

## 转基因大豆外源基因 NOS 终止子定量测定的不确定度分析

王 东, 宋 君, 叶先林, 雷绍荣, 刘文娟, 常丽娟, 尹 全, 张富丽

(四川省农业科学院 分析测试中心, 四川 成都 610066)

**摘要:** 为了解转基因成分定量分析结果不确定度的主要贡献因素, 提高转基因成分定量检测质量, 用含转基因大豆 GTS40-3-2 样品进行了 NOS 终止子含量的测定, 并对其测量不确定度进行了初步估算。NOS 终止子测量不确定度估算结果: A 类不确定度( $u_A$ )为 0.002, B 类不确定度( $u_B$ )为 0.002, 合成不确定度( $u_C$ )为 0.003; 在置信水准( $P$ )为 95% 的条件下, 包含因子( $k$ )取 1.96, 测量结果的扩展不确定度( $U$ )为 0.016; 测量结果( $C$ )为  $0.032 \pm 0.016$ , 接近约定真值(0.03), 测量不确定度相对较小, 检测质量较高。不确定度评估结果表明试验中的微量液体转移的偏差是测量不确定度的主要贡献者, 在以后的检测中应重点注意降低微量液体转移的偏差。

**关键词:** 转基因大豆; NOS 终止子含量; 不确定度; 评估

中图分类号: TS227

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2013)05-0601-05

## Uncertainty of Testing Content of NOS Terminator from Genetically Modified Soybean Samples by Real-time Quantitative PCR

WANG Dong, SONG Jun, YE Xian-lin, LEI Shao-rong, LIU Wen-juan, CHANG Li-juan, YIN Quan, ZHANG Fu-li

(Analysis and Determination Center, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China)

**Abstract:** A preliminary evaluation of measurement uncertainty of NOS terminator from transgenic soybean samples was made in this paper to understand the main contributors among sources of uncertainty and to further increase the quality of testing genetically modified organism (GMO) in future experiments. The measurement uncertainty estimates showed uncertainty of Type A ( $u_A$ ), Type B ( $u_B$ ) and combined uncertainty ( $u_C$ ) was 0.002, 0.002 and 0.003, respectively. When confidence level ( $P$ ) was 95% and the coverage factor ( $k$ ) was 1.96, the expanded uncertainty ( $U$ ) was 0.016. Consequently, content of NOS terminator in this measurement was  $0.032 \pm 0.016$ , close to the conventional true value (0.03). The measurement uncertainty was relatively small, reflecting a high quality of detection. Measurement uncertainty of NOS terminator indicated the trace amount of liquid transfer was the major source of measurement uncertainty in this experiment. Thus, the trace amount of liquid transfer should be noted in future detection.

**Key words:** Genetically modified soybean (GTS40-3-2); Content of NOS terminator; Measurement uncertainty; Evaluation

转基因大豆品种 GTS40-3-2 是由美国孟山都公司 (Monsanto Company) 开发出的第一代抗除草剂大豆, 商品名称为抗农达 (Roundup Ready®) 大豆。该大豆品种是为使除草剂 (Roundup) 中的活性组分草铵膦作为大豆种植中的一种杂草控制选择而发展出来的抗除草剂转基因大豆。这种基因工程改造的大豆品种含有一种来自于植物 5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸合酶 (EPSPS) 的草铵膦耐受性形式。美国在 1994 年开始将转基因大豆 GTS40-3-2 进行环境释放并同时将其用作食用或饲料原材料, 紧接着加拿大、日本、阿根廷等 7 个国家于 1995 ~ 1998 年在各自国家进行环境释放并用作食用和饲料原材料, 我国于 2004 年首次进口该大豆品种用于食用和饲料原材料。

近年来转基因食品 (genetically modified food,

GMF) 安全成为全球关注的热点, 我国于 2002 年发布了《农业转基因生物标识管理办法》, 明确规定对进入我国流通市场的转基因生物及产品实施标识制度<sup>[1-3]</sup>。国际上转基因生物及产品定量检测方法主要包括基于核酸检测的半定量 PCR、竞争性定量 PCR、实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR) 以及针对外源蛋白质的 ELISA 免疫学检测方法<sup>[4]</sup>。采用 TaqMan 水解探针的实时荧光定量 PCR 技术因具有结果可靠、重复性好等特点而得到了广泛的应用<sup>[5]</sup>。实时荧光定量 PCR 主要检测严格意义上的“对数期”内基因扩增的拷贝数。在基因的定量扩增分析中, 对数期的选择、标准曲线的拟合、反应体系制备中微量液体的转移等因素对测量结果影响较大, 因此利用实时荧光定量 PCR 测量转基因成分结果的不确定度成为转基因成分定量分析

收稿日期: 2013-03-15

基金项目: 四川省质量技术监督局标准化技术体系 (ZYBZ2013-39)。

第一作者简介: 王东 (1975-), 男, 硕士, 助理研究员, 主要从事转基因生物安全研究。E-mail: scnuwd@163.com。

通讯作者: 宋君 (1973-), 男, 博士, 副研究员, 主要从事转基因生物安全研究。E-mail: drsjn@126.com。

首要考虑的问题。

为探索转基因成分定量分析结果不确定度的主要贡献因素,提高转基因成分定量检测质量,现采用农业部 953 号公告-6-2007<sup>[6]</sup>中 NOS 实时荧光定量检测方法,对含量约为 3% 的转基因大豆 GTS40-3-2 粉末样品进行了 NOS 终止子含量测定,对测量不确定度进行了初步估算。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

以含量为 100% 的转基因大豆 GTS40-3-2 粉末的 DNA 梯度稀释液作为制备标准曲线的 DNA 模板。含量约为 3% 的转基因大豆 GTS40-3-2 混合粉末(100% 含量转基因大豆 GTS40-3-2 粉末与非转基因大豆粉末按质量比 3:97 均匀混合)作为测试样品。

### 1.2 仪器

超微量分光光度计(Nanodrop1000,Thermo),高速冷冻离心机(Heraeus,Thermo),7500 Real Time PCR system (Applied Biosystem Incorporation, Foster city, USA) 等。

### 1.3 试剂

植物基因组 DNA 纯化试剂盒和 Real Time PCR Master Mix 试剂盒,均购自 Tiangen 生物技术有限公司(北京)。

### 1.4 DNA 提取

称取 100% 和含量约为 3% 的转基因大豆 GTS40-3-2 粉末各 100 mg,按照植物基因组 DNA 纯化试剂盒(Tiangen 生物技术有限公司,北京)说明书分离、纯化 DNA。

### 1.5 引物和探针

根据农业部 953 号公告-6-2007<sup>[6]</sup>和 GB/T 19495.5-2004<sup>[7]</sup>中的引物、探针序列合成引物和探针。

### 1.6 标准物质的 DNA 梯度稀释和 PCR 反应体系

将分离纯化得到的 100% 含量的 GTS40-3-2 粉末

的 DNA 溶液,按照 1:5 稀释成 5 个质量-体积浓度梯度:100,20,4,0.8 和 0.16 ng·μL<sup>-1</sup>。将 3% 含量的 GTS40-3-2 粉末的 DNA 溶液稀释成 50 ng·μL<sup>-1</sup>。取 3 μL 上述 DNA 稀释液加入到 25 μL 反应体系:2×Taqman Master mix 12.5 μL,上下游引物(10 μmol·L<sup>-1</sup>)各 1 μL,探针(10 μmol·L<sup>-1</sup>)0.5 μL,补无菌水至 25 μL。每个 DNA 浓度稀释液做 3 个平行反应,待测样品做 13 个重复测试。在 ABI7500 型荧光定量 PCR 仪器上运行反应程序:95℃ 预变性 10 min;95℃ 变性 15 s,60℃ 延伸 1 min,共 40 次循环。

### 1.7 NOS 终止子相对含量的计算

根据实时荧光定量 PCR 指数扩增期,循环数阈值(*Ct* 值)与基因含量对数值(lg*A*)之间的数学关系式, $Ct = m \times \lg A + k$ [*A* 为内源基因(*Lectin*)或外源基因(NOS)的质量;*Ct* 为仪器检测到的 PCR 反应循环数阈值;*k* 为标准曲线在 *y* 轴的截距;*m* 为标准曲线的斜率],以 *Ct* 值为纵坐标,以 lg*A* 值为横坐标,7500 Real Time PCR system (Applied Biosystem Incorporation, Foster city, USA) 仪器自带软件自动拟合标准曲线得到内、外源基因含量的线性回归方程。将所测样品外源基因或内源基因的 *Ct* 值代入各自的回归方程,计算出样品中内源基因或外源基因的质量。根据公式  $C = A_{\text{外}}/A_{\text{内}} \times 100\%$  [*C* 为样品中转基因成分的百分含量(%);*A*<sub>外</sub> 为样品中外源基因的质量;*A*<sub>内</sub> 为样品中内源基因的质量]计算样品中转基因成分的百分含量。

### 1.8 不确定度估算

根据《测量不确定度评定与表示》(JJF1059.1-2012)<sup>[8]</sup>评估不确定度。

## 2 结果与分析

### 2.1 检测结果

对 NOS 终止子含量约为 3% 的测试样品,做 13 次重复测定,结果 NOS 终止子相对含量变幅为 2.7% ~ 5.1%,平均相对含量为 3.2%,接近 3% (表 1)。

表 1 测试样品中 NOS 终止子含量测定结果

Table 1 Quantitative results of NOS terminator in the analysis sample

重复 Replicates	<i>Lectin Ct</i> 值 <i>Ct</i> value of <i>Lectin gene</i>	<i>Lectin</i> 绝对含量 Absolute quantity of <i>Lectin gene</i> /ng	NOS 终止子 <i>Ct</i> 值 <i>Ct</i> value of NOS terminator	NOS 终止子绝对含量 Absolute quantity of NOS terminator/ng	NOS 终止子相对含量 Relative quantity of NOS terminator/%
1	23.33	201.86	26.83	6.64	3.3
2	23.19	222.11	26.97	6.03	2.7
3	23.14	228.78	26.70	7.23	3.2
4	23.17	225.38	26.74	7.04	3.1
5	23.08	238.00	26.61	7.67	3.2
6	22.98	255.01	26.73	7.10	2.8
7	23.11	233.85	26.73	7.10	3.0

续表 1

重复 Replicates	<i>Lectin</i> Ct 值 <i>Ct</i> value of <i>Lectin</i> gene	<i>Lectin</i> 绝对含量 Absolute quantity of <i>Lectin</i> gene/ng	NOS 终止子 Ct 值 <i>Ct</i> value of NOS terminator	NOS 终止子绝对含量 Absolute quantity of NOS terminator/ng	NOS 终止子相对含量 Relative quantity of NOS terminator/%
8	23.13	230.41	26.83	6.65	2.9
9	23.10	236.27	26.67	7.40	3.1
10	23.32	203.83	26.95	6.13	3.0
11	23.02	248.83	26.77	6.91	2.8
12	23.06	241.95	26.77	6.89	2.8
13	23.07	240.79	25.90	12.38	5.1
平均值 Mean	23.13	231.31	26.71	7.32	3.2
NOS 终止子平均相对含量 Average relative quantity of NOS terminator/%					3.2

2.2 内、外源基因标准曲线的制备  
*Lectin* 内源基因和 NOS 终止子的标准曲线,由 ABI7500 software 2.0 软件自动拟合(表 2 和表 3)。*Lectin*内源基因标准曲线的回归方程为  $y =$

$-3.476x + 31.345$ ,相关系数为  $R^2 = 0.997$ ;NOS 终止子标准曲线的回归方程为  $y = -3.423x + 29.641$ ,相关系数为  $R^2 = 0.999$ 。

表 2 内源基因 *Lectin* 标准曲线拟合

Table 2 Fitting of standard curve of *Lectin* gene

	实际测量 Ct <i>Ct</i> value measured actually	拟合 Ct <i>Ct</i> value fitted	内源基因 Quantity of <i>Lectin</i> gene/ng	Ct 残差 D-value between <i>Ct</i> value measured actually and <i>Ct</i> value fitted
1	22.91	22.85	278.00	-0.06
2	25.24	25.28	55.60	0.04
3	27.69	27.71	11.12	0.02
4	30.05	30.14	2.22	0.09
5	32.66	32.57	0.44	-0.09

表 3 NOS 终止子标准曲线拟合

Table 3 Fitting of standard curve of NOS terminator

	实际测量 Ct <i>Ct</i> value measured actually	拟合 Ct <i>Ct</i> value fitted	NOS 终止子 Quantity of NOS terminator/ng	Ct 残差 D-value between <i>Ct</i> value measured actually and <i>Ct</i> value fitted
1	21.27	21.28	278.00	0.01
2	23.66	23.67	55.60	0.01
3	26.00	26.06	11.12	0.06
4	28.59	28.45	2.22	-0.14
5	30.77	30.85	0.44	0.08

2.3 不确定度来源

转基因成分测量的不确定度来源主要有影响数据对之间非线性偏离的荧光基团分解、仪器稳定性、基因扩增效率偏差等随机效应。此外试验中微量液体转移、移液器定值偏差等都是基因定量分析结果引入不确定度的主要因素<sup>[9]</sup>。

2.4 标准不确定评定

2.4.1 A 类标准不确定评定 A 类不确定度由各类随机效应引起,按照 Bessel 公式计算:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} = 0.006$$
$$u_A = \frac{s}{\sqrt{n}} = 0.002$$

$$v_A = 12$$

式中  $x_i$  为 NOS 终止子每次相对含量测量结果值; $\bar{x}$  为 13 次重复测量 NOS 终止子相对含量的平均值; $n$  为测量次数。

2.4.2 B 类标准不确定评定 (1) 标准曲线读数 Ct 值的标准不确定度

与  $\lg A_{\text{外}}$  对应的响应值  $C_{t_{\text{外}}}$  对终止子 NOS 标准曲线拟合的标准差,即回归标准差,按照以下公式计算:

$$s(C_{t_{\text{外}}}) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (C_{t_{\text{外}}} \text{ 拟合值} - C_{t_{\text{外}}} \text{ 测量值})^2}{n - 2}}$$
$$= 0.047$$

式中, $n$  为标准曲线上数据对总数。

在试样的测量次数  $p = 13$  时,最小二乘法引入的不确定度分量为:

$$u(\lg A_{\text{外}}) = \frac{s(Ct_{\text{外}})}{m_{\text{外}}}$$

$$\sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(\overline{\lg A_{\text{外}}} - \overline{\lg A_{i\text{外}}})^2}{\sum (\lg A_{i\text{外}})^2 - \sum (\lg A_{i\text{外}})^2/n}} = 0.005$$

其中,  $s(Ct_{\text{外}})$  为由标准溶液  $Ct$  值残差计算的标准差;  $n$  为标准曲线上数据对总数;  $p$  为测量次数;  $\overline{\lg A_{\text{外}}}$  为试样重复测量  $p$  次结果的平均值;  $\overline{\lg A_{i\text{外}}}$  为拟合直线全部 ( $n$  个) 输入值  $\lg A_{i\text{外}}$  的总平均值,  $\lg A_{i\text{外}}$  为绘制拟合直线上的 5 个输入浓度的对数值。

$$u(A_{\text{外}}) = 10^{\lg A_{\text{外}}} \times \ln 10 \times u(\lg A_{\text{外}})$$

$$u(A_{\text{外}}) = A_{\text{外}} \times 2.303 \times u(\lg A_{\text{外}})$$

故其相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}} A_{\text{外}} = u(A_{\text{外}})/A_{\text{外}} = 2.303 \times 0.005 = 0.012$$

同理, 与  $\lg A_{\text{内}}$  对应的响应值  $Ct_{\text{内}}$  对内源基因 *Lectin* 标准曲线拟合的回归标准差为

$$s(Ct_{\text{内}}) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Ct_{\text{内}} \text{ 拟合值} - Ct_{\text{内}} \text{ 测量值})^2}{n - 2}}$$

$$= 0.041$$

内源基因标准曲线的不确定度  $u(Ct_{\text{内}})$  分量为:

$$u(\lg A_{\text{内}}) = \frac{s(Ct_{\text{内}})}{m_{\text{内}}}$$

$$\sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(\overline{\lg A_{\text{内}}} - \overline{\lg A_{i\text{内}}})^2}{\sum (\lg A_{i\text{内}})^2 - \sum (\lg A_{i\text{内}})^2/n}} = 0.007$$

$$u(A_{\text{内}}) = 10^{\lg A_{\text{内}}} \times \ln 10 \times u(\lg A_{\text{内}})$$

$$u(A_{\text{内}}) = A_{\text{内}} \times 2.303 \times u(\lg A_{\text{内}})$$

故其相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}} A_{\text{内}} = u(A_{\text{内}})/A_{\text{内}} = 2.303 \times 0.007 = 0.016$$

按照统计原理计算得到标准曲线的不确定度, 其自由度为  $n - 2$ 。

$$\text{故, } v_{A_{\text{外}}} = n - 2 = 15 - 2 = 13; v_{A_{\text{内}}} = n - 2 = 15 - 2 = 13$$

(2) 微量移液器的标准不确定度

根据本实验室微量移液器检定证书, 微量移液器在  $10 \sim 100 \mu\text{L}$  测量范围内最大允差为  $\pm 0.8 \mu\text{L}$ , 由于微量移液器造成的不确定度呈均匀分布, 故  $10 \sim 100 \mu\text{L}$  微量移液器的测量标准不确定度  $u_1 = 0.8/\sqrt{3} = 0.4619 (\mu\text{L})$ 。使用该规格 (量程) 的微量移液器在本次检验中的加样体积为  $12.5 \mu\text{L}$ , 故其相对标准不确定度为  $u_{\text{rel}1} = 0.4619/12.5 = 0.037$ 。

微量移液器在测量范围  $0.5 \sim 10 \mu\text{L}$  内的最大允差为  $\pm 0.12 \mu\text{L}$ , 其测量标准不确定度  $u_2 = 0.12/\sqrt{3} = 0.069 (\mu\text{L})$ 。使用该规格 (量程) 的微量移液器在本次检验中的加样体积分别为  $3, 7 \mu\text{L}$ , 故其相对标准不确定度分别为  $u_{\text{rel}2} = 0.069/3 = 0.023$ 、 $u_{\text{rel}3} = 0.069/7 = 0.010$ 。

微量移液器在  $0.1 \sim 2.5 \mu\text{L}$  内的最大允差为  $\pm 0.04 \mu\text{L}$ , 其测量标准不确定度  $u_3 = 0.04/\sqrt{3} = 0.023 (\mu\text{L})$ 。使用该规格 (量程) 的微量移液器在本次检验中的加样体积分别为  $0.5, 1, 1 \mu\text{L}$ , 故其相对标准不确定度为  $u_{\text{rel}4} = 0.023/0.5 = 0.046$ ,  $u_{\text{rel}5} = 0.023/1 = 0.023$ ,  $u_{\text{rel}6} = 0.023/1 = 0.023$ 。

不同量程的移液器在加样过程中具有测量的独立性, 因此微量移液器允差带来的合成相对不确定度为:

$$u_{\text{rel 移液器}} = \sqrt{u_{\text{rel}1}^2 + u_{\text{rel}2}^2 + u_{\text{rel}3}^2 + u_{\text{rel}4}^2 + u_{\text{rel}5}^2 + u_{\text{rel}6}^2} = 0.072$$

标准不确定度以最大偏差估计, 其自由度为无穷大,  $\nu_3 = \nu_4 = \nu_5 = \infty$ 。

(3) B 类标准不确定度的合成

B 类不确定度各分量  $u_{\text{rel 外}}$ ,  $u_{\text{rel 内}}$ ,  $u_{\text{rel 移液器}}$  彼此独立, 其灵敏系数都为 1,  $u_{\text{rel 外}}$ ,  $u_{\text{rel 内}}$ ,  $u_{\text{rel 移液器}}$  合成为 B 类合成标准不确定度  $u_{\text{rel B}}$ :

$$u_{\text{rel B}} = \sqrt{\sum (u_{\text{rel}})^2} = \sqrt{(u_{\text{rel 外}})^2 + (u_{\text{rel 内}})^2 + (u_{\text{rel 移液器}})^2} = 0.075$$

$$u_{\text{B}} = \bar{C} \% \times u_{\text{rel B}} = 0.002$$

$$v_{\text{B}} = \frac{(u_{\text{rel B}})^4}{\frac{(u_{\text{rel A 外}})^4}{v_{A_{\text{外}}}} + \frac{(u_{\text{rel A 内}})^4}{v_{A_{\text{内}}}}} = 4768$$

## 2.5 合成不确定度 $u_{\text{rel}}$

因为 A 类标准不确定度和 B 类标准不确定度彼此独立, 故

$$u_{\text{C}} = \sqrt{u_{\text{A}}^2 + u_{\text{B}}^2} = 0.03$$

$$v_{\text{eff}} = \frac{(u_{\text{C}})^4}{\frac{(u_{\text{A}})^4}{v_{\text{A}}} + \frac{(u_{\text{B}})^4}{v_{\text{B}}}} = 61$$

## 2.6 扩展不确定度 $U$

$U = k \times u_{\text{C}}$ , 包含因子  $k$  为置信水准  $p = 95\%$ , 自由度  $\nu_{\text{eff}} = 61$  的  $t$  分布临界值, 按非整  $\nu$  内插计  $k = 1.96$ , 故  $U = 1.96 \times 0.003 = 0.016$ 。

所以测量结果  $C = 0.032 \pm 0.016$ 。

## 3 讨论

不确定度是与测量结果相关的参数, 表征合理地赋予被测量之值的分散性<sup>[10]</sup>, 通过评估测试结果的不确定度, 可使测试结果的表达更科学、更完整, 并可针对各不确定度分量的大小, 针对性地控制产生这些分量的测试要素, 以获得更准确的测试结果。本文采用国家标准<sup>[6]</sup>, 测试了转基因大豆 GTS40-3-2 混合粉末样品中外源基因 (调控元件参数) NOS 含量, 首先根据 13 次重复测量 NOS 参数相对含量结果, 用 Bessel 公式估算了本次测量结果的

A 类不确定度,  $u_A = 0.002$ 。由于转基因成分检测反应体系都是微量体系,一般总反应体系为  $10 \sim 50 \mu\text{L}$ ,本试验中反应体系为  $25 \mu\text{L}$ 。利用校准曲线间接测量被测量值时,由最小二乘法拟合校准曲线,数据对与校准直线的非线性偏离是不确定度的主要来源。因此在 B 类不确定评估中,重点估算了内源基因(*Lectin*)、外源基因(NOS)校准曲线拟合产生的不确定度以及在反应体系中微量液体转移时移液量不准导致的不确定度。测量不确定度是实验室检测质量的主要衡量指标,不确定度越小,测量结果的质量越好,使用价值也越高。如果不确定度偏大,则会因测量不能满足需要而造成浪费;不确定度过小,会对生产造成危害<sup>[11]</sup>。不确定度是用来衡量测量结果的可靠程度,而自由度则是用来衡量不确定度的可靠程度<sup>[12]</sup>。本文中 B 类评定不确定度的自由度达到 4 768,合成不确定度的自由度(有效自由度  $\nu_{\text{eff}}$ )达到了 61,说明本试验中测量不确定度评估的可靠程度较高。在所有分量中移液器引入的不确定度最大(0.07),而外源基因(NOS)与内源基因(*Lectin*)校准曲线拟合产生的相对标准不确定度相差不大(分别为 0.012 和 0.016),均小于移液器引入的不确定度(0.072)。因此在以后的检测中应重点注意微量液体转移量的准确性,加大移液器的校准、检定频率,购买与移液器契合较好的耗材以及液体低吸附(low binding)枪头,降低移液器带来的不确定度。从校准曲线变动性的不确定度分量评定中可知,校准曲线的变动性越小(相关性越好),测量不确定度越小。外源基因(参数)NOS 的校准曲线的相关系数  $R^2 = 0.999$ ,不确定度分量  $u_{\text{relA 外}} = 0.012$ ;内源基因 *Lectin* 的校准曲线的相关系数  $R^2 = 0.997$ ,不确定度分量  $u_{\text{relA 内}} = 0.016$ 。因此提高校准曲线制备质量,比如增加每个浓度梯度平行测量次数等,可以降低校准曲线变动性的不确定度。

## 参考文献

- [1] 宋君,王东,刘勇,等.转基因产品检测技术标准存在的问题及建议[J].中国测试,2009,35(6):88-90. (Song J, Wang D, Liu Y, et al. Disadvantages and proposal of standards for detecting genetically modified products[J]. China Measurement & Test, 2009, 35(6):88-90.)
- [2] 宋君,牛蓓,王东,等.成都市场大豆酱油 rDNA 成分分析[J].西南农业学报,2010,23(6):2158-2160. (Song J, Niu B, Wang D, et al. Detection of recombinant DNA fragments of soybean oil in Chengdu markets[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2010, 23(6):2158-2160.)
- [3] 刘信,宋贵文,沈平,等.国外转基因植物检测技术及其标准化研究综述[J].农业科技管理,2007,26(4):3-7. (Liu X, Song G W, Shen P, et al. A review of testing technology for transgenic plants and its standardizations abroad[J]. Management of Agricultural Science and Technology, 2007, 26(4):3-7.)
- [4] 谢小波,舒庆尧.用 Envirologix CrylAb/CrylAc 试剂盒快速测定转基因水稻 *Bt* 杀虫蛋白含量的研究[J].中国农业科学,2001,34(5):465-468. (Xie X B, Shu Q Y. Studies on rapid quantitative analysis of *Bt* toxin by using Envirologix kits in transgenic rice [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2001, 34(5):465-468.)
- [5] 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. (Deng P J, Yang D Y, Li B L, et al. The theory study on mathematical equation of GM component quantitative analysis by real-time fluorescence PCR[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2005, 15(7):769-772.)
- [6] 农业部.农业部 953 号公告-6-2007 转基因植物及产品成分检测—抗虫转 *Bt* 基因水稻定性 PCR 方法[S].北京:中国农业出版社,2007. (Ministry of Agriculture of the Republic of China. Ministry of Agriculture Bulletin No. 953-6-2007, Detection of genetically modified plants and their derived products—Qualitative PCR methods for pest-resistant rice transgenic for *Bt* gene[S]. Beijing: China Agriculture Press, 2007.)
- [7] 国家质量监督检验检疫总局. GB/T 19495.5-2004 转基因产品检测核酸定量 PCR 检测方法[S].北京:中国标准出版社,2007. (General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. GB/T 19495.5-2004, Detection of genetically modified organisms and derived products—Quantitative PCR methods based on nucleic acid[S]. Beijing: China Standard Press, 2007.)
- [8] 国家质量监督检验检疫总局. JJF1059.1-2012 测量不确定度评定与表示[M].北京:中国计量出版社,2012. (General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. JJF1059.1-2012, Guide to the expression of uncertainty in measurement[M]. Beijing: China Metrology Press, 2012.)
- [9] 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,2011,9(33):20312-20315. (Song J, Lei S R, Liu Y, et al. Uncertainty in measuring construct specific fragments of genetically modified maize MON863 by quantitative real time PCR[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2011, 39(33):20312-20315.)
- [10] 国家质量监督检验检疫总局. GB/T 27025-2008 检测和校准实验室能力的通用要求[S].北京:中国标准出版社,2008. (General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. GB/T 27025-2008, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories[S]. Beijing: China Standard Press, 2008.)
- [11] 宋君,雷绍荣,刘勇,等.实时荧光定量 PCR 检测转基因玉米 NK603 结构特异基因的测量不确定度分析[J].西南农业学报,2012,25(4):1147-1151. (Song J, Lei S R, Liu Y, et al. Uncertainty in measuring construct specific fragments of genetically modified maize, event NK603, by quantitative real time PCR[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2012, 25(4):1147-1151.)
- [12] 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. (Song J, Lei S R, Guo L A, et al. Uncertainty in measuring flanking fragments of genetically modified maize, event MON863, by quantitative real time PCR [J]. Journal of Maize Sciences, 2012, 20(5):45-49.)