

应用多重荧光PCR快速筛查 作物中转基因成分研究

邢珍娟, 董立明, 龙丽坤, 刘娜, 夏蔚, 谢彦博, 李葱葱, 李飞武

(吉林省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 长春 130033)

摘要: 通过对我国批准进口的和获得农业转基因生物安全证书的转基因玉米转化体的序列分析发现, 除 DAS40278-9 和 BLVA430101 外, CaMV35s 启动子、NOS 终止子、*CryIAb/Ac* 基因和 *pat* 基因覆盖了 21 种玉米转基因转化体。通过引物组合筛选、反应体系优化、灵敏度测试、适用性测试等实验, 建立了基于 4 个通用筛选元件及 *zSSIb* 内源基因的五重荧光 PCR 和基于转化体特异性序列的二重荧光 PCR 检测转基因成分方法体系。方法参数测定结果表明, 此方法特异性强、稳定性好, 检测灵敏度达到 0.05%。同时, 此方法体系不仅适用于转基因玉米成分筛查, 对大豆、水稻等多种作物进行转基因成分筛选鉴定也有良好的适用性。

关键词: 玉米; 转基因作物; 多重实时荧光 PCR; 快速筛查

中图分类号: S513.037

文献标识码: A

Rapid Screening of Genetically Modified Ingredient in Crops by Multiplex Real-time PCR

XING Zhen-juan, DONG Li-ming, LONG Li-kun, LIU Na, XIA Wei, XIE Yan-bo, LI Cong-cong, LI Fei-wu

(Institute of Agricultural Quality Standard and Testing Technology,
Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

Abstract: Through sequence analysis of genetically modified corn transformants approved for import and obtained agricultural genetically modified organisms safety certificates in China, it was found that CaMV35s promoter, NOS terminator, *CryIAb/Ac* gene, and *Pat* gene covered 21 corn transgenic events. In this study, a series of experiments, including primer combination screening, reaction system optimization, sensitivity test, and applicability test were conducted. Consequently, a five-plex fluorescent PCR system and a duplex fluorescent PCR system were established based on four common screening elements and an endogenous gene *zSSIb*. The measurement results of parameters showed that these two multiplex fluorescent PCR detection systems established in this study are characterized by strong specificity, good stability high sensitivity, which can reach 0.05%. Meanwhile, these two systems can also be used to screen and identify genetically modified ingredients in soybean, rice and many other crops.

Key words: Corn; Genetically modified crop; Multiplex real-time PCR; Rapid screening

2018 年全球转基因作物种植面积达 1.917 亿 hm^2 , 其中转基因玉米种植面积 5 890 万 hm^2 ^[1]。我国批准进口的转化体数量是 21 种, 获得农业转基因生物

安全证书的有 3 个。随着转基因植物的大面积推广应用, 其安全性问题引起了公众和研究人员的广泛关注^[2]。不同国家根据自身国情建立了相应的转基因植物安全管理制度, 为确保这些监管制度的实施, 国内外学者围绕转基因产品精准、快速检测技术开展了大量研究, 其中, PCR 是最常应用的转基因分子检测技术, 已建立了一系列以外源调控元件、标记和报告基因、目的基因、转化体成分等为靶标的单一 PCR 检测方法^[3, 4]。

在转基因产品分子检测时, 往往需要检测多个外源基因来确认其是否为转基因产品及含哪些转基

录用日期: 2020-09-09

基金项目: 国家转基因生物新品种培育科技重大专项(2018ZX08012-001)

作者简介: 邢珍娟(1978-), 女, 副研究员, 硕士, 研究方向为转基因生物安全方面。E-mail: zhenjuanxing2004@163.com

李飞武为本文通讯作者。

E-mail: lifeiwu3394@sina.com

因成分或者需要检测包含多种转化体的样品,多重实时荧光聚合酶链式反应(mul-titarget real-time polymerase chain reaction, MT-PCR)技术在转基因产品检测中得到了应用,不仅能节省样品和试剂,同时也能大大缩短检测时间,实现一管多检的高效率,此方法在微生物和病毒的检测中已广泛应用^[5-8]。近年来,在转基因检测方面也有一些报道,Köppel R等^[9]建立了能同时检测 *Mhmg*、*Lectin*、*P-35S*、*T-NOS*、*T-35S* 共5个基因和同时检测 *PFMV*、*Bar*、*CTP2-CP4EPSPS*、*Pat* 共4个基因的2个多重荧光PCR检测方法。张耀川等^[10]利用MPCR技术建立了7种转基因油菜籽转化体的检测方法。李忆等^[11]利用多重PCR技术同时检测6种棉花转化体。董立明等^[12]采用多重PCR技术建立了转基因大豆品系的高通量检测方法。闫伟等^[13]建立了3种转基因大豆品系的多重荧光PCR检测体系。Samson等建立了同时检测 *Zein* 基因、*Adh1* 基因、MON810和GA21的四重荧光PCR检测方法^[14]。李飞武等^[15]建立了能同时检测8种 *Bt* 基因的多重简并PCR方法。David Dobnik等^[16]利用多重荧光PCR结合数字PCR建立了同时检测 *hmg* 基因和7种转基因玉米的2个多重荧光PCR检测方法。Gu等^[17]建立了同时检测水稻内源基因 *sps*、*CaMV35S* 启动子的二重荧光定量PCR方法。Bhoge R K等^[18]利用SYBR Green I荧光染料和TaqMan探针建立了同时检测转基因玉米 Bt11、Bt176、MON89034以及 *Adh1* 基因的多重荧光PCR方法。

根据国内外相关数据库的统计信息^[19],目前已经批准商业化种植的、自主研发的具有产业化前景的转基因玉米中,70%使用了CaMV35S启动子、60%以上使用了NOS终止子。此外,*cry1Ab/Ac*基因是抗虫转基因作物中应用最为广泛的目的基因,*pat*基因作为耐除草剂转基因作物的目的基因。因此,选择这4种基因元件作为转基因成分筛选检测的靶标对象,具有很好的代表性。本研究通过对我国批准进口的和获得农业转基因生物安全证书的转基因玉米转化体的序列分析发现,除DAS40278-9和BLVA430101外,*zSSIIb*、*P-CaMV35S*启动子、*T-NOS*终止子、*Cry1Ab/Ac*基因、*pat*基因覆盖了21种转化体。本研究设计1个基于4个通用筛选元件及*zSSIIb*内源基因的五重荧光PCR(简称S5体系)和1个基于转化体特异性序列二重荧光PCR(简称S2体系)对常见的转基因作物进行初步筛选是否含转基因成分,提高转化体检测效率、降低检测成本,为转基因作物的安全监管和身份鉴定提供一种更为高效的技术手段。

1 材料与方法

1.1 供试材料

转基因玉米 NK603、Bt11、Bt176、MON810、59122、MON863、T25、DAS40278-9、MON89034、3272、MON88017、IE034、Bt799、5307、Bt38、GA21、MIR162、TC1507、MIR604、MON87460、MON87427、BVLA43010、SK12-5,转基因大豆、转基因棉花、转基因油菜、转基因甜菜、转基因水稻和非转基因玉米均由本实验室收集保存。

1.2 主要试剂和仪器

植物基因组提取试剂盒购自北京天根生物公司;Hi Taq probe qPCR MasterMix购自北京爱普拜生物公司;检测引物和探针由上海生工生物公司和美国英杰生命技术公司合成和纯化。

紫外/可见光分光光度计(ND8000)购自 Thermo Fisher公司;实时荧光定量PCR仪(CFX96)购自 Bio-Red公司;高速离心机(5424)购自 Eppendorf公司。

1.3 实验方法

1.3.1 样品基因组DNA提取

按照植物基因组提取试剂盒说明书,提取全部试验样品的基因组DNA,用紫外分光光度计测量DNA的质量和浓度,用1×TE溶液将样品的DNA稀释至25 ng/μL,备用。

1.3.2 引物的设计及筛选

通过查阅国内外已发表论文、基因数据库及检测标准等文献,获得了每个检测靶标的实时荧光PCR引物和探针,具体信息见表1和表2。引物委托上海生工进行合成,并用1×TE溶液将每种引物或探针溶解,稀释至10 μmol/L备用。

1.3.3 PCR扩增体系及程序

S5反应体系为:Hi probe qPCR MasterMix 12.5 μL,引物/探针总量5.93 μL,DNA模板2.0 μL,超纯水4.56 μL。每种引物/探针的终浓度见表1。S2反应体系为,Hi probe qPCR MasterMix 12.5 μL,引物/探针总量2.5 μL,DNA模板2.0 μL,超纯水8 μL。每种引物/探针的终浓度见表2。MT-PCR扩增程序为,95℃预变性5 min;95℃变性15 s,60℃退火60 s,共进行45个循环,每个循环结束后收集荧光信号。

1.3.4 两个体系的引物优化

两个体系均设置4组引物浓度组合(表3),每个靶标的正、反向引物用量相等,探针用量为引物的一半,每个样品3个平行,分别对各自的阳性对照样品进行多重PCR扩增,筛选确定两个体系的最佳引物/探针配比。

表1 S5体系PCR引物序列信息^[20~24]
Table 1 PCR primers information of S5 system

检测靶标 Target	终浓度(μmol/L) Final concentration	引物/探针名称及序列(5'→3') Name and sequences of primer/probe(5'→3')	扩增序列长度(bp) Amplicon length
zSSIb-QF	0.3	CGGTGGATGCTAAGGCTGATG	88
zSSIb-QR	0.3	AAAGGGCCAGGTTCATTATCCTC	
zSSIb-QP	0.15	HEX-TAAGGAGCACTCGCCGCCGATCTG-BHQ1	
P-CaMV35s-QF	0.4	CATCATTGCGATAAAGGAAAGGC	
P-CaMV35s-QR	0.4	TGCTTTGAAGACGTGTTGGA	125
P-CaMV35s-QP	0.2	FAM-TCGTGGGTGGGGGTC-MGBNFQ	
T-NOS-QF	0.4	ATCGTTCAAACATTTGGCA	
T-NOS-QR	0.4	ATTGCGGGACTCTAATCATA	
T-NOS-QP	0.2	Texas Red-CATCGCAAGACCGGCAACAGG-BHQ1	165
pat-QF	0.4	TTGAGGGTGTTGTGGCTGTA	
pat-QR	0.4	TGTCCAATCGTAAGCGTTCCT	
pat-QP	0.2	Cy5-CTTCCAGGGCCCAGCGTAAGCA-BHQ1	
Cry1Ab/Ac-QF	0.4	GACCCTCACAGTTTGGACATTG	93
Cry1Ab/Ac-QR	0.4	ATTTCTCTGGTAAGTTGGGACACT	
Cry1Ab/Ac-QP	0.2	Cy5.5-TCCCGAACTATGACTCCAGAACCTACCCTATCC-BHQ3	

表2 S2体系引物序列信息^[25,26]
Table 2 PCR primers information of S2 system

检测靶标 Target	终浓度(μmol/L) Final concentration	引物/探针名称及序列(5'→3') Name and sequences of primer/probe(5'→3')	扩增序列长度(bp) Amplicon length
DAS40278-9-QF	0.4	CACGAACCATTGAGTTACAATC	98
DAS40278-9-QR	0.4	TGGTTCATTGTATTCTGGCTTTG	
DAS40278-9-QP	0.2	FAM-CGTAGCTAACCTTCATTGTATTCCG-BHQ1	
BVLA430101-QF	0.4	AATTGCGTTCGCTCACT	
BVLA430101-QR	0.4	GCAACACATGGGCACATACC	152
BVLA430101-QP	0.2	Cy5.5-CCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCC-BHQ1	

表3 多重荧光PCR反应体系优化
Table 3 The optimization of the fluorescence Multiplex PCR system

引物 Primer	S5体系 S5 system				引物 Primer	S2体系 S2 system			
	1	2	3	4		1	2	3	4
zSSIb	0.5	0.375	0.375	0.5	DAS40278-9	0.625	0.75	0.5	1.0
P-CaMV35s	0.5	0.5	0.5	0.5	BVLA430101	0.5	0.5	0.5	0.5
T-NOS	0.5	0.625	0.5	0.625	/	/	/	/	/
pat	0.5	0.5	0.5	0.5	/	/	/	/	/
Cry1Ab/Ac	0.5	0.5	0.5	0.5	/	/	/	/	/

注:上、下游引物体积单位为μL;探针的体积为引物的1/2。
Note: The volume unit of the upstream and downstream primers is in μL; the volume of the probe is 1/2 of the primer.

1.3.5 MT-PCR 体系适用性验证

分别以23种转基因玉米、7个转基因大豆、6个转基因水稻、6个转基因棉花、9个转基因油菜、1个转基因油菜和非转基因玉米的基因组DNA为模板,

进行两个体系的扩增,验证两个检测体系的适用性。

1.3.6 MT-PCR 体系灵敏度测试

分别以转基因玉米Bt11作为S5体系的阳性样品,转基因玉米DAS40278-9和BVLA430101等比例

混合样作为S2体系的阳性样品,用0.1×TE溶液分别进行梯度稀释,获得各品系含量分别为25%、5%、1%、0.2%、0.1%、0.05%和0.01%的灵敏度测试样品,进行多重荧光PCR扩增,每个样品6个平行,以

确定多重荧光PCR检测体系的灵敏度。

2 结果与分析

2.1 检测靶标的确定

表4 23种转基因玉米对应的靶标基因
Table 4 Target genes of 23 genetically modified corns

样 品 Sample	靶标基因 Target gene				
	<i>zSSIb</i>	<i>P-CaMV35s</i>	<i>T-NOS</i>	<i>CryIAb/Ac</i>	<i>pat</i>
Bt11	+	+	+	+	+
Bt176	+	+	—	—	—
MON810	+	+	—	—	—
MON863	+	+	+	—	—
TC1507	+	+	—	—	+
GA21	+	—	+	—	—
NK603	+	+	+	—	—
T25	+	+	—	—	+
MON89034	+	+	+	—	—
59122	+	+	—	—	+
MIR604	+	—	+	—	—
3272	+	—	+	—	—
MON88017	+	+	+	—	—
MON87460	+	+	+	—	—
MIR162	+	—	+	—	—
DAS40278	+	—	—	—	—
5307	+	—	+	—	—
MON87427	+	+	+	—	—
BVLA430101	+	—	—	—	—
SK12-5	+	+	—	—	—
IE034	+	+	+	—	—
Bt799	+	+	+	—	—
Bt38	+	+	+	—	—

注:“+”表示检测结果为阳性;“—”表示检测结果为阴性。下表同。
Note: “+” means the test result is positive; “—” means the test result is negative. The same below.

通过查阅文献确定转化体所含具体的靶标基因,用单一PCR方法验证了23种转基因玉米,结果如表4所示,每个转化体都扩增出相应的靶标基因,结果与预期一致。

2.2 MT-PCR体系的建立

用含量为1%和0.1%的Bt11、DAS40278-9及BVLA430101等比例混合样,对两个多重体系的引物/探针终浓度处理进行测试,扩增结果见图1。当五重荧光PCR体系中*zSSIb*、*P-CaMV35s*启动子、*T-NOS*终止子、*CryIAb/Ac*基因、*pat*基因的引物终浓度为0.375、0.5、0.5、0.5和0.5 μmol/L,2重荧光PCR体系中DAS40278-9和BVLA430101的引物终浓度为0.5、0.5 μmol/L时,1%和0.1%样品都扩增出明显的

曲线,其他引物组合的0.1%样品不能全扩增出明显的曲线,由此建立了五重和二重PCR体系。

2.3 S2和S5体系对转基因玉米的适用性验证

适用性测试结果由表5所示,在23种测试样品中均扩增*zSSIb*基因,其Ct值均<36;两个体系的23种测试样品均能扩增到对应的靶标,表明这两个多重体系可用于玉米样品中相应靶标的检测。

2.4 S5体系对其他转基因作物的适用性验证

利用7个转基因大豆、6个转基因水稻、6个转基因棉花、9个转基因油菜和1个转基因甜菜对S5体系进行适用性测试(表6)。结果表明,29个样品的测试结果与预期结果一致,表明S5体系也能检测出其他常见转基因作物的相应靶标基因。

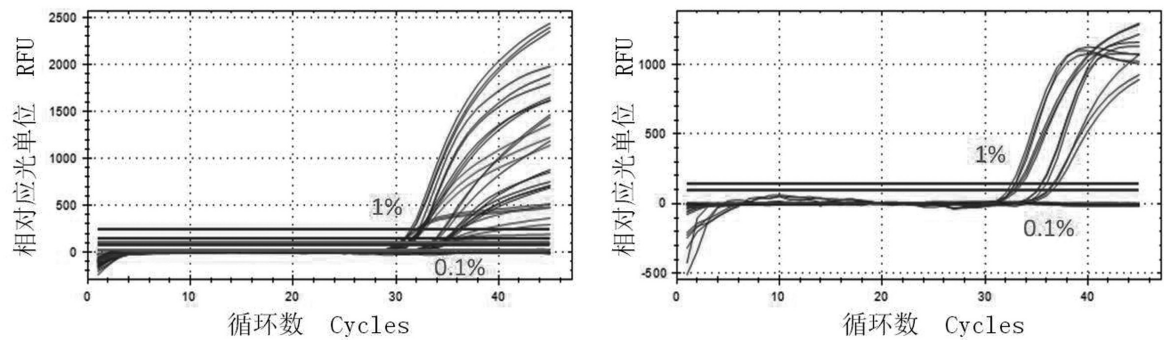


图1 两个多重体系最佳引物配比组合扩增曲线

Fig.1 Amplification curve of optimal primers concentration in fluorescence multiplex PCR systems

表5 两个多重体系对转基因玉米的适用性测试

Table 5 Test of suitability to genetically modified corn of the two systems

样 品 Sample	S5体系 S5 system(Ct)					S2体系 S2 system(Ct)	
	<i>zSSIIb</i>	<i>P-CaMV35s</i>	<i>T-NOS</i>	<i>pat</i>	<i>CryIAb/Ac</i>	<i>DAS40278-9</i>	<i>BLVA430101</i>
Bt11	27.08±0.21	26.57±0.21	25.56±0.19	26.55±0.25	25.99±0.22	—	—
MON810	26.17±0.14	26.98±0.15	—	—	—	—	—
Bt176	27.09±0.06	26.59±0.05	—	—	—	—	—
59122	27.35±0.05	28.34±0.05	—	27.15±0.02	—	—	—
Bt38	26.41±0.10	28.90±0.12	30.45±0.07	—	—	—	—
MON89034	26.14±0.08	26.92±0.09	25.52±0.10	—	—	—	—
IE034	27.30±0.11	25.54±0.13	25.05±0.10	—	—	—	—
MON863	26.38±0.11	26.60±0.15	25.86±0.15	—	—	—	—
MON88017	26.77±0.24	26.39±0.23	26.73±0.27	—	—	—	—
5307	26.90±0.49	—	25.18±0.14	—	—	—	—
T25	25.56±0.28	24.76±0.29	—	24.53±0.29	—	—	—
NK603	26.67±0.18	26.08±0.19	25.44±0.18	—	—	—	—
TC1507	28.76±0.36	31.69±0.33	—	28.50±0.43	—	—	—
MON87460	27.05±0.06	26.73±0.05	27.05±0.06	—	—	—	—
MON87427	25.79±0.09	25.56±0.06	26.22±0.05	—	—	—	—
MIR604	26.80±0.09	—	28.56±0.05	—	—	—	—
Bt799	26.09±0.13	26.46±0.06	25.96±0.14	—	—	—	—
MIR162	24.81±0.36	—	28.72±0.14	—	—	—	—
GA21	25.63±0.16	—	25.08±0.40	—	—	—	—
3272	27.07±0.06	—	23.70±0.16	—	—	—	—
SK12-5	26.78±0.17	26.96±0.04	—	—	—	—	—
DAS40278-9	26.13±0.02	—	—	—	—	26.23±0.23	—
BVLA430101	26.35±0.12	—	—	—	—	—	26.59±0.07

表6 S5体系对其他转基因作物的适用性测试

Table 6 Test of suitability to other crops of the two systems

作物种类 Crop type	样 品 Sample	S5体系 S5 system(Ct)				
		<i>zSSIIb</i>	<i>P-CaMV35s</i>	<i>T-NOS</i>	<i>pat</i>	<i>CryIAb/Ac</i>
大 豆	GTS40-3-2	—	23.79±0.19	22.38±0.16	—	—
	MON89788	—	—	—	—	—
	CV127	—	—	—	—	—

续表6 Continued 6

作物种类 Crop type	样 品 Sample	S5体系 S5 system(Ct)				
		<i>zSSIIb</i>	<i>P-CaMV35s</i>	<i>T-NOS</i>	<i>pat</i>	<i>CryIAb/Ac</i>
大 豆	A2704-12	—	23.34±0.07	—	22.49±0.15	—
	A5547-127	—	24.97±0.12	—	24.10±0.05	—
	305423	—	—	—	—	—
	356043	—	30.26±0.29	—	—	—
甜 菜	H7-1	—	—	—	—	—
水 稻	KF2	—	25.41±0.16	25.12±0.06	—	—
	KF6	—	23.75±0.04	22.18±0.03	—	22.23±0.04
	KF8	—	—	—	—	24.03±0.08
	KMD	—	25.84±0.10	23.74±0.21	—	24.32±0.17
	TT51	—	—	24.45±0.09	—	23.89±0.08
	M12	—	—	26.83±0.12	—	—
棉 花	MON1445	—	26.80±0.09	25.73±0.11	—	—
	MON15985	—	25.84±0.39	25.12±0.39	—	26.00±0.27
	MON531	—	26.15±0.03	25.99±0.04	—	25.65±0.05
	MON88913	—	30.86±0.26	—	—	—
	LLCOTTON25	—	32.22±0.11	31.04±0.15	—	—
	GHB614	—	—	—	—	—
油菜	MS1	—	—	31.20±0.08	—	—
	MS8	—	32.65±0.28	29.35±0.21	—	—
	OXY235	—	27.77±0.27	—	—	—
	T45	—	29.66±0.05	—	—	—
	RF1	—	—	28.23±0.05	—	—
	RF2	—	—	29.34±0.10	—	—
	RF3	—	—	24.73±0.07	—	—
	Topas19/2	—	29.69±0.05	—	28.84±0.07	—
	GT73	—	—	—	—	—

2.5 S2和S5体系的灵敏度测试

将S2和S5体系的阳性样品进行一系列浓度梯度稀释,进行灵敏度测试(表7)。结果表明,当转基因靶标含量为25%~0.05%时,S5体系的5个靶标基因均能扩增出典型的扩增曲线,S2体系的两个转化

事件也都能扩增出典型的扩增曲线;当转基因靶标含量为0.01%及以下时,两个多重体系不能全部检测出对应的靶标基因,表明两个多重体系检测灵敏度能达到0.05%。

表7 两个多重的灵敏度测试
Table 7 The sensitivity test of the two systems

体 系 System	靶标基因 Target gene	样品稀释浓度 Sample dilution concentration(Ct)						
		25%	5%	1%	0.2%	0.1%	0.05%	0.01%
S5	<i>Zssüib</i>	27.17±0.07	29.23±0.04	31.41±0.13	33.15±0.11	34.59±0.30	36.68±0.10	—
	<i>P-CaMV35s</i>	27.40±0.02	29.49±0.05	31.67±0.05	33.63±0.08	34.54±0.11	35.57±0.08	—
	<i>T-Nos</i>	24.51±0.14	26.72±0.08	28.64±0.10	30.65±0.16	31.43±0.20	32.15±0.01	—
	<i>pat</i>	27.82±0.01	29.88±0.05	31.69±0.15	33.45±0.07	34.58±0.18	35.17±0.07	—
	<i>CryIAb/Ac</i>	26.73±0.12	28.84±0.04	30.68±0.06	32.78±0.13	33.43±0.20	35.18±0.02	—
S2	<i>DAS40278-9</i>	25.80±0.01	27.05±0.02	29.51±0.03	31.47±0.06	34.25±0.06	35.22±0.27	—
	<i>BLVA430101</i>	25.37±0.01	27.05±0.01	29.27±0.03	31.76±0.04	33.78±0.14	35.53±0.20	—

3 结论与讨论

在转基因产品分子检测时,一般先对几种常见转基因成分如外源调控元件、目的基因等进行筛查,确认样品中是否存在转基因成分,然后再进行转基因身份鉴定^[27]。在检测作物产品时,往往需要检测多个外源基因来确认其是否为转基因产品及含哪些转基因成分或者需要检测包含多种转化体的样品。为提高检测通量和效率,国内外学者采用多重PCR策略,将多种靶标的检测引物和探针置于同一PCR扩增体系,实现了多个品系的同步检测^[28,29]。在实际应用中,不同引物序列对多重PCR结果存在很多影响因素,如引物浓度、退火温度等。在关键影响因素引物浓度选择过程中,本研究采用不同引物浓度梯度和引物配比,建立了可特异性扩增的两个多重体系,覆盖了目前已商品化和研发中常见的转基因玉米转化事件。

与前期已发表的转基因产品多重荧光PCR检测方法相比,本研究通过分析国内已批准的转基因玉米中的外源基因元件,建立2个多重PCR体系,实现了对23种转基因玉米的全覆盖筛选检测。Bhoge和尹全^[31]建立的转基因玉米多重荧光PCR方法均以转化体为靶标,可实现对转基因玉米产品的身份鉴定。本研究建立的方法是为了快速测定样品中是否含有转基因成分,实现的目标有所不同。在转基因检测的实际工作中,将本研究的筛选方法与其他转化体特异性检测方法结合使用,则即可实现筛选检测,又能实现身份鉴定。

本研究建立的两个多重体系能对我国批准进口的和获得安全证书的转基因玉米进行初筛,还可对常见转基因大豆、水稻、棉花、油菜和甜菜进行筛查,在转基因检测工作中具有很好的适用性。这种高效的检测手段,可为我国转基因作物监管和检测提供一定的技术支撑。而且,随着新的外源元件或转化体的出现,还可以对多重PCR体系进行完善,使其可以检测更多的靶标。

参考文献:

- [1] Clive James. 2018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, 2019, 39(8): 1-6.
Clive James. Global biotech/GM crop commercialization in 2018[J]. China Biotechnology, 2019, 39(8): 1-6. (in Chinese)
- [2] Qaim M, Kouser S. Genetically modified crops and food security[J]. PLoS One, 2013, 8(6): e64879.
- [3] Fraiture M A, Herman P, Taverniers I, et al. Current and new approaches in GMO detection: challenges and solutions[J]. BioMed Research International, 2015, 4: 392872.
- [4] 张富丽,雷绍荣,刘勇. 转基因作物及加工品检测技术概述[J]. 生物技术通讯, 2009, 20(5): 733-737.
Zhang F L, Lei S R, Liu Y. Detection methods for transgenic crops and its processed goods[J]. Letters in Biotechnology, 2009, 20(5): 733-737. (in Chinese)
- [5] Cecilia D, Kakade M, Alagarasu K, et al. Development of a multiplex real-time RT-PCR assay for simultaneous detection of dengue and chikungunya viruses[J]. Archives of Virology, 2015, 160(1): 323-327.
- [6] Ramezannia M, Hosseini S M, Fotouhi F, et al. Development of a multiplex real-time RT-PCR assay for detection of human parainfluenza viruses in patients with respiratory symptoms[J]. Future Virology, 2016, 11(9): 611-617.
- [7] Milillo M, Kwak Y I, Snesrud E, et al. Rapid and simultaneous detection of blaKPC and blaNDM by use of multiplex real-time PCR[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2015, 53(4): 1460.
- [8] Wang C X, Wang Q, Hu J Y, et al. A Multiplex RT-PCR Assay for detection and differentiation of Avian-Origin Canine H3N2, Equine-Origin H3N8, Human-Origin H3N2, and H1N1/2009 Canine Influenza Viruses[J]. PLoS ONE, 12(1): e0170374.
- [9] Köppel R, Sendic A, Waiblinger H U, et al. Two quantitative multiplex real-time PCR systems for the efficient GMO screening of food products[J]. European Food Research Technology, 2014, 239(4): 653-659.
- [10] 张耀川,许亮,张洁,等. 利用多重PCR方法检测7种转基因卡诺拉油菜籽品种(系)研究[J]. 粮食与油脂, 2012(9): 30-32.
Zhang Y C, Xu L, Zhang J, et al. Detection of seven genetically modified canola using multiplex PCR[J]. Cereals & Oils, 2012(9): 30-32. (in Chinese)
- [11] 李忆,尹全,刘勇. 利用多重PCR技术同时检测6种棉花转化体的方法研究[J]. 棉花学报, 2017, 29(5): 487-494.
Li Y, Yin Q, Liu Y. Development of a multiplex polymerase chain reaction method for simultaneous detection of six events in genetically modified cotton[J]. Cotton Science, 2017, 29(5): 487-494. (in Chinese)
- [12] 董立明,李葱葱,邢珍娟,等. 利用多重PCR技术快速检测五个转基因大豆品系[J]. 大豆科学, 2016, 35(6): 1002-1007.
Dong L M, Li C C, Xing Z Z, et al. Rapid detection of five genetically modified soybean lines by multiplex PCR method[J]. Soybean Science, 2016, 35(6): 1002-1007. (in Chinese)
- [13] 闫伟,龙丽坤,李葱葱,等. 三种转基因大豆品系的多重荧光PCR检测体系建立[J]. 大豆科学, 2019, 38(5): 712-718.
Yan W, Long L K, Li C C, et al. Establishment of detection system for three genetically modified soybean lines[J]. Soybean Science, 2019, 38(5): 712-718. (in Chinese)
- [14] Samson M C, Gulli M, Marmiroli N, et al. Multiplex real-time PCR assays for simultaneous detection of maize MON810 and GA21 in food samples[J]. Food Control, 2013, 30(2): 518-525.
- [15] 李飞武,闫伟,龙丽坤,等. 应用多重PCR技术筛选检测转Bt基因作物[J]. 现代食品科技, 2014, 30(5): 262-266.
Li F W, Yan W, Long L K, et al. Screening detection of Bt genes in genetically modified crops using a multiplex PCR Assay[J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(5): 262-266. (in Chinese)

- [16] Dobink D, Štebih D, Blejecl A, et al. Multiplex quantification of four DNA targets in one reaction with Bio-Rad droplet digital PCR system for GMO detection[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 35451.
- [17] Gu S B, Wu Y, Li S C, et al. Development of a real-time multiplex PCR system for the quantitative detection of Chinese GM rice[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2009, 89(6): 1101–1106.
- [18] Bhoge R K, Chhabra R, Singh M, et al. Multiplex real-time PCR-based detection and quantification of genetically modified maize events employing SYBR Green I and TaqMan chemistries[J]. Current Science, 2016, 110(8): 1446–1451.
- [19] GMO Detection Laboratory in Shanghai JiaoTong University (GMODL- SJTU). GMO Detection method Database[DB/OL]. [2020-08-07]. <http://gmdd.sjtu.edu.cn>.
- [20] 农业部 1861 号公告-3-2012. 转基因植物及其产品成分检测—玉米内标准基因定性 PCR 方法[S]. 北京: 中国农业出版社, 2015.
- [21] Li X F, Wu Y H, Li J, et al. Development and validation of a48-target analytical method for high-throughput monitoring of genetically modified organisms[J]. Sci. Rep., 2015, 5(1): 593–600.
- [22] 农业部 1782 号公告-3-2012. 转基因植物及其产品成分检测—调控元件 CaMV35S 启动子、FMV35S 启动子、NOS 启动子、NOS 终止子和 CaMV35S 终止子定性 PCR 方法[S]. 北京: 中国农业出版社, 2015.
- [23] Weighardt F, Barbati C, Paoletti C, et al. Real-time polymerase chain reaction-based approach for quantification of the pat gene in the T25 *Zea mays* event[J]. J. AOAC Int., 2004, 87(6): 1342–1355.
- [24] Lutz G, Ralf R, Dietrich M, et al. Collaborative trial validation of cry1Ab/Ac and Pubi-cry TaqMan-based real-time PCR assays for detection of DNA derived from genetically modified Bt plant products[J]. Accreditation and Quality Assurance, 2015, 20(2): 85–96.
- [25] Savini C, Bogni A, Foti N, et al. Event-specific method for the quantification of maize DAS-40278-9 by Real-time PCR[R]. European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed, 2012.
- [26] 农业部 1782 号公告-11-2012. 转基因植物及其产品成分检测—转植酸酶基因玉米 BLVA430101 及其衍生品种定性 PCR 方法[S]. 北京: 中国农业出版社, 2015.
- [27] 瞿 勇, 武玉花, 吴 刚, 等. 转基因玉米 MON88017 转化事件特异性定性 PCR 检测方法其标准化[J]. 农业生物技术学报, 2010, 18(6): 1208–1214.
- Qu Y, Wu Y H, Wu G, et al. Event-specific PCR detection method of transgenic maize line MON88017 and its standardization[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2010, 18(6): 1208–1214. (in Chinese)
- [28] Kppel R, van Velsen F, Felderer N, et al. Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from four transgenic soy Mon89788, A5547-127, Roundup Ready, A2704-12 and lectin [J]. European Food Research and Technology, 2012, 235(1): 23–28.
- [29] Kim J H, Jeong D, Kim Y R, et al. Development of a multiplex PCR method for testing six GM soybean events[J]. Food Control, 2013, 31(2): 366–371.
- [30] 尹 全, 李 忆, 宋 君, 等. 四种转基因玉米多重 PCR 检测方法的建立[J]. 湖北农业科学, 2016, 55(6): 1540–1544.
- Yin Q, Li Y, Song J, et al. Multiplex PCR for detection of four transgenic corns[J]. Hubei Agriculture Sciences, 2016, 55(6): 1540–1544. (in Chinese)

(责任编辑: 朴红梅)