

罗建兴,刘国强,其勒木格,等. 农作物中 *CryIA(c)* 和 *CP4-EPSPS* 转基因成分双重实时荧光 PCR 检测方法的建立[J]. 江苏农业科学,2022, 50(5):23-28.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.05.004

农作物中 *CryIA(c)* 和 *CP4-EPSPS* 转基因成分 双重实时荧光 PCR 检测方法的建立

罗建兴^{1,2,3}, 刘国强^{1,2,3}, 其勒木格^{1,2}, 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:采用羧基荧光素(FAM)和六氯荧光素(HEX)荧光基团标记探针,建立针对农作物中常见抗虫和抗除草剂基因的双重实时荧光 PCR 检测方法,通过特异性、检出限以及模拟掺假试验验证此方法在转基因检测中的适用性。特异性检测试验中仅转基因作物(转基因棉花、转基因水稻、转基因大豆)和阳性质粒检测出相应转基因成分,其余样品均未出现明显 PCR 扩增曲线;检出限结果表明,双重实时荧光 PCR 方法对 *CryIA(c)*、*CP4-EPSPS* 基因的检出限分别为 1、0.1 ng,所建立的标准曲线 r^2 值均大于 0.98,具有对农作物中的转基因成分进行定量检测的能力;模拟掺假检测显示此方法可检测到 1% 的 *CryIA(c)* 和 5% 的 *CP4-EPSPS* 转基因成分。综上所述,本试验建立的双重实时荧光 PCR 法适用于对 *CryIA(c)* 和 *CP4-EPSPS* 转基因成分的快速检测和定量分析。

关键词:转基因; *CryIA(c)* 基因; *CP4-EPSPS* 基因; 双重实时荧光 PCR; 特异性; 检出限; 模拟掺假

中图分类号:TS207.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)05-0023-05

转基因是指利用现代生物技术,将一些有利于人类生产生活的外源基因导入动物、植物或微生物中,通过对生物体内 DNA 分子修饰改造达到改变原物种遗传性状的目的,从而使原物种获得本不具备的优良品质和特性^[1-2]。1996 年转基因烟草的商业化种植,标志着全球转基因商业化时代正式到来^[3]。由于转基因具有提高产量、改善产品品质、抗虫、抗氧化剂、抗逆、性状优良等特性,全球都加大了对转基因作物的种植^[4-6]。有研究表明,截至 2018 年年底,全球转基因作物种植面积已达到 1.917 亿 hm^2 ^[7]。据有关机构预计,2020 年转基因食品带来的生物经济将直接达 15 万亿美元,从而成为保持经济可持续发展的中坚力量^[8]。

转基因技术在农作物上的广泛应用不仅带动了全球经济发展,同时也产生了巨大社会效益,但任何技术的发展和进步都离不开风险管理。目前,

一些人认为转基因农产品在营养成分、毒理性、潜在致敏性等多方面存在食品安全风险,会对环境及人类健康产生巨大影响^[9-11]。20 世纪 90 年代有研究表明,斑蝶幼虫在食用转基因马利筋草后,产生了 40% 以上的死亡率^[12]。同时代的英国研究者给大鼠投食转基因马铃薯,最终导致大鼠免疫系统受损,身体发育出现异常^[11]。此类事件的发生间接推动了转基因检测技术的发展,目前针对转基因的检测技术主要分为 3 个方面,即基于核酸、蛋白^[13]及小分子代谢物^[14]的检测。由于核酸本身的稳定性相比蛋白和小分子代谢物较强,在各种产品加工过程中稳定、不易降解,同时制备过程简单、成本低^[15-16]。因此,目前的检测技术尤以基于核酸检测居多,核酸检测应用较为广泛的主要是 PCR 技术。传统 PCR 只能对单一基因进行检测,在一定程度上具有检测通量低的缺陷,而多重 PCR 虽具有扩增多重靶标的特点,但在后续电泳检测试验中却很难对一些大小相近的 DNA 片段进行区分^[17]。而荧光定量 PCR 由于特异性强、灵敏度高、无交叉污染且高通量的特点成为目前转基因检测的有效主流技术^[3]。

CryIA(c) 和 *CP4-EPSPS* 分别是转基因植物中常见的抗虫和抗除草剂基因^[18],在现代农业生产生活中对农作物的优良品质和高产等起着非常重

收稿日期:2021-04-16

基金项目:锡林郭勒职业学院重点科研项目(编号:ZD-2020-04、ZD-2019-01)。

作者简介:罗建兴(1993—),男,陕西榆林人,主要从事食品安全检测和风险评估及转基因成分检测研究。E-mail:ljxylyh@126.com。

通信作者:郭 梁,博士,主要从事转基因成分检测和动物源性成分检测以及微生物资源开发研究。E-mail:herdman86@163.com。

要的作用。其中,*CryIA(c)* 是苏云金芽孢杆菌的一种杀虫晶体蛋白,自然界的一些敏感幼虫在吞食附带有该蛋白的农作物后会形成活性毒素,最终导致昆虫因渗透压失衡死亡,该转基因技术目前已广泛应用于现代农林卫生害虫防治^[19]。*CP4-EPSPS* 是一种抗除草剂草甘膦基因,能够消除田间杂草,降低人工成本^[20],目前没有 *CryIA(c)* 和 *CP4-EPSPS* 同步检测的研究和应用。因此,本试验通过建立双重实时荧光 PCR 检测方法对植物中 *CryIA(c)* 和 *CP4-EPSPS* 转基因成分进行检测,以期为转基因食品安全检测提供高效的检测手段和方法,从而保证食品的安全性和民众知情权。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

3 种转基因试验样品(转基因棉花、转基因大豆、转基因水稻)由从事转基因基础研究的实验室

提供;8 种普通非转基因作物(棉花、水稻、大豆、玉米、小麦、苜蓿、白菜及烟草)于锡林浩特市本地农贸市场及超市采购。TransStart Probe qPCR SuperMix 购自北京全式金生物技术有限公司;qPCR 引物和探针委托北京睿博兴科生物技术有限公司进行合成;DNA 提取试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司。高速台式离心机(型号为 5418R),德国艾本德股份公司(Eppendorf AG 公司);核酸蛋白测定仪(型号为 Nanodrop 2000c),美国 Thermo Fisher Scientific;实时荧光 PCR 仪(型号为 7300Plus),美国 ABI 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 引物和探针的设计与合成 参考 GB/T 19495.4—2018^[21]用荧光基团 FAM 和 HEX 分别标记 *CryIA(c)* 和 *CP4-EPSPS* 探针并委托北京睿博兴科公司合成引物和探针,2 种基因引物与探针序列见表 1。

表 1 引物和探针序列

目的基因	名称	序列(5'→3')	扩增片段大小(bp)
<i>CryIA(c)</i>	正向引物	CGGAAATGCGTATTCAATTCAAC	71
	反向引物	TTCTGGACTGCGAACAATGG	
	探针	FAM-ACATGAACAGCGCCTTGACCACAGC-BHQ1	
<i>CP4-EPSPS</i>	正向引物	GCAAATCCTCTGGCCTTTCC	146
	反向引物	CTTGCCCGTATTGATGACGTC	
	探针	HEX-TCATGTTCCGGCGTCTCGCG-BHQ1	

1.2.2 试验样品基因组 DNA 的提取与纯化 采用溴化十六烷三甲基铵(cetyltrimethylammonium bromide,CTAB)法提取 DNA,并加适量的灭菌双蒸水溶解样品 DNA。经核酸蛋白分析仪测定浓度后,将试验样品 DNA 终浓度稀释至约 100 ng/μL,且使 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 为 1.8~2.0,保存于 -20℃ 冰箱备用。

1.2.3 阳性质粒 DNA 的提取 本实验室具有事先经过验证且特异性及可靠性检测结果均良好的阳性质粒 *pCryIA(c)* 和 *pCP4-EPSPS*,能够在试验中起到阳性对照的作用,按 DNA 提取试剂盒所述步骤提取质粒 DNA,经核酸蛋白分析仪测定浓度后,将其终浓度稀释为 0.5 ng/μL,于 -80℃ 保存备用。

1.2.4 实时荧光 PCR 反应体系及条件 反应体系(总体积 20 μL):上下游引物各 1 μL,探针 1 μL,模板 DNA 1 μL,TransStart Probe qPCR SuperMix 10 μL,补水至 20 μL。反应条件:94℃ 预变性 30 s;94℃ 变性 5 s,60℃ 退火 34 s,40 个循环,在每次循环退火时采集荧光信号。

1.2.5 特异性检测试验 以“1.1”节所示试验样品的 DNA 及“1.2.3”节提取的 2 种转基因阳性质粒 DNA 为模板,按照上述 PCR 反应体系加样,对设计和合成引物及探针进行特异性检测试验。根据典型扩增曲线和各反应体系循环阈值的差异验证 *CryIA(c)* 和 *CP4-EPSPS* 这 2 种基因引物和探针对于不同样品 DNA 模板的特异性。

1.2.6 检出限检测试验及定量分析 将质量浓度同为 10 ng/μL 的转基因棉花和转基因大豆等体积混合,加灭菌双蒸水对混合 DNA 原液进行 10 倍梯度稀释,使各梯度 DNA 模板质量浓度分别为 10、1、0.1、0.01、0.001、0.000 1、0.000 01 ng/μL,然后按照反应体系加样进行荧光定量 PCR 扩增反应,通过反应测定试验的检出限。根据检出限分析结果制作标准曲线,对 DNA 样品中的转基因成分作定量分析。

1.2.7 模拟掺假检测试验 将同浓度转基因作物 DNA 与其非转基因作物 DNA(转基因棉花+普通非转基因棉花、转基因大豆+普通非转基因大豆)按

不同体积进行混合,使转基因作物成分百分含量分别为 0.1%、1%、5%、10%,然后按照实时荧光 PCR 反应体系及程序进行模拟掺假试验检测,以检验引物和探针在转基因作物掺假检测试验中的适用性。

1.3 数据处理

通过试验仪器自带软件处理和分析检测结果,数据均以“平均值±标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 特异性检测

利用双重实时荧光 PCR 技术对 *CryIA(c)* 和

CP4-EPSPS 基因引物和探针进行特异性检测,检测结果如表 2 和图 1 所示。可以看出,转基因棉花和转基因水稻中均检测出 *CryIA(c)* 基因,转基因大豆中检测出 *CP4-EPSPS* 基因,在混合阳性质粒中 2 种基因均有检出,以上试验结果循环数(C_T 值)的标准差均在 0.1~1 之间,且扩增曲线具有很好的平行度(每个样品 3 个平行反应),说明试验检测结果较好,而对于其他样品的检测无明显特异性扩增曲线,进一步说明设计引物及探针对于不同检测样品的特异性。

表 2 *CryIA(c)* 和 *CP4-EPSPS* 基因的特异性检测结果

样品	加入的 DNA 量 (ng/μL)	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$	循环数(C_T 值,次)	
			<i>CryIA(c)</i> - FAM	<i>CP4-EPSPS</i> - HEX
空白	0.0	0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
提取空白	0.0	0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
阳性质粒 <i>pCryIA(c)</i> + <i>pCP4-EPSPS</i>	132.0	1.99	20.60±0.78	17.00±0.63
非转基因棉花	110.7	1.62	0.00±0.00	0.00±0.00
非转基因水稻	120.4	2.04	0.00±0.00	0.00±0.00
非转基因大豆	92.2	1.74	0.00±0.00	0.00±0.00
转基因棉花	111.2	1.66	24.14±0.32	0.00±0.00
转基因水稻	128.6	2.03	33.72±0.31	0.00±0.00
转基因大豆	112.3	1.72	0.00±0.00	25.64±0.13
玉米	115.3	2.06	0.00±0.00	0.00±0.00
小麦	50.4	1.98	0.00±0.00	0.00±0.00
苜蓿	131.1	2.06	0.00±0.00	0.00±0.00
白菜	122.1	2.04	0.00±0.00	0.00±0.00
烟草	125.3	2.02	0.00±0.00	0.00±0.00

2.2 检出限检测与定量分析

特异性检测试验表明,转基因棉花和转基因大豆中分别含有 *CryIA(c)* 和 *CP4-EPSPS* 基因,将上述 2 种样品 DNA 进行同浓度等体积混合,并进行梯度稀释,得到质量浓度分别为 10、1、0.1、0.01、0.001、0.000 1、0.000 01 ng/μL 的样品,以不同浓度样品 DNA 为模板(每个浓度样品 6 个平行反应),通过双重实时荧光 PCR 检测以测定引物和探针的检出限,相应的 C_T 检测结果如表 3 所示,扩增曲线见图 2,以扩增结果 $C_T\leq 35$ 次时判定为确认检出。可以看出,*CryIA(c)*、*CP4-EPSPS* 基因在混合 DNA 中的检出限分别为 1、0.1 ng,试验使用 ΔC_T 法进行相对定量,检出限试验结果显示 DNA 浓度的对数值与其对应的 C_T 值呈线性关系,然后以模板 DNA 浓度的对数值为横轴、 C_T 值为纵轴得到回归

方程,结果见图 3。既得 2 种基因的标准曲线方程如下:*CryIA(c)*, $y = -3.682x + 53.86, r^2 = 0.983\ 6$; *CP4-EPSPS*, $y = -2.616x + 47.69, r^2 = 0.987\ 2$ 。由于双重扩增 2 个基因的 r^2 显示标准曲线呈明显线性相关,说明该方法可适用于转基因作物中 *CryIA(c)* 和 *CP4-EPSPS* 这 2 种基因的双重检测。

2.3 模拟掺假检测

试验将同浓度转基因作物 DNA 与非转基因作物 DNA 按一定比例混合来模拟掺假检测,掺假组合为转基因棉花+非转基因棉花(组合 1)、转基因大豆+非转基因大豆(组合 2),按比例混合使混 DNA 中转基因成分含量为 0.1%、1%、5%、10%,利用双重实时荧光 PCR 技术进行检测,检测结果见表 4。以扩增结果 $C_T\leq 35$ 次时判定为确认检出,由此可知,组合 1 中针对 *CryIA(c)* 基因的检测在掺假试验中

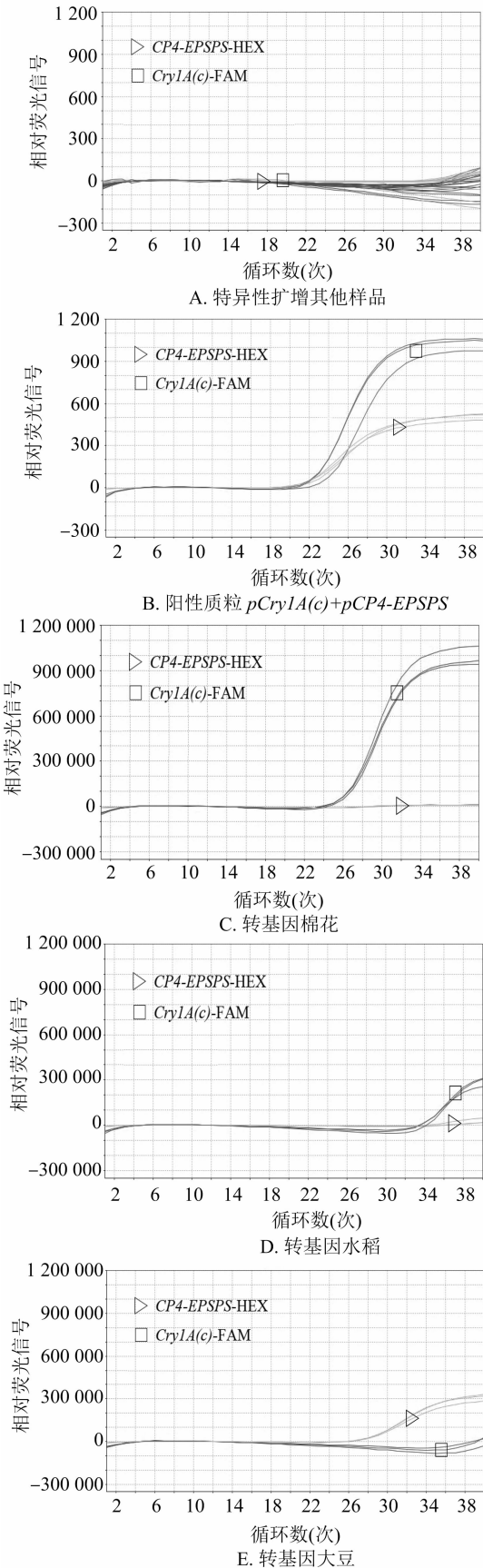


图1 *Cry1A(c)* 和 *CP4-EPSPS* 基因在不同检测样品中的特异性扩增曲线

表3 双重实时荧光 PCR 检出限检测结果		
DNA 质量浓度 (ng/ μ L)	C_T 值(次)	
	<i>Cry1A(c)</i> - FAM	<i>CP4-EPSPS</i> - HEX
10	28.09 ± 0.21	29.45 ± 0.18
1	31.75 ± 0.44	31.84 ± 0.32
0.1	35.46 ± 0.46	34.68 ± 0.08
0.01	0.00 ± 0.00	35.07 ± 0.55
0.001	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.000 1	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.000 01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

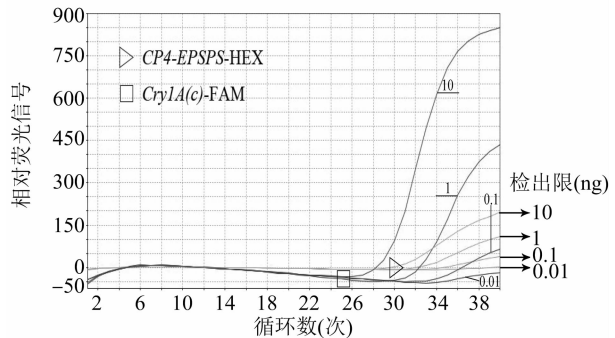


图2 转基因棉花和转基因大豆混合 DNA 梯度稀释模板的检出限扩增曲线

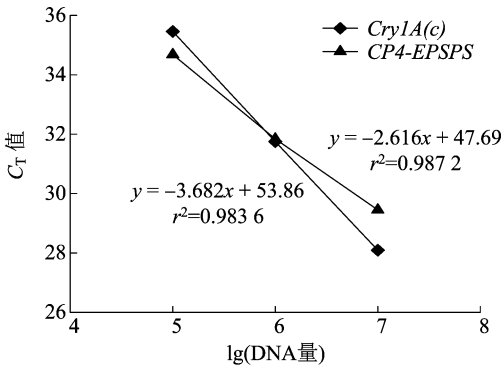


图3 *Cry1A(c)* 和 *CP4-EPSPS* 基因定量检测标准曲线

能够检测到 1% 的转基因棉花成分,针对 *CP4-EPSPS* 基因的检测因组合 1 样品中不含有该转基因成分,因此未检测到(图 4)。综上所述,本试验建立的双重实时荧光 PCR 方法适用于对掺假样品中的转基因成分检测。同理,组合 2 中针对 *CP4-EPSPS* 基因的检测在试验中能够检测到 5% 的转基因大豆成分,相较组合 1,其检测结果较差。

3 结论与讨论

本试验在特异性检测过程中以水作为空白对照,并且增加了提取空白的特异性检测,进一步加强了试验检测的完整性,在对试验材料的检测中,仅在阳性质粒及转基因作物检出转基因成分,其他

表 4 掺假试验中引物和探针适用性检测结果

转基因成分样品含量 (%)	C_T 值(次)			
	转基因棉花 + 非转基因棉花		转基因大豆 + 非转基因大豆	
	<i>CryIA(c)</i> - FAM	<i>CP4</i> - <i>EPSPS</i> - HEX	<i>CryIA(c)</i> - FAM	<i>CP4</i> - <i>EPSPS</i> - HEX
0.1	35.51 ± 0.31	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
1	32.37 ± 0.11	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
5	29.18 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	34.29 ± 0.34
10	28.47 ± 0.08	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	32.28 ± 0.33

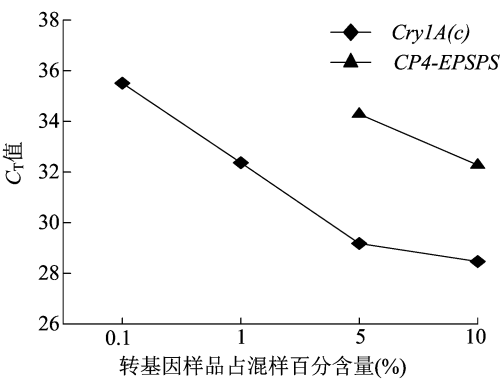


图4 掺假试验检测结果

普通非转基因样品中并未检出转基因外源基因,说明试验引物和探针具有较好的特异性,能够满足对转基因定性检测。对样品原液梯度稀释进行检出限检测,结果表明,*CryIA(c)*、*CP4-EPSPS* 基因在混合 DNA 中的检出限分别为 1、0.1 ng,以 C_T 值为纵轴、模板 DNA 浓度的对数值为横轴制作标准曲线,线性回归方程 r^2 均大于 0.98,说明检测结果能够较好地对外源转基因进行定量分析。模拟掺假在一定程度能够对检测方法或技术的适用性进行评估和检验,本试验显示,双重实时荧光 PCR 法对转基因成分的检测分别为 1% [*CryIA(c)*] 和 5% (*CP4-EPSPS*),一定程度上能满足实际检测需求。

2017 年的国际农业生物技术应用服务组织 (ISAAA) 数据显示,1996—2016 年 20 年间转基因共使农作物增产 6.576 亿 t^[22],全球转基因种植面积的逐年增加使得转基因产品在市场上的份额也越来越大,这都给转基因检测带来了巨大的挑战。同时,由于基因元件的复杂性和转基因作物的多样性加大了转基因检测的难度和需求。2009 年,吴珊等对大豆产品外源基因做了普通 PCR、荧光定量 PCR 及微流控芯片等 3 种方法的灵敏度检测比较,结果显示,普通 PCR 对于个别基因存在无法检测到或凝胶条带较弱的情况,根据普通 PCR 和凝胶检测结果容易造成假阴性。荧光 PCR 和微流体芯片技术检测则不存在此类问题,且检测结果更好,灵敏

度和检测效率也更高^[23]。王颖等也对普通 PCR 和荧光 PCR 检测转基因成分进行了比较^[24],得出了相同的结论。尹全等利用多重 PCR 对进口转基因玉米进行筛查检测,通过构建的基因元件信息矩阵表得出,必须检测 2 个或 2 个以上基因才能够对同一物种不同品系的转基因作物达到检测的目的^[25]。相比常规 PCR 技术,多重 PCR 可以对多个靶基因片段进行检测,不仅打破常规 PCR 引物受限只能检测 1 个目的片段的局限,还大幅提高了检测的效率,能够较好地满足对多个转基因品种的检测需求。本试验双重实时荧光 PCR 技术对农作物中 *CryIA(c)* 和 *CP4-EPSPS* 转基因成分检测方法,相比于多重 PCR 不仅检测准确性、灵敏度更高且能够根据标准曲线进行相对定量。

参考文献:

[1] 顾爱国,王 伟,张晓强,等. 转基因食品检测技术的研究进展[J]. 江苏农业科学,2006,34(3):180-183.
[2] 励建荣. 转基因食品的优点和安全性[J]. 食品工业科技,2002,23(4):71-73.
[3] 赵雨佳,范培蕾,梁 亮,等. 转基因作物的发展与检测分析[J]. 计量技术,2019(10):54-57.
[4] Luthy J. Detection strategies for food authenticity and genetically modified foods[J]. Food Control,1999,10(6):359-361.
[5] 樊振江,孟 楠. 转基因食品的安全性及优点[J]. 食品安全导刊,2017(3):35-36.
[6] 沈 泓,李 超,李 珏. 分子生物学技术在转基因食品检测领域中的研究进展[J]. 中国农业信息,2017(15):57-59,61.
[7] 国际农业生物技术应用服务组织. 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.
[8] 张振铎. 转基因食品质量安全检测技术的发展研究[J]. 现代食品,2019(24):135-137,148.
[9] 宋 欢,王坤立,许文涛,等. 转基因食品安全性评价研究进展[J]. 食品科学,2014,35(15):295-303.
[10] 王立平,王 东,龚熠欣,等. 国内外转基因农产品食用安全性研究进展与生产现状[J]. 中国农业科技导报,2018,20(3):94-103.
[11] 贾士荣,金芳军. 国际转基因作物的安全性争论:几个事件的剖析[J]. 农业生物技术学报,2003,11(1):1-5.

陈满静,任 艳,彭 秋,等. 基于 BSA-seq 方法定位贵州高粱抗炭疽病害关键遗传区段[J]. 江苏农业科学,2022,50(5):28-34.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.05.005

基于 BSA-seq 方法定位贵州高粱抗炭疽病害关键遗传区段

陈满静,任 艳,彭 秋,李青凤,高 杰,邓小锋

(贵州省农业科学院旱粮研究所,贵州贵阳 550006)

摘要:高粱炭疽病是威胁高粱生长的主要病害之一,挖掘高粱抗炭疽病相关基因能够为高粱抗性品种育种打下基础。利用前期田间试验鉴定出的高粱高抗材料 F41 和高感材料 B57 进行杂交构建 $F_{2,3}$ 代分离群体,挑选高粱高抗炭疽病植株和高感炭疽病植株各 30 株,分别构建 2 个极端性状的 DNA 混合池,利用高通量测序技术与集团分离分析法相结合的方法(BSA-seq)进行全基因组重测序和关联分析,定位和抗性性状相关的基因组区段。通过 SNP-index 及 InDel-index 方法进行关联分析及对候选区域进行基因注释,共注释到基因 143 个,其中非同义突变基因 49 个,移码突变基因 16 个。研究结果为高粱抗炭疽病分子机制及抗性相关基因的克隆奠定了理论基础。

关键词:高粱;炭疽病;抗性;候选区段;BSA-seq

中图分类号:S435.14 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)05-0028-07

高粱[*Sorghum bicolor* (L.) Moench]作为全球重要的禾谷作物,其耐旱、耐瘠薄的生长优势深受种植人的喜爱。一直以来,高粱主要用于粮食、饲料和酿造加工业,近年来,以高粱为原料开发绿色能源

的研究也正在兴起^[1]。白酒酿造作为贵州省的主打产业,其原料就是有机酒用高粱,据统计,全贵州省在 2018 年种植的高粱面积不少于 8.67 万 hm^2 ,其中有机高粱面积占总面积的 50%^[2]。高粱炭疽病是危害高粱生长的主要病害之一,侵染源是禾生炭疽菌(*Colletotrichum sublineolum* P. Henn., Kabát and Bubák)^[3-4],它能够侵染高粱所有地上部分组织,包括高粱叶片、茎秆、花序等,病害严重时可发生植株干枯死亡,感病品种生物学产量减产可达 67%,在我国北方甚至能减产 78%,严重影响高粱的产量和品质^[5-7]。该病害易在高温潮湿地区发生,但近

收稿日期:2021-09-08

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2014BAD07B02-2-4);黔农科院青年基金(编号:[2018]57号)。

作者简介:陈满静(1991—),女,贵州三穗人,硕士,助理研究员,主要从事高粱作物栽培技术研究。E-mail:nkycmj@yeah.net。

通信作者:邓小锋,博士,助理研究员,主要从事高粱育种研究。E-mail:dixifor@yeah.net。

[12] Losey J E, Rayer L S, Carter M E. Transgenic pollen harms monarch larvae[J]. Nature, 1999, 399(6733): 214.

[13] 李夏莹, 高鸿飞, 刘鹏程, 等. 转基因作物快速检测技术的研究进展[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(3): 5-9.

[14] 梁晋刚, 徐俊锋, 焦 悦, 等. 转基因作物快速检测技术进展与展望[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(21): 71-74.

[15] 罗建兴, 海 小, 刘国强, 等. 利用实时荧光定量 PCR 法检测食品中鹌鹑源性成分[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(3): 177-183.

[16] 杨镇州, 刘 刚, 梁 文. 转基因大豆 MON89788 芯片式数字 PCR 定量方法的建立[J]. 生物技术通报, 2020, 36(5): 68-73.

[17] 李永进, 熊 涛, 吴华伟, 等. 利用可视化膜芯片检测 9 种转基因玉米[J]. 湖北农业科学, 2016, 55(11): 2926-2929.

[18] 刘国强, 海 小, 罗建兴, 等. 基于 TaqMan 实时荧光 PCR 检测植物中转基因成分[J]. 农业与技术, 2020, 40(10): 4-9.

[19] 吴洪福, 郭淑元, 李海涛, 等. 苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白结

构和功能研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2009, 40(2): 118-122.

[20] 郭文芳, 王 楠, 李刚强, 等. CP4-EPSPS 转基因棉花植株鉴定方法比较分析[J]. 生物技术通报, 2017, 33(4): 114-118.

[21] 转基因产品检测 实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)检测方法: GB/T 19495.4—2018[S].

[22] James C. Global status of commercialized Biotech/GM crops in 2017[J]. ISAAA Briefs, 2017(35): 53.

[23] 吴 珊, 吴志毅, 张晓峰, 等. 普通 PCR 法、荧光定量 PCR 法及微流控芯片法检测大豆产品中外源基因灵敏度的比较[J]. 中国食品学报, 2009, 9(2): 176-186.

[24] 王 颖, 任志莹, 陈芳芳. 应用普通 PCR 与实时荧光标记 PCR 技术检测玉米子粒中转基因成分的比较[J]. 玉米科学, 2016, 24(5): 43-48.

[25] 尹 全, 李 忆, 宋 君, 等. 多重 PCR 筛查检测进口转基因玉米[J]. 核农学报, 2016, 30(6): 1045-1053.