

棉花中转基因成分多重 PCR 检测体系的建立

陈贞¹ 芦春斌^{2*} 杨梦婕² 马骏³ 白卫斌¹ 吴希阳^{1*}

(1. 暨南大学 理工学院, 广州 510632; 2. 暨南大学 生殖免疫研究所, 广州 510632;
3. 广东出入境检验检疫局 检验检疫技术中心, 广州 510623)

摘要 以棉花内源基因 *sad1*、报告基因 *GUS*、外源抗虫基因 *Cry1Ab/Ac*、筛选基因 *NPT II*、*NOS* 终止子和 *CaMV35S* 启动子为检测对象, 设计的 6 对引物能扩增长度合适的基因片段且避免了引物二聚体。通过优化 PCR 扩增体系中不同引物终浓度的配比以及退火温度对多重 PCR 检测的影响, 建立了棉花转基因成分 6 重 PCR 检测体系。结果表明: 采用本研究建立的棉籽基因组 DNA 提取方法, 该 6 重 PCR 检测体系能够有效地从少至 1 颗棉籽的少量样品里检测出棉花中的转基因成分。

关键词 棉花; 转基因检测; 多重 PCR

中图分类号 S 562 文章编号 1007-4333(2011)03-0015-06 文献标志码 A

Multiplex PCR for detection of genetically modified components in cotton seeds

CHEN Zhen¹, LU Chun-bin^{2*}, YANG Meng-jie², MA Jun³, BAI Wei-bin¹, WU Xi-yang^{1*}

(1. College of Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China;
2. Institute of Reproductive Immunology, Jinan University, Guangzhou 510632, China;
3. Inspection and Quarantine Technology Center, Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510623, China)

Abstract To detect transgenic components in genetically modified cotton, endogenous gene *sad1*, reporter gene *GUS*, exogenous insect resistant gene *Cry1Ab/Ac*, screening gene *NPT II*, *NOS* terminator and *CaMV35S* promoter were chosen for establishing a multiplex polymerase chain reaction method. The designed six pairs of primers can amplify proper fragments and avoid primer dimers. The PCR conditions for the multiplex PCR analysis were optimized based on the primer concentration and annealing temperature, and the Six-Plex PCR detection system for transgenic components in cotton was then established. Results showed that the Six-Plex PCR can successfully detect the transgenic components in genetically modified cotton, from even a small quantity sample as little as a cotton seed using a modified genomic DNA extraction method for cotton seeds in this study.

Key words cotton; transgenic detection; multiplex PCR

棉花作物不仅可生产纤维应用在纺织品上, 其棉籽也是动物饲料和各种加工食品组分原材料的重要来源。目前许多国家如印度、美国、中国、阿根廷和南非等均种植转基因棉花, 且发展迅速。2007 年全世界种植转基因棉花面积达 1 500 万 hm^2 , 占世

界棉花总面积的 43%。截止到 2009 年, 美国、印度和中国的转基因棉花种植面积分别为 320 万、840 万和 370 万 hm^2 , 约占本国棉花种植面积的 88%、89% 和 60%^[1]。随着转基因棉花的广泛种植, 出于对转基因作物安全性的考虑, 日本、欧盟等许多国家

收稿日期: 2010-09-13

基金项目: 农业部转基因重大专项(2008ZX08012-005)

第一作者: 陈贞, 硕士研究生, E-mail: chenzhen198507@163.com

通讯作者: 吴希阳, 教授, 博士, 主要从事食品安全及微生物分子免疫研究, E-mail: kentwu@hotmail.com

芦春斌, 副研究员, 博士, 主要从事转基因植物与粘膜免疫研究, E-mail: tcblu@jnu.edu.cn

相继建立了转基因食品标识制度^[2]。我国于2002年3月20日起施行《农业转基因生物标识管理办法》，要求对5类转基因生物所涉及的17种转基因产品进行标识，其中也包括了转基因棉花种子^[3]。因此建立一套方便、快捷的棉花转基因产品检测技术是贯彻标识制度的重要前提。

近年来国内外关于转基因植物检测的报道多涉及转基因大豆、玉米、水稻及其加工产品^[4]，对于转基因棉花的检测研究则报道较少。这些报道中虽然包括SSR(simple sequences repeat,简单重复序列)PCR技术^[5]、ELISA检测^[6]和单一PCR检测^[7]，但是现有的检测技术操作复杂、检测耗时长且无法同时检测转基因棉花中多个外源基因。本研究以棉籽为试验材料提取基因组DNA，根据检验检疫行业标准以及技术规范^[8-9]，对6种基因(5种外源基因、1种内源基因)进行6重PCR检测分析，以建立稳定、低成本且便于在科研机构和相关检疫部门应用的转基因棉花多重PCR检测体系。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

材料:本试验于2009年夏在暨南大学理工学院和生科院进行。转基因棉花(内含棉籽)由北京出入境检验检疫局提供;质粒PTF102(含GUS、NOS和CaMV35S基因)由暨南大学生殖免疫研究所保存;

转基因大米、菜籽粕和大豆由广东出入境检验检疫局提供。

主要试剂:Wizard Genomic DNA purification试剂盒,美国Promega公司;Taq聚合酶、dNTPs、10×PCR缓冲液、MgCl₂(25 mmol/L)、100 bp DNA Ladder Marker,6×Loading Buffer,Multiplex PCR Assay Kit,大连宝生物工程有限公司。

1.2 主要仪器及设备

高速离心机;NANODROP 1000生物分光光度计, Gene Company Limited; PT-1148 MJ mini Thermal Cycler梯度PCR仪, Bio-rad公司;核酸电泳仪;凝胶成像仪;电热恒温水槽。

1.3 引物

引物由上海生工生物技术有限公司合成(表1);利用国标(行标、农标)的引物在NCBI中BLAST搜索基因的原序列,再利用Primer Premier V5.0软件进行单一PCR的引物设计,用Oligo V6.22软件筛选出各种指标优良的引物。引物设计遵循的原则是:3'-端要避免发生碱基配对,当3'-端发生聚合现象时,其|ΔG|尽量控制在8.0以内;引物的熔解温度(T_m值)应该高于65℃以增加PCR反应的特异性^[10];PCR产物片段大小在在200 bp以内时,片段差异大于30 bp,500 bp以上片段差异要大于70 bp。

表1 引物序列及扩增产物
Table 1 Primer sequence and PCR products

扩增基因	引物名称	引物序列(5'-3')	T _m /℃	产物大小/bp
sad1	sad1-F	CCACGAGACAGCCTATACCAAAAT	70.9	539
	sad1-R	CCCTAACCAAAGCCACGCA	72.8	
GUS	GUS-F	CTGCGACGCTCACACCGATACC	77.1	441
	GUS-R	TCACCGAAGTTCATGCCAGTCCAG	78.0	
Cry1Ab/Ac	Cry1Ab/Ac-F	GAAGGATTGAGCAATCTCTACCAA	69.3	304
	Cry1Ab/Ac-R	TTCCAATCAGCCTAGTAAGGTCGT	70.7	
NPT II	NPT II-F	CTCACCTTGCTCCTGCCGAGA	75.8	215
	NPT II-R	CGCCTTGAGCCTGGCGAACAG	79.9	
NOS	NOS-F	TGAATCCTGTTGCCGGTCTT	71.3	138
	NOS-R	AAATGTATAATTGCGGGACTCTAATC	68.2	
CaMV35S	CaMV35S-F	ATTGATGTGATATCTCCACTGACGT	69.4	101
	CaMV35S-R	CCTCTCAAATGAAATGAACTTCCT	71.3	

注:T_m值来源于Oligo V6.22软件。

1.4 方法

1.4.1 基因组 DNA 提取

棉籽用 98% 浓硫酸脱绒处理^[11], 将脱绒籽用水浸泡 6~8 h, 然后取出用研钵研碎, 接着放入 65 °C 烘箱稍微烘干 (30 min), 采用改进的试剂盒法 (Promega 公司) 提取棉籽基因组 DNA, 提取方法按照说明书进行, 将原来的裂解水浴时间由 20 min 延长至 40 min~1 h, 离心时间由 5 min 延长至 8 min。提取后的 DNA 在生物分光光度计上测定其浓度和纯度。棉籽 DNA 稀释为 50 ng/ μ L。

1.4.2 内源基因和外源转基因的单一 PCR 检测

单一 PCR 反应体系包括: 10 \times PCR buffer 5 μ L, dNTP mixture 4 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 3 μ L, 引物终浓度各 0.4 μ mol/L, 模板 DNA 2 μ L, TaqTM DNA 聚合酶 1.25 U, ddH₂O 将体积调整为 50 μ L。PCR 反应条件为: 94 °C, 5 min; 94 °C, 40 s, 60 °C, 60 s, 72 °C, 60 s, 35 个循环; 72 °C, 5 min。取 6 μ L PCR 产物, 经质量分数 2.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4.3 多重 PCR 体系的建立与检测

多重 PCR 反应体系包括: Multiplex PCR Assay Kit 中 Mix 1 (含 Buffer、dNTP、MgCl₂) 25 μ L, Mix 2 (含 TaqTM DNA 聚合酶) 0.25 μ L, 引物终浓度分别为 0.1、0.4、0.1、0.1、0.4 和 0.4 μ mol/L (次序见表 1), 模板 DNA 3 μ L (50 ng/ μ L), ddH₂O 将体积调整为 50 μ L。PCR 反应条件为: 94 °C, 1 min; 94 °C, 30 s, 60.4 °C, 90 s, 72 °C, 90 s, 35 个循环; 72 °C, 10 min。取 PCR 产物 8 μ L 于 2.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

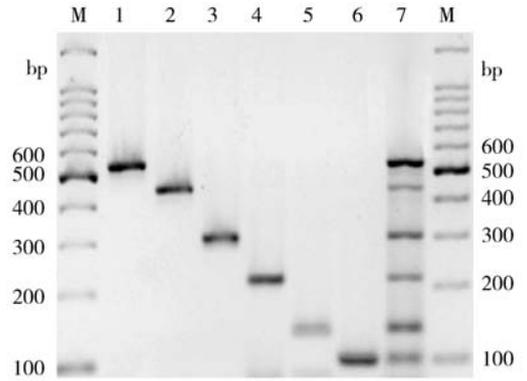
1.4.4 PCR 产物的序列测定

PCR 产物测序委托上海博尚生物技术有限公司完成, 序列结果用 NCBI-BLAST 在线软件对其进行生物信息学分析。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取和转基因成分单一 PCR 检测

采用改进的 Promega 试剂盒法提取的棉籽基因组 DNA, 经生物分光光度计检测, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值在 1.7~1.9 之间, 所提取的 DNA 纯度较好, DNA 含量为 276 ng/ μ L, 符合 PCR 反应的要求。经单一 PCR 分别检测 *sad1*、*GUS*、*Cry1Ab/Ac*、*NPT II*、*NOS*、*CaMV35S* 均呈阳性 (图 1)。



M 为 100bp Ladder DNA Marker; 1~6 分别为 *sad1*、*GUS*、*Cry1Ab/Ac*、*NPT II*、*NOS*、*CaMV35S* 基因的单一 PCR 产物; 7 为上述 6 个基因的多重 PCR 产物。

图 1 转基因成分的单— PCR 检测和多重 PCR 检测结果
Fig. 1 Single PCR and multiplex PCR detection for transgenic components

2.2 转基因成分多重 PCR 检测结果

多重 PCR 检测结果与单一 PCR 检测结果一致 (图 1), 表明研究建立的多重 PCR 方法是可行的。

在同一 PCR 体系中同时扩增 6 种基因 (内源 *sad1* 基因、*GUS* 报告基因、*Cry1A(b)/A(c)* 抗虫基因、*NPT II* 筛选基因、*NOS* 终止子基因和 *CaMV35S* 启动子基因) 时, 对 PCR 扩增条件中的各引物的浓度配比及退火温度进行了研究。当引物浓度配比为 1:1:1:1:1:1 时, 在所采用的各个退火温度下, *Cry1Ab/Ac* 基因和 *NPT II* 基因的 PCR 产物产量较大, 且内源 *sad1* 基因的扩增受到极大的抑制。当引物的终浓度配比为 1:4:1:1:4:4 时, 退火温度采用 60.4 °C 时, *sad1*、*GUS*、*Cry1A(b)/A(c)*、*NPT II* 基因都能得到很好的扩增, 且条带清晰均一 (图 1)。

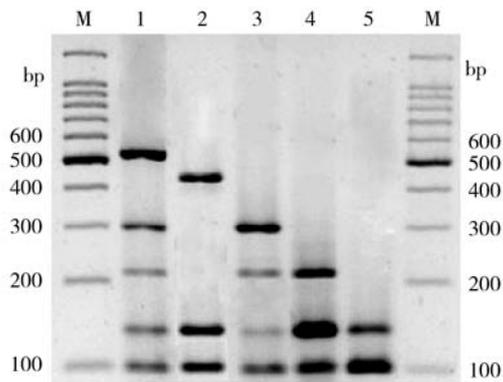
2.3 *sad1*、*GUS*、*Cry1Ab/Ac*、*NPT II*、*NOS*、*CaMV35S* 基因 PCR 产物的序列测定

多重 PCR 扩增产物的 DNA 序列与 NCBI 数据库进行 BLAST 比对分析可见, PCR 扩增产物 *sad1*、*GUS*、*Cry1Ab/Ac*、*NPT II*、*NOS* 和 *CaMV35S* 的 DNA 序列与已知序列的同源性分别为 99%、98%、100%、100%、100% 和 99%, 从而证实 PCR 扩增产物确为目的扩增产物。

2.4 6 重 PCR 体系检测实证分析

利用现有的其他转基因材料验证本实验中建立的多重 PCR 检测体系, 结果见图 2。这些转基因植物材料的 DNA 提取方法和 PCR 条件同上述 6 重

PCR 体系。



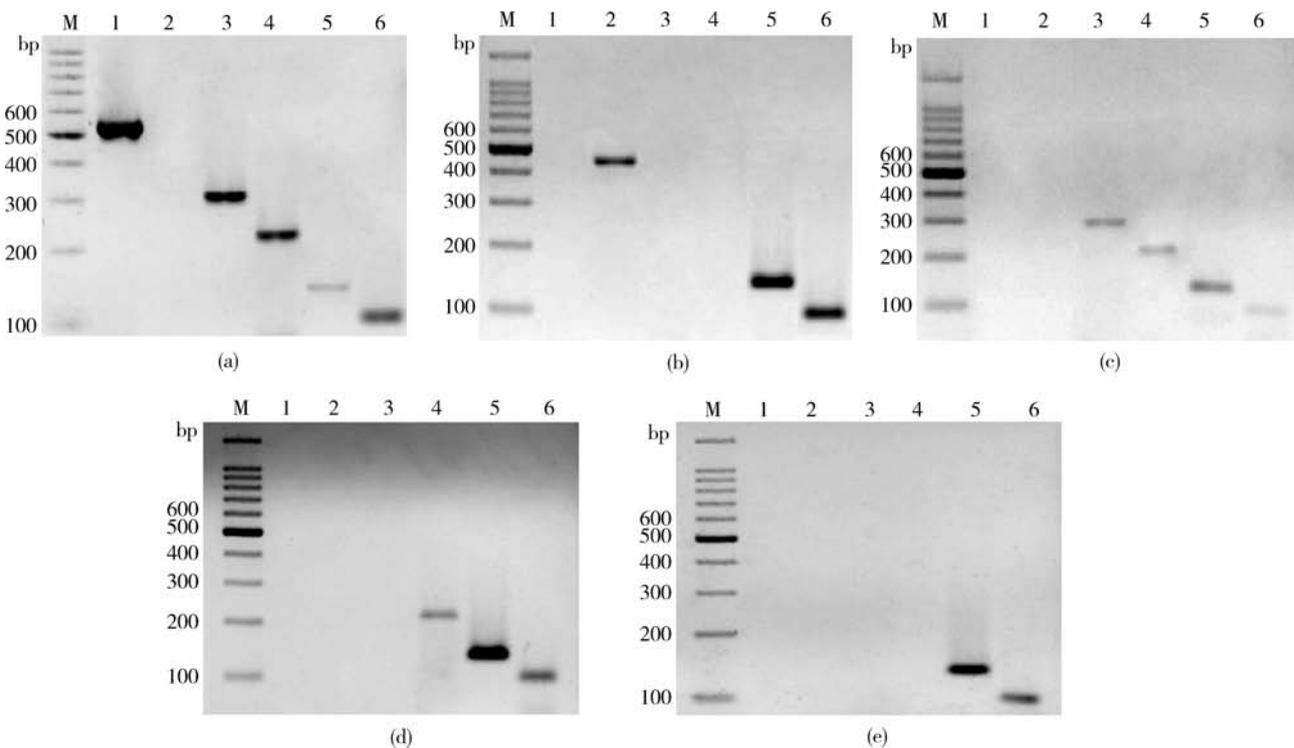
M 为 100 bp Ladder DNA Marker; 1~5 分别为上述建立的 6 重 PCR 体系检测转基因棉花、PTF102、转基因大米、转基因菜籽粕、转基因大豆。

图 2 6 重 PCR 体系分别检测各已知转基因样品

Fig. 2 Detection for the known transgenic samples using the above established Six-Plex PCR system

从质粒图谱中得出 PTF102 含有 *GUS*、*NOS* 和 *CaMV35S* 基因;转基因大米经检验检疫行业标准(广东出入境检验检疫局)所采用的荧光定量 PCR^[12] 验证含有 *Cry1Ab/Ac*、*NPT II*、*NOS* 和 *CaMV35S* 基因;转基因菜籽粕经检验检疫行业标准(广东出入境检验检疫局)采用荧光定量 PCR 验证含有 *NPT II*、*NOS* 和 *CaMV35S* 基因;转基因大豆经检验检疫行业标准(广东出入境检验检疫局)采用荧光定量 PCR 验证含有 *NOS* 和 *CaMV35S*。因而图 2 中的结果与检验检疫行业标准方法(检疫局)检测结果一致。再用单一 PCR 分别验证转基因棉花、PTF102、大米、菜籽粕、大豆含 *sad1*、*GUS*、*Cry1Ab/Ac*、*NPT II*、*NOS* 和 *CaMV35S* 基因的情况,结果见图 3。

以上结果表明,单一 PCR 的结果也与多重 PCR 的结果一致,再次证实了多重 PCR 体系的特异性和可靠性。



(a)~(e)模板依次为转基因棉花、PTF102、大米、菜籽粕、大豆;M 为 100 bp Ladder DNA Marker; 1~6 分别为 *sad1*、*GUS*、*Cry1Ab/Ac*、*NPT II*、*NOS* 和 *CaMV35S* 基因。

图 3 单一 PCR 分别验证 *sad1*、*GUS*、*Cry1Ab/Ac*、*NPT II*、*NOS*、*CaMV35S* 基因

Fig. 3 Single PCR detection for *sad1*, *GUS*, *Cry1Ab/Ac*, *NPT II*, *NOS* and *CaMV35S* gene, respectively

综合以上结果,本研究所建立的 6 重 PCR 体系能有效地检测出棉籽、PTF102 质粒、大米、菜籽粕

和大豆中的转基因成分,由此证明以上建立的 6 重 PCR 体系用来检测棉花中的转基因成分是可行的,

检测方法效率高且简便准确。

3 讨论

1)本研究根据2003年检验检疫行业标准^[9](以CaMV35S、NOS、NPT II、18r DNA、GUS、CryIAb/Ac和CryIAc基因为检测对象)以及2005年技术规范^[8](以棉花的*sadl*基因和转基因抗虫棉花中的CaMV35S启动子、NOS终止子和Cry抗虫基因为检测对象),选取*sadl*(能检测出棉花成分的内源基因)、GUS(常见报告基因)、CryIAb/Ac(常见抗虫基因)、NPT II、NOS和CaMV35S(一般转基因作物含有的筛选基因)这6个基因作为检测对象建立6重PCR检测技术,通量较高,提高了检测效率,避免了漏检。

2)本研究试验材料仅用一颗棉籽,借鉴棉籽脱绒的方法,成功提取了基因组DNA并用于PCR检测,方法新颖,且可应用于少量样品抽样检测的情况。另外本试验对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,满足了多重PCR的需求。

3)引物设计是多重PCR成功的关键因素。在多重PCR引物设计中对PCR反应有着较大影响的是引物二聚体,本试验采用Primer5.0的Multiplex primer功能,进行多条引物的二聚体检验,检验不合格的重新设计引物。

4)在多重PCR扩增中另一个要考虑的主要因素是扩增产物的片段大小不能太接近。目前在已发布的标准和外文文献里的扩增片段中针对CaMV35S启动子主要有195、165^[13-14]、188^[15]、162^[16]、123^[17]和101 bp^[18],Nos终止子主要有213^[16]、165、180^[14]、170^[19]、151^[18]、138^[15]和118 bp^[20],筛选基因NPT II主要有364^[16]、215^[20]、183^[21]、173^[22]、157^[15]和155 bp^[18],考虑到扩增片段大小不应太接近的原则同时分析了各引物间的序列和退火温度以及相互二聚体情况后,选择了101、138和215 bp以分别扩增内源35S启动子、NOS终止子和筛选基因NPT II的相应片段。CryIAb/Ac的引物设计参考了文献^[23],增加了文献中的引物序列的长度,使之退火温度满足需求。GUS基因参照文献^[24]。*sadl*基因的引物由本课题组自行设计。

5)配比引物时,通常根据扩增条带质量调整不同引物的浓度,降低过亮条带的引物浓度,增加条带过暗的引物浓度,直至最佳扩增结果^[4]。本研究发

现在一定条件下调整过亮条带的引物浓度时会对过暗条带的亮度有较大的影响。当减少CryIAb/Ac和NPT II的引物量,其产物量会随之减少,但是*sadl*基因的PCR产物量会大大增加,其原因可能是当CryIAb/Ac和NPT II引物量(原始浓度均为20 μmol/L)相对较大,竞争了Taq酶,导致*sadl*基因扩增受到抑制。当减小CryIAb/Ac和NPT II引物量(原始浓度分别稀释为3和2 μmol/L)时,CryIAb/Ac和NPT II基因对酶的竞争减少,*sadl*在体系中有足够的酶和引物量得以较大的扩增(*sadl*基因扩增过多,其引物原始浓度也相应从20 μmol/L调整到5 μmol/L)。试验结果证明配比引物受多因素的作用,必须通过试验反复验证才能确定。

参 考 文 献

- [1] GMO Compass. Cotton[DB/OL]. [2010-10-07]. <http://www.gmo-compass.org/eng/database/plants/21.cotton.html>
- [2] Xu J, Miao H Z, Wu H F, et al. Screening genetically modified organisms using multiplex-PCR coupled with oligonucleotide microarray[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2006, 22: 71-77
- [3] 农业转基因生物标识管理办法[S]. 中华人民共和国对外贸易经济合作部文告, 2002, (S3)
- [4] 敖金霞, 高学军, 于艳波, 等. 转基因大豆、玉米、水稻深加工产品的五重巢式PCR技术检测[J]. 中国农业大学学报, 2010, 15(2): 93-99
- [5] 马雪霞, 王凯, 郭旺珍, 等. 棉花SSR多重PCR技术的初步研究和利用[J]. 分子植物育种, 2007, 4(4): 648-654
- [6] 郭艾英. 应用ELISA检测转基因棉花中基因蛋白的研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2006
- [7] 徐宝梁, 苏宁, 陈颖, 等. 应用PCR方法检测转基因棉籽的研究[J]. 粮油食品科技, 2004, 12(2): 28-30
- [8] 魏启文, 刘信, 宋贵文, 等. 转基因抗虫棉花检测技术规范-定性PCR筛查方法(试行)[S/OL]. [2010-09-12]. <http://www.cgap.org.cn/ewebeditor/Example/aemctxt/NewsFile/200612792657772.doc2005.3>
- [9] 中华人民共和国天津出入境检验检疫局. SNT 1199-2003, 棉花中转基因成分定性PCR检测方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003
- [10] Nishiwaki M, Yamamoto T, Tone S, et al. Genotyping of human papillomaviruses by a novel One-Step typing method with multiplex PCR and clinical applications [J]. Clinical Microbiology, 2008, 46(4): 1161-1168
- [11] 张存信. 棉花种子硫酸脱绒技术[J]. 北京农业, 1995(2): 13
- [12] Mäde Z, Degner C, Grohmann L. Detection of genetically modified rice: a construct-specific real-time PCR method based on DNA sequences transgenic Bt rice [J]. Eur Food Res

- Technol, 2006, 224: 274-278
- [13] Hurst C D, Knight A, Bruce I J. PCR detection of genetically modified soya and maize in food stuffs[J]. Molecular Breeding, 1999(5): 579-586
- [14] Lipp M, Brodmann P, Pietsch K, et al. IUPAC col-laborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder[J]. Journal of AOAC International, 1999, 82(4): 923-928
- [15] 中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、国家质量监督检验检疫总局动植物检验检疫所. GB/T19495. 6-2004, 转基因产品检测-基因芯片检测方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004
- [16] Zhou P P, Zhang J Z, You Y H, et al. Detection of genetically modified crops by combination of multiplex PCR and low-density DNA microarray[J]. Biomedical and Environmental Sciences, 2008, 21: 53-62
- [17] Nikolic'Z, Milosevic M, Vujakovic M, et al. Qualitative triplex PCR for the detection of genetically modified soybean and maize[J]. Biotechnol, 2008, 22: 801-803
- [18] Mano J, Oguchi T, Akiyama H, et al. Simultaneous Detection of recombinant DNA segments introduced into genetically modified crops with multiplex ligase chain reaction coupled with multiplex Polymerase Chain Reaction[J]. Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(7): 2640-2646
- [19] 中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国新疆出入境检验检疫局和山东出入境检验检疫局. SN/T1816-2006, 番茄中转基因成分定性 PCR 检测方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006
- [20] 中华人民共和国上海出入境检验检疫局和天津出入境检验检疫局. GB/T19495. 4-2004, 转基因产品检测-核酸定性 PCR 检测方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004
- [21] 中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局. SN/T1196-2003, 玉米中转基因成分定性 PCR 检测方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003
- [22] 中华人民共和国上海出入境检验检疫局. SN/T1197-2003, 油菜籽中转基因成分定性 PCR 检测方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003
- [23] 闻伟刚, 盛蕾, 张吉红, 等. 痕量及微量转基因大米成分半巢式 PCR 检测方法的建立[J]. 食品科学, 2008, 29(12): 622-626
- [24] 李伟丰, 杨朗, 黄鹏. 应用复合 PCR 检测水稻种子的转基因成分[J]. 种子, 2007, 26(1): 32-35

(棉花专栏研究论文 3, 责任编辑: 袁文业)

· 科研简讯 ·

我校工学院“沼液沼渣利用和农村生活污水处理”两项成果通过教育部鉴定

由工学院董仁杰教授主持的“沼气工程沼液、沼渣高值利用技术研究”, “北方户用农村污水生态净化系统”两项成果, 通过了教育部组织的专家鉴定。

“规模化沼气工程沼液沼渣高值利用技术与工程示范”课题, 是“十一五”国家科技支撑计划课题。该课题针对沼液沼渣减量化、资源化和土地承载力等难点, 定量确定了沼液养分和活性成分, 在小试和大田施用规模上确定了不同作物施用沼液沼渣的土地承载力, 研发了沼液大回流工艺、沼液浓缩工艺、高效沼液营养液配方、沼液有机肥配方和生产工艺、沼渣人工基质配方等技术。其中沼液大回流工艺在干清粪养殖场沼气工程中实现沼液排放减量 70% 以上, 复配固氮菌剂的沼液有机营养液稳定期 3 个月以上, 优质沼渣人工育苗基质可完全或部分替代草炭, 且育苗效果优于常规人工育苗基质。

“北方户用农村污水生态净化系统”是科技部科技成果转化项目。课题组针对农村地区生活污水排放规律和排放规模, 分别研发了单户型、小规模型(多户型)和综合型(村级型)3 种适宜于北方农村地区生活污水人工湿地处理系统, 并在山东、河北、北京和天津建立了推广应用示范点。项目研发的小型人工湿地系统, 首次考虑了农村地区居民的生活习惯和文化传统, 将家庭生活污水的处理设施建在庭院之外、深埋于地下、并采用柳树等耐涝树种作为湿地植物, 既不改变村容、不占用地表面积, 还解决了北方冬季湿地运行和湿地常年运行后的堵塞等难题。

鉴定委员会认为, “沼气工程沼液沼渣高值利用技术研究”解决了沼液、沼渣高值利用的多项关键技术问题, 所取得的多项技术成果将为生物质能的开发和减少矿物资源消耗、应对气候变化, 提供重要的技术基础; “北方户用农村污水生态净化系统”为北方地区农村污水净化提供了切实可行的技术, 保护了农村生态环境。这 2 个项目成果, 具有显著的经济、社会和生态效益, 应用前景广阔; 成果达到国际先进水平。