

环介导等温扩增技术(LAMP)在转基因大豆DBN9004品系快速检测中的应用

麦晓东¹, 石磊², 常彦磊³, 韩宏娇^{1*}

(1. 新疆农业大学食品科学与药学学院, 新疆乌鲁木齐 830000) (2. 暨南大学食品安全与营养研究院, 广东广州 510632)

(3. 广州双螺旋基因技术有限公司, 广东广州 510320)

摘要: 耐除草剂转基因大豆 DBN9004 为我国自主研发的品系, 已于 2021 年获得农业转基因生物安全证书, 具有广阔的应用前景。为了给该品系的转基因生物安全监管提供快捷可靠的技术支撑, 该研究基于环介导等温扩增技术 (Loop-mediated Isothermal Amplification, LAMP), 针对 DBN9004 的 3' 端边界序列设计了 LAMP 扩增引物组, 并建立了扩增时间约为 45 min 的快速检测体系。该体系能有效区分 DBN9004 和其他转基因大豆品系, 具有较高的特异性。对含有 DBN9004 序列的重组质粒的检测灵敏度达 $10 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 对 DBN9004 的基因组 DNA 的检测灵敏度达 $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 对混合阳性样品的检测灵敏度的体积分数达 0.5%。该体系具有时间短、特异性以及灵敏度高等优点, 对推动该品系的现场转基因产品核酸检测技术的发展具有重要的促进作用。因此, 该体系的建立为 DBN9004 的快速筛查和生物安全监管提供了实用可靠的理论基础。

关键词: 环介导等温扩增 (LAMP); 转基因大豆 DBN9004 品系; 快速检测

文章编号: 1673-9078(2026)7-295-301

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.7.0561

Application of Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) in Rapid Identification of Genetically Modified Soybean Variety DBN9004

MAI Xiaodong¹, SHI Lei², CHANG Yanlei³, HAN Hongjiao^{1*}

(1.College of Food Science and Pharmacy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830000, China)

(2.Institute of Food Safety and Nutrition, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

(3.Guangzhou Double Helix Gene Technology Co. Ltd., Guangzhou 510320, China)

Abstract: Herbicide-tolerant genetically modified soybean DBN9004, independently developed in China, was granted the agricultural genetically modified organism (GMO) safety certificate in 2021, demonstrating extensive application prospects. To provide prompt and reliable technical support for the GMO biosafety supervision of this variety, loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technology was employed in this study. A set of LAMP amplification primers targeting the 3'-end boundary sequence of DBN9004 was designed to establish a rapid detection method for DBN9004 with an amplification time of approximately 45 min. This system effectively distinguished DBN9004 from other genetically modified soybean varieties, demonstrating strong specificity. Furthermore, detection sensitivity was $10 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ for recombinant plasmids containing DBN9004 sequences, $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ for DBN9004 genomic DNA, and 0.5% for positive mixed samples. The results demonstrate that this system offers several

引文格式:

麦晓东, 石磊, 常彦磊, 等. 环介导等温扩增技术(LAMP)在转基因大豆DBN9004品系快速检测中的应用[J]. 现代食品科技, 2026, 42(7): 295-301.

MAI Xiaodong, SHI Lei, CHANG Yanlei, et al. Application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in rapid identification of genetically modified soybean variety DBN9004 [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(7): 295-301.

收稿日期: 2025-04-21; 修回日期: 2025-07-14; 接受日期: 2025-07-20

作者简介: 麦晓东 (2004-), 男, 本科生, 研究方向: 食品安全与检测技术, E-mail: 3177914427@qq.com

通讯作者: 韩宏娇 (1994-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品加工与利用, E-mail: hhxjau@126.com

advantages, including a short processing time and high specificity and sensitivity, thereby playing a critical role in advancing on-site nucleic acid detection technology for genetically modified products of this soybean variety. Therefore, this system provides a practical and reliable technical foundation for the rapid screening and biosafety regulation of DBN9004.

Key words: loop-mediated isothermal amplification (LAMP); genetically modified soybean variety DBN9004; rapid detection

1993 年转基因番茄在美国的上市标志着转基因植物开始作为商品进入大众的视线,而转基因植物的种植面积也在随后的及时年迅速增长。截至 2019 年,全球已有 29 个国家种植了转基因作物,当年度的种植面积为 1.904 亿 hm^2 , 相比于 1996 年增加了约 112 倍,累计总种植面积已经达到 27 亿 hm^2 , 其中约 48% 的转基因种植面积被用于种植转基因大豆^[1]。伴随转基因植物的大量种植,转基因植物相关的食品安全性也受到了公众的广泛关注,大部分国家已依据自身国情对转基因植物制定了明确的监管法规^[2]。其中转基因生物的阈值标识制度被认为是比较有效监管的技术保障,比如美国实行阈值为 5.0% 的自愿标识制度;欧盟实行阈值为 0.9% 的强制性标识制度,韩国为 3.0%,日本为 5.0%,而我国对转基因产品实行最严格的零阈值强制标识制度^[3,4]。

现阶段针对转基因植物成分的检测包括基于蛋白质的检测方法以及以聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 技术及其衍生出的巢式 PCR、多重 PCR、实时荧光定量 PCR^[5-9]。鉴于基于蛋白质的方法无法检测启动子或终止子等非编码序列,所以基于 DNA 的 PCR 被认为可以作为检测转基因作物的金标准^[6,10]。大部分 PCR 检测技术的应用都依赖于昂贵的设备以及专业的操作人员,严重限制了这一检测技术的应用,一些需要现场快速检测的基层机构不能将这些方法作为常规诊断技术^[11,12]。环介导等温扩增技术 (Loop-mediated Isothermal Amplification, LAMP) 是在 PCR 技术基础上发展而来的一种恒温核酸检测技术,其特点是只需恒定温度 (60~65 $^{\circ}\text{C}$) 即可完成扩增反应,并且反应时间短,通常不到 1 小时即可完成^[13,14]。该技术具有高特异性、高效扩增、操作简便等优点,已经在转基因成分分析^[15-22]、病毒检测^[23-27]、食品中动植物源性成分鉴定^[28,29]等多个领域得到了广泛应用。我国农业农村部也于 2020 年 8 月颁布了《转基因植物及其产品成分检测 环介导等温扩增方法制定指南》^[30],进一步推进了 LAMP 作为检测技术在我国转基因成分检测过程的应用。

转基因大豆品系 DBN9004 是我国开发的新型耐除草剂大豆品种,由于其基因组中含有耐草甘膦基因 (*epsps*)^[31] 和耐草铵膦基因 (*pat*)^[32],该品种可同时耐

受除草剂草甘膦和草铵膦,已于 2021 年获得农业转基因生物安全证书,具有广阔的应用前景。赵新等^[33]已针对 DBN9004 建立了 qPCR 和 ddPCR 定量检测方法,为转基因大豆 DBN9004 的检测提供了基础,然而,尚未报道针对该品系的快速检测方法。该研究旨在利用 LAMP 技术,以 DBN9004 的 3' 端边界序列为靶标,建立一种快速便捷的 DBN9004 的检测方法,以推动该品系的现场转基因产品核酸检测技术的发展。

1 材料与方法

1.1 实验样品

转基因大豆品系 GTS40-3-2、中黄 6106 (ZH10-6)、DBN9004 以及转基因玉米品系 MON810、双抗 12-5、DBN9036 均选购于农业农村部科技发展中心。其余非转基因植物样品购自广州市超市,其中 10 份为大豆,5 份为玉米。

1.2 实验试剂

植物基因组提取试剂盒,广州双螺旋基因技术有限公司;无 DNA/RNA 酶去离子水,天根生化科技 (北京) 有限公司;DNA 扩增试剂盒 (恒温扩增法),广州双螺旋基因技术有限公司;2 $\times$ RM-SCI Buffer (包含 2.8 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs, 40 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl, 16 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgSO_4 , 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.6 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甜菜碱),广州双螺旋基因技术有限公司;SYTO 9 绿色荧光核酸染料,Life technology; *Bst* 聚合酶,NEB; 1 $\times$ TE buffer, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

1.3 实验仪器

96E 实时荧光 PCR 仪,西安天隆科技有限公司;Nanodrop 微量分光光度计,Thermo Fisher 美国;10、100、1 000 μL 微量移液器,Eppendorf 德国;5418 离心机,Eppendorf 德国。

1.4 实验方法

1.4.1 引物设计及重组质粒合成

根据王登元等^[34]的专利所提供的边界序列及注释信息,确定插入序列和大豆基因组的边界位置。使

用在线 LAMP 引物设计软件 PrimerExploer V5 对 DBN9004 的插入序列 3' 端附近的边界序列进行引物设计, 基于引物位置、引物长度、Tm 值、GC 含量以及是否存在二级结构对软件的候选引物进行筛选。使用美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information) 的 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 对候选引物的特异性进行评估, 最后筛选出 1 套跨越边界位置的引物。委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行合成相应引物以及含有其对应扩增子序列的重组质粒。引物序列及其位置见表 1 及图 1。

表 1 引物信息
Table 1 Primers information

引物名称	序列 (5'-3')	位置	长度
F3	GGGTTTATTTATAGCTACAACCTCTT	83 107	25
B3	TGATGAACCTAGATCCACAA	298 317	20
FIP	F1c AGCAGAGAAGGATACAAACGGA	149 170	22
	F2 TCTTCTGTTTACGAAATTACCCTTA	109 133	25
BIP	B1c GTGCTTCTCACGTCTCGTAGTTAA	205 228	24
	B2 TTCAAACACTGATAGTTTAAACG	266 288	23
LB	CTTGATAACGCGGCCGCTCT	230 249	20

GAAGAAGCTGCGCTAAACCCTAGCCGCAAGAGAAGAAGAGTGAACAAGGTGTGAAGAGAAGTA

ATGCGACGAGGGTTAGAGGGTTTATTTATAGCTACAACCTCTTTCTTCTGTTTACGAAATTACCCTTAC

TAATTTACCCTAGTTCGGTTTGTATCCTTCTCTGCTTTCGTAGCGACAATTGAAACGCTCGCTAAAGCG

CGTGCTTCTCACGTCTCGTAGTTAAGCTTGATAACGCGGCCGCTCTAGGGCGCGCCGGTCCCGTTTA

AACTATCAGTGTGGAAGACAATTTTGTGGATCTAGGTTATCACCTACATCTTTTCTTTTATTTAATT

TAAATATTTGTTAATTCATTAATTTTCTTCGGTCATTCTTCCACATAATTACCAATTAATTTGAGTAAT

ACAGCTCTAAATATCTTTTTTAAATGATAATTATTACAAACAACAACAACAACGCTTATCCCACTA

GGTGGGGTGCAGTACATGGATCAACTCCGTCATAATGTTCTATCAAGTACCATACTTCTATCCAAATCAATA

GTTGAGGTCCTCTTGATAACCTCTCTTATAATCTTTTGGGCTCTCTCTGCCTCGAA

图 1 转基因大豆品系 DBN9004 3' 端边界序列及 LAMP 各引物位置

Fig.1 The 3' end border sequence of transgenic soybean event DBN9004 and the position of each LAMP primer

注: 下划线为插入片段, 斜体为大豆基因组片段。

1.4.2 DNA提取

采用植物基因组提取试剂盒 (广州双螺旋基因技术有限公司), 对所有样品进行核酸提取操作。提取过程严格遵循试剂盒说明书中详细阐述的步骤逐步执行。完成核酸提取后, 利用 Nanodrop One 仪器对所提取核酸的浓度进行测定。测定完成后, 依据测定结果, 将核酸质量浓度调整至 10~100 ng·μL⁻¹ 的范围, 以满足后续实验对核酸质量浓度的要求。

1.4.3 LAMP反应体系的构建

参考 DNA 扩增试剂盒构建反应体系: 其中 2×RM-SCI Buffer 12.5 μL, 外引物 F3 及 B3 终浓度 0.2 μmol·L⁻¹, FIP 及 BIP 终浓度为 1.6 μmol·L⁻¹, 环引物 LB 终浓度 0.8 μmol·L⁻¹, Bst 酶 8 U, SYTO 9 绿色荧光核酸染料 0.5 μL, 模板 2 μL, 其余用超纯水补足到 25 μL。反应温度为 63 ℃: 反应时间为 45 min, 设置信号每隔 1 min 采集一次荧光。

1.4.4 LAMP反应体系特异性分析

参照 1.4.3 的反应体系及条件对转基因大豆品系 DBN9004、GTS40-3-2、中黄 6106 (ZH10-6)、转基因玉米品系 MON810、双抗 12-5、DBN9036、10 份市販大豆, 5 份市販玉米进行检验, 以评价该方法的特异性。

1.4.5 以质粒为模板的LAMP反应体系灵敏度分析

以重组质粒 (100 ng·μL⁻¹) 作为原液, 使用 1×TE Buffer 对其进行 10 倍梯度稀释, 获得 1 ng·μL⁻¹、100、10、1 pg·μL⁻¹、100、10、1 fg·μL⁻¹, 共计 7 个梯度。依照 1.4.3 的反应体系及条件对这 7 个梯度进行扩增以确定体系灵敏度。每个梯度进行 3 个重复。另设超纯水作为阴性对照, 进行 3 个重复。

1.4.6 以基因组为模板的LAMP反应体系灵敏度分析

采用植物基因组提取试剂盒对转基因大豆 DBN9004 标准品进行核酸提取操作。提取过利用 Nanodrop One 仪器对所提取核酸的浓度进行测定。将核酸质量浓度调整至 100 ng·μL⁻¹, 以 100 ng·μL⁻¹ 的核酸为原液, 使用 1×TE Buffer 对其进行 10 倍梯度稀释, 获得 10、1 ng·μL⁻¹、100、10、1 pg·μL⁻¹、100 fg·μL⁻¹, 共计 6 个梯度。依照 1.4.3 的反应体系及条件对这 7 个梯度进行扩增以确定体系灵敏度。每个梯度进行 3 个重复。另设超纯水作为阴性对照, 进行 3 个重复。

1.4.7 以混合阳性样品为模板的LAMP反应体系灵敏度分析

采用植物基因组提取试剂盒对基因大豆 DBN9004 标准品以及非转基因大豆进行核酸提取操作, 利用 Nanodrop One 仪器对所提取核酸的浓度进行测定。将核酸质量浓度调整至 100 ng·μL⁻¹, 以不同比例混合 DBN9004 基因组 DNA 和非转基因大豆基因组 DNA, 制备成添加体积分数分别为 0.1%、0.5%、1%、5%、10% 以及 50% 的 DBN9004 阳性模拟样品, 依照 1.4.3 的反应体系及条件对这 6 个梯度进行扩增以确定体系灵敏度。每个梯度进行 3 个重复。另设超纯水作为阴性对照, 进行 3 个重复。

1.4.8 重复性以及数据分析

取体积分数为 50%、5%、0.5% 的阳性模拟样品,以重组质粒 ($100 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 作为阳性对照,以超纯水作为阴性对照。参照 1.4.3 所述的体系,进行重复性分析。针对每个浓度的阳性模拟样品以及阴性对照,设置 20 个生物重复样本,每个样本设置 2 个技术重复样本。计算不同浓度的 Ct 值的平均值 (Mean)、标准差 (SD) 以及变异系数 (CV) 以评估稳定性。

$$CV = \frac{SD}{Mean} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

CV——变异系数;

SD——标准差;

Mean——平均值。

2 结果与讨论

2.1 LAMP非特异性扩增风险分析结果

利用 DBN9004 的特异性引物对阳性对照 (质量浓度为 $100 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 重组质粒) 以及阴性对照 (超纯水) 进行环介导等温扩增,验证 DBN9004 引物的非特异性扩增风险。仅有阳性对照产生显著的 S 形荧光扩增曲线, Ct 值为 11.92; 阴性对照均无荧光扩增信号 (图 2), 说明所设计的 LAMP 反应体系中各引物之间不会自发产生非特异性扩增。

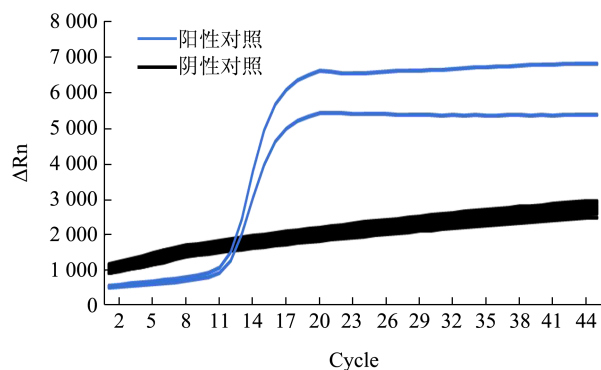


图 2 LAMP 非特异性扩增风险分析

Fig.2 Non-specific amplification analysis of LAMP detection system

2.2 LAMP反应体系特异性分析结果

利用 DBN9004 的特异性引物对转基因大豆品系 GTS40-3-2、中黄 6106 (ZH10-6)、DBN9004 以及转基因玉米品系 MON810、双抗 12-5、DBN9036、非转基因植物的基因组 DNA 以及阴性对照 (超纯水) 进行环介导等温扩增,验证该反应体系的特异性 (图 3)。

仅有 DBN9004 产生显著的 S 形荧光扩增曲线, Ct 值为 11.121, 而转基因大豆品系 GTS40-3-2、中黄 6106 (ZH10-6) 以及转基因玉米品系 MON810、双抗 12-5、DBN9036、非转基因植物以及阴性对照 (超纯水) 均无荧光扩增信号 (图 3), 说明该反应体系具有较好的特异性,可特异性地扩增 DBN9004 成分。

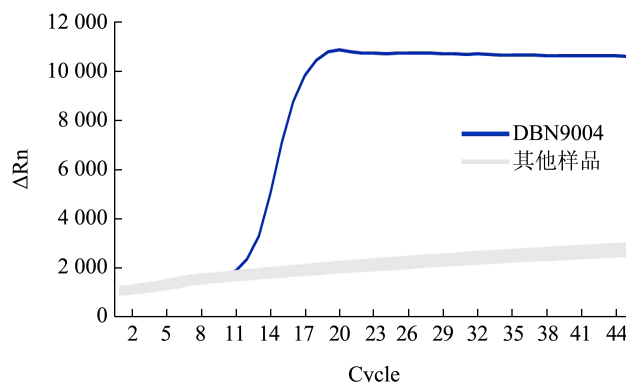


图 3 LAMP 反应体系特异性分析

Fig.3 Specificity analysis of LAMP detection system

2.3 以质粒为模板的LAMP反应体系灵敏度分析结果

为了评估反应体系的灵敏程度,该研究开展了相关实验。首先,把浓度为 $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的重组质粒当作原液,采用 $1 \times \text{TE Buffer}$ 对其做 10 倍梯度稀释,得到质量浓度分别是 $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $100 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $10 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $1 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $100 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $10 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $1 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的质粒样本,同时以超纯水作为阴性对照 (见图 4)。之后,对这些不同浓度的质粒样本以及阴性对照实施环介导等温扩增。

从实验结果来看,质量浓度为 $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $100 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $10 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $1 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $100 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $10 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $1 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的质粒都能出现明显的 S 形荧光扩增曲线。各浓度对应的 Ct 值平均数分别为 5.28、6.83、8.81、10.16、11.93、15.12。但对于质量浓度为 $1 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的质粒,没有检测出形成明显的 S 曲线的信号,表明该引物不能检出质量浓度为 $1 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的质粒。

标准曲线的 R^2 为 0.980 9,具有高度线性 (见图 5)。此结果证明了该体系在检出限范围内具备可靠的定量能力以及高灵敏度。

根据上述结果能够判定,该分析体系的检测下限为 $10 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。需要指出的是,这一结果高于赵新等^[33]利用 qPCR 技术得出的检测下限 ($25 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 大约 20 拷贝)。需要注意的是,赵新等的研究用的是基因组 DNA,而该研究用的是质粒。所以,若要进行更有成效的对比,还需要用基因组 DNA 进一步开展实验。

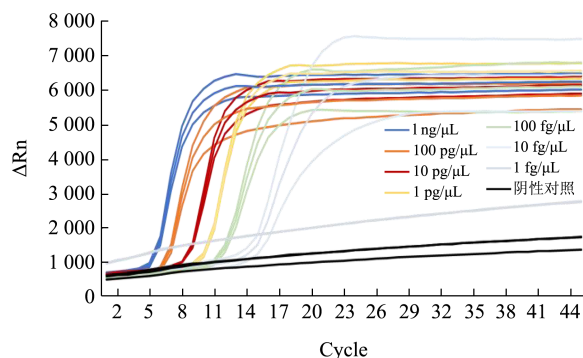


图4 以质粒为模板的 LAMP 反应体系灵敏度分析

Fig.4 Sensitivity analysis of LAMP detection system for plasmid

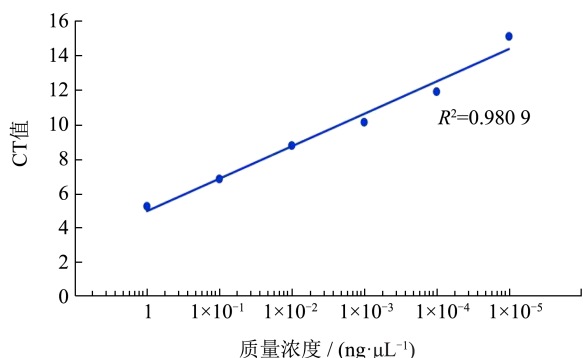


图5 LAMP 反应体系标准曲线

Fig.5 Standard curve of LAMP detection system

2.4 以基因组为模板的LAMP反应体系灵敏度分析结果

为了评估反应体系的对于大豆基因组的灵敏程度, 该研究开展了相关实验。首先, 以 $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的核酸为原液, 使用 $1 \times \text{TE Buffer}$ 对其进行 10 倍梯度稀释, 获得 $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $100 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $10 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $1 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $100 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $10 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 共计 6 个梯度, 同时以超纯水作为阴性对照 (见图 6)。之后, 对这些不同浓度的质粒样本以及阴性对照实施环介导等温扩增。

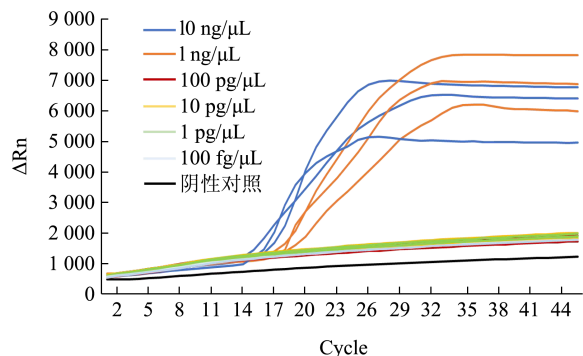


图6 以基因组 DNA 为模板的 LAMP 实际样品反应体系灵敏度分析

Fig.6 Sensitivity analysis of LAMP detection system for genomic DNA

从实验结果来看, 质量浓度为 10 、 $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的基因组核酸能出现明显的 S 形荧光扩增曲线。各浓度对应的 Ct 值平均数分别为 15.40 以及 17.32 。表明该引物不能检出质量浓度低于 $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的基因组 DNA。

该体系对基因组 DNA 的检测下限为 $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 低于赵新等^[33]利用 qPCR 技术得出的检测下限 ($25 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 大约 20 拷贝), 但对于高浓度的样品, 本方法能在 30 min 以内得出结果, 相比于赵新等的 qPCR 法具备更短的时效性, 更适合于现场快速检测。

2.5 以混合阳性样品为模板的LAMP反应体系灵敏度分析结果

为了评估反应体系对混合阳性样品的灵敏程度, 取 0.1% 、 0.5% 、 1% 、 5% 、 10% 以及 50% 的 DBN9004 阳性模拟样品, 除 0.1% 外都能出现明显的 S 形荧光扩增曲线 (见图 7)。各浓度对应的 Ct 值平均数分别为 15.63 、 14.35 、 13.45 、 12.86 、 11.20 。

根据上述结果能够判定, 该分析体系对混合阳性样品的检测下限为 0.5% , 和赵新等^[33]利用 qPCR 技术得出的检测下限 0.05% 有一定差距, 但对于浓度为 0.5% 以上的样品, 本方法能在 30 min 以内得出结果, 相比于赵新等的 qPCR 法具备更短的时效性, 更适合于现场快速检测。

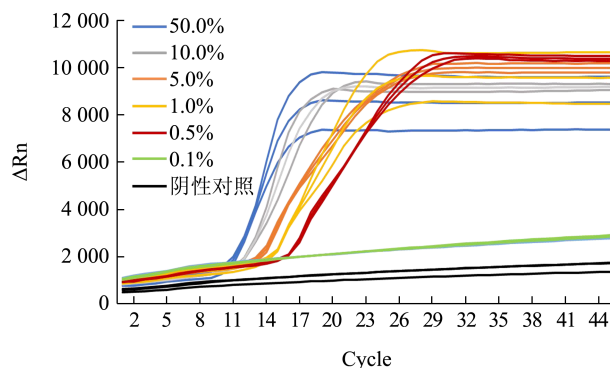


图7 LAMP 实际样品反应体系灵敏度分析

Fig.7 Sensitivity analysis of LAMP detection system for positive mixed samples

2.6 LAMP反应体系重复性分析

取体积分数 50% 、 10% 、 1% 的阳性模拟样品, 以重组质粒 ($100 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 作为阳性对照, 以超纯水作为阴性对照。参照 1.4.3 所述的体系, 进行重复性测试。其中, 阳性模拟样品以及阴性对照设置 20 个重复样本。结果见表 2 以及表 3。经计算可知, 高体积分数 (50%) 的 Ct 值变异系数为 0.23% , 中体积分数 (5%) 的 Ct 值变异系数为 2.25% , 低体积分数 (0.5%) 的 Ct 值变异系数为 1.73% , 表明建立的反应体系重复性良好。

表 2 阳性模拟样品重复性分析结果

Table 2 Repeatability analysis of positive simulated samples

样品 编号	Ct 值（50%）		Ct 值（5%）		Ct 值（0.5%）	
1	11.07	11.05	13.42	13.30	15.61	15.13
2	11.09	11.08	13.08	13.10	15.81	15.85
3	11.02	11.06	13.71	13.95	15.24	15.26
4	11.08	11.10	13.47	13.02	15.74	15.18
5	11.01	11.08	13.67	13.32	15.72	15.24
6	11.08	11.10	13.44	13.20	15.61	15.21
7	11.10	11.04	13.54	13.02	15.39	15.48
8	11.08	11.03	13.38	13.84	15.20	15.85
9	11.04	11.07	13.31	13.91	15.05	15.58
10	11.06	11.09	13.51	13.99	15.21	15.73
11	11.07	11.05	13.42	13.30	15.61	15.13
12	11.09	11.08	13.08	13.10	15.81	15.85
13	11.02	11.06	13.71	13.95	15.24	15.26
14	11.08	11.10	13.47	13.02	15.74	15.18
15	11.01	11.08	13.67	13.32	15.72	15.24
16	11.08	11.10	13.44	13.20	15.61	15.21
17	11.10	11.04	13.54	13.02	15.39	15.48
18	11.08	11.03	13.38	13.84	15.20	15.85
19	11.04	11.07	13.31	13.91	15.05	15.58
20	11.06	11.09	13.51	13.99	15.21	15.73

表 3 对照组样品重复性分析结果

Table 3 Repeatability analysis of control samples

样品编号	Ct 值（阳性）		Ct 值（阴性）	
1	11.87	11.75	-	-
2	11.83	11.90	-	-
3	11.48	11.22	-	-
4	11.68	11.19	-	-
5	11.23	11.83	-	-
6	11.30	11.47	-	-
7	11.85	11.28	-	-
8	11.72	11.46	-	-
9	11.81	11.53	-	-
10	11.77	11.26	-	-
11	11.47	11.72	-	-
12	11.43	11.41	-	-
13	11.22	11.45	-	-
14	11.51	11.41	-	-
15	11.72	11.59	-	-
16	11.78	11.53	-	-
17	11.81	11.23	-	-
18	11.27	11.71	-	-
19	11.59	11.74	-	-
20	11.22	11.85	-	-

3 结论

在转基因大豆检测领域，准确高效的技术十分关键。该研究针对转基因大豆品系 DBN9004，基于其 3' 端边界序列设计 LAMP 扩增引物组，成功构建了快速检测体系。

该检测体系具备显著优势：扩增过程耗时约 45 min，结果可在扩增完成后约 30 min 内完成判读，显著缩短了总检测时间，适用于现场快速检测；体系表现出良好的非特异性稳定性，有效避免了假阳性结果，确保了检测的可靠性；其特异性强，引物组可特异性识别 DBN9004 特异性序列，可准确区分目标品系 DBN9004 与多种非目标转基因材料，包括大豆品系 GTS40-3-2、中黄 6106（ZH10-6），玉米品系 MON810、双抗 12-5、DBN9036 等；灵敏度高，对含 DBN9004 序列的重组质粒检测下限为 10 fg·μL⁻¹，对 DBN9004 基因组 DNA 的检测下限为 1 ng·μL⁻¹，对含 DBN9004 的混合阳性样品的检测下限为 0.5%。重复性良好，高（50%）、中（5%）、低（0.5%）浓度的阳性混合样品的变异系数分别为 0.23%、2.25% 和 1.73%。

实验结果表明，此体系集耗时短、特异性好、灵敏度、重复性好等较高诸多优点于一身。在转基因产品现场检测中，传统方法难以满足快速检测需求，而本体系有望为 DBN9004 品系的现场核酸检测提供高效方案，推动相关检测技术发展，助力转基因产品监管与质量把控。

参考文献

[1] 国际农业生物技术应用服务组织,张恬编译,张宏翔译校.2019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, 2021, 41(1):6.

[2] LOU Y, CHEN C, LONG, X, et al. Detection and quantification of chimeric antigen receptor transgene copy number by droplet digital PCR versus real-time PCR [J]. The Journal of Molecular Diagnostics, 2020, 22(5): 699-707.

[3] 徐琳杰,刘培磊,熊鹏,等.国际上主要国家和地区农业转基因产品的标识制度[J].生物安全学报,2014,23 (4):301-304.

[4] ZENG H, WANG J, JIA J, et al. Development of a lateral flow test strip for simultaneous detection of BT-Cry1Ab, BT-Cry1Ac and CP4 EPSPS proteins in genetically modified crops [J]. Food Chemistry, 2021, 335: 127627.

[5] 蒋亦武,黄明,王保战,等.转基因大豆及制品中转基因成分检测技术研究进展[J].江苏农业科学, 2011,1:4.

[6] XIAO B, WANG M, ZHANG J, et al. Rapid DNA extraction and microfluidic LAMP system in portable equipment for GM crops detection [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2024, 411: 135716.

[7] WANG X, XIE S, CHEN X, et al. A rapid and convenient method for on-site detection of MON863 maize through real-

- time fluorescence recombinase polymerase amplification [J]. Food Chemistry, 2020, 324: 126821.
- [8] ZENG H, YANG Q, LIU H, et al. A sensitive immunosensor based on graphene-PAMAM composites for rapid detection of the CP4-EPSPS protein in genetically modified crops [J]. Food Chemistry, 2021, 361: 129901.
- [9] MAZZARA M, PAOLETTI C, CORBISIER P, et al. Kernel lot distribution assessment (KeLDA): a comparative study of protein and DNA-based detection methods for GMO testing [J]. Food Analytical Methods, 2013, 6: 210-220.
- [10] QIAN, C, WANG R, WU H, et al. Recent advances in emerging DNA-based methods for genetically modified organisms (GMOs) rapid detection [J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2018, 109: 19-31.
- [11] WANG F, FENG J, YE S, et al. Development of a multiplex fluorescence quantitative PCR for detection of genetically modified organisms [J]. Biologia, 2018, 73: 21-29.
- [12] NADEEM SA, MUGHAL D, BUTT NA, et al. Utilization of corn silk for GMO detection through real-time PCR [J]. Waste and Biomass Valorization, 2023, 14.12: 4313-4322.
- [13] NOTOMI, T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): e63.
- [14] 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.
- [15] SINGH M, PAL D, SOOD P, RANDHAWA G. Construct-specific loop-mediated isothermal amplification: rapid detection of genetically modified crops with insect resistance or herbicide tolerance [J]. Journal of AOAC International, 2020, 103(5): 1191-1200.
- [16] WU H, ZHANG X, WU B, et al. Rapid on-site detection of genetically modified soybean products by real-time loop-mediated isothermal amplification coupled with a designed portable amplifier [J]. Food Chemistry, 2020, 323: 126819.
- [17] YU Y, LI R, MA Z, et al. Development and evaluation of a novel loop mediated isothermal amplification coupled with TaqMan probe assay for detection of genetically modified organism with NOS terminator [J]. Food Chemistry, 2021, 356: 129684.
- [18] XING Y, LIANG J, DONG F, et al. Rapid visual LAMP method for detection of genetically modified organisms [J]. ACS Omega, 2023, 8(32): 29608-29614.
- [19] CHENG N, SHANG Y, XU Y, et al. On-site detection of stacked genetically modified soybean based on event-specific TM-LAMP and a DNzyme-lateral flow biosensor [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2017, 91: 408-416.
- [20] ZHEN Z, ZHANG M, YU Y, et al. Establishment of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) detection method for genetically modified maize MON88017 [J]. European Food Research and Technology, 2016, 242: 1787-1793.
- [21] HARDINGE P, KIDDLE G, TISI L, JAH MURRAY, et al. Optimised LAMP allows single copy detection of 35Sp and NOST in transgenic maize using Bioluminescent Assay in Real Time (BART) [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 17590.
- [22] SINGH M, BHOGE R K, RANDHAWA G. Real-time and visual loop-mediated isothermal amplification: efficient GMO screening targeting pat and pmi marker genes [J]. Food Control, 2017, 71: 248-254.
- [23] LIN F, LIU L, HAO G, et al. The development and application of a duplex reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay combined with a lateral flow dipstick method for *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus isolated in China [J]. Molecular and Cellular Probes, 2018, 40: 1-7.
- [24] STEHLÍKOVÁ D, BERAN P, COHEN SP, CUM V. Development of real-time and colorimetric loop mediated isothermal amplification assay for detection of *Xanthomonas gardneri* [J]. Microorganisms, 2020, 8(9): 1301.
- [25] RIZZO D, LIO D DA, PANATTONI A, et al. Rapid and sensitive detection of tomato brown rugose fruit virus in tomato and pepper seeds by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays (real time and visual) and comparison with RT-PCR end-point and RT-qPCR methods [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 640932.
- [26] TSENG Y-W, WU CF, LEE CH, et al. Universal primers for rapid detection of six poospiviroids in Solanaceae plants using one-step Reverse-Transcription PCR and Reverse-Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification [J]. Plant Disease, 2021, 105(10): 2867-2872.
- [27] DOMESLE K J, YOUNG S R, GE B. Rapid screening for Salmonella in raw pet food by loop-mediated isothermal amplification [J]. Journal of Food Protection, 2021, 84(3): 399-407.
- [28] ALLGÖWER SM, HARTMANN CA, LIPINSKI C, et al. LAMP-LFD based on isothermal amplification of multicopy gene ORF160b: Applicability for highly sensitive low-tech screening of allergenic soybean (*Glycine max*) in food [J]. Foods, 2020, 9(12): 1741.
- [29] MOUNIKA T, GIRISH PS, KUMAR SHASHI M, et al. Identification of sheep (*Ovis aries*) meat by alkaline lysis-loop mediated isothermal amplification technique targeting mitochondrial D-loop region [J]. Journal of Food Science and Technology, 2021, 58: 3825-3834.
- [30] 中华人民共和国农业农村部,公告第323号-9-2020,转基因植物及其产品成分检测 环介导等温扩增方法制定指南[S].
- [31] PATTERSON EL, PETTINGA DJ, RAVET K, et al. Glyphosate resistance and EPSPS gene duplication: convergent evolution in multiple plant species [J]. Journal of Heredity, 2018, 109(2): 117-125.
- [32] DROGE-LASER W, SIEMELING U, PUHLER A, et al. The metabolites of the herbicide L-phosphinothricin (glufosinate) (identification, stability, and mobility in transgenic, herbicide-resistant, and untransformed plants) [J]. Plant Physiology, 1994, 105(1): 159-166.
- [33] 赵新,刘双,刘娜,等.耐除草剂大豆‘DBN9004’精准定量检测方法的建立[J].农业生物技术学报, 2022,30(12):2446-2455.
- [34] 王登元,于彩虹,张成伟,等.用于检测除草剂耐受性大豆植物 DBN9001的核酸序列及其检测方法:201610440595[P][2024-02-20].