

抗除草剂转基因作物实时荧光定量PCR检测*

王恒波 陈如凯 陈平华**

(福建农林大学农业部甘蔗遗传改良重点开放实验室 福州 350002)

摘要 建立了一种以SYBR Green I为结合染料、快速准确检测抗除草剂基因成分的实时荧光定量PCR方法. 以转基因大豆与转基因玉米标准品为材料, 通过使用特异性引物和SYBR Green I结合染料实时荧光定量PCR技术, 对转基因农作物中外源抗除草剂基因进行了定量检测, 绘制了两种基因扩增的标准曲线图, 根据标准曲线方程计算外源基因含量; 并作了溶解曲线、检测方法检测灵敏度和精密度的分析. 研究发现, 两者标准曲线方程线性关系良好, R^2 值分别达到0.993 9与0.992 4. 通过已知标准品进行验证, 实测值与真值接近, 与实际含量的相对偏差是6.52%和7.90%. 结果表明, SYBR Green I结合染料法完全可以用于转基因农作物定量PCR检测. 图5 表2 参11

关键词 抗除草剂转基因作物; SYBR Green I荧光染料; 实时荧光定量PCR; 溶解曲线; 检测
CLC Q943.2

Detection of Genetically Modified Herbicide-tolerant Crops by Real-time Fluorescent Quantitative PCR Assay*

WANG Hengbo, CHEN Rukai & CHEN Pinghua**

(Key Laboratory of Genetic Improvement for Sugarcane, Ministry of Agriculture, Sugarcane Research Institute of Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract A rapid and sensitive SYBR Green I-based real-time PCR method was developed for quantitative detection of *CP4-EPSPS* and *PAT* genes from the genetically modified (GM) herbicide-tolerant crops. The target genes from transgenic soybean and maize references were amplified to make standard curves. The transgenic ratios were then calculated according to the standard C_i -copies linear graphs of these two genes. The reproducibility and melting curves of the genes were also analyzed. The results showed that the standard equations of *CP4-EPSPS* and *PAT* genes had higher R^2 values of 0.993 9 and 0.992 4, respectively. The difference in transgenic ratios between the known standards and measured crops was only 6.52%~7.90%. These results suggest that the real-time PCR assay with SYBR Green I dye is suitable for detecting the ratios of GM crops and their derivatives. Fig 5, Tab 2, Ref 11

Keywords genetically modified herbicide-tolerant crop; SYBR Green I dye; real-time fluorescent quantitative PCR; melting curve; detection

CLC Q943.2

随着转基因技术的日趋成熟, 各种转基因农作物由实验室走向环境释放, 其中不少农作物已进行商品化生产, 且种植面积急剧扩大. 根据国际农业生物技术应用咨询服务中心 (ISAAA) 2007年的报告, 95%的转基因农作物集中在大豆、玉米、棉花和油菜籽4种植物上, 抗各种杂草和抗虫害的两个转基因类型占主导地位. 由此带来的转基因生物及产品的安全性问题已经成为人们讨论的热点问题. 世界多数国家和国际组织的普遍做法是对转基因产品实施标识管理, 大部分实施转基因产品标识管理政策的国家都规定了各自不同的标识阈值. 例如: 欧盟 (2002) 规定转基因产品成分高于0.9%, 巴西为4%, 澳大利亚和新西兰为1%, 俄罗斯、中国香港和中国台湾地区都为5%时, 就必须进行标识. 我国2001年颁布实施《农业转基因生物安全管理条例》, 其中第四章第

二十八条明确规定, 在中华人民共和国境内销售列入农业转基因生物标识目录的农业转基因生物, 应当有明显的标识. 因此, 为转基因产品实施标签制度的定量检测技术显得尤为重要.

近年来, 对转基因生物产品进行定量分析的主要方法是荧光定量PCR技术. 由于该技术不仅实现了PCR从定性到定量的飞跃, 而且与常规PCR相比, 具有特异性强和灵敏度高的特点, 避免了PCR产物进行后期处理, 克服了以往PCR技术中存在的假阳性污染和不能进行准确定量的缺点^[1], 极大地提高了检测速度和自动化程度. 荧光定量PCR技术是指在普通PCR反应体系中加入荧光基团, 利用荧光信号积累监测整个PCR反应的进程, 最后通过标准曲线对未知模板进行定量的方法. 荧光定量PCR的荧光基团包括探针类和染料类两种. 本文所用染料类如SYBR Green I是一种非饱和菁类荧光素, 利用与双链DNA小沟结合发光的理化特征指示扩增产物的增加, 其处于游离状态时, 检测不到荧光信号, 当结合dsDNA后荧光强度明显增强, 即被荧光探测系统检测到, 荧光强度的增加与初始模板量相关. 目前实时荧光定量PCR中

收稿日期: 2008-12-15 接受日期: 2009-03-17

*国家“863”计划项目 (No. 2007AA100701) 和福建省科技计划重点项目 (No. 2007I0036) 资助 Support by the National “863” Project of China (No. 2007AA100701) and the Major Research Projects of the Department of Science & Technology of Fujian, China (No. 2007I0036)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: phcemail@126.com)

使用特异性的荧光探针较多,但由于反应体系中荧光探针能与靶序列特异性杂交,同时存在猝灭不彻底、合成和标记复杂、成本较高等缺陷^[2-4]。SYBR Green I 荧光染料成本较低,但尚未在定量检测转抗除草剂基因作物中应用。为了降低检测成本,本研究利用SYBR Green I 荧光染料代替价格昂贵的TaqMan探针进行定量检测,分别建立了两种商品化程度最高的转基因大豆CP4-EPSPS和转基因玉米(TC1507)PAT两种抗除草剂基因的定量PCR检测体系,以期为我国转基因定量标识检测体系提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

转基因大豆标准品(Roundup Ready™ soya beans)(ERM-BF410f、ERM-BF410d、ERM-BF410a),其中转基因成分含量分别占5%、1%、0%;转基因玉米标准品(TC1507 Maize),转基因成分含量分别占0%、1%、10%,以上标准品均由国际标准物质收藏中心(IRMM)制备,均购自Fluka公司。阴性对照材料大豆为鲁豆4号、玉米吉单275,系本实验室保存。

1.2 酶及试剂

PCR反应试剂(包括ExTaq酶、SYBR Premix ExTaq、dNTPs、buffer)购自TaKaRa宝生物工程(大连)有限公司;CTAB提取液[200 mmol/L Tris-HCl, 2 mol/L NaCl, 25 mmol/L EDTA, 0.5% SDS, pH 8.0];沉淀缓冲液[2% CTAB, 100 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L EDTA, 1.4 mol/L NaCl, 1% PVP];100 μg/mL蛋白酶K;酚:氯仿:异戊醇(25:24:1);氯仿:异戊醇(24:1);异丙醇;75%乙醇。

1.3 主要仪器

定量PCR仪:美国BIO-RAD公司生产;离心机:德国Eppendorf 5810型;PCR仪:德国Eppendorf公司Master Cycler gradient 96;核酸蛋白分析仪:瑞典APBiotech产品;生物安全柜:上海力新有限公司。

1.4 PCR引物

引物由上海生工生物工程有限公司合成,其核苷酸序列和扩增片段长度见表1。引物采用中华人民共和国出入境检验检疫行业标准SN/T1195-2003、SN/T1196-2003。

1.5 基因组DNA的提取

采用SN/T1195-2003标准提取基因组DNA,用核酸蛋白分析仪测定核酸提取液中DNA的浓度,稀释到400 ng/μL备用。

1.6 定性PCR对内源基因的检测与定量PCR对CP4-EPSPS和PAT外源基因的检测

大豆和玉米的内源基因分别是*Lectin*、*IVR*,其检测引物如表1中所示,定性PCR反应在25 μL体系中进行。反应体系:10×PCR Buffer(含Mg²⁺) 2.5 μL, dNTP(2.5 mmol/L) 2 μL,引物(10 pmol/L)各0.5 μL, ExTaq酶(5 U/μL) 0.125 μL,模板DNA(100 ng/μL) 1 μL,加灭菌双蒸水使总体积为25 μL。扩增条件为预变性95℃ 5 min;变性94℃ 30 s,退火60℃ 30 s,延伸72℃ 30 s, 35个循环;最后72℃延伸4 min。

采用TaKaRa宝生物工程(大连)有限公司提供的试剂盒,在25 μL的反应体系中进行,其余按照说明书进行。定量PCR反应条件:50℃ 2 min;95℃ 5 min;60℃ 40 s;40个循环。反应结束后,记录参照样品和待测样品的C_t值,溶解曲线温度范围设置为65.0℃至95.0℃,每间隔0.5℃读数一次,每次1 s,并且连续记录荧光信号的变化,将温度的变化与荧光信号的变化求负倒数后对温度作图,可得到产物的T_m值。除特别说明外,每个试样均做3个重复,并同时设立空白对照和非转基因样品的阴性对照。

1.7 DNA模板的制备

提取转基因大豆含量(转基因大豆基因组量/大豆总基因组量)为5%的标准参照物质的DNA样品,利用核酸蛋白分析仪检测DNA的浓度,稀释到400 ng/μL。用双蒸水分别将其DNA稀释1倍、5倍、25倍、125倍制作标准曲线,为了验证生成的标准曲线,特别将浓度为400 ng/μL、1%的转基因大豆标准品作为待测样品。取不同稀释倍数的DNA待测样品进行实时荧光PCR检测,建立合适的标准曲线,用于待测转基因大豆样品的定量检测。将转基因玉米TC1507含量为10%的参照物质提取的DNA样品稀释到400 ng/μL。用双蒸水分别将其DNA稀释1倍、2倍、10倍、50倍、250倍制作标准曲线,用于待测转基因玉米TC1507样品的定量检测。

1.8 定量标准曲线的建立和验证及溶解曲线分析

通过对模拟不同转基因含量的转基因大豆和转基因玉米样品的测定,计算机自动生成标准曲线,纵坐标为C_t,横坐标为百分含量的对数。根据回归曲线方程,将样品的C_t值代入公式,即可得到该转基因作物的百分含量。

荧光染料的优势在于能检测各种双链DNA序列的扩增,无需设计探针,检测过程简便,成本低廉。然而正是由于荧光染料能和任何dsDNA结合,对DNA模板没有选择性,因此也能与非特异的dsDNA结合,使实验容易产生假阳性信号,目前引物二聚体的问题可以通过溶解曲线分析加以解决。

表1 大豆*Lectin*、玉米*IVR*内源基因和转化的CP4-EPSPS、PAT基因的PCR引物序列及产物大小
Table 1 List of PCR primers designed for *Lectin*, CP4-EPSPS in RR soybean and *IVR*, PAT in maize TC1507, and the sizes of their products

基因 Gene	引物序列 Primer sequence	产物片段大小 Amplified fragment (bp)
<i>Lectin</i>	Forward 5'-GCC CTC TAC TCC ACC CCC ATC C-3'	118
	Reverse 5'-GCC CAT CTG CAA GCC TTT TTG TG-3'	
CP4-EPSPS	Forward 5'-CCA CTA TCC TTC GCA AGA CCC TTC C-3'	320
	Reverse 5'-CTT CTG TGC TGT AGC CAC TGA TGC-3'	
<i>IVR</i>	Forward 5'-CCG CTG TAT CAC AAG GGC TGG TAC C-3'	226
	Reverse 5'-GGA GCC CGT GTA GAG CAT GAC GAT C-3'	
PAT	Forward 5'-GTC GAC ATG TCT CCG GCG AG-3'	191
	Reverse 5'-GCA ACC AAC CAA GGG TAT C-3'	

1.9 检测方法精密度分析^[5]

本实验在讨论以上两种标准品的基础上分别选择了3个不同转基因含量的浓度(0.04%、1.00%、5.00%),分别进行10次重复测定,通过统计分析方法计算两者的精密度。

2 结果与分析

2.1 大豆和玉米DNA的质量及其内源基因的扩增

经过核酸蛋白测定仪测定,提取的基因组DNA的 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 在1.7~2.0之间,稀释DNA的浓度为400 ng/ μL 。提取高质量的DNA是进行转基因成分检测的前提条件。通过检测内源特异参照基因,可以判定DNA是否被提取出来,或所提DNA是否存在抑制PCR扩增的物质,从而可以避免检测出现的假阴性结果。首先通过对大豆和玉米基因组中内源单拷贝Lectin基因与IVR基因进行定性PCR检测,验证所提取的基因组DNA能够适合于PCR扩增。图1、图2分别显示Lectin基因与IVR基因扩增结果,由图可以看出,分别扩增出了预期的118 bp内源Lectin基因片段和226 bp的内源IVR基因片段,表明提取的基因组DNA质量完全符合PCR扩增的要求。

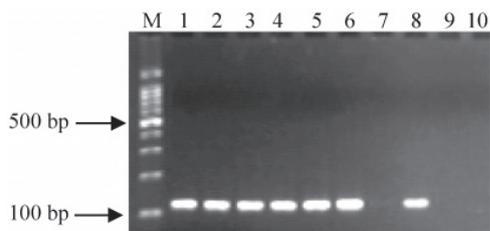


图1 大豆内源Lectin基因的定性检测

Fig. 1 Qualitative detection of the endogenous gene *Lectin* of soybean

M: 100 bp DNA ladder marker (Tiangen); 泳道1、2、3为5%转基因大豆标准品; 4、5、6为1%转基因大豆标准品; 7: 阴性对照(pBI121); 8: 阳性对照(鲁豆4号); 9: 提取空白对照; 10: 试剂空白对照

M: 100 bp DNA ladder marker; Lanes 1, 2, 3: Transgenic soybean reference of 5%; Lanes 4, 5, 6: Transgenic soybean reference of 1%; Lane 7: Negative control (pBI121); Lane 8: Positive control (Ludou No. 4); Lane 9: Environment control; Lane 10: Reagent control

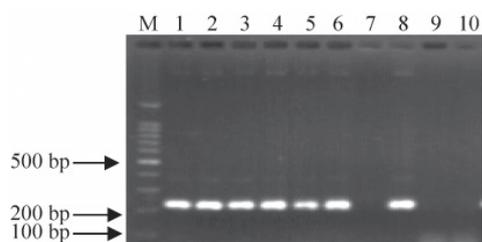


图2 玉米内源IVR基因的定性检测

Fig. 2 Qualitative detection of the endogenous gene *IVR* of maize

M: 100 bp DNA ladder marker (Tiangen); 1、2、3为10%转基因玉米标准品; 4、5、6为1%转基因玉米标准品; 7: 阴性对照(鲁豆4); 8: 阳性对照(非转基因玉米); 9: 提取空白对照; 10: 试剂空白对照

M: 100 bp DNA ladder marker; Lanes 1, 2, 3: Transgenic maize reference of 10%; Lanes 4, 5, 6: Transgenic maize reference of 1%; Lane 7: Negative control (Ludou No. 4); Lane 8: Positive control (Jidan No. 275); Lane 9: Environment control; Lane 10: Reagent control

2.2 定量标准曲线的建立和验证

将转基因大豆含量为5%和转基因玉米含量为10%的DNA标准品,通过5倍稀释模拟5%、1%、0.2%、0.04%不同含量的转基因样品建立标准曲线,将待测样品扩增得到的 C_t 值

代入公式,即可得到待测样品的转基因成分的百分含量的对数,进而计算转基因成分的含量,最后通过已知百分含量的标准品进行验证所建立的标准曲线是否适合对转基因大豆和转基因玉米TC1507的定量检测。研究表明: C_t 值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系^[6]。 C_t 值越小,模板DNA的起始拷贝数越多; C_t 值越大,模板DNA的起始拷贝数越少。图3与图4分别是两个基因实时荧光定量扩增图。由图可以看出,虽然两个基因的起始含量(大豆为5%和玉米为10%)不同,但是由于拷贝数/基因组的差异,它们在25个循环左右开始进入指数扩增期,且两个基因扩增稳定,浓度较低的样品用较多的循环次数才能产生较高的荧光信号,其 C_t 值也相应增大。检测转基因大豆得到的标准曲线方程为 $y = -2.9429x + 20.918$, $r^2 = 0.9939$ 。其中: x 为外源基因的百分含量的对数, y 为 C_t 值, r^2 为线性相关系数;检测转基因玉米TC1507得到的标准曲线方程为 $y = -3.4394x + 23.193$, $r^2 = 0.9924$ 。

以上定量PCR检测的标准曲线相关系数达到了0.99以上,具有较好的线性关系和可以接受范围内的SD值,检测灵敏度为0.04%,该灵敏度是目前国际上设定的转基因最低标识限量的25倍,已经完全能满足转基因产品标识检测的需要。将已知转基因含量的待测样品 C_t 均值代入方程,得出0.9348%和1.079%,与实际含量的相对偏差是6.52%和7.9%,可以看出,线性方程完全可以满足转基因抗除草剂大豆和玉米的定量PCR检测需要。

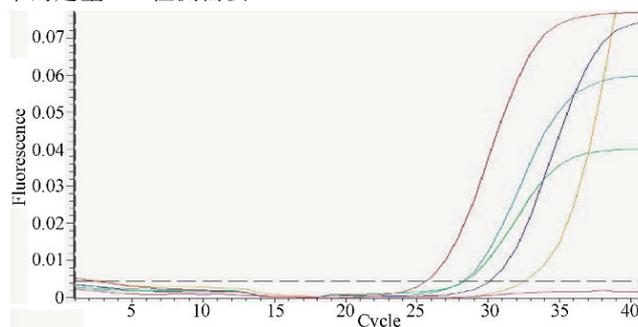


图3 转基因大豆标准品CP4-EPSPS基因SYBR Green I染料荧光定量PCR扩增曲线

Fig. 3 Quantitative real-time PCR detection of *CP4-EPSPS* in GM soybean references with SYBR Green I dye

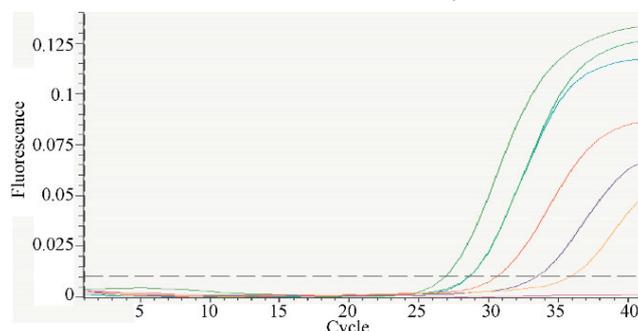


图4 转基因玉米TC1507标准品PAT基因SYBR Green I染料荧光定量PCR扩增曲线

Fig. 4 Quantitative real-time PCR detection of *PAT* in GM maize references with SYBR Green I dye

2.3 溶解曲线分析

在SYBR Green I染料法检测中,染料与所有的双链DNA

相结合,不需要探针,检测方法简便;但其特异性完全依赖于引物,对引物设计要求特别高.引物二聚体、单链二级结构以及错误的扩增产物都将引起假阳性的出现^[7],这将严重影响到定量检测的精确性和可靠性.但利用荧光染料可以指示双链DNA熔点的性质,通过温度的变化进行熔解曲线(T_m)分析^[8],可识别扩增产物和引物二聚体,然后在检测的过程中通过提高退火温度,区分非特异扩增,从而降低非特异产物的影响.一般通过熔解曲线来分析其扩增特异性.理想的熔解曲线应该是单峰型曲线,如果出现两个或两个以上的峰,说明有引物二聚体等非特异性扩增产生.本实验根据CP4-EPSPS和Lectin的扩增产物特点确定的读板温度分别为83.5℃和82℃,生成的溶解曲线如图5(A、B),可以看出,这两个基因的溶解曲线都是单峰型,说明PCR扩增过程中没有出现非特异性扩增,由此推断定量PCR扩增所获得的数据是可靠的.

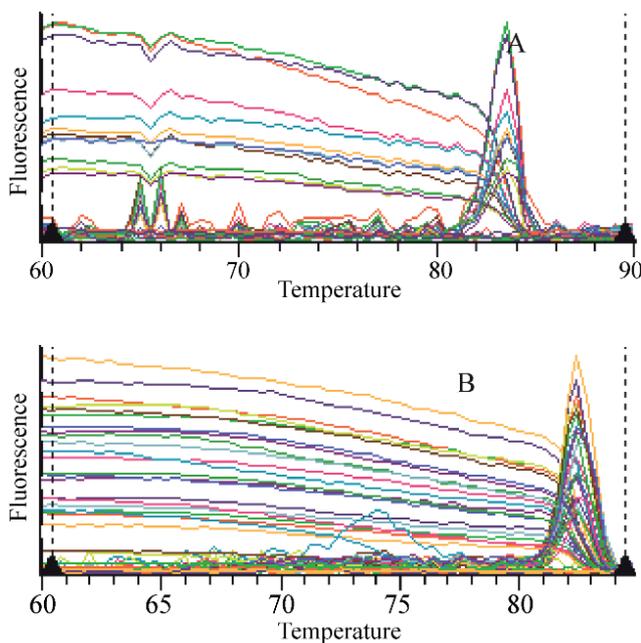


图5 使用SYBR Green I染料测得标准品与待测样品的溶解曲线

Fig. 5 Melting curve resulting from FQ-PCR analysis with SYBR Green I dye

A为引物CP4-EPSPS特异扩增的溶解曲线; B为引物PAT特异扩增的溶解曲线

A: Melting curve of the CP4-EPSPS gene; B: Melting curve of the PAT gene

2.4 检测方法灵敏度和精密度的分析

对于不同检测方法来讲,其检测的灵敏度在很大程度上决定了检测结果的可信度,尤其是对于特异性不强的

SYBR Green I荧光染料法.如果本实验的检测灵敏度不高,就很可能将阳性结果判为阴性.本实验以模拟的转基因大豆和转基因玉米1%、0.2%、0.04%的模板进行扩增.结果如图3、图4,所有不同含量的标准品均能够正常扩增,由此可以确定此荧光定量PCR方法的检测灵敏度为0.04%,完全满足国际上对转基因含量检测的最低标识(欧盟2003)0.9%的要求.

精密度表征测定过程中随机误差的大小,表示测量的再现性,是保证准确度的先决条件.一般说来,精密度不高,就不可能有高的准确度;反之,精密度好,准确度不一定高.这种情况表明测定中随机误差小,但系统误差较大.本实验选择不同水平0.04%、1.00%和5%转基因大豆和玉米TC1507样品,进行10次重复测定,通过统计分析方法计算该检测方法检测的精密度.从表2可知,0.04%、1.00%和5%的转基因大豆和玉米TC1507样品的最终实际测定值分别为0.040 3%、1.085 5%、5.079 7%和0.040 6%、1.051 4%、5.034 4%;变异系数分别在1.948 4%~3.711 8%,说明本实验建立的方法准确可靠,具有良好的重现性.

3 讨论

3.1 实时荧光PCR技术进行定量的方式

随着转基因标签制度的实施,对转基因产品检测的要求不仅是要能够给出是或否的定性检测结果,更要能够对农作物及其产品中的转基因成分进行精确定量,因此实时荧光定量PCR检测技术正日渐成为转基因产品检测的热点问题.利用实时荧光PCR技术进行定量的方式有3种:第1种方式是当前国际上采用的质量百分比(m/m)对转基因产品进行定量,标准品是将不同质量百分比的转基因与非转基因干粉混合后提取DNA定量检测;第2种方式是转基因产品(纯品)DNA与非转基因产品DNA的百分比,即将转基因产品纯品提取DNA后,与非转基因产品的DNA进行不同梯度的稀释,用所得的 C_t 值绘制出标准曲线;第3种方式是计算样品中的基因初始拷贝数,这需要将阳性质粒DNA溶液作不同拷贝数的稀释,绘制出不同拷贝数的标准曲线^[9].本实验采用的是第一种方式,探讨进行定量的可行性,通过标准曲线可以得出待检样品中外源基因DNA的含量.

3.2 荧光染料的优缺点

由于FQ-PCR是指在PCR反应体系中加入能够特异标记PCR产物的荧光物质,利用荧光信号积累实时监控整个PCR进程,得到S型的扩增曲线.这种荧光物质可分为特异性荧光探针和嵌入荧光探针两大类.本研究选用了嵌入荧光染料即SYBR Green I,它是一种成本较低的结合染料的PCR检测方法.在反应体系中,加入过量SYBR荧光染料,SYBR荧光染

表2 转基因大豆Roundup Ready和转基因玉米TC1507定量检测精密度结果分析
Table 2 Precision analysis of quantitative detections of transgenic RR soybean and maize TC1507

精密度分析 Precision analysis	转基因成分检测值 Quantity (% of content)					
	转基因大豆Roundup Ready GM soybean			转基因玉米TC1507 GM maize TC1507		
	0.04%	1%	5%	0.04%	1%	5%
平均值(10次重复) Average value (AV)	0.0403	1.0855	5.0397	0.0406	1.0514	5.0344
标准偏差 Standard deviation (SD)	0.0019	0.0475	0.0508	0.0017	0.0694	0.0981
变异系数 Coefficient of variation (CV/%)	3.7118	3.0608	2.9389	3.2017	2.6011	1.9484

料特异性地掺入DNA双链后,发射荧光信号,而不掺入链中的SYBR染料分子不会发射任何荧光信号,从而保证荧光信号的增加与PCR产物的增加完全同步.其优点是对模板没有选择性,使用非常方便,但也易与非特异性双链DNA结合并产生荧光信号,从而产生假阳性,引物二聚体是最常见的假信号源,而且任何非特异的双链DNA的存在都会产生信号,这些荧光信号有可能被当作来自目标扩增序列的信号,特别是当目的序列的扩增量很少或者根本没有的时候,但是这些不足之处可以通过融解曲线的分析^[10],优化反应条件,降低或者消除引物二聚体的干扰.因为引物二聚体的片段一般很小,融解温度通常都比目标PCR产物的融解温度低.如果在高于引物二聚体的 T_m 但低于特异产物的 T_m 的温度下读板,由于引物二聚体已经变性,与之结合的SYBR Green I(SGI)都脱离下来,因此这个时候检测到的荧光都来自目标扩增序列,这就消除了因引物二聚体而产生的荧光信号.而在这个温度下,大部分的特异产物仍然保持双链形式与SGI结合.此时检测到的荧光信号,就没有了因引物二聚体而产生的干扰信号,荧光信号就与特异扩增产物量的关联性更加紧密.

3.3 定量检测存在的问题

在荧光定量PCR技术中仍存在一些有待解决的问题.在标准曲线定量中,标准品的制备是一个必不可少的过程.目前由于无统一标准,各个实验室所用的生成标准曲线的样品各不相同,致使实验结果缺乏可比性.另外,与传统的PCR技术相比,FQ-PCR的不足之处^[11]是:(1)由于运用了封闭的检测,减少了扩增后电泳的检测步骤,因此也就不能监测扩增产物的大小;(2)因为荧光素种类以及检测光源的局限性,从而相对地限制了FQ-PCR的复合式(Multiplex)检测的应用能力;(3)目前FQ-PCR实验成本比较高,从而限制了其广泛的应用.随着技术不断改进和发展,目前FQ-PCR已成为转基因检测技术的主要工具,该技术未来的应用前景是令人鼓舞的,一方面FQ-PCR技术与其它分子生物学技术相结合使定量极微量的基因表达或DNA拷贝数成为可能.另一方面荧光标记核酸化学技术和寡核苷酸探针杂交技术的发展以及Real Time技术的应用,使定量PCR技术有一个足够的基础为广大检测室所接受,将有助于对转基因生物产品成分进行准确、快速的检测.

References

- Zhang LG (张立国), Zhang J (张璐). Introduced the quantitative real-time PCR technology. *Biotechnology* (生物技术), 2003, **13** (2): 39~40
- Zhu YZ (朱元招), Yin JD (尹靖东), Li DF (李德发), Wang FL (王凤来). Quantitative PCR method for detecting glyphosate tolerant gene transfer in soybeans. *J China Agric Univ* (中国农业大学学报), 2005, **10** (3): 25~29
- Knut G, Berdal K, Holst-Jensen A. Roundup Ready soybean event-specific real-time quantitative PCR assay and estimation of the practical detection and quantification limits in GMO analyses. *Eur Food Res Technol*, 2001, **2** (13): 432~438
- Vailingom M, Pijnenburg H, Gendre F, Brignon P. Real-time quantitative PCR detection of genetically modified maximizer maize and Roundup Ready soybean in some representative foods. *J Agric Food Chem*, 1999, **47**: 5261~5266
- Chen Y (陈颖), Xu BL (徐宝良), Zhu N (朱宁), Ge YQ (葛毅强), Wang SG (王曙光). Real-time quantitative PCR detection of genetically modified maximizer maize and yieldgard maize. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2004, **6** (30): 602~607
- Knut GB, Arne HJ. Roundup Ready soybean event-specific real-time quantitative PCR assay and estimation of the practical detection and quantification limits in GMO analysis. *Eur Food Res Technol*, 2001, **2** (13): 432~438
- Chen JQ (陈建魁). Quantitative PCR technology. *J Clin Lab* (临床检验杂志), 1997, **15** (2): 121~123
- Pan LW (潘良文), Chen JH (陈家华), Luo D (罗达), Yu DY (喻德跃), Feng XZ (冯献忠). Quantitative detection of genetically modified Bt176 maize in maize powder. *J Plant Physiol & Mol Biol* (植物生理与分子生物学学报), 2002, **28** (6): 463~467
- Tan W (谭文), Cao JJ (曹际娟), Zhu SF (朱水芳). Quantitative identified detection of the genetically modified maize Bt11 components in processed products. *Biotechnol Bull* (生物技术通讯), 2003 (6): 46~50
- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem*, 1997, **245**: 154~160
- Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res*, 2002, **30** (6): 1292~1305