

转基因植物及其产品成分检测
产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体特异性
PCR 方法征求意见稿编制说明

目录

转基因植物及其产品成分检测	1
产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体特异性 PCR 方法报批稿编制说明	1
一、工作简况	1
（一）标准制定背景	1
（二）任务来源	2
（三）起草单位情况	2
（四）起草过程	3
1. 前期准备	3
2. 方法建立	3
3. 文本起草和征求意见	3
4. 标准方法验证	3
5. 验证数据的汇总分析、标准文本完善与送审	4
6. 标准审定和报批	4
二、标准编制原则、主要内容及技术参数确定	4
（一）编制原则	4
1. 科学性	4
2. 先进性	4
3. 适用性	4
（二）产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 背景方法建立的准备工作	5
1. 产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 简介	5
2. 产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 分子特征	5
3. 产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 的检测方法	9
4. 方法建立的准备工作	9
（三）标准的主要内容及技术参数确定	12
方法一、产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体特异性实时荧光 PCR 定性检测 方法建立	13
1. 引物探针的设计与确定	13
1.1 引物探针的设计	13

1.2 引物和探针的筛选.....	16
1.3 引物探针的确定.....	19
2. PCR 扩增反应条件的优化与确定.....	19
3. 特异性测试.....	21
4. 靶标序列测序验证.....	23
5. 检出限 (LOD) 的测试.....	24
序号.....	25
作物.....	25
基因组大小 Mbp.....	25
1 ng 基因组 DNA 约含拷贝数 copies.....	25
纯合性.....	25
1.....	25
2.....	25
3.....	25
4.....	25
5.....	25
方法二、产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体特异性实时荧光 PCR 定量检测	
方法建立.....	28
1. 引物和探针的设计与确定.....	29
1.1 引物和探针的设计.....	29
1.2 引物和探针的筛选.....	29
1.3 引物和探针的确定.....	29
2. PCR 反应条件的优化与确定.....	29
2.1 引物探针浓度的优化.....	29
2.2 PCR 反应条件的确定.....	29
3. 特异性测试.....	30
3.1 测试样品的设置.....	30
3.2 样品的特异性测试.....	30
4. 测序验证及靶标序列分析.....	30
5. 标准曲线的建立.....	30

5.1 标准曲线的制备	30
5.2 标准曲线的斜率、决定系数和 PCR 扩增效率合格判定	31
5.2.1 标准曲线合格判定标准	31
5.2.2 标准曲线各参数的计算方法	31
5.2.3 标准曲线各参数的测试结果和合格判定	32
6. 实验室内正确度和精密度（精确度）数据分析	32
6.1 正确度和精密度合格判定标准	32
6.2 试样检测数据汇总统计	33
6.3 正确度和精密度分析	34
6.3.1 正确度计算方法	34
6.3.2 精密度计算方法	34
6.3.3 正确度和精密度计算结果	34
6.3.4 正确度和精密度结果判定	35
7. 检出限（LOD）和定量限（LOQ）的测试	35
7.1 检出限（LOD）	35
7.2 定量限（LOQ）	35
7.2.1 定量限判定标准	35
7.2.2 定量限的初步测试样品设定要求	35
7.2.3 测试样品的初始化浓度	35
7.2.4 定量限测试样品的配制、初步测试和初始化浓度测定值的准确性判断	35
7.2.5 定量限的确认	38
8. 稳健性测试	39
8.1 稳健性要求	39
8.2 稳健性测试	39
8.3 稳健性结果判定	39
方法三、产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体特异性普通 PCR 定性方法建立	40
1. 引物设计与确定	40
1.1 引物设计	40
1.3 引物的确定	44

2. PCR 扩增反应条件的优化	44
2.1 PCR 扩增反应条件的优化	44
2.2 PCR 扩增反应条件的确定	45
3. 特异性测试	46
3.1 测试样品的设置	46
3.2 引物的特异性测试	47
4. 靶标序列测序验证	47
5. 检出限的测试	48
5.1 检出限的要求	48
5.2 检出限的初步测试样品设定要求	48
5.3 测试样品的初始化浓度	48
5.4 检出限测试样品的配制、初步测试	48
5.5 检出限的确定	49
6. 稳健性测试	50
三、试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效益、社会效益和生态效益	51
（一）实验室间验证及结果统计	51
1. 实时荧光 PCR 定性验证结果分析	51
1.1 特异性验证	51
1.2 检出限验证	52
1.3 $\Delta\Delta C_t$ 值法判断样品中转基因成分含量	53
2. 实时荧光 PCR 定量验证结果分析	54
3. 普通 PCR 定性验证结果分析	67
3.1 特异性	67
3.2 检出限	68
4. 标准文本方法验证结论	68
5. 阳性定量质控品设置	68
6. 实时荧光定量不确定度评定	69
（二）预期的经济效益、社会效益和生态效益	70
四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况	70

五、以国际标准为基础的起草情况，以及是否合规引用或者采用国际国外标准，并说明未采用国际标准的原因	70
六、与现行标准、法律法规和强制性标准的关系	70
七、重大分歧意见的处理经过和依据	70
八、涉及专利的说明	70
九、标准作为强制性或推荐性标准发布的意见及实施建议	70
十、其他应说明的事项	71
十一、参考文献	71
转转基因植物及其产品成分检测	72
产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体特异性 PCR 方法	72
标准文本验证方案	72
三、提供的资料和样品	72
（一）标准的文本	72
（二）样品	73
1. 实时荧光定性 PCR 方法验证	73
2. 实时荧光定量 PCR 方法验证	76
3. 普通定性 PCR 方法验证	80
四、验证内容要求和提交验证报告的格式	83
（一）实时荧光 PCR 定性检测方法验证	83
（二）实时荧光 PCR 定量检测方法验证	84
（三）普通 PCR 定性检测方法验证	84

一、工作简况

（一）标准制定背景

转基因技术自 1996 年实现商业化应用以来在全球持续推广，种植面积由 1996 年的 170 万公顷增加到 2025 年的 2.16 亿公顷，同比增长 2.5%，共有 30 个国家种植 11 种转基因作物 [1]。从作物构成看，转基因大豆 1.062 亿公顷，占转基因作物总面积的 49.2%；转基因玉米 7460 万公顷，占 34.5%，同比增长 7.9%，是增速最快的主要转基因作物。从国别分布看，美国和巴西分别为 7520 万公顷和 7000 万公顷，合计占全球的 67.2%；我国约 620 万公顷（0.93 亿亩），同比增长 79%，居全球第六位，其中转基因玉米约 320 万公顷，约占国内玉米种植面积的 7%。我国玉米供需总体平衡，但饲用和工业加工需求仍需进口调剂，据海关总署统计，2025 年进口玉米 264.8 万吨，同比减少 80.8%，主要来自巴西、俄罗斯。随着转基因玉米种植规模扩大，建立特异、灵敏、标准化的品系检测方法，是保障转基因标识管理制度实施的重要技术支撑。

转基因玉米的种植面积从 1996 年的 32 万公顷增加到 2025 年的 7460 万公顷，是全球种植面积第二大的转基因作物。转基因玉米相较于非转基因玉米具有明显优势：抗虫基因可有效防治鳞翅目和鞘翅目害虫，耐除草剂基因使玉米免受草甘膦、草铵膦等除草剂影响，在提高产量和品质的同时减少农药使用和对环境的污染。玉米是我国养殖业最核心的饲料原料，饲料端消费规模保持稳步增长；以玉米为原料开发的深加工产品已超过 400 种，是国内深加工品类最丰富的农作物。我国玉米总产量基本可以匹配国内市场需求，但伴随下游消费持续扩张，进口长期保持较大规模。因此，针对转基因玉米品系建立特异性好、灵敏度高的标准化检测方法，是保证转基因作物安全监管的重要技术支撑。

在转基因产品检测过程中，PCR 技术因其灵敏度高、再现性好等特性，应用最为广泛。转基因产品 PCR 检测技术依据其特异性可分为筛选、基因、构建和转化体特异性 4 类。其中转化体特异性检测方法具有高度专一性，已成为国际上转基因产品检测方法标准的首选，我国近年来发布的检测方法标准绝大多数为转化体特异性检测方法。本次标准研制过程中同时制定了实时荧光 PCR 定性和定量方法、普通 PCR 定性方法等 3 种转基因成分检测方法，便于检测单位根据自己的实际条件选择合适的方法。

产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体是先锋国际良种公司（科迪华农业科技全资子公司）研发的品系，已在美国、加拿大、阿根廷、巴西、澳大利亚、欧盟、日本、韩国、中国等多个国家和地区获得食品、饲料或种植用途的安全审批。该 DP202216 转化体运用农杆菌介导转化的方法导入 zmm28 和 mo-pat 基因，使得转基因玉米具有产量性状改良和耐除草剂的特性，具有良好的产业化前景。然而我国当前尚未发布专门针对产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体及其衍生品种实时荧光定性和定量检测的方法标准，这就要求我们根据农业部 2259 号公告—4—2015《转基因植物及其产品成分检测 定性 PCR 方法制定指南》

[2]的要求，尽快制定相关技术标准，为我国转基因生物安全管理部门实施各项安全管理制度提供科学方法和技术支撑。

（二）任务来源

本标准制定任务来源于农业农村部 2025 年农业国家和行业标准制修订项目（农质标函〔2025〕96 号）。由农业农村部科技发展中心、上海市农业科学院联合起草。

本方法主要起草人为：陈一帆、陈红、吕贝贝、付伟、孙宇、张华、贾军伟、王翠、章寅、李鹏、王金斌、晁盛茜、杨明超。

（三）起草单位情况

上海市农业科学院是上海市属公益一类事业单位，为上海和全国农业发展提供强有力支撑的地方综合性农业科研机构。根据农业部 2005 年 9 月 21 日《关于下达农业农村部第五批部级质检中心筹建计划的通知》，经农业农村部批准由上海市农业科学院负责筹建的第五批部级质检机构，挂靠在上海市农业科学院生物技术研究所以运行的“农业农村部农作物生态环境安全检验检测中心（上海）”具有国家法定资质，是我国专门从事转基因生物检测鉴定、监测监控和安全评价的全国性技术机构。中心于 2007 年 11 月通过审查认可和国家计量认证“双认证”现场评审后，以重要农业转基因生物（产品）的定性、定量检测及环境安全评价为主攻方向。开展农业转基因生物（产品）的检测服务，为农业转基因产品标识和生物育种产业的健康发展提供技术支撑。近年来，承担多项农业农村部和上海市下达的转基因产品成分检测与监测任务，多次参与检测标准文本的循环验证工作。具备丰富的国际、国家和行业技术标准制定经验，负责和参与制定农业部农业转基因生物检测技术标准 17 项、国家标准 2 项，地方标准 2 项，并已发布实施。中心依托单位主持获得上海市科技进步、技术发明一等奖 5 项、二等奖 7 项、三等奖 3 项，上海市科学技术普及二等奖 1 项，神农中华农业科技三等奖 1 项。

农业农村部科技发展中心为农业农村部直属事业单位，加挂农业农村部转基因生物安全监管中心牌子，是国家农业转基因生物安全评价与检定中心的依托单位，是我国专门从事转基因生物检测鉴定、监测监控和安全评价的全国性技术机构。完成建设的农业农村部农业生物技术产品质量安全检验检测中心紧紧围绕转基因管理与产业发展，牵头开展了转基因产品分子特征鉴定，检测标准物质、标准，检测技术等技术研究。自《农业转基因生物安全管理条例》实施以来，一直从事农业转基因生物安全评价与检定等管理和研究工作，组织制定了全国有关农业转基因生物安全管理的国家和行业标准，开展了全国转基因产品成分检测和进口用作加工原料的农业转基因生物食用安全与环境安全检测与评价工作。2004 年以来，农业农村部科技发展中心已牵头组织研制并发布了转基因产品检测类标准 260 余项。

（四）起草过程

1. 前期准备

任务下达后，按照工作需要我们及时组成了标准制定工作组，并根据实际情况初步确定了标准制定的工作计划及技术路线。工作组通过开展文献检索，收集、整理了专利文献、期刊文献和转基因检测相关数据库，仔细分析了产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 的分子特征相关的技术信息。

此外，在标准制定的过程中，我们主要参考了农业部 2259 号公告—4—2015《转基因植物及其产品成分检测 定性 PCR 方法制定指南》、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》^[3]等相关标准，并按照相应要求进行标准的撰写工作。

2. 方法建立

对产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 外源基因序列以及旁侧序列等在标准制定过程中使用到的碱基序列，先进行验证确认，在此基础上，根据已公布的序列设计了一系列特异性定性和定量 PCR 引物，分别进行引物、探针的设计和优化、PCR 扩增条件和反应体系优化、特异性分析、标准曲线建立、灵敏度测试、准确性测试、检出限和定量限确认等实验，建立了产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体特异性实时荧光 PCR 定性检测方法、实时荧光 PCR 定量检测方法和普通 PCR 定性检测方法。

3. 文本起草和征求意见

本次标准制定是按照 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》^[4]，参照已发布的转基因植物及其产品成分检测标准，结合实验研究的产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体定性和定量 PCR 检测方法，编写《转基因植物及其产品成分检测 产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体特异性 PCR 方法》标准征求意见稿，并送有关专家征求意见，收集整理专家回复的意见，对征求意见稿的文本进行修改完善。

4. 标准方法验证

制定标准文本复验证方案（详见附件 1-1），并按验证方案的要求准备验证样品，邀请通过计量认证的转基因检测机构进行复验证。主要包括：农业农村部农产品及加工品质量安全检验检测中心（杭州）、农业农村部农作物生态环境安全检验检测中心（上海）、农业农村部谷物及制品质量检验检测中心（哈尔滨）、农业农村部农产品及加工品检验检测中心（南京）、农业农村部食品质量检验检测中心（成都）、农业农村部植物及植物用微生物生态环境安全检验检测中心（广州）、农业农村部农作物及产品质量检验检测中心（哈尔滨）、农业农村部植物及植物用微生物生态环境安全检验检测中心（三亚）共 8 个第三方检测机构对本方法特异性、灵敏度、准确度和精密度进行验证分析，并对标准的科学性、先进性和适

用性进行综合评价。

5. 验证数据的汇总分析、标准文本完善与送审

汇总分析 8 个实验室的验证结果，组织专家对修改完善的征求意见稿文本、验证方案和验证结果及分析汇总结论、标准的编制说明等相关材料进行预审。根据专家意见进一步修改完善相关材料，形成标准送审稿及编制说明等相关资料，提交全国农业转基因生物安全管理标准化技术委员会进行审定。

二、编制原则、标准的主要内容、技术参数的确定

（一）（一）编制原则

本方法的制定过程遵循了以下几项原则：

1. 科学性

在检测方法的选择、技术指标的确定、结果分析判断等方面首先确保科学，在标准适用范围规定的界限内力求完整，在标准文本编制过程中力求做到技术内容的表述科学准确、清晰易懂。

2. 先进性

对标准中有关内容的确定，严格遵守我国农业转基因生物安全管理法律法规及相关规章制度的要求，力求反映本研究领域国内外先进技术及标准的发展现状与趋势，既体现目前稳定可靠的最新研究成果，又能为未来技术发展提供框架，使标准中所规定的技术内容有利于提高检测结果的准确性和可重复性。

3. 适用性

在标准方法操作程序的设计、试剂和仪器设备需求方面，始终把经济实用和可操作性作为重要的依据，确保标准的内容便于实施。特别是引物和探针等的筛选要确保在不同的酶和仪器中能够展现最好的特异性。易于被其他标准和文件所引用。

（二）（二）产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 背景及方法建立的准备工作

1. 产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 简介

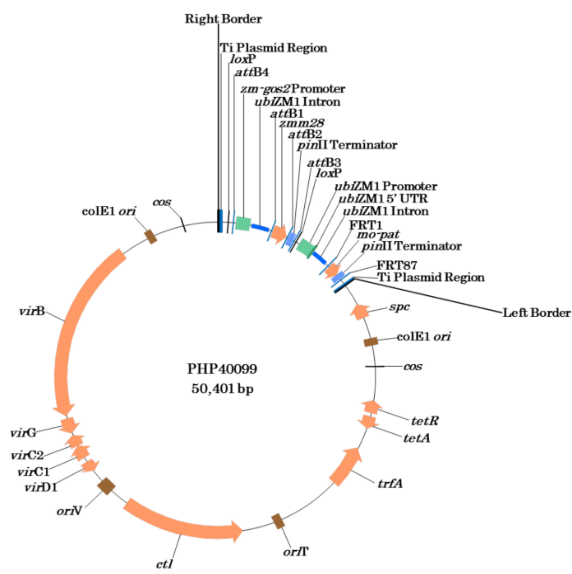
产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216（OECD 唯一识别符 DP-202216-6）是先锋国际良种公司（科迪华农业科技全资子公司）研发的产量性状改良耐除草剂玉米品系。研发者将来源于玉米的 *zmm28* 基因和来源于绿色产色链霉菌（*Streptomyces viridochromogenes*）、经玉米表达密码子优化的磷丝菌素乙酰转移酶基因 *mo-pat* 构建到转化载体 PHP40099 中，利用农杆菌介导法转化玉米自交系 PH17AW 的未成熟胚，经草铵膦筛选和再生获得转基因玉米品系 DP202216。*zmm28* 基因编码 MADS-结构域转录因子，其表达可提高玉米产量；*mo-pat* 基因编码磷丝菌素乙酰转移酶（PAT），使玉米对草铵膦类除草剂具有耐受性。该品系兼具产量性

状改良和耐除草剂特性，具有良好的产业化前景。

2. 产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 分子特征

产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 以农杆菌转化载体 PHP40099 为表达载体，载体全长 50,401 bp，T-DNA 区全长 7,470 bp，含有 *zmm28* 和 *mo-pat* 两个基因盒。*zmm28* 基因盒中，*zmm28* 基因的表达由玉米翻译起始因子 *gos2* 基因启动子（*zm-gos2*）和玉米泛素基因 1（*ubiZM1*）内含子共同调控，由马铃薯蛋白酶抑制剂 II 基因（*pinII*）终止子终止转录；*mo-pat* 基因盒中，*mo-pat* 基因的表达由 *ubiZM1* 启动子（含 5' 非翻译区和内含子）调控，终止子同样为 *pinII* 终止子。T-DNA 区内还含有 *loxP*、*attB*、*FRT* 等重组位点及间插序列。载体图谱见图 2-1。

图 2-1 产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化载体 PHP40099 图谱



产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 的外源插入序列为单位点、单拷贝插入，并经 Southern 杂交和 Southern-by-sequencing 分析确认在 T1、T2、BC1F1、BC3F3、BC3F6 等多个世代稳定遗传。经 PCR 扩增和 Sanger 测序，DP202216 中插入的 PHP40099 T-DNA 及两侧基因组侧翼序列总长度为 10,091 bp，其中 5' 端玉米基因组侧翼序列 1,283 bp，T-DNA 插入序列 7,436 bp，3' 端玉米基因组侧翼序列 1,372 bp。将插入位点旁侧序列与玉米参考基因组比对，外源 T-DNA 整合在玉米第 1 号染色体上；插入过程中 T-DNA 右边界缺失 22 bp、左边界缺失 12 bp，插入位点处玉米基因组缺失 6 bp（TCCCAA），除边界缺失外插入序列与 PHP40099 的 T-DNA 序列一致，未发生碱基突变，转化载体骨架序列未插入。插入序列结构说明见表 2-1 和图 2-2。

表 2-1 DP202216 转化体插入序列结构说明

序列位置 (bp)	序列长度 (bp)	序列说明	描述及功能
1-1283	1283	玉米基因组 5'侧翼序列	插入位点 5'端玉米基因组序列
1284-1286	3	RB	农杆菌 C58 Ti 质粒 T-DNA 右边界序列剩余部分（边界处共缺失 22 bp）
1287-1438	152	Ti 质粒区域	来源于根癌农杆菌 Ti 质粒的序列
1439-1696	258	间插序列	用于克隆的 DNA 序列
1697-1730	34	loxP	Cre 重组酶识别的噬菌体 P1 重组位点
1731-1959	229	间插序列	用于克隆的 DNA 序列
1960-1980	21	attB4	λ噬菌体整合酶重组位点
1981-2014	34	间插序列	用于克隆的 DNA 序列
2015-2874	860	zm-gos2 启动子	来源于玉米翻译起始因子 gos2 基因的启动子区域，调控 zmm28 基因表达
2875-2915	41	间插序列	用于克隆的 DNA 序列
2916-3928	1013	ubiZM1 内含子	来源于玉米泛素基因 1 的内含子区域，增强 zmm28 基因表达
3929-3968	40	间插序列	用于克隆的 DNA 序列
3969-3992	24	attB1	来源于 Gateway 克隆系统的λ噬菌体整合酶重组位点
3993-4009	17	间插序列	用于克隆的 DNA 序列
4010-4866	857	zmm28	来源于玉米 MADS-结构域转录因子基因（含 5'和 3'UTR），编码 ZMM28 蛋白，提高玉米产量
4867-4882	16	间插序列	用于克隆的 DNA 序列
4883-4906	24	attB2	来源于 Gateway 克隆系统的λ噬菌体整合酶重组位点
4907-4920	14	间插序列	用于克隆的 DNA 序列
4921-5228	308	pinII 终止子	来源于马铃薯蛋白酶抑制剂 II 基因的终止子区域，终止 zmm28 基因转录
5229-5258	30	间插序列	用于克隆的 DNA 序列
5259-5279	21	attB3	λ噬菌体整合酶重组位点

5280-5352	73	间插序列	用于克隆的 DNA 序列
5353-5386	34	loxP	Cre 重组酶识别的噬菌体 P1 重组位点
5387-5405	19	间插序列	用于克隆的 DNA 序列
5406-6305	900	ubiZM1 启动子	来源于玉米泛素基因 1 的启动子区域，调控 mo-pat 基因表达
6306-6388	83	ubiZM1 5'UTR	来源于玉米泛素基因 1 的 5'非翻译区
6389-7401	1013	ubiZM1 内含子	来源于玉米泛素基因 1 的内含子区域，增强 mo-pat 基因表达
7402-7429	28	间插序列	用于克隆的 DNA 序列
7430-7477	48	FRT1	来源于酿酒酵母的翻转酶重组靶位点
7478-7503	26	间插序列	用于克隆的 DNA 序列
7504-8055	552	mo-pat	来源于绿色产色链霉菌并经玉米表达优化的腓丝菌素乙酰转移酶基因，编码 PAT 蛋白，赋予草铵膦耐受性
8056-8062	7	间插序列	用于克隆的 DNA 序列
8063-8373	311	pinII 终止子	来源于马铃薯蛋白酶抑制剂 II 基因的终止子区域，终止 mo-pat 基因转录
8374-8394	21	间插序列	用于克隆的 DNA 序列
8395-8442	48	FRT87	来源于酿酒酵母的经修饰的翻转酶重组靶位点
8443-8649	207	间插序列	用于克隆的 DNA 序列
8650-8706	57	Ti 质粒区域	来源于根癌农杆菌 Ti 质粒的序列
8707-8719	13	LB	农杆菌 C58 Ti 质粒 T-DNA 左边界序列剩余部分（边界处共缺失 12 bp）
8720-10091	1372	玉米基因组 3'侧翼序列	插入位点 3'端玉米基因组序列

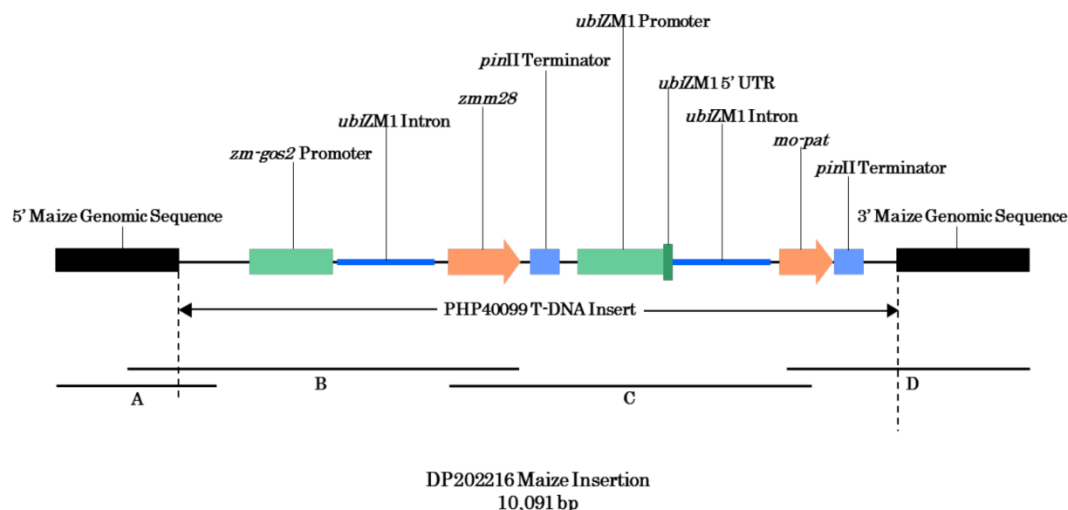


图 2-2 DP202216 转化体插入序列结构示意图

研发者提供了 1000 bp 的 LB 端（3'端）基因组旁侧序列和 1000 bp 的 RB 端（5'端）基因组旁侧序列，LB 端和 RB 端旁侧序列信息如下。

LB 端（3'端）旁侧序列 1000 bp:

>DP202216_LB (5'-3')

```

1   AGTAGACAAG TTGTGTTCAA ACCGCGGATC AGAAACAAAT AAAGCGACCC CGCATGCACG
61  TCAGGTACCA ACCCAAATCG GGACCCCTCCC CCCGGCTCCG GCCGGTGTCT CCCAAGTTAA
121 ACGGCCGCCC GCGCCAATAA TTACCACCAC ACCCCGGTAG AGAGATGGAG TAGAAGAAGA
181 AAAAAAATCA TCCGCCAAGC CGCGATCCGC GACCGCAGCG CATCGACGGC GCACCCCCCT
241 CCCCTCCGGT CGTCGGTCCA CAGCAGACAG GCCCGGTCAT TGCAGATTAC TGCACCACCG
301 CATCGCATCA TCGCAGCGGC CCGCATGAAC GAACACGAGC CCCCATTTTC CGCGCGGGTT
361 GCCGAGCCGG CAGCCCAGCG CGGACACGGG GAGCTAGCGG CGGTCAGTTC AGTACGTCAG
421 TCACACTGGT CGCGCCGAGA GCGGGACGAC GGCACGCCAA CTAAGGATGA AAACGGCCGG
481 TAACGGTCGG AAAAAACCTC TCACCGTTTT CACCCGCATA AATTTTGTGT CGGTCGGAAT
541 CGGTAAACGG GAAAGTCGGA AACGGATAAC GACCGGTAAA TTCCGGTATA TCGAAAACGG
601 ATAAATCCGA GCAAAATAGC TCGAAATTGA TCGGGAAACG GTAAGTGTAA TCGGAAAAGC
661 TCACAATAAA CAAATCCTAA CCACACAGAT GTTCATTAC ATCCACATAC AAGTCTCATT
721 CACAAAAGTA CACAAAACAC AATCTTGTC ACATATAATT GGCATACAC TCATCCATGT
781 CCACTCTTAA ATTATAACAC ACAACACATA AGTCTTAAAA CACGATTGTT CATTCACATT
841 CACATACAAG TCTCAACCAC ACAAATATAC AATACATAGT CATGACCACA CATAAATGAT
901 CATACATGTT CACTAAAGTT TTAACCACAT AGTATATAAG TCTTAAACAC ACGATACATA
961 AACTAGAAAT CATGTGACAT GTCGTCTGGA TCACTTGATA

```

RB 端（5'端）旁侧序列 1000 bp:

>DP202216_RB (5'-3')

1 CATAGCAGTG CACATACATC TAACTAGCAA GAGAGTGTTT AGTCTCTCAC TCTAAAGTTT
 61 AGTACATATC ATATCGGATG TTTGAATACC AATTCCGAGT AGTAAATATA GTGTAATTGT
 121 AAAACTATTT ATCGAAATGA AACTACACA GCAAGACGAA TTTATTAAAA GGTATATATG
 181 ACTTGTGAT GCTAGATGAT TTATAGAAAA AAATAAAATA TACATTTTTA TGATTGAATT
 241 AAGTCATTTT ATTATAGTTA CAGTCTAAAA TAATAAAACC GTTTTGTGGG AGAAATATGG
 301 GAAACGCGTT TCTTGGTTAC CTCTGTTTTT TTATTTAATA TCGATAATGT AAACCCTGGT
 361 TCGAGGTCGC TTGGATTACT GCTGGGACTG GGAGAGGGTG AAGCCGAGG AGGAGGATCG
 421 AGGACGGCCG CTGAGGCTGT GGCATCTGGC CTAGTAGCCG CCTGGCCTGG GGCCTTGCTG
 481 CCCATGAAAG TATCCGTAGC GAGACCTAGG CTGTCTGAGC CTAGCGCGCA GTAGGTGTCG
 541 CAGATCGGTC TGCTATACTA CTGGTGGTGG CCTGGTACTT ATATGGGCTC TGCCGTTGGA
 601 GATGATGGGC AAGGCCTTCC GAGGAGCCGA GATGAGGATT TAGGCCTTCC ATTGAGTTGC
 661 GCTCGGGCCG TCCTCGGTGG CACGAACCAG TGGGCCAACG GGGCCAACGG GCCTAACTAA
 721 TCGTGTCTGA TGGATGGTCC TCCGTTCCAG AGAAATCAGA CCTGCTGGCT GTGGCCTGT
 781 GGCTGAGGAG CCGGCAGTGA TCCATCGAGT GCTACTGTTT TCTTTTTTCA GAACAGCGTG
 841 CAGCAAAGGC TCACTGTGCA GTTTAAACAC CTAAAAGACC CGACAAGTCG GTGTTGGTAC
 901 TGAGGACGAA CCCAGACCGA ATGATTGCCT CGCCCTCACC ACCTATTTCT TCCCATCTGA
 961 GGTCTGCACT CTCACCGTA GTACAGCACA AACAACACAC

注：下划线部分为玉米基因组序列，未包含 T-DNA 序列；LB 端为 T-DNA 插入位点下游紧邻的 1000 bp，RB 端为插入位点上游紧邻的 1000 bp。

3. 产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 的检测方法

经资料查询，PHN165665/PHN143487/PHN-2074 Probe 1 为欧盟针对产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体特异性定量 PCR 检测标准，描述了转化体特异性定性 PCR 和转化体特异性定量 PCR 检测引物对（表 2-2），PCR 扩增产物长度为 105 bp，符合农业部 2259 号公告—4—2015《转基因植物及其产品成分检测定性 PCR 方法制定指南》的规定。

表 2-2 研发者提供的产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 检测方法

	引物名称	序列 (5' -3')	目的片段大小
特异性定量 PCR 检测 方法（欧盟 标准）	PHN165665	CCATCTGAGGTCTGCACTCTCAC	105 bp
	PHN143487	CTCCGCTCATGATCAGATTGTC	
	PHN-2074 Probe 1	FAM-CAACACACTCAAACACTGATAG-MGB	

4. 方法建立的准备工作

4.1 分子特征验证

首先对获得的 DP202216 转化体分子特征部分资料（标准参数需要使用的部分）正确性进行验证。根据研发者提供的材料信息，利用 NCBI 在线 Primer-BLAST 软件，综合考虑核苷酸序列 GC 含量和引物 Tm 值，针对插入位置的右边界（RB）即 5'端和左边界（LB）即 3'端分别设计转化体特异性引物，引物序列信息见表 2-3。参照农业部 1861 号公告—3—2012 玉米内标准基因检测中所述的 PCR 反应体系和反应程序，进行 PCR 扩增。

表 2-3 产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体旁侧序列验证引物

5' 端引物	序列 (5' -3')	目的片段大小	3' 端引物	序列 (5' -3')	目的片段大小
DP202216-RB-F	CGTTGGAGATGATG GGCAAGGC	745 bp	DP202216-LB-F	AGGTGTGTTTTGCGA ATGCG	661 bp
DP202216-RB-R	AACCGTGAGCGCTT CATGTCAC		DP202216-LB-R	TGCGGTGGTGCAGTA ATCTG	

Query	1	ATTGAGTTGCGCTCGGGCCGTCTCTCGGTGGCAGAACCACTGGGCCAACGGGGCCAAAGG	60
Sbjct	934		993
Query	61	GCCTAACTAATCGTGTCTGATGGATGGTCTCCGTTCCAGAGAAATCAGACCTGCTGGCT	120
Sbjct	994		1053
Query	121	GTGGGCTGTGGCTGAGGAGCGGCAATGATCCATCGAGTGTCTACTGTTTTCTTTTCA	180
Sbjct	1054		1113
Query	181	GAACAGCGTCAGCAAAGGCTCACTGTGAGTTTAAACACCTAAAAGACCGGCAAGTCG	240
Sbjct	1114		1173
Query	241	GTGTTGGTACTGAGGACGAACCCAGCAGCAATGATTGCCTGCCCTCACCACTATTCT	300
Sbjct	1174		1233
Query	301	TCCCATCTGAGGTCTGCACTCTACCGGTAGTACAGCACAACACACTCAAACTAG	360
Sbjct	1234		1293
Query	361	ATAGTTTAACTGAAGCGGGAACGACAACTCTGATCATGAGCGGAGATTAAAGGAGTC	420
Sbjct	1294		1353
Query	421	ACGTTATGACCCCGCGATGACGCGGACAAGCGGTTTACGTTTGAAGTACAGAAC	480
Sbjct	1354		1413
Query	481	CGCAACGTTGAAGGAGCACTCAGCAAGCTGGTACGATTGTAATAAGACTCAGTATAGGG	540
Sbjct	1414		1473
Query	541	CGAATTGAGCGCTGTTTAAACGCTCTTCAACTGGAAGAGCGGTACTACCGGCTGGATGG	600
Sbjct	1474		1533
Query	601	CGGGGCTTGTGCTGACCGCGGCTCCGGACTAACTAGTCAGCTAGTTACCC	660
Sbjct	1534		1593
Query	661	TATGAGGTGACATGAAGCGCTCACGGTT	688
Sbjct	1594		1621
Query	1	ATTCTCCAGAAAGTATAGGAAGTCTGTACACCTGAGCTGATCCGATGACTTCGTAGGT	60
Sbjct	8418		8477
Query	61	TCCTAGCTCAAGCCGCTCGTGTCCAAGCGTCACTTACGTTAGCTAATGATTACGGCATC	120
Sbjct	8478		8537
Query	121	TAGGACCGACTAGCTAACTAAGTACGTAGTAATTAATTCATTCCGATTAATCGTGGCC	180
Sbjct	8538		8597
Query	181	TCTTGCTCTTCAGGATGAAGAGCTATGTTTAAACGTGCAAGCGCTACTAGCAATTCAGT	240
Sbjct	8598		8657
Query	241	ACATTAAAAAGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTCTAAGCGTCAATTGTTTACACCAC	300
Sbjct	8658		8717
Query	301	AAAGTAGACAAGTTGTGTTCAAACCGCGGATCAGAAACAAATAAAGCGACCCCGCATGCA	360
Sbjct	8718		8777
Query	361	CGTAGGTACCAACCAATCGGGACCTCCCCCGGCTCCGGCCGGTGTCTCCCAAGTT	420
Sbjct	8778		8837
Query	421	AAACGGCCGCCCGCCAATAATTACCACACACCCCGGTAGAGAGATGGAGTAGAAGAA	480
Sbjct	8838		8897
Query	481	GAAAAAAATCATCCGCCAAGCCGCGATCCGCGACCGGCGCATGACGGCGACCCCG	540
Sbjct	8898		8957
Query	541	CTCCCCCTCGGTGTGCTGCTCCAGCAGAGAGGCGGTCATTGAGATTACTGCACCAC	600
Sbjct	8958		9017
Query	601	CGCA	604
Sbjct	9018		9021

Query: PCR 测序序列; Sbjct: 公司提供 DP202216 序列

A: RB 端旁侧序列（前 350 bp 为玉米基因组序列，351-688 bp 为 T-DNA 插入序列）；B: LB 端旁侧序列（前 302 bp 为 T-DNA 插入序列，303-604 bp 为玉米基因组序列）。测序序列 5'端引物序列及低质量碱基（前 57 bp）未列出。

图 2-3 产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 旁侧序列验证测序比对结果

将旁侧序列验证引物 DP202216-RB-F/R、DP202216-LB-F/R 扩增的目的条带进行测序分析，然后将测序结果与研发单位提供的序列信息进行比较，结果如图 2-3 所示，测得的产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体 RB 端 688 bp 旁侧序列碱基、LB 端 604 bp 旁侧序列碱基与技术资料上提供的完全一致。

4.2 材料的纯合性或杂合性验证

(1) 材料纯合性鉴定方法

在旁侧序列验证正确的基础上，对材料的纯合性或杂合性进行鉴定。产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体材料的纯合性鉴定采用普通 PCR 方法进行，提取产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 及其受体材料单粒种子的基因组 DNA，以 50 ng/μL DNA 为模板，随机选取 10 个单粒进行纯合性鉴定。以水为空白对照、DP202216 受体玉米基因组 DNA 为阴性对照，参照农业部 1861 号公告—3—2012 玉米内标准基因检测中所述的 PCR 反应体系和反应程序，进行 PCR 扩增。

纯杂合鉴定引物包括转化体特异性引物 DP-11F/DP-11R 和纯合子鉴定引物 DP-1F/DP-11R（研发者提供），具体引物序列信息见表 2-4。转化体特异性引物分别位于 DP202216 转化体 LB 端旁侧序列的玉米基因组和外源插入序列上，在产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体中均能获得预期扩增片段；纯合子鉴定引物分别位于 LB 端和 RB 端旁侧序列的玉米基因组上，只有在没有外源插入序列存在的玉米基因组中能够顺利扩增（如图 2-4 所示）。因此，结合两次扩增结果可以对材料的纯合性或杂合性进行鉴定，如在转化体特异性 PCR 中出现预期扩增片段，而纯合子鉴定 PCR 中没有预期条带出现时，可表明鉴定的材料为纯合转化体。

表 2-4 产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体纯杂合鉴定引物表

引物	序列（5'-3'）	目的片段大小(bp)	预期获得目的片段材料
DP-1F	CCCAGACCGAATGATTGCCT	>259	DP202216 受体/杂合的 DP202216 转化体
DP-11R	TCCATCTCTCTACCGGGGTG		
DP-11F	GGCCTCTTGCTCTTCAGGAT	295	DP202216 转化体
DP-11R	TCCATCTCTCTACCGGGGTG		

(2) 材料纯合性鉴定结果

鉴定结果如图 2-5 所示，转化体特异性 PCR 中，转化体特异性引物 DP-11F/DP-11R 在 DP202216 转化体中均获得预期扩增条带，而阴性对照和空白对照中均无扩增条带出现；纯合子鉴定 PCR 中，纯合子鉴定引物 DP-1F/DP-11R 在阴性对照中获得预期扩增条带，而在

DP202216 转化体以及空白对照中均无扩增条带出现，表明鉴定的产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体材料为纯合转化体，可用于进行后续实验。后续实验中用到的 DP202216 转化体材料也都进行了纯杂合鉴定，鉴定结果均为纯合。

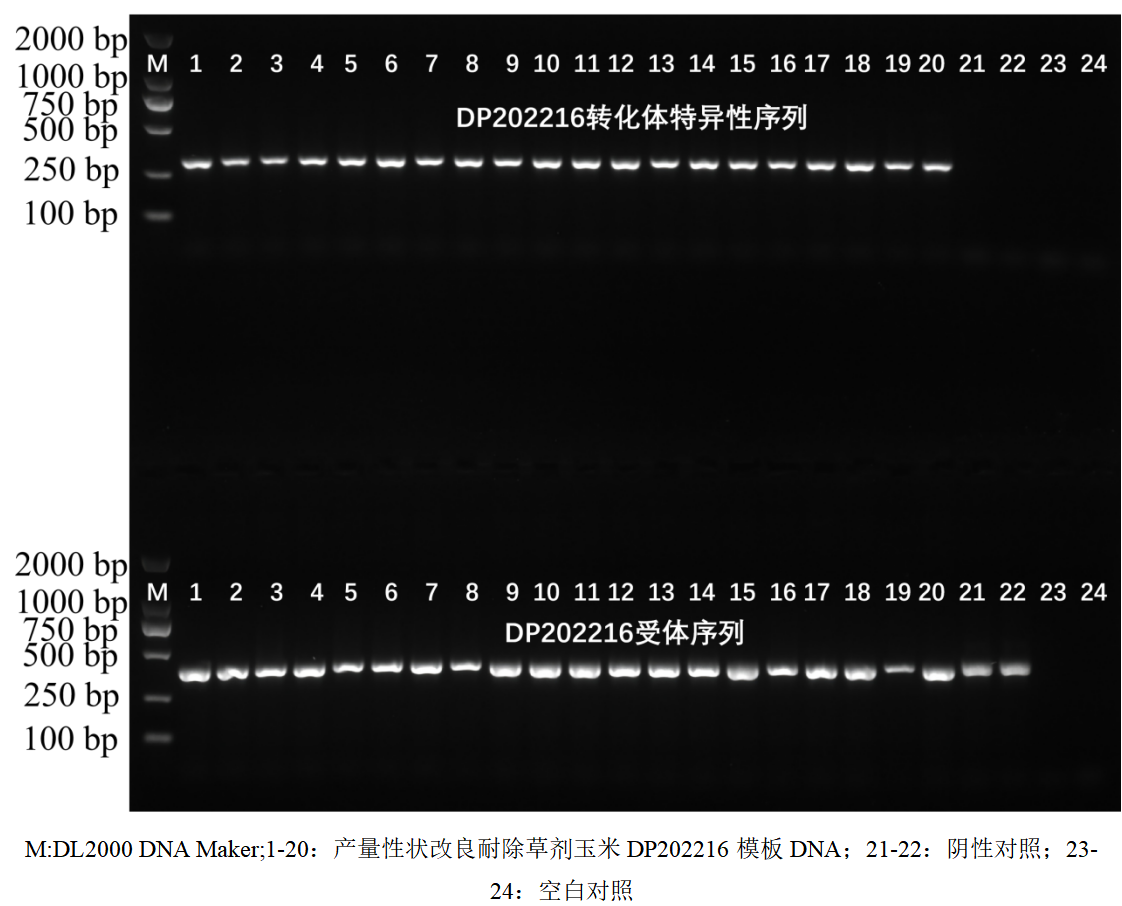


图 2-5 产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体纯杂合鉴定结果

（三）标准的主要内容及技术参数确定

标准文本结构包括范围、规范性引用文件、术语和定义、通用要求、实时荧光 PCR 定性检测方法、实时荧光 PCR 定量检测方法、普通 PCR 定性检测方法和附录共 8 个部分。

标准文本主要技术内容包括产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体特异性实时荧光 PCR 定性检测方法、实时荧光 PCR 定量检测方法和普通 PCR 定性检测方法。标准的主要技术参数包括内标准基因引物及探针序列、产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体特异性检测引物及探针序列、目的片段大小、PCR 扩增体系（成分、浓度、体积等）、PCR 扩增条件（温度、时间、循环数等）、检出限、定量限等。

方法一、产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体特异性实时荧光 PCR 定性检测方法建立

1. 引物探针的设计与确定

1.1 引物探针的设计

前期对研发者提供的 DP202216 转化体材料信息序列进行了确认，在此基础上应用引物设计软件 Beacon Designer 8，综合考虑核苷酸序列 GC 含量和引物 Tm 值，针对插入位置的右边界（RB）即 5' 端和左边界（LB）即 3' 端，分别设计多条转化体特异引物和探针。从 5' 端候选引物探针中挑选 13 对（其中 PHN165665/PHN143487/PHN-2074 Probe 1 为欧盟标准给出的引物探针组合），从 3' 端候选引物探针中挑选 3 对，共同组成 16 对引物/探针组合，引物探针序列信息见表 2-5。

表 2-5 实时荧光 PCR 检测引物探针序列信息表

引物（5' 端）	序列（5' -3' ）	引物（3' 端）	序列（5' -3' ）
DP202216-qF1	AAGTCGGTGTGTTGGTACTGAGG	DP202216-qR1	AGATTGTCGTTTCCCGCCTTC
PHN165665	CCATCTGAGGTCTGCACTCTCAC	PHN143487	CTCCGCTCATGATCAGATTGTC
DP202216-qF3	CCCAGACCGAATGATTGCCT	DP202216-qR3	TCGTTTCCCGCCTTCAGTTT
DP202216-qF4	TACTGAGGACGAACCCAGAC	DP202216-qR4	GACTCCCTTAATTCTCCGCTCAT
DP202216-qF5	CCGGTAGTACAGCACAAACAAC	DP202216-qR5	CTTGCTGAGTGGCTCCTTCAA
DP202216-qF6	CTCACCGGTAGTACAGCACAA	DP202216-qR6	GCGGTTCTGTCAGTTCCAAAC
DP202216-qF7	ACCGGTAGTACAGCACAAACA	DP202216-qR7	TCATCGGCGGGGGTGCATAA
DP202216-qF8	ACTCTCACCGGTAGTACAGCA	DP202216-qR8	GGGTCATAACGTGACTCCCT
DP202216-qF9	GACGAACCCAGACCGAATGA	DP202216-qR9	TTGTTCGTTTCCCGCCTTCA
DP202216-qF10	CGCCCTCACACCTATTCT	DP202216-qR10	TGACTCCCTTAATTCTCCGCTCAT
DP202216-qF11	TCTGAGGTCTGCACTCTCAC	DP202216-qR11	CCGCTCATGATCAGATTGTCG
DP202216-qF12	ACCACCTATTCTTCCCATCTGAG	DP202216-qR12	CCGCTCATGATCAGATTGTCGTT
DP202216-qF13	CTCTCACCGGTAGTACAGCACA	DP202216-qR13	CCAAACGTAAAACGGCTTGTC
DP202216-	AAGCGCTACTAGACAATTCAGTA	DP202216-	CTGATCCGCGGTTTGAACACA

引物 (5' 端)	序列 (5' -3')	引物 (3' 端)	序列 (5' -3')
3'-qF1	CA	3'-qR1	A
DP202216-3'-qF2	AGCGCTACTAGACAATTCAGTAC A	DP202216-3'-qR2	ATCCGCGGTTTGAACACAA
DP202216-3'-qF3	AGCGCTACTAGACAATTCAGTAC A	DP202216-3'-qR3	CTGATCCGCGGTTTGAACACA A
DP202216-qP1	FAM- AGACCGAATGATTGCCTCGCCCT- BHQ1	PHN-2074 Probe 1	FAM- CAACACACTCAAACACTGATA G-MGB
DP202216-qP3	FAM- CCACCTATTCTTCCCATCTGAGG TCTGC-BHQ1	DP202216-qP4 (同 qP3)	FAM- CCACCTATTCTTCCCATCTGA GGTCTGC-BHQ1
DP202216-qP5	FAM- CATGAGCGGAGAATTAAGGGAG TCACGTT-BHQ1	DP202216-qP6 (同 qP5)	FAM- CATGAGCGGAGAATTAAGGGA GTCACGTT-BHQ1
DP202216-qP7	FAM- AAACGACAATCTGATCATGAGCG G-BHQ1	DP202216-qP8	FAM- ACACTCAAACACTGATAGTTT AA-BHQ1
DP202216-qP9 (同 qP3)	FAM- CCACCTATTCTTCCCATCTGAGG TCTGC-BHQ1	DP202216-qP10	FAM- CGGTAGTACAGCACAAACAAC ACAC-BHQ1
DP202216-qP11	FAM- CAACACACTCAAACACTGAT- BHQ1	DP202216-qP12 (同 qP10)	FAM- CGGTAGTACAGCACAAACAAC ACAC-BHQ1
DP202216-qP13 (同 qP7)	FAM- AAACGACAATCTGATCATGAGCG G-BHQ1	DP202216-3'-qP1	FAM- CACCACAAAGTAGACAAGTT- BHQ1
DP202216-3'-qP2 (同 3'-qP1)	FAM- CACCACAAAGTAGACAAGTT- BHQ1	DP202216-3'-qP3	FAM- CCACAAAGTAGACAAGTTG- BHQ1

引物具体位置如图 2-6 所示。

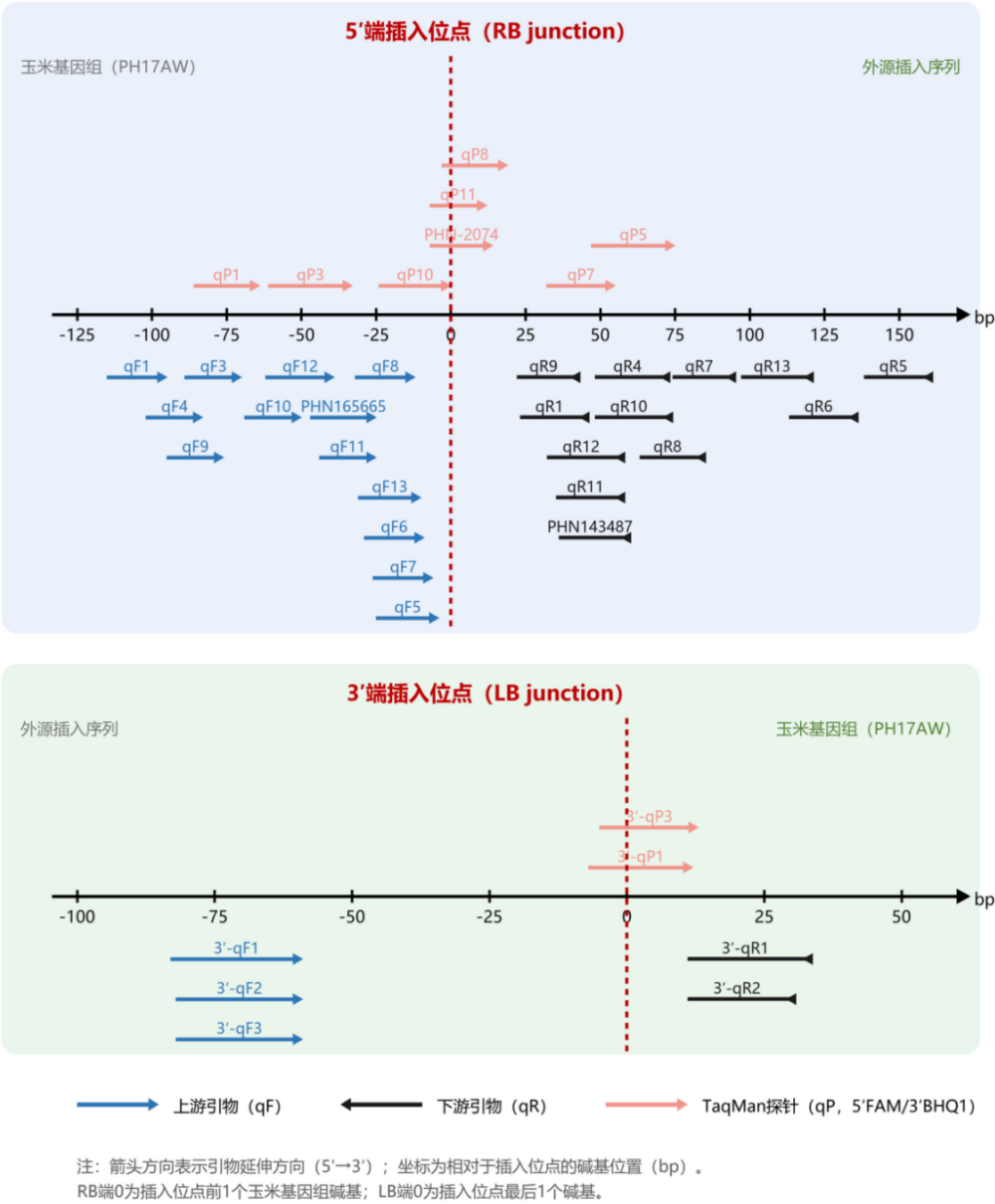


图 2-6 DP202216 转化体实时荧光 PCR 引物探针位置图

应用上述设计的多条特异引物/探针，组合成 16 对引物/探针组合，如表 2-6 所示。根据农业部 2259 号公告—4—2015《转基因植物及其产品成分检测定性 PCR 方法制定指南》要求，实时荧光 PCR 产物长度宜为 80 bp~200 bp，16 对引物/探针组合的预期扩增产物为 100 bp~184 bp，均符合要求，可进行后续试验。

表 2-6 实时荧光 PCR 检测引物探针组合信息表

序号	引物探针组合	产物大小	序号	引物探针组合	产物大小
1	DP202216-qF1/qR1/qP1	159 bp	9	DP202216-qF9/qR9/qP9	136 bp
2	PHN165665/PHN143487/P HN-2074 Probe 1	105 bp	10	DP202216-qF10/qR10/qP10	141 bp
3	DP202216-qF3/qR3/qP3	127 bp	11	DP202216-qF11/qR11/qP11	100 bp
4	DP202216-qF4/qR4/qP4	173 bp	12	DP202216-qF12/qR12/qP12	118 bp
5	DP202216-qF5/qR5/qP5	184 bp	13	DP202216-qF13/qR13/qP13	150 bp
6	DP202216-qF6/qR6/qP6	163 bp	14	DP202216-3'-qF1/3'-qR1/3'- qP1	116 bp
7	DP202216-qF7/qR7/qP7	119 bp	15	DP202216-3'-qF2/3'-qR2/3'- qP2	112 bp
8	DP202216-qF8/qR8/qP8	115 bp	16	DP202216-3'-qF3/3'-qR3/3'- qP3	115 bp

1.2 引物和探针的筛选

转化体特异性引物和探针筛选的体系和程序,参考农业部 1861 号公告—3—2012 玉米内标准基因检测^[5]中所述的实时荧光 PCR 扩增体系和反应条件进行初筛,用不同的酶和 PCR 仪 (ABI 7500 和 Thermo Fisher QuantStudio 3) 测试,筛选出适合的引物和探针后,再进行优化。具体扩增体系见表 2-7,反应程序为: 95 °C 变性 5 min (第一阶段); 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火延伸 60 s, 循环数 40 (第二阶段); 在第二阶段的退火延伸时段收集荧光信号。

表 2-7 引物探针初筛实时荧光 PCR 扩增体系

试剂	终浓度	体积
ddH ₂ O		—
10×PCR 缓冲液	1×	2.5 μL
25 mmol/L 氯化镁溶液	2.5 mmol/L	2.5 μL
dNTPs 混合溶液（各 2.5 mmol/L）	0.2 mmol/L	2.0 μL
10 μmol/L 上游引物	0.4 μmol/L	1.0 μL
10 μmol/L 下游引物	0.4 μmol/L	1.0 μL
10 μmol/L 探针	0.2 μmol/L	0.5 μL
<i>Taq</i> DNA 聚合酶	0.04 U/μL	—
50 mg/L DNA 模板	4.0 mg/L	2.0 μL
总体积		25.0 μL

注 1：“—”表示体积不确定，如果 PCR 缓冲液中含有氯化镁，则不加氯化镁溶液，根据 *Taq* DNA 聚合酶的浓度确定其体积，并相应调整 ddH₂O 的体积，使反应体系总体积达到 25.0 μL。

注 2：若采用实时荧光 PCR 试剂盒，则按试剂盒的推荐用量配制反应体系，但引物和探针用量按表 6-3 执行。

注 3：反应扩增体系可根据仪器及耗材的实际使用情况，按比例进行调整。

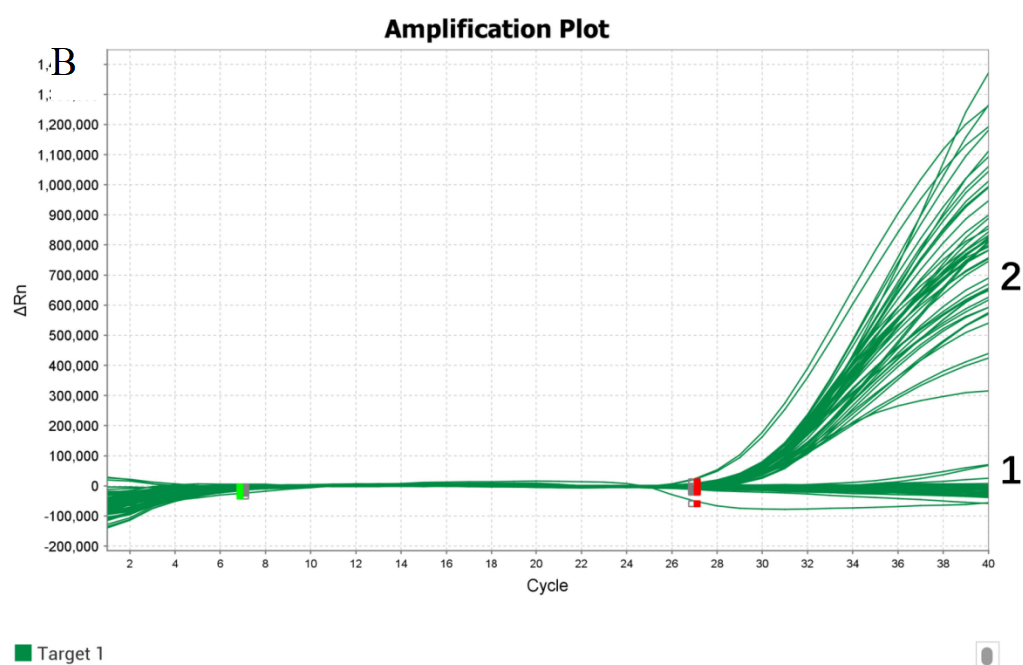
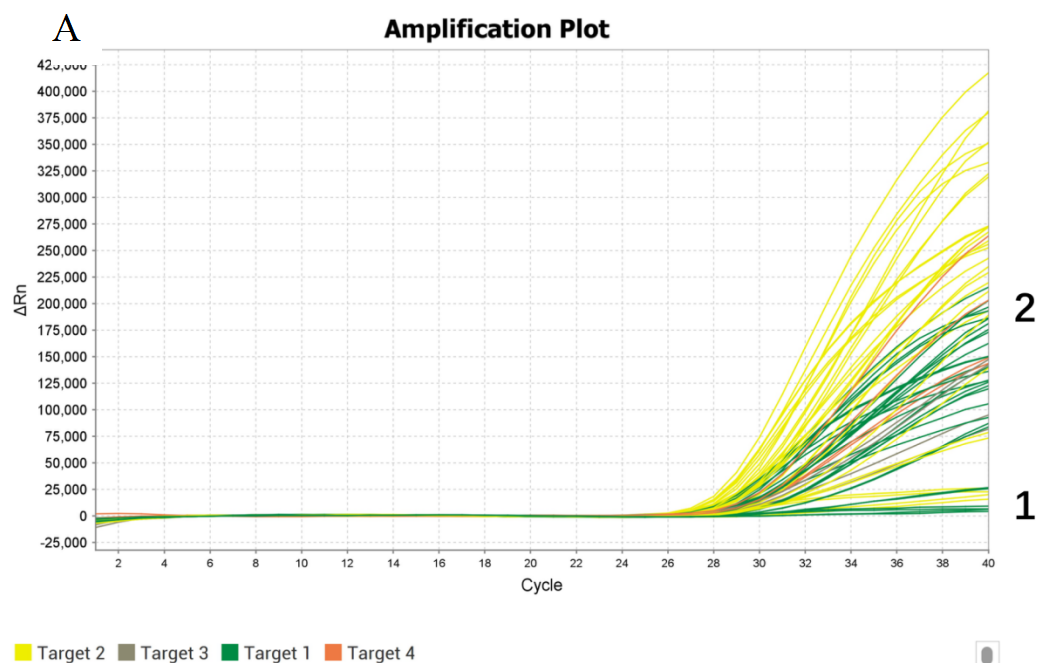
注 4：此表是 1 个反应体系的体积，可按照实际反应的数量进行扩增体系配置。

引物/探针组合筛选时设置的样品包括空白对照、阴性对照（DP202216 受体）、1%的产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 模板 DNA。通过其扩增曲线形状及荧光信号的高低进行比较，选择扩增曲线呈“S”型且荧光信号较高、*C_t* 值较小的引物探针组合作为后续试验验证的候选引物。

利用 PCR 仪（Thermo Fisher QuantStudio 3）进行测试，结果如图 2-7A 所示，16 组引物/探针组合中 1% DP202216 模板实时荧光 PCR 扩增曲线 *C_t* 值在 29.5 至 33.2 之间。根据扩增曲线带型及荧光信号的高低，较好的引物探针组合有组合 1、2、3、4、5、6、12 和 16。

更换另一台 PCR 仪（Thermo Fisher QuantStudio 3）并更换酶之后，实时荧光 PCR 扩增曲线如图 2-7B 所示，16 组引物/探针组合中 1% DP202216 模板实时荧光 PCR 扩增曲线 *C_t* 值在 28.7 至 31.9 之间。根据扩增曲线带型及荧光信号的高低，较好的引物探针组合有组合 1、2、3、4、5、6、12 和 16。

其中引物/探针组合 1 在不同仪器和酶中表现相对稳定，荧光信号较高，且 *C_t* 值较小。因此选择引物/探针组合 1（DP202216-qF1/qR1/qP1），用作下一步分析的候选引物。



1: 空白对照、阴性对照； 2: 1%产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 模板 DNA；
 (注：所使用的仪器和试剂，A: BIO-RAD CFX96 PCR 仪，TaKaRa 的 Premix Ex Taq™(Probe qPCR)；
 B: BIO-RAD CFX96 PCR 仪，ABi 的 TaqMan™ Fast Advanced Master Mix； C: Abi QuantStudio 3 PCR
 仪，TaKaRa 的 Premix Ex Taq™(Probe qPCR))

图 2-7 DP202216 的 16 对引物探针组合实时荧光 PCR 扩增结果

1.3 引物探针的确定

根据测试结果，确定产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体特异性序列实时荧光 PCR 检测使用的引物探针：

DP202216-qF: 5' -AAGTCGGTGTTGGTACTGAGG-3' ;

DP202216-qR: 5' -AGATTGTCGTTTCCCGCCTTC-3' ;

DP202216-qP: 5' -AGACCGAATGATTGCCTCGCCCT-3' 。

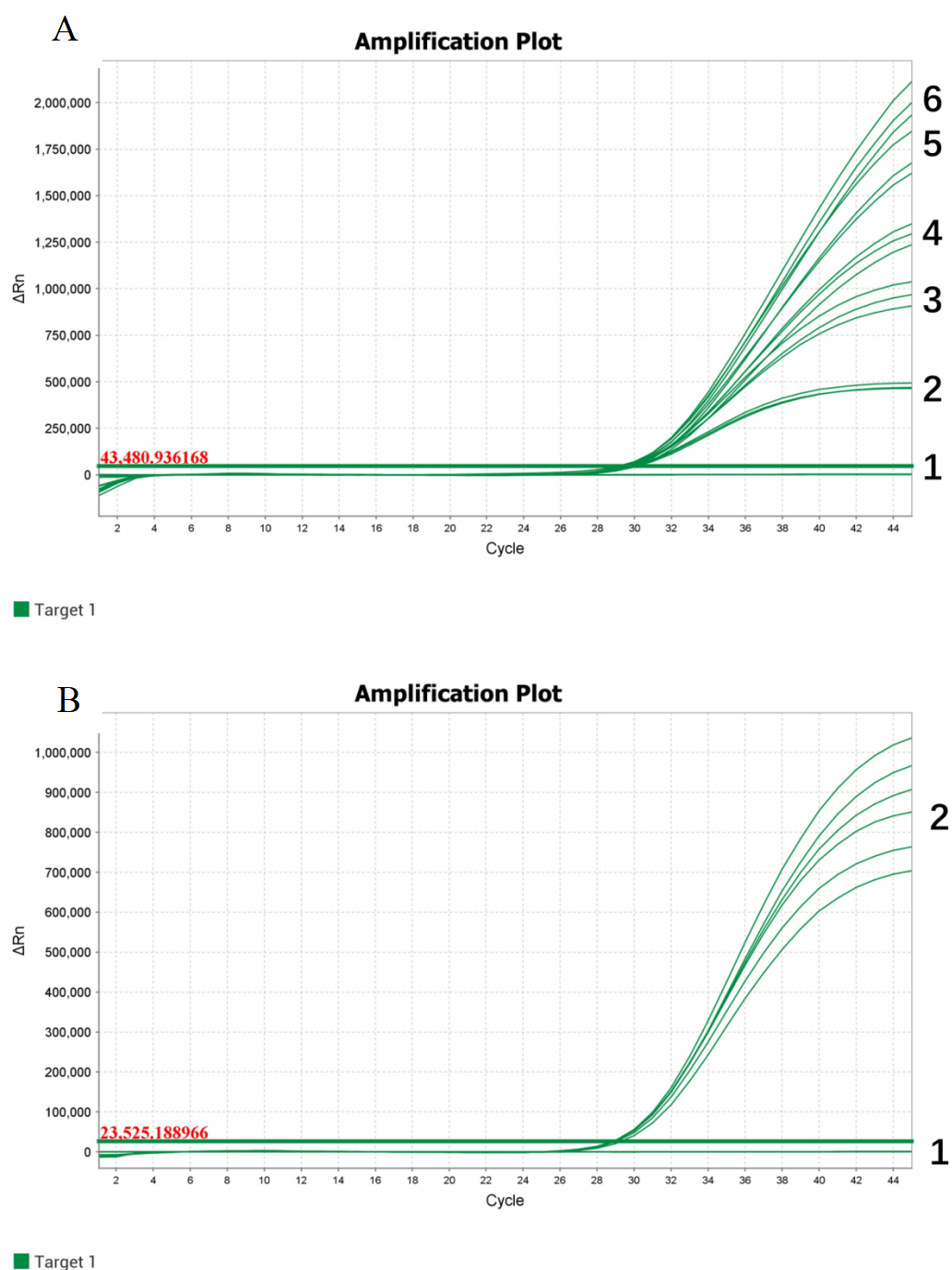
其中 DP202216-qP 为产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体特异性序列的 TaqMan 探针，其 5' 端标记荧光报告基团(如 FAM, HEX 等), 3' 端标记对应的淬灭基团(如 TAMRA, BHQ1 等)。预期扩增片段大小为 159 bp。

2. PCR 扩增反应条件的优化与确定

2.1 引物探针浓度的优化

参照农业部 1861 号公告—3—2012 中玉米内标准基因 *zSSIb* 的反应程序，以 60℃ 为退火温度进行 PCR 扩增，调整优化实时荧光 PCR 反应体系，使用筛选出来的引物探针组合，分别设置 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 、0.4 $\mu\text{mol/L}$ 、0.6 $\mu\text{mol/L}$ 、0.8 $\mu\text{mol/L}$ 、1 $\mu\text{mol/L}$ 共 5 种引物浓度梯度，探针浓度为引物浓度的一半，根据荧光曲线的线型、相对 C_t 值等，确定引物和探针的浓度。利用 PCR 仪 Thermo Fisher QuantStudio 3 进行测试，实时荧光 PCR 结果显示引物浓度在 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 以上、探针浓度在 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 以上时 C_t 值差异不明显（图 2-9A），综合考量扩增效率和体系配置的适用性等因素，确定产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体检测体系中的引物浓度为 0.4 $\mu\text{mol/L}$ ，探针浓度为 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 。

选择 *zSSIb* 基因作为玉米内标准基因，农业部 1861 号公告-3-2012 中规定 *zSSIb* 基因检测体系的引物浓度为 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 、探针浓度为 0.16 $\mu\text{mol/L}$ 。与确定的 DP202216 转化体反应体系相比，其引物浓度一致，探针浓度不同。比较 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.16 $\mu\text{mol/L}$ 2 种探针浓度下 *zSSIb* 基因的扩增曲线及 C_t 值大小，发现二者的 C_t 值大小一致，扩增曲线基本一致（图 2-9B）。因此在本方法中将 *zSSIb* 内标基因与 DP202216 转化体的反应体系统一，方便标准的使用。



A: 1: 空白对照、阴性对照; 2: 0.2 $\mu\text{mol/L}$; 3: 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 、阳性对照; 4: 0.6 $\mu\text{mol/L}$; 5: 0.8 $\mu\text{mol/L}$; 6: 1 $\mu\text{mol/L}$;
 B: 7: 引物 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 、探针 0.16 $\mu\text{mol/L}$; 8: 引物 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 、探针 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 。

图 2-9 产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体和 zSSIb 内标准基因实时荧光 PCR 引物探针浓度优化

2.2 PCR 扩增反应条件的确定

利用 PCR 仪 BIO-RAD CFX96 进行测试, 经优化最终确立了产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体特异性实时荧光 PCR 扩增体系, 各项成分按表 2-8 所述添加。反应程序为:

95 °C 变性 5 min（第一阶段）；95 °C 变性 15 s，60 °C 退火延伸 60 s，循环数 45（第二阶段）；在第二阶段的退火延伸时段收集荧光信号。

表 2-8 DP202216 转化体特异性序列实时荧光 PCR 扩增体系

试剂	终浓度	体积
ddH ₂ O		—
10×PCR 缓冲液	1×	2.5 μL
25 mmol/L 氯化镁溶液	2.5 mmol/L	2.5 μL
dNTPs 混合溶液（各 2.5 mmol/L）	0.2 mmol/L	2.0 μL
10 μmol/L DP202216-qF	0.4 μmol/L	1.0 μL
10 μmol/L DP202216-qR	0.4 μmol/L	1.0 μL
10 μmol/L DP202216-qP	0.2 μmol/L	0.5 μL
<i>Taq</i> DNA 聚合酶	0.04 U/μL	—
50 mg/L DNA 模板	4.0 mg/L	2.0 μL
总体积		25.0 μL

注 1：“—”表示体积不确定，如果 PCR 缓冲液中含有氯化镁，则不加氯化镁溶液，根据 *Taq* DNA 聚合酶的浓度确定其体积，并相应调整 ddH₂O 的体积，使反应体系总体积达到 25.0 μL。

注 2：若采用实时荧光 PCR 试剂盒，则按试剂盒的推荐用量配制反应体系，但引物和探针用量按表 6-4 执行。

注 3：反应扩增体系可根据仪器及耗材的实际使用情况，按比例进行调整。

注 4：此表是 1 个平行反应体系的体积，可按照实际反应的数量进行扩增体系配置。

3. 特异性测试

3.1 测试样品的设置

BIO-RAD CFX96 具有操作简单，灵敏度高，测量准确等优点，因此选择此 PCR 仪进行特异性测试。选用不同作物及其主要的商业化转化体对筛选的产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 引物/探针组合 1（DP202216-qF1/qR1/qP1）进行特异性测试，样品设置 3 份对照（空白、阴性和阳性样品）和 7 份试样（1%DP202216 玉米、常见转基因作物混合样、非转基因玉米混合样），具体样品信息见下表 2-9。

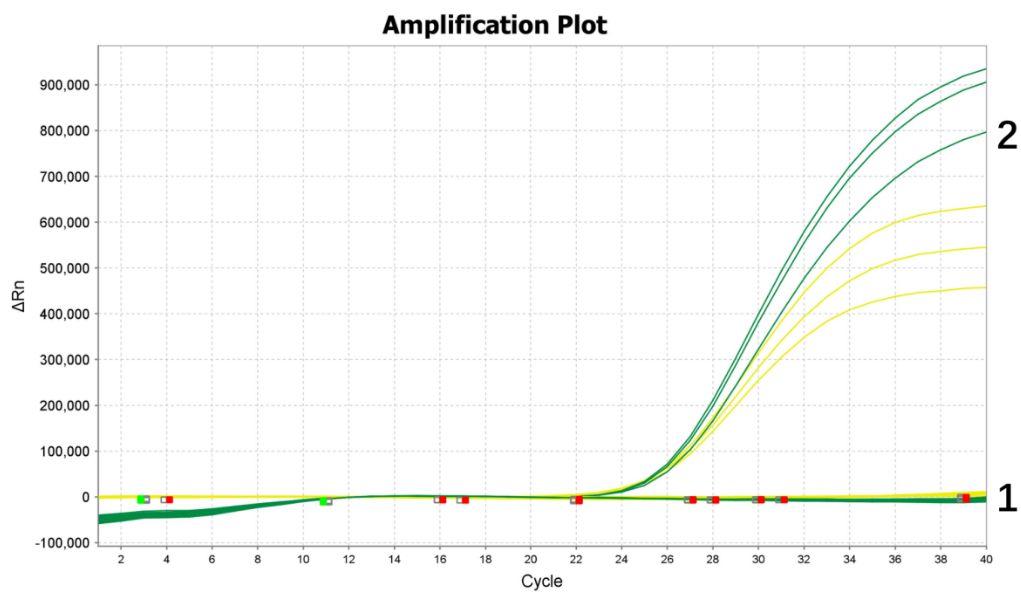
表 2-9 特异性测试样品

序号	样品名称	样品内容	样品状态	样品性质
1	空白对照	用水作为空白对照	——	对照
2	阴性对照	DP202216 非转基因受体玉米	基因组 DNA 溶液	
3	阳性对照	转化体拷贝数比值为 5%的产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 基因组 DNA	基因组 DNA 溶液	
4	1% DP202216 转化体	转化体拷贝数分数为 1%的产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 基因组 DNA	基因组 DNA 溶液	测试样品
5	其他转基因玉米混合样	Bt11、Bt176、MON810、MON863、GA21、NK603、T25、TC1507、MON89034、MON88017、59122、MIR604、3272、MON87460、DAS40278-9、4114、MON87427、5307、DBN9858、ND207、DBN9501、瑞丰 125、DBN9936、MON87411、MZIR098、浙大瑞丰 8、BFL4-2、nCX-1，28 个转化体混合制成 1 个样品，每个转化体质量分数为 1%	粉末	
6	转基因大豆混合样	GTS40-3-2、MON89788、A5547-127、A2704-12、356043、305423、CV127、MON87701、MON87708、MON87769、MON87705、FG72、DAS81419-2、DAS-44406-6、MON87751、SHZD3201、CAL16、中黄 6106、DBN9004，19 个转化体混合制成 1 个样品，每个转化体质量分数为 1%	粉末	
7	转基因水稻混合样	TT51-1、KF-6、KMD-1、M12、KF-8、KF-2、G6H1、T1C-19，8 个转化体混合制成一个样品，每个转化体质量分数为 1%	粉末	
8	转基因油菜混合样	MS1、MS8、RF1、RF2、RF3、T45、Oxy-235、Topas19/2、MON88302、73496，10 个转化体混合制成 1 个样品，每个转化体质量分数为 1%	粉末	
9	转基因棉花混合样	MON1445、MON531、MON15985、LLCOTTON25、MON88913、GHB614、COT102，7 个转化体混合制成 1 个样品，每个转化体质量分数为 1%	粉末	
10	非转基因玉米混合样	多种非转基因玉米等量混合制成的 1 个样品	粉末	

3.2 方法特异性测试

特异性方法仅从产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 样品中获得预期的扩增曲线，而在其他样品中均未获得预期的扩增曲线（图 2-10）。因此，选择引物/探针组合 1（DP202216-qF1/qR1/qP1）作为产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体实时荧光 PCR 方法的候选引物/探针组合，并将该引物探针组合在后续实验及标准中命名为 DP202216-qF/DP202216-

qR/DP202216-qP，其扩增产物片段大小为 159 bp。



1：空白对照、阴性对照、其他转基因玉米混合样品、转基因大豆混合样品、转基因水稻混合样品、转基因油菜混合样品、转基因棉花混合样品、非转基因玉米混合样；2：1% DP202216 玉米、阳性对照

图 2-10 DP202216 转化体实时荧光 PCR 检测方法特异性测试

4. 靶标序列测序验证

对引物组合 DP202216-qF/DP202216-qR/DP202216-qP 扩增的片段进行测序验证，结果与研发单位提供的分子特征信息一致，序列比对结果见图 2-11。

Query	1	AAGTCGGTGTTGGTACTGAGGACGAACCCAGACCGAATGATTGCCTCGCCCTCACCACCT	60
Sbjct	1168	AAGTCGGTGTTGGTACTGAGGACGAACCCAGACCGAATGATTGCCTCGCCCTCACCACCT	1227
Query	61	ATTTCTTCCCATCTGAGGTCTGCACTCTCACCGGTAGTACAGCACAAACAACACACTCAA	120
Sbjct	1228	ATTTCTTCCCATCTGAGGTCTGCACTCTCACCGGTAGTACAGCACAAACAACACACTCAA	1287
Query	121	ACACTGATAGTTTAAACTGAAGGCGGGAAACGACAATCT	159
Sbjct	1288	ACACTGATAGTTTAAACTGAAGGCGGGAAACGACAATCT	1326

注：Query：PCR 产物测序序列；Sbjct：公司提供 DP202216 序列

注：序列中 1~116 bp 为玉米基因组部分序列，117~159 bp 为外源插入片段部分序列

图 2-11 产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体实时荧光 PCR 引物探针组合扩增产物测序验证

实时荧光 PCR 扩增产物的靶标序列如下：

```
1   AAGTCGGTGTTGGTACTGAGGACGAACCCAGACCGAATGATTGCCTCGCC
51  CTACCCACCTATTTCTTCCCATCTGAGGTCTGCACTCTCACCGGTAGTAC
101 AGCACAAACAACACACTCAAACACTGATAGTTTAAACTGAAGGCGGGAAA
151 CGACAATCT
```

序列中 1~116 bp 为玉米基因组部分序列，117~159 bp 为外源插入片段部分序列，其中 5' 端下划线部分为 DP202216-qF 引物序列，3' 端下划线部分为 DP202216-qR 引物的反向互补序列，方框内部分为 DP202216-qP 探针序列。

5. 检出限（LOD）的测试

5.1 检出限的要求

根据农业部 2259 号公告—5—2015 等标准规定，转基因检测方法的检出限应不高于目标浓度（转基因的标识阈值）的 1/20。由于我国目前法律尚未规定转基因的标识阈值，鉴于此，参考欧盟阈值 0.9%，本方法制定将目标浓度设定为 1%，确定了检出限应不高于 0.05%。

5.2 试验材料的选择

本方法的试验材料为研发人提供的种子，为非有证标准物质，在前面方法建立的准备工作中已对实验使用的 DP202216 转化体材料进行了纯杂合鉴定，鉴定结果均为纯合体，可用于检出限测试。

5.2.1 有证标准物质

若试验材料为基体或基因组 DNA 等有证标准物质，则按照有证标准物质证书的相关信息及要求使用。

5.2.2 非有证标准物质

若试验材料为研发人提供的种子等非有证标准物质，应先鉴定材料纯合性，尽可能选择纯合体作为试样，进行检出限测定。

5.3 基因组 DNA 质量和拷贝数的换算关系

转基因植物 PCR 检测方法的检出限与定量限通常使用检测目标 DNA 片段的拷贝数比值或拷贝数进行表示，但由于不同植物的基因组 DNA 大小不一致，需要将测试的 DNA 样品进行质量与拷贝数的换算，本方法使用以下公式进行样品质量与拷贝数的换算：

样品中植物基因组拷贝数=样品 DNA 质量（g） $\times 6.02 \times 10^{23}$ /（植物单倍体基因组的大小 $\times 2 \times 324.5$ （g.mol））

本方法所用的材料为玉米，其参考单倍体基因组大小为 2319 Mbp^[6]，由此计算出 1 ng 的纯合玉米基因组 DNA 约含有 $400(10^{-9} \times 6.02 \times 10^{23} / (2319 \times 10^6 \times 2 \times 324.5))$ 个拷贝的目标 PCR 产物片段。其他常见作物基因组 DNA 质量和拷贝数的换算关系见下表 2-10。

表 2-10 常见作物基因组 DNA 质量和拷贝数的换算关系

序号	作物	基因组大小 Mbp	1 ng 基因组 DNA 约含拷贝数 copies	纯合性
1	大豆	1115	832	纯合
2	玉米	2319	400	纯合
3	棉花	2118	438	纯合
4	水稻	441	2103	纯合
5	油菜	1182	785	纯合

5.4 检出限的初步测试样品设定要求

检出限测试时，在 100 ng 基因组 DNA 的体系中，样品的设置必须包含的 4 个样品为：

（1）相对含量为转基因拷贝数含量浓度 0.05%；（2）绝对含量为转化体基因组 DNA 小于 50 个拷贝的；（3）绝对含量为转化体基因组 DNA 为 1 个拷贝。（4）空白对照。其他样品浓度在 1-50 拷贝之间选择。共测试至少 5 个样品。

5.5 测试样品的初始化浓度

将提取的产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 及其非转基因对照的基因组 DNA 用 0.1 ×TB 稀释成 50 ng/μL（换算成拷贝数浓度 400×50=20000 copies/μL），确保体系中加入 2 μL 样品后 DNA 模板量为 100 ng。

5.6 检出限测试样品的配制、初步测试和初始化浓度测定值的准确性判断

将 50 ng/μL 的产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 基因组 DNA，用 50 ng/μL 的非转基因玉米基因组 DNA，梯度稀释成 DP202216 转化体拷贝数比值为 0.20%、0.10%、0.05%、0.025%、0.005%和 0.0025%共 6 个测试样品，对应的转化体拷贝数浓度分别为 40、20、10、5、1、0.5 copies/μL。反应体系中加入 2 μL 测试样品，对应转化体拷贝数分别为 80、40、20、10、2、1 copies，每个测试样品至少进行 10 个反应。

模板浓度的准确性判断（包括转化体及其受体对照）：若当模板量为 1 copy 时，10 个反应中有 2-5 个阴性反应，表明梯度稀释的模板 DNA 浓度大致准确，否则重新进行 DNA 模板浓度测定及稀释。

测试结果如图 2-12 和表 2-11 所示，当模板量为 1 copy 时，10 个反应中有 7 个阳性反应；当模板量为 1 copies 时，10 个反应中有 4 个阳性反应，当模板量为 100、40、20、10、5copies 时，10 个反应均能得到扩增曲线。

根据检测结果，结合扩增曲线和 *Ct* 值，初步确定产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体拷贝数比值为 0.05%的模板浓度（即模板量为 20 copies）为能够稳定检出（10 个均为阳性）的最低浓度。

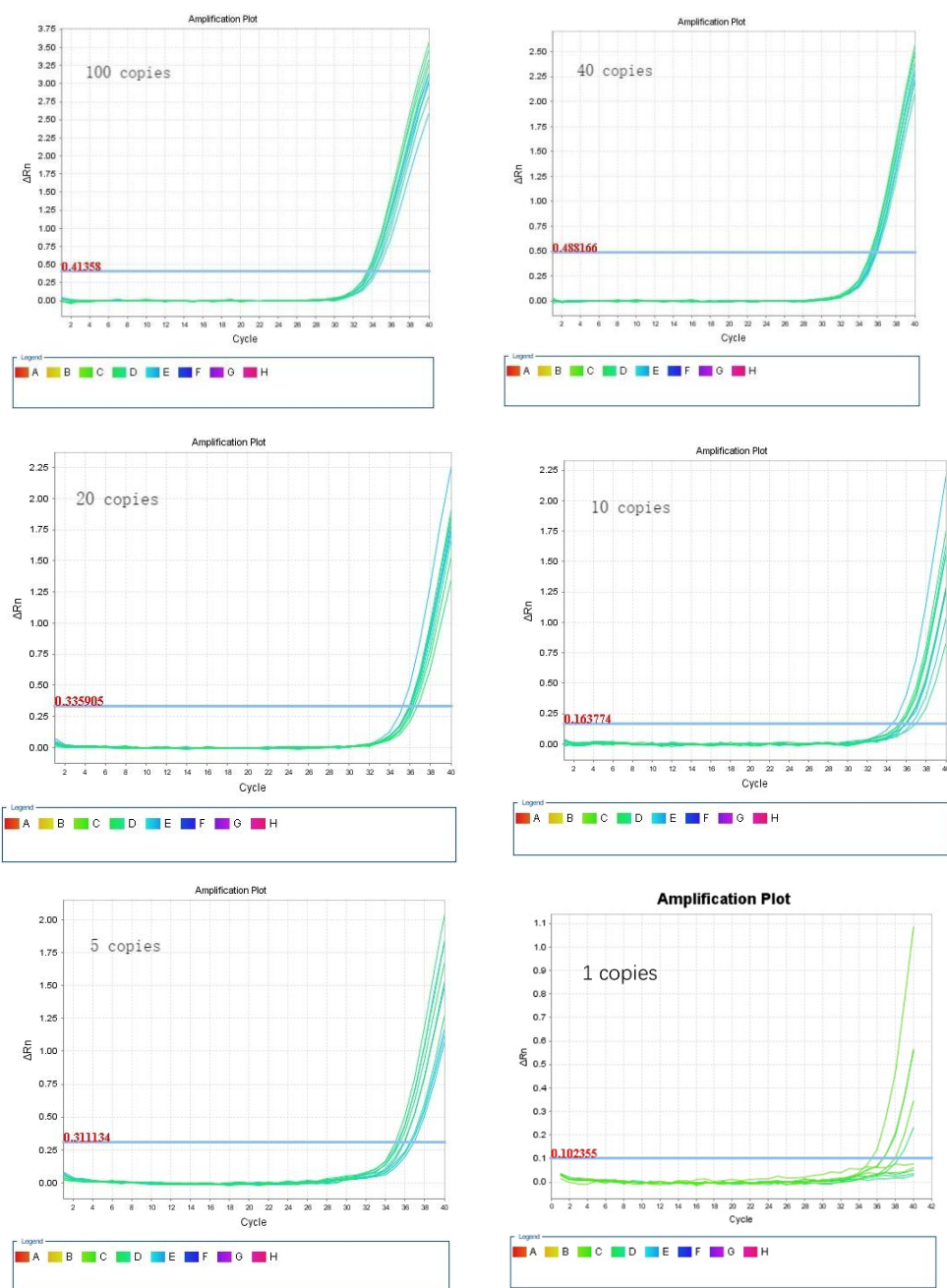


图 2-12 DP202216 转化体检出限初步测试扩增图

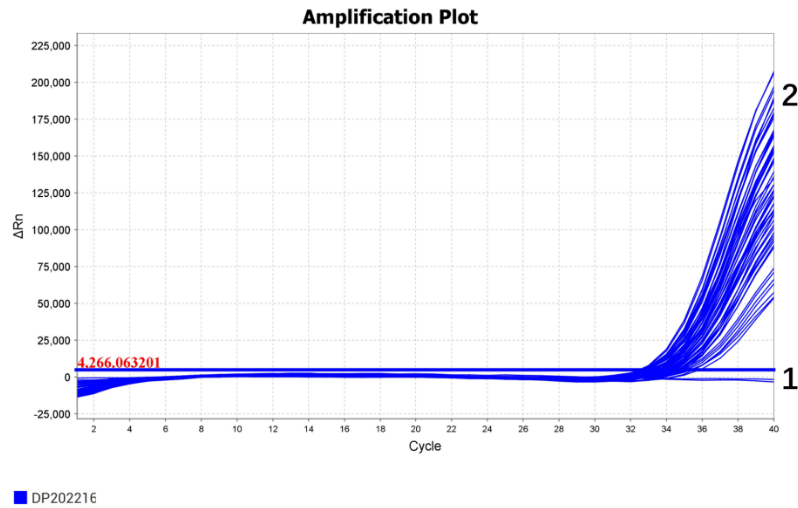
表 2-11 DP202216 转化体检出限初步测试结果

序号	DP202216 不同模板扩增 Ct 值					
	100 copies (0.25%)	40 copies (0.10%)	20 copies (0.05%)	10 copies (0.025%)	5 copies (0.0125%)	1 copies (0.0025%)
1	32.14	33.57	34.86	35.39	35.78	/
2	32.80	33.17	35.07	35.96	36.11	36.74
3	32.12	33.02	34.37	35.25	35.26	/
4	32.11	33.00	34.71	35.56	36.79	35.51
5	32.47	32.91	34.39	36.99	35.50	38.01

6	33.01	33.58	34.74	35.56	36.92	/
7	32.30	33.31	34.42	36.58	36.92	36.84
8	32.43	33.45	33.84	34.56	35.55	/
9	32.75	33.41	34.45	36.07	37.16	/
10	32.51	33.47	34.47	36.03	36.18	38.43

5.7 检出限的确认

对通过初步测试的 DP202216 转化体拷贝数比值为 0.05%（在 PCR 检测反应体系中加入 100 ng DNA 模板进行测算）的样品，进行 60 次测试。60 次反应均有典型扩增曲线（图 2-13），确认结果表明该方法在 95%的置信度下，拷贝数比值为 0.05%的样品出现阳性结果的概率大于 95%。因此确定本方法的检出限可达到 0.05%，满足欧盟转基因检测标准的要求。

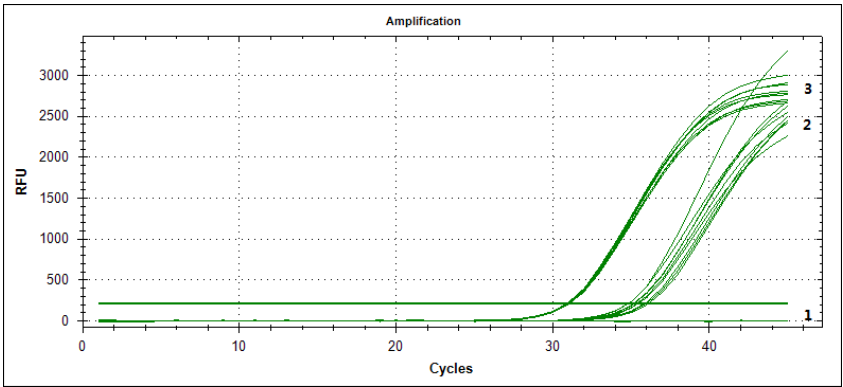


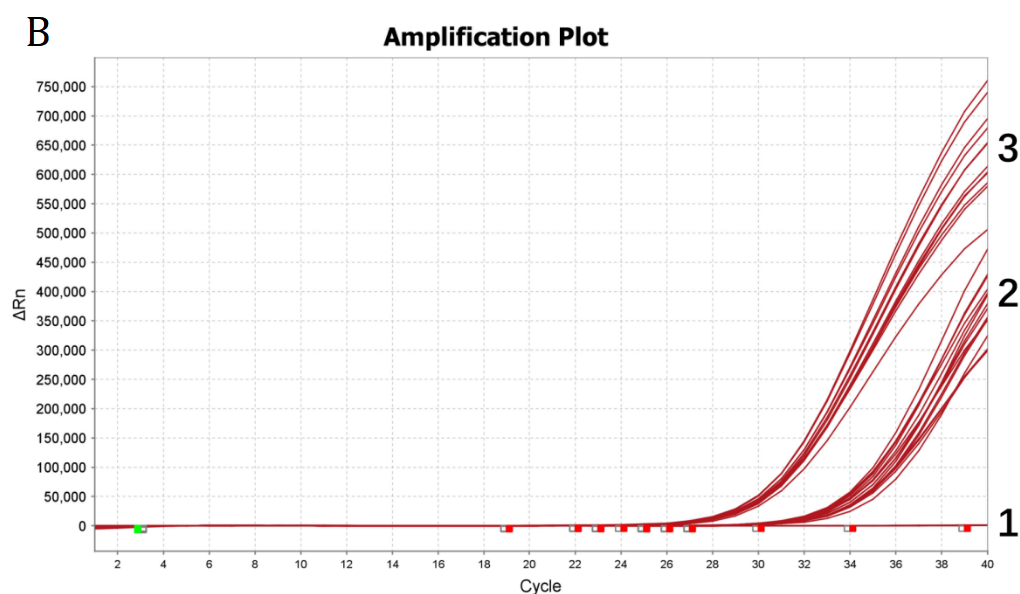
1: 空白对照、阴性对照；2: 拷贝数比值为 0.05%的 DP202216 样品；

图 2-13 产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体实时荧光 PCR 方法检出限测试扩增曲线图

6. 稳健性测试

由两个不同操作人员，在两个不同时间段，利用两台不同的 PCR 仪（BIO-RAD CFX96 和 Thermo Fisher QuantStudio 3），分别对 30 份不同拷贝数比值的样品进行测试，样品包括 10 份 DP202216 受体样品、10 份检出限样品、10 份拷贝数比值为 1%的样品。测试结果（图 2-14A 和图 2-14B）与预期一致，表明方法稳健性符合要求。





A: PCR 仪 BIO-RAD CFX96 测试结果; B: PCR 仪 Thermo Fisher QuantStudio 3 测试结果;
1: 空白对照、阴性对照; 2: DP202216 检出限样品; 3: DP202216 拷贝数比值为 1% 的样品

图 2-14 DP202216 转化体稳健性测试扩增图

方法二、产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体特异性实时荧光 PCR 定量检测方法建立

实时荧光 PCR 定量检测方法建立要经过引物探针设计及筛选、反应体系及条件优化、特异性测试、检出限测试、标准曲线绘制、准确性测试、定量限测试、稳健性测试等步骤，每个步骤的考察要点及注意事项见表 2-12。

表 2-12 方法建立步骤及考察要点

序号	步骤	考察要点	注意事项
1	引物探针设计及筛选	C_t 值大小， 荧光信号强度	扩增片段小于 150 bp，在通用条件下筛选
2	反应体系及条件优化	在不同的引物/探针浓度下都能稳定扩增	在 60℃ 下反应
3	特异性测试	仅在含目标转化体样品中有扩增曲线	样品设置
4	检出限测试	能稳定检测的最低浓度	模板拷贝数浓度准确
5	标准曲线绘制	斜率 (b)、决定系数 (R^2) 和 PCR 扩增效率 (E)	校准品浓度梯度设置
6	准确性测试	重复条件下测量结果的精确度和正确度	样品设置，1 个 PCR 排板（试样 3 个子样，3 个 PCR 重复），对照和校准品仅设 1 个子样，重复 3 次
7	定量限测试	能准确定量的最低浓度	模板拷贝数浓度准确
8	稳健性测试	改变 PCR 反应条件（操作者、试剂盒、PCR 仪），测量结果的精确度和正确度	用转基因含量为定量限的样品测试

1. 引物和探针的设计与确定

1.1 引物和探针的设计

同方法一的 1.1。

1.2 引物和探针的筛选

同方法一的 1.2。

1.3 引物和探针的确定

同方法一的 1.3。

2. PCR 反应条件的优化与确定

2.1 引物探针浓度的优化

同方法一的 2.1。

2.2 PCR 反应条件的确定

经优化最终确立了产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体特异性实时荧光 PCR 扩增体系，按表 2-13 配制。反应程序为：95℃ 变性 5 min（第一阶段）；95℃ 变性 15 s，60℃ 退火延伸 60 s，循环数 45（第二阶段）；在第二阶段的退火延伸时段收集荧光信号。

表 2-13 DP202216 转化体特异性序列实时荧光 PCR 扩增体系

试剂	终浓度	体积
ddH ₂ O		—
10×PCR 缓冲液	1×	2.5 μL
25 mmol/L 氯化镁溶液	2.5 mmol/L	2.5 μL
dNTPs 混合溶液（各 2.5 mmol/L）	0.2 mmol/L	2.0 μL
10 μmol/L DP202216-qF	0.4 μmol/L	1.0 μL
10 μmol/L DP202216-qR	0.4 μmol/L	1.0 μL
10 μmol/L DP202216-qP	0.2 μmol/L	0.5 μL
Taq DNA 聚合酶	0.04 U/μL	—
50 mg/L DNA 模板	4.0 mg/L	2.0 μL
总体积		25.0 μL

注 1：“—”表示体积不确定，如果 PCR 缓冲液中含有氯化镁，则不加氯化镁溶液，根据 Taq DNA 聚合酶的浓度确定其体积，并相应调整 ddH₂O 的体积，使反应体系总体积达到 25.0 μL。反应体系中 DNA 模板量不大于 200 ng。

注 2：若采用实时荧光 PCR 试剂盒，则按试剂盒的推荐用量配制反应体系，但引物和探针用量按表 6-8 执行。

注 3：反应扩增体系可根据仪器及耗材的实际使用情况，按比例进行调整。

注 4：此表是 1 个反应体系的体积，可按照实际反应的数量进行扩增体系配置。

3. 特异性测试

3.1 测试样品的设置

同方法一的 3.1。

3.2 样品的特异性测试

同方法一的 3.2。

4. 测序验证及靶标序列分析

同方法一的 4。

5. 标准曲线的建立

5.1 标准曲线的制备

根据农业部 2259 号公告—5—2015 的要求，为绘制出 DP202216 转化体检测方法的标准曲线，提取产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 纯合体基因组 DNA（理论转基因含量 100%），将基因组 DNA 浓度稀释到 50 ng/μL。然后用水或 0.1×TE 缓冲液对基因组 DNA 进行梯度稀释，依次稀释配制 5 个不同含量（拷贝数浓度）的校准品。以校准品为模板进行实时荧光 PCR 反应，PCR 体系中 DNA 模板量为 2.0 μL。

关于标准曲线绘制，依据靶标序列拷贝数与 Ct 值之间的线性关系，获得曲线的线性回归方程，标准曲线校准点数一般不少于 5 个，至少重复 3 次试验，每次试验至少设置 3 个平行。

关于 5 个校准点，应包括**试样的目标浓度**（如法规规定的标识阈值等），并且至少涵盖

目标浓度 1/10 倍和 5 倍的浓度点，同时最低模板量等于或小于定量限且大于检出限，最高浓度大于测试样品 DNA 浓度。

关于试样的目标浓度，参考欧盟阈值 0.9%，将其设定为 1%。本标准研制中体系中模板加入量为 100 ng，因此目标浓度 1/10 倍和 5 倍的浓度点分别为 0.1 ng 和 5.0 ng（体系中转化体 DNA 含量），定量限和检出限分别为 40 copies 和 20 copies；本标准研制中测试样品 DNA 浓度分别为 0.1%、1.0%和 5.0%，体系中模板加入量为 100 ng，因此体系中转化体 DNA 含量分别为 0.1 ng、1.0 ng 和 5.0 ng。

因此，确定标准曲线制备中 5 个不同浓度点（检测体系中校准品 DNA 含量）DNA 质量及其对应的拷贝数见表 2-14。

表 2-14 产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 检测体系中校准品 DNA 含量

样品编号	反应体系中 DNA 含量(ng)	玉米 <i>zSSIIb</i> 基因 拷贝数(copies)	DP202216 转化体 拷贝数(copies)
G1	100.00	40000.00	40000.00
G2	10.00	4000.00	4000.00
G3	5.00	2000.00	2000.00
G4	1.00	400.00	400.00
G5	0.10	40.00	40.00

5.2 标准曲线的斜率、决定系数和 PCR 扩增效率合格判定

5.2.1 标准曲线合格判定标准

标准曲线斜率、决定系数和 PCR 扩增效率合格判定依据《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》，其中实时荧光定量 PCR 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 ；标准曲线的斜率应在-3.6~-3.1；标准曲线的扩增效率 E 应在 90%~110%。

5.2.2 标准曲线各参数的计算方法

一般情况下仪器会自动给出标准曲线的各参数。当仪器无法自动实现时，实验室根据各水平校准品（一般设置 5 个水平， $q=5$ ，每个水平做 3 次 PCR 重复）的 DP202216 转化体和 *zSSIIb* 基因检测数据，即 y 值（3 次 PCR 重复 Ct 值的平均值）与 x 值（标称拷贝数对数）间的线性关系，绘制出实验室的内标准基因和转化体的标准曲线（ $y=bx+a$ ），统计标准曲线的斜率 b （ $= \frac{SP_{xy}}{SS_x}$ ，其中 SP_{xy} 为 x 变量与 y 变量之间的乘积和， SS_x 为 x 变量的平方和）；决定系数 R^2 （ $= \frac{xy_2^{SP}}{SS_x SS_y}$ ，其中 SP_{xy} 为 x 变量与 y 变量之间的乘积和， SS_x 为 x 变量的平方和， SS_y 为 y 变量的平方和）；扩增效率 E （%） $= [10^{(-1/b)} - 1] \times 100\%$ ；截距 a 。具体计算公式如下：

$$b = \frac{SP_{xy}}{SS_x} = \frac{\sum_{j=1}^q (x_j - \bar{x})(y_j - \bar{y})}{\sum_{j=1}^q (x_j - \bar{x})^2} = \frac{\sum_{j=1}^q x_j y_j - \frac{\sum_{j=1}^q x_j \sum_{j=1}^q y_j}{q}}{\sum_{j=1}^q x_j^2 - \frac{(\sum_{j=1}^q x_j)^2}{q}} \dots\dots\dots (1)$$

$$R^2 = \frac{SP_{xy}^2}{SS_x SS_y} = \frac{[\sum_{j=1}^q (x_j - \bar{x})(y_j - \bar{y})]^2}{\sum_{j=1}^q (x_j - \bar{x})^2 \sum_{j=1}^q (y_j - \bar{y})^2} = \frac{\left[\sum_{j=1}^q x_j y_j - \frac{\sum_{j=1}^q x_j \sum_{j=1}^q y_j}{q} \right]^2}{\left[\sum_{j=1}^q x_j^2 - \frac{(\sum_{j=1}^q x_j)^2}{q} \right] \left[\sum_{j=1}^q y_j^2 - \frac{(\sum_{j=1}^q y_j)^2}{q} \right]} \dots\dots\dots (2)$$

$$a = \bar{y} - b \bar{x} \dots\dots\dots (3)$$

式中：

x_j — 第 j 个水平的校准样品标称拷贝数对数值；

y_j — 第 j 个水平的校准样品 3 次重复 PCR 测定 Ct 值的平均值；

$\bar{x}$ — q 个水平校准样品标称拷贝数对数值的平均值；

$\bar{y}$ — q 个水平校准样品所有测定 Ct 值的平均值；

q — 校准样品水平个数，一般 $q=5$ 。

5.2.3 标准曲线各参数的测试结果和合格判定

根据标准样品 PCR 反应的 Ct 值及初始模板拷贝数的对数分别绘制产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 和玉米内标准基因 $zSSIb$ 的标准曲线，本文绘制了 3 组标准曲线（因此提供了 3 组标准曲线数据）。计算标准曲线的斜率、决定系数和 PCR 扩增效率，结果详见表 2-15。表中结果显示，3 组玉米内标准基因 $zSSIb$ 和产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 的标准曲线斜率 b 分别为 -3.247、-3.314、-3.206、-3.242、-3.273、-3.303，均位于 -3.6~-3.1 的允许区间内；决定系数 R^2 均在 0.990 以上，大于可接受的最低值 0.98；PCR 扩增效率 E 分别为 103.2%、100.3%，105.1%、103.5%，102.1%、100.8%，均位于 90%~110% 的允许区间内。标准曲线的所有指标全部满足了标准制定的要求范围，DP202216 转化体和玉米内标准基因 $zSSIb$ 检测体系的 Ct 值与模板拷贝数间均具有良好的线性关系。

表 2-15 DP202216 检测方法的标准曲线构建结果

	引物组合	曲线斜率 b	扩增效率 $E(\%)$	R^2
组 1	DP202216	-3.314	100.3	0.999
	$zSSIb$	-3.247	103.2	0.999

组 2	DP202216	-3.242	103.5	0.998
	<i>zSSIb</i>	-3.206	105.1	0.997
组 3	DP202216	-3.303	100.8	0.998
	<i>zSSIb</i>	-3.273	102.1	0.998
平均值	DP202216	-3.286	101.533	0.998
	<i>zSSIb</i>	-3.242	103.467	0.998

6. 实验室内正确度和精密度（精确度）数据分析

6.1 正确度和精密度合格判定标准

依据《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》，对建立的实时荧光定量 PCR 方法，在实验室内进行确认时，应达到以下要求：在整个动态线性范围内，用正确度表示多次测试的平均值与该样品标称值（已知值）之间的接近程度，且偏倚（Bias）不能超过标称值（已知值）的 25.0%，即 $|biasR| \leq 25.0\%$ ；线性动态范围内的精密度（重复性的相对标准偏差 *RSD*）一般应 $\leq 25.0\%$ 。

6.2 试样检测数据汇总统计

设置初始浓度为 50 ng/μL 的产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体基因组 DNA 拷贝数比值为 5%、1%、0.1% 的 3 个含量样品进行测试，每个含量样品设置 3 个平行子样，每个子样重复测试 3 次 PCR，计算每个含量样品各平行子样的 DP202216 转化体特异性序列与玉米内标准基因 *zSSIb* 拷贝数平均值的比值（表 2-16）。

$$\bar{c}_k = \frac{\bar{c}_{1,k}}{\bar{c}_{2,k}} \times 100 \dots \dots \dots (4)$$

式中：

$\bar{c}_k$ —平行子样 *k* 各重复 DP202216 转化体序列与玉米内标准基因的拷贝数浓度平均值的比值，单位为百分号（%）。其中，下标 *k*—各平行子样的顺序号，分别记为 1、2、3。

$\bar{c}_{1,k}$ —平行子样 *k* 各重复 DP202216 转化体特异性序列拷贝数浓度平均值。

$\bar{c}_{2,k}$ —平行子样 *k* 各重复玉米内标准基因 *zSSIb* 拷贝数浓度平均值。

按照上述公式，计算每个含量样品各平行子样的 DP202216 转化体特异性序列与玉米内标准基因拷贝数平均值的比值，每个样品设 3 个平行子样、每个子样重复 3 次 PCR，统计汇总见表 2-16。

表 2-16 试样各子样拷贝数比值

样品 标称 值	测定序 列拷贝 数及其 比值	平行子样 3 次重复转化体拷贝数平均值与内标准基因拷贝数平均值比值								
		子样 1			子样 2			子样 3		
		重复 1	重复 2	重复 3	重复 1	重复 2	重复 3	重复 1	重复 2	重复 3
5.0%	DP2022 16	2758.00	2693.00	2850.00	2651.00	2683.00	2554.00	2693.00	2794.00	2680.00
	$\pm SSIIb$	56100.0 0	54860.0 0	51030.0 0	61480.0 0	60890.0 0	61220.0 0	59560.0 0	56730.0 0	58470.0 0
	平均值 比值	5.12%			4.30%			4.67%		
1.0%	DP2022 16	617.20	527.00	622.20	534.90	564.70	559.30	607.40	626.90	617.80
	$\pm SSIIb$	58270.0 0	55050.0 0	53900.0 0	62550.0 0	59710.0 0	60300.0 0	59100.0 0	56410.0 0	53900.0 0
	平均值 比值	1.06%			0.91%			1.09%		
0.1%	DP2022 16	43.87	49.67	41.14	59.64	54.06	60.16	54.54	65.36	66.60
	$\pm SSIIb$	52020.0 0	50680.0 0	51010.0 0	64250.0 0	62260.0 0	61120.0 0	63660.0 0	62570.0 0	60330.0 0
	平均值 比值	0.09%			0.09%			0.10%		

6.3 正确度和精密度分析

6.3.1 正确度计算方法

计算各含量样品 3 个平行子样、每个子样 3 次重复测量的平均值（3 个平行子样转基因含量的平均值）与标称值的相对偏倚 $biasR$ ，分析实时荧光 PCR 定量检测方法的正确度，即：

$$\dots biasR = \frac{\bar{c} - c_E}{c_E} \times 100 \dots \quad (5)$$

式中：

$biasR$ 一试样检测数据平均值与其标称值的相对偏倚（相对偏差），单位为百分号（%）。

$\bar{c}$ 一试样 3 个平行子样 3 次重复检测数据平均值（3 个平行子样转基因含量的平均值）。

c_E 一试样预期值。

6.3.2 精密度计算方法

计算每个试样 3 个平行子样的转基因含量值（每个平行子样 3 次重复的转化体拷贝数浓度平均值除以内标准基因拷贝数浓度平均值的比值），采用极差法计算 3 个平行子样检测数据的标准差 s ，然后计算 3 个平行子样检测数据的相对标准差 sR ，分析实时荧光 PCR 定量检测方法的精密度，即：

$$\dots s = \frac{\bar{c}_{max} - \bar{c}_{min}}{f} \dots \quad (6)$$

$$\dots sR = \frac{s}{\bar{c}} \times 100 \dots \quad (7)$$

式中：

s 一试样设置 3 个平行子样，每个子样重复 3 次 PCR，3 个子样检测数据的标准差。

$\bar{c}_{max}$ 一3 个子样各自转化体拷贝数浓度平均值除以内标准基因拷贝数浓度平均值的比值的最大值；

$\bar{c}_{min}$ 一3 个子样各自转化体拷贝数浓度平均值除以内标准基因拷贝数浓度平均值的比值的比值的最小值；

f 一极差系数（f 因子），当重复 $n=3$ 时， $f=1.693$ 。

sR 一试样设置 3 个平行子样，每个子样重复 3 次，3 个子样检测数据的相对标准差。

$\bar{c}$ 一试样设置 3 个平行子样，每个子样 3 次重复，所有子样检测数据平均值（每个子样的转基因含量为各自转化体拷贝数浓度平均值除以内标准基因拷贝数浓度平均值的比值，3 个子样比值的平均即为 $\bar{c}$ ）。

6.3.3 正确度和精密度计算结果

将表 2-16 的计算结果汇总成表 2-17 如下：

表 2-17 DP202216 转化体实时荧光 PCR 检测定量方法的正确度和精密度测试结果

含量标称值	各平行子样转基因含量			平均值	相对偏倚	标准差 s	相对标准差 sR
	子样 1	子样 2	子样 3				
5.0%	5.12%	4.30%	4.67%	4.70%	6.04%	0.49%	10.41%
1.0%	1.06%	0.91%	1.09%	1.02%	1.94%	0.11%	10.69%
0.1%	0.09%	0.09%	0.10%	0.09%	6.58%	0.01%	7.81%

6.3.4 正确度和精密度结果判定

表 2-17 结果显示，3 个含量样品测量总平均值与标称值的相对偏倚 $biasR$ 的绝对值分别为 6.04%、1.94%和 6.58%，在允许的 $\pm 25\%$ 区间内，表明 DP202216 转化体荧光定量 PCR 方法测量结果具有良好的正确度；3 个含量样品的重复性相对标准差 sR 分别为 10.41%、10.69%和 7.81%，均小于规定的 25%，表明 DP202216 转化体荧光定量 PCR 方法测量结果具有良好的精密度。

7. 检出限（LOD）和定量限（LOQ）的测试

7.1 检出限（LOD）

同方法一的 5。

7.2 定量限（LOQ）

7.2.1 定量限判定标准

根据农业部 2259 号公告—5—2015 等标准规定，转基因检测方法的定量限应不高于目标

浓度（转基因的标识阈值）的 1/10。由于我国目前法律尚未规定转基因的标识阈值，因此本方法制定时的目标浓度参考欧盟阈值 0.9%，将目标浓度设定为 1%，因此确定了定量限不高于 0.1%。

7.2.2 定量限的初步测试样品设定要求

定量限测试时，在 100 ng 基因组 DNA 的体系中，样品的设置必须包含的 3 个样品为：（1）相对含量为转基因拷贝数含量浓度 0.1%；（2）绝对含量为转化体基因组 DNA 小于 100 个拷贝的；（3）绝对含量为转化体基因组 DNA 为 1 个拷贝。（4）空白对照。其他样品浓度在 1-100 拷贝之间选择。共测试至少 6 个样品。

7.2.3 测试样品的初始化浓度

将提取的 DP202216 转化体及其非转基因对照的基因组 DNA 用 $0.1 \times TB$ 稀释成 $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ （换算成拷贝数浓度 $20000 \text{ copies}/\mu\text{L}$ ），确保体系中加入 $2 \mu\text{L}$ 样品后 DNA 模板量为 100 ng。

7.2.4 定量限测试样品的配制、初步测试和初始化浓度测定值的准确性判断

将 $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 的产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 基因组 DNA，用 $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 的非转基因玉米基因组 DNA，梯度稀释成 DP202216 转化体拷贝数比值为 0.20%、0.10%、0.05%、0.025%、0.0125%、0.0025% 的 6 个测试样品，反应体系中加入 $2 \mu\text{L}$ 测试样品，对应体系中转化体拷贝数分别为 80、40、20、10、5、1 copies。每个测试样品进行 10 个反应。

模板浓度的准确性判断（包括转化体及其受体对照）：当模板量为 1 copy 时，10 个反应中有 2-5 个阴性反应，表明梯度稀释的模板 DNA 浓度大致准确，否则重新进行 DNA 模板浓度测定及稀释。

将测试样品的 C_t 值带入标准曲线，计算每个稀释样品的拷贝数浓度。按 6.3 的方法进行测量结果的精密度和正确度分析，按照公式（5）计算每个测试样品 10 次 PCR 重复检测数据平均值与标称值的相对偏倚 biasR ，按照贝塞尔公式计算每个测试样品 10 次 PCR 重复检测数据的标准差 s 和相对标准差 sR 。

测试结果如图 2-16 和表 2-18 所示，当模板量为 1 copy 时，10 个反应中有 4 个阴性反应；当模板量为 80、40、20、10、5 copies 时，10 个反应均能得到扩增曲线，其中模板量为 80、40、20、10 copies 时，其正确度和精密度分别为 2.79%和 10.31%、1.26%和 21.57%、19.12%和 22.18%、13.34%和 32.52%。

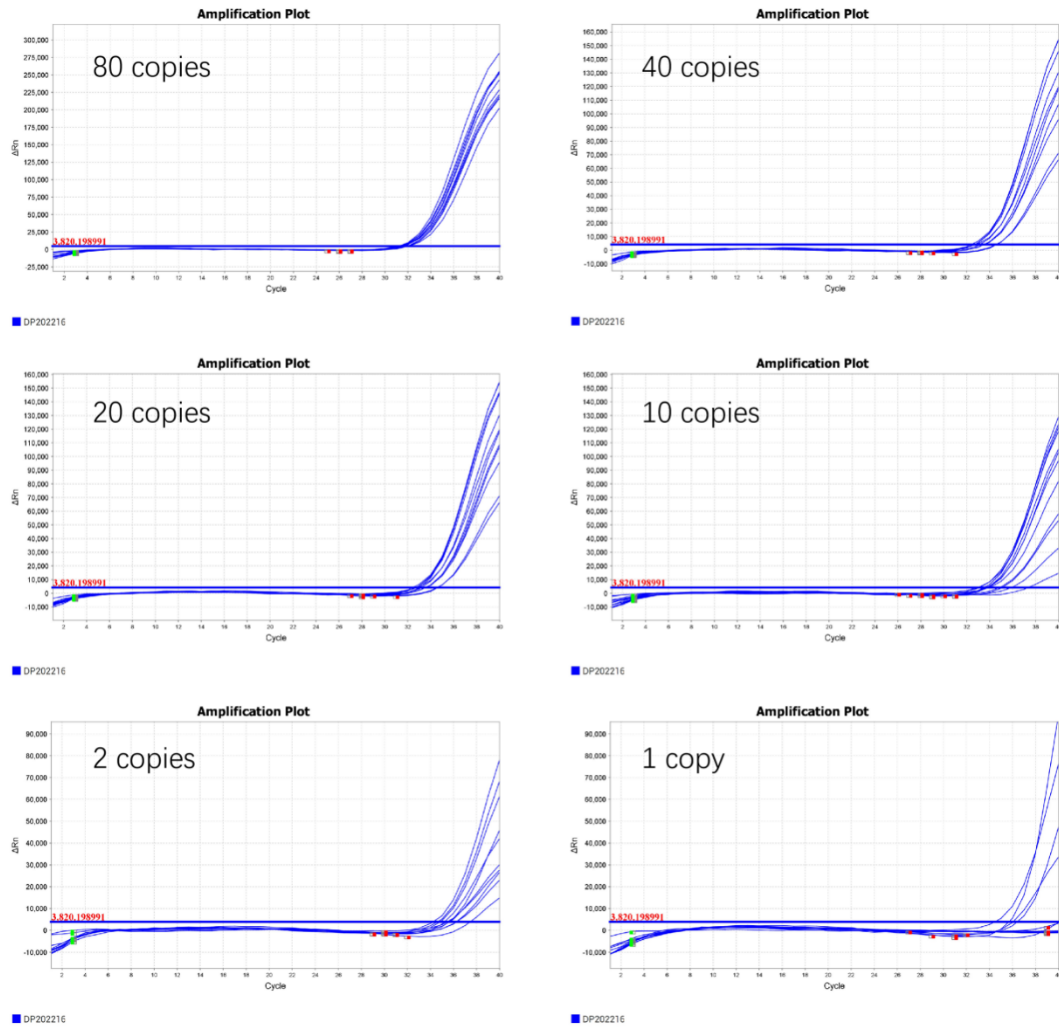


图 2-16 DP202216 转化体定量限初步测试扩增图

表 2-18 DP202216 转化体定量限初步测试结果

重复	0.20%/80 copies 模板量			0.10%/40 copies 模板量		
	转化体拷贝数 (copies)	<i>zSSIIB</i> 拷贝数 (copies)	百分比 (%)	转化体拷贝数 (copies)	<i>zSSIIB</i> 拷贝数 (copies)	百分比 (%)
1	78.72	39840.00	0.1976	43.14	50050.00	0.0862
2	63.01	34240.00	0.1840	51.54	51790.00	0.0995
3	84.23	42400.00	0.1987	50.81	50010.00	0.1016
4	64.20	37800.00	0.1698	49.24	50760.00	0.0970
5	82.78	38870.00	0.2130	41.97	47810.00	0.0878
6	89.93	37740.00	0.2383	41.14	47090.00	0.0874
7	89.41	41250.00	0.2168	69.35	46080.00	0.1505
8	83.45	39420.00	0.2117	35.59	47550.00	0.0748
9	96.36	41340.00	0.2331	42.47	48510.00	0.0875
10	75.02	38890.00	0.1929	52.53	45670.00	0.1150
平均值	80.71	39179.00	0.2060	47.78	48532.00	0.0984
<i>biasR</i>	—	—	2.79%	—	—	1.26%
s	—	—	0.02%	—	—	0.02%

sR	—	—	10.31%	—	—	21.57%
重复	0.05%/20 copies 模板量			0.025%/10 copies 模板量		
	转化体拷贝数 (copies)	zSSIIb 拷贝数 (copies)	百分比 (%)	转化体拷贝数 (copies)	zSSIIb 拷贝数 (copies)	百分比 (%)
1	28.00	40340.00	0.0694	10.69	46710.00	0.0229
2	24.03	32960.00	0.0729	14.25	49200.00	0.0290
3	26.94	39220.00	0.0687	12.81	46040.00	0.0278
4	25.33	38090.00	0.0665	6.96	47840.00	0.0146
5	20.86	36730.00	0.0568	9.88	39060.00	0.0253
6	16.60	36240.00	0.0458	4.26	44200.00	0.0096
7	24.58	38630.00	0.0636	7.50	42800.00	0.0175
8	22.27	36230.00	0.0615	8.35	44360.00	0.0188
9	10.56	36690.00	0.0288	14.37	44470.00	0.0323
10	22.23	36080.00	0.0616	8.45	44880.00	0.0188
平均值	22.14	37121.00	0.0596	9.75	44956.00	0.0217
biasR	—	—	19.12%	—	—	13.34%
s	—	—	0.01%	—	—	0.01%
sR	—	—	22.18%	—	—	32.52%
重复	0.0125%/5 copies 模板量			0.0025%/1 copy 模板量		
	Cr 值			Cr 值		
1	37.23			38.84		
2	36.83			37.79		
3	36.88			39.61		
4	36.66			38.15		
5	36.62			/		
6	36.00			/		
7	36.18			/		
8	37.52			/		
9	35.66			/		
10	38.41			/		

根据数据分析结果，初步确定产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体拷贝数比值为 0.1% 的模板浓度（体系中转转化体为 40 个拷贝数）为能够可靠定量（10 个反应均为阳性，且精密度和正确度分析结果符合要求）的最低浓度。

7.2.5 定量限的确认

对通过初步测试的 DP202216 转化体拷贝数比值为 0.1%（在 PCR 检测反应体系中加入 100 ng DNA 模板进行测算）定量限的样品，至少进行 15 个反应的定量测试，计算检测数据的相对偏倚（*biasR*）和相对标准差（*sR*）。按照公式（5）计算测试样品 15 次 PCR 重复检测数据平均值与标称值的相对偏倚 *biasR*，按照贝塞尔公式计算测试样品 15 次 PCR 重复检测数据的标准差 *s* 和相对标准差 *sR*。

测试结果如表 2-19 所示，结果显示，偏倚和相对标准偏差均 ≤25%，在允许范围之内，即确定 DP202216 转化体荧光定量 PCR 方法的定量限可达到 0.1%，满足欧盟标准的要求。

本方法研制中 PCR 检测反应体系中 DNA 模板量为 100 ng，确定本方法的检出限 (LOD)

为 0.05%，相当于反应体系中含有约 20 拷贝的产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体特异性序列；确定定量限为 0.1%，相当于反应体系中含有约 40 拷贝的产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体特异性序列。

表 2-19 DP202216 转化体实时荧光 PCR 方法定量限测试结果

重复	转化体 拷贝数 (copies)	<i>ZSSIIIb</i> 拷贝数 (copies)	百分比/%
重复 1	45.08	56270.00	0.0801
重复 2	43.99	52930.00	0.0831
重复 3	33.99	50910.00	0.0668
重复 4	39.91	52190.00	0.0765
重复 5	60.84	48680.00	0.1250
重复 6	35.69	40140.00	0.0889
重复 7	45.71	69480.00	0.0658
重复 8	44.46	53780.00	0.0827
重复 9	42.56	54250.00	0.0785
重复 10	36.96	53070.00	0.0696
重复 11	33.70	55090.00	0.0612
重复 12	34.49	51500.00	0.0670
重复 13	48.24	53660.00	0.0899
重复 14	43.37	53010.00	0.0818
重复 15	51.90	50630.00	0.1025
平均值	42.73	53039.33	0.0806
相对偏倚 <i>biasR</i>	—	—	19.44%
标准差 <i>s</i>	—	—	0.02%
相对标准差 <i>sR</i>	—	—	20.25%

8. 稳健性测试

8.1 稳健性要求

稳健性 (Robustness) 是指 PCR 反应的条件, 包括操作者、试剂盒厂家、PCR 设备、PCR 反应体系、引物/探针浓度、PCR 退火温度等因素发生改变, 依然能够获得可接受的定量检测结果。在定量检测过程中, 各实验室通常严格执行标准, 按标准规定配置 PCR 反应体系, 并在规定的退火温度下进行 PCR 扩增。但一个标准方法在实施过程中, 各实验室会选用不同的操作者、不同厂家生产的荧光 PCR 试剂盒、不同的荧光 PCR 仪, 进行试样的定量检测, 因此需要针对操作者、荧光 PCR 试剂盒、荧光 PCR 仪等因素进行方法的稳健性考察。

8.2 稳健性测试

用转基因含量为定量限的样品进行荧光定量 PCR 方法的稳健性测试。每改变一个因素, 进行一次重复实验, 各因素配组设计详见表 2-20。每次重复实验设置 3 个平行子样, 每个子样进行 3 次 PCR 重复。根据标准曲线和样品的 Ct 值, 计算各反应样品的拷贝数及拷贝数比

值（表 2-20）。

表 2-20 DP202216 转化体实时荧光 PCR 方法稳健性测试结果

因素	平行子样 3 次重复转化体拷贝数平均值与内标准基因拷贝数平均值比值			平均值	相对偏倚	标准差 s	相对标准差 RSDr
	子样 1	子样 2	子样 3				
其他操作者	0.10%	0.11%	0.12%	0.11%	6.27%	0.01%	11.87%
其他荧光 PCR 试剂盒	0.11%	0.12%	0.10%	0.11%	9.05%	0.01%	6.03%
其他荧光 PCR 仪	0.10%	0.10%	0.10%	0.10%	2.18%	0.002%	1.65%
注：各因素配组设计说明：已完成的准确性测试的操作者记为 A1、用的荧光 PCR 试剂盒记为 B1、用的荧光 PCR 仪为记 C1，各因素配组为 A1+B1+C1。换 1 位其他操作者为 A2，各因素配组为 A2+B1+C1；换 1 种其他荧光 PCR 试剂盒为 B2，各因素配组为 A1+B2+C1；换 1 台荧光 PCR 仪为 C2，各因素配组为 A1+B1+C2。							

8.3 稳健性结果判定

分析各重复实验检测数据的相对标准差 sR 和相对偏倚 biasR（表 2-20）。计算方法同 6.3.1 和 6.3.2。其他操作者检测数据的相对标准差 sR 为 11.87%，相对偏倚 biasR 为 6.27%；选用其他荧光定量 PCR 试剂盒，检测数据的相对标准差 sR 为 6.03%，相对偏倚 biasR 为 9.05%；选用其他荧光定量 PCR 仪，检测数据的相对标准差 sR 为 1.65%，相对偏倚 biasR 为 2.18%。结果表明，在实际检测过程中，改变操作者、荧光定量 PCR 试剂盒、荧光定量 PCR 仪等因素，DP202216 转化体实时荧光 PCR 方法检测结果的精密度和正确度均满足要求，定量结果准确可靠，具有良好的稳健性。

方法三、产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体特异性普通 PCR 定性方法建立

1. 引物设计与确定

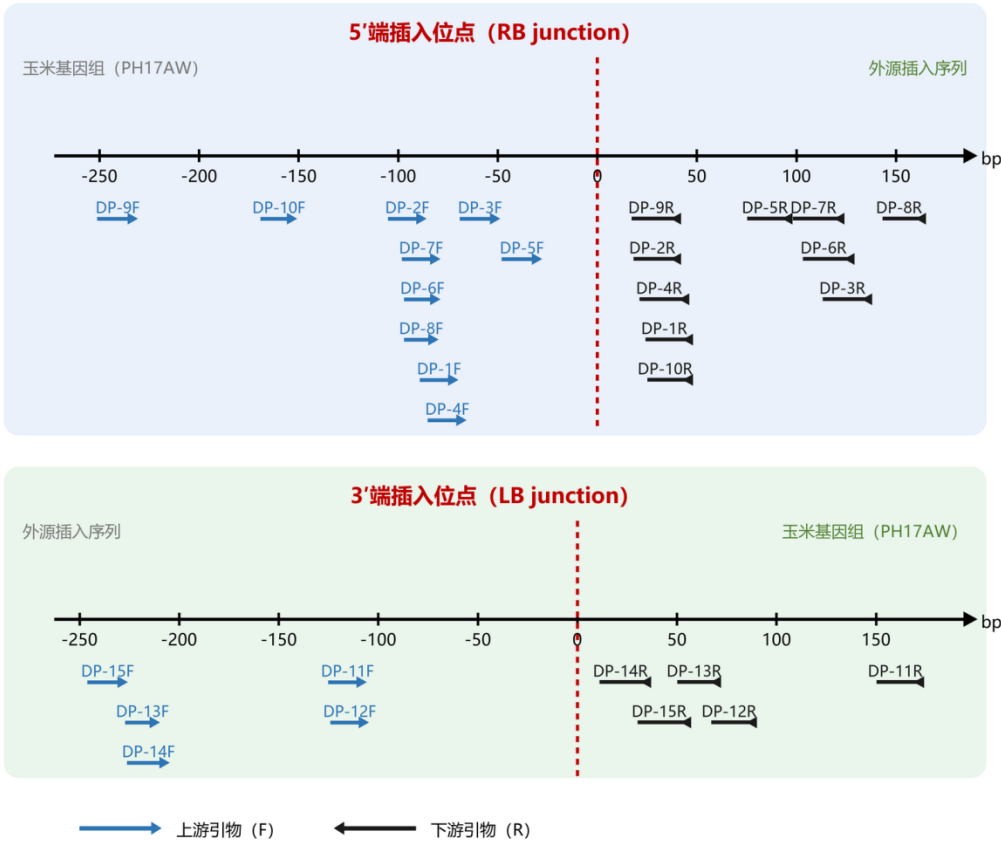
1.1 引物设计

我们根据研发者提供的产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 的 RB（5'端）和 LB（3'端）两端侧翼序列信息，利用 NCBI 在线 Primer-BLAST 软件，综合考虑核苷酸序列 GC 含量和引物 Tm 值，针对插入位置的右边界（RB）即 5'端和左边界（LB）即 3'端，分别设计多条转化体特异引物，共组成 15 对引物组合（5'端 10 对、3'端 5 对），引物序列信息如表 2-21。

表 2-21 普通 PCR 定性检测方法引物信息表

上游引物	序列 (5' -3')	下游引物	序列 (5' -3')
DP-1F	CCCAGACCGAATGATTGCCT	DP-1R	AGATTGTCGTTTCCCGCCTT
DP-2F	TGGTACTGAGGACGAACCCA	DP-2R	TCGTTTCCCGCCTTCAGTTT
DP-3F	CGCCCTCACCACCTATTTCTT	DP-3R	GCGGTTCTGTCAGTTCCAAAC
DP-4F	GACCGAATGATTGCCTCGCC	DP-4R	ATTGTCGTTTCCCGCCTTCAG
DP-5F	CCCATCTGAGGTCTGCACTCT	DP-5R	GTCATCGGCGGGGGTCATA
DP-6F	AGGACGAACCCAGACCGAA	DP-6R	TCAGTTCCAAACGTAACGCGC
DP-7F	GAGGACGAACCCAGACCGAA	DP-7R	TCCAAACGTAACGCGCTTGTC
DP-8F	AGGACGAACCCAGACCGA	DP-8R	AGCTTGCTGAGTGGCTCC
DP-9F	AGAGAAATCAGACCTGCTGGC	DP-9R	TCGTTTCCCGCCTTCAGTTTA
DP-10F	GAACAGCGTGCAGCAAAGG	DP-10R	AGATTGTCGTTTCCCGCCT
DP-11F	GGCCTCTTGCTCTTCAGGAT	DP-11R	TCCATCTCTTACCGGGGTG
DP-12F	GCCTCTTGCTCTTCAGGATG	DP-12R	GGTCCCATTGTTGGTGGT
DP-13F	GCTCGTGTCCAAGCGTCA	DP-13R	TACCTGACGTGCATGCGG
DP-14F	CTCGTGTCCAAGCGTCACTTAC	DP-14R	CTGATCCGCGGTTTGAACACAA
DP-15F	TAGGTTCTAGCTCAAGCCGC	DP-15R	CGGGGTCGCTTTATTGTTTCTG

引物具体位置如图 2-18 所示。



注：箭头方向表示引物延伸方向 (5'→3')；坐标为相对于插入位点的碱基位置 (bp)。
RB端0为插入位点前1个玉米基因组碱基；LB端0为插入位点最后1个碱基。

图 2-18 产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体普通 PCR 引物位置

根据农业部 2259 号公告—4—2015《转基因植物及其产品成分检测定性 PCR 方法制定指南》要求，普通 PCR 产物长度宜为 120 bp~300 bp，应用上述设计的转化体特异引物组成 15 对引物组合，预期扩增产物为 127 bp~299 bp，均符合要求，对这 15 对引物组合进行后续试验，如表 2-22 所示。

表 2-22 DP202216 转化体普通 PCR 定性检测方法候选引物组合信息表

序号	组合	产物大小	序号	组合	产物大小
1	DP-1F/DP-1R	133	9	DP-9F/DP-9R	289
2	DP-2F/DP-2R	143	10	DP-10F/DP-10R	213
3	DP-3F/DP-3R	203	11	DP-11F/DP-11R	295
4	DP-4F/DP-4R	127	12	DP-12F/DP-12R	210
5	DP-5F/DP-5R	142	13	DP-13F/DP-13R	295
6	DP-6F/DP-6R	222	14	DP-14F/DP-14R	259
7	DP-7F/DP-7R	218	15	DP-15F/DP-15R	299
8	DP-8F/DP-8R	258			

1.2 引物筛选（依据扩增强度和灵敏度）

为了使该标准与先前发布的一系列转基因检测标准相适应，方便操作，参照农业部 1861 号公告—3—2012 玉米内标准基因检测中所述的 PCR 反应体系和反应程序，对自行设计的 15 对引物进行引物初筛。PCR 扩增反应体系见表 2-23，反应程序为：94℃变性 5 min；94℃变性 30 s，58℃退火 30 s，72℃延伸 30 s，共进行 35 次循环；72℃延伸 5 min；10℃保存。

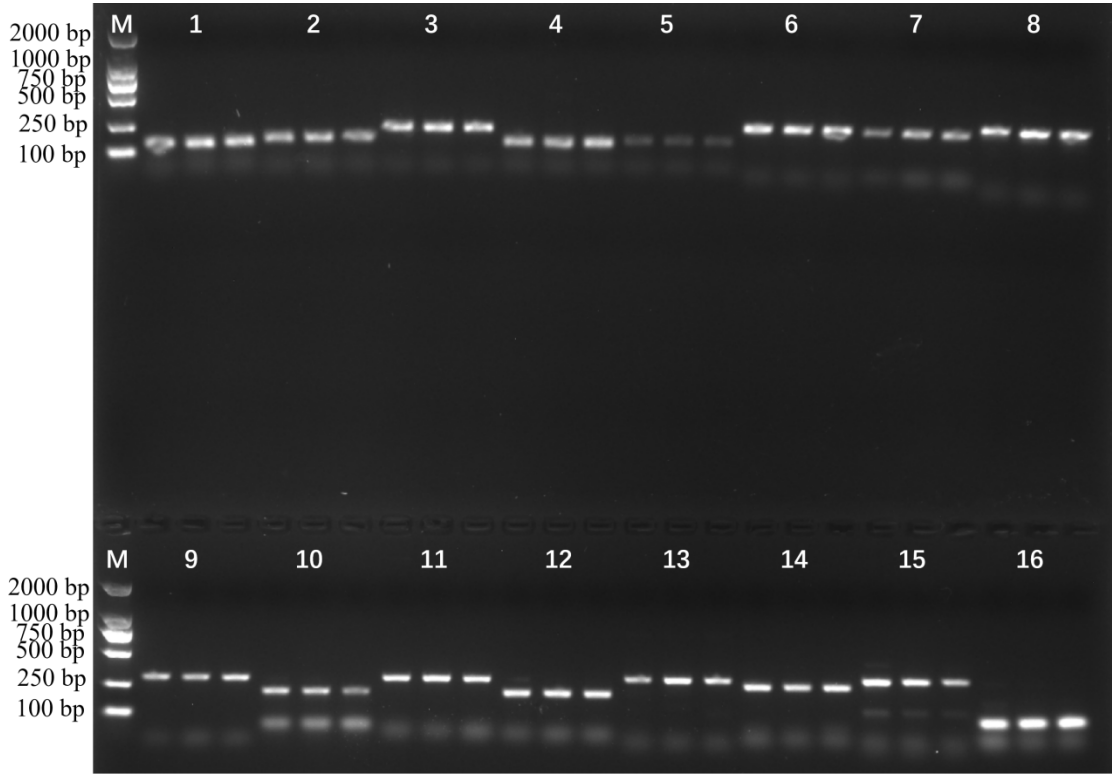
表 2-23 玉米内标准基因普通 PCR 扩增体系

试剂	终浓度	体积
ddH ₂ O		—
10×PCR 缓冲液	1×	2.5 μL
25 mmol/L 氯化镁溶液	1.5 mmol/L	1.5 μL
dNTPs 混合溶液（各 2.5 mmol/L）	0.2 mmol/L	2.0 μL
10 μmol/L zSSIb-1F	0.4 μmol/L	1.0 μL
10 μmol/L zSSIb-2R	0.4 μmol/L	1.0 μL
Taq DNA 聚合酶	0.025 U/μL	—
50 mg/L DNA 模板	4.0 mg/L	2.0 μL
总体积		25.0 μL
注 1：“—”表示体积不确定，如果 PCR 缓冲液中含有氯化镁，则不加氯化镁溶液，根据 Taq DNA 聚合酶的浓度确定其体积，并相应调整 ddH ₂ O 的体积，使反应体系总体积达到 25.0 μL。 注 2：若采用定性 PCR 试剂盒，则按试剂盒说明书的推荐用量配制反应体系，但上下游引物用量		

试剂	终浓度	体积
按表 18 执行。		
注 3：反应扩增体系可根据仪器及耗材的实际使用情况，按比例进行调整。		
注 4：此表是 1 个平行反应体系的体积，可按照实际反应的数量进行扩增体系配置。		

引物筛选样品设置为空白对照、阴性对照、1%的产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 模板 DNA、0.1%的产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 模板 DNA。通过其扩增条带亮度、特异性进行比较，选择扩增条带清晰、特异性好的引物作为后续试验验证的候选引物。

从图 2-19 中可以看出，15 对引物组合中，组合 12、13、14 和 15 出现不同程度的非特异性扩增，其余引物组合均无非特异扩增，条带单一、清晰明亮。综合考虑条带清晰度及扩增强度等因素，选择其中扩增亮度最好的组合 1、8、10、11 作为下一步特异性测试的候选引物。

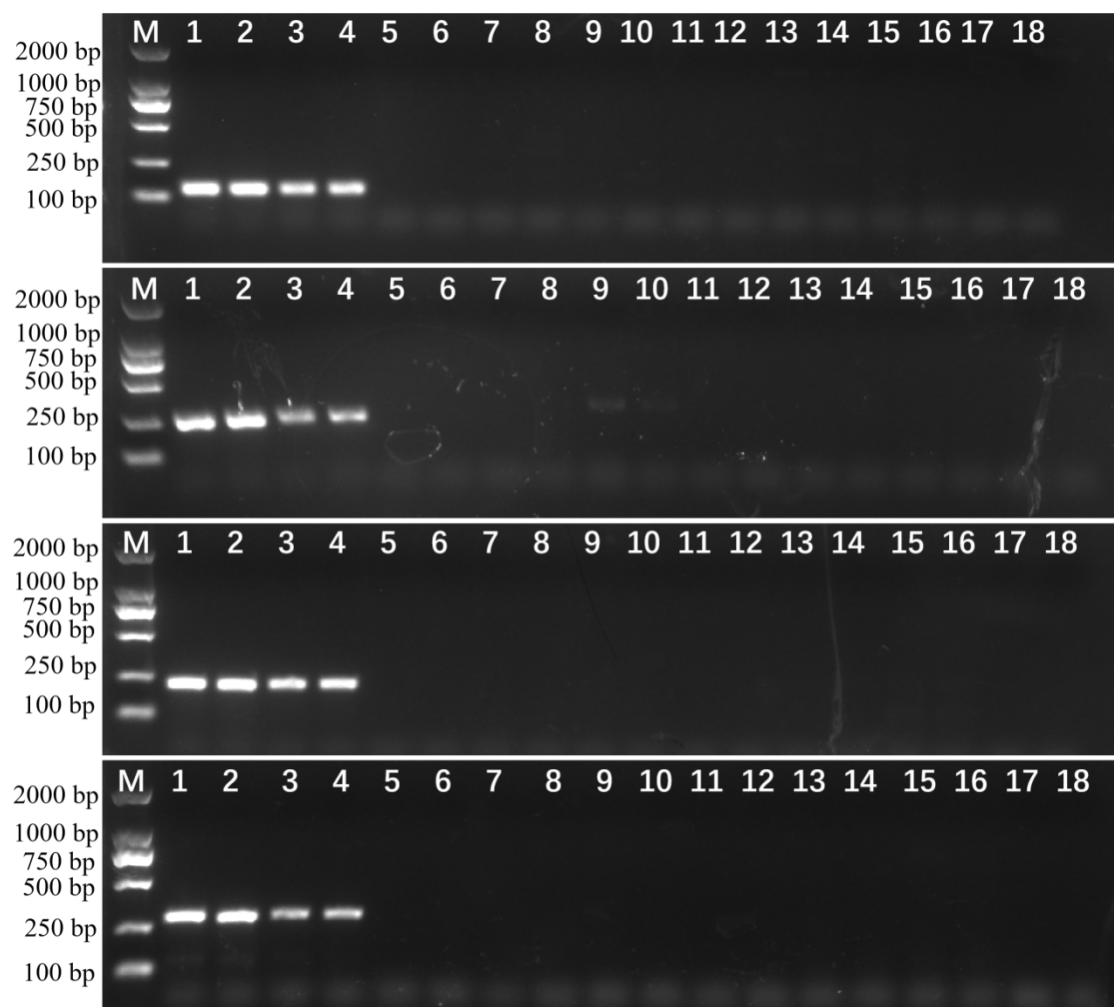


M: DL2000 分子量标准; 1: 组合 1; 2: 组合 2; 3: 组合 3; 4: 组合 4; 5: 组合 5; 6: 组合 6; 7: 组合 7; 8: 组合 8; 9: 组合 9; 10: 组合 10; 11: 组合 11; 12: 组合 12; 13: 组合 13; 14: 组合 14; 15: 组合 15; 16: *zssIIb*

图 2-19 产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 的 15 对引物初步筛选结果

从上述候选引物中选取组合 1、8、10、11，采用转基因作物主要转化体混合物、1%的产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体基因组 DNA、DP202216 非转基因受体玉米基因组 DNA 对这 4 对引物组合进行特异性测试，结果表明（图 2-20），引物组合 1、8、10、11 均具有良好的特异性，仅从产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 样品中获得预期的扩增。其中组合 1 的扩增条带最亮，最终选择引物组合 1 作为候选引物，进行下一步扩增条件和反

应体系优化。



M: DL2000 分子量标准; 1-2: DP202216 转基因玉米阳性样品; 3-4: DP202216 含量 1%样品; 5-6: 空白对照; 7-8: 阴性对照; 9-10: 转基因大豆混合样品; 11-12: 转基因水稻混合样品; 13-14: 转基因棉花混合样品; 15-16: 转基因油菜混合样品; 17-18: 其他转基因玉米混合样品。

图 2-20 DP202216 转化体 4 对遴选引物组合筛选特异性测试

1.3 引物的确定

根据测试结果，确定产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体特异性序列普通 PCR 检测使用的引物（引物组合 1，即 DP202216-F/DP202216-R）：

DP202216-F: 5'-CCCAGACCGAATGATTGCCT-3';

DP202216-R: 5'-AGATTGTCGTTTCCCGCCTT-3'。

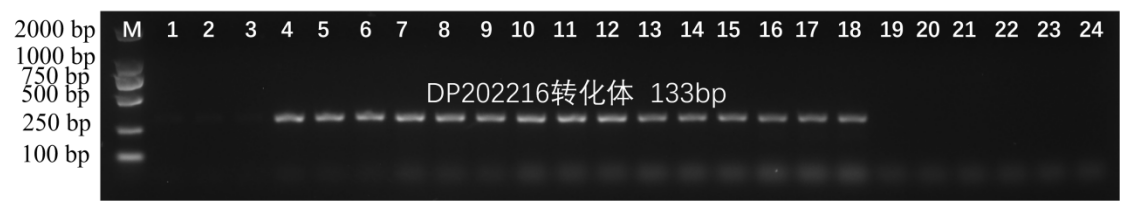
预期扩增片段大小为 133 bp。

2. PCR 扩增反应条件的优化

2.1 PCR 扩增反应条件的优化

以 1%浓度的产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 基因组 DNA 为模板，选择与玉米内

标准基因相同的扩增程序，设置 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、0.2 $\mu\text{mol/L}$ 、0.4 $\mu\text{mol/L}$ 、0.6 $\mu\text{mol/L}$ 、0.8 $\mu\text{mol/L}$ 、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 6 种引物浓度梯度进行 PCR 反应的扩增。结果如图 2-21 所示，兼顾考虑统一 PCR 反应体系，确定检测引物浓度为 0.4 $\mu\text{mol/L}$ ，退火温度与内标准基因一致为 58℃。



M: DL2000 分子量标准; 1-3: 0.1 $\mu\text{mol/L}$; 4-6: 0.2 $\mu\text{mol/L}$; 7-9: 0.4 $\mu\text{mol/L}$; 10-12: 0.6 $\mu\text{mol/L}$; 13-15: 0.8 $\mu\text{mol/L}$; 16-18: 1 $\mu\text{mol/L}$; 19-21: ; 阴性对照; 22-24: 空白对照

图 2-21 产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体特异性普通 PCR 定性方法反应体系的优化

2.2 PCR 扩增反应条件的确定

经优化最终确立了产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体特异性普通 PCR 扩增体系，各项成分按表 2-24 所述添加。普通 PCR 扩增反应程序为：94℃变性 5 min；94℃变性 30 s，58℃退火 30 s，72℃延伸 30 s，共进行 35 次循环；72℃延伸 5 min；10℃保存。

表 2-24 产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体特异性序列普通 PCR 扩增体系

试剂	终浓度	体积
ddH ₂ O		—
10×PCR 缓冲液	1×	2.5 μL
25 mmol/L 氯化镁溶液	1.5 mmol/L	1.5 μL
dNTPs 混合溶液（各 2.5 mmol/L）	0.2 mmol/L	2.0 μL
10 $\mu\text{mol/L}$ DP202216-F	0.4 $\mu\text{mol/L}$	1.0 μL
10 $\mu\text{mol/L}$ DP202216-R	0.4 $\mu\text{mol/L}$	1.0 μL
Taq DNA 聚合酶	0.025 U/ μL	—
50 mg/L DNA 模板	4.0 mg/L	2.0 μL
总体积		25.0 μL
注 1：“—”表示体积不确定，如果 PCR 缓冲液中含有氯化镁，则不加氯化镁溶液，根据 Taq DNA 聚合酶的浓度确定其体积，并相应调整 ddH ₂ O 的体积，使反应体系总体积达到 25.0 μL 。		
注 2：若采用定性 PCR 试剂盒，则按试剂盒说明书的推荐用量配制反应体系，但上下游引物用量按表 6-19 执行。		
注 3：反应扩增体系可根据仪器及耗材的实际使用情况，按比例进行调整。		
注 4：此表是 1 个平行反应体系的体积，可按照实际反应的数量进行扩增体系配置。		

3. 特异性测试

3.1 测试样品的设置

选用不同作物及其主要的商业化转化体对产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 引物组合进行特异性测试，样品设置包括 3 份对照（空白、阴性和阳性样品）和 7 份测试样品（常见转基因作物混合样），具体样品信息见表 2-25。

表 2-25 特异性测试样品

序号	样品名称	样品内容	样品状态	样品性质
1	空白对照	用水作为空白对照	——	对照
2	阴性对照	DP202216 非转基因受体玉米	基因组 DNA 溶液	
3	阳性对照	转化体拷贝数分数为 1%的产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 基因组 DNA	基因组 DNA 溶液	
4	1% DP202216 转化体	转化体拷贝数分数为 1%的产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 基因组 DNA	基因组 DNA 溶液	测试样品
5	其他转基因玉米混合样	Bt11、Bt176、MON810、MON863、GA21、NK603、T25、TC1507、MON89034、MON88017、59122、MIR604、3272、MON87460、DAS40278-9、4114、MON87427、5307、DBN9858、ND207、DBN9501、瑞丰 125、DBN9936、MON87411、MZIR098、浙大瑞丰 8、BFL4-2、nCX-1，28 个转化体混合制成 1 个样品，每个转化体质量分数为 1%	粉末	
6	转基因大豆混合样	GTS40-3-2、MON89788、A5547-127、A2704-12、356043、305423、CV127、MON87701、MON87708、MON87769、MON87705、FG72、DAS81419-2、DAS-44406-6、MON87751、SHZD3201、CAL16、中黄 6106、DBN9004，19 个转化体混合制成 1 个样品，每个转化体质量分数为 1%	粉末	
7	转基因水稻混合样	TT51-1、KF-6、KMD-1、M12、KF-8、KF-2、G6H1、T1C-19，8 个转化体混合制成一个样品，每个转化体质量分数为 1%	粉末	
8	转基因油菜混合样	MS1、MS8、RF1、RF2、RF3、T45、Oxy-235、Topas19/2、MON88302、73496，10 个转化体混合制成 1 个样品，每个转化体质量分数为 1%	粉末	
9	转基因棉花混合样	MON1445、MON531、MON15985、LLCOTTON25、MON88913、GHB614、COT102，7 个转化体混合制成 1 个样品，每个转化体质量分数为 1%	粉末	
10	非转基因玉米混合样	多种非转基因玉米等量混合制成的样品	粉末	

3.2 引物的特异性测试

分别提取特异性测试样品的 DNA 进行测试，测试结果显示，在 3~18 号特异性测试样品中，其对应的内标准基因均能得到有效扩增，如图 2-22A；DP202216 引物组合 1 仅从阳性对照和 1%DP202216 转化体样品中扩增到预期大小 DNA 片段，而在其他样品中均未扩增到预期大小的条带，如图 2-22B。表明 DP202216 引物组合 1 具有良好的特异性，可作为产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 普通 PCR 定性检测方法的最终引物。



M: DL2000 分子量标准; 1-2: DP202216 转基因玉米阳性样品; 3-4: DP202216 含量 1%样品; 5-6: 空白对照; 7-8: 阴性对照; 9-10: 转基因大豆混合样品; 11-12: 转基因水稻混合样品; 13-14: 转基因棉花混合样品; 15-16: 转基因油菜混合样品; 17-18: 其他转基因玉米混合样品。

图 2-22 产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体检测候选引物的扩增特异性测试

4. 靶标序列测序验证

对引物 DP202216-F/DP202216-R 扩增的片段进行测序验证，结果与研发单位提供的分子特征信息无差异，序列比对结果见图 2-23。

```

Query      1  CCCAGACCGAATGATTGCCTCGCCCTCACCACCTATTTCTTCCCATCTGAGGTCTGCACT  60
          |||
Sbjct     1194 CCCAGACCGAATGATTGCCTCGCCCTCACCACCTATTTCTTCCCATCTGAGGTCTGCACT 1253
Query      61  CTCACCGGTAGTACAGCACAAACAACACACTCAAACACTGATAGTTTAAACTGAAGGCGG 120
          |||
Sbjct     1254 CTCACCGGTAGTACAGCACAAACAACACACTCAAACACTGATAGTTTAAACTGAAGGCGG 1313
Query     121  GAAACGACAATCT 133
          |||
Sbjct    1314 GAAACGACAATCT 1326
  
```

注: Query: PCR 产物测序序列; Sbjct: 公司提供 DP202216 序列
序列中 1~90 bp 为玉米基因组部分序列, 91~133 bp 为外源插入片段部分序列

图 2-23 引物组合 DP202216-F/ DP202216-R 扩增序列测序比对验证

普通 PCR 扩增产物的靶标序列如下:

```

1  CCCAGACCGAATGATTGCCTCGCCCTCACCACCTATTTCTTCCCATCTGAGGTCTGCACT
61  CTCACCGGTAGTACAGCACAAACAACACACTCAAACACTGATAGTTTAAACTGAAGGCGG
121  GAAACGACAA TCT
  
```

序列中 1~90 bp 为玉米基因组部分序列, 91~133 bp 为外源插入片段部分序列, 其中 5' 端划线部分为普通 PCR 方法引物 DP202216-F 的序列, 3' 端划线部分为普通 PCR 方法引物 DP202216-R 的反向互补序列。

5. 检出限的测试

5.1 检出限的要求

依据 ENGL-GMFF 2015 对检出限测试的要求, 根据检出限 (灵敏度) 测试结果, 确定能够连续 60 次稳定检出的最低浓度作为该方法的检出限。

5.2 检出限的初步测试样品设定要求

检出限测试时，在 100 ng 基因组 DNA 的体系中，样品的设置必须包含的 3 个样品为：相对含量是转基因拷贝数含量浓度是 0.1%、0.05% 和空白对照。

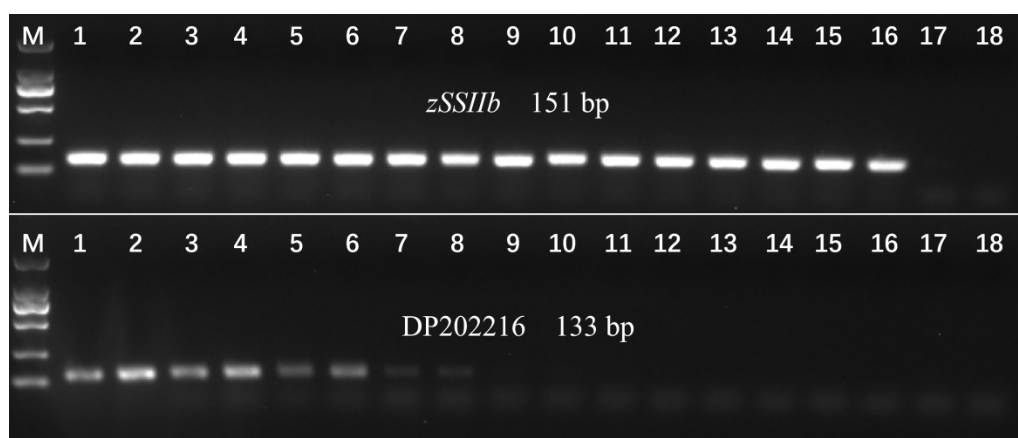
5.3 测试样品的初始化浓度

将提取的 DP202216 转化体及其非转基因对照的基因组 DNA 用 $0.1 \times \text{TE}$ 稀释成 $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ （并换算成拷贝数浓度 $20000 \text{ copies}/\mu\text{L}$ ），确保体系中加入 $2 \mu\text{L}$ 样品后 DNA 模板量为 100 ng。

5.4 检出限测试样品的配制、初步测试

将 $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 的 DP202216 转化体基因组 DNA，用 $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 的非转基因玉米基因组 DNA，梯度稀释成 DP202216 转化体拷贝数比值为 1%、0.5%、0.1%、0.05% 和 0.01% 共 5 个测试样品，对应的转化体拷贝数浓度为 200、100、20、10 和 2 $\text{copies}/\mu\text{L}$ 。反应体系中加入 $2 \mu\text{L}$ 测试样品，每个测试样品至少测试 3 个反应。

测试结果如图 2-24 所示，除空白外所有样品中，玉米内标准基因 *zSSIb* 均能得到有效扩增，如图 2-24A；引物组合 1 在拷贝数比值为 0.05% 及以上的模板中，均能扩增得到产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体预期 133 bp 的 DNA 片段，如图 2-24B。



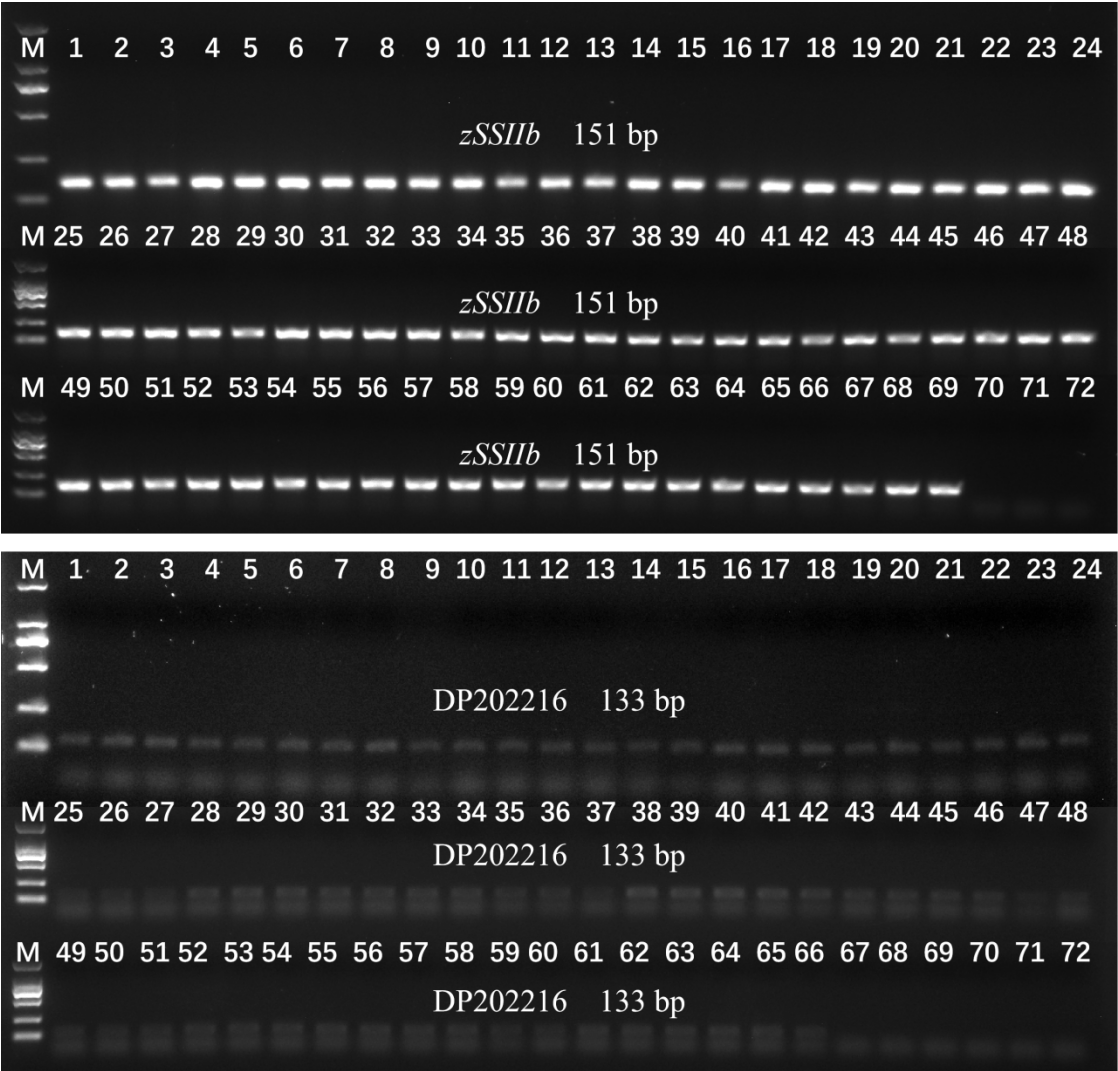
M: DL2000 分子量标准；1-2: 阳性对照；3-4: DP202216 转化体拷贝数比值 1%；5-6: DP202216 转化体拷贝数比值 0.5%；7-8: DP202216 转化体拷贝数比值 0.1%；9-10: DP202216 转化体拷贝数比值 0.05%；11-12: DP202216 转化体拷贝数比值 0.01%；13-14: DP202216 转化体拷贝数为 1 个 copy；15-16: 阴性对照；17-18: 空白对照。

图 2-24 产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体普通 PCR 方法灵敏度测试

5.5 检出限的确定

依据检出限初步测试结果，综合考虑本方法在使用时的稳定性和适用性，依据 ENGL-GMFF 2015 对检出限测试的要求，随机抽取 66 份产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体特异性序列拷贝数比值为 0.1%（依据 5.3 中测试的检出限浓度确定）的样品进行测试。

结果显示，66 份产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 拷贝数比值为 0.1%（依据 5.3 中测试的检出限浓度确定）的样品中，玉米内标准基因 *zSSIIb* 均能得到有效扩增；66 份产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 拷贝数比值为 0.1%的样品中(依据 5.3 中测试的检出限浓度确定)，引物组合 1 均能扩增得到产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体特异性序列预期 133 bp 的 DNA 片段。由此可以确定普通 PCR 方法的检出限为 0.1%（依据 5.3 中测试的检出限浓度确定），以反应体系中加入 100 ng DNA 模板进行测算，约 40 个拷贝。



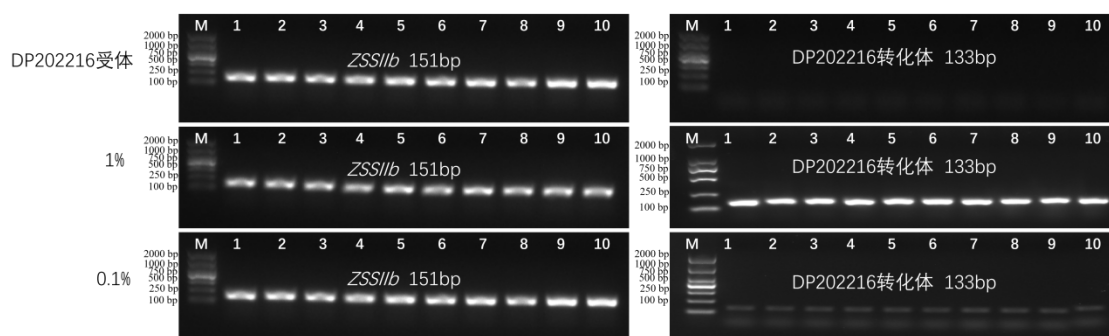
M: DL2000 分子量标准；1-66: 0.1% DP202216 玉米；67-69: 阴性对照 70-72: 空白对照；

图 2-25 产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体普通 PCR 方法检出限测试

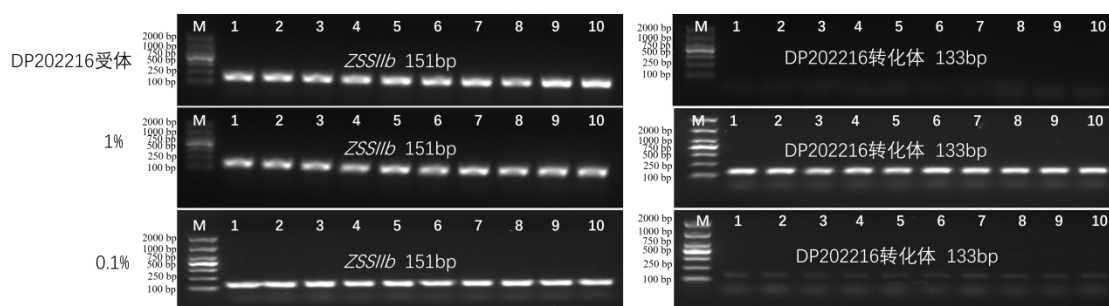
6. 稳健性测试

由两个不同操作人员，在两个不同时间段，利用两台不同的 PCR 仪，分别对 30 份不同拷贝数比值的样品进行测试，样品包括 10 份 DP202216 受体样品、10 份检出限样品、10 份拷贝数比值为 1%的样品（依据 5.4 中测试的检出限浓度确定）。测试结果（图 2-26）与预期一致，表明方法稳健性符合要求。

稳健性测试 1



稳健性测试 2



M: DL2000 分子量标准; 1-10: DP202216 受体样品、检出限样品和拷贝数比值 1%样品的 10 个重复

图 2-26 方法稳健性测试

三、试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效益、社会效益和生态效益

(一) 实验室间验证及结果统计

研究并确立了方法验证方案，详细内容见《转基因植物及其产品成分检测 产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体特异性 PCR 方法 标准文本验证方案》（见附件 1-1）。

实验室间验证时，各实验室各样品检测数据通常表示为：

下标 i —第 i 个实验室，编号为 $i=1,2,\dots,p$ 。

下标 j —第 j 个水平，编号为 $j=1,2,\dots,q$ 。

下标 k —第 k 个平行子样，编号为 $k=1,2,\dots,m$ 。

下标 l —第 l 次 PCR 重复，编号为 $l=1,2,\dots,n$ 。

注：对某个水平（含量）样品而言，“实验室平均值”是指每个实验室对各自检测数据单独平均，“全部实验室平均值”是指全部实验室检测数据进行平均。

1. 实时荧光 PCR 定性验证结果分析

1.1 特异性验证

8 个实验室分别对下表中 11 个样品进行产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体特异性定性验证，每个试样设置 3 个平行子样，每个子样 PCR 重复 3 次。实时荧光 PCR 定性结果显示，在阳性对照、1% DP202216 玉米和 0.05% DP202216 玉米（实时荧光 PCR 方

法检出限) 的样品中均有典型扩增曲线, 其他样品中无扩增曲线。8 个实验室验证结果一致 (表 3-1), 与实验室内部测试结果相符。

表 3-1 DP202216 特异性片段定性 PCR 方法实验室间测定结果

样品名称 / 编号	DP202216 转化体特异性序列各子样重复测定结果								
	子样 1			子样 2			子样 3		
	重复 1	重复 2	重复 3	重复 1	重复 2	重复 3	重复 1	重复 2	重复 3
空白对照	—	—	—	/	/	/	/	/	/
阴性对照	—	—	—	/	/	/	/	/	/
阳性对照	+	+	+	/	/	/	/	/	/
1% DP202216 玉米	+	+	+	+	+	+	+	+	+
其它转基因玉米混合样	—	—	—	—	—	—	—	—	—
转基因大豆混合样	—	—	—	—	—	—	—	—	—
转基因水稻混合样	—	—	—	—	—	—	—	—	—
转基因棉花混合样	—	—	—	—	—	—	—	—	—
转基因油菜混合样	—	—	—	—	—	—	—	—	—
非转基因玉米混合样	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.05% DP202216 玉米	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注: “+”表示阳性结果, “—”表示阴性结果, “/”表示不需验证

1.2 检出限验证

8 个实验室分别对拷贝数比值为 0.05% (本方法的检出限是在 PCR 检测反应体系中加入 100 ng DNA 模板测算, 相当于反应体系中含有 20 拷贝的 DP202216 转化体特异性序列) 的 DP202216 样品进行了测试, 结果显示, 8 个实验室的 72 个反应均有典型扩增曲线, 结果见表 3-2, 与实验室内测试出的 LOD 值相符。表明本方法中产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体特异性序列实时荧光 PCR 方法的检出限为 0.05%, 相当于反应体系中含有 20 拷贝的 DP202216 转化体特异性序列。

表 3-2 DP202216 转化体实时荧光 PCR 方法检出限实验室间测试结果

Lab	拷贝数比值 0.05% 的 DP202216 样品								
	子样 1			子样 2			子样 3		
	重复 1	重复 2	重复 3	重复 1	重复 2	重复 3	重复 1	重复 2	重复 3
Lab1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lab2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lab3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lab4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lab5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lab6	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Lab7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lab8	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注：“+”表示阳性结果，“—”表示阴性结果，“/”表示不需验证

1.3 $\Delta\Delta Ct$ 值法初步判断样品中转基因成分含量

利用 8 家单位测定的 q1、q3 样品及相应反应板的阳性定量质控品扩增获得的 Ct 值，分别计算 3 个子样的 ΔCt 值及 2 个样品的 $\Delta\Delta Ct$ 值。统计结果如表 3-3 所示，8 家实验室中 q1 样品的 $\Delta\Delta Ct$ 值均小于 0，且绝对值均大于 0.6，可以判定样品中 DP202216 的转基因含量高于质控样品 3%；q3 样品的 $\Delta\Delta Ct$ 值除 Lab 3 明显偏小（-0.24~0.29）外，其余实验室均大于 0，且绝对值均大于 1.5，可判定样品中 DP202216 的转基因含量低于质控样品 3%，与 q1、q3 样品的标称含量（5.0%、1.0%）及质控样品含量（3.0%）相符。

实 验 室	样品	子样 1				子样 2				子样 3			
		DP202216 Ct 值	zSSIIb Ct 值	ΔCt 值	$\Delta\Delta Ct$ 值	DP202216 Ct 值	zSSIIb Ct 值	ΔCt 值	$\Delta\Delta Ct$ 值	DP202216 Ct 值	zSSIIb Ct 值	ΔCt 值	$\Delta\Delta Ct$ 值
Lab 1	q1	30.78	25.64	5.14	-0.75	30.86	25.7	5.17	-0.72	30.83	25.67	5.16	-0.73
	3.0%	31.55	25.66	5.89	/	31.52	24.93	6.59	/	31.07	25.19	5.88	/
	q3	32.94	24.81	8.13	1.54	32.92	24.81	8.11	1.52	32.93	24.79	8.15	1.56
	3.0%	31.55	25.66	5.89	/	31.52	24.93	6.59	/	31.07	25.19	5.88	/
Lab 2	q1	28.86	23.81	5.06	-0.95	28.88	23.88	5.0	-1.01	28.79	23.9	4.89	-1.12
	3.0%	29.78	23.77	6.01	/	32.21	23.61	8.59	/	30.03	23.51	6.53	/
	q3	34.01	23.75	10.26	1.67	33.89	23.75	10.14	1.55	33.95	23.8	10.15	1.56
	3.0%	29.78	23.77	6.01	/	32.21	23.61	8.59	/	30.03	23.51	6.53	/
Lab 3	q1	27.7	23.88	3.82	-1.65	27.87	24.19	3.68	-1.79	27.84	24.04	3.8	-1.67
	3.0%	29.38	23.91	5.47	/	29.66	23.32	6.35	/	29.47	23.6	5.87	/
	q3	30.39	23.75	6.64	0.29	30.52	24.07	6.45	0.1	30.14	24.04	6.11	-0.24
	3.0%	29.38	23.91	5.47	/	29.66	23.32	6.35	/	29.47	23.6	5.87	/
Lab 4	q1	28.87	22.51	6.36	-0.8	28.95	22.6	6.35	-0.81	28.91	22.55	6.36	-0.8
	3.0%	29.66	22.5	7.16	/	29.72	22.53	7.19	/	29.79	22.54	7.25	/
	q3	31.26	22.46	8.8	1.61	31.23	22.49	8.75	1.56	31.26	22.52	8.74	1.55
	3.0%	29.66	22.5	7.16	/	29.72	22.53	7.19	/	29.79	22.54	7.25	/
Lab 5	q1	29.62	25.19	4.43	-0.82	29.7	25.15	4.55	-0.7	29.53	25.11	4.42	-0.83
	3.0%	30.43	25.18	5.25	/	30.88	25.17	5.71	/	30.68	24.62	6.06	/
	q3	32.74	25.25	7.49	1.78	32.58	25.15	7.44	1.73	32.49	25.12	7.37	1.66
	3.0%	30.43	25.18	5.25	/	30.88	25.17	5.71	/	30.68	24.62	6.06	/
Lab 6	q1	29.47	23.17	6.3	-0.84	29.51	23.18	6.33	-0.81	29.57	23.21	6.36	-0.78
	3.0%	30.41	23.27	7.14	/	30.3	23.22	7.08	/	30.39	23.37	7.02	/
	q3	31.93	23.22	8.71	1.63	31.96	23.2	8.76	1.68	32.06	23.34	8.72	1.64
	3.0%	30.41	23.27	7.14	/	30.3	23.22	7.08	/	30.39	23.37	7.02	/
Lab 7	q1	30.55	24.19	6.36	-0.84	30.42	24.09	6.33	-0.87	30.45	24.13	6.32	-0.88
	3.0%	31.53	24.33	7.2	/	31.02	24.58	6.44	/	30.54	23.64	6.91	/
	q3	32.56	24.53	8.03	1.59	32.5	24.46	8.04	1.6	32.46	24.48	7.98	1.54
	3.0%	31.53	24.33	7.2	/	31.02	24.58	6.44	/	30.54	23.64	6.91	/
Lab 8	q1	30.07	23.17	6.91	-0.7	30.05	23.15	6.9	-0.71	30.1	23.26	6.84	-0.77
	3.0%	30.77	23.16	7.61	/	29.71	25.65	4.07	/	30.04	25.87	4.17	/
	q3	31.18	25.56	5.62	1.55	31.17	25.51	5.66	1.59	31.23	25.62	5.61	1.54
	3.0%	30.77	23.16	7.61	/	29.71	25.65	4.07	/	30.04	25.87	4.17	/

表 3-3 8 家实验室测试样品 $\Delta\Delta Ct$ 值统计表

注 1: ΔCt 值是 DP202216 转化体特异性序列平均 Ct 值与内标准基因 zSSIIb 平均 Ct 值的差值；

注 2: $\Delta\Delta Ct$ 值是试样的 ΔCt 值与阳性定量质控品的 ΔCt 值的差值;

注 3: q_1 为 5%含量样品, q_3 为 1%含量样品。

2. 实时荧光 PCR 定量验证结果分析

按照验证方案, 8 个实验室对各水平 (各转基因含量) 样品进行定量检测, 检测时在同一块 PCR 板上进行转化体和内标基因的 PCR 扩增, 推荐按表 3-4 进行样品布局和数据统计分析。

表 3-4 每个实验室各水平样品排列表

转化体特异性序列				内标准基因			
3 个平行子样, 每个子样 3 次 PCR 重复检测数据	子样1	子样2	子样3	3 个平行子样, 每个子样 3 个 PCR 重复检测数据	子样 1	子样 2	子样 3
	$c_{1,ij11}$	$c_{1,ij21}$	$c_{1,ij31}$		$c_{2,ij11}$	$c_{2,ij21}$	$c_{2,ij31}$
	子样1	子样2	子样3		子样1	子样2	子样3
	$c_{1,ij12}$	$c_{1,ij22}$	$c_{1,ij32}$		$c_{2,ij12}$	$c_{2,ij22}$	$c_{2,ij32}$
子样浓度平均值	子样1	子样2	子样3	子样平均值	子样1	子样2	子样3
	$c_{1,ij13}$	$c_{1,ij23}$	$c_{1,ij33}$		$c_{2,ij13}$	$c_{2,ij23}$	$c_{2,ij33}$
最终转基因含量=(a1/b1+a2/b2+a3/b3)÷3							
注: (1)p个实验室, 编号为 <i>i</i> =1,2,...,p; q个水平, 编号为 <i>j</i> =1,2,...,q; 每个水平m个平行子样, 编号为 <i>k</i> =1,2,...,m; 每个子样n个PCR重复, 编号为 <i>l</i> =1,2,...,n。							
(2) c_{ijkl} 为第 <i>i</i> 实验室、第 <i>j</i> 个水平、第 <i>k</i> 个平行子样、第 <i>l</i> 个平行 PCR 重复的编号及其检测数据。							
(3) 转化体和内标准基因的校准品 (每个水平1个样品, 技术重复3次PCR) +对照 (每类1个样品, 技术重复3次PCR); 每个水平试样设3个平行子样, 分别为子样1、子样2和子样3, 每个子样重复3次PCR, 并与校准品和对照在1个PCR板上进行内标准基因和转化体特异性序列的扩增。							

制标单位从 8 个实验室收集验证检测数据, 核对后进行统计分析。

2.1 标准曲线分析与合格判定

每个实验室用 5 个水平校准品绘制标准曲线, 根据 PCR 板的数量收集相关标准曲线数据。

2.1.1 标准曲线各参数 (斜率、决定系数和 PCR 扩增效率) 合格判定标准

根据 2259 号公告—5—2015 的要求, 转化体特异性序列和内标基因的标准曲线合格标准为: 斜率 b 值均应位于 -3.6~-3.1 区间内; 决定系数 R^2 可接受的最低值 0.98; PCR 扩增效率 E 应位于 90%~110% 的区间内。

2.1.2 各实验室标准曲线各参数计算

参照本文 “二、(三) 中, 方法二、产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体特异性实时荧光 PCR 定量检测方法建立中 5.2.2 标准曲线各参数的计算方法” 进行计算。

2.1.3 实验室标准曲线各参数统计结果

将 8 个实验室的标准曲线各参数分别进行统计，汇总结果详见表 3-5。

表 3-5 各实验室实时荧光 PCR 方法标准曲线参数汇总结果

实验室	PCR 板 序号	DP202216 转化体特异性序列			zSSI II b 基因		
		曲线斜率 <i>b</i>	决定系数 R^2	扩增效率 <i>E</i> (%)	曲线斜率 <i>b</i>	决定系数 R^2	扩增效率 <i>E</i> (%)
Lab 1	1	-3.258	0.996	102.70	-3.401	0.999	96.80
	2	-3.359	0.998	98.50	-3.378	0.998	97.70
	3	-3.352	0.998	98.80	-3.327	0.999	99.80
Lab 2	1	-3.426	0.998	95.83	-3.317	0.999	100.19
	2	-3.329	0.993	99.71	-3.277	0.997	101.91
	3	-3.514	0.999	92.56	-3.419	0.999	96.09
Lab 3	1	-3.268	0.998	102.32	-3.323	0.997	99.98
	2	-3.517	0.996	92.45	-3.493	0.997	93.32
	3	-3.328	0.995	99.74	-3.368	0.998	98.10
Lab 4	1	-3.446	1.000	95.00	-3.303	1.000	101.00
	2	-3.387	1.000	97.00	-3.405	1.000	97.00
	3	-3.452	1.000	95.00	-3.454	1.000	95.00
Lab 5	1	-3.433	0.989	95.60	-3.540	0.998	91.70
	2	-3.474	0.993	94.00	-3.386	0.998	97.40
	3	-3.573	0.994	90.50	-3.421	0.997	96.00
Lab 6	1	-3.348	0.998	98.90	-3.487	0.999	93.60
	2	-3.430	0.998	95.70	-3.424	0.999	95.90
	3	-3.324	0.996	99.90	-3.387	0.998	97.30
Lab 7	1	-3.373	0.993	97.90	-3.443	0.999	95.20
	2	-3.499	0.993	93.10	-3.402	0.999	96.70
	3	-3.506	0.993	92.90	-3.412	0.999	96.40
Lab 8	1	-3.324	0.999	99.99	-3.292	0.999	101.24
	2	-3.301	0.995	100.89	-3.322	1.000	100.00
	3	-3.292	0.997	101.23	-3.406	0.999	96.62

2.1.4 实验室标准曲线各参数合格判定

表 3-5 的检测数据显示，8 个实验室产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体特异性序列和 zSSI**II**b 内标基因的标准曲线斜率分别在-3.573~-3.258、-3.540~-3.277 之间；决定系数 R^2 分别在 0.989~1.000、0.997~1.000 之间，大于可接受的最低值 0.98；PCR 扩增效率分别在 90.45%~102.68%、91.68%~101.91%之间，位于 90%~110%的允许区间内。

8 个实验室产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体特异性序列和 zSSI**II**b 内标基因的标准曲线的 3 个参数均在允许范围内，符合 2259 号公告—5—2015 的要求，满足验证样品的定量需求。

2.2 检测数据统计及有效性确认

2.2.1 检测数据统计

按照标准文本，8 个实验室各自对统一提供的 5 个已知转基因含量样品进行检测，每个水平的样品设 3 个平行子样，每个子样至少重复 3 次 PCR，每个反应的转基因含量检测数据记为 c_{ijkl} （转化体拷贝数/内标准基因拷贝数），下标 i 为实验室顺序号，分别记为 1 至 8， $p=8$ ； j 为各水平顺序号，分别记为 1 至 5， $q=5$ ； k 为各平行子样的顺序号，分别记为 1 至 3， $m=3$ ； l 为各 PCR 重复的顺序号，分别记为 1 至 3， $n=3$ 。

每个实验室根据提供的各个含量样品测定的 Ct 值和绘制的标准曲线，计算各个含量样品的转基因含量。每个子样 3 次重复 PCR 测定含量的平均值作为该水平试样的 1 次平行的结果。

$$\bar{c}_{ijk} = \frac{1}{n} \sum_{l=1}^n c_{ijkl} \quad (\text{其中 } n=3) \dots\dots\dots (8)$$

【特别提示 1：上述公式 n 是第 i 个实验室第 j 个水平试样中的第 k 个平行子样的重复 PCR 次数】

按照上述公式，核对各实验室对各个含量样品各子样转基因含量的检测结果，并汇总见表 3-6。

表 3-6 8 个实验室对 5 个含量样品 3 个子样检测结果统计汇总

实验室子样值（每个子样的 3 次重复转化体拷贝数平均值与内标准基因拷贝数平均值的比值作为该子样 1 个平行的值）		样品转基因含量标称值（%）				
		水平 1 5.0	水平 2 3.0	水平 3 1.0	水平 4 0.5	水平 5 0.1
Lab 1	子样 1	4.76	2.76	1.00	0.49	0.10
	子样 2	4.63	2.76	1.02	0.50	0.10
	子样 3	4.67	2.86	1.00	0.50	0.10
Lab 2	子样 1	4.57	2.88	0.77	0.48	0.12
	子样 2	4.78	2.87	0.84	0.51	0.12
	子样 3	5.12	2.90	0.82	0.47	0.12
Lab 3	子样 1	5.35	2.85	0.98	0.55	0.09
	子样 2	5.50	2.83	1.02	0.48	0.10
	子样 3	5.52	2.90	0.92	0.53	0.09
Lab 4	子样 1	4.98	3.03	1.01	0.53	0.11
	子样 2	5.03	2.17	1.05	0.52	0.11
	子样 3	4.98	2.99	1.06	0.51	0.11
Lab 5	子样 1	4.72	3.02	0.95	0.51	0.11
	子样 2	4.36	2.96	0.99	0.56	0.11
	子样 3	4.78	3.06	1.03	0.55	0.10

实验室子样值（每个子样的3次重复转化体拷贝数平均值与内标准基因拷贝数平均值的比值作为该子样1个平行的值）		样品转基因含量标称值（%）				
		水平 1 5.0	水平 2 3.0	水平 3 1.0	水平 4 0.5	水平 5 0.1
Lab 6	子样 1	4.85	2.78	0.98	0.51	0.10
	子样 2	4.75	2.82	0.96	0.47	0.11
	子样 3	4.69	2.91	0.96	0.52	0.10
Lab 7	子样 1	4.76	3.00	0.95	0.48	0.10
	子样 2	4.87	2.80	0.95	0.36	0.10
	子样 3	4.93	2.75	0.99	0.49	0.10
Lab 8	子样 1	4.91	3.03	1.00	0.50	0.10
	子样 2	4.94	3.01	0.97	0.51	0.10
	子样 3	5.06	3.07	1.00	0.51	0.10

2.2.2 检测数据的有效性确认

2.2.2.1 检测数据离群值分析

根据标准 GB/T6379.2-2004^[7]或 ISO5725-2:1994^[8]，采用科克伦法（Cochran's test）和格拉布斯法（Grubbs tests）检测各实验室检测数据是否存在离群值。如果检验统计量小于或等于 5%临界值，则接受被检验项目为正确值；如果检验统计量大于 5%临界值，但小于或等于 1%临界值，则称被检验项目为歧离值，该歧离值保留，并用于后续计算；若检验统计量大于 1%临界值，则被检验项目称为统计离群值，要剔除该离群值。

2.2.2.2 科克伦检验（等精度检验）

5 个水平（转基因含量）样品（ $q=5$ ），分别在 8 个实验室（ $p=8$ ）各进行了 3 个平行子样检测，每个子样 3 次重复，每个子样 3 次重复的平均值作为该试样 1 个平行的结果（ $m=3$ ）。计算各个含量样品在各实验室 3 个平行子样检测结果的标准差（ s_{ij} ），按照 8 个实验室的 s_{ij} 进行从大到小的排序后，找出的最大标准差（ $s_{\max, j}$ ），计算检验统计量值 C_j ，汇总后详见下表 3-7。

各水平的科克伦检验统计量 C_j 计算公式为

$$C_j = \frac{s_{\max, j}^2}{\sum_{i=1}^p s_{ij}^2} \dots\dots\dots (9)$$

式中：

C_j — 每个含量样品的科克伦检验统计量

$s_{\max, j}$ — 各实验室第 j 水平 m 个平行子样测量结果标准差中的最大值（共 8 个实验室，8 个数据比较）。

s_{ij} —第 i 个实验室第 j 个含量样品 m 个平行子样检测结果的标准差，公式为

$$s_{ij} = \sqrt{\sum_{k=1}^m (\bar{c}_{ijk} - \bar{\bar{c}}_{ij})^2 / (m - 1)}。$$

p —实验室个数。

表 3-7 各含量样品标准差最大的实验室及其检验统计量

序号	样品水平标称值	S_j 最大实验室 ($s_{\max, j}$)	检验统计量值 C_j	5%临界值	1%临界值
				实验室 $p=8$ 、平行 $m=3$ 时	
1	5.0%	Lab 2	0.461	0.516	0.615
2	3.0%	Lab 4	0.890		
3	1.0%	Lab 3	0.359		
4	0.5%	Lab 7	0.588		
5	0.1%	Lab 6	0.420		

科克伦检验结果表明，Lab 4 在检测 3.0%样品时， C_j 为 0.890，大于 1%临界值 0.615，为离群值，剔除 Lab 4 的 3.0%检测数据后按 $p=7$ 重新分析，Lab 7 的 C_j 为 0.577，介于 5%临界值 0.561 与 1%临界值 0.676 之间，判为歧离值，予以保留；Lab 7 在检测 0.5%样品时， C_j 为 0.588，介于 5%临界值 0.516 与 1%临界值 0.615 之间，判为歧离值，予以保留；其余样品各实验室的 C_j 均小于 5%临界值 0.516，为可接受值。

2.2.2.3 格拉布斯检验（异常平均值检验）

对每个含量样品，分别将各个实验室 3 个平行子样转基因含量的平均值按大小升序排列（每个实验室 3 个平行子样平均，即 8 个实验室 8 个数据），检验最大平均值（ $\bar{\bar{c}}_{\max, j}$ ）和最小平均值（ $\bar{\bar{c}}_{\min, j}$ ）是否为离群值。

计算 j 含量样品最大平均值格拉布斯检验统计量 $G_{\max, j}$ ：

$$G_{\max, j} = \frac{\bar{\bar{c}}_{\max, j} - \bar{\bar{c}}_j}{s_j} \dots\dots\dots (10)$$

式中：

$G_{\max, j}$ —第 j 水平最大平均值格拉布斯检验统计量；

$\bar{\bar{c}}_{\max, j}$ —第 j 水平每个实验室平均值，在 8 个实验室中选其平均值最大的 1 个。；

$\bar{\bar{c}}_j$ —第 j 水平 8 个实验室 3 个平行子样的总平均值（即 24 个结果的平均值）；

s_j —第 j 水平 8 个实验室平均值的标准差，其中 s_j 依据下式计算。

$$s_j = \sqrt{\sum_{i=1}^8 (\bar{c}_{ij} - \bar{\bar{c}}_j)^2 / (8 - 1)} \dots\dots\dots (11)$$

计算第 j 水平最小平均值格拉布斯检验统计量 $G_{\min,j}$:

$$G_{\min,j} = \frac{\bar{\bar{c}}_j - \bar{\bar{c}}_{\min,j}}{s_j} \dots\dots\dots (12)$$

式中:

$G_{\min,j}$ —第 j 水平最小平均值格拉布斯检验统计量;

$\bar{\bar{c}}_{\min,j}$ —第 j 水平每个实验室平均值中被选中最小的值;

$\bar{\bar{c}}_j$ —第 j 水平 8 个实验室总平均值;

s_j —第 j 水平 8 个实验室平均值的标准差。

5 个含量样品, 最大平均值格拉布斯检验统计量依次为: 2.151、1.493、1.060、1.356、1.859; 最小平均值格拉布斯检验统计量依次为: 1.063、1.128、2.307、1.948、1.364。当实验室个数 $p=8$ 、子样个数 $m=3$ 时, 格拉布斯检验 5%临界值为 2.126, 1%临界值为 2.274。1.0%样品的最小平均值 (Lab 2) 为 2.307, 大于 1%临界值 2.274, 判为离群值, 剔除后按 $p=7$ 重新检验 (5%临界值 2.020), 剩余实验室统计量均小于临界值; 5.0%样品的最大平均值 (Lab 3) 为 2.151, 介于 5%临界值 2.126 与 1%临界值 2.274 之间, 判为歧离值, 予以保留; 其余样品各实验室平均值均无离群值。

2.2.2.4 实验室有效检测数据统计

经科克伦检验, Lab 4 检测的 3.0%样品结果为离群值, 予以剔除; Lab 7 检测的 3.0%和 0.5%样品结果为歧离值, 予以保留。经格拉布斯检验, Lab 2 检测的 1.0%样品结果为离群值, 予以剔除; Lab 3 检测的 5.0%样品结果为歧离值, 予以保留。其余均为有效数据。根据表 3-8 数据, 统计汇总 8 个实验室对 5 个含量样品 3 个平行子样的检测结果, 计算 8 个实验室检测结果的总平均值 (详见表 3-8)。

表 3-8 8 个实验室对 5 个含量样品检测结果统计汇总

实验室子样值 (每个子样的 3 次重复转化体拷贝数平均值与内标准基因拷贝数平均值的比值作为该子样 1 个平行的值)		样品转基因含量标称值 (%)				
		水平 1 5.0	水平 2 3.0	水平 3 1.0	水平 4 0.5	水平 5 0.1
Lab 1	子样 1	4.76	2.76	1.00	0.49	0.10
	子样 2	4.63	2.76	1.02	0.50	0.10
	子样 3	4.67	2.86	1.00	0.50	0.10

Lab 2	子样 1	4.57	2.88	0.77**	0.48	0.12
	子样 2	4.78	2.87	0.84**	0.51	0.12
	子样 3	5.12	2.90	0.82**	0.47	0.12
Lab 3	子样 1	5.35	2.85	0.98	0.55	0.09
	子样 2	5.50	2.83	1.02	0.48	0.10
	子样 3	5.52	2.90	0.92	0.53	0.09
Lab 4	子样 1	4.98	3.03**	1.01	0.53	0.11
	子样 2	5.03	2.17**	1.05	0.52	0.11
	子样 3	4.98	2.99**	1.06	0.51	0.11
Lab 5	子样 1	4.72	3.02	0.95	0.51	0.11
	子样 2	4.36	2.96	0.99	0.56	0.11
	子样 3	4.78	3.06	1.03	0.55	0.10
Lab 6	子样 1	4.85	2.78	0.98	0.51	0.10
	子样 2	4.75	2.82	0.96	0.47	0.11
	子样 3	4.69	2.91	0.96	0.52	0.10
Lab 7	子样 1	4.76	3.00	0.95	0.48	0.10
	子样 2	4.87	2.80	0.95	0.36	0.10
	子样 3	4.93	2.75	0.99	0.49	0.10
Lab 8	子样 1	4.91	3.03	1.00	0.50	0.10
	子样 2	4.94	3.01	0.97	0.51	0.10
	子样 3	5.06	3.07	1.00	0.51	0.10
总平均值		4.896	2.896	0.990	0.502	0.105

注：“**”为经检验剔除的离群值，其中 3.0%为科克伦检验离群值，1.0%为格拉布斯检验离群值。

2.3. 准确度分析方法和结果

2.3.1 精密度（重复性和再现性）分析方法和结果

2.3.1.1 精密度分析方法

根据 GB/T6379.2-2004 或 ISO5725-2:1994，对有效检测数据进行统计，分析方法的重复性和再现性。可分 2 种情况进行分析：一是理想情况下，即各实验室各含量样品子样个数相等(相当于重复测量次数相等)，如： $m_{ij}=3$ ，则根据下面“2.3.1.1.1”的步骤分析精密度；二是无论各实验室重复次数 m_{ij} 是否相等，均可根据下面“2.3.1.1.2”步骤的扩展通用公式，按 5 个统计量进行简便计算。

2.3.1.1.1 理想情况下精密度分析方法的推导

第 j 个水平下，第 i 个实验室的第 k 个子样检测平均值（3 次重复 PCR 的平均值）记为 $\bar{c}_{ijk}$ ，当理想情况（各实验室平行子样个数 m_{ij} 均相等，相当于平行次数相等， $m=3$ ）， p 个实验室，共有 pm 次重复值。对这 pm 次重复值可以按以下步骤统计重复性方差 jr_2^s 、实验室间方差 jL_2^s 和再现性方差 jR_2^s 。

（1）平方和（Sum of Square, SS）与自由度（degree of freedom，df）的剖分

方差分析中，平方和以及自由度是可以线性剖分的，即总平方和 SS_T 可以剖分成实验室间（组间）平方和 SS_L 以及实验室内（组内）平方和 SS_r ，公式表示即：

$$SS_T = SS_L + SS_r \dots\dots\dots (13)$$

总自由度 df_T 可以剖分成实验室间（组间）自由度 df_L 以及实验室内（组内）自由度 df_r ，公式表示即：

$$df_T = df_L + df_r \dots\dots\dots (14)$$

总平方和、总自由度公式如下：

$$SS_T = \sum_{i=1}^p \sum_{k=1}^m (\bar{c}_{ijk} - \bar{\bar{c}}_j)^2 \dots\dots\dots (15)$$

$$df_T = pm - 1 \dots\dots\dots (16)$$

实验室间平方和、自由度公式如下：

$$SS_L = \sum_{i=1}^p m(\bar{c}_{ij} - \bar{\bar{c}}_j)^2 \dots\dots\dots (17)$$

$$df_L = p - 1 \dots\dots\dots (18)$$

实验室内平方和、自由度公式如下：

$$SS_r = SS_T - SS_L = \sum_{i=1}^p \sum_{k=1}^m (\bar{c}_{ijk} - \bar{c}_{ij})^2 \dots\dots\dots (19)$$

$$df_r = pm - p \dots\dots\dots (20)$$

(2) 均方差 (Mean Square, MS) 的计算

实验室内均方差公式如下：

$$MS_r = SS_r / df_r = \sum_{i=1}^p \sum_{k=1}^m (\bar{c}_{ijk} - \bar{c}_{ij})^2 / (pm - p) \dots\dots\dots (21)$$

实验室间均方差公式如下：

$$MS_L = SS_L / df_L = \sum_{i=1}^p m(\bar{c}_{ij} - \bar{\bar{c}}_j)^2 / (p - 1) \dots\dots\dots (22)$$

(3) 方差 (variance) 组分估计

1) 重复性方差 (实验室内方差)

实验室内均方差 (误差方差) 即是估计的重复性方差 s_{jr}^2 。

$$s_{jr}^2 = MS_r = SS_r / df_r = \sum_{i=1}^p \sum_{k=1}^m (\bar{c}_{ijk} - \bar{\bar{c}}_{ij})^2 / (pm - p) \dots\dots\dots (23)$$

2) 实验室间方差

根据抽样理论即期望均方 (Expected Mean Square, EMS) 可知实验室间均方差(MS_L)的方差构成为:

$$MS_L = m \times s_{jL}^2 + s_{jr}^2 \dots\dots\dots (24)$$

于是可得**实验室间方差** s_{jL}^2 :

$$s_{jL}^2 = (MS_L - s_{jr}^2) / m = \left(\frac{\sum_{i=1}^p m(\bar{\bar{c}}_{ij} - \bar{\bar{c}})^2}{p-1} - s_{jr}^2 \right) / m \dots\dots\dots (25)$$

3) 再现性方差:

$$s_{jR}^2 = s_{jL}^2 + s_{jr}^2 \dots\dots\dots (26)$$

2.3.1.1.2 精密度分析方法的扩展通用公式

(1) 统计量的简便计算

以第 j 水平为例, 无论各实验室平行子样个数 m_{ij} 是否相等, 均可按 5 个统计量简便计算验证结果的重复性方差 s_{jr}^2 、实验室间方差 s_{jL}^2 和再现性方差 s_{jR}^2 :

$$T_{1j} = \sum_{i=1}^p m_{ij} \bar{\bar{c}}_{ij} \dots\dots\dots (27)$$

$$T_{2j} = \sum_{i=1}^p m_{ij} \bar{\bar{c}}_{ij}^2 \dots\dots\dots (28)$$

$$T_{3j} = \sum_{i=1}^p m_{ij} \dots\dots\dots (29)$$

$$T_{4j} = \sum_{i=1}^p m_{ij}^2 \dots\dots\dots (30)$$

$$T_{5j} = \sum_{i=1}^p (m_{ij} - 1) s_{ij}^2 \dots\dots\dots (31)$$

其中

$$s_{ij} = \sqrt{\sum_{l=1}^{m_{ij}} (\bar{c}_{ijl} - \bar{\bar{c}}_{ij})^2 / (m_{ij} - 1)} \dots\dots\dots (32)$$

式中：

T_{1j} — j 水平的 T_1 统计量；

T_{2j} — j 水平的 T_2 统计量；

T_{3j} — j 水平的 T_3 统计量；

T_{4j} — j 水平的 T_4 统计量；

T_{5j} — j 水平的 T_5 统计量；

m_{ij} — i 实验室 j 水平的平行子样个数；

$\bar{\bar{c}}_{ij}$ — i 实验室 j 水平检测结果平均值（平行子样的平均值）；

s_{ij}^2 — i 实验室 j 水平 3 个平行子样检测结果的方差；

p —参加联合验证的实验室个数。

(2) 方差 (variance) 组分估计

1) 重复性方差 (实验室内方差)

$$s_{jr}^2 = MS_r = \frac{\sum_{i=1}^p \sum_{l=1}^m (\bar{c}_{ijl} - \bar{\bar{c}}_{ij})^2}{pm - p} = \frac{\sum_{i=1}^p (m_{ij} - 1) s_{ij}^2}{\sum_{i=1}^p m_{ij} - p} = \frac{T_{5j}}{T_{3j} - p} \dots\dots\dots (33)$$

2) 实验室间方差

当各实验室重复数 m_{ij} 不等时，需要计算平均的重复数 $\bar{m}_j$ ，

$$m_j = \frac{1}{p-1} \times \left[\sum_{i=1}^p m_{ij} - \frac{\sum_{i=1}^p m_{ij}^2}{\sum_{i=1}^p m_{ij}} \right] = \frac{(\sum_{i=1}^p m_{ij})^2 - \sum_{i=1}^p m_{ij}^2}{(p-1) \sum_{i=1}^p m_{ij}} = \frac{T_{3j}^2 - T_{4j}}{(p-1) \cdot T_{3j}} \dots\dots\dots (34)$$

所以实验室间方差 s_{jL}^2 ：

$$s_{jL}^2 = \left(\frac{\sum_{i=1}^p m_{ij} (\bar{c}_{ij} - \bar{\bar{c}}_j)^2}{p-1} - s_{jr}^2 \right) / m_j = \left(\frac{\sum_{i=1}^p m_{ij} (\bar{c}_{ij} - \bar{\bar{c}}_j)^2}{p-1} - s_{jr}^2 \right) / \bar{m}_j$$

$$\begin{aligned}
& \sum_{i=1}^p m_{ij} \bar{\bar{c}}_{ij}^2 - \frac{(\sum_{i=1}^p m_{ij} \bar{\bar{c}}_{ij})^2}{\sum_{i=1}^p m_{ij}} \\
&= \left(\frac{\sum_{i=1}^p m_{ij} \bar{\bar{c}}_{ij}^2 - \frac{(\sum_{i=1}^p m_{ij} \bar{\bar{c}}_{ij})^2}{\sum_{i=1}^p m_{ij}}}{p-1} - s_{jr}^2 \right) / \bar{m}_j = \left(\frac{\sum_{i=1}^p m_{ij} \sum_{i=1}^p m_{ij} \bar{\bar{c}}_{i,j}^2 - (\sum_{i=1}^p m_{ij} \bar{\bar{c}}_{i,j})^2}{(p-1) \sum_{i=1}^p m_{ij}} - s_{jr}^2 \right) / \bar{m}_j \\
&= \left(\frac{\sum_{i=1}^p m_{ij} \sum_{i=1}^p m_{ij} \bar{\bar{c}}_{ij}^2 - (\sum_{i=1}^p m_{ij} \bar{\bar{c}}_{ij})^2}{(p-1) \sum_{i=1}^p m_{ij}} - s_{jr}^2 \right) \bigg/ \left(\frac{T_{3j}^2 - T_{4j}}{(p-1) \cdot T_{3j}} \right) \\
&= \left[\frac{T_{2j} T_{3j} - T_{1j}^2}{(p-1) T_{3j}} - s_{jr}^2 \right] \left[\frac{(p-1) \cdot T_{3j}}{T_{3j}^2 - T_{4j}} \right] \dots\dots\dots (35)
\end{aligned}$$

3) 再现性方差

$$s_{jR}^2 = s_{jL}^2 + s_{jr}^2 \dots\dots\dots (36)$$

2.3.1.1.3 相对标准差的计算

无论使用“2.3.1.1.1”还是“2.3.1.1.2”的计算方法，当获得重复性方差 s_{jr}^2 和再现性方差 s_{jR}^2 后，即可开方获得其相应的标准差，即重复性标准差 s_{jr} 和再现性标准差 s_{jR} ，从而可以计算出重复性相对标准差 RSD_{jr} 和再现性相对标准差 RSD_{jR} ，公式如下：

$$RSD_{jr} = \frac{s_{jr}}{\bar{\bar{c}}_j} \times 100\% \quad (37)$$

$$RSD_{jR} = \frac{s_{jR}}{\bar{\bar{c}}_j} \times 100\% \quad (38)$$

式中， s_{jr} —第 j 水平的重复性标准差，

$\bar{\bar{c}}_j$ —第 j 水平的总平均值，

s_{jR} —第 j 水平的再现性标准差。

2.3.1.2 精密度分析结果

8 家联合定值实验室对 5 个含量样品进行检测，各实验室平行子样个数均相等，相当于重复次数相等，采用理想情况下精密度分析方法计算 5 个含量样品检测数据的重复性标准差 s_{jr} 、重复性相对标准差 RSD_{jr} 、再现性标准差 s_{jR} 和再现性相对标准差 RSD_{jR} （表 3-9）。

5 个含量样品的重复性相对标准差 RSD_{jr} 在 2.242%~6.722%之间，均小于规定的 25%，再现性相对标准差 RSD_{jR} 在 3.611%~8.093%之间，均小于规定的 35%。重复性和再现性分

析结果表明 DP202216 转化体荧光定量 PCR 方法测量结果具有良好的精密度。

表 3-9 5 个含量样品的重复性和再现性分析

统计量	水平 j (%)				
	1	2	3	4	5
标称值%	5.0	3.0	1.0	0.5	0.1
检测总平均值%	4.896	2.896	0.990	0.502	0.105
重复性标准差 s_{jr}	0.143	0.065	0.029	0.034	0.004
重复性相对标准差 RSD_{jr} (%)	2.921	2.242	2.924	6.722	4.174
再现性标准差 s_{JR}	0.284	0.106	0.036	0.040	0.009
再现性相对标准差 RSD_{JR} (%)	5.805	3.670	3.611	7.949	8.093

2.3.2 正确度分析方法和结果

2.3.2.1 正确度分析方法

计算实验室测量总平均值与标准值的偏倚 $bias_j$ 和相对偏倚 $biasR_j$ ，判定验证检测结果的正确度。即：

$$bias_j = \bar{\bar{c}}_j - c_{E,j} \dots \dots \dots (39)$$

$$biasR_j = \frac{\bar{\bar{c}}_j - c_{E,j}}{c_{E,j}} \times 100\% \dots \dots \dots (40)$$

式中：

- $bias_j$ — j 含量样品测量平均值的偏倚；
- $biasR_j$ — j 含量样品测量平均值的相对偏倚；
- $\bar{\bar{c}}_j$ — j 含量样品的测量总平均值；
- $c_{E,j}$ — j 含量样品标准值。

2.3.2.2 正确度分析结果

计算样品各水平下，8 个实验室测量总平均值与标称值的偏倚 $bias_j$ 和相对偏倚 $biasR_j$ ，汇总结果见表 3-10：

表 3-10 5 个含量样品测量总平均值的偏倚分析

统计量	水平 j (%)				
	1	2	3	4	5
标称值	5.0	3.0	1.0	0.5	0.1
总平均值	4.896	2.896	0.990	0.502	0.105
偏倚 $bias_j$	-0.104	-0.104	-0.010	+0.002	+0.005

相对偏倚 $biasR_j$ (%)	-2.088	-3.471	-1.041	+0.344	+5.266
-----------------------	--------	--------	--------	--------	--------

5 个含量样品检测结果总平均值与标称值的相对偏倚 $biasR_j$ 在-3.471%~5.266%之间, 绝对值均小于 25%, 表明 DP202216 转化体荧光定量 PCR 方法检测结果具有良好的正确度。

2.3.3 准确度分析方法和结果

方法的准确度包括正确度和精密度。汇总“2.2.2 实验室有效检测数据统计”的结论、表 3-8、表 3-9 和表 3-10 的数据, 形成实验室联合验证数据的汇总分析结果(详见表 3-11)。可以看出: 5 个含量样品 8 个实验室的测量平均值分别为 4.896%、2.896%、0.990%、0.502%和 0.105%, 检测平均值相对偏倚 ($biasR_j$) 在-3.471%~5.266%之间, 位于 $\pm 25\%$ 的区间内, 正确度符合要求。重复性相对标准差 RSD_{jr} 均小于 25%, 再现性相对标准差 RSD_{jR} 均小于 35%, 精密度符合要求。

鉴于结果的正确度和精密度指标均符合农业部 2259 号公告—5—2015 的要求, 说明本方法具有良好的准确度。

表 3-11 实验室联合验证数据的汇总分析结果

	测试样品预期值 (%)				
	5.0	3.0	1.0	0.5	0.1
返回数据实验室数	8	7	7	8	8
每个实验室平行样品个数	3	3	3	3	3
离群值数	0	1	1	0	0
平均值	4.896	2.896	0.990	0.502	0.105
重复性标准差 s_{jr}	0.143	0.065	0.029	0.034	0.004
重复性相对标准差 RSD_{jr}	2.92	2.24	2.92	6.72	4.17
再现性标准差 s_{jR}	0.284	0.106	0.036	0.040	0.009
再现性相对标准差 RSD_{jR}	5.81	3.67	3.61	7.95	8.09
偏倚 $bias_j$	-0.104	-0.104	-0.010	+0.002	+0.005
相对偏倚 $biasR_j$ (%)	-2.088	-3.471	-1.041	+0.344	+5.266

2.4 检测限 (LOD) 的验证

DP202216 转化体特异性荧光定量 PCR 方法的检出限同荧光定性 PCR 方法检出限, 详见“三”中“(一)的 1.2”。

2.5 定量限 (LOQ) 的验证

在建立方法过程中, 确定产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体特异性荧光定量 PCR 方法的定量限 LOQ 可达到 0.1%, 以 100 ng 初始 DNA 模板计, 相当于反应体系中含有 40 拷贝的 DP202216 转化体特异性序列。在多个实验室循环验证样品中包含了转基因含量为 0.1%的定量限样品 (LOQ 样品), 多个实验室按标准方法在 PCR 反应体系中加入 100 ng DNA

模板进行定量检测。结果显示 8 个实验室的 LOQ 样品百分含量测量值的平均值在 0.095%~0.120%之间，总平均值为 0.105%，实验室内相对标准差、重复性相对标准差、再现性相对标准差均小于 25%，测量总平均值相对偏倚 5.266%，位于±25%范围内（表 3-12）。定量限样品的联合验证结果表明测量结果的准确度满足转基因定量检测方法的准确性目标，证明本方法的定量检测极限不高于 0.1%（约 40 拷贝 DP202216 转化体特异性序列），与实验室内测试出的 LOQ 值相符。

表 3-12 定量限样品测量结果统计分析

平行子样 3 次重复转化体拷贝数平均值与内标准基因拷贝数平均值的比值	LOQ 样品百分含量测量值(%)								mean	RSD _r (%)	RSD _R (%)	Bias(%)
	Lab1	Lab2	Lab3	Lab4	Lab5	Lab6	Lab7	Lab8				
子样 1	0.10	0.12	0.09	0.11	0.11	0.10	0.10	0.10	0.105	4.17	8.09	5.27
子样 2	0.10	0.12	0.10	0.11	0.11	0.11	0.10	0.10				
子样 3	0.10	0.12	0.09	0.11	0.10	0.10	0.10	0.10				
mean	0.102	0.120	0.095	0.112	0.109	0.103	0.100	0.102				
s	0.002	0.003	0.006	0.002	0.005	0.008	0.001	0.000				
s _r (%)	1.683	2.862	6.587	2.072	5.048	7.800	0.65	0.446				

3. 普通 PCR 定性验证结果分析

3.1 特异性

8 个实验室分别对下表中 11 个样品进行产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体特异性定性验证，每个样品 3 个平行，3 次重复。普通 PCR 结果显示，在阳性对照、1%DP202216 和 0.1%DP202216（普通 PCR 方法检出限）的样品中扩增出清晰明亮的特异性条带，其他样品中无扩增条带。8 个实验室验证结果一致（表 3-13），与实验室内部测试结果相符。

表 3-13 DP202216 转化体特异性片段定性 PCR 方法实验室间测定结果

样品名称 / 编号	DP202216 转化体特异性序列子样重复测定结果								
	子样 1			子样 2			子样 3		
	重复 1	重复 2	重复 3	重复 1	重复 2	重复 3	重复 1	重复 2	重复 3
空白对照	—	/	/	—	/	/	—	/	/
阴性对照	—	/	/	—	/	/	—	/	/
阳性对照	+	+	+	/	/	/	/	/	/
1% DP202216 玉米	+	+	+	+	+	+	+	+	+
其它转基因玉米混合样	—	—	—	—	—	—	—	—	—
转基因大豆混合样	—	—	—	—	—	—	—	—	—
转基因水稻混合样	—	—	—	—	—	—	—	—	—
转基因棉花混合样	—	—	—	—	—	—	—	—	—

样品名称 / 编号	DP202216 转化体特异性序列子样重复测定结果								
	子样 1			子样 2			子样 3		
	重复 1	重复 2	重复 3	重复 1	重复 2	重复 3	重复 1	重复 2	重复 3
转基因油菜混合样	—	—	—	—	—	—	—	—	—
非转基因玉米混合样	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.1% DP202216 玉米	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注：“+”表示阳性结果，“—”表示阴性结果，“/”表示不需验证

3.2 检出限

8 个实验室分别对拷贝数比值为 0.1% 的 DP202216 样品（本方法的检出限是在 PCR 检测反应体系中加入 100 ng DNA 模板进行测算的，相当于反应体系中含有 40 拷贝的 DP202216 转化体特异性序列）进行了普通 PCR 测试，结果显示 8 个实验室共计 72 个反应均能检测出预期 DNA 片段，见表 3-14，与实验室内测试出的 LOD 值相符。表明本方法中产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体特异性序列普通 PCR 方法的检出限为 0.1%，相当于反应体系中含有 40 拷贝的 DP202216 转化体特异性序列。

表 3-14 DP202216 转化体普通 PCR 方法检出限室间测试结果

Lab	0.1% DP202216								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Lab1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lab2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lab3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lab4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lab5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lab6	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lab7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lab8	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注：“+”表示阳性结果，“—”表示阴性结果。

4. 标准文本方法验证结论

8 个实验室对本检测方法的验证结果表明，本方法的主要技术参数（特异性、检出限、定量限、标准曲线的决定系数、斜率、扩增效率、重复性和再现性、正确度和精密度等）全部符合农业部 2259 号公告—4—2015、农业部 2259 号公告—5—2015、ENGL-GMFF^[9]和 SN/T 4561—2016^[10]等相关标准的要求，该方法的科学性、适用性、重复性、再现性和可操作性均达到了国内领先、国际先进水平。

5. 阳性定量质控品设置

阳性定量质控品宜优先选用与标识阈值相当的有证标准物质。若无有证标准物质，则使用实验室配制样品，此样品转基因含量值应与标识阈值相当。阳性定量质控品是在定量检测

过程中，用于试样检测数据合格判定的质量控制样品。按照标准“6.4.10 检测数据合格判定”执行。

6. 实时荧光定量不确定度评定

6.1 不确定度评定的原则

不确定度的评定可以选择自上而下或自下而上的方式进行。校准品和阳性定量质控品类型（有证标准物质或实验室自制样品）及其认定值的标示方式（拷贝数或拷贝数比值）都影响不确定度评定。

检测实验室宜优先选择自上而下的方式进行。

6.2 定量结果的不确定度评定

本方法采用实验室自上而下非自行评定的方法（实验室结合多家联合验证数据评定不确定度），根据文本验证时多家联合验证数据预评定的相对标准不确定度分量（ u_r ）和绝对标准不确定度分量（ u_0 ），评定定量结果的不确定度。根据实时荧光 PCR 定量方法实验室间统一验证样品（各水平顺序号用 j 表示，共 q 个水平）的检测数据再现性标准差 s_{jR} 与平均值（ $\bar{c}_j$ ）间的线性关系，绘制再现性标准差 s_{jR} 与各水平（ $q=5$ ）验证样品检测数据平均值（ $\bar{c}_j$ ）的回归曲线 $s_{jR} = u_r \times \bar{c}_j + u_0$ ，确定定量结果的相对标准不确定度分量（ u_r ）和绝对标准不确定度分量（ u_0 ）。 u_r 是回归曲线的斜率， u_0 是回归曲线的截距，斜率和截距的计算公式参照本文“二、（三）中方法二、产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体特异性实时荧光 PCR 定量检测方法建立中 5.2.2 标准曲线各参数的计算方法”进行计算。根据表 3-11 中的数据绘制的回归曲线如图 3-1 所示。回归曲线为 $s_{jR} = 0.054 \times \bar{c}_j - 0.0067$ ，计算的相对标准不确定度分量 $u_r = 0.054$ ，由于截距 -0.0067 为负值，因此取最低浓度（0.1%）试样的再现性标准差 0.0085 作为 u_0 的估计值。

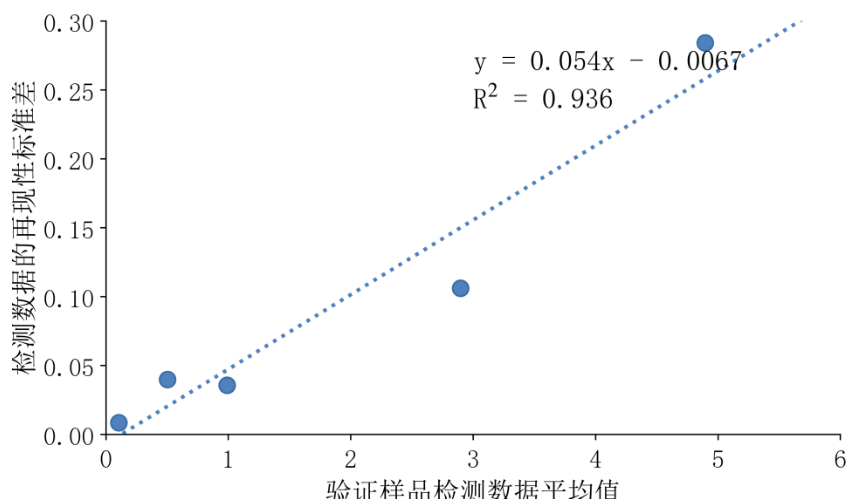


图 3-1 实验室间联合验证结果再现性标准差与验证样品检测平均值间的线性关系

检测结束后，检测实验室将试样检测结果的平均值($\bar{c}$)带入下面的公式，计算定量结果的标准不确定度：

$$u = \sqrt{0.2^2 + (u_r \times \bar{c})^2} = \sqrt{0.0085^2 + (0.054 \times \bar{c})^2} \dots\dots\dots (41)$$

取扩展因子 $k=2$ ，则试样定量结果的扩展不确定度 (U) 表示为：

$$U = ku \dots\dots\dots (42)$$

(二) 综述报告、技术经济论证及预期的经济效益、社会效益和生态效益

转基因成分检测目前以转化体特异性 PCR 方法为主。欧盟 ENGL-GMFF 对转基因检测方法的特异性、检出限、定量限和稳健度等性能指标提出了明确要求，我国依据农业部 2259 号公告—4—2015 和 2259 号公告—5—2015 已发布一系列转化体特异性检测方法标准。产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 已在美国、加拿大、巴西、阿根廷、欧盟、日本、韩国等国家和地区获得审批，并于 2023 年获批我国进口用作加工原料的安全证书(农基安证字(2023)第 301 号)，进口和加工环节的监管检测需求明确。本标准同步建立实时荧光 PCR 定性、实时荧光 PCR 定量和普通 PCR 定性 3 种方法，检测机构可根据自身仪器条件选用，兼顾监管执法和常规筛查的需要。

技术经济论证：本方法的各项关键技术参数均经过试验确认和实验室间验证。8 家实验室对 5 个含量水平样品的联合验证结果表明，5 个含量样品检测总平均值的相对偏倚在 -3.471%~5.266%之间，重复性相对标准差均小于 7%，再现性相对标准差均小于 9%，正确度和精密度符合农业部 2259 号公告—5—2015 的要求；实时荧光 PCR 方法的检出限为 0.05%（约 20 拷贝）、定量限为 0.1%（约 40 拷贝），普通 PCR 定性方法的检出限为 0.1%（约 40 拷贝）。方法所用试剂、耗材和仪器均为转基因检测实验室常规配置，操作步骤与现行同类标准保持一致，检测人员经常规培训即可掌握，单样次检测成本与其他转化体特异性方法相当，具备推广应用的技术经济条件。

经济效益方面，本标准发布实施后，检测机构可直接依据本标准开展 DP202216 转化体成分的定性和定量检测，避免各自开发方法带来的重复投入，缩短检测周期；在此基础上可开发商业化检测试剂盒、开展检测服务，为检测机构形成新的业务收入。普通 PCR 定性方法仅需常规 PCR 仪和电泳设备，便于基层实验室采用，可降低设备投入和检测门槛。

社会效益方面，本标准将为农业行政主管部门对生物技术产品监管、或有效处置意外扩散事件，保护消费者知情权，避免非法生产造成严重经济损失，维护农产品贸易秩序，保障农业生物技术产业推进和舆论安全，发挥重要的技术支撑作用。

生态效益方面，本标准为 DP202216 及其产品的入境检验、市场监测和身份验证提供统一的检测手段，有助于防止未经批准的转基因品系及其产品流入市场和种植环节，规范转基因玉米加工、流通各环节的管理，保护农业生态环境。

四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况

本标准严格遵循我国已发布的“转基因植物及其产品成分检测定性 PCR 方法和实时荧光定量 PCR 方法指南”开展研制，并参考了测量方法与结果准确度评估的国家标准。本标准主要技术内容与国内现行有效的转基因植物转化体特异性检测方法相一致。主要技术参数，如定性 PCR 方法的特异性、灵敏度、实时荧光 PCR 定量方法的检出限、定量限、准确性、精确性等，均达到了方法指南的要求。

五、以国际标准为基础的起草情况，以及是否合规引用或者采用国际国外标准，并说明未采用国际标准的原因

本标准内容无对应的相关国际标准。

六、与现行标准、法律法规和强制性标准的关系

目前，我国尚没有专门针对产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 的检测标准。本标准作为推荐性标准，在国内首次提出，与现行相关法律、法规和强制性标准没有冲突。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

无重大分歧意见。

八、涉及专利的说明

本标准内容不涉及专利和专利纠纷。

九、标准作为强制性或推荐性标准发布的意见及实施建议

建议本标准作为推荐性标准发布。产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 已于 2023 年获批我国进口用作加工原料的安全证书（农基安证字〔2023〕第 301 号），建议尽快发布并实施本标准。

十、其他应说明的事项

无。

十一、参考文献

- [1] AgBioInvestor. Global GM crop area review 2025[R]. 2026.
- [2] 《转基因植物及其产品成分检测定性 PCR 方法制定指南》（农业部 2259 号公告—4—2015）
- [3] 《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》（农业部 2259 号公告—5—2015）
- [4] 《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》（GB/T 1.1—2020）
- [5] 《转基因植物及其产品成分检测玉米内标准基因定性 PCR 方法》（农业部 1861 号

公告—3—2012)

[6] 《转基因植物检测》.农业部科技发展中心编.中国农业出版社, 2008 年

[7] 《测量方法与结果的准确度 第 2 部分: 确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法》(GB/T 6379.2-2004)

[8] 测试方法与结果的准确度(正确度与精密度)第 2 部分:确定标准测试方法重复性和可再现性的基本方法(ISO 5725-2-1994)

[9] ENGL-GMFF. Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing, European Network of GMO Laboratories 2015

[10] 《转基因检测非标方法确认评价指南》(SN/T 4561—2016)

附件 1

转基因植物及其产品成分检测
产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体特异性 PCR 方法
标准文本验证方案

一、验证目的

通过对产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体（杂合体）特异性 PCR 方法的标准文本各参数的验证，综合评价标准文本的科学性、先进性和适用性。

二、组织实施和参与实验室

方法的验证工作由农业农村部科技发展中心统一组织实施，选择 8 家已通过“资质认证”和“审查认可”的生物安全检测机构对标准文本进行循环验证、检验验证和综合评价，具体参与验证单位见表 1。

表 1 验证单位

序号	单位名称
1	农业农村部农产品及加工品质量安全检验检测中心（杭州）
2	农业农村部农作物生态环境安全检验检测中心（上海）
3	农业农村部谷物及制品质量检验检测中心（哈尔滨）
4	农业农村部农产品及加工品检验检测中心（南京）
5	农业农村部食品质量检验检测中心（成都）
6	农业农村部植物及植物用微生物生态环境安全检验检测中心（广州）
7	农业农村部农作物及产品质量检验检测中心（哈尔滨）
8	农业农村部植物及植物用微生物生态环境安全检验检测中心（三亚）

三、提供的资料和样品

（一）标准的文本

《转基因植物及其产品成分检测 产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体特异性 PCR 方法》。

（二）样品

1. 实时荧光定性 PCR 方法验证

实时荧光定性 PCR 方法验证，需验证产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 实时荧光定性检测方法的特异性和检出限等参数。共设计 11 个样品，其中对照 3 个、试样 8 个。每个试样设置 3 个平行子样（试样的 3 个平行应为 3 份不同子样的 DNA），每个子样至少重复 3 次 PCR；每个对照设置 1 个子样，至少重复 3 次 PCR，分别进行内标准基因和转化体特异性引物的 PCR 扩增，共计 162 个反应。具体样品设计见表 2，建议内标准基因和转化体特异性引物的 PCR 扩增样品排列形式见表 3~4（表 3 中非玉米混合样需选用各自对应的内标准基因进行 PCR 扩增；若验证单位能确保各验证样品的 DNA 质量，可仅进行转化体特异性引物扩增）。

表 2 实时荧光 PCR 定性检测方法验证样品

样品编号	样品名称	样品内容	样品来源	样品性质
对照 1	空白对照	用水作为空白对照	验证单位自备	对照
对照 2	阴性对照	非转基因玉米基因组 DNA	中心统一提供	
对照 3	阳性对照	产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体基因组 DNA，拷贝数分数为 1%	中心统一提供	
试样 1	1% DP202216 玉米	拷贝数分数为 1% 的产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体基因组 DNA	中心统一提供	试样
试样 2	其他转基因 玉米混合样	Bt11、Bt176、MON810、MON863、GA21、NK603、T25、TC1507、MON89034、MON88017、59122、MIR604、3272、MON87460、DAS40278-9、4114、MON87427、5307，含量各 1%，以非转基因玉米为填充物	中心统一提供	
试样 3	转基因大豆 混合样	GTS40-3-2、MON89788、A5547-127、A2704-12、356043、305423、CV127、MON87701、MON87708、MON87769、MON87705、FG72、DAS81419-2，含量各 1%，以非转基因大豆	中心统一提供	

样品编号	样品名称	样品内容	样品来源	样品性质
		为填充物		
试样 4	转基因水稻 混合样	TT51-1、KF-6、KMD-1、M12、KF-8、KF-2、 G6H1、T1C-19，含量各 1%，以非转基因水稻为填充物	中心统一提供	
试样 5	转基因棉花 混合样	MON1445 、 MON531 、 MON15985 、 LLCOTTON25 、 MON88913 、 GHB614 、 COT102，含量各 1%，以非转基因棉花为填充物	中心统一提供	
试样 6	转基因油菜 混合样	MS1、MS8、RF1、RF2、RF3、T45、Oxy235、 Topas19/2、MON88302、73496，含量各 1%， 以非转基因油菜为填充物	中心统一提供	
试样 7	非转基因玉米 混合样	3 个非转基因玉米等量混合制成的 1 个样品	中心统一提供	
试样 8	0.05% DP202216 玉米	拷贝数分数为 0.05%的产量性状改良耐除草 剂玉米 DP202216 转化体基因组 DNA，该样品 为实时荧光 PCR 方法检出限样品	中心统一提供	

表 3 实时荧光定性 PCR 方法样品排列形式（内标准基因）

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	对照 1	对照 1	对照 1	试样 1	试样 1	试样 1	试样 1	试样 1	试样 1	试样 1	试样 1	试样 1
2				试样 2	试样 2	试样 2	试样 2	试样 2	试样 2	试样 2	试样 2	试样 2
3				试样 3	试样 3	试样 3	试样 3	试样 3	试样 3	试样 3	试样 3	试样 3
4	对照 2	对照 2	对照 2	试样 4	试样 4	试样 4	试样 4	试样 4	试样 4	试样 4	试样 4	试样 4
5				试样 5	试样 5	试样 5	试样 5	试样 5	试样 5	试样 5	试样 5	试样 5
6				试样 6	试样 6	试样 6	试样 6	试样 6	试样 6	试样 6	试样 6	试样 6
7	对照 3	对照 3	对照 3	试样 7	试样 7	试样 7	试样 7	试样 7	试样 7	试样 7	试样 7	试样 7
8				试样 8	试样 8	试样 8	试样 8	试样 8	试样 8	试样 8	试样 8	试样 8

表 4 实时荧光定性 PCR 方法样品排列形式（转化体特异性引物）

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	对照 1	对照 1	对照 1	试样 1	试样 1	试样 1	试样 1	试样 1	试样 1	试样 1	试样 1	试样 1
2				试样 2	试样 2	试样 2	试样 2	试样 2	试样 2	试样 2	试样 2	试样 2
3				试样 3	试样 3	试样 3	试样 3	试样 3	试样 3	试样 3	试样 3	试样 3
4	对照 2	对照 2	对照 2	试样 4	试样 4	试样 4	试样 4	试样 4	试样 4	试样 4	试样 4	试样 4

5				试样 5	试样 5	试样 5	试样 5	试样 5	试样 5	试样 5	试样 5	试样 5
6				试样 6	试样 6	试样 6	试样 6	试样 6	试样 6	试样 6	试样 6	试样 6
7	对照 3	对照 3	对照 3	试样 7	试样 7	试样 7	试样 7	试样 7	试样 7	试样 7	试样 7	试样 7
8				试样 8	试样 8	试样 8	试样 8	试样 8	试样 8	试样 8	试样 8	试样 8

2. 实时荧光定量 PCR 方法验证

实时荧光 PCR 定量检测方法验证，需验证产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 实时荧光定量检测方法的特异性、检出限、定量限、重复性和再现性等参数。共设计 13 个样品，其中对照 3 个、试样 5 个、校准样品 5 个。每个试样设置 3 个平行子样（试样的 3 个平行应为 3 份不同子样的 DNA），每个子样至少重复 3 次 PCR；校准品每个浓度、各对照设置 1 个子样，至少重复 3 次 PCR，分别进行 *zSSIb* 内标准基因和转化体特异性引物的 PCR 扩增。具体样品设计见表 5，建议 *zSSIb* 内标准基因和转化体特异性引物的 PCR 扩增样品排列形式见表 6~8。

表 5 实时荧光 PCR 定量检测方法验证样品

样品编号	样品名称	样品内容	样品来源	样品性质
对照 1	空白对照	用水作为空白对照	验证单位自备	对照
对照 2	阴性对照	非转基因玉米基因组 DNA	中心统一提供	
对照 3	阳性定量质控品	产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体基因组 DNA，拷贝数分数为 3%	中心统一提供	
q ₁	试样 q ₁	拷贝数分数为 5% 的产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体基因组 DNA	中心统一提供	试样
q ₂	试样 q ₂	拷贝数分数为 3% 的产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体基因组 DNA	中心统一提供	
q ₃	试样 q ₃	拷贝数分数为 1% 的产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体基因组 DNA	中心统一提供	
q ₄	试样 q ₄	拷贝数分数为 0.5% 的产量性状改良耐除草剂	中心统一提供	

样品编号	样品名称	样品内容	样品来源	样品性质
		玉米 DP202216 转化体基因组 DNA		
q ₅	试样 q ₅	拷贝数分数为 0.1% 的产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体基因组 DNA，该样品为实时荧光 PCR 方法定量限样品	中心统一提供	
G1	校准品 G1	G1 为初始浓度 50 ng/μL 的 100% DP202216 转化体成分含量玉米基因组 DNA（DP202216 为杂合体），反应体系中 DNA 2 μL 含量 100 ng 相当于 20000 copies，该拷贝数应高于试样 q ₁	中心统一提供	校准样品 （建议 G2、G3、G4、G5 采用 5 倍稀）
G2	校准品 G2	G1 和 G5 满足要求的前提下，选择适宜的梯度进行稀释	验证单位自行配置	
G3	校准品 G3	G1 和 G5 满足要求的前提下，选择适宜的梯度进行稀释	验证单位自行配置	
G4	校准品 G4	G1 和 G5 满足要求的前提下，选择适宜的梯度进行稀释	验证单位自行配置	
G5	校准品 G5	G5 为校准品最低浓度，其拷贝数应低于试样 q ₅ ，同时满足等于或小于定量限（约 40 copies）且大于检测限（约 20 copies）	验证单位自行配置	

表 6 实时荧光定量 PCR 方法样品排列形式（试样 1~2）

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	G1	G1	G1	试样 q1	试样 q1	试样 q1	G1	G1	G1	试样 q1	试样 q1	试样 q1
2	G2	G2	G2	试样 q1	试样 q1	试样 q1	G2	G2	G2	试样 q1	试样 q1	试样 q1
3	G3	G3	G3	试样 q1	试样 q1	试样 q1	G3	G3	G3	试样 q1	试样 q1	试样 q1
4	G4	G4	G4	试样 q2	试样 q2	试样 q2	G4	G4	G4	试样 q2	试样 q2	试样 q2
5	G5	G5	G5	试样 q2	试样 q2	试样 q2	G5	G5	G5	试样 q2	试样 q2	试样 q2
6	对照 1	对照 1	对照 1	试样 q2	试样 q2	试样 q2	对照 1	对照 1	对照 1	试样 q2	试样 q2	试样 q2
7	对照 2	对照 2	对照 2				对照 2	对照 2	对照 2			
8	对照 3	对照 3	对照 3				对照 3	对照 3	对照 3			
	内标准基因						转化体特异性引物					

表 7 实时荧光定量 PCR 方法样品排列形式（试样 3~4）

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	G1	G1	G1	试样 q3	试样 q3	试样 q3	G1	G1	G1	试样 q3	试样 q3	试样 q3
2	G2	G2	G2	试样 q3	试样 q3	试样 q3	G2	G2	G2	试样 q3	试样 q3	试样 q3
3	G3	G3	G3	试样 q3	试样 q3	试样 q3	G3	G3	G3	试样 q3	试样 q3	试样 q3
4	G4	G4	G4	试样	试样	试样	G4	G4	G4	试样	试样	试样

				q4	q4	q4				q4	q4	q4
5	G5	G5	G5	试样 q4	试样 q4	试样 q4	G5	G5	G5	试样 q4	试样 q4	试样 q4
6	对照 1	对照 1	对照 1	试样 q4	试样 q4	试样 q4	对照 1	对照 1	对照 1	试样 q4	试样 q4	试样 q4
7	对照 2	对照 2	对照 2				对照 2	对照 2	对照 2			
8	对照 3	对照 3	对照 3				对照 3	对照 3	对照 3			
	内标准基因						转化体特异性引物					

表 8 实时荧光定量 PCR 方法样品排列形式（试样 5）

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	G1	G1	G1	试样 q5	试样 q5	试样 q5	G1	G1	G1	试样 q5	试样 q5	试样 q5
2	G2	G2	G2	试样 q5	试样 q5	试样 q5	G2	G2	G2	试样 q5	试样 q5	试样 q5
3	G3	G3	G3	试样 q5	试样 q5	试样 q5	G3	G3	G3	试样 q5	试样 q5	试样 q5
4	G4	G4	G4				G4	G4	G4			
5	G5	G5	G5				G5	G5	G5			
6	对照 1	对照 1	对照 1				对照 1	对照 1	对照 1			
7	对照 2	对照 2	对照 2				对照 2	对照 2	对照 2			
8	对照 3	对照 3	对照 3				对照 3	对照 3	对照 3			
	内标准基因						转化体特异性引物					

3. 普通定性 PCR 方法验证

普通 PCR 定性方法验证，需验证产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 普通 PCR 定性方法的特异性和检出限等参数。共设计 11 个样品，其中对照 3 个、试样 8 个。每个试样设置 3 个平行子样（试样的 3 个平行应为 3 份不同子样的 DNA），每个子样至少重复 3 次 PCR；每个对照设置 1 个子样，至少重复 3 次 PCR，进行转化体特异性引物的 PCR 扩增。具体样品设计见表 9，建议转化体特异性引物的 PCR 扩增样品排列形式见表 10~11（表 10 中非玉米混合样需选用各自对应的内标准基因进行 PCR 扩增；若验证单位能确保各验证样品的 DNA 质量，可仅进行转化体特异性引物扩增）。

表 9 普通 PCR 定性方法验证样品

样品编号	样品名称	样品内容	样品来源	样品性质
对照 1	空白对照	用水作为空白对照	验证单位自备	对照
对照 2	阴性对照	非转基因玉米基因组 DNA	组织单位提供	
对照 3	阳性对照	产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体基因组 DNA，拷贝数分数为 1%	组织单位提供	
试样 1	1% DP202216 玉米	拷贝数分数为 1% 的产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体基因组 DNA	组织单位提供	试样
试样 2	其他转基因 玉米混合样	Bt11、Bt176、MON810、MON863、GA21、NK603、T25、TC1507、MON89034、MON88017、59122、MIR604、3272、MON87460、DAS40278-9、4114、MON87427、5307，含量各 1%，以非转基因玉米为填充物	中心统一提供	
试样 3	转基因大豆 混合样	GTS40-3-2、MON89788、A5547-127、A2704-12、356043、305423、CV127、MON87701、MON87708、MON87769、MON87705、FG72、DAS81419-2，含量各 1%，以非转基因大豆为填充物	中心统一提供	
试样 4	转基因水稻 混合样	TT51-1、KF-6、KMD-1、M12、KF-8、KF-2、G6H1、T1C-19，含量各 1%，以非转基因水稻为填充物	中心统一提供	
试样 5	转基因棉花 混合样	MON1445、MON531、MON15985、LLCOTTON25、MON88913、GHB614、COT102，含量各 1%，以非转基因棉花为填充物	中心统一提供	
试样 6	转基因油菜 混合样	MS1、MS8、RF1、RF2、RF3、T45、Oxy235、Topas19/2、MON88302、73496，含量各 1%，以非转基因油菜为填充物	中心统一提供	

样品编号	样品名称	样品内容	样品来源	样品性质
试样 7	非转基因玉米混合样	3 个非转基因玉米等量混合制成的 1 个样品	中心统一提供	
试样 8	0.1% DP202216 玉米	拷贝数分数为 0.1%的产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体基因组 DNA，该样品为普通 PCR 定性方法检出限样品	中心统一提供	

表 10 普通定性 PCR 方法样品排列形式（内标准基因）

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	对照	对照	对照	试样	试样	试样	试样	试样	试样	试样	试样	试样
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2				试样	试样	试样	试样	试样	试样	试样	试样	试样
				2	2	2	2	2	2	2	2	2
3				试样	试样	试样	试样	试样	试样	试样	试样	试样
				3	3	3	3	3	3	3	3	3
4	对照	对照	对照	试样	试样	试样	试样	试样	试样	试样	试样	试样
	2	2	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4
5				试样	试样	试样	试样	试样	试样	试样	试样	试样
				5	5	5	5	5	5	5	5	5
6				试样	试样	试样	试样	试样	试样	试样	试样	试样
				6	6	6	6	6	6	6	6	6
7	对照	对照	对照	试样	试样	试样	试样	试样	试样	试样	试样	试样
	3	3	3	7	7	7	7	7	7	7	7	7
8				试样	试样	试样	试样	试样	试样	试样	试样	试样
				8	8	8	8	8	8	8	8	8

表 11 普通定性 PCR 方法样品排列形式（转化体特异性引物）

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	对照	对照	对照	试样	试样	试样	试样	试样	试样	试样	试样	试样
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

2				试样 2	试样 2	试样 2	试样 2	试样 2	试样 2	试样 2	试样 2	试样 2
3				试样 3	试样 3	试样 3	试样 3	试样 3	试样 3	试样 3	试样 3	试样 3
4	对照 2	对照 2	对照 2	试样 4	试样 4	试样 4	试样 4	试样 4	试样 4	试样 4	试样 4	试样 4
5				试样 5	试样 5	试样 5	试样 5	试样 5	试样 5	试样 5	试样 5	试样 5
6				试样 6	试样 6	试样 6	试样 6	试样 6	试样 6	试样 6	试样 6	试样 6
7	对照 3	对照 3	对照 3	试样 7	试样 7	试样 7	试样 7	试样 7	试样 7	试样 7	试样 7	试样 7
8				试样 8	试样 8	试样 8	试样 8	试样 8	试样 8	试样 8	试样 8	试样 8

四、验证内容要求和提交验证报告的格式

（一）实时荧光 PCR 定性检测方法验证

表 12 引物探针初筛实时荧光 PCR 扩增体系

试剂	终浓度	体积
ddH ₂ O		—
10×PCR 缓冲液	1×	2.5 μL
25 mmol/L 氯化镁溶液	2.5 mmol/L	2.5 μL
dNTPs 混合溶液（各 2.5 mmol/L）	0.2 mmol/L	2.0 μL
10 μmol/L 上游引物	0.4 μmol/L	1.0 μL
10 μmol/L 下游引物	0.4 μmol/L	1.0 μL
10 μmol/L 探针	0.2 μmol/L	0.5 μL
Taq DNA 聚合酶	0.04 U/μL	—
50 mg/L DNA 模板	4.0 mg/L	2.0 μL
总体积		25.0 μL

反应程序为：95℃变性 5 min(第一阶段)；95℃变性 15 s，60℃退火延伸 60 s，循环数

≥40(第二阶段); 在第二阶段退火延伸时段收集荧光信号。

(二) 实时荧光 PCR 定量检测方法验证

表 13 引物探针初筛实时荧光 PCR 扩增体系

试剂	终浓度	体积
ddH ₂ O		—
10×PCR 缓冲液	1×	2.5 μL
25 mmol/L 氯化镁溶液	2.5 mmol/L	2.5 μL
dNTPs 混合溶液 (各 2.5 mmol/L)	0.2 mmol/L	2.0 μL
10 μmol/L 上游引物	0.4 μmol/L	1.0 μL
10 μmol/L 下游引物	0.4 μmol/L	1.0 μL
10 μmol/L 探针	0.2 μmol/L	0.5 μL
Taq DNA 聚合酶	0.04 U/μL	—
50 mg/L DNA 模板	4.0 mg/L	2.0 μL
总体积		25.0 μL

反应程序为: 95℃变性 5 min(第一阶段); 95℃变性 15 s, 60℃退火延伸 60 s, 循环数 ≥40(第二阶段); 在第二阶段退火延伸时段收集荧光信号。

(三) 普通 PCR 定性检测方法验证

表 14 普通 PCR 扩增体系

试剂	终浓度	体积
ddH ₂ O		—
10×PCR 缓冲液	1×	2.5 μL
25 mmol/L 氯化镁溶液	1.5 mmol/L	1.5 μL
dNTPs 混合溶液 (各 2.5 mmol/L)	0.2 mmol/L	2.0 μL
10 μmol/L DP202216-F	0.4 μmol/L	1.0 μL
10 μmol/L DP202216-R	0.4 μmol/L	1.0 μL
Taq DNA 聚合酶	0.025 U/μL	—
50 mg/L DNA 模板	4.0 mg/L	2.0 μL
总体积		25.0 μL

反应程序为: 94℃变性 5 min; 94℃变性 30 s, 58℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 共进行 35 次循环; 72℃延伸 5 min; 10℃保存。DP202216 转化体扩增片段大小为 133 bp, 内标准基因扩增片段大小为 151 bp。

五、验证方法注意事项

(一) 发样单位和时间

样品寄出单位: 上海市农业科学院。本轮验证发样时间为 2026 年 10 月 8 日。

（二）接收样品和资料后填写回执

验证单位在收到样品和资料后，立即填写回执寄给样品寄出单位。

（三）提交收样回执及验证报告的时间要求

收到样品和资料后，2个工作日内请将附件1接收回执的电子版（扫描或拍照）发送至：
641986563@qq.com。

因时间有限，请在收到样品的7个工作日内完成验证并提交验证报告。请将验证报告的电子版及相关资料电子版发送至：641986563@qq.com，并随后再打印签章纸质版寄出。

（四）收样回执和验证报告接收单位地址及联系方式

联系人：陈一帆；联系电话：17349710353（微信同号）

电子邮件：641986563@qq.com

联系地址：上海市闵行区北翟路2901号生物所生物安全检测与评价研究中心124室

附件 1

表 1 验证样品接收记录

样品名称	样品核对 (请用√或×标记)	状态检查（请用√或×标记）		备注
		样品包装完整		
阴性对照				
阳性对照（1%）				
1% DP202216 玉米（同阳性对照）				
0.1% DP202216 玉米				
0.05% DP202216 玉米				
试样 q ₁ （5%）				
试样 q ₂ （3%）				
试样 q ₃ （1%）				
试样 q ₄ （0.5%）				
试样 q ₅ （0.1%）				
阳性定量质控品（3%）				
校准品 G1（50 ng/μL，DP202216 为杂合体）				
DP202216 转化体特异性序列引物/ 探针 DP202216-qF/-qR/-qP（实时 荧光 PCR）				
zSSI II b 基因引物/探针 zSSI II b-3F/- 4R/-P（实时荧光 PCR）				
DP202216 转化体特异性序列引物 DP202216-F/-R				
zSSI II b 基因引物 zSSI II b-1F/-2R				
发样单位	上海市农业科学院 生物技术研究所	接收单位		
发样人	陈一帆	接收人		
发样日期	2026 年 10 月 8 日	接收日期		

附件 2

转基因植物及其产品成分检测
产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体特异性 PCR 方
法
实时荧光 PCR 定性检测方法验证报告

验证单位（公章）：

验证人员（签字）：

技术负责人（签字）：

报告日期： 年 月 日

表 2 DP202216 实时荧光 PCR 定性检测方法测定结果

样品名称 / 编号	实时荧光 PCR 定性检测方法								
	重复 1			重复 2			重复 3		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
空白对照									
阴性对照									
阳性对照									
1% DP202216 玉米									
其他转基因玉米混合样									
转基因大豆混合样									
转基因水稻混合样									
转基因棉花混合样									
转基因油菜混合样									
非转基因玉米混合样									
0.05% DP202216 玉米（检出限）									
使用的主要仪器（如 PCR 仪等）型号和试剂（如 Taq 酶等）相关信息：									

注：“+”表示阳性结果，“-”表示阴性结果。

附件 3

转基因植物及其产品成分检测
产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体特异性 PCR
方法

实时荧光 PCR 定量检测方法验证报告

验证单位（公章）：

验证人员（签字）：

技术负责人（签字）：

报告日期： 年 月 日

表 3 内标准基因 *zSSIb* 基因定量 PCR 结果

样品名称/编号		Ct 值								
		重复 1			重复 2			重复 3		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
校准品 G1 (40000 copies)										
校准品 G2 (? copies)										
校准品 G3 (? copies)										
校准品 G4 (? copies)										
校准品 G5 (? copies)										
标准曲线	公式									
	R ² 值									
	扩增效率									
空白对照										
阴性对照										
阳性定量质控对照										
试样 q ₁	重复 1									
	重复 2									
	重复 3									
试样 q ₂	重复 1									
	重复 2									
	重复 3									
试样 q ₃	重复 1									
	重复 2									
	重复 3									
试样 q ₄	重复 1									
	重复 2									
	重复 3									
试样 q ₅	重复 1									
	重复 2									
	重复 3									

表 4 DP202216 转化体特异性序列定量 PCR 结果

样品名称/编号		Ct 值								
		重复 1			重复 2			重复 3		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
校准品 G1 (20000 copies)										
校准品 G2 (? copies)										
校准品 G3 (? copies)										
校准品 G4 (? copies)										
校准品 G5 (? copies)										
标准曲线	公式									
	R ² 值									
	扩增效率									
空白对照										
阴性对照										
阳性定量质控对照										
试样 q ₁	重复 1				/	/	/	/	/	/
	重复 2				/	/	/	/	/	/
	重复 3				/	/	/	/	/	/
试样 q ₂	重复 1				/	/	/	/	/	/
	重复 2				/	/	/	/	/	/
	重复 3				/	/	/	/	/	/
试样 q ₃	重复 1	/	/	/				/	/	/
	重复 2	/	/	/				/	/	/
	重复 3	/	/	/				/	/	/
试样 q ₄	重复 1	/	/	/				/	/	/
	重复 2	/	/	/				/	/	/
	重复 3	/	/	/				/	/	/
试样 q ₅	重复 1	/	/	/	/	/	/			
	重复 2	/	/	/	/	/	/			
	重复 3	/	/	/	/	/	/			

表 5 试样拷贝数比值（转化体拷贝数/内标准基因拷贝数）结果计算

样品名称	测定序列及其 拷贝数比值	重复1			拷贝数比值 的平均值（%）	重复2			拷贝数比值 的平均值（%）	重复3			拷贝数比值 的平均值（%）
		1	2	3		1	2	3		1	2	3	
阳性定量 质控对照	DP202216												
	<i>zSSIIb</i>												
试样 q ₁	DP202216												
	<i>zSSIIb</i>												
试样 q ₂	DP202216												
	<i>zSSIIb</i>												
试样 q ₃	DP202216												
	<i>zSSIIb</i>												
试样 q ₄	DP202216												
	<i>zSSIIb</i>												
试样 q ₅	DP202216												
	<i>zSSIIb</i>												

附件 4

转基因植物及其产品成分检测
产量性状改良耐除草剂玉米 DP202216 转化体特异性 PCR 方
法
普通 PCR 定性方法验证报告

验证单位（公章）：

验证人员（签字）：

技术负责人（签字）：

报告日期： 年 月 日

表 6 DP202216 普通 PCR 定性方法测定结果

样品名称 / 编号	普通 PCR 定性方法								
	重复 1			重复 2			重复 3		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
空白对照									
阴性对照									
阳性对照									
1% DP202216 玉米									
其他转基因玉米混合样									
转基因大豆混合样									
转基因水稻混合样									
转基因棉花混合样									
转基因油菜混合样									
非转基因玉米混合样									
0.1% DP202216 玉米（检出限）									
使用的主要仪器（如 PCR 仪等）型号和试剂（如 Taq 酶等）相关信息：									

注：“+”表示阳性结果，“-”表示阴性结果。