

转 EPSPS 基因大豆植株中蛋白的表达

邢珍娟,李飞武,刘娜,李葱葱,康岭生,宋新元,邵改革,张明

(吉林省农业科学院 农业部转基因植物环境安全监督检验检测中心,吉林 长春 130033)

摘要:采用 ELISA 定量测定法研究了转 EPSPS 基因大豆不同生长时期不同器官中 CP4 EPSPS 蛋白含量的变化。结果表明:转 EPSPS 基因大豆不同器官在不同生育期 CP4 EPSPS 蛋白含量表现出较大的差异,R8 期籽粒中的 CP4 EPSPS 蛋白含量在所有时期和组织中蛋白含量最高;上位叶和下位叶中 CP4 EPSPS 蛋白除 V3 ~ V5 期和 R8 期外的表达趋势一致,茎上部和茎下部中 CP4 EPSPS 蛋白在不同时期表达动态趋势基本一致,根中 CP4 EPSPS 蛋白含量在 V3 ~ V5 期下降,然后逐渐升高,R1 ~ R8 期有一个大幅度的下降过程。从 V1 期至 R8 期,随着植株的不断生长,各组织中 CP4 EPSPS 蛋白的含量有明显的变化。

关键词:转基因大豆;CP4 EPSPS 蛋白含量;酶联免疫吸附测定

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2009)06-0981-04

Expression of CP4 EPSPS Protein of Genetically Modified Roundup Ready Soybean

XING Zhen-juan, LI Fei-wu, LIU Na, LI Cong-cong, KANG Ling-sheng, SONG Xin-yuan, SHAO Gai-ge, ZHANG Ming

(Jilin Academy of Agricultural Sciences, National Center for Environmental Safety Inspection of Transgenic Plants, Ministry of Agriculture, Changchun 130033, Jilin, China)

Abstract: The content of CP4 EPSPS protein in transgenic soybean plant was studied by Elisa method in this paper. Results showed that significant difference of CP4 EPSPS protein contents existed in different tissues and growth stages, with CP4 EPSPS protein content in seeds at maturity the highest. The contents of CP4 EPSPS protein in the upper and the bottom leaves were not significantly different in all growth stages except stages V3- V5 and R8. The contents of CP4 EPSPS protein in the upper and the bottom stalks showed consistent trend in different stages. The content of CP4 EPSPS protein in root decreased in stage V3- V5, then increased gradually, and then decreased from R1 to R8. With the growth of the plant, the content of the protein of CP4 EPSPS in all tissues changed greatly from V1 to V8 stage.

Key words: Transgenic soybean; CP4 EPSPS protein content; Enzyme-linked immunosorbent assay

转基因抗草甘膦大豆在抗除草剂作物中是种植最早、发展迅速、种植面积最大的作物。自 1994 年美国孟山都(Monsanto)公司研制的抗除草剂转基因大豆品种获准推广以来,转基因大豆的种植面积不断扩大^[1-2]。2003 年转基因大豆的播种面积已占世界大豆总面积的一半以上,并有进一步扩大的趋势,其中美国种植超过 2 400 万 hm^2 转基因大豆(其中 2 200 万 hm^2 为抗除草剂转基因大豆),占其大豆总面积的 81%。阿根廷种植的转基因大豆更是接近其大豆种植面积的 100%^[3-5]。2005 年全球转基因大豆种植面积达到 5 440 万 hm^2 ,占转基因作物

总面积的 60%^[6]。2006 年全球转基因大豆播种面积达到 5 860 万 hm^2 ,占大豆总播种面积的 64%,占转基因作物总面积的 57%,美国转基因大豆在其大豆播种面积中的比例为 92%,巴西为 55%,阿根廷为 99%^[7]。2007 年全球转基因大豆种植面积达 5 860 万 hm^2 ,占大豆总种植面积的 64%,同 2006 年持平,但占转基因作物总种植面积为 51%,美国转基因大豆占其大豆播种面积的比例约为 80%,巴西为 64%,阿根廷几乎为 100%^[8]。

随着抗草甘膦大豆的迅速推广及扩大种植,在世界大豆贸易中,抗草甘膦大豆已占主导地位。我

收稿日期:2009-05-19

基金项目:转基因生物新品种培育重大专项资助项目(2008ZX08011-003)。

第一作者简介:邢珍娟(1979-),女,硕士,研究方向为转基因植物环境安全评价。E-mail:zhenjuanxing2004@yahoo.com.cn。

通讯作者:张明,研究员。E-mail:zhangming5451@sina.com。

国农产品市场的不断开放,国外的转基因大豆大量涌入我国^[10-11],我国每年进口抗草甘膦大豆达1 000万 t以上,市场上销售的豆油以及各种含大豆成分的调和油绝大多数是抗草甘膦大豆产品。近10余年来,我国大豆需求量猛增,而大豆生产发展却较为缓慢。为满足市场需求,我国自1995年开始大量进口大豆,1996年成为净进口国,之后进口量持续增加,成为世界上最大的大豆进口国。2007年,大豆进口量再创新高,达到3 082.1万 t,同年进口豆油282.3万 t^[12],其中绝大部分是转基因大豆及其产品。

转EPSPS基因大豆即第二代抗草甘膦大豆(Roundup RReady2Yield™, RR2Y)是美国孟山都公司利用农杆菌介导法获得的最新转基因大豆品种,具有比第一代抗草甘膦大豆(Roundup Ready Soybean, RRS)更优异的农艺性状。作为RRS的替代产品,RR2Y已在美国、加拿大等国家获准商业化种植,必将迅速成为全球种植面积最大的转基因作物。RR2Y已于2008年在我国获准进口用作加工原料。

由于人们对转基因作物安全性意识的提高,转基因作物潜在的安全性问题也成为最近几年研究的热点。近年国内外对转*Bt*基因大豆的环境安全性和对转CP4 EPSPS基因的大豆成分检测作了一些研究^[13-14],关于转CP4 EPSPS基因大豆蛋白含量测定的相关情况尚未见报道。检测各个时期蛋白含量也是研究转基因大豆环境安全的重要内容。因此,采用转EPSPS基因大豆为材料,通过ELISA方法对在田间种植的转EPSPS基因大豆进行蛋白的含量测定,以期对转EPSPS基因大豆的研究及利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试大豆品系:分别为孟山都公司的转基因大豆MON89788和其受体非转基因大豆A3244。

供试药剂有CP4 EPSPS酶联免疫试剂盒(美国Agdia公司):过氧化物酶标记物、TMB底物、阳性质控物、PBST洗涤缓冲液和96孔包被抗体的微孔板。

1.2 试验设计

于2008年4月30日把转基因大豆及非转基因对照大豆种子播种到吉林省农业科学院公主岭试验田,小区面积约为150 m²(11.5 m × 13 m),小区间

设有2 m宽隔离带。分别在V1(5月28日),V3~V5(6月10日),V6~V8(6月26日),V10~V12(7月10日),R1(7月23日),R3(8月21日),R8(9月25日)取样,每个小区每个品种每次取6株,分为上位叶(顶部叶片)、下位叶(底部叶片)、茎上部(茎秆顶部)、茎下部(茎秆底部)、花和籽粒。置于-20℃冰箱保存,待取样结束,用ELISA法统一测定CP4 EPSPS蛋白含量。

1.3 ELISA法定量测定Bt蛋白含量

采用酶联免疫ELISA(Enzyme immunosorbent assay)方法测定,试剂盒(Quantip late ELISA kit for CP4 EPSPS)由美国Agdia公司生产。

具体操作步骤:(1)准备样品:分别取不同时间取回的转基因大豆MON89788和受体A3244的各个组织,用剪刀剪碎放入研钵中,加入液氮充分研磨,用1/10 000电子天平称取0.2 g再加入6 mL提取缓冲液,4℃条件下10 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清液,4℃保存待测。(2)点样:分别取样品上清液、不同梯度的标准蛋白(阳性对照)和MEB(阴性对照)100 μL加入同一酶标板内(重复3次),4℃过夜。(3)洗板。(4)每孔加入100 μL TMB酶标记物,室温1 h。(5)加入100 μL TMB底物,室温20 min。(6)在酶标仪650 nm波长下读数。(7)计算出干湿重比值,最后折合成干重的含量。

1.4 数据分析

应用DPS软件对数据进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 不同组织相同时期蛋白含量表达动态

转基因大豆的受体A3244的各个组织在不同生长时期均未检测到蛋白表达,转基因大豆MON89788不同生育时期不同组织中CP4 EPSPS蛋白含量的测定结果如图1所示,从V1期至R8,随着植株的不断生长,各组织中CP4 EPSPS蛋白含量有明显的变化,V1期上位叶中CP4 EPSPS蛋白含量最高,达到410.34 ng·g⁻¹,下位叶中CP4 EPSPS蛋白含量最低。V3~V5期各个组织中CP4 EPSPS蛋白含量较其它几个生育期低,这个时期下位叶中的CP4 EPSPS蛋白含量最高。V6~V8期茎下部中CP4 EPSPS的蛋白含量最高,达到405.13 ng·g⁻¹,根中的CP4 EPSPS蛋白含量和茎下部的含量相当。V10~V12期和R1期都是根中的CP4 EPSPS蛋白含量最高,分别达到

534.57 ng · g⁻¹ 和 536.35 ng · g⁻¹, 其它各组织 CP4 EPSPS 蛋白含量都较根低得多。R3 期下位叶中 CP4 EPSPS 蛋白含量最大, 其它各种组织中 CP4 EPSPS 蛋白含量差异不大, 同时测定了花和幼荚中的 CP4 EPSPS 蛋白含量, 花中含量为 245.15 ng · g⁻¹, 幼荚中含量为 262.13 ng · g⁻¹, 稍高于茎上部和花中的 EPSPS 蛋白含量。R8 期测定了籽粒中 CP4 EPSPS 蛋白含量, 达到 603.13 ng · g⁻¹, 高于同时期其它组织中的 EPSPS 蛋白含量, 茎下部和根、下位叶和茎上部中 EPSPS 蛋白含量差别不大。

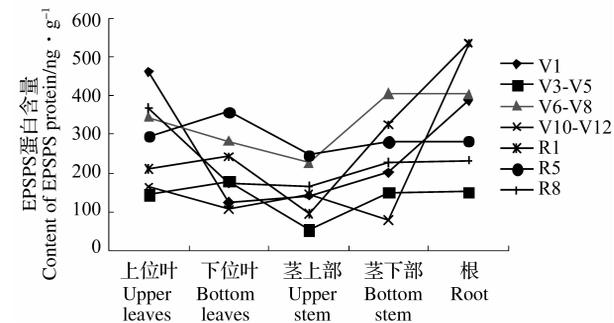


图1 V1 ~ R8 期不同组织中 CP4 EPSPS 蛋白含量

Fig. 1 Content of CP4 EPSPS protein in different tissues at all growth stages

2.2 相同组织不同时期蛋白含量表达动态

转基因大豆 MON89788 相同组织不同时期蛋白含量表达见图 2~4, 从图 2 可以看出上位叶和下位叶中 CP4 EPSPS 蛋白在 V1 期到 V3 ~ V5 和 R3 期到 R8 期表达动态不同, 其它各时期表达趋势均一致, V1 期到 V3 ~ V5 期上位叶中 CP4 EPSPS 蛋白含量是下降过程, 而下位叶中 CP4 EPSPS 蛋白在此时段是升高过程, R3 期到 R8 期上位叶中 CP4 EPSPS 蛋白含量是上升过程, 而下位叶中的 CP4 EPSPS 蛋白含量此时段是下降过程。上位叶中 CP4 EPSPS 蛋白含量在 V3 ~ V5 期和 V10 ~ V12 期, V6 ~ V8 和 R8 期二者之间差异不显著, 在其它各时期 CP4 EPSPS 蛋白含量差异都显著。

从图 3 可以看出茎上部和茎下部中 CP4 EPSPS 蛋白在不同时期表达动态基本一致, 二者都是从 V1 期到 V3 ~ V5 期 CP4 EPSPS 蛋白含量下降, V3 ~ V5 期到 V6 ~ V8 期 CP4 EPSPS 蛋白含量上升, V6 ~ V8 期到 V10 ~ V12 期 CP4 EPSPS 蛋白含量又下降, R3 期到 R8 期 CP4 EPSPS 蛋白含量下降的过程。茎上部中的 CP4 EPSPS 蛋白含量在 V1 期、V10 ~ V12 期和 R8 期, V6 ~ V8 期和 R3 期之间差异不显著, 在其它各时期 CP4 EPSPS 蛋白含量差异都显著; 茎下部

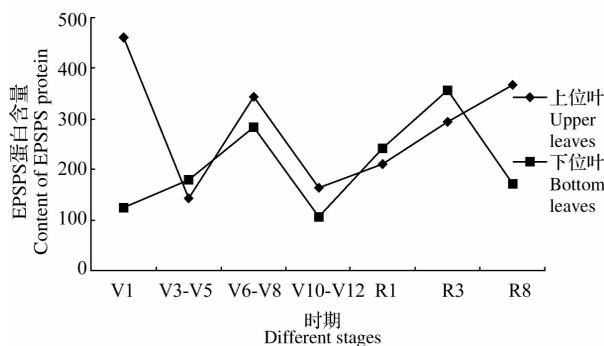


图2 上位叶和下位叶在不同时期的 CP4 EPSPS 蛋白表达动态

Fig. 2 Expression of CP4 EPSPS protein in leaves in different stages

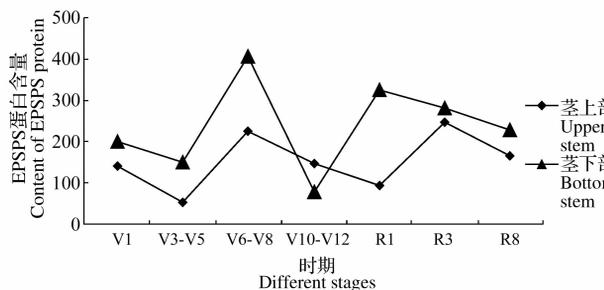


图3 茎上部和茎下部在不同时期的 CP4 EPSPS 蛋白表达动态

Fig. 3 Expression of CP4 EPSPS protein in stalks in different stages

中的 CP4 EPSPS 蛋白含量在 V1 期和 R8 期之间差异不显著, 在其它各时期 CP4 EPSPS 蛋白含量差异都显著。

从图 4 可以看出根中 CP4 EPSPS 蛋白含量在 V3 ~ V5 期下降, 然后逐渐升高, R1 期到 R8 期有一个大幅度的下降过程。CP4 EPSPS 蛋白含量 V1 期和 V6 ~ V8 期、V10 ~ V12 期和 R1 期、R3 期和 R8 期之间差异不显著, 在其它各时期 CP4 EPSPS 蛋白含量差异都显著。

3 结论与讨论

研究表达 CP4 EPSPS 蛋白的转基因大豆 MON89788 不同时期不同组织中蛋白表达动态, 结果表明, 转基因大豆不同时期不同组织中蛋白表达不同, 从 V1 期至 R8 期, 随着植株的不断生长, 各组织中 CP4 EPSPS 蛋白的含量有明显的变化, 不同组织同一时期大豆中 CP4 EPSPS 蛋白含量也有明显不同, 同为叶片或茎的不同部位含量差别也很大, 上位叶蛋白含量最高的是在 V1 期, 达到

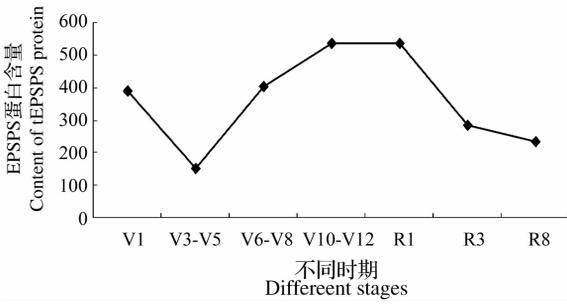


图4 根在不同时期的 CP4 EPSPS 蛋白表达动态

Fig. 4 Expression of CP4 EPSPS protein in roots in different stages

461.34 ng·g⁻¹,而下位叶中蛋白含量最高在 R8 期,达到 357.58 ng·g⁻¹;茎上部中蛋白含量最高在 R8 期,达到 245.93 ng·g⁻¹,而茎下部中蛋白含量最高在 V6~V8,达到 405.13 ng·g⁻¹;根中蛋白含量最高在 R1 期,达到 536.35 ng·g⁻¹。孟山都公司也用 ELISA 法测定了种植在美国的 MON 89788 不同生长时期的叶片,籽粒、根和秸秆中的 CP4 EPSPS 蛋白表达平均水平,测定的结果和该试验不尽相同(郭北海,2008 年,私人通讯)。因为转 Bt 基因作物体内杀虫蛋白的时空表达动态变化除了与作物本身内部发育调控有关外,环境因素的作用也很重要,如温度、干旱和降水可能影响到 Bt 作物杀虫蛋白的表达^[15-16],不同播期会影响到转 Bt 基因作物生长所处环境因素,进而影响 Bt 杀虫蛋白的表达有关^[17],转 EPSPS 基因大豆蛋白的表达和转 Bt 基因作物可能相似。

相同组织在不同时期蛋白含量表达动态基本一致,R8 期籽粒中的 CP4 EPSPS 蛋白含量最高,达到 603.13 ng·g⁻¹,但 MON 89788 籽粒里的 CP4 EPSPS 表达平均水平也低于第一代抗农达大豆 40-3-2^[18]。CP4 EPSPS 与来源于食品的、具有长期安全消费史的各种 EPSPS 的相似性,CP4 EPSPS 蛋白和天然存在于植物里的各种 EPSPS 具有同源性,包括粮食作物(如大豆和玉米)、真菌和微生物来源的食品,而这些作物和食品都具有人类长期安全消费的历史^[19-20]。MON89788 大豆是新一代抗农达大豆品种,与第一代抗农达大豆相比,在相同的遗传背景下,除了保持相同的杂草控制效果外,还具有 4%~7% 的增产优势,同时保持了相同的杂草控制效果和用药安全性,因此在未来的大豆育种改良和生产应用计划中,MON89788 将是一个优异的亲本。

参考文献

- [1] 雷秉乾. 农业转基因生物的发展及安全管理[J]. 垦殖与稻作, 2003,2:4-6. (Lei B K. Development and safety management of agriculture transgenic creature [J]. Reclaim and Rice Cultivation, 2003,2:4-6.)
- [2] 张磊,戴瓯和. 转基因大豆安全性评价与发展趋势[J]. 安徽农学通报,2003,9(1):54-55. (Zhang L, Dai O H. Safety assessment and development trend of transgenic soybean [J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2003,9(1):54-55.)
- [3] 苏少泉. 转基因抗除草剂作物评述[J]. 现代农药, 2003,2(4):3-7. (Su S Q. Review of transgenic resistant herbicide crops [J]. Modern Agrochemicals, 2003,2(4):3-7.)
- [4] 程焉平. 抗除草剂转基因作物的研究及其安全性[J]. 吉林农业科学, 2003,28(4):23-28. (Cheng N P. The study and biosafety of herbicide resistant transgenic crops [J]. Jilin Agricultural Sciences, 2003,28(4):23-28.)
- [5] Wilson R F. Perspectives on the impact of biotechnology on soybean production and utilization [R] // Moscardi F. Proceedings of VII World Soybean Research Conference, Londrina, PR, Brazil, 2004:85-96.
- [6] James C. Global status of commercialized biotech [A] // GM Crops: 2005, ISAAA Briefs No. 34, ISAAA, Ithaca, New York.
- [7] James C. Global status of commercialized biotech [A] // GM Crops: 2006, ISAAA Brief No1351, ISAAA, Ithaca, NY 2006.
- [8] James C. Global status of commercialized biotech [A] // GM Crops: 2007 // ISAAA Brief 37-2007: Executive Summary, Ithaca, NY, USA; ISAAA, 2007.
- [9] Owen M D K. Current use of transgenic herbicide-resistant soybean and corn in the USA [C]. XIVth International Plant Protection Congress, 1999:25-30.
- [10] 张纪兵,赵克强,张爱国. 基因工程技术应用对有机农业生态环境的影响[J]. 农业现代化研究, 2003,24(6):418-421. (Zhang J B, Zhao K Q, Zhang A G. Influence of application of gene engineering technology on ecological environment of organic agriculture [J]. Research of Agricultural Modernization, 2003,24(6):418-421.)
- [11] 贾士荣. 转基因作物的环境风险分析研究进展[J]. 中国农业科学, 2004,37(2):175-187. (Jia S R. Environmental risk assessment of GM Crops: Progress in RISK Assessment [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2004,37(2):175-187.)
- [12] 农业部. 2007 年我国农产品进出口情况 [EB/OL]. <http://www.agri.gov.cn/xxfb/t20080207-968293.htm>, 2008-02-04.
- [13] 朱路青,曹越平. 转 Bt 基因大豆植株中 Bt 毒蛋白的表达[J]. 上海交通大学学报, 2005,23(3):234-238 (Zhu L Q, Cao Y P. Expression of insecticidal protein of bacillus thuringiensis in Bt transgenic soybean [J]. Journal of Shanghai Jiaotong University, 2005,23(3):234-238.)

选择提供了信息,而且为豆制品生产的原料选择提供了参考。

参考文献

- [1] 李富山,常汝镇,舒世珍,等.栽培、野生、半野生大豆蛋白质含量及氨基酸组成的初步分析[J].大豆科学,1986,5(1):65-71. (Li F S, Chang R Z, Shu S Z, et al. Cultivated, wild, semi-wild soybean protein content and amino acid composition of the preliminary analysis[J]. Soybean Science, 1986, 5(1): 65-71.)
- [2] 陈绍江,张国栋.大豆贮藏蛋白氨基酸组成与遗传密码的相关研究[J].东北农业大学学报,1994,25(2):105-109. (Chen S J, Zhang G D. Study on the relationship between amino acid composition and genetic code in soybean storage protein[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 1994, 25(2): 105-109.)
- [3] 刘至胜,李里特,辰巳英三.大豆蛋白质的营养品质和生理功能研究进展[J].大豆科学,2000,19(3):263-266. (Liu Z S, Li Lite, Eiso Tatsumi. Nutritional quality and physiological functions of soy protein: A Review[J]. Soybean Science, 2000, 19(3): 263-266.)
- [4] 张新会,杨晓泉.大豆蛋白摄入与冠心病关系的研究进展[J].粮食与油脂,2001(6):6-9. (Zhang X H, Yang X Q. The relationship between soy protein and CHD[J]. Food and Oil, 2001(6): 6-9.)
- [5] 江和源,吕飞杰,郇建祥.大豆中生物活性成分及其功能[J].大豆科学,2000,19(2):162-163. (Jiang H Y, Lv F J, Tai J X. Bioactive components of soybean and their function[J]. Soybean Science, 2000, 19(2): 162-163.)
- [6] Meng X X. Summarization about breeding of soybean qualification [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 1992, 8(2): 14-17.
- [7] Mori T, Utsumi S, Inaba H, et al. Differences in subunit composition of glycinin among soybean cultivars[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1981, 29: 20-23.
- [8] Nieson N C. The structure and complexity of the 11S polypeptide in soybean[J]. Journal of American Oil Chemists Society, 1985, 49: 2733-2740.
- [9] Staswick P E, Hermodson M A, Nielson N C. Identification of cystines which link the acidic and basic components of glycinin subunits [J]. Journal of Biological Chemistry, 1984, 259: 13431-13435.
- [10] Kriboruchco D, Kaba H, Sambucetti M E, et al. Maturation time and some seed composition characters affecting nutritive value in soybean varieties [J]. Cereal Chemistry, 1979, 56(4): 217-219.
- [11] Murphy P A, Chen H P, Hauck C C, et al. Soybean storage protein composition and tofu quality [J]. Food Technology, 1997, 51: 86-88.
- [12] Murphy P A, Resurreccion A P. Varietal and environmental differences in soybean glycinin and β -conglycinin content [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1984, 32: 911-915.
- [13] Cai T, Chang K C. Processing effect on soybean storage proteins and their relationship with Tofu quality [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47: 720-727.
- [14] Utsumi S, Kinsella J E. Structure-function relationships in food proteins: subunit interactions in heat-induced gelation of 7S, 11S and soy isolate proteins [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1985, 33(2): 297-303.
- [15] 姜振峰,陈庆山,杨庆凯,等.大豆种质资源贮藏蛋白亚基研究[J].东北农业大学学报,2006,37(5):596-603. (Jiang Z F, Chen Q S, Yang Q K, et al. Analysis of subunits of storage protein of soybean germplasm resources[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2006, 37(5): 596-603.)
- [16] Wagner J R, Gueguen J. Surface functional properties of native, acid-treated, and reduced soy glycinin emulsifying properties [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47(6): 2181-2187.
- [17] Teraishi M, Takahashi M, Hajika M, et al. Suppression of soybean β -conglycinin genes by a dominant gene, Seg-1 [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 103: 1266-1272.
- (上接第 984 页)
- [14] 宋扬,吴存祥,侯文胜,等.对引进的美国大豆品种进行转基因成分的检测[J].大豆科学,2005,24(2):116-120. (Song Y, Wu C X, Hou W S, et al. Identification of the transgenic elements in the introduced America soybean lines[J]. Soybean Science, 2005, 24(2): 116-120.)
- [15] 王家宝,王留明,沈法富,等.环境因素对转 Bt 基因棉 Bt 杀虫蛋白表达量的影响[J].山东农业科学,2000(6):4-6. (Wang J B, Wang L M, Shen F F, et al. Effect of environment elements on Bt-protein content in transgenic Bt cotton[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2000(6): 4-6.)
- [16] Traore S B, Carlson R E, Picher C D, et al. Bt and non-Bt maize growth and development as affect by temperature and drought stress [J]. Agronomy Journal, 2000, 92(5): 1027-1035.
- [17] 王冬妍,王振营,何康来,等. Bt 玉米杀虫蛋白的时空表达及对亚洲玉米螟的杀虫效果[J].中国农业科学,2004,37(8): 1155-1159. (Wang D Y, Wang Z Y, He K L, et al. Temporal and spatial expression of CryIAb toxin in transgenic Bt corn and its effects on Asian corn borer[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2004, 37(8): 1155-1159.)
- [18] Padgett S R, N B Taylor, D L Nida, et al. The composition of glyphosate-tolerant soybean seeds is equivalent to conventional soybeans[J]. Journal of Nutrition, 1995, 126: 702-716.
- [19] Harrison L, M Bailey, M Naylor, et al. The expressed protein in glyphosate-tolerant soybean, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from Agrobacterium sp. strain CP4, is rapidly digested in vitro and is not toxic to acutely gavaged mice[J]. Journal of Nutrition, 1996, 126: 728-740.
- [20] Padgett S R, D B Re, G F Barry, et al. New weed control opportunities: Development of soybeans with a roundup ready gene[M]// Herbicide-resistant Crops; Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory, and Technical Aspects. S. O. Duke. CRC Press, New York, 1996: 53-84.