**《植物转基因产品检测 目标区域测序法》国家标准**

**编 制 说 明**

（征求意见稿）

一、任务来源

本国家标准的制定任务列入国家标准化管理委员会2018年第二批国家标准制修订计划，项目编号“20180930-T-424”。本项任务由中国标准化研究院提出并归口，定于2019年完成。本标准起草工作组由江汉大学等单位共同组成。

二、目的和意义

（一）国内外研究现状

第一个遗传修饰即转基因作物的商业化开发出现在1996年，随着生物技术的发展，转基因植物产品逐年增加。根据国际农业生物技术应用服务组织（ISAAA）的报告，全世界至2013年，已经有27种转基因作物类型和336种品种被开发出来，在27年国家种植面积达到1.75亿公顷。在中国，至2015年，已经有37种转基因作物被批准进口，用作加工原料。在许多国家（包括中国），因为政府和公众担心转基因产品的食品安全或环境安全的危害，对转基因产品持有不信任的态度。为了保护公众的知情权，许多国家（也包括中国）通过立法对转基因食品与饲料进行管制和跟踪。

为了适应转基因立法要求和确保产品的合法与可追踪，有效且精准的转基因筛选、鉴定和定量方法是十分必要的。除少部分以蛋白免疫反应显色为基础的检测方法外，DNA聚合酶链式反应（PCR）为基础的转基因检测方法是应用最广泛的方法，也是目前转基因检测国家标准与行业标准的主要方法。根据检测的特异性水平分为筛选方法、基因特异性方法、载体特异性方法和转基因事件特异性方法。大部分情况下，需要逐个做一系列的PCR反应来鉴定待测样品中的转基因成分。首先，需要筛选在转基因中常用的元件，然后，对筛选获得的怀疑样品鉴定事件特异性的序列，以便对转基因产品进行确认。转基因品种数量和转基因事件十分庞大且复杂，因此，单个PCR反应来鉴定所有的转基因元件与事件是不现实的。同时，单重PCR反应鉴定耗时、费力且成本高。因此，在转基因产品快速增长的背景下，部分研究者提出了转基因的高通量筛选与鉴定方法。已经应用的高通量筛选与鉴定方法包括多重PCR、多重PCR为基础的技术、以及预制好的实时PCR反应体系。

多重PCR的目的是在单个反应中同时检测多个目标。多重PCR需要对试剂和引物的浓度与组成进行仔细的优化。由于普通电泳技术的低分辨率，传统的多重PCR加电泳检测技术仅可以检测5-6个目标。实时PCR多重检测的能力也受限于实时PCR反应通道的数量限制和可以获取的荧光染料的种类的限制。为了解决转基因检测的通量问题，一些新技术被用于了转基因检测技术中。这些新技术的策略是将多重PCR与毛细管电泳或者芯片杂交技术相结合。特别地，DNA芯片具有同时分析上千种目标的能力，我国也有部分标准采用DNA芯片杂交进行转基因元件的筛选。然而，不论PCR产物的检测通量有多高，转基因的检测通量还要受限于多重PCR可以扩增的目标数量的限制。其它基于多重PCR开发的技术所受到的限制还包括选择性扩增，以及由于多重引物组合并存于同一反应中的相互干扰导致的非特异性背景扩增。为了克服末端多重PCR技术带来的上述缺陷，低浓度的引物和少数PCR循环数的预扩增步骤被用来增加模板DNA的量。多种高通量DNA检测方法中应用了预扩增策略，包括核酸序列扩增后芯片杂交技术、多重定量PCR后芯片杂交技术和多重微液滴PCR后的毛细管电泳技术。多重定量PCR后芯片杂交技术可以同时检测91个目标，然而，以芯片为基础的分析方法十分复杂且昂贵，在转基因检测的实际应用中是不现实的。

商业化的预制实时PCR芯片通常是96孔或者384孔，里面预埋了引物与探针，因此，可以同时检测多个目标。例如，Joint Reaseach Centre开发的实时PCR为基础的96孔板可以同时分析2个样本的48个目标。也开发了384孔板，用于分析7个样本中的47个目标，且可以重复2次。一般来说，如果需要分析多个目标，配制好的多重PCR体系只能分析少数几个样本。

（二）存在的问题

大部分转基因元件，都起源于微生物，而在植物生长的过程中，微生物可能感染植物，导致检出的转基因元件即可能是转基因成份也可能是微生物基因，因此转基因元件检测只能作物转基因产品的筛选手段，还需要根据转基因事件检测进行确定。由此，产生了以下严重的问题：

1. 筛选实验显著增加了转基因产品检测成本与时间；
2. 无法鉴定未知的转基因事件的产品；
3. 已有的转基因事件数量宠大，且每次检测一种转基因事件，若需要证明产品为非转基因产品，需要做大量的检测，不具有现实可行性，但是否为转基因产品又恰恰是公众与管理部门关心的核心问题。

现有的转基因检测方法都是基于PCR反应进行的，PCR产物形成的气溶胶可能污染实验室。由此产生以下问题：

1. 转基因检测的实验室防污染级别要求很高；
2. 实验人员防污染操作要求严格；
3. 转基因检测的假阳性无法彻底避免。

最后，现有的转基因检测方法大多为定性检测方法，即使只有0.1%以下的转基因成份，也会按照100%的转基因成份等同对待，导致争议。

（三）项目的意义

为了解决现有的转基因检测技术存在的问题，本标准综合了分子杂交技术、高通量测序技术与生物信息学技术，采用目标区域测序法对转基因产品进行检测。在目标区域测序法中，外源基因定性与定量鉴定流程如下：第一步，将样品基因组DNA破碎后连接带有样品条形码和随机条形码的接头；第二步，对连接产物进行PCR扩增；第三步，利用探针捕获扩增产物；第四步，利用带有测序接头的引物扩增捕获产物构建文库；第五步，利用二代高通量测序技术对文库进行高通量测序；最后一步，利用软件对测序数据进行质量控制并获得鉴定结果。

目标区域测序法改进了现有的转基因检测方法的上述局限，包括不同同检测多种外源基因的问题、不能检测新的转基因事件的问题、不能依据转基因元件确认转基因产品的问题，不能检测多种混合生物产品的问题、不同外源基因方法不能通用的问题、测试样本生物污染造成的假阳性问题、气溶胶污染造成的假阳性问题和转基因成份的定量检测问题。总之，本标准的目的是建立适用于所有多种植物转基因检测的准确、高通量、简单、快捷且定量鉴定标准方法，对食品安全、环境安全、转基因安全管理等具有重要意义。

三、标准制定原则

**（一）标准编制原则**

1、科学性

转基因鉴定结果往往是行政处罚的依据，方法的选择具备科学性。

2、高效性

海关或行政抽查，往往需要同时鉴定大批样品，标准操作需要遵循高效原则。

3、通用性

现有的转基因鉴定标准中，不同外源基因成份采用不同的鉴定方法，极大地增加了鉴定工作量，本标准采用的方法具备通用性。

**（二）标准制订主要依据**

1、标准编写遵循GB1.1-2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则》的有关要求。

2、标准编写内容参考我国相关的国家标准，包括：GB/T19495.2 转基因产品检测实验室技术要求、GB/T19495.3 转基因产品检测核酸提取纯化方法、GB/T19495.7 转基因产品检测抽样和制样方法和GB/T19495.5 转基因产品检测实时荧光定量聚合酶链式反应（PCR）检测方法。

四、标准主要技术内容

**（一）关于实验与结果分析中的准确性与参数值的确定。**

标准方法同时检测待测样品中的多个外源基因与内标准基因，且每个外源基因与内标准基因同时检测多个位置，只要有一个外源基因的一个检测位点被确证检出，就可以确定该待测样品为转基因产品，极大地降低了测试样品假阴性的风险。同时，每一种外源基因成份的确认需要同时有外源基因与非外源基因起源物种的边界序列的杂交序列作为证据，极大地降低了微生物污染导致的假阳性的风险。利用样品条形码，可以区分空气中的气溶胶和待测样品的测序片段，基本杜绝了空气污染导致的假阳性的风险。总之，标准方法从多个层面，极大地降低了转基因定性检测的错误。外源基因与内标准基因在同一反应体系中进行检测，降低了反应条件差异对定量的影响；利用随机条形码还原模板分子极大降地降低了扩增效率的影响；每个外源基因的检测多个区域，每个区域检测多至数万次，可以利用统计学的原理，尽量消除系统中残留的随机误差的影响。总之，多个方面的优势共同作用，增加了转基因定量检测的准确性。

本标准利用测序数据同，实现了实验过程中的全面监控，包括交叉污染、基因组DNA用量、文库构建、测序数量和测序数据中的模板片段数量，以确保实验过程中的质量与不合格的原因，根据不合格的原因作出相应的后续处理方式。结果监控实验质量优于在过程中进行预防的方式，例如，通过DNA定量的方式加入一定量的DNA以确保在足够的DNA分子用于检测，然而，并不能保证定量的准确性，在不知道问题原因时，也不知道后续操作如何进行。本标准通过测序数据的质量监控，避免了类似的问题。

本标准中规定测序的测序片段数量为每个待测样本1 G，有效Reads（非特异的Reads）最低按20%计，那么，最低有0.2 G的有效数据。那么，按300 bp的片段长度计算，片段的Reads数量为0.65 M。内标准基因与外源基因的有效检测区域（存在对应模板DNA的检测区域）按12个计算，那么，平均每个区域有5.5 万 Reads覆盖。本标准规定按GB/T 19495.5-2018规定的最低用量使用模板DNA的量，即最低有2.5万个模板分子。当有5.5万Reads去覆盖2.5万个模板分子时，91%的模板分子至少可以被1个Read所覆盖，即可以被检出，也即每个探针位点的检出模板分子的数量约为2万个。即使按本标准的最低检出限0.1%计，平均可以检出的外源基因的模板数量为20个，其不被检出，即检出的模板分子的数目小于2条的理论概率0.05%，理论成功率为99.95%。

利用本标准的方法，我们检测了55个含有1%的外源基因的转基因标准样品（表一）和3个不含有外源基因的标准样品。其中，55个含有1%的外源基因的转基因标准样品均通过本标准的方法检出含有至少一种外源基因成份，成功率100%。3个内标准基因的样品均通过 本标准的方法检测不含有外源基因成份，成功率100%

表一、转基因标准样品清单

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 序号 | 产品名称 | 检测参数 |
| 1 | *CaMV 35S*启动子、  *FMV 35S*启动子、  *NOS*启动子/终止子 | *CaMV 35S*启动子、*FMV 35S*启动子、*NOS*启动子/终止子 |
| 2 | *NPTII*、*HPT*和*PMI* | *NPTII*、*HPT*和*PMI* |
| 3 | GUS | *GUS* |
| 4 | CP4-epsps | *CP4-epsps* |
| 5 | bar或pat | *bar*或*pat* |
| 6 | Barnase | *Barnase* |
| 7 | H7-1甜菜 | H7-1、*FMV35S*启动子、*Cp4-epsps* |
| 8 | MON863玉米 | MON863、*CaMV35S*启动子、*NOS*终止子、*nptII* |
| 9 | MIR604玉米 | MIR604、*NOS*终止子 |
| 10 | MIR162玉米 | MIR162 |
| 11 | NK603玉米 | NK603、*NOS*终止子、Cp4-epsps |
| 12 | T25玉米 | T25、*CaMV 35S*启动子、*pat* |
| 13 | MON89034 玉米 | MON89034*、CaMV35S*启动子、*FMV35S*启动子、*NOS*终止子 |
| 14 | BVLA430101玉米 | BVLA430101 |
| 15 | 59122玉米 | 59122、*CaMV35S*启动子 |
| 16 | MON88017玉米 | MON88017、*CaMV35S*启动子、*NOS*终止子 |
| 17 | 3272玉米 | 3272、*NOS*终止子 |
| 18 | DAS-40278玉米 | DAS-40278 |
| 19 | Bt11玉米 | Bt11、*CaMV35S*启动子、*NOS*终止子、*cry1Ab* |
| 20 | Bt176玉米 | Bt176、*CaMV35S*启动子 |
| 21 | J101 苜蓿 | J101 |
| 22 | MON810玉米 | MON810、*CaMV35S*启动子、*cry1Ab* |
| 23 | IE09S034玉米 | IE09S034 |
| 24 | 双抗12-5玉米 | 双抗12-5 |
| 25 | MON89788 大豆 | MON89788 、*FMV35S*启动子、*Cp4-epsps* |
| 26 | A2704-12大豆 | A2704-12、*CaMV35S*启动子、*pat* |
| 27 | A5547-127 大豆 | A5547-127、*CaMV35S*启动子、*pat* |
| 28 | 356043 大豆 | 356043、*CaMV35S*启动子 |
| 29 | 305423 大豆 | 305423 |
| 30 | CV127 大豆 | CV127 |
| 31 | GTS40-3-2 大豆 | GTS40-3-2 、*CaMV35S*启动子、*NOS*终止子、*Cp4-epsps* |
| 32 | 大豆 | 大豆内标准基因 |
| 33 | MON87705大豆 | MON87705、*Cp4-epsps* |
| 34 | MON87769 大豆 | MON87769 |
| 35 | MON87708大豆 | MON87708 |
| 36 | MON87701大豆 | MON87701 |
| 37 | FG72大豆 | FG72 |
| 38 | MON1445棉花 | MON1445、*FMV35S*启动子、*CaMV35S*启动子、*NOS*终止子 |
| 39 | 转Bt基因棉花 | Bt基因 |
| 40 | LLcotton25棉花 | LLcotton25、*CaMV35S*启动子 |
| 41 | MON88913 棉花 | MON88913、*CaMV35S*启动子、*Cp4-epsps* |
| 42 | MON15985 棉花 | MON15985、*CaMV35S*启动子、*NOS*终止子、*nptII* |
| 43 | GHB614棉花 | GHB614 |
| 44 | MS1\*RF1 油菜 | MS1\*RF1 |
| 45 | MS8\*RF3油菜 | MS8\*RF3 |
| 46 | MS1\*RF2 油菜 | MS1\*RF2 |
| 47 | GT73油菜 | GT73、*FMV35S*启动子、*Cp4-epsps* |
| 48 | T45 油菜 | T45、*CaMV35S*启动子、*pat* |
| 49 | Oxy-235油菜 | Oxy-235、*CaMV35S*启动子、*NOS*终止子 |
| 50 | Topas油菜 | Topas |
| 51 | 油菜 | 油菜内标准基因 |
| 52 | MON88302油菜 | MON88302 |
| 53 | Bt基因水稻 | Bt基因 |
| 54 | TT51-1水稻 | TT51-1、*NOS*终止子、*cry1Ab/Ac* |
| 55 | M12 水稻 | M12 、*NOS*终止子 |
| 56 | 水稻 | 水稻内标准基因 |
| 57 | 科丰2号水稻 | 科丰2号、*CaMV35*S启动子、*NOS*终止子 |
| 58 | J163苜蓿 | J163 |

利用表一中的转基因阳性的标准样品与标准品种进行混合，制作成含有0.1%的外源基因的转基因样品，共计116个样品（含重复）。利用本标准的方法，对获得的116个转基因阳性样品进行了检测，其中有112个样品被判定含有一种或多种转基因成份，正确率为96.56%。利用标准中的方法，我们继续对100个已知的非转基因植物品种的样品进行了测试，没有发现任何转基因成份，结论的正确率为100%。因此，本标准在95%以上的概率保证下，可以检出0.1%的转基因成份。

当转基因成份含量为10%时，依旧按以上参数进行计算，平均可以检出的外源基因的模板片段的数量为2046个，那么，按二项分布，在95%的置信区间内，检出的转基因成份的理论模板片段的数量为2006个到2148个，转基因含量的理论变异不超过10%。事实上，我们利用3个已知的100%的转基因品种的粉未（含有Bt基因的水稻与玉米品种各1个，含有Bar基因的水稻品种1个），与已知的非转基因品种的样品混合 ，制作了200个含有10%的外源基因的转基因样品，利用本标准对这200个样品进行检测，获得第个样品检出的外源基因的含量，计算第个样品呷检出的外源基因的与参考值10%的偏差。结果表明，在200个样品中，只有8个样品的RSD的值超过了10%，因此，确定了本标准在96%的概率保障下，定量检测下限为10%。

**（二）关于片段化的大小**

对于高通量测序的文库构建来说，文库中DNA片段大小一般为300bp左右。对于植物样品来说，提取的DNA一般来说是比较完整的，因此，大于300bp是可以实现的。对于食品样品来说，DNA可能在食品的加工过程中已经降解，平均长度不足300bp。因此，为了满足多种情况，本标准中，规定片段化大小为100 bp至1000 bp。

**（三）关于实验操作**

由于本标准中，多重扩增循环数在20个以下，处于线性增长期，采用二代高通量测序对扩增的线性产物进行检测，可以在不同基因间进行比较，获得准确的定量。实验室的气溶胶污染样本条形码在分析中被排除。因此，本标准的方法对于加上条形码后的样品，防止气溶胶污染的要求并不是十分严格，只要求实验分区、单向流动、设备器具专用且保持通风，这些要求在普通实验室可以满足，使得本标准可以在多数实验室中实施。

本标准采用二代高通量测序进行检测。与传统的基于实时PCR或者电泳检测的标准方法比较，二代高通量测序的在定量检测的动态范围只取决于测序深度，并没有检测的下限与上限的限制，因此，不需要根据标准曲线确定定量检测的动态范围。

本标准中，不同样本采用不同的样本条形码且样本条形码在30天内不重复，在实验室通风良好的要求下，30天内足够进行一轮实验室内外的气体交换。因此，在实验室的气溶胶中，不存在相同的样本条形码，可以根据样本条形码，从测序数据中将气溶胶的数据排除在外，因此，不需要实验PCR反应的空白对照。

本标准中，内标准基因与外源基因在相同的反应管中进行反应，因此，误差小。根据我们的200个转基因含量为10%的转基因样品的检测结果，在96%的概率保证下，定量误差不超过10%，因此，不需要设置平行实验，以校正不同反应管中的误差。同样由于同一管中的检测误差较小，因此，当建库试剂盒固定下来后，外源基因与标准基因间检测效率在不同反应中的差异较小。根据我们的200个转基因含量为10%的转基因样品的检测结果，外源基因与标准基因间检测校率在不同反应中变异超过10%只有2次。因此，不必在每一次检测中，计算外源基因与标准基因间检测效率的差异，可以将检测效率的差异整合在转基因分析软件中。

**五、主要工作过程**

1、组成标准起草小组

标准制定任务下达后，2017年1月，组成了标准起草工作组，明确了任务要求，安排了工作进度，会议研究讨论了标准制定的原则与方法，标准验证的方式与方法，标准中要研究的物种的类别与数量。

2、开展相关调研情况

到农业农村部分科技发展中心及湖北省油料所等多家机构进行了多次调研，调研内容包括转基因鉴定的政策、法规、检测方法和检测实验室要求等内容。

3、标准起草完善过程

依据GB/T 1.1—2000《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则》、GB/T 1.2—2002《标准化工作导则 第2部分：标准中规范性技术要素内容的确定方法》等标准编制要求，对《植物转基因鉴定　目标区域测序法》标准开展了研制工作。起草工作小组完成了《植物转基因鉴定　目标区域测序法》国家标准（草案）。2016年完成了标准的调研工作；2018年标准在国家标准委正式立项；2019年完成了标准的研制与验证工作。在此基础上，2019年3月征求了专家意见，起草组按照专家意见对标准内容进行了修改完善，形成了标准征求意见稿。

**六、方法验证及结果**

本标准的验证单位包括湖清华大学化学工程系、四川农业大学水稻研究所和郑州大学生命科学学院。三家单位认为《植物转基因鉴定 目标区域测序法》标准草案中的方法可以鉴定出标准样品中的转基因品系和外源基因，定量检测误差不超过10%，具有定性定量准确的特点。

**七、与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系**

本标准符合国家现行法律、法规、规章和强制性国家标准的要求。本标准的实施不涉及对现行标准的废止情况。

**八、标准属性的建议**

本标准属于基础管理标准，建议作为推荐性标准批准发布。

**九、贯彻国家标准的要求和措施建议**

本标准相对于已有的标准具有准确、定量、通用等优势，建议加强宣传和推广应用。