

# 转基因产品 CaMV 35S 启动子基因实时荧光 PCR 检测方法中引物探针序列特征及影响

杨杰, 李兰, 戴莉, 张江国\*, 莫善明, 徐新龙 (阿拉山口海关技术中心, 新疆阿拉山口 833418)

**摘要** [目的]分析不同标准方法中 CaMV 35S 启动子基因筛查方法中引物探针位置关系, 讨论以引物探针序列重组为阳性对照样品的可行性。[方法]收集国内标准方法中 CaMV 35S 启动子基因检测引物探针序列与 CaMV 参考序列比较, 确定其引物探针位置特点。设计不同长度间隔序列的串联引物探针重组序列, 检测其结果差别。[结果]CaMV 35S 启动子基因实时荧光 PCR 检测方法中引物与探针区间隔序列对扩增结果影响甚微。[结论]通过将引物探针序列顺序串联合成重组序列可以作为特定实时荧光 PCR 检测方法的阳性对照。

**关键词** 转基因; CaMV 35S 启动子; 实时荧光 PCR; 阳性样品

中图分类号 Q 785 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)24-0192-04

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2019.24.058



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

## Characteristics and Effects of Primer Probe Sequences in Real-time Fluorescent PCR Detection Method for GMO Products CaMV 35S Promoter Gene

YANG Jie, LI Lan, DAI Li et al (Technical Center of Alashankou Customs, Alashankou, Xinjiang 833418)

**Abstract** [Objective]The research aimed to analyze the position relationship of primer probe in different standard methods for CaMV 35S promoter gene screening detection method, and discuss the feasibility of using primer probe sequence recombination as positive control sample. [Method]The primer and probe sequence of CaMV 35S promoter gene detection in domestic standard methods was compared with the CaMV genome reference sequence, to determine the position characteristics of the primer and probe. [Result]The interval sequence between primers and probes in real-time PCR detection of CaMV 35S promoter gene had little effect on amplification results. [Conclusion]By combining primer probe sequences into recombinant sequences, it can be used as a positive control for specific real-time PCR detection methods.

**Key words** GMO; CaMV 35s promoter; Real-time fluorescent PCR; Positive control sample

随着基因工程技术在遗传育种方面相关的研究中不断加深, 转基因作物开发日渐成熟, 其在世界范围内的应用和种植越来越广泛, 在国际农业发展和经济贸易过程中都起到了举足轻重的作用。根据国际农业生物技术应用服务组织(international service for the acquisition of afri-bio-tech applications, ISAAA)官方数据统计, 截至 2019 年 4 月, 全球各国总计批准了 31 个物种共计 517 个商业化转基因事件的加工或种植, 并且这个数量每年仍有数以十计的数量在不断增长<sup>[1]</sup>。

在一个转化事件的开发过程中, 插入基因片段的构建是工作的核心, 插入片段大都是以一个或多个由启动子-目的基因-终止子构成的转录单元串联而成。目前在世界各国已经通过审批允许贸易、加工和种植的商业化转基因作物中, 花椰菜花病毒(简称 CaMV)35S 启动子是使用最为成熟的外源启动子序列之一。完整的 CaMV 35S 启动子具有在多数植物及部分真菌中均能高效转录的特点, 这使其能够被广泛应用于玉米、大豆、土豆等各种主要粮食及经济作物的基因工程改造工作中<sup>[2]</sup>, 目前根据国际生物安全信息交换所(bio-safety clearing-house, BCH)中的信息记录, 插入基因片段的结构中涉及 CaMV 35S 启动子的转化事件已经多达 368 个<sup>[3]</sup>。

转基因技术不断发展的过程中, 转基因作物及其加工产

品的安全性一直是世界范围内关注的焦点。为了保障各个国家生态环保及社会政治经济等方面的需求, 各国对转基因作物的种植贸易加工都有着不同程度的管理规定, 而是否具备成熟的转基因成分检测标准方法体系就成为这些监管政策是否可以顺利实施的先决条件。由于 CaMV 35S 启动子基因在转基因技术中应用广泛的特点, 通过对食品农产品中 CaMV 35S 启动子基因的筛查成为转基因产品检验方法中应用最为常用的手段, 不同国家和地区对于转基因成分中 CaMV 35S 启动子基因筛查大多建立了国家、地区及行业标准<sup>[4]</sup>。然而不同产品不同范围的检测标准方法中, CaMV 35S 启动子的检测所采用的引物探针序列不尽相同。对于 Taqman 探针实时荧光 PCR 检测而言, 其检测的特异性取决于引物探针序列, 与引物探针结合区域之间的序列无关。该研究旨在通过对目前国内现行有效的 13 个不同对象转基因成分检测标准方法<sup>[5-17]</sup>中 CaMV 35S 启动子基因检测片段的序列特点进行分析, 建立在人工合成引物及探针序列中插入不同长度间隔序列作为比较对象的模型, 通过将这些不同长度的重组序列与阳性物质进行实时荧光 PCR 检测, 比较引物与探针序列之间不同长度插入片段对实时荧光 PCR 检测结果是否产生明确影响, 从而确定仅用引物及探针序列信息进行重组构建的序列作为特定转基因成分检测方法阳性对照模板的可行性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 阳性物质。**试验采用 2016 年由中国检验检疫科学研究院测试评价中心组织的粮食转基因检测能力验证计划(计

**基金项目** 新疆维吾尔自治区国际合作项目(20166012)。

**作者简介** 杨杰(1986—), 男, 新疆乌鲁木齐人, 助理工程师, 从事转基因及微生物检测工作。\* 通信作者, 高级农艺师, 从事实验室管理及出入境植物检疫工作。

**收稿日期** 2019-06-04

划编号:ACAS-PT215)中检出的阳性转基因玉米粉作为阳性物质。

**1.1.2 重组序列及引物、探针。**试验所用重组序列片段、引物序列及水解探针均由北京鼎国生物技术有限公司合成。

**1.1.3 主要试剂。**植物基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司;FastStart Essential DNA Probes Master 预混液购自罗氏诊断产品(上海)有限公司;琼脂糖凝胶及 DNA Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司。

**1.1.4 主要仪器。**Roche LightCycler 96 型实时荧光定量 PCR 仪,ABI 9700 型 PCR 仪。

## 1.2 方法

**1.2.1 CaMV 35S 启动子基因不同检测片段特征分析。**通过 NCBI 检索获得花椰菜花叶病毒全基因组参考序列(编号:

NC\_001497),使用 DNAMAN 软件分析对 SN/T 1198—2013《转基因成分检测 马铃薯检测方法》、GB/T 19495.4—2018《转基因产品检测 实时荧光定性聚合酶链式反应(PCR)检测方法》、农业部 1782 号公告-3-2012《转基因植物及其产品成分检测调控元件 CaMV 35S 启动子、FMV 35S 启动子、NOS 启动子、NOS 终止子和 CaMV 35S 终止子定性 PCR 方法》等 13 个转基因检测标准中 CaMV 35S 启动子基因检测引物及探针序列与参考序列进行比对,确定每个检测片段在基因中的位置,从而分析不同标准检测方法中实时荧光 PCR 的上下游引物及探针之间的间隔序列的长度特征。

**1.2.2 不同长度插入片段的 CaMV 35S 检测阳性重组序列设计与合成。**根据比对结果,分别设计 5 条插入片段长度不同的阳性重组序列,序列信息详见表 1。

表 1 重组序列信息及特征

Table 1 Sequence information and features of recombinant positive sequence

编号 No.	重组序列 Recombinant sequence	序列特征 Sequence feature
C*	GCTCCTACAAATGCCATCATCTCCACT- GACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATC	CaMV35S 基因上游拼接,下游重叠序列
C <sub>0</sub>	GCTCCTACAAATGCCATCATCTCCACT- GACGTAAGGGATGACGCATGACGCACAATCCCACTATC	CaMV35S 基因上下游引物及探针拼接序列
C <sub>1</sub>	GCTCCTACAAATGCCATCAATCTCCACT- GACGTAAGGGATGACGCATGACGCACAATCCCACTATC	CaMV35S 基因上下游引物及探针拼接序列,插入 1 个 A 碱基
C <sub>3</sub>	GCTCCTACAAATGCCATCAAAAATCTC- CACTGACGTAAGGGATGACGCATGACGCACAATCCCACTATC	CaMV35S 基因上下游引物及探针拼接序列,插入 3 个 A 碱基
C <sub>5</sub>	GCTCCTACAAATGCCATCAAAAAATCTC- CACTGACGTAAGGGATGACGCATGACGCACAATCCCACTATC	CaMV35S 基因上下游引物及探针拼接序列,插入 5 个 A 碱基

**1.2.3 阳性重组序列的荧光定量 PCR 检测。**阳性物质基因组的提取按照植物基因组 DNA 提取试剂盒 DP305 说明进行操作,将合成好的阳性重组序列梯度稀释,选择浓度为  $10^{-9}$   $\mu\text{mol/L}$  作为模板与阳性物质基因组一同检测。PCR 反应体系及程序按照 SN/T 1198—2013《转基因成分检测 马铃薯检测方法》中要求进行配置。

## 2 结果与分析

**2.1 CaMV 35S 启动子基因检测引物探针结合序列的特点** 13 个检测标准中 CaMV35S 启动子基因检测的上下游引物及探针序列信息如表 2,由表 2 可见 13 个检测标准中共有 3 个检测片段的选,分别将农业部 1782 号公告-3-2012 等 9 个检测标准中位于参考序列 7 249~7 322 bp 的检测片段记为 CaMV1,SN/T 1198—2013 中位于参考序列 7 191~7 385 bp 的检测片段为 CaMV2,GB/T 19495.4—2018 等 3 个标准中位于参考序列 7 241~7 322 bp 的检测片段标记为 CaMV3。

经比对发现 3 条检测片段有如下特征:①3 条检测片段上游引物与探针序列均在同链,下游引物在互补链;②3 个检测片段区域范围有重合,CaMV1、CaMV3 全长位于 CaMV2 上游引物与探针序列之间;③CaMV1 上游较 CaMV3 短 8 bp,且两者下游引物区相同;④CaMV1 上游引物与探针序列间直接相连,无间隔序列;⑤CaMV2 上游引物与探针序列间插入片段较长,达到 138 bp;⑥CaMV2 探针序列 3' 端与其下游引物

3' 端有 7 个 bp 的碱基互补状况,即探针结合区与下游引物结合区的互补链有部分重合。序列特征情况参见图 1。

由以上特征可以发现在扩增片段中荧光探针的位置选择条件较为宽泛,与同侧引物间最近可直接相连不插入间隔序列,与异侧引物影响更小甚至可以有部分重叠而不影响扩增结果。检测片段上引物与探针序列间隔序列对检测结果影响较小。因此在设计阳性重组序列时,设立了将 SN/T 1198—2013《转基因成分检测 马铃薯检测方法》上游拼接下游重叠序列的重组片段和上下游引物与探针序列间分别间隔 0、1、3、5 bp 的共 5 组阳性重组序列,与阳性物质进行比较插入碱基对检测结果的影响。

**2.2 重组序列 CaMV 35S 启动子实时荧光 PCR 检测结果** 经检测,C\*、C<sub>0</sub>、C<sub>1</sub>、C<sub>3</sub>、C<sub>5</sub> 不同插入片段的 5 条重组阳性与阳性物质中 CaMV 35S 启动子基因均能有效地扩增,无明显差异,扩增曲线见图 2。

## 3 讨论

**3.1 现行标准中 CaMV 35S 启动子基因检测方法可能存在的问题** 比对过程中发现 SN/T 2135—2008《蜂蜜中转基因成分检测方法 普通 PCR 方法和实时荧光 PCR 方法》CaMV 35S 启动子基因实时荧光检测方法上游引物 3' 端与荧光探针 5' 端有一个重叠的碱基 T,由于上游引物与探针均结合同侧链,重叠碱基两者结合时会发生竞争,降低扩增效率,但推测由于仅重叠一个碱基,对结果影响尚小。

表 2 13 个标准方法中 CaMV 35S 启动子基因的检测引物探针序列及位置信息

Table 2 Sequence and position information of 13 CaMV 35S promoter gene standard test methods

标准编号 Standard number	上游引物序列 Upstream primer sequence	探针序列 Probe sequence	下游引物序列 Downstream primer sequence	上游引物位置 Upstream primer position	探针位置 Probe position	下游引物位置 Downstream primer position	检测片段位置 Detect fragment location
SN/T 2584—2010	CGACAGTGGTC-CCAAAGA	TGGACCCCCAC-CCACGAGGAGCATC	AAGACGTGGTTG-GAACGTCTTC	7 249~7 266	7 267~7 291	7 301~7 322	7 249~7 322
SN/T 1202—2010	CGACAGTGGTC-CCAAAGA	TGGACCCCCAC-CCACGAGGAGCATC	AAGACGTGGTTG-GAACGTCTTC	7 249~7 266	7 267~7 291	7 301~7 322	7 249~7 322
SN/T 2705—2010	CGACAGTGGTC-CCAAAGA	TGGACCCCCAC-CCACGAGGAGCATC	AAGACGTGGTTG-GAACGTCTTC	7 249~7 266	7 267~7 291	7 301~7 322	7 249~7 322
SN/T 1816—2013	CGACAGTGGTC-CCAAAGA	TGGACCCCCAC-CCACGAGGAGCATC	AAGACGTGGTTG-GAACGTCTTC	7 249~7 266	7 267~7 291	7 301~7 322	7 249~7 322
SN/T 3959—2014	CGACAGTGGTC-CCAAAGA	TGGACCCCCAC-CCACGAGGAGCATC	AAGACGTGGTTG-GAACGTCTTC	7 249~7 266	7 267~7 291	7 301~7 322	7 249~7 322
SN/T 1201—2014	CGACAGTGGTC-CCAAAGA	TGGACCCCCAC-CCACGAGGAGCATC	AAGACGTGGTTG-GAACGTCTTC	7 249~7 266	7 267~7 291	7 301~7 322	7 249~7 322
SN/T 1196—2018	CGACAGTGGTC-CCAAAGA	TGGACCCCCAC-CCACGAGGAGCATC	AAGACGTGGTTG-GAACGTCTTC	7 249~7 266	7 267~7 291	7 301~7 322	7 249~7 322
农业部 1782 号公告-3-2012	CGACAGTGGTC-CCAAAGA	TGGACCCCCAC-CCACGAGGAGCATC	AAGACGTGGTTG-GAACGTCTTC	7 249~7 266	7 267~7 291	7 301~7 322	7 249~7 322
SN/T 2135—2008	CGACAGTGGTC-CCAAAGAT	TGGACCCCCAC-CCACGAGGAGCATC	AAGACGTGGTTG-GAACGTCTTC	7 249~7 267	7 267~7 291	7 301~7 322	7 249~7 322
SN/T 1198—2013	GCTCCTACAAATGC-CATCA	TCTCCACTGACGTA-AGGGATGACCA	GATAGTGGGATT-GTGGCTCA	7 191~7 209	7 347~7 372	7 366~7 385	7 191~7 385
SN/T 1197—2016	GCCTCTGCCGACAGT-GGT	CAAAGATGGAC-CCCCACCCACG	AAGACGTGGTTG-GAACGTCTTC	7 241~7 258	7 261~7 282	7 301~7 322	7 241~7 322
GB/T 19495.4—2018	GCCTCTGCCGACAGT-GGT	CAAAGATGGAC-CCCCACCCACG	AAGACGTGGTTG-GAACGTCTTC	7 241~7 258	7 261~7 282	7 301~7 322	7 241~7 322
SN/T 1204—2016	GCCTCTGCCGACAGT-GGT	CAAAGATGGAC-CCCCACCCACG	AAGACGTGGTTG-GAACGTCTTC	7 241~7 258	7 261~7 282	7 301~7 322	7 241~7 322



图 1 3 个 CaMV 35S 基因启动子检测方法检测片段的序列信息  
Fig.1 Sequence information of three CaMV 35S promoter detection fragments

SN/T 1198—2013 《转基因成分检测 马铃薯检测方法》中 CaMV 35S 启动子基因实时荧光检测方法上下游引物与常规 PCR 引物序列相同,其实时荧光检测方法可能是在旧版标准 SN/T 1198—2003 中 CaMV 35S 启动子基因常规 PCR 检测方法的基础上,设计加入了荧光探针,因此其检测片段较常见实时荧光 PCR 检测方法的扩增片段较长。另外对于其检测方法中探针区与下游引物区重叠的状况,由于在 PCR 扩增时探针与下游引物分别结合不同单链,因此不会对扩增造成直接影响。但互补的片段可能造成下游引物和探针的配对结合,一方面降低了检测方法的特异性,另一方面也可能导致探针与下游引物非特异性结合,使扩增效率下降,在方法设计中应当避免选择类似片段进行检测。

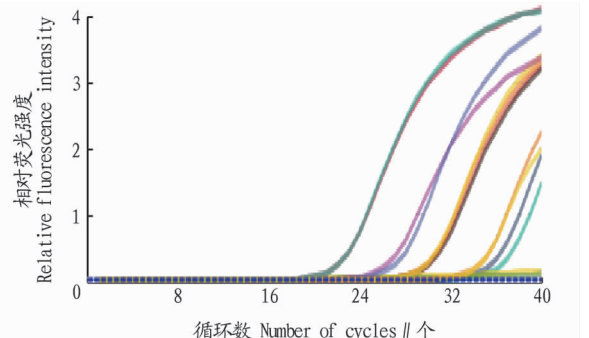


图 2 阳性重组序列与阳性样品 CaMV 35S 启动子检测的实时荧光 PCR 扩增曲线

Fig.2 Fluorescence quantitative PCR amplification curves of CaMV 35S promoter detection of five recombinant positive sequences and positive sample

3.2 通过引物探针序列信息合成重组阳性序列可能影响的因素与基本原则 在 Taqman 水解探针法荧光定量 PCR 检测过程中,检测方法的特异性是由方法中上下游引物序列及探针序列决定的,在扩增片段中引物区和探针区以外的碱基对 PCR 扩增效率的影响较小。可能发生的影响包括:①较长的 PCR 产物长度会受限于 DNA 聚合酶合成速度的影响,需要不同的反应时间,一个检测方法中引物探针碱基总数一般在 80 bp 以下,如果阳性重组片段与产物长度差距过大时,可能对产物延长产生影响;②CG 比值较高的区域 Tm 值也较高,若在非引物及探针区含有部分 CG 比值较高的片段,可

能在退火过程中产生二级结构,从而对引物、探针的结合以及 DNA 的复制产生影响。但这 2 个方面影响与水解探针法荧光定量 PCR 一般的设计原则相违背,发生的情况应当并不多见。首先是 PCR 产物长度应当尽可能短,长度最好为 50~150 bp<sup>[18]</sup>,过长的 PCR 产物可能会影响扩增效率,目前市面上能够获得的 DNA 聚合酶每分钟的复制速度均在 500 bp 以上,因此 30~60 s 的退火延伸时间是足以覆盖目标片段扩增的,从而排除了非引物探针区片段长度对扩增的影响。其次,若非引物探针区片段含有特殊结构,其对扩增的影响大都是不利的,在方法设计之初大多需要避免选择类似序列作为检测片段。

在以引物探针序列信息合成重组序列作为 Taqman 探针实时荧光 PCR 检测方法的阳性对照物质时,应当按照从 5' 至 3' 端依次将上游引物序列、探针序列、下游引物反向互补序列进行顺序拼接即可满足阳性结果扩增的条件。通过 oligoDNA 合成可以直接合成 80 bp 左右的 ssDNA 作为阳性对照直接使用。若重组序列长度达到 100 bp 以上时,常规 oligo 序列合成价格较高,可以将 2 条或多条 ssDNA 通过搭桥 PCR 等方式进行延长,以期达到所设计阳性对照的长度。

**3.3 通过引物探针序列信息合成重组阳性的应用和发展前景** 随着转基因产品国际贸易的日渐普遍,转基因产品的准入、监管要求也有着更加严格的要求,转基因成分检测成分需求也日益增加。实时荧光 PCR 检测作为目前最为成熟的基因检测方法具有检测灵敏度高、检测周期短、可定量检测等显著优势,同时还是开发基因芯片检测等高通量检测方法的试验基础。Taqman 水解探针实时荧光 PCR 相较染料法实时荧光 PCR 而言,特异性更强、适用范围更广。

由于转基因技术的不断进步,新型转基因产品中含有的外源基因也在不断扩展。即使是同一外源基因,不同国家地区的检测方法也不尽相同。传统单一品系的基体转基因阳性样品用作阳性对照试验也很难满足逐渐发展的多样化检测需求。对于目前现行有效的转基因成分检测方法而言,在有内源基因检测保证检测样品基因组提取有效性的前提下,阳性对照样品的主要功能是确保每个外源基因检测的试验条件能够正常运作,对于含有检测目的基因的模板溶液即可产生阳性结果。尤其是对于采取标准定性检测方法开展检测工作时,使用引物探针序列信息重组构建检测阳性对照样品能够更加快速、低廉地建立起一套相对稳定可靠的检测体系。除转基因成分检测以外,对于试验条件有限、经费相对

紧张、检测需求多样的一线检测实验室,引物探针序列重组阳性更加适合稀有或高致病性动植物病原体、珍惜保护动植物检测等传统阳性样品难于取得或生物扩散风险较高的检测工作中。同时该方法也能促进检测工作标准化的实施,保障食品安全、生态安全各个领域执法监督工作的顺利开展。

#### 参考文献

- [1] 国际农业生物技术应用服务组织.全球转基因产品批准情况数据库 [DB/OL].[2019-07-15].<http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp>.
- [2] 张春晓,王文棋,蒋湘宁,等.植物基因启动子研究进展[J].遗传学报,2004,31(12):1455-1464.
- [3] 国际生物安全信息交换所.CaMV35S 启动子基因相关转化事件收录情况 [DB/OL].[2019-07-15].<http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=100287>.
- [4] 汤婷,谢实龙,祝旋,等.CaMV35S 启动子及其在转基因作物中的应用和检测[J].浙江农业学报,2019,31(1):161-170.
- [5] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.水稻及其产品中转基因成分实时荧光 PCR 检测方法:SN/T 2584—2010[S].北京:中国标准出版社,2010.
- [6] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.食品中转基因植物成分定性 PCR 检测方法:SN/T 1202—2010[S].北京:中国标准出版社,2011.
- [7] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.调味品中转基因植物成分实时荧光 PCR 定性检测方法:SN/T 2705—2010[S].北京:中国标准出版社,2011.
- [8] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.转基因成分检测 番茄检测方法:SN/T 1816—2013[S].北京:中国标准出版社,2013.
- [9] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.甜菜中转基因成分检测普通 PCR 方法和实时荧光 PCR 方法:SN/T 3959—2014[S].北京:中国标准出版社,2014.
- [10] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.饲料中转基因植物成分 PCR 检测方法:SN/T 1201—2014[S].北京:中国标准出版社,2016.
- [11] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.转基因成分检测 玉米检测方法:SN/T 1196—2018[S].北京:中国标准出版社,2018.
- [12] 中华人民共和国农业部.转基因植物及其产品成分检测调控元件 CaMV35S 启动子、FMV 35S 启动子、NOS 启动子、NOS 终止子和 CaMV35S 终止子定性 PCR 方法:农业部 1782 号公告—3—2012[S].北京:中国农业出版社,2012.
- [13] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.蜂蜜中转基因成分检测方法 普通 PCR 方法和实时荧光 PCR 方法:SN/T 2135—2008[S].北京:中国标准出版社,2008.
- [14] 国家市场监督管理总局,中国国家标准化管理委员会.转基因产品检测 实时荧光定性聚合酶链式反应 (PCR) 检测方法:GB/T 19495.4—2018[S].北京:中国标准出版社,2018.
- [15] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.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:SN/T 1204—2016[S].北京:中国标准出版社,2017.
- [16] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.转基因成分检测 马铃薯检测方法:SN/T 1198—2013[S].北京:中国标准出版社,2013.
- [17] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.油菜中转基因成分检测普通 PCR 和实时荧光 PCR 方法:SN/T 1197—2016[S].北京:中国标准出版社,2018.
- [18] GIULIETTI A, OVERBERGH L, VALCKX D, et al. An Overview of real-time quantitative PCR: Applications to quantify cytokine gene expression [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 386-401.
- [13] 普冰清,徐怡,杜春华,等.不同茶叶中茶多酚类成分及咖啡碱含量研究[J].食品工业,2017,38(2):301-303.
- [12] 黄业伟,徐欢欢,王素敏,等.不同茶叶中所含结合咖啡因比例的分析[J].云南农业大学学报,2015,30(2):228-233.

(上接第 176 页)