

# 粮油作物及饲料转基因成分检测能力验证 结果分析

蔡军, 李慧\*, 胡梦龙, 傅洋, 石嵩, 欧静堃

(营养健康与食品安全北京市重点实验室, 中粮营养健康研究院, 北京 102209)

**摘要:** **目的** 通过参加转基因检测能力验证计划, 对实验室转基因成分检测技术能力进行有效确认。**方法** 针对能力验证组织方的要求, 依据相应国家标准、农业部公告及出入境检验检疫行业标准, 对水稻、玉米、玉米酒糟粕、大豆和油菜籽共 10 份样品进行转基因成分定性检测和品系鉴定。**结果** 所参加 5 项 10 份样品的能力验证均获得满意结果。**结论** 转基因成分检测能力验证结果受检测方法的选择、DNA 提取的效率与质量、实验过程的质量控制等因素影响较大。

**关键词:** 转基因成分; 能力验证; 结果; 影响因素

## Analysis of proficiency test for detecting genetically modified component in crops and feed

CAI Jun, LI Hui\*, HU Meng-Long, FU Yang, SHI Song, OU Jing-Kun

(Beijing Key Laboratory of Nutrition, Health & Food Safety, Nutrition & Health Research Institute, COFCO Corporation, Beijing 102209, China)

**ABSTRACT: Objective** To make valid confirmation of the technical ability for genetically modified component detection in our laboratory by participating in the proficiency tests for detecting genetically modified components. **Methods** According to proficiency test organizer's requirements, genetically modified components of 10 samples including rice, corn, corn distillers dried grains (DDG), soybean and rapeseed were qualitative detected or event identified, in accordance with the corresponding GB/T standards, announcements of the ministry of agriculture PRC and SN/T standards. **Results** All the 5 proficiency tests and 10 samples were shown satisfactory results. **Conclusion** Results of proficiency tests are greatly affected by the choice of detection method, the extraction efficiency and quality of DNA, the quality control of experiment process *etc.*

**KEY WORDS:** genetically modified components; proficiency testing; result; influencing factors

## 1 引言

能力验证是利用实验室间的比对判定实验室的特定

校准、检测能力, 即按照预先规定的条件, 由 2 个或以上实验室对相同或相似样品进行检测的组织、实施和评价, 是国际通行的实验室质量控制方法和认可机构确认实验室能

基金项目: 中粮集团基础研究项目(2013-C2-F005)

**Fund:** Supported by Basic Research Project of COFCO (2013-C2-F005)

\*通讯作者: 李慧, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品生物检测及研发。E-mail: lhui@cofco.com

\*Corresponding author: LI Hui, Ph.D., Senior Engineer, Nutrition & Health Research Institute, COFCO Corporation, Beijing 102209, China. E-mail: lhui@cofco.com

力的有效技术手段<sup>[1-4]</sup>。通过参加能力验证,可发现实验室存在的问题和监控实验室的运行状态,提高实验室检测能力和检测水平,确保检测质量<sup>[5-7]</sup>。近年来,随着转基因作物产业化进程的加快,转基因成分监测的种类和范围不断扩大。因此,转基因检测工作的重要性日益突显。当转基因作物由主要用于饲料的经济作物向用于人类直接食用的粮食作物发展后,大众对转基因产品的关注度随之提高,对食品是否含有转基因成分提出了更严格的要求。目前国际上在转基因检测与标识管理方面已经形成部分共识性文件、评价原则及检测标准。我国《食品安全法》第六十九条明确规定“生产经营转基因食品应当按照规定显著标示”,转基因成分检测数据的准确性和可靠性将直接影响到对产品质量安全控制的效果及监督执法工作的权威性和公正性。因此,转基因检测实验室的检测能力和实验室质量控制需要在积极参与能力验证的过程中得到提高<sup>[8-11]</sup>。本实验室连续两年参加了中国检验检疫科学研究院和北京出入境检验检疫局组织的粮油、饲料转基因检测能力验证计划,通过对能力验证过程中重要影响因素及能力验证结果进行简要的分析和总结,旨在为提高转基因检测能力及实验室质量控制提供技术参考。

## 2 能力验证项目相应要求描述

所参加的5项能力验证均需要参加实验室对样品中的转基因成分进行定性测定,包括内源基因、确定是否含有

外源基因及特定转基因品系。每项能力验证均要求所提供样品的检测结果与指定值完全一致,才能获得检测结果满意评价,否则相应检测项目结果为不满意,具体要求描述见表1。

## 3 材料与方法

### 3.1 样品

能力验证样品为中国检验检疫科学研究院测试评价中心转基因检测能力验证计划(编号:ACAS-PT067, ACAS-PT101, ACAS-PT102 和 ACAS-PT103)和北京出入境检验检疫局检验检疫技术中心能力验证计划(编号:BIQTC-2015-P08)提供样品。所有样品均为粉末状,每种样品均只提供1份,相应样品标识及能力验证项目如表1所示。

### 3.2 主要仪器及试剂

Veriti96 孔热循环仪、7500 Fast 实时荧光定量 PCR 系统及 NanoDrop 2000 超微量分光光度计(美国 Thermo Fisher 公司)、PowerPac 通用电泳仪及 GelDoc XR System 凝胶成像系统(美国 Bio-rad 公司)、Allegra 64R 高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司)、dNTPs、Taq 酶及 DNA Marker 等购自 Takara 公司,荧光定量 PCR 试剂购自美国 Thermo Fisher 公司,新型植物基因组提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;检测引物及探针均由美国 Thermo Fisher 公司合成提供。

表1 能力验证项目信息  
Table 1 Information of participated proficiency tests

能力验证计划名称	能力验证承办方	样品标识	项目检测目标	参加时间
ACAS-PT067 粮食转基因能力验证计划	中国检验检疫科学研究院测试评价中心	14-J808	转基因水稻	2014.10
ACAS-PT101 粮食转基因检测	中国检验检疫科学研究院测试评价中心	15-H908	转基因玉米	2015.09
		15-G517	转基因大豆	2015.09
ACAS-PT102 玉米酒精粕转基因检测	中国检验检疫科学研究院测试评价中心	15-J656	转基因玉米	2015.08
ACAS-PT103 转基因玉米品系检测	中国检验检疫科学研究院测试评价中心	15-R722	MIR 162, NK 603, Bt 11, MON 810, MON 89034, T25	2015.08
		15-T418	MIR 162, NK 603, Bt 11, MON 810, MON 89034, T25	2015.08
		2015P08-04-01	转基因油菜 Ms8 品系	2015.09
BIQTC-2015-P08 油菜籽中转基因成分定性检测及 Ms8 品系的鉴定能力验证	北京出入境检验检疫局检验检疫技术中心	2015P08-04-02	转基因油菜 Ms8 品系	2015.09
		2015P08-04-03	转基因油菜 Ms8 品系	2015.09
		2015P08-04-04	转基因油菜 Ms8 品系	2015.09

### 3.3 基因组 DNA 提取

称取阳性对照样品、阴性对照样品及测试样品各 40 mg 分别置于 1.5 mL 无菌离心管内, 按照新型植物基因组提取试剂盒说明书的要求进行基因组 DNA 的提取。采用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计测量相应提取 DNA 的浓度及质量, 确保  $OD_{260}/OD_{280}$  的比值在 1.7~1.9,  $OD_{260}/OD_{230} \geq 2.0$ , 同时采用琼脂糖凝胶电泳检测相应提取 DNA 的完整性。将 DNA 溶液稀释至浓度为 25~50 ng/ $\mu$ L, 分装于 -20 °C 备用。

### 3.4 检测方法

本实验室参加能力验证计划, 举办方不指定测试方法。通常将接收到的样品严格按作业指导书进行制备。不同的转基因检测项目采用其相应的技术指南<sup>[12]</sup>、国家标准<sup>[13,14]</sup>、农业部公告<sup>[15]</sup>和(或)出入境检验检疫行业标准<sup>[16,17]</sup>检测方法进行。

## 4 结 果

所参加 5 项能力验证活动的 10 份样品的转基因成分均采用普通 PCR 方法及实时荧光 PCR 方法进行定性检测与比较, 并采用实时荧光 PCR 方法检测数据进行结果报告, 10 份样品转基因成分实时荧光 PCR 方法检测结果如表 2 所示。此外, 阳性对照样品、阴性对照样品及 10 份检测样品的内源基因(水稻为 *SPS*、玉米及玉米酒糟粕为 *Zein*、大豆为 *Lectin* 及油菜籽为 *CruA*)的 Ct 值均小于 36.00,

其中针对玉米《ACAS-PT103 转基因玉米品系检测》的 Ct 值均小于 24.00; 相应的阴性对照样品和空白对照的外源基因 Ct 值均大于 40.00。标识为 14-J808 样品未检出转基因调控元件 *CaMV* 35S 启动子、*CaMV* 35S 终止子、*NOS* 启动子、*NOS* 终止子和 *FMV* 35S 启动子成分, 检测结果为阴性; 标识为 15-H908 样品检出转基因调控元件 *CaMV* 35S 启动子、*NOS* 终止子和 *FMV* 35S 启动子成分, 检测结果为阳性; 标识为 15-G517 样品检出转基因调控元件 *CaMV* 35S 启动子、*NOS* 终止子和 *FMV* 35S 启动子成分, 检测结果为阳性; 标识为 15-J656 样品检出转基因调控元件 *CaMV*35S 启动子和 *NOS* 终止子成分, 检测结果为阳性。标识为 15-R722 样品检出 NK 603, Bt 11, MON 810, T25 转基因玉米品系, 标识为 15-T418 样品检出 MIR 162, NK 603, Bt 11, MON 810, MON 89034, T25 转基因玉米品系。标识为 2015P08-04-01 样品检出转基因调控元件 *CaMV* 35S 启动子和 *NOS* 终止子成分, 标识为 2015P08-04-02 样品检出转基因调控元件 *NOS* 终止子成分, 标识为 2015P08-04-03 样品检出转基因调控元件 *CaMV*35S 启动子和 *NOS* 终止子成分, 检测结果均为阳性, 标识为 2015P08-04-04 样品未检出转基因调控元件 *CaMV* 35S 启动子、*CaMV*35S 终止子、*NOS* 启动子、*NOS* 终止子和 *FMV* 35S 启动子成分, 检测结果为阴性; 标识为 2015P08-04-01 及 2015P08-04-03 样品检出 Ms8 转基因油菜品系, 而为 2015P08-04-02 及 2015P08-04-04 样品未检出 Ms8 转基因油菜品系。

表 2 能力验证项目检测数据及结论

Table 2 Test data and conclusions for participated proficiency tests

能力验证计划名称	样品标识	项目检测目标	应用检测标准	目标基因 Ct 值	检测结论
ACAS-PT067 粮食转基因能力验证计划	14-J808	转基因水稻	农业部 1782 号公告-3-2012	<i>SPS</i> 22.96 <i>CaMV</i> 35S 启动子 > 40.00 <i>CaMV</i> 35S 终止子 > 40.00 <i>NOS</i> 启动子 > 40.00 <i>NOS</i> 终止子 > 40.00 <i>FMV</i> 35S 启动子 > 40.00	未检出(检测结果为阴性)
	15-H908	转基因玉米	农业部 1782 号公告-3-2012	<i>Zein</i> 23.78 <i>CaMV</i> 35S 启动子 26.97 <i>CaMV</i> 35S 终止子 > 40.00 <i>NOS</i> 启动子 > 40.00 <i>NOS</i> 终止子 28.44 <i>FMV</i> 35S 启动子 32.30	检出(检测结果为阳性)
ACAS-PT101 粮食转基因检测	15-G517	转基因大豆	农业部 1782 号公告-3-2012	<i>Lectin</i> 22.38 <i>CaMV</i> 35S 启动子 21.98 <i>CaMV</i> 35S 终止子 > 40.00 <i>NOS</i> 启动子 > 40.00 <i>NOS</i> 终止子 22.00 <i>FMV</i> 35S 启动子 29.32	检出(检测结果为阳性)

续表 2

能力验证计划名称	样品标识	项目检测目标	应用检测标准	目标基因 Ct 值	检测结论
ACAS-PT102 玉米酒 糟粕转基因检测	15-J656	转基因玉米	农业部 1782 号 公告-3-2012	<i>Zein</i> 23.45 <i>CaMV</i> 35S 启动子 25.98 <i>CaMV</i> 35S 终止子 > 40.00 <i>NOS</i> 启动子 > 40.00 <i>NOS</i> 终止子 29.50 <i>FMV</i> 35S 启动子 > 40.00	检出(检测结果为阳性)
	15-R722	MIR 162, NK 603, Bt 11, MON 810, SN/T 1196-2012 MON 89034, T25		<i>Zein</i> 23.24 MIR162 > 40.00 NK603 32.16 Bt11 34.55 MON810 31.04 MON89034 > 40.00 T25 35.90	检出 NK 603, Bt 11, MON 810, T25 转基因 玉米品系
ACAS-PT103 转基因 玉米品系检测	15-T418	MIR 162, NK 603, Bt 11, MON 810, SN/T 1196-2012 MON 89034, T25	农业部 1782 号 公告-3-2012 及 SN/T 2668-2010	<i>Zein</i> 23.77 MIR162 27.98 NK603 26.64 Bt11 31.39 MON810 27.97 MON89034 28.08 T25 31.37	检出 MIR 162, NK 603, Bt 11, MON 810, MON 89034, T25 转基因玉米 品系
	2015P08-04-01	转基因油菜 Ms8 品系		<i>CruA</i> 28.28 <i>CaMV</i> 35S 启动子 34.23 <i>CaMV</i> 35S 终止子 > 40.00 <i>NOS</i> 启动子 > 40.00 <i>NOS</i> 终止子 32.61 <i>FMV</i> 35S 启动子 > 40.00 Ms8 30.21	检出(检测结果为阳 性); 检出 Ms8 转基因油菜 品系
BIQTC-2015-P08 油菜 籽中转基因成分定性 检测及 Ms8 品系的鉴 定能力验证	2015P08-04-02	转基因油菜 Ms8 品系	农业部 1782 号 公告-3-2012 及 SN/T 2668-2010	<i>CruA</i> 24.24 <i>CaMV</i> 35S 启动子 > 40.00 <i>CaMV</i> 35S 终止子 > 40.00 <i>NOS</i> 启动子 > 40.00 <i>NOS</i> 终止子 25.79 <i>FMV</i> 35S 启动子 > 40.00 Ms8 > 40.00	检出(检测结果为阳 性); 未检出 Ms8 转基因油 菜品系
	2015P08-04-03	转基因油菜 Ms8 品系	农业部 1782 号 公告-3-2012 及 SN/T 2668-2010	<i>CruA</i> 27.47 <i>CaMV</i> 35S 启动子 34.98 <i>CaMV</i> 35S 终止子 > 40.00 <i>NOS</i> 启动子 > 40.00 <i>NOS</i> 终止子 31.68 <i>FMV</i> 35S 启动子 > 40.00 Ms8 30.08	检出(检测结果为阳 性); 检出 Ms8 转基因油菜 品系
	2015P08-04-04	转基因油菜 Ms8 品系	农业部 1782 号 公告-3-2012 及 SN/T 2668-2010	<i>CruA</i> 24.93 <i>CaMV</i> 35S 启动子 > 40.00 <i>CaMV</i> 35S 终止子 > 40.00 <i>NOS</i> 启动子 > 40.00 <i>NOS</i> 终止子 > 40.00 <i>FMV</i> 35S 启动子 > 40.00 Ms8 > 40.00	未检出(检测结果为阴 性); 未检出 Ms8 转基因油 菜品系

## 5 分析与讨论

实验室参加的5项10份样品的转基因成分检测能力验证实验反馈结果均为满意,表明本实验室具备利用标准开展相关转基因项目检测的技术能力。综合分析本实验室所参加的5项10份样品的转基因成分检测能力验证活动,表明有如下几方面影响因素在转基因成分检测能力验证活动中需要重点关注。

### 5.1 检测方法的选择

本实验室所参加5项能力验证活动的10份样品的转基因成分均采用普通PCR方法及实时荧光PCR方法进行定性检测与比较。同普通PCR方法相比,实时荧光PCR方法检测用时更短,从开始PCR扩增到检测结果判定用时小于2h;操作过程更简单易行,省去了凝胶电泳这个操作繁琐、实验室污染风险大的环节;此外,实时荧光PCR方法还具有基因组DNA质量要求更低、检测敏感性更高、特异性更强及结果更易判断等优点。因此,在转基因成分检测能力验证活动中,建议优先考虑应用范围广泛且技术成熟的实时荧光PCR方法。

### 5.2 DNA提取的效率与质量

本实验室所参加5项能力验证活动的10份样品均采用新型植物基因组提取试剂盒推荐方法提取样品基因组DNA。同传统手工提取方法相比,该提取方法操作简捷方便,减少了人为因素对DNA提取结果的影响,并且采用该方法所提取到的基因组DNA具有浓度高、完整性较好及含有较少抑制因子等优点,有利于后续目标基因的扩增与分析。因此,在转基因成分检测能力验证活动中,建议优先考虑应用基因组提取试剂盒法进行样品基因组DNA提取,使得结果的准确性更有保障。

### 5.3 实验过程的质量控制

对于转基因检测项目,严格控制实验过程、防止交叉污染至关重要。本实验室在设计建造上对不同区域进行了有效隔离,整体划分为试剂准备区、样品准备区、核酸提取区、反应体系配制区、扩增区和检测区6个独立区域,各区域明显标识,单向流动,以降低污染风险。同时,定期进行环境质控对照,即在试剂准备区,向主反应混合液中加入灭菌水以替代模板。然后将这些PCR管分别放置在试剂准备区、样品准备区、核酸提取区及反应体系配制区中,将盖子打开,暴露15min后盖好。将这些PCR管同阴性对照一样进行PCR扩增结果显示,实验室环境污染控制良好。在实验过程中,合理设置PCR方法的阳性、阴性、提取和空白对照,避免阴性或假阳性结果出现而影响结果判断。

综上所述,为做好转基因成分检测能力验证活动,获得满意结果评价,需要考虑诸多的影响因素,如作业指导

书的说明、检测方法的选择、检测标准的应用、DNA提取效率与质量、实验过程的质量控制、实验操作的防污染措施和检测仪器设备的运转状态等,特别是要重点关注和控制检测方法的选择、DNA提取效率与质量和实验过程的质量控制这三方面检测结果重要影响因素。

### 参考文献

- [1] 林立民,刘萍萍,马文丽,等.能力验证与实验室质量管理实践研究[J].食品安全质量检测学报,2013,4(4):1288-1291.  
Lin LM, Liu PP, Ma WL, *et al.* Study on proficiency testing and laboratory quality practices [J]. *J Food Saf Qual*, 2013, 4(4):1288-1291.
- [2] 毛燕,闫林.实验室参加能力验证活动的意义分析[J].食品安全质量检测学报,2014,5(9):2958-2961.  
Mao Y, Yan Lin. Benefits analysis of the laboratories participation in proficiency testing programs [J]. *J Food Saf Qual*, 2014, 5(9): 2958-2961.
- [3] 李志强.能力验证在检测管理中的应用[J].华东科技:学术版,2014,(8):474-475.  
Li ZQ. Application of proficiency testing in detection management [J]. *East China Sci Technol*, 2014, (8): 474-475.
- [4] Generali T, Stefanelli P, Girolimetti S, *et al.* Proficiency tests on olive oil organized by the Italian National Reference Laboratory for pesticides: long-term performance of laboratories [J]. *Accredit Qual Assu*, 2015, 20(4): 1-7.
- [5] 曹际娟,郑江,曹志军,等.国际实验室间转基因产品检测能力验证的研究[J].化学分析计量,2005,14(2):12-16.  
Cao JJ, Zheng J, Cao ZJ, *et al.* Study on international proficiency testing program on genetically modified organism [J]. *Chem Anal Meter*, 2005, 14(2): 12-16.
- [6] Powell J, Owen L. Reliability of food measurements: the application of proficiency testing to GMO analysis [J]. *Accredit Qual Assu*, 2002, 7(10): 392-402.
- [7] 郝曼.能力验证活动对现代实验室建设的重要性[J].现代测量与实验室管理,2014,(3):46-47.  
Hao M. The importance of proficiency testing on the construction of modern laboratory [J]. *Adv Measur Lab Manag*, 2014, (3): 46-47.
- [8] 张明,马树才,王冬妍,等.大豆粉中转基因成分检测能力验证研究[J].食品安全质量检测学报,2013,4(6):1915-1920.  
Zhang M, Ma SC, Wang DY, *et al.* Analysis on proficiency test for detecting genetically modified component in soybeans flour [J]. *J Food Saf Qual*, 2013, 4(6): 1915-1920.
- [9] 尤波,吴永生,周雅男,等.如何做好大豆粉转基因成分检测能力验证[J].食品安全质量检测学报,2013,4(5):1601-1604.  
You B, Wu YS, Zhou YN, *et al.* How to test the genetically modified soybean flour [J]. *J Food Saf Qual*, 2013, 4(5): 1601-1604.
- [10] 张文玲.农业转基因生物安全中心如何做好能力验证样品的检测[J].种子科技,2009,27(2):33-34.  
Zhang WL. How to do well sample detection of ability validation for biological safety test center of agricultural genetically modified organisms [J]. *Seed Sci Technol*, 2009, 27(2): 33-34.
- [11] Barbau-Piednoir E, Stragier P, Roosens N, *et al.* Inter-laboratory Testing of GMO Detection by Combinatory SYBR® Green PCR Screening (CoSYPS) [J]. *Food Anal Meth*, 2014, 7(8): 1719-1728.

- [12] Trapmann S, Delobel CC, Corbisier P. European technical guidance document for the flexible scope accreditation of laboratories quantifying GMOs [M]. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2014.
- [13] GB/T 19495.3-2004 转基因产品检测核酸提取纯化方法[S].  
GB/T 19495.3-2004 Detection of genetically modified organisms and derived products-Nucleic acid extraction [S].
- [14] GB/T 19495.4-2004 转基因产品检测核酸定性 PCR 检测方法[S].  
GB/T 19495.4-2004 Detection of genetically modified organisms and derived products-Qualitative PCR methods based on nucleic acid [S].
- [15] 农业部 1782 号公告-3-2012 转基因植物及其产品成分检测调控元件 *CaMV* 35S 启动子、*FMV* 35S 启动子、*NOS* 启动子、*NOS* 终止子和 *CaMV* 35S 终止子定性 PCR 方法[S].  
Announcement No.1782-3-2012 of the Ministry of Agriculture Detection of genetically modified plants and derived products—Qualitative PCR methods for the regulatory elements *CaMV* 35S promoter, *FMV* 35S promoter, *NOS* promoter, *NOS* terminator and *CaMV* 35S terminator [S].
- [16] SN/T 1196-2012 转基因成分检测玉米检测方法[S].  
SN/T 1196-2012 Detection of genetically modified components-Maize test methods [S].
- [17] SN/T 2668-2010 转基因植物品系特异性检测方法[S].  
SN/T 2668-2010 Event-specific method for the detection of genetically modified plants [S].

(责任编辑: 白洪健)

### 作者简介



蔡 军, 博士, 主要研究方向为食品分子生物学检测与研发。

E-mail: cai\_jun@cofco.com



李 慧, 高级工程师, 主要研究方向为食品生物检测及研发。

E-mail: lhui@cofco.com