

转基因植物及其产品成分检测
耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体特异性 PCR 方法
征求意见稿编制说明

目录

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.....	4
1. 前期准备.....	4
2. 方法建立.....	4
3. 文本起草和征求意见.....	5
4. 标准方法验证.....	5
5. 验证数据的汇总分析、标准文本完善与送审.....	5
6. 标准审定和报批.....	5
二、编制原则、标准的主要内容、技术参数的确定.....	6
（一）编制原则.....	6
1. 科学性.....	6
2. 先进性.....	6
3. 适用性.....	6
（二）耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 背景及方法建立的准备工作.....	6
1. 耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 简介.....	6
2. 耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 分子特征.....	6
3. 耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 检测方法.....	7
4. 方法建立的准备工作.....	8
（三）标准的主要内容、技术参数的确定.....	11
方法一、耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体特异性实时荧光 PCR 定性检测方法建立	11
方法二、耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体特异性实时荧光 PCR 定量检测方法建立	24
方法三、耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体特异性普通 PCR 定性方法建立	37
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	45
（一）实验室间验证及结果统计.....	45
（二）预期的经济效益、社会效益和生态效益.....	65

四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况	65
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；	66
六、与现行标准、法律法规和强制性标准的关系	66
七、重大分歧意见的处理经过和依据	66
八、涉及专利的有关情况说明	66
九、标准作为强制性或推荐性标准发布的意见及实施建议	66
十、其他应说明的事项	66
十一、参考文献	66
十二、本文相关附件	67
（一）文本验证方案（附件 1）	67
（二）文本验证报告（附件 2~4）	67

一、工作简况

（一）标准制定背景

根据最新统计显示，截至 2025 年，全球已有 30 个国家种植了获批的转基因作物，全球转基因作物种植面积增长了 2.5%，其中，中国种植面积增幅达 79%^[1]。

随着转基因作物种植面积的持续增长和全球公众对于转基因植物及其产品安全性的关注度不断提升，包括我国在内的全球 62 个国家相继颁布实施了转基因生物标识管理制度。根据我国《农业转基因生物安全管理条例》及其配套管理规章的规定，我国对农业转基因生物及其产品实行安全评价、产品标识、生产许可、经营许可、进口许可、加工许可等制度。其中，针对各个转基因作物转化体建立特异、灵敏、标准化的检测方法是保证标识管理制度顺利实施的重要技术支撑。

在转基因作物及其产品安全检测方法中，PCR 技术以其灵敏度高、稳定性好、准确性强、操作简便等特点已成为国际上转基因植物及其产品检测的主要方法。特别是实时荧光 PCR 技术因具有灵敏度高、特异性强、自动化程度高、实时性和准确性好等特点，近年来广泛应用于转基因作物的检测。目前针对大豆、水稻、玉米等作物特定转基因品系的定量方法已陆续研发成功。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普通 PCR 和实时荧光 PCR 技术两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。

耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 是青岛清原种子科学有限公司自主研发的转基因大豆品种，该转化体通过农杆菌介导的方法将 *pat* 基因和 *OsPPO2-k1* 基因转入大豆基因组中，于 2025 年 11 月 5 日获得农业农村部颁发的生物安全证书（证书编号：农基安证字(2025)第 187 号）。该品种是全球首例耐氟草啞等 PPO 抑制剂类除草剂的商业化转基因大豆，与耐氟草啞除草剂形成“专利种子+专利农药”一体化解决方案，突破了传统草甘膦、草铵膦等除草剂的抗性瓶颈，推动我国生物育种技术从“跟跑”到“领跑”。目前，我国还没有相应的耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体的定性定量检测标准，检测标准的缺失，极大制约了转基因生物相关生产、加工、经营和进出口等相关活动的监管，对于转化体事件特异性检测方法的建立，有利于高效快速的开展检测工作，提高效率，提升监管力度。

本项目针对耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体事件特异性序列，进行引物（探针）设计和筛选、结合 PCR 扩增体系的退火温度及引物（探针）浓度筛选、检测限定量限的测试等，建立

该转化体的事件特异性定性、定量 PCR 检测方法，保护研发者的知识产权，保护消费者的知情权和选择权，促进我国生物育种产业化，保护国际贸易的健康发展。项目的完成，将提升对该转化体的检测能力，完善监管体系。

（二）任务来源

本标准制定任务来源于农业农村部 2026 年农业国家标准和行业标准制修订项目（农质标函〔2026〕78 号），由华南农业大学、农业农村部科技发展中心、中国农业科学院生物技术研究所以、青岛清原种子科学有限公司联合起草。

本标准主要起草人为：****。

（三）起草单位情况

华南农业大学是全国重点大学，是广东省和农业农村部共建的“211 工程”大学，为具有独立法人资格的事业单位，主要从事人才培养和科学研究工作。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）是农业农村部依托华南农业大学建设的部级质检中心，主要开展转基因植物及其产品成分检测和环境安全检测技术研究，承担农业农村部行业标准制定修订及验证任务，承担国家和广东省下达的转基因生物安全监测与检测任务、政府指令性转基因植物环境安全检测任务、国内外企事业单位委托的各类产品检测与环境安全评价试验等工作。中心的建设于 2008 年完成，2008 年 11 月初次通过了国家计量认证和农业部质量安全检测机构考核、机构审查认可的现场评审，2009 年 2 月正式获得了国家实验室资质认定计量认证证书，2009 年 4 月获得了农业部审查认可和农产品质量安全检测机构考核合格证书，并分别于 2011 年 12 月、2014 年 11 月、2018 年 3 月，再次通过了“三认证”的现场复审。2024 年 3 月，中心再次通过资质认定与机构考核复评审，获颁“农产品质量安全检测机构考核合格证书”和“检验检测机构资质认定证书”证书。中心一直积极参与转基因相关国家标准的制（修）订、征求意见、循环验证工作，近十年主持完成了《转基因植物及其产品成分检测 抗病番木瓜 55-1 及其衍生品种定性 PCR 方法》（农业农村部公告第 111 号—6—2018）、《转基因植物及其产品成分检测 番木瓜内标准基因定性 PCR 方法》（农业农村部公告第 323 号—1—2020）、《转基因植物及其产品成分检测 耐除草剂大豆 KA-6G2016-7GmC 转化体特异性 PCR 方法》（农业农村部公告第 1012 号—13—2026）三项国家标准的制定，此外还主持一项国家标准《转基因植物及其产品成分检测 番木瓜转基因成分定性检测》的制定，目前已报批待发布。

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，主要职能包括：参与国家有关农业转基因生物安全管理法律法规的制定和组织实施；负责农业转基因生物安全评价和标识申请的受理与审查，参与评审的组织工作；负责农业转基因生物安全评价、检定与监控技术标准的制修订；负责全国农业转基因生物安全标准化技术委员会秘书处工作；负责农业转基因生物安全技术检测体系建设与管理的组织实施；组织开展农业转基因生物产品成分、食用安全、环境安全检测鉴定与监测监控；负责承担国际《生物安全议定书》规定的农业转基因生物安全管理信息交流与交换；组织开展农业转基因生物安全评价、检定与监控技术的国际合作与交流；负责农业转基因生物安全管理技术培训与公众宣传工作；承担农业农村部交办的其他工作。多年来，已主持和参与超过 250 项转基因检测标准的研制。依托于农业农村部科技发展中心建立的农业农村部农业生物技术产品质量安全检验检测中心，可开展农作物及产品转基因成分检测、农作物及产品营养成分检测、农作物品种鉴定、动植物源性成分检测和转基因环境安全检测。

中国农业科学院生物技术研究所，依托其成立的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（北京）于 2008 年首次通过检验检测机构资质认定（国家计量认证）、农业部农产品质量安全检测机构考核和农业部农业质检机构审查认可现场考核，获得转基因生物及其产品成分检测、分子特征评价检测、环境安全评价检测及水稻玉米等作物 DNA 指纹检测资质。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（北京）在机构设置、仪器配备、环境条件、人才培养、质量保证体系等各方面在全国范围内处于领先水平，是我国转基因植物及其产品检测标准的主要研制单位之一，在转基因植物及其产品的定性和定量检测技术及其标准化研究方面开展了大量卓有成效的工作，成功搭建了标准制定技术平台。近年来参与制定发布转基因植物安全评价、转基因植物及其产品成分检测国家标准超过 40 项，为我国转基因生物安全评价提供了重要的科学和技术支撑。

青岛清原种子科学有限公司是清原作物科学集团旗下的全资子公司，总部位于青岛，是集生物技术与种子研发、生产、加工、包装、销售及技术服务于一体的现代化农业科技企业。清原种子科学拥有超过 300 人的研发团队，建立了行业领先的生物技术与现代化育种体系。在生物技术育种领域，可实现 30 多种主要农作物的遗传转化；发明了“KingCas12 基因剪刀”、“基因敲高”等基因编辑底层核心技术，研制的单载体含 8 个基因的超级玉米、大豆等，标志着我国第四代转基因产品上的领先，公司目前已获得转基因安全证书 5 个。在商业化育种领域，清原种子科学已在全国建立了 10 余个育种站，350 余个测试点，形成覆盖全国的商业化育种网络。通过数字化采集设备和人工智能，实现农作物性状数据大规模采集和智能化分析，率先迈入智慧育种

4.0 时代。目前推出的“清田”系列品种，涵盖玉米、大豆、小麦、油菜等多个作物及生态区。未来，清原种子科学将不断加大对生物技术性状及商业化育种的研发，通过科技创新赋予种子新的“生命”，让种子拥有更高价值，为世界粮食安全贡献清原力量。耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 是青岛清原作物科学自主研发的转基因大豆品种，于 2025 年 11 月 5 日获得农业农村部颁发的生物安全证书（证书编号：农基安证字（2025）第 187 号），是全球首例耐氟草啶等 PPO 抑制剂类除草剂的商业化转基因大豆，突破了传统草甘膦、草铵膦等除草剂的抗性瓶颈。

（四）起草过程

1. 前期准备

任务下达后，按照工作需要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，认真分析了耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体分子特征相关的技术资料，分离、验证了耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 的外源载体的侧翼序列。在此基础上开展了对耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 的定性及定量检测方法及其标准化研究。

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》^[2]、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]、EURL-GMFF《Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing 2015》^[4]等相关标准，并按照 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》^[5]的要求进行标准的撰写工作。

2. 方法建立

正式试验前，应先完成耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体的特异性序列分子特征验证试验和材料的纯杂合鉴定试验。根据研发者提供的序列，设计和优化了转化体特异性普通 PCR 检测引物，对所选引物进行特异性检测，并对扩增序列进行了测序比对，与研发者提供序列完全一致。进而对定性方法扩增体系和扩增程序进行了优化，对该定性方法的方法检出限和方法再现性进行了测试。根据序列信息，设计和优化了转化体特异性的实时荧光 PCR 检测引物和探针，经实验选定了转化体特异性实时荧光 PCR 检测的引物探针组合，并对扩增序列进行了测序比对，与研发者提供序列完全一致。对选出的引物探针进行了特异性、标准曲线、正确度、精密度、检测限和定量限等测试，最终建立了耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体特异性实时 PCR 定性检测方法、

实时荧光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》^[5]，参照已发布的转基因植物及其产品成分检测标准，结合实验研究的耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 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 耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 及其衍生品种定性定量检测方法》标准征求意见稿。同时向有关专家定向征求意见和向社会公开征求意见，收集整理反馈意见，并对征求意见稿的文本进行修改完善。

4. 标准方法验证

制定标准文本验证方案（详见附件 1），并按验证方案的要求准备验证样品，邀请具备转基因检测条件和能力的检测机构进行实验室间验证，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）、农业农村部农作物种子质量检验检测中心（深圳）、农业农村部农作物生态环境安全检验检测中心（合肥）、农业农村部农产品及加工品检验检测中心（南京）、农业农村部农作物生态环境安全检验检测中心（上海）、农业农村部农作物及产品质量检验检测中心（哈尔滨）、农业农村部农产品质量检验检测中心（沈阳）以及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）共 8 个第三方检测机构对本标准方法特异性、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。

6. 标准审定和报批

受农业农村部农产品质量安全监管司委托，农业农村部科技教育司于 202*年**月**日~**日组织全国农业转基因生物安全管理标准化技术委员会**位专家，在**对本标准进行审定。根据标准审定的原则和程序，制标人汇报了标准研制的背景、研制过程、关键技术参数、验证结果和标准文本的主要内容等，然后请专家对标准的研制过程和标准文本逐条进行质疑，并对标准不妥之处提出了修改意见。审定过程中，专家对本标准的政策性、先进性和可操作性给予了肯定，在认

可本标准组织研制工作、技术路线和标准方法的同时，对标准文本的规范性提出了更高的要求，提出了进一步修改的意见。标准审定会后，根据专家提出的意见，进行了认真的分析，接受了修改意见。通过对标准的进一步修改，形成了标准报批稿。

二、编制原则、标准的主要内容、技术参数的确定

（一）编制原则

本标准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的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）耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 背景及方法建立的准备工作

1. 耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 简介

耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 是青岛清原作物科学自主研发的转基因大豆品种，该转化体通过农杆菌介导的方法将 *pat* 基因和 *OsPPO2-k1* 基因转入大豆基因组中，于 2025 年 11 月 5 日获得农业农村部颁发的生物安全证书（证书编号：农基安证字(2025)第 187 号）。

2. 耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 分子特征

耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 外源插入序列整合在大豆基因组 6 号染色体上(NC_038242.2)，

整合位点在 Chr6: 1647904~1647928 之间, T-DNA 序列全长为 4405 碱基, 整合进基因组过程中, 删除了 25 bp 的基因组序列, 同时在 LB 和基因组序列之间插入了 4 bp。外源插入序列相关元件信息见表 1, 外源插入序列 T-DNA 结构示意图见图 1。

表 1 耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 插入位点全长序列的元件、位置和功能注释

遗传元件	大小 (bp)	位置	功能
Gm-gDNA5' flanking	745	1~745	大豆 6 号染色体 (NC_038242.2) 1647159~1647903 序列
RB	47	746~792	农杆菌 T-DNA 右边界序列
间插序列	25	793~817	载体元件间隔核苷酸序列
P-CsVMV	517	818~1334	木薯叶脉花叶病毒的启动子, 驱动 pat 基因表达
pat 基因	555	1335~1889	编码草铵膦乙酰转移酶, 赋予植物对精草铵膦除草剂的耐受性。
T-E9	643	1890~2532	E9 终止子, 转录终止信号
间插序列	40	2533~2572	载体元件间隔核苷酸序列
P-CLSV	433	2573~3005	花生褪绿条纹病毒 CLSV 启动子, 驱动 OsPPO2-k1 基因表达
L-TEV	132	3006~3137	蛋白酶前导序列, 稳定 OsPPO2-k1 蛋白表达
间插序列	6	3138~3143	载体元件间隔核苷酸序列
CTP-OsPPO2	132	3144~3275	叶绿体定位肽, 引导 OsPPO2-k1 成熟蛋白至叶绿体
OsPPO2-k1	1527	3276~4802	编码原卟啉原氧化酶 2, 赋予植物对氟草啶除草剂的耐受性。
间插序列	6	4803~4808	载体元件间隔核苷酸序列
T-NOS	253	4809~5061	NOS 终止子, 转录终止信
间插序列	32	5062~5093	载体元件间隔核苷酸序列
LB	53	5094~5146	农杆菌 T-DNA 左边界序列
随机插入序列	4	5147~5150	大豆基因组和 T-DNA 的序列
Gm-gDNA3' flanking	309	5151~5459	大豆 6 号染色体 (NC_038242.2) 1647929~1648238 序列

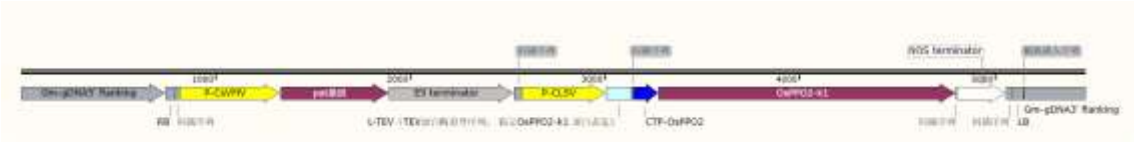


图 1 除草剂大豆 KA-6G2016-7 外源插入序列结构示意图

3. 耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 检测方法

经资料查询发现, 研发单位提供了针对耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体特异性 PCR 检测方法: 普通 PCR 检测引物在 KA-6G2016-7 外源插入序列的 RB 端, 目的片段扩增产物大小为 208 bp; 实时荧光 PCR 检测引物在转化体的 LB 端, 目的片段扩增产物大小为 118 bp, 序列信息见表 2。

表 2 研发单位耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 检测方法引物/探针序列

引物/探针名称	序列 (5'-3')	目的片段大小
KA-6G2016-7-RB-F	AAGACGCTTGAGTTGGTTAGGTATC	208 bp
KA-6G2016-7-RB-R	CCGCATATTGATCTGCTTCTTG	
KA-6G2016-7-RB-QF	AGGAAAGGTGAGCGAGAAATTAAG	118 bp
KA-6G2016-7-RB-QR	CTTAGCAGCTTGAGCTTGGATC	
KA-6G2016-7-RB-QP	FAM-AACTGAAGGCGGGAAACGACAAT-BHQ1	

4. 方法建立的准备工作

4.1 分子特征验证

首先对获得的转化体分子特征序列（标准参数需要使用的部分，如旁侧序列部分碱基）正确性进行验证。用研发者提供的 RB 和 LB 端检测引物（表 3），以研发者提供试验材料的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增，预期扩增产物序列如 4.1.1 和 4.1.2（大写字母为大豆基因组序列，小写字母为外源插入序列）。

表 3 研发单位耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 检测方法引物/探针序列

引物/探针名称	序列 (5'-3')	目的片段大小
KA-6G2016-7-RB-SEQ-F	GCTACATACTCTTAGATTGA	477 bp
KA-6G2016-7-RB-SEQ-R	CTGGCAGTATAGGATCTTGTATCTGTA	
KA-6G2016-7-LB-SEQ-F	GATTGAATCCTGTTGCCGGTCTT	522 bp
KA-6G2016-7-LB-SEQ-R	CACGGGTTCTTTCTTCTCA	

4.1.1 RB 端预期扩增产物序列

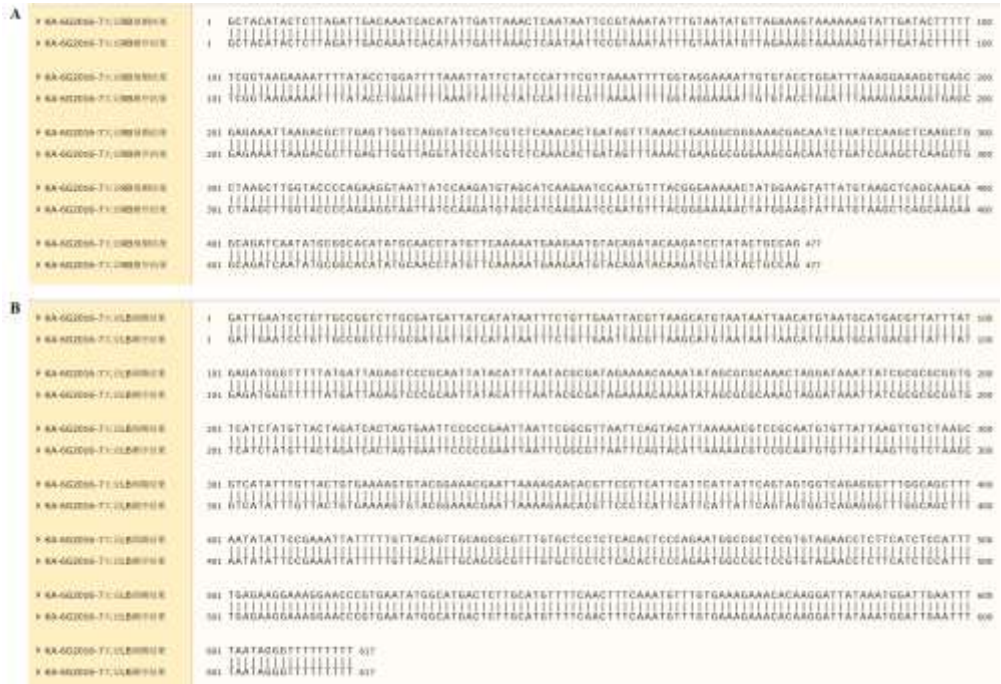
GCTACATACT CTTAGATTGA CAAATCACAT ATTGATTAAG CTCAATAATT CCGTAAATAT TTGTAATATG
 TTAGAAAGTA AAAAGTATT GATACTTTTT TCGGTAAGAA AATTTTATAC CTGGATTTTA AATTATTCTA
 TCCATTTTCGT TAAATTTTG GTAGGAAAAT TGTGTACCTG GATTTAAAGG AAAGGTGAGC GAGAAATTAA
 GACGCTTGAG TTGGTTAGGT ATCCATCGTC TCaaacactg atagttaa ctgaagcg gaaacgacaa
 tctgatccaa gctcaagctg ctaagcttgg taccccagaa ggtaattatc caagatgtag catcaagaat
 ccaatgttta cgggaaaaac tatggaagta ttatgtaagc tcagcaagaa gcagatcaat atgcggcaca
 tatgcaacct atgttcaaaa atgaagaatg tacagatata agatcctata ctgccag

4.1.2 LB 端预期扩增产物序列

gattgaatcc tgttgccggt cttgcgatga ttatcatata atttctgttg aattacgtta agcatgtaat
aattaacatg taatgcatga cgttatttat gagatgggtt tttatgatta gagtcccgcga attatacatt
taatacgcga tagaaaacaa aatatagcgc gcaaactagg ataaattatc gcgcgcggtg tcatctatgt
tactagatcA CTAGTGAATT CCCCCGAATT AATTCGGCGT TAATTCAGTA CATTAAAAAC GTCCGCAATG
TGTTATTAAG TTGTCTAAGC GTCATATTG TTAAGTGAA AAGTGTACGG AACGAATTA AAAGAACACG
TTCCCTCATT CATTCAATTAT TCAGTAGTGG TCAGAGGGTT TGGCAGCTTT AATATATTCC GAAATTATTT
TTGTTACAGT TGCAGCGCGT TTGTGCTCCT CTCACACTCC CAGAATGGCC GCTCCGTGTA GAACCTCTTC
ATCTCCATTT TGAGAAGGAA AGGAACCCGT G

4.1.3 RB 和 LB 端扩增产物比对结果

对扩增产物进行测序，与研发者提供的旁侧序列进行比较。序列分析结果显示，PCR 产物序列与研发者提供的旁侧序列一致，表明 KA-6G2016-7 转化体分子特征序列正确，提供的试验材料确为 KA-6G2016-7 转化体（图 2）。



注：A：RB 端扩增产物序列比对结果；B：LB 端扩增产物序列比对结果。

图 2 除草剂大豆 KA-6G2016-7 旁侧序列测序分析结果

4.2 材料的纯合性或杂合性验证

4.2.1 材料纯合性鉴定方法

耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 及其受体材料育苗后提取单株叶片的基因组 DNA，以 25 ng/μL DNA 为模板，选取 20 个单株采用数字 PCR 进行纯合性鉴定。

4.2.2 材料纯合性鉴定结果

由于杂合种子和纯合种子中外源基因与内标准基因的拷贝数（内外源基因均为单拷贝）比值存在差异，纯合种子中外源基因和内标准基因的拷贝数比值为 100%，而杂合种子中外源基因和内标准基因的拷贝数比值的测量值在 50%左右。因此，需要鉴定原材料的纯合度。依据农业部 1485 号公告—19—2010《转基因植物及其产品成分检测 基体标准物质候选物鉴定方法》对 20 个样本进行纯合度鉴定，将 KA-6G2016-7 种子单粒提取的基因组 DNA 作为微滴式数字 PCR 反应的模板，使用研发者提供的转化体 RB 端检测引物/探针组合 KA-6G2016-7-RB-QF/QR/QP 和内标准基因 *Lectin* 基因引物探针组合 lec-1215F/lec-1332R/lec-1269P 同时进行数字 PCR 扩增，扩增结果显示：转基因大豆 DNA 中 KA-6G2016-7 转化体和 *Lectin* 基因引物探针组合均有微滴生成，且 KA-6G2016-7 转化体和 *Lectin* 基因拷贝数比值的均值为 0.99%，表明 KA-6G2016-7 大豆为纯合体，纯合度 100%（表 4）。

表 4 微滴数字 PCR 方法测试纯合度结果

序号	参数	拷贝数 (copies)	比值	纯合性情况
1	内标准基因 <i>Lectin</i>	38921	1.02	纯合
	KA-6G2016-7 转化体 RB 端特异性序列	39821		
2	内标准基因 <i>Lectin</i>	39054	0.97	纯合
	KA-6G2016-7 转化体 RB 端特异性序列	37839		
3	内标准基因 <i>Lectin</i>	36708	1.06	纯合
	KA-6G2016-7 转化体 RB 端特异性序列	38755		
4	内标准基因 <i>Lectin</i>	38939	0.93	纯合
	KA-6G2016-7 转化体 RB 端特异性序列	36065		
5	内标准基因 <i>Lectin</i>	36388	1.06	纯合
	KA-6G2016-7 转化体 RB 端特异性序列	38701		
6	内标准基因 <i>Lectin</i>	37873	1.00	纯合
	KA-6G2016-7 转化体 RB 端特异性序列	37818		
7	内标准基因 <i>Lectin</i>	39215	0.94	纯合
	KA-6G2016-7 转化体 RB 端特异性序列	36926		
8	内标准基因 <i>Lectin</i>	37673	1.01	纯合
	KA-6G2016-7 转化体 RB 端特异性序列	38165		
9	内标准基因 <i>Lectin</i>	36558	1.09	纯合
	KA-6G2016-7 转化体 RB 端特异性序列	39778		
10	内标准基因 <i>Lectin</i>	37189	0.97	纯合
	KA-6G2016-7 转化体 RB 端特异性序列	36069		
11	内标准基因 <i>Lectin</i>	39555	0.92	纯合
	KA-6G2016-7 转化体 RB 端特异性序列	36451		
12	内标准基因 <i>Lectin</i>	38355	1.00	纯合
	KA-6G2016-7 转化体 RB 端特异性序列	38481		

序号	参数	拷贝数 (copies)	比值	纯合性情况
13	内标准基因 <i>Lectin</i>	39498	0.98	纯合
	KA-6G2016-7 转化体 RB 端特异性序列	38822		
14	内标准基因 <i>Lectin</i>	37376	0.99	纯合
	KA-6G2016-7 转化体 RB 端特异性序列	37118		
15	内标准基因 <i>Lectin</i>	38596	0.94	纯合
	KA-6G2016-7 转化体 RB 端特异性序列	36437		
16	内标准基因 <i>Lectin</i>	38060	1.01	纯合
	KA-6G2016-7 转化体 RB 端特异性序列	38400		
17	内标准基因 <i>Lectin</i>	39436	0.93	纯合
	KA-6G2016-7 转化体 RB 端特异性序列	36496		
18	内标准基因 <i>Lectin</i>	36389	1.02	纯合
	KA-6G2016-7 转化体 RB 端特异性序列	36971		
19	内标准基因 <i>Lectin</i>	39873	0.98	纯合
	KA-6G2016-7 转化体 RB 端特异性序列	39110		
20	内标准基因 <i>Lectin</i>	36365	1.01	纯合
	KA-6G2016-7 转化体 RB 端特异性序列	36646		

（三）标准的主要内容、技术参数的确定

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、附录等 8 个部分。

标准文本主要技术内容包括耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 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、耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 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、耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 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

根据研发者提供的 KA-6G2016-7 大豆外源载体插入片段的 RB 和 LB 侧翼序列信息,以及《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）^[2]中推荐实时荧光 PCR 检测方法的扩增片段长度为 80 bp~200 bp 的要求,使用 NCBI 网站的引物（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome）在线设计软件 Primer designing tool 进行引物探针的设计,综合考虑核苷酸序列 GC 含量和引物 T_m 值,合成研

发者 RB 端引物探针 1 组（118 bp）与 RB 端引物 2 条，合成自行设计的实时荧光 PCR 引物 2 条与探针 1 条，具体位置如图 3 所示。

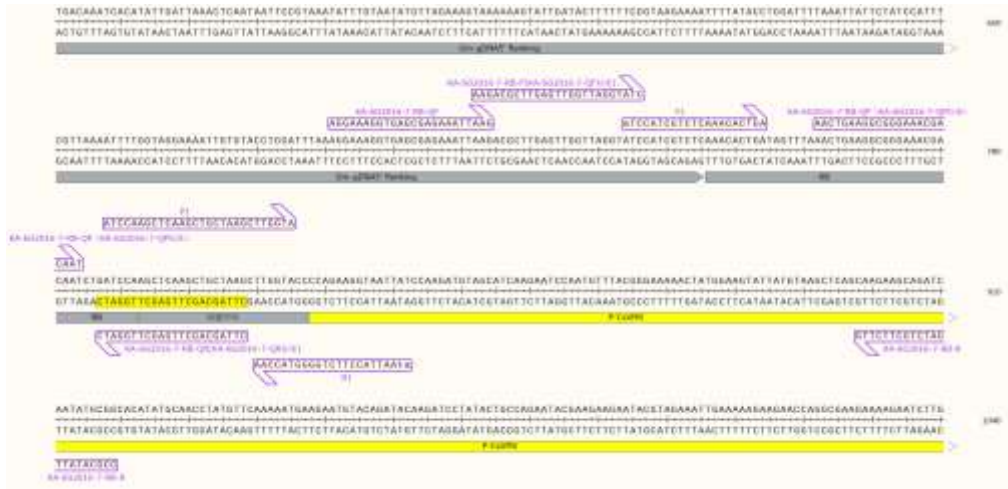


图 3 耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体实时荧光 PCR 引物探针位置图

共得到符合预期扩增大小的引物/探针组合 10 个引物探针组合序列信息详见表 5。

表 5 耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 大豆转化体实时荧光 PCR 检测候选引物/探针组合信息表

组合编号	引物/探针名称	序列（5'-3'）	目的片段大小	来源
A	KA-6G2016-7-RB-QF	AGGAAAGGTGAGCGAGAAATTAAG	118 bp	研发者
	KA-6G2016-7-RB-QR	CTTAGCAGCTTGAGCTTGATC		
	KA-6G2016-7-RB-QP	FAM-AACTGAAGGCGGGAAACGACAAT-BHQ1		
B	KA-6G2016-7-RB-QF	AGGAAAGGTGAGCGAGAAATTAAG	142 bp	研发者
	RB-R1	ATAATTACCTTCTGGGGTACCAA		自行设计
	KA-6G2016-7-RB-QP	FAM-AACTGAAGGCGGGAAACGACAAT-BHQ1		研发者
C	KA-6G2016-7-RB-F	AAGACGCTTGAGTTGGTTAGGTATC	97 bp	研发者
	KA-6G2016-7-RB-QR	CTTAGCAGCTTGAGCTTGATC		研发者
	KA-6G2016-7-RB-QP	FAM-AACTGAAGGCGGGAAACGACAAT-BHQ1		研发者
D	KA-6G2016-7-RB-F	AAGACGCTTGAGTTGGTTAGGTATC	121 bp	研发者
	RB-R1	ATAATTACCTTCTGGGGTACCAA		自行设计
	KA-6G2016-7-RB-QP	FAM-AACTGAAGGCGGGAAACGACAAT-BHQ1		研发者
E	RB-F1	ATCCATCGTCTCAAACACTGA	99 bp	自行设计
	RB-R1	ATAATTACCTTCTGGGGTACCAA		自行设计
	KA-6G2016-7-RB-QP	FAM-AACTGAAGGCGGGAAACGACAAT-BHQ1		研发者
F	RB-F1	ATCCATCGTCTCAAACACTGA	186 bp	自行设计
	KA-6G2016-7-RB-R	CCGCATATTGATCTGCTTCTTG		研发者
	KA-6G2016-7-RB-QP	FAM-AACTGAAGGCGGGAAACGACAAT-BHQ1		研发者
G	KA-6G2016-7-RB-QF	AGGAAAGGTGAGCGAGAAATTAAG	142 bp	研发者
	RB-R1	ATAATTACCTTCTGGGGTACCAA		自行设计

组合编号	引物/探针名称	序列 (5'-3')	目的片段大小	来源
	RB-P1	FAM-ATCCAAGCTCAAGCTGCTAAGCTTGGTA-BHQ1		自行设计
H	KA-6G2016-7-RB-F	AAGACGCTTGAGTTGGTTAGGTATC	121 bp	研发者
	RB-R1	ATAATTACCTTCTGGGGTACCAA		自行设计
	RB-P1	FAM-ATCCAAGCTCAAGCTGCTAAGCTTGGTA-BHQ1		自行设计
I	RB-F1	ATCCATCGTCTCAAACACTGA	99 bp	自行设计
	RB-R1	ATAATTACCTTCTGGGGTACCAA		自行设计
	RB-P1	FAM-ATCCAAGCTCAAGCTGCTAAGCTTGGTA-BHQ1		自行设计
J	RB-F1	ATCCATCGTCTCAAACACTGA	186 bp	自行设计
	KA-6G2016-7-RB-R	CCGCATATTGATCTGCTTCTTG		研发者
	RB-P1	FAM-ATCCAAGCTCAAGCTGCTAAGCTTGGTA-BHQ1		自行设计

1.2 引物探针的筛选

转化体特异性引物和探针筛选的体系和程序，先用通用的实时荧光 PCR 扩增体系和反应条件初筛，再用不同的酶和仪器测试，筛选出合适的引物和探针后，再进行优化。具体的 PCR 扩增体系见表 6，扩增程序采用《转基因植物及其产品成分检测 大豆内标准基因定性 PCR 方法》（农业部 2031 号公告—8—2013）^[6]中 *Lectin* 基因的扩增程序：95 °C 变性 5 min；95 °C 变性 15 s，60 °C 退火延伸 60 s（优先选择 60 °C 测试，若不适合再调换），循环 ≥40；在第二阶段的退火延伸（60 °C）时段收集荧光信号。

表 6 通用的实时荧光 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 F	0.4 μmol/L	1.0 μL
10 μmol/L R	0.4 μmol/L	1.0 μL
10 μmol/L P	0.2 μmol/L	0.5 μL
<i>Taq</i> DNA 聚合酶	0.04 U/μL	—
25mg/L DNA 模板	2.0 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 <i>Taq</i> DNA 聚合酶的浓度确定其体积，并相应调整 ddH ₂ O 的体积，使扩增体系总体积达到 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扩增体系，但引物和探针用量按表 6 执行。 注 3：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 个扩增体系的体积，可按照实际反应的数量进行扩增体系配置。		

引物探针组合筛选样品设置为空白样品（ddH₂O）、阴性样品（12.5 ng/μL 的非转基因大豆）、

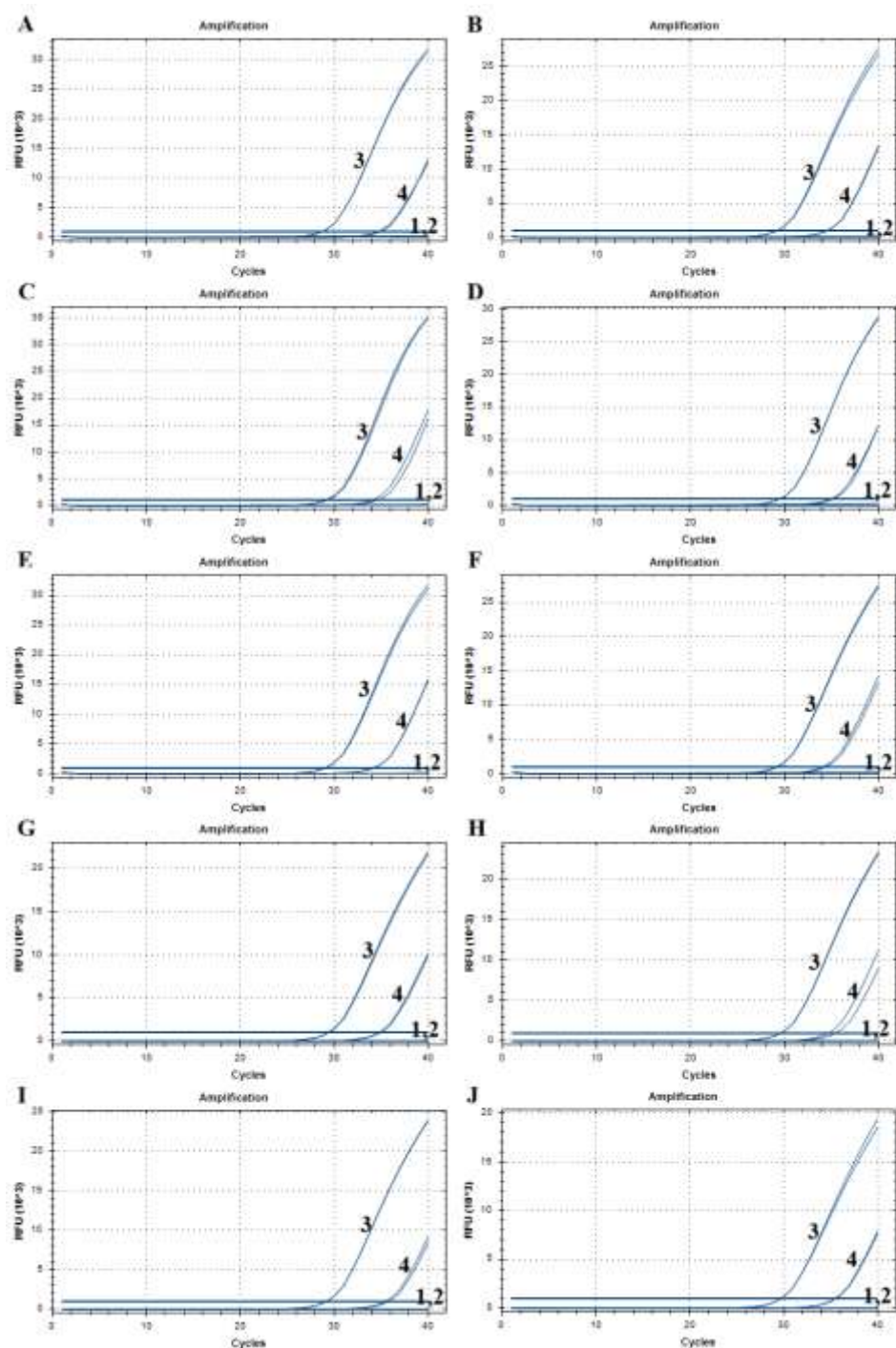
阳性样品（0.8 ng/ μ L 和 0.05 ng/ μ L 的耐除草剂大豆 KA-6G2016-7）。通过其扩增曲线形状及荧光信号的高低进行比较，选择扩增曲线呈“S”型且荧光信号较高、 C_t 值较小的引物探针组合作为后续试验验证的候选引物。

表 7 引物探针组合测试结果

组合编号	引物/探针组合	空白样品 扩增 C_t 值	阴性样品 扩增 C_t 值	阳性样品 1 扩增 C_t 值	阳性样品 2 扩增 C_t 值
A	KA-6G2016-7-RB-QF/KA-6G2016-7-RB-QR/ KA-6G2016-7-RB-QP	N/A	N/A	28.72	34.96
		N/A	N/A	28.75	34.70
B	KA-6G2016-7-RB-QF/RB-R1/ KA-6G2016-7-RB-QP	N/A	N/A	29.21	34.54
		N/A	N/A	29.18	34.49
C	KA-6G2016-7-RB-F/KA-6G2016-7-RB-QR/ KA-6G2016-7-RB-QP	N/A	N/A	29.11	34.05
		N/A	N/A	29.23	34.58
D	KA-6G2016-7-RB-F/RB-R1/ KA-6G2016-7-RB-QP	N/A	N/A	29.45	35.13
		N/A	N/A	29.45	34.96
E	RB-F1/RB-R1/ KA-6G2016-7-RB-QP	N/A	N/A	29.13	34.24
		N/A	N/A	29.06	34.24
F	RB-F1/KA-6G2016-7-RB-R/ KA-6G2016-7-RB-QP	N/A	N/A	28.72	34.09
		N/A	N/A	28.75	34.37
G	KA-6G2016-7-RB-QF/RB-R1/ RB-P1	N/A	N/A	29.21	34.77
		N/A	N/A	29.18	34.99
H	KA-6G2016-7-RB-F/RB-R1/ RB-P1	N/A	N/A	29.11	34.65
		N/A	N/A	29.23	35.44
I	RB-F1/RB-R1/ RB-P1	N/A	N/A	29.45	35.76
		N/A	N/A	29.45	35.43
J	RB-F1/KA-6G2016-7-RB-R/ RB-P1	N/A	N/A	29.13	35.45
		N/A	N/A	29.06	35.55

注：N/A 表示无典型扩增曲线。

采用通用的实时荧光 PCR 扩增体系和反应条件进行 PCR 扩增,对表 4 中 10 组实时荧光 PCR 检测引物探针组合进行特异性初步筛选，每个样品设置 2 个平行。根据结果选择扩增信号最强、 C_t 值最小的引物作为建立检测方法的候选引物。经过初步筛选，结果见表 7 与图 4，综合考虑扩增曲线形态、荧光信号、 C_t 值和引物位置，初步确定引物探针组合 C（即 KA-6G2016-7-RB-F/KA-6G2016-7-RB-QR/KA-6G2016-7-RB-QP）阳性样品扩增曲线终点信号最强，扩增效率最接近 100%，适合作为候选引物探针。



注：1：空白样品；2：阴性样品；3：阳性样品 1；4：阳性样品 2。

图4 耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体实时荧光 PCR 引物/探针筛选

1.3 引物探针的确定

根据测试结果，确定耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体特异性序列实时荧光 PCR 使用的引物探针：

KA-6G2016-7-RB-F: 5'- AAGACGCTTGAGTTGGTTAGGTATC -3'

KA-6G2016-7-RB-QR: 5'- CTTAGCAGCTTGAGCTTGGATC -3'

KA-6G2016-7-RB-QP: 5'-AACTGAAGGCGGGAAACGACAAT-3'

其中KA-6G2016-7-RB-QP为耐除草剂大豆KA-6G2016-7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97 bp。

2. PCR 扩增条件的优化与确定

2.1 引物探针浓度的优化

参照农业部2031号公告—8—2013^[6]中Lectin基因的扩增程序，以60℃为退火温度进行PCR扩增，调整优化耐除草剂大豆KA-6G2016-7转化体实时荧光PCR扩增体系，分别设置0.1 μmol/L、0.2 μmol/L、0.3 μmol/L、0.4 μmol/L、0.5 μmol/L共5种引物浓度梯度，探针浓度均为引物浓度的一半，根据荧光曲线的线型、相对Ct值等，确定引物和探针的浓度。

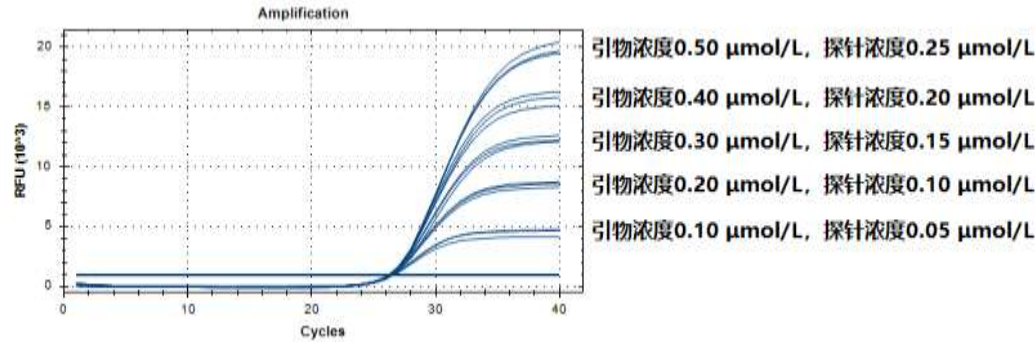


图5 耐除草剂大豆KA-6G2016-7转化体实时荧光PCR引物探针扩增体系优化测试

表8 引物探针浓度测试结果

引物/探针组合浓度	阳性对照 扩增 Ct 值	阳性对照 扩增平均 Ct 值
引物浓度 0.50 μmol/L 探针浓度 0.25 μmol/L	26.50	26.44
	26.35	
	26.47	
引物浓度 0.40 μmol/L 探针浓度 0.20 μmol/L	26.30	26.24
	26.23	
	26.19	
引物浓度 0.30 μmol/L 探针浓度 0.15 μmol/L	26.22	26.32
	26.25	
	26.49	
引物浓度 0.20 μmol/L 探针浓度 0.10 μmol/L	26.16	26.19
	26.20	
	26.21	
引物浓度 0.10 μmol/L 探针浓度 0.05 μmol/L	26.14	26.19
	26.20	
	26.23	

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 $\mu\text{mol/L}$ 以上时扩增曲线线性良好、终点信号强（图 5），同时 C_t 值差异并不明显（表 8），最后综合考量了扩增效率和体系配置的适用性等因素，确定了耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 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 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.2 PCR 扩增条件的确定

经优化最终确立了耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体特异性实时荧光 PCR 扩增体系与扩增程序与农业部 2031 号公告—8—2013^[6]一致，扩增体系各项成分按表 9 所述添加。扩增程序为：95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min；95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s，60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 60 s，循环数 ≥ 40 ；在第二阶段的退火延伸（60 $^{\circ}\text{C}$ ）时段收集荧光信号。

表 9 耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 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 $\times$ PCR 缓冲液	1 $\times$	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 $\mu\text{mol/L}$ KA-6G2016-7-QF	0.4 $\mu\text{mol/L}$	1.0 μL
10 $\mu\text{mol/L}$ KA-6G2016-7-qR	0.4 $\mu\text{mol/L}$	1.0 μL
10 $\mu\text{mol/L}$ KA-6G2016-7-qP	0.2 $\mu\text{mol/L}$	0.5 μL
<i>Taq</i> DNA 聚合酶	0.04 U/ μL	—
25 mg/L DNA 模板	2.0mg/ μL	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 <i>Taq</i> DNA 聚合酶的浓度确定其体积，并相应调整 ddH₂O 的体积，使扩增体系总体积达到 25.0 μL。 2.若采用实时荧光 PCR 试剂盒，则按试剂盒的推荐用量配制扩增体系，但引物和探针用量按表 9 执行。 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。 4.此表是 1 个平行扩增体系的体积，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

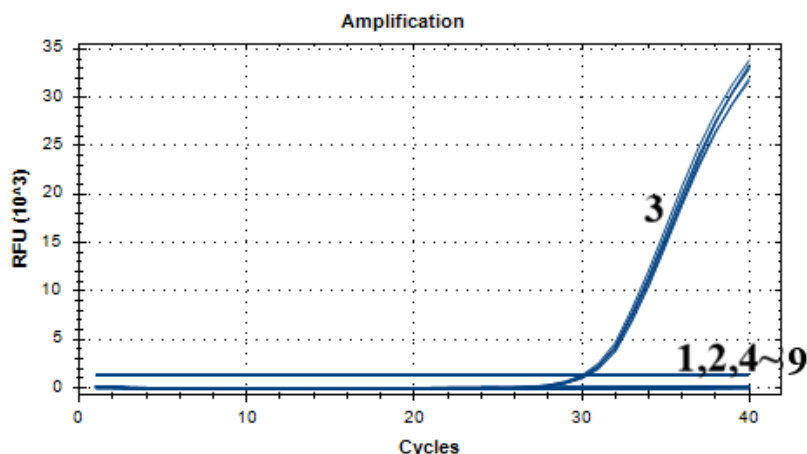
选用不同作物及其主要的商业化转化体对耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 引物探针组合 C（KA-6G2016-7-RB-F/KA-6G2016-7-RB-QR/KA-6G2016-7-RB-QP）进行特异性测试，样品包括空白对照、阴性对照（12.5 ng/ μL 的非转基因大豆）、1%阳性对照（12.5 ng/ μL 的耐除草剂大豆 KA-6G2016-7）和 5 份转基因试样（其他转基因大豆混合样、转基因玉米混合样、转基因水稻混合样、转基因油菜混合样、转基因棉花混合样），具体样品信息见表 10。

表 10 特异性测试样品

序号	样品名称	样品内容	样品性质
1	空白对照	用水作为空白对照	空白对照
2	阴性对照	KA-6G2016-7 受体（非转基因）大豆基因组 DNA（12.5 ng/ μ L）	阴性对照
3	1%阳性对照	含量为 1%的耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 基因组 DNA（12.5 ng/ μ L）	阳性对照
4	其他转基因大豆混合样	GTS40-3-2、MON89788、A5547-127、A2704-12、356043、305423、CV127、MON87701、MON87708、MON87769、MON87705、FG72、DAS81419-2，13 个转化体混合制成 1 个样品，每个转化体质量分数为 1%	测试样品
5	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、5307，18 个转化体混合制成 1 个样品，每个转化体质量分数为 1%	测试样品
6	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%	测试样品
7	转基因油菜混合样	MS1、MS8、RF1、RF2、RF3、T45、Oxy235、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%	测试样品
8	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%	测试样品
9	非转基因大豆混合样	3 个非转基因大豆（天隆 1 号、Williams 82）等量混合制成的 1 个样品	测试样品

3.2 方法的特异性测试

应用本方法仅能从耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体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 6）。因此，选择耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 引物探针组合 C（KA-6G2016-7-RB-F/KA-6G2016-7-RB-QR/KA-6G2016-7-RB-QP）作为耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体实时荧光 PCR 方法的候选引物探针组合，并将该组合在后续实验及标准中命名为 KA-6G2016-7-QF/KA-6G2016-7-QR/KA-6G2016-7-QP，其扩增产物片段大小为 97 bp。



注：1~9 依次为空白对照、阴性对照、1%阳性对照、其他转基因大豆混样、转基因玉米混合样、转基因水稻混合样、转基因油菜混合样、转基因棉花混合样、非转基因大豆混合样。

图 6 耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 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

扩增包含目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 7。

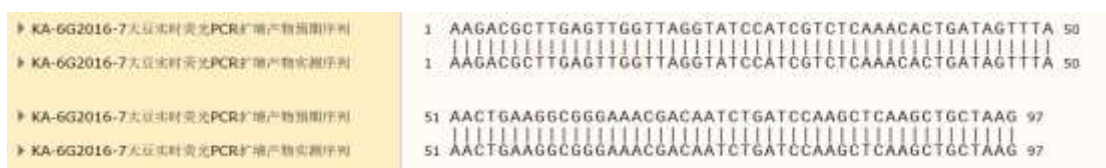


图 7 耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体实时荧光 PCR 引物探针组合扩增产物测序验证

实时荧光 PCR 扩增产物的序列如下：

1 AAGACGCTTG AGTTGGTTAG GTATCCATCG TCTCAAACAC TGATAGTTTA AACTGAAGGC
61 GGGAAACGAC AATCTGATCC AAGCTCAAGC TGCTAAG

该序列为 KA-6G2016-7 的 5'端转化体特异性序列，序列方向为 5'~3'，5'端单下划线部分为实时荧光 PCR 检测方法引物 KA-6G2016-7-QF 的序列，3'端单下划线部分为实时荧光 PCR 检测方法引物 KA-6G2016-7-QR 的反向互补序列，中间方框内部为实时荧光 PCR 检测方法探针 KA-6G2016-7-QP 的序列。1~34 为大豆基因组部分序列，35~97 为外源插入片段部分序列。

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^[3]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，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%，由此确定了检出限应不高于 0.05%。

5.2 试验材料的选择

用于检出限测试的试验材料，可选择有证标准物质或非有证标准物质（如：研发人提供的种子），分别按 5.2.1 或 5.2.2 执行。

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。

本试验材料为是研发人提供的种子，经本实验室鉴定为纯合体，可进行后续检出限测试。

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，本标准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 $\times 324.5 \times 2$ ）。

其他常见作物基因组 DNA 质量和拷贝数的换算关系见表 10。本标准中试验材料为大豆，其参考单倍体基因组大小为 1115 Mbp^[7]，由此计算出 1 ng 的纯合大豆基因组 DNA 约含有 832 ($10^{-9} \times 6.02 \times 10^{23} / (1115 \times 10^6 \times 2 \times 324.5)$) 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表 11。

表 11 不同作物基因组 DNA 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

本方法所用的试验材料为研发人提供的转基因大豆种子，选择发芽后经过鉴定的纯合体植株

叶片作为试样，进行检出限测定。

5.4 检出限的初步测试样品设定要求

检出限测试时，在含有 50 ng 基因组 DNA 的体系中，样品的设置必须包含的 5 个样品：（1）转基因拷贝数含量为 0.05%（相对含量）的测试样品；（2）转化体基因组 DNA 不小于 20 个拷贝（绝对含量）的测试样品；（3）转化体基因组 DNA 为 1 个拷贝的质控样品；（4）空白对照；（5）其他样品浓度在 1~20 拷贝之间选择。共测试至少 5 个样品。

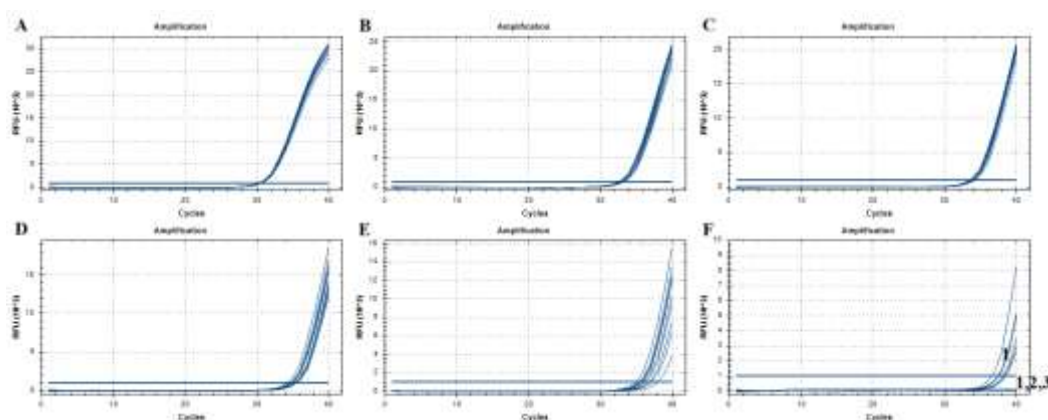
5.5 测试样品的初始化浓度

将提取的 KA-6G2016-7 转化体及其非转基因对照的基因组 DNA 用 1×TE 稀释成 25 ng/μL 换算成拷贝数浓度 $832 \times 25 = 20800$ copies/μL，确保体系中加入 2 μL 样品后 DNA 模板量为 50 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 25 ng/μL 的 KA-6G2016-7 转化体基因组 DNA，用 25 ng/μL 的非转基因大豆基因组 DNA，梯度稀释成 KA-6G2016-7 转化体拷贝数比值为 0.50%、0.10%、0.05%、0.025%、0.0125%、0.0025% 共 6 个测试样品，对应的转化体拷贝数浓度为 100、20、10、5、2.5、0.5 copies/μL。扩增体系中加入 2 μL 测试样品，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。



注：A：0.5%KA-6G2016-7（转化体拷贝数 200 copies）；B：0.10%KA-6G2016-7（转化体拷贝数 40 copies）；C：0.05%KA-6G2016-7（转化体拷贝数 20 copies）；D：0.025%KA-6G2016-7（转化体拷贝数 10 copies）；E：0.0125%KA-6G2016-7（转化体拷贝数 5 copies）；F：1 为 0.0025%KA-6G2016-7（转化体拷贝数 1 copies），2~3 依次为空白对照与阴性对照。

图 8 KA-6G2016-7 转化体检出限初步测试扩增图

表 12 KA-6G2016-7 转化体检出限初步测试结果

序号	KA-6G2016-7 模板量 C_t 值					
	200 copies	40 copies	20 copies	10 copies	5 copies	1 copy
1	30.55	32.78	33.63	34.89	35.48	N/A
2	30.52	32.91	33.91	35.27	34.94	38.12
3	30.42	33.03	33.68	35.49	36.75	N/A
4	30.46	33.26	33.90	35.23	36.25	36.53
5	30.57	33.09	33.78	34.90	38.01	37.47
6	30.33	32.63	33.81	34.54	35.58	38.46
7	30.53	33.04	34.01	35.19	35.32	37.46
8	30.61	32.69	34.18	34.19	37.07	38.28
9	30.47	33.05	33.85	34.67	35.64	N/A
10	30.70	33.30	33.41	35.40	36.04	N/A

测试结果如图 8 和表 12 所示，当模板量为 1 copy 时，10 个反应中有 6 个反应能得到典型扩增曲线，大约有 2/5 的反应呈阴性，表明梯度稀释的模板 DNA 浓度大致准确。当模板量 5 copies 时，10 个反应中有 10 个能得到典型扩增曲线；当模板量为大于等于 10 copies 时，10 个反应均能得到典型扩增曲线，且 C_t 值均小于 36。

根据检测结果，耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体拷贝数比值为 0.025%及以上时（即模板量大于等于 10 个拷贝数），能够稳定检出（10 个均为阳性）。为了能够稳定检出耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体成分，初步确定本方法检出限为 0.05%（对应转化体为 20 个拷贝数）。

5.7 检出限的确认

对通过初步测试的 KA-6G2016-7 转化体拷贝数比值为 0.05%（在 PCR 检测扩增体系中加入 50 ng DNA 模板进行测算）的样品，进行 60 次测试。

表 13 KA-6G2016-7 转化体检出限初步测试结果

60 次 KA-6G2016-7 检出限样品扩增 C_t 值					
33.33	33.13	33.40	33.23	33.61	33.32
33.18	33.76	33.79	33.52	33.34	32.82
33.17	33.05	33.80	33.49	34.06	33.59
33.99	33.02	32.80	33.69	33.68	33.26
33.57	33.32	33.35	33.24	33.21	33.93
32.98	33.37	32.73	33.81	33.36	33.57
33.59	32.92	32.92	33.79	33.18	33.09
33.05	33.87	33.39	33.91	33.16	33.72
33.11	33.42	32.85	33.06	33.37	33.37
33.35	33.45	33.36	33.29	33.20	33.02

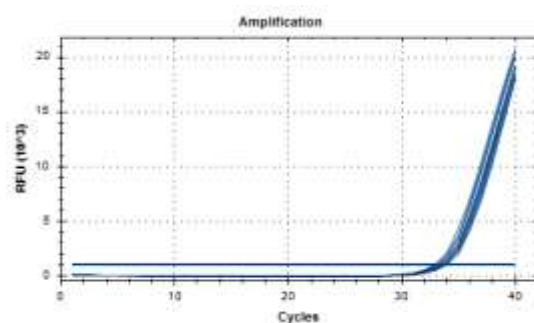


图9 耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体实时荧光 PCR 方法检出限测试扩增曲线图

60 次平行反应均有扩增 C_t 值（表 13）和典型扩增曲线（图 9），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%，满足有关转基因检测标准的要求。

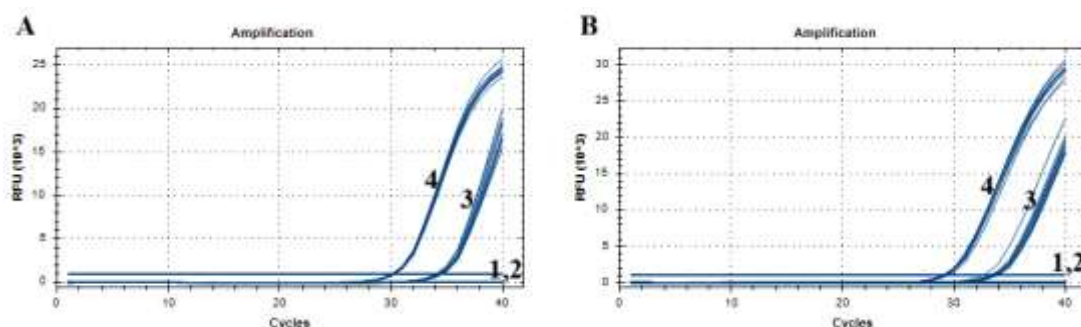
6. 稳健性测试

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和空白对照进行测试，样品包括 10 份 KA-6G2016-7 受体样品（0%）、10 份检出限（0.05%）样品、10 份拷贝数比值为 1% 的样品。

测试结果（表 14 与图 10）与预期一致，表明方法稳健性符合要求。

表 14 KA-6G2016-7 转化体稳健性测试结果

序号	KA-6G2016-7 模板量 C_t 值							
	测试人员 1				测试人员 2			
	空白对照	受体样品	检出限	1%样品	空白对照	受体样品	检出限	1%样品
1	N/A	N/A	34.23	30.13	N/A	N/A	33.60	29.11
2	N/A	N/A	34.13	30.10	N/A	N/A	33.47	29.38
3	N/A	N/A	34.32	30.18	N/A	N/A	33.80	29.00
4	N/A	N/A	34.39	30.27	N/A	N/A	33.79	29.14
5	N/A	N/A	34.07	30.20	N/A	N/A	32.47	29.19
6	N/A	N/A	34.61	30.29	N/A	N/A	33.17	28.96
7	N/A	N/A	34.56	30.11	N/A	N/A	33.29	29.06
8	N/A	N/A	34.40	30.33	N/A	N/A	33.46	29.05
9	N/A	N/A	34.52	30.24	N/A	N/A	33.73	29.02
10	N/A	N/A	35.05	30.23	N/A	N/A	33.33	29.01



注：A：操作人员 1 采用 Bio-Rad CFX 384；B：操作人员 2 采用 Bio-Rad CFX connect；1~4 依次为空白对照、阴性对照、KA-6G2016-7 检出限（0.05%）样品和 KA-6G2016-7 拷贝数比值为 1% 的样品。

图 10 KA-6G2016-7 转化体稳健性测试扩增图

7. $\Delta\Delta Ct$ 判断转化体成分含量的相对高低

实时荧光 PCR 样品转化体特异性序列平均 Ct 值与内标准基因平均 Ct 值的差值是 ΔCt ，实时荧光 PCR 试样的 ΔCt 值与阳性定量质控品的 ΔCt 值的差值是 $\Delta\Delta Ct$ 。

采用规定的引物和探针对试样中大豆内标准基因和耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体特异性序列，进行实时荧光 PCR 扩增。依据是否扩增获得预期的典型扩增曲线，判断试样中是否含有耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体成分；若试样中含有耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体成分，计算试样与阳性定量质控品的 $\Delta\Delta Ct$ 值，判定试样与阳性定量质控品中耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体成分含量的相对高低。

如进行含量比较，需计算试样的 $\Delta\Delta Ct$ 值，根据 $\Delta\Delta Ct$ 值大小初步判定试样的转基因含量。当 $\Delta\Delta Ct < -0.4$ 时，表明试样中检测出耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体成分，含量显著高于阳性定量质控品；当 $\Delta\Delta Ct > 0.4$ 时，表明试样中检测出耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体成分，含量显著低于阳性定量质控品。

方法二、耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 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、扩增体系及条件优化、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 15。

表 15 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	Ct 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	扩增体系及条件优化	在不同的引物/探针浓度下都能稳定扩增	在 60 °C 下反应

序号	步骤	考察要点	注意事项
3	特异性测试	仅在含目标转化体的样品中有扩增曲线	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

与实时荧光 PCR 定性检测方法一致, 详见“方法一”的 1.1。

1.2 引物和探针的筛选

与实时荧光 PCR 定性检测方法一致, 详见“方法一”的 1.2。

1.3 引物和探针的确定

与实时荧光 PCR 定性检测方法一致, 详见“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

与实时荧光 PCR 定性检测方法一致, 详见“方法一”的 2.1。

2.2 PCR 反应条件的确定

经优化最终确立了耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体特异性实时荧光 PCR 扩增体系, 按表 16 配制。扩增程序为: 95 °C 变性 5 min; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火延伸 60 s, 循环数 ≥ 40 ; 在第二阶段的退火延伸 (60 °C) 时段收集荧光信号。

表 16 耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 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 μ L
25 mmol/L 氯化镁溶液	2.5 mmol/L	2.5 μ L
dNTPs 混合溶液 (各 2.5 mmol/L)	0.2 mmol/L	2.0 μ L
10 μ mol/L KA-6G2016-7-QF	0.4 μ mol/L	1.0 μ L
10 μ mol/L KA-6G2016-7-QR	0.4 μ mol/L	1.0 μ L

试剂	终浓度	体积
10 $\mu\text{mol/L}$ KA-6G2016-7-QP	0.2 $\mu\text{mol/L}$	0.5 μL
<i>Taq</i> DNA 聚合酶	0.04 U/ μL	—
25 mg/L DNA 模板	2.0 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, 使扩增体系总体积达到 25.0 μL 。扩增体系中 DNA 模板量不大于 100 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扩增体系, 但引物和探针用量按表 16 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 个扩增体系的体积, 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

与实时荧光 PCR 定性检测方法一致, 详见“方法一”的 3.1。

3.2 样品的特异性测试

与实时荧光 PCR 定性检测方法一致, 详见“方法一”的 3.2。

4. 靶标序列测序验证

与实时荧光 PCR 定性检测方法一致, 详见“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 KA-6G2016-7 检测方法的标准曲线, 提取耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 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 48 ng/ μL 。然后用水或 1 $\times$ 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 μL , 对应的 DNA 质量和拷贝数见表 17。

表 17 耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 检测体系中的 DNA 含量

校准品编号	扩增体系中大豆 <i>Lectin</i> 基因拷贝数(copies)	扩增体系中 KA-6G2016-7 大豆拷贝数(copies)
G1	80000.00	80000.00
G2	10000.00	10000.00
G3	1250.00	1250.00
G4	156.25	156.25
G5	39.06	39.06

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 KA-6G2016-7 转化体和 *Lectin* 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，绘制出实验室的内外源基因的标准曲线（ $y=bx+a$ ），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 （ $= \frac{SP_{xy}^2}{SS_x SS_y}$ ，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 C_t 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 C_t 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 C_t 值及初始模板拷贝数的对数分别绘制耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 和大豆内标准基因 *Lectin* 的标准曲线，本文绘制了 3 组标准曲线（图 11）。

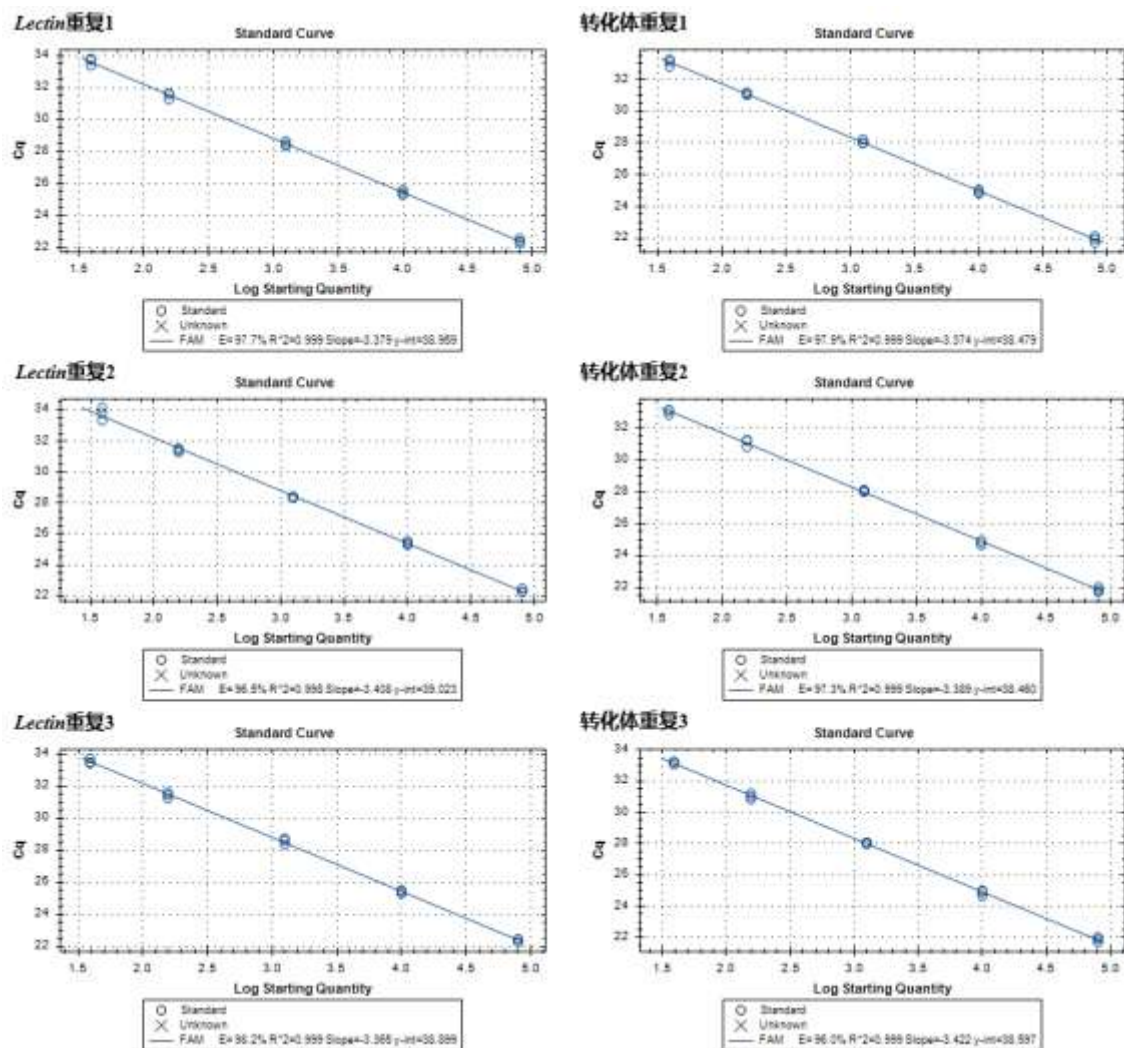


图 11 耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体和大豆内标准基因检测的标准曲线

表 18 标准曲线参数

重复数	参数	曲线斜率 b	扩增效率 (E)	R ²
重复 1	KA-6G2016-7	-3.374	97.9%	0.999
	<i>Lectin</i>	-3.379	97.7%	0.999
重复 2	KA-6G2016-7	-3.389	97.3%	0.999
	<i>Lectin</i>	-3.408	96.5%	0.998
重复 3	KA-6G2016-7	-3.422	96.0%	0.999
	<i>Lectin</i>	-3.365	98.2%	0.999
平均值	KA-6G2016-7	-3.395	97.1%	0.999
	<i>Lectin</i>	-3.384	97.5%	0.999

结果显示, 3 组耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体和大豆内标准基因 *Lectin* 的标准曲线斜率 b 分别在-3.422~-3.374、-3.408~-3.365 之间, 平均值分别为-3.395、-3.384, 均位于-3.6~-3.1 的允许区间内; 决定系数 R^2 分在 0.999~0.999、0.998~0.999 之间, 平均值分别为 0.999 和 0.999, 大于可接受的最低值 0.98; PCR 扩增效率 E 分别在 96.0%~97.9%、96.5%~98.2%之间, 平均值分别为 97.1%、97.5%, 位于 90%~110%的允许区间内 (图 11, 表 18)。标准曲线的所有指标全部满足了标准制定的要求范围, KA-6G2016-7 转化体和大豆内标准基因 *Lectin* 检测体系的 C_t 值与模板拷贝数间均具有良好的线性关系。

6. 实验室内正确度和精确度数据分析

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%, 即 $|biasR| \leq 25\%$; 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 $\leq 25\%$ 。

6.2 试样检测数据汇总统计

设置初始浓度为 25 ng/ μ L 的耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体基因组 DNA 拷贝数比值为 5%、3%、1%、0.5%、0.1% 的 5 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, 每个样品各平行子样的转基因含量计算为 3 次 PCR 重复中耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体特异性序列拷贝数平均值与大豆内标准基因拷贝数平均值的比值 (表 15)。

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

式中：

$\bar{c}_k$ ——平行子样 k 各重复耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体序列拷贝数平均值与大豆内标准基因拷贝数平均值的比值，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 各重复耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体特异性序列拷贝数平均值。

$\bar{c}_{2,k}$ ——平行子样 k 各重复大豆内标准基因 *Lectin* 拷贝数平均值。

每个样品设 3 个平行子样、每个子样重复 3 次 PCR。按照上述公式，计算每个含量样品各平行子样的拷贝数比值，统计汇总见表 19。

表 19 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的比值								
		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	KA-6G2016-7	2043	1935	1961	1950	1847	1872	1871	2199	1884
	<i>Lectin</i>	41348	37843	48364	46072	36616	42198	43813	43218	37178
	比值 (%)	4.66			4.54			4.79		
3	KA-6G2016-7	1192	1047	1347	1140	1002	1288	1100	1216	1085
	<i>Lectin</i>	39422	41915	42781	40796	36616	41351	40084	42923	37690
	比值 (%)	2.89			2.89			2.82		
1	KA-6G2016-7	368	342	431	354	329	414	390	420	409
	<i>Lectin</i>	42491	36825	43074	41073	38390	40249	39811	43813	39539
	比值 (%)	0.93			0.92			0.99		
0.5	KA-6G2016-7	165	181	208	159	175	200	216	202	176
	<i>Lectin</i>	40236	34399	41631	39709	36864	44844	41764	41479	35439
	比值 (%)	0.48			0.44			0.50		
0.1	KA-6G2016-7	47	34	36	46	33	35	31	40	41
	<i>Lectin</i>	39692	38362	41348	39441	34925	40249	39270	43218	36924
	比值 (%)	0.10			0.10			0.09		

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 个平行子样的转基因含量与标称值的相对偏倚，分析实时荧光 PCR 定量检测方法的正确度，即：

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

式中：

$BiasR$ —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（%）。

$\bar{C}$ —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 —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，采用极差法计算 3 个平行子样检测数据的标准差（SD），然后计算 3 个平行子样检测数据的相对标准差（RSD），分析实时荧光 PCR 定量检测方法的精密度，即：

$$SD = \frac{\bar{C}_{max} - \bar{C}_{min}}{c} \dots\dots\dots (6)$$

$$RSD = \frac{SD}{\bar{C}} \times 100\% \dots\dots\dots (7)$$

式中：

SD —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。

$\bar{C}_{max}$ —3 个子样各自转化体拷贝数平均值与内标准基因拷贝数平均值的比值的最大值；

$\bar{C}_{min}$ —3 个子样各自转化体拷贝数平均值与内标准基因拷贝数平均值的比值的的最小值；

C —极差系数（C 因子），当平行 $m=3$ 时， $C=1.693$ 。

RSD —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。

$\bar{C}$ —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平均值与内标准基因拷贝数平均值的比值，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 19 的数据计算结果汇总成表 20。

表 20 KA-6G2016-7 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 biasR（%）	标准差 SD（%）	相对标准差 RSD（%）
	子样 1	子样 2	子样 3				
5.0	4.66	4.54	4.79	4.66	6.74	12.69	2.72
3.0	2.89	2.89	2.82	2.87	4.50	4.12	1.44
1.0	0.93	0.92	0.99	0.95	5.36	3.84	4.06

含量标称 值 (%)	各平行子样转基因含量 (%)			平均值 (%)	相对偏倚 <i>biasR</i> (%)	标准差 <i>SD</i> (%)	相对标准差 <i>RSD</i> (%)
	子样 1	子样 2	子样 3				
0.5	0.48	0.44	0.50	0.47	5.58	3.05	6.46
0.1	0.10	0.10	0.09	0.10	3.13	0.25	2.59

6.3.4 正确度和精密度结果判定

表 20 结果显示,5 个含量样品测量平均值与标称值的相对偏倚 *biasR* 在 3.13%~6.74%之间,在允许的 $\pm 25\%$ 区间内,表明 KA-6G2016-7 转化体荧光定量 PCR 方法测量结果具有良好的正确度;5 个含量样品的重复性相对标准差 *RSD* 在 1.44%~6.46%之间,均小于规定的 25%。重复性分析结果表明 KA-6G2016-7 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)

与实时荧光 PCR 定性检测方法一致,详见“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 25 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)相对含量是转基因拷贝数含量浓度是 0.1%;(2)绝对含量是转化体基因组 DNA 小于 50 个拷贝的;(3)绝对含量是转化体基因组 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 6 个样品。

7.2.3 测试样品的初始化浓度

将提取的 KA-6G2016-7 转化体及其非转基因对照的基因组 DNA 用 1×TE 稀释成 25 ng/ μL (并换算成拷贝数浓度 20800 copies/ μL),确保体系中加入 2 μL 样品后 DNA 模板量为 50 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 25 ng/ μL 的 KA-6G2016-7 转化体基因组 DNA,用 25 ng/ μL 的非转基因大豆基因组 DNA,梯度稀释成 KA-6G2016-7 转化体拷贝数比值为 0.50%、0.10%、0.05%、0.025%、0.0125%、0.0025%,共 6 个测试样品、阴性对照、空白对照,对应的转化体拷贝数浓度为 100、20、10、5、2.5、0.5 copies/ μL 。扩增体系中加入 2 μL 测试样品,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）：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。

将测试样品的 *Ct* 值带入标准曲线，计算每个稀释样品的拷贝数浓度。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 SD 和相对标准差 *RSD*。

测试结果如图 12 和表 21 所示，当模板量为 1 copy 时，10 个反应中有 6 个阳性反应，测量的模板浓度值准确；当模板量为 200、40、20、10、5 copies 时，10 个反应均能得到典型扩增曲线，其正确度（*biasR*）和精密度（*RSD*）分析结果分别为-5.27%和 5.44%、-13.23%和 14.16%、-0.25%和 16.86%、-8.92%和 27.23%、4.20%和 49.31%。

根据数据分析结果，耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体拷贝数比值为 0.1%及以上时（对应转化体为 40 个拷贝数），能够准确定量（10 个反应均为阳性，且精密度和正确度分析结果符合要求）。为了能够准确定量耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体，初步确定本方法定量限为 0.1%（对应转化体为 40 个拷贝数）。

表 21 KA-6G2016-7 转化体定量限初步测试结果

重复	200 copies 模板量			40 copies 模板量		
	转化体拷贝数 (copies)	<i>Lectin</i> 拷贝数 (copies)	百分比 (%)	转化体拷贝数 (copies)	<i>Lectin</i> 拷贝数 (copies)	百分比 (%)
1	186.56	39590.38	0.471	40.54	40402.48	0.100
2	190.43	39859.25	0.478	37.09	44418.13	0.084
3	203.92	40953.11	0.498	34.17	40953.11	0.083
4	198.41	41231.23	0.481	29.19	41511.25	0.070
5	184.02	42940.10	0.429	32.79	39859.25	0.082
6	216.87	41511.25	0.522	44.93	40953.11	0.110
7	189.13	39859.25	0.474	33.93	40953.11	0.083
8	179.05	40129.94	0.446	43.12	40676.86	0.106
9	197.06	40402.48	0.488	33.70	41231.23	0.082
10	168.35	37503.70	0.449	28.40	42076.99	0.067
平均值	191.38	40398.07	0.474	35.79	41303.55	0.087
<i>biasR</i> (%)	5.27			13.23		
SD	0.0272			0.0142		
<i>RSD</i> (%)	5.44			14.16		

重复	20 copies 模板量			10 copies 模板量		
	转化体拷贝数 (copies)	<i>Lectin</i> 拷贝数 (copies)	百分比 (%)	转化体拷贝数 (copies)	<i>Lectin</i> 拷贝数 (copies)	百分比 (%)
1	22.66	38272.99	0.059	9.56	39323.32	0.024
2	18.71	40676.86	0.046	7.37	39590.38	0.019
3	21.90	38532.91	0.057	6.34	40953.11	0.015
4	18.84	40953.11	0.046	7.58	42076.99	0.018
5	20.45	40676.86	0.050	9.50	40953.11	0.023
6	20.03	40676.86	0.049	12.15	42940.10	0.028
7	17.47	42650.45	0.041	7.79	40402.48	0.019
8	15.55	41511.25	0.037	15.44	41231.23	0.037
9	19.49	40953.11	0.048	11.12	41231.23	0.027
10	26.34	40402.48	0.065	6.75	42076.99	0.016
平均值	20.14	40530.69	0.050	9.36	41077.89	0.023
biasR (%)	0.25			8.92		
SD	0.0084			0.0068		
RSD (%)	16.86			27.23		
重复	5 copies 模板量			1 copy 模板量		
	转化体拷贝数 (copies)	<i>Lectin</i> 拷贝数 (copies)	百分比 (%)	转化体拷贝数 (copies)	<i>Lectin</i> 拷贝数 (copies)	百分比 (%)
1	6.39	39590.38	0.016	N/A	40129.94	/
2	9.24	40953.11	0.023	1.05	41511.25	0.003
3	2.68	42940.10	0.006	N/A	39590.38	/
4	3.77	39323.32	0.010	3.11	39859.25	0.008
5	1.13	39859.25	0.003	1.64	39058.07	0.004
6	5.96	40129.94	0.015	0.83	38794.60	0.002
7	7.13	40953.11	0.017	1.65	43231.72	0.004
8	2.15	42362.75	0.005	0.94	44418.13	0.002
9	5.72	40953.11	0.014	N/A	39323.32	/
10	4.35	39323.32	0.011	N/A	38794.60	/
平均值	/			/		
biasR (%)	4.20			/		
SD	0.0062			/		
RSD (%)	49.31			/		

7.2.5 定量限的确认

对通过初步测试的 KA-6G2016-7 转化体拷贝数比值为 0.1%（在 PCR 检测扩增体系中加入 50 ng DNA 模板进行测算）定量限的样品，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（RSD）。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 SD 和相对标准差 RSD。

表 22 耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 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>Lectin</i> 拷贝数（copies）	含量（%）
1	40.54	40402.48	0.100
2	40.27	44418.13	0.091
3	37.09	40953.11	0.091
4	48.11	41511.25	0.116
5	34.17	39859.25	0.086
6	33.47	40953.11	0.082
7	29.19	40953.11	0.071
8	44.62	40676.86	0.110
9	32.79	41231.23	0.080
10	40.82	42076.99	0.097
11	44.93	40402.48	0.111
12	40.27	39859.25	0.101
13	33.93	42362.75	0.080
14	43.12	40129.94	0.107
15	34.64	41793.16	0.083
平均值	38.53	41172.21	0.094
相对偏倚 <i>biasR</i> （%）	6.33		
标准偏差 SD	0.013585723		
相对标准偏差 RSD(%)	13.59		

结果显示(表 22)，相对偏倚和相对标准偏差均 $\leq 25\%$ ，在允许范围之内，即确定 KA-6G2016-7 转化体荧光定量 PCR 方法的定量限可达到 0.1%，满足我国有关标准的要求。

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 扩增体系、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 扩增体系，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 23。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 C_t 值，计算各反应样品的拷贝数及拷贝数比值（表 23）。

表 23 KA-6G2016-7 转化体实时荧光 PCR 检测定量方法稳健性测试结果

因素	样品标称值	重复	含量测试结果			平均值	相对偏倚 (%)	标准差 SD	相对标准差 RSDr (%)
			子样 1	子样 2	子样 3				
其他操作者	0.1%	重复 1	0.080	0.081	0.085	0.090	10.44	0.008	8.68
		重复 2	0.082	0.096	0.096				
		重复 3	0.096	0.091	0.100				
其他荧光 PCR 试剂盒	0.1%	重复 1	0.116	0.102	0.115	0.112	12.25	0.006	5.57
		重复 2	0.114	0.107	0.113				
		重复 3	0.106	0.116	0.122				
其他荧光 PCR 仪	0.1%	重复 1	0.087	0.102	0.123	0.106	5.53	0.011	10.60
		重复 2	0.120	0.098	0.106				
		重复 3	0.107	0.098	0.109				
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精确度 RSD 和正确度 $BiasR$ (表 23)。计算方法同 6.3.1 和 6.3.2。其他操作者检测数据的精密度 RSD 为 8.68%，正确度 $BiasR$ 为 -10.44%；选用其他荧光定量 PCR 试剂盒，检测数据的精密度 RSD 为 5.57%，正确度 $BiasR$ 为 12.25%；选用其他荧光定量 PCR 仪，检测数据的精密度 RSD 为 10.60%，正确度 $BiasR$ 为 5.53%。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，KA-6G2016-7 转化体实时荧光 PCR 方法检测结果的精确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、耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 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

根据研发者提供的 KA-6G2016-7 大豆外源载体插入片段的 LB 和 RB 侧翼序列信息，使用 NCBI 网站的引物在线设计软件 Primer designing tool 进行引物探针的设计（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome），综合考虑核苷酸序列 GC 含量和引物 Tm 值，以及《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）中推荐技术参数扩增产物大小适宜大小 120 bp~300 bp，在 RB 端设计了 1 对转化体特异性定性 PCR 引物，与研发者提供的 RB 端引物一同进行测试，引物具体位置如图 12 所示，序列信息详见表 24。



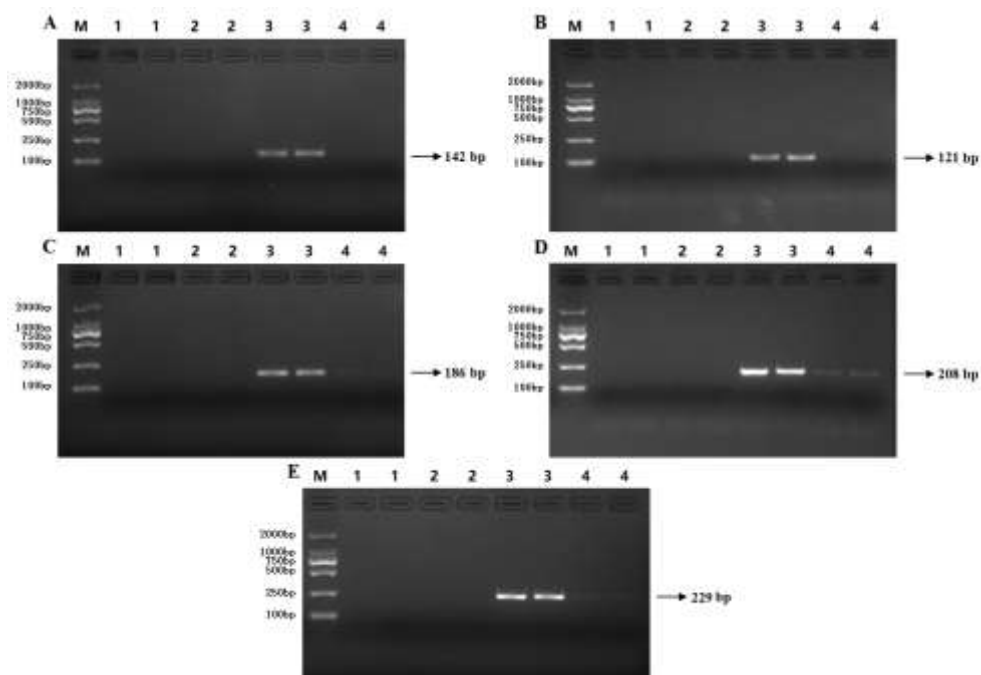
图 12 耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体普通 PCR 引物位置图

表 24 耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体普通 PCR 引物信息表

引物名称	引物序列（5'-3'）	预期扩增产物大小（bp）	来源
KA-6G2016-7-RB-QF	AGGAAAGGTGAGCGAGAAATTAAG	142 bp	研发者
RB-R1	ATAATTACCTTCTGGGGTACCAA		自行设计
KA-6G2016-7-RB-F	AAGACGCTTGAGTTGGTTAGGTATC	121 bp	研发者
RB-R1	ATAATTACCTTCTGGGGTACCAA		自行设计
RB-F1	ATCCATCGTCTCAAACACTGA	186 bp	自行设计
KA-6G2016-7-RB-R	CCGCATATTGATCTGCTTCTTG		研发者

引物名称	引物序列 (5'-3')	预期扩增产物大小 (bp)	来源
KA-6G2016-7-RB-F	AAGACGCTTGAGTTGGTTAGGTATC	208 bp	研发者
KA-6G2016-7-RB-R	CCGCATATTGATCTGCTTCTTG		研发者
KA-6G2016-7-RB-QF	AGGAAAGGTGAGCGAGAAATTAAG	229 bp	研发者
KA-6G2016-7-RB-R	CCGCATATTGATCTGCTTCTTG		研发者

1.2 引物筛选



注：A：KA-6G2016-7-RB-QF 与 RB-R1 引物组合；B：KA-6G2016-7-RB-F 与 RB-R1 引物组合；C：RB-F1 与 KA-6G2016-7-RB-R 引物组合；D：KA-6G2016-7-RB-F 与 KA-6G2016-7-RB-R 引物组合；E：KA-6G2016-7-RB-QF 与 KA-6G2016-7-RB-R 引物组合；M 为分子量标准 Marker DL2000，1~4 依次为空白对照、阴性对照、阳性对照 1（1% KA-6G2016-7 大豆）和阳性对照 2（0.1% KA-6G2016-7 大豆）。

图 13 耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体引物组合初筛

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 2031 号公告—8—2013 大豆内标准基因检测中所述的 PCR 扩增程序，本次测试的退火温度设定为 58℃，对自行设计的 4 对引物进行引物初筛。PCR 扩增程序为：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 10 min；4℃保存。引物筛选样品包括空白对照、阴性对照（12.5 ng/μL 的非转基因大豆）、阳性对照 1（12.5 ng/μL 的 1% 的耐除草剂大豆 KA-6G2016-7）、阳性对照 2（12.5 ng/μL 的 0.1% 的耐除草剂大豆 KA-6G2016-7）。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。

图 13 中 5 对引物扩增结果表明，5 对引物均具有良好的特异性扩增，在 0.1%浓度下，KA-6G2016-7-RB-F 与 KA-6G2016-7-RB-R 引物组合扩增条带比其他 4 个组合明亮，因此将 KA-6G2016-7-RB-F 与 KA-6G2016-7-RB-R 引物组合定为耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体普通 PCR 定性检测方法引物进行后续测试。

1.3 引物的确定

根据测试结果，确定耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体普通 PCR 定性检测方法引物为：

KA-6G2016-7-F：5'-AAGACGCTTGAGTTGGTTAGGTATC-3'；

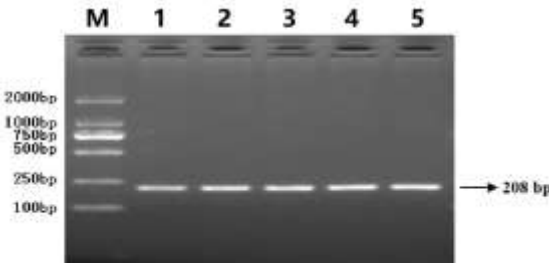
KA-6G2016-7-R：5'-CCGCATATTGATCTGCTTCTTG-3'。

注：预期扩增片段大小为 208 bp。

2. PCR 扩增条件的优化与确定

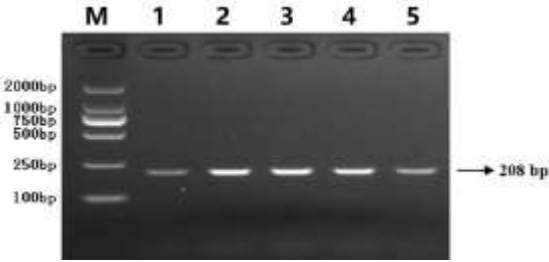
2.1 PCR 扩增条件的优化

以 1%浓度的耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 基因组 DNA 为模板，分别设置引物浓度为 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、0.2 $\mu\text{mol/L}$ 、0.3 $\mu\text{mol/L}$ 、0.4 $\mu\text{mol/L}$ 、0.5 $\mu\text{mol/L}$ ，配置 PCR 体系，分别在不同退火温度 62 $^{\circ}\text{C}$ 、60 $^{\circ}\text{C}$ 、58 $^{\circ}\text{C}$ 、56 $^{\circ}\text{C}$ 和 54 $^{\circ}\text{C}$ （以农业部 2031 号公告—8—2013 大豆内标准基因检测中所述的 PCR 退火温度为基准上下浮动 4 $^{\circ}\text{C}$ ）下进行 PCR 扩增。



M 为分子量标准 Marker DL2000，1~5 分别为 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、0.2 $\mu\text{mol/L}$ 、0.3 $\mu\text{mol/L}$ 、0.4 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 引物终浓度。

图 14 耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 普通 PCR 方法的扩增体系测试



M 为分子量标准 Marker DL2000，1~5 分别为 54 $^{\circ}\text{C}$ 、56 $^{\circ}\text{C}$ 、58 $^{\circ}\text{C}$ 、60 $^{\circ}\text{C}$ 、和 62 $^{\circ}\text{C}$ 退火温度。

图 15 耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 普通 PCR 方法的退火温度测试

扩增体系和退火温度测试结果表明（图 14~15），KA-6G2016-7-F 与 KA-6G2016-7-R 引物在不同的引物浓度和退火温度处理中均表现出非常好的扩增性能。而且，当引物终浓度为 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 及以上时，56~60 $^{\circ}\text{C}$ 退火表现出较为一致，特异性扩增条带清晰、无非特异扩增、引物二聚体较少，无明显差异。综合考虑大豆内标准基因 *Lectin* 的定性 PCR 检测方法的扩增体系和扩增程序，结合本研究结果，确定普通 PCR 扩增体系中的上下游引物终浓度均为 0.4 $\mu\text{mol/L}$ ，扩增程序中的退火温度为 58 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2 PCR 扩增条件的确定

经优化最终确立了耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体特异性普通 PCR 扩增体系，各项成分按表 24 所述添加。普通 PCR 扩增程序为：94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min；94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s，58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s，共进行 35 次循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min；4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

表 24 耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 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 $\mu\text{mol/L}$ KA-6G2016-7-F	0.4 $\mu\text{mol/L}$	1.0 μL
10 $\mu\text{mol/L}$ KA-6G2016-7-R	0.4 $\mu\text{mol/L}$	1.0 μL
<i>Taq</i> DNA 聚合酶	0.025 U/ μL	—
25mg/L DNA 模板	2.0 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 <i>Taq</i> DNA 聚合酶的浓度确定其体积，并相应调整 ddH₂O 的体积，使扩增体系总体积达到 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扩增体系，但上下游引物用量按表 24 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 个平行扩增体系的体积，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耐除草剂大豆转化体检测引物 KA-6G2016-7-F 与 KA-6G2016-7-R 进行特异性测试，样品设置包括 3 份对照（空白对照、阴性对照和阳性对照）和 8 份测试样品（1% KA-6G2016-7、0.1% KA-6G2016-7 和常见转基因作物混合样、非转基因大豆混合样等），具体样品信息见表 25。

表 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	KA-6G2016-7 非转基因受体大豆	植株叶片	
3	阳性对照	拷贝数比值 1%的 KA-6G2016-7 基因组 DNA	植株叶片	
4	1% KA-6G2016-7	拷贝数比值 1%的 KA-6G2016-7 基因组 DNA	植株叶片	测试样品
5	其他转基因大豆 混合样	GTS40-3-2、MON89788、A5547-127、A2704-12、356043、305423、CV127、MON87701、MON87708、MON87769、MON87705、FG72、DAS81419-2, 13 个转化体混合制成 1 个样品, 以非转基因大豆粉末都为填充物, 每个转化体质量分数为 1%	粉末	
6	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, 以非转基因大豆粉末都为填充物, 每个转化体质量分数为 1%	粉末	
7	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, 以非转基因大豆粉末都为填充物, 每个转化体质量分数为 1%	粉末	
8	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, 18 个转化体混合制成 1 个样品, 以非转基因大豆粉末都为填充物, 每个转化体质量分数为 1%	粉末	测试样品
9	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, 以非转基因大豆粉末都为填充物, 每个转化体质量分数为 1%	粉末	
10	非转基因大豆混合样	3 个非转基因大豆 (天隆 1 号、Williams 82) 等量混合制成的 1 个样品	粉末	
11	0.1% KA-6G2016-7	拷贝数比值 0.1%的 KA-6G2016-7 基因组 DNA	植株叶片	

3.2 样品的特异性测试

分别提取对照与测试样品的 DNA 进行测试, 测试结果显示, KA-6G2016-7 转化体特异性序列仅从含有 KA-6G2016-7 大豆的阳性对照 3 和测试样品 4 以及测试样品 11 中扩增到 208 bp 的预期片段条带, 而在其他样品中均未扩增到预期大小的条带, 表明引物 KA-6G2016-7-F 与 KA-6G2016-7-R 具有高度特异性 (图 16)。



注：M 为分子量标准 Marker DL2000，1~11 依次为空白对照、阴性对照、阳性对照、1% KA-6G2016-7 测试样品、其他转基因大豆混合样、转基因玉米混合样、转基因水稻混合样、转基因油菜混合样、转基因棉花混合样、0.1% KA-6G2016-7 测试样品。

图 16 341 LB-F1 与 341 LB-R1 检测引物的扩增特异性测试

4 测序验证及靶标序列分析

对引物组合 KA-6G2016-7-F 与 KA-6G2016-7-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 17。

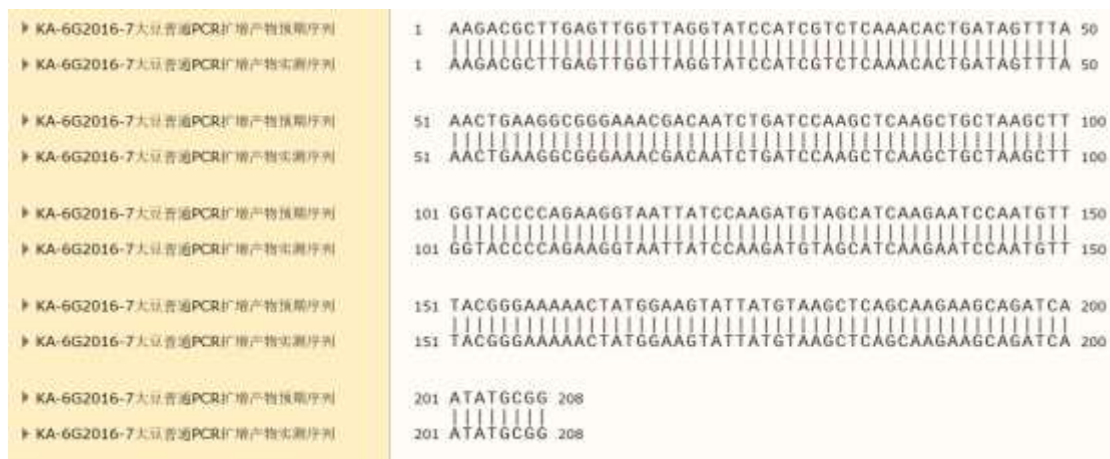


图 17 KA-6G2016-7-F/R 引物扩增序列测序比对验证

普通 PCR 扩增产物的靶标序列如下：

```

1   AAGACGCTTG AGTTGGTTAG GTATCCATCG TCTCAAACAC TGATAGTTTA AACTGAAGGC
61  GGGAAACGAC AATCTGATCC AAGCTCAAGC TGCTAAGCTT GGTACCCCAG AAGGTAATTA
121 TCCAAGATGT AGCATCAAGA ATCCAATGTT TACGGGAAAA ACTATGGAAG TATTATGTAA
181 GCTCAGCAAG AAGCAGATCA ATATGCGG

```

该序列为 KA-6G2016-7 的 5'端转化体特异性序列，序列方向为 5'-3'。序列中 1~34 bp 为大豆基因组部分序列，35~208 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 KA-6G2016-7-F 的序列，3'端划线部分为普通 PCR 方法引物 KA-6G2016-7-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

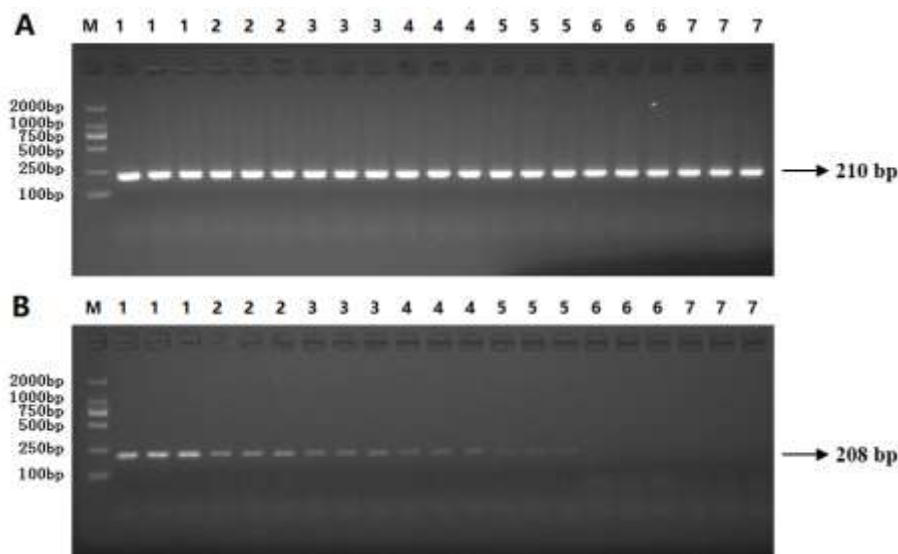
检出限测试时，在包含 50 ng 基因组 DNA 的扩增体系中，样品的设置必须包含的 3 个样品为：相对含量是转基因拷贝数含量浓度是 0.05%、0.025%和空白对照。

5.3 测试样品的初始化浓度

将提取的 KA-6G2016-7 转化体及其非转基因对照的基因组 DNA 用 1×TE 稀释成 25 ng/μL（并换算成拷贝数浓度 20800 copies/μL），确保体系中加入 2 μL 样品后 DNA 模板量为 50 ng。

5.4 检出限测试样品的配制、初步测试

将 25 ng/μL 的 KA-6G2016-7 转化体基因组 DNA，用 25 ng/μL 的非转基因大豆基因组 DNA，梯度稀释成 KA-6G2016-7 转化体拷贝数比值为 1%、0.5%、0.1%、0.05%、0.025%和 0.01%共 6 个测试样品，对应的转化体拷贝数浓度 200、100、20、10、5、2 copies/μL。扩增体系中加入 2 μL 测试样品，每个测试样品 3 个反应。



注：A 为大豆内标准基因 *Lectin* 扩增图谱，B 为 KA-6G2016-7 转化体特异性序列扩增图谱；M 为分子量标准 Marker DL2000，1~7 依次为 1%、0.5%、0.1%、0.05%、0.025%、0.01% 的测试样品和阴性对照。

图 17 耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体普通 PCR 方法灵敏度测试

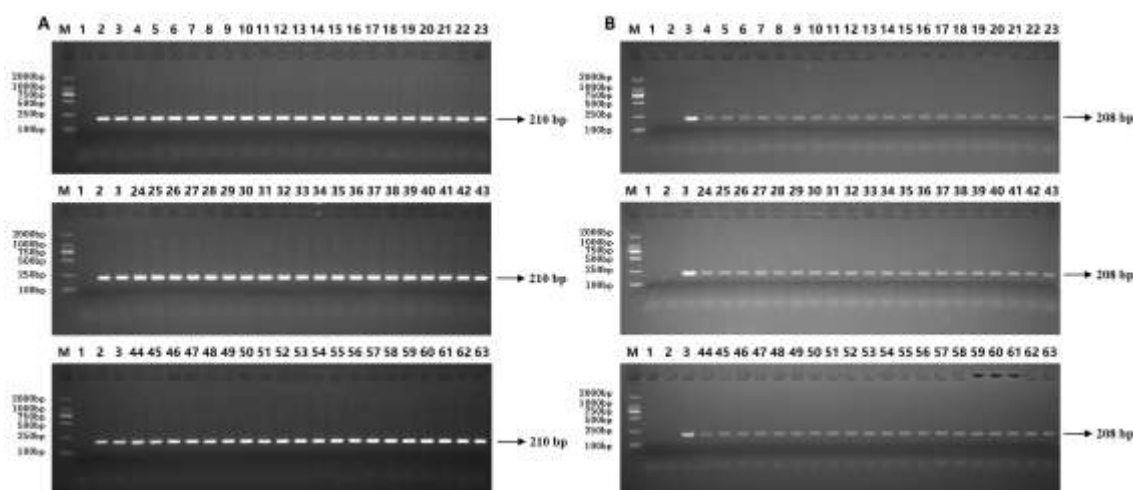
测试结果表明：6 个不同拷贝数比值样品与阴性对照中，大豆内标准基因 *Lectin* 均能得到有效扩增，如图 18A；KA-6G2016-7-F 与 KA-6G2016-7-R 引物组合在拷贝数比值为 0.05% 及以上的模板中，均能扩增得到预期 208 bp 的耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体特异性片段，如图 18B。

为了能够稳定检出耐除草剂大豆 KA-6G2016-7，初步确定本方法检出限为 0.1%（以扩增体系中 50 ng 总 DNA 加入量进行计算，约为 40 个拷贝）。

5.5 检出限的确定

依据检出限初步测试结果,综合考虑本标准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 60 份耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体特异性序列拷贝数比值为 0.1% (依据 5.4 中测试的检出限浓度确定) 的样品进行测试。

结果显示,60 份耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 拷贝数比值为 0.1% 的样品中,大豆内标准基因 *Lectin* 均能得到有效扩增,如图 18A;对应的 60 份耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 拷贝数比值为 0.1% 的样品中,KA-6G2016-7-F/KA-6G2016-7-R 均能扩增得到耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体预期 198 bp 的 DNA 片段,如图 18B。由此可以确定普通 PCR 方法的检出限为 0.1%,以扩增体系中加入 50 ng DNA 模板进行测算,约为 40 个拷贝。

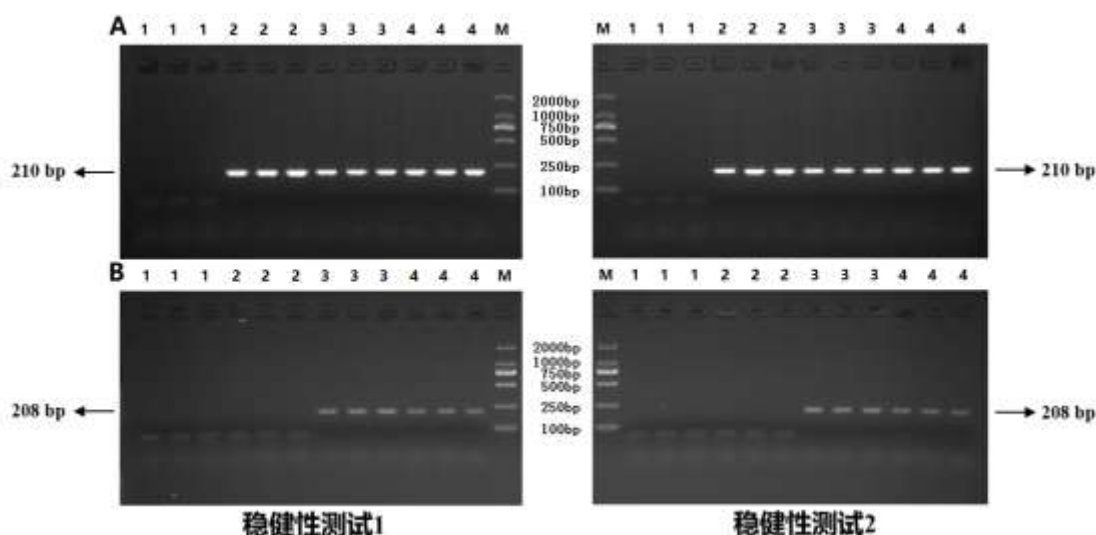


注: A 为大豆内标准基因 *Lectin* 扩增图谱, B 为 KA-6G2016-7 转化体特异性序列扩增图谱; M 为分子量标准 Marker DL2000, 1~3 依次为空白对照、阴性对照和阳性对照, 4~63 依次为 60 份 KA-6G2016-7 拷贝数比值为 0.1% 的样品。

图 18 耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 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 9 份不同拷贝数比值的样品进行测试,样品包括 3 份非转基因对照样品、3 份检出限样品(拷贝数比值为 0.1%)、3 份拷贝数比值为 1% 的样品。测试结果(图 19)与预期一致,表明方法再现性符合要求。



注：A 为大豆内标准基因 *Lectin* 扩增图谱，B 为 KA-6G2016-7 转化体特异性序列扩增图谱；M 为分子量标准 Marker DL2000，1~4 依次为空白对照、阴性对照、1%阳性样品、0.1%阳性样品。

图 19 耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体普通 PCR 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 耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体特异性 PCR 方法 标准文本验证方案》（见附件 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 $l=1,2,\dots,n$ 。

特别提示：对实验室验证检测数据统计分析时，注意表述的准确性。如：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 定性检测方法验证结果分析

1.1 特异性验证

8 个实验室分别对表中 11 个样品进行耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 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。

表 26 耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 实时荧光 PCR 定性检测方法实验室间测定结果

样品名称 / 编号	KA-6G2016-7 转化体特异性序列重复测定结果								
	重复 1			重复 2			重复 3		
	平行 1	平行 2	平行 3	平行 1	平行 2	平行 3	平行 1	平行 2	平行 3
空白对照	—	/	/	—	/	/	—	/	/
阴性对照	—			—			—		
阳性对照	+			+			+		
1% KA-6G2016-7 大豆	+	+	+	+	+	+	+	+	+
转基因玉米混合样	—	—	—	—	—	—	—	—	—
其他转基因大豆混合样	—	—	—	—	—	—	—	—	—
转基因水稻混合样	—	—	—	—	—	—	—	—	—
转基因棉花混合样	—	—	—	—	—	—	—	—	—
转基因油菜混合样	—	—	—	—	—	—	—	—	—
非转基因大豆混合样	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.05% KA-6G2016-7 大豆	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注：“+”表示阳性结果，“—”表示阴性结果，“/”表示不需验证。

实时荧光 PCR 定性检测方法验证结果显示，在阳性对照、1% KA-6G2016-7 和 0.05% KA-6G2016-7（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 26），与实验室内部测试结果相符。

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 检测扩增体系中加入 50 ng DNA 模板进行测算的，相当于扩增体系中含有 20 拷贝的 KA-6G2016-7 转化体特异性序列）的 KA-6G2016-7 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 27，与实验室内测试出的 LOD 值相符。表明本方法中耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体特异性序列实时荧光 PCR 方法的检出限为 0.05%，相当于扩增体系中含有 20 拷贝的 KA-6G2016-7 转化体特异性序列。

表 27 耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体实时荧光 PCR 方法检出限室间测试结果

Lab	0.05% KA-6G2016-7								
	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	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Lab	0.05% KA-6G2016-7								
	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
Lab5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lab6	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lab7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lab8	+	+	+	+	+	+	+	+	+

2. 实时荧光 PCR 定量检测方法验证结果分析

按照验证方案，8 个实验室对 5 个水平（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 28 进行样品布局和数据统计分析。

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。

表 28 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
	子样 1	子样 2	子样 3		子样 1	子样 2	子样 3
	子样 1	子样 2	子样 3		子样 1	子样 2	子样 3
子样浓度平均值	a1	a2	a3	子样浓度平均值	b1	b2	b3
最终转基因含量=(a1/b1+a2/b2+a3/b3)÷3							
注：（1） c_{ijkl} 为第 i 实验室（ p 个实验室， $i=1,2,\dots,p$ ）、第 j 个水平（ q 个水平， $j=1,2,\dots,q$ ）、第 k 个平行子样（每个水平 m 个平行子样， $k=1,2,\dots,m$ ）、第 l 个 PCR 重复（每个子样 n 个 PCR 重复， $l=1,2,\dots,n$ ）的检测数据。 （2）转化体和内标准基因的校准品（每个水平 1 个样品，3 次 PCR 重复）+对照（每类 1 个样品，3 次 PCR 重复）；每个水平试样设 3 个平行子样，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。							

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 标准曲线各参数合格判定标准

根据农业部 2259 号公告—5—2015 的要求，转化体和内标准基因的标准曲线合格标准为：斜率 b 值均应位于 $-3.6 \sim -3.1$ 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）标准的主要内容、技术参数的确定方法二、耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 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 29。

表 29 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	KA-6G2016-7 转化体			<i>Lectin</i> 基因		
		曲线斜率 b	决定系数 R^2	扩增效率 E	曲线斜率 b	决定系数 R^2	扩增效率 E
Lab 1	1	-3.318	0.999	100.2%	-3.324	0.999	99.9%
	2	-3.317	0.999	100.2%	-3.289	0.999	101.4%
	3	-3.316	0.999	100.2%	-3.267	0.999	102.3%
Lab 2	1	-3.41	0.999	98.12%	-3.43	0.996	105.47%
	2	-3.43	0.993	95.09%	-3.20	0.989	96.47%
	3	-3.42	0.999	101.04%	-3.20	0.985	108.32%
Lab 3	1	-3.319	0.999	100.1%	-3.300	0.998	100.9%
	2	-3.435	0.996	95.5%	-3.573	0.994	90.5%
	3	-3.575	0.994	90.4%	-3.521	0.992	92.3%
Lab 4	1	-3.3570	1.000	99.0%	-3.363	1.000	98.0%
	2	-3.3267	1.000	100.0%	-3.355	1.000	99.0%
	3	-3.2521	1.000	103.0%	-3.334	1.000	99.0%
Lab 5	1	-3.231	1.000	103.952%	-3.263	1.000	102.541%
	2	-3.270	1.000	102.218%	-3.275	0.999	101.982%
	3	-3.271	1.000	102.162%	-3.278	0.998	101.877%
Lab 6	1	-3.328	0.998	101.7%	-3.223	0.995	104.3%
	2	-3.409	0.998	96.5%	-3.173	0.993	106.6%
	3	-3.384	0.998	97.5%	-3.198	0.993	105.5%
Lab 7	1	-3.374	0.999	97.9%	-3.369	0.997	98.1%
	2	-3.405	0.999	96.6%	-3.313	0.996	100.4%
	3	-3.581	0.998	90.2%	-3.576	0.994	90.4%
Lab 8	1	-3.265	0.999	102.4%	-3.330	0.998	99.6%
	2	-3.354	0.998	98.7%	-3.294	0.999	101.2%
	3	-3.281	0.999	101.8%	-3.325	0.999	99.9%

2.1.4 实验室标准曲线各参数合格判定

表 29 的检测数据显示，8 个实验室耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体和 *Lectin* 内标基因的标准曲线斜率分别在 -3.581~-3.231、-3.173~-3.576 之间；决定系数 R^2 分别在 0.993~1.000、0.985~1.000 之间，大于可接受的最低值 0.98；PCR 扩增效率分别在 90.4%~104.0%、90.4%~108.3% 之间，位于 90%~110% 的允许区间内。

8 个实验室耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体和 *Lectin* 内标基因的标准曲线的 3 个参数均

在允许范围内，符合农业部 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。每个实验室根据各水平样品的测定的 *Ct* 值和绘制的标准曲线，计算各样品的转基因含量（公式 8）。每个子样 3 次重复 PCR，采用 3 次重复测量的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（表 30）。

表 30 8 个实验室对 5 个含量样品各 3 个子样的检测结果统计汇总

实验室	子样	样品转基因含量标称值（%）				
		水平 1 5.00	水平 2 3.00	水平 3 1.00	水平 4 0.50	水平 5 0.10
Lab 1	子样 1	5.08	2.99	1.05	0.50	0.10
	子样 2	5.11	3.05	1.08	0.50	0.10
	子样 3	5.22	3.00	1.09	0.49	0.10
Lab 2	子样 1	4.98	2.77	1.00	0.50	0.08
	子样 2	5.09	2.86	1.11	0.50	0.08
	子样 3	4.75	2.99	1.01	0.52	0.09
Lab 3	子样 1	4.92	2.56	1.12	0.57	0.11
	子样 2	4.64	2.70	1.14	0.56	0.12
	子样 3	4.18	2.75	1.11	0.55	0.10
Lab 4	子样 1	5.07	3.09	1.03	0.53	0.10
	子样 2	5.04	2.87	1.06	0.52	0.10
	子样 3	5.09	3.07	1.06	0.52	0.10
Lab 5	子样 1	5.21	3.14	0.93	0.47	0.08
	子样 2	5.22	3.20	0.98	0.49	0.10
	子样 3	5.20	3.00	0.98	0.46	0.10
Lab 6	子样 1	4.85	3.29	0.95	0.52	0.10
	子样 2	5.13	3.04	0.98	0.53	0.10
	子样 3	4.97	3.30	1.06	0.58	0.10

实验室	子样	样品转基因含量标称值 (%)				
		水平 1 5.00	水平 2 3.00	水平 3 1.00	水平 4 0.50	水平 5 0.10
Lab 7	子样 1	4.97	2.93	1.04	0.50	0.11
	子样 2	5.08	2.86	0.96	0.48	0.10
	子样 3	5.04	2.95	1.02	0.53	0.10
Lab 8	子样 1	5.46	3.21	1.10	0.56	0.11
	子样 2	5.25	3.30	1.11	0.56	0.11
	子样 3	5.19	3.08	1.09	0.51	0.11

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 或 ISO5725-2:1994，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 PCR 重复。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 ，汇总后详见表 31。

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。

p —实验室个数。

表 31 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_{ij} 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 $p=8$ 、重复 $m=3$ 时	
1	5.0%	Lab3	0.635	0.516	0.615
2	3.0%	Lab6	0.256		
3	1.0%	Lab2	0.366		
4	0.5%	Lab5	0.305		
5	0.1%	Lab3	0.293		

表 31 科克伦检验结果表明,实验室 3 在检测 5.0%样品时,科克伦检验统计量分别为 0.635,大于 1%临界值 0.615,为离群值,剔除后进行后续数据分析,实验室 3 在检测其余 5.0%、1.0%、0.5%、0.1%这 4 个水平样品的科克伦检验统计量均小于 5%临界值 0.516,予以保留;其余 7 个实验室对 5.0%、3.0%、1.0%、0.5%、0.1%这 5 个水平样品,检验统计量均小于 5%临界值,无岐离值或离群值。

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 ($\bar{\bar{c}}_{\max,ij}$) 和最小平均值 ($\bar{\bar{c}}_{\min,ij}$) 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;

$\bar{\bar{c}}_{\max,ij}$ —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。(相当于对每个实验室 9 个 c_{ijkl} 数据平均,选 8 个实验室值中最大的 1 个值);

$\bar{\bar{c}}_j$ —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。

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

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。

对 5.0%、3.0%、1.0%、0.5%、0.1% 5 个样品, 最大平均值格拉布斯检验统计量依次为: 1.228、1.151、1.473、1.473、1.139; 最小平均值格拉布斯检验统计量依次为: 2.076、1.833、1.464、1.531、1.244。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 1.966。对 5 个含量样品, 最大平均值格拉布斯检验统计量和最小平均值格拉布斯检验统计量均小于格拉布斯检验 5% 临界值 2.126, 表明 8 个实验室数据无离群值或歧离值。

2.2.2 实验室有效检测数据统计

经科克伦检验和格拉布斯检验后, 8 个实验室的数据除了 5% 样品实验室 3 的 1 组数据剔除, 其余均为有效数据。根据表 30 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 32)。

表 32 8 个实验室对 5 个含量样品 3 个平行子样的检测结果统计汇总

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	水平 2	水平 3	水平 4	水平 5
		5.00	3.00	1.00	0.50	0.10
Lab 1	子样 1	5.08	2.99	1.05	0.50	0.10
	子样 2	5.11	3.05	1.08	0.50	0.10
	子样 3	5.22	3.00	1.09	0.49	0.10
Lab 2	子样 1	4.98	2.77	1.00	0.50	0.08
	子样 2	5.09	2.86	1.11	0.50	0.08
	子样 3	4.75	2.99	1.01	0.52	0.09

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 5.00	水平 2 3.00	水平 3 1.00	水平 4 0.50	水平 5 0.10
Lab 3	子样 1		2.56	1.12	0.57	0.11
	子样 2		2.70	1.14	0.56	0.12
	子样 3		2.75	1.11	0.55	0.10
Lab 4	子样 1	5.07	3.09	1.03	0.53	0.10
	子样 2	5.04	2.87	1.06	0.52	0.10
	子样 3	5.09	3.07	1.06	0.52	0.10
Lab 5	子样 1	5.21	3.14	0.93	0.47	0.08
	子样 2	5.22	3.20	0.98	0.49	0.10
	子样 3	5.20	3.00	0.98	0.46	0.10
Lab 6	子样 1	4.85	3.29	0.95	0.52	0.10
	子样 2	5.13	3.04	0.98	0.53	0.10
	子样 3	4.97	3.30	1.06	0.58	0.10
Lab 7	子样 1	4.97	2.93	1.04	0.50	0.11
	子样 2	5.08	2.86	0.96	0.48	0.10
	子样 3	5.04	2.95	1.02	0.53	0.10
Lab 8	子样 1	5.46	3.21	1.10	0.56	0.11
	子样 2	5.25	3.30	1.11	0.56	0.11
	子样 3	5.19	3.08	1.09	0.51	0.11
总平均值		5.095	3.000	1.045	0.520	0.101

注：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。

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/T 6379.2—2004^[8]或 ISO 5725-2:1994^[9]，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 l 个子样检测平均值（3 次重复 PCR 的平均值）记为 $\bar{c}_{ijl}$ ，

当理想情况（各实验室平行子样个数 m_{ij} 均相等，相当于重复次数相等， $m=3$ ）， 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 s_{jr}^2 、实验室间方差 s_{jL}^2 和再现性方差 $s_{\mathcal{R}}^2$ 。

（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：

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

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

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：

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

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

（2）均方（Mean Square, MS）的计算

实验室内均方公式如下：

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

实验室间均方公式如下：

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

(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 。

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

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 ：

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

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

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 ，：

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

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

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

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

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

其中

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

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；

$\bar{c}_{ij}$ — 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）

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

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 ：

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

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“3.1.1.1”还是“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：

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

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

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 33）。

5 个含量样品的重复性相对标准差 RSD_{jr} 在 3.403%~6.083%之间，均小于规定的 25%，再现性相对标准差 RSD_{jR} 在 2.822%~10.817%之间，均小于规定的 35%。重复性和再现性分析结果表明 KA-6G2016-7 转化体荧光定量 PCR 方法测量结果具有良好的精密度。

表 33 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	3	1	0.5	0.1
检测总平均值%	5.095	3.000	1.045	0.520	0.101
重复性标准差 s_{jr}	0.166	0.102	0.037	0.020	0.006
重复性相对标准差 RSD_{jr} (%)	3.290	3.403	3.586	3.869	6.083
再现性标准差 s_{jR}	0.256	0.199	0.062	0.034	0.011
再现性相对标准差 RSD_{jR} (%)	5.091	6.637	5.969	6.509	10.817

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 34。

表 34 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%	5.095	3.000	1.045	0.520	0.101
偏倚 $bias_j$ (%)	0.031	0.000	0.045	0.020	0.001
相对偏倚 $biasR_j$ (%)	0.617	0.004	4.487	3.935	1.308

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 0.004%~4.487%之间，在允许的±25%区间内，表明 KA-6G2016-7 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 32、表 33 和表 34 的数据，形成实验室联合验证数据的汇总分析结果（表 35）。可以看出：5 个含量样品 8 个实验室的测量平均值分别为 5.095%、3.000%、1.045%、0.520%、0.101%，检测平均值相对偏倚（ $biasR_j$ ）在 0.004%~4.487%之间，位于±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 35 实验室联合验证数据的汇总分析结果

	测试样品预期值 (%)				
	5	3	1	0.5	0.1
返回数据实验室数	8	8	8	8	8
每个实验室平行样品个数	3	3	3	3	3

	测试样品预期值 (%)				
	5	3	1	0.5	0.1
离群值数	1	0	0	0	0
平均值(%)	5.095	3.000	1.045	0.520	0.101
重复性标准差 s_{jr}	0.166	0.102	0.037	0.020	0.006
重复性相对标准差 $RSD_{jr}(\%)$	3.290	3.403	3.586	3.869	6.083
再现性标准差 s_{jR}	0.256	0.199	0.062	0.034	0.011
再现性相对标准差 $RSD_{jR}(\%)$	5.091	6.637	5.969	6.509	10.817
偏倚 $bias_j(\%)$	0.031	0.000	0.045	0.020	0.001
相对偏倚 $biasR_j(\%)$	0.617	0.004	4.487	3.935	1.308

2.4 检测限 (LOD) 的验证

KA-6G2016-7 转化体特异性实时荧光 PCR 定量检测方法的检出限同实时荧光 PCR 定性检测方法的检出限, 详见“三”中“ (一) 的 1”。

2.5 定量限 (LOQ) 的验证

在建立方法过程中, 确定耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体特异性荧光定量 PCR 方法的定量限 LOQ 可达到 0.1%, 以 50 ng 初始 DNA 模板计, 相当于扩增体系中含有 40 拷贝的 KA-6G2016-7 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 扩增体系中加入 50 ng DNA 模板进行定量检测。

表 36 定量限样品测量结果统计分析

子样 个数	LOQ 样品百分含量测量值(%)								mean	RSDr (%)	RSDR (%)	Bias (%)
	Lab1	Lab2	Lab3	Lab4	Lab5	Lab6	Lab7	Lab8				
子样 1	0.105	0.076	0.111	0.102	0.084	0.102	0.115	0.114	0.101	6.083	10.817	1.308
子样 2	0.102	0.079	0.121	0.100	0.098	0.100	0.103	0.113				
子样 3	0.100	0.092	0.102	0.103	0.100	0.100	0.101	0.110				
mean	0.102	0.082	0.111	0.102	0.094	0.101	0.106	0.112				
s	0.002	0.008	0.009	0.002	0.008	0.001	0.008	0.002				
sr (%)	2.33	10.30	8.49	1.69	9.03	1.06	7.15	1.69				

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 0.082%~0.112%之间, 总平均值为 0.101%, 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 1.308%, 位于 $\pm 25\%$ 范围内 (表 36)。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 KA-6G2016-7 转化体特异性序列），与实验室内测试出的 LOQ 值相符。

2.6 $\Delta\Delta Ct$ 值法判断样品中转基因成分含量

利用 8 家测定的 5%、3%、1%、0.5%、0.1%样品和阳性定量质控品的扩增 Ct 值，分别计算 5%、3%、1%、0.5%、0.1%样品和阳性定量质控品的耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体的扩增 Ct 值与内标准基因 *Lectin* 的扩增 Ct 值的平均值，然后分别计算 ΔCt 值，以 5 个样品同阳性定量质控品相比分别计算 $\Delta\Delta Ct$ 值。统计结果如表 37，发现 8 家实验室中 5%的样品同阳性定量质控样品的 $\Delta\Delta Ct$ 值均小于 0，且绝对值大于 0.4，说明样品中耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 的转基因含量显著高于 3%的阳性定量质控品；1%、0.5%和 0.1%的样品同阳性定量质控品的 $\Delta\Delta Ct$ 值均大于 0，且绝对值均大于 0.4，说明 3 个样品中耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 的转基因含量显著低于 3%的阳性定量质控品；3%的样品 $\Delta\Delta Ct$ 值的绝对值均小于 0.4，表明含量与 3%的阳性定量质控品相比较差异不显著。8 家测定的 5%、3%、1%、0.5%、0.1%样品和阳性定量质控品的检测数据符合国家规定标准《转基因植物及其产品成分检测 实时荧光 PCR $\Delta\Delta Ct$ 法快速比较转基因成分含量》（农业农村部公告第 1012 号—16—2026）规定。基于所有实验室的 $\Delta\Delta Ct$ 值正常，判断本方法在整体上十分可靠。

表 37 8 家实验室测试样品 $\Delta\Delta Ct$ 值统计表

实验室	样品	KA-6G2016-7 转化体扩增 Ct 值				内标准基因 <i>Lectin</i> 扩增 Ct 值				ΔCt 值	$\Delta\Delta Ct$ 值
		子样 1	子样 2	子样 3	平均值	子样 1	子样 2	子样 3	平均值		
Lab1	5.0%	29.57	29.65	29.63	29.62	23.37	23.45	23.47	23.43	6.19	-0.47
	3.0%	30.36	30.37	30.36	30.36	23.39	23.43	23.39	23.40	6.96	-0.20
	1.0%	31.81	31.77	31.79	31.79	24.09	24.08	24.11	24.10	7.69	1.04
	0.5%	32.81	32.83	32.90	32.85	24.01	24.03	24.08	24.04	8.81	2.15
	0.1%	34.91	34.80	34.81	34.84	23.98	23.83	23.83	23.88	10.96	4.30
Lab2	5.0%	26.38	26.17	26.16	26.24	22.66	22.50	22.39	22.51	3.72	-0.66
	3.0%	26.97	26.90	26.87	26.91	22.48	22.39	22.41	22.43	4.49	0.11
	1.0%	28.90	28.56	28.48	28.65	22.93	22.75	22.48	22.72	5.93	1.55
	0.5%	29.46	29.47	30.06	29.67	22.43	22.41	23.12	22.65	7.01	2.63
	0.1%	31.99	31.97	31.82	31.93	22.06	22.12	22.17	22.12	9.81	5.43
Lab3	5.0%	28.39	28.35	28.52	28.42	23.58	23.45	23.47	23.50	4.92	-0.56
	3.0%	29.27	29.23	29.20	29.24	23.51	23.55	23.55	23.54	5.70	0.22
	1.0%	30.04	29.97	29.95	29.99	23.55	23.51	23.45	23.50	6.49	1.01
	0.5%	30.91	30.92	30.90	30.91	23.41	23.39	23.34	23.38	7.53	2.05
	0.1%	34.52	34.39	34.48	34.47	23.26	23.28	23.11	23.22	11.25	5.77

实验室	样品	KA-6G2016-7 转化体扩增 Ct 值				内标准基因 <i>Lectin</i> 扩增 Ct 值				ΔCt 值	$\Delta\Delta Ct$ 值
		子样 1	子样 2	子样 3	平均值	子样 1	子样 2	子样 3	平均值		
Lab4	5.0%	27.28	27.29	27.28	27.28	23.63	23.62	23.63	23.63	3.65	-0.77
	3.0%	27.98	28.00	27.99	27.99	23.60	23.60	23.61	23.60	4.38	-0.04
	1.0%	29.50	29.52	29.48	29.50	23.38	23.44	23.41	23.41	6.09	1.67
	0.5%	30.48	30.53	30.55	30.52	23.40	23.42	23.44	23.42	7.10	2.68
	0.1%	32.72	32.83	32.75	32.77	23.50	23.57	23.57	23.54	9.22	4.80
Lab5	5.0%	28.04	27.99	27.98	28.00	22.95	22.91	22.90	22.92	5.08	-0.83
	3.0%	28.68	28.68	28.69	28.68	22.88	22.91	22.83	22.87	5.81	-0.10
	1.0%	30.93	30.80	30.79	30.84	23.09	23.05	23.03	23.05	7.79	1.87
	0.5%	31.81	31.76	31.82	31.80	22.99	23.02	22.98	23.00	8.80	2.89
	0.1%	33.89	33.75	33.64	33.76	23.13	23.20	23.12	23.15	10.61	4.70
Lab6	5.0%	28.86	28.73	28.72	28.77	22.98	22.93	23.17	23.03	5.74	-0.95
	3.0%	29.49	29.48	29.41	29.46	23.06	22.93	22.99	22.99	6.47	-0.22
	1.0%	30.92	30.73	30.71	30.79	22.87	22.74	22.83	22.81	7.97	1.29
	0.5%	31.61	31.49	31.56	31.55	22.68	22.61	22.78	22.69	8.86	2.17
	0.1%	34.47	34.13	34.30	34.30	22.26	21.93	22.08	22.09	12.21	5.52
Lab7	5.0%	27.80	27.95	28.30	28.02	23.32	23.48	23.82	23.54	4.48	-0.78
	3.0%	29.05	28.79	28.76	28.87	23.77	23.47	23.48	23.58	5.29	0.03
	1.0%	29.73	29.70	29.97	29.80	23.26	23.13	23.38	23.26	6.55	1.29
	0.5%	30.67	30.72	30.77	30.72	23.05	22.96	23.27	23.09	7.63	2.37
	0.1%	33.85	34.44	34.89	34.40	21.52	22.47	22.84	22.28	12.12	6.86
Lab8	5.0%	26.68	26.76	26.75	26.73	23.20	23.22	23.19	23.20	3.53	-0.68
	3.0%	27.41	27.42	27.48	27.44	23.18	23.23	23.19	23.20	4.24	0.04
	1.0%	29.09	29.06	29.10	29.08	23.21	23.19	23.21	23.20	5.88	1.68
	0.5%	30.06	30.05	30.22	30.11	23.20	23.19	23.21	23.20	6.91	2.70
	0.1%	32.31	32.25	32.28	32.28	23.27	23.21	23.20	23.22	9.05	4.85

注 1: ΔCt 值是 KA-6G2016-7 转化体特异性序列平均 Ct 值与内标准基因 *Lectin* 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。

3. 普通 PCR 定性检测方法验证结果分析

3.1 特异性验证

8 个实验室分别对表 38 中 11 个样品进行耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 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% KA-6G2016-7 和 0.1%KA-6G2016-7 (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 38), 与实验室内部测试结果相符。

表 38 耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 特异性片段定性 PCR 方法实验室间测定结果

样品名称 / 编号	KA-6G2016-7 转化体特异性序列重复测定结果								
	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% KA-6G2016-7 大豆	+	+	+	+	+	+	+	+	+
其它转基因玉米混合样	—	—	—	—	—	—	—	—	—
转基因玉米混合样	—	—	—	—	—	—	—	—	—
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% KA-6G2016-7 大豆	+	+	+	+	+	+	+	+	+

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 KA-6G2016-7 样品（本方法的检出限是在 PCR 检测扩增体系中加入 50 ng DNA 模板进行测算的，相当于扩增体系中含有 40 拷贝的 KA-6G2016-7 转化体特异性序列）进行了普通 PCR 测试。

表 39 耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体普通 PCR 方法检出限实验室间测试结果

Lab	0.1% KA-6G2016-7 转化体特异性序列重复测定结果								
	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。

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 39，与实验室内测试出的 LOD 值相符。表明本方法中耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体特异性序列普通 PCR 方法的检出限为 0.1%，相当于扩增体系中含有 40 拷贝的 KA-6G2016-7 转化体特异性序列。

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、重复性和重演性、正确度和精密度等)全部符合农业部 2259 号公告—4—2015^[2]、农业部 2259 号公告—5—2015^[3]、ENGL-GMFF^[4]、GB/T 6379.2—2004^[8]、ISO 5725-2:1994^[9]、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。

该方法形成国家标准后, 将被转基因检测机构或相关管理部门采用, 用于耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体在国内的检测和安全监管, 预期能够产生良好的经济效益和社会效益。

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, 则使用实验室配置样品, 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“5.4.5. 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方法

实验室根据本文件进行检测之初, 可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与检测平均值($\bar{c}$)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($\bar{c}$)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、(二)标准的主要内容、技术参数的确定、方法二、耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 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 33 中的数据绘制的回归曲线如图 20 所示。回归曲线为 $y=0.0521x+0.0115$, 计算的相对标准不确定度分量 u_r 为 0.0521, 绝对标准不确定度分量 u_0 为 0.0115。

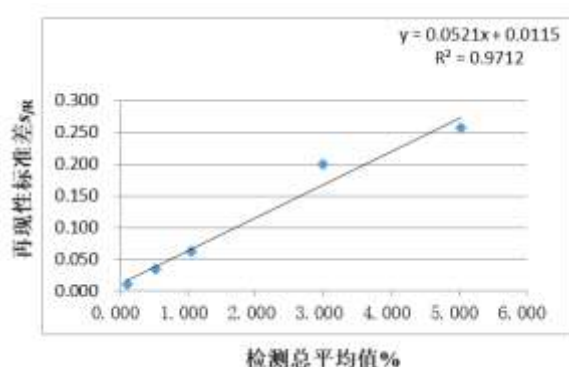


图 20 实验室间循环验证结果再现性标准差与验证样品检测平均值间的线性关系

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

$$u = \sqrt{0.0115^2 + (0.0521 \times \bar{c})^2} \quad \dots\dots\dots (41)$$

随着检测工作的开展，每个实验室需评定自己的测量不确定度。如自行评定本实验室的测量不确定度，实验室可基于足够数量的阳性样品或有证标准物质，采用自上而下或自下而上的方法进行。

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：

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

(二) 预期的经济效益、社会效益和生态效益

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，避免非法生产造成更加经济损失，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，社会效益显著。另外，利用这些检测技术开发商业化试剂盒、并开展检测服务，也将为全国检测机构创造良好的经济效益。

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耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 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、涉及专利的有关情况说明

本标准中，耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体材料由青岛清原种子科学有限公司提供；耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体插入位置核酸序列信息经研发人授权使用。耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 转化体已由青岛清原种子科学有限公司提交了发明专利申请（申请号：CN202511493928.2/公开号：CN121992130A），目前处于实质审查阶段。本标准内容不涉及专利纠纷。

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。耐除草剂大豆 KA-6G2016-7 是我国自主研发的转基因大豆转化体，于 2025 年 11 月 5 日获得农业农村部颁发的生物安全证书（证书编号：农基安证字(2025) 第 187 号），产业化前景广阔，因此建议尽快发布并实施本标准，为该转化体的安全监管提供技术支撑。

十、其他应说明的事项

无。

十一、参考文献

[1] AgbioInvestor-GM, <http://gm.agbioinvestor.com>

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

[5] 《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)

[6] 《转基因植物及其产品成分检测 大豆内标准基因定性 PCR 方法》(农业部 2031 号公告—8—2013)

[7] 《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

[8] 《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

[9] 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)

[10] 《转基因检测非标方法确认评价指南》SN/T 4561-2016

十二、本文相关附件

(一) 文本验证方案(附件 1)

(二) 文本验证报告(附件 2~4)