

## 5 种转基因油菜转化体特异性 多重 PCR 检测方法

鲁 军<sup>1,2</sup>, 李 刚<sup>1</sup>, 赵建宁<sup>1</sup>, 杨殿林<sup>1</sup>, 修伟明<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>农业部环境保护科研监测所, 农业部产地环境质量重点实验室/天津市农业环境与农产品安全  
重点实验室/天津市农田生态与环境修复技术工程中心, 天津 300191;

<sup>2</sup>沈阳农业大学植物保护学院, 辽宁 沈阳 110866

**摘要:** 【目的】全球转基因植物及其产品的数量和种类越来越多, 迫切需要可同时精准高效检测多个转化载体的检测方法。【方法】针对 RF1、MS8、Topas19/2、Oxy235 和 RF3 等 5 个转基因油菜品系的侧翼序列及油菜内源基因 *cruciferinA* (*CruA*) 序列设计多重聚合酶链式反应特异性引物, 通过对转基因油菜、转基因大豆、转基因玉米、转基因水稻、转基因棉花等不同作物进行 PCR 扩增来测试所选择的引物特异性, 优化多重 PCR 反应引物的浓度, 用所建立的检测体系对不同混合比例的转基因油菜进行多重 PCR 扩增来测试所建立的检测方法的灵敏度。【结果】通过测试, 仅在含有目标样品中检测出阳性结果, 灵敏度达 0.05%, 表明所建立的 6 重 PCR 检测方法可同时精准检测 RF1、MS8、Topas19/2、Oxy235 和 RF3 等 5 种转基因油菜转化载体。【结论】所建立的 6 重转基因油菜转化体特异性 PCR 检测方法通量高、特异性好、灵敏度高, 符合有关转基因产品检测的要求, 可作为转基因油菜检测的有效方法。

**关键词:** 多重 PCR; 转基因油菜; 转化载体特异性

## Event-specific multiplex PCR detection method for five genetically modified canola lines

LU Jun<sup>1,2</sup>, LI Gang<sup>1</sup>, ZHAO Jianning<sup>1</sup>, YANG Dianlin<sup>1</sup>, XIU Weiming<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Original Agro-Environment Quality of Ministry of Agriculture/Tianjin Key Laboratory of Agro-Environment and Agro-Product Safety/Tianjin Engineering Research Center of Agricultural Ecological & Environmental Remediation, Agro-Environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture, Tianjin 300191, China; <sup>2</sup>College of Plant Protection, Shenyang Agriculture University, Shenyang, Liaoning 110866, China

**Abstract:** 【Aim】 With the increased number and variety of genetically modified (GM) plants and their derived products in the world, detection methods that can efficiently detect multiplex transformation vector simultaneously become increasingly important. 【Method】 Based on flanking sequences of five GM canola line (RF1, MS8, Topas19/2, Oxy235 and RF3) and endogenous reference gene *cruciferinA* (*CruA*) for canola, event-specific primers were designed. To analyze specificity and sensitivity of primers, GM canola lines, GM soybean lines, GM maize lines, GM rice lines and GM cotton lines were amplified by single PCR and different DNA concentrations of GM canola were amplified by multiplex PCR. 【Result】 The developed 6×multiplex PCR assay could specifically detect five canola lines, RF1, MS8, Topas19/2, Oxy235 and RF3. The sensitivity of multiplex PCR detection was 0.05%. 【Conclusion】 The developed 6×multiplex PCR system has high efficiency, specificity and sensitivity, and could meet the requirements of transgenic component detection. All these results suggested the developed multiplex PCR system could be applied in GM canola detection.

**Key words:** multiplex polymerase chain reaction; genetically modified (GM) canola; event-specific

收稿日期 (Received): 2017-02-14 接受日期 (Accepted): 2017-04-08

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(农业部环境保护科研监测所); 国家自然科学基金(31200424)

作者简介: 鲁军, 男, 硕士研究生。研究方向: 转基因成分检测技术。E-mail: syaulujun@163.com

\* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: xiuweiming@caas.cn

1996—2015年,全球转基因作物累计种植面积达到20亿 $\text{hm}^2$ ,其中26种转基因作物、363个转化体获得批准种植和进口用于粮食或饲料(James, 2015)。转基因作物的大规模种植给人类带来了巨大的经济收益和环境收益,如减少广谱化学农药的使用量,增加农民收入,改善生态环境,提高农产品质量等(杨艳等,2014)。但其引发的环境与食品安全问题也备受社会关注(雒珺瑜等,2014)。当前迫切需要建立简便、快速、高效、准确的转基因植物及其产品的身份识别及检测技术,加强对转基因作物及其产品的安全监管,切实贯彻标识制度,保护转基因品种的产权,维护广大消费者的知情权和选择权(Forte *et al.*, 2005; Gachet *et al.*, 1999)。

油菜籽是重要的食用植物油原料来源和饲料蛋白源。2015年,转基因油菜种植面积占全球转基因作物种植面积的5%(1亿 $\text{hm}^2$ )(James, 2015)。我国是最大的油菜籽进口国,进口量约占全球油菜籽进口总量的一半以上。我国已经批准用作进口加工原料的转基因油菜有GT73、Topas19/2、T45、MS1、MS1×RF1、MS1×RF2、MS1×RF3、Oxy235、MS8×RF3、RF1、RF2等(<http://www.isaaa.org/gmap-provaldatabase/>)。据中国海关总署发布的月度统计数据显示,2016年1—5月,中国油菜籽进口总量为173万t,2016年9月,进口菜籽油5.8万t,同比增加119.28%。

转基因生物检测中,转化载体特异性检测由于其检测的目的片段是外源插入基因和宿主DNA之间的连接区域,故比单纯基因特异性检测和构建特异性检测具有更高的特异性(Holst-Jensen, 2009; Yang *et al.*, 2007a)。转化载体特异性PCR已经被广泛应用于转基因生物身份识别和验证检测过程中(Kim *et al.*, 2014; Zhang & Guo, 2011)。

定性PCR检测是转基因成分检测中最常用的方法,对于转基因产品没有要求进行定量标识的我国来说更是重要的检测手段。目前,转基因油菜GT73、MS1×RF1、MS1×RF2、MS8×RF3和Topas19/2都建立了转化载体定性PCR检测方法(Akiyama *et al.*, 2010; Demeke & Ratnayaka, 2008; Kim *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2007, 2008, 2009; Yang *et al.*, 2007b)。随着转基因油菜转化载体越来越多,迫切需要可同时检测多转化载体的高效检测技术。

多重PCR(multiplex PCR)又称复合PCR,由传

统PCR技术发展而来,涉及多种植物源性转基因食品(胡金强等,2015),但多数都是针对通用元件和基因特异性进行检测,缺乏特异性更好的转化载体层面的研究。与单重检测方法相比,多重检测具有成本低、通量高、节省实验样品和药品等优点(Kim *et al.*, 2014; Samson *et al.*, 2013)。本研究的目的是建立一种可同时高效检测RF1、MS8、Topas19/2、Oxy235、RF3等转基因油菜转化载体的多重PCR检测方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

转基因油菜(RF1、MS8、Topas19/2、RF3、RF2、T45)和非转基因油菜样品购自美国石油化学家学会(AOCS);转基因油菜(Oxy235)、转基因玉米(Bt11、MON810)、转基因水稻(TT51-1、KF-6)、转基因大豆(GTS 40-3-2、MON89788)和转基因棉花(MON1445、MON531)样品为本实验室保存样品。

Taq聚合酶、dNTPs、10×PCR buffer(含 $\text{Mg}^{2+}$ )、50 bp DNA Ladder、6×Loading Buffer购自大连宝生物工程有限公司,其他试剂及耗材购自鼎国昌盛生物技术有限公司。

### 1.2 仪器与设备

5417型高速离心机(德国Eppendorf公司);NANODROP 2000型超微量分光光度计(美国Thermo公司);Thermal Cycler C1000型梯度PCR仪(美国Bio-Rad公司);Gel Doc XR+凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司)。

### 1.3 DNA提取

采用国家标准《转基因植物及其产品成分检测DNA提取和纯化》(金莞军等,2016)提取油菜基因组DNA和其他样品基因组DNA。用NANODROP 2000型超微量分光光度计测定提取的基因组DNA浓度。根据琼脂糖凝胶电泳和DNA在260 nm/280 nm和260 nm/230 nm紫外波长下的吸光度来判定提取DNA的质量。

### 1.4 引物设计

多重PCR引物序列见表1。选择油菜*cruciferinaA*(*CruA*)基因作为内标准基因(卢长明等,2016a),转基因油菜MS8引物(MS8-F/R)和RF3引物(RF3-F/R)来自国家标准农业部869号公告-5-2007(卢长明等,2016b)。转基因油菜RF1引物(RF1-F/R)、Topas19/2引物(Topas19/2-F/R)、

Oxy235 引物 (Oxy235-F/R) 分别根据 GenBank 核酸数据库的边界序列信息 EU090199.1、EU124676.1 和 EU099579.1, 采用 Oligo V7.0 软件进行设计和分析。

表 1 多重 PCR 引物

Table 1 Primer pairs for multiplex PCR

引物 Primer	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	靶标 Target	扩增长度 Length of amplification/bp	参考 References
RF1-F	GAATTGGCCTGTAGACCTCA	RF1	125	本研究 This research
RF1-R	TTCCATCTTTTCGGTGAC			
MS8-F	CCTTTTCTTATCGACCATGTA	MS8	159	卢长明等, 2016b
MS8-R	AATTTTAAAAAATTGTGGGATGCT			
Topas19/2-F	ATAATGGTTTCTGACGTATGTGCTT	Topas	198	本研究 This research
Topas19/2-R	CCTTCGGCCTTAATCCAC			
Oxy235-F	GAATTGGCCTGTAGACCTCA	Oxy235	263	本研究 This research
Oxy235-R	TTCATCCCGACAAGGTCCC			
RF3-F	CAATAACTTTGTGGCTTATGG	RF3	284	卢长明等, 2016b
RF3-R	CTCGTCTCGGACCTCCGAAAACC			
CruA-F	GGCCAGGGTTTCCGTGAT	CruA	101	卢长明等, 2016a
CruA-R	CCGTCGTTGTAGAACCATTGG			

## 1.5 PCR 反应条件

实验使用 Thermal Cycler C1000 型梯度 PCR 仪。采用传统单重 PCR 测试引物的特异性, 反应体系包括 2.5  $\mu\text{L}$  10 $\times$ buffer、200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTP、1.5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ 、0.65 units Taq 酶、引物终浓度 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、50 ng 基因组 DNA, ddH<sub>2</sub>O 补至 25  $\mu\text{L}$ 。多重 PCR 反应体系 (25  $\mu\text{L}$ ) 为 2.5  $\mu\text{L}$  10 $\times$ buffer、200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTP、1.5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$  和 1.5 units Taq 酶, 100 ng 基因组 DNA。

PCR 反应条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 min; 40 次循环扩增反应 (94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 58  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s); 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。取 PCR 产物 10  $\mu\text{L}$  于含有 0.5  $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  EB 的 3% 琼脂糖凝胶电泳检测分析。

## 1.6 灵敏度实验

为了评估所建立的多重 PCR 检测方法的检测限 (LOD), 将非转基因油菜的 DNA 与含 RF1、MS8、Topas19/2、Oxy235、RF3 等不同转化载体转基因油菜的 DNA 进行充分混合, 使每个转化载体的转基因油菜在混合体系中所占质量比分别为 10%、5%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、0.01%。

## 2 结果与分析

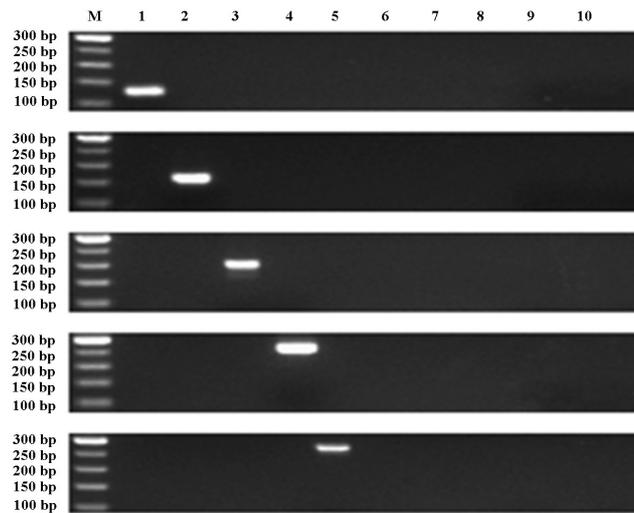
### 2.1 引物特异性

根据 5 个转基因油菜转化载体 (RF1、MS8、Topas19/2、Oxy235、RF3) 特异性序列建立多重 PCR 检测方法。由于在加工过程中油菜基因组有可能遭到破坏, 因此设计多重 PCR 引物时, 扩增片段最

好不大于 300 bp (李飞武等, 2016)。为了评价和验证所建立的检测体系中引物的特异性, 选取不同转化载体的转基因油菜、转基因大豆、转基因玉米、转基因水稻、转基因棉花等转基因作物提取基因组 DNA 进行传统 PCR 验证。结果表明, 仅在含有目的转化载体的转基因油菜中获得了预期的扩增产物: 转化载体 RF1 的 5' 端侧翼序列扩增片段大小为 125 bp, 转化载体 MS8 的 5' 端侧翼序列扩增片段大小为 159 bp, 转化载体 Topas19/2 的 3' 端侧翼序列扩增片段大小为 198 bp, 转化载体 Oxy235 的 3' 端侧翼序列扩增片段大小为 263 bp, 转化载体 RF3 的 5' 端侧翼序列扩增片段大小为 284 bp (图 1)。PCR 扩增产物经克隆回收后送生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行了 4 次测序验证 (图 2)。

### 2.2 多重 PCR 反应条件和引物浓度优化

在多重 PCR 反应体系中, 为了确保同时扩增多个目的 DNA 序列的特异性和灵敏性并且避免引物间出现交叉反应, 引物的设计至关重要 (Lee *et al.*, 2014)。假如每个引物的扩增效率一致, 则短片段的扩增引物的浓度要低于大片段的扩增引物, 但在实际选择中, 每个引物的扩增效率不可能完全一致。为了使不同引物对在同一 PCR 反应体系中具有很好的特异性和相近的扩增效率, 需要将所用引物的浓度进行最优化处理 (Demeke & Ratnayaka, 2008)。



M: 50 bp DNA ladder; 1: RF1; 2: MS8; 3: Topas19/2; 4: Oxy235; 5: RF3; 6: 转基因玉米混合物 (Bt11、MON810); 7: 转基因大豆混合物 (GTS 40-3-2、MON89788); 8: 转基因水稻混合物 (TT51-1、KF-6); 9: 转基因棉花混合物 (MON1445、MON531); 10: 转基因油菜 (RF2、T45)。

M: 50 bp DNA ladder; 1: RF1; 2: MS8; 3: Topas19/2; 4: Oxy235; 5: RF3; 6: GM maize (Bt11, MON810); 7: GM soybean (GTS40-3-2, MON89788); 8: GM rice (TT51-1, KF-6); 9: GM cotton (MON1445, MON531); 10: GM canola (RF2, T45).

图 1 引物特异性分析

Fig.1 Analysis of the specificity of primers designed for multiplex PCR



A: 转基因油菜 RF1 的 5'边界序列, PCR 产物大小 125 bp; B: 转基因油菜 MS8 的 5'边界序列, PCR 产物大小 159 bp; C: 转基因油菜 Topas19/2 的 3'边界序列, PCR 产物大小 198 bp; D: 转基因油菜 Oxy235 的 3'边界序列, PCR 产物大小 263 bp; E: 转基因油菜 RF3 的 5'边界序列, PCR 产物大小 284 bp; 划横线部分代表引物位置, 阴影部分代表油菜基因组部分序列。

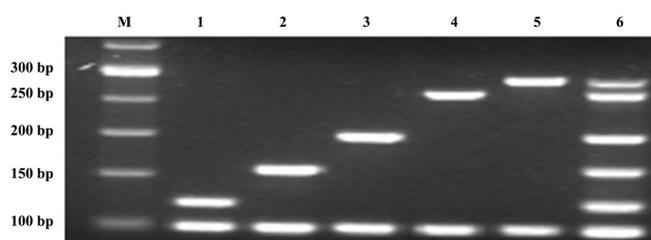
A: 5'flanking sequences of RF1, the PCR product is 125 bp; B: 5'flanking sequences of MS8, the PCR product is 159 bp; C: 3'flanking sequences of Topas19/2, the PCR product is 198 bp; D: 3'flanking sequences of Oxy235, the PCR product is 263 bp; E: 5'flanking sequences of RF3, the PCR product is 284 bp. The primers are underlined. The canola genome sequence is shaded.

图 2 转基因油菜边界序列

Fig.2 Flanking sequences of the transferred DNA flanking region and the inserted region of the GMO genome from five GM canola PCR products

考虑上述因素,多组引物对的长度和溶解温度必须相似(Kwon *et al.*, 2014)。对多重 PCR 反应体系中的引物终浓度从  $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  到  $1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  逐级进行筛选。通过优化,  $25 \mu\text{L}$  多重 PCR 反应体系

中的 6 对引物 CruA-F/R、RF1-F/R、MS8-F/R、Topas19/2-F/R、Oxy235-F/R 和 RF3-F/R 的终浓度分别为  $0.1$ 、 $1.0$ 、 $0.8$ 、 $0.24$ 、 $1.0$  和  $0.72 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (图 3)。



M: 50 bp DNA ladder; 1: CruA 和 RF1; 2: CruA 和 MS8; 3: CruA 和 Topas19/2; 4: CruA 和 Oxy235; 5: CruA 和 RF3; 6: RF3、Oxy235、Topas19/2、MS8、RF1 和 CruA。

M: 50 bp DNA ladder; 1: CruA and RF1; 2: CruA and MS8; 3: CruA and Topas19/2; 4: CruA and Oxy235; 5: CruA and RF3; 6: RF3, Oxy235, Topas19/2, MS8, RF1 and CruA.

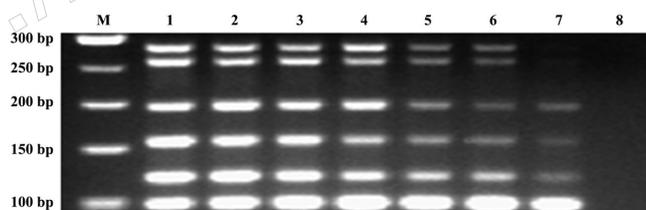
图 3 转基因油菜的多重 PCR 扩增

Fig.3 Multiplex PCR amplified from GM canola lines

### 2.3 多重 PCR 检测灵敏度

用非转基因油菜基因组 DNA 稀释 5 个不同转化载体转基因油菜的基因组 DNA,充分混匀,制备成质量分数为 10%、5%、1%、0.5%、0.1%、0.05% 和 0.01% 等一系列基因组 DNA 模板。在多重 PCR 反应中,使用 100 ng 基因组 DNA 作为模板,PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳分析结果显示,所建立的多重 PCR 在 0.01% 水平也可检出,但转化体 RF3 和

Oxy235 条带非常弱,而在 0.05% 水平各 PCR 扩增条带清晰可见,且可稳定检出,故所建立转基因油菜多重 PCR 检测方法的检测限为 0.05% (图 4)。假设一个油菜的单倍体基因组约 1.3 pg,大约相当于 38 个油菜单倍体基因组拷贝 (Oguchi *et al.*, 2010)。与先前的报道 (Kim *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2016; Oguchi *et al.*, 2010) 相比,这个检测限的结果在转基因油菜的检测分析上可以被接受。



M: 50 bp DNA ladder; 1~7: 转基因油菜 RF1、MS8、Topas19/2、Oxy235、RF3 DNA 混合物: 10%、5%、1%、0.5%、0.1%、0.05% 和 0.01%; 8: 非转基因油菜。

M: 50 bp DNA ladder; 1~7: 10%, 5%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05% and 0.01% of a mixture of GM canola lines (RF1, MS8, Topas19/2, Oxy235 and RF3); 8: Non-GM canola.

图 4 多重 PCR 的最低检测限分析

Fig.4 LOD analysis of the multiplex PCR

## 3 结论

转化载体特异性检测是转基因植物及其产品检测中最准确和最特异的检测方法,也是国际普遍采用的方法。多重 PCR 技术因其特异性好、效率高、成本低的优势,已在转基因成分检测的各个领域得到应用(白卫滨等, 2016; 邱良焱等, 2013; 张明哲等, 2016)。本研究针对转基因油菜的不同转化载体特异性序列设计了多对引物,通过筛选引物,优化检测体系,最终建立了一个可在同一 PCR

体系中检测转基因油菜 RF1、MS8、Topas19/2、Oxy235、RF3 等 5 种不同转化载体和一个内参基因的 6 重 PCR 检测方法。所建立的多重 PCR 特异性好,在其他转化载体转基因油菜、转基因大豆、转基因玉米、转基因水稻、转基因棉花品系没有预期扩增。每个转化载体的检测限达 0.05%,完全符合欧盟有关转基因产品标识的要求。本方法的建立可作为快速检测多种转基因油菜转化载体的有效方法,对转基因油菜的安全监管具有重要意义。

## 参考文献

- 白卫滨, 李宵, 朱翠娟, 文罗娜, 王丽芳, 卢军利, 欧仕益, 孙健霞, 2016. 通用引物多重PCR新技术对番木瓜转基因成分检测的研究. *现代食品科技*, 32(4): 229-234.
- 胡金强, 雷俊婷, 孙新城, 景建洲, 章银良, 董彩文, 高辉, 耿尧, 姜春鹏, 2015. 植物源性转基因食品PCR衍生技术研究进展. *食品工业科技*, 36(22): 379-383, 388.
- 金芫军, 沈平, 张秀杰, 彭于发, 宋贵文, 黄昆仑, 张大兵, 宛煜嵩, 2016. 转基因植物及其产品成分检测DNA提取和纯化. 北京: 中国农业出版社.
- 李飞武, 沈平, 李葱葱, 宋贵文, 龙丽坤, 闫伟, 夏蔚, 邢珍娟, 邵改革, 王永, 徐俊峰, 陈笑云, 张明, 2016. 农业部2259号公告-4-2015. 转基因植物及其产品成分检测定性PCR方法制定指南. 北京: 中国农业出版社.
- 卢长明, 刘信, 武玉花, 吴刚, 沈平, 杨立桃, 张大兵, 2016a. 转基因植物及其产品成分检测油菜内标准基因定性PCR方法. 北京: 中国农业出版社.
- 卢长明, 武玉花, 宋贵文, 吴刚, 肖玲, 沈平, 连庆, 2016b. 转基因植物及其产品成分检测抗除草剂油菜MS8、RF3及其衍生品种定性PCR方法. 北京: 中国农业出版社.
- 雒珺瑜, 张帅, 吕丽敏, 王春义, 朱香镇, 李春花, 崔金杰, 2014. 转Cry1Ac+Cry2Ab棉花生长势及其对棉田节肢动物物种丰富度的影响. *生物安全学报*, 23(4): 256-264.
- 邱良焱, 肖有玉, 刘佳, 宋尚新, 肖红梅, 索娜, 王於建, 王雪强, 2013. 多重PCR法检测转Bar、Bt基因双抗稻米. *食品科学*, 34(6): 139-142.
- 杨艳, 李云河, 曹凤勤, 程立生, 彭于发, 2014. 转Bt基因抗虫作物对鳞翅目非靶标昆虫生态影响的研究进展. *生物安全学报*, 23(4): 224-237.
- 张明哲, 张晓峰, 徐莉莉, 陈笑梅, 周圆, 尹文秀, 陈吴健, 李孝军, 2016. 复合PCR荧光检测方法检测转基因水稻品系. *食品科学*, 37(20): 187-190.
- AKIYAMA H, MAKIYAMA D, NAKAMURA K, NOBUHIRO S, MINEGISHI Y, MANO J, KITTA K, OZEKI Y, TESHIMA R, 2010. A novel detection system for the genetically modified canola (*Brassica rapa*) line RT73. *Analytical Chemistry*, 82(23): 9909-9916.
- DEMEKE T, RATNAYAKA I, 2008. Multiplex qualitative PCR assay for identification of genetically modified canola events and real-time event-specific PCR assay for quantification of the GT73 canola event. *Food Control*, 19(9): 893-897.
- FORTE V T, DI PINTO A, MARTINO C, TANTILLO G M, GRASSO G, SCHENA F P, 2005. A general multiplex-PCR assay for the general detection of genetically modified soy and maize. *Food Control*, 16(16): 535-539.
- GACHET E, MARTIN G G, VIGNEAU F, MEYER G, 1999. Detection of genetically modified organism (GMOs) by PCR: a brief review of methodologies available. *Trends in Food Science and Technology*, 9(11/12): 380-388.
- HOLST-JENSEN A, 2009. Testing for genetically modified organisms (GMOs): past, present and future perspective. *Biotechnology Advances*, 27(6): 1071-1082.
- JAMES C, 2015. 20th anniversary (1996 to 2015) of the global commercialization of biotech crops and biotech crop highlights in 2015. Ithaca, NY: ISAAA Brief.
- KWON J Y, HONG J S, KIM M J, CHOI S H, MIN B E, SONG E G, KIM H H, RYU K H, 2014. Simultaneous multiplex PCR detection of seven cucurbit-infecting viruses. *Journal of Virological Methods*, 206(15): 133-139.
- KIM J H, JEONG D, KIM Y R, KWON Y K, RHEE G S, ZHANG D B, KIM H Y, 2013. Development of a multiplex PCR method for testing six GM soybean events. *Food Control*, 31(2): 366-371.
- KIM J H, SONG H S, KIM D H, KIM H Y, 2006. Quantification of genetically modified canola GT73 using TaqMan real-time PCR. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(11): 1778-1783.
- KIM J H, ZHANG D, KIM H Y, 2014. Detection of sixteen genetically modified maize events in processed foods using four event-specific pentaplex PCR systems. *Food Control*, 35(1): 345-353.
- LEE N, KWON K Y, OH S K, CHANG H J, CHUN H S, CHOI S W, 2014. A multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* in Korean ready-to-eat food. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11(7): 574-580.
- LU J, JI G Z, LI G, WU Y F, YANG J, LIN S L, YANG D L, ZHAO J N, XIU W M, 2016. Development of a multiplex event-specific PCR assay for detection of genetically modified rice. *Cereal Research Communications*, 44(1): 47-56.
- OGUCHI T, ONISHI M, MANO J, AKIYAMA H, TESHIMA R, FUTO S, FURUI S, KITTA K, 2010. Development of multiplex PCR method for simultaneous detection of four events of genetically modified maize: DAS-59122-7, MIR604, MON863 and MON88017. *Food Hygiene and Safe-*

- ty Science*, 51(3): 92–100.
- SAMSON M C, GULLÍ M, MARMIROLI N, 2013. Multiplex real-time PCR assays for simultaneous detection of maize MON810 and GA21 in food samples. *Food Control*, 30(2): 518–525.
- WU Y H, WU G, XIAO L, LU C M, 2007. Event-specific qualitative and quantitative PCR detection methods for transgenic rapeseed hybrids MS1 × RF1 and MS1 × RF2. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(21): 8380–8389.
- WU G, WU Y H, XIAO L, LU C M, 2008. Event-specific qualitative and quantitative polymerase chain reaction methods for detection for genetically modified rapeseed Ms8 × RF3 based on the right border junctions. *Journal of AOAC International*, 91(1): 143–151.
- WU G, WU Y H, XIAO L, LU C M, 2009. Event-specific qualitative and quantitative PCR detection of genetically modified rapeseed Topas 19/2. *Food Chemistry*, 112(1): 232–238.
- YANG L T, GUO J C, PAN A H, ZHANG H B, ZHANG K W, WANG Z M, ZHANG D, 2007a. Event-specific quantitative detection of nine genetically modified maizes using one novel standard reference molecule. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(1): 15–24.
- YANG R, XU W T, LUO Y B, GUO F, LU Y, HUANG K L, 2007b. Event-specific qualitative and quantitative PCR detection of roundup ready event GT73 based on the 3'-integration junction. *Plant Cell Reports*, 26(10): 1821–1831.
- ZHANG D, GUO J, 2011. The development and standardization of testing methods for genetically modified organisms and their derived products. *Journal of Integrative Plant Biology*, 53(7): 539–551.

(责任编辑:郭莹)

<http://www.jbscn.org>