

双重实时荧光定量 PCR 检测转基因植物常用 调控元件的适用性研究

刘国强^{1,2,3}, 罗建兴^{1,2,3}, 其勒木格^{1,2,3}, 郭 梁^{1,2,3*}

[1. 锡林郭勒职业学院, 锡林浩特 026000; 2. 锡林郭勒生物工程研究院, 锡林浩特 026000;
3. 锡林郭勒盟食品科学与检测实验中心(锡林郭勒盟农畜产品检验检测中心), 锡林浩特 026000]

摘 要: **目的** 建立一种双重实时荧光定量 PCR 检测转基因植物中常用调控元件 *pCaMV35S* 和 *tNOS*。 **方法** 通过扩增多个植物 DNA 来测定所建立的反应系统的特异性, 将转基因棉花的模板 DNA 稀释 5 个梯度, 检测此方法检出限(limit of detection, LOD), 建立标准曲线判断该方法的定量能力, 通过相对模拟掺假试验测定方法的灵敏度。 **结果** 特异性试验的检测结果显示此系统具备较强的特异性, 能够区分含有上述两种调控元件的转基因植物和非转基因植物。此方法中, *pCaMV35S* 基因的检测限为 1 ng, *tNOS* 基因的检测限为 10 ng。依托此方法建立的标准曲线的扩增效率分别为 96%和 87%, r^2 均大于 0.99, 方法具有较好地定量能力, 相对灵敏度达到 1%, 满足混合样品中转基因成分的检测要求。 **结论** 建立的双重实时荧光 PCR 方法表现出较强的特异性和较高的灵敏度, 有高通量、低成本以及定量检测的能力。

关键词: 转基因植物; 调控元件; 双重; 实时荧光 PCR

Study on the applicability of duplex real-time fluorescence quantitative PCR to detect the common regulatory elements of genetically modified plants

LIU Guo-Qiang^{1,2,3}, LUO Jian-Xing^{1,2,3}, Qilemuge^{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 Science and Testing Experimental Center (Xilingol Agricultural and Animal Products Testing Center),
Xilinhot 026000, China]

ABSTRACT: Objective To develop a method for the detection of common regulatory elements *pCaMV35S* and *tNOS* in genetically modified plants by duplex real-time fluorescence quantitative PCR. **Methods** The specificity of the system was determined by amplifying multiple plant DNA, and the template DNA of genetically modified cotton was diluted by 5 gradients to detect the limit of detection (LOD) and a standard curve was established to determine the quantitative ability of this method, the sensitivity was determined by simulated adulteration experiments. **Results** The results of the specificity test showed that the system had strong specificity and could distinguish genetically modified plants and non-genetically modified plants containing the two regulatory

基金项目: 锡林郭勒职业学院科研课题项目(ZD-2021-01)、锡林郭勒盟科技计划项目(202006、202103)

Fund: Supported by the Scientific Research Project of Xilingol Vocational College (ZD-2021-01), and the Science and Technology Program of Xilingol (202006, 202103)

*通信作者: 郭梁, 博士, 副研究员, 主要研究方向为动物源性成分检测和转基因成分检测以及微生物资源开发。E-mail: herdman86@163.com

*Corresponding author: GUO Liang, Ph.D, Associated Professor, Xilingol Vocational College, No.11, Mingantu Road, Xilingol 026000, China . E-mail: herdman86@163.com

elements. The LOD of this method for *pCaMV35S* gene was 1 ng, and *tNOS* was 10 ng. The amplification efficiency of the standard curve established by this method was 96% and 87%, respectively, and r^2 was greater than 0.99. The method had quantitative ability. Moreover, the relative sensitivity of the method up to 1%, which met the requirements for the detection of genetically modified ingredients in the mixed samples. **Conclusion** The developed duplex real-time fluorescence quantitative PCR method shows strong specificity and high sensitivity, and is capable of high throughput, low cost and quantitative detection.

KEY WORDS: genetically modified plants; regulatory elements; duplex; real-time PCR

0 引言

中国只有世界 6%的淡水和 7%的耕地,却必须养活世界近 20%的人口^[1],粮食进口是我国粮食安全战略的重要组成部分,但是进口转基因作物必须得到政府的批准^[2],批准程序非常严格^[3]。21 世纪初以来,中国每年都有超过 1000 万 t 的转基因大豆油被贴上转基因标签^[4],而公众对转基因食品仍存在较大争议^[5],因此转基因作物的筛查也变得非常重要。

花椰菜花叶病毒 35S 启动子(cauliflower mosaic virus 35S promoter, *pCaMV35S*)^[6-8]和胭脂碱合酶终止子(nopaline synthase terminator, *tNOS*)^[9]是转基因生物的两个主要筛查靶点^[10],大多数情况下,通过筛查上述两种调控元件来确定食品和饲料产品是否存在转基因成分^[11]。检测调控元件 *pCaMV35S* 和 *tNOS* 的方法有很多,如针对代谢产物检测的二维电泳法^[12]、毛细管电泳法^[13]、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[14],针对蛋白质检测的酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)^[15]以及针对 DNA 的聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)^[16-19]、实时荧光 PCR^[20-24]和环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)^[25]等。代谢产物易降解,蛋白质加热会变质,而 DNA 具有热稳定性,因此以 DNA 作为检测依据的技术成为了主流检测手段^[26]。PCR 和 LAMP 需要后续处理步骤,会加大实验室污染风险^[27],所以实时荧光 PCR 成为了转基因检测的主流技术。针对调控元件 *pCaMV35S* 和 *tNOS*,大多数研究是利用单通道实时荧光

PCR 进行检测^[28-30],多重实时荧光 PCR 同时检测调控元件 *pCaMV35S* 和 *tNOS* 的研究却鲜有报道。

本研究参照出入境检验检疫行业标准 SN/T 1204—2016《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》设计双重实时荧光 PCR 方法同时检测转基因植物中常见的两种调控元件,为转基因植物的监管和规范食品市场提供技术保障。

1 材料与方法

1.1 样品准备

非转基因棉花、非转基因水稻、非转基因大豆、转基因棉花、转基因水稻、非转基因玉米、非转基因小麦、非转基因苜蓿、非转基因白菜和非转基因烟草均由从事转基因基础研究的实验室提供,将样品进行研磨,置于 1.5 mL 离心管中,保存于 4 °C,阳性质粒 *pCaMV35S* 和阳性质粒 *tNOS* 混合当做阳性对照(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* 和终止子基因 *tNOS* 碱基序列,连接到拓扑异构酶(topoisomerase, 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控)。

1.2 试剂和仪器

TransStart Probe qPCR SuperMix(北京全式金生物技术有限公司);实时荧光定量 PCR 引物和探针合成(北京睿博兴科公司),引物与探针序列如下表 1。

表 1 引物和探针序列
Table 1 Primers and probe sequences for qPCR

基因名称	序列(5'-3')	片段大小/bp
<i>pCaMV35S</i>	上游引物: GCCTCTGCCGACAGTGGT	82
	下游引物: AAGACGTGGTTGGAACGTCTTC	
	探针: FAM ^a -CAAAGATGGACCCCCACCCACG- ^b BHQ1	
<i>tNOS</i>	上游引物: CATGTAATGCATGACGTTATTTATG	165
	下游引物: TTGTTTTCTATCGCGTATTAAATGT	
	探针: HEX ^c -ATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA- ^b BHQ1	

注: FAM^a, 6-羧基荧光素; ^bBHQ1, 黑洞淬灭基团^[31]; HEX^c, 六氯-6-羧荧光素^[32]。

Eppendorf 5418R Centrifuge 高速台式离心机(德国艾本德股份公司); Nanodrop 2000c 核酸蛋白测定仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 7300plus 实时荧光 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 DNA 提取和质量控制

取 1.1 准备好的植物样品, 使用十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)法^[33]提取 DNA, 采用 Nanodrop 2000c 核酸蛋白分析在 260 nm (A_{260})和 280 nm (A_{280})吸光度下测定样品中提取的 DNA 的纯度和浓度, DNA 纯度测定采用 A_{260}/A_{280} 。其中提取空白对照为提取 DNA 时用水代替样品制备。

1.3.2 反应体系与反应条件

反应体系(总体积 20 μ L): TransStart Probe qPCR SuperMix 10 μ L, 上下游引物各 1 μ L, 探针 1 μ L, 模板 DNA 1 μ L, 补水至 20 μ L。

反应条件: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 1 个循环; 94 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 31 s, 40 个循环, 在每次循环退火时收集荧光信号。

1.3.3 特异性试验

将提取好的非转基因棉花、非转基因水稻、非转基因大豆、转基因棉花、转基因水稻、非转基因玉米、非转基因小麦、非转基因苜蓿、非转基因白菜和非转基因烟草分别进行双重(*pCaMV35S-tNOS*)实时荧光 PCR 检测, 分析该

双重检测方法的特异性。

1.3.4 检出限试验

将转基因棉花样品 DNA 稀释为质量浓度分别为 100、10、1、0.1、0.01 ng/ μ L 的 DNA 稀释液, 进行双重实时荧光 PCR 检测, 分析该双重检测方法的检出限。

1.3.5 建立标准曲线

以 10 为底 DNA 量的对数为横坐标, 循环阈值(cycle threshold, Ct)为纵坐标建立标准曲线, 分析双重系统的扩增效率和曲线拟合性。

1.3.6 相对灵敏度试验

将转基因棉花 DNA 和非转基因棉花 DNA 按照体积比例混合, 分别制成转基因棉花 DNA 含量分别为 0.1%、1%、5%和 10%的 DNA 混合样品, 分析该双重检测方法的灵敏度。

1.3.7 数据处理

利用 7300plus 实时荧光 PCR 扩增仪自带分析软件对扩增曲线和 Ct 进行分析, 每个试验进行 3 个平行试验, 试验结果用平均值 $\pm$ 标准偏差表示。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取结果

DNA 提取结果如表 2 所示, 提取的 DNA 纯度在 1.6~2.1 之间, 说明样本 DNA 都能适用于该实时荧光 PCR 扩增^[18]。

表 2 样品特异性检测的 Ct 值
Table 2 Ct values of detection for sample specificity

样品	加入的 DNA 量/(ng/ μ L)	$A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$	Ct 值	
			<i>pCaMV35S</i> -FAM	<i>tNOS</i> -HEX
空白	NA	NA	36.86 $\pm$ 0.45	0.00
提取空白	NA	NA	36.88 $\pm$ 0.32	0.00
阳性质粒 <i>pCaMV35S+tNOS</i>	132	1.99	26.47 $\pm$ 0.30	25.39 $\pm$ 1.45
非转基因棉花	110.7	1.62	-	-
非转基因水稻	120.4	2.04	37.07 $\pm$ 0.30	-
非转基因大豆	92.2	1.72	-	-
转基因棉花	111.2	1.66	26.02 $\pm$ 0.11	28.56 $\pm$ 0.15
转基因水稻	108.5	2.06	25.92 $\pm$ 0.02	-
转基因大豆	112.3	1.72	29.42 $\pm$ 0.50	29.84 $\pm$ 0.28
玉米	115.3	2.06	36.30 $\pm$ 0.22	-
小麦	50.4	1.98	36.92 $\pm$ 0.34	-
苜蓿	131.1	2.06	35.76 $\pm$ 0.43	-
白菜	122.1	2.04	37.06 $\pm$ 0.39	-
烟草	125.3	2.02	-	-

注: NA 表示不存在; Ct 用平均值 $\pm$ 标准偏差表示; -表示未检出; 下同。

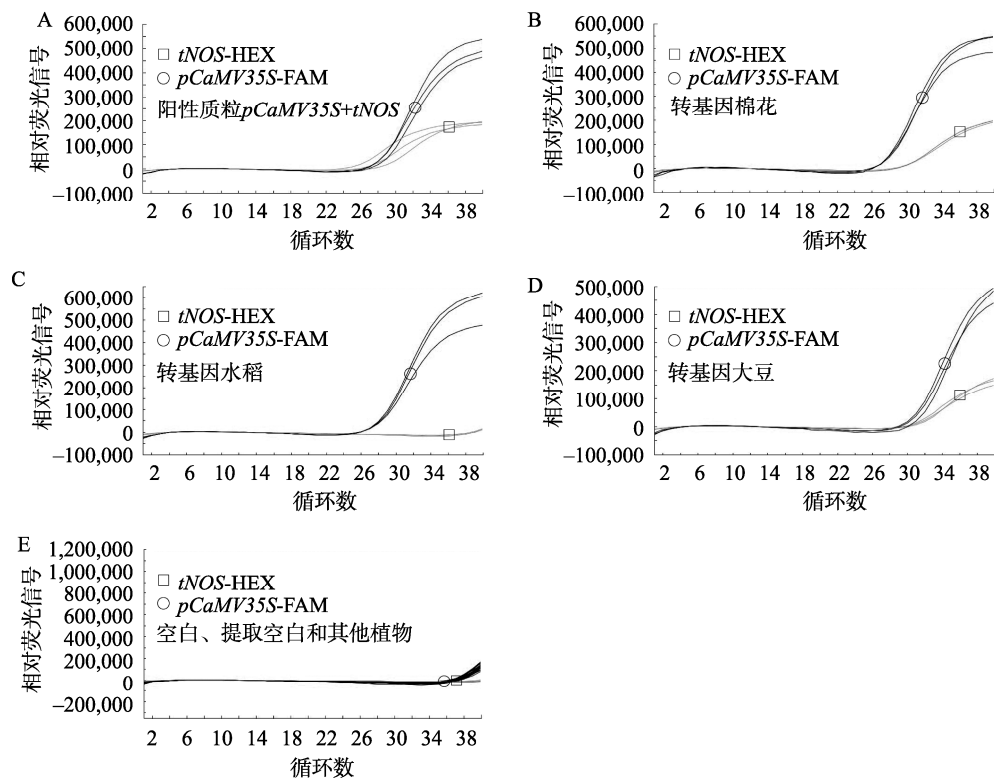
2.2 特异性试验结果

双重实时荧光 PCR 的检测结果如图 1 和表 2 所示, Ct 值 ≤ 35 判定为检出。混合阳性质粒 *pCaMV35S+tNOS* 的 Ct 值分别为 26.47 ± 0.30 和 25.39 ± 1.45 可以作为阳性对照(图 1A)。转基因棉花和转基因大豆对于 *pCaMV35S* 和 *tNOS* 都出现扩增, 转基因棉花的 Ct 值分别是 26.02 ± 0.11 和 28.56 ± 0.15 (图 1B), 转基因大豆的 Ct 值分别是 29.42 ± 0.50 和 29.84 ± 0.28 (图 1D)。转基因水稻只出现 *pCaMV35S* 扩增, Ct 值分别 25.92 ± 0.02 (图 1C)。空白、提取空白和其他植物没有出现扩增或 Ct 值大于 35, 表示没有检测到 *pCaMV35S*

和 *tNOS*(图 1E)。综上, 转基因棉花、转基因水稻和转基因大豆都是转入 *CaMV35S* 的启动子, 其中转基因棉花和转基因大豆也转入了 *NOS* 终止子。

2.3 检出限检测结果

通过对转基因棉花 5 种梯度的限度检测, 结果如表 3 和图 2 所示。*pCaMV35S* 的检出限度为 1 ng, Ct 值为 33.39 ± 0.13 , 出现明显扩增曲线, *tNOS* 的检出限度为 10 ng, Ct 值为 31.72 ± 0.20 , 也出现明显扩增曲线。两种通道的检出限度不同的原因可能是因为双通道同管检测不同引物和探针同管中有限资源的竞争。



注: A 为阳性质粒 *pCaMV35S+tNOS* 的扩增曲线图; B 为转基因棉花的扩增曲线图; C 为转基因水稻的扩增曲线图; D 为转基因大豆的扩增曲线图; E 为空白对照、提取空白对照和其他植物扩增曲线图。

图 1 特异性检测结果
Fig.1 Results of test for specificity

表 3 转基因棉花检出限检测结果
Table 3 Results of the limits of detection test for genetically modified cotton

质量浓度/(ng/ μ L)		100	10	1	0.1	0.01
Ct 值	<i>pCaMV35S</i> -FAM	26.05 ± 0.12	30.04 ± 0.20	33.39 ± 0.13	36.16 ± 0.25	-
	<i>tNOS</i> -HEX	28.69 ± 0.13	31.72 ± 0.20	35.53 ± 0.03	-	-

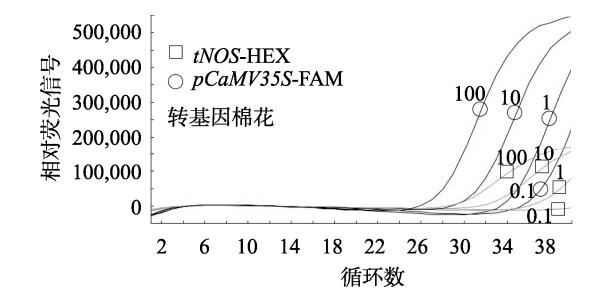


图 2 转基因棉花的检出限检测结果(ng/μL)

Fig.2 Results of limits of detection test for the genetically modified cotton (ng/μL)

2.4 定量分析

依据表 3 检出限结果, 建立标准曲线。*pCaMV35S* 的标准曲线为 $Y=-3.422X+55.94$, $r^2=0.9933$, *tNOS* 的标准曲线为 $Y=-3.668X+55.50$, $r^2=0.9948$ 。由于 PCR 扩增效率 $E(\%)=[10^{(-1/\text{slope})}-1]\times 100$ ^[34] 的接受范围在 90%~110%之间,

对应于回归斜率在-3.1 和-3.6, $r^2\geq 0.98$ ^[35]。*pCaMV35S* 的扩增效率为 96%, *tNOS* 的扩增效率为 87%, *pCaMV35S* 的扩增效率满足上述标准, *tNOS* 的扩增效率稍低, 多重 PCR 是一个复杂的试验系统, 寡核苷酸和扩增产物(靶和非靶)之间存在潜在干扰^[36], 这可能会使此方法的检出限偏低。它们的相关系数 r^2 均大于 0.99, 说明拟合的标准曲线良好, 可以完成定量分析。

2.5 模拟掺假和相对灵敏度

本试验利用双重实时荧光 PCR 检测方法, 对转基因棉花 DNA 和非转基因棉花 DNA 混合样品(转基因棉花含量分别为 0.1%、1%、5%、10%)进行检测, 检测结果如表 4 所示。当混合 DNA 样品中转基因棉花含量为 1%时, *pCaMV35S* 和 *tNOS* 均出现典型的扩增曲线, Ct 值为 33.55 ± 0.08 和 34.88 ± 0.09 。因此, 双重实时荧光 PCR 的可以检测到微量的转基因成分, 同时上述结果能充分证明此双重实时荧光 PCR 检测系统具有较高的灵敏度。

表 4 双重实时荧光 PCR 方法的灵敏度检测结果

Table 4 Sensitivity test results of duplex real-time PCR method

转基因棉花含量/%		0.1	1	5	10
Ct 值	<i>pCaMV35S</i> -FAM	36.32±0.17	33.55±0.08	30.31±0.08	29.52±0.01
	<i>tNOS</i> -HEX	-	34.88±0.09	32.36±0.31	30.81±0.17

3 结论与讨论

本研究通过出入境检验检疫行业标准 SN/T 1204—2016 合成检测两种调控元件的引物和探针。在此基础上, 将 *tNOS* 的探针由 FAM 标记改为 HEX 标记, 新建立了一种双重实时荧光 PCR 检测植物中常见调控元件 (*pCaMV35S* 和 *tNOS*) 的方法。试验验证双重实时荧光 PCR 系统的特异性强, 能够区分出转入 *pCaMV35S* 和 *tNOS* 的植物; 利用稀释转基因棉花模板 DNA 的试验方法, 得到双重实时荧光 PCR 系统的检出限分别为 1 ng (*pCaMV35S*) 和 10 ng (*tNOS*), 满足于对常见植物基因组的实时荧光 PCR 定性检测, 通过建立此系统的标准曲线, 两通道的扩增效率和曲线拟合度都能满足双重实时荧光 PCR 系统的定量检测。最后, 本试验模拟转基因植物 DNA 掺杂到非转基因植物 DNA 中, 两种通道都能够检测到 1% 的转基因棉花。由于为经济利益而故意掺假一般超过 10%, 而本方法可作为鉴定经济动物肉类掺假的一种非常有用的工具^[37], 在判断是否含有转基因成分的检测上同样适用。综上, 此双重实时荧光 PCR 系统可以满足检测含有常用调控元件的转基因植物。

一直以来, 实时荧光 PCR 都作为转基因植物分析的

工具^[38-40]。由于特异探针可以用不同的报告集团标记, 这使得 *TaqMan* 实时荧光 PCR 可以发展成单管同步的多重 PCR 体系成为可能^[33], 从而成为实时荧光 PCR 检测的主要方法。相比于之前研究^[28,41], 本研究建立的双重实时荧光 PCR 检测方法, 使得两种常见调控元件在同一管中能够同时检测, 不但降低了试验所需成本, 同时缩短了检测时间, 且本方法特异性强、灵敏度高, 为食品分析中常规的转基因植物鉴定提供了一种有效的替代方法。

参考文献

[1] WONG AYT, CHAN AWK. Genetically modified foods in China and the United States: A primer of regulation and intellectual property protection [J]. Food Sci Hum Well, 2016, 5(3): 124-140.

[2] HUANG J, HU R, ROZELLE S, et al. Genetically modified rice, yields, and pesticides: Assessing farm-level productivity effects in China [J]. Econ Dev Cult Change, 2008, 56(2): 241-263.

[3] JIN Y, DRABIK D, HEERINK N, et al. Getting an imported GM crop approved in China [J]. Trends Biotechnol, 2019, 37(6): 566-569.

[4] HUANG J, WANG X, DANG H. Impacts of and attitudes toward GM technology in China: Challenges, policy and research implications [J]. China Agric Econ Rev, 2017, 9(3): 334-339.

[5] DENG H, HU R, HUANG J, et al. Attitudes toward GM foods, biotechnology R & D investment and lobbying activities among

- agribusiness firms in the food, feed, chemical and seed industries in China [J]. *China Agric Econ Rev*, 2017, 9(3): 385–396.
- [6] AMACK SC, ANTUNES MS. *CaMV35S* promoter-A plant biology and biotechnology workhorse in the era of synthetic biology [J]. *Curr Plant Biol*, 2020, 24: 100179.
- [7] 汤婷, 谢实龙, 祝旋, 等. *CaMV35S* 启动子及其在转基因作物中的应用和检测[J]. *浙江农业学报*, 2019, 31(1): 161–170.
- YANG T, XIE SL, ZHU X, *et al.* *CaMV35S* promoter and its application and detection in transgenic crops [J]. *Acta Agric Zhejiangensis*, 2019, 31(1): 161–170.
- [8] SHIRAI N, MOMMA K, OZAWA S, *et al.* Safety assessment of genetically engineered food: detection and monitoring of glyphosate-tolerant soybeans [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1998, 62(7): 1461–1464.
- [9] LIPP M, BLUTH A, EYQUEM F, *et al.* Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs [J]. *Eur Food Res Technol*, 2001, 212(4): 497–504.
- [10] 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]. *Eur Food Res Technol*, 2013, 236(4): 659–669.
- [11] REITING R, BROLL H, WAIBLINGER HU, *et al.* Collaborative study of a T-nos real-time PCR method for screening of genetically modified organisms in food products [J]. *J Consum Prot Food Saf*, 2007, 2(2): 116–121.
- [12] KIM YH, CHOI SJ, LEE HA, *et al.* Quantitation of CP4 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in soybean by two-dimensional gel electrophoresis [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2006, 16: 25–31.
- [13] LATOSZEK A, GARCÍA-RUIZ C, MARINA ML, *et al.* Modification of resolution in capillary electrophoresis for protein profiling in identification of genetic modification in foods [J]. *Croat Chem Acta*, 2011, 84(3): 375–382.
- [14] ABU-REIDAH IM, CONTRERAS MM, ARRAEZ-ROMAN D, *et al.* Reversed-phase ultra high performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry as a powerful tool for metabolic profiling of vegetables: *Lactuca sativa* as an example of its application [J]. *J Chromatogr A*, 2013, 1313: 212–227.
- [15] XU W, HUANG K, LIANG Z, *et al.* Application of stepwise ammonium sulfate precipitation as cleanup tool for an enzyme-linked immunosorbent assay of glyphosate oxidoreductase in genetically modified rape of Gt73 [J]. *J Food Biochem*, 2009, 33(5): 630–648.
- [16] SAFAEI P, AGHAEI EM, KHANIKI GJ, *et al.* A simple and accurate PCR method for detection of genetically modified rice [J]. *J Environ Health Sci Eng*, 2019, 17(2): 847–851.
- [17] WOLF C, SCHERZINGER M, WURZ A, *et al.* Detection of cauliflower mosaic virus by the polymerase chain reaction: Testing of food components for false-positive 35S-promoter screening results [J]. *Eur Food Res Technol*, 2000, 210: 367–382.
- [18] MATSUOKA T, KURIBARA H, TAKUBO K, *et al.* Detection of recombinant DNA segments introduced to genetically modified maize (*Zea mays*) [J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50: 2100–2109.
- [19] VOLLENHOFER S, BURG K, SCHMIDT J, *et al.* Genetically modified organisms in food-screening and specific detection by polymerase chain reaction [J]. *J Agric Food Chem*, 1999, 47(12): 5038–5043.
- [20] 王颖潜, 张飞燕, 高芳瑞, 等. 主要农作物转基因成分检测能力验证结果与分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(18): 6362–6371.
- WANG XQ, ZHANG FY, GAO FR, *et al.* Proficiency testing results and analysis of detection of genetically modified ingredients in main crops [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(18): 6362–6371.
- [21] 张海波, 肖长文, 刘冰, 等. 玉米转基因成分筛查方法比较[J]. *黑龙江农业科学*, 2020, 9: 78–84.
- ZHANG HB, XIAO CW, LIU B, *et al.* Comparison of screening methods for genetically modified maize [J]. *Heilongjiang Agric Sci*, 2020, 9: 78–84.
- [22] MATTARUCCHI E, WEIGHARDT F, BARBATI C, *et al.* Development and applications of real-time PCR standards for GMO quantification based on tandem-marker plasmids [J]. *Eur Food Res Technol*, 2005, 221(3–4): 511–519.
- [23] ZEITLER R, PIETSCH K, WAIBLINGER HU. Validation of real-time PCR methods for the quantification of transgenic contaminations in rape seed [J]. *Eur Food Res Technol*, 2002, 214(4): 346–351.
- [24] FERNANDEZ S, CHARLES-DELOBEL C, GELDREICH A, *et al.* Quantification of the 35S promoter in DNA extracts from genetically modified organisms using real-time polymerase chain reaction and specificity assessment on various genetically modified organisms, part I: Operating procedure [J]. *J AOAC Int*, 2005, 88(2): 547–557.
- [25] FUKUTA S, MIZUKAMI Y, ISHIDA A, *et al.* Real-time loop-mediated isothermal amplification for the *CaMV*-35S promoter as a screening method for genetically modified organisms [J]. *Eur Food Res Technol*, 2004, 218(5): 496–500.
- [26] DEBODE F, JANSSEN E, BERBEN G. Physical degradation of genomic DNA of soybean flours does not impair relative quantification of its transgenic content [J]. *Eur Food Res Technol*, 2007, 226(1–2): 273–280.
- [27] PENG C, WANG P, XU X, *et al.* Development of a qualitative real-time PCR method to detect 19 targets for identification of genetically modified organisms [J]. *Springerplus*, 2016, 5(1): 889.
- [28] 罗建兴, 海小, 刘国强, 等. 基于 *TaqMan* 实时荧光 PCR 技术检测转基因作物中的调控基因 [J]. *河南农业科学*, 2020, 49(11): 159–165.
- LUO JX, HAI X, LIU GQ, *et al.* Detection of regulatory genes in genetically modified crops using *TaqMan* probe based on real-time PCR [J]. *J Henan Agric Sci*, 2020, 49(11): 159–165.
- [29] YU Y, LI R, MA Z, *et al.* Development and evaluation of a novel loop mediated isothermal amplification coupled with *TaqMan* probe assay for detection of genetically modified organism with NOS terminator [J]. *Food Chem*, 2021, 356: 129684.
- [30] 赵阳, 金龙国, 王步军. 706 份常规大豆品系转基因成分筛查及检测[J]. *中国油料作物学报*, 2021, 43(1): 117–123.
- ZHAO Y, JIN LG, WANG BJ, *et al.* Screening and detection of transgenic components in 706 conventional soybean lines [J]. *Chin J Oil Crop Sci*, 2021, 43(1): 117–123.
- [31] LEE J, MOON SU, LEE YS, *et al.* Quantum dot-based molecular beacon to monitor intracellular microRNAs [J]. *Sensors-Basel*, 2015, 15(6): 12872–12883.
- [32] ARYA M, SHERGILL IS, WILLIAMSON M, *et al.* Basic principles of

- real-time quantitative PCR [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2005, 5(2): 209–219.
- [33] ROGERS SO, BENDICH AJ. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant [J]. *Plant Mol Biol*, 1985, 5(2): 69–76.
- [34] BUSTIN SA, BENES V, GARSON JA, *et al*. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments [J]. *Clin Chem*, 2009, 55(4): 611–622.
- [35] IWOB I A, SEBAH D, KRAEMER I, *et al*. A multiplex real-time PCR method for the quantification of beef and pork fractions in minced meat [J]. *Food Chem*, 2015, 169: 305–313.
- [36] DOBNIK D, SPILSBERG B, BOGOZALEC KA, *et al*. Multiplex quantification of 12 European Union authorized genetically modified maize lines with droplet digital polymerase chain reaction [J]. *Anal Chem*, 2015, 87(16): 8218–8226.
- [37] LI TT, JALBANI YM, ZHANG GL, *et al*. Detection of goat meat adulteration by real-time PCR based on a reference primer [J]. *Food Chem*, 2019, 277: 554–557.
- [38] WU Y, LI J, LI X, *et al*. Development and strategy of reference materials for the DNA-based detection of genetically modified organisms [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2019, 411(9): 1729–1744.
- [39] 其勒木格, 刘国强, 罗建兴, 等. 基于实时荧光 PCR 技术检测水稻转基因成分[J]. *农业与技术*, 2020, 40(24): 34–39.
- QILEMUGE, LIU GQ, LUO JX, *et al*. Detection of genetically modified components in rice based on real-time PCR [J]. *Agric Technol*, 2020, 40(24): 34–39.
- [40] 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.
- YU Y, LIU GQ, SU SL, *et al*. Detection of transgenic ingredients in maize [J]. *Jiangsu J Agric Sci*, 2020, 36(4): 836–841.
- [41] 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.
- LIU GQ, HAI X, LUO JX, *et al*. Identification of genetically modified components in plant based on TaqMan real-time PCR [J]. *Agric Technol*, 2020, 40(10): 4–9.

(责任编辑: 郑丽于梦娇)

作者简介



刘国强, 研究实习员, 主要研究方向为动物源性成分检测和转基因成分检测。
E-mail: 1907106463@qq.com



郭梁, 博士, 副研究员, 主要研究方向为动物源性成分检测和转基因成分检测以及微生物资源开发。
E-mail: herdman86@163.com