

基于双重微滴式数字 PCR 对转基因油菜 RF1 品系的定量方法

蔡教英, 姚丽锋, 王小玉, 游淑珠, 丁琦

(珠海出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 广东珠海 519015)

摘要: 基于微滴式数字 PCR 平台, 建立了一种在同一个微滴反应体系中同时检测油菜样品中两种靶标序列的双重微滴式数字 PCR (duplex-ddPCR) 定量分析方法。试验结果表明, 内参基因和品系特异性基因均能特异性扩增出来, 所建立的 RF1 品系 duplex-ddPCR 方法特异性好。在单位体系内参和外源基因拷贝数位于 18~23077 的区间内可以呈现出良好的线性, $r^2=0.999$ 。经验证, 本方法的定量检测限 (LOQ) 和最低检测限 (LOD) 分别为 18 拷贝/反应和 3.7 拷贝/反应。精密度试验结果表明两组浓度的 DNA 样品所得到的平行试验结果的标准偏差 (relative standard deviations, RSD) 介于 8.40%~24.50%, 准确度试验结果显示标准偏差 RSD 值介于 5.97%~12.64%, 均达到了对方法精密度 RSD 和准确度 RSD 小于 25% 的要求。综上所述, 本研究建立的 duplex-ddPCR 定量分析方法可用于转基因油菜 RF1 的定量检测。

关键词: 双重微滴式数字 PCR; 转基因油菜; RF1 品系; 定量

文章编号: 1673-9078(2018)06-282-287

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.6.039

Quantitative Analysis of Genetically Modified Rapeseed of RF1 by Duplex Droplet Digital Polymerase Chain Reaction (Duplex-ddPCR)

CAI Jiao-ying, YAO Li-feng, WANG Xiao-yu, YOU Shu-zhu, DING Qi

(Technical Center of Zhuhai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhuhai 519015, China)

Abstract: A duplex droplet digital PCR (duplex-ddPCR) quantitative analysis method for the the simultaneous detection of genetically modified rapeseed Rf1 was established based on the droplet digital PCR platform. The results showed that both endogenous reference gene and Rf1 event-specific gene could be specifically amplified, and the established duplex-ddPCR method for RF1 event-specific rapeseed had good specificity. In unit system, the reference gene number and the exogenous gene copy number showed a good linearity ($r^2=0.999$) in the range of 18~23077 copies, and the LOQ and LOD were 18 copies and 3.7 copies, respectively. The precision test results showed that the relative standard deviations (RSD) of endogenous PEP and RF1 content were between 8.40% and 24.50%, respectively, and the accuracy test results showed that the relative standard deviations (RSD) were between 5.97% and 12.64%, respectively. The RSD of precision and accuracy were all less than 25%, which met the detecting requirements. In conclusion, the duplex-ddPCR quantitative analysis method established in this study could be used for the quantitative detection of genetically modified rapeseed RF1.

Key words: duplex-droplet digital polymerase chain reaction (duplex-ddPCR); genetically modified rapeseed; line RF1; quantification

随着生物技术的快速发展, 全球转基因作物的种植面积持续增加。全球转基因作物累计种植面积由 170 万公顷 (1996 年) 增加至 20 亿公顷 (2015 年), 且转基因作物的种植面积前 6 位的国家一次是美国、

收稿日期: 2018-01-23

基金项目: 出入境检验检疫行业标准计划项目 (2015B218k); 珠海出入境检验检疫局科技计划项目 (ZH2016-15)

作者简介: 蔡教英 (1987-), 女, 工程师, 硕士, 研究方向: 微生物与分子生物学

通讯作者: 王小玉 (1973-), 女, 高级工程师, 硕士, 研究方向: 微生物与分子生物学

巴西、阿根廷、印度和中国^[1]。近年来, 转基因作物带来的食品安全和环境安全问题一直是一个关注的热点, 目前公众对转基因作物到底含有哪些转基因及其相应含量尤为关注, 因此许多国家和地区均出台了转基因限量规定, 并实施了标识管理措施。然而各个国家或地区做规定的限量标准和标识管理措施存在很大差异^[2], 为了打破国际贸易壁垒和促进标识管理制度的顺利进行, 迫切需要对作物中转基因含量建立可靠、准确的定量分析方法。

目前应用最广的定量检测方法是实时荧光定量 PCR 技术, 该方法需要通过标准曲线来进行定量, 但

是在建立标准曲线的过程, 容易受到样品中抑制剂等的影响, 导致准确性降低^[3]。数字 PCR (digital polymerase chain reaction PCR, dPCR), 又成为“第三代 PCR”技术, 是一种近年来发展迅速的检测手段, 在转基因成分检测领域拥有巨大的潜能。微滴式数字 PCR (droplet digital polymerase chain reaction, ddPCR) 是将反应体系分割成很多微小的反应微滴, 实现每个反应微滴只有单个模板分子进行 PCR 扩增, 根据泊松分布原理, 按阳性微滴与阴性微滴数的比例计算目标分子拷贝数, 实现绝对定量^[4,5]。国内外已有将微滴式数字 PCR 平台应用于精准定量转基因拷贝数的报道^[6-10]。本研究以转基因油菜 RF1 品系作为研究对象, 建立其内参基因及品系特异性基因的 ddPCR 定量检测方法。全球转基因油菜的种植面积从 2015 年的 850 万公顷增加到 2016 年的 860 万公顷^[11]。美国、加拿大和澳大利亚的转基因菜籽油的边际产量均有所增加, 满足了全球对食用油的需求。智利也有种植, 但仅作为种子使用, 不用来榨油。在短期内, 为了应对菜籽油和生物柴油日渐增加的使用需求, 全球油菜需求量可能会显著增加。转基因油菜籽是我国广泛应用的加工原料, 根据我国的“转基因生物安全管理条例”, 要求对转基因油菜种子、油菜籽及其加工产品进行强制标识管理^[12]。为此, 本研究拟建立一种转基因油菜 RF1 双重 ddPCR 定量方法, 为实现转基因油菜 RF1 精准定量奠定基础。

1 材料与方法

1.1 原料

转基因油菜 RF1、RF2、MS1、MS2 和 T45 品系以及转基因大豆 GTS40-3-2 品系标准物质购于美国油脂化学家协会 (American Oil Chemists' Society, AOCS)。非转基因油菜、大豆样品为本实验室储备。Premix Ex Taq TM, 大连宝生物; MasterMix(2×)、ddPCR Droplet Generation Oil、GD8 Cartridge 均购自美国伯乐公司; 引物和探针由 invitron 公司合成, 稀释为终浓度为 10 μmol/L 的工作液使用。ddPCR Super Mix、ddPCR Droplet Generation Oil、ddPCR Droplet Reader Oil、Droplet Generator DG8 Cartridge、Droplet Generator DG8 Gasket、plate holder 美国 Bio-Rad 公司; QX200 Droplet Digital PCR 系统美国 Bio-Rad 公司; Nanodrop 2000c 核酸蛋白分析仪美国 Thermo 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物探针和特异性验证

根据文献选取磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (phosphoenolpyruvate-carboxylase, PEP) 和油菜 RF1 特异性基因序列, 选取适用于数字 PCR 的引物探针对, 序列信息 (见表 1), 并在实时荧光 PCR 仪上验证特异性, 扩增体系为: Premix Ex Taq 12.5 μL, 引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, 探针 (10 μmol/L) 各 0.25 μL, DNA 模板 2 μL, 补水至 25 μL。反应参数: 预变性 95 °C、5 min; 95 °C、15 s, 60 °C、1 min, 收集荧光信号 45 个循环。

表 1 引物探针序列表

Table 1 Primer probe sequence for ddPCR

检测位点	引物探针序列	来源
PEP 基因	PEP-F1CCCTTGTAAGCTCGACATC	上海出入境检验检疫局
	PEP-R1CTTGTCCTCTGACCATTCTTTGT	
	PEP-P1 HEX-CCGACCGTCACACCGATGTTTTAGA-BHQ1	
RF1 品系	Rf1-F2 TCC TTC TAC TTT CTC TTC CCT AT	上海交通大学 ^[13]
	RF1-R2 CAG ATC GGT AAC TTC ATA ACA GAA	
	RF1-P2FAM-CTG TCC TTC TTT CCA AAT CCT CGA AAC-BHQ1	

1.2.2 扩增稳定性试验

为验证转基因油菜 RF1 品系标准品在微滴式数字 PCR 的扩增稳定性, 以 30 ng/μL 转基因油菜 RF1 品系基因组 DNA 按照下述反应体系和参数进行检测, 同时设置 3 个平行进行检测, 3 个平行的相对标准偏差 (RSD) 不超过 25%。

数字 PCR 反应体系: 2×MasterMix 10 μL, 引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, 探针 (10 μmol/L) 各 0.25 μL, DNA 模板 2 μL, 补水至 20 μL。反应参数: 95 °C、5 min (1 °C/s);

94 °C 15 s, 60 °C、1 min (1 °C/s), 共 45 个循环; 98 °C、10 min (1 °C/s), 12 °C 保存反应产物。反应结束后将 96 孔反应板置微滴分析仪中读取数据, 应用 QuantaSoft V1.3.2 软件进行数据分析。

1.2.3 线性范围验证

将油菜 RF1 品系标准品的基因组稀释至 30 ng/μL, 用 0.1×TE (Tris-HCl, EDTA-Na, pH 8.0) 缓冲液进行 6 个梯度的梯度稀释, 将原始基因组分别稀释至 6, 1.2, 0.24, 0.12, 0.024, 0.0048 ng/μL, 将以上

梯度稀释组的 DNA 模板进行数字 PCR 检测, 每个浓度梯度组包含 3 个平行, 平行间相对标准偏差 (RSD) 不超过 25%。检测结果 RSD (<25%) 的样品拷贝数为定量检测限 (LOQ), 能够检测的样品最低拷贝数为检测限 (LOD)。

1.2.4 定量检测限和检测限的验证

取上一步线性范围下限的 DNA 样品进行 LOQ 的验证。将该 DNA 进行十个平行的数字 PCR 验证, 计算每个平行的单位体积的内参基因和外源基因的拷贝数, 计算平均值和 RSD 值, RSD 要求小于 25%。

1.2.5 精密度试验

选取外源基因 LOQ 临界值和 LOQ 临界值 10 倍浓度的 DNA 样品进行精密度验证, 每个样品做 5 个平行。通过数字 PCR 对其拷贝数进行测定, 计算其定量检测的精密度, 检测结果要求 RSD 小于 25%。

1.2.6 准确度试验

取 LOQ 值, LOQ5 倍, LOQ 值 25 倍的 3 组阳性进行准确度的验证。对以上 3 组 DNA 样品进行三个平行的数字 PCR 实验。通过测定拷贝数计算其定量检测的准确度, 检测结果要求 RSD 小于 25%。

2 结果与讨论

2.1 引物探针特异性验证

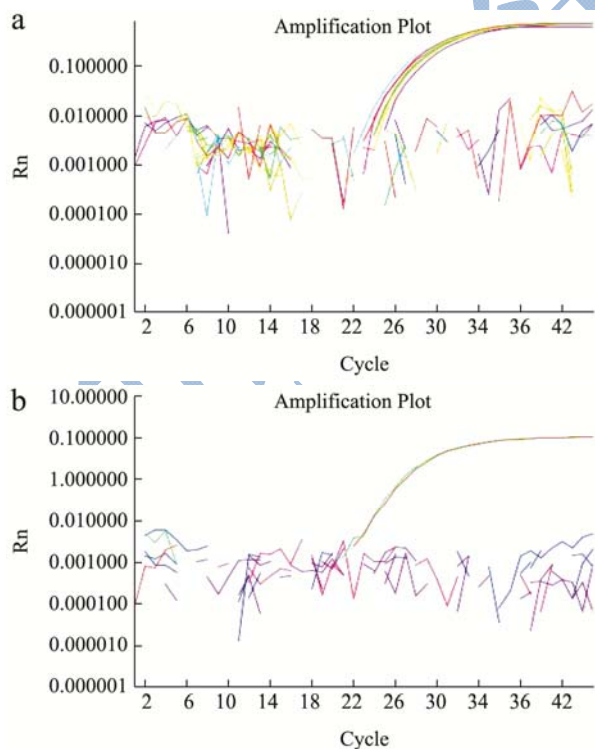


图 1 PEP 和 RF1 特异性荧光 PCR 结果

Fig.1 Specificity of RF1 by real-time PCR

应用荧光 PCR 方法对转基因油菜 RF1 品系、5

种转基因油菜、1 种大豆基因组 DNA 和 1 种非转基因大豆、1 种非转基因油菜进行扩增的结果如图 1 所示。6 个油菜基因组 DNA 在 HEX 通道下都有扩增曲线, 而大豆基因组 DNA 未见扩增曲线(见图 1a)。在 FAM 通道下, 只有转基因油菜 RF1 品系有扩增曲线, 其余的 DNA 均未见扩增曲线, 结果表明该引物探针特异性好(见图 1b)。

2.2 扩增稳定性验证结果

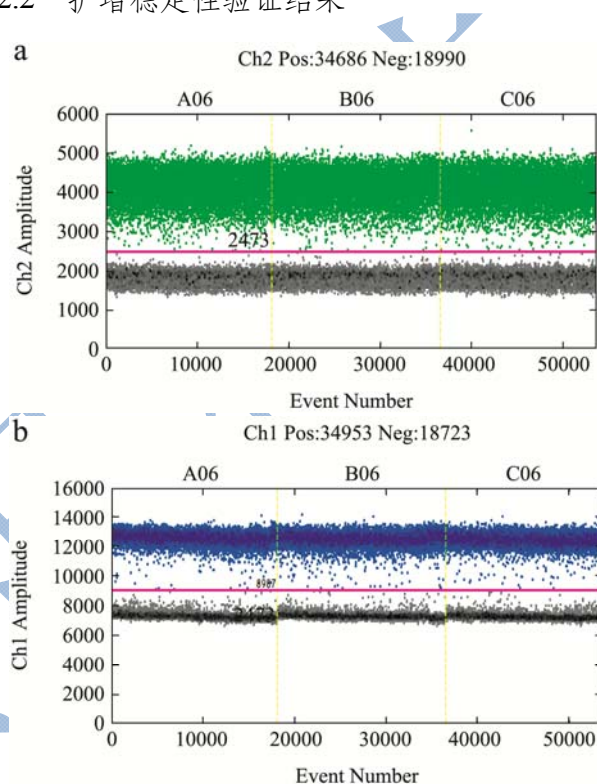


图 2 内参基因 PEP 与外源基因 RF1 数字 PCR 热点图

Fig.2 Heat map of the amplification stability of RF1

采用 1.2.2 中数字 PCR 反应体系和参数, 对油菜 RF1 标准品的内源基因 PEP 和 RF1 品系特异性序列进行稳定性验证的数据见表 2, 热点图如图 2 所示, 图 2a 为 PEP 内参基因, 图 2b 为外源基因。在此反应体系中, 模板的添加量为 30 ng, 按照单倍体油菜基因组 1.3 pg 计算, 预期体系中内参基因的拷贝数为 23077 个。从图 2 可以看出数字 PCR 所获得的阴性点与阳性点之间有明显的荧光信号差距, 可以通过设置统一的阈值限进行阴性反应点和阳性反应点的区分。内参基因三次扩增重复的实际检测拷贝数分别为 24520、24480 和 24240, 平均检测拷贝数为 24413, 相对标准偏差为 0.62%; 外源基因三次扩增重复的实际检测拷贝数分别为 25000、24880 和 24800, 平均检测拷贝数为 24893, RSD 为 0.40%。本文所用的内参基因和外源基因的引物探针扩增稳定性良好, 并且该阳性样品稳定可用。

表2 油菜 RF1 扩增稳定性验证

模板上样量	目标基因	实际拷贝数	平均拷贝数	RSD
30 ng	PEP	24520	24413	0.62%
		24480		
		24240		
	品系特异基因	25000	24893	0.40%
		24880		
		24800		

2.3 线性范围验证结果

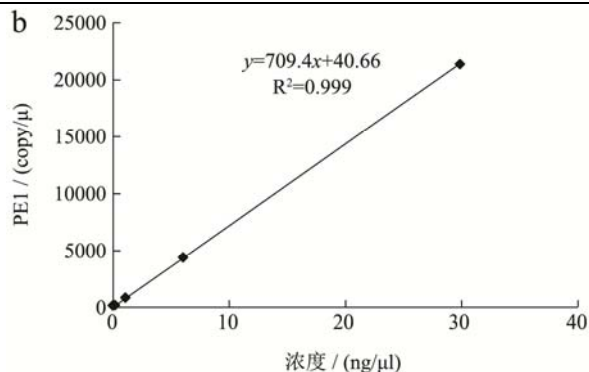
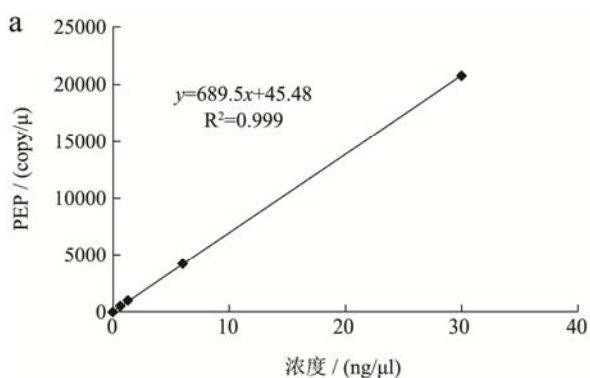


图3 RF1 数字 PCR 线性范围拟合标准曲线

Fig.3 Standard curves of the RF1 ddPCR assay

线性范围验证实验检测结果见表 3，线性范围内的数据拟合标准曲线见图 3。由实际拷贝数的检测结果和拟合标准曲线可以看出，本标准方法在单位体系内参基因拷贝数位于 18~23077 的区间内可以呈现出良好的线性， r^2 为 0.999，所有浓度组的 RSD 值位于 1.23%到 11.45%之间，均小于 25%；外源基因拷贝数位于 18~23077 的区间内可以呈现出良好的线性， r^2 为 0.999，所有浓度组的 RSD 值位于 1.01%到 21.43%之间，均小于 25%。因此，本方法在内参基因和外源基因拷贝数位于 18~23077 时，具有良好的定量能力。

表3 RF1 数字 PCR 的线性范围验证

Table 3 Dynamic range of RF1 for ddPCR

浓度 / (ng/μL)	理论拷贝数/个	目的基因	平行组/拷贝/μL			平均值/拷贝/μL	RSD
			1	2	3		
30	23077	PEP	20970	20600	20480	20683	1.23%
		RF1	21260	21080	21510	21283.33	1.01%
6	4615	PEP	4420	4560	4290	4423.33	3.05%
		RF1	4470	4590	4440	4500.00	1.76%
1.2	923	PEP	960	865	930	918.33	5.29%
		RF1	950	916	947	937.67	2.01%
0.24	185	PEP	159	165	182	168.67	7.07%
		RF1	180	170	171	173.67	3.17%
0.12	92	PEP	66	72	84	74.00	12.39%
		RF1	83	89	73	81.67	9.90%
0.024	18	PEP	13	12	15	13.33	11.46%
		RF1	17	14	11	14.00	21.43%
0.0048	3.7	PEP	3.5	2.8	2.9	3.07	12.35%
		RF1	2.8	2.1	5.8	3.57	55.11%

2.4 定量检测限和检测限的验证结果

定量检测限和检测线实验结果见表 4。LOQ 试验中内源基因和品系特异性基因的 RSD 分别为 17.87% 和 15.58%，均小于 25%。这说明方法可以对单位体积

内源基因和外源基因拷贝数为 18 的样品进行稳定的定量检测。LOD 验证结果如表 5 所示。十个平行试验中，阳性检出率为 10 个，符合 LOD 质控的要求（不低于 9 个）。因此本方法可以对单位体积外源基因拷贝数为 3.7 的样品进行稳定检测。

表 4 RF1 数字 PCR 的 LOQ 验证

Table 4 Verification of the LOQ of RF1 by ddPCR

浓度/(ng/μL)	理论拷贝数/个	目的基因	平行组/(拷贝/μL)										平均值/(拷贝/μL)	RSD
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
0.024	18	PEP	17	19	24	24	16	21	22	15	16	17	19.10	17.87%
		RF1	23	19	17	19	16	20	22	26	19	17		

表 5 RF1 数字 PCR 的 LOD 验证

Table 5 LOD verification of the RF1 by ddPCR

浓度/(ng/μL)	理论拷贝数/个	目的基因	平行组/(拷贝/μL)										平均值/(拷贝/μL)
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
0.0048	3.7	PEP	2	2.5	2.5	4	3.5	5.5	3	5	6	4	3.80
		RF1	5	4.5	4	4	6.5	7.5	3	6.5	6	6.5	

2.5 精密度试验结果

精密度试验检测结果见表 6。综合分析 LOQ 临界点和临界点 10 倍的 DNA 样品的检测结果, 两组浓度的 DNA 样品所得到的组内 RSD 值分别为 24.50%、17.39%和 10.60%、8.40%, 符合整个方法对于精密度的要求 (RSD 小于 25%)。

2.6 准确度试验结果

取 LOQ 值, LOQ5 倍, LOQ 值 25 倍进行数字 PCR 实验。实验结果如表 7 所示, 对于浓度为 0.024, 0.12, 0.6 ng/μL 的 DNA 标准样品, 所测得拷贝数百分比的平均值分别为 112.6%, 106.0%和 107.2%, DNA 标准样品理论拷贝数百分比为 100%, 计算得到浓度为 0.024, 0.12, 0.6 ng/μL 的 DNA 标准样品的检测偏差分别为 12.64%, 5.97%和 7.20%, 三组偏差均符合要求 (小于 25%)。因此本方法可以比较准确的对油菜 RF1 品系进行绝对定量检测。

表 6 RF1 数字 PCR 的精密度验证

Table 6 Precision of the RF1 by ddPCR

浓度/(ng/μL)	理论拷贝数/个	目的基因	平行组/(拷贝/μL)					平均值/(拷贝/μL)	RSD
			1	2	3	4	5		
0.024	18	PEP	12	10	16	9	10	11.4	24.50%
		RF1	16	12	13	10	12		
0.24	185	PEP	146	161	184	184	188	173	10.60%
		RF1	169	158	194	190	183		

表 7 RF1 数字 PCR 的准确度验证

Table 7 Accuracy of the RF1 by ddPCR

浓度/(ng/μL)	平行	拷贝数(外源/内参)	拷贝数百分比/%	理论拷贝数百分比/%	平均拷贝数百分比/%	偏差/%
0.024	1	14/14	100.00	100.00	112.6	12.64
	2	17/13	130.8			
	3	15/14	107.1			
0.12	1	96/97	99.0	100.00	106.0	5.97
	2	96/92	104.3			
	3	110/96	114.6			
0.6	1	479/419	114.3	100.00	107.2	7.20
	2	504/501	100.6			
	3	479/449	106.7			

3 结论

3.1 目前, 国际上最常用的转基因作物转基因检测的

方法主要基于核酸的 PCR 反应。前人根据油菜中所转入的外源性基因种类制备基因芯片, 其检测的特异性和重复性较好, 但是在检测低含量的转基因油菜时的

灵敏度为0.5%^[14]。还有研究者利用热不对称交错 PCR 检测转基因油菜 Oxy-235, 其绝对 LOD 和 LOQ 分别为 10 个拷贝数和 20 个拷贝数^[13]。2003 年, 我国国家质检总局颁布了转基因油菜筛选、基因检测普通 PCR 和实时荧光 PCR 方法^[15,16]。李想等人利用实时荧光 PCR 对我国进口油菜籽进行了转基因品系分布及转基因成分含量情况进行了详细的分析, 研究表明, 含 MS1×RF1 和 MS1×RF2 的检出率约为 40%^[10]。但是, 普通 PCR 和实时荧光 PCR 反应易受引物之间的相互干扰和 DNA 样品的纯度等因素的影响, 从而影响 PCR 扩增效率。数字 PCR 是一种新的核酸检测和定量分析方法, 具有特异性好、灵敏度高, 其检测结果直接反应样品的拷贝数, 与标准曲线和参考样品无关。国内还为见采用双重 ddPCR 对转基因油菜籽产品进行定量分析的报道。

3.2 本文在国内首次建立了转基因油菜籽 RF1 双重 ddPCR 定量分析方法。通过对引物探针的特异性进行筛查, 同时还验证了扩增稳定性、线性范围、确定了定量检测限和检测限, 也对精密度、准确度进行了研究。结果显示本研究所建立的转基因油菜籽 RF1 双重数字 ddPCR 定量方法特异性好、扩增稳定性好。综上所述, 本研究建立的转基因油菜籽 RF1 双重 ddPCR 定量分析方法可用于转基因油菜 RF1 的转基因成分定量检测。

参考文献

- [1] 张佳玲, 潘广, 章桂明, 等. 微滴式数字 PCR 定量检测转基因玉米品系 VCO-01981-5[J]. 食品科学, 2017, 38(12): 246-252
ZHANG Jia-ling, PAN Guang, ZHANG Gui-ming, et al. Quantitative detection of transgenic maize event VCO-01981-5 with droplet digital PCR [J]. Food Science, 2017, 38(12): 246-252
- [2] 金莞军, 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
JIN Wu-jun, JIA Shi-rong, PENG Yu-fa. Comparison of labeling policy of genetically modified products in different countries and territories [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2004, 12(1): 1-7
- [3] Cankar K, Stebih D, Dreo T, et al. Critical points of DNA quantification by real-time PCR-effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms [J]. BMC Biotechnology, 2006, 6: 37-37
- [4] 朱鹏宇. 利用微滴数字 PCR 定量检测食品或饲料样品[J]. 农业生物技术学报, 2013, 12: 1472-1472
ZHU Peng-yu. Quantitative analysis of food and feed samples with droplet digital PCR [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2013, 12: 1472-1472
- [5] Sykes P J, Neoh S H, BRISCO M J, et al. Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution [J]. Bio Techniques, 1992, 13 (3): 444-449
- [6] CAI Y, LI X, LV R, et al. Quantitative analysis of pork and chicken products by droplet digital PCR [J]. Bio. Med. Research International, 2014, 810209-810215
- [7] Kosir A B, Spilberg B, Holst J A, et al. Development and inter-laboratory assessment of droplet digital PCR assays for multiplex quantification of 15 genetically modified soybean lines [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 8601-8612
- [8] Morisset D, Stebih D, MILAVEC M, et al. Quantitative analysis of food and feed samples with droplet digital PCR [J]. PLoS One, 2013, 8 (5): e62583-26592
- [9] 潘广, 章桂明, 黄新, 等. 应用双重数字 PCR 对转基因玉米成分进行定量方法研究[J]. 植物检疫, 2016, 30(3): 65-71
PAN Guang, ZHANG Gui-Ming, HUANG Xin, et al. Studies on quantification of transgenic maize ingredient with duplex droplet digital polymerase chain reaction [J]. Plant Quarantine, 2016, 30(3): 65-71
- [10] 任怡菲, 高琴, 邓婷婷, 等. 基于数字 PCR 的转基因水稻 LL62 品系精准定量检测方法建立[J]. 生物技术通报, 2016, 32(8): 69-76
REN Yi-fei, GAO Qin, DENG Ting-ting, et al. Establishment of precisely quantitative method of genetically modified rice LL62 based on digital PCR [J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(8): 69-76
- [11] ISAAA, Global status of commercialized biotech/GM crops: 2016. ISAAA Brief No. 52. ISAAA: Ithaca, NY. 2016
- [12] 张忠民. 转基因食品标识豁免制度研究[J]. 食品科学, 2016, 37(11): 262-269
ZHANG Zhong-Min. Labeling exemption regulation for genetically modified foods [J]. Food Science, 2016, 37(11): 262-269
- [13] WU Y, WU G, XIAO L, et al. Event-specific qualitative and quantitative PCR detection methods for transgenic rapeseed hybrids MS1×RF1 and MS1×RF2 [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(21): 8380-8389
- [14] 黄文胜, 潘良文, 粟智平, 等. 基因芯片检测转基因油菜[J]. 农业生物技术学报, 2003, 11(6): 588-592
HUANG Wen-sheng, PAN Liang-wen, SU Zhi-ping, et al. Detection of transgenic rapeseeds with DNA microarray [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2003, 11(6): 588-592
- [15] SN/T 1204-2016, 植物及其加工产品中转基因成分实时荧

光 PCR 定性检验方法[S]

SN/T 1204-2016, Protocol of the real-time PCR method for detecting genetically modified Plants and their derived products [S]

[16] SN/T 1197-2016,油菜籽中转基因成分定性 PCR 检测方法

SN/T 1197-2016, Detection of genetically modified ingredients in rapeseed conventional and real-time PCR methods [S]

