种子转基因检测实验室污染原因排查和分析应对

雷 军[1] 苟飞凡[2] 张海波[1]
（[1]陕西省种子工作总站，西安 710018；[2]陕西礼泉甘河国家湿地公园管理处，咸阳 713200）

摘要：污染防控是种子转基因检测实验室结果质量控制的核心，对种子转基因检测实验室的污染产生原因进行了回顾性分析，总结了在种子转基因检测污染防控中获取的经验和教训，对不同类型实验样品污染情况进行了深入分析，并提出了对应的解决方法，为加强种子转基因检测实验污染防控获取真实可靠的结果提供参考。

关键词：种子；转基因检测；污染；PCR 检测

Investigation and Analysis of Pollution Causes in Genetically Modified Seeds Testing Laboratory

LEI Jun[1], GOU Fei-fan[2], ZHANG Hai-bo[1]
（[1]*Shaanxi Seed Administration Bureau, Xi'an 710018*；[2]*Gan River National Wetland Park Management Office of Liquan county, Xianyang 713200, Shaanxi*）

随着国内外转基因产业的不断发展，种子转基因检测已成为种子检验的重要项目[1-2]。我国目前除了棉花以外，尚未批准其他主要农作物的转基因商业化种植，目前对待转基因种子是一票否决制，任何非法转基因种子品种都不能进入审定、生产和销售环节，因此种子转基因检测是种子市场监管的重要技术支撑[1]。目前种子转基因检测以 PCR 技术为基础，PCR 技术的基本原理是以一段特定的核酸分子为模板，通过引物延伸重复性地合成双链 DNA。PCR 技术在转基因检测领域得到了广泛的应用[3-4]，在种子转基因检测方面发挥了重要作用。

PCR 技术的优越性在于它特异性和灵敏度非常高，能够检测到微量的核酸序列。但正是由于它的高效扩增能力，在应用 PCR 技术进行种子转基因成分检测过程中，不可避免地会遇到各种影响结果质量的问题，尤其是检测污染的问题[5]。种子转基因检测实验室污染会导致假阳性结果，将原本应该是“未检出转基因”的种子，误判为“检出转基因”的种子，严重影响种子企业对种子的后续处理，给种子企业造成巨大的损失。

陕西省农作物种子检验站近年来多次承担省部级种子转基因检测任务，以及各地市和省内外种子企业委托的种子转基因检测样品检测任务[6]。2010-2022 年累计检测种子转基因样品 17010 份。工作中，陕西省农作物种子检验站科学合理地制定检测方案，采取各种措施应对种子转基因检测实验室的污染问题，也总结了大量经验和教训，为种子转基因监管提供了强有力的技术支撑。

1 种子转基因检测实验室污染来源分析

1.1 样品间污染 目前除了棉花，我国尚未批准其他主要农作物的转基因商业化种植，一般种子市场抽查和品种试验检测的种子样品预期结果大多数情况下是“未检出”，因此转基因成分检测目标是“意外混入检测”（AP 检测）。

但是，从近几年的检测结果看，每年都会出现转基因检测为“检出”的样品，每年样品阳性率在 1% 以下（包括能力验证中的阳性样品），如表 1 所示。同这些阳性样品同一批次进行检测的样品，需要同步进行样品流转、粉碎研磨、核酸提取、配置体系、扩增电泳等操作，稍不注意就会产生假阳性结

基金项目：陕西省农业科技创新专项（陕农计财〔2022〕29 号）

果。可见，样品间污染是转基因检测污染的重要来源。

表1 2010–2022年种子转基因成分检测样品数量及阳性率

年份	作物	检测样品数	阳性样品数	阳性率（%）
2010	玉米、水稻、油菜	1448	5	0.35
2011	玉米、水稻、大豆	1126	3	0.27
2012	玉米、油菜、水稻、大豆	1798	6	0.33
2013	玉米、棉花、大豆	833	8	0.96
2014	玉米、棉花、水稻、大豆、油菜	2200	17	0.77
2015	玉米、油菜、大豆	2163	11	0.51
2016	玉米、棉花、油菜、大豆	1200	8	0.67
2017	玉米、水稻、小麦、油菜	1900	13	0.68
2018	玉米、棉花、油菜、大豆	1426	8	0.56
2019	玉米、棉花、水稻、大豆	816	3	0.37
2020	玉米、水稻、油菜	750	2	0.27
2021	玉米、水稻、小麦	479	4	0.84
2022	玉米、棉花、水稻、大豆、油菜	871	6	0.69

1.2 PCR产物污染 种子转基因检测是通过对目标核酸片段进行成百万倍的复制，来检测目标核酸片段是否存在于样品中。如果扩增成功，表明含有该核酸片段；如果未检测到产物，说明样品中不含有该核酸片段。

核酸扩增是进行指数级扩增的，每一次扩增的产物，都是下一次扩增的模板。每一次成功的扩增，都会产生百万数量级的模板。而以PCR扩增的灵敏度，1个模板就会检出。即使有微量的产物进入扩增步骤，也会产生假阳性结果。可见，每个阳性样品或者对照的PCR扩增产物都是重要的污染来源。

1.3 试剂污染 PCR检测过程需要提取、扩增和电泳的各种试剂，涉及种类多，操作过程中气溶胶或者液体飞溅，都有可能造成试剂污染。使用污染试剂进行样品检测，会将“未检出”误判为“检出”的样品，造成假阳性结果。

试剂污染的另一个方面，是针对转基因的某些检测靶标的，即某些检测元件总是出现假阳性结果。这是由于PCR扩增的关键试剂－耐热扩增酶是由基因工程菌生产的，这些耐热扩增酶在生产提纯的过程中，会不可避免地带有某些基因工程菌的核酸片段，比如常见的抗新霉素的新霉素磷酸转移酶基因（*NPT II*基因）的核酸片段。*NPT II*基因也是转基因植物常用的筛选基因之一。如果耐热扩增酶在生产中使用了该基因，且提纯的过程中没有完全去除，则必然造成假阳性结果。

2 种子转基因检测实验室污染防控

2.1 实验室布局 合理的实验室布局能够有效减少种子转基因检测实验室的污染问题。种子转基因检测实验室总体布局和各工作区域的安排，是以减少其潜在的对样本的污染、获得可靠的检测结果和减轻对人员的危害为目的，可采取必要的物理隔离、增加可控空气流向的通风设备及相对独立的区域等有效措施，降低交叉污染、实验室中其他样品和扩增材料产生的残留物污染以及试剂和样品所引起的假阳性结果等风险。

一般来说，种子转基因检测实验室布局可按照分子生物学实验室的要求设计，根据种子转基因检测的特点，按照核酸污染程度，可划分为试剂配制区、样品制备区、前PCR区和PCR区4个独立的功能区域（图1）。每个分隔区独立使用实验室设备，开展相应实验，将能有效消除或降低实验污染的机会。

2.1.1 试剂配制区 用于检测中所有试剂的存储、配制和分装，包括PCR反应体系预混液的配制与分装。该区域与实验室的其他区域间必须存在完全的物理隔离，使正常空气流向不能来自于样品准备区域、产物分析区域。检测的样品不能带入该区域。如果不能做到正压，试剂的配制操作必须在该区域专用的生物安全柜或超净工作台中进行。

2.1.2 样品制备区 用于样品的准备、前处理。该区域正常空气流动不能来自于前PCR区、PCR区。样品准备区域内部的排气系统可以排除任何来源于空气中的污染物，其排出的气流不能污染到其他几个区域。任何和样品接触的仪器和设备应该进行清洗、消毒。

2.1.3 前PCR区 用于核酸提取纯化、储存和在PCR反应体系加入DNA模板。该区域要和样品制备区、试剂配制区、PCR区分开；该区域的正常空气流动不能来自于样品制备区、PCR区；该区域排出的气流不能流向样品制备区、试剂配制区；该区域中的正常空气应该使用正压，使空气流向区域外部，以避免来自样品的交叉污染。如果该区域是完全与PCR区隔离，并且和样品制备区及试剂配制区没有

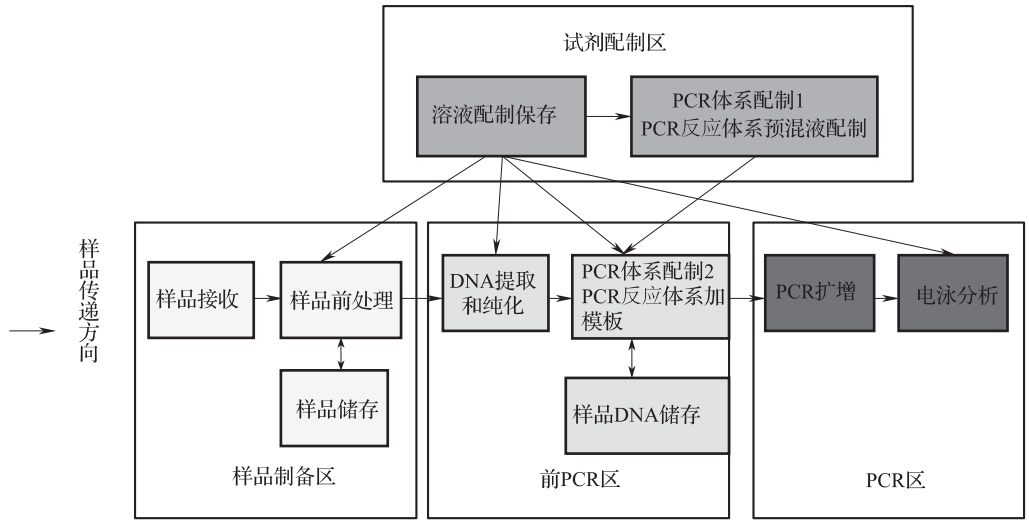


图1 种子转基因检测实验室布局

空气交换，那么这个区域的正压也可以不用设置。

2.1.4 PCR区域 用于PCR扩增反应和扩增产物分析。该区必须和其他3个区域进行完全的物理隔离；该区应具备负压或单向排风条件或设置生物安全柜，使空气流向区域内部，或者进行内部循环，而不能流向试剂配制区和样品制备区。

2.2 减少实验步骤 种子转基因检测一般分为样品流转、粉碎研磨、核酸提取、配置体系、扩增电泳等操作，每一步操作都可能会产生样品间污染，减少操作步骤能够有效减少污染。其中实时荧光PCR（TaqMan技术）能够实时观测检测结果，有效减少污染发生。

一般PCR检测由核酸提取、PCR扩增和琼脂糖凝胶电泳3个步骤组成。实时荧光PCR（TaqMan技术）是在一般PCR基础上，添加1条标记荧光基团和淬灭基团（一般是FAM和TAMRA）的探针，能够在PCR扩增过程中通过记录荧光信号强度对扩增产物的积累进行实时监控，从而在扩增结束时对结果进行判断。以实时荧光PCR技术为基础的种子转基因成分检测可将检测步骤缩短为两步，即核酸提取和PCR扩增，提高检测效率，节约时间成本。实时荧光PCR检测则采用完全闭管检测，无需PCR开盖后处理，避免了交叉污染和假阳性的风险，能够有效防止PCR产物污染。

2.3 使用高质量试剂 使用高质量试剂能够有效降低试剂污染。首先，应对购买的试剂进行质量测试，避免试剂本身携带可检出的靶标，比如*NPT II*基因的核酸片段。其次，应对大包装试剂进行分装，避免试剂反复冻融，防止反复使用试剂，造成试剂污染。第三，应定期检测保存的试剂，对变质试剂和过期试剂及时清理，如遇试剂污染，应尽快检查和处理。

2.4 设置对照 设置对照能够很快发现结果是否准确以及是否存在污染的情况。种子转基因成分检测采用的对照包括空白对照、阴性样品对照和阳性样品对照。空白对照包括试剂空白对照和提取空白对照。试剂空白对照是在PCR反应体系中用相同体积的水代替模板DNA，用于验证PCR反应过程中没有污染。提取空白对照是在DNA提取过程中，用水代替测试样品完成提取的所有步骤，用以验证提取过程没有核酸污染。在同时对多个测试样品提取DNA并进行PCR分析时，设置提取空白对照是十分必要的。阴性样品对照是从可溯源的阴性标准物质中提取的不含外源目标核酸序列的DNA，用于验证测试样品中是否含有该物种特异性基因（内标基因）以及反应体系是否受到阳性污染。阳性样品对照是从可溯源的阳性标准物质中提取的DNA或从含有已知序列阳性样品中提取的DNA，用于验证测试样品的检测过程是否能检测出阳性片段。阳性对照的转基因成分含量根据检测方法的检出限设置，如检出限为0.1%的检测方法，应选用转基因含量为0.1%的样品作为阳性对照。利用这些对照的检测结果，可对检测过程和检测结果进行分析和报告（表2）。

表2 种子转基因PCR检测对照的设置

检测样品	试剂空白对照	提取空白对照	阴性样品对照	阳性样品对照	结果分析
+[a]	−[b]	−	−	+	阳性
−	−	−	−	+	阴性
+	+	+	+	+	可疑[c]
+	−	+	−	+	可疑[d]
−	−	−	−	−	可疑[e]

[a]扩增的目标片段可检出；[b]扩增的目标片段未检出；[c]试剂和环境可能存在污染，应逐个排查污染源；[d]核酸提取过程可能存在污染，应从提取核酸环节开始重做实验；[e]核酸中可能存在抑制物，应选择更换核酸提取方法或将已提取的核酸重新纯化

2.5 质量控制计划 为确保检测结果的准确性，种子转基因成分检测可采用仪器比对、人员比对、方法比对、样品复测等方法对检测结果进行质量控制，防止污染。制定种子转基因成分检测结果质量控制计划，定期采用以上方法对结果进行质量控制，发现污染情况及时处理。如果污染问题常发，可适当增加质量控制的实施次数。

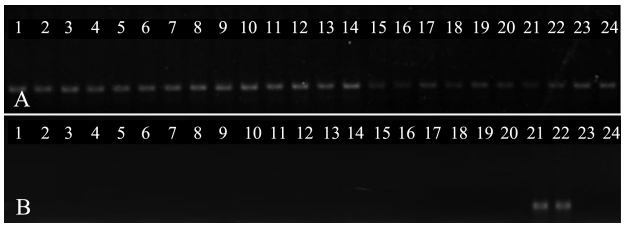
3 种子转基因检测实验室污染应对策略

实验室污染会出现假阳性结果，即本应是阴性的样品扩增出目的条带。可能的原因是样品间交叉污染、PCR试剂的污染、PCR扩增产物污染、环境的气溶胶污染等情况。出现这种情况时，应考虑所用试剂及操作的每一步出现DNA污染的可能性，逐一分析，排除污染。

3.1 个别样品污染的原因分析及应对策略 如果同一批次检测的样品只有个别样品出现污染情况，则很可能是样品间交叉污染，尤其是该批样品中有阳性样品时。这时应将该样品重新进行单独检测，并在检测中设置提取对照、阴性对照和阳性对照，检测过程中尽量避免与其他样品接触。如果仍有污染，则考虑试剂污染，重新换DNA提取试剂后重复检验。

3.2 大量样品污染的原因分析及应对策略 如果同一批次或不同批次检测的样品都出现污染情况，且是多检测元件污染，则考虑是试剂污染或PCR产物污染。试剂污染可能是在操作过程中有产物或者阳性核酸混入了试剂中，这时阴性对照也呈现阳性，需要更换试剂重新实验。PCR产物污染影响比较严重，需要对环境进行清理，整个实验室可进行核酸酶喷洒、紫外线照射消毒、实验仪器高温灭菌等操作。整个实验室处理完成后需要通风，如有必要，可在通风处进行临时实验。

3.3 某一检测元件污染的原因分析及应对策略 种子转基因检测中很可能出现某一检测元件污染，而其他元件正常的情况。这可能是因为核酸扩增酶中自带检测目标核酸序列，比如*NPT II*基因的核酸片段。扩增酶中含有该核酸片段，会导致每个扩增反应包括阴性对照，都会显示为阳性“检出”，这就是实验室遇到的“水中都可以检出转基因成分”问题，如图2所示。这种情况下需要更换使用的扩增体系，对新使用的体系进行测试，以确保新体系中没有*NPT II*基因的核酸片段。



泳道1~20为检测样品，21~22为阳性对照，23~24为阴性对照
A：污染时的电泳结果；B：正确电泳结果示意图

图2 *NPT II*基因扩增污染电泳结果

4 讨论

种子转基因检测实验室的污染主要来源于样品间污染、PCR产物污染和试剂污染。防止种子转基因检测实验室污染的方法主要依靠合理的实验室布局、减少实验步骤、使用高质量试剂、设置对照和制定合理的质量控制计划来防控。对于污染的种子转基因检测实验室，应该分析具体原因，对实验试剂、实验样品、实验环境等进行逐一分析，确定污染源，消除污染因素后继续实验。

一个合格的种子转基因检测实验室，不仅要有先进的检测技术能力，还应按照转基因成分检测的特点，制定合理的防污染措施，以确保检测结果的准确性和可靠性。随着我国转基因政策的不断放宽，转基因种子将很快进入审定和种植环节，这对于种子转基因检测来说是巨大的挑战[7]。做好种子转基因检测实验室污染防控将更加重要。

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

天津市农作物品种区域试验站的发展现状与建议

梁 晨 王连芬 于澎湃 张华颖 王妍卿 李 争
（天津市农业发展服务中心，天津 300061）

摘要：农作物品种区域试验站是品种试验、示范和推广的主要场所。在深入推进种业振兴的形势下，推动品种区域试验站的建设与提升，有助于提高试验容量、提升育种创新能力。通过对天津市农作物品种区域试验站的现状进行调研，分析指出当前存在建设布局欠合理、基础设施较落后、信息化水平不先进、技术能力欠规范4个方面的问题，提出了相应的对策建议。

关键词：天津；品种；区域试验站；种业振兴；对策；建议

Current Development Status and Suggestions of Regional Experimental Stations of Crop Varieties in Tianjin

LIANG Chen, WANG Lian-fen, YU Peng-pai, ZHANG Hua-ying, WANG Yan-qing, LI Zheng
(*Tianjin Agriculture Development Service Center, Tianjin 300061*)

品种区域试验是品种审定的基础，是鉴定农作物新品种丰产性、稳定性、适应性及其利用价值的重要手段[1]，是新品种从选育到推广的重要必经环节，具有显著的基础性、公益性和社会性。区域试验站（以下简称区试站）是品种区域试验的载体，是开展品种审定、品种登记、展示示范、植物新品种保护、种子认证及执法监管等工作有力的技术支撑平台。

随着现代种业高速发展，近年来参加区域试验的品种呈井喷之势，区试站的承载能力已经不能满足选育单位的需求，影响了种业科技成果的快速转化进程和优新品种的推广应用速度。在当前全面推进种业振兴的形势下，加紧提升农作物品种区试站建设，对于落实国家和天津市种业振兴行动方案，加强种业基础性研究和品种选育，发挥良种提质增效作用，促进天津市种业和农业高质量发展有着十分重要的意义。

1 天津市农作物区域试验站现状

目前天津市共有品种区试站11个（其中国家级区试站3个），试验地面积共计140多hm^2，其中试验地面积最大的有20余hm^2，最小的有3hm^2左右。按照全市农作物生产布局，区试站主要分布在蓟州、宝坻、武清、宁河、静海、西青6个区。各区试站依据自身条件及能力分别承担水稻、玉米、小麦、棉花、大豆等主要农作物的国家和市级统一试验、联合体试验，新审定品种及引种备案品种的展示示范，蔬菜、西甜瓜等非主要农作物品种的展示评价、符合性验证等工作，有相对固定的专业技术人员。各区试站平均每年可承担品种试验20~30组，试验品

通信作者：王连芬

[2] 甄贞，高学军，张明辉. 主要农作物种子转基因检测方法及应用. 中国种业，2018（4）：8-10
[3] 李晶，尹祥佳，王雅琳. 转基因玉米培育及其检测技术应用研究. 中国种业，2022（4）：27-30
[4] 高芳瑞，王颢潜，李瑞环，刘娜，王永，武玉花，李亮，赵新，梁晋刚. 转基因检测标准物质研制关键环节质量控制研究. 中国生物防治学报，2022，38（5）：1125-1134
[5] 李葱葱，李飞武，刘娜，康岭生，邢珍娟，张明. 转基因植物成分检测实验室的污染控制. 吉林农业科学，2010（6）：21-24
[6] 张海波，张英，刘冰，杨娟妮，陈西，张田. 玉米中转基因成分筛查策略. 西北农业学报，2015，24（12）：57-63
[7] 兰青阔，李文龙，孙卓婧，赵新，陈锐，王永，宋贵文. 国内外转基因检测标准体系现状与启示. 农业科技管理，2020（3）：27-32

（收稿日期：2023-05-09）