

网络出版时间:2013-10-22 17:22

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20131022.1722.018.html>

转基因玉米中膦丝菌素乙酰转移酶双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立

刘志浩^a, 高丽丽^a, 王新桐^a, 孙佳芝^a, 杨正友^b, 柴同杰^a

(山东农业大学 a 动物科技与动物医学院, b 生命科学学院, 山东 泰安 271018)

【摘要】【目的】以单克隆抗体(monoclonal antibody, mAbs)为基础, 建立检测膦丝菌素乙酰转移酶(the phosphinothricin acetyltransferase, PAT)的双抗体夹心 ELISA 方法, 为转基因玉米 PAT 蛋白的检测提供参考。【方法】由 P3301 质粒扩增出膦丝菌素乙酰转移酶基因(blalaphos resistance gene)*bar*, 并与表达载体 pET28a 构建重组质粒, 诱导表达产生外源性 PAT 蛋白; 以纯化后的 PAT 蛋白为免疫原, 制备 mAbs, 建立双抗体夹心 ELISA 方法, 并与 PCR 检测方法进行比较, 确定该方法的准确性和可靠性。【结果】应用 mAbs 4D5 和 3E8 成功建立了检测 PAT 蛋白的双抗体夹心 ELISA 方法, 其有效检测范围为 3.125~50 ng/mL。采用该夹心 ELISA 方法对 36 份已知转基因背景的玉米样品进行了检测, 根据阴阳性判定值 $OD_{450} > 0.210$, 检测出含 PAT 蛋白的 Bt176 阳性样品 4 份, 以 *bar* 基因为检测目标利用传统 PCR 方法也检测出相同的 Bt176 样品 4 份, 2 种检测方法的符合率为 100%。【结论】利用建立的双抗体夹心 ELISA 免疫学检测方法, 可以对转基因玉米中的 PAT 蛋白进行准确、特异、有效的检测。

【关键词】 PAT 蛋白; 单克隆抗体; 双抗体夹心 ELISA; Bt176

【中图分类号】 S513.021

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2013)11-0045-06

Development of monoclonal antibody based sandwich ELISA to detect PAT protein in genetically modified maize

LIU Zhi-hao^a, GAO Li-li^a, WANG Xin-tong^a, SUN Jia-zhi^a,

YANG Zheng-you^b, CHAI Tong-jie^a

(a College of Animal and Veterinary Medicine,

b College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

Abstract: 【Objective】A monoclonal antibody-based sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect phosphinothricin acetyltransferase (PAT) was developed and evaluated for determination of genetically modified (GM) maize. 【Method】The coding sequence of the blalaphos resistance gene (*bar*) was amplified by PCR from the plasmid P3301, cloned into the plasmid pET28a and expressed in *E. Coli* BL21 (DE3). mAbs against PAT was prepared using purified recombinant PAT as immunogen. Based on mAbs 4D5 and 3E8, double-antibody sandwich ELISA method was develop and the accuracy and reliability of this assay were determined by comparing with the PCR method. 【Result】The working range of sandwich ELISA was defined as a standard curve with a linear range of 3.125—50 ng/mL. Using the sandwich ELISA developed in this study, we could determine 4 GM maize Bt176 samples out of 36 corn samples analyzed with the threshold value of 0.210. PCR method targeting the *bar* gene showed the same

【收稿日期】 2012-12-21

【基金项目】 国家转基因重大专项(2009VX08012-003B)

【作者简介】 刘志浩(1986—), 男, 山东菏泽人, 在读硕士, 主要从事转基因作物检测研究。E-mail: liuzhihaow@163.com

【通信作者】 柴同杰(1957—), 男, 山东泰安人, 教授, 博士生导师, 主要从事环境微生物研究。E-mail: chaitj117@163.com

results. 【Conclusion】 The sandwich ELISA developed in this study can be used as a specific and reliable immunoassay for screening PAT in GM maize.

Key words: PAT; monoclonal antibody; sandwich ELISA; Bt176

随着转基因技术在植物遗传改造和生产中的广泛应用,转基因作物的种植面积越来越大,目前已有玉米、大豆、油菜、水稻、棉花等转基因品种进行了商品化种植^[1]。转基因作物在带来巨大经济效益和社会效益的同时,其安全性也引起了广泛争议和高度担忧。很多国家对进口的转基因食品及其成分含量都有明确的规定和标识要求,以保护消费者知情和自由选择的权利^[2]。有些国家尚未批准转基因作物进入商业化种植和生产,对转基因作物及其产品的有效监督和标识管理主要依赖于对转基因作物的快速、准确、有效检测。

目前对转基因作物的检测和鉴定方法主要集中在基因水平和蛋白质水平上。在基因水平上,主要是利用 PCR、Southern 杂交等方法对外源基因进行检测^[3-4]。近年来,多重 PCR、荧光定量 PCR、巢式 PCR 和基因芯片等技术在转基因作物的检测中也得到了长足的发展^[5-7]。PCR 方法虽然灵敏度很高,但存在一定的假阳性和假阴性率,并且不能区分不同转基因作物中的相同结构^[8],样品的处理及提取方法重复性差、检测方法繁琐耗时且检测成本较高,这些缺点使其不能完全承担国内和国际贸易中大量进出口产品的常规检测工作。在蛋白质水平上,主要是对外源基因的表达产物进行检测,主要有以高特异性抗体为基础的 Western-blot 方法、胶体金试纸条方法和 ELISA 方法^[9],其中 ELISA 方法以抗原和抗体特异性结合为基础,可以从原材料复杂成分中检测出靶蛋白,具有灵敏、简便、费用较低等特点。结合单克隆抗体技术和 ELISA 方法建立的双抗体夹心 ELISA 方法具有高灵敏性、高特异性等优点,可以被应用于转基因作物中外源蛋白的高通量检测,此前已有应用免疫学方法检测转基因大豆中 5-烯醇式丙酮莽草酸-3-磷酸合酶(5-enolpyruvylshimate-3-phosphate synthase, CP4-EPSPS)蛋白和某些转基因作物中新霉素磷酸转移酶(neomycin phosphotransferase II, NPT II)蛋白的报道^[10-11]。

转基因玉米 Bt176 由瑞士先正达公司开发并推广,具有耐除草剂和抗虫性状,在许多国家和地区大面积种植并作为食品和饲料广泛应用,目前我国已经允许进口加工此品种玉米。*bar* 基因是在 Bt176 玉米中应用的耐除草剂基因,其编码的 PAT 蛋白使

灭生性除草剂草丁膦的自由氨基乙酰化,使之不能抑制谷氨酰胺合成酶(Glutamine synthetase, Gs)的活性,从而使作物表现出对草丁膦的抗性^[12-13]。另外,*bar* 基因还作为标记基因广泛应用于作物的遗传改造和育种等方面^[14]。目前对耐除草剂 Bt176 玉米的检测主要依赖于不同类型的 PCR 方法,尚未见基于单克隆抗体技术对转基因玉米 PAT 蛋白进行检测的研究和报道。本研究以抗 PAT 蛋白单克隆抗体为基础,建立并初步应用夹心 ELISA 方法对 PAT 蛋白进行准确、特异的检测,以期对转基因玉米中 PAT 蛋白的检测提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

转基因玉米(主要外源基因) Bt176 (*bar*, Cry1Ab)、Bt11 (*pat*, Cry1Ab)、GA21 (EPSPS)、MON810 (Cry1Ab)、MON832 (EPSPS, *nptII*)、NK603 (EPSPS)、T25 (*pat*) 和 TC1507 (*pat*, Cry1Fa),均由农业部转基因植物环境安全监督检验测试中心提供;非转基因玉米购自山东省泰安市种子公司。含 *bar* 基因的 P3301 质粒由中国农业大学生物学院惠赠, BL21 (DE3) 和 Sp2/0 瘤细胞株由山东农业大学动物科技与动物医学院环境微生物实验室保存。

单克隆抗体亚型鉴定试剂盒、辣根过氧化物酶(HRP),均购自美国 Sigma 公司;pMD18-T,购自大连宝生物公司;High Affinity Ni-IDA Resin,购自南京金斯瑞公司;anti-His Tag 兔多抗,购自杭州华宝公司;融合剂 PEG1500,购自德国 Roche 公司。

1.2 *bar* 基因的克隆与表达

根据 *bar* 基因的全编码区序列和 pET28a 载体上的阅读框和多克隆位点,设计 1 对引物(上游引物: 5'-CGGAATTCATGAGCCCAGAACGACGC-3';下游引物: 5'-CCCAAGCTTATCAAATCTCG-GTGACGGGCAGG-3'),以 P3301 质粒为模板进行扩增,扩增条件为 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 64 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 7 min^[15]。得到的 PCR 产物经回收试剂盒纯化,与 pMD18-T 连接测序。测序正确的重组质粒经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切,连接到经同样双酶切的表达质粒 pET28a 上,转化表达感受态细胞 BL21(DE3),经过 IPTG 诱

导,外源基因表达情况用体积分数 12% SDS-PAGE 进行电泳分析。菌体超声破碎后,经 High Affinity Ni-IDA Resin 纯化,用抗 his 标签抗体作为一抗,对重组蛋白进行 Western-blot 验证。

1.3 抗 PAT 蛋白单克隆抗体的制备与鉴定

选择与骨髓瘤细胞 Sp2/0 同源的纯系雌性 BALB/c 小鼠(4~6 周龄)作为免疫动物。免疫方案:初次免疫为 100 μg 纯化后的 PAT 蛋白与等体积弗式完全佐剂乳化完全后,小鼠背部皮下多点注射;3 周和 6 周后,取 100 μg PAT 蛋白与等体积弗式不完全佐剂乳化完全后,背部皮下多点注射作为第 2、3 次免疫。融合前 4 d,腹腔注射 100 μg 不加佐剂的 PAT 蛋白。利用 PEG1500 对细胞进行化学法融合,间接 ELISA 方法检测细胞培养板上的阳性孔,经过 3 次亚克隆,扩大培养并及时冻存稳定分泌抗 PAT 蛋白的杂交瘤细胞株,利用单克隆抗体亚型鉴定试剂盒确定单克隆抗体的亚型。Western-blot 验证单克隆抗体与 PAT 蛋白、转基因玉米蛋白提取液反应的特异性。

选择 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠,腹腔注射弗式不完全佐剂 0.5 mL/只,1 周后注射杂交瘤细胞 $0.5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^6$ 个/只,7~10 d 后收集腹水,300×g 离心取上清,间接 ELISA 方法检测腹水效价。腹水经辛酸-硫酸铵方法纯化后,SDS-PAGE 检测纯化效果。利用高碘酸钠法将辣根过氧化物酶(HRP)标记到纯化后的单克隆抗体上^[16]。

1.4 双抗体夹心 ELISA 方法的建立

含单克隆抗体的抗原包被液(0.1 mol/L 碳酸盐缓冲液,pH=9.6),每孔 100 μL 包被酶标板,4 ℃过夜;PBST 洗涤 3 次后,用 200 μL 含质量分数 5%脱脂奶粉的 PBST 溶液封闭酶标板,室温孵育 1 h;洗涤 3 次,每孔加入 100 μL 制备的标准 PAT 蛋白(1 μg/mL)或待检样品,37 ℃孵育 1 h;洗涤 3 次,加入稀释于 PBS 的 100 μL 酶标抗体,37 ℃孵育 1 h。洗涤 3 次后,每孔加入 100 μL 可溶性 TMB 底物显色液,室温条件下避光孵育 15 min,2 mol/L H₂SO₄ 终止反应,450 nm 处读取吸光值。

初步选择抗体 4D5 和 2B7 作为包被抗体,以 3E8 为酶标抗体,进一步进行最佳抗体配对的选择,利用方阵滴定试验确定包被抗体的最佳包被浓度和酶标抗体的最佳稀释浓度。将标准 PAT 蛋白从 800 ng/mL 倍比稀释到 0.78 ng/mL,按已建立的双抗体夹心 ELISA 操作步骤建立标准曲线,根据标准曲线相关系数 $R^2 > 0.99$ 的线性相关部分,确定双抗体夹心 ELISA 方法检测 PAT 蛋白的有效检测范围,同时以非转基因玉米提取液作为阴性对照。对此 ELISA 方法进行重复性试验,每天 1 次,于不同时段共检测 3 次,验证此检测方法的稳定性和可靠性。采用建立的双抗体夹心 ELISA 方法对实验室中 8 种共 40 份非转 *bar* 基因玉米样品进行检测,根据公式:阴阳性临界值=阴性样本 OD₄₅₀ 平均值+3×标准偏差(SD),计算转 *bar* 基因玉米阴阳性判定的分界线。若待检玉米样品的 OD 值高于阴阳性临界值则被判定为阳性。

1.5 双抗体夹心 ELISA 方法和 PCR 方法对样品的检测

1.5.1 双抗体夹心 ELISA 方法检测 取玉米幼苗期的新鲜组织样品或干种子 1 g,液氮保护下研碎,加入 5 倍蛋白质提取液 PBS(pH=7.4,0.01 mL/L EDTA)提取 2 h,800×g 离心 20 min,上清作为夹心 ELISA 方法的待检溶液。取未经稀释的 100 μL 上清加入到已包被好的 96 孔酶标板中,按建立的夹心 ELISA 的最佳条件操作,测定酶标板在 450 nm 处的吸光值,根据阴阳性临界值判断待检玉米样品是否为转 *bar* 基因玉米。

1.5.2 定性 PCR 方法检测 取适量玉米组织研磨后,CTAB 法提取总 DNA^[17],以 OD₂₆₀/OD₂₈₀ = 1.7~2.0 的 DNA 溶液为模板,Bt176-F 和 Bt176-R 为引物,*zSSIb* 基因作为玉米的内参基因(表 1),进行转化体特异性检测的 PCR 扩增。PCR 扩增条件为:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,35 个循环;72 ℃ 延伸 7 min^[18]。10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析,纯化后连接 pMD18-T 载体进行测序验证。

表 1 PCR 引物序列与相应的目的片段
Table 1 Sequences and target elements of PCR primer pairs

引物名称 Primer	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	扩增基因 Target element	产物大小/bp Size
Bt176-F	AAGCACGGTCAACTCCGTAC	Bt176 玉米转化体序列 Event-specific sequence in Bt176	570
Bt176-R	TCGACTTTATAGGAAGGGAGAGG		
zSSIb-F	CGGTGGATGCTAAGGCTGATG	玉米 <i>zSSIb</i> 基因 Maize <i>zSSIb</i> gene	88
zSSIb-R	AAAGGGCCAGGTTCAATTATCCTC		

1.5.3 2 种检测方法对玉米样品检测结果的比较

比较双抗体夹心 ELISA 方法与 PCR 方法对 36 份已知转基因背景的玉米样品(试验所用的 8 种转基因玉米和非转基因玉米各 4 份)的检测结果,判定双抗体夹心 ELISA 方法对转基因玉米中 PAT 蛋白检测的准确性和可行性。

2 结果与分析

2.1 *bar* 基因的克隆与表达

以 P3301 质粒为模板,扩增出了 524 bp 的目的片段,测序结果表明 *bar* 基因序列正确,经双酶切与 pET28a 连接,成功构建了重组表达载体。重组菌经 IPTG 诱导,超声破碎并纯化后,SDS-PAGE 电泳

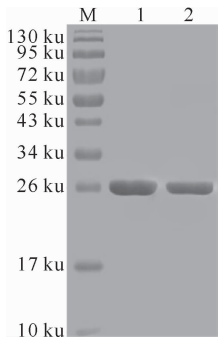


图 1 纯化后 PAT 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

M. 蛋白分子质量标准;

1~2. 纯化后的 PAT 重组蛋白

Fig. 1 Identification of purified PAT recombinant protein by SDS-PAGE

M. Protein Marker;

1—2. Purified recombinant PAT protein

2.3 双抗体夹心 ELISA 方法的建立及其对样品的检测

方阵滴定试验确定选择 4D5 为包被抗体,最佳包被质量浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$;3E8 为酶标抗体,最佳稀释倍数为 1 : 3 200。以重组 PAT 蛋白标准品质量浓度的自然对数为横坐标、OD₄₅₀ 值为纵坐标绘制双抗体夹心 ELISA 标准曲线。由图 3 可见,重组 PAT 蛋白质量浓度在 3.125~50 ng/mL 时与吸光值有较好的线性关系,表明双抗体夹心 ELISA 方法对 PAT 蛋白的有效检测范围为 3.125~50 ng/mL,最低检测限为 2.68 ng/mL。3 次重复性检测结果表明,每个质量浓度标准样品检测结果的变异系数均小于 5%,说明该方法具有较好的稳定性和再现性。

根据建立的双抗体夹心 ELISA 方法对 40 份非转 *bar* 基因玉米样品在 450 nm 处测得的吸光值见

分析结果表明,在 26 ku 处有明显的条带(图 1)。Western-blot 验证结果表明,重组原核表达载体成功表达出了目的蛋白(图 2)。

2.2 抗 PAT 蛋白单克隆抗体的制备与鉴定

细胞融合后,检测为阳性的杂交瘤细胞孔经过 3 次亚克隆,得到 6 株能够稳定分泌抗 PAT 蛋白的杂交瘤细胞株。单克隆抗体亚型鉴定结果表明,其中单克隆抗体 4D5 为 IgG2a 型,其余 5 株为 IgG1 型。6 株单抗与 PAT 蛋白均有良好的反应性,与非转基因玉米、转基因玉米 Bt11、GA21、MON810、MON832、NK603、T25 和 TC1507 组织中的内源性蛋白质均无交叉反应。

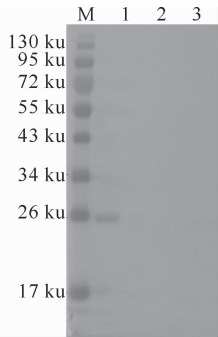


图 2 PAT 重组蛋白的 Western-blot 鉴定

M. 蛋白分子质量标准;1. 纯化后的 PAT 重组蛋白;

2. 空载体诱导后的裂解上清液;3. 空白对照

Fig. 2 Identification of recombinant PAT protein by Western-blot

M. Protein Marker;1. Purified recombinant PAT protein;

2. Lysis supernatant of pET28a under induction;3. Blank control

图 4。

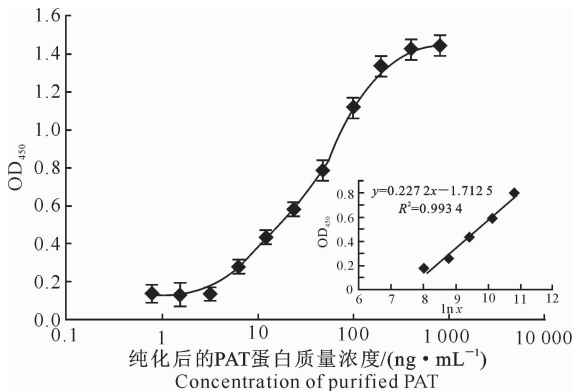


图 3 双抗体夹心 ELISA 标准曲线

ln *x*. 纯化后 PAT 蛋白质量浓度的自然对数

Fig. 3 Standard curve for the determination of purified PAT using sandwich ELISA

ln *x*. shows the natural logarithm of purified PAT concentrations

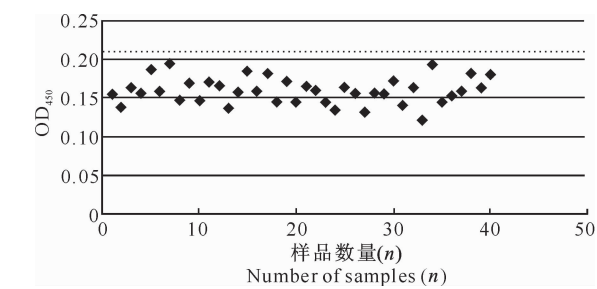


图 4 非转 *bar* 基因玉米样品的检测结果

Fig. 4 Results of non-transgenic *bar* maize samples

由图 4 得阴阳性临界值为“ OD_{450} 平均值 + $3SD$ ”= 0.210 ,即待检样品 $OD_{450} \leq 0.210$ 判定为阴性; $OD_{450} > 0.210$ 判断为阳性。由此测得转基因玉米 Bt176 样品的 OD_{450} 在 0.291 以上,其中新生叶片的 OD_{450} 值为 0.514 ± 0.020 ;茎秆处的 OD_{450} 值为 0.368 ± 0.024 ,二者差异显著 ($P < 0.05$),干种子的 OD_{450} 值为 0.331 ± 0.013 ,说明转基因玉米 Bt176 不同组织之间 PAT 蛋白的表达能力和水平并不相同。

2.4 定性 PCR 方法对转基因作物的特异性检测

对各玉米样品的定性 PCR 分析结果(图 5)显示,各样品均能扩增出对应的内参基因,空白对照未出现任何扩增条带。只有转 *bar* 基因耐除草剂玉米 Bt176 能扩增出 570 bp 的预期产物,而检测的其余转基因和非转基因玉米样品均未扩增出任何片段,表明参照的 PCR 方法对转基因玉米 Bt176 及其衍生品种鉴定的准确性。

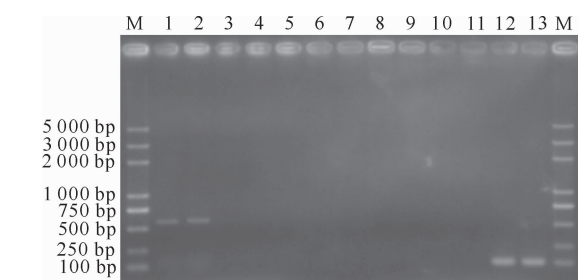


图 5 PCR 方法对各品种玉米和内参基因的扩增结果

M. DNA 标准 DL5000;1~2. 转基因玉米 Bt176;
3. Bt11;4. GA21;5. MON832;6. MON810;7. NK603;
8. T25;9. TC1507;10. 非转基因玉米;11. 空白对照;
12. 转基因玉米 $\approx SSIIb$ 内参基因;
13. 非转基因玉米 $\approx SSIIb$ 内参基因

Fig. 5 Amplification results of different maize types and endogenous reference gene by PCR

M. 5 000 bp DNA ladder;1~2. GM maize Bt176;3. Bt11;
4. GA21;5. MON832;6. MON810;7. NK603;8. T25;9. TC1507;
10. Non-GM maize;11. Blank control;12. Endogenous reference gene $\approx SSIIb$ of GM maize Bt176;13. Endogenous reference gene $\approx SSIIb$ of Non-GM maize

2.5 夹心 ELISA 方法与传统 PCR 方法检测结果的比较

利用双抗体夹心 ELISA 方法和传统 PCR 方法对 36 份已知转基因背景的玉米样品进行检测,结果表明,双抗体夹心 ELISA 法共检出 4 份阳性样品,4 份转基因玉米 Bt176 样品全部被检出,对 Bt11、GA21、MON810、MON832、NK603、T25 和 TC1507 的检测结果均为阴性;以 *bar* 基因为检测目标的 PCR 方法也检出 4 份阳性样品,4 份转基因玉米 Bt176 样品全部被检出。2 种检测方法的符合率为 100% ,说明建立的检测 PAT 蛋白的双抗体夹心 ELISA 方法具有较高的准确性和特异性。

3 讨论

在进行转基因作物外源蛋白的检测、安全性评价时,往往需要提供大量外源性蛋白,但转基因作物自身产生的外源蛋白一般含量很低,有的甚至不能达到可以检测的水平,难以富集和纯化,无法满足试验的要求^[19]。例如,PAT 蛋白在作物材料中的表达量非常低,一般 < 50 mg/kg。因此,采用现代生物学技术,建立一种大量产生外源蛋白的方法势在必行。对转基因外源蛋白检测或半定量测定时,最常用、准确的是夹心 ELISA 法,其灵敏度最高。单克隆抗体是针对单一抗原表位的高特异性抗体,应用于抗原的检测具有比多克隆抗体更准确、特异性更好的优势。本研究利用原核表达系统,在体外条件下大量制备了重组 PAT 蛋白,以此为抗原,制备了高特异性的单克隆抗体,并以此为基础建立了能准确、特异检测转基因玉米中 PAT 蛋白的夹心 ELISA 方法,该方法可操作性强、灵敏度高,更适用于对转 *bar* 基因玉米进行有效的市场监管和标识管理。

ELISA 方法可操作性强、技术条件要求较低,是一种广泛应用和较为成熟的生物检测和分析技术。目前,已有一些商品化外源转基因作物检测试剂盒研制成功,例如美国 Prime 公司研制的用于 RR 大豆(Roundup Ready soybean)CP4-EPSPS 蛋白检测的 GMO Chek RUR soya 试剂盒、美国 Envirologix 公司的 Bt 杀虫蛋白检测试剂盒等。ELISA 等免疫学检测方法虽然具备酶反应的高灵敏性和抗原抗体反应的特异性,但在加工过程中蛋白质会发生降解,因此,这种检测方法目前还只适合未加工原材料的检测。在该领域中,不同作物材料中蛋白质的更有效提取方法、基因沉默现象及一种

检测试剂盒能否在不同作物间通用都是目前亟待解决的问题。

本研究以转基因玉米外源蛋白为检测目标,制备了抗 PAT 蛋白的单克隆抗体,并用所建立的双抗体夹心 ELISA 方法对耐除草剂玉米 Bt176 及其衍生品种中的 PAT 蛋白进行了快速、准确的检测,显示该方法具有特异性强、稳定性和重复性好等优点,为转基因玉米高通量的检测奠定了方法基础。经过进一步开发,可望组装成可操作性强的定性和定量检测试剂盒或制备胶体金试纸条,供研究机构和监督单位使用。

参考文献

- [1] James C. Global hectaraage of GM crops in 2002 [J]. International Science for the Acquisition of Agribiotechnology Applications Briefs, 2003, 3(1): 2-5.
- [2] Nikolić Z, Taški-Ajduković Z K, Jevtić Z A, et al. Detection of GM soybean in food products by simultaneous employment of three pairs of PCR primers [J]. Food Research International, 2009, 42(3): 349-352.
- [3] Ahmed F E. Detection of genetically modified organisms in foods [J]. Trends in Biotechnology, 2002, 20(5): 215-223.
- [4] Zhang D B, Guo J C. The development and standardization of testing methods for genetically modified organisms and their derived products [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2011, 53(7): 539-551.
- [5] Deisingh A K, Badrie N. Detection approaches for genetically modified organisms in foods [J]. Food Research International, 2005, 38(6): 639-649.
- [6] Pter D B, Evelyn C I, Helene B, et al. Real-time quantitative polymerase chain reaction methods for four genetically modified maize varieties and maize DNA [J]. Journal of AOAC International, 2002, 85(3): 646-653.
- [7] Zhang M H, Gao X J, Yu Y B, et al. Detection of roundup ready soy in highly processed products by triplex nested PCR [J]. Food Control, 2007, 18(10): 1277-1281.
- [8] Zhu H, Zhao X, Jia J W, et al. A specific qualitative and real-time PCR detection of MON863 maize based on the 5'-transgene integration sequence [J]. Journal of Cereal Science, 2008, 48(3): 592-597.
- [9] Lipton C R, Dautlick J X, Grothaus G D, et al. Guidelines for the validation and use of immunoassays for determining of introduced proteins in biotechnology enhanced crops and derived food ingredients [J]. Food and Agriculture Immunology, 2000, 12(2): 153-164.
- [10] Lipp M, Ankla M, Stave J W. Validation of an immunoassay for detection and quantitation of a genetically modified soybean in food and food fractions using reference materials: Interlaboratory study [J]. Journal of AOAC International, 2000, 83(4): 919-927.
- [11] McKenzie M J, Mett V, Jameson P E. Modified ELISA for the detection of neomycin phosphotransferase II in transformed plant species [J]. Plant Cell Reports, 2000, 19(3): 286-289.
- [12] Hérouet C, Esdaile D J, Mallyon B A, et al. Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the pat and bar sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants [J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2005, 41(2): 134-149.
- [13] Maughan S C, Cobbett C S. Methionine sulfoximine, an alternative selection for the bar marker in plants [J]. Journal of Biotechnology, 2003, 102(2): 125-128.
- [14] D'Halluin K, De Block M, Denecke J, et al. The bar gene as selectable and screenable marker in plant engineering [J]. Method Enzymol, 1992, 216(3): 415-426.
- [15] 许文涛, 黄昆仑, 罗云波. bar 基因在大肠杆菌中的高效表达及其表达产物的分离和纯化 [J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(5): 583-588.
Xu W T, Huang K L, Luo Y B. High expression of bar gene in *Escherichia coli* and isolation and purification of its expressed protein [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2004, 12(5): 583-588. (in Chinese)
- [16] 郎立伟, 王玉霞, 王晨宇, 等. 双抗体夹心酶联免疫法检测不同样品中的蓖麻毒素 [J]. 国际药学研究杂志, 2009, 36(1): 12-16.
Lang L W, Wang Y X, Wang C Y, et al. Determination of ricin by double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay in different samples [J]. Journal of International Pharmaceutical Research, 2009, 36(1): 12-16. (in Chinese)
- [17] 中国国家标准化管理委员会. NY/T 674—2003 转基因植物及其产品检测: DNA 提取和纯化 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
Standardization Administration of the People's Republic of China. NY/T 674—2003 Detection of genetically modified plants and their products: DNA extraction and purification [S]. Beijing: China Standard Publishing House, 2003. (in Chinese)
- [18] 中华人民共和国农业部科技发展中心. 农业部 869 号公告-8-2007 转基因植物及其产品成分检测: 抗虫和耐除草剂玉米 Bt176 及其衍生品种定性 PCR 方法 [S]. 北京: 中国农业出版社, 2012.
Science and Technology Development of Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. The 869th announcement of Ministry of Agriculture of the People's Republic of China-8-2007 Detection of genetically modified plants and derived products: Qualitative PCR method for insect-resistant and herbicide-tolerant maize Bt176 and its derivatives [S]. Beijing: China Agriculture Press, 2012. (in Chinese)
- [19] Groat R G, Mattison J W, French E J. Quantitative immunoassay of insecticidal proteins in *Bacillus thuringiensis* products [J]. Analytical Chemistry of *Bacillus Thuringiensis*, 1990, 432(10): 88-97.