

农作物种子转基因成分检测能力验证样品 制备技术分析总结

张 英 刘 冰 张海波 杨娟妮 张 田 陈国瑛 马亚琴

(陕西省种子工作总站,西安 710018)

摘要:能力验证是评价检验机构技术水平和质量控制的重要手段,对近年来陕西省农作物种子检验站承担的各项转基因成分检测能力验证样品的制备工作进行回顾,总结了在能力验证样品制备工作中获取的经验与教训,分析了样品制备工作中一些好的做法和存在的问题,并提出了进一步改进的建议,为能力验证样品制备工作更为科学、规范地开展提供参考。

关键词:农作物种子;能力验证;转基因成分;样品制备

Summary and Advice of Preparing Samples for Proficiency Testing of Agricultural Genetically Modified Organism

ZHANG Ying, LIU Bing, ZHANG Hai-bo, YANG Juan-ni,

ZHANG Tian, CHEN Guo-ying, MA Ya-qin

(Shaanxi Seed Administration Bureau, Xi'an 710018)

能力验证是通过检验机构间的检测结果,来判定其出具检验数据的准确性、可靠性是否符合规定要求的合格评定活动^[1]。农作物种子检验机构能力验证,是了解掌握种子检验机构工作开展情况的重要渠道,也是评价种子检验机构技术水平高低的重要依据。能力验证样品制备是能力验证工作正常开展的重要保障。

陕西省农作物种子检验站近年来多次承担各类不同转基因成分检测能力验证和比对样品的制备,用于考核通过的检验机构的能力验证、检验机构能力考评和实验室内/间的仪器比对。工作中,陕西省农作物种子检验站科学合理地设计样品制备方案和测试方案,通过符合性验证、均匀度测试、严格

质量控制等手段,保质保量、科学高效地完成了样品制备和测试工作,为评价检验机构转基因成分检测能力提供了强有力的技术支撑。

1 工作开展情况

陕西省农作物种子检验站从2014年开始承担各类转基因成分检测样品的制备工作,共计制备样品2800余份。制备的样品涉及玉米、棉花、油菜、大豆、水稻等5种作物,检测参数涵盖CaMV35S启动子、NOS终止子、Cp4-epsps基因、Bt基因、Bar/pat基因、Bt11转化体、MOM810转化体、TC1507转化体、BT176转化体、NK603转化体、NK603×TC1507转化体、DBN9936转化体、TT51-1转化体、GTS40-3-2转化体、GT73转化体、RF3转化体、抗虫棉

参考文献

- [1] 常宏,李友强.甘肃省国家级玉米制种“四化”基地建设情况调研报告.甘肃农业,2014(8):47-48
- [2] 曹文凯,李慧,汤磊.泰安市高标准农田建设的主要措施及建议.山

东水利,2014(5):5-6

- [3] 张新明.西北玉米制种基地存在的问题及发展对策.中国种业,2012(10):16-17

(收稿日期:2023-02-09)

等,共计2个调控元件、3个目的基因、12个转化体,基本覆盖了国内常见的转基因作物及常见的转化体。

表1列举了陕西省农作物种子检验站每年转基因成分检测样品的制备情况。从表1可以看出,转基因成分检测制备样品的转基因含量从最初的0和1.0% 2个梯度,增加到0、0.5%和1.0% 3个梯度,样品份数从最初2014年的100份,增加到2022年的400份,说明参与转基因成分检测能力验证的种子质量检验机构数量有所增加,能力验证样品的需要也在稳步增加,这与“十三五”期间对各省种子质量检验机构加大资金投入和能力建设密切相关。

2 主要做法

2.1 样品设计 陕西省农作物种子检验站综合考虑了目前国内外转基因作物的商业化情况、不同转基因作物的分子特征以及近几年违规转基因的检出情况,确定样品类型、检测参数和转基因含量。样品选择粉末形态,以保证均匀性。检测参数选择实际检测工作中常见的调控元件、目的基因和转化体。转基因含量方面,0和1.0% 2个梯度用于测试检验机构正确检出全部参数的基本能力,0.5% 梯度用于测试检验机构的能力水平。一般情况下,转基因植物及产品成分检测标准中定性PCR阳性对照转基因含量为0.1%~1.0%,检出限一般在0.05%~0.10%之间;且已报道的转基因检测方法,如依赖于凝胶电泳的PCR、多重PCR、实时荧光PCR、数字PCR等,检出限一般在0.01%~0.50%^[2]。为确保能力合格的检验机构能够按照检测标准检出阳性样品,且考

虑到样品制备和运输过程中产生的小量误差,2014年将能力验证中阳性样品转基因含量水平设置为1.0%,2016年考虑到参加转基因成分检测能力验证的种子检验机构数量增加,且检验机构能力水平不断提升,为了更有效地区分不同检验机构的能力水平,增设了0.5%的转基因含量梯度。

2.2 方案制定 样品制备需要制定科学且详细的方案、程序和工作计划,一方面确保样品制备的各个环节按照程序规范开展,另一方面确保各环节在计划时间内完成,从而保质保量、按时完成样品制备。与常规的转基因成分检测工作相比,能力验证样品的获取来源、制备方法、制备要求、预期效果的验证、分装包装、运输保存都有特殊的要求^[2],需要制定专门的方案。

2.3 设施和环境的准备

2.3.1 设置工作区域 为了减少污染,选择与分子检测区域不同楼层的种子常规质量检测室用于能力验证样品的粉碎、分装和包装。样品核酸提取、扩增和电泳分析则使用原有的PCR检测功能区。不同工作区配备专用的仪器、设备、试剂、耗材和实验服等。各工作区严格按照单向流动的原则工作,避免不同样品间的交叉污染^[3]。

2.3.2 选择原始样品 按照制备样品的检测对象、检测参数、转基因含量、样品组合、样品数量等要求,选择经过反复检测验证的样品作为制备材料,确保样品质量稳定可靠。

2.3.3 购置设备耗材 能力验证样品需要对能力验证轮次、样品编号、作物种类、重量等内容进行标识。

表1 2014–2022年转基因成分检测能力验证样品制备汇总

年份	作物	不同检测参数数量			转基因含量(%)	样品份数
		转化体	调控元件	目的基因		
2014	玉米、油菜、水稻、大豆	7	2	3	0、1.0	100
2015	玉米、水稻、大豆	5	2	3	0、1.0	200
2016	玉米、棉花、水稻、大豆	5	2	3	0、0.5、1.0	300
2017	玉米、棉花、水稻、大豆	5	2	3	0、0.5、1.0	300
2018	玉米、棉花、水稻、大豆	5	2	3	0、0.5、1.0	300
2019	玉米、棉花、油菜、大豆	5	2	3	0、0.5、1.0	400
2020	玉米、棉花、油菜、大豆	5	2	3	0、0.5、1.0	400
2021	玉米、棉花、油菜、大豆	5	2	3	0、0.5、1.0	400
2022	玉米、棉花、油菜、大豆	5	2	3	0、0.5、1.0	400

为了高效、高质量地完成样品的分装及包装工作,陕西省农作物种子检验站专门购置了铝箔封口机、标签打印机及塑料分装瓶、封口膜、标签打印纸、自封袋等配套耗材,用于样品瓶口的封装和标签的设计打印。

2.4 样品制备 制备过程中要按照制备程序规范操作,保证制备工作严谨精确,自始至终坚持无污染原则。

2.4.1 样品粉碎 样品粉碎按照转基因含量从低到高的顺序,先粉碎阴性样品再粉碎阳性样品。粉碎机的配件要做到“一样一杯一刀座”,粉碎阴性样品的配件清洗后可继续使用,为避免污染,粉碎阳性样品的配件使用后应丢弃。

2.4.2 样品称量 将粉碎后的阳性样品按照比例与阴性样品混合,制备成不同转基因含量的阳性对照和阳性样品。混合过程中可使用混匀仪等设备充分混合,确保均匀度,同时避免不同样品间的交叉污染和对工作环境的污染。

2.4.3 样品分装和标识 样品分装封口过程应尽量减少污染。标签标注时应做到及时准确,不能将样品混淆。按照阴性样品、阴性对照、阳性样品、阳性对照的顺序分装与标识。采取分装一批、封口一批、标识一批的方法进行,分装每一批样品之前要对环境进行充分彻底地清理。标识的标签应包括作物种类名称、验证轮次、样品编号、重量等内容。

2.5 样品测试 样品测试是样品制备工作最重要的质量控制手段,包括3个阶段,分别是制样前原材料质量测试、封装前均匀性测试、封装后符合性测试。

2.5.1 原材料质量测试 用于样品制备的原材料,使用前应进行质量测试。原材料粉碎后随机取3~5个样品,进行符合性检测和转基因含量测定,符合预期结果的材料方可用于样品制备。

2.5.2 封装前均匀性测试 样品研磨完成后,在封装前应对样品进行均匀性测试。均匀性测试采用实时荧光PCR法。每个阳性样品随机取5份粉末,进行转基因含量测试。对于转基因含量为1%的样品,重复间的差异应小于0.2%,平均值与预期值的差异应小于0.1%。对于转基因含量为0.5%的样品,重复间的差异应小于0.1%,平均值与预期值的差异应小于0.05%。超差的样品应重新进行混合,直至符合预

期结果。符合预期结果的材料方可用于样品封装。

2.5.3 封装后符合性测试 样品封装完成后,将每类分装好的样品规则摆放,每类样品随机取3~5个样品,依据能力验证作业指导书要求,对每个检测参数进行符合性测试。结果须与预期一致。若不一致,要查找原因并及时改正,重新测试一致后方可放行。

2.6 样品包装与运输 样品一般采用加厚塑料小瓶包装,铝箔封口。每组样品包括验证样品、阳性对照和阴性对照。每组样品用自封袋双层包装,外层自封袋标注组号,在降低样品损坏和污染可能性的同时,方便能力验证的组织实施单位查询样品检测结果^[2]。

2.7 样品信息保密 样品编号随机生成,至少保证每10年内样品编号不重复。每次能力验证活动结束前,严格保密样品编号、检测结果、制备单位等相关信息,任何人不得向能力验证组织实施单位以外的单位及个人透漏信息^[4]。

3 经验及建议

3.1 采用可靠的原始样品 原始样品的符合性和转基因含量是样品制备工作的基础。原材料须经过转基因成分检测,并使用欧洲标准物质局(IRMM)认证的转基因标准物质进行转基因含量的测定。符合性测试和转基因含量测定均符合预期的原材料方可作为原始样品制备能力验证样品。

3.2 始终坚持防污染原则 防污染是转基因检测的重点,可以有效避免假阳性或假阴性结果的产生。为了有效区分不同检验机构的能力水平,能力验证设计的阳性样品数量远大于日常的转基因检测任务。为避免大量阳性样品粉碎时产生的粉末污染PCR检测功能区的工作环境,造成假阳性,制备能力验证样品时最好选择与分子检测不同的样品粉碎区。粉碎时要注意及时清理工作环境,充分清洗粉碎机配件。

3.3 严格进行质量控制 在检测环节设置对照样品是对检测质量进行监控的最有效方式。制备的样品在测试过程中应设置空白对照、阴性对照和阳性对照,在保证检测结果准确可靠的同时,也能检测反应体系是否污染、反应体系是否有效扩增^[3]。

3.4 采用籽粒形态的样品作为以后的能力验证样品 为了确保样品的均匀性,避免出现假阴性结果,

(下转第52页)

表 6 参试品系皮棉产量方差分析

处理	皮棉产量 (kg/hm ²)	5% 显著 水平	1% 极显著 水平	位次
辽棉 60	917.10	a	A	1
辽棉 58	911.25	ab	AB	2
辽棉 57	907.05	abc	ABC	3
辽棉 63	906.15	abcd	ABC	4
辽棉 61	901.05	bcde	ABC	5
辽棉 59	898.65	bcde	ABC	6
辽棉 64	895.20	cde	BC	7
辽棉 65	894.45	cde	BC	8
新石 K39	891.00	de	BC	9
新石 K40	886.80	e	C	10
辽棉 23 号(CK)	858.15	f	D	11
辽棉 62	857.40	f	D	12

3 结论与讨论

通过对 11 个参试品系的综合性状表现进行分析发现,生育期均在审定标准规范的 130d 之内,早熟性表现均良好;10 个参试品系的皮棉产量较辽棉 23 号(CK)增产 3.34%~6.87%,均达到极显著水平。仅辽棉 62 衣分含量稍低于辽棉 23 号(CK),其余 10 个品系均高于对照;8 个参试品系的单铃重高于

辽棉 23 号(CK),综合产量性状表现良好。11 个参试品系中 5 个品系的纤维品质达到 I 型品种标准,6 个品系达到 II 型品种标准,除辽棉 61 外,其余 10 个品系的上半部平均纤维长度和断裂比强度均达到了双 30 标准(上半部平均纤维长度≥30mm、断裂比强度≥30cN/tex),品质表现十分优异。枯萎病、黄萎病抗性方面,辽棉 60 等 5 个品系枯萎病抗性达到高抗水平,辽棉 57 等 5 个品系抗枯萎病,仅新石 K39(非辽棉品系)耐枯萎病,整体抗性水平表现较高;辽棉 60 等 6 个品系黄萎病抗性达到高抗水平,辽棉 57 等 4 个品系表现抗黄萎病,新石 K39(非辽棉品系)品系表现耐黄萎病,整体抗性水平表现较高;综合抗性总体体现出辽棉品种选育多年来的枯萎病、黄萎病抗病育种的水平和特点。

参考文献

[1] 王国山,顾横琴,吕春修. 辽宁棉花育种回顾及品种价值分析. 辽宁农业科学,1997(3): 46-48
[2] 王子胜,李心宽,徐敏. 中国棉业科技进步 30 年——辽宁篇. 中国棉花,2009,36(S): 76-81
[3] 韩晓军,李海燕,吴蔚,王子胜. 2019-2020 年辽宁省棉花品种区域试验简报. 中国棉花,2021,48(8): 15-19,21
[4] 许乃银,李健. 棉花区试中品种多性状选择的理想试验环境鉴别. 作物学报,2014,40(11): 1936-1945

(收稿日期: 2023-03-03)

(上接第 47 页)

能力验证样品一直采用粉末形态,而种子检验机构日常工作中接受委托的样品,一般都是籽粒形态的。为了适应这一实际情况,且保证能力验证样品的均匀性,陕西省农作物种子检验站已经进行了相应的研究摸索,具有了一定的技术储备。

能力验证是考核实验室检测结果一致性和准确性、监督实验室质量管理过程、识别实验室存在问题的一种验证活动^[2]。随着我国转基因技术商业化的不断推进,转基因生物安全监管的范围和难度日益增加。种子质量检验机构作为农业转基因安全监管的技术支撑,通过能力验证评价其技术能力和质量管理水平十分重要。

样品制备的稳定可靠、均匀一致则是能力验证活动有效开展的前提保障^[4]。近年来陕西省农作物种子检验站多次承担了转基因成分检测样品的制备

工作,在工作中获取了很多关于样品制备的经验与教训,并为以后能力验证制备工作的进一步提高做了相关研究和储备,为能力验证样品制备工作更为科学、规范地开展提供参考。

参考文献

[1] 张英. 农作物种子转基因 PCR 检测技术. 西安:陕西科学技术出版社,2020
[2] 王颢潜. 农业转基因成分检测能力验证工作的关键点分析. 天津农业科学,2018,24(9): 85-89
[3] 李夏莹. 转基因玉米成分定性检测能力验证结果与分析. 食品安全质量检测学报,2019,10(16): 5421-5426
[4] 李建红. 江西省农作物种子检验能力验证样品制备工作总结及体会. 中国种业,2020(2): 40-42

(收稿日期: 2023-02-06)