

环介导等温扩增技术在转基因作物成分检测中的应用

梁晋刚¹, 杜再慧^{3*}, 黄春蒙², 张飞燕¹, 许文涛³, 张秀杰^{1*}

(1. 农业农村部科技发展中心, 北京, 100176; 2. 中国检验检疫科学研究院, 北京, 100176;
3. 中国农业大学营养健康系, 北京, 100083)

摘要: 转基因作物成分检测为农业转基因生物安全管理提供了重要技术支撑。环介导等温扩增 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 技术操作简便、灵敏度高、特异性强, 在转基因作物成分检测中得到了广泛应用。本文针对近年来 LAMP 技术在转基因大豆、玉米和油菜成分检测中的应用情况进行了分析和总结, 以期为 LAMP 技术在转基因作物成分检测中的应用和标准化提供科学参考。

关键词: 环介导等温扩增技术; 转基因作物; 成分检测; 标准化

中图分类号: S511; TS210.1

文献标识码: A

文章编号: 1007-9084(2021)01-0051-05

Loop-mediated isothermal amplification technology in the detection of genetically modified crops

LIANG Jin-gang¹, DU Zai-hui^{3*}, HUANG Chun-meng², ZHANG Fei-yan¹, XU Wen-tao³, ZHANG Xiu-jie^{1*}

(1. Development Center of Science and Technology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100176, China;
2. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China; 3. Department of Nutrition and Health,
China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: The detection of genetically modified (GM) crops provides important technical support for the safety management of agricultural genetically modified organisms (GMOs). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technology is easy to operate, efficient, sensitive, and specific. It has been widely used in the detection of GM crops. This article analyzes and summarizes the application of LAMP technology in the detection of GM soybean, maize and rapeseed in recent years, hoping to provide scientific references for further application and standardization of LAMP technology in the detection of GM crops.

Key words: LAMP; genetically modified crops; components detection; standardization

从全球范围来看,转基因大豆、玉米和油菜仍是种植最广泛的转基因作物,且新品系、新产品等仍在不断研发中。目前,我国已经批准了部分转基因大豆、玉米和油菜品种作为加工原料进口^[1],农业农村部近期为国内自主研发的多个转基因材料颁发了农业转基因生物安全证书,包括转 *cry1Ab* 和 *epsps* 基因抗虫耐除草剂玉米 DBN9936、转 *cry1Ab/cry2Aj* 和 *g10evo-epsps* 基因抗虫耐除草剂玉米瑞丰 125、转 *epsps* 和 *pat* 基因耐除草剂玉米 DBN9858、转 *g10evo-epsps* 基因耐除草剂大豆 SHZD3201, 以及转 *g2-epsps* 和 *gat* 基因耐除草剂大豆中黄 6106 ([http://](http://www.moa.gov.cn/ztl/zjyqwgz/)

www.moa.gov.cn/ztl/zjyqwgz/)。转基因产品数量和种类的不断增长,极大地加剧了农业转基因生物安全评价、监管和标识管理的难度,而转基因成分检测是农业转基因生物安全评价、监管和标识管理的重要技术保障^[2]。

日本学者 Notomi 在 2000 年提出的环介导等温扩增 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 技术是一种核酸恒温扩增技术,因其灵敏度高、特异性强等特点,已经被广泛应用于疾病诊断、食品安全检测及转基因检测等领域^[3-5]。2020 年 8 月,农业农村部发布了国家标准《转基因植物及其产品成

收稿日期: 2020-11-25

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项 (2016ZX08012003)

作者简介: 梁晋刚 (1987-), 男, 博士, 高级农艺师, 主要从事农业转基因生物安全检测技术研究, E-mail: liangjingang@agri.gov.cn; * 杜再慧为本文共同第一作者

* 通讯作者: 张秀杰 (1974-), 女, 博士, 副研究员, 主要从事农业转基因生物安全检测技术研究, E-mail: zhxj7410@sina.com

分检测 环介导等温扩增方法制定指南》(农业农村部公告第 323 号-9-2020), 进一步推进了 LAMP 技术在我国转基因检测过程中的标准化应用。

本文对目前基于 LAMP 技术的转基因大豆、玉米和油菜成分检测的应用和标准化进行了总结和分析, 为拓展 LAMP 技术的发展和在转基因作物成分检测中的应用和标准化提供科学参考。

1 LAMP 技术介绍

LAMP 技术是基于引物和 DNA 聚合酶的恒温指数核酸扩增技术, 其关键在于引物的合理设计。通常利用 PrimerExplorerV5 在线网站设计(<http://primerexplorer.jp/lampv5e/index.html>), 根据靶标的 6 个区域设计 4 对引物, 包括内引物 FIP 和 BIP, 外引物 F-3 和 R-3。同时, 为进一步提高扩增效率, 还可以向反应体系中加入环状引物 Loop F 和 Loop R。DNA 聚合酶是具有 3' 到 5' 的延伸活性, 而缺乏 5' 到 3' 的外切酶活性的恒温扩增酶, 其最适温度在 60~65°C, 此温度范围恰好与基因组的单双链动态平衡相吻合, 因此确保了引物与靶标的结合、延伸, 以及在短时间内实现靶标的恒温指数扩增。

LAMP 扩增的产物可以通过琼脂糖凝胶电泳法、显色法、荧光法、浊度法等进行信号输出^[6]。由于 LAMP 反应的扩增产物是大量重复单元的双链产物, 因此可以在琼脂糖凝胶中显示出弥散的梯形条带; 显色法通常采用钙黄绿素和氯化锰指示剂, 在 LAMP 反应扩增之前由于钙黄绿素和锰离子结合体系呈黄色, 而 LAMP 反应扩增之后由于焦磷酸根离子的产生可以剥夺钙黄绿素结合的锰离子, 进而体系呈现绿色; LAMP 反应的双链扩增产物可以与 SYBR Green I 荧光染料结合, 进而实现 LAMP 的实时荧光监测; 而浊度法是由于 LAMP 的高效扩增可以产生大量的焦磷酸根, 进而与反应体系中的镁离子结合形成焦磷酸镁沉淀。

2 国内 LAMP 技术在转基因作物成分检测中的应用

随着技术的发展, LAMP 逐渐用于转基因作物检测领域, 在转基因植物检测中的应用经历了由外源基因检测到品系检测的发展过程, 涉及到包含油料作物在内的多种作物, 如大豆、玉米、油菜等。

2.1 转基因大豆

2018 年转基因大豆以 9590 万公顷的种植面积, 在全球主要转基因作物种植面积中位居首位, 占比

50%^[7]。我国转基因大豆现已颁发了 21 项农业转基因生物安全证书, 其中生产应用为 2 项, 进口用作加工原料为 19 项。除草剂耐受性是转基因大豆的主要性状^[7]。

近年来, 研究人员已建立起了关于转基因耐除草剂大豆 GTS40-3-2、MON87708、356043 和 MON89788 等的 LAMP 检测方法。杨丽霞^[8]等建立了两种针对转化体 GTS40-3-2 的特异性等温扩增方法: 一种方法是显色法, 反应前加入金属离子指示剂羟基萘酚蓝(HNB)作为 LAMP 扩增的指示剂, 根据染料颜色判定反应结果; 另一种方法是将普通 LAMP 与实时荧光扩增技术相结合, 建立了实时荧光 LAMP 检测技术。两种方法的定性检测限均达到 0.1%, 均可有效运用于转基因大豆 GTS40-3-2 的成分检测。王永^[9]等建立了基于新型钙黄绿素染料可视化 LAMP 技术对 GTS40-3-2 转化体进行检测, 其灵敏度可达 0.001%, 是普通定性 PCR 方法灵敏度的 10 倍。Long 等^[10]采用实时浊度法和 SYBR Green I 显色法, 首次建立了针对 4 种转基因大豆 MON87701、MON87705、MON87708 和 MON87769 转化事件的可视化 LAMP 检测方法, 两种方法的检测限均可达到 0.05%。Ji 等^[11]基于 SYBR Green I 显色法建立的 356043 转化体特异性 LAMP 检测方法检测限也可达到 0.05%。Di 等^[12]采用实时浊度法检测 MON89788 转化体特异性, 检测限为 0.01%。LAMP 技术在转基因大豆成分检测中的应用大多数为转化体特异性检测^[13]。

2.2 转基因玉米

2018 年全球转基因玉米的种植面积达到了 5890 万公顷, 仅次于转基因大豆。转基因玉米在 14 个国家有种植, 其中美国以 3317 万公顷的种植面积远超第二位的巴西(1540 万公顷)和第三位的阿根廷(550 万公顷), 成为全球种植转基因玉米最多的国家^[1]。我国已为 24 种转基因玉米颁发了农业转基因生物安全证书, 其中 20 种用作加工原料、4 种为生产应用(<http://www.moa.gov.cn/ztzl/zjyqwgz/>)。

LAMP 技术在转基因玉米中的应用越来越广泛。王小玉等^[14]建立了 LAMP 实时浊度法快速检测转基因玉米 MON810, 对特异性、灵敏度、稳定性进行测试, 检测限为 0.5%, 与实时荧光 PCR 方法检测结果一致。邵碧英等^[15]建立了 LAMP 方法检测转基因耐除草剂玉米 GA21 转化体, 在反应体系中加入 SYBR Green I 荧光染料, 就可以在实时荧光定量 PCR 仪上实现对 LAMP 检测的实时监测。杨丽霞、

甄贞等^[16,17]基于不同的检测原理,分别采用显色法和实时荧光检测法对转基因玉米NK603转化体特异性进行检测,检测限均达到0.1%。马丹等^[18]用LAMP实时荧光检测法、钙黄绿素显色法和荧光PCR法分别检测转基因玉米MON88017,最终三种方法检测结果相同,进一步证实了LAMP检测方法准确可信。Zhen等^[19]基于SYBR Green I显色法所建立的针对MON88017转化体特异性的LAMP检测方法检测限低至40个拷贝。凌莉等^[20]采用实时浊度法建立了Bt176的LAMP检测方法。以上检测方法均是通过检测转化体特异性达到转基因玉米及其加工品初筛的目的。

2.3 转基因油菜

全球转基因油菜的种植面积为1010万公顷,占全球油菜种植面积的29%^[1]。耐除草剂性状是转基因油菜改良的主要性状,具有多种性状组合的转基因油菜也在不断的研发中,部分转化体已获得批准。我国的转基因油菜研究保持国际先进水平,研究成果涵盖面较广泛。

Maurizio等^[21]针对MS8、RF3两种转基因油菜品系的特征序列建立了LAMP快速检测方法,检测限达到0.01%。张吉红等^[22]针对转基因油菜MS8品系的特征序列设计了1组特异性引物,对反应体系进行优化,其检测方法在60 min内即可完成扩增,检测结果通过肉眼观察染色情况即可分辨,方法灵敏度高,检测限可达到65.12 pg/L,并且具有良好的特异性,适用于转基因油菜MS8品系室内和现场检测。马路遥^[23]针对转基因油菜RT73品系旁侧序列以及内源序列E9分别设计了RT73特异引物和内参引物,建立并优化LAMP检测转基因油菜RT73反应体系,同时就稳定性、灵敏度、特异性、检测时间、判读方法等方面对LAMP法与实时荧光PCR法两种方法进行比较分析。结果发现,LAMP方法检测转基因油菜稳定性良好,灵敏度高,特异性强,实时浊度法检测时间约30~40 min,染色法仅需10 min左右。LAMP方法的检测结果可以通过实时浊度仪、染色法、目视法三种途径进行判读。LAMP法相对于实时荧光PCR具有快速、结果判读简便的优势,灵敏度和实时荧光PCR相同,但此方法检测低含量($\leq 0.01\%$)转基因样品时,其稳定性和重复性有待完善。

3 LAMP技术在我国转基因作物成分检测中的标准化进程

我国农业转基因生物安全标准体系主要包括

国标委体系(GB/T)、农业部/农业农村部标准体系(NY/T、农业部/农业农村部公告)、检验检疫行业标准体系(SN/T)和地方标准体系(DB/T)^[24]。农业农村部公告第323号-9-2020规定了转基因植物及其产品成分检测的环介导等温扩增方法建立的要求和程序。出入境检验检疫行业标准(SN/T)中关于转基因成分LAMP检测方法有30个标准,包括1项通用要求和定义、1项筛选方法,28项转化体特异性检测方法。其中,12个玉米品系,5个大豆品系和1个油菜品系。标准的检测方法详见表1。

现行SN/T标准中,转基因成分LAMP检测方法多采用SYBR Green I染色法,在外源基因和作物基因组边界序列设计引物,定性检测极限为0.5%。其中,玉米MON88017品系可选用SYBR Green I或钙黄绿素染色达到检测目的(SN/T 3767.10-2014);玉米59122品系基于钙黄绿素显色法,使体系中的锰离子和钙黄绿素结合,进一步加强钙黄绿素的荧光强度,其定性检测极限为1%(SN/T 3767.14-2014);玉米3272品系则采用转基因成分LAMP检测现行标准中多重检测的方法,在同一反应体系和反应条件下,实现对磷酸甘露糖异构酶PMI和高温 α -淀粉酶797E两个目标基因的快速检测,定性检测极限为1%(SN/T 3767.13-2014)。

4 LAMP技术的优缺点

转基因作物从单一性状逐渐发展成抗虫耐除草剂等复合性状,全球转基因作物呈现出快速发展的态势^[1]。随着《中华人民共和国生物安全法》的发布,生物安全制度和政策的改善及强化需要检测方法作为技术支撑。LAMP技术优势明显,由于其灵敏度高、特异性强、恒温扩增,几十分钟内产生大量片段,实现核酸的高效扩增,且该技术不需要复杂的仪器设备,适合基层实验室、转基因检验机构和进出口岸现场抽检。在DNA的完整性较低的情况下,LAMP更适合于转基因食品和深加工品的现场快检。

目前,转基因作物成分检测仍然以定性和定量PCR的方法为主,LAMP在转基因成分检测中的应用还有很大提升空间^[25]。一是由于LAMP属于链置换反应,对靶序列的长度有一定的限制,很难做多重扩增,在定量能力上不如实时荧光PCR。二是反应体系不封闭,容易受到气溶胶的影响,产生假阳性,不易区分非特异性扩增,且反应产物的回收、克隆方面不如传统PCR方法。三是LAMP方法的引物

表1 基于LAMP检测方法的转基因成分出入境检验检疫行业标准(SN/T)

Table 1 Industrial standards for Entry-Exit Inspection and Quarantine of GMO based on LAMP detection methods

序号 Num.	标准号 Industrial standards	适用范围 Application scope	显色方法 Staining method	定性检测下限 Low limit of qualitative detection
1	SN/T 3767.3-2014	转基因玉米 Bt-11 GM maize Bt-11	SYBR Green I	0.5%
2	SN/T 3767.4-2014	转基因玉米 Bt-176 GM maize Bt-176	SYBR Green I	0.5%
3	SN/T 3767.5-2014	转基因玉米 GA21 GM maize GA21	SYBR Green I	0.5%
4	SN/T 3767.6-2014	转基因玉米 MIR162 GM maize MIR162	SYBR Green I	0.5%
5	SN/T 3767.7-2014	转基因玉米 MIR604 GM maize MIR604	SYBR Green I	0.5%
6	SN/T 3767.8-2014	转基因玉米 MON810 GM maize MON810	SYBR Green I	0.5%
7	SN/T 3767.9-2014	转基因玉米 MON863 GM maize MON863	SYBR Green I	0.5%
8	SN/T 3767.10-2014	转基因玉米 MON88017 GM maize MON88017	SYBR Green I 钙黄绿素 Calcein	0.5%
9	SN/T 3767.11-2014	转基因玉米 MON89034 GM maize MON89034	SYBR Green I	0.5%
10	SN/T 3767.12-2014	转基因玉米 T-25 GM maize T-25	SYBR Green I	0.5%
11	SN/T 3767.13-2014	转基因玉米 3272 GM maize 3272	钙黄绿素 Calcein	1%
12	SN/T 3767.14-2014	转基因玉米 59122 GM maize 59122	钙黄绿素 Calcein	1%
13	SN/T 3767.15-2014	转基因大豆 A2704-12 GM soybean A2704-12	SYBR Green I	0.5%
14	SN/T 3767.16-2014	转基因大豆 A5547-127 GM soybean A5547-127	SYBR Green I	0.5%
15	SN/T 3767.17-2014	转基因大豆 DP356043 GM soybean DP356043	SYBR Green I	0.5%
16	SN/T 3767.18-2014	转基因大豆 GTS40-3-2 GM soybean GTS40-3-2	SYBR Green I	0.5%
17	SN/T 3767.19-2014	转基因大豆 MON89788 GM soybean MON89788	SYBR Green I	0.5%
18	SN/T 3767.30-2014	转基因油菜 RT-73 GM soybean rapeseed RT-73	SYBR Green I	0.5%

注:本表格仅统计了转基因玉米、大豆、油菜3种作物的LAMP检测标准

Note: This table only summarizes the industrial standards of GM maize, soybean and rapeseed

设计较PCR引物相对较复杂,需要经过预实验来验证引物的可行性。

5 展望

随着转基因产品数量和种类的不断增多,由于LAMP检测的高灵敏度、强特异性、操作简单,LAMP技术已发展成为转基因检测领域的一种重要检测手段。对此,LAMP技术和酶联免疫吸附反应、实时荧光定量PCR等检测技术联用可以实现准确定量,

提高灵敏度;与试纸条结合使用,可以降低假阳性的概率。此外,LAMP在多重检测中的研究仍需继续深入。LAMP技术在我国转基因作物成分检测中的标准化进程也发挥着重要的作用,未来基于LAMP技术的转基因作物成分检测标准会朝着原位、实时、多重、高灵敏的方向不断发展进步。且应更加注重交叉学科对于LAMP技术的推动作用,继续深入LAMP技术的创新和完善,使其在应对转基因成分低水平混杂、农业转基因生物标识管理、农

业转基因生物进口安全管理等问题及转基因标准的研制中发挥更大作用。

参考文献:

- [1] ISAAA. Global status of commercialized Biotech/GM crops in 2018: Biotech crops continue to help meet the challenges of increased population and climate change [R]. ISAAA Brief No. 54. ISAAA: Ithaca, NY, 2018.
- [2] 梁晋刚, 徐俊锋, 焦悦, 等. 转基因作物快速检测技术进展与展望[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(21): 71-74. DOI: 10.15889/j.issn.1002-1302.2019.21.016.
- [3] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): e63. DOI: 10.1093/nar/28.12.e63.
- [4] 王稼璇, 胡昱莹, 吴海星, 等. 转 *cry1Ab/c* 水稻环介导等温扩增快速检测方法[J]. 食品工业, 2020, 41(5): 215-219.
- [5] 闫兴华, 许文涛, 商颖, 等. 环介导等温扩增技术(LAMP)快速检测转基因玉米 LY038[J]. 农业生物技术学报, 2013, 21(5): 621-626. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7968.2013.05.015.
- [6] 林晟豪, 杜再慧, 张秀杰, 等. 基于环介导等温扩增技术的生物传感器研究进展[J]. 生物技术进展, 2019, 9(6): 599-610. DOI: 10.19586/j.2095-2341.2019.0069.
- [7] 杨树果. 全球转基因作物发展演变与趋势[J]. 中国农业大学学报, 2020, 25(9): 13-26. DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2020.09.02.
- [8] 杨丽霞, 邱华丽, 彭新凯, 等. 转基因大豆 GTS40-3-2 环介导等温扩增检测方法的建立[J]. 亚热带植物科学, 2015, 44(3): 213-217. DOI: 10.3969/j.issn.1009-7791.2015.03.007.
- [9] 王永, 兰青阔, 朱珠, 等. 转基因大豆 GTS40-3-2 成分现场可视化检测方法的建立[J]. 大豆科学, 2014, 33(4): 570-573. DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2014.04.0570.
- [10] Long L K, Yan W, Li C C, et al. Rapid visual detection of four specific transgenic events in GM soybean using loop-mediated isothermal amplification method[J]. Russ J Plant Physiol, 2019, 66(4): 646-655. DOI: 10.1134/S1021443719040071.
- [11] Ji G Z, Li G, Wu Y F, et al. Rapid visual event-specific detection of soybean DP-356043-5 by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) [J]. Food Sci Technol Res, 2015, 21(4): 517-523. DOI: 10.3136/fstr.21.517.
- [12] Di H L, Shi L, Shen H P, et al. Rapid detection of genetically modified ingredients in soybean products by real-time loop-mediated isothermal amplification [J]. J Food Nutr Res, 2014, 2(7): 363-368. DOI: 10.12691/jfnr-2-7-6.
- [13] 周杰, 黄文胜, 邓婷婷, 等. 环介导等温扩增法检测6种转基因大豆[J]. 农业生物技术学报, 2017, 25(2): 335-344. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7968.2017.02.019.
- [14] 王小玉, 邝筱珊, 胡松楠, 等. LAMP实时浊度法快速检测转基因玉米 MON810[J]. 现代食品科技, 2013, 29(12): 3002-3005, 3069. DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2013.12.039.
- [15] 邵碧英, 陈文炳, 曾莹, 等. 转基因玉米 GA21 品系 LAMP 检测引物的筛选及方法的建立[J]. 中国食品学报, 2014, 14(10): 216-222. DOI: 10.16429/j.1009-7848.2014.10.033.
- [16] 杨丽霞. 环介导等温扩增法检测转基因玉米 NK603 [J]. 食品与机械, 2016, 32(1): 56-58, 80. DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2016.01.013.
- [17] 甄贞, 张明辉, 刘营, 等. 转基因玉米 NK603 品系成分 LAMP 快速 PCR 检测方法的建立[J]. 中国农业大学学报, 2015, 20(3): 24-29. DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2015.03.04.
- [18] 马丹, 张沫琦, 魏海燕, 等. 环介导等温扩增法检测转基因玉米 MON88017 品系 [J]. 检验检疫学刊, 2017, 27(2): 1-5.
- [19] Zhen Z, Zhang M H, Yu Y B, et al. Establishment of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) detection method for genetically modified maize MON88017 [J]. Eur Food Res Technol, 2016, 242(10): 1787-1793. DOI: 10.1007/s00217-016-2678-0.
- [20] 凌莉, 刘静宇, 易敏英, 等. 转基因玉米 Bt176 品系特异性环介导等温扩增检测方法的研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(3): 310-313. DOI: 10.13386/j.issn.1002-0306.2013.03.004.
- [21] Lee D, La Mura M, Allnutt T R, et al. Detection of genetically modified organisms (GMOs) using isothermal amplification of target DNA sequences [J]. BMC Biotechnol, 2009, 9: 7. DOI: 10.1186/1472-6750-9-7.
- [22] 张吉红, 王佳莹, 崔霞霞, 等. 转基因油菜 Ms8 品系的 LAMP 检测[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(21): 5592-5595. DOI: 10.3969/j.issn.2095-0381.2018.21.010.
- [23] 马路遥. 环介导等温扩增技术检测转基因油菜 RT73 [D]. 吉林: 吉林大学, 2013.
- [24] 兰青阔, 李文龙, 孙卓婧, 等. 国内外转基因检测标准体系现状与启示[J]. 农业科技管理, 2020, 39(3): 27-32. DOI: 10.16849/J.CNKI.ISSN1001-8611.2020.03.008.
- [25] 冀国桢, 李刚, 赵建宁, 等. 环介导等温扩增技术在转基因成分检测中的应用[J]. 食品科学, 2016, 37(11): 255-261. DOI: 10.7506/spkx1002-6630-201611045.

(责任编辑:王丽芳)