

宋 君, 王 东. 实时荧光定量 PCR 检测转基因玉米 MON88017[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(5): 992-998.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.05.006

实时荧光定量 PCR 检测转基因玉米 MON88017

宋 君, 王 东

(四川省农业科学院分析测试中心, 四川 成都 610066)

摘要: 为完善中国转基因生物及产品定量分析标准化技术体系, 保障中国生物安全和降低生态风险, 本研究建立了转基因玉米 MON88017 及产品的实时荧光定量 PCR 分析方法, 并用特异性、准确度、灵敏度以及测量不确定度等指标评价了该方法。结果显示该方法分析转基因玉米 MON88017 特异性很强; 29 次重复测量含量为 1.50% 的转基因玉米 MON88017 样品, 平均测量值(1.541%) 接近真实值(1.50%), 相对偏差为 2.70%, 测量值的变异系数为 0.110 4, 回收率为 100.00%, 测量不确定度为 0.096; 在 97.5% 的置信水平下能检测到最低含量为 5 个拷贝的 MON88017 分子片段。因此, 本研究建立的转基因玉米 MON88017 实时荧光定量 PCR 方法具有较高的特异性、准确度和灵敏度, 能为中国转基因生物安全监管提供良好的技术支撑。

关键词: 转基因玉米 MON88017; 实时荧光定量 PCR; 特异性; 灵敏度; 精确度; 测量不确定度

中图分类号: S513.035.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)05-0992-07

A real-time fluorescent quantitative PCR for detection of genetically modified maize MON88017

SONG Jun, WANG Dong

(Analytical and Testing Center, Sichuan Academy of Agricultural Science, Chengdu 610066, China)

Abstract: In order to compensate and improve the standardized technical systems of quantitative analyses for genetically modified organisms (GMOs) and protect China's bio-safety and reduce ecological risk, a quantitative detection method for the genetically modified (GM) maize MON88017 was developed using real-time fluorescent quantitative PCR. The method was evaluated by several methodological indices such as specificity, sensitivity, accuracy and measurement uncertainty. The mean value of GM maize content (1.541%) repeatedly measured for 29 times was close to the real value (1.50%) with the variation coefficient of 0.1 and the relative deviation of 2.70%. The recoveries and measurement uncertainty were 100.00% and 0.096, respectively. The content of MON88017 molecular fragment as low as five copies could be detected at 97.50% confidence level. The quantitative detection method established for the GM maize MON88017 is of high specificity, accuracy and sensitivity and is capable of providing technical support for the safety supervision of genetically modified organisms in China.

Key words: genetically modified maize MON88017; real-time fluorescent quantitative PCR; specificity; sensitivity; accuracy; measurement uncertainty

收稿日期: 2016-01-15

基金项目: 四川省质监局标准化技术体系研究项目
(ZYBZ2013-39)

作者简介: 宋 君 (1973-), 男, 博士, 四川成都人, 副研究员,
从事生物安全和分子鉴定技术研究。(E-mail) drsjn
@ 126.com

通讯作者: 王 东, (E-mail): scnuwd@ 163.com

随着转基因作物的大面积种植, 转基因作物本身的安全性及其对人类健康和生态环境的潜在威胁

成为国际社会和公众普遍关注的热点问题之一^[1]。转基因产品应用的时间相对较短,其潜在影响可能需要相当长的时间才能显现出来,由于受科学技术和人类认知水平等因素限制,目前尚无法系统、准确地回答转基因产品对人类健康是否具有危害。尽管中国在转基因生物安全管理方面出台了一系列严格的法律法规,但是尚缺乏系统和完整的转基因产品全程溯源管理体系和定量检测标准化技术体系。近年来,中国出口到欧盟的大米被检出超过欧盟规定的转基因成分标识含量阈值(0.9%)^[2]。由于中国缺乏转基因成分定量检测技术标准,在国际农产品贸易中受进口国利用转基因成分定量检测技术设置的贸易壁垒限制,严重影响了中国农产品的出口贸易。因此对农产品转基因成分进行有效、快速、准确、定量分析已成为目前亟待解决的课题。截至目前,中国共颁布 101 项转基因生物安全检测技术标准,其中农业行业转基因成分检测标准 41 项,环境安全检测技术标准 39 项,商检行业转基因成分检测技术标准 21 项。101 项标准中只有 7 项标准(GTS40-3-2、MON810、bt176、bt11、GA21、TA25、RT73)是转基因成分定量检测技术标准,其余标准都是转基因成分定性检测技术标准。随着生物化学与分子生物学技术的飞速发展,原有定性分析方法已远远滞后于转基因生物新品种研发和分析技术的进步,无法满足日常转基因生物安全监管需求。因此,建立相关转基因生物及产品定量分析方法显得尤为迫切。

以农产品中 DNA 含量为依据,用 QRT-PCR (Quantitative real time polymerase chain reaction) 分析特定转基因成分拷贝数(Copies)与物种内标准基因拷贝数(Copies)之比来定量分析农产品中转基因成分含量,是目前国际上定量分析转基因成分含量的主流方法。实时荧光定量 PCR(QRT-PCR)分析方法^[3-7]是在 PCR(多聚酶链式反应, Polymerase chain reaction)反应体系中,除采用人工化学合成的 1 对特异寡核苷酸聚合分子(引物,起引发多聚酶链式反应)外,还加入了 1 条与模板 DNA 匹配的标记有荧光化学基团的特异寡核苷酸聚合分子(探针,与模板 DNA 杂交使反应产物带有荧光信号)。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 1 个荧光强度信号,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 1 条含荧光信号的反应

产物积累量的曲线(扩增曲线)。当荧光信号超过所设定的阈值(Threshold value)时,荧光信号可被检测出来。在产物生成的对数增长长期内,每个 DNA 模板的 C_t (Cycle of threshold)值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系。利用已知起始拷贝数(含量)的基体标准物质或质粒标准分子可制备标准曲线,将通过分析仪器获得未知样品的 C_t 值代入标准曲线,即可计算出该样品的内源基因和转基因成分的起始拷贝数(含量),从而计算出目标核酸拷贝数(含量)的比值(百分数),即为转基因成分的相对百分含量。

MON88017 是美国孟山都公司研发的具有抗虫和耐除草剂特性的转基因玉米。欧洲食品安全局(European food safety authority, EFSA)在 2011 年发布了一份转基因玉米 MON88017 在欧洲市场上市的风险评估报告,认为 MON88017 不太可能对环境产生不良影响,除了该玉米含有的 Cry3Bb1 蛋白对鞘翅类靶标害虫的抗性演化外。中国于 2013 年底批准进口转基因玉米 MON88017 用作加工原材料,进口有效期截止 2016 年 12 月 31 日。目前关于 MON88017 玉米的检测有相对成熟的定性分析方法^[8-9],但是其定量分析方法却鲜有报道^[9]。本研究根据 MON88017 外源基因插入受体玉米基因组的旁侧 DNA 序列,设计并合成了特异的寡核苷酸和探针,建立了一种高灵敏度的转基因玉米 MON88017 及衍生品定量分析方法,以期为中国转基因生物及产品定量分析提供精准定量分析技术。

1 材料与方法

1.1 试验材料

含量为 100% 的转基因玉米 MON88017 粉末用于标准曲线制备,含量为 1.5% 的转基因玉米 MON88017 粉末(用含量为 100% 的转基因玉米 MON88017 粉末与普通玉米粉末,按照 1.5% 的质量百分比在本实验室制备)用作测试样品。

1.2 试验方法

1.2.1 试剂与仪器 本试验中的核心试剂基因组 DNA 提取试剂和探针型(TaqMan[®] 水解探针)实时聚合酶链式反应试剂[Real time polymerase chain reaction (PCR) master mix]购自 TIANGEN[®] 天根生化科技(北京)有限公司。

试验中使用的关键仪器有超微量分光光度计

(Nanodrop® 1000, thermo fisher scientific corporation) 和实时荧光 PCR 系统 (Real time PCR system 7500, applied biosystem corporation, USA), 分别用于测试从转基因玉米 MON88017 中分离、纯化的基因组 DNA 的质量和扩增玉米 *zSS IIb* 内源基因以及 MON88017 转化 DNA 片段。

1.2.2 DNA 的分离与纯化 称取含量为 100% 的转基因玉米 MON88017 粉末和含量为 1.5% 的转基因玉米 MON88017 粉末各 0.1 g。按照植物基因组 DNA 纯化试剂盒 [TIANGEN®, 天根生化科技 (北京) 有限公司产品] 说明书分离、纯化转基因玉米 MON88017 基因组 DNA。

1.2.3 引物和探针设计 按照国家标准 GB19495.4-2004^[10] 合成引物和探针, 扩增玉米内标基因 *zSS IIb*; 根据转基因玉米 MON88017 的旁侧序列 (GI: 397146042), 用 Primer express3.0 (Applera corporation, U. S.) 软件设计跨越基因表达调控元件 (CaMV35S) 和玉米基因组的特异引物和探针 (表 1), 扩增 MON88017 分子片段; *zSS IIb* 和本试验设计的 MON88017 的引物与探针由生工生物工程 (上海) 股份有限公司 (Sangon biotech) 进行化学合成。合成纯度为 HPLC 级, 探针 5' 端和 3' 端分别标记荧光基团 FAM (6-carboxy-fluorescein, 6-羧基荧光素) 和 TAMRA (6-Carboxytetramethylrhodamine, 6-羧基四甲基罗丹明)。

表 1 引物和探针序列

Table 1 The primers and probes designed in this study

基因	设计的引物和探针序列	产物大小 (bp)
<i>zSS IIb</i>	5'-CTCCCAATCCTTTGACATCTGC-3' 5'-TCGATTCTCTCTTGGTGACAGG-3' 5'-FAM-AGCAAAGTCAGAGCGCTG-CAATGCA-TAMRA-3'	151
MON88017 分子片段	5'-CGCTAGCAGCTCTCTCCAA-3' 5'-CCGGACATGAAGCCATTACA-3' 5'-FAM-CTTTTTCGCGGAGTATGACG-GTGACG-TAMARA-3'	97

1.2.4 标准曲线制备和反应体系 将含量为 100% 的转基因玉米 MON88017 的基因组 DNA, 按照 1:5 稀释成 5 个浓度梯度: 100.00 ng/μl、20.00 ng/μl、4.00 ng/μl、0.80 ng/μl、0.16 ng/μl。将含量为 1.5% 的转基因玉米 MON88017 基因组 DNA 的浓度稀释成 50 ng/μl。取上述 DNA 稀释液 3 μl 加入到 25 μl 反应体系: TaqMan® Master mix (2×) 12.5 μl, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μl, 探针 (10

μmol/L) 0.5 μl, 补水至 25 μl。每个梯度浓度的 DNA 稀释液做 3 个平行反应, 对测试样品进行 29 次重复分析。把配制好的反应体系置于 7500 型荧光定量 PCR 仪器上, 运行如下程序: 首先 95 °C 预变性 DNA 模板 10 min, 然后运行 45 个热循环反应 (95 °C 变性 15 s, 59 °C 退火 60 s)。

1.2.5 方法的特异性、灵敏度、精密度和测量不确定度 为了检验所建方法的特异性, 除了将本研究设计的引物和探针在数据库 (EMBL、GenBank、Patent 等) 中进行比对外, 还用设计的引物和探针检测转基因玉米 TC1507、NK603、MON863、MON810、3272 非目标转化体粉末样品和转基因大豆、棉花、油菜、甜菜种子粉末样品来确定方法的特异性。

根据玉米基因组大小 (2.5×10^9 bp), 计算出 3 μl 含量 100% 的 MON88017 玉米 DNA 溶液 (50 ng/μl) 含 50 000 个拷贝 (Copies) MON88017 分子片段, 然后连续 4 次 10 倍梯度稀释, 获得 MON88017 分子片段的 5 个梯度拷贝数分别为 50 000 拷贝, 5 000 拷贝, 500 拷贝, 50 拷贝, 5 拷贝, 分别以这 5 个梯度拷贝数的 DNA 为模板进行实时扩增以测定方法的灵敏度。

对转基因成分含量为 1.5% 的样品进行 29 次重复检测, 然后计算这些测量数据的变异系数和回收率来评估方法的精密度。变异系数和回收率的计算公式分别为变异系数 (CV) = 标准差 (S) / 算术平均值 (X), 回收率 (%) = $C_1 / C_2 \times 100\%$, 其中 C_1 为样品转基因成分测量值的平均值, C_2 为样品转基因成分真实值 (约定值)。

采用 $U = 2 \times \sqrt{0.0481^2 + (0.1829 \times C)^2}$ 公式, 计算本试验的测量不确定度, 其中 U 为扩展不确定度, C 为试样的测量值。

2 结果与分析

2.1 方法的特异性和拟合的标准曲线

采用本试验设计的引物和探针分别对转基因玉米 MON88017、TC1507、NK603、MON863、MON810、3272 非目标转化体粉末样品和转基因大豆、棉花、油菜、甜菜种子粉末样品的 DNA 进行分析 (图 1), 只有转基因玉米 MON88017 的信号能被检测到, 说明设计的定量分析 MON88017 分子片段的引物和探针针对转基因玉米 MON88017 有非常强的特异性。

根据最小二乘法原理, 7500 软件 (Applied bio-

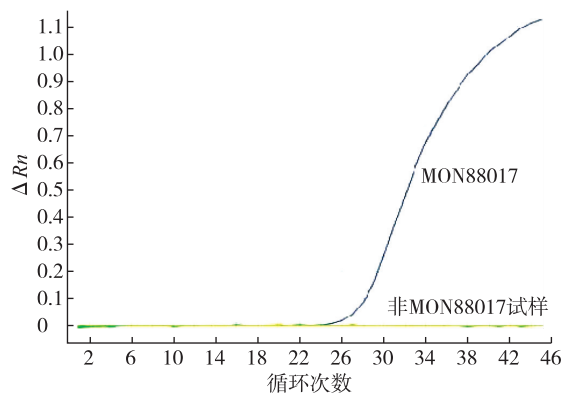


图1 方法的特异性
Fig.1 The specificity of the method for detection of genetically modified maize MON88017

system corporation, USA) 拟合出标准曲线。转基因玉米 MON88017 的标准曲线方程为 $Y = -3.25x + 32.63$, 相关系数 (r) 为 0.999, 扩增效率为 103.18%; 玉米内源基因 *zSS IIb* 的标准曲线方程为 $Y = -3.28x + 31.63$, 相关系数 (r) 为 0.997, 扩增效率为 99.73%。结果显示本试验的内源 (*zSS IIb*)、外源 (59122 分子片段) 基因扩增效率大于 90.00%, 相关系数 (r) 大于 0.980, 说明本试验设计的引物和探针扩增效率高。

2.2 方法的灵敏度和精密度

用 50 000、5 000、500、50、5 个拷贝数 (分子数) 的 MON88017 分子片段作为模板, 实时分析结果表明本方法能检测到 5 个拷贝的 MON88017 分子片段 (图 2 和表 2)。为了验证本试验建立的转基因玉米 MON88017 定量检测低限 (LOD) 的可靠性, 本研究对 5 拷贝的 MON88017 分子片段进行 40 次重复检测, 结果表明 39 次能够检测到 5 拷贝的 MON88017

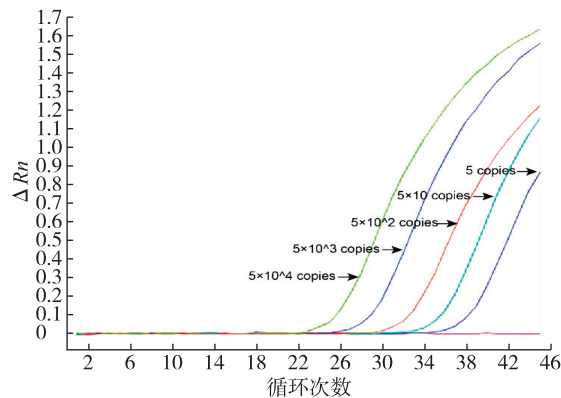


图2 方法的检测下限
Fig.2 The limit of detection of the method

分子片段 (表 3)。因此, 试验结果表明在 97.5% 的置信水平下本研究建立的转基因玉米 MON88017 定量检测方法低限为 5 个拷贝。

表2 方法的灵敏度
Table 2 Analysis of the sensitivity of the method established

拷贝数	C_t 值			平均 C_t 值
	第 1 次试验	第 2 次试验	第 3 次试验	
5×10^4	26.13	26.04	25.91	26.03
5×10^3	29.13	29.12	29.16	29.13
5×10^2	32.88	32.68	32.63	32.73
5×10^1	35.46	35.87	35.91	35.75
5×10^0	38.56	38.53	39.45	38.85

表3 97.5%置信水平的检测下限的 C_t 值
Table 3 C_t values for the limit of detection of the new method at 97.5% confidence level

重复序号	C_t 值	重复序号	C_t 值	重复序号	C_t 值
1	38.301 35	23	39.826 81	20	39.201 58
2	38.225 63	24	37.972 31	21	38.100 36
3	39.148 56	25	40.146 29	22	39.351 88
4	36.624 08	26	37.595 07	23	37.862 45
5	39.201 58	27	39.122 37	24	37.777 74
6	38.100 36	28	37.785 30	25	36.874 87
7	39.351 88	29	36.650 46	26	39.182 85
8	37.862 45	30	37.225 65	27	39.149 05
9	37.777 74	31	39.268 49	28	35.566 59
10	36.874 87	32	38.330 07	29	36.161 82
11	39.182 85	33	38.218 66	30	37.102 99
12	39.149 05	34	37.191 11	31	37.296 23
13	35.566 59	35	38.586 76	32	37.901 70
14	36.161 82	36	37.089 62	33	38.019 34
15	37.102 99	37	-	34	36.722 59
16	37.296 23	38	38.148 19	35	37.184 39
17	37.901 70	39	39.120 46	36	38.805 19
18	38.019 34	40	36.917 19	37	36.958 68
19	36.722 59	16	38.301 35	38	39.826 81
20	37.184 39	17	38.225 63	39	37.972 31
21	38.805 19	18	39.148 56	40	40.146 29
22	36.958 68	19	36.624 08		

-: 待定

用本试验建立的方法对含 MON88017 为 1.500% 的测试样品重复检测 29 次, 结果表明测试样品中 MON88017 的相对含量为 1.235% ~ 1.860%, 平均相对含量为 1.541% (表 4), 接近真实

含量 1.500% (约定真值), 测量值与真实值的相对偏差为 2.7%。29 次测量结果的变异系数为 0.110 4, 回收率为 100%, 说明该分析方法具有良好的准确性和重现性。

表 4 含 1.50% 转基因玉米 MON88017 样品的定量检测

Table 4 Quantitative detection of 1.5% genetically modified maize MON88017 specific fragment

重复序号	$zSS II b C_i$ 值	$zSS II b$ 绝对含量 (ng)	MON88017 片段 C_t 值	MON88017 片段绝对含量 (ng)	MON88017 片段相对含量 (%)
1	23.249	368.538	30.430	6.562	1.781
2	23.248	368.803	30.502	6.234	1.690
3	23.214	377.623	30.553	6.011	1.592
4	23.267	363.979	30.823	4.957	1.362
5	23.213	377.975	30.553	6.011	1.590
6	23.230	373.341	30.351	6.945	1.860
7	23.076	415.349	30.262	7.402	1.782
8	23.317	351.593	30.594	5.838	1.660
9	23.177	387.479	30.389	6.759	1.744
10	23.023	430.686	30.291	7.247	1.683
11	22.958	450.601	30.486	6.305	1.399
12	22.929	459.639	30.428	6.572	1.430
13	23.000	437.726	30.426	6.581	1.504
14	23.003	436.880	30.388	6.762	1.548
15	23.075	415.690	30.465	6.400	1.540
16	22.938	456.690	30.643	5.638	1.235
17	23.011	434.372	30.385	6.778	1.560
18	22.936	457.397	30.604	5.797	1.267
19	23.177	387.282	30.614	5.754	1.486
20	23.184	385.553	30.424	6.592	1.710
21	23.059	420.262	30.487	6.303	1.500
22	22.999	437.852	30.463	6.411	1.464
23	23.197	382.083	30.668	5.538	1.449
24	23.360	341.313	30.562	5.973	1.750
25	23.198	381.709	30.654	5.592	1.465
26	23.034	427.590	30.710	5.374	1.257
27	23.179	386.772	30.606	5.789	1.497
28	23.351	343.594	30.911	4.656	1.355
29	23.249	368.538	30.430	6.562	1.781
平均	23.129	402.085	30.524	6.171	1.541

2.3 测量不确定度

根据公式 $U = 2 \times \sqrt{0.048 I^2 + (0.182 \times C)}$, 计

算得到 29 次定量分析转基因玉米 MON88017 的测量不确定度为 0.096, 低于 10%, 测量值分布范围较

窄($1.541\% \pm 0.096\%$),说明使用本方法定量分析转基因玉米 MON88017 的检测质量较高。

3 讨论

中国是世界上对转基因生物及产品安全监管最严格的国家之一,目前对转基因农产品实施的是零容忍的定性标识制度,只要产品中检出转基因成分都必须标识该产品含转基因成分,而不考虑产品的安全等级差异。这种标识制度缺乏足够的科学性,不利于转基因生物产业的健康发展。欧盟(标识阈值为 0.9%)、日本(标识阈值为 5.0%)和韩国(标识阈值为 3.0%)等国家(地区)采取的是定量标识制度^[11-12],产品中的转基因成分含量高于标识阈值才需进行含转基因成分标识。从目前国际转基因生物产业发展情况推测,产品的转基因成分定量标识最终可能会成为国际趋势。

由于中国目前实施的是转基因成分定性标识政策,所以缺乏完整的转基因产品定量分析技术体系。国际上转基因成分定量分析主要采用荧光定量 PCR 方法,本研究根据定量 PCR 原理设计了定量分析转基因玉米 MON88017 的引物和探针,建立了一种高灵敏度的转基因玉米 MON88017 的实时定量 PCR 检测方法。对于新建的化学分析方法,一般需要用特异性、准确性、灵敏性、精密度以及测量不确定度等方法学指标来评价新建方法的先进性。本研究设计的引物和探针在 NCBI 数据库中进行理论比对,除了能与转基因玉米外源基因旁侧序列结合外,没有发现别的结合位点。本研究还用设计的引物和探针进一步分析了抗除草剂和抗虫转基因玉米其他品系,仍然没有检测到 MON88017 分子片段,充分说明本试验建立的定量分析转基因玉米 MON88017 的方法具有很高的特异性。

结果的准确性是分析方法的内在要求。在实际操作中,PCR 的扩增效率为 90%~110%,对应的标准曲线斜率的平均值为 $-3.6 \sim -3.1$,测试样品的 C_t 值在 18~30 个循环数范围内,能够获得可靠的测量结果^[13]。 R^2 是反映标准曲线数据对相关性的一个重要参数,在基因的定量分析中,一般要求决定系数 R^2 大于或等于 0.98。本研究用建立的转基因玉米 MON88017 定量 PCR 检测方法,制备的标准曲线斜率为 -3.25 ,扩增效率为 103.18%,相关系数 r 为 0.999,用该标准曲线得到的检测结果(1.541%)接

近样品中 MON88017 含量的真实值(1.500%)。测量值与真实值的相对偏差(2.7%)小于 10%,而且样品测试的回收率为 100%,充分显示本方法的测量结果具有较高的准确度和较好的重现性。灵敏度是衡量检测方法先进性的主要指标,在分析化学中一般是指测定方法能检测出物质的最低量或最低浓度。本研究建立的方法在高置信水平(97.5%)下能够检测到 5 个拷贝的 MON88017 分子片段,远高于袁磊等报道的 17~30 个拷贝(未给出置信度)的灵敏度^[9],说明本方法具有很高的灵敏度。理论上,利用 PCR 技术可以检测到 1 个拷贝数的 DNA 分子,但是在分析实践中往往因为 DNA 等大分子溶液的均一性低于离子化合物溶液的均一性和微量液体转移等问题导致试验不能在 100%置信水平下检测到 5 个拷贝数的 MON88017 分子片段。

精密度是用来表征各次测量数据大小彼此接近的程度。精密度越高,说明各次测量数据比较接近,精密度是偶然误差的反映。通过连续 29 次重复测量同一样品,测量值分布在 $1.235\% \sim 1.860\%$,变异系数为 0.110 4,显示应用本方法测量具有较高的精密度。测量不确定度是与测量结果关联的一个参数,用于表征合理赋予被测量值的分散性^[14],是评估检测数据质量的重要参数。本试验的测量不确定度 U 为 0.096,低于 10%,测量值主要分布在 $1.444\% \sim 1.636\%$,说明本方法的检测质量较高。因此,从特异性、灵敏度、精密度、准确度以及测量不确定度等指标评价结果看,本研究建立的转基因玉米 MON88017 实时定量 PCR 分析方法是一种高灵敏度的转基因生物及产品定量分析技术,能为中国转基因生物安全监管提供良好的技术支撑。

参考文献:

- [1] 宋 君,雷绍荣,郭灵安,等.实时荧光定量 PCR 检测转基因玉米 NK603 品系特异片段的测量不确定度[J].西南农业学报,2013,26(5):1769-1773.
- [2] WU G, WU Y H, NIE S J, et al. Real-time PCR method for detection of the transgenic rice event TT51-1[J]. Food Chemistry, 2010, 119:417-422.
- [3] 邓平建,杨冬燕,李碧兰,等.转基因成分实时荧光 PCR 定量分析数学方程的理论研究[J].中国卫生检验杂志,2005,15(7):769-772.
- [4] 宋 君,雷绍荣,郭灵安,等.实时荧光定量 PCR 检测转基因玉米 MON863 的测量不确定度分析[J].玉米科学,2012,20(5):45-49.

- [5] 王 东, 宋 君, 郭灵安, 等. 转基因大豆外源基因 CaMV35S 启动子测定不确定度分析[J]. 西南农业学报, 2014, 27(1): 40-45.
- [6] 宋 君, 雷绍荣, 刘 勇, 等. 转基因玉米 MON863 品系特异定量 PCR 方法的建立[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(24): 5250-5253.
- [7] 宋 君, 雷绍荣, 刘 勇, 等. 转基因玉米 NK603 品系特异定量 PCR 检测方法的建立[J]. 生物技术通讯, 2012, 23(2): 238-241.
- [8] 瞿 勇, 武玉花, 吴 刚, 等. 转基因玉米 MON88017 转化事件特异性定性 PCR 检测方法及其标准化[J]. 农业生物技术学报, 2010, 18(6): 1208-1214.
- [9] 袁 磊, 孙红伟, 杨崇良, 等. 转基因玉米 MON88017 旁侧序列分析及定性 PCR 检测[J]. 作物学报, 2010, 36(2): 361-364.
- [10] 转基因产品检测核酸定量 PCR 检测方法: GB19495.5-2004 [S].
- [11] 金芑军, 贾士荣, 彭于发. 不同国家和地区转基因产品标识管理政策的比较[J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(1): 1-7.
- [12] 徐琳杰, 刘培磊, 熊 鹏, 等. 国际上主要国家和地区农业转基因产品的标识制度[J]. 生物安全学报, 2014, 23(3): 301-304.
- [13] 宋 君, 雷绍荣, 刘 勇, 等. 实时荧光定量 PCR 检测转基因玉米 MON863 结构特异基因的测量不确定度[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(33): 20312-20315.
- [14] 余 南, 甘 明, 詹希美, 等. 乙型肝炎病毒核酸定量检测中不确定度的研究[J]. 热带医学杂志, 2007, 7(4): 310-314.

(责任编辑:陈海霞)