



## 三种转基因大豆品系的多重荧光 PCR 检测体系建立

闫 伟, 龙丽坤, 李葱葱, 夏 蔚, 董立明, 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, 吉林 长春 130033)

**摘 要:**转基因大豆 MON87701、MON87708、MON87769 是我国大豆进口贸易中重点监测的转基因品系,为探讨这 3 个品系的高效监管技术手段,应用多重实时荧光聚合酶链式反应建立在同一反应体系中同时检测 MON87701、MON87708、MON87769 的方法。通过分析转基因大豆 MON87701、MON87708、MON87769 品系的特性序列及大豆内标准基因 *lectin* 序列,在此基础上优化设计 1 组多重 PCR 引物/探针,并以转基因大豆 MON87701、MON87708 和 MON87769 为测试样品,以其它转基因大豆、玉米、水稻、油菜、棉花及非转基因大豆为对照测试样品,经引物/探针浓度优化、特异性、灵敏度等测试,建立多重实时荧光 PCR 检测体系。结果显示:该多重 PCR 方法可从各种复杂样品中准确检出相应的靶标转基因大豆成分,对转基因大豆 MON87701、MON87708 和 MON87769 的检测灵敏度达到 43 个 DNA 拷贝,相当于比 0.05% (w/w)。该方法特异性强、灵敏度高,在转基因大豆成分快速检测和品系鉴定中具有很好的应用前景。

**关键词:**多重实时荧光 PCR;转基因大豆;快速检测;品系特异性鉴定

## Establishment of Detection System for Three Genetically Modified Soybean Lines

YAN Wei, LONG Li-kun, LI Cong-cong, XIA Wei, DONG Li-ming, LI Fei-wu

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

**Abstract:** Genetically modified soybean lines MON87701, MON87708 and MON87769 are the key monitoring targets in soybean import trade in China. In order to provide a highly efficient technical means for the supervision of these transgenic soybean lines, this study established a multitarget real-time polymerase chain reaction (MT-PCR) assay for simultaneous detection of MON87701, MON87708 and MON87769 in one reaction system. We optimized the primers and probes according to the event-specific border sequences of MON87701, MON87708, MON87769 and the endogenous *lectin* gene sequence in soybean. The primers/probes concentration optimization, specificity, sensitivity and applicability were tested, respectively. Other transgenic soybean, maize, rice, rapeseed, cotton and non-transgenic soybean were used as test samples in this study. The results showed that the MT-PCR method could accurately detect the corresponding target GM soybean components from various complex samples. The absolute limit of detection for MON87701, MON87708 and MON87769 were 43 copies, equivalent to 0.05% (w/w). This method can be used for the rapid identification of corresponding GM soybean lines.

**Keywords:** Multitarget real-time PCR; Genetically modified soybean; Rapid analysis; Event-specific identification

大豆是全球重要的粮油作物之一,也是目前种植面积最大的转基因作物,2017 年全球转基因大豆面积为 9 410 万  $\text{hm}^2$ ,占转基因作物总面积的 49.6%,转基因技术在大豆上的应用率已接近 80%<sup>[1]</sup>。目前,全球批准上市的转基因大豆品系有 41 个,其中仅 16 个品系被我国批准进口用作加工原料,包括 GTS40-3-2、MON89788、MON87701、MON87708、MON87769 等<sup>[2-3]</sup>。至今,我国尚未放开转基因大豆在国内的商业化种植,开展转基因大豆品系特异性检测方法研究,加强转基因大豆监测,对于保障国家粮食安全、贸易安全和生态安全至关重要。

转基因成分检测方法主要分为两类:基于核酸的方法和基于蛋白质的方法,其中核酸方法不受外源基因表达量、生产加工过程等因素的影响,应用最为广泛,常见的有聚合酶链式反应法 (polymerase

chain reaction, PCR)、环介导等温扩增技术 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP)<sup>[4]</sup>等。随着转基因作物品系种类的不断增多,以单一靶标为检测对象的方法已难以满足检测需求,如何提高检测通量和效率成为转基因检测技术研究的发展趋势。

多重 PCR 技术是通过将多种靶标的引物放在同一 PCR 体系中,同时检测 2 种以上靶标成分的高通量技术<sup>[5]</sup>,该技术已广泛应用于食源性致病菌检测<sup>[6]</sup>、动物源食品掺假鉴别<sup>[7]</sup>等食品安全检测领域。在转基因成分检测领域,国内外也报道了诸多基于多重 PCR 的筛选检测、基因特异性检测和品系特异性检测方法<sup>[8-11]</sup>。在转基因大豆品系检测方面, Köppel 等<sup>[12]</sup>建立了针对 MON89788、A5547-127、A2704-12 和 GTS40-3-2 共 4 个品系的多重实时荧光 PCR 方法, Kim 等<sup>[13]</sup>开发了能同时鉴定 GTS40-3-2、A2704-12、DP356043、MON89788、A5547-

收稿日期:2019-04-04

基金项目:国家转基因生物新品种培育科技重大专项(2018ZX08012-001);吉林省农业科技创新工程(CXGC2017JQ017)。

第一作者简介:闫伟(1984-),女,硕士,助理研究员,主要从事转基因作物分子检测技术研究。E-mail:jindyanwei@126.com。

通讯作者:李飞武(1982-),男,博士,研究员,主要从事转基因作物安全评价与分子检测研究。E-mail:lfeiwu3394@sina.com。

127 和 DP305423 6 种大豆品系的常规多重 PCR 方法,董立明等<sup>[14]</sup>报道了 GTS40-3-2、MON89788、DP356043、DP305423 和 CV127 共 5 个品系的常规多重 PCR 方法,这些方法可有效提高转基因大豆品系的通量和效率。其中,相对于需结合电泳技术的常规多重 PCR,多重实时荧光聚合酶链式反应(multitarget real-time polymerase chain reaction,MT-PCR)操作更为简便,扩增结束后无需开盖操作,可有效避免气溶胶污染<sup>[15]</sup>。

转基因大豆 MON87701、MON87708、MON87769 是美国孟山都公司研发的转基因大豆品系,分别于 2013 年(MON87701)和 2015 年(MON87708 和 MON87769)获得我国进口许可,但尚未取得巴西、阿根廷等大豆主产国的种植许可<sup>[2]</sup>。因此,在我国大豆进口活动中需对这 3 个品系进行重点监管。目前,国内外已针对这 3 个品系分别建立了单一 PCR 方法<sup>[16-21]</sup>,但相应的多重 PCR 检测方法尚未见报道。本研究旨在建立能同时检测这 3 个转基因大豆品系的多重实时荧光 PCR 方法,为这些转基因大豆的安全监管提供更为高效的检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料

转基因大豆 MON87701、MON87708、MON87769 及其混合样品,转基因大豆混合样品(GTS40-3-2、

MON89788、A2704-127、A5547-127、305423、356043),转基因玉米混合样品(Bt11、MON810、MON863、MON89034、MON88017),转基因水稻 TT51,转基因油菜 GT73,转基因棉花 MON15985,非转基因大豆吉育 80,均由本实验室收集保存。

1.2 主要仪器和试剂

CFX96 实时荧光定量 PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司);NanoDrop 核酸微量分析仪(美国 Thermo Fisher 公司)。

DNeasy Plant Mini Kit 试剂盒(德国 QIAGEN 公司);HiTaq Probe qPCR MasterMix(北京爱普拜生物技术有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 基因组 DNA 的提取 按照 QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit 操作说明书,提取样品基因组 DNA,取 1 μL 用 NanoDrop 核酸微量分析仪测定 DNA 的质量和浓度,用 1 × TE 溶液将所有 DNA 样品稀释至 25 ng·μL<sup>-1</sup>。

1.3.2 引物及探针设计 根据大豆内标基因 *Lectin* 及转基因大豆 MON87701、MON87708、MON87769 的品系特异性序列<sup>[16-18]</sup>,使用 Vector NTI 11.5 软件进行序列分析,并结合 Charels 等检测方法<sup>[16-21]</sup>,设计 4 种靶标 DNA 的检测引物和探针序列(表 1),委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成,用 1 × TE 溶液分别稀释至 10 μmol·L<sup>-1</sup>。

表 1 多重实时荧光 PCR 引物和探针信息

Table 1 Multitarget real-time PCR primers and probes used in this study			
检测靶标 Targets	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 Amplicon length/bp	文献 Reference
MON87701	MON87701-QF: TGGTGATATGAAGATACATGCTTAGCAT	89	[16][19]
	MON87701-QR: CGTTTCCCGCCTTCAGTTTAAA		
	MON87701-QP: Texas Red-TCAGTGTTTGACACACACACTAAGCGTGCC-BHQ1		
MON87708	MON87708-QF: TCATACTCATTTGCTGATCCATGTAG	91	[17][20]
	MON87708-QR: AGAACAAATTAACGAAAAGACAGAACG		
	MON87708-QP: FAM-TCCCGGACTTTAGCTCAAAATGCATGTA-BHQ1		
MON87769	MON87769-QF: TCATACTCATTTGCTGATCCATGTAG	87	[17-18][20-21]
	MON87769-QR: GCAAGTTGCTCGTGAAGTTTTG		
	MON87769-QP: Cy5-CCCGGACATGAAGCCATTTACAATTGAC-BHQ1		
<i>Lectin</i>	Lectin-QF: CCAGCTTCGCCGCTTCCTTC	74	[16]
	Lectin-QR: GCGGACATCTACATTTTTGAATTGA		
	Lectin-QP: HEX-CTTCACCTTCTATGCCCTGACAC-BHQ1		

1.3.3 MT-PCR 反应体系优化 MT-PCR 总体积为 25 μL,包括:2 × HiTaq probe qPCR MasterMix 12.5 μL,上、下游引物和探针溶液,DNA 模板 4 μL(100 ng),用 ddH<sub>2</sub>O 补齐至 25 μL。设置上游引物、下游引物、

探针终浓度不同的 3 个处理,处理 1 中 3 个组分的浓度分别为 0.8,0.8 和 0.4 μmol·L<sup>-1</sup>;处理 2 中分别为 0.4,0.4 和 0.2 μmol·L<sup>-1</sup>;处理 3 中分别为 0.2,0.2 和 0.1 μmol·L<sup>-1</sup>。

MT-PCR 扩增反应程序:95 ℃ 预变性 2 min; 95 ℃ 变性 15 s,60 ℃ 变性和退火 1 min,45 个循环;在每个循环结束后采集荧光信号。每个样品 3 次重复。

对含有转基因大豆 MON87701、MON87708 和 MON87769 的混合样品进行 MT-PCR 扩增,分析其扩增效果,确定最合适的 MT-PCR 反应体系。

1.3.4 MT-PCR 方法特异性测试 以转基因大豆 MON87701、MON87708 和 MON87769,其它转基因大豆混合样品、转基因玉米混合样品、转基因水稻 TT51、转基因油菜 GT73、转基因棉花 MON15985 及非转基因大豆吉育 80 基因组 DNA 为模板,以 ddH<sub>2</sub>O 作为空白对照,按优化后的反应体系进行 MT-PCR 扩增。

1.3.5 MT-PCR 方法灵敏度测试 根据 Bennett 等<sup>[22]</sup>方法进行单一组分样品扩增灵敏度的测试,每个单拷贝的大豆基因组约为 1.25 pg,用 ddH<sub>2</sub>O 将转基因大豆 MON87701、MON87708 和 MON87769 的基因组 DNA 进行 10 倍梯度稀释,分别对 MON87701、MON8778 和 MON87769 大豆基因组 DNA 的梯度稀释液进行 MT-PCR 扩增,体系中每种靶标的拷贝数分别为 80 000,8 000,800,80 和 8 个。

复杂组分样品的灵敏度测试:将转基因大豆 MON87701、MON87708 和 MON87769 的基因组 DNA 进行等量混合,然后用 ddH<sub>2</sub>O 进行 5 倍梯度稀释,进行 MT-PCR 扩增,体系中 MON87701、MON87708 和 MON87769 的拷贝数分别为 27 000,5 400,1 080,216,43 和 8 个。

1.3.6 MT-PCR 方法适用性验证 将转基因大豆 MON87701、MON87708 和 MON87769 的基因组 DNA 混合,配制 4 种不同组分的混合样品,验证 MT-PCR 方法的适用性。混合样品 1: MON87701 + MON87708;混合样品 2: MON87701 + MON87769;混合样品 3: MON87708 + MON87769;混合样品 4: MON87701 + MON87708 + MON87769。

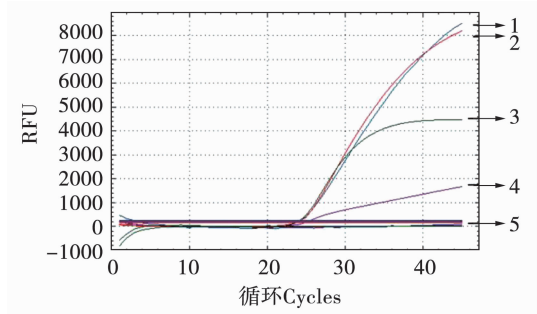
2 结果与分析

2.1 MT-PCR 方法的优化和建立

比对转基因大豆品系 MON87701、MON87708 和 MON87769 的特异性序列,发现 MON87708 和 MON87769 的 3' 端旁侧序列有 270 bp 的一致性序列,均位于外源 T-DNA 区段。MON87708 和 MON87769 品系的特异性实时荧光 PCR 标准检测方法<sup>[20-21]</sup>的上游引物均位于该一致性序列区段,而上游引物的序列不同,如将上述标准中的 4 条引物置于同一 PCR 体系中,将会出现非预期扩增产物。为避免发生该情况,本研究针对 MON87708 和

MON87769 采用了同样的上游引物<sup>[18,21]</sup>(表 1)。经引物和探针用量的梯度试验,确定了 MT-PCR 的反应体系。当 3 种转基因大豆品系的上、下游引物和探针终浓度分别为 0.4,0.4 和 0.2 μmol·L<sup>-1</sup>时,能够清晰鉴别 3 种转基因大豆品系。

利用该 MT-PCR 体系,对含有转基因大豆 MON87701、MON87708 和 MON87769 的混合样品进行扩增,能够准确获得 *Lectin* 基因及 3 个转基因大豆品系的扩增信号,而在非转基因大豆对照样品中没有典型扩增曲线(图 1)。表明该 MT-PCR 体系适用于 3 种转基因大豆成分的检测。



1: MON87708; 2: MON87701; 3: *Lectin* 基因; 4: MON87769; 5: 非转基因大豆。  
1: MON87708; 2: MON87701; 3: *Lectin* gene; 4: MON87769; 5: Non-GM soybean.

图 1 多重实时荧光 PCR 体系扩增曲线

Fig 1 Amplification curve of established MT-PCR

2.2 MT-PCR 方法的特异性检测结果

采用 MT-PCR 方法测定 9 份特异性测试样品中的 4 种不同靶标,相应的 Ct 值见表 2。所有大豆样品均获得 *Lectin* 基因的典型扩增曲线,且 Ct 值 < 24,其它物种样品均未获得典型扩增曲线;MON87701、MON87708、MON87769 样品中相应品系的 Ct 值分别为 22.76,26.42 和 23.25,均为阳性,与待测样品信息相符。结果表明,本研究建立的 MT-PCR 方法对 MON87701、MON87708、MON87769 品系均表现出很好的特异性。

2.3 MT-PCR 方法对单一组分样品灵敏度检测

采用 MT-PCR 方法分别检测 MON87701、MON8778 和 MON87769 转基因大豆基因组 DNA 梯度稀释液中的 4 种不同靶标。随着体系中转基因大豆 DNA 拷贝数的降低,Ct 值逐渐增加;当转基因大豆 DNA 拷贝数低至 80 时,4 种靶标均能得到典型扩增(表 3)。当转基因大豆 DNA 低至 8 拷贝时,3 次 PCR 重复中仅 2 次检出 MON87701 成分,仅 1 次检出 MON87708 和 MON87769 靶标。结果表明该 MT-PCR 方法对转基因大豆 DNA 的检测灵敏度至少可达到 80 个拷贝。

表 2  多重实时荧光 PCR 特异性测试结果  
Table 2  Specificity test result of the MT-PCR

样品 Sample	Ct 值 Ct value			
	<i>Lectin</i>	MON87701	MON87708	MON87769
MON87701	21. 22	22. 76	N/A	N/A
MON87708	23. 83	N/A	26. 42	N/A
MON87769	23. 98	N/A	N/A	23. 25
其它转基因大豆混合样品 Mixtures of other genetically modified soybean	23. 75	N/A	N/A	N/A
转基因玉米混合样品 Mixtures of genetically modified corn	N/A	N/A	N/A	N/A
转基因水稻 TT51 Genetically modified rice TT51	N/A	N/A	N/A	N/A
转基因油菜 GT73 Genetically modified rape GT73	N/A	N/A	N/A	N/A
转基因棉花 MON15985 Genetically modified cotton MON15985	N/A	N/A	N/A	N/A
非转基因大豆 Non-genetically modified soybean	23. 86	N/A	N/A	N/A

表 3  单一组分样品 MT-PCR 灵敏度测试  
Table 3  Sensitivity of the MT-PCR for single sample

样品 Sample	DNA 拷贝数 DNA copy number	Ct 值 Ct value			
		MON87701	MON87708	MON87769	<i>Lectin</i>
MON87701	80000	25. 21	N/A	N/A	27. 09
	8000	28. 42	N/A	N/A	30. 22
	800	31. 69	N/A	N/A	33. 44
	80	35. 03	N/A	N/A	37. 00
	8	38. 13	N/A	N/A	37. 51
MON87708	80000	N/A	27. 46	N/A	27. 23
	8000	N/A	30. 37	N/A	30. 25
	800	N/A	33. 56	N/A	33. 33
	80	N/A	35. 52	N/A	35. 48
	8	N/A	N/A	N/A	38. 07
MON87769	80000	N/A	N/A	28. 72	29. 45
	8000	N/A	N/A	30. 49	31. 27
	800	N/A	N/A	33. 4	33. 50
	80	N/A	N/A	37. 15	35. 87
	8	N/A	N/A	39. 58	35. 22

2. 4  MT-PCR 方法对多组分样品灵敏度检测

MON87701、MON8778 和 MON87769 转基因大豆基因组 DNA 混合样品的 MT-PCR 测试结果如表 4 所示,当转基因大豆 DNA 拷贝数为 43 个时,3 种大豆品系均能得到典型扩增。当靶标 DNA 低

至 8 个拷贝时,3 次 PCR 平行中仅 1 次检出 MON87701 成分,2 次检出 MON87708,3 次均未检出 MON87769。表明该 MT-PCR 方法针对多组分样品中 MON87701、MON87708 及 MON87769 的检测灵敏度可达到 43 个拷贝。

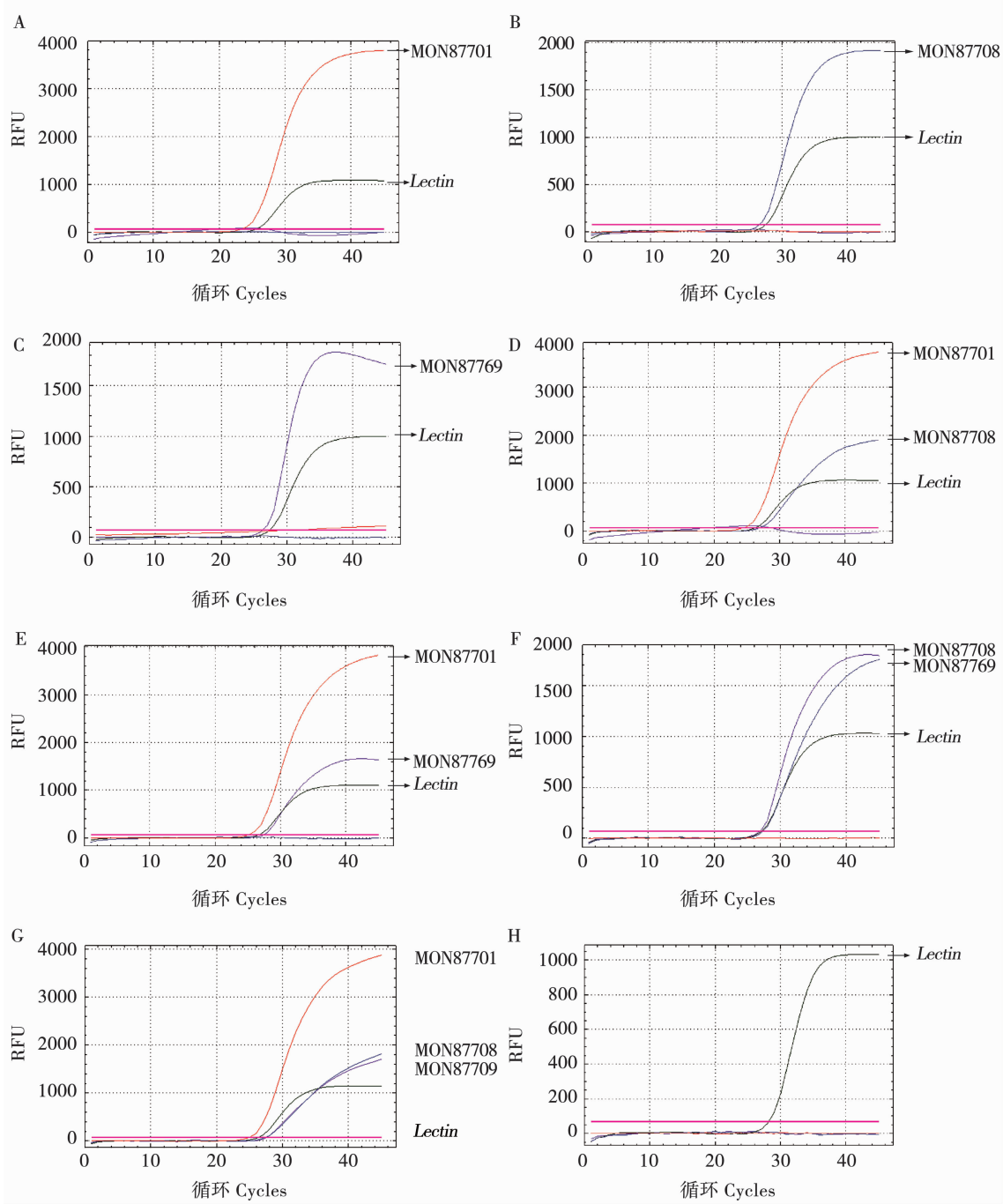
表 4 多组分样品 MT-PCR 灵敏度测试

Table 4 Sensitivity of the MT-PCR for complex sample

DNA 拷贝数	Ct 值 Ct value		
	MON87701	MON87708	MON87769
27000	27.07	26.86	27.51
5400	29.75	29.50	30.09
1080	31.92	31.61	32.42
216	34.19	35.50	34.16
43	37.22	36.68	34.05
8	37.63	37.68	N/A

2.5 MT-PCR 检测效果实测

8 种不同组分样品的 MT-PCR 扩增结果如图 2 所示,无论是对单一组分样品,还是多组分样品,均能特异地获得预期转基因大豆成分的典型扩增曲线,既无非特异性扩增,也没有出现假阳性或假阴性情况,表明该 MT-PCR 方法适用于转基因大豆 MON87701、MON8778 和 MON87769 的品系特异性鉴定。



A: MON87701; B: MON87708; C: MON87769; D: MON87701 + MON87708; E: MON87701 + MON87769; F: MON87708 + MON87769; G: MON87701 + MON87708 + MON87769; H: 非转基因大豆。

A: MON87701; B: MON87708; C: MON87769; D: MON87701 + MON87708; E: MON87701 + MON87769; F: MON87708 + MON87769; G: MON87701 + MON87708 + MON87769; H: Non-genetically modified soybean.

图 2 单组分和多组分样品的适用性测试

Fig. 2 Applicability of the MT-PCR for single and complex sample

3 讨论

根据靶标 DNA 序列的性质不同,基于 DNA 的转基因成分检测方法通常被分为筛选、外源基因特异性、载体构建特异性和品系特异性 4 类<sup>[23]</sup>。在开展转基因检测工作时,一般先进行筛选检测,对筛查为阳性的,再进行品系特异性检测,以确定转基因品系是否获得批准。品系特异性检测方法以外源插入载体与植物基因组的连接区序列为检测靶标,该序列在转基因品系的基因组上具有唯一性,因此此类检测方法可用于转基因成分身份鉴定。

目前,针对每个已获上市批准的转基因大豆品系,如 MON89788、GTS40-3-2、MON87701 等,都建立了品系特异性的实时荧光 PCR 检测方法,但这些方法均只能检测单个品系<sup>[24]</sup>。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<sup>[12-14]</sup>。避免因引物间干扰导致扩增效率低、非预期扩增等,是建立多重 PCR 方法的关键因素。本研究比较了 3 种转基因大豆品系的特异性序列,发现已有检测方法的引物在多重 PCR 体系中会出现非预期扩增。通过对靶标检测引物的优化调整,建立了无非预期扩增的 MT-PCR 体系。

本研究基于转基因大豆 MON87701、MON87708 和 MON87769 的品系特异性序列,并以 *Lectin* 基因为大豆内参照基因,首次建立了在单一反应管内对 3 种转基因大豆品系进行精准鉴定的多重实时荧光 PCR 方法。该方法与传统多重 PCR 相比,无需电泳,效率更高,对每种靶标的检测灵敏度可达到 43 个拷贝,按 100 ng 大豆 DNA 模板量换算成质量分数,相当于检测灵敏度为 0.05%,检测精度与 Kim 等<sup>[13]</sup>建立的其它转基因大豆品系的多重 PCR 方法相当,比董立明等<sup>[14]</sup>报道的常规多重 PCR 方法提高了一倍。而且,该方法的检测灵敏度远低于欧盟(0.9%)、以色列(1%)、韩国(3%)、日本(5%)等一些国家和地区的转基因食品标识阈值<sup>[25]</sup>,能够满足我国进出境检验检疫、农产品和食品安全监测等领域的需求,具有很好的应用前景。

4 结论

本研究采用多重实时荧光 PCR 技术,并针对不同靶标的引物和探针用量进行梯度试验,建立了能同时检测 MON87701、MON87708 和 MON87769 转基因大豆品系的检测方法。在序列比对分析基础上,通过优化调整 MON87769 大豆检测引物,有效避免了该 MT-PCR 体系中非预期扩增的产生。该方法可从各种复杂样品中准确检测出含量低至 0.05%

的相应转基因大豆品系,为转基因大豆安全监管和检测监测提供了一种新的手段。

参考文献

[1] 国际农业生物技术应用服务组织. 2017 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, 2018, 38(6): 1-8. (The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications. Global status of commercialized biotech/GM crops in 2017[J]. China Biotechnology, 2018, 38(6): 1-8.)

[2] International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications. GM approval database [DB/OL]. (2019-01-22) [2019-02-03]. <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase>.

[3] 中华人民共和国农业农村部. 转基因权威关注 [EB/OL]. (2019-01-08) [2019-02-03]. <http://www.moa.gov.cn/ztl/zjyqwgz/spxx>. (MOA of China. Authoritative publication of GMO [EB/OL]. (2019-01-08) [2019-02-03]. <http://www.moa.gov.cn/ztl/zjyqwgz/spxx>.)

[4] Fraiture M A, Herman P, Taverniers I, et al. Current and new approaches in GMO detection: Challenges and solutions[J]. BioMed Research International, 2015: 1-22.

[5] Guo J C, Chen L L, Liu X, et al. A multiplex degenerate PCR analytical approach targeting to eight genes for screening GMOs [J]. Food Chemistry, 2011(3): 1566-1573.

[6] 冯可, 胡文忠, 姜爱丽, 等. 鲜切果蔬中 4 种病原微生物多重 PCR 检测技术[J]. 食品科学, 2018, 39(6): 276-283. (Feng K, Hu W Z, Jiang A L. Multiplex PCR method for detection of four foodborne pathogens on fresh-cut fruits and vegetables[J]. Food Science, 2018, 39(6): 276-283.)

[7] 周彤, 李家鹏, 李金春, 等. 一种基于多重实时荧光聚合酶链式反应熔解曲线分析的肉及肉制品掺假鉴别方法[J]. 食品科学, 2017, 38(12): 217-222. (Zhou T, Li J P, Li J C, et al. A multiplex RT-PCR melting curve analysis method for adulteration identification in meat and meat products [J]. Food Science, 2017, 38(12): 217-222.)

[8] Cottenet G, Blancpain C, Sonnard V, et al. Development and validation of a multiplex real-time PCR method to simultaneously detect 47 targets for the identification of genetically modified organisms [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013, 405(21): 6831-6844.

[9] Holck A, Pedersen B O, Heir E. Detection of five novel GMO maize events by qualitative, multiplex PCR and fluorescence capillary gel electrophoresis [J]. European Food Research and Technology, 2010, 231(3): 475-483.

[10] Xu W T, Zhai Z F, Huang K L, et al. A novel universal primer-multiplex-PCR method with sequencing gel electrophoresis analysis [J]. PLoS One, 2012, 7(1): e22900.

[11] Datukishvili N, Kutateladze T, Gabriadze I, et al. New multiplex PCR methods for rapid screening of genetically modified organisms in foods [J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 757.

[12] Köppel 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.

[13] 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.

[14] 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 J, et al. Rapid detection of five genetically modified soybean lines by multiplex PCR method [J]. Soybean Science, 2016, 35(6): 1002-1007.)

[15] Hans-Henno D, Remus I, Astrid G, et al. Development of a qualitative, multiplex real-time PCR kit for screening of genetically modified organisms (GMOs) [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010, 396(6): 2043-2054.

[16] Charels D, Mazzara M, Grazioli E, et al. Event-specific method for the quantification of soybean line MON87701 using real-time PCR-validation report and protocol [EB/OL]. (2012-05-11) [2019-02-03]. <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/entry?db=gmometh&id=qt-eve-gm-010&q=id%3aQT-eve-gm>.

[17] Savini C, Mazzara M, Munaro B, et al. Event-specific method for the quantification of soybean MON87708 using real-time PCR-validation report and validated method [EB/OL]. (2013-05-21) [2019-02-03]. <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/entry?db=gmometh&id=qt-eve-gm-012&q=id%3aQT-eve-gm>.

[18] Mazzara M, Charles D C, Pinski G, et al. Event-specific method for the quantification of soybean MON87769 using real-time PCR-validation report and validated method [EB/OL]. (2012-12-13) [2019-02-03]. <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/entry?db=gmometh&id=qt-eve-gm-002&q=id%3aQT-eve-gm>.

[19] 中华人民共和国农业部. 转基因植物及其产品成分检测——抗虫大豆 MON87701 及其衍生品种定性 PCR 方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015. (People's Republic of China Ministry of Agriculture. Detection of genetically modified plants and derived products — qualitative PCR method for insect-resistant soybean MON87701 and its derivatives [S]. Beijing: Standards Press of China, 2015.)

[20] 中华人民共和国农业部. 转基因植物及其产品成分检测——耐除草剂大豆 MON87708 及其衍生品种定性 PCR 方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015. (People's Republic of China Ministry of Agriculture. Detection of genetically modified plants and derived products — qualitative PCR method for herbicide-tolerant soybean MON87708 and its derivatives [S]. Beijing: Standards Press of China, 2015.)

[21] 中华人民共和国农业部. 转基因植物及其产品成分检测——品质改良大豆 MON87769 及其衍生品种定性 PCR 方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014. (People's Republic of China Ministry of Agriculture. Detection of genetically modified plants and derived products — qualitative PCR method for quality improved soybean MON87769 and its derivatives [S]. Beijing: Standards Press of China, 2014.)

[22] Bennett M D, Leitch I J. Plant DNA C-values database (release 6.0, Dec. 2012) [EB/OL]. [2019-02-13]. <http://www.kew.org/cvalues>.

[23] Holst-Jensen A, Rønning S B, Løvseth A, et al. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs) [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2003, 375(8): 985-993.

[24] Dong W, Yang L T, Shen K L, et al. GMDD: A database of GMO detection methods[J]. BMC Bioinformatics, 2008, 9: 260.

[25] 张忠民. 转基因食品标识阈值问题研究[J]. 食品科学, 2015, 36(9): 254-259. (Zhang Z M. Studies on labeling threshold of genetically modified foods[J]. Food Science, 2015, 36(9): 254-259.)

欢迎订阅 2020 年《大豆科学》

《大豆科学》是由黑龙江省农业科学院主管主办的大豆专业性学术期刊,被国内外多家重要数据库和文摘收录源收录的重点核心期刊。主要刊登有关大豆遗传育种、品种资源、生理生态、耕作栽培、植物保护、营养肥料、生物技术、食品加工、药用功能及工业用途等方面的学术论文、科研报告、研究简报、国内外研究述评、学术活动简讯和新品种介绍等。

《大豆科学》主要面向从事大豆科学研究的科技工作者,大专院校师生、各级农业技术推广部门的技术人员及科技种田的农民。

《大豆科学》为双月刊,16 开本,国内外公开发行。国内每期定价:40.00 元,全年 240.00 元,邮发代号:14-95。国外每期定价:40.00 美元(含邮资),全年 240.00 美元,国外代号:Q5587。全国各地邮局均可订阅,也可向编辑部直接订购。

地址:哈尔滨市南岗区学府路 368 号《大豆科学》编辑部  
邮编:150086  
电话:0451-86668735  
网址:<http://ddkx.haasep.cn>  
E-mail:soybeanscience@vip.163.com

