

## 改良环介导等温扩增技术快速检测转基因大豆

柳毅,张军方,张会彦,苏旭东,马晓燕,亢春雨,王雪静,张伟

(河北农业大学食品科技学院,河北保定 071001)

**摘要:**采用改良环介导等温扩增(LAMP)技术,建立一套准确、快速、可靠的用于转基因大豆检测及DNA提取的方法。以CP4-EPSPS外源基因为检测的目的片段,设计内、外引物和环引物,并采用改进的方法提取DNA,进行LAMP扩增,实际检测已知转基因大豆和市售大豆,通过肉眼观察白色沉淀,判断检测结果。改进的DNA提取方法与经典的CTAB方法相比,提取时间至少缩短了1h,降低了提取成本。环介导等温扩增(LAMP)技术对转基因大豆的检出限为0.01%,是普通PCR方法的20倍。因此,改良的LAMP检测转基因大豆方法灵敏度高,耗时短,方法简便。

**关键词:**环介导等温扩增;检测;CP4-EPSPS;转基因大豆

**中图分类号:**S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2009)04-0706-05

## Development of a Loop-mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid Detection of Transgenic Soybean

LIU Yi<sup>1</sup>, ZHANG Jun-fang, ZHANG Hui-yan, SU Xu-dong, MA Xiao-yan, KANG Chun-yu, WANG Xue-jing, ZHANG Wei

(Institute of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, Hebei, China)

**Abstract:** A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technology was established to detect transgenic soybean. The sequence of exogenous gene CP4-EPSPS was used as target sequence, to design outer primers, inner primers and loop primers. The DNA extraction method was improved. Through visual observation of white precipitate to judge results of detection. The improved CTAB method isolated total DNA quickly and reducing DNA-extraction cost as compared with the traditional CTAB method. The detection limit of the genetically modified soybeans by LAMP technology was 0.01% which was superior to PCR. Results indicate that LAMP can provide a sensitive, rapid yet simple test for the detection of CP4-EPSPS in transgenic soybean.

**Key words:** Loop-mediated isothermal amplification; Detection; CP4-EPSPS; Transgenic soybean

随着转基因产品商品化,使得转基因植物、动物、微生物加工而成的转基因食品在传统食品市场中的份额不断加大。然而,转基因食品中含有新的遗传物质,即外源DNA以及由外源基因编码的新蛋白,而传统食品是不存在这些情况的,并且传统食品经过人类几千年的食用证明是安全的,因此转基因食品的安全性是摆在人类面前的重大难题;由于转基因食品的安全性在较短的时间内无法确定,因此,目前各国对转基因食品都采用标签制度进行管理,所以急需建立一套能够对转基因食品进行准确、快速检测的方法。目前对转基因的检测方法主要为传

统的PCR检测方法,检测方法操作繁琐,检测时间长,而且灵敏度较低<sup>[1]</sup>,更由于需要昂贵的仪器设备、繁琐的电泳过程以及对检测人员较高的技术要求,而使其难以在基层普及和推广。

环介导等温扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是Notomi等在2000年开发的一种新颖的恒温核酸扩增方法,其原理是针对目的基因的6个区域设计4条特异引物,利用一种链置换DNA聚合酶(Bst DNA polymerase)在等温65℃左右,几十分钟即可实现核酸的高效扩增<sup>[2-3]</sup>。4条引物对靶序列的6个特异序列区域的识别,保证了

收稿日期:2009-02-16

作者简介:柳毅,男(1982-),硕士研究生,研究方向为食品安全。E-mail:liuyi0882@163.com。

通讯作者:张伟,教授。E-mail:zhangwei631126@yahoo.com.cn。

LAMP 扩增的高度特异性。LAMP 不需要模板的热变性<sup>[4]</sup>,长时间温度循环,在等温条件下扩增,不会因温度改变而造成时间的浪费。有无肉眼可见的焦磷酸镁的白色沉淀,成为判断核酸是否扩增的最简单的方法。LAMP 将成为可以替代 PCR 的核酸扩增的新技术,增加环引物的环介导等温扩增方法,使反应速度可提高 30%~50%<sup>[5]</sup>。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 主要仪器和试剂 电热恒温水浴锅,高速冷冻离心机(SIGMA3K30,德国西格马公司),PCR 扩增仪(Whatman T Gradient 基因扩增仪,德国 Biometra 公司),恒温培养箱,凝胶成像系统(KodakE-DAS290,美国柯达公司),电泳仪(北京市六一厂生产 DXY-33A 型),微量移液器(0.1~10  $\mu\text{L}$  LIBIO-HIT 芬兰)等。Bst DNA 聚合酶,Taq DNA 聚合酶,dNTP,10  $\times$  Loading buffer,DNA Marker DL100、DL2000,LAMP 引物等购自或合成于上海生工生物工程技术有限公司。

1.1.2 转基因大豆来源 CP4-EPSPS 转基因大豆(河北省农业科学院粮油作物研究所赠)。

1.1.3 样品来源 购自当地超市。

### 1.2 方法

1.2.1 模板 DNA 的制备 对 CTAB 法<sup>[6]</sup>进行改良:

a. 称取 200 mg 试样,在液氮中磨碎,装入已经用液氮预冷的 1.5 mL 离心管中。

b. 加入 1 mL 预冷至 4 $^{\circ}\text{C}$  的抽提液,剧烈摇动混匀后,在冰上静置 5 min,用 13 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心机,4 $^{\circ}\text{C}$  离心 15 min,弃去上清液。

c. 加入 600  $\mu\text{L}$  预热到 65 $^{\circ}\text{C}$  的抽提裂解液,用玻棒搅拌上下颠倒充分混匀,在 65 $^{\circ}\text{C}$  的水浴锅中裂解 30~60 min。

d. 用 13 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心机室温离心 10 min,将上清液转至另一离心管中,加入 3  $\mu\text{L}$  RNase A (10  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),37 $^{\circ}\text{C}$  水浴 40 min。

e. 分别用等体积苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)和氯仿:异戊醇(24:1)各抽提一次。

f. 用 13 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心机室温离心 10 min,将上清转至另一离心管中。加入 2/3 体积异丙醇,1/10 体积 3  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  乙酸钠(pH 5.6),-20 $^{\circ}\text{C}$  放置 1.5 min,充分沉淀 DNA。

g. 13 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,4 $^{\circ}\text{C}$  离心 15 min,用 70% 乙醇洗沉淀一次,倒出乙醇,55 $^{\circ}\text{C}$  烘干 DNA。加入 50  $\mu\text{L}$  TE(pH8.0)溶解 DNA。

h. 把 DNA 溶液浓度用重蒸馏水调制为 100  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ,储存于 -20 $^{\circ}\text{C}$  备用。

1.2.2 引物设计 为了检测转基因大豆,针对转基因大豆 GenBank 中(基因号 AY5966948),运用引物设计软件(<https://primerexplorer.jp/lamp3.0.0/index.html>)在线进行 LAMP 引物设计。引物设计的原则如 Notomi 等<sup>[2]</sup>所述。设计的 6 对引物是:两条外引物(F3 和 B3),两条内引物(FIP 和 BIP),以及二条环引物(LF 和 LB)。两个外引物被描述为上游外引物(F3)和下游外引物(B3)。两个内引物被描述为上游内引物(FIP)和下游内引物(BIP)。此外,两个环引物被描述为上游环引物(LF)和下游环引物(LB)。扩增基因组中的位置从 154 至 386 区域 233bp 目的基因片断。引物的名称和具体序列见表 1。FIP 由 F1 的一个互补序列和正向序列 F2 构成。BIP 由 B1 的一个互补序列和正向序列 B2 构成。每条引物在基因组中具体的位置如图 1 所示。

表 1 LAMP 反应引物 1 的序列

Table 1 Oligonucleotides primer for LAMP

引物名称 Primer name	序列 Sequence(5'~3')
Forward outer(F3)	ATATCTCCACTGACGTAAGG
Backward outer(B3)	CCAAAAACAAGAAAACCTTGAAGA
Forward inner primer(FIP)	CCTCTCCAATGAAATGAACTTCCT-GATGACGCACAATCCCAC
Backward inner primer(BIP)	TCAAGAATGGCACAAATTAACAACA-GGTTTATGGAAATTGGAATT
Forward loop primer(LF)	GAAGGGTCTTGCGAAGGATA
Backward loop primer(LB)	TGGCACAAGGGATACAAAC

1.2.3 LAMP 反应 25  $\mu\text{L}$  的反应体系由内引物(FIP 和 BIP)各 1.5  $\mu\text{m}$ ,外引物(F3 和 B3)各 0.25  $\mu\text{m}$ ,环引物(LF 和 LB)各 0.8  $\mu\text{m}$ ,2.5 mM dNTP,4 mM  $\text{MgSO}_4$ ,10  $\times$  Bst DNA 聚合酶反应缓冲液(New England Biolabs,MA)(20 mM Tris-HCl(pH 8.8),10 mM KCl,10 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,2 mM  $\text{MgSO}_4$ ,0.1% Triton X-100),8U 的 Bst DNA 聚合酶大片段(New England Biolabs,Beverly,MA),3.5  $\mu\text{L}$  DNA 模板和用灭菌双蒸水补足体系。LAMP 反应过程是首先在 65 $^{\circ}\text{C}$  水浴锅中反应 30 min,然后将其放入 80 $^{\circ}\text{C}$  水浴

```

121 caaccacgct tcaaaagcaa gtggattgat gtgatatctc cactgacgta agggatgacg
181 cacaatcca ctatcctcgg caagaccctt cctctatata aggaagtca ttcatcttgg
241 agaggacacg ctgacaagct gactctagca gatctttcaa gaatggcaca aattaacaac
301 atggcacaag ggatacaaac ccttaatccc aattccaatt tcataaac ccaagtctct
361 aaatctcaa gttttctgt tttggatct aaaaaactga aaaattcagc aaattctatg

```

← F3 → ← F2 →  
 ← LF → ← F1 →  
 ← B1 → ← B2 →  
 ← LB → ← B3 →

图1 用于外引物(F3和B3)与内引物(F1P和B1P)设计的部分CP4-EPSPS基因序列

Fig. 1 Nucleotide sequence of partial CP4-EPSPS gene used to design inner primers(F1P and B1P) and outer primers(F3 and B3) for LAMP. The DNA sequences used for primer design are shown by heavy lines

锅中,水浴 10 min 终止反应,通过肉眼观察有无白色焦磷酸镁沉淀<sup>[7-8]</sup>。此外,取扩增产物 5 μL,与 1 μL 的 loading buffer 混合均匀,进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,观察梯形条带,以证实是否发生了 LAMP 反应。另外,取 2 μL 灭菌的去离子水作为 LAMP 反应的模板,加入反应体系中进行 LAMP 扩增,扩增结果作为阴性对照。

**1.2.4 PCR 反应** 为了比较 LAMP 检测转基因大豆的灵敏度和检出限,进行了 PCR 反应,PCR 反应的引物是检测转基因大豆的 LAMP 反应的两条外引物(F3和B3)见表1。PCR 扩增反应的 25 μL 反应体系包括 10 × 聚合酶链反应缓冲液(Mg<sup>2+</sup> Free)(100 mM Tris-HCl(pH8.3),500 mM KCl),25 mM MgCl<sub>2</sub>,2.5 mM dNTP,上下游引物各 10 μm,5 U 的 Taq DNA 聚合酶,3 μL 的 DNA 模板和用灭菌双蒸水补足体系。PCR 反应体系在 PCR 仪中反应的程序是预变性 94℃,5 min,变性 94℃,40 s;退火 57℃,30 s;延伸 72℃,30 s。进行 35 个循环,最后 72℃ 延伸 6 min。PCR 产物 5 μL,与 1 μL 的 loading buffer 混合均匀,进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。

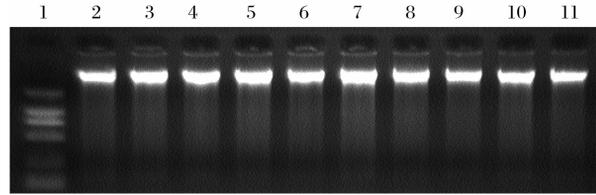
## 2 结果与分析

### 2.1 DNA 的提取

采用改进后的 CTAB 方法对提取的基因组 DNA 进行电泳,结果只有一条带,带较清晰,纯度较高。因此,采用改进后的 CTAB 方法进行基因组 DNA 提取结果比较理想,可用于 LAMP 扩增。

### 2.2 LAMP 反应的肉眼可视结果

靶序列的高度保守的区域进行引物在线设计,从 600 对引物中筛选,得到带有 2 条环引物的特异



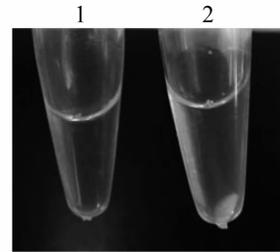
1: DNA Marker, 2 为转基因大豆的基因组 DNA, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11: 为市售不同大豆的基因组 DNA。

1, 25000 bp DNA ladder marker; 2, genetically modified soybean DNA Samples; 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, soybean DNA Samples.

图2 琼脂糖凝胶电泳检测转基因大豆基因组 DNA

Fig. 2 Detection genome DNA of transgenic soybean by electrophoresis

引物。成功地进行了 LAMP 检测转基因大豆的试验。反应结果如图 3 所示,由结果可知反应产生大量肉眼可见的白色焦磷酸镁沉淀,试验结果理想。



1: negative control, 2: positive results

图3 LAMP 反应的可视结果

Fig. 3 The visual results of the LAMP reaction

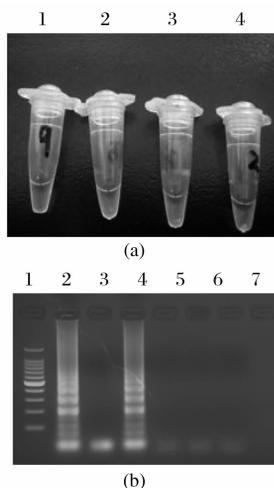
### 2.3 LAMP 检测转基因大豆的特异性分析

以表 1 设计的引物,对供试的样品分别进行 LAMP。结果显示,供试的标准样品反应管出现沉淀(图 4-a),电泳后有扩增条带,而其它非转基因大豆样品反应管未出现沉淀,电泳也未见扩增条带(图 4-b)。表明所设计的引物有较好的特异性。

### 2.4 LAMP 和 PCR 检测大豆样品中的 CP4-EPSPS 外源基因的检出限的比较

将转基因大豆和非转基因大豆混合,转基因大豆占的比例分别为:100%,30%,10%,1%,0.5%,0.2%,0.1%,0.01%和0.001%,用高速粉碎机从低浓度到高浓度粉碎大豆样品,DNA 提取按 1.2.1 方法,以已知标准转基因大豆为阳性对照,分别按 1.2.3 建立的 LAMP 检测方法和 1.2.4 建立的 PCR 检测方法进行扩增,确定转基因大豆和非转基因大豆混合样的 DNA 最低检出限。

进行 LAMP 和常规 PCR 检测大豆样品中的 CP4-EPSPS 外源基因的检出限试验,如图 5 所示,常规 PCR 当转基因大豆的含量在 0.2% 时可以扩增



(b-1): 100 bp DNA ladder marker; (b-2): 阳性对照; (b-3): 阴性对照; (a-4), (b-4): 标准转基因大豆 DNA 样品; (a-2) (b-5): 转基因棉花 DNA 样品; (a-1) (b-6): 转基因玉米 DNA 样品; (a-3), (b-7): 转基因番茄 DNA 样品

(b-1): 100 bp DNA ladder marker; (b-2): positive reaction; (b-3): negative control; (a-4), (b-4): genetically modified soybean DNA Samples; (a-2) (b-5): genetically modified cotton DNA Samples; (a-1) (b-6): genetically modified maize DNA Samples; (a-3), (b-7): genetically modified tomato DNA Samples.

图4 LAMP 检测转基因大豆的特异性分析

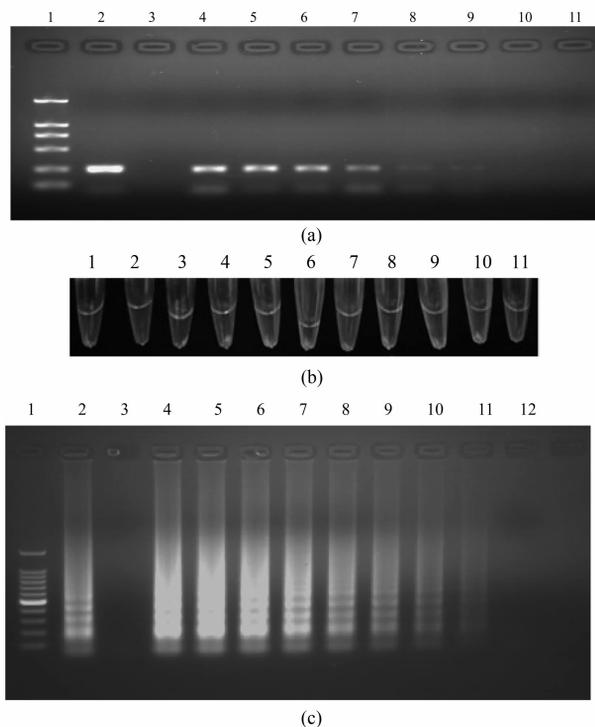
Fig. 4 The result of specificity test of LAMP

出条带,含量在 0.1% 时未扩增出条带,所以检出限为 0.2%,其琼脂糖凝胶电泳图如图 5a 所示。而改良的 LAMP 方法,在转基因大豆的含量在 0.01% 时仍能出沉淀,电泳有梯形条带。含量在 0.001% 时不出沉淀,电泳无梯形条带。即检测大豆样品中的 CP4-EPSPS 外源基因的检出限为 0.01%,其沉淀如图 5b 所示,琼脂糖凝胶电泳如图 5c 所示。比较 LAMP 和常规 PCR 反应的检出限,改良的 LAMP 的检出限是 PCR 的 20 倍。

### 3 讨论

大豆成分较复杂,脂肪和蛋白的含量较高,其中一些成分对 PCR 反应有明显的干扰。另外,转基因大豆中的外源基因的含量通常较少,因此获得高纯度的 DNA 是非常重要的,却也很困难。在吸收前人相关研究基础之上,对 DNA 的提取方法进行了适当的改进,使提取的 DNA 纯度和效率相对较高,在很大程度上减弱了对 PCR 反应的干扰,提取时间缩短了 1 h。

目前,对转基因食品的检测方法主要为核酸检测。利用 PCR 方法进行核酸检测是适应性最广、灵



1: (a) 2000 bp DNA ladder marker; (c) 100 bp DNA ladder marker; 2: 阳性对照; 3: 阴性对照; 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 标准转基因大豆样品混入 100%, 30%, 10%, 1%, 0.5%, 0.2%, 0.1%, 0.01%, 0.001% 的样品

a: Electrophoretic analysis of corresponding PCR reaction; b: The visual results of the LAMP reaction; c: Electrophoretic analysis of LAMP reaction. Tubes and lanes 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, and 12, 100%, 30%, 10%, 1%, 0.5%, 0.2%, 0.1%, 0.01% and 0.001% GMO1; tube and lane 2, positive reaction; tube and lane 3, negative control; lane 1, (a) 2000 bp DNA ladder marker; (c) 100 bp DNA ladder marker.

图5 LAMP 和常规 PCR 检测转基因大豆的灵敏度比较  
Fig. 5 Comparison on sensitivity of LAMP and conventional

PCR for detection of transgenic soybean

敏度较高、技术较成熟的一种方法。在我国,转基因食品的检测也主要应用的是 PCR 方法,但是目前还没有省时、省力、成本低比较理想的检测方法。另一方面,从大豆中提取 DNA 的方法较多,但大多费用较高、或是步骤较为繁琐、或是提取的模板较差,以致影响最终的检测效果和技术的普及。

LAMP 方法是一种新型的恒温核酸扩增技术。它依赖于能够识别靶 DNA 上 6 个特定区域的 4 条引物和一种具有链置换活性的 DNA 聚合酶,在恒温条件下扩增核酸,保证了扩增的高特异性和高效率。由于 LAMP 独特的核酸扩增机制,它的产物是由多重靶序列的茎-环状 DNA 和花椰菜状 DNA 所组成的混合物,在琼脂糖凝胶电泳上会呈现出 LAMP

反应典型的阶梯状条带。另外,核酸大量生成时,从dNTP中析出的焦磷酸根离子与反应体系中的 $Mg^{2+}$ 结合,产生肉眼可见的扩增反应副产物—白色焦磷酸镁沉淀<sup>[7-8]</sup>。结果鉴定简单,非常适合高通量的快速检测。建立的LAMP检测系统为转基因食品标示制度的实施提供了可靠的检测方法,其检测方法与传统PCR相比,具有更大的可靠性和更强的适应性,并且降低检测成本,缩短检测时间。以CP4-EPSPS外源基因作为靶序列,采用带有2条环引物的LAMP方法,检测转基因大豆,表现出较高的灵敏度。LAMP法检测转基因大豆的研究至今未见报道,本研究探索了一种更为稳定、快捷的分子检测样品中转基因成分的新技术。

从结果中可以看到,改良的LAMP方法检测灵敏度是常规PCR的20倍,许多研究表明,LAMP技术可检测到10个拷贝数甚至更低的靶标,在检测灵敏度上具有更大的优势<sup>[9-10]</sup>。而且LAMP方法操作简单,反应快速,不需要昂贵的仪器设备、繁琐的电泳过程,尤其适合在基层医疗单位和食品检测部门推广和应用,另外最近研究表明LAMP法检测各种食源性致病菌方面也具有良好潜力<sup>[11-12]</sup>。

## 参考文献

[1] Miraglia M, Berdal K G, Brera C, et al. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain[J]. Food and Chemical Toxicology, 2004, 42: 1163-1170.

[2] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): E63-e63

[3] Eiken Chemical Co. Ltd. The principles of LAMP method[EB/OL]. <http://loopamp.eiken.co.jp/e/tech/index.html>. 2003-10.

[4] Nagamine K, Watanabe K, Ohtsuka K, et al. Loop-mediated isothermal amplification reaction using a nondenatured template[J]. Clinical Chemistry, 2001, 47: 1742-1743.

[5] Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers[J]. Molecular and Cellular Probes, 2002, 16: 223-229.

[6] 金芄军. 转基因抗虫棉花检测技术规范——定性PCR筛查方法(试行)[EB/OL]. <http://www.cgap.org.cn/ewebeditor/Example/aemctx/NewsFile/200612792657772.doc>. Transgenic cotton detection technical specifications- qualitative PCR method[EB/OL]. <http://www.cgap.org.cn/ewebeditor/Example/aemctx/NewsFile/200612792657772.doc>.

[7] Mori Y, Hirano T, Notomi T. Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers. BMC Biotechnology, 2006, 6: 3. <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/6/3>.

[8] Mori Y, Nagamine K, Tomita N, et al. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001, 289: 150-154.

[9] 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: 145-157.

[10] Suzuki R, Yoshikawa T, Ihira M, et al. Development of the loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of cytomegalovirus DNA[J]. Journal of Virological Methods, 2006, 132: 216-221.

[11] Kato H, Yoshida A, Ansai T, et al. Loop-mediated isothermal amplification method for the rapid detection of Enterococcus faecalis in infected root canals[J]. Oral Microbiology and Immunology, 2007, 22(2): 131-135.

[12] Hara-Kudo Y, Nemoto J, Ohtsuka K, et al. Sensitive and rapid detection of Vero toxin-producing Escherichia coli using loop-mediated isothermal amplification[J]. Journal of Medical Microbiology, 2007, 56: 398-406.

## 欢迎订阅 2010 年《大豆科学》

《大豆科学》是由黑龙江省农业科学院主管主办国内外公开发行的专业领域学术性期刊,也是被国内外多家重要数据库和文摘收录源收录的重点核心期刊,反映大豆科学研究的最新成果。主要刊登有关大豆遗传育种、品种资源、生理生态、耕作栽培、植物保护、营养肥料、生物技术、食品加工、药用功能及工业用途等方面的学术论文、科研报告、研究简报、国内外研究述评、学术活动简讯和新品种介绍等。

《大豆科学》主要面向从事大豆科学研究的科技工作者,大专院校师生、各级农业技术推广部门的技术人员及科技种田的农民。

国内外公开发行,双月刊,16开本,每期180页。国内每期订价:10.00元,全年60.00元,邮发代号:14-95。国外每期订价:10.00美元(包括邮资),全年60美元。国外由中国国际图书贸易总公司发行,北京399信箱。国外代号:Q5587。

本刊热忱欢迎广大科研及有关企事业单位刊登广告,广告经营许可证号:2301030000004。

地址:哈尔滨市南岗区学府路368号《大豆科学》编辑部。

邮编:150086 电话:0451-86668735 E-mail:dadoukx@sina.com ddkexue@126.com