

农产品中转基因检测抽样研究-第2部分: 从分析样品到试料

徐 静, 邵筠乔, 赵 禹, 张 琳, 汪 霖, 郑 江, 曹际娟*

(辽宁出入境检验检疫局, 大连 116001)

摘 要: **目的** 针对农产品中转基因检测抽样过程, 研究从分析样品到试料的抽样和分析过程各因素对结果准确性的影响。**方法** 取非转基因玉米为基体, 添加 12 个品系转基因玉米制作标准分析样品, 按系统抽样方法抽取试样, 以随机顺序分别测试添加的转基因含量, 计算其单次相对标准差, 作为分析样品的总相对标准差(单次分析)的度量。**结果** 影响标准差的参数包括含量 a_{AS} 、粒度 d_{AS} 、试料量 M_{TP} 、构成试料的份样数 n_{IT} 等, 降低总分析相对标准差的主要途径是减小分析样品的粒度、增加试料量和增加试料的份样数。**结论** 得出从分析样品到试料过程中, 粒度、试料量和重复次数的建议值, 为该部分抽样方法提供了参考。

关键词: 转基因; 抽样; 农产品

Sampling for genetically modified organism content analysis in agricultural products-part 2: process from analytical sample to test portions

XU Jing, SHAO Yun-Qiao, ZHAO Yu, ZHANG Lin, WANG Lin, ZHENG Jiang, CAO Ji-Juan*

(Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001, China)

ABSTRACT: Objective To study the effects of the process from analytical sample to test portions on the accuracy of results during sampling of GMO content analysis in agricultural products. **Methods** Taking non-GMO maize as matrix, 12 strains of GM maize were added to produce standard analytical samples. According to the systematic sampling method, GMO content in these samples were tested in random order and the relative standard deviation (RSD) was calculated as the measure to total RSD (single analysis). **Results** Factors affecting RSD included GMO content a_{AS} , particle size d_{AS} , test portion mass M_{TP} and the number of increments composing the test portion n_{IT} . The main ways to reduce total RSD were to reduce the particle size, increase the mass of test portion and the number of increments. **Conclusion** According to the experimental results, the recommended value including the particle size, mass of test portion and the number of duplicate analysis are given for the process from analytical sample to test portions.

KEY WORDS: genetically modified organisms; sampling; agricultural products

基金项目: 基金项目转基因生物新品种培育重大专项项目、转基因生物抽制样和精准检测技术项目(2014ZX08012-001)

Fund: Supported by the Genetically Modified Organisms Breeding Major Projects and Genetically Modified Organisms Sample Preparation and Accurate Detection Technology Projects(2014ZX08012-001)

*通讯作者: 曹际娟, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全。E-mail: cjj0909@163.com

*Corresponding author: CAO Ji-Juan, Ph.D., Professor, Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001, China. E-mail: cjj0909@163.com

1 引 言

在过去 30 多年里, 转基因植物(genetically modified organisms, GMOs)的种植面积和产量持续提升^[1], 但其对人类健康的影响尚不清楚; 一些国家认为转基因产品无害, 不必实施控制措施, 只要是经过批准的品系就可以种植和生产加工; 而更多的国家采取谨慎态度, 对转基因产品的种植、入境和销售采取了严格程度不同的技术措施, 这导致与转基因产品相关的国际贸易中经常发生纠纷, 进而对转基因检测提出了越来越高的要求, 作为准确检测先决条件—抽样, 得到越来越多的关注^[2-7]。作为准确检测先决条件的抽样技术对检测结果的准确度起到了至关重要的作用; 如何准确抽取含有转基因成分的农产品样品, 成为摆在科技工作者面前的重要课题^[8]。欧盟^[9-12]、ISO^[13,14]和中国^[15]分别针对 GMO 的抽样制订了法规标准, 但现行标准法规中, 全部采用理论计算、计算机模拟等方法, 而缺少采用实际数据研究并分析所获得的方法。

转基因产品的抽样, 按照先后顺序可分为以下 3 个过程: 从批到实验室样品(process from lot to laboratory sample), 从实验室样品到分析样品(from laboratory sample to analytical sample), 从分析样品到试料(from analytical sample to test portion)。本系列文章将针对以上 3 个过程分别开展研究。

本文将讨论从分析样品到试料的过程。从分析样品中采取试料是一个选择过程, 其主要误差的大小取决于分析

样品的非均匀性、试料量和重复试料个数。

2 材料与方法

2.1 实验材料

转基因标准物质 T25、MON88017、MON87640 购买自 American Oil Chemists' Society。

转基因标准物质 TC1507、NK603、MON863、MON810、GA21、BT176、BT11、ES3272、MIR604 购买自 Sigma 公司。

2.2 仪器设备

DNA 提取试剂盒, DNA extraction kit of genetically modified organism (GMO) detection Ver2.0 (No. D9093) 购买自 TaKaRa 公司。

实时 PCR 分析仪, ABI7500, 购买自 Applied Biosystems 公司。

2.3 标准分析样品的制备

将转基因玉米原粒和非转基因玉米原粒分别冻干, 分别粉碎至-60 目、-100 目和-200 目, 采用直接分别称重添加法, 取非转基因玉米为基体, 采用 MON810、Bt11、Bt176、T25、GA21、MON863、NK603、TC1507、ES3272、MON88017、MIR604、MON87640 等 12 个品系纯品(原粒)作为添加物。每个标准分析样品添加含量: 每个品系约为 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ (即质量比为 10%~0.0001%), 其中含量 10^{-1} 的标准分析样品添加 MON810、Bt11、Bt176、T25 等 4 个品系。使用 V 型混合器充分混匀并注意防止交叉污染。表 1 列出了典型的 MON810 品系添加含量。

表 1 标准样品的制备
Table 1 The preparation of standard samples

品系	添加量	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
	总质量, g	100	100	100	100	100	250
M1: 玉米,-60 目	GMO(MON810) 质量, g	10.134	1.012	0.0987	0.0122	0.00109	0.00011
	基体质量, g	90.389	99.221	99.856	99.925	100.721	100.454
	实际含量, %	10.08	1.010	0.0987	0.0122	0.00108	0.00011
M2: 玉米,-100 目	GMO(MON810) 质量, g	10.295	1.366	0.1067	0.0091	0.00102	0.00012
	基体质量, g	91.478	99.254	99.528	99.473	100.695	100.268
	实际含量, %	10.12	1.358	0.107	0.0091	0.00101	0.00012
M3: 玉米,-200 目	GMO(MON810) 质量, g	10.658	1.201	0.1066	0.0102	0.00117	0.0001
	基体质量,g	91.141	99.959	99.791	99.936	100.511	100.104
	实际含量,%	10.47	1.187	0.107	0.0102	0.00116	0.00010

2.4 试料抽取方法及结果

对于每个标准分析样品,分别使用系统抽样方法采取约 5 mg×5, 25 mg×1 各 10 组, 5 mg×10, 10 mg×5, 25 mg×2, 50 mg×1 各 10 组, 5 mg×20, 10 mg×10, 20 mg×5, 50 mg×2, 100 mg×1 各 10 组和 10 mg×20, 20 mg×10, 40 mg×5, 100 mg×2, 200 mg×1 各 10 组。分别将各组样品混合成 25、50、100、200 mg 的试料,得到 25 mg 试料 20 个, 50 mg 试料 40 个, 100 mg 试料 50 个, 200 mg 试料 50 个。用同一种 DNA 提取试剂盒提取试料中的目标 DNA,以随机顺序分别测试添加的转基因含量,计算其单次相对标准差,作为分析样品的总相对标准差(单次分析)的度量。其中,每个试料全部用于提取 DNA,每份 DNA 提取液实施 PCR 分析 1 次。比较各种试料抽取方法的相对标准差,发现各品系获得结果基本一致,MON810 的数据列于表 2~4。

3 结果与讨论

3.1 影响 RSD 的参数

从表 2、3、4 中可知,影响分析样品 RSD 的主要参数有分析样品的含量 a_{AS} (analytical sample, AS)和粒度 d_{AS} 、试料量 M_{TP} (test portion, TP)、构成试料的份样数 n_{IT} (increase composition of test portion, IT)等。除 n_{IT} 外,其他 3 个主要参数对 RSD 影响程度的排序为 a_{AS} 、 d_{AS} 和 M_{TP} 。

3.2 分析样品粒度的优化

分析样品的粒度 d_{AS} (标称粒度)对低含量样品的 RSD 有着至关重要的影响。根据表 2 做出粒度的影响谱图,见图 1。总体趋势是粒度越小,RSD 越小。在较高含量($10^{-1} \sim 10^{-3}$)段,粒度对 RSD 的影响不大,这主要是由于分析样品的聚集分布非均匀性占据了主导地位;在低含量段($10^{-4} \sim 10^{-6}$),粒度的影响开始逐渐显现并随着含量的降低而增强。

表 2 各种试料抽取方法的相对标准偏差-M1
Table 2 RSD results of different sample extraction methods-M1

M1: -60 目, 25 mg						
份样数	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
5	18.3%	19.4%	20.9%	65.8%	416.8%	931.6%
1	24.7%	28.1%	29.5%	104.0%	422.7%	931.6%
M1: -60 目, 50 mg						
份样数	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
10	13.0%	14.8%	12.2%	51.1%	159.9%	785.8%
5	16.7%	18.6%	17.6%	62.7%	393.5%	931.6%
2	18.8%	21.5%	20.9%	76.6%	314.0%	overflow
1	19.8%	19.7%	18.6%	77.4%	262.3%	852.7%
M1: -60 目, 100 mg						
份样数	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
20	10.2%	11.9%	9.6%	35.0%	149.4%	598.2%
10	13.2%	13.4%	15.6%	46.2%	244.2%	784.3%
5	13.3%	12.1%	14.4%	47.5%	164.8%	794.9%
2	13.5%	13.5%	13.2%	44.6%	194.6%	854.1%
1	13.7%	15.6%	15.1%	50.2%	317.7%	931.6%
M1: -60 目, 200 mg						
份样数	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
20	8.9%	8.2%	8.1%	31.1%	127.0%	574.4%
10	10.3%	9.1%	7.8%	26.7%	125.2%	637.0%
5	10.3%	10.2%	10.4%	33.8%	137.7%	575.6%
2	8.8%	9.8%	10.0%	36.4%	151.9%	779.3%
1	10.1%	10.0%	9.2%	37.0%	144.1%	794.9%

注: overflow-溢出

表 3 各种试料抽取方法的相对标准偏差-M2
Table 3 RSD results of different sample extraction methods-M2

M2: -100 目, 25 mg						
份样数	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
5	21.4%	19.7%	20.7%	27.3%	129.2%	784.3%
1	24.7%	27.4%	27.4%	39.8%	185.0%	570.1%
M2: -100 目, 50 mg						
份样数	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
10	13.3%	14.6%	13.6%	21.0%	85.2%	413.7%
5	14.2%	17.9%	16.1%	24.2%	122.9%	476.5%
2	16.3%	19.9%	19.4%	25.0%	101.3%	726.5%
1	19.1%	19.1%	20.4%	30.0%	139.9%	716.0%
M2: -100 目, 100 mg						
份样数	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
20	10.9%	8.7%	11.1%	16.9%	56.5%	206.3%
10	15.2%	12.9%	12.7%	17.6%	78.4%	243.5%
5	13.4%	13.0%	13.0%	18.7%	75.5%	477.3%
2	14.6%	13.5%	13.8%	18.7%	90.7%	407.4%
1	13.2%	13.6%	13.9%	16.5%	87.2%	398.5%
份样数	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
20	7.2%	9.1%	9.6%	12.8%	49.8%	174.1%
10	9.7%	9.8%	9.4%	14.7%	59.2%	345.7%
5	9.5%	7.8%	10.7%	13.6%	59.9%	258.1%
2	9.5%	8.6%	11.3%	14.9%	69.3%	245.1%
1	9.3%	9.5%	10.1%	13.5%	80.2%	381.4%

表 4 各种试料抽取方法的相对标准偏差-M3
Table 2 RSD results of different sample extraction methods-M3

M3: -200 目, 25 mg						
份样数	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
5	19.8%	18.5%	21.4%	21.6%	41.1%	204.6%
1	23.3%	27.8%	31.2%	29.8%	54.3%	444.8%
M3: -200 目, 50 mg						
份样数	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
10	16.3%	14.8%	15.1%	14.5%	30.8%	153.1%
5	18.0%	17.7%	17.2%	16.8%	29.7%	190.4%
2	20.5%	17.9%	17.9%	17.6%	42.3%	279.8%
1	17.3%	20.0%	16.4%	23.3%	35.1%	373.1%

续表 4

M3: -200 目, 100 mg						
份样数	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
20	9.9%	9.1%	10.8%	10.0%	18.7%	120.5%
10	13.0%	13.3%	13.1%	13.3%	27.3%	119.1%
5	11.4%	13.1%	12.8%	15.0%	23.7%	177.8%
2	13.0%	12.1%	13.2%	13.9%	23.4%	132.0%
1	15.4%	17.5%	14.0%	13.3%	26.2%	112.6%

M3: -200 目, 200 mg						
份样数	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
20	8.2%	8.6%	9.4%	9.6%	16.7%	93.9%
10	9.9%	8.8%	9.2%	9.4%	18.1%	103.2%
5	9.4%	9.6%	8.7%	10.8%	16.3%	119.4%
2	8.9%	8.7%	10.3%	10.3%	18.6%	101.0%
1	9.3%	9.5%	10.3%	10.6%	18.8%	106.6%

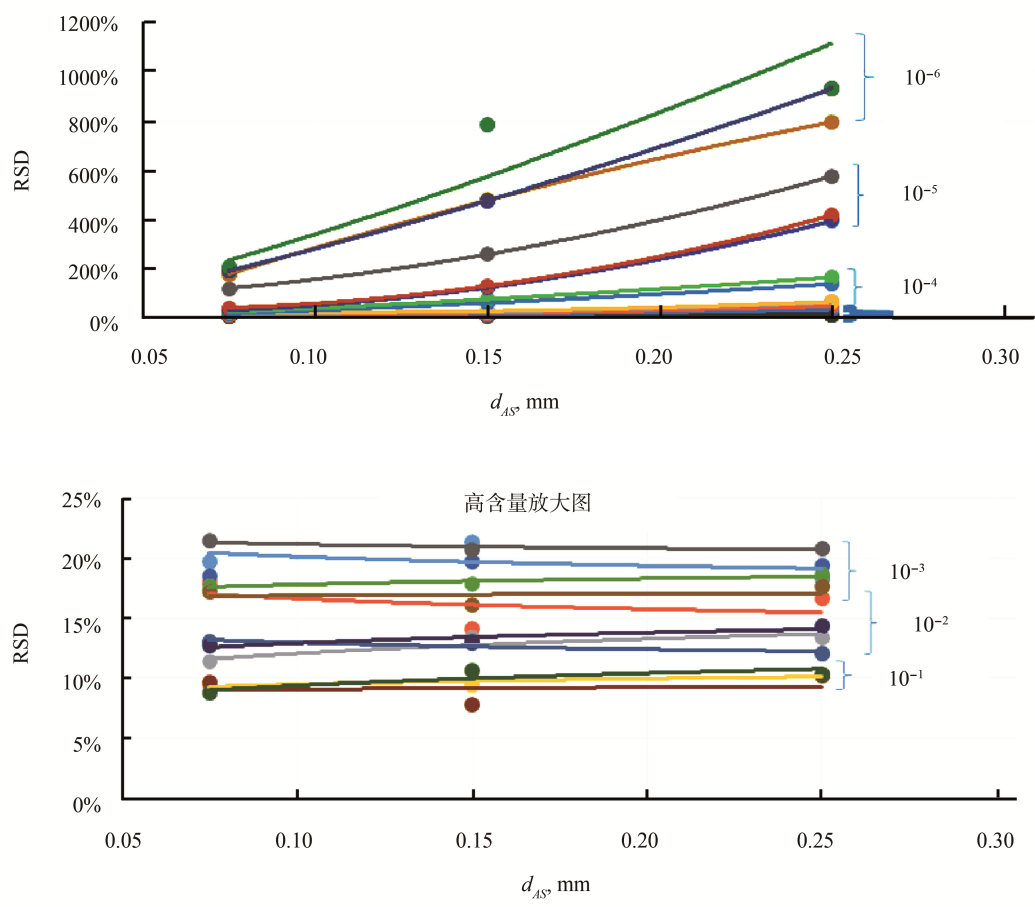


图 1 分析样品粒度对 RSD 的影响
Fig. 1 Influence of partical size on RSD

在所研究的对象中, 研磨至-100目是可行的。由于所研究的对象具有较为普遍的代表性, 因此, 在日常抽样和分析工作中, 可将分析样品粒度研磨至-100目或更细。

-100目和-200目分析样品在较高含量($10^{-1} \sim 10^{-3}$)时其产生的 RSD 无明显差别, 在试料量 100 mg 及以上时, -100目和-200目分析样品在较低含量(10^{-4})时的差别也不大, 对于低含量($10^{-5} \sim 10^{-6}$)时其 RSD 差别在 4~5 倍。因此降低分析样品粒度到-200目对含量 10^{-4} 以上的样品来说是没有必要的, 只有在含量小于 10^{-4} 时, 降低分析样品粒度才是最经济的。

3.3 最小试料量

在现行分析方法的范围内(25~200 mg), 随着试料量的增加, RSD 总体呈下降趋势。当试料量增加至 100 mg 以上时, RSD 的下降幅度明显收窄。100 mg 和 200 mg 试料量所导致的 RSD 仅差 1.5 倍左右。而试料量从 50 mg 增加至 100 mg 时, RSD 下降的幅度有时会超过 2.3 倍。但从实测

数据分析, 最小试料量设定在 200 mg 较为合理, 推荐测试方法采用。图 2 显示了采用不同试料量对分析样品总分析相对标准差的影响情况。

3.4 构成试料的份样数

对于-100目样品, 构成试料的份样数 n_{IT} 对 RSD 的影响如图 3 所示。可知, n_{IT} 对 RSD 的影响仅对低含量($10^{-5} \sim 10^{-6}$)分析样品较为明显。由于从分析样品中随机抽取份样构成试料的操作较容易实施, 因此推荐采用 $n_{IT}=5$ 或以上的操作方法, 尽可能降低分析样品不均匀分布所导致的方差。

3.5 试料抽取方差的计算机模拟

利用计算机仿真技术建立上述标准分析样品 M1、M2、M3 的模型, 并按照 5、10、25、50、100、200 mg 试料量采取试料, 实施模拟分析, 从而可得到在无分析方差情况下的试料抽取方差估计, 见图 4。

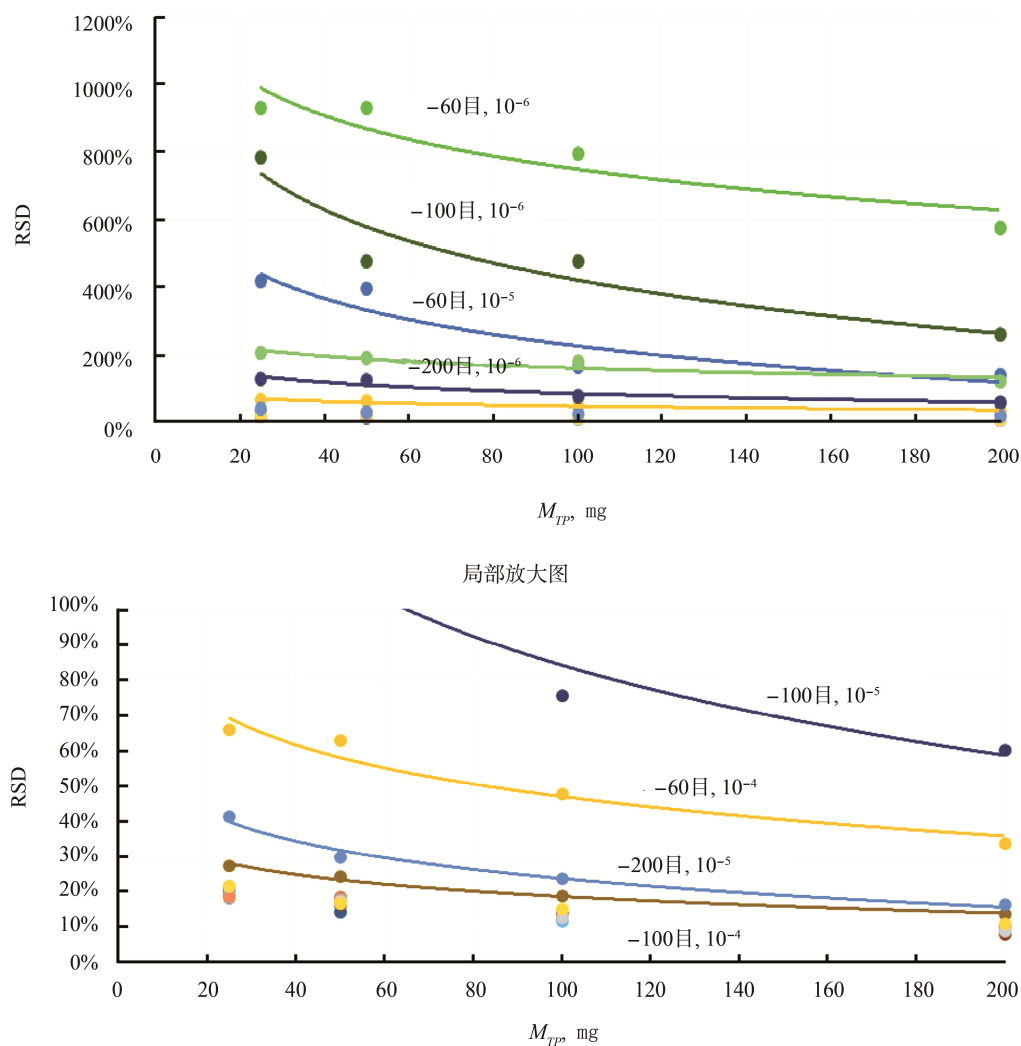
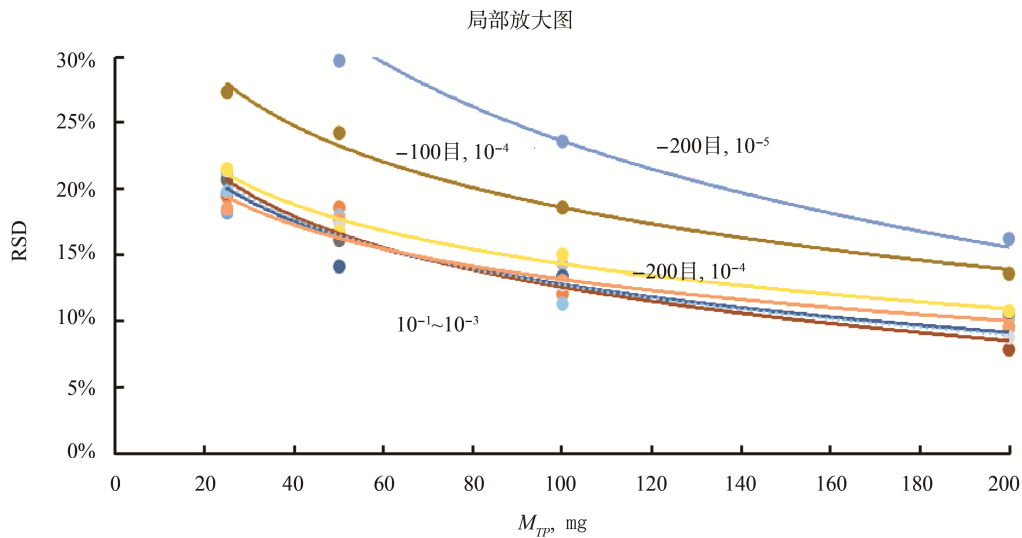


图2 试料量对 RSD 的影响

Fig. 2 Influences of the test portion mass on RSD



续图 2 试料量对 RSD 的影响
Fig. 2 Influences of the test portion mass on RSD

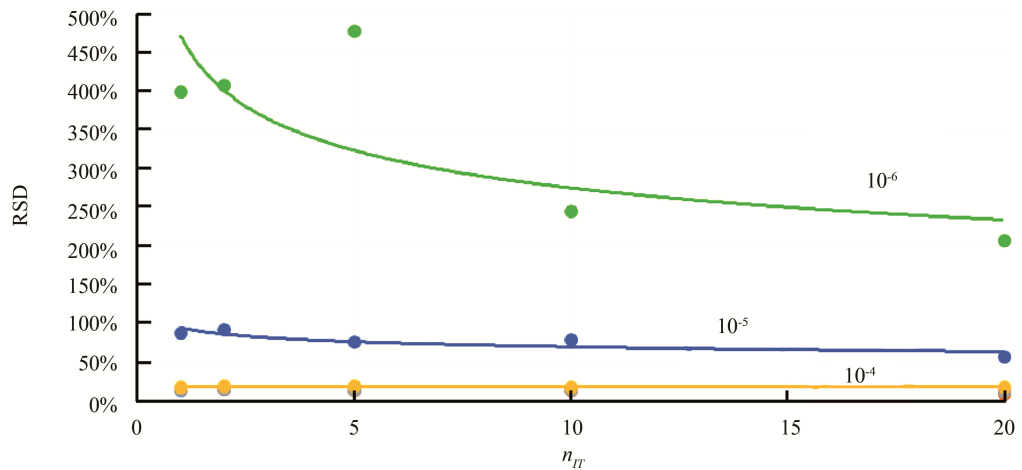


图 3 构成试料的份样数对 RSD 的影响
Fig. 3 Influences of the number of increments on RSD

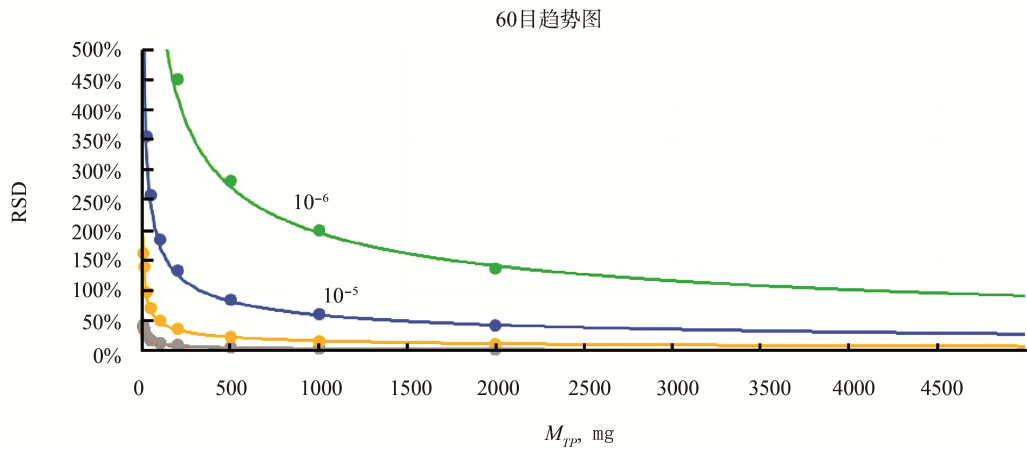
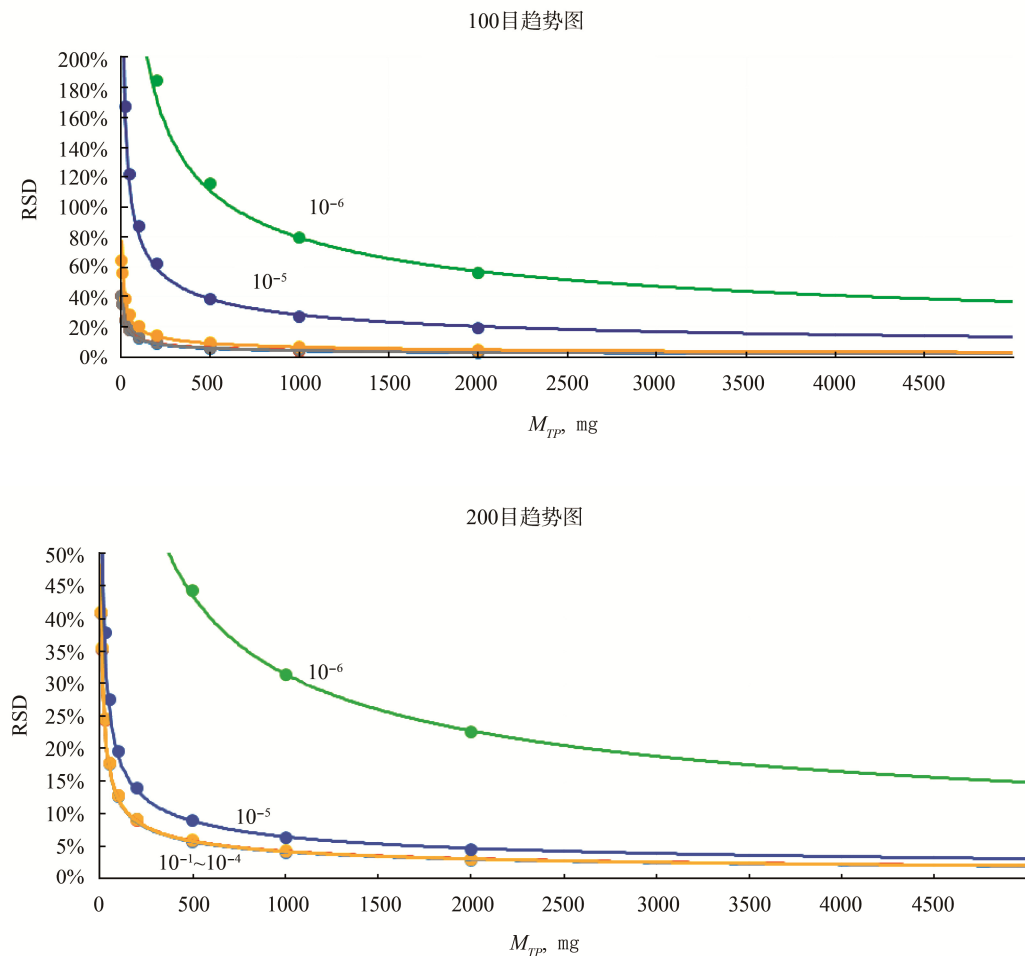


图 4 均匀分析样品试料抽的 RSD
Fig. 4 RSD results in the process from homogeneous analytical sample to test portion



续图 4 均匀分析样品试料抽的 RSD

Fig. 4 RSD results in the process from homogeneous analytical sample to test portion

4 结论和建议

从分析样品中抽取试料的抽样相对标准差 RSD(TP) 主要取决于分析样品的粒度和含量、试料量, 即分析样品的固有非均匀性起到了关键作用。构成试料的份样数对 RSD(TP)有一定的影响。降低分析样品的总分析相对标准差 RSD(TAE)的主要途径是减小分析样品的粒度、增加试料量和增加重复试料。

实践中, 鉴于实验室测试条件、农产品本身性质等限制, 至少应采用-100 目的分析样品, 对 2 个以上 200 mg 以上重复试料进行分析, 以保证较高含量(>0.01%)分析样品的总分析相对标准差 RSD(TAE)在 10%以下; 对较低含量(<0.01%), 建议采用-200 目样品, 对 3 个 200 mg 以上重复试料进行分析, 以保证 RSD(TAE)在 10%以下。

对于适合使用的-100 目以下粒度分析样品, 虽然构成试料的份样数对 RSD(TAE)的影响并不明显, 但 1 次抽

取整个试料所带来的方差仍然有一定的影响, 因此仍建议采用 5 次左右抽取一个试料的方法。

以上结论基于分析样品的含量、粒度、组成试料的份样数、试料量等与分析样品的物种性质无关的参数得出, 因此只要针对可破碎固体进行抽样, 上述结论适用于其他品系或物种, 这些结论具备通用性。

参考文献

[1] ISAAA Brief 49-2014 [EB/OL]. <http://www.isaaa.org>. 2015-08-20.

[2] 盛耀, 许文涛, 罗云波. 转基因生物产业化情况[J]. 农业生物技术学报, 2013, 12: 1479-1487.

Sheng Y, Xu WT, Luo YB. Commercialization of genetically modified organisms [J]. J Agric Biotech, 2013, 12: 1479-1487.

[3] 刘培磊, 李宁, 周云龙. 美国转基因生物安全管理体系及其对我国的启示[J]. 中国农业科技导报, 2009, 5: 49-53.

Liu PL, Li N, Zhou YL. Safety administration system for transgenic organism in America and its enlightenment for China [J]. J Agric Sci

- Technol, 2009, 5: 49–53.
- [4] James C. 2014 年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势[J]. 中国生物工程杂志, 2015, 1: 1–14.
- James C. The 2014 global biotech/gm crops commercialization development situation [J]. J Chin Biotechnol. 2015, 1: 1–14.
- [5] Barbau-Piednoir E, Stragier P, Roosens N, *et al.* Inter-laboratory testing of GMO detection by combinatory SYBR® green PCR screening(Co SYPS) [J]. Food Anal Methods, 2014, 8: 1719–1728.
- [6] Twardowski T, Malyska A. Uninformed and disinformed society and the GMO market [J]. Trends Biotechnol, 2015, 1: 1–3.
- [7] 韩永明, 翟广谦, 徐俊锋. 欧盟转基因生物管理法规体系的演变及对我国的启示[J]. 浙江农业科学, 2013, 11: 1482–1485.
- Han YM, Zhai GQ, Xu JF. The evolution of the eu regulation system of transgenic organisms and the enlightenment to our country [J]. J Zhejiang Agric Sci, 2013, 11: 1482–1485.
- [8] Emslie KR, Whaites L, Griffiths KR, *et al.* Sampling plan and test protocol for the semiquantitative detection of genetically modified canola(*Brassica napus*)seed in bulk canola seed [J]. J Agric Food Chem, 2007, 11: 4414–4421.
- [9] Kay S, Paoletti C. Sampling Strategies for GMO detection and/or quantification, EC directorate general JRC [Z]. 2001.
- [10] ISO 542:1990 Oilseeds-Sampling [S].
- [11] ISO 13690:1999 Cereals, pulses and milled products-Sampling of static batches [S].
- [12] Kay S, Eede GVD. The limit of GMO detection [J]. Nat Biotechnol, 2001(19): 405–409.
- [13] ISO 24333:2009 Cereals and cereal products-Sampling [S].
- [14] ISO DTR29263 Cereals and cereal products-Sampling studies [S].
- [15] GB/T 19495.7-2004 转基因产品检测 取样和制样方法[S].
- GB/T 19495.7-2004 Detection of genetically modified organisms and derived products-methods for sampling preparation [S].

(责任编辑: 金延秋)

作者简介



徐 静, 博士, 高级工程师。主要研究方向为食品安全色谱检测的研究。
E-mail: jingxu99@163.com



曹际娟, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测与研究。
E-mail: cjj0909@163.com