

## 大豆中转基因成分筛查策略研究

刘冰, 张英, 张海波, 杨娟妮, 陈西, 张田

(陕西省种子管理站/农业部农作物种子质量监督检验测试中心(西安) 陕西 西安 710018)

**摘要:** 转基因大豆是目前我国进口量最大的转基因作物, 为避免转基因大豆及制品的违法使用, 快速筛查大豆中转基因成分的方法策略亟待开发。为检索已知商业化转基因大豆的外源基因信息, 通过构建转基因大豆常用转化元件的数据库, 建立了转基因大豆的筛查策略。结果表明: 已知的 15 个转基因大豆转化事件中, 利用 CaMV35S 启动子、CP4-epsps 基因、Bt 基因、pat 基因 4 个靶标元件的组合, 可筛查 12 个转基因大豆的转化事件; 另有 3 个转化事件需要使用转化事件特异性引物检测。使用 4 个靶标元件和转化事件组合的筛查方法检测的灵敏度可达到  $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 可对大豆中的转化事件进行快速、高灵敏度的筛查。

**关键词:** 转基因大豆; 筛查检测; PCR 方法; 灵敏度

中图分类号: S565.1 文献标识码: A DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2016.03.0411

## Screening Strategy of Genetically Modified Soybean Based on Qualitative PCR Methods

LIU Bing, ZHANG Ying, ZHANG Hai-bo, YANG Juan-ni, CHEN Xi, ZHANG Tian

(Shaanxi Seed Administration Bureau / The Crop Seed Quality Testing Center, Xi'an 710018, China)

**Abstract:** Genetically modified (GM) soybean is the largest amount crop of imported genetically modified organism in China. In order to avoid unauthorized genetically modified (GM) soybean events occurred occasionally, a quick screening method is needed urgently. According to the inserted gene elements information of commercial domestic and foreign in GM soybean events, a screening strategy was developed for detecting complex molecular structure in GM soybean events based on element frequencies. A combination of CaMV35S promoter, CP4-epsps/Bt/Bar/pat genes as screening target elements could screen twelve genetically modified (GM) soybean events, the event specific primer could detect other three genetically modified (GM) soybean. Results showed that the detection sensitivity of this method was  $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ . In conclusion, the screening strategy is currently a unique and very valuable tool which could quickly screen out GM soybean detection with high sensitivity and specificity.

**Keywords:** Genetically modified soybean; Screening method; PCR method; Sensitivity

大豆含有丰富的蛋白质和脂肪, 是重要的油料作物以及高蛋白粮饲兼用作物, 也是食品、饲料等多种加工工业的优质原料。作为最早进行大面积商业化种植的转基因作物, 大豆也是是目前种植面积最大的转基因作物<sup>[1]</sup>。截止 2014 年底全球转基因大豆商业化种植面积达 9 736.68 万  $\text{hm}^2$ , 占大豆种植总面积的 82%<sup>[2]</sup>, 主要种植于美国、巴西和阿根廷<sup>[3]</sup>。截至 2015 年 6 月, 国内外商业化的转基因大豆转化事件有 15 个<sup>[4-6]</sup>, 我国允许作为加工用途

进口的转基因大豆的转化事件有 9 个<sup>[7]</sup>, 分别为 5 个耐除草剂大豆 GTS40-3-2、A2704-12、A5547-127、MON89788、CV127; 1 个抗虫大豆 MON87701、1 个高油酸大豆 305423 及具有复合性状的 MON87701 × MON89788 和 305423 × 40-3-2。

2014 年中国转基因大豆进口量达 7 100 万 t<sup>[8]</sup>, 是世界最大的转基因大豆进口国。从 1997 年进口转基因大豆 288 万 t 到 2014 年进口转基因大豆 7 100 万 t, 近 20 年来转基因大豆的进口量激增<sup>[9]</sup>。

收稿日期: 2015-09-14

第一作者简介: 刘冰(1982-), 女, 硕士, 农艺师, 主要从事农作物种子分子检验工作。E-mail: himlau1982@126.com。

通讯作者: 张英(1969-), 男, 高级农艺师, 主要从事农作物种子质量管理和分子检验工作。E-mail: zhying6@gmail.com。

转基因大豆从进口到生产加工要经过进口审批、检验检疫、分销运输、企业加工等诸多环节。面对日益庞大的转基因大豆消费市场,监管部门为避免转基因大豆的使用超出国家规定,出现非法种植和食用的现象,加强对进口转基因大豆的在这些环节的检测力度就显得尤为重要。快速、准确、科学地对大量样品进行转基因成分检测,是当前转基因成分检测技术所面临的一个关键问题<sup>[10]</sup>。

转基因成分检测主要包括 DNA 检测和蛋白质检测,其中基于 DNA 的 PCR 检测技术在转基因检测中应用最广。PCR 检测技术可以检测样品中是否含有转基因成分(即筛查法);含有什么基因成分(即基因特异性检测)以及来自哪个转基因品种(即品系特异性检测)。在日常监管工作中,筛查法是使用最普遍的检测方法<sup>[11]</sup>。该方法的原理是首先通过对某些遗传元件进行筛查,例如导入的外源各种启动子、终止子,挑选出使用频率最高的少数几个遗传元件作为检测靶标,如果检测出其中任何一个元件,表明该样品含有转基因成分,如果未检出,则表明样品中不含有已知转基因成分。不同作物使用的遗传元件种类和频次各不相同,因此不同作物需根据具体情况采用合适的筛查检测策略<sup>[12]</sup>。目前尚无关于转基因大豆筛查检测统一标准和方法的报道。

本研究检索已知商业化转基因大豆的外源基因信息,构建了转基因大豆常用转化遗传元件的数据库,并根据元件的使用频率建立了转基因大豆的筛查检测策略,同时确定了转基因大豆筛查的靶标元件和检测方法,并对方法的特异性和灵敏度做了研究,旨在建立一种能够快速、准确、科学地检测转基因大豆的筛查策略,为转基因大豆的全面监管提供有力的技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

转基因大豆标准品粉末 GTS40-3-2、305423、356043、Mon87701、MON89788、A2704-12、A5547-127、CV127 购自 LGC 公司(艾吉析科技北京有限公司)。非转基因大豆种子秦豆 13 由本实验室保存。

植物基因组 DNA 提取试剂盒(DP320)购自天根生化科技(北京)有限公司;PCR 扩增试剂(Premix Ex Taq,R003A)和 DNA 分子量 Marker(DL1000,3591A)购自宝生物工程(大连)有限公司。扩增引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

仪器设备主要有 Bio-rad My Cycler PCR 仪和 Gel-doc 凝胶成像系统(美国伯乐公司)、台式冷冻离心机 5430R(德国艾本德公司)、紫外分光光度计 ND2000(美国赛默飞世尔公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 样品基因组 DNA 的提取采用试剂盒法。提取方法参照试剂盒的说明书。紫外分光光度计测定获得 DNA 的纯度和浓度。

1.2.2 定性 PCR 检测 转基因成分的检测采用定性 PCR 方法,检测项目包括 CaMV35S 启动子、*pat* 基因、*CP4-epsps* 基因、*Bt* 基因 4 个靶标原件及 DP305423、DP356043、BPS-CV127-9 三个转化事件,引物序列如表 1。

## 2 结果与分析

### 2.1 转基因大豆转化事件的遗传信息及筛查策略

从环境风险评估中心转基因作物数据库(CE-RA, <http://www.cera-gmc.org/>)<sup>[4]</sup>、欧洲转基因生物指南(<http://www.gmo-compass.org/eng/gmo/db>)<sup>[5]</sup>和上海交通大学转基因检测数据库(GMDD, <http://gmdd.shgmo.org/>)<sup>[6]</sup>中,检索已知商业化转基因大豆的外源基因信息,构建了转基因大豆常用转化事件遗传信息表(表 2)。

表 2 中列出的 15 个大豆转化事件中,出现频次最高的元件是 *pat* 基因,出现 7 次;其次是 CaMV 35S 启动子,出现 6 次;之后是 *CP4-EPSPS* 基因出现 4 次;*Bt* 基因出现 3 次;FMV 35S 启动子和 NOS 终止子各出现 2 次。

由图 1 可看出,利用 CaMV35S 启动子、*pat* 基因、*CP4-epsps* 基因、*Bt* 基因 4 个靶标元件的组合,可完成对 15 个商业化转基因大豆转化事件中 12 个转化事件的筛查检测;剩余 3 个转化事件 DP-305423, DP356043, BPS-CV127-9 可使用转化事件特异性引物检测。

表 1 检测中所用的引物序列、扩增片段长度及检测依据

Table 1 Primers used in this research

| 引物名称<br>Primer name | 引物序列<br>Primer sequence(5'-3') | 扩增片段<br>Amplicon/bp | 检测标准<br>Detection standard |
|---------------------|--------------------------------|---------------------|----------------------------|
| 35S-F1              | GCTCCTACAAATGCCATCATTGC        | 195                 | 农业部 1782 号公告               |
| 35S-R1              | GATAGTGGGATTGTGCGTCATCCC       |                     | -3-2012 <sup>[13]</sup>    |
| Pat-F               | GAAGGCTAGGAACGCTTACGA          | 262                 | 农业部 1782 号公告               |
| Pat-R               | CCAAA AACCAACATCATGCCA         |                     | -6-2012 <sup>[15]</sup>    |
| mCP4ES-F            | ACGGTGA CGTCTTCC GTTAC         | 333                 | 农业部 1861 号公告               |
| mCP4ES-R            | GAACAAGCA GGC GCAACCA          |                     | -5-2012 <sup>[16]</sup>    |
| Bt-F                | GAAGGTTTGAGCAATCTCTAC          | 301                 | 农业部 953 号公告                |
| Bt-R                | CGATCAGCCTAGTAAGGTCGT          |                     | -6-2007 <sup>[14]</sup>    |
| 305423-F            | CGTCAGGAATAAAGGAAGTACAGTA      | 235                 | 农业部 1782 号公告               |
| 305423-R            | GCCCTAAAGGATGCGTATAGAGT        |                     | -4-2012 <sup>[17]</sup>    |
| 356043-F            | CTTTTGCCCGAGGTCGTTAG           | 145                 | 农业部 1782 号公告               |
| 356043-R            | GCCCTTTGGTCTTCTGAGACTG         |                     | -1-2012 <sup>[18]</sup>    |
| 127-F               | CCTTCGCCGTTTGTGTATAGG          | 238                 | 农业部 1782 号公告               |
| 127-R               | AGCAGGTTTCGTTAAGGATGAA         |                     | -5-2012 <sup>[19]</sup>    |

表 2 转基因大豆转化事件遗传信息

Table 2 Genetic information of GM soybean

| 序号<br>No. | 转基因品系<br>Transgenic event     | 遗传元件 Genetic elements |                  |                |         |          |                      | 其他元件<br>Other elements |
|-----------|-------------------------------|-----------------------|------------------|----------------|---------|----------|----------------------|------------------------|
|           |                               | CaMV 35S 启动子          | FMV 35S 启动子      | NOS 终止子        | Bt 基因   | Pat 基因   | CP4-epsps 基因         |                        |
|           |                               | CaMV 35S promoter     | FMV 35S promoter | NOS terminator | Bt gene | Pat gene | CP4-epsps gene       |                        |
| 1         | A2704-12, A2704-21, A5547-35* | +                     |                  |                |         | +        |                      |                        |
| 2         | A5547-127*                    | +                     |                  |                |         | +        |                      |                        |
| 3         | G94-1, G94-19, G168           | +                     |                  | +              |         |          |                      |                        |
| 4         | GTS 40-3-2*                   | +                     |                  | +              |         |          | +                    |                        |
| 5         | GU262                         | +                     |                  |                |         | +        |                      |                        |
| 6         | MON89788*                     |                       | +                |                |         |          | +                    |                        |
| 7         | W62, W98                      | +                     |                  |                |         | +        |                      |                        |
| 8         | DAS-44406-6                   |                       |                  |                |         | +        | +                    |                        |
| 9         | DAS-81419-2                   |                       |                  |                | +       | +        |                      |                        |
| 10        | MON87701*                     |                       |                  |                | +       |          |                      |                        |
| 11        | MON87701 x<br>MON89788        |                       | +                |                | +       |          | +                    |                        |
| 12        | SYHT0H2                       |                       |                  |                |         | +        |                      |                        |
| 13        | DP-305423*                    |                       |                  |                |         |          | gm-fad2-1,<br>gm-hra |                        |
| 14        | DP356043                      |                       |                  |                |         |          | gat4601,<br>gm-hra   |                        |
| 15        | BPS-CV127-9*                  |                       |                  |                |         |          | csr1-2               |                        |

+ 表示含有此元件; \* 表示我国允许作为加工用途进口的转基因大豆的转化事件。

+ means existence of the element; \* means the approval of imported GM soybean used for processing.

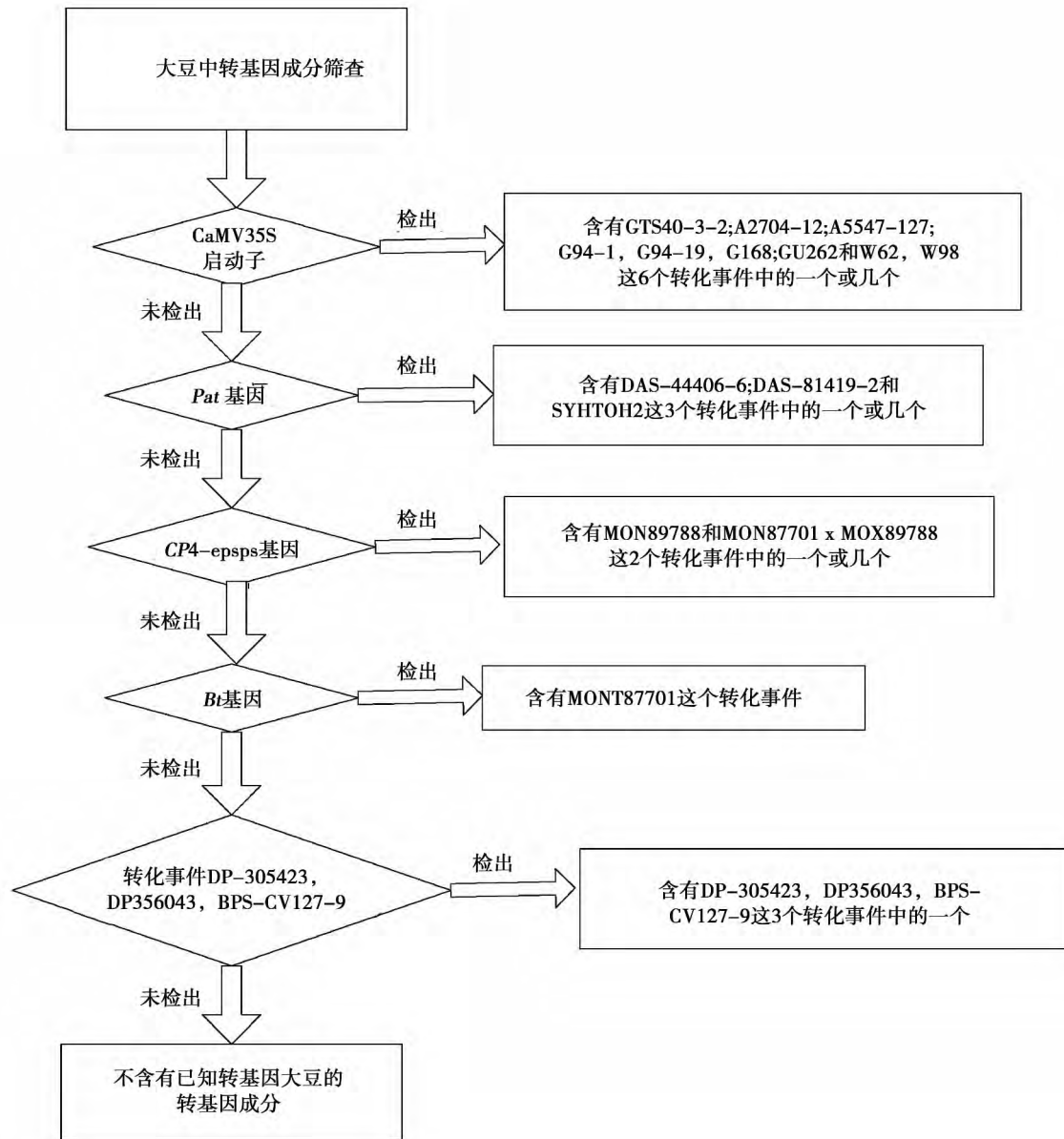


图1 转基因大豆筛查策略

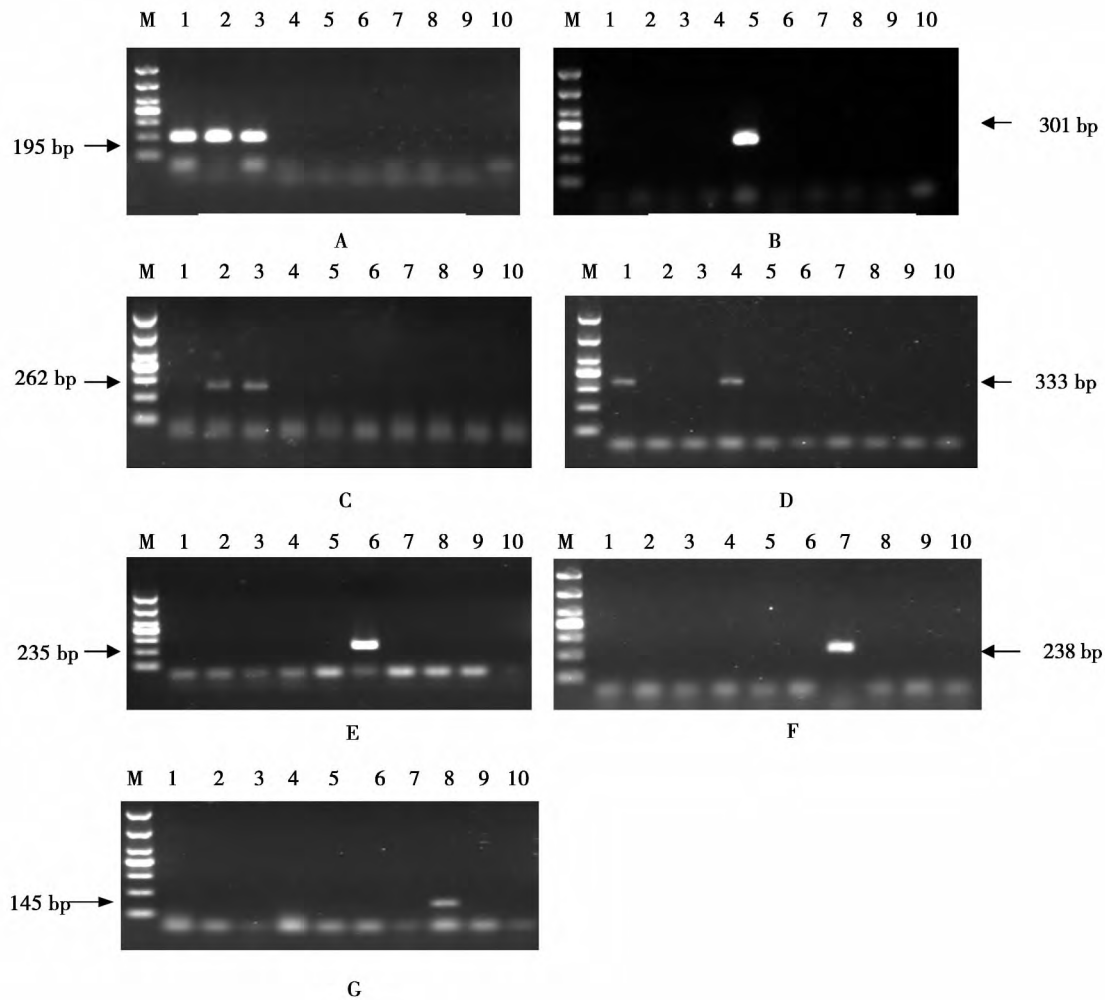
Fig. 1 The screening strategy of GM soybean

## 2.2 转基因大豆定性 PCR 筛查特异性检测

为了验证选择的 CaMV35S 启动子、*Bt* 基因、*pat* 基因、*CP4-epsps* 基因、305423 转化事件、356043 转化事件、CV127-9 转化事件的扩增引物是否适合对大豆中转基因成分进行筛查,利用表 1 中的引物对我国允许进口作为加工原料的转基因大豆 GTS40-3-2、A2704-12、A5547-127、MON89788、MON87701、305423、CV127 和 356043 转化事件进行了验证。

检测结果如图 2 所示,CaMV35S 启动子检测

中,泳道 1~3 为阳性,其余为阴性;*Bt* 基因检测中,泳道 5 为阳性,其余为阴性;*pat* 基因检测中,泳道 2、3 为阳性,其余为阴性;*CP4-epsps* 基因检测中,泳道 1、4 为阳性,其余为阴性。305423 转化事件检测中,泳道 6 为阳性,其余为阴性;CV127 转化事件检测中,泳道 7 为阳性,其余为阴性;356043 转化事件检测中,泳道 8 为阳性,其余为阴性。以上检测结果与转基因大豆转化事件遗传信息(表 2)结果一致。表明本研究选用的引物序列具有较好的特异性。



A: CaMV35S 启动子; B: *Bt* 基因; C: *pat* 基因; D: *CP4-epsps* 基因; E: 305423 转化事件; F: CV127 转化事件; G: 356043 转化事件; M 为分子量标记 DL1000(由上至下,分别是 1 000 ,700 ,500 ,400 ,300 ,200 ,100 bp);泳道 1~10 分别是转基因大豆 GTS40-3-2、A2704-12、A5547-127、MON89788、MON88701、305423、CV127、356043、非转基因大豆秦豆 13 和空白对照。

A: CaMV35S promoter; B: *Bt* gene; C: *pat* gene; D: *CP4-epsps* gene; E: 305423 event; F: CV127 event; G: 356043 event; M: DNA Marker DL1000; 1-10: Genetically modified soybean GTS40-3-2 , A2704-12 , A5547-127 , MON89788 , MON88701 , 305423 , CV127 , 356043 , Qindou 13 and no DNA control , respectively.

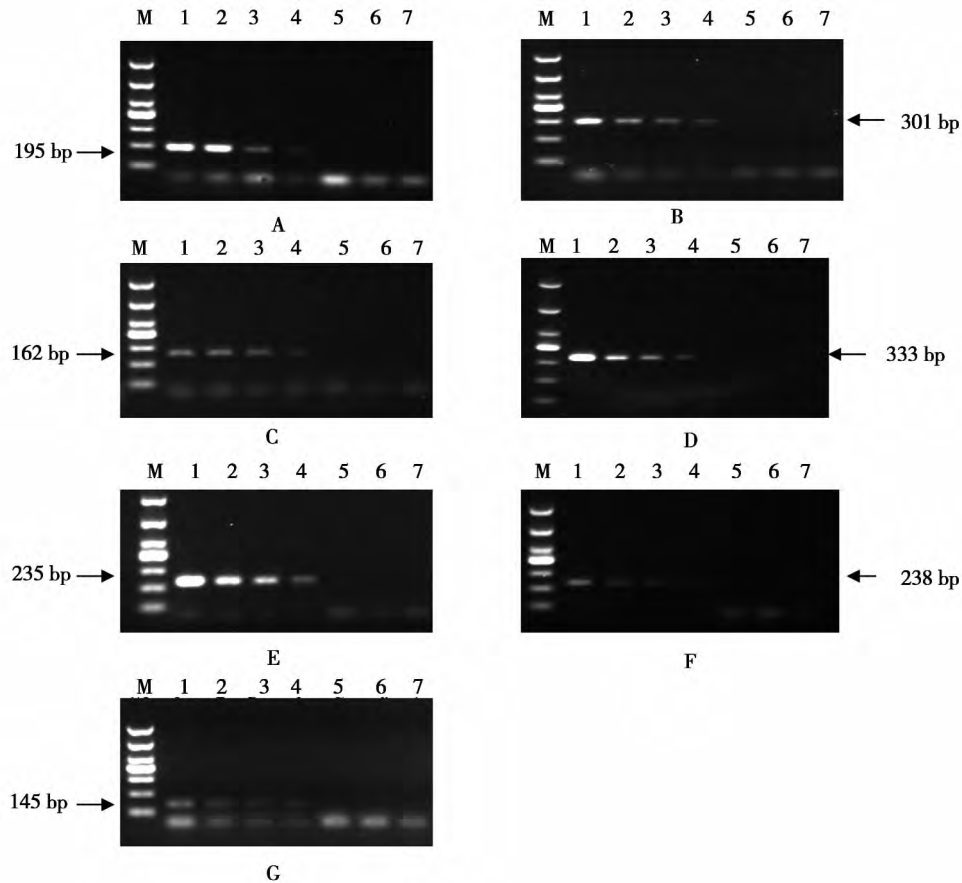
图 2 PCR 检测大豆基因组 DNA 中的不同筛查元件

Fig. 2 PCR detection of screening elements

### 2.3 转基因大豆定性 PCR 筛查灵敏度检测

分别使用不同重量的转基因大豆 GTS 40-3-2、MON87701、A5547-127、305423、CV127 和 356043 转化事件与非转基因大豆秦豆 13 粉末混合制成 CaMV35S 启动子、*CP4-epsps* 基因、*Bt* 基因、*pat* 基因、305423 转化事件、CV127 转化事件和 356043 转化事件的待测样品。混合后 6 个样品中转基因粉末含量分别为 1 000 ,100 ,10 ,1 ,0.1 和 0  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。分别

提取 6 个样品的基因组 DNA ,对所选用的引物进行灵敏度测试。结果如图 3 所示,在 CaMV35S 启动子、*Bt* 基因、*pat* 基因、*CP4-epsps* 基因、305423 转化事件、CV127 转化事件和 356043 转化事件的检测中,转基因粉末含量为 1 000 ,100 ,10 ,1  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  的混合样品均可以检测到,而转基因粉末含量为 0.1  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  的混合样品未扩增出条带,说明本研究选用的引物序列的灵敏度可达到 0.1%。



A: CaMV 35S 启动子; B: *Bt* 基因; C: *pat* 基因; D: *CP4-epsps* 基因; E: 305423 转化事件; F: CV127 转化事件; G: 356043 转化事件; M 为分子量标记 DL1000, 泳道 1~7 转基因粉末含量分别为 1 000, 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0 g·kg<sup>-1</sup> 及空白对照。

A: CaMV 35S promoter; B: *Bt* gene; C: *pat* gene; D: *CP4-epsps* gene; E: 305423 event; F: CV127 event; G: 356043 event; M: DNA Marker DL1000; 1-7: 1 000, 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0 g·kg<sup>-1</sup> GM content and no DNA control, respectively.

图 3 不同筛查元件在大豆基因组 DNA 中的检测灵敏度

Fig. 3 The detection sensitivity of the screening elements in GM soybean

### 3 结论与讨论

2008-2015 年的 8 年间,中央一号文件连续 6 次提到转基因问题。而 2015 年中共中央国务院印发的《关于加大改革创新力度加快农业现代化建设的若干意见》一文中提出“加强农业转基因生物技术研究、安全管理、科学普及”,是中央一号文件中首次提及加强转基因生物的安全管理。转基因大豆的全面监管涉及出入境检验检疫局、食品药品监督管理局、工商行政管理局、农业部等多部门的相互协调;包括进口入境检验、大豆加工企业监管、超商大豆制品的监督检查以及大豆种子从品种审定、生产、销售到大田种植等诸多环节。实现对这些环节的全覆盖监管,就需要加大转基因检测的力度,增大样品抽查的力度<sup>[9]</sup>。因此,从大量的非转基因大豆样品中快速、高效、准确地筛查出个别的转基因样品,成为加强转基因安全监管的技术瓶颈<sup>[10]</sup>。

制定转基因成分筛查方法的原则是:(1)以最

经济、高效的方法达到最佳的检测效果;(2)筛查出所有已知转化事件;(3)特异性强,灵敏度好,避免假阳性和假阴性结果,做到不漏检阳性也不误检阴性<sup>[11]</sup>。本研究利用网络数据库资料,分析了转基因大豆中外源插入基因元件在不同转化事件中的分布规律,选择了 CaMV35S 启动子、*Bt* 基因、*pat* 基因、*CP4-epsps* 基因四个靶标元件和 305423、356043、CV127 三个转化事件的组合,完成了对已知转基因大豆转化事件的筛查;同时对检测方法的特异性和灵敏度进行了分析。试验结果证明该方法在特异性筛查出已知商业化转基因大豆的同时,检测的灵敏度可达 1 g·kg<sup>-1</sup>,与吴明生等<sup>[20]</sup>、Wu 等<sup>[21]</sup>所报道筛查方法的检测灵敏度相近。说明该方法可快速、准确、科学地筛查大豆中的转基因成分,有效提高了检测效率,为转基因大豆的全面、有效监管提供了有力的技术支撑,对于保障我国的食品安全、饲用安全和保护我国大豆的种质资源都具有十分重要的意义。

## 参考文献

- [1] 侯文胜,林抗雪,陈普,等.大豆规模化转基因技术体系的构建及其应用[J].中国农业科学,2014,47(21):4198-4210. (Hou W S, Lin K X, Chen P, et al. Establishment and prospect of efficient transformation systems for soybean [J]. *Scientia Agricultura Sinica* 2014, 47(21):4198-4210.)
- [2] James C. 2014 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,2015,35(1):1-14. (James C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2014 [J]. *China Biotechnology*, 2015, 35(1):1-14.)
- [3] 殷瑞锋,徐雪高.2014 年大豆市场形势分析与 2015 年展望[J].农业展望,2014(12):4-13. Yin R F, Xu X G. Soybean market in 2014 and its prospect for 2015 [J]. *Agriculture Outlook*, 2014(12):4-13.
- [4] GM Crop Database of Center for Environmental Risk Assessment, [http://cera-gmc.org/GM\\_CropDatabase](http://cera-gmc.org/GM_CropDatabase). [2015-07-30].
- [5] GMO Database of GMO Compass, EU, <http://www.gmo-compass.org/eng/gmo/db>. [2015-07-30].
- [6] <http://gmdd.shgmo.org>. GMO Detection Method Database (GMDD), <http://gmdd.shgmo.org>. [2015-07-30].
- [7] 中华人民共和国农业部.进口用作加工原料的农业转基因生物审批情况[OL].<http://www.moa.gov.cn/ztl/zjyqwgz/spxx/> Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. The approval of imported genetically modified plants used for processing materials. <http://www.moa.gov.cn/ztl/zjyqwgz/spxx/>.
- [8] 中华人民共和国海关总署.2014 年 12 月全国进口重点商品量值表[OL].<http://www.customs.gov.cn/publish/portal0/tab49666/info729731.htm> General Administration of Customs of the People's Republic of China. The national key value of goods imported in December 2014. <http://www.customs.gov.cn/publish/portal0/tab49666/info729731.htm>.
- [9] 孟素芬.中国进口转基因大豆使用管理研究[D].郑州:河南工业大学,2012. (Meng S F. The using management research of imported transgenic soybeans of China[D]. Zhengzhou: Henan University of Technology 2012.)
- [10] Zel J, Cankar K, Ravnikar M, et al. Accreditation of GMO detection laboratories: Improving the reliability of GMO detection [J]. *Accreditation and Quality Assurance*, 2006, 10(10): 531-536.
- [11] 张丽,武玉花,吴刚,等.转基因油菜筛查检测策略研究[J].中国油料作物学报,2012,34(1):74-81. (Zhang L, Wu Y H, Wu G, et al. Strategy of transgenic rapeseed screening based on exogenous gene elements [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences* 2012, 34(1):74-81.)
- [12] 余婧,张孝廉,赵丹,等.烟草转基因研究常用遗传元件筛查策略[J].中国烟草学报,2014,20(1):78-83. (Yu J, Zhang X L, Zhao D, et al. Screening strategy of genetic elements used in transgenic study [J]. *Acta Tabacaria Sinica* 2014, 20(1):78-83.)
- [13] 农业部.农业部 1782 号公告-3-2012 转基因植物及其产品成分检测调控元件 CaMV 35S 启动子、FMV 35S 启动子、NOS 启动子、NOS 终止子和 CaMV 35S 终止子定性 PCR 方法[S].北京:农业部,2012. (Ministry of Agriculture. Announcement by the Ministry of Agriculture, No. 1782-3-2012. Detection of genetically modified plants and derived products-Qualitative PCR methods for the regulatory elements CaM V 35S promoter, FM V 35S promoter, NOS promoter, NOS terminator and CaM V 35S terminator [S]. Beijing: Ministry of Agriculture 2012.)
- [14] 农业部.农业部 953 号公告-6-2007 转基因植物及其产品成分检测抗虫转 *Bt* 基因水稻定性 PCR 方法[S].北京:农业部,2007. Ministry of Agriculture. Announcement by the Ministry of Agriculture, No. 953-6-2007. Detection of genetically modified plants and their derived products-Qualitative PCR methods for *Bt* rice to control insect pests [S]. Beijing: Ministry of Agriculture, 2007.)
- [15] 农业部.农业部 1782 号公告-6-2012 转基因植物及其产品成分检测 *bar* 或 *pat* 基因定性 PCR 方法[S].北京:农业部,2012. (Ministry of Agriculture. Announcement by the Ministry of Agriculture, No. 1782-6-2012. Detection of genetically modified plants and derived products-Qualitative PCR method of *bar* or *pat* gene [S]. Beijing: Ministry of Agriculture 2012.)
- [16] 农业部.农业部 1861 号公告-5-2012 转基因植物及其产品成分检测 *CP4-epsps* 基因定性 PCR 方法[S].北京:农业部,2012. (Ministry of Agriculture. Announcement by the Ministry of Agriculture, No. 1861-5-2012. Detection of genetically modified plants and derived products Qualitative PCR method for *CP4-epsps* gene [S]. Beijing: Ministry of Agriculture 2012.)
- [17] 农业部.农业部 1782 号公告-4-2012 转基因植物及其产品成分检测高油酸大豆 305423 及其衍生品种定性 PCR 方法[S].北京:农业部,2012. (Ministry of Agriculture. Announcement by the Ministry of Agriculture, No. 1782-4-2012. Detection of genetically modified plants and derived products-Qualitative PCR method for high oleic acid soybean 305423 and its derivatives [S]. Beijing: Ministry of Agriculture 2012.)
- [18] 农业部.农业部 1782 号公告-1-2012 转基因植物及其产品成分检测耐除草剂大豆 356043 及其衍生品种定性 PCR 方法[S].北京:农业部,2012. (Ministry of Agriculture. Announcement by the Ministry of Agriculture, No. 1782-1-2012. Detection of genetically modified plants and derived products-Qualitative PCR method for for herbicide-tolerant soybean 356043 and its derivatives [S]. Beijing: Ministry of Agriculture, 2012.)
- [19] 农业部.农业部 1782 号公告-5-2012 转基因植物及其产品成分检测耐除草剂大豆 CV127 及其衍生品种定性 PCR 方法[S].北京:农业部,2012. (Ministry of Agriculture. Announcement by the Ministry of Agriculture, No. 1782-5-2012. Detection of genetically modified plants and derived products-Qualitative PCR method for herbicide-tolerant soybean CV127 and its derivatives [S]. Beijing: Ministry of Agriculture 2012.)
- [20] 吴明生,云晓敏,宋歌,等.转基因玉米种子快速筛查方法研究与应用[J].生物技术通报,2013(1):102-106. (Wu M S, Yun X M, Song G, et al. Study and application of a rapid screening method for GM maize seeds [J]. *Biotechnology Bulletin* 2013(1):102-106.)
- [21] Wu Y H, Wang Y L, Li J, et al. Development of a general method for detection and quantification of the P35S promoter based on assessment of existing methods [J]. *Scientific Reports* 2014(4): 7358.)