

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.20240022

转基因抗虫玉米浙大瑞丰 8 实时荧光 定量 PCR 检测方法

田 锦^{1,2}, 句荣辉², 蒋红叶¹, 陈子言¹, 张 华¹, 李凌燕², 孙 宇^{1,3}, 王颢潜¹, 陈 红^{1*}, 梁晋刚^{1*}

¹农业农村部科技发展中心, 北京 100176; ²北京农业职业学院, 北京 102442;

³上海市农业科学院, 上海 201106

摘要:【目的】转基因抗虫玉米浙大瑞丰 8 是杭州瑞丰生物科技有限公司研发的新型抗虫玉米, 于 2021 年获批农业转基因生物安全证书(生产应用)。本研究旨在为转基因抗虫玉米浙大瑞丰 8 设计特异性扩增引物和 TaqMan 探针, 并对其转化体成分进行定量检测, 为管理部门提供安全监管的依据。【方法】通过体系优化、正确度及精密度检测、稳健性测试等系列研究, 设计特异性引物和探针, 对浙大瑞丰 8 转化体成分进行定量检测。【结果】本研究研制的方法能够特异、定量检测出浙大瑞丰 8 转化体成分, 对拷贝数比值在 0.1% (20 个拷贝数) 以上的阳性样品可进行准确定量, 对 0.05% (10 个拷贝数) 的阳性样品可特异性检出。【结论】本研究结果为管理部门对浙大瑞丰 8 的安全监管提供了有效的支撑, 说明研制的方法可用于浙大瑞丰 8 的定量检测和安全监管。

关键词: 转基因抗虫玉米浙大瑞丰 8; 实时荧光定量 PCR; 检测



开放科学标识码
(OSID 码)

Real-time fluorescent quantitative PCR for detection of transgenic insect-resistant maize Zheda Ruifeng 8

TIAN Jin^{1,2}, JU Ronghui², JIANG Hongye¹, CHEN Ziyang¹, ZHANG Hua¹, LI Lingyan²,
SUN Yu^{1,3}, WANG Haoqian¹, CHEN Hong^{1*}, LIANG Jingang^{1*}

¹Development Center of Science and Technology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100176, China; ²Beijing Vocational College of Agriculture, Beijing 102442, China; ³Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China

Abstract:【Aim】Genetically modified (GM) insect-resistant maize, Zheda Ruifeng 8, is a new type of insect-resistant maize developed by Hangzhou Ruifeng Biotechnology Co. Ltd., and it was approved for an agricultural genetically modified organism safety certificate (for production and application) in 2021. This study aimed to design specific amplification primers and TaqMan probes for the transgenic insect-resistant maize Zheda Ruifeng 8 and to quantitatively detect its transgenic components, thereby providing a basis for safety supervision by regulatory authorities.【Method】Through a series of experiments, including system optimization, accuracy and precision testing, and robustness testing, specific primers and probes were designed to quantitatively detect the transgenic components of Zheda Ruifeng 8.【Result】The data showed that the method can specifically and quantitatively detect the transgenic components of Zheda Ruifeng 8. Positive samples with a copy number ratio of $>0.1\%$ (20 copies) were accurately quantified, and positive samples with a copy number ratio of 0.05% (ten copies) were specifically detected.【Conclusion】The findings of this study provide effective support for safety supervision by regulatory authorities, thereby indicating that the developed method can be used for the quantitative detection and safety supervision of Zheda Ruifeng 8.

Key words: transgenic insect-resistant maize Zheda Ruifeng 8; real-time fluorescence quantitative PCR; detection

玉米 *Zea mays* L. 是我国种植面积最大、分布最广的经济作物。根据国家统计局数据显示, 2022 年, 我国玉米播种面积 430701 km², 玉米总产量 27720.3 万 t, 单位面积产量 6436.1 kg · hm⁻² (国家

收稿日期(Received): 2024-02-05 接受日期(Accepted): 2024-07-01

基金项目: 农业农村部农业国家和行业标准制修订项目(农质标函[2022]66 号); 科技创新 2030 重大项目(2022ZD0401909); 农业科研杰出人才培养计划

作者简介: 田锦, 女, 教授。研究方向: 分子遗传学。E-mail: 73466@bvca.edu.cn

* 通信作者(Author for correspondence), 陈红, E-mail: chen1975hong@163.com; 梁晋刚, E-mail: liangjingang@agri.gov.cn

统计局,2022)。根据海关总署公布的数据显示,2022年,我国进口玉米2062万t,绝大部分为转基因玉米(2000万t以上)。因此,加大玉米新种质的选育,是保障玉米种植业持续稳定发展的有力举措。

随着我国对生物育种产业化应用政策逐渐放开,转基因监管工作也面临新的挑战,既要区分是不是“转基因”,还要知道是不是“合法转基因”“转基因含量是多少”。转基因监管工作不能因为要推进产业化而放松,严格监管是推进转基因生物育种产业化应用的重要前提。因此,转基因检测在转基因监管工作中发挥着重要作用,可保障标识制度有效实施和合理监管(蒋诗萌,2014)。聚合酶链式反应技术(PCR技术)因特异性高、操作可控性好,被广泛应用于转基因产品检测中。转化体特异性PCR检测方法具有高度专一性,已成为国际上转基因产品检测方法标准的首选(李凌燕等,2023a,2023b;温洪涛等,2023)。

转基因抗虫玉米浙大瑞丰8,能同时表达2种Bt杀虫蛋白质(Cry1Ab和Cry2Ab),是杭州瑞丰生物科技有限公司研发的新型抗虫玉米。经安全性评价表明,转基因抗虫玉米浙大瑞丰8分子特征清晰,在环境安全和食用安全方面与常规栽培玉米实质性相同,于2021年12月获批生产应用安全证书。因此,急需为浙大瑞丰8转化体研制特异性定量检测方法。

本研究以转基因抗虫玉米浙大瑞丰8转化体的3'端特异性序列为靶标,设计特异性引物,利用实时荧光定量PCR(qPCR)技术(安娜等,2019;刘双等,2021),建立转基因抗虫玉米浙大瑞丰8特异性定量检测方法,以期能为转基因抗虫玉米浙大瑞丰8的安全监管提供有力技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 样品 转基因抗虫玉米浙大瑞丰8及其非转基因亲本受体瑞丰1的种子均由杭州瑞丰生物科技有限公司提供。

其他转基因玉米混样:在本实验室原有(李凌燕等,2023b)基础上新增MIR162、DAS40278-9、4114、MON87427、5307、DBN9858、ND207、DBN9501、瑞丰125、DBN9936、MON87411、MZ-IR098、BFL4-2、nCX-1转化体,且各转化体质量百分比含量为1%。

转基因大豆 *Glycine max* (Linn.) Merr. 混样:在本实验室原有(李凌燕等,2023b)基础上新增DAS-44406-6、MON87751、SHZD3201、CAL16、中黄6106、DBN9004转化体,各转化体按1%质量百分比添加。

转基因水稻 *Oryza sativa* L. 混样、转基因油菜 *Brassica chinensis* L. 混样和转基因棉花 *Gossypium hirsutum* L. 混样使用本实验室已制备好样品(李凌燕等,2023b)。

非转基因玉米混样:5种常见非转基因玉米(天农九、先玉335、郑单958、湖北6号、东单1331)按20%质量百分比混合。

1.1.2 主要试剂 QIAGEN DNeasy® Plant Maxi kit (24)(刘欣等,2013)购于杭州沃森生物技术有限公司;TaqMan™ Gene Expression Master Mix、Premix Ex Taq™ (Probe qPCR)、DNA Marker等购于宝生物工程(大连)有限公司。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.1.3 仪器设备 德国Eppendorf台式微量冷冻离心机;ABI StepOne Plus实时荧光定量PCR仪;HITACHI CR226 GIII离心机;美国Quawell Q5000超微量紫外分光光度计;美国Bio-Rad CFX 96实时荧光定量PCR仪。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组DNA提取 将转基因抗虫玉米浙大瑞丰8及其非转基因亲本受体瑞丰1种子育苗。按照QIAGEN DNeasy® Plant Maxi kit (24)试剂盒操作说明书分别提取浙大瑞丰8及其受体瑞丰1植株、转基因混样和非转基因玉米混样基因组DNA,测定浓度和纯度, $D_{260/280}$ 在1.7~1.9、 $D_{260/230}$ 大于2的用于后续试验(安娜等,2019;Gryson,2010)。

1.2.2 引物设计与筛选 根据研发单位提供的序列信息,在插入序列的两端分别设计荧光探针和相应的正反向引物(中华人民共和国农业部,2015)。

本研究所用玉米内标准基因为 *zSSIb* (中华人民共和国农业部,2013),其扩增引物和探针序列为:

zSSIb-3F: 5'-CGGTGGATGCTAAGGCTGATG-3';

zSSIb-4R: 5'-AAAGGGCCAGGTTCATTATCCTC-3';

zSSIb-P: 5'-TAAGGAGCACTCGCCGCCGCATCTG-3'。

以1.2.1提取的转基因抗虫玉米浙大瑞丰8及其受体基因组DNA为初始浓度,分别用1×TE稀释为25 ng·μL⁻¹母液,按照公式:浙大瑞丰8转基因含量/%=(浙大瑞丰8拷贝数/*zSSIb*拷贝数)×

100,配制转基因含量为 10%的 DNA 作为模板。采用农业部 1861 号公告-3-2012 中所述的反应体系和反应程序进行引物筛选,每对引物设置 3 个重复。根据结果选择扩增信号最强、C_q 值最小的引物作为建立检测方法的候选引物。

1.2.3 反应体系优化 以 1.2.2 配制的转基因含量为 10%的 DNA 作为模板,分别设置 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 μmol · L⁻¹引物浓度梯度,引物浓度为探针浓度的 1 倍,每种引物浓度设置 3 个重复,根据荧光曲线的线型、相对 C_q 值等,确定引物和探针的最佳浓度 (Christian & Junko,1996)。

表 1 浙大瑞丰 8 转化体检测体系中的 DNA 含量及拷贝数
Table 1 DNA content and copy number in the detection system of Zheda Ruifeng 8 event

样品编号 Sample No.	DNA 含量 DNA content/ng	zSSIIb 基因拷贝数 zSSIIb gene copy number	浙大瑞丰 8 转化体拷贝数 Copy number of Zheda Ruifeng 8 event
G1	100.00	40000.00	20000.00
G2	16.67	6668.00	3334.00
G3	2.78	1112.00	556.00
G4	0.46	184.00	92.00
G5	0.08	30.80	15.40

1.2.6 正确度及精密度检测 以 10%的 DNA 为初始浓度,按照 1.2.4 的方法梯度稀释 5.0%、1.0%和 0.1% 3 个 DNA 样品进行实时荧光 PCR 反应。每个浓度样品重复测试 3 次,计算多次测试的偏差 (Bias)、标准偏差 (standard deviation, SD)和相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD)。

1.2.7 定量限 (LOQ)测定 本研究以实施标识制度管理且标识阈值最低的欧盟标准 0.9%为参考,将目标浓度设定为 1.0%。根据农业部 2259 号公告-5-2015 标准 (中华人民共和国农业部,2015)规定,确定本方法的定量限不高于 0.1%。

采用 15 份转基因抗虫玉米浙大瑞丰 8 含量为 0.1%的 DNA 样品进行定量测试 (以 PCR 反应体系中加入 50 ng 模板测算)。

1.2.8 稳健性测试 通过 qPCR 试剂、qPCR 仪以及操作者 3 个变量对 0.1%定量限样品的稳健性表

1.2.4 特异性检测 将 1.2.2 制备的 10%的 DNA 用 25 ng · μL⁻¹瑞丰 1 母液稀释为转基因含量为 1%的测试样品,与非转基因亲本受体瑞丰 1、转基因作物混样和非转基因玉米混样等测试样品一并对 1.2.2 筛选到的引物组合和 1.2.3 确定的引物探针浓度进行特异性检测,每个测试样品设置 4 个重复。

1.2.5 标准曲线的建立 将 1.2.1 提取到的浙大瑞丰 8 基因组 DNA 稀释为 50 ng · μL⁻¹的初始浓度,倍比稀释后进行实时荧光定量 PCR 反应 (表 1),每个 PCR 反应设置 3 个平行,重复 3 次。统计标准曲线的斜率 *b*、决定系数 *R*² 和 PCR 扩增效率 *E*。

现进行测试。每个变量设置 2 个平行,分别测试 3 个平行子样 3 次重复的拷贝数比值以及不同变量下的 Bias、SD 和 RSD。

2 结果与分析

2.1 引物/探针的设计与筛选

在浙大瑞丰 8 转化体 3'端设计如表 2 所示的引物与探针,将引物与探针正交组合成 25 对 (表 3)。结果表明,在均获得特异性扩增组合中,最终选择扩增信号最强和 C_q 值最小的组合 7 即 RF 8-LB-QF2/QR2/QP1 作为候选引物/探针组合 (图 1),并对其进行后续测试,命名为 RF 8-QF/QR/QP。

2.2 反应体系优化

依据图 2 试验结果,在综合扩增效率、体系配制适用性等基础上,确定了抗虫玉米浙大瑞丰 8 转化体检测体系中的引物浓度为 0.4 μmol · L⁻¹,探针浓度为 0.2 μmol · L⁻¹。

表 2 浙大瑞丰 8 转化体候选引物和探针
Table 2 Candidate primers and probes of Zheda Ruifeng 8 event

引物/探针 Primer/probe	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	引物/探针 Primer/probe	序列(5'-3') Sequence (5'-3')
RF 8-LB-QR1	CAAGAACCAGAGCACTCTCACC	RF 8-LB-QR3	GTCAGAACCATTTCATTG
RF 8-LB-QF1	AATTCGGCGTTAATTCAGTACAT	RF 8-LB-QF3	CGTCAATTTGTTTACACCA
RF 8-LB-QP1	CGACGGCTGAGATGAAGATACGA	RF 8-LB-QP2	TCGTATCTTCATCTCAGCCGTCG
RF 8-LB-QR2	CAACTGGCGACACAGGGTG	RF 8-LB-QF4	CGCAATGTGTTATTAAGTTG
RF 8-LB-QF2	GTTGTCTAAGCGTCAATTGTTTAC	RF 8-LB-QP3	ATGAGTCCAAGAACCAGAGCAC

表 3 浙大瑞丰 8 转化体引物/探针组合
Table 3 Primer/probe pairs of Zheda Ruifeng 8 event

序号 No.	组合 Group	产物大小 Amplification size/bp	序号 No.	组合 Group	产物大小 Amplification size/bp
1	RF 8-LB-QF1/QR1/QP1	201	14	RF 8-LB-QF3/QR2/QP1	82
2	RF 8-LB-QF1/QR1/QP2	201	15	RF 8-LB-QF3/QR2/QP2	82
3	RF 8-LB-QF1/QR2/QP1	141	16	RF 8-LB-QF3/QR3/QP1	173
4	RF 8-LB-QF1/QR2/QP2	141	17	RF 8-LB-QF3/QR3/QP2	173
5	RF 8-LB-QF2/QR1/QP1	152	18	RF 8-LB-QF3/QR3/QP3	173
6	RF 8-LB-QF2/QR1/QP2	152	19	RF 8-LB-QF4/QR1/QP1	168
7	RF 8-LB-QF2/QR2/QP1	92	20	RF 8-LB-QF4/QR1/QP2	168
8	RF 8-LB-QF2/QR2/QP2	92	21	RF 8-LB-QF4/QR2/QP1	108
9	RF 8-LB-QF2/QR3/QP1	183	22	RF 8-LB-QF4/QR2/QP2	108
10	RF 8-LB-QF2/QR3/QP2	183	23	RF 8-LB-QF4/QR3/QP1	199
11	RF 8-LB-QF2/QR3/QP3	183	24	RF 8-LB-QF4/QR3/QP2	199
12	RF 8-LB-QF3/QR1/QP1	142	25	RF 8-LB-QF4/QR3/QP3	199
13	RF 8-LB-QF3/QR1/QP2	142			

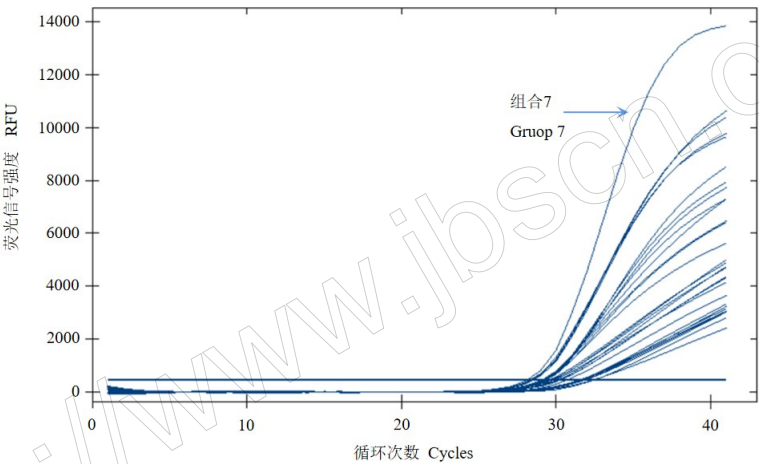


图 1 浙大瑞丰 8 转化体引物探针筛选
Fig.1 Screening of the primers/probes for Zheda Ruifeng 8 event

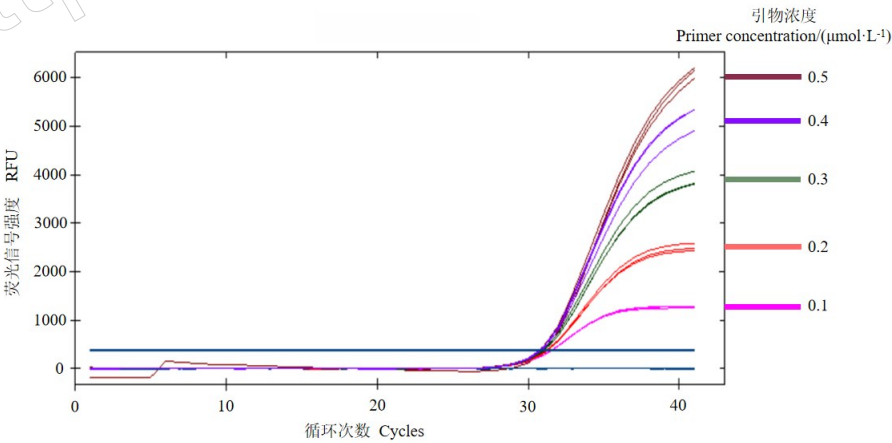


图 2 浙大瑞丰 8 转化体引物探针反应浓度优化
Fig.2 Optimization of primer/probe concentration of Zheda Ruifeng 8 event

2.3 特异性检测

如图 3 所示,仅从抗虫玉米浙大瑞丰 8 转化体样品中获得预期的扩增曲线,而在其他样品中均未获得预期的扩增曲线,表明本试验所确定的方法特异性良好。

2.4 标准曲线的建立

本试验绘制了 3 组标准曲线(图 4),结果表明,3 组标准曲线斜率 b 均位于-3.6~-3.1 的允许区间内,决定系数 R^2 均高于 0.98,扩增效率 E 均位于 90%~110% 的允许区间内。

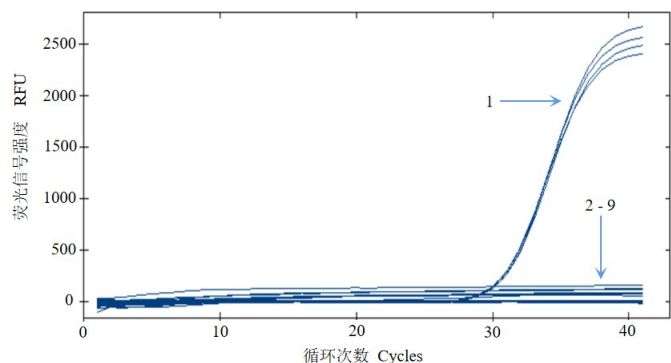


图 3 浙大瑞丰 8 转化体特异性测试

Fig.3 Specificity test of Zheda Ruifeng 8 event

1:1%抗虫玉米浙大瑞丰 8;2:瑞丰 1 受体玉米;3:空白对照;4:其他转基因玉米混合样品;5:转基因大豆混合样品;
6:转基因水稻混合样品;7:转基因棉花混合样品;8:转基因油菜混合样品;9:非转基因玉米混合样品。

1: 1% insect-resistant maize Zheda Ruifeng 8; 2: Receptor maize of Ruifeng 1; 3: Blank control; 4: Other GM maize mixed samples; 5: GM soybean mixed samples; 6: GM rice mixed samples; 7: GM cotton mixed samples; 8: GM rape mixed samples; 9: Non-GM maize mixed samples.

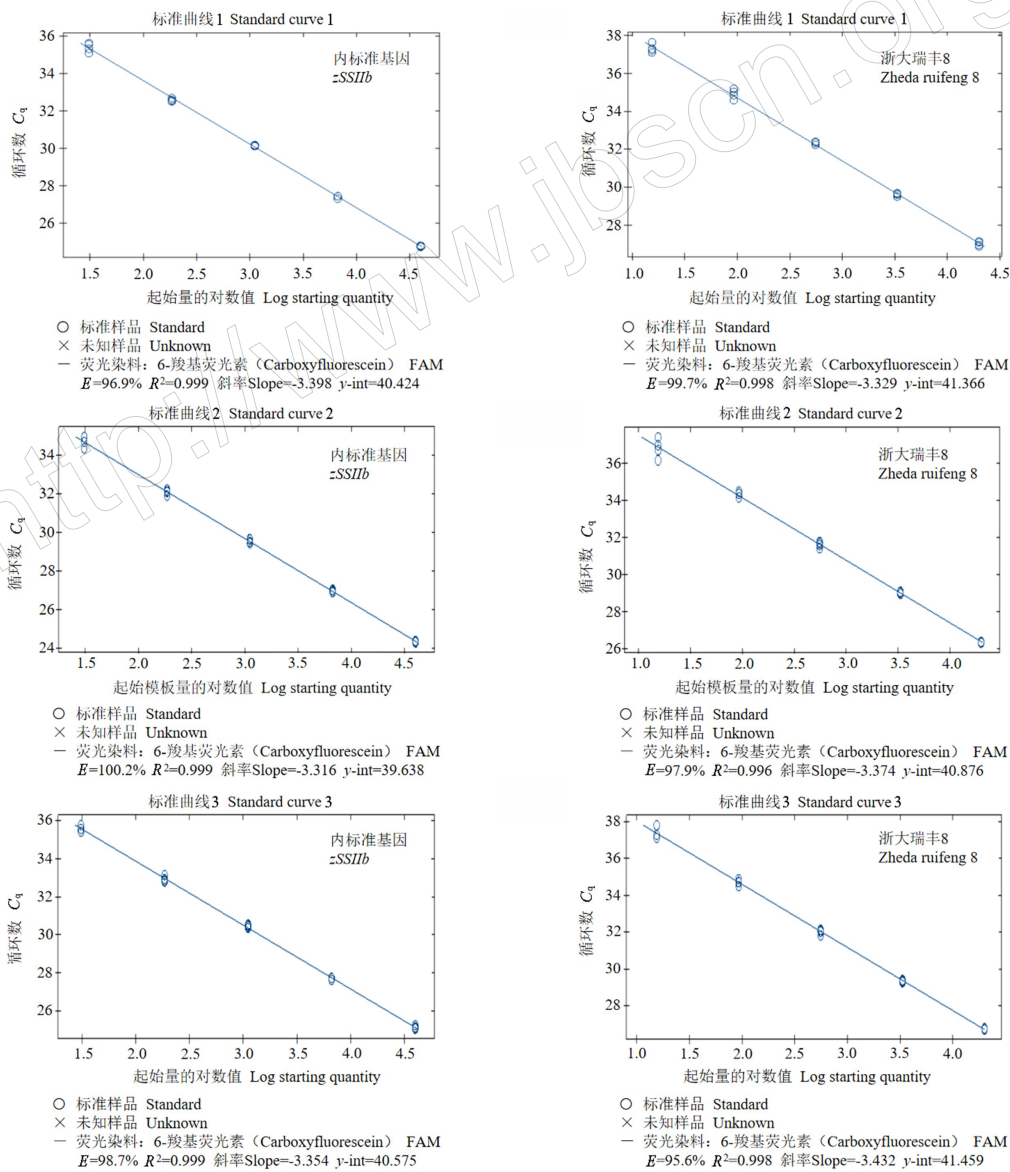


图 4 浙大瑞丰 8 转化体检测方法标准曲线

Fig.4 Standard curve for detection method of Zheda Ruifeng 8 event

2.5 正确度及精密度检测

表 4 测试结果显示,3 个含量样品测量平均值的偏差 Bias 在允许的±25%区间内,表明浙大瑞丰 8 转化体荧光定量 PCR 方法测量结果具有良好的正确度,重复性相对标准偏差 RSD 小于规定的 25%,表明测量结果具有良好的精密度。

2.6 定量限(LOQ)的确定

含量为 0.1%的转基因抗虫玉米浙大瑞丰 8 测试结果显示(表 5),15 份样品的偏差的绝对值和相对标准偏差均≤25%,故本研究的定量限确定为 0.1%。

2.7 稳健性测试

如表 6 所示,不同的操作者利用 TaqMan Gene Expression Master Mix (试剂 1) 和 Premix Ex Taq (Probe qPCR) (试剂 2) 2 种试剂,ABI StepOne Plus 实时荧光定量 PCR 仪(仪器 1)和 CFX 96 实时荧光定量 PCR 仪(仪器 2)2 台仪器,在 72 次测试中拷贝数比值均位于 0.075%~0.125%,Bias 的绝对值、SD 和 RSD≤25%,浙大瑞丰 8 转化体实时荧光定量 PCR 方法检测结果的精确度和正确度均满足要求,

定量结果准确可靠,具有良好的稳健性。

3 讨论与结论

转基因抗虫玉米浙大瑞丰 8 是国内最早表达 *Cry1Ab* 和 *Cry2Ab* 的二价抗虫产品。本研究为浙大瑞丰 8 转化体 3' 端侧翼序列设计特异性引物和 TaqMan 探针(吴影等,2007),在 25 对引物/探针组合中筛选目标引物,确定了 qPCR 反应最优体系,经特异性、稳健性等系列指标测试,建立了抗虫玉米浙大瑞丰 8 特异性 qPCR 定量检测方法。

结果表明,本试验方法特异性强、灵敏度高、重复性好,具有良好的正确度、精密度和稳健性,定量限达 0.1%(约 20 个拷贝),检出限达 0.05%(约 10 个拷贝)。在方法的建立过程中,使用了农业部 2259 号公告-5-2015 中推荐的反应体系,引物退火温度与内标准基因一致,保证了本方法在检测浙大瑞丰 8 转基因抗虫玉米时的高通量,为安全监管提供规范化技术保证,也为相关转基因标准物质定值提供了计量方法(郑子繁等,2023)。

表 4 浙大瑞丰 8 转化体检测方法的正确度和精密度测试
Table 4 Accuracy and precision test for detection method of Zheda Ruifeng 8 event

预期含量 Expected content/%	浙大瑞丰 8 测定含量 Determined content of Zheda Ruifeng 8 event/%			平均值 Average value/%	偏差 Bias /%	标准 偏差 SD/%	相对标 准偏差 RSD/%
	重复 1 Repeat 1	重复 2 Repeat 2	重复 3 Repeat 3				
5.0	5.14	4.83	4.97	4.98	-0.40	0.155	3.12
1.0	1.05	0.99	1.06	1.03	3.33	0.038	3.66
0.1	0.10	0.11	0.11	0.11	6.67	0.006	5.41

表 5 浙大瑞丰 8 转化体定量限测试结果
Table 5 Results of quantitative limit test for Zheda Ruifeng 8 event

重复 Repeat	浙大瑞丰 8 转化体拷贝数 Copy number of Zheda Ruifeng 8 event	<i>zSSIIb</i> 基因拷贝数 <i>zSSIIb</i> gene copy number	百分比 Percent/%
1	31.1	27612	0.113
2	33.6	31194	0.108
3	32.5	28206	0.115
4	27.0	28554	0.095
5	31.7	28532	0.111
6	30.8	31340	0.098
7	34.6	29871	0.116
8	36.1	35406	0.102
9	36.0	35766	0.101
10	36.2	33734	0.107
11	29.0	30823	0.094
12	35.0	30721	0.114
13	30.1	29809	0.101
14	37.6	33415	0.113
15	37.7	34080	0.111
平均值 Average value	33.3	31271	0.107
偏差 Bias			6.620
标准偏差 SD			0.007
相对标准偏差 RSD			7.018

表 6 浙大瑞丰 8 转化体稳健性测试结果(拷贝数比值)
Table 6 Results of robustness test for Zheda Ruifeng 8 event (copy number ratio)

仪器 instrument	子样 Sub-sample	操作者 1 Operator 1						操作者 2 Operator 2						平均值 Average value	偏差 Bias /%	标准 偏差 SD /%	相对 标准 偏差 RSD /%
		试剂 1 Reagents 1			试剂 2 Reagents 2			试剂 1 Reagents 1			试剂 2 Reagents 2						
		重复 1 Repeat 1	重复 2 Repeat 2	重复 3 Repeat 3	重复 1 Repeat 1	重复 2 Repeat 2	重复 3 Repeat 3	重复 1 Repeat 1	重复 2 Repeat 2	重复 3 Repeat 3	重复 1 Repeat 1	重复 2 Repeat 2	重复 3 Repeat 3				
仪器 1 Instrument 1	子样 1 Sub-sample 1	0.1143	0.1032	0.0976	0.0758	0.0779	0.0809	0.1173	0.1052	0.0955	0.0778	0.0746	0.0946	0.0920	-8.0	0.0149	16.2245
	子样 2 Sub-sample 2	0.1162	0.1201	0.1033	0.0820	0.0939	0.0964	0.0946	0.0885	0.0850	0.0842	0.0800	0.0799	0.0937	-6.3	0.0129	13.8175
	子样 3 Sub-sample 3	0.0943	0.0876	0.0978	0.0752	0.0758	0.0783	0.1133	0.1471	0.0989	0.0769	0.0876	0.0899	0.0941	-5.9	0.0203	21.5225
仪器 2 Instrument 2	子样 1 Sub-sample 1	0.0909	0.0923	0.0935	0.1077	0.1108	0.1177	0.1090	0.1252	0.1191	0.1123	0.1034	0.1200	0.1085	8.5	0.0110	10.1381
	子样 2 Sub-sample 2	0.0944	0.0954	0.0843	0.0742	0.0776	0.0834	0.1198	0.1214	0.1227	0.0909	0.1099	0.1210	0.0996	-0.4	0.0176	17.6941
	子样 3 Sub-sample 3	0.1240	0.0974	0.1045	0.0853	0.0947	0.1011	0.1239	0.1172	0.1202	0.0994	0.1011	0.1085	0.1064	6.4	0.0119	11.1844

试剂 1: TaqMan Gene Expression Master Mix; 试剂 2: Premix Ex Taq (Probe qPCR); 仪器 1: ABI StepOne Plus 荧光定量 PCR 仪; 仪器 2: CFX 96 荧光定量 PCR 仪。

Reagents 1: TaqMan Gene Expression Master Mix; Reagents 2: Premix Ex Taq (Probe qPCR); Instrument 1: ABI StepOne Plus fluorescent quantitative PCR instrument; Instrument 2: CFX 96 fluorescent quantitative PCR instrument.

参考文献

安娜, 柳方方, 董美, 胡晓颖, 宛煜嵩, 金芃军, 兰青阔, 李亮, 韩阳, 2019. 基于 PCR 技术的 DNA 分析测试关键要素. 基因组学与应用生物学, 38(2): 624-629.

国家统计局, 2022. 国家统计局关于 2022 年粮食产量数据的公告. (2022-12-12)[2024-01-02]. https://www.gov.cn/xinwen/2022-12/12/content_5731454.htm.

蒋诗萌, 2014. 基于亲疏水微孔芯片和微流控技术的转基因成分高通量检测技术. 硕士学位论文. 上海: 上海交通大学.

李凌燕, 肖冰, 张旭冬, 陈子言, 王颢潜, 张秀杰, 陈红, 梁晋刚, 2023a. 转基因耐除草剂玉米 MON87419 品系特异性定性 PCR 检测方法的建立. 江苏农业科学, 51(1): 50-57.

李凌燕, 张旭冬, 陈子言, 王颢潜, 乌兰, 田锦, 张秀杰, 陈红, 梁晋刚, 2023b. 转基因抗虫耐除草剂玉米 MON87411 精准定量检测方法的建立. 生物安全学报, 32(1): 38-45.

刘欣, 祝长青, 王毅谦, 沈赟, 黄明, 蒋原, 周光宏, 2013. 大豆转基因检测中 DNA 提取方法的比较研究. 食品科学, 34(4): 199-203.

刘双, 陈笑芸, 曹际娟, 兰青阔, 檀建新, 王永, 2021. 转基因耐除草剂大豆 ZH10-6 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立. 分子植物育种, 19(15): 5030-5037.

温洪涛, 杨洋, 丁一佳, 关海涛, 苑冉, 张瑞英, 李凌燕, 梁晋刚, 王晶, 2023. 转基因玉米 MZIR098 定量 PCR 检测方法的建立. 计量学报, 44(3): 430-439.

吴影, 宋丰顺, 陆徐忠, 赵伟, 杨剑波, 李莉, 2007. 实时荧光 PCR 技术定量检测转基因大豆方法的研究. 作物学报, 33(10): 1733-1737.

郑子繁, 王颢潜, 高佳奇, 陈硕, 柳方方, 张秀杰, 李亮, 2023. 耐除草剂转基因大豆 SHZD32-1 数字 PCR 绝对定量方法的建立. 计量学报, 44(3): 415-420.

中华人民共和国农业部, 2013. 转基因植物及其产品成分检测玉米内标准基因定性 PCR 方法: 农业部 1861 号公告-3-2012. 北京: 中国农业出版社.

中华人民共和国农业部, 2015. 转基因植物及其产品成分检测定性 PCR 方法制定指南: 农业部 2259 号公告-4-2015. 北京: 中国农业出版社.

中华人民共和国农业部, 2015. 转基因植物及其产品成分检测实时荧光定量 PCR 方法制定指南: 农业部 2259 号公告-5-2015. 北京: 中国农业出版社.

CHRISTIAN A H, JUNKO S, 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 24(6): 986-994.

GRYSON N, 2010. Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(6): 2003-2022.

(责任编辑:陈晓雯)