



转基因植物的分子检测与鉴定方法及进展

贺熙勇^{1,2}, 陈善春³, 彭爱红³

(1. 西南大学 园林园艺学院, 重庆 北碚, 400716; 2. 云南省热带作物科学研究所, 云南 景洪 666100;
3. 中国农业科学院柑橘研究所, 重庆 北碚 400712)

摘要: 对转基因育种过程中分子检测与鉴定的3个阶段(即外源基因是否整合的检测;目的基因是否转录的检测;目的基因是否有效表达的检测)所涉及的方法进行了概述,并对近期发展起来的新方法作简要介绍。

关键词: 转基因植物; 检测; 鉴定; 进展

中图分类号: Q946-33 文献标识码: A 文章编号: 1672-450X(2008)01-0039-06

Review of Molecular Screening and Detection Methods of Transgenic Plants and Improvement

HE Xi-yong^{1,2}, CHEN Shan-chun³, PENG Ai-hong³

1. Horticulture and Landscape Academy of Southwest University, Beibei 400716, China

2. Yunnan Institute of Tropical Crops, Jinghong 666100, China

3. Citrus Research Institute, CAAS, Beibei 400712, China

Abstract: The various molecular screening and detection methods of transgenic plants at three periods from integration and number of copies, transcription to translation were all reviewed. In addition to some novel methods of detection in recent years were briefly introduced in this paper.

Key words: transgenic plants; screening; detection; improvement

随着分子生物学和植物基因工程的不断发展,越来越多的育种工作者开始利用转基因技术获得常规育种技术难以得到的新种质和新品种。植物转基因技术最大的好处在于可以打破自然界物种间原有的生殖隔离,促进基因在不同物种间的交流,极大地丰富变异类型,增大遗传多样性,为植物新品种的培育提供丰富的育种资源。通过对基因功能的研究,筛选出目的基因,还可实现植物性状的定向改良。因此该技术自1983年首次获得转基因植物以来,便深受育种工作者青睐,得到了蓬勃地发展。至今已有30多科约200多种植物转基因成功;国际上相继有30多个国家批准3000多例转基因植物进入田间试验,并且在美国、加拿大、中国等20多个国家成功进行了商品化生产^[1]。到2006年止,全球转基因作物的商业种植面积达1.02亿hm²,比2005年增长13%,是1996年的62倍^[2]。转基因作物品种在农业生产中日益显现出巨大潜力。

植物转基因操作中,除利用抗生素抗性和除草剂抗性选择基因排除非转化细胞而留存转化细胞,以及利用GUS和GFP等报告基因显示转基因成功外,更重要的是从分子水平鉴别出阳性转化体,明确目的基

因在转基因植株中的拷贝数和转录与表达情况。本文就常用的转基因植株检测与鉴定方法作一概述,并对近期发展起来的新方法做简要介绍。

1 外源基因整合与否及其整合拷贝数的鉴定

1.1 PCR (polymerase chain reaction) 检测

1.1.1 常规 PCR

PCR技术对目的片段的快速扩增实际上是一种在模板DNA、引物和4种脱氧核糖核苷酸存在的条件下利用DNA聚合酶的酶促反应,通过3个温度依赖性步骤(即变性、退火和延伸)完成的反复循环。经PCR扩增所得目的片段的特异性取决于引物与模板DNA间结合的特异性。根据外源基因序列设计出一对引物,通过PCR反应便可特异性地扩增出转化植株基因组内外源基因的片段,而非转化植株不被扩增,从而筛选出可能被转化的植株。

由于PCR检测所需的DNA用量少,纯度要求也不高,不需用同位素,实验安全,操作简单,检测灵敏,效率高,成本低,使之成为当今转基因检测不可或缺的方法,被广泛应用。然而,PCR检测易出现假性结果。引物设计不合理,靶序列或扩增产物的交叉污染,外源DNA插入后的重排、变异等因素都会造成

收稿日期: 2007 - 11 - 14



检测的误差。因此常规PCR的检测结果通常仅作为转基因植物初选的依据,有必要对PCR技术进行优化,并对PCR(real-time quantitative PCR)检测为阳性的植株做进一步验证。

1.1.2 优化的PCR

PCR技术的优化目的在于提高扩增产物的特异性、推测目的基因的拷贝数及整合情况,从而提高检测的效率。常见的有多重PCR(Multiplex PCR, MPCR)、降落PCR(Touchdown PCR, TD-PCR)、rpPCR、反向PCR(inverse PCR, IPCR)、实时定量PCR等。

1.1.2.1 多重PCR

MPCR是在同一管PCR反应体系中,使用多套针对多个DNA模板或同一模板的不同区域进行PCR扩增的方法。与普通PCR法相比,MPCR反应更快捷,更经济,只需1次PCR反应,就能检测多个靶基因。Matsuoka等^[3]用该方法同时扩增出了转基因玉米的5种外源基因Bt11, Bt176Mon810, T25 and GA21。陈明洁^[4]等用MPCR对转基因小麦植株的报告基因uidA和选择基因bar进行扩增,MPCR的检测方法与单基因的PCR检测结果完全一致。

由于MPCR技术是在同一反应管中加多对引物同时对多个靶位点进行检测,因此对引物的要求较高,不同引物间的相互干扰应降至最低;同时扩增的目的片段大小也不能太接近,否则凝胶电泳时难以分开,无法辨别。

1.1.2.2 降落PCR

TD-PCR是一种在一个反应管或少数几个反应管中通过一系列退火温度逐渐降低的反应循环来达到最佳扩增目的基因的PCR方案。它通过体系自身的代偿功能弥补以反应体系和并非完美的循环参数所造成的不足。此策略保证了最初形成的引物模板杂交体具最强的特异性。尽管最后一些循环采用的退火温度会降到非特异的 T_m 值,但此时的扩增产物已开始几何扩增,在余下的循环中处于超过任何非特异性PCR产物的地位,从而使PCR产物仍然呈现出特异性扩增。R. H. Don等认为PCR过程中的前几个循环对于扩增产物的纯度非常重要,因此前几个循环较高的退火温度,会增加引物与模板结合的特异性,TD-PCR方法可以阻止非特异性产物的形成^[5]。由于TD-PCR的策略是在较早的循环中避免低 T_m 值配对,故在TD-PCR中必须采用热启动技术。田路明等^[6]用TD-PCR对高

羊茅转基因植株两个片段进行了扩增,结果表明TD-PCR能快速准确检测转基因植株。

1.1.2.3 rpPCR

由于外源基因整合到目标基因组时常发生重排,因此Southern杂交并不能清楚地分析转基因的拷贝数和整合情况。Kumar和Fladung^[7]在研究转基因杨树的外源基因整合行为时发明了rpPCR方法。这种方法就是利用不同的引物进行配对,对基因组DNA扩增,根据不同的引物对的扩增情况及产物的大小来推定T-DNA的拷贝数、整合情况及拷贝的完整性等信息。与Southern杂交相比,该法的优点在于能比较方便快捷地指出重复单位是否完整,并能表明这种重复的方向。此方法的不足之处是在有多拷贝整合在不同的染色体上时不能显示作用^[8]。

1.1.2.4 反向PCR

IPCR与普通PCR相同之处是都有一个已知序列的DNA片段,引物都分别与已知片段的两末端互补。不同的是对该已知片段来说,普通PCR两引物的3'-末端是相对的,而IPCR则是相互反向的。因而IPCR可以扩增已知序列片段旁侧的未知序列。根据这一特点,可以对外源基因在植物基因组中整合的拷贝数进行分析,多拷贝多位点整合时,扩增产物在电泳图谱上呈现多条带,单拷贝时只得到一条带。

然而,该技术要求DNA模板复杂度低于 10^6 bp,如果高于此值,则不能获得理想的效果^[9]。另外,自连接(环化)的效率也是限制该技术成功的因素^[10]。

1.1.2.5 实时定量PCR

实时定量PCR是一种在PCR反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累实时监测整个PCR进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法^[11]。其特点是:特异性好,实时定量PCR技术通过引物或和探针的特异性杂交对模板进行鉴别,具有很高的准确性,假阳性低;灵敏度高,采用灵敏的荧光检测系统对荧光信号进行实时监控;线性关系好,由于荧光信号的强弱与模板扩增产物的对数呈线性关系,通过荧光信号的检测对样品初始模板浓度进行定量,误差小;操作简单,自动化程度高,实时定量PCR技术对PCR产物的扩增和检测在闭管的情况下一步完成,不需要开盖,交叉污染和污染环境机会少;没有后处理,不用杂交、电泳、拍照^[12]。

Ingham等^[13]研究发现可用双向实时定量PCR检测转基因植物中的外源基因拷贝数。他们通过对37个



株系的实时定量 PCR 检测,发现仅有 2 个株系是由于多个拷贝同时插入到了 1 个位点而与 Southern 结果不符,其余 35 个株系的双向实时定量 PCR 检测结果与 Southern 结果高度吻合,表明实时定量 PCR 技术可用于检测转基因植物的拷贝数。杜春芳等^[14]则建立了一种双重定量 PCR 技术鉴定转基因植物纯合子的新方法,该方法能鉴定出转基因植株是纯合型还是杂合型,并能准确鉴定出转化植株外源基因的拷贝数,为鉴定转基因植物的整合性提供了方便。

1.2 Southern 杂交

Southern 杂交是利用经过标记的 DNA、RNA 探针与靶 DNA 进行特异性杂交,分析外源基因在植物染色体上的整合情况(如拷贝数、插入方式)以及外源基因在转基因后代的稳定性问题。Southern 杂交可以不受操作过程中的 DNA 污染影响和清除转化中的质粒残留所引起的假阳性信号,准确度高,特异性强,是研究转基因植株外源基因整合最可靠的方法。已广泛应用于水稻^[15,16]、小麦^[17]、玉米^[18,19]、大豆^[20]、油菜^[21]、桃^[22]等各类作物转基因植株的检测。然而该方法程序复杂,成本高,且对实验技术条件要求较高,使其使用受到了限制。

2 外源基因在转化植株中是否转录的检测与鉴定

2.1 Northern 杂交

外源基因在转化植株中的转录水平可以通过细胞总 RNA 和 mRNA 与探针杂交来分析,称为 Northern 杂交,它是研究转基因植株中外源基因表达及调控的重要手段。Northern 杂交程序一般分为三个部分:植物细胞总 RNA 的提取;探针的制备;印迹及杂交。Northern 杂交比 Southern 杂交更接近于目的性状的表现,因此更有现实意义。如竺晓平、孙辉、刘君等用 Northern 杂交分别对马铃薯^[23]、水稻^[24]、烟草^[25]的目的基因表达进行了鉴定。

但 Northern 杂交的灵敏度有限,对细胞中低丰度的 mRNA 检出率较低。因此在实际工作中更多的是利用 RT-PCR (reverse transcription PCR) 技术对外源基因的转录水平进行检测。

2.2 RT-PCR

RT-PCR 的原理是在反转录酶作用下,以待检植株的 mRNA 合成 cDNA,再以 cDNA 为模板扩增出特异的 DNA。因此,RT-PCR 可在 mRNA 水平上检测目的

基因是否表达。RT-PCR 十分灵敏,能够检测出低丰度的 mRNA,特别是在外源基因以单拷贝方式整合时,其 mRNA 的检出常用 RT-PCR。

Samia Djennane 等^[26]把烟草硝酸还原酶基因 Nia2 经农杆菌介导入马铃薯,经 RT-PCR 分析,Nia2 基因在转基因马铃薯体内 RNA 水平得到表达。周苏玫等^[27]以皖麦 48 为受体导入反义 trxs 基因,研究抗穗发芽特性,用 RT-PCR 检测 trxs 基因的转录水平,结果表明反义 trxs 基因正常表达的阳性植株, trxs 基因 mRNA 的丰度极显著降低,从而起到抵制穗发芽的作用。

由于 RT-PCR 是在总 RNA 或 mRNA 水平上操作,检测过程中必须注意 RNA 的降解和 DNA 的污染,另外还要设置严格的对照来防止假性结果的出现。

3 转基因植株外源基因表达情况的检测与鉴定

尽管在 mRNA 水平也能一定程度地研究外源基因的表达,但存在 mRNA 在细胞质中被特异性地降解等情况^[28],mRNA 与表达蛋白质的相关性不高(相关系数低于 0.5)^[29,30],基因表达的中间产物 mRNA 水平的研究并不能取代基因最终表达产物的研究^[31]。转基因植株外源基因表达的产物一般为蛋白,外源基因编码蛋白在转基因植物中能够正常表达并表现出应有的功能才是植物基因转化的最终目的。外源基因表达蛋白检测主要利用免疫学原理,ELISA 及 Western 杂交是外源基因表达蛋白检测的经典方法。

3.1 ELISA 检测

ELISA 是酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assays) 的简称,基础是抗原或抗体的固相化及抗原或抗体的酶标记,把抗原抗体反应的高度专一性、敏感性与酶的高效催化特性有机结合,从而达到定性或定量测定的目的。ELISA 有直接法、间接法和双抗夹心法之分,目前使用最多的是双抗夹心法,其灵敏度最高。一般 ELISA 为定性检测,但若作出已知转基因成分浓度与吸光度值的标准曲线,也可据此来确定样品转基因成分的含量,达到半定量测定^[32]。该方法已在棉花^[33]、辣椒^[34]、水稻^[35]、烟草^[36]、番茄^[37]等多种转化植株的检测中应用。

使用 ELISA 检测外源基因表达蛋白具有便捷、灵敏、特异性好、试剂商业化程度高、成本低、适用范围广、试验结果易读等特点。但也存在易出现本底过高,缺乏标准化等问题。

3.2 Western 杂交



Western杂交是将蛋白质电泳、印迹、免疫测定融为一体的蛋白质检测技术,其原理是将聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS—PAGE)分离的目的蛋白原位固定在固相膜上(如硝酸纤维膜),再将膜放入高浓度的蛋白质溶液中温育,以封闭非特异性位点,然后在印迹上用特定抗体(一抗)与目的蛋白(抗原)杂交,再加入能与一抗专一结合的标记二抗,最后通过二抗上的标记化合物的性质进行检出。根据检出结果,可知目的蛋白是否表达,浓度大小及大致的分子量。此方法特异性高,可用于定性检测^[38]。

由于Western杂交是在翻译水平上检测目的基因的表达结果,能够直接表现出目的基因的导入对植株的影响,一定程度上反映了转基因的成败,所以具有非常重要的意义,被广泛采用。该方法已应用于烟草^[39,40]、青蒿^[41]、枸杞^[42]、杨树^[43]等相关目的基因导入后的表达。Western杂交的缺点是操作烦琐,费用较高,不适合做批量检测。

4 转基因植株检测的其它技术

4.1 基因芯片技术

生物芯片技术是起源于核酸分子杂交,于20世纪80年代提出,90年代初期迅速发展,1991年Affymetrix公司Fodor小组对原位合成的DNA芯片作了首次报道。生物芯片(biochip)是指高密度固定在固相支持介质上的生物信息分子(如寡核苷酸、基因片段、cDNA片段或多肽、蛋白质)的微阵列。生物芯片可分为基因芯片及蛋白质芯片。这两类芯片都可用于转基因植物的检测与鉴定,但目前应用潜力较大的是用于转基因植株中外源基因表达调控的cDNA芯片。cDNA芯片能够检测出由外源基因整合及外源基因不同的整合方式所引起的植物基因组任何微小的表达差异。将不同被测样品的mRNA分别用不同的荧光物质标记,各种探针等量混合与同一阵列杂交,可以得到外源基因表达强度差异的信息,从而实现外源基因表达调控的比对研究。如用基因芯片比较转基因植物和野生型植物的基因表达水平差异,HAT4基因在转基因植物中的表达水平是其野生型的50倍^[44]。将目前通用的报告基因、选择标记基因、目的基因、启动子和终止子的特异片段固定于玻片上制成检测芯片,与从待检植株抽提、扩增、标记后DNA杂交,杂交信号经扫描仪扫描后,再经计算机软件进行分析判断,可对转化植株进行有效筛选。例如,利用基因芯片对

转基因水稻、木瓜、大豆、玉米、油菜等^[45-49]作物的检测结果表明,该方法快速、准确。

与常规技术相比,生物芯片技术的突出特点是高度并行性、多样性、微型化及自动化。

目前,由于受到成本高的局限,使得该项技术的推广应用受到了限制,同时,一些假阳性背景也使得其应用受限。相信随着生命技术的不断向前发展,计算机处理软件的进一步开发利用,生物芯片必将得到越来越多的应用。

4.2 试纸条技术

与ELISA原理相似,不同之处是以硝化纤维膜代替聚苯乙烯反应板为固相载体。先将特异性抗体吸附在膜上,将膜放入混有样品的溶液中,蛋白质随着液相扩散,遇到抗体,发生抗原-抗体反应,通过阴性对照筛选阳性结果,并给出转基因成份含量的大致范围^[50]。试纸条方法是一种快速简便的定性检测方法,将试纸条放在待测样品抽提物中,5~10min就可得出检测结果,检测过程不需要特殊仪器和熟练技能,经济便捷,特别适用于田间和现场检测^[51]。Akiyama H等^[52]用试纸条检测了转基因水稻中CryIAc蛋白质的含量,精度可达 $0.012 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。但试纸条检测只能对特定的单一靶蛋白进行检测。

另外,近来有文献报道了试纸条检测技术的新发展,可利用试纸条技术对样品中某一核酸序列进行特异性的检测,并且实现了在同一试纸条上对多个核酸序列的同时检测^[53,54]。这无疑拓展了这项技术的应用范围,有助于检测效率的提高。

4.3 原位杂交技术

原位杂交是通过杂交确定被检物在样本中的原本位置,是目前外源基因在染色体上定位及外源基因在组织细胞内表达定位的主要方法^[55]。染色体DNA原位杂交可用来确定外源基因在染色体上的整合位置,对研究外源基因遗传特性有重要意义。许多实验^[56,57]表明位置效应是影响外源基因稳定及表达的重要因素。mRNA原位杂交可直观地观察到外源mRNA的表达量及不同发育时期表达有否差异。外源基因表达蛋白的组织细胞免疫定位可用来确定表达蛋白在转基因植物组织及细胞中的分布,成为研究转基因植物中外源基因功能及外源蛋白稳定性的重要手段。A. P. Santos等^[58]报道了利用原位杂交技术使不同组织和物种在分裂间期的外源基因(包括单拷贝基因)和它的转录本可视化,与在细胞分裂中期研究基因行为相比,因基因



(外源基因)的表达主要是发生在染色体分裂间期的,因此更直观、更有意义,有助于准确预测外源基因是否表达,可望减少外源基因后期检测时间。王逸群等^[59]利用蛋白免疫原位杂交法研究了转基因植物外源基因表达,认为该法比Western杂交操作简便、有效可行,适用于在翻译水平上对转基因植物进行分子检测。

4.4 其它方法

近几年还发展了一些新的外源基因的检测方法,如质谱分析^[60]、色谱分析^[60]、生物传感器^[61,62]、近红外光谱^[63]、微纤维装置(Microfabricated Device)^[60]等在转基因植物检测中都有应用。

5 展望

综上所述,转基因植物的检测方法有很多。PCR可以检测目的基因是否整合在受体细胞的染色体上,但PCR检测灵敏,易受DNA污染,同时对多位点插入难以检测。检测外源基因整合在植物染色体上最可靠的方法就是Southern杂交和原位杂交。Southern杂交可检测外源基因插入的拷贝数和插入方式,是一种较为精确的分析,也是目前鉴定外源基因存在于转基因植物中的权威方法;原位杂交是可以检测外源基因存在的位置、整合外源基因的染色体及外源基因在该染色体上的位置。在外源基因的转录水平上,可用Northern杂交和RT-PCR检测。Northern杂交是研究转基因植物中外源基因表达的重要方法,然而较烦琐,而RT-PCR较之操作简单,且更灵敏,特别是单拷贝时更常用。外源基因若编码蛋白,在转基因植物中表达蛋白的检测可采用ELISA和Western杂交。用Western杂交检测外源基因是否表达,用ELISA则可做定量检测,两者常结合起来应用。

从转基因植物的检测技术的来看,新技术不断涌现,多种技术相互结合,互相补充,朝着高效、便捷、安全、自动化方向发展。

致谢:承蒙张兴国教授在写作过程中给予的热情指导与帮助,谨致以衷心的感谢!

参考文献:

[1] 金万梅,潘青华,尹淑萍.外源基因在转基因植物中的遗传稳定性及其转育研究进展[J].分子植物育种,2005,3(6):864-868.
 [2] James C Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops [J]. 2006, 35.

[3] Matsuoka T, Kuribara H, Akiyama H, et al A Hino A (2001). A Multiplex PCR Method of Detecting Recombinant DNAs from Five Lines of Genetically Modified Maize[J] Food Hyg, Soc Japan, 42:24-32.
 [4] 陈明洁,刘勇,涂知明.多重PCR法快速鉴定转基因小麦植株有后代[J].华中科技大学学报(自然科学版):2004,32(9):105-107.
 [5] Don R H, Cox P T, Wainwright B J Nucleic Acids Research [J]. 1991, (19): 4008.
 [6] 田路明,黄丛林,张秀海.降落PCR法快速检测高羊茅转基因植株[J].生物技术通报,2006,(3):85-87.
 [7] Kumar S, Fladung M Determination of Transgene Repeat Formation and Promoter Methylation in Transgenic Plants [J]. Bio Techniques, 2000 (28):1128-1137.
 [8] 曾凡锁,詹亚光.转基因植物中外源基因的整合特性及其研究策略[J].植物学通报,2004,21(5):571-572.
 [9] 萨姆布鲁克 J,弗里奇 E F,曼尼阿蒂斯 T.分子克隆指南第三版(上册)[M].北京:科学出版社,2006:671-676.
 [10] Yuan xiang Zhou, Ronald J Newton 等 A Simple Method for Identifying Plant/T-DNA Junction Sequences Resulting from Agrobacterium-mediated DNA Transformation [J] Plant Molecular Biology Reporter, 1997 (15): 246-254.
 [11] 黄留玉.PCR最新技术原理、方法及应用[M].北京:化学工业出版社,2005.
 [12] 蒋春燕.实时荧光定量PCR技术[J].动物医学进展,2005,26(12):97-101.
 [13] Ingham DJ, Beer S, Money S, et al Quantitative Real-time PCR Assay for Determining Transgene Copy Number in Transformed Plants [J] Biotechnology, 2001, 31(1):132-140.
 [14] 杜春芳,李朋波,李润植.一种快速鉴定转基因植物纯合体的新方法[J].生物技术通讯,2004,15(6):585-587.
 [15] 彭昊,翟英,等.水稻高效RNA干涉体系的建立及其功能分析[J].中国农业科学,2006,39(9):1729-1735.
 [16] 吴关庭,朗春秀,胡张华.转CBF1基因增强水稻的耐逆性[J].核农学报,2006,20(3):169-173.
 [17] 耿洪伟,张庆祝等.转外源puroindoline基因小麦的获得与检测[J].中国农业科学,2006,39(9):1751-1755.
 [18] 董琼珠,和备久,朱苏文.转基因玉米的脉冲电流技术检测及遗传分析[J].安徽农业大学学报,2006,33(1):21-24.
 [19] 张秀君,等.用基因枪将高赖氨酸基因导入玉米及转基因植株的检测[J].农业生物技术学报,1999,7(4):363-367.
 [20] 张春秀,郭丽琼,等.双T-DNA表达载体转化大豆的研究[J].大豆科学,2005,24(4):291-294.
 [21] 李俊,方小平,王转.外源基因定向插入甘蓝型油菜C基因组[J].科学通报,2006,51(12):1406-1412.
 [22] 吴延军,张上隆,谢鸣.桃ACO基因反义转化桃幼胚子



- 叶的研究 [J]. 遗传, 2006, 28 (1): 65-70 .
- [23] 竺晓平, 朱常香, 等 . CP 基因3' 端短片段介导的对马铃薯 Y 病毒的抗性 [J]. 中国农业科学, 2006, 39 (6): 1153-1158 .
- [24] Sun Hui, Huang Qiman, Su Jin Highly Effective Expression of Glutamine Synthetase Genes GS1 and GS2 in Transgenic Rice Plants Increases Nitrogen-deficiency Tolerance [J] Journal of Plant Physiology and Molecular Biology 2005 31(5): 492-498 .
- [25] 刘君, 韩烈保, 等 . CMO 与 BADH 双基因表达载体构建及在烟草中的表达 [J]. 中国生物工程杂志, 2006, 26(8): 5-9 .
- [26] Samia Djennane, Jean-Eric Chauvin et al . Introduction and Expression of a Deregulated Tobacco Nitrate Reductase Gene in Potato Lead to Highly Reduced Nitrate Levels in Transgenic Tubers [J]. Transgenic Research 2002 (11): 175-184 .
- [27] 周苏玫, 尹钧, 等 . 转反义 trxs 基因小麦株系 00T89 分子鉴定及抗穗发芽特性研究 [J]. 生物工程学报, 2006, 22 (3): 438-494 .
- [28] 邹永梅, 施季森, 等 . 遗传转化植物中沉默基因的消除 [J]. 分子植物育种, 2006, 4 (1): 95 .
- [29] Anderson L, Seilhamer J A Comparison of Selected mRNA and Protein Abundances in Human [J] Electrophoresis, 1997, (18): 533 .
- [30] Gygi S P, Bochon Y et al Correlation Between Protein and mRNA Abundance in Yeast [J] Mol Cell Biol, 1999, (19): 1720-1730 .
- [31] 曹尚银, 张秋明, 等 . 蛋白质组学研究技术及其在果树学中的应用 [J]. 果树学报, 2005, 22 (2): 138-142 .
- [32] 刘光明, 苏文金 . 应用间接 ELISA 方法定量检测转基因抗虫玉米 [J]. 无锡轻工大学学报, 2003, 22 (1): 49 .
- [33] 陈松, 张震林, 等 . ELISA 方法鉴定转 Bt 基因抗虫棉 [J]. 江苏农业科学, 2003, (1): 21-24 .
- [34] 张宗江, 周钟信, 等 . 黄瓜花叶病毒壳蛋白基因转化辣椒及其在转基因株后代的表达 [J]. 华北农学报, 1994, 9 (3): 67-71 .
- [35] Tian Wen Zhang Rice Transformation with a Phytoalexin Gene and Bioassay of the Transgenic Plant [J] Acta Botanica Sinica, 1998, 40 (9): 803-808 .
- [36] 石春林, 朱祯, 等 . 转基因烟草中 Bt 毒蛋白基因的表达行为 [J]. 植物学报, 2000, 42 (3): 269-273 .
- [37] 赵春晖, 王荣, 等 . 含与不含前导序列的乙肝病毒表面抗原在转基因番茄中表达的研究 [J]. 农业生物技术学报, 2000, 8 (1): 85-88 .
- [38] Lipton C R, Dautlick J X 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 Agric Immunol, 2000 (12): 153-164 .
- [39] 王志兴, 刘昱辉, 等 . 葡萄糖氧化酶基因的克隆及其在转基因烟草中的表达 [J]. 自然科学进展, 2003, 13 (3): 248-251 .
- [40] 刘红莉, 雷霆, 等 . LT-B 转基因烟草植株的建立 [J]. 西安交通大学学报 (医学版), 2004, 25 (5): 425-429 .
- [41] 冯丽铃, 曾庆平, 杨雪芹 . 人 RANTES 基因在转基因青蒿植株中表达的测定 [J]. 中草药, 2004, 35 (10): 1167-1171 .
- [42] 赵亚华, 何平, 高向阳 . 根癌农杆菌介导的 Mint-1 cDNA 转化枸杞及其表达的研究 [J]. 中国农业科学, 2000, 33 (2): 92-97 .
- [43] 樊军锋, 韩一凡, 李铃, 等 . mt1D/gutD 双价基因转化美洲黑杨 × 青杨的研究 [J]. 林业科学, 2002, 38 (6): 30-35 .
- [44] 李晋涛 . DNA 芯片技术及其在基因表达检测中的应用 [J]. 生物技术, 1999, 9 (4): 31 .
- [45] 黄迎春, 孙春响, 等 . 利用基因芯片检测转基因作物 [J]. 遗传, 2003, 25 (3): 307-310 .
- [46] 高秀丽, 杨剑波, 等 . 用引物延伸芯片法实现对转基因水稻中质粒 pCAMBIA1301 的检测 [J]. 遗传, 2005, 27 (2): 271-279 .
- [47] 许小丹, 文思远, 等 . 检测及鉴定 Roundup Ready 转基因大豆寡核苷酸芯片的制备 [J]. 农业生物技术学报, 2005, 13 (4): 429-434 .
- [48] 高秀丽, 杨剑波, 等 . 微测序基因芯片检测质粒 pCAMBIA1301 [J]. 中国水稻科学, 2005, 19 (2): 181-185 .
- [49] 黄文胜, 潘良文, 等 . 基因芯片检测转基因油菜 . 农业生物技术学报 [J]. 2003, 11 (6): 588-592 .
- [50] 卢天成, 王兴智, 植物转基因产品检测方法的评价 [J]. 分子植物育种, 2003, 1 (3): 361-366 .
- [51] Ahmed F E . Trends in Biotechnology [J] 2002 20(5): 215-223 .
- [52] Akiyama H, Watanabe T et al A Detection Method of CryIaC Protein for Identifying Genetically Modified Rice Using the Lateral Flow Strip Assay [J] Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 2006, 47 (3): 111-114 .
- [53] Oku Y, Kamiya K et al Journal of Immunological Methods, 2001, (258): 73-84 .
- [54] Corstjens M, Paul L A et al Analytical Biochemistry [J]. 2003, (312): 191-200 .
- [55] 王关林, 方宏筠 . 植物基因工程 [M]. 北京: 科学技术出版社, 2005, (7): 217-530 .
- [56] Wang J, Lewis M E et al Chromosomal Mapping of T-DNA Inserts in Transgenic Petunia by in Situ Hybridization [J]. Transgenic Res, 1995, 4 (4): 241-246 .
- [57] Iglesias V A, Moscone E A, Papp I . Molecular and Cytogenetic Analyses of Stably and Unstably Expressed Transgene Loci in Tobacco [J]. The Plant Cell, 1997, 9 (8): 1251-1264 .

(下转第 52 页)



究等各项工作,为我省的社会、经济、科技进步继续做出应有的贡献。2008年重点做好如下几项工作:

(一)2008年下半年按学会章程规定如期召开学会第七次会员代表大会,选举生产新一届理事会、常务理事会和领导集体;以发展热区现代农业为主题,进行学术研讨。

(二)在云南省科学技术协会和云南省农垦总局的组织和领导下,承办好2008年中国昆明“走出去”发展国际学术研讨会。

(三)3月份完成《云南省主要热带作物病虫害诊断与综合防治原色图谱》的出版发行工作。

(四)上半年邀请省内外有关专家,对《云南天

然橡胶产业发展战略研究》进行评审,评审后上报省政府有关部门和省科协。

(五)3月底完成农业行业标准《小粒种咖啡病虫害防治技术规程》(征求意见稿)的起草工作;7月底完成农业行业标准《小粒种咖啡病虫害防治技术规程》(送审稿)的审改工作。

(六)继续以实施“走出去”发展战略,发展替代罂粟种植产业为契机,接受委托争取完成“走出去”发展替代种植可行性研究项目1~2项。

云南省热带作物学会

二 七年十二月二十九日

(上接第47页)

Expression of the Shpx2 Peroxidase Gene of *Stylosanthes Humilis* in Transgenic Tobacco Leads to Enhanced Resistance to *Phytophthora parasitica* cv. *nicotiana* and *Cercospora nicotianae* [J] *Molecular Plant Pathology* 2000 (1):223-232.

[20] Manners J M McIntyre C Le Nourse J P. Cloning and Sequence of a cDNA Encoding Phenylalanine Ammonia-lyase from the Tropical Forage Legume *Stylosanthes Humilis* [J] *Plant Physiology* ,1995 (108): 130121302 .

[21] Heather Way M, Kemal Kenal Eena Mitter et al . Constructive Expression of a Phenylalanine Ammonialyase Gene from *Stylosanthes Humilis* in Transgenic Tobacco Leads to Enhanced Disease Resistance But Impaired Plant Growth [J]. *Physiological Molecular Plant Pathology* 2002 (60):275-282 .

[22] Biochemical Characterization of *Hevea Brasiliensis* *Colletotrichum Gloeosporioides* Interaction (CAB Abstract) .

[23] H ,TAN AND A. M ,TAN Genetic Studies of Leaf Disease Resistance in *Hevea* [J] *J. Nat . Rubb* ,11(2),148-114 .

[24] GOBINA, M.S. ACHUO E. A. and CHUBA. P. N. Field

Evaluation of *Hevea* Clones for Leaf Disease Resistance [J]. IRRDB .

[25] 柳建良,等 .水杨酸对芒果炭疽病的诱导抗性作用 [J]. *热带亚热带植物学报*, 1993, 6 (3): 245-248 .

[26] 任建国,黄思良,等 .拮抗微生物防治芒果炭疽病研究 [J]. *西南农业学报*, 2002 ,(4): 82-85 .

[27] Bergmann, C. W, et al . Polygalacturonase-Inhibiting Protein Accumulates in *Phaseolus Vulgaris* L. in Response to Wounding Elicitors and Fungal Infection [J] *Plant-Journal* , 1994, 5 (5): 625-634 .

[28] Devoto A. et al Developmental and Pathogen-Induced Accumulation of Transcripts of Polygalacturonase-Inhibiting Protein in *Phaseolus* [J] *vulgaris* L. *Planta* 1997 203 (3): 284-292 .

[29] 李振华,凌金锋,曾会才 . 6株土壤链霉菌的抑真菌活性及其发酵液对采后香蕉果实炭疽病的防效 [J]. *热带农业科学*, 2006, 26 (3): 35-37 .

[30] Prusky-D Ardi-R Kobilier-I Mechanism of Resistance of *Avocado* Fruits to *Colletotrichum Gloeosporioides* Attack [C] / . *ACIAR- Proceedings-Series*, 1998 (80):63-71 .

(上接第44页)

[58] Ana Paula Santos Eva Wegel et al . In situ Methods to Localize Transgenes and Transcripts in Interphase Nuclei: a Tool for Transgenic Plant Research [J] *Plant Methods* 2006 (2): 18 .

[59] 王逸群,郑金贵,等 .一种对转基因植物基因表达进行检测的新方法 [J]. *吉林农业大学学报*, 2002, 24 (1): 15-17 .

[60] Laura B Petra H et al . Review of GMO Detection and Quantification Techniques [J] 2001 ,(21):17-23 .

[61] Mannelli I Minunni M et al Quartz Crystal Microbalance

(QCM) Affinity Biosensor for Genetically Modified Organisms (GMOs) Detection [J] *Biosensors and Bioelectronics* , 2003 ,(18): 129-140 .

[62] Mariotti E, Minunni M, Maacini M . Surface Plasmon resonance Biosensor for Genetically Modified Organisms Detection [J] *Analytica Chimica Acta* 2002 (453): 165-172 .

[63] Kuiper H A Summary Report of the ILSI Europe Workshop on Detection Methods for Novel Foods Derived from Genetically Modified Organisms [J] *Food Control* ,1999 ,(10):339-349 .