DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20251107006
引用格式: 李怡霏, 孙妍, 郭荣晖, 等. 双重重组酶聚合酶扩增介导的胶体金试纸条同时可视化检测转基因植物标记基因 *NPT II* 和 *HPT II* [J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(7): 287–297.
LI YF, SUN Y, GUO RH, *et al*. Simultaneous visual detection of transgenic plant marker genes *NPT II* and *HPT II* by dual recombinase polymerase amplification combined with colloidal gold test strips [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(7): 287–297. (in Chinese with English abstract).

双重重组酶聚合酶扩增介导的胶体金试纸条同时可视化检测转基因植物标记基因 *NPT II* 和 *HPT II*

李怡霏[1], 孙　妍[1], 郭荣晖[1], 陈赵然[2], 曾德新[3], 姚帮本[2], 余晓峰[3*], 陈　伟[1*]
(1. 合肥工业大学食品与生物工程学院, 合肥　230601; 2. 安徽省产品质量监督检验研究院, 合肥　230051; 3. 合肥海关技术中心, 合肥　230071)

摘　要: 目的　开发一种双重重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)介导的胶体金试纸条检测方法用于快速、可视化地检测转基因植物中的新霉素磷酸转移酶 II 基因(neomycin phosphotransferase II gene, *NPT II*)和潮霉素磷酸转移酶 II 基因(hygromycin phosphotransferase II gene, *HPT II*) 2 种标记基因。**方法**　本研究分别选定 *NPT II* 和 *HPT II* 中高度特异性的基因片段, 设计对应的扩增引物, 利用 RPA 技术快速、稳定地对 2 种靶标核酸进行指数级扩增, 并利用双重试纸条对扩增产物进行快速可视化检测。扩增产物在试纸条上 2 种基因对应的检测线(T_N、T_H线)以及质控线(C 线)层析显色, 根据 T_N线、T_H线以及 C 线显色强度进行定性分析。**结果**　本方法在 40 ℃恒温条件下进行 15 min 双重 RPA 反应, 并在试纸条上进行 5 min 的抗原抗体识别反应, 即可对 *NPT II* 基因实现检出限为 615 copies/μL、*HPT II* 基因实现检出限为 314 copies/μL 的精准检测, 模拟实际样本中实现 *NPT II* 最低含量为 0.10%、*HPT II* 最低含为 0.05%的快速筛查。**结论**　本研究开发双重 RPA 介导的胶体金试纸条检测方法, 能同时对标记基因 *NPT II* 和 *HPT II* 实现可视化检测, 操作简便、检测快速、特异性高, 有望在现场即时检测中实现广泛应用。

关键词: 新霉素磷酸转移酶 II 基因; 潮霉素磷酸转移酶 II 基因; 重组酶聚合酶扩增; 胶体金试纸条; 双重检测

Simultaneous visual detection of transgenic plant marker genes *NPT II* and *HPT II* by dual recombinase polymerase amplification combined with colloidal gold test strips

LI Yi-Fei[1], SUN Yan[1], GUO Rong-Hui[1], CHEN Zhao-Ran[2], ZENG De-Xin[3], YAO Bang-Ben[2], YU Xiao-Feng[3*], CHEN Wei[1*]

收稿日期: 2025-11-07
基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFF1102900); 国家自然科学基金项目(32172295)
第一作者: 李怡霏(2001—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为快速检测。E-mail: 1638691069@qq.com
***通信作者:** 余晓峰(1967—), 男, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全快速检测。E-mail: amyxf@126.com
陈伟(1982—), 男, 博士, 教授, 主要研究方向为食品安全快速检测。E-mail: chenweishnu@163.com

(1. *School of Food and Biological Engineering*, *Hefei University of Technology*, *Hefei* 230601, *China*;
2. *Anhui Institute of Product Quality Supervision and Inspection*, *Hefei* 230051, *China*;
3. *Technical Center of Hefei Customs*, *Hefei* 230071, *China*)

ABSTRACT: Objective To develop a dual recombinase polymerase amplification (RPA)-mediated colloidal gold strip assay for the rapid and visible simultaneous detection of 2 kinds of marker genes, the neomycin phosphotransferase II gene (*NPT II*) and the hygromycin phosphotransferase II gene (*HPT II*), in transgenic plants. **Methods** In this study, highly specific gene fragments of *NPT II* and *HPT II* were selected to design corresponding amplification primers. Using RPA technology, the 2 kinds of target nucleic acids were rapidly and stably amplified exponentially. The amplification products were subsequently detected by a dual test strip for rapid visual interpretation. On the test strip, the corresponding detection lines (test line N, test line, T_N and T_H lines) and the quality control line (C line) developed visible signals, allowing qualitative analysis based on the color intensity of the T_N, T_H, and C lines. **Results** The assay was performed under isothermal conditions at 40 °C, involving a 15 min dual RPA reaction followed by a 5 min antigen-antibody recognition step on the test strip. It achieved precise detection with limits of detection of 615 copies/μL for the *NPT II* gene and 314 copies/μL for the *HPT II* gene, and enabled rapid screening in simulated reald samples down to 0.10% for *NPT II* and 0.05% for *HPT II*. **Conclusion** The dual RPA-mediated colloidal gold strip method developed in this study enables visual detection of the marker genes *NPT II* and *HPT II*. Characterized by user-friendly operation, rapid detection and high specificity, this platform demonstrates significant potential for broad application in point-of-care testing.

KEY WORDS: neomycin phosphotransferase II gene; hygromycin phosphotransferase II gene; recombinase polymerase amplification; colloidal gold test strip; dual detection

0 引 言

为解决人口剧增所导致的食品资源匮乏，转基因技术在农业方面被广泛应用。随着市场需求的不断深入，转基因植物及其衍生产品目前在市场销售中占比超 90%[1]，因此，检测转基因植物性食品中转基因成分是否安全显得尤为重要。新霉素磷酸转移酶 II 基因(neomycin phosphotransferase II gene, *NPT II*)和潮霉素磷酸转移酶 II 基因(hygromycin phosphotransferase II gene, *HPT II*)是两种广泛使用的选择标记基因[2]，常作为外源基因导入转基因植物体内，并伴随着植物的生长、采集、加工最终保留在农副产品中[3]。*NPT II* 与 *HPT II* 基因能编码抗性蛋白，通过抗性蛋白使氨基糖苷类抗生素发生磷酸化，阻断其与核糖体结合，赋予转基因植株抗生素抗性[4−5]。因为对抗生素的抑制作用显著，*NPT II* 与 *HPT II* 基因及其衍生物所引发的生物安全风险一直备受关注[6]。被关注的问题主要包括：(1)是否会发生基因转移，尤其是转移到病原菌中使之获得抗性，导致目前临床使用的抗生素失效；(2)是否会发生基因漂流，通过自然杂交改变生物的遗传多样性，破坏生态平衡；(3)对人类健康和食品安全是否产生负面影响，有研究表明[7]，部分抗性标记基因在表达过程中可能产生抑制转化细胞再生能力、降低转化效率的有毒代谢物，从而限制多基因转化体系的构建。基于上述问题的困扰，如何快速、准确地对靶标进行诊断亟待研究者的解决[8]。

为实现对靶标的准确检测，最常用的方法是酶联免疫吸附剂测定法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)和实时荧光定量聚合酶链式反应法(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)[9−11]。尽管二者都被认为是分析转基因成分及其衍生物最有力的手段[12]，但仍存在反应时间长、操作步骤烦琐、对仪器设备及专业人员依赖度高等局限，难以满足现场快速检测的需求[13]。为适应快速、灵敏检测靶标的现实需求，针对核酸层面的多种等温扩增技术结合信号读取平台应运而生，如环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)[14−16]、滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)[17−18]、重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)[19−21]等技术得到蓬勃地发展。相较于 LAMP 与 RCA 依赖复杂的引物设计，RPA 凭借简单的引物设计即可实现高效的信号放大这一优势，使得其在实用性层面实现了飞跃性的进步。同时，RPA 的结果可以通过实时荧光曲线[22−23]、荧光比色法[24]、侧向层析试纸条[25−26]等方式进行输出，极大地提高了 RPA 及其相关技术作为商业化核酸检测首选工具的认可度。并且随着市场需求的不断发展，对多重 RPA 的探索与开发也日趋重要[27]。另外，目前多重 RPA 在食品基因检测中主要用于

同时筛查多种病原体(如食源性细菌、病毒)或转基因成分(如 35S 启动子、NOS 终止子)。然而, 针对 *NPT II*与 *HPT II* 这类特定标记基因的多重快速检测体系则鲜有报道。

在此, 本研究开发了一种双重 RPA 介导的胶体金试纸条检测方法用以检测 *NPT II* 和 *HPT II* 基因, 旨在利用高度特异性引物引导的双重 RPA 快速对靶标核酸进行扩增, 并且结合胶体金试纸条操作简便、成本低廉、便于携带和储存的优点, 有望为实现现场快速诊断标记基因提供坚实的保障。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

含有 *NPT II* 和 *HPT II* 基因的阳性标准样品, 以及验证特异性所需的小麦粉、玉米粉、花生粉、土豆粉均来自新疆农科院; 验证实际样品所需的 14 件(No.1~No.14)植物类食品样品均购自当地大型超市。

RPA(基础型 4.0)冻干小球(苏州可尔生命科技有限公司); 吸水垫、玻璃纤维膜、硝酸纤维素膜(nitrocellulose membrane, NC 膜)、聚氯乙烯(polyvinyl chloride, PVC)底板(上海捷宁生物科技有限公司); 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、人血清蛋白(human serum albumin, HSA)(纯度 98%, 北京拜尔迪生物科技公司); 羊抗鼠二抗(杭州贤至科技生物有限公司); 异硫氰酸荧光素抗体(fluorescein isothiocyanate antibody, FITC Ab)、地高辛抗体(digoxin antibody, Dig Ab)(武汉艾美捷科技有限公司); 酪蛋白、酪蛋白钠(分析纯, 北京百灵威科技有限公司); 吐温-20、柠檬酸三钠($C_6H_5Na_3O_7$)、碳酸钾(K_2CO_3)、海藻糖、乙二胺四乙酸二钠、曲拉通 X-100、聚乙二醇-20000(polyethylene glycol-20000, PEG-20000)、十六烷基三甲基氯化铵(hexadecyl trimethyl ammonium chloride, CTAB)、氯化镁($MgCl_2$)、磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)、磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)、蔗糖、氯化钠(NaCl)、氯化镁($MgCl_2$)、氢氧化钠(NaOH)、氯化钾(KCl)、乙酸镁(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 四水合氯金酸($HAuCl_4 \cdot 4H_2O$)、20×磷酸盐缓冲盐溶液(phosphate-buffered saline, PBS)、磷酸缓冲液(phosphate buffer solution, PB)、链霉亲和素(streptavidin, SAV)、琼脂糖、4S Red Plus 核酸染料、双蒸水、聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone, PVPK 40000)、DNA 分子量标准 Maker、2×柠檬酸钠盐水溶液(saline sodium citrate buffer, SSC)缓冲液、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(tris aminomethane hydrochloride, Tris-HCl) (1 mol/L, pH 7.4、8.0)、1×三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸[1×tris(hydroxymethyl)aminomethane-ethylenediaminetetraacetic acid buffer, 1×TE Buffer]缓冲液、硼酸-硼酸盐缓冲液(boric acid-borate buffer, BB)、上样液(Running Buffer)、1×TaqMan 快速实时荧光定量 PCR 预混液(上海生工生物股份有限公司)。

本研究所使用的 *NPT II* 和 *HPT II* 引物、质粒及 RT-qPCR 相关引物、探针均由通用生物(安徽)股份有限公司合成, 其中 RT-qPCR 相关引物、探针序列参考农业部 1782 号公告-2-2012 所公布内容[28]。并根据 RT-qPCR 引物对应的核酸序列, 在 Primer Premier 6 软件上自行设计引物, 最终选择的具体序列见表 1。

表 1 本研究用的引物与探针序列

Table 1 Primer and probe sequences used in this study

引物名称	引物序列(5′→3′)	产物长度/bp
F_N	Biotin-GTGCCTTGAATGAACTGC	254
R_N	FITC-TGTTTCGCTTGGTGGTC	
F_H	Dig-GTTTAGCGAGAGCCTGACCTATTGC	197
R_H	FITC-GCCATGTAGTGTATTGACCGATTCCT	

1.2 仪器与设备

KQ 218 超声仪(昆山市超声仪器有限公司); Pico 12 高速冷冻离心机[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]; SW-CJ-2D 双人单面净化工作台(苏州净化设备有限公司); LG 2020 凝胶成像仪(杭州朗基科学仪器有限公司); XYZ 3000 双喷头喷膜仪、CM 4000 全自动切条机(美国 BIO-DOT 公司); A200 便携式 PCR 仪(杭州傲敏生物科技有限公司); ENDURO Gel XL 电泳仪(青岛佳鼎分析仪器有限公司); QuantStudio 5 荧光定量 PCR(美国应用生物系统公司); B15-3 磁力加热搅拌器(上海司乐仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验原理

实验原理见图 1。本研究针对 *NPT II* 和 *HPT II* 基因的高度特异性区域, 分别设计对应的 RPA 引物, 并在其上下游引物 5'端进行特定基团修饰。双重 RPA 扩增的关键在于实现两种靶标核酸的同时高效扩增。当体系中存在靶标核酸时, 重组酶与引物结合形成的重组酶/引物丝复合物侵入双链 DNA, 识别同源序列并启动链置换反应[29]。随后, 单链结合蛋白迅速结合互补链, 防止其复性; Bsu DNA 聚合酶则催化 dNTP 沿引物 3'端延伸, 在恒温条件下实现对靶标序列的指数级扩增。若无靶标核酸存在, 上述反应无法启动, 从而保证 RPA 结果的特异性和可靠性[30]。扩增产物与金标垫中的金标偶联物结合后, 在上样缓冲液的驱动下沿 NC 膜层析, 依次经过检测线(test line N、test line H, T_N、T_H 线)以及质控线(control line, C 线)。根据产物中所含靶标类型, 分别与相应检测线上的抗体发生特异性结合, 导致胶体金富集并显色, 实现检测结果的直观判读。

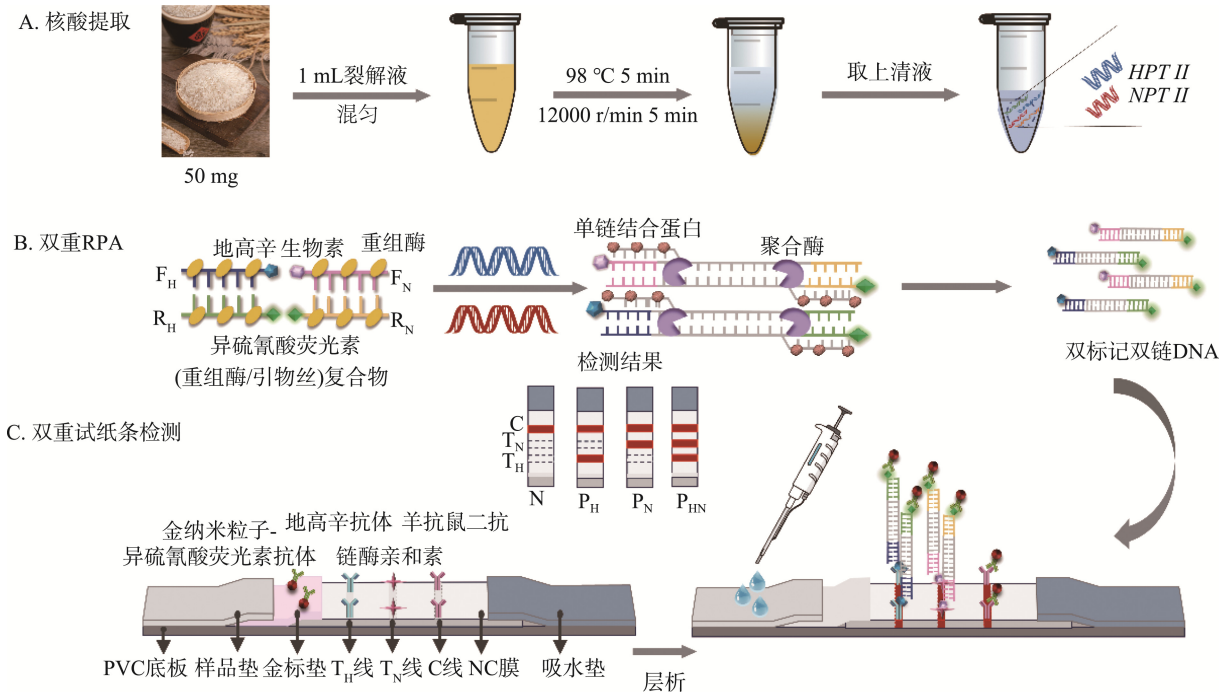


图 1 双重 RPA 介导的胶体金试纸条对 *NPT II* 和 *HPT II* 基因可视化检测原理

Fig.1 Working principle of the dual RPA-mediated colloidal gold strip for simultaneous detection of *NPT II* and *HPT II*

1.3.2 胶体金纳米粒子的制备

向锥形瓶中加入 150 mL 纯水和 2.55 mL 氯金酸溶液(5 g/L), 在磁力加热搅拌器上 1300 r/min、310 ℃加热至液体微沸时关闭磁力搅拌, 加入 1.8 mL 柠檬酸三钠(1%)溶液后恢复磁力搅拌, 待胶体金溶液呈均匀稳定的酒红色后关闭加热。室温放至冷却, 于 4 ℃冰箱留存备用。

1.3.3 金纳米粒子-FITC Ab 偶联物的制备

向 1.5 mL 离心管中依次加入 1 mL 胶体金溶液、8 μL K_2CO_3 (0.1 mol/L)、6 μL FITC Ab(1 mg/mL), 涡匀。置于孵育器上偶联 1 h 后加入 100 μL BSA (10%)溶液封闭 1 h。完成封闭后金标偶联液 4 ℃, 9800 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 用 100 μL 重悬液 D 将沉淀重新分散均匀, 即完成金纳米粒子-FITC Ab 偶联物的制备。

1.3.4 双重胶体金试纸条的制备

(1)样品垫制备。干燥玻璃纤维素膜切成 1.8 cm×30 cm 大小, 放入样品垫处理液内室温浸泡 2 h, 结束后置于 42 ℃烘箱内过夜烘干。处理好后室密封保存备用。

(2)金标垫制备。干燥玻璃纤维素膜切成 0.6 cm×30 cm 大小, 放入金标垫处理液内室温浸泡 2 h, 结束后置于 42 ℃烘箱内过夜烘干。烘干后切成 0.6 cm×0.3 cm 的大小, 将 4 μL 金标偶联物均匀滴在每片垫子上, 再次 42 ℃过夜烘干。处理好后室密封保存备用。

(3) C 线、T 线制备。用喷膜仪在 NC 膜上以 0.5 μL/cm 的速度喷涂羊抗鼠二抗(1 mg/mL)作为 C 线; T_H 线喷涂 Dig Ab (0.9 mg/mL); T_N 线上喷涂 SAV (1 mg/mL), 将喷涂好试剂的 NC 膜放置在 37 ℃烘箱内过夜烘干。处理好后室温密封保存备用。

(4)试纸条组装。先在 PVC 底板中间位置上贴好 NC 膜, 随后依次贴合吸水垫与样品垫。组装好后用切条机切成 6 cm×0.3 cm 大小试纸条, 最后在样品垫上方粘贴制备好的金标垫。将组装好的试纸条室温密封保存备用。

1.3.5 样品核酸模板的提取

本研究参考一种基于碱性裂解液的核酸提取方法[31], 并稍作优化, 步骤如下: 用研钵将植物样品研磨成细粉, 取适量粉末加入 1 mL 碱性裂解液并充分研磨。将研磨混合物转移至 1.5 mL 离心管, 金属浴 98 ℃加热 5min。随后 4 ℃、12000 r/min 离心 5 min, 所得上清液即核酸模板。

1.3.6 双重 RPA 扩增体系与试纸条免疫层析反应的建立

双重 RPA 扩增反应总体积为 50 μL, 反应体系包括 2 颗 RPA(基础型 4.0)冻干小球, 1.3 μL (10 μmol/L) F_H、R_H, 2 μL (10 μmol/L) F_N、R_N, *HPT II* 和 *NPT II* 核酸模板各 2 μL, 2 μL 乙酸镁(250 mmol/L), 用 dd H_2O 补足 50 μL。40 ℃恒温反应 15 min 即可得到双重 RPA 的扩增产物。

在胶体金试纸条样品垫上滴加 1 μL 扩增产物, 随后滴加 59 μL 上样液(Running Buffer), 5 min 左右免疫层析反应完全即可拍照记录 T_H、T_N、C 线的显色情况。

1.3.7 特异性引物的设计与实验可行性验证

使用 10^4 copies/μL 的 *HPT II* 和 *NPT II* 质粒, 在 38 ℃条件下分别用 4 组自行设计的 RPA 引物扩增 15 min, 根据 2%琼脂糖凝胶电泳结果筛选出 2 种靶标对应的特异性引

物。利用筛选出的 2 对引物 38 ℃进行 15 min 双重 RPA 扩增, 将扩增结果分别用 2%琼脂糖凝胶电泳和胶体金试纸条进行测试和表征。

1.3.8 双重 RPA 扩增体系的优化

双重 RPA 扩增体系中引物 F_N、R_N 用量的优化: 固定加入 1.3 μL F_H、R_H (10 μmol/L), 4 组优化实验中分别加入 1.6、2.0、2.4、2.8 μL F_N、R_N (10 μmol/L); 双重 RPA 扩增体系中扩增温度的优化: 设置扩增反应温度为 36、38、40、42 ℃。根据 2%琼脂糖凝胶电泳结果确定最适 F_N、R_N 用量与反应温度。

1.3.9 双重胶体金试纸条参数优化

NC 膜的 T_H、T_N 线喷涂组合优化: 设计 5 种不同的喷涂组合, T_N 线: SAV (1 mg/mL), T_H 线: Dig Ab (1 mg/mL); T_N 线: SAV (0.9 mg/mL), T_H 线: Dig Ab (1 mg/mL); T_N 线: SAV (0.9 mg/mL), T_H 线: Dig Ab (0.9 mg/mL); T_N 线: Dig Ab (1 mg/mL), T_H 线: SAV (1 mg/mL); T_N 线: SAV (1 mg/mL, T_H 线: Dig Ab (0.9 mg/mL), 选取试纸条显色结果最均匀的组合进行 T_H、T_N 线的喷涂; 金标垫参数优化: 优化 K_2CO_3 使用量(4、6、8、10、12 μL); FITC Ab 使用量(2、4、6、8、10 μL); 以 HSA (10%)、BSA (10%)、重悬液 D、酪蛋白、酪蛋白钠 5 种溶液先后作为封闭液、重悬液。上述 4 种优化分别制备对应的金标垫; 上样液种类的优化: 使用 1×PBS、PB (10 mmol/L, pH 7.4)、BB (50 mmol/L, pH 7.4)、1×TE Buffer (pH 7.4)、Running Buffer 5 种上样缓冲液。根据试纸条的显色结果, 确定各项最适参数。

1.3.10 双重检测的灵敏度与特异性

将初始浓度为 1 ng/μL 的 *HPT II* 和 *NPT II* 质粒溶液用 1×TE Buffer 进行 10 倍梯度稀释, 依次稀释至 1 fg/μL~10 pg/μL 的浓度范围, 并以 1×TE Buffer 为空白对照, 根据 1.3.6 方法进行双重 RPA 扩增及试纸条检测, 根据检测结果建立 2 种靶标基因对应的线性方程; 同时根据检测结果, 按照公式(1), 计算出各浓度对应的拷贝数, 确定 2 种靶标基因的具体检出限。

$$N=\frac{C\times10^{-9}\times N_A}{L\times M_{bp}} \quad (1)$$

式中: N 为拷贝数, copies/μL; C 为 DNA 质量浓度, ng/μL; L 为质粒碱基对总长度, bp; M_{bp} 为碱基对的平均分子量, 对于双链 DNA 通常取 660 g/mol; N_A 为阿伏伽德罗常数, 通常取 6.022×10^{23}; 10^{-9} 为单位转化系数。

将 *HPT II* 和 *NPT II* 基因的阳性标品用阴性标品按照 100.00%、50.00%、25.00%、10.00%、1.00%、0.10%、0.05% 的质量比例逐级混合, 按照 1.3.5 方法提取核酸模板后再按 1.3.6 方法进行双重 RPA 扩增, 根据试纸条检测结果确定对 2 种靶标基因的模拟实际样本检测能力。

为评估该检测方法的特异性, 将不含 2 种靶标基因的小麦粉、玉米粉、花生粉、土豆粉样本均按照 1.3.5 方法提取核酸模板, 并按 1.3.6 方法进行双重 RPA 扩增和试纸条的检测, 根据检测结果进行特异性分析。

1.3.11 双重检测的重复性与稳定性

用阳性标品含量为 25%的 2 种靶标核酸模板按照 1.3.6 方法进行 10 次独立重复实验, 统计分析各次检测中 T_H、T_N 线的显色结果, 以考察本方法的检测重复性; 同时为评估试纸条稳定性, 将双重试纸条于室温下储存 30 d, 分别于第 1、7、15、20 以及 30 d 时按照 1.3.6 所述方法进行双重 RPA 扩增及试纸条检测, 每次实验重复 3 次, 并对各次检测中 T_H、T_N 线的显色结果进行分析统计, 以考察试纸条的检测稳定性。

1.3.12 双重检测平台检测实际样本

将购买自当地大型超市的 14 件植物类型实际食品样本均按 1.3.5 方法进行核酸提取, 再按 1.3.6 方法进行双重 RPA 扩增与试纸条检测, 分析各实际样品是否含有 2 种靶标基因。

1.3.13 RT-qPCR 验证实际样本检测

将 1.3.5 所获得的 14 件实际样本核酸模板进行 RT-qPCR 验证, 体系和程序参照农业部 1782 号公告-2-2012 进行, 并稍作修改, 方法如下:

(1) RT-qPCR 扩增体系(25 μL)包括 12.5 μL 1× TaqMan 快速实时荧光定量 PCR 预混液、0.5 μL *HPT II* 或 *NPT II* 对应上下游引物(10 μmol/L)、0.5 μL 对应荧光探针(10 μmol/L)和 1 μL 14 件实际样本核酸模板, 最终用 dd H_2O 补充至 25 μL。

(2)反应循环参数设置为预变性 95 ℃, 5 min; 变性 94 ℃, 15 s, 退火延伸 60 ℃, 60 s, 变性和退火延伸进行 40 个循环。

1.4 数据处理

采用 Adobe Photoshop 2020 软件处理图片, 使用 Image J-win 64 软件分析拍照记录的试纸条 T_H、T_N、C 线信号强度, 运用 Origin 2021 软件进行数据处理与图像绘制。所有实验均独立重复 3 次(n=3)。对原始数据进行描述性统计分析, 具体采用“行统计”功能, 分别计算每组的算术平均值和标准偏差。

2 结果与分析

2.1 双重 RPA 扩增可行性验证

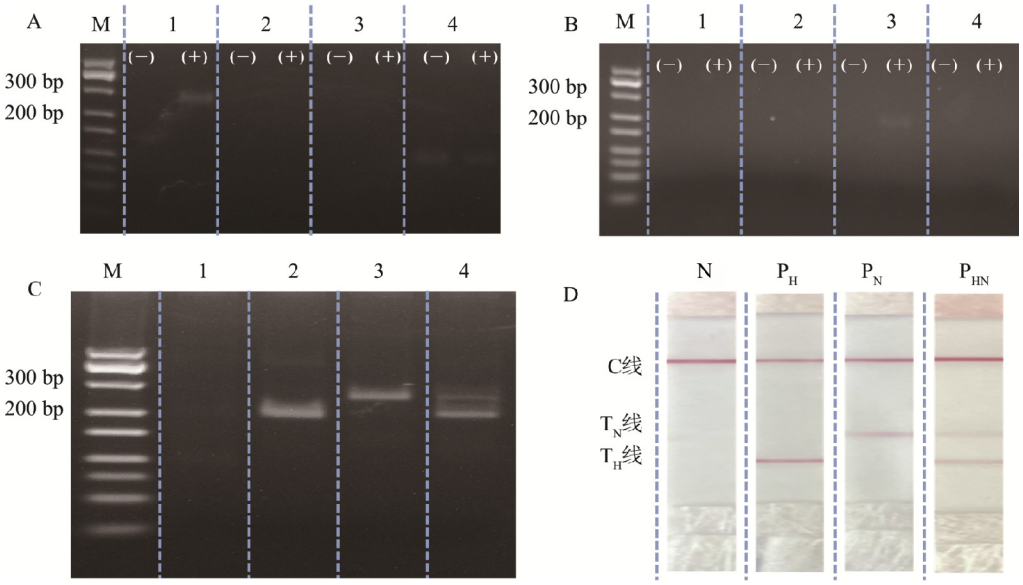
图 2A 2%琼脂糖凝胶中仅泳道 1 中对应的引物可以扩出 *NPTII* (254 bp), 图 2B 2%琼脂糖凝胶电泳则只有泳道 3 对应的引物可以扩增出 *HPTII* (197 bp)。将 2 对引物进行双重 RPA 后, 利用 2%琼脂糖凝胶电泳和双重试纸条对可行性扩增结果进行相互验证, 结果如图 2C、2D。结果显示, 在没有模板时, 泳道 1 中没有对应靶标条带和明显的非特异性扩增条带出现, 试纸条 N 中 T_H、T_N 线均未显色且仅有 C 线显色, 相互证明了 2 种引物的设计具特异性; 泳道 2、3 和试纸条 P_H、P_N 中仅有单一靶标对应的单一条带出

现，进一步说明了 2 种引物的设计相互独立、高度特异；泳道 4 和试纸条 P_{HN} 的结果显示，2 种靶标对应的扩增条带和测试线均出现，但检测 *HPT II* 基因对应的目标条带 197 bp 和 T_H 线亮度均高于检测 *NPT II* 基因对应的目标条带 254 bp 和 T_N 线的亮度，这一方面说明了 F_N、R_N 用量的不足，仍需继续优化，另一方面则证明了双重 RPA 扩增和双重试纸条检测方法的有效建立。

2.2 双重 RPA 扩增体系的优化结果

设置 4 组不同 F_N、R_N 用量的实验对双重 RPA 扩增体系进行优化，结果见图 3A。在 F_N、R_N (10 μmol/L)用量为 2.0 μL 时，阴性扩增结果无非特异性条带、阳性扩增结果达到 2 种靶标基因对应的目标条带亮度基本一致，确定为最佳引物使用量；当 F_N、R_N (10 μmol/L)用量为 2.4 μL 或 1.6 μL 时，均出现 2 种靶标基因对应目标条带亮度不一致的情况，说明 NPT 引物用量过多或过少都会影响到与 HPT 引物的竞争扩增关系；在 F_N、R_N (10 μmol/L)用量高达 2.8 μL 时反而亮度降低，这归因于过量的引物会竞争性抑制重组酶对靶标基因的特异性识别。

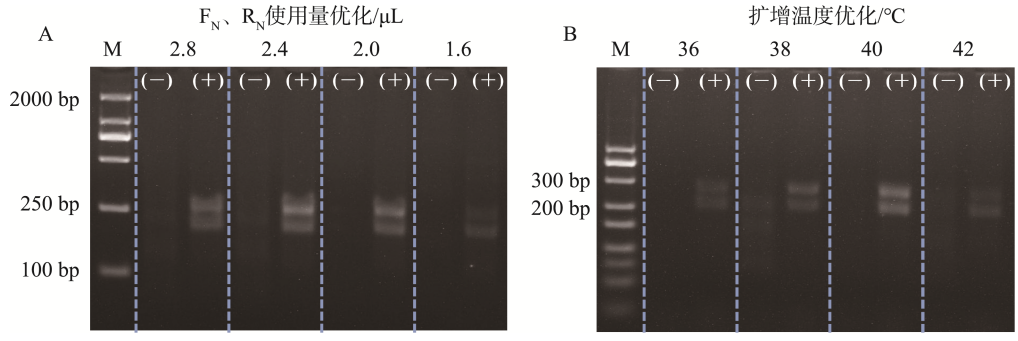
在引物用量优化结果的基础上，设置双重 RPA 扩增温度的优化实验，结果如图 3B。当扩增温度达到 40 ℃时，阴性扩增结果没有出现任何非特异性扩增条带，阳性扩增结果显示为 2 种目标条带最亮且亮度相同，说明该温度下的重组酶与聚合酶都达到了最佳活性状态，而其余温度对重组酶活性均产生抑制，导致扩增结果不佳。



注：A. *NPT II*特异性引物的筛选；B. *HPT II*特异性引物的筛选；C. 2%琼脂糖凝胶电泳验证双重 RPA 可行性；D. 双重胶体金试纸条验证双重 RPA 可行性。图 C 中泳道 1 与图 D 试纸条 N 为 N(–)、H(–)；泳道 2 与试纸条 P_N 为 N(+)、H(–)；泳道 3 与试纸条 P_H 为 N(–)、H(+)；泳道 4 与试纸条 P_{HN} 为 N(+)、H(+)，其中(–)表示不含该类型基因，(+)表示含有该类型基因。

图 2 特异性引物的筛选与双重 RPA 介导的胶体金试纸条对 *NPT II* 和 *HPT II* 基因检测可行性验证

Fig.2 Feasibility verification of specific primer screening and dual RPA-mediated colloidal gold strips for detecting *NPT II* and *HPT II* genes



注：A. 双重 RPA 扩增中 F_N、R_N 使用量的优化；B. 双重 RPA 扩增的反应温度优化。(–)表示阴性扩增结果，(+)表示阳性扩增结果。图 4 同。

图 3 双重 RPA 扩增体系的优化

Fig.3 Optimizing the dual RPA amplification system

2.3 双重胶体金试纸条的优化结果

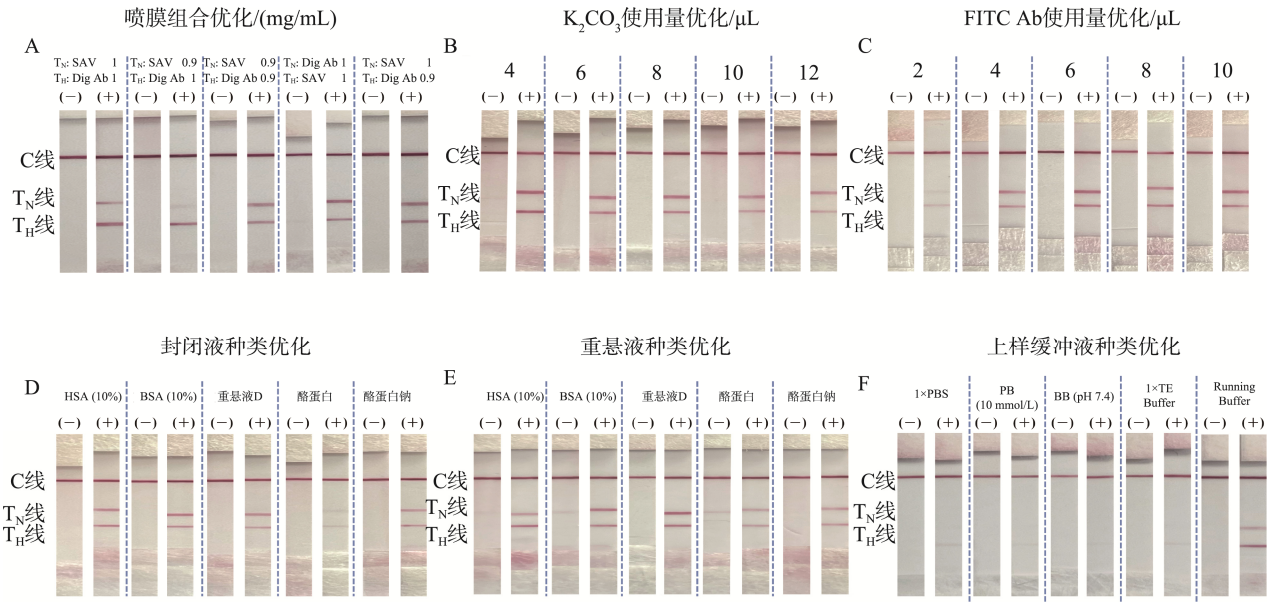
为保证双重 RPA 检测结果输出的可靠性, 本研究对胶体金试纸条的相关条件进行了一系列优化。由 2.2 结果可知, 双重 RPA 的扩增体系已优化至最佳, 而双重试纸条的 T_H、T_N 线显色结果却无法与凝胶电泳结果达成一致。因此, 本研究对胶体金试纸条上的 T_H、T_N 线喷涂组合进行调整, 结果如图 4A, 选择在下方喷涂质量浓度为 0.9 mg/mL 的 Digoxin Ab 作为 T_H 线, 在上方喷涂质量浓度为 1 mg/mL 的 SAV 作为 T_N 线, 此时胶体金试纸条上 2 条测试线的显色结果基本相同, 达到了对 2 种靶标基因检测信号输出保持一致的研究目的。

图 4B~E 是对双重试纸条金标垫的优化结果。用 8 μL K_2CO_3 调节出的偶联 pH 环境比 6 μL K_2CO_3 调节出的偶联 pH 环境更有利于层析反应液的流动, 使得 T_H、T_N、C 线显色更为迅速、完整。而当 K_2CO_3 滴加量仅为 4 μL 时, 过低的 pH 破坏了偶联液的稳定性, 导致 T_N 线假阳, 影响检测结果; FITC Ab 使用量在 6 μL 时就已达到饱和, 过高的抗体量使用会造成抗体的不必要浪费; 5 种封闭液中, 用 BSA (10%)封闭后的金标垫显色效果最好, 剩余几种封闭液可能对金纳米粒子过度封闭, 甚至一定程度上封闭了 FITC Ab 的识别位点, 进而影响抗原抗体识别效率, 导致出线颜色不佳; 重悬液与封闭液使用相同溶液, 由结果可知选重悬液 D 作为重悬液时, 不会影响偶联物的稳定性从而导致 T_N 线结果假阳, 且试纸条显色效果最好。

图 4F 是对上样缓冲液种类进行优化的结果, 结果显示用 Running Buffer 作为缓冲液的显色效果最佳, 因为 Running Buffer 含有表面活性剂吐温-20, 吐温-20 的亲水端和疏水端可以覆盖 NC 膜空白区域, 降低表面张力, 促进层析反应液的流动, 更好地维持抗原抗体的识别微环境, 使得免疫反应识别充分, 故选择 Running Buffer 为最适上样缓冲液。

2.4 双重检测平台灵敏度分析与特异性分析

经过优化, 本研究通过 2 种方式评估所建检测平台的灵敏度。随着 2 种靶标质粒浓度的增加, 图 5A 中 T_H、T_N 线显色逐渐增强并在 10^5 copies/μL 时均达到饱和。结果显示, 该平台对 2 种靶标基因的同步检测灵敏度可达 10^3 copies/μL 级别, 其中对 *HPT II* 基因的单独检测灵敏度可达到 10^2 copies/μL 级别。根据 1.3.10 实验的最终结果, 得到 *HPT II* 基因检出限(limit of detection H, LOD_H)为 314 copies/μL, *NPT II* 基因检出限则略低于 LOD_H, 为 615 copies/μL, 这主要归因于设计的 2 种 RPA 引物扩增效率不同。注意到 1.3.7 筛选的 2 种引物对应的扩增产物长度分别为 254 bp 和 197 bp, 认为 RPA 扩增效率的差异可能是由不同的扩增片段长度引起的。从分子动力学角度来看, 更短的核酸片段(如本体系中的 197 bp 产物)在链置换和聚合酶延伸中更具动力学优势, 能更快地进入指数增长期, 从而在引物和底物的竞争中占主导, 导致其表现为更优的灵敏度。根据 T_H、T_N 线显色强度与对应靶标浓度呈现出的相关度, 在图 5B 中建立 2 种靶标基



注: A. 喷膜组合; B. K_2CO_3 使用量; C. FITC Ab 使用量; D. 封闭液种类; E. 重悬液种类; F. 上样缓冲液种类。

图 4 双重胶体金试纸条的优化

Fig.4 Optimizing the dual colloidal gold lateral flow strip

因质粒质量浓度为 10 fg/μL 至 10 pg/μL 时对应的线性方程(Y_H=2590.4355X–75.665, r^2_H=0.99956; Y_N=1524.945X+3430.071, r^2_N=0.99876), 证明了检测平台具有出色的线性; 在模拟实际样本检测中, 该平台可有效识别 *HPT II* 含量为 0.05%及 *NPT II* 含量为 0.10%的模拟样本(图 5C)。需要说明的是, 在标品梯度实验中, 当 *NPT II* 模板浓度为 50.00%时检测线显色深于 100.00%浓度样本, 其原因可能包括: (1)高浓度靶标在双重 RPA 体系中引发扩增竞争, 抑制了部分扩增效率; (2) *NPT II* 标品本身含有色素及纤维组织等复杂基质, 对扩增产生干扰。尽管如此, 本方法在上述复杂条件下仍成功实现对 2 种靶标的稳定检测, 反映出其良好的抗干扰性与实际应用潜力。

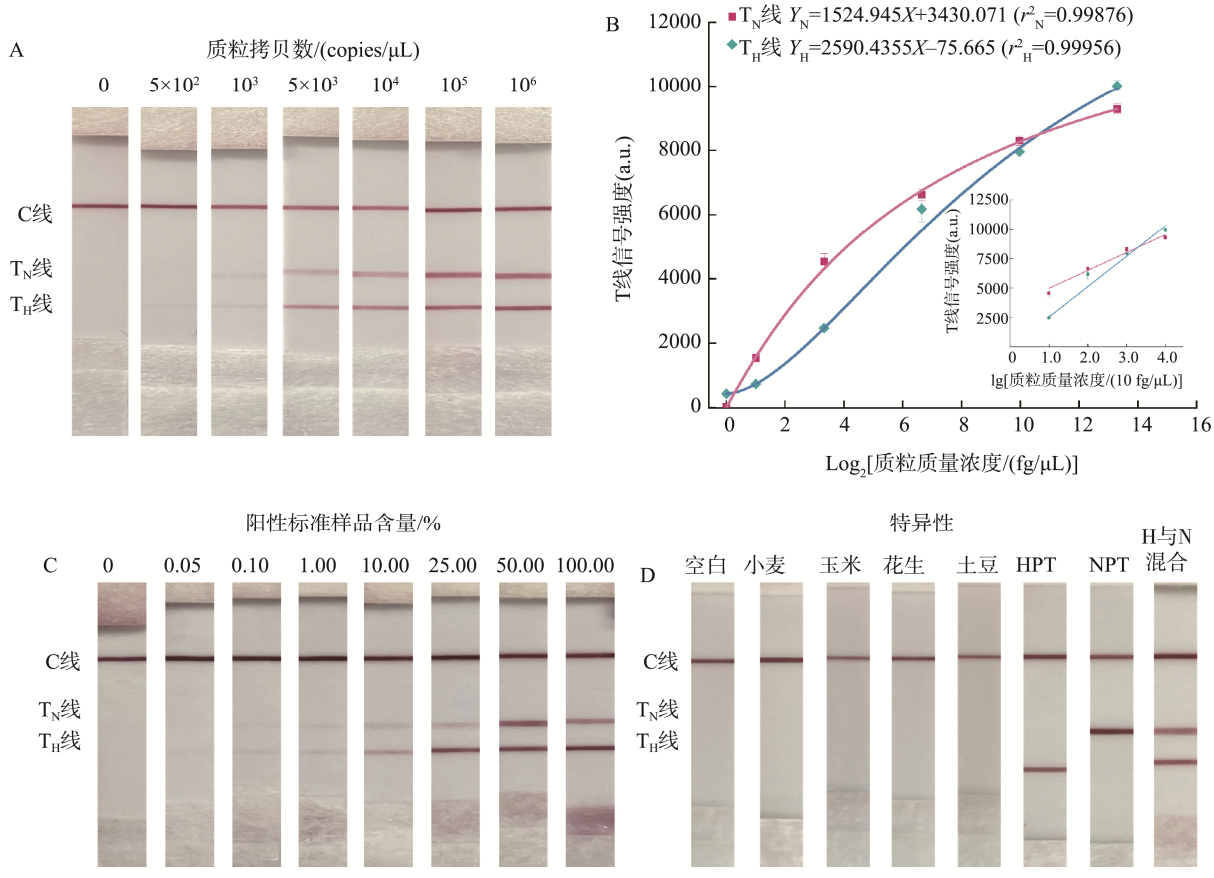
为评估该检测平台的特异性, 本研究选取了几种不含靶标基因的植物实际样本作为对照组, 结果如图 5D 所示, 在相同的扩增检测条件下, 双重胶体金试纸条的 T_H、T_N 线均未显色, 表示检测结果均为阴性, 证明了检测平台对靶标序列的检测具有高度特异性, 能有效鉴别实际样本中是否含有 2 种靶标基因, 为实际样本检测提供了可靠的保障。

2.5 重复性分析与稳定性分析

重复性、稳定性结果如图 6A、6B 所示, 经过 10 次独立重复实验, 用 Image J-win 64 软件分析试纸条 T_H、T_N 线的显色强度, 并计算其相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。T_H 线显色强度对应的 RSD 为 8.49%, T_N 线显色强度对应的 RSD 为 8.77%, 离散程度较小, 证实了该方法具有良好的重复性; 另外将双重胶体金试纸条在室温条件下储存 30 d, 用相同的方法计算出 RSD_H、RSD_N 分别为 10.47%和 9.96%, 信号衰弱程度较小, 表明该检测方法具有良好的稳定性。

2.6 实际样本检测结果与 RT-qPCR 验证

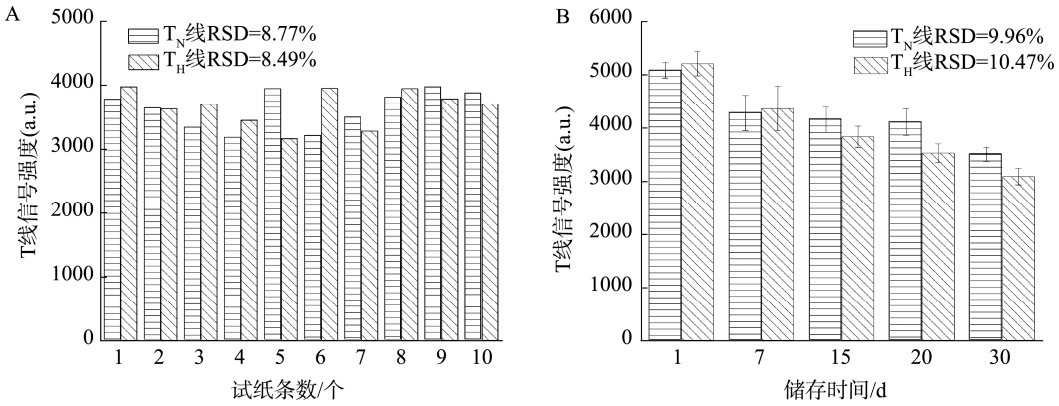
利用构建的检测方法, 将购买自当地大型超市的 14 件植物类型实际样本均进行了双重 RPA 扩增与胶体金试纸条的检测, 检测结果如图 7A 所示。在 14 件实际样品中, NO.3、NO.4 两件样本仅检测出了 *HPT II* 基因, No.6、No.7、No.11 3 件样本仅检测出了 *NPT II* 基因, 而 NO.8 样本同时检测出 2 种靶标基因, 这些检测结果均与 RT-qPCR 的验证完全一致(图 7B、7C), 证明了构建的检测方法对实际样本的检测真实、可靠。



注: A. 以质粒梯度为模板建立的灵敏度; B. 2 种靶标对应的线性方程; C. 以阳性标准样品梯度为模板建立的检出限; D. 特异性分析。

图 5 双重检测平台的灵敏度和特异性分析

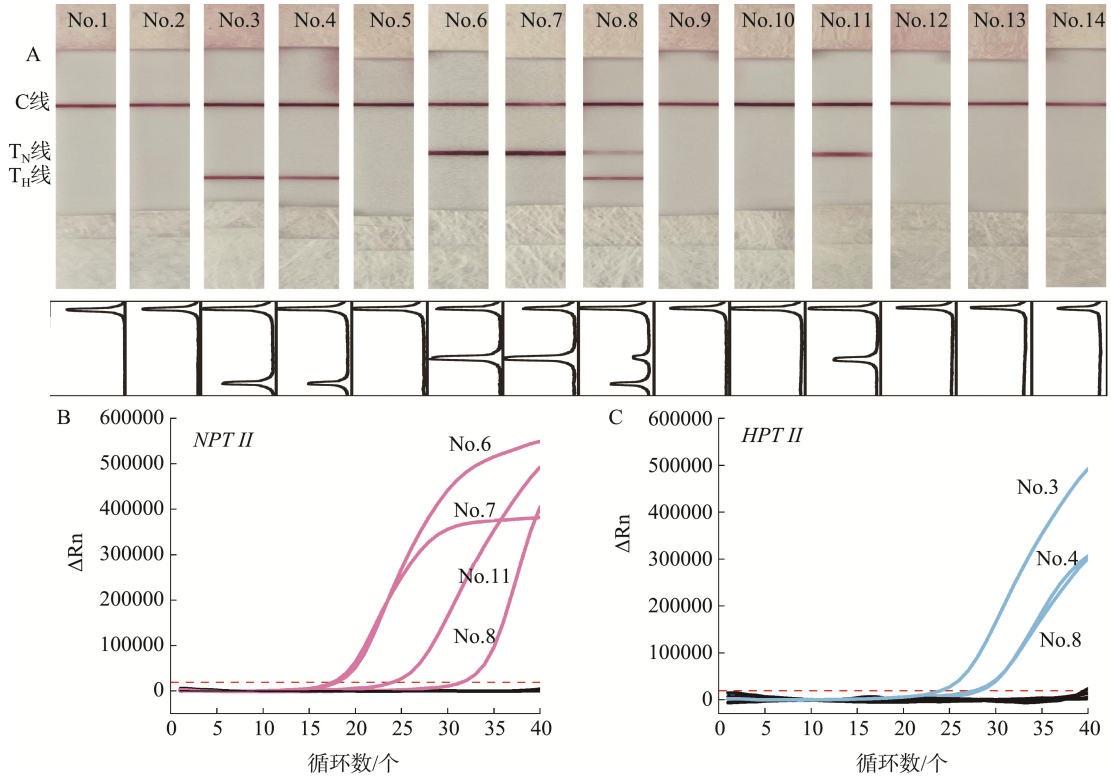
Fig.5 Sensitivity and specificity analysis of the dual detection platform



注: A. 重复性结果; B. 稳定性结果。

图 6 重复性和稳定性分析

Fig.6 Analysis of repeatability and stability



注: A. 本研究建立的方法检测实际样本的结果; B. *NPT II* 基因对应的 RT-qPCR 验证结果; C. *HPT II* 基因对应的 RT-qPCR 验证结果。

图 7 检测实际样本以及 RT-qPCR 验证实际样本检测结果的可靠性

Fig.7 Detection of actual samples and verification of the reliability of the detection results by RT-qPCR

3 讨论与结论

本研究成功地开发了一种基于双重 RPA 介导的胶体金试纸条的检测方法, 并成功实现了对于标记基因 *NPT II* 和 *HPT II* 的同时检测。性能评估方面, 与岳运锋等[32]研究的利用 RT-qPCR 对标记基因进行定性分析相比, 本方法的检测灵敏度级别(10^2 copies/μL)虽然略低于其方法检出的灵敏度级别(10 copies/μL), 但开发出的检测方法用时短(15 min 扩增, 5 min 免疫反应)、对检测设备和专业检测人员的依赖性小、特异性优异, 更因为胶体金试纸条的纸基性质而兼具方便储存运输的特点。JACKOWSKA 等[33]运用电化学适配体传感器的方法 30 min 内检测出了牛奶样品中的新霉素, 尽管该方法抗干扰能力优异(10 倍稀释的牛奶样本中检出限为 36.3 nmol/L), 但存在适配体筛选难

度大、对结构类似物区分不足、电极修饰工艺复杂等问题，影响了该方法的实际应用前景。相比之下，本研究开发的双重 RPA 介导的胶体金试纸条检测平台仅通过简单的引物设计即可特异性区分不同靶标，且整个反应在均相溶液中进行，无需复杂的固相界面修饰，操作更简便、更易于标准化和集成化，更适合现场快速检测。最后，利用 RT-qPCR 的方法对实际样本的检测结果进行了验证，充分证明了开发出的检测方法结果准确可靠。

综上所述，本研究建立的基于双重 RPA 介导的胶体金试纸条检测方法，不仅适用于 *NPT II* 和 *HPT II* 基因的快速可视化检测，也为其它标记基因的快速可视化检测提供了一种新思路。同时，该方法也对转基因生物及其衍生物的痕量检测与现场快速检测展现出了有力的应用前景，因此具有显著的推广应用价值。

参考文献

[1] 杨丽琛, 杨晓光. 转基因食品中标记基因的生物安全性研究进展及对策[J]. 卫生研究, 2003, 32(3): 239–245.
YANG LC, YANG XG. Progress on biosafety assessment of marker genes in genetically modified foods [J]. Journal of Hygiene Research, 2003, 32(3): 239–245.

[2] SOULARD C, MONFORT M, PILLOT JP, *et al*. Efficient and heritable gene editing through CRISPR-Cas9 in Pisum sativum [J]. Plant Biotechnology Journal, 2025, 23(8): 3398.

[3] GOODMAN CP, PADGETT VN, EVANS ER, *et al*. Paromomycin is a more effective selection agent than kanamycin in *Arabidopsis* harboring the neomycin phosphotransferase II transgene [J]. PLoS one, 2025, 20(6): e0325322.

[4] SULIMAN M, BISHR AS, ABOSHANAB KM. Deciphering hygromycin B biosynthetic pathway and *D*-optimal design for production optimization [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2025, 41(5): 1–14.

[5] YUAN G, ISLAM MT, TUSKAN GA, *et al*. A novel gene stacking method in plant transformation utilizing split selectable markers [J]. Bio-protocol, 2025, 15(4): e5214.

[6] 刘婷婷, 仝涛, 黄昆仑. 转基因玉米的研究进展和食用安全性评价[J]. 生物技术进展, 2022, 12(4): 523–531.
LIU TT, TONG T, HUANG KL. Research progress and safety evaluation of transgenic corn [J]. Current Biotechnology, 2022, 12(4): 523–531.

[7] LURQUIN PF. Production of a toxic metabolite in 2,4-*D*-resistant GM crop plants [J]. 3 Biotech, 2016, 6(1): 82.

[8] BRARA Z, MADANI K, COSTA J, *et al*. Current progress on the detection of genetically modified organisms in food: From transgenic towards genome-edited crops [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2025, 24(5): e70243.

[9] ARSHAD E, BALAN RK, GEMMEL M, *et al*. Development and validation of robust real-time PCR assays for genetically modified plants using CaMV 35 S, FMV 34 S, and T-Nos markers [J]. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 2025, 34(4): 1–12.

[10] 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.

[11] HUANG SL, TSEN HY, CHEN HC, *et al*. Detection of major rice allergenic proteins in phytase-transgenic and non-transgenic rice [J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2011, 19(1): 11.

[12] 罗建兴, 刘国强, 呼李乐, 等. 转基因作物检测技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(15): 139–148.
LUO JX, LIU GQ, HU LL, *et al*. Research progress on detection technology of genetically modified crops [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2023, 14(15): 139–148.

[13] 郭雨湄, 贾振军, 刘瑞. 核酸等温扩增方法在食品安全检测中的应用综述[J]. 食品与发酵工业, 2025, 51(11): 435–448.
GUO YM, JIA ZJ, LIU R. Isothermal nucleic acid amplification technology [J]. Food and Fermentation Industries, 2025, 51(11): 435–448.

[14] DING G, JIN Z, ZHANG Y, *et al*. Detection of genetically modified rice by loop-mediated isothermal amplification assays on a self-priming compartmentalization chip [J]. Food Analytical Methods, 2020, 13(7): 1454–1461.

[15] SINGH M, PAL D, AMINEDI R, *et al*. Multiplex real-time loop-mediated isothermal amplification (LAMP) based on the annealing curve analysis: toward an on-site multiplex detection of transgenic sequences in seeds and food products [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(31): 17658–17665.

[16] SASI S, REVATHY KA, BHAT AI. Rapid identification of transgenic black pepper using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and real-time LAMP assays [J]. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 2015, 24(4): 466–469.

[17] PANG YH, WANG YY, SUN MM, *et al*. Visual detection of CaMV35S promoter via target-triggered rolling circle amplification of DNA zyme [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2021, 106: 104304.

[18] WANG X, TENG D, GUAN Q, *et al*. Detection of genetically modified crops using multiplex asymmetric polymerase chain reaction and asymmetric hyperbranched rolling circle amplification coupled with reverse dot blot [J]. Food Chemistry, 2015, 173: 1022–1029.

[19] XU C, LI L, JIN W, *et al*. Recombinase polymerase amplification (RPA) of CaMV-35S promoter and nos terminator for rapid detection of genetically modified crops [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(10): 18197–18205.

[20] SU A, CHEN Z, XU W, *et al*. CRISPR/dCas9-assisted SERS sensing for transgenic crops based on two-factor verification of 35S promoter and Nos terminator [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2025, 429: 137293.

[21] LIU H, WANG J, LI P, *et al*. Rapid detection of P–35S and T-nos in genetically modified organisms by recombinase polymerase amplification combined with a lateral flow strip [J]. Food Control, 2020, 107: 106775.

[22] 闫家通, 陈冠玮, 缪青梅, 等. 基于重组酶聚合酶扩增的转基因玉米和

大豆现场快速检测方法[J]. 遗传, 2025, 47(6): 694–707.
YAN JT, CHEN GW, MIAO QM, *et al*. Onsite rapid detection method for genetically modified maize and soybean based on recombinase polymerase amplification [J]. Hereditas (Beijing), 2025, 47(6): 694–707.

[23] ZHU L, WEI F, WU C, *et al*. On-site visualization and sensing platform for detecting genetically modified papaya “55–1” in papaya-derived products [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2025. DOI: 10.1021/ACS.JAFC.5C07325

[24] 颜晶莹, 倪亮, 沈星宇, 等. 转基因作物多重重组酶聚合酶扩增结合 CRISPR/Cas12a 现场可视化检测方法的建立(英文)[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2025, 51(3): 391–401.
YAN JY, NI L, SHEN XY, *et al*. Establishment of a field visualization detection method for multiplex recombinase polymerase amplification combined with CRISPR/Cas12a in genetically modified crops [J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences), 2025, 51(3): 391–401.

[25] TAO R, ZHANG J, MENG L, *et al*. A rapid field-visualization detection platform for genetically modified soybean ‘Zhonghuang 6106’ based on RPA-CRISPR [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 26(1): 108.

[26] WANG J, WANG Y, HU X, *et al*. The development of RPA and CRISPR-Cas12a based immunoassay strip for sensitive detection of genetically modified crops [J]. Food Control, 2022, 139: 109048.

[27] WANG J, WANG Y, LIU H, *et al*. An ultra-sensitive test strip combining with RPA and CRISPR/Cas12a system for the rapid detection of GM crops [J]. Food Control, 2023, 144: 109383.

[28] 卢长明, 宋贵文, 吴刚. 农业部 1782 号公告-2-2012.转基因植物及其产品成分检测标记基因 NPTⅡ, HPT 和 PMI 定性 PCR 方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 2012.
LU CM, SONG GW, WU G. Announcement No.1782-2-2012 of the ministry of agriculture: detection of genetically modified plants and derived products-qualitative PCR method for the marker genes NPTII, HPT and PMI [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2012.

[29] WANG J, LUO J, LIU H, *et al*. “Blue-red-purple” multicolored lateral flow immunoassay for simultaneous detection of GM crops utilizing RPA and CRISPR/Cas12a [J]. Talanta, 2025, 282: 127010.

[30] ZHENG B, YAN J, LI T, *et al*. Hydrophilic/hydrophobic modified microchip for detecting multiple gene doping candidates using CRISPR-Cas12a and RPA [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2024, 263: 116631.

[31] 孙稚成, 孙兆法, 段玉军, 等. 碱解法快速提取菠菜基因组 DNA 方法的优化[J]. 中国农学通报, 2020, 36(36): 79–83.
SUN ZC, SUN ZF, DUAN YJ, *et al*. Rapid extraction of genomic DNA in spinach: Optimization of sodium hydroxide hydrolysis method [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2020, 36(36): 79–83.

[32] 岳运锋, 吴刚, 武玉花, 等. 转基因植物中标记基因定性 PCR 检测方法研究[J]. 中国油料作物学报, 2011, 33(3): 280–289.
YUE YF, WU G, WU YH, *et al*. Development of qualitative PCR method targeting marker genes in transgenic plants [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2011, 33(3): 280–289.

[33] JACKOWSKA A, GRABOWSKA I, KURZĄTKOWSKA-ADASZYŃSKA K. Electrochemical RNA-based aptasensor for neomycin detection in milk samples [J]. Food Control, 2025, 175: 111257.

(责任编辑: 韩晓红 蔡世佳)