 63℃温浴 60 min,80℃灭活 2 min。反应过程中,使用 LA-320CE 浊度仪对反应管浊度进行实时测量,每 6 s 检测反应管在 650 nm 处吸光度,生成浊度变化曲线,当反应体系浊度超过 0.25 以及浊度的变化速率大于 0.1 时,结果判定为阳性。

现场可视化检测时,在上述体系中再加入显色剂 1 μL (钙黄绿素和氯化锰),用灭菌去离子水补齐到 25 μL ,充分混匀后,置于金属加热块上,于 63℃

温浴 60 min。反应结束后,通过肉眼观察反应体系的颜色变化判定结果,颜色由黄色变为浅绿色判断为阳性。

1.4.4 特异性实验 用建立的 LAMP 方法,分别对 8 种转基因作物进行检测,通过浊度法和颜色变化验证方法的特异性。

1.4.5 灵敏度试验 将转基因大豆 GTS40-3-2 粉末烘干至恒重,按照质量含量为 1%、0.5%、0.1%、0.05%、0.01%、0.005%、0.001% 和 0.0005% 的比例与非转基因大豆进行梯度配制,充分混匀,提取基因组 DNA 并进行 LAMP 扩增,通过肉眼观察反应体系的颜色变化判定结果。

2 结果与分析

2.1 转基因大豆 GTS40-3-2 转化体特异性 LAMP 扩增引物筛选

以 1% 转基因大豆 GTS-40-3-2 基因组 DNA ($50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 为模板,对设计的 2 套引物进行筛选。结果表明,候选引物 A、B 分别在 42, 36 min 时出现浊度信号,因此选择引物 B 作为转基因大豆 GTS40-3-2 转化体特异性 LAMP 扩增最优引物(图 1)。

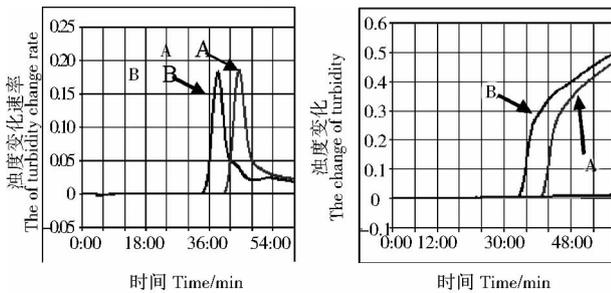


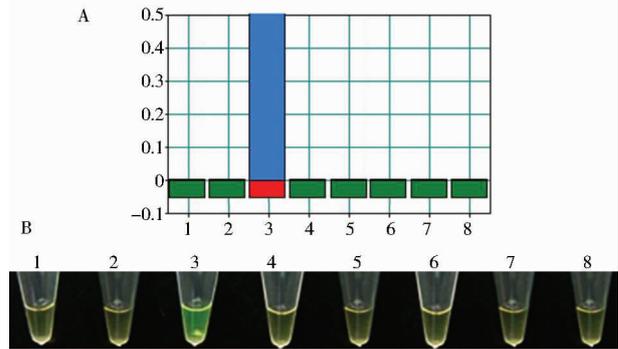
图 1 转基因大豆 GTS40-3-2 转化体特异性 LAMP 引物筛选结果

Fig. 1 Primer screening of soybean GTS40-3-2 event-specific LAMP assay

2.2 特异性实验

采用优化的 LAMP 反应条件,分别以科丰 6 号、转基因抗虫棉、GTS-40-3-2、MON810、MON863、Bt176、Bt11 和 NK603 的 DNA 为模板,分别应用浊度法和肉眼观察来考察检测方法的特异性。

测试结果显示(图 2),仅转基因大豆 GTS40-3-2 样品反应管中发生浊度信号的急剧上升(图 2A)和由黄色转为绿色的颜色变化(图 2B),反应结果为阳性;而其他转基因样品反应结果均为阴性,表明建立的转基因大豆 GTS40-3-2 转化体特异性可视化检测方法具有高度特异性。



1:转基因水稻科丰 6 号;2:转基因抗虫棉;3:转基因大豆 GTS-40-3-2;4:转基因玉米 MON810;5:转基因玉米 MON863;6:转基因玉米 Bt176;7:转基因玉米 Bt11;8:转基因玉米 NK603。

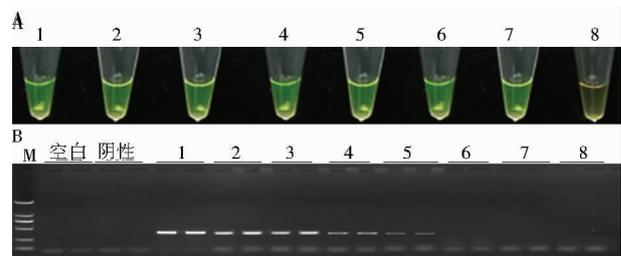
1: Kefeng 6; 2: GM cotton; 3: GTS-40-3-2; 4: MON810; 5: MON863; 6: Bt176; 7: Bt11; 8: NK603.

图 2 转基因大豆 GTS40-3-2 转化体特异性 LAMP 特异性实验结果

Fig. 2 Specificity of soybean GTS40-3-2 event-specific LAMP assay

2.3 灵敏度实验

以转基因大豆 GTS-40-3-2 质量含量为 1%、0.5%、0.1%、0.05%、0.01%、0.005%、0.001% 及 0.0005% 非转基因水稻 DNA 为模板,模拟食品中污染转基因大豆成分情况,进行可视化检测和定性 PCR 检测,考察两种方法的灵敏度。结果表明,现场可视化检测方法在含量为 1%~0.001% 样品反应管中均明显观察到颜色变化(图 3A),反应结果为阳性;定性 PCR 检测方法在 1%~0.01% 样品中扩增到 371 bp 大小的条带(图 3B),检测结果为阳性。说明本研究建立的现场可视化检测方法灵敏度是定性 PCR 方法^[2]的 10 倍。



1:1%; 2:0.5%; 3:0.1%; 4:0.05%; 5:0.01%; 6:0.005%; 7:0.001%; 8:0.0005%.

图 3 转基因大豆 GTS40-3-2 转化体特异性 LAMP 灵敏度与 PCR 灵敏度实验对比

Fig. 3 Comparison on sensitivity of soybean GTS40-3-2 LAMP assay and PCR assay

3 结论与讨论

转基因成分快速检测是转基因生物安全监管必需的技术手段,是转基因检测方法体系的重要环节和难点。特别是对于生产车间、田间地头、市场

加工品等临检,亟需现场能够获得结果的技术和产品。兰青阔等^[13]以转基因大豆 GTS40-3-2 中 *cp4-epsps* 目的基因序列(AB209952)为靶标,使用 1000 × SYBR Green 荧光染料,建立了转基因大豆基因特异性检测方法,检出限为 0.005%;刘津等^[14]以转基因大豆 GTS40-3-2 的 3' 端转化体特异性序列(AJ308514.1)为靶标,也使用 1000 × SYBR Green 荧光染料,建立了 GTS40-3-2 转化体特异性检测方法,检出限为 0.5%。与上述研究结果相比,本研究建立的检测方法靶标设定在 GTS40-3-2 的 5' 端转化体特异性序列(AJ308515.1),与 *cp4-epsps* 目的基因相比更能证明 GTS40-3-2 转化体的存在,与 3' 端转化体特异性序列相比更适合于 LAMP 引物设计,这也可能是刘津等^[14]建立方法检出限为 0.5% 的原因;本研究另一技术优势在于采用钙黄绿素染料,与 1000 × SYBR Green 荧光染料相比,该染料能够在反应前加入反应管,对扩增效率无影响,避免反应后开盖操作,有效避免污染机率。

本研究在前期研制核酸快速检测试剂盒的基础上,结合转基因大豆 GTS40-3-2 转化体特异性的可视化恒温扩增方法,建立转基因大豆 GTS40-3-2 转化体特异性成分现场可视化检测方法。该方法具备以下特点:①速度快:其中核酸提取 10 min,恒温扩增 50 min,在 1 h 内能够获得检测结果;②操作简单:仅需要将 LAMP Master MIX、聚合酶、显色剂和模板按比例混合,置于恒温加热块上扩增即可获得结果,不需要特殊的技术人才和高精尖的设备,便于操作和携带;③闭管观察结果:采用新型钙黄绿素染料,检测反应结束后,无需进行开盖,即可肉眼观察结果,减少开盖带来的产物污染的影响,有效避免假阳性的产生^[12-13];④灵敏度高:本方法灵敏度是普通 PCR 的 10 倍,能够检测出加工品中转基因大豆 GTS40-3-2 转化体特异性成分。

参考文献

- [1] Clive James. 2012 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, 2013, 33(2): 1-8. (Clive J. Global status of commercialized biotech/GM crops in 2012[J]. China Biotechnology, 2013, 33(2): 1-8.)
- [2] 中华人民共和国国家标准, 农业部 1861 号公告-2-2012, 转基因植物及其产品成分检测耐除草剂大豆 GTS40-3-2 及其衍生品种定性 PCR 方法[S]. (The National Standard of the People's Republic of China, Announcement No. 1861-2-1861 of MOA, Detection of genetically modified plants and derived products—Qualitative PCR method for herbicide-resistant soybean GTS 40-3-2 and its derivatives[S].)
- [3] 中华人民共和国检验检疫行业标准, SN/T 2668-2010, 转基因植物品系特异性检测方法[S]. (The inspection and quarantine industry standards of the People's Republic of China, SN/T 2668-2010, Event-specific method for detection of genetically modified plants[S].)
- [4] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): 63.
- [5] Yano A, Ishimaru R, Hujikata R. Rapid and sensitive detection of heat-labile I and heat-stable I Enterotoxin genes of enterotoxigenic Escherichia coli by Loop-Mediated Isothermal Amplification[J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 68(2): 414-420.
- [6] Nagamine K, Watanabe K, Ohtsuka K, et al. Loop-mediated isothermal amplification reaction using a non-denatured template[J]. Clin Chem, 2001, 47(9): 1742-1743.
- [7] Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers[J]. Molecular and Cellular Probes, 2002, 16(3): 223-229.
- [8] Mori Y, Kitao M, Tomita N, et al. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA[J]. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2004, 59(2): 145-157.
- [9] Mori Y, Hirano T, Notomi T. Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers[J]. BMC Biotechnology, 2006, 6: 3.
- [10] Ihira M, Ohta A, Sugata K, et al. Loop-mediated isothermal amplification for discriminating between human herpesvirus 6 A and B[J]. Journal of Virological Methods, 2008, 154(1/2): 223-225.
- [11] Curtis K A, Rudolph D L, Owen S M. Rapid detection of HIV-1 by reverse transcription, loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) [J]. Journal of Virological Methods, 2008, 151(2): 264-270.
- [12] Gao H W, Lei Z W, Jia J T, et al. Application of loop-mediated isothermal amplification for detection of *Yersinia enterocolitica* in pork meat [J]. Journal of Microbiological Methods, 2008, 77(2): 198-201.
- [13] 兰青阔, 王永, 赵新, 等. LAMP 在检测转基因抗草甘膦大豆 *cp4-epsps* 基因上的应用[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(24): 10377-10378, 10390. (Lan Q K, Wang Y, Zhao X, et al. Application of LAMP in *cp4-epsps* gene detection of Roundup Ready soybean [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2008, 36(24): 10377-10378, 10390.)
- [14] 刘津, 凌莉, 吴少云, 等. 转基因大豆 GTS40-3-2 品系特异性环介导等温扩增法检测方法的建立与应用[J]. 粮食与饲料工业, 2012(12): 60-63. (Liu J, Ling L, Wu S Y, et al. Establishment and application of specific loop-mediated isothermal amplification method for detection of transgenic soybean GTS40-3-2 strains [J]. Cereal & Feed Industry, 2012(12): 60-63.)