

FAPAS 转基因成分检测能力验证结果与分析

李夏莹¹, 单露英², 张飞燕², 梁晋刚², 王颢潜², 张旭冬², 张秀杰^{2*}

(1. 北京大学, 北京 100871; 2. 农业农村部科技发展中心, 北京 100176)

摘要: 目的 提高转基因成分检测实验室对转基因成分的检测能力和检测人员专业技术水平, 增强实验室竞争力。**方法** 依据能力验证作业指导书和标准方法的要求, 参与了 GeMMU77(2019)食品转基因检测能力验证计划, 对玉米和大豆混合样品中的 14 个参数进行检测。**结果** 待测样品中, *CaMV35S* 启动子、*NOS* 终止子、GTS40-3-2 转化体和 MON810 转化体为阳性。**结论** 本次能力验证获得满意评价, 实验室具备开展转基因成分检测的技术能力。

关键词: 玉米; 大豆; 转基因成分; 能力验证

Validation results and analysis of the detection ability of FAPAS genetically modified organisms components

LI Xia-Ying¹, SHAN Lu-Ying², ZHANG Fei-Yan², LIANG Jin-Gang², WANG Hao-Qian²,
ZHANG Xu-Dong², ZHANG Xiu-Jie^{2*}

(1. Peking University, Beijing 100871, China; 2. Development Center for Science and Technology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100176, China)

ABSTRACT: Objective To improve the testing ability of the testing laboratory for genetically modified ingredients and the professional technical level of the testing personnel, and enhance the competitiveness of the laboratory. **Methods** According to the requirements of the operation instructions and standard methods of capability verification, we participated in the gm77 (2019) food transgene detection capability verification plan, and tested 14 parameters in the mixed samples of corn and soybean. **Results** Among the tested samples, *CaMV35S* promoter, *NOS* terminator, GTS40-3-2 transformants and MON810 transformants were positive. **Conclusion** This proficiency test has been satisfactorily evaluated, and the laboratory has the technical ability to carry out genetically modified component testing.

KEY WORDS: maize; soybean; genetically modified organisms components; proficiency test

1 引言

随着现代生物技术的发展, 转基因生物产业的发展势头也越来越猛。根据国际农业生物技术应用服务组织(international agricultural biotechnology application service

organization, ISAAA)2018 年度报告显示: 转基因作物的种植面积已经由 1996 年的 170 万公顷增加到 2018 年的 1.917 亿公顷, 增长 113 倍, 种植面积累计达到 25 亿公顷。全球商业化应用的国家已增加到 70 个。自 1992 年以来全球已批准了 4349 项监管审批, 涉及 27 种转基因作物^[1-3]。

基金项目: 国家科技重大专项项目(2016ZX08012003)

Fund: Supported by Major National Science and Technology Projects (2016ZX08012003)

*通讯作者: 张秀杰, 硕士, 副研究员, 主要研究方向为转基因检测技术。E-mail: zhxj7410@sina.com

*Corresponding author: ZHANG Xiu-Jie, Master, Associate Professor, Room No.403, Keji Building, No.1 Ronghua Nanlu, Daxing District, Beijing 100176, China. E-mail: zhxj7410@sina.com

转基因安全问题一直受到社会广泛关注, 争论不断, 必须科学认识、理性对待、正确把握、依法管理。为保障我国转基因产业健康发展, 2006 年国务院颁布了《农业转基因生物安全管理条例》, 农业部先后颁布了《农业转基因生物安全管理条例》、《农业转基因生物安全评价办法》、《农业转基因生物进口安全管理办法》(农业部 9 号令)、《农业转基因生物标识管理办法》(农业部 10 号令)、《农业转基因生物加工审批办法》(农业部 59 号令), 质检总局颁布《进出口转基因产品检验检疫管理办法》^[4]。这些法律法规的颁布都是为了科学规范的管理转基因。作为检测实验室, 首先要做的是识别出哪些产品属于转基因产品, 因此实验室的检测能力是做好转基因安全管理工作的重要技术支撑。

CNAS-CL 03-2010《能力验证提供者认可准则》^[5]和 (proficiency test, PT)ISO/IEC 17043—2010《合格评定能力验证通用要求》^[6]将能力验证定义为: 利用实验室间比对, 按照预先定制的准则评价参加者的能力, 包括符合本定义的各类能力验证计划、测量审核和比对计划。能力验证是对实验室检测能力和质量管理体系进行客观考核的一种方法。

能力验证必须由有资质的机构来组织, 在中国 CNAS 会认可有资质的单位为能力验证提供者。由能力验证提供者向参加实验室发送盲样进行检测, 规定时间内返回实验结果, 按照预定的规则来进行判断^[7,8]。能力验证不仅是实验室内部和外部质量控制的有效手段, 也是国际互认的必

要条件^[9-11]。

为了测试本实验室的转基因成分检测能力, 发现实验室日常运行管理中存在的问题, 实验室报名参加了 2020 年 FAPAS 的食品转基因检测能力验证计划^[11], 并选用农业部公告、行业标准和欧盟公布的实时荧光 PCR 方法进行检测^[12-18], 为其他相关实验室日常规范检测提供一定的参考。

2 材料与方法

2.1 实验材料

待测样品编号为粉末状, 重约 5.0 g, 离心管密封包装。由 FAPAS 提供。阳性对照样品为本实验室自制保存的标准样品, 阴性对照样品为非转基因玉米或大豆。

2.2 仪器及试剂

CFX-96 实时荧光 PCR 仪(美国伯乐公司); 5424R 高速冷冻离心机(日本艾本德公司); Q5000 核酸蛋白分析仪(美国 Quawell 公司)。

植物基因组 DNA 提取试剂盒(德国 Qiagen 公司); PCR 扩增试剂盒(美国 ABI 公司)。

2.3 试验方法

参照表 1 中所列标准进行实验。

表 1 检测方法列表
Table 1 List of detection methods

序号	检测项目	检测方法
1	玉米内标准基因实时荧光 PCR 方法(<i>zSSIIb</i>)	SN/T 1204—2016《植物及其加工产品中转基因成分实时荧光 PCR 定性检验方法》 ^[12]
2	大豆内标准基因实时荧光 PCR 方法(<i>Lectin</i>)	SN/T 1204—2016 ^[12]
3	转基因植物及其产品成分检测调控元件 <i>CaMV</i> 35S 启动子、 <i>FMV</i> 35S 启动子、 <i>NOS</i> 启动子、 <i>NOS</i> 终止子和 <i>CaMV</i> 35S 终止子定性 PCR 方法	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 <i>CaMV</i> 35S 启动子、 <i>FMV</i> 35S 启动子、 <i>NOS</i> 启动子、 <i>NOS</i> 终止子和 <i>CaMV</i> 35S 终止子定性 PCR 方法(农业部 1782 号公告-3-2012 ^[13])
4	植物及其加工产品中转基因成分实时荧光 PCR 定性检测方法(GTS40-3-2)	SN/T 1204—2016 ^[12]
5	植物及其加工产品中转基因成分实时荧光 PCR 定性检测方法(MON89788)	SN/T 1204—2016 ^[12]
6	转基因玉米 BT11 实时荧光 PCR 检测方法	欧盟验证报告 ^[14]
7	转基因玉米 Bt176 实时荧光 PCR 检测方法	欧盟验证报告 ^[15]
8	转基因玉米 NK603 实时荧光 PCR 检测方法	欧盟验证报告 ^[16]
9	植物及其加工产品中转基因成分实时荧光 PCR 定性检测方法(MON810)	SN/T 1204—2016 ^[12]
10	转基因玉米 GA21 实时荧光 PCR 检测方法	欧盟验证报告 ^[17]
11	植物及其加工产品中转基因成分实时荧光 PCR 定性检测方法(MIR604)	SN/T 1204—2016 ^[12]
12	转基因玉米 TC1507 实时荧光 PCR 检测方法	欧盟验证报告 ^[18]
13	植物及其加工产品中转基因成分实时荧光 PCR 定性检测方法(MON863)	SN/T 1204—2016 ^[12]
14	植物及其加工产品中转基因成分实时荧光 PCR 定性检测方法(MON89034)	SN/T 1204—2016 ^[12]
15	植物及其加工产品中转基因成分实时荧光 PCR 定性检测方法(MON88017)	SN/T 1204—2016 ^[12]

2.3.1 基因组 DNA 提取

分别称取待测样品、阳性对照样品、阴性对照样品各 200 mg 置于 1.5 mL 离心管中, 按照德国 QIAGEN 公司植物基因组 DNA 提取试剂盒所述方法提取样品基因组 DNA。

使用核酸蛋白分析仪对提取样品 DNA 的质量进行评估, 测定 OD_{260} , 根据 $OD_{260}=50 \mu\text{g/mL}$ 估算出 DNA 的浓度; 根据 $OD_{260/280}$ 比值判断 DNA 的纯度, 使 $OD_{260/280}$ 在 1.7~2.0 之间。之后将提取的基因组 DNA 稀释至终浓度 $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 备用。

2.3.2 PCR 扩增

检测待测样品内源和外源基因采用的 PCR 扩增反应体系和反应程序参照见表 1 所列标准。

阳性对照以本实验室保存的转基因玉米或大豆 DNA 为模板; 阴性对照以非转基因玉米或大豆 DNA 为模板; 空白对照以 ddH₂O 代替模板。扩增体系: Probe qPCR Mix 12.5 μL , 上下游引物及探针(工作浓度 10 $\mu\text{mol/L}$)具体参照检测标准, DNA 模板 50~250 ng, 用灭菌水补足至体积 20 μL 。引物、探针与扩增条件均参照标准。

2.3.3 凝胶电泳检测 PCR 产物

取出 PCR 产物, 取 8 μL PCR 产物加入 2 μL 的

5*loading buffer, 将混合样品上样于 1.5% 琼脂糖凝胶, 150 V, 电泳 30 min, 电泳结束之后, 在凝胶成像仪上拍照, 分析结果。

3 结果与分析

本次能力验证活动采用表 1 中的标准方法, 标准中规定: 若样品的内标准基因和筛选元件基因(或转化体特异性序列)片段均得到了扩增曲线, 表明样品中检测出转基因成分, 检测结果为阳性; 若样品的内标准基因得到扩增曲线, 而筛选元件基因(或转化体特异性序列)未得到扩增, 表明样品中未检测出转基因成分, 检测结果为阴性; 若样品的内标准基因未得到扩增, 则不作判定。

结合标准方法的要求, 对实验的结果进行判定: 图 1~14 中, 阳性对照的内标准基因和特异性外源基因均得到扩增曲线, 阴性对照仅内标准基因得到扩增曲线, 空白对照没有扩增曲线, 待检测样品内标准基因和 *CaMV 35S* 启动子、*NOS* 终止子、GTS40-3-2、MON810 得到扩增曲线。说明样品中含有 *CaMV 35S* 启动子、*NOS* 终止子、GTS40-3-2、MON810。测试结果与预期相符, 获能力验证满意评价。

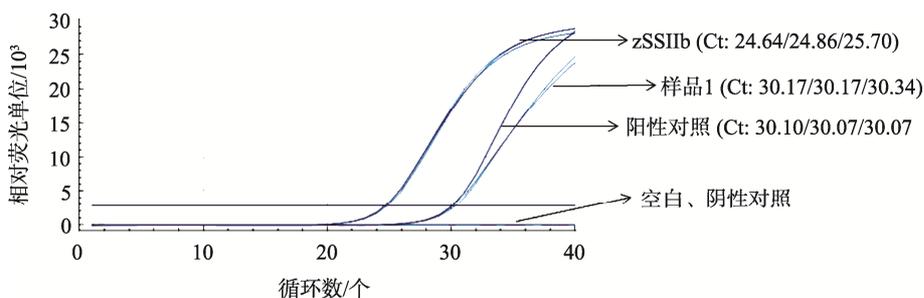


图 1 *CaMV 35S* 启动子实时荧光 PCR 扩增图

Fig.1 Real-time PCR amplification of *CaMV 35S* promoter

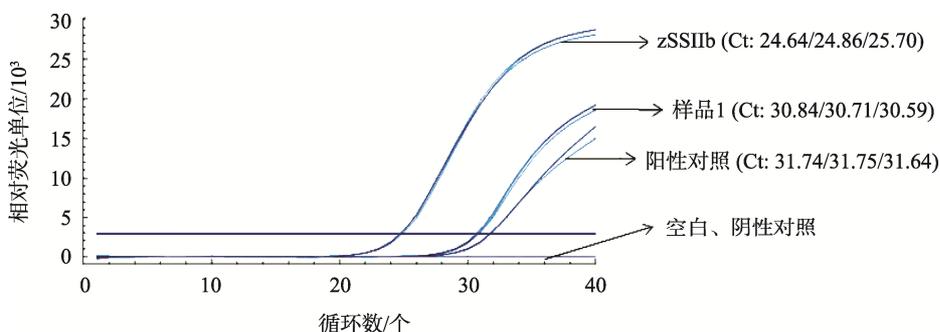


图 2 *NOS* 终止子实时荧光 PCR 扩增图

Fig.2 Real-time PCR amplification of *NOS* terminator

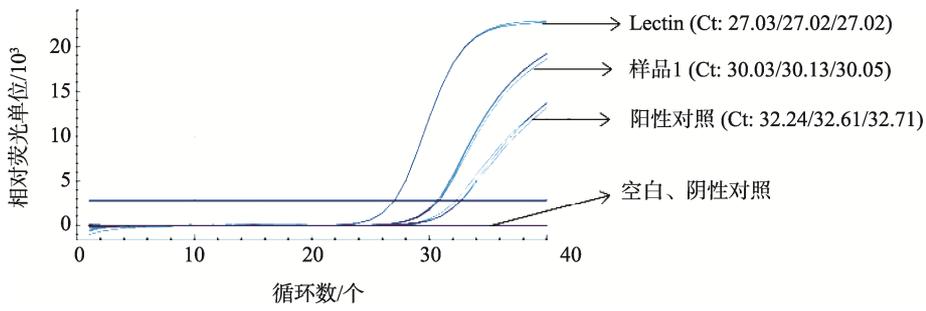


图 3 GTS40-3-2 实时荧光 PCR 扩增图
Fig.3 Real-time PCR amplification of GTS40-3-2

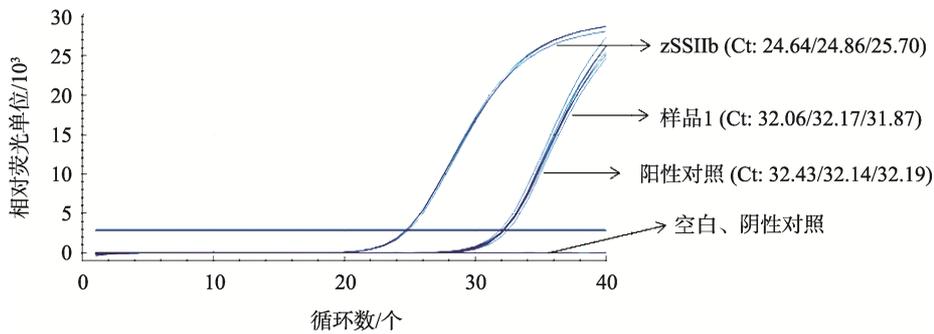


图 4 MON810 实时荧光 PCR 扩增图
Fig.4 Real-time PCR amplification of MON810

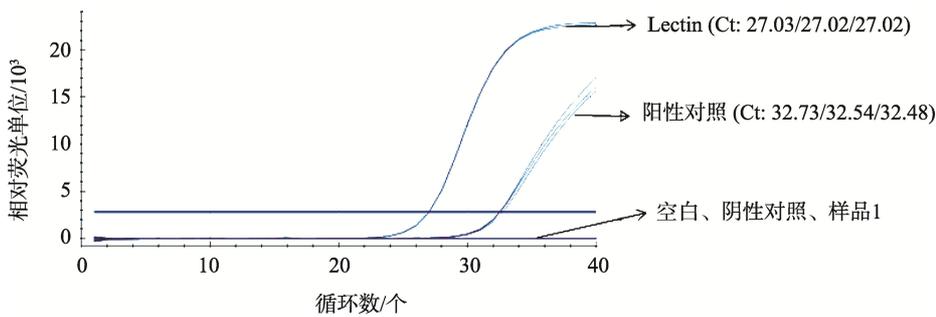


图 5 MON89788 实时荧光 PCR 扩增图
Fig.5 Real-time PCR amplification of MON89788

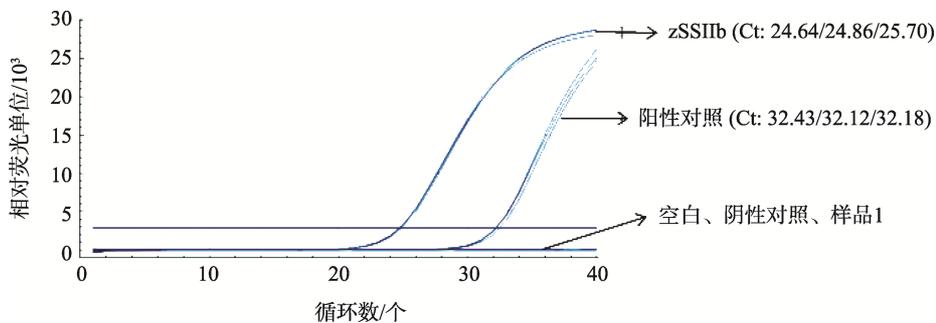


图 6 Bt11 实时荧光 PCR 扩增图
Fig.6 Real-time PCR amplification of Bt11

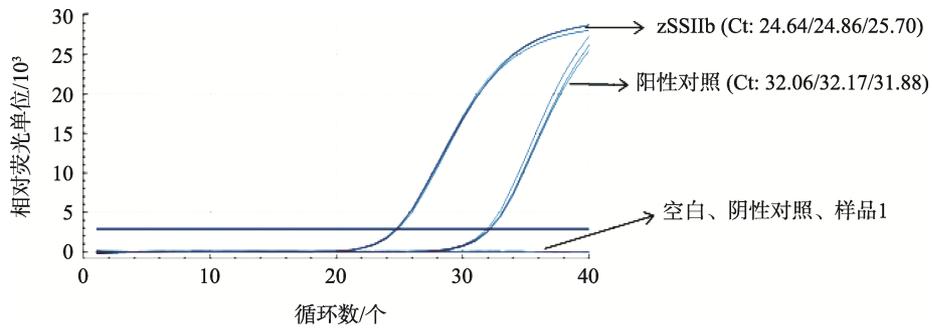


图 7 Bt176 实时荧光 PCR 扩增图
Fig.7 Real-time PCR amplification of Bt176

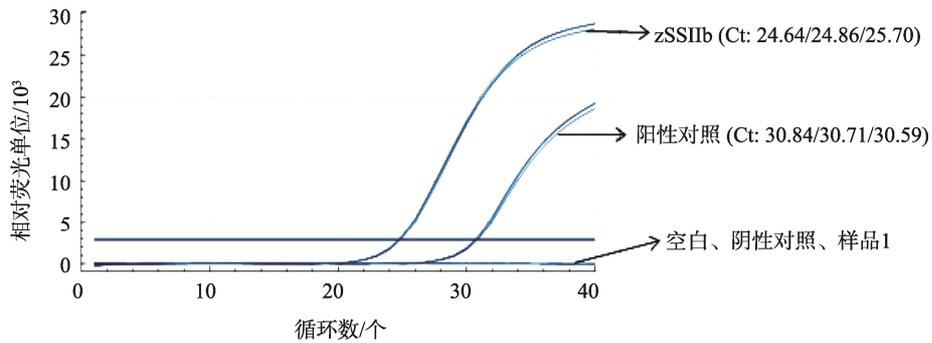


图 8 NK603 实时荧光 PCR 扩增图
Fig.8 Real-time PCR amplification of NK603

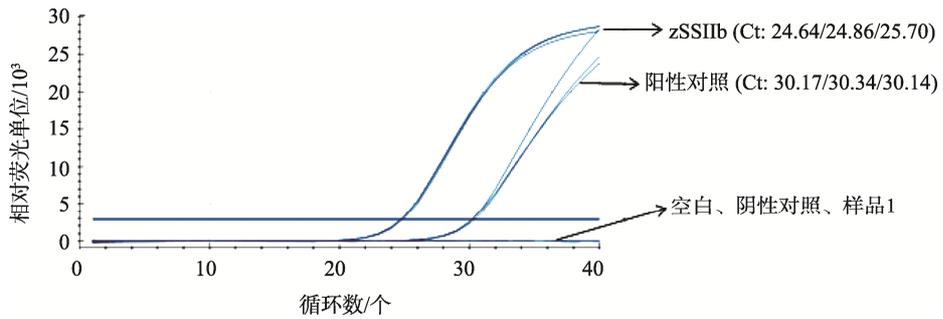


图 9 GA21 实时荧光 PCR 扩增图
Fig.9 Real-time PCR amplification of GA21

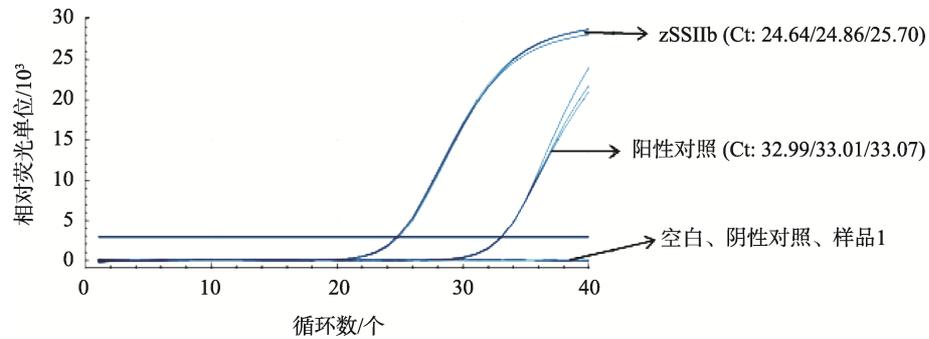


图 10 MIR604 实时荧光 PCR 扩增图
Fig.10 Real-time PCR amplification of MIR604

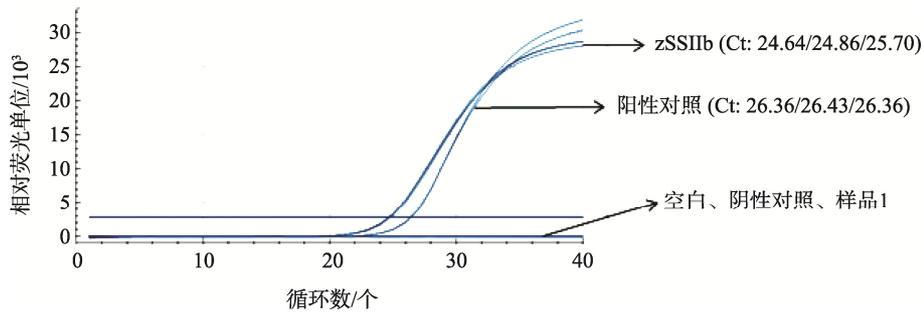


图 11 TC1507 实时荧光 PCR 扩增图
Fig.11 Real-time PCR amplification of TC1507

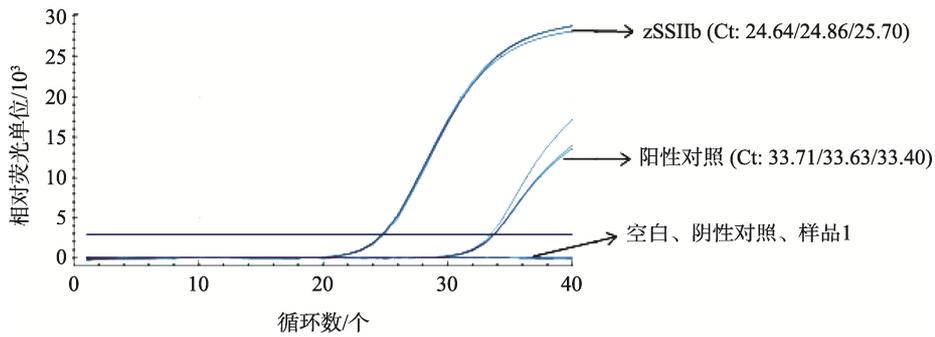


图 12 MON863 实时荧光 PCR 扩增图
Fig.12 Real-time PCR amplification of MON863

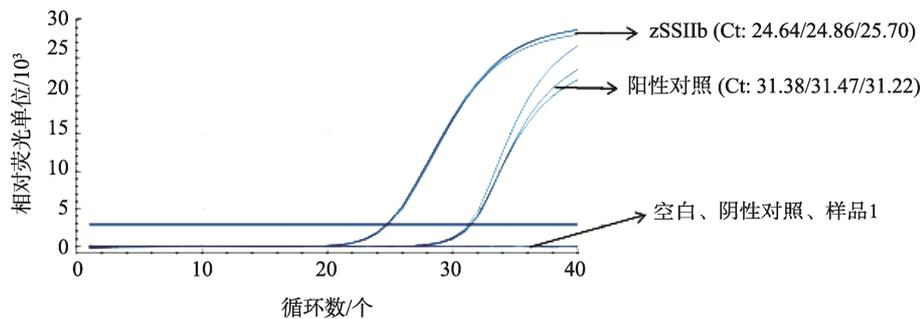


图 13 MON89034 实时荧光 PCR 扩增图
Fig.13 Real-time PCR amplification of MON89034

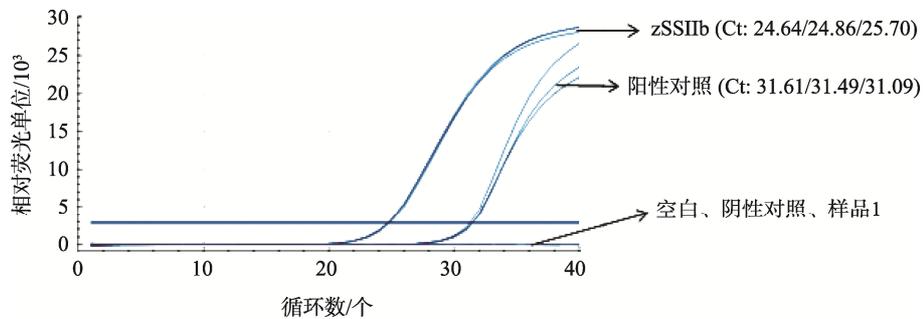


图 14 MON88017 实时荧光 PCR 扩增图
Fig.14 Real-time PCR amplification of MON88017

4 结论与讨论

通过参加此次能力验证实验室总结出一些注意事项,以供参考: (1) 参加能力验证的实验人员在能力验证之前进行了充分的练兵和考核。(2) 能力验证所需试剂耗材、引物、探针经过实验验证。(3) 能力验证用到的标准方法在能力验证之前在本实验室进行过新方法验证。(4) 能力验证所用仪器设备进行了检定校准或功能检查。(5) 在实验操作过程中,重点关注以下环节: DNA 抽提时避免使用变性条件,避免温度过高或操作过猛;试验过程中避免样品、试剂交叉污染,以及人员操作污染。

本实验室采用的方法有国家标准(农业部公告)、行业标准(出入境检验检疫系统)和欧盟验证报告中提供的方法,所用方法覆盖两个行业、国内外标准,能全面的反映实验室的转基因成分检测能力。此次能力验证共检测了 14 个参数,检测结果均获得“满意”的评价,表明本实验室转基因玉米和大豆成分测试能力良好,可正确检测出样品中筛选元件和转化体成分,具备开展转基因成分检测的技术能力,能为社会提供公正客观的转基因检测技术服务^[19,20]。

参考文献

- [1] 国际农业生物技术应用服务组织. 2018 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, 2019, 38(6): 1-8.
International agricultural biotechnology application service organization. Global biotechnology/genetically modified crops commercialization development trend in 2018 [J]. Chin Biotechnol, 2019, 38(6): 1-8.
- [2] 郭慧敏, 李涛, 王建龙, 等. 转基因作物全球发展现状及检测技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(12): 4870-4876.
Guo HM, Li T, Wang JL, et al. Global development status of transgenic crops and research progress in testing technology [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(12): 4870-4876.
- [3] 夏义苗, 陈复生, 郝莉花, 等. 抗草甘膦玉米与非转基因玉米营养组成对比研究进展[J]. 中国油脂, 2017, 42(6): 25-30.
Xia YM, Chen FS, Hao LH, et al. Progress in the comparative study of nutritional composition between glyphosate-resistant corn and non-transgenic corn [J]. Chin Oils Fats, 2017, 42(6): 25-30.
- [4] 农业转基因生物标识管理方法[Z]. 2002.
Management method of agricultural genetically modified biomarkers [Z]. 2002.
- [5] CNAS-CL 03-2010 能力验证提供者认可准则[S].
CNAS-CL 03-2010 Provider accreditation guidelines for competence verification [S].
- [6] ISO/IEC 17043-2010 合格评定能力验证通用要求[S].
ISO/IEC 17043-2010 General requirements for conformity assessment capability verification [S].
- [7] CNAS-RL 02-2010 能力验证规则[S].
CNAS-RL 02-2010 Apacity verification rules [S].
- [8] GB/T 15483.1-2011 利用实验室间比对的能力验证[S].
GB/T 15483.1-2011 Capability verification by inter-laboratory comparison [S].
- [9] 边勇, 刘来福, 李建光, 等. 浅析我国植物检疫领域能力验证现状[J]. 植物检疫, 2014, 28(5): 6-11.
Bian Y, Liu LF, Li JG, et al. A brief analysis of the current status of capacity verification in the field of plant quarantine in China [J]. Plant Quar, 2014, 28(5): 6-11.
- [10] 邢小茹, 马小爽, 刘涛, 等. 环境检测领域能力验证工作的组织及评价方法[J]. 环境监测管理与技术, 2014, 26(4): 1-4.
Xing XR, Ma XS, Liu T, et al. Organization and evaluation methods of capacity verification in the field of environmental testing [J]. Environ Monitor Manag Technol, 2014, 26(4): 1-4.
- [11] 汪小福, 陈笑芸, 徐俊锋, 等. 食品分析水平测试计划(FAPAS)转基因检测能力验证中的方法分析与质量控制[J]. 中国食品学报. 2016, 16(7): 224-230.
Wang XF, Chen XY, Xu JF, et al. Analysis and quality control for the detection of transgenic in FAPAS proficiency tests [J]. Chin J Food Sci Technol, 2016, 16(7): 224-230.
- [12] SN/T 1204-2016 植物及其加工产品中转基因成分实时荧光 PCR 定性检验方法[S].
SN/T 1204-2016 Protocol of the real-time PCR method for detecting genetically modified plants and their derived products [S].
- [13] 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[EB/OL]. [2012-06-06]. <http://www.aqsc.org/zlbz/>
Qualitative PCR method for *CaMV* 35S promoter, *FMV* 35S promoter, *NOS* promoter, *NOS* terminator and *CaMV* 35S terminator [EB/OL]. [2012-06-06]. <http://www.aqsc.org/zlbz/>
- [14] Mazzara M, Grazioli E, Savini C, et al. Event-specific method for the quantification of Maize Bt11 using real-time PCR. Validation report and validated method [EB/OL]. [2005-01-01]. <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/>
- [15] Mazzara M, Grazioli E, Savini C, et al. Event-specific method for the quantification of Maize Bt176 using real-time PCR. Validation report and validated method [EB/OL]. [2007-01-01]. <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/>
- [16] Mazzara M, Grazioli E, Savini C, et al. Event-specific method for the quantification of Maize NK603 using real-time PCR. Validation report and validated method [EB/OL]. [2005-01-01]. <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/>
- [17] Mazzara M, Grazioli E, Savini C, et al. Event-specific method for the quantification of Maize GA21 using real-time PCR. Validation report and validated method [EB/OL]. [2005-01-01]. <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/>
- [18] Mazzara M, Grazioli E, Savini C, et al. Event-specific method for the quantification of Maize TC1507 using real-time PCR. Validation report

and validated method [EB/OL]. [2005-01-01]. <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/>

- [19] Miyachi H. Overview of proficiency testing and external quality assessment programs of laboratory tests from the standpoint of international standardization [J]. Rinsho Byori, 2015, 63(8): 919-924.
- [20] 许明华, 王晓艳, 付成松. 通过参加能力验证活动提高实验室管理水平[J]. 中国计量, 2012, 11(2): 47-56.
- Xu MH, Wang XY, Fu CS. Improving laboratory management level through participating in capacity verification activities [J]. Chin Metrol, 2012, 11(2): 47-56.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



李夏莹, 博士, 高级农艺师, 主要研究方向为转基因检测技术研究。
E-mail: esmacloed006@163.com



张秀杰, 硕士, 副研究员, 主要研究方向为转基因检测技术研究。
E-mail: zhxj7410@sina.com

“农药、兽药以及重金属残留分析”专题征稿函

食用产品中农药、兽药以及重金属的残留问题是国内外广泛关注的课题。

鉴于此, 本刊特别策划了“农药、兽药以及重金属残留分析”专题, 由福州大学化学学院的付凤富教授和中山大学化学学院的李攻科教授共同担任专题主编主要围绕食品中农兽药残留与重金属检测方法与风险评估、重金属与农药分析、农兽药的代谢与迁移转化、农兽药与重金属残留样品前处理方法、农兽药与重金属残留检测技术与应用、农兽药与重金属残留现场检测技术、农兽药与重金属残留市场监测与结果分析等或者您认为与本专题相关有意义的领域展开论述和研究, 综述及研究论文均可。

鉴于您在该领域丰富的研究经历和突出的学术造诣, 本刊主编吴永宁研究员、专题主编付凤富教授、李攻科教授及编辑部全体成员特别邀请您为本专题撰写稿件, 综述、研究论文、研究简报均可, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。

本专题计划在 2020 年 8 月出版, 请在 2020 年 6 月 15 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

同时烦请您帮忙在同事之间转发一下, 再次感谢您的关怀与支持!

感谢您的参与和支持!

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com(备注: 投稿请登录食品安全质量检测学报主页-作者登录-注册投稿-投稿选择“专题: 农药、兽药以及重金属残留分析”)

E-mail: jfoodsq@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部