

转基因成分定量检测数据分析及不确定度 评估现状概述

杨冬燕*, 杨永存, 李 浩

(深圳市疾病预防控制中心, 深圳 518055)

摘 要: 在利用实时荧光定量(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测转基因成分的含量时, 数据分析的规范化与标准化对保证实验数据的准确性及实验室间数据的可比性具有重要意义。基于目前很多国家和地区对转基因产品有强制性标识要求的现状, 测量不确定度在进出口食品的转基因检测中作用显著。本文在分析 qRT-PCR 实验至少应提供的信息(the minimum information for publication of quantitative Real-time PCR experiments(MIQE))数据分析的基础上, 综合阐述了 qRT-PCR 转基因成分定量数据分析中众多因素对定量准确性的影响, 以及 qRT-PCR 转基因成分定量不确定度来源主要要素及其相应的评估策略。尽管 MIQE 为 qRT-PCR 实验设计及数据处理提供了参考, 但目前仍然有许多实验设计甚至已经发表的论文并未完全遵照相关要求, 从而导致实验结果偏差甚至错误, 其数据处理的某些环节尚缺乏一致性的要求。由于对一些影响因子缺少定量描述, 在转基因成分定量检测的不确定度分析方面还缺乏一个通行的方法。

关键词: 实时荧光定量 PCR; 转基因成分; 数据分析; 不确定度

Data analysis and uncertainty evaluation of genomic modified ingredients quantitation by real-time PCR

YANG Dong-Yan*, YANG Yong-Cun, LI Hao

(Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518055, China)

ABSTRACT: During the quantitative real-time PCR experiments for detection of genomic modified (GM) ingredients, the normalization of data processing is important for the accuracy of experimental results and comparability among different laboratories. Since it is now required to label the GM products in many countries and regions, the uncertainty of measurement is vital for the GM detection in the imports and exports. Based on the minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments(MIQE), the affects of various factors for quantitative accuracy, as well as the main resources of measurement uncertainty and corresponding evaluations were elucidated. Although MIQE provides reference for qRT-PCR experimental design and data processing, but at present many experimental design and published papers still did not fully comply with the relevant requirements, which lead to the result deviation even error. Some links of data processing are short in consistency requirements. Due to the lack of quantitative description for some factors, a generally accepted method of uncertainty analysis on genetically

基金项目: 深圳市科技计划重点项目(201201008)

Fund: Supported by the Key Projects of Shenzhen Science and Technology Plan (201201008)

*通讯作者: 杨冬燕, 主任技师, 主要研究方向为营养与食品安全。E-mail: szyang6699@126.com

*Corresponding author: YANG Dong-Yan, Director of Technicians, Shenzhen center for disease control and prevention, Shenzhen 518055, China. E-mail: szyang6699@126.com

modified ingredients quantitation has not been developed.

KEY WORDS: quantitative real-time PCR; genomic modified ingredients; data analysis; uncertainty

1 引言

在过去的十多年中,转基因作物的全球性栽培和商业化进程不断推进。越来越多的转基因食品、食品配料和添加剂进入市场和餐桌,转基因产品的食用安全、环境风险及伦理等问题被社会普遍关注。截至2013年,全球60多个国家和地区制定了相关的法律和法规,要求对转基因生物及其产品(包括食品和饲料)进行标识管理^[1]。目前全球的转基因标识管理存在限量标识和不限量标识两种方式,限量标识是指当转基因含量达到或超过标识阈值即需要标识,未达到阈值可不标识。目前,欧盟、日本等多个国家都实行基于转基因含量(阈值)的限量标识,标识阈值从欧盟规定的0.9%至日本的5%不等^[2],阈值作为判定转基因产品身份的标尺,是实施转基因产品标识管理的关键点。而我国目前采用的是转基因不限量标识的管理方式,对包括大豆、玉米、棉花、油菜和甜菜5种17类转基因作物进行无限量强制性标识^[3,4]。但有专家指出,随着我国转基因技术和产业的发展,定量标识是必然趋势^[5]。

实时荧光PCR定量技术(real-time quantitative PCR, qRT-PCR)以其灵敏度高、特异性强等优势,成为世界各国进行转基因食品成分定量检测的重要技术手段^[6,7]。基于转基因生物具有外源基因和受体看家基因同时存在于一个转基因生物体的特点,目前转基因成分定量多采用双标准曲线相对定量法,即标准物质DNA溶液被梯度稀释后,基于内、外源基因的扩增结果分别制备标准曲线,依据标准曲线分别定量待测样品的内、外源基因拷贝数,最后以待测样品的内、外源基因的拷贝数之比来近似代表样品中的转基因质量分数^[8]。

在利用实时荧光定量PCR检测转基因成分含量时,数据分析的规范化及不确定度评估对保证实验数据的准确性及实验室间数据的可比性具有重要意义。然而,目前转基因成分定量数据分析及不确定度评估要素尚不规范,检测员对实时定量qRT-PCR的操作规范和试验数据分析缺乏共识,使得其试验结果的可重复性以及准确性受到一定质疑。本文针对转基因成分定量检测数据分析及不确定度评估现状及要点进行概述。

2 数据分析

2009年英国学者Bustin等^[9]提出了qRT-PCR实验至少应提供的信息(the minimum information for publication of quantitative Real-time PCR experiments, MIQE)。自从MIQE被提出以来,它一直被作为qRT-PCR实验流程及数据处理

的国际化标准指南^[10],为促进qRT-PCR检测数据的可靠性以及数据在实验室内和实验室间的验证比对发挥重要作用。MIQE标准规定qPCR试验中至少需要提供的信息,并从名称术语、样品的采集、处理和准备、核酸的质量控制、反转录、PCR过程和分析等多方面对qPCR试验的各个环节提出规范性要求。MIQE指出数据分析包括检测原始数据、原始数据质量和可靠性评价以及得出最终结果。数据收集和处理的办法可以多种多样,但需提供数据分析方法和置信度以及准确度的评价方法、评价的详细信息,具体包括qPCR分析程序的来源与版本、 C_t 值的确定方法、异常值的确定和处理、对照样品试验结果、内参基因数量及选择依据、技术性重复的次数和阶段、生物性重复的次数和一致性、再现性、统计学软件及统计学方法对结果的意义。

尽管MIQE为qRT-PCR实验设计及数据处理提供了参考,但目前仍然有许多实验设计甚至已经发表的论文并未完全遵照相关要求,从而导致实验结果偏差甚至错误^[11]。在利用qRT-PCR检测转基因成分的含量时,其数据处理的某些环节尚缺乏一致性的要求,并因此对转基因检测实验室间的数据分析和可比性产生重要影响^[12]。这些环节包括:对于源于两个平行实验数据的标准曲线绘制是基于平行实验数据的单个值,还是平行数据的平均值;两个平行实验样品 C_t 值,是将两个 C_t 值分别代入标准曲线计算靶基因的拷贝数,再计算平均值;还是先计算平行数据的 C_t 值平均值,再代入标准曲线计算靶基因拷贝数;而在计算平均值时,尚存在取算术平均或几何平均的问题;此外,对样品进行多次重复测定后,多次重复的数据怎样进行统计分析,其准确性如何判定也缺乏统一要求。针对上述问题,张丽等^[13]研究表明,一般基于多个平行反应 C_t 值平均值得到的标准曲线获得较好的相关系数,但如果检测精密度不高,该相关系数并不能真实反映实际PCR过程中数据的离散性,而基于几次平行反应的单个 C_t 值计算得到的标准曲线相关系数却能真实地反应几次平行反应数据的离散性,有助于检验数据的可靠性。此外,在获得标准曲线后,对于待测样品的起始模板拷贝数计算,先计算个平行反应的平均 C_t 值,再代入标准曲线计算待测样品起始模板拷贝数,定量结果准确性更高;而对于定量准确性的分析,需以标准物质为实验样品,通过比较标准物质测量值与标准值之间的差异,将该差异与测量值和标准值的组合不确定度进行比较,判断测量结果的可靠性。

此外,欧盟转基因网络实验室(European Network of GMO Laboratories, ENGL)对转基因检测方法中要求^[14],采用双标准曲线相对定量法测定转基因成分含量,为确保实

验结果的有效性, 其标准曲线的斜率应在-3.6~3.1 之间, 此时 PCR 扩增效率在 90%~110%之间, 线性相关系数应大于 0.98。通常用相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)评估测量的精密度, 转基因定量检测要求 RSD 25%^[15]。

3 不确定度评估

测量不确定度是经典的误差理论进一步发展和完善的产物。1993 年国际标准化组织等 7 个国际权威组织正式颁布《测量不确定度表述导则》(guide to the expression of uncertainty in measurement, GUM), 明确规定了测量不确定度的评定和表示方法^[16]。此外, 根据 ISO/17025^[17]的要求, 测试和校准实验室必须建立并实施测量不确定度评定程序, 一份完整的定量检测结果需报告与方法对应的测量不确定度, 但现在只有部分基因检测实验室进行转基因定量检测的不确定度计算, 关于转基因成分测量不确定度的研究报道还非常有限^[18,19]。由于对一些影响因子缺少定量描述, 因此在转基因成分定量检测的不确定度分析方面还缺乏一个通行的方法。

目前国内外对于转基因定量不确定度的分析大多参考《欧盟转基因检测实验室不确定度评定指南》(guidance document on measurement uncertainty for gmo testing laboratories)^[20]。根据该指南的要求, 转基因定量分析不确定度评定需考虑诸多因素, 包括标准曲线偏差、标准物质含量误差、仪器读数误差、仪器分辨率误差、加样误差和环境引起的随机误差等。而标准曲线偏差、移液器误差、人工和环境引起的随机误差等属于 A 类评定标准不确定度, 即可用统计分析的方法对重复测量值进行评定的不确定度; 标准物质含量误差、仪器读数误差、仪器分辨率误差等属于 B 类评定标准不确定度, 即根据经验值或其他已知信息评定的标准不确定度。

3.1 标准曲线的不确定度

黄文胜等^[4]研究表明, 在转基因荧光 PCR 定量测量过程中, 内外源基因标准曲线所产生的不确定度是对测量不确定度贡献最大的因素。而标准曲线的不确定度主要来自于每个测量点的读数误差及测量点相对回归曲线的相关系数。标准曲线斜率代表 PCR 效率, PCR 反应体系性能, 引物探针的质量及样品 DNA 纯度等因素均可对 PCR 效率产生影响。尽量加大标准物质的稀释梯度可提高 PCR 扩增效率测量的准确性, 然而随着样品 DNA 的不断稀释, 低浓度标准品 Ct 值的相对标准差不断增大, 成为标准曲线不确定度的主要来源, 因此, 为了提高转基因定量检测精度, 需要确定合理的稀释梯度, 既保证标准品有较大的浓度跨度, 又避免低浓度带来的较大误差。一般而言, 标准曲线的制作至少需要 5 个连续梯度稀释, 且每个梯度需要 3 次重复。

3.2 样品重复测量的标准不确定度

同一管 DNA 溶液在同批次 PCR 反应中获得的重复测量误差是定量结果不确定度的另一重要来源, 属 A 类评定不确定度, 这类误差主要来源包括人工操作、耗材的不均一性和环境因素等。批内重复测量不确定度最后表现为 Ct 值的测量偏差, 所以统一用 C_t 值的标准差表示。需要指出的是, 移液误差产生的 PCR 批内体积差异对最终结果有显著影响, 然而有研究表明, 如果将参比荧光(Rox™ 染料)加入 PCR 体系, 经过 Rox 荧光值的均一化校正后, C_t 值的批内标准差可大幅降低^[21]。因此, 如果 PCR 反应体系中加入参比荧光, 移液误差所致的不确定度可以被忽略。此外, 由于 PCR 仪的各孔之间热循环不均一性以及 PCR 反应板的形状、厚度、透光度的不均一性等也对 PCR 反应的批内重复测量的不确定度有贡献, 因此, 在评估转基因定量不确定度时也需要考虑。

3.3 标准物质不确定度

标准物质自身定量结果不确定度也是转基因定量不确定度的来源之一, 属于 B 类评定。标准物质的不确定度来源于转基因样本与非转基因样本混合的不均一性。目前国内大部分实验室的转基因标准物质来源于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), IRMM 提供的有证参考物质带有不确定度, 可以直接用于不确定度计算。

此外, 目前采用作物种子粉末作为标准物质的定量方法, 是以样品内、外源基因的拷贝数之比代表样品的转基因质量分数(genetically modified organism, GMO%), 然而这两者之间存在事实上的差异。有研究表明, 植物不同组织之间及同一作物的不同品种间样品的 DNA 密度有显著差异。Xu 等^[22]对大豆籽粒各部分的 DNA 密度测量发现, DNA 密度从高到低依次为胚芽、种皮和子叶, 而且胚芽的 DNA 密度竟达到子叶的 30 倍左右; 此外, 不同品种的大豆的 DNA 密度也存在显著差异, 15 种大豆品种中 Kefeng 6 的 DNA 密度接近 Wandou 16 的 2 倍。因此, 当前的定量方法仅适用于具有相同组织来源的样品。

4 结 论

转基因 qRT-PCR 检测数据分析方法的规范化和标准化是提高不同实验室测量数据的可比性的重要基础。而基于目前很多国家和地区对转基因产品有强制性标识要求的现状, 全面准确的测量不确定度分析在进出口食品的转基因检验中具有重要意义, 尤其是检测结果处在临界值的时候, 结果判断依赖于不确定度提供的测量结果的可信区间。

参考文献

- [1] James C. Brief 46: Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2013[EB/OL].

- <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/46/default.asp>. ISAAA Brief 46-2013
- [2] Official Journal of the European Union. Regulation(EC) No 1831 / 2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003, concerning the traceability and labeling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending directive 2001/18/EC [Z].
- [3] 卓勤. 各国转基因食品标识管理[J]. 食品安全导刊, 2014, 11: 23–24. Zhuo Q. Administration measures for labeling of genetically modified foods in different countries [J]. Food Saf Leader, 2014, 11: 23–24.
- [4] 我国对农业转基因生物实施全面管理[J]. 中国农村小康科技, 2002, 8: 15. Comprehensive management for agricultural genetically modified organisms will be implemented in our country [J]. China Rural Well-Off Technol, 2002, 8: 15.
- [5] 卢长明. 我国实施转基因产品定量标识的对策与建议[J]. 科技导报, 2011, 29 (24): 11. Lu CM. Countermeasures and suggestions on the labeling of genetically modified products in our country [J]. Sci Leader, 2011, 29(24): 11.
- [6] Filiz G, Ercan A, Nermin G, *et al.* Recent molecular tools for detecting transgenic events in genetically modified (GM) crop products [J]. Sci Res Essays Vol, 2011, 6(24): 5091–5099.
- [7] Kim JH, Kim YR, Kim HY. Current status on the development of detection methods for genetically modified plants [J]. J Plant Biotechnol, 2011, 38: 143–150.
- [8] 黄文胜, 邓婷婷, 韩建勋, 等. 转基因定量检测的不确定度研究[J]. 中国生物工程杂志[J]. 2012, 32(1): 49–55. Huang WA, Deng TT, Han JX, *et al.* Research on the uncertainty of transgene quantitation [J]. J Chin Biotechnol, 2012, 32(1): 49–55.
- [9] Bustin SA, Benes V, Garson JA, *et al.* The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative Real-time PCR experiments [J]. Clin Chem, 2009, 55(4): 611–622
- [10] Taylor SC, Mrkusich EM. The state of RT-quantitative PCR: First hand observations of implementation of minimum information for the publication of quantitative Real-time PCR experiments (MIQE) [J]. J Mol Microbiol Biotechnol, 2014, 24(1): 46–52.
- [11] Abdel NA, Azhar E, Damanhour G, *et al.* Five years MIQE guidelines: The case of the Arabian countries [J]. PLoS One, 2014, 9(2): e88266.
- [12] Žel J, Cankar K, Ravnikar M, *et al.* Accreditation of GMO detection laboratories: Improving the reliability of GMO detection [J]. Accred Qual Assur, 2006, 10(10): 531–536
- [13] 张丽, 曹应龙, 王海英, 等. 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测转基因成分的数据分析及其标准化研究[J]. 农业生物技术学报, 2015, 23(1): 126–134. Zhang L, Cao YL, Wang HY, *et al.* Data analysis and standardized research on detection of genetically modified ingredients by real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR) [J]. J Agric Biotechnol, 2015, 23(1): 126–134.
- [14] European Commission. Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing[R/OL]. <http://www.doc88.com/p-9179402168128.html>. 2008.10.13.
- [15] Watanabe S, Sawada H, Naito S, *et al.* Simulation of collaborative studies for real-time PCR-based quantitation methods for genetically modified crops [J]. J AOAC Int, 2013, 96(2): 357–368.
- [16] Kučera J, Bode P, Stvpánek V. The 1993 iso guide to the expression of uncertainty in measurement applied to NAA [J]. J Radioanal Nucl Chem, 2000, 245(1): 115–122.
- [17] 中国合格评定认可委员会. ISO/IEC17025 检测和校准实验室能力的通用要求[Z]. China National Approval Committee For Conformity Assessment. ISO/IEC17025 Accreditation Criteria for the Competence of Testing and Calibration Laboratories [Z].
- [18] 宋君, 郭灵安, 雷绍荣, 等. 实时荧光定量 PCR 检测转基因玉米 59122 的方法建立及测量不确定度评估[J]. 食品科学, 2014, 35(24): 259–264. Song J, Guo LG, Lei SR, *et al.* Detection of genetically modified maize 59122 by real-time fluorescent quantitative PCR and uncertainty evaluation [J]. Food Sci, 2014, 35(24): 259–264.
- [19] Song J, Lei SR, Liu Y. Uncertainty in measuring construct-specific fragments of genetically modified maize MON863 by real time quantitative PCR [J]. Agric Sci Technol, 2011, 12(12): 1777–1780.
- [20] European Commission. Guidance document on measurement uncertainty for GMO testing laboratories [EB/OL]. 2009-7-1. https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/eur_22756en.pdf
- [21] 高峰, 杨学文, 王佳, 等. ROX 参比荧光在实时荧光定量 RT-PCR 检测 Nrf2mRNA 中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2011, (34)8: 742–747. Gao F, Yang XW, Wang J, *et al.* Application of ROX reference fluorescence in Nrf2mRNA detection by real-time fluorescent quantitative PCR [J]. J China Inspect Med, 2011, (34)8: 742–747.
- [22] Xu WT, Huang KL, Deng AK, *et al.* Variations of tissue DNA density and nuclear DNA content in soybean lines and their impacts on the GMO quantification [J]. Food Control, 2007, 18 (10): 1300–1306.

(责任编辑: 姚菲)

作者简介



杨冬燕, 硕士, 主任技师, 主要研究方向为营养与食品安全。

E-mail: szyang6699@126.com