

转基因玉米双抗 12-5 荧光 RPA 现场可视化检测方法的建立

陈欲^{1,2}, 陈笑芸¹, 彭城¹, 徐俊锋¹, 沈洁³, 李玥莹², 汪小福¹

1. 浙江省农业科学院, 农产品质量安全危害因子与风险防控国家重点实验室, 杭州 310021

2. 沈阳师范大学生命科学学院, 沈阳 110034

3. 宁夏医科大学临床医学院, 银川 750004

摘要: 转基因玉米双抗 12-5 具有良好的抗虫性和除草剂耐受性, 是我国第一批获得安全证书的转基因玉米之一, 具有广阔的应用前景。本研究利用重组酶聚合酶扩增技术(recombinase polymerase amplification, RPA)建立转基因玉米双抗 12-5 的现场快速检测方法。针对转基因玉米双抗 12-5 的转化体特异性序列片段, 设计引物和探针, 通过引物筛选实验得到最佳引物与探针组合。荧光 RPA 扩增结果可以在蓝光下直接进行可视化分析。结果表明, 建立的转基因玉米双抗 12-5 可视化检测体系特异性强, 检测灵敏度达到 10 拷贝。进一步研究发现 RPA 的扩增体系对温度有很强的适应性, 样品在 34°C~46°C 之间都能得到扩增, 据此, 本研究利用市面上常见的自发热暖贴代替常规的加热仪器来激发 RPA。结果表明, 自发热暖贴满足 RPA 扩增体系对温度的需要。最终, 本研究将自发热暖贴加热法与 RPA 可视化检测体系结合, 对转基因玉米双抗 12-5 进行现场检测, 并与 qPCR 方法检测结果作比较, 检测结果表明, 本研究建立的现场可视化检测方法与 qPCR 方法检测结果一致, 并且可视化检测方法时间短, 检测结果清晰易分辨。本研究建立的转基因玉米双抗 12-5 现场快速可视化检测方法, 其特异性强、灵敏度高、方便、快捷, 不仅满足了转基因玉米双抗 12-5 的现场快速检测的需要, 也为其他现场快速检测方法的开发提供了新思路。

关键词: 转基因玉米; RPA; 可视化检测; 现场检测

收稿日期: 2021-03-24; 修回日期: 2021-07-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31772098)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 31772098)]

作者简介: 陈欲, 在读硕士研究生, 专业方向: 植物基因工程。E-mail: yuchen_115@126.com

通讯作者: 汪小福, 博士, 副研究员, 研究方向: 转基因安全评价与检测。E-mail: yywxf1981@163.com

李玥莹, 博士, 教授, 研究方向: 植物基因工程。E-mail: yueyinglicn@163.com

DOI: 10.16288/j.ycz.21-110

网络出版时间: 2021/7/29 16:46:14

URI: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20210729.1345.003.html>

Establishment of a field visual detection method for genetically modified maize ‘Shuangkang’12-5 by fluorescence RPA

Yu Chen^{1,2}, Xiaoyun Chen¹, Cheng Peng¹, Junfeng Xu¹, Jie Shen³, Yueying Li², Xiaofu Wang¹

1. State Key Laboratory for Managing Biotic and Chemical Threats to the Quality and Safety of Agro-products, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China

2. College of Life Science, Shenyang Normal University, Shenyang 110034, China

3. School of Clinical Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China

Abstract: The genetically modified (GM) maize ‘Shuangkang’12-5 has good insect resistance and herbicide tolerance, which is one of the first series of GM maizes obtained a safety certificate in China, and it has broad application prospect in the future. This study established an on-site rapid detection method for GM ‘Shuangkang’12-5 based on recombinase polymerase amplification (RPA) technology, which primers and probe were designed according to the specific flank sequence. Then the best combination of primers and probe was obtained through a screening process. The amplification results of fluorescence RPA can be directly visualized under blue light. The results showed that the visual detection system of GM ‘Shuangkang’12-5 with high specificity, and the detection sensitivity of the method could reached 10 copies. Further research found that the RPA amplification system had a wide range of temperature (34°C-46°C). According to this property, the common self-heating warm pastes on the market were used replace the traditional heating instruments to stimulate the RPA. The results showed that the self-heating warm paste meets the temperature requirement of the RPA system. Finally, we combined the self-heating warm pastes with the RPA visual detection system to conduct on-site detection of GM ‘Shuangkang’12-5, and compared the results with the detection results of qPCR. The detection showed that the results of on-site visual detection method established in this study were consistent with the detection results of the qPCR. Moreover, the visual detection method was more shorter in time and the final detection result was clear and easy to distinguish. The rapid on-site visual detection method for GM ‘Shuangkang’ 12-5 established in this study has high specificity, high sensitivity and convenience. It not only meets the needs of on-site rapid detection of GM ‘Shuangkang’12-5, but also provides highlight for the development of other on-site rapid detection methods.

Keywords: genetically modified maize; RPA; visual detection; field detection

玉米是全球三大粮食作物之一^[1], 具有很高的营养价值和良好的耐旱、耐寒、耐贫瘠性, 是用途最为广泛的粮食作物^[2], 对粮食安全和保障农业产业结构稳定具有重要作用^[3]。随着转基因技术的发展和满足粮食安全保障的需要, 自 1990 年起, 世界各国开始广泛种植转基因作物^[4]。转基因玉米是全球种植面积第二大的转基因作物, 2019 年种植面积达到了 6090 万公顷, 占全球玉米种植面积的 31%。转基因玉米的种植为粮食安全、环境保护等方面起到了积极的作用。

我国对于粮食的需求随着人口的增长而递增,

玉米作为我国主要的粮食作物和加工原料, 其市场需求更大^[5]。自 2010 年以来, 我国转变为玉米净进口国, 目前我国批准进口的转基因玉米转化体有 20 多种, 为保证我国的粮食安全, 国内也在进行转基因玉米的研发。2019 年 12 月我国自主研发的两个玉米转化体首次获得安全证书^[6], 其中转基因玉米双抗 12-5 是由浙江大学研发, 拥有我国自主知识产权的转基因玉米品系。该品系中导入了两个基因表达框, 分别是 pUbi-Cry1Ab/Cry2Aj-T(PEPC)和 p(35S/Ubi)-EPSPS-T(35S), 融合 *Bt* 基因由玉米泛素启动子和 PEPC 终止子调控, 而 *EPSPS* (5-enolpyruvylshikimate-

3-phosphate synthase gene)基因由 CaMV35S 和玉米泛素启动子组成的复合启动子及 35S 终止子调控。由于 *EPSPS* 基因具有除草剂耐受性, 可以作为筛选标记基因, 后期可以用草甘膦进行阳性植株的筛选。该转基因玉米表现出良好的抗虫性和除草剂耐受性, 具有广阔的应用前景^[3,6], 今后可能会商业化大范围种植。为了对其进行更好的监控和管理, 迫切需要建立现场快速检测方法。

目前转基因作物的检测主要有基于蛋白质和基于核酸两种方法。基于蛋白质的检测方法多需要制备抗体, 其周期长、成本高, 而且只能检测外源蛋白, 检测靶标有限; 另一方面, 基于蛋白质的检测方法, 只能检测作物的新鲜样品或初加工样品, 对于加工品或深加工品的检测存在局限性。而基于核酸的检测方法更加准确、稳定, 应用范围也更加广泛^[7]。在诸多核酸检测方法中, PCR 技术(如普通 PCR、qPCR)等是目前国内外已开发的数量最多的一类转基因检测方法, 结果准确、灵敏度高、特异性强^[8], 被许多国家作为有关食品法规的标准检验方法^[9]。但 PCR 检测法依赖于精密仪器, 且耗时长, 限制了其在现场检测中的使用^[10]。

重组酶聚合酶扩增技术(recombinase polymerase amplification, RPA)是一种新型恒温扩增技术^[11], 利用重组酶、单链结合蛋白、DNA 聚合酶在恒温条件下可实现对核酸的快速、特异性扩增, 短时间(5~20 min)内即可完成核酸的扩增^[12]。扩增条件一般为恒温 39°C, 不需要大型仪器, 而且 RPA 对模板的纯度要求不高, 适合不同样品的扩增检测。本研究结合 RPA 的这些特性, 首先筛选出针对转基因玉米双抗 12-5 转化体特异性检测的 RPA 引物对与探针组合, 并利用蓝光灯照射直接判断其扩增结果, 再结合 RPA 对扩增温度的耐受性, 利用自发热暖贴代替仪器加热, 从而建立一种针对转基因玉米双抗 12-5 的现场快速可视化检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料

转基因玉米双抗 12-5 种子, 转基因玉米 NK603、BT176、T25 和 BT11, 转基因大豆 A5547-127、356043、

GTS40-3-2 和 FG72, 转基因油菜 MS1×RF1、MS2×RF2、MS8×RF3 和 OXY235, 转基因棉花 LLcotton25、MON15985 和 GHB119 的 DNA 均来自本实验室。

1.2 DNA 提取

按照植物 DNA 提取试剂盒(杭州新景生物试剂开发有限公司)说明书提取各样品的基因组 DNA, 所提取的 DNA 用核酸蛋白测定仪 NanoDrop2000C (美国 Thermo 公司)进行核酸质量分析, 并置于-20°C 贮存备用。

1.3 荧光 RPA

参照 RPA (荧光型)试剂盒(潍坊安普未来生物科技有限公司)说明书进行体系配置, 荧光 RPA 反应体系为 50 μ L: Buffer A 12.5 μ L, 10 μ mol/L 正、反向引物各 2 μ L, 10 μ mol/L 探针 0.6 μ L, 模板 DNA 2 μ L, 加 ddH₂O 补齐到 47.5 μ L, 充分混匀后加入 Buffer B 2.5 μ L, 再次混匀。荧光 RPA 反应条件: 39°C 扩增 20 min。荧光 RPA 的实时荧光信号用荧光定量 PCR 仪 CFX96 (美国伯乐公司)观察, 荧光 RPA 的可视化结果用手持蓝光灯(LUYOR-3415RG, 路阳仪器)照射并在黄色滤镜下拍照观察。

1.4 引物与探针设计

荧光 RPA 体系包括 2 条引物和 1 条探针, 转基因玉米双抗 12-5 的载体示意图及扩增的转化体特异性序列信息见图 1A。利用 Vector NTI 软件在外源插入位点的左侧即转基因玉米基因组序列设计上游引物 8 条, 在外源插入位点的右侧即外源插入片段序列设计下游引物 8 条。所设计的上、下游引物分别处于外源插入位点的两侧, 以保证对转基因玉米双抗 12-5 的特异性扩增。引物长度 30~35 bp, GC 含量占 30%~70%^[13]。所设计探针包含玉米基因组和外源片段的序列, 长度 46~52 bp, 并避免回文序列、内部二级结构和连续重复碱基。探针共有 4 个修饰位点, 在探针中间部位, 用一个四氢呋喃(THF)碱基类似物代替第 31 个碱基 G, 作为核酸外切酶的识别位点; 在 THF 位点的上游, 第 30 个碱基 T 处标记一个荧光基团 6-羧基荧光素(FAM:6-carboxy-fluorescein), 在 THF 位点的下游, 第 33 个碱基 T 处标记一个黑洞淬灭基团(BHQ:black hole quencher),

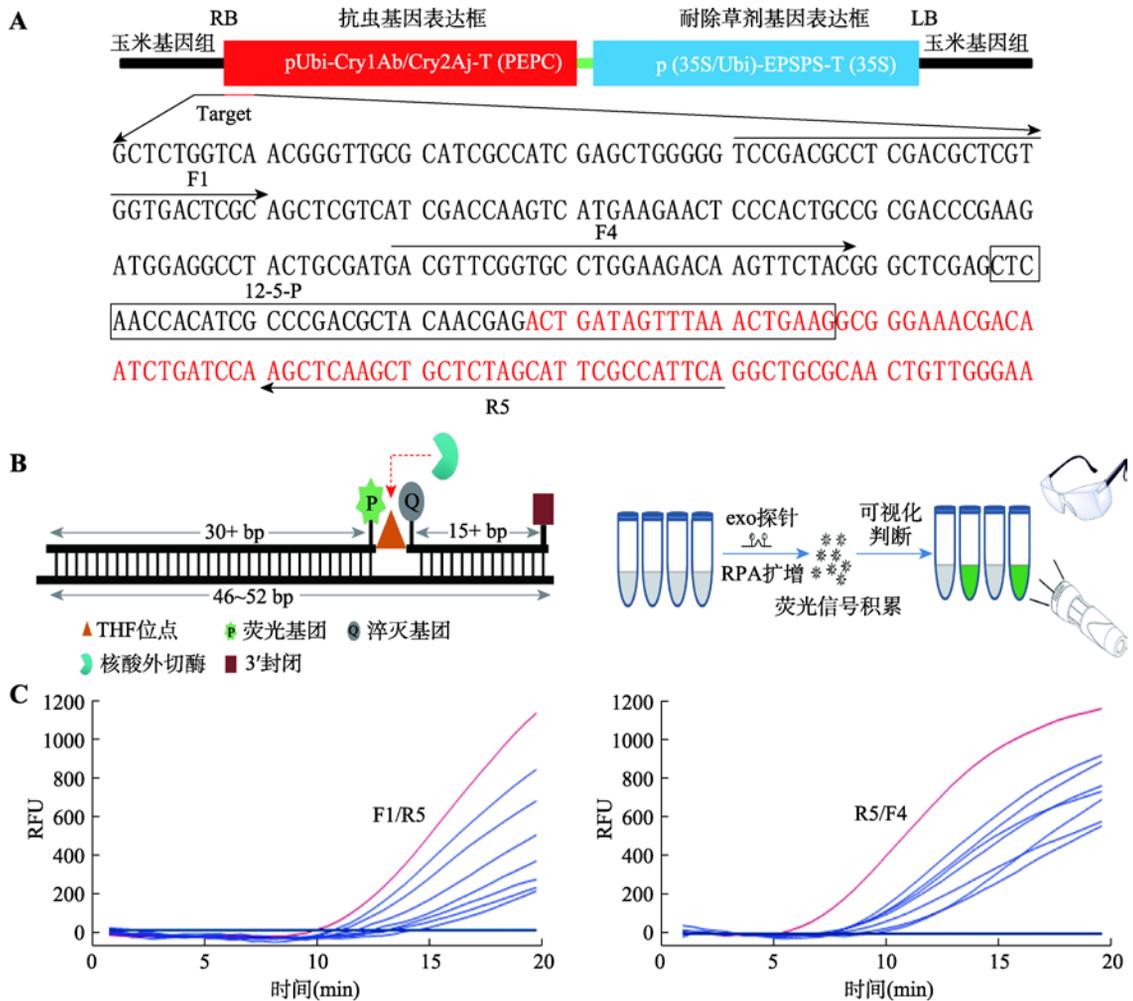


图 1 荧光 RPA 引物和探针的设计与筛选

Fig. 1 Design and screening of the primers and probe of fluorescence RPA

A: 转基因玉米 12-5 载体示意图及扩增的特异性序列。黑色字母为玉米基因组序列; 红色字母为外源插入片段序列; 带箭头的横线为引物 F1、F4 以及 R5 所在位置; 黑色框内为探针所在位置。B: 探针设计原理与可视化检测示意图。C: 引物筛查扩增结果。左图为上游引物 F1 与所有下游引物扩增结果, 右图为下游引物 R5 与所有上游引物扩增结果。RFU: 相对荧光强度。

两基团的间距为 1~5 bp; THF 位点距离 3'末端至少 15 bp 长度, 并在探针 3'末端标记一个封闭基团。只有当探针与序列成功配对时, THF 位点才会被外切酶切割, 使荧光基团与淬灭基团分离, 从而产生荧光信号(图 1B)。

转基因玉米双抗 12-5 的普通 PCR 引物和 qPCR 引物引用国家标准^[14], 本研究所用的引物和探针配制为 10 μmol/L。所有引物和探针均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 引物和探针信息见表 1。

1.5 引物筛查

用上游引物 F1 分别与所有下游引物组合, 结合

探针, 对转基因玉米双抗 12-5 进行实时荧光 RPA 检测实验, 分析结果, 选出其中扩增效率最高的下游引物, 再用这条下游引物分别与所有上游引物组合, 结合探针, 对转基因玉米双抗 12-5 进行实时荧光 RPA 检测实验, 选择扩增效率最高的一组, 作为最终的检测引物组合。

1.6 普通 PCR 与 qPCR

普通 PCR 体系 25 μL: 10×PCR buffer 2.5 μL, dNTPs 0.2 mmol/L, 上、下游引物各 0.2 μmol/L, rTaq 酶 0.025 U/μL。使用德国 Biometra 公司 Tgradient PCR 仪进行扩增。普通 PCR 扩增程序: 98℃ 预变性 2 min;

表 1 本文所用引物与探针序列

Table 1 Primer sequences and probe sequences used in this study

目的	名称	序列(5'→3')	扩增产物长度(bp)	参考文献
荧光 RPA	12-5-F1	TCCGACGCCTCGACGCTCGTGGTGACTCGC		本研究
	12-5-F2	CGACCAAGTCATGAAGAACTCCCACTGCCG		
	12-5-F3	CGACCCGAAGATGGAGGCCTACTGCGATGA		
	12-5-F4	GACGTTCCGGTGCCTGGAAGACAAGTTCTAC		
	12-5-F5	CGTCATCGACCAAGTCATGAAGAACTCCCA		
	12-5-F6	CAGCTCGTCATCGACCAAGTCATGA		
	12-5-F7	CCGACGCCTCGACGCTCGTGGTGACTCGCAGC		
	12-5-F8	CATCGACCAAGTCATGAAGAACTCCCACTGCCG		
	12-5-R1	ATGCTAGAGCAGCTTGAGCTTGGATCAGAT		
	12-5-R2	CCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCC		
	12-5-R3	CCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCA		
	12-5-R4	TAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCC		
	12-5-R5	TGAATGGCGAATGCTAGAGCAGCTTGAGCT		
	12-5-R6	CTGAATGGCGAATGCTAGAGCAGCT		
	12-5-R7	CTTGAGCTTGGATCAGATTGTCGT TTCCCGCC		
	12-5-R8	CCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGC		
	12-5-P	AACCACATCGCCGACGCTACAACGAGAC[FAM-dT][THF]A [BHQ-dT]AGTTAAACTGAA[3'-block]		
普通 PCR	12-5-PCR-F	CAACGTCGTGACTGGGAAAA	256	[14]
	12-5-PCR-R	TGGAAGACAAGTTCTACGGGCT		
qPCR	12-5qPCR-F	GTCGTTCCCGCCTTCAGTT	94	
	12-5qPCR-R	GGTGCCTGGAAGACAAGTTCTA		
	12-5qPCR-P	[FAM]AGCTCAACCACATCGCCCGACGC[BHQ1]		

98°C变性 30 s, 55°C退火 30 s, 72°C延伸 1 min, 35 个循环; 72°C延伸 2 min, 4°C保存。配制 2%的琼脂糖凝胶, GelRed 染色, 对扩增产物进行电泳检测, 凝胶成像仪上观察与拍照。凝胶电泳系统为美国 GE 公司的 EPS301; 紫外凝胶成像分析仪购自美国伯乐公司。

qPCR 体系 25 μ L: 2 \times qPCR Master Mix 12.5 μ L, 上、下游引物各 0.4 μ mol/L, 探针 0.2 μ mol/L。qPCR 扩增程序: 95°C预变性 5 min; 95°C变性 15 s, 58°C退火 1 min, 40 个循环。荧光定量 PCR 仪为美国伯乐公司的 CFX96, 反应结束使用 Bio-Rad CFX Manager 3.1 进行数据分析。

1.7 荧光 RPA 特异性实验

用筛选出的最佳引物对, 根据上述荧光 RPA 扩增体系, 以转基因玉米 12-5 DNA 作为阳性对照, 以

转基因玉米 NK603、BT176、T25、BT11, 转基因大豆 A5547-127、356043、GTS40-3-2、FG72, 转基因油菜 MS1 \times RF1、MS2 \times RF2、MS8 \times RF3、OXY235 以及转基因棉花 LLcotton25、MON15985、GHB119 样品 DNA 作为其他作物模板进行检测, 以评价所建立的荧光 RPA 检测方法的特异性。

1.8 灵敏度实验

核酸蛋白测定仪测定所提取转基因玉米双抗 12-5 的 DNA 浓度, 计算拷贝数, 并稀释提取的 DNA 至 640 拷贝/ μ L, 再 2 倍系列稀释, 分别得到 320、160、80、40、20、10、5 拷贝/ μ L 共 7 个浓度。以上述 8 个浓度 DNA 为模板, 以无菌水作为阴性对照, 进行实时荧光 RPA 检测, 同时可视化观察结果, 并用 qPCR 检测法和普通 PCR 检测法对上述 8 个浓度转基因玉米双抗 12-5 的 DNA 进行检测, 以评估比

较所建立荧光 RPA 方法的灵敏度。

1.9 荧光 RPA 温度适应性及暖贴加热法可行性分析

为探究荧光 RPA 可视化检测法的温度适应性范围,本研究共设 12 个扩增温度,分别是 26℃、28℃、30℃、32℃、34℃、36℃、38℃、40℃、42℃、44℃、46℃和 48℃。根据上述荧光 RPA 扩增体系,进行荧光 RPA 扩增实验,扩增结束后可视化观察分析结果。为优化荧光 RPA 现场扩增方式,本研究尝试用市面上一种可以自发热的暖贴对样品进行加热,对暖贴自发热后 50 min 内的温度进行测定,分析温度随时间的变化情况,初步判定该尝试是否可行;并使用暖贴加热法和加热块 39℃加热法分别对转基因玉米双抗 12-5 和非转基因玉米进行荧光 RPA 扩增实验,可视化观察结果并使用多标记微孔板系统 Cytation5 (美国伯腾公司)测定荧光值大小,进一步评价暖贴加热法的可行性。

1.10 实际检测

为实现高通量的现场检测,本研究尝试用 96 孔板完成现场可视化扩增和检测。用上述建立的转基因玉米双抗 12-5 可视化荧光 RPA 检测体系,结合暖贴加热法,对 96 个实际样品进行检测,并同时使用 qPCR 检测法对上述 96 个实际样品进行检测。通过分析和对比两种检测方法所得结果,判断本研究建立的转基因玉米 12-5 荧光 RPA 现场检测方法是否可行。本研究模拟实际样品检测时,对 96 个样品只进

行了一次检测,其他实验如没有特别说明,都是 3 次重复,每次 3 个平行。

2 结果与分析

2.1 荧光 RPA 引物筛选结果

引物筛选过程见图 1C。图 1C 中左图为上游引物 F1 与所有下游引物组合结合探针,对转基因玉米双抗 12-5 进行实时荧光 RPA 扩增的结果,可以看到上游引物 F1 与下游引物 R5 组合扩增效率最高,10 min 开始出现荧光信号,荧光信号曲线起峰时间最早,且最终荧光值达到最高,为 1200 左右,其他引物组合最终达到荧光值最高仅 800,说明下游引物中,R5 的扩增能力最强。图 1C 中右图为下游引物 R5 与所有上游引物组合结合探针,对转基因玉米双抗 12-5 进行实时荧光 RPA 检测的结果,可以看到下游引物 R5 与上游引物 F4 组合的扩增效率最高,5 min 开始起峰,且最终荧光值最高,为 1200 左右,而其他引物组合最早 8 min 开始起峰,最终达到荧光值也未超过 1000,说明上游引物中,F4 的扩增能力最强。最终选定上游引物 F4 与下游引物 R5 组合,作为最终建立荧光 RPA 检测转基因玉米双抗 12-5 的引物。

2.2 荧光 RPA 特异性检验

实时荧光 RPA 特异性检测结果见图 2A,仅样品为转基因玉米双抗 12-5 时出现扩增曲线,其他样

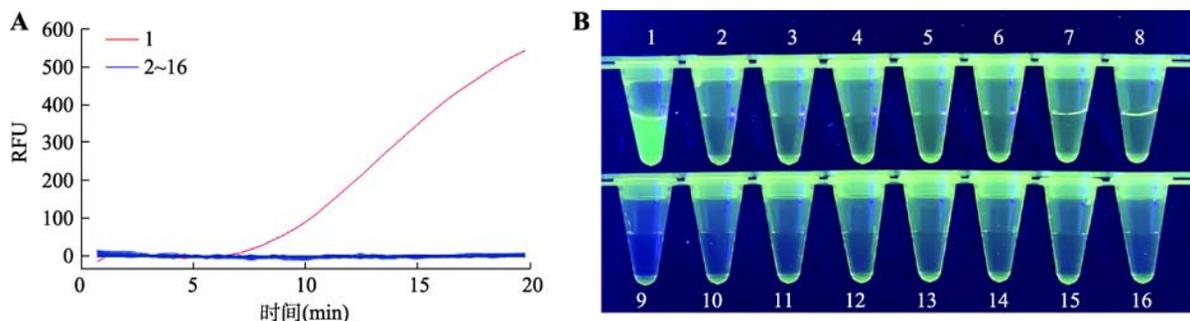


图 2 荧光 RPA 特异性检测

Fig. 2 Specificity experiment of fluorescence RPA

A: 实时荧光 RPA 检测。RFU: 相对荧光强度。B: 可视化荧光 RPA 检测。1: 转基因玉米双抗 12-5; 2~16: 转基因玉米 NK603、BT176、T25、BT11, 转基因大豆 A5547-127、356043、GTS40-3-2、FG72, 转基因油菜 MS1×RF1、MS2×RF2、MS8×RF3、OXY235, 转基因棉花 LLcotton25、MON15985、GHB119。

品均无扩增曲线产生,表明转基因玉米双抗 12-5 实时荧光 RPA 检测方法特异性良好。可视化观察荧光 RPA 扩增结果见图 2B,可以明显看到仅转基因玉米双抗 12-5 样品所在离心管有绿色荧光,明亮且可辨识度强。其他管内均未见绿色荧光,可视化观察的特异性实验结果与实时荧光结果一致,表明转基因玉米双抗 12-5 可视化荧光 RPA 检测方法特异性良好。

2.3 灵敏度实验

灵敏度检测结果见图 3。实时荧光 RPA 灵敏度实验结果见图 3A,结果显示随模板拷贝数降低,扩增曲线的起峰时间逐渐推迟,达到的最终荧光强度随之减弱,模板为 1280 拷贝数时,5 min 开始出现扩增,最终荧光信号达 2000。模板为 10 拷贝数时,13 min 开始出现扩增,虽然最终产生的荧光信号较弱,但可以与阴性对照区分开。荧光 RPA 灵敏度实验的可视化检测观察结果见图 3B:1~4 号管拷贝数依次为 1280、640、320、160,管内样品荧光强度肉眼观察相差无几;5~8 号管拷贝数依次为 80、40、20、10,可以观察到绿色荧光逐渐减弱;10 拷贝数模板扩增结果,荧光最弱,但是肉眼观察其结果可以与阴性对照区分开,与实时荧光 RPA 检测结果一致,说明拷贝数为 10 时,荧光 RPA 检测技术可以准确检测得到结果。qPCR 灵敏度实验结果见图 3C,随拷贝数降低,扩增曲线起峰循环数逐渐增加,

除 1280 拷贝数的模板外,最终达到荧光信号强度依次减弱,1280 拷贝数的荧光信号强度与 20 拷贝数的荧光信号强度相差不多,可能是因为高浓度模板内的杂质或者盐离子对扩增产生影响。图 3D 为普通 PCR 的灵敏度实验,随着模板拷贝数降低,条带亮度逐渐减弱。

2.4 温度适应性及暖贴加热法可行性分析

暖贴激发 RPA 的实验结果见图 4。在 12 个温度下进行荧光 RPA 扩增可视化观察,结果显示在 34℃~46℃范围内均可观察到荧光,说明可用于可视化荧光 RPA 扩增实验的温度范围广,为 34℃~46℃。温度为 42℃时,荧光最亮,说明 42℃为本可视化荧光 RPA 检测法的最适温度。暖贴自发热后 50 min 内对样品进行加热,对样品的温度进行测定(图 4B)。结果可以看到 0~18 min,样品温度从室温 24℃逐渐升高到 40℃。随后的 18~50 min,样品温度保持 40℃几乎不变。样品温度从第 10 min 达到 35℃,开始满足荧光 RPA 扩增的温度条件,说明本研究尝试暖贴加热方式实现可视化荧光 RPA 现场检测的方法或许可行。另外建议提前 10 min 撕开暖贴包装用于加热样品,保证扩增顺利。测定样品温度方式见图 4B。

用暖贴加热法和加热块 39℃加热法分别激发转基因玉米双抗 12-5 和非转基因玉米的荧光 RPA,其可视化观察的结果见图 4C。两种加热方式均使样

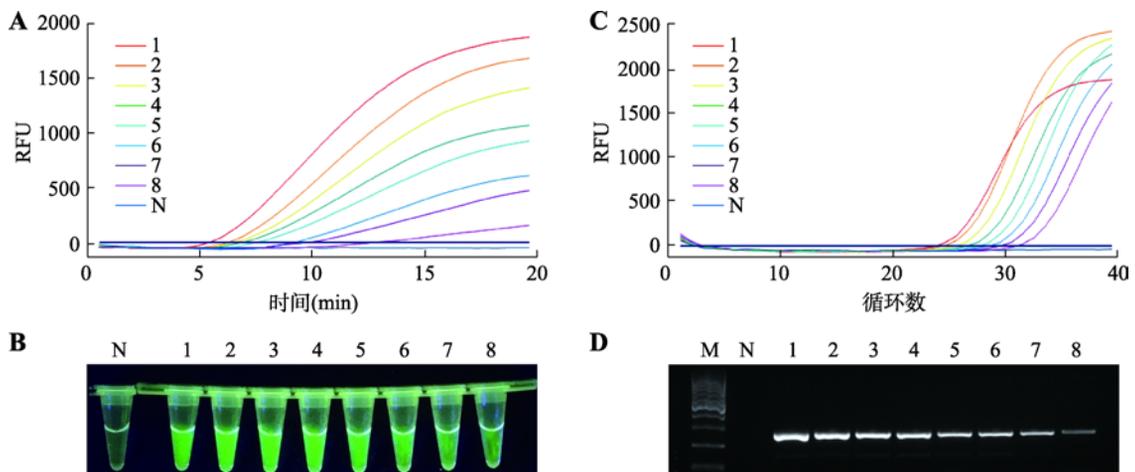


图 3 转基因作物灵敏度检测

Fig. 3 Sensitivity experiment for genetically modified crops

A: 实时荧光 RPA; B: 可视化荧光 RPA; C: qPCR; D: 普通 PCR。M: Marker; N: 阴性对照; 1~8: 分别是 1280、640、320、160、80、40、20、10 拷贝。RFU: 相对荧光强度。

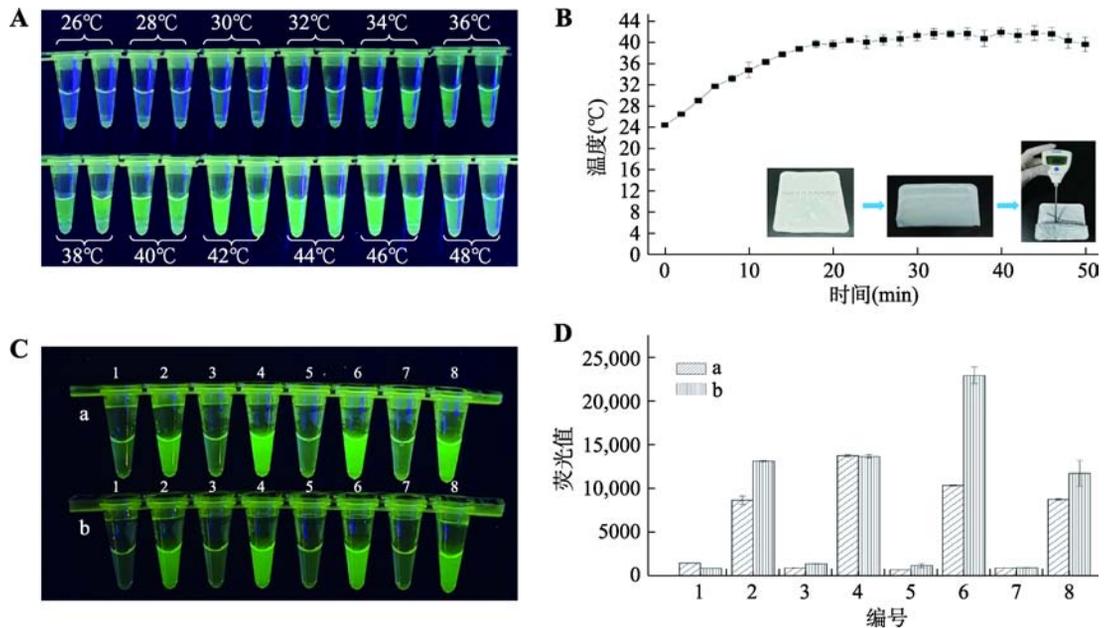


图 4 荧光 RPA 温度适应性及暖贴加热法可行性实验

Fig. 4 Temperature adaptability experiment of fluorescence RPA and feasibility experiment of heating method of warm paste

A: 可视化荧光 RPA 温度适应性结果。B: 暖贴加热 8 连管 50 min 内管中样品温度变化情况。C: 两种加热方法扩增荧光 RPA 产物可视化观察结果。a: 加热块 39°C 加热 20 min; b: 暖贴加热 20 min; 1、3、5、7 为阴性对照; 2、4、6、8 为转基因玉米 12-5。D: 两种加热方法扩增荧光 RPA 产物荧光值测定结果。

品得到扩增, 产生明显荧光, 且荧光强度无明显差异, 易与阴性结果区分。使用多标记微孔板系统测定暖贴加热法和加热块 39°C 加热的反应管中的荧光值的结果见图 4D。可以发现除 4 号管两种加热方法得到荧光值结果基本相同以外, 2、6、8 号管由暖贴加热得到的荧光值明显高于加热块 39°C 加热得到的荧光值, 这或许因为暖贴加热温度约为 40°C, 相较于加热块的 39°C 更接近最适温度 42°C, 进一步说明用暖贴替代传统加热块实现便携式的现场荧光 RPA 检测实验可行。

2.5 实际检测

用两片暖贴加热 96 孔板内样品进行荧光 RPA 扩增示意图见图 5A, 用两片暖贴分别附在 96 孔板上、下两面, 简单方便。图 5B 为用所建立的荧光 RPA 体系实际检测 96 个样品可视化观察结果, 共观察到 24 个样品有荧光产生, 且荧光十分明显。qPCR 法检测上述 96 个样品结果见图 5C, 共有 24 条扩增曲线产生。qPCR 法检测结果与荧光 RPA 可视化检测结果相同, 说明本研究建立的荧光 RPA 可视化检

测准确。荧光 RPA 与 qPCR 检测结果和检测所用时间的比较见表 2 (表中只显示转基因玉米双抗 12-5 样品的阳性结果比对), 荧光 RPA 可视化检测所用时间均为 20 min, qPCR 的 C_t 值在 26.82~29.76 之间, 忽略 PCR 仪器升降温时间, qPCR 检测时间范围为 58.64~64.54 min, 耗时远高于荧光 RPA。实际检测结果表明, 所建立的可视化荧光 RPA 检测方法快速、准确、易分辨。

3 讨论

近年来, RPA 技术得到迅速的发展, 与传统 PCR 相比, RPA 技术无需昂贵的 PCR 仪, 可以短时间内对靶片段进行快速扩增, 具有简便、灵敏、快速等优点, 适用于现场检测, 目前已在病毒^[15,16]、细菌^[17]等临床检测中得到了广泛应用。

引物是影响扩增效率的关键因素, 引物过长可能容易产生引物二聚体或发夹结构, 而过短会降低重组率和检测灵敏度。RPA 引物一般在 30~35 bp^[13], 目前没有专门针对 RPA 的引物设计软件, 为了获得

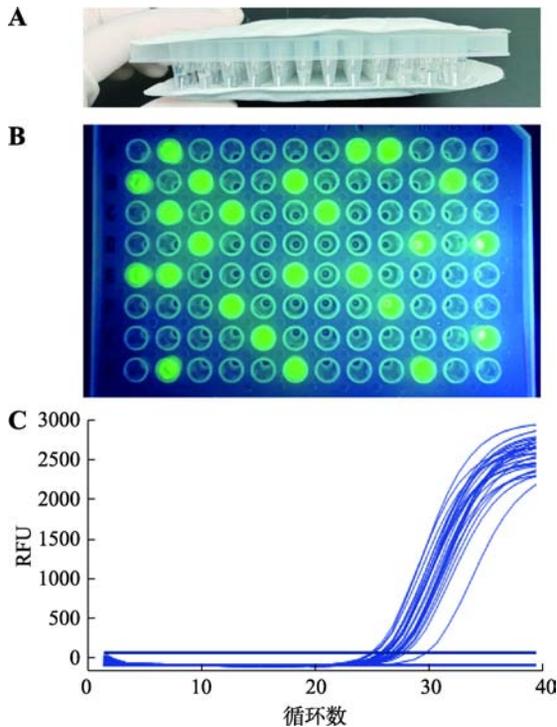


图 5 实际检测结果

Fig. 5 The actual detection results

A: 暖贴加热 96 孔板方式; B: 荧光 RPA 实际检测可视化观察结果; C: qPCR 检测结果。RFU: 相对荧光强度。

更加高效的引物组合, 本研究根据 RPA 引物设计原理, 设计上、下游引物各 8 条, 先用任意一条上游引物与所有下游引物组合结合探针, 对样品进行扩增, 观察结果筛选出扩增效率最高的下游引物, 再用筛选出的下游引物与所有上游引物组合结合探针, 对样品进行扩增, 观察筛选出扩增效率最高的上游引物。采取这种方法, 仅两次就可以筛选出其中扩增效率最高的引物对。

目前根据 RPA 建立的现场检测方法多是基于 RPA 与侧向流动免疫技术结合或与荧光检测技术结合的检测方法。其中 RPA 与侧向流动免疫技术结合的检测方法操作简便、肉眼可观察结果、无需特殊检测设备, 但检测时需要开盖, 存在气溶胶污染的风险, 且相应标记抗体试纸条的制备, 也增加了检测成本。基于 RPA 与荧光检测技术结合的检测方法, 多为实时荧光 RPA, 近年来许多商用便携式实时荧光 RPA 检测设备问世, 为实时荧光 RPA 现场检测技术的推广提供了设备支持, 但同时也增加了检测的成本投入。本研究通过 RPA 在不同温度下的扩增反

表 2 荧光 RPA 和 RT-PCR 对实际样品的检测

Table 2 The detection results of fluorescence RPA and real-time PCR

样品	检测结果		检测时间(min)	
	荧光 RPA	qPCR	荧光 RPA	qPCR
1	+	+	20	60.9 (Ct=27.95)
2	+	+	20	60.1 (Ct=27.55)
3	+	+	20	64.52 (Ct=29.76)
4	+	+	20	60.48 (Ct=27.74)
5	+	+	20	60.94 (Ct=27.97)
6	+	+	20	63.18 (Ct=29.09)
7	+	+	20	62.84 (Ct=28.92)
8	+	+	20	63.64 (Ct=29.32)
9	+	+	20	60.62 (Ct=27.81)
10	+	+	20	60.58 (Ct=27.79)
11	+	+	20	62.48 (Ct=28.74)
12	+	+	20	62.66 (Ct=28.83)
13	+	+	20	62.92 (Ct=28.96)
14	+	+	20	59.8 (Ct=27.40)
15	+	+	20	59.86 (Ct=27.43)
16	+	+	20	62.9 (Ct=28.95)
17	+	+	20	63.92 (Ct=29.46)
18	+	+	20	62.36 (Ct=28.68)
19	+	+	20	58.94 (Ct=26.97)
20	+	+	20	58.64 (Ct=26.82)
21	+	+	20	60.98 (Ct=27.99)
22	+	+	20	61.02 (Ct=28.01)
23	+	+	20	61.6 (Ct=28.30)
24	+	+	20	61.84 (Ct=28.42)
其他	-	-	/	/

应, 发现 RPA 的荧光可视化检测具有很宽的温度适应性(34°C~46°C)。据此, 本研究利用市场上很普通的暖贴作为热源替代仪器加热, 暖贴成本可忽略不计, 而且其便于保存, 方便携带。在检测结果判别方面, 检测人员利用小型手持蓝光灯, 佩戴护目镜即可完成现场的可视化检测。目前, 蛋白质试纸条是转基因成分现场检测最常用的方法, 蛋白质试纸条市场价格大概在 10~20 元/条, 而 RPA 目前一个反应的费用大概在 15~30 元。但随着 RPA 技术的推广和应用, 其检测费用会得到进一步的减少。

参考文献(References):

- [1] Wu WY, Liu XX, Zhou MY, Liu JX, Liu YY. Establishment of event-specific PCR detection method of transgenic maize line 2A-5. *Curr Biotechnol*, 2020, 10(04): 363–370.
武文艳, 刘新香, 周杪依, 刘金香, 刘亚. 转基因玉米 2A-5 特异性 PCR 方法的建立. *生物技术进展*, 2020, 10(04): 363–370. [DOI]
- [2] Wang J, Wu FC, Liu XY, Feng SD, Song XY. Evaluation of transgenic maize ‘Shuangkang 12-5’ with complex traits of insect-resistance and glyphosate-resistance for the resistance to *Ostrinia furnacalis* and tolerance to glyphosate. *Plant Protec*, 2016, 42(1): 45–50.
王江, 武奉慈, 刘新颖, 冯树丹, 宋新元. 转基因抗虫耐除草剂复合性状玉米‘双抗 12-5’对亚洲玉米螟的抗性以及对草甘膦的耐受性研究. *植物保护*, 2016, 42(1): 45–50. [DOI]
- [3] Wang R. Rapid nucleic acid amplification and visual detection strategies for the detection of food-borne pathogen and genetically modified organisms[Dissertation]. Zhejiang University, 2019.
王瑞. 快速核酸扩增及可视化策略用于食源性致病菌和转基因作物检测[学位论文]. 浙江大学, 2019. [DOI]
- [4] Jiang ZB. The significance and way of spreading corn planting technology. *Mod Agric*, 2020, (23): 5.
江真兵. 玉米种植技术推广的意义及途径. *新农业*, 2020, (23): 5. [DOI]
- [5] Jiao Y, Han Y, Yang Q, Huang YH, An JC, Yang YZ, Ye JM. Commercialization development trend of genetically modified maize and the enlightenment. *Biotechnol Bull*, 2021, 37(4): 164–176.
焦悦, 韩宇, 杨桥, 黄耀辉, 安吉翠, 杨亚洲, 叶纪明. 全球转基因玉米商业化发展态势概述及启示. *生物技术通报*, 2021, 37(4): 164–176. [DOI]
- [6] Wang HQ, Xiao F, Yang L, Miu QM, Zhang XD, Zhang XJ. Analysis of verification results by PCR methods for genetically modified double-resistant 12-5 event-specific maize. *Biotechnol Bull*, 2020, 36(5): 48–55.
王颢潜, 肖芳, 杨蕾, 缪青梅, 张旭冬, 张秀杰. 转基因玉米双抗 12-5 转化体特异性 PCR 方法验证结果分析. *生物技术通报*, 2020, 36(5): 48–55. [DOI]
- [7] Yu Y, Liu GQ, Su SL, Luo JX, Guo L. Detection of transgenic components in corn. *Jiangsu J Agric Sci*, 2020, 36(4): 836–841.
于园, 刘国强, 苏圣淋, 罗建兴, 郭梁. 玉米转基因成分的检测. *江苏农业学报*, 2020, 36(4): 836–841. [DOI]
- [8] Meng LC, Zhou DL, Gao TT, Wang M, Lu Ming. Rapid screening of genetically modified maize based on TaqMan Real-time PCR. *Mol Plant Breed*, 2020, 1–7.
孟令聪, 周德龙, 高婷婷, 王敏, 路明. 基于 TaqMan 实时荧光 PCR 技术快速筛查转基因玉米. *分子植物育种*, 2020, 1–7. [DOI]
- [9] Lin FF, Hou HL, Liu J, Wang XL, Deng HC, Zhou XY. Research progress in DNA component detection of transgenic plants. *Chin Seed Ind*, 2016, (11): 19–22.
林藜芬, 侯红利, 刘晋, 王学林, 邓汉超, 周向阳. 转基因植物 DNA 成分检测技术研究进展. *中国种业*, 2016, (11): 19–22. [DOI]
- [10] Jia X. The application of recombinase polymerase amplification (RPA) technology in detection of transgenic rices[Dissertation]. Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2017.
贾玄. RPA 等温扩增技术在转基因水稻检测中的应用[学位论文]. 中国农业科学院, 2017. [DOI]
- [11] OPiepenburg O, Williams CH, Stemple DL, Armes NA. DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biol*, 2006, 4(7): e204. [DOI]
- [12] Ding X, Liu YH, Ni BX, Wang XT, Xu XZ, Ying QJ, Dai Y, Cao J. Establishment of a nucleic acid assay for detection of *Echinococcus granulosus* based on recombinase-aided isothermal amplification assay. *Chin J Schi Contl*, 2020, 32(4): 340–344.
丁昕, 刘燕红, 倪碧娴, 王晓婷, 徐祥珍, 应清界, 戴洋, 曹俊. 基于重组酶介导等温扩增技术的细粒棘球绦虫核酸检测方法的建立. *中国血吸虫病防治杂志*, 2020, 32(4): 340–344. [DOI]
- [13] Lobato IM, O’Sullivan CK. Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances. *Trac Trend Anal Chem*, 2018, 98: 19–35. [DOI]
- [14] Announcement No.2259 of ministry of agriculture-12-2015. Detection of genetically modified plants and derived products. Qualitative PCR method for insect-resistant and herbicide-tolerant maize Shuangkang 12-5 and its derivatives. Beijing: China Agriculture Press, 2015.
农业部 2259 号公告-12-2015, 转基因植物及其产品成分检测. 抗虫耐除草剂玉米 12-5 及其衍生品种定性 PCR 方法. 北京: 中国农业出版社, 2015. [DOI]

- [15] Tan LQ, Zheng XC, Wang CP, Li WS, Qin ZF. Development of real time RT-RPA for rapid detection of rabies virus. *Chin J Vet Med*, 2019, 55(5): 44-47+122.
谭理琦, 郑晓聪, 王翠萍, 李文松, 秦智锋. 狂犬病病毒实时荧光 RT-RPA 等温检测方法的建立. *中国兽医杂志*, 2019, 55(5): 44-47+122. [DOI]
- [16] Zhang QL, Fu CX, Zhang W, Gao XL, Wang L, Cheng MH, Zheng XY, Liu HY, Zhou DG. Establishment and application of real-time fluorescence RT-RPA detection method for canine distemper virus. *Prog Vet Med*, 2020, 41(11): 19-23.
张启龙, 傅彩霞, 张玮, 高晓龙, 王林, 程敏姮, 郑雪莹, 刘海莹, 周德刚. 犬瘟热病毒实时荧光 RT-RPA 检测方法的建立及应用. *动物医学进展*, 2020, 41(11): 19-23. [DOI]
- [17] Wang SH, Yuan SH, Shuai JB, Wang ZC, Cai J, Zhao ZG. Establishment and application of recombinase polymerase amplification assay for detection of *Bacillus anthracis*. *Chin J Prev Vet Med*, 2020, 42(6): 590-594.
王素华, 袁淑辉, 帅江冰, 王忠才, 蔡军, 赵治国. 炭疽杆菌 RPA 等温检测方法的建立和应用. *中国预防兽医学报*, 2020, 42(6): 590-594. [DOI]

(责任编辑: 宋任涛)