

食品中转基因成分检测

第 10 章

转基因生物定量 PCR 检测方法

F. Weighardt



目 录

第 10 章

转基因生物的定量 PCR 检测方法

引言	3
定量 PCR 方法	4
实时 PCR 技术发展史	6
实时 PCR 原理	6
实时 PCR 定量的原理	12
参考文献	17

引言

一旦发现食品中含有一种或多种转基因品系 (如: Roundup Ready®大豆、Bt-176 玉米、Bt-11 玉米、MON810 玉米和 T25 玉米), 这时就需要通过定量分析此食品中每一种转基因品系成分在个体成分中的含量, 来评估此食品中转基因成分是否在强制性法律法规所规定的范围内 (如: 法规 (EC) 1829/2003、法规 (EC) 1830/2003) (图 1)。

上述提到的法规规定的需要标识的产品包括: 由转基因作物组成的产品, 或含有转基因作物成分的产品, 或由转基因作物加工而来的产品。

不需标识的产品包括: 各转基因成分的含量低于 0.9% 的, 由转基因作物组成的产品、含有转基因作物成分的产品或由转基因作物加工来的产品, 因为这种少量的存在可假定是由偶然的或技术上不可避免的因素造成的。

来自同一物种 (如: 玉米、大豆、油菜等) 的不同形式产品 (如: 粉末、颗粒、油等等) 应该等同的作为同一种成分 (如: 玉米)。

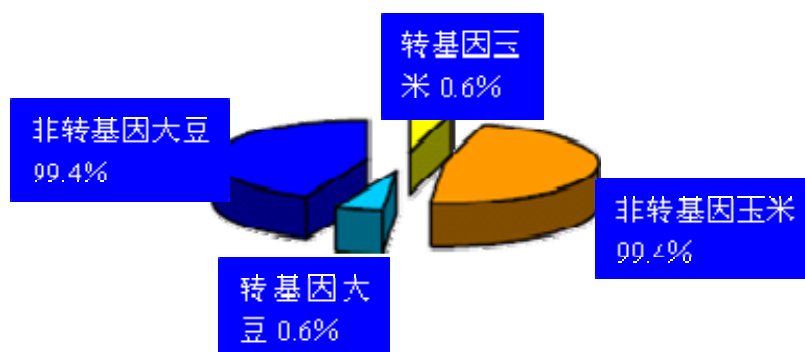


图 1. 无需标识。转基因大豆和转基因玉米的含量都低于法规所规定的阈值。

举例来说, 假如一个食品样品全部是来自于含量为低于 0.9% 的转基因玉米材料, 那么则不需对此食品样品进行标识。反之, 如果食品样品来自于超过 0.9% 的转基因玉米材料, 此加工食品必须进行标识。在终产品中, 考虑到会含有来自不同种类 (如: 大豆和玉米) 的转基因成分, 但只要每种转基因成分的相对含量低于 0.9%, 则按照上述规定, 不需要标识。如果两种或多种转基因玉米品种同时存在, 则应当将它们的含量相加, 用它们总的含量来确定是否需要标识 (图 2), 如果相加的总和低于 0.9%, 则不需标识 (图 2)。

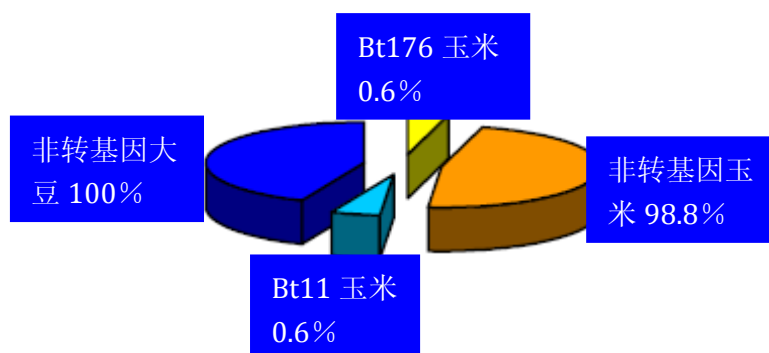


图 2.需要标识的玉米成分。Bt-11 (0.6%) 和 Bt-176 (0.6%) 的相加超过 0.9%。

转基因成分的相对含量 (百分比) 通过转基因特异性序列的量与植物内源特异性基因 (如: 大豆 *lectin* 基因、玉米 *invertase* 基因、或 *zein* 基因) 的量之比来计算。得出的转基因成分百分比可表示为:

转基因成分 (%) = 转基因-DNA / 参照材料-DNA × 100。

定量 PCR 方法

因为扩增效率的原因而不能得到准确的定量信息, 是常规 PCR 的主要缺点。假如每个 PCR 扩增循环的反应效率是一致的, 那么 PCR 反应后 DNA 的浓度跟最初的目的 DNA 的量是成比的。然而, 扩增效率在不同的反应之间, 以及在同一反应的不同循环中是不断变化的, 特别是在 PCR 循环反应的后期, 扩增产物以未知的反应速率呈非指数形式扩增。

为使检测的灵敏度达到最高, 基于常规 PCR 的 DNA 定量是终点定量法, 此时扩增得到最大产物量 (即“平台期”)。由于试剂的消耗以及聚合酶逐渐热失活, 在平台期反应已经过了指数扩增期, 因此终产物的浓度和最初目标分子数目之间的相互关系就很难确定。

竞争性-定量 PCR (quantitative-competitive PCR, QC-PCR) 和实时 PCR (real-time PCR) 技术的建立和发展, 很好地解决了这些问题, 确定了目标 DNA 浓度和扩增的 PCR 产物量之间的关系问题。

竞争性定量 PCR

最初发展的定量 PCR 方法之一是竞争性-定量 PCR (Giacca *et al.*, 1994; Studer *et al.*, 1998; Hardegger *et al.*, 1999)。这种方法是基于目的 DNA 模版和带有相同引物位点的已知量的内部 DNA 标准 (竞争子) 的共同扩增。因为竞争子的初始量已知, 假设目的 DNA 模版和竞争子的扩增效率是一致的, 则两种 PCR 的产物之间存在一定的比例关系, 可通过凝胶电泳等方法确定, 此比例代表目的 DNA 模版和扩增前在反应样品中存在的竞争子的比例。

一般来说, 一个竞争子是一个线性质粒, 这种质粒带有和目的 DNA 相同的引物位点, 和目的 DNA 的差别在于缺失或插入了部分序列。这样, 经过扩增, 就可在标准凝胶电泳后形成两个不同大小的产物条带 (图 3)。

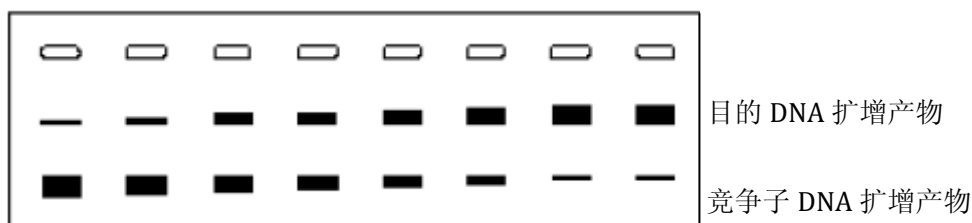


图 3. 定量目的 DNA 和梯度竞争子 DNA 的共扩增。

竞争性 PCR 已经成功的用于定量 DNA 和 RNA, 但是它的动态范围局限于目标 DNA 量对竞争子量之间比率大约为 1: 10 到 10: 1 之间。实际上, 竞争性 PCR 是通过寻找等量点 (目标 DNA 量对竞争子量为 1: 1) 获得最佳的定量准确性 (图 3), 因此就必须测试多个稀释梯度以取得目标 DNA 量和竞争子量之间的合适比率。

此方法的另一个缺点是需要构建和描述针对于每一个要求定量的目标 DNA 的不同竞争子。事实上, 在扩增效率上, 甚至是细微差别就可能严重影响竞争性定量 PCR 的准确性。最后, 在反应结束之后, 竞争性 PCR 要求准确地定量目标 DNA 和竞争子扩增产物的量, 这通常需要繁琐的后期 PCR 处理步骤。

竞争性 PCR 是一种半定量的方法, 需要标准品 (竞争子) 和样品进行比较, 得出的结果仅能显示低于、等于或高于设定的标准浓度。

竞争性 PCR 方法的优点是实验室不需要特殊仪器，在常用的标准 PCR 和分子生物学实验室设备上就可进行操作。

实时 PCR

实时 PCR 是一种更为准确和应用更加广泛地定量 PCR 方法。相对于终点测量方法，实时 PCR 体系可以随反应的实际进行实时监控反应进程。在实时 PCR 中，PCR 反应扩增产物的量和荧光信号的释放是联系在一起，而且是成一定比例的，随着每个循环中 PCR 扩增产物量的增加，荧光信号也会成比例地增加。记录每个循环中释放的荧光信号量，就可监控整个指数期中 PCR 扩增反应的情况。监测到的荧光信号首次的显著增加和目的模板的初始量相互关联 (Ahmed, 2002)。

实时 PCR 技术的发展史

Higuchi *et al.* (1992, 1993) 最先通过建立一种可以检测 PCR 产物累积的体系，分析 PCR 扩增反应动力学，这种“实时”体系首先是在反应混和体系中添加溴化乙锭，然后用一个带有紫外光监测系统的热循环仪，和一个能用计算机控制的用于操控运行的制冷 CCD (电荷耦合装置) 照相机检测产生的荧光。随着 PCR 扩增反应的进行，双链 DNA 的量不断增加，通过溴化乙锭的插入，导致荧光强度的增加。监测每一循环释放的荧光量，绘制释放的荧光对循环数的曲线，得到 PCR 扩增过程中产物增加情况的曲线，就可以在任一循环后分析 PCR 产物的累积情况。

实时 PCR 原理

实时 PCR 方法的特异性依赖于产生和监控扩增反应的化学物质以及用于监控信号的仪器。有许多化学物质可用于此目的：插入染料 (溴化乙锭、SYBR Green I) 和杂交探针 (TaqMan 探针、荧光能量共振转移探针、分子信标、Scorpions 和 TaqMan-小沟结合物探针)。

基于 SYBR Green I 染料的实时 PCR

实时 PCR 的最初应用来自 Higuchi *et al.* (1992, 1993) 的实验, 实验用具有较小毒性但更为特异、灵敏 (10 到 25 倍) 的荧光双链 DNA 插入染料 SYBR Green I (Haugland, 2002) 代替溴化乙啶。

SYBR Green I 染料结合到双链 DNA 的小沟, 但不与单链 DNA 作用, 结合的结果是荧光 (在大约 488 nm 和 254 nm 激发; 释放大约 560 nm 的荧光) 极大地增强 (将近 800 到 1000 倍), 随着 PCR 的进行, 新合成的 DNA 量的增加导致荧光信号的增强 (图 4))。基于序列检测体系的 SYBR Green I 方法, 其局限性在于它的非特异性 DNA 识别模式。实际上, 出现在 PCR 反应中的每一个双链 DNA 分子 (包括非特异性 PCR 产物和引物二聚体) 都有可被定量, 从而影响定量结果。为了解决这个问题, 除去某些设备上由于非特异 DNA 和引物二聚体所引起的定量影响因素, 可进行溶解曲线分析。在 PCR 反应的最后阶段, 随着温度升高, 产物会缓慢的熔解, 同时收集荧光信号。每一双链 DNA 都有其特有的熔链温度, 因此可以在某一单独反应混和体系中定量有不同熔链温度的成分, 这样就可消除非特异性成分对定量结果的影响。

基于序列特异性探针的实时 PCR 方法

扩增子荧光检测的特异性问题可通过使用带有荧光标记的序列特异性探针得到解决, 此探针设计在 PCR 引物对的内部。探针杂交 (和最终降解) 的过程一般不会影响 PCR 产物的指数累积。应用不同的原理已建立了基于特异性实时 PCR 的不同定量方法。

荧光能量共振转移探针

荧光能量共振转移 (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) 是基于从供体荧光团向受体荧光团的能量转移 (图 4) (Haugland, 2002)。FRET 的基本条件是:

- 供体和受体分子必须紧密接近 (典型地为 10-100 Å)。
- 受体的吸收光谱必须和供体的荧光发射光谱交错重叠。
- 供体和受体跃迁的偶极方向必须接近平行。

如果供体和受体荧光基团相互紧密靠近, 那么供体受蓝光的激发将导致能量转移给受体, 之后受体释放长波的光, 这样 PCR 产物的产生就可以通过两个序列特异性的、带

有荧光标记的寡聚核苷酸探针（也叫杂交探针）进行监测。杂交探针的设计是成对的，其中一个标记有供体荧光基团（3'-二氢荧光素）、另一个标记有受体（5'-Red 640 或 5'-Red 705）荧光基团。因为荧光能量共振转移与距离的六次方成反比，因此设计的杂交探针必须杂交到模板DNA上的相邻区域（通常地，它们相距1-5个核苷酸）。如果两个探针都能与模板杂交，使得两个荧光染料距离接近，供体荧光能量共振转移给受体，产生的荧光信号就可以通过荧光光度计进行测量。

降解探针 (TaqMan 原理)

TaqMan 方法利用了 *Taq* DNA 聚合酶的 5' - 3' 外切酶活性，在 PCR (Lie and Petropoulos, 1998) 反应过程中切开降解探针。典型的降解探针或者 TaqMan 探针一般是长度为 20-30 个碱基的寡聚核苷酸（熔链温度一般比引物的高 10°C），其在 5' 端含有一个报告基团，在 3' 端含有一个淬灭基团（图 4），因为 3' 端是封闭的，因此探针不能像引物一样延伸。在 PCR 反应过程中，如果有目标 DNA 序列存在，探针就会特异地退火到正向引物和反向引物位点之间。当探针完整时，报告基团和淬灭基团接近就会导致报告荧光主要地受 Forster-型能量转移的抑制 (Forster, 1948; Lakowicz, 1983)。在反应过程中，如果探针杂交到目标序列上，*Taq* DNA 聚合酶因具有 5'-3' 外切酶活性，就会在报告基团和淬灭基团之间降解探针，随着扩增的继续就会导致荧光的增加，这样 PCR 产物的累积就可以通过监测报告基团荧光的增加进行检测。这样的过程发生在每个 PCR 循环过程中，而且不会影响扩增产物的指数累积。与 FRET 探针不同，降解探针在每一个循环释放荧光，在先前释放荧光信号的基础上加入新释放的荧光信号。结果，荧光信号在每一个循环急剧增强。TaqMan 方法使用常用的热循环参数和 PCR 反应条件，对荧光探针的一个特异性要求是在 5' 端不含有 G，因为在探针切开后，如果连接到报告染料上的碱基是 G，它也会使报告荧光淬灭。

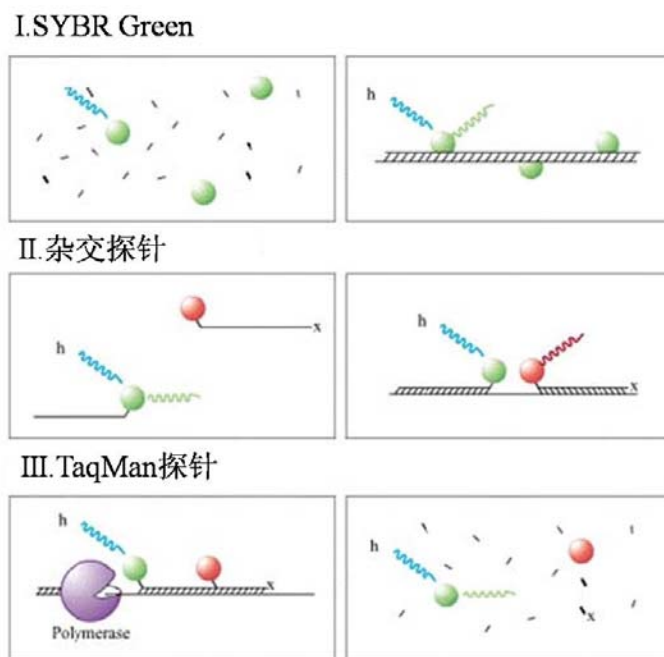


图 4. 不同的实时 PCR 体系的原理。

I. SYBR green I 。 II. FRET (荧光能量共振转移) 探针。 III. TaqMan 5' -3' -降解探针。

分子信标

分子信标 (Molecular Beacons) 是一个含有茎-环结构的DNA探针，环的DNA序列和探针的目标特异DNA序列互补，茎的序列两端互补 (图5) (Tyagi and Kramer, 1996)，探针的5'端和3'端分别共价连接有一个荧光基团和淬灭基团。当茎-环的结构关闭时，荧光基团和淬灭基团靠在一起，此时，荧光基团释放的所有光子被淬灭基团吸收。当互补的目标DNA序列存在时，探针展开与目标序列杂交，荧光基团远离淬灭基团，探针开始发光。

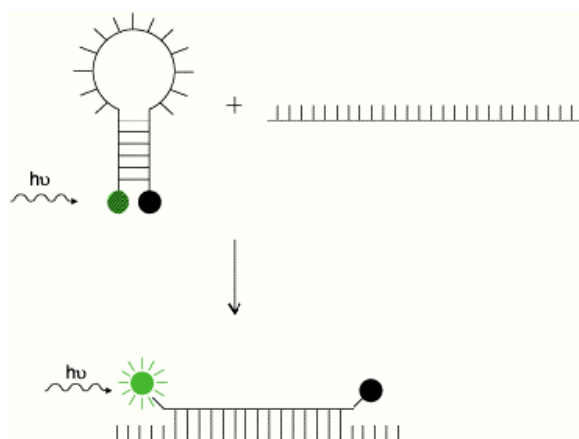


图 5. 分子信标原理

Scorpions

杂交探针更进一步发展的代表是被称作“**Scorpions**”的探针。一个 **Scorpions** 由一个特异性的探针序列和一个茎-环结构组成 (图 6) (Thelwell *et al.*, 2000)。

连接探针在 5'端的荧光基团发出的荧光信号被茎-环结构中连接在 3'的淬灭基团部分淬灭。此茎-环结构连接在引物的 5'端，扩增过程中，**Scorpions** 引物延伸后，特异性探针序列可以连接到位于相同 DNA 链内的互补序列上进行杂交，杂交过程打开了发夹环，因此荧光不再被淬灭，同时观察到的信号会增加。如果引物和茎序列之间的 PCR 阻碍物阻止了发夹结构的通读，可以导致在特异性目标序列不存在的情况下发夹结构的打开，造成假信号的产生。杂交过程的单分子特性赋予了其优于相似探针系统的特点。不像分子信标、TaqMan 或 FRET 方法，Scorpion 方法不需要除引物外的单独探针。

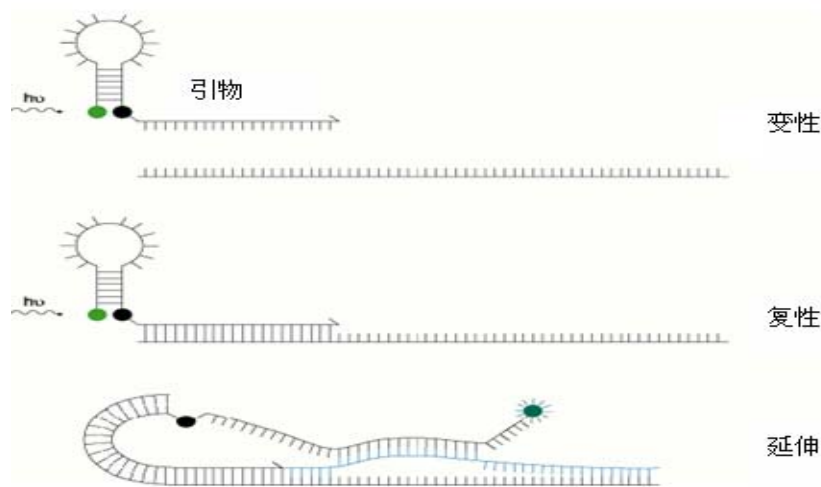


图 6. Scorpion 探针原理

TaqMan MGB 探针

小沟结合子 (Minor Groove Binder, MGB)是一个小的新月形分子,可以与双螺旋DNA的小沟结合(Kutyavin *et al.*, 2000)。在TaqMan探针中, MGB基团连接在3'端,同淬灭基团连在一起(图7)。当TaqMan探针与目标序列杂交时, MGB稳定地退火掺入到在探针和目标序列之间形成的DNA双螺旋小沟内。当双螺旋完全配对时(即当没有序列错配时), MGB与双螺旋小沟的结合会更非常稳定。MGB可以增强探针的鉴别能力,增加的稳定性意味着相对于标准的TaqMan探针(一般18-40 mer),在满足其它设计要求的同时, TaqMan MGB探针可以设计的非常短(一般地为13-20mer)。对于定量PCR,特别是对复合PCR的方法, TaqMan MGB具有更多的优点。光学性能的提高增加了检测的准确性,方法之间更高的探针杂交特异性,使得对于目标序列的识别和检出更具有准确性。而且,较短的探针使得针对它更容易设计检测方法,提供更大范围的短目标区域的合适探针,例如,一致认为的序列保守或分散的“windows”。扩增子的大小可以通过使用更短的MGB探针达到最小,较短的MGB探针可以进一步提高内部检测的一致性。

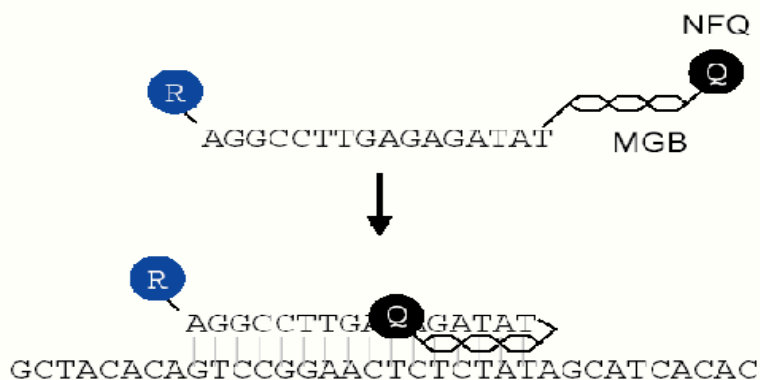


图 7. MGB 探针原理

实时 PCR 定量的原理

相对定量

样品中转基因的含量可表达为总材料中转基因材料的含量。应用实时 PCR 体系确定样品中转基因的含量，需要测量内标准参照基因（用作标准）DNA 序列的量和 GMO 特异性目标 DNA 序列的量。参照基因的选择应具有种的特异性、应在单倍体基因组中以单拷贝形式出现、应可以稳定并同等地表达相同种的不同品系，并且可以在分析的转基因材料中稳定并同等地扩增（尽管更多的是由于好的引物-探针的设计）。相对定量中的一个问题是对于 GMO 含量百分比的解释，立法中没有特别的说明；因此，转基因含量（百分比）可认为是纯的转基因成分的重量与相应成分的总重之比（如：转基因玉米与样品中含有的所有玉米的重量之比）。从分析的角度说，可以把 GMO 含量的百分比定义为每个目标种类特异性序列中目的 DNA 序列的数量，这个定义忽略了 GMO 品系的一些重要性质；因此，在解释结果时，需要仔细考虑下列的一些要点：

- a. 品系的染色体倍数。相对于野生型品系，转基因品系可能有不同的染色体倍数（如：四倍体代替二倍体）。
- b. 品系的接合性。转基因性状可能是纯合的或者杂合的。
- c. 单倍体基因组中插入的构建元件的数目。每单倍体基因组中，一个构建元件可能以单拷贝或多拷贝的形式插入。

其中上述“c”这点可以通过在基因组和构建元件的边界区域设计引物-探针体系，消除其对定量结果的影响。因为边界区域的序列是唯一的，这一点使得此定量体系具有双重优点，首先它是品系（事件）特异性定量方法，同时可以排除相同结构多个插入子对定量结果的影响。从经验上说，上述“a”和“b”可以通过利用和样品同类的有证参考物质加以解决（如：玉米粉参照材料定量玉米粉）。作为选择，不同于有证参考物质的定量标准（如：克隆 DNA 序列或基因组 DNA 混合物）可以通过有证参考物质来校正，以纠正此定量标准在定量上同有证参考物质的分子差异。关于上述要点“a”和“b”，一个更为广泛接受的解决方法，是根据单倍体基因组来表述 GMO 的百分比。

在任何情况下，当有一种新方法出现时，上述这些定量因素都是需要考虑的，因为检测限 (Limit Of Detection, LOD) 和定量检测限 (Limit Of Quantification, LQD) 会受到所需定量样品的真实拷贝数影响。

转基因产品实时定量检测实验的设计

实时 PCR 检测方法的设计必须包括以下几个方面：

- 设计一个 PCR 体系检测 GMO-特异的目标 DNA 序列。
- 另外要设计一个检测内标准参照序列的 PCR 体系，此序列应该是种间特异的，适用于在计算转基因相对含量时用作“标准”。
- 转基因目标序列和内标序列的标准曲线。对每一个实验样品，目标序列和内标参照序列的量依靠合适的标准曲线进行确定。目标序列的量用内标参照量标准化，获得目标序列的相对含量。为了满足统计学要求，标准曲线至少应包括4个不同的浓度点，标准曲线的每一个点和样品至少应重复3次。

除此之外，要加入参照基因和 GMO 定量的阴性对照 (NTC-无模版对照)，也可以加入其它的对照（如：目标 DNA 阴性对照、目标 DNA 阳性对照）。

最后，参照基因定量和 GMO 特异性序列定量应当在相同的 PCR 运行（共扩增）中进行，以避免不同实验间可能产生的统计学差异。

复合实时 PCR 反应

依据用于定量的化学试剂和仪器，可以设计实时 PCR 反应对参照基因和 GMO 序列分别在不同的反应管中定量，或者在相同的反应管中定量（称为“复合”反应）。

两中定量方法的设置各有其优点和不足：复合反应可以节约时间、节省试剂（在一个单独的实验中可以分析两倍的样品），因为此两个反应是在同一反应管中进行的，这样就避免了测量参照基因和 GMO 目标基因之间的设置误差，但是因为两个反应间的相互作用以及不同的试剂消耗，这样会降低检测的灵敏度（依据是定量检测限）。另一方面，根据定量检测限（LOQ），在测量样品时，分别用单个的反应定量参照基因和 GMO 目标基因会有更高的灵敏度，但其要求两倍的试剂，在实时 PCR 仪器上需要两倍的孔，而且更容易受到移液操作等误差的影响。TaqMan 探针多种报告染料的应用使得在同一反应管中检测多个目标序列变为可能。报告染料（FAM）与另一个报告染料（VIC）区别的是因为它们有不同的最大发射波长。例如：使用不同发射波长（FAM、TET、VIC 和 JOE）的多种染料可以进行复合 TaqMan 方法的操作。TAMRA 染料可以用作探针上的淬灭基团，ROX 用作反应混和体系中的阴性参照。为获得最好的结果，推荐使用 FAM（目标）和 VIC（内标对照）的组合，因为它们在最大发射波长上有最大的差异。另一方面，JOE 和 VIC 不能组合使用。复合 TaqMan 方法可以在 ABI PRISM 7700、7900、7500、7300 和 7000 序列检测系统上操作，因为它们可以检测具有不同的发射波长的多种染料。

实时 PCR 数据的图解分析

在实时 PCR 进行过程中收集荧光数据（Rn 值），通过建立信号强度对循环数（或时间）的曲线，称为扩增曲线。一般地，扩增曲线以半对数坐标形式建立。实时 PCR 的扩增曲线可以分为 3 个不同的时期：第一个时期是停滞期，是产生于背景荧光信号的微弱波动；第二个时期是指数扩增期，标绘点逐渐平行增长；第三个时期标绘点趋向一个“平台”（图 8）。

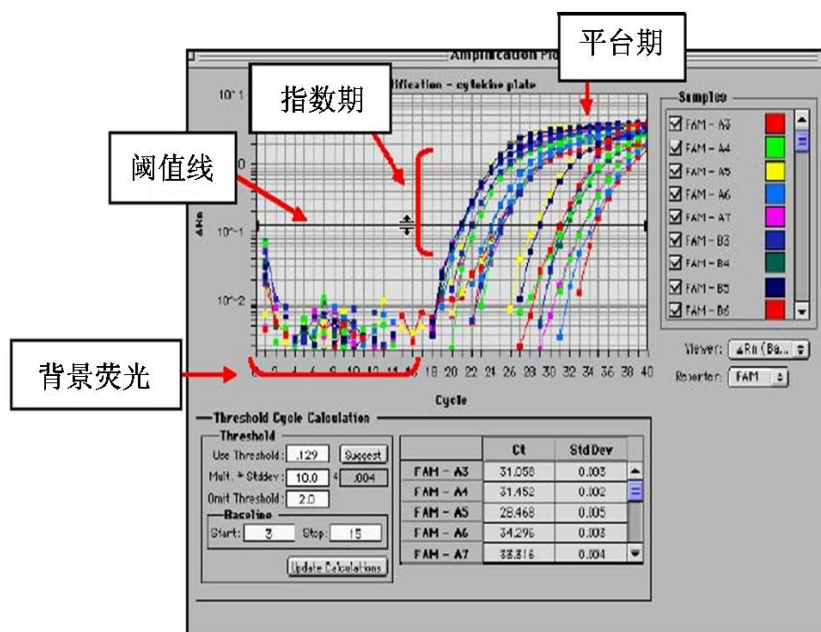


图 8. 实时 PCR 扩增曲线图。重点突出了实时 PCR 的几个主要阶段。

实时 PCR 定量不是在 PCR 反应的末端时期 (平台期), 而是在扩增 DNA 量 (R_n 值) 处于指数增加的时期, 此时扩增 DNA 的量明显高于背景信号。这种测量方法明显增加了定量的准确性, 因为在模板的起始量与扩增进入指数期所需的时间有直接的关系。实时 PCR 的阈值循环数 (C_T) 在实验上一般定义为: 荧光信号达到 3-15 个循环荧光信号平均值加上 10 倍标准偏差时的循环数。初始基因组 DNA 的量越高, PCR 过程中能检测到扩增产物的时间越早, C_T 值就越低。实际操作中, 阈值的选择和 C_T 的确定常常取决于操作人员, 表现出实时 PCR 中主观因素的一面。阈值的设置应当考虑在基线以上、指数扩增期内, 并且在转换为对数时能够显出 (所有的荧光点是平行的) 线性关系。总之, 阈值应当设置在各梯度重复的荧光值开始达到一致时的水平。事实上, 有时梯度重复的荧光值在指数扩增初期会发生微弱的分散递减或者随着反应的进行完全消失。

GMO 含量计算

实时 PCR 产物的量表示为 ΔR_n , 不同于 R_n^+ (包括所有成分荧光信号) 和 R_n^- (反应的背景信号——基线或者无模板对照样品的读数)。

样品的转基因含量可以用两种不同的方法确定:

1. 根据不同含量的 DNA，分别建立两个标准曲线：

- 第一个标准曲线特异定量参照基因的含量；
- 第二个标准曲线特异定量目标转基因的含量。

对每一个样品，特异目标序列和参照基因的量通过标准曲线内插法确定。之后，转基因 DNA 的含量 (百分比) 可以计算为：转基因目标序列的量与参照基因序列的量的比率 (转基因/参照基因*100)。

有必要考虑的是，分析样品必须落在标准曲线的上下限范围内，超过上下限值应当排除在外，因为这些值会产生定量误差。

2. 比较 C_T 值方法 ($\Delta\Delta C_T$)：此种方法使用未知浓度的标准，比较 GMO 目标序列和参照基因序列的相对含量。标准曲线通过设置一系列不同的已知 GMO 含量的样品获得 (如：来自 IRMM 的标准参照物质)，结果就是 $\Delta\Delta C_T$ ($\Delta C_T = \text{参照基的 } C_T - \text{GMO 的 } C_T$) 值的标准曲线，GMO 含量的值可以通过计算样品的 ΔC_T 值获得，并用标准获得的值与之比较。

这种方法的使用，要求目标序列和参照基因序列 PCR 的扩增效率相近。扩增效率主要是决定于 ΔC_T 值 (相同初始模板量的两个 PCR 中，两个 C_T 值之间的差异) 随模板稀释梯度的变化值。如果两个 PCR 反应的扩增效率近似相等，那么模板初始加入量的对数与 ΔC_T 值所构成的曲线将会是一个接近水平的线 (斜率 < 0.10)，这就证明这两个 PCR 反应的扩增效率在初始模板梯度的范围内是相等的。如果曲线显示不相等的效率，那么应当使用标准曲线方法定量测定 GMO 的含量。定量检测的动态范围是由以下两点决定的：(1) 能够得到准确结果情况下，目标序列的最小浓度和最大浓度。(2) 能够得到准确结果情况下，两个基因量的最小和最大的比率。在传统的竞争性 RT-PCR 中，定量检测的动态范围局限为：目标基因序列与竞争子的比率大约是 10:1 到 1:10 (目标对竞争子比率为 1:1 时可以获得最好的准确性) 之间，实时 PCR 方法的动态范围不受此限制，可以得到更广的定量动态范围。

参考文献

- Regulation (EC) 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. OJ L 268, 18.10.2003, pp. 1-23.
- Regulation (EC) 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC. OJ L 268, 18.10.2003, pp 24-28.
- Ahmed, F.E. (2002). Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends in Biotechnology* 5, 215-23.
- Forster, T. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann Phys* (Leipzig) 2, 55-75.
- Giacca, M., Zentilin, L., Norio, P., Diviacco, S., Dimitrova, D., Contreas, G., Biamonti, G., Perini, G., Weighardt, F., Riva, S. and Falaschi, A. (1994). Fine mapping of a replication origin of human DNA. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 91, 7119-23.
- Hardegger, M., Brodmann, P. and Hermann, A. (1999). Quantitative detection of the 35S promoter and the nos terminator using quantitative competitive PCR. *European Food Research Technology* 209, 83-87.
- Haugland, R.P. (2002). The Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, *Ninth Edition*. Molecular Probes, Inc. <http://www.probes.com>
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S. and Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 10, 413-417.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. and Watson, R. (1993). Kinetic PCR: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11, 1026-1030.

- Kutyavin, I.V., Afonina, I.A., Mills, A., Gorn, V.V., Lukhtanov, E.A., Belousov, E.S., Singer, M.J., Walburger, D.K., Lokhov, S.G., Gall, A.A., Dempcy, R., Reed, M.W., Meyer, R.B. and Hedgpeth, J. (2000). 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Research* 28, 655-61.
- Lakowicz, J.R. (1983). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New York, chapter
- Lie, Y. S. and Petropoulos, C. J. (1998). Advances in quantitative PCR technology: 5' nuclease assays. *Current Opinion Biotechnol* 9, 43-48.
- Studer, E., Rhyner, C., Lüthy, J. and Hübner, P. (1998). Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified soybean and maize. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A* 207, 207-213.
- Thelwell, N., Millington, S., Solinas, A., Booth, J. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A* and Brown, T. (2000). Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Research* 28, 3752-3761.
- Tyagi, S. and Kramer, F.R. (1996). Molecular Beacons: Probes that fluoresce upon hybridisation. *Nature Biotechnology* 14, 303-308.
- Väitilingom, M., Pijnenburg, H., Gendre, F. and Brignon, P. (1999). Real-time quantitative PCR detection of genetically modified Maximizer maize and Roundup Ready soybean in some representative foods. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 47, 5261-5266.