

转基因生物标准物质 研制与应用

周云龙 主编

 中国质检出版社

转基因生物标准物质 研制与应用

周云龙 主编

中国质检出版社

图书在版编目(CIP)数据

转基因生物标准物质研制与应用/周云龙主编. —北京:中国质检出版社,2014.8
ISBN 978-7-5026-3935-8

I. ①转… II. ①周… III. ①转基因技术—生物工程—标准物质—研究
IV. ①Q789

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 276427 号



中国质检出版社出版发行

北京市朝阳区和平里西街甲 2 号(100029)

北京市西城区三里河北街 16 号(100045)

网址:www.spc.net.cn

总编室:(010)64275323 发行中心:(010)51780235

读者服务部:(010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

各地新华书店经销

*

开本 787×1092 1/16 印张 16.5 字数 336 千字

2014 年 8 月第一版 2014 年 8 月第一次印刷

*

定价:56.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换

版权专有 侵权必究

举报电话:(010)68510107

编委会名单

主 编 周云龙

副主编 吴 刚 宋贵文

编 委 (按姓氏笔画排序)

王灿华 卢长明 龙丽坤 朱 莉

沈 平 张 丽 张秀杰 李 亮

李 昂 李文龙 李飞武 李允静

杨立桃 金芑军 武玉花 姜 羽

章秋艳

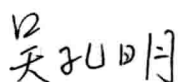
序

我国是一个人口众多、农业资源十分有限的国家,利用转基因技术培育动植物新品种对增强我国农业科技自主创新能力和促进农业增效和农民增收具有重大战略意义。但转基因生物在带给我们巨大经济利益的同时,也存在不容忽视的安全性问题。我国政府高度重视转基因生物的安全性管理,已经形成了一整套适合我国国情并与国际惯例相衔接的法律法规、技术规程和管理体系,对在中国境内从事的农业转基因生物研究、试验、生产、加工、经营和进出口等活动进行全过程安全管理。

转基因产品的检测是安全性管理的技术基础。转基因生物检测标准物质是在转基因产品检测中用以校准测量装置、评价测量方法或给检测样品赋值的基础材料,其特性值要求具有足够强的均匀度和稳定性。因此,在转基因生物安全监管、转基因产品定性与定量检测、检测方法研究与标准化过程中,转基因生物标准物质是不可缺少的物质基础。国外,尤其是欧美国家,在 20 世纪转基因产品开始规模化研发的同时,启动了转基因检测标准和标准物质的研究工作,支撑了政府对转基因生物品种研发、商业化种植和国际贸易的安全性监管工作。

我国对转基因标准物质的系统研究工作始于 2008 年。在转基因重大专项的资助下,农业部科技发展中心周云龙同志组织中国农业科学院油料作物所、上海交通大学和中国计量科学研究院等单位,根据我国转基因新品种的研发现状和国内外转基因农产品贸易的需求,重点开展了水稻、玉米和棉花等农作物转基因产品检测标准物质研制技术、标准物质研制和应用技术规范的研究工作,取得了一系列的研究成果,填补了我国在该领域的多项研究空白。

由周云龙同志主编的《转基因生物标准物质研制与应用》一书,从专业层面系统地介绍了转基因生物标准物质的基本知识和研制过程,并融入最新的研究成果,信息量大、学术性强。主要包括转基因标准物质的基础知识与管理、转基因标准物质的分类与特点、转基因标准物质的研制方法与应用规范等。我相信,本书的出版为我国转基因产品的检测技术研究与应用提供了一本高水平的工具书,对支撑我国转基因生物的研发和安全性管理工作有重要价值。

中国工程院院士 

2013 年 12 月

前 言

本书由农业部科技发展中心组织编写,在编写过程中,借鉴了相关领域专家的经验,参考了国内外的相关管理办法。本书的编委会成员都是转基因重大专项——转基因产品检测标准物质研制课题的成员,课题2008年立项并获得连续三次滚动资助,通过研究课题已制备了12种基体标准物质,18种质粒标准物质,首次建立了集转基因产品检测标准物质原材料鉴定、标准物质制备、量值测定、储藏保存、试用评价等关键环节技术于一体的研制技术体系;确定了质粒DNA标准物质制备流程,建立了靶标片段分离技术、拼接技术、繁殖技术、定值技术、可替代性分析技术等关键技术。课题研制的抗虫水稻BT63的基体标准物质已经获得国家质检总局颁发的一级标准物质证书。本书的技术成果是重大专项转基因产品检测标准物质研制课题成果以及经验的总结。

本书立项提出、课题框架审定、编写组织和审稿由主编周云龙负责,第1章由沈平和宋贵文、朱莉、李昂、章秋艳编写,第2章由金芜军、龙丽坤、杨立桃、宋贵文、李飞武、李亮、李文龙编写,第3章由王灿华、李允静、沈平编写,第4章由武玉花、吴刚编写,第5章由杨立桃、姜羽编写,第6章由吴刚、武玉花编写,第7章由吴刚、张丽编写,第8章由龙丽坤、金芜军、李飞武、张秀杰编写,附录中T25玉米基因组DNA标准物质研制报告范例与MON810玉米质粒DNA标准物质研制报告范例由张丽、武玉花、李允静、吴刚翻译整理,并得到了IRMM以及AOCS的授权。

本书初期撰写提纲的起草修改中,得到彭于发研究员、卢长明研究员、黄昆仑教授、张大兵教授的倾心支持;中国工程院院士吴孔明先生应

邀作序,为本书增添了光彩;中国质检出版社特别是黄洁主任对本书的出版给予真诚的帮助。在此一并表示诚挚的谢意。

由于转基因技术与分析测量技术发展速度很快,有关标准物质以及转基因技术的知识更新周期短,撰写和编辑过程中会存在一些不足和错误,衷心地希望广大读者批评指正。

编 者

2013 年 11 月

目 录

第 1 章 标准物质基础知识	1
1.1 标准物质定义和基本特性	1
1.1.1 标准物质定义	1
1.1.2 标准物质基本特征及满足条件	2
1.1.3 标准物质相关术语	4
1.2 标准物质分类分级	6
1.2.1 标准物质的分类	6
1.2.2 标准物质的分级	7
1.3 标准物质定值	8
1.3.1 准确度/不确定度	8
1.3.2 标准物质定值方式的选择	9
1.3.3 对特性量值测量时的影响参数和影响函数的研究	10
1.3.4 定值数据的统计处理	10
1.3.5 定值不确定度的估计	11
1.3.6 定值结果的表示	11
1.4 标准物质质量值溯源	11
1.4.1 国际单位制	11
1.4.2 基准标准物质	12
1.4.3 基准测量方法	13
1.5 标准物质使用一般原则	14
1.5.1 标准物质使用的一般原则	14
1.5.2 选择标准物质的注意事项	15
第 2 章 标准物质管理	17
2.1 国际标准化组织的标准物质管理	17
2.1.1 国际标准化组织下设的全球标准化物质协调机构	17
2.1.2 国际标准化组织与标准物质研制相关的技术文件	18
2.1.3 国际标准化组织对标准物质研制的技术要求	19
2.2 我国标准物质管理	25

2.2.1	标准物质管理制度	25
2.2.2	标准物质类别和编号	26
2.2.3	我国标准物质管理机构	29
2.2.4	我国标准物质申报要求	30
2.2.5	标准物质评审	32
2.2.6	标准物质证书	35
第3章	转基因生物标准物质类型及特点	39
3.1	转基因生物标准物质分类	39
3.1.1	基体标准物质	39
3.1.2	基因组 DNA 标准物质	41
3.1.3	质粒 DNA 标准物质	42
3.1.4	蛋白质标准物质	45
3.1.5	不同类型转基因生物的比较	45
3.2	转基因生物标准物质特性量值含义	46
3.2.1	转基因含量定义	46
3.2.2	质量分数	47
3.2.3	拷贝数分数	47
3.2.4	两种量值方式比较	47
3.3	转基因生物标准物质定值关键技术	51
3.3.1	重量法	51
3.3.2	实时荧光 PCR 法	51
3.3.3	数字 PCR 法	53
3.3.4	测序法	56
3.4	转基因生物标准物质溯源性	57
3.4.1	基本概念	57
3.4.2	溯源性体系	58
3.4.3	溯源性过程	59
第4章	转基因生物标准物质研制进展	62
4.1	欧盟	63
4.1.1	基体标准物质	64
4.1.2	质粒标准物质	69
4.2	美国	70
4.2.1	基体标准物质	72

4.2.2	基因组 DNA 标准物质	73
4.3	日本	74
4.3.1	基体标准物质	74
4.3.2	质粒 DNA 标准物质	74
4.4	中国	75
4.5	转基因生物标准物质研制面临的挑战	76
4.5.1	标准物质质量值的表达单位	76
4.5.2	标准物质的形态	77
4.5.3	基体标准物质浓度	77
4.5.4	适合中国国情的“量值”表达方式及其技术实现途径	77
第 5 章	转基因生物基体标准物质制备	80
5.1	候选物繁殖	81
5.2	候选物鉴定	82
5.2.1	一般要求和原则	82
5.2.2	候选物鉴定常用技术	84
5.2.3	转基因水稻 TT51-1 基体标准物质候选物繁殖与鉴定	87
5.3	候选物加工	89
5.3.1	种子	89
5.3.2	种子粉末	91
5.4	标准物质包装	96
5.4.1	种子	96
5.4.2	粉末	97
5.5	均匀性检验	98
5.5.1	检验方案及实验设计	98
5.5.2	测量方法	99
5.5.3	数据统计分析	100
5.6	稳定性检验	104
5.6.1	短期稳定性	104
5.6.2	长期稳定性	105
5.6.3	测量方法	105
5.6.4	数据统计分析	105
5.7	定值	107
5.7.1	特性值测定策略及方法	107
5.7.2	不确定度合成	109

5.7.3 赋值	110
5.8 包装与储运	111
5.9 试用与评价	111
5.9.1 使用与评价要求	111
5.9.2 试用评价内容	111
5.9.3 出具试用评价报告	112
第6章 基因组 DNA 标准物质制备	113
6.1 候选物的基本要求	113
6.1.1 候选物的基本要求	113
6.1.2 候选物鉴定技术	114
6.2 基因组 DNA 提取与纯化	114
6.2.1 CTAB 法	114
6.2.2 其他方法	115
6.3 基因组 DNA 质量评价	117
6.3.1 基因组 DNA 质量要求	117
6.3.2 基因组 DNA 质量评价方法	117
6.3.3 不同 DNA 浓度测定方法比较	120
6.4 分装	121
6.5 均匀性检验	122
6.5.1 检验方法	122
6.5.2 均匀性评价方法	122
6.5.3 均匀性不确定度	122
6.6 稳定性检验	123
6.6.1 稳定性检验的原理	123
6.6.2 短期稳定性	123
6.6.3 长期稳定性	124
6.6.4 稳定性评价方法	124
6.6.5 有效期限的确定	124
6.6.6 稳定性不确定度	124
6.7 定值	124
6.7.1 定值策略	124
6.7.2 实验数据的检验	125
6.7.3 标准值及定值不确定度	125
6.8 不确定度分析	126

6.9	包装与保存	127
6.10	试用与评价	127
第7章	质粒 DNA 标准物质制备	128
7.1	质粒分子设计与构建	128
7.1.1	质粒分子的种类与设计	128
7.1.2	质粒分子的构建	130
7.1.3	质粒分子的鉴定	134
7.2	质粒繁殖	134
7.3	质粒 DNA 提取与纯化	135
7.3.1	SDS 碱裂解法	135
7.3.2	试剂盒法	137
7.4	质粒 DNA 质量评价	137
7.4.1	琼脂糖凝胶电泳法	138
7.4.2	酶切法	138
7.5	可替代性分析	138
7.5.1	定性检测可替代性分析	138
7.5.2	定量检测可替代性分析	139
7.6	分装	141
7.7	均匀性检验	142
7.8	稳定性检验	142
7.8.1	短期稳定性	142
7.8.2	长期稳定性	142
7.8.3	稳定性评价方法	143
7.8.4	稳定性不确定度	143
7.9	定值	144
7.9.1	定值策略	144
7.9.2	标准值及定值不确定度	144
7.10	包装与储运	145
7.11	试用与评价	145
第8章	转基因生物标准物质应用	146
8.1	转基因生物标准物质在仪器设备检定/校准中的应用	146
8.1.1	使用转基因生物有证标准物质的校准	147
8.1.2	使用转基因标准品的校准	147

8.1.3	转基因标准物质在仪器设备自校准中的应用	148
8.2	转基因生物标准物质在方法评价中的应用	149
8.2.1	定性方法的评价	149
8.2.2	定量方法的评价	151
8.2.3	实例说明	152
8.3	转基因生物标准物质在检测中的应用	154
8.3.1	检测体系控制	154
8.3.2	标准曲线制作	155
8.3.3	转基因生物标准物质在检测中的应用实例	155
8.4	转基因生物标准物质在质量控制中的应用	159
8.4.1	实验室内部质量控制	160
8.4.2	实验室间质量控制	162
8.4.3	标准物质在质量控制中的作用	163
8.5	转基因生物标准物质在能力验证中的应用	163
8.5.1	能力验证的实施	163
8.5.2	能力验证结果评价	164
附录 1	商业化转基因生物标准物质目录	166
附录 2	国内外相关标准物质研制及使用标准	172
附录 3	国内外标准物质相关数据库	173
附录 4	TT51-1 水稻基体标准物质研制报告范例	174
附录 5	T25 玉米基因组 DNA 标准物质研制报告范例	205
附录 6	MON810 玉米质粒 DNA 标准物质研制报告范例	213
附录 7	缩略语	234
参考文献		238

第 1 章 标准物质基础知识

分析测量是人类认识自然和改造自然的一种基本手段,在科技、社会和经济发
展过程中,分析测量结果日益成为决策的重要依据。标准物质是国家分析测量能
力的重要物质基础,普及标准物质基础知识,加强标准物质的研制、规范标准物质
的管理和应用,对提高我国的国家分析测量能力具有重要的意义。

1.1 标准物质定义和基本特性

1.1.1 标准物质定义

标准物质(reference material, RM)又称参考物质,人们在对标准物质应用过程
中,对其内涵和外延也有了新的认识,它的定义也在发生变化。20 世纪 80 年代,标
准物质的研制者和使用者在不断探索、研究和讨论过程中,逐渐对标准物质和有证
标准物质的定义达成了共识,并最终在 ISO 导则 30:1992 和 ISO/IEC GUIED99《国
际通用计量学基本术语[第二版(VIM2)]》中给出了明确的定义。随着标准物质
在保证分析测量结果的可比性和准确性方面的基础支撑作用日益重要,研制、管理
和应用标准物质的机构及人员数量不断增加,近年来,在 ISO 导则 30 和 ISO/IEC-
GUIED99 关于标准物质定义的基础上,由于不同机构在术语修订工作进程和内容
上出现差异,又规定了另外两套不完全一致的新定义。我国在 JJF 1001—2011《通
用计量术语及定义》中,对标准物质和有证标准物质的定义如下:

**标准物质是具有足够均匀和稳定的特定特性的物质,其特性被证实适用于测
量中或标称特性检查中的预期用途。**

注:

1 标称特性的检查提供一个标称特性值及其不确定度。该不确定度不是测
量不确定度。

2 赋值或未赋值的标准物质都可用于测量精密度控制,只有赋值的标准物质
才可用于校准或测量正确度控制。

3 “标准物质”既包括具有量的物质,也包括具有标称特性的物质。

例:

1 具有量的标准物质举例:

①给出了纯度的水,其动力学黏度用于校准黏度计;

②含胆固醇但没有其物质的量浓度赋予的,人血清仅用作测量精密度控制;

2 具有标称特性的标准物质举例:

①一种或多种指定颜色的色图;

②含有特定的核酸序列的 DNA 化合物;

③含有 19-雄(甾)烯二酮的尿。

3 标准物质有时与特制装置是一体化的。

例:

①三相点瓶中已知三相点的物质;

②置于透射滤光器支架上已知光密度的玻璃;

③安放在显微镜载玻片上尺寸一致的小球。

4 有些标准物质的量值计量溯源到国际单位制(Système International d'Unités, SI)外的某个测量单位,这些物质包括疫苗,其国际单位(IU)由世界卫生组织指定。

5 在某个特定测量中,所给定的标准物质只能用于校准或质量保证两者中的一种用途。

6 对标准物质的说明应包括该物质的追溯性,指明其来源和加工过程。

7 国际标准化组织/标准物质委员会有类似定义,但采用术语“测量过程”意指“检查”,它既包含了量的测量,也包含了标称特性的检查。

有证标准物质(certified reference material, CRM)是附有由权威机构发布的文件,提供使用有效程序获得的具有不确定度和溯源性的一个或多个特性量值的标准物质。

例:在所附证书中,给出胆固醇浓度赋值及其测量不确定度的人体血清,用作校准器或测量正确度控制的物质。

注:

1 “文件”是以“证书”的形式给出(见 ISO Guide 31:2000)。

2 有证标准物质制备和颁发证书的程序是有规定的(例如见 ISO Guide 34 和 ISO Guide 35)。

3 在定义中,“不确定度”包含了“测量不确定度”和“标称特性值的不确定度”两个含义,这样做是为了一致和连贯。“溯源性”既包含量值的“计量溯源性”,也包含“标称特性值的追溯性”。

4 “有证标准物质”的特定量值要求附有测量不确定度的计量溯源性。

1.1.2 标准物质基本特征及满足条件

标准物质是以特性量值的均匀性、稳定性和准确性等特性为主要特征。为获得这些基本特征,标准物质应满足以下基本条件。

(1) 材质均匀

从理论上讲,如果物质的一部分(单元)的特性值与另一部分(单元)的特性值没有显著差异,则该物质的该特征是均匀的。但是,完全均匀的物质是不存在的,物质内部和单元之间不可避免会存在不均匀性,在贮存过程中,也会发生层析、偏析、聚焦等不均匀的倾向。因此,均匀性是相对的,而不均匀是绝对的。如果物质的一部分(单元)的特性值与另一部分(单元)的特性值之间的差异不能被实验检测出来,或检测出来的差异很小且相对于测量准确度要求来说是可以忽略的,则该物质的该特征就可以视为是“均匀”的。

(2) 量值稳定

标准物质在规定的时间和环境条件下,其特性量值应保持在规定的范围以内。这种特征也被称为标准物质的稳定性。

研制(生产)者要保证所提供的标准物质在一定期限内其特性量值不发生显著改变。为得出这一期限,研制者在研制标准物质过程中必须要进行稳定性考察,量值不稳定的物质不能用来制备标准物质。我国规定一级标准物质的稳定性一般应大于1年。

(3) 认定量值准确

量值准确可靠是标准物质的重要特征之一,是指标准物质具有准确的或严格定义的认定值(亦称标准值)。正是由于标准物质认定值准确度高且具有规定的不确定度,因而才能够成为计量学溯源链的重要单元,用于测量仪器的校准或检定、测量方法的评价或确认,以及测量审核与能力验证等量值传递或溯源有关的活动。从这个意义上来说,标准物质必须在有资质的实验室,由具有一定资质和经验的操作人员,用准确可靠的测量方法进行定值测量。

当以某种测量方法来对标准物质进行定值测量时,认定值是对被认定特性量值的最佳估计,认定值与真值的偏离不超过定值测量的不确定度。

(4) 附有特定的证书

有证标准物质必须带有特定的“证书”,它是介绍标准物质特性的主要技术文件,是标准物质研制者(生产者)向使用者提供的质量保证书。证书上需注明该标准物质的认定(标准)值、认定值的不确定度、正确使用方法、运输与贮存应注意的有关事项等。证书的编写与内容应符合国际标准化组织/标准物质委员会(ISO/REMCO)发布的技术文件(ISO 导则 31)和国家计量主管部门颁布的证书编写相关规则的要求。

(5) 可批量生产

标准物质应当有足够的批量和储备,以满足测量工作对标准物质的实际需要。尤其二级(即工作级)标准物质,直接用于现场分析测量,需求量大。对于性能比较稳定的金属、岩石、矿石等类标准物质,一批的制备量最好能满足现场分析测量5~10年的使用量。