

植物源性转基因食品PCR衍生技术研究进展

胡金强^{1,2,3,*}, 雷俊婷¹, 孙新城¹, 景建洲¹, 章银良¹, 董彩文¹, 高 辉¹, 耿 尧¹, 姜春鹏¹

(1. 郑州轻工业学院食品与生物工程学院, 河南郑州 450002;

2. 食品生产与安全河南省协同创新中心, 河南郑州 450002;

3. 河南省食品安全国际联合实验室, 河南郑州 450002)

摘要:转基因食品尤以植物源性转基因食品的安全性已成为公众关注的焦点。针对植物源性转基因食品甄别与安全性评估, 已有多种检测手段得到广泛应用。PCR衍生技术因为具有高特异性、高敏感性等技术优势, 为植物源性转基因食品的快速、准确检测提供了有效方法。PCR衍生技术包括多重PCR技术、实时荧光定量PCR技术、多重实时荧光定量PCR技术、多重巢式PCR技术以及多重PCR-DHPLC技术。本文就植物源性转基因食品检测的PCR衍生技术的研究进展作简要综述。

关键词:植物源性, 转基因食品, PCR

Advance in PCR-derived technologies for plant-derived genetically modified food

HU Jin-qiang^{1,2,3,*}, LEI Jun-ting¹, SUN Xin-cheng¹, JING Jian-zhou¹, ZHANG Yin-liang¹, DONG Cai-wen¹, GAO Hui¹, GENG Yao¹, JIANG Chun-peng¹

(1. School of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China;

2. Henan Collaborative Innovation Center for Food Production and Safety, Zhengzhou 450002, China;

3. Henan International Joint Laboratory for Food Safety, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Safety of genetically modified food especially plant-derived genetically modified food are increasingly becoming attentive focus of the public. Many detection methods have been developed for the detection of discrimination and safe evaluation of plant-derived genetically modified food. PCR-derived technologies are sensitive and specific and so have provided rapid, accurate detection methods for plant-derived genetically modified food. PCR-derived technologies include multiplex PCR, real-time PCR, multiplex real-time PCR, multiplex nested PCR, multiple PCR-DHPLC. In this review, these PCR-derived methods should be summarized in brief.

Key words: plant-derived; genetically modified food; PCR

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)22-0379-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.22.070

转基因食品 (Genetically Modified Food, GMF) 是由转基因生物加工生产的食品 and 食品添加剂^[1-3]。随着转基因技术的推广, 转基因食品已广泛渗透到食物链中。近年来, 食品生产企业应用转基因技术进行食品的商品化生产与加工。转基因食品的种类迅速增加, 产销量与销售额也大幅上升。虽然转基因技术应用于食品生产促使食品工业快速发展, 但其安全性具有巨大争议^[4-5]。人类进行生物种内或近缘种间

有性杂交的传统育种已有百年, 从未提出生物安全性评价的问题。转基因食品是利用生物种间基因重组生产的, 无法对其长期效应进行安全性评价^[6]。转基因食品涵盖植物源、动物源以及微生物源食品。其中, 植物源性转基因食品最普遍, 常用于植物源性食品转基因作物有玉米、大豆、油菜、水稻等。Raffaele M等^[7]研究证实经转基因玉米喂养的猪, 在它们的血液、脾、肝、肾等器官发现转基因碎片。

收稿日期: 2015-03-20

作者简介: 胡金强 (1979-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 病原生物学、免疫学与食品安全, E-mail: jqhu@hotmail.com。

基金项目: 国家自然科学基金 (31201901); 教育部留学回国人员科研启动基金 (第46批, 教外司留[2013]693号); 河南省教育厅科学技术重点研究项目 (14A180025); 郑州市科技攻关项目 (20130857); 郑州轻工业学院博士基金项目 (2011BSJJ033); 郑州轻工业学院青年骨干教师资助计划项目 (2013QNGG02); 郑州轻工业学院研究生创新基金 (2014031)。

Jeffrey S^[8]研究发现,在老鼠食用的大豆中添加转基因成分后,老鼠的日常行为均出现异常,半数以上老鼠出生时或出生3周内死亡。因此,建立与推广现代检测技术,实现转基因食品快速、灵敏、特异、自动化检测,是保障食品安全的必要条件。由于传统PCR技术不能进行定量检测,且容易产生假阳性与假阴性结果,因此在转基因食品检测中受到了限制^[9]。相比之下,经改进的PCR衍生技术在转基因食品检测中具有明显优势^[9]。本文就植物源性转基因食品检测的PCR衍生技术进行简要综述。

1 多重PCR技术

多重PCR (multiplex PCR) 又称复合PCR,是由传统PCR技术发展而来,即将多条引物和多条模板DNA混合在同一个反应体系中,分别扩增不同的目的基因片段,或者多条引物和单一模板DNA混合在同一反应体系中扩增同一模板的不同目的基因片段,进行特异性检测。

利用多重PCR技术高通量的特点,能够对植物源性食品中转基因成分进行定性定量检测。对于单一源性食品的检测和通用性食品的检测,选用筛选基因启动子(CaMV35S启动子^[10-17]、Ubiquitin启动子^[11]、FMV35S启动子^[14])、筛选基因终止子(如NOS基因^[10-17])、内源基因(如大豆凝集素基因^[10,17]和肌动蛋白基因^[10,17]、水稻SPS基因^[11-12]、玉米zSSIb基因^[13]、油菜PEP基因^[14]、柑橘肌动蛋白基因^[15]、小麦UidA基因^[16])、品系特异性基因(EPSPS基因^[10,13]、BAR基因^[11-14,16]、PAT基因^[13-14])。为排除假阴性的检测结果,以宿主内部的特异性基因作为扩增内标(如大豆凝集素基因^[10,17]和肌动蛋白基因^[10,17])。利用报告基因(GUS基因^[12]、NPTII基因^[14])的表达产物标定目的基因进行筛选。

多重PCR技术灵敏度可达0.1%~0.9%,满足国际标准规定转基因食品1%检测底线的要求。该技术还具有操作简单、特异性强、稳定性好等优点。近年来,多重PCR检测技术涉及多种植物源性转基因食品,包括水稻^[10-12]、玉米^[10,13]、油菜^[10,14]、柑橘^[15]、小麦^[10,16]、大豆^[10,17]等。

2 实时荧光定量PCR技术

实时荧光定量PCR技术是由美国Applied Biosystems公司于1996年首先推出,其原理是在PCR指数扩增期间通过连续监测荧光信号出现的先后顺序以及信号强弱的变化实时分析目的基因的拷贝数目,再通过与加入已知量的标准样品比对,实现对未知样品即时定量的分析检测。

由于实时荧光定量PCR技术具有精确定量与高灵敏度的特点,广泛应用于植物源性转基因食品的检测。根据内源基因(如大豆凝集素基因^[18-20]、小麦UidA基因^[19,21]、水稻SPS基因^[20]、GOS基因^[22]与CpTI基因^[26-27]、油菜FatA基因^[19-20]、玉米zSSIb基因^[20,23-25])与品系特异性基因设计特异性引物与探针,验证内源基因的物种特异性与外源基因边界序列的品系特异性。通过标记荧光素(如FAM^[18-27])进行可视化定量检测。实时荧光定量PCR技术灵敏度高,可达0.01%~

0.1%。操作完全自动化,大幅减少假阳性结果。该技术还具有精确定量、重现性好、特异性强、快速的特点^[28]。目前,该技术涉及植物源性转基因食品的检测,包括大豆^[18-20]、油菜^[19-20]、小麦^[19,21]、水稻^[20,22,26-27]、玉米^[20,23-25]等。

3 多重实时荧光定量PCR技术

多重实时荧光定量PCR技术是结合高特异性的多重PCR技术与高灵敏度的实时荧光定量PCR的新技术。该技术是在精确度不高的普通实时荧光定量PCR体系中加入多条特异性引物,实现定性定量检测深加工食品样品中的转基因成分。

多重实时荧光定量PCR技术能够同时进行多个样品多个靶序列的高通量检测。利用植物源性转基因食品中最频繁使用的基因(如玉米^[29-32]、大豆^[29-32]、水稻^[30-32]、油菜^[30-32]、番茄^[30-33]、小麦^[31]、土豆^[31-32]、甜菜^[31-32]中的)内源基因,筛选基因启动子(如CaMV35S启动子^[29-34]、FMV35S启动子^[30-32])、筛选基因终止子(如NOS基因^[29-34])、品系特异性基因(如EPSPS基因^[29-32]、Cry1A基因^[29-32]、PAT基因^[30-31]、BAR基因^[30-32])与报告基因(如NPTII基因^[30-34])设计引物。扩增时选择长度相近、小于20拷贝的目标序列,G+C含量及熔解温度相近的引物^[29-32]。通过设置阳性与阴性对照,能够检测出样品间潜在的交叉污染,减少假阳性与假阴性的检测结果,大幅提高灵敏度与特异性^[29-32]。

多重实时荧光定量PCR技术能够实现90%以上的已知转基因成分的检测。该技术还具有稳定性好、可视化、快速的特点。目前,该技术涉及植物源性的转基因食品检测,包括玉米^[29-32]、大豆^[29-32]、水稻^[30-32]、油菜^[30-32]、番茄^[30-33]、小麦^[31]、土豆^[31-32]、甜菜^[31-32]等。

4 多重巢式PCR技术

巢式PCR技术原理是先对靶DNA进行第一次扩增,从第一次反应产物中取出少量作为第二次扩增的反应模板,第二次PCR引物与第一次反应产物的序列是互补关系,则第二次PCR扩增的产物即为目的产物。多重巢式PCR技术是结合了高灵敏度的巢式PCR技术与高特异性的多重PCR技术的新技术。该技术能够高通量检测多条基因片段。

传统巢式PCR技术只能进行单一基因检测(应用巢式PCR技术检测转基因小麦的SSP1-TIERFI基因^[25])。近年开发的多重巢式PCR技术利用植物源性转基因食品检测常用的内源基因(通用内标RBCL基因^[33-34]、大豆凝集素基因^[36-38])、品系特异性基因(EPSPS基因^[36-38]、BAR基因^[37-38]、PAT基因^[37-38]、Cry1A(b)基因^[37-38]、Cry2A(b)基因^[39])、报告基因(CaMV35S-CTP结合区域基因^[36]、EPSPS-NOS结合区域基因^[36]、NPTII基因^[39])与筛选基因(如P-35S启动子^[39]、NOS终止子^[39])、设计多条特异性引物,通过两轮扩增,进而实现高特异性的检出深加工食品中的转基因成分,灵敏度高达0.005%。筛选得到的植物源性转基因食品共有内标RBCL基因能够应用于混合食品体系的高通量检测^[33-34]。由于不同品种与不同品系中相同外源基因序列不完全相同,因此,利用转基因食品共有外源基因上的保守区域设计引物^[36-39]。

多重巢式PCR技术能够有效减少假阳性结果,灵敏度高。利用共有内标RBCL基因,能够大幅减少假阴性结果,提高检测效率。多重巢式PCR技术还具有特异性强、高通量等特点。目前,该技术应用涉及植物源性转基因食品包括小麦^[35]、大豆^[36-38]、水稻^[37-38]、玉米^[37-39]等。

5 多重PCR-DHPLC技术

DHPLC技术即变性高效液相色谱技术。多重PCR-DHPLC技术是利用HPLC技术原理,在非变性温度条件下,以多重PCR技术扩增出的不同分子量基因片段与缓冲液作为流动相,通过DNA分离柱、检测器,进而利用转换的数字信号实现定量分析的联用技术。

DHPLC技术是能够同时检测不同长度引物的扩增产物的新型基因分析技术。基于这一特点,该技术与能够在同管中扩增多个引物序列的多重PCR技术联用,能够达到高灵敏度、高特异性、高通量、快速、准确检测目的。应用于植物源性转基因食品的多重PCR-DHPLC技术,是针对内源基因和特异性外源基因进行克隆,利用构建成为的重组质粒提高检测的灵敏度与特异性^[40-41]。将重组质粒按照相同含量比例配对混合成质粒模板作为阳性质粒标准品,能够解决由于基因出现频次不同导致的多重PCR扩增困难的问题^[40]。PCR扩增后的产物不需纯化、不需电泳、不需使用有毒试剂溴化乙锭^[40-41]。经DHPLC技术分离得到的基因片段通过紫外检测或荧光检测进行定量分析^[40-41,44]。多重PCR-DHPLC技术能够同时检测数百个不同品种与不同品系的食品样本以及多组分的食品体系的转基因成分^[40-44]。

与传统凝胶电泳相比,DHPLC技术分离鉴定时间仅10~15 min,分辨率达1%。多重PCR-DHPLC技术具有灵敏度高、特异性强、自动化、快速、经济等特点。目前,该技术检测应用涉及植物源性转基因食品包括玉米^[40]、大豆^[41]、番茄^[42]、小麦^[43]、马铃薯^[44]等。

6 PCR-ELISA技术

PCR-ELISA技术是将PCR技术与ELISA相结合的联用技术。它的原理是以特异性探针诱捕PCR扩增产物,并在微孔板上运用ELISA原理,借助酶标抗体进行固相或液相杂交完成对扩增产物的定性与定量检测。

植物源性转基因食品的PCR-ELISA检测技术包括传统技术与改进技术。传统PCR-ELISA技术,是根据目的基因设计引物,利用PCR扩增获得的产物,进行电泳检测,再将产物连接入载体,转化为感受态细胞,进而通过两种方法定性检测(利用序列鉴定检测阳性产物^[45-47],或者利用从感受态细胞获得的重组蛋白酶切、电泳、PCR反应^[48-49]),最后将定性产物利用ELISA进行定量检测^[45-51]。改进的PCR-ELISA技术是针对待测特异性基因蛋白进行ELISA检测,将阳性样品的DNA提取、鉴定后进行PCR扩增,最后进行鉴定^[52-53]。两种PCR-ELISA技术都是利用前一种技术获得的阳性初筛产物,应用后一种技术进一步鉴定^[45-53]。PCR-ELISA检测技术中的PCR技术可进行如下改

进,如利用实时荧光定量PCR技术^[46,51,54]提高特异性,利用重组聚合酶扩增(RPA)^[46]提高精确度、实现快速温度循环,利用PCR技术与GUS活性检测的结合提高灵敏度^[47]。PCR-ELISA技术中的ELISA技术可进行如下改进,如利用比色免疫法^[46]、间接ELISA^[48]、商品化免疫检测试纸条^[49]、DAS-ELISA^[53]进行精确定量。

PCR-ELISA技术适用于定性与定量检测。该技术具有特异性强、灵敏度高、重现性好、高通量、快速的特点^[54]。目前,该技术应用涉及植物源性转基因食品包括玉米^[45-46,49,52-53]、大豆^[45-46,48]、油菜^[45,47]、花生^[46]、番茄^[46]、土豆^[50]、木瓜^[51]、水稻^[51]等。

7 多重PCR-毛细管电泳技术

毛细管电泳技术是以高压电场为驱动力,利用传统电泳的基本原理,结合气相色谱中毛细管柱的高分离度与高效液相色谱操作的自动化,以毛细管为分离通道,依据样品中各组分之间淌度和分配系数的不同进行高效、快速分离的液相分离技术。

多重PCR-毛细管电泳技术是结合高通量的多重PCR技术与高分离度的毛细管电泳技术的联用技术,适用于同时检测含有多种类、微量转基因成分的复杂食品体系^[55-58]。利用多重PCR-毛细管电泳技术与紫外可见光谱技术联用或对多重PCR体系进行荧光修饰,使检测结果可视化,大大缩短检测时间^[55-56]。改进的多重荧光PCR技术中,PCR扩增产物无需纯化,使用等量样品可得到比传统多重PCR-琼脂糖凝胶电泳技术更加清晰的电泳图谱,灵敏度高^[55]。基于激光诱导荧光检测器具有较好的聚焦性能与单色性的特点,利用该检测器作为毛细管电泳技术的检测器,与多重PCR-毛细管电泳技术联用,能够显著提高灵敏度,一次反应即可达到筛选、鉴定的目的^[57-58]。

与传统多重PCR-琼脂糖凝胶电泳技术相比,多重PCR-毛细管电泳技术应用于植物源性转基因食品的检测,具有高特异性、高灵敏度、高通量、可视化、快速、经济等特点。该技术应用涉及植物源性转基因食品包括玉米^[56-57]、大豆^[55,58]等。

8 数字PCR技术

数字PCR技术是利用PCR技术结合微流控或微滴化方法进行计数的核酸绝对定量技术。它的原理是将稀释后的核酸溶液分散至微反应器或微滴中,经PCR扩增后,含有目标DNA模板的反应器能够发出荧光信号,根据计算荧光反应的微反应器或微滴的数目进行定量检测。

应用于植物源性转基因食品检测的数字PCR技术,包括微滴数字PCR技术和微流控芯片数字PCR技术。微滴数字PCR技术是将预混合的PCR反应体系随机分散到数万至数十万个微滴中形成油包水的结构,扩增产物发出的荧光信号根据泊松分布公式进行计算,进而进行定量检测^[59-60]。微滴反应能够大幅度分散反应体系,有效降低抑制因子的作用,保证检测过程中的扩增效率,对于含有微量目标DNA的样品具有良好检测效果,适用于复杂食品体系与深加工食品中转基因成分的检测^[59-60]。微流控芯片技术是把各基本操作步骤集成到一块几平方厘米的芯片上

进行精确定量检测^[61-62]。相对于传统检测技术,微流控芯片技术能够检出实时荧光定量PCR技术无法检出的样品,灵敏度很高^[62]。

数字PCR技术能够精确定量,适用于复杂食品体系中低含量转基因目标序列成分的检测。该技术还具有灵敏度高、特异性强、微型化、自动化、快速、准确、经济等特点。目前,该技术应用涉及植物源性转基因食品包括玉米^[59-62]、大豆^[59-62]、水稻^[59-62]等。

9 结论

国内外食品安全形势严峻,食品安全事件频发,严重影响人民的身心健康与安全,植物源性转基因食品已对食品安全构成了潜在威胁。因此,建立精确实用、方便快捷的检测技术实现对植物源性转基因食品的安全监测、甄别与风险性评估,成为国内外植物源性食品安全研究领域的热点与难题。PCR衍生技术由于具有特异、灵敏、可重复性等优势,已广泛应用于植物源性转基因食品检测,对保障植物源性转基因食品安全起着至关重要的作用。然而,PCR衍生技术受到自动化、简便快捷、高通量等方面的局限性,在一定程度上限制了在植物源性转基因食品安全中的推广与应用。近年来,电化学纳米生物传感器、纳米金光学分子探针等技术在植物源性转基因食品检测中的应用,加速了植物源性转基因食品检测技术升级,对我国食品安全监管体系的建立以及植物源性转基因食品安全性的提升起到重大的推动与保障作用。总之,开发集高灵敏度、高特异性、高自动化、高通量、简便快捷、低成本为一体的定量检测手段将是今后植物源性转基因检测技术的发展趋势。

参考文献

[1] Bawa A, Anilakumar K. Genetically modified foods: safety, risks and public concerns—a review[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2013, 50(6): 1035–1046.

[2] 倪娜, 张智勇, 李国瑞, 等. 实时荧光定量PCR技术在转基因食品检测中的应用研究进展[J]. *内蒙古民族大学学报: 自然科学版*, 2013, 28(1): 64–70.

[3] 卢洁, 施向东, 莫祺红, 等. 转基因食品的安全问题与检测技术[J]. *现代预防医学*, 2008, 35(20): 3951–3953.

[4] Kramkowska M, Grzelak T, Czyżewska K. Benefits and risks associated with genetically modified food products[J]. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 2013, 20(1): 413–419.

[5] Qaim M, Kouser S. Genetically Modified Crops and Food Security[J]. *Plos One*, 2013, 8(6): 1–7.

[6] 王桂才. 转基因食品的安全性评价及检测技术进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2012, 33(5): 220–221.

[7] Mazza R, Soave M, Morlacchini M, et al. Assessing the Transfer of Genetically Modified DNA from Feed to Animal Tissues[J]. *Transgenic Research*, 2005, 14(5): 775–784.

[8] Jeffrey M Smith. Most Offspring Died When Mother Rats Ate Genetically Engineered Soy. Spilling the Beans[EB/OL]. <http://www.responsibletechnology.org>, 2005.

[9] 陈碧华, 张建伟, 王广印, 等. 转基因食品检测技术的应用

与发展 II. 检测技术的分类、比较、应用及检测步骤[J]. *食品科学*, 2008, 29(11): 705–711.

[10] 张平平, 刘宪华. 多重PCR方法对大豆转基因食品定性检测[J]. *食品科学*, 2004, 25(11): 227–230.

[11] 邱良焱, 肖有玉, 刘佳, 等. 多重PCR法检测转Bar、Bt基因双抗稻米[J]. *食品科学*, 2013, 34(6): 139–142.

[12] 魏霜, 陈贞, 芦春斌, 等. 多重PCR检测转基因水稻的转基因成分[J]. *食品科学*, 2013, 34(6): 139–142.

[13] 陈贞, 芦春斌, 杨梦捷, 等. 多重PCR检测转基因菜籽粕中的转基因成分[J]. *植物检疫*, 2011, 25(3): 35–38.

[14] Kim JH, Zhang DB, Kim HY. Detection of sixteen genetically modified maize events in processed foods using four event-specific pentaplex PCR systems[J]. *Food Control*, 2014, 35(1): 345–353.

[15] Wang XF, Chen XY, Xu JF, et al. Multiplex event-specific qualitative polymerase chain reaction for detecting three transgenic rice lines and application of a standard plasmid as a quantitative reference molecule[J]. *Analytical Biochemistry*, 2014, 464: 1–8.

[16] 陈明洁, 刘勇, 涂知明, 等. 多重PCR法快速鉴定转基因小麦植株及后代[J]. *华中科技大学学报: 自然科学版*, 2004, 32(9): 105–107.

[17] 吴影, 陆徐忠, 赵伟, 等. 多重PCR分析方法应用于转基因农作物的检测[J]. *安徽农业科学*, 2006, 34(7): 1297–1299.

[18] 焦新萍, 曾金红, 郑云峰, 等. 发酵豆制品中转基因成分的荧光定量PCR研究[J]. *食品研究与开发*, 2013, 34(13): 79–83.

[19] Chaouach M, Nab N, Hafsa A, et al. Monitoring of Genetically Modified Food and Feed in the Tunisian Market Using Qualitative and Quantitative Real-time PCR[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2014, 35(1): 345–353.

[20] 吴永彬, 肖维威, 张宝, 等. 转基因大豆、玉米、油菜和水稻品系特异性检测质粒标准分子的快速构建及应用[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2011, 27(8): 775–782.

[21] 段敏, 王梦娇. 实时定量PCR技术研究进展及其在小麦转基因检测中的应用[J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(10): 5808–5810.

[22] 陈文炳, 张冰, 王志纯, 等. 样品前处理对大米及米制品转基因成分荧光PCR检测结果的影响[J]. *检验检疫学刊*, 2013, 23(2): 27–31.

[23] 王凤军, 冯俊丽, 张祥林, 等. Taqman-MGB实时荧光PCR定量检测转基因玉米MON863[J]. *分析实验室*, 2012, 31(12): 5–8.

[24] 宋君, 雷绍荣, 郭灵安, 等. 实时荧光定量PCR检测转基因玉米NK603品系特异片段的测量不确定度[J]. *西南农业学报*, 2013, 26(5): 1769–1773.

[25] 袁磊, 孙红炜, 李凡, 等. 以实时荧光定量PCR技术检测转基因玉米MON 88017[J]. *作物学报*, 2011, 37(11): 2117–2121.

[26] 黄新, 张琰, 侯立华, 等. 转基因水稻“科丰6号”实时荧光PCR定性定量检测方法研究[J]. *生物技术通报*, 2010(2): 90–93.

[27] Nakamura K, Akiyama H, Kawano N, et al. Evaluation of real-time PCR detection methods for detecting rice products contaminated by rice genetically modified with a CpTI-KDEL-T-nos transgenic construct[J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(3):

2618-2624.

- [28] 胡金强,雷俊婷,詹丽娟,等. 食源性微生物的分子生物学检测方法的研究进展[J]. 郑州轻工业学院学报:自然科学版, 2014,29(3):7-11.
- [29] Fang C, Ping S, Dabing Z, et al. Improved quantification accuracy for duplex real-time PCR detection of genetically modified soybean and maize in heat processed foods[J]. Journal of Shanghai Normal University(Natural Sciences), 2013,42(2): 197-205.
- [30] Huber IC, Block A, Sebah D, et al. Development and Validation of Duplex, Triplex, and Pentaplex Real-Time PCR Screening Assays for the Detection of Genetically Modified Organisms in Food and Feed[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(43): 10293-10301.
- [31] 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.
- [32] Dörries HH, Remus I, Grönwald A, et al. Development of a qualitative, multiplex real-time PCR kit for screening of genetically modified organisms (GMOs)[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010, 369(6): 2043-2054.
- [33] Wang FJ, Zhang XL, Feng JL, et al. Establishment of a quadruplex real-time PCR for screening of genetically modified tomatoes[J]. European Food Research and Technology, 2014, 238(4): 683-690.
- [34] Ballari RV, Martin A, Gowda LR. Detection and identification of genetically modified EE-1 brinjal (Solanum melongena) by single, multiplex and SYBR[®] real-time PCR[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2013, 93(2): 340-347.
- [35] 庄洪涛,张学文,张增艳. 巢式PCR检测转基因小麦的研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(19): 9991-9992.
- [36] 张明辉,高学军,于艳波,等. 三重巢式PCR技术检测抗草甘膦转基因大豆深加工产品[J]. 农业生物技术学报, 2006, 14(5): 752-756.
- [37] Ao JX, Li QZ, Gao XJ, et al. A multiplex nested PCR assay for the simultaneous detection of genetically modified soybean, maize and rice in highly processed products[J]. Food Control, 2011, 22(10): 1617-1623.
- [38] 敖金霞,高学军,于艳波,等. 转基因大豆、玉米、水稻深加工产品的五重巢式PCR技术检测[J]. 中国农业大学学报, 2010, 15(2): 93-99.
- [39] Kamle S, Kumar A, Bhatnagar RK. Development of multiplex and construct specific PCR assay for detection of cry2Ab transgene in genetically modified crops and product[J]. GM Crops, 2011, 2(1): 74-81.
- [40] 吴静,李铁柱,孙瑶,等. 应用PCR-DHPLC技术高通量快速检测转基因玉米[J]. 玉米科学, 2012, 20(5): 40-44.
- [41] 陶然,郭顺堂. 应用MPCR-DHPLC技术检测转基因大豆及其食品[J]. 大豆科学, 2012, 31(6): 976-979.
- [42] 白月,才华,栾凤侠,等. 多重PCR结合DHPLC方法检测番茄中转基因成分[J]. 作物杂志, 2011(2): 28-31.
- [43] 白月,栾凤侠,王珣,等. 多重PCR结合变性高效液相色谱技术转基因小麦检测方法的建立[J]. 麦类作物学报, 2011, 31(4): 577-581.
- [44] 白月,栾凤侠,高宏伟. 应用多重PCR-DHPLC方法快速检测转基因马铃薯及EH92-527-1品系鉴定[J]. 中国马铃薯, 2011, 25(3): 129-134.
- [45] Guertler P, Paul V, Albrecht C, et al. Sensitive and highly specific quantitative real-time PCR and ELISA for recording a potential transfer of novel DNA and CryIAb protein from feed into bovine milk[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009, 393(6): 1629-1638.
- [46] Santiago-Felipe S, Tortajada-Genaro LA, Puchades R, et al. Recombinase polymerase and enzyme-linked immunosorbent assay as a DNA amplification-detection strategy for food analysis[J]. Analytica Chimica Acta, 2014, 811: 81-87.
- [47] 吴玉俊,许文钊,吴拥军,等. 转ChIFN- γ 基因油菜植株的建立[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2013, 29(5): 490-495.
- [48] 王硕,董峰,杜欣军,等. 草甘膦抗性基因的重组表达及ELISA检测方法的初步建立[J]. 食品科技, 2010, 35(8): 39-43.
- [49] 巴超杰,薛静,陈绪清,等. 利用花青素可视化跟踪表达系统快速筛选表达Cry1Ab/c基因的转基因玉米[J]. 植物学报, 2013, 48(1): 59-64.
- [50] Vanegas Araujo PN, Blanco Martinez JT, Chaparro-giraldo A. Expresión de la proteína Cry1Ac en tejidos de líneas transgénicas de papa (Solanum tuberosum spp. Andígena) Var. Diacol capiro[J]. Acta biológica colombiana, 2010, 15(2): 101-114.
- [51] Kyrova V, Ostry V, Laichmannova L, et al. An occurrence of genetically modified foodstuffs on the Czech food market[J]. Acta Alimentaria, 2010, 39(4): 387-396.
- [52] Ma BL, Subedi K, Evenson L, et al. Evaluation of detection methods for genetically modified traits in genotypes resistant to European corn borer and herbicides[J]. Journal of Environmental Science and Health, 2005, 40(4): 633-644.
- [53] Galeano P, Debat CM, Ruibal F, et al. Cross-fertilization between genetically modified and non-genetically modified maize crops in Uruguay[J]. Environmental Biosafety Research, 2010, 9(3): 147-154.
- [54] 胡金强,雷俊婷,詹丽娟,等. 免疫学技术在食源性微生物检测中的应用综述[J]. 食品工业, 2014, 35(7): 201-204.
- [55] Basak S, Ehtesham NZ, Sesikeran B, et al. Detection and Identification of Transgenic Elements by Fluorescent-PCR-Based Capillary Gel Electrophoresis in Genetically Modified Cotton and Soybean[J]. Journal of AOAC International, 2014, 97(1): 159-165.
- [56] 张春娇,许文涛,程国灵,等. 转基因玉米的多重PCR-毛细管电泳紫外检测技术研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(2): 328-333.
- [57] 周颖,黎源倩,裴晓方. 转基因玉米的多重PCR-毛细管电泳-激光诱导荧光检测方法研究[J]. 高等学校化学学报, 2007, 28(8): 1458-1463.
- [58] Zhou Y, Li Y, Pei X. Determination of genetically modified soybean by multiplex PCR and CGE with LIF detection[J]. Chromatographia, 2007, 66(9): 691-696.
- [59] 朱鹏宇. 利用微滴数字PCR定量检测食品或饲料样品[J].

(下转第388页)

