

研究
简报

实时荧光 PCR 技术定量检测转基因大豆方法的研究

吴 影^{1,2} 宋丰顺¹ 陆徐忠¹ 赵 伟¹ 杨剑波¹ 李 莉^{1,*}

(¹ 安徽省农科院水稻研究所,安徽合肥 230031; ² 安徽农业大学生命科学学院,安徽合肥 230036)

摘要: 以转基因大豆 Roundup Ready 为材料,通过特异性引物和探针,对转基因大豆中外源基因 *cp4-epsps* 进行了定量检测。研究发现 Taqman 荧光探针法和 SYBR 荧光染料法均可作为转基因大豆定量检测的方法,但前者比后者具更高的检测灵敏度和精确度,其检测阈值可降到 0.05%,变异系数为 0.09%~0.53%。在此基础上,建立和优化了 Taqman 探针实时荧光定量 PCR 检测技术体系,有助于提高转基因作物及产品的生物安全性定量检测的准确度和可靠性。

关键词: 实时荧光 PCR; 转基因大豆; Taqman 探针; SYBR 染料; 定量检测

Detecting Genetically Modified Soybean by Real-time Quantitative PCR Technique

WU Ying^{1,2}, SONG Feng-Shun¹, LU Xu-Zhong¹, ZHAO Wei¹, YANG Jian-Bo¹, and LI Li^{1,*}

(¹ Rice Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031, Anhui; ² department of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui, China)

Abstract: In this paper, fluorescence-labeled Taqman probes and SYBR dye were chosen to detect the amplified DNA fragments by PCR. Before special primers and probes were used to amplify the exogenous gene *cp4-epsps*, the endogenous gene *Lectin* was detected to avoid the fake negative result. Then, two quantitative systems were optimized. And the standard curve of *Ct* vs. the GM content in the reference materials was generated and a linear regression equation was obtained to quantify GM soybean. The result showed that fluorescence signal appeared at the 24th cycles in Taqman-labeled, while at the 18th cycles in SYBR-labeled. It suggested that a little primer dimmers or other unspecific amplifications had cumulated before objective product formed in SYBR assay. The correlation coefficient ($R^2 = 0.993$) of SYBR assay was lower than that of Taqman ($R^2 = 0.999$). Finally, the two quantitative systems were tested respectively by using known samples with three GM contents. The results indicated that the precision of two systems were high, and the recurrences of the results were fine. Comparing the two quantitative assays, it has higher delicacy and precision in Taqman assay. The inferior limit of detection was less than 0.05%, and the Coefficient Variance was up to 0.09%. A very sensitive quantitative PCR method for the detection of genetically modified (GM) soybean was developed and validated. We also discussed the difference between Taqman assay and SYBR assay on detecting GMOs, and recommend the Taqman assay to use in transgenic product detection, especially in GMO food detection.

Keywords: Real-time PCR; Genetically modified soybean; Taqman probe; SYBR dye; Quantitative detection

随着大量的转基因作物相继在美国、欧盟、加拿大、日本等国家和地区获得批准,其种植面积急剧扩大^[1]。转基因产品的生物安全性以及转基因生物对人类健康和生态环境可能的潜在危害已引起了各国政府和民众的普遍关注,出现了一系列涉及转基因生物及其产品的案件和纠纷^[2-3]。现在许多国家和地区在国际贸易中都十分重视对转基因商品的管理,并出台了许多相应的措施,如对转基因生物产品实施强制性标签制度,规定了食品中转基因成分含量的最低标识限

量等^[5]。对此,作为转基因产品实施标签制度的重要技术支持的定量检测技术显得尤为重要。

实时荧光定量 PCR 技术,是近几年发展起来的一项分子生物学检测技术,由于使用了荧光标记,提高了检测的准确性和灵敏度,勿需对 PCR 产物进行后期处理,避免了交叉污染,克服了以往 PCR 技术中存在的假阳性污染和不能进行准确定量的缺点^[6],也提高了检测速度和自动化程度。目前已经被广泛地应用于疾病和病毒的定量检测^[7-10],基因突

*基金项目:安徽省自然科学基金项目(0341102)

作者简介:吴影(1981-),女,硕士研究生,主要从事植物基因工程研究, Tel:0551-5160535, E-mail: viyen99@yahoo.com.cn

*通讯作者(Corresponding author):李莉(1957-),研究员,硕士生导师,主要从事植物分子生物学研究工作, Tel: 0551-5160535,
Fax: 0551-5160535, E-mail: lili2005@263.net

Received (收稿日期): 2007-01-25; Accepted (接受日期): 2007-04-29.

变检测^[11]、基因表达研究^[12]、转基因食品检测^[13-15]等领域。人们在使用实时荧光定量PCR检测时通常采用荧光探针和荧光染料两种方法,Taqman探针法是在常规PCR反应体系中加入一个特异性的Taqman荧光标记探针,PCR每扩增一条DNA链,就有一个荧光分子形成,即荧光信号的累积与PCR产物形成完全同步,以PCR反应的第3~15个循环的荧光值作为荧光本底信号,以3~15个循环的荧光值增加量 ΔRn 的标准偏差的10倍为荧光阈值,信号达到该荧光阈值时的循环次数(C_t 值)与PCR反应体系中的起始模板量的对数值有严格的线性关系,从而实现定量^[16]。SYBR Green I染料法是利用SYBR染料与双链DNA结合的特性,在PCR反应体系中加入过量SYBR荧光染料,SYBR特异性地掺入DNA双链后,发射荧光信号,而不掺入链中的SYBR染料分子不会发射任何荧光信号,从而保证荧光信号的增加与PCR产物的增加完全同步。目前报道的有关转基因产品的检测中多采用的Taqman荧光探针标记法,很少有SYBR Green I荧光染料标记法方面的研究。本文以分别采用这两种方法进行检测分析,并对其比较和评价,建立转基因大豆的定量检测方法,以期为我国对转基因产品实施定量标识提供有力的技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

转基因成分含量分别为0、0.1%、0.5%、1%、2%、5%的转基因大豆Roundup Ready定量标准品购自Fluka公司。

转基因农作物基因组DNA抽提试剂盒和100 bp DNA Marker购自TaKaRa公司,SYBR Green I荧光染料购于MJ公司,UNG酶(5 U μL^{-1}),Taq DNA聚合酶及其缓冲液、dNTPs、MgCl₂购自Promega公司,其余试剂均为国产分析纯。

MJ Research Opticon 2荧光定量PCR仪。

1.2 方法

1.2.1 豆粉DNA的提取和纯化 称取0.1 g大豆粉末,采用DNA抽提试剂盒提取基因组DNA。并测定其质量和浓度。

1.2.2 PCR引物 大豆内标基因Lectin的引物序列及cp4-epsps基因的引物和探针序列,由TaKaRa公司参照文献[17-18]合成。

Lectin-P1 5'-CTC TTC CCG AGT GGG TGA GGA -3'

Lectin-P2 5'-CGA TTC CCC AGG TAT GTC GA -3'

cp4-epsps-P1 5'-TGA TGT GAT ATC TCC ACT GAC G-3'

cp4-epsps-P2 5'-TGT ATC CCT TGA GCC ATG TTG T-3'

cp4-epsps-probe 5' (FAM)-CCC ACT ATC CTT CGC AAG ACC CT -(TAMRA)-3'

1.2.3 内源基因的定性PCR检测 反应体系含1×PCR buffer、2.0 mmol L⁻¹ MgCl₂、0.1 mmol L⁻¹ dNTP、0.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Lectin引物、100 ng μL^{-1} 模板DNA、Taq DNA聚合酶2 U,加ddH₂O至25 μL 。扩增程序为94℃预变性5 min;94℃变性30 s,62℃退火30 s,72℃延伸30 min,共35个循环;72℃后延伸7

min。以2%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 实时荧光定量PCR检测 反应体系含1×PCR buffer、4.0 mmol L⁻¹ MgCl₂、0.2 mmol L⁻¹(dATP、dGTP、dCTP)、0.4 mmol L⁻¹ dUTP、0.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ primer、0.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Taqman探针(或者1 μL SYBR Green I)、0.5 U UNG酶、2 U Taq DNA聚合酶、100 ng DNA模板,加ddH₂O至25 μL 。MJ Research Opticon 2荧光定量PCR仪上的扩增程序为50℃2 min;95℃10 min;94℃15 s,60℃30 s(对于用SYBR Green I检测要增加72℃30 s),读板,共40个循环。每个试样重复3次,并同时设立无菌双蒸水(空白)和非转基因样品(阴性)对照。

2 结果与分析

2.1 DNA提取的质量及内源基因的检测

经核酸蛋白定量仪测定,提取的DNA的OD260/OD280约为1.8,DNA浓度为300 ng μL^{-1} 。内源Lectin基因的定性PCR检测可以保证PCR反应的质量,避免出现假阴性的检测结果。本文首先对转基因大豆的内源Lectin基因进行了定性PCR检测,确保所提取的DNA能够适合于PCR扩增。图1显示,转基因成分含量分别为0、0.1%、0.5%、1%、2%、5%的转基因大豆,均扩增出了118 bp的内源Lectin基因片段,表明所提取的DNA均适合于PCR扩增。

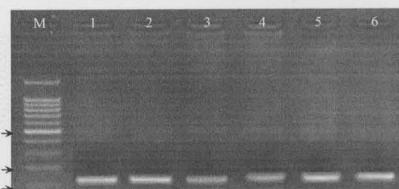


图1 大豆内源Lectin基因的定性PCR检测

Fig.1 The qualitative detection for the endogenous gene Lectin of soybean

M: DNA marker; 1~6: 转基因含量分别为0、0.1%、0.5%、1%、2%、5%的转基因大豆内源Lectin基因PCR产物。

M: DNA marker; 1~6: PCR products of the endogenous gene Lectin from the GM soybean with 0, 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, and 5% transgenic content respectively.

2.2 实时荧光定量PCR体系的优化

在DNA模板量相同的情况下,通过改变探针(或染料)浓度、镁离子浓度或者退火温度,得到的 C_t 值越小,荧光强度越高,说明用较少的循环次数就可产生较高的荧光信号,其反应敏感性较高。以100 ng 1.0%的GM大豆DNA为模板,进行上述3因素的条件筛选试验。其中,探针(或染料)浓度选择0.4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 、0.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 和0.6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (0.5 μL 、1 μL 、1.5 μL)3个水平;镁离子浓度选择3 mmol L⁻¹、4 mmol L⁻¹和5 mmol L⁻¹3个水平;退火温度设置53~64℃12个梯度。结果(图2)显示,Taqman探针法中0.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 探针、4 mmol L⁻¹镁离子和60℃退火温度的反应条件组合中得到的

C_t 值较小; SYBR 染料法中 1 μL SYBR、4 mmol L^{-1} 镁离子和 60℃ 退火温度的反应条件组合中得到的 C_t 值较小。

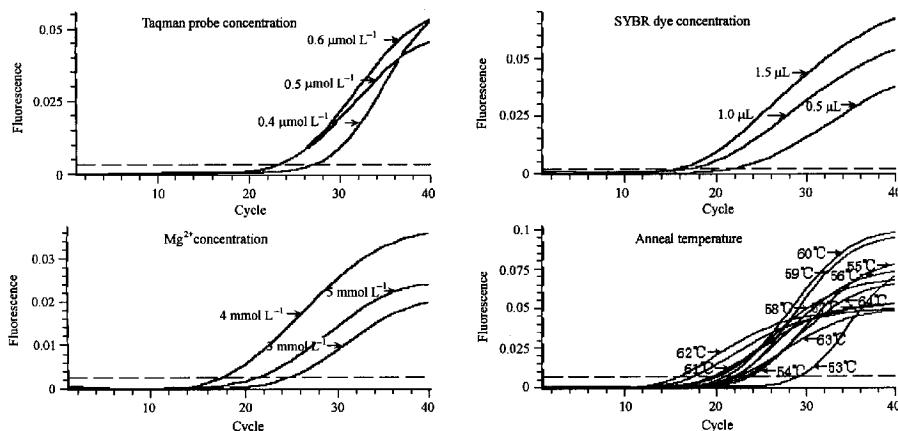


Fig. 2 The optimization of the real-time quantitative PCR system

2.3 定量标准曲线的建立和分析比较

以转基因成分含量分别为 0.0%、0.1%、0.5%、1%、2%、5% 的转基因大豆 DNA 为模板, 按照上述优化的定量检测体系, 以特异的 cp4-epsps 引物和探针(或者 SYBR Green I)进行荧光定量 PCR。计算机软件自动生成标准曲线, 并给出每个样品的 C_t 值。横坐标为 C_t , 纵坐标代表已知浓度的标准品的转基因

因含量的对数。Taqman 探针法检测转基因大豆标准品得到的标准曲线线性方程为 $y = -0.22x + 5.85$, 相关系数为 $R^2 = 0.999$; SYBR Green I 染料法检测转基因大豆标准品得到的标准曲线线性方程为 $y = -0.28x + 6.35$, 相关系数为 $R^2 = 0.993$ (图 3, 图 4)。

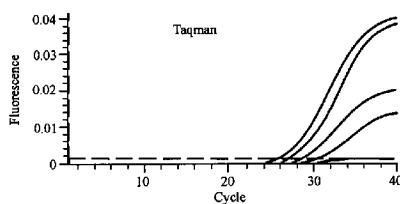


图 3 转基因大豆标准品 cp4-epsps 基因 Taqman 法荧光定量 PCR 扩增曲线及产生的标准曲线
Fig. 3 Quantitative detection and standard curve of GM soybean labeled by Taqman probe

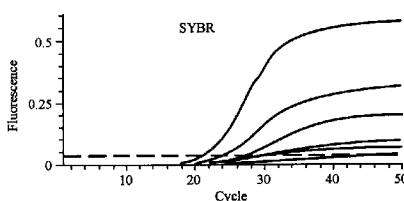
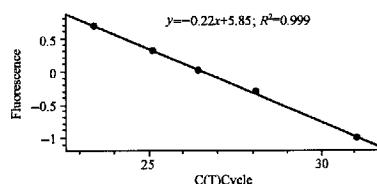


图 4 转基因大豆标准品 cp4-epsps 基因 SYBR 法荧光定量 PCR 扩增曲线及产生的标准曲线
Fig. 4 Quantitative detection and standard curve of GM soybean labeled by SYBR dye

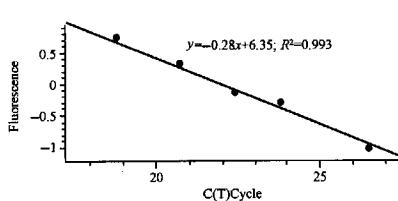


图 3 和图 4 显示在荧光定量 PCR 扩增曲线中, Taqman 法在 24 个循环时出现荧光信号, 而 SYBR 法在 18 个循环时就有荧光信号出现, 表明应用 SYBR 法检测时, 由于 SYBR Green

I 染料的非特异结合的特点, 往往可以在目的片段荧光信号积累之前有少量引物二聚体或其他非特异片段的信号积累, 从而使检测得到的标准曲线的相关系数 ($R^2 = 0.993$) 低于

Taqman 法得到的相关系数 ($R^2 = 0.999$)。

2.4 转基因大豆荧光定量检测方法的分析比较和评价

分别准确称取 0.05 g 的 0 与 0.1% 标准品充分混匀, 得到 0.05% 的转基因标准品; 0.5% 与 1% 标准品充分混匀, 得

到 0.75% 的转基因标准品; 0 与 5% 标准品充分混匀, 得到 2.5% 的转基因标准品。提取 DNA, 应用 Taqman 探针法和 SYBR 染料法进行定量检测, 每个检测样品均设立了 3 个平行反应(图 5)。得到相应的 C_t 值(见表 1)。

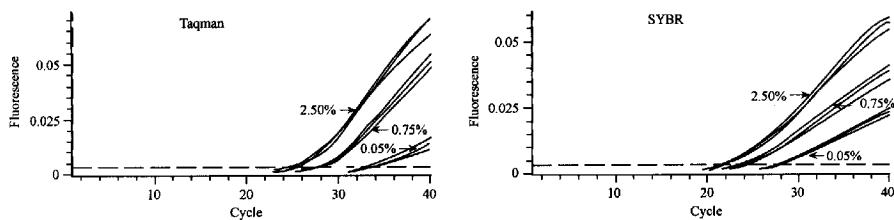


图 5 Taqman 探针法和 SYBR 染料法对转基因大豆 *cp4-epsps* 基因定量检测的 PCR 扩增曲线
Fig. 5 Quantitative detection for GM soybean labeled by Taqman probe and SYBR dye respectively

表 1 Taqman 探针法和 SYBR 染料法对转基因大豆 *cp4-epsps* 基因定量检测的 C_t 值
Table 1 The C_t value of quantitative detection for GM soybean labeled by Taqman probe and SYBR dye respectively

转基因大豆的百分含量 The percent of GM soybean (%)	C_t			\bar{C}_t Standard deviation (SD)	标准偏差 Standard deviation (SD)	变异系数 CV (%)
	1	2	3			
Taqman 探针法	0.05	32.594	32.653	32.634	32.627	0.030
Taqman probe assay	0.75	27.159	27.217	26.945	27.107	0.143
	2.5	24.764	24.738	24.892	24.798	0.082
SYBR Green I 染料法	0.05	26.708	27.106	27.159	26.991	0.247
SYBR dye assay	0.75	23.017	22.782	23.105	22.968	0.167
	2.5	21.184	21.316	21.109	21.203	0.105

根据标准曲线所得的线性计算公式, 将样品的 C_t 值分别代入 $y = -0.22x + 5.85$ (Taqman) 和 $y = -0.28x + 6.35$ (SYBR) 相应的公式中, 即可得到配制的大豆样品的 GMO 含量^[19-20]。Taqman 探针法的检测值为 0.047%、0.77%、2.48%; SYBR 染料法的检测值为 0.062%、0.83%、2.59%。虽然两种检测方法均表现较好的符合性, 但 Taqman 探针法较之 SYBR 染料法更具有精确度高, 检测结果可靠的特点。

3 讨论

应用 Taqman 探针法检测得到的定量检测值与实际值较接近, 且检测的重现性较好, 可靠性较高, 与陈颖等人的实验结果相近^[18]; 应用 SYBR Green I 染料检测法, 往往表现出相对较大的误差, 其原因可能是在 PCR 扩增中存在微量引物二聚体和非目的片段的扩增带来的荧光信号的积累, 造成本底较高, 导致检测结果普遍高于实际值。相对而言, Taqman 探针法更适合应用于转基因作物及产品定量检测。

在 Taqman 探针法检测中, 使用的引物和探针是针对检测的目的基因序列特别设计的, 反应过程中只有与探针特异结合的 DNA 模板才能得到扩增, 产生荧光信号。排除了非特异片段产生荧光信号的干扰, 因而得到的定量检测值与实际值较接近, 且具有很强的特异性, 检测重现性较好, 可靠性较高^[21]。

在 SYBR Green I 染料法检测中, 染料与所有的双链 DNA 相结合, 不需要探针, 检测方法简便; 但它的特异性完全依赖

于引物, 对引物设计要求特别高, 引物二聚体、单链二级结构以及错误的扩增产物都将引起假阳性的出现, 这将严重影响定量检测的精确性和可靠性。虽然有报道指出利用荧光染料可以指示双链 DNA 熔点的性质, 通过温度的变化进行熔解曲线(T_m)分析^[22], 可识别扩增产物和引物二聚体等, 然后在检测的过程中通过提高退火温度, 区分非特异扩增, 从而降低非特异产物的影响。但对转基因产品的定量检测来说, 由于其要求的检测阈值较低, 引物二聚体等非特异性扩增对检测结果的准确性仍然有一定影响, 特别是对于转基因加工产品(如大豆油、饼干等)的检测, 由于经过了加工生产过程, 其目标基因成分可能会遭到严重破坏, 且可能存在许多干扰因素, 更增加了其检测的难度。

同时, SYBR Green I 荧光信号的强弱依赖于双链 DNA 的质量而不是分子数, 即使在扩增效率相同情况下, 长的扩增产物的信号要强于短的扩增产物; 如果扩增效率不同, 那么定量会更不准确。因此, 基于在国际进出口贸易的检测中要求检测结果真实可靠, 避免引起不必要的贸易纠纷, 建议在转基因作物及产品的定量检测中最好采用特异性比较强的探针方法。当然在检测要求不高, 实验条件有限的情况下, 在优化检测条件和严格对照的基础上, 利用 SYBR Green I 染料法也能获得较好的检测效果。

致谢: 本工作得到了汪秀峰、易成新、王云生、张海涛、宣云、皮桃花等老师和同事的支持和帮助, 在此一并表示感谢。

References

- [1] James C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2004. <http://www.iiasaa.org/kc/bin/ESummary/index.htm>
- [2] Yao J-R(姚建仁), Peng Y-F(彭于发), Dong F-S(董丰收), Zhao J(赵静), Zheng Y-Q(郑永权). International organizations pay close attention to the safety of food from transgenic crops. *Sci Technol Rev(科技导报)*, 2002, 8: 43-46 (in Chinese)
- [3] Jia S-R(贾士荣). The nature of current debate on biosafety of genetically modified crops. *Biotechnol Inform(生物技术通报)*, 1999, 6: 1-8 (in Chinese with English abstract)
- [4] Jin H(金红). Progress of labeling administration and detection techniques of transgenic agricultural products and GMO. *Tianjin Agric Sci(天津农业科学)*, 2002, 8(4): 48-53 (in Chinese with English abstract)
- [5] EC Regulation 1998/1139. Council regulation (EC) No 1139/98 of May 26, 1998 Concerning the Compulsory Indication of the Labeling of Certain Foodstuffs Produced from Genetically Modified Organism of Particulars other than Those Provided for in D 79/112/EEC. Brussels, Belgium, L159; 4-7
- [6] Zhang L-G(张立国), Zhang J(张璐). The introduction of real-time quantitative PCR technique. *Biotechnology(生物技术)*, 2003, 13(2): 39-40 (in Chinese)
- [7] Ou-Yang S-Y(欧阳松应), Yang D(杨冬), Ou-Yang H-S(欧阳红生), Ma H-W(马鹤曼). The application of real-time quantitative PCR technique. *Chem Life(生命的化学)*, 2004, 24(1): 74-76 (in Chinese)
- [8] Han J-Y(韩俊英), Zeng R-P(曾瑞萍). Real-time quantitative PCR technique and application. *Foreign Med Sci: Genet Section(国外医学: 遗传学分册)*, 2000, 23(3): 117-120 (in Chinese)
- [9] Kaplan J C, Kahn A, Chelly J. Illegitimate transcription: Its use in the study of inherited disease. *Hum Mutat*, 1992, 1(3): 357-360
- [10] Brechbuehl K, Whalley S A, Duusheko G M. A rapid real-time quantitative polymerase chain reaction for hepatitis B virus. *J Virol Methods*, 2001, 93(1): 105-113
- [11] Yagi S, Bratu D P, Kramer F R. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nat Biotechnol*, 1998, 16(1): 49-53
- [12] Yajima T, Yagihashi A, Kameshima H. Quantitative reverse transcription-PCR assay of the RNA component of human telomerase using the TaqMan fluorogenic detection system. *Clin Chem*, 1998, 44 (12): 2441-2445
- [13] Mayre R. Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOS in food. *Food Contr*, 1999, 10: 391-399
- [14] Hubner P, Waiblinger H U, Pietzsch K, Brodmann P. Validation of PCR methods for quantitation of genetically modified plants in food. *J AOAC Int*, 2001, 84: 1855-1864
- [15] Wiseman G. State of the art and limitations of quantitative polymerase chain reaction. *J AOAC Int*, 2002, 85: 1-5
- [16] Ma R-Q(马莱群), Chen H-Y(陈红运), Huang W-S(黄文胜), Zhu S-F(朱水芳). The real-time PCR method for the detection of GMO products. *Plant Quarantine(植物检疫)*, 2002, 16(1): 61-64 (in Chinese)
- [17] Luo Y-B(罗云波), Huang K-L(黄昆仑), Zhang D-B(张大兵), Jia S-R(贾士荣), Peng Y-F(彭于发), Jin W-J(金光军), Lin N(李宁), Wang Q-H(汪其怀). Detection of genetically modified plant organisms and derived products—Qualitative PCR methods for soybeans. China Agricultural Trade Standard(中华人民共和国农业行业标准), NY/T 675-2003 (in Chinese)
- [18] Chen Y(陈颖), Xu B-L(徐宝梁), Su N(苏宁), Wang Y(王媛), Wang B-W(王丙武), Ge Y-Q(葛毅强). Real-time quantitative polymerase chain reaction methods for genetically modified soybean. *Food & Fermentation Industries(食品与发酵工业)*, 2003, 29(8): 65-69 (in Chinese with English abstract)
- [19] Chen Y(陈颖), Xu B-L(徐宝梁), Su N(苏宁), Ge Y-Q(葛毅强), Wang S-G(王曙光). Real-time quantitative PCR detection of genetically modified Maximizer® Maize and YieldGard® Maize. *Acta Agron Sin(作物学报)*, 2004, 30(6): 602-607 (in Chinese with English abstract)
- [20] Pan L-W(潘良文), Chen J-H(陈建华), Luo D(罗达), Yu D-Y(喻德跃), Feng X-Z(冯獻忠). Quantitative detection of genetically modified Bt176 maize in maize powder. *J Plant Physiol Mol Biol(植物生理与分子生物学学报)*, 2002, 28(6): 463-467 (in Chinese with English abstract)
- [21] Song P, Cai C Q, Skokol M. Quantitative real-time PCR as a screening tool for estimating transgene copy number in WHISKERS™ derived transgenic maize. *Plant Cell Rep*, 2002, 20: 948-954
- [22] Ririe K M, Rasmussen R P, Wittwer C T. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem*, 1997, 245: 154-160

欢迎订阅 2008 年《植物遗传资源学报》

《植物遗传资源学报》是中国农业科学院作物科学研究所和中国农学会主办的专业性学术期刊，全国优秀农业期刊，由中国农科院副院长刘旭先生担任主编。报道内容为大田、园艺作物，观赏、药用植物，林用植物、草类植物及其一切经济植物的有关植物遗传资源基础理论研究、应用研究方面的研究成果、创新性学术论文和高水平综述或评论。诸如，种质资源的考察、收集、保存、评价、利用、创新、信息学、管理学等；起源、演化、分类等系统学；基因发掘、鉴定、克隆、基因文库建立、遗传多样性研究。

该刊为中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)、中国科学引文数据库来源期刊(核心期刊)、中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊，被《中国生物学文摘》和中国生物学文献数据库、中文科技期刊数据库收录。据中国期刊引证研究报告统计(扩刊版)统计，2006 年度《植物遗传资源学报》影响因子为 0.872。

《植物遗传资源学报》为季刊，大 16 开本，128 页/期。定价 20 元/期，全年 80 元。国内刊号 CN 11-4996/S，国际统一刊号 ISSN 1672-1810。各地邮局发行，邮发代号：82-643。

本刊编辑部常年办理订阅手续，如需邮挂每期另加 3 元。

地址：北京市中关村南大街 12 号 中国农业科学院《植物遗传资源学报》编辑部(邮编：100081)

电话：010-62180257；62180279(兼传真)

E-mail：zwyczyxb2003@163.com; zwyczyxb2003@sina.com