

## 基于焦磷酸测序技术的基因编辑位点检测方法的建立

李葱葱<sup>1</sup> 高越<sup>2,4</sup> 沈晓玲<sup>2</sup> 李飞武<sup>1</sup> 赵新<sup>2</sup> 龙丽坤<sup>1</sup> 李亮<sup>3</sup> 王永<sup>2</sup> 兰青阔<sup>2\*</sup>

(1. 吉林省农业科学院 农业质量标准与检测技术研究所, 长春 130033;

2. 天津市农业质量标准与检测技术研究所, 天津 300381;

3. 中国农业科学院 生物技术研究所, 北京 100081;

4. 河北农业大学 植物保护学院, 河北 保定 071000)

**摘要** 为探索建立基因编辑农产品的检测方法,本研究以猪 *MSTN* 基因定点编辑位点为靶标,通过设计 PCR-焦磷酸测序引物、优化测序碱基次序、构建标准曲线等步骤,建立基于焦磷酸测序技术的基因编辑产品定性和定量检测方法。结果表明,该方法能够准确检测出 *MSTN* 基因第 3 外显子的 AG 缺失位点,具备基因分型定性判定和等位基因频率定量检测的功能,从而准确检测样品是否为 *MSTN* 基因编辑猪产品,以及样品基因编辑产品的含量。

**关键词** 基因编辑猪; *MSTN* 基因; 焦磷酸测序技术; 分子检测; 基因分型

**中图分类号** Q78 **文章编号** 1007-4333(2019)09-0010-07 **文献标志码** A

## Pyrosequencing-based detection method for gene editing site

LI Congcong<sup>1</sup>, GAO Yue<sup>2,4</sup>, SHEN Xiaoling<sup>2</sup>, LI Feiwu<sup>1</sup>, ZHAO Xin<sup>2</sup>,  
LONG Likun<sup>1</sup>, LI Liang<sup>3</sup>, WANG Yong<sup>2</sup>, LAN Qingkuo<sup>2\*</sup>

(1. Institute of Agricultural Quality Standard and Testing Technology, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China;

2. Tianjin Institute of Agricultural Quality Standard and Testing Technology, Tianjin 300381, China;

3. Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;

4. College of Plant Protection, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, China)

**Abstract** In this study, targeted editing sites of *MSTN* gene were used as object, and a qualitative and quantitative detection method for gene editing products based on pyrosequencing technology was established. The key parameters of the method included PCR and sequencing primers, dispensation order, standard curve and linearity. The results showed that this method could accurately detect the AG deletion site of exon 3 of *MSTN* gene and had the functions of qualitative genotyping determination and quantitative detection of allele frequency to accurately determine whether the sample was *MSTN* gene editing pig product or not and the content of gene editing product. This study would provide technical support for the regulation of gene editing products.

**Keywords** gene editing pig; *MSTN* gene; pyrosequencing; molecular detection; genotyping

随着基因编辑技术的发现与应用<sup>[1-3]</sup>,基因编辑生物呈现井喷式的发展。不同功能和性状的玉米<sup>[4]</sup>、烟草<sup>[5]</sup>、水稻<sup>[6]</sup>和马铃薯<sup>[7]</sup>等基因编辑作物,以及猪<sup>[8-9]</sup>、羊<sup>[10]</sup>、兔<sup>[11-12]</sup>和鼠<sup>[13]</sup>等基因编辑动物相

继研发成功。基因编辑产品的安全性和监管问题受到国际上广泛关注<sup>[14]</sup>,目前各国对基因编辑产品的监管政策不同。美国对基因编辑的态度相对宽松,对于终产品没有引进任何其他物种外源遗传物质类

收稿日期: 2018-11-20

基金项目: 转基因重大专项(2016ZX08012003); 吉林省科技发展计划项目(20170204012NY); 天津市科普项目(17KPHDSF00040); 农业部农业转基因生物安全评价(食用)重点实验室开放课题

第一作者: 李葱葱, 副研究员, 主要从事转基因生物安全研究, E-mail: licongcong1100@163.com

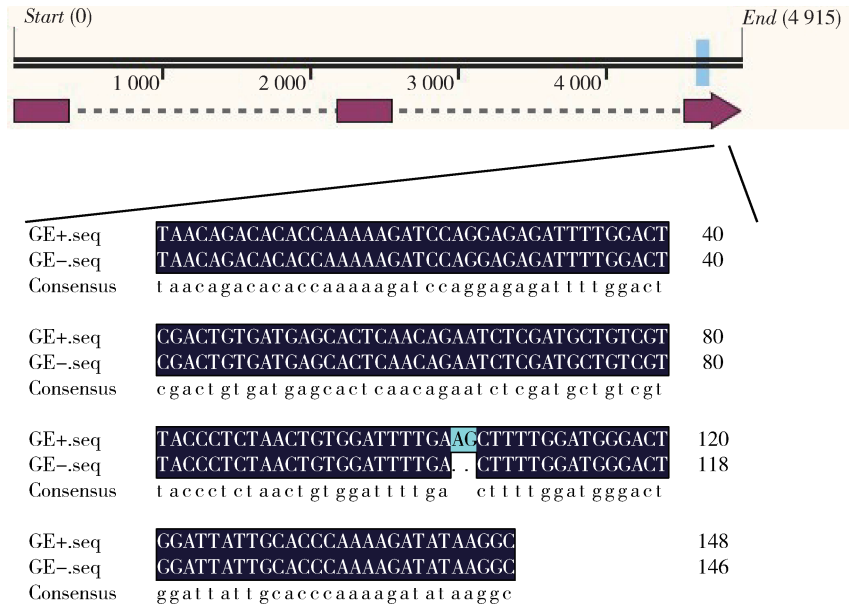
通讯作者: 兰青阔, 副研究员, 主要从事转基因生物安全评价技术研究, E-mail: lanqingkuo@163.com

的基因编辑产品不予法律的监管<sup>[15-16]</sup>；欧盟态度较为谨慎，对基因编辑产品和传统转基因产品的态度一致，仍然要受到欧盟相关法律的监管<sup>[17]</sup>；依据我国《农业转基因生物安全管理条例》的规定，基因编辑产品仍属于农业转基因生物，需要进行安全评价和监管<sup>[18]</sup>。但目前基因编辑生物检测方法研究严重滞后，在检测通量和精确度上难以满足转基因生物安全管理的需要。

焦磷酸测序技术(Pyrosequencing)是目前少数能进行实时、定量分析 InDel/SNP 标记等短片段变异的新型技术<sup>[17]</sup>。该技术先对目标区域进行 PCR 扩增，再对 PCR 产物进行测序。在测序体系中加入一种碱基，如果与测序引物后的碱基配对，在 DNA 聚合酶、ATP 硫酸化酶、荧光素酶和三磷酸腺苷双磷酸酶 4 种酶的协同作用下，会释放一次荧光信号；通过检测荧光的释放和强度，达到实时测定 InDel/SNP 不同基因型含量的目的。该技术兼有 PCR 技术的灵敏性和测序技术的准确性，而且测序平台一

次检测 96 个样本，可与 96 孔 PCR 板无缝结合，自动化程度高，操作简单，目前广泛应用于病原微生物快速鉴定<sup>[18-19]</sup>、转基因成分鉴定<sup>[20]</sup>及动植物 InDel/SNP 位点分析<sup>[21-22]</sup>等研究领域。

MSTN(Myostatin, 肌肉生长抑制素)基因能够通过调控成肌细胞的数量、大小以及增殖速度来实现负向调控肌肉生长。猪 MSTN 基因全长 4 915 bp，包括 3 个外显子和 2 个内含子，其 CDS 全长 1 128 bp，共编码 375 个氨基酸(图 1)。近年中国农业科学院北京畜牧兽医研究所以梅山猪为对象，对 MSTN 基因的第 3 外显子进行基因组编辑，使之缺失 2 个碱基而形成移码突变，成功进行 MSTN 基因敲除。MSTN 基因敲除的梅山猪腿臀、生长速度、瘦肉率等性状得到改良。但是针对该基因编辑产品的检测方法未见报道。本研究以猪 MSTN 基因编辑位点为研究对象，基于焦磷酸测序技术建立基因编辑位点的定性和定量检测方法，分析样品中是否含有转基因成分及其含量，以期为基因编辑产品的监管提供技术支撑。



红色代表外显子在 MSTN 基因中的位置，蓝色代表本研究中合成序列在 MSTN 基因中的位置，AG 代表基因编辑位点。

Red represents the position of exons in the MSTN gene, blue represents the position of the synthetic sequence in the MSTN gene in this study, and highlighted AG represents the gene editing site.

图 1 MSTN 基因敲除梅山猪编辑型和野生型序列同源性比较结果

Fig. 1 Clustal alignment of edited and wild-type sequences of MSTN sequence

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

依据 MSTN 基因敲除梅山猪编辑型和野生型序列(图 1)，构建编辑型和野生型质粒(苏州金唯智

生物科技有限公司合成)。其中编辑型含有 MSTN 基因序列 147 bp(图 1 中 GE+)，野生型含有 149 bp(图 1 中 GE-)，编辑型较野生型少了 2 个碱基，形成一个[AG]缺失的 InDel 标记。本研究检测的靶标即为该标记位点。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 焦磷酸测序引物设计

针对[AG]标记位点,使用 PSQ Assay Design 软

件设计焦磷酸测序用 PCR 扩增引物 MSTN-F/R、测序引物 MSTN-Seq,设置待分析序列和喷入碱基顺序(表 1)。

表 1 焦磷酸测序用 PCR 扩增及测序引物信息

Table 1 Pyrosequencing primer set for MSTN gene editing site

引物名称 Primer name	序列 5'-3' Sequence 5'-3'
PCR 正向引物 MSTN-F	ATGCTGTCGTTACCCTCTAACTGT
PCR 反向引物 MSTN-R	biotin-CTTTTGGGTGCAATAATCCAGTC
测序引物 MSTN-Seq	CTCTAACTGTGGATTTTGA
待分析序列 Sequence to Analyze	[AG]CTTTTGGATGGGACTGGATTATTGC
喷入碱基顺序 Dispensation order	GAGCTTGA

注:biotin-代表该引物需生物所标记。

Note:biotin- represents the biomarker needed for the primer.

### 1.2.2 PCR 扩增

PCR 扩增体系总体积为 50  $\mu\text{L}$ ,其中  $2 \times \text{Go Taq Green Master Mix}$  25  $\mu\text{L}$ ,引物 MSTN-F 和 MSTN-R (10  $\mu\text{mol/L}$  浓度)各 1  $\mu\text{L}$ ,DNA (0.001  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ,约  $3.3 \times 10^5$   $\text{cops}/\mu\text{L}$ )模版 2  $\mu\text{L}$ ,超纯水补至 50  $\mu\text{L}$ 。PCR 扩增程序为:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,50  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s,50 个循环,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min,4  $^{\circ}\text{C}$  保存。取 PCR 产物 8  $\mu\text{L}$ ,经 2%琼脂糖凝胶电泳检测产物质量。

### 1.2.3 焦磷酸测序反应

焦磷酸测序反应在瑞典 Biotge 公司的 PyroMark ID 焦磷酸测序仪上进行。

PCR 产物单链制备:向 PCR 产物中加入 47  $\mu\text{L}$  Binding buffer 和 3  $\mu\text{L}$  Sepharose beads,1 300 r/min 涡旋混匀 15 min,经 Vacuum prep workstation 单链分离,释放到预先加入 38.8  $\mu\text{L}$  Annealing buffer 和 1.2  $\mu\text{L}$  测序引物的 PSQ 96 测序反应板中,80  $^{\circ}\text{C}$  金属加热块上加热 2 min 自然冷却至室温;

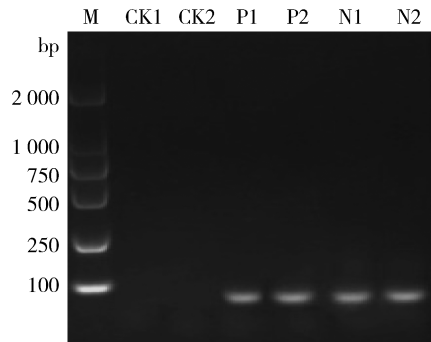
焦磷酸测序:将焦磷酸测序用酶、底物和 A、T、C 和 G 分别加入试剂仓;依据待分析序列和喷入碱基顺序(表 1),编制焦磷酸测序的方法和程序,上机测序。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 产物电泳分析

焦磷酸测序要求 PCR 产物必须单一,不能有非特异性扩增或严重的二聚体,以免造成测序结果不

准确。本研究设计的扩增产物预期为 67 和 69 bp。从图 2 可以看出,PCR 扩增产物与预期大小相符,电泳条带单一、清晰和明亮且没有二聚体产生,说明设计的 PCR 引物位点和扩增效率较好。



M, DL 2000 maker; CK1, CK2, 空白对照; P1, P2, MSTN 编辑型模板 PCR 扩增产物; N1, N2, MSTN 野生型模板 PCR 扩增产物。

M, DL 2000 maker; CK1, CK2, blank control; P1, P2, gene editing template; N1, N2, wild type template.

图 2 MSTN 基因 PCR 产物电泳结果

Fig. 2 Electrophoresis results MSTN gene of PCR products

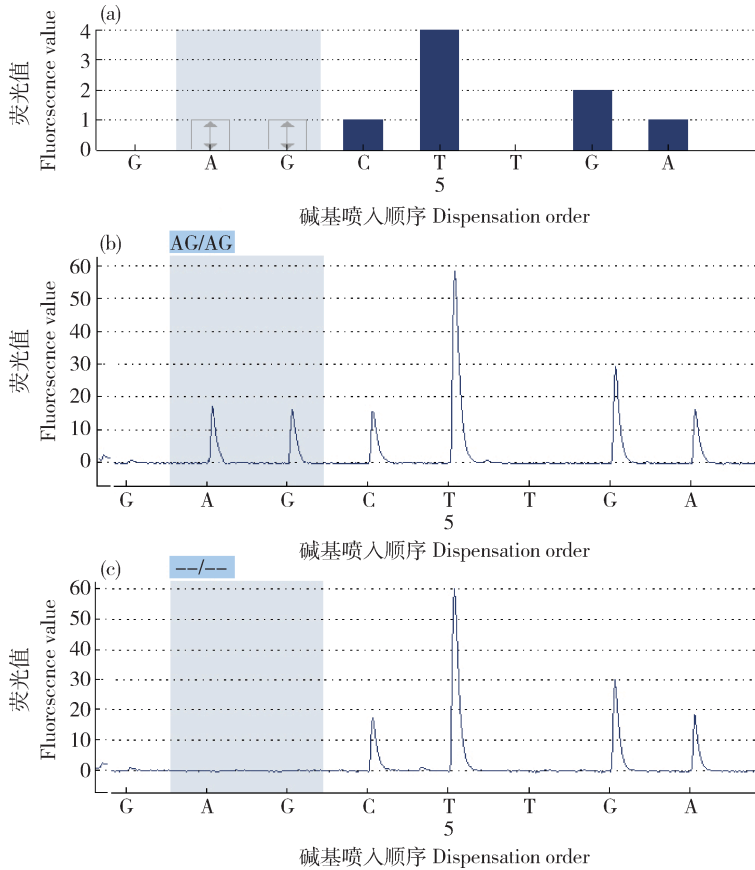
### 2.2 焦磷酸测序分型分析结果

根据 Sequence to Analyze 及 Dispensation order, PyroMark 程序给出编辑型、野生型及杂交型的测序结果柱形示意图(图 3(a));其中第一位碱基 G 和第六位碱基 T 为程序设置的阴性对照,作为反应体系阴性质控,荧光信号峰高为零;第二、三位碱基 AG 为检测靶标,呈灰色底纹;依据峰高可分为野生型(AG 为 1 倍峰高,标识为 AG/AG)、编辑型

(AG 峰高为零, 标识为 --/--) 和杂合型 (AG 为半倍峰高, 标识为 AG/--) 3 种分型; 后续碱基依次为第四位 C(1 倍)、第五位 T(4 倍)、第七位 G(2 倍) 和第八位 A(1 倍), 均为阳性质控位点。

以编辑型和野生型质粒为模板进行 PCR 扩增及焦磷酸测序, 测序结果如图 3(b) 和 (c) 所示。选

择以 SNP 模式对测序结果进行分析, 能够自动分析其分型为“AG/AG”和“--/--”。从焦磷酸测序图中能清晰显示出所检测靶点的 DNA 序列, 其中野生型样品中在第二、三位检测出 A、G 碱基, 编辑型样品第二、三位未检测出 A、G 碱基, 阴性和阳性质控位点结果正常。



灰色背景为测序靶点, 下同; “AG/AG”代表该靶点基因型为“AG 插入型”; “--/--”代表该靶点基因型为“AG 缺失型”。

The gray background is the pyrosequencing target. The same below. AG/AG means that the genotyping of the target is AG insertion type; --/-- represents that the genotyping of the target is AG deletion type.

(a) 焦磷酸测序结果示意图; (b) 野生型焦磷酸测序结果; (c) 编辑型焦磷酸测序结果

(a) Schematic diagram of pyrosequencing results; (b) GE- pyrosequencing results; (c) GE+ pyrosequencing results

图 3 MSTN 基因编辑焦磷酸测序结果

Fig. 3 Pyrosequencing results of MSTN GE- and GE+ samples

### 2.3 焦磷酸测序定量分析结果

焦磷酸测序结果可通过 SNP 和 AQ (Allele frequencies quantification) 2 种模式进行分析, 获得位点基因型和等位基因频率。本研究通过野生型和编辑型质粒梯度混合构建不同分型标准曲线, 并对焦磷酸测序定量分析能力进行考察。

各取  $3.3 \times 10^5$  copies/ $\mu\text{L}$  的野生型和编辑型质粒, 按照表 2 的比例混匀成 7 个梯度 ( $M_1 \sim M_7$ ) 模板。梯度模板按照 1.2 的方法进行 PCR 扩增和焦

磷酸测序。

从焦磷酸测序图中可以看出, 随着编辑型质粒含量的提高, [AG] 位点的碱基峰高逐步降低 (图 4(a))。选择以 AQ 模式对焦磷酸测序结果进行分析, 结果显示  $M_1 \sim M_7$  样品中 [AG] 位点的等位基因频率 AQ 值逐步降低, 平均值分别为 96.67%, 86.67%, 75.67%, 60.33%, 49.67%, 21.00% 和 1.00%; AQ 值与编辑型质粒含量呈线性关系, 斜率为 0.996, 相关系数  $R^2 = 0.9978$  (图 4(b))。

表2 M1~M8 体积梯度比例

Table 2 M1-M8 volume gradient ratio

样品 Sample	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>	M <sub>6</sub>	M <sub>7</sub>
野生型质粒	100%	80%	50%	40%	25%	15%	0%
编辑型质粒	0%	20%	50%	60%	75%	85%	100%

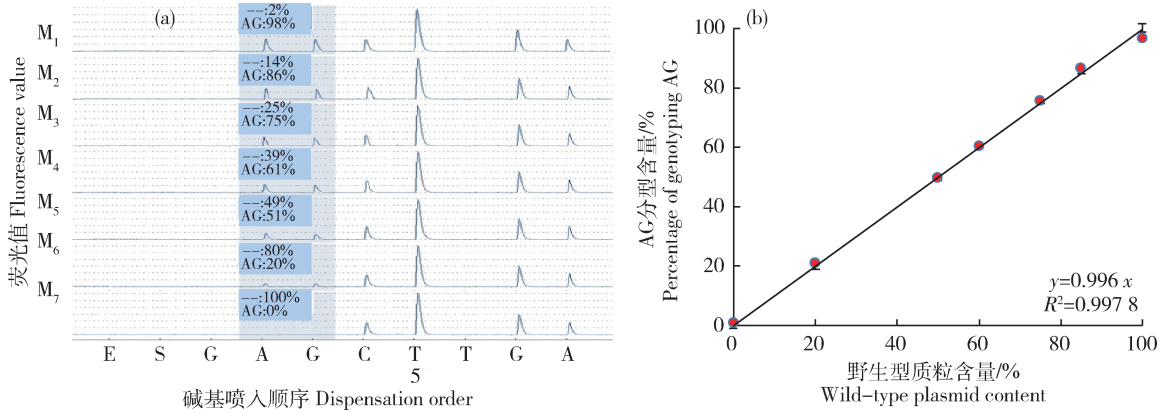


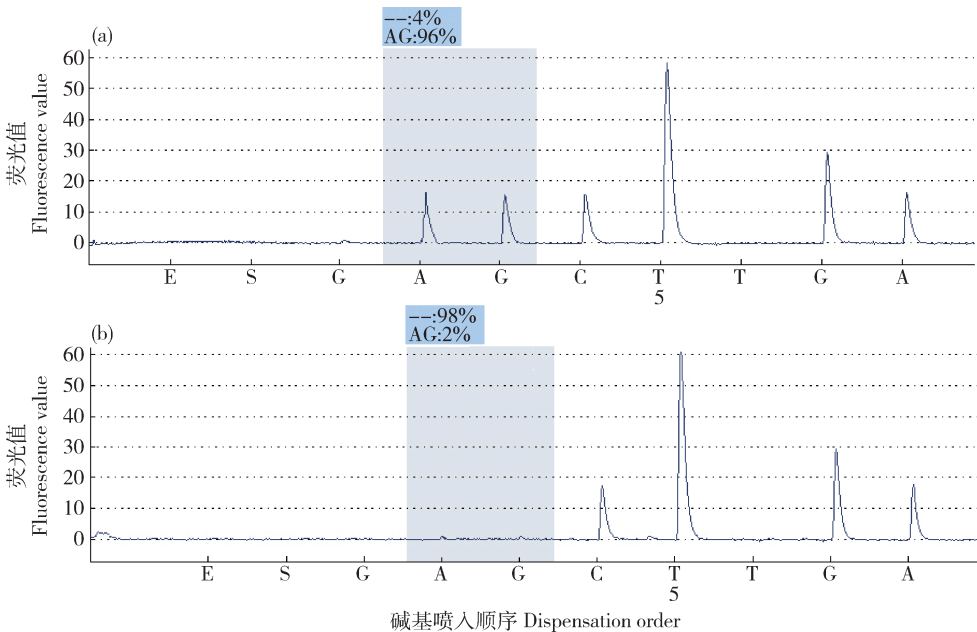
图4 不同浓度梯度测序结果(a)和标准曲线图(b)

Fig. 4 Concentration gradient sequencing results (a) and standard curve (b)

2.4 基于焦磷酸测序技术的基因编辑位点样品实际测定

应用本研究建立的检测方法,对市售猪肉样品和基因编辑梅山猪样品的DNA进行PCR扩增和焦磷酸测序。结果显示,市售猪肉样品的DNA测

序结果分型为“AG/AG”,AQ分析模式下为“-:4%,AG:96%”,基因编辑梅山猪样品的DNA测序结果分型为“-/-”,AQ分析模式下为“-:98%,AG:2%”(图5)。基于焦磷酸测序技术的基因编辑位点检测方法能有效鉴定出MSTN基因编辑分型



(a)市售猪肉样品焦磷酸测序结果;(b)基因编辑梅山猪样品的DNA焦磷酸测序结果

(a) MSTN pyrosequencing results of market pork samples;(b) MSTN pyrosequencing results of genome editing Meishan pig

图5 实际样品焦磷酸测序结果

Fig. 5 Pyrosequencing results of pig samples

及 2 种基因分型所占比例。

### 3 结论与讨论

基因组编辑技术由于其定点编辑的特点,被改造的生物体内留下的痕迹较少,原有转基因检测方法,如转化体特异性 PCR,已经很难满足基因组编辑产品的检测,特别是单碱基或少量碱基缺失的基因组编辑产品。因此,急需加强基因编辑检测新技术的研究,一方面可以保护基因编辑作物研发人的知识产权,另一方面为基因编辑产品监管监测提供有力的技术支撑。

*MSTN* 基因参与调节动物骨骼肌的发育,与普通动物相比 *MSTN* 基因编辑动物比普通动物具有生长速度快、瘦肉率高和脂肪含量低等特点,并且采食量低和饲料利用率高。*MSTN* 基因在不同物种中具有高度保守性,相似率 > 89%。在 NCBI 网站分别对本研究中编辑型和野生型序列进行 BLAST 比对发现,该段序列在牛、马、羊、猪、鼠、海豚、鲸鱼和鸟类等物种间相似率 > 95%; 编辑位点在上述物种中未见自然突变;本研究应用的测序引物、设定的焦磷酸测序靶标 [AG]CTTTTGGGA 中均不存在自然变异。因此,本研究建立的检测方法能有效区分 *MSTN* 基因编辑产品和野生型产品。

目前,关于基因编辑位点的检测和确认,大多采用 Sanger 法测序,能够直观的看到基因编辑位点碱基序列的变化,但该方法耗时较长,不适用于快速、大规模检测。其他能够用来检测点突变的方法还有 PCR-RFLP、PCR-焦磷酸测序、MGB 探针实时荧光 PCR、LNA 探针实时荧光 PCR、高分辨率熔融曲线实时荧光 PCR (HRM-qPCR)、四引物扩增受阻突变体系 (T-ARMS-PCR) 和两对交叉引物 PCR (PCR-CTPP) 等。其中,PCR-RFLP 技术操作复杂,难以满足高通量、定量检测的要求;HRM-qPCR 和 MGB 探针实时荧光 PCR 技术具有高通量、操作简便的特点,可以对基因编辑位点进行分型分析,不能进行定量检测;T-ARMS-PCR 和 PCR-CTPP 对引物筛选和体系优化要求较高,具有不稳定的弊端。

PCR-焦磷酸测序是检测短片段变异的金标准,本研究以 *MSTN* 基因编辑猪中 [AG] 位点作为检测靶点,建立焦磷酸测序检测方法。结果显示,该方法能够准确检测出靶标位点变异情况,在 SNP 分析模式下,可以对靶标位点自动分型,进而识别野生型与编辑型;在 AQ 模式下,可对靶标位点的定位基因

频率定量检测,进而换算样品中基因编辑基因型的含量,满足基因编辑产品定性鉴别和定量检测的需求。

### 参考文献 References

- [1] Pabo C O, Peisach E, Grant R A. Design and selection of novel Cys2His2 zinc finger proteins[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2001, 70(1): 313-340
- [2] Li T, Huang S, Zhao X, Wright D A, Carpenter S, Spalding M H, Weeks D P, Yang B. Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(14): 6315-6325
- [3] Cong L, Ran F A, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu P D, Wu X, Jiang W, Marraffini L A, Zhang F. Multiplex genome engineering using Crispr/Cas systems[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823
- [4] Shukla V K, Doyon Y, Miller J C, Dekelver R, Moehle E A, Worden S E, Urnov F. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases[J]. *Nature*, 2009, 459(7245): 437-441
- [5] Cai C Q, Doyon Y, Ainley W M, Miller J C, Dekelver R, Moehle E A, Petolino J F. Targeted transgene integration in plant cells using designed zinc finger nucleases [J]. *Plant Molecular Biology*, 2009, 69(6): 699-709
- [6] Li T, Liu B, Spalding M H, Weeks D P, Yang B. High efficiency Talen-based gene editing produces disease resistant rice[J]. *Nature Biotechnology*, 2012, 30(5): 390-392
- [7] Jones H D. Regulatory uncertainty over genome editing [J/OL]. *Nature Plants*, (2015-01-08), DOI: <https://doi.org/10.1038/nplants.2014.11>
- [8] Wang K, Ouyang H, Xie Z, Yao C, Guo N, Li M, Pang D. Efficient generation of Myostatin mutations in pigs using the crispr/cas9 system[J/OL]. *Scientific Reports*, (2015-11-13), <https://doi.org/10.1038/srep16623>
- [9] Bi Y, Hua Z, Liu X, Hua W, Ren H, Xiao H, Zheng X. Isozygous and selectable marker-free *MSTN* knockout cloned pigs generated by the combined use of Crispr/Cas9 and Cre/LoxP[J/OL]. *Scientific Reports*, (2016-08-17), <https://doi.org/10.1038/srep31729>
- [10] Ni W, Qiao J Q, Hu S, Zhao X, Regouski M, Yang M, Chen C. Efficient gene knockout in goats using crispr/cas9 system [J/OL]. *Plos One*, (2014-09-04), DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106718>
- [11] Guo R, Wan Y, Xu D, Cui L, Deng M, Zhang G, Zhang Y. Generation and evaluation of myostatin knock-out rabbits and goats using crispr/cas9 system [J/OL]. *Scientific Reports*, (2016-07-15), <https://doi.org/10.1038/srep29855>
- [12] Lv Q, Yuan L, Deng J, Chen M, Wang Y, Zeng J, Lai L.

- Efficient generation of Myostatin gene mutated rabbit by crispr/cas9[J/OL]. *Scientific Reports*, (2016-04-26), DOI: <https://doi.org/10.1038/srep25029>
- [13] Gu H, Cao Y, Qiu B, Zhou Z, Deng R, Chen Z, Yong W. Establishment and phenotypic analysis of an Mstn knockout rat[J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2016,477(1):115-122
- [14] Yee J K. Off-target effects of engineered nucleases[J]. *Febs Journal*, 2016,283(17):3239-3248
- [15] 付伟,魏霜,王晨光,杜智欣,朱鹏宇,刘中勇,吴希阳,朱水芳. 基因编辑作物的发展及检测监管现状[J]. *植物检疫*, 2016,30(3):1-8 (in Chinese)
- Fu W, Wei S, Wang C G, Du Z X, Zhu P Y, Liu Z Y, Wu X Y, Zhu S F. Development, regulatory and detection of genetically modified plant based on genome editing techniques[J]. *Plant Quarantine*, 2016,30(3):1-8 (in Chinese)
- [16] 沈平,章秋艳,杨立桃,张丽,李文龙,梁晋刚,李夏莹,王颀潜,沈晓玲,宋贵文等. 基因组编辑技术及其安全管理[J]. *中国农业科学*, 2017,50(8):1361-1369
- Shen P, Zhang Q Y, Yang L T, Zhang L, Li W L, Liang J G, Li X Y, Wang H Q, Seng X L, Song G W. The safety management of genome editing technology [J]. *Scientia Agricultural Sinica*, 2017,50(8):1361-1369 (in Chinese)
- [17] Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate[J]. *Science*, 1998, 281 (5375): 363-365
- [18] 赵新,王永,兰青阔,陈锐,朱珠,余景会,李欧静,郭永泽. 食源性致病菌磷焦酸通用引物测序方法的建立[J]. *食品研究与开发*, 2013,33(12):97-100
- Zhao X, Wang Y, Lan Q K, Chen R, Zhu Z, Yu J H, Li O J, Guo Y Z. The study of pyrosequencing method by the universal primers for food-borne pathogenic bacteria[J]. *Food Research and Development*, 2013,33(12):97-100 (in Chinese)
- [19] 赵新,王永,兰青阔,陈锐,朱珠,余景会,李欧静,郭永泽. 焦磷酸测序技术在4种食源性致病菌快速检测中的应用[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2013,32(2):182-187
- Zhao X, Wang Y, Lan Q K, Chen R, Zhu Z, Yu J H, Li O J, Guo Y Z. Study and application on detection of four kinds of food-borne pathogenic bacteria by pyrosequencing technology [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2013,32(2):182-187 (in Chinese)
- [20] 兰青阔,王永,赵新,陈锐,朱珠,李欧静,余景会,郭永泽,程奕. 基于 Special-Base 模型检测转基因作物 nos/plasmid 构建特异性[J]. *中国农业大学学报*, 2012,17(2):8-12
- Lan Q K, Wang Y, Zhao X, Chen R, Zhu Z, Li O J, Yu J H, Guo Y Z, Cheng Y. Special-base GMCs detection using multiple PCR and pyrosequencing[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2012,17(2):8-12 (in Chinese)
- [21] 兰青阔,张桂华,王永,赵新,朱珠,杜胜利,程奕. 基于 InDel 标记快速检测黄瓜津优 38 种子纯度[J]. *种子*, 2011,30(6):19-23
- Lan Q K, Zhang G H, Wang Y, Zhao X, Zhu Z, Du S L, Cheng Y. Detecting seed purity quickly by InDel molecular of cucumber Jinyou-38[J]. *Seed*, 2011,30(6):19-23 (in Chinese)
- [22] 兰青阔,陈锐,赵新,王成,陈笑芸,汪小福,沈晓玲,刘娜,朱珠,刘征辉,王永. 贝母属药用植物叶绿体基因组单核苷酸多态性位点生物信息学分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018,9(17):4527-4233
- Lan Q K, Chen R, Zhao X, Wang C, Chen X Y, Wang X F, Shen X L, Liu N, Zhu Z, Liu Z H, Wang Y. Bioinformatics analysis for single nucleotide polymorphism sites of chloroplast genome of *Fritillaria*[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2018,9(17):4527-4233 (in Chinese)

责任编辑:吕晓梅