

文章编号:1001-1498(2011)03-0334-06

# 抗虫转基因欧洲黑杨多重 PCR 技术检测体系构建\*

刘海涛<sup>1,2</sup>, 周静<sup>1,2</sup>, 张川红<sup>1,2</sup>, 冯锦霞<sup>1,2</sup>, 郑勇奇<sup>1,2\*\*</sup>

(1. 中国林业科学研究院林业研究所, 国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091;  
2. 国家林业局植物新品种分子测试实验室, 北京 100091)

**摘要:**根据抗虫转基因欧洲黑杨中的 CaMV 35S 启动子、NOS 终止子、*NPT II* 标记基因以及 *Bt* 目的基因序列, 设计合成了相应引物, 采用单重 PCR 和多重 PCR 技术对启动子、终止子、选择标记基因以及目的基因等多个外源基因进行检测, 并对各引物的退火温度及引物之间的浓度配比进行优化, 建立了适用于抗虫转基因欧洲黑杨检测的 *Bt*、*NPT II* 和 NOS 基因的三重 PCR 分析的技术体系。结果表明: 当各组引物的终浓度配比为 1.0:0.5:0.5, 退火温度为 59 °C 时, 所建立的三重 PCR 检测体系能够有效地检测出抗虫转基因欧洲黑杨中的转基因成分, 实现了对抗虫转基因欧洲黑杨的快速、高效、准确的鉴定。

**关键词:**抗虫转基因; 欧洲黑杨; 多重 PCR 检测; 外源基因

中图分类号: S718.46

文献标识码: A

## A Multiplex Polymerase Chain Reaction Method for Rapid Detection of Foreign Genes in Insect-resistant Transgenic *Populus nigra*

LIU Hai-tao<sup>1,2</sup>, ZHOU Jing<sup>1,2</sup>, ZHANG Chuan-hong<sup>1,2</sup>, FENG Jin-xia<sup>1,2</sup>, ZHENG Yong-qi<sup>1,2</sup>

(1. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry; Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, State Forestry Administration, Beijing 100091, China; 2. Laboratory of Molecular Testing for New Plant Varieties, State Forestry Administration, Beijing 100091, China)

**Abstract:** In order to establish a multiplex PCR detection method of genetically modified ingredient in *Populus nigra*, primers were designed according to CaMV 35s promoter, NOS terminator, *NPT II* marker gene and *Bt* target gene sequences of insect-resistant transgenic *P. nigra*. The promoter, terminator, marker gene and target gene were detected by simplex PCR and multiplex PCR. The PCR system such as annealing temperature and content of primers were optimized. The results showed that the high efficiency PCR system was obtained when the final ratio of the primer is 1.0:0.5:0.5 for *Bt*, *NPT II* and NOS respectively, and the annealing temperature is 59 °C. Base on these, a technical system was set up to detect the *Bt*, *NPT II*, NOS gene of insect-resistant transgenic *P. nigra* with triple PCR, and the quick, efficient and accurate identification way of insect-resistant transgenic *P. nigra* was achieved.

**Key words:** insect-resistant transgenic; *Populus nigra*; multiplex PCR reaction; foreign gene

20 世纪 70 年代以来, 植物基因工程技术飞速发展, 据国际农业生物技术应用咨询服务中心 (ISAAA) 统计, 截止到 2008 年底全球转基因植物的种植已遍布 25 个国家和地区, 种植面积约 1.25 亿

收稿日期: 2010-03-09

基金项目: 国家林业局项目 (J-J-07-05); 国家林业局“948”技术引进项目 (2002-55)

作者简介: 刘海涛 (1983—), 男, 安徽淮南人, 博士生, 主要从事转基因树木检测及生态安全评估和植物生理生态学研究. E-mail: forest\_lau@163.com

\* 衷心感谢中国林业科学研究院林业研究所胡建军副研究员为本研究提供的宝贵实验材料。

\*\* 通讯作者: E-mail: zhengyq@caf.ac.cn

hm<sup>2</sup>,相当于世界上 15 亿 hm<sup>2</sup> 耕地的 8%,从 1996 年转基因植物第 1 次实现商业化,累计 12 年的全球价值达 498 亿美元<sup>[1]</sup>。在转基因植物研究取得了举世瞩目的成就的同时,国际上也多次出现了有关转基因植物安全性负面事件,引起了学术界的广泛争论<sup>[2]</sup>。为了消除转基因产品的安全隐患和消费者对转基因产品安全性方面的疑虑,世界许多国家对转基因产品的研究开发、生产销售及在自然环境里的代谢降解等各个环节都制订了严格的法规条例;同时,越来越多的国家要求对转基因产品实行标签制度,对转基因检测技术的灵敏度和准确性提出了严格的要求,各种转基因检测技术也逐渐成为研究热点。

PCR (Polymerase chain reaction) 是 20 世纪 80 年代末发展起来的应用最广泛的分子生物学技术之一,现已渗透到生命科学的各个领域,PCR 作为一种快速、灵敏的核酸检测方法,在转基因产品的检测上已得到广泛的认可和应用,但采用普通 PCR 检测多个转基因成分时,一次反应只能扩增出一个目的基因片段,存在效率偏低,操作繁琐,且成本较高等问题;而且如果事先不清楚待测样品的转基因背景,普通 PCR 的检测结果可能不可靠;因为大多数转基因植物中的启动子和终止子都是 CaMV35S 启动子和 NOS 终止子,而 35S 启动子天然存在于花椰菜花叶病毒中,NOS 终止子天然存在于植物病毒 Ti 质粒中,所以针对启动子和终止子的单一基因的检测无法排除病毒感染的可能性。多重 PCR (Multiplex Polymerase Chain Reaction, MPCR) 是指在一个单一反应体系中加入一对以上的特异性引物对,一次性扩增多个序列的反应过程,从而实现同时检测出多个目的基因片段。与普通 PCR 相比,多重 PCR 无疑极大的加快检测进程,提高了检测效率。自从 1988 年 Chamberlain 等<sup>[3]</sup>首先报道多重 PCR 以来,因该技术具有高效快捷、高产率、高度特异性等优点而被广泛的应用于植物种质纯度鉴定、植物病虫害检测、植物分子育种等方面<sup>[4-7]</sup>。目前利用多重 PCR 技术检测转基因植物,大多局限于转基因玉米 (*Zea mays* L.)、大豆 (*Glycine max* L.) 等农作物和转基因花卉等观赏植物<sup>[8-9]</sup>。将多重 PCR 技术应用于转基因木本植物外源基因的检测方面的研究报道相对较少,国内仅见于对转基因白桦 (*Betula platyphylla* Suk.) 及转基因番木瓜 (*Carica papaya* L.) 的研究中<sup>[10-11]</sup>。转 *Bt* 基因欧洲黑杨 (*Populus nigra* L.) 是

国际上少数几种被批准商品化的木本植物之一,在我国转 *Bt* 基因欧洲黑杨已在 7 省 8 个基点大田释放,是世界上释放面积最大的转基因树木<sup>[12]</sup>。目前,中国还没有建立这类转基因杨树产品的国家检测标准,而转基因木本植物及其产品的检测已被纳入国内外检验检疫部门的检测项目,成为各主要贸易国的一项重要工作。因此,开展转基因欧洲黑杨外源基因 PCR 检测技术的探索,构建出一套快速定性检测抗虫转基因欧洲黑杨的标准体系,以期相关的检验检疫部门提供技术支持是一项十分有意义的工作。本研究以转 *Bt* 基因的欧洲黑杨为材料,利用 PCR 技术对转基因植物中常用的启动子、终止子、选择标记基因和目的基因等多个外源基因进行检测,以期建立可同时扩增 *Bt* 基因、*NPT II* 基因和 NOS 基因的三重 PCR 检测的技术体系,从而实现对抗虫转基因欧洲黑杨的快速、高效、准确的鉴定。

## 1 材料与方 法

### 1.1 转基因植株及阳性对照

于 2008 年 6 月进行实验样品的采集工作。抗虫转基因欧洲黑杨无性系 n153、阴性对照非转基因欧洲黑杨无性系 CK2 的鲜叶均采自中国林科院北京玉泉山下实验苗圃地,采集后放入便携式小冰箱中迅速带回实验室用无菌蒸馏水冲洗干净并阴干后放入 -78 °C 超低温冰箱中冷冻储藏备用。阳性对照质粒 (Plasmid) 由中国林科院林业研究所胡建军副研究员提供。

### 1.2 试剂及仪器

1.2.1 主要试剂 2 × Taq PCR MasterMix (产品组成: Taq Polymerase 0.1 U · μL<sup>-1</sup>, 500 μmol · L<sup>-1</sup> dNTP each, 20 mmol · L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 8.3), 100 mmol · L<sup>-1</sup> KCl, 3 mmol · L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>), 其它稳定剂和增强剂购自 TIANGEN 公司; ladder DNA Maker 购自 TIANGEN 公司; 其余试剂为国产分析纯。引物由北京奥科生物技术有限责任公司合成。

1.2.2 主要仪器 普通 PCR 扩增仪 (ABI9700), 温度梯度 PCR 扩增仪 (BIO-RAD DNA Engine), 电泳仪 (PS 2A200), 全自动凝胶成像分析仪 (GBOX-HR)。

### 1.3 总 DNA 的提取

用改良的 CTAB 法提取杨树叶片中的总 DNA<sup>[13]</sup>。主要步骤如下:

(1) 2 × CTAB 提取缓冲液: 2% (w/v) CTAB, 1.4 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl, 0.2% (v/v) β-mercaptoethanol,

20 mmol · L<sup>-1</sup> EDTA, 100 mmol · L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH8.0), 60 ~ 65 °C 水浴预热;

(2) 将 0.2 g 植物叶片在液氮中研磨成粉末, 转移至 1.5 mL 离心管中;

(3) 加入 700 μL 2 × CTAB 缓冲液, 65 °C 水浴 30 min, 期间稍加混匀;

(4) 加等体积的氯仿: 异戊醇 (24:1), 轻柔混匀;

(5) 12 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 小心将上清液转移到干净的 1.5 mL 离心管中;

(6) 0.8 V 预冷异丙醇 (或 2 V 预冷的无水乙

醇) 和 0.1 V 3 mol · L<sup>-1</sup> NaAc (pH5.2) 沉淀 DNA, 在 -20 °C 下放置 30 min 以上;

(7) 12 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 ~ 30 min, 沉淀用 70% 预冷乙醇洗涤 1 ~ 2 次;

(8) 用适量 TE 或去离子灭菌水 50 μL 溶解;

(9) 采用紫外分光光度法检测 DNA 浓度。

根据 OD<sub>260</sub> 值计算提取的 DNA 浓度, 并依据测得的浓度将 DNA 溶液稀释到 20 ng · mL<sup>-1</sup>, -20 °C 保存备用。

#### 1.4 引物

本实验所用特异性引物见表 1。

表 1 引物序列及扩增产物大小

扩增基因(序列)	引物名称	引物序列(5'—3')	产物/bp
CaMV 35S 启动子	35S Forward	GCTCCTACAAATGCCATCATGCG	195
	35S Reverse	GATAGTGGGATGTGCGTCATCCC	
NOS 终止子	NOS Forward	GAATCCTGTTGCCGCTCTTG	180
	NOS Reverse	TTATCCTAGTTTGGCGGCTA	
NPT II 卡那霉素抗性基因	NPT II Forward	TCCGGCCGCTTGGGTGGAGAG	470
	NPT II Reverse	CTGGCGCGAGCCCCTGATGCT	
<i>Bt</i> 苏云金芽孢杆菌毒蛋白基因	<i>Bt</i> Forward	GAATTCGCTAGGAACCAAGCCATT	700
	<i>Bt</i> Reverse	AAGTATATCCATCAAATGTGGACT	
<i>rbcL</i> 杨树叶绿体内源基因	<i>rbcL</i> Forward	ACGGGCTTACCAGTCTTGAT	425
	<i>rbcL</i> Reverse	ACGCATAAATGGTTGGGAGTT	

#### 1.5 单重 PCR 扩增

反应体系成分及用量见表 2。

表 2 PCR 反应体系 (25 μL)

成分	用量/μL
2 × PCR Mixer	12.5
Primer 1 (10 μmol · L <sup>-1</sup> )	1.0
Primer 2 (10 μmol · L <sup>-1</sup> )	1.0
DNA (20 ng · mL <sup>-1</sup> )	1.0
无菌去离子水	9.5

注: 每次反应均以无菌去离子水替代模板 DNA 作为对照, 检测反应成分中有无污染。

PCR 反应采用如下循环参数: 预变性: 95 °C, 5 min; 变性: 95 °C, 30 s → 退火: 52 ~ 68 °C (52.4、53.4、54.6、56.3、58.8、61.5、63.8、65.5、66.8、67.7 °C), 30 s → 延伸: 72 °C, 45 s (35 个循环); 抚平: 72 °C, 7 min。

扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶在 1 × TAE 电泳缓冲液中电泳, 以凝胶成像系统检测并记录扩增产物在琼脂糖凝胶上的条带, 确定每对引物的最佳退火温度。染料用量为: 100 mL 琼脂糖凝胶 + 5 μL GoldView, 5 μL 电泳样品 + 1 ~ 2 μL SYBRGreen。

#### 1.6 三重 PCR 检测体系的优化

在单重 PCR 确定各个引物的最佳退火温度范围的基础上, 综合考虑各个引物的最佳退火温度, 确定三重 PCR 检测体系的最佳退火温度。反应体系设定为 50 μL, 对引物浓度进行优化, *Bt*、*NPTII*、*NOS* 终浓度的配比设 3 个组合: A、1:1:1; B、1:0.5:1; C、1:0.5:0.5, 单位: μL。模板 DNA 1.0 μL, 2 × PCR Mixer 25 μL, 无菌去离子水补足至 50 μL。PCR 反应的循环参数除退火温度外, 其他条件与单重 PCR 反应条件相同。扩增产物的检测方法同 1.5 节。

#### 1.7 PCR 空白对照、阴性对照及内标基因

空白对照以无菌去离子水作为模板进行 PCR 扩增; 阴性对照以欧洲黑杨未转化植株 CK2 叶片提取的 DNA 作为模板进行 PCR 扩增; 内标基因采用本实验室设计的核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶大亚基基因 (Ribulose biphosphate carboxylase / oxygenase large subunit, 简称 *rbcL* 基因), 它是由叶绿体 DNA 编码, 属于比较保守的功能基因。本实验针对此内标基因设计的通用引物在五大派杨树中均得到了良好的扩增效果, 相关试验结果另有报道<sup>[13]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 DNA 提取质量分析

本实验采用改良的 CTAB 法提取的杨树叶片基因组 DNA,经紫外分光光度计测定并记录其在 260、280 nm 的紫外光吸收率,OD<sub>260</sub> 值在 1.8 左右,说明纯度很好。

### 2.2 单重 PCR 扩增检测体系的建立

为了优化 PCR 反应条件,本研究设置了 10 个不同的退火温度以分别进行不同检测基因最佳退火温度筛选试验,图 1 是各个引物进行退火温度筛选试验的检测结果。

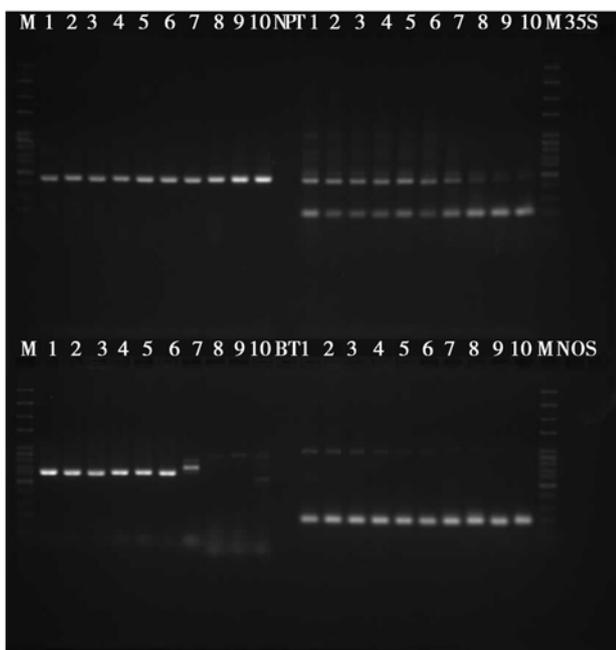


图1 各个引物进行退火温度筛选试验的检测结果(电泳支持物为 1% 琼脂糖, M 为 100 bp plus DNA ladder, 从下至上的条带分别为 100、200、300、400、500、600、700、800、900、1 000、1 500、2 000、3 000、5 000 bp, 1~10 代表的退火温度依次为: 52.4、53.4、54.6、56.3、58.8、61.5、63.8、65.5、66.8、67.7 ℃。)

从图 1 可以看出: *NPT II* 引物的 PCR 扩增产物经电泳后, 在 52.4~67.7 ℃ 之间均有明显、清晰、单一、大小一致的目的条带出现, 且温度越高, 条带越清晰。35S 引物的 PCR 扩增产物经电泳后, 退火温度在 52.4~63.8 ℃ 之间虽有明亮条带, 但也存在明显的非特异性条带; 退火温度在 65.5~67.7 ℃ 之间时, 非特异性条带不明显, 目的条带较清晰, 扩增效果较好。 *Bt* 引物的 PCR 扩增产物经电泳后, 退火温度在 52.4~61.5 ℃ 之间时均有明显、清晰、单一、大小一致的目的条带, 扩增效果好; 退火温度

在 63.8~67.7 ℃ 之间时, 无目的条带出现或有较弱的非特异性条带出现。 *NOS* 引物的 PCR 扩增产物经电泳后, 退火温度在 52.4~67.7 ℃ 之间均有明显、清晰、大小一致的目的条带出现, 但在 52.4~56.3 ℃ 时有非特异性条带出现, 温度为 58.8~67.7 ℃ 时, 扩增效果相对较为理想。综上所述, 针对 *Bt*、*NPT II*、*NOS* 引物的三重 PCR 的检测体系的退火温度理论上应该设定为 59 ℃ 较为理想。图 2 显示的就是以 59 ℃ 退火温度分别针对 *Bt*、*NPT II*、*NOS* 基因的单重 PCR 检测结果。

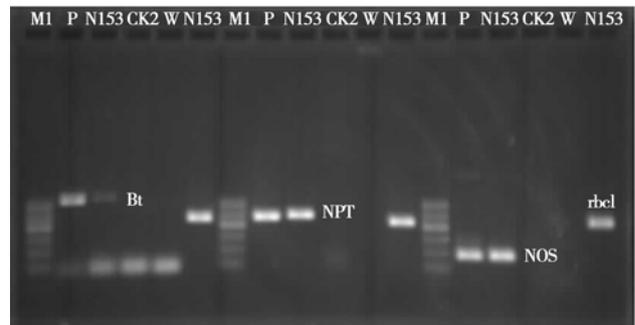


图2 *Bt*、*NPT II*、*NOS* 基因的单重 PCR 检测结果(电泳支持物为 1% 琼脂糖, M1 为 DNA Maker I, 从下至上的条带分别为 100、200、300、400、500、600 bp, 退火温度均为 59 ℃。)

### 2.3 三重 PCR 检测体系的建立

2.3.1 特异性引物最适反应浓度的确定 引物浓度直接影响到 PCR 的扩增效果, 引物过多会产生错误引导或产生引物二聚体, 过低则降低产量。一般 PCR 反应中的引物终浓度为 0.2~1.0 μmol·L<sup>-1</sup>。设定退火温度为 59 ℃, 引物浓度优化实验结果图 3 表明: 当转基因欧洲黑杨 *Bt*、*NPT II*、*NOS* 的引物浓度比为 1:1:1 或 1.0:0.5:1.0 时, 3 个目的片段虽然都得到了扩增, 但有些片段不是很清楚, 只能隐约可见, 且非特异性明显; 只有当引物浓度比为 1.0:0.5:0.5 时, *Bt*、*NPT II*、*NOS* 基因均得到了有效的扩增, 3 条目的片段清晰可见, 且只有极为微弱的非特异性条带出现, 效果相对较好。

2.3.2 最适退火温度的确定 退火温度是影响多重 PCR 扩增的一个非常重要因素, 因此对退火温度进行进一步优化确定是非常必要的。设定 *Bt*、*NPT II*、*NOS* 的引物浓度比为 1.0:0.5:0.5, 设置了 12 个不同的退火温度。由图 4 可以看出: 当退火温度位于 54.5~63.5 ℃ 时, 均可以实现 *Bt*、*NPT II*、*NOS* 基因的重重 PCR, 以 59.5 ℃ 效果最好, 这与单重 PCR 得出的理论最适退火温度为 59 ℃ 的结论相符合。

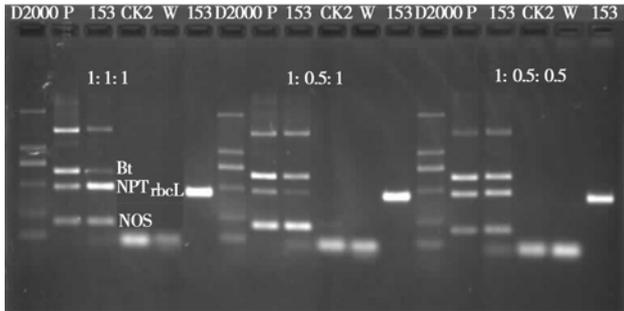


图3 特异性引物 *Bt*、*NPT II*、*NOS* 基因最适反应浓度的优化(电泳支持物为 1% 琼脂糖, M 为 D2000, 从下至上的条带分别为 100、250、500、750、1 000、2 000 bp, P 为质粒阳性对照, W 为去离子水空白对照, 退火温度为 59 °C。)

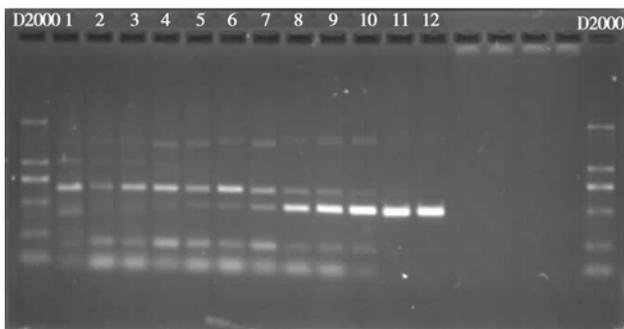


图4 三重 PCR 最适退火温度的确定及验证(电泳支持物为 1% 琼脂糖, M 为 D2000, 从下至上的条带分别为 100、250、500、750、1 000、2 000 bp, 1 ~ 12 代表的退火温度依次为: 50.0、50.4、51.4、52.6、54.5、56.8、59.5、61.8、63.5、64.8、65.7、66.0 °C。)

### 3 结论与讨论

通常,转基因产品的检测方法要求具有快速、简便、灵敏、可靠、适应样品量大等特点。目前,国际上转基因产品的检测方法主要是基于插入的外源基因和表达产物的基础上,包括 DNA 检测方法和蛋白质检测方法<sup>[14]</sup>。此外,还可以利用酶法分析、组织化学定位等方法快速检测鉴定报告基因的表达,对转基因产品进行初步分析。以 DNA 为基础的检测方法又包括聚合酶链式反应 PCR、Southern 杂交、Northern 杂交、RT-PCR 等;以蛋白质为基础的检测方法主要包括 ELISA 检测和 Western 杂交。用于 PCR 检测的 DNA 材料用量少,提取方便,快速,适合大批量样品分析,适用于转基因产品的初步检测。Southern、Northern、Western 杂交分别从整合、转录、翻译水平检测外源基因,说服力强;但这些分子杂交技术操作繁琐且费用高,不适合大批量的检测,可在 PCR 检测为阳性结果的基础上对转基因产品做进一

步的鉴定。

利用 PCR 检测转基因植物时,通常要通过 2 种或 2 种以上的转基因成分的检测结果来判断是否为转基因产品。另外,通常还需要检测植物的内源基因以确定是否提取到 DNA 或 DNA 提取物中是否存在抑制 PCR 反应的物质。普通 PCR 方法在检测这些转基因成分和内源基因上存在着种种缺点和弊端,利用多重 PCR 技术检测转基因植物的应用前景较好;同时由于多重 PCR 的复杂性,基因组 DNA 的提取质量、引物设计、引物组合、引物浓度的比例、退火温度等都会影响到多重 PCR 的检测效果,因此不同基因(片段)组合的多重 PCR 反应体系和反应条件都需要进行优化<sup>[4, 7, 15-17]</sup>。

本实验通过对普通 PCR 和多重 PCR 的比较,证明了该方法在转基因木本植物欧洲黑杨上同步检测外源基因的可行性。同时,针对基因组 DNA 的提取、引物的特异性、解链温度、引物浓度比等方面,对 *Bt*、*NPT II*、*NOS* 三个基因的多重 PCR 条件进行了摸索,建立并优化了 3 个基因组合的多重 PCR 检测体系,当 *Bt*、*NPT II*、*NOS* 三个基因引物的终浓度配比为 1:0.5:0.5,退火温度为 59 °C 时,所建立的多重 PCR 检测体系能够有效地检测出抗虫转基因欧洲黑杨中的转基因成分,实现了对抗虫转基因欧洲黑杨的快速、高效、准确的鉴定。同普通 PCR 相比,本方法简化了检测步骤,节约了大量原料,效率明显提高,结果也确凿可靠;同时,这一研究结果也为下一步利用全自动化毛细管电泳仪检测大批量转基因杨树及其产品奠定了良好的基础。

### 参考文献:

- [1] James C. 2008 年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势—第一个十三年(1996-2008)[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(2): 1-10
- [2] Fim R D, Jones C G. Secondary metabolism and the risks of GMOs [J]. Nature, 1999, 400(4739): 13-14
- [3] Chamberian J S, Gibbs R A, Ranier J E, et al. Detection screening of the duchenne muscular dystrophy locus via multiples DNA amplification[J]. Nucl Acids Res, 1988, 16:1141-1156
- [4] 刘正斌, 高庆荣, 王瑞霞, 等. 多重 PCR 技术在植物生物学中研究的应用[J]. 分子植物育种, 2005, 3(2): 261-268
- [5] Fraaije B A, Lovell D J, Coelho J W, et al. PCR-based assays to assess wheat varietal resistance to blotch and rust diseases[J]. European Journal of Plant Pathology, 2001, 107(9): 905-917
- [6] Matsuoka T, Kuribara H, Akiyama H, et al. A multiplex PCR method of detecting recombinant DNAs from five lines of genetically modified maize[J]. Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 2001, 42(1): 24-32

- [7] 陶震,杨胜利,龚毅. 利用 MPCR 方法快速检测植物基因背景[J]. 生物技术通报, 2000, (6): 37-41
- [8] 邵碧英,陈文炳,李寿崧,等. 转基因花卉的 DNA 提取与多重 PCR 分析[J]. 厦门大学学报:自然科学版, 2002, 41(5): 674-678
- [9] 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
- [10] 詹亚光,苏涛,韩梅,等. 转基因白桦外源基因的多重 PCR 快速检测[J]. 植物研究, 2006, 26(4): 480-485
- [11] 杨冬燕,杨勇存,邓平建. 转基因番木瓜 55-1 的多重 PCR 鉴定方法研究[J]. 中国卫生检疫杂志, 2006, 16(10): 1156-1157
- [12] 侯英杰,张冰玉,苏晓华. 转基因林木潜在生态风险研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2006, 26(12): 117-121
- [13] 刘海涛,张川红,马森,等. 杨属转基因植物 PCR 检测内标准基因的建立[J]. 广东农业科学, 2010, 37(3): 208-211
- [14] 贺熙勇,陈善春,彭爱红. 转基因植物的分子检测与鉴定方法及进展[J]. 热带农业科技, 2008, 31(1): 39-44
- [15] 邵碧英,江树勋,陈文炳,等. 番茄、甜椒中转基因成分和内源基因的多重 PCR 检测方法的建立[J]. 食品科学, 2004, 25(10): 209-213
- [16] 黄银花,胡晓湘,徐慰倬,等. 影响多重 PCR 扩增效果的因素[J]. 遗传, 2003, 25(1): 65-68
- [17] James D, Schidt A M, Wall E, *et al.* Reliable detection and identification of genetically modified maize, soybean, and canola by multiplex PCR analysis[J]. J Agric Food Chem, 2003, 51: 5829-5834