ICS 65.020.01
CCS B 04

中华人民共和国国家标准

农业农村部公告第423号—10—2021

转基因植物及其产品成分检测
转基因成分定量检测结果不确定度评定与表示

Detection of genetically modified plants and derived products—Guidance on Measurement Uncertainty for GMO Testing Results

2021-05-07 发布　　2021-11-01 实施

中华人民共和国农业农村部　发布

全国农业食品标准公共服务平台
食典通

前　言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则　第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

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专利的责任。

本文件由中华人民共和国农业农村部提出。

本文件由全国农业转基因生物安全管理标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：农业农村部科技发展中心、中国计量科学研究院、中国农业科学院生物技术研究所。

本文件主要起草人：高运华、张秀杰、李亮、李夏莹、金芜军、刘卫晓、王迪、梅英婷。

转基因植物及其产品成分检测
转基因成分定量检测结果不确定度评定与表示

1 范围

本文件规定了转基因产品核酸成分定量检测结果不确定度评定的方法与结果表示。

本文件适用于实验室对转基因成分定量检测结果的测量不确定度评估，亦适用于标准物质研制等相关领域。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

农业部 1485 号公告—4—2010 转基因植物及其产品成分检测 DNA 提取和纯化

农业部 2259 号公告—5—2015 转基因植物及其产品成分检测 实时荧光定量 PCR 方法制定指南

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

JJF 1059.1 测量不确定度评定与表示

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

转化体 transformant (event)

利用基因工程技术获得的具有特定基因组结构并稳定遗传的转基因生物。

3.2

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：本文件数字 PCR 包括芯片式及微滴式两种。

3.3

实时荧光定量 PCR real-time quantitative PCR

通过实时监测 PCR 反应中的荧光信号强度，实现对起始模板定量分析的一种技术。

3.4

测量不确定度 measurement uncertainty

表征合理地赋予被测量之值的分散性，与测量结果相联系的参数。

3.5

转基因植物标准物质 genetically modified plant reference material

具有足够均匀和稳定的特性，用于转基因植物及产品核酸（蛋白质）成分测量程序校准、确认与质量控制的物质，包括基体标准物质、基因组 DNA 标准物质、质粒 DNA 标准物质和蛋白质标准物质。

3.6

转基因成分 ingredients of genetically modified plant

转基因植物及产品核酸与蛋白质成分，本文件主要指核酸成分，用质量百分比或拷贝数百分比表示。

4 测量不确定度评估模型

4.1 转基因成分含量测量模型

测量待测样本中外源基因与内标准基因的拷贝数浓度或质量浓度，测量模型见公式(1)。按公式(1)计算测试样本中的转基因成分含量。

$$c = \frac{A}{B} \times 100\% \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

c ——测试样品中的转基因成分含量，单位为百分号(%)；

A ——测试样品中外源基因的拷贝数浓度或质量浓度；

B ——测试样品中内标准基因的拷贝数浓度或质量浓度。

4.2 实时荧光定量 PCR 法测量模型

以系列标准物质扩增的 Ct 值为 Y 轴，DNA 拷贝数浓度或质量浓度 c 的对数为 X 轴，经线性拟合得到外源基因标准曲线和内标准基因标准曲线线性方程，测量模型见公式(2)。利用公式(2)计算待测样本外源基因和内标准基因的拷贝数浓度或质量浓度。

$$Ct = -a \times \log c + b \quad \cdots\cdots (2)$$

式中：

Ct ——荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数；

a ——标准曲线的斜率；

c ——标准梯度样品中 DNA 的拷贝数浓度或质量浓度；

b ——标准曲线的截距。

4.3 数字 PCR 法测量模型

数字 PCR 的原理是将 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，测量模型见公式(3)。

$$T_p = \frac{-D}{V_p} \times \ln\left(1 - \frac{P}{N}\right) \quad \cdots\cdots (3)$$

式中：

T_p ——目标基因拷贝数浓度；

D ——稀释因子；

V_p ——反应室或微滴的体积；

P ——阳性反应室或微滴的个数；

N ——总的反应室或微滴的个数。

5 质量控制

测量程序和数据质量部分，实时荧光定量 PCR 法应符合农业部 2259 号公告—5—2015 的要求，数字 PCR 法应符合农业农村部公告第 323 号—21—2020 的要求。

6 不确定度量化计算

6.1 基因组 DNA 的稀释引入不确定度

按农业部 1485 号公告—4—2010 的要求进行提取，并测定提取的基因组 DNA 含量，每个基因组 DNA 样本平行取样 3 次，每次读 2 次，得到 6 个数据，取其平均值为基因组 DNA 含量值。依据该测量值对基因组 DNA 样本进行稀释，达到实时荧光定量 PCR 或数字 PCR 方法测量的合适浓度进行测量。基因组 DNA 稀释引入的不确定度主要由天平或移液器引入，按公式(4)计算。

$$u_d = u_t - k \quad \cdots\cdots (4)$$

式中：

u_d ——天平或移液器校准引入不确定度；

u_t ——天平或移液器的校准不确定度；

k ——扩展因子。

6.2 实时荧光定量PCR法测量不确定度评定

6.2.1 标准物质引入不确定度

测量未知样中目标片段的浓度，需要依赖标准物质制作标准曲线进行定量，标准物质的不确定度为定量测量结果不确定度的来源之一。由标准物质引入的不确定度按公式(5)计算。

$$u_{crm}=U_{crm}/k \quad \cdots\cdots (5)$$

式中：

u_{crm}——标准物质引入的不确定度；

U_{crm}——标准物质不确定度；

k——扩展因子。

6.2.2 标准物质稀释引入不确定度

标准曲线制作需对标准物质进行系列稀释，需采用重量法或容量法，由此引入的不确定度分量来源于天平或移液器。天平或移液器引入的不确定度 u_v 按公式(4)计算。标准物质梯度稀释时，每个梯度浓度的标准物质分别按公式(4)计算。使用梯度标准物质时，不需考虑这部分的不确定度。

6.2.3 标准曲线拟合引入不确定度

利用系列标准物质或系列稀释的标准物质进行标准曲线制作，得到线性方程：$y=a+bc$。则标准曲线拟合时引入的目标分子质量浓度 c 的标准不确定度按公式(6)计算。

$$u_c=\frac{s}{b}\sqrt{\frac{1}{M}+\frac{1}{n}+\frac{(c-\overline{c})^2}{\sum_{i=1}^{n}(c_i-\overline{c})^2}} \quad \cdots\cdots (6)$$

其中 s 为校准曲线的标准偏差，按照公式(7)进行计算。

$$s=\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}[y_i-(a+bc_i)]^2}{n-2}} \quad \cdots\cdots (7)$$

式中：

c_i——建立标准曲线用标准系列溶液中目标分子的质量浓度；

y_i——建立校准曲线用标准系列溶液中目标分子的质量浓度对应的值；

a——校准曲线的截距；

b——校准曲线的斜率；

M——对待测样品平行测定的次数；

n——建立标准曲线用标准系列溶液测量总数，如每个标准溶液测量3次，$n=15$；

c——根据测得的 y 的平均值，利用标准曲线求得的待测样品中目标样品的质量浓度；

$\overline{c}$——标准系列溶液中目标分子的平均质量浓度；

$\sum_{i-1}^{n}(c_i-\overline{c})^2$——标准系列溶液中目标样品的质量浓度方差和。

6.2.4 PCR测量重复性引入不确定度

利用PCR进行目标基因扩增，每个样本平行测量 n 次，按公式(8)计算测量重复性引入的不确定度。

$$u_a=\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x-\overline{x})^2}{n-1}} \quad \cdots\cdots (8)$$

式中：

u_a——标准不确定度；

$\overline{x}$——n 次含量测定值的算术平均值，$n\geqslant 6$；

x_i——每次的含量测定值；

n——测定的次数；

i——测定的序号，$i=1\sim n$。

6.2.5 实时荧光定量PCR仪校准不确定度

实时荧光定量PCR仪的校准不确定度，由仪器的校准证书得到，按公式(9)计算。

$$u_{pcr}=\frac{U_{pcr}}{k} \quad \cdots\cdots (9)$$

式中：

u_{pcr}——实时荧光定量PCR仪校准不确定度；

U_{pcr}——仪器校准引入不确定度；

k ——扩展因子。

6.2.6 合成标准不确定度

实时荧光定量PCR法不确定度由6.2.1、6.2.2、6.2.3、6.2.4和6.2.5五个分量组成，按公式(10)计算。

$$u=\sqrt{u_{crm}^2+u_d^2+u_c^2+u_a^2+u_{pcr}^2} \quad \cdots\cdots (10)$$

6.2.7 扩展不确定度

扩展不确定度按公式(11)计算。

$$U=u\times k \quad \cdots\cdots (11)$$

式中：

U——扩展不确定度；

k——包含因子，一般$k=2$，置信概率95%；

u——合成标准不确定度。

6.3 数字PCR法测量不确定度评定

6.3.1 微滴或小室体积引入测量不确定度

设微滴式数字PCR的微滴引入的测量不确定度u_r为常数，u_r为1.40%。

设芯片式数字PCR的小室引入的测量不确定度u_r为常数，u_r为1.47%。

6.3.2 DNA稀释引入不确定度

依据6.1的规定计算。

6.3.3 测量重复性引入不确定度

依据6.2.4的规定计算。

6.3.4 数字PCR仪器校准引入不确定度

依据6.2.5的规定计算。

6.3.5 合成标准不确定度

数字PCR法不确定度由6.3.1、6.3.2、6.3.3和6.3.4四个分量组成，按公式(12)计算。

$$u=\sqrt{u_{pcr}^2+u_r^2+u_d^2+u_a^2} \quad \cdots\cdots (12)$$

6.3.6 扩展不确定度

扩展不确定度按公式(13)计算。

$$U=u\times k \quad \cdots\cdots (13)$$

式中：

U——扩展不确定度；

k——包含因子，一般$k=2$，置信概率95%；

u——合成标准不确定度。

附　录　A
（资料性）
转基因成分定量检测结果不确定度评定与表示
——实时荧光定量 PCR 法示例

A.1　标准物质引入不确定度

实时荧光定量 PCR 法检测待测样品内标准基因和外源基因的浓度，需要依赖标准物质制作标准曲线进行定量，标准物质的不确定度为定量测量结果不确定度的分量之一。则由标准物质引入的不确定度按公式(5)计算。

若使用的标准物质特性量值和不确定度为：51.0 g/kg(‰)，U=0.5 g/kg(‰)，k=2。则标准物质引入的相对标准不确定度为 u_{crm}=(0.5/2)/51×100%=0.49%。

A.2　标准物质稀释引入不确定度

标准曲线制作需对标准物质进行系列稀释，需采用重量法或容量法，由此引入的不确定度分量来源于天平或移液器。

天平或移液器引入的不确定度 u_d 按公式(4)计算。标准物质梯度稀释时，每个梯度浓度的标准物质分别按公式(4)计算。使用梯度标准物质时，不需考虑这部分的不确定度。

若使用的标准物质目标基因特性量值和不确定度为：51 g/kg(‰)、U=0.5 g/kg(‰)、k=2。分别做 1.7 倍、2.5 倍、10 倍、100 倍的稀释，得到 30 g/kg(‰)、20.4 g/kg(‰)、5.1 g/kg(‰)、0.51 g/kg(‰)系列工作标准物质进行标准曲线制作，用与标准物质 DNA 浓度一致的 100%阴性基因组 DNA 溶液按表 A.1 中设定的比例进行系列稀释，则标准物质稀释引入的不确定度为：

表 A.1　标准物质系列稀释

设定浓度，g/kg(‰)	移取溶液体积(质量)，μL		稀释后浓度，g/kg(‰)
	51 ng/μL 的标准物质基因组 DNA 溶液	100 ng/μL 的阴性基因组 DNA 溶液	
30	58.8	41.2	30.0
20	39.2	60.8	20.0
5.1	10.0	90.0	5.1
0.51	1.00	99.0	0.51

确定稀释方法：

采用容量法。用最大量程为 100 μL 的移液器，U_{95}=0.1 μL，k_p=2.03；最大量程为 2 μL 的移液器，U_{95}=0.01 μL，k_p=2.03。用 30 g/kg(‰)浓度点标准物质稀释。相对不确定度：U_1=(0.1/2.03)/58.8×100%=0.084%，U_2=(0.1/2.03)/41.2×100%=0.12%。

其他浓度点参照 30 g/kg(‰)浓度点计算，结果见表 A.2。

表 A.2　标准物质系列稀释不确定度计算结果

设定浓度，g/kg(‰)	相对标准不确定度，%	
	51 g/kg(‰)	超纯水或阴性基因组 DNA
30	$U_{30\text{-}1}$=0.084	$U_{30\text{-}2}$=0.12
20	$U_{20\text{-}1}$=0.13	$U_{20\text{-}2}$=0.081
5.1	$U_{5.1\text{-}1}$=0.49	$U_{5.1\text{-}2}$=0.055
0.51	$U_{0.51\text{-}1}$=0.49	$U_{0.51\text{-}2}$=0.21

$$u_{dcrm}=\sqrt{U_{30\text{-}1}^2+U_{30\text{-}2}^2+U_{20\text{-}1}^2+U_{20\text{-}2}^2+U_{5.1\text{-}1}^2+U_{5.1\text{-}2}^2+U_{0.51\text{-}1}^2+U_{0.51\text{-}2}^2}=0.76\%$$

A.3 标准曲线拟合引入不确定度

利用系列标准物质或系列稀释的标准物质进行标准曲线制作，得到线性方程：$y=a+bc$。标准曲线拟合时引入的目标分子质量浓度 c 的标准不确定度按公式(6)计算。

其中 s 为校准曲线的标准偏差，按照公式(7)进行计算。

采用实时荧光定量 PCR 进行转基因定量检测。以 5 个拷贝数浓度梯度样品的对数为横坐标 X 轴，测定的 Ct 值为纵坐标 Y 轴建立标准曲线，对每个待测样品平行测定 3 次。结果见表 A.3 所示。

表 A.3 标准曲线线性拟合检测数据

梯度	copies	Lg(copies)	Ct_1	Ct_2	Ct_3	均值
$s1$	106 395.3	5.027	19.14	19.26	19.32	19.24
$s2$	10 639.53	4.027	22.58	22.84	22.73	22.72
$s3$	1 063.953	3.027	26.21	26.24	26.16	26.20
$s4$	106.395 3	2.027	29.57	29.34	29.42	29.44
$s5$	10.639 53	1.027	33.11	32.45	33.23	32.93
待测样品			24.74	24.54	24.61	24.63
标准曲线 X 轴参数			3.43	3.49	3.47	

建立的标准曲线为：$y=-3.410\ 7x+36.432$　　$b=-3.410\ 7$　　$a=36.432$

则：$\sum_{i=1}^{n}[y_i-(a+bc_i)]^2=0.482\ 1$

$$s=\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}[y_i-(a+bc_i)]^2}{n-2}}=\sqrt{\frac{0.480\ 2}{15-2}}=0.192\ 6$$

$$\bar{c}=\frac{5.027+4.027+3.027+2.027+1.027}{5}=3.027$$

$$c=\frac{3.43+3.49+3.47}{3}=3.46$$

$$\sum_{i=1}^{n}(c_i-\bar{c})^2=10$$

$$M=3$$

$$u_c=\frac{s}{b}\sqrt{\frac{1}{M}+\frac{1}{n}+\frac{(c-\bar{c})^2}{\sum_{i=1}^{n}(c_i-\bar{c})^2}}=0.037$$

则 $u_c=1.1\%$

A.4 PCR 测量重复性引入不确定度

若平行测量 3 次，结果分别为：23.1 g/kg(‰)、23.5 g/kg(‰)、24.1 g/kg(‰)、22.4 g/kg(‰)、24.3 g/kg(‰)、23.7 g/kg(‰)。

按公式(8)计算量值不确定度。则利用上述数据计算得到的目标基因定量重复性引入的相对标准不确定度为：2.70%。

A.5 实时荧光定量 PCR 仪校准不确定度

由仪器的校准证书得到，若定量 PCR 仪校准不确定度为：4.1%，$k=2$，则按公式(9)计算。$u_{pcr}=4.1\%/2=2.05\%$

A.6 合成标准不确定度

实时荧光定量 PCR 法不确定度由 A.1、A.2、A.3、A.4 和 A.5 五个分量组成，按公式(10)计算得到：

$$u=\sqrt{u_{crm}^2+u_{dcrm}^2+u_a^2+u_c^2+u_{pcr}^2}$$
$$=\sqrt{0.004\ 9^2+0.007\ 6^2+0.011^2+0.027^2+0.020\ 5^2}$$
$$=3.7\%$$

测量结果为 23.5 g/kg(‰)，则标准不确定度为：23.5×0.037=0.87 g/kg(‰)

A.7 扩展不确定度

扩展不确定度按公式(11)计算。

$$U=u\times k=u\times 2=0.87\times 2=1.8\ \text{g/kg}\ (‰)$$

A.8 测量结果表示

测量结果：23.5 g/kg(‰)，扩展不确定度：$U=1.8$ g/kg(‰)，$k=2$ 或者测量结果为(23.5±1.8) g/kg(‰)。

注 1：以上各个实例的不确定度为分别举例说明，并非相关联数据。

注 2：标准物质质量分数“g/kg(‰)”由标准物质配制时含有外源基因的阳性样本质量与标准物质中含有内源基因的样本的质量比值，若是单拷贝则与标准物质中外源基因和内参比基因拷贝数比值一致。

附　录　B
（资料性）
转基因成分定量检测结果不确定度评定与表示
——数字 PCR 法示例

B.1　基因组 DNA 的稀释引入不确定度

样本按农业部 1485 号公告—4—2010 要求进行提取，提取的基因组 DNA 用分光光度法进行含量测量，每个基因组 DNA 样本平行取样 3 次，每次读 2 次，得到 6 个数据，分别为 112.4 ng/μL、113.1 ng/μL、112.6 ng/μL、113.3 ng/μL、114.1 ng/μL、113.7 ng/μL，取其平均值 113.2 ng/μL 为基因组 DNA 含量值。依据该测量值对基因组 DNA 样本进行稀释，达到数字 PCR 方法测量的合适浓度进行测量，如 20 ng/μL。

a）　稀释方法

容量法：用最大量程为 100 μL 的移液器取含量为 113.2 ng/μL 的基因组 DNA 溶液 40 μL 至 1.5 mL 离心管中，然后用最大量程为 200 μL 的移液器取超纯水或 TE 缓冲溶液 181.12 μL 至同一 1.5 mL 离心管中，振荡混匀后待测。

b）　不确定度分量

分量来源：U_1 来自 100 μL 的移液器，U_2 来自 200 μL 的移液器。

基因组 DNA 稀释引入的不确定度主要由移液器引入，按公式(4)计算。

若 100 μL 的移液器的校准不确定度为 $U_{95}=0.1$ μL、$k_p=2.03$，转移 40 μL 液体；200 μL 的移液器校准不确定度为 $U_{95}=0.2$ μL、$k_p=2.03$，转移 181.12 μL 液体。

则相对不确定度：$U_1=(0.1/2.03)/40\times100\%=0.13\%$，$U_2=(0.2/2.03)/181.12\times100\%=0.06\%$；

2 次移液为独立操作，则合成相对不确定度为：

$$u_d=\sqrt{U_1^2+U_2^2}=0.14\%$$

B.2　微滴或小室体积引入测量不确定度

设微滴式或芯片式数字 PCR 的微滴和小室引入的测量不确定度 u_r 为常数，u_r 分别为 1.40%和 1.47%。

B.3　PCR 测量重复性引入不确定度

若采用在同一反应体系中对目标基因和内标准基因同时进行扩增，平行测量 6 次，计算其拷贝数比值，得到的结果分别为：

外源基因/内标准基因：23.1 g/kg(‰)、23.5 g/kg(‰)、24.1 g/kg(‰)、22.4 g/kg(‰)、24.3 g/kg(‰)、23.7 g/kg(‰)。

按公式(8)计算量值不确定度。计算得到的目标基因定量重复性引入的相对标准不确定度为：2.70%。

B.4　数字 PCR 仪校准不确定度

数字 PCR 仪的校准不确定度，由仪器的校准证书得到，若数字 PCR 仪校准不确定度为：4.1%，$k=2$，则按公式(9)计算。计算得到 $u_{pcr}=4.1\%/2=2.05\%$。

B.5　合成标准不确定度

数字 PCR 法不确定度由 B.1、B.2、B.3 和 B.4 四个分量组成，按公式(10)计算，得出合成标准不确定

度 $u=3.67\%$。

B.6 扩展不确定度

扩展不确定度按公式(11)计算，得出扩展不确定度 $U=3.67\%\times2=7.34\%$。

按照 JJF 1059.1 的要求，测量不确定度保留 1 位或 2 位有效数字，故此，$U=7.4\%$。

B.7 测量结果表示

测量结果值：23.5 g/kg(‰)，扩展不确定度：$U=1.8$ g/kg(‰)，$k=2$ 或者测量结果为(23.5±1.8) g/kg(‰)。

注：以上各个实例的不确定度为分别举例说明，并非相关联数据。

农业农村部公告第 423 号—10—2021

全国农业食品标准公共服务平台

中华人民共和国
国家标准
转基因植物及其产品成分检测
转基因成分定量检测结果不确定度
评定与表示
农业农村部公告第 423 号—10—2021

*　　*　　*

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 1　　字数 20 千字
2021 年 10 月第 1 版　　2021 年 10 月北京第 1 次印刷
书号：16109·8683
定价：32.00 元

食典通

版权专有　侵权必究
举报电话：(010) 59194261

农业农村部公告第 423 号—10—2021