

实时荧光定量 PCR 检测转基因玉米 Bt176 测量不确定度分析

熊娟, 黄启红*, 伍玲燕, 蔡大川, 张志军, 黄璇莹, 陈敏儿

(中国广州分析测试中心, 广东省化学危害应急检测技术重点实验室, 广州 510070)

摘要: 应用实时定量 PCR 方法测定样品中转基因玉米 Bt176 的含量, 并从多个方面来分析测量的不确定度。结果显示, A 类不确定度为 0.0003, B 类不确定度为 0.0007, 合成不确定度为 0.001, 有效自由度 ν_{eff} 为 272, 包含概率 P 为 95%, 扩展不确定度 $U=0.002$, 测量结果为 $(0.8\pm 0.2)\%$ 。不确定度评估结果表明, 测量不确定度的主要来源是微量液体转移量的偏差。

关键词: 转基因玉米 Bt176; 实时荧光定量 PCR; 定量检测; 不确定度评估

中图分类号: S513

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2017)01-0119-05

Uncertainty in detecting event-specific fragments of genetically modified maize BT176 by quantitative real time PCR

XIONG Juan, HUANG Qihong, WU Lingyan, CAI Dachuan, ZHANG Zhijun, HUANG Xuanying, CHEN Miner
(Guangdong Provincial Key Laboratory of Emergency Test for Dangerous Chemicals, China National Analytical Center, Guangzhou 510070)

Abstract: The real-time fluorescent quantitative PCR method was used to detect the event-specific fragments in a sample of genetically modified maize BT176 and the uncertainty of measurement derived from several aspects was analyzed. The results showed that uncertainty of type A and type B was 0.0003 and 0.0007, respectively; the combined standard uncertainty was 0.001; the effective degree of freedom was 272; the coverage probability was 95%; the expanded uncertainty was 0.001, and the measured result was $0.8\% \pm 0.2\%$. This result indicated that the main source of uncertainty was the trace amount of liquid transfer, which should be paid more attention to in future detection.

Key words: genetically modified maize Bt176; real-time fluorescent quantitative PCR method; quantitative detection; uncertainty evaluation

转基因食品(genetically modified food, GMF)及其安全问题近年已经成为全球关注的热点^[1], 世界各国纷纷出台政策要求对转基因产品进行限量标识。我国于 2001 年和 2002 年先后发布了《农业转基因生物安全管理条例》及农业转基因生物标识管理办法等配套管理办法^[2], 明确规定对进入我国流通市场的转基因生物及产品实施标识制度。

目前, 转基因成分定量检测是国际上主流的转基因检测方法, 它通过测量指数时期扩增后的外源 DNA 数量, 然后根据数学公式计算出样品中外源 DNA 的原始拷贝数量。转基因含量定量检测结果均

应提供测定值和测定值的不确定度^[3], 本实验不确定度分析和计算采用的是 Bottom 方式, 适用于不确定度来源清晰、可分别测量的检测情况^[4-5]。转基因玉米 Bt176 是先正达公司开发的抗虫耐草铵膦除草剂的转基因玉米品种, 美国农业部 (USDA) 1994 年受理该公司的申请, 并于 1995 年批准在美国国内无限制种植。

本实验依据 GB/T 19495.5-2004《转基因产品检测核酸定量 PCR 检测方法》^[6], 利用荧光定量 PCR 方法对含量为 1% 的转基因玉米 Bt176 标准品中的品系特异性片段含量进行测定, 分析各种影响因素,

收稿日期: 2016-03-04

基金项目: 广东省省级科技计划项目 (2014B070705001) 和广东专业镇中小微企业食品安全与质量控制检测服务平台 (2013B091604003) 共同资助。

作者简介: 熊娟, 硕士研究生。E-mail: 349891074@qq.com

* 通信作者: 黄启红, 助理研究员。E-mail: 39341441@qq.com

对不确定的来源进行分析和计算，以期为提高转基因生物检测质量提供参考数据。

1 材料与方法

1.1 材料

含量为 1% 的转基因玉米 Bt176 测试样品，购于 LGC 中国公司（艾吉析科技有限公司，北京）。

植物基因组 DNA 纯化试剂盒购于广州迪澳生物科技有限公司；含量为 1% 的转基因玉米 Bt176 标准物质、实时荧光 PCR 试剂盒购于拜发公司（拜发分析系统销售有限公司，北京）。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的分离与纯化 称取含量为 1% 的转基因玉米 Bt176 粉末 0.05 g，按照植物基因组 DNA 纯化试剂盒说明书分离、纯化转基因玉米 Bt176 基因组 DNA。

1.2.2 引物和探针 采用 GB 19495.5-2204《转基因产品检测核酸定量 PCR 检测方法》中的引物和探针，扩增玉米内源基因 zSSIIB 和转基因玉米 Bt176 品系特异基因。

1.2.3 标准曲线制备和反应体系 将含量已知的转基因玉米 Bt176 标准物质基因组 DNA，按照 1:10 稀释成 5 个拷贝浓度梯度：100 000、10 000、1 000、100 和 10 copies·μL⁻¹，依次取上述稀释液 5 μL（分别含有 500 000、50 000、5 000、500 和 50 copies）加入 25 μL 反应体系：TaqMan Master mix 12.5 μL，上下游引物（10 μmol·L⁻¹）各 1 μL，探针（10 μmol·L⁻¹）0.5 μL，补水至 25 μL。每个梯度拷贝浓度的 DNA 稀释液做 3 个平行反应，测试样品做 14 个平行扩增反应。

把配制好的反应体系置于 7500 型荧光定量 PCR 仪器上，运行程序如下：首先 95℃ 预变性 DNA 模板，10 min；然后运行 45 个循环：95℃ 变性 15 s；60℃ 退火 30 s。

1.2.4 转基因玉米 Bt176 测量不确定度的评估 根据实验获得 zSSIIB（内源基因）和转基因玉米 Bt176 品系特异基因的标准曲线方程 $C_t = K \times \lg A + B$ （ C_t 为定量 PCR 仪检测到的超过荧光信号背景阈值的热循环数， A 为基因的绝对含量， B 为一次函数的截距），计算出测试样品中 zSSIIB 基因和转基因玉米 Bt176 品系特异基因的绝对含量（ A ），再根据以下公式计算出转基因玉米 Bt176 品系特异基因的相对含量。

$$\text{外源基因相对含量 \%} = \frac{\text{外源基因绝对含量}}{\text{内源基因绝对含量}} \times 100$$

根据测量不确定度的评定，先计算实验中随机

效应产生的 A 类不确定度 (u_A)，然后计算数据对的非线性偏离、微量液体转移误差引起的 B 类不确定度 (u_B)，再将 A、B 两类不确定度合成为合成不确定度 (u_C)，最后计算出本实验的测量不确定度 (U)。

2 结果与分析

2.1 实验的标准曲线

根据最小二乘法原理，利用 Applied Biosystem Corporation 7500 软件拟合出标准曲线。转基因玉米 Bt176 品系特异基因的标准曲线方程为 $Y = -3.25X + 41.54$ ，相关系数为 $R^2 = 0.998$ ，扩增效率为 103.07%（图 1）；玉米内源基因 zSSIIB 的标准曲线方程 $Y = -3.21X + 40.95$ ，相关系数为 $R^2 = 0.997$ ，扩增效率为 104.91%（图 2）。

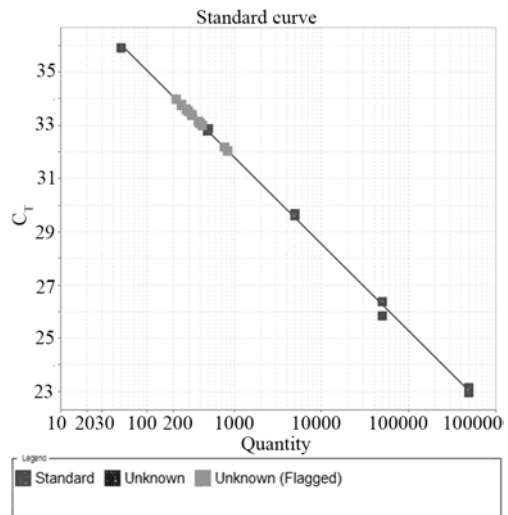


图 1 转基因玉米 Bt176 的品系特异基因标准曲线
Figure 1 Standard curve of structure specific genes of genetically modified maize Bt176

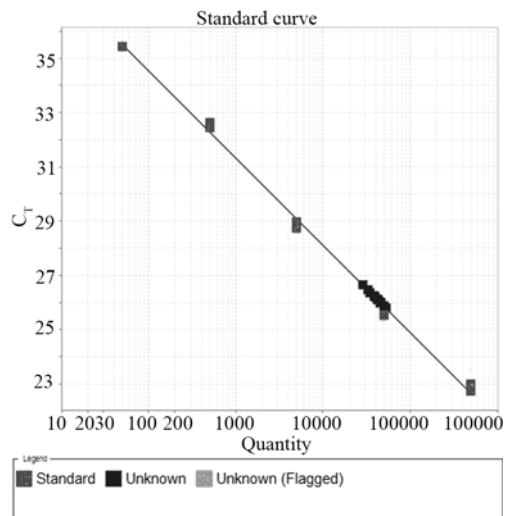


图 2 玉米内源基因 zSSIIB 的标准曲线
Figure 2 Standard curve of endogenous zSSIIB gene in maize

表 1 测试样 (1%) 转基因玉米 Bt176 定量检测结果

Table 1 Quantitative rests of genetically modified maize Bt176 in the analysis sample

重复次数 Times of repetition	玉米内源基因 zSSIIB Ct 值 Ct values of zSSIIB	玉米内源基因 含量/拷贝数 Content of zSSIIB/copies	外源基因 Ct 值 Ct values of exogenous gene	外源基因含量/拷贝数 Content of exogenous gene /copies	Bt176 相对含量/% Relative amount of Bt176
1	26.083	42 900	33.526	291	0.7
2	26.232	38 500	33.786	242	0.6
3	25.966	46 600	32.998	423	0.9
4	26.003	45 400	33.084	398	0.9
5	26.207	39 200	33.574	282	0.7
6	25.859	50 300	32.794	489	1.0
7	25.881	49 600	33.134	385	0.8
8	26.122	41 700	33.368	326	0.8
9	26.000	45 500	33.053	407	0.9
10	26.011	38 400	33.413	315	0.8
11	26.372	34 800	33.591	278	0.8
12	26.457	32 800	33.954	215	0.7
13	26.650	28 500	33.966	213	0.7
14	26.189	39 700	33.755	248	0.6
平均值	26.145	40 993	33.428	322	0.8

表 2 玉米内源基因标准曲线拟合

Table 2 Fitting of standard curve of endogenetic gene

编号 No.	zSSIIB 拷贝数 The number of zSSIIB copies	Ct 测量值 Measurements of Ct	Ct 拟合值 Fitted values of Ct	Ct 残差值 Residualvalue of Ct
1	500 000	22.86	22.66	0.20
2	50 000	25.65	25.87	-0.22
3	5 000	28.88	29.08	-0.20
4	500	32.54	32.29	0.25
5	50	35.44	35.50	-0.06

表 3 外源基因 Bt176 基因标准曲线拟合

Table 3 Fitting of standard curve of exogenous gene Bt176

编号 No.	Bt176 拷贝数 The number of Bt176 copies	Ct 测量值 Measurements of Ct	Ct 拟合值 Fitted values of Ct	Ct 值残差 Residualvalue of Ct
1	500 000	23.06	23.01	0.05
2	50 000	26.10	26.26	-0.16
3	5 000	29.64	29.51	0.13
4	500	32.86	32.76	0.10
5	50	35.89	36.01	-0.12

$$v_A = n - 1 = 14 - 1 = 13$$

3 不确定度分量的评估

3.1 A 类不确定度

根据贝塞尔公式计算由随机效应导致的 A 类不确定度。

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} = 0.001$$

$$u_A = \frac{s}{\sqrt{n}} = 0.0003$$

式中: x_i 为 Bt176 基因相对含量测量值; \bar{x} 为 14 次测量 Bt176 基因相对含量平均值; n 为测量值次数 14 次 (表 1)。

3.2 B 类不确定度

3.2.1 标准曲线拟合中数据对非线性的不确定度 ($Ct_{外}$, $\lg A_{外}$) 在标准曲线拟合中的非线性关系标准差为:

$$s(Ct_{外}) = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (Ct_{外拟合值} - Ct_{外测量值})^2}{n-2}} = 0.0731$$

式中： n 为标准曲线上数据对的总数； $C_{t外}$ 拟合值、 $C_{t外}$ 测量值分别为由已知梯度含量值根据标准曲线计算出的 C_t (C_t 拟合值) 和定量 PCR 仪测量到的 C_t (表 2)。

测量次数 P 为 16, 最小二乘法引入的不确定度分量为:

$$u(\lg A_{外}) = \frac{S_{C_{t外}}}{K} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{n} + \frac{(\lg A_{外} - \overline{\lg A_{j外}})^2}{\sum_{j=1}^n (\lg A_{j外} - \overline{\lg A_{j外}})^2}} = \frac{0.0731}{3.25} \sqrt{\frac{1}{14} + \frac{1}{15} + \frac{(2.67337 - 3.69897)^2}{30}} = 0.009$$

式中： $S_{C_{t外}}$ 为由标准溶液 C_t 值残差计算的标准差； n 为标准曲线上数据对的总数； P 为测量次数； $\overline{\lg A_{外}}$ 为试样重复测量 P 次结果的平均值； $\overline{\lg A_{j外}}$ 为绘制拟合直线全部 (n 个) 输入值 $\overline{\lg A_j}$ 的总平均值。

故其相对标准不确定度为:

$$u(A_{外}) = 10^{\lg A_{外}} \times \ln 10 \times u(\lg A_{外})$$

$$u_{rel}(A_{外}) = u(A_{外}) / A_{外} = 2.303 \times u(\lg A_{外}) = 0.037$$

同理计算 $\lg A_{内}$ 的响应值对 $zSSIIb$ 标准曲线的标准差:

$$s(C_{t内}) = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (C_{t内} \text{拟合值} - C_{t内} \text{测量值})^2}{n-2}} = 0.122$$

式中： n 为标准曲线上数据对的总数； $C_{t内}$ 拟合值、 $C_{t内}$ 测量值分别为由已知梯度含量值根据标准曲线计算出的 C_t (C_t 拟合值) 和定量 PCR 仪测量到的 C_t (表 3)。

测量次数 P 为 16, 最小二乘法引入的不确定度分量为:

$$u(\lg A_{内}) = \frac{S_{C_{t内}}}{K} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{n} + \frac{(\lg A_{内} - \overline{\lg A_{j内}})^2}{\sum_{j=1}^n (\lg A_{j内} - \overline{\lg A_{j内}})^2}} = \frac{0.122}{3.21} \sqrt{\frac{1}{14} + \frac{1}{15} + \frac{(4.63245 - 3.69897)^2}{30}} = 0.016$$

式中： $S_{C_{t内}}$ 为由标准溶液 C_t 值残差计算的标准差； n 为标准曲线上数据对的总数； P 为测量次数； $\overline{\lg A_{内}}$ 为试样重复测量 P 次结果的平均值； $\overline{\lg A_{j内}}$ 为绘制拟合直线全部 (n 个) 输入值 $\overline{\lg A_j}$ 的总平均值。

故其相对标准不确定度为:

$$u(A_{内}) = 10^{\lg A_{内}} \times \ln 10 \times u(\lg A_{内})$$

标准曲线的不确定度的自由度为 $n-2$ 。

所以:

$$u_{rel}(A_{内}) = u(A_{内}) / A_{内} = 2.303 \times u(\lg A_{内}) = 0.036$$

3.2.2 微量移液器的不确定度 根据 JJG

646-2006^[7]规定, 20℃时 10~100 μL 量程的测量范围内的最大允许差为 ±0.8 μL, 取均匀分布, 则由此带来的不确定度 u_1 (μL) 为:

$$u_1 = \frac{0.8}{\sqrt{3}} = 0.4619$$

该移液器在本实验中的加样体积为 12.5 μL, 其相对标准不确定度 u_{rel1} 为:

$$u_{rel1} = \frac{0.4619}{12.5} = 0.037$$

20℃时 0.5~10 μL 量程的测量范围内的最大允许差为 ±0.12 μL, 取均匀分布, 则由此带来的不确定度 u_2 (μL) 为:

$$u_2 = \frac{0.12}{\sqrt{3}} = 0.069$$

该移液器在本实验中的加样体积为 10 μL, 其相对标准不确定度 u_{rel2} 为:

$$v_{A_{外}} = n - 2 = 15 - 2 = 13$$

$$v_{A_{内}} = n - 2 = 15 - 2 = 13$$

$$u_{rel2} = \frac{0.069}{10} = 0.0069$$

20℃时 0.1~2.5 μL 量程的测量范围内的最大允许差为 ±0.04 μL, 取均匀分布, 则由此带来的不确定度 u_3 (μL) 为:

$$u_3 = \frac{0.04}{\sqrt{3}} = 0.023$$

该移液器在本实验中的加样体积为 0.5、1 和 1 μL, 其相对标准不确定度 u_{rel3} 、 u_{rel4} 和 u_{rel5} 为:

$$u_{rel3} = \frac{0.023}{0.5} = 0.046$$

$$u_{rel4} = \frac{0.023}{1} = 0.023$$

$$u_{rel5} = \frac{0.023}{1} = 0.023$$

由于 3 种不同量程的移液器在实验过程中具独立性, 因此由微量移液器允差带来的合成不确定度 u_{rel} (移液器) 为:

$$u_{rel}(\text{移液器}) = \sqrt{u_{rel1}^2 + u_{rel2}^2 + u_{rel3}^2 + u_{rel4}^2 + u_{rel5}^2} = \sqrt{0.037^2 + 0.0069^2 + 0.046^2 + 0.023^2 + 0.023^2} = 0.068$$

标准不确定度以最大偏差估计, 其自由度为无穷大, $v_3 = v_4 = v_5 = \infty$ 。

3.2.3 B 类不确定度的合成 因为各分量 $u_{rel}(A_{外})$ 、 $u_{rel}(A_{内})$ 和 u_{rel} (移液器) 不确定度彼此独立, 所以灵敏度系数 C_i 都为 1, 故 B 类合成不确定度为:

$$u_{rel}(B) = \sqrt{[u_{rel}(A_{外})]^2 + [u_{rel}(A_{内})]^2 + [u_{rel}(\text{移液器})]^2} = \sqrt{0.037^2 + 0.036^2 + 0.068^2} = 0.085$$

$$u_B = \bar{C}\% \times u_{rel}(B) = 0.8\% \times 0.085 = 0.0007$$

$$v_B = \frac{(u_{rel}(B))^4}{\frac{u_{rel}(A_{外})^4}{v_{A外}} + \frac{u_{rel}(A_{内})^4}{v_{A内}}} = \frac{0.085^4}{\frac{0.037^4}{13} + \frac{0.036^4}{13}} = 191$$

3.3 合成不确定度

因为 A 类不确定度和 B 类不确定度彼此独立, 所以:

$$u_c = \sqrt{u_A^2 + u_B^2} = \sqrt{0.0007^2 + 0.0007^2} = 0.001$$

$$v_{eff} = \frac{(u_c)^4}{\frac{u_A^4}{v_A} + \frac{u_B^4}{v_B}} = \frac{0.001^4}{\frac{0.0003^4}{13} + \frac{0.0007^4}{191}} = 272$$

3.4 扩展不确定度及测定结果的报告

根据扩展不确定公式 $U=k \cdot u_c$, 在包含概率 P 等于 95% 时, 有效自由度 v_{eff} 为 272 的 t 分布临界值, 按非整 v 内插计 $k=1.96^{[11]}$, 则玉米转基因成分含量的扩展不确定度为: $U = k u_c = 1.96 \times 0.001 = 0.2\%$

玉米转基因成分含量为: $X=(0.8 \pm 0.2)\%$, $k=1.96$

测量不确定度是与测量结果关联的一个参数, 用于表征合理赋予被测量值的分散性^[8], 是评估检测数据质量的重要参数。在我国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法律法规判断临界值的时候, 结果判断依赖于不确定度提供的测量结果可信区间。关于测量不确定的评估在理化分析文献中报道较多^[9-11], 而转基因成分定量检测结果不确定评估研究的报道尚少见。

本研究采用实验室建立的实时荧光定量 PCR 检测 1% 标准物质转基因玉米 Bt176 的含量, 并对测量值做了不确定度的评估和分析。PCR 反应的数学理论表明, PCR 扩增效率在 90%~110% 范围内能够获得可靠的结果, 而对应的标准曲线斜率的平均值为一 3.6~一 3.1。 r^2 是反映标准曲线相关性的重要参数, 在基因的定量检测中, 一般要求相关系数 r^2 大于或等于 0.99。本实验采用已知拷贝数的分别含有内外源基因的质粒作为标准曲线扩增基因, 排除了标准品在提取过程中的不确定因素对计算质量百分比的影响, 制备的内外源基因标准曲线扩增效率分别为 104.91% 和 103.07%, 斜率分别为—3.21 和 —3.25, 相关系数分别为 0.997 和 0.998, 本实验的检测结果 0.8% 接近样品中转基因玉米 Bt176 的真实含量 (1%)。

在实际转基因成分定量检测过程中, 不同环节都可能产生不确定度^[12], 本研究重点讨论了转基因

生物检测中样品批量重复、标准品曲线和微量液体的转移等引入的不确定度, 由计算结果可以看出, 在转基因荧光 PCR 定量测量过程中, 对测量不确定度影响最大的是微量液体转移引入的不确定度 (0.068), 因此, 在今后的实验中应重点关注微量液体转移量的准确性, 例如: 重视微量移液器的校准; 选用与移液器匹配较好, 液体低吸附的枪头; 吸取操作要规范; 量程选择要正确, 尽量降低微量移液器带来的不确定度。

本实验是对转基因成分检测结果不确定度评定的初步尝试, 而在实际检测中, 应尽可能多地对不同环节的不确定度进行评估, 考虑全面, 从而获得较准确的测量不确定度。

参考文献:

- [1] 宋君, 王东, 刘勇, 等. 转基因产品检测技术标准存在的问题及建议[J]. 中国测试, 2009, 35(6): 88-90.
- [2] 刘信, 宋贵文, 沈平, 等. 国外转基因植物检测技术及其标准化研究综述[J]. 农业科技管理, 2007, 26(4): 3-7.
- [3] BURNS M, VALDIVIA H. A procedural approach for the identification of sources of uncertainty associated with GM quantification and real-time quantitative PCR measurements[J]. Eur Food Res Technol, 2007, 226(1/2): 7-18.
- [4] 全国法制计量管理技术委员会. 测量不确定度评定与表示: JJF1059.1-2012 [S]. 北京: 中国质检出版社, 2012.
- [5] GRUDEN K, CANKAR K, BLEJEC A. Calculation of measurement uncertainty in quantitative analysis of genetically modified organisms using intermediate precision-A practical approach[J]. J AOAC Int, 2007, 90(2): 582-586.
- [6] 国家认证认可监督管理委员会. GB 19495.5-2004 转基因产品检测核酸定量 PCR 检测方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [7] 全国流量容量计量技术委员会. 移液器: JJF646-2006 [S]. 北京: 中国计量出版社, 2007.
- [8] 全国认证认可标准化技术委员会. 检测和校准实验室能力的通用要求: GB/T 27025-2008 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [9] 郝晓莉, 赵瑛博, 陈芳芳. 分光光度法测定白菜中亚硝酸盐的不确定度评定[J]. 食品科学, 2013, 34(6): 208-210.
- [10] 牛华, 牛之瑞, 冯雷, 等. 高效液相色谱法测定辣椒粉中罗丹明 B 的测量不确定度评估[J]. 食品科学, 2014, 35(8): 165-168.
- [11] 王吉祥, 张学忠, 王亚琴, 等. 气相色谱法和气相色谱-质谱法测定茶叶中联苯菊酯的不确定度评定[J]. 食品科学, 2014, 35(12): 200-203.
- [12] 宋君, 雷绍荣, 郭灵安, 等. 实时荧光定量 PCR 检测转基因玉米 MON863 的测量不确定度分析[J]. 玉米科学, 2012, 20(5): 45-49.