

多重 PCR 检测抗草甘膦大豆 GTS40-3-2

尹全¹ 李忆² 宋君¹ 王东¹ 张富丽¹ 刘文娟¹ 常丽娟¹ 刘勇³

(1. 四川省农业科学院 分析测试中心, 四川 成都 610066; 2. 四川民族学院, 四川 康定 626001; 3. 四川省农业科学院 植物保护研究所, 四川 成都 610066)

摘要: 将大豆内源参照基因(*Lectin*)、外源基因 *P-CaMV* 35S、*CP4-EPSPS* 和 T-NOS 作为多重 PCR 检测参数, 建立了一种多重 PCR 检测抗草甘膦大豆 GTS40-3-2 的方法。反应条件优化结果表明: 多重 PCR 的适宜退火温度为 58℃, 适宜引物终浓度($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 配比为: 0.1:0.2:0.2:0.2。采用已知样品对多重 PCR 体系进行验证, 检测结果可靠, 证明该多重 PCR 体系为一种有效的抗草甘膦大豆 GTS40-3-2 的检测方法。

关键词: 多重 PCR; 大豆; GTS40-3-2; 检测

中图分类号: S565.1 文献标识码: A DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2016.04.0666

Multiplex PCR for Detection of Roundup-Ready Soybean GTS40-3-2

YIN Quan¹ LI Yi² SONG Jun¹ WANG Dong¹ ZHANG Fu-li¹ LIU Wen-juan¹ CHANG Li-juan¹ LIU Yong³

(1. Center of Analysis and Testing Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China; 2. Sichuan Minzu College, Kangding 626001, China; 3. Institute of Plant Protection, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China)

Abstract: In order to establish a multiplex PCR (polymerase chain reaction) method detection for Roundup-Ready soybean GTS40-3-2, the soybean endogenous reference gene (*Lectin*), exogenous gene *CaMV* 35S promoter, *CP4-EPSPS* and NOS terminator were used as detection parameters. The optimization results showed that the optimum annealing temperature of multiple PCR was 58℃, and the optimum final concentration of primers ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) ratio is 0.1:0.2:0.2:0.2. The multiplex PCR method is confirmed to be reliable through known samples. And it is proved that the multiplex PCR system is an effective method for detection Roundup-Ready soybean GTS40-3-2.

Keywords: Multiplex PCR; Soybean; GTS40-3-2; Detection

抗草甘膦大豆 GTS40-3-2 (Roundup Ready, RR) 由孟山都公司通过基因枪转化大豆品种 A5403 得来^[1], 其转入来自 CP4 农杆菌的 5-烯醇丙酮酰莽草酸 (5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase, *CP4-EPSPS*) 基因^[2], 该基因编码磷酸烯醇式丙酮酰莽草酸合成酶, 使大豆能够耐受除草剂草甘膦的伤害。我国在 2004 年首次批准抗草甘膦大豆 GTS40-3-2 进口用作加工原料^[3]。

随着生物技术的不断发展, 转基因作物已成为农业及食品中的重要组成部分^[4], 其安全性问题争议也越来越大^[5], 许多国家出台了转基因产品标签制度及相关法规, 要求对转基因产品进行标识^[6]。2002 年, 我国农业部首次公布农业转基因生物第一批标识目录, 共 5 类 17 种, 包括当时我国批准商业化种植或进口的转基因棉花种子、大豆种子、玉米种子、油菜籽、番茄种子等^[7]。转基因标识制度的科学执行必须依托快速、可靠的转基因检测技术。

目前在国际上比较认同的是利用 PCR 对转基

因作物及产品的遗传背景进行检测^[8]。灵敏、快速、简便是 PCR 技术应用于转基因作物及产品检测的特点, 其主要用于检测转基因作物及产品中的标记基因和目的基因^[9-10]。但对产品的检测经常需对多个转基因成分进行检测来确认其是否为转基因产品及含哪些转基因成分, 然而用普通 PCR 分别检测每个成分存在操作繁琐、时间和试剂耗费大等缺点。因此, 多重 PCR 技术在转基因产品检测、动物源成分鉴定及致病菌鉴定中得到大量应用^[11-13]。多重 PCR 是指在常规 PCR 的基础上, 向一个反应体系中加入多对特异性引物, 针对一个或多个 DNA 模板的不同区域扩增多个目的片段的 PCR 技术^[14], 其具有快速、简单和高特异性的特点, 并可以减少假阳性的出现^[15-16]。

目前国内外已有抗草甘膦大豆 GTS40-3-2 转化体特异检测方法, 前人也曾利用转化事件中的多个基因进行了多重 PCR 检测方法的研究^[11], 但不仅 GTS40-3-2 含有外源基因 *P-CaMV* 35S、T-NOS 和

收稿日期: 2015-12-08

基金项目: 四川省财政现代农业技术创新与示范专项(2014CXSF-040); 四川省教育厅自然科学一般项目(15ZB0331)。

第一作者简介: 尹全(1981-), 男, 硕士, 助理研究员, 主要从事转基因植物环境安全工作。E-mail: xiangfeng_1981@163.com。

通讯作者: 刘勇(1964-), 男, 研究员, 主要从事转基因植物环境安全研究工作。E-mail: liuyongdr@163.com。

CP4-EPSPS 其它转基因作物也可能同时含有这 3 个外源基因(如转基因玉米 NK603^[17]), 仅仅利用外源基因建立的多重 PCR 体系不足以证明含有这 3 个外源基因的样品是 GTS40-3-2。为了提高抗草甘膦大豆 GTS40-3-2 检测效率和可靠性, 本文根据抗草甘膦大豆 GTS40-3-2 插入的基因元件, 预期建立一种包括大豆内源参照基因(*Lectin*)、花椰菜花叶病毒启动子(*P-CaMV* 35S)、农杆菌胭脂碱合成酶基因终止子(T-NOS)、目的基因(*CP4-EPSPS*)的四重 PCR, 为抗草甘膦大豆 GTS40-3-2 的检测提供另外一种有效的检测方法。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 转基因大豆 GTS40-3-2(含有 *Lectin*、*P-CaMV* 35S、T-NOS、*CP4-EPSPS* 基因)、转基因大豆 A2704-12(含有 *Lectin*、*P-CaMV* 35S 基因)、转基因大豆 A5547-127(含有 *Lectin*、*P-CaMV* 35S 基因)、转基因玉米 MON810(含有 *P-CaMV* 35S 基因)、转基因油菜 T45(含有 *P-CaMV* 35S 基因)、转基因油菜 Topas19/2(未含有 *Lectin*、*P-CaMV* 35S、T-

NOS、*CP4-EPSPS* 基因)、转基因水稻 TT51-1(含有 T-NOS 基因)均为本实验室保存。

1.1.2 仪器与试剂 PCR 仪(Veritec 96-well, 美国 ABI 公司)、毛细管电泳仪(QIAXcel Advanced, 德国 QIAGEN 公司);离心机(5424, 德国 Eppendorf 公司)。植物基因组提取试剂盒、标准分子量(M)购于天根生化科技(北京)有限公司; Master Mix 购于日本东洋纺绩株式会社; 引物由成都擎科梓熙生物技术有限公司合成。

1.2 样品 DNA 提取

样品 DNA 提取按照植物基因组 DNA 提取试剂盒方法进行, 测定提取 DNA 浓度和判断质量。

1.3 引物序列

根据抗草甘膦大豆 GTS40-3-2 的分子特征选择大豆内源参照基因(*Lectin*)、外源基因花椰菜花叶病毒启动子(*P-CaMV* 35S)和农杆菌胭脂碱合成酶基因终止子(T-NOS)以及目的基因(*CP4-EPSPS*)4 个基因作为多重 PCR 检测基因, 特异性引物序列引用国家相关标准(表 1)。将各检测基因上下游引物浓度稀释为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表 1 引物 DNA 序列

Table 1 DNA sequences of the primers used in this study

元件 Element	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	大小 Size /bp	检测标准 Detection standard
<i>Lectin</i>	<i>Lectin</i> -F	GCCCTCTACTCCACCCCATCC	118	NY/T 675-2003 ^[18]
	<i>Lectin</i> -R	GCCCATCTGCAAGCCTTTTGTG		
<i>P-CaMV</i> 35S	35S -F	GCTCTACAAATGCCATCATGCG	195	农业部 1782 号公告 -3-2012 ^[19]
	35S -R	GATAGTGGGATTGTGCGTCATCCC		
<i>CP4-EPSPS</i>	<i>CE</i> -F	CCTTCATGTTCCGGCGTCTCG	498	NY/T 675-2003
	<i>CE</i> -R	GCGTCATGATCGGCTCGATG		
T-NOS	NOS -F	TGAATCCTGTTGCCGGTCTT	138	GB/T 19495.6-2004 ^[20]
	NOS -R	AAATGTATAATTGCGGGACTCTAATC		

1.4 多重 PCR 方法的优化建立

1.4.1 单基因特异性 在 25 μL 的 PCR 反应体系中进行单对引物的扩增。反应体系为: Master Mix (2 \times) 12.5 μL , 正反向引物各 1 μL , 模板 2 μL 。反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。采用毛细管电泳仪及 QIAXcel ScreenGel Software 对反应产物进行结果分析。

1.4.2 多重 PCR 条件优化 在 25 μL 的多重 PCR 反应体系中对退火温度进行优化。反应体系为:

Master Mix(2 \times) 12.5 μL , 4 对引物中正反向引物各 0.25 μL , 模板 2 μL 。反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 退火温度设置梯度 50, 54, 56, 58, 60, 64 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min。采用毛细管电泳仪及 QIAXcel ScreenGel Software 对反应产物进行结果分析, 选择最适宜的退火温度。

在 25 μL 多重 PCR 反应体系中对引物终浓度进行优化。反应体系: Master Mix(2 \times) 12.5 μL , 4 对引物终浓度按照表 2 设置浓度梯度, 模板 DNA 2 μL 。反应条件选择退火温度优化后确定的程序。

采用毛细管电泳仪及 QIAxcel ScreenGel Software 对反应产物进行分析,选择最适宜的引物浓度配比。

表2 引物终浓度配比

Table 2 The ratio of primer concentration ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

方案 Scheme	引物配比 Primer ratio (<i>Lectin</i> : <i>P-CaMV 35S</i> : <i>CP4-EPSPS</i> : <i>T-NOS</i>)
A	0.4:0.4:0.4:0.4
B	0.2:0.2:0.2:0.2
C	0.1:0.1:0.1:0.1
D	0.1:0.2:0.2:0.2
E	0.1:0.1:0.2:0.1
F	0.2:0.2:0.4:0.2

1.5 多重 PCR 检测灵敏度

用 ddH₂O 对转基因大豆 GTS40-3-2 基因组 DNA 进行梯度稀释,使得每个反应体系中基因组 DNA 分别为 50, 10, 3, 1, 0.3 ng, 使用 1.4 的反应体系及优化的反应条件考察多重 PCR 方法的灵敏度。

1.6 已知样品检测

使用优化的多重 PCR 检测体系对已知样品转基因大豆 GTS40-3-2、转基因大豆 A2704-12、转基因玉米 MON810、转基因油菜 T45、转基因油菜 Topas19/2 进行实例检测,验证方法的准确性和可靠性。

2 结果与分析

2.1 样品 DNA 提取

样品 DNA 提取纯化采用植物基因组提取试剂盒方法,通过 Nano Drop 1000 (Thermo scientific) 微量分光光度计测定浓度和质量,经测定,所有样品 OD₂₆₀/OD₂₃₀ 比值均大于 2.0, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值均在 1.8~2.0,说明提取的样品 DNA 较好。将样品 DNA 浓度稀释至 25 ng· μL^{-1} 待测。

2.2 单基因特异性验证

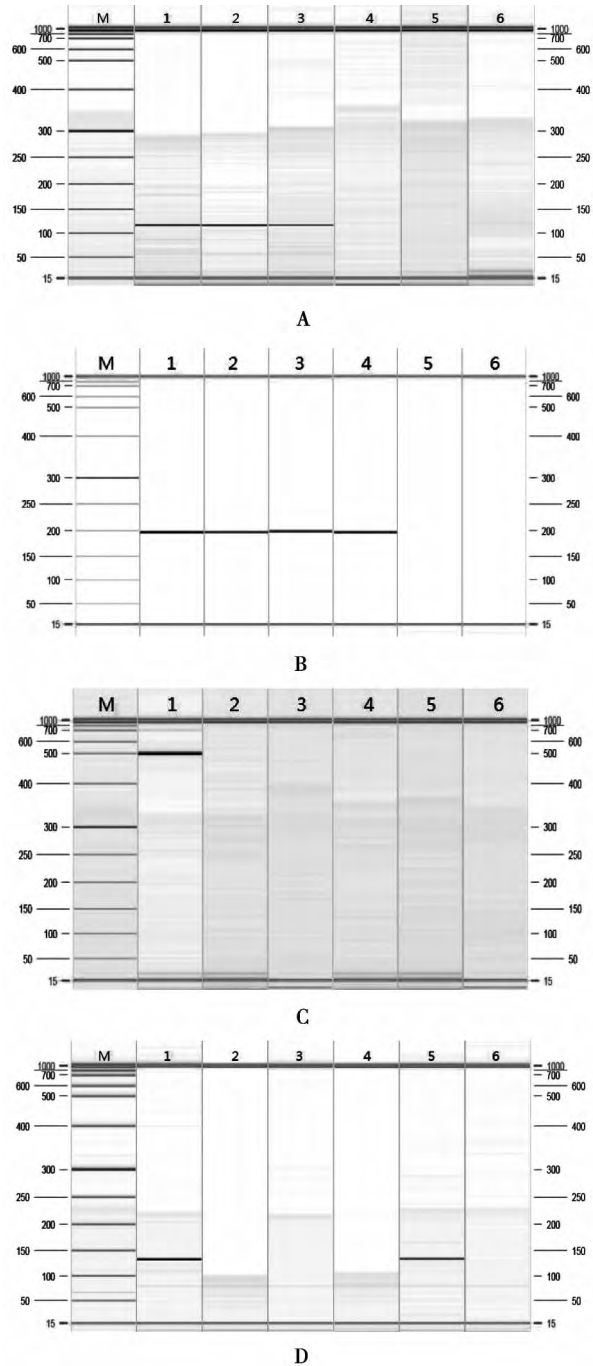
由图 1 可见 A 对引物均可在目的位置处观察到特异性条带,未见明显非特异性条带扩增。因此,本文选择的 4 对引物可用于多重 PCR 检测体系。

2.3 多重 PCR 条件的优化

由图 2 退火温度扩增图谱可见,在 ddH₂O 对照中没有出现条带扩增,说明体系正常;在 50℃ 条件下, T-NOS 基因的目的条带未得到有效扩增,外源基因 (*CP4-EPSPS*) 的扩增量显著高于其它两个基因,所以退火温度 50℃ 不适合;在 60 和 64℃ 条件下,引物二聚体出现较多,这两个温度也不适合;在其它温度条件下,虽然所有目的条带都得到扩增,但目

的条带之间的扩增量有所不同,当退火温度为 58℃ 时各目的条带的扩增量相对一致,因此最终选择多重 PCR 反应的适宜退火温度为 58℃。

由图 3 引物浓度扩增图谱可见,各引物终浓度按照方案 D 配比时,各目的基因的扩增效率一致;而其它方案均不理想,目的基因存在无扩增、扩增效率不一致等情况。所以最终确定最适宜的引物终浓度 ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 配比为 0.1:0.2:0.2:0.2。

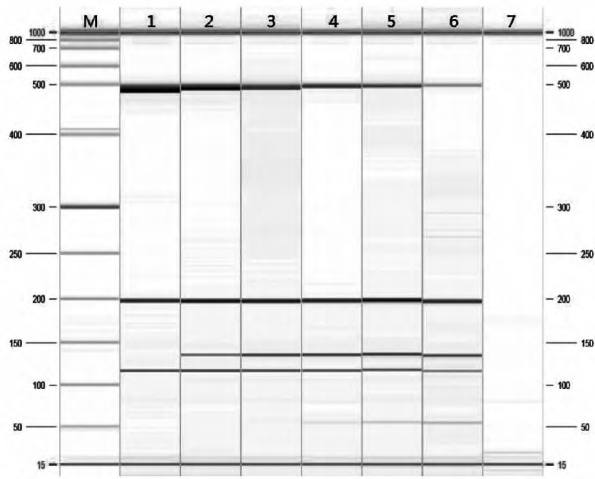


A: *Lectin*; B: *P-CaMV 35S*; C: *CP4-EPSPS*; D: *T-NOS*.

M: Marker; 1: GTS40-3-2; 2: A2704-12; 3: A5547-127; 4: MON810; 5: TT51-1; 6: ddH₂O.

图1 单基因扩增图谱

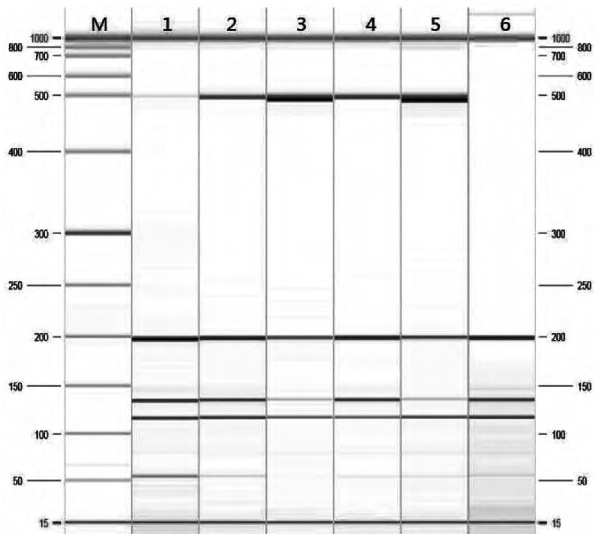
Fig. 1 PCR amplification of the single gene system



M: Marker; 1-6: 50°C 54°C 56°C 58°C 60°C 64°C; 7: ddH₂O.

图2 退火温度梯度扩增图谱

Fig. 2 PCR amplification of the different annealing temperatures



M: Marker; 1-6: scheme A-F.

图3 引物浓度梯度扩增图谱

Fig. 3 PCR amplification of the different primer concentrations

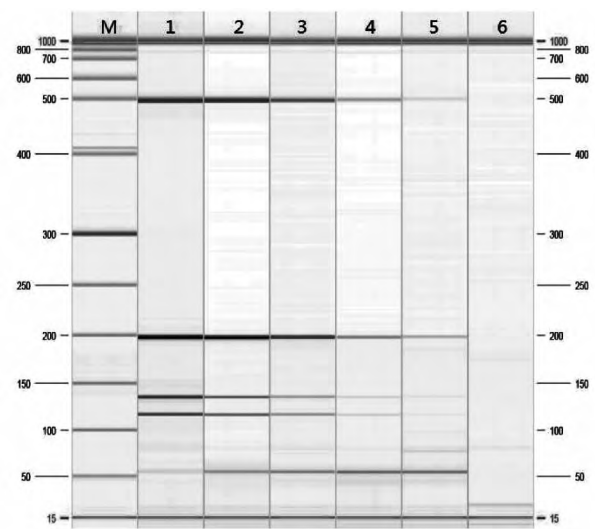
2.4 多重 PCR 灵敏度

将模板 DNA 稀释至设定浓度,通过多重 PCR 灵敏度试验,由图 4 可见,在模板浓度不低于 1 ng 时 4 个目标片段均可得到有效扩增。而当模板浓度低至 1 ng 时,虽然所有目标片段均得到扩增,但扩增量偏小,特别是 T-NOS 和 *Lectin* 基因,毛细管电泳软件不能识别其目的条带;在模板浓度低于 1 ng 时 4 个外源基因目的条带扩增量少或者几乎没有扩增。试验表明本文所建立的多重 PCR 检测体系灵敏度不低于 1 ng。

2.5 已知样品验证

采用上述多重 PCR 方法对已知样品进行检测,

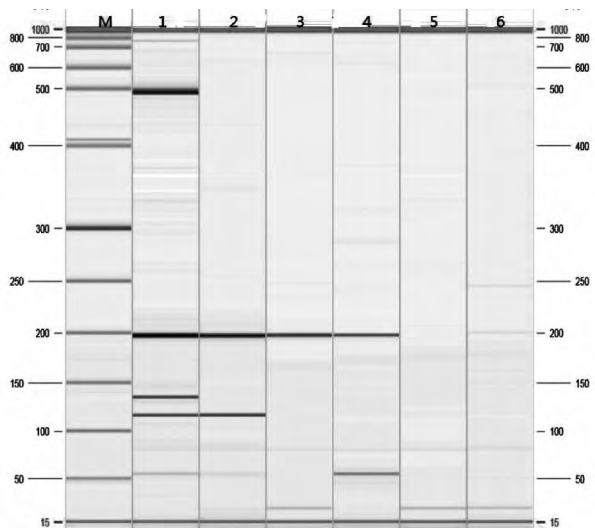
结果(图 5)表明,1 号泳道为转基因大豆 GTS40-3-2,检出 *Lectin*、*P-CaMV 35S*、*T-NOS*、*CP4-EPSPS* 基因片段;2 号泳道为转基因大豆 A2704-12,检出 *Lectin*、*P-CaMV 35S* 基因片段,未检出 *T-NOS*、*CP4-EPSPS* 基因片段;3 号泳道为转基因玉米 MON810,检出 *P-CaMV 35S* 基因片段,未检出 *Lectin*、*T-NOS*、*CP4-EPSPS* 基因片段;4 号泳道为转基因油菜 T45,检出 *P-CaMV 35S* 基因片段,未检出 *Lectin*、*T-NOS*、*CP4-EPSPS* 基因片段;5 号泳道为转基因油菜 Topas19/2,未检出 *Lectin*、*P-CaMV 35S*、*T-NOS*、*CP4-EPSPS* 基因片段,所有样品扩增的目的条带与其分子特征显示的基因元件是一致的。此结果进一步验证了本文建立的多重 PCR 检测方法的准确性和可靠性。



M: Marker; 1-5: 50、10、3、1、0.3 ng; 6: ddH₂O.

图4 灵敏度扩增图谱

Fig. 4 PCR amplification of the sensitivity samples



M: Marker; 1: GTS40-3-2; 2: A2704-12; 3: MON810; 4: T45; 5: Topas19/2; 6: ddH₂O.

图5 已知样品扩增图谱

Fig. 5 PCR amplification of the known samples

3 结论与讨论

毛细管凝胶电泳是将凝胶移到毛细管中作支持物进行的一种电泳,在起分子筛作用的聚合物内进行电泳时由于 PCR 产物分子大小不同而被分离。本检测方法最大特点就是分辨率更高、电泳条带更清晰的毛细管电泳引入到多重 PCR 检测体系中,有效提高了检测效率。虽然目的基因间碱基差异大也可以采用普通琼脂糖凝胶电泳方法进行分析判断,但毛细管电泳能将扩增目的条带分离得更明显,结果更加清晰;如果需要检测的目的基因间的碱基差异大小不能采用普通琼脂糖凝胶电泳方式进行准确分析,特别是在只有几个碱基差异时,毛细管电泳的优势则更明显。本多重 PCR 反应体系选择的基因扩增条带大小差异 20 bp,采用普通琼脂糖凝胶电泳分离比较困难,而采用毛细管电泳能清晰地将两者区分,并进行有效的判断。

多重 PCR 最早由 Chamberlain 等^[14]于 1988 年提出,目前已被广泛应用于医学及生物等领域,包括基因敲除分析、突变、多态性分析、定量分析、RNA 检测及微生物耐药检测等^[21]。在实际应用中,由于不同引物序列对多重 PCR 结果存在很多因素(如引物浓度、退火温度等)影响。在关键影响因素引物浓度选择过程中,本文采用不同引物浓度配比,在充分考虑 PCR 反应过程中易产生的引物二聚体、非特异性条带等特殊情况下,选择目的条带特异、引物二聚体少,各基因引物扩增效率相对一致,最终获得适宜的引物浓度配比。退火温度是多重 PCR 反应中另一个关键因素。通常情况下可以依据引物的解链温度直接选择退火温度,但有的时候其结果与预期并不一致。在多重 PCR 反应条件优化过程中可以设置 54℃ 为初始退火温度,如果多重 PCR 扩增产生非特异性条带,这时需要适当提高引物退火温度,反之则需要降低引物退火温度^[22]。本文从 6 个退火温度中,依据 4 个目的基因特异性条带扩增效率、引物二聚体及非特异性条带的产生等因素确定了 58℃ 作为抗草甘膦大豆 GTS40-3-2 多重 PCR 检测体系适宜的退火温度。

在进行植物转基因定性 PCR 检测时,加入内源基因可以判断提取核酸样品的质量,起到质量控制的作用,即如果内源基因目的条带未得到有效扩增,说明所提取的核酸中含有 PCR 抑制物质或者所抽提的核酸不含该植物的 DNA,从而可以避免转基因检测的假阴性结果出现。另一方面,由于存在同一载体转化不同植物的情况,当样品中所有外源基因检测都相同时并不能准确定论,而加入内源基因

后可准确判断检测样品是何种转基因植物,这也正是本研究的出发点之一。

本文建立的抗草甘膦大豆 GTS40-3-2 多重 PCR 反应体系,可实现在一个反应体系中同时检测抗草甘膦大豆 GTS40-3-2 内源参照基因和多个外源基因成分,有效简化了操作程序、缩短了检测时间、提高了检测效率、降低了漏检概率,为转基因大豆 GTS40-3-2 提供另外一种有效的检测手段。

参考文献

- [1] 张海波. 适合转基因大豆 GTS40-3-2 复合 PCR 检测标准分子研制及番茄内标准基因国际协同验证 [D]. 上海: 上海交通大学, 2008: 25. (Zhang H B. A novel plasmid molecule for duplex quantitative PCR analysis of roundup ready soybean and international validation of tomato endogenous reference gene [D]. Shanghai: Shanghai Jiaotong University, 2008: 25.)
- [2] 李信申, 何红, 胡汉桥, 等. 抗草甘膦转基因大豆多重 PCR 检测及假阳性问题探讨 [J]. 广东海洋大学学报, 2008, 28(6): 66-71. (Li X S, He H, Hu H Q. Multiplex PCR detection of transgenic soybean resistant to glyphosate and discussion of false positive results [J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2008, 28(6): 66-71.)
- [3] 中华人民共和国农业部农业转基因生物安全管理办公室. 2004-2011 年进口用作加工原料的农业转基因生物审批情况 [EB/OL]. (2012-02-03). [2015-06-18]. <http://www.moa.gov.cn/ztl/zjyqwgz/spxx/201202/P020130618408715248212.pdf>. (The agricultural genetically modified organisms safety management office of MOA. The approval of imported agriculture GMO used as processing raw materials from 2004 to 2012 in china [EB/OL]. (2012-02-03). [2015-06-18]. <http://www.moa.gov.cn/ztl/zjyqwgz/spxx/201202/P020130618408715248212.pdf>.)
- [4] 芦春斌, 周文, 刘标. 喂食转基因大豆对子代雄鼠生殖系统的影响 [J]. 大豆科学, 2013, 32(1): 119-123. (Lu C B, Zhang W, Liu B, et al. Effects of transgenic soybean on reproductive system in male mice [J]. Soybean Science, 2012, 31(2): 292-294.)
- [5] Domingo J L. Health risks of GM foods: Many opinions but few data [J]. Science, 2000, 288(5472): 1748-1749.
- [6] 金莞军, 贾士荣, 彭于发. 不同国家和地区转基因产品标识管理政策的比较 [J]. 农业生物技术学报, 2004, 2(1): 1-7. (Jin W J, Jia S R, Peng Y F, et al. Comparison of labeling policy of genetically modified products in different countries and territories [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2004, 12(1): 1-7.)
- [7] 中华人民共和国农业部. 农业转基因生物标识管理办法 [EB/OL]. (2001-12-19). [2015-06-18]. http://www.gov.cn/gongbao/content/2002/content_61835.htm. (Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Identification measures for the administration of agricultural genetically modified organisms [EB/OL]. (2001-12-19). [2015-06-18]. http://www.gov.cn/gongbao/content/2002/content_61835.htm.)
- [8] 黄昆仑, 罗云波. 用巢式和半巢式 PCR 检测转基因大豆 Roundup Ready 及其深加工食品 [J]. 农业生物技术学报, 2003, 11(5): 461-466. (Huang K L, Luo Y B. Detecting genet-

- ically modified soybean roundup ready ingredient in foodstuffs by nested PCR and semi-nested PCR [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2003, 11(5): 461-466.)
- [9] 尹全, 宋君, 刘勇. 生物技术作物食品检测技术研究进展 [J]. *江西农业学报*, 2010, 22(5): 135-137. (Yin Q, Song J, Liu Y. Research progress in detection techniques for food from biotech crops [J]. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2010, 22(5): 135-137.)
- [10] 张富丽, 雷绍荣, 刘勇. 转基因作物及加工品检测技术概述 [J]. *生物技术通讯*, 2009, 20(5): 733-737. (Zhang F L, Lei S R, Liu Y. Detection methods for transgenic crops and its processed goods [J]. *Letters in Biotechnology*, 2009, 20(5): 733-737.)
- [11] 徐景升, 余爱丽, 姚伟, 等. 利用 MPCR 技术快速检测进口大豆转基因背景 [J]. *江西农业大学学报*, 2005, 27(2): 262-264, 269. (Xu J S, Yu A L, Yao W, et al. Rapid Detection of imported genetically modified soybean (*Glycine max*) with MPCR [J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2005, 27(2): 262-264, 269.)
- [12] 何玮玲, 张驰, 杨静, 等. 食品中 4 种肉类成分多重 PCR 的快速鉴别方法 [J]. *中国农业科学*, 2012, 45(9): 1873-1880. (He W L, Zhang C, Yang J, et al. A quick multiplex PCR method for the identification of four meat ingredients in food products [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45(9): 1873-1880.)
- [13] 范宏英, 吴清平, 吴若菁, 等. 饮用水中 5 种致病菌多重 PCR 技术检测研究 [J]. *微生物学通报*, 2005, 32(3): 102-107. (Fan H Y, Wu Q P, Wu R J, et al. Study on detection of five-kinds of pathogenic bacteria in drinking water by multiplex PCR [J]. *Microbiology*, 2005, 32(3): 102-107.)
- [14] Chamberlain J S, Gibbs R A, Rainer J L, et al. Detection screening of the duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA implication [J]. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16: 1141-1156.
- [15] Fore V T, Pinto A D, Martino C, et al. A general multiplex PCR assay for the general detection of genetically modified soya and maize [J]. *Food Control*, 2005, 16(6): 535-539.
- [16] Germini A, Zanetti A, Salati C, et al. Development of a seven target multiplex PCR for the simultaneous detection of transgenic soybean and in feeds and foods [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(11): 3275-3280.
- [17] GMO detection method database (GMDD) [EB/OL]. [2015-06-18]. <http://gmdd.shgmo.org/event/view/88>.
- [18] 中华人民共和国农业部. NY/T 675-2003: 转基因植物及其产品检测大豆定性 PCP 方法 [S]. 北京: 中国标准出版社 2003. (Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. NY/T 675-2003: Detection of genetically modified plant organisms and derived products-Qualitative PCR methods for soybeans [S]. Beijing: China standard publishing house, 2003.)
- [19] 中华人民共和国农业部. 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: 中国标准出版社, 2012. (The agriculture department announcement no. 1782-3-2012. Detection of genetically modified plants and derived products-Qualitative PCR methods for the regulatory elements CaMV 35S promoter, FMV 35S promoter, NOS promoter, NOS terminator and CaMV 35S terminator [S]. Beijing: China standard publishing house, 2012.)
- [20] 中国国家标准化管理委员会. GB/T 19495.6-2004: 转基因产品检测基因芯片检测方法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2004. (Standardization Administration of the People's Republic of China. GB/T 19495.6-2004: Detection of genetically modified organisms and derived products gene chip detection [S]. Beijing: China Standard Publishing House, 2004.)
- [21] 赵红庆, 苑锡铜, 黄留玉. 多重 PCR 技术在病原检测中的应用 [J]. *生物技术通讯*, 2007, 8(5): 863-866. (Zhao H Q, Yuan X T, Huang L Y. Application of multiplex PCR in detection of pathogens [J]. *Letters in Biotechnology*, 2007, 8(5): 863-866.)
- [22] Henegariu O, Heerema N A, Dlouhy S R, et al. Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol [J]. *Biotechniques*, 1997, 23(3): 504-511.

(上接第 648 页)

- [16] 杨帅, 王健生, 马振川, 等. 引致大豆根腐病的层出镰孢菌分离鉴定及其特性 [J]. *植物保护学报*, 2012(2): 187-188. (Yang S, Wang J S, Ma Z C, et al. Isolation and identification of *Fusarium proliferatum* causing soybean root rot and its biological characterization [J]. *Acta Phytologica Sinica*, 2012(2): 187-188.)
- [17] 秦国勋, 吴品珊, 张睿. 大豆猝死综合症病菌研究进展 [J]. *检验检疫科学*, 2006(S1): 125-128. (Qin G X, Wu P S, Zhang R. The research progress of soybean sudden death syndrome [J]. *Journal of Inspection and Quarantine* 2006(S1): 125-128.)
- [18] 许艳丽, 王丽芳, 战丽莉. 大豆胞囊线虫病研究进展(续一) [J]. *大豆科技*, 2010(1): 21-24. (Xu Y L, Wang L F, Zhan L L. The research progress of soybean cyst nematode disease [J]. *Soybean Science & Technology* 2010(1): 21-24.)
- [19] 刘大伟, 马朝旺, 段玉玺. 辽宁省大豆胞囊线虫病发生分布研究 [J]. *吉林农业科学*, 2014(4): 47-49. (Liu D W, Ma C W, Duan Y X. Studies on occurrence and distribution of soybean cyst nematode in Liaoning province [J]. *Journal of Jilin Agricultural Sciences* 2014(4): 47-49.)
- [20] 顾鑫, 丁俊杰. 大豆灰斑病的研究现状 [J]. *中国农学通报*, 2010(9): 303-306. (Gu X, Ding J J. The research status of *Cercospora sojina* [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010(9): 303-306.)
- [21] 汪立刚, 沈阿林, 孙克刚, 等. 大豆连作障碍及调控技术研究进展 [J]. *土壤肥料*, 2001(5): 3-8. (Wang L G, Shen A L, Sun K G, et al. The research progress of soybean continuous cropping obstacle and its control technology [J]. *Soil and Fertilizer Sciences in China* 2001(5): 3-8.)
- [22] 王孟雪, 张玉先. 麦/玉/豆轮作制度下不同施肥措施对大豆产量的影响 [J]. *大豆科学*, 2009, 28(6): 1040-1043, 1048. (Wang M X, Zhang Y X. Fertilization measures affects soybean yield under wheat-maize-soybean rotation cropping [J]. *Soybean Science* 2009 28(6): 1040-1043, 1048.)