

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2011.01533

## 一种适合转基因棉 *CpTI* 和 *cryIA* 基因剂量测定的标准质粒的构建和应用

苏长青<sup>1,2</sup> 谢家建<sup>1,\*</sup> 孙 爻<sup>1</sup> 彭于发<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> 植物病虫害生物学国家重点实验室 / 农业部转基因植物环境安全监督检验测试中心(北京) / 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100193; <sup>2</sup> 衡水学院生命科学系, 河北衡水 053000

**摘 要:** 在转基因检测领域, 标准质粒以容易获得、纯度高、成本低和稳定性好的优点逐渐被广泛应用, 适合同时检测多个靶标基因的需求。本研究针对我国抗虫棉(*Gossypium hirsutum* L.)的主要外源基因类型, 构建含有豇豆胰蛋白酶抑制剂基因(*CpTI*)、苏云金杆菌晶体杀虫蛋白基因(*cryIA*)和棉花内标准基因硬脂酰-酰基载体蛋白脱饱和酶基因(*Sad1*)的多靶标质粒 pMD-CCS 作为标准物质, 建立了 *CpTI* 和 *cryIA* 基因的实时荧光定量 PCR 方法。测定了我国 9 个抗虫棉品种中的 *CpTI* 和 *cryIA* 基因剂量, 显示科棉 3 号等 3 个抗虫棉品种中 *CpTI* 基因的平均剂量为 0.020~0.018 拷贝/基因组, *cryIA* 基因的平均剂量为 1.377~2.136 拷贝/基因组; 鄂杂棉 1 号 F<sub>1</sub> 等 6 个抗虫棉品种中 *cryIA* 基因的平均剂量为 0.887~2.564 拷贝/基因组, 定量结果的标准差(SD)范围在 0.001~0.149 之间。结果说明, pMD-CCS 适合作为标准物质用于抗虫棉中 *CpTI* 和 *cryIA* 基因的定量测定。

**关键词:** 抗虫棉; *CpTI* 基因; *cryIA* 基因; 基因特异性实时 PCR; 标准质粒

## Construction and Application of a Reference Plasmid Suitable for Determination of *CpTI* and *cryIA* Gene Dosages in Genetically Modified Cottons

SU Chang-Qing<sup>1,2</sup>, XIE Jia-Jian<sup>1,\*</sup>, SUN Yao<sup>1</sup>, and PENG Yu-Fa<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests / Institute of Plant Protection, China Inspection Test Center for Environmental Safety of Transgenic Crops, Ministry of Agriculture / Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; <sup>2</sup> Department of Life Science, Hengshui College in Hebei, Hengshui 053000, China

**Abstract:** In transgenic detection field, a preferable reference material (RM) has been developing with the advantage of easy availability, high purity, low cost and good stability, which is more suitable for detecting multiple target genes. In the present study, we constructed a multi-target reference plasmid named pMD-CCS containing *cowpea trypsin inhibitor* (*CpTI*) and *Bacillus thuringiensis insecticidal crystal protein* (*cryIA*) and cotton endogenous gene *Stearoyl-acyl carrier protein desaturase* (*Sad1*) sequences targeting the key exogenous gene types of the insect resistant cotton varieties (*Gossypium hirsutum* L.) in China. The real-time quantitative PCR methods for *CpTI* and *cryIA* were established using pMD-CCS as the RM. The dosages of *CpTI* and *cryIA* from nine insect resistant cotton varieties were determined. The average *CpTI* dosages were 0.020–0.018 copies/genome and the average *cryIA* dosages were 1.377–2.136 copies/genome in three insect resistant cotton varieties including Kemian3. The average *cryIA* dosages were 0.887–2.564 copies/genome in six ones including Ezamian1-F<sub>1</sub>. The standard deviations (SD) of the quantitative measurement ranged from 0.001–0.149. The above results demonstrated that pMD-CCS could be used as the RM for the quantitative measurement of *CpTI* and *cryIA* genes in insect resistant cotton varieties.

**Keywords:** Insect resistant cotton; *CpTI* gene; *cryIA* gene; Gene-specific real-time PCR; Reference plasmid

本研究由国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2007CB109201)和国家转基因新品种培育重大科技专项(2011ZX08012-002, 2011ZX08011-001)资助。

\* 通讯作者(Corresponding authors): 谢家建, E-mail: jjxie@ippcaas.cn; 彭于发, E-mail: yfpeng@ippcaas.cn

第一作者联系方式: E-mail: scqhengshui@126.com

Received(收稿日期): 2011-01-19; Accepted(接受日期): 2011-04-27; Published online(网络出版日期): 2011-06-28.

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20110628.1009.015.html>

转基因棉花是我国首个大面积商业化种植的转基因作物,在全球的种植面积仅次于转基因大豆和玉米,具耐除草剂和抗虫等主要性状<sup>[1]</sup>。我国的转基因抗虫棉研究技术处于国际领先水平。Guo 等<sup>[2]</sup>利用农杆菌介导法和花粉管通道法将 *Bt* 杀虫蛋白基因 *cryIA* 导入棉花获得具有自主知识产权的转基因抗虫棉国抗系列。为了有效应对靶标害虫对抗虫棉的适应并产生抗性的问题,Guo 等<sup>[3-4]</sup>又将豇豆胰蛋白酶抑制基因 *CpTI* 和 *cryIA* 成功导入棉花育成转双价基因(*CpTI*+*cryIA*)抗虫棉 SGK 系列。目前,在我国生产上应用的国产抗虫棉,以国抗系列和 SGK 系列为主。除此之外,美国孟山都公司研发的转 *cryIA* 单价抗虫棉品系 MON531(新棉 33B)在我国也有一定的市场份额<sup>[5-6]</sup>。

随着转基因技术的迅速发展,越来越多的转化事件不断出现。特别是我国转基因抗虫棉品种繁多、来源广泛,许多品种背景不明,且根据本实验室对市场抗虫棉品种追踪研究,尚存在种子混杂的现象,因此非常有必要建立一种抗虫基因的高特异性、高通量、快速定量的方法。现在实时荧光定量 PCR 方法为首选方法<sup>[7]</sup>。标准物质是建立定量方法的关键。由于阳性植物标准品不容易大量获得,制备又较困难,成本也高,因此,标准质粒成为一种受欢迎的替代品,它的优点是容易获得,纯度高,而且根据需要可以将多个靶标序列构建到一个标准质粒中建立多靶标标准分子,经济高效,已经成功应用于转基因大豆、棉花和玉米等的定量检测<sup>[8-12]</sup>。

本研究根据我国抗虫棉的主要外源基因类型,构建一种含有外源 *CpTI*、*cryIA* 基因和棉花内标准基因 *Sad1* 序列的标准质粒作为标准物质,建立了基于两个外源基因的实时荧光定量检测方法,以期实现对混合样品中 2 个外源基因剂量的测定,为我国抗虫棉的种子鉴别、谱系筛查等提供技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料和 DNA 提取

转基因棉花材料购自江苏、甘肃和安徽省的种子市场。经本实验室使用常规 PCR 进行 *CpTI* 和 *cryIA* 基因筛查,选取 3 个含 *cryIA* 和 *CpTI* 基因的棉花(*Gossypium hirsutum* L.)品种科棉 3 号、苏杂棉 66 和科棉 6 号以及 6 个转 *cryIA* 基因抗虫棉品种鄂杂棉 1 号 F<sub>1</sub>、湘丰棉 3 号、南农优 3 号、升金棉 10 号、新陆早 33 和皖棉 13 作为研究材料。采用植物

基因组提取试剂盒提取棉花基因组 DNA。

### 1.2 主要试剂和仪器

*rTaq* DNA 聚合酶、2×*Taq* Man Realtime PCR Master mix、克隆载体 pMD20-T 购自大连宝生物公司(TaKaRa);大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 JM110 于本实验室保存。植物基因组提取试剂盒购自北京天根生物技术公司,质粒 DNA 提取试剂盒购自杭州爱思进生物技术公司。荧光定量反应在 ABI PRISM 7500 荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems, USA)上进行。

### 1.3 引物和探针设计

根据 *CpTI* (GenBank 登录号为 DQ417204)和 *cryIA* (GenBank 登录号为 EU816953)基因序列使用 Primer Express 软件(ABI, 美国)设计 *CpTI*-F/*CpTI*-R、*CpCry*-F/*cryIA*-R、*CpTI*-QF/*CpTI*-QR、*cryIA*-QF/*cryIA*-QR 4 个引物对和 *CpTI*-QP、*cryIA*-QP 两个荧光探针。参考 Yang 等<sup>[13]</sup>设计 *CrySad*-F/*Sad1*-2R 和 *cryIA*-QF/*cryIA*-QR 引物对和荧光探针 *Sad1*-p。由北京三博远志生物技术公司合成引物,由上海英骏生物技术公司合成探针,5'端标记 FAM 荧光基团,3'端标记 BHQ1 荧光猝灭基团(表 1)。

### 1.4 标准质粒构建

采用重叠 PCR 方法经过 3 轮 PCR 扩增获得含有 *CpTI*、*cryIA* 基因序列和棉花内标基因 *Sad1* 序列的克隆片段。第 1 轮 PCR 使用 *CpTI*-F/*CpTI*-R、*CpCry*-F/*cryIA*-R 和 *CrySad*-F/*sad1*-2R 引物对扩增科棉 3 号基因组 DNA 分别获得 257、322 和 128 bp 的扩增片段 *cp*、*cry* 和 *sad*;第 2 轮 PCR 使用 *CpTI*-F/*cryIA*-R,以 *cp* 和 *cry* 为模板获得 559 bp 的扩增连接片段 *cp-cry*;第 3 轮 PCR 使用 *CpTI*-F/*sad1*-2R 以 *cp-cry* 和 *sad* 为模板获得 666 bp 的 *cp-cry-sad* 连接片段。

扩增反应体系为 50  $\mu$ L,包含 2  $\mu$ L 基因组 DNA、5  $\mu$ L 10×PCR 缓冲液、2.5 mmol L<sup>-1</sup> dNTPs、4  $\mu$ L 10  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> 上下游引物各 2  $\mu$ L、5 U *Taq* 聚合酶 0.25  $\mu$ L、纯水 34.75  $\mu$ L。反应条件为 94℃变性 4 min;进行 35 次循环扩增反应(94℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 30 s 或 1 min),最后 72℃延伸 7 min。

将重组片段回收、纯化后克隆到 pMD20-T 载体中,通过测序验证克隆序列的正确性。提取鉴定好的质粒 DNA,用 0.8%凝胶电泳和分光光度计检测完整性、浓度和纯度。根据质粒质量和分子量计算出每微升质粒 DNA 的拷贝数。用纯水将质粒 DNA

表 1 本研究使用的引物和探针  
Table 1 Primers and probes in this study

目的 Objective	靶标序列 Target sequence	引物/探针 Primer/probe	引物序列 Primer sequence (5'-3')	扩增长度 Length (bp)
标准质粒构建 Construction of standard plasmid	<i>CpTI</i>	CpTI-F	GATTTGAACCACCTCGGAAG	257
		CpTI-R	CTCATCATCTTCATCCCTGG	
	<i>cryIA</i>	CpCry-F	CCAGGGATGAAGATGATGAG GAAGGTTTGAGCAATCTCTAC	321
		cry1A -R	CGATCAGCCTAGTAAGGTCGT	
	<i>Sad1</i>	CrySad-F	ACGACCTTACTAGGCTGATCG CCAAAGGAGGTGCCTGTTCA	128
		sad1-2R	TTGAGGTGAGTCAGAATGTTGTTC	
基因特异性实时 PCR Gene-specific real-time PCR	<i>Sad1</i>	sad1-1F	CCAAAGGAGGTGCCTGTTCA	107
		sad1-2R	TTGAGGTGAGTCAGAATGTTGTTC	
		sad1-p	TCACCCACTCCATGCCGCTCACA	
	<i>CpTI</i>	CpTI-QF	CTCAAGCGATGAACCTTCTGAGT	99
		CpTI-QR	CACCTGATATCTGTACAATGGCATT	
		CpTI-QP	TTCAGAACCATGCTGCGATTTCATGCA	
	<i>cryIA</i>	cry1A-QF	CCGTGTACGTTCAAGCAGCTAA	62
		cry1A-QR	CCCACCTTTGCCCAAACA	
		cry1A -QP	CTTCACCTCAGCGTGCTTCGAGACG	

分别稀释到  $5\times10^6\sim5\times10^2$  拷贝  $\mu\text{L}^{-1}$ 。拷贝数=(质量/分子量) $\times6.0\times10^{23}$ 。

1.5 转基因棉花中 *CpTI* 和 *cryIA* 基因剂量的测定

1.5.1 *CpTI* 基因的测定 分别以 5 个浓度梯度 ( $10^7\sim10^3$  拷贝)的标准质粒作为模板,应用棉花 *Sad1* 基因特异性定量引物 Sad1-1F/Sad1-2R 和探针 Sad1-p 以及 *CpTI* 基因特异性定量引物 CpTI-QF/CpTI-QR 和探针 CpTI-QP 建立基于 *Sad1* 和 *CpTI* 两个靶标序列的实时荧光定量 PCR 标准曲线。应用建立的 2 个标准曲线,分别以科棉 3 号、苏杂棉 66 和科棉 6 号基因组 DNA 为模板,测定 3 个样品 DNA 中的 *Sad1* 基因和 *CpTI* 基因拷贝数。

考虑到采用的棉花内标基因 *Sad1* 是两个拷贝(单倍体基因组),而陆地棉基因组是四倍体<sup>[14]</sup>,故 *Sad1* 基因总的拷贝数是 8。外源基因剂量 copies/genome = (样品外源基因拷贝数 $\times8$ )/(样品 *Sad1* 基因拷贝数)

1.5.2 *cryIA* 基因的测定 应用棉花 *Sad1* 基因特异性定量引物 Sad1-1F/Sad1-2R 和探针 Sad1-p 以及 *cryIA* 基因特异性定量引物 cry1A-QF/cry1A-QR 和

荧光探针 cry1A-QP 建立基于 *Sad1* 基因和 *cryIA* 基因的 2 个定量标准曲线。然后应用建立的标准曲线对所有 9 个含 *cryIA* 基因的棉花基因组 DNA 剂量进行测定。标准曲线建立、基因拷贝数测定和基因剂量计算与 *CpTI* 基因相同。

1.5.3 定量条件 反应体系为 20  $\mu\text{L}$ , 包括 2  $\mu\text{L}$  模板(质粒 DNA 或棉花基因组 DNA), 50 $\times$ Rox Reference Dye 0.4  $\mu\text{L}$ , 2 $\times$ Taq Man Realtime PCR Master mix 10  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  上下游引物各 2  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  荧光探针 1  $\mu\text{L}$ , 纯水 4.6  $\mu\text{L}$ 。反应的程序为 95 $^{\circ}\text{C}$  5 s, 1 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$  5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 45 个循环; 在 60 $^{\circ}\text{C}$  时收集荧光信号。

2 结果与分析

2.1 *CpTI*、*cryIA* 和 *Sad 1* 多靶标标准质粒的构建

通过重叠 PCR 成功构建了含有 *CpTI*、*cryIA* 和 *Sad 1* 3 个靶标序列的标准质粒 pMD-CCS。重组片段序列和标准质粒图谱见图 1。

2.2 *CpTI*、*cryIA* 基因特异性定量方法的建立

以  $10^7\sim10^3$  拷贝的标准质粒 pMD-CCS 为模板建

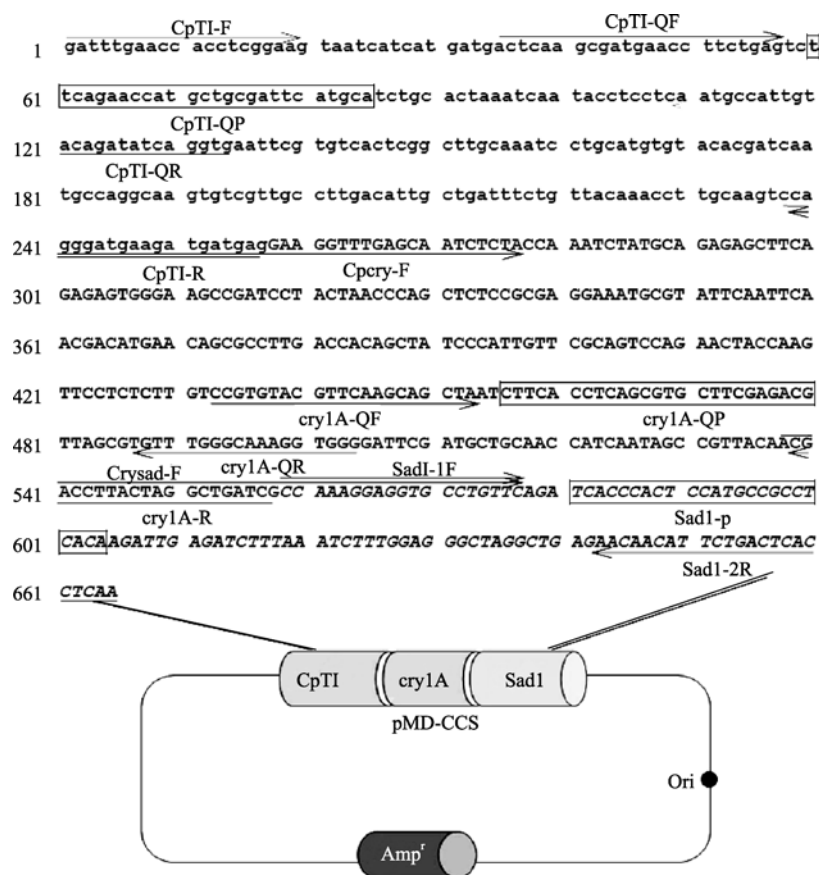


图 1 标准质粒 pMD-CCS 的插入核苷酸序列及结构

Fig. 1 Nucleotide sequence and construction of the reference plasmid pMD-CCS

小写字母表示 *CpTI* 序列; 大写字母表示 *cryIA* 序列; 斜体表示 *Sad1* 序列。

Lowercase letters indicate *CpTI* sequence; capital letters indicate *cryIA* sequence; italic letters indicate *Sad1* sequence.

立了基于 *Sad1*、*CpTI* 和 *cryIA* 3 个靶标序列的标准曲线。棉花内标准基因 *Sad1* 作为定量的内参照。3 个标准曲线的相关系数( $R^2$ )分别为 0.9963、0.9974 和 0.9965, 表明起始模板拷贝数和荧光阈值( $C_t$ )值之间具有良好的线性关系。PCR 扩增效率( $E$ )分别为 1.0797、1.0584 和 1.0286, 均接近 1 (图 2)。目前, 国际上关于转基因定量方法的相关要求是满足  $-3.1$  slope  $-3.6$ ;  $R^2$  0.98; 120%  $E$  80%<sup>[15]</sup>, 本研究建立的 3 个基因的标准曲线均完全符合这个要求, 可以用于转基因棉花中外源 *CpTI* 和 *cryIA* 基因的定量检测。

### 2.3 *CpTI* 和 *cryIA* 基因剂量的测定

应用建立的 3 个标准曲线对我国 3 个含 *CpTI* 和 *cryIA* 基因的抗虫棉(科棉 3 号、苏杂棉 66 和科棉 6 号)和 6 个含 *cryIA* 基因的抗虫棉(鄂杂棉 1 号  $F_1$ 、湘丰棉 3 号、南农优 3 号、升金棉 10 号、新陆早 33 和皖棉 13)测定的结果如表 2 和表 3 所示。其中, 科棉 3 号等 3 个抗虫棉样品中 *cryIA* 基因的平均

剂量分别为 1.377、2.136 和 2.070 拷贝/基因组, *CpTI* 基因的平均剂量分别为 0.020、0.016 和 0.018 拷贝/基因组, 鄂杂棉 1 号  $F_1$  等 6 个抗虫棉样品中 *cryIA* 基因的平均剂量在 0.887~2.564 拷贝/基因组之间, 含量最高的是湘丰棉 3 号, 含量最低的是南农优 3 号。对上述定量结果进行统计分析的标准差( $SD$ )范围在 0.001~0.149 之间, 测定结果之间的偏差较小, 说明该方法可以可靠地用于 2 个靶标基因的定量测定。

### 3 讨论

研究表明, 外源基因的拷贝数与其表达量和遗传稳定性有着密切的关系, 外源基因低拷贝整合可以高水平表达, 高拷贝可以导致外源基因低水平表达甚至基因沉默<sup>[16-17]</sup>, 因此确定外源基因拷贝数对转基因作物的选择和应用至关重要。确定外源基因拷贝数的传统方法是 Southern 杂交<sup>[18]</sup>, 虽然这种方

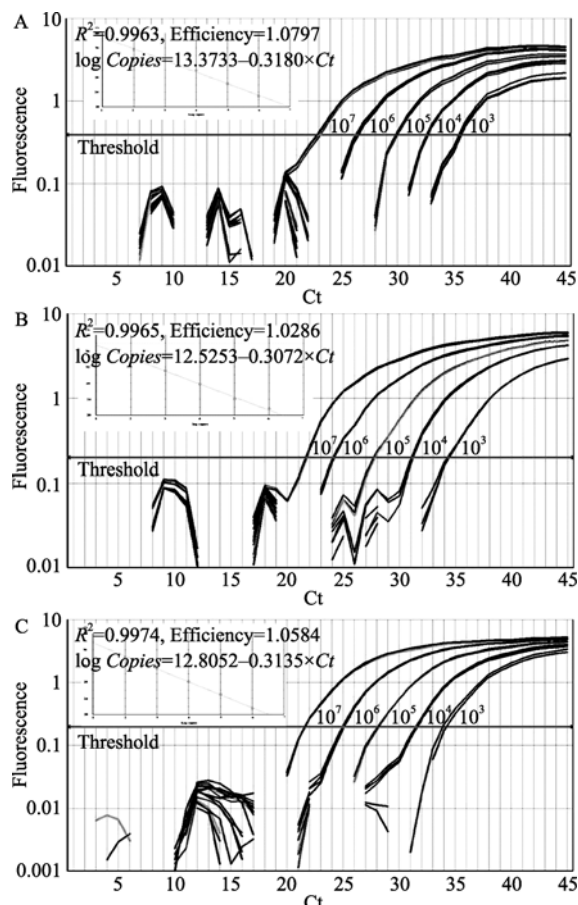


图2 pMD-CCS作为标准物质的基因特异性定量方法的扩增曲线和标准曲线

Fig. 2 Amplification plots and standard curves of the gene-specific quantitative PCR assays using pMD-CCS as the RM

A: *Sad1* 基因; B: *CpTI* 基因; C: *cryIA* 基因。

A: *Sad1* gene; B: *cryIA* gene; C: *CpTI* gene.

法比较直观,但是成本高、费时、费力,需要大量基因组DNA。而实时荧光定量PCR技术实现了在整个PCR扩增过程中对扩增产物的实时监测,具特异性强,重复性好,灵敏度高、高通量等优点,被广泛应用于各个领域,包括基因拷贝数的测定以及基因表达的定量分析等<sup>[19-22]</sup>。其中,Yang等<sup>[21]</sup>应用实时荧光定量PCR方法以转化载体pCambia 1301质粒DNA作为标准,测定了转基因水稻植株中 $\beta$ -葡萄糖苷酸酶(*GUS*)和潮霉素(*HPT*)基因拷贝数,并与Southern杂交检测结果比较,证实两种方法的结果是一致的。

*CpTI*和*cryIA*基因是我国抗虫棉的2个主要的抗虫基因类型。从基因水平分析抗虫棉品种是鉴定

其质量的一个重要内容。而我国转基因棉花育种单位众多,水平参差不齐,在一定程度上存在基因混杂、品种不纯等现象。通过分析抗虫基因在品种中的平均整合数量是从整体上评价该品种抗虫质量的一种有效方法。Yang等<sup>[9]</sup>建立了我国抗虫棉品系SGK321基于*CpTI*和*cryIAc*两个外源基因的定性PCR方法,但并没有对我国其他棉花品种进行定性和定量分析。考虑到我国转基因棉花品种中可能含有多个转化事件,而且单粒种子间还存在纯合或杂合等不纯的现象,因此很难通过Southern杂交来测定目的基因在基因组中的平均拷贝数。与此相似,转基因产品生产、销售过程,需要标识转基因含量。转基因含量一般以标准质粒或纯合材料的DNA为标准建立的定量PCR方法来测定的<sup>[23-25]</sup>。随着转基因品种的不断增多,同时检测多靶标的标准质粒分子应用越来越多<sup>[9-10]</sup>。本研究成功构建了含有*CpTI*和*cryIA*两个靶标序列和*Sad1*内标准基因序列的标准质粒pMD-CCS,建立了能对混合样品DNA中*CpTI*和*cryIA*基因剂量(拷贝数/基因组)准确定量的实时荧光定量PCR方法,5个浓度梯度( $10^7 \sim 10^3$ 拷贝)之间的相关系数接近1,PCR扩增效率也接近1,说明在此浓度区间定量具有良好的线性关系。和基因组DNA作为标准物质比较<sup>[24-25]</sup>,相关系数和PCR扩增效率值均接近。从对我国9种转基因棉花的定量检测结果看,*cryIA*基因剂量在1~2拷贝/基因组左右,说明*cryIA*比较稳定地整合到棉花基因组上,但品种间还存在一定差异。而检测的几个品种中*CpTI*基因的剂量较低,推测可能是由于这几个品种中仅含有少量携带*CpTI*基因的种子。我们进一步对其中一个品种进行单粒种子的检测,通过*CpTI*基因常规定性PCR检测表明,在随机抽取的30粒种子中仅有1粒检测为阳性,这也证实我们的推断,表明我们建立的定量检测方法是可靠的。

#### 4 结论

以构建的含有*cryIA*基因、*CpTI*基因和棉花内标准*Sad1*基因的重组质粒为标准物质建立了Taqman实时荧光定量PCR方法,实现了对棉花样品中*cryIA*和*CpTI*基因剂量的高通量、快速和低成本的测定,在我国转基因棉花的目的基因分析中具有一定的应用价值。

表 2 9 个抗虫棉样品中 *cryIA* 基因剂量的测定  
Table 2 Quantification of the *cryIA* dosages in nine insect resistant cotton samples

样品名称 Sample name	<i>Sad1</i>	<i>cryIA</i>	基因剂量(拷贝数/基因组) Dosage (copies/genome)	平均值 Average value	<i>SD</i>
科棉 3 号 Kemian 3	1701900	286333	1.346	1.377	0.103
	1772030	286751	1.295		
	1693110	315544	1.491		
苏杂棉 66 Suzamian 66	702702	180964	2.060	2.136	0.149
	721412	183916	2.040		
	675920	194929	2.307		
科棉 6 号 Kemian 6	665244	174346	2.097	2.070	0.066
	664879	176000	2.118		
	709695	176994	1.995		
鄂杂棉 1 号 F <sub>1</sub> Ezamian 1-F <sub>1</sub>	293064	52655	1.437	1.570	0.089
	285715	56873	1.592		
	303068	63677	1.681		
湘丰棉 3 号 Xiangfengmian 3	318537	98526	2.474	2.564	0.083
	323735	106705	2.637		
	331622	107027	2.582		
南农优 3 号 Nannongyou 3	76214	9047	0.950	0.887	0.057
	80821	8799	0.871		
	78439	8232	0.840		
升金棉 10 号 Shengjinmian 10	426655	103986	1.950	1.932	0.037
	433960	106082	1.956		
	454515	107308	1.889		
新陆早 33 Xinluzao 33	113109	16115	1.140	1.074	0.085
	112203	15485	1.104		
	114104	13945	0.978		
皖棉 13 Wanmian 13	176808	27965	1.265	1.276	0.092
	182097	27106	1.191		
	169046	29004	1.373		

表 3 3 个抗虫棉样品中 *CpTI* 基因剂量的测定  
Table 3 Quantification of the *CpTI* dosages in three insect resistant cotton samples

样品名称 Sample name	<i>Sad1</i>	<i>CpTI</i>	基因剂量(拷贝数/基因组) Dosage (copies/genome)	平均值 Average value	<i>SD</i>
科棉 3 号 Kemian 3	1701900	4189	0.020	0.020	0.001
	1772030	3950	0.018		
	1693110	4323	0.020		
苏杂棉 66 Suzamian 66	702702	1424	0.016	0.016	0.001
	721412	1375	0.015		
	675920	1412	0.017		
科棉 6 号 Kemian 6	665244	1488	0.018	0.018	0.002
	664879	1610	0.019		
	709695	1403	0.016		

References

[1] James C. Global status of commercialized biotech/GM crops: *ISAAA Briefs*. No.42, 2010. ISAAA: Ithaca, NY

[2] Guo S-D(郭三堆), Ni W-C(倪万潮), Xu Q-F(徐琼芳). Expressive carrier with coded insect-killing protein fusion gene, and transfer gene plant. China, 1995, patent number: 95119563.8 (in Chinese)

- [3] Guo S-D(郭三堆), Cui H-Z(崔洪志), Xu Q-F(徐琼芳), Ni W-C(倪万潮). Expressive carrier with coded two insect-killing protein fusion genes, and transfer gene plant. China, 1998, Patent number: ZL98102885.3 (in Chinese)
- [4] Guo S-D(郭三堆), Cui H-Z(崔洪志), Xia L-Q(夏兰芹), Wu D-L(武东亮), Ni W-C(倪万潮), Zhang Z-L(张震林), Zhang B-L(张宝龙), Xu Y-J(徐英俊). Development of Bivalent Insect-resistant transgenic cotton plants. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 1999, 32(3): 1–7 (in Chinese with English abstract)
- [5] Huang J K, Rozelle S, Pray C, Wang Q F. Plant biotechnology in China. *Science*, 2002, 295: 674–677
- [6] Network of Science and Technology Education of Agricultural Information of China (中国农业科教信息网). The Second Batch List of Approved Safety Certificates of Genetically Modified Organisms in 2009 (2009年第二批农业转基因生物安全证书批准清单). [2011-01-10] <http://www.stee.agri.gov.cn/biosafety/spxx/020091127591594596689.pdf> (in Chinese)
- [7] Elenis D S, Kalogianni D P, Glynnou K, Ioannou P C, Christopoulos T K. Advances in molecular techniques for the detection and quantification of genetically modified organisms. *Anal Bioanal Chem*, 2008, 392: 347–354
- [8] Kuribara H, Shindo Y, Matsuoka T, Takubo K, Futo S, Aoki N, Hirao T, Akiyama H, Goda Y, Toyada M, Hino A. Novel reference molecules for quantification of genetically modified maize and soybean. *J AOAC Int*, 2002, 85: 1077–1089
- [9] Yang L T, Pan A H, Zhang K W, Guo J C, Yin C S, Chen J X, Huang C, Zhang D B. Identification and quantification of three genetically modified insect resistant cotton lines using conventional and Taqman real-time polymerase chain reaction methods. *J Agric Food Chem*, 2005, 53: 6222–6229
- [10] Yang L T, Pan A H, Zhang K W, Yin C S, Qian B J, Chen J X, Huang C, Zhang D B. Qualitative and quantitative PCR methods for event-specific detection of genetically modified cotton Mon1445 and Mon531. *Transgenic Res*, 2005, 14: 817–831
- [11] Yang L T, Guo J C, Pan A H, Zhang H B, Zhang K W, Wang Z M, Zhang D B. Event-specific quantitative detection of nine genetically modified maizes using one novel standard reference molecule. *J Agric Food Chem*, 2007, 55: 15–24
- [12] Li X, Shen K L, Yang L T, Wang S, Pan L W, Zhang D B. Applicability of a novel reference molecule suitable for event-specific detections of maize NK603 based on 5' and 3' flanking sequences. *Food Control*, 2010, 21: 927–934
- [13] Yang L T, Chen J X, Huang C, Liu Y H, Jia S R, Pan L W, Zhang D B. Validation of a cotton-specific gene, *Sad1*, used as an endogenous reference gene in qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenic cottons. *Plant Cell Rep*, 2005, 24: 237–245
- [14] Arumuganathan K, Earle E D. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol Rep*, 1991, 9: 208–218
- [15] Marmiroli N, Maestri E, Gulli M, Malcevski A, Peano C, Bordon R, Bellis G D. Methods for detection of GMOs in food and feed. *Anal Bioanal Chem*, 392: 369–384
- [16] Flavell R B. Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 3490–3496
- [17] Vaucheret H, Béclin C, Elmayan T, Feuerbach F, Godon C, Morel J B, Mourrain P, Palauqui J C, Vernhetters S. Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant J*, 1998, 16: 651–659
- [18] Mason G, Provero P, Vaira A M, Accotto G P. Estimating the number of integrations intraspecific plants by quantitative real-time PCR. *BMC Biotechnol*, 2002, 2: 20
- [19] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 2001, 25: 402–408
- [20] Song P, Cai C Q, Skokut M, Kosegi B D, Petolino J F. Quantitative real-time PCR as a screening tool for estimating transgene copy number in WHISKERS™-derived transgenic maize. *Plant Cell Rep*, 2002, 20: 948–954
- [21] Yang L T, Ding J Y, Zhang C M, Jia J W, Weng H B, Liu W X, Zhang D B. Estimating the copy number of transgenes in transformed rice by real-time quantitative PCR. *Plant Cell Rep*, 2005, 23: 759–763
- [22] Ginzinger D G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol*, 2002, 30: 503–512
- [23] Hernandez M, Pla M, Esteve T, Prat S, Puigdomenech P, Ferrando A. A specific real-time quantitative PCR detection system for event MON810 in maize YieldGard based on the 3'-transgene integration sequence. *Transgenic Res*, 2003, 12: 179–189
- [24] Rønning S B, Våhtilingom M, Berdal K G, Holst-Jensen A. Event specific real-time quantitative PCR for genetically modified Bt11 maize (*Zea mays*). *Eur Food Res Technol*, 2003, 216: 347–354
- [25] Jiang L X, Yang L T, Rao J, Guo J C, Wang S, Liu J, Lee S H, Zhang D B. Development and in-house validation of the event-specific qualitative and quantitative PCR detection methods for genetically modified cotton MON15985. *J Sci Food Agric*, 2010, 90: 402–408