

利用竞争性 PCR 筛选无标记 *Xa21* 转基因水稻

夏志辉^{1,2}, 高利芬², 罗越华¹, 邓晓建³, 李仕贵³, 翟文学²

1 海南大学农学院, 海口 570228

2 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101

3 四川农业大学水稻研究所, 成都 611130

摘要: PCR 是一种简单、迅速、灵敏的检测方法, 但假阳性与假阴性却影响了它在常规应用中的准确性。本研究利用竞争性 PCR 解决无标记 *Xa21* 转基因水稻 PCR 检测中的假阳性与假阴性问题。标记基因潮霉素基因(Hygromycin phosphotransferase, *hpt*)的竞争模板是外加的日本晴 *hpt* 转基因植株基因组 DNA, 抗白叶枯病基因 *Xa21* 的竞争模板是待测水稻内源的位于第 11 染色体上的 *Xa21* 同源基因序列。利用这一方法对双右边界 T-DNA 载体转化产生的转基因 T1 代植株进行分析, 可以有效地减少或排除假阳性或假阴性样品, 选出真正的转基因阳性植株。与常规 PCR 相比竞争性 PCR 提高了无标记 *Xa21* 转基因植株筛选的准确性。对获得的无标记 *Xa21* 转基因植株进行白叶枯抗病鉴定与潮霉素抗性鉴定证实了该方法的可靠性。

关键词: 竞争性 PCR, 假阳性, 假阴性, 无标记转基因水稻, *Xa21*

Application of competitive PCR for screening selectable marker-free *Xa21* transgenic rice

Zhihui Xia^{1,2}, Lifan Gao², Yuehua Luo¹, Xiaojian Deng³, Shigui Li³, and Wenxue Zhai²

1 College of Agriculture, Hainan University, Haikou 570228, China

2 Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

3 Rice Research Institute, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

Abstract: Polymerase chain reaction (PCR) is a simple, quick and highly sensitive method. However the accuracy of the conventional PCR assay was often affected by false positives and false negatives. In this study, a protocol competitive PCR was used to reduce the false results in screening for selectable marker-free (SMF) *Xa21* transgenic rice plants. The competitive template of *Xa21* was the endogenous *Xa21* homologous sequence located on chromosome 11. The competitive template of the selectable marker gene, hygromycin phosphotransferase (*hpt*), was an additive DNA extracted from *hpt* transgenic Nipponbare (*Oryza sativa* L). Through competitive PCR analysis of transgenic T1 plants produced by double right border binary vector, false positive or false negative samples were effectively diminished, and genuine SMF *Xa21* transgenic plants were obviously obtained. Comparing with the conventional non-competitive PCR, competitive PCR increased the accuracy for selecting SMF *Xa21* transgenic plants. The results of bacterial blight (BB) resistance tests and hygromycin B resistance assay of SMF *Xa21* transgenic plants testified the reliability of this method.

Received: December 19, 2008; **Accepted:** February 4, 2009

Supported by: The Project of The National Ministry of Science and Technology(Nos. 2006AA10Z1C8, 2006AA100101, 2007BAD81B01), Innovative Program of The Chinese Academy of Sciences(Nos. KSCX-YW-N-009-02, KSCX1-YW-03).

Corresponding author: Tel: +86-10-64807633; Fax: +86-10-64873428; E-mail: wxzhai@genetics.ac.cn

国家科技部研究项目(Nos. 2006AA10Z1C8, 2006AA100101, 2007BAD81B01), 中国科学院创新项目(Nos. KSCX-YW-N-009-02, KSCX1-YW-03)资助。

Keywords: competitive PCR, false positive, false negative, selectable marker-free transgenic rice, *Xa21*

聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)是一种选择性体外扩增 DNA 或 RNA 片段的方法,自它诞生以来,由于其操作简单、成本低、灵敏度高而得到了广泛的应用。但假阳性与假阴性却影响了它在实际应用中的准确性。尽管前人在如何消除 PCR 在检测过程的假阳性和假阴性方面进行了很多的研究与探索^[1-3],这些方法在提高少量样品的 PCR 检测可靠性方面起了很大的作用,但在大规模样品的 PCR 检测过程中,由于每个反应条件很难达到完全的一致,并且随时随地都可能存在样品间的交叉污染,难以避免假阳性与假阴性的出现。

转基因植物的安全性是生物安全的重要内容,而标记基因是首先要排除的潜在的不安全因素。目前已经成功建立了一些去除标记基因的转化策略^[4-7],然而这些方法都需要筛选大量的转基因植株后代或经过诱导处理后的当代植株才能得到无标记的转基因植株。通过 Southern 杂交来筛选无标记转基因植株是最准确的方法,但是由于其对 DNA 质量、试剂、仪器的高要求,以及检测大量样品时需要较多的经费、时间等原因,导致 Southern 杂交不能成为普通实验室的常规方法。PCR 检测在许多方面具有优越性,如能解决在大规模样品检测中的假阳性与假阴性问题,提高实验结果的可靠性,PCR 检测可以作为 Southern 杂交的替代方法。

竞争性 PCR 是目前公认的比较准确的 DNA 或 RNA 定量方法之一^[8-10]。本研究首次将竞争性 PCR 运用到无标记转基因植株筛选中,获得了较好的效果。竞争性 PCR 消除 PCR 假阳性与假阴性的原理是:在一个 PCR 反应中,目的模板和竞争模板共同竞争同一对引物,两者的产物大小不同,通过电泳能分开;由于每一个反应中都存在竞争模板,因此没有任何扩增产物的反应即为假阴性,可以明确地排除。另外被微量目的基因污染的非转基因样品,由于竞争模板总量比目的基因的污染物要多成千上万倍,在相同扩增效率下,竞争模板比目的基因的扩增产物也相应多成千上万倍,污染物的扩增产物通过常规方法是无法检测到的,这就自然消除 PCR 的假阳性。

1 材料与方法

1.1 植物材料及转化质粒载体

利用本实验室前期构建的双右边界载体 PXA21(图 1)^[5],在 pBXA21 载体中 *Xa21* 基因位于相邻的 2 个左右边界之间,标记基因位于 2 个右边界之间,在转化过程中,可以形成 3 种类型的 T-DNA:一种 T-DNA 含有 *hpt* 基因与 *Xa21* 基因(RB1 到 LB),另一种只含有 *Xa21* 基因(RB2 到 LB),或者只含有 *hpt* 基因,这 3 种 T-DNA 独立整合到不同的染色体位置,通过转基因植株后代分离就可以得到无标记基因只含 *Xa21* 基因的转基因植株,通过电激将质粒 pBXA21 和 pCAMBIA1300 分别导入根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)LBA4404 中用于遗传转化,其中质粒 pBXA21 转化杂交水稻的一个骨干恢复系明恢 86,经 Southern 杂交鉴定 *hpt* 和 *Xa21* 都为阳性的转基因植株的分离后代 T1 植株叶片所提取的 DNA 作为筛选无标记 *Xa21* 转基因植株的样品;质粒 pCAMBIA1300 转化的经 Southern 杂交鉴定为 *hpt* 阳性日本晴所提取的叶片 DNA 作为竞争模板。

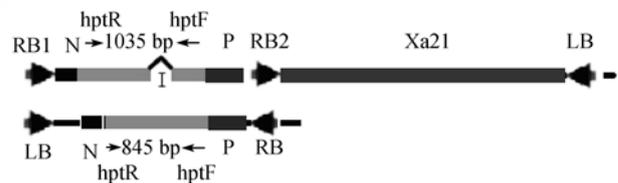


图 1 质粒 pBXA21 和 pCAMBIA1300 结构图^[5]

Fig. 1 Diagram of the plasmids pBXA21 and pCAMBIA1300^[5]. RB: the right border of T-DNA; LB: the left border of T-DNA; N: terminator of nos gene; P: CaMV35S promoter; *Xa21*: *Xa21* gene; I: the 190 bp intron of *icinus communis* catalase-I; hptF and hptR: PCR primers for *hpt* gene; the lengths of the PCR fragments from both plasmids were also donated respectively in the diagram.

1.2 *Xa21* 基因引物的设计

依据 *Xa21* 基因序列设计引物 U1(5'-CGATCGG TATAACAGCAAAC-3')、I1 (5'-ATAGCAACTGAT TGCTTGG-3')^[5],此引物对扩增质粒 PBXA21 能产生 1.4 kb 的特异性片段,在水稻第 11 染色体存在 *Xa21* 的同源序列,未转 *Xa21* 基因的植株,能扩增出一条 1.3 kb 的 DNA 片段,在 *Xa21* 转基因植株中 2 种序列共同存在,因而能扩增出 1.4 kb、1.3 kb 两种

DNA 片段。

1.3 标记基因潮霉素基因的 PCR 检测引物的设计

根据潮霉素基因序列, 设计一对 PCR 引物: hptF(5'-TAGGAGGGCGTGGATATGTC-3'); hptR (5'-TACACAGCCATCGGTCCAGA-3')。用此引物对质粒载体 pCAMBIA1300 的潮霉素基因进行扩增能产生 845 bp 的特异条带; 对质粒载体 pBXA21 的潮霉素基因进行扩增, 由于包含一个 190 bp 的内含子能产生 1035 bp 的片段(图 1)。同样用这对引物对 2 种载体分别转化获得的转基因植株进行扩增也能产生出 845 bp 或 1035 bp 的特异性片段。这 2 条片段大小差异明显, 通过 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳就能迅速的分开。

1.4 竞争模板 DNA 的最佳添加量的确定

适量的竞争模板是竞争性 PCR 能否成功消除假阳性和假阴性的关键, 如果竞争模板添加太多, 甚至比目的基因还多几十倍, 则只能显示出竞争模板的 PCR 片段而导致假阴性; 竞争模板添加太少, 又达不到竞争的效果, 无法达到消除假阳性和显示假阴性的效果。在本实验中将处于相同生长发育时期的 100 mg 的 pBXA21 和 pCAMBIA1300 转基因植株叶片所提取的 DNA, 加 600 μ L 重蒸水溶解后, 分别以 1:1、10:1、50:1、100:1 的体积比将模板 DNA 与竞争模板 DNA 混合后, 取 2 μ L 混合液作为模板, 进行 PCR 反应。

1.5 无标记 *Xa21* 转基因植株的抗病性及潮霉素抗性鉴定

将所有的 *Xa21* 转基因后代(T1)在分蘖盛期接种白叶枯病原菌生理小种 P6(PXO99), 2 周后, 当病斑长度稳定后, 以测量的病斑长度作为抗感指标, 统计后观察利用竞争性 PCR 筛选到的无标记 *Xa21* 阳性植株是否抗病。待无标记转基因植株成熟时, 单株收种后取 50 粒种子(T2), 在 37 $^{\circ}$ C 培养室萌芽, 接着将出芽的种子一半继续在不含任何抗生素的水中培养, 另一半转移到含有 50 mg/L 潮霉素的溶液中培养, 培养 12 d 左右进行调查。如果在水中生长很好而在潮霉素溶液中褐化死亡则说明无 *hpt* 基因; 如果在水和潮霉素溶液中都有一些植株生长良好则说明有 *hpt* 基因。阳性对照为已鉴定的 *hpt* 阳性的明恢 86 种子, 阴性对照为未转基因的水稻种子。

2 结果与分析

2.1 *Xa21* 竞争性 PCR 检测选择 *Xa21* 转基因植株

对于目标转基因 *Xa21* 的筛选, 关键是要保证转基因植株中 *Xa21* 基因的真阳性。利用引物 U1、I1 对转基因植株的 *Xa21* 目标基因进行检测, 结果显示(图 2), 非转基因植株扩增出 1.3 kb 的片段, 阳性质粒只能扩增出 1.4 kb 的片段, 而绝大多数的转基因抗病植株, 则能扩增 1.4 kb 与 1.3 kb 两条带。1.3 kb 的扩增带来自转基因受体水稻基因组中一个内源的同源模板, 是天然的待测目标基因 *Xa21* 的竞争性模板。如果非转基因植株模板中有微量的 *Xa21* 基因 DNA 污染, 由于存在的内源竞争模板量比污染的 *Xa21* 基因模板量要多很多倍, 在 PCR 反应中二者竞争的结果, 1.4 kb 的 *Xa21* 产物无法形成足量的扩增而在电泳后的琼脂糖凝胶上显示不出来, 表现出来的 PCR 条带只是 1.3 kb 的片段, 从而达到减少或避免假阳性的效果。在 *Xa21* 转基因植株中, 由于内源竞争模板与所转入目的基因 *Xa21* 在数量上差异不大, 二者均能有效的扩增并显示出来, 因此能扩增出 2 条带的植株都是含有 *Xa21* 基因的。所有能扩增出 2 条带的植株都表现出对白叶枯病的抗性验证了这个结果(数据未显示)。这一系统比只对目标转基因 *Xa21* 进行扩增检测的常规 PCR 极大地提高了 *Xa21* 基因真阳性植株的准确性。另外在对大量的转基因植株进行 PCR 反应时, 受各种 PCR 因素的影响经常会有个别样品不能扩增出任何条带, 如图 2 中的泳道 8。理论上无论转基因还是非转基因植株都能扩增出 1.3 kb 的竞争模板片段, 该片段没有出现不能肯定无 1.4 kb 的 *Xa21* 产物为阴性, 需要对样品重新检测, 把这类结果定义为假阴性。本研究统计, 在 480 个 PCR 反应有 22 个反应没有任何扩增片段, 假阴性率占总反应的 4.58%。如果采用只对目标转基因 *Xa21* 进行扩增检测的非竞争性的常规 PCR 则不能把假阴性和真阴性区分, 会造成转基因植株漏检。更为严重的是降低了真阳性转基因植株的准确性, 这一点对无标记转基因植株的筛选尤为重要。

2.2 *hpt* 竞争性 PCR 检测选择无标记转基因植株

标记基因 *hpt* 的检测与去除是转基因植物安全评估的一个重要方面, 确保 *hpt* 真阴性是获得无 *hpt* 选择标记的 *Xa21* 转基因植株的关键。对大量的转基

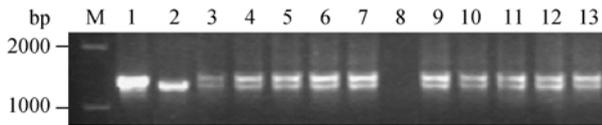


图2 引物 U1、II 对 *Xa21* 基因的 PCR 检测

Fig. 2 PCR analysis of the *Xa21* transgenic plants with the primers U1 and II. M: DL2000 marker; 1: pBXA21 plasmid as a positive control; 2: nontransgenic plant as a negative control; 3-13: *Xa21* transgenic plants with BB resistance.

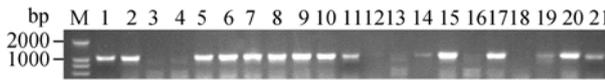


图3 选择标记 *hpt* 基因的非竞争性 PCR 检测

Fig. 3 Noncompetitive PCR analysis of the selectable marker *hpt* gene. M: DL2000 marker; 1-21: *Xa21* transgenic plants (T₁) with BB resistance.

因植株的 *hpt* 基因进行非竞争性的常规 PCR 检测时总会出现个别样品的扩增片段较弱而影响判断, 如图 3 中的泳道 3、4、13、14、19 和 21。即便没有任何扩增产物, 如泳道 12 和 18, 也不能完全肯定无 *hpt* 基因。正如前面所分析的那样, 这类问题都可以归为假阳性或假阴性问题。特别是假阴性样品严重影响了 *hpt* 真阴性转基因植株筛选。本实验设计了检测标记基因 *hpt* 的竞争 PCR 系统来确保 *hpt* 真阴性转基因植株的筛选。该系统中目标转基因 *hpt* 的扩增产物为 1035 bp, 竞争模板产物为 845 bp。通过在转基因 *hpt* 的 PCR 系统中添加外源竞争性模板来减少 *hpt* 的假阳性与假阴性, 同时把 *hpt* 真阴性样品显示出来(图 4)。当等质量叶片所提取的目标模板 DNA 与竞争模板 DNA 等体积混合液时, 该系统能扩增出 1035 bp 的目标转基因产物与 845 bp 的竞争模板产物; 当样品模板 DNA 与竞争模板 DNA 体积比为 10:1、50:1、100:1 时, 只能扩增出 1035 bp 的目标转基因产物。而竞争模板的同样浓度的稀释对照都能有效地扩增出清晰的 845 bp 的竞争模板产

物。这说明样品模板 DNA 与竞争模板 DNA 在该混合比例下只扩增出 1035 bp 的目标转基因产物是 2 种不同数量模板竞争的结果, 并不是直接由竞争模板的稀释引起。以上结果显示当目标模板 DNA 与竞争模板 DNA 为 10:1 以上时就只能扩增出 1035 bp 的目标转基因片段。反之, 当竞争模板 DNA 与目标模板 DNA 为 10:1 以上时就只能扩增出 845 bp 的竞争模板产物(结果未显示)。根据以上结果, 在保证竞争模板有效扩增的前提下, 同时考虑减少由于个别样品 DNA 量少而出现的假阴性, 或者由于微量的污染可能出现的假阳性, 确定 *hpt* 竞争性 PCR 检测的样品模板 DNA 与竞争模板 DNA 体积比为 50:1。采用这一比例对大量的转基因 T₁ 代植株进行 *hpt* 竞争性 PCR 扩增, 提高了标记基因 *hpt* 真阴性样品即无 *hpt* 标记转基因植株的准确性(图 5)。泳道 16、18、42 和 68, 只能扩增出竞争模板的片段, 无目标转基因 *hpt*, 初步定为无标记转基因植株。在非竞争性的常规 PCR 中, 这些样品与假阴性是区分不开的。泳道 1、17、22 和 50 不能扩增出任何条带, 存在假阴性, 51 可能为假阳性, 还需要进行再次检测。

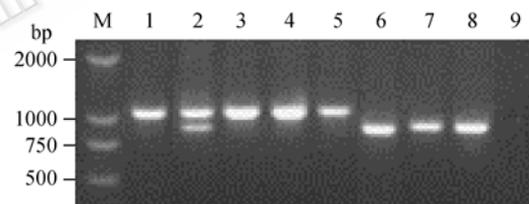


图4 外加竞争模板与目的模板不同比例下的 *hpt* 基因的 PCR 检测

Fig. 4 PCR analysis of the *hpt* gene at different ratios of target template and additive competitive template. M: DL2000 marker; 1-5: the volume ratio of target template and additive competitive template were 1:0, 1:1, 10:1, 50:1 and 100:1, respectively; 6-8: competitive template was respectively diluted 10, 50 and 100 times with distilled water; 9: distilled water as negative control.

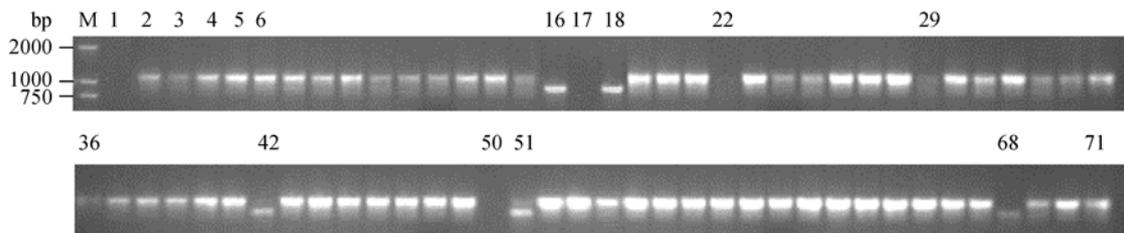


图5 选择标记 *hpt* 基因的竞争性 PCR 检测

Fig. 5 Competitive PCR analysis of the selectable marker *hpt* gene. M: DL2000 marker; 1-71: *Xa21* transgenic plants (T₁) with BB resistance.

2.3 竞争性 PCR 检测获得的无标记 *Xa21* 转基因植株的表型验证

通过对 *Xa21* 和 *hpt* 分别进行竞争性 PCR 检测, 在 1500 株 T1 代分离单株中获得了 26 株无标记 *Xa21* 阳性植株, 田间接菌试验也表明所有 *Xa21* 阳性植株都表现为抗病。对这些无标记 *Xa21* 阳性植株进行单株收种即 T2 代, 取 50 粒种植于田间继续对 *hpt* 基因进行 PCR 检测, 发现所有 T2 代植株的 *hpt* 基因检测均为阴性。同时取 50 粒种子(T2)进行潮霉素敏感鉴定 (图 6)。播种在清水的 25 粒 T2 种子生长良好, 说明种子的萌发及生长是没有问题的。含有潮霉素基因的明恢 86 植株作为 *hpt* 基因阳性对照植株能在 50 mg/L 潮霉素浓度下生长, *hpt* 阴性即无标记 *Xa21* 转基因植株不能在该潮霉素浓度下生长。说明无标记 *Xa21* 转基因植株确实不含有潮霉素基因。通过对上述 26 株无标记 *Xa21* 阳性植株的 T2 代进行进行潮霉素敏感鉴定发现 25 个植株的所有供试种子都不抗潮霉素, 确证为无标记 *Xa21* 转基因植株。有一个植株的 25 粒 T2 种子在 50 mg/L 潮霉素浓度下长出 3 株抗性株, 但不符合有规律的抗感分离比, 分析是由含有潮霉素基因的植株意外串粉或种子混收引起, 并不是 PCR 检测的问题。

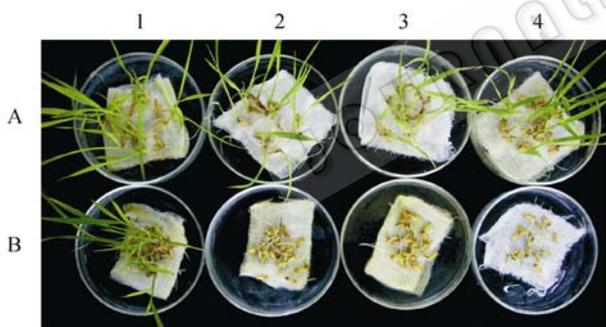


图 6 无标记 *Xa21* 转基因植株的潮霉素抗性分析

Fig. 6 Hygromycin B resistance assay of selectable marker-free *Xa21* transgenic plants. (A) Treated in water. (B) Treated in solution with 50 mg/L hygromycin B. 1: *hpt* positive plants as positive control; 2-3: selectable marker(*hpt*)-free *Xa21* transgenic plants; 4: nontransgenic plants as negative control.

3 讨论

目前转基因植物的安全性已引起人们越来越多的关注, 获得无标记的转基因植株是今后转基因发展的趋势。目前已经成功发展了一些获得无标记转

基因植株的安全的转基因策略, 而这些策略都需要筛选大量的转基因植株后代或对当代植株进行诱导处理^[5-7]。为了获得无标记基因且农艺性状良好的转基因植株, 通常要对上千甚至上万转基因后代植株进行筛选。另一方面从样品的采取到收种, 基本上只有 1~2 个月的时间。为了确保采收到农艺性状好的无标记转基因植株, 就要求在短时间内把所有的样品从研磨提取 DNA, PCR 检测到数据整理全部完成。在大批量的样品 DNA 提取和 PCR 检测过程中, 随时存在可能的污染。如果按照常规的 PCR 方法进行检测, 假阳性就变得不可避免。同时在大规模的 DNA 提取与 PCR 反应过程, 也极易出现个别样品的 DNA 的丢失, 模板遗漏以及个别 PCR 管与 PCR 仪之间接触不好等, 从而导致假阴性的出现。竞争性 PCR 从一定程度上可以很好地解决这些假阳性和假阴性问题。最重要的是竞争性 PCR 保证了目标基因阳性和标记基因阴性, 即无标记转基因植株的准确性。

目前利用在转基因植物上的很多基因都是来源于植物本身的 cDNA, 而大部分基因都含有内含子, 如果在检测转基因植株时设计的 2 个引物之间含有一个较小内含子, PCR 时能扩增出 2 条片段, 其中大的片段为内源的基因组片段, 小的片段则为所转入的外源的 cDNA 片段, 由于内源 DNA 的竞争作用, 一方面消除了假阳性, 另一方面内源 DNA 序列还起到了 DNA 内对照的作用, 从而能显示而排除无任何扩增片段的假阴性结果。

REFERENCES

- [1] Hu YS, Li JF, Wang J. A new differential display PCR-restriction fragment differential display PCR. *Lett Biotechnol*, 2004, **15**: 65-66.
胡岳山, 李杰芬, 王剑. 限制性酶切片差异显示及其应用. *生物技术通讯*, 2004, **15**: 65-66.
- [2] Song XL, Chen JL, Xin JQ, *et al.* Establishment and application of a nested-PCR for the detection of CAV. *Chin J Prev Vet Med*, 2000, **22**: 220-223.
宋秀龙, 陈奖励, 辛九庆, 等. 鸡贫血病毒套式 PCR 检测方法的建立及应用. *中国预防兽医学报*, 2000, **22**: 220-223.
- [3] Hao CY, Zhao M, Li Y, *et al.* A technique to decrease the false positive rate of differential display PCR. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2002, **18**: 110-114.

- 郝纯毅, 赵敏, 李勇, 等. 降低 mRNA 差异显示技术假阳性率的一种方法. 中国生物化学与分子生物学报, 2002, **18**: 110-114.
- [4] Guo RL, Guo SY, Bao QY, *et al.* A competitive RT-PCR assay and quantitation of BM P-2 mRNA. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2000, **16**: 680-683.
- 郭若霖, 郭善一, 鲍秋野, 等. 竞争性 RT-PCR 测定法及 BMP-2 mRNA 的定量检测. 中国生物化学与分子生物学报, 2000, **16**: 680-683.
- [5] Xia ZH, Li XB, Chen CY, *et al.* Generation of selectable marker-free and vector backbone sequence-free *Xa21* transgenic rice. *Chin J Biotech*, 2006, **22**: 204-210.
- 夏志辉, 李晓兵, 陈彩艳, 等. 无选择标记和载体骨干序列的 *Xa21* 转基因水稻的获得. 生物工程学报, 2006, **22**: 204-210.
- [6] Sreekala C, Wu L, Gu K, *et al.* Excision of a selectable marker in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) using a chemically regulated Cre/loxP system. *Plant Cell Rep*, 2005, **24**: 86-94.
- [7] Komari T, Hiei Y, Saito Y, *et al.* Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *Plant J*, 1996, **10**: 165-174.
- [8] Mariasegaram M, Robinson N, Goddard M. Quantification of cattle DNA using quantitative competitive PCR with sheep DNA as competitor. *Mol Cell Probes*, 2006, **20**: 18-20.
- [9] Mauritz R, Schwabe W, Haeusler P, *et al.* Comparison of mRNA expression levels determined with TaqMan and competitive template RT-PCR. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2004, **23**: 1471-1474.
- [10] Matthews J, Chung M, Matyas R. Persistent DNA contamination in competitive RT-PCR using cRNA internal standards: Identity, quantity, and control. *Biotechniques*, 2002, **32**: 1412-1414, 1416-1417.

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

乳品科学百科全书 (共四卷) (翻译版, 精装)

〔澳大利亚〕H. 罗金斯基 〔美国〕J. W. 富卡

〔爱尔兰〕P. F. 福克斯 主编

第一卷 赵新准 主译 李庆章 主审

第二卷 霍贵成 主译 李庆章 主审

第三卷 赵新准 刘宁 主译 李庆章 主审

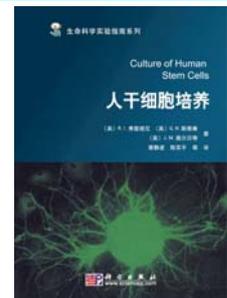
第四卷 孟祥晨 主译 李庆章 主审

978-7-03-020620-6 ¥680.00 (全四卷) 2009年3月出版

本书分为4卷, 收录了世界上著名的乳业专家编撰的427篇文章, 是迄今乳业领域最为权威的多卷大型乳品百科全书。

本书首次最系统、最完整地汇集了当代乳品科学领域的理论与技术(食品、畜牧、兽医、加工、机械、工程、管理、教育), 涉及的主要议题有乳的生产与乳业技术、顺应营养和公共健康需求, 以及包括乳和乳制品贸易方面的乳品工业经济。全书内容按英文字母顺序的系列条目排列, 且每篇文章附有“see also”和“延伸阅读”, 通过实际应用, 读者可获得“一书在手, 百疑俱释”的知识充实感和专业满足感。

本书适合科研院所和实验室的研究人员、乳品公司的管理者和从事研发的人员、乳品科学及相关学科的本科生和研究生、经济和营养政策部门及媒体的工作人员参考阅读。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 阮芯 联系电话: 010-64034622 (带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>