

中华人民共和国国家标准

农业农村部公告第 323 号—21—2020

转基因植物及其产品成分检测 数字PCR方法制定指南

Detection of genetically modified plants and derived products—
Technical guidelines for development of digital PCR methods

2020-08-04 发布

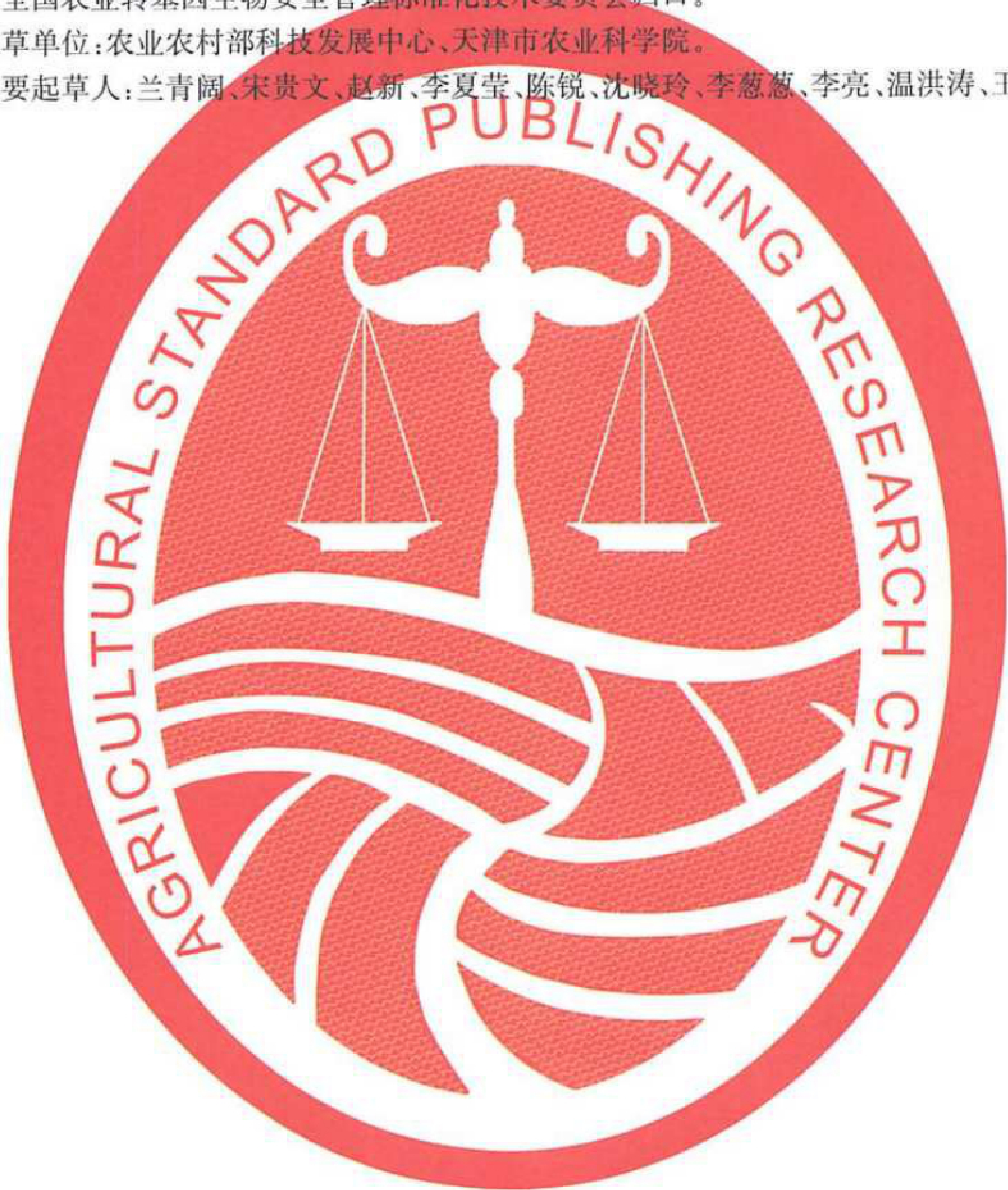
2020-11-01 实施



中华人民共和国农业农村部 发布

前言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。
请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。
本标准由中华人民共和国农业农村部提出。
本标准由全国农业转基因生物安全管理标准化技术委员会归口。
本标准起草单位：农业农村部科技发展中心、天津市农业科学院。
本标准主要起草人：兰青阔、宋贵文、赵新、李夏莹、陈锐、沈晓玲、李葱葱、李亮、温洪涛、王永。



转基因植物及其产品成分检测 数字 PCR 方法制定指南

1 范围

本标准规定了转基因植物及其产品数字 PCR 检测方法的建立与确认的总体要求。
本标准适用于转基因植物及其产品成分检测的数字 PCR 检测方法的建立与确认。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适合于本文件。

农业部 2259 号公告—4—2015 定性 PCR 方法制定指南

农业部 2259 号公告—5—2015 实时荧光定量 PCR 方法制定指南

3 术语和定义

农业部 2259 号公告—4—2015 和农业部 2259 号公告—5—2015 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

数字 PCR digital PCR

将原始 PCR 反应体系进行分割,进而对所有小的反应体系进行扩增,通过阳性率和泊松分布计算获得样品中靶序列拷贝数或拷贝数浓度。

注:现阶段数字 PCR 包括芯片式及微滴式两种。

3.2

微反应体系 tiny reaction partition

将 DNA 模板、引物/荧光探针、DNA 聚合酶及其缓冲液等 PCR 反应体系充分混匀后,通过乳化、芯片等方式分配至体积相同且相互物理隔离的油包水液滴或其他微孔、微室中所形成的小体积荧光 PCR 反应体系。

3.3

正确度 trueness

多次测试的均值与采纳的标准值之间的接近程度。

4 实验室资质

进行转基因生物数字 PCR 检测方法的建立与确认的实验室,一般应满足以下要求:

- a) 具备资质认定和/或实验室认可的条件及证明;
- b) 从事过转基因植物成分定量测量的工作;
- c) 参加过权威部门组织的转基因植物定量测量能力验证或计量比对,并且测量结果在可控范围内。

5 技术要求

5.1 方法的建立

数字 PCR 方法的建立应包括如下步骤:

- a) 检测引物和探针的设计与筛选:依据靶序列设计引物和探针,通过试验对其进行比较分析,筛选出具有严格特异性和灵敏度的引物和探针组合;
- b) PCR 反应体系和反应程序优化:通过试验确定适合的反应体系(最适模板量、引物、探针浓度等)

及反应程序(退火温度、循环数等),能有效区分阳性信号和阴性信号;采用多重 PCR 检测方法的,应提供与单重 PCR 检测方法的对比结果;

- c) 方法特异性测试:通过试验验证检测方法的特异性,特异性测试样品至少应包括 3 类:
 - 1) 含有靶序列的转基因植物材料;
 - 2) 不含有靶序列的转基因植物材料;
 - 3) 不含靶序列的非转基因植物材料。
- d) 线性动态范围测试:依据技术平台,选择合理的拷贝数浓度测试范围,确定方法的线性动态范围、定量限。测试浓度点数一般不少于 5 个,至少 3 次重复,每次试验至少设置 3 个平行;
- e) 方法适用性测试:选择合适的加工品类型,测试方法的适用性。

5.2 实验室内方法验证

对建立的数字 PCR 方法,在实验室内进行确认时,应达到以下要求:

- a) 线性度:线性动态范围的线性度以线性回归曲线的决定系数 R^2 表示,均值一般应 ≥ 0.98 ;
- b) 精密度:线性动态范围内的精密度用重复性相对标准偏差 RSD_r 表示,一般应 $\leq 25\%$;
- c) 正确度:在整个线性动态范围内,正确度偏差不超过标准值的 25% ;
- d) 定量限:线性动态范围内,符合精密度条件的最低拷贝数浓度;
- e) 再现性:由两个不同操作人员,在两个不同时间段,对包含不同质量分数的同批样品(至少包括阳性样品、阴性样品和定量限样品)进行测试。测试结果与预期偏差 RSD 一般应 $\leq 25\%$,表明方法再现性符合要求。否则,重新进行相关测试。

5.3 实验室间方法确认

经实验室内方法确认符合要求后,组织多家实验室对检测方法的特异性、灵敏度和再现性进行实验室间确认,需符合以下要求:

- a) 样品设计:实验室间方法确认样品应包括阳性对照样品、阴性对照样品、特异性测试样品和灵敏度测试样品;
- b) 特异性测试样品应包括:
 - 1) 含有靶序列的转基因植物材料;
 - 2) 不含有靶序列的转基因植物材料;
 - 3) 不含靶序列的非转基因植物材料。
- c) 灵敏度测试样品应包括:定量限样品;
- d) 不少于 6 个实验室提供有效数据,且至少重复 3 次试验,每次试验至少设置 3 个平行;
- e) 线性动态范围的线性度、正确度符合 5.2 的要求;
- f) 实验室间的再现性相对标准偏差精密度 RSD_R 一般应 $\leq 35\%$;
- g) 确认报告按照农业部 2259 号公告—4—2015 中 5.2 的规定执行。

中华人民共和国
国家标准

转基因植物及其产品成分检测
数字 PCR 方法制定指南

农业农村部公告第 323 号—21—2020

* * *

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)

(邮政编码:100125 网址:www.ccap.com.cn)

北京印刷一厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

* * *

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 0.5 字数 10 千字

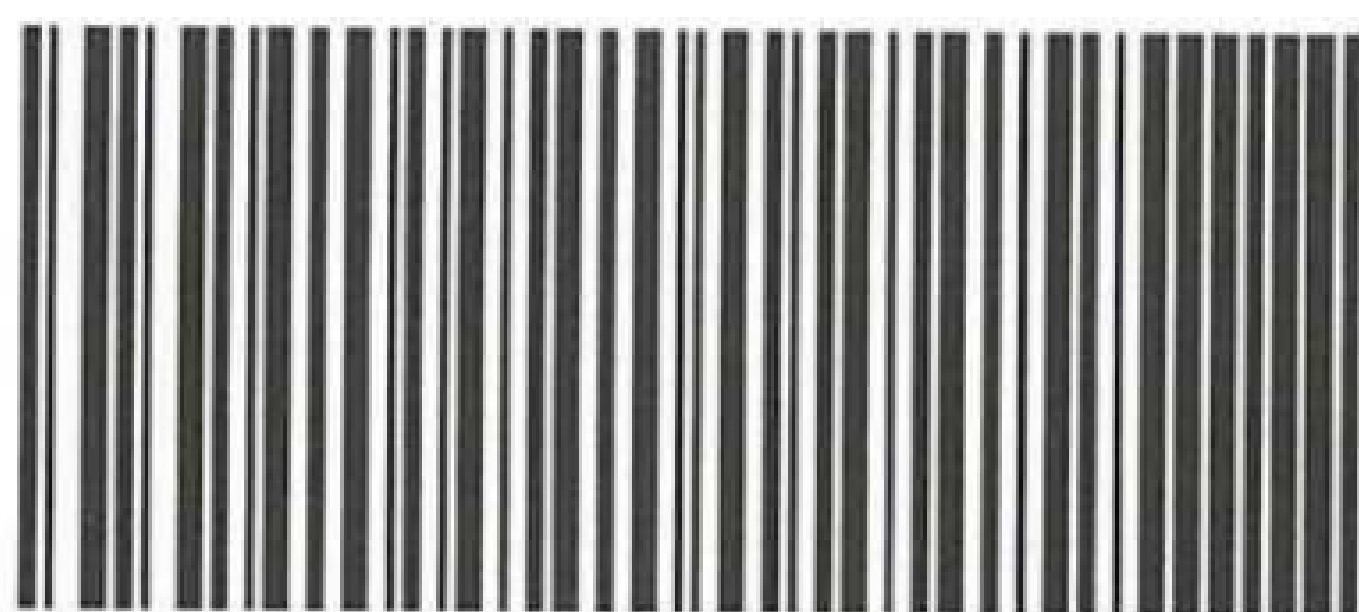
2020 年 10 月第 1 版 2020 年 10 月北京第 1 次印刷

书号: 16109·8244

定价: 12.00 元

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 59194261



农业农村部公告第 323 号—21—2020