

环介导等温扩增技术检测含有 CaMV35S 的转基因玉米

陈金松^{1,2}, 黄丛林¹, 张秀海¹, 吴忠义¹

(1. 北京市农林科学院 北京农业生物技术研究中心, 北京 100097; 2. 首都师范大学 生命科学学院, 北京 100048)

摘要: DNA 环介导等温扩增技术是一种特异、灵敏、快速的新型基因检测技术。针对玉米表达载体的花椰菜花叶病毒 35 S 启动子 (CaMV35S) 的 6 个区域设计 4 种特异引物, 对 LAMP 反应的 $MgSO_4$ 、dNTPs、Betaine、内引物、外引物各个成分进行了优化, 此外还对 LAMP 和 PCR 两种不同方法的特异性进行了比较。建立转基因玉米花椰菜花叶病毒 35 S 启动子环介导等温扩增技术检测方法, LAMP 与 PCR 相比具有更高的灵敏度。环介导等温扩增技术检测方法具有时间少、成本低、特异性高、检测方法多样等优势, 为检测转基因玉米花椰菜花叶病毒 35 S 启动子提供了一种更加简便快速的方法。

关键词: 转基因玉米; 环介导等温扩增技术 (LAMP); 检测方法

中图分类号: S513.03 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2011)04-0008-07

Loop-mediated Isothermal Amplification for the Detection of CaMV35S Promoter in Genetically Modified Maize

CHEN Jin-song^{1,2}, HUANG Cong-lin¹, ZHANG Xiu-hai¹, WU Zhong-yi¹

(1. Beijing Agro-Biotechnology Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China; 2. College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100048, China)

Abstract: The objective is to develop a loop-mediated isothermal amplification method for detection of CaMV-35S promoter in Genetically Modified maize. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP), a novel nucleic acid amplification method, was developed for the rapid detection of Genetically Modified maize. Cauliflower mosaic virus 35S (CaMV35S) promoter gene was amplified by a set of four primers that recognize six distinct sequences of the target. The optimized conditions for LAMP were studied using different Mg^{2+} , dNTPs, Betaine and primers concentrations. Furthermore, the sensitivity of LAMP was tested comparing with PCR. The LAMP method can detect CaMV35S promoter from genetically modified maize and their test results were consistent with the results of conventional PCR method. LAMP assay results were found to be more sensitive than the conventional PCR. The LAMP assay is an extremely rapid, highly sensitive, specific method, and will be an effective tool for rapid detection of Genetically Modified maize.

Key words: Genetically modified maize; Loop-mediated isothermal amplification (LAMP); Detection method

自 1996 年转基因作物的第一次商品化,截至 2009 年已有 25 个国家种植商业化的转基因作物,转基因作物耕种面积从 1996 年的 170 万 hm^2 增长到 2009 年的 1.34 亿 hm^2 ,其中转基因玉米为 4 270 万 hm^2 ,占 31%,仅次于转基因大豆。从世界范围看,转基因玉米的种植带来了经济、环境和社会福利

等方面持续可观的利益。转基因玉米 2009 年市场价值预计达到 53 亿美元^[1]。然而转基因玉米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安全性方面。因此,建立有效的转基因玉米快速检测方法,为进一步完善我国在转基因食品标识上的管理

收稿日期: 2010-10-29

基金项目: 国家转基因专项资助项目 (2009ZX08003-009B); 北京市科委项目 (KJCX201102003)

作者简介: 陈金松 (1986-), 女, 浙江温州人, 在读硕士, 主要从事生物化学与分子生物学研究。

通讯作者: 吴忠义 (1969-), 男, 福建泉州人, 副研究员, 主要从事植物逆境分子生物学研究。

制度, 同时在保护消费者知情权方面提供重要的技术保障。

目前, 对转基因农产品采取的主要检测方法一是建立在核酸水平上的, 包括多重 PCR (Multiplex PCR)^[2]、竞争 PCR (Competitive PCR)^[3-5]、实时定量 PCR (Real-time PCR)^[6-8]、PCR-ELISA^[9,10]、核酸印迹法 (Southern 杂交)^[11]; 二是建立在蛋白质水平上的 Western 印记^[12]、酶联免疫吸附测定 (ELISA)^[13] 和免疫试纸条^[14]。由于这些方法存在操作步骤繁琐、检测时间较长; 不适合于现场实时检测和跟踪检测; 检测成本过高; 对检验人员的知识、操作水平和仪器水平要求过高等不足之处, 方法较难普及。Notomi 等^[15] 在 2000 年首次报道一种新的 DNA 扩增方法即 DNA 环介导等温扩增法 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)。该方法的基本特点是针对靶基因的 6 个区域设计 4 种特异引物, 包括内引物 (FIP 和 BIP) 和外引物 (F3 和 B3), 利用一种链置换 DNA 聚合酶 (Bst DNA polymerase) 在恒温条件 (60 ~ 65℃) 保温 1 h, 即可达到 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ 个拷贝, 完成核酸扩增反应, 而且除了琼脂糖凝胶电泳, 扩增产物也直接靠扩增副产物焦磷酸镁沉淀的浊度^[16] 或者荧光染料^[17] 进行判断是否发生反应。LAMP 法广泛应用于细菌、病毒、寄生虫等病原体疫病的检测和胚胎性别的鉴定^[18-21], 但在转基因检测的报道较少^[22,23]。本研究中, 笔者将 LAMP 方法用于检测转基因玉米花椰菜花叶病毒 35

S 启动子 (CaMV35S), 针对 CaMV35S 的 6 个区域设计 4 种特异引物, 并对 LAMP 体系中的 $MgSO_4$ 、dNTPs、Betaine、内引物、外引物各个成分进行了优化, 从而获得检测转基因玉米 CaMV35S 的最合适体系。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源 带有花椰菜花叶病毒 35 S 启动子 (CaMV35S) 的植物表达载体质粒 (pGreen0229-35s-CBF3-DHA) 由北京市农林科学院北京农业生物技术研究中心花卉和重要经济植物课题组实验室保存^[24], 并进行 501 玉米转化而得到转基因抗性苗。

1.1.2 主要试剂和仪器 Bst DNA Polymerase 购于 New England Biolabs, 100 bp ladder marker 购于 New England Biolabs, Betaine 购于 Sigma, 金属恒温混匀仪购于 Eppendorf, PCR 仪购于东胜创新生物科技有限公司, 细胞破碎仪 TissueLyser II 购于 QIA-GEN, Taq 酶购于 TaKaRa, 凝胶分析系统 UVP Gel Document 购于 Bio-rad。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计 2 对引物是由识别 6 个特异性独立区域的 4 条引物组成, 其设计方案如图 1。其中正向内部引物 (FIP) 由 F1c 与 F2 组成, 反向内部引物 (BIP) 由 B1c 与 B2 组成。F3、B3 为正反向外部引物。

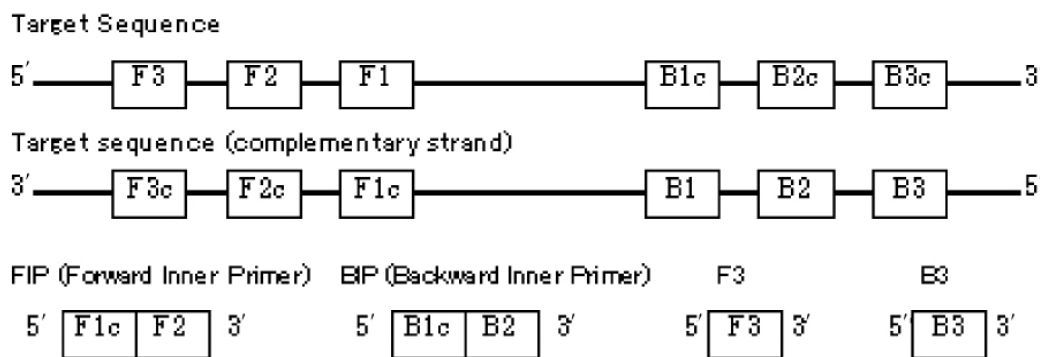


图 1 LAMP 引物设计图

Fig.1 The sketch map of primer design of LAMP

根据 GenBank 登陆号为 EF090408.1 的 CaMV35S 基因序列, 采用 LAMP 专用引物设计软件 (<http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index.html>) 设计引物并进行 Blast 比对, 设计一套特异性的 LAMP 引物, 包括两条外引物 F3、B3 和两条内引物 FIP、BIP。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。CaMV35S 引物序列位置在 2 750 ~ 2 949 bp, 序列见表 1。

1.2.2 DNA 提取及处理 玉米转基因抗性苗总 DNA 提取参照 CTAB^[24] 改进法提取: 取 0.05 g 叶片, 使用细胞破碎仪 TissueLyser II 进行研磨, 加入 1 mL CTAB 65℃ 水浴 50 min。12 000 r/min 4℃ 离心 10 min, 去除沉淀转移上清。用等体积的氯仿异戊醇溶液 ($V_{\text{氯仿}}:V_{\text{异戊醇}} = 24:1$) 抽提, 12 000 r/min 4℃ 离心 7 min。转移上清液, 用等体积的氯仿异戊醇溶液 ($V_{\text{氯仿}}:V_{\text{异戊醇}} = 24:1$) 再次抽提, 12 000 r/min 4℃

离心 7 min。转移上清液,加入等体积的异丙醇沉淀 DNA,离心。弃上清,用乙醇洗沉淀,干燥。溶于含

有 RNA 酶的去离子水中,37℃ 处理 1 h, -20℃ 保存。

表 1 LAMP 引物序列

Tab. 1 LAMP primers for CaMV35S promoter

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
F3	5'-CGGGAACCTCCTCGGAT-3'
B3	5'-CGTGGTTGGAACGTCTTCT-3'
FIP(F1c + F2)	5'-TGGCATTGTAGGTGCCACCTTCCATTGCCAGCTATCTGT-3'
BIP(B1c + B2)	5'-ATCGTTCAAGATGCCTCTGCCGTTCACGATGCTCCTTG-3'

1.2.3 LAMP 反应及条件的优化 LAMP 反应体系:1 μL 的 DNA 模板,2.5 μL 的 10 × Bst polymerase Buffer,1 μL Bst DNA 聚合酶大片段(8 U/μL),Mg²⁺、dNTPs、Betaine 和引物根据试验设置不同的量,加水至 25 μL。

试验中分别对 MgSO₄、dNTPs、Betaine 浓度和内外引物浓度设置不同的浓度梯度进行优化。在试验中先对其中一个因素设定不同梯度,而其他因素则为固定值。Mg²⁺ 终浓度设置了 1,2,4,6,8,10,12 mmol/L 等 7 个不同处理;dNTPs 设置了 0.2,0.5,0.8,1,1.5,2,2.5,3,3.5 mmol/L 等 9 个不同处理;Betaine 设置了 0,0.3,0.5,0.8,1,1.3,1.5 mol/L 等 7 个不同处理;内外引物比设置了 1:1,2:1,4:1,6:1,8:1,10:1 等 6 个不同处理,这个处理中外引物浓度保持 0.2 μmol/L,外引物浓度设置了 0.2,0.4,0.8,1.2,1.6,2.0 μmol/L 等 6 个处理。将配好的溶液混匀,于 65℃ 等温扩增 1 h,80℃ 灭活 10 min。产物于 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析,根据电泳结果,确定最佳 LAMP 反应体系。

1.2.4 PCR PCR 反应引物采用 LAMP 反应中一对外引物 F3 和 B3,基因扩增产物为 172 bp。PCR 反应为 25 μL 体系,10 × PCR Buffer 2.5 μL,2.5 mmol/L dNTPs 2.5 μL,上游和下游引物(10 mmol/L)各 1 μL,5 U/μL Taq 酶 0.25 μL,DNA 模板 1 μL,灭菌去离子水 16.75 μL。

PCR 反应程序为 94℃ 预变性 4 min;94℃ 变性 1 min,54℃ 退火 40 s,72℃ 延长 30 s,循环次数 30;72℃ 延长 7 min。

1.2.5 灵敏度的测验 以带有花椰菜花叶病毒 35 S 启动子(CaMV35S)的质粒(pGreen0229-35S-CBF3-DHA)为模板,原始浓度为 65 ng/μL,分别进行倍比稀释,采用优化的反应体系和反应条件分别进行 LAMP 和 PCR 反应结束后,取 10 μL 反应液,进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,电泳结束后,紫外观察。

1.2.6 利用 LAMP 检测玉米转基因抗性苗 对经过除草剂筛选后所得的 8 株 501 玉米转基因抗性苗分别进行 LAMP 法和 PCR 的检测。

2 结果与分析

2.1 LAMP 反应条件的优化

Mg²⁺ 浓度、dNTPs 浓度、Betaine 浓度和引物浓度等反应条件是影响 LAMP 扩增效果的主要因素,利用 65 ng/μL 质粒(pGreen0229-35S-CBF3-DHA)作为模板,分别对这些参数进行了优化试验。

2.1.1 Mg²⁺ 浓度 试验中使用的 dNTPs 浓度为 1 mmol/L, Betaine 浓度为 0.8 mol/L,内外引物浓度比为 4:1,选择不同的 Mg²⁺ 浓度进行 LAMP 反应,范围为 1 ~ 12 mmol/L,如图 2 所示,当 Mg²⁺ 浓度为 1 mmol/L,反应没有产生 DNA 扩增产物;Mg²⁺ 浓度在 2 ~ 4 mmol/L 范围内,随着 Mg²⁺ 浓度的提高,DNA 扩增产物随之增加;之后随着 Mg²⁺ 浓度提高,DNA 扩增产物随之减少;当 Mg²⁺ 浓度提高到 10 mmol/L 时,反应没有产生 DNA 扩增产物。因此,Mg²⁺ 适宜浓度为 4 mmol/L。

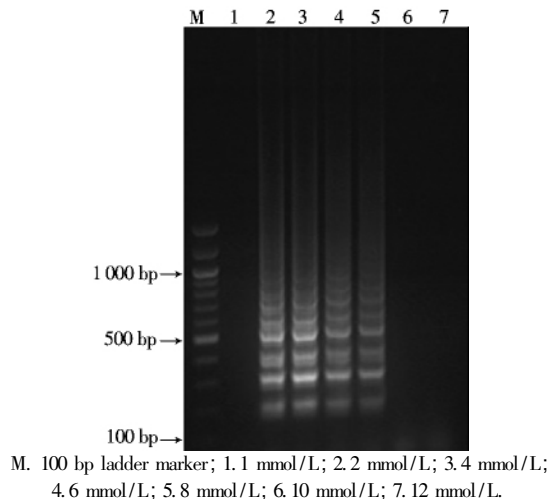
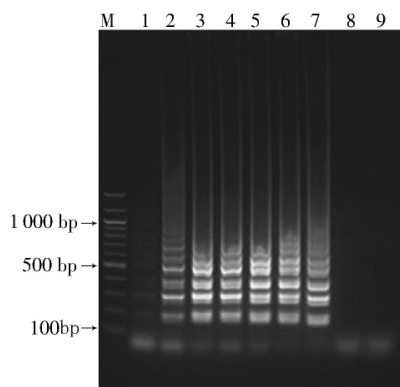


图 2 不同 Mg²⁺ 浓度对 LAMP 的影响
Fig. 2 Effects of the Mg²⁺ concentrations on the LAMP reaction

2.1.2 dNTPs 浓度 试验中使用 Betaine 浓度为 0.8 mol/L, 内外引物浓度比为 4:1, 优化后的 Mg^{2+} 浓度为 4 mmol/L, 选择不同的 dNTPs 浓度进行反应, 范围为 0.2 ~ 3.5 mmol/L。如图 3 所示, dNTPs 浓度在 0.2 ~ 0.8 mmol/L 范围内, 随着 dNTPs 浓度的提高, DNA 扩增产物随之增加; dNTPs 浓度在 0.8 ~ 2.5 mmol/L 范围内, DNA 扩增产物差异不大, 而且扩增产物最多; 当 dNTPs 浓度在 3 ~ 3.5 mmol/L 范围内, 反应没有 DNA 扩增产物。因此, dNTPs 适宜浓度为 0.8 mmol/L。



M. 100 bp ladder marker; 1. 0.2 mmol/L; 2. 0.5 mmol/L; 3. 0.8 mmol/L; 4. 1 mmol/L; 5. 1.5 mmol/L; 6. 2 mmol/L; 7. 2.5 mmol/L; 8. 3 mmol/L; 9. 3.5 mmol/L.

图 3 不同 dNTPs 浓度对 LAMP 的影响

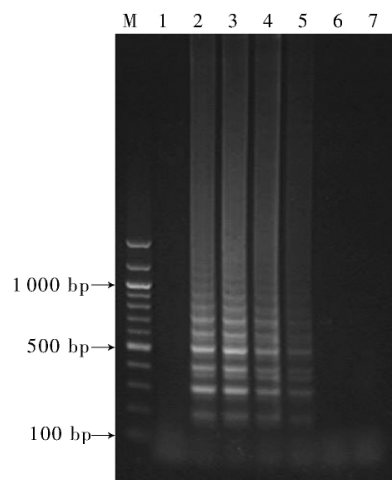
Fig. 3 Effects of the dNTPs concentrations on the LAMP reaction

2.1.3 Betaine 浓度 试验中使用内外引物浓度比为 4:1, 优化后的 Mg^{2+} 浓度为 4 mmol/L, dNTPs 浓度为 0.8 mmol/L, 选择不同的 Betaine 浓度进行反应, 范围为 0 ~ 1.5 mol/L。如图 4 所示, 当 Betaine 浓度为 0 mol/L 时, 反应没有 DNA 扩增产物; 当 Betaine 浓度为 0.3 mol/L 和 0.5 mol/L 时, DNA 扩增产物差异不大, 而且扩增产物最大; Betaine 浓度为 0.5 ~ 1 mol/L 时, 随着 Betaine 浓度的提高, DNA 扩增产物减少; 当 Betaine 浓度为 1.3 mol/L 和 1.5 mol/L 时, 反应没有 DNA 扩增产物。因此, Betaine 最适宜浓度为 0.3 mol/L。

2.1.4 引物浓度 试验中使用优化后的 Mg^{2+} 浓度为 4 mmol/L, dNTPs 浓度为 0.8 mmol/L, Betaine 浓度为 0.3 mol/L, 选择不同的内外引物浓度比进行反应, 范围为 1:1 ~ 10:1。如图 5 所示, 内外引物浓度比为 1:1 ~ 10:1 时, 随着内外引物浓度比的增大, 长片段的 DNA 扩增产物随之减少, 短片段的 DNA 扩增产物随之增多。当内外引物浓度为 4:1 时, 呈现出清晰的典型 LAMP 带型, 反应效果最好。

综上所述: 经优化过后的 LAMP 反应体系为: 4

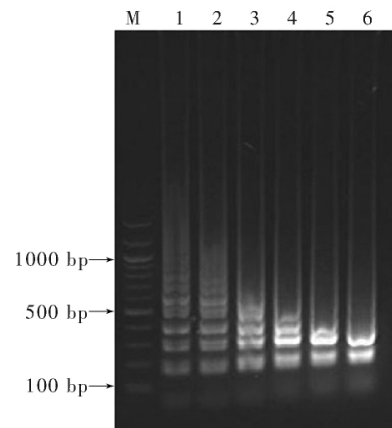
mmol/L Mg^{2+} 、0.8 mmol/L dNTPs、0.3 mol/L Betaine、0.8 μ mol/L 的内引物、0.2 μ mol/L 的外引物、8 U Bst DNA 聚合酶大片段、2.5 μ L 的 10 × Bst polymerase Buffer 以及 1 μ L 的 DNA 模板。



M. 100 bp ladder marker; 1. 0 mol/L; 2. 0.3 mol/L; 3. 0.5 mol/L; 4. 0.8 mol/L; 5. 1 mol/L; 6. 1.3 mol/L; 7. 1.5 mol/L.

图 4 不同 Betaine 浓度对 LAMP 的影响

Fig. 4 Effects of the Betaine concentrations on the LAMP reaction



M. 100 bp ladder marker; 1. 1:1; 2. 2:1; 3. 4:1; 4. 6:1; 5. 8:1; 6. 10:1.

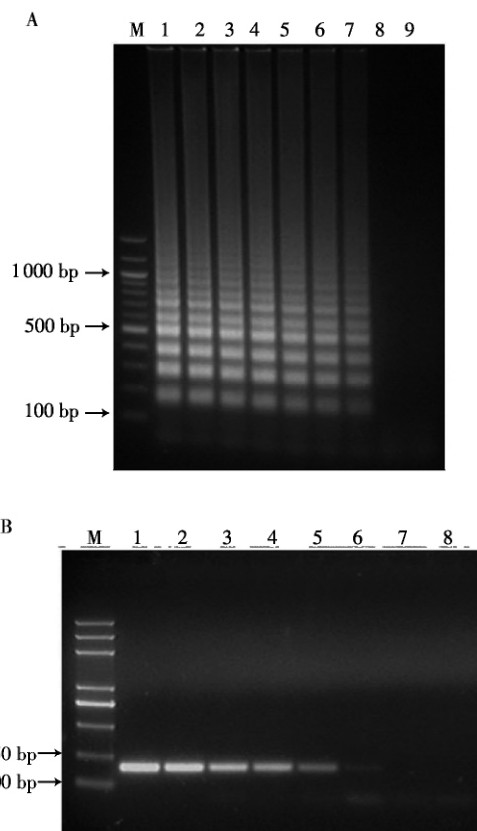
图 5 不同引物浓度比对 LAMP 的影响

Fig. 5 Effects of the ratio outer and inner primer concentrations on the LAMP reaction

2.2 灵敏度测验

检测 LAMP 和 PCR 反应敏感性: 取质粒 (pGreen0229-35s-CBF3-DHA) 原始浓度为 65 ng/ μ L 分别以 10 倍依次进行稀释, 采用优化的反应体系和反应条件, 检测所建立 LAMP 方法的灵敏度。如图 6 所示: 图 A 中泳道 1 ~ 7 中均出现典型的 LAMP 的梯状带型, 当浓度稀释至模板浓度的 1×10^{-7} 时 LAMP 依然可以检测出来, 可检测到 6.5 fg; 图 B 中泳道 1 ~ 5 常规 PCR 都扩增出清晰的 172 bp 大小特异性条

带泳道6扩增出模糊的条带,但当浓度稀释为 1×10^{-7} 时PCR反应就无法检测了,只检测到65~650 fg。电泳结果显示,本研究中建立的LAMP方法的灵敏度是常规PCR方法的10~100倍。



A: LAMP 灵敏度电泳结果: M. 100 bp ladder marker; 1. 1×10^{-1} ; 2. 1×10^{-2} ; 3. 1×10^{-3} ; 4. 1×10^{-4} ; 5. 1×10^{-5} ; 6. 1×10^{-6} ; 7. 1×10^{-7} ; 8. 1×10^{-8} ; 9. 水。B: PCR 灵敏度电泳结果: M. trans 2 kb plus marker; 1. 1×10^{-1} ; 2. 1×10^{-2} ; 3. 1×10^{-3} ; 4. 1×10^{-4} ; 5. 1×10^{-5} ; 6. 1×10^{-6} ; 7. 1×10^{-7} ; 8. 水。

A: Sensitivity of electrophoretic analysis of LAMP products: M. 100 bp ladder marker; 1. 1×10^{-1} ; 2. 1×10^{-2} ; 3. 1×10^{-3} ; 4. 1×10^{-4} ; 5. 1×10^{-5} ; 6. 1×10^{-6} ; 7. 1×10^{-7} ; 8. 1×10^{-8} ; 9. H_2O . B: Sensitivity of electrophoretic analysis of PCR products: M. trans 2 kb plus marker; 1. 1×10^{-1} ; 2. 1×10^{-2} ; 3. 1×10^{-3} ; 4. 1×10^{-4} ; 5. 1×10^{-5} ; 6. 1×10^{-6} ; 7. 1×10^{-7} ; 8. H_2O .

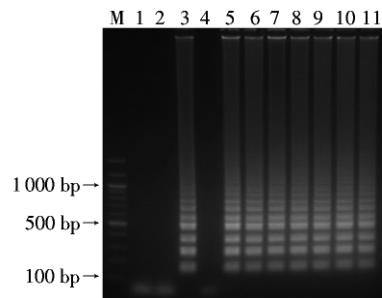
图6 LAMP和PCR检测CaMV35S启动子的灵敏度试验结果
Fig. 6 Detection limit of LAMP and PCR for CaMV35S promoter

2.3 利用LAMP检测玉米转基因抗性苗

2.3.1 LAMP扩增玉米转基因抗性苗 分别以质粒(pGreen0229-35s-CBF3-DHA)和玉米转基因抗性苗为模板对CaMV35S启动子进行LAMP扩增,对LAMP的扩增产物进行的凝胶电泳,结果显示,玉米表达载体和其中7株玉米转基因抗性苗都有明显的条带,呈阶梯状分布;而4号玉米转基因抗性苗没有扩增产物,水和非转基因植株阴性对照结果正常,也没有条带出现(图7)。

2.3.2 PCR扩增玉米转基因抗性苗 为验证LAMP反应的特异性,在对以上模板进行LAMP扩

增的同时,进行PCR扩增,结果见图8。玉米表达载体和其中7株玉米转基因抗性苗都扩增出CaMV35S特异性条带,而其中4号玉米转基因抗性苗则为阴性结果,空白与阴性对照结果正常,与LAMP扩增结果一致。

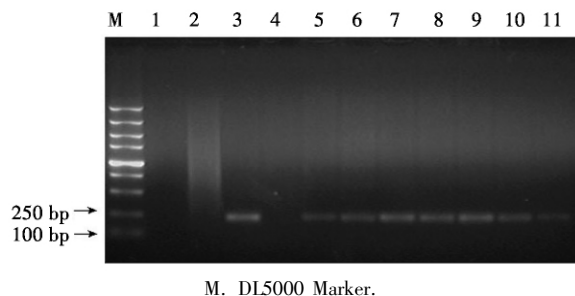


M. 100 bp ladder marker; 1. 水; 2. 非转基因苗; 3. 质粒(pGreen0229-35s-CBF3-DHA); 4~11. 玉米转基因抗性苗。图8同。

M. 100 bp ladder marker; 1. H_2O ; 2. Non-transgenic maize sample; 3. Plasmid (pGreen0229-35s-CBF3-DHA); 4-11. Herbicide resistant maize samples. The same as Fig. 8.

图7 转基因玉米抗性苗的LAMP扩增图谱

Fig. 7 Results of LAMP amplification of transgenic maize



M. DL5000 Marker.

图8 转基因玉米抗性苗的PCR图谱

Fig. 8 Results of PCR amplification of transgenic maize

3 讨论

建立转基因玉米的LAMP检测方法,引物设计是一个非常关键的步骤。LAMP与常规PCR引物相比,LAMP需要4条引物,分别是外引物(F3和B3)和内引物(FIP和BIP),外引物与常规引物功能一样,而内引物能在扩增反应中形成环状,FIP引物包括F1c和F2,BIP包括B1c和B2。设计引物时要注意以下几点:①引物间的距离。F2和B2之间的距离为120~180 bp;F2和F3,B2和B3之间距离为0~20 bp。F2与F1,B2与B1之间碱基数为40~60个。②引物的 T_m 值。一般情况下或富GC时 T_m 值为60~65℃,富AT时 T_m 值为55~60℃。③引物末端的稳定性。F1c与B1c的5'端,F2/B2,F3/B3的3'端6个碱基的dG值要小于-4 kcal/mol。④GC含量与二级结构。一般情况下或富GC时GC含量约50%~60%,富AT时GC含量约40%~50%。引物设计应尽量避免二级结构的产生,3'端不可出

现富 AT 结构或与其他引物互补配对。

据文献 [25] 报道, 为提高 LAMP 反应的速度, 可在原来的反应体系基础上可再设计两条环引物, 通过两条环状引物来加快反应, 环状引物也是通过与茎环结构杂交, 启动链置换 DNA 的合成。本试验只设计了四条特异性引物: 两条内引物和两条外引物, 虽然没有设计环状引物, 但是也能在 1 h 内高效快速地完成试验, 并不影响试验进程。

LAMP 法与其他核酸扩增方法相比, 具有设备要求简单, 操作简便, 高效快速, 特异性高, 灵敏度高等优点。正是因为 LAMP 检测方法的灵敏度高, 因此在试验操作过程中控制交叉污染是这个试验的关键。通过对该试验的分析和总结, 认为可以通过以下措施来防止和排除污染, 保证试验结果准确性: ①污染的预防: 严格遵守分区操作, 隔离配置反应液和检查反应结果的实验室; 对 LAMP 试验的工作桌面及相关器具应定期用 1% 次氯酸钠、75% 酒精、1 mol/L 盐酸或紫外灯进行灭菌和消毒; ②利用 DNA 酶对反应体系的前处理: 每 25 μ L 体系的 LAMP 混合液 (未加模板和酶时) 加入 0.5 U DNase I 酶, 37 $^{\circ}$ C 反应 30 min 后, 65 $^{\circ}$ C 灭活 10 min, 然后加入模板和酶进行 LAMP 扩增。

4 结论

本试验通过检测花椰菜花叶病毒 35 S 启动子 (CaMV35S) 的 LAMP 体系, 优化了反应体系中重要的参数, 其优化过后的 LAMP 反应体系为: 4 mmol/L Mg^{2+} 、0.8 mmol/L dNTPs、0.3 mol/L Betaine、0.8 μ mol/L 的内引物、0.2 μ mol/L 的外引物、8 U Bst DNA 聚合酶大片段、2.5 μ L 的 10 \times Bst polymerase buffer 以及 1 μ L 的 DNA 模板。在等温条件 (65 $^{\circ}$ C 左右) 保温 60 min, 即可完成核酸扩增反应。此方法与常规 PCR 法相比, 设备要求简单, 高效快速, 特异性高, 灵敏度高, 非常适合转基因检测, 有较好的应用价值。

参考文献:

- [1] Clive James. 2009 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, 2010, 30(2): 1-22.
- [2] Matsuoka T, Kuribara H, Akiyama H, *et al.* A multiplex PCR method of detecting combinant DNAs from five lines of genetically modified maize [J]. Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 2001, 42(1): 24-32.
- [3] Hardegger M, Brodmann P, Herrmann A. Quantitative detection of the 35S promoter and the NOS terminator u-

- sing quantitative competitive PCR [J]. European Food Research and Technology, 1999, 209(2): 83-87.
- [4] Hübner P, Studer E, Lüthy J. Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified organisms in food [J]. Food Control, 1999, 10(6): 353-358.
- [5] Studer E, Rhyner C, Lüthy J, *et al.* Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified soybean and maize [J]. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A, 1998, 207(3): 207-213.
- [6] Ahmed F E. Application of molecular biology to biomedicine and toxicology [J]. J Environ Sci Health C, 1995, 11: 1-51.
- [7] Hernández M, Esteve T, Prat S, *et al.* Development of real-time PCR systems based on SYBR[®] Green I, Amplifluor[™] and TaqMan[®] technologies for specific quantitative detection of the transgenic maize event GA21 [J]. Journal of Cereal Science, 2004, 39(1): 99-107.
- [8] Chaouachi M, El Malki R, Berard A, *et al.* Development of a real-time PCR method for the differential detection and quantification of four solanaceae in GMO analysis: potato (*Solanum tuberosum*), tomato (*Solanum lycopersicum*), eggplant (*Solanum melongena*), and pepper (*Capsicum annuum*) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2008, 56(6): 1818-1828.
- [9] Brunnert H J, Spener F, Borchers T. PCR-ELISA for the CaMV-35S promoter as a screening method for genetically modified Roundup Ready soybeans [J]. Eur Food Res Technol, 2001, 213: 366-371.
- [10] Liu G, Su W, Xu Q, *et al.* Liquid-phase hybridization based PCR-ELISA for detection of genetically modified organisms in food [J]. Food Control, 2004, 15(4): 303-306.
- [11] Jennings J C, Albee L D, Kolwyck D C, *et al.* Attempts to detect transgenic and endogenous plant DNA and transgenic protein in muscle from broilers fed yield gard corn borer corn [J]. Poultry Sci, 2003, 82(3): 371-380.
- [12] Gert Van Duijn, Ria Van Biert, Henriëtte Bleeker-Marcelis, *et al.* Detection methods for genetically modified crops [J]. Food Control, 1999, 10: 375-378.
- [13] Rogan G J, Dudin Y A, Lee T C, *et al.* Immunodiagnostic methods for detection of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in Roundup Ready soybeans [J]. Food Control, 1999, 10: 407-414.
- [14] 阚贵珍, 喻德跃. 试纸条法和 PCR 法检测抗草甘膦转基因大豆的外源基因 [J]. 中国油料作物学报, 2005, 27(4): 18-21.
- [15] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic

- Acids Research ,2000 ,28(12) : 12.
- [16] Yasuyoshi Mori ,Kentaro Nagamine ,Norihito Tomita ,*et al.* Detection of loop-mediated Isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications ,2001 ,289(1) : 150 – 154.
- [17] Tomotada Iwamoto ,Toshiaki Sonobe ,Kozaburo Hayashi. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex ,*M. avium* , and *M. intracellulare* in sputum samples [J]. Journal of Clinical Microbiology ,2003 ,41(6) :2616 – 2622.
- [18] Akihiro Yoshida ,Shiori Nagashima ,Toshihiro Ansai ,*et al.* Loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of the periodontopathic bacteria *Porphyromonas gingivalis* ,*Tannerella forsythia* , and *Treponema denticola* [J]. Journal of Clinical Microbiology ,2005 ,43(5) : 2418 – 2424.
- [19] Manmohan Parida ,Kouhei Horioka ,Hiroyuki Ishida ,*et al.* Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay [J]. Journal of Clinical Microbiology ,2005 ,43(6) :2895 – 2903.
- [20] Hiromi Ikada ,Hiroko Tanaka ,Nona Shibahara ,*et al.* Molecular evidence of infections with babesia gibsoni parasites in Japan and evaluation of the diagnostic potential of a loop-mediated isothermal amplification method [J]. Journal of Clinical Microbiology ,2004 ,42(6) : 2465 – 2469.
- [21] Hiroki Hirayama ,Soichi Kageyama ,Satoru Moriyasu ,*et al.* Rapid sexing of bovine preimplantation embryos using loop-mediated isothermal amplification [J]. Theriogenology ,2004 ,62:887 – 896.
- [22] Shiro Fukuta ,Yuko Mizukami ,Akira Ishida ,*et al.* Real-time loop-mediated isothermal amplification for the CaMV-35S promoter as a screening method for genetically modified organisms [J]. Eur Food Res Technol ,2004 218:496 – 500.
- [23] 王永兰,青阔赵新,等. 转基因作物外源转基因成分环介导等温扩增技术检测方法的建立及应用 [J]. 中国农业科学 2009 42(4) :1473 – 1477.
- [24] 梁蕊芳. 利用基因枪轰击法将 NHX1、CBF 耐逆相关基因导入高羊茅 (*Festuca arundinacea* Schreb.) [D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2005.
- [25] Murray M G ,Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight DNA [J]. Nucleic Acids Research ,1980 ,8(19) : 4321 – 4325.
- [26] 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.