

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2023.03.02

鼠源细胞 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立

苏佳, 赵炜, 秦义娴, 邓永, 高月异, 白洪旭, 薛青红, 陈晓春*, 吴华伟*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2022-09-21 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2023) 03-0010-07 [中图分类号] Q78

[摘要] 为对鼠源细胞进行鉴别检测, 以鼠线粒体 16S rRNA 基因序列为靶位点设计特异性引物及探针, 建立实时荧光定量 PCR 检测方法, 并评价该方法的特异性及敏感性。结果显示, 所建立的检测方法特异性好, 针对鼠源细胞基因组荧光定量 PCR 扩增曲线良好, 其他物种来源细胞基因组及生物制品原辅材料未出现特异性扩增曲线; 敏感性高, 基因拷贝数检出限为 45.3 拷贝。本试验建立的荧光定量 PCR 检测方法能够有效地对鼠源细胞进行快速检测, 为细胞质量控制提供了有效方法。

[关键词] 鼠源细胞; 荧光定量 PCR; 线粒体 16S rRNA; 检测

Establishment of a TaqMan Real-time PCR Assay for Detection of Murine Derived Cells

SU Jia, ZHAO Wei, QIN Yi-xian, DENG Yong, GAO Yue-yi, BAI Hong-xu,

XUE Qing-hong, CHEN Xiao-chun*, WU Hua-wei*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding authors: CHEN Xiao-chun, E-mail: chunxiao1981@126.com. WU Hua-wei, E-mail: 314174205@qq.com.

Abstract: To establish a fluorogenic quantitative PCR method, which could identify the cells of murine origin, specific primers along with probe were designed with the mitochondrial 16S rRNA gene sequence of murine, and the specificity alongwith sensitivity of the method were evaluated. The established detection method could specially detect murine cells without detecting any other animal cells along with raw and secondary materials of biological products. The detection limit of 16S rRNA gene copy number is 45.3 copies. The established fluorescence quantitative PCR detection method can effectively detect murine derived cells rapidly, providing an effective method for cell quality control.

Key words: murine cells; fluorogenic quantitative PCR; mitochondrial 16S rRNA; detection

基金项目: 兽药行业公益性重点专项(GY202008)

作者简介: 苏佳, 助理研究员, 从事兽用生物制品检验及相关研究工作。

通讯作者: 陈晓春, E-mail: chunxiao1981@126.com; 吴华伟, E-mail: 314174205@qq.com

实验细胞资源是目前兽用生物制品研制、生产与检验中应用最广泛、最重要的实验工具之一,使用背景清楚的细胞是控制兽用生物制品质量的关键。不同类型的细胞在制备、扩繁及使用等过程中,经常会发生交叉污染^[1]。如曾报道的 Hela 细胞与不同类型细胞的交叉污染^[2],有学者 2010 年公布了 360 种被种间交叉污染或错误认定的人源细胞系^[1],北京协和细胞资源中心发布其保藏的 6 个非人源细胞系的种属鉴定结果与预期种属不符(共检测 160 个细胞系)^[3]。

有效判断细胞的种属来源和确保细胞在制备及体外操作等过程中无不同种属间细胞交叉污染,是细胞质量控制的重要内容之一^[4-5]。目前,《中华人民共和国兽药典》(2020 年版)^[5]和最新的 WHO^[4]对于细胞种属鉴定及排除细胞间交叉污染的方法,主要是胞核学检验、染色体分析、STR 图谱和同工酶图谱分析法,然而这些方法操作复杂、耗时久,且对技术水平要求较高。因此,建立一种简易、高效、灵敏的快速鉴定细胞种属的鉴别方法,用

于细胞系种属间交叉污染初筛检验,对于细胞系质量把控具有重要意义。

荧光定量 PCR 作为一种快速、灵敏的诊断方法已广泛应用于病原检测、分子诊断、分子生物学研究、动植物检疫以及食品安全检测等方面^[6-8]。目前有关鼠源细胞的快速鉴定方法还未见报道,结合线粒体 16S rRNA 在不同种属动物间进化保守性差异较大、种属内变异性较低的特点^[9],本研究拟以鼠线粒体 16S rRNA 基因为靶位点设计特异性引物及探针,建立基于荧光定量 PCR 技术的鼠源细胞快速鉴别方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 本研究中除鸡胚成纤维细胞(Chick Embryo Fibroblast, CEF)外的细胞均由中国兽医药品监察所保存(表 1)。从勃林格购买 SPF 鸡胚,按照药典制备 CEF。各细胞用胰酶消化后 1500 r/min 离心 10 min 取细胞沉淀,台盼蓝染色后计数,用磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline, PBS)稀释成 10⁵/μL, -20 ℃ 保存备用。

表 1 研究中使用的细胞
Tab 1 List of the cell lines used

编号	细胞	种属
1	非洲绿猴胚胎肾细胞(Meat Animal Research Center - 145, MARC145)	猴
2	罗猴胚胎肾细胞(Microbiological Associates - 104, MA104)	猴
3	非洲绿猴肾细胞(Verda Reno, VERO)	猴
4	猪睾丸细胞(Swine Testis cell, ST)	猪
5	猪肾细胞(Porcine Kidney cell, PK)	猪
6	新生牛鼻甲细胞(Bovine Turbinate cell, BT)	牛
7	犬肾细胞(Madin - Darby Canine Kidney cell, MDCK)	犬
8	猫肾细胞(Crandell - Rees Feline Kidney cell, CRFK)	猫
9	山羊子宫内膜细胞(Endometrial Epithelial cell, EEC)	羊
10	幼年仓鼠肾细胞(Baby Hamster Kidney cell, BHK)	鼠
11	鸡胚成纤维细胞(Chick Embryo Fibroblast, CEF)	鸡
12	鸡胚成纤维细胞(Douglas Foster - 1, DF - 1)	鸡

1.1.2 生物制品原辅材料 胎牛血清(PAN,Cat#:ST30-3302)、小牛血清(Hyclone,Cat#:SH30406.05)、5%蔗糖(Solarbio,Cat#:S8271)、10%脱脂乳(BD,Cat#:232100)、2%BSA(Sigma,Cat#:B2064)、胰酶(Gibco,Cat#:25200-056)、M199(Gibco,Cat#:C11150500BT)、MEM(Gibco,Cat#:11095-080)、DMEM(Gibco,Cat#:C11995500BT)。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 根据 GenBank 上公布的猴、猪、牛、犬、猫、羊、鼠及鸡 8 种动物线粒体 16S rRNA 基因序列,经 BLAST 比对分析,针对鼠特异性碱基位点分别设计特异性引物及探针。引物和探针由北京六合华大基因科技有限公司合成。

1.2.2 DNA 提取 分别取 100 μL 各细胞悬液或生物制品原辅材料,使用离心柱式组织基因组 DNA 小量抽提试剂盒(Qiagen,Cat#:69506)基于全自动核酸提取仪(Qiagen)自动提取 DNA。提取的总 DNA 样品溶于 50 μL 洗脱液中,于 -20℃ 保存备用。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 反应体系和反应条件 参考 2×Fast qPCR Mix(Probe)(Biomed,Cat#:MT530)推荐的反应体系和反应条件,固定反应体系和模板浓度,综合考虑 Ct 值、荧光强度,确定最终反应体系与反应条件。20 μL 反应体系:2×Fast qPCR Mix 10 μL,10 μmol/L 上游引物 0.8 μL,10 μmol/L 下游引物 0.8 μL,10 μmol/L 探针 0.2 μL,模板 3 μL,ddH₂O 5.2 μL。反应条件:95℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 10 s,60℃ 退火 35 s,收集荧光信号,40 个循环。

1.2.4 特异性试验 分别以提取的各细胞悬液或生物制品原辅材料 DNA 为模板,采用建立的实时

荧光定量 PCR 方法进行扩增,同时设立双蒸水对照,分析所建立检测方法的特异性。

1.2.5 标准曲线的建立及敏感性试验 根据金色大鼠线粒体基因(序列号:NC_013276.1)合成所设计的特异性引物扩增区域,将其连接至 pMV 载体,构建标准品质粒。使用超微量核酸蛋白检测仪测定标准品质粒浓度,按照公式 $N = (\text{质粒浓度}(\text{ng}/\mu\text{L}) \times 10^{-9} \times 6.02 \times 10^{23}) / (\text{重组质粒碱基数} \times 660)$ 计算重组质粒拷贝数为 $1.51 \times 10^8 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 。将重组质粒 10 倍系列稀释,获得拷贝数为 $1.51 \times 10^7 \sim 1.51 \times 10^0 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 等 8 个稀释度的重组质粒作为标准阳性模板,以优化的反应条件进行实时荧光定量 PCR 检测,确定其灵敏度,绘制标准曲线。

此外,将 $10^5/\mu\text{L}$ 的 BHK 细胞原液用 PBS 进行 10 倍系列稀释,取 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 及 10^{-7} 稀释度的样品各 100 μL,提取细胞 DNA 后进行检测,判定所建立检测方法对不同数量 BHK 细胞的检出率。

1.2.6 人工污染试验 为了验证所建立的方法是否可用于其他种属细胞污染鼠源细胞的检测,进行人工模拟细胞种源污染试验。BHK 细胞和猴、猪、牛、犬、猫、羊、鸡等物种来源细胞分别传代后使用台盼蓝染色法计数,将 10 个、5 个 BHK 细胞分别加入到 10000 个其他物种细胞中,定容到 100 μL,提取细胞 DNA,采用所建立的实时荧光定量 PCR 方法进行检测。

2 结果与分析

2.1 引物设计与合成 根据猴、猪、牛、犬、猫、羊、鼠及鸡 8 种动物线粒体 16S rRNA 基因序列比对结果,针对鼠设计特异性引物及探针,具体见表 2。

表 2 引物和探针序列
Tab 2 Primers and probes

引物和探针	序列(5'-3')
Murine-16S rRNA-F	AAGACGAGAAGACCTTGGACTTTA
Murine-16S rRNA-R	GATTGCGCTGTTATCCCTAGGGTA
Murine-16S rRNA-P	FAM-CCGAATGATTATAACCTAGACTTACAAGTC-BHQ1

2.2 特异性检测结果 特异性试验结果显示,所设计的针对鼠的特异性引物和探针只有与鼠源细胞基因组 DNA 反应才会有典型 S 型扩增曲线,与

其余动物源细胞、生物性材料和双蒸水反应无典型扩增曲线、无非特异性扩增(图 1),说明建立的检测方法特异性好。

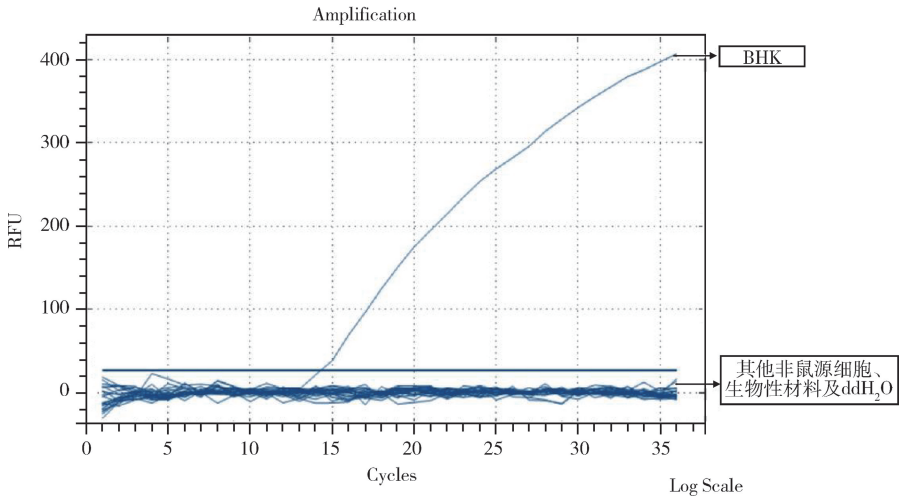
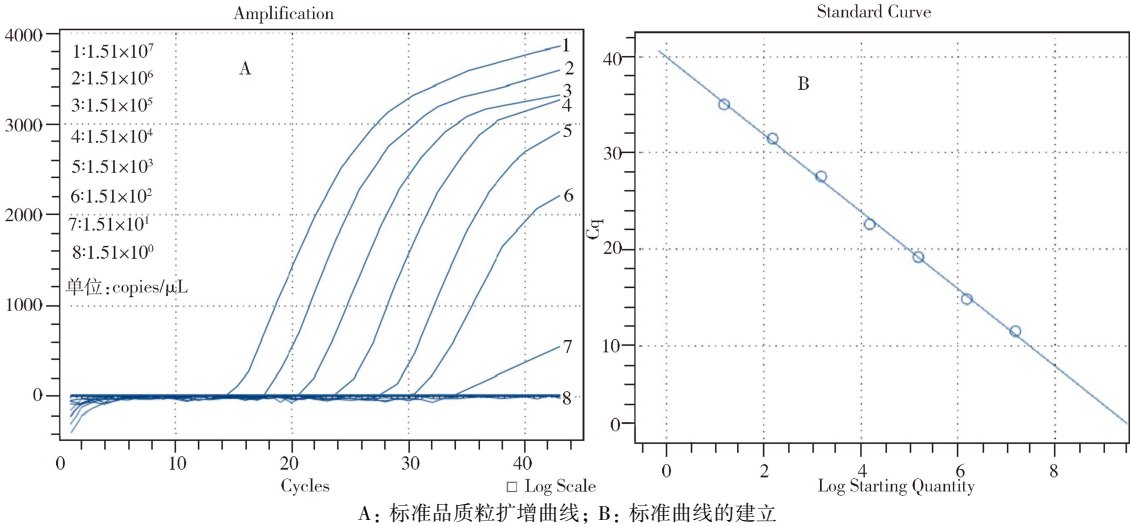


图 1 实时荧光定量 PCR 特异性检测

Fig 1 Specificity test for the real time PCR assay

2.3 标准曲线的建立 以 10 倍系列稀释的标准品质粒做模板,进行荧光定量 PCR,获得相应的 Ct 值,以 Log(拷贝数)为横坐标、Ct 值为纵坐标绘制

标准曲线。标准曲线如图 2A,2B 所示:相关系数 $R^2=0.997$,标准曲线方程 $Y=-3.313X+37.819$,其中 Y 为 Ct,X 为 Log(拷贝数)。



A: 标准品质粒扩增曲线; B: 标准曲线的建立

A: Amplification curves of standard plasmids; B: Establishment of a standard curve

图 2 实时荧光定量 PCR 敏感性检测及标准曲线的建立

Fig 2 Sensitivity test and standard curve generation for real time PCR assay

2.4 敏感性检测结果 经检测,所建立的荧光定量 PCR 方法基因拷贝数检出浓度为 15.1 拷贝/μL(图 2A),反应体系中共加入 3 μL 模板,因此检出限度为 45.3 拷贝。此外,将 BHK 细胞

按 10 倍系列稀释,提取基因组 DNA 进行检测,扩增曲线见图 3,各稀释度 BHK 细胞的检测 Ct 值见表 3。结果显示,所建立的方法能够检测 10 个 BHK 细胞。

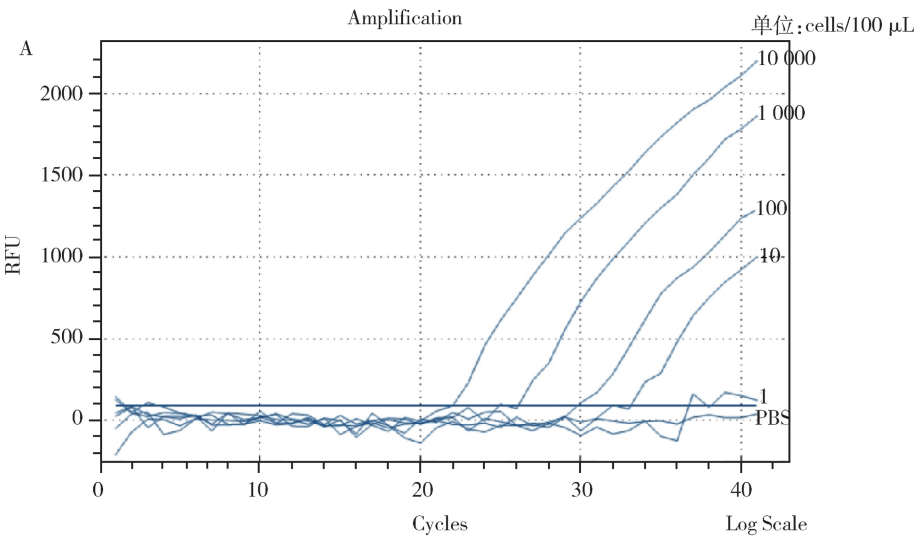


图 3 系列稀释的 BHK 细胞的扩增曲线

Fig 3 Amplification curves of gradient diluted BHK cells

表 3 系列稀释的 BHK 细胞的 Ct 值

Tab 3 Ct values of gradient diluted BHK cells							
细胞浓度 /(100 · μL ⁻¹)	10000	1000	100	10	1	PBS	
Ct 值	22.07	26.16	29.90	33.18	NA	NA	
NA:未检测到 Ct 值							

2.5 人工污染试验 通过将 5 个、10 个 BHK 细胞分别加入到 10000 个其他物种细胞中,提取细胞 DNA 进行荧光定量 PCR 检测的结果显示,针对混合 10 个 BHK 细胞的样品,其 Ct 值 <35,且扩增曲线较典型,判定为阳性,混合 5 个 BHK 细胞的样品不能有效检测(表 4)。

3 讨论

不同种属细胞间的交叉污染是影响细胞质量控制的重要因素,使用交叉污染的细胞得到的研究结果不可信且浪费资源^[10]。国外学者报告,在使用中的细胞有 15% ~20% 已经不是原来的细胞系或者与其他细胞系发生了交叉污染^[11];国内学者分析了来自 113 个研究机构的 380 例细胞系,种属间交叉污染达 28% (95/380)^[12];世界上多个细胞资源中心,如美国 ATCC、欧洲 ECACC、德国 DSMZ、瑞尔医学研究所、日本细胞库和北京协和细胞资源中心都报道过其保藏的部分细胞为“错误”细胞系^[3, 13-14]。

表 4 检测人工将 BHK 细胞污染不同动物来源细胞的 Ct 值

Tab 4 Ct values of artificial contamination of BHK cells with different animal – derived cells		
细胞类型	Ct 值	
	人工污染 5 个 BHK 细胞	人工污染 10 个 BHK 细胞
MARC – 145	38.61	32.61
MA104	39.41	33.83
VERO	38.26	34.12
ST	38.53	34.01
PK	0	34.31
BT	38.04	34.16
MDCK	38.51	33.66
CRFK	37.16	34.29
EEC	0	34.24
CEF	38.46	34.31
DF – 1	39.79	32.26

目前,主要依靠胞核学检验、染色体分析、STR 图谱和同工酶图谱分析法进行细胞种属鉴别或种属间交叉污染检测,但相关试验操作繁琐、耗时长,且敏感性较低、相关材料昂贵^[4-5]。因此,人们一直在寻找简单快速的 PCR 和荧光定量 PCR 方法^[15-16]。鉴于线粒体 DNA 具有快速进化及缺少重组等特点,加之在脊椎动物中,线粒体基因组较小、易于测序及分析,因此,目前线粒体 DNA 已成

为鉴定物种来源的理想对象^[17-18]。脊椎动物线粒体基因组含有 13 个蛋白质基因(细胞色素 b 基因与细胞色素 C 氧化酶三个亚基基因在不同脊椎动物间最保守, 同源性最高)、22 个 tRNA 基因, 2 个 rRNA (12S rRNA 和 16S rRNA) 和非编码区^[19]。基于线粒体细胞色素 b 基因, Dooley 等^[20] 分别建立了牛、猪、羊、鸡和火鸡的实时荧光定量 PCR 检测方法, 何玮玲等^[21] 报道了区分猪、牛、羊和鸡的多重 PCR 检测方法, 韩志玲等^[22] 发表了牛、猪、鼠、人、犬、非洲绿猴和仓鼠等 7 种不同种属来源细胞的 PCR 鉴定方法; 基于线粒体 12S rRNA 基因, Girish 等^[23] 应用 PCR-RFLP 成功鉴定了牛、水牛、绵羊及山羊, 陈冬等^[24] 建立了鉴别牛种来源的 PCR 检测方法; 基于 16S rRNA, 张晶鑫等^[25] 建立了灵敏度在 DNA 水平可达 pg 级的鸭源肌肉 DNA 荧光定量 PCR 方法, Ghovvati 等^[26] 报道了可以对反刍动物、家禽和猪进行鉴别的多重 PCR 技术。各学者所建立的方法各有优缺点, 考虑到鼠源细胞在科学研究及应用中的重要作用, 本研究以一级结构相对保守的线粒体 16S rRNA 基因为靶标建立了鉴别鼠源细胞的荧光定量 PCR 方法。

本研究所建立的荧光定量 PCR 方法, 在反应体系中加入特异性荧光标记的探针, 机器直接探测、收集反应过程中荧光信号的变化, 从而实现扩增产物的定量, 避免了扩增后二次开盖检测, 大大降低了污染的可能性, 而鉴别鼠等 10 种不同物种种属来源细胞交叉污染的 PCR 方法, 操作较繁琐、费时^[27]; 此外, 该方法敏感性较高, 检出限度为 45.3 拷贝; 在生物制品生产中, 生产和检验用细胞如果存在有效的鼠源细胞污染, 其污染量是巨大的, 而在人工污染试验中, 所建立方法可检出其他种属细胞中 10 个 BHK 细胞的污染。因此, 本研究建立的荧光定量 PCR 方法可以应用于实际细胞生物制品中鼠源细胞的检测。

综上, 建立的荧光定量 PCR 检测方法能够有效地对鼠源细胞进行快速检测, 为细胞质量控制提供了基础。本研究在建立方法的过程中即同时对单位菌种保藏中心的细胞进行了检测, 除鼠源 BHK

细胞外, 其他猴、猪、牛、犬、猫、羊及鸡来源细胞检测结果都为阴性, 本研究后续将进一步对来源于不同单位的细胞进行检测。

参考文献:

- [1] Capes D A, Theodosopoulos G, Atkin I, *et al.* Check your Cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines [J]. *International Journal of Cancer*, 2010, 127(1): 1.
- [2] Culliton B J. He La cells: contaminating cultures around the world [J]. *Science*, 1974, 184(4141): 1058.
- [3] 卞晓翠, 杨振丽, 左春霞, 等. 160 例非人源细胞系的种间交叉污染情况分析 [J]. *基础医学与临床*, 2018, 38(5): 632-637.
- Bian X C, Yang Z L, Zuo C X, *et al.* Analysis of inter-species cross-contamination in 160 non-human cell lines [J]. *Basic & Clinical Medicine*, 2018, 38(5): 632-637.
- [4] World Health Organization. Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks. Technical Report Series 978, Annex 3 [S]. 2010.
- [5] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2020 年版三部 [S]. Chinese Veterinary Pharmacopoeia Commission. The Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China (Volume III, 2020) [S].
- [6] Liang H, Geng J, Bai S, *et al.* TaqMan real-time PCR for detecting bovine viral diarrhea virus [J]. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 2019, 22(2): 405-413.
- [7] Sunaga F, Tsuchiaka S, Kishimoto M, *et al.* Development of a one-run real-time PCR detection system for pathogens associated with porcine respiratory diseases [J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2020, 82(2): 217-223.
- [8] Harshitha R, Arunraj D R. Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification [J]. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 2021, 49(5): 800-812.
- [9] Harrison J S. Evolution, biogeography and the utility of mitochondrial 16 S and COI genes in phylogenetic analysis of the crab genus *Austinxia* (Decapoda: Pinnotheridae) [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2004, 30: 743-754.
- [10] Katsnelson A. Biologists tackle cells' identity crisis [J]. *Nature*, 2010, 465(7298): 537.
- [11] Freshney R I. Database of misidentified cell lines [J]. *International Journal of Cancer*, 2010, 126(1): 302.
- [12] Ye F, Chen C G, Qin J, *et al.* Genetic profiling reveals an

- alarming rate of cross – contamination among human cell lines used in China [J]. *FASEB Journal*, 2015, 29(10): 4268 – 72.
- [13] Canny G. Cell line contamination and misidentification [J]. *Biology of Reproduction*, 2013, 89(3): 76.
- [14] Macleod R A F, Dirks W G, Drexler H G. Where have all the cell lines gone? [J]. *International Journal of Cancer*, 2013, 132(5): 1232.
- [15] Singh C, Roy – Chowdhuri S. Quantitative Real – Time PCR: Recent Advances [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2016, 1392: 161 – 76.
- [16] Saez R, Sanz Y, Toldra F. PCR – based fingerprinting techniques for rapid detection of animal species in meat products [J]. *Meat Science*, 2004, 66(3): 659 – 665.
- [17] 宋洁, 张小芳, 刁雪涛, 等. 线粒体 DNA 12S rRNA、16S rRNA 研究进展 [J]. *安徽农学通报*, 2008, 14(9): 42 – 43.
- Song J, Zhang X F, Diao X T, *et al.* Research progress of mitochondrial DNA 12S rRNA and 16S rRNA [J]. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 2008, 14(9): 42 – 43.
- [18] Gao T X, Li J, Wang Q Y, *et al.* Sequence analysis on mitochondrial 16S rRNA gene in *Fenneropenaeus chinensis* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2003, 10(5): 59 – 62.
- [19] 翟中和, 王喜忠, 丁明孝, 编. 细胞生物学 [S]. 高等教育出版社, 2011.
- Zhai Z H, Wang X Z, Ding M X. *Cell Biology* [S]. Higher Education Press, 2011.
- [20] Dooley J J, Paine K E, Garrett S D, *et al.* Detection of meat species using Taq Man real – time PCR assays [J]. *Meat Science*, 2004, 68(3): 431 – 438.
- [21] 何玮玲, 张驰, 杨静, 等. 食品中 4 种肉类成分多重 PCR 的快速鉴别方法 [J]. *中国农业科学*, 2012, 45(9): 1873 – 1880.
- He W L, Zhang C, Yang J, *et al.* A Quick Multiplex PCR Method for the Identification of Four Meat Ingredients in Food Products [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45(9): 1873 – 1880.
- [22] 韩志玲, 郝鹏, 商晓桂, 等. 7 种不同种属来源细胞的 PCR 检测方法与应用 [J]. *畜牧与兽医*, 2019, 51(4): 87 – 91.
- Han Z L, Hao P, Shang X G, *et al.* PCR detection and its application for cells of seven different species [J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2019, 51(4): 87 – 91.
- [23] Girish P S, Anjaneyulu A S R, Viswas K N, *et al.* Meat species identification by polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism (PCR – RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene [J]. *Meat Science*, 2005, 70(1): 107 – 112.
- [24] 陈冬, 柏凡, 周明亮, 等. 基于线粒体 12S rRNA 基因鉴别混合牛肉及制品的牛种来源 [J]. *遗传*, 2008, 30(8): 1008 – 1014.
- Chen D, Bai F, Zhou M L, *et al.* Differentiation of *Bos grunniens*, *Bos Taurus*, and *Bubalus* from meat products mixture based on mitochondrion 12S rRNA gene [J]. *Hereditas*, 2008, 30(8): 1008 – 1014.
- [25] 张晶鑫, 樊艳凤, 唐修君, 等. 基于线粒体 DNA 16S rRNA 基因鉴别畜禽肉中鸭源性成分研究 [J]. *中国家禽*, 2016, 38(17): 41 – 44.
- Zhang J X, Fan Y F, Tang X J, *et al.* Identification of duck origin ingredients in livestock and poultry meat based on mitochondrion 16S rRNA gene [J]. *China Poultry*, 2016, 38(17): 41 – 44.
- [26] Ghovvati S, Nassiri M R, Mirhoseini S Z, *et al.* Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay [J]. *Food Control*, 2009, 20(8): 696 – 699.
- [27] 纳涛, 袁宝珠. 基于细胞色素 b 序列差异的细胞种属鉴别及种属间细胞交叉污染的快速检测方法 [J]. *药物分析杂志*, 2014, 34(11): 2054 – 2059.
- Na T, Yuan B Z. A cytochrome b based PCR method to rapidly determine cell species and inter – speices cross – contamination [J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2014, 34(11): 2054 – 2059.

(编辑:李文平)