

抗草甘膦转基因大豆及加工品 LAMP 检测研究

刘彩霞, 梁成珠, 徐彪, 高宏伟, 林超, 孙敏

(山东出入境检验检疫局, 检验检疫技术中心, 山东 青岛 266002)

摘要:将环介导的等温核酸扩增技术应用于转基因大豆及加工品检测。针对抗草甘膦 Roundup Ready 转基因大豆及加工品外源基因 *EPSPS* 设计 2 对特异性引物进行扩增, 成功建立起定性检测转基因大豆及加工品的 LAMP 检测方法。优化 LAMP 反应条件, 反应温度为 65℃, 反应时间为 1h。结果表明: 该体系能快速、灵敏、有效地检测转基因大豆及加工品中整合的 *EPSPS* 基因, 检测限为 0.01%, 低于国际现行最低检测量 0.5% 的要求。检测 *EPSPS* 基因操作简单, 成本低、特异性强、灵敏度高。LAMP 检测结果可信, 稳定性好, 可对目前批准的抗草甘膦 Roundup Ready 转基因大豆及加工品进行定性检测。

关键词:环介导等温核酸扩增; 快速检测; 抗草甘膦转基因; *EPSPS* 基因

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2009)02-0305-05

Detection of Genetically Modified Soybean and Products by LAMP Reaction

LIU Cai-xia, LIANG Cheng-zhu, XU Biao, GAO Hong-wei, LIN Chao, SUN Min

(Technical Center of Inspection and Quarantine, Shandong Administration for Entry-Exit Inspection and Quarantine, Qingdao 266002, Shandong China)

Abstract: The loop-mediated isothermal amplification (LAMP) that amplifies DNA with high specificity and rapidity under an isothermal condition was applied for rapid detection of Roundup Ready and its products. A set of four primers, two outer and two inner primers, was designed specifically to recognize *EPSPS* gene of Roundup Ready. The LAMP reaction mix was optimized. The optimal reaction temperature and time of the LAMP assay for *EPSPS* gene were 65℃ and 1 h, respectively. The LAMP detection method has been successfully set up. The results showed that the LAMP reaction system can detect *EPSPS* gene effectively and sensitively. The limit of detection is under 0.01% lower than the international limit. These results suggest that detection of *EPSPS* by LAMP is an effective and low-cost procedure with high specificity and sensitivity that requires no specialized equipment. This assay is expected to become a valuable tool for rapid detection and identification of Roundup Ready soybean and its products.

Key words: Loop-mediated isothermal amplification; Rapid detection; Roundup Ready; *EPSPS* gene

大豆由于含有丰富的蛋白质、脂肪、碳水化合物、多种矿物质及维生素等, 成为动物饲养的主要饲料并被加工成多种食品。国内大豆加工品产量远远满足不了市场需求, 大豆及豆制品大量依赖进口。随着转基因技术的发展, 进入市场的转基因大豆及豆制品食品越来越多。在转基因植物中, 抗除草剂转基因大豆的种植面积和销售最为广泛, 其中又以抗草甘膦 (Roundup Ready) 的 CP4-*EPSPS* 转基因大豆为主。抗草甘膦转基因大豆是国际市场上主要的转基因产品之一, 约占转基因植物总面积的 40%^[1], 并且这种作物还有不断增加的趋势。抗草甘膦

转基因大豆已经被加工成各种食品。转基因农作物的食品安全历来是人们关注的问题。为了保护公众的认知权, 36 个国家和地区要求转基因食品加注转基因食品标签。为保护我国消费者利益, 解决贸易纠纷, 必须建立一套快速、有效、准确的检测方法。

转基因大豆是通过农杆菌介导、PEC 介导、电击、花粉管通道、微注射和基因枪等方法将外源基因导入大豆植株体内而获得的。检测转基因方法已有不少报道, 20 世纪 90 年代国外就有关于转基因植物及其产品的报道^[2-5]。目前建立的检测抗草甘膦转基因大豆及加工品方法主要依照检测内源基因

收稿日期: 2008-09-27

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局科研资助项目 (20071K167)。

作者简介: 刘彩霞 (1981-), 女, 硕士, 工程师。主要从事出入境转基因食品检测研究。E-mail: emlcai@163.com。

通讯作者: 高宏伟, 博士, 高级工程师。E-mail: ghw75@126.com。

Lectin, 35S 启动子, NOS 终止子和目的基因 *EPSPS*^[6-7], 操作比较繁琐, 且由于豆制品经过高温等处理, 基因结构遭到破坏, 较难检测。近年来出现的以蛋白为目标的检测方法 (ELISA 和胶体金快速检测试纸条法) 价格昂贵, 难在日常检测中普及^[8-9]。LAMP 技术是 2000 年 Notomi T 等发明的一种体外恒温核酸扩增方法, 即所谓的环介导等温核酸扩增 (Loop-mediated isothermal amplification, 简称 LAMP) 技术。因其具有高特异性、高效率 and 快速反应等特点, 可以大量扩增所需的靶序列。该方法只需要极少的试剂费用和一个水浴锅即可完成绝大多数 PCR 检测的过程, 无论是实验室检验还是现场检验都可以准确快速灵敏的完成, 是真正普及型的核酸检测方法^[10-12]。

以部分进出口转基因大豆样品和市场购买的大豆加工品豆粕、豆粉、大豆组织蛋白、豆瓣酱、豆芽、豆腐、豆浆为材料, 利用设计的特殊引物检测大豆及加工品中的 *EPSPS* 基因, 采用转基因成分含量分别为 100%、10%、5%、2%、1%、0.1%、0.05%、0.01%、0.005%、0.001% 的转基因大豆 Roundup Ready 标准品为试验样品, 对外源基因 *EPSPS* 基因进行扩增, 探讨 LAMP 技术检测抗草甘膦转基因大豆及加工品的特异性、灵敏性和稳定性。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

选取转基因大豆及豆制品大豆组织蛋白、豆粕、豆瓣酱、豆芽、豆腐、豆粉、豆浆进行检测, 材料购自市场或为检验检疫局送检样品 (山东出入境检验检疫局提供)。以山东出入境检验检疫局日常检测样品转基因大豆和阴性大豆为参照, 检测 LAMP 反应

的特异性。将含不同浓度转基因成分细胞裂解液提取的核酸制作成转基因成分比例浓度标准参照进行 LAMP 扩增检测得到 LAMP 反应的灵敏度^[13]。DNA 提取试剂盒 Plant DNA Mini-Prep Kit (for GMO detection use only) 购自上海农科院, DNA 聚合酶购自天为生物科技公司, 10 倍 Bst Buffer 反应缓冲液、dNTP 溶液、甜菜碱溶液、MgSO₄ 溶液、ddH₂O。

1.2 主要仪器与设备

离心机 (Thermo 17、Eppendorf 5810)、电热恒温水槽 (DK-8D)、电泳仪 (DYY-8L)、凝胶成像分析系统 (FUSION FX7)、微量移液器 (Eppendorf)、核酸蛋白仪 (Eppendorf)、电子天平 ((Sartorius BS 210S))。

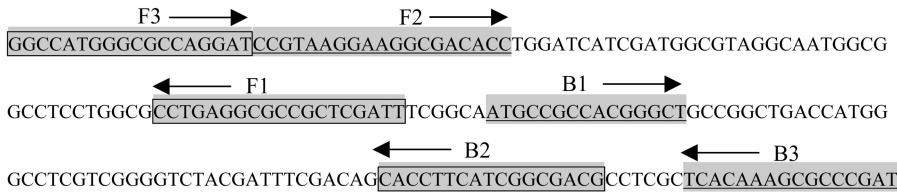
1.3 LAMP 反应体系及条件

1.3.1 LAMP 引物 引物的设计以 NCBI Gene-Bank 序列为基础, 选用 LAMP 引物免费在线设计软件——Primer ExplorerV3 (<http://primerexplorer.jp/lamp3.0.0>) 设计一套特异性引物, 包括两条外引物 F3、B3 和两条内引物 FIP、BIP (图 1)。引物合成由上海闪晶生物技术公司完成。引物序列及长度见表 1。

表 1 扩增 *EPSPS* 基因的 LAMP 引物序列

Table 1 Primers of *EPSPS* gene in LAMP detection

名称 Name	引物序列 Primer sequences	长度 Length
FIP	5'-AATCGAGCGCGCCTCAGGCCGTA- AGGAAGGCGACACC-3'	38
BIP	5'-AATGCCGCCACGGCTCGTCGCCGATGAAGGTG-3'	33
F3	5'-CCATGGGCGCCAGGAT-3'	16
B3	5'-ATCGGGCGCTTTCTGAG-3'	18



右向箭头表示引物的有义链。左向箭头表示引物序列的互补链。GenBank 序列号: AY592954。FIP 引物序列包含前半段包含 F1 互补链和 F2 链, BIP 引物序列包含 B1 链和 B2 互补链。A right arrow indicates that a sense sequence is used for the primer. A left arrow indicate that a complementary sequence is used for the primer. Positions are based on GenBank accession No. AY592954. The forward inner primer (FIP) consisted of the F1 complementary sequence and the F2 direct sequence, the back inner primer (BIP) consisted of the B1 direct sequence and the B2 complementary sequence.

图 1 用来设计 LAMP 引物的 *EPSPS* 基因的核酸序列

Fig. 1 Nucleotide sequence of *EPSPS* gene used for designing LAMP primers

1.3.2 反应体系及条件 2.5 μL 10 \times Bst Buffer 反应缓冲液、3.0 μL 100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgSO_4 、5.0 μL 2 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甜菜碱、1.3 μL 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP、上/下游内引物(20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)各 3.0 μL 、上/下游外引物(20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)各 0.5 μL 、3.2 μL ddH₂O、DNA 模板(100 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 2 μL 、Bst 酶 1 μL ，总体积为 25 μL ，实验过程中设置提取空白对照(以 PCR 的 Buffer 代替样品)，PCR 反应试剂空白对照(以水代替 DNA 模板)、阴性对照、阳性对照、样品做平行试验^[14-15]。根据仪器及试剂的特性对 LAMP 反应数进行优化，在 95℃ 条件下变性 5 min，在 65℃ 恒温水浴 1 h，85℃ 持续 5 min 而终止。

1.4 结果检测

配制 1.5% 的琼脂糖凝胶，LAMP 结果取 2 μL 进行琼脂糖电泳。调整电泳仪至 80 V 电泳约 45 min，置于凝胶成像分析系统下观测结果。

通过向试验管中加入染料 PICO Green 观察管中溶液因阳性结果产生的颜色变化来快速判断结果。

1.5 LAMP 检测灵敏度

提取转基因大豆 Roundup Ready 样品基因组 DNA 核酸时，将 DNA 抽提缓冲液中的转基因大豆和非转基因大豆样品进行配比混合以得到一系列百分比为 100%、10%、5%、2%、1%、0.1%、0.05%、0.01%、0.005%、0.001% 的转基因成分细胞裂解液，将这一系列浓度制作成不同浓度转基因成分标准参照，对外源基因 *EPSPS* 进行扩增，确定 LAMP 检测 *EPSPS* 基因的灵敏度^[13]。

1.6 LAMP 检测稳定性试验

S 采用荧光定量 PCR 检测结果为阳性的转基因大豆 Roundup Ready 为试验样品对其外源基因 *EPSPS* 进行连续 8 次重复扩增，确定 LAMP 检测的稳定性。试验过程中设立阴性和空白对照。

2 结果与分析

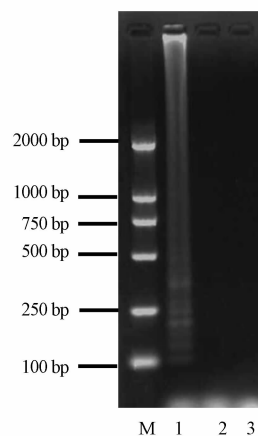
2.1 DNA 提取

按照上海农科院 GMO 专用提取试剂盒操作提取大豆及豆制品基因组 DNA，检测 OD260/OD280 在 1.6~2.0^[16]，根据核酸蛋白仪所测值调整核酸浓度至 100 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

2.2 目的片断的扩增结果

转基因大豆 Roundup Ready 琼脂糖电泳结果见图 2，DNA 泳道产生阶梯状条带，以水做模板的空白

对照和以阴性大豆为模板的阴性对照均没有产生条带；另外用肉眼观察反应管，发现阳性反应管中反应体系比较浑浊，阴性和空白对照均未见浑浊。向试验管中加入染料 PICO Green 阳性显示橙黄色，阴性和空白对照显示红色。结果如图 3。结果表明：抗草甘膦转基因大豆 *EPSPS* 基因呈阳性扩增，阴性对照、空白对照均无扩增。日常检测阳性转基因大豆 Roundup Ready 样品经过连续 8 次重复扩增结果表明 LAMP 检测均能扩增，稳定性较高。试验体系能有效、特异地扩增转基因大豆中的 *EPSPS* 基因。



M:DL-2000 Marker;1:*EPSPS* 阳性样品;2:*EPSPS* 阴性样品;
3:对照。
M:DL-2000 Marker,1:*EPSPS* positive,2:*EPSPS* negative,
3:Blank.

图 2 转基因大豆 Roundup Ready 样品电泳图谱
Fig. 2 The amplification of *EPSPS* gene of Roundup Ready soybean with the LAMP method

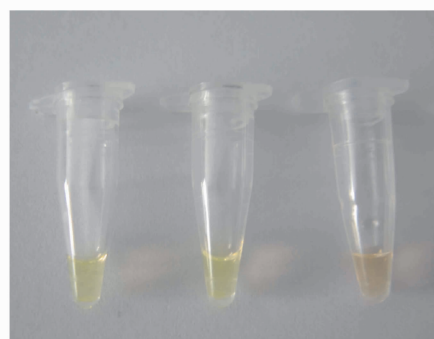
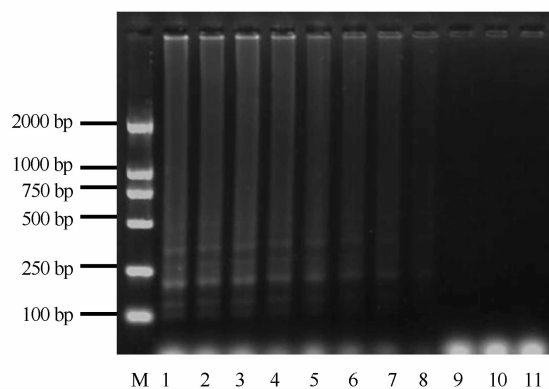


图 3 试验管中加入染料 PICO Green，
LAMP 阳性扩增结果显示橙黄色，
阴性和空白显示红色

Fig. 3 The LAMP amplification results with PICO Green.
orange means LAMP result is positive, red
means result negative or none

2.3 LAMP 检测灵敏度结果

将预先稀释好的不同阳性浓度 EPSPS 标准品进行 LAMP 反应,琼脂糖电泳结果显示 LAMP 检测的最低检测限为 0.01% (图 4)。与普通 PCR 的灵敏度大抵相同,可以检测大豆及豆制品中含有 EPSPS 基因。



M:DL-2000 Marker;1:100% 含量;2:10% 含量;3:5% 含量;4:2% 含量;5:1% 含量;6:0.1% 含量;7:0.05% 含量;8:0.01% 含量;9:0.005% 含量;10:0.001% 含量;11:对照

M:DL-2000 Marker,1:100%,2:10%,3:5%,4:2%,5:1%,6:0.1%,7:0.05%,8:0.01%,9:0.005%,10:0.001%,11:none

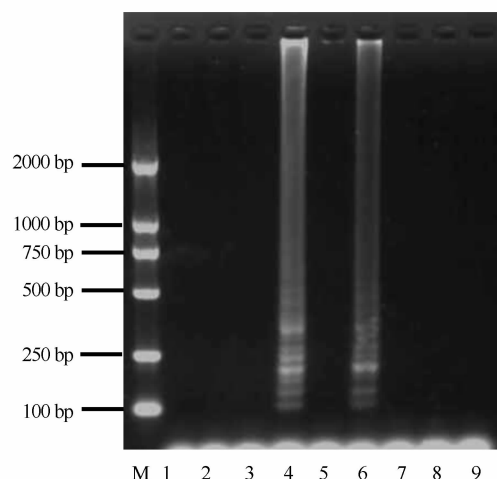
图 4 梯度含量的转基因大豆 Roundup Ready 样品 LAMP 检测 EPSPS 基因灵敏度结果

Fig.4 The amplification of EPSPS gene of Roundup Ready soybean with LAMP method

对不同豆制品样品进行 LAMP 检测,电泳图谱见图 5。结果表明豆芽、豆腐样品出现阶梯状条带,而大豆组织蛋白、豆粕、豆瓣酱、豆粉、豆浆样品均没有条带产生,即未检测到转基因成分 EPSPS 基因,样品为阴性。对豆芽、豆腐样品进行检测结果显示有阳性条带产生,样品为阳性。

3 讨论

通过设计 LAMP 引物扩增转基因大豆 Roundup Ready 外源基因 EPSPS,优化反应条件,保证了方法的可靠性和特异性。LAMP 检测过程中通过转基因大豆和非转基因大豆样品的混合测定了 LAMP 检测方法对转基因大豆及加工品的检测灵敏度,结果表明本方法灵敏度高,检测灵敏度为 0.01%。LAMP 检测与 PCR 法检测 EPSPS 基因的检测低限相当,低于国际现行最低检测量 0.5% 的要求。运用 LAMP 技术成功检测出抗草甘膦转基因大豆及加工品的 EPSPS 基因。与传统的 PCR 检测相比,缩短了检测周期,能直接对食品样品中 EPSPS 基因进行



M:Marker;1:大豆组织蛋白;2:豆粕;3:豆瓣酱;4:豆芽;5:豆粉;6:豆腐;7:豆浆;8:阴性对照;9:对照

M:Marker,1:Textured soy protein,2:Soybean meal,3:Broad bean sauce,4:Bean sprouts,5:Soybean powder;6:Bean curd,7:Soybean milk,8:Negative,9:Blank

图 5 转基因豆制品不同样品 LAMP 检测图谱

Fig.5 The amplification of GMO Roundup Ready soybean products using the LAMP method

检测。8 次重复表明,LAMP 检测稳定性良好。

LAMP 扩增结果判断一般有三种方法:1、通过琼脂糖凝胶电泳,在紫外灯下观察。LAMP 反应会产生各种片断长度的茎环结构的扩增产物,因此在电泳图谱中显示为从点样孔处开始的 smear 和条带现象。2、由于 LAMP 反应形成大量扩增产物,也可以直接向扩增管中加入嵌入剂 PICO Green 染料,无扩增反应的管内反应液呈红色,有扩增反应的管内反应液将变为橙黄色。显色反应有极高的特异性可以用肉眼观察判断扩增与否。3、LAMP 检测可以通过评估扩增副产物焦磷酸镁的白色沉淀物的量来进行。LAMP 反应中,在核酸大量合成时,从 dNTP 析出的焦磷酸根离子与反应溶液中的 Mg^{2+} 结合,产生副产物——焦磷酸镁沉淀。可以通过肉眼观察沉淀判断结果。采用三种判断方法判断结果。浑浊情况、显色反应和电泳结果都能清晰显示阳性和阴性结果。

与传统的 PCR 检测相比,LAMP 检测在恒温条件下进行,反应耗时短,1 h 即可完成;不需要使用昂贵、精密的仪器设备,使用恒温水浴装置即可完成反应而且可以目测反应体系浊度变化或加入染料后颜色变化进行产物检测,能够实现反应及产物检测一步完成。扩增效果良好,减少了试验步骤,缩短了操作时间,操作简便,检测成本低。

综上所述,利用 LAMP 技术检测转基因大豆及加工品具有方便、快捷、成本低等特点。灵敏度高、

特异性强、稳定性好的优点为快速检测转基因大豆及豆制品提供了新的发展方向,并有望成为简易的常规检测手段,尤其适用于基层检验检疫机构。使用 LAMP 技术快速检测转基因大豆及加工品对于提高食品卫生水平、保证食品安全和推动食品国际贸易发展具有重要意义。

参考文献

- [1] 黄亚东,白卫滨,孙建霞,等. 抗草甘膦转基因大豆加工品的 PCR 检测研究[J]. 食品研究与开发,2006,27(3):119-122. (Huang Y D, Bai W B, Sun J X, et al. Study on the detection of genetically modified soybean products by polymerase chain reaction [J]. Food Research and Development, 2006, 27(3):119-122.)
 - [2] Lipp M, Brodamann P, Pietsch K, et al. IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soybeans and maize in dried powder[J]. Journal of AOAC International, 1999, 82(4):923-928.
 - [3] van Hoef A M, Kok E J, Bouw E, et al. Development and application of a selective detection method for genetically modified soy and soy-derived products[J]. Food Additives and Contaminants, 1998, 15(7):767-774.
 - [4] Hurst C D, Knight A, Bruce I J. PCR detection of genetically modified soya and maize in food stuffs[J]. Molecular Breeding, 1999, 5:579-586.
 - [5] Vollenhofer S, Burg K, Schmidt J, et al. Genetically modified organisms in food screening and specific detection by polymerase chain reaction[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47: 5038-5043.
 - [6] 郑文杰,刘烜,刘伟,等. 转基因大豆加工品的定性 PCR 检测[J]. 农业生物技术学报,2003,11(5):467-471. (Zheng W J, Liu Q, Liu W et al. Qualitative analysis of the processed genetically modified soybean products by PCR-based methods[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2003, 11(5):467-471.)
 - [7] 吕山花,常汝镇,陶波,等. 抗草甘膦转基因大豆 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 中国农业科学,2003,36(8):883-887. (Lü S H, Chang R Z, Tao B, et al. Methodological research on PCR based detection of genetically modified soybean resistant to glyphosate[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2003, 36(8):883-887.)
 - [8] Ahmed F E. Detection of genetically modified organisms in foods [J]. Trends in Biotechnology, 2002, 20(5):215-223.
 - [9] 周颖,黎源倩,苏宁,等. 双重 PCR-毛细管电泳法快速检测大豆中的转基因成分[J]. 四川大学学报,2005,36(1):119-123. (Zhou Y, Li Y Q, Su N, et al. Rapid analysis of genetically modified soybean by a duplex PCR-capillary electrophoresis system with Laser-induced fluorescence detection[J]. Journal of Sichuan University, 2005, 36(1):119-123.)
 - [10] 岳志芹,梁成珠,吕朋,等. LAMP 技术及其在水生动物疫病诊断中的应用[J]. 检验检疫科学,2006,16(5):70-74. (Yue Z X, Liang C Z, Lü P, et al. Loop-mediated isothermal amplification method for the diagnosis of Aquatic Animals diseases[J]. Inspection and Quarantine Science, 2006, 16(5):70-74.)
 - [11] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28:E63.
 - [12] 蔡哲钧,冯杰雄,朱圣禾. 核酸环介导等温扩增技术[J]. 国际检验医学杂志,2006,27(12):1092-1096. (Cai Z J, Feng J X, Zhu S H. Loop-mediated isothermal amplification method[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2006, 27(12):1092-1096.)
 - [13] 高宏伟,梁成珠,岳志芹,等. 使用 EVA Green 染料的荧光 PCR 定性检测转基因产品[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2006, 37(2):319-324. (Gao H W, Liang C Z, Yue Z Q et al. Fluorescence PCR for detection genetically modified products by a novel EVA Green dye[J]. Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science), 2006, 37(2):319-324.)
 - [14] 大豆中转基因成分的定性 PCR 检测方法[S]. 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准 SN/T 1195—2003. (Protocol of the qualitative polymerase chain reaction (PCR) for detecting genetically modified component in soybeans[S]. SN/T 1195—2003)
 - [15] 食品中转基因成分定性 PCR 检测方法[S]. 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准 SN/T 1195—2003. (Protocol of the qualitative polymerase chain reaction (PCR) for detecting foods [S]. SN/T 1195—2003)
 - [16] Meyer R, Chardonens F, Hübner P, et al. Polymerase chain reaction in the quality and safety assurance of food: Detection of soya in pressed meat products[J]. Z Lebensm Unters Forsch, 1996, 203: 339-344.
-
- (上接第 304 页)
- [8] Fukushima D. Review: Recent progress in research and technology on soybeans[J]. Food Science and Technology Research, 2001, 7(1):8-16.
 - [9] Shibasaki M, Suzuki S, Tajima S, et al. Allergenicity of major components of soybean[J]. International Archives of Allergy and Immunology, 1980, 61:441-448.
 - [10] Bush R K, Schroekenstein, D, Meier-Davis S, et al. Soybean flour asthma; detection of allergens by immunoblotting[J]. Journal Allergy and Clinical Immunology, 1988, 82:251-255.
 - [11] Thanh V H, Shibasaki K. Beta-conglycinin from soybean proteins. Isolation and immunological and physicochemical properties of the monomeric forms [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1977, 490(2):370-384.
 - [12] Maruyama N, Katsube T, Wade Y. The roles of the N-linked glycans and extension regions of soybean beta-conglycinin in folding, assembly and structural features[J]. European Journal of Biochemistry, 1998, 258:854-862.
 - [13] Chun Liu, Hongling Wang, Zhumei Cui. Optimization of extraction and isolation for 11S and 7S globulins of soybean seed storage protein[J]. Food Chemistry, 2007, 102(4):1310-1316.
 - [14] Iwabuchi S, Yamauchi F. Determination of glycinin and β -conglycinin in soybean protein by immunological methods[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1987, 35:200-205.