

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2020.93047

转基因玉米 MIR604 基体标准物质研制

李俊¹ 李亮² 李夏莹³ 宋贵文³ 沈平³ 张丽¹
翟杉杉¹ 柳方方² 吴刚¹ 张秀杰^{3,*} 武玉花^{1,*}

¹ 中国农业科学院油料作物研究所 / 农业农村部油料作物生物学与遗传育种重点实验室, 湖北武汉 430062; ² 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081; ³ 农业农村部科技发展中心, 北京 100025

摘要: 转基因生物安全监管是生物技术产业健康发展的保障, 而转基因检测标准物质是进行转基因监管检测的物质基础, 缺少标准物质就难以保证检测数据的准确性、可靠性和可比性。转基因玉米 MIR604 是我国批准进口用作加工原料的转基因品种, 对其安全监管亟须制备标准物质。本项目通过对转基因玉米 MIR604 种子进行原材料鉴定、研磨、过筛、含水量测定等步骤, 制备出转基因玉米 MIR604 纯品基体标准物质。均匀性检验和稳定性检验结果表明, 本批标准物质在瓶内和瓶间均具有良好的均匀性, 可在常温下运输 1 个月, 长期稳定性达到 6 个月, 量值稳定。本批标准物质的特性量值为转基因 DNA 与总 DNA 的拷贝数比值, 由 9 家实验室采用 MIR604/*Adh1* 二重数字 PCR 联合定值, 量值为 0.50。充分评估了标准物质定值结果的各个不确定度分量, 合成扩展不确定度为 0.06 (copy/copy)。本批标准物质规格为 1 g 瓶⁻¹, 使用时最小取样量为 100 mg, 可用于转基因玉米 MIR604 的安全监管和定量标识、以及实验室质量控制等领域。

关键词: 转基因玉米 MIR604; 基体标准物质; 数字 PCR; 实时荧光 PCR; 联合定值

Development of genetically modified maize MIR604 matrix reference materials

LI Jun¹, LI Liang², LI Xia-Ying³, SONG Gui-Wen³, SHEN Ping³, ZHANG Li¹, ZHAI Shan-Shan¹, LIU Fang-Fang², WU Gang¹, ZHANG Xiu-Jie^{3,*}, and WU Yu-Hua^{1,*}

¹ Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Oil Crops, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Oil Crops Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430062, Hubei, China; ² Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; ³ Development Center of Science and Technology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100025, China

Abstract: The safety supervision of genetically modified organisms (GMO) is the guarantee for the healthy development of the biotechnology, and the reference materials (RM) are the material basis for GMOs detection. The lack of RMs makes it difficult to ensure the accuracy, reliability and comparability of the test data. GM maize MIR604 is approved for import as a raw material in China. The safety supervision of GM maize MIR604 urgently requires to prepare RMs. The pure GM maize MIR604 matrix RMs were prepared through the steps of raw material identification, grinding, sieving and water content determination. The results of homogeneity test and stability test showed that the RMs in this batch had good homogeneity within the bottle and between the bottles, the property value of the RMs was stable, allowing them to be transported at room temperature for one month, as even for six months verified by the long-term stability test. The copy number ratio of the transgenic DNA to the total DNA was collaboratively characterized by nine laboratories using the duplex digital PCR of MIR604/*Adh1*. The certified value was 0.50. The various uncertainty components of the RM characterization results were fully evaluated, and the expanded uncertainty was combined to be 0.06 (copy/copy). The specification of RMs of this batch is 1 g bottle⁻¹ and the minimum sample size is 100 mg. This batch of RMs can be used in the fields of safety supervision and labelling of MIR604, and laboratory quality control.

Keywords: GM maize MIR604; matrix reference material; digital PCR; Real-time PCR; collaborative characterization

本研究由国家转基因生物新品种培育重大专项(2016ZX08012003)和国家自然科学基金项目(31601581)资助。

This study was supported by the National Major Project for Developing New GM Crops (2016ZX08012003) and the National Natural Science Foundation of China (31601581).

* 通信作者(Corresponding authors): 张秀杰, E-mail: zhxj7410@sina.com, Tel: 010-59198153; 武玉花, E-mail: wuyuhua@oilcrops.cn, Tel: 027-86711573

第一作者联系方式: E-mail: lijuner@163.com, Tel: 027-86711573

Received (收稿日期): 2019-08-28; Accepted (接受日期): 2019-12-26; Published online (网络出版日期): 2020-01-15.

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20200115.1122.014.html>

随着生物技术产业的迅速发展,对转基因生物安全监管工作,政府越来越重视,民众越来越关注。2007 年至今,“中央一号文件”已有 8 次明确提及转基因,强调“加强农业转基因技术研发和监管,在确保安全的基础上慎重推广”^[1]。实施转基因生物安全管理和标识,一方面要建立转基因检测标准方法,另一方面要研制转基因生物标准物质。转基因生物标准物质是一种或多种足够均匀和很好地确定了特性(转基因成分和含量),在转基因检测中用以校正测量装置、评价测量方法或给材料赋值的一种材料和物质^[2-3]。近年来,我国转基因产品检测方法的标准化工作进展迅速,建立了完善的转基因检测标准方法体系,涵盖国家标准、农业农村部发布的具国家标准效力的公告以及进出口检验检疫行业标准等。相对于标准方法,我国转基因检测标准物质研制工作严重滞后于转基因生物安全监管工作的实际需求。而转基因检测标准物质是保障检测结果准确、可靠、可比、有效和可溯源的物质基础,转基因检测标准物质的缺乏将严重影响转基因产品的安全评价、身份验证、国内监管、进出口检验、企业自控和国际贸易互认等工作^[4-5]。

为了对转基因产品进行有效的监管和实施转基因产品标识法规,原则上,每种批准商业化的转化体都必须研制对应的标准物质,欧盟、美国、日本等从 2000 年前后就大力研制转基因检测标准物质,于 2004 年公开发售研制成功的标准物质产品。研制转基因检测标准物质最多的研发机构主要有欧盟联合研究中心下属的标准物质与测量研究所(Institute for Reference Materials and Measurements, IRMM)和美国石油化学家学会(American Oil Chemists' Society, AOCS)^[6]。到 2017 年,欧盟 IRMM 针对在欧盟商业化生产的转基因作物已经研发 127 种转基因检测基体标准物质,涵盖了六大作物的 30 个转基因品种,如转基因大豆 GTS40-3-2、转基因玉米 MON863、转基因油菜 73496 等,每个品种有 2~6 个浓度梯度;IRMM 还研发了 4 种质粒标准物质,包括转基因玉米 MON810、98140、NK603 和转基因大豆 356043^[5]。美国的 AOCS 生产了 35 种基体粉末标准物质和 19 种纯品基因组 DNA 标准物质,涉及的转化体几乎覆盖目前已在国际市场上商业化种植的转基因作物^[7]。

为了满足不断增长的食用油和饲料需求,我国从 2003 年开始大量进口转基因产品用作加工原料,

批准进口的品种包括 19 个玉米、14 个大豆、9 个棉花、8 个油菜和 1 个甜菜。在转基因生物安全监管工作中,我国一直从国外购买转基因检测标准物质,周期长、价格昂贵。为了消除对外标准物质的严重依赖,从 2008 年开始我国自主研发标准物质。转基因玉米 MIR604 是先正达公司(Syngenta)研发的抗虫转基因玉米,2008 年我国批准其进口用作加工原料,是我国进行转基因生物安全监管的重要对象。转基因玉米 MIR604 采用农杆菌介导法将修饰的抗虫基因 *mcry3A* 表达盒(pMTL-*mcry3A*-Tnos)和磷酸甘露糖异构酶基因 *Pmi* 表达盒(pZmUbiInt-*pmi*-Tnos)转化到玉米中,在受体基因组中外源基因为单拷贝插入,插入位点的旁侧基因组序列已经阐释清楚,5'端旁侧基因组序列长 1312 bp,3'端旁侧基因组序列长 1570 bp^[8]。

本研究的目的是研制转基因玉米 MIR604 基体标准物质,用于对转基因玉米 MIR604 及其加工产品的定性和定量检测,为我国转基因生物安全管理和标识制度的实施提供有效的技术支撑。通过转基因玉米 MIR604 基体标准物质的研制,建立起转基因玉米检测基体标准物质制备、检测、质量控制、定值和量值溯源的技术平台。

1 材料与方法

1.1 实验材料

转基因玉米 MIR604 种子由先正达公司提供。

1.2 原材料研磨及过筛

采用冷冻研磨系统 Spex6870 研磨转基因玉米 MIR604 种子。先在仪器中注入液氮,令仪器充分冷却。待其充分冷却后,将种子和撞子装入样品瓶,浸入液氮,以电磁为动力,带动钢制撞子粉碎研磨。样品瓶在破碎过程中处于全封闭状态,可避免样品间的交叉污染以及外界污染。优化后的冷冻研磨程序为预冷 10 min,运行 3 min,停止 2 min,5 个循环。

研磨后的玉米粉末,用振动分筛机(8411-A,湖南湘潭)以 40、80、120 和 160 目标准筛分筛,120 目以上颗粒需第 2 次研磨,研磨后,干燥、过筛,与第 1 次筛分的 120 目以下颗粒混合在一起,用粉末混匀机进行(YG-1KG,进杰机械)正反反转混匀。混匀程序为 30 转 min^{-1} ,搅拌 3 h,停止 1 h,4 个循环。混匀后装入干燥密封瓶中备用。

1.3 DNA 提取及质量评价

取研磨的玉米粉末 100 mg,用 Qiagen 的

DNeasy Plant Mini Kit 试剂盒按说明书提取其基因组 DNA, 将提取的 DNA 溶解到 90 μL 0.1 \times TE 缓冲液中, 基因组 DNA 完全溶解后, 在 Nanodrop 1000 仪器上采用紫外分光光度法测定 DNA 溶液的 OD230、OD260、OD280, 考察 DNA 的纯度和浓度。然后制备 1% 的琼脂糖凝胶, 取 1 μL DNA 溶液进行凝胶电泳分析, 评估 DNA 的完整性。

1.4 PCR

1.4.1 普通 PCR 在 PCR 仪 C1000 (伯乐, Hercules, CA, USA) 上进行普通 PCR, 25 μL 反应体系含 1 μL DNA 模板, 1 \times PCR buffer [含 10 mmol L^{-1} Tris HCl (pH 8.3), KCl 50 mmol L^{-1}], 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ dNTPs, 2.5 mmol L^{-1} MgCl_2 , 250 nmol L^{-1} 的正向引物和反向引物, 1 U *Taq* DNA 聚合酶。反应程序为 94 $^\circ\text{C}$ 2 min 预变性; 94 $^\circ\text{C}$ 15 s, 60 $^\circ\text{C}$ 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 30 s, 35 次循环; 72 $^\circ\text{C}$ 保温 2 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分离, EB 染色后鉴定是否存在扩增产物。

1.4.2 实时荧光 PCR 在 CFX96 实时荧光 PCR 仪(伯乐, Hercules, CA, USA) 上进行实时荧光 PCR 扩增, 玉米转化体 MIR604、MON810、T25、MON863、NK603、TC1507 和玉米内标基因 *Adh1* 的 PCR 体系均含基因组 DNA 2.0 μL , 1 \times *Taq*Man Universal PCR Master Mix, 400 nmol L^{-1} primer, 200 nmol L^{-1} probe, 1 U *Taq* DNA 聚合酶, 加 ddH₂O 至总反应体积为 20 μL 。反应程序为 95 $^\circ\text{C}$ 变性 10 min; 95 $^\circ\text{C}$ 变性 15 s, 60 $^\circ\text{C}$ 退火延伸 1 min, 50 个循环。

1.4.3 数字 PCR 在微滴数字 PCR 平台 QX200 上进行 MIR604/*Adh1* 二重数字 PCR, 优化后的反应体系为 20 μL , 包含 10 μL 2 \times ddPCR Master Mix, 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 正向引物和反向引物各 0.8 μL 、探针 0.4 μL , DNA 模板 2 μL 。将 20 μL PCR 体系和 70 μL 微滴生成油(droplet generation oil)加入微滴生成卡, 覆盖专用胶垫后置微滴生成仪生成微滴。将生成的微滴转移至 PCR 管, 置普通 PCR 仪 C1000 进行 PCR 扩增。PCR 程序为 95 $^\circ\text{C}$ 变性 10 min; 95 $^\circ\text{C}$ 变性 15 s, 57.7 $^\circ\text{C}$ 退火延伸 1 min, 50 个循环; 98 $^\circ\text{C}$ 酶变性 10 min; 4 $^\circ\text{C}$ 保存。扩增后, 将 96 孔板置微滴读取仪中读取信号, 并使用软件 QuantaSoft V1.3.2.0 分析实验数据。

1.5 标准物质联合定值

参加定值的实验室需配备数字 PCR 系统, 并有一定的技术权威性^[9]。首先, 由组织单位制定详细的定值实施方案, 详细规定样品的发送、保存、操作步骤、反应体系、程序及操作注意事项等。然后将经过质量验证的引物/探针和制备的粉末标准物质

分发给 9 家实验室, 严格根据定值实施方案操作, 测定后将软件 QuantaSoft V1.3.2.0 导出的数据反馈给组织单位, 汇总并处理数据。

2 结果与分析

2.1 原材料鉴定

2.1.1 典型性鉴定 首先对转基因玉米种子进行转化体特异性及“排他性”检测, 以验证原材料是否是预期的转基因玉米 MIR604, 以及转基因玉米 MIR604 是否被其他玉米转化体污染。根据“基体标准物质候选物鉴定方法”(农业部 1485 号公告-19-2010), 取至少 3000 粒种子研磨成粉末, 用 1 g 粉末提取基因组 DNA。以提取的基因组 DNA 作为实时荧光 PCR 模板, 用内标基因 *Adh1* 和 6 种转基因玉米转化体特异性引物/探针(MIR604、MON863、MON810、NK603、T25、TC1507)进行 PCR 扩增, 引物/探针信息见表 1。扩增结果显示, 只有 MIR604 转化体特异性引物有典型扩增曲线, 对其他转化体的引物均没有扩增曲线。仅内标基因和 MIR604 引物/探针序列有典型扩增曲线, 其他转化体均无扩增曲线, 表明转基因原材料确为转基因玉米 MIR604 的种子, 且没被其他的玉米转化体污染。

2.1.2 纯度鉴定 采用四分法抽取玉米 MIR604 种子 240 粒, 用 Qiagen 的 DNeasy Plant Mini Kit 试剂盒提取单粒基因组 DNA, 用 MIR604 转化体特异性引物探针 MIR604F/R/P 进行实时荧光 PCR 扩增。检测结果显示 240 粒种子均为阳性。根据泊松分布原理, 在 95% 的置信度下, 其纯度 98.76%。

2.1.3 基因型鉴定 转基因玉米种子的基因型与其转基因含量密切相关, 根据 MIR604 转化体的分子特征, 在插入位点的两侧基因组序列上分别设计 1 条引物(MIR604GF/MIR604GR), 在插入位点处设计 1 条探针(MIR604GP)(图 1), 序列见表 1。将插入位点特异性引物探针组合 MIR604GF/R/P 与 MIR604 转化体特异性引物探针 MIR604F/R/P 组合使用, 鉴定转基因玉米 MIR604 种子的基因型。对于纯合种子, 2 条染色体上均含有外源插入序列, 只有引物探针组合 MIR604F/R/P 有典型扩增曲线, 而引物探针组合 MIR604GF/R/P 无扩增曲线; 对于杂合种子, 一条染色体上有插入序列, 另一条染色体上没有, 2 个引物探针组合均有典型扩增曲线。对于阴性植株, 因不含有外源插入序列, 只有引物探针组合 MIR604GF/R/P 有典型扩增曲线(图 1)。将单粒提取

表 1 引物探针信息表

Table 1 List of primer and probe information

靶标 Target	引物名称 Primer name	序列 Sequence (5'-3')	产物大小 Amplicon size (bp)	参考文献 Reference
MIR604	MIR604F	GCGCACGCAATTCAACAG	76	Mazzara et al. 2007 ^[10]
	MIR604R	GGTCATAACGTGACTCCCTTAATCT		
	MIR604P	AGGCGGGAAACGACAATCTGATCATG		
<i>Adh1</i>	ADH-FF3	CGTCGTTTCCCATCTCTTCCTCT	135	Mazzara et al. 2013 ^[10]
	ADH-RR4	CCACTCCGAGACCTCAGTC		
	ADH1-MDO	AATCAGGGCTCATTTTCTCGCTCCTCA		
MON810	MON810F	TCGAAGGACGAAGGACTCTAACGT	92	ISO 21570 ^[11]
	MON810R	GCCACCTTCCTTTTCCACTATCTT		
	MON810P	AACATCCTTTGCCATTGCCAGC		
MON863	MON863F	TGTTACGGCCTAAATGCTGAACT	84	Mazzara et al. 2005 ^[12]
	MON863R	GTAGGATCGGAAAGCTTGGTAC		
	MON863P	TGAACACCCATCCGAACAAGTAGGGTCA		
NK603	NK603-F	ATGAATGACCTCGAGTAAAGCTTGTTAA	108	Mazzara et al. 2005 ^[13]
	NK603-R	AAGAGATAACAGGATCCACTCAAACACT		
	NK603-PR	TGGTACCACGCGACACACTTCCACTC		
T25	MLD143	ACAAGCGTGTCGTGCTCCAC	102	Mazzara et al. 2013 ^[14]
	MDB551	GACATGATACTCCTTCCACCG		
	TM016	TCATTGAGTCGTTCCGCCATTGTCG		
TC1507	TC1507F	TAGTCTTCGGCCAGAATGG	58	Mazzara et al. 2007 ^[15]
	TC1507R	CTTTGCCAAGATCAAGCG		
	TC1507P	TAACTCAAGGCCCTCACTCCG		
MIR604 插入位点 MIR604 insert site	MIR604GF	GACGCCAGATCACACATG	168	本研究 This study
	MIR604GR	CACACCTCGTTGCCAAAG		
	MIR604GP	CGTGCCGATCTCGCACCAGCA		

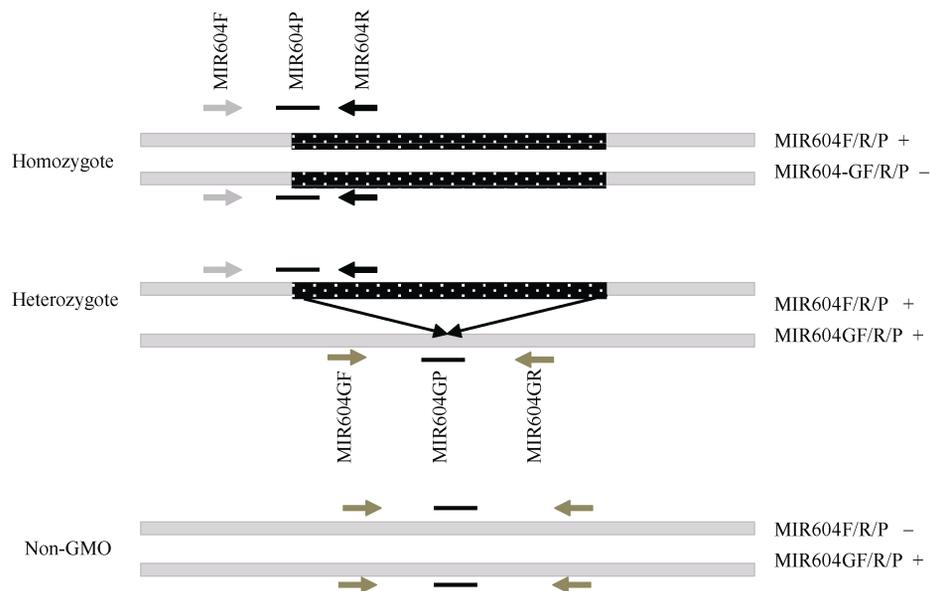


图 1 鉴定转基因种子基因型的原理示意图

Fig. 1 Schematic diagram of identifying genotype of genetically modified seeds

灰白矩形表示受体基因组 DNA, 带白斑点的黑色矩形表示外源插入序列, 箭头表示引物位置, 加粗黑线表示探针位置。

The grey rectangles indicate the recipient genomic DNA, the black rectangles with white spots indicate the insert DNA, the arrows indicate the position of the primers, and the bold black lines indicate the position of the probes.

的基因组 DNA 作为 PCR 的模板, 用 MIR604 转化体、插入位点和 *Adh1* 内标基因 3 个引物/探针组合同时进行 PCR 扩增。扩增结果显示, 240 粒

种子的单粒 DNA 中 3 个引物/探针组合均有典型扩增曲线(图 2), 表明原材料 MIR604 种子均为杂合种子。

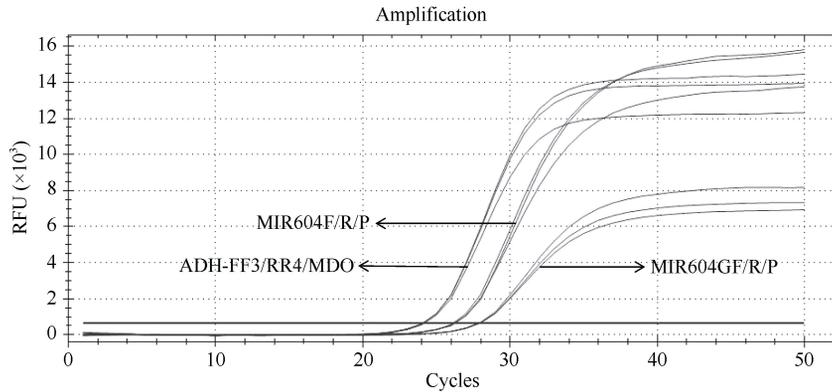


图 2 杂合种子的扩增曲线图

Fig. 2 Amplification curves of heterozygous seed

2.2 粉末标准物质制备

2.2.1 种子研磨 将种子清洗、烘干后, 在冷冻研磨系统 Spex6870 中研磨。研磨完后, 过筛, 120 目以上的颗粒经第 2 次研磨, 研磨好的粉末装入干燥密封瓶中。称取 10 g 粉末利用振动分筛机进行颗粒大小测定, 重复 3 次。转基因原材料粉末约有 50% 的颗粒介于 120~200 μm 之间, 而颗粒度小于 200 μm 的颗粒均占 80% 以上, 与欧盟制备的粉末标准物质的粒度大小相近。

2.2.2 含水量测定 粉末标准物质的含水量与其稳定性密切相关, 称取 6 份 MIR604 玉米粉末, 每份 2 g, 用卡尔费休滴定法测试含水量, 测试 6 个重复。粉末含水量(4.30±0.03)%, 低于农业部 1782 号公告-8-2012 规定的 10%^[16]。

2.2.3 均匀性初检 将转基因玉米 MIR604 种子粉末在混匀机中混匀。混匀过程中每隔 3 h 取样一次, 共取样 4 次。每次选不同的部位取样, 取 9 份, 每份 100 mg。提取样品的基因组 DNA, 采用表 1 中 MIR604 转化体和玉米内标基因 *Adh1* 特异性引物探针进行荧光定量 PCR 扩增。以基因型鉴定的纯品 MIR604 基因组 DNA 作为标准品, 绘制标准曲线。依据标准曲线计算样品的转基因含量(转基因和内标基因拷贝数比值)。采用方差分析法检验数据, 检验结果表明, 从不同位置抽取的样品其量值均在 0.45~0.55 的区间内波动, 没有明显差异(图 3), 均匀性良好, 且不随混匀时间的长短发生变化, 表现出良好的稳定性。

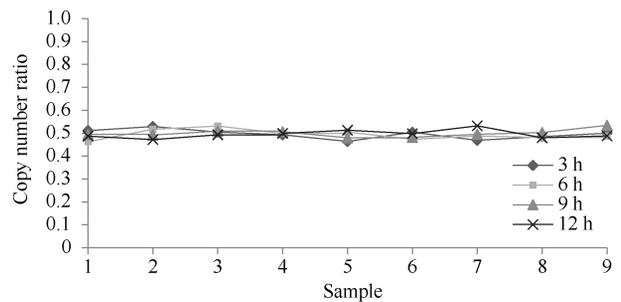


图 3 均匀性初检样品的量值测定结果

Fig. 3 Measured values of initial test samples for homogeneity

2.2.4 分装和保存 将转基因玉米 MIR604 种子粉末分装, 称取约 1.00 g (0.98~1.02 g) 的粉末置玻璃瓶中, 调节高压氮气的低压表气压到 0.5~0.8 MPa 之间, 将调节好气流量的氮气橡胶管对准玻璃瓶口充气, 约 2~3 s, 移除氮气管, 同时将橡胶塞盖紧, 将加好塞的玻璃瓶在自动轧盖机上轧盖。分装完成后粘贴标准物质初级标签。分装好的标准物质规格约为每瓶 1.00 g (0.98~1.02 g), 分装 400 瓶。-20℃ 保存。

2.3 均匀性检验

从制备的 400 瓶标准物质中随机抽取 15 瓶, 分别标记 1~15, 从每瓶上中下 3 个位置取 3 个子样, 每份取样量为 100 mg, 共取样 45 份。在重复性实验条件下测定抽取的样品, 从而使样品间的差异完全反映样品间的不均匀性。提取样品 DNA, 采用荧光定量 PCR 扩增 MIR604 转化体和内标准基因 *Adh1*, 用

基因型鉴定的纯品基因组 DNA 作为标准品绘制标准曲线, 定量标准物质样品中 MIR604 特异性序列和内标基因 *Adh1* 的拷贝数比值, 15 瓶标准物质的转基因含量水平在 0.5 左右波动(图 4)。方差分析法是通过组间(瓶间)方差和组内(瓶内)方差的比较来判断各组测量值之间有无系统性差异, 如果二者的比值小于统计检验的临界值, 则认为样品是均匀的^[17]。采用单因素方差分析法(*F* 检验法)对拷贝数比值进行均匀性检验, 统计分析结果表明 $F < F_{0.05(14,30)}$ (表 2), 分装后的种子粉末在瓶内和瓶间均匀性无显著性差异, 因此判定种子粉末具有良好的均匀性。

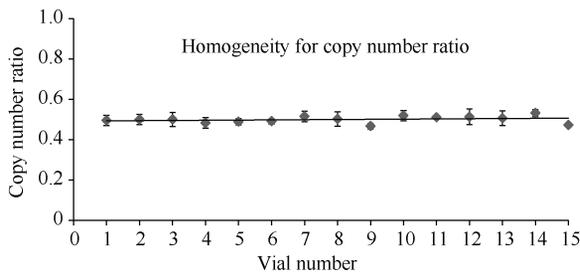


图 4 均匀性检验样品的测试结果

Fig. 4 Measurement results for homogeneity test of reference materials

表 2 均匀性检测测试数据的方差分析结果

Table 2 Variance analysis of homogeneity test data

项目 Item	分析结果 Test data
测量平均值 Mean	0.5
组间差方和 Q_1	0.013
组间自由度 V_1	14
组间方差 S_1^2	0.000922
组内差方和 Q_2	0.019
组内自由度 V_2	30
组内方差 S_2^2	0.000649
统计量 F	1.42
临界值 $F_{0.05(14, 30)}$	2.04
比较 Comparison	$F < F_{0.05(14, 30)}$
结论 Conclusion	均匀 Homogenous

在采用方差分析法分析标准物质均匀性时, 组间方差大于组内方差, 即 $S_1^2 > S_2^2$ (表 2), 根据标准物质定值的通用原则及统计学原理(JJF1343-2012)^[17], 标准物质转基因含量这一特性量值的均匀性引入的不确定度采用下面公式计算。

$$s_{bb}=u_{bb}=\sqrt{\frac{S_1^2-S_2^2}{n}}=\sqrt{\frac{0.000922-0.000649}{3}}=0.0095$$

式中, s_{bb} 为瓶间标准偏差, u_{bb} 为不确定度, s_1^2 为组间方差, s_2^2 为组内方差, n 为组内测量次数。

相对标准不确定度

$$u_{rel(bb)}=\frac{u_{bb}}{\bar{x}}=0.0095/0.500=0.019$$

据农业部发布的标准《转基因植物及其产品成分检测 DNA 提取和纯化》(农业部 1485 号公告-4-2010)^[18] 以及试剂盒的操作说明, 通常推荐以 100 mg 的粉末样品作为原料提取基因组 DNA。本研究中进行标准物质的均匀性检验, 抽取的子样也是 100 mg, 显示标准物质在瓶内和瓶间均具有良好的均匀性。因此, 建议本批标准物质的最少取样量为 100 mg。

2.4 稳定性检验

标准物质的稳定性分为短期稳定性和长期稳定性, 短期稳定性又称为运输稳定性, 与样品运输过程中的外部因素有关; 长期稳定性与储存条件相关^[17]。本研究采用同步稳定性研究方案, 即在重复性条件下对抽取的样品进行测量。稳定性的评价是通过在不同时间测定标准物质的特性值, 以时间为 X 轴, 以特性量值为 Y 轴, 描绘出特性量值与时间的关系, 表示为 $Y = \beta_0 + \beta_1 X$, 其中 β_1 、 β_0 表示回归系数。计算 β_1 的标准偏差 $s(\beta_1)$, 然后用 *t* 检验进行判断, 若 $|\beta_1| < t_{0.95, n-2} \times s(\beta_1)$, 则表明斜率不显著, 没有观察到不稳定性^[17]。

将短期稳定性检验样品分别存储在 4℃、25℃、37℃、60℃, 分别在第 0 周、第 1 周、第 2 周、第 4 周后取样并储存于 -70℃, 每次每个贮存温度随机选取 3 瓶, 每瓶重复取样 3 次($N = 3, n = 3$), 取样后统一检测。提取 DNA 后进行荧光定量 PCR 检测, 梯度稀释经基因型鉴定的纯品 MIR604 基因组 DNA, 配置标准品, 进行荧光定量 PCR 扩增, 绘制 MIR604 转化体特异性序列和内标基因 *Adh1* 的标准曲线, 计算样品中转化体特异性基因和内标基因拷贝数, 进而计算其转基因含量(表 3)。对数据进行 *t* 检验显示, 储存 4 周后, 在 4℃、25℃、37℃和 60℃下粉末标准物质的转基因含量未发生显著变化, 表现出良好的短期稳定性。因此, 本批标准物质可以在常温下稳定储存和运输 4 周, 特性量值不会发生显著变化。

将长期稳定性检验样品分别存储在 4℃和 -20℃, 分别在第 0 月、第 1 月、第 2 月、第 4 月、第 6 月后取样并储存于 -70℃, 随机选取每次每个贮存温度 3 瓶, 每瓶重复 3 次($N = 3, n = 3$)。MIR604 和内

表 3 标准物质拷贝数比值的短期稳定性检验结果

Table 3 Short-term stability of copy number ratio

时间 Time	贮存温度 Storage temperature			
	4℃	25℃	37℃	60℃
0 周 0 week	0.499	0.493	0.500	0.489
1 周 1 week	0.507	0.514	0.509	0.518
2 周 2 weeks	0.510	0.504	0.488	0.500
4 周 4 weeks	0.493	0.498	0.513	0.501
平均值 Mean	0.502	0.502	0.503	0.502
斜率 Slope (β_1)	-0.002	-0.0004	0.002	0.001
与斜率相关的不确定度 Uncertainty associated with slope $s(\beta_1)$	0.0029	0.0037	0.0043	0.0049
$t_{0.95, n-2}$	4.303	4.303	4.303	4.303
$t_{0.95, n-2} \times s(\beta_1)$	0.013	0.016	0.018	0.021
稳定性判断 Conclusion	稳定 Stable	稳定 Stable	稳定 Stable	稳定 Stable

标基因的标准曲线绘制同短期稳定性。根据样品测定的 Ct 值和绘制的标准曲线, 计算转化体特异性序列和内标基因拷贝数, 进而计算转基因含量, 测量值均在 0.5 左右波动(表 4)。对数据进行 t 检验(表 4)。通过

数据分析显示在 4℃和-20℃下, $|\beta_1| < t_{0.95, n-2} \times s(\beta_1)$, 表明斜率不显著, 没有观察到不稳定性。因此判定本批标准物质在 4℃和-20℃条件下 6 个月内均处于稳定状态, 推荐在 4℃条件下长期保存。

表 4 标准物质拷贝数比值长期稳定性检验结果

Table 4 Long-term stability of copy number ratio

时间 Time	4℃条件下测量值 Measured value at 4℃	-20℃条件下测量值 Measured value at -20℃
0 个月 0 month	0.496	0.506
1 个月 1 month	0.486	0.494
2 个月 2 months	0.508	0.495
4 个月 4 months	0.492	0.484
6 个月 6 months	0.506	0.506
平均值 Mean	0.498	0.497
斜率 Slope (β_1)	0.003	-0.001
与斜率相关的不确定度 Uncertainty associated with slope $s(\beta_1)$	0.0031	0.0034
$t_{0.95, n-2}$	3.182	3.182
$t_{0.95, n-2} \times s(\beta_1)$	0.010	0.011
稳定性判断 Conclusion	稳定 Stable	稳定 Stable

标准物质稳定性不确定度由短期稳定性不确定度和长期稳定性不确定度组成, 稳定性不确定度 $u_s = s(\beta_1) \times X$ 。短期 25℃条件下, 有效期 $t = 4$ 周的短期稳定性不确定度 $u_{ss} = 0.0037 \times 4 = 0.015$, 检测平均值 \bar{X}_{ss} 为 0.502 (表 3), 短期稳定性引入的相对不确定度 $u_{rel(ss)}$ 为 0.030。长期-4℃条件下, 有效期 $t = 6$ 个月的长期稳定性不确定度 $= 0.0031 \times 6 = 0.019$, 检测平均值 \bar{X}_{ls} 为 0.498 (表 4), 长期稳定性引入的相对不确定度为 $u_{rel(ls)} = 0.038$ 。

2.5 定值

为确定标准物质的量值, 组织 9 家实验室利用

MIR604/*Adh1* 二重数字 PCR 进行联合定值。定值结果如表 5 所示。根据“标准物质定值的通用原则及统计学原理(JJF1343-2012)”^[17], 对各家实验室返回的数据先后进行如下检验。(1)用狄克逊法和格拉布斯法进行 9 家实验数据的可疑值检验, 未在实验室内发现可疑数据;(2)采用达戈斯提诺法对所有联合定值的原始数据进行正态分布检验, 测定数据呈正态分布;(3)用狄克逊法对 9 组定值数据平均值进行实验室间数据组可疑值检验, 判定无界外值;(4)用科克伦法检验 9 组数据是否等精度, 结果 9 组数据的方差无显著差异, 实验室间数据组等精度。由于 9

家实验数据服从正态分布,且实验室间等精度,计算总平均值和总标准差(表 5),将总平均值 0.5027 作

为转基因和内标基因比值的标准值,将总标准差 0.001 作为联合定值引入的不确定度。

表 5 转基因 MIR604 玉米种子粉末标准物质转基因和内标基因比值联合定值数据
Table 5 Data of collaborative characterization for the copy number ratio of MIR604 powdered reference materials

实验室编号 Lab. no.	重复 1 Rep.1	重复 2 Rep.2	重复 3 Rep.3	重复 4 Rep.4	重复 5 Rep.5	重复 6 Rep.6	重复 7 Rep.7	重复 8 Rep.8
1	0.5029	0.5095	0.5110	0.5070	0.5109	0.5042	0.4968	0.5087
2	0.5088	0.4990	0.5000	0.4896	0.5191	0.5064	0.5183	0.5021
3	0.5135	0.4941	0.5070	0.5030	0.5010	0.4943	0.5018	0.4861
4	0.5141	0.5119	0.4903	0.5070	0.4949	0.4829	0.4990	0.5128
5	0.5011	0.4844	0.5072	0.4898	0.5053	0.4927	0.5077	0.4947
6	0.5094	0.5170	0.5064	0.5090	0.4948	0.5126	0.4861	0.4965
7	0.5000	0.4859	0.5132	0.4909	0.5167	0.5000	0.5082	0.4917
8	0.4990	0.5114	0.4858	0.4951	0.4981	0.5134	0.5028	0.5038
9	0.5143	0.5115	0.4962	0.5028	0.5163	0.5059	0.5091	0.4962
平均值 Mean	0.5027							
标准差 SD	0.001							
相对标准差 RSD	0.002							

2.6 不确定度评估

标准物质定值结果的合成不确定度由 3 个部分组成。第 1 部分是标准物质定值过程带来的 A 类和 B 类不确定度的合成不确定度 u_c ; 第 2 部分是标准物质不均匀性所引起的标准不确定度 u_{bb} ; 第 3 部分是物质在有效期内的不稳定性所引起的标准不确定度 u_s , 包括短期不稳定性(u_{ss})和长期不稳定性(u_{ls})引入的不确定度^[9,17]。标准物质均匀性不确定度和稳定性不确定度已在均匀性检验和稳定性检验时分别评估,评估结果汇总在表 6 中。标准物质联合定值带来的 A 类不确定度是统计测量数据、测量次数及所要求的置信水平计算出的标准偏差,统计分析联合定值数据,其不确定度为 0.001,相对不确定度为 0.002 (表 5)。标准物质联合定值引入的 B 类不确定度主要来源于错误识别阳性微滴和阴性微滴产生的不确定度和数字 PCR 微反应体积不一致产生的不确定度^[19-20]。在进行定值前,充分优化了二重数字 PCR 方法,采用特别设计的自动识别软件,不产生难以识别的微滴,其不确定度忽略不计。因此 B 类

不确定度主要统计数字 PCR 微滴体积不一致产生的不确定度。本项目采用 8 通道微滴生成仪(DG8)生成微滴,斯洛文尼亚的国家生物研究所(the National Institute of Biology, NIB)在实验室间组织了 8 通道微滴生成仪生产的微滴体积的联合测量,平均体积 0.715 nL,扩展不确定度 0.014 nL^[21]。本项目选取 NIB 的测量不确定度作为微滴体积不一致引入的不确定度,则其相对不确定度:

$$u_r(V) = \frac{0.014}{2 \times 0.715} = 0.0098 \text{ (扩展因子 } k = 2)$$

MIR604/*Adh1* 二重数字 PCR 微滴体积不一致引入的不确定度合成为:

$$u_{vr} = \sqrt{u_r^2(V_{转}) + u_r^2(V_{内标})} = \sqrt{0.0098^2 + 0.0098^2} = 0.01386$$

各不确定度分量见表 6,合成本批标准物质的相对不确定度为:

$$u = \sqrt{u_c^2 + u_{bb}^2 + u_s^2} = 0.054$$

扩展不确定度 U 为 0.06 ($k = 2$, 95%置信度)。本批标准物质的量值表示为 0.50 ± 0.06 。

表 6 标准物质标准值的不确定度分量及合成
Table 6 Components and combination of uncertainty for the copy number ratio of MIR604 powdered reference materials

标准物质 标准值 Certified value	定值引入的相对不确定度 u_c		均匀性引入的相对不确定度 u_{bb}	稳定性引入的相对不确定度 u_s		相对不确定度 u_{CRM}	扩展不确定度 $U_{CRM} (k = 2)$
	A 类 u_A	B 类 u_B		短期稳定性 u_{ss}	长期稳定性 u_{ls}		
0.50	0.002	0.014	0.019	0.030	0.038	0.054	0.06

3 讨论

本批转基因玉米 MIR604 标准物质是以杂合种子为原料制备的纯品标准物质,与欧盟 IRMM 研制的质量分数标准物质相比,制备工艺相对简单,省去了阳性粉末和阴性粉末的称量混匀过程。鉴于纯品标准物质的优点,美国的 AOCS 长期致力于生产纯品粉末标准物质和纯品 DNA 标准物质,IRMM 在后来生产的标准物质中也增加了纯品类型,如转基因玉米 DP-004114-39 (ERM-BF439)^[22]。AOCS 生产了 13 个纯品玉米标准物质,包括 2 个非转基因玉米标准物质和 11 个转基因玉米标准物质^[23]。11 个转基因玉米标准物质均为以杂合种子为原料生产的纯品标准物质,其特性值均表述为“Pure, heterozygous”^[24]。对于纯品标准物质,原材料的鉴定环节非常关键,标准物质的转基因含量与原材料的纯度和基因型密切相关。AOCS 仅用转化体特异性实时荧光 PCR 鉴定原材料的身份,没有采用单粒法鉴定原材料的纯度和基因型,导致生产的标物存在着转基因含量不确定的风险。本实验室采用数字 PCR 测定 AOCS 生产的玉米标准物质(GA21, 0407-B; MIR604, 0607-A2; MIR162, 1208-A; MON88017, 0406-D)的转基因含量,测量值在 34.03%~59.91%之间波动^[7]。

本项目中制备本批标准物质的原材料通过随机抽样 240 粒种子,对单粒种子一一鉴定,考察原材料的纯度和基因型。所有籽粒的检测结果均为阳性且均为杂合种子,根据泊松分布,计算出在 95%的置信度下原材料的纯度大于 98.5%。因为原材料的单粒 PCR 检测是一种破坏性检测,检测后不能再用作标准物质的原材料,因此导致我们不能对所有的原材料一一检测。为了获得标准物质的准确量值,本研究在原材料鉴定的基础上,采用二重微滴数字 PCR 方法联合定值,标准值为转基因含量(转基因和内标基因比值)。数字 PCR 是一种不依赖标准物质的核酸绝对定量方法,目前已被美国国家标准技术研究院(National Institute of Standards and Technology, NIST)用于核酸标准物质的量值测定,也被应用于欧盟 IRMM 转基因检测标准物质研制的定值中。如欧盟 IRMM 研制的白血病诊断质粒标准物质(ERM-AD263a-ERM-AD263f)和美国发布的乳腺癌诊断基因组 DNA 标准物质(SRM2373)均采用数字 PCR 方法定值^[25-26]。在联合定值前,本实验室建立了 MIR604/*Adh1* 二重数字 PCR 方法,消除了单重 PCR 中取样误差对定值结果的影响。而且对数字

PCR 的引物/探针浓度、退火温度进行了充分优化;考察了数字 PCR 的定量极限、检测极限、动力学范围和重复性等参数,保证定值过程中阳性微滴和阴性微滴的准确识别。转基因含量由 9 家实验室采用数字 PCR 仪通过不依赖标准物质的数字 PCR 方法测量而确定。另外,荧光定量 PCR 仪、移液器等设备在投入使用前都进行了校准,确保定值结果的准确、有效和可溯源。研制的本批标准物质具有准确的量值,全面评估了其定值不确定度,克服了 AOCS 生产的纯品粉末标准物质的缺陷。

4 结论

本批标准物质的特性量值为转基因 DNA 与总 DNA 拷贝数比值,由 9 家实验室采用二重数字 PCR 联合测定。转基因玉米 MIR604 粉末标准物质中转基因 DNA 与总 DNA 拷贝数比值为 0.50,扩展不确定度为 0.06。通过荧光定量 PCR 检测标准物质的均匀性和稳定性,结果表明该标准物质的均匀性和稳定性良好,在 4℃和-20℃条件下可以稳定保存。该标准物质已通过国家标准物质管理委员会组织的国家标准物质技术委员会专家的评审,获得标准物质证书[编号 GBW(E)100505]。转基因玉米种子粉末标准物质的成功研制为我们互相关展标准物质的研制提供了技术基础,MIR604 标准物质的使用将有效地解决我国实验室间转基因检测结果不可比的问题,为我国的玉米及其加工产品的检测、监测提供技术保障。

References

- [1] 沈平,武玉花,梁晋刚,卢新,章秋艳,王颢潜,刘鹏程.转基因作物发展及应用概述.中国生物工程杂志,2017,37(1):119-128.
Shen P, Wu Y H, Liang J G, Lu X, Zhang Q Y, Wang H Q, Liu P C. The overview in development and application of genetically modified crops. *China Biotechnol*, 2017, 37(1): 119-128 (in Chinese with English abstract).
- [2] 于亚东,卢晓华,倪晓丽,陈文祥,胡晓燕,吴忠祥,王亚平.标准物质通用术语和定义. JJF 1005-2016. 北京:中国标准出版社,2016. pp 1-22.
Yu Y D, Lu X H, Ni X L, Chen W X, Hu X Y, Wu Z X, Wang Y P. General Terms and Definitions Used in Connection with Reference Materials. JJF 1005-2016. Beijing: Standards Press of China, 2016 (in Chinese).
- [3] 周云龙,吴刚,宋贵文,王灿华,卢长明,龙丽坤,朱莉,沈平,张丽,张秀杰,李亮,李昂,李文龙,李飞武,李允静,杨立桃,金宪军,武玉花,姜羽,章秋燕.转基因生物标准物质研制与应用.北京:中国质检出版社,2014. pp 39-61.

- Zhou Y L, Wu G, Song G W, Wang C H, Lu C M, Long L K, Zhu Li, Shen P, Zhang L, Zhang X J, Li L, L A, Li W L, Li F W, Li Y J, Yang L T, Jin W J, Wu Y H, Jiang Y, Zhang Q Y. Development and Application of Reference Materials for Genetically Modified Organisms. Beijing: China Quality Inspection Press, 2014. pp 39–61 (in Chinese).
- [4] Ciabatti I, Marchesi U, Froio A, Paternò A, Ruggeri M, Amadeo D. Role of the “National Reference Centre for Genetically Modified Organisms (GMO) Detection” in the official control of food and feed. *Veterinary Res Commun*, 2005, 29(2): 31–34.
- [5] Lauwaars M, Anklam E. Method validation and reference materials. *Accred Qual Assur*, 2004, 9: 253–258.
- [6] 张丽, 吴刚, 武玉花, 沈平, 宋贵文, 周云龙. 转基因产品检测标准物质的定值和不确定度研究进展. *农业生物技术学报*, 2014, 22: 362–371.
Zhang L, Wu G, Wu Y H, Shen P, Song G W, Zhou Y L. Research progress on value characterization and uncertainty evaluation of reference materials for genetically modified organisms. *J Agric Biotechnol*, 2014, 22: 362–371 (in Chinese with English abstract).
- [7] Wu Y, Li J, Li X, Zhai S S, Gao H F, Li Y, Zhang X, Wu G. Development and strategy of reference materials for the DNA-based detection of genetically modified organisms. *Anal Bioanal Chem*, 2019, 411: 1729–1744.
- [8] Steiner H Y, Chen E, Meghji M. Corn event MIR604. Patent No: US 8884102B2, 2014. pp 1–33.
- [9] 余逵, 刘清贤, 陈保华. 一级标准物质技术规范, JJF 1006-1994. 北京: 中国标准出版社, 1994. pp 1–21.
Yu K, Liu Q X, Chen B H. Technical Norm of Primary Reference Material, JJF 1006-1994. Beijing: Standards Press of China, 1994. pp 1–21 (in Chinese).
- [10] Mazzara M, Munaro B, Foti N, Savini C, Van Den Eede G. Event-specific method for the quantification of maize line MIR604 using real-time PCR—validation report and protocol—maize seeds sampling and DNA extraction. 2007 [2017-05-10] pp 1–76. <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/docs/QT-EVE-ZM-013.pdf>.
- [11] International Organization for Standardization. Foodstuffs—Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products—Quantitative nucleic acid based methods. ISO 21570:1-103, 2005.
- [12] Mazzara M, Foti N, Price S, Paoletti C, Van Den Eede G. Event-specific method for the quantitation of maize line MON 863 using real-time PCR—Validation report and protocol. 2005[2017-05-10]. pp 1–84. <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/docs/QT-EVE-ZM-009.pdf>.
- [13] Mazzara M, Paoletti C, Puumalainen J, Rasulo D, Van Den Eede G. Event-specific method for the quantitation of maize line NK603 using real-time PCR—Validation report and protocol. 2005 [2017-05-10], pp 1–108. <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/docs/QT-EVE-ZM-008.pdf>.
- [14] Mazzara M, Grazioli E, Savini C, Van Den Eede G. Event-specific method for the quantification of maize line T25 using real-time PCR—Validation report and validated method. 2013 [2017-05-10], pp 1–102. <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/docs/QT-EVE-ZM-011.pdf>.
- [15] Mazzara M, Foti N, Price S, Paoletti C, Van Den Eede G. Event-specific method for the quantitation of maize line TC1507 using real-time PCR—Validation report and protocol—Sampling and DNA extraction of maize TC1507. 2005 [2017-05-10]. pp 1–58. <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/docs/QT-EVE-ZM-010.pdf>.
- [16] 周云龙, 卢长明, 刘信, 曹应龙, 宋贵文, 沈平, 吴刚, 杨立桃, 王晶, 王江, 李允静, 李飞武, 赵欣. 转基因植物及其产品成分检测: 基体标准物质制备技术规范, 农业部 1782 号公告-8-2012. 北京: 中国农业出版社, 2012. pp 1–14.
Zhou Y L, Lu C M, Liu X, Cao Y L, Song G W, Shen P, Wu G, Yang L T, Wang J, Wang J, Li Y J, Li F W, Zhao X. Detection of Genetically Modified Plants and Derived Products: Technical Specification for Manufacture of Matrix Reference Material. Announcement No.1782 of the Ministry of Agriculture-8-2012. Beijing: China Agriculture Press, 2012. pp 1–14 (in Chinese).
- [17] 阚莹, 李红梅, 孟凡敏, 卢晓华, 郭敬, 胡晓燕, 王亚平. 标准物质定值的通用原则及统计学原理, JJF 1343-2012. 北京: 中国标准出版社, 2012. pp 1–66.
Kan Y, Li H M, Meng F M, Lu X H, Guo J, Hu X Y, Wang Y P. General and Statistical Principles for Characterization of Reference Materials, JJF 1343-2012. Beijing: Standards Press of China, 2012. pp 1–66 (in Chinese).
- [18] 金芳军, 沈平, 张秀杰, 彭于发, 宋贵文, 黄昆仑, 张大兵, 宛煜嵩. 转基因植物及其产品成分检测 DNA 提取和纯化, 农业部 1485 号公告-4-2010. 北京: 中国农业出版社, 2010. pp 1–12.
Jin W J, Shen P, Zhang X J, Peng Y F, Song G W, Huang K L, Zhang D B, Wan Y S. Detection of genetically modified plants and derived products—DNA extraction and purification. Announcement No.1485 of the Ministry of Agriculture-4-2010. Beijing: China Agriculture Press, 2010. pp 1–12 (in Chinese).
- [19] Kline M C, Duewer D L. Evaluating droplet digital polymerase chain reaction for the quantification of human genomic DNA: lifting the traceability fog. *Anal Chem*, 2017, 89: 4648–4654.
- [20] Duewer D L, Kline M C, Romsos E L, Toman B. Evaluating droplet digital PCR for the quantification of human genomic DNA: converting copies per nanoliter to nanograms nuclear DNA per microliter. *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410: 2879–2887.
- [21] Košir A B, Divieto C, Pavšič J, Pavarelli S, Dobnik D, Dreo T, Bellotti R, Sassi M P, Žel J. Droplet volume variability as a critical factor for accuracy of absolute quantification using droplet digital PCR. *Anal Bioanal Chem*, 2017, 409: 6689–6697.
- [22] European Union. Certification report: The certification of different mass fractions of DP-ØØ4114-3 in maize seed powder. Certified reference materials ERM®-BF439a, ERM®-BF439b, ERM®-BF439c, ERM®-BF439d and ERM®-BF439e. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2015.
- [23] AOCS. Certified reference materials (CRMs). <https://www.aocs.org/crm#maize> [2018-07-13].

- [24] AOCS. Certificate of Analysis AOCS 1208-A, MIR162 maize. <https://www.aocs.org/store/shop-aocs/shop-aocs?productId=125101624> [2018-07-13].
- [25] European Union. Certification report: the certification of the copy number concentration of solutions of plasmid DNA containing a BCR-ABL b3a2 transcript fragment, Certified reference materials: ERM®-AD623a, ERM®-AD623b, ERM®-AD623c, ERM®-AD623d, ERM®-AD623e, ERM®-AD623f. Luxembourg: Publications Office of the European Union. © European Union, 2012. pp 1–53.
- [26] Haynes R J, Kline M C, Toman B, Scott C, Wallace P, Butler J M, Holden M J. Standard reference material 2366 for measurement of human cytomegalovirus DNA. *J Mol Diagn*, 2013, 15: 177–185.