

于园, 刘国强, 苏圣淋, 等. 玉米转基因成分的检测[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(4): 836-841.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2020.04.005

玉米转基因成分的检测

于园^{1,2,3}, 刘国强^{1,2,3}, 苏圣淋^{1,2,3}, 罗建兴^{1,2,3}, 郭梁^{1,2,3}

(1. 锡林郭勒职业学院, 内蒙古 锡林浩特 026000; 2. 锡林郭勒生物工程研究院, 内蒙古 锡林浩特 026000; 3. 锡林郭勒食品检验检测和风险评估中心, 内蒙古 锡林浩特 026000)

摘要: 基于实时荧光 PCR 技术, 通过构建阳性质粒, 对一种玉米样品进行多种转基因成分分析。首先, 筛选出玉米样品中常见的外源转基因片段, 构建阳性质粒并对阳性质粒进行验证; 然后, 对样品中可能含有的调控元件、目的基因以及筛选基因进行检测分析。实时荧光 PCR 检测结果表明, 转基因玉米样品中含有 2 种启动子 (*pCaMV35S* 和 *pRice-Actin*)、2 种终止子 (*tNOS* 和 *tCaMV35S*)、3 种目的基因 [*CryIA(c)*、*CP4-EPSPS* 和 *CTP2-CP4-EPSPS*] 以及 1 种筛选基因 (*PMI*)。因此所检测的玉米样品中含有多种转基因成分, 推测其转基因玉米样品含有多种转基因玉米品系。

关键词: 玉米; 实时荧光 PCR; 转基因; 分析

中图分类号: S513.01 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2020)04-0836-06

Detection of transgenic ingredients in maize

YU Yuan^{1,2,3}, LIU Guo-qiang^{1,2,3}, SU Sheng-lin^{1,2,3}, LUO Jian-xing^{1,2,3}, GUO Liang^{1,2,3}

(1. Xilingol Vocational College, Xilinhot 026000, China; 2. Xilingol Institute of Bioengineering, Xilinhot 026000, China; 3. Xilingol Food Testing and Risk Assessment Center, Xilinhot 026000, China)

Abstract: In this study, multiple transgenic components of a maize sample were analyzed by constructing positive quality control based on real-time PCR. Firstly, the exogenous transgenic fragments commonly found in maize samples were screened, and the positive plasmids were constructed verified. Then, the possible regulatory elements, target genes and screening genes in the samples were analyzed. The results of real-time PCR showed that the transgenic maize samples contained two promoters (*pCaMV35S* and *pRice-Actin*), two terminators (*tNOS* and *tCaMV35S*), three target genes (*CryIA(c)*, *CP4-EPSPS* and *CTP2-CP4-EPSPS*) and a screening gene (*PMI*). Therefore, the tested maize samples contain many transgenic ingredients, and it is speculated that the transgenic corn samples contain many transgenic maize strains.

Key words: maize; real-time PCR; transgenic; analysis

转基因作物由于抗逆性强或产量高的优点, 在全球范围内得以广泛种植。近年来, 随着转基因作物种植面积不断增加, 关于其在食品和环境安全等方面存在的争议也越来越多^[1-2], 急需通过加强检测来为监管提供基础数据^[3]。目前, 四大转基因农

作物为大豆、棉花、玉米和油菜^[4]。除此以外, 甜菜、木瓜、茄子、马铃薯等转基因作物的种植面积也在持续不断地扩大^[5-7]。根据中国农业农村部规定, 对于转基因作物的安全性评价需要提供目标蛋白质的毒理性试验和致敏性评价数据。由于现有研究基础比较薄弱, 且该研究属于长期性研究, 因此还无法对转基因作物是否含有毒性给出明确结论^[8]。1994 年的“巴西坚果”事件充分说明了转基因作物引起过敏反应的复杂性^[9]。抗生素选择标记的潜在危险也是不可忽略的, 抗生素抗性基因是很容易被细

收稿日期: 2019-11-14

基金项目: 锡林郭勒职业学院科研课题 (ZD-2019-01, ZD-2020-03)

作者简介: 于园 (1982-), 女, 内蒙古锡林浩特人, 硕士, 讲师, 研究方向为食品安全。 (E-mail) 422471357@qq.com

通讯作者: 郭梁, (E-mail) herdman86@163.com

菌交换的,若致病菌体交换了抗生素抗性基因,就可能产生超级细菌,这对于人类和其他生物是极大的威胁。因此,科学的检测是监督和管理转基因作物及其加工制品的前提和基础。

目前,转基因作物检测的手段和方法主要基于蛋白质和 DNA,其中基于 DNA 的检测更加稳定、准确,应用较为广泛。最主要的 DNA 检测方法有普通 PCR^[10]和实时荧光 PCR^[11],这 2 种方法以其简单和快速的优点成为转基因作物检测的主流技术。与普通 PCR 技术相比,实时荧光 PCR 技术具有实时动态、灵敏度高、精密度高、定量准确等优点,避免了交叉污染,实现了高通量,节约了时间^[12]。实时荧光 PCR 又可分为染料法和探针法,其中基于 TaqMan 探针的实时荧光 PCR 一直是转基因作物检测的首选方法^[13]。

本研究所检测的调控元件包括启动子(*pCaMV35S*、*pFMV35S* 和 *pRice-Actin*)^[14-16]和终止子(*tNOS*、*tCaMV35S* 和 *tE9*),而目的基因则包括抗虫基因[*CryIA(c)*^[17]、*Cry3A*^[18]]、草丁膦抗性基因(*Bar*)^[19]和抗除草剂基因 *CP4-EPSPS*(5-烯醇丙酮酸莽草酸-3-磷酸合酶基因)^[20]、*CTP2-CP4-EPSPS*(编码叶绿素转运肽的序列来自拟南芥的 5-烯醇式丙酮酸莽草酸-3-磷酸合成酶基因)^[21]和筛选标记基因 *PMI*(磷酸甘露糖异构酶基因)^[22]和 *NPTII*(新霉素磷酸转移酶 II 基因)^[23]。对以上基因进行阳性质粒的构建,以阳性质粒为阳性对照,利用 TaqMan 探针法实时荧光 PCR 技术检测玉米样品中的调控元件、目标基因和标记基因,根据检测结果判断玉米样品中所含有的转基因成分。为保障食品安全、维护消费者知情权提供转基因成分检测的技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

转基因玉米样品来源于内蒙古自治区农业科学院,非转基因玉米样品来源于锡林浩特市本地农贸市场。

Probe qPCR SuperMix 购买于北京全式金生物技术有限公司,Nanodrop 2000c 核酸蛋白质分析仪购买于美国 Thermo Fisher 公司,7300plus 实时荧光 PCR 扩增仪购买于美国 ABI 公司,Eppendorf 5418R Centrifuge 高速台式离心机购买于德国 Eppendorf AG 公司。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 利用溴化十六烷三甲基铵(Cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)法提取转

基因玉米和非转基因玉米的基因组 DNA^[24-25]。使用 Nanodrop 2000c 核酸蛋白质分析仪测量所提取 DNA 的质量浓度,将母液稀释至 100 ng/ μ l 左右用作实时荧光定量 PCR 的模板,保存于 -20℃。

1.2.2 阳性质粒的构建 作为阳性质粒的阳性质粒对于转基因检测至关重要,阳性质粒的检出是建立转基因检测方法的前提。本研究根据转基因外源序列的信息构建阳性质粒为核心的标准物质。通过人工合成的方法合成启动子基因(*pCaMV35S*、*pFMV35S* 和 *pRice-Actin*)、终止子基因(*tNOS*、*tCaMV35S* 和 *tE9*)、抗虫基因[*CryIA(c)*、*Cry3A*]、草丁膦抗性基因(*Bar*)、抗除草剂基因(*CP4-EPSPS*、*CTP2-CP4-EPSPS*)和筛选基因(*PMI* 和 *NPTII*)的碱基序列,连接到 TOPO 载体上,并转化到感受态细胞中,经过 PCR 检测、酶切、测序对阳性质粒上插入的外源序列进行验证。所构建的阳性质粒作为检测的阳性质粒。

1.2.3 探针和引物合成 引物和探针由睿博兴科生物技术有限公司合成,序列如表 1 所示^[26]。

1.2.4 实时荧光 PCR 扩增 对提取的转基因玉米样品 DNA 进行实时荧光 PCR 扩增。实时荧光 PCR 反应体系(20 μ l):10 μ l Probe qPCR SuperMix,正向引物和反向引物各 1 μ l(10 μ mol/L),探针 1 μ l(10 μ mol/L),灭菌双蒸水 7 μ l。实时荧光 PCR 反应条件:94℃ 预变性 10 min,94℃ 变性 30 s,60℃ 延伸 34 s,40 个循环。以构建的阳性质粒为模板作为阳性对照,以非转基因玉米材料的 DNA 为模板作为阴性对照,以灭菌超纯水(不加质粒)提取空白和无插入质粒的空模板为空白对照,每个样品进行 2 组平行试验。

1.2.5 数据处理 利用 7300Plus 型实时荧光定量 PCR 仪的分析软件对扩增结果进行扩增曲线和循环(Cycle threshold, Ct)分析。

2 结果与分析

2.1 转基因玉米样品检测阳性质粒的确定

以阳性质粒稀释液为模板,加入调控基因、目的基因和筛选基因的引物和探针进行实时荧光 PCR 试验。由图 1 可以看出,阳性质粒能够很好地匹配探针和引物,可作为转基因玉米样品检测的阳性对照。与转基因阳性样品的 DNA 相比,阳性质粒作为质粒,数据输出更加稳定,是合适的标准化阳性质粒。

表 1 qPCR 引物和探针序列

Table 1 Primers and probe sequences for qPCR

基因	引物和探针	序列(5'→3')
<i>pCaMV35S</i>	左引物	GCCTCTGCCGACACTGGT
	右引物	AAGACGTGGTTGGAACGTCTTC
	探针	FAM-CAAAGATGGACCCCAACCCACG-BHQ1
<i>pFMV35S</i>	左引物	CGAAGACTTAAAGTTAGTGGGCATCT
	右引物	TTTTGTCTGGTCCCACAA
	探针	FAM-TGAAAGTAATCTTGTCAACATCGAGCAGCTGG-BHQ1
<i>pRice-Actin</i>	左引物	TCGAGGTCATTCATATGCTTGAG
	右引物	TTTAACTGATGTTTCACTTTTGACC
	探针	FAM-AGAGAGTCGGGATAGTCCAAAATAAAACAAAGGTA-BHQ1
<i>tNOS</i>	左引物	CATGTAATGCATGACGTTATTTATG
	右引物	TTGTTTTCTATCGCGTATTAAATGT
	探针	FAM-ATGGGTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA-BHQ1
<i>tCaMV35S</i>	左引物	GGGGTTTCTTATATGCTCAACACATG
	右引物	TCACCAGTCTCTCTCTACAAATCTATCAC
	探针	FAM-AAACCCTATAAGAACCCTAATTCCTTATCTGGGA-BHQ1
<i>tE9</i>	左引物	TGAGAATGAACAAAAGGACCATATCA
	右引物	TTTTATTGGTTTTTCGCTATCG
	探针	FAM-TCATTAACCTCTTCTCCATCCATTTCCATTTACAGT-BHQ1
<i>CryIA(c)</i>	左引物	CGGAAATGCGTATTCAATTCAAC
	右引物	TTCTGGACTGCGAACAATGG
	探针	FAM-ACATGAACAGCGCTTGACCACAGC-BHQ1
<i>Cry3A</i>	左引物	TCCGGTTACGAGGTTCTT
	右引物	CCATAGATTTGAGCGTCCTTA
	探针	FAM-ACCTATGCTCAAGCTGCCAACACCC-BHQ1
<i>Bar</i>	左引物	ACAAGCACGGTCAACTTCC
	右引物	GAGGTGCTCCGTCCACTC
	探针	FAM-TACCGAGCCGAGGAACC-BHQ1
<i>CP4-EPSPS</i>	左引物	GCAAATCCTCTGGCCTTTCC
	右引物	CTTGCCCGTATTGATGACGTC
	探针	FAM-TCATGTTCCGGCGTCTCGCG-BHQ1
<i>CTP2-CP4-EPSPS</i>	左引物	GGGATGACGTTAATTGGCTCTG
	右引物	GGCTGCTTGCACCGTGAAG
	探针	FAM-CACGCCGTGGAACAGAAGACATGACC-BHQ1
<i>PMI</i>	左引物	CCGGGTGAATCAGCGTTT
	右引物	GCCGTGGCCTTTGACAGT
	探针	FAM-TGCCGCCAACGAATCACCGG-BHQ1
<i>NPT II</i>	左引物	AGGATCTCGTCGTACCCAT
	右引物	GCACGAGGAAGCGGTCA
	探针	FAM-CACCCAGCCGCCACAGTTCGAT-BHQ1

序列均来源于国家出入境检验检疫行业标准 SN/T 1204-2016。

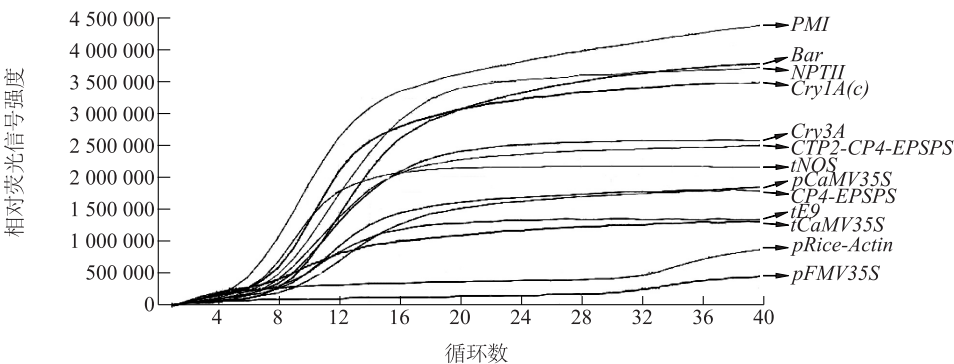


图 1 阳性质粒的检测结果

Fig.1 Detection results of positive plasmid

2.2 转基因玉米中的调控元件

将转基因玉米样品的 DNA 分别利用启动子 *pCaMV35S*、*pFMV35S*、*pRice-Actin* 和终止子 *tNOS*、*tCaMV35S*、*tE9* 的引物和探针进行实时荧光定量 PCR 试验,以 *Ct* 值 ≤ 35 判定为检出。表 2 和图 2 显示,启动子 (*pCaMV35S*和*pRice-Actin*) 和终止子

(*tNOS* 和 *tCaMV35S*) 在转基因玉米混合样品中均有检出, *Ct* 值分别是 29.93 ± 0.22 、 31.35 ± 0.04 、 28.55 ± 0.03 和 32.81 ± 0.03 。但是启动子 *pFMV35S* 和终止子 *tE9* 均没有检测到。综上所述,转基因玉米样品中含有启动子 *pCaMV35S*、*pRice-Actin* 和终止子 *tNOS*、*tCaMV35S*。

表 2 转基因玉米样品的检测结果

Table 2 Detection results of transgenic maize

基因	Ct 值											
	空白对照		提取空白对照		质粒空白		阴性对照		阳性对照		转基因玉米样品	
	平行 1	平行 2	平行 1	平行 2	平行 1	平行 2	平行 1	平行 2	平行 1	平行 2	平行 1	平行 2
<i>pCaMV35S</i>	37.85	39.15	36.55	37.18	0	0	36.74	36.28	6.34	6.23	29.72	30.15
<i>pFMV35S</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	29.61	29.21	0	0
<i>pRice-Actin</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	32.82	32.37	31.39	31.32
<i>tNOS</i>	0	36.41	37.23	25.25	0	0	36.61	37.69	6.84	6.97	28.57	28.52
<i>tCaMV35S</i>	37.22	36.22	37.53	37.03	0	0	36.00	36.23	4.29	5.30	32.84	32.78
<i>tE9</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	6.27	6.95	0	0
<i>CryIA(c)</i>	37.31	35.68	36.70	36.08	0	0	35.87	35.10	4.95	4.69	33.26	33.23
<i>Cry3A</i>	0	35.335	36.877	0	0	0	37.245	0	6.34	6.36	0	36.98
<i>Bar</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	6.55	6.95	0	0
<i>CP4-EPSPS</i>	37.39	35.10	35.93	35.83	0	0	35.95	35.92	6.24	6.05	32.61	31.42
<i>CTP2-CP4-EPSPS</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	6.47	6.61	28.81	28.39
<i>PMI</i>	0	0	39.27	0	0	0	38.26	38.33	4.21	4.37	33.78	34.02
<i>NPTII</i>	35.54	35.10	36.28	35.81	0	0	0	0	6.55	6.53	0	0

2.3 转基因玉米中的目的基因

对抗虫基因[*CryIA(c)*、*Cry3A*]、草丁膦抗性基因(*Bar*)、抗除草剂基因(*CP4-EPSPS* 和 *CTP2-CP4-EPSPS*)的检测结果表明,抗虫基因 *CryIA(c)* 和抗除草剂基因 *CP4-EPSPS*、*CTP2-CP4-EPSPS* 都能被检测到,其 *Ct* 值分别为 33.25 ± 0.02 、 32.02 ± 0.60 和 28.60 ± 0.21 (表 2)。抗虫基因 *Cry3A* 和草丁膦抗性

基因 *Bar* 都没有被检测到。因此,转基因玉米样品中所含的目的基因分别是抗虫基因 *CryIA(c)* 和抗除草剂基因 *CP4-EPSPS*、*CTP2-CP4-EPSPS*。

2.4 转基因玉米中的筛选标记基因

通过实时荧光 PCR 试验确定筛选基因。结果(表 2)显示,*PMI* 基因有检出,*Ct* 值为 33.90 ± 0.12 ; *NPTII* 基因没有被检测到。以上结果说明转基因玉

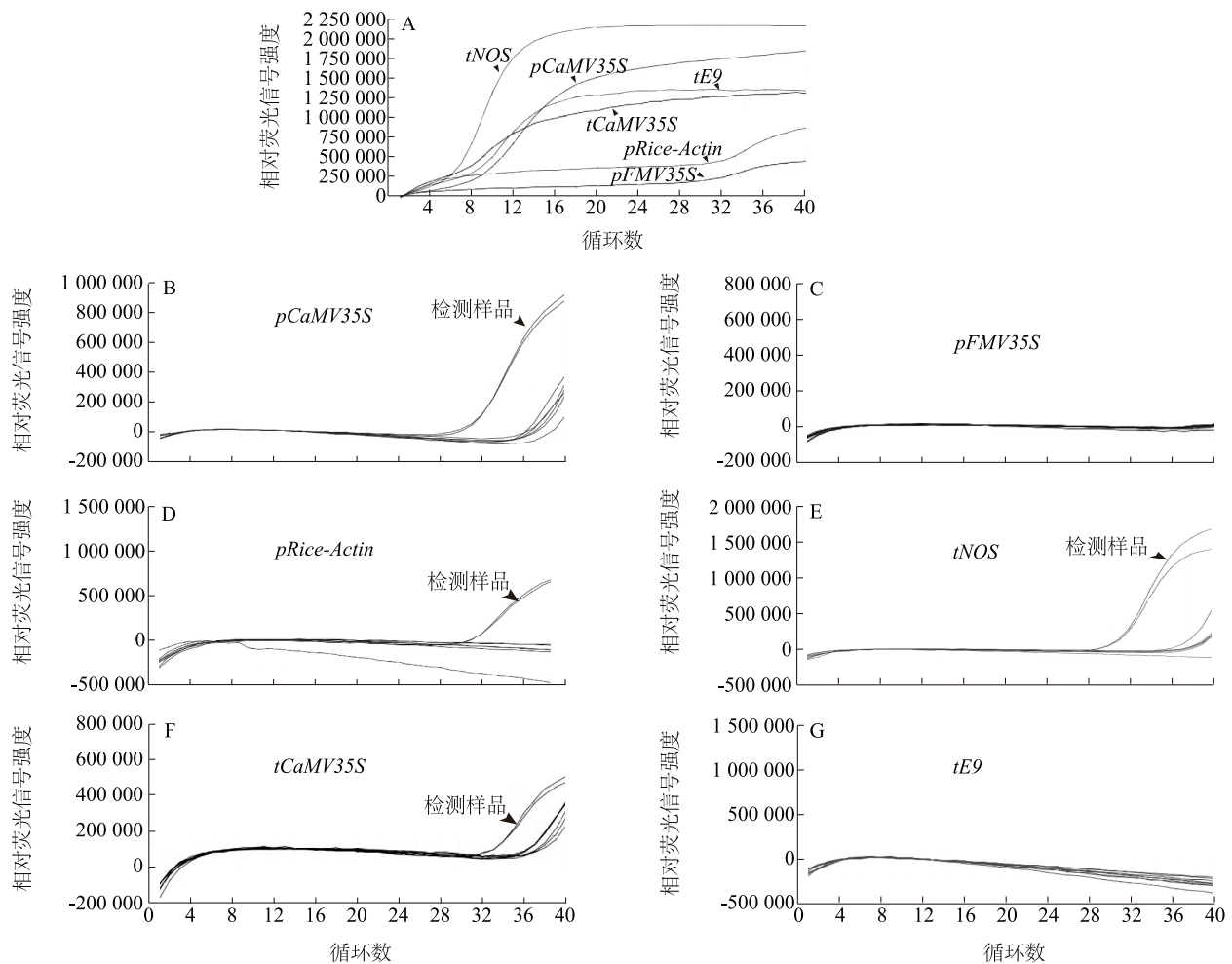


图 2 调控基因的检测结果

Fig.2 The result of detection for regulatory gene

米样品中含有筛选基因 *PMI*。

3 讨论

TaqMan 探针法由于引入了特异性的 TaqMan 探针,所以其特异性高于常规 PCR 和荧光染料实时荧光 PCR。TaqMan 探针法可以用不同的荧光集团标记特异性的探针,在同一个反应中用多个探针检测多个模板 DNA,有效地减少了检测时间,特别是检测大批量样品时优势尤为明显。与常规 PCR 相比,TaqMan 探针法不需要电泳等后续处理步骤,所以其也减少了检测时间。综上所述,TaqMan 探针实时荧光 PCR 法具有强特异性、快速省时的特点^[27]。

本试验采用 TaqMan 探针实时荧光 PCR 技术,对转基因玉米样品进行基因成分分析。发现转基因玉米样品中所含的调控元件是启动子 *pCaMV35S*、*pRice-Actin* 和终止子 *tNOS*、*tCaMV35S* 基因,且含有抗虫基因 *Cry1A(c)* 和抗除草剂基因 *CP4-EPSPS*、

CTP2-CP4-EPSPS 以及筛选基因 *PMI*。

金红等^[28]以转基因大豆为阳性对照,从大豆色拉油中检测到了 35S 启动子和 *NOS* 终止子外源调控元件以及目的基因 *EPSPS*。王小花等^[29]建立了内源基因 *lectin* 和启动子 35S 的检测方法,以转基因标准品为阳性对照。李葱葱等^[30]建立了检测转基因玉米 Bt176 品系的实时荧光 PCR 方法,以转基因样品 Bt176 为阳性样品。以上研究都检测到转基因作物中只含有一种启动子、目的基因、筛选基因和终止子,属于转基因作物检测的一般情况。而本研究中所检测的玉米样品中含有多种转基因成分,推测由内蒙古自治区农业科学院提供的试验样品是多种玉米转基因品系的混合样品。同时金红等^[28]、王小花等^[29]、李葱葱等^[30]研究使用的阳性样品都为转基因植物本身或转基因标准品,相比于本研究构建的阳性质粒,此类阳性样品不但保存时间短,而且占用空间大,除此以外样品前处理和 DNA 提取过程费

时费力。故本研究方法的建立为快速、高效和准确检测转基因玉米的基因成分提供了检测技术支持。

参考文献:

- [1] HOLLINGWORTH R M, BJELDANES L F, BOLGER M, et al. The safety of genetically modified foods produced through biotechnology[J]. Toxicological Sciences, 2003, 71(1): 2-8.
- [2] SINGH O V, GHAI S, PAUL D, et al. Genetically modified crops: success, safety assessment, and public concern[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 71(5): 598-607.
- [3] SINGER M, SOLL D. Guidelines for DNA hybrid molecules[J]. Science, 1973, 181(4105): 1114.
- [4] 农业部农业贸易促进中心政策研究所,中国农业科学院农业信息研究所国际情报研究室. 2016 年全球生物技术及转基因作物商业化发展态势[J]. 世界农业,2017(7):231-232.
- [5] 龙 阳,谢艳辉,袁俊杰,等. 我国转基因食品标识制度完善对策[J]. 食品工业科技,2018,39(18):311-314.
- [6] 胡加祥. 我国转基因生物、食品规制体系完善研究[J]. 贵州省党校学报,2018,173(1):102-110.
- [7] 祁潇哲. 加强粮食收储环节转基因质量安全监管探讨[J]. 粮油食品科技,2018,26(5):58-62.
- [8] 张 卉,刘长江. 转基因作物安全性研究进展[J]. 沈阳农业大学学报,2002,33(2):151-154.
- [9] NORDLEE J A, TAYLOR S L, TOWNSEND J A, et al. Identification of a Brazil-nut allergen in transgenic soybeans[J]. The New England Journal of Medicine, 1996, 334(11): 688-692.
- [10] SONG P, PINERO D, CHARLTON S, et al. Polymerase chain reaction technology as analytical tool in agricultural biotechnology[J]. Journal of AOAC International, 2005, 88(1): 136-155.
- [11] ZEITLER R, PIETSCH K, WAIBLINGER H U. Validation of real-time PCR methods for the quantification of transgenic contaminations in rape seed[J]. European Food Research and Technology, 2002, 214(4): 346-351.
- [12] BAEUMLER S, WULFF D, TAGLIANI L, et al. A real-time quantitative PCR detection method specific to widestrike transgenic cotton (Event 281-24-236/3006-210-23) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(18): 6527-6534.
- [13] MIRAGLIA M, BERDAL K G, BRERA C, et al. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain[J]. Food and Chemical Toxicology, 2004, 42: 1157-1180.
- [14] 徐俊锋,王鹏飞,李玥莹,等. 转基因植物中 *CaMV35S* 和 *nOS* 元件的 4 种定性 PCR 检测方法的比较[J]. 农业生物技术学报,2015,23(3):397-407.
- [15] MCELROY D, ZHANG W, WU C R. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation[J]. The Plant Cell, 1990, 2(2): 163-171.
- [16] DEBODE F, JANSSEN E, BERBEN G. Development of 10 new screening PCR assays for GMO detection targeting promoters (*pFMV*, *pNOS*, *pSSuAra*, *pTA29*, *pUbi*, *pRice actin*) and terminators (*t35S*, *tE9*, *tOCS*, *tg7*) [J]. European Food Research and Technology, 2013, 236(4): 659-669.
- [17] GUNNING R V, DANG H T, KEMP F C, et al. New resistance mechanism in *Helicoverpa armigera* threatens transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(5): 2558-2563.
- [18] FERRY N, MULLIGAN E A, MAJERUS M E N, et al. Biotrophic and tritrophic effects of *Bt* Cry3A transgenic potato on beneficial, non-target, beetles[J]. Transgenic Research, 2007, 16(6): 795-812.
- [19] CHRIST B, HOCHSTRASSER R, GUYER L, et al. Non-specific activities of the major herbicide-resistance gene *BAR* [J]. Nature Plants, 2017, 3(12): 1-34.
- [20] CHHAPEKAR S, RAGHAVENDRARAO S, PAVAN G, et al. Transgenic rice expressing a codon-modified synthetic *CP4-EPSPS* confers tolerance to broad-spectrum herbicide, glyphosate [J]. Plant Cell Reports, 2015, 34(5): 721-731.
- [21] DOBNIK D, SPILSBERG B, BOGOZALEC K A, et al. Multiplex quantification of 12 European Union authorized genetically modified maize lines with droplet digital polymerase chain reaction[J]. Analytical Chemistry, 2015, 87(16): 8218-8226.
- [22] GADALETA A, GIANCASPRO A, BLECHL A, et al. Phosphomannose isomerase, *pmi*, as a selectable marker gene for durum wheat transformation [J]. Journal of Cereal Science, 2006, 43(1): 31-37.
- [23] DE VRIES J, WACKERNAGEL W. Detection of *npt II* (kanamycin resistance) genes in genomes of transgenic plants by marker-rescue transformation [J]. Molecular Genetics and Genomics, 1998, 257(6): 606-613.
- [24] ZHANG C L, CHEN D F, MCCORMAC A C, et al. Use of the GFP reporter as a vital marker for agrobacterium-mediated transformation of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) [J]. Molecular Biotechnology, 2001, 17(2): 109-117.
- [25] MURRAY M G, THOMPSON W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. Nucleic Acids Research, 1980, 8(19): 4321-4325.
- [26] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 植物及其加工产品中转基因成分实时荧光 PCR 定性检验方法;SN/T 1204-2016[S]. 北京:中国质检出版社,2016.
- [27] NAGESWARA-RAO1 M, KWIT C, AGARWAL S, et al. Sensitivity of a real-time PCR method for the detection of transgenes in a mixture of transgenic and non-transgenic seeds of papaya (*Carica papaya* L.) [J]. BMC Biotechnology, 2013, 13(1): 69-69.
- [28] 金 红,程 奕,赵 昕,等. 大豆色拉油中转基因成分检测技术研究[J]. 华北农学报,2004,19(1):24-27.
- [29] 王小花,傅春玲,王国卿,等. Taqman 实时定量 PCR 技术检测大豆转基因成分[J]. 食品科技,2009,34(2):264-268.
- [30] 李葱葱,王青山,李飞武,等. 用实时荧光 PCR 方法定量检测 *Bt176* 转基因玉米[J]. 吉林农业科学,2007(5):24-27.

(责任编辑:张震林)