

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2135—2008

蜂蜜中转基因成分检测方法 普通 PCR 方法和实时荧光 PCR 方法

Detection of genetically modified components in honey—
Contentional PCR and real-time fluorescence PCR

2008-09-04 发布

2009-03-16 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

本标准的附录 A 和附录 B 均为规范性附录。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国北京出入境检验检疫局起草。

本标准主要起草人：饶红、冯骞、陈广全、付浦博、曾静、汪琦、张惠媛。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

蜂蜜中转基因成分检测方法

普通 PCR 方法和实时荧光 PCR 方法

1 范围

本标准规定了蜂蜜中转基因成分的定性检测方法。

本标准中适用于以转基因棉花、转基因油菜等作为蜜源植物采集的蜂蜜或受到转基因作物污染的蜂蜜中的转基因成分的检测。

2 规范化引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法(GB/T 6682—2008,ISO 3696:1987,MOD)

SN/T 1193 基因分析检测实验室技术要求

SN/T 1194 植物及其产品转基因成分检测抽样和制样方法

3 术语、定义和缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1.1

聚合酶链式反应 **polymerase chain reaction, PCR**

体外酶催化合成特异 DNA 片段的方法,模板基因序列先经高温变性成为单链,在 DNA 聚合酶作用和适宜的反应条件下,根据模板序列设计的两条引物分别与模板 DNA 两条链上相应的一段互补序列发生退火而相互结合,接着在 DNA 聚合酶的作用下以四种脱氧核糖(dNTP)为底物,使引物得以延伸,然后不断重复变性、退火和延伸这一循环,使欲扩增的基因片段以几何倍数扩增。

3.1.2

实时荧光 PCR **real-time fluorescence PCR**

在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累实时检测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定性或定量分析的方法。PCR 扩增时在加入一对引物的同时加入一个特异性的荧光探针,该探针为一寡核苷酸,两端分别标记一个报告荧光基团和一个淬灭荧光基团。探针完整时,报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收;PCR 扩增时,*Taq* 酶的 5'-3' 外切酶活性将探针酶切降解,使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离,从而荧光检测系统可接收到荧光信号,即每扩增一条 DNA 链,就有一个荧光分子形成,实现了荧光信号的积累与 PCR 产物形成完全同步。就是通过对 PCR 扩增反应中每一个循环产物荧光信号的实时检测从而实现对起始模板定量及定性的分析。在实时荧光定量 PCR 反应中,引入了一种荧光化学物质,随着 PCR 反应的进行,PCR 反应产物不断累计,荧光信号强度也等比例增加。每经过一个循环,收集一次荧光强度信号,这样就可以通过荧光强度变化监测产物量的变化,从而得到一条荧光扩增曲线图。

3.1.3

定性检测 **qualitative detection**

对样品中转基因成分进行检测,以判定该样品是否为转基因产品。

3.2 缩略语

3.2.1 下列缩略语适用于本标准。

GMO genetically modified organism
转基因生物。

3.2.2 CaMV 35S 35S promoter from Cauliflower mosaic virus
花椰菜花叶病毒 35S 启动子。

3.2.3 NOS terminator of nopaline synthase gene from *Agrobacterium tumefaciens*
来源于农杆菌的胭脂碱合成酶基因终止子。

3.2.4 CP4 EPSPS 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene
5-莽草酸-3-磷酸合成酶基因。

3.2.5 IVR Invertase 1 gene from maize
玉米转化酶 1 基因。

3.2.6 NptII neomycin-3'-phosphotransferase gene
新霉素-3'-磷酸转移酶基因。

3.2.7 CryIA(b); a synthetic gene encoded the first 648 amino acids, insecticidal-active truncated product identical to that of cryIA(b) gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki strain HD-1*
苏云金芽孢杆菌结晶蛋白 CryIA(b)型毒素抗虫基因。

3.2.8 PAT phosphinothricin acetyltransferase gene
草丁膦乙酰转移酶基因。

3.2.9 BARNASE ribonuclease gene from *Bacillus amyloliquefaciens*
来源于杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* 的 ribonuclease 基因。

3.2.10 BARSTAR specific inhibitor of the barnase gene from *Bacillus amyloliquefaciens*
来源于杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* 的 barnase 基因的特异抑制基因。

3.2.11 PEP phosphoenilpyruvate-carboxylase
磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因。

3.2.12 FMV 35s 35S promoter from a modified figwort mosaic virus (caulimovirus group)
玄参花叶病毒 35S 启动子。

3.2.13 BAR phosphinothricin acetyltransferase gene
抗除草剂基因 (Bar)。

3.2.14 CryIA(b)-CryIA(c) insecticidal-active truncated product identical to that of cryIA(b)-cryIA(c) gene of *Bacillus thuringiensis* subsp
苏云金芽孢杆菌结晶蛋白 (Cry) I 型毒素抗虫融合基因。

3.2.15 GOX glyphosate oxidoreductase gene
草甘膦氧化还原酶基因。

3.2.16 CryIA(c) insecticidal-active truncated product identical to that of cryIA(c) gene of *Bacillus thuringiensis* subsp
苏云金芽孢杆菌结晶蛋白 CryIA(c)型毒素抗虫基因

4 原理

蜂蜜中转基因成分检测是利用外源基因与植物本身基因的不同,通过设计只能扩增外源基因中 DNA 片段的引物和进行 PCR 扩增,根据实验结果,判定该蜂蜜是否带有植物外源基因成分,从而判断蜂蜜中是否含有转基因成分。实时荧光 PCR 检测是在常规 PCR 基础上加入荧光标记探针来实现核酸定量,由于荧光探针在 PCR 反应时被切割的数量与 PCR 原始模板量成正相关,因此,可以通过检测荧

光信号的强度来推算转基因含量。待测样品中转基因的含量是通过与用一系列已知不同含量的转基因标准品而作出的标准曲线拟合的数学模型计算得出。

5 试剂

除另有规定外,所有试剂均为分析纯和生化级试剂。实验用水均为超纯水,规格符合 GB/T 6682 相关规定。

- 5.1 SDS 提取液:1.5% SDS,EDTA- Na_2 100 mmol/L(pH8.0),Tris-HCl 20 mmol/L(pH8.0),NaCl 500 mmol/L。
- 5.2 CTAB 提取液:2% CTAB,EDTA- Na_2 20 mmol/L(pH8.0),Tris-HCl 100 mmol/L,NaCl 140 mmol/L。
- 5.3 CTAB 沉淀液:0.5% CTAB,NaCl 40 mmol/L。
- 5.4 Tris 饱和酚。
- 5.5 三氯甲烷。
- 5.6 异戊醇。
- 5.7 异丙醇。
- 5.8 70%乙醇。
- 5.9 氯化钠溶液:氯化钠 1.2 mol/L。
- 5.10 RNA 酶(10 mg/mL)。
- 5.11 琼脂糖。
- 5.12 三羟甲基氨基甲烷(Tris)。
- 5.13 PCR 缓冲液。
- 5.14 dNTP。
- 5.15 *Taq* DNA 聚合酶。
- 5.16 溴化乙锭(10 mg/mL)。
- 5.17 100bp ladder DNA Marker。
- 5.18 电泳缓冲液。
- 5.19 电泳上样缓冲液。
- 5.20 2-ME(β -巯基乙醇)。
- 5.21 实验用水:应符合 GB/T 6682 中一级水的规格。

6 仪器设备

- 6.1 恒温水浴(10℃~95℃)。
- 6.2 电子天平(最小精度值 0.01 g)。
- 6.3 普通离心机(Eppendorf centrifuge 5415D 或其他等效设备)。
- 6.4 低温高速离心机(Meckman model J2-21 或其他等效设备)。
- 6.5 制冰机。
- 6.6 冰箱。
- 6.7 恒温磁力搅拌器。
- 6.8 pH 计(0~14.00pH,最小显示单位 0.01pH,1 mV)。
- 6.9 移液器(0.1 μL ~2 μL ,1 μL ~10 μL ,20 μL ~100 μL ,100 μL ~1 000 μL ,1 000 μL ~5 000 μL)。
- 6.10 PCR 管(200 μL)。
- 6.11 离心管(1.5 mL,2.0 mL,50.0 mL)。
- 6.12 PCR 仪(PE9600 或其他等效设备)。

- 6.13 实时荧光 PCR 仪 (ABI7000 或其他等效设备)。
- 6.14 电泳仪 (0 V~300 V)。
- 6.15 凝胶成像分析系统。
- 6.16 核酸蛋白分析仪。

7 抽样与制样

7.1 抽样

按照 SN/T 1194 中规定的方法执行。

7.2 制样

将装有蜂蜜样品的容器放置于 37 °C 水浴中 1 h~2 h, 取样时将蜂蜜搅拌均匀, 使下层沉淀物与上层的液体充分混匀后再称取样品。

8 蜂蜜中 DNA 提取方法

8.1 DNA 提取

8.1.1 改良 SDS 方法

- a) 称取蜂蜜样品 10 g 放入有磁力搅拌子的 50 mL 小烧杯中, 加灭菌双蒸水 20 mL, 40 °C 恒温振荡 20 min, 使蜂蜜样品和水充分混合均匀, 转移至 50 mL 离心管;
- b) 15 000g 离心 10 min, 迅速倒掉上清液, 保留沉淀。用 2 mL~4 mL (根据沉淀的多少) 的去离子水将离心管管壁上的沉淀冲洗下来, 转入 2 mL 离心管中, 15 000 g 离心 10 min。弃上清液, 保留沉淀。若溶液体积达 4 mL, 应分两次转入 2 mL 离心管中, 弃上清液, 保留沉淀;
- c) 加 800 μ L 预热到 65 °C 的 SDS 提取缓冲液, 混匀, 转入 1.5 mL 离心管中, 放入 65 °C 水浴锅中水浴 15 min;
- d) 15 000g 离心 15 min, 取上清液 500 μ L;
- e) 加 RNase (终浓度 10 μ g/mL), 37 °C 水浴 30 min;
- f) 加入等体积 Tris 饱和酚, 充分混匀;
- g) 13 000g 离心 15 min, 取上清液 400 μ L, 加入 200 μ L Tris 饱和酚及 200 μ L 三氯甲烷-异戊醇 (体积比, 24 : 1) 混匀;
- h) 15 000g 离心 10 min, 取上清液 300 μ L, 加入等体积三氯甲烷-异戊醇 (体积比, 24 : 1) 混匀;
- i) 15 000g 离心 5 min, 取上清液 150 μ L, 加入两倍体积异丙醇, 轻轻混匀, 冰浴 10 min;
- j) 13 000g 离心 5 min 取沉淀, 并用 1 mL 70% 乙醇清洗 3 次;
- k) 倒去乙醇, 离心, 用吸管尽可能吸去剩余乙醇。干燥后加入 50 μ L 去离子水溶解 DNA。低温 (-20 °C) 保存。

8.1.2 CTAB 法

- a) 称取蜂蜜样品 10g 放入有磁力搅拌子的 50 mL 小烧杯中, 加灭菌双蒸水 20 mL, 40 °C 恒温振荡 20 min, 使蜂蜜样品和水充分混合均匀, 转移至 50 mL 离心管;
- b) 15 000g 离心 10 min, 迅速倒掉上清液, 保留沉淀。用 2 mL~4 mL (根据沉淀的多少) 的去离子水将离心管管壁上的沉淀冲洗下来, 转入 2 mL 离心管中, 15 000g 离心 10 min。弃上清液, 保留沉淀。若溶液体积达 4 mL, 应分两次转入 2 mL 离心管中, 弃上清液, 保留沉淀;
- c) 18 000g 离心 15 min, 弃上清液保留沉淀。加入 CTAB 提取液 500 μ L 和 2 μ L RNA 酶, 同时加入终浓度为 2% 的 2-ME (巯基乙醇), 混匀;
- d) 转入 1.5 mL 离心管, 65 °C 温育 30 min, 取出后置冰上 1 min~2 min, 加入等体积 Tris-酚-三氯甲烷-异戊醇 (25 : 24 : 1), 混匀, 15 000g 离心 10 min;
- e) 取上清液, 加入等体积三氯甲烷-异戊醇 (24 : 1), 混匀, 15 000g 离心 10 min;

- f) 取上清液,加入 2 体积 CTAB 沉淀液,室温放置 60 min,15 000g 离心 10 min;
- g) 弃上清液,以 350 μL NaCl(1.2 mol/L)溶解沉淀,并加入 350 μL 三氯甲烷-异戊醇,混匀,15 000g 离心 10 min;
- h) 取上清液,加入 0.6 体积异丙醇,室温放置 60 min,混匀,14 000g,离心 8 min;
- i) 13 000g 离心 5 min 取沉淀,并用 1 mL 70%乙醇清洗 3 次;
- j) 室温干燥 15 min~30 min,干燥后加入 50 μL ~100 μL 去离子水溶解 DNA;
- k) 低温(-20 $^{\circ}\text{C}$)保存。

8.2 样品中核酸的定量

蜂蜜样品中所提取的 DNA 只适合采用紫外分光光度法进行定量,所测得 OD 值为核酸总量。紫外分光光度法检测核酸浓度的最佳范围是 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,OD 值应该在 0.05~1 的区间内。将 DNA 溶液做适当的稀释,放入蛋白核酸定量分析仪或紫外分光光度计的比色皿中,于 260 nm 处测定其吸收峰,10D_{260nm} = 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 双链 DNA 或 38 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 单链 DNA。PCR 级 DNA 溶液的 OD_{260nm}/OD_{280nm} 比值为 1.7~2.0。

9 定性 PCR 检测

9.1 方法概述

定性 PCR 检测包括对蜂蜜中植物(蜜源植物和非蜜源植物)内源基因和外源基因的检测。通过植物内源基因的检测, CaMV 35S 和 NOS 等外源基因的检测,确定上述主要成分是否含有植物外源基因,从而判定蜂蜜是否被转基因植物污染,可能被何种转基因植物污染。每次 PCR 检测须设立相应的阳性对照、阴性对照和试剂空白对照。

9.2 PCR 所用引物

PCR 扩增所用的引物的序列及扩增片段长度见附录 A。

9.3 PCR 扩增反应体系

PCR 扩增反应体系见表 1。

表 1 普通 PCR 检测蜂蜜中内、外源基因的反应体系

试剂名称	贮备液浓度	加样量/ μL	
		25 μL 反应体系	50 μL 反应体系
10 \times PCR 缓冲液	—	2.5	5.0
MgCl ₂	25 mmol/L	2.5	5.0
dNTPs	2.5 mmol/L	2.5	5.0
Taq 酶	5 U/ μL	0.2	0.4
正义引物	10 pmol/ μL	0.5	1.0
反义引物		0.5	1.0
DNA 模板	—	2.0	5.0
加双蒸水至	—	25.0	50.0

9.4 PCR 扩增程序

PCR 反应参数为:95 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$, 20 s, 引物的退火温度, 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$, 40 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$, 3 min。引物退火温度见表 1。PCR 反应循环参数可根据基因扩增仪型号的不同进行适当调整。

9.5 PCR 产物凝胶电泳

用电泳缓冲液配制 1.8% 的琼脂糖凝胶。在电泳槽中加入电泳缓冲液,使液面刚刚没过凝胶。将 5 μL ~10 μL PCR 扩增产物分别与适量加样缓冲液混合,点样。3 V/cm~5 V/cm 恒压,电泳

20 min~30 min。凝胶成像仪下观察电泳结果,拍照并记录结果。

9.6 定性 PCR 的验证实验——实时荧光 PCR 检测

9.6.1 扩增反应体系

扩增反应的引物见附录 B,反应体系见表 2。

表 2 实时荧光 PCR 检测蜂蜜中植物内、外源基因的反应体系

试剂名称	贮备液浓度	50 μL 反应体系终浓度
2 \times PCR 缓冲液	—	25 μL
MgCl ₂	25 mmol/L	5 μL
dNTPs	2.5 mmol/L	1 μL
Taq 酶	5 U/ μL	0.5 μL
正义引物	10 pmol/ μL	0.75 μL
反义引物		0.75 μL
荧光探针	10 pmol/ μL	0.5 μL
DNA 模板		5 μL
双蒸水	—	补水至 50 μL

9.6.2 PCR 扩增程序

实时荧光 PCR 反应参数为:50 $^{\circ}\text{C}$, 2 min;95 $^{\circ}\text{C}$, 10 min;50 个循环,95 $^{\circ}\text{C}$, 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$, 1 min。反应循环参数可根据基因扩增仪型号的不同进行适当调整。

10 反应体系中对照的设置

10.1 阳性对照:用含转基因成分的蜂蜜样品提取 DNA 作为模板。

10.2 阴性对照:用不含转基因成分的蜂蜜样品提取的 DNA 作为模板。

10.3 空白对照:用配制反应体系的超纯水代替 DNA 模板,检测试剂是否受到污染。

11 结果判定

11.1 结果分析

11.1.1 普通 PCR 检验

11.1.1.1 如果外源筛选基因(35S、NOS 等)中有一个检测结果为阳性,而阴性对照和空白对照未出现条带,内源基因和阳性对照出现预期大小的扩增条带,可初步判定该批样品可能带有转基因成分,可进一步检测外源基因以确认是何种转基因植物污染了蜂蜜样品。

11.1.1.2 如果用覆盖待检样品所有转基因品种的筛选基因进行检测均为阴性,阴性对照和空白对照未出现条带,内源基因和阳性对照出现预期大小的扩增条带,则可以判定该样品不含转基因成分。

11.1.1.3 如果不属于上述两种情况,则应采用实时荧光 PCR 检测方法进行验证。

11.1.2 实时荧光 PCR 定性检验

11.1.2.1 待检样品外源基因检测 Ct 大于或等于 42,内参照基因检测值小于或等于 36,阴性对照、阳性对照和空白对照结果正常者,则可判定为该样品中未检出该外源基因。

11.1.2.2 待检样品外源基因检测 Ct 值小于或等于 38,内参照基因检测值小于 36,阴性对照、阳性对照和空白对照结果正常者,则可判定为该样品中检出该外源基因。

11.1.2.3 待检样品外源基因检测 Ct 值在 38~42 之间,应重做实时荧光 PCR 扩增。再次扩增的 Ct 值仍小于 42,且阴性对照、阳性对照和空白对照结果正常,则可判定该样品中检出该外源基因。再次扩增的 Ct 值仍大于 42,且阴性对照、阳性对照和空白对照结果正常,则可判定该样品中未检出该外源基因。

11.2 结果表述

蜂蜜样品中检出或未检出 CaMV 35S、NOS、NPTII 基因、CryIA(b)、BAR 等外源基因。

12 防污染措施

检测过程中防污染措施按照 SN/T 1193 中的规定执行。

附 录 A
(规范性附录)

普通 PCR 检测蜂蜜中植物内、外源基因的引物序列

表 A.1 普通 PCR 检测蜂蜜中植物内、外源基因的引物序列列表

被检测基因	基因性质	引物序列	退火温度/℃	扩增长度/bp
所有植物通用内源基因 18S rRNA(PUV)	所有植物内源基因	5'-ATTCCAGCCTCCATAGCGTATA-3' 5'-TTCCATGCTAATGTATTCAGAG-3'	55	226
PEP	油菜内源基因	5'-GCTAGTGTAGACCAGTTCTTG-3' 5'-CACTCTTGCTCTTGTCCTC-3'	55	248
IVR	玉米内源基因	5'-CCGCTGTATCACAATGGCTGGTACC-3' 5'-GGAGCCCGTGTAGAGCATGACGATC-3'	58	226
CaMV 35S	外源基因	5'-GCTCCTACAAATGCCATC-3' 5'-GATAGTGGGATTGTGCGTCA-3'	55	195
FMV 35s	外源基因	5'-AAGACATCCACCGAAGACTTA-3' 5'-AGGACAGCTCTTTCCACGTT-3'	60	210
NOS	外源基因	5'-TTAAGATTGAATCCTGTTGCCG-3' 5'-TAATTTATCCTAGTTTGCGCGC-3'	55	180
NPTII	外源基因	5'-CTCACCTTGCTCCTGCCGAGA-3' 5'-CGCCTTGAGCCTGGCGAACAG-3'	55	215
PAT	外源基因	5'-GTCGACATGTCTCCCGGAGAG-3' 5'-GCAACCAACCAAGGGTATC-3'	60	191
BAR	外源基因	5'-ACAAGCACGGTCAACTTCC-3' 5'-ACTCGGCCGTCCAGTCGTA-3'	60	175
CP4-EPSPS (修饰)	外源基因	5'-GACTTGCGTGTTTCGTTCTTCC-3' 5'-AACACCGTTGAGCTTGAGAC-3'	55	204
GOX(修饰)	外源基因	5'-CTCTTGTTTCGTCGTTTCATC-3' 5'-GAAACCCATCCACTTGGAGTGA-3'	55	450
BARNASE	外源基因	5'-CTGGGTGGCATCAAAGGGAACC-3' 5'-TCCGGTCTGAATTTCTGAAGCCTG-3'	60	161
BARSTAR	外源基因	5'-TCAGAAGTATCAGCGACCTCCACC-3' 5'-AAGTATGATGGTGATGTCGAGCC-3'	60	236
CryIA(b)-CryIA(c)	外源基因	5'-GTTTCGTTCTCGGACTAGTTG-3' 5'-GGAGAGCTGGGTTAGTAGGA-3'	54	215
CryIA(c)	外源基因	5'-GTTCCAGCTACAGCTACCTCC-3' 5'-CCACTAAAGTTTCTAACACCCAC-3'	60	119

附 录 B
(规范性附录)

实时荧光 PCR 检测含转基因成分的蜂蜜内、外源基因的引物序列及扩增片段长度

表 B.1 实时荧光 PCR 检测含转基因成分的蜂蜜内、外源基因的引物序列及扩增片段长度列表

检测基因	引物序列(5'-3')	探针序列(5'-3')	基因性质
CaMV35S	CGACAGTGGTCCCAAAGAT	TGGACCCCCACCCACGAGGAG CATC	外源基因
	AAGACGTGGTTGGAACGTCTTC		
NOS	ATCGTTCAAACATTTGGCA	CATCGCAAGACCGGCAACAGG	外源基因
	ATTGCGGGACTCTAATCAIA		
tRNA ^{Leu}	CGAAATCGGTAGACGCTACG	GCAATCCTGAGCCAAATCC	植物 (内参照基因)
	TTCCATTGAGTCTCTGCACCT		
18SrRNA	CCTGAGAAAACGGCTACCAT	TGC GCGCCTGCTGCCTTCC	真核生物 (内参照基因)
	CGTGT CAGGATTGGGTAAT		
PE3-PEP ^{caSe}	CCAGTTCTTGGAGCCGCTTGA	CAGGTCGCTATGCGACTGCGG AGACA	油菜 (内参照基因)
	AAGGGCCAGTCCAAATGCAGA		
棉花内源 基因片段 (acp1)	ATTGTGATGGGACTTGAGG AAGA	ATTGTCCTCTTCCACCGTGATT CCGAA	棉花 (内参照基因)
	CTTGAACAGTTGGATGGATTGGTG		
PAT	GTCGACATGTCTCCGGAGAG	TGGCCGCGGTTTGTGATATCG TTAA	外源基因
	GCAACCAACCAAGGGTATC		
FMV35S	AAGACATCCACCGAAGACTTA	TGGTCCCCACAAGCCAGCTGC TCGA	外源基因
	AGGACAGCTCTTTTCCACGTT		
BAR	ACAAGCACGGTCAACTTCC	CCGAGCCGCAGGAACCGCAG GAG	外源基因
	ACTCGGCCGTCCAGTCGTA		
Cry ^{III} A	TCCGGTTACGAGGTTCTT	ACCTATGCTCAAGCTGCCAAC ACCC	外源基因
	CCATAGATTTGAGCGTCCTTA		
GOX	GTCTTCGTGTTGCTGGAACCGTT	TGCTCACGTTCTCTACACTCG CGCTCG	外源基因
	GAAGTGGCAGGAGCGAGAGCT		
CryIA(b)	CGCGACTGGATCAGGTACA	CCGCCGCGAGCTGACCCTGAC CGTG	外源基因
	TGGGGAACAGGCTCACGAT		