

转基因植物及其产品成分检测  
玉米转化体特异性数字 PCR 方法  
征求意见稿编制说明

中国农业科学院油料作物研究所

**2026.5**

## 目录

一、工作简况 .....	4
(一) 标准制定背景 .....	4
(二) 任务来源 .....	6
(三) 起草单位情况 .....	7
(四) 起草过程 .....	9
1、前期准备 .....	9
2.方法建立或确认 .....	9
3.文本起草和征求意见 .....	13
4.标准方法验证 .....	13
5.验证数据的汇总分析、标准文本完善与送审 .....	14
6. 标准审定和报批 .....	15
二、 标准编制原则、标准的主要内容、技术参数的确定	15
(一) 编制原则 .....	15
(二) 玉米转化体批准应用情况及方法建立/确认的准备工作 .....	16
(三) 标准的主要内容、技术参数的确定 .....	25
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 .....	434

(一) 实验室间验证及结果统计 .....	434
(二) 预期的经济效益、社会效益和生态效益 .....	491
四、 与国际、国外同类标准技术内容的对比情况 .....	492
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 .....	493
(一) 以国际标准为基础的起草情况 .....	493
(二) 合规引用或采用国际国外标准情况 .....	494
(三) 未采用国际标准的原因 .....	495
六、 与现行标准、法律法规和强制性标准的关系 .....	497
七、 重大分歧意见的处理经过和依据 .....	498
八、 涉及专利的说明 .....	498
九、 标准作为强制性或推荐性标准发布的意见及实施建议 .....	498
十、 其他应说明的事项 .....	499
十一、 参考文献 .....	499
十二、 本文相关附件 .....	500

## 一、工作简况

### （一）标准制定背景

生物育种已成为全球农业科技竞争的战略高地。在我国，生物育种产业化在提高粮食生产力、保障国家粮食安全、保护生物多样性及降低化学投入品环境负担等方面做出了重大贡献，产生了显著的经济效益与社会效益。中央一号文件已明确提出加快玉米、大豆生物育种产业化步伐，有序扩大试点范围，规范种植管理。在国家转基因生物新品种培育等科技计划的持续支持下，我国已自主研发出具有重大产业化前景、获得生产应用安全证书的转基因玉米、大豆、水稻等品种。2021年以来，农业农村部组织开展了耐除草剂转基因大豆和抗虫耐除草剂转基因玉米的产业化试点；2024年进一步启动产业化示范，种植范围与面积显著扩大。生物育种产业化即将从试点示范迈向全面实施阶段。

与此同时，为适应产业化新形势、平衡技术创新与公众知情权，我国拟实施转基因产品定量标识制度。2023年10月17日，农业农村部发布了《关于修改农业转基因生物标识管理办法的决定（征求意见稿）》，其核心思想是对意外混杂转基因成分的农产品设定豁免阈值，从而在保障消费者选择权的前提下，降低标识合规成本，提升经济效益。这一制度调整，对转基因成分的精准定量检测能力提出了更高要求。

转基因定量检测标准是实施定量标识制度的技术前提。目前，转基因定量检测主要依赖荧光定量 PCR（qPCR）和数字 PCR（dPCR）两种技术。其中，荧光定量 PCR 被认为是“金标准”方法，我国已成功研制并发布了十余项覆盖主要转化体的 qPCR 定量检测标准，在转基因产品监管中发挥了重要作用。然而，随着定量标识制度转向阈值管理，现有 qPCR 方法在应用中逐渐暴露出不足：其依赖校准品和标准曲线，不同实验室、不同批次间结果可比性受校准品影响较大，且易受 PCR 反应体系抑制物干扰，在低含量或复杂基质样本中的定量准确性面临挑战。

相比之下，数字 PCR 技术通过对样本极限稀释和大量微反应单元分区扩增，依据泊松分布直接计算 DNA 分子拷贝数，不依赖标准曲线，具有更高的耐受抑制物能力和绝对定量优势，已被越来越多的检测机构和标准物质研制单位所采用，逐步成为转基因精准定量检测的主流技术。但目前我国尚缺乏系统性的玉米转化体数字 PCR 方法标准。转基因玉米作为获批品种最多、种植面积最大、应用最广泛的转基因作物，我国目前批准进口用作加工原料的玉米转化体共 23 个，批准生产应用（含产业化试点）的转化体共 20 个。这些转化体的精准定量检测，既涉及进口原料的合规监管，也涵盖国内产业化后的安全管理，而现有标准体系尚未形成统一、系统、覆盖全面的数字 PCR 检测方法标准。

为支撑我国转基因产品定量标识制度的实施并满足生物育种产业化后对安全监管的迫切需求，亟需研制一套系统性的玉米转化体数字 PCR 方法标准。该标准应全面涵盖我国目前已批准生产应用和批准进口用作加工原料的两类玉米转化体，共计 40 个转化体。针对各转化体的特异性序列和内标基因，建立适用性广、灵敏度高、重复性好的二重或多重数字 PCR 检测方法，明确反应体系、扩增程序及阳性判定规则；对各转化体的定量准确性进行系统验证，确保检测结果能够满足定量标识阈值监管要求。在此基础上，形成涵盖转化体覆盖清单、操作流程、结果计算与表达等完整技术内容的数字 PCR 方法标准，为行政执法、第三方检测机构、进出口检验及企业自检提供统一可靠的技术工具，切实保障定量标识制度的落地执行，并为后续转化体扩增与产业化安全监管提供可扩展的技术支撑。

## （二）任务来源

本标准制定任务来源于农业农村部 2025 年农业国家标准和行业标准制修订项目（农质标函〔2025〕96 号）。由中国农业科学院油料作物研究所、农业农村部科技发展中心、吉林省农业科学院（中国农业科技东北创新中心）、天津市农业科学院、上海市农业科学院、上海交通大学、深圳市农产品质量安全检验检测中心（深圳市动植物疫病预防控制中心）、中国农业科学院水稻研究所、中国农业科学院生物技术研究所、中国农业科学院环境保护研究所、华南农业大学、

江苏省农业科学院、浙江省农业科学院、四川省农业科学院、中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所、黑龙江省农业科学院、内蒙古自治区农牧业质量安全与检测研究所、中国农业科学院植物保护研究所联合起草。

本标准主要起草人为：。

### （三）起草单位情况

中国农业科学院油料作物研究所（简称油料所）是我国唯一的国家级油料专业研究机构，隶属农业农村部；2002年被正式列入国家非营利性科研机构，是我国首批整体进入国家科技创新体系的农业科研单位。依托本单位建有“农业农村部植物生态环境安全检验检测中心(武汉)”，该中心是我国第一批授权进行转基因检测的机构，也是本项目主要执行单位。检测中心于2007年12月份首次通过了双认证，并于2008年4月21日获颁了“审查认可证书”和“计量认证证书”。检测中心先后于2011年1月份、2014年1月份、2017年1月份、2020年11月份顺利通过了农产品质量安全检测机构考核、审查认可与国家计量认证现场评审复审，获颁了“农产品质量安全检测机构考核合格证书”、“审查认可证书”和“计量认证证书”三证书。中心的技术团队围绕保障我国生物技术产业健康发展对转基因产品安全技术与理论的重大需求，在转基因安全评价研究领域，开展了转基因油菜、大豆、棉花及水稻等作物的环境安全检测技术、转基因产品成分检测技

术和转基因检测标准物质研究。通过开展与检测相关的科研工作，本检测中心发表检测论文近百篇，其中 SCI 论文 50 余篇；申请专利 20 余项并获授权；制定并发布国家标准 20 余项。通过长期积累，检测中心具备实施本项目的人力资源、技术平台和能力。

农业农村部科技发展中心（以下简称中心）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。多年来牵头组织全国农业转基因检测体系建设，负责 42 家部级转基因检测机构体系建设和业务指导，负责国家农业转基因生物安全委员会秘书处、全国农业转基因生物安全标准化技术委员会秘书处日常工作，自 1997 年起一直承担农业农村部委托的农业转基因生物安全管理工作。2021 年，依托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（以下简称“检测中心”）获得检验检测机构资质认定（CMA）与农产品质量安全检测机构考核（CATL）合格证书，建设了各类农业转基因生物成分、环境和食用安全检测及生物材料保存设施。共有实验室 1000 多平方米，试验基地 75 亩，拥有荧光定量 PCR 仪、数字 PCR 仪等仪器设备 63 台套。多年来，发表论文 100 余篇，申请专利和软著 20 余项，组织开展近 300 项转基因检测标准的研制，不仅有进行转基因检测标准研制的设备设施和技术能力，且具备统筹实验材料，组织循环验证、协调项目实施的条件和技术能力。

## （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、整理了标准、专利文献、期刊文献和转基因检测相关数据库，统计了我国批准进口和产业化应用的玉米转化体，仔细分析了玉米转化体的分子特征，收集玉米转化体的标准方法等相关的技术信息。

此外，在标准制定的过程中，我们主要参考了农业部 1485 号公告—4—2010 转基因植物及其产品成分检测 DNA 提取和纯化、农业部 1861 号公告—3—2012 转基因植物及其产品成分检测 玉米内标基因定性 PCR 方法、农业农村部公告第 323 号-21-2020 转基因植物及其产品成分检测 数字 PCR 方法制定指南等相关标准，并按照相应要求进行标准的撰写工作。

### 2.方法建立或确认

本标准涉及 40 个玉米转化体，工作量极大，任务艰巨，需要组建工作组联合攻关。征集配备数字 PCR 设备、有一定工作基础的检测机构，组建联合起草工作组。根据前期工作基础，进行合理分工，具体分工见表 1。在方法建立过程中，先将已发布的标准方法与玉米

内标基因进行配组，对二重数字 PCR 方法进行确认。若转化体和内标基因的引物探针间不存在相互干扰，确认可以配组，优先采用已发布标准中的引物/探针组合；若同一转化体有多个标准方法，首先将不同标准中的引物探针分别与内标基因进行配备，并比较转化体与内标基因扩增效率的一致性、荧光信号强度、及阳性与阴性微反应单元间的分辨率，遴选出最优的引物/探针组合；若已发布的标准方法不能平移至数字 PCR 平台上，与内标基因的引物/探针序列相互干扰，或扩增效率存在差异，则重新设计引物/探针，筛选出适用于数字 PCR 平台的最佳引物/探针组合；对于没有标准方法的转化体，制标单位要根据转化体的分子特征自主设计引物探针，通过比较筛选出最适引物/探针组合。

确定各转化体的引物/探针组合后，对 PCR 扩增体系中的引物/探针浓度、PCR 扩增的退火延伸温度进行优化、特异性分析、动力学范围测试、检测限、定量限、准确性测试等实验，建立玉米转化体特异性二重数字 PCR 定量检测方法。

表 1 检测方法建立/确认及联合验证工作分工

序号	检测参数	方法开发/确认单位	验证单位 1	验证单位 2	验证单位 3
1	DBN9936	中国农业科学院油料作物研究所	—	—	—
2	DBN9858	中国农业科学院油料作物研究所	—	—	—
3	DBN9501	中国农业科学院油料作物研究所	天津市农业科学院	华南农业大学	上海交通大学

4	瑞丰 125	中国农业科学院油料作物研究所	四川省农业科学院	华南农业大学	上海交通大学
5	浙大瑞丰 8	中国农业科学院油料作物研究所	—	—	—
6	nCX-1	中国农业科学院油料作物研究所	—	—	—
7	ND207 (2A-7)	天津市农业科学院	—	—	—
8	BFL4-2	天津市农业科学院	—	—	—
9	LW2-1	吉林省农业科学院	浙江省农业科学院	华南农业大学	天津市农业科学院
10	WYN17132	浙江省农业科学院	上海市农业科学院	天津市农业科学院	中国农业科学院油料作物研究所
11	WYN041	黑龙江省农业科学院	天津市农业科学院	华南农业大学	浙江省农业科学院
12	BBL2-2	深圳市农产品质量安全检验检测中心	中国农业科学院环境保护研究所	中国农业科学院生物技术研究所	浙江省农业科学院
13	CC-2	吉林省农业科学院	—	—	—
14	LP026-2	吉林省农业科学院	中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所	中国农业科学院油料作物研究所	中国农业科学院环境保护研究所
15	KJ1003	深圳市农产品质量安全检验检测中心	上海市农业科学院	中国农业科学院生物技术研究所	中国农业科学院环境保护研究所
16	QY2569-42	天津市农业科学院	上海市农业科学院	中国农业科学院油料作物研究所	中国农业科学院环境保护研究所
17	ZZM032	天津市农业科学院	上海市农业科学院	中国农业科学院油料作物研究所	中国农业科学院生物技术研究所
18	MZIR260	天津市农业科学院	上海市农业科学院	中国农业科学院油料作物研究所	中国农业科学院生物技术研究所
19	Bt11	上海市农业科学院	中国水稻研究所	中国农业科学院油料作物研究所	中国农业科学院生物技术研究所
20	MIR162	中国农业科学院油料作物研究所	中国水稻研究所	天津市农业科学院	深圳市农产品质量安全检验检测中心
21	GA21	中国农业科学院油料	中国水稻研究所	天津市农业科	深圳市农产品质

		作物研究所		学院	量安全检验检测中心
22	MON810	四川省农业科学院	中国水稻研究所	中国农业科学院油料作物研究所	深圳市农产品质量安全检验检测中心
23	Bt176	上海市农业科学院	吉林省农业科学院	中国农业科学院油料作物研究所	深圳市农产品质量安全检验检测中心
24	TC1507	上海交通大学	中国水稻研究所	中国农业科学院油料作物研究所	中国农业科学院油料作物研究所
25	MON863	上海交通大学	中国水稻研究所	中国农业科学院油料作物研究所	中国农业科学院油料作物研究所
26	59122	上海交通大学	中国水稻研究所	中国农业科学院油料作物研究所	中国农业科学院油料作物研究所
27	MON87460	深圳市农产品质量安全检验检测中心	吉林省农业科学院	上海交通大学	中国农业科学院油料作物研究所
28	MON89034	中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所	吉林省农业科学院	上海交通大学	中国农业科学院油料作物研究所
29	MON88017	江苏省农业科学院	吉林省农业科学院	上海交通大学	内蒙古自治区农牧业质量安全与检测研究所
30	3272	上海市农业科学院	吉林省农业科学院	上海交通大学	内蒙古自治区农牧业质量安全与检测研究所
31	5307	吉林省农业科学院	天津市农业科学院	上海交通大学	中国农业科学院油料作物研究所
32	DAS-40278-9	中国水稻所	吉林省农业科学院	上海交通大学	中国农业科学院油料作物研究所
33	DP4114	华南农业大学	吉林省农业科学院	上海交通大学	中国农业科学院油料作物研究所
34	MON87411	上海市农业科学院	吉林省农业科学院	上海交通大学	内蒙古自治区农牧业质量安全与检测研究所
35	MZIR098	环保所	吉林省农业科学院	上海交通大学	中国农业科学院油料作物研究所
36	DP202216	中国农业科学院生物技术研究所	吉林省农业科学院	上海交通大学	中国农业科学院油料作物研究所

37	NK603	中国农业科学院油料作物研究所	—	—	—
38	T25	中国农业科学院油料作物研究所	上海市农业科学院	江苏省农业科学院	内蒙古自治区农牧业质量安全与检测研究所
39	MIR604	中国农业科学院油料作物研究所	上海市农业科学院	江苏省农业科学院	吉林省农业科学院
40	MON87427	中国农业科学院油料作物研究所	—	—	—

注：“—”表示用标准物质定值数据，无需重新验证

### 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》，参照已发布的转基因植物及其产品成分检测标准，结合实验研究的玉米转化体特异性数字 PCR 定量方法，编写《转基因植物及其产品成分检测 玉米转化体特异性数字 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，并对征求意见稿的文本进行修改完善。

### 4.标准方法验证

制定标准方法复核验证方案（详见附件 1-1），并按验证方案的要求准备验证样品，每个方法邀请 3 家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。参与验证的机构包括农业农村部植物生态环境检验检测中心（武汉）、农业农村部农产品及加工品质量检验检测中心（长春）、农业农村部农产品及加工品质量检验检测中心

(天津)、农业农村部植物及植物用微生物生态环境安全检验测试中心(北京)、农业农村部植物生态环境检验测试中心(天津)、农业农村部谷物及制品质量检验测试中心(哈尔滨)、农业农村部农作物生态环境安全检验测试中心(上海)、农业农村部植物生态环境安全监督检验测试中心(上海)、农业农村部植物及植物用微生物生态环境安全监督检验测试中心(广州)、农业农村部农产品及加工品检验测试中心(南京)、农业农村部农产品及加工品质量检验测试中心(杭州)、农业农村部植物生态环境安全检验测试中心(杭州)、农业农村部农作物种子质量检验测试中心(深圳)、农业农村部食品质量检验测试中心(成都)、农业农村部农产品质量安全检验测试中心(呼和浩特)、中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所共 15 个(表 1)。

## 5.验证数据的汇总分析、标准文本完善与送审

汇总分析 40 个转化体 3 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2026年7月x日组织全国农业转基因生物安全管理标准化技术委员会XX位专家，在北京对本标准进行审定。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、标准编制原则、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) 玉米转化体批准应用情况及方法建立/确认的准备工作

#### 1.玉米转化体批准进口及产业化应用情况

##### 1.1 批准进口用作加工原料的玉米转化体

自2002年3月20日《农业转基因生物安全管理条例》配套规章实施后,我国正式建立了转基因生物进口安全管理制度。2004年2月23日,农业部公布了首批通过安全评价的进口转基因作物品种。在受理的8份转基因玉米安全证书申请中,GA21和MON810 2个品种率先获得安全证书。截至2024年底,我国批准进口用作加工原料

的玉米转化体累计已达 21 个（表 2）。这些转基因玉米只能用作加工原料，不得改变用途，不能进入环境种植。进口转化体主要来自孟山都（现属拜耳）、先正达、陶氏益农、先锋国际良种等国际种业公司，性状以耐除草剂、抗虫及复合性状为主。

表 2 我国批准进口的玉米转化体

序号	转化体名称	研发机构	目的基因	目标性状	批准时间
1	3272	先正达	<i>amy797E</i>	品质改良	2008
2	4114	杜邦	<i>cry1F</i> 、 <i>cry34Ab1</i> 、 <i>cry35Ab1</i> 、 <i>pat</i>	抗虫、耐除草剂	2013
3	5307	先正达	<i>ecry3.1Ab</i>	抗虫	2013
4	59122	陶氏益农	<i>cry34Ab1</i> 、 <i>cry35Ab1</i> 、 <i>pat</i>	抗虫、耐除草剂	2005
5	Bt11	先正达	<i>cry1Ab</i> 、 <i>pat</i>	抗虫、耐除草剂	1996
6	Bt176	先正达	<i>cry1Ab</i> 、 <i>bar</i>	抗虫、耐除草剂	1995
7	DAS40278-9	陶氏益农	<i>aad-1</i>	耐除草剂	2012
8	GA21	孟山都	<i>mepsps</i>	耐除草剂	1997
9	LY038	孟山都	<i>cordapA</i>	品质改良	2006
10	MIR162	先正达	<i>vip3Aa20</i>	抗虫	2009
11	MIR604	先正达	<i>mcry3A</i>	抗虫	2007
12	MON810	孟山都	<i>cry1Ab</i>	抗虫	1996
13	MON863	孟山都	<i>cry3Bb1</i>	抗虫	2002
14	MON87411	孟山都	<i>cry3Bb1</i> 、 <i>cp4-epsps</i> 、 <i>dvsnf7</i>	抗虫、耐除草剂	2015
15	MON87427	孟山都	<i>cp4-epsps</i>	耐除草剂	2012
16	MON87460	孟山都	<i>cspB</i>	抗旱	2010
17	MON88017	孟山都	<i>cry3Bb1</i> 、 <i>cp4-epsps</i>	抗虫、耐除草剂	2005
18	MON89034	孟山都	<i>cry1A.105</i> 、 <i>cry2Ab</i>	抗虫	2008
19	MZIR098	先正达	<i>ecry3.1Ab</i> 、 <i>mcry3A</i> 、 <i>pat</i>	抗虫、耐除草剂	2016
20	NK603	孟山都	<i>cp4-epsps</i>	耐除草剂	2000
21	T25	拜耳	<i>pat</i>	耐除草剂	1995
21	TC1507	陶氏益农、杜	<i>pat</i> 、 <i>cry1Fa2</i>	抗虫、耐除草剂	2001

序号	转化体名称	研发机构	目的基因	目标性状	批准时间
		邦			

## 1.2 我国批准生产应用的玉米转化体

在国内转基因玉米产业化应用方面，我国已建立起从安全证书审批到品种审定的完整管理体系。自 2021 年以来，农业农村部对已获批生产应用安全证书的抗虫耐除草剂转基因玉米开展了产业化试点；2024 年开始进行产业化示范，种植范围和种植面积进一步扩大。

在安全证书方面，我国已批准多个玉米转化体获得生产应用安全证书。2019 年，抗虫耐除草剂玉米 DBN9936 和抗虫玉米瑞丰 125 获得生产应用安全证书。2024 年，抗虫耐除草剂玉米 ND207×CC-2、QY2569-42、KJ1003，耐除草剂玉米 ZZM032，抗虫玉米 MZIR260 等转化体首次获得生产应用安全证书，另有部分转化体有效区域扩大至全国。目前，我国批准生产应用的玉米转化体累计已达 21 个（表 3）。

在品种审定方面，我国转基因玉米商业化进程持续加速。2023 年和 2024 年，已合计通过 64 个转基因玉米品种审定。2025 年，97 个转基因玉米品种拟通过国审，涉及大北农、登海种业、隆平高科、丰乐种业等多家上市公司，其中 58 个品种转化体所有者为大北农生物技术有限公司。这些品种普遍兼具抗虫（抗亚洲玉米螟、粘虫、棉铃虫等）和耐除草剂（耐草甘膦、草铵膦等）的复合性状，产量表

现普遍比对照品种增产 3%~9%，部分品种增产超过 10%，适应区域覆盖东华北、黄淮海、西北、西南等中国主要玉米种植区。

表 3 我国批准应用的玉米转化体

序号	作物类别	性状	转化体	研发机构	目的基因	发证时间
1	玉米	抗虫、耐除草剂	瑞丰 125	杭州瑞丰、浙江大学	<i>cry1Ab/cry2Aj</i> 、 <i>g10evo-epsps</i>	2019
2	玉米	抗虫	瑞丰 8	杭州瑞丰、浙江大学	<i>cry1Ab</i> 、 <i>cry2Ab</i>	2021
3	玉米	耐除草剂	nCX-1	杭州瑞丰	<i>CdP450</i> 、 <i>cp4epsps</i>	2022
4	玉米	抗虫、耐除草剂	DBN9936	大北农	<i>cry1Ab</i> 、 <i>epsps</i>	2019
5	玉米	耐除草剂	DBN9858	大北农	<i>epsps</i> 、 <i>pat</i>	2020
6	玉米	抗虫、耐除草剂	DBN9501	大北农	<i>vip3Aa19</i> 、 <i>pat</i>	2020
7	玉米	抗虫	ND207	中国农大、中国林木种子集团	<i>mcry1Ab</i> 、 <i>mcry2Ab</i>	2021
8	玉米	耐除草剂	CC-2	中国农大、中国林木种子集团	<i>maroACC</i>	2023
9	玉米	抗虫、耐除草剂	Bt11×GA21	中国种子集团	<i>cry1Ab</i> 、 <i>pat</i> 、 <i>mepsps</i>	2022
10	玉米	抗虫、耐除草剂	Bt11×MIR162×GA21	中国种子集团	<i>cry1Ab</i> 、 <i>pat</i> 、 <i>vip3Aa20</i> 、 <i>mepsps</i>	2022
11	玉米	耐除草剂	GA21	中国种子集团	<i>mepsps</i>	2022
12	玉米	抗虫耐除草剂	BFL4-2	隆平高科/中国农科院生物所	<i>cry1Ab</i> 、 <i>cry1F</i> 、 <i>cp4epsps</i>	2023
13	玉米	抗虫耐除草剂	QY2569-42	青岛清原	<i>vip3Aa-k1</i> 、 <i>cry1Ab</i> 和 <i>pat</i>	2024

14	玉米	抗虫、耐除草剂	BBL2-2	北京奥瑞金、中国农科院生物所、北京博艾远上	<i>cry1Ab</i> 、 <i>cry3Bb</i> 和 <i>cp4epsps</i>	2024
15	玉米	耐除草剂	ZZM032	中国种子集团	<i>ar</i> 和 <i>epsps</i>	2024
16	玉米	抗虫	MZIR260	中国种子集团	<i>eCry1Gb.1lg-03</i>	2024
17	玉米	抗虫、耐除草剂	KJ1003	科稷达隆（北京）	<i>cry1A.105</i> 、 <i>cry2Ab2</i> 、 <i>vip3Aa19</i> 和 <i>cp4epsps</i>	2024
18	玉米	耐除草剂	WYN17132	浙江新安化工	<i>am79epsps</i>	2024
19	玉米	抗虫耐除草剂	WYN041	浙江新安化工	<i>cry1Ab</i> 和 <i>am79epsps</i>	2024
20	玉米	耐除草剂	LP026-2	隆平生物技术	<i>cry2Ab</i> 、 <i>cry1Fa</i> 、 <i>cry1Ab</i> 和 <i>epsps</i>	2024
21	玉米	抗虫耐除草剂	LW-2	隆平生物技术	<i>epsps</i> 和 <i>pat</i>	2024

## 2. 玉米转化体检测方法

检索中国知网（CNKI，<https://www.cnki.net/>）、万方数据（<https://www.wanfangdata.com.cn/>）、维普网（<https://www.cqvip.com/>）、web of science（<https://webofscience.clarivate.cn/wos/alldb/basic-search>）以及搜索平台，包括国家标准信息公共服务平台（<https://std.samr.gov.cn/>）、食品伙伴网（<https://m.foodmate.net/>）、全国农业食品标准公共服务平台（<https://www.sdtdata.com/fx/fmoa/tsLib>）、EURL GMFF（<https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/>）和 ISO Standards（<https://www.iso.org/standards.html>）等数据库，以及农业农村部组织

研制的转基因玉米转化体特异性 PCR 方法的报批稿，收集转基因玉米转化体特异性检测方法的引物/探针序列及相关信息（表 4）。

表 4 各玉米转化体的引物、探针信息

序号	检测参数	引物/探针	序列 (5'-3')
1	DBN9936	DBN9936-qF	AGCGTCAATTTGTTTACAC
		DBN9936-qR	CAGGGGCAAGAAAACATC
		DBN9936-qP	TCTTGTGTGCCCATGAGCCTA
2	DBN9858	DBN9858-qF	TAAACCTAATCAGTCAGTGCCG
		DBN9858-qR	AGCGCTGATTCTCGAGTAAGG
		DBN9858-qP	CCCAAACAACCAGCCCACCAG
3	DBN9501(C006 3.3)	C0063.3-qF	AACGTGACTCCCTTAATTCTCC
		C0063.3-qR	CCGGACTACTATACCATTTATAGTTACA
		C0063.3-qP	ACTGAAGGCGGGAAACGACAATCT
4	瑞丰 125	RF125-qF	GTCGTTTCCCGCCTTCAGTT
		RF125-qR	GGTGCCTGGAAGACAAGTTCTA
		RF125-qP	AGCTCAACCACATCGCCCGACGC
5	浙大瑞丰 8 (GAB-3)	FR 8-qF	GTTGTCTAAGCGTCAATTTGTTTAC
		FR 8-qR	CAACTGGCGACACAGGGTG
		FR 8-qP	CGACGGCTGAGATGAAGATACGA
6	nCX-1	nCX-1-qF	CGCTAGTTCATCCTCTGACTGGTA
		nCX-1-qR	CTAAGCGTCAATTTGTTTACACCAC
		nCX-1-qP	CGACCATAACCAGTTGCTCAGGTGCCT
7	ND207 (2A-7)	2A-7-qF	GATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAA
		2A-7-qR	TGCCGGAGAAGACCTCGTT
		2A-7-qP	CCACGCGCATCACCTGCGTC
8	BFL4-2	BFL4-2-QF	CGTCCGCAATGTGTTATT
		BFL4-2-QR	GCAACTACTTTGGATGAGG
		BFL4-2-QP	CTAAGCGTCAATTTGTTTACACCAC
9	LW2-1	LW2-1 -qF	TCTTAAACCCACCTTACATACTGA
		LW2-1 -qR	CGTGACTCCCTTAATTCTCCG

		LW2-1 -qP	CAGATTGTCGTTTCCCGCCTTC
10	WYN17132	WYN17132-qF	ACAAATAGGGTGTGGCTGTT
		WYN17132-qR	AACGTCCGCAATGTGTTATTAAG
		WYN17132-qP	CAGCGTCTCGTACCGGTTTCGTTT
11	WYN041	WYN041-QF	ATTCGGCGTTAATTCAGTACATTA
		WYN041-QR	CTTTTCTTCTCCGTGAACCTGC
		WYN041-QP	ATTAAGTTGTCTAAGCGGCGGGATC
12	BBL2-2	BBL2-2-QF	GTGATCTTGTTTCGTTGTATTGG
		BBL2-2-QR	TTCGGCGTTAATTCAGTACAT
		BBL2-2-QP	TCCCTGAGAGTCAACTGCCCC
13	CC-2	CC-2 -qF	TGCAATGGGCCAGATCTAGTTA
		CC-2 -qR	GCTCACTGAATTAACGCCGA
		CC-2 -qP	CCAGTACTAAAATCCAGATCCCCCGA
14	LP026-2	LP026-2-qF	CTCGGACCCATCGAATGC
		LP026-2-qR	CTCCCTTAATTCTCCGCTCT
		LP026-2-qP	TCAGATTGTCGTTTCCCGCCTT
15	KJ1003	KJ1003 qF	GTCCTCGCTCCCTTTTCTCTT
		KJ1003 qR	ATAGCGCGCAAACCTAGGAT
		KJ1003 qP	CAGATTGTCGTTTCCCGCCT
16	Bt11	Bt11qF1	GCGGAACCCCTATTTGTTTA
		Bt11qR1	TCCAAGAATCCCTCCATGAG
		Bt11qP1	AAATACATTCAAATATGTATCCGCTCA
		Bt11qF2	TGTGTGGCCATTTATCATCGA
		Bt11qR2	CGCTCAGTGGAACGAAAACCTC
		Bt11qP2	TTCCATGACCAAAAATCCCTTAACGTGAGT
17	MIR162	MIR162-f1	GCGCGGTGTCATCTATGTTACTAG
		MIR162-r1	TGCCTTATCTGTTGCCTTCAGA
		MIR162-p1	TCTAGACAATTCAGTACATTA AAAACGTCCGCCA
18	GA21	esGA21-5F	CGTTATGCTATTTGCAACTTTAGAACA
		esGA21-5R	GCGATCCTCCTCGCGTT
		esGA21-5P	TTTCTCAACAGCAGGTGGGTGCGGGT
		GA21 qF	CTTATCGTTATGCTATTTGCAACTTTAGA

		GA21 qR	TGGCTCGCGATCCTCCT
		GA21 qP	CATATACTAACTCATATCTCTTTCTCAACAGCAGG TGGGT
19	MON810	Mail-F1	TCGAAGGACGAAGGACTCTAACGT
		Mail-R1	GCCACCTTCCTTTTCCACTATCTT
		Mail-S2	AACATCCTTTGCCATTGCCCAGC
20	Bt176	Bt176 F	GGCCGTGAACGAGCTGTT
		Bt176 R	GGGAAGAAGCCTACATGTTTTCTAA
		Bt-176 P	AGCAACCAGATCGGCCGACACC
21	TC1507	TC1507-F1	TAGTCTTCGGCCAGAATGG
		TC1507-R3	CTTTGCCAAGATCAAGCG
		TC1507-PS1	TAACTCAAGGCCCTCACTCCG
22	MON863	MON863F	TGTTACGGCCTAAATGCTGAACT
		MON863R	GTAGGATCGGAAAGCTTGGTAC
		MON863P	TGAACACCCATCCGAACAAGTAGGGTCA
23	59122	59122-7-rb1f	GGGATAAGCAAGTAAAAGCGCTC
		59122-7-rb1r	CCTTAATTCTCCGCTCATGATCAG
		59122-7-rb1s	TTTAAACTGAAGGCGGGAAACGACAA
24	MON87460	87460 qF	CACGTTGAAGGAAAATGGATTG
		87460 qR	TCGCGATCCTCCTCAAAGAC
		87460 qP	AGGGAGTATGTAGATAAATTTCAAAGCGTTAGA CGGC
25	MON89034	MON89034F	TTCTCCATATTGACCATCATACTCATT
		MON89034R	CGGTATCTATAATACCGTGGTTTTTAA
		MON89034P	ATCCCCGGAAATTATGTT(MGBNFQ)
26	MON88017	MON88017F	GAGCAGGACCTGCAGAAGCT
		MON88017R	TCCGGAGTTGACCATCCA
		MON88017P	TCCCCCCTTCAGTTTAAACAGAGTCGGGT
27	3272	ES3272-F	TCATCAGACCAGATTCTCTTTTATGG
		ES3272-R	CGTTTCCCGCCTTCAGTTTA
		ES3272-P	ACTGCTGACGCGGCCAAACTG
28	5307	5307 qF	CATGGCCGTATCCGCAATGTG
		5307 qR	TGCACCCTTTGCCAGTGG
		5307 qP	ACCACAATATACCCTCTTCCCTGGGCCAG

29	DAS-40278-9	40278-9_5'-f1	CACGAACCATTGAGTTACAATC
		40278-9_5'-r3	TGGTTCATTGTATTCTGGCTTTG
		40278-9_5'-S2	CGTAGCTAACCTTCATTGTATTCCG
30	DP4114	4114 qF	CGCTACTAGACAATTCAG
		4114 qR	GAAGTTCTTATATCTGGCGAT
		4114 qP	AGACAACCTTAATAACACATTGCGGACG
31	MON87411	87411 QF	CTCTGTAACAGAAAACACCATCTAGAG
		87411 QR	ACAAAAGTGAAGTCTAGGGTAGAT
		87411 QP	CCGCGTTTAAACTATCAGTGTTTAGAGAAT
32	MZIR098	MZIR qF	ATCTCAGACACCAAACCGAGATC
		MZIR qR	ACACCGTTAGGCTAGTGCCAGT
		MZIR qP	CAAGTGACAGCGAACGGAGCTGGTTT
33	DP202216	2216 qF	CCATCTGAGGTCTGCACTCTCAC
		2216 qR	CTCCGCTCATGATCAGATTGTC
		2216 qP	CAACACACTCAAACACTGATAG
34	NK603	NK603F	ATGAATGACCTCGAGTAAGCTTGTTAA
		NK603R	AAGAGATAACAGGATCCACTCAAACACT
		NK603P	TGGTACCACGCGACACACTTCCACTC
35	T25	MLD143	ACAAGCGTGTCGTGCTCCAC
		MDB551	GACATGATACTCCTTCCACCG
		TM016	TCATTGAGTCGTTCCGCCATTGTGCG
36	MIR604	MIR604F	GCGCACGCAATTCAACAG
		MIR604R	GGTCATAACGTGACTCCCTTAATTCT
		MIR604P	AGGCGGGAAACGACAATCTGATCATG
37	MON87427	MON87427 qF	ACGGAAACGGTCGGGTCAAATG
		MON87427 qR	CCATGTAGATTTCCCGGTTTTCTC
		MON87427 qP	TCGGGACAATATGGAGAAAAAGAAAGAG

### 3.转基因材料的获取和验证

根据任务分工,由农业农村部科技发展中心向各个具体承担检测方法开发/确认的单位提供玉米转化体和对应非转基因玉米材料。各

家单位在收到实验材料后，通过转化体特异性普通 PCR 方法或实时荧光 PCR 方法进行材料的符合性验证，确定转基因材料和非转基因材料的准确可靠。

### （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、原理、试剂和材料、主要仪器和设备、操作步骤、结果分析于表述、检出限和定量限、附录等 10 个部分。

标准文本主要技术内容包括 DBN9936、DBN9858、DBN9501、瑞丰 125、浙大瑞丰 8、ND207、nCX-1、CC-2、BFL4-2、LW2-1、WYN17132、LP026-2、WYN041、BBL2-2、KJ1003、QY2569-42、ZZM032、MZIR260、MON810、Bt11、Bt176、NK603、T25、TC1507、MON863、59122、MON87460、MIR604、MON89034、MON88017、3272MIR162MON87427、5307、DAS-40278-9、DP4114、MON87411、MZIR098、DP202216 等 40 个玉米转化体的二重数字 PCR 方法。标准的主要技术参数包括 40 个玉米转化体的特异性检测引物及探针序列、内标准基因引物及探针序列、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）、荧光信号检测、数据分析、不确定度评定、检出限、定量限等。

## 1. DBN9936/*zSSIIB* 二重数字 PCR 方法

### 1.1 引物探针的确认

转基因玉米 DBN9936 转化体特异性荧光定量 PCR 方法标准已经发布，引物探针序列见表 4 将荧光定量 PCR 引物探针平移到数字 PCR 平台上，与 *zSSIIB* 内标基因配组，进行二重数字 PCR 扩增，经测试，DBN9936/*zSSIIB* 二重数字 PCR 在扩增过程中，引物探针间没有相互干扰，一维图中 DBN9936 转化体和 *zSSIIB* 内标基因的阳性和阴性微滴可明显区分，可以将 DBN9936 的荧光定量 PCR 引物探针作为进行二重数字 PCR 扩增的候选引物探针组合。

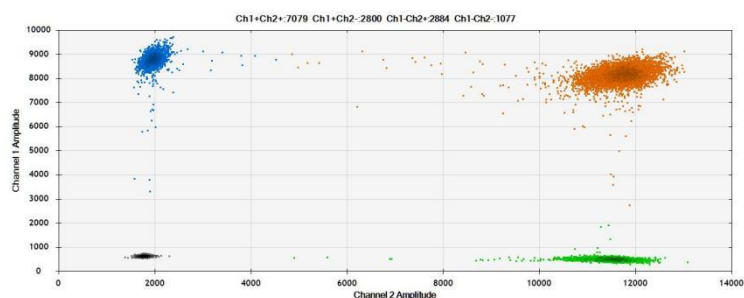


图 1 DBN9936 引物探针 2-D 微滴图

### 1.2 DBN9936 微滴数字 PCR 特异性测试

用转基因玉米 DBN9936、瑞丰 12-5、T25、MIR604、NK603、DBN9858、MON87427 基因组 DNA 作模板进行 DBN9936 和 *zSSIIB* 微滴数字 PCR (ddPCR) 扩增，用水做空白对照，测试 DBN9936 转化体特异性 ddPCR 的检测特异性。*zSSIIB* 内标基因 ddPCR 在各转

基因品种中都产生了阳性微滴，在空白对照中无阳性微滴，仅在转基因玉米 DBN9936 中有阳性微滴，在其他转基因玉米品种和空白对照中均无阳性微滴（图 2）。结果表明 DBN9936 微滴数字 PCR 有良好的扩增特异性。

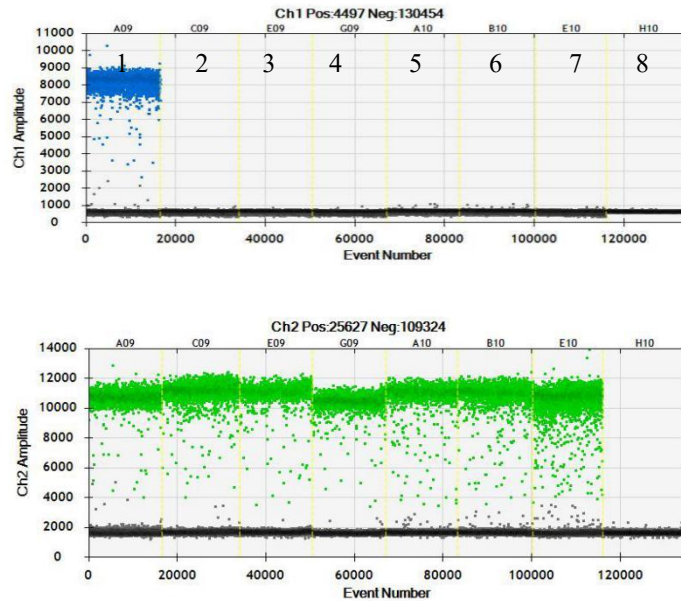


图 2 DBN9936 微滴数字 PCR 特异性测试。

A, DBN9936 微滴数字 PCR 一维热图；B, *zSSIb* 微滴数字 PCR 一维热图。样品顺序：1. DBN9936, 2. 瑞丰 12-5, 3. T25, 4. MIR604, 5. NK603, 6. DBN9858, 7. MON87427, 8. 空白

### 1.3 DBN9936 转化体和 *zSSIb* 内标基因单重数字 PCR 的反应条件优化

GMO 定量检测依赖于 GM DNA 拷贝数和总 DNA 拷贝数的准确测量，其中 GM DNA 拷贝数通过转化体特异性 PCR 检测定量，总 DNA 拷贝数定量通过内标基因测定。DBN9936 转化体和 *zSSIb* 内标基因单重数字 PCR 分别优化了退火/延伸温度和引物/探针浓度，以改善阳性/阴性液滴的区分并减少雨滴对定量结果的影响。在 54°C

至 60°C 的不同退火温度下, *zSSIIb* 内标基因的阳性液滴的荧光强度保持稳定(图 3A), 但 DBN9936 阳性液滴的荧光强度随着退火温度的降低而增加, 在退火温度降低到 57°C 时, 液滴的信号强度达到平台期, 且雨滴数相对较少(图 3B)。选择 57°C 作为 DBN9936 转化体和 *zSSIIb* 内标基因单重数字 PCR 的退火温度。引物/探针浓度的变化对测量结果和阳性、阴性液滴之间的分离没有显著影响(图 3C D), 因此 DBN9936 和 *zSSIIb* 单重数字 PCR 采用与荧光定量 PCR 检测相同的引物/探针浓度, 为 400/200 nM。

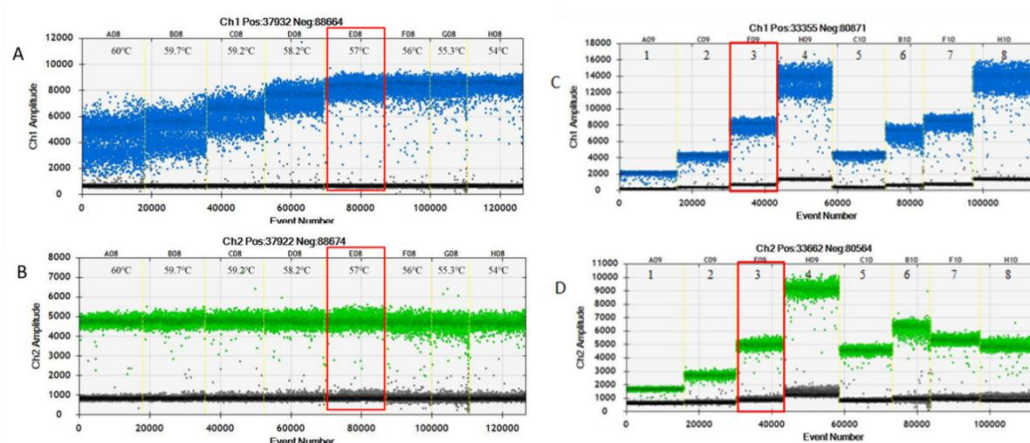


图 3 DBN9936 和 *zSSIIb* 单重 ddPCR 退火/延伸温度和引物/探针浓度的优化。

*zSSIIb* (A) 和 DBN9936 (B) 在 54°C 至 60°C 不同退火温度下单重 ddPCR 测定中的一维 (1-D) 热点图, *zSSIIb* (C) 和 DBN9936 (D) 在单重 ddPCR 测定中在不同引物/探针浓度下的一维热点图。1-4 对应 *zSSIIb* 和 DBN9936 的引物探针浓度相同, 分别为 100/50, 200/100, 400/200, 800/400 nM; 5-8 对应 *zSSIIb* 和 DBN9936 不同的引物探针浓度, 分别为 200/100 nM (*zSSIIb*)、400/200 nM (DBN9936), 400/200 nM (*zSSIIb*)、200/100 nM (DBN9936), 800/400 nM (*zSSIIb*)、400/200 nM (DBN9936), 400/200 nM (*zSSIIb*)、800/400 nM (DBN9936)。

#### 1.4 DBN9936/*zSSIIb* 二重 ddPCR 的反应条件确认

用 DBN9936/*zSSIIb* 二重 ddPCR 进行标准物质的检验和定值，可以降低成本、提高效率、提高定量结果的准确度。在57°C退火、引物/探针浓度为400/200 nM的反应条件下，以纯合体基因组DNA为模板，进行DBN9936/*zSSIIb*二重 ddPCR。二重数字PCR二维热图显示了四个明显的液滴簇，分别对应FAM阳性液滴簇、HEX阳性液滴簇、双荧光液滴簇和阴性液滴簇（图 4），测量的拷贝数比值为1.012，非常接近理论值 1.0,表明DBN9936/*zSSIIb*二重ddPCR中*zSSIIb*内标基因与DBN9936转化体具有相同的扩增能力。选择57°C作为DBN9936/*zSSIIb* 二重 ddPCR 的最佳退火温度，DBN9936 转化体和*zSSIIb* 内标基因的引物/探针浓度均为400/200 nM。

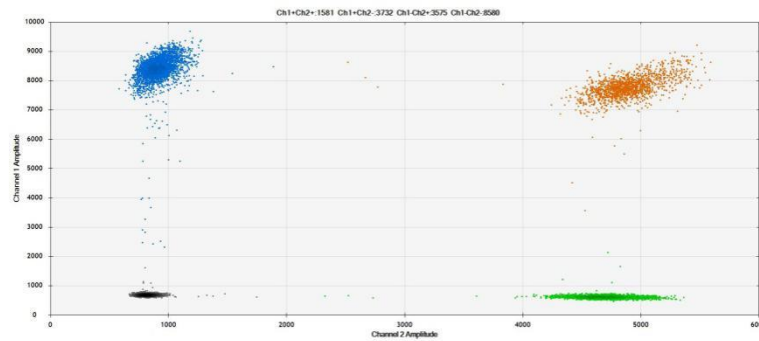


图 4 DBN9936/*zSSIIb* 二重 ddPCR 在优化的反应体系和反应条件下的二维热图。

## 1.5 DBN9936/*zSSIIB* 二重 ddPCR 的 LOD、LOQ 和动力学范围测试

在优化的 PCR 条件下, DBN9936 gDNA 的连续稀释液用于测试 DBN9936/*zSSIIB*二重 ddPCR 的动态范围、LOD 和 LOQ。不同浓度的微滴热图见图8, 测量的拷贝数浓度以及 DBN9936 和 *zSSIIB* 的拷贝数比值显示在表 5 中。DBN9936/*zSSIIB* 二重 ddPCR 的 LOD 确定为 12 个拷贝 DBN9936 gDNA, LOQ 确定为 48 个拷贝。二重 ddPCR 的 LOD 和 LOQ 与实时 PCR 测定的相似。当20  $\mu\text{L}$  反应液 DNA 模板量在 12 到  $7.5 \times 10^4$  个拷贝的范围内, DBN9936/*zSSIIB*二重ddPCR显示预期 DNA 拷贝数和测量的 DNA 拷贝数之间存在良好的线性响应,  $R^2$ 为 1.0 (图 6AB)。当DNA 模板量为6 和 12 拷贝时, 测得的拷贝数比值严重偏离了理论值(图 6C)。DBN9936/*zSSIIB*二重ddPCR动态范围测试表明, 20  $\mu\text{L}$ 反应体系中, 当模板量在 $600 \sim 7.5 \times 10^4$ 拷贝的范围内, 可获得准确的拷贝数浓度和拷贝数比值测量值。

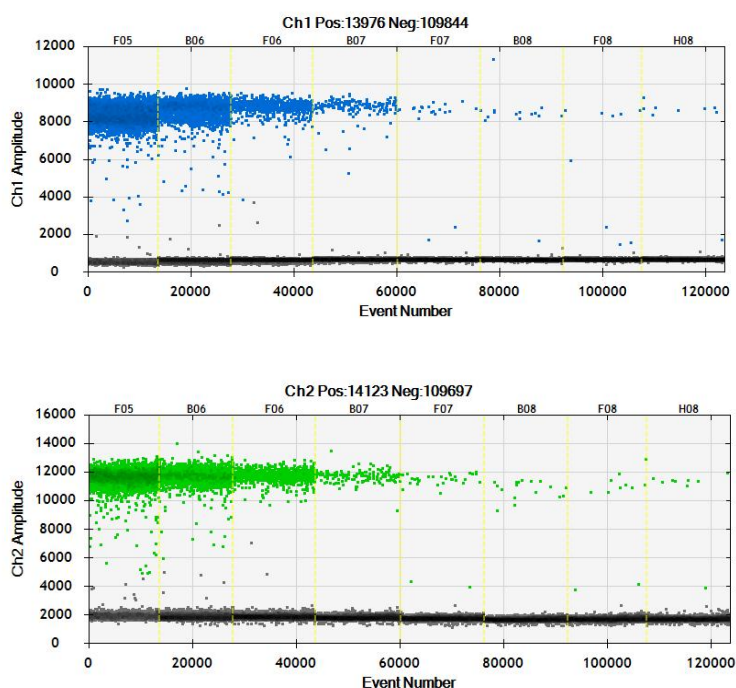


图 5 梯度稀释DNA溶液DBN9936/*zSSIIB*二重 ddPCR的微滴热图。

F05-H08 的模板量依次为 75000 、 15000、 3000 、 600 、 120 、 24 、 12 、 6 copies。

表 5 DBN9936/*zSSIIB* 二重 ddPCR 测量梯度稀释 DBN9936 DNA 溶液的拷贝数浓度和比值

Target	Expected concentration (copie/ $\mu$ L)	Copy number concentration (copie/ $\mu$ L)							
		Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Mean	SD	RSD (%)	Bias (%)
DBN9936	75000	74900	73100	78000	76300	75575	2080.66	2.75	0.77
	15000	15050	14720	14660	14940	14842.5	183.37	1.24	-1.05
	3000	2820	2920	2880	3010	2908	79.74	2.74	-3.08
	600	606	574	561	565	577	20.40	3.54	-3.92
	120	134	125	116	122	124	7.50	6.04	3.54
	24	23	15	27	19	21	5.16	24.59	-12.50
	12	9	11	13	16	12	2.99	24.38	2.08
	6	4.1	7	4.8	6.6	6	1.40	24.82	-6.25
<i>zSSIIB</i>	75000	79000	77500	76000	74400	76725	1975.47	2.57	2.30
	15000	15290	14970	15010	15400	15168	210.46	1.39	1.12
	3000	2870	2910	2900	2940	2905	28.87	0.99	-3.17
	600	591	634	626	617	617	18.67	3.03	2.83
	120	148	109	130	126	128	16.01	12.48	6.88
	24	29	23	27	24	26	2.75	10.69	7.29

	12	13	12	12	6.5	11	2.95	27.17	-9.38
	6	9	9	4.2	6.6	7	2.30	31.91	20.00
DBN9936/ <i>zSSIb</i> ratio	75000	0.95	0.94	1.02	1.03	0.99	0.05	4.73	-1.50
	15000	0.98	0.98	0.98	0.97	0.98	0.01	0.66	-2.15
	3000	0.98	1.00	0.99	1.02	1.00	0.02	1.69	0.05
	600	1.03	0.91	0.90	0.92	0.94	0.06	6.44	-6.00
	120	0.90	1.15	0.89	0.96	0.98	0.12	12.38	-2.50
	24	0.80	0.62	1.00	0.81	0.81	0.16	19.22	-19.25
	12	0.70	0.90	1.10	2.40	1.28	0.77	60.20	27.50
6	0.45	0.80	1.20	1.00	0.86	0.32	37.08	-13.75	

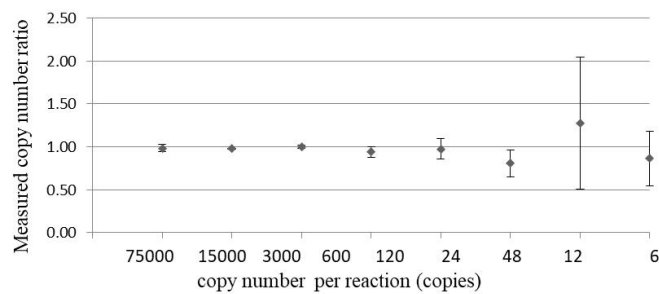
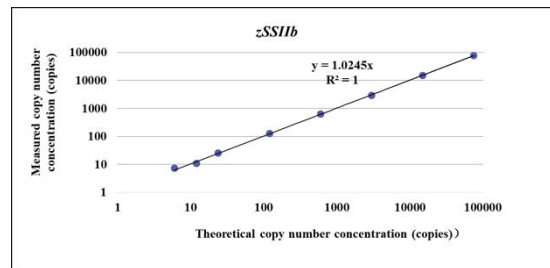
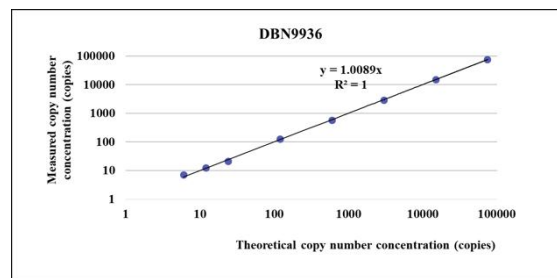


图 6 DBN9936/*zSSIb* 二重 ddPCR 的动态范围和实测拷贝数比。

A 二重 ddPCR 中 DBN9936 在 6 到  $7.5 \times 10^4$  个拷贝的动态范围内测量拷贝数与预期拷贝数间有良好的线性关系；B 二重 ddPCR 中/*zSSIb* 在 6 到  $7.5 \times 10^4$  个拷贝的动态范围内测量拷贝数与预期拷贝数间有良好的线性关系；C 测得的 DNA 溶液的拷贝数比随着 DNA 浓度的降低显示出升高的标准差(SD)，垂直线段表示标准差。数据来自四个技术重复的平均值。

## 1.6 DBN9936/*zSSIIB* 二重 ddPCR 的测量准确性

粉末样品 (Sm1-Sm4) 和DNA 样品 (Sc1-Sc4) 的转基因含量通过 DBN9936/*zSSIIB*二重 ddPCR 进行定量。二重ddPCR的定量检测由不同的操作者在不同的日期进行了3次测量。测量的平均DBN9936/*zSSIIB*拷贝数比值分别接近预期含量,从而使测量平均值与预期值的偏差在 $\pm 25\%$ 的可接受范围内(表6)。重复性相对标准偏差  $RSD^r$ 和再现性相对标准偏差 $RSD^R$  均小于 25%。随着盲样中转基因含量的降低,  $RSD^r$ 和  $RSD^R$ 值都在不断上升(表6)。已建立的DBN9936/*zSSIIB*二重ddPCR实现了对GMO含量的准确定量,具有良好的重复性和重现性。

表 6 DBN9936/*zSSIIB* 二重 ddPCR 定量结果的重复性和重现性统计分析

Sample		Expected value (%)	Mean value (%)	S <sup>r</sup> (%)	RSD <sup>r</sup> (%)	S <sup>R</sup> (%)	RSD <sup>R</sup> (%)	Bias (%)
matrix samples	Sm1	5	5.11	0.09	1.71	0.14	2.65	2.28
	Sm2	1	1.07	0.07	6.23	0.07	6.87	7.49
	Sm3	0.5	0.51	0.06	12.28	0.06	12.28	2.80
	Sm4	0.1	0.11	0.03	23.30	0.03	23.30	8.07
DNA samples	Sc1	5	5.27	0.21	4.01	0.21	4.01	5.46
	Sc2	1	1.07	0.09	8.14	0.09	8.14	7.14
	Sc3	0.5	0.53	0.03	6.45	0.04	6.71	6.91
	Sc4	0.1	0.12	0.02	13.07	0.02	13.73	15.26

DBN9936/*zSSIIB* 二重 ddPCR 中的 DBN9936 和 *zSSIIB* 采用与实时荧光 PCR 检测相同的引物/探针浓度,为 400/200 nM。DBN9936 转化体和 *zSSIIB* 内标基因的反应体系见表 7。反应程序如下: 94°C 变性 10 min; 50 个循环 (94 °C 变性 30 s, 57°C 退火延伸 1 min) ; 98

°C 变性 10 min; 4 °C 保存。扩增结束后, 将 96 孔板置入微滴读取仪中读取信号, 并使用软件 QuantaSoft V1.3.2.0 分析实验数据, 获得绝对定量结果。动力学范围测试表明, DNA 模板量在  $12 \sim 7.5 \times 10^4$  copies/反应, 拷贝数浓度测量值与预期值具有良好的线性关系。但 20  $\mu\text{L}$  反应体系中当模板量在  $600 \sim 7.5 \times 10^4$  拷贝的范围内, 才可获得准确的拷贝数浓度和拷贝数比值测量值。用 DBN9936/*zSSIb* 二重 ddPCR 方法定量基体样品和基因组 DNA 样品, 测量结果具有良好的准确性。DBN9936/*zSSIb* 二重 ddPCR 为转基因玉米 DBN9936 标准物质的拷贝数浓度和拷贝数比值检测和定值提供了可靠的参考方法。

表 7 DBN9936/*zSSIb* 二重微滴数字 PCR 反应体系

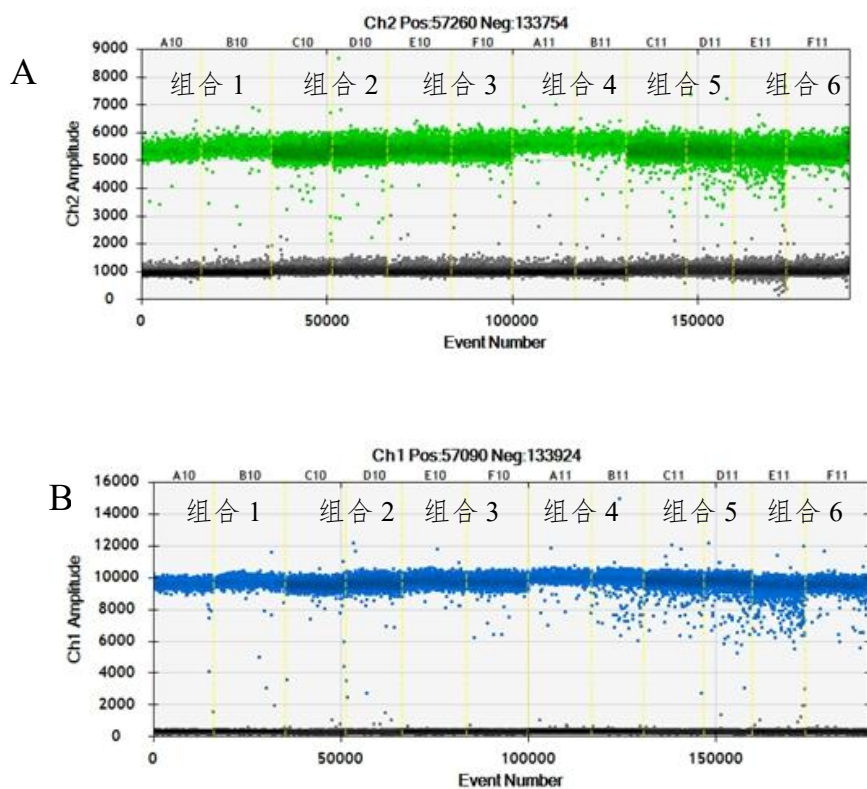
PCR 反应试剂	终浓度	体积( $\mu\text{L}$ )
DNA Template	40ng/ $\mu\text{l}$	2
内标-F	10 $\mu\text{M}$	0.8
内标-R	10 $\mu\text{M}$	0.8
内标-P	10 $\mu\text{M}$	0.4
外源-F	10 $\mu\text{M}$	0.8
外源-R	10 $\mu\text{M}$	0.8
外源-P	10 $\mu\text{M}$	0.4
ddPCR Mix (2 $\times$ )	1 $\times$	10
ddH <sub>2</sub> O	/	5

## 2. DBN9858/*zSSIb* 二重数字 PCR 方法

### 2.1 引物探针筛选

在数字 PCR 平台上, 对 DBN9858 的引物探针组合进行筛选。用 DBN9858 纯合体基因组 DNA 为模板, 进行 DBN9858 转化体和 *zSSIb* 内标基因的数字 PCR 扩增。每个引物探针组合 2 个平行反应,

DBN9858 转化体和 *zSSIIb* 内标基因的 1 维 (1-D) 微滴热图、2 维微滴热图 (2-D)、DBN9858/*zSSIIb* 拷贝数比值如图 7 所示, DBN9936 转化体和 *zSSIIb* 内标基因的 1-D 微滴热图中, 6 个引物组合阳性微滴和阴性微滴都能显著区分, 雨滴较少 (图 7AB); 2-D 微滴热图中, 6 个引物探针组合都产生了 4 个显著区分的微滴群 (图 7C); 6 个引物探针组合检测 DBN9858 纯合体基因组 DNA, 获得不同的 DBN9858/*zSSIIb* 拷贝数比值 (图 7D), 其中引物探针组合 5 和组合 6 的拷贝数比值均非常接近理论值 1.0, 考虑到组合 6 的拷贝数比值 1.01 和 1.009 比组合 5 更接近理论值, 且与用于实时荧光 PCR 的引物探针组合相同, 因此本项目选择引物探针组合 6 用于数字 PCR 扩增, 数字 PCR 引物探针序列详见表 4。



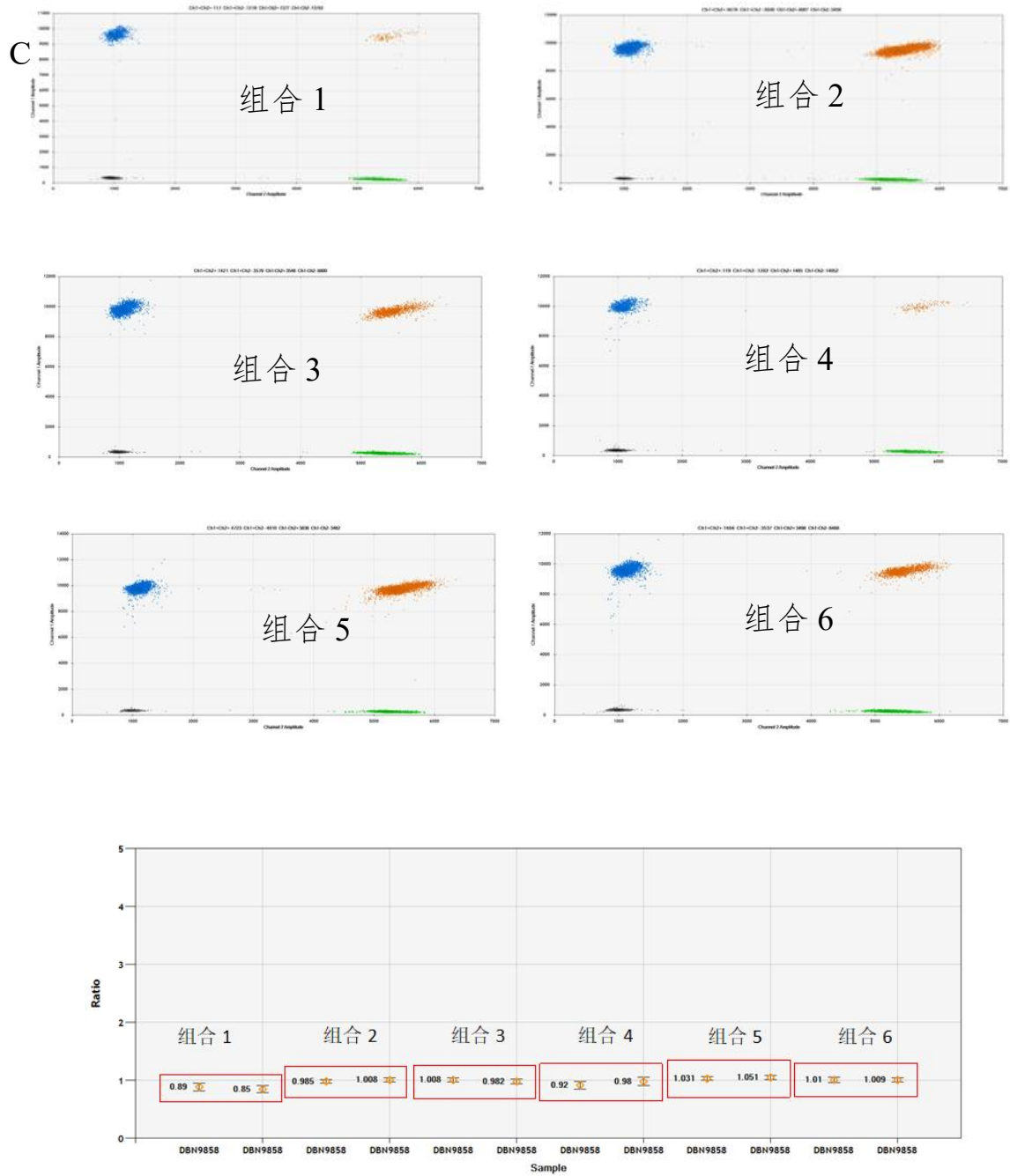


图 7 数字 PCR 引物探针筛选

A, DBN9858 转化体不同引物探针组合 1-D 微滴图; B, zSIIb 内标基因 1-D 微滴图; C, 6 个引物探针组合与 zSIIb 的 2-D 微滴图; D, 6 个引物探针组合检测 DBN9858 纯合体基因组 DNA, 获得的 DBN9858/zSIIb 拷贝数比值。

## 2.2 DBN9858 微滴数字 PCR 特异性测试

用转基因玉米 DBN9858、瑞丰 12-5、T25、MIR604、NK603、DBN9936、MON87427 基因组 DNA 作模板进行 DBN9858 和 *zSSIb* 微滴数字 PCR (ddPCR) 扩增, 用水做空白对照, 测试 DBN9858 转化体特异性 ddPCR 的检测特异性。*zSSIb* 内标基因 ddPCR 在各转基因品种中都产生了阳性微滴, 在空白对照中无阳性微滴; DBN9858 转化体特异性 ddPCR 仅在转基因玉米 DBN9858 中有阳性微滴, 在其他转基因玉米品种和空白对照中均无阳性微滴 (图 8)。结果表明 DBN9858 微滴数字 PCR 有良好的扩增特异性。

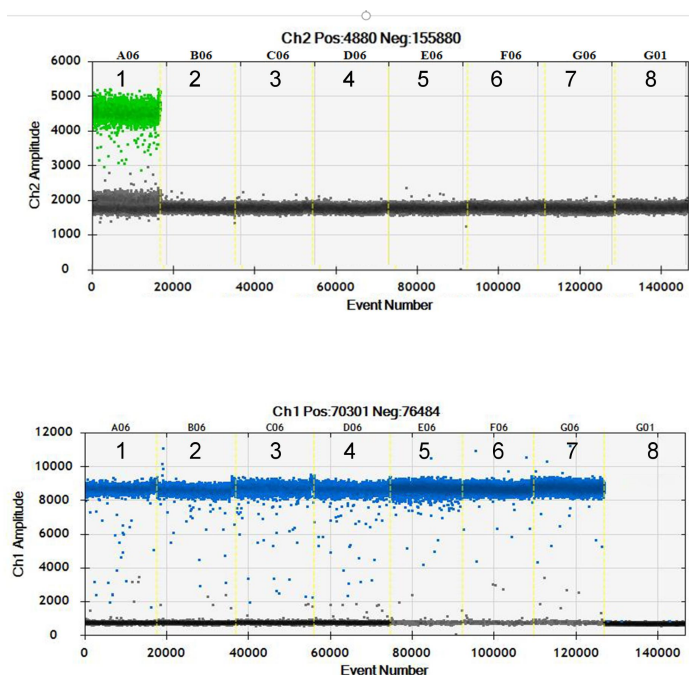


图 8 DBN9858 微滴数字 PCR 特异性测试。

A, DBN9858 微滴数字 PCR 一维热图; B, *zSSIb* 微滴数字 PCR 一维热图。样品顺序: 1. DBN9858, 2. 瑞丰 12-5, 3. T25, 4. MIR604, 5. NK603, 6. DBN9936, 7. MON87427, 8. 空白

## 2.3 DBN9858 转化体和 *zSSIIb* 内标基因单重数字 PCR 的反应条件优化

GMO 定量检测依赖于GM DNA拷贝数和总DNA拷贝数的准确测量，其中GM DNA 拷贝数通过转化体特异性PCR检测定量，总DNA 拷贝数定量通过内标基因测定。DBN9858 转化体和 *zSSIIb* 内标基因单重数字 PCR 分别优化了退火/延伸温度和引物/ 探针浓度，以改善阳性/阴性液滴的区分并减少雨滴对定量结果的影响。在54°C 至 63°C 的不同退火温度下，*zSSIIb* 内标基因的阳性液滴的荧光强度保持稳定（图 9A），但 DBN9858 阳性液滴的荧光强度随着退火温度的降低而增加，在退火温度降低到59.7°C时，微滴的信号强度达到平台期，且雨滴数相对较少（图 9B），且在59.7°C时，测量的拷贝数比值为1.0，等于理论值（图 9C）。因此，均选择60°C作为 DBN9858 转化体和 *zSSIIb* 内标基因单重数字PCR的退火温度。引物/探针浓度的变化对测量结果和阳性、阴性液滴之间的分离没有显著影响（图 9D E），但在引物/探针浓度为400/200 nM时，测量的拷贝数比值为0.99，最接近理论值（图 9F），DBN9858 和*zSSIIb*单重数字PCR采用与荧光定量PCR检测相同的引物/探针浓度为400/200 nM。

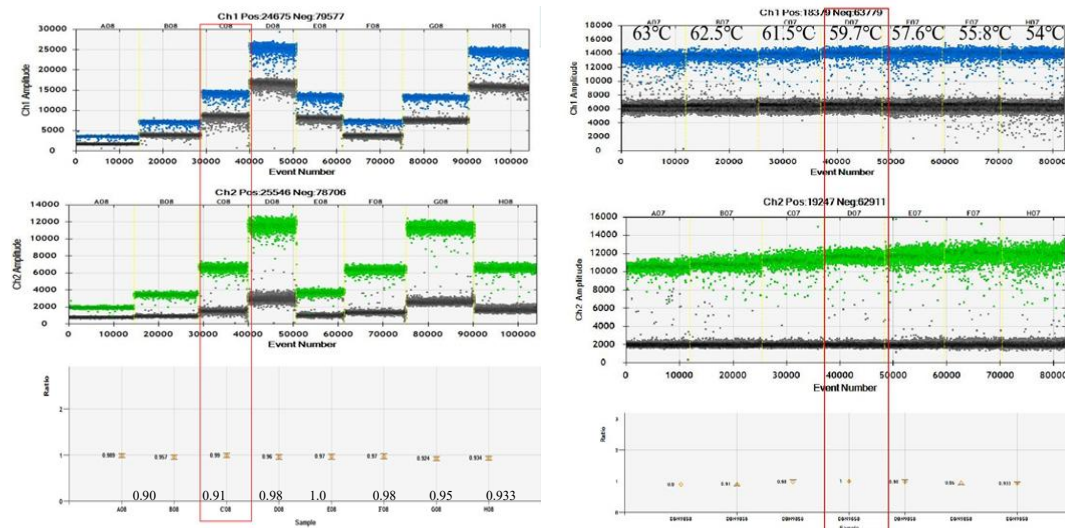


图 9 DBN9858和zSSIIb单重 ddPCR退火/延伸温度和引物/探针浓度的优化。

zSSIIb (A) 和 DBN9858 (B) 在 54°C 至 63°C 不同退火温度下单重 ddPCR 测定中的一维热点图；(C) 为在不同的退火温度下测得的拷贝数比值；zSSIIb (D) 和 DBN9858 (E) 在单重 ddPCR 测定中在不同引物/探针浓度下的一维热点图。1-4 对应 zSSIIb 和 DBN9858 的引物探针浓度相同，分别为 100/50, 200/100, 400/200, 800/400 nM；5-8 对应 zSSIIb 和 DBN9858 不同的引物探针浓度，分别为 200/100 nM (zSSIIb)、400/200 nM (DBN9858), 400/200 nM (zSSIIb)、200/100 nM (DBN9858), 800/400 nM (zSSIIb)、400/200 nM (DBN9858), 400/200 nM (zSSIIb)、800/400 nM (DBN9858)；(F) 为在不同引物/探针浓度下测得的拷贝数比值。

## 2.4 DBN9858/zSSIIb 二重 ddPCR 的反应条件确认

用 DBN9858/zSSIIb 二重 ddPCR 进行标准物质的检验和定值，可以降低成本、提高效率、提高定量结果的准确度。在 60°C 退火、引物/探针浓度为 400/200 nM 的反应条件下，以纯合体基因组 DNA 为模板，进行 DBN9858/zSSIIb 二重 ddPCR。二重数字 PCR 二维热图显示了四个明显的液滴簇，分别对应 FAM 阳性液滴簇、HEX 阳性液滴簇、双荧光液滴簇和阴性液滴簇（图 10），测量的拷贝数比值为 1.012，非常接近理论值 1.0，表明 DBN9858/zSSIIb 二重 ddPCR 中 zSSIIb 内标基因与 DBN9858 转化体具有相同的扩增能力。选择 60°C

作为 DBN9858/*zSSIIb* 二重 ddPCR 的最佳退火温度，DBN9858 转化体和 *zSSIIb* 内标基因的引物/探针浓度均为 400/200 nM。

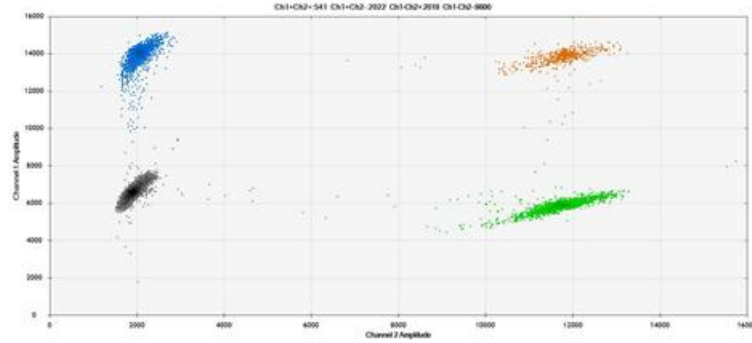


图 10 DBN9858/*zSSIIb* 二重 ddPCR 在优化的反应体系和反应条件下的二维热图。

## 2.5 DBN9858/*zSSIIb* 二重 ddPCR 的 LOD、LOQ 和动力学范围测试

在优化的 PCR 条件下，DBN9858 gDNA 的连续稀释液用于测试 DBN9858/*zSSIIb* 二重 ddPCR 的动态范围、LOD 和 LOQ。不同浓度的微滴热图见图 11，测量的拷贝数浓度以及 DBN9858 和 *zSSIIb* 的拷贝数比值显示在表 8 中。DBN9858/*zSSIIb* 二重 ddPCR 的 LOD 确定为 16 个拷贝 DBN9858 gDNA，LOQ 确定为 33 个拷贝。二重 ddPCR 的 LOD 和 LOQ 与实时 PCR 测定的相似。当 20  $\mu\text{L}$  反应液 DNA 模板量在 3 到  $4.22 \times 10^4$  个拷贝的范围内，DBN9858/*zSSIIb* 二重 ddPCR 显示预期 DNA 拷贝数和测量的 DNA 拷贝数之间存在良好的线性响应， $R^2$  为 0.9999（图 12A B）。当 DNA 模板量高至  $7.60 \times 10^4$  拷贝数，以及低至 3 和 16 拷贝时，测

得的拷贝数比值严重偏离了理论值（图 12C）。DBN9858/*zSSIIb* 二重 ddPCR 动态范围测试表明，20  $\mu\text{L}$  反应体系中，当模板量在  $33 \sim 4.22 \times 10^4$  拷贝的范围内，可获得准确的拷贝数浓度和拷贝数比值测量值。

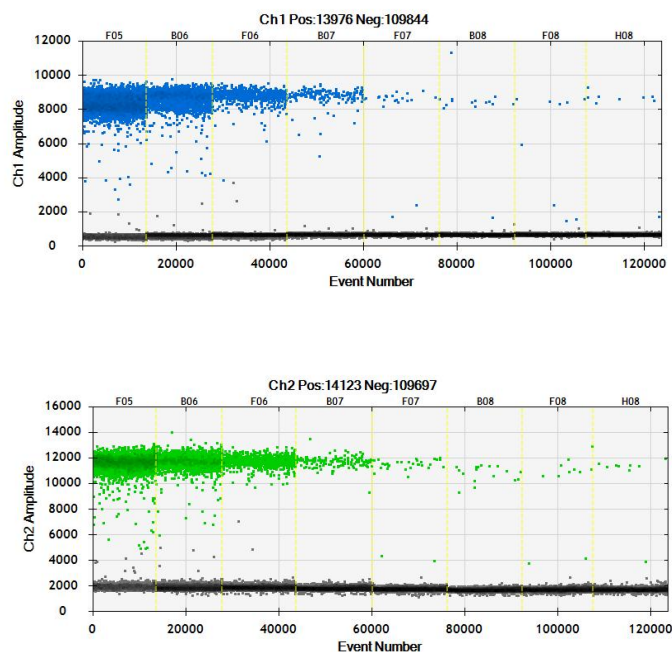


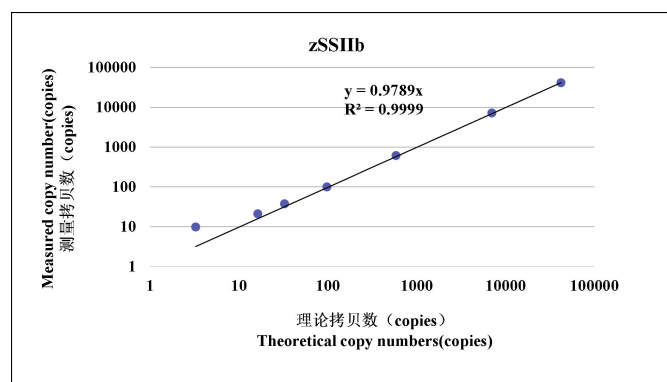
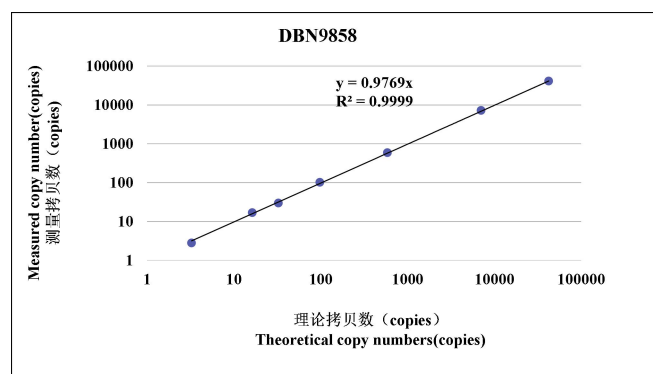
图 11 梯度稀释 DNA 溶液 DBN9858/*zSSIIb* 二重 ddPCR 的微滴热图。

F05-H08 的模板量依次为 76000、42222、7037、586、98、33、16、3 copies。

表 8 DBN9858/*zSSIIb* 二重 ddPCR 测量梯度稀释 DBN9858 DNA 溶液的拷贝数浓度和比值

Target	Expected concentration (copie/ $\mu\text{L}$ )	Copy number concentration (copie/ $\mu\text{L}$ )						
		Rep1	Rep2	Rep3	Mean	SD	RSD (%)	Bias (%)
DBN9858	76000	65800.00	66200.00	64200.00	65400.00	1058.30	1.62	-13.95
	42222	41240.00	41040.00	41540.00	41273.33	251.66	0.61	-2.25
	7037	7380.00	7200.00	7180.00	7253.33	110.15	1.52	3.07
	586	566.00	588.00	624.00	592.67	29.28	4.94	1.07
	98	106.00	96.00	104.00	102.00	5.29	5.19	4.36
	33	34.00	32.00	24.00	30.00	5.29	17.64	-7.92

	16	12.20	16.60	22.00	16.93	4.91	28.99	3.95
	3	2.20	2.40	3.80	2.80	0.87	31.13	-14.05
<i>zSSIb</i>	76000	81000	81600	79800	80800.00	916.52	1.13	6.32
	42222	41140	41280	42120	41513.33	530.03	1.28	-1.68
	7037	7460	7060	7040	7186.67	236.92	3.30	2.13
	586	574	626	634	611.33	32.58	5.33	4.25
	98	102	100	98	100.00	2.00	2.00	2.32
	33	34.4	44	34	37.47	5.66	15.11	15.00
	16	24.6	19	19.8	21.13	3.03	14.33	29.74
	3	10	8.2	11.2	9.80	1.51	15.41	200.81
DBN9858/ <i>zSSIb</i> ratio	76000	0.81	0.81	0.80	0.81	0.00	0.52	-19.06
	42222	1.00	0.99	0.99	0.99	0.01	0.81	-0.57
	7037	0.99	1.02	1.02	1.01	0.02	1.75	0.97
	586	0.99	0.94	0.98	0.97	0.03	2.73	-3.01
	98	1.04	0.96	1.06	1.02	0.05	5.22	2.01
	33	0.99	0.73	0.71	0.81	0.16	19.49	-19.28
	16	0.50	0.87	1.11	0.83	0.31	37.52	-17.31
	3	0.22	0.29	0.34	0.28	0.06	21.17	-71.60



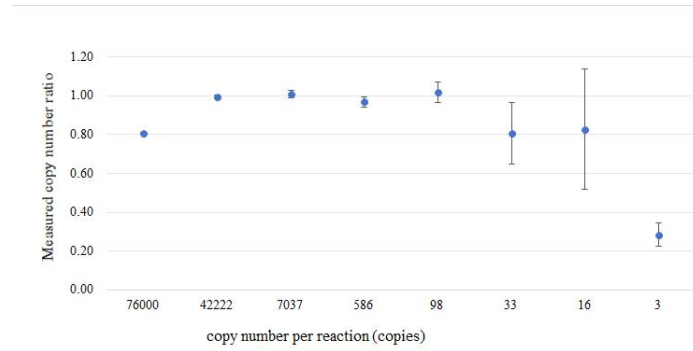


图 12 DBN9858/zSSIIB 二重 ddPCR 的动态范围和实测拷贝数比。

A 二重 ddPCR 中 DBN9858 在 3 到  $4.22 \times 10^4$  个拷贝的动态范围内测量拷贝数与预期拷贝数间有良好的线性关系；B 二重 ddPCR 中/zSSIIB 在 3 到  $4.22 \times 10^4$  个拷贝的动态范围内测量拷贝数与预期拷贝数间有良好的线性关系；C 测得的 DNA 溶液的拷贝数比随着 DNA 浓度的降低显示出升高的标准差(SD)，垂直线段表示标准差。数据来自 4 个技术重复的平均值。

## 2.6 DBN9858/zSSIIB 二重 ddPCR 的测量准确性确认

粉末样品 (Sm1-Sm2) 和 DNA 样品 (Sc1-Sc2) 的转基因含量通过 DBN9858/zSSIIB 二重 ddPCR 进行定量。二重 ddPCR 的定量检测由不同的操作者在不同的日期进行了 3 次测量。测量的平均 DBN9858/zSSIIB 拷贝数比值分别接近预期含量，从而使测量平均值与预期值的偏差在 $\pm 25\%$  的可接受范围内（表 9）。重复性相对标准偏差  $RSD^r$  和再现性相对标准偏差  $RSD^R$  均小于 25%（表 9）。已建立的 DBN9858/zSSIIB 二重 ddPCR 实现了对 GMO 含量的准确定量，具有良好的重复性和重现性。

表 9 DBN9858/zSSIIB 二重 ddPCR 定量结果的重复性和重现性统计分析

Sample		Expected value (%)	Mean value (%)	$S^r$ (%)	$RSD^r$ (%)	$S^R$ (%)	$RSD^R$ (%)	Bias (%)
matrix samples	Sm1	3.0	3.036	0.072	2.360	0.047	1.556	1.197
	Sm2	1.0	1.029	0.039	3.782	0.014	1.386	2.941

DNA	Sc1	3.0	2.994	0.055	1.847	0.024	0.801	-0.216
samples	Sc2	1.0	1.019	0.040	3.964	0.024	2.333	1.909

DBN9858/*zSSIb* 二重 ddPCR 中的 DBN9858 和 *zSSIb* 采用与实时荧光 PCR 检测相同的引物/探针浓度，为 400/200 nM。DBN9858 转化体和 *zSSIb* 内标基因的反应体系见表 10。反应程序如下：94°C 变性 10 min; 50 个循环（94 °C 变性 30 s, 60°C 退火延伸 1 min）；98 °C 变性 10 min; 4 °C 保存。扩增结束后，将 96 孔板置入微滴读取仪中读取信号，并使用软件 QuantaSoft V1.3.2.0 分析实验数据，获得绝对定量结果。动力学范围测试表明，DNA 模板量在 33 ~ 4.22×10<sup>4</sup> copies/反应，拷贝数浓度测量值与预期值具有良好的线性关系。但 20 μL 反应体系中当模板量在 33~4.22×10<sup>4</sup> 拷贝的范围内，才可获得准确的拷贝数浓度和拷贝数比值测量值。用 DBN9858/*zSSIb* 二重 ddPCR 方法定量基体样品和基因组 DNA 样品，测量结果具有良好的准确性。DBN9858/*zSSIb* 二重 ddPCR 为转基因玉米 DBN9858 标准物质的拷贝数浓度和拷贝数比值检测和定值提供了可靠的参考方法。

表 10 DBN9858/*zSSIb* 二重微滴数字 PCR 反应体系

PCR 反应试剂	终浓度	体积(μL)
DNA Template	40ng/μl	2
内标-F	0.4 μM	0.8
内标-R	0.4 μM	0.8
内标-P	0.2 μM	0.4
外源-F	0.4 μM	0.8
外源-R	0.4 μM	0.8
外源-P	0.2 μM	0.4
ddPCR Mix (2×)	1×	10
ddH <sub>2</sub> O	/	4

### 3. DBN9501/*zSSIIb* 二重数字 PCR 方法

#### 3.1 引物探针的确认

转基因玉米 DBN9858 转化体特异性荧光定量 PCR 方法标准已经发布，引物探针序列见表 4 将荧光定量 PCR 引物探针平移到数字 PCR 平台上，与 *zSSIIb* 内标基因配组，进行二重数字 PCR 扩增，经测试，DBN9858/*zSSIIb* 二重数字 PCR 在扩增过程中，引物探针间没有相互干扰，一维图中 DBN9858 转化体和 *zSSIIb* 内标基因的阳性和阴性微滴可明显区分，可以将 DBN9858 的荧光定量 PCR 引物探针作为进行二重数字 PCR 扩增的候选引物探针组合。

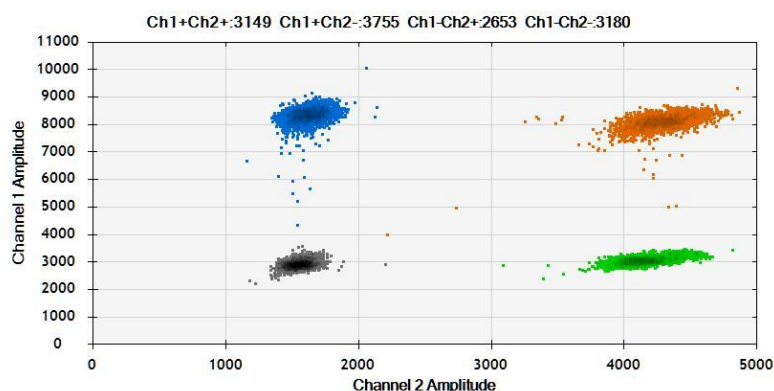


图 13 DBN9501 引物探针 2-D 微滴图

#### 3.2 DBN9501 微滴数字 PCR 特异性测试

用转基因玉米 DBN9501、瑞丰 12-5、T25、MIR604、NK603、DBN9858、MON87427 基因组 DNA 作模板进行 DBN9501 和 *zSSIIb* 微滴数字 PCR (ddPCR) 扩增，用水做空白对照，测试 DBN9501 转化体特异性 ddPCR 的检测特异性。*zSSIIb* 内标基因 ddPCR 在各转

基因品种中都产生了阳性微滴，在空白对照中无阳性微滴，仅在转基因玉米 DBN9501 中有阳性微滴，在其他转基因玉米品种和空白对照中均无阳性微滴（图 14）。结果表明 DBN9501 微滴数字 PCR 有良好的扩增特异性。

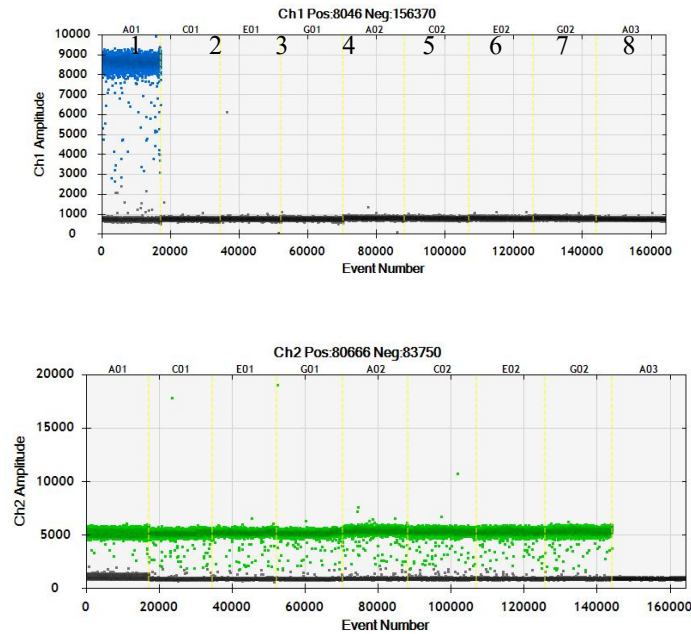


图 14 DBN9501 微滴数字 PCR 特异性测试。

A, DBN9501 微滴数字 PCR 一维热图; B, zSSIIb 微滴数字 PCR 一维热图。样品顺序: 1. DBN9501, 2.DBN9858, 3. NK603, 4. MIR604, 5. T25, 6. 瑞丰 12-5, 7. MON87427, 8. 空白

### 3.3 DBN9501 转化体和 zSSIIb 内标基因单重数字 PCR 的反应条件优化

GMO 定量检测依赖于 GM DNA 拷贝数和总 DNA 拷贝数的准确测量，其中 GM DNA 拷贝数通过转化体特异性 PCR 检测定量，总 DNA 拷贝数定量通过内标基因测定。DBN9501 转化体和 zSSIIb 内标基因单重数字 PCR 分别优化了退火/延伸温度和引物/探针浓度，

以改善阳性/阴性液滴的区分并减少雨滴对定量结果的影响。在 55°C 至 63°C 的不同退火温度下, *zSSIIb* 内标基因的阳性液滴的荧光强度保持稳定 (图 15B), 但 DBN9501 阳性液滴的荧光强度随着退火温度的降低而增加, 在退火温度降低到 60°C 时, 微滴的信号强度达到平台期, 且雨滴数相对较少 (图 15A)。选择 60°C 作为 DBN9501 转化体和 *zSSIIb* 内标基因单重数字 PCR 的退火温度。引物/探针浓度的变化对测量结果和阳性、阴性液滴之间的分离没有显著影响 (图 15 C D), 因此 DBN9501 和 *zSSIIb* 单重数字 PCR 采用与荧光定量 PCR 检测相同的引物/探针浓度, 为 400/200 nM。

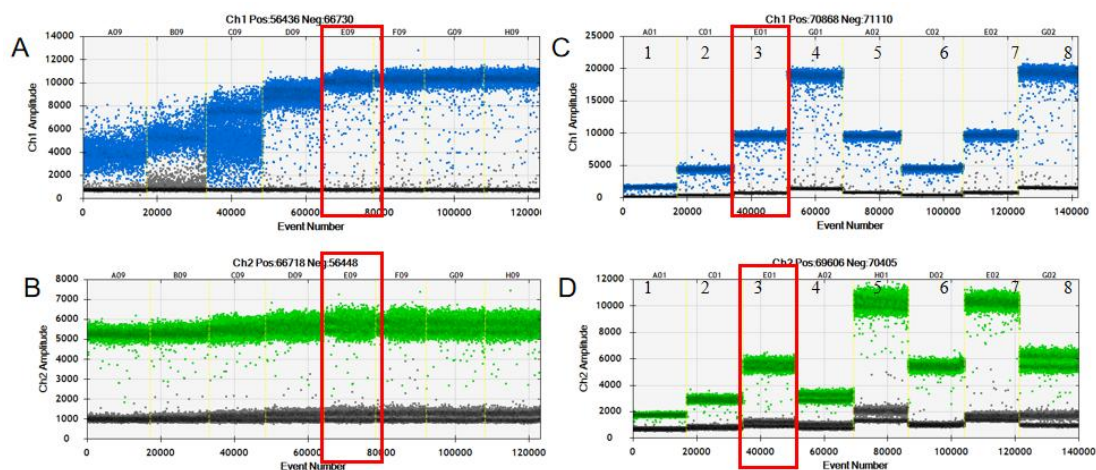


图 15 DBN9501 和 *zSSIIb* 单重 ddPCR 退火/延伸温度和引物/探针浓度的优化。*zSSIIb* (B) 和 DBN9501 (A) 在 55°C 至 63°C 不同退火温度下单重 ddPCR 测定中的一维热点图, *zSSIIb* (D) 和 DBN9501 (C) 在单重 ddPCR 测定中在不同引物/探针浓度下的一维热点图。1-4 对应 *zSSIIb* 和 DBN9501 的引物探针浓度相同, 分别为 100/50, 200/100, 400/200, 800/400 nM; 5-8 对应 *zSSIIb* 和 DBN9501 不同的引物探针浓度, 分别为 200/100 nM (*zSSIIb*)、400/200 nM (DBN9501), 400/200 nM (*zSSIIb*)、200/100 nM (DBN9501), 800/400 nM (*zSSIIb*)、400/200 nM (DBN9501), 400/200 nM (*zSSIIb*)、800/400 nM (DBN9501)。

### 3.4 DBN9501/*zSSIIB* 二重 ddPCR 的反应条件确认

用 DBN9501/*zSSIIB* 二重 ddPCR 进行标准物质的检验和定值，可以降低成本、提高效率、提高定量结果的准确度。在 60°C 退火、引物/探针浓度为 400/200 nM 的反应条件下，以纯合体基因组 DNA 为模板，进行 DBN9501/*zSSIIB* 二重 ddPCR。二重数字 PCR 二维热图显示了四个明显的液滴簇，分别对应 FAM 阳性液滴簇、HEX 阳性液滴簇、双荧光液滴簇和阴性液滴簇（图 16），测量的拷贝数比值为 1.008，非常接近理论值 1.0，表明 DBN9501/*zSSIIB* 二重 ddPCR 中 *zSSIIB* 内标基因与 DBN9501 转化体具有相同的扩增能力。选择 60°C 作为 DBN9501/*zSSIIB* 二重 ddPCR 的最佳退火温度，DBN9501 转化体和 *zSSIIB* 内标基因的引物/探针浓度均为 400/200nM。

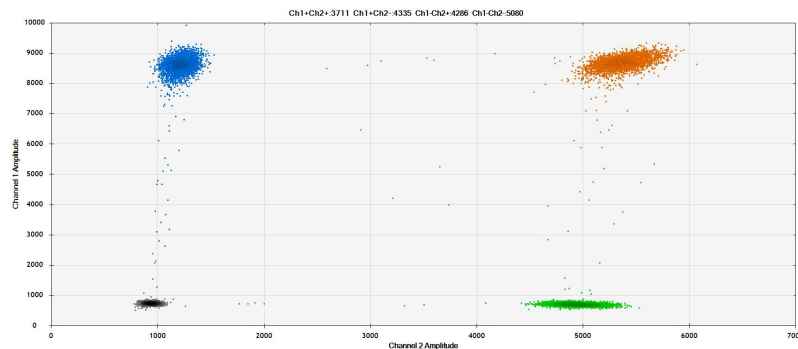


图 16 DBN9501/*zSSIIB* 二重 ddPCR 在优化的反应体系和反应条件下的二维热图。

### 3.5 DBN9501/*zSSIIB* 二重 ddPCR 的 LOD、LOQ 和动力学范围测试

在优化的 PCR 条件下, DBN9501 gDNA 的连续稀释液用于测试 DBN9501/*zSSIIB* 二重 ddPCR 的动态范围、LOD 和 LOQ。不同浓度的微滴热图见图 17, 测量的拷贝数浓度以及 DBN9501 和 *zSSIIB* 的拷贝数比值显示在表 11 中。DBN9501/*zSSIIB* 二重 ddPCR 的 LOD 确定为 11 个拷贝 DBN9501 gDNA, LOQ 确定为 22 个拷贝。二重 ddPCR 的 LOD 和 LOQ 与实时 PCR 测定的相似。当 20  $\mu\text{L}$  反应液 DNA 模板量在 5 到  $1.36 \times 10^4$  个拷贝的范围内, DBN9501/*zSSIIB* 二重 ddPCR 显示预期 DNA 拷贝数和测量的 DNA 拷贝数之间存在良好的线性响应,  $R^2$  为 0.9998 (图 18)。当 DNA 模板量为 5 和 11 拷贝时, 测得的拷贝数比值严重偏离了理论值(图 18C)。DBN9501/*zSSIIB* 二重 ddPCR 动态范围测试表明, 20  $\mu\text{L}$  反应体系中, 当模板量在  $2720 \sim 1.36 \times 10^4$  拷贝的范围内, 可获得准确的拷贝数浓度和拷贝数比值测量值。

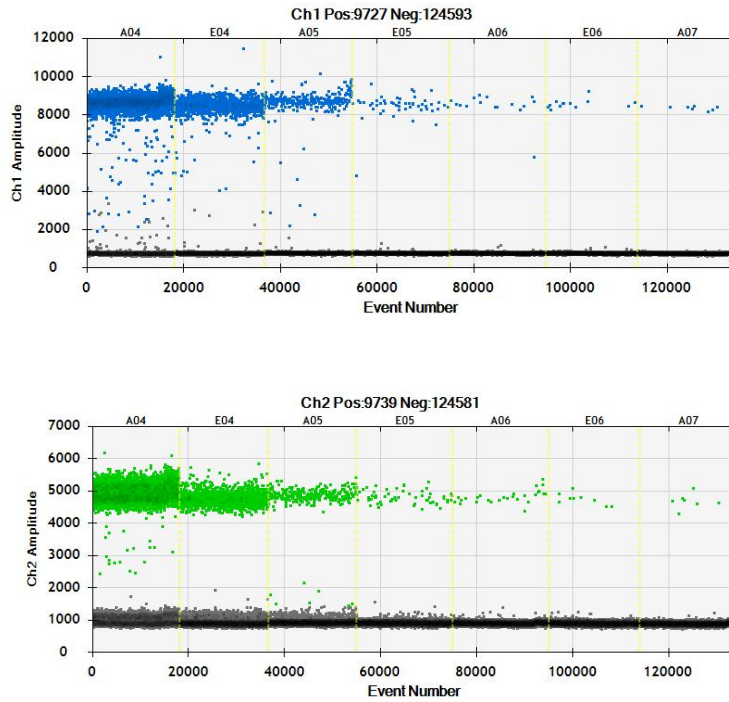


图 17 梯度稀释 DNA 溶液 DBN9501/*zSSIb* 二重 ddPCR 的微滴热图，E03-A07 的模板量依次为 13600、2720、544、109、22、11、5 copies。

表 11 测量梯度稀释 DBN9501 DNA 溶液获得的拷贝数浓度和比值

Target	Expected concentration (copie/ $\mu$ L)	Measured copy number concentration (copie/ $\mu$ L)							
		Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Mean	SD	RSD (%)	Bias (%)
DBN9501	13600	12880	12880	13020	12920	12925	57.2	0.4	-4.96
	2720	2160	2160	2180	2160	2165	8.7	0.4	-20.40
	544	508	566	522	542	535	21.8	4.1	-1.75
	109	102	100	104	101	102	1.5	1.5	-6.48
	22	19	22	16.6	18	18.9	2.0	10.5	-17.28
	11	7.4	7.2	7	10.6	8.1	1.5	18.4	-26.01
	5	9.4	3.6	7	5.8	6.5	2.1	32.5	36.00
<i>zSSIb</i>		Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Mean	SD	RSD (%)	Bias (%)
	13600	12860	13020	12780	12800	12865	94.2	0.7	-5.40
	2720	2180	2220	2140	2140	2170	33.2	1.5	-20.22
	544	528	556	566	546	549	14.0	2.6	0.92
	109	108	97	102	108	103.8	4.6	4.4	-4.64
	22	22	19	17	19	19.3	1.8	9.3	-12.68
	11	11.2	4.8	8.2	14	9.6	3.4	35.9	-12.22
5	8.4	9.4	5.8	5.8	7.4	1.6	21.6	36.00	

DBN9501/ <i>zSSIIb</i> ratio		Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Mean	SD	RSD (%)	Bias (%)
13600		1.00	0.99	1.02	1.01	1.00	0.01	1.1	0.5
2720		0.99	0.97	1.02	1.01	1.00	0.02	1.8	-0.2
544		0.96	1.02	0.92	0.99	0.97	0.04	3.7	-2.6
109		0.94	1.03	1.02	0.94	0.98	0.04	4.4	-1.7
22		0.86	1.16	0.98	0.95	0.99	0.11	10.9	-1.4
11		0.66	1.50	0.85	0.76	0.94	0.33	34.9	-5.7
5		1.12	0.38	1.21	0.90	0.90	0.32	35.4	-9.7

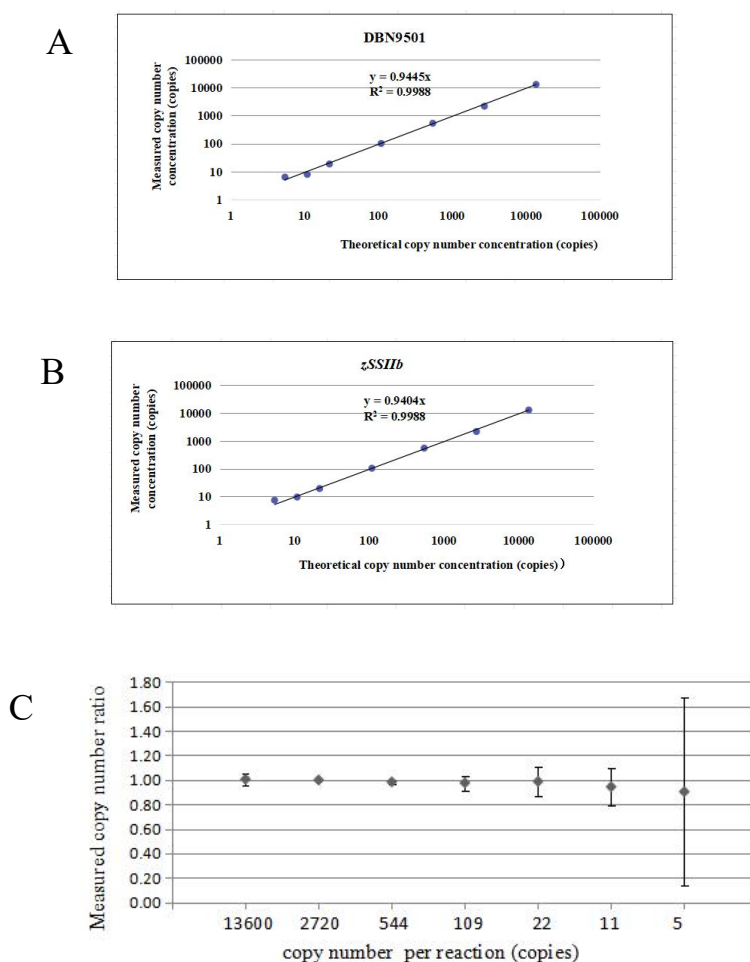


图 18 DBN9501/*zSSIIb* 二重 ddPCR 的动态范围和实测拷贝数比。

A:二重 ddPCR 中 DBN9501 在 5 到  $1.36 \times 10^4$  个拷贝的动态范围内测量拷贝数与预期拷贝数间有良好的线性关系；B:二重 ddPCR 中/*zSSIIb* 在 5 到  $1.36 \times 10^4$  个拷贝的动态范围内测量拷贝数与预期拷贝数间有良好的线性关系；C:测得的 DNA 溶液的拷贝数比随着 DNA 浓度的降低显示出升高的标准差(SD)，垂直线段表示标准差。数据来自四个技术重复的平均值。

### 3.6 DBN9501/*zSSIIB* 二重 ddPCR 的测量准确性

4 种不同转基因含量的 DBN9501 通过 DBN9501/*zSSIIB* 二重 ddPCR 进行定量。二重 ddPCR 的定量检测由不同的操作者在不同的日期进行了 3 次测量。测量的平均 DBN9501/*zSSIIB* 拷贝数比值分别接近预期含量,从而使测量平均值与预期值的偏差在 $\pm 25\%$  的可接受范围内(表 12)。重复性相对标准偏差  $RSD^r$  和再现性相对标准偏差  $RSD^R$  均小于 25%。随着盲样中转基因含量的降低, $RSD^r$  和  $RSD^R$  值都在不断上升(表 12)。已建立的 DBN9501/*zSSIIB* 二重 ddPCR 实现了对 GMO 含量的准确定量,具有良好的重复性和重现性。

表 12 DBN9501/*zSSIIB* 二重 ddPCR 定量结果的重复性和重现性统计分析

Sample	Expected value (%)	Mean value (%)	S <sup>r</sup> (%)	RSD <sup>r</sup> (%)	S <sup>R</sup> (%)	RSD <sup>R</sup> (%)	Bias (%)
S1	5	5.07	0.09	1.78	0.10	1.92	1.32
S2	1	1.05	0.14	8.15	0.08	7.73	4.76
S3	0.5	0.51	0.08	10.74	0.06	10.98	2.93
S4	0.1	0.11	0.02	18.59	0.02	18.29	9.32

DBN9501/*zSSIIB* 二重 ddPCR 中的 DBN9501 和 *zSSIIB* 采用与实时荧光 PCR 检测相同的引物/探针浓度,为 400/200 nM。DBN9501 转化体和 *zSSIIB* 内标基因的反应体系见表 10。反应程序如下: 94°C 变性 10 min; 50 个循环(94 °C 变性 30 s, 60°C 退火延伸 1 min); 98 °C 变性 10 min; 4 °C 保存。扩增结束后,将 96 孔板置入微滴读取仪中读取信号,并使用软件 QuantaSoft V1.3.2.0 分析实验数据,获得绝对定量结果。动力学范围测试表明,DNA 模板量在  $11 \sim 1.36 \times 10^4$

copies/反应，拷贝数浓度测量值与预期值具有良好的线性关系。但 20  $\mu\text{L}$  反应体系中当模板量在  $2720 \sim 1.36 \times 10^4$  拷贝的范围内，才可获得准确的拷贝数浓度和拷贝数比值测量值。用 DBN9501/*zSSIb* 二重 ddPCR 方法定量不同转基因含量的 DBN9501，测量结果具有良好的准确性。DBN9501/*zSSIb* 二重 ddPCR 为转基因玉米 DBN9501 标准物质的拷贝数浓度和拷贝数比值检测和定值提供了可靠的参考方法。

#### 4. 瑞丰 125/*zSSIb* 二重数字 PCR 方法

##### 4.1 引物探针筛选

在数字 PCR 平台上，用通用的 PCR 反应体系（引物/探针浓度 400/200 nM）和退火温度（60°C），以瑞丰 125 纯合体基因组 DNA 为模板，进行瑞丰 125 转化体/*zSSIb* 内标基因的二重数字 PCR 扩增，对表 13 中的引物探针组合进行筛选。*zSSIb* 内标基因选用发布的标准方法（农业部 1861 号公告-3-2012），引物/探针序列见表 13。每个引物探针组合设 2 个平行反应，瑞丰 125 转化体和 *zSSIb* 内标基因的 1 维（1-D）微滴热图、2 维微滴热图（2-D）、瑞丰 125/*zSSIb* 拷贝数比值如图 19 所示，瑞丰 125 转化体和 *zSSIb* 内标基因的 1-D 微滴热图中，6 个引物组合阳性微滴和阴性微滴都能显著区分，雨滴较少（图 19a）；2-D 微滴热图中，6 个引物探针组合中，只有引物组合 1、引物组合 5 和引物组合 6 产生了 4 个显著区分的微滴群（图 19b）；6 个引物探针组合检测瑞丰 125 纯合体基因组 DNA，获得不

同的瑞丰 125/zSSIIb 拷贝数比值 (图 19c), 其中引物探针组合 1 的拷贝数比值为 1.011, 最接近理论值 1.0, 因此本项目选择引物探针组合 1 用于数字 PCR 扩增, 引物探针序列详见表 13。

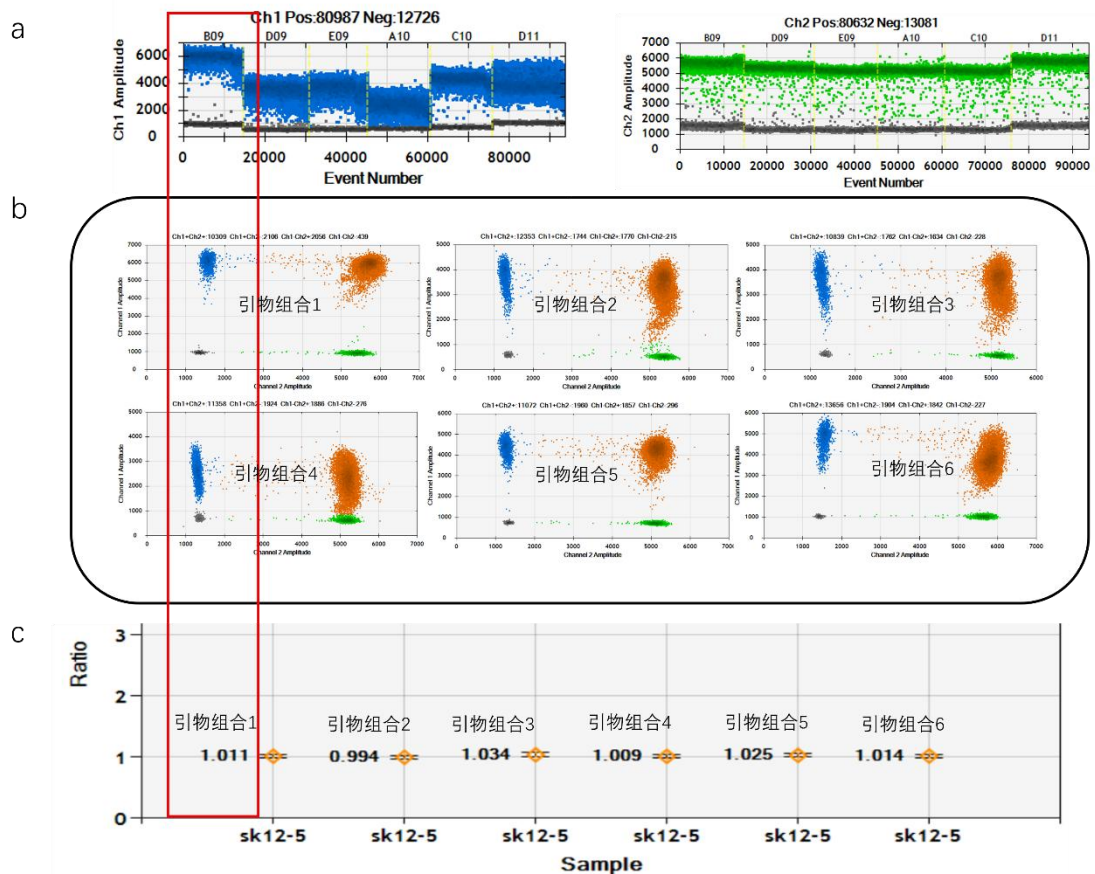


图 19 数字 PCR 引物探针筛选。

a, 瑞丰 125 转化体不同引物探针组合和 zSSIIb 内标基因 1-D 微滴图; b, 6 个引物探针组合与 zSSIIb 的 2-D 微滴图; c, 6 个引物探针组合检测瑞丰 125 纯合体基因组 DNA, 获得的瑞丰 125/zSSIIb 拷贝数比值。

表 13 玉米转化体及 zSSIIb 内标基因引物和探针序列

转化体 (基因)	引物/探针名称及序列 (5'-3')	扩增片段大小 (bp)	序列来源
瑞丰 125	瑞丰 125-QF: GATCGCCCTTCCCAACAGT	122	自主设计
	瑞丰 125-QR: ATCGCCCGACGCTACAAC		

	瑞丰 125-QP:FAM-AGATTGTCGTTTCCCGCCTTCA-MGB		
<i>zSSIb</i>	<i>zSSIb</i> -3F:CGGTGGATGCTAAGGCTGATG	88	农业部 1861 号公 告-3-2012
	<i>zSSIb</i> -4R:AAAGGGCCAGGTTTCATTATCCTC		
	<i>zSSIb</i> -HP:HEX-TAAGGAGCACTCGCCGCCGCATCTG--BHQ		

#### 4.2 瑞丰 125 /*zSSIb* 二重微滴数字 PCR 特异性测试

用转基因玉米瑞丰 125、其他转基因玉米混合样（瑞丰 8、T25、MIR604、NK603、MON87427、DBN9936、DBN9858、DBN9501）、转基因大豆混合样（DBN9004、MON89788、MON87751、CAL16、中黄 6106、DBN8205）、转基因水稻混合样（TT51-1、KF-6、KMD、G6H1、T1C-19、T2A-1）、转基因油菜混合样（MS1、MS8、RF1、RF2、RF3、T45、Oxy-235、Topas19/2、MON88302、73496）、转基因棉花混合样（MON1445、MON531、MON15985、LLCOTTON25、MON88913、GHB614、COT102）、非转基因玉米基因组 DNA 作模板进行瑞丰 125 和 *zSSIb* 微滴数字 PCR (ddPCR) 扩增，用水做空白对照，测试瑞丰 125 转化体特异性 ddPCR 的检测特异性。*zSSIb* 内标基因 ddPCR 在转基因玉米和非转基因玉米品种中都产生了阳性微滴，在其他作物和空白对照中无阳性微滴；瑞丰 125 转化体特异性 ddPCR 仅在转基因玉米瑞丰 125 中有阳性微滴，在其他转基因玉米品种和空白对照中均无阳性微滴（图 20）。结果表明瑞丰 125 /*zSSIb* 二重微滴数字 PCR 有良好的扩增特异性。

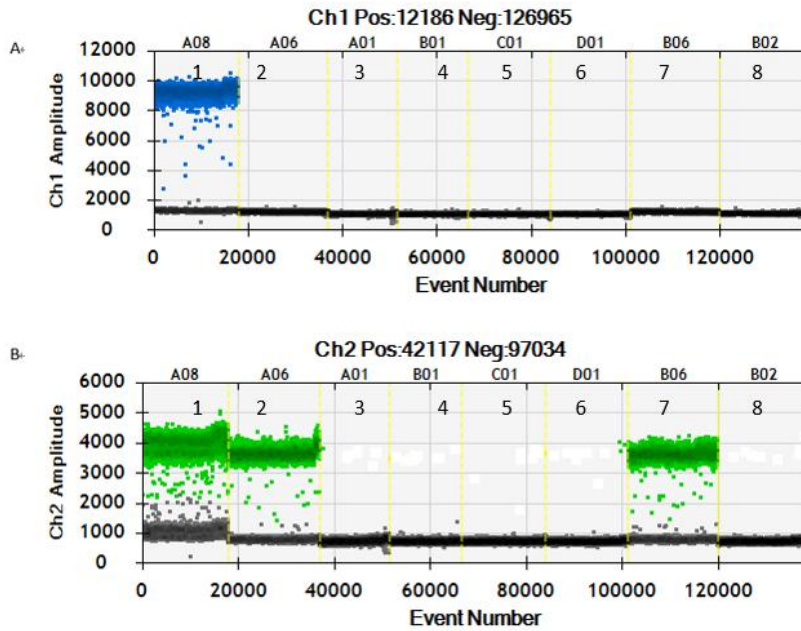


图 20 瑞丰 125 微滴数字 PCR 特异性测试。

A, 瑞丰 125 微滴数字 PCR 一维热图; B, zSSIIb 微滴数字 PCR 一维热图。样品顺序: 1. 瑞丰 125, 2. 其他转基因玉米混合样 3. 转基因大豆混合样, 4. 转基因水稻混合样, 5. 转基因油菜混合样, 6. 转基因棉花混合样, 7. 非转基因玉米, 8. 空白对照

#### 4.3 瑞丰 125 /zSSIIb 二重数字 PCR 的反应条件优化

转基因定量检测依赖于转基因 DNA 拷贝数和总 DNA 拷贝数的准确测量，其中转基因 DNA 拷贝数通过转化体特异性 PCR 检测定量，总 DNA 拷贝数定量通过内标基因测定。以瑞丰 125 纯合体基因组 DNA 为模板，分别优化二重数字 PCR 中瑞丰 125 转化体和 zSSIIb 内标基因的引物/探针浓度和退火/延伸温度，改善阳性/阴性液滴的分辨率以减少雨滴对定量结果的影响，同时测试二重数字 PCR 反应中转化体和内标基因是否具有相似的扩展效率。在 55°C 至 63°C 的不同退火温度下，zSSIIb 内标基因和的瑞丰 125 转化体阳性液滴的荧光强度随着退火温度的降低而增加，在退火温度降低到 58.2°C 时，微滴

的信号强度达到平台期都保持稳定（图 21a 和 3b）。当退火温度低于 61.7°C，瑞丰 125 的阳性和阴性微滴都能明显区分，拷贝数比值在 1.04 -1.092 的范围内波动，当退火温度在 58.2°C 时，测量的拷贝数比值为 1.04，非常接近理论值 1.0（图 21 c）。选择 58°C 作为瑞丰 125 转化体和 zSSIIb 内标基因二重数字 PCR 的退火温度。瑞丰 125 和内标基因的引物/探针浓度低于 400/200 nM 时，阳性、阴性液滴信号偏低，且难以明显区分（图 21 d、e）；当两个靶标的引物/探针浓度均为 400/200 nM 时，阳性微滴和阴性微滴具有最佳的分辨率；当两个靶标的引物/探针浓度高于 400/200 nM 时，阴性微滴信号值升高，且阳性微滴群变宽。当两个靶标的引物/探针浓度均为 400/200 nM 时，测量的平均拷贝数比值为 1.02，接近理论值（图 21 f）。综合考虑引物探针用量和微滴荧光强度，二重数字 PCR 中瑞丰 125 和 zSSIIb 的引物/探针浓度均采用 400/200 nM。在 58°C 退火、引物/探针浓度为 400/200 nM 的反应条件下，以纯合体基因组 DNA 为模板，进行瑞丰 125/zSSIIb 二重 ddPCR。二重数字 PCR 二维热图显示了 4 个明显的液滴簇，分别对应 FAM 阳性液滴簇、HEX 阳性液滴簇、双荧光液滴簇和阴性液滴簇（图 21 g），测量的拷贝数比值为 1.02，非常接近理论值 1.0，表明瑞丰 125/zSSIIb 二重 ddPCR 中 zSSIIb 内标基因与瑞丰 125 转化体具有相同的扩增能力。选择 58°C 作为 瑞丰 125/zSSIIb 二重 ddPCR 的最佳退火温度，瑞丰 125 转化体和 zSSIIb 内标基因的引物/探针浓度均为 400/200 nM。

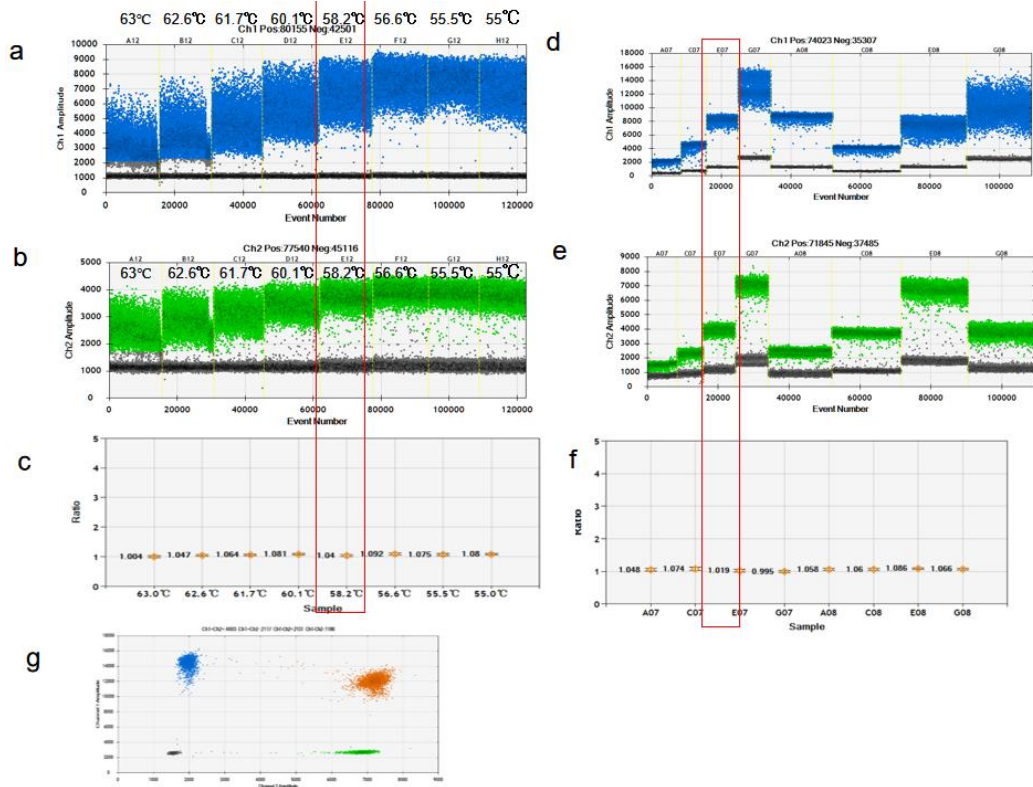


图 21 瑞丰 125 /zSSIIB 二重 ddPCR 退火/延伸温度和引物/探针浓度的优化。瑞丰 125 (a) 和 zSSIIB (b) 在 55°C 至 63°C 不同退火温度下的一维 (1-D) 微滴图；c, 不同退火温度下测量的瑞丰 125/zSSIIB 拷贝数比值；瑞丰 125 (d) 和 zSSIIB (e) 在不同引物/探针浓度下的一维微滴图, 1-4 对应瑞丰 125 和 zSSIIB 的引物/探针浓度相同, 分别为 100/50, 200/100, 400/200, 800/400 nM; 5-8 对应瑞丰 125 和 zSSIIB 不同的引物/探针浓度, 分别为 200/100 nM (zSSIIB)、400/200 nM (瑞丰 125), 400/200 nM (zSSIIB)、200/100 nM (瑞丰 125), 800/400 nM (zSSIIB)、400/200 nM (瑞丰 125), 400/200 nM (zSSIIB)、800/400 nM (瑞丰 125); f, 不同引物/探针浓度下测量的瑞丰 125/zSSIIB 拷贝数比值；g, 在优化的反应体系和退火温度下, 瑞丰 125/zSSIIB 二重 ddPCR 的二维微滴图。

#### 4.4. 瑞丰 125 /zSSIIB 二重 ddPCR 的 LOD、LOQ 和动力学范围测试

在优化的 PCR 条件下, 瑞丰 125 基因组 DNA 的连续稀释液用于测试瑞丰 125/zSSIIB 二重 ddPCR 的动态范围、LOD 和 LOQ。不同浓度的微滴热图见图 22, 测量的拷贝数浓度以及瑞丰 125 /zSSIIB 的拷贝数比值显示在表 15 中。当反应体系中模板拷贝数为 10 拷贝时,

瑞丰 125/*zSSIIB* 二重 ddPCR 3 个反应的阳性微滴数均超过 3 个，呈现阳性信号，LOD 确定为 10 个拷贝瑞丰 125 基因组 DNA。统计各个二重数字 PCR 反应测量瑞丰 125 拷贝数、*zSSIIB* 拷贝数、和瑞丰 125/*zSSIIB* 拷贝数比值，计算各模板量测量结果的相对标准差 (RSD) 和相对偏倚 (Bias%)。当反应体系中模板拷贝数为 40 拷贝时，测量结果的 RSD 值均小于 25%，Bias% 均在  $\pm 25\%$  之间，LOQ 确定为 40 个拷贝瑞丰 125 基因组 DNA (表 14)。

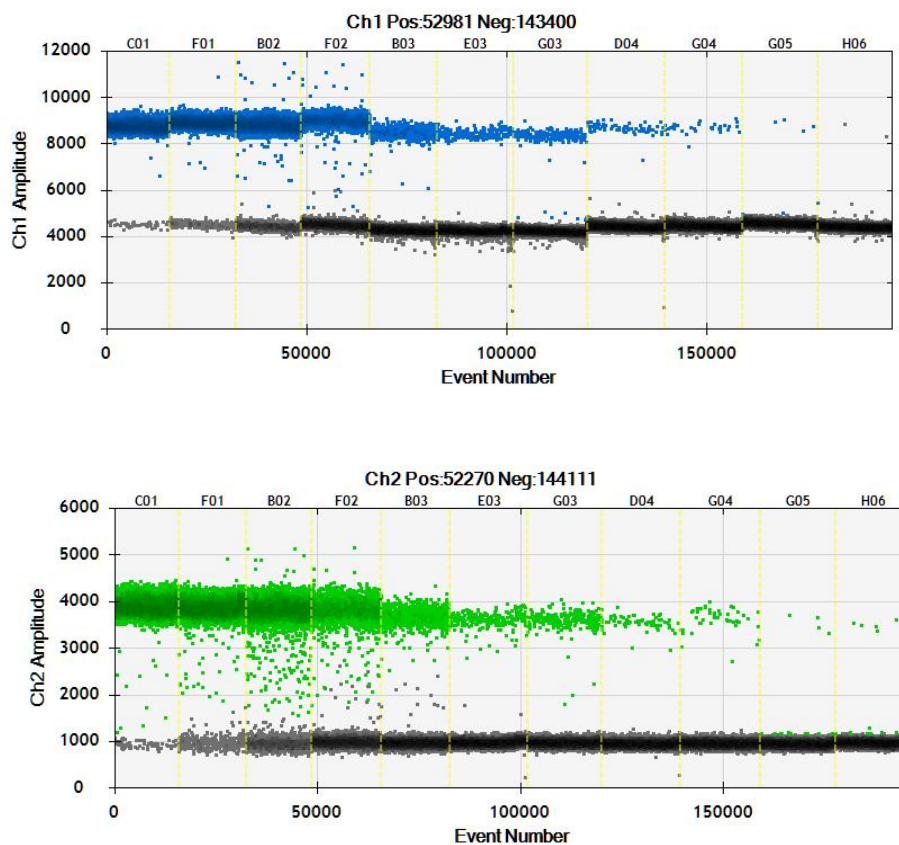


图 22 梯度稀释 DNA 溶液瑞丰 125/*zSSIIB* 二重 ddPCR 的微滴热图。A01-E06 的模板量依次为 60000、40000、20000、4000、800、160、40、20、10、5、1copies。

表 14 瑞丰 125 /zSSIIb 二重 ddPCR 测量梯度稀释 zSSIIb DNA 溶液的拷贝数浓度和比值

Target	Expected concentration (copie/μL)	Copy number concentration (copie/μL)						
		Rep1	Rep2	Rep3	Mean	SD	RSD (%)	Bias (%)
瑞丰 125	66000	67375.00	67375.00	68975.00	67908.33	923.76	1.36	2.89
	44000	44675.00	45975.00	46075.00	45575.00	781.02	1.71	3.58
	22000	22115.00	21305.00	21655.00	21691.67	406.24	1.87	-1.40
	4400	4405.00	4405.00	4385.00	4398.33	11.55	0.26	-0.04
	880	915.00	851.00	865.00	877.00	33.65	3.84	-0.34
	176	152.00	162.00	163.00	159.00	6.08	3.83	-9.66
	40	41.00	35.00	42.00	39.33	3.79	9.63	-1.67
	20	22.00	12.00	24.00	19.33	6.43	33.25	-3.33
	10	12.00	12.00	16.00	13.33	2.31	17.32	33.33
	5	5.50	10.90	6.40	7.60	2.89	38.07	52.00
1	4.60	/	12.00	8.30	5.23	63.04	730.00	
zSSIIb	66000	63775	65275	67275.00	65441.67	1755.94	2.68	-0.85
	44000	41580	42980	43380.00	42646.67	945.16	2.22	-3.08
	22000	20520	20260	20490.00	20423.33	142.24	0.70	-7.17
	4400	4195	4185	4205.00	4195.00	10.00	0.24	-4.66
	880	825	795	847.00	822.33	26.10	3.17	-6.55
	176	175	173	176.00	174.67	1.53	0.87	-0.76
	40	41	33	40.00	38.00	4.36	11.47	-5.00
	20	18	18	26.00	20.67	4.62	22.35	3.33
	10	19	18	18.00	18.33	0.58	3.15	83.33
	5	9	/	13.00	11.00	2.83	25.71	120.00
1	/	/	/	/	/	/	/	
瑞丰 125/ zSSIIb ratio	66000	1.06	1.03	1.03	1.04	0.02	1.58	3.80
	44000	1.07	1.07	1.06	1.07	0.01	0.58	6.87
	22000	1.08	1.05	1.06	1.06	0.01	1.30	6.21
	4400	1.05	1.05	1.04	1.05	0.01	0.48	4.85
	880	1.11	1.07	1.02	1.07	0.04	4.13	6.69
	176	0.87	0.94	0.93	0.91	0.04	4.02	-8.96
	40	1.00	1.06	1.05	1.04	0.03	3.12	3.69
	20	1.22	0.67	0.92	0.94	0.28	29.66	-6.27
	10	0.63	0.67	0.89	0.73	0.14	19.14	-27.10
	5	0.61	/	0.49	/	/	/	/
1	-	-	-	/	/	/	/	

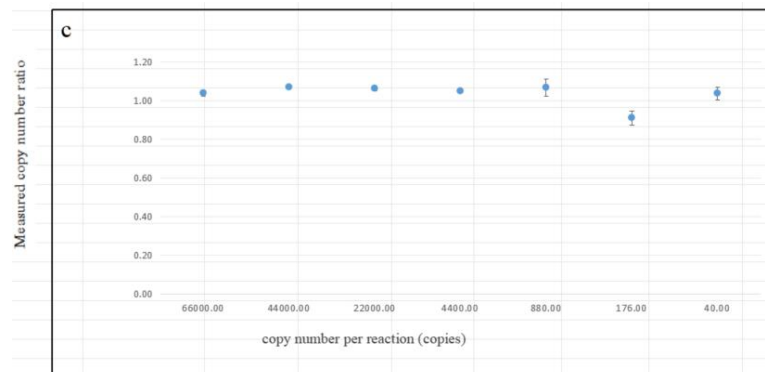
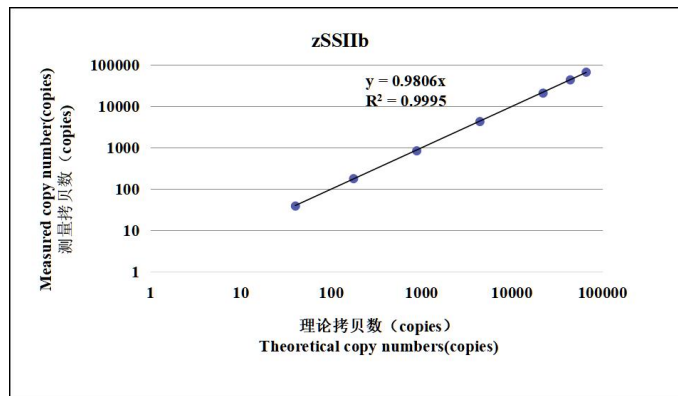
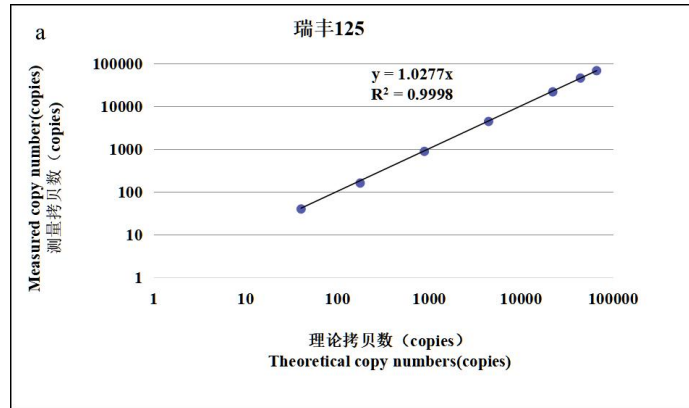


图 23 瑞丰 125 /zSSIb 二重 ddPCR 的动态范围和实测拷贝数比。

a, 二重 ddPCR 中瑞丰 125 在 40 到  $6.6 \times 10^4$  个拷贝的动态范围内测量拷贝数与预期拷贝数间有良好的线性关系；b, 二重 ddPCR 中 /zSSIb 在 40 到  $6.6 \times 10^4$  个拷贝的动态范围内测量拷贝数与预期拷贝数间有良好的线性关系；c, 测得的 DNA 溶液的拷贝数比随着 DNA 浓度的降低显示出升高的标准差(SD), 垂直线段表示标准差。数据来自三个技术重复的平均值。

#### 4.5 瑞丰 125 /zSSIIb 二重 ddPCR 的测量准确性

通过天平称量法配制 5 个瑞丰 125 基因组 DNA 盲样(Sg1-Sg5), 拷贝数比值依次为 5.0%、3.0%、1.0%、0.5%、0.1%。用 瑞丰 125 /zSSIIb 二重 ddPCR 对 5 个盲样进行定量。二重 ddPCR 的定量检测由不同的操作者在不同的日期进行了 3 次测量, 测量结果如表 15 所示。计算 5 个盲样瑞丰 125 /zSSIIb 拷贝数比值的平均值, 统计测量结果的重复性相对标准差 (RSD<sup>r</sup>)、重现性相对标准差 (RSD<sup>R</sup>)、和相对偏倚 (Bias)。测量平均值均接近预期含量, 与预期值的相对偏倚在±25%的可接受范围内; 重复性相对标准偏差 RSD<sup>r</sup>和再现性相对标准偏差 RSD<sup>R</sup>均小于 25%。已建立的瑞丰 125 /zSSIIb 二重 ddPCR 实现了对 GMO 含量的准确定量, 具有良好的重复性和重现性。

表 15 5 个盲样的测量结果

重复	PCR 平行	盲样				
		Sg1 (%)	Sg2 (%)	Sg3 (%)	Sg4 (%)	Sg5 (%)
1	1	5.06	3.06	1.03	0.51	0.11
	2	5.13	3.08	0.96	0.51	0.12
	3	5.19	3.01	1.09	0.53	0.10
2	1	5.08	3.00	1.00	0.49	0.11
	2	4.97	2.89	1.12	0.53	0.12
	3	5.04	2.98	1.05	0.54	0.11
3	1	4.99	3.04	1.12	0.49	0.12
	2	5.13	3.13	1.13	0.53	0.10
	3	5.15	3.03	1.02	0.52	0.09

表 16 浙大瑞丰 125/zSSIIb 二重 ddPCR 定量结果的重复性和重现性统计分析

Sample	Expected value (%)	Mean value (%)	S <sup>r</sup> (%)	RSD <sup>r</sup> (%)	S <sup>R</sup> (%)	RSD <sup>R</sup> (%)	Bias (%)
Sg1	5	5.08	0.07	1.39	0.08	1.49	1.64
Sg2	3	3.02	0.05	1.68	0.07	2.39	0.81
Sg3	1	1.06	0.06	5.87	0.06	5.87	5.78
Sg4	0.5	0.52	0.02	3.98	0.02	3.98	3.33
Sg5	0.1	0.11	0.01	10.15	0.01	10.15	8.89

#### 4.6 结论

瑞丰 125 /*zSSIb* 二重 ddPCR 中的瑞丰 125 和 *zSSIb* 采用与实时荧光 PCR 检测相同的引物/探针浓度，为 400/200 nM，反应体系见表 17。反应程序如下：94°C 变性 10 min; 50 个循环（94 °C 变性 30 s，58°C 退火延伸 1 min); 98 °C 变性 10 min。DNA 模板量在 40 ~ 6.0×10<sup>4</sup> copies/反应，拷贝数浓度测量值与预期值具有良好的线性关系。

表 17 瑞丰 125 /*zSSIb* 二重微滴数字 PCR 反应体系

PCR 反应试剂	终浓度	体积(μL)
ddPCR Mix (2×)	1×	10
10 μmol/L 瑞丰 125-f1	0.4 μmol/L	0.8
10 μmol/L 瑞丰 125-r1	0.4 μmol/L	0.8
10 μmol/L 瑞丰 125-p1	0.2 μmol/L	0.4
10 μmol/L <i>zSSIb</i> -3F	0.4 μmol/L	0.8
10 μmol/L <i>zSSIb</i> -4R	0.4 μmol/L	0.8
10 μmol/L <i>zSSIb</i> -HP	0.2 μmol/L	0.4
DNA 模板	25 ng/μl	2
ddH <sub>2</sub> O	/	4
合计	/	20

## 5. 浙大瑞丰 8/*zSSIb* 二重数字 PCR 方法

### 5.1 浙大瑞丰 8 转化体引物探针筛选

在数字 PCR 平台上，用通用的 PCR 反应体系（引物/探针浓度 400/200 nM）和退火温度（60°C），以浙大瑞丰 8 纯合体基因组 DNA 为模板，进行浙大瑞丰 8 转化体/*zSSIb* 内标基因的二重数字 PCR 扩增，对 8 个引物探针组合进行筛选。*zSSIb* 内标基因选用发布的标准方法（农业部 1861 号公告-3-2012），引物/探针序列见表 4。每个引物探针组合 2 个平行反应，浙大瑞丰 8 转化体和 *zSSIb* 内标基因的 1 维（1-D）微滴热图、2 维微滴热图（2-D）、浙大瑞丰 8/*zSSIb* 拷贝数比值如图 24 所示，浙大瑞丰 8 转化体和 *zSSIb* 内标基因的 1-D 微滴热图中，6 个引物组合阳性微滴和阴性微滴都能显著区分，雨滴较少（图 24a）；2-D 微滴热图中，6 个引物探针组合都产生了 4 个显著区分的微滴群（图 24b）；6 个引物探针组合检测浙大瑞丰 8 纯合体基因组 DNA，获得不同的浙大瑞丰 8/*zSSIb* 拷贝数比值（图 24c），其中引物探针组合 6 的拷贝数比值为 1.01，最接近理论值 1.0，且与用于实时荧光 PCR 的引物探针组合相同，因此本项目选择引物探针组合 6 用于数字 PCR 扩增，数字 PCR 引物探针序列详见表 4。

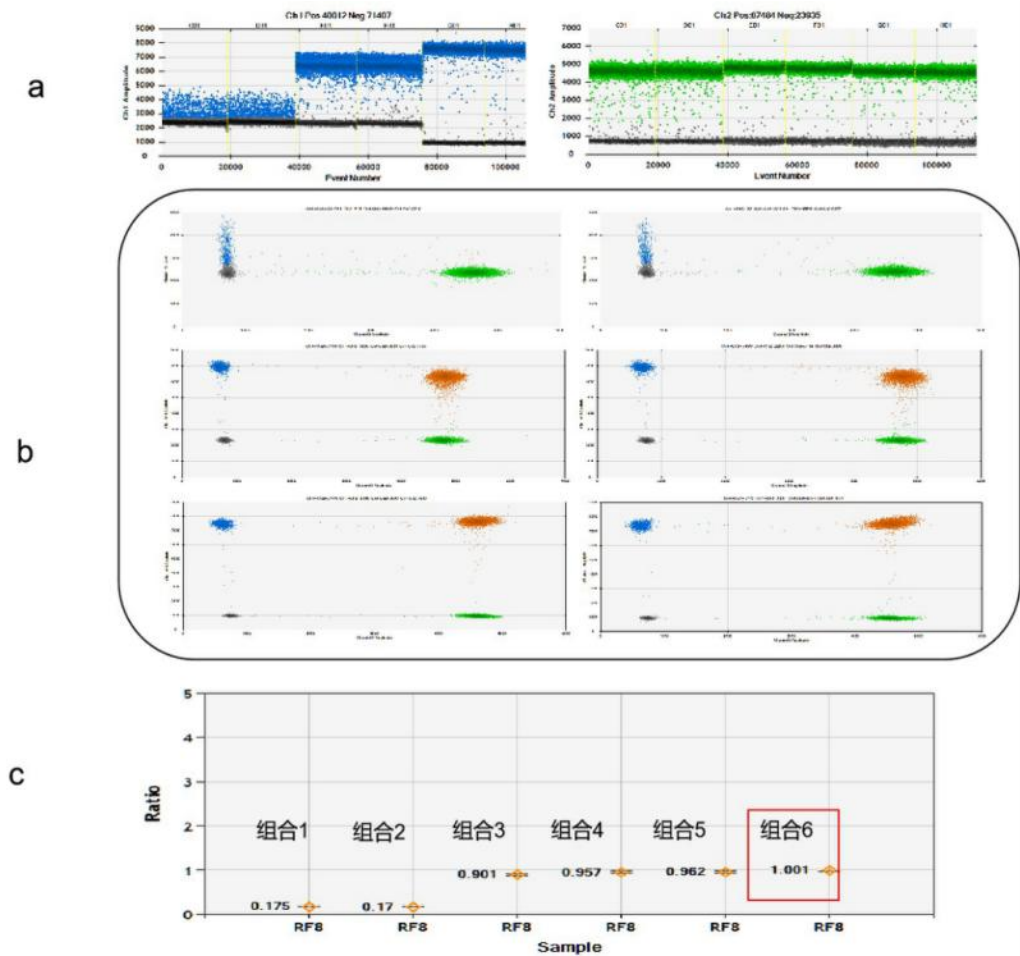


图 24 数字 PCR 引物探针筛选

a, 浙大瑞丰 8 转化体不同引物探针组合和 zSSIIB 内标基因 1-D 微滴图; b, 6 个引物探针组合与 zSSIIB 的 2-D 微滴图; c, 6 个引物探针组合检测浙大瑞丰 8 纯合体基因组 DNA, 获得的浙大瑞丰 8/zSSIIB 拷贝数比值。

## 5.2 浙大瑞丰 8 微滴数字 PCR 特异性测试

用转基因玉米浙大瑞丰 8、转基因玉米混合样（瑞丰 125、T25、MIR604、NK603、MON87427、DBN9936、DBN9858、nCX-1）、转基因大豆混合样（DBN9004、MON89788、MON87751、CAL16、中黄 6106、DBN8205）、转基因水稻混合样（TT51-1、KF-6、KMD、G6H1、T1C-19、T2A-1）、转基因油菜混合样（MS1、MS8、RF1、RF2、RF3、T45、Oxy-235、Topas19/2、MON88302、73496）、转基

因棉花混合样（MON1445、MON531、MON15985、LLCOTTON25、MON88913、GHB614、COT102）、非转基因玉米基因组 DNA 作模板进行浙大瑞丰 8 和 *zSSIb* 微滴数字 PCR (ddPCR) 扩增，用水做空白对照，测试浙大瑞丰 8 转化体特异性 ddPCR 的检测特异性。混合样中每种转化体的含量不低于 1%。扩增结果显示，*zSSIb* 内标基因 ddPCR 在转基因玉米和非转基因玉米品种中都产生了阳性微滴，在其他作物和空白对照中无阳性微滴；浙大瑞丰 8 转化体特异性 ddPCR 仅在转基因玉米浙大瑞丰 8 中有阳性微滴，在其他转基因玉米品种、其他转基因作物和空白对照中均无阳性微滴（图 25）。结果表明浙大瑞丰 8/*zSSIb* 二重微滴数字 PCR 有良好的扩增特异性。

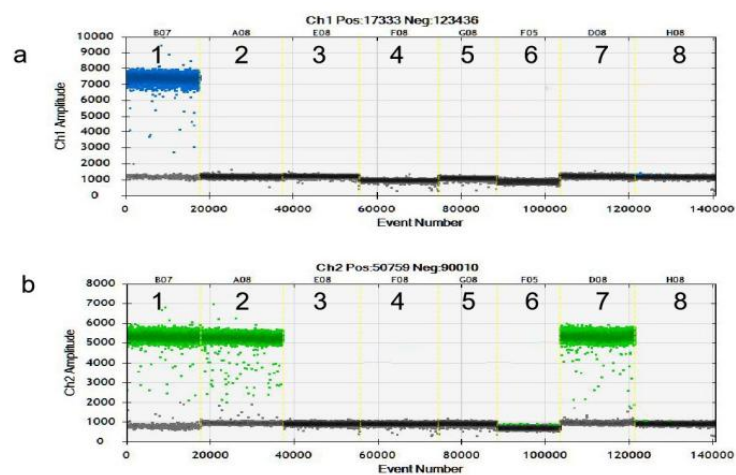


图 25 浙大瑞丰 8 微滴数字 PCR 特异性测试

a, 浙大瑞丰 8 微滴数字 PCR 一维热图; b, *zSSIb* 微滴数字 PCR 一维热图。样品顺序: 1. 浙大瑞丰 8, 2. 其他转基因玉米混合样 3. 转基因玉米混合样, 4. 转基因水稻混合样, 5. 转基因油菜混合样, 6. 转基因棉花混合样, 7. 非转基因玉米, 8. 空白

### 5.3 浙大瑞丰 8 转化体和 *zSSIIb* 内标基因单重数字 PCR 的反应条件优化

转基因定量检测依赖于转基因 DNA 拷贝数和总 DNA 拷贝数的准确测量，其中 GM DNA 拷贝数通过转化体特异性 PCR 检测定量，总 DNA 拷贝数定量通过内标基因测定。以浙大瑞丰 8 纯合转化体基因组 DNA 为模板（转基因含量理论值是 1.0），分别优化浙大瑞丰 8 转化体和 *zSSIIb* 内标基因单重数字 PCR 退火/延伸温度和引物/探针浓度，以改善阳性/阴性液滴的区分并减少雨滴对定量结果的影响。在 55°C 至 62°C 的不同退火温度下，浙大瑞丰 8 和 *zSSIIb* 内标基因的阳性液滴的荧光强度保持稳定（图 26 a b），退火温度在 59.5°C 和 61°C 时，浙大瑞丰 8 转化体和内标基因的拷贝数比值分别为 0.992、0.999（图 26 c），均接近理论值 1.0，选择 60°C 作为浙大瑞丰 8 转化体和 *zSSIIb* 内标基因单重数字 PCR 的退火温度。考察了引物/探针浓度的变化对测量结果和阳性、阴性液滴之间的分辨率的影响，当转化体和内标基因的引物探针浓度均为 100/50, 200/100 nM 时，两个靶标的阳性微滴和阴性微滴的分辨率较低；为 400/200 nM 时，两个靶标的阳性微滴和阴性微滴均能显著区分；为 800/400 nM 时，两个靶标的阳性微滴和阴性微滴均能显著区分，但阳性微滴的信号区间变宽（图图 26 d e）。在引物探针为 400/200 nM 的浓度下，对分离没有显著影响，且浙大瑞丰 8 转化体和内标基因的拷贝数比值为 1.063（图 26 f），接近理论值，考虑到 400/200 nM 为常用的引物探针浓

度，因此浙大瑞丰 8 和 *zSSIb* 单重数字 PCR 采用与荧光定量 PCR 检测相同的引物/探针浓度为 400/200 nM。

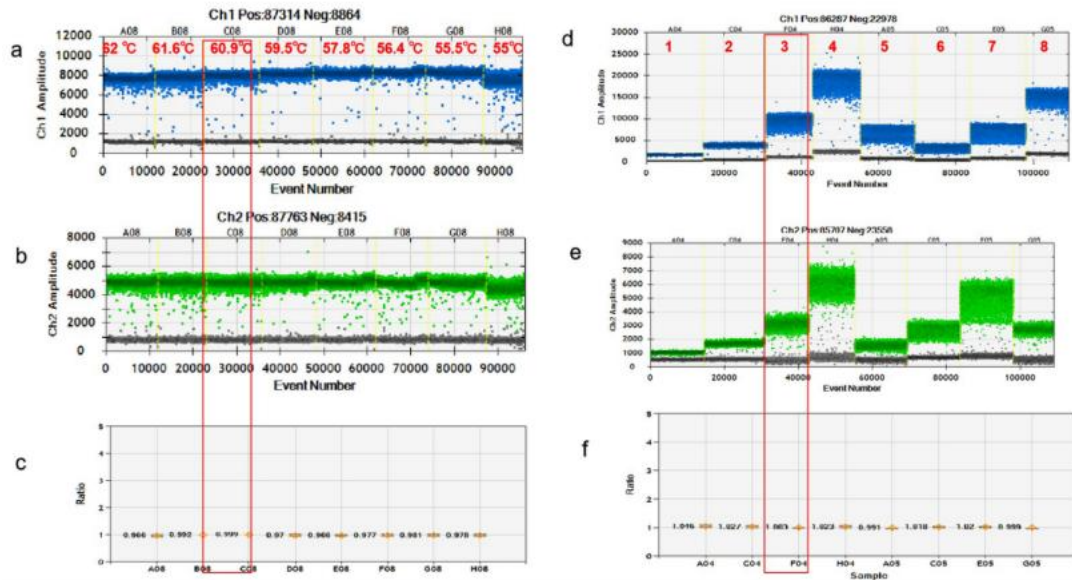


图 26 浙大瑞丰 8 和 *zSSIb* 单重 ddPCR 退火/延伸温度和引物/探针浓度的优化。浙大瑞丰 8 (a) 和 *zSSIb* (b) 在 55°C 至 62°C 不同退火温度下的一维 (1- D) 微滴图；c，不同退火温度下测量的浙大瑞丰 8/*zSSIb* 拷贝数比值；浙大瑞丰 8 (d) 和 *zSSIb* (e) 在不同引物/探针浓度下的一维微滴图，1-4 对应浙大瑞丰 8 和 *zSSIb* 的引物探针浓度相同，分别为 100/50, 200/100, 400/200, 800/400 nM；5-8 对应浙大瑞丰 8 和 *zSSIb* 不同的引物探针浓度，分别为 200/100 nM (*zSSIb*)、400/200 nM (浙大瑞丰 8)、400/200 nM (*zSSIb*)、200/100 nM (浙大瑞丰 8)、800/400 nM (*zSSIb*)、400/200 nM (浙大瑞丰 8)、400/200 nM (*zSSIb*)、800/400 nM (浙大瑞丰 8)；f，不同引物探针浓度下测量的浙大瑞丰 8/*zSSIb* 拷贝数比值。

#### 5.4 浙大瑞丰 8/*zSSIb* 二重 ddPCR 的反应条件确认

用浙大瑞丰 8/*zSSIb* 二重 ddPCR 进行标准物质的检验和定值，可以降低成本、提高效率、提高定量结果的准确度。在 60°C 退火、引物/探针浓度为 400/200 nM 的反应条件下，以纯合体基因组 DNA 为模板，分别进行浙大瑞丰 8、*zSSIb* 单重和浙大瑞丰 8/*zSSIb* 二重 ddPCR。二重数字 PCR 二维热图显示了 4 个明显的液滴簇，分别对

应 FAM 阳性液滴簇、HEX 阳性液滴簇、双荧光液滴簇和阴性液滴簇（图 27a）。选择 60°C 作为 浙大瑞丰 8/*zSSIIb* 二重 ddPCR 的最佳退火温度，浙大瑞丰 8 转化体和 *zSSIIb* 内标基因的引物/探针浓度均为 400/200 nM。

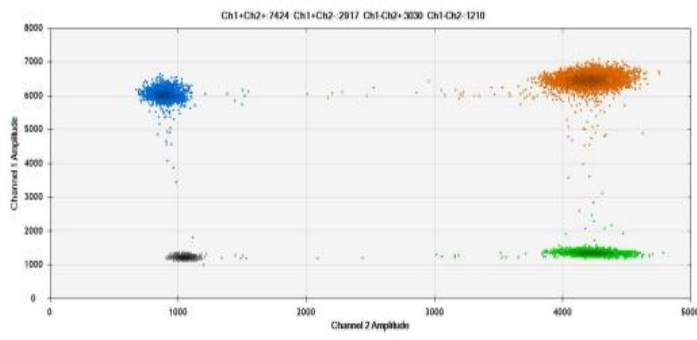


图 27 在优化的反应体系和反应条件下二重 ddPCR 的微滴热图

### 5.5 浙大瑞丰 8/*zSSIIb* 二重 ddPCR 的 LOD、LOQ 和动力学范围测试

在优化的 PCR 条件下，浙大瑞丰 8 gDNA 的连续稀释液用于测试浙大瑞丰 8/*zSSIIb* 二重 ddPCR 的动态范围、LOD 和 LOQ。不同浓度的微滴热图见图 28，测量的拷贝数浓度以及浙大瑞丰 8 和 *zSSIIb* 的拷贝数比值显示在表 18 中。当 DNA 模板量为 10 和 20 拷贝/反应时，测得的拷贝数比值严重偏离了理论值；当 DNA 模板量为 40 拷贝/反应时，测得的拷贝数比值接近理论值，且拷贝数浓度的正确度和精密度在允许范围内。浙大瑞丰 8/*zSSIIb* 二重 ddPCR 的 LOD 确定为 10 个拷贝浙大瑞丰 8 gDNA，LOQ 确定为 40 个拷贝。二重 ddPCR 的 LOD 和 LOQ 与实时 PCR 测定的相似。当 20  $\mu$ L 反应液 DNA

模板量在 40 到  $8.7 \times 10^4$  个拷贝的范围内，浙大瑞丰 8/zSSIIb 二重 ddPCR 显示测量的 DNA 拷贝数与预期 DNA 拷贝数之间具有良好的线性响应， $R^2$  为 1.0（图 29）。浙大瑞丰 8/zSSIIb 二重 ddPCR 动态范围测试表明，20  $\mu\text{L}$  反应体系中，当模板量在  $40 \sim 8.7 \times 10^4$  拷贝的范围内，可获得准确的拷贝数浓度和拷贝数比值测量值。

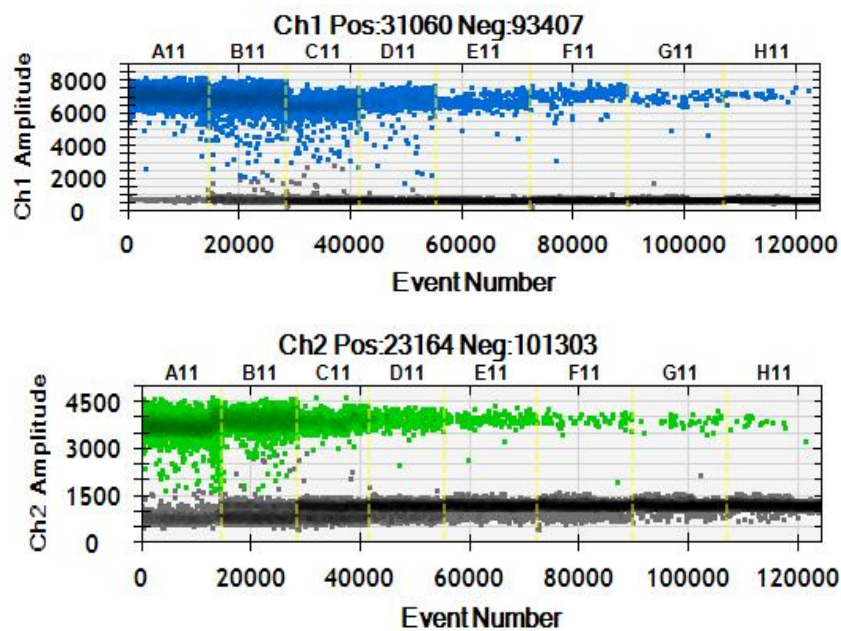


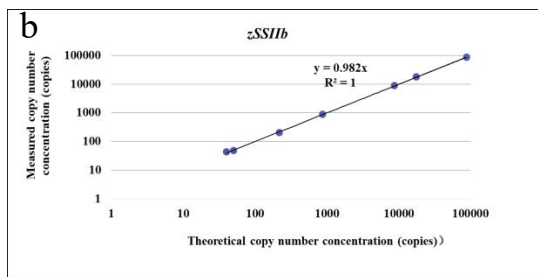
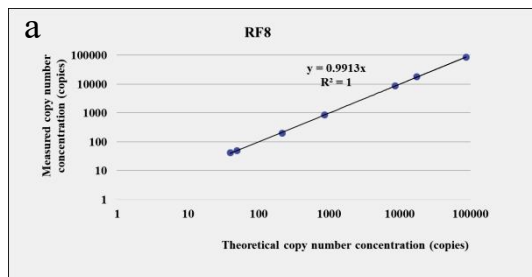
图 28 梯度稀释 DNA 溶液浙大瑞丰 8/zSSIIb 二重 ddPCR 的微滴热图

A07-E08 的模板量依次为 87000、17400、8700、870、218、50、40、20、10、5、1copies。

表 18 浙大瑞丰 8/zSSIIb 二重 ddPCR 测量梯度稀释 浙大瑞丰 8 DNA 溶液的拷贝数浓度和比值

Target	Expected concentration (copie/ $\mu\text{L}$ )	Copy number concentration (copie/ $\mu\text{L}$ )						
		Rep1	Rep2	Rep3	Mean	SD	RSD (%)	Bias (%)
浙大瑞丰 8	87000	86000	86000	86400	86133	188.56	0.22	-1.00
	17400	17580	17920	17640	17713	148.17	0.84	1.80
	8700	9000	8740	8700	8813	133.00	1.51	1.30
	870	834	896	870	867	25.42	2.93	-0.38

	218	204	182	210	199	12.04	6.06	-8.66
	50	48	52	48	49	12.04	24.40	-1.33
	40	35	31	40	35	1.89	5.34	-11.67
	20	26	20	26	24	3.68	15.34	20.00
	10	6	7	8	7	2.53	40.41	-30.00
	5	3	5	/	/			
	1	/	/	/	/	/	/	/
<i>zSSIb</i>	87000	84800	85200	86000	85333	498.89	0.58	-1.92
	17400	17500	17940	17160	17533	319.30	1.82	0.77
	8700	8720	8600	8780	8700	74.83	0.86	0.00
	870	864	858	878	867	8.38	0.97	-0.38
	218	200	192	206	199	5.73	2.88	-8.35
	50	46	54	45	48	5.73	11.87	-3.33
	40	40	47	44	44	4.03	9.22	9.17
	20	18	15	16	16	2.87	17.56	-18.33
	10	13	12	13	13	1.47	11.57	27.33
	5	6	7	/	/	/	/	/
	1	/	/	/	/	/	/	/
浙大瑞 丰 8/ <i>zSSI</i> <i>b</i> ratio	87000	1.01	1.01	1.00	1.01	0.00	0.38	0.94
	17400	1.00	1.00	1.03	1.01	0.01	1.25	1.05
	8700	1.03	1.02	0.99	1.01	0.02	1.68	1.31
	870	0.97	1.04	0.99	1.00	0.03	3.29	0.02
	218	1.02	0.95	0.95	0.97	0.03	3.50	-2.81
	50	1.04	0.96	1.07	1.02	0.04	4.34	2.44
	40	0.88	0.66	0.91	0.81	0.11	13.56	-18.54
	20	1.43	1.37	1.60	1.47	0.10	6.81	46.78
	10	0.43	0.59	0.63	0.55	0.09	15.68	-44.94
	5	0.52	0.76	/	/	/	/	/
	1	/	/	/	/	/	/	/



**c**

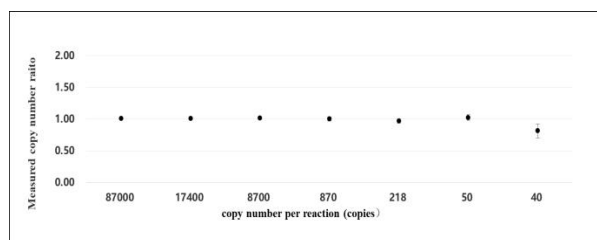


图 29 浙大瑞丰 8/zSSIIb 二重 ddPCR 的动态范围和实测拷贝数比

a, 二重 ddPCR 中浙大瑞丰 8 在 40 到  $8.7 \times 10^4$  个拷贝的动态范围内测量拷贝数与预期拷贝数间有良好的线性关系；b, 二重 ddPCR 中 zSSIIb 在 40 到  $8.7 \times 10^4$  个拷贝的动态范围内测量拷贝数与预期拷贝数间有良好的线性关系；c, 测得的 DNA 溶液的拷贝数比随着 DNA 浓度的降低显示出升高的标准差(SD), 垂直线段表示标准差。数据来自 3 个技术重复的平均值。

### 5.6 浙大瑞丰 8/zSSIIb 二重 ddPCR 的测量准确性确认

DNA 样品(S1-S4)的转基因含量通过 浙大瑞丰 8/zSSIIb 二重 ddPCR 进行定量。二重 ddPCR 的定量检测由不同的操作者在不同的日期进行了 3 次测量。测量的平均浙大瑞丰 8/zSSIIb 拷贝数比值分别接近预期含量，测量平均值与预期值的偏差在 $\pm 25\%$ 的可接受范围内（表 19）。重复性相对标准偏差  $RSD_r$  和再现性相对标准偏差  $RSD_R$  均小于 25%。建立的浙大瑞丰 8/zSSIIb 二重 ddPCR 可准确定量样品中的浙大瑞丰 8 转化体成分，测量结果具有良好的重复性和重现性。

表 19 浙大瑞丰 8/zSSIIb 二重 ddPCR 定量结果的重复性和重现性统计分析

Sample	Expected value (%)	Mean value (%)	$S_r$ (%)	$RSD_r$ (%)	$S_R$ (%)	$RSD_R$ (%)	Bias (%)
S1	5.0	5.07	0.09	1.78	0.10	1.92	1.32
S2	1.0	1.05	0.14	8.15	0.08	7.73	4.76
S3	0.5	0.51	0.08	10.74	0.06	10.98	2.93
S4	0.1	0.11	0.02	18.59	0.02	18.29	9.32

浙大瑞丰 8/*zSSIIb* 二重 ddPCR 中的浙大瑞丰 8 和 *zSSIIb* 采用与实时荧光 PCR 检测相同的引物/探针浓度，为 400/200 nM。浙大瑞丰 8 转化体和 *zSSIIb* 内标基因的反应体系见表 20。反应程序如下：94°C 变性 10 min；50 个循环（94 °C 变性 30 s，60°C 退火延伸 1 min）；98 °C 变性 10 min；4 °C 保存。扩增结束后，将 96 孔板置入微滴读取仪中读取信号，并使用软件 QuantaSoft V1.3.2.0 分析实验数据，获得绝对定量结果。动力学范围测试表明，DNA 模板量在 40 ~ 8.0×10<sup>4</sup> copies/反应，拷贝数浓度测量值与预期值具有良好的线性关系。浙大瑞丰 8/*zSSIIb* 二重 ddPCR 为转基因玉米浙大瑞丰 8 标准物质的拷贝数比值测量提供了可靠的参考方法。

表 20 浙大瑞丰 8/*zSSIIb* 二重微滴数字 PCR 反应体系

PCR 反应试剂	终浓度	体积(μL)
ddPCR Mix (2×)	1×	10
RF8-qF	0.4 μM	0.8
RF8-qR	0.4 μM	0.8
RF8-qP	0.2 μM	0.4
<i>zSSIIb</i> -QF	0.4 μM	0.8
<i>zSSIIb</i> -QR	0.4 μM	0.8
<i>zSSIIb</i> -QP	0.2 μM	0.4
DNA 模板	/	2
ddH <sub>2</sub> O	/	4
合计	/	20

## 6. nCX-1/zSSIIb 二重数字 PCR 方法

### 6.1 nCX-1 转化体引物探针筛选

在数字 PCR 平台上，用通用的 PCR 反应体系（引物/探针浓度 400/200 nM）和退火温度（60°C），以 nCX-1 纯合体基因组 DNA 为模板，进行 nCX-1 转化体/zSSIIb 内标基因的二重数字 PCR 扩增，筛选最佳引物探针组合。zSSIIb 内标基因选用发布的标准方法（农业部 1861 号公告-3-2012），引物/探针序列见表 4。每个引物探针组合 2 个平行反应，nCX-1 转化体和 zSSIIb 内标基因的 1 维（1-D）微滴热图、2 维微滴热图（2-D）、nCX-1/zSSIIb 拷贝数比值如图 30 所示，nCX-1 转化体和 zSSIIb 内标基因的 1-D 微滴热图中，8 个引物组合阳性微滴和阴性微滴都能显著区分，雨滴较少（图 30a）；2-D 微滴热图中，8 个引物探针组合都产生了 4 个显著区分的微滴群（图 30b）；8 个引物探针组合检测 nCX-1 纯合体基因组 DNA，获得不同的 nCX-1/zSSIIb 拷贝数比值（图 30c），其中引物探针组合 4 的拷贝数比值为 1.001，最接近理论值 1.0，且与用于实时荧光 PCR 的引物探针组合相同，因此本项目选择荧光定量 PCR 标准的引物探针组合用于数字 PCR 扩增，数字 PCR 引物探针序列详见表 4。

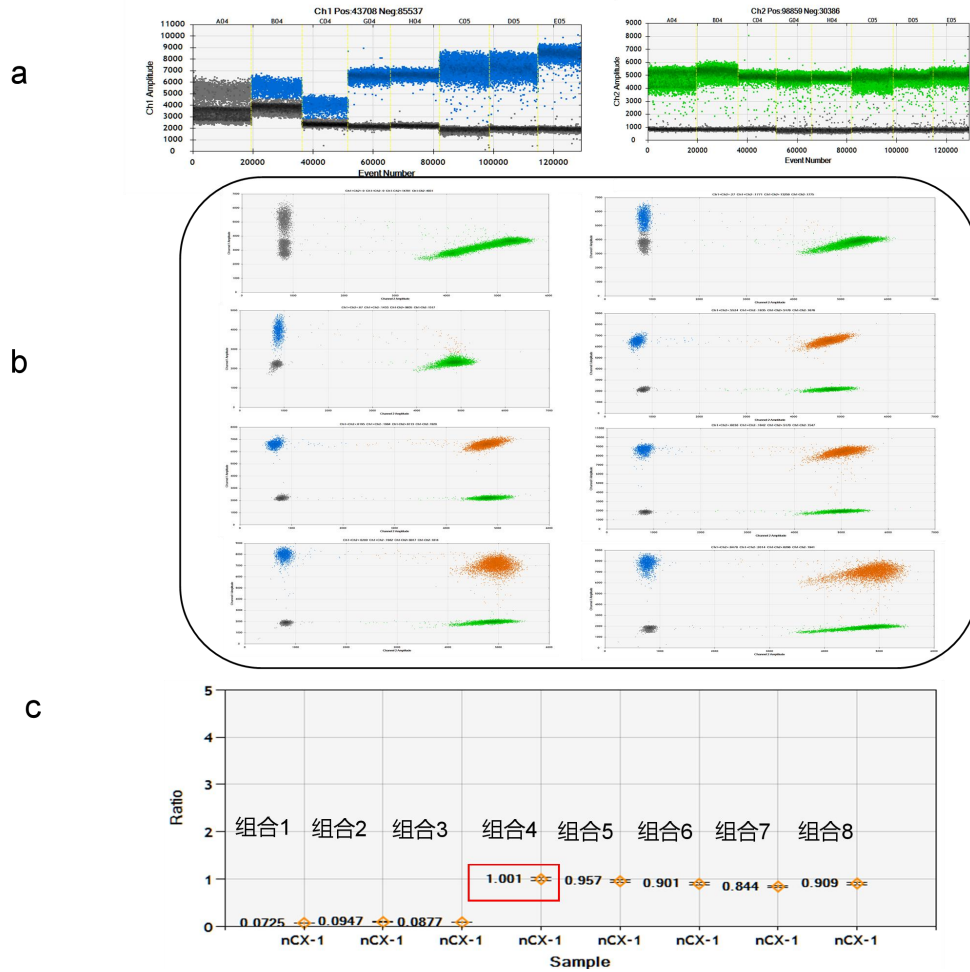


图 30 数字 PCR 引物探针筛选

a, nCX-1 转化体不同引物探针组合和 zSSIIB 内标基因 1-D 微滴图; b, 8 个引物探针组合与 zSSIIB 的 2-D 微滴图; c, 8 个引物探针组合检测 nCX-1 纯合体基因组 DNA, 获得的 nCX-1/zSSIIB 拷贝数比值。

## 6.2 nCX-1 微滴数字 PCR 特异性测试

用转基因玉米 nCX-1、转基因玉米混合样（双抗 12-5、T25、MIR604、NK603、MON87427、DBN9936、DBN9858、RF8）、转基因大豆混合样（DBN9004、MON89788、MON87751、CAL16、中黄 6106、DBN8205）、转基因水稻混合样（TT51-1、KF-6、KMD、G6H1、T1C-19、T2A-1）、转基因油菜混合样（MS1、MS8、RF1、RF2、

RF3、T45、Oxy-235、Topas19/2、MON88302、73496)、转基因棉花混合样 (MON1445、MON531、MON15985、LLCOTTON25、MON88913、GHB614、COT102)、非转基因玉米基因组 DNA 作模板进行 *nCX-1* 和 *zSSIIb* 微滴数字 PCR (ddPCR) 扩增, 用水做空白对照, 测试 *nCX-1* 转化体特异性 ddPCR 的检测特异性。*zSSIIb* 内标基因 ddPCR 在转基因玉米和非转基因玉米品种中都产生了阳性微滴, 在其他作物和空白对照中无阳性微滴; *nCX-1* 转化体特异性 ddPCR 仅在转基因玉米 *nCX-1* 中有阳性微滴, 在其他转基因玉米品种和空白对照中均无阳性微滴 (图 31)。结果表明 *nCX-1/zSSIIb* 二重微滴数字 PCR 有良好的扩增特性。

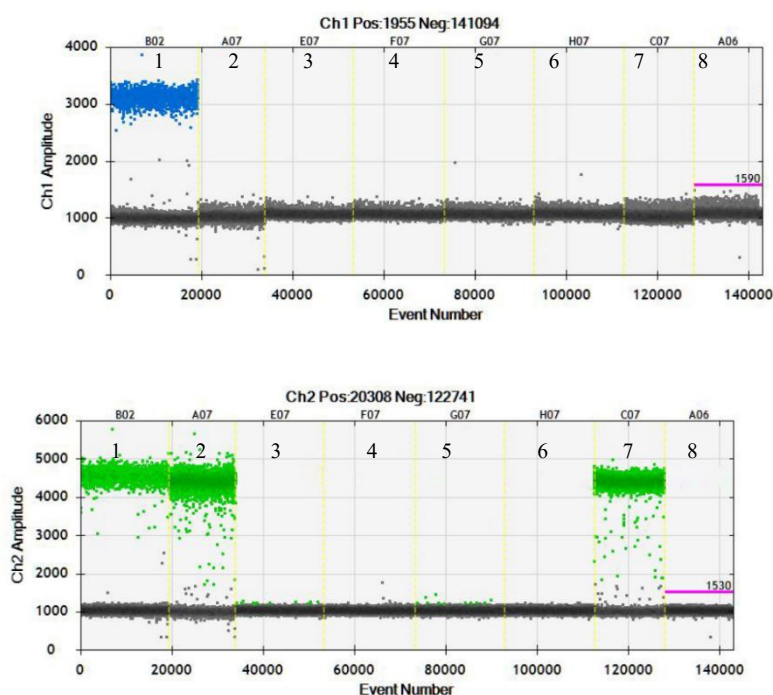


图 31 *nCX-1* 微滴数字 PCR 特异性测试

a, nCX-1 微滴数字 PCR 一维热图; b, zSSIIb 微滴数字 PCR 一维热图。样品顺序: 1. nCX-1, 2. 其他转基因玉米混合样, 3. 转基因玉米混合样, 4. 转基因水稻混合样, 5. 转基因油菜混合样, 6. 转基因棉花混合样, 7. 非转基因玉米, 8. 空白

### 6.3 nCX-1 转化体和 zSSIIb 内标基因单重数字 PCR 的反应条件优化

转基因定量检测依赖于转基因 DNA 拷贝数和总 DNA 拷贝数的准确测量, 其中转基因 DNA 拷贝数通过转化体特异性 PCR 检测定量, 总 DNA 拷贝数定量通过内标基因测定。以 nCX-1 纯合体基因组 DNA 为模板(转基因含量理论值是 1.0), 分别优化了 nCX-1 转化体和 zSSIIb 内标基因单重数字 PCR 退火/延伸温度和引物/探针浓度, 改善阳性/阴性液滴的分辨率以减少雨滴对定量结果的影响, 同时测试转化体和内标基因数字 PCR 反应是否具有相似的扩增效率。在 55°C 至 62°C 的不同退火温度下, nCX-1 和 zSSIIb 内标基因的阳性液滴的荧光强度保持稳定(图 32 a b), 退火温度在 59.5°C 时拷贝数比值为 1.009, 接近理论值 1.0 (图 32c), 选择 60°C 作为 nCX-1 转化体和 zSSIIb 内标基因单重数字 PCR 的退火温度。nCX-1 和内标基因的引物/探针浓度低于 400/200 nM 时, 阳性、阴性液滴信号偏低, 且难以明显区分(图 32d e); 当两个靶标的引物/探针浓度均为 400/200 nM 时, 阳性微滴和阴性微滴具有最佳的分辨率; 当两个靶标的引物/探针浓度高于 400/200 nM 时, 阳性微滴信号进一步升高, 但 nCX-1 转化体的阴性微滴信号值也同步升高。当两个靶标的引物/探针浓度均为 400/200 nM 时, 测量的平均拷贝数比值为 1.002 (图 32f), 接近理

论值（图 32f）。综合考虑引物探针用量和微滴荧光强度，nCX-1 和 zSSIIb 单重数字 PCR 采用与荧光定量 PCR 检测相同的引物/探针浓度为 400/200 nM。

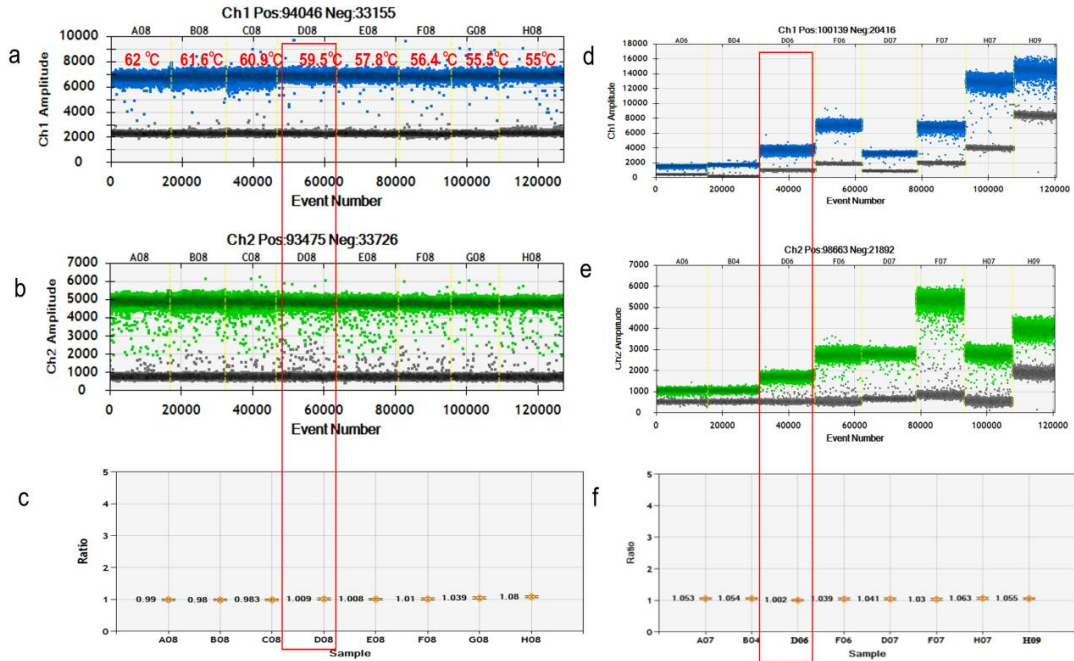


图 32 nCX-1 和 zSSIIb 单重 ddPCR 退火/延伸温度和引物/探针浓度的优化

nCX-1 (a) 和 zSSIIb (b) 在 55°C 至 62°C 不同退火温度下的一维 (1- D) 微滴图; c, 不同退火温度下测量的 nCX-1/zSSIIb 拷贝数比值; nCX-1 (d) 和 zSSIIb (e) 在不同引物/探针浓度下的一维微滴图, 1-4 对应 nCX-1 和 zSSIIb 的引物探针浓度相同, 分别为 100/50, 200/100, 400/200, 800/400 nM; 5-8 对应 nCX-1 和 zSSIIb 不同的引物探针浓度, 分别为 200/100 nM (zSSIIb)、400/200 nM (nCX-1), 400/200 nM (zSSIIb)、200/100 nM (nCX-1), 800/400 nM (zSSIIb)、400/200 nM (nCX-1), 400/200 nM (zSSIIb)、800/400 nM (nCX-1); f, 不同引物探针浓度下测量的 nCX-1/zSSIIb 拷贝数比值。

#### 6.4 nCX-1/zSSIIb 二重 ddPCR 的反应条件确认

用 nCX-1/zSSIIb 二重 ddPCR 进行标准物质的检验和定值, 可以降低成本、提高效率、提高定量结果的准确度。在 60°C 退火、引物/探针浓度为 400/200 nM 的反应条件下, 以纯合体基因组 DNA 为模板, 分别进行 nCX-1、zSSIIb 单重和 nCX-1/zSSIIb 二重 ddPCR。二重数

字 PCR 二维热图显示了 4 个明显的液滴簇，分别对应 FAM 阳性液滴簇、HEX 阳性液滴簇、双荧光液滴簇和阴性液滴簇（图 33）。选择 60°C 作为 nCX-1/zSSIIb 二重 ddPCR 的最佳退火温度，nCX-1 转化体和 zSSIIb 内标基因的引物/探针浓度均为 400/200 nM。nCX-1/zSSIIb 二重 ddPCR 中 zSSIIb 内标基因与 nCX-1 转化体的引物探针间没有相互干扰，二者具有相同的扩增能力。

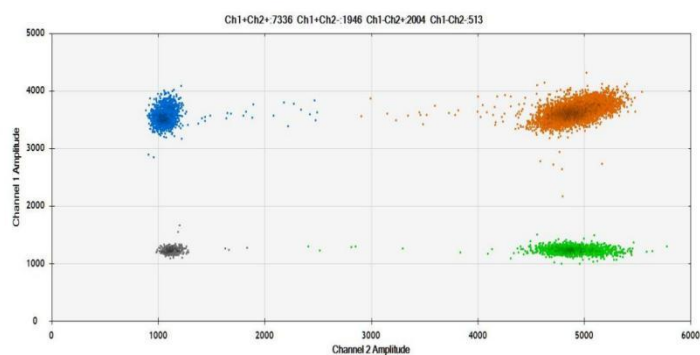


图 33 在优化的反应体系和反应条件下二重 ddPCR 的微滴热图

### 6.5 nCX-1/zSSIIb 二重 ddPCR 的 LOD、LOQ 和动力学范围测试

在优化的 PCR 条件下，nCX-1 gDNA 的连续稀释液用于测试 nCX-1/zSSIIb 二重 ddPCR 的动态范围、LOD 和 LOQ。不同浓度的微滴热图见图 34，测量的拷贝数浓度以及 nCX-1 和 zSSIIb 的拷贝数比值显示在表 21 中。当 DNA 模板量为 10 拷贝/反应时，所有反应都有阳性微滴，但不同反应测得的拷贝数浓度和比值波动较大，相对标准差大于 25%，精密度不符合定量要求；当 DNA 模板量为 20 拷贝/反应时，测量的 zSSIIb 拷贝数浓度的相对标准差大于 25%，相对偏倚

也在 $\pm 25\%$ 的范围之外，测量结果的准确性不能满足定量的需求；当 DNA 模板量为 40 拷贝/反应时，测得的拷贝数比值接近理论值，且拷贝数浓度和比值的测量数据具有良好的准确性（表 21）。nCX-1/zSSIIb 二重 ddPCR 的 LOD 确定为 10 个拷贝 nCX-1 gDNA，LOQ 确定为 40 个拷贝。当 20  $\mu\text{L}$  反应液中 DNA 模板量在 40 到  $7.0 \times 10^4$  个拷贝的范围内，nCX-1/zSSIIb 二重 ddPCR 测量的 DNA 拷贝数与预期 DNA 拷贝数之间显示良好的线性响应， $R^2$  为 1.0（图 35 a b），测量的拷贝数比值在预期范围内波动，具有良好的重复性（图 35 c）。nCX-1/zSSIIb 二重 ddPCR 动态范围测试表明，20  $\mu\text{L}$  反应体系中，当模板量在  $40 \sim 7.0 \times 10^4$  拷贝的范围内，可获得准确的拷贝数浓度和拷贝数比值测量值。

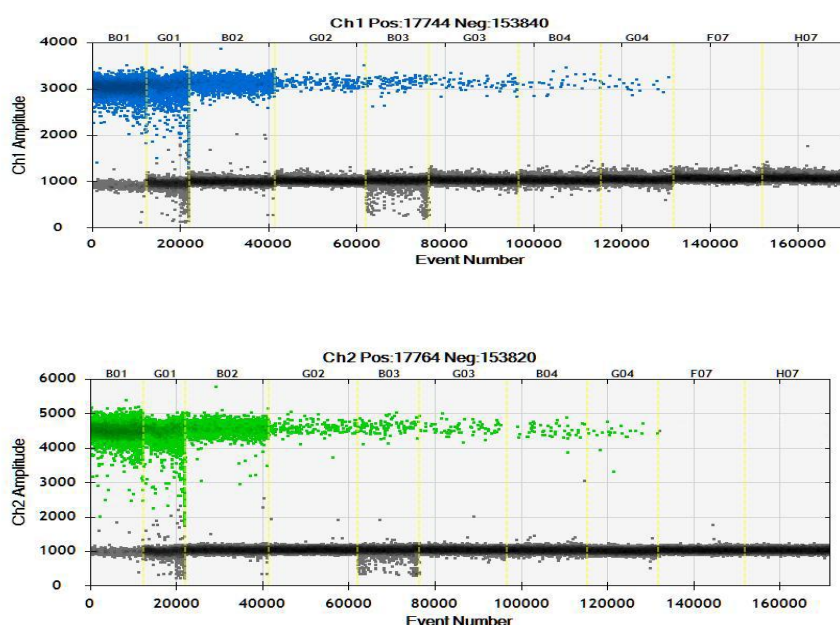


图 34 梯度稀释 DNA 溶液 nCX-1/zSSIIb 二重 ddPCR 的微滴热图

H09-D08 的模板量依次为 70000、1000、2000、200、50、40、20、10、5、1 copies。

表 21 nCX-1/zSSIb 二重 ddPCR 测量梯度稀释 nCX-1 DNA 溶液的拷贝数浓度和比值

Target	Expected concentration (copie/ $\mu$ L)	Copy number concentration (copie/ $\mu$ L)						
		Rep1	Rep2	Rep3	Mean	SD	RSD (%)	Bias (%)
nCX-1	70000	62400	72800	67400	67533.33	4246.83	6.29	-3.52
	10000	9940	9480	10260	9893.33	320.14	3.24	-1.07
	2000	1992	2480	2200	2224.00	199.95	8.99	11.20
	200	212	186	230	209.33	18.06	8.63	4.67
	50	44	58	42	48.00	7.12	14.83	-4.00
	40	38	44	44	42.00	7.12	16.95	5.00
	20	24	11	30	21.73	2.83	13.01	8.67
	10	10	8	15	11.33	7.84	69.18	13.33
	5	/	/	/	/	/	/	/
	1	/	/	/	/	/	/	/
zSSIb	70000	63000	72600	69200	68266.67	3974.36	5.82	-2.48
	10000	9700	9440	9900	9680.00	188.33	1.95	-3.20
	2000	1920	2600	2160	2226.67	281.58	12.65	11.33
	200	202	188	200	196.67	6.18	3.14	-1.67
	50	46	52	46	48.00	2.83	5.89	-4.00
	40	36	32	58	42.00	2.83	6.73	5.00
	20	28	22	32	27.33	11.43	41.82	36.67
	10	18	20	8	15.53	4.11	26.46	55.33
	5	/	/	/	/	/	/	/
	1	/	/	/	/	/	/	/
nCX-1/zSSIb ratio	70000	0.99	1.00	0.97	0.99	0.01	1.19	-1.09
	10000	1.02	1.00	1.04	1.02	0.01	1.30	2.18
	2000	1.04	0.95	1.02	1.00	0.04	3.57	0.33
	200	1.05	0.99	1.15	1.06	0.07	6.23	6.30
	50	0.96	1.12	0.91	0.99	0.09	8.74	-0.50
	40	1.06	1.38	0.76	1.06	0.25	23.68	6.31
	20	0.86	0.51	0.94	0.77	0.19	24.21	-23.21
	10	0.57	0.42	1.85	0.95	0.64	68.03	-5.30
	5	/	/	/	/	/	/	/
	1	/	/	/	/	/	/	/

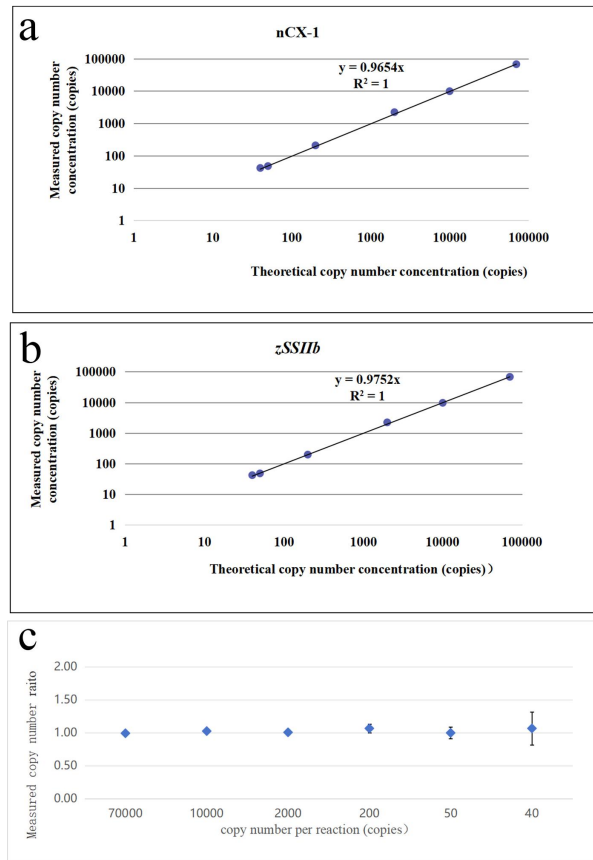


图 35 nCX-1/zSSIIB 二重 ddPCR 的动态范围和实测拷贝数比

a, 二重 ddPCR 中 nCX-1 在 40 到  $7.0 \times 10^4$  个拷贝的动态范围内测量拷贝数与预期拷贝数间有良好的线性关系；b, 二重 ddPCR 中 zSSIIB 在 40 到  $7.0 \times 10^4$  个拷贝的动态范围内测量拷贝数与预期拷贝数间有良好的线性关系；c, 测得的 DNA 溶液的拷贝数比随着 DNA 浓度的降低显示出升高的标准差(SD), 垂直线段表示标准差。数据来自 3 个技术重复的平均值。

## 6.6 nCX-1/zSSIIB 二重 ddPCR 的测量准确性确认

将转基因玉米 nCX-1 纯合体基因组 DNA 和非转基因玉米基因组 DNA 混合, 制备 2 个预期转基因含量为 3.0%和 1.0%的盲样, 同时将纯合体基因组 DNA 也作为 1 个盲样。用 nCX-1/zSSIIB 二重数字 PCR 对 3 个样品进行定量检测, 每个样品检测 6 次, 每次设置 3 个重复。对检测结果进行统计分析, 结果如表 22 所示。各样品中 nCX-1/zSSIIB

拷贝数比值的测量平均值与预期值的相对偏差小于 5%，在±25%的可接受范围内（表 22）；相对标准偏差 RSD 小于 3.65%，均小于 25%。建立的 nCX-1/zSSIIb 二重 ddPCR 可准确定量样品中的 nCX-1 转化体成分，测量结果具有良好的精密度和正确度。

表 22 nCX-1/zSSIIb 二重 ddPCR 定量结果的重复性和重现性统计分析

样品	S1 (100%)			S2 (3%)			S3 (1%)		
	Rep1	Rep2	Rep3	Rep1	Rep2	Rep3	Rep1	Rep2	Rep3
Run 1	97.55	100.00	99.62	3.03	3.06	2.77	1.08	1.01	1.21
Run 2	98.65	102.21	97.96	3.01	2.90	3.13	1.08	0.96	0.91
Run 3	101.47	101.24	96.75	3.02	2.76	3.01	1.14	1.02	0.91
Run 4	103.25	103.88	98.33	2.93	2.98	3.07	1.17	1.06	1.02
Run5	100.28	102.56	100.00	2.87	2.94	3.08	1.07	1.17	0.97
Run 6	100.84	100.00	101.75	2.80	2.99	2.92	1.07	1.09	0.96
平均值	100.35			2.96			1.05		
RSD(%)	1.99			3.65			3.11		
Bias%	0.35			1.33			5.00		

nCX-1/zSSIIb 二重 ddPCR 中的 nCX-1 和 zSSIIb 采用与实时荧光 PCR 相同的引物/探针浓度，均为 400/200 nM。nCX-1 转化体和 zSSIIb 内标基因的反应体系见表 23。反应程序如下：94°C 变性 10 min；50 个循环（94 °C 变性 30 s，60°C 退火延伸 1 min）；98 °C 变性 10 min。扩增结束后，将 96 孔板置入微滴读取仪中读取信号，并使用软件 QuantaSoft V1.3.2.0 分析实验数据，获得绝对定量结果。动力学范围测试表明，DNA 模板量在 40 ~ 7.0×10<sup>4</sup> copies/反应，拷贝数浓度测量值与预期值具有良好的线性关系。nCX-1/zSSIIb 二重 ddPCR 为转基因玉米 nCX-1 标准物质的拷贝数比值测量提供了可靠的参考方法。

表 23 nCX-1/zSSIIb 二重微滴数字 PCR 反应体系

PCR 反应试剂	终浓度	体积( $\mu\text{L}$ )
ddPCR Mix (2 $\times$ )	1 $\times$	10
nCX-1-qF	0.4 $\mu\text{M}$	0.8
nCX-1-qR	0.4 $\mu\text{M}$	0.8
nCX-1-qP	0.2 $\mu\text{M}$	0.4
<i>zSSIb</i> -QF	0.4 $\mu\text{M}$	0.8
<i>zSSIb</i> -QR	0.4 $\mu\text{M}$	0.8
<i>zSSIb</i> -QP	0.2 $\mu\text{M}$	0.4
DNA 模板	/	2
ddH <sub>2</sub> O	/	4
合计	/	20

## 7. ND207/*zSSIb* 二重数字 PCR 方法

### 7.1 引物探针筛选

用 8 组转化体特异性引物/探针组合玉米国标内标准基因 *zSSIb* 对 ND207 的单株基因组 DNA 进行扩增,通过分析微滴扩增图谱确定后续引物/探针。由微滴扩增图谱(图 36)可见,引物探针组合 1、2、3、4、6 的阳性微滴不能与阴性微滴明显分开,引物探针组合 5、7、8 的阳性微滴虽然均可以与阴性微滴分开,但引物探针组合 7 的荧光信号明显高于引物探针组合 5、8,且引物探针组合 7 与内标准基因 *zSSIb* 的比值为 0.98,均接近理论值 1.0,故选择引物探针组合 7 用于后续实验,序列见表 24。

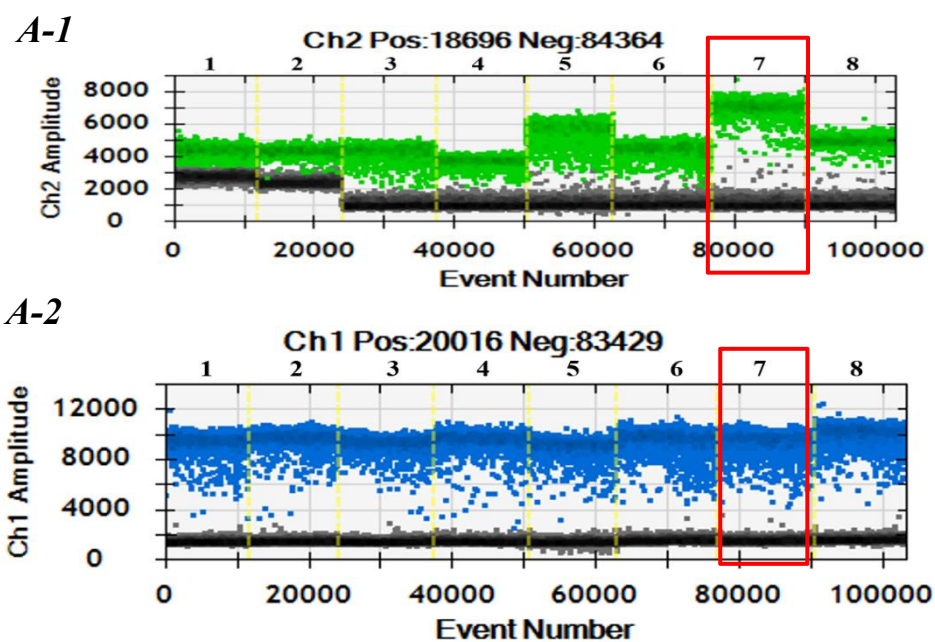


图 36 转基因玉米 ND207 转化体特异性序列引物探针双重数字 PCR 初筛微滴图

注：A-1 为双重数字 PCR 反应时 1~8 组 HEX 标记的 ND207 转化体特异性引物探针组合的微滴反应图，A-2 为双重数字 PCR 反应时玉米国标内标准基因 *zSSIb* 引物探针组合（农业部 1861 号公告-3-2012）的微滴反应图。

经初筛后，ND207 双重微滴数字 PCR 方法所采用的转化体特异性序列和内标准基因 *zSSIb* 引物和探针序列如表 24 所示。

表 24 ND207 转化体和 *zSSIb* 内标基因引物/探针序列信息

检测靶标	引物/探针名称及序列(5'-3')	扩增片段大小(bp)	序列来源
ND207	3-qF2: AATATAGCGCGCAATCCAGAT	91	数字PCR 用自行 设计
	3-qR2: CTGGCCATCGTGGCCGTGTCGT		
	3-qP1: HEX-CACGCGCATCACCTGCGTCA-BHQ1		
<i>zSSIb</i>	<i>zSSIb</i> -3F: CGGTGGATGCTAAGGCTGATG	88	农业部 1861号 公告 -3-2012
	<i>zSSIb</i> -4R: AAAGGGCCAGGTTCATTATCCTC		
	<i>zSSIb</i> -P: FAM-TAAGGAGCACTCGCCGCCGCATCTG-BHQ1		

## 7.2. ND207 二重微滴数字 PCR 特异性测试

为了考察 ND207 转化体特异性序列数字 PCR 系统的扩增特异性, 分别以转基因玉米 ND207、其他转基因玉米混合样品、转基因大豆混合样品、转基因棉花混合样品、转基因油菜混合样品、转基因水稻混合样品、非转基因玉米 (阴性对照, NTC) 的基因组 DNA 和 ddH<sub>2</sub>O (空白对照) 为模板, 进行数字 PCR 扩增。ND207 转化体特异性序列只有在以转基因玉米 ND207 基因组 DNA 为模板时, 才有阳性微滴, 而以其他转基因玉米混合样品、转基因大豆混合样品、转基因棉花混合样品、转基因油菜混合样品、转基因水稻混合样品、非转基因玉米的基因组 DNA 和 ddH<sub>2</sub>O 为模板时, 均无阳性微滴, 扩增结果为阴性 (图 37)。扩增结果显示, 转基因玉米 ND207 转化体数字 PCR 系统具有良好的扩增特异性。

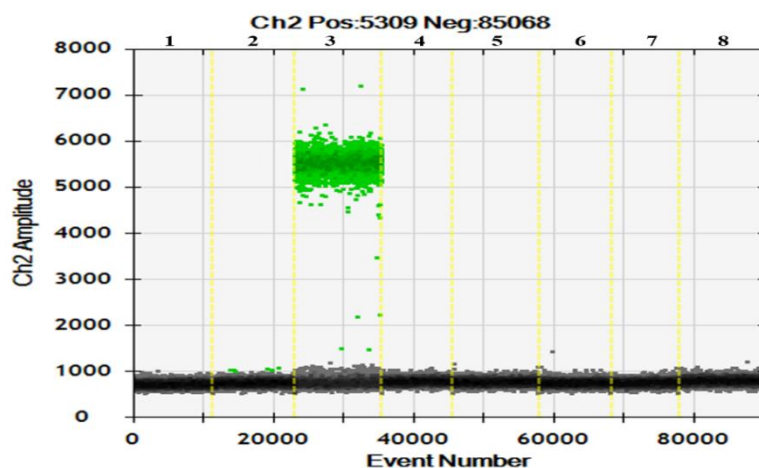


图 37 ND207 转化体数字 PCR 特异性检测扩增热图

注: 1: CK; 2: NTC; 3: 转基因玉米 ND207; 4: 其他转基因玉米混合样品; 5: 转基因大豆混合样品; 6: 转基因棉花混合样品; 7: 转基因油菜混合样品; 8: 转基因水稻混合样品。

### 7.3. ND207/*zSSIb* 二重数字 PCR 的条件优化

本项目使用具有温度梯度功能的热循环仪来确定微滴式数字 PCR 反应体系理想的退火温度，在反应程序的退火环节，设置 54°C、56°C、58°C、60°C、62°C、64°C 等 6 个退火温度梯度对 ND207 转化体特异性序列和内标准基因引物探针进行优化，以筛选出最理想的温度条件。

根据双重数字 PCR 反应的扩增图（图 38、图 39），ND207 转化体特异性序列和玉米内标准基因 *zSSIb* 在不同的退火温度下，微滴的荧光强度存在一定的差异。综合比较 ND207 转化体和 *zSSIb* 基因的数字 PCR 扩增热图，当退火温度在 54°C、56°C、58°C、60°C 时，荧光强度在同一水平，而当退火温度高于 60°C 时，荧光强度有下降趋势。在退火温度为 60°C 时，转化体特异性序列及内标准基因阳性微滴均无严重弥散，同时参考不同退火温度时转化体特异性序列和内标准基因的拷贝数比值（表 25），当退火温度为 60°C 时，比值也接近于 1，所以确定双重数字 PCR 的最佳退火温度 60°C。经过优化后 *zSSIb* 基因和 ND207 转化体特异性序列数字 PCR 扩增程序为：95°C 预变性 10 min；94°C 变性 30 s，60°C 退火延伸 60 s，共进行 50 个循环；98°C 变性 10 min，4°C 保存（升降温速率 2°C/s）。

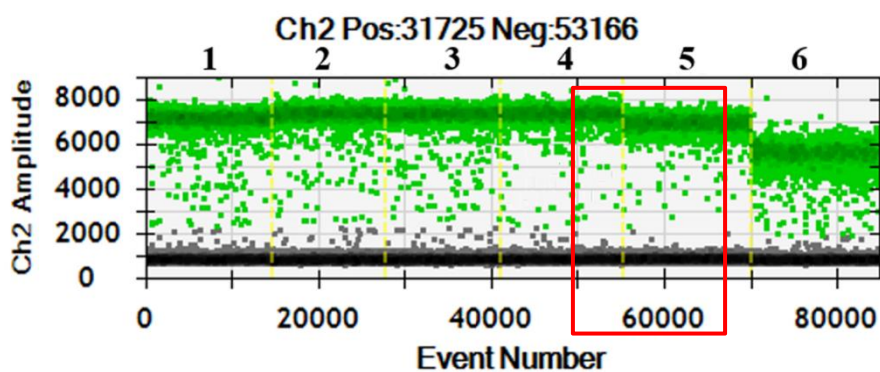


图 38 双重数字 PCR ND207 转化体特异性序列退火温度优化

注：1~6 的退火温度依次为 54°C、56°C、58°C、60°C、62°C、64°C。

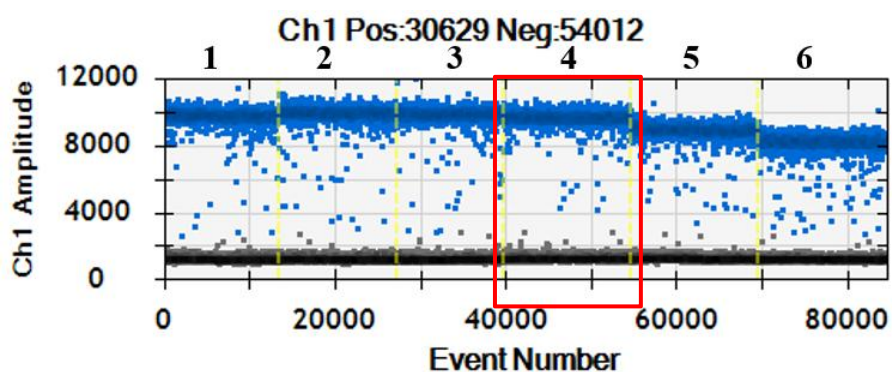


图 39 双重数字 PCR 内标准基因 zSSIIb 退火温度优化

注：1~6 的退火温度依次为 54°C、56°C、58°C、60°C、62°C、64°C。

表 25 双重数字 PCR 退火温度优化转化体特异性序列和内标准基因的拷贝数

Tm	54°C	56°C	58°C	60°C	62°C	64°C
ND207 拷贝数(copies/μL)	20160	20600	20440	20880	20560	20400
zSSIIb 拷贝数(copies/μL)	20960	21320	21040	20840	20960	21040
ND207 转化体/zSSIIb 拷贝数比值(copies/copies)	0.96	0.97	0.97	1.00	0.98	0.97

由于微滴式数字 PCR 平台 Bio-Rad QX200 需使用专用的扩增试剂，PCR 扩增体系中仅选择引物探针浓度进行优化测试。参考厂家提

供的数字 PCR 通用体系为引物/探针 1: 1 过饱和状态, 并参照已发布标准和文献中提到的数字 PCR 体系多为引物/探针非过饱和状态, 故设置两种引物探针配比组合, 借鉴标准制修订方法建立中引物探针终浓度优化的通用范围在 0.1~1.0  $\mu\text{mol/L}$  之间, 按表 26 设置 8 个引物/探针终浓度梯度, 其中①-④为引物/探针终浓度 1: 1: 1 的探针过饱和状态, ⑤-⑧为引物/探针终浓度 1: 1: 0.5 的探针半倍状态, 应用上述优化的微滴式数字 PCR 反应程序扩增。微滴数字 PCR 应用的引物和探针序列见表 4。

表 26 引物探针浓度优化配比表

引物、探针终浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )		引物、探针终浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )	
①	0.3:0.3:0.3	⑤	0.3:0.3:0.15
②	0.4:0.4:0.4	⑥	0.4:0.4:0.2
③	0.5:0.5:0.5	⑦	0.5:0.5:0.25
④	0.6:0.6:0.6	⑧	0.6:0.6:0.3

根据双重和单重微滴数字 PCR 反应的图谱(图 40、图 41)可知, 在同等的引物终浓度下, 比较探针过饱和状态和半倍两种状态发现, ND207 转化体和玉米内标 *zSSIb* 基因在探针过饱和状态下, 微滴的荧光强度较高, 在探针半倍状态下, 阳性微滴较为聚拢。在探针半倍状态下, 当引物终浓度为 0.5  $\mu\text{mol/L}$  时, 阳性微滴弥散较不明显; 当引物终浓度小于 0.5  $\mu\text{mol/L}$  时, 阳性微滴明显减少且荧光强度降低, 综合考虑且兼顾经济高效, 故选取双重微滴数字 PCR 的最佳引物终浓度为 0.5  $\mu\text{mol/L}$ 、探针终浓度为 0.25  $\mu\text{mol/L}$ , 此时转化体与内标准基因的比值也接近于 1 (表 27)。

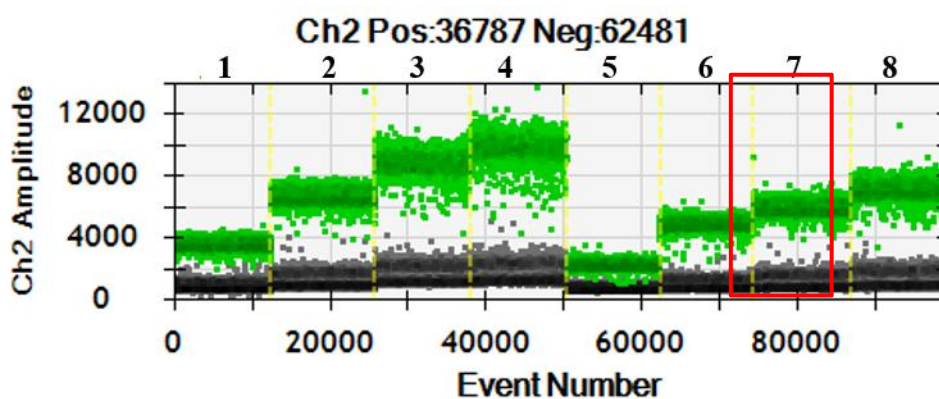


图 40 双重数字转化体特异性序列引物探针浓度筛选

注：1~8 依次为表 26 所示的引物探针浓度。

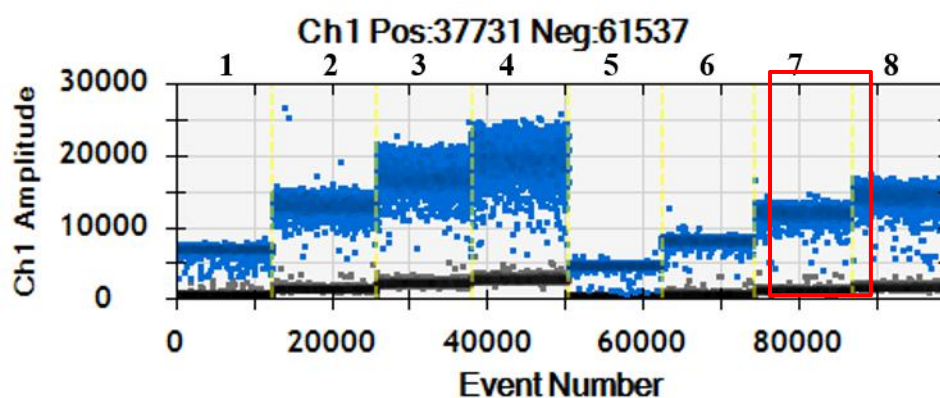


图 41 双重数字内标准基因 *zSSIIB* 引物探针浓度筛选

注：1~8 依次为表 26 所示的引物探针浓度。

表 27 双重数字 PCR 引物探针优化转化体特异性序列和内标准基因的拷贝数

引物探针终浓度	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
ND207 拷贝数 (copies/ $\mu$ L)	20080	20520	20960	20280	20800	20240	20640	21000
<i>zSSIIB</i> 拷贝数 (copies/ $\mu$ L)	20520	21120	21480	21360	21320	21040	20400	21480
ND207 转化体/ <i>zSSIIB</i> 拷贝数比值 (copies/copies)	0.98	0.97	0.98	0.95	0.98	0.96	1.01	0.98

经过优化后 *zSSIb* 基因和 ND207 转化体特异性序列数字 PCR 扩增体系如表 28 所示。

表 28 数字 PCR 扩增体系

组分	体积
ddH <sub>2</sub> O	3.0 $\mu$ L
2 $\times$ ddPCR <sup>TM</sup> Supermix for Probes	10.0 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 内标上游引物 <i>zSSIb</i> -3F	1.0 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 内标下游引物 <i>zSSIb</i> -4R	1.0 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 内标探针 <i>zSSIb</i> -P	0.5 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 转化体上游引物 ND207-qF	1.0 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 转化体上游引物 ND207-qR	1.0 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 转化体探针 ND207-qP	0.5 $\mu$ L
DNA 模板	2.0 $\mu$ L
总体积	20.0 $\mu$ L

#### 7.4 ND207/*zSSIb* 二重 ddPCR 的 LOD、LOQ 和动力学范围测试

微滴式数字 PCR 的理论有效线性范围是 1-120000 个拷贝，但 20  $\mu$ L 反应液在微滴生成器中只能产生 12000-16000 个有效微滴，微滴数大于 10000 为有效反应。为了测试数字 PCR 系统的动力学范围，将 ND207 基因组 DNA 进行梯度稀释，浓度依次为 24000、4800、960、192、38.4、15.36、7.68、3.84 copies/ $\mu$ L，进行数字 PCR 扩增，每个浓度重复 4 次，用于测试数字 PCR 系统的动力学范围、检出限和定量限。当 DNA 浓度为 15.36 copies/ $\mu$ L 时，此时反应体系内 DNA 的模板量为 30.72 copies，转基因玉米 ND207 转化体特异性序列拷贝数浓度的 RSD 值为 17.14%，偏差为 13.93%，内标准基因 *zSSIb* 拷贝

数浓度的 RSD 值为 16.03%，偏差为 7.42%，ND207 转化体/*zSSIb* 拷贝数比值的 RSD 为 8.34%，偏差为 6.08%，均低于 25%，故推测此浓度为 ND207 数字 PCR 反应的定量限，以 20  $\mu$ L PCR 检测反应体系中加入含有转基因玉米 ND207 转化体特异性序列的 120 ng DNA 模板进行测算，定量限约为 31 copies/反应；当反应体系内 DNA 浓度低至 7.68 copies/ $\mu$ L 时，此时反应体系内 DNA 的模板量为 15.36 copies，转基因玉米 ND207 转化体特异性序列拷贝数浓度的 RSD 值为 28.69%，偏差为 17.19%，内标准基因 *zSSIb* 拷贝数浓度的 RSD 值为 27.00%，偏差为 13.93%，ND207 转化体/*zSSIb* 拷贝数比值的 RSD 为 37.96%，偏差为 10.12%，RSD 均高于 25%，偏差均低于 25%，故推测数字 PCR 反应的检出限，以 20  $\mu$ L PCR 检测反应体系中加入含有转基因玉米 ND207 转化体特异性序列的 120 ng DNA 模板进行测算，检出限约为 15 copies/反应（见表 29）。

如图 42 所示，当 20  $\mu$ L 反应体系内模板浓度在 7.68~48000 copies 范围内时，通过微滴数字 PCR 获得转化体的测量值与预期拷贝数浓度间具有良好的相关性，决定系数  $R^2$  值等于 0.9999，线性方程为  $y=1.0055x$ （ $y$  代表测量拷贝数， $x$  代表预期拷贝数）；通过微滴数字 PCR 获得内标准基因 *zSSIb* 决定系数  $R^2$  值等于 0.9999，线性方程为  $y=1.0227x$ （ $y$  代表测量拷贝数， $x$  代表预期拷贝数）；当模板量低至 15.36 和 7.68 copies 时，转化体特异性序列/*zSSIb* 拷贝数比值 RSD 明显较大。当测试样品模板量浓度处于 30.72~48000 copies 时，

RSD 值及偏差均小于 25%，检测结果稳定、可靠。当测试样品的浓度处于动力学范围的中间位置时，定量结果最准确。

表 29 梯度稀释 ND207 基因组 DNA 溶液的拷贝数和比值

转化体 名称	预期值 (copies/ $\mu$ L)	拷贝数浓度 (copies/ $\mu$ L)					SD	RSD(%)	Bias(%)
		重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	平均值			
ND207	24000	24200	23710	24910	23860	24170.0	534.23	2.21	0.71
	4800	4450	4730	4630	4700	4627.5	125.53	2.71	-3.59
	960	1070	970	1060	940	1010.0	64.81	6.42	5.21
	192	182	221	205	212	205.0	16.67	8.13	6.77
	38.4	45	47	37	39	42.0	4.76	11.34	9.38
	15.36	19	13	19	19	17.5	3.00	17.14	13.93
	7.68	6	8	12	10	9.0	2.58	28.69	17.19
	3.84	8	6	3	5	5.5	2.08	37.85	43.23
zSSIIb	24000	24610	24520	25190	24050	24592.5	467.93	1.90	2.47
	4800	4640	4520	4740	4750	4662.5	107.20	2.30	-2.86
	960	1030	940	1060	970	1000.0	54.77	5.48	4.17
	192	189	218	204	196	201.8	12.45	6.17	5.08
	38.4	45	42	37	38	40.5	3.70	9.13	5.47
	15.36	18	13	16	19	16.5	2.65	16.03	7.42
	7.68	12	7	9	7	8.8	2.36	27.00	13.93
	3.84	6	5	6	3	5.0	1.41	28.28	30.21
比值	24000	0.98	0.97	0.99	0.99	0.98	0.01	1.14	-1.72
	4800	0.96	1.05	0.98	0.99	0.99	0.04	3.81	-0.71
	960	1.04	1.03	1.00	0.97	1.01	0.03	3.18	1.00
	192	0.96	1.01	1.00	1.08	1.02	0.05	4.84	1.58
	38.4	1.00	1.12	1.00	1.03	1.04	0.06	5.45	3.63
	15.36	1.06	1.00	1.19	1.00	1.06	0.09	8.34	6.08
	7.68	0.50	1.14	1.33	1.43	1.10	0.42	37.96	10.12
	3.84	1.33	1.20	0.50	1.67	1.18	0.49	41.78	17.50

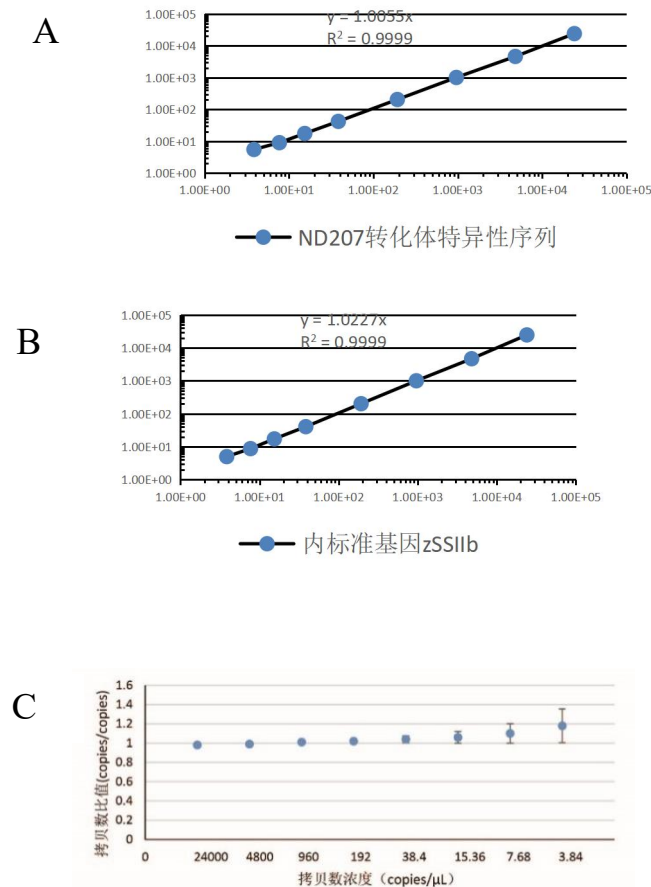


图 42 ND207 转化体特异性序列及 *zSSIb* 数字 PCR 动力学范围

注：X 轴表示 DNA 溶液的预期拷贝数浓度，Y 轴表示通过数字 PCR 测量出的拷贝数浓度；A 为 ND207 在 3.84~24000 copies/ $\mu$ L 的动态范围内测量值与预期拷贝数间有良好的线性关系；B 为内标基因 *zSSIb* 在 3.84~24000 copies/ $\mu$ L 的动态范围内测量值与预期拷贝数间有良好的线性关系；C 为测得的 DNA 溶液的拷贝数比值随着 DNA 浓度的降低显示出升高的相对标准偏差(RSD)，垂直线段表示相对标准偏差。数据来自 4 个反应重复的平均值。

## 7.5 ND207/*zSSIb* 二重 ddPCR 的测量准确性

以梯度稀释的 ND207 基因组 DNA 为模板进行 ND207 转化体和内标基因的数字 PCR 扩增，每个模板重复 4 次反应。统计 4 个重复间测量值的标准偏差和相对标准偏差（表 30）。

对本项目的数字 PCR 结果分析发现, 5%、1%、0.1%浓度梯度稀释的 3 个样品拷贝数多次测试的偏差|Bias|依次为 4.25%、7.75%、7.50%, 相对标准偏差 RSD 依次为 3.45%、4.19%、14.30%, 均小于 25%; 3 个样品拷贝数比值多次测试的偏差|Bias|依次为 2.22%、3.51%、8.68%, 相对标准偏差 RSD 依次为 3.62%、4.94%、13.52%, 均小于 25%。结果表明 ND207 数字 PCR 方法具有良好的正确度和精密度, 重复间测量结果稳定、可靠。

表 30 玉米 ND207 转化体和内标基因 *zSSIb* 的测量结果稳定性分析

预期值		重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	平均 值	SD	RSD( %)	Bias( %)
5% (1000 copies/ $\mu$ L)	ND207 转化体	1050	1010	1090	1020	1043	35.94	3.45	4.25
	内标基因	2000	2040	2060	2060	2040	282.84	1.39	/
	<i>zSSIb</i>	0	0	0	0	0			
	比值 (%)	5.25	4.95	5.29	4.95	5.11	0.19	3.62	2.22
1% (200 copies/ $\mu$ L)	ND207 转化体	216	227	214	205	216	9.04	4.19	7.75
	内标基因	2080	2070	2070	2110	2082	189.30	0.91	/
	<i>zSSIb</i>	0	0	0	0	5			
	比值 (%)	1.04	1.10	1.03	0.97	1.04	0.05	4.94	3.51
0.1% (20 copies/ $\mu$ L)	ND207 转化体	22	19	16	17	19	2.65	14.30	-7.50
	内标基因	2070	1990	2060	1980	2025	465.47	2.30	/
	<i>zSSIb</i>	0	0	0	0	0			
	比值 (%)	0.11	0.10	0.08	0.09	0.09	0.01	13.52	-8.68

## 7.5 结论

ND207/*zSSIb* 二重 ddPCR 扩增引物探针采用自行设计的实时荧光 PCR 方法引物探针 (表 24)。ND207/*zSSIb* 二重 ddPCR 扩增体系见表 31, 扩增程序为: 95°C 预变性 10 min; 94°C 变性 30 s, 60°C

退火延伸 60 s，共进行 50 个循环；98°C 变性 10 min，4°C 保存（升降温速率 2°C/s）。

表 31 数字 PCR 扩增体系

组分	终浓度	体积
ddH <sub>2</sub> O		3.0 μL
2×ddPCR <sup>TM</sup> Supermix for Probes	1×	10.0 μL
10 μmol/L 内标上游引物 <i>zSSIb</i> -QF	0.5 μmol/L	1.0 μL
10 μmol/L 内标下游引物 <i>zSSIb</i> -QR	0.5 μmol/L	1.0 μL
10 μmol/L 内标探针 <i>zSSIb</i> -QP	0.25 μmol/L	0.5 μL
10 μmol/L 转化体上游引物 ND207-qF	0.5 μmol/L	1.0 μL
10 μmol/L 转化体上游引物 ND207-qR	0.5 μmol/L	1.0 μL
10 μmol/L 转化体探针 ND207-qP	0.25 μmol/L	0.5 μL
25 mg/L DNA 模板	2.5 mg/L	2.0 μL
总体积		20.0 μL

扩增体系可根据仪器及试剂耗材的实际使用情况，进行相应调整。此表是 1 个扩增体系的体积，应按照实际反应数量进行扩增体系配置。空白质控品以 2.0 μL 的 ddH<sub>2</sub>O 作模板。

## 8. BFL4-2/*zSSIb* 二重数字 PCR 方法

### 8.1. 引物探针筛选

在伯乐微滴式数字 PCR 平台 QX200 上，用通用的 PCR 反应体系（引物/探针浓度 400/200 nM）和退火温度（56°C），以 BFL4-2 纯合体基因组 DNA 为模板，进行 BFL4-2 转化体/*zSSIb* 基因的二重 ddPCR 扩增，对引物探针组合进行筛选。*zSSIb* 内标基因选用发布的标准方法（农业部 1861 号公告-3-2012），引物/探针序列见表 32。由微滴扩增图谱（图 34）可见，引物探针组合 3、5 无阳性微滴，引物探针组合 1、2、4、8 的阳性微滴不能与阴性微滴明显分开，引物

探针组合 6、7 的阳性微滴虽然均可以与阴性微滴分开，且二者阳性微滴荧光信号接近，进一步结合引物探针组合 6、7 与内标准基因 *zSSIIb* 的比值发现，引物探针组合 6 更接近理论值 1.0，故选择引物探针组合 6 用于后续实验。引物探针序列详见表 32。

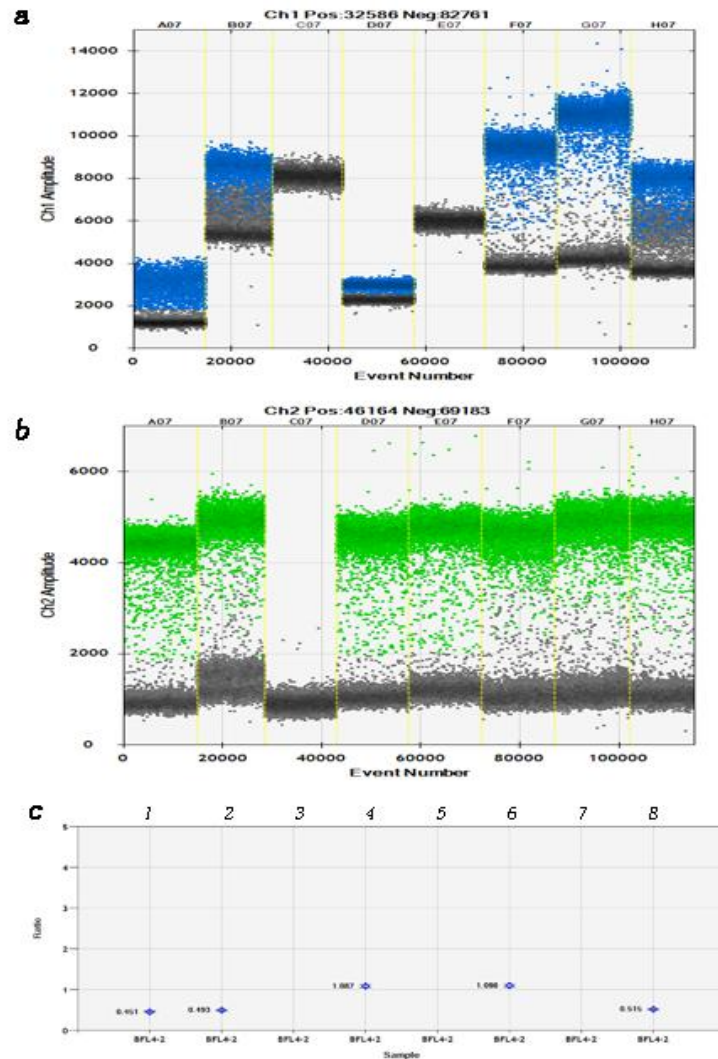


图 43 数字 PCR 引物探针筛选

注：a，BFL4-2 转化体不同引物探针组合 1-D 微滴图；b *zSSIIb* 内标基因 1-D 微滴图；c 为 8 组 BFL4-2 引物探针组合与 *zSSIIb* 内标的拷贝数比值。

表 32 BFL4-2 转化体和 *zSSIIb* 内标基因引物/探针序列信息

检测靶标	引物/探针名称及序列(5'-3')	扩增片段大小	序列来源
------	-------------------	--------	------

		(bp)	
BFL4-2	PE-3-QF1: CGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTG	74 bp	自行设计
	PE-3-QR2: CCTCCGGGACTTTGAAGCTA		
	BFL4-2-QP:FAM-CTAAGCGTCAATTTGTTTACACCAC-BHQ1		
<i>zSSIb</i>	<i>zSSIb</i> -3F: CGGTGGATGCTAAGGCTGATG	88 bp	农业部 1861号 公告 -3-2012
	<i>zSSIb</i> -4R: AAAGGGCCAGGTTTCATTATCCTC		
	<i>zSSIb</i> -P: HEX-TAAGGAGCACTCGCCGCCGCATCTG-BHQ1		

## 8.2 BFL4-2/*zSSIb* 二重微滴数字 PCR 特异性测试

分别以转基因玉米 BFL4-2、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、转基因棉花混合样品、转基因油菜混合样品、非转基因玉米（阴性对照，NTC）、受体玉米的基因组 DNA 和 ddH<sub>2</sub>O（空白对照）为模板，进行 BFL4-2 和 *zSSIb* 二重 ddPCR 扩增，用水做空白对照，测试 BFL4-2 转化体和 *zSSIb* 二重 ddPCR 方法的特异性。

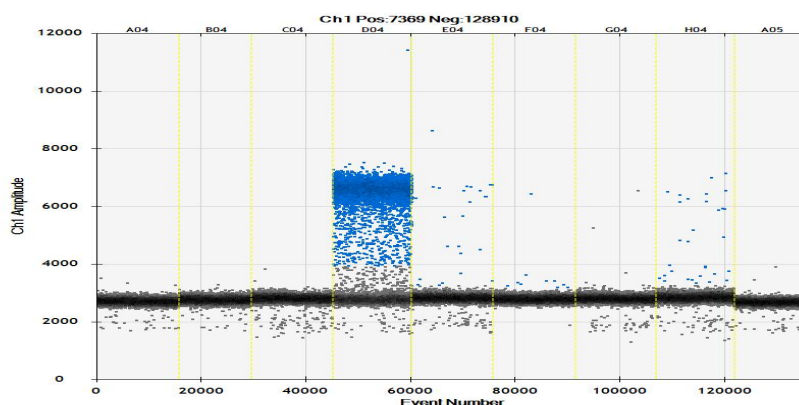


图 44 BFL4-2/*zSSIb* 二重 ddPCR 特异性测试扩增图谱（一维）

注：A04：CK；B04：NTC；C04：受体玉米；D04：转基因玉米 BFL4-2；E04：其他转基因玉米混合样品；F04：转基因大豆混合样品；G04：转基因棉花混合样品；H04：转基因油菜混合样品；A05：转基因水稻混合样品。

结果显示，*zSSIIb* 基因 ddPCR 在玉米样品中扩增得到阳性微滴，在其他作物和空白对照中不能扩增得到阳性微滴；BFL4-2 转化体特异性序列 ddPCR 仅在转基因玉米 BFL4-2 样品中扩增得到阳性微滴，在其他转基因玉米品种和空白对照中不能扩增得到阳性微滴，结果表明 BFL4-2/*zSSIIb* 二重 ddPCR 方法有良好的特异性（图 44）。

### 8.3 BFL4-2/*zSSIIb* 二重数字 PCR 的条件优化

PCR 扩增程序中退火温度的高低对阴阳性微滴区分有显著的影响，本项目设置了 52℃、54℃、56℃、58℃、60℃、62℃五个温度梯度，测试 BFL4-2 和 *zSSIIb* 基因二重 ddPCR 的扩增效果。

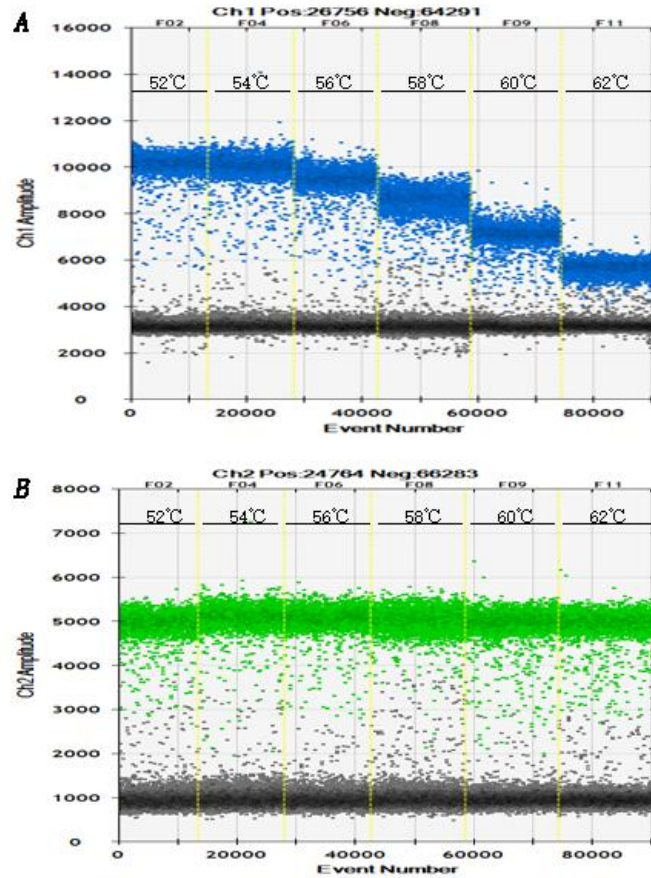


图 45 数字 PCR 引物探针退火温度优化扩增图谱

注：A 为 BFL4-2 玉米转化体特异性序列一维微滴图谱；B 为 *zSSIb* 基因一维微滴图谱。

表 33 数字 PCR 引物探针退火温度优化扩增数据

靶标	退火温度 Tm					
	52°C	54°C	56°C	58°C	60°C	62°C
BFL4-2 拷贝数(copies/ $\mu$ L)	391	429	417	407	412	401
<i>zSSIb</i> 拷贝数(copies/ $\mu$ L)	374	358	376	366	396	370
BFL4-2 转化体/ <i>zSSIb</i> 拷贝数比值 (copies/copies)	1.047	1.198	1.107	1.112	1.039	1.082

数字 PCR 扩增结果显示：扩增图谱中 *zSSIb* 基因和 BFL4-2 转化体特异性序列引物探针在 52°C、54°C、56°C、58°C、60°C、62°C 六个退火温度下，BFL4-2 玉米转化体特异性序列阳性微滴的荧光强度随温度升高在退火温度为 56°C 呈现明显的降低趋势，*zSSIb* 基因阴阳

微滴的荧光强度无显著差异, 阴阳液滴分界清晰, 没有难以界定的“下雨”现象 (图 45); 进一步对测试数据进行分析可以发现, 在 56°C 时, 相同模板测算的拷贝数较高, 且拷贝数比值接近理论值 1.0 (表 34)。因此, 确定 *zSSIb* 基因和 BFL4-2 转化体特异性序列引物探针最优退火延伸温度为 56°C。经过优化后 *zSSIb* 基因和 BFL4-2 转化体特异性序列数字 PCR 扩增程序为: 95°C 预变性 10 min; 94°C 变性 30 s, 56°C 退火延伸 60 s, 共进行 50 个循环; 98°C 变性 10 min, 4°C 保存 (升降温速率 2°C/s)。

由于微滴式数字 PCR 平台 Bio-Rad QX200 需使用专用的扩增试剂, PCR 扩增体系中仅选择引物探针浓度进行优化测试。根据内外标引物探针浓度 1: 1 和内外标引物探针终浓度递增或递减设置了 7 组 *zSSIb* 基因和 BFL4-2 转化体特异性序列引物探针终浓度进行测试 (表 34)。

引物: 探针终浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )  
 zSSIb: 0.4:0.2 0.4:0.2 0.4:0.2 0.3:0.15 0.5:0.25 0.5:0.25 0.3:0.15  
 BFL4-2: 0.4:0.2 0.3:0.15 0.5:0.25 0.4:0.2 0.4:0.2 0.5:0.25 0.3:0.15

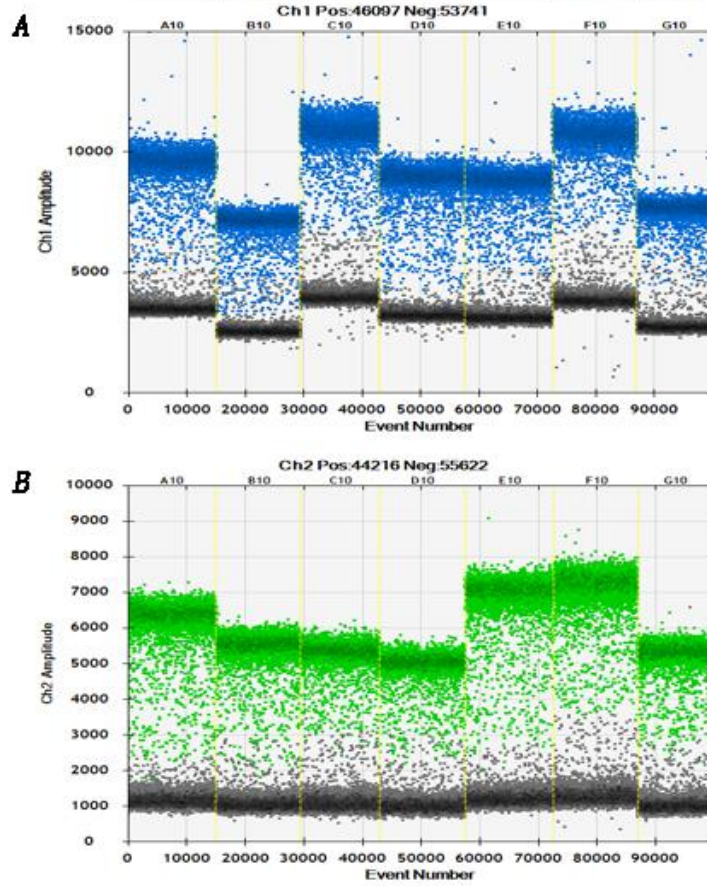


图 46 数字 PCR 引物探针浓度优化扩增图谱

注: A 为 BFL4-2 玉米转化体特异性序列一维微滴图谱; B 为 zSSIb 基因一维微滴图谱。

表 34 数字 PCR 引物探针浓度优化扩增数据

zSSIb 引物: 探针终浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )	0.4:0.2	0.4:0.2	0.4:0.2	0.3:0.15	0.5:0.25	0.5:0.25	0.3:0.15
BFL4-2 引物: 探针终浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )	0.4:0.2	0.3:0.15	0.5:0.25	0.4:0.2	0.4:0.2	0.5:0.25	0.3:0.15
zSSIb 基因拷贝数测量值	691	720	672	688	681	691	673
BFL4-2 玉米特异性序列拷贝数测量值	719	763	720	741	717	732	708
BFL4-2: zSSIb 拷贝数平均值比值	1.04	1.06	1.07	1.08	1.05	1.06	1.05

数字 PCR 扩增结果显示：扩增图谱中 *zSSIb* 基因和 BFL4-2 转化体特异性序列在不同的引物探针浓度下，微滴的荧光强度存在较显著差异，随着引物探针浓度增加，阳性微滴信号出现升高，而随着引物探针浓度降低，阳性微滴信号也会出现降低（图 46）。结合不同引物探针浓度组合时 BFL4-2 和 *zSSIb* 基因拷贝数比值的进一步对测试数据分析发现，在 *zSSIb* 基因和 BFL4-2 转化体特异性序列引物探针终浓度分别为 0.4: 0.2  $\mu\text{mol/L}$  和 0.4: 0.2  $\mu\text{mol/L}$  时，拷贝数比值最接近理论值 1.0（表 34）。因此，确定 *zSSIb* 基因和 BFL4-2 转化体特异性序列最优引物：探针终浓度分别为 0.4: 0.2  $\mu\text{mol/L}$  和 0.4: 0.2  $\mu\text{mol/L}$ 。经过优化后 *zSSIb* 基因和 BFL4-2 转化体特异性序列数字 PCR 扩增体系如表 35 所示。

表 35 数字 PCR 扩增体系

组分	体积
ddH <sub>2</sub> O	4.0 $\mu\text{L}$
2 $\times$ ddPCR <sup>TM</sup> Supermix for Probes	10.0 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 内标上游引物 <i>zSSIb</i> -3F	0.8 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 内标下游引物 <i>zSSIb</i> -4R	0.8 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 内标探针 <i>zSSIb</i> -P	0.4 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 转化体上游引物 BFL4-2-qF	0.8 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 转化体上游引物 BFL4-2-qR	0.8 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 转化体探针 BFL4-2-qP	0.4 $\mu\text{L}$
DNA 模板	2.0 $\mu\text{L}$
总体积	20.0 $\mu\text{L}$

## 8.4 BFL4-2/*zSSIb* 二重 ddPCR 的 LOD、LOQ 和动力学范围测试

微滴式数字 PCR 的理论有效线性范围是 1~100000 个拷贝，实际测试时，20  $\mu\text{L}$  反应液在微滴生成仪中一般生成 10000~20000 个有效微滴，微滴数大于 10000 为有效反应。为了测试 *zSSIb* 基因和 BFL4-2 转化体特异性序列数字 PCR 方法的线性范围，将 100  $\text{ng}/\mu\text{L}$  的纯合 BFL4-2 玉米基因组 DNA 进行梯度稀释制作成 10 个浓度的标准品，按确定的扩增条件进行 *zSSIb* 基因和 BFL4-2 转化体特异性序列数字 PCR 扩增，每个标准品扩增设置 4 个平行。根据标准品数字 PCR 测量值及初始模板拷贝数分别绘制 *zSSIb* 基因和 BFL4-2 转化体特异性序列的线性回归曲线进行线性范围分析，对 4 个平行间 *zSSIb* 基因和 BFL4-2 转化体特异性序列测量值以及拷贝数比值的标准偏差和相对标准偏差进行数据统计，评价 *zSSIb* 基因和 BFL4-2 转化体特异性序列数字 PCR 方法的重复性。根据《转基因植物及其产品成分检测 数字 PCR 方法制定指南》（农业农村部公告第 323 号—21—2020）中定量检测的要求，在整个线性动态范围内，线性度即线性回归方程的决定系数  $R^2$  一般应  $\geq 0.98$ ，正确度偏差 (*Bias*) 不超过标称值的 25%，精密度即重复性相对标准偏差 (*RSD*) 一般应  $\leq 25\%$ 。

表 36 BFL4-2 玉米特异性序列数字 PCR 线性动态范围与重复性分析

Target	Expected concentration (copies)	Copy number concentration (copies)						
		Rep1	Rep2	Rep3	Mean	SD	RSD (%)	Bias (%)

Target	Expected concentration (copies)	Copy number concentration (copies)						
		Rep1	Rep2	Rep3	Mean	SD	RSD (%)	Bias (%)
BFL4-2 copy number	15000	14460	14260	14180	14300.00	144.22	1.01	-4.67
	3000	2910	2910	2800	2873.33	63.51	2.21	-4.22
	600	503	525	561	529.67	29.28	5.53	-11.72
	120	92	94	107	97.67	8.14	8.34	-18.61
	24	16	18	18	17.33	1.15	6.66	-27.78
	12	3.5	16	10	9.83	6.25	63.58	-18.06
	6	12	14	9	11.67	2.52	21.57	94.44
<i>zSSIIB</i> copy number	15000	13030	12630	12890	12850.00	202.98	1.58	-14.33
	3000	2710	2660	2540	2636.67	87.37	3.31	-12.11
	600	518	476	508	500.67	21.94	4.38	-16.56
	120	79	95	76	83.33	10.21	12.26	-30.56
	24	12	14	20	15.33	4.16	27.15	-36.11
	12	5	18	14	12.33	6.66	53.99	2.78
	6	10	10	6	8.67	2.31	26.65	44.44
Target	Expected BFL4-2 concentration (copies)	Rep1	Rep2	Rep3	Mean	SD	RSD (%)	Bias (%)
BFL4-2/ <i>zSSIIB</i> ratio	15000	1.11	1.13	1.10	1.11	0.01	1.33	11.30
	3000	1.07	1.09	1.10	1.09	0.01	1.35	9.00
	600	0.97	1.10	1.10	1.06	0.08	7.23	5.94
	120	1.16	0.99	1.41	1.19	0.21	17.70	18.73
	24	1.33	1.29	0.90	1.17	0.24	20.26	17.30
	12	0.70	0.89	0.71	0.77	0.11	13.70	-23.23
	6	1.20	1.40	1.50	1.37	0.15	11.18	36.67

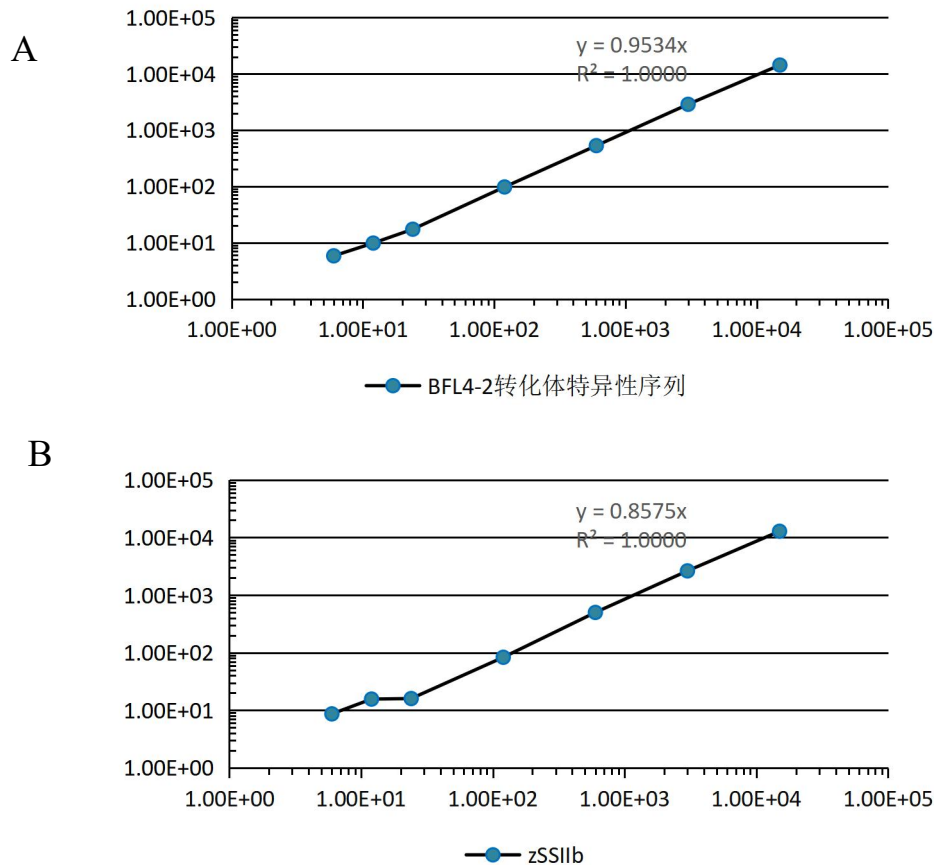


图 47 BFL4-2/zSSIIB 二重数字 PCR 方法线性动态范围测试

注：A 为 BFL4-2 转化体特异性序列拷贝数测量值与预期值的线性回归方程（y 代表拷贝数测量值，x 代表拷贝数预期值）；B 为 zSSIIB 基因拷贝数测量值与预期值的线性回归方程（y 代表拷贝数测量值，x 代表拷贝数预期值）。

结果显示：当 20  $\mu$ L 扩增体系中 BFL4-2 转化体特异性序列和 zSSIIB 基因拷贝数在 6~15000 copies 之间时，随着拷贝数的降低，4 个重复间正确度偏差（Bias）和重复性相对标准偏差（RSD）升高，但均小于 25%，当模板量为 24 拷贝时，正确度偏差（Bias）和重复性相对标准偏差（RSD）出现大于 25% 的情况，因此定量极限（LOQ）确定为 48 个拷贝（BFL4-2 转化体特异性序列），检测极限（LOD）确定为 20 拷贝（BFL4-2 转化体特异性序列）（表 36）；BFL4-2 转化体特异性序列和 zSSIIB 基因微滴数字 PCR 获得的拷贝数浓度测量

值与预期值具有良好的相关性，线性回归方程分别为  $y=0.9534x$  和  $y=0.8575x$ ，决定系数  $R^2$  值均为 1.0000，BFL4-2 转化体特异性序列和 *zSSIIb* 基因拷贝数比值在 0.5 附近波动（图 47）。BFL4-2/*zSSIIb* 二重数字 PCR 方法线性动态范围测试结果表明，20  $\mu\text{L}$  扩增体系中，当模板量在 BFL4-2 转化体特异性序列 48~15000 拷贝的范围内，可获得准确的拷贝数浓度和拷贝数比值测量值。

### 8.5 BFL4-2/*zSSIIb* 二重 ddPCR 的测量准确性

以梯度稀释的 BFL4-2 基因组 DNA 为模板进行 BFL4-2 转化体和内标基因的数字 PCR 扩增，每个模板重复 4 次反应。统计 4 个重复间测量值的标准偏差和相对标准偏差（表 37）。依据《农业部 323 号公告-21-2020 转基因植物及其产品成分检测 数字 PCR 方法制定指南》，对建立的数字 PCR 方法在实验室内进行确认，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采纳的标准值之间的接近程度，且偏差（Bias）不能超过标准值的 25%，即  $|\text{Bias}| \leq 25\%$ ；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  $\leq 25\%$ 。

对本项目的数字 PCR 结果分析发现，5%、1%、0.1% 浓度梯度稀释的 3 个样品拷贝数多次测试的偏差  $|\text{Bias}|$  依次为 2.25%、5.75%、8.75%，相对标准偏差 RSD 依次为 2.57%、5.26%、10.19%，均小于 25%；3 个样品拷贝数比值多次测试的偏差  $|\text{Bias}|$  依次为 -1.79%、2.75%、

11.24%，相对标准偏差 RSD 依次为 1.93%、5.25%、8.58%，均小于 25%。结果表明 BFL4-2 数字 PCR 方法具有良好的正确度和精密度，重复间测量结果稳定、可靠。

表 37 玉米 BFL4-2 转化体和内标基因 *zSSIb* 的测量结果稳定性分析

预期值		重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	平均值	SD	RSD(%)	Bias(%)
5% (1000 copies/ $\mu$ L)	BFL4-2 转 化体	1060	1020	1000	1010	1022.5	26.30	2.57	2.25
	内标基因 <i>zSSIb</i>	21020	20890	20420	20960	20822.5	273.54	1.31	/
	比值 (%)	5.04	4.88	4.90	4.82	4.91	0.09	1.93	-1.79
1% (200 copies/ $\mu$ L)	BFL4-2 转 化体	216	208	224	198	211.5	11.12	5.26	5.75
	内标基因 <i>zSSIb</i>	21070	20960	20280	20040	20587.5	505.26	2.45	/
	比值 (%)	1.03	0.99	1.10	0.99	1.03	0.05	5.25	2.75
0.1% (20 copies/ $\mu$ L)	BFL4-2 转 化体	23	19	21	24	21.75	2.22	10.19	8.75
	内标基因 <i>zSSIb</i>	19880	18930	19650	19670	19532.5	414.92	2.12	/
	比值 (%)	0.12	0.10	0.11	0.12	0.11	0.01	8.58	11.24

BFL4-2/*zSSIb* 二重 ddPCR 扩增引物探针采用自行设计的实时荧光 PCR 方法引物探针 (表 32)。BFL4-2/*zSSIb* 二重 ddPCR 扩增体系见表 38，扩增程序为：95°C 预变性 10 min；94°C 变性 30 s，56°C 退火延伸 60 s，共进行 50 个循环；98°C 变性 10 min，4°C 保存 (升降温速率 2°C/s)。

表 38 数字 PCR 扩增体系

组分	终浓度	体积
ddH <sub>2</sub> O		4.0 $\mu$ L
2 $\times$ ddPCR <sup>TM</sup> Supermix for Probes	1 $\times$	10.0 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 内标上游引物 <i>zSSIb</i> -QF	0.4 $\mu$ mol/L	0.8 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 内标下游引物 <i>zSSIb</i> -QR	0.4 $\mu$ mol/L	0.8 $\mu$ L

10 $\mu\text{mol/L}$ 内标探针 <i>zSSIb</i> -QP	0.2 $\mu\text{mol/L}$	0.4 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 转化体上游引物 BFL4-2-qF	0.4 $\mu\text{mol/L}$	0.8 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 转化体上游引物 BFL4-2-qR	0.4 $\mu\text{mol/L}$	0.8 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 转化体探针 BFL4-2-qP	0.2 $\mu\text{mol/L}$	0.4 $\mu\text{L}$
25 mg/L DNA 模板	2.5 mg/L	2.0 $\mu\text{L}$
总体积		20.0 $\mu\text{L}$

扩增体系可根据仪器及试剂耗材的实际使用情况，进行相应调整。此表是 1 个扩增体系的体积，应按照实际反应数量进行扩增体系配置。空白质控品以 2.0  $\mu\text{L}$  的 ddH<sub>2</sub>O 作模板。

## 9. LW2-1/*zSSIb* 二重数字 PCR 方法

### 9.1 引物探针确认

LW2-1 是隆平生物研发已获得安全证书的一种转基因耐除草剂玉米转化体，对草甘膦和草铵膦均具有耐受性，其转化体分子特征由隆平生物公司解析。首先对获得转基因材料的分子特征进行验证，确定转基因材料的转化体身份。LW2-1 转化体特异性引物探针和玉米内标准基因 *zSSIb* 引物探针选用已发布的标准方法（农业农村部公告第 1012 号—4—2026）中的实时荧光 PCR 方法引物探针。

表 39 LW2-1 转化体特异性引物和探针序列

靶标	引物/探针名称及序列 (5'-3')	扩增片段大小 (bp)	来源
<i>zSSIb</i> 基因	<i>zSSIb</i> -3F: CGGTGGATGCTAAGGCTGATG	88	农业农村部公告第 1012 号—4—2026
	<i>zSSIb</i> -4R: AAAGGGCCAGGTTCATTATCCTC		
	<i>zSSIb</i> -P:HEX-TAAGGAGCACTCGCCGCCGCATCTG-BHQ1		
LW2-1 转化体	LW2-1-qF: TCTTAAACCCACCTTACATACTGA	86	6
	LW2-1-qR: CGTGACTCCCTTAATTCTCCG		
	LW2-1-qP: FAM-CAGATTGTCGTTCCCGCCTTC -BHQ1		

在伯乐微滴式数字 PCR 平台 QX200 上，用通用的 PCR 反应体系（引物/探针浓度 400/200 nM）和退火温度（58℃），以 LW2-1 杂合体基因组 DNA 为模板，分别进行单重数字 PCR、LW2-1 转化体/zSSIIb 基因的二重 ddPCR 扩增，对表 39 中的引物探针组合进行测试，设 3 个平行反应。

结果显示，单重数字 PCR、LW2-1 转化体和 zSSIIb 基因二重微滴式数字 PCR 的阴性微滴和阳性微滴分界清晰，LW2-1 转化体和 zSSIIb 基因拷贝数比值接近 0.5，符合杂合体 LW2-1 玉米分子特征。综上，确认表 39 的引物探针适用 LW2-1 转化体/zSSIIb 基因的二重 ddPCR 扩增。

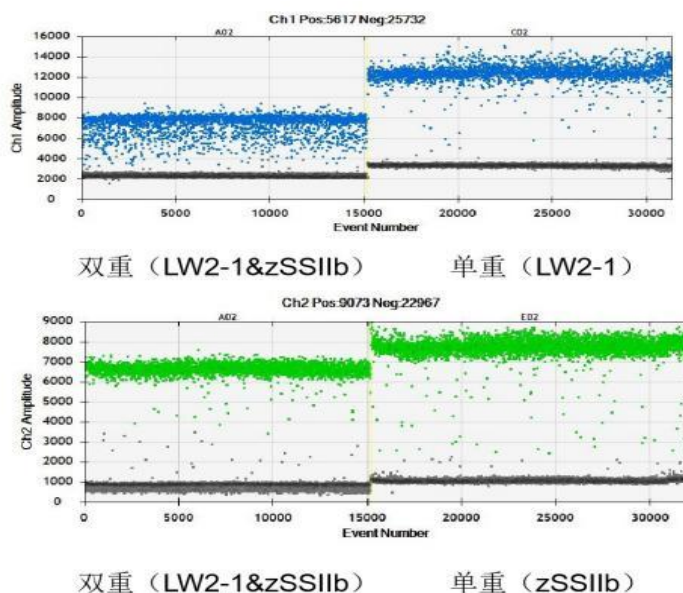


图 48 数字 PCR 引物探针确认

## 9.2 LW2-1/*zSSIb* 二重微滴数字 PCR 特异性测试

用转基因玉米 LW2-1、其他转基因玉米混合样、转基因水稻混合样、转基因大豆混合样、转基因油菜混合样、转基因棉花混合样、非转基因玉米基因组 DNA 作模板进行 LW2-1 和 *zSSIb* 二重 ddPCR 扩增，用水做空白对照，测试 LW2-1 转化体和 *zSSIb* 二重 ddPCR 方法的特异性。

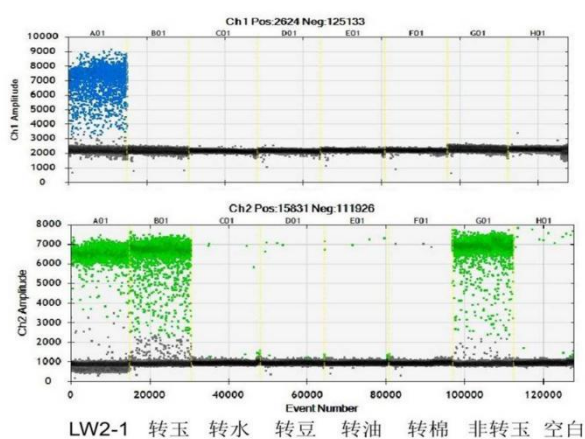


图 49 LW2-1/*zSSIb* 二重 ddPCR 特异性测试扩增图谱

结果显示，*zSSIb* 基因 ddPCR 在玉米样品中扩增得到阳性微滴，在其他作物和空白对照中不能扩增得到阳性微滴 LW2-1 转化体特异性序列 ddPCR 仅在转基因玉米 LW2-1 样品中扩增得到阳性微滴，在其他转基因玉米品种和空白对照中不能扩增得到阳性微滴，结果表明 LW2-1/*zSSIb* 二重 ddPCR 方法有良好的特异性（图 49）。

### 9.3 LW2-1 转化体特异性数字 PCR 的条件优化

PCR 扩增程序中退火温度的高低对阴阳性微滴区分有显著的影响，本项目设置了 52°C、52.7°C、54°C、55.9°C、58.4°C、60.3°C、61.4°C、62°C 共 8 个温度梯度，测试 LW2-1 和 *zSSIIb* 基因二重 ddPCR 的扩增效果。

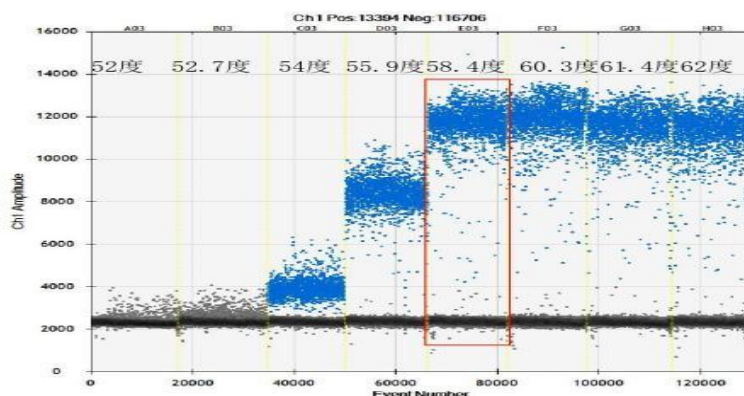


图 50 数字 PCR 引物探针退火温度优化扩增图谱

数字 PCR 扩增结果显示：扩增图谱中 LW2-1 玉米转化体特异性序列阳性微滴的荧光强度在 52°C、52.7°C、54°C、55.9°C、58.4°C 随温度升高呈现升高趋势，在 58.4°C、60.3°C、61.4°C、62°C 温度荧光强度无显著差异，阴阳液滴分界清晰，没有难以界定的“下雨”现象（图 50）；进一步对荧光强度、阴阳液滴分界综合分析可以发现，在 58.4°C 时结果最佳。因此，LW2-1 转化体特异性序列引物探针最优退火延伸温度为 58.4°C。经过优化后 LW2-1 转化体特异性序列数字 PCR 扩增程序为：95°C 预变性 10 min；94°C 变性 30 s，58°C 退火延伸 60 s，共进行 50 个循环；98°C 变性 10 min，4°C 保存（升降温速率 2°C/s）。

由于微滴式数字 PCR 平台 Bio-Rad QX200 需使用专用的扩增试剂，PCR 扩增体系中仅选择引物探针浓度进行优化测试。实时荧光 PCR 方法中常用引物与探针终浓度分别为 0.5  $\mu\text{mol/L}$  和 0.25  $\mu\text{mol/L}$ ，Bio-Rad 2 $\times$ ddPCRTM Supermix for Probes 的说明书引物与探针的终浓度分别为 0.9  $\mu\text{mol/L}$  和 0.25  $\mu\text{mol/L}$ 。参考上述引物探针终浓度设置了 16 组（见表 40）对 LW2-1 转化体特异性序列引物/探针终浓度进行测试。

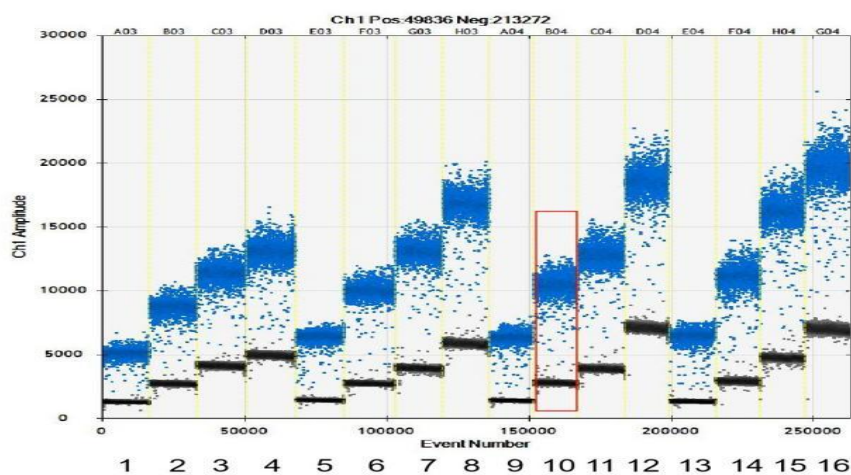


图 51 数字 PCR 引物探针终浓度优化扩增图谱

表 40 数字 PCR 引物探针浓度优化设置及扩增数据

序号	引物/探针终浓度 ( $\mu\text{mol}$ )	引物/探针用量 ( $\mu\text{L}$ )	拷贝数测量平均值
1	250/250/125	0.5/0.5/0.25	5020
2	250/250/250	0.5/0.5/0.5	5100
3	250/250/375	0.5/0.5/0.75	5100
4	250/250/500	0.5/0.5/1.0	5120
5	375/375/125	0.75/0.75/0.25	5040
6	375/375/250	0.75/0.75/0.5	4780
7	375/375/375	0.75/0.75/0.75	4800
8	375/375/500	0.75/0.75/1.0	4920
9	500/500/125	1.0/1.0/0.25	5040
10	500/500/250	1.0/1.0/0.5	5080

11	500/500/375	1.0/1.0/0.75	5000
12	500/500/500	1.0/1.0/1.0	4600
13	750/750/125	1.5/1.5/0.25	4940
14	750/750/250	1.5/1.5/0.5	5020
15	750/750/375	1.5/1.5/0.75	4580
16	750/750/500	1.5/1.5/1.0	4900

数字 PCR 扩增结果显示：扩增图谱中 LW2-1 转化体特异性序列在不同的引物探针浓度下，微滴的荧光强度存在较显著差异，随着引物探针浓度升高，阳性微滴信号出现升高，在 LW2-1 转化体特异性序列引物/探针终浓度分别为 0.5: 0.5: 0.25  $\mu\text{mol/L}$  时，扩增图谱阴阳液滴分界更清晰，没有难以界定的“下雨”现象（图 51）；因此，确定 LW2-1 转化体特异性序列最优引物、探针终浓度分别为 0.5: 0.5: 0.25  $\mu\text{mol/L}$ 。经过优化后 LW2-1 转化体特异性序列数字 PCR 扩增体系如表 41 所示。

表 41 数字 PCR 扩增体系

组分	体积
ddH <sub>2</sub> O	3.0 $\mu\text{L}$
2 $\times$ ddPCR <sup>TM</sup> Supermix for Probes	10.0 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 内标上游引物 zSSIIb-3F	1.0 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 内标下游引物 zSSIIb-4R	1.0 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 内标探针 zSSIIb-P	0.5 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 转化体上游引物 LW2-1-qF	1.0 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 转化体上游引物 LW2-1-qR	1.0 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 转化体探针 LW2-1-qP	0.5 $\mu\text{L}$
DNA 模板	2.0 $\mu\text{L}$
总体积	20.0 $\mu\text{L}$

## 9.4 LOD、LOQ 和动力学范围测试

为了测试 LW2-1 转化体特异性序列数字 PCR 方法的线性范围，将 LW2-1 的杂合基因组 DNA 进行梯度稀释，获得拷贝数为 40000、8000、1600、320、40、20、10、5、2、1 拷贝/反应进行数字 PCR 扩增。根据标准品数字 PCR 测量值及初始模板拷贝数绘制 LW2-1 转化体特异性序列的线性回归曲线进行线性范围，按照《转基因植物及其产品成分检测 数字 PCR 方法制定指南》（农业农村部公告第 323 号—21—2020）中定量检测的要求，在整个线性动态范围内，线性度即线性回归方程的决定系数  $R^2$  一般应  $\geq 0.98$ ，正确度偏差（Bias）不超过标称值的 25%，精密度即重复性相对标准偏差（RSD）一般应  $\leq 25\%$ 。

表 42 玉米特异性序列数字 PCR 线性动态范围与重复性分析

LW2-1 拷贝数	LW2-1 转化体											
	Repeat-1			Repeat-2			Repeat-3			平均	RSD	Bias
	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
40000	42640	45120	41800	41040	44720	44240	41920	42560	42080	42902.22	3.16	7.26%
8000	7160	6720	6960	7240	6880	6600	7680	6920	6720	6986.67	4.48	-12.67%
1600	1628	1520	1680	1440	1640	1560	1840	1760	1560	1625.33	7.15	1.58%
320	328	360	300	320	344	360	256	336	320	324.89	9.39	1.53%
40	44	66	68	52	60	56	58	76	48	58.67	17.82	18.89%
20	40	20	24	44	18	16	50	20	14	27.33	46.66	36.67%
10	6	17	15	5	8	31	17	7	12	13.11	58.80	31.11%

结果显示：当 20  $\mu$ L 扩增体系中 LW2-1 转化体特异性序列拷贝数分别在 40~40000 copies 时，随着拷贝数的降低，3 次重复测试的正

准确度偏差 (Bias) 和重复性相对标准偏差 (RSD) 均小于 25%，当模板量为 20 拷贝时，准确度偏差 (Bias) 和重复性相对标准偏差 (RSD) 出现大于 25% 的情况，因此定量极限 (LOQ) 确定为 40 个拷贝 (LW2-1 转化体特异性序列)；当 DNA 浓度低至 10 拷贝 (LW2-1 转化体特异性序列) 时，3 次重复测试的 9 个平行均检测到阳性信号，因此检测极限 (LOD) 确定为 10 拷贝。LW2-1 数字 PCR 方法线性动态范围测试结果表明，20  $\mu$ L 扩增体系中，当模板量在 LW2-1 转化体特异性序列 40~40000 拷贝的范围内，可获得准确的拷贝数浓度和拷贝数比值测量值。

## 9.5 准确性测试

配制 5.0%、3.0%、1.0%、0.5%、0.1% 共 5 个拷贝数分数的 LW2-1 盲样，由不同操作者在不同日期进行 3 次重复测定，每次 3 个平行。测定结果如表 43、表 44 所示，测量平均值与预期值的相对偏倚 (Bias) 均在  $\pm 25\%$  以内，三次测定的 RSD 均小于 25%，表明方法具有良好的准确性和可重复性。

表 43 5 个盲样的测量结果

重复	PCR 平行	盲样含量测量值				
		S1 (5%)	S2 (3%)	S3 (1%)	S4 (0.5%)	S5 (0.1%)
1	1	5.33	3.65	0.85	0.44	0.10
	2	6.23	2.75	0.97	0.59	0.09
	3	4.44	3.52	0.88	0.62	0.14
2	1	5.35	2.90	1.09	0.58	0.13
	2	5.05	2.84	0.96	0.55	0.12
	3	5.03	2.97	0.93	0.56	0.09

3	1	5.64	3.55	1.04	0.56	0.09
	2	4.81	2.75	1.02	0.42	0.15
	3	4.79	3.01	0.95	0.53	0.08

表 44 5 个盲样定量结果的重复性和重现性统计分析

盲样	预期拷贝数比值(%)	测量平均值(%)	S <sup>r</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	S <sup>R</sup> (%)	RSD <sub>R</sub> (%)	Bias(%)
S1	5	5.19	0.60	11.51	0.60	11.51	4.25
S2	3	3.10	0.37	11.87	0.37	11.87	3.31
S3	1	0.97	0.07	6.91	0.08	8.17	-3.53
S4	0.5	0.54	0.07	13.11	0.07	13.11	0.07
S5	0.1	0.11	0.03	26.59	0.03	26.59	10.80

二重 ddPCR 的定量结果如表 43 所示，计算得到 5 个盲样 LW2-1/zSSIIb 拷贝数比值的平均值，统计测量结果的重复性相对标准差 (RSD<sub>r</sub>)、重现性相对标准差 (RSD<sub>R</sub>)、和相对偏倚 (Bias)。结果显示，测量平均值均接近预期含量，与预期值的相对偏倚在±25%的可接受范围内；高浓度样品重复性相对标准偏差 RSD<sub>r</sub> 和再现性相对标准偏差 RSD<sub>R</sub> 均小于 25%，但转基因含量低至 0.1% 时，RSD<sub>r</sub> 和 RSD<sub>R</sub> 超过了 25%，但小于 30% (表 44)。已建立的 LW2-1/zSSIIb 二重 ddPCR 实现了对样品中 LW2-1 转化体含量的准确定量，具有良好的重复性和重现性。

## 9.6 结论

LW2-1/zSSIIb 二重 ddPCR 扩增引物探针采用已发布的标准方法 (农业农村部公告第 1012 号—4—2026) 中的实时荧光 PCR 方法引物探针 (表 39)。LW2-1/zSSIIb 二重 ddPCR 扩增体系见表 41，扩

增程序为：95℃预变性 10 min；94℃变性 30 s，58℃退火延伸 60 s，共进行 50 个循环；98℃变性 10 min，4℃保存（升降温速率 2℃/s）。

## 10. WYN17132/*zSSIIb* 二重数字 PCR 方法

### 10.1 引物探针确认

WYN17132 是浙江新安化工集团股份有限公司研发，利用农杆菌介导法转化普通栽培玉米 4125-2 获得。该转基因玉米引入了草甘膦抗性基因 *am79 epsps*，对草甘膦高抗，可以满足玉米种植者对田间杂草的有效防治，具有较好的农艺性状和商业化潜力。首先对获得转基因材料的分子特征进行测序验证，确定转基因材料的转化体身份。WYN17132 转化体特异性引物探针和玉米内标准基因 *zSSIIb* 引物探针选用已发布的标准方法（农业农村部公告第 1012 号-8-2026）中的实时荧光 PCR 方法引物探针。

表 45 WYN17132 转化体特异性引物和探针序列

靶标	引物/探针名称及序列 (5'-3')	扩增片段大小 (bp)	来源
<i>zSSIIb</i> 基因	<i>zSSIIb</i> -3F: CGGTGGATGCTAAGGCTGATG	88	农业农村部公告第 1012 号—8—2026
	<i>zSSIIb</i> -4R: AAAGGGCCAGGTTTCATTATCCTC		
	<i>zSSIIb</i> -P: HEX-TAAGGAGCACTCGCCGCCGCATCTG-BHQ1		
WYN17132 转化体	17132-qF: ACAAATAGGGTGTGGCTGTT	145	
	17132-qR: AACGTCCGCAATGTGTTATTAAG		
	17132-qP: FAM-CAGCGTCTCGTACCGGTTTCGTTT-BHQ1		

在伯乐微滴式数字 PCR 平台 QX200 上，用通用的 PCR 反应体系（引物/探针浓度 400/200 nM）和退火温度（58°C），以 WYN17132 基因组 DNA 为模板，进行 WYN17132 转化体/*zSSIb* 基因的二重 ddPCR 扩增，对表 45 中的引物探针组合进行测试，设 3 个平行反应。

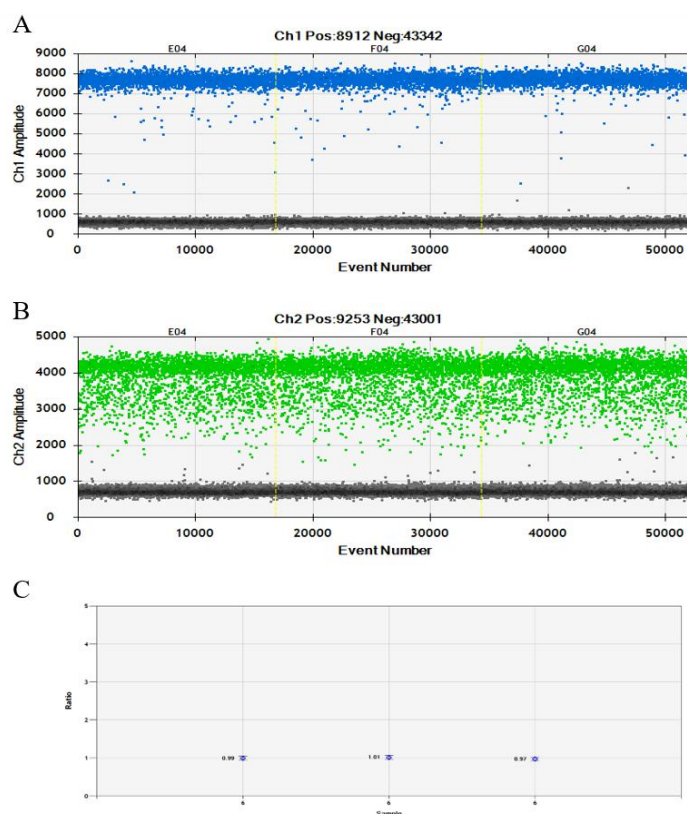


图 52 数字 PCR 引物探针确认

注：A 为 WYN17132 玉米转化体特异性序列一维微滴图谱；B 为 *zSSIb* 基因一维微滴图谱，C 为 WYN17132 转化体和 *zSSIb* 基因拷贝数比值。

结果显示，WYN17132 转化体和 *zSSIb* 基因二重微滴式数字 PCR 的一维微滴图谱的阴性微滴和阳性微滴分界清晰，“雨滴”较少（图 52A, B）；WYN17132 转化体和 *zSSIb* 基因拷贝数比值接近 1.0，符

合 WYN17132 玉米分子特征（图 52C）。综上，确认表 45 的引物探针适用于 WYN17132 转化体/*zSSIIb* 基因的二重 ddPCR 扩增。

## 10.2 WYN17132/*zSSIIb* 二重微滴数字 PCR 特异性测试

用转基因玉米 WYN17132、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）、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）、转基因水稻混合样（TT51-1、KF-6、KMD-1、M12、KF-8、KF-2、G6H1、T1C-19）、转基因油菜混合样（MS1、MS8、RF1、RF2、RF3、T45、Oxy-235、Topas19/2、MON88302、73496）、转基因棉花混合样（MON1445、MON531、MON15985、LLCOTTON25、MON88913、GHB614、COT102）、非转基因玉米基因组 DNA 作为模板进行 WYN17132 和 *zSSIIb* 二重 ddPCR 扩增，用水做空白对照，测试 WYN17132 转化体和 *zSSIIb* 二重 ddPCR 方法的特异性。

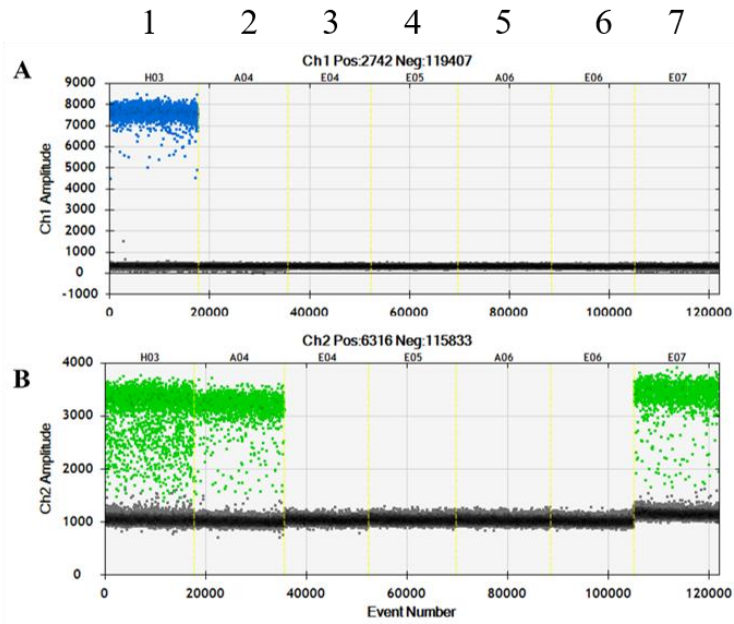


图 53 WYN17132/*zSSIb* 二重 ddPCR 特异性测试扩增图谱

注：A 为 WYN17132 转化体特异性序列；B 为 *zSSIb* 基因；1 为转基因玉米 WYN17132，2 为其他转基因玉米混合样，3 为转基因大豆混合样，4 为转基因水稻混合样，5 为转基因油菜混合样，6 为转基因棉花混合样，7 为非转基因玉米。

结果显示，*zSSIb* 基因 ddPCR 在玉米样品中扩增得到阳性微滴，在其他作物和空白对照中均不能扩增得到阳性微滴；WYN17132 转化体特异性序列 ddPCR 仅在转基因玉米 WYN17132 样品中扩增得到阳性微滴，在其他转基因玉米品种和空白对照中均不能扩增得到阳性微滴，结果表明 WYN17132/*zSSIb* 二重 ddPCR 方法有良好的特异性(图 53)。

### 10.3 WYN17132/*zSSIb* 二重数字 PCR 的条件优化

PCR 扩增程序中退火温度的高低对阴阳性微滴区分有显著的影响，本项目设置了 54°C、56°C、58°C、60°C、62°C 五个温度梯度，测试 WYN17132 和 *zSSIb* 基因二重 ddPCR 的扩增效果。

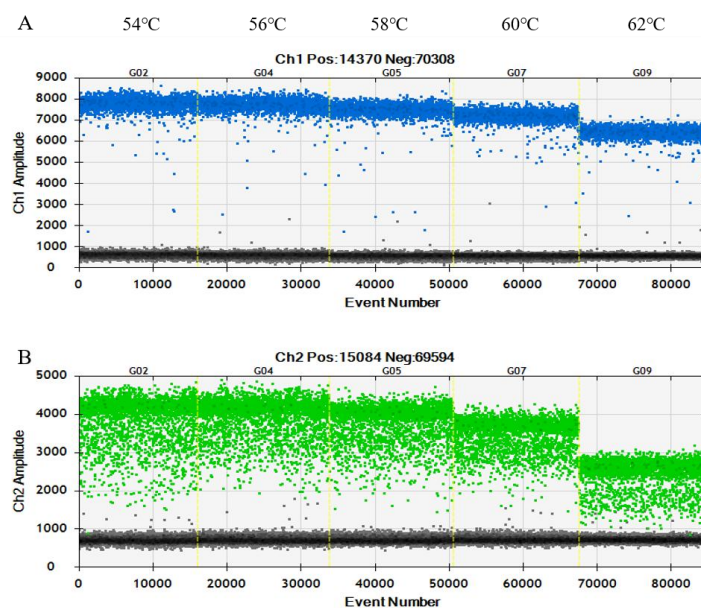


图 54 数字 PCR 引物探针退火温度优化扩增图谱

注：A 为 WYN17132 玉米转化体特异性序列一维微滴图谱；B 为 *zSSIb* 基因一维微滴图谱。

表 46 数字 PCR 引物探针退火温度优化扩增数据分析

靶标	<i>zSSIb</i> 基因				WYN17132 玉米特异性序列				WYN17132: <i>zSSIb</i> 拷贝数 平均值比值
	拷贝数 测量值	平均值	标准差 SD	相对标 准偏差 RSD	拷贝数 测量值	平均值	标准差 SD	相对标 准偏差 RSD	
54	11520	11395	176.78	1.55%	10890	11075	261.630	2.36%	0.97
	11270				11260				
56	12350	12245	148.49	1.21%	12170	12180	14.142	0.12%	0.99
	12140				12190				
58	12130	12240	155.56	1.27%	12090	12120	42.426	0.35%	0.99
	12350				12150				

靶标	<i>zSSIb</i> 基因				WYN17132 玉米特异性序列				WYN17132: <i>zSSIb</i> 拷贝数 平均值比值
	拷贝数 测量值	平均值	标准差 SD	相对标 准偏差 <i>RSD</i>	拷贝数 测量值	平均值	标准差 SD	相对标 准偏差 <i>RSD</i>	
60	12310	12200	155.56	1.28%	12250	12345	134.350	1.09%	1.01
	12090				12440				
62	11860	11995	190.92	1.59%	12340	12275	91.924	0.75%	1.02
	12130				12210				

数字 PCR 扩增结果显示：扩增图谱中 *zSSIb* 基因和 WYN17132 转化体特异性序列引物探针在 54°C、56°C、58°C、60°C、62°C 五个退火温度下，WYN17132 玉米转化体特异性序列和 *zSSIb* 基因阳性微滴的荧光强度随温度升高呈现降低趋势，阴阳液滴分界清晰，没有难以界定的“下雨”现象（图 55）；进一步对测试数据进行分析可以发现，在 56°C 时，拷贝数比值最接近理论值 1.0，*RSD* 较小（表 46）。因此，确定 *zSSIb* 基因和 WYN17132 转化体特异性序列引物探针最优退火延伸温度为 56°C。经过优化后 *zSSIb* 基因和 WYN17132 转化体特异性序列数字 PCR 扩增程序为：95°C 预变性 10 min；94°C 变性 30 s，56°C 退火延伸 60 s，共进行 40 个循环；98°C 变性 10 min，4°C 保存（升降温速率 2°C/s）。

由于微滴式数字 PCR 平台 Bio-Rad QX200 需使用专用的扩增试剂，PCR 扩增体系中仅选择引物探针浓度进行优化测试。实时荧光 PCR 方法中常用引物与探针终浓度分别为 0.4  $\mu\text{mol/L}$  和 0.2  $\mu\text{mol/L}$ ，Bio-Rad 2 $\times$ ddPCR<sup>TM</sup> Supermix for Probes 的说明书引物与探针的终浓度分别为 0.9  $\mu\text{mol/L}$  和 0.25 nmol/L。参考上述引物探针终浓度设置

了 4 组 *zSSIb* 基因和 WYN17132 转化体特异性序列引物：探针终浓度进行测试。

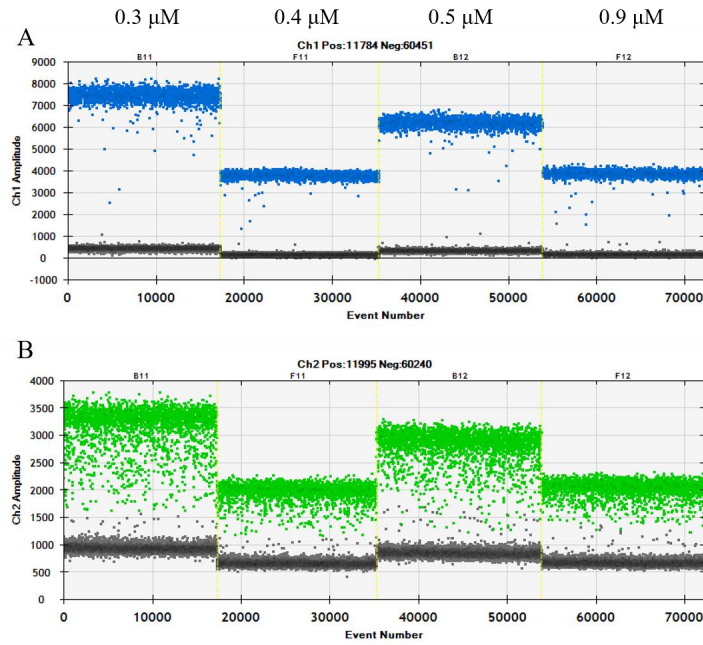


图 55 数字 PCR 引物探针浓度优化扩增图谱

注：A 为 WYN17132 玉米转化体特异性序列一维微滴图谱；B 为 *zSSIb* 基因一维微滴图谱。

表 47 数字 PCR 引物探针浓度优化扩增数据分析

靶标		<i>zSSIb</i> 基因				WYN17132 玉米特异性序列				WYN17132 ： <i>zSSIb</i> 拷 贝数平均 值比值	
<i>zSSIb</i> 引物：探针 终浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )	WYN17132 引物：探针 终浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )	拷贝数 测量值	平均值	标准差 SD	相对标 准偏差 RSD	拷贝数 测量值	平均值	标准差 SD	相对标 准偏差 RSD		
0.3: 0.15	0.3: 0.15	12620	12435	261.63	2.10%	12380	12500	169.71	1.36%	1.01	
		12250				12620					
0.4: 0.2	0.4: 0.2	12230	12285	77.78	0.63%	12420	12535	162.64	1.30%		1.02
		12340				12650					
0.5: 0.25	0.5: 0.25	12590	12575	21.21	0.17%	12600	12635	49.50	0.39%	1.00	
		12560				12670					
0.9: 0.25	0.9: 0.25	12390	12405	21.21	0.17%	12260	12440	254.56	2.05%		1.00
		12420				12620					
		12430				12720					

数字 PCR 扩增结果显示：扩增图谱中 *zSSIb* 基因和 WYN17132 转化体特异性序列在不同的引物探针浓度下，微滴的荧光强度存在较显著差异，在 *zSSIb* 基因和 WYN17132 转化体特异性序列引物：探针终浓度分别为 0.5：0.25  $\mu\text{mol/L}$  和 0.5：0.25  $\mu\text{mol/L}$  时，扩增图谱见图 55；进一步对测试数据进行分析可以发现，在 *zSSIb* 基因和 WYN17132 转化体特异性序列引物：探针终浓度分别为 0.5：0.25  $\mu\text{mol/L}$  和 0.5：0.25  $\mu\text{mol/L}$  时，相同模板测算的拷贝数比值最接近理论值 1.0，*RSD* 较小（表 47）。因此，确定 *zSSIb* 基因和 WYN17132 转化体特异性序列最优引物：探针终浓度分别为 0.5：0.25  $\mu\text{mol/L}$  和 0.5：0.25  $\mu\text{mol/L}$ 。经过优化后 *zSSIb* 基因和 WYN17132 转化体特异性序列数字 PCR 扩增体系如表 48 所示。

表 48 数字 PCR 扩增体系

组分	体积
ddH <sub>2</sub> O	3.0 $\mu\text{L}$
2 $\times$ ddPCR <sup>TM</sup> Supermix for Probes	10.0 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 内标上游引物 <i>zSSIb</i> -3F	1.0 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 内标下游引物 <i>zSSIb</i> -4R	1.0 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 内标探针 <i>zSSIb</i> -P	0.5 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 转化体上游引物 WYN17132-qF	1.0 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 转化体上游引物 WYN17132-qR	1.0 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 转化体探针 WYN17132-qP	0.5 $\mu\text{L}$
DNA 模板	2.0 $\mu\text{L}$
总体积	20.0 $\mu\text{L}$

## 10.4 WYN17132/*zSSIb* 二重 ddPCR 的 LOD、LOQ 和动力学范围测试

微滴式数字 PCR 的理论有效线性范围是 1~100000 个拷贝，实际测试时，20  $\mu$ L 反应液在微滴生成仪中一般生成 10000~20000 个有效微滴，微滴数大于 10000 为有效反应。为了测试 *zSSIb* 基因和 WYN17132 转化体特异性序列数字 PCR 方法的线性范围，将 47 ng/ $\mu$ L 的 WYN17132 玉米基因组 DNA 进行梯度稀释制作成 9 个浓度的标准品，按确定的扩增条件进行 *zSSIb* 基因和 WYN17132 转化体特异性序列数字 PCR 扩增，每个标准品扩增设置 4 个平行。根据标准品数字 PCR 测量值及初始模板拷贝数分别绘制 *zSSIb* 基因和 WYN17132 转化体特异性序列的线性回归曲线进行线性范围分析，对 4 个平行间 *zSSIb* 基因和 WYN17132 转化体特异性序列测量值以及拷贝数比值的标准偏差和相对标准偏差进行数据统计，评价 *zSSIb* 基因和 WYN17132 转化体特异性序列数字 PCR 方法的重复性。根据《转基因植物及其产品成分检测 数字 PCR 方法制定指南》（农业农村部公告第 323 号—21—2020）中定量检测的要求，在整个线性动态范围内，线性度即线性回归方程的决定系数  $R^2$  一般应  $\geq 0.98$ ，正确度偏差 (*Bias*) 不超过标称值的 25%，精密度即重复性相对标准偏差 (*RSD*) 一般应  $\leq 25\%$ 。

表 49 WYN17132 玉米特异性序列数字 PCR 线性动态范围与重复性分析

Target	理论拷贝数	拷贝数浓度 (copies)
--------	-------	----------------

		1	2	3	4	Mean	SD	<i>RSD</i> (%)	<i>Bias</i> (%)
WYN1713 2 拷贝数	16000	15600	15240	16620	16300	15940	631.82	3.96	-0.38
	8000	8570	8720	8650	8370	8577.5	151.30	1.76	7.22
	1600	1660	1650	1660	1690	1665	17.32	1.04	4.06
	320	370	320	374	366	357.5	25.21	7.05	11.72
	80	76	79	84	78	79.25	3.40	4.29	-0.94
	40	34	31	38	42	36.25	4.79	13.21	-9.38
	20	10	18	16	12	14	3.65	26.08	-30.00
	10	3.4	12	8	5	7.1	3.78	53.27	-29.00
	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>zSSIb</i> copy number	16000	16860	16150	15960	16320	16322.5	387.33	2.37	2.02
	8000	8480	8250	8340	8120	8297.5	151.52	1.83	3.72
	1600	1630	1620	1550	1620	1605	36.97	2.30	0.31
	320	358	321	365	352	349	19.41	5.56	9.06
	80	77	83	85	74	79.75	5.12	6.42	-0.31
	40	37	35	38	32	35.5	2.65	7.45	-11.25
	20	12	18	15	22	16.75	4.27	25.50	-16.25
	10	4.6	8.8	6	5.7	6.275	1.79	28.49	-37.25
	5	7.8	-	-	-	-	-	-	-
Target	理论拷贝数 (copies)	1	2	3	4	Mean	SD	<i>RSD</i> (%)	<i>Bias</i> (%)
WYN1713 2/ <i>zSSIb</i> ratio	16000	92.53	94.37	104.14	99.88	97.73	5.29	5.42	-2.27
	8000	101.06	105.70	103.72	103.08	103.39	1.91	1.85	3.39
	1600	101.84	101.85	107.10	104.32	103.78	2.50	2.41	3.78
	320	103.35	99.69	102.47	103.98	102.37	1.89	1.85	2.37
	80	98.70	95.18	98.82	105.41	99.53	4.27	4.29	-0.47
	40	91.89	88.57	100.00	131.25	102.93	19.48	18.93	2.93
	20	83.33	100.00	106.67	54.55	86.14	23.23	26.97	-13.86
	10	73.91	136.36	133.33	87.72	107.83	31.72	29.42	7.83
	5	-	-	-	-	-	-	-	-

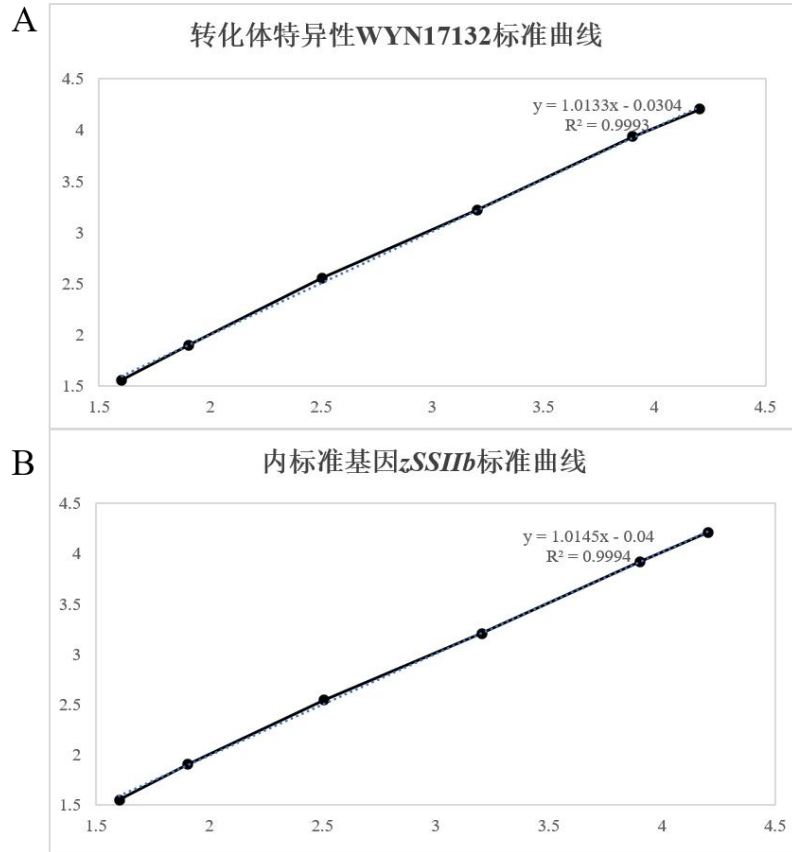


图 56 WYN17132/zSSIb 二重数字 PCR 方法线性动态范围测试

注：A 为 WYN17132 转化体特异性序列拷贝数测量值与预期值的线性回归方程（y 代表拷贝数测量值的对数，x 代表拷贝数预期值的对数）；B 为 zSSIb 基因拷贝数测量值与预期值的线性回归方程（y 代表拷贝数测量值的对数，x 代表拷贝数预期值的对数）。

结果显示：当 20  $\mu\text{L}$  扩增体系中 WYN17132 转化体特异性序列和 zSSIb 基因拷贝数分别在 40~16000 copies 之间时，随着拷贝数的降低，4 个重复间正确度偏差（Bias）和重复性相对标准偏差（RSD）升高，但均小于 25%，当模板量为 20 拷贝时，正确度偏差（Bias）和重复性相对标准偏差（RSD）出现大于 25% 的情况，因此定量极限（LOQ）确定为 40 个拷贝，当 DNA 浓度低至 5 拷贝时，4 个平行中只有 1 个检测到阳性信号，其余均无阳性微滴，而当 DNA 浓度为 10 拷贝时，依然可以稳定的检测到阳性信号，拷贝数测量值在 1.4-12

之间，因此检测极限（LOD）确定为 10 拷贝（表 49）；WYN17132 转化体特异性序列和 *zSSIb* 基因微滴数字 PCR 获得的拷贝数浓度测量值与预期值具有良好的相关性，线性回归方程分别为  $y=1.0133x-0.0304$  和  $y=1.0145x-0.04$ ，决定系数  $R^2$  值分别为 0.9993 和 0.9994（图 56）。WYN17132/*zSSIb* 二重数字 PCR 方法线性动态范围测试结果表明，20  $\mu$ L 扩增体系中，当模板量在 WYN17132 转化体特异性序列 40~16000 拷贝的范围内，可获得准确的拷贝数浓度和拷贝数比值测量值。

### 10.5 WYN17132/*zSSIb* 二重 ddPCR 的测量准确性

配制 5 个含 WYN17132 基因组 DNA 盲样（S1~S5），WYN17132/*zSSIb* 拷贝数比值依次为 5.0%、3.0%、1.0%、0.5%、0.1%。由不同的操作者在不同的日期用 WYN17132/*zSSIb* 二重 ddPCR 方法对 5 个盲样进行进行了 3 次测量。

表 50 5 个盲样的测量结果

重复	PCR 平行	盲样含量测量值				
		S1 (%)	S2 (%)	S3 (%)	S4 (%)	S5 (%)
1	1	5.332	3.053	1.052	0.542	0.075
	2	5.297	3.067	0.957	0.534	0.076
	3	5.264	3.245	0.927	0.539	0.083
2	1	5.275	2.861	0.995	0.494	0.089
	2	5.027	2.894	0.983	0.475	0.104
	3	5.021	2.831	0.976	0.531	0.105
3	1	5.246	2.795	0.958	0.475	0.108
	2	5.204	3.021	0.953	0.467	0.095
	3	5.448	2.867	0.964	0.491	0.085

表 51 5 个盲样定量结果的重复性和重现性统计分析

盲样	预期拷贝数比值 (%)	测量平均值 (%)	$S^r$ (%)	$RSD_r$ (%)	$S^R$ (%)	$RSD_R$ (%)	$Bias$ (%)
S1	5	5.23	0.11	2.18	0.11	2.18	4.70
S2	3	2.96	0.11	3.59	0.14	4.55	-1.36
S3	1	0.97	0.04	3.92	0.04	3.92	-2.61
S4	0.5	0.51	0.02	3.57	0.03	6.73	1.07
S5	0.1	0.09	0.01	9.66	0.01	14.9	-8.89

二重 ddPCR 的定量结果如表 50 所示，计算得到 5 个盲样 WYN17132/zSSIIb 拷贝数比值的平均值，统计测量结果的重复性相对标准差 ( $RSD_r$ )、重现性相对标准差 ( $RSD_R$ )、和相对偏倚 ( $Bias$ )。结果显示，测量平均值均接近预期含量，与预期值的相对偏倚在 $\pm 25\%$ 的可接受范围内；重复性相对标准偏差  $RSD_r$  和再现性相对标准偏差  $RSD_R$  均小于 25% (表 51)。已建立的 WYN17132/zSSIIb 二重 ddPCR 实现了对样品中 WYN17132 转化体含量的准确定量，具有良好的重复性和重现性。

WYN17132/zSSIIb 二重 ddPCR 扩增引物探针采用已发布的标准方法（农业农村部公告第 1012 号—8—2026）中的实时荧光 PCR 方法引物探针（表 52）。WYN17132/zSSIIb 二重 ddPCR 扩增体系见表 9，扩增程序为：95°C 预变性 10 min；94°C 变性 30 s，56°C 退火延伸 60 s，共进行 40 个循环；98°C 变性 10 min，4°C 保存（升降温速率 2°C/s）。

表 52 数字 PCR 扩增体系

组分	终浓度	体积
----	-----	----

ddH <sub>2</sub> O		3.0 μL
2×ddPCR™ Supermix for Probes	1×	10.0 μL
10 μmol/L 内标上游引物 <i>zSSIb</i> -QF	0.5 μmol/L	1.0 μL
10 μmol/L 内标下游引物 <i>zSSIb</i> -QR	0.5 μmol/L	1.0 μL
10 μmol/L 内标探针 <i>zSSIb</i> -QP	0.25 μmol/L	0.5 μL
10 μmol/L 转化体上游引物 17132-qF	0.5 μmol/L	1.0 μL
10 μmol/L 转化体上游引物 17132-qR	0.5 μmol/L	1.0 μL
10 μmol/L 转化体探针 17132-qP	0.25 μmol/L	0.5 μL
25 mg/L DNA 模板	2.5 mg/L	2.0 μL
总体积		20.0 μL

扩增体系可根据仪器及试剂耗材的实际使用情况，进行相应调整。此表是1个扩增体系的体积，应按照实际反应数量进行扩增体系配置。空白质控品以2.0 μL的 ddH<sub>2</sub>O 作模板。

## 11. WYN041/*zSSIb* 二重数字 PCR 方法

### 11.1 引物探针确认

WYN041 是浙江新安化工集团股份有限公司由目的基因 *am79epsps* 和 *Cry1Ab* 单拷贝插入玉米基因组，使其获得抗虫耐除草剂的性能。首先对获得转基因材料的分子特征进行测序验证，确定转基因材料的转化体身份。WYN041 转化体特异性引物探针和玉米内标准基因 *zSSIb* 引物探针选用未发布的标准方法（抗虫耐除草剂玉米 WYN041 转化体特异性 PCR 方法报批稿）中的实时荧光 PCR 方法引物探针。

表 53 WYN041 转化体特异性引物和探针序列

靶标	引物/探针名称及序列 (5'-3')	扩增片段大小(bp)	来源
<i>zSSIb</i> 基因	<i>zSSIb</i> -3F: CGGTGGATGCTAAGGCTGATG	88	抗虫耐除草剂玉米 WYN041 转化体特
	<i>zSSIb</i> -4R: AAAGGGCCAGGTTTCATTATCCTC		
	<i>zSSIb</i> -P: HEX-TAAGGAGCACTCGCCGCCGCATCTG-BHQ1		
WYN041	WYN041-qF: ATTCGGCGTTAATTCAGTACATTA	144	

转化体	WYN041-qR: CTTTTCTTCTCCGTGAACCTGC	异性 PCR 方法报批 稿
	WYN041-qP:	
	FAM-ATTAAGTTGTCTAAGCGGCGGGATC-BHQ1	

在迈克微滴式数字 PCR 平台 D600 上，用通用的 PCR 反应体系（引物/探针浓度 400/200 nM）和退火温度（58℃），以 WYN041 基因组 DNA 为模板，进行 WYN041 转化体/*zSSIb* 基因的二重 ddPCR 扩增，对表 53 中的引物探针组合进行测试，设 3 个平行反应。

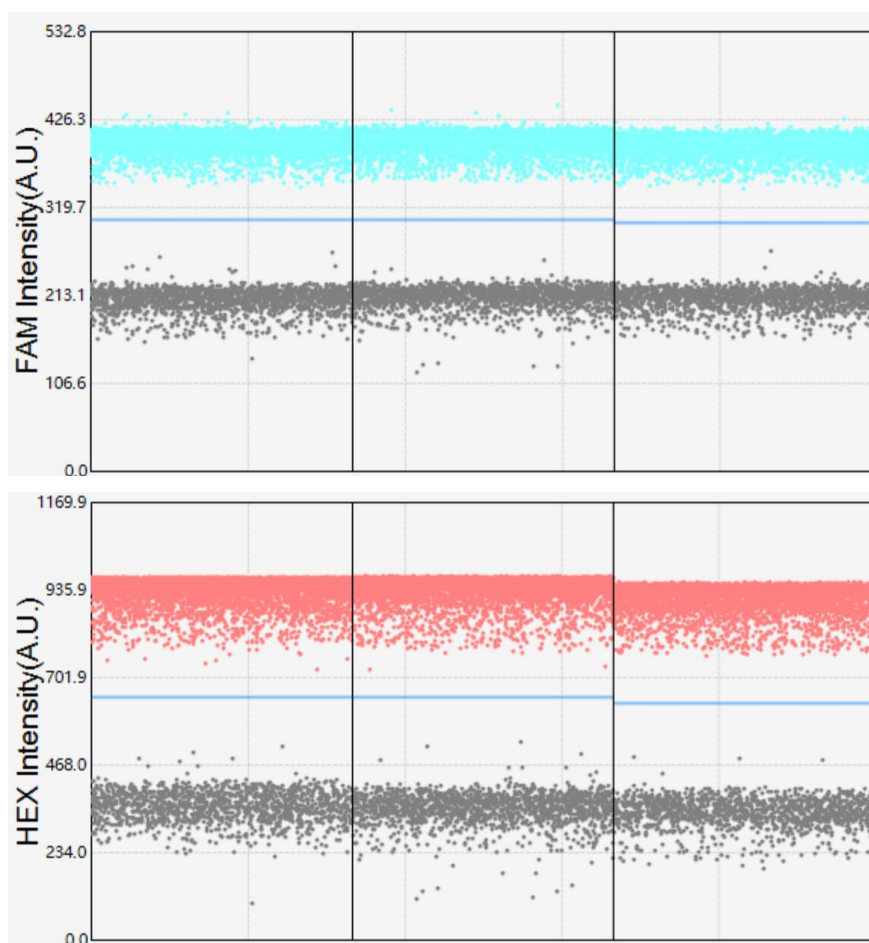


图 57 数字 PCR 引物探针确认

注：A 为 WYN041 玉米转化体特异性序列一维微滴图谱；B 为 *zSSIb* 基因一维微滴图谱

结果显示, WYN041 转化体和 *zSSIIb* 基因二重微滴式数字 PCR 的一维微滴图谱 (1-D) 的阴性微滴和阳性微滴分界清晰, “雨滴” 较少 (图 57A, B); 综上, 确认表 53 的引物探针适用 WYN041 转化体/*zSSIIb* 基因的二重 ddPCR 扩增。

## 11.2 WYN041/*zSSIIb* 二重微滴数字 PCR 特异性测试

用转基因玉米 WYN041、其他转基因玉米混合样 (瑞丰 125、瑞丰 8、T25、MIR604、NK603、MON87427、DBN9936、DBN9858、DBN9501)、转基因大豆混合样 (DBN9004、MON89788、MON87751、CAL16、中黄 6106、DBN8205)、转基因水稻混合样 (TT51-1、KF-6、KMD、G6H1、T1C-19、T2A-1)、转基因油菜混合样 (MS1、MS8、RF1、RF2、RF3、T45、Oxy-235、Topas19/2、MON88302、73496)、转基因棉花混合样 (MON1445、MON531、MON15985、LLCOTTON25、MON88913、GHB614、COT102)、非转基因玉米基因组 DNA 作模板进行 WYN041 和 *zSSIIb* 二重 ddPCR 扩增, 用水做空白对照, 测试 WYN041 转化体和 *zSSIIb* 二重 ddPCR 方法的特异性。

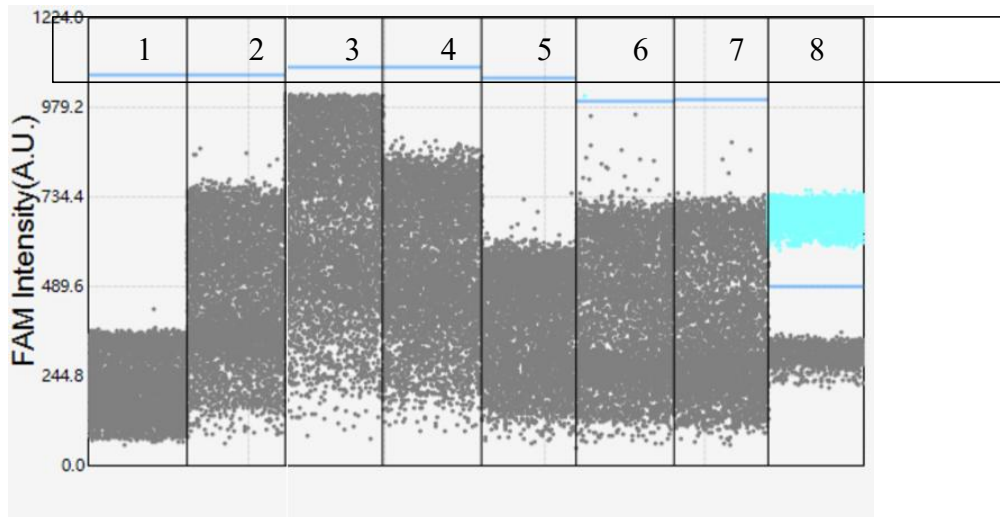


图 58 WYN041-ddPCR 特异性测试扩增图谱（一维）

注：WYN041 转化体特异性序列；1 为空白对照，2 为转基因棉花混合样，3 为转基因大豆混合样，4 为转基因水稻混合样，5 为转基因油菜混合样，6 为其他转基因玉米混合样，7 为非转基因玉米，8 为转基因玉米 WYN041。

结果显示，WYN041 转化体特异性序列 ddPCR 仅在转基因玉米 WYN041 样品中扩增得到阳性微滴，在其他转基因玉米品种和空白对照中不能扩增得到阳性微滴，结果表明 WYN041-ddPCR 方法有良好的特异性（图 58）。

### 11.3 WYN041/*zSSIb* 二重数字 PCR 的条件优化

PCR 扩增程序中退火温度的高低对阴阳性微滴区分有显著的影响，本项目设置了 58℃、60℃、62℃ 三个温度梯度，测试 WYN041 和 *zSSIb* 基因二重 ddPCR 的扩增效果。

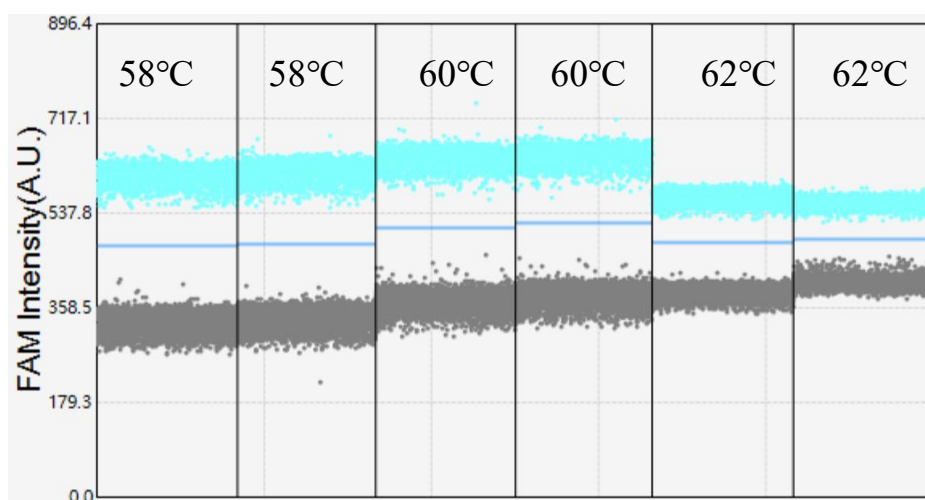
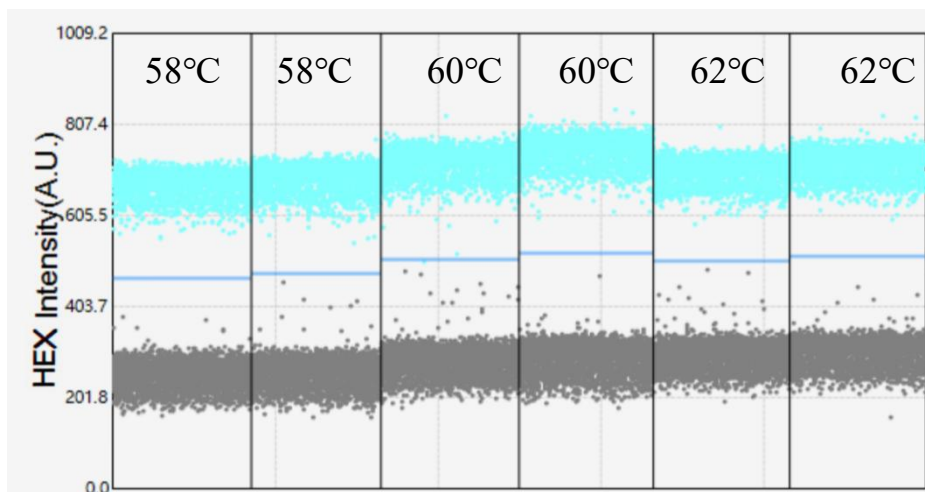


图 59 数字 PCR 引物探针退火温度优化扩增图谱

注：A 为 zSSIb 基因一维微滴图谱；B 为 WYN041 玉米转化体特异性序列一维微滴图谱。

表 54 数字 PCR 引物探针退火温度优化扩增数据分析

靶标	zSSIb 基因				WYN041 玉米特异性序列			
	拷贝数测量值	平均值	标准差 SD	相对标准偏差 RSD	拷贝数测量值	平均值	标准差 SD	相对标准偏差 RSD
58	13718	14274	555.625	0.04	13623	14110	487	0.03
	14830				14597			
60	14872	15073	201.25	0.01	14597	14702	105.25	0.01
	15274				14807			

靶标	<i>zSSIb</i> 基因				WYN041 玉米特异性序列			
	拷贝数测量值	平均值	标准差 SD	相对标准偏差 RSD	拷贝数测量值	平均值	标准差 SD	相对标准偏差 RSD
退火温度 (°C)	15271	16092	820.25	0.05	15845	14949	895.125	0.06
	16912				14054			

数字 PCR 扩增结果显示：扩增图谱中 *zSSIb* 基因和 WYN041 转化体特异性序列引物探针在 58°C、60°C、62°C 三个退火温度下，数字 PCR 扩增图（图 59）显示，在不同退火温度下，不同退火温度下微滴的荧光强度存在较明显差异，结果比较发现，退火温度为 58°C 时，阳性微滴与阴性微滴分开较明显，效果更好，通过计算各温度下测量拷贝数相对标准偏差（表 55），最终确定 58°C 为退火温度。因此，确定 *zSSIb* 基因和 WYN041 转化体特异性序列引物探针最优退火延伸温度为 58°C。经过优化后 *zSSIb* 基因和 WYN041 转化体特异性序列数字 PCR 扩增程序为：95°C 预变性 10 min；94°C 变性 30 s，58°C 退火 60s；45 个循环，4°C 保存（升降温速率 2°C/s）。

由于微滴式数字 PCR 平台迈克 D600 需使用专用的扩增试剂，PCR 扩增体系中仅选择引物探针浓度进行优化测试。实时荧光 PCR 方法中常用引物与探针终浓度分别为 0.4 μmol/L 和 0.2 μmol/L。参考上述引物探针终浓度设置了 4 组 *zSSIb* 基因和 WYN041 转化体特异性序列引物：探针终浓度进行测试。

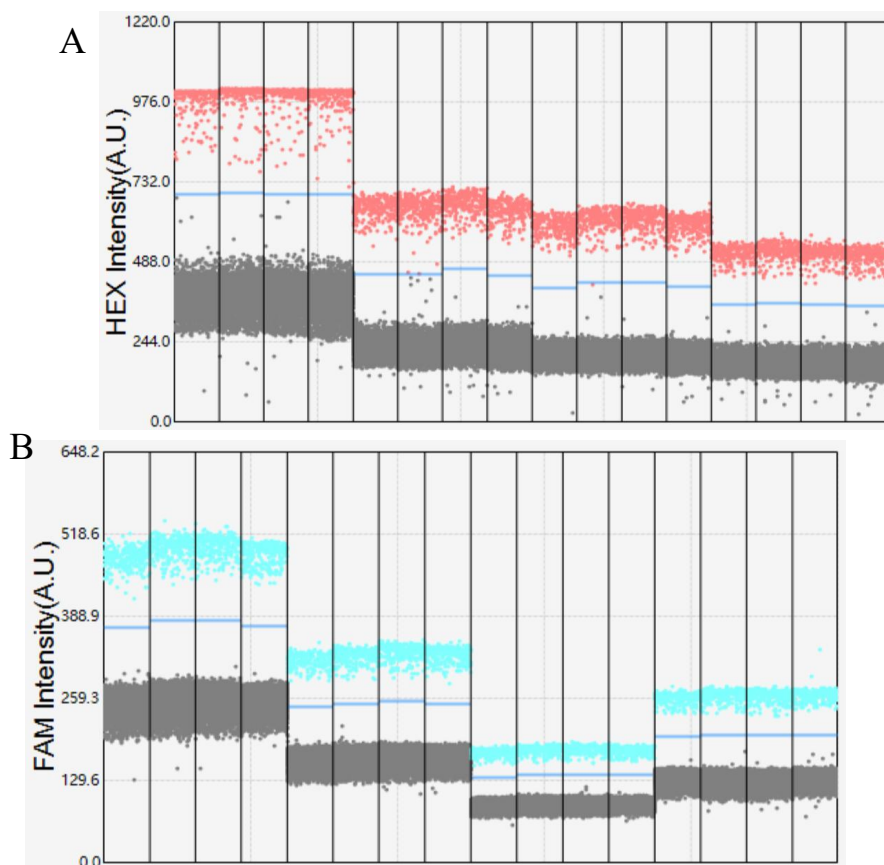


图 60 数字 PCR 引物探针浓度优化扩增图谱

注：A 为 WYN041 玉米转化体引物探针浓度一维微滴图谱；B 为 zSSIIB 基因一维微滴图谱。

表 55 数字 PCR 引物探针浓度优化扩增数据分析

靶标引物：探针 终浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )		<i>zSSIIB</i> 拷贝数测量结果				WYN041 拷贝数测量结果			
<i>zSSIIB</i>	WYN041	测量值	平均值	SD	RSD	测量值	平均值	SD	RSD
0.3: 0.15	0.3: 0.15	14429	15162	841.3	5.55	15540	14839	437.0	2.95
		15394				14393			
		14383				14854			
		16440				14568			
0.4: 0.2	0.4: 0.2	13730	14653	791.2	5.40	14786	15212	594.0	3.90
		14062				15941			
		15689				15631			
		15132				14489			
0.5: 0.25	0.5: 0.25	14510	14885	444.6	2.99	15862	15561	627.0	4.03
		14729				14496			

靶标引物：探针 终浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )		<i>zSSIb</i> 拷贝数测量结果				WYN041 拷贝数测量结果			
<i>zSSIb</i>	WYN041	测量值	平均值	SD	RSD	测量值	平均值	SD	RSD
		14659				15773			
		15643				16111			
0.9: 0.25	0.9: 0.25	13740	14362	1223.8	8.52	13800	14373	558.1	3.88
		12679				13958			
		15269				14506			
		15758				15226			

数字 PCR 扩增结果显示：扩增图谱中 *zSSIb* 基因和 WYN041 转化体特异性序列在不同的引物探针浓度下，微滴的荧光强度存在较显著差异，随着引物探针浓度降低，阳性微滴信号出现降低，在 *zSSIb* 基因和 WYN041 转化体特异性序列引物：探针终浓度分别为 0.5:0.25  $\mu\text{mol/L}$  和 0.5: 0.25  $\mu\text{mol/L}$  时，扩增图谱阴阳液滴分界更清晰，没有难以界定的“下雨”现象（图 60）；进一步对测试数据进行分析可以发现，在 *zSSIb* 基因和 WYN041 转化体特异性序列引物：探针终浓度分别为 0.5:0.25  $\mu\text{mol/L}$  和 0.5:0.25  $\mu\text{mol/L}$  时，RSD 较小（表 55）。因此，确定 *zSSIb* 基因和 WYN041 转化体特异性序列最优引物：探针终浓度分别为 0.5: 0.25  $\mu\text{mol/L}$  和 0.5: 0.25  $\mu\text{mol/L}$ 。经过优化后 *zSSIb* 基因和 WYN041 转化体特异性序列数字 PCR 扩增体系如表 56 所示。

表 56 数字 PCR 扩增体系

组分	体积
ddH <sub>2</sub> O	4.25 $\mu\text{L}$
2 $\times$ ddPCR <sup>TM</sup> Supermix for Probes	12.5 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 内标上游引物 <i>zSSIb</i> -3F	1.25 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 内标下游引物 <i>zSSIb</i> -4R	1.25 $\mu\text{L}$

10 $\mu\text{mol/L}$ 内标探针 <i>zSSIb</i> -P	0.625 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 转化体上游引物 WYN041-qF	1.25 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 转化体上游引物 WYN041-qR	1.25 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 转化体探针 WYN041-qP	0.625 $\mu\text{L}$
DNA 模板	2.0 $\mu\text{L}$
总体积	25.0 $\mu\text{L}$

#### 11.4 WYN041/*zSSIb* 二重 ddPCR 的动力学范围测试

微滴式数字 PCR 的理论有效线性范围是 1~100000 个拷贝，实际测试时，25  $\mu\text{L}$  反应液在微滴生成仪中一般生成 10000~20000 个有效微滴，微滴数大于 10000 为有效反应。为了测试 *zSSIb* 基因和 WYN041 转化体特异性序列数字 PCR 方法的线性范围，将 100 ng/ $\mu\text{L}$  的 WYN041 玉米基因组 DNA 进行梯度稀释制作成 6 个浓度的标准品，按确定的扩增条件进行 *zSSIb* 基因和 WYN041 转化体特异性序列数字 PCR 扩增，每个标准品扩增设置 3 个平行。根据标准品数字 PCR 测量值及初始模板拷贝数分别绘制 *zSSIb* 基因和 WYN041 转化体特异性序列的线性回归曲线进行线性范围分析，对 3 个平行间 *zSSIb* 基因和 WYN041 转化体特异性序列测量值以及拷贝数比值的标准偏差和相对标准偏差进行数据统计，评价 *zSSIb* 基因和 WYN041 转化体特异性序列数字 PCR 方法的重复性。根据《转基因植物及其产品成分检测 数字 PCR 方法制定指南》（农业农村部公告第 323 号—21—2020）中定量检测的要求，在整个线性动态范围内，线性度即线性回归方程的决定系数  $R^2$  一般应  $\geq 0.98$ ，正确度偏差（Bias）不超过标称值的 25%，精密度即重复性相对标准偏差（RSD）一般应  $\leq 25\%$ 。

表 57 WYN041/zSSIb 玉米特异性序列数字 PCR 线性动态范围

样品	基因	拷贝数			含量 (%)		
		重复 1	重复 2	重复 3	平均值	SD	RSD
G1	WYN041	42953.25	40420.25	38804.75	40726.08	1707.37	4.19
	<i>zSSIb</i>	43741	40881	41779.25	42133.75	1194.20	2.83
G2	WYN041	6827.5	6328.5	6568.5	6574.83	203.77	3.10
	<i>zSSIb</i>	6846	6756	7220.5	6940.83	201.14	2.90
G3	WYN041	1083.25	1071	1010.75	1055.00	31.69	3.00
	<i>zSSIb</i>	1242.5	1275.5	1181	1233.00	39.16	3.18
G4	WYN041	176.75	177.25	187	180.33	4.72	2.62
	<i>zSSIb</i>	209.25	172.75	184.75	188.92	15.19	8.04
G5	WYN041	40.25	35.75	38.25	38.08	1.84	4.83
	<i>zSSIb</i>	35.5	41	38	38.17	2.25	5.89
G6	WYN041	24.25	27.75	23.75	25.25	1.78	7.05
	<i>zSSIb</i>	17.25	15.75	25	19.33	4.05	20.97

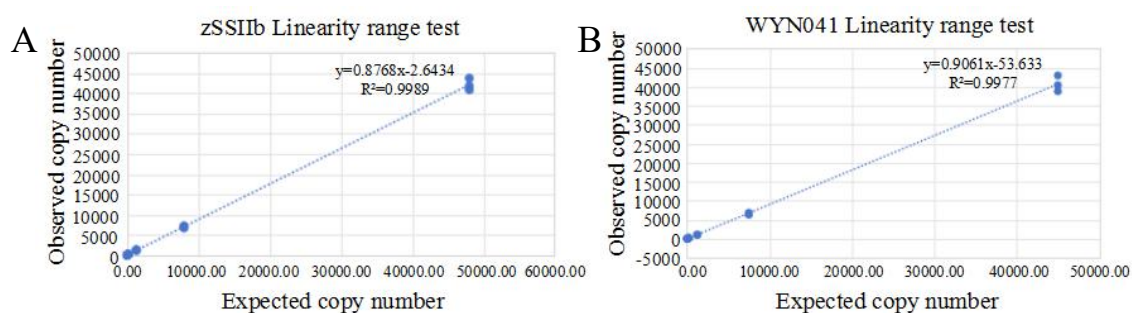


图 61 WYN041/zSSIb 二重数字 PCR 方法线性动态范围测试

注：A 为 *zSSIb* 基因拷贝数测量值与预期值的线性回归方程（y 代表拷贝数测量值，x 代表拷贝数预期值）；B 为 WYN041 转化体特异性序列拷贝数测量值与预期值的线性回归方程（y 代表拷贝数测量值，x 代表拷贝数预期值）

结果显示：当 25  $\mu$ L 扩增体系中内标准基因 *zSSIb* 线性范围为 20~43000 copies；抗虫耐除草剂玉米 WYN041 线性范围为 25~42000 copies。内标准基因 *zSSIb* 与抗虫耐除草剂玉米 WYN041 线性曲线  $R^2$  分别为 0.9989 和 0.9977， $R^2$  均  $\geq 0.98$ ，证明真实拷贝数与期望拷贝数有良好的线性关系，线性回归方程分别为  $y=0.8768x+2.6434$  和

$y=0.9061x+53.633$ ，决定系数  $R^2$  值分别等于 0.9989 和 0.9977。

WYN041/*zSSIb* 二重数字 PCR 方法线性动态范围测试结果表明，25  $\mu\text{L}$  扩增体系中，当模板量在 WYN041 转化体特异性序列 40~43000 拷贝的范围内，可获得准确的拷贝数浓度和拷贝数比值测量值。

### 11.5 WYN041/*zSSIb* 二重 ddPCR 的测量准确性、LOD 和 LOQ

配制 10 个含 WYN041 基因组 DNA 盲样 (S1~S10)，其中 5 个样品 (S1-S5) 的 WYN041/*zSSIb* 拷贝数比值为 5.0%、3.0%、1.0%、0.5%、0.3%，用于测量准确性确认用 WYN041/*zSSIb* 二重 ddPCR 方法对每个盲样进行进行了 3 次测量。

表 58 5 个盲样的测量结果

样品	基因	拷贝数			含量 (%)						
		重复 1	重复 2	重复 3	重复 1	重复 2	重复 3	平均值	SD	RSD	Bias
S1	WYN041	2062.75	1936.50	2038.25	5.08	4.86	5.04	4.99	0.10	1.95	0.2
	<i>zSSIb</i>	40601.50	39867.75	40428.75							
S2	WYN041	1135.25	1173.25	1108.50	2.85	3.03	2.93	2.94	0.07	2.55	2
	<i>zSSIb</i>	39803.25	38663.25	37855.75							
S3	WYN041	367.00	396.25	368.50	0.89	0.93	0.94	0.92	0.02	2.45	8
	<i>zSSIb</i>	41367.00	42674.50	39225.50							
S4	WYN041	206.50	199.50	210.25	0.51	0.49	0.53	0.51	0.01	2.74	2
	<i>zSSIb</i>	40518.25	40625.50	40032.50							
S5	WYN041	135.75	130.50	144.00	0.34	0.31	0.35	0.33	0.02	5.27	10
	<i>zSSIb</i>	40240.50	42305.25	41098.75							

表 59 检出限和定量限

样品 sample	基因 gene	拷贝数平均值 number of copies average value	含量平均值 (%) content average value (%)	阳性反应孔占 比 Percentage of negative reaction wells	SD	RSD (%)	Bias (%)
S6	WYN041	200.33	0.493	10/10	0.03	6.69	1.33
	<i>zSSIb</i>	40392.08					
S7	WYN041	136.75	0.332	10/10	0.02	6.80	10.67
	<i>zSSIb</i>	41214.83					
S8	WYN041	37.50	0.090	10/10	0.01	9.07	10.05
	<i>zSSIb</i>	41695.30					
S9	WYN041	20.25	0.049	10/10	0.00	6.60	1.62
	<i>zSSIb</i>	41214.83					
S10	WYN041	10.55	0.025	10/7	0.002	15.32	145.42
	<i>zSSIb</i>	42928.98					

二重 ddPCR 的定量结果如表 58 所示，计算得到 5 个盲样 WYN041/*zSSIb* 拷贝数比值的平均值，统计测量结果的重复性相对标准差 ( $RSD_r$ ) 和相对偏倚 ( $Bias$ )。结果显示，测量平均值均接近预期含量，与预期值的相对偏倚在  $\pm 25\%$  的可接受范围内；重复性相对标准偏差  $RSD$  小于 25%。已建立的 WYN041/*zSSIb* 二重 ddPCR 实现了对样品中 WYN041 转化体含量的准确定量，具有良好的重复性和重现性。

将抗虫耐除草剂玉米 WYN041 稀释 5 个浓度梯度，S6~S10 的浓度分别为 0.5%、0.3%、0.1%、0.05%、0.01%，进行实时荧光定量 PCR 和微滴数字 PCR 测试，每个样品 10 次重复，结果见表 59。由数据可看出，S6~S10 的浓度分别为 0.493%、0.332%、0.090%、0.049%、

0.025%，相对标准偏差 (RSD) 分别为 6.69%、6.80%、9.07%、6.60%、15.32%，相对标准误差 (Bias) 分别为 1.33%、10.67%、10.05%、1.62%、145.42%。S6-S10 符合 EURL 规定的相对标准偏差 (RSD)  $\leq 25\%$  的阈值范围，但是 S10 的相对标准误差 (Bias)  $> 25\%$ ，且 10 次重复中仅有 7 次出现了典型的扩增曲线，定量浓度不准确，由此确定 dPCR 方法的定量限为 0.1%，检出限为 0.05%。

## 11.6 结论

WYN041/zSSIIb 二重 ddPCR 扩增引物探针采用未发布的标准方法（抗虫耐除草剂玉米 WYN041 转化体特异性 PCR 方法报批稿）中的实时荧光 PCR 方法引物探针（表 60）。WYN041/zSSIIb 二重 ddPCR 扩增体系见表 61，扩增程序为：95°C 预变性 10 min；94°C 变性 30 s，58°C 退火 60 s，共进行 45 个循环；98°C 变性 10 min，4°C 保存（升降温速率 2°C/s）。

表 60 WYN041 转化体特异性引物和探针序列

靶标	引物/探针名称及序列 (5'-3')	扩增片段大小 (bp)	来源
zSSIIb 基因	zSSIIb-3F: CGGTGGATGCTAAGGCTGATG	88	抗虫耐除草剂玉米 WYN041 转化体特异性 PCR 方法报批稿
	zSSIIb-4R: AAAGGGCCAGGTCATTATCCTC		
	zSSIIb-P:HEX-TAAGGAGCACTCGCCGCCGCATCTG-BHQ1		
WYN041 转化体	WYN041-qF: ATTCGGCGTTAATTCAGTACATTA	144	抗虫耐除草剂玉米 WYN041 转化体特异性 PCR 方法报批稿
	WYN041-qR: CTTTTCTTCTCCGTGAACCTGC		
	WYN041-qP:FAM-ATTAAGTTGTCTAAGCGGCGGGATC-BHQ1		

表 61 数字 PCR 扩增体系

组分	终浓度	体积
ddH <sub>2</sub> O		4.25 $\mu$ L
2 $\times$ ddPCR <sup>TM</sup> Supermix for Probes	1 $\times$	12.5 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 内标上游引物 zSSIIb-QF	0.5 $\mu$ mol/L	1.25 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 内标下游引物 zSSIIb-QR	0.5 $\mu$ mol/L	1.25 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 内标探针 zSSIIb-QP	0.25 $\mu$ mol/L	0.625 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 转化体上游引物 WYN041-qF	0.5 $\mu$ mol/L	1.25 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 转化体上游引物 WYN041-qR	0.5 $\mu$ mol/L	1.25 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 转化体探针 WYN041-qP	0.25 $\mu$ mol/L	0.625 $\mu$ L
25 mg/L DNA 模板	2.5 mg/L	2.0 $\mu$ L
总体积		25.0 $\mu$ L

扩增体系可根据仪器及试剂耗材的实际使用情况，进行相应调整。此表是 1 个扩增体系的体积，应按照实际反应数量进行扩增体系配置。空白质控品以 2.0  $\mu$ L 的 ddH<sub>2</sub>O 作模板。

## 12. BBL2-2/zSSIIb 二重数字 PCR 方法

## 13. CC-2/zSSIIb 二重数字 PCR 方法

### 13.1 转化体特异性序列及内标准基因的引物探针筛选

采用 6 组候选 CC-2 转化体特异性引物/探针，对转基因耐除草剂玉米 CC-2 的纯合种子的 DNA 进行扩增，通过分析微滴扩增图确定最佳引物/探针组。由微滴扩增图（图 62）可见。引物探针组合 3 阳性微滴与阴性微滴不能明显分开，引物探针组合 2、4、6 的阳性微滴虽能与阴性微滴分开，但阳性微滴有一定程度的弥散。比较引物探针组合 1、5 阳性微滴和阴性微滴均能明显分开，阳性微滴分布也较为集中，但引物探针组合 1 非特异性扩增现象较少，故选择引物探针组合 1 开展后续实验，引物探针组合 1 与发布的标准方法（农业农村部公告第 864 号-11-2024）中的引物探针一致（表 62）。

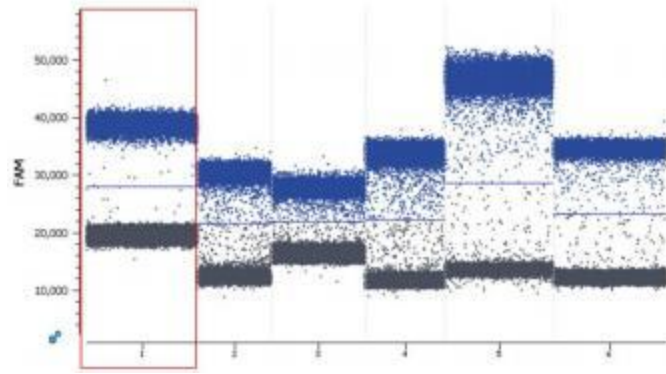


图 62 转基因玉米 CC-2 转化体特异性序列引物探针初筛微滴图

引物、探针组：1. CC-2-uQF4/R4/P4 ， 2. CC-2-uQF7/R7/P7 ， 3. CC-2-uQF8/R8/P8 ， 4. CC-2-uQF9/R9/P9 ， 5. CC-2-uQF10/R10/P10 ， 6. CC-2-uQF11/R11/P11

将筛选出的 CC-2 转化体特异性引物探针组合 1 分别与 3 组 HEX 标记的内标准基因 *zSSIb* 引物探针组合,以纯合的转基因玉米 CC-2 DNA 为模版进行双重数字 PCR 扩增,通过分析微滴扩增图,对比不同引物探针组对纯合样品的转基因含量测试结果,理论值为 1.0,即 100%,确定后续 *zSSIb* 的引物探针序列。综上,参照转化体特异性序列拷贝数与内标准基因拷贝数比值接近于 1.0,能够筛选出与转化体特异性序列扩增效率一致的内标准基因引物探针。

综合分析双重数字 PCR 中内标准基因 *zSSIb* 微滴图和转化体特异性序列的微滴图,结果显示:3 个内标准基因 *zSSIb* 引物探针组合阳性微滴与阴性微滴均能明显分开(图 63),且转化体特异性序列没有受到双重引物探针组合的影响,引物探针组合 1 与组合 2、3 相比,阳性微滴与阴性微滴分离更为明显,且组合 1 的 CC-2 转化体/*zSSIb* 拷贝数比值为 0.99,接近于 1.0,符合双重微滴数字 PCR 的理想结果,因此选择内标准基因 *zSSIb* 引物探针组合 1 进

行后续双重数字 PCR 实验。经初筛后, CC-2 双重微滴数字 PCR 方法所采用的转化体特异性序列和内标准基因 *zSSIb* 引物和探针序列如表 62 所示。

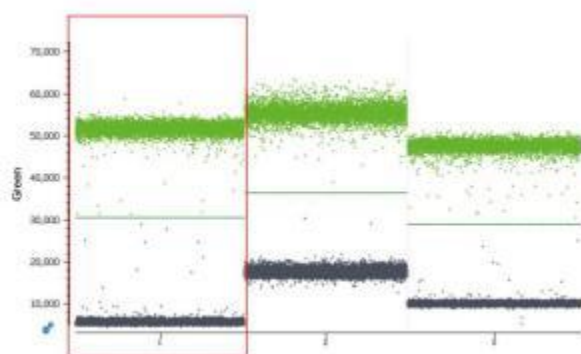


图 63 玉米内标准基因 *zSSIb* 引物探针初筛双重数字 PCR 微滴图

引物、探针组: 1. *zSSIb*-3F/4R/P , 2. *Hmg*-F/R/P , 3. *adh1*-F/R/P

表 62 CC-2 转化体特异性和 *zSSIb* 内标准基因引物/探针序列信息

编号	引物/探针名称	引物和探针序列(5'-3')	产物大小 (bp)
1	<i>zSSIb</i> -3F	CGGTGGATGCTAAGGCTGATG	88
	<i>zSSIb</i> -4R	AAAGGGCCAGGTTTCATTATCCTC	
	<i>zSSIb</i> -P	5'-HEX-TAAGGAGCACTCGCCGCCGCATCTG-3'-BHQ1	
2	CC-2-uQF4	TGCAATGGGCCAGATCTAGTTA	107
	CC-2-uQR4	GCTCACTGAATTAACGCCGA	
	CC-2-uQP4	5'-FAM-CCAGTACTAAAATCCAGATCCCCCGA-3'-BHQ1	

### 13.2 CC-2 微滴数字 PCR 特异性测试

为了考察 CC-2 双重数字 PCR 方法的扩增特异性, 分别用转基因玉米 CC-2、双抗 12-5、NK603、DBN9501、T25、MON87427、MIR604 为模板进行 CC-2 转化体和 *zSSIb* 内标准

基因微滴数字 PCR (dPCR) 扩增, 以水为空白对照, 测试 CC-2 转化体特异性。zSSIIb 内标基因在各转基因品种中都产生了阳性微滴, 在空白对照中无阳性微滴; CC-2 转化体特异性序列仅在转基因玉米 CC-2 中有阳性微滴, 在其他转基因玉米品种和空白对照中均无阳性微滴 (图 64)。结果表明转基因玉米 CC-2 转化体 dPCR 系统具有良好的扩增特异性。

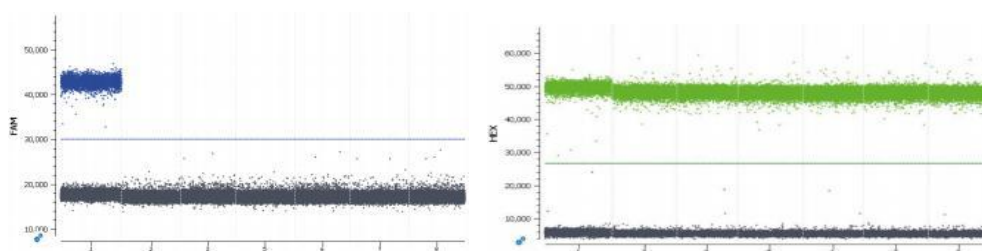


图 64 CC-2 微滴数字 PCR 特异性测试图

A, CC-2 微滴数字 PCR 一维热图; B, zSSIIb 微滴数字 PCR 一维热图。样品顺序: 1. CC-2, 2. 双抗 12-5, 3. NK603, 4. DBN9501, 5. T25, 6. MON87427, MIR604 8. 空白

### 13.3 CC-2 转化体和 zSSIIb 内标基因 dPCR 反应条件和反应体系优化

PCR 反应程序中退火温度是关键参数之一。在反应程序的退火环节, 设置 54°C、56°C、58°C、60°C、62°C 5 个退火温度梯度对 CC-2 转化体特异性序列和 zSSIIb 内标准基因的引物探针进行优化, 以筛选出最理想的温度条件。根据数字 PCR 反应的扩增图 (图 65), 综合比较不同退火温度下的扩增微滴图, 当退火温度在 54°C、56°C、58°C 和 62°C 时, CC-2 转化体阳性微滴与其余 2 个温度的

阳性微滴相比，阳性和阴性微滴分离程度较低。在 56°C 和 60°C 这 2 个退火温度中，56°C 的退火温度下 *zSSIb* 内标基因“雨滴状”阳性微滴数量更少，同时 CC-2 转化体特异性序列阳性微滴荧光强度略高，所以确定双重数字 PCR 的最佳退火温度为 56°C。

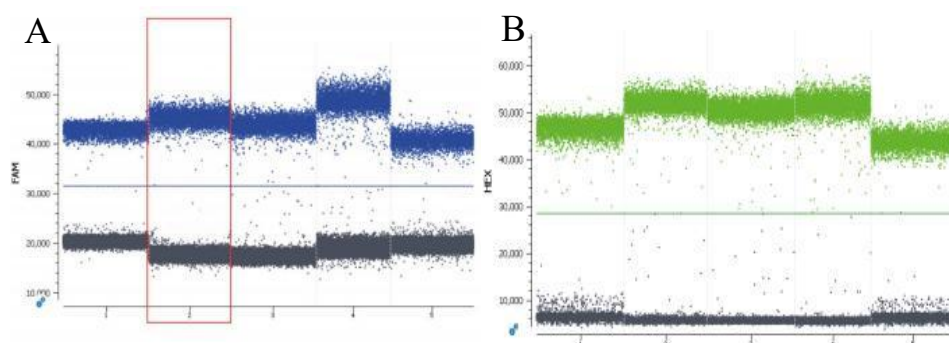


图 65 CC-2 转化体和 *zSSIb* 内标基因退火温度优化

A, CC-2 微滴数字 PCR 一维图；B, *zSSIb* 微滴数字 PCR 一维图样品顺序：退火温度梯度 1. 54°C, 2. 56°C, 3. 58°C, 4. 60°C, 5. 62°C

通过设置不同的 CC-2 和 *zSSIb* 的引物/探针浓度来评估引物/探针浓度对测试结果的影响。借鉴标准制修订方法建立中引物探针终浓度优化的通用范围在 0.1-1.0  $\mu\text{mol/L}$  之间，设置 5 个引物/探针终浓度梯度，引物/探针终浓度 1:1:0.5 的探针半倍状态，6 为空白对照，应用上述优化的微滴式数字 PCR 反应程序进行扩增。

依据微滴数字 PCR 反应的图谱（图 66）结果发现，CC-2 转化体和玉米内标准基因 *zSSIb* 在探针半倍状态下，阳性微滴弥散较不明显。在探针半倍状态下，当引物终浓度为 0.5  $\mu\text{mol/L}$  时，阳性微滴分布更为集中；当引物终浓度小于 0.5  $\mu\text{mol/L}$  时，阳性微滴明显

减少且荧光强度降低,综合考虑且兼顾经济高效,故选取双重微滴数字 PCR 的最佳引物终浓度为  $0.5 \mu\text{mol/L}$ 、探针终浓度为  $0.25 \mu\text{mol/L}$

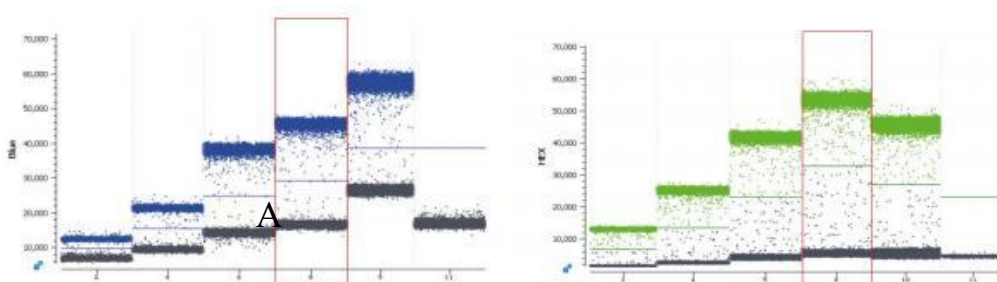


图 66 数字 PCR 引物探针浓度优化

A, zSSIIB 微滴数字 PCR 一维图; B, CC-2 微滴数字 PCR 一维图。引物/探针终浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ ) 及比例: 1. 0.1:0.1:0.05, 2. 0.2:0.2:0.1, 3. 0.4:0.4:0.2, 4. 0.5:0.5:0.25, 5. 0.8:0.8:0.4, 6. 空白对照

### 13.4 CC-2 转化体和 zSSIIB 内标基因双重 dPCR 的反应条件确认

采用 CC-2/zSSIIB 双重 dPCR 方法对标准物质进行定值,可以降低成本、提高效率和定量结果的准确性。在退火温度为  $56^{\circ}\text{C}$ 、引物/探针浓度为  $500/250 \text{ nM}$  的反应条件下,以纯合体基因组 DNA 为模板,进行 CC-2/zSSIIB 双重 dPCR 扩增。双重 dPCR 二维热图显示了四个明显的液滴簇,分别对应 FAM 阳性液滴簇、HEX 阳性液滴簇、双荧光液滴簇和阴性液滴簇(图 67),测量的拷贝数比值为 0.99,非常接近理论值 1.0,表明 CC-2/zSSIIB 双重 dPCR 中 zSSIIB 内标基因与 CC-2 转化体具有相同的扩增能力。

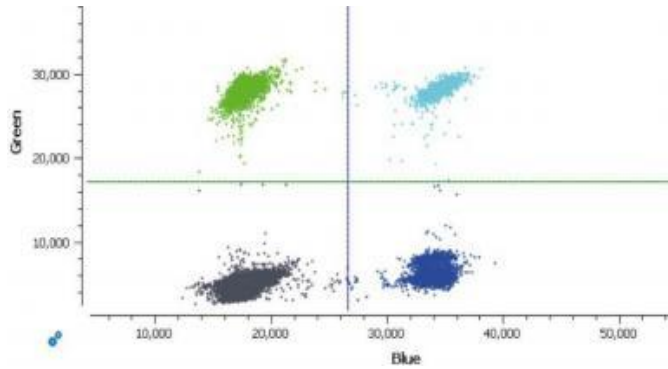
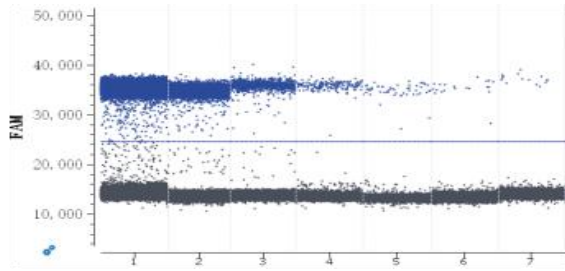


图 67 CC-2/*zSSIb* 双重 dPCR 在优化的反应体系和反应条件下的二维热图

### 13.5 CC-2/*zSSIb* dPCR 动力学范围测试及检出限、定量限

为了测试数字 PCR 方法的动力学范围，将 CC-2 基因组 DNA 溶液按比例 1.0 ， 0.2 ， 0.04 ， 0.008 ， 0.0025 ， 0.0011 ， 0.0006 ， 0.00025 ， 0.00015 ， 0.00005 进行梯度稀释配制成 10 个浓度的样品，每个浓度重复 4 次，用于测试数字 PCR 系统的动力学范围。不同浓度的微滴热图见图 68，测量的拷贝数浓度以及 CC-2 和 *zSSIb* 的拷贝数比值显示在表 63 中。当 DNA 模板量 15.38 到  $2.00 \times 10^4$  copies/ $\mu\text{L}$  的范围内，CC-2/*zSSIb* 双重 dPCR 显示稀释梯度样品和实际测量的 DNA 拷贝数之间存在良好的线性响应， $R^2$  为 0.9999(图 68A)。当稀释倍数为 0.0006 倍时，实测值的平均值为 15.38 copies/ $\mu\text{L}$  ，  $RSD < 25\%$  ，；当稀释倍数为 0.00025 倍时，重复测量值的平均值为 7.38copies/ $\mu\text{L}$ ，虽然有阳性微滴，但  $RSD > 25\%$ ，不在线性范围内，故确定双重数字 PCR 的动力学范围为 15.38~ $2.00 \times 10^4$  拷贝，检出限为 7.38 copies/ $\mu\text{L}$  ，定量限为 15.38 copies/ $\mu\text{L}$ (见表 63)。

A



B

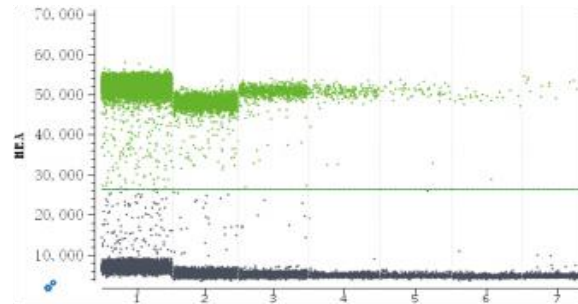


图 68 梯度稀释 DNA 溶液 CC-2/zSSI***b*** 双重 dPCR 的微滴热图

A , CC-2 微滴数字 PCR 一维图; B , zSSI***b*** 微滴数字 PCR 一维图。1-7 的模板量稀释倍数依次为 1.0 , 0.2 , 0.04 , 0.008 , 0.0025 , 0.0011 , 0.0006

表 63 测量梯度稀释 CC-2 DNA 溶液的拷贝数浓度和比值

	稀释梯度	实测浓度 (copie/μL)							
		重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	平均值	SD	RSD (%)	Bias (%)
CC-2	1.0	19575	21438	22688	20563	21065.63	1322.10	6.28	5.33
	0.2	3834	4089	4100	4225	4061.88	164.14	4.04	1.55
	0.04	726	741	788	750	751.25	26.08	3.47	-6.09
	0.008	155	159	165	150	157.19	6.32	4.02	-1.76
	0.0025	57	46	52	44	49.63	5.99	12.06	-0.75
	0.0011	17	23	19	20	19.75	2.57	13.00	-10.23
	0.0006	16	16	13	17	15.38	1.66	10.81	28.13
	0.00025	3	6	11	9	7.38	3.20	43.32	47.50
	0.00015	2.79	4.32	5.55	0	3.17	2.39	75.61	--
	0.00005	0	1	1	2	1.10	0.96	86.94	--
zSSI <b><i>b</i></b>	稀释梯度	重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	平均值	SD	RSD (%)	Bias (%)
	1.0	18938	20138	20813	19913	19950.00	775.81	3.89	-0.25
	0.2	4004	4061	4064	4274	4100.63	118.70	2.89	2.45
	0.04	798	789	864	844	823.44	36.12	4.39	2.85

0.008	156	149	183	173	165.00	15.31	9.28	3.03
0.0025	69	46	58	56	57.28	9.22	16.09	12.71
0.0011	20	25	23	29	24.06	4.07	16.89	8.57
0.0006	13	15	13	10	12.81	1.91	14.91	6.34
0.00025	10	7	4	7	7.31	2.40	32.81	31.62
0.00015	2.79	0	2.22	5.55	2.64	2.28	86.48	--
0.00005	2	0	2	0	1.01	1.17	115.63	--

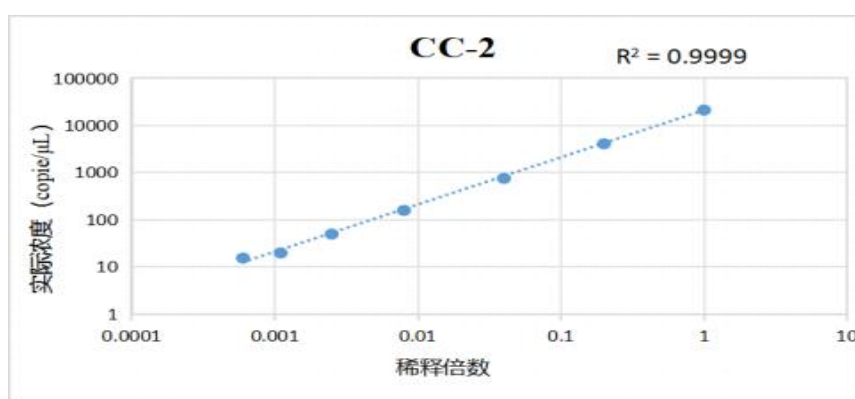


图 69 CC-2/zSSIb 双重 dPCR 的动态范围和实测拷贝数比

### 13.6 CC-2/zSSIb 双重 dPCR 的测量准确性

邀请不同实验人员，采用 CC-2/zSSIb 双重 dPCR 对不同转基因含量样品（1-4）进行定量，每份样品做了 4 次重复测量。测量结果与统计分析结果一起显示在表 64 中。4 个样品测得的拷贝数比值均接近预期值，RSD<25%，相对偏倚在±25%范围内。实验证明，已建立的 CC-2/zSSIb 双重 dPCR 实现了对 CC-2 不同含量样品的准确定量，具有良好的重复性和重现性。

表 64 CC-2/zSSIb 双重 dPCR 测量结果

样本	实测拷贝数比值 (%)				平均值	SD	RSD (%)	Bisa (%)
	重复1	重复2	重复3	重复4				

1 (5%)	4.86	4.81	5.03	4.83	4.88	0.10	2.05	-2.36
2 (1%)	1.07	1.02	1.09	1.12	1.07	0.04	4.16	7.41
3 (0.5%)	0.58	0.48	0.51	0.49	0.51	0.04	8.59	2.85
4 (0.1%)	0.09	0.08	0.09	0.07	0.08	0.01	11.06	-15.27

## 14. LP026-2/*zSSIb* 二重数字 PCR 方法

### 14.1 引物探针确认

LP026-2 是隆平生物研发已获得安全证书的一种转基因玉米转化体，具有抗虫和耐除草剂双重目标性状，其转化体分子特征由隆平生物公司解析。首先对获得转基因材料的分子特征进行验证，确定转基因材料的转化体身份。LP026-2 转化体特异性引物探针和玉米内标准基因 *zSSIb* 引物探针选用已发布的标准方法(农业农村部公告第 1012 号—5—2026) 中的实时荧光 PCR 方法引物探针。

表 65 LP026-2 转化体特异性引物和探针序列

靶标	引物/探针名称及序列 (5'-3')	扩增片段大小 (bp)	来源
<i>zSSIb</i> 基因	<i>zSSIb</i> -3F: CGGTGGATGCTAAGGCTGATG	88	农业农村部公告第 1012 号—5—2026
	<i>zSSIb</i> -4R: AAAGGGCCAGGTTCATTATCCTC		
	<i>zSSIb</i> -P:HEX-TAAGGAGCACTCGCCGCCGCATCTG-BHQ1		
LP026-2 转化体	LP026-2-qF: CTCGGACCCATCGAATGC	87	
	LP026-2-qR: CTCCTTAATTCTCCGCTCT		
	LP026-2-qP:FAM-TCAGATTGTCGTTTCCCGCCTT-BHQ1		

在伯乐微滴式数字 PCR 平台 QX200 上，用通用的 PCR 反应体系（引物/探针浓度 500/250 nM）和退火温度（58°C），以 LP026-2

杂合体基因组 DNA 为模板，分别进行单重数字 PCR、LP026-2 转化体/*zSSIb* 基因的二重 ddPCR 扩增，对表 65 中的引物探针组合进行测试，设 3 个平行反应。

结果显示，单重数字 PCR、LP026-2 转化体和 *zSSIb* 基因二重微滴式数字 PCR 的阴性微滴和阳性微滴分界清晰，LP026-2 转化体和 *zSSIb* 基因拷贝数比值接近 0.5，符合杂合体 LP026-2 玉米分子特征。综上，确认表 65 的引物探针适用 LP026-2 转化体/*zSSIb* 基因的二重 ddPCR 扩增。

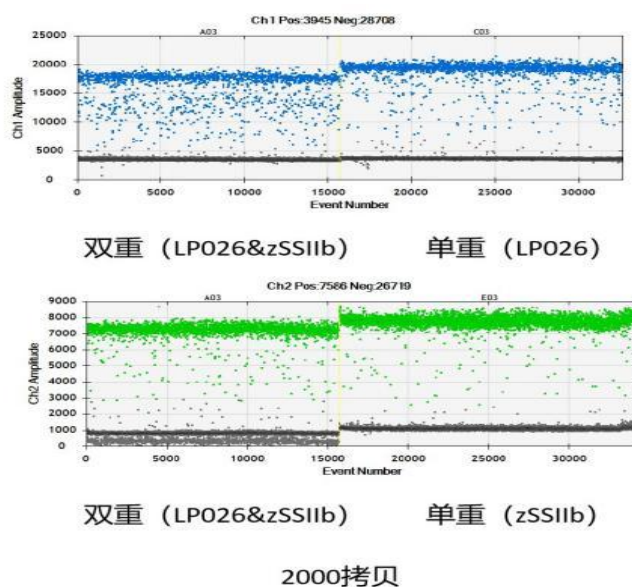


图 70 数字 PCR 引物探针确认

## 14.2 LP026-2/*zSSIb* 二重微滴数字 PCR 特异性测试

用转基因玉米 LP026-2、其他转基因玉米混合样、转基因水稻混合样、转基因大豆混合样、转基因油菜混合样、转基因棉花混合样、非转基因玉米基因组 DNA 作模板进行 LP026-2 和 *zSSIb* 二重 ddPCR

扩增，用水做空白对照，测试 LP026-2 转化体和 *zSSIb* 二重 ddPCR 方法的特异性。

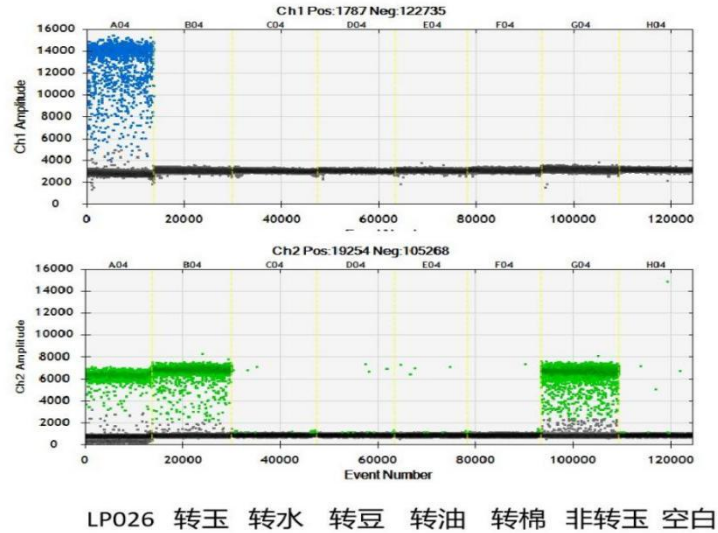


图 71 LP026-2/*zSSIb* 二重 ddPCR 特异性测试扩增图谱

结果显示，*zSSIb* 基因 ddPCR 在玉米样品中扩增得到阳性微滴，在其他作物和空白对照中不能扩增得到阳性微滴 LP026-2 转化体特异性序列 ddPCR 仅在转基因玉米 LP026-2 样品中扩增得到阳性微滴，在其他转基因玉米品种和空白对照中不能扩增得到阳性微滴，结果表明 LP026-2/*zSSIb* 二重 ddPCR 方法有良好的特异性（图 71）。

### 14.3 LP026-2 转化体特异性数字 PCR 的条件优化

PCR 扩增程序中退火温度的高低对阴阳性微滴区分有显著的影响，本项目设置了 52℃、52.7℃、54℃、55.9℃、58.4℃、60.3℃、61.4℃、62℃共 8 个温度梯度，测试 LP026-2 和 *zSSIb* 基因二重 ddPCR 的扩增效果。

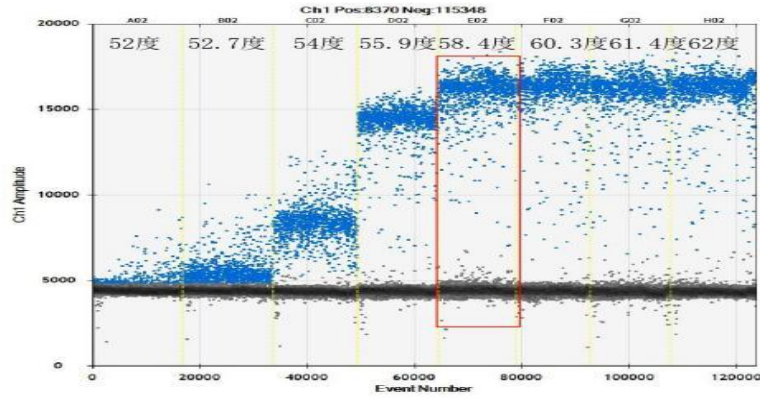


图 72 数字 PCR 引物探针退火温度优化扩增图谱

数字 PCR 扩增结果显示：扩增图谱中 LP026-2 玉米转化体特异性序列阳性微滴的荧光强度在 52°C、52.7°C、54°C、55.9°C、58.4°C 随温度升高呈现升高趋势，在 58.4°C、60.3°C、61.4°C、62°C 温度荧光强度无显著差异，阴阳液滴分界清晰，没有难以界定的“下雨”现象（图 72）；进一步对荧光强度、阴阳液滴分界综合分析可以发现，在 58.4°C 时结果最佳。因此，LP026-2 转化体特异性序列引物探针最优退火延伸温度为 58.4°C。经过优化后 LP026-2 转化体特异性序列数字 PCR 扩增程序为：95°C 预变性 10 min；94°C 变性 30 s，58°C 退火延伸 60 s，共进行 50 个循环；98°C 变性 10 min，4°C 保存（升降温速率 2°C/s）。

由于微滴式数字 PCR 平台 Bio-Rad QX200 需使用专用的扩增试剂，PCR 扩增体系中仅选择引物探针浓度进行优化测试。实时荧光 PCR 方法中常用引物与探针终浓度分别为 0.5  $\mu\text{mol/L}$  和 0.25  $\mu\text{mol/L}$ ，Bio-Rad 2 $\times$ ddPCRTM Supermix for Probes 的说明书引物与探针的终浓度分别为 0.9  $\mu\text{mol/L}$  和 0.25 nmol/L。参考上述引物探针终浓度设

置了 16 组（见表 66）对 LP026-2 转化体特异性序列引物/探针终浓度进行测试。

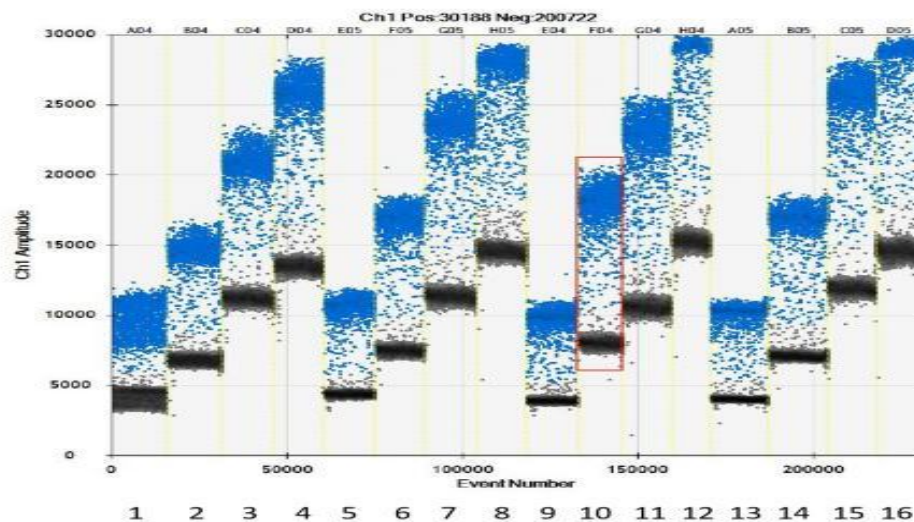


图 73 数字 PCR 引物探针终浓度优化扩增图谱

表 66 数字 PCR 引物探针浓度优化设置及扩增数据

序号	引物/探针终浓度 ( $\mu\text{mol}$ )	引物/探针用量 ( $\mu\text{L}$ )	拷贝数测量平均值
1	250/250/125	0.5/0.5/0.25	5780
2	250/250/250	0.5/0.5/0.5	6080
3	250/250/375	0.5/0.5/0.75	6960
4	250/250/500	0.5/0.5/1.0	6940
5	375/375/125	0.75/0.75/0.25	4620
6	375/375/250	0.75/0.75/0.5	4760
7	375/375/375	0.75/0.75/0.75	5100
8	375/375/500	0.75/0.75/1.0	5860
9	500/500/125	1.0/1.0/0.25	4780
10	500/500/250	1.0/1.0/0.5	7140
11	500/500/375	1.0/1.0/0.75	5900
12	500/500/500	1.0/1.0/1.0	3880
13	750/750/125	1.5/1.5/0.25	4140
14	750/750/250	1.5/1.5/0.5	4920
15	750/750/375	1.5/1.5/0.75	6460
16	750/750/500	1.5/1.5/1.0	4100

数字 PCR 扩增结果显示：扩增图谱中 LP026-2 转化体特异性序列在不同的引物探针浓度下，微滴的荧光强度存在较显著差异，随着引物探针浓度升高，阳性微滴信号出现升高，在 LP026-2 转化体特异性序列引物/探针终浓度分别为 0.5：0.5：0.25  $\mu\text{mol/L}$  时，扩增图谱阴阳液滴分界更清晰，没有难以界定的“下雨”现象（图 73）；因此，确定 LP026-2 转化体特异性序列最优引物、探针终浓度分别为 0.5：0.5：0.25  $\mu\text{mol/L}$ 。经过优化后 LP026-2 转化体特异性序列数字 PCR 扩增体系如表 67 所示。

表 67 数字 PCR 扩增体系

组分	体积
ddH <sub>2</sub> O	3.0 $\mu\text{L}$
2 $\times$ ddPCR <sup>TM</sup> Supermix for Probes	10.0 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 内标上游引物 zSSIIb-3F	1.0 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 内标下游引物 zSSIIb-4R	1.0 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 内标探针 zSSIIb-P	0.5 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 转化体上游引物 LP026-2-qF	1.0 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 转化体上游引物 LP026-2-qR	1.0 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 转化体探针 LP026-2-qP	0.5 $\mu\text{L}$
DNA 模板	2.0 $\mu\text{L}$
总体积	20.0 $\mu\text{L}$

#### 14.4 LOD、LOQ 和动力学范围测试

为了测试 LP026-2 转化体特异性序列数字 PCR 方法的线性范围，将 LP026-2 的杂合基因组 DNA 进行梯度稀释，获得拷贝数为 40000、8000、1600、320、40、20、10、5、2、1 拷贝/反应进行数字 PCR 扩增。根据标准品数字 PCR 测量值及初始模板拷贝数绘制 LP026-2 转化体特异性序列的线性回归曲线进行线性范围，按照《转基因植物及

其产品成分检测 数字 PCR 方法制定指南》(农业农村部公告第 323 号—21—2020) 中定量检测的要求, 在整个线性动态范围内, 线性度即线性回归方程的决定系数  $R^2$  一般应  $\geq 0.98$ , 正确度偏差 (Bias) 不超过标称值的 25%, 精密度即重复性相对标准偏差 (RSD) 一般应  $\leq 25\%$ 。

表 68 玉米特异性序列数字 PCR 线性动态范围与重复性分析

LP026-2 拷贝数	LP026-2 转化体											
	Repeat-1			Repeat-2			Repeat-3			平均	RSD	Bias
	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
40000	40720	41580	40756	40123	40349	40398	40512	40298	40478	40579	424.33	1.05%
8000	7760	7845	7932	7794	7912	7750	7943	7912	7923	7863	77.48	0.99%
1600	1520	1543	1567	1525	1574	1538	1549	1501	1536	1539	22.74	1.48%
320	304	312	319	305	301	304	326	329	302	311	10.77	3.46%
40	40	29	47	37	56	43	27	39	41	40	20.72	-0.28%
20	15	12	13	15	13	14	29	19	13	16	31.60	-20.56%
10	6	14	26	13	16	5	14	7	21	14	48.58	35.56%

结果显示: 当 20  $\mu\text{L}$  扩增体系中 LP026-2 转化体特异性序列拷贝数分别在 40~40000 copies 时, 随着拷贝数的降低, 3 次重复测试的正确度偏差 (Bias) 和重复性相对标准偏差 (RSD) 均小于 25%, 当模板量为 20 拷贝时, 正确度偏差 (Bias) 和重复性相对标准偏差 (RSD) 出现大于 25% 的情况, 因此定量极限 (LOQ) 确定为 40 个拷贝 (LP026-2 转化体特异性序列); 当 DNA 浓度低至 10 拷贝 (LP026-2 转化体特异性序列) 时, 3 次重复测试的 9 个平行均检测到阳性信号, 因此检测极限 (LOD) 确定为 10 拷贝。LP026-2 数字 PCR 方法线性

动态范围测试结果表明，20 μL 扩增体系中，当模板量在 LP026-2 转化体特异性序列 40~40000 拷贝的范围内，可获得准确的拷贝数浓度和拷贝数比值测量值。

### 14.5 准确性测试

配制 5.0%、3.0%、1.0%、0.5%、0.1% 共 5 个拷贝数分数的 LP026-2 盲样，由不同操作者在不同日期进行 3 次重复测定，每次 3 个平行。测定结果如表 69、表 70 所示，测量平均值与预期值的相对偏倚 (Bias) 均在 ±25% 以内，三次测定的 RSD 均小于 25%，表明方法具有良好的准确性和可重复性。

表 69 5 个盲样的测量结果

重复	PCR 平行	盲样含量测量值				
		S1 (5%)	S2 (3%)	S3 (1%)	S4 (0.5%)	S5 (0.1%)
1	1	5.24	2.78	0.96	0.46	0.11
	2	5.24	2.69	1.07	0.47	0.07
	3	5.34	2.68	0.97	0.46	0.10
2	1	5.25	2.77	1.08	0.46	0.08
	2	5.15	2.81	1.12	0.51	0.09
	3	5.20	2.70	0.97	0.43	0.08
3	1	5.36	2.74	1.01	0.44	0.08
	2	5.21	2.64	1.11	0.43	0.10
	3	5.25	2.79	1.01	0.47	0.09

表 70 5 个盲样定量结果的重复性和重现性统计分析

盲样	预期拷贝数比值(%)	测量平均值(%)	S <sup>r</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	S <sup>R</sup> (%)	RSD <sub>R</sub> (%)	Bias(%)
S1	5	5.25	0.06	1.20	0.07	1.27	4.98
S2	3	2.73	0.06	2.31	0.06	2.31	-8.90
S3	1	1.03	0.07	6.39	0.07	6.39	3.22

盲样	预期拷贝数比值(%)	测量平均值(%)	S <sup>r</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	S <sup>R</sup> (%)	RSD <sub>R</sub> (%)	Bias(%)
S4	0.5	0.46	0.03	5.77	0.03	5.77	-8.02
S5	0.1	0.09	0.01	15.46	0.01	15.46	-12.00

二重 ddPCR 的定量结果如表 69 所示，计算得到 5 个盲样 LP026-2/zSSIIb 拷贝数比值的平均值，统计测量结果的重复性相对标准差 (RSD<sub>r</sub>)、重现性相对标准差 (RSD<sub>R</sub>)、和相对偏倚 (Bias)。结果显示，测量平均值均接近预期含量，与预期值的相对偏倚在±25%的可接受范围内；重复性相对标准偏差 RSD<sub>r</sub> 和再现性相对标准偏差 RSD<sub>R</sub> 均小于 25% (表 70)。已建立的 LP026-2/zSSIIb 二重 ddPCR 实现了对样品中 LP026-2 转化体含量的准确定量，具有良好的重复性和重现性。

## 14.6 结论

LP026-2/zSSIIb 二重 ddPCR 扩增引物探针采用已发布的标准方法 (农业农村部公告第 1012 号—5—2026) 中的实时荧光 PCR 方法引物探针 (表 65)。LP026-2/zSSIIb 二重 ddPCR 扩增体系见表 71，扩增程序为：95°C 预变性 10 min；94°C 变性 30 s，58°C 退火延伸 60 s，共进行 50 个循环；98°C 变性 10 min，4°C 保存 (升降温速率 2°C/s)。

表 71 数字 PCR 扩增体系

组分	终浓度	体积
ddH <sub>2</sub> O		3.0 μL
2×ddPCR <sup>TM</sup> Supermix for Probes	1×	10.0 μL
10 μmol/L 内标上游引物 zSSIIb-QF	0.5 μmol/L	1.0 μL

10 $\mu\text{mol/L}$ 内标下游引物 <i>zSSIb</i> -QR	0.5 $\mu\text{mol/L}$	1.0 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 内标探针 <i>zSSIb</i> -QP	0.25 $\mu\text{mol/L}$	0.5 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 转化体上游引物 LP026-2-qF	0.5 $\mu\text{mol/L}$	1.0 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 转化体上游引物 LP026-2-qR	0.5 $\mu\text{mol/L}$	1.0 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 转化体探针 LP026-2-qP	0.25 $\mu\text{mol/L}$	0.5 $\mu\text{L}$
25 mg/L DNA 模板	2.5 mg/L	2.0 $\mu\text{L}$
总体积		20.0 $\mu\text{L}$

扩增体系可根据仪器及试剂耗材的实际使用情况，进行相应调整。此表是 1 个扩增体系的体积，应按照实际反应数量进行扩增体系配置。空白质控品以 2.0  $\mu\text{L}$  的 ddH<sub>2</sub>O 作模板。

## 15. KJ1003/*zSSIb* 二重数字 PCR 方法

## 16. QY2569-42/*zSSIb* 二重数字 PCR 方法

### 16.1 引物探针筛选

用 8 组转化体特异性引物/探针组合玉米国标内标准基因 *zSSIb* 对 QY2569-42 的单株基因组 DNA 进行扩增，通过分析微滴扩增图谱确定后续引物/探针。由微滴扩增图谱（图 74）可见，引物探针组合 7、8 未产生阳性微滴，引物探针组合 4、6 的阳性微滴不能与阴性微滴明显分开，引物探针组合 1、2、3、5 的阳性微滴虽然均可以与阴性微滴分开，但引物探针组合 2 的荧光信号明显高于引物探针组合 1、3、5，且引物探针组合 2 与内标准基因 *zSSIb* 的比值为 0.99，均接近理论值 1.0，故选择引物探针组合 2 用于后续实验。

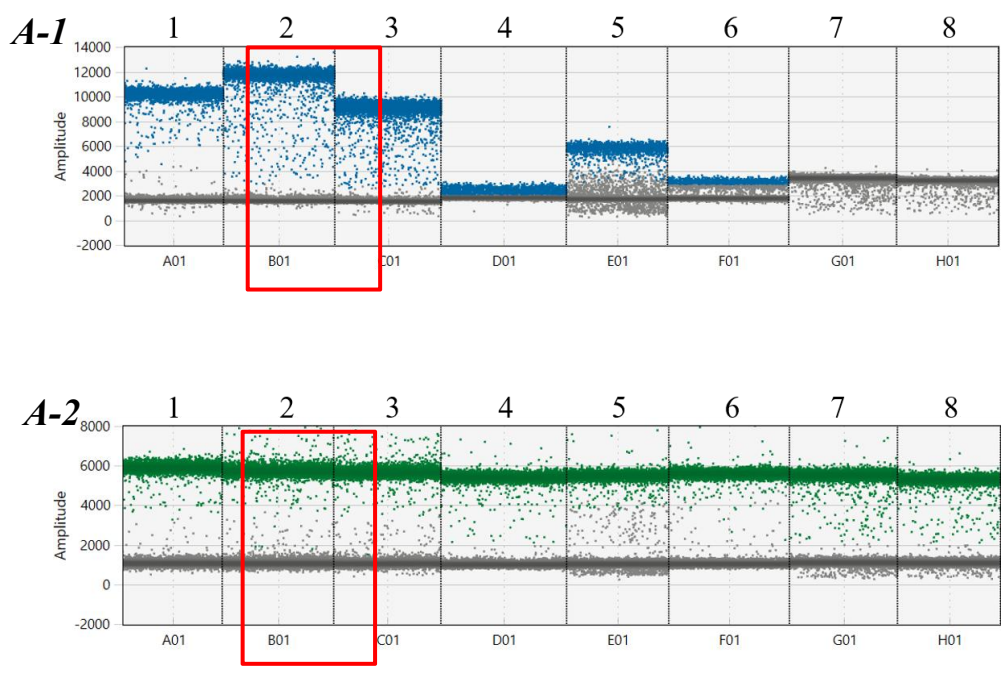


图 74 转基因玉米 QY2569-42 转化体特异性序列引物探针双重数字 PCR 初筛微滴图

注：A-1 为双重数字 PCR 反应时 1~8 组 FAM 标记的 QY2569-42 转化体特异性引物探针组合的微滴反应图，A-2 为双重数字 PCR 反应时 1~8 组 HEX 标记的玉米国标内标准基因 *zSSIb* 引物探针组合（农业部 1861 号公告-3-2012）的微滴反应图。

经初筛后，QY2569-42 双重微滴数字 PCR 方法所采用的转化体特异性序列和内标准基因 *zSSIb* 引物和探针序列如表 72 所示。

表 72 QY2569-42 转化体和 *zSSIb* 内标基因引物/探针序列信息

检测靶标	引物/探针名称及序列(5'-3')	扩增片段大小(bp)	序列来源
QY2569-42	5-qF3: ATGTTTTAAACCATACTGTAATTTCG	82	待发布国家标准
	5-qR1: TTAGCAGCTTGAGCTTGGATCAG		
	5-qP1:FAM-AAACTGAAGGCGGGAAACGACAAT-BHQ1		
<i>zSSIb</i>	<i>zSSIb</i> -3F: CGGTGGATGCTAAGGCTGATG	88	农业部 1861号公告-3-2012
	<i>zSSIb</i> -4R: AAAGGGCCAGGTTTCATTATCCTC		
	<i>zSSIb</i> -P:FAM-TAAGGAGCACTCGCCGCCGCATC-TG-BHQ1		

## 16.2 QY2569-42 二重微滴数字 PCR 特异性测试

为了考察 QY2569-42 转化体特异性序列数字 PCR 系统的扩增特异性，分别以转基因玉米 QY2569-42、其他转基因玉米混合样品、转基因大豆混合样品、转基因棉花混合样品、转基因油菜混合样品、转基因水稻混合样品、非转基因玉米（阴性对照，NTC）的基因组 DNA 和 ddH<sub>2</sub>O（空白对照）为模板，进行数字 PCR 扩增。QY2569-42 转化体特异性序列只有在以转基因玉米 QY2569-42 基因组 DNA 为模板时，才有阳性微滴，而以其他转基因玉米混合样品、转基因大豆混合样品、转基因棉花混合样品、转基因油菜混合样品、转基因水稻混合样品、非转基因玉米的基因组 DNA 和 ddH<sub>2</sub>O 为模板时，均无阳性微滴，扩增结果为阴性（图 75）。扩增结果显示，转基因玉米 QY2569-42 转化体数字 PCR 系统具有良好的扩增特异性。

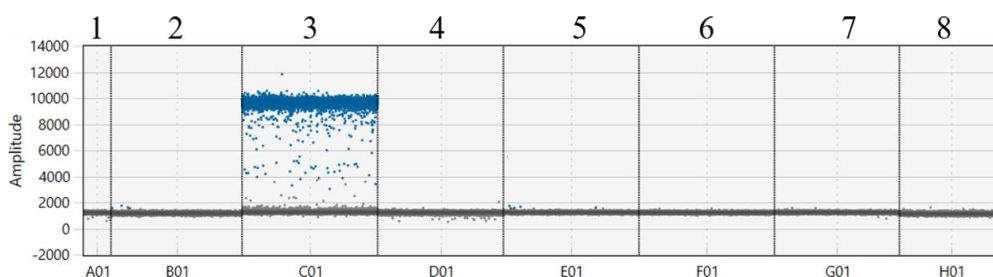


图 75 QY2569-42 转化体数字 PCR 特异性检测扩增热图

注：1：CK；2：NTC；3：转基因玉米 QY2569-42；4：其他转基因玉米混合样品；5：转基因大豆混合样品；6：转基因棉花混合样品；7：转基因油菜混合样品；8：转基因水稻混合样品。

### 16.3 QY2569-42/*zSSIb* 二重数字 PCR 的条件优化

本项目使用具有温度梯度功能的热循环仪来确定微滴式数字 PCR 反应体系理想的退火温度，在反应程序的退火环节，设置 54°C、56°C、58°C、60°C、62°C、64°C 等 6 个退火温度梯度对 QY2569-42 转化体特异性序列和内标准基因引物探针进行优化，以筛选出最理想的温度条件。

根据双重数字 PCR 反应的扩增图（图 76、图 77），QY2569-42 转化体特异性序列和玉米内标准基因 *zSSIb* 在不同的退火温度下，微滴的荧光强度存在一定的差异。综合比较 QY2569-42 转化体和 *zSSIb* 基因的数字 PCR 扩增热图，当退火温度在 54°C、56°C、58°C、60°C 时，荧光强度在同一水平，而当退火温度高于 60°C 时，荧光强度有下降趋势。在退火温度为 60°C 时，转化体特异性序列及内标准基因阳性微滴均无严重弥散，同时参考不同退火温度时转化体特异性序列和内标准基因的拷贝数比值（表 73），当退火温度为 60°C 时，比值也接近于 1，所以确定双重数字 PCR 的最佳退火温度 60°C。经过优化后 *zSSIb* 基因和 QY2569-42 转化体特异性序列数字 PCR 扩增程序为：95°C 预变性 10 min；94°C 变性 30 s，60°C 退火延伸 60 s，共进行 50 个循环；98°C 变性 10 min，4°C 保存（升降温速率 2°C/s）。

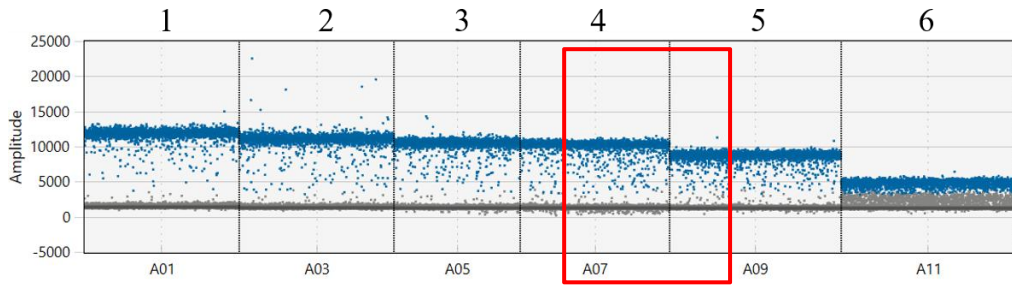


图 76 双重数字 PCR QY2569-42 转化体特异性序列退火温度优化

注：1~6 的退火温度依次为 54°C、56°C、58°C、60°C、62°C、64°C。

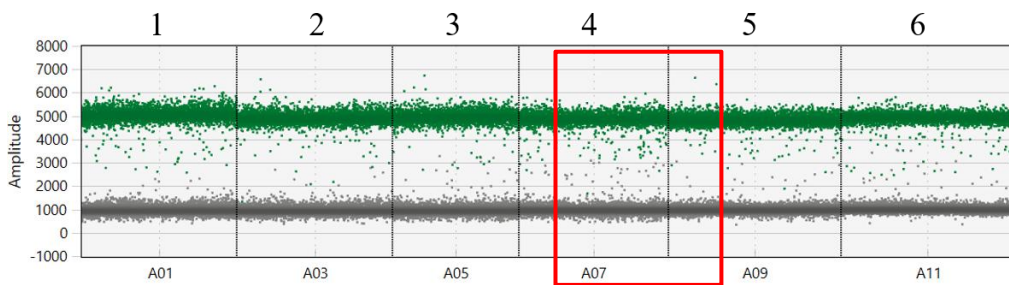


图 77 双重数字 PCR 内标准基因 *zSSIb* 退火温度优化

注：1~6 的退火温度依次为 54°C、56°C、58°C、60°C、62°C、64°C。

表 73 双重数字 PCR 退火温度优化转化体特异性序列和内标准基因的拷贝数

Tm	54°C	56°C	58°C	60°C	62°C	64°C
QY2569-42 拷贝数(copies/μL)	20880	21400	21160	20160	19800	18680
<i>zSSIb</i> 拷贝数(copies/μL)	19560	19920	20040	19920	20720	19800
QY2569-42 转化体/ <i>zSSIb</i> 拷贝数比值(copies/copies)	1.07	1.07	1.06	1.01	0.96	0.94

由于微滴式数字 PCR 平台 Bio-Rad QX200 需使用专用的扩增试剂，PCR 扩增体系中仅选择引物探针浓度进行优化测试。参照已发布标准和文献中提到的数字 PCR 体系多为引物/探针非过饱和状态，借鉴标准制修订方法建立中引物探针终浓度优化的通用范围在 0.1~1.0

$\mu\text{mol/L}$  之间，按表 74 设置 12 个引物/探针终浓度梯度，应用上述优化的微滴式数字 PCR 反应程序扩增。

表 74 引物探针浓度优化配比表

引物、探针终浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )		引物、探针终浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )	
①	0.5:0.5:0.25+0.5:0.5:0.25	⑦	0.6:0.6:0.3+0.5:0.5:0.25
②	0.5:0.5:0.25+0.4:0.4:0.2	⑧	0.4:0.4:0.2+0.4:0.4:0.2
③	0.5:0.5:0.25+0.6:0.6:0.3	⑨	0.6:0.6:0.3+0.6:0.6:0.3
④	0.5:0.5:0.25+0.3:0.3:0.15	⑩	0.4:0.4:0.2+0.3:0.3:0.15
⑤	0.4:0.4:0.2+0.5:0.5:0.25	⑪	0.3:0.3:0.15+0.4:0.4:0.2
⑥	0.6:0.6:0.3+0.5:0.5:0.25	⑫	0.3:0.3:0.15+0.3:0.3:0.15

根据双重微滴数字 PCR 反应的图谱 (图 77、图 79) 可知，在  $60^{\circ}\text{C}$  退火、引物终浓度为  $0.5 \mu\text{mol/L}$ 、探针终浓度为  $0.25 \mu\text{mol/L}$  的反应条件下，以纯合体基因组 DNA 为模板，进行 QY2569-42/zSSIIb 二重 ddPCR。二重数字 PCR 二维热图显示了 4 个明显的液滴簇，分别对应 FAM 阳性液滴簇、HEX 阳性液滴簇、双荧光液滴簇和阴性液滴簇，测量的拷贝数比值为 0.99，非常接近理论值 1.0，表明 QY2569-42/zSSIIb 二重 ddPCR 中 zSSIIb 内标基因与 QY2569-42 转化体具有相同的扩增能力。选择  $60^{\circ}\text{C}$  作为 QY2569-42/zSSIIb 二重 ddPCR 的最佳退火温度，QY2569-42 转化体和 zSSIIb 内标基因的引物终浓度均为  $0.5 \mu\text{mol/L}$ 、探针终浓度均为  $0.25 \mu\text{mol/L}$ 。

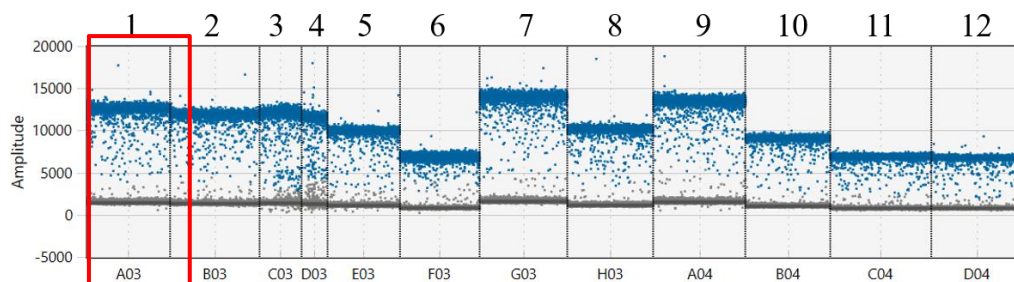


图 78 双重数字转化体特异性序列引物探针浓度筛选

注：1~12 依次为表 74 所示的引物探针浓度。

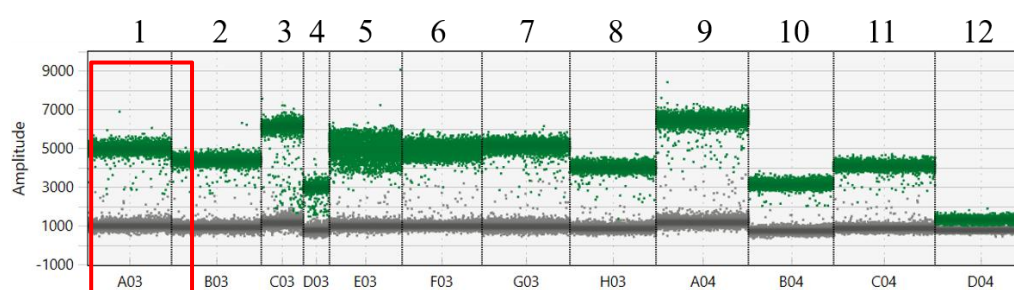


图 79 双重数字内标准基因 *zSSIb* 引物探针浓度筛选

注：1~8 依次为表 74 所示的引物探针浓度。

表 75 双重数字 PCR 引物探针优化转化体特异性序列和内标准基因的拷贝数

引物探针终浓度	①	②	③	④	⑤	⑥
QY2569-42 拷贝数(copies/ $\mu$ L)	19960	19760	19960	19520	19680	19400
<i>zSSIb</i> 拷贝数(copies/ $\mu$ L)	19360	18760	19440	19080	18640	19520
QY2569-42 转化体/ <i>zSSIb</i> 拷贝数比值(copies/copies)	1.03	1.05	1.03	1.02	1.06	0.99
引物探针终浓度	⑦	⑧	⑨	⑩	⑪	⑫
QY2569-42 拷贝数(copies/ $\mu$ L)	19600	19520	19680	19760	19840	19880
<i>zSSIb</i> 拷贝数(copies/ $\mu$ L)	18680	18520	18760	18600	19040	19760
QY2569-42 转化体/ <i>zSSIb</i> 拷贝数比值(copies/copies)	1.05	1.05	1.05	1.06	1.04	1.01

经过优化后 *zSSIb* 基因和 QY2569-42 转化体特异性序列数字 PCR 扩增体系如表 78 所示。

表 76 数字 PCR 扩增体系

组分	体积
ddH <sub>2</sub> O	3.0 $\mu$ L
2 $\times$ ddPCR <sup>TM</sup> Supermix for Probes	10.0 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 内标上游引物 <i>zSSIb</i> -3F	1.0 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 内标下游引物 <i>zSSIb</i> -4R	1.0 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 内标探针 <i>zSSIb</i> -P	0.5 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 转化体上游引物 QY2569-42-qF	1.0 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 转化体上游引物 QY2569-42-qR	1.0 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 转化体探针 QY2569-42-qP	0.5 $\mu$ L
DNA 模板	2.0 $\mu$ L
总体积	20.0 $\mu$ L

#### 16.4 QY2569-42/*zSSIb* 二重 ddPCR 的 LOD、LOQ 和动力学范围测试

微滴式数字 PCR 的理论有效线性范围是 1-120000 个拷贝，但 20  $\mu$ L 反应液在微滴生成器中只能产生 12000-16000 个有效微滴，微滴数大于 10000 为有效反应。为了测试数字 PCR 系统的动力学范围，将 QY2569-42 基因组 DNA 进行梯度稀释，浓度依次为 24000、4800、960、192、38.4、15.36、7.68、3.84 copies/ $\mu$ L，进行数字 PCR 扩增，每个浓度重复 4 次，用于测试数字 PCR 系统的动力学范围、检出限和定量限。当 DNA 浓度为 15.36 copies/ $\mu$ L 时，此时反应体系内 DNA 的模板量为 30.72 copies，转基因玉米 QY2569-42 转化体特异性序列拷贝数浓度和内标准基因 *zSSIb* 拷贝数浓度的 RSD 和偏差均低于 25%，故推测此浓度为 QY2569-42 数字 PCR 反应的定量限，以 20  $\mu$ L

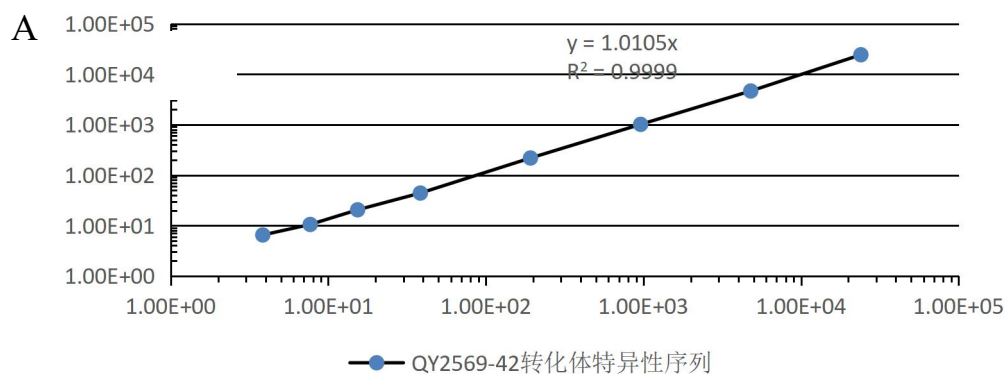
PCR 检测反应体系中加入含有转基因玉米 QY2569-42 转化体特异性序列的 120 ng DNA 模板进行测算，定量限约为 31 copies/反应；当反应体系内 DNA 浓度低至 7.68 copies/ $\mu$ L 时，此时反应体系内 DNA 的模板量为 15.36 copies，转基因玉米 QY2569-42 转化体特异性序列拷贝数浓度和内标准基因 *zSSIIB* 拷贝数浓度的 RSD 均高于 25%，偏差均低于 25%，故推测数字 PCR 反应的检出限，以 20  $\mu$ L PCR 检测反应体系中加入含有转基因玉米 QY2569-42 转化体特异性序列的 120 ng DNA 模板进行测算，检出限约为 15 copies/反应（见表 75）。

如图 80 所示，当 20  $\mu$ L 反应体系内模板浓度在 7.68~48000 copies 范围内时，通过微滴数字 PCR 获得转化体的测量值与预期拷贝数浓度间具有良好的相关性，决定系数  $R^2$  值等于 0.9999，线性方程为  $y=1.0105x$ （ $y$  代表测量拷贝数， $x$  代表预期拷贝数）；通过微滴数字 PCR 获得内标准基因 *zSSIIB* 决定系数  $R^2$  值等于 0.9999，线性方程为  $y=1.0336x$ （ $y$  代表测量拷贝数， $x$  代表预期拷贝数）；当模板量低至 15.36 和 7.68 copies 时，转化体特异性序列/*zSSIIB* 拷贝数比值 RSD 明显较大。当测试样品模板量浓度处于 30.72~48000 copies 时，RSD 值及偏差均小于 25%，检测结果稳定、可靠。当测试样品的浓度处于动力学范围的中间位置时，定量结果最准确。

表 77 梯度稀释 QY2569-42 基因组 DNA 溶液的拷贝数和比值

转化体名称	预期值 (copies/ $\mu$ L)	拷贝数浓度 (copies/ $\mu$ L)					SD	RSD(%)	Bias(%)
		重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	平均值			
QY2569-42	24000	24320	23830	25030	23980	24290.0	534.23	2.20%	1.21

转化体名称	预期值 (copies/ $\mu$ L)	拷贝数浓度 (copies/ $\mu$ L)					SD	RSD(%)	Bias(%)
		重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	平均值			
	4800	4470	4750	4650	4720	4647.5	125.53	2.70%	-3.18
	960	1080	970	1060	940	1012.5	68.01	6.72%	5.47
	192	195	234	218	225	218.0	16.67	7.65%	13.54
	38.4	47	49	39	41	44.0	4.76	10.82%	14.58
	15.36	22	16	22	16	19.0	3.46	18.23%	23.70
	7.68	10	12	5	11	9.5	3.11	32.73%	23.70
	3.84	3	9	6	8	6.5	2.65	40.70%	69.27
	24000	24860	24770	25440	24300	24842.5	467.93	1.88%	3.51
	4800	4750	4630	4850	4860	4772.5	107.20	2.25%	-0.57
	960	1060	970	1090	1000	1030.0	54.77	5.32%	7.29
	192	202	231	217	209	214.8	12.45	5.80%	11.85
	38.4	47	44	39	40	42.5	3.70	8.70%	10.68
	15.36	21	16	21	16	18.5	2.89	15.60%	20.44
	7.68	5	12	10	11	9.5	3.11	32.73%	23.70
	3.84	9	6	3	6	6.0	2.45	40.82%	56.25
	24000	0.98	0.96	0.98	0.99	0.98	0.01	1.13%	-2.22
	4800	0.94	1.03	0.96	0.97	0.97	0.04	3.76%	-2.58
	960	1.02	1.00	0.97	0.94	0.98	0.03	3.49%	-1.72
	192	0.97	1.01	1.00	1.08	1.01	0.05	4.54%	1.49
	38.4	1.00	1.11	1.00	1.03	1.03	0.05	5.21%	3.47
	15.36	1.05	1.00	1.05	1.00	1.02	0.03	2.69%	2.38
	7.68	2.00	1.00	0.50	1.00	1.13	0.63	55.92%	12.50
	3.84	0.33	1.50	2.00	1.33	1.29	0.70	54.11%	29.17



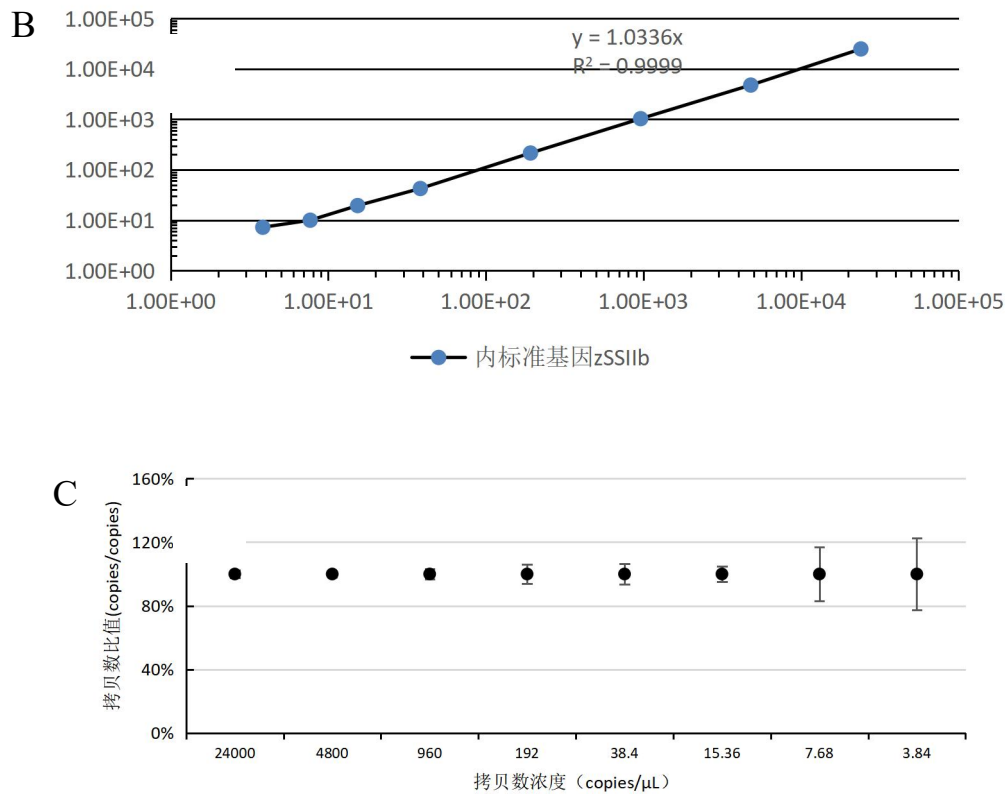


图 80 QY2569-42 转化体特异性序列及 *zSSIIB* 数字 PCR 动力学范围

注：X 轴表示 DNA 溶液的预期拷贝数浓度，Y 轴表示通过数字 PCR 测量出的拷贝数浓度；A 为 QY2569-42 在 3.84~24000 copies/ $\mu$ L 的动态范围内测量值与预期拷贝数间有良好的线性关系；B 为内标基因 *zSSIIB* 在 3.84~24000 copies/ $\mu$ L 的动态范围内测量值与预期拷贝数间有良好的线性关系；C 为测得的 DNA 溶液的拷贝数比值随着 DNA 浓度的降低显示出升高的相对标准偏差(RSD)，垂直线段表示相对标准偏差。数据来自 4 个反应重复的平均值。

### 16.5 QY2569-42/*zSSIIB* 二重 ddPCR 的测量准确性

以梯度稀释的 QY2569-42 基因组 DNA 为模板进行 QY2569-42 转化体和内标基因的数字 PCR 扩增，每个模板重复 4 次反应。统计 4 个重复间测量值的标准偏差和相对标准偏差（表 78）。

对本项目的数字 PCR 结果分析发现，5%、1%、0.1%浓度梯度稀释的 3 个样品拷贝数多次测试的偏差|Bias|、相对标准偏差 RSD 均小

于 25%；3 个样品拷贝数比值多次测试的偏差|Bias|、相对标准偏差 RSD 均小于 25%。结果表明 QY2569-42 转化体数字 PCR 方法具有良好的正确度和精密度，重复间测量结果稳定、可靠。

表 78 玉米 QY2569-42 转化体转化体和内标基因 *zSSIb* 的测量结果稳定性分析

预期值		重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	平均值	SD	RSD(%)	Bias(%)
5% (1000 copies/ $\mu$ L)	QY2569-42 转化体	1029	989	1069	999	1022	35.94	3.52	2.15
	内标基因 <i>zSSIb</i>	20110	20510	20710	20710	20510	282.84	1.38	/
	比值 (%)	5.12	4.82	5.16	4.82	4.98	0.18	3.69	-0.38
1% (200 copies/ $\mu$ L)	QY2569-42 转化体	203	214	201	192	203	9.04	4.46	1.25
	内标基因 <i>zSSIb</i>	20910	20810	20810	21210	20935	189.30	0.90	/
	比值 (%)	0.97	1.03	0.97	0.91	0.97	0.05	5.20	-3.24
0.1% (20 copies/ $\mu$ L)	QY2569-42 转化体	16	21	18	19	19	2.08	11.25	-7.50
	内标基因 <i>zSSIb</i>	20820	20020	20720	19920	20370	465.47	2.29	/
	比值 (%)	0.08	0.10	0.09	0.10	0.09	0.01	13.15	-9.00

QY2569-42/*zSSIb* 二重 ddPCR 扩增引物探针采用国家标准的实时荧光 PCR 方法引物探针（表 72）。QY2569-42/*zSSIb* 二重 ddPCR 扩增体系见表 79，扩增程序为：95°C 预变性 10 min；94°C 变性 30 s，60°C 退火延伸 60 s，共进行 50 个循环；98°C 变性 10 min，4°C 保存（升降温速率 2°C/s）。

表 79 数字 PCR 扩增体系

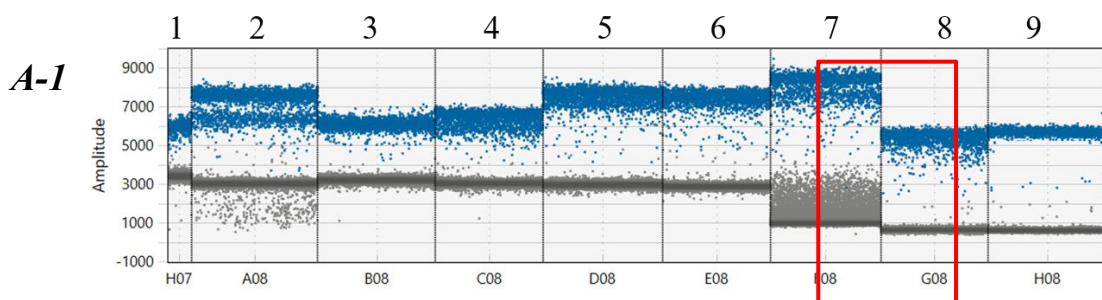
组分	终浓度	体积
ddH <sub>2</sub> O		3.0 $\mu$ L
2 $\times$ ddPCR <sup>TM</sup> Supermix for Probes	1 $\times$	10.0 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 内标上游引物 <i>zSSIb</i> -QF	0.5 $\mu$ mol/L	1.0 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 内标下游引物 <i>zSSIb</i> -QR	0.5 $\mu$ mol/L	1.0 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 内标探针 <i>zSSIb</i> -QP	0.25 $\mu$ mol/L	0.5 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 转化体上游引物 QY2569-42-qF	0.5 $\mu$ mol/L	1.0 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 转化体上游引物 QY2569-42-qR	0.5 $\mu$ mol/L	1.0 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 转化体探针 QY2569-42-qP	0.25 $\mu$ mol/L	0.5 $\mu$ L
25 mg/L DNA 模板	2.5 mg/L	2.0 $\mu$ L

总体积	20.0 $\mu\text{L}$
扩增体系可根据仪器及试剂耗材的实际使用情况，进行相应调整。此表是 1 个扩增体系的体积，应按照实际反应数量进行扩增体系配置。空白质控品以 2.0 $\mu\text{L}$ 的 ddH <sub>2</sub> O 作模板。	

## 17. ZZM03/*zSSIb* 二重数字 PCR 方法

### 17.1 引物探针筛选

用 9 组转化体特异性引物/探针组合玉米国标内标准基因 *zSSIb* 对杂合体 ZZM032 的单株基因组 DNA 进行扩增，通过分析微滴扩增图谱确定后续引物/探针。由微滴扩增图谱（图 81）可见，引物探针组合 1、2、3、4、6 的阳性微滴不能与阴性微滴明显分开，引物探针组合 5、7、8 的阳性微滴虽然均可以与阴性微滴分开，但引物探针组合 7 的荧光信号明显高于引物探针组合 5、8，且引物探针组合 7 与内标准基因 *zSSIb* 的比值为 0.98，均接近理论值 1.0，故选择引物探针组合 7 用于后续实验。



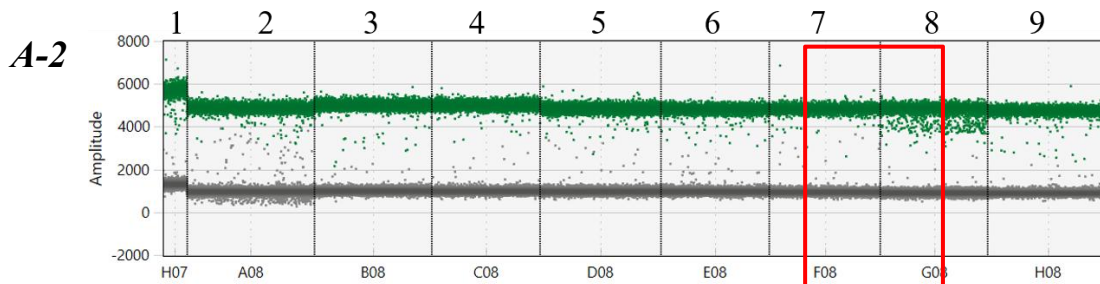


图 81 转基因玉米 ZMZ032 转化体特异性序列引物探针双重数字 PCR 初筛微滴图

注：A-1 为双重数字 PCR 反应时 1~8 组 FAM 标记的 ZMZ032 转化体特异性引物探针组合的微滴反应图，A-2 为双重数字 PCR 反应时玉米国标内标准基因 *zSSIb* 引物探针组合（农业部 1861 号公告-3-2012）的微滴反应图。

经初筛后，ZMZ032 双重微滴数字 PCR 方法所采用的转化体特异性序列和内标准基因 *zSSIb* 引物和探针序列如表表 80 所示。

表 80 ZMZ032 转化体和 *zSSIb* 内标基因引物/探针序列信息

检测靶标	引物/探针名称及序列(5'-3')	扩增片段大小(bp)	序列来源
ZMZ032	3-qF2: CGCAAAGTACTAGGATAAATTATCG	124 bp	待发布国家标准
	3-qR2: TCGTCAAATTATAAATTGAGGG		
	3-qP2: FAM-CGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATC-BHQ1		
<i>zSSIb</i>	<i>zSSIb</i> -3F: CGGTGGATGCTAAGGCTGATG	88	农业部1861号公告-3-2012
	<i>zSSIb</i> -4R: AAAGGCCAGGTTTCATTATCCTC		
	<i>zSSIb</i> -P: FAM-TAAGGAGCACTCGCCGCCGCATCTG-BHQ1		

## 17.2 ZMZ032 二重微滴数字 PCR 特异性测试

为了考察 ZMZ032 转化体特异性序列数字 PCR 系统的扩增特异性，分别以转基因玉米 ZMZ032、其他转基因玉米混合样品、转基因大豆混合样品、转基因棉花混合样品、转基因油菜混合样品、转基因水稻混合样品、非转基因玉米（阴性对照，NTC）的基因组 DNA 和

ddH<sub>2</sub>O（空白对照）为模板，进行数字 PCR 扩增。ZMZ032 转化体特异性序列只有在以转基因玉米 ZMZ032 基因组 DNA 为模板时，才有阳性微滴，而以其他转基因玉米混合样品、转基因大豆混合样品、转基因棉花混合样品、转基因油菜混合样品、转基因水稻混合样品、非转基因玉米的基因组 DNA 和 ddH<sub>2</sub>O 为模板时，均无阳性微滴，扩增结果为阴性（图 82）。扩增结果显示，转基因玉米 ZMZ032 转化体数字 PCR 系统具有良好的扩增特异性。

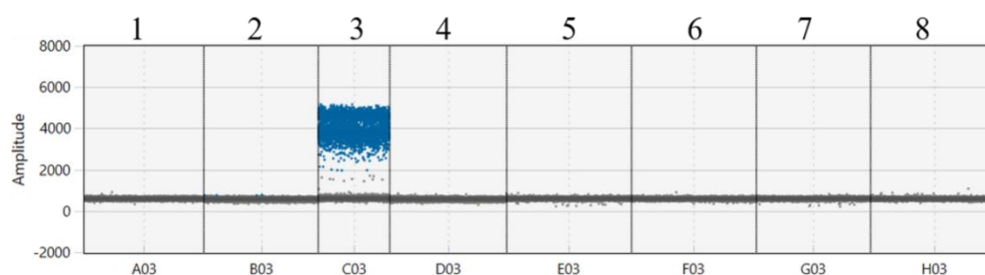


图 82 ZMZ032 转化体数字 PCR 特异性检测扩增热图

注：1：CK；2：NTC；3：转基因玉米 ZMZ032；4：其他转基因玉米混合样品；5：转基因大豆混合样品；6：转基因棉花混合样品；7：转基因油菜混合样品；8：转基因水稻混合样品。

### 17.3 ZMZ032/*zSSIIB* 二重数字 PCR 的条件优化

本项目使用具有温度梯度功能的热循环仪来确定微滴式数字 PCR 反应体系理想的退火温度，在反应程序的退火环节，设置 54℃、56℃、58℃、60℃、62℃、64℃ 等 6 个退火温度梯度对 ZMZ032 转化体特异性序列和内标准基因引物探针进行优化，以筛选出最理想的温度条件。

根据双重数字 PCR 反应的扩增图（图 83、图 84），ZMZ032 转化体特异性序列和玉米内标准基因 *zSSIb* 在不同的退火温度下，微滴的荧光强度存在一定的差异。综合比较 ZMZ032 转化体和 *zSSIb* 基因的数字 PCR 扩增热图，当退火温度在 54°C、56°C、58°C、60°C 时，荧光强度在同一水平，而当退火温度高于 60°C 时，荧光强度有下降趋势。在退火温度为 60°C 时，转化体特异性序列及内标准基因阳性微滴均无严重弥散，同时参考不同退火温度时转化体特异性序列和内标准基因的拷贝数比值（表 81），当退火温度为 60°C 时，比值也接近于 0.5，所以确定双重数字 PCR 的最佳退火温度 60°C。经过优化后 *zSSIb* 基因和 ZMZ032 转化体特异性序列数字 PCR 扩增程序为：95°C 预变性 10 min；94°C 变性 30 s，60°C 退火延伸 60 s，共进行 50 个循环；98°C 变性 10 min，4°C 保存（升降温速率 2°C/s）。

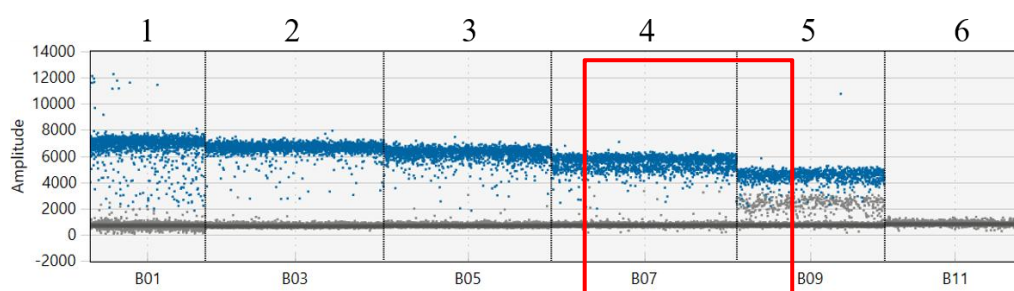


图 83 双重数字 PCR ZMZ032 转化体特异性序列退火温度优化

注：1~6 的退火温度依次为 54°C、56°C、58°C、60°C、62°C、64°C。

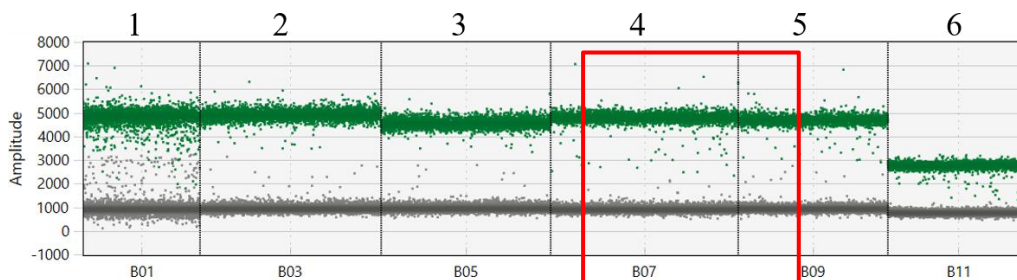


图 84 双重数字 PCR 内标准基因 *zSSIIB* 退火温度优化

注：1~6 的退火温度依次为 54°C、56°C、58°C、60°C、62°C、64°C。

表 81 双重数字 PCR 退火温度优化转化体特异性序列和内标准基因的拷贝数

Tm	54°C	56°C	58°C	60°C	62°C	64°C
ZZM032 拷贝数(copies/ $\mu$ L)	9280	9160	9480	9680	8520	No call
<i>zSSIIB</i> 拷贝数(copies/ $\mu$ L)	19600	19240	19360	19480	19720	19520
ZZM032 转化体/ <i>zSSIIB</i> 拷贝数比值(copies/copies)	0.47	0.48	0.49	0.50	0.43	/

由于微滴式数字 PCR 平台 Bio-Rad QX200 需使用专用的扩增试剂，PCR 扩增体系中仅选择引物探针浓度进行优化测试。参照已发布标准和文献中提到的数字 PCR 体系多为引物/探针非过饱和状态，借鉴标准制修订方法建立中引物探针终浓度优化的通用范围在 0.1~1.0  $\mu$ mol/L 之间，按表 82 设置 12 个引物/探针终浓度梯度，应用上述优化的微滴式数字 PCR 反应程序扩增。

表 82 引物探针浓度优化配比表

引物、探针终浓度 ( $\mu$ mol/L)		引物、探针终浓度 ( $\mu$ mol/L)	
①	0.5:0.5:0.25+0.5:0.5:0.25	⑦	0.6:0.6:0.3+0.5:0.5:0.25
②	0.5:0.5:0.25+0.4:0.4:0.2	⑧	0.4:0.4:0.2+0.4:0.4:0.2
③	0.5:0.5:0.25+0.6:0.6:0.3	⑨	0.6:0.6:0.3+0.6:0.6:0.3
④	0.5:0.5:0.25+0.3:0.3:0.15	⑩	0.4:0.4:0.2+0.3:0.3:0.15
⑤	0.4:0.4:0.2+0.5:0.5:0.25	⑪	0.3:0.3:0.15+0.4:0.4:0.2

⑥	0.6:0.6:0.3+0.5:0.5:0.25	⑫	0.3:0.3:0.15+0.3:0.3:0.15
---	--------------------------	---	---------------------------

根据双重微滴数字 PCR 反应的图谱（图 85、图 86）可知，在 60°C 退火、引物终浓度为 0.5 μmol/L、探针终浓度为 0.25 μmol/L 的反应条件下，以杂合体基因组 DNA 为模板，进行 ZZM032/zSSIIb 二重 ddPCR。二重数字 PCR 二维热图显示了 4 个明显的液滴簇，分别对应 FAM 阳性液滴簇、HEX 阳性液滴簇、双荧光液滴簇和阴性液滴簇，测量的拷贝数比值为 0.49，非常接近理论值 0.5，表明 ZZM032/zSSIIb 二重 ddPCR 中 zSSIIb 内标基因与 ZZM032 转化体具有相同的扩增能力。选择 60°C 作为 ZZM032/zSSIIb 二重 ddPCR 的最佳退火温度，ZZM032 转化体和 zSSIIb 内标基因的引物终浓度均为 0.5 μmol/L、探针终浓度均为 0.25 μmol/L。

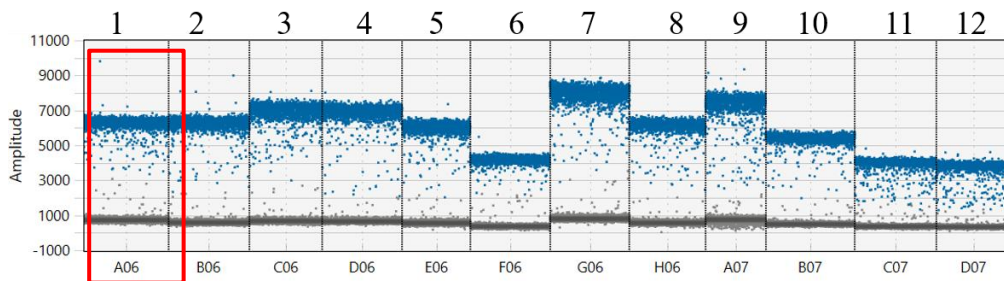


图 85 双重数字转化体特异性序列引物探针浓度筛选

注：1~12 依次为表 82 所示的引物探针浓度。

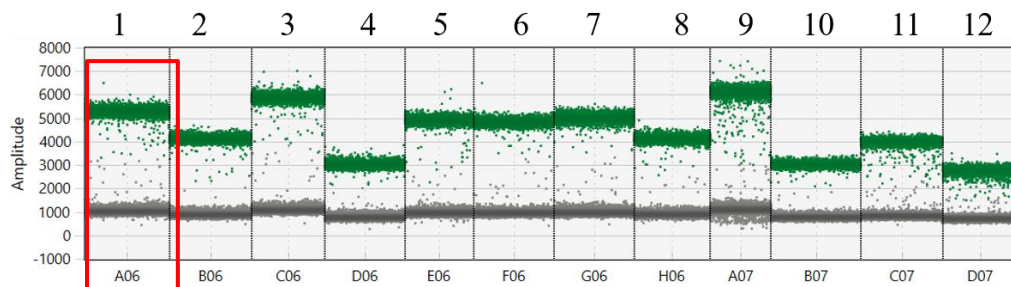


图 86 双重数字内标准基因 *zSSIb* 引物探针浓度筛选

注：1~12 依次为表 82 所示的引物探针浓度。

表 83 双重数字 PCR 引物探针优化转化体特异性序列和内标准基因的拷贝数

引物探针终浓度	①	②	③	④	⑤	⑥
ZZM032 拷贝数(copies/ $\mu$ L)	7930	7560	7920	8000	7840	7360
<i>zSSIb</i> 拷贝数(copies/ $\mu$ L)	16260	16320	16240	16320	16160	16600
ZZM032 转化体/ <i>zSSIb</i> 拷贝数比值(copies/copies)	0.49	0.46	0.49	0.49	0.49	0.44
引物探针终浓度	⑦	⑧	⑨	⑩	⑪	⑫
ZZM032 拷贝数(copies/ $\mu$ L)	7880	7480	7760	7440	6640	6720
<i>zSSIb</i> 拷贝数(copies/ $\mu$ L)	16280	16200	16600	15840	14400	16200
ZZM032 转化体/ <i>zSSIb</i> 拷贝数比值(copies/copies)	0.48	0.46	0.47	0.47	0.46	0.41

经过优化后 *zSSIb* 基因和 ZZM032 转化体特异性序列数字 PCR 扩增体系如表 84 所示。

表 84 数字 PCR 扩增体系

组分	体积
ddH <sub>2</sub> O	3.0 $\mu$ L
2 $\times$ ddPCR <sup>TM</sup> Supermix for Probes	10.0 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 内标上游引物 <i>zSSIb</i> -3F	1.0 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 内标下游引物 <i>zSSIb</i> -4R	1.0 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 内标探针 <i>zSSIb</i> -P	0.5 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 转化体上游引物 ZZM032-qF	1.0 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 转化体上游引物 ZZM032-qR	1.0 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 转化体探针 ZZM032-qP	0.5 $\mu$ L
DNA 模板	2.0 $\mu$ L
总体积	20.0 $\mu$ L

## 17.4 ZZM032/*zSSIIB* 二重 ddPCR 的 LOD、LOQ 和动力学范围测试

微滴式数字 PCR 的理论有效线性范围是 1-120000 个拷贝，但 20  $\mu\text{L}$  反应液在微滴生成器中只能产生 12000-16000 个有效微滴，微滴数大于 10000 为有效反应。为了测试数字 PCR 系统的动力学范围，将 ZZM032 基因组 DNA 进行梯度稀释进行数字 PCR 扩增，每个浓度重复 4 次，用于测试数字 PCR 系统的动力学范围、检出限和定量限。当 DNA 浓度为 19.2copies/ $\mu\text{L}$  时，此时反应体系内 DNA 的模板量为 38.4 copies，转基因玉米 ZZM032 转化体特异性序列拷贝数浓度和内标准基因 *zSSIIB* 拷贝数浓度的 RSD 和偏差均低于 25%，故推测此浓度为 MZIR260 数字 PCR 反应的定量限，以 20  $\mu\text{L}$  PCR 检测反应体系中加入含有转基因玉米 ZZM032 转化体特异性序列的 120 ng DNA 模板进行测算，定量限约为 38 copies/反应；当反应体系内 DNA 浓度低至 7.66 copies/ $\mu\text{L}$  时，此时反应体系内 DNA 的模板量为 15.32 copies，转基因玉米 ZZM032 转化体特异性序列拷贝数浓度和内标准基因 *zSSIIB* 拷贝数浓度的 RSD 均高于 25%，偏差均低于 25%，故推测数字 PCR 反应的检出限，以 20  $\mu\text{L}$  PCR 检测反应体系中加入含有转基因玉米 ZZM032 转化体特异性序列的 120 ng DNA 模板进行测算，检出限约为 15 copies/反应（见表 85）。

如图 87 所示，当 20  $\mu\text{L}$  反应体系内模板浓度在 15.32~24000 copies 范围内时，通过微滴数字 PCR 获得转化体的测量值与预期拷贝数浓度间具有良好的相关性，决定系数  $R^2$  值等于 0.9999，线性方程为  $y=1.0064x$  ( $y$  代表测量拷贝数， $x$  代表预期拷贝数)；通过微滴数字 PCR 获得内标准基因 *zSSIb* 决定系数  $R^2$  值等于 1，线性方程为  $y=0.9985x$  ( $y$  代表测量拷贝数， $x$  代表预期拷贝数)；当模板量低至 15.32 和 7.68 copies 时，转化体特异性序列/*zSSIb* 拷贝数比值 RSD 明显较大。当测试样品模板量浓度处于 38.4~24000 copies 时，RSD 值及偏差均小于 25%，检测结果稳定、可靠。当测试样品的浓度处于动力学范围的中间位置时，定量结果最准确。

表 85 梯度稀释 ZZM032 基因组 DNA 溶液的拷贝数和比值

转化体 名称	预期值 (copies/ $\mu\text{L}$ )	拷贝数浓度 (copies/ $\mu\text{L}$ )					SD	RSD(%)	Bias(%)
		重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	平均值			
ZZM032	12000	11780	11910	12330	12380	12100.0	299.89	2.48%	0.83
	2400	2310	2270	2390	2250	2305.0	61.91	2.69%	-3.96
	480	410	460	500	450	455.0	36.97	8.12%	-5.21
	96	110	90	108	97	101.3	9.43	9.31%	5.47
	19.2	16	19	26	25	21.5	4.80	22.31%	11.98
	7.66	10	14	7	5	9.0	3.92	43.51%	17.49
	3.84	7	9	6	2	6.0	2.94	49.07%	56.25
	1.92	3	7	2	4	4.0	2.16	54.01%	108.33
zSSIb	24000	23960	23770	24110	24020	23965.0	143.87	0.60%	-0.15
	4800	4750	4710	4670	4980	4777.5	138.89	2.91%	-0.47
	960	980	1050	1060	950	1010.0	53.54	5.30%	5.21
	192	187	205	195	229	204.0	18.22	8.93%	6.25
	38.4	35	37	42	51	41.3	7.14	17.30%	7.42
	15.36	19	25	16	12	18.0	5.48	30.43%	17.19
	7.68	11	14	8	16	12.3	3.50	28.57%	59.51
	3.84	5	7	6	12	7.5	3.11	41.46%	95.31
比值	24000	0.49	0.50	0.51	0.52	0.50	0.01	2.12%	0.98

转化体名称	预期值 (copies/ $\mu$ L)	拷贝数浓度 (copies/ $\mu$ L)					SD	RSD(%)	Bias(%)
		重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	平均值			
	4800	0.49	0.48	0.51	0.45	0.48	0.02	5.09%	-3.41
	960	0.42	0.44	0.47	0.47	0.45	0.03	5.97%	-9.91
	192	0.59	0.44	0.55	0.42	0.50	0.08	16.39%	0.23
	38.4	0.46	0.51	0.62	0.49	0.52	0.07	13.46%	4.00
	15.36	0.53	0.56	0.44	0.42	0.49	0.07	14.21%	-2.98
	7.68	0.64	0.64	0.75	0.13	0.54	0.28	52.10%	7.71
	3.84	0.60	1.00	0.33	0.33	0.57	0.32	55.60%	13.33

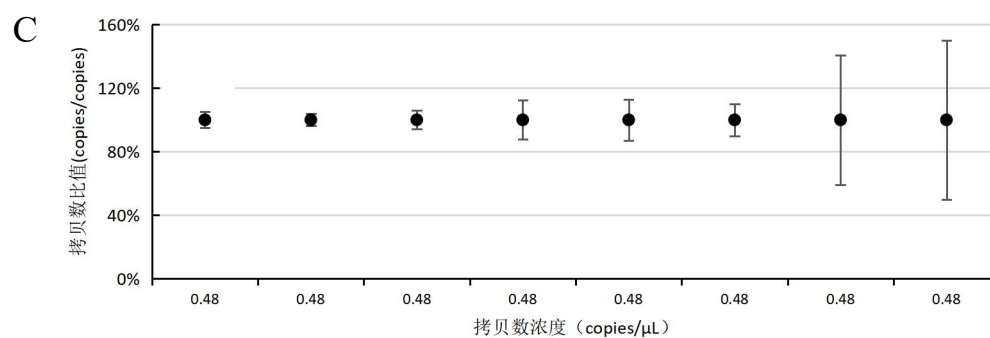
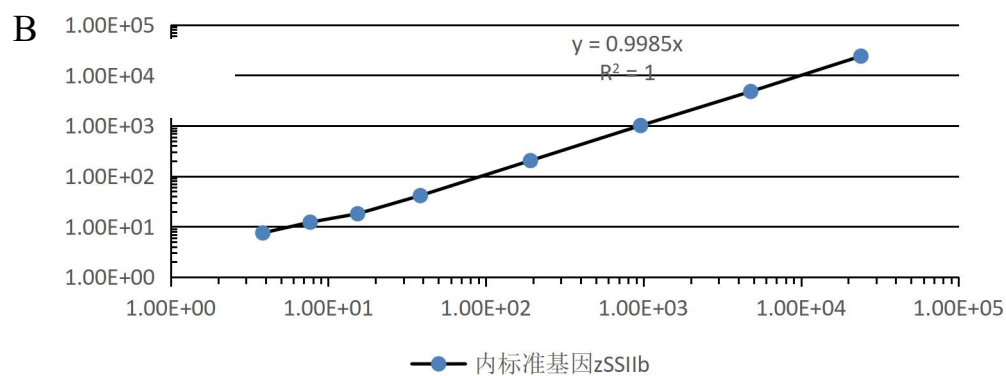
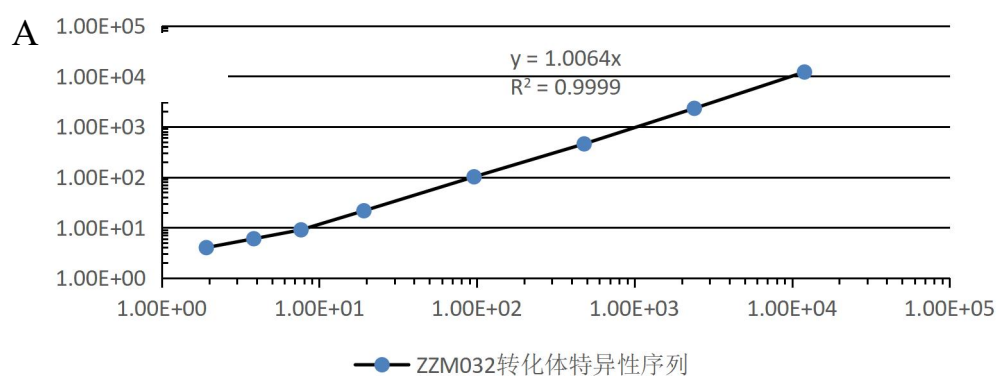


图 87 ZZM032 转化体特异性序列及 *zSSIb* 数字 PCR 动力学范围

注：X 轴表示 DNA 溶液的预期拷贝数浓度，Y 轴表示通过数字 PCR 测量出的拷贝数浓度；A 为 ZZM032 在 1.92~12000 copies/ $\mu$ L 的动态范围内测量值与预期拷贝数间有良好的线性关系；B 为内标基因 *zSSIb* 在 3.84~24000 copies/ $\mu$ L 的动态范围内测量值与预期拷贝数间有良好的线性关系；C 为测得的 DNA 溶液的拷贝数比值随着 DNA 浓度的降低显示出升高的相对标准偏差(RSD)，垂直线段表示相对标准偏差。数据来自 4 个反应重复的平均值。

### 17.5 ZZM032/*zSSIb* 二重 ddPCR 的测量准确性

以梯度稀释的杂合体 ZZM032 基因组 DNA 为模板进行 ZZM032 转化体和内标基因的数字 PCR 扩增，每个模板重复 4 次反应。统计 4 个重复间测量值的标准偏差和相对标准偏差（表 86）。

对本项目的数字 PCR 结果分析发现，5%、1%、0.1%浓度梯度稀释的 3 个样品拷贝数多次测试的偏差|Bias|、相对标准偏差 RSD 均小于 25%；3 个样品拷贝数比值多次测试的偏差|Bias|、相对标准偏差 RSD 均小于 25%。结果表明 ZZM032 转化体数字 PCR 方法具有良好的正确度和精密度，重复间测量结果稳定、可靠。

表 86 玉米 ZZM032 转化体和内标基因 *zSSIb* 的测量结果稳定性分析

预期值		重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	平均值	SD	RSD(%)	Bias(%)
5% (1000 copies/ $\mu$ L)	ZZM032 转化体	1040	990	960	1030	1005	36.97	3.68	0.50
	内标基因 <i>zSSIb</i>	20780	20410	21000	21200	20848	338.37	1.62	/
	比值 (%)	5.00	4.85	4.57	4.86	4.82	0.18	3.76	-3.57
1% (200 copies/ $\mu$ L)	ZZM032 转化体	209	218	202	198	207	8.77	4.24	3.38
	内标基因 <i>zSSIb</i>	21200	21400	21500	21800	21475	250.00	1.16	/
	比值 (%)	0.99	1.02	0.94	0.91	0.96	0.05	5.08	-3.69
0.1% (20 copies/ $\mu$ L)	ZZM032 转化体	22	15	17	22	19	3.56	18.73	-5.00
	内标基因 <i>zSSIb</i>	21400	19500	21100	19400	20350	1047.22	5.15	/
	比值 (%)	0.10	0.08	0.08	0.11	0.09	0.02	18.79	-6.58

ZZM032/*zSSIb* 二重 ddPCR 扩增引物探针采用报批实时荧光 PCR 方法标准的引物探针（表 80）。ZZM032/*zSSIb* 二重 ddPCR 扩增体系见表 87，扩增程序为：95°C 预变性 10 min；94°C 变性 30 s，60°C 退火延伸 60 s，共进行 50 个循环；98°C 变性 10 min，4°C 保存（升降温速率 2°C/s）。

表 87 数字 PCR 扩增体系

组分	终浓度	体积
ddH <sub>2</sub> O		3.0 μL
2×ddPCR™ Supermix for Probes	1×	10.0 μL
10 μmol/L 内标上游引物 <i>zSSIb</i> -QF	0.5 μmol/L	1.0 μL
10 μmol/L 内标下游引物 <i>zSSIb</i> -QR	0.5 μmol/L	1.0 μL
10 μmol/L 内标探针 <i>zSSIb</i> -QP	0.25 μmol/L	0.5 μL
10 μmol/L 转化体上游引物 ZZM032-qF	0.5 μmol/L	1.0 μL
10 μmol/L 转化体上游引物 ZZM032-qR	0.5 μmol/L	1.0 μL
10 μmol/L 转化体探针 ZZM032-qP	0.25 μmol/L	0.5 μL
25 mg/L DNA 模板	2.5 mg/L	2.0 μL
总体积		20.0 μL

扩增体系可根据仪器及试剂耗材的实际使用情况，进行相应调整。此表是 1 个扩增体系的体积，应按照实际反应数量进行扩增体系配置。空白质控品以 2.0 μL 的 ddH<sub>2</sub>O 作模板。

## 18. MZIR260/*zSSIb* 二重数字 PCR 方法

### 18.1 引物探针筛选

用 8 组转化体特异性引物/探针组合玉米国标内标准基因 *zSSIb* 对杂合体 MZIR260 的单株基因组 DNA 进行扩增，通过分析微滴扩增图谱确定后续引物/探针。由微滴扩增图谱（图 88）可见，引物探针组合 1、2、3、5、6、7 的阳性微滴虽然均可以与阴性微滴分开，

但引物探针组合 4 的荧光信号明显高于其他引物探针组合并且阳性微滴条带单一,且引物探针组合 4 与内标准基因 *zSSIb* 的比值为 0.49, 接近理论值 0.5, 故选择引物探针组合 4 用于后续实验。

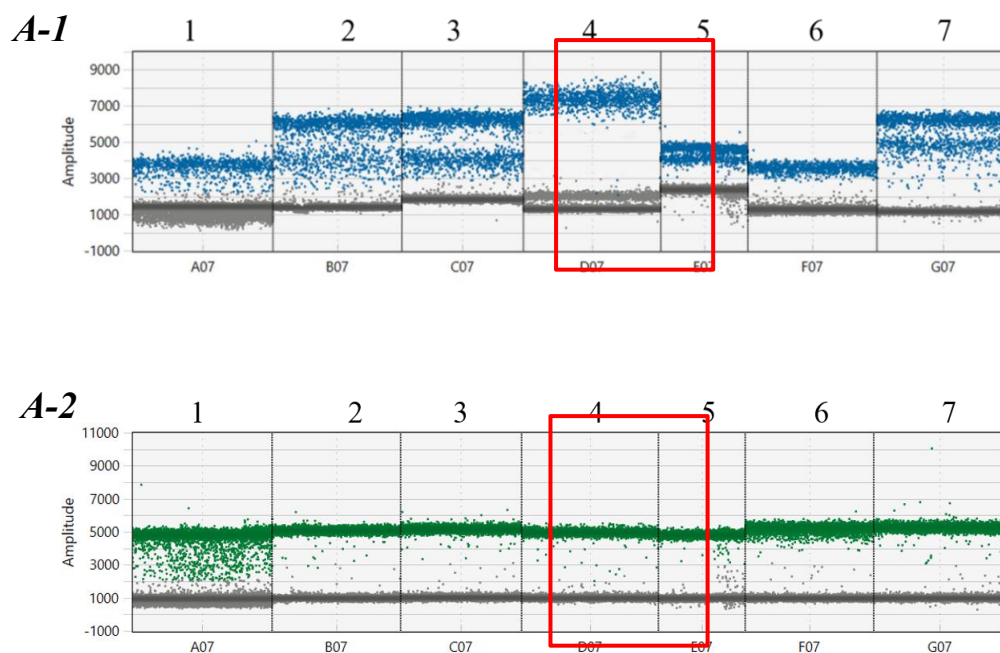


图 88 转基因玉米 MZIR260 转化体特异性序列引物探针双重数字 PCR 初筛微滴图

注: A-1 为双重数字 PCR 反应时 1~8 组 HEX 标记的 MZIR260 转化体特异性引物探针组合的微滴反应图, A-2 为双重数字 PCR 反应时玉米国标内标准基因 *zSSIb* 引物探针组合(农业部 1861 号公告-3-2012)的微滴反应图。

经初筛后, MZIR260 双重微滴数字 PCR 方法所采用的转化体特异性序列和内标准基因 *zSSIb* 引物和探针序列如表 88 所示。

表 88 MZIR260 转化体和 *zSSIb* 内标基因引物/探针序列信息

检测靶标	引物/探针名称及序列(5'-3')	扩增片段大小(bp)	序列来源
MZIR260	3-qF: GTTATTAAGTTGTCTAAGCGTCAATTTGTT	88	技术资料
	3-qR: CGCCATAGTGTACTTGACAICTTATGT		
	3-qP: FAM-CACCACAATATAAAAAG-MGB		

<i>zSSIb</i>	<i>zSSIb</i> -3F: CGGTGGATGCTAAGGCTGATG	88	农业部1861 号公告 -3-2012
	<i>zSSIb</i> -4R: AAAGGGCCAGGTTCATTATCCTC		
	<i>zSSIb</i> -P: FAM-TAAGGAGCACTCGCCGCCGCATCTG-BHQ1		

## 18.2 MZIR260 二重微滴数字 PCR 特异性测试

为了考察 MZIR260 转化体特异性序列数字 PCR 系统的扩增特异性，分别以转基因玉米 MZIR260、其他转基因玉米混合样品、转基因大豆混合样品、转基因棉花混合样品、转基因油菜混合样品、转基因水稻混合样品、非转基因玉米（阴性对照，NTC）的基因组 DNA 和 ddH<sub>2</sub>O（空白对照）为模板，进行数字 PCR 扩增。MZIR260 转化体特异性序列只有在以转基因玉米 MZIR260 基因组 DNA 为模板时，才有阳性微滴，而以其他转基因玉米混合样品、转基因大豆混合样品、转基因棉花混合样品、转基因油菜混合样品、转基因水稻混合样品、非转基因玉米的基因组 DNA 和 ddH<sub>2</sub>O 为模板时，均无阳性微滴，扩增结果为阴性（图 89）。扩增结果显示，转基因玉米 MZIR260 转化体数字 PCR 系统具有良好的扩增特异性。

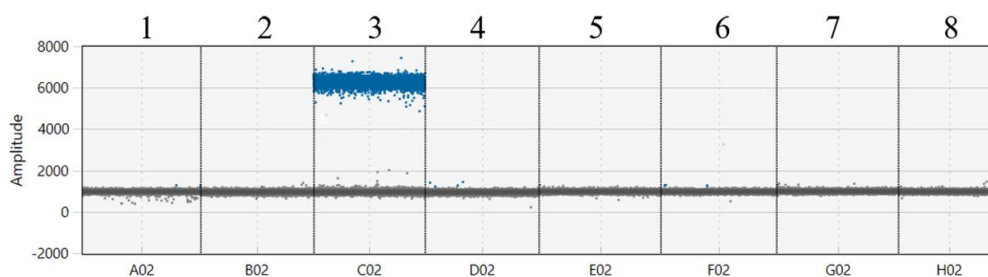


图 89 MZIR260 转化体数字 PCR 特异性检测扩增热图

注：1：CK；2：NTC；3：转基因玉米 MZIR260；4：其他转基因玉米混合样品；5：转基因大豆混合样品；6：转基因棉花混合样品；7：转基因油菜混合样品；8：转基因水稻混合样品。

### 18.3 MZIR260/*zSSIIB* 二重数字 PCR 的条件优化

本项目使用具有温度梯度功能的热循环仪来确定微滴式数字 PCR 反应体系理想的退火温度，在反应程序的退火环节，设置 54°C、56°C、58°C、60°C、62°C、64°C 等 6 个退火温度梯度对 MZIR260 转化体特异性序列和内标准基因引物探针进行优化，以筛选出最理想的温度条件。

根据双重数字 PCR 反应的扩增图（图 90、图 91），MZIR260 转化体特异性序列和玉米内标准基因 *zSSIIB* 在不同的退火温度下，微滴的荧光强度存在一定的差异。综合比较 MZIR260 转化体和 *zSSIIB* 基因的数字 PCR 扩增热图，当退火温度在 54°C、56°C 时，荧光强度在同一水平，而当退火温度高于 58°C 时，荧光强度有下降趋势。同时参考不同退火温度时转化体特异性序列和内标准基因的拷贝数比值（表 88），当退火温度为 60°C 时，荧光强度虽有下降，比值也接近于 0.5，所以确定双重数字 PCR 的最佳退火温度 60°C。经过优化后 *zSSIIB* 基因和 MZIR260 转化体特异性序列数字 PCR 扩增程序为：95°C 预变性 10 min；94°C 变性 30 s，60°C 退火延伸 60 s，共进行 50 个循环；98°C 变性 10 min，4°C 保存（升降温速率 2°C/s）。

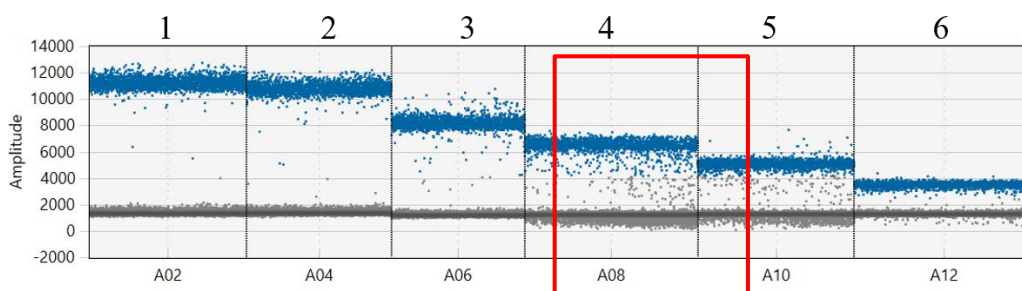


图 90 双重数字 PCR MZIR260 转化体特异性序列退火温度优化

注：1~6 的退火温度依次为 54°C、56°C、58°C、60°C、62°C、64°C。

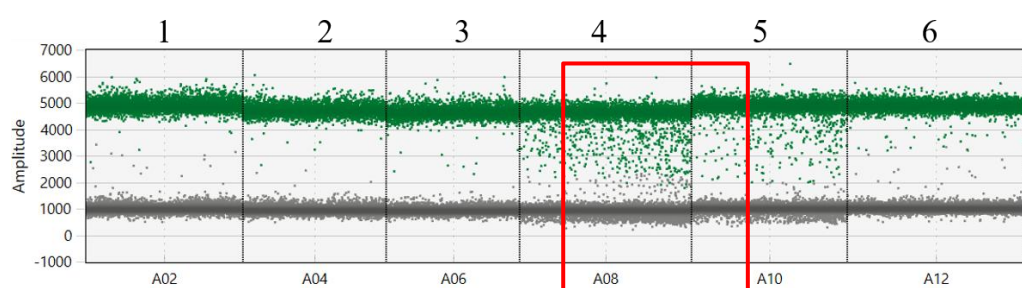


图 91 双重数字 PCR 内标准基因 *zSSIIB* 退火温度优化

注：1~6 的退火温度依次为 54°C、56°C、58°C、60°C、62°C、64°C。

表 89 双重数字 PCR 退火温度优化转化体特异性序列和内标准基因的拷贝数

Tm	54°C	56°C	58°C	60°C	62°C	64°C
MZIR260 拷贝数(copies/ $\mu$ L)	9400	9520	9320	9800	10280	10120
<i>zSSIIB</i> 拷贝数(copies/ $\mu$ L)	20680	20080	20240	20040	22080	22040
MZIR260 转化体/ <i>zSSIIB</i> 拷贝数 比值(copies/copies)	0.45	0.47	0.46	0.49	0.47	0.46

由于微滴式数字 PCR 平台 Bio-Rad QX200 需使用专用的扩增试剂，PCR 扩增体系中仅选择引物探针浓度进行优化测试。参照已发布标准和文献中提到的数字 PCR 体系多为引物/探针非过饱和状态，借鉴标准制修订方法建立中引物探针终浓度优化的通用范围在 0.1~1.0

$\mu\text{mol/L}$  之间, 按表 90 设置 12 个引物/探针终浓度梯度, 应用上述优化的微滴式数字 PCR 反应程序扩增。

表 90 引物探针浓度优化配比表

引物、探针终浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )		引物、探针终浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )	
①	0.5:0.5:0.25+0.5:0.5:0.25	⑦	0.6:0.6:0.3+0.5:0.5:0.25
②	0.5:0.5:0.25+0.4:0.4:0.2	⑧	0.4:0.4:0.2+0.4:0.4:0.2
③	0.5:0.5:0.25+0.6:0.6:0.3	⑨	0.6:0.6:0.3+0.6:0.6:0.3
④	0.5:0.5:0.25+0.3:0.3:0.15	⑩	0.4:0.4:0.2+0.3:0.3:0.15
⑤	0.4:0.4:0.2+0.5:0.5:0.25	⑪	0.3:0.3:0.15+0.4:0.4:0.2
⑥	0.6:0.6:0.3+0.5:0.5:0.25	⑫	0.3:0.3:0.15+0.3:0.3:0.15

根据双重微滴数字 PCR 反应的图谱 (图 92、图 93) 可知, 在  $60^{\circ}\text{C}$  退火、引物终浓度为  $0.5 \mu\text{mol/L}$ 、探针终浓度为  $0.25 \mu\text{mol/L}$  的反应条件下, 以杂合体 MZIR260 基因组 DNA 为模板, 进行 MZIR260/*zSSIb* 二重 ddPCR。二重数字 PCR 二维热图显示了 4 个明显的液滴簇, 分别对应 FAM 阳性液滴簇、HEX 阳性液滴簇、双荧光液滴簇和阴性液滴簇, 测量的拷贝数比值为 0.49, 非常接近理论值 0.5, 表明 MZIR260/*zSSIb* 二重 ddPCR 中 *zSSIb* 内标基因与 MZIR260 转化体具有相同的扩增能力。选择  $60^{\circ}\text{C}$  作为 MZIR260/*zSSIb* 二重 ddPCR 的最佳退火温度, MZIR260 转化体和 *zSSIb* 内标基因的引物终浓度均为  $0.5 \mu\text{mol/L}$ 、探针终浓度均为  $0.25 \mu\text{mol/L}$ 。

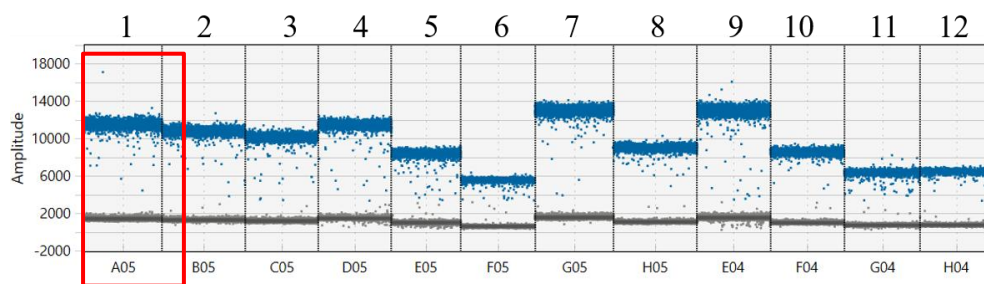


图 92 双重数字转化体特异性序列引物探针浓度筛选

注：1~12 依次为表 90 所示的引物探针浓度。

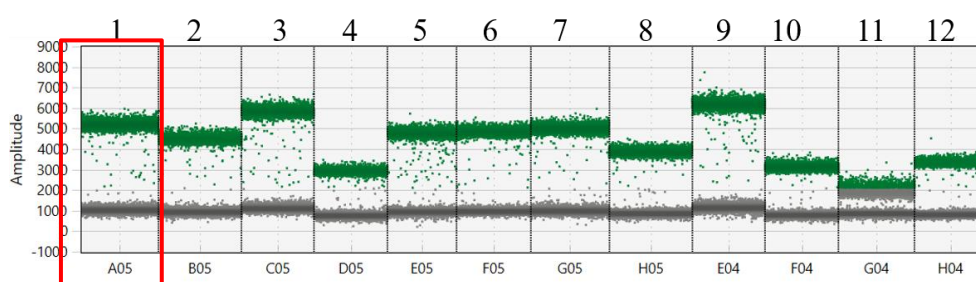


图 93 双重数字内标准基因 *zSSIIB* 引物探针浓度筛选

注：1~12 依次为表 91 所示的引物探针浓度。

表 91 双重数字 PCR 引物探针优化转化体特异性序列和内标准基因的拷贝数

引物探针终浓度	①	②	③	④	⑤	⑥
MZIR260 拷贝数(copies/ $\mu$ L)	10680	9320	9480	9320	10760	9400
<i>zSSIIB</i> 拷贝数(copies/ $\mu$ L)	21720	21320	21720	20520	22520	20680
MZIR260 转化体/ <i>zSSIIB</i> 拷贝数 比值(copies/copies)	0.49	0.44	0.44	0.45	0.48	0.45
引物探针终浓度	⑦	⑧	⑨	⑩	⑪	⑫
MZIR260 拷贝数(copies/ $\mu$ L)	8960	9600	9240	9440	9520	9480
<i>zSSIIB</i> 拷贝数(copies/ $\mu$ L)	21120	20080	20640	20560	20840	20800
MZIR260 转化体/ <i>zSSIIB</i> 拷贝数 比值(copies/copies)	0.42	0.48	0.45	0.46	0.46	0.46

经过优化后 *zSSIIB* 基因和 MZIR260 转化体特异性序列数字 PCR 扩增体系如表 92 所示。

表 92 数字 PCR 扩增体系

组分	体积
ddH <sub>2</sub> O	3.0 $\mu$ L
2 $\times$ ddPCR <sup>TM</sup> Supermix for Probes	10.0 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 内标上游引物 <i>zSSIb</i> -3F	1.0 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 内标下游引物 <i>zSSIb</i> -4R	1.0 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 内标探针 <i>zSSIb</i> -P	0.5 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 转化体上游引物 MZIR260-qF	1.0 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 转化体上游引物 MZIR260-qR	1.0 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 转化体探针 MZIR260-qP	0.5 $\mu$ L
DNA 模板	2.0 $\mu$ L
总体积	20.0 $\mu$ L

### 18.4 MZIR260/*zSSIb* 二重 ddPCR 的 LOD、LOQ 和动力学范围测试

微滴式数字 PCR 的理论有效线性范围是 1-120000 个拷贝，但 20  $\mu$ L 反应液在微滴生成器中只能产生 12000-16000 个有效微滴，微滴数大于 10000 为有效反应。为了测试数字 PCR 系统的动力学范围，将杂合体 MZIR260 基因组 DNA 进行梯度稀释进行数字 PCR 扩增，每个浓度重复 4 次，用于测试数字 PCR 系统的动力学范围、检出限和定量限。当 DNA 浓度为 19.2copies/ $\mu$ L 时，此时反应体系内 DNA 的模板量为 38.4 copies，转基因玉米 MZIR260 转化体特异性序列拷贝数浓度和内标准基因 *zSSIb* 拷贝数浓度的 RSD 和偏差均低于 25%，故推测此浓度为 MZIR260 数字 PCR 反应的定量限，以 20  $\mu$ L PCR 检测反应体系中加入含有转基因玉米 MZIR260 转化体特异性序列的 120 ng DNA 模板进行测算，定量限约为 38 copies/反应；当反应体系内 DNA 浓度低至 7.66 copies/ $\mu$ L 时，此时反应体系内 DNA 的模板量

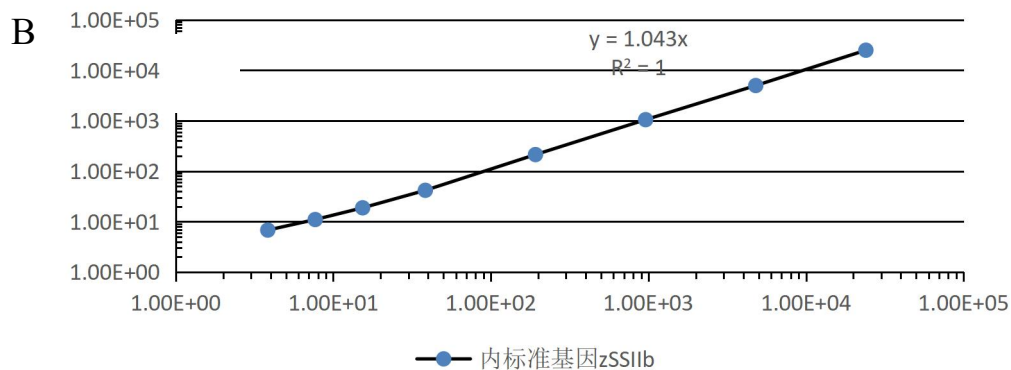
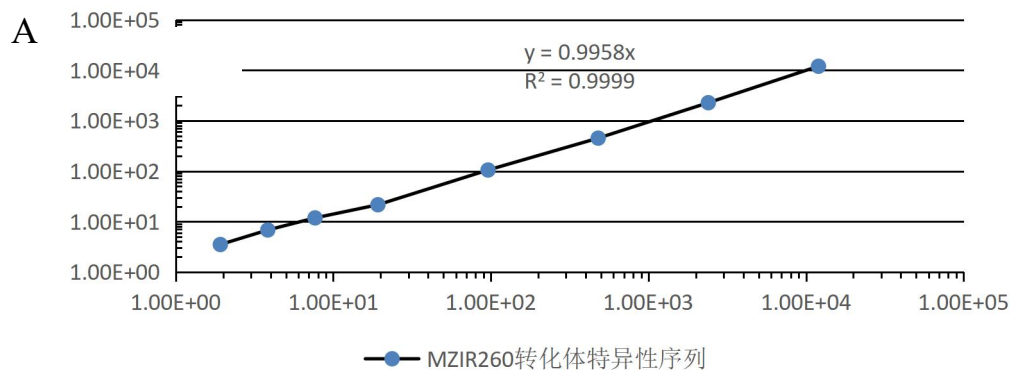
为 15.32 copies，转基因玉米 MZIR260 转化体特异性序列拷贝数浓度和内标准基因 *zSSIb* 拷贝数浓度的 RSD 均高于 25%，偏差均低于 25%，故推测数字 PCR 反应的检出限，以 20  $\mu$ L PCR 检测反应体系中加入含有转基因玉米 MZIR260 转化体特异性序列的 120 ng DNA 模板进行测算，检出限约为 15 copies/反应（见表 93）。

如图 94 所示，当 20  $\mu$ L 反应体系内模板浓度在 15.32~24000 copies 范围内时，通过微滴数字 PCR 获得转化体的测量值与预期拷贝数浓度间具有良好的相关性，决定系数  $R^2$  值等于 0.9999，线性方程为  $y=0.9958x$ （ $y$  代表测量拷贝数， $x$  代表预期拷贝数）；通过微滴数字 PCR 获得内标准基因 *zSSIb* 决定系数  $R^2$  值等于 1，线性方程为  $y=1.043x$ （ $y$  代表测量拷贝数， $x$  代表预期拷贝数）；当模板量低至 15.32 和 7.68 copies 时，转化体特异性序列/*zSSIb* 拷贝数比值 RSD 明显较大。当测试样品模板量浓度处于 38.4~24000 copies 时，RSD 值及偏差均小于 25%，检测结果稳定、可靠。当测试样品的浓度处于动力学范围的中间位置时，定量结果最准确。

表 93 梯度稀释 MZIR260 基因组 DNA 溶液的拷贝数和比值

转化体名称	预期值 (copies/ $\mu$ L)	拷贝数浓度 (copies/ $\mu$ L)					SD	RSD(%)	Bias(%)
		重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	平均值			
MZIR260	12000	12000	11700	12370	11830	11975.0	290.57	2.43%	-0.21
	2400	2350	2260	2210	2250	2267.5	59.09	2.61%	-5.52
	480	420	440	430	510	450.0	40.82	9.07%	-6.25
	96	104	97	101	118	105.0	9.13	8.69%	9.38
	19.2	17	21	25	23	21.5	3.42	15.89%	11.98
	7.66	10	11	5	10	9.0	2.71	30.09%	17.49
	3.84	2	5	8	4	4.8	2.50	52.63%	23.70

转化体名称	预期值 (copies/ $\mu$ L)	拷贝数浓度 (copies/ $\mu$ L)					SD	RSD(%)	Bias(%)
		重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	平均值			
	1.92	1	4	5	4	3.5	1.73	49.49%	82.29
<i>zSSIIB</i>	24000	25050	24960	25630	24490	25032.5	467.93	1.87%	4.30
	4800	4970	4850	5070	5080	4992.5	107.20	2.15%	4.01
	960	1080	990	1110	1020	1050.0	54.77	5.22%	9.38
	192	217	216	196	224	213.3	12.04	5.65%	11.07
	38.4	45	42	43	37	41.8	3.40	8.15%	8.72
	15.36	17	21	15	11	16.0	4.16	26.02%	4.17
	7.68	14	6	8	10	9.5	3.42	35.95%	23.70
	3.84	5	8	4	9	6.5	2.38	36.62%	69.27
比值	24000	0.48	0.47	0.48	0.48	0.48	0.01	1.39%	-4.33
	4800	0.47	0.47	0.44	0.44	0.45	0.02	3.91%	-9.12
	960	0.39	0.44	0.39	0.50	0.43	0.05	12.46%	-13.96
	192	0.48	0.45	0.52	0.53	0.49	0.04	7.18%	-1.48
	38.4	0.38	0.50	0.58	0.62	0.52	0.11	20.68%	4.04
	15.36	0.59	0.52	0.33	0.91	0.59	0.24	40.69%	17.72
	7.68	0.14	0.83	1.00	0.40	0.59	0.39	66.15%	18.81
	3.84	0.20	0.50	1.25	0.44	0.60	0.45	75.74%	19.72



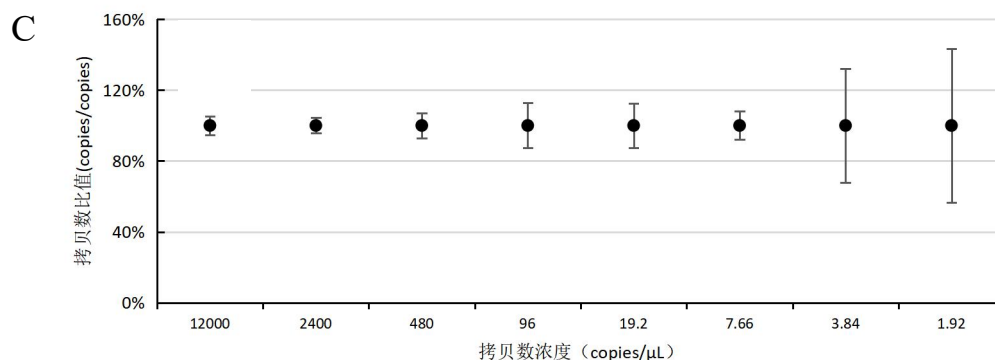


图 94 MZIR260 转化体特异性序列及 *zSSIb* 数字 PCR 动力学范围

注：X 轴表示 DNA 溶液的预期拷贝数浓度，Y 轴表示通过数字 PCR 测量出的拷贝数浓度；A 为 MZIR260 在 1.92~12000 copies/μL 的动态范围内测量值与预期拷贝数间有良好的线性关系；B 为内标基因 *zSSIb* 在 3.84~24000 copies/μL 的动态范围内测量值与预期拷贝数间有良好的线性关系；C 为测得的 DNA 溶液的拷贝数比值随着 DNA 浓度的降低显示出升高的相对标准偏差(RSD)，垂直线段表示相对标准偏差。数据来自 4 个反应重复的平均值。

### 18.5 MZIR260/*zSSIb* 二重 ddPCR 的测量准确性

以梯度稀释的杂合体 MZIR260 基因组 DNA 为模板进行 MZIR260 转化体和内标基因的数字 PCR 扩增，每个模板重复 4 次反应。统计 4 个重复间测量值的标准偏差和相对标准偏差（表 94）。

对本项目的数字 PCR 结果分析发现，5%、1%、0.1%浓度梯度稀释的 3 个样品拷贝数多次测试的偏差|Bias|、相对标准偏差 RSD 均小于 25%；3 个样品拷贝数比值多次测试的偏差|Bias|、相对标准偏差 RSD 均小于 25%。结果表明 MZIR260 转化体数字 PCR 方法具有良好的正确度和精密度，重复间测量结果稳定、可靠。

表 94 玉米 MZIR260 转化体和内标基因 *zSSIb* 的测量结果稳定性分析

预期值		重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	平均值	SD	RSD(%)	Bias(%)
5%	MZIR260 转化体	855	875	895	875	875	16.33	1.87	-2.78

(900 copies/ $\mu$ L)	内标基因 <i>zSSIb</i>	17320	18010	17800	17710	17710	288.79	1.63	/
	比值 (%)	4.94	4.86	5.03	4.94	4.94	0.07	1.40	-1.18
1% (200 copies/ $\mu$ L)	MZIR260 转化体	189	177	188	180	184	5.92	3.22	1.94
	内标基因 <i>zSSIb</i>	17300	16930	17030	17080	17085	156.31	0.91	/
	比值 (%)	1.09	1.05	1.10	1.05	1.07	0.03	2.66	7.39
0.1% (18 copies/ $\mu$ L)	MZIR260 转化体	22	15	20	21	20	3.11	15.94	8.33
	内标基因 <i>zSSIb</i>	17730	17630	17700	17810	17718	74.55	0.42	/
	比值 (%)	0.12	0.09	0.11	0.12	0.11	0.02	15.66	10.02

MZIR260/*zSSIb* 二重 ddPCR 扩增引物探针采用 Z 自行设计的实时荧光 PCR 方法引物探针 (表 88)。MZIR260/*zSSIb* 二重 ddPCR 扩增体系见表 95, 扩增程序为: 95°C 预变性 10 min; 94°C 变性 30 s, 60°C 退火延伸 60 s, 共进行 50 个循环; 98°C 变性 10 min, 4°C 保存 (升降温速率 2°C/s)。

表 95 数字 PCR 扩增体系

组分	终浓度	体积
ddH <sub>2</sub> O		3.0 $\mu$ L
2 $\times$ ddPCR <sup>TM</sup> Supermix for Probes	1 $\times$	10.0 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 内标上游引物 <i>zSSIb</i> -QF	0.5 $\mu$ mol/L	1.0 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 内标下游引物 <i>zSSIb</i> -QR	0.5 $\mu$ mol/L	1.0 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 内标探针 <i>zSSIb</i> -QP	0.25 $\mu$ mol/L	0.5 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 转化体上游引物 MZIR260-qF	0.5 $\mu$ mol/L	1.0 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 转化体上游引物 MZIR260-qR	0.5 $\mu$ mol/L	1.0 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 转化体探针 MZIR260-qP	0.25 $\mu$ mol/L	0.5 $\mu$ L
25 mg/L DNA 模板	2.5 mg/L	2.0 $\mu$ L
总体积		20.0 $\mu$ L

扩增体系可根据仪器及试剂耗材的实际使用情况, 进行相应调整。此表是 1 个扩增体系的体积, 应按照实际反应数量进行扩增体系配置。空白质控品以 2.0  $\mu$ L 的 ddH<sub>2</sub>O 作模板。

## 19. Bt11/*zSSI**b*** 二重数字 PCR 方法

### 19.1 引物探针确认

Bt11 是先正达农作物保护股份公司研发的抗鳞翅目害虫、耐除草剂草铵膦的转基因玉米品种，其转化体分子特征由大北农生物技术公司解析。首先对获得转基因材料的分子特征进行验证，确定转基因材料的转化体身份。

根据资料获得 Bt11 转化体特异性序列，合成携带 Bt11 转化体和内标准基因靶标的质粒分子，酶切，-20°C 存储备用。

Bt11 转化体特异性引物探针和玉米内标准基因 *zSSI**b*** 引物探针选用已发布的标准方法（GB/T 19495.4-2018、GB/T 19495.5-2018、农业部 1861 号公告—3—2012）中的实时荧光 PCR 方法引物探针，并对 Bt11 转化体特异性 2 组引物探针进一步筛选。

根据现有标准查找到 2 组 Bt11 转化体特异性引物/探针，如表 96 所示。

表 96 Bt11 转化体特异性引物和探针序列

靶标	引物/探针名称及序列 (5'-3')	扩增片段大小(bp)	来源
<i>zSSI<b>b</b></i>	<i>zSSI<b>b</b></i> -3F: CGGTGGATGCTAAGGCTGATG	88	农业部 1861 号 公告 —3—201 2
	<i>zSSI<b>b</b></i> -4R: AAAGGGCCAGGTTTCATTATCCTC		
	<i>zSSI<b>b</b></i> -P:HEX-TAAGGAGCACTCGCCGCCGCATCTG-BH Q1		
Bt11	Bt11-qF1: TGTGTGGCCATTTATCATCGA	68	GB/T

转化体	Bt11-qR1: CGCTCAGTGGAACGAAAACCTC	70	19495.4-2018
	Bt11-P1:FAM-TTCCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGT-BHQ1		
	Bt11-qF2: GCGGAACCCCTATTTGTTTA		GB/T 19495.5-2018
	Bt11-qR2: TCCAAGAATCCCTCCATGAG		
	Bt11-P2;FAM-AAATACATTCAAATATGTATCCGCTCA-BHQ1		

## 19.2 引物探针筛选

在伯乐 QX200 微滴式数字 PCR 平台上，用通用的 PCR 反应体系（引物/探针浓度 0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$ ）和退火温度（60 $^{\circ}\text{C}$ ），以 Bt11 质粒 DNA 为模板，进行 Bt11 转化体/*zSSIIb* 内标基因的二重 ddPCR 扩增，对表 96 中的引物探针组合进行筛选。每个引物探针组合设 2 个平行反应。

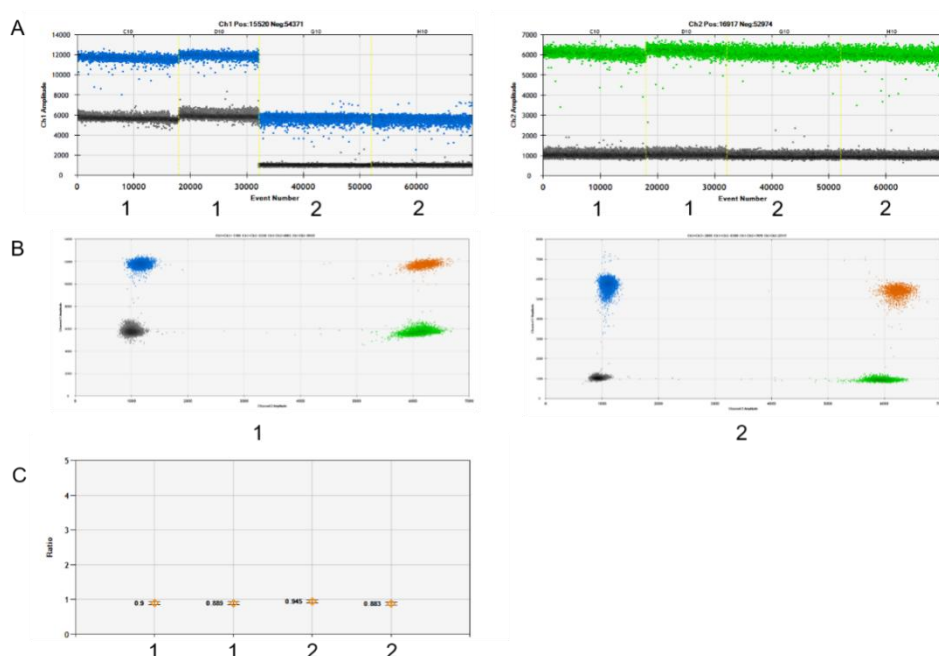


图 95 数字 PCR 引物探针筛选

注：A 为 Bt11 转化体不同引物探针组合和 *zSSIIb* 内标基因 1-D 微滴图；B 为 2 个引物探针组合与 *zSSIIb* 的 2-D 微滴图；C 为 2 个引物探针组合检测 Bt11 质粒 DNA，获得的 Bt11/*zSSIIb*

拷贝数比值。1 为 Bt11-QF1/QR1/P1 (GB/T 19495.4-2018)，2 为 Bt11-QF2/QR2/P2 (GB/T 19495.5-2018)。

Bt11 转化体和 *zSSIIb* 内标基因的 1 维 (1-D) 微滴热图、2 维微滴热图 (2-D)、Bt11/*zSSIIb* 拷贝数比值如图 1 所示，Bt11 转化体和 *zSSIIb* 内标基因的 1-D 微滴热图中，2 个引物组合阳性微滴和阴性微滴都能显著区分，雨滴较少 (图 95A)，组合 2 与 *zSSIIb* 的荧光强度较一致；2-D 微滴热图中，2 个引物探针组合都产生了 4 个显著区分的微滴群 (图 95B)；2 个引物探针组合检测 Bt11 质粒 DNA，获得不同的 Bt11/*zSSIIb* 拷贝数比值 (图 95C)，其中引物探针组合 2 的拷贝数比值为 0.945，较接近理论值 1.0，因此本项目选择引物探针组合 2 用于数字 PCR 扩增。

### 19.3 Bt11/*zSSIIb* 二重微滴数字 PCR 特异性测试

用转基因玉米 Bt11、其他转基因玉米混合物 (Bt11、Bt176、MON810、MON863、GA21、NK603、T25、TC1507、MON89034、MON88017、59122、MIR604、3272、MON87460、DAS40278-9、Bt11、MON87427、5307)、转基因大豆混合物 (GTS40-3-2、MON89788、A5547-127、A2704-12、356043、305423、CV127、MON87701、MON87708、MON87769、MON87705、FG72、DAS68416-4)、转基因水稻混合物 (TT51-1、KF-6、KMD-1、M12、KF-8、KF-2、G6H1、T1C-19)、转基因油菜混合物 (MS1、MS8、RF1、RF2、RF3、T45、Oxy235、Topas19/2、MON88302、73496)、转基因棉花混合物

(MON1445、MON531、MON15985、LLCOTTON25、MON88913、GHB614、COT102)、非转基因玉米基因组 DNA 作模板进行 Bt11 和 *zSSIIb* 微滴数字 PCR (ddPCR) 扩增,用水做空白对照,测试 Bt11 转化体特异性 ddPCR 的检测特异性。

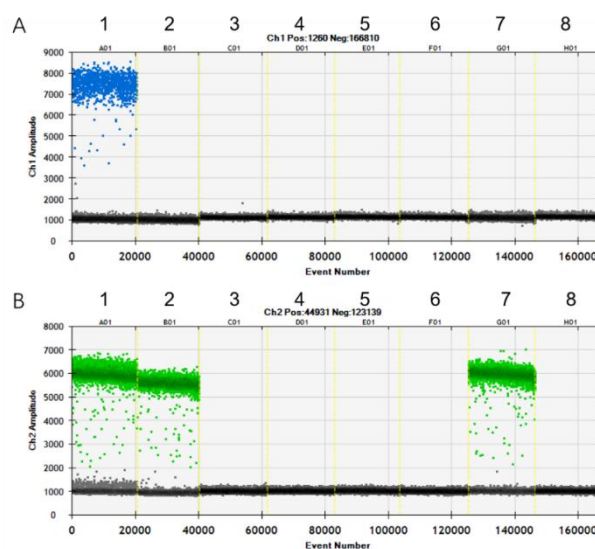


图 96 Bt11/*zSSIIb* 二重 ddPCR 特异性测试扩增图谱

注: A 为 Bt11 转化体特异性序列一维热图; B 为 *zSSIIb* 基因一维热图。样品顺序: 1 为 Bt11, 2 为其他转基因玉米混合样, 3 为转基因大豆混合样, 4 为转基因水稻混合样, 5 为转基因油菜混合样, 6 为转基因棉花混合样, 7 为非转基因玉米混合样, 8 为空白对照。

结果显示, *zSSIIb* 内标基因 ddPCR 在玉米样品中扩增得到阳性微滴, 在其他作物和空白对照中无阳性微滴; Bt11 转化体特异性序列 ddPCR 仅在转基因玉米 Bt11 样品中扩增得到阳性微滴, 在其他样品和空白对照中均无阳性微滴, 结果表明 Bt11/*zSSIIb* 二重微滴数字 PCR 方法有良好的特异性 (图 96)。

## 19.4 Bt11/*zSSIIb* 二重数字 PCR 反应条件优化

转基因定量检测依赖于转基因 DNA 拷贝数和总 DNA 拷贝数的准确测量,其中转基因 DNA 拷贝数通过转化体特异性 PCR 检测定量,总 DNA 拷贝数定量通过内标基因测定。以 Bt11 质粒 DNA 为模板,分别优化二重数字 PCR 中 Bt11 转化体特异性序列和 *zSSIIb* 内标基因的引物/探针浓度和退火/延伸温度,改善阳性/阴性液滴的分辨率以减少雨滴对定量结果的影响,同时测试二重数字 PCR 反应中转化体和内标基因是否具有相似的扩展效率。

PCR 扩增程序中退火温度的高低对阴阳性微滴区分有显著的影响,本项目设置了 55.0°C、55.5°C、56.6°C、58.2°C、60.1°C、61.7°C、62.6°C、63.0°C 八个温度梯度,测试 Bt11 和 *zSSIIb* 基因二重 ddPCR 的扩增效果。

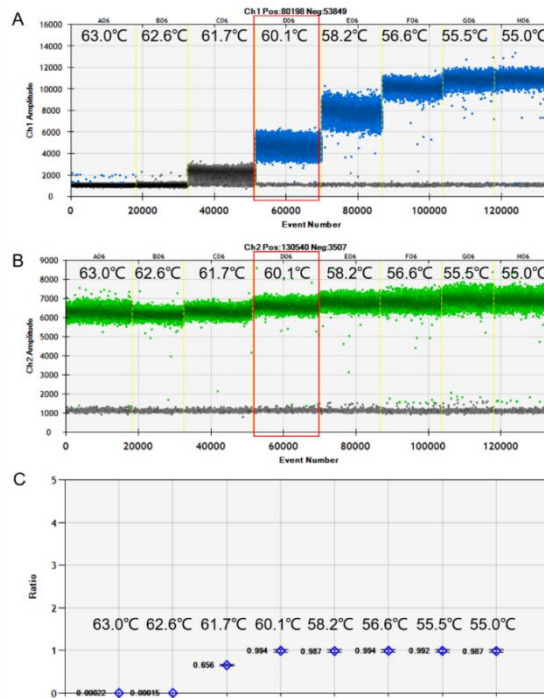


图 97 数字 PCR 引物探针退火温度优化扩增图谱

注：A 为 Bt11 玉米转化体特异性序列一维微滴图谱；B 为 zSSIb 基因一维微滴图谱，C 为 Bt11 转化体和 zSSIb 基因拷贝数比值。

数字 PCR 扩增结果显示：在 55°C 至 63°C 的不同退火温度下，zSSIb 内标基因的阳性液滴的荧光强度保持稳定（图 97B），但 Bt11 阳性液滴的荧光强度随着退火温度的降低而增加，在退火温度降低到 55.5°C 时，微滴的信号强度达到平台期（图 97A）。在 61.7°C~63.0°C 的退火温度下，Bt11 的阳性和阴性微滴不能区分；在 55.0°C~60.1°C 的退火温度下，Bt11 的阳性和阴性微滴都能区分，拷贝数比值在 0.987~0.994 的范围内波动，都接近理论值，当退火温度在 60.1°C 时，测量的拷贝数比值为 0.994，非常接近理论值（图 97C），且与内标基因具有更相似的扩增效率。考虑到退火温度对扩增特异性的影响，选择 60°C 作为 Bt11 转化体和 zSSIb 内标基因双重数字 PCR 的退火温

度。经过优化后 *zSSIb* 基因和 Bt11 转化体特异性序列数字 PCR 扩增程序为：95°C 预变性 10 min；94°C 变性 30 s，60°C 退火延伸 60 s，共进行 50 个循环；98°C 变性 10 min，4°C 保存（升降温速率 2°C/s）。

由于微滴式数字 PCR 平台 Bio-Rad QX200 需使用专用的扩增试剂，PCR 扩增体系中仅选择引物探针浓度进行优化测试。实时荧光 PCR 方法中常用引物与探针终浓度分别为 0.4  $\mu\text{mol/L}$  和 0.2  $\mu\text{mol/L}$ ，Bio-Rad 2 $\times$ ddPCRTM Supermix for Probes (no dntp) 的说明书引物与探针的终浓度分别为 0.9  $\mu\text{mol/L}$  和 0.25  $\mu\text{mol/L}$ 。参考上述引物探针终浓度设置了八组 Bt11 转化体特异性序列和 *zSSIb* 基因引物探针终浓度进行测试，包括：Bt11 和 *zSSIb* 的引物探针浓度相同，分别为 0.1/0.05  $\mu\text{mol/L}$ ，0.0.2/0.1  $\mu\text{mol/L}$ ，0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$ ，0.8/0.4  $\mu\text{mol/L}$ ；Bt11 和 *zSSIb* 不同的引物探针浓度，分别为 0.2/0.1  $\mu\text{mol/L}$  (*zSSIb*)、0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$  (Bt11)，0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$  (*zSSIb*)、0.2/0.1  $\mu\text{mol/L}$  (Bt11)，0.8/0.4  $\mu\text{mol/L}$  (*zSSIb*)、0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$  (Bt11)，0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$  (*zSSIb*)、0.8/0.4  $\mu\text{mol/L}$  (Bt11)。

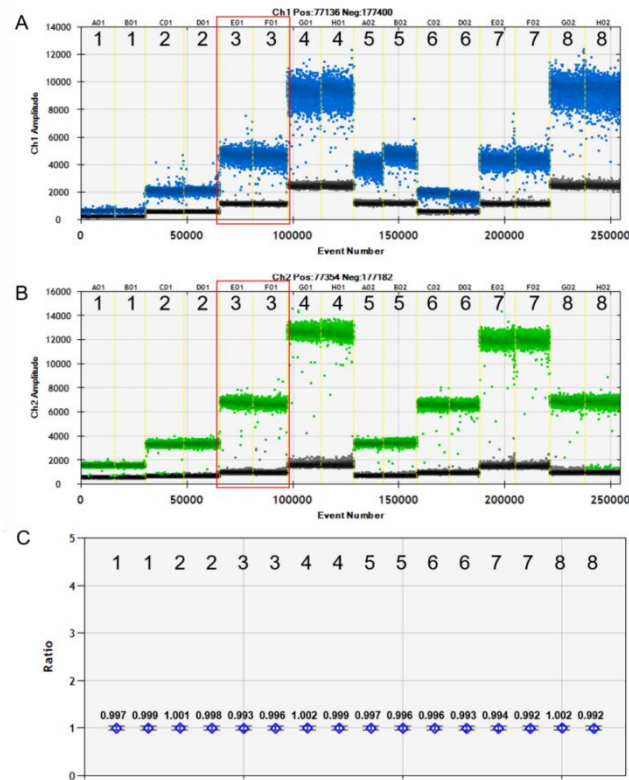


图 98 数字 PCR 引物探针浓度优化扩增图谱

注：A 为 Bt11 玉米转化体特异性序列一维微滴图谱；B 为 zSSIIb 基因一维微滴图谱，C 为 Bt11 转化体和 zSSIIb 基因拷贝数比值。1~4 对应 Bt11 和 zSSIIb 的引物探针浓度相同，分别为 0.1/0.05  $\mu\text{mol/L}$ 、0.2/0.1  $\mu\text{mol/L}$ 、0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$ 、0.8/0.4  $\mu\text{mol/L}$ ；5~8 对应 Bt11 和 zSSIIb 不同的引物探针浓度，分别为 0.2/0.1  $\mu\text{mol/L}$  (zSSIIb)、0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$  (Bt11)，0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$  (zSSIIb)、0.2/0.1  $\mu\text{mol/L}$  (Bt11)，0.8/0.4  $\mu\text{mol/L}$  (zSSIIb)、0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$  (Bt11)，0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$  (zSSIIb)、0.8/0.4  $\mu\text{mol/L}$  (Bt11)。

数字 PCR 扩增结果显示：Bt11 和内标基因的引物/探针浓度低于 0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$  时，阳性、阴性液滴信号偏低，且难以明显区分(图 98A、B)；当两个靶标的引物/探针浓度均为 0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$  时，阳性微滴和阴性微滴具有最佳的分辨率；当两个靶标的引物/探针浓度高于 0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$  时，阴性微滴信号值升高，且阳性微滴群变宽。当两个靶标的引物/探针浓度均为 0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$  时，测量的平均拷贝数比值为 0.995，接近理论值(图 98C)。综合考虑引物探针用量和微滴

荧光强度，二重数字 PCR 中 Bt11 和 *zSSIb* 的引物/探针浓度均采用 0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$ 。经过优化后 *zSSIb* 基因和 Bt11 转化体特异性序列数字 PCR 扩增体系如表 97 所示。

表 97 数字 PCR 扩增体系

组分	体积 ( $\mu\text{L}$ )
ddH <sub>2</sub> O	4.0 $\mu\text{L}$
2 $\times$ ddPCR <sup>TM</sup> Supermix for Probes (no dntp)	10.0 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 内标上游引物 <i>zSSIb</i> -3F	0.8 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 内标下游引物 <i>zSSIb</i> -4R	0.8 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 内标探针 <i>zSSIb</i> -P	0.4 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 转化体上游引物 Bt11-qF	0.8 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 转化体上游引物 Bt11-qR	0.8 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 转化体探针 Bt11-P	0.4 $\mu\text{L}$
DNA 模板	2.0 $\mu\text{L}$
总体积	20.0 $\mu\text{L}$

### 19.5 Bt11/*zSSIb* 二重数字 PCR 的 LOD、LOQ 和动力学范围测试

微滴式数字 PCR 的理论有效线性范围是 1~100000 个拷贝，实际测试时，20  $\mu\text{L}$  反应液在微滴生成仪中一般生成 10000~20000 个有效微滴，微滴数大于 10000 为有效反应。为了测试 *zSSIb* 基因和 Bt11 转化体特异性序列数字 PCR 方法的线性范围，在优化的 PCR 条件下，将 Bt11 质粒 DNA 的连续稀释液用于测试 Bt11/*zSSIb* 二重 ddPCR 的动态范围、LOD 和 LOQ，每个标准品扩增设置 4 个平行。根据标准品数字 PCR 测量值及初始模板拷贝数分别绘制 *zSSIb* 基因和 Bt11 转化体特异性序列的线性回归曲线进行线性范围分析，对 4 个平行间

*zSSIb* 基因和 Bt11 转化体特异性序列测量值以及拷贝数比值的标准偏差和相对标准偏差进行数据统计，评价 *zSSIb* 基因和 Bt11 转化体特异性序列数字 PCR 方法的重复性。根据《转基因植物及其产品成分检测 数字 PCR 方法制定指南》（农业农村部公告第 323 号—21—2020）中定量检测的要求，在整个线性动态范围内，线性度即线性回归方程的决定系数 R<sup>2</sup> 一般应≥0.98，正确度偏差（Bias）不超过标称值的 25%，精密度即重复性相对标准偏差（RSD）一般应≤25%。

表 98 Bt11 玉米特异性序列数字 PCR 线性动态范围与重复性分析

Target	Expected concentration (copie/μL)	Copy number concentration (copie/μL)							RSD (%)	Bias (%)
		Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Mean	SD			
Bt11 copy number	80000	89000	87000	87000	91000	88500	1914.85	2.16	10.63	
	16000	16790	16420	16860	16330	16600	263.94	1.59	3.75	
	3200	3210	3170	3230	3310	3230	58.88	1.82	0.94	
	640	652	633	674	674	658.25	19.77	3.00	2.85	
	128	127	112	126	111	119	8.68	7.29	-7.03	
	40	31	43	33	29	34	6.22	18.29	-15.00	
	20	23	21	19	21	21	1.63	7.78	5.00	
	10	11	7.7	10	6.9	8.9	1.92	21.57	-11.00	
	5	5.5	3.9	1.7	3	3.525	1.60	45.29	-29.50	
1	0.7	0.6	0.6	0.62	0.63	0.05	7.56	-37.00		
<i>zSSIb</i> copy number	80000	89000	86000	87000	88000	87500	1290.99	1.48	9.38	
	16000	16830	16440	16860	16320	16612.5	273.18	1.64	3.83	
	3200	3210	3170	3220	3310	3227.5	59.09	1.83	0.86	
	640	654	631	673	670	657	19.24	2.93	2.66	
	128	128	113	126	110	119.25	9.07	7.61	-6.84	
	40	31	43	34	29	34.25	6.18	18.06	-14.38	
	20	24	21	19	20	21	2.16	10.29	5.00	
	10	11	7.7	9.5	6.9	8.775	1.84	20.96	-12.25	
	5	5.5	3.9	1.7	3	3.525	1.60	45.29	-29.50	
1	—	0.6	0.6	1.6	—	—	—	—		
Bt11/ <i>zSSIb</i>	80000	1.00	1.01	1.00	1.03	1.01	0.02	1.59	0.01	
	16000	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.13	0.00	

ratio	3200	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.16	0.00
	640	1.00	1.00	1.00	1.01	1.00	0.00	0.38	0.00
	128	0.99	0.99	1.00	1.01	1.00	0.01	0.83	0.00
	40	1.00	1.00	0.97	1.00	0.99	0.01	1.48	-0.01
	20	0.96	1.00	1.00	1.05	1.00	0.04	3.74	0.00
	10	1.00	1.00	1.05	1.00	1.01	0.03	2.60	0.01
	5	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00
	1	-	1.01	1.00	1.03	-	-	-	0.01

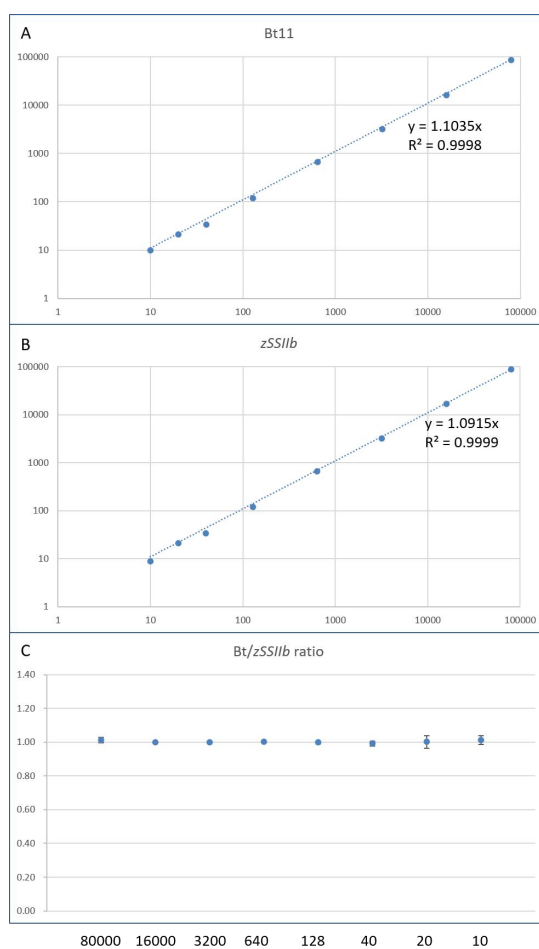


图 99 Bt11/zSSIb 二重数字 PCR 方法线性动态范围测试

A 为 Bt11 转化体特异性序列拷贝数测量值与预期值的线性回归方程（y 代表拷贝数测量值，x 代表拷贝数预期值）；B 为 zSSIb 基因拷贝数测量值与预期值的线性回归方程（y 代表拷贝数测量值，x 代表拷贝数预期值）；C 为 Bt11 转化体特异性序列和 zSSIb 基因拷贝数比值与不同浓度模板量的关系（y 代表模板拷贝数比值，x 代表 Bt11 转化体特异性序列拷贝数预期值）。

结果显示:当 20  $\mu$ L 扩增体系中 Bt11 转化体特异性序列和 *zSSIIb* 基因拷贝数分别在 10~80000 copies 之间时,随着拷贝数的降低,4 个重复间正确度偏差 (Bias) 和重复性相对标准偏差 (RSD) 升高,但均小于 25%,当模板量为 5 拷贝时,正确度偏差 (Bias) 和重复性相对标准偏差 (RSD) 出现大于 25%的情况,因此定量极限 (LOQ) 确定为 10 个拷贝,当 DNA 浓度低至 5 拷贝时,4 个平行中有 1 个未检测到阳性信号,而当 DNA 浓度为 5 拷贝时,依然可以稳定的检测到阳性信号,拷贝数测量值在 1.7~9.5 之间,因此检测极限 (LOD) 确定为 5 拷贝 (表 98); Bt11 转化体特异性序列和 *zSSIIb* 基因微滴数字 PCR 获得的拷贝数浓度测量值与预期值具有良好的相关性,线性回归方程分别为  $y=1.1035x$  和  $y=1.0915x$ ,决定系数 R<sup>2</sup> 值分别等于 0.9998 和 0.9999, Bt11 转化体特异性序列和 *zSSIIb* 基因拷贝数比值在 1.0 附近波动 (图 99)。Bt11/*zSSIIb* 二重数字 PCR 方法线性动态范围测试结果表明,20  $\mu$ L 扩增体系中,当模板量在 10~80000 拷贝的范围内,可获得准确的拷贝数浓度和拷贝数比值测量值。

### 19.6 Bt11/*zSSIIb* 二重 ddPCR 的测量准确性

配制 4 个含 Bt11 基因组 DNA 盲样(Sg1-Sg4),拷贝数比值依次为 5.0%、3.0%、1.0%、0.5%。由不同的操作者在不同的日期用 Bt11/*zSSIIb* 二重 ddPCR 对 4 个盲样进行三次测量。

表 99 5 个盲样的测量结果

重复	PCR 平行	盲样含量测量值			
		S1 (%)	S2 (%)	S3 (%)	S4 (%)
1	1	4.92	2.87	1.00	0.47
	2	4.90	2.91	1.01	0.52
	3	5.03	2.96	0.93	0.56
2	1	4.91	3.00	0.94	0.55
	2	4.98	3.03	1.00	0.47
	3	5.04	2.98	1.00	0.58
3	1	4.92	3.02	1.03	0.42
	2	4.87	2.92	0.95	0.49
	3	4.90	3.03	0.96	0.58

表 100 4 个盲样定量结果的重复性和重现性统计分析

盲样	预期拷贝数比值 (%)	测量平均值 (%)	S <sub>r</sub> (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	S <sub>R</sub> (%)	RSD <sub>R</sub> (%)	Bias (%)
S1	5	4.94	0.06	1.15	0.06	1.25	-1.18
S2	3	2.97	0.05	1.55	0.06	2.07	-1.04
S3	1	0.98	0.04	4.17	0.04	4.17	-2.00
S4	0.5	0.52	0.06	12.11	0.06	12.11	3.11

测量结果如表 99 所示，计算 4 个盲样 *Bt11/zSSIIB* 拷贝数比值的平均值，统计测量结果的重复性相对标准差 (RSD<sub>r</sub>)、重现性相对标准差 (RSD<sub>R</sub>)、和相对偏倚 (Bias)。结果显示，测量平均值均接近预期含量，与预期值的相对偏倚在±25%的可接受范围内；重复性相对标准偏差 RSD<sub>r</sub> 和再现性相对标准偏差 RSD<sub>R</sub> 均小于 25% (表 100)。已建立的 *Bt11/zSSIIB* 二重 ddPCR 实现了对样品中 *Bt11* 含量的准确定量，具有良好的重复性和重现性。

## 20. MIR162/*zSSIb* 二重数字 PCR 方法

### 20.1 引物探针确认

MIR162 是先正达公司通过农杆菌转化方法开发的含 vip3Aa20 的转基因抗虫玉米品种，其转化体分子特征由先正达公司解析。首先对获得转基因材料的分子特征进行测序验证，确定转基因材料的转化体身份。MIR162 转化体特异性引物探针和玉米内标准基因 *zSSIb* 引物探针选用已发布的标准方法《转基因产品检测 实时荧光定性聚合酶链式反应》（GBT 1949.5.5-2018）中的实时荧光 PCR 方法引物探针。

表 101 MIR162 转化体及 *zSSIb* 内标基因引物和探针序列

转化体 (基因)	引物/探针名称及序列 (5'-3')	扩增片 段大小 (bp)	序列来源
MIR162	MIR162-f1: GCGCGGTGTCATCTATGTTACTAG	92	GBT 1949.5-2018
	MIR162-r1: TGCCTTATCTGTTGCCTTCAGA		
	MIR162-p1:FAMTCTAGACAATTCAGTACATTA AAAACGTCCG CCA-BHQ		
<i>zSSIb</i>	<i>zSSIb</i> -3F:CGGTGGATGCTAAGGCTGATG	88	农业部 1861 号公告 -3-2012
	<i>zSSIb</i> -4R:AAAGGGCCAGGTTTCATTATCCTC		
	<i>zSSIb</i> -HP:HEX-TAAGGAGCACTCGCCGCCGCATCTG--BHQ		

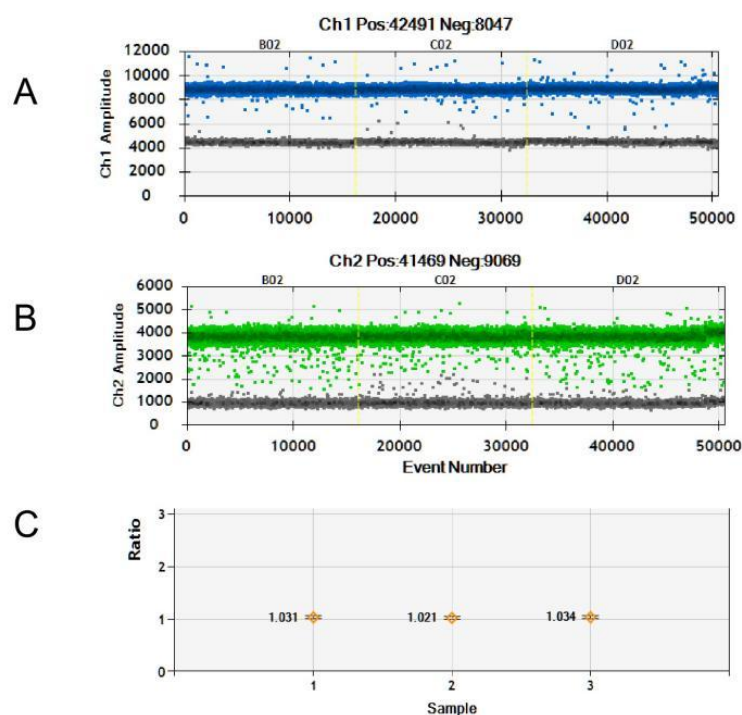


图 100 数字 PCR 引物探针确认

注：A 为 MIR162 玉米转化体特异性序列一维微滴图谱；B 为 *zSSIb* 基因一维微滴图谱，C 为 MIR162 转化体和 *zSSIb* 基因拷贝数比值。

在伯乐微滴式数字 PCR 平台 QX200 上，用通用的 PCR 反应体系（引物/探针浓度 400/200 nM）和退火温度（60°C），以 MIR162 纯合体基因组 DNA 为模板，进行 MIR162 转化体/*zSSIb* 基因的二重 ddPCR 扩增，对表 101 中的引物探针组合进行测试，设 3 个平行反应。

结果显示，MIR162 转化体和 *zSSIb* 基因二重微滴式数字 PCR 的一维微滴图谱（1-D）的阴性微滴和阳性微滴分界清晰，“雨滴”较少（图 100A, B）；MIR162 转化体和 *zSSIb* 基因拷贝数比值接近 1.0，

符合纯合体 MIR162 玉米分子特征（图 100C）。综上，确认表 101 的引物探针适用 MIR162 转化体/*zSSIb* 基因的二重 ddPCR 扩增。

## 20.2 MIR162 /*zSSIb* 二重微滴数字 PCR 特异性测试

用转基因玉米 MIR162、其他转基因玉米混合样（瑞丰 125、瑞丰 8、T25、MIR604、NK603、MON87427、DBN9936、DBN9858、DBN9501）、转基因大豆混合样（DBN9004、MON89788、MON87751、CAL16、中黄 6106、DBN8205）、转基因水稻混合样（TT51-1、KF-6、KMD、G6H1、T1C-19、T2A-1）、转基因油菜混合样（MS1、MS8、RF1、RF2、RF3、T45、Oxy-235、Topas19/2、MON88302、73496）、转基因棉花混合样（MON1445、MON531、MON15985、LLCOTTON25、MON88913、GHB614、COT102）、非转基因玉米基因组 DNA 作模板进行 MIR162 和 *zSSIb* 微滴数字 PCR（ddPCR）扩增，用水做空白对照，测试 MIR162 转化体特异性 ddPCR 的检测特异性。*zSSIb* 内标基因 ddPCR 在转基因玉米和非转基因玉米品种中都产生了阳性微滴，在其他作物和空白对照中无阳性微滴；MIR162 转化体特异性 ddPCR 仅在转基因玉米 MIR162 中有阳性微滴，在其他转基因玉米品种和空白对照中均无阳性微滴（图 101）。结果表明 MIR162 /*zSSIb* 二重微滴数字 PCR 有良好的扩增特异性。

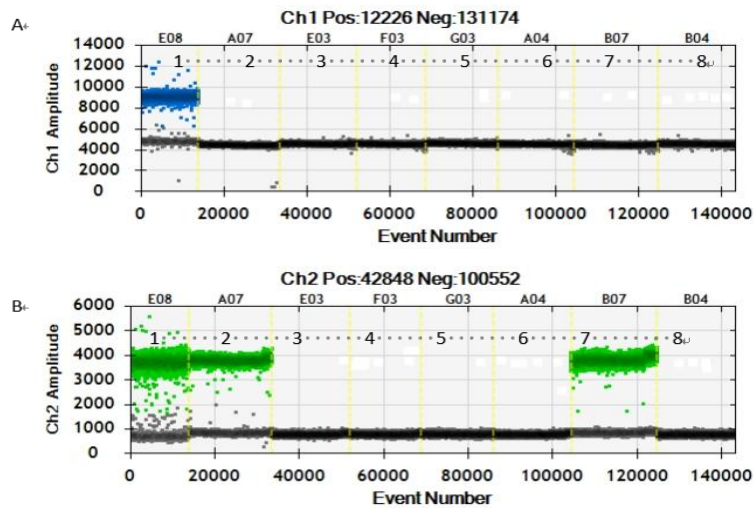


图 101 MIR162 微滴数字 PCR 特异性测试。

A, MIR162 微滴数字 PCR 一维热图; B, *zSSIb* 微滴数字 PCR 一维热图。样品顺序: 1. MIR162, 2. 其他转基因玉米混合样 3. 转基因大豆混合样, 4. 转基因水稻混合样, 5. 转基因油菜混合样, 6. 转基因棉花混合样, 7. 非转基因玉米, 8. 空

### 20.3 MIR162 /*zSSIb* 二重数字 PCR 的反应条件优化

转基因定量检测依赖于转基因 DNA 拷贝数和总 DNA 拷贝数的准确测量, 其中转基因 DNA 拷贝数通过转化体特异性 PCR 检测定量, 总 DNA 拷贝数定量通过内标基因测定。以 MIR162 纯合体基因组 DNA 为模板, 分别优化二重数字 PCR 中 MIR162 转化体和 *zSSIb* 内标基因的引物/探针浓度和退火/延伸温度, 改善阳性/阴性液滴的分辨率以减少雨滴对定量结果的影响, 同时测试二重数字 PCR 反应中转化体和内标基因是否具有相似的扩展效率。在 55°C 至 63°C 的不同退火温度下, *zSSIb* 内标基因和的 MIR162 转化体阳性液滴的荧光强度都保持稳定 (图 102 b)。在不同的退火温度下, MIR162 的阳性和阴性微滴都能明显区分, 拷贝数比值在 0.966—0.996 的范围内

波动，当退火温度在 60.1°C 时，测量的拷贝数比值为 0.996，非常接近理论值（图 102 c）。选择 60°C 作为 MIR162 转化体和 *zSSIIb* 内标基因二重数字 PCR 的退火温度。

MIR162 和内标基因的引物/探针浓度低于 400/200 nM 时，阳性、阴性液滴信号偏低，且难以明显区分（图 102d、e）；当两个靶标的引物/探针浓度均为 400/200 nM 时，阳性微滴和阴性微滴具有最佳的分辨率；当两个靶标的引物/探针浓度高于 400/200 nM 时，阴性微滴信号值升高，且阳性微滴群变宽。当两个靶标的引物/探针浓度均为 400/200 nM 时，测量的平均拷贝数比值为 1.02，接近理论值（图 102f）。综合考虑引物探针用量和微滴荧光强度，二重数字 PCR 中 MIR162 和 *zSSIIb* 的引物/探针浓度均采用 400/200 nM。

在 60°C 退火、引物/探针浓度为 400/200 nM 的反应条件下，以纯合体基因组 DNA 为模板，进行 MIR162/*zSSIIb* 二重 ddPCR。二重数字 PCR 二维热图显示了 4 个明显的液滴簇，分别对应 FAM 阳性液滴簇、HEX 阳性液滴簇、双荧光液滴簇和阴性液滴簇（图 102 g），测量的拷贝数比值为 0.99，非常接近理论值 1.0，表明 MIR162/*zSSIIb* 二重 ddPCR 中 *zSSIIb* 内标基因与 MIR162 转化体具有相同的扩增能力。选择 60°C 作为 MIR162/*zSSIIb* 二重 ddPCR 的最佳退火温度，MIR162 转化体和 *zSSIIb* 内标基因的引物/探针浓度均为 400/200 nM。

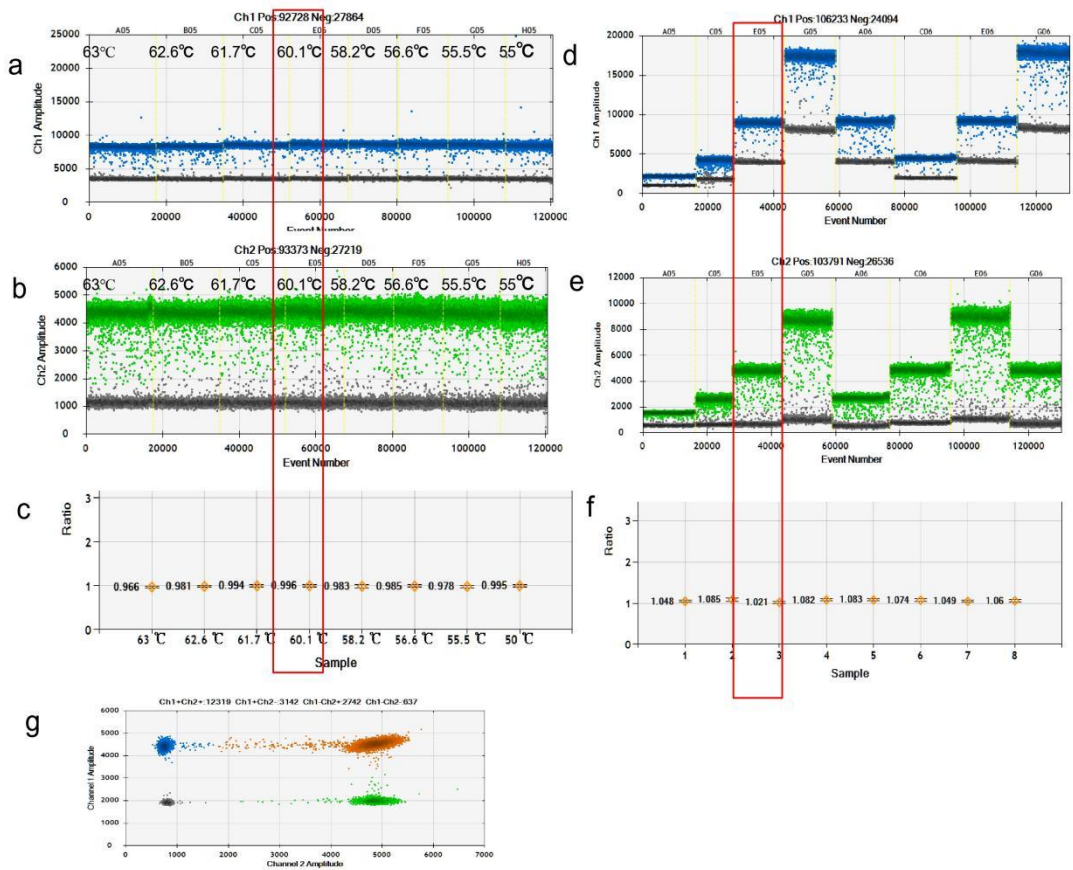


图 102 MIR162 /zSSIIB 二重 ddPCR 退火/延伸温度和引物/探针浓度的优化。

MIR162 (a) 和 zSSIIB (b) 在 55°C 至 63°C 不同退火温度下的一维 (1-D) 微滴图; c, 不同退火温度下测量的 MIR162 /zSSIIB 拷贝数比值; MIR162 (d) 和 zSSIIB (e) 在不同引物/探针浓度下的一维微滴图, 1-4 对应 MIR162 和 zSSIIB 的引物/探针浓度相同, 分别为 100/50, 200/100, 400/200, 800/400 nM; 5-8 对应 MIR162 和 zSSIIB 不同的引物/探针浓度, 分别为 200/100 nM (zSSIIB)、400/200 nM (MIR162), 400/200 nM (zSSIIB)、200/100 nM (MIR162), 800/400 nM (zSSIIB)、400/200 nM (MIR162), 400/200 nM (zSSIIB)、800/400 nM (MIR162); f, 不同引物/探针浓度下测量的 MIR162 /zSSIIB 拷贝数比值; g, 在优化的反应体系和退火温度下, MIR162 /zSSIIB 二重 ddPCR 的二维微滴图。

经优化确定, MIR162 /zSSIIB 二重 ddPCR 中反应体系见表 102。

反应程序为: 94°C 变性 10 min; 50 个循环 (94 °C 变性 30 s, 60°C 退火延伸 1 min) ; 98 °C 变性 10 min。

表 102 MIR162 /zSSIIB 二重微滴数字 PCR 反应体系

PCR 反应试剂	终浓度	体积(μL)
ddPCR Mix (2×)	1×	10

MIR162-f1	10 $\mu$ M	0.8
MIR162-r1	10 $\mu$ M	0.8
MIR162-p	10 $\mu$ M	0.4
<i>zSSIb</i> -3F	10 $\mu$ M	0.8
<i>zSSIb</i> --4R	10 $\mu$ M	0.8
<i>zSSIb</i> --HP	10 $\mu$ M	0.4
DNA 模板	25 ng/ $\mu$ l	2
ddH <sub>2</sub> O	/	4
合计	/	20

## 20.4 MIR162 /*zSSIb* 二重 ddPCR 的 LOD、LOQ 和动力学范围测试

在优化的 PCR 条件下，MIR162 基因组 DNA 的连续稀释液用于测试 MIR162/*zSSIb* 二重 ddPCR 的动态范围、LOD 和 LOQ。不同浓度的微滴热图见图 103，测量的拷贝数浓度以及 MIR162 /*zSSIb* 的拷贝数比值显示在表 103 中。当反应体系中模板拷贝数为 5 拷贝时，MIR162/*zSSIb* 二重 ddPCR 3 个反应的阳性微滴数均超过 3 个，呈现阳性信号，LOD 可以达到 5 个拷贝 MIR162 基因组 DNA，为了能够稳定检出 MIR162 转化体，确定 LOD 为 10 个拷贝 MIR162 基因组 DNA。统计各个二重数字 PCR 反应测量 MIR162 拷贝数、*zSSIb* 拷贝数、和 MIR162/*zSSIb* 拷贝数比值，计算各模板量测量结果的相对标准差 (RSD) 和相对偏倚 (Bias%)。当反应体系中模板拷贝数为 20 拷贝时，测量结果的 RSD 值均小于 25%，Bias% 均在  $\pm 25\%$  之间，LOQ 可以达到 20 个拷贝 MIR162 基因组 DNA，为了更能准确地定量

MIR162 转化体， 确定 LOQ 为 40 个拷贝 MIR162 基因组 DNA（表 103）。

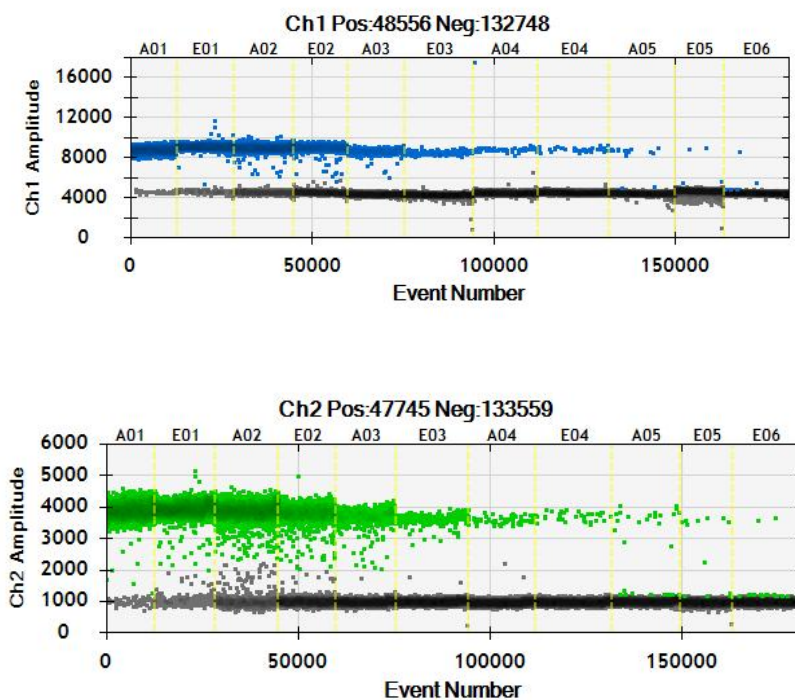


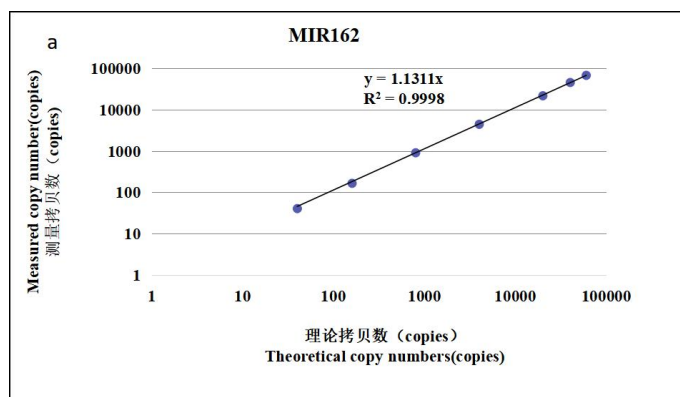
图 103 梯度稀释 DNA 溶液 MIR162 /zSSIIb 二重 ddPCR 的微滴热图。

A01-E06 的模板量依次为 60000、40000、20000 、4000、800、160 、40 、20 、10、5、1copies。

表 103 MIR162 /zSSIIb 二重 ddPCR 测量梯度稀释 zSSIIb DNA 溶液的拷贝数浓度和比值

Target	Expected concentration (copie/ $\mu$ L)	Copy number concentration (copie/ $\mu$ L)						
		Rep1	Rep2	Rep3	Mean	SD	RSD (%)	Bias (%)
MIR162	60000	67400.00	67400.00	69000.00	67933.33	923.76	1.36	13.22
	40000	44700.00	46000.00	46100.00	45600.00	781.02	1.71	14.00
	20000	22140.00	21330.00	21680.00	21716.67	406.24	1.87	8.58
	4000	4430.00	4430.00	4410.00	4423.33	11.55	0.26	10.58
	800	940.00	876.00	890.00	902.00	33.65	3.73	12.75
	160	157.00	167.00	168.00	164.00	6.08	3.71	2.50
	40	43.00	33.00	44.00	40.00	6.08	15.21	0.00
	20	20.00	23.00	22.00	21.67	1.53	7.05	8.33
	10	10.00	10.00	14.00	11.33	2.31	20.38	13.33

	5	3.50	8.90	4.40	5.60	2.89	51.66	12.00
	1	6.60	/	14.00	10.30	5.23	50.80	930.00
<i>zSSIb</i>	60000	63800	65300	67300	65466.67	1755.94	2.68	9.11
	40000	41600	43000	43400	42666.67	945.16	2.22	6.67
	20000	20540	20280	20510	20443.33	142.24	0.70	2.22
	4000	4170	4160	4180	4170.00	10.00	0.24	4.25
	800	850	820	872	847.33	26.10	3.08	5.92
	160	170	168	171	169.67	1.53	0.90	6.04
	40	43	35	42	40.00	4.36	10.90	0.00
	20	20	20	28	22.67	4.62	20.38	13.33
	10	21	20	20	20.33	0.58	2.84	103.33
	5	11	/	15	13.00	2.83	21.76	160.00
	1	-	-	-	-	-	-	-
MIR162/ <i>zSSIb</i> ratio	60000	1.06	1.03	1.03	1.04	0.02	1.58	3.79
	40000	1.07	1.07	1.06	1.07	0.01	0.58	6.88
	20000	1.08	1.05	1.06	1.06	0.01	1.30	6.22
	4000	1.06	1.06	1.06	1.06	0.01	0.48	6.08
	800	1.11	1.07	1.02	1.06	0.04	4.01	6.49
	160	0.92	0.99	0.98	0.97	0.04	3.91	3.33
	40	1.00	0.94	1.05	1.00	0.05	5.26	0.32
	20	1.00	1.15	0.79	0.98	0.18	18.71	2.14
	10	0.48	0.50	0.70	0.56	0.12	22.00	44.13
	5	0.32	-	-	0.32	-	-	-
	1	-	-	-	-	-	-	-



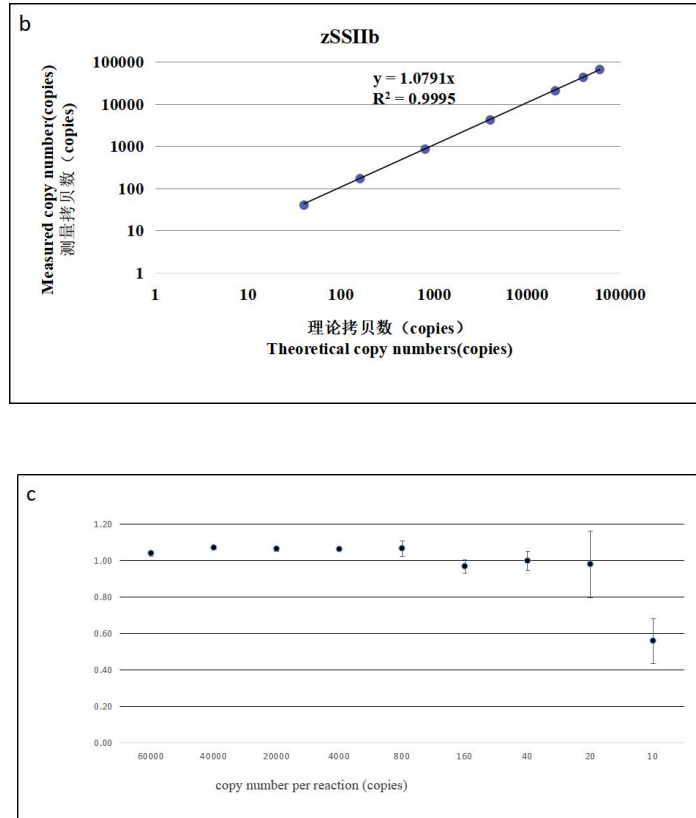


图 104 MIR162 /zSSIIB 二重 ddPCR 的动态范围和实测拷贝数比。

a, 二重 ddPCR 中 MIR162 在 40 到  $6.0 \times 10^4$  个拷贝的动态范围内测量拷贝数与预期拷贝数间有良好的线性关系; b, 二重 ddPCR 中 /zSSIIB 在 40 到  $6.0 \times 10^4$  个拷贝的动态范围内测量拷贝数与预期拷贝数间有良好的线性关系; c, 测得的 DNA 溶液的拷贝数比随着 DNA 浓度的降低显示出升高的标准差(SD), 垂直线段表示标准差。数据来自三个技术重复的平均值。

## 20.5 MIR162 /zSSIIB 二重 ddPCR 的测量准确性

通过天平称量法配制 5 个 MIR162 基因组 DNA 盲样(Sg1-Sg5), 拷贝数比值依次为 5.0%、3.0%、1.0%、0.5%、0.1%。用 MIR162 /zSSIIB 二重 ddPCR 对 5 个盲样进行定量。二重 ddPCR 的定量检测由不同的操作者在不同的日期进行了 3 次测量, 测量结果如表 104 所示。计算 5 个盲样 MIR162 /zSSIIB 拷贝数比值的平均值, 统计测量结果的重复性相对标准差 (RSDr)、重现性相对标准差 (RSDR)、和相对

偏倚 (Bias)。测量平均值均接近预期含量，与预期值的相对偏倚在  $\pm 25\%$  的可接受范围内；重复性相对标准偏差  $RSD^r$  和再现性相对标准偏差  $RSD^R$  均小于 25% (表 105)。已建立的 MIR162 /zSSIIb 二重 ddPCR 实现了对 GMO 含量的准确定量，具有良好的重复性和重现性。

表 104 5 个盲样的测量结果

重 复	PCR 平 行	盲样				
		Sg1 (%)	Sg2 (%)	Sg3 (%)	Sg4 (%)	Sg5 (%)
1	1	5.16	2.97	1.04	0.49	0.12
	2	5.23	3.13	0.96	0.53	0.13
	3	5.19	3.01	1.12	0.50	0.12
2	1	5.02	3.10	1.00	0.45	0.09
	2	4.87	2.73	1.15	0.50	0.10
	3	5.14	3.10	1.10	0.51	0.12
3	1	4.95	3.24	1.13	0.46	0.13
	2	5.23	3.23	1.10	0.51	0.09
	3	5.05	3.13	1.19	0.50	0.11

表 105 MIR162 /zSSIIb 二重 ddPCR 定量结果的重复性和重现性统计分析

盲样	拷贝数比值 (%)	平均值 (%)	$S^r$ (%)	$RSD^r$ (%)	$S^R$ (%)	$RSD^R$ (%)	Bias (%)
1	5	5.09	0.11	2.26	0.13	2.59	1.87
2	3	3.07	0.14	4.46	0.16	5.24	2.37
3	1	1.09	0.07	6.35	0.08	6.94	8.78
4	0.5	0.49	0.03	5.44	0.03	5.44	-1.11
5	0.1	0.11	0.01	13.28	0.02	14.14	12.22

## 20.6 结论

MIR162 /zSSIIb 二重 ddPCR 中的 MIR162 和 zSSIIb 采用与实时荧光 PCR 检测相同的引物/探针浓度，为 400/200 nM，反应体系见表 106。反应程序如下：94°C 变性 10 min；50 个循环（94°C 变性 30 s，60°C

退火延伸 1 min)；98 °C 变性 10 min。DNA 模板量在 40 ~ 6.0×10<sup>4</sup> copies/反应，拷贝数浓度测量值与预期值具有良好的线性关系。

表 106 MIR162 /*zSSIb* 二重微滴数字 PCR 反应体系

PCR 反应试剂	终浓度	体积(μL)
ddPCR Mix (2×)	1×	10
MIR162-f1	10 μM	0.8
MIR162-r1	10 μM	0.8
MIR162-p1	10 μM	0.4
<i>zSSIb</i> -3F	10 μM	0.8
<i>zSSIb</i> -4R	10 μM	0.8
<i>zSSIb</i> -HP	10 μM	0.4
DNA 模板	25 ng/μl	2
ddH <sub>2</sub> O	/	4
合计	/	20

## 21. GA21/*zSSIb* 二重数字 PCR 方法

### 21.1 引物探针确认

GA21 是先正达公司研发的耐草甘膦(修饰的 EPSPS)转基因玉米品种，其转化体分子特征由先正达公司解析。首先对获得转基因材料的分子特征进行测序验证，确定转基因材料的转化体身份。GA21 转化体特异性引物探针和玉米内标准基因 *zSSIb* 引物探针选用已发布的标准方法《转基因产品检测 实时荧光定性聚合酶链式反应》(GBT 1949.5.5-2018) 中的实时荧光 PCR 方法引物探针。

表 107 GA21 转化体及 *zSSIb* 内标基因引物和探针序列

靶标	引物/探针名称及序列 (5'-3')	扩增片段大小(bp)	序列来源

GA21	esGA21-f1: CGTTATGCTATTTGCAACTTTAGAACA	112	GBT 19495.5-2018
	esGA21-r1: GCGATCCTCCTCGCGTT		
	esGA21-p:FAM-TTTCTCAACAGCAGGTGGGTCCGGGT-BHQ1		
zSSIIb	zSSIIb-3F:CGGTGGATGCTAAGGCTGATG	88	农业部 1861 号 公告-3-2012
	zSSIIb-4R:AAAGGGCCAGGTTTCATTATCCTC		
	zSSIIb-HP:HEX-TAAGGAGCACTCGCCGCCGCATCTG--BHQ1		

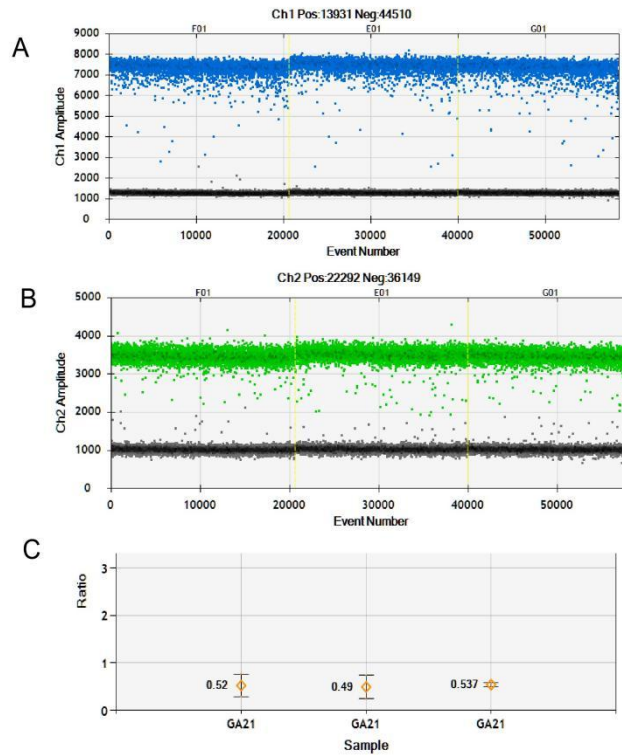


图 105 数字 PCR 引物探针确认

注：A 为 GA21 玉米转化体特异性序列一维微滴图谱；B 为 zSSIIb 基因一维微滴图谱，C 为 GA21 转化体和 zSSIIb 基因拷贝数比值。

在伯乐微滴式数字 PCR 平台 QX200 上，用通用的 PCR 反应体系（引物/探针浓度 400/200 nM）和退火温度（60°C），以 GA21 杂合体基因组 DNA 为模板，进行 GA21 转化体/zSSIIb 基因的二重 ddPCR 扩增，对表 107 中的引物探针组合进行测试，设 3 个平行反应。

结果显示,GA21 转化体和 *zSSIIb* 基因二重微滴式数字 PCR 的一维微滴图谱 (1-D) 的阴性微滴和阳性微滴分界清晰,“雨滴”较少 (图 105A, B); GA21 转化体和 *zSSIIb* 基因拷贝数比值接近 0.5, 符合杂合体 GA21 玉米分子特征 (图 105C)。综上, 确认表 107 的引物探针适用 GA21 转化体/*zSSIIb* 基因的二重 ddPCR 扩增。

## 21.2 GA21 /*zSSIIb* 二重微滴数字 PCR 特异性测试

用转基因玉米 GA21、其他转基因玉米混合样 (瑞丰 125、瑞丰 8、T25、MIR604、NK603、MON87427、DBN9936、DBN9858、DBN9501)、转基因大豆混合样 (DBN9004、MON89788、MON87751、CAL16、中黄 6106、DBN8205)、转基因水稻混合样 (TT51-1、KF-6、KMD、G6H1、T1C-19、T2A-1)、转基因油菜混合样 (MS1、MS8、RF1、RF2、RF3、T45、Oxy-235、Topas19/2、MON88302、73496)、转基因棉花混合样 (MON1445、MON531、MON15985、LLCOTTON25、MON88913、GHB614、COT102)、非转基因玉米基因组 DNA 作模板进行 GA21 和 *zSSIIb* 微滴数字 PCR (ddPCR) 扩增, 用水做空白对照, 测试 GA21 转化体特异性 ddPCR 的检测特异性。*zSSIIb* 内标基因 ddPCR 在转基因玉米和非转基因玉米品种中都产生了阳性微滴, 在其他作物和空白对照中无阳性微滴; GA21 转化体特异性 ddPCR 仅在转基因玉米 GA21 中有阳性微滴, 在其他转基因玉米品种和空白对照

中均无阳性微滴（图 106）。

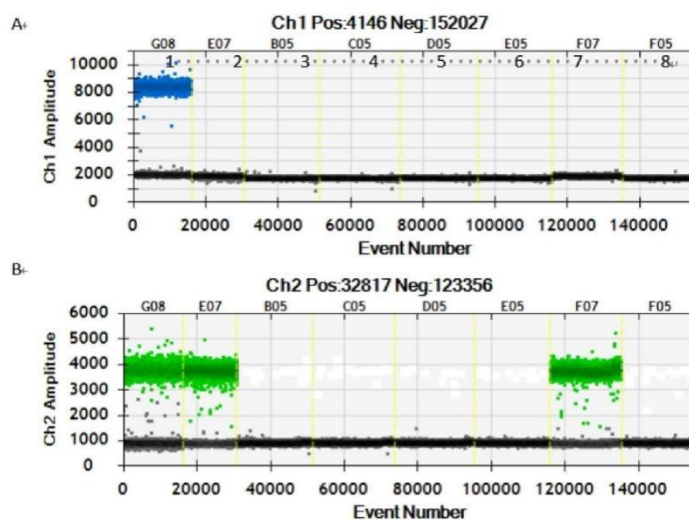


图 106 GA21 微滴数字 PCR 特异性测试

A, GA21 微滴数字 PCR 一维热图; B, *zSSIIB* 微滴数字 PCR 一维热图。样品顺序: 1. GA21, 2. 其他转基因玉米混合样 3. 转基因大豆混合样, 4. 转基因水稻混合样, 5. 转基因油菜混合样, 6. 转基因棉花混合样, 7. 非转基因玉米, 8. 空

结果表明 GA21 /*zSSIIB* 二重微滴数字 PCR 有良好的扩增特异性。

### 21.3 GA21 /*zSSIIB* 二重数字 PCR 的反应条件优化

转基因定量检测依赖于转基因 DNA 拷贝数和总 DNA 拷贝数的准确测量, 其中转基因 DNA 拷贝数通过转化体特异性 PCR 检测定量, 总 DNA 拷贝数定量通过内标基因测定。以 GA21 杂合体基因组 DNA 为模板, 分别优化二重数字 PCR 中 GA21 转化体和 *zSSIIB* 内标基因的引物/探针浓度和退火/延伸温度, 改善阳性/阴性液滴的分辨率以减少雨滴对定量结果的影响, 同时测试二重数字 PCR 反应中转化体和内标基因是否具有相似的扩展效率。在 55°C 至 63°C 的不同退

火温度下，*zSSIb* 内标基因和的 GA21 转化体阳性液滴的荧光强度都保持稳定（图 107 b）。在不同的退火温度下，GA21 的阳性和阴性微滴都能明显区分，拷贝数比值在 0.195—0.537 的范围内波动，当退火温度在 60.1°C 时，测量的拷贝数比值为 0.514，非常接近理论值（图 107 c）。选择 60°C 作为 GA21 转化体和 *zSSIb* 内标基因二重数字 PCR 的退火温度。

GA21 和内标基因的引物/探针浓度低于 400/200 nM 时，阳性、阴性液滴信号偏低，且难以明显区分（图 107 d、e）；当两个靶标的引物/探针浓度均为 400/200 nM 时，阳性微滴和阴性微滴具有最佳的分辨率；当两个靶标的引物/探针浓度高于 400/200 nM 时，阴性微滴信号值升高，且阳性微滴群变宽。当两个靶标的引物/探针浓度均为 400/200 nM 时，测量的平均拷贝数比值为 0.56，接近理论值 0.50（图 107 f）。综合考虑引物探针用量和微滴荧光强度，二重数字 PCR 中 GA21 和 *zSSIb* 的引物/探针浓度均采用 400/200 nM。

在 60°C 退火、引物/探针浓度为 400/200 nM 的反应条件下，以纯合体基因组 DNA 为模板，进行 GA21/*zSSIb* 二重 ddPCR。二重数字 PCR 二维热图显示了 4 个明显的液滴簇，分别对应 FAM 阳性液滴簇、HEX 阳性液滴簇、双荧光液滴簇和阴性液滴簇（图 107g），测量的拷贝数比值为 0.52，非常接近理论值 0.5，表明 GA21/*zSSIb* 二重 ddPCR 中 *zSSIb* 内标基因与 GA21 转化体具有相同的扩增能力。选择

60°C作为 GA21/zSSIIb 二重 ddPCR 的最佳退火温度,GA21 转化体和 zSSIIb 内标基因的引物/探针浓度均为 400/200 nM。

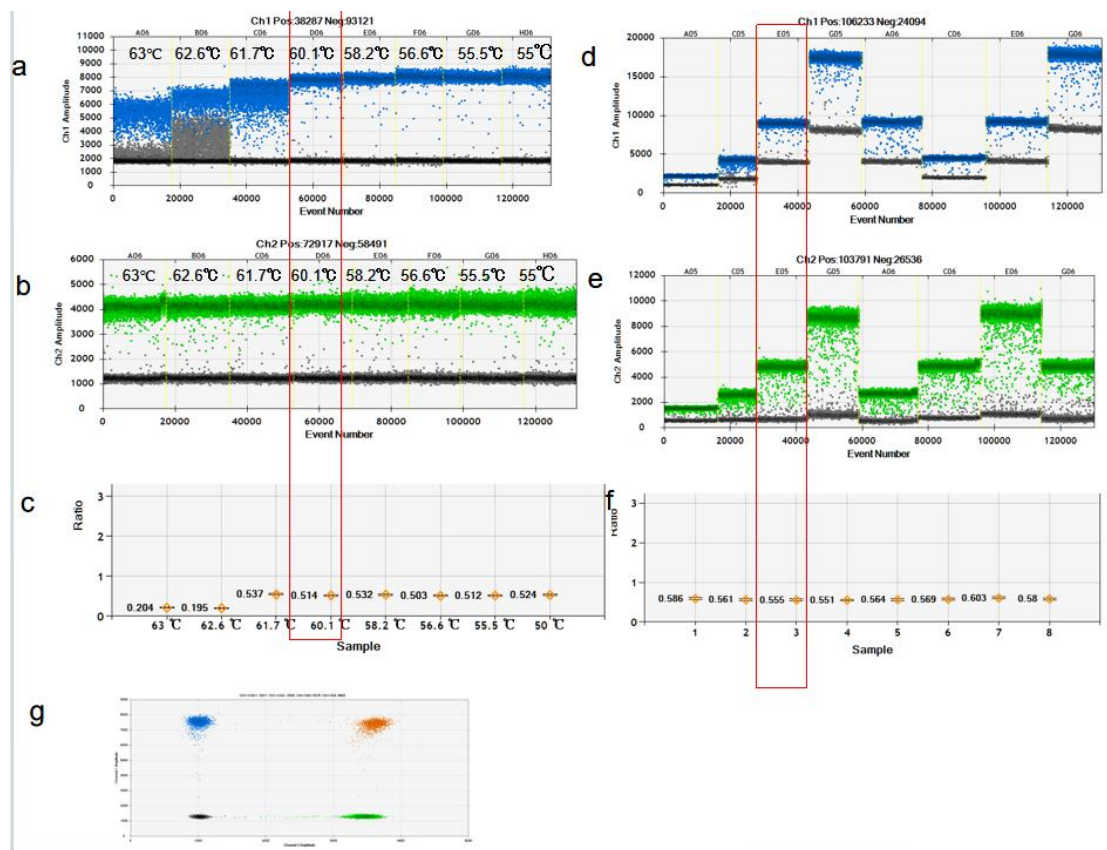


图 107 GA21 /zSSIIb 二重 ddPCR 退火/延伸温度和引物/探针浓度的优化

GA21 (a) 和 zSSIIb (b) 在 55°C 至 63°C 不同退火温度下的一维 (1-D) 微滴图; c, 不同退火温度下测量的 GA21 /zSSIIb 拷贝数比值; GA21 (d) 和 zSSIIb (e) 在不同引物/探针浓度下的一维微滴图,1-4 对应 GA21 和 zSSIIb 的引物探针浓度相同,分别为 100/50, 200/100, 400/200, 800/400 nM; 5-8 对应 GA21 和 zSSIIb 不同的引物探针浓度,分别为 200/100 nM (zSSIIb)、400/200 nM (GA21), 400/200 nM (zSSIIb)、200/100 nM (GA21), 800/400 nM (zSSIIb)、400/200 nM (GA21), 400/200 nM (zSSIIb)、800/400 nM (GA21); f, 不同引物探针浓度下测量的 GA21 /zSSIIb 拷贝数比值; g, 在优化的反应体系和退火温度下, GA21 /zSSIIb 二重 ddPCR 的二维微滴图。

经优化确定, GA21 /zSSIIb 二重 ddPCR 中反应体系见表 108。

反应程序为: 94°C 变性 10 min; 50 个循环 (94 °C 变性 30 s, 60°C 退火延伸 1 min) ; 98 °C 变性 10 min。

表 108 GA21 /zSSIIb 二重微滴数字 PCR 反应体系

PCR 反应试剂	终浓度	体积(μL)
ddPCR Mix (2×)	1×	10
GA21-f1	10 μM	0.8
GA21-r1	10 μM	0.8
GA21-p	10 μM	0.4
zSSIIb-3F	10 μM	0.8
zSSIIb--4R	10 μM	0.8
zSSIIb--HP	10 μM	0.4
DNA 模板	25 ng/μl	2
ddH <sub>2</sub> O	/	4
合计	/	20

#### 21.4 GA21 /zSSIIb 二重 ddPCR 的 LOD、LOQ 和动力学范围测试

在优化的 PCR 条件下, GA21 基因组 DNA 的连续稀释液用于测试 GA21/zSSIIb 二重 ddPCR 的动态范围、LOD 和 LOQ。不同浓度的微滴热图见图 108, 测量的拷贝数浓度以及 GA21 /zSSIIb 的拷贝数比值显示在表 109 中。当反应体系中模板拷贝数为 5 拷贝时, GA21/zSSIIb 二重 ddPCR 3 个反应的阳性微滴数均超过 3 个, 呈现阳性信号, LOD 可以达到 5 个拷贝 GA21 基因组 DNA, 为了能够稳定检出 GA21 转化体, 确定 LOD 为 10 个拷贝 GA21 基因组 DNA。统计各个二重数字 PCR 反应测量 GA21 拷贝数、zSSIIb 拷贝数、和 GA21/zSSIIb 拷贝数比值, 计算各模板量测量结果的相对标准差(RSD)和相对偏倚 (Bias%)。当反应体系中模板拷贝数为 40 拷贝时, 测量

结果的 RSD 值均小于 25%， Bias%均在±25%之间， LOQ 确定为 40 个拷贝 GA21 基因组 DNA（表 109）。

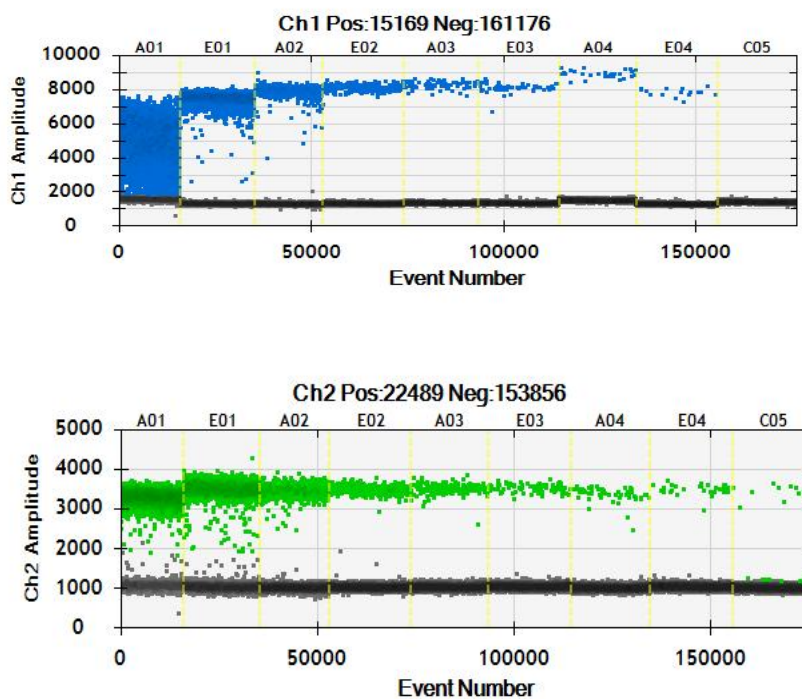


图 108 梯度稀释DNA溶液 GA21 /zSSIb二重 ddPCR的微滴热图。

A01-E06 的模板量依次为 9000、3000、600、120 、40 、20 、10、5、1copies。

表 109 GA21 玉米特异性序列数字 PCR 线性动态范围与重复性分析

Target	Expected concentration (copie/μL)	Copy number concentration (copie/μL)						
		Rep1	Rep2	Rep3	Mean	SD	RSD (%)	Bias (%)
GA21	9000	9710	9370	9800	9627	226.79	2.36	6.96
	3000	3160	3180	3250	3197	47.26	1.48	6.56
	600	643	671	680	665	19.30	2.90	10.78
	120	137	143	144	141	3.79	2.68	17.78
	40	45	53	47	48	4.16	8.61	20.83
	20	29	23	23	25	3.46	13.86	25.00
	10	16	13	16	15	1.73	11.55	50.00
	5	9	9	10	9	0.30	3.26	84.00
zSSIb	18000	17590	17310	17120	17340	236.43	1.36	3.67
	6000	5590	5680	5660	5643	47.26	0.84	5.94

	1200	1200	1200	1240	1213	23.09	1.90	1.11
	240	239	268	246	251	15.13	6.03	4.58
	80	95	89	83	89	6.00	6.74	11.25
	40	47	48	37	44	6.08	13.82	10.00
	20	32	27	30	30	2.52	8.48	48.33
	10	17	16	11	15	3.10	21.04	47.33
	2	-	-	-	-	-	-	-
	9000	0.55	0.54	0.57	0.56	0.02	2.85	11.05
	3000	0.57	0.56	0.57	0.57	0.01	1.28	13.29
	600	0.54	0.56	0.55	0.55	0.01	2.13	9.56
	120	0.57	0.53	0.59	0.56	0.03	4.80	12.81
GA21/ <i>zSSIIb</i> ratio	40	0.47	0.60	0.57	0.55	0.06	11.67	9.03
	20	0.62	0.48	0.62	0.57	0.08	14.14	14.52
	10	0.50	0.48	0.53	0.50	0.03	5.20	0.99
	5	0.52	0.58	0.85	0.65	0.17	26.89	29.78
	1	-	-	-	-	-	-	-

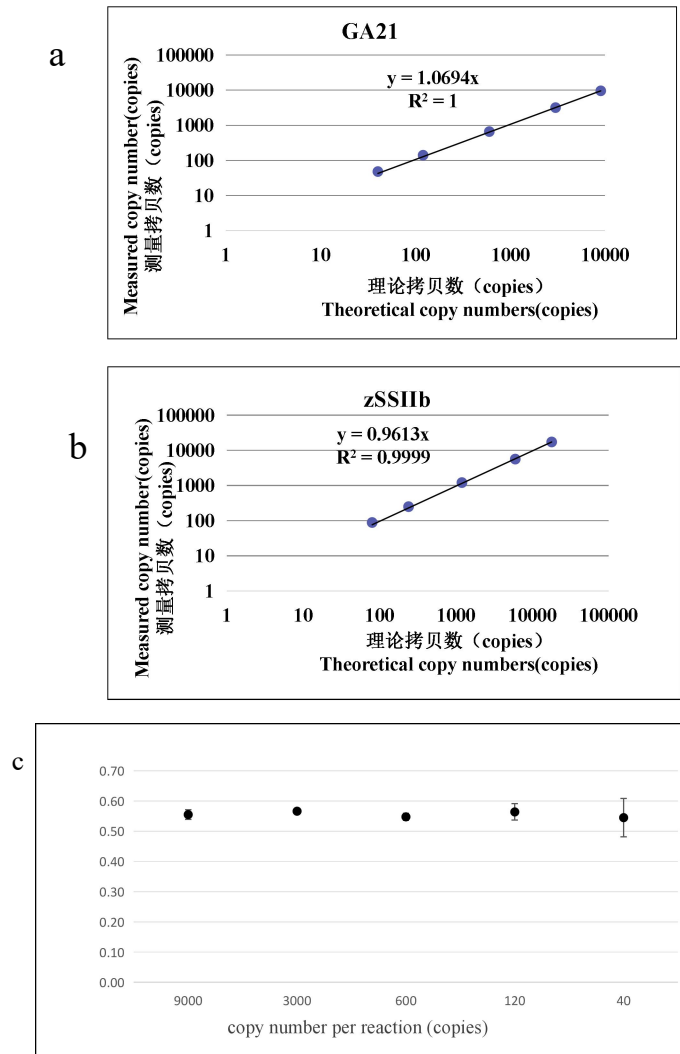


图 109 GA21 /zSSIb 二重 ddPCR 的动态范围和实测拷贝数比

a, 二重 ddPCR 中 GA21 在 40 到  $9.0 \times 10^3$  个拷贝的动态范围内测量拷贝数与预期拷贝数间有良好的线性关系; b, 二重 ddPCR 中 /zSSIb 在 40 到  $9.0 \times 10^3$  个拷贝的动态范围内测量拷贝数与预期拷贝数间有良好的线性关系; c, 测得的 DNA 溶液的拷贝数比随着 DNA 浓度的降低显示出升高的标准差(SD), 垂直线段表示标准差。数据来自三个技术重复的平均值。

### 21.5 GA21 /zSSIb 二重 ddPCR 的测量准确性

通过天平称量法配制 5 个 GA21 基因组 DNA 盲样(Sg1-Sg5), 拷贝数比值依次为 5.0%、3.0%、1.0%、0.5%、0.1%。用 GA21 /zSSIb 二重 ddPCR 对 5 个盲样进行定量。二重 ddPCR 的定量检测由不同的操作者在不同的日期进行了 3 次测量, 测量结果如表 110 所示。

计算 5 个盲样 GA21 /zSSIIb 拷贝数比值的平均值, 统计测量结果的重复性相对标准差 (RSD<sub>r</sub>)、重现性相对标准差 (RSD<sub>R</sub>)、和相对偏倚 (Bias)。测量平均值均接近预期含量, 与预期值的相对偏倚在±25%的可接受范围内; 重复性相对标准偏差 RSD<sub>r</sub> 和再现性相对标准偏差 RSD<sub>R</sub> 均小于 25% (表 111)。已建立的 GA21 /zSSIIb 二重 ddPCR 实现了对 GMO 含量的准确定量, 具有良好的重复性和重现性。

表 110 5 个盲样的测量结果

重 复	PCR 平 行	盲样				
		Sg1 (%)	Sg2 (%)	Sg3 (%)	Sg4 (%)	Sg5 (%)
1	1	5.17	3.19	1.06	0.50	0.11
	2	5.24	3.10	1.10	0.54	0.12
	3	5.20	2.97	0.95	0.51	0.11
2	1	5.03	3.17	0.91	0.46	0.08
	2	4.88	3.16	1.11	0.51	0.09
	3	5.15	3.08	1.00	0.52	0.11
3	1	4.96	2.98	1.12	0.47	0.12
	2	5.24	3.11	1.18	0.52	0.08
	3	5.06	3.03	1.16	0.51	0.10

表 111 GA21 /zSSIIb 二重 ddPCR 定量结果的重复性和重现性统计分析

盲样(%)	拷贝数比值 (%)	平均值 (%)	S <sup>r</sup> (%)	RSD <sup>r</sup> (%)	S <sup>R</sup> (%)	RSD <sup>R</sup> (%)	Bias (%)
1	5	5.10	0.11	2.25	0.13	2.59	2.07
2	3	3.09	0.08	2.58	0.08	2.62	2.93
3	1	1.07	0.08	7.06	0.10	9.28	6.56
4	0.5	0.50	0.03	5.33	0.02	4.84	0.89
5	0.1	0.10	0.01	14.58	0.02	15.52	2.22

## 21.6 结论

GA21 /*zSSIb* 二重 ddPCR 中的 GA21 和 *zSSIb* 采用与实时荧光 PCR 检测相同的引物/探针浓度, 为 400/200 nM, 反应体系见表 112。反应程序如下: 94°C 变性 10 min; 50 个循环 (94 °C 变性 30 s, 60°C 退火延伸 1 min) ; 98 °C 变性 10 min。DNA 模板量在 40 ~ 9.0×10<sup>3</sup> copies/反应, 拷贝数浓度测量值与预期值具有良好的线性关系。

表 112 GA21 /*zSSIb* 二重微滴数字 PCR 反应体系

PCR 反应试剂	终浓度	体积(μL)
ddPCR Mix (2×)	1×	10
GA21-f1	10 μM	0.8
GA21-r1	10 μM	0.8
GA21-p1	10 μM	0.4
<i>zSSIb</i> -3F	10 μM	0.8
<i>zSSIb</i> -4R	10 μM	0.8
<i>zSSIb</i> -HP	10 μM	0.4
DNA 模板	25 ng/μl	2
ddH <sub>2</sub> O	/	4
合计	/	20

## 22. MON810/*zSSIb* 二重数字 PCR 方法

### 22.1 引物探针设计

MON810 转化体特异性引物和探针序列, 依据欧盟 QT-EVE-ZM-032 抗虫玉米 MON810 的引物/探针序列信息, 引物/探针如表 113 所示。

表 113 MON810 转化体及 *zSSIb* 内标基因引物和探针序列

转化体 (基因)	引物/探针名称及序列 (5'-3')	扩增片段大小 (bp)	序列来源
MON810	MON810-qF: TCGAAGGACGAAGGACTCTAACGT	92	欧盟 QT-EVE-ZM-03 2
	MON810-qR: GCCACCTTCCTTTTCCACTATCTT		
	MON810-qP: FAM-AACATCCTTTGCCATTGCCAGC-BHQ1		
<i>zSSIb</i>	<i>zSSIb</i> -qF: CGGTGGATGCTAAGGCTGATG	88	农业部 1861 号 公告-3-2012
	<i>zSSIb</i> -qR: AAAGGGCCAGGTCATTATCCTC		
	<i>zSSIb</i> -qP: HEX-TAAGGAGCACTCGCCGCCGCATCTG-BHQ1		

## 22.2 MON810/*zSSIb* 二重微滴数字 PCR 特异性测试

用转基因玉米 MON810、转基因玉米混合样、转基因大豆混合样、转基因水稻混合样、转基因油菜混合样、转基因棉花混合样、非转基因玉米基因组 DNA 作模板进行 MON810 和 *zSSIb* 微滴数字 PCR (ddPCR) 扩增, 用水做空白对照, 测试 MON810 转化体特异性 ddPCR 的检测特异性。*zSSIb* 内标基因 ddPCR 在转基因玉米和非转基因玉米品种中都产生了阳性微滴, 在其他作物和空白对照中无阳性微滴; MON810 转化体特异性 ddPCR 仅在转基因大豆 MON810 中有阳性微滴, 在其他转基因作物品种和空白对照中均无阳性微滴 (图 110)。结果表明 MON810/*zSSIb* 二重微滴数字 PCR 有良好的扩增特异性。

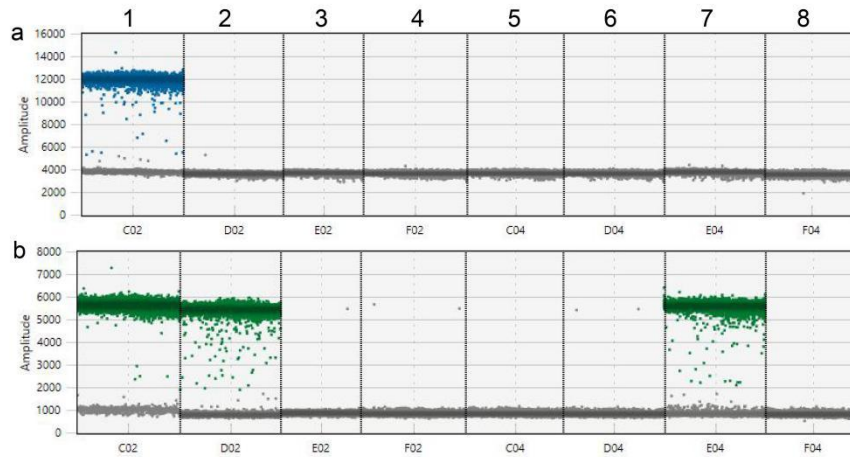


图 110 MON810 微滴数字 PCR 特异性测试。

a, MON810 微滴数字 PCR 一维热图; b, Lectin 微滴数字 PCR 一维热图。样品顺序: 1. MON810, 2. 其他转基因玉米混合样, 3. 转基因大豆混合样, 4. 转基因水稻混合样, 5. 转基因油菜混合样, 6. 转基因棉花混合样, 7. 非转基因玉米, 8. 空白

### 22.3 MON810/*zSSIb* 二重数字 PCR 的反应条件优化

转基因定量检测依赖于转基因 DNA 拷贝数和总 DNA 拷贝数的准确测量, 其中转基因 DNA 拷贝数通过转化体特异性 PCR 检测定量, 总 DNA 拷贝数定量通过内标基因测定。由于未知杂合体 MON810 具体拷贝数比值, 我们人工合成携带转化体 MON810 和内标准基因 *zSSIb* 靶标的质粒分子, 理论值是 100% (1.0)。以人工合成的质粒为模板, 分别优化二重数字 PCR 中 MON810 转化体和 *zSSIb* 内标基因的引物/探针浓度和退火/延伸温度, 改善阳性/阴性液滴的分辨率以减少雨滴对定量结果的影响, 同时测试二重数字 PCR 反应中转化体和内标基因是否具有相似的扩展效率。在 55°C 至 63°C 的不同退火温度下, *zSSIb* 内标基因的阳性液滴的荧光强度保持稳定(图 111 b), 但 MON810 阳性液滴的荧光强度随着退火温度的降低而增加, 在退

火温度降低到 56.6°C 时，微滴的信号强度达到平台期（图 111 a）。当退火温度在 60.1°C 时，MON810 和 *zSSIIb* 内标基因“雨滴状”阳性液滴更少。在不同的退火温度下，MON810 的阳性和阴性微滴都能明显区分，拷贝数比值在 0.993-1.010 的范围内波动，都接近理论值（图 111c）。考虑到退火温度对扩增特异性的影响，选择 60°C 作为 MON810 转化体和 *zSSIIb* 内标基因双重数字 PCR 的退火温度。

MON810 和内标基因的引物/探针浓度低于 400/200 nM 时，阳性、阴性液滴信号偏低（图 111d、e）；当两个靶标的引物/探针浓度均为 400/200 nM 时，阳性微滴和阴性微滴具有最佳的分辨率；当两个靶标的引物/探针浓度高于 400/200 nM 时，阴性微滴信号值升高，且阳性微滴群变宽。当两个靶标的引物/探针浓度均为 400/200 nM 时，测量的平均拷贝数比值为 1.00，接近理论值（图 111 f）。综合考虑引物探针用量和微滴荧光强度，二重数字 PCR 中 MON810 和 *zSSIIb* 的引物/探针浓度均采用 400/200 nM。

在 60°C 退火、引物/探针浓度为 400/200 nM 的反应条件下，以人工合成的质粒为模板，进行 MON810/*zSSIIb* 二重 ddPCR。二重数字 PCR 二维热图显示了 4 个明显的液滴簇，分别对应 FAM 阳性液滴簇、HEX 阳性液滴簇、双荧光液滴簇和阴性液滴簇（图 111g），测量的拷贝数比值为 1.0，接近理论值 1.0，表明 MON810/*zSSIIb* 二重 ddPCR 中 *zSSIIb* 内标基因与 MON810 转化体具有相同的扩增能力。选择 60°C

作为 MON810/zSSIIb 二重 ddPCR 的最佳退火温度, MON810 转化体和 zSSIIb 内标基因的引物/探针浓度均为 400/200 nM。

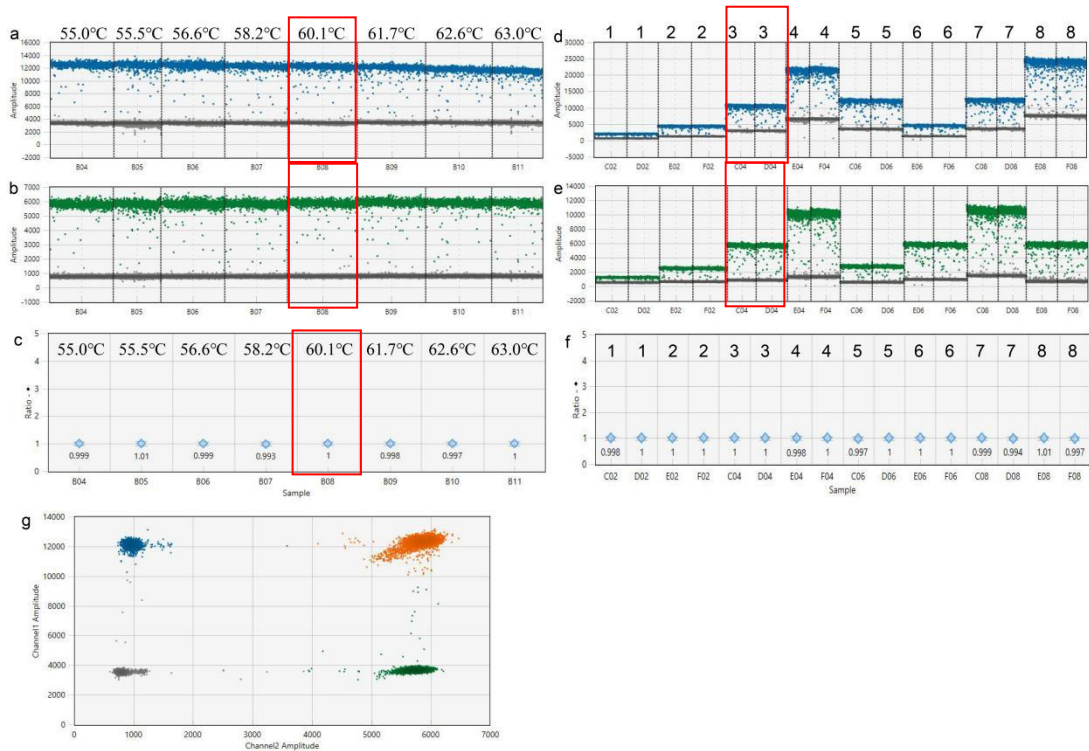


图 111 MON810/zSSIIb 二重 ddPCR 退火/延伸温度和引物/探针浓度的优化。MON810 (a) 和 zSSIIb (b) 在 55°C 至 63°C 不同退火温度下的一维 (1-D) 微滴图; c, 不同退火温度下测量的 MON810/zSSIIb 拷贝数比值; MON810(d) 和 zSSIIb (e) 在不同引物/探针浓度下的一维微滴图, 1-4 对应 MON810 和 zSSIIb 的引物探针浓度相同, 分别为 100/50, 200/100, 400/200, 800/400 nM; 5-8 对应 MON810 和 zSSIIb 不同的引物探针浓度, 分别为 200/100 nM (zSSIIb)、400/200 nM (MON810), 400/200 nM (zSSIIb)、200/100 nM (MON810), 800/400 nM (zSSIIb)、400/200 nM (MON810), 400/200 nM (zSSIIb)、800/400 nM (MON810); f, 不同引物探针浓度下测量的 MON810/zSSIIb 拷贝数比值; g, 在优化的反应体系和退火温度下, MON810/zSSIIb 二重 ddPCR 的二维微滴图。

## 22.4 MON810/zSSIIb 二重 ddPCR 的 LOD、LOQ 和动力学范围

### 测试

在优化的 PCR 条件下, 将 MON810 基因组 DNA 进行梯度稀释, 浓度分别为 40000、8000、1600、320、80、40、20、5、1 copies/ $\mu$ L,

用于测试 MON810/zSSIIb 二重 ddPCR 的动力学范围、LOD 和 LOQ。不同浓度的微滴热图见图 112，测量的拷贝数浓度以及 MON810/zSSIIb 的拷贝数比值显示在表 114 中。统计各个二重数字 PCR 反应测量的 MON810 拷贝数、zSSIIb 拷贝数、和 MON810/zSSIIb 拷贝数比值，计算各模板量测量结果的相对标准差 (RSD) 和相对偏倚 (Bias%)。当 DNA 浓度为 20 copies/ $\mu\text{L}$ ，即反应体系中模板拷贝数为 40 拷贝，测量结果的 RSD 值均小于 25%，Bias%均在 $\pm 25\%$ 之间，LOQ 确定为 40 个拷贝 MON810 基因组 DNA。当 DNA 浓度为 5 copies/ $\mu\text{L}$ ，即反应体系中模板拷贝数为 10 拷贝，MON810/zSSIIb 二重 ddPCR 4 个反应的阳性微滴数均超过 3 个，呈现阳性信号，LOD 确定为 10 个拷贝 MON810 基因组 DNA (表 114)。

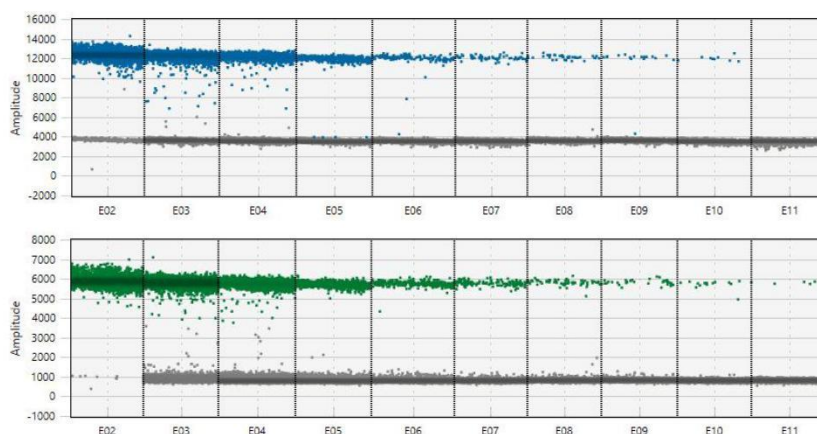


图 112 梯度稀释 DNA 溶液二重 ddPCR 的微滴热图。

模板浓度依次为 40000、8000、1600、320、80、40、20、5、1 copies/ $\mu\text{L}$ 。

表 114 MON810/zSSIIb 二重 ddPCR 测量梯度稀释 MON810 gDNA 溶液的拷贝数浓度和比值

Target	Expected concentration (copies/ $\mu$ L)	Copy number concentration (copies/ $\mu$ L)							
		Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Mean	SD	RSD (%)	Bias (%)
MON810 copy number	40000	42734.32	43121.27	43788.73	42974.65	43154.74	451.75	1.05	7.89
	8000	8597.24	8653.06	8530.11	8500.97	8570.34	68.30	0.80	7.13
	1600	1559.30	1518.42	1621.25	1598.08	1574.27	45.16	2.87	-1.61
	320	304.29	308.63	304.73	303.15	305.20	2.38	0.78	-4.62
	80	69.30	80.00	69.22	82.82	75.33	7.11	9.44	-5.83
	40	36.51	40.80	36.76	40.48	38.64	2.32	6.00	-3.41
	20	22.42	17.15	21.19	19.58	20.09	2.28	11.34	0.44
	10	13.35	9.63	9.75	9.20	10.48	1.93	18.40	4.80
	5	3.97	3.79	5.34	6.48	4.90	1.26	25.79	-2.09
<i>zSSIb</i> copy number	80000	91884.91	91837.32	91859.03	89505.03	91271.57	1177.86	1.29	14.09
	16000	18766.25	18667.53	18502.32	18235.70	18542.95	231.97	1.25	15.89
	3200	3332.17	3444.15	3503.72	3501.65	3445.42	80.39	2.33	7.67
	640	635.73	654.87	657.57	649.80	649.49	9.72	1.50	1.48
	160	142.23	151.51	147.39	166.23	151.84	10.32	6.80	-5.10
	80	77.72	86.78	79.09	85.17	82.19	4.46	5.42	2.73
	40	47.14	37.10	36.52	43.50	41.06	5.14	12.51	2.66
	20	20.03	19.26	19.50	25.31	21.02	2.87	13.66	5.12
	10	9.64	9.22	8.31	8.64	8.95	0.59	6.63	-10.49
MON810/ <i>zSSIb</i> ratio	40000/80000	0.47	0.47	0.48	0.48	0.47	0.01	1.44	-5.43
	8000/16000	0.46	0.46	0.46	0.47	0.46	0.00	0.74	-7.56
	1600/3200	0.47	0.44	0.46	0.46	0.46	0.01	2.57	-8.60
	320/640	0.48	0.47	0.46	0.47	0.47	0.01	1.41	-6.01
	80/160	0.49	0.53	0.47	0.50	0.50	0.02	4.94	-0.84
	40/80	0.47	0.47	0.46	0.48	0.47	0.00	0.91	-6.00
	20/40	0.48	0.46	0.58	0.45	0.49	0.06	12.13	-1.58
	10/20	0.67	0.50	0.50	0.36	0.51	0.12	24.45	1.47
	5/10	0.41	0.41	0.64	0.75	0.55	0.17	30.70	10.80

当 20  $\mu$ L 反应液中 DNA 模板浓度在 20 到  $4 \times 10^4$  copies/ $\mu$ L 范围内时, MON810/*zSSIb* 二重 ddPCR 测量的 DNA 拷贝数浓度与预期 DNA 拷贝数浓度之间显示良好的线性响应, 决定系数  $R^2$  值等于 1.0 (图 113

a b) , 测量的拷贝数比值在预期范围内波动, RSD 值均小于 25%, Bias 均在 $\pm 25\%$ 之间, 且具有良好的重复性(图 113 c)。MON810/zSSIIb 二重 ddPCR 动态范围测试表明, 20  $\mu\text{L}$  反应体系中, 当测试样品模板量浓度在  $20\sim 4\times 10^4$  copies/ $\mu\text{L}$  的范围内, 可获得准确的拷贝数浓度和拷贝数比值测量值。

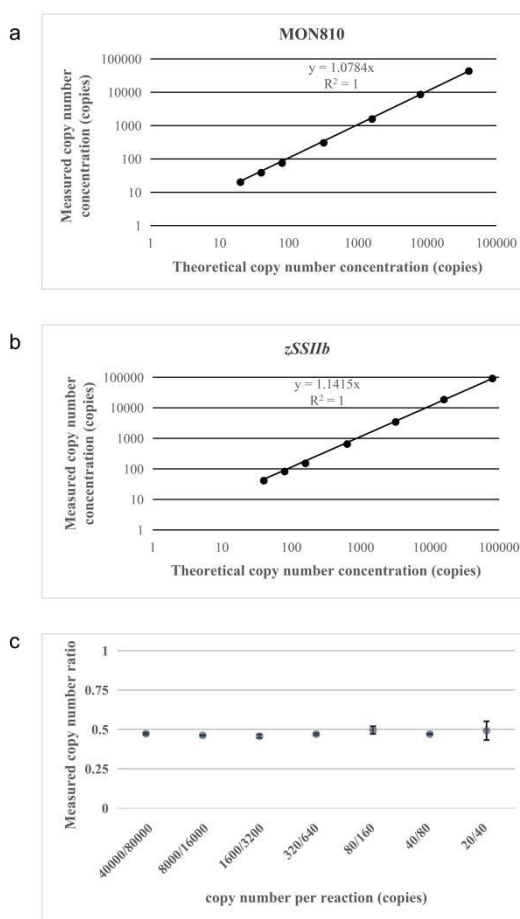


图 113 MON810/zSSIIb 二重 ddPCR 的动态范围和实测拷贝数比。

a, 二重 ddPCR 中 MON810 在  $20\sim 4\times 10^4$  copies/ $\mu\text{L}$  的动态范围内测量拷贝数浓度与预期拷贝数浓度间的线性关系; b, 二重 ddPCR 中 zSSIIb 在  $40\sim 8\times 10^4$  copies/ $\mu\text{L}$  的动态范围内测量拷贝数浓度与预期拷贝数浓度间的线性关系; c, 测得的 DNA 溶液的拷贝数比值, 垂直线段表示标准差。数据来自四个技术重复的平均值。

## 22.5 MON810/zSSIIb 二重 ddPCR 的测量准确性

使用 DNA 溶液配制 5 个 MON810 基因组 DNA 盲样(Sg1-Sg5), 拷贝数比值依次为 5.0%、3.0%、1.0%、0.5%、0.1%。用 MON810/zSSIIb 二重 ddPCR 对 5 个盲样进行定量。二重 ddPCR 的定量检测由不同的操作者在不同的日期进行了 3 次测量, 测量结果如表 115 所示。计算 5 个盲样 MON810/zSSIIb 拷贝数比值的平均值, 统计测量结果的重复性相对标准差 ( $RSD^r$ )、重现性相对标准差 ( $RSD^R$ )、和相对偏倚 (Bias)。测量平均值均接近预期含量, 与预期值的相对偏倚在  $\pm 25\%$  的可接受范围内; 重复性相对标准偏差  $RSD^r$  和再现性相对标准偏差  $RSD^R$  均小于 25% (表 115)。已建立的 MON810/zSSIIb 二重 ddPCR 实现了对 GMO 含量的准确定量, 具有良好的重复性和重现性。

表 115 5 个盲样的测量结果

重复	PCR 平行	盲样				
		Sg1 (%)	Sg2 (%)	Sg3 (%)	Sg4 (%)	Sg5 (%)
1	1	4.92	3.09	0.98	0.48	0.09
	2	4.97	2.87	1.02	0.46	0.10
	3	4.72	2.80	1.01	0.52	0.13
2	1	4.87	2.79	1.05	0.54	0.11
	2	4.91	2.94	0.94	0.52	0.09
	3	4.74	3.12	0.98	0.46	0.11
3	1	4.94	2.94	0.98	0.59	0.10
	2	4.80	2.93	0.98	0.42	0.10
	3	4.82	3.00	0.96	0.51	0.09

表 116 MON810/zSSIIb 二重 ddPCR 定量结果的重复性和重现性统计分析

盲样	拷贝数比值 (%)	平均值 (%)	S <sup>r</sup> (%)	RSD <sup>r</sup> (%)	S <sup>R</sup> (%)	RSD <sup>R</sup> (%)	Bias (%)
Sg1	5.00	4.85	0.10	2.10	0.10	2.10	-2.91
Sg2	3.00	2.94	0.13	4.46	0.13	4.46	-1.93
Sg3	1.00	0.99	0.03	3.54	0.03	3.54	-1.11
Sg4	0.50	0.50	0.06	11.49	0.06	11.49	0.00
Sg5	0.10	0.10	0.01	13.83	0.01	13.83	2.22

## 22.6 结论

MON810/*zSSIb* 二重 ddPCR 中的 MON810 和 *zSSIb* 采用的引物/探针浓度为 400/200 nM，反应体系见表 117。反应程序如下：94°C 变性 10 min；40 个循环（94 °C 变性 30 s，60°C 退火延伸 1 min）；98 °C 变性 10 min。DNA 模板浓度在 20~4×10<sup>4</sup> copies/μL，拷贝数浓度测量值与预期值具有良好的线性关系。

表 117 MON810/*zSSIb* 二重微滴数字 PCR 反应体系

PCR 反应试剂	终浓度	体积 (μL)
ddPCR Mix (2×)	1×	10
MON810-qF (10 μmol/L)	0.4 μmol/L	0.8
MON810-qR (10 μmol/L)	0.4 μmol/L	0.8
MON810-qP (10 μmol/L)	0.2 μmol/L	0.4
<i>zSSIb</i> -qF (10 μmol/L)	0.4 μmol/L	0.8
<i>zSSIb</i> -qR (10 μmol/L)	0.4 μmol/L	0.8
<i>zSSIb</i> -qP (10 μmol/L)	0.2 μmol/L	0.4
DNA 模板	50 ng/μL	2
ddH <sub>2</sub> O	/	4
合计	/	20

## 23. Bt176/zSSIIb 二重数字 PCR 方法

### 23.1 引物探针确认

Bt176 是先正达农作物保护股份公司培育的抗鳞目害虫、耐草铵膦的转基因玉米品种，其转化体分子特征由先正达农作物保护股份公司解析。首先对获得转基因材料的分子特征进行验证，确定转基因材料的转化体身份。

根据资料获得 Bt176 转化体特异性序列，合成携带 Bt176 化体和内标准基因靶标的质粒分子，酶切，-20°C 存储备用。

Bt176 转化体特异性引物探针和玉米内标准基因 *zSSIIb* 引物探针选用已发布的标准方法（GB/T 19495.5-2018、农业部 1861 号公告—3—2012）中的实时荧光 PCR 方法引物探针（表 118）。

表 118 Bt176 转化体特异性引物和探针序列

靶标	引物/探针名称及序列 (5'-3')	扩增片段大小 (bp)	来源
<i>zSSIIb</i> 基因	<i>zSSIIb</i> -3F: CGGTGGATGCTAAGGCTGATG	88	农业部 1861 号公告—3—2012
	<i>zSSIIb</i> -4R: AAAGGGCCAGGTTTCATTATCCTC		
	<i>zSSIIb</i> -P:HEX-TAAGGAGCACTCGCCGCCGCATCTG-BHQ1		
Bt176 转化体	Bt176-qF: GGCCGTGAACGAGCTGTT	82	GB/T 19495.5-2018
	Bt176-qR: GGGAAGAAGCCTACATGTTTTCTAA		
	Bt176-qP: FAM-AGCAACCAGATCGGCCGACACC-BHQ1		

在伯乐 QX200 微滴式数字 PCR 平台上，用通用的 PCR 反应体系（引物/探针浓度 400/200  $\mu\text{mol/L}$ ）和退火温度（60°C），以 Bt176

质粒 DNA 为模板,进行 Bt176 转化体/*zSSIIB* 基因的二重 ddPCR 扩增,对表 118 中的引物探针组合进行测试。

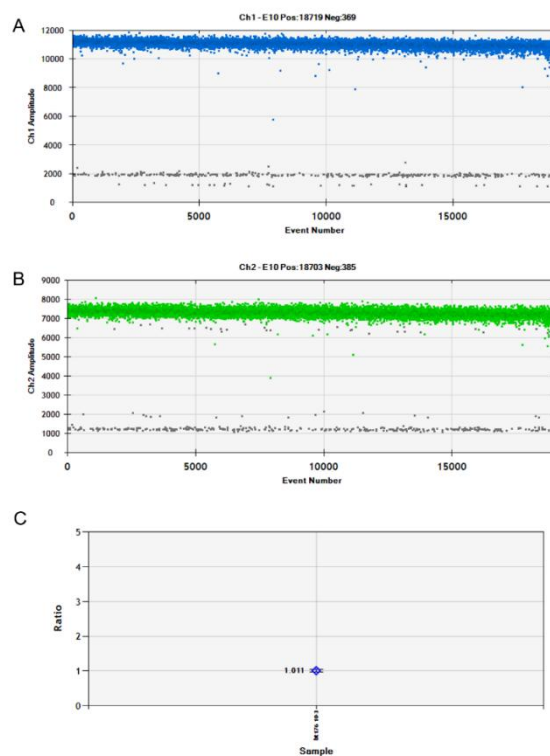


图 114 数字 PCR 引物探针确认

注: A 为 Bt176 玉米转化体特异性序列一维微滴图谱; B 为 *zSSIIB* 基因一维微滴图谱, C 为 Bt176 转化体和 *zSSIIB* 基因拷贝数比值。

结果显示,Bt176 转化体和 *zSSIIB* 基因二重微滴式数字 PCR 的一维微滴图谱 (1-D) 的阴性微滴和阳性微滴分界清晰,“雨滴”较少(图 114A, B);Bt176 转化体和 *zSSIIB* 基因拷贝数比值接近 1.0(图 114C)。综上,确认表 118 的引物探针适用 Bt176 转化体/*zSSIIB* 基因的二重 ddPCR 扩增。

### 23.2 Bt176/zSSIIb 二重微滴数字 PCR 特异性测试

用转基因玉米 Bt176、其他转基因玉米混合样（瑞丰 125、瑞丰 8、T25、MIR604、NK603、MON87427、DBN9936、DBN9858、DBN9501）、转基因大豆混合样（DBN9004、MON89788、MON87751、CAL16、中黄 6106、DBN8205）、转基因水稻混合样（TT51-1、KF-6、KMD、G6H1、T1C-19、T2A-1）、转基因油菜混合样（MS1、MS8、RF1、RF2、RF3、T45、Oxy-235、Topas19/2、MON88302、73496）、转基因棉花混合样（MON1445、MON531、MON15985、LLCOTTON25、MON88913、GHB614、COT102）、非转基因玉米基因组 DNA 作模板进行 Bt176 和 zSSIIb 二重 ddPCR 扩增,用水做空白对照,测试 Bt176 转化体和 zSSIIb 二重 ddPCR 方法的特异性。

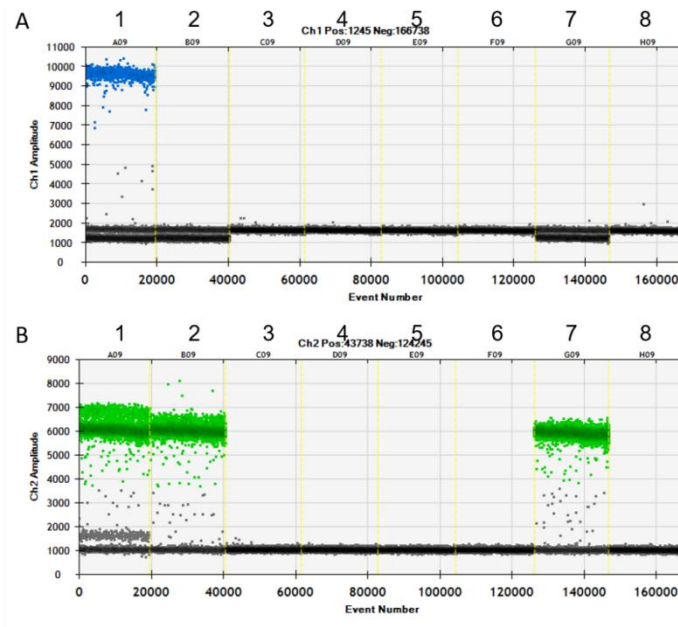


图 115 Bt176/zSSIIb 二重 ddPCR 特异性测试扩增图谱（一维）

注：A：Bt176 微滴数字 PCR 一维热图；B：zSSIIb 微滴数字 PCR 一维热图。1：阳性对照；2：其他转基因玉米混合样；3：转基因大豆混合样；4：转基因水稻混合样；5：转基因油菜混合样；6：转基因棉花混合样；7：非转基因玉米混合样；8：空白对照。

结果显示，zSSIIb 基因 ddPCR 在玉米样品中扩增得到阳性微滴，在其他作物和空白对照中不能扩增得到阳性微滴；Bt176 转化体特异性序列 ddPCR 仅在转基因玉米 Bt176 样品中扩增得到阳性微滴，在其他转基因玉米品种、其他作物和空白对照中不能扩增得到阳性微滴，结果表明 Bt176/zSSIIb 二重 ddPCR 方法有良好的特异性（图 115）。

### 23.3 Bt176/zSSIIb 二重数字 PCR 的条件优化

转基因定量检测依赖于转基因 DNA 拷贝数和总 DNA 拷贝数的准确测量，其中转基因 DNA 拷贝数通过转化体特异性 PCR 检测定量，总 DNA 拷贝数定量通过内标基因测定。以 Bt176 质粒 DNA 为模板，分别优化二重数字 PCR 中 Bt176 转化体和 zSSIIb 内标基因的引物/探针浓度和退火/延伸温度，改善阳性/阴性液滴的分辨率以减少雨滴对定量结果的影响，同时测试二重数字 PCR 反应中转化体和内标基因是否具有相似的扩展效率。

PCR 扩增程序中退火温度的高低对阴阳性微滴区分有显著的影响，本项目设置了 55.0°C、55.5°C、56.6°C、58.2°C、60.1°C、61.7°C、62.6°C、63.0°C 八个温度梯度，测试 Bt176 和 zSSIIb 基因二重 ddPCR 的扩增效果。

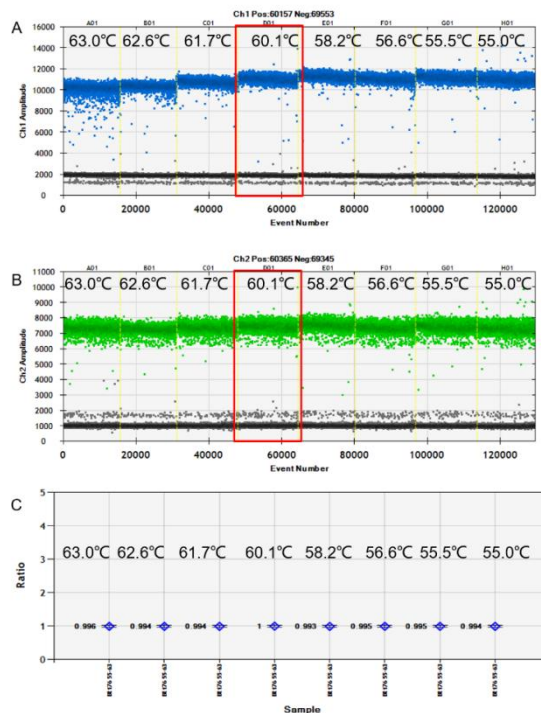


图 116 数字 PCR 引物探针退火温度优化扩增图谱

注：A 为 Bt176 玉米转化体特异性序列一维微滴图谱；B 为 zSSI**II**b 基因一维微滴图谱，C 为 Bt176 转化体和 zSSI**II**b 基因拷贝数比值。

数字 PCR 扩增结果显示：扩增图谱中 zSSI**II**b 基因和 Bt176 转化体特异性序列引物探针在 55.0°C、55.5°C、56.6°C、58.2°C、60.1°C、61.7°C、62.6°C、63.0°C 八个退火温度下，Bt176 玉米转化体特异性序列阳性微滴的荧光强度随温度升高变化趋势不显著，zSSI**II**b 基因阴阳微滴的荧光强度无显著差异，阴阳液滴分界清晰，没有难以界定的“下雨”现象（图 116）；进一步对测试数据进行分析可以发现，在 60.1°C 时，拷贝数比值为 1。因此，确定 zSSI**II**b 基因和 Bt176 转化体特异性序列引物探针最优退火延伸温度为 60°C。经过优化后 zSSI**II**b 基因和 Bt176 转化体特异性序列数字 PCR 扩增程序为：95°C 预变性 10 min；

94°C变性 30 s, 60°C退火延伸 60 s, 共进行 50 个循环; 98°C变性 10 min, 4°C保存 (升降温速率 2°C/s)。

由于微滴式数字 PCR 平台 Bio-Rad QX200 需使用专用的扩增试剂, PCR 扩增体系中仅选择引物探针浓度进行优化测试。实时荧光 PCR 方法中常用引物与探针终浓度分别为 0.4  $\mu\text{mol/L}$  和 0.2  $\mu\text{mol/L}$ , Bio-Rad 2 $\times$ ddPCRTM Supermix for Probes 的说明书引物与探针的终浓度分别为 0.9  $\mu\text{mol/L}$  和 0.25 nmol/L。参考上述引物探针终浓度设置了 8 组 *zSSIb* 基因和 Bt176 转化体特异性序列引物探针终浓度进行测试, 包括: Bt176 和 *zSSIb* 的引物探针浓度相同, 分别为 0.1/0.05  $\mu\text{mol/L}$ , 0.2/0.1  $\mu\text{mol/L}$ , 0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$ , 0.8/0.4  $\mu\text{mol/L}$ ; Bt176 和 *zSSIb* 不同的引物探针浓度, 分别为 0.2/0.1  $\mu\text{mol/L}$  (*zSSIb*)、0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$  (Bt176), 0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$  (*zSSIb*)、0.2/0.1  $\mu\text{mol/L}$  (Bt176), 0.8/0.4  $\mu\text{mol/L}$  (*zSSIb*)、0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$  (Bt176), 0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$  (*zSSIb*)、0.8/0.4  $\mu\text{mol/L}$  (Bt176)。

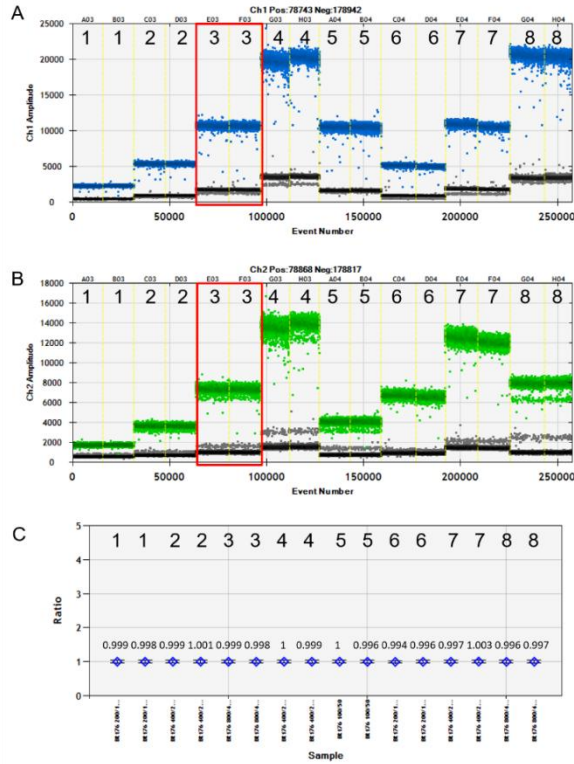


图 117 数字 PCR 引物探针浓度优化扩增图谱

注：A 为 Bt176 玉米转化体特异性序列一维微滴图谱；B 为 zSSIIb 基因一维微滴图谱，C 为 Bt176 转化体和 zSSIIb 基因拷贝数比值。1~4 对应 Bt176 和 zSSIIb 的引物探针浓度相同，分别为 0.1/0.05  $\mu\text{mol/L}$ ，0.2/0.1  $\mu\text{mol/L}$ ，0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$ ，0.8/0.4  $\mu\text{mol/L}$ ；5~8 对应 Bt176 和 zSSIIb 不同的引物探针浓度，分别为 0.2/0.1  $\mu\text{mol/L}$  (zSSIIb)、0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$  (Bt176)，0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$  (zSSIIb)、0.2/0.1  $\mu\text{mol/L}$  (Bt176)，0.8/0.4  $\mu\text{mol/L}$  (zSSIIb)、0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$  (Bt176)，0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$  (zSSIIb)、0.8/0.4  $\mu\text{mol/L}$  (Bt176)。

数字 PCR 扩增结果显示：Bt176 和内标基因的引物/探针浓度低于 0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$  时，阳性、阴性液滴信号偏低（图 117A、B）；当两个靶标的引物/探针浓度均为 0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$  时，阳性微滴和阴性微滴具有最佳的分辨率；当两个靶标的引物/探针浓度高于 0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$  时，阴性微滴信号值升高，且阳性微滴群变宽。当两个靶标的引物/探针浓度均为 0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$  时，测量的平均拷贝数比值为 0.999，接近理论值（图 117C）。综合考虑引物探针用量和微滴荧光

强度,二重数字 PCR 中 Bt176 和 *zSSIb* 的引物/探针浓度均采用 0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$ 。经过优化后 *zSSIb* 基因和 Bt176 转化体特异性序列数字 PCR 扩增体系如表 119 所示。

表 119 数字 PCR 扩增体系

组分	体积
ddH <sub>2</sub> O	4.0 $\mu\text{L}$
2 $\times$ ddPCR <sup>TM</sup> Supermix for Probes	10.0 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 内标上游引物 <i>zSSIb</i> -3F	0.8 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 内标下游引物 <i>zSSIb</i> -4R	0.8 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 内标探针 <i>zSSIb</i> -P	0.4 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 转化体上游引物 Bt176-qF	0.8 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 转化体上游引物 Bt176-qR	0.8 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 转化体探针 Bt176-P	0.4 $\mu\text{L}$
DNA 模板	2.0 $\mu\text{L}$
总体积	20.0 $\mu\text{L}$

### 23.4 Bt176/*zSSIb* 二重 ddPCR 的 LOD、LOQ 和动力学范围测试

微滴式数字 PCR 的理论有效线性范围是 1~100000 个拷贝,实际测试时,20  $\mu\text{L}$  反应液在微滴生成仪中一般生成 10000~20000 个有效微滴,微滴数大于 10000 为有效反应。为了测试 *zSSIb* 基因和 Bt176 转化体特异性序列数字 PCR 方法的线性范围,在优化的 PCR 条件下,将 Bt176 质粒 DNA 的连续稀释液用于测试 Bt176/*zSSIb* 二重 ddPCR 的动态范围、LOD 和 LOQ,每个标准品扩增设置 4 个平行。根据标准品数字 PCR 测量值及初始模板拷贝数分别绘制 *zSSIb* 基因和 Bt176 转化体特异性序列的线性回归曲线进行线性范围分析,对 4 个平行间

*zSSIIB* 基因和 Bt176 转化体特异性序列测量值以及拷贝数比值的标准偏差和相对标准偏差进行数据统计,评价 *zSSIIB* 基因和 Bt176 转化体特异性序列数字 PCR 方法的重复性。根据《转基因植物及其产品成分检测 数字 PCR 方法制定指南》(农业农村部公告第 323 号—21—2020) 中定量检测的要求,在整个线性动态范围内,线性度即线性回归方程的决定系数 R<sup>2</sup> 一般应≥0.98,正确度偏差(Bias)不超过标称值的 25%,精密度即重复性相对标准偏差(RSD)一般应≤25%。

表 120 Bt176 玉米特异性序列数字 PCR 线性动态范围与重复性分析

Target	Expected concentration (copies)	Copy number concentration (copies)							
		Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Mean	SD	RSD (%)	Bias (%)
Bt176 copy number	80000	88000	93000	88000	89000	89500.00	2380.48	2.66	11.88
	16000	16600	16310	16180	16140	16307.50	208.07	1.28	1.92
	3200	2990	2930	2970	3100	2997.50	72.74	2.43	-6.33
	640	622	593	617	587	604.75	17.33	2.87	-5.51
	128	117	119	127	110	118.25	6.99	5.91	-7.62
	40	43	34	41	41	39.75	3.95	9.93	-0.63
	20	21	15	19	11	16.50	4.43	26.88	-17.50
	10	14	7.1	9.2	10.7	10.25	2.90	28.33	2.50
	5	3.8	4.9	3	6.3	4.50	1.43	31.79	-10.00
1	—	—	1.8	0.6	—	—	—	—	
<i>zSSIIB</i> copy number	80000	86000	88000	87000	91000	88000.00	2160.25	2.45	10.00
	16000	16580	16320	16160	16160	16305.00	198.24	1.22	1.91
	3200	2990	2930	2970	3090	2995.00	68.07	2.27	-6.41
	640	622	589	617	584	603.00	19.27	3.20	-5.78
	128	117	120	125	109	117.75	6.70	5.69	-8.01
	40	43	35	41	41	40.00	3.46	8.66	0.00
	20	20	15	20	11	16.50	4.36	26.42	-17.50
	10	14	7.1	9.2	10.7	10.25	2.90	28.33	2.50
	5	3.8	4.9	3	6.3	4.50	1.43	31.79	-10.00
1	—	0.7	1.8	0.6	—	—	—	—	
Bt176/ <i>zSSIIB</i>	80000	1.02	1.06	1.01	0.98	1.02	0.03	3.20	1.70
	16000	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.13	0.02

ratio	3200	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.16	0.08
	640	1.00	1.01	1.00	1.01	1.00	0.00	0.35	0.29
	128	1.00	0.99	1.02	1.01	1.00	0.01	1.06	0.42
	40	1.00	0.97	1.00	1.00	0.99	0.01	1.44	-0.62
	20	1.05	1.00	0.95	1.00	1.00	0.04	4.08	0.00
	10	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00
	5	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00
	1	—	—	1.00	1.00	—	—	—	—

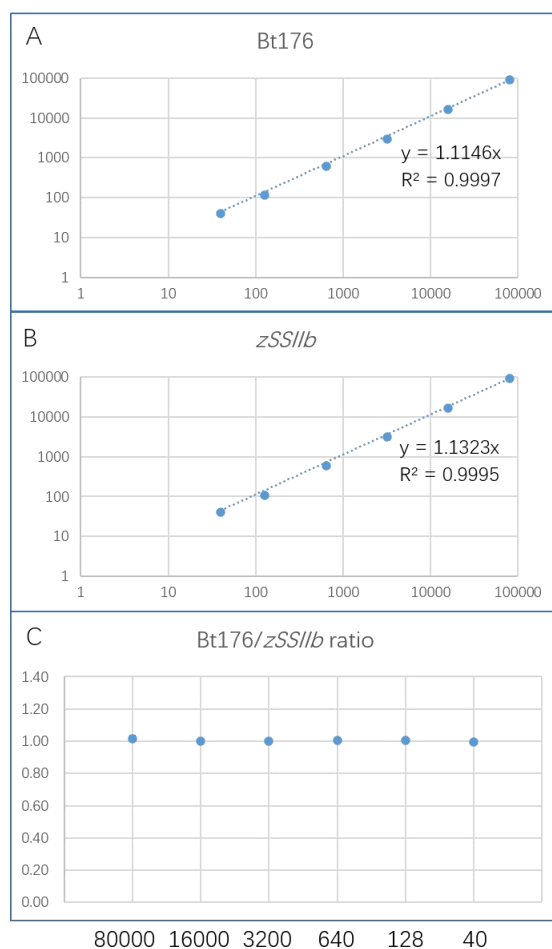


图 118 Bt176/zSSIb 二重数字 PCR 方法线性动态范围测试

注：A 为 Bt176 转化体特异性序列拷贝数测量值与预期值的线性回归方程（y 代表拷贝数测量值，x 代表拷贝数预期值）；B 为 zSSIb 基因拷贝数测量值与预期值的线性回归方程（y 代表拷贝数测量值，x 代表拷贝数预期值）；C 为 Bt176 转化体特异性序列和 zSSIb 基因拷贝数比值与不同浓度模板量的关系（y 代表模板拷贝数比值，x 代表 Bt176 转化体特异性序列拷贝数预期值）。

结果显示:当 20  $\mu$ L 扩增体系中 Bt176 转化体特异性序列和 *zSSIIb* 基因拷贝数分别在 40~80000 copies 之间时,随着拷贝数的降低,4 个重复的正确度偏差 (Bias) 和重复性相对标准偏差 (RSD) 升高,但均小于 25%,当模板量为 20 拷贝时,正确度偏差 (Bias) 和重复性相对标准偏差 (RSD) 出现大于 25%的情况,因此定量极限 (LOQ) 确定为 40 个拷贝,当 DNA 浓度低至 1 拷贝时,4 个平行中只有 2 个检测到阳性信号,其余均无阳性微滴,而当 DNA 浓度为 5 拷贝时,依然可以稳定的检测到阳性信号,拷贝数测量值在 3~6.3 之间,因此检测极限 (LOD) 确定为 5 拷贝 (表 120); Bt176 转化体特异性序列和 *zSSIIb* 基因微滴数字 PCR 获得的拷贝数浓度测量值与预期值具有良好的相关性,线性回归方程分别为  $y=1.1146x$  和  $y=1.1323x$ ,决定系数  $R^2$  值分别等于 0.9997 和 0.9995, Bt176 转化体特异性序列和 *zSSIIb* 基因拷贝数比值在 1.0 附近波动 (图 118)。Bt176/*zSSIIb* 二重数字 PCR 方法线性动态范围测试结果表明,20  $\mu$ L 扩增体系中,当模板量在 Bt176 转化体特异性序列 40~80000 拷贝的范围内,可获得准确的拷贝数浓度和拷贝数比值测量值。

### 23.5 Bt176/*zSSIIb* 二重 ddPCR 的测量准确性

配制 4 个含 Bt176 基因组 DNA 盲样 (S1~S4), Bt176/*zSSIIb* 拷贝数比值依次为 5.0%、3.0%、1.0%、0.5%。由不同的操作者在不同的日期用 Bt176/*zSSIIb* 二重 ddPCR 方法对 4 个盲样进行了三次测量。

表 121 4 个盲样的测量结果

重复	PCR 平行	盲样含量测量值			
		S1 (%)	S2 (%)	S3 (%)	S4 (%)
1	1	4.69	3.04	1.08	0.52
	2	5.02	3.07	0.92	0.55
	3	5.23	3.06	1.07	0.47
2	1	5.03	2.96	0.95	0.50
	2	5.05	2.97	0.98	0.47
	3	5.04	2.92	1.01	0.51
3	1	4.86	3.00	1.06	0.53
	2	5.14	3.11	0.98	0.50
	3	4.80	2.97	0.96	0.55

表 122 4 个盲样定量结果的重复性和重现性统计分析

盲样	预期拷贝数比值 (%)	测量平均值 (%)	Sr (%)	RSD r (%)	SR (%)	RSD R (%)	Bias (%)
S1	5	4.98	0.19	3.79	0.19	3.79	-0.31
S2	3	3.01	0.05	1.53	0.07	2.21	0.37
S3	1	1.00	0.06	6.25	0.06	6.25	0.11
S4	0.5	0.51	0.03	5.87	0.03	5.87	2.22

二重 ddPCR 的定量结果如表 121 所示，计算得到 4 个盲样 Bt176/zSSIIb 拷贝数比值的平均值，统计测量结果的重复性相对标准差 (RSDr)、重现性相对标准差 (RSDR)、和相对偏倚 (Bias)。结果显示，测量平均值均接近预期含量，与预期值的相对偏倚在±25% 的可接受范围内；重复性相对标准偏差 RSDr 和再现性相对标准偏差 RSDR 均小于 25% (表 122)。已建立的 Bt176/zSSIIb 二重 ddPCR 实现了对样品中 Bt176 转化体含量的准确定量，具有良好的重复性和重现性。

## 23.6 结论

Bt176/*zSSIb* 二重 ddPCR 扩增引物探针采用已发布的标准方法 (GB/T 19495.5-2018、农业部 1861 号公告—3—2012) 中的实时荧光 PCR 方法引物探针 (表 118)。Bt176/*zSSIb* 二重 ddPCR 扩增体系见表 123, 扩增程序为: 95°C 预变性 10 min; 94°C 变性 30 s, 60°C 退火延伸 60 s, 共进行 50 个循环; 98°C 变性 10 min, 4°C 保存 (升降温速率 2°C/s)。

表 123 数字 PCR 扩增体系

组分	终浓度	体积
ddH <sub>2</sub> O	—	4.0 μL
2×ddPCR™ Supermix for Probes	1×	10.0 μL
10 μmol/L 内标上游引物 <i>zSSIb</i> -QF	0.4 μmol/L	0.8 μL
10 μmol/L 内标下游引物 <i>zSSIb</i> -QR	0.4 μmol/L	0.8 μL
10 μmol/L 内标探针 <i>zSSIb</i> -QP	0.2 μmol/L	0.4 μL
10 μmol/L 转化体上游引物 Bt176-qF	0.4 μmol/L	0.8 μL
10 μmol/L 转化体上游引物 Bt176-qR	0.4 μmol/L	0.8 μL
10 μmol/L 转化体探针 Bt176-qP	0.2 μmol/L	0.4 μL
25 mg/L DNA 模板	2.5 mg/L	2.0 μL
总体积		20.0 μL

扩增体系可根据仪器及试剂耗材的实际使用情况, 进行相应调整。此表是 1 个扩增体系的体积, 应按照实际反应数量进行扩增体系配置。空白质控品以 2.0 μL 的 ddH<sub>2</sub>O 作模板。

## 24. TC1507/*zSSIb* 二重数字 PCR 方法

### 24.1 引物探针确认

TC1507 转化体特异性引物探针和玉米内标准基因 *zSSIb* 引物探针选用经过欧盟联合研究中心转基因检测实验室网络验证过的多重

数字 PCR 引物和探针。ENGL 网络实验室对此已经进行了验证，相关结果发表于 *Anal Chem.* 2015, 87, 8218–8226. DOI: 10.1021/acs.analchem.5b01208

表 124 TC1507 转化体特异性引物和探针序列

靶标	引物/探针名称及序列 (5'-3')	扩增片段大小 (bp)	来源
<i>zSSIb</i> 基因	<i>zSSIb</i> -1F: CGGTGGATGCTAAGGCTGATG	88	Anal Chem. 2015, 87, 8218–8226
	<i>zSSIb</i> -2R: AAAGGGCCAGGTTTCATTATCCTC		
	<i>zSSIb</i> -P: HEX-TAAGGAGCACTCGCCGCCGCATCTG-BHQ1		
TC1507 转化体	TC1507-1F: TAGTCTTCGGCCAGAATGG	58	6
	TC1507-2R: CTTTGCCAAGATCAAGCG		
	TC1507-P: FAM-TAACTCAAGGCCCTCACTCCG-BHQ1		

在伯乐微滴式数字 PCR 平台 QX200 上，用通用的 PCR 反应体系（引物/探针浓度 400/200 nM）和退火温度（60℃），以 TC1507 基因组 DNA 为模板，进行 TC1507 转化体/*zSSIb* 基因的二重 ddPCR 扩增，对表 124 中的引物探针组合进行测试，设 3 个平行反应。

## 24.2 TC1507/*zSSIb* 二重微滴数字 PCR 特异性测试

用转基因玉米 TC1507、其他转基因玉米混合样（瑞丰 125、瑞丰 8、T25、MIR604、NK603、DBN9936、DBN9858、DBN9501）、转基因大豆混合样（中黄 6106、DBN8205、DBN9004、MON89788、MON87751、）、转基因水稻混合样（TT51-1、G6H1、T1C-19、T2A-1）、转基因油菜混合样（MS1、MS8、RF3、T45、Oxy-235）、转基因棉花混合样（MON1445、MON531、MON15985、MON88913、GHB614）、

非转基因玉米基因组 DNA 作模板进行 TC1507 和 *zSSIb* 二重 ddPCR 扩增，用水做空白对照，测试 TC1507 转化体和 *zSSIb* 二重 ddPCR 方法的特异性。

结果显示，*zSSIb* 基因 ddPCR 在玉米样品中扩增得到阳性微滴，在其他作物和空白对照中不能扩增得到阳性微滴；TC1507 转化体特异性序列 ddPCR 仅在转基因玉米 TC1507 样品中扩增得到阳性微滴，在其他转基因玉米品种和空白对照中不能扩增得到阳性微滴，结果表明 TC1507/*zSSIb* 二重 ddPCR 方法有良好的特异性（表 125）。

表 125 转基因玉米 TC1507 方法特异性检测结果表

测试样品类型	重复次数	总生成微滴数	1507 靶标阳性微滴数	<i>zSSIb</i> 阳性微滴数
TC1507	重复 1	18609	5899	10963
	重复 2	19897	6065	13802
	重复 3	19877	6932	12637
其他转基因玉米	重复 1	19502	0	11295
	重复 2	18408	0	10402
	重复 3	20943	0	14438
非转基因玉米	重复 1	21796	0	15411
	重复 2	20617	0	14553
	重复 3	19740	0	14286
转基因大豆	重复 1	21767	0	0
	重复 2	20352	0	0
	重复 3	21072	0	0
转基因水稻	重复 1	20390	0	0
	重复 2	18567	0	0
	重复 3	21563	0	0
转基因油菜	重复 1	21890	0	0
	重复 2	20954	0	0
	重复 3	21738	0	0
转基因棉花	重复 1	21796	0	0
	重复 2	20617	0	0

	重复 3	19740	0	0
--	------	-------	---	---

### 24.3 TC1507/*zSSIb* 二重数字 PCR 的条件优化

PCR 扩增程序中退火温度的高低对阴阳性微滴区分有显著的影响，本项目设置了 58℃、60℃、62℃ 三个温度梯度，测试 TC1507 和 *zSSIb* 基因二重 ddPCR 的扩增效果。

表 126 数字 PCR 引物探针退火温度优化扩增数据分析

靶标	<i>zSSIb</i> 基因				TC1507 玉米特异性序列			
	拷贝数 测量值	平均值	标准差 SD	相对标 准偏差 RSD	拷贝数 测量值	平均值	标准差 SD	相对标 准偏差 RSD
58	1833.03	1954.44	149.55	0.08	1008.97	981.29	60.91	0.06
	1908.79				1023.45			
	2121.49				911.46			
60	2074.42	996.69	33.82	0.03	1008.38	2046.61	30.86	0.02
	2052.01				958.57			
	2013.41				1023.11			
62	1883.34	2028.29	149.88	0.07	916.18	957.40	77.22	0.08
	2018.86				909.54			
	2182.66				1046.48			

数字 PCR 扩增结果显示：在 60℃ 退火温度下，TC1507 玉米转化体特异性序列、*zSSIb* 基因阴阳微滴的阴阳液滴分界清晰，没有难以界定的“下雨”现象；进一步对测试数据进行分析可以发现，在 60℃ 时，相同模板重复之间的标准偏差最小（表 126）。因此，确定 *zSSIb* 基因和 TC1507 转化体特异性序列引物探针最优退火延伸温度为 60℃。经过优化后 *zSSIb* 基因和 TC1507 转化体特异性序列数字 PCR

扩增程序为：95℃预变性 10 min；94℃变性 30 s，60℃退火延伸 60 s，共进行 50 个循环；98℃变性 10 min，4℃保存（升降温速率 2℃/s）。

#### 24.4 数字 PCR 扩增体系优化

PCR 扩增体系中仅选择引物探针浓度进行优化测试。参考发表论文，上述引物探针终浓度设置了 3 组 *zSSIb* 基因和 TC1507 转化体特异性序列引物：探针终浓度进行测试。

表 127 数字 PCR 引物探针浓度优化扩增数据分析

靶标引物：探针终浓度 (μmol/L)		<i>zSSIb</i> 基因拷贝数测量结果				TC1507 拷贝数测量结果			
<i>zSSIb</i>	TC1507	测量值	平均值	SD	RSD	测量值	平均值	SD	RSD
0.6: 0.3	0.6: 0.3	2107.13	2001.81	133.61	0.07	930.27	972.51	66.60	0.07
		1851.52				1049.29			
		2046.79				937.97			
0.4: 0.2	0.4: 0.2	2192.5	2141.33	62.65	0.03	1074.55	1045.44	26.52	0.03
		2160.03				1022.66			
		2071.45				1039.11			
0.8: 0.4	0.8: 0.4	2142.05	2081.94	139.48	0.07	927.91	983.78	78.39	0.08
		1922.49				1073.39			
		2181.29				950.05			

数字 PCR 扩增结果显示：扩增图谱中 *zSSIb* 基因和 TC1507 转化体特异性序列在不同的引物探针浓度下，微滴的荧光强度存在较显著差异，随着引物探针浓度降低，阳性微滴信号出现降低；进一步对测试数据进行分析可以发现，在 *zSSIb* 基因和 TC1507 转化体特异性序列引物：探针终浓度分别为 0.4: 0.2 μmol/L 和 0.4: 0.2 μmol/L 时，

相同模板测定的重复之间的标砖偏差较小（表 127）。因此，确定 *zSSIb* 基因和 TC1507 转化体特异性序列最优引物：探针终浓度分别为 0.4: 0.2  $\mu\text{mol/L}$  和 0.4: 0.2  $\mu\text{mol/L}$ 。

#### 24.5 TC1507/*zSSIb* 二重 ddPCR 的 LOD、LOQ 和动力学范围测试

微滴式数字 PCR 的理论有效线性范围是 1~100000 个拷贝，实际测试时，20  $\mu\text{L}$  反应液在微滴生成仪中一般生成 10000~20000 个有效微滴，微滴数大于 10000 为有效反应。为了测试 *zSSIb* 基因和 TC1507 转化体特异性序列数字 PCR 方法的线性范围，将 TC1507 玉米基因组 DNA 进行梯度稀释制作成 8 个浓度的标准品，按确定的扩增条件进行 *zSSIb* 基因和 TC1507 转化体特异性序列数字 PCR 扩增，每个梯度扩增设置 3 个平行。根据测量值及初始模板拷贝数分别绘制 *zSSIb* 基因和 TC1507 转化体特异性序列的线性回归曲线进行线性范围分析，对 3 个平行间 *zSSIb* 基因和 TC1507 转化体特异性序列测量值以及拷贝数比值的标准偏差和相对标准偏差进行数据统计，评价 *zSSIb* 基因和 TC1507 转化体特异性序列数字 PCR 方法的重复性。根据《转基因植物及其产品成分检测 数字 PCR 方法制定指南》（农业农村部公告第 323 号—21—2020）中定量检测的要求，在整个线性动态范围内，线性度即线性回归方程的决定系数  $R^2$  一般应  $\geq 0.98$ ，正确度偏差

(*Bias*) 不超过标称值的 25%，精密度即重复性相对标准偏差 (*RSD*)

一般应  $\leq 25\%$ 。

表 128 TC1507 玉米特异性序列数字 PCR 线性动态范围与重复性分析

靶标	预期拷贝数/反应	测定拷贝数/反应				标准偏差	相对标准偏差 (%)	正确度偏差 (%)
		重复 1	重复 2	重复 3	平均值			
zSSI <b>b</b>	20000	21019.23	20866.57	20985.63	20957.14	80.22	0.38	4.79
	10000	10820.78	9098.17	9212	9710.32	963.37	9.92	-2.90
	5000	5176.06	5347.08	5024.4	5182.51	161.44	3.12	3.65
	1000	1072.58	982.29	1087.26	1047.38	56.84	5.43	4.74
	500	540.24	492.64	493.88	508.92	27.13	5.33	1.78
	100	104.88	95.63	102.8	101.10	4.85	4.80	1.10
	10	9.05	10.2	10.93	10.06	0.95	9.42	0.60
	1	/	0.97	/	/	/	/	/
TC1507	20000	10407.49	9813.86	10016.93	10079.43	301.71	2.99	0.79
	10000	4789.98	5386.23	4670.65	4948.95	383.36	7.75	-1.02
	5000	2545.65	2658.56	2968.31	2724.17	218.84	8.03	8.97
	1000	485.84	525.48	461.35	490.89	32.36	6.59	-1.82
	500	270.84	245.48	261.35	259.22	12.81	4.94	3.69
	100	48.82	49.2	42.4	46.81	3.82	8.16	-6.39
	10	4.62	3.86	3.65	4.04	0.51	12.62	-19.13
	1	/	/	0.98	/	/	/	/

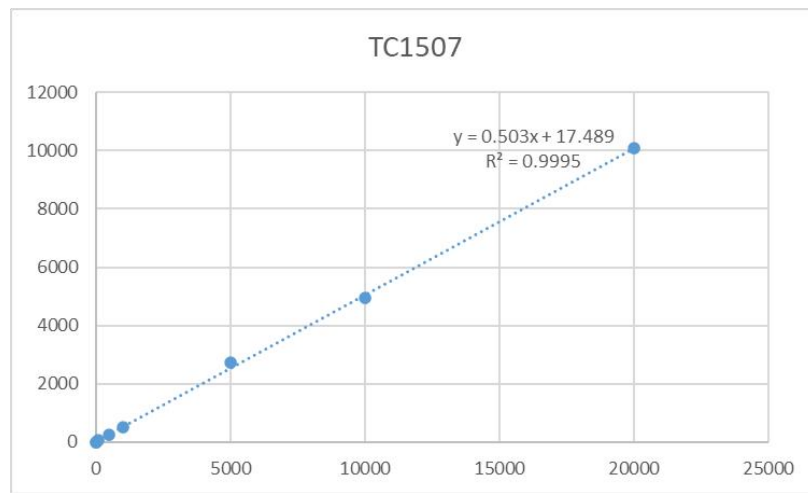
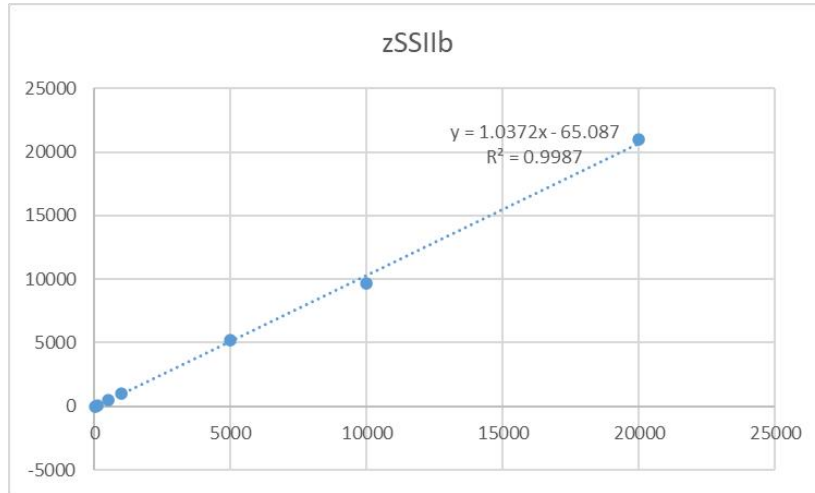


图 119 TC1507/zSSIb 二重数字 PCR 方法线性动态范围测试

注：y 代表拷贝数测量值，x 代表拷贝数预期值

结果显示：TC1507 转化体特异性序列和 zSSIb 基因拷贝数重复间正确度偏差 (*Bias*) 和重复性相对标准偏差 (*RSD*) 均小于 25%，当 DNA 浓度低至 1 拷贝，3 个平行中只有 1 个检测到阳性信号，其余均无阳性微滴，因此定量极限 (LOQ) 确定为 10 个拷贝 (TC1507 转化体特异性序列)，检测极限 (LOD) 确定为 10 拷贝 (TC1507 转化体特异性序列) (表 128)；

TC1507 转化体特异性序列和 *zSSIb* 基因微滴数字 PCR 获得的拷贝数浓度测量值与预期值具有良好的相关性，线性回归方程决定系数  $R^2$  值 > 0.098，符合要求（图 119）。TC1507/*zSSIb* 二重数字 PCR 方法线性动态范围测试结果表明，20  $\mu$ L 扩增体系中，当模板量在 TC1507 转化体特异性序列 10~20000 拷贝的范围内，可获得准确的拷贝数。

#### 24.6 TC1507/*zSSIb* 二重 ddPCR 的测量准确性

配制 4 个含 TC1507 基因组 DNA 盲样 (S1~S4)，TC1507/*zSSIb* 拷贝数比值依次为 5.0%、3.0%、1.0%、0.5%。由不同的操作者在不同的日期用 TC1507/*zSSIb* 二重 ddPCR 方法对 5 个盲样进行进行了 3 次测量。

表 129 4 个盲样的测量结果

重复	ddPCR 平行	盲样含量测量值			
		S1 (%)	S2 (%)	S3 (%)	S4 (%)
1	1	5.09	2.88	1.03	0.54
	2	5.21	2.99	0.94	0.54
	3	4.97	2.78	0.88	0.50
2	1	5.38	2.78	1.02	0.54
	2	5.00	2.79	0.97	0.45
	3	5.01	3.36	0.96	0.48
3	1	5.34	2.80	1.00	0.44
	2	5.26	2.84	1.06	0.49
	3	5.28	3.17	0.84	0.52

表 130. 4 个盲样定量结果的重复性和重现性统计分析

盲样	预期拷贝数比值 (%)	测量平均值 (%)	Sr (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	S <sub>R</sub> (%)	RSD <sub>R</sub> (%)
S1	5.0	5.17	0.11	2.08	0.16	3.02
S2	3.0	2.93	0.05	1.60	0.21	7.01
S3	1.0	0.97	0.02	1.72	0.07	7.40
S4	0.5	0.50	0.02	4.67	0.04	7.68

二重 ddPCR 的定量结果如表 129 所示，计算得到 4 个盲样 TC1507/*zSSIIB* 拷贝数比值的平均值，统计测量结果的重复性相对标准差 ( $RSD_r$ )、重现性相对标准差 ( $RSD_R$ )、和相对偏倚 ( $Bias$ )。结果显示，测量平均值均接近预期含量，与预期值的相对偏倚在 ±25% 的可接受范围内；重复性相对标准偏差  $RSD_r$  和再现性相对标准偏差  $RSD_R$  均小于 25% (表 130)。已建立的 TC1507/*zSSIIB* 二重 ddPCR 实现了对样品中 TC1507 转化体含量的准确定量，具有良好的重复性和重现性。

## 25. MON863/*zSSIIB* 二重数字 PCR 方法

### 25.1 引物探针确认

MON863 转化体特异性引物探针和玉米内标准基因 *zSSIIB* 引物探针选用经过欧盟联合研究中心转基因检测实验室网络验证过的多重数字 PCR 引物和探针。ENGL 网络实验室对此已经进行了验证，相关结果发表于 *Anal Chem.* 2015, 87, 8218–8226. DOI: 10.1021/acs.analchem.5b01208

表 131 MON863 转化体特异性引物和探针序列

靶标	引物/探针名称及序列 (5'-3')	扩增片段大小 (bp)	来源
<i>zSSIb</i> 基因	<i>zSSIb</i> -1F: CGGTGGATGCTAAGGCTGATG	88	Anal Chem. 2015, 87, 8218-8226
	<i>zSSIb</i> -2R: AAAGGGCCAGGTTTCATTATCCTC		
	<i>zSSIb</i> -P: HEX-TAAGGAGCACTCGCCGCCGCATCTG-BHQ1		
MON863 转化体	MON863-1F: TGTTACGGCCTAAATGCTGAACT	84	
	MON863-2R: GTAGGATCGGAAAGCTTGGTAC		
	MON863-P: FAM-TGAACACCCATCCGAACAAGTAGGGTCA-BHQ1		

在伯乐微滴式数字 PCR 平台 QX200 上，用通用的 PCR 反应体系（引物/探针浓度 400/200 nM）和退火温度（60°C），以 MON863 基因组 DNA 为模板，进行 MON863 转化体/*zSSIb* 基因的二重 ddPCR 扩增，对表 131 中的引物探针组合进行测试，设 3 个平行反应。

## 25.2 MON863/*zSSIb* 二重微滴数字 PCR 特异性测试

用转基因玉米 MON863、其他转基因玉米混合样（瑞丰 125、瑞丰 8、T25、MIR604、NK603、DBN9936、DBN9858、DBN9501）、转基因大豆混合样（中黄 6106、DBN8205、DBN9004、MON89788、MON87751、）、转基因水稻混合样（TT51-1、G6H1、T1C-19、T2A-1）、转基因油菜混合样（MS1、MS8、RF3、T45、Oxy-235）、转基因棉花混合样（MON1445、MON531、MON15985、MON88913、GHB614）、非转基因玉米基因组 DNA 作模板进行 MON863 和 *zSSIb* 二重 ddPCR 扩增，用水做空白对照，测试 MON863 转化体和 *zSSIb* 二重 ddPCR 方法的特异性。

结果显示, *zSSIb* 基因 ddPCR 在玉米样品中扩增得到阳性微滴, 在其他作物和空白对照中不能扩增得到阳性微滴; MON863 转化体特异性序列 ddPCR 仅在转基因玉米 MON863 样品中扩增得到阳性微滴, 在其他转基因玉米品种和空白对照中不能扩增得到阳性微滴, 结果表明 MON863/*zSSIb* 二重 ddPCR 方法有良好的特异性 (表 132)。

表 132. 转基因玉米 MON863 方法特异性检测结果表

测试样品类型	重复次数	总生成微滴数	MON863 靶标阳性微滴数	<i>zSSIb</i> 阳性微滴数
MON863	重复 1	15509	7418	11262
	重复 2	16123	7372	11274
	重复 3	15742	7295	11227
其他转基因玉米	重复 1	17242	0	11692
	重复 2	17638	0	11814
	重复 3	16658	0	11666
非转基因玉米	重复 1	16561	0	11558
	重复 2	17497	0	12096
	重复 3	16524	0	11487
转基因大豆	重复 1	16552	0	0
	重复 2	16725	0	0
	重复 3	16711	0	0
转基因水稻	重复 1	16726	0	0
	重复 2	16393	0	0
	重复 3	16138	0	0
转基因油菜	重复 1	16164	0	0
	重复 2	17359	0	0
	重复 3	17968	0	0
转基因棉花	重复 1	16324	0	0
	重复 2	16143	0	0
	重复 3	17155	0	0

### 25.3 MON863/*zSSIb* 二重数字 PCR 的条件优化

PCR 扩增程序中退火温度的高低对阴阳性微滴区分有显著的影响，本项目设置了 58°C、60°C、62°C 三个温度梯度，测试 MON863 和 *zSSIb* 基因二重 ddPCR 的扩增效果。

表 133 数字 PCR 引物探针退火温度优化扩增数据分析

靶标	<i>zSSIb</i> 基因				MON863 玉米特异性序列			
	拷贝数 测量值	平均值	标准差 SD	相对标 准偏差 RSD (%)	拷贝数 测量值	平均值	标准差 SD	相对标 准偏差 RSD (%)
58	2195.97	1978.13	190.44	9.63	927.87	972.00	68.01	7.00
	1895.25				937.82			
	1843.17				1050.32			
60	2195.38	2097.66	85.60	4.08	1022.48	1055.21	28.48	2.70
	2061.71				1068.77			
	2035.9				1074.37			
62	2089.92	2051.05	118.26	5.77	926.8	1000.74	85.89	8.58
	1918.25				1094.96			
	2144.99				980.46			

数字 PCR 扩增结果显示：在 60°C 退火温度下，MON863 玉米转化体特异性序列、*zSSIb* 基因阴阳微滴的阴阳液滴分界清晰，没有难以界定的“下雨”现象；进一步对测试数据进行分析可以发现，在 60°C 时，相同模板重复之间的标准偏差最小（表 133）。因此，确定 *zSSIb* 基因和 MON863 转化体特异性序列引物探针最优退火延伸温度为 60°C。经过优化后 *zSSIb* 基因和 MON863 转化体特异性序列数字 PCR 扩增程序为：95°C 预变性 10 min；94°C 变性 30 s，60°C 退火延伸 60 s，共进行 50 个循环；98°C 变性 10 min，4°C 保存（升降温速率 2°C/s）。

## 25.4 数字 PCR 扩增体系优化

PCR 扩增体系中仅选择引物探针浓度进行优化测试。参考发表论文，上述引物探针终浓度设置了 3 组 *zSSIb* 基因和 MON863 转化体特异性序列引物：探针终浓度进行测试。

表 134 数字 PCR 引物探针浓度优化扩增数据分析

靶标引物：探针 终浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )		<i>zSSIb</i> 基因				MON863 拷贝数测量结果			
<i>zSSIb</i>	MON863	测量值	平均值	SD	RSD	测量值	平均值	SD	RSD
0.6: 0.3	0.6: 0.3	1806.64	1889.12	102.37	5.42	1083.14	1000.78	78.19	7.81
		2003.69				927.56			
		1857.03				991.63			
0.4: 0.2	0.4: 0.2	2116.32	2076.58	35.38	1.70	1088.01	1054.60	29.13	2.76
		2048.49				1034.51			
		2064.93				1041.28			
0.8: 0.4	0.8: 0.4	1876.07	1985.62	97.86	4.93	1095.6	995.44	90.32	9.07
		2016.43				970.54			
		2064.37				920.19			

数字 PCR 扩增结果显示：扩增图谱中 *zSSIb* 基因和 MON863 转化体特异性序列在不同的引物探针浓度下，微滴的荧光强度存在较显著差异，随着引物探针浓度降低，阳性微滴信号出现降低；进一步对测试数据进行分析可以发现，在 *zSSIb* 基因和 MON863 转化体特异性序列引物：探针终浓度分别为 0.4: 0.2  $\mu\text{mol/L}$  和 0.4: 0.2  $\mu\text{mol/L}$  时，相同模板测定的重复之间的标砖偏差较小（表 134）。因此，确定 *zSSIb* 基因和 MON863 转化体特异性序列最优引物：探针终浓度分别为 0.4: 0.2  $\mu\text{mol/L}$  和 0.4: 0.2  $\mu\text{mol/L}$ 。

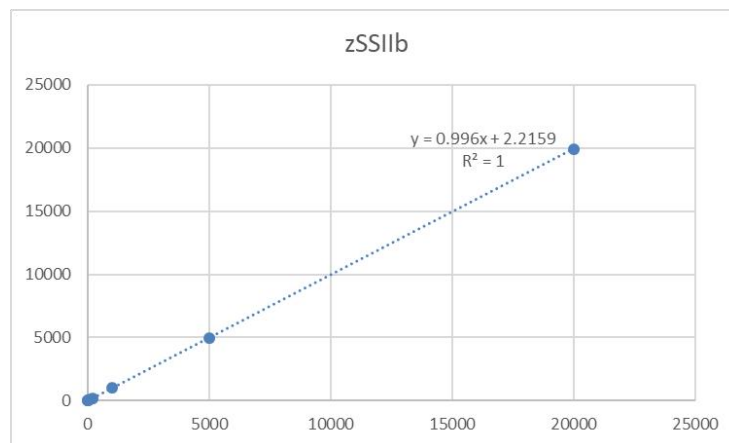
## 25.5 MON863/*zSSIb* 二重 ddPCR 的 LOD、LOQ 和动力学范围测试

微滴式数字 PCR 的理论有效线性范围是 1~100000 个拷贝，实际测试时，20  $\mu$ L 反应液在微滴生成仪中一般生成 10000~20000 个有效微滴，微滴数大于 10000 为有效反应。为了测试 *zSSIb* 基因和 MON863 转化体特异性序列数字 PCR 方法的线性范围，将 MON863 玉米基因组 DNA 进行梯度稀释制作成 8 个浓度的标准品，按确定的扩增条件进行 *zSSIb* 基因和 MON863 转化体特异性序列数字 PCR 扩增，每个梯度扩增设置 3 个平行。根据测量值及初始模板拷贝数分别绘制 *zSSIb* 基因和 MON863 转化体特异性序列的线性回归曲线进行线性范围分析，对 3 个平行间 *zSSIb* 基因和 MON863 转化体特异性序列测量值以及拷贝数比值的标准偏差和相对标准偏差进行数据统计，评价 *zSSIb* 基因和 MON863 转化体特异性序列数字 PCR 方法的重复性。根据《转基因植物及其产品成分检测 数字 PCR 方法制定指南》（农业农村部公告第 323 号—21—2020）中定量检测的要求，在整个线性动态范围内，线性度即线性回归方程的决定系数  $R^2$  一般应  $\geq 0.98$ ，正确度偏差 (*Bias*) 不超过标称值的 25%，精密度即重复性相对标准偏差 (*RSD*) 一般应  $\leq 25\%$ 。

表 135 MON863 玉米特异性序列数字 PCR 线性动态范围与重复性分析

靶标	预期拷贝数/ 反应	测定拷贝数/反应	标准偏 差	相对标 准偏差	正确度 偏差
----	--------------	----------	----------	------------	-----------

		重复 1	重复 2	重复 3	平均值			
zSSIIb	20000	20395.04	19622.85	19760.68	19926.19	411.84	2.07	-2.34
	5000	4939.42	4998.7	4944.57	4960.90	32.84	0.66	0.43
	1000	980.03	1095.14	1038.46	1037.88	57.56	5.55	5.78
	200	162.76	222.36	190.18	191.77	29.83	15.56	14.50
	100	81.2	97.27	113.38	97.28	16.09	16.54	16.08
	20	22.01	23.02	15.01	20.01	4.36	21.80	-9.98
	10	11	10	7	9.33	2.08	22.30	-16.67
	1	0	1	1	0.67	0.58	86.60	66.67
MON863	10000	10035.26	10079.16	10107.49	10073.97	36.39	0.36	0.39
	2500	2524.37	2494.8	2669.02	2562.73	93.23	3.64	1.53
	500	488.02	473.46	505.78	489.09	16.19	3.31	0.21
	100	100.29	96.26	92.28	96.28	4.01	4.16	-4.01
	50	60.15	52.08	47.07	53.10	6.60	12.43	-14.10
	10	13.01	10	15.01	12.67	2.52	19.90	-3.37
	5	9	6	3	6.00	3.00	50.00	-60.00
	1	1	0	0	0.33	0.58	173.21	-66.67



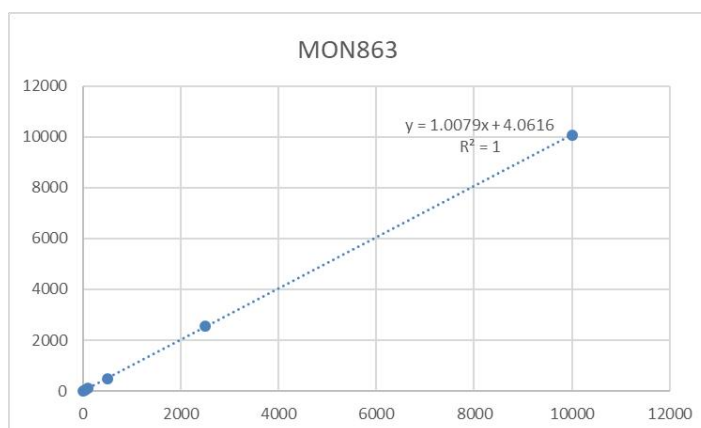


图 120 MON863/*zSSIIB* 二重数字 PCR 方法线性动态范围测试

注： y 代表拷贝数测量值， x 代表拷贝数预期值

结果显示： MON863 转化体特异性序列和 *zSSIIB* 基因拷贝数重复间正确度偏差 (*Bias*) 和重复性相对标准偏差 (*RSD*) 均小于 25%，当 DNA 浓度低至 1 拷贝，3 个平行中只有 1 个或 2 个检测到阳性信号，其余均无阳性微滴，因此定量极限 (LOQ) 确定为 10 个拷贝 (MON863 转化体特异性序列)，检测极限 (LOD) 确定为 10 拷贝 (MON863 转化体特异性序列) (表 135)；

MON863 转化体特异性序列和 *zSSIIB* 基因微滴数字 PCR 获得的拷贝数浓度测量值与预期值具有良好的相关性，线性回归方程决定系数  $R^2$  值 > 0.098，符合要求 (图 120)。MON863/*zSSIIB* 二重数字 PCR 方法线性动态范围测试结果表明，20  $\mu$ L 扩增体系中，当模板量在 MON863 转化体特异性序列 10~20000 拷贝的范围内，可获得准确的拷贝数。

## 25.6 MON863/zSSIIb 二重 ddPCR 的测量准确性

配制 4 个含 MON863 基因组 DNA 盲样(S1~S4), MON863/zSSIIb 拷贝数比值依次为 5.0%、3.0%、1.0%、0.5%。由不同的操作者在不同的日期用 MON863/zSSIIb 二重 ddPCR 方法对 5 个盲样进行进行了 3 次测量。

表 136 4 个盲样的测量结果

重复	ddPCR 平行	盲样含量测量值			
		S1 (%)	S2 (%)	S3 (%)	S4 (%)
1	1	5.12	3.15	0.91	0.43
	2	4.79	3.06	0.92	0.53
	3	5.14	2.83	0.95	0.42
2	1	4.74	3.17	1.14	0.59
	2	4.85	2.94	1.02	0.61
	3	4.85	2.91	0.96	0.52
3	1	5.12	2.86	0.98	0.56
	2	4.80	3.16	1.12	0.41
	3	4.79	2.97	1.04	0.47

表 137 4 个盲样定量结果的重复性和重现性统计分析

盲样	预期拷贝数比值 (%)	测量平均值 (%)	Sr (%)	RSDr (%)	SR (%)	RSDR (%)
S1	5.0	4.93	0.10	2.07	0.17	3.36
S2	3.0	3.01	0.01	0.28	0.13	4.42
S3	1.0	1.05	0.07	6.71	0.11	10.08
S4	0.5	0.53	0.06	11.99	0.07	12.56

二重 ddPCR 的定量结果如表 136 所示, 计算得到 4 个盲样 MON863/zSSIIb 拷贝数比值的平均值, 统计测量结果的重复性相对标准差 ( $RSD_r$ )、重现性相对标准差 ( $RSD_R$ )、和相对偏倚 ( $Bias$ )。

结果显示,测量平均值均接近预期含量,与预期值的相对偏倚在±25%的可接受范围内;重复性相对标准偏差  $RSD_r$ 和再现性相对标准偏差  $RSD_R$ 均小于 25% (表 137)。已建立的 MON863/*zSSIb* 二重 ddPCR 实现了对样品中 MON863 转化体含量的准确定量,具有良好的重复性和重现性。

## 26. 59122/*zSSIb* 二重数字 PCR 方法

### 26.1 引物探针确认

59122 转化体特异性引物探针和玉米内标准基因 *zSSIb* 引物探针选用经过欧盟联合研究中心转基因检测实验室网络验证过的多重数字 PCR 引物和探针。ENGL 网络实验室对此已经进行了验证,相关结果发表于 *Anal Chem.* 2015, 87, 8218–8226. DOI: 10.1021/acs.analchem.5b01208

表 138 59122 转化体特异性引物和探针序列

靶标	引物/探针名称及序列 (5'-3')	扩增片段大小 (bp)	来源
<i>zSSIb</i> 基因	<i>zSSIb</i> -1F: CGGTGGATGCTAAGGCTGATG	88	Anal Chem. 2015, 87, 8218–8226 6
	<i>zSSIb</i> -2R: AAAGGGCCAGGTTTCATTATCCTC		
	<i>zSSIb</i> -P: HEX-TAAGGAGCACTCGCCGCCGCATCTG-BHQ1		
59122 转化体	59122-1F: GGGATAAGCAAGTAAAAGCGCTC	86	
	59122-2R: CCTTAATTCTCCGCTCATGATCAG		
	59122-P: FAM-TTTAAACTGAAGGCGGGAAACGACAA -BHQ1		

在伯乐微滴式数字 PCR 平台 QX200 上,用通用的 PCR 反应体系 (引物/探针浓度 400/200 nM) 和退火温度 (60°C),以 59122 基

基因组 DNA 为模板,进行 59122 转化体/*zSSIIb* 基因的二重 ddPCR 扩增,对表 138 中的引物探针组合进行测试,设 3 个平行反应。

## 26.2 59122/*zSSIIb* 二重微滴数字 PCR 特异性测试

用转基因玉米 59122、其他转基因玉米混合样(瑞丰 125、瑞丰 8、T25、MIR604、NK603、DBN9936、DBN9858、DBN9501)、转基因大豆混合样(中黄 6106、DBN8205、DBN9004、MON89788、MON87751、)、转基因水稻混合样(TT51-1、G6H1、T1C-19、T2A-1)、转基因油菜混合样(MS1、MS8、RF3、T45、Oxy-235)、转基因棉花混合样(MON1445、MON531、MON15985、MON88913、GHB614)、非转基因玉米基因组 DNA 作模板进行 59122 和 *zSSIIb* 二重 ddPCR 扩增,用水做空白对照,测试 59122 转化体和 *zSSIIb* 二重 ddPCR 方法的特异性。

结果显示,*zSSIIb* 基因 ddPCR 在玉米样品中扩增得到阳性微滴,在其他作物和空白对照中不能扩增得到阳性微滴;59122 转化体特异性序列 ddPCR 仅在转基因玉米 59122 样品中扩增得到阳性微滴,在其他转基因玉米品种和空白对照中不能扩增得到阳性微滴,结果表明 59122/*zSSIIb* 二重 ddPCR 方法有良好的特异性(表 139)。

表 139. 转基因玉米 59122 方法特异性检测结果表

测试样品类型	重复次数	总生成微滴数	59122 阳性微滴数	<i>zSSIIb</i> 阳性微滴数
59122	重复 1	17417	3509	7498
	重复 2	17184	3676	7666

	重复 3	16345	3514	7420
其他转基因玉米	重复 1	17135	0	7371
	重复 2	17014	0	7758
	重复 3	17335	0	7444
非转基因玉米	重复 1	17109	0	7401
	重复 2	16871	0	7697
	重复 3	16981	0	7266
转基因大豆	重复 1	16887	0	0
	重复 2	16787	0	0
	重复 3	17006	0	0
转基因水稻	重复 1	16653	0	0
	重复 2	16870	0	0
	重复 3	17088	0	0
转基因油菜	重复 1	16747	0	0
	重复 2	17125	0	0
	重复 3	17373	0	0
转基因棉花	重复 1	16903	0	0
	重复 2	16874	0	0
	重复 3	17314	0	0

### 26.3 59122/zSSIIb 二重数字 PCR 的条件优化

PCR 扩增程序中退火温度的高低对阴阳性微滴区分有显著的影响,本项目设置了 58°C、60°C、62°C 三个温度梯度,测试 59122 和 zSSIIb 基因二重 ddPCR 的扩增效果。

表 140 数字 PCR 引物探针退火温度优化扩增数据分析

靶标	zSSIIb 基因拷贝数测量结果				59122 拷贝数测量结果			
	测量值	平均值	SD	RSD (%)	测量值	平均值	SD	RSD (%)
58	2096.42	2063.51	130.13	6.31	1084.63	1045.61	61.50	5.88
	2174.03				974.71			
	1920.08				1077.48			
60	1839.58	1860.44	42.77	2.30	1023.22	1029.70	10.36	1.01
	1832.1				1024.23			
	1909.64				1041.64			
62	1876.38	2037.73	142.54	7.00	916.76	968.10	48.50	5.01

靶标	<i>zSSIb</i> 基因拷贝数测量结果				59122 拷贝数测量结果			
退火温度 (°C)	测量值	平均值	SD	RSD (%)	测量值	平均值	SD	RSD (%)
	2146.56				974.4			
	2090.25				1013.15			

数字 PCR 扩增结果显示：在 60°C 退火温度下，59122 玉米转化体特异性序列、*zSSIb* 基因阴阳微滴的阴阳液滴分界清晰，没有难以界定的“下雨”现象；进一步对测试数据进行分析可以发现，在 60°C 时，相同模板重复之间的标准偏差最小（表 140）。因此，确定 *zSSIb* 基因和 59122 转化体特异性序列引物探针最优退火延伸温度为 60°C。经过优化后 *zSSIb* 基因和 59122 转化体特异性序列数字 PCR 扩增程序为：95°C 预变性 10 min；94°C 变性 30 s，60°C 退火延伸 60 s，共进行 50 个循环；98°C 变性 10 min，4°C 保存（升降温速率 2°C/s）。

PCR 扩增体系中仅选择引物探针浓度进行优化测试。参考发表论文，上述引物探针终浓度设置了 3 组 *zSSIb* 基因和 59122 转化体特异性序列引物：探针终浓度进行测试。

表 141 数字 PCR 引物探针浓度优化扩增数据分析

靶标引物：探针终浓度 (μmol/L)		<i>zSSIb</i> 基因				59122 拷贝数测量结果			
<i>zSSIb</i>	59122	测量值	平均值	SD	RSD	测量值	平均值	SD	RSD
0.6: 0.3	0.6: 0.3	1849.74	1911.82	118.69	6.21	910.17	1027.53	101.64	9.89
		2048.68				1086.29			
		1837.05				1086.13			
0.4: 0.2	0.4: 0.2	1854.73	2066.67	47.30	2.29	923.1	943.78	37.89	4.01
		2020.9				1078.75			

靶标引物：探针 终浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )		<i>zSSIb</i> 基因				59122 拷贝数测量结果			
<i>zSSIb</i>	59122	测量值	平均值	SD	RSD	测量值	平均值	SD	RSD
		2030.7				921.53			
0.8: 0.4	0.8: 0.4	2016.64	1968.78	98.89	5.02	914.9	974.46	90.32	9.27
		2110.65				986.68			
		2072.73				929.76			

数字 PCR 扩增结果显示：扩增图谱中 *zSSIb* 基因和 59122 转化体特异性序列在不同的引物探针浓度下，微滴的荧光强度存在较显著差异，随着引物探针浓度降低，阳性微滴信号出现降低；进一步对测试数据进行分析可以发现，在 *zSSIb* 基因和 59122 转化体特异性序列引物：探针终浓度分别为 0.4: 0.2  $\mu\text{mol/L}$  和 0.4: 0.2  $\mu\text{mol/L}$  时，相同模板测定的重复之间的标砖偏差较小（表 141）。因此，确定 *zSSIb* 基因和 59122 转化体特异性序列最优引物：探针终浓度分别为 0.4: 0.2  $\mu\text{mol/L}$  和 0.4: 0.2  $\mu\text{mol/L}$ 。

#### 26.4 59122/*zSSIb* 二重 ddPCR 的 LOD、LOQ 和动力学范围测试

微滴式数字 PCR 的理论有效线性范围是 1~100000 个拷贝，实际测试时，20  $\mu\text{L}$  反应液在微滴生成仪中一般生成 10000~20000 个有效微滴，微滴数大于 10000 为有效反应。为了测试 *zSSIb* 基因和 59122 转化体特异性序列数字 PCR 方法的线性范围，将 59122 玉米基因组 DNA 进行梯度稀释制作成 8 个浓度的标准品，按确定的扩增条件进

行 *zSSIb* 基因和 59122 转化体特异性序列数字 PCR 扩增，每个梯度扩增设置 3 个平行。根据测量值及初始模板拷贝数分别绘制 *zSSIb* 基因和 59122 转化体特异性序列的线性回归曲线进行线性范围分析，对 3 个平行间 *zSSIb* 基因和 59122 转化体特异性序列测量值以及拷贝数比值的标准偏差和相对标准偏差进行数据统计，评价 *zSSIb* 基因和 59122 转化体特异性序列数字 PCR 方法的重复性。根据《转基因植物及其产品成分检测 数字 PCR 方法制定指南》（农业农村部公告第 323 号—21—2020）中定量检测的要求，在整个线性动态范围内，线性度即线性回归方程的决定系数  $R^2$  一般应  $\geq 0.98$ ，正确度偏差（*Bias*）不超过标称值的 25%，精密度即重复性相对标准偏差（*RSD*）一般应  $\leq 25\%$ 。

表 142 59122 玉米特异性序列数字 PCR 线性动态范围与重复性分析

靶标	预期拷贝数/ 反应	测定拷贝数/反应				标准偏差	相对标准偏差 (%)	正确度 偏差 (%)
		重复 1	重复 2	重复 3	平均值			
<i>zSSIb</i>	20000	19834.27	19850.63	20194.07	19959.66	203.17	1.02	-0.20
	5000	4921	4937.55	4941	4933.18	10.69	0.22	-1.34
	1000	1023.69	1025.34	991.64	1013.56	19.00	1.87	1.36
	200	185.01	209.2	210.38	201.53	14.32	7.11	0.76
	100	103.33	103.29	98.27	101.63	2.91	2.86	1.63
	20	13	20.01	16.01	16.34	3.52	21.52	-18.30
	10	4	8	13	8.33	4.51	54.11	-16.67
	1	/	/	/	/	/	/	/
59122	10000	10030.78	10313.7	10049.8	10131.43	158.14	1.56	1.31
	2500	2461.21	2450	2507.32	2472.84	30.38	1.23	-1.09
	500	481.41	508.02	463.09	484.17	22.59	4.67	-3.17

靶标	预期拷贝数/ 反应	测定拷贝数/反应				标准偏差	相对标准偏差 (%)	正确度 偏差 (%)
		重复 1	重复 2	重复 3	平均值			
	100	113.38	98.27	99.31	103.65	8.44	8.14	3.65
	50	46.07	42.05	58.1	48.74	8.35	17.13	-2.52
	10	10.1	12.6	13.1	11.93	1.61	13.47	19.33
	5	4	2	5	3.67	1.53	41.66	-26.67
	1	/	/	/	/	/	/	/

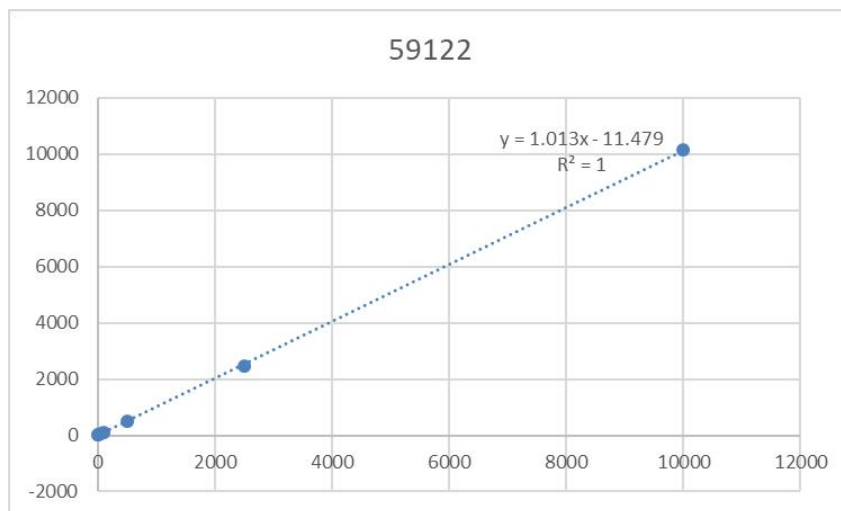
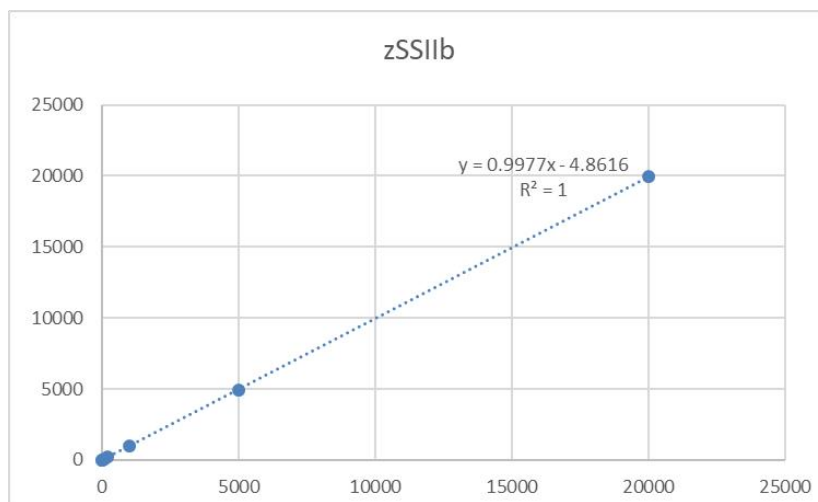


图 121 59122/zSSIb 二重数字 PCR 方法线性动态范围测试

注： y 代表拷贝数测量值， x 代表拷贝数预期值

结果显示：59122 转化体特异性序列和 *zSSIIb* 基因拷贝数重复间正确度偏差 (*Bias*) 和重复性相对标准偏差 (*RSD*) 均小于 25%，当 DNA 浓度低至 1 拷贝，3 个平行中没有检测到阳性信号，其余均无阳性微滴，因此定量极限 (LOQ) 确定为 10 个拷贝 (59122 转化体特异性序列)，检测极限 (LOD) 确定为 10 拷贝 (59122 转化体特异性序列) (表 142)；

59122 转化体特异性序列和 *zSSIIb* 基因微滴数字 PCR 获得的拷贝数浓度测量值与预期值具有良好的相关性，线性回归方程决定系数  $R^2$  值 > 0.098，符合要求 (图 121)。59122/*zSSIIb* 二重数字 PCR 方法线性动态范围测试结果表明，20  $\mu$ L 扩增体系中，当模板量在 59122 转化体特异性序列 10~20000 拷贝的范围内，可获得准确的拷贝数。

### 26.5 59122/*zSSIIb* 二重 ddPCR 的测量准确性

配制 4 个含 59122 基因组 DNA 盲样 (S1~S4)，59122/*zSSIIb* 拷贝数比值依次为 5.0%、3.0%、1.0%、0.5%。由不同的操作者在不同的日期用 59122/*zSSIIb* 二重 ddPCR 方法对 5 个盲样进行进行了 3 次测量。

表 143 4 个盲样的测量结果

重复	ddPCR 平行	盲样含量测量值			
		S1 (%)	S2 (%)	S3 (%)	S4 (%)
1	1	4.76	3.17	1.06	0.42
	2	4.82	2.95	1.05	0.48
	3	4.87	2.92	1.06	0.52

2	1	4.67	2.81	0.99	0.48
	2	4.90	2.95	1.02	0.48
	3	4.95	2.97	0.97	0.48
3	1	5.08	2.86	1.07	0.47
	2	5.06	3.13	1.04	0.47
	3	5.22	2.94	1.01	0.51

表 144 4 个盲样定量结果的重复性和重现性统计分析

盲样	预期拷贝数比值 (%)	测量平均值 (%)	Sr (%)	RSDr (%)	SR (%)	RSDR (%)
S1	5.0	4.93	0.10	2.13	0.19	3.84
S2	3.0	2.97	0.12	4.15	0.12	4.15
S3	1.0	1.03	0.02	2.22	0.04	3.67
S4	0.5	0.48	0.03	6.68	0.03	6.68

二重 ddPCR 的定量结果如表 143 所示，计算得到 4 个盲样 59122/zSSI***b*** 拷贝数比值的平均值，统计测量结果的重复性相对标准差 ( $RSD_r$ )、重现性相对标准差 ( $RSD_R$ )、和相对偏倚 ( $Bias$ )。结果显示，测量平均值均接近预期含量，与预期值的相对偏倚在  $\pm 25\%$  的可接受范围内；重复性相对标准偏差  $RSD_r$  和再现性相对标准偏差  $RSD_R$  均小于 25% (表 144)。已建立的 59122/zSSI***b*** 二重 ddPCR 实现了对样品中 59122 转化体含量的准确定量，具有良好的重复性和重现性。

## 27. MON87460/zSSI***b*** 二重数字 PCR 方法

## 28. MON89034/zSSIIb 二重数字 PCR 方法

### 28.1 数字 PCR 引物探针优化

经资料查阅后，本实验参考欧盟标准 QT-EVE-ZM-018、GB/T 19495.4-201、GB/T 19495.5-2018、SN/T1204-2016 和文献，并自行设计两组引物探针，对以上三组引物探针进行优化，引物探针具体信息见表 145。

表 145 转基因玉米 MON89034 PCR 检测引物探针序列信息

名称	引物探针序列 (5' - 3')	扩增子 (bp)	来源
组合 1	F1 TTCTCCATATTGACCATCATACTCATT	77	欧盟标准 <sup>[1]</sup> 、国家标准 <sup>[2-4]</sup> 、文献 <sup>[5,6]</sup>
	R1 CGGTATCTATAATACCGTGGTTTTTAAA		
	P1 FAM-ATCCCCGAAATTATGTT-BHQ1		
组合 2	F2 TGC GGACATCTACATTTTTGAATTG	98	自行设计
	R2 AACACGGTATCTATAATACCGTGGT		
	P2 FAM-CATACTCATTGCATCCCCGAAATTATGTT-BHQ1		
组合 3	F3 ACGCTGCGGACATCTACATT	105	自行设计
	R3 ACGGTATCTATAATACCGTGGTT		
	P3 FAM-ACCATCATACTCATTGCATCCCCGAAATT-BHQ1		

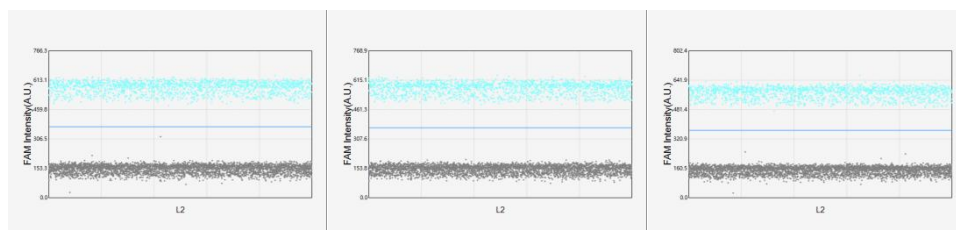
三组引物探针的扩增 PCR 结果见表 146 和如图 122 所示，F1/R1/P1 组合的拷贝数最高，组内 RSD 最小，阳性微滴荧光条带与阴性微滴条带分离明显，中间雨滴较少，因此实验确定了 F1/R1/P1 引物探针组合。

表 146 不同引物探针扩增结果

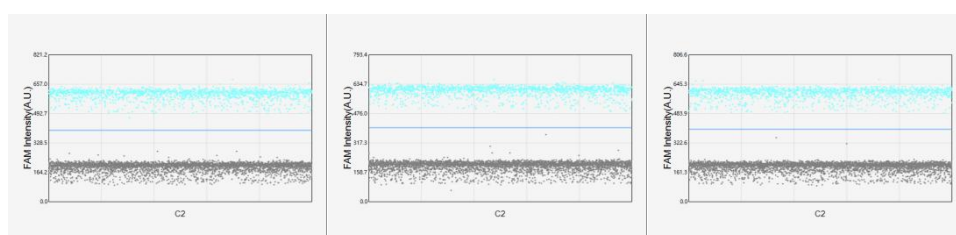
组合	拷贝数			平均数	RSD
	重复 1	重复 2	重复 3		
组合 1	2214.10	2194.07	2196.12	2201.43	0.50%

组合 2	2149.18	2106.04	2067.28	2107.50	1.94%
组合 3	2128.93	2160.94	2153.94	2147.94	0.78%

组合 1



组合 2



组合 3

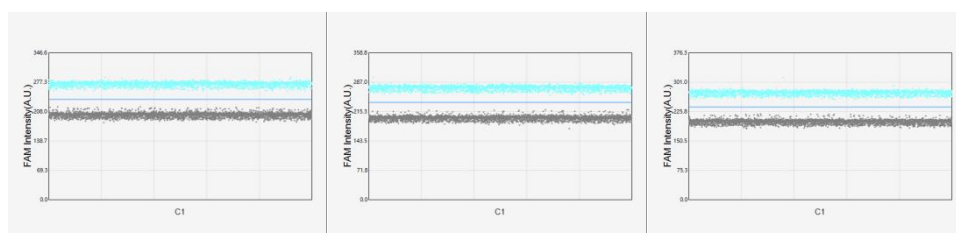


图 122 不同引物探针扩增一维图

目前国内多种应用场景均选用的是欧盟标准 QT-EVE-ZM-018<sup>[1]</sup>中提供的 MON89034 转化体引物探针组合的检测方法。因此，本实验对参考欧盟标准 QT-EVE-ZM-018 中提供的 MON89034 转化体引物探针组合的检测方法进行 qPCR 验证，同时选取 *zSSI1b* 玉米内标基因作为内参基因，结果表明欧盟标准 QT-EVE-ZM-018 的引物探针可行性良好，结果见表 147 欧盟标准 QT-EVE-ZM-018 引物探针可行性验证结果

表 147 欧盟标准 QT-EVE-ZM-018 引物探针可行性验证结果

重复	内标准基因 <i>zSSIb</i> ( <i>Ct</i> 值)			MON89034 转化体 ( <i>Ct</i> 值)		
	MON89034 (+)	MON89034 (-)	MON89034 (+)	MON89034 (+)	MON89034 (-)	MON89034 (+)
	35 ng/ $\mu$ L	35 ng/ $\mu$ L	5 ng/ $\mu$ L	35 ng/ $\mu$ L	35 ng/ $\mu$ L	5 ng/ $\mu$ L
1	24.54	24.30	27.49	29.12	N/A	31.09
2	24.65	24.19	27.38	28.55	N/A	30.72
3	24.72	24.25	27.34	28.12	N/A	30.90
均值	24.64	24.24	27.40	28.60	N/A	30.90

对转基因玉米 MON89034 转化体特异性引物进行数字 PCR 方法建立, 参考欧盟标准 QT-EVE-ZM-018 中提供的 MON89034 转化体引物探针组合, 在迈克生物 D 600 数字 PCR 分析系统上进行方法建立, 如下表 148。

表 148 数字 PCR 方法中试剂和仪器信息

试剂	终浓度	20K 模式-每反应体 积	5K 模式-每反应体 积
ddH <sub>2</sub> O		—	—
mix	1×	12.5 $\mu$ L	5 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 上游引物	0.4 $\mu$ mol/L	1.00 $\mu$ L	0.40 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 下游引物	0.4 $\mu$ mol/L	1.00 $\mu$ L	0.40 $\mu$ L
10 $\mu$ mol/L 探针	0.2 $\mu$ mol/L	0.50 $\mu$ L	0.20 $\mu$ L
DNA 模板	- ng	—	—
总体积		25 $\mu$ L	10 $\mu$ L

## 28.2 数字 PCR 退火温度优化

退火温度是数字 PCR 实验中很关键的影响因素，温度过低会影响引物和探针与模板的结合效率，温度过高会影响微滴的扩增效率，同时退火温度的高低对微滴下雨现象有显著的影响。实验设置了 56°C、58°C、60°C 和 62°C 进行退火温度的优化，仪器实验选取 5K 模式，4 次重复，模板 10 ng-MON89034(+) 基因组 DNA，反应程序如表 149。根据 PCR 结果，不同退火温度下定量结果存在较明显差异（图 123 数字 PCR 引物和探针浓度组合-退火温度优化结果）。结果比较发现，退火温度为 58°C 时，扩增后拷贝数最高为 2376，且下雨现象较弱，因此实验选择 58°C 退火温度。

表 149 数字 PCR 退火温度优化反应程序

步骤	温度 (°C)	时间	循环数
1	58	2 min	1
2	95	10 min	1
3	95	15 sec	45
4	56/58/60/62	1 min	

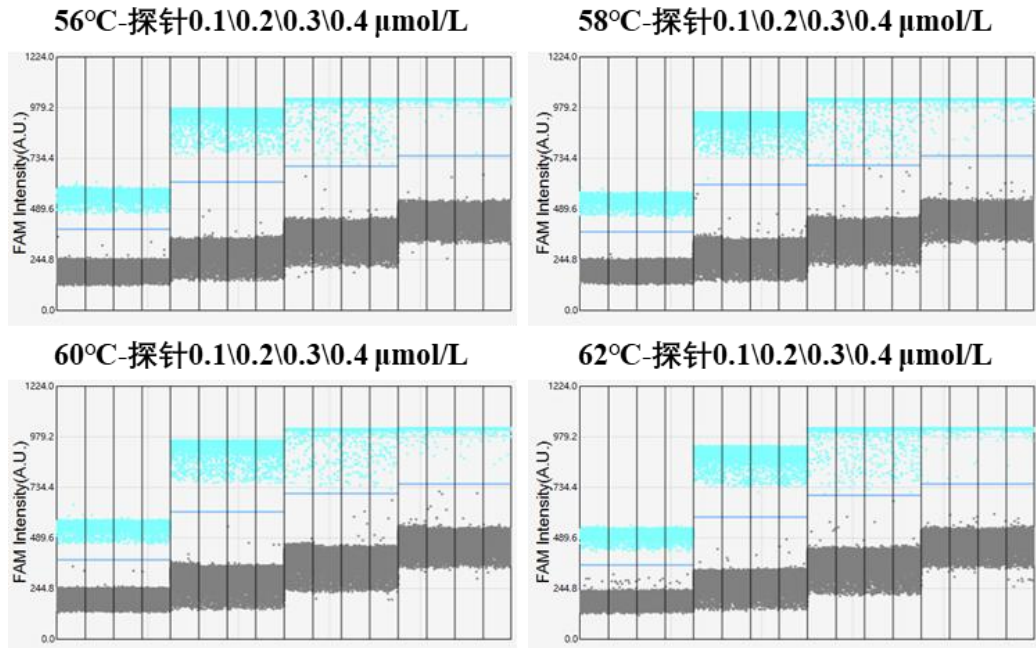


图 123 数字 PCR 引物和探针浓度组合-退火温度优化结果

### 28.3 数字 PCR 引物探针浓度

影响数字 PCR 检测结果的关键因素之一是引物探针的浓度，浓度过低会导致拷贝数降低，浓度多高会导致 PCR 反应抑制。实验设置了引物/探针浓度的不同组合，如表 150 所示。通过引物/探针几种浓度配比进行数字 PCR，优化反应体系中引物/探针的终浓度。根据数字 PCR 反应结果，选择了微滴荧光强度最高的引物探针终浓度比 2:1 (0.4 : 0.2)。

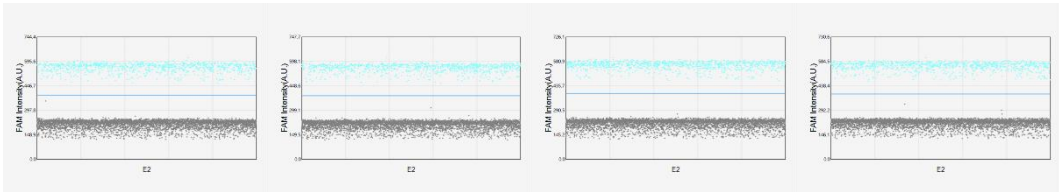
表 150 数字 PCR 引物和探针浓度组合-退火温度优化结果

退火温度	引物终浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )	探针终浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )	数字 PCR 结果				平均值
			1	2	3	4	
56°C	0.2	0.1	2201.80	2187.40	2303.20	2246.40	2234.70
	0.4	0.2	2315.60	2161.70	2296.00	2287.50	2265.20
	0.6	0.3	2314.90	2391.30	2298.40	2156.80	2290.35
	0.8	0.4	2254.70	2273.30	2152.40	2183.70	2216.03

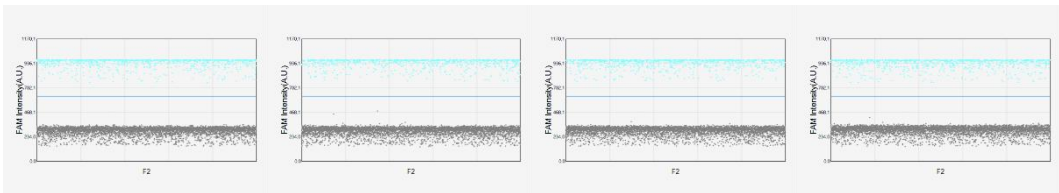
58°C	0.2	0.1	2192.10	2320.30	2351.70	2245.90	2277.50
	0.4	0.2	2328.60	2514.70	2326.30	2338.30	2376.98
	0.6	0.3	2360.60	2282.80	2365.30	2199.20	2301.98
	0.8	0.4	2405.30	2282.80	2314.10	2196.80	2299.75
60°C	0.2	0.1	2335.50	2201.20	2350.70	2426.80	2328.55
	0.4	0.2	2367.10	2242.70	2324.00	2252.10	2296.48
	0.6	0.3	2298.70	2259.20	2413.30	2272.40	2310.90
	0.8	0.4	2344.10	2192.30	2309.40	2241.10	2271.73
62°C	0.2	0.1	2200.40	2129.20	2190.50	2012.50	2133.15
	0.4	0.2	2296.30	2381.70	2228.70	2246.40	2288.28
	0.6	0.3	2294.40	2234.30	2345.30	2236.00	2277.50
	0.8	0.4	2232.50	2308.00	2212.40	2116.40	2217.33

具体每个条件的扩增反应结果图如下所示：

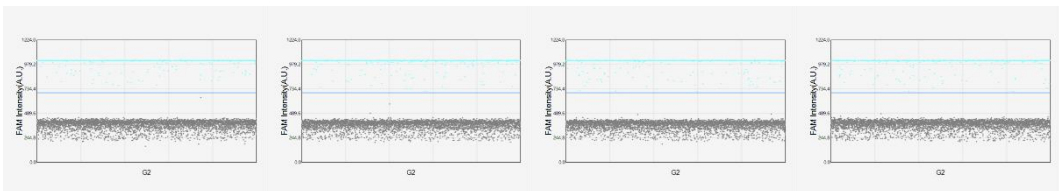
扩增图 56°C-探针 0.1 μmol/L:



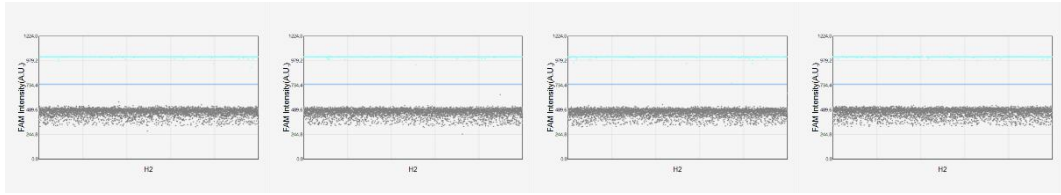
扩增图 56°C-探针 0.2 μmol/L:



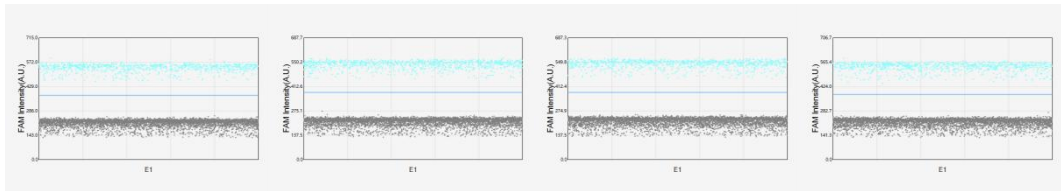
扩增图 56°C-探针 0.3 μmol/L:



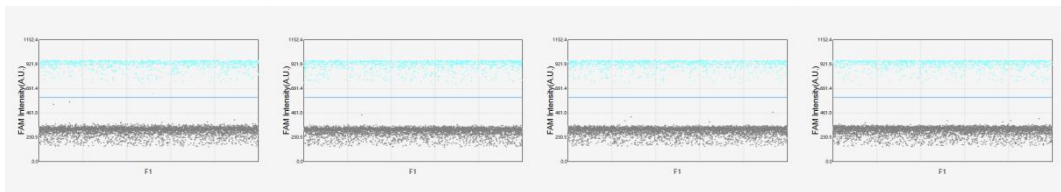
扩增图 56°C-探针 0.4 μmol/L:



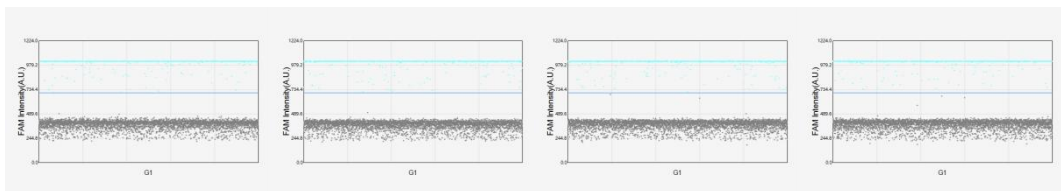
扩增图 58°C-探针 0.1 μmol/L:



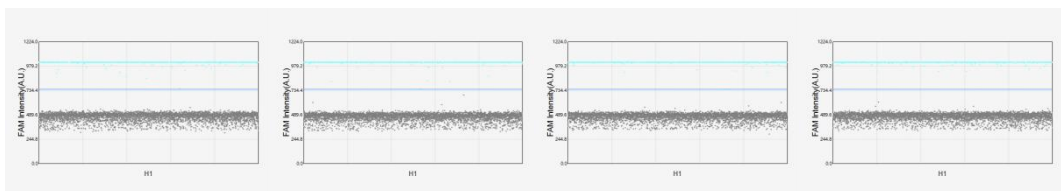
扩增图 58°C-探针 0.2 μmol/L:



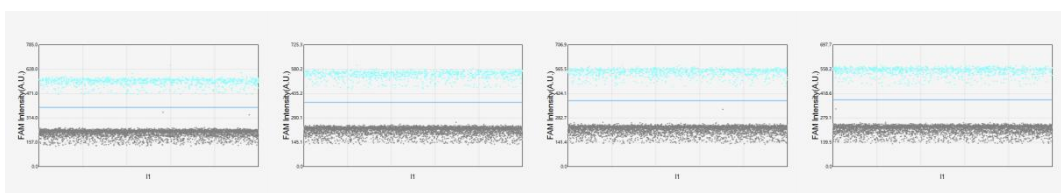
扩增图 58°C-探针 0.3 μmol/L:



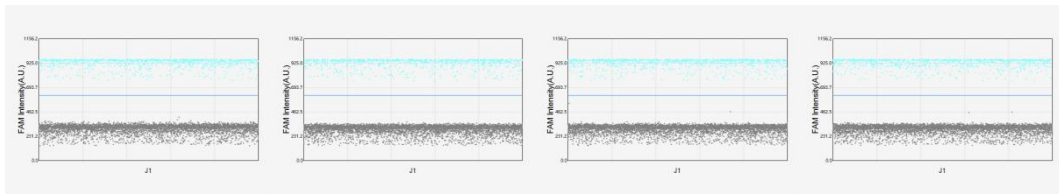
扩增图 58°C-探针 0.4 μmol/L:



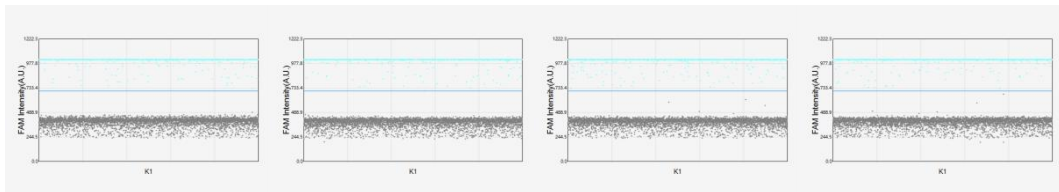
扩增图 60°C-探针 0.1 μmol/L:



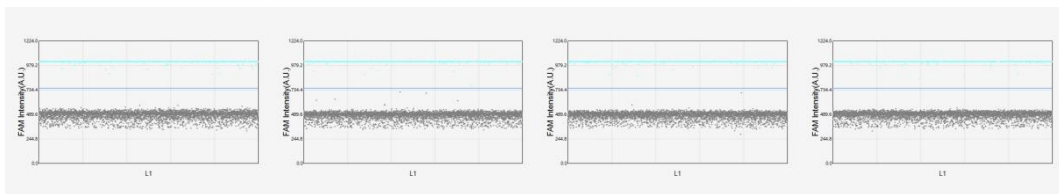
扩增图 60°C-探针 0.2 μmol/L:



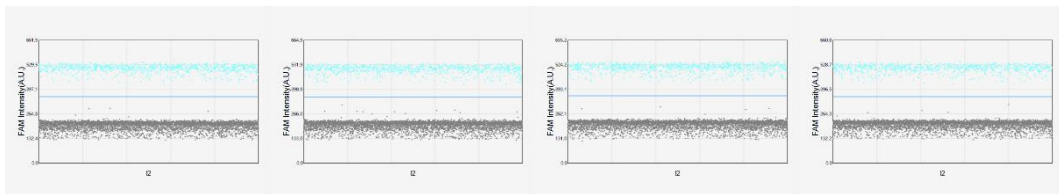
扩增图 60°C-探针 0.3 μmol/L:



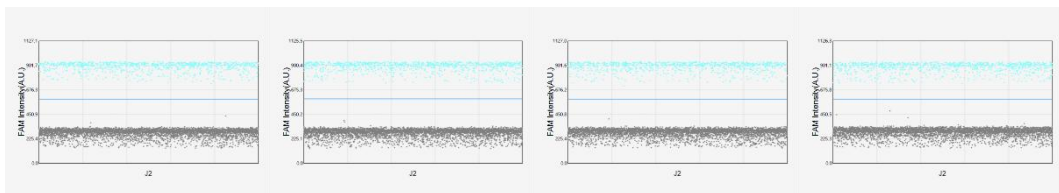
扩增图 60°C-探针 0.4 μmol/L:



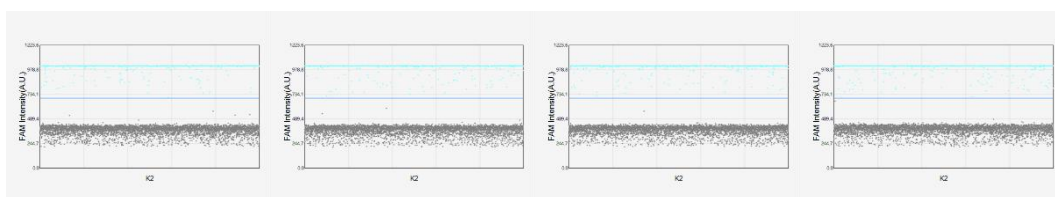
扩增图 62°C-探针 0.1 μmol/L:



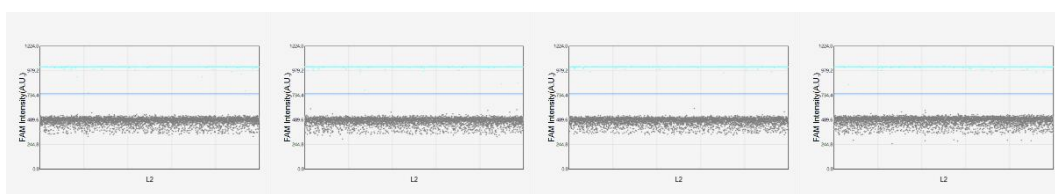
扩增图 62°C-探针 0.2 μmol/L:



扩增图 62°C-探针 0.3 μmol/L:



扩增图 62°C-探针 0.4 μmol/L:



## 28.4 线性测试

将转基因玉米 MON89034 基因组 DNA 进行梯度稀释，配置成 8 个浓度的样品，从 40000 copies/μL 稀释至 20000、10000、1000、100、40、20 和 10，每个 PCR 反应设置 3 个平行，利用优化好的数字 PCR 反应体系进行实验，结果数据见表 151，散点图见图 124。根据结果构建标准曲线（图 125），测量范围在 10-40000 copies/μL 之间具有良好的线性关系，拟合曲线方程为  $y=1.04x-0.873$ ， $R^2=0.9998$ 。该结果证明，构建的转基因玉米 MON89034 特异性数字 PCR 检测方法具有良好的线性范围。

表 151 数字 PCR 测量的线性结果

样品	数字 PCR 结果 拷贝数	平均值	SD	RSD %
40000 拷贝	41730.00	41332.73	445.58	1.08
	41417.25			
	40850.94			
20000 拷贝	20818.88	21054.25	225.74	1.07
	21268.94			
	21074.94			

10000 拷贝	10435.00	10262.75	156.22	1.52
	10223.00			
	10130.25			
1000 拷贝	1171.38	1116.42	87.83	7.87
	1015.13			
	1162.75			
100 拷贝	76.63	96.02	18.21	18.96
	98.69			
	112.75			
40 拷贝	40.13	44.15	9.74	22.06
	55.25			
	37.06			
20 拷贝	25.19	20.75	3.92	18.90
	17.75			
	19.31			
10 拷贝	11.75	8.88	2.91	32.75
	5.94			
	8.94			

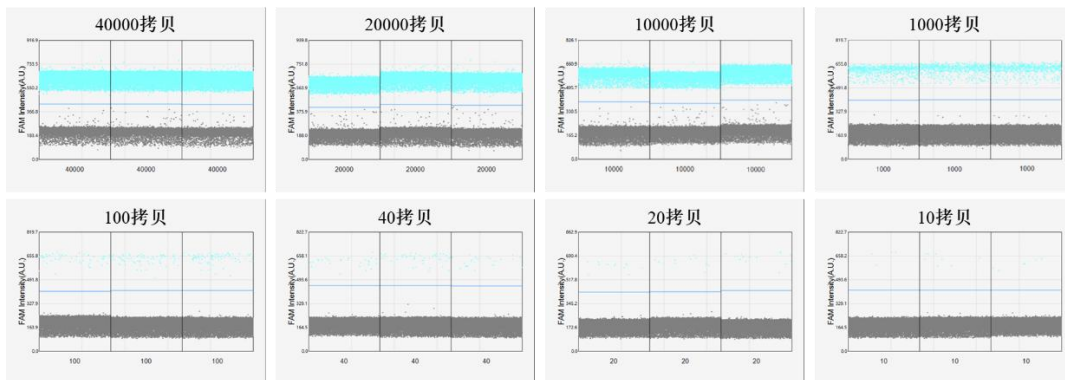


图 124 数字 PCR 线性定量结果

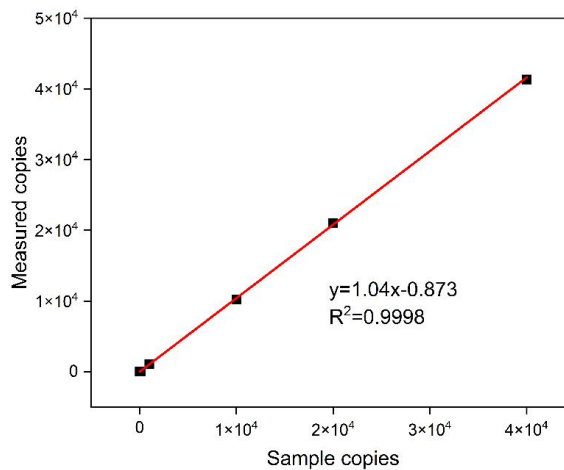


图 125 数字 PCR 标准曲线

## 28.5 特异性测试

以多种转基因玉米转化体(MON810、BT176、MON863、MIR604、MON88017、NK603、LY038、T25、59122)和空白对照,对 MON89034 方法特异性进行测试。利用优化好的数字 PCR 反应体系进行检测,检测结果表明(图 126),其它转化体中均未获得扩增微滴,表明建立的数字 PCR 方法具有很好的特异性。

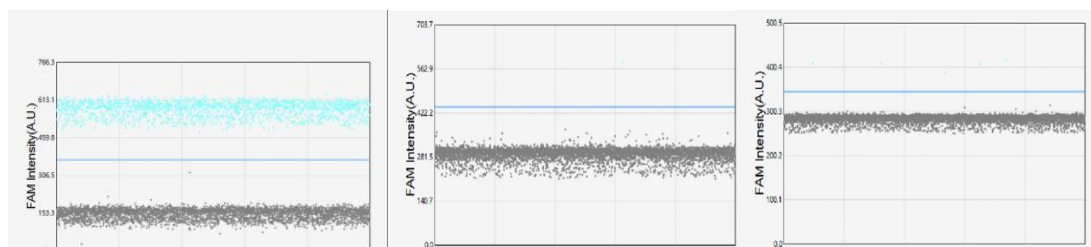


图 126 转基因玉米 MON89034 特异性检测结果散点图

(a 为阳性对照; b 为混样对照; c 为空白对照)

## 28.6 检出限测试

将转基因玉米 MON89034 基因组 DNA 进行梯度稀释至 10 拷贝,利用优化好的方法进行实验,平行进行 10 次,结果数据见表 152,散点图见图 127。当 DNA 浓度低至 10 copies/ $\mu$ L 时,阳性微滴在 5.75~23.25 copies/ $\mu$ L 之间,平均值为 10.05 copies/ $\mu$ L, RSD 为 61.22%,可以稳定的检测到阳性信号,证明 10 copies/ $\mu$ L 可以稳定检出。

表 152 MON89034 数字 PCR10 次重复检测结果

序号	数字 PCR 结果 拷贝数	平均数	SD	RSD %
1	23.25	10.05	6.15	61.22

2	11.75			
3	6.00			
4	6.00			
5	5.75			
6	6.00			
7	6.00			
8	6.00			
9	12.00			
10	17.75			

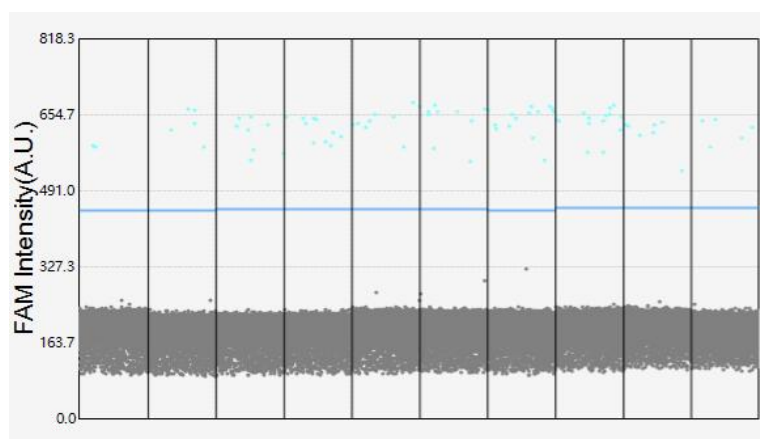


图 127 MON89034 数字 PCR10 次重复检出限散点结果

### 28.7 定量限测试

为测定该方法的定量限，将转基因玉米 MON89034 基因组 DNA 进行梯度稀释至 20 拷贝，利用优化好的方法进行实验，平行进行 10 次，结果数据见表 153，散点图见图 128。当 DNA 浓度低至 20 copies/ $\mu\text{L}$  时，阳性微滴在 15.75~29.50 copies/ $\mu\text{L}$  之间，平均值为 19.04 copies/ $\mu\text{L}$ ，RSD 为 21.7%，可以稳定的检测到阳性信号，且 RSD 小于 25%，因此确定定量限为 20 copies/ $\mu\text{L}$ 。

表 153 MON89034 数字 PCR10 次重复定量限检测结果

序号	数字 PCR 结果 拷贝数	平均数	SD	RSD %
----	------------------	-----	----	-------

序号	数字 PCR 结果 拷贝数	平均数	SD	RSD %
1	29.50	19.04	4.13	21.70
2	17.75			
3	16.75			
4	18.74			
5	16.00			
6	15.75			
7	18.75			
8	17.75			
9	17.00			
10	22.38			

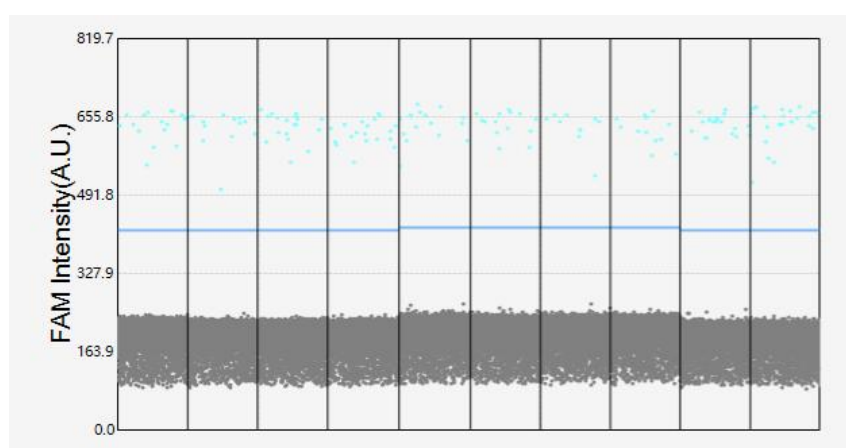


图 128 MON89034 数字 PCR10 次重复定量限散点结果

## 28.8 结论

构建了针对转基因玉米 MON89034 转化体特异性数字 PCR 检测方法，反应体系为  $1 \times$  迈克 mix， $5 \mu\text{L}$ ，上游引物  $0.4 \mu\text{mol/L}$ ，下游引物  $0.4 \mu\text{mol/L}$ ，探针  $0.2 \mu\text{mol/L}$ ，DNA 模板  $50\text{ng}$ ，最后用 ddH<sub>2</sub>O 补齐至总体积  $10\mu\text{L}$ ；反应程序为  $58^\circ\text{C}$ ，2 分钟； $95^\circ\text{C}$  变性 10 分钟； $95^\circ\text{C}$  变性 15 秒， $58^\circ\text{C}$  退火延伸 1 分钟，45 个循环。在最优条件下，该方法在  $10\text{-}40000 \text{ copies}/\mu\text{L}$  的范围内具有良好的线性关系，拟合曲

线  $y=1.04x-0.873$ ,  $R^2$  达到了 0.9998, 检测限可以达到 10 copies/ $\mu$ L, 定量限为 20 copies/ $\mu$ L。

## 29. MON88017/*zSSIb* 二重数字 PCR 方法

### 29.1 引物探针确认

MON88017 是孟山都（现属拜耳）开发的抗虫耐草甘膦双价转基因玉米品种。MON88017 转化体特异性引物探针和玉米内标准基因 *zSSIb* 引物探针选用已发布的标准方法（GB/T 19495.4—2018 和农业农村部公告第 423 号—9—2021）中的实时荧光 PCR 方法引物探针。

表 154 MON88017 转化体特异性引物和探针序列

靶标	引物/探针名称及序列 (5'-3')	扩增片段大小 (bp)	来源
<i>zSSIb</i> 基因	<i>zSSIb</i> -qF: CGGTGGATGCTAAGGCTGATG	88	农业农村部公告第 423 号—9—2021
	<i>zSSIb</i> -qR: AAAGGCCAGGTTTCATTATCCTC		
	<i>zSSIb</i> -qP: HEX-TAAGGAGCACTCGCCGCCGCATCTG-BHQ1		
MON88017 转化体	MON88017-qF: GAGCAGGACCTGCAGAAGCT	95	GB/T 19495.4—2018
	MON88017-qR: TCCGGAGTTGACCATCCA		
	MON88017-qP: FAM-TCCCCGCTTCAGTTTAAACAGAGTCGGGT-BHQ1		

在伯乐微滴式数字 PCR 平台 QX200 上, 用通用的 PCR 反应体系 (引物/探针浓度 400/200 nM) 和退火温度 (60°C), 以 MON88017 杂合体基因组 DNA 为模板, 进行 MON88017 转化体/*zSSIb* 基因的二重 ddPCR 扩增, 对表 154 中的引物探针组合进行测试, 设 3 个平行反应。

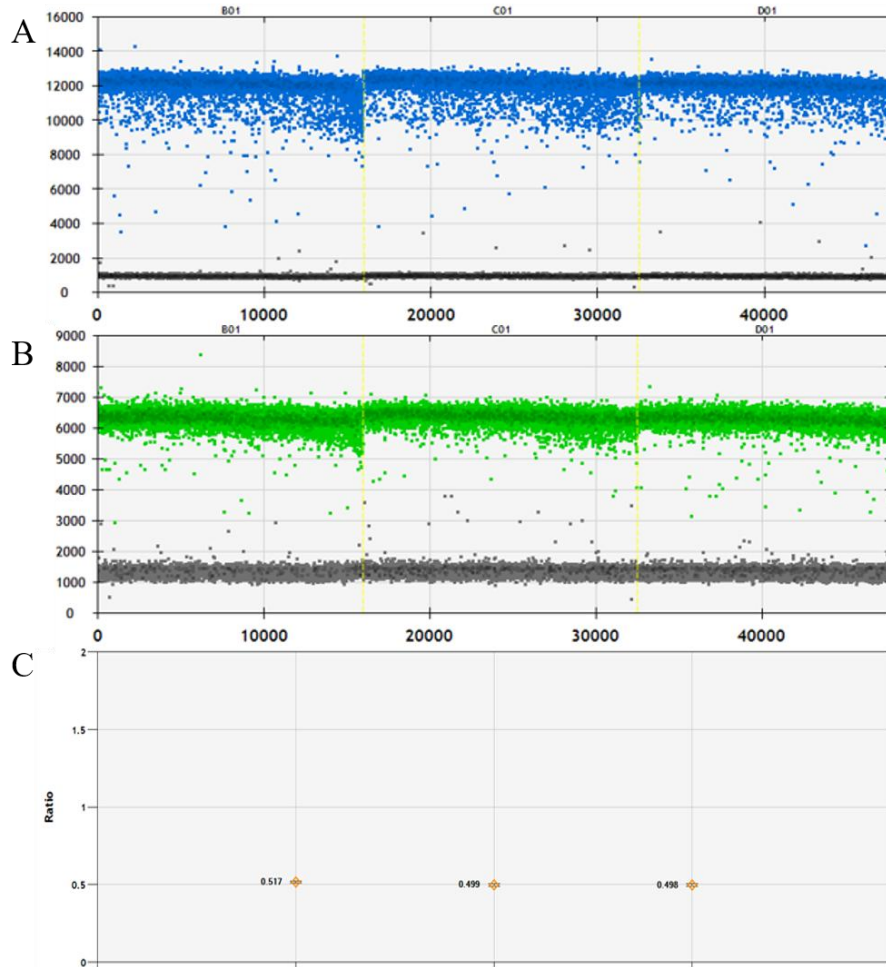


图 129 数字 PCR 引物探针确认

注：A 为 MON88017 玉米转化体特异性序列一维微滴图谱；B 为 *zSSIb* 基因一维微滴图谱，C 为 MON88017 转化体和 *zSSIb* 基因拷贝数比值。

结果显示,MON88017 转化体和 *zSSIb* 基因二重微滴式数字 PCR 的一维微滴图谱 (1-D) 的阴性微滴和阳性微滴分界清晰,“雨滴”较少 (图 129A, B); MON88017 转化体和 *zSSIb* 基因拷贝数比值接近 0.5, 符合杂合体 MON88017 玉米分子特征 (图 129C)。综上, 确认表 145 的引物探针适用 MON88017 转化体/*zSSIb* 基因的二重 ddPCR 扩增。

## 29.2 MON88017/*zSSIb* 二重微滴数字 PCR 特异性测试

用转基因玉米 MON88017、其他转基因玉米混合样（瑞丰 125、瑞丰 8、T25、MIR604、NK603、MON87427、DBN9936、DBN9858、DBN9501）、转基因大豆混合样（DBN9004、MON89788、MON87751、CAL16、中黄 6106、DBN8205）、转基因水稻混合样（TT51-1、KF-6、KMD、G6H1、T1C-19、T2A-1）、转基因油菜混合样（MS1、MS8、RF1、RF2、RF3、T45、Oxy-235、Topas19/2、MON88302、73496）、转基因棉花混合样（MON1445、MON531、MON15985、LLCOTTON25、MON88913、GHB614、COT102）、非转基因玉米基因组 DNA 作模板进行 MON88017 和 *zSSIb* 二重 ddPCR 扩增，用水做空白对照，测试 MON88017 转化体和 *zSSIb* 二重 ddPCR 方法的特异性。

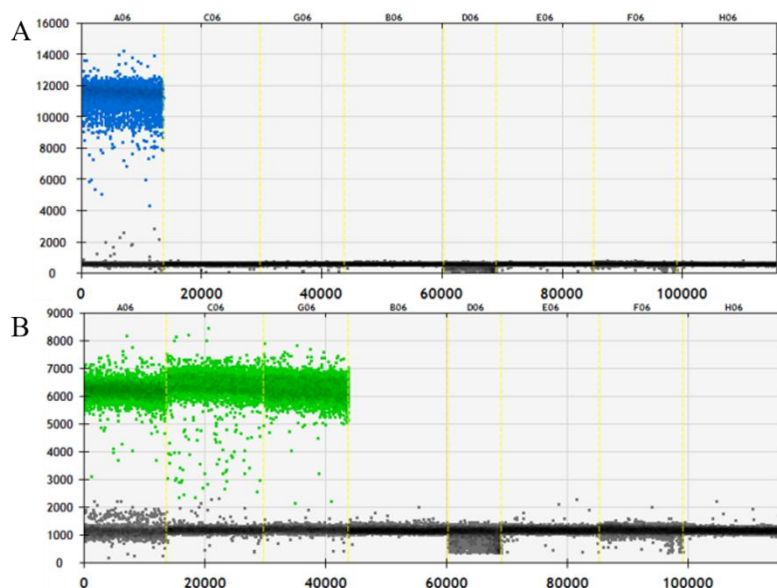


图 130 MON88017/*zSSIb* 二重 ddPCR 特异性测试扩增图谱（一维）

注：A 为 MON88017 转化体特异性序列；B 为 *zSSIb* 基因；1 为转基因玉米 MON88017，2 为其他转基因玉米混合样，3 为非转基因玉米，4 为转基因水稻混合样，5 为转基因油菜混合样，6 为转基因棉花混合样，7 为转基因大豆混合样，8 为空白对照

结果显示，*zSSIb* 基因 ddPCR 在玉米样品中扩增得到阳性微滴，在其他作物和空白对照中不能扩增得到阳性微滴；MON88017 转化体特异性序列 ddPCR 仅在转基因玉米 MON88017 样品中扩增得到阳性微滴，在其他转基因玉米品种和空白对照中不能扩增得到阳性微滴，结果表明 MON88017/*zSSIb* 二重 ddPCR 方法有良好的特异性（图 130）。

### 29.3 MON88017/*zSSIb* 二重数字 PCR 的条件优化

本项目设置了 63.0°C、62.4°C、61.4°C、59.9°C、58.1°C、56.5°C、55.6°C、55.0°C 八个温度梯度，测试 MON88017 和 *zSSIb* 基因二重 ddPCR 的扩增效果。结果表明：PCR 扩增程序中退火温度在 56°C~63.0°C 间对阴阳性微滴区分基本无影响。

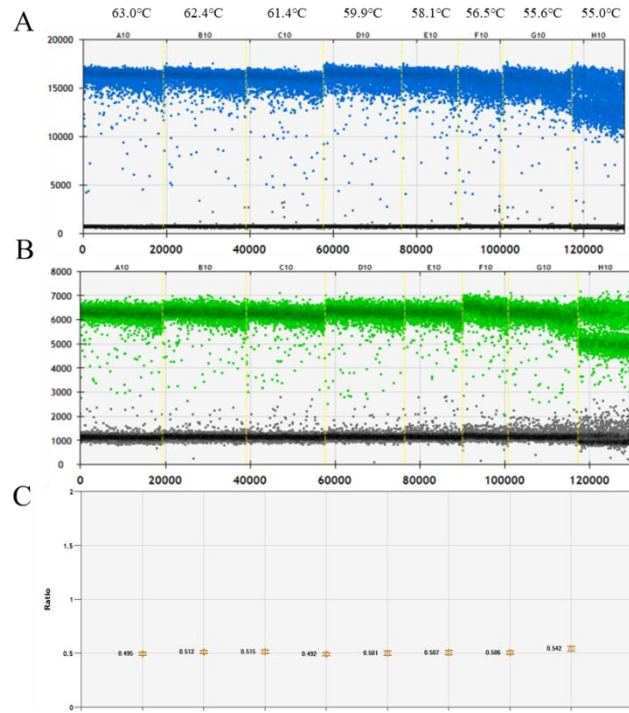


图 131 数字 PCR 引物探针退火温度优化扩增图谱

注：A 为 MON88017 玉米转化体特异性序列一维微滴图谱；B 为 zSSIb 基因一维微滴图谱，C 为 MON88017 转化体和 zSSIb 基因拷贝数比值。

表 155 数字 PCR 引物探针退火温度优化扩增数据分析

靶标	zSSIb 基因拷贝数测量结果				MON88017 拷贝数测量结果				MON88017: zSSIb 拷贝数 平均值比值
	测量值	平均值	SD	RSD	测量值	平均值	SD	RSD	
63.0	16580	16330	353.55	2.17	8220	8120	141.42	1.74	0.50
	16080				8020				
62.4	16600	16780	254.56	1.52	8500	8530	42.43	0.50	0.51
	16960				8560				
61.4	16840	16520	452.55	2.74	8680	8400	395.98	4.71	0.51
	16200				8120				
59.9	16300	16480	254.56	1.54	8020	8090	98.99	1.22	0.49
	16660				8160				
58.1	16020	16140	169.71	1.05	8020	8110	127.28	1.57	0.50
	16260				8200				
56.5	17000	16740	367.70	2.20	8620	8430	268.70	3.19	0.50
	16480				8240				
55.6	16160	17250	1541.49	8.94	8180	7950	325.27	4.09	0.46

靶标	<i>zSSIb</i> 基因拷贝数测量结果				MON88017 拷贝数测量结果				MON88017: <i>zSSIb</i> 拷贝数 平均值比值
	测量值	平均值	SD	RSD	测量值	平均值	SD	RSD	
退火 温度 (°C)	18340				7720				
55.0	15680 16040	15860	254.56	1.61	8500 8060	8280	311.13	3.76	0.52

数字 PCR 扩增结果显示：扩增图谱中 *zSSIb* 基因和 MON88017 转化体特异性序列引物探针在 63.0°C、62.4°C、61.4°C、59.9°C、58.1°C、56.5°C、55.6°C、55.0°C 八个退火温度下，MON88017 玉米转化体特异性序列阳性微滴的荧光强度随温度升高无显著差异，*zSSIb* 基因阴阳微滴的荧光强度无显著差异，阴阳液滴分界清晰，没有难以界定的“下雨”现象（图 131），在 56°C~63.0°C 时，拷贝数比值都接近理论值 0.5，RSD 较小（表 155）。因此，*zSSIb* 基因和 MON88017 转化体特异性序列引物探针最优退火延伸温度选择范围较宽，范围为 56°C~63.0°C。因此，*zSSIb* 基因和 MON88017 转化体特异性序列数字 PCR 扩增程序可以同通用荧光 PCR 扩增程序一致，即：95°C 预变性 10 min；94°C 变性 30 s，60°C 退火延伸 60 s，共进行 50 个循环；98°C 变性 10 min，4°C 保存（升降温速率 2°C/s）。

## 29.4 数字 PCR 扩增体系优化

由于微滴式数字 PCR 平台 Bio-Rad QX200 需使用专用的扩增试剂，PCR 扩增体系中仅选择引物探针浓度进行优化测试。实时荧光 PCR 方法中常用引物与探针终浓度分别为 0.4 μmol/L 和 0.2 μmol/L，

Bio-Rad 2×ddPCR™ Supermix for Probes 的说明书引物与探针的终浓度分别为 0.9 μmol/L 和 0.25 nmol/L。参考上述引物探针终浓度设置了 8 组 *zSSIb* 基因和 MON88017 转化体特异性序列引物：探针终浓度进行测试。

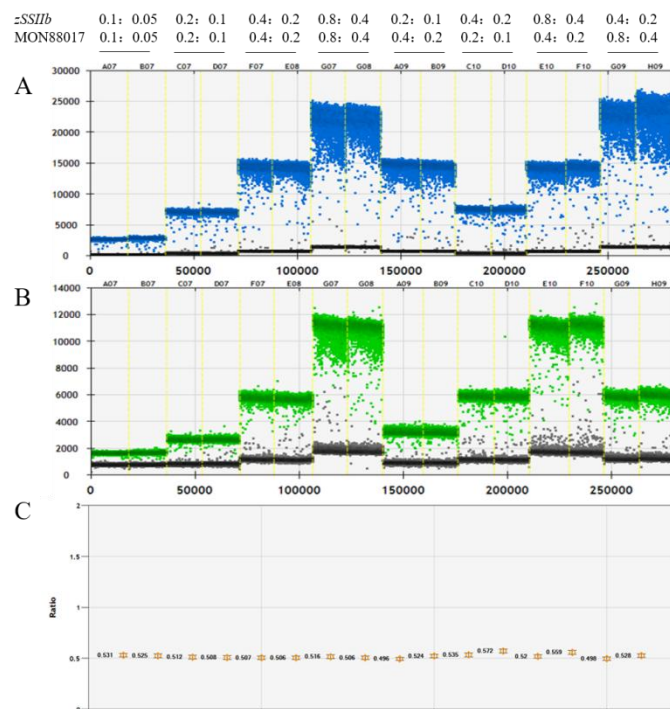


图 132 数字 PCR 引物探针浓度优化扩增图谱

注：A 为 MON88017 玉米转化体特异性序列一维微滴图谱；B 为 *zSSIb* 基因一维微滴图谱；C 为 MON88017 转化体和 *zSSIb* 基因拷贝数比值。

表 156 数字 PCR 引物探针浓度优化扩增数据分析

靶标引物：探针终浓度 (μmol/L)		<i>zSSIb</i> 基因拷贝数测量结果				MON88017 拷贝数测量结果				MON88017: <i>zSSIb</i> 拷贝数 平均值比值
<i>zSSIb</i>	MON88017	测量值	平均值	SD	RSD	测量值	平均值	SD	RSD	
0.1: 0.05	0.1: 0.05	16440	16540	141.42	0.86	8740	8795	77.78	0.88	0.53
		16640				8850				
0.2: 0.1	0.2: 0.1	16000	16240	339.41	2.09	8200	8290	127.28	1.54	0.51
		16480				8380				
0.4: 0.2	0.4: 0.2	16200	15860	480.43	3.03	8220	8040	254.56	3.17	0.51

靶标引物：探针 终浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )		<i>zSSIb</i> 基因拷贝数测量结果				MON88017 拷贝数测量结果				MON88017: <i>zSSIb</i> 拷贝数 平均值比值
<i>zSSIb</i>	MON88017	测量值	平均值	SD	RSD	测量 值	平均值	SD	RSD	
		15520				7860				
0.8: 0.4	0.8: 0.4	16300	16160	197.99	1.23	8420	8260	226.27	2.74	0.51
		16020				8100				
0.2: 0.1	0.4: 0.2	16680	17050	523.26	3.07	8280	8700	593.97	6.83	0.51
		17420				9120				
0.4: 0.2	0.2: 0.1	16460	15540	1301.08	8.37	8800	8580	311.13	3.63	0.55
		14620				8360				
0.8: 0.4	0.4: 0.2	16680	15590	1541.49	9.89	8660	8380	395.98	4.73	0.54
		14500				8100				
0.4: 0.2	0.8: 0.4	17280	16970	438.41	2.58	8600	8700	141.42	1.63	0.51
		16660				8800				

数字 PCR 扩增结果显示：扩增图谱中 *zSSIb* 基因和 MON88017 转化体特异性序列在不同的引物探针浓度下，微滴的荧光强度存在较显著差异，随着引物探针浓度降低，阳性微滴信号出现降低，在 *zSSIb* 基因和 MON88017 转化体特异性序列引物：探针终浓度分别为 0.4: 0.2  $\mu\text{mol/L}$  和 0.4: 0.2  $\mu\text{mol/L}$  时，扩增图谱阴阳液滴分界更清晰，没有难以界定的“下雨”现象（图 132）；进一步对测试数据进行分析可以发现，在 *zSSIb* 基因和 MON88017 转化体特异性序列引物：探针终浓度分别为 0.4: 0.2  $\mu\text{mol/L}$  和 0.4: 0.2  $\mu\text{mol/L}$  时，相同模板测算的拷贝数比值最接近理论值 0.5，RSD 较小（表 156）。因此，确定 *zSSIb* 基因和 MON88017 转化体特异性序列最优引物：探针终浓度分别为 0.4: 0.2  $\mu\text{mol/L}$  和 0.4: 0.2  $\mu\text{mol/L}$ 。经过优化后 *zSSIb* 基因和 MON88017 转化体特异性序列数字 PCR 扩增体系如表 157 所示。

表 157 数字 PCR 扩增体系

组分	体积
ddH <sub>2</sub> O	4.0 μL
2×ddPCRTM Supermix for Probes	10.0 μL
10 μmol/L 内标上游引物 zSSI <b><i>b</i></b> -qF	0.8 μL
10 μmol/L 内标下游引物 zSSI <b><i>b</i></b> -qR	0.8 μL
10 μmol/L 内标探针 zSSI <b><i>b</i></b> -qP	0.4 μL
10 μmol/L 转化体上游引物 MON88017-qF	0.8 μL
10 μmol/L 转化体上游引物 MON88017-qR	0.8 μL
10 μmol/L 转化体探针 MON88017-qP	0.4 μL
DNA 模板	2.0 μL
总体积	20.0 μL

### 29.5 MON88017/zSSI***b*** 二重 ddPCR 的 LOD、LOQ 和动力学范围测试

微滴式数字 PCR 的理论有效线性范围是 1~100000 个拷贝，实际测试时，20 μL 反应液在微滴生成仪中一般生成 10000~20000 个有效微滴，微滴数大于 10000 为有效反应。为了测试 zSSI***b*** 基因和 MON88017 转化体特异性序列数字 PCR 方法的线性范围，将 100 ng/μL 的杂合 MON88017 玉米基因组 DNA 进行梯度稀释制作成 9 个浓度的标准品，按确定的扩增条件进行 zSSI***b*** 基因和 MON88017 转化体特异性序列数字 PCR 扩增，每个标准品扩增设置 3 个平行。根据标准品数字 PCR 测量值及初始模板拷贝数分别绘制 zSSI***b*** 基因和 MON88017 转化体特异性序列的线性回归曲线进行线性范围分析，对 3 个平行间 zSSI***b*** 基因和 MON88017 转化体特异性序列测量值以及拷贝数比值的标准偏差和相对标准偏差进行数据统计，评价 zSSI***b*** 基因

和 MON88017 转化体特异性序列数字 PCR 方法的重复性。根据《转基因植物及其产品成分检测 数字 PCR 方法制定指南》（农业农村部公告第 323 号—21—2020）中定量检测的要求，在整个线性动态范围内，线性度即线性回归方程的决定系数  $R^2$  一般应  $\geq 0.98$ ，正确度偏差（*Bias*）不超过标称值的 25%，精密度即重复性相对标准偏差（*RSD*）一般应  $\leq 25\%$ 。

表 158 MON88017 玉米特异性序列数字 PCR 线性动态范围与重复性分析

Target	Expected concentration (copies)	Copy number concentration (copies)						
		Rep1	Rep2	Rep3	Mean	SD	<i>RSD</i> (%)	<i>Bias</i> (%)
MON88017 copy number	40000	45220	46080	45680	45660.00	430.35	0.94	14.15
	8000	8680	8820	8680	8726.67	80.83	0.93	9.08
	1600	1848	1724	1616	1729.33	116.09	6.71	8.08
	320	354	386	364	368.00	16.37	4.45	15.00
	64	62	72	64	66.00	5.29	8.02	3.13
	20	21	24	25	23.33	2.08	8.92	16.67
	10	14.6	13	14	13.87	0.81	5.83	38.67
	5	8	7.4	4.2	6.53	2.04	31.27	30.67
	2.5	-	3.8	2.6	-	-	-	-
<i>zSSIIB</i> copy number	80000	88560	87040	85720	87106.67	1421.17	1.63	8.88
	16000	17700	17560	17380	17546.67	160.42	0.91	9.67
	3200	3500	3520	3280	3433.33	133.17	3.88	7.29
	640	706	716	696	706.00	10.00	1.42	10.31
	128	138	156	140	144.67	9.87	6.82	13.02
	40	46	49	46	47.00	1.73	3.69	17.50
	20	24	28	18	23.33	5.03	21.57	16.67
	10	11.8	15	7.2	11.33	3.92	34.60	13.33
	5	-	2.6	7.4	-	-	-	-0
Target	Expected MON88017	Rep1	Rep2	Rep3	Mean	SD	<i>RSD</i> (%)	<i>Bias</i> (%)

Target	Expected concentration (copies)	Copy number concentration (copies)						
		Rep1	Rep2	Rep3	Mean	SD	<i>RSD</i> (%)	<i>Bias</i> (%)
	concentration (copies)							
MON88017/ <i>zSSIIb</i> ratio	40000	0.51	0.53	0.53	0.52	0.01	2.29	4.86
	8000	0.49	0.50	0.50	0.50	0.01	1.25	-0.53
	1600	0.53	0.49	0.49	0.50	0.02	4.23	0.70
	320	0.50	0.54	0.52	0.52	0.02	3.63	4.23
	64	0.45	0.46	0.46	0.46	0.01	1.36	-8.80
	20	0.46	0.49	0.54	0.50	0.04	8.84	-0.68
	10	0.61	0.46	0.78	0.62	0.16	25.44	23.36
	5	0.68	0.49	0.58	0.58	0.09	15.79	16.98
	2.5	-	1.46	0.35	-	-	-	-

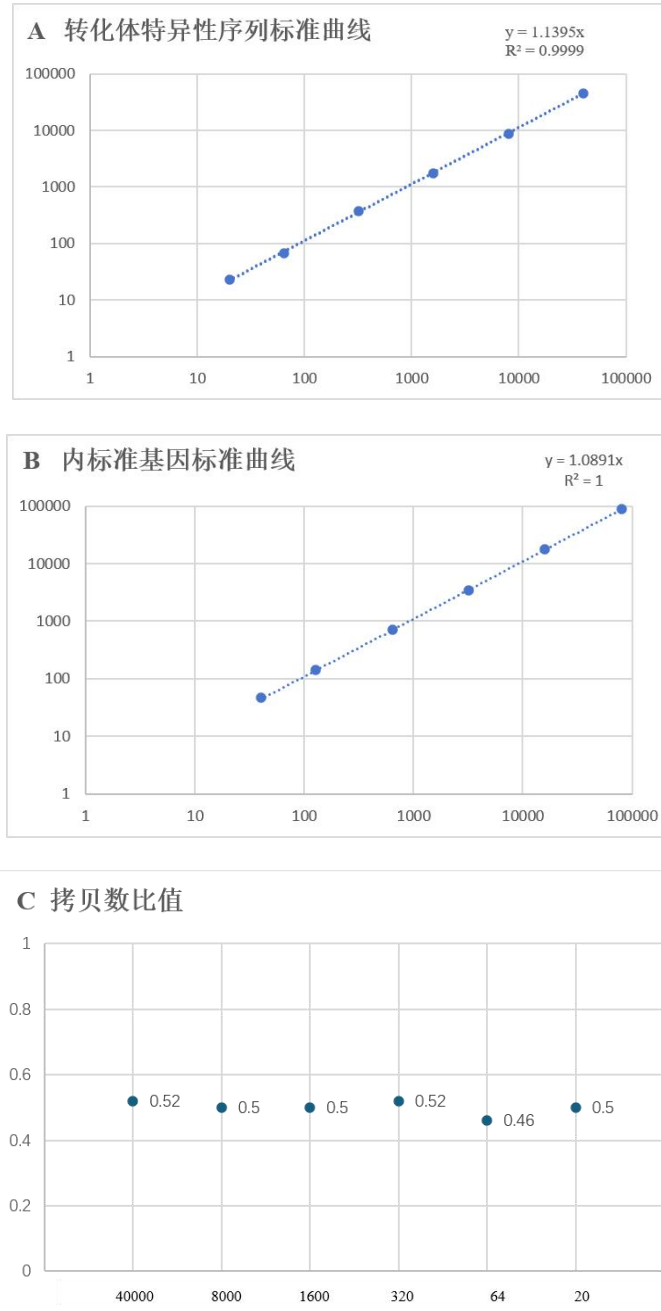


图 133 MON88017/*zSSIb* 二重数字 PCR 方法线性动态范围测试

注：A 为 MON88017 转化体特异性序列拷贝数测量值与预期值的线性回归方程（y 代表拷贝数测量值，x 代表拷贝数预期值）；B 为 *zSSIb* 基因拷贝数测量值与预期值的线性回归方程（y 代表拷贝数测量值，x 代表拷贝数预期值）；C 为 MON88017 转化体特异性序列和 *zSSIb* 基因拷贝数比值与不同浓度模板量的关系（y 代表模板拷贝数比值，x 代表 MON88017 转化体特异性序列拷贝数预期值）。

结果显示：当 20  $\mu\text{L}$  扩增体系中 MON88017 转化体特异性序列和 *zSSIb* 基因拷贝数分别在 20~40000 copies 和 40~80000 copies 之间时，3 个重复间正确度偏差 (*Bias*) 和重复性相对标准偏差 (*RSD*) 但均小于 25%；当 *zSSIb* 基因拷贝数模板量为 20 拷贝时，正确度偏差 (*Bias*) 和重复性相对标准偏差 (*RSD*) 低于 25%，但对应 MON88017 转化体特异性序列模板量为 10 拷贝，正确度偏差 (*Bias*) 和重复性相对标准偏差 (*RSD*) 出现大于 25% 的情况，因此定量极限 (LOQ) 确定为 40 个拷贝 (MON88017 转化体特异性序列)，当 DNA 浓度低至 2.5 拷贝 (MON88017 转化体特异性序列) 时，3 个平行中只有 2 个检测到阳性信号，而当 DNA 浓度为 5 拷贝 (MON88017 转化体特异性序列) 时，依然可以稳定的检测到阳性信号，拷贝数测量值在 4.2~8 之间，因此检测极限 (LOD) 确定为 5 拷贝 (MON88017 转化体特异性序列) (表 158)；MON88017 转化体特异性序列和 *zSSIb* 基因微滴数字 PCR 获得的拷贝数浓度测量值与预期值具有良好的相关性，线性回归方程分别为  $y=1.1395x$  和  $y=1.089x$ ，决定系数  $R^2$  值分别等于 0.9999 和 1，MON88017 转化体特异性序列和 *zSSIb* 基因拷贝数比值在 0.5 附近波动 (图 133)。MON88017/*zSSIb* 二重数字 PCR 方法线性动态范围测试结果表明，20  $\mu\text{L}$  扩增体系中，当模板量在 MON88017 转化体特异性序列 20~40000 拷贝的范围内，可获得准确的拷贝数浓度和拷贝数比值测量值。

## 29.6 MON88017/zSSIIb 二重 ddPCR 的测量准确性

配制 3 个含 MON88017 基因组 DNA 盲样 (S1~S3)，MON88017/zSSIIb 拷贝数比值依次为 3.0%、1.0%、0.1%。由不同的操作者在不同的日期用 MON88017/zSSIIb 二重 ddPCR 方法对 3 个盲样进行了 3 次测量。

表 159 3 个盲样的测量结果

重复	PCR 平行	盲样含量测量值		
		S1 (3%)	S2 (1%)	S3 (0.1%)
S1	1	2.92	1.06	0.10
	2	2.80	0.99	0.11
	3	2.79	1.02	0.10
S1	1	2.74	0.94	0.10
	2	2.79	1.04	0.11
	3	2.70	0.98	0.11
S3	1	3.07	1.06	0.10
	2	2.92	0.93	0.11
	3	2.76	0.99	0.10

表 160 3 个盲样定量结果的重复性和重现性统计分析

盲样	预期拷贝数比值 (%)	测量平均值 (%)	Sr (%)	RSDr (%)	SR (%)	RSDR (%)	Bias (%)
S1	3	2.83	0.12	4.10	0.14	5.12	-5.67
S2	1	1.00	0.05	4.78	0.05	5.16	0.00
S3	0.1	0.10	0.01	5.27	0.01	5.61	0.00

二重 ddPCR 的定量结果如表 159 所示，计算得到 3 个盲样 MON88017/zSSIIb 拷贝数比值的平均值，统计测量结果的重复性相对标准差 ( $RSD_r$ )、重现性相对标准差 ( $RSD_R$ )、和相对偏倚 ( $Bias$ )。

结果显示,测量平均值均接近预期含量,与预期值的相对偏倚在 $\pm 25\%$ 的可接受范围内;重复性相对标准偏差  $RSD_r$  和再现性相对标准偏差  $RSD_R$  均小于  $25\%$ (表 160)。已建立的 MON88017/zSSIIb 二重 ddPCR 实现了对样品中 MON88017 转化体含量的准确定量,具有良好的重复性和重现性。

## 29.7 结论

MON88017/zSSIIb 二重 ddPCR 扩增引物探针采用已发布的标准方法(农业农村部公告第 423 号—9—2021 和 GB/T 19495.4—2018)中的实时荧光 PCR 方法引物探针(表 161)。MON88017/zSSIIb 二重 ddPCR 扩增体系见表 162,扩增程序为:95°C 预变性 10 min; 94°C 变性 30 s, 60°C 退火延伸 60 s, 共进行 50 个循环; 98°C 变性 10 min, 4°C 保存(升降温速率 2°C/s)。

表 161 MON88017 转化体特异性引物和探针序列

靶标	引物/探针名称及序列 (5'-3')	扩增片段大小 (bp)	来源
zSSIIb 基因	zSSIIb-qF: CGGTGGATGCTAAGGCTGATG	88	农业农村部公告第 423 号—9—2021
	zSSIIb-qR: AAAGGGCCAGGTTTCATTATCCTC		
	zSSIIb-qP: HEX-TAAGGAGCACTCGCCGCCGCATCTG-BHQ1		
MON88017 转化体	MON88017-qF: GAGCAGGACCTGCAGAAGCT	95	GB/T 19495.4—2018
	MON88017-qR: TCCGGAGTTGACCATCCA		
	MON88017-qP: FAM-TCCCGCCTTCAGTTTAAACAGAGTCGGGT-BHQ1		

表 162 数字 PCR 扩增体系

组分	终浓度	体积
ddH <sub>2</sub> O		4.0 μL
2×ddPCRTM Supermix for Probes	1×	10.0 μL
10 μmol/L 内标上游引物 zSSIb-F	0.4 μmol/L	0.8 μL
10 μmol/L 内标下游引物 zSSIb-R	0.4 μmol/L	0.8 μL
10 μmol/L 内标探针 zSSIb-qP	0.2 μmol/L	0.4 μL
10 μmol/L 转化体上游引物 MON88017-qF	0.4 μmol/L	0.8 μL
10 μmol/L 转化体上游引物 MON88017-qR	0.4 μmol/L	0.8 μL
10 μmol/L 转化体探针 MON88017-qP	0.2 μmol/L	0.4 μL
25 mg/L DNA 模板	2.5 mg/L	2.0 μL
总体积		20.0 μL

扩增体系可根据仪器及试剂耗材的实际使用情况，进行相应调整。此表是 1 个扩增体系的体积，应按照实际反应数量进行扩增体系配置。空白质控品以 2.0 μL 的 ddH<sub>2</sub>O 作模板。

### 30. 3272/zSSIb 二重数字 PCR 方法

#### 30.1 引物探针确认

3272 由先正达公司研制品质改良转基因玉米品系，其转化体分子特征由先正达公司解析。首先对获得转基因材料的分子特征进行验证，确定转基因材料的转化体身份。

根据资料获得 3272 转化体特异性序列，合成携带 3272 转化体和内标准基因靶标的质粒分子，酶切，-20℃存储备用。

3272 转化体特异性引物探针和玉米内标准基因 zSSIb 引物探针选用已发布的标准方法（GB/T 19495.5-2018、农业部 1861 号公告—3—2012）中的实时荧光 PCR 方法引物探针（表 161）。

表 163 3272 转化体特异性引物和探针序列

靶标	引物/探针名称及序列 (5'-3')	扩增片段大小(bp)	来源
zSSI <b>i</b> b 基因	zSSI <b>i</b> b-3F: CGGTGGATGCTAAGGCTGATG	88	农业部 1861 号公告—3—2012
	zSSI <b>i</b> b-4R: AAAGGGCCAGGTTTCATTATCCTC		
	zSSI <b>i</b> b-P:HEX-TAAGGAGCACTCGCCGCCGCATCTG-BHQ1		
3272 转化体	ES3272-qF: TCATCAGACCAGATTCTCTTTTATGG	95	GB/T 19495.5-2018
	ES3272-qR: CGTTTCCC GCCTTCAGTTTA		
	ES3272-qP:FAM-ACTGCTGACGCGGCCAAACACTG-BHQ1		

在伯乐 QX200 微滴式数字 PCR 平台上，用通用的 PCR 反应体系（引物/探针浓度 0.4/0.2 $\mu$ mol/L）和退火温度（60 $^{\circ}$ C），以 3272 质粒 DNA 为模板，进行 3272 转化体/zSSI**i**b 基因的二重 ddPCR 扩增，对表 161 中的引物探针组合进行测试。

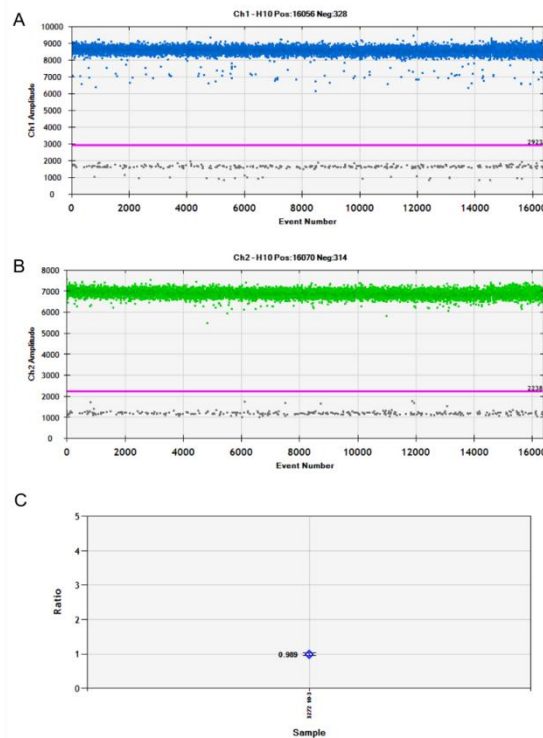


图 134 数字 PCR 引物探针确认

注：A 为 3272 玉米转化体特异性序列一维微滴图谱；B 为 zSSI**i**b 基因一维微滴图谱，C 为 3272 转化体和 zSSI**i**b 基因拷贝数比值。

结果显示, 3272 转化体和 *zSSIIb* 基因二重微滴式数字 PCR 的一维微滴图谱 (1-D) 的阴性微滴和阳性微滴分界清晰, “雨滴”较少 (图 134A, B); 3272 转化体和 *zSSIIb* 基因拷贝数比值接近 1.0 (图 134C)。综上, 确认表 161 的引物探针适用 3272 转化体/*zSSIIb* 基因的二重 ddPCR 扩增。

### 30.2 3272/*zSSIIb* 二重微滴数字 PCR 特异性测试

用转基因玉米 3272、其他转基因玉米混合样 (瑞丰 125、瑞丰 8、T25、MIR604、NK603、MON87427、DBN9936、DBN9858、DBN9501)、转基因大豆混合样 (DBN9004、MON89788、MON87751、CAL16、中黄 6106、DBN8205)、转基因水稻混合样 (TT51-1、KF-6、KMD、G6H1、T1C-19、T2A-1)、转基因油菜混合样 (MS1、MS8、RF1、RF2、RF3、T45、Oxy-235、Topas19/2、MON88302、73496)、转基因棉花混合样 (MON1445、MON531、MON15985、LLCOTTON25、MON88913、GHB614、COT102)、非转基因玉米基因组 DNA 作模板进行 3272 和 *zSSIIb* 二重 ddPCR 扩增, 用水做空白对照, 测试 3272 转化体和 *zSSIIb* 二重 ddPCR 方法的特异性。

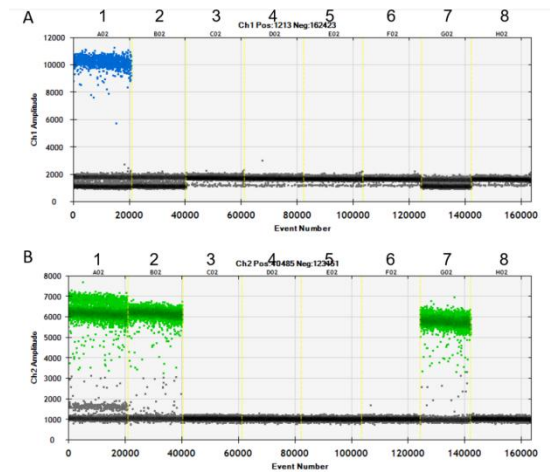


图 135 3272/*zSSIb* 二重 ddPCR 特异性测试扩增图谱（一维）

注：A 为 3272 微滴数字 PCR 一维热图；B 为 *zSSIb* 微滴数字 PCR 一维热图。样品顺序：1 为 3272，2 为其他转基因玉米混合样，3 为转基因大豆混合样，4 为转基因水稻混合样，5 为转基因油菜混合样，6 为转基因棉花混合样，7 为非转基因玉米混合样，8 为空白对照。

结果显示，*zSSIb* 基因 ddPCR 在玉米样品中扩增得到阳性微滴，在其他作物和空白对照中无阳性微滴；3272 转化体特异性序列 ddPCR 仅在转基因玉米 3272 样品中扩增得到阳性微滴，在其他样品和空白对照中均无阳性微滴，结果表明 3272/*zSSIb* 二重 ddPCR 方法有良好的特异性（图 135）。

### 30.3 3272/*zSSIb* 二重数字 PCR 的条件优化

转基因定量检测依赖于转基因 DNA 拷贝数和总 DNA 拷贝数的准确测量，其中转基因 DNA 拷贝数通过转化体特异性 PCR 检测定量，总 DNA 拷贝数定量通过内标基因测定。以 3272 质粒 DNA 为模板，分别优化二重数字 PCR 中 3272 转化体特异性序列和 *zSSIb* 内标基因的引物/探针浓度和退火/延伸温度，改善阳性/阴性液滴的分辨率以减

少雨滴对定量结果的影响，同时测试二重数字 PCR 反应中转化体和内标基因是否具有相似的扩展效率。

PCR 扩增程序中退火温度的高低对阴阳性微滴区分有显著的影响，本项目设置了 55.0°C、55.5°C、56.6°C、58.2°C、60.1°C、61.7°C、62.6°C、63.0°C 八个温度梯度，测试 3272 和 *zSSIb* 基因二重 ddPCR 的扩增效果。

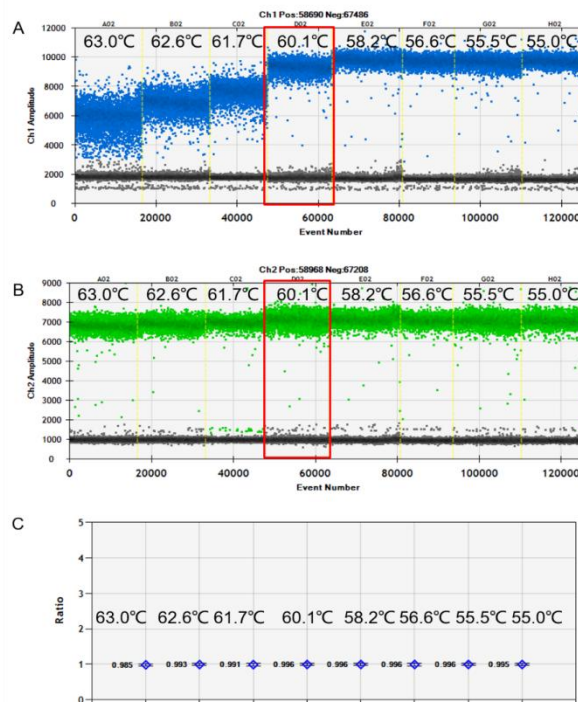


图 136 数字 PCR 引物探针退火温度优化扩增图谱

注：A 为 3272 玉米转化体特异性序列一维微滴图谱；B 为 *zSSIb* 基因一维微滴图谱，C 为 3272 转化体和 *zSSIb* 基因拷贝数比值。

数字 PCR 扩增结果显示：在 55°C 至 63°C 的不同退火温度下，*zSSIb* 内标基因的阳性液滴的荧光强度保持稳定 (图 136B)，但 3272 阳性液滴的荧光强度随着退火温度的降低而增加，在退火温度降低到

60.1°C时，微滴的信号强度达到平台期（图 136A）。在 63.0°C的退火温度下，3272 转化体特异性序列存在阴阳液滴分界不清晰，出现“下雨”现象；在 55.0°C~62.6°C的退火温度下，3272 的阳性和阴性微滴都能区分，拷贝数比值在 0.991~0.996 的范围内波动；当退火温度在 60.1°C时，测量的拷贝数比值为 0.996，非常接近理论值（图 136C）。考虑到退火温度对扩增特异性的影响，选择 60°C作为 3272 转化体和 *zSSIIb* 内标基因双重数字 PCR 的退火温度。经过优化后 *zSSIIb* 基因和 3272 数字 PCR 扩增程序为：95°C预变性 10 min；94°C变性 30 s，60°C退火延伸 60 s，共进行 50 个循环；98°C变性 10 min，4°C保存（升降温速率 2°C/s）。

由于微滴式数字 PCR 平台 Bio-Rad QX200 需使用专用的扩增试剂，PCR 扩增体系中仅选择引物探针浓度进行优化测试。实时荧光 PCR 方法中常用引物与探针终浓度分别为 0.4  $\mu\text{mol/L}$  和 0.2  $\mu\text{mol/L}$ ，Bio-Rad 2 $\times$ ddPCRTM Supermix for Probes 的说明书引物与探针的终浓度分别为 0.9  $\mu\text{mol/L}$  和 0.25  $\text{nmol/L}$ 。参考上述引物探针终浓度设置了 8 组 *zSSIIb* 基因和 3272 转化体特异性序列引物探针终浓度进行测试，包括：3272 和 *zSSIIb* 的引物探针浓度相同，分别为 0.1/0.05  $\mu\text{mol/L}$ ，0.2/0.1  $\mu\text{mol/L}$ ，0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$ ，0.8/0.4  $\mu\text{mol/L}$ ；3272 和 *zSSIIb* 不同的引物探针浓度，分别为 0.2/0.1  $\mu\text{mol/L}$  (*zSSIIb*)、0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$  (3272)，0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$  (*zSSIIb*)、0.2/0.1  $\mu\text{mol/L}$  (3272)，0.8/0.4

$\mu\text{mol/L}$  (*zSSIb*)、 $0.4/0.2 \mu\text{mol/L}$  (3272)， $0.4/0.2 \mu\text{mol/L}$  (*zSSIb*)、 $0.8/0.4 \mu\text{mol/L}$  (3272)。

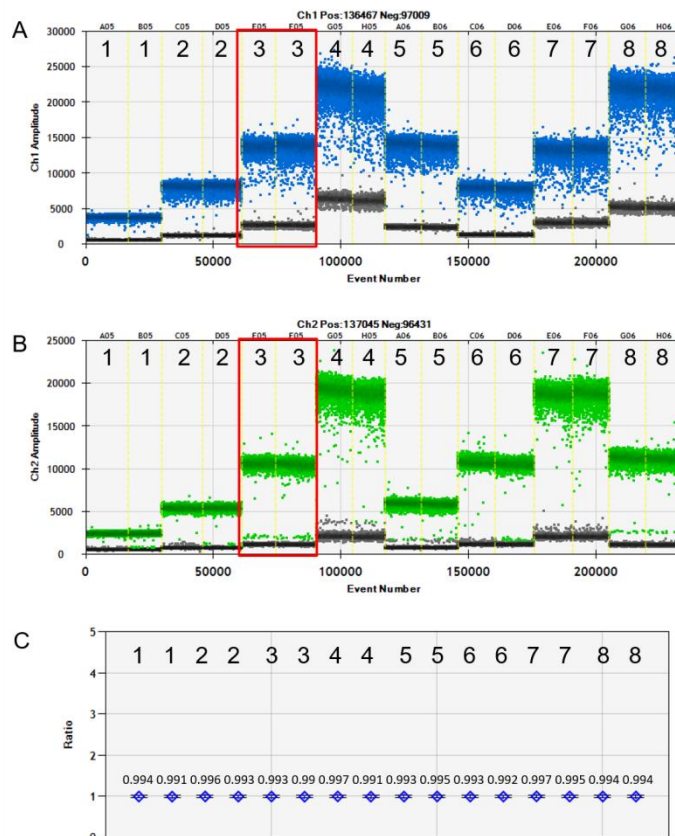


图 137 数字 PCR 引物探针浓度优化扩增图谱

注：A 为 3272 玉米转化体特异性序列一维微滴图谱；B 为 *zSSIb* 基因一维微滴图谱，C 为 3272 转化体和 *zSSIb* 基因拷贝数比值。1~4 对应 3272 和 *zSSIb* 的引物探针浓度相同，分别为  $0.1/0.05 \mu\text{mol/L}$ ， $0.2/0.1 \mu\text{mol/L}$ ， $0.4/0.2 \mu\text{mol/L}$ ， $0.8/0.4 \mu\text{mol/L}$ ；5~8 对应 3272 和 *zSSIb* 不同的引物探针浓度，分别为  $0.2/0.1 \mu\text{mol/L}$  (*zSSIb*)、 $0.4/0.2 \mu\text{mol/L}$  (3272)， $0.4/0.2 \mu\text{mol/L}$  (*zSSIb*)、 $0.2/0.1 \mu\text{mol/L}$  (3272)， $0.8/0.4 \mu\text{mol/L}$  (*zSSIb*)、 $0.4/0.2 \mu\text{mol/L}$  (3272)， $0.4/0.2 \mu\text{mol/L}$  (*zSSIb*)、 $0.8/0.4 \mu\text{mol/L}$  (3272)。

数字 PCR 扩增结果显示：3272 和内标基因的引物/探针浓度低于  $0.4/0.2 \mu\text{mol/L}$  时，阳性、阴性液滴信号偏低（图 137A、B）；当两个靶标的引物/探针浓度均为  $0.4/0.2 \mu\text{mol/L}$  时，阳性微滴和阴性微滴具有最佳的分辨率；当两个靶标的引物/探针浓度高于  $0.4/0.2 \mu\text{mol/L}$

时，阴性微滴信号值升高，且阳性微滴群变宽。当两个靶标的引物/探针浓度均为 0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$  时，测量的平均拷贝数比值为 0.992，接近理论值（图 137C）。综合考虑引物探针用量和微滴荧光强度，二重数字 PCR 中 3272 和 *zSSIIb* 的引物/探针浓度均采用 0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$ 。经过优化后 *zSSIIb* 基因和 3272 转化体特异性序列数字 PCR 扩增体系如表 162 所示。

表 164 数字 PCR 扩增体系

组分	体积
ddH <sub>2</sub> O	4.0 $\mu\text{L}$
2 $\times$ ddPCR <sup>TM</sup> Supermix for Probes	10.0 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 内标上游引物 <i>zSSIIb</i> -3F	0.8 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 内标下游引物 <i>zSSIIb</i> -4R	0.8 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 内标探针 <i>zSSIIb</i> -P	0.4 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 转化体上游引物 3272-qF	0.8 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 转化体上游引物 3272-qR	0.8 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 转化体探针 3272-P	0.4 $\mu\text{L}$
DNA 模板	2.0 $\mu\text{L}$
总体积	20.0 $\mu\text{L}$

### 30.4 3272/*zSSIIb* 二重 ddPCR 的 LOD、LOQ 和动力学范围测试

微滴式数字 PCR 的理论有效线性范围是 1~100000 个拷贝，实际测试时，20  $\mu\text{L}$  反应液在微滴生成仪中一般生成 10000~20000 个有效微滴，微滴数大于 10000 为有效反应。为了测试 *zSSIIb* 基因和 3272 转化体特异性序列数字 PCR 方法的线性范围，在优化的 PCR 条件下，将 3272 质粒 DNA 的连续稀释液用于测试 3272/*zSSIIb* 二重 ddPCR 的动态范围、LOD 和 LOQ，每个标准品扩增设置 4 个平行。根据标准

品数字 PCR 测量值及初始模板拷贝数分别绘制 *zSSIb* 基因和 3272 转化体特异性序列的线性回归曲线进行线性范围分析，对 4 个平行间 *zSSIb* 基因和 3272 转化体特异性序列测量值以及拷贝数比值的标准偏差和相对标准偏差进行数据统计，评价 *zSSIb* 基因和 3272 转化体特异性序列数字 PCR 方法的重复性。根据《转基因植物及其产品成分检测 数字 PCR 方法制定指南》（农业农村部公告第 323 号—21—2020）中定量检测的要求，在整个线性动态范围内，线性度即线性回归方程的决定系数  $R^2$  一般应  $\geq 0.98$ ，正确度偏差（Bias）不超过标称值的 25%，精密度即重复性相对标准偏差（RSD）一般应  $\leq 25\%$ 。

表 165 3272 玉米特异性序列数字 PCR 线性动态范围与重复性分析

Target	Expected concentration (copies)	Copy number concentration (copies)							
		Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Mean	SD	RSD (%)	Bias (%)
3272 copy number	80000	86000	89000	85000	89000	87250.00	2061.55	2.36	9.06
	16000	15620	16250	16160	16480	16127.50	364.18	2.26	0.80
	3200	3270	3270	3470	3350	3340.00	94.52	2.83	4.38
	640	638	656	659	642	648.75	10.31	1.59	1.37
	128	118	128	122	149	129.25	13.79	10.67	0.98
	40	41	36	44	42	40.75	3.40	8.35	1.88
	20	18	16	18	16	17.00	1.15	6.79	-15.00
	10	10	7.2	13	7.7	9.48	2.65	27.94	-5.25
	5	3.7	5	5.5	6.7	5.23	1.24	23.77	4.50
1	0.6	1.8	0.6	—	—	—	—	—	
<i>zSSIb</i> copy number	80000	86000	89000	85000	89000	87250.00	2061.55	2.36	9.06
	16000	15620	16270	16170	16480	16135.00	366.83	2.27	0.84
	3200	3270	3280	3460	3350	3340.00	87.56	2.62	4.38
	640	638	654	657	644	648.25	8.81	1.36	1.29
	128	118	128	120	147	128.25	13.23	10.31	0.20
	40	41	34	44	42	40.25	4.35	10.81	0.63

	20	18	16	18	16	17.00	1.15	6.79	-15.00
	10	10	7.2	13	7.7	9.48	2.65	27.94	-5.25
	5	3.7	5	5.5	6.1	5.08	1.02	20.12	1.50
	1	0.6	1.8	0.6	—	—	0.69	—	—
	80000	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00
	16000	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.06	-0.05
	3200	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.24	0.00
	640	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.29	0.08
3272/ zSSIIb ratio	128	1.00	1.00	1.02	1.01	1.01	0.01	0.88	0.78
	40	1.00	1.06	1.00	1.00	1.01	0.03	2.91	1.24
	20	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00
	10	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00
	5	1.00	1.00	1.00	1.10	1.03	0.05	4.78	2.96
	1	1.00	1.00	1.00	—	—	—	—	—

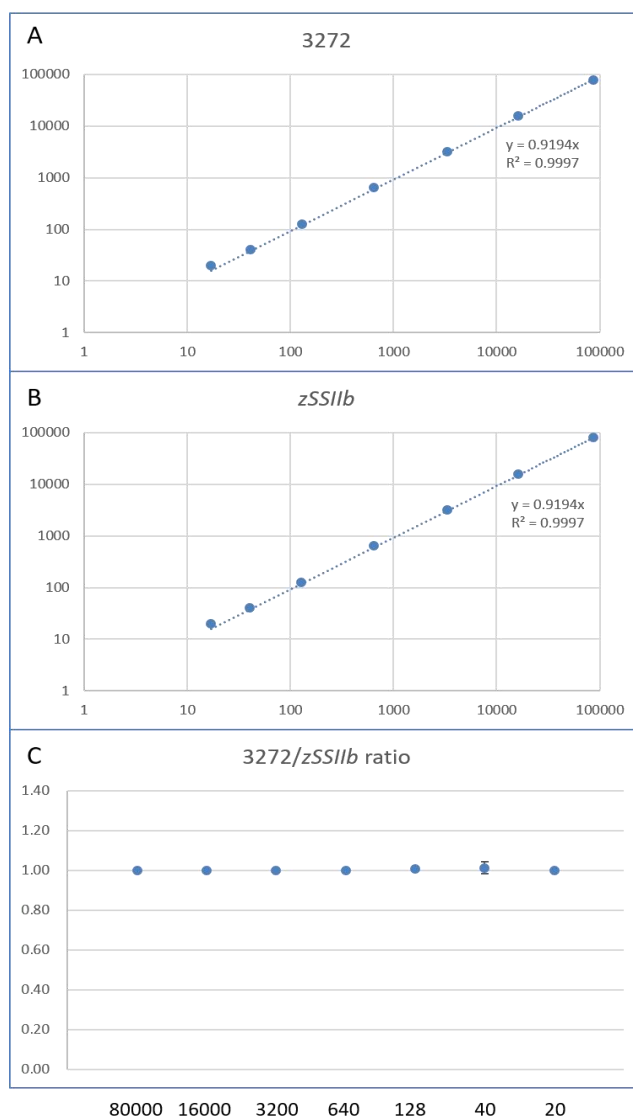


图 138 3272/zSSIIB 二重数字 PCR 方法线性动态范围测试

注：A 为 3272 转化体特异性序列拷贝数测量值与预期值的线性回归方程（y 代表拷贝数测量值，x 代表拷贝数预期值）；B 为 zSSIIB 基因拷贝数测量值与预期值的线性回归方程（y 代表拷贝数测量值，x 代表拷贝数预期值）；C 为 3272 转化体特异性序列和 zSSIIB 基因拷贝数比值与不同浓度模板量的关系（y 代表模板拷贝数比值，x 代表 3272 转化体特异性序列拷贝数预期值）。

结果显示：当 20  $\mu$ L 扩增体系中 3272 转化体特异性序列和 zSSIIB 基因拷贝数分别在 20~80000 copies 之间时，4 个重复的正确度偏差（Bias）和重复性相对标准偏差（RSD）均小于 25%，当模板量为 10 拷贝时，正确度偏差（Bias）和重复性相对标准偏差（RSD）出现大

于 25%的情况，因此定量极限 (LOQ) 确定为 20 个拷贝 (3272 转化体特异性序列)，当 DNA 浓度低至 5 拷贝 (3272 转化体特异性序列) 时，4 个平行中只有 1 个检测到阳性信号，其余均无阳性微滴，而当 DNA 浓度为 10 拷贝 (3272 转化体特异性序列) 时，依然可以稳定的检测到阳性信号，拷贝数测量值在 5.3~18.9 之间，因此检测极限 (LOD) 确定为 10 拷贝 (3272 转化体特异性序列) (表 163)；3272 转化体特异性序列和 *zSSIIb* 基因微滴数字 PCR 获得的拷贝数浓度测量值与预期值具有良好的相关性，线性回归方程分别为  $y=0.9194x$  和  $y=0.9194x$ ，决定系数 R<sup>2</sup> 值分别等于 0.9997 和 0.9997，3272 转化体特异性序列和 *zSSIIb* 基因拷贝数比值在 1.0 附近波动 (图 138)。3272/*zSSIIb* 二重数字 PCR 方法线性动态范围测试结果表明，20 μL 扩增体系中，当模板量在 3272 转化体特异性序列 20~80000 拷贝的范围内，可获得准确的拷贝数浓度和拷贝数比值测量值。

### 30.5 3272/*zSSIIb* 二重 ddPCR 的测量准确性

配制 4 个含 3272 基因组 DNA 盲样(Sg1-Sg4)，拷贝数比值依次为 5.0%、3.0%、1.0%、0.5%。由不同的操作者在不同的日期用 3272/*zSSIIb* 二重 ddPCR 对 4 个盲样进行三次测量。

表 166 4 个盲样的测量结果

重复	PCR 平行	盲样含量测量值			
		Sg1 (5%)	Sg2 (3%)	Sg3 (1%)	Sg4 (0.5%)
1	1	4.99	3.03	1.02	0.55
	2	5.02	2.90	1.04	0.43

	3	4.88	3.04	1.00	0.54
2	1	4.94	2.94	1.10	0.50
	2	4.90	3.04	1.00	0.53
	3	4.92	3.15	0.97	0.47
3	1	4.95	2.94	1.03	0.56
	2	4.99	3.12	1.07	0.45
	3	4.96	3.05	0.98	0.43

表 167 4 个盲样定量结果的重复性和重现性统计分析

盲样	预期拷贝数比值 (%)	测量平均值 (%)	S <sub>r</sub> (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	S <sub>R</sub> (%)	RSD <sub>R</sub> (%)	Bias (%)
S1	5	4.95	0.05	0.92	0.05	0.92	-1.00
S2	3	3.02	0.09	3.04	0.09	3.04	0.78
S3	1	1.02	0.05	4.74	0.05	4.74	2.33
S4	0.5	0.50	0.06	11.79	0.06	11.79	-0.89

二重 ddPCR 的定量结果如表 164 所示，计算得到 4 个盲样 3272/zSSIIb 拷贝数比值的平均值，统计测量结果的重复性相对标准差 (RSD<sub>r</sub>)、重现性相对标准差 (RSD<sub>R</sub>)、和相对偏倚 (Bias)。结果显示，测量平均值均接近预期含量，与预期值的相对偏倚在±25%的可接受范围内；重复性相对标准偏差 RSD<sub>r</sub> 和再现性相对标准偏差 RSD<sub>R</sub> 均小于 25% (表 165)。已建立的 3272/zSSIIb 二重 ddPCR 实现了对样品中 3272 转化体含量的准确定量，具有良好的重复性和重现性。

3272/zSSIIb 二重 ddPCR 扩增引物探针采用已发布的标准方法 (GB/T 19495.5-2018、农业部 1861 号公告—3—2012) 中的实时荧光 PCR 方法引物探针(表 9)。3272/zSSIIb 二重 ddPCR 扩增体系见表 166,

扩增程序为：95℃预变性 10 min；94℃变性 30 s，60℃退火延伸 60 s，共进行 50 个循环；98℃变性 10 min，4℃保存（升降温速率 2℃/s）。

表 168 数字 PCR 扩增体系

组分	终浓度	体积
ddH <sub>2</sub> O	—	4.0 μL
2×ddPCR™ Supermix for Probes	1×	10.0 μL
10 μmol/L 内标上游引物 <i>zSSIb</i> -qF	0.4 μmol/L	0.8 μL
10 μmol/L 内标下游引物 <i>zSSIb</i> -qR	0.4 μmol/L	0.8 μL
10 μmol/L 内标探针 <i>zSSIb</i> -P	0.2 μmol/L	0.4 μL
10 μmol/L 转化体上游引物 3272-qF	0.4 μmol/L	0.8 μL
10 μmol/L 转化体上游引物 3272-qR	0.4 μmol/L	0.8 μL
10 μmol/L 转化体探针 3272-P	0.2 μmol/L	0.4 μL
25 mg/L DNA 模板	2.5 mg/L	2.0 μL
总体积		20.0 μL
<p>扩增体系可根据仪器及试剂耗材的实际使用情况，进行相应调整。 此表是 1 个扩增体系的体积，应按照实际反应数量进行扩增体系配置。空白质控品以 2.0 μL 的 ddH<sub>2</sub>O 作模板。</p>		

### 31. 5307/*zSSIb* 二重数字 PCR 方法

#### 31.1 引物探针确认

5307 是先正达作物保护公司研发的一种转基因抗虫玉米，主要用于防控玉米根虫，其转化体分子特征由先正达公司解析。本中心首先对获得转基因材料的分子特征进行验证，确定转基因材料的转化体身份。5307 转化体特异性引物探针和玉米内标准基因 *zSSIb* 引物探针选用已发布的标准方法（GB/19495.5-2018、农业部 1861 号公告—3—2012）中的实时荧光 PCR 方法引物探针。

表 169 5307 转化体特异性引物和探针序列

靶标	引物/探针名称及序列（5'-3'）	扩增片	来源
----	-------------------	-----	----

		段大小 (bp)	
z <i>SSIb</i> 基因	z <i>SSIb</i> -3F: CGGTGGATGCTAAGGCTGATG	88	农业部 1861号公 告 —3—201 2
	z <i>SSIb</i> -4R: AAAGGGCCAGGTTTCATTATCCTC		
	z <i>SSIb</i> -P:HEX-TAAGGAGCACTCGCCGCCGCATCTG-BHQ1		
5307转 化体	5307-qF: CATGGCCGTATCCGCAATGTG	107	GB/19495 .5-2018
	5307-qR: TGCACCCTTTGCCAGTGG		
	5307-qP:FAM-ACCACAATATACCCTCTTCCCTGGGCCAG -BHQ1		

在伯乐微滴式数字 PCR 平台 QX200 上，用通用的 PCR 反应体系（引物/探针浓度 400/200 nM）和退火温度（58°C），以 5307 杂合体基因组 DNA 为模板，分别进行单重数字 PCR、5307 转化体/z*SSIb* 基因的二重 ddPCR 扩增，对表 167 中的引物探针组合进行测试，设 3 个平行反应。

结果显示，单重数字 PCR、5307 转化体和 z*SSIb* 基因二重微滴式数字 PCR 的阴性微滴和阳性微滴分界清晰，5307 转化体和 z*SSIb* 基因拷贝数比值接近 0.5，符合杂合体 5307 玉米分子特征。综上，确认表 167 的引物探针适用 5307 转化体/z*SSIb* 基因的二重 ddPCR 扩增。

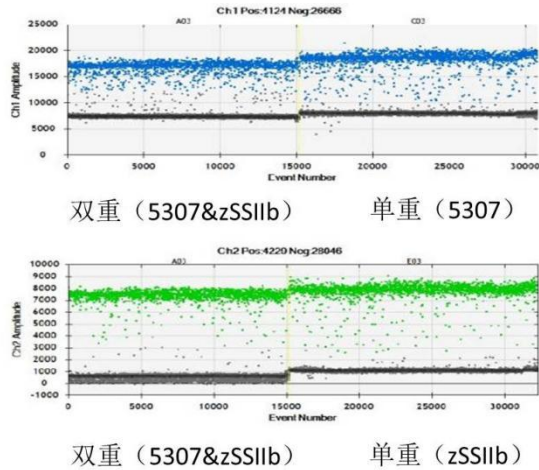
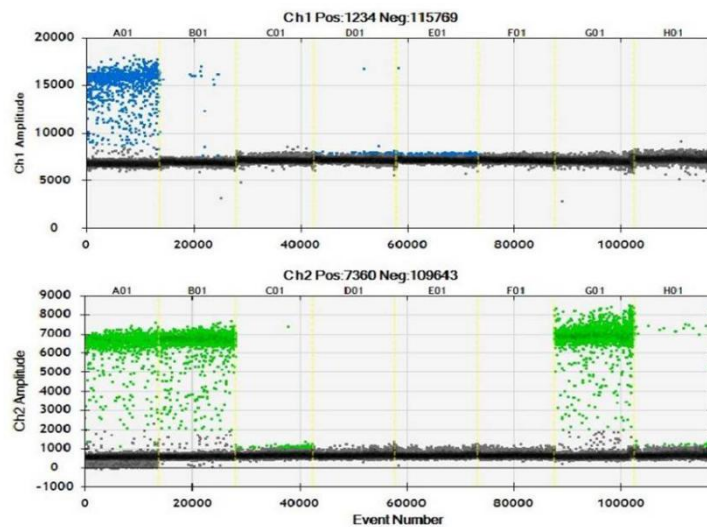


图 139 数字 PCR 引物探针确认

### 31.2 5307/*zSSIb* 二重微滴数字 PCR 特异性测试

用转基因玉米 5307、其他转基因玉米混合样、转基因水稻混合样、转基因大豆混合样、转基因油菜混合样、转基因棉花混合样、非转基因玉米基因组 DNA 作模板进行 5307 和 *zSSIb* 二重 ddPCR 扩增，用水做空白对照，测试 5307 转化体和 *zSSIb* 二重 ddPCR 方法的特异性。



5307 转玉 转水 转豆 转油 转棉 非转玉 空白

图 140 5307/*zSSIIB* 二重 ddPCR 特异性测试扩增图谱

结果显示，*zSSIIB* 基因 ddPCR 在玉米样品中扩增得到阳性微滴，在其他作物和空白对照中不能扩增得到阳性微滴；5307 转化体特异性序列 ddPCR 仅在转基因玉米 5307 样品中扩增得到阳性微滴，在其他转基因玉米品种和空白对照中不能扩增得到阳性微滴，结果表明 5307/*zSSIIB* 二重 ddPCR 方法有良好的特异性（图 140）。

### 31.3 5307 转化体特异性数字 PCR 的条件优化

PCR 扩增程序中退火温度的高低对阴阳性微滴区分有显著的影响，本项目设置了 52℃、52.7℃、54℃、55.9℃、58.4℃、60.3℃、61.4℃、62℃共 8 个温度梯度，测试 5307 和 *zSSIIB* 基因二重 ddPCR 的扩增效果。

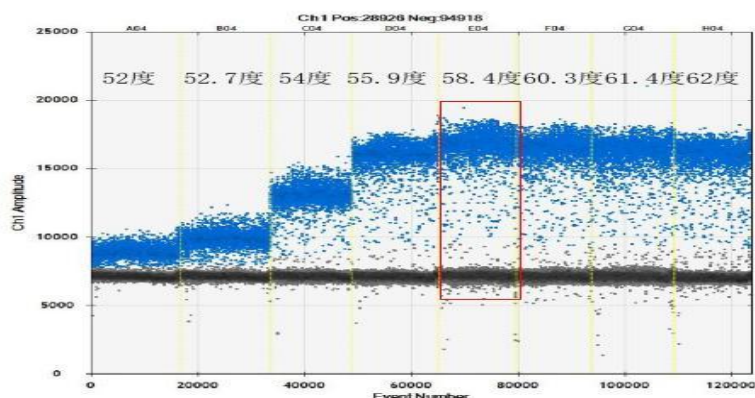


图 141 数字 PCR 引物探针退火温度优化扩增图谱

数字 PCR 扩增结果显示：扩增图谱中 5307 玉米转化体特异性序列阳性微滴的荧光强度在 52℃、52.7℃、54℃、55.9℃、58.4℃随温度升高呈现升高趋势，在 58.4℃、60.3℃、61.4℃、62℃温度荧光强

度无显著差异，阴阳液滴分界清晰，没有难以界定的“下雨”现象（图 141）；进一步对荧光强度、阴阳液滴分界综合分析可以发现，在 58.4°C 时结果最佳。因此，5307 转化体特异性序列引物探针最优退火延伸温度为 58.4°C。经过优化后 5307 转化体特异性序列数字 PCR 扩增程序为：95°C 预变性 10 min；94°C 变性 30 s，58°C 退火延伸 60 s，共进行 50 个循环；98°C 变性 10 min，4°C 保存（升降温速率 2°C/s）。

由于微滴式数字 PCR 平台 Bio-Rad QX200 需使用专用的扩增试剂，PCR 扩增体系中仅选择引物探针浓度进行优化测试。实时荧光 PCR 方法中常用引物与探针终浓度分别为 0.5  $\mu\text{mol/L}$  和 0.25  $\mu\text{mol/L}$ ，Bio-Rad 2 $\times$ ddPCRTM Supermix for Probes 的说明书引物与探针的终浓度分别为 0.9  $\mu\text{mol/L}$  和 0.25 nmol/L。参考上述引物探针终浓度设置了 16 组（见表 168）对 5307 转化体特异性序列引物/探针终浓度进行测试。

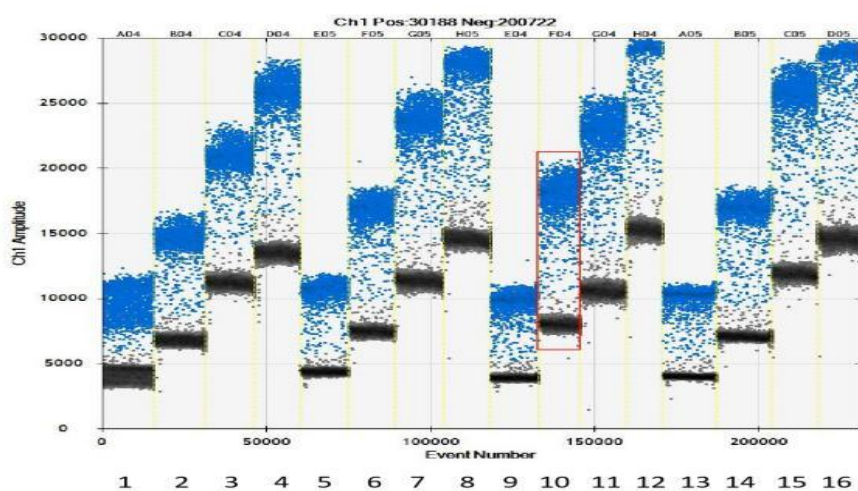


图 142 数字 PCR 引物探针终浓度优化扩增图谱

表 170 数字 PCR 引物探针浓度优化设置及扩增数据

序号	引物/探针终浓度 ( $\mu\text{mol}$ )	引物/探针用量 ( $\mu\text{L}$ )	拷贝数测量平均值
1	250/250/125	0.5/0.5/0.25	4880
2	250/250/250	0.5/0.5/0.5	5060
3	250/250/375	0.5/0.5/0.75	5480
4	250/250/500	0.5/0.5/1.0	5660
5	375/375/125	0.75/0.75/0.25	4960
6	375/375/250	0.75/0.75/0.5	4740
7	375/375/375	0.75/0.75/0.75	4840
8	375/375/500	0.75/0.75/1.0	5040
9	500/500/125	1.0/1.0/0.25	4880
10	500/500/250	1.0/1.0/0.5	5000
11	500/500/375	1.0/1.0/0.75	5060
12	500/500/500	1.0/1.0/1.0	5160
13	750/750/125	1.5/1.5/0.25	5080
14	750/750/250	1.5/1.5/0.5	5220
15	750/750/375	1.5/1.5/0.75	5440
16	750/750/500	1.5/1.5/1.0	4780

数字 PCR 扩增结果显示：扩增图谱中 5307 转化体特异性序列在不同的引物探针浓度下，微滴的荧光强度存在较显著差异，随着引物探针浓度升高，阳性微滴信号出现升高，在 5307 转化体特异性序列引物/探针终浓度分别为 0.5：0.5：0.25  $\mu\text{mol/L}$  时，扩增图谱阴阳液滴分界更清晰，没有难以界定的“下雨”现象（图 142）；因此，确定 5307 转化体特异性序列最优引物、探针终浓度分别为 0.5：0.5：0.25  $\mu\text{mol/L}$ 。经过优化后 5307 转化体特异性序列数字 PCR 扩增体系如表 169 所示。

表 171 数字 PCR 扩增体系

组分	体积
----	----

ddH <sub>2</sub> O	3.0 μL
2×ddPCR™ Supermix for Probes	10.0 μL
10 μmol/L 内标上游引物 zSSIIb-3F	1.0 μL
10 μmol/L 内标下游引物 zSSIIb-4R	1.0 μL
10 μmol/L 内标探针 zSSIIb-P	0.5 μL
10 μmol/L 转化体上游引物 5307-qF	1.0 μL
10 μmol/L 转化体上游引物 5307-qR	1.0 μL
10 μmol/L 转化体探针 5307-qP	0.5 μL
DNA 模板	2.0 μL
总体积	20.0 μL

### 31.4 LOD、LOQ 和动力学范围测试

为了测试 5307 转化体特异性序列数字 PCR 方法的线性范围，将 5307 的杂合基因组 DNA 进行梯度稀释，获得拷贝数为 40000、8000、1600、320、40、20、10、5、2、1 拷贝/反应进行数字 PCR 扩增。根据标准品数字 PCR 测量值及初始模板拷贝数绘制 5307 转化体特异性序列的线性回归曲线评价线性范围，按照《转基因植物及其产品成分检测 数字 PCR 方法制定指南》（农业农村部公告第 323 号—21—2020）中定量检测的要求，在整个线性动态范围内，线性度即线性回归方程的决定系数 R<sup>2</sup> 一般应≥0.98，正确度偏差（Bias）不超过标称值的 25%，精密度即重复性相对标准偏差（RSD）一般应≤25%。

表 172 玉米特异性序列数字 PCR 线性动态范围与重复性分析

5307 拷贝数	5307 转化体											
	Repeat-1			Repeat-2			Repeat-3			平均	RSD	Bias
	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
20000	21500	21980	23300	21980	22150	22360	22270	22700	22010	22250	2.17	11.25
4000	4680	4420	4390	4570	4660	4780	4870	4750	4630	4638.89	3.23	15.97
800	950	880	900	910	910	960	900	1000	1010	935.56	4.70	16.94
160	180	188	183	190	197	203	192	186	183	189.11	3.67	18.19
20	26	16	22	27	14	18	25	18	21	20.78	20.89	3.89

10	11	19	9	10	12	13	9	9	16	11.99	27.61	19.89
<i>zSSIb</i> 拷贝数	<i>zSSIb</i> 基因											
	Repeat-1			Repeat-2			Repeat-3			平均	RSD	Bias
	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
40000	45100	46420	46860	46800	47020	45960	46140	47020	46360	46409	1.26	16.02
8000	9540	9020	9000	9180	9560	9180	9500	9560	9520	9340	2.43	16.75
1600	1940	1940	1880	1840	2000	1980	1980	2000	1960	1947	2.65	21.67
320	356	390	366	394	360	386	364	372	406	377	4.35	17.85
40	56	56	40	38	54	50	46	46	40	47	14.08	18.33
20	28	20	38	38	26	28	17.2	22	24	27	24.68	22.89

结果显示：当 20  $\mu\text{L}$  扩增体系中 5307 转化体特异性序列拷贝数在 20~20000 copies 时，3 次重复测试的正确度偏差（Bias）和重复性相对标准偏差（RSD）均小于 25%，当模板量为 10 拷贝时，正确度偏差（Bias）和重复性相对标准偏差（RSD）出现大于 25% 的情况，因此定量极限（LOQ）确定为 20 个拷贝（5307 转化体特异性序列）；当 DNA 浓度低至 10 拷贝（5307 转化体特异性序列）时，3 次重复测试的 9 个平行均检测到阳性信号，因此检测极限（LOD）确定为 10 拷贝。5307 数字 PCR 方法线性动态范围测试结果表明，20  $\mu\text{L}$  扩增体系中，当模板量在 5307 转化体特异性序列 20~20000 拷贝的范围内，可获得准确的拷贝数浓度和拷贝数比值测量值。

### 31.5 准确性测试

配制 5.0%、3.0%、1.0%、0.5%、0.1% 共 5 个拷贝数分数的 5307 盲样，由不同操作者在不同日期进行 3 次重复测定，每次 3 个平行。测定结果如表 171、表 172 所示，测量平均值与预期值的相对偏倚

(Bias) 均在 $\pm 25\%$ 以内，三次测定的 RSD 均小于 25%，表明方法具有良好的准确性和可重复性。

表 173 5 个盲样的测量结果

重复	PCR 平行	盲样含量测量值				
		S1 (5%)	S2 (3%)	S3 (1%)	S4 (0.5%)	S5 (0.1%)
1	1	4.76	3.46	0.84	0.50	0.08
	2	4.60	2.79	0.89	0.43	0.11
	3	4.97	2.78	0.86	0.44	0.08
2	1	5.03	2.44	0.83	0.39	0.16
	2	4.70	2.62	0.85	0.38	0.12
	3	4.99	2.54	0.95	0.40	0.17
3	1	4.87	2.29	1.04	0.40	0.11
	2	4.70	2.68	0.85	0.38	0.12
	3	4.37	2.88	0.84	0.47	0.10

表 174 5 个盲样定量结果的重复性和重现性统计分析

盲样	预期拷贝数比值(%)	测量平均值(%)	S <sup>r</sup> (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	S <sup>R</sup> (%)	RSD <sub>R</sub> (%)	Bias(%)
S1	5	4.78	0.21	4.38	0.21	4.50	-4.47
S2	3	2.72	0.29	10.61	0.35	12.76	-9.33
S3	1	0.88	0.08	8.64	0.08	8.64	-11.67
S4	0.5	0.42	0.04	8.41	0.04	10.52	-15.78
S5	0.1	0.12	0.02	16.41	0.03	29.42	16.67

二重 ddPCR 的定量结果如表 171 所示，计算得到 5 个盲样 5307/zSSIIb 拷贝数比值的平均值，统计测量结果的重复性相对标准差 (RSD<sub>r</sub>)、重现性相对标准差 (RSD<sub>R</sub>)、和相对偏倚 (Bias)。结果显示，测量平均值均接近预期含量，与预期值的相对偏倚在 $\pm 25\%$ 的可接受范围内；重复性相对标准偏差 RSD<sub>r</sub> 和再现性相对标准偏差 RSD<sub>R</sub> 均小于 25% (表 172)。已建立的 5307/zSSIIb 二重 ddPCR 实

现了对样品中 5307 转化体含量的准确定量，具有良好的重复性和重现性。

### 31.6 结论

5307 ddPCR 扩增引物探针采用已发布的标准方法（GB/19495.5-2018）中的实时荧光 PCR 方法引物探针（表 167）。5307/*zSSIb* 二重 ddPCR 扩增体系见表 173，扩增程序为：95°C 预变性 10 min；94°C 变性 30 s，58°C 退火延伸 60 s，共进行 50 个循环；98°C 变性 10 min，4°C 保存（升降温速率 2°C/s）。

表 175 数字 PCR 扩增体系

组分	终浓度	体积
ddH <sub>2</sub> O		3.0 μL
2×ddPCR™ Supermix for Probes	1×	10.0 μL
10 μmol/L 内标上游引物 <i>zSSIb</i> -QF	0.5 μmol/L	1.0 μL
10 μmol/L 内标下游引物 <i>zSSIb</i> -QR	0.5 μmol/L	1.0 μL
10 μmol/L 内标探针 <i>zSSIb</i> -QP	0.25 μmol/L	0.5 μL
10 μmol/L 转化体上游引物 5307-qF	0.5 μmol/L	1.0 μL
10 μmol/L 转化体上游引物 5307-qR	0.5 μmol/L	1.0 μL
10 μmol/L 转化体探针 5307-qP	0.25 μmol/L	0.5 μL
25 mg/L DNA 模板	2.5 mg/L	2.0 μL
总体积		20.0 μL

扩增体系可根据仪器及试剂耗材的实际使用情况，进行相应调整。此表是 1 个扩增体系的体积，应按照实际反应数量进行扩增体系配置。空白质控品以 2.0 μL 的 ddH<sub>2</sub>O 作模板。

## 32. DAS-40278-9/*zSSIIb* 二重数字 PCR 方法

### 32.1 引物探针浓度确定

根据农业部 2122 号公告-9-2014 中给出的 DAS-40278-9 238bp 的 5'端旁侧序列和玉米内标准基因 *ZSSIIb*(ID. AF019297.1 长度 2480bp), 选取内标基因序列 360bp (340~700bp) 的序列和转化体 5'端旁侧序列 238bp 合成质粒分子。

引物探针浓度比均设为 2:1。当 DAS40278-9 和内标基因的引物/探针浓度为等浓度 200/100 nM 时, 阳性、阴性液滴信号偏低, 且难以明显区分 (图 143 A1, A2); 当两个靶标的引物/探针浓度高于 400/200 nM 时, 阳性微滴信号值升高, 微滴群变宽。当两个靶标的引物/探针浓度均为 800/400 nM 时, 测量的平均拷贝数比值为 0.86, 距离理论值 1.0 最远 (图 143 A3)。当采用 DAS40278-9 引物探针浓度为 500/250 nM, 内标基因的引物/探针为 400/200 nM 时, 阳性和阴性微滴分群明显, 确雨滴最少。测量的拷贝数比值最接近理论值 1.0。二重数字 PCR 二维热图显示了 4 个明显的液滴簇, 分别对应 FAM 阳性液滴簇、HEX 阳性液滴簇、双荧光液滴簇和阴性液滴簇 (图 143B4) 故选择二重数字 PCR 中 DAS40278-9 和 *zSSIIb* 的引物/探针浓度分别为 500/250 nM 和 400/200 nM。

在引物探针浓度确定的前提下, 从 55-63°C 选择 8 个不同的退火温度, 以酶切后质粒分子 DNA 为模板, 进行 DAS40278-9/*zSSIIb* 二

重 ddPCR。在 55°C 至 63°C 的不同退火温度下，DAS40278-9 和 *zSSIb* 阳性液滴的荧光强度均随着退火温度的降低而增加，在退火温度降低到 56.5°C 时，微滴的信号强度达到平台期（图 143 B1, B2）。在 63°C 的退火温度下，DAS40278-9 无阳性微滴，低于 62.4°C 的退火温度时 DAS40278-9 和 *zSSIb* 的阳性和阴性微滴都能明显区分，拷贝数比值在 0.998 -1.001 的范围内波动（图 143 B3），都接近理论值，考虑到退火温度越高，非特异性扩增越少，选择 60°C 作为退火温度（图 143 B1, B2）。60°C 时二重数字 PCR 二维热图显示了 4 个明显的液滴簇，分别对应 FAM 阳性液滴簇、HEX 阳性液滴簇、双荧光液滴簇和阴性液滴簇（图 143 A4）。

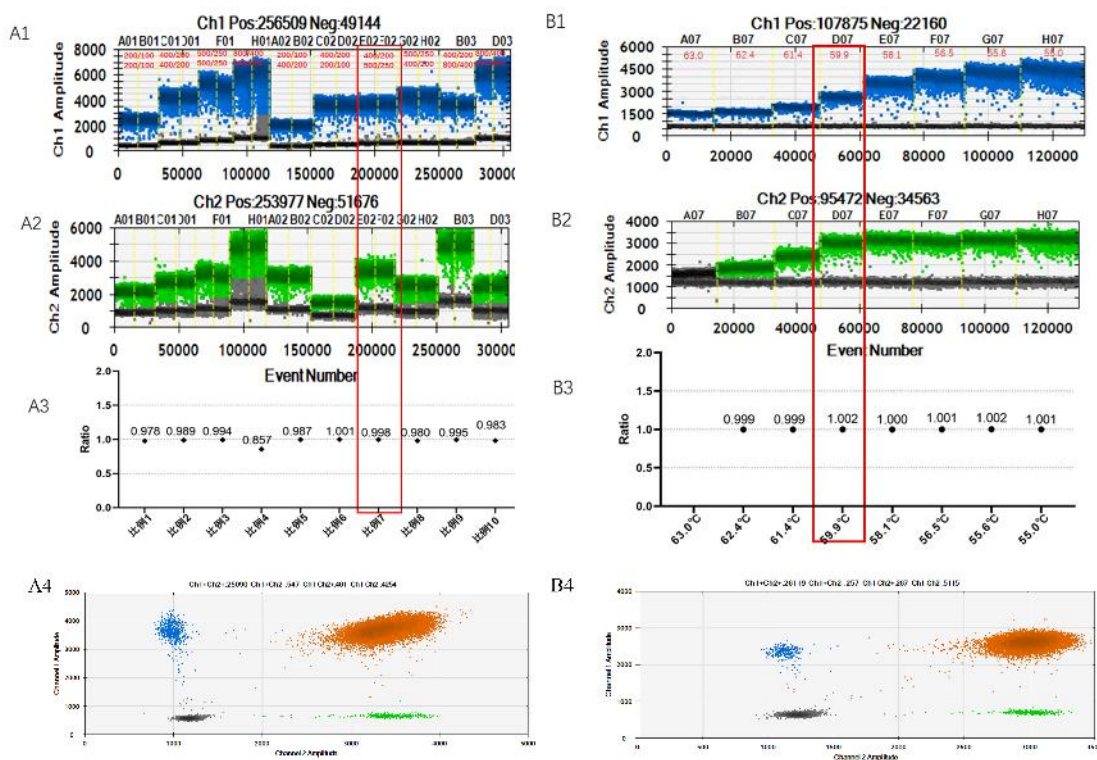


图 143 DAS40278-9/zSSIIB 二重 ddPCR 退火/延伸温度和引物/探针浓度的优化。

A1,A2, zSSIIB 和 DAS40278-9 在不同引物/探针浓度下的一维微滴图，引物/探针浓度备注于各泳道上方，每一浓度设置两个重复。其中 1-8 对应 zSSIIB 和 DAS40278-9 的引物探针浓度相同，分别为 200/100, 400/200, 500/250, 800/400 nM；9-20 对应 zSSIIB 和 DAS40278-9 不同的引物探针浓度，分别为 200/100 nM (zSSIIB)、400/200 nM (DAS40278-9), 400/200 nM (zSSIIB)、200/100 nM (DAS40278-9), 400/200 nM (zSSIIB)、500/250 nM (DAS40278-9), 500/250 nM (zSSIIB)、400/200 nM (DAS40278-9), 400/200 nM (zSSIIB)、800/400 nM (DAS40278-9), 800/400 nM (zSSIIB)、400/200 nM (DAS40278-9)；A3, 不同引物探针浓度下测量的 DAS40278-9/zSSIIB 拷贝数比值；A4, 确认的引物/探针浓度下 DAS40278-9/zSSIIB 二重 ddPCR 的二维微滴图。B1,B2, zSSIIB 和 DAS40278-9 在 55°C 至 63°C 不同退火温度下的一维微滴图；B3, 不同退火温度下测量的 DAS40278-9/zSSIIB 拷贝数比值；B4, 在优化的反应体系和退火温度下 DAS40278-9/zSSIIB 二重 ddPCR 的二维微滴图。

## 32.2 转化体 DAS40278-9 纯合/杂合性的确认

提取转化体 DAS40278-9 的基因组 DNA，设置 4 个浓度值（基因组 DNA 内标拷贝数 20000 两倍梯度稀释），每个浓度重复 4 次。

利用建立的二重数字 PCR 体系检测转化体 DAS40278-9 中转化体序列与内源基因 *zSSIIb* 的拷贝数比值。结果显示转化体序列与内源基因拷贝数比值均在 0.49-0.50 之间，表明 DAS40278-9 转化体为杂合子。

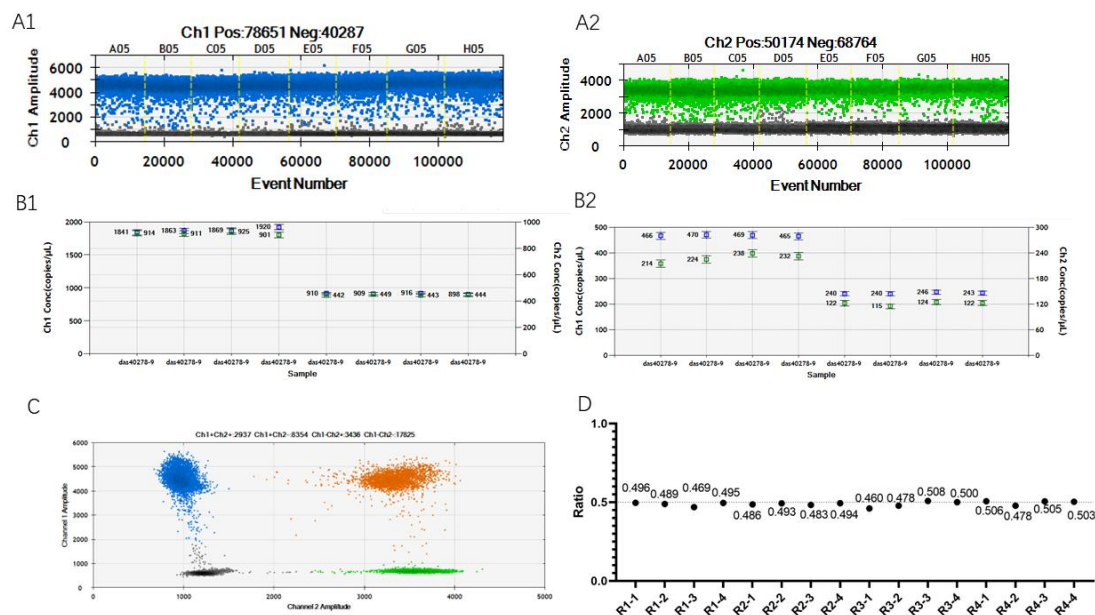


图 144 二重数字 PCR 引物探针在 DAS40278-9 基因组中的确认

A1, A2, 基因组 DNA 在不同浓度下内标 *zSSIIb* 和 DAS40278-9 扩增的一维微滴图，每个浓度显示 2 各重复的结果；B1,B2, 四种不同基因组 DNA 浓度下二重数字 PCR 扩增拷贝数值；C 基因组 DNA 的 DAS40278-9/*zSSIIb* 二重 ddPCR 的二维微滴图；D, 四种浓度下测量的 DAS40278-9/*zSSIIb* 拷贝数比值。

### 32.3 DAS40278-9/*zSSIIb* 二重微滴数字 PCR 特异性测试

用转基因大豆 DAS40278-9、转基因大豆混合样（DBN9004、MON89788、MON87751、CAL16、中黄 6106、DBN8205）、转基因玉米混合样（瑞丰 125、瑞丰 8、T25、MIR604、NK603、MON87427、DBN9936、DBN9858、DBN9501）、转基因水稻混合样（TT51-1、KF-6、KMD、G6H1、T1C-19、T2A-1）、转基因油菜混合样（MS1、

MS8、RF1、RF2、RF3、T45、Oxy-235、Topas19/2、MON88302、73496)、转基因棉花混合样(MON1445、MON531、MON15985、LLCOTTON25、MON88913、GHB614、COT102)、非转基因大豆基因组DNA作模板进行DAS40278-9和ZSSIIb微滴数字PCR(ddPCR)扩增,用水做空白对照,测试DAS40278-9转化体特异性ddPCR的检测特异性。ZSSIIb内标基因ddPCR在转基因大豆和非转基因大豆品种中都产生了阳性微滴,在其他作物和空白对照中无阳性微滴;DAS40278-9转化体特异性ddPCR仅在转基因大豆DAS40278-9中有阳性微滴,在其他转基因玉米品种和空白对照中均无阳性微滴(图145)。结果表明DAS40278-9/ZSSIIb二重微滴数字PCR有良好的扩增特异性。

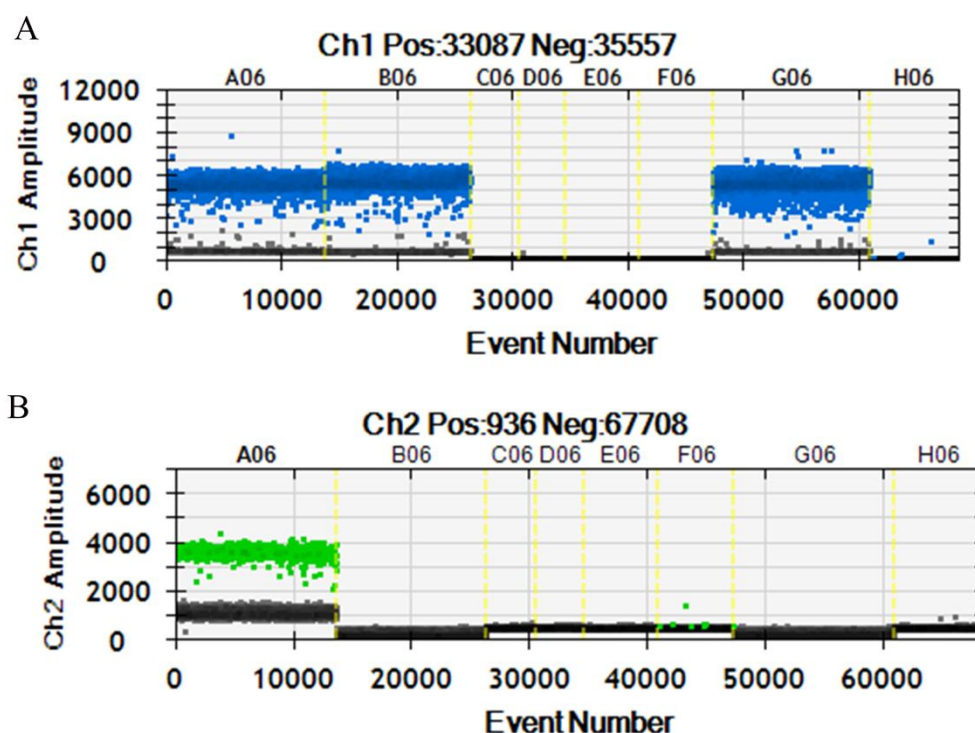


图 145 DAS40278-9 微滴数字 PCR 特异性测试

A, ZSSI***b*** 微滴数字 PCR 一维热图; B, DAS40278-9 微滴数字 PCR 一维热图。样品顺序: A06. DAS40278-9, B06. 其他转基因玉米混合样 C06. 转基因水稻混合样, D06. 转基因油菜混合样, E06. 转基因棉花混合样, F06 转基因大豆混合样, G06. 非转基因玉米, H06. 空白。

### 32.4 DAS40278-9/*zSSIb* 二重 ddPCR 的 LOD、LOQ 和动力学范围测试

在优化的 PCR 条件下, 用含 DAS40278-9 基因组 DNA 的连续稀释液测试 DAS40278-9/*zSSIb* 二重 ddPCR 的动态范围、LOD 和 LOQ。不同浓度的微滴热图见图 146, 测量的拷贝数浓度以及 DAS40278-9/*zSSIb* 的拷贝数比值显示在表 174 中。当反应体系中模板拷贝数为 5 拷贝时, DAS40278-9/*zSSIb* 二重 ddPCR 4 个反应中 DAS40278-9 的阳性微滴数均超过 1 个, 4 个反应中 *zSSIb* 的阳性微滴数均超过 2 个, 呈现阳性信号, DAS40278-9 LOD 确定为 5 个拷贝的 DAS40278-9 基因组 DNA。统计各个二重数字 PCR 反应测量的 DAS40278-9 拷贝数、*zSSIb* 拷贝数、和 DAS40278-9/*zSSIb* 拷贝数比值, 计算各模板量测量结果的相对标准差(RSD)和相对偏倚(Bias%)。当反应体系中模板拷贝数为 50 拷贝时, 测量结果的 RSD 值均小于 25%, Bias%均在±25%之间, LOQ 确定为 50 个拷贝的 DAS40278-9 基因组 DNA (表 174)。

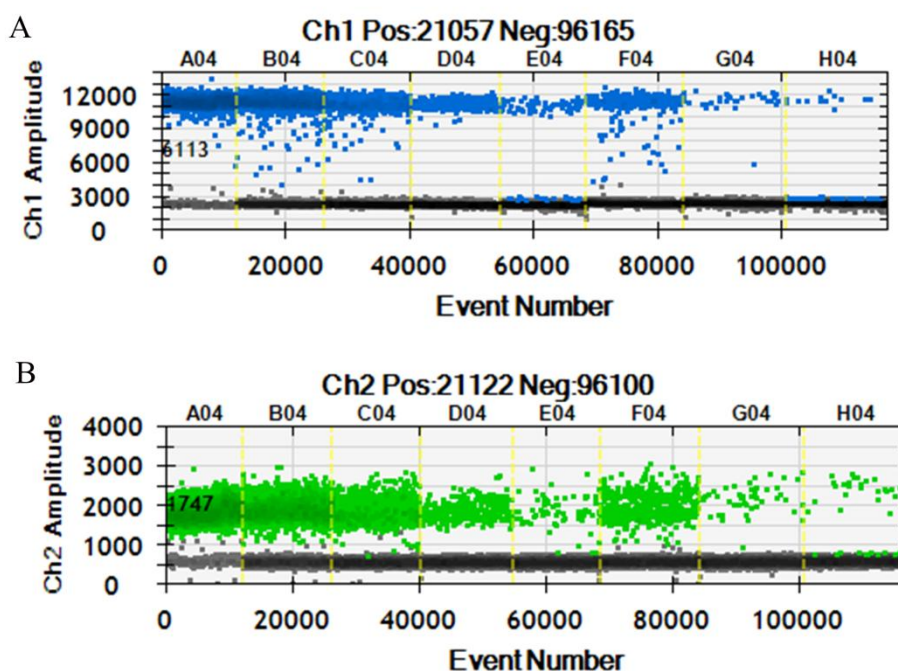


图 146 梯度稀释 DNA 溶液 DAS40278-9/*ZSSIIb* 二重 ddPCR 的微滴热图  
 A, *ZSSIIb* 微滴数字 PCR 一维热图; B, DAS40278-9 微滴数字 PCR 一维热图。模板量依次为 55000、20000、4000、800、200、100、50、5copies。

表 176 DAS40278-9 玉米特异性序列数字 PCR 线性动态范围与重复性分析

Target	Expected concentration (copies/uL)	Copy number concentration (copies/uL)							
		Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Mean	SD	RSD%	Bias%
<i>zSSIIb</i> copy number	55000	51800	51800	53100	54200	52725	1158.66	2.20	-4.14
	20000	19000	19390	18330	15740	18115	1642.73	9.07	-9.43
	4000	3910	3880	3830.00	3450	3767	214.22	5.69	-5.81
	800	854	880	739.00	766	810	67.85	8.38	1.22
	200	184	230	184	187	196	22.54	11.49	-1.88
	100	127	114	122	100	116	11.79	10.18	15.75
	50	47	42	39	51	45	5.32	11.88	-10.50
	5	2.00	2.10	2.00	2.00	2.03	0.05	2.47	-59.50
DAS40278 -9 copy number	27500	24400	25300	24800	25300	24950	436	1.75	-9.27
	10000	9260	9310	9260	9380	9302	57	0.61	-6.98
	2000	1800	1830	1820	1890	1835	39	2.11	-8.25
	400	372	394	401	415	395	18	4.53	-1.13
	100	109	112	100	109	107	5	4.83	7.50

	50	60	63	53	64	60	5	8.28	20.00
	25	29	19	26	30	26	5	19.10	4.00
	2.5	1.70	2.20	1.10	1.50	1.63	0.46	28.14	-35.00
DAS40278 -9/ <i>ZSSIIb</i> ratio	55000	0.47	0.49	0.47	0.47	0.47	0.01	2.17	-5.34
	20000	0.49	0.48	0.51	0.60	0.52	0.05	10.36	3.43
	4000	0.46	0.47	0.48	0.55	0.49	0.04	8.16	-2.25
	800	0.44	0.45	0.54	0.54	0.49	0.06	11.84	-1.61
	200	0.59	0.49	0.54	0.58	0.55	0.05	8.69	10.29
	100	0.47	0.73	0.35	0.64	0.55	0.17	30.67	9.65
	50	0.47	0.55	0.43	0.64	0.52	0.09	17.38	4.97
	5	0.85	1.05	0.55	0.75	0.80	0.21	25.92	59.88

当 20  $\mu\text{L}$  反应液中 DNA 模板量在 50 到  $5.5 \times 10^4$  个拷贝的范围内，DAS40278-9/*zSSIIb* 二重 ddPCR 测量的 DNA 拷贝数与预期 DNA 拷贝数之间显示良好的线性响应， $R^2$  为 0.999（图 147 A, B），测量的拷贝数比值在预期范围内波动，具有良好的重复性（图 147 C）。DAS40278-9/*zSSIIb* 二重 ddPCR 动态范围测试表明，20  $\mu\text{L}$  反应体系中，当模板量在  $50 \sim 5.5 \times 10^4$  拷贝的范围内，可获得准确的拷贝数浓度和拷贝数比值测量值。当模板量为 5 拷贝时，DAS40278-9/*zSSIIb* 二重 ddPCR 测量的 DNA 拷贝数与预期 DNA 拷贝数之间偏差为 59.88%。

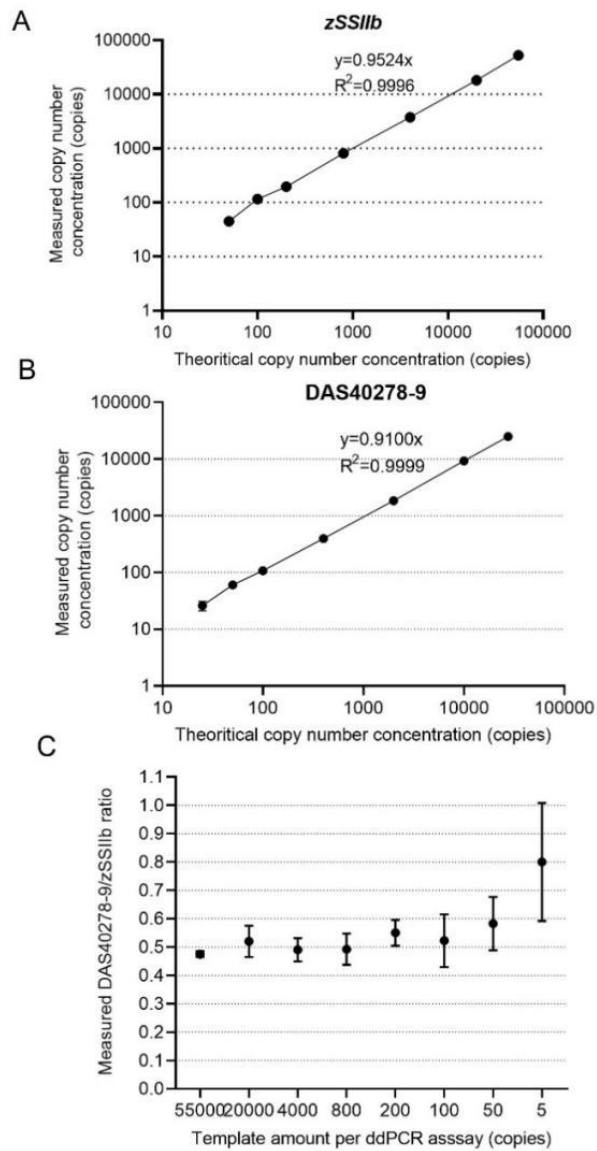


图 147 DAS40278-9/zSSIIB 二重 ddPCR 的动态范围和实测拷贝数比

A, 二重 ddPCR 中 zSSIIB 在 50 到  $5.5 \times 10^4$  个拷贝的动态范围内测量拷贝数与预期拷贝数间有良好的线性关系; B, 二重 ddPCR 中 DAS40278-9 在 25 到  $2.75 \times 10^4$  个拷贝的动态范围内测量拷贝数与预期拷贝数间有良好的线性关系; C, 测得的 DNA 溶液的拷贝数比随着 DNA 浓度的降低显示出升高的标准差(SD), 且垂直线段表示标准差。数据来自四个技术重复的平均值。

### 32.5 DAS40278-9/zSSIIb 二重 ddPCR 的测量准确性

通过天平称量法配制 5 个 DAS40278-9 基因组 DNA 盲样 (Sg1-Sg5)，拷贝数比值依次为 5.0%、3.0%、1.0%、0.5%、0.1%。用 DAS40278-9/zSSIIb 二重 ddPCR 对 5 个盲样进行定量。二重 ddPCR 的定量检测由不同的操作者在不同的日期进行了 3 次测量，测量结果如表 175 所示。计算 5 个盲样 DAS40278-9/zSSIIb 拷贝数比值的平均值，统计测量结果的重复性相对标准差 (RSD<sup>r</sup>)、重现性相对标准差 (RSD<sup>R</sup>)、和相对偏倚 (Bias)。测量平均值均接近预期含量，与预期值的相对偏倚在 5.22%~22.5 之间，在±25%的可接受范围内；重复性相对标准偏差 RSD<sup>r</sup> 在 2.42%~9.82%之间，再现性相对标准偏差 RSD<sup>R</sup> 在 2.80%~9.82%之间，均小于 25% (表 3)。已建立的 DAS40278-9/ZSSIIb 二重 ddPCR 实现了对 GMO 含量的准确定量，具有良好的重复性和重现性 (表 176)。

表 177 5 个盲样的测量结果

重复	PCR 平行	盲样				
		Sg1 (%)	Sg2 (%)	Sg3 (%)	Sg4 (%)	Sg5 (%)
1	1	4.92	2.82	1.01	0.58	0.12
	2	5.12	2.81	1.05	0.58	0.10
	3	4.90	2.82	1.04	0.55	0.11
2	1	4.62	2.72	1.09	0.59	0.11
	2	4.95	2.74	1.02	0.60	0.12
	3	4.80	2.75	1.05	0.64	0.10
3	1	4.86	2.74	1.06	0.66	0.12
	2	4.97	2.91	0.99	0.64	0.11
	3	4.93	2.93	1.09	0.58	0.11
4	1	4.76	2.96	0.97	0.65	0.09

	2	4.70	3.07	1.11	0.60	0.11
	3	4.90	2.85	1.09	0.68	0.12

表 178 DAS40278-9/*ZSSIIb* 二重 ddPCR 定量结果的重复性和重现性统计分析

盲样	拷贝数比值 (%)	平均值 (%)	S <sup>r</sup> (%)	RSD <sup>r</sup> (%)	S <sup>R</sup> (%)	RSD <sup>R</sup> (%)	Bias (%)
Sg1	5.0	4.87	0.12	2.42	0.14	2.80	-2.62
Sg2	3.0	2.84	0.08	2.68	0.11	3.94	-5.22
Sg3	1.0	1.05	0.05	4.78	0.05	4.78	4.75
Sg4	0.5	0.61	0.03	5.39	0.04	6.76	22.50
Sg5	0.1	0.11	0.01	9.82	0.01	9.82	10.00

### 32.6 结论

DAS40278-9/*ZSSIIb* 二重 ddPCR 中的 DAS40278-9 和 *ZSSIIb* 所用引物/探针序列见表 177，扩增体系见表 178，扩增程序为：94℃ 变性 10 min；50 个循环（94℃ 变性 30 s，58℃ 退火延伸 1 min）；98℃ 变性 10 min，4℃ 保存（升降温速率 2℃/s）。

表 179 玉米 DAS40278-9 转化体及 *zSSIIb* 内标基因引物和探针序列

转化体/基因	引物/探针名称及序列 (5'-3')	扩增片段大小 (bp)
DAS40278-9	DAS40278-9-qF: CACGAACCATTGAGTTACAATC	98
	DAS40278-9-qR: TGGTTCATTGTATTCTGGCTTTG	
	DAS40278-9-qP:HEX- CGTAGCTAACCTTCATTGTATTCCG-BHQ	
<i>zSSIIb</i>	<i>zSSIIb</i> -QF: CGGTGGATGCTAAGGCTGATG	88
	<i>zSSIIb</i> -QR: AAAGGGCCAGGTTTCATTATCCTC	
	<i>zSSIIb</i> -QP:FAM-AGCTTCGCCGCTTCCTTCAACTTCAC-BHQ1	

表 180 DAS40278-9/*ZSSIIb* 二重微滴数字 PCR 反应体系

PCR 反应试剂	终浓度	体积(μL)
2×ddPCR™ Supermix for Probes	1×	10
10 μmol/L DAS40278-9-qF	0.5 μM	1.0
10 μmol/L DAS40278-9-qR	0.5 μM	1.0
10 μmol/L DAS40278-9-qP	0.25 μM	0.5
10 μmol/L <i>ZSSIIb</i> -QF	0.4 μM	0.8

10 $\mu\text{mol/L}$ <i>ZSSIIb</i> -QR	0.4 $\mu\text{M}$	0.8
10 $\mu\text{mol/L}$ <i>ZSSIIb</i> -QP	0.2 $\mu\text{M}$	0.4
25 mg/L DNA 模板	25 ng/ $\mu\text{L}$	2.0
ddH <sub>2</sub> O	/	3.5
合计	/	20

扩增体系可根据仪器及试剂耗材的实际使用情况,进行相应调整。此表是1个扩增体系的体积,应按照实际反应数量进行扩增体系配置。空白质控品以2.0  $\mu\text{L}$ 的 ddH<sub>2</sub>O作模板。

### 33. DP4114/*zSSIIb* 二重数字 PCR 方法

#### 33.1 引物探针确认

DP4114 是先锋国际良种公司通过农杆菌转化方法开发的含 *cry1F*、*cry34Ab1*、*cry35Ab1* 和 *pat* 基因的转基因抗虫耐除草剂玉米品种,其转化体分子特征由先锋国际良种公司解析。首先对获得转基因材料的分子特征进行测序验证,确定转基因材料的转化体身份。DP4114 转化体特异性引物探针和玉米内标准基因 *zSSIIb* 引物探针选用已发布的标准方法(农业农村部公告第 864 号—6—2024)中的实时荧光 PCR 方法引物探针。

表 181 DP4114 转化体特异性引物和探针序列

靶标	引物/探针名称及序列 (5'-3')	扩增片段大小 (bp)	来源
<i>zSSIIb</i> 基因	<i>zSSIIb</i> -3F: CGGTGGATGCTAAGGCTGATG	88	农业农村部公告第 864 号—6—2024
	<i>zSSIIb</i> -4R: AAAGGGCCAGGTTTCATTATCCTC		
	<i>zSSIIb</i> -P:HEX-TAAGGAGCACTCGCCGCCGCATCTG-BHQ1		
DP4114 转化体	4114-qF: CGCTACTAGACAATTCAG	102	4
	4114-qR: GAAGTTCTTATATCTGGCGAT		
	4114-qP:FAM-AGACAACCTTAATAACACATTGCGGACG-BHQ1		

在伯乐微滴式数字 PCR 平台 QX200 上，用通用的 PCR 反应体系（引物/探针浓度 400/200 nM）和退火温度（56°C），以 DP4114 杂合体基因组 DNA 为模板，进行 DP4114 转化体/*zSSIb* 基因的二重 ddPCR 扩增，对表 179 中的引物探针组合进行测试，设 3 个平行反应。

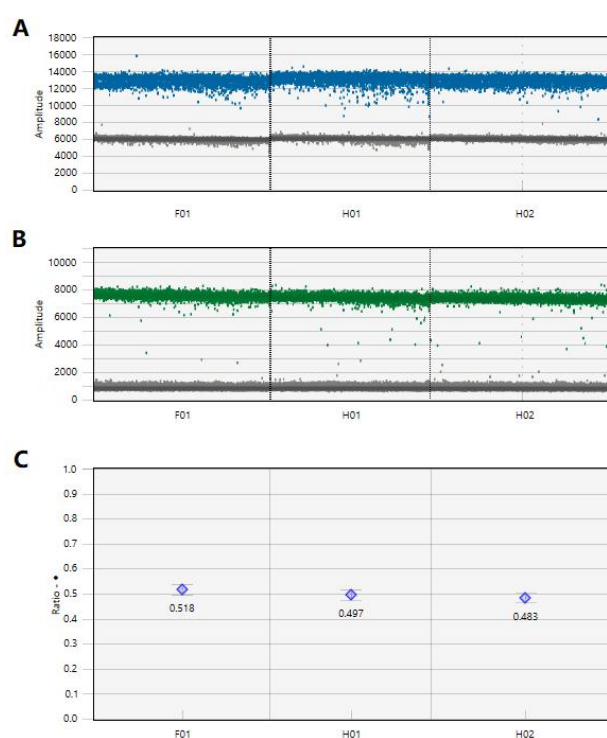


图 148 数字 PCR 引物探针确认

注：A 为 DP4114 玉米转化体特异性序列一维微滴图谱；B 为 *zSSIb* 基因一维微滴图谱，C 为 DP4114 转化体和 *zSSIb* 基因拷贝数比值。

结果显示，DP4114 转化体和 *zSSIb* 基因二重微滴式数字 PCR 的一维微滴图谱（1-D）的阴性微滴和阳性微滴分界清晰，“雨滴”较少（图 148A，B）；DP4114 转化体和 *zSSIb* 基因拷贝数比值接近 0.5，

符合杂合体 DP4114 玉米分子特征（图 148C）。综上，确认表 1 的引物探针适用 DP4114 转化体/*zSSIb* 基因的二重 ddPCR 扩增。

### 33.2 DP4114/*zSSIb* 二重微滴数字 PCR 特异性测试

用转基因玉米 DP4114、其他转基因玉米混合样（瑞丰 125、瑞丰 8、T25、MIR604、NK603、MON87427、DBN9936、DBN9858、DBN9501）、转基因大豆混合样（DBN9004、MON89788、MON87751、CAL16、中黄 6106、DBN8205）、转基因水稻混合样（TT51-1、KF-6、KMD、G6H1、T1C-19、T2A-1）、转基因油菜混合样（MS1、MS8、RF1、RF2、RF3、T45、Oxy-235、Topas19/2、MON88302、73496）、转基因棉花混合样（MON1445、MON531、MON15985、LLCOTTON25、MON88913、GHB614、COT102）、非转基因玉米基因组 DNA 作模板进行 DP4114 和 *zSSIb* 二重 ddPCR 扩增，用水做空白对照，测试 DP4114 转化体和 *zSSIb* 二重 ddPCR 方法的特异性。

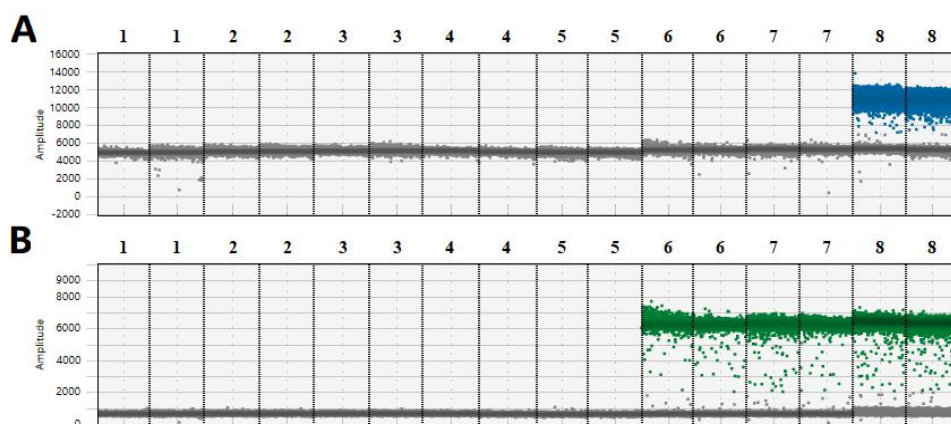


图 149 DP4114/*zSSIb* 二重 ddPCR 特异性测试扩增图谱（一维）

注：A 为 DP4114 转化体特异性序列；B 为 *zSSIIb* 基因；1 为空白对照，2 为转基因棉花混合样，3 为转基因大豆混合样，4 为转基因水稻混合样，5 为转基因油菜混合样，6 为其他转基因玉米混合样，7 为非转基因玉米，8 为转基因玉米 DP4114。

结果显示，*zSSIIb* 基因 ddPCR 在玉米样品中扩增得到阳性微滴，在其他作物和空白对照中不能扩增得到阳性微滴；DP4114 转化体特异性序列 ddPCR 仅在转基因玉米 DP4114 样品中扩增得到阳性微滴，在其他转基因玉米品种和空白对照中不能扩增得到阳性微滴，结果表明 DP4114/*zSSIIb* 二重 ddPCR 方法有良好的特异性（图 149）。

### 33.3 DP4114/*zSSIIb* 二重数字 PCR 的条件优化

PCR 扩增程序中退火温度的高低对阴阳性微滴区分有显著的影响，本项目设置了 54°C、56°C、58°C、60°C、62°C 五个温度梯度，测试 DP4114 和 *zSSIIb* 基因二重 ddPCR 的扩增效果。

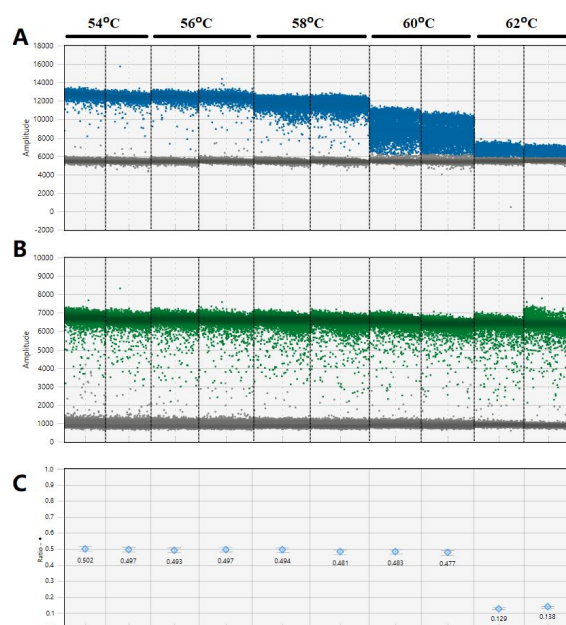


图 150 数字 PCR 引物探针退火温度优化扩增图谱

注：A 为 DP4114 玉米转化体特异性序列一维微滴图谱；B 为 *zSSIb* 基因一维微滴图谱，C 为 DP4114 转化体和 *zSSIb* 基因拷贝数比值。

表 182 数字 PCR 引物探针退火温度优化扩增数据分析

靶标	<i>zSSIb</i> 基因				DP4114 玉米特异性序列				DP4114: <i>zSSIb</i> 拷贝数平均值比值
	拷贝数测量值	平均值	标准差 SD	相对标准偏差 RSD	拷贝数测量值	平均值	标准差 SD	相对标准偏差 RSD	
54	13430	13350	113.14	0.85	6730	6665	91.92	1.38	0.50
	13270				6600				
56	13530	13425	148.49	1.11	6670	6660	14.14	0.21	0.50
	13320				6650				
58	13290	13415	176.78	1.32	6570	6540	42.43	0.65	0.49
	13540				6510				
60	13350	13050	424.26	3.25	6450	6265	261.63	4.18	0.48
	12750				6080				
62	13330	13450	169.71	1.26	1710	1795	120.21	6.70	0.13
	13570				1880				

数字 PCR 扩增结果显示：扩增图谱中 *zSSIb* 基因和 DP4114 转化体特异性序列引物探针在 54°C、56°C、58°C、60°C、62°C 五个退火温度下，DP4114 玉米转化体特异性序列阳性微滴的荧光强度随温度升高呈现降低趋势，*zSSIb* 基因阴阳微滴的荧光强度无显著差异，阴阳液滴分界清晰，没有难以界定的“下雨”现象（图 150）；进一步对测试数据进行分析可以发现，在 56°C 时，相同模板测算的拷贝数最高，且拷贝数比值最接近理论值 0.5，RSD 较小（表 180）。因此，确定 *zSSIb* 基因和 DP4114 转化体特异性序列引物探针最优退火延伸温度为 56°C。经过优化后 *zSSIb* 基因和 DP4114 转化体特异性序列数字 PCR 扩增程序为：95°C 预变性 10 min；94°C 变性 30 s，56°C 退火

延伸 60 s，共进行 50 个循环；98°C 变性 10 min，4°C 保存（升降温速率 2°C/s）。

由于微滴式数字 PCR 平台 Bio-Rad QX200 需使用专用的扩增试剂，PCR 扩增体系中仅选择引物探针浓度进行优化测试。实时荧光 PCR 方法中常用引物与探针终浓度分别为 0.4  $\mu\text{mol/L}$  和 0.2  $\mu\text{mol/L}$ ，Bio-Rad 2 $\times$ ddPCR<sup>TM</sup> Supermix for Probes 的说明书引物与探针的终浓度分别为 0.9  $\mu\text{mol/L}$  和 0.25 nmol/L。参考上述引物探针终浓度设置了 8 组 *zSSIb* 基因和 DP4114 转化体特异性序列引物：探针终浓度进行测试。

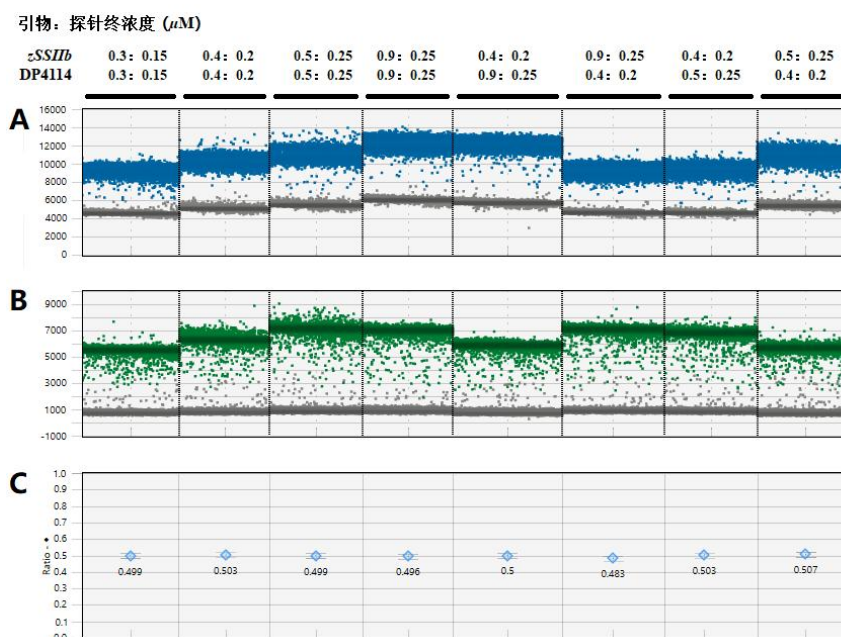


图 151 数字 PCR 引物探针浓度优化扩增图谱

注：A 为 DP4114 玉米转化体特异性序列一维微滴图谱；B 为 *zSSIb* 基因一维微滴图谱，C 为 DP4114 转化体和 *zSSIb* 基因拷贝数比值。

表 183 数字 PCR 引物探针浓度优化扩增数据分析

靶标	<i>zSSIb</i> 基因	DP4114 玉米特异性序列	DP4114
----	-----------------	----------------	--------

<i>zSSIb</i> 引物: 探针 终浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )	DP4114 引物: 探针 终浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )	拷贝数 测量值	平均值	标准 差 SD	相对 标准 偏差 <i>RSD</i>	拷贝 数测 量值	平均值	标准差 SD	相对标准 偏差 <i>RSD</i>	
0.3: 0.15	0.3: 0.15	12810	12845	49.50	0.39	6390	6405	21.21	0.33	0.50
		12880				6420				
0.4: 0.2	0.4: 0.2	13290	13295	7.07	0.05	6690	6765	106.07	1.57	0.51
		13300				6840				
0.5: 0.25	0.5: 0.25	13030	13015	21.21	0.16	6500	6525	35.36	0.54	0.50
		13000				6550				
0.9: 0.25	0.9: 0.25	12830	12965	190.92	1.47	6360	6525	233.35	3.58	0.50
		13100				6690				
0.4: 0.2	0.9: 0.25	13270	13175	134.35	1.02	6640	6530	155.56	2.38	0.50
		13080				6420				
0.9: 0.25	0.4: 0.2	13230	13055	247.49	1.90	6390	6405	21.21	0.33	0.49
		12880				6420				
0.4: 0.2	0.5: 0.25	13070	13010	84.85	0.65	6570	6495	106.07	1.63	0.50
		12950				6420				
0.5: 0.25	0.4: 0.2	13050	13115	91.92	0.70	6610	6555	77.78	1.19	0.50
		13180				6500				

数字 PCR 扩增结果显示：扩增图谱中 *zSSIb* 基因和 DP4114 转化体特异性序列在不同的引物探针浓度下，微滴的荧光强度存在较显著差异，随着引物探针浓度降低，阳性微滴信号出现降低，在 *zSSIb* 基因和 DP4114 转化体特异性序列引物：探针终浓度分别为 0.5: 0.25  $\mu\text{mol/L}$  和 0.5: 0.25  $\mu\text{mol/L}$  时，扩增图谱阴阳液滴分界更清晰，没有难以界定的“下雨”现象（图 151）；进一步对测试数据进行分析可以发现，在 *zSSIb* 基因和 DP4114 转化体特异性序列引物：探针终浓度分别为 0.5: 0.25  $\mu\text{mol/L}$  和 0.5: 0.25  $\mu\text{mol/L}$  时，相同模板测算的拷贝数比值最接近理论值 0.5，*RSD* 较小（表 181）。因此，确定 *zSSIb* 基因和 DP4114 转化体特异性序列最优引物：探针终浓度分别为 0.5:

0.25  $\mu\text{mol/L}$  和 0.5: 0.25  $\mu\text{mol/L}$ 。经过优化后 *zSSIb* 基因和 DP4114 转化体特异性序列数字 PCR 扩增体系如表 182 所示。

表 184 数字 PCR 扩增体系

组分	体积
ddH <sub>2</sub> O	3.0 $\mu\text{L}$
2 $\times$ ddPCR <sup>TM</sup> Supermix for Probes	10.0 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 内标上游引物 <i>zSSIb</i> -3F	1.0 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 内标下游引物 <i>zSSIb</i> -4R	1.0 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 内标探针 <i>zSSIb</i> -P	0.5 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 转化体上游引物 4114-qF	1.0 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 转化体上游引物 4114-qR	1.0 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 转化体探针 4114-qP	0.5 $\mu\text{L}$
DNA 模板	2.0 $\mu\text{L}$
总体积	20.0 $\mu\text{L}$

### 33.4 DP4114/*zSSIb* 二重 ddPCR 的 LOD、LOQ 和动力学范围测试

微滴式数字 PCR 的理论有效线性范围是 1~100000 个拷贝，实际测试时，20  $\mu\text{L}$  反应液在微滴生成仪中一般生成 10000~20000 个有效微滴，微滴数大于 10000 为有效反应。为了测试 *zSSIb* 基因和 DP4114 转化体特异性序列数字 PCR 方法的线性范围，将 100 ng/ $\mu\text{L}$  的杂合 DP4114 玉米基因组 DNA 进行梯度稀释制作成 10 个浓度的标准品，按确定的扩增条件进行 *zSSIb* 基因和 DP4114 转化体特异性序列数字 PCR 扩增，每个标准品扩增设置 4 个平行。根据标准品数字 PCR 测量值及初始模板拷贝数分别绘制 *zSSIb* 基因和 DP4114 转化体特异性序列的线性回归曲线进行线性范围分析，对 4 个平行间 *zSSIb* 基因和

DP4114 转化体特异性序列测量值以及拷贝数比值的标准偏差和相对标准偏差进行数据统计, 评价 *zSSIb* 基因和 DP4114 转化体特异性序列数字 PCR 方法的重复性。根据《转基因植物及其产品成分检测 数字 PCR 方法制定指南》(农业农村部公告第 323 号—21—2020) 中定量检测的要求, 在整个线性动态范围内, 线性度即线性回归方程的决定系数  $R^2$  一般应  $\geq 0.98$ , 正确度偏差 (*Bias*) 不超过标称值的 25%, 精密度即重复性相对标准偏差 (*RSD*) 一般应  $\leq 25\%$ 。

表 185 DP4114 玉米特异性序列数字 PCR 线性动态范围与重复性分析

Target	Expected concentration (copies)	Copy number concentration (copies)							
		Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Mean	SD	<i>RSD</i> (%)	<i>Bias</i> (%)
DP4114 copy number	85000	65826	69637	67731	69461	68163.75	1780.04	2.61	-19.81
	17000	16999	17435	17853	16469	17189.00	593.27	3.45	1.11
	3400	3402	3689	3552	3618	3565.25	122.37	3.43	4.86
	680	711	694	762	764	732.75	35.62	4.86	7.76
	160	164	173	146	164	161.75	11.32	7.00	1.09
	80	64.3	95.5	86.7	69.5	79.00	14.58	18.46	-1.25
	40	44.5	40.4	39.7	27.7	38.08	7.23	19.00	-4.81
	20	36.9	32.4	15.2	14.3	24.70	11.64	47.13	23.50
	10	12.6	8.5	4.9	4.5	7.63	3.77	49.48	-23.75
	1	-	-	1.6	-	-	-	-	-
<i>zSSIb</i> copy number	170000	136962	140645	131986	133628	135805.25	3833.55	2.82	-20.11
	34000	34935	35387	34842	32104	34317.00	1494.41	4.35	0.93
	6800	6903	7388	6796	7199	7071.50	271.24	3.84	3.99
	1360	1333	1483	1502	1377	1423.75	81.76	5.74	4.69
	320	293	353	306	345	324.25	29.25	9.02	1.33
	160	137	172	183	143	158.75	22.25	14.01	-0.78
	80	83.8	76.6	89	90.4	84.95	6.25	7.36	6.19
	40	46	35.4	30.2	52.1	40.93	9.94	24.28	2.31
	20	28.4	14.7	10.1	23.5	19.18	8.29	43.23	-4.13

Target	Expected concentration (copies)	Copy number concentration (copies)							
		Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Mean	SD	RSD (%)	Bias (%)
	2	-	1.2	-	-	-	-	-	-
Target	Expected DP4114 concentration (copies)	Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Mean	SD	RSD (%)	Bias (%)
DP4114/ <i>zSSIb</i> ratio	85000	0.481	0.495	0.513	0.520	0.502	0.018	3.537	0.218
	17000	0.487	0.493	0.512	0.513	0.501	0.014	2.702	0.117
	3400	0.493	0.499	0.523	0.503	0.504	0.013	2.551	0.435
	680	0.533	0.468	0.507	0.555	0.516	0.037	7.246	1.588
	160	0.560	0.490	0.477	0.475	0.501	0.040	7.986	0.057
	80	0.469	0.555	0.474	0.486	0.496	0.040	8.074	-0.391
	40	0.531	0.527	0.446	0.306	0.453	0.105	23.222	-4.727
	20	0.802	0.915	0.503	0.274	0.624	0.291	46.582	12.380
	10	0.444	0.578	0.485	0.191	0.425	0.165	38.928	-7.537
	1	-	-	-	-	-	-	-	-

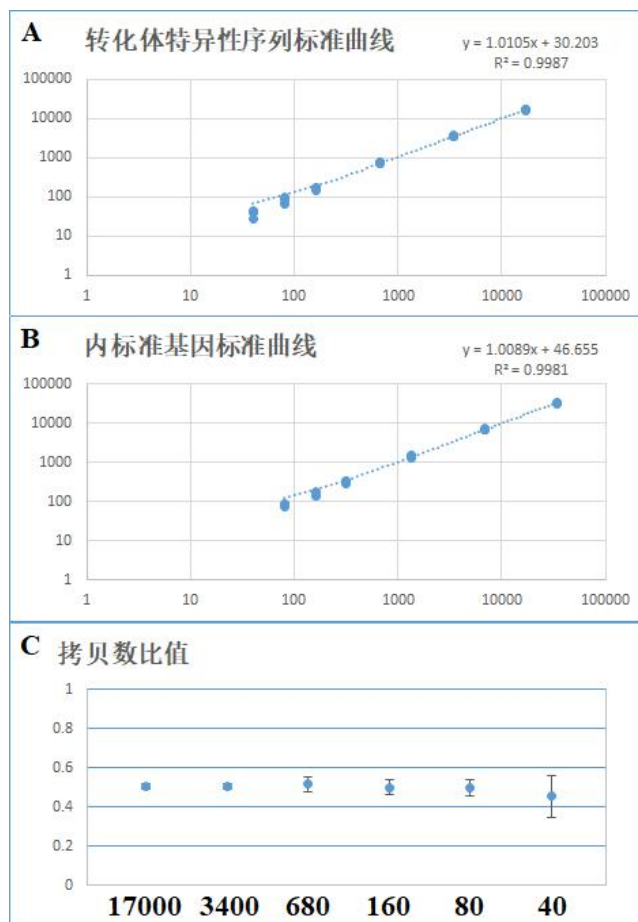


图 152 DP4114/zSSIIB 二重数字 PCR 方法线性动态范围测试

注：A 为 DP4114 转化体特异性序列拷贝数测量值与预期值的线性回归方程（y 代表拷贝数测量值，x 代表拷贝数预期值）；B 为 zSSIIB 基因拷贝数测量值与预期值的线性回归方程（y 代表拷贝数测量值，x 代表拷贝数预期值）；C 为 DP4114 转化体特异性序列和 zSSIIB 基因拷贝数比值与不同浓度模板量的关系（y 代表模板拷贝数比值，x 代表 DP4114 转化体特异性序列拷贝数预期值）。

结果显示：当 20  $\mu$ L 扩增体系中 DP4114 转化体特异性序列和 zSSIIB 基因拷贝数分别在 40~17000 copies 和 80~34000 copies 之间时，随着拷贝数的降低，4 个重复间正确度偏差（Bias）和重复性相对标准偏差（RSD）升高，但均小于 25%，当模板量为 20 拷贝时，正确度偏差（Bias）和重复性相对标准偏差（RSD）出现大于 25% 的情况，因此定量极限（LOQ）确定为 40 个拷贝（DP4114 转化体特异性序列），

当 DNA 浓度低至 5 拷贝 (DP4114 转化体特异性序列) 时, 4 个平行中只有 1 个检测到阳性信号, 其余均无阳性微滴, 而当 DNA 浓度为 10 拷贝 (DP4114 转化体特异性序列) 时, 依然可以稳定的检测到阳性信号, 拷贝数测量值在 5.3~18.9 之间, 因此检测极限 (LOD) 确定为 10 拷贝 (DP4114 转化体特异性序列) (表 183); DP4114 转化体特异性序列和 *zSSIIb* 基因微滴数字 PCR 获得的拷贝数浓度测量值与预期值具有良好的相关性, 线性回归方程分别为  $y=1.0105x+30.232$  和  $y=1.0089x+46.655$ , 决定系数  $R^2$  值分别等于 0.9987 和 0.9981, DP4114 转化体特异性序列和 *zSSIIb* 基因拷贝数比值在 0.5 附近波动 (图 152)。DP4114/*zSSIIb* 二重数字 PCR 方法线性动态范围测试结果表明, 20  $\mu$ L 扩增体系中, 当模板量在 DP4114 转化体特异性序列 40~17000 拷贝的范围内, 可获得准确的拷贝数浓度和拷贝数比值测量值。

### 33.5 DP4114/*zSSIIb* 二重 ddPCR 的测量准确性

配制 5 个含 DP4114 基因组 DNA 盲样 (S1~S5), DP4114/*zSSIIb* 拷贝数比值依次为 5.0%、3.0%、1.0%、0.5%、0.1%。由不同的操作者在不同的日期用 DP4114/*zSSIIb* 二重 ddPCR 方法对 5 个盲样进行进行了 2 次测量。

表 186 5 个盲样的测量结果及统计分析

重复	PCR 平行	盲样含量测量值				
		S1 (%)	S2 (%)	S3 (%)	S4 (%)	S5 (%)

1	1	5.047	2.939	1.033	0.534	0.100
	2	5.019	3.019	1.044	0.532	0.088
	3	4.754	2.943	1.048	0.467	0.088
2	1	4.940	3.252	1.101	0.553	0.102
	2	5.324	3.079	1.168	0.471	0.119
	3	5.491	2.825	1.084	0.437	0.121
平均值		5.10	3.01	1.08	0.50	0.10
相对标准差		5.25	4.86	4.67	9.35	14.00
相对偏倚		1.92	-2.03	7.97	-0.20	3.00

二重 ddPCR 的定量结果如表 184 所示，计算得到 5 个盲样 DP4114/zSSIIb 拷贝数比值的平均值，统计测量结果的相对标准差 ( $RSD_r$ ) 和相对偏倚 ( $Bias$ )。结果显示，测量平均值均接近预期含量，与预期值的相对偏倚在 $\pm 25\%$ 的可接受范围内；相对标准偏差  $RSD_r$  均小于 25%。已建立的 DP4114/zSSIIb 二重 ddPCR 实现了对样品中 DP4114 转化体含量的准确定量，具有良好的重复性和重现性。

### 33.6 结论

DP4114/zSSIIb 二重 ddPCR 扩增引物探针采用已发布的标准方法（农业农村部公告第 864 号—6—2024）中的实时荧光 PCR 方法引物探针（表 185）。DP4114/zSSIIb 二重 ddPCR 扩增体系见表 186 数字 PCR 扩增体系，扩增程序为：95°C 预变性 10 min；94°C 变性 30 s，56°C 退火延伸 60 s，共进行 50 个循环；98°C 变性 10 min，4°C 保存（升降温速率 2°C/s）。

表 187 DP4114 转化体特异性引物和探针序列

靶标	引物/探针名称及序列 (5'-3')	扩增片段大小 (bp)	来源

z <i>SSIb</i> 基因	z <i>SSIb</i> -3F: CGGTGGATGCTAAGGCTGATG	88	农业农村部公告第 864号 —6—202 4
	z <i>SSIb</i> -4R: AAAGGGCCAGGTTTCATTATCCTC		
	z <i>SSIb</i> -P:HEX-TAAGGAGCACTCGCCGCCGCATCTG-BHQ1		
DP4114 转 化体	4114-qF: CGCTACTAGACAATTCAG	102	
	4114-qR: GAAGTTCTTATATCTGGCGAT		
	4114-qP;FAM-AGACAACCTTAATAACACATTGCGGACG-BHQ1		

表 188 数字 PCR 扩增体系

组分	终浓度	体积
ddH <sub>2</sub> O		3.0 μL
2×ddPCR™ Supermix for Probes	1×	10.0 μL
10 μmol/L 内标上游引物 z <i>SSIb</i> -QF	0.5 μmol/L	1.0 μL
10 μmol/L 内标下游引物 z <i>SSIb</i> -QR	0.5 μmol/L	1.0 μL
10 μmol/L 内标探针 z <i>SSIb</i> -QP	0.25 μmol/L	0.5 μL
10 μmol/L 转化体上游引物 4114-qF	0.5 μmol/L	1.0 μL
10 μmol/L 转化体上游引物 4114-qR	0.5 μmol/L	1.0 μL
10 μmol/L 转化体探针 4114-qP	0.25 μmol/L	0.5 μL
25 mg/L DNA 模板	2.5 mg/L	2.0 μL
总体积		20.0 μL

扩增体系可根据仪器及试剂耗材的实际使用情况，进行相应调整。此表是 1 个扩增体系的体积，应按照实际反应数量进行扩增体系配置。空白质控品以 2.0 μL 的 ddH<sub>2</sub>O 作模板。

### 34. MON87411/z*SSIb* 二重数字 PCR 方法

#### 34.1 引物探针确认

MON87411 是孟山都远东有限公司利用农杆菌介导的方法研发的抗虫耐除草剂玉米品种，其转化体分子特征由孟山都远东有限公司解析。首先对获得转基因材料的分子特征进行验证，确定转基因材料的转化体身份。

根据资料获得 MON87411 转化体特异性序列，合成携带 MON87411 转化体和内标准基因靶标的质粒分子，酶切，-20℃存储备用。

MON87411 转化体特异性引物探针和玉米内标准基因 *zSSIIb* 引物探针选用已发布的标准方法（GB/T 19495.5-2018、农业部 1861 号公告—3—2012）中的实时荧光 PCR 方法引物探针（表 187）。

表 189 MON87411 转化体特异性引物和探针序列

靶标	引物/探针名称及序列（5'-3'）	扩增片段大小（bp）	来源
<i>zSSIIb</i> 基因	<i>zSSIIb</i> -3F: CGGTGGATGCTAAGGCTGATG	88	农业部 1861 号公告—3—2012
	<i>zSSIIb</i> -4R: AAAGGGCCAGGTTTCATTATCCTC		
	<i>zSSIIb</i> -P:HEX-TAAGGAGCACTCGCCGCCGCATCTG-BHQ1		
MON87411 转化体	MON87411-qF:CTCTGTAACAGAAAACACCATCTAGAG	109	GB/T 19495.5-2018
	MON87411-qR:ACAAAAGTGAACTAGTTCTAGGGTAGA T		
	MON87411-P:FAM-CCGCGTTTAAACTATCAGTGTTTAG AGAAT -BHQ1		

在伯乐 QX200 微滴式数字 PCR 平台上，用通用的 PCR 反应体系（引物/探针浓度 0.4/0.2 μmol/L）和退火温度（60℃），以 MON87411 质粒 DNA 为模板，进行 MON87411 转化体/*zSSIIb* 基因的二重 ddPCR 扩增，对表 187 中的引物探针组合进行测试。

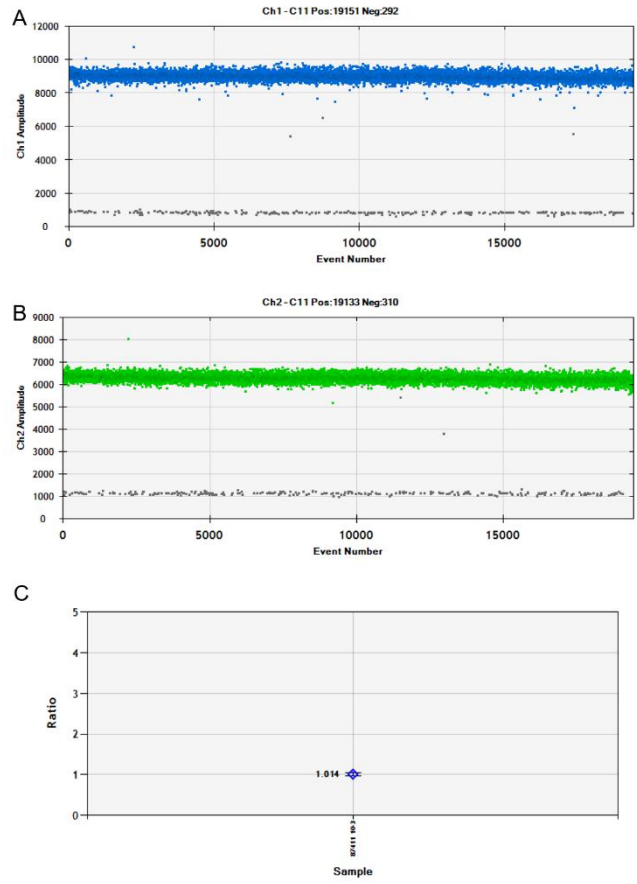


图 153 数字 PCR 引物探针确认

注：A 为 MON87411 玉米转化体特异性序列一维微滴图谱；B 为 *zSSIb* 基因一维微滴图谱，C 为 MON87411 转化体和 *zSSIb* 基因拷贝数比值。

结果显示,MON87411 转化体和 *zSSIb* 基因二重微滴式数字 PCR 的一维微滴图谱 (1-D) 的阴性微滴和阳性微滴分界清晰,“雨滴”较少 (图 153B) ; MON87411 转化体和 *zSSIb* 基因拷贝数比值接近 1.0 (图 153C)。综上,确认表 1 的引物探针适用 MON87411 转化体/*zSSIb* 基因的二重 ddPCR 扩增。

### 34.2 MON87411/*zSSIIb* 二重微滴数字 PCR 特异性测试

用转基因玉米 MON87411、其他转基因玉米混合样（瑞丰 125、瑞丰 8、T25、MIR604、NK603、MON87427、DBN9936、DBN9858、DBN9501）、转基因大豆混合样（DBN9004、MON89788、MON87751、CAL16、中黄 6106、DBN8205）、转基因水稻混合样（TT51-1、KF-6、KMD、G6H1、T1C-19、T2A-1）、转基因油菜混合样（MS1、MS8、RF1、RF2、RF3、T45、Oxy-235、Topas19/2、MON88302、73496）、转基因棉花混合样（MON1445、MON531、MON15985、LLCOTTON25、MON88913、GHB614、COT102）、非转基因玉米基因组 DNA 作模板进行 MON87411 和 *zSSIIb* 二重 ddPCR 扩增，用水做空白对照，测试 MON87411 转化体和 *zSSIIb* 二重 ddPCR 方法的特异性。

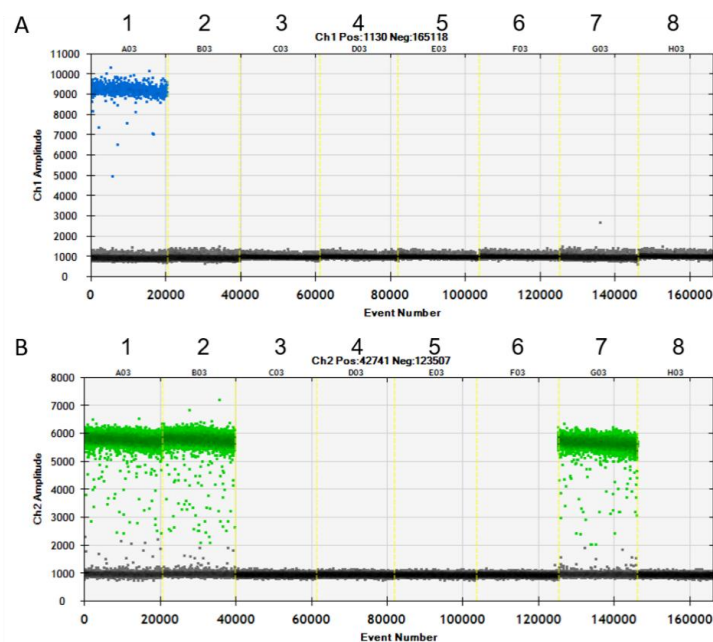


图 154 MON87411/*zSSIIb* 二重 ddPCR 特异性测试扩增图谱（一维）

注：A 为 MON87411 微滴数字 PCR 一维热图；B 为 *zSSIIb* 微滴数字 PCR 一维热图。样品顺序：1 为 MON87411，2 为其他转基因玉米混合样，3 为转基因大豆混合样，4 为转基因水稻混合样，5 为转基因油菜混合样，6 为转基因棉花混合样，7 为非转基因玉米混合样，8 为空白对照。

结果显示，*zSSIIb* 基因 ddPCR 在玉米样品中扩增得到阳性微滴，在其他作物和空白对照中无阳性微滴；MON87411 转化体特异性序列 ddPCR 仅在转基因玉米 MON87411 样品中扩增得到阳性微滴，在其他样品和空白对照中均无阳性微滴，结果表明 MON87411/*zSSIIb* 二重 ddPCR 方法有良好的特异性（图 154）。

### 34.3 MON87411/*zSSIIb* 二重数字 PCR 的条件优化

转基因定量检测依赖于转基因 DNA 拷贝数和总 DNA 拷贝数的准确测量，其中转基因 DNA 拷贝数通过转化体特异性 PCR 检测定量，总 DNA 拷贝数定量通过内标基因测定。以 MON87411 质粒 DNA 为模板，分别优化二重数字 PCR 中 MON87411 转化体特异性序列和 *zSSIIb* 内标基因的引物/探针浓度和退火/延伸温度，改善阳性/阴性液滴的分辨率以减少雨滴对定量结果的影响，同时测试二重数字 PCR 反应中转化体和内标基因是否具有相似的扩展效率。

PCR 扩增程序中退火温度的高低对阴阳性微滴区分有显著的影响，本项目设置了 55.0°C、55.5°C、56.6°C、58.2°C、60.1°C、61.7°C、62.6°C、63.0°C 八个温度梯度，测试 MON87411 和 *zSSIIb* 基因二重 ddPCR 的扩增效果。

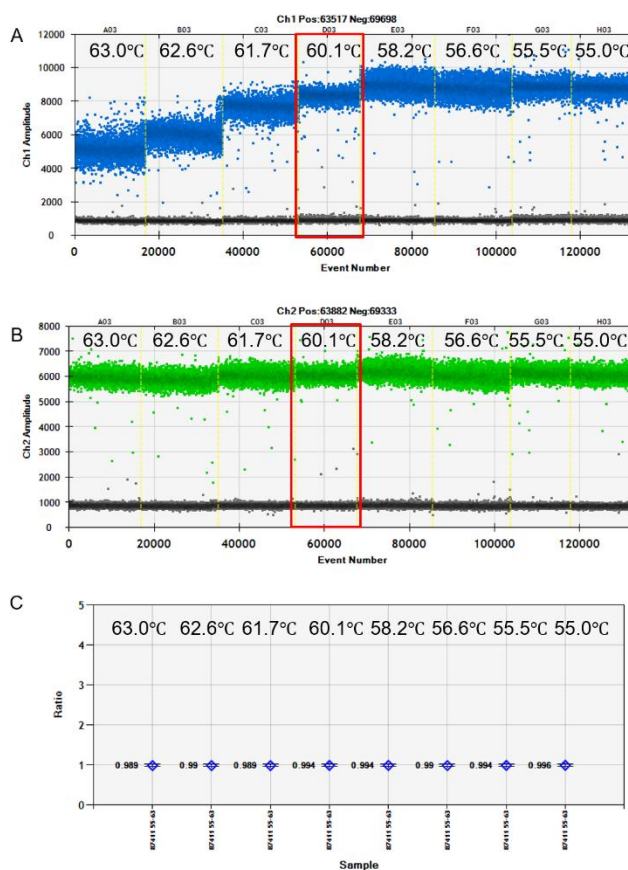


图 155 数字 PCR 引物探针退火温度优化扩增图谱

注：A 为 MON87411 玉米转化体特异性序列一维微滴图谱；B 为 *zSSIIB* 基因一维微滴图谱，C 为 MON87411 转化体和 *zSSIIB* 基因拷贝数比值。

数字 PCR 扩增结果显示：在 55°C 至 63°C 的不同退火温度下，*zSSIIB* 内标基因的阳性液滴的荧光强度保持稳定（图 155B），但 MON87411 阳性液滴的荧光强度随着退火温度的降低而增加，在退火温度降低到 60.1°C 时，微滴的信号强度达到平台期（图 155A）。在 55.0°C~63°C 的退火温度下，MON87411 的阳性和阴性微滴都能区分，拷贝数比值在 0.989~0.996 的范围内波动；当退火温度在 60.1°C 时，测量的拷贝数比值为 0.994，接近理论值（图 155C）。考虑到退火温度对扩增特异性的影响，选择 60°C 作为 MON87411 转化体和 *zSSIIB*

内标基因双重数字 PCR 的退火温度。经过优化后 *zSSIIb* 基因和 MON87411 数字 PCR 扩增程序为：95°C 预变性 10 min；94°C 变性 30 s，60°C 退火延伸 60 s，共进行 50 个循环；98°C 变性 10 min，4°C 保存（升降温速率 2°C/s）。

由于微滴式数字 PCR 平台 Bio-Rad QX200 需使用专用的扩增试剂，PCR 扩增体系中仅选择引物探针浓度进行优化测试。实时荧光 PCR 方法中常用引物与探针终浓度分别为 0.4  $\mu\text{mol/L}$  和 0.2  $\mu\text{mol/L}$ ，Bio-Rad 2 $\times$ ddPCRTM Supermix for Probes 的说明书引物与探针的终浓度分别为 0.9  $\mu\text{mol/L}$  和 0.25  $\text{nmol/L}$ 。参考上述引物探针终浓度设置了 8 组 *zSSIIb* 基因和 MON87411 转化体特异性序列引物探针终浓度进行测试，包括：MON87411 和 *zSSIIb* 的引物探针浓度相同，分别为 0.1/0.05  $\mu\text{mol/L}$ ，0.2/0.1  $\mu\text{mol/L}$ ，0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$ ，0.8/0.4  $\mu\text{mol/L}$ ；MON87411 和 *zSSIIb* 不同的引物探针浓度，分别为 0.2/0.1  $\mu\text{mol/L}$  (*zSSIIb*)、0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$  (MON87411)，0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$  (*zSSIIb*)、0.2/0.1  $\mu\text{mol/L}$  (MON87411)，0.8/0.4  $\mu\text{mol/L}$  (*zSSIIb*)、0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$  (MON87411)，0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$  (*zSSIIb*)、0.8/0.4  $\mu\text{mol/L}$  (MON87411)。

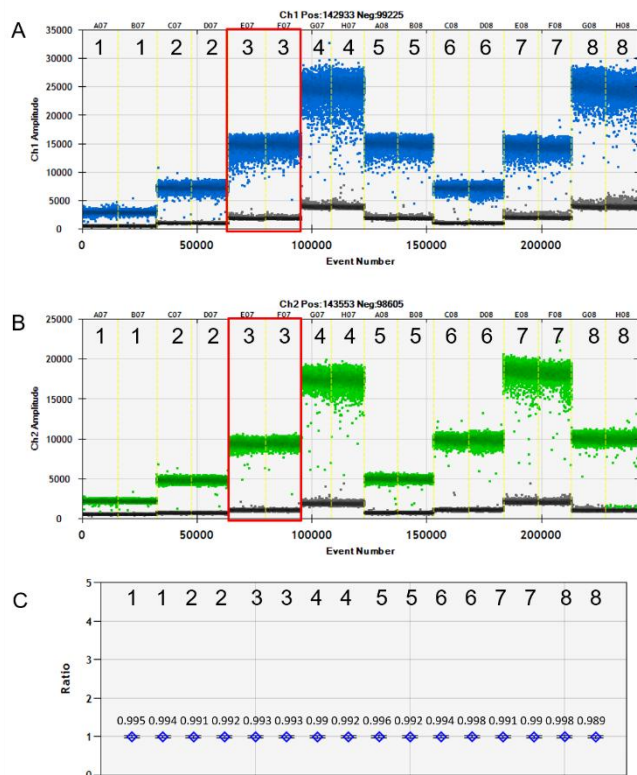


图 156 数字 PCR 引物探针浓度优化扩增图谱

注：A 为 MON87411 玉米转化体特异性序列一维微滴图谱；B 为 zSSIb 基因一维微滴图谱，C 为 MON87411 转化体和 zSSIb 基因拷贝数比值。1~4 对应 MON87411 和 zSSIb 的引物探针浓度相同，分别为 0.1/0.05  $\mu\text{mol/L}$ ，0.2/0.1  $\mu\text{mol/L}$ ，0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$ ，0.8/0.4  $\mu\text{mol/L}$ ；5~8 对应 MON87411 和 zSSIb 不同的引物探针浓度，分别为 0.2/0.1  $\mu\text{mol/L}$  (zSSIb)、0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$  (MON87411)，0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$  (zSSIb)、0.2/0.1  $\mu\text{mol/L}$  (MON87411)，0.8/0.4  $\mu\text{mol/L}$  (zSSIb)、0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$  (MON87411)，0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$  (zSSIb)、0.8/0.4  $\mu\text{mol/L}$  (MON87411)。

数字 PCR 扩增结果显示：MON87411 和内标基因的引物/探针浓度低于 0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$  时，阳性、阴性液滴信号偏低（图 156A、B）；当两个靶标的引物/探针浓度均为 0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$  时，阳性微滴和阴性微滴具有最佳的分辨率；当两个靶标的引物/探针浓度高于 0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$  时，阴性微滴信号值升高，且阳性微滴群变宽。当两个靶标的引物/探针浓度均为 0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$  时，测量的平均拷贝数比值为 0.993，接近理论值（图 156C）。综合考虑引物探针用量和微滴荧光强度，二重数字 PCR 中 MON87411 和 zSSIb 的引物/探针浓度均采

用 0.4/0.2  $\mu\text{mol/L}$ 。经过优化后 *zSSIIb* 基因和 MON87411 转化体特异性序列数字 PCR 扩增体系如表 188 所示。

表 190 数字 PCR 扩增体系

组分	体积
ddH <sub>2</sub> O	4.0 $\mu\text{L}$
2 $\times$ ddPCR <sup>TM</sup> Supermix for Probes	10.0 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 内标上游引物 <i>zSSIIb</i> -3F	0.8 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 内标下游引物 <i>zSSIIb</i> -4R	0.8 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 内标探针 <i>zSSIIb</i> -P	0.4 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 转化体上游引物 MON87411-qF	0.8 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 转化体上游引物 MON87411-qR	0.8 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{mol/L}$ 转化体探针 MON87411-P	0.4 $\mu\text{L}$
DNA 模板	2.0 $\mu\text{L}$
总体积	20.0 $\mu\text{L}$

### 34.4 MON87411/*zSSIIb* 二重 ddPCR 的 LOD、LOQ 和动力学范围测试

微滴式数字 PCR 的理论有效线性范围是 1~100000 个拷贝，实际测试时，20  $\mu\text{L}$  反应液在微滴生成仪中一般生成 10000~20000 个有效微滴，微滴数大于 10000 为有效反应。为了测试 *zSSIIb* 基因和 MON87411 转化体特异性序列数字 PCR 方法的线性范围，在优化的 PCR 条件下，将 MON87411 质粒 DNA 的连续稀释液用于测试 MON87411/*zSSIIb* 二重 ddPCR 的动态范围、LOD 和 LOQ，每个标准品扩增设置 4 个平行。根据标准品数字 PCR 测量值及初始模板拷贝数分别绘制 *zSSIIb* 基因和 MON87411 转化体特异性序列的线性回归曲线进行线性范围分析，对 4 个平行间 *zSSIIb* 基因和 MON87411 转

化体特异性序列测量值以及拷贝数比值的标准偏差和相对标准偏差进行数据统计，评价 *zSSIb* 基因和 MON87411 转化体特异性序列数字 PCR 方法的重复性。根据《转基因植物及其产品成分检测 数字 PCR 方法制定指南》（农业农村部公告第 323 号—21—2020）中定量检测的要求，在整个线性动态范围内，线性度即线性回归方程的决定系数  $R^2$  一般应  $\geq 0.98$ ，正确度偏差（Bias）不超过标称值的 25%，精密度即重复性相对标准偏差（RSD）一般应  $\leq 25\%$ 。

表 191 MON87411 玉米特异性序列数字 PCR 线性动态范围与重复性分析

Target	Expected concentration (copies)	Copy number concentration (copies)							
		Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Mean	SD	RSD (%)	Bias (%)
MON87411 copy number	80000	93000	92000	99000	92000	94000.00	3366.50	3.58	17.50
	16000	16300	15720	16460	16170	16162.50	317.95	1.97	1.02
	3200	3270	3270	3420	3320	3320.00	70.71	2.13	3.75
	640	622	589	617	584	603.00	19.27	3.20	-5.78
	128	134	132	144	144	138.50	6.40	4.62	8.20
	40	43	45	43	44	43.75	0.96	2.19	9.38
	20	22	27	19	27	23.75	3.95	16.62	18.75
	10	10.7	11	9.9	8.1	9.93	1.30	13.12	-0.75
	5	2.8	4.9	6.9	6.3	5.23	1.82	34.85	4.50
1	1.5	0.7	0.6	0.7	0.88	0.42	47.92	-12.50	
<i>zSSIb</i> copy number	80000	93000	92000	96000	92000	93250.00	1892.97	2.03	16.56
	16000	16270	15650	16440	16140	16125.00	339.66	2.11	0.78
	3200	3270	3280	3410	3330	3322.50	63.97	1.93	3.83
	640	657	647	662	690	664.00	18.42	2.77	3.75
	128	133	130	144	142	137.25	6.80	4.95	7.23
	40	43	44	42	43	43.00	0.82	1.90	7.50
	20	22	27	19	27	23.75	3.95	16.62	18.75
	10	10.7	11	9.9	7.4	9.75	1.63	16.76	-2.50
	5	2.8	4.9	6.9	6.9	5.38	1.96	36.44	7.50

	1	1.5	0.7	—	—	—	—	—	—
	80000	1.00	1.00	1.03	1.00	1.01	0.02	1.55	0.80
	16000	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.14	0.23
	3200	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.29	-0.08
	640	0.95	0.91	0.93	0.85	0.91	0.04	4.87	-9.19
MON87411/ zSSI <b>b</b> ratio	128	1.01	1.02	1.00	1.01	1.01	0.01	0.70	0.91
	40	1.00	1.02	1.02	1.02	1.02	0.01	1.14	1.74
	20	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00
	10	1.00	1.00	1.00	1.09	1.02	0.05	4.65	1.79
	5	1.00	1.00	1.00	0.91	0.97	0.04	4.47	-2.79
	1	—	—	—	—	—	—	—	—

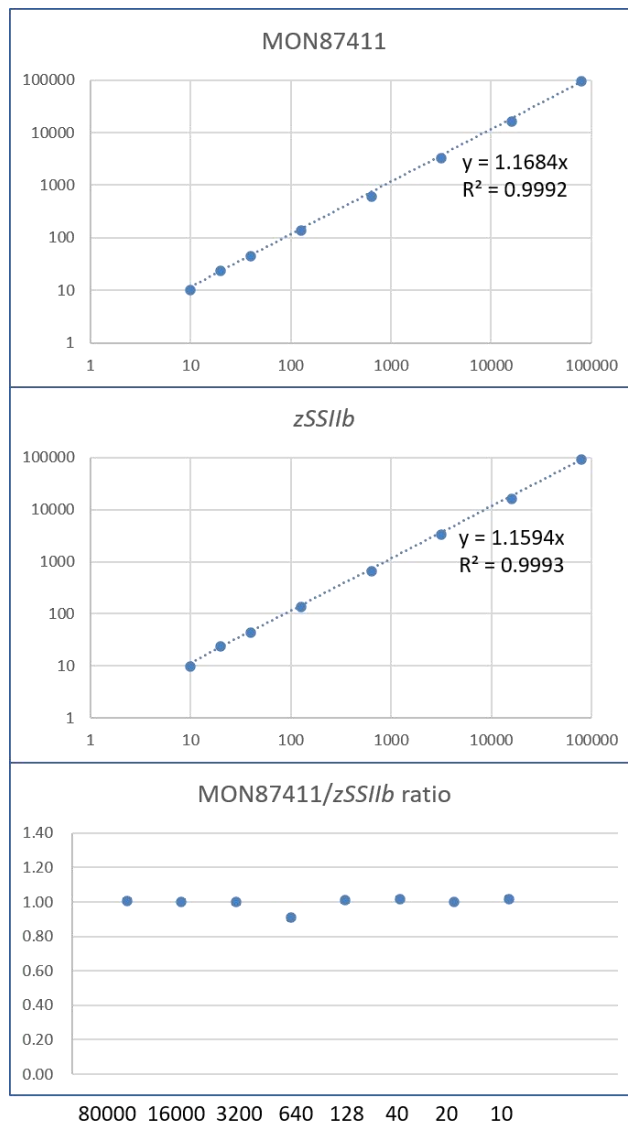


图 157 MON87411/*zSSIb* 二重数字 PCR 方法线性动态范围测试

注：A 为 MON87411 转化体特异性序列拷贝数测量值与预期值的线性回归方程（ $y$  代表拷贝数测量值， $x$  代表拷贝数预期值）；B 为 *zSSIb* 基因拷贝数测量值与预期值的线性回归方程（ $y$  代表拷贝数测量值， $x$  代表拷贝数预期值）；C 为 MON87411 转化体特异性序列和 *zSSIb* 基因拷贝数比值与不同浓度模板量的关系（ $y$  代表模板拷贝数比值， $x$  代表 MON87411 转化体特异性序列拷贝数预期值）。

结果显示：当 20  $\mu\text{L}$  扩增体系中 MON87411 转化体特异性序列和 *zSSIb* 基因拷贝数分别在 10~80000 copies 之间时，4 个重复的正确度偏差（Bias）和重复性相对标准偏差（RSD）均小于 25%，当模板量为 5 拷贝时，正确度偏差（Bias）和重复性相对标准偏差（RSD）出现大于 25% 的情况，因此定量极限（LOQ）确定为 10 个拷贝，当 DNA 浓度低至 1 拷贝（MON87411 转化体特异性序列）时，4 个平行中只有 2 个检测到阳性信号，其余均无阳性微滴，而当 DNA 浓度为 5 拷贝（MON87411 转化体特异性序列）时，依然可以稳定的检测到阳性信号，拷贝数测量值在 7.4~11.0 之间，因此检测极限（LOD）确定为 5 拷贝（表 189）；MON87411 转化体特异性序列和 *zSSIb* 基因微滴数字 PCR 获得的拷贝数浓度测量值与预期值具有良好的相关性，线性回归方程分别为  $y=1.1684x$  和  $y=1.1594x$ ，决定系数  $R^2$  值分别等于 0.9992 和 0.9993，MON87411 转化体特异性序列和 *zSSIb* 基因拷贝数比值在 1.0 附近波动（图 157）。MON87411/*zSSIb* 二重数字 PCR 方法线性动态范围测试结果表明，20  $\mu\text{L}$  扩增体系中，当模板量在 MON87411 转化体特异性序列 10~80000 拷贝的范围内，可获得准确的拷贝数浓度和拷贝数比值测量值。

### 34.5 MON87411/zSSIIb 二重 ddPCR 的测量准确性

配制 4 个含 MON87411 基因组 DNA 盲样(Sg1-Sg4), 拷贝数比值依次为 5.0%、3.0%、1.0%、0.5%。由不同的操作者在不同的日期用 MON87411/zSSIIb 二重 ddPCR 对 4 个盲样进行三次测量。

表 192 4 个盲样的测量结果

重复	PCR 平行	盲样含量测量值			
		Sg1 (5%)	Sg2 (3%)	Sg3 (1%)	Sg4 (0.5%)
1	1	5.10	2.95	1.10	0.50
	2	4.94	3.02	0.99	0.56
	3	5.01	3.05	1.07	0.52
2	1	4.97	3.04	1.04	0.53
	2	4.99	3.22	0.97	0.54
	3	5.00	3.05	0.99	0.53
3	1	5.04	2.98	0.99	0.51
	2	5.29	3.10	1.00	0.54
	3	4.91	2.99	1.01	0.54

表 193 4 个盲样定量结果的重复性和重现性统计分析

盲样	预期拷贝数 比值 (%)	测量平均值 (%)	S <sub>r</sub> (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	S <sub>R</sub> (%)	RSD <sub>R</sub> (%)	Bias (%)
S1	5	5.03	0.12	2.41	0.12	2.41	0.56
S2	3	3.04	0.08	2.49	0.08	2.65	1.48
S3	1	1.02	0.04	3.86	0.04	4.37	1.78
S4	0.5	0.53	0.02	3.88	0.02	3.88	6.00

二重 ddPCR 的定量结果如表 190 所示, 计算得到 4 个盲样 MON87411/zSSIIb 拷贝数比值的平均值, 统计测量结果的重复性相对标准差 (RSD<sub>r</sub>)、重现性相对标准差 (RSD<sub>R</sub>)、和相对偏倚 (Bias)。结果显示, 测量平均值均接近预期含量, 与预期值的相对偏倚在±25%

的可接受范围内；重复性相对标准偏差 RSD<sub>r</sub> 和再现性相对标准偏差 RSD<sub>R</sub> 均小于 25%(表 191)。已建立的 MON87411/*zSSIb* 二重 ddPCR 实现了对样品中 MON87411 转化体含量的准确定量，具有良好的重复性和重现性。

### 34.6 结论

MON87411/*zSSIb* 二重 ddPCR 扩增引物探针采用已发布的标准方法 (GB/T 19495.5-2018、农业部 1861 号公告—3—2012) 中的实时荧光 PCR 方法引物探针 (表 187)。MON87411/*zSSIb* 二重 ddPCR 扩增体系见表 192, 扩增程序为: 95°C 预变性 10 min; 94°C 变性 30 s, 60°C 退火延伸 60 s, 共进行 50 个循环; 98°C 变性 10 min, 4°C 保存 (升降温速率 2°C/s)。

表 194 数字 PCR 扩增体系

组分	终浓度	体积
ddH <sub>2</sub> O	—	4.0 μL
2×ddPCR™ Supermix for Probes	1×	10.0 μL
10 μmol/L 内标上游引物 <i>zSSIb</i> -QF	0.4 μmol/L	0.8 μL
10 μmol/L 内标下游引物 <i>zSSIb</i> -QR	0.4 μmol/L	0.8 μL
10 μmol/L 内标探针 <i>zSSIb</i> -P	0.2 μmol/L	0.4 μL
10 μmol/L 转化体上游引物 MON87411-qF	0.4 μmol/L	0.8 μL
10 μmol/L 转化体上游引物 MON87411-qR	0.4 μmol/L	0.8 μL
10 μmol/L 转化体探针 MON87411-P	0.2 μmol/L	0.4 μL
25 mg/L DNA 模板	2.5 mg/L	2.0 μL
总体积		20.0 μL
<p>扩增体系可根据仪器及试剂耗材的实际使用情况，进行相应调整。 此表是 1 个扩增体系的体积，应按照实际反应数量进行扩增体系配置。空白质控品以 2.0 μL 的 ddH<sub>2</sub>O 作模板。</p>		

## 35. MZIR098/*zSSIb* 二重数字 PCR 方法

### 35.1 引物/探针信息收集

MZIR098 是先正达农作物保护股份公司研发的抗虫耐除草剂玉米品种，通过农杆菌介导的转化方法，将载体 pSYN17629 导入未成熟的玉米胚中研发得到。MZIR098 玉米转入两个杀虫蛋白基因，分别为编码 eCry3.1Ab 蛋白的 *ecry3.1Ab* 基因和编码 mCry3A 蛋白的 *mcry3A* 基因，同时转入编码 PAT 蛋白的 *pat-08* 基因作为筛选标记。其表达的 eCry3.1Ab 蛋白和 mCry3A 蛋白对西方玉米根虫 (*Diabrotica virgifera virgifera*) 和其他鞘翅目玉米害虫具有杀虫活性，但对鳞翅目害虫没有杀虫活性，同时表达的 PAT 蛋白能够使草铵膦乙酰化进而使其失活，因此对草铵膦除草剂具有耐受性。

检索相关文献和标准，其中使用引物/探针的文章为发表在《计量学报》上的《转基因玉米 MZIR098 定量 PCR 检测方法的建立》和技术方法为《EURL GMFF - 2018 Quantitative PCR method for detection of maize event MZIR098》，二者使用了不同的引物/探针。因此，首先对 2 种引物/探针进行筛选。同时使用已颁布实施的标准《农业部 1861 号公告-3-2012 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》中用于检测玉米内标准基因 (*zSSIb* 基因) 的引物/探针。抗虫耐除草剂玉米 MZIR098 转化体特异性和玉米 *zSSIb* 内标准基因的引物/探针信息见表 193。

表 195 MZIR098 转化体特异性和 *zSSIb* 内标准基因的引物/探针信息

转化体 (或基因)	引物/探针	序列 (5'-3')	片段长度 (bp)	来源
MZIR098	MZIR098-qF	GACACCAAACCGAGATCCAAGT	77	《计量学报》
	MZIR098-qR	TACTTAGTCAACACCGTTAGGCTAG		
	MZIR098-qP	TGCCAGTTTAAACCAGCTCCGTTTCGCTGTC		
MZIR098	MZIR-qF	ATCTCAGACACCAAACCGAGATC	73	EURL GMFF - 2018
	MZIR-qR	ACACCGTTAGGCTAGTGCCAGT		
	MZIR-qP	CAAGTGACAGCGAACGGAGCTGGTTT		
<i>zSSIb</i>	<i>zSSIb</i> -3F	CGGTGGATGCTAAGGCTGATG	88	农业部 1861 号公告 -3-2012
	<i>zSSIb</i> -4R	AAAGGGCCAGGTTTCATTATCCTC		
	<i>zSSIb</i> -P	TAAGGAGCACTCGCCGCCGCATCTG		

注: 探针 MZIR098-qP 和 MZIR-qP 的 5'端标记 FAM, 3'端标记 BHQ1;

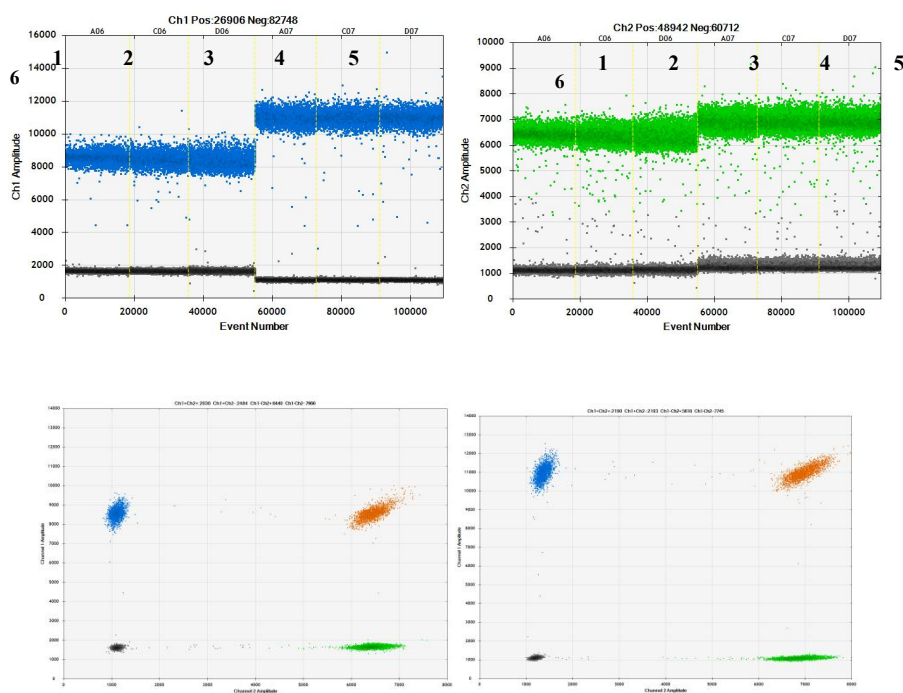
探针 *zSSIb*-P 的 5'端标记 HEX, 3'端标记 BHQ1。

### 35.2 引物探针筛选

在数字 PCR 平台上, 使用通用 PCR 反应体系 (引物/探针浓度 400/200 nM) 和退火温度 (60°C), 以 MZIR098 杂合体基因组 DNA 为模板, 进行 MZIR098 转化体/*zSSIb* 内标准基因的二重数字 PCR 扩增, 对表 193 中的 2 个引物/探针集进行筛选。*zSSIb* 内标准基因选用颁布实施的标准方法 (农业部 1861 号公告 -3-2012) (*zSSIb*-3F/*zSSIb*-4R/*zSSIb*-P), 引物/探针的序列信息见表 193。每个引物/探针集各设置 3 个平行反应, MZIR098 转化体和 *zSSIb* 内标准基因的 1 维 (1-D) 微滴热图、2 维 (2-D) 微滴热图、MZIR098/*zSSIb* 拷贝数比值如图 158 所示。

MZIR098 转化体和 *zSSIb* 内标准基因的 1-D 微滴热图中, 2 个引物/探针集的 3 次平行反应的阳性微滴和阴性微滴都能显著区分, 雨

滴均较少（图 158A），但引物/探针集 2 的 MZIR098 转化体的阳性微滴振幅更高且阴性微滴振幅更低，导致阳性与阴性微滴间的振幅差值更大，而且，其他条件均相同的情况下，使用引物/探针集 2 时，*zSSIIb* 内标准基因的阳性与阴性微滴间的振幅差有小幅提升；2-D 微滴热图中，2 个引物/探针集都产生了 4 个显著区分的微滴群(图 158B)；2 个引物/探针集检测 MZIR098 杂合体基因组 DNA，获得不同的 MZIR098/*zSSIIb* 拷贝数比值（图 158C），2 个引物/探针集的拷贝数比值的平均值分别为 0.474 和 0.478，均接近理论值 0.5，但引物/探针集 2 的 MZIR098/*zSSIIb* 拷贝数比值的 SD、RSD 和 Bias 均低于引物/探针集 1（表 194）。因此，综合考虑后，本项目选择引物/探针集 2 用于后续数字 PCR 扩增。



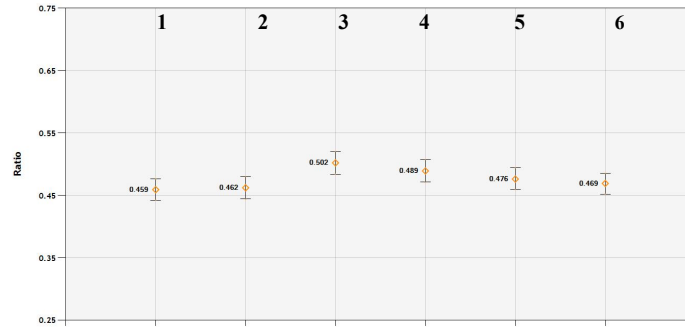


图 158 数字 PCR 引物/探针集的筛选

注：A. 2 个引物/探针集的 MZIR098 转化体和 zSSIIB 内标基因 ddPCR 的 1-D 微滴图，1、2 和 3 为引物/探针集 1 的 3 次重复，4、5 和 6 为引物/探针集 2 的 3 次重复，下同；B. 2 个引物/探针集的 2-D 微滴图(2 个引物/探针集各选 1 个反应)；C. 2 个引物/探针集检测 MZIR098 杂合体基因组 DNA，获得的 MZIR098/zSSIIB 拷贝数比值。

表 196 不同引物/探针集测定同一 DNA 溶液的 MZIR098/zSSIIB 拷贝数比值

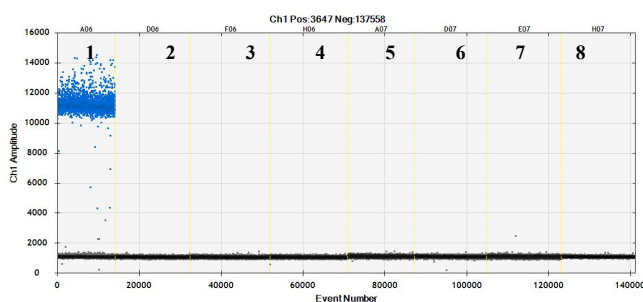
引物/探针集	重复 1	重复 2	重复 3	平均值	标准差	相对标准差 (%)	相对偏倚 (%)
1	0.459	0.462	0.502	0.474	0.024	5.061	5.133
2	0.489	0.476	0.469	0.478	0.010	2.123	4.400

### 25.3 MZIR098/zSSIIB 二重微滴数字 PCR 特异性测试

采用抗虫耐除草剂玉米 MZIR098、其他转基因玉米混合样 (MON863、MON810、MON88017、MON89034、Bt176、Bt11、59122、TC1507、T25、GA21、MIR604、NK603、C0030.3.5、C0030.2.4、C0010.3.1、C0030.2.5 和 C0010.1.3)、转基因玉米混合样 (305423、CV127、A2704-12、GTS 40-3-2、A5547-127、DAS-444Ø6-6、SYHT0H2、DAS-81419-2、SHZD32-1、MON87701、MON87751、ZH10-6、MON89788、MON87769、MON87708 和 MON87705)、转基因水稻

混合样（KF-6、KMD、皖 21B、G6H1 和 TT51）、转基因油菜混合样（RF1、RF2、RF3、MS1、MS8、Topas19/2、T45、Oxy-235 和 GT73）、转基因棉花混合样（MON88913、MON15985、GHB614、LLCOTTON25、MON1445 和 鄂杂棉）、非转基因玉米的基因组 DNA 作为模板，进行 MZIR098/*zSSIIb* 二重微滴数字 PCR（ddPCR）扩增，并采用灭菌超纯水作为空白对照，测试 MZIR098 转化体特异性 ddPCR 方法的特异性。

*zSSIIb* 内标准基因 ddPCR 在抗虫耐除草剂玉米 MZIR098、其他转基因玉米混合样和非转基因玉米中均产生了阳性微滴，在转基因玉米混合样、转基因水稻混合样、转基因油菜混合样、转基因棉花混合样和空白对照中均未产生阳性微滴；MZIR098 转化体特异性 ddPCR 仅在抗虫耐除草剂玉米 MZIR098 中产生阳性微滴，在其他转基因玉米混合样、转基因玉米混合样、转基因水稻混合样、转基因油菜混合样、转基因棉花混合样、非转基因玉米和空白对照中均未产生阳性微滴（图 159）。结果表明 MZIR098/*zSSIIb* 二重微滴数字 PCR 具有良好的扩增特异性。



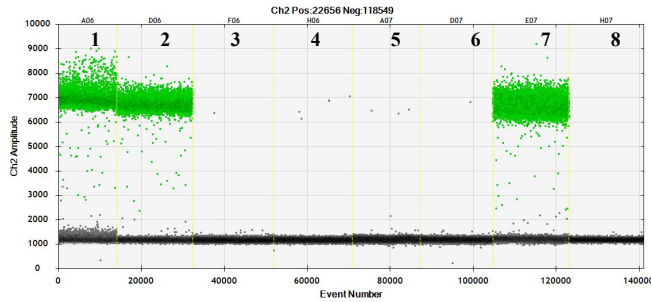


图 159 MZIR098/*zSSIIB* 二重微滴数字 PCR 特异性测试

注：A. MZIR098 转化体微滴数字 PCR 的 1-D 热图；B. *zSSIIB* 内标准基因微滴数字 PCR 的 1-D 热图。1. MZIR098；2. 其他转基因玉米混合样；3. 转基因玉米混合样；4. 转基因水稻混合样；5. 转基因油菜混合样；6. 转基因棉花混合样；7. 非转基因玉米；8. 空白。

### 35.4 MZIR098/*zSSIIB* 二重微滴数字 PCR 反应条件优化

转基因定量检测依赖于转基因 DNA 拷贝数和总 DNA 拷贝数的准确测量，其中转基因 DNA 拷贝数通过转化体特异性 PCR 检测定量，总 DNA 拷贝数定量通过内标准基因测定实现。以杂合体 MZIR098 基因组 DNA 为模板，分别优化二重微滴数字 PCR 中 MZIR098 转化体和 *zSSIIB* 内标准基因的退火/延伸温度和引物/探针浓度，改善阳性/阴性液滴分辨率以减少雨滴对定量结果的影响，同时测试二重微滴数字 PCR 反应中 MZIR098 转化体和 *zSSIIB* 内标准基因是否具有相似的扩增能力。

在 55°C 至 63°C 的不同退火/延伸温度下，*zSSIIB* 内标准基因的阳性液滴的荧光强度保持稳定（图 159B），而 MZIR098 转化体的阳性液滴的荧光强度随着退火/延伸温度的降低而呈现逐步上升趋势，尽管变化幅度并不显著，在退火/延伸温度降低到 56.6°C 时，微滴的信号强度基本到达平台期（图 160A）。在不同的退火/延伸温度下，

MZIR098 转化体的阳性和阴性微滴均能明显区分，拷贝数比值在 0.469 ~ 0.514 的范围内波动，均比较接近理论值（图 160C），当退火/延伸温度在 60.1°C 时，测量的拷贝数比值的平均值为 0.501，非常接近理论值，且标准差、相对标准差在所有退火/延伸温度中均处于中间位置，并且具有最小的相对偏倚。考虑到退火/延伸温度对扩增特异性的影响，选择 60°C 作为 MZIR098 转化体和 *zSSIIb* 内标准基因二重微滴数字 PCR 的退火/延伸温度。

MZIR098 转化体和 *zSSIIb* 内标准基因的引物/探针浓度低于 400/200 nM 时，阳性、阴性液滴信号相对较低，但可以区分（图 160D）；当两个靶标的引物/探针浓度均为 400/200 nM 时，阳性、阴性液滴信号提升，而且阳性微滴和阴性微滴具有最佳的分辨率；当两个靶标的引物/探针浓度高于 400/200 nM 时，阴性微滴信号值升高，且阳性微滴群变宽。当两个靶标的引物/探针浓度均为 400/200 nM 时，测量的平均拷贝数比值为 0.504，接近理论值 0.5（图 160F）。综合考虑引物/探针用量和微滴荧光强度，二重微滴数字 PCR 中 MZIR098 转化体和 *zSSIIb* 内标准基因的引物/探针浓度均采用 400/200 nM。

在退火/延伸温度为 60°C、引物/探针浓度为 400/200 nM 的反应条件下，以杂合体 MZIR098 基因组 DNA 为模板，进行 MZIR098/*zSSIIb* 二重 ddPCR。二重微滴数字 PCR 二维热图显示了 4 个明显的液滴簇，分别对应 FAM 阳性液滴簇、HEX 阳性液滴簇、双荧光液滴簇和阴性

液滴簇（图 160G），测量的拷贝数比值为 0.504，接近理论值 0.5，表明 MZIR098/*zSSIb* 二重 ddPCR 中 *zSSIb* 内标准基因与 MZIR098 转化体具有相同的扩增能力。因此，选择 60°C 作为 MZIR098/*zSSIb* 二重 ddPCR 的最佳退火/延伸温度，同时 MZIR098 转化体和 *zSSIb* 内标准基因的最佳引物/探针浓度均为 400/200 nM。

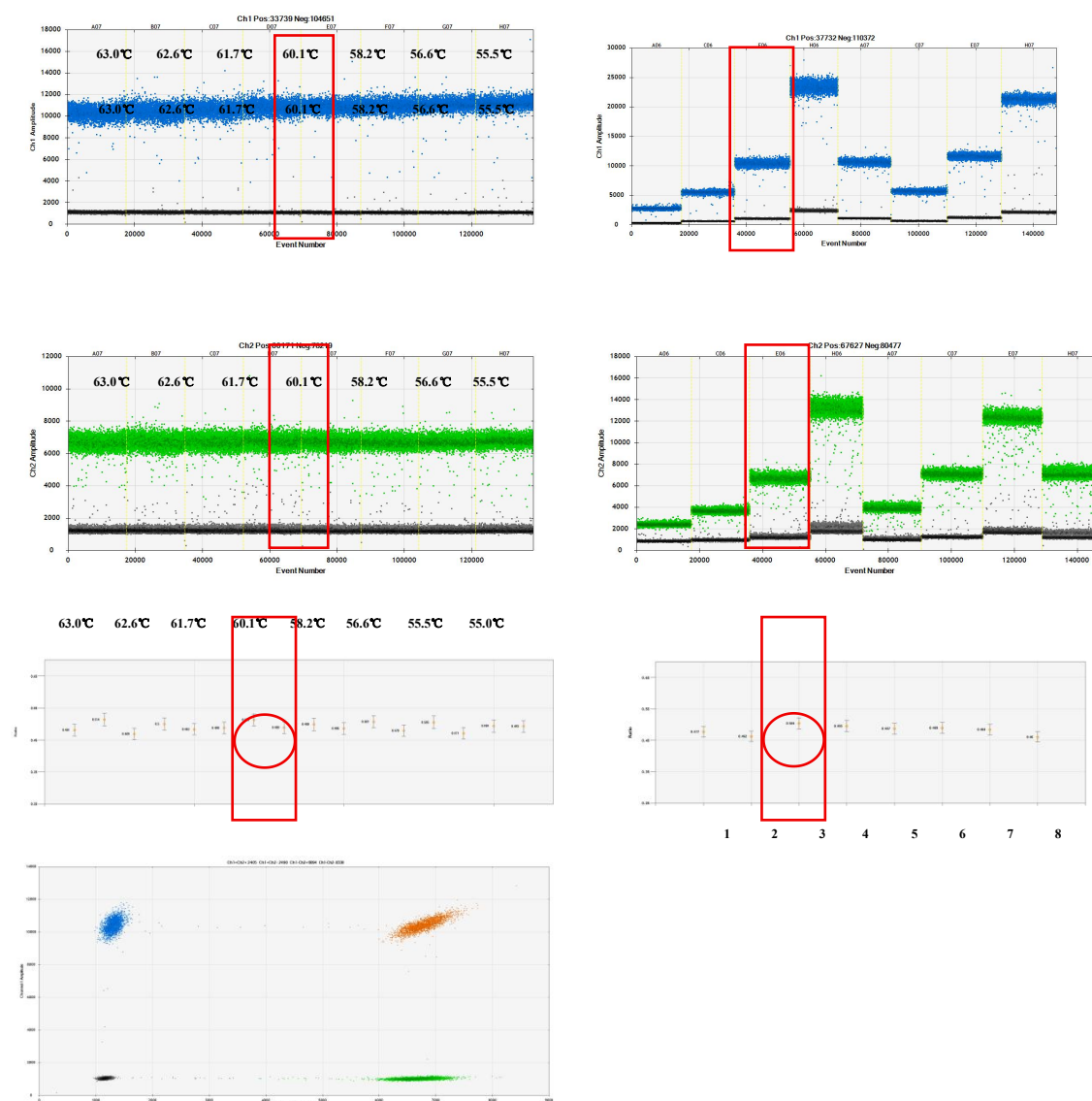


图 160 MZIR098/*zSSIb* 二重微滴数字 PCR 退火/延伸温度和引物/探针浓度优化

注：A 和 B：分别为 MZIR098 和 zSSIIb 在 55°C 至 63°C 不同退火/延伸温度下的一维（1-D）微滴图；C：不同退火/延伸温度下测量的 MZIR098/zSSIIb 拷贝数比值；D 和 E：分别为 MZIR098 和 zSSIIb 在不同引物/探针浓度下的一维微滴图，1-4 对应 MZIR098 和 zSSIIb 的引物/探针浓度相同，分别为 100/50、200/100、400/200 nM 和 800/400 nM；5-8 对应 MZIR098 和 zSSIIb 不同的引物/探针浓度，分别为 200/100 nM（zSSIIb）、400/200 nM（MZIR098）、400/200 nM（zSSIIb）、200/100 nM（MZIR098）、800/400 nM（zSSIIb）、400/200 nM（MZIR098）、400/200 nM（zSSIIb）、800/400 nM（MZIR098）；F：不同引物探针/浓度下测量的 MZIR098/zSSIIb 拷贝数比值；G：在优化的反应体系和退火/延伸温度下，MZIR098/zSSIIb 二重微滴数字 PCR 的二维微滴图。

### 35.5 MZIR098/zSSIIb 二重微滴数字 PCR 的 LOD、LOQ 和动力学范围测试

在优化的 ddPCR 条件下，杂合体 MZIR098 玉米基因组 DNA 的连续稀释液用于测试 MZIR098/zSSIIb 二重 ddPCR 的动态范围、LOD 和 LOQ。不同基因组 DNA 浓度下计算得到的反应体系中杂合体 MZIR098 转化体拷贝数和 zSSIIb 内标准基因拷贝数以及 MZIR098/zSSIIb 拷贝数比值见表 195。

当反应体系中模板拷贝数为 5（MZIR098 转化体拷贝数为 2.5）时，MZIR098/zSSIIb 二重 ddPCR 的 4 个重复反应的 MZIR098 转化体和 zSSIIb 内标准基因阳性样品均超过 3 个，呈现阳性信号，因此，LOD 确定为 5 个拷贝的杂合体 MZIR098 玉米基因组 DNA（表 195）。统计各个二重 ddPCR 反应测量的 MZIR098 转化体拷贝数、zSSIIb 内标准基因拷贝数和 MZIR098/zSSIIb 拷贝数比值，计算各基因组 DNA 浓度下测量结果的相对标准差（RSD）和相对偏倚（Bias%）。当反应体系中模板拷贝数为 40（MZIR098 转化体拷贝数为 20）时，测量

结果的 RSD 值均小于 25%，Bias%均在±25%之间，因此，LOQ 确定为 40 个拷贝杂合体 MZIR098 玉米基因组 DNA（表 195）。

表 197 MZIR098/*zSSIb* 二重 ddPCR 测量梯度稀释 MZIR098 DNA 溶液的拷贝数浓度和比值

目标	预期浓度 (拷贝/反应)	测定浓度 (拷贝/反应)						相对标准差 (%)	相对偏倚 (%)
		重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	平均值	标准差		
MZIR098 拷贝数	40000	44780.00	43320.00	40000.00	36980.00	41270.00	3489.97	8.46	3.18
	8000	8040.00	7980.00	7500.00	7900.00	7855.00	243.52	3.10	-1.81
	1600	1606.00	1758.00	1608.00	1638.00	1657.33	71.84	4.33	3.58
	320	314.00	290.00	310.00	336.00	304.67	18.86	6.19	-4.79
	64	56.00	62.00	56.00	66.00	58.00	4.90	8.45	-9.38
	20	26.00	24.00	22.00	24.00	24.00	1.63	6.80	20.00
	10	6.40	5.00	7.40	3.80	5.65	1.58	27.93	-43.50
	5	6.20	3.80	6.60	2.40	4.75	2.00	42.02	-5.00
	2.5	4.80	2.40	1.20	2.40	2.70	1.51	55.92	8.00
0.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>zSSIb</i> 拷贝数	80000	92200.00	87800.00	73400.00	67600.00	80250.00	11644.03	14.51	0.31
	16000	16400.00	16140	13920	15060	15380.00	1133.14	7.37	-3.88
	3200	3360.00	3480.00	3600.00	3460.00	3475.00	98.49	2.83	8.59
	640	692.00	638.00	626.00	664.00	655.00	29.33	4.48	2.34
	128	128.00	128.00	120.00	154.00	132.50	14.82	11.19	3.52
	40	40.00	38.00	38.00	42.00	39.50	1.91	4.85	-1.25
	20	15.20	13.60	18.6	12.40	14.95	2.69	17.99	-25.25
	10	7.6	7.40	6.60	5.00	6.65	1.18	17.77	-33.50
5	3.60	—	7.60	2.40	—	—	—	—	
1	1.20	—	—	1.20	—	—	—	—	
MZIR098/ <i>zSSIb</i> 比值	40000/80000	0.49	0.49	0.54	0.55	0.52	0.03	6.33	3.55
	8000/16000	0.49	0.49	0.54	0.52	0.51	0.02	4.59	2.40
	1600/3200	0.48	0.51	0.45	0.47	0.48	0.02	5.04	4.84
	320/640	0.45	0.45	0.50	0.51	0.48	0.03	5.70	4.52
	64/128	0.44	0.48	0.47	0.43	0.45	0.03	5.69	9.14
	20/40	0.65	0.63	0.58	0.57	0.61	0.04	6.37	21.60

10/20	0.42	0.37	0.40	0.31	0.37	0.05	13.29	-25.35
5/10	0.82	0.51	1.00	0.48	0.70	0.25	35.51	40.47
2.5/5	—	—	—	—	—	—	—	—
0.5/1	—	—	—	—	—	—	—	—

当 20  $\mu\text{L}$  反应液中 DNA 模板量在  $4.0 \times 10^1 \sim 8.0 \times 10^4$  个拷贝的范围内（MZIR098 转化体拷贝数范围为  $2 \times 10^1 \sim 4.0 \times 10^4$ ），MZIR098/*zSSIb* 二重 ddPCR 测量的 DNA 拷贝数与预期的 DNA 拷贝数之间显示良好的线性响应， $R^2$  均为 0.9999（图 161A 和 4B），测量的拷贝数比值在预期范围内波动，具有良好的重复性（图 161C）。MZIR098/*zSSIb* 二重 ddPCR 动态范围测试表明，20  $\mu\text{L}$  反应体系中，当 DNA 模板量在  $4.0 \times 10^1 \sim 8.0 \times 10^4$  拷贝的范围内，可获得准确的拷贝数浓度和拷贝数比值测量值。

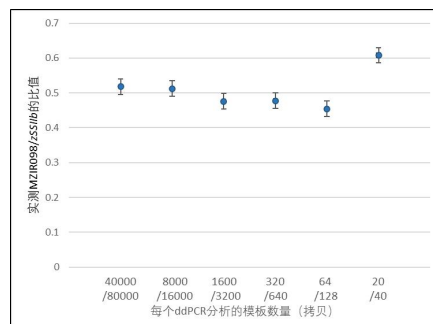
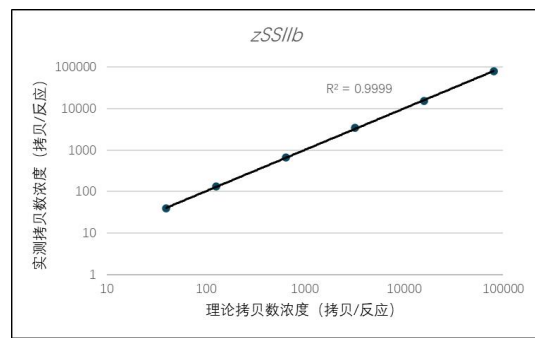
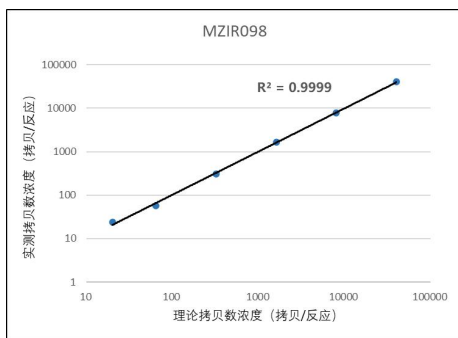


图 161 MZIR098/zSSIIb 二重 ddPCR 的动态范围和实测拷贝数比

注：A、二重 ddPCR 中 MZIR098 转化体在  $2.0 \times 10^1$  到  $4.0 \times 10^4$  个拷贝的动态范围内测量拷贝数与预期拷贝数间有良好的线性关系；B、二重 ddPCR 中 zSSIIb 内标准基因在  $4.0 \times 10^1$  到  $8.0 \times 10^4$  个拷贝的动态范围内测量拷贝数与预期拷贝数间有良好的线性关系；C、测得的 DNA 溶液的 MZIR098/zSSIIb 拷贝数比值随着 DNA 浓度降低与预期拷贝数比间的差异增大。数据来自 4 个技术重复的平均值。

### 35.6 MZIR098/zSSIIb 二重微滴数字 PCR 的测量准确性

使用杂合体抗虫耐除草剂玉米 MZIR098 基因组 DNA 和亲本玉米基因组 DNA（二者具有相同的 zSSIIb 内标准基因拷贝数浓度），按照比例配制 5 个 MZIR098 玉米基因组 DNA 盲样（Sg1~Sg5），拷贝数比值依次为 5.0%、3.0%、1.0%、0.5%、0.1%。

二重 ddPCR 的定量准确性检测由不同操作者在不同日期进行了 3 次测量，测量结果如表 196 所示。计算 5 个盲样 MZIR098/zSSIIb 拷贝数比值的平均值，统计测量结果的重复性相对标准差（RSD<sup>r</sup>）、重现性相对标准差（RSD<sup>R</sup>）和相对偏倚（Bias）。测量平均值均接近预期含量，与预期值的相对偏倚在  $\pm 25\%$  的可接受范围内；重复性相对标准偏差 RSD<sub>r</sub> 和再现性相对标准偏差 RSD<sub>R</sub> 均小于 25%（表 197）。已建立的 MZIR098/zSSIIb 二重 ddPCR 实现了对抗虫耐除草剂玉米 MZIR098 含量的准确定量，具有良好的重复性和重现性。

表 198 5 个盲样的测量结果

重复	PCR 平行	盲样				
		Sg1 (%)	Sg2 (%)	Sg3 (%)	Sg4 (%)	Sg5 (%)
1	1	4.52	2.61	1.04	0.52	0.11
	2	4.80	2.63	0.98	0.45	0.10
	3	5.00	2.60	1.05	0.49	0.10
2	1	4.88	3.12	1.08	0.52	0.11

	2	4.89	3.22	1.14	0.56	0.10
	3	5.10	3.26	1.18	0.49	0.09
3	1	5.04	3.02	1.05	0.57	0.10
	2	5.00	3.05	1.10	0.47	0.10
	3	5.05	3.13	0.94	0.51	0.09

表 199 MZIR098/*zSSIb* 二重 ddPCR 定量结果的重复性和重现性统计分析

盲样	拷贝数比值 (%)	平均值 (%)	SD <sup>r</sup> (%)	RSD <sup>r</sup> (%)	S <sup>R</sup> (%)	RSD <sup>R</sup> (%)	Bias (%)
Sg1	5.0	4.92	0.16	3.20	0.18	3.75	-1.60
Sg2	3.0	2.96	0.05	1.82	0.31	10.49	-1.33
Sg3	1.0	1.06	0.06	5.61	0.08	7.40	6.22
Sg4	0.5	0.51	0.04	8.02	0.04	8.02	1.78
Sg5	0.1	0.10	0.01	7.45	0.01	7.45	0.00

### 35.7 结论

MZIR098/*zSSIb* 二重 ddPCR 中 MZIR098 转化体和 *zSSIb* 内标准基因采用与实时荧光 PCR 检测相同的引物/探针，其浓度为 400/200 nM，反应体系见表 198。反应程序如下：94°C 变性 10 min；50 个循环（94°C 变性 30 s，60°C 退火/延伸 1 min）；98°C 变性 10 min。DNA 模板量在  $4 \times 10^1 \sim 8.0 \times 10^4$  copies/反应（相应的 MZIR098 转化体量为  $2 \times 10^1 \sim 4.0 \times 10^4$  copies/反应），拷贝数浓度的测量值与预期值具有良好的线性关系。

表 200 MZIR098/*zSSIb* 二重微滴数字 PCR 反应体系

PCR 反应试剂	终浓度	体积 ( $\mu\text{L}$ )
ddPCR Supermix (2 $\times$ )	1 $\times$	10.0
MZIR-qF (10 $\mu\text{M}$ )	0.4 $\mu\text{M}$	0.8
MZIR-qR (10 $\mu\text{M}$ )	0.4 $\mu\text{M}$	0.8
MZIR-qP (10 $\mu\text{M}$ )	0.2 $\mu\text{M}$	0.4
<i>zSSIb</i> -3F (10 $\mu\text{M}$ )	0.4 $\mu\text{M}$	0.8
<i>zSSIb</i> -4R (10 $\mu\text{M}$ )	0.4 $\mu\text{M}$	0.8

<i>zSSIb</i> -P (10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ M	0.4
DNA 模板 (25 ng/ $\mu$ L)	2.5 ng/ $\mu$ L	2.0
ddH <sub>2</sub> O	/	4.0
合计	/	20.0

注：扩增体系可根据仪器及试剂耗材的实际使用情况，进行相应调整。此表是 1 个扩增体系的体积，应按照实际反应数量进行扩增体系配置。空白质控品以 2.0  $\mu$ L 的 ddH<sub>2</sub>O 作模板。

## 36. DP202216/*zSSIb* 二重数字 PCR 方法

### 36.1 引物探针确认

DP202216 是先锋国际良种公司开发的转 *zmm28* 和 *mo-pat* 基因产量性状改良和耐除草剂玉米品种，其转化体分子特征由先锋国际良种公司解析。首先对获得转基因材料的分子特征进行测序验证，确定转基因材料的转化体身份。然后用 Primer 5 引物探针设计软件，根据 DP202216 的左、右边界旁侧序列设计多条 DP202216 转化体特异性引物及探针，并组合配对，设计的引物/探针如表 199 所示。

表 201 DP202216 转化体特异性引物和探针序列

组合	引物/探针名称及序列 (5'-3')	扩增片段大小(bp)
1	DP-QF1:GGACGAACCCAGACCGAATG	167
	DP-QR2:GACTCCCTTAATTCTCCGCTCAT	
	DP-QP:TAAACTGAAGGCGGGAAACGAC	
2	DP-QF2:CTCGCCCTCACCACCTATTTCT	142
	DP-QR2:GACTCCCTTAATTCTCCGCTCAT	
	DP-QP:TAAACTGAAGGCGGGAAACGAC	
3	DP-QF3:CTATTTCTTCCCATCTGAGGTCTGC	128
	DP-QR2:GACTCCCTTAATTCTCCGCTCAT	
	DP-QP:TAAACTGAAGGCGGGAAACGAC	
4	DP-QF4:TGCACTCTCACCGGTAGTACAGCAC	106
	DP-QR2:GACTCCCTTAATTCTCCGCTCAT	
	DP-QP:TAAACTGAAGGCGGGAAACGAC	
5	DP-QF1:GGACGAACCCAGACCGAATG	179
	DP-QR3:GGGTCATAACGTGACTCCCTTAATT	

	DP-QP:TAAACTGAAGGCGGGAAACGAC	
6	DP-QF2:CTCGCCCTCACCACCTATTTCT	154
	DP-QR3:GGGTCATAACGTGACTCCCTTAATT	
	DP-QP:TAAACTGAAGGCGGGAAACGAC	
7	DP-QF3:CTATTTCTTCCCATCTGAGGTCTGC	140
	DP-QR3:GGGTCATAACGTGACTCCCTTAATT	
	DP-QP:TAAACTGAAGGCGGGAAACGAC	
8	DP-QF4:TGCACTCTCACCGGTAGTACAGCAC	118
	DP-QR3:GGGTCATAACGTGACTCCCTTAATT	
	DP-QP:TAAACTGAAGGCGGGAAACGAC	

在伯乐微滴式数字 PCR 平台 QX200 上用通用的 PCR 反应体系（引物/探针浓度 400/200 nM）和退火温度（60℃），以 DP202216 杂合体基因组 DNA 为模板，进行 DP202216 转化体/*zSSIb* 基因的二重 ddPCR 扩增，对表 199 中的引物探针组合进行筛选 *zSSIb* 内标基因选用发布的标准方法（农业部 1861 号公告-3-2012），引物/探针序列见表 200。DP202216 转化体和 *zSSIb* 内标基因的 1 维（1-D）微滴热图、2 维微滴热图（2-D）、DP202216/*zSSIb* 拷贝数比值如图 162 所示，DP202216 转化体和 *zSSIb* 内标基因的 1-D 微滴热图中，8 个引物组合阳性微滴和阴性微滴都能区分，雨滴较少（图 162a）；2-D 微滴热图中，8 个引物探针组合都产生了 4 个显著区分的微滴群（图 162b）；8 个引物探针组合检测 DP202216 杂合体基因组 DNA，获得不同的 DP202216/*zSSIb* 拷贝数比值（图 162c），其中引物探针组合 3 的拷贝数比值为 0.501，接近理论值 0.5 且微滴区分最为显著，因此本项目选择引物探针组合 3 用于数字 PCR 扩增，引物探针序列详见表 200。

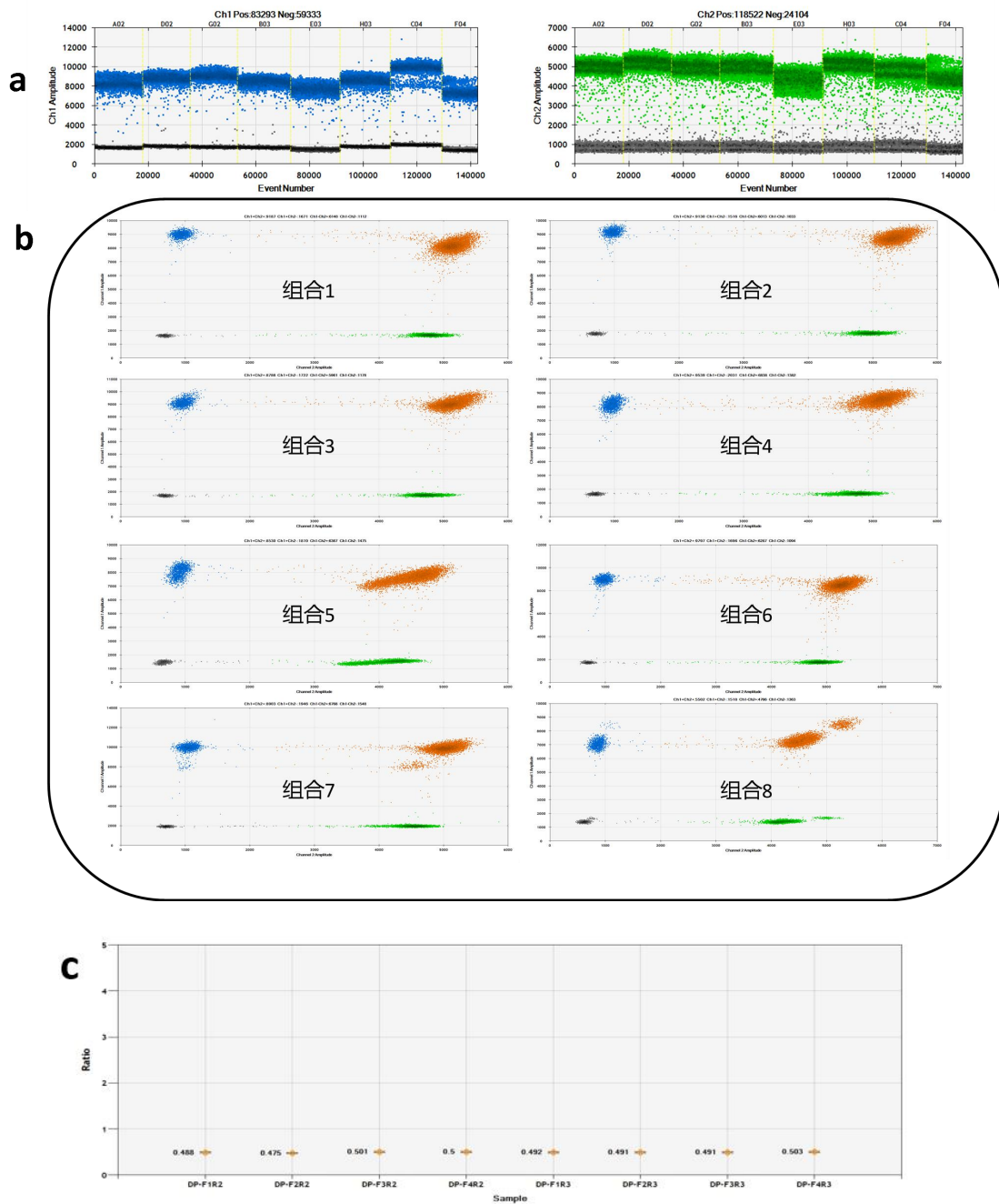


图 162 数字 PCR 引物探针筛选。

a, DP202216 转化体不同引物探针组合和 zSSIIB 内标基因 1-D 微滴图；b, 8 个引物探针组合与 zSSIIB 的 2-D 微滴图；c, 8 个引物探针组合检测 DP202216 杂合体基因组 DNA, 获得的 DP202216/zSSIIB 拷贝数比值。

表 202 DP202216 玉米转化体及 zSSIIB 内标基因引物和探针序列

转化体/基因	引物/探针名称及序列 (5'-3')	扩增片段	序列来源
--------	--------------------	------	------

		大小 (bp)	
DP202216	DP202216-QF:CTATTTCTTCCCATCTGAGGTCTGC	128	自主设计
	DP202216-QR:GACTCCCTTAATTCTCCGCTCAT		
	DP202216-QP:FAM-TAAACTGAAGGCGGGAAACGAC -BHQ1		
<i>zSSIb</i>	<i>zSSIb</i> -3F:CGGTGGATGCTAAGGCTGATG	88	农业部 1861 号 公告-3-2012
	<i>zSSIb</i> -4R:AAAGGGCCAGGTTTCATTATCCTC		
	<i>zSSIb</i> -P:HEX-TAAGGAGCACTCGCCGCCGCATCTG-B HQ		

### 36.2 DP202216/*zSSIb* 二重微滴数字 PCR 特异性测试

用转基因玉米 DP202216、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%)、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%)、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%)、转基因油菜混合样 (MS1、MS8、RF1、RF2、RF3、T45、Oxy235、Topas19/2、MON88302、73496, 含量各 1%)、转基因棉花混合样 (MON1445、MON531、MON15985、LLCOTTON25、MON88913、GHB614、COT102, 含量各 1%)、非转基因玉米的基因组 DNA 作模板进行 DP202216 和 *zSSIb* 微滴数字 PCR (ddPCR) 扩增, 用水做空白对照, 测试 DP202216 转化体特异性 ddPCR 的检测特异性。*zSSIb* 内标基因 ddPCR 在转基因玉米和非

转转基因玉米品种中都产生了阳性微滴，在其他作物和空白对照中无阳性微滴；DP202216 转化体特异性 ddPCR 仅在转基因玉米 DP202216 中有阳性微滴，在其他转基因玉米品种和空白对照中均无阳性微滴（图 163）。结果表明 DP202216/*zSSIIb* 二重微滴数字 PCR 有良好的扩增特异性。

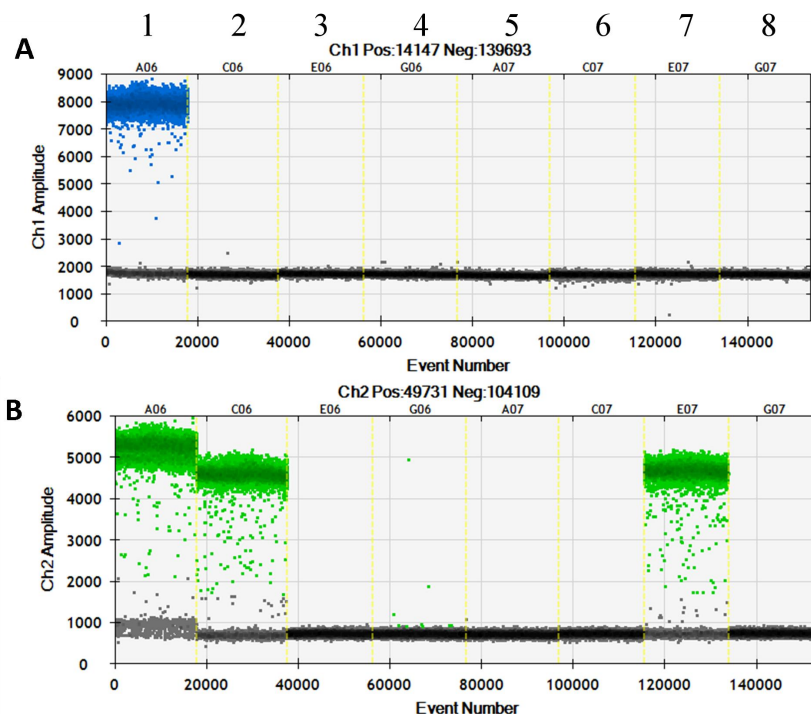


图 163 DP2022162 微滴数字 PCR 特异性测试。

A, DP202216 微滴数字 PCR 一维热图；B, *zSSIIb* 微滴数字 PCR 一维热图。样品顺序：1.DP2022162, 2. 其他转基因玉米混合样 3. 转基因大豆混合样, 4. 转基因水稻混合样, 5. 转基因油菜混合样, 6. 转基因棉花混合样, 7. 非转基因玉米, 8. 空白对照

### 36.3 DP202216 /*zSSIIb* 二重数字 PCR 的反应条件优化

转基因定量检测依赖于转基因 DNA 拷贝数和总 DNA 拷贝数的准确测量，其中转基因 DNA 拷贝数通过转化体特异性 PCR 检测定量，

总 DNA 拷贝数定量通过内标基因测定。以 DP202216 杂合体基因组 DNA 为模板，分别优化二重数字 PCR 中 DP202216 转化体和 *zSSIb* 内标基因的引物/探针浓度和退火/延伸温度，改善阳性/阴性液滴的分辨率以减少雨滴对定量结果的影响，同时测试二重数字 PCR 反应中转化体和内标基因是否具有相似的扩展效率。在 57℃ 至 62℃ 的不同退火温度下，*zSSIb* 内标基因的阳性液滴的荧光强度保持稳定（图 164b），但 DP202216 阳性液滴的荧光强度随着退火温度的降低而增加，在退火温度降低到 60℃ 时，微滴的信号强度达到平台期（图 164 a）。在不同的退火温度下，DP202216 的阳性和阴性微滴都能明显区分，拷贝数比值在 0.487—0.496 的范围内波动，都接近理论值，当退火温度在 60℃ 时，测量的拷贝数比值为 0.496，非常接近理论值（图 164 c）。考虑到退火温度对扩增特异性的影响，选择 60℃ 作为 DP202216 转化体和 *zSSIb* 内标基因二重数字 PCR 的退火温度。

DP202216 和内标基因的引物/探针浓度低于 400/200 nM 时，阳性、阴性液滴信号偏低，且难以明显区分（图 164 d、e）；当两个靶标的引物/探针浓度均为 400/200 nM 时，阳性微滴和阴性微滴具有最佳的分辨率；当两个靶标的引物/探针浓度高于 400/200 nM 时，阴性微滴信号值升高，且阳性微滴群变宽。当两个靶标的引物/探针浓度均为 400/200 nM 时，测量的平均拷贝数比值为 0.528，接近理论值（图 164 f）。综合考虑引物探针用量和微滴荧光强度，二重数字 PCR 中 DP202216 和 *zSSIb* 的引物/探针浓度均采用 400/200 nM。

在 60°C 退火、引物/探针浓度为 400/200 nM 的反应条件下，以杂合体基因组 DNA 为模板，进行 DP202216/*zSSIIb* 二重 ddPCR。二重数字 PCR 二维热图显示了 4 个明显的液滴簇，分别对应 FAM 阳性液滴簇、HEX 阳性液滴簇、双荧光液滴簇和阴性液滴簇（图 164 g），测量的拷贝数比值为 0.528，非常接近理论值 0.5，表明 DP202216/*zSSIIb* 二重 ddPCR 中 *zSSIIb* 内标基因与 DP202216 转化体具有相同的扩增能力。选择 60°C 作为 DP202216/*zSSIIb* 二重 ddPCR 的最佳退火温度，DP202216 转化体和 *zSSIIb* 内标基因的引物/探针浓度均为 400/200 nM。

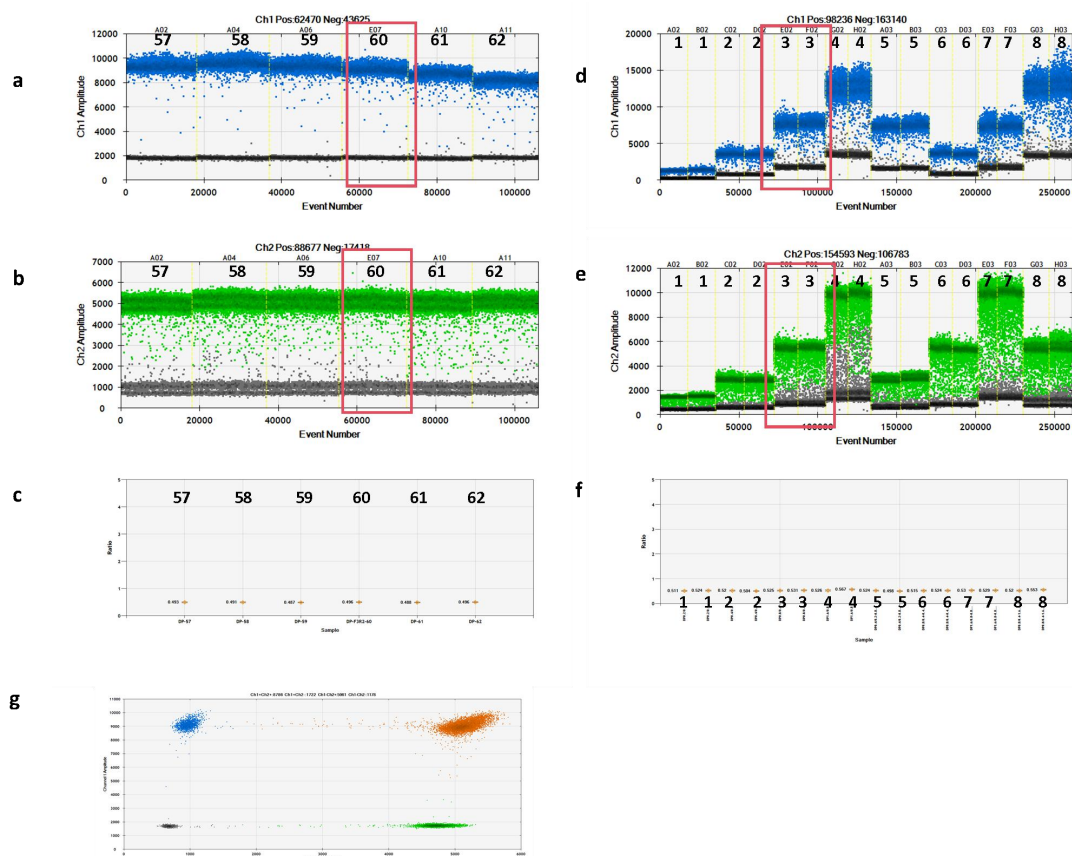


图 164 DP202216/*zSSIIb* 二重 ddPCR 退火/延伸温度和引物/探针浓度的优化。

DP202216 (a) 和 zSSIIb (b) 在 57°C 至 62°C 不同退火温度下的一维 (1-D) 微滴图; c, 不同退火温度下测量的 DP202216/zSSIIb 拷贝数比值; DP202216 (d) 和 zSSIIb (e) 在不同引物/探针浓度下的一维微滴图, 1-4 对应 DP202216 和 zSSIIb 的引物探针浓度相同, 分别为 100/50, 200/100, 400/200, 800/400 nM; 5-8 对应 DP202216 和 zSSIIb 不同的引物探针浓度, 分别为 200/100 nM (zSSIIb)、400/200 nM (DP202216), 400/200 nM (zSSIIb)、200/100 nM (DP202216), 800/400 nM (zSSIIb)、400/200 nM (DP202216), 400/200 nM (zSSIIb)、800/400 nM (DP202216); f, 不同引物探针浓度下测量的 DP202216/zSSIIb 拷贝数比值; g, 在优化的反应体系和退火温度下, DP202216/zSSIIb 二重 ddPCR 的二维微滴图。

### 36.4 DP202216/zSSIIb 二重 ddPCR 的 LOD、LOQ 和动力学范围测试

在优化的 PCR 条件下, DP202216 基因组 DNA 的连续稀释液用于测试 DP202216/zSSIIb 二重 ddPCR 的动态范围、LOD 和 LOQ。不同浓度的微滴热图见图 165, 测量的拷贝数浓度以及 DP202216/zSSIIb 的拷贝数比值显示在表 3 中。当反应体系中模板拷贝数为 5 拷贝及以上时, DP202216/zSSIIb 二重 ddPCR 4 个反应均呈现阳性信号, 参考同类标准, LOD 确定为 10 个拷贝 DP202216 gDNA。统计各个二重数字 PCR 反应测量的 DP202216 拷贝数、zSSIIb 拷贝数、和 DP202216/zSSIIb 拷贝数比值, 计算各模板量测量结果的相对标准差 (RSD) 和相对偏倚 (Bias%)。当反应体系中模板拷贝数为 40 拷贝时, 测量结果的 RSD 值均小于 25%, Bias% 均在 ±25% 之间, LOQ 确定为 40 个拷贝 DP202216 基因组 DNA (表 201)。

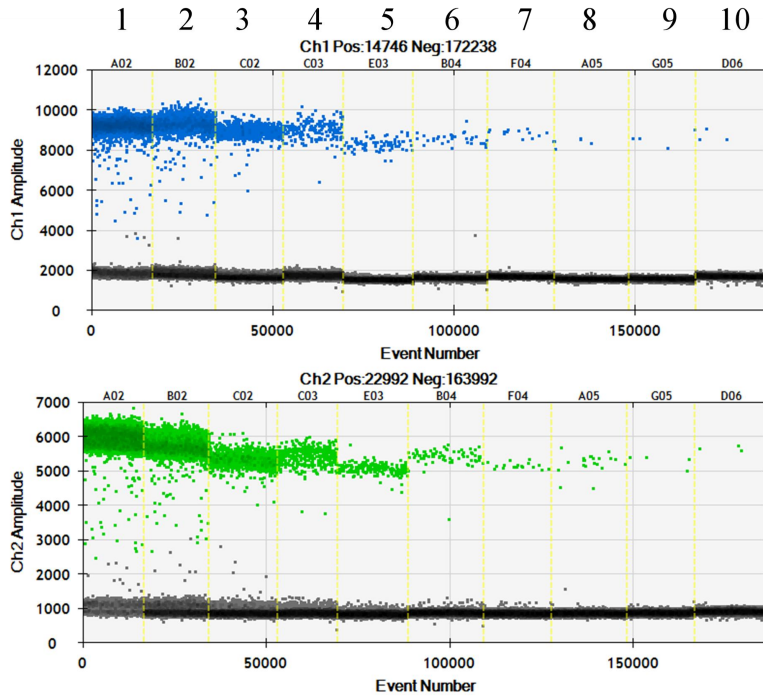


图 165 梯度稀释 DNA 溶液 DP202216/*zSSIIB* 二重 ddPCR 的微滴热图  
 DP202216 转化体 1-10 的模板量依次为 20000、5000、1250、312.5、100、40、20、10、5、1copies;  
*zSSIIB* 基因 1-10 的模板量依次为 40000、1000、2500、625、200、80、40、20、10、2copies

表 203 DP202216 玉米特异性序列数字 PCR 线性动态范围与重复性分析

Target	Expected concentration (copies)	Copy number concentration (copies)					SD	RSD (%)	Bias (%)
		Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Mean			
DP202216 copy number	20000	18700	20620	20380	18160	19465	1219.22	6.26	-2.68
	5000	4860	4960	4940	4940	4925	44.35	0.90	-0.38
	1250	1116	1102	1128	1198	1136	42.68	3.76	-0.57
	312.5	252	256	272	274	263.50	11.12	4.22	-0.25
	100	90	116	94	120	105.00	15.19	14.46	0.03
	40	30	36	44	40	37.50	5.97	15.93	-0.01
	20	14.8	14	14.2	17.2	15.05	1.47	9.79	-0.02
	10	8	10	8.2	7.6	8.45	1.06	12.58	-0.01
	5	6	6.6	5	4.8	5.60	0.85	15.15	0.00
	1	-	3.4	-	-	-	-	-	-
<i>zSSIIB</i> copy number	40000	38000	40780	40900	36980	39165	1979.05	5.05	-2.09
	10000	9660	9600	9720	9860	9710	111.36	1.15	-0.73

	2500	2220	2340	2300	2300	2290	50.33	2.20	-0.53
	625	512	526	598	614	562.50	50.97	9.06	-0.16
	200	228	220	212	222	220.50	6.61	3.00	0.05
	80	60	88	78	90	79.00	13.71	17.36	0.00
	40	32	22	24	34	28.00	5.89	21.03	-0.03
	20	12.6	20.2	15.2	15.4	15.85	3.17	19.99	-0.01
	10	15.8	10	12.4	13.2	12.85	2.39	18.61	0.01
	2	14.2	-	-	-	-	-	-	-
Target	Expected ratio	DP202216/ <i>zSSIb</i> ratio					SD	RSD (%)	Bias (%)
		Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Mean			
DP202216/ <i>zSSIb</i> ratio	20000/40000	0.492	0.506	0.498	0.491	0.497	0.01	1.35	-0.64
	5000/10000	0.503	0.517	0.508	0.501	0.507	0.01	1.37	1.45
	1250/2500	0.503	0.471	0.490	0.521	0.496	0.02	4.23	-0.75
	312.5/625	0.492	0.487	0.455	0.446	0.470	0.02	4.86	-6.00
	100/200	0.395	0.527	0.443	0.541	0.476	0.07	14.57	-4.70
	40/80	0.500	0.409	0.564	0.444	0.479	0.07	14.13	-4.12
	20/40	0.463	0.636	0.592	0.506	0.549	0.08	14.41	9.82
	10/20	0.635	0.495	0.539	0.494	0.541	0.07	12.26	8.15
	5/10	0.380	0.660	0.403	0.364	0.452	0.14	30.96	-9.67
	1/2	-	-	-	-	-	-	-	-

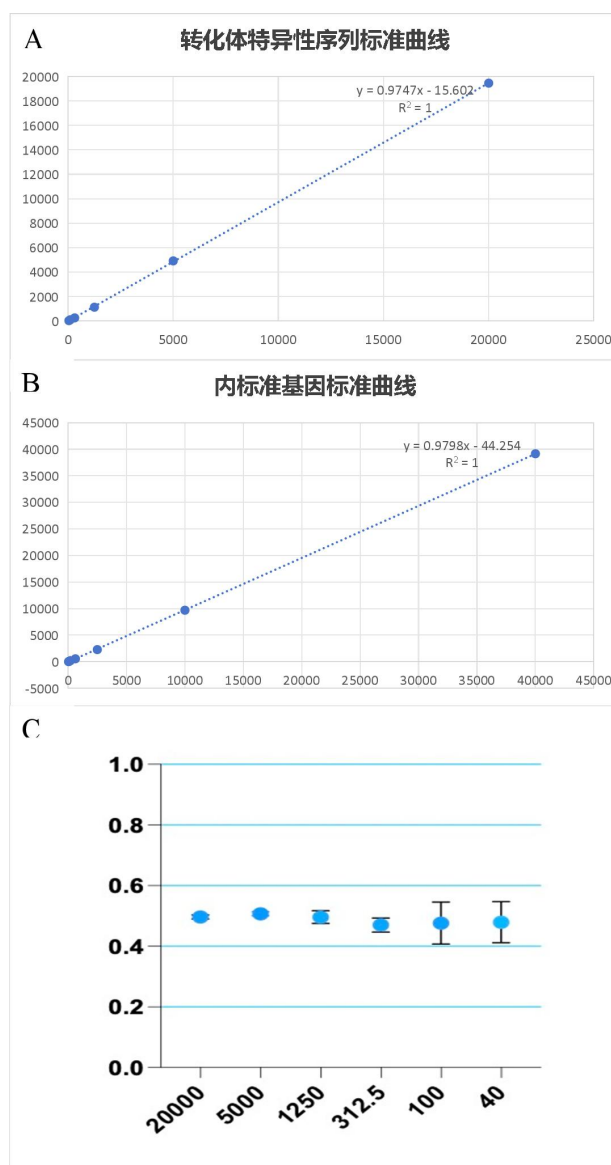


图 166 DP202216/zSSIIB 二重数字 PCR 方法线性动态范围测试

注：A 为 DP202216 转化体特异性序列拷贝数测量值与预期值的线性回归方程（y 代表拷贝数测量值，x 代表拷贝数预期值）；B 为 zSSIIB 基因拷贝数测量值与预期值的线性回归方程（y 代表拷贝数测量值，x 代表拷贝数预期值）；C 为 DP202216 转化体特异性序列和 zSSIIB 基因拷贝数比值与不同浓度模板量的关系（y 代表模板拷贝数比值，x 代表 DP202216 转化体特异性序列拷贝数预期值）。

结果显示：当 20  $\mu$ L 扩增体系中 DP202216 转化体特异性序列和 zSSIIB 基因拷贝数分别在 5~20000 copies 和 10~40000 copies 之间时，随着拷贝数的降低，4 个重复间正确度偏差（Bias）和重复性相对标准偏差（RSD）升高，但均小于 25%，参考同类标准，因此定量极限

(LOQ) 确定为 40 个拷贝 (DP202216 转化体特异性序列)。当 DNA 浓度为 10 拷贝 (DP202216 转化体特异性序列) 时, 可以稳定的检测到阳性信号, 拷贝数测量值在 7.6~10 之间, 因此检测极限 (LOD) 确定为 10 拷贝 (DP202216 转化体特异性序列) (表 202); DP202216 转化体特异性序列和 *zSSIb* 基因微滴数字 PCR 获得的拷贝数浓度测量值与预期值具有良好的相关性, 线性回归方程分别为  $y=0.9747x - 15.602$  和  $y=0.9798x - 44.254$ , 决定系数  $R^2$  值分别等于 1 和 1, DP202216 转化体特异性序列和 *zSSIb* 基因拷贝数比值在 0.5 附近波动 (图 166)。DP202216/*zSSIb* 二重数字 PCR 方法线性动态范围测试结果表明, 20  $\mu$ L 扩增体系中, 当模板量在 DP202216 转化体特异性序列 40~20000 拷贝的范围内, 可获得准确的拷贝数浓度和拷贝数比值测量值。

### 36.5 DP202216/*zSSIb* 二重 ddPCR 的测量准确性

配制 5 个含 DP202216 基因组 DNA 盲样 (S1~S5), DP202216/*zSSIb* 拷贝数比值依次为 5.0%、3.0%、1.0%、0.5%、0.1%。由不同的操作者在不同的日期用 DP202216/*zSSIb* 二重 ddPCR 方法对 5 个盲样进行进行了 3 次测量。

表 204 5 个盲样的测量结果

重复	PCR 平行	盲样含量测量值				
		S1 (%)	S2 (%)	S3 (%)	S4 (%)	S5 (%)
1	1	4.991	2.978	1.017	0.514	0.126
	2	5.002	2.914	0.956	0.487	0.105

	3	5.145	2.903	1.041	0.508	0.105
2	1	5.027	2.947	1.028	0.509	0.109
	2	5.086	3.065	1.035	0.481	0.085
	3	5.005	3.058	0.994	0.508	0.121
3	1	5.039	3.023	0.939	0.479	0.114
	2	5.050	3.014	0.962	0.557	0.103
	3	4.978	3.046	0.989	0.492	0.071

表 205 5 个盲样定量结果的重复性和重现性统计分析

盲样	预期拷贝数比值 (%)	测量平均值 (%)	Sr (%)	RSDr (%)	S <sub>R</sub> (%)	RSD <sub>R</sub> (%)	Bias (%)
S1	5	5.04	0.06	1.18	0.06	1.18	0.72
S2	3	2.99	0.05	1.53	0.07	2.20	-0.19
S3	1	1.00	0.03	3.19	0.04	3.90	-0.43
S4	0.5	0.50	0.03	5.37	0.03	5.37	0.78
S5	0.1	0.10	0.02	17.34	0.02	17.34	4.33

二重 ddPCR 的定量结果如表 202 所示，计算得到 5 个盲样 DP202216/zSSIIb 拷贝数比值的平均值，统计测量结果的重复性相对标准差 ( $RSD_r$ )、重现性相对标准差 ( $RSD_R$ )、和相对偏倚 ( $Bias$ )。结果显示，测量平均值均接近预期含量，与预期值的相对偏倚在 ±25% 的可接受范围内；重复性相对标准偏差  $RSD_r$  和再现性相对标准偏差  $RSD_R$  均小于 25% (表 203)。已建立的 DP202216/zSSIIb 二重 ddPCR 实现了对样品中 DP202216 转化体含量的准确定量，具有良好的重复性和重现性。

### 36.6 结论

DP202216/zSSIIb 二重 ddPCR 扩增引物探针见表 206。DP202216/zSSIIb 二重 ddPCR 扩增体系见表 207，扩增程序为：95°C

预变性 10 min; 94°C变性 30 s, 60°C退火延伸 60 s, 共进行 50 个循环; 98°C变性 10 min, 4°C保存 (升降温速率 2°C/s)。

表 206 DP202216 转化体特异性引物和探针序列

靶标	引物/探针名称及序列 (5'-3')	扩增片段大小 (bp)	来源
zSSIIb 基因	zSSIIb-3F: CGGTGGATGCTAAGGCTGATG	88	农业部 1861 号公告-3-2012
	zSSIIb-4R: AAAGGGCCAGGTTTCATTATCCTC		
	zSSIIb-P: HEX-TAAGGAGCACTCGCCGCCGCATCTG-BHQ1		
DP202216 转化体	DP202216-QF: CTATTTCTTCCCATCTGAGGTCTGC	128	本研究
	DP202216-QR: GACTCCCTTAATTCTCCGCTCAT		
	DP202216-QP: FAM-TAAACTGAAGGCGGGAAACGAC-BHQ1		

表 207 数字 PCR 扩增体系

组分	终浓度	体积
ddH <sub>2</sub> O		4.0 μL
2×ddPCR <sup>TM</sup> Supermix for Probes	1×	10.0 μL
10 μmol/L 内标上游引物 zSSIIb-3F	0.4 μmol/L	0.8 μL
10 μmol/L 内标下游引物 zSSIIb-4R	0.4 μmol/L	0.8 μL
10 μmol/L 内标探针 zSSIIb-P	0.2 μmol/L	0.4 μL
10 μmol/L 转化体上游引物 DP202216-QF	0.4 μmol/L	0.8 μL
10 μmol/L 转化体上游引物 DP202216-QR	0.4 μmol/L	0.8 μL
10 μmol/L 转化体探针 DP202216-QP	0.2 μmol/L	0.4 μL
25 mg/L DNA 模板	2.5 mg/L	2.0 μL
总体积		20.0 μL

扩增体系可根据仪器及试剂耗材的实际使用情况, 进行相应调整。此表是 1 个扩增体系的体积, 应按照实际反应数量进行扩增体系配置。空白质控品以 2.0 μL 的 ddH<sub>2</sub>O 作模板。

## 37. NK603/zSSIIb 二重数字 PCR 方法

### 37.1 玉米内标基因的比较

玉米常见的内标基因有 *zein-ENDO*、*zein-taq*、*hmg*、*zSSIIb* 和 *Adh1*，在进行二重 ddPCR 方法建立时，将 NK603 转化体与不同的玉米内标基因组合，以标准质粒分子 pUC57-N 为模板进行二重 ddPCR 扩增，通过考察外源基因和内标基因的微滴信号强度、阳性微滴与阴性微滴的分辨率、中等信号强度雨滴数量、以及外源基因与内标基因拷贝数的比值，确定能与 NK603 配组进行二重 ddPCR 扩增的最适内标基因。退火温度是影响 ddPCR 微滴信号强度和雨滴数量的关键因素，本研究设置了 8 个退火温度梯度（52 °C、52.7 °C、54 °C、55.9 °C、58.4 °C、60.3 °C、61.4 °C、62 °C），以确定 NK603 转化体和内标基因二重 ddPCR 的最适退火温度。

ddPCR 一维（1-D）热图显示，NK603 转化体与不同的玉米内标基因组合，NK603 转化体在同一退火温度下阳性微滴的信号强度相似，随着退火温度的降低，阳性微滴信号强度增强，当退火温度低至 58.4 °C 时，阳性微滴信号强度趋于一致（图 167）。与 NK603 转化体组合进行二重 ddPCR 反应，玉米内标基因 *zein-ENDO* 的阴性微滴和阳性微滴在任何温度下都不能清晰的区分（图 167A）；*Adh1* 在退火温度低于 58.4 °C 时，阳性微滴和阴性微滴不能清晰的区分，在 58.4~61.4 °C 时阳性微滴和阴性微滴勉强能分开（图 167B）；

NK603/hmg 二重 ddPCR 中，外源基因和内标基因的阳性微滴和阴性微滴虽能区分，但“下雨”现象严重（图 167C）；*zSSIIb* 和 *zein-taq* 在所有温度下都能清晰的区分阳性微滴和阴性微滴，微滴的信号强度也比较稳定，但与 *zein-taq* 相比，*zSSIIb* 的阳性微滴和阴性微滴在 8 个退火温度条件下的区分度更高，中等信号强度的雨滴相对更少（图 167D~E）。因此，初步选择 *zSSIIb* 作为候选内标基因，退火温度为 60 °C。在 60 °C 退火温度下，NK603/*zSSIIb* 的 2-D 热图中有 4 个清晰的微滴群，对应阴性微滴、FAM 荧光微滴、HEX 荧光微滴和双荧光微滴（图 167F）。统计 60 °C 下，NK603/*zSSIIb* 二重 ddPCR 的定值结果，NK603 转化体与 *zSSIIb* 内标基因的拷贝数比值的平均值为  $1.01 \pm 0.006$ ，很接近理论值 1.0，NK603 转化体和内标基因 *zSSIIb* 在该反应条件下具有相似的扩增能力。因此本研究选择 *zSSIIb* 作为 NK603 二重 ddPCR 定量的内标基因，二重 ddPCR 的最适退火温度为 60 °C。

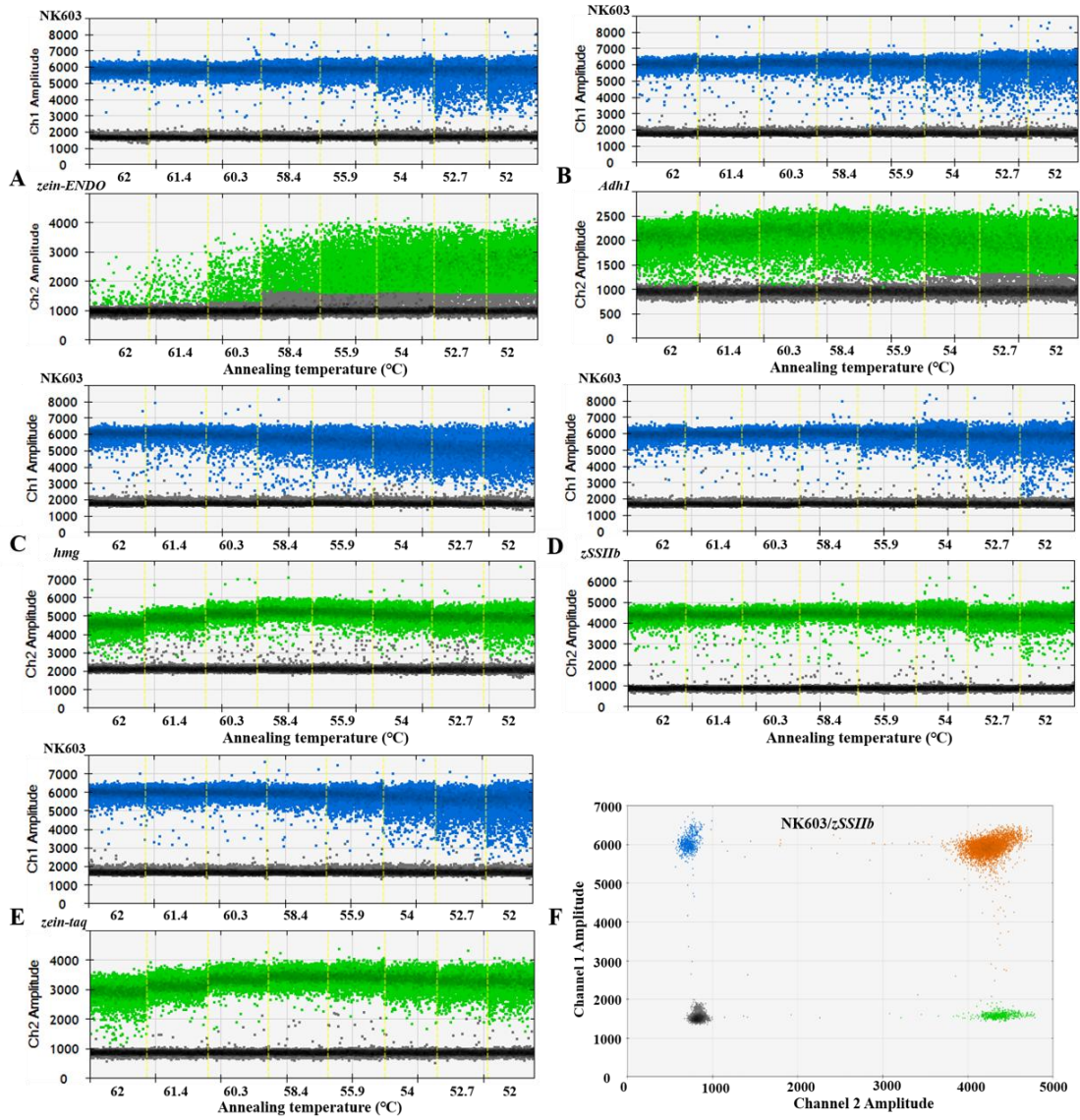


图 167 NK603 与不同内标基因配组的二重 ddPCR 退火温度优化热图

注：A, NK603/Zein-ENDO 二重 ddPCR 1-D 热图；B, NK603/Adh1 双重 ddPCR 1-D 热图；C, NK603/hmg 双重 ddPCR 1-D 热图；D, NK603/zSSIb 二重 ddPCR 1-D 热图；E, NK603/zein-taq 二重 ddPCR 1-D 热图；F, 60 °C 退火温度下 NK603/zSSIb 二重 ddPCR 的 2-D 热图

### 37.2 NK603/zSSIb 二重数字 PCR 引物探针浓度优化

将转化体特异性引物/探针与内标基因引物/探针加到同一反应体系中，转化体和内标基因的引物/探针间可能会互相干扰，而且，引物探针浓度会影响数字 PCR 微滴信号强度、雨滴数量及测量值的准

确性。通过设置引物/探针浓度梯度，优化数字 PCR 反应体系，遴选出最佳的引物/探针组合。设计了两种模式的引物/探针浓度，第一种模式中转化体和内标基因的引物/探针浓度相同，设置了 4 个浓度梯度，分别为 100/100/50nmol/L、200/200/100nmol/L、400/400/200nmol/L、800/800/400nmol/L；第二种模式中转化体和内标基因的引物/探针浓度不同，转化体和内标基因的引物/探针浓度分别为 400/400/200nmol/L、200/200/100nmol/L，200/200/100nmol/L、400/400/200nmol/L，400/400/200nmol/L、800/800/400nmol/L，800/800/400nmol/L、400/400/200nmol/L。数字 PCR 一维（1-D）热图如图 168 所示。无论是第一种模式还是第二种模式，微滴信号强度都是随着引物/探针浓度的升高而升高，但当引物探针浓度升至 800/800/400nmol/L，阳性微滴的信号强度出现很大的波动，且雨滴增多（图 168 A4 B4 A8 B7）；第二种模式中转化体和内标基因的引物/探针浓度不同，相应的转化体和内标基因阳性微滴的信号强度差异大（图 168A5-A8，B5-B8）；当转化体和内标基因的引物/探针浓度相同，浓度均为 400/400/200nmol/L 时，转化体和内标基因的阳性微滴信号强、信号强度相似、中等信号强度的雨滴少、方便反应体系配置、且与荧光定量 PCR 反应体系一致（图 168 A3 B3），选择 400/400/200nmol/L 作为 NK603/zSSIIb 双重 ddPCR 的引物探针浓度，在该引物/探针浓度下，二维热图中有四个明显的微滴信号群，分别

是阴性微滴群、FAM 荧光微滴群、HEX 荧光微滴群、和双荧光微滴群（图 168C）。

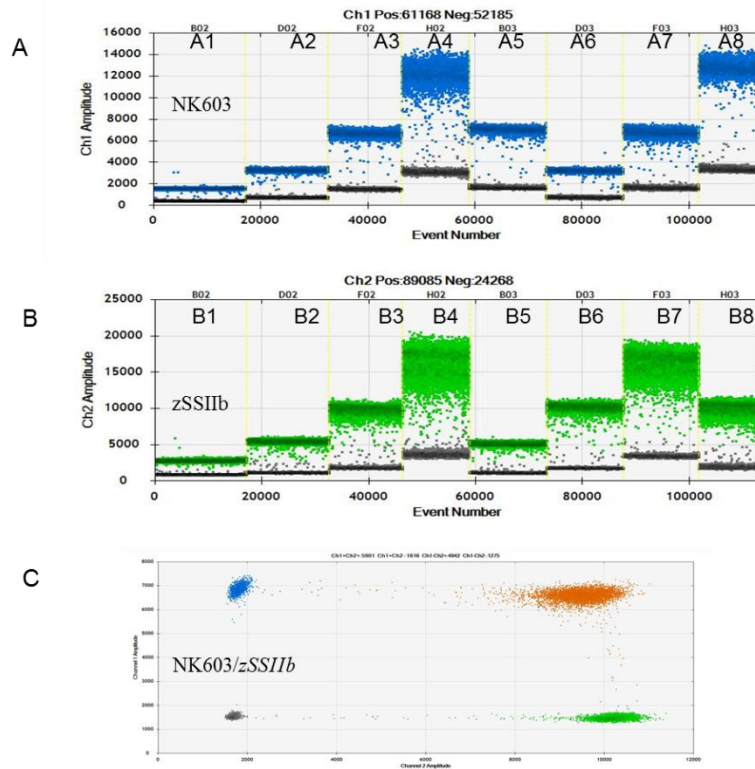


图 168 引物/探针浓度优化的扩增热图

注：A，二重数字 PCR 中 NK603 转化体不同引物/探针浓度的 1-D 扩增热图；B，二重数字 PCR 中 *zSSIb* 不同引物/探针浓度的 1-D 扩增热图；C，NK603/*zSSIb* 二重数字在引物/探针浓度 400/400/200nmol/L 下的二维图。A1-A8 的引物/探针浓度依次为 100/100/50nmol/L、200/200/100nmol/L、400/400/200nmol/L、800/800/400nmol/L、400/400/200nmol/L、200/200/100nmol/L、400/400/200nmol/L、800/800/400nmol/L；B1-B8 的引物/探针浓度依次为 100/100/50nmol/L、200/200/100nmol/L、400/400/200nmol/L、800/800/400nmol/L、200/200/100nmol/L、400/400/200nmol/L、800/800/400nmol/L、400/400/200nmol/L。

### 37.3 NK603/*zSSIb* 二重 ddPCR 线性动力学范围

ddPCR 理论上可检测 1~100000 copies 的核酸分子，为了测试 NK603/*zSSIb* 双重 ddPCR 的线性动力学范围，用 ddH<sub>2</sub>O 将线性化的质粒 pUC57-N 进行梯度稀释，模板量分别为  $3 \times 10^5$ 、 $6 \times 10^4$ 、 $3 \times 10^4$ 、

$6 \times 10^3$ 、 $1.2 \times 10^3$ 、 $2.4 \times 10^2$ 、48、9.6 copies/反应，每个梯度做 3 个平行。结果显示，当模板拷贝数浓度为  $3 \times 10^5$  copies/反应时，全部微滴均为阳性，超过了 ddPCR 的最高检测极限；当模板拷贝数浓度低至 9.6 copies/反应时，NK603 和 *zSSIIB* 均有阳性信号；当模板拷贝数浓度低至 48 copies/反应时，NK603 和 *zSSIIB* 均有阳性信号，且定量数据的 RSD 值和 Bias% 绝对值均小于 25%；确定 NK603/*zSSIIB* 二重数字 PCR 方法的 LOD 为 10 copy/反应，LOQ 为 50 copies/反应。根据质粒模板预期浓度和测量浓度间的对应关系绘制 NK603 和 *zSSIIB* 的回归曲线，NK603 回归曲线的决定系数  $R^2$  为 0.9991，内标基因 *zSSIIB* 回归曲线的决定系数  $R^2$  为 0.9989，NK603/*zSSIIB* 二重数字的 PCR 的线性动力学范围在  $48 \sim 6 \times 10^4$  copies，在此范围内模板拷贝数的测量值与理论值间具有良好的线性关系（图 169）。动力学范围测试结果表明，模板量大于 48 copies/反应时，测量值具有相对更高的正确度（Bias）和精确度（RSD）。

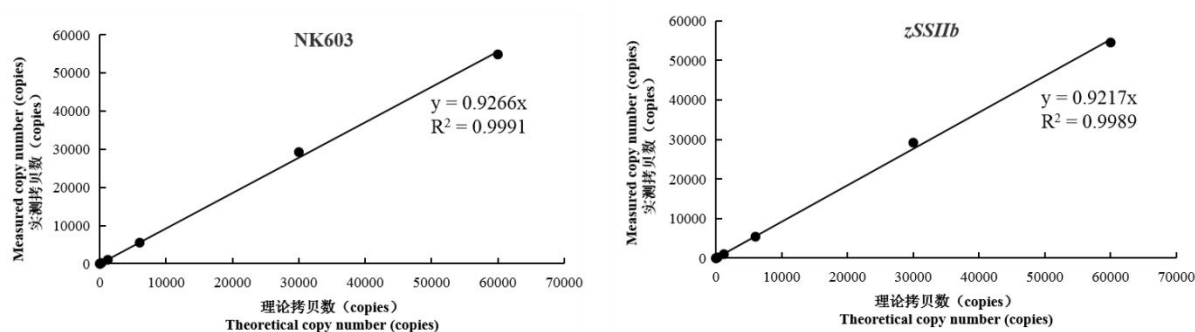


图 169 NK603/*zSSIIB* 双重 ddPCR 线性动力学范围

### 37.4 二重 ddPCR 定量检测盲样

用优化的 NK603/*zSSIb* 二重 ddPCR, 定量检测 NK603 质量分数分别为 100% (S1)、10% (S2) 和 6% (S3) 的盲样。ddPCR 的测量结果为 NK603 转化体和内标基因 *zSSIb* 的拷贝数百分比。3 个盲样的转基因含量分别为 51.05%、4.82%和 3.07%, 定量结果的相对标准偏差 (RSD) 分别为 1.91%、2.28%和 0.50% (表 204), 都小于 25%, 在允许的范围內。质量分数为 100%的 NK603 种子 (S1) 的测量值为 51.05%, 接近 50%; 质量分数为 10%的样品 (S2) 测量值为 4.82%, 接近 5%; 质量分数为 6%的样品 (S2) 测量值为 3.07%, 接近 3%; 表明 NK603 种子确为杂合体, 与普通 PCR 的鉴定结果相吻合。检测结果表明 NK603/*zSSIb* 二重 ddPCR 可准确测量样品中转基因 DNA 的含量。

表 208 二重 ddPCR 和 qPCR 定量检测盲样中转基因玉米 NK603 含量

方法 Method	样品 Sample	质量分数 (%) Mass fraction (%)	转基因 DNA 含量 (%) Transgenic DNA content (%)			平均值 Mean	SD	RSD(%)
			1	2	3			
ddPCR	S1	100	50.39	50.60	52.17	51.05	0.97	1.91
	S2	10	4.95	4.74	4.79	4.82	0.11	2.28
	S3	6	3.05	3.08	3.07	3.07	0.02	0.50

## 38. T25/*zSSIb* 二重数字 PCR 方法

### 38.1 引物探针确认

T25 是拜耳作物科学公司培育的耐除草剂转基因玉米品种，其转化体分子特征由拜耳作物科学公司解析。首先对获得转基因材料的分子特征进行测序验证，确定转基因材料的转化体身份。T25 转化体特异性引物探针和玉米内标准基因 *zSSIb* 引物探针分别选用已发布的标准方法《转基因产品检测 实时荧光定量聚合酶链式反应》（GBT 1949.5.5-2018）和《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）中的实时荧光 PCR 方法引物探针。

表 209 T25 转化体及 *zSSIb* 内标基因引物和探针序列

转化体 (基因)	引物/探针名称及序列 (5'-3')	扩增片 段大小 (bp)	序列来源
T25	T25-F: ACAAGCGTGTCGTGCTCCAC	102	GBT 1949.5-2018
	T25-R: GACATGATACTCCTTCCACCG		
	T25-P: FAM-TCATTGAGTCGTTCCGCCATTGTCTG-BHQ1		
<i>zSSIb</i>	<i>zSSIb</i> -3F:CGGTGGATGCTAAGGCTGATG	88	农业部 1861 号公告 -3-2012
	<i>zSSIb</i> -4R:AAAGGGCCAGGTTTATTATCCTC		
	<i>zSSIb</i> -HP:HEX-TAAGGAGCACTCGCCGCCGATCTG--BHQ1		

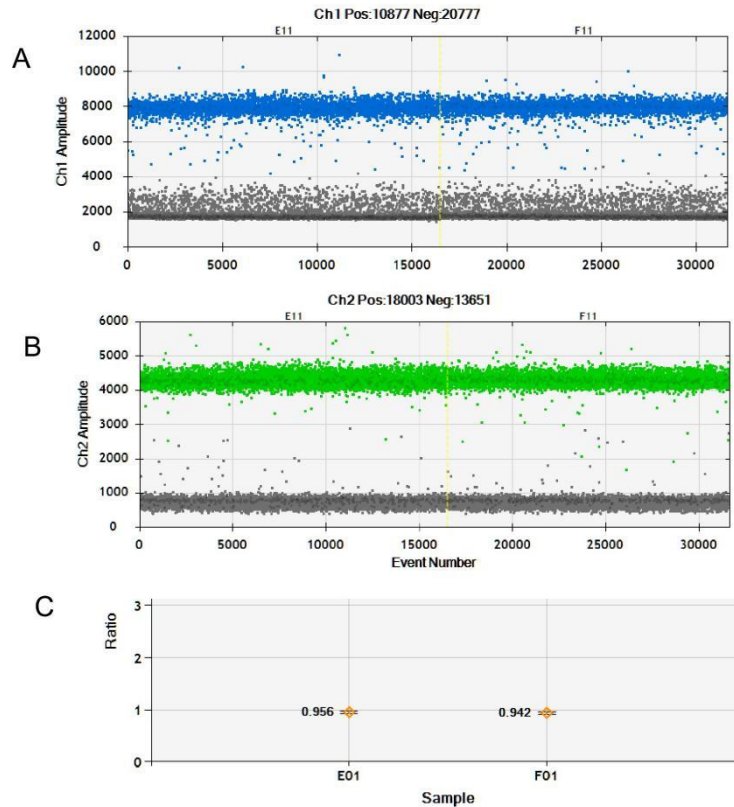


图 170 数字 PCR 引物探针确认

注：A 为 T25 玉米转化体特异性序列一维微滴图谱；B 为 *zSSIIB* 基因一维微滴图谱，C 为 T25 转化体和 *zSSIIB* 基因拷贝数比值。

在伯乐微滴式数字 PCR 平台 QX200 上，用通用的 PCR 反应体系（引物/探针浓度 400/200 nM）和退火温度（60°C），以 T25 纯合体基因组 DNA 为模板，进行 T25 转化体/*zSSIIB* 基因的二重 ddPCR 扩增，对表 205 中的引物探针组合进行测试，设 2 个平行反应。

结果显示，T25 转化体和 *zSSIIB* 基因二重微滴式数字 PCR 的一维微滴图谱（1-D）的阴性微滴和阳性微滴分界清晰，“雨滴”较少（图 170A， B）；T25 转化体和 *zSSIIB* 基因拷贝数比值接近 1.0，符合纯合体 T25 玉米分子特征（图 170C）。综上，确认表 1 的引物探针适用 T25 转化体/*zSSIIB* 基因的二重 ddPCR 扩增。

### 38.2 T25 /*zSSIb* 二重微滴数字 PCR 特异性测试

用转基因玉米 T25、其他转基因玉米混合样（瑞丰 125、瑞丰 8、MIR604、NK603、MON87427、DBN9936、DBN9858、DBN9501）、转基因大豆混合样（DBN9004、MON89788、MON87751、CAL16、中黄 6106、DBN8205）、转基因水稻混合样（TT51-1、KF-6、KMD、G6H1、T1C-19、T2A-1）、转基因油菜混合样（MS1、MS8、RF1、RF2、RF3、T45、Oxy-235、Topas19/2、MON88302、73496）、转基因棉花混合样（MON1445、MON531、MON15985、LLCOTTON25、MON88913、GHB614、COT102）、非转基因玉米基因组 DNA 作模板进行 T25 和 *zSSIb* 微滴数字 PCR（ddPCR）扩增，用水做空白对照，测试 T25 转化体特异性 ddPCR 的检测特异性。*zSSIb* 内标基因 ddPCR 在转基因玉米和非转基因玉米品种中都产生了阳性微滴，在其他作物和空白对照中无阳性微滴；T25 转化体特异性 ddPCR 仅在转基因玉米 T25 中有阳性微滴，在其他转基因玉米品种和空白对照中均无阳性微滴（图 171）。结果表明 T25 /*zSSIb* 二重微滴数字 PCR 有良好的扩增特异性。

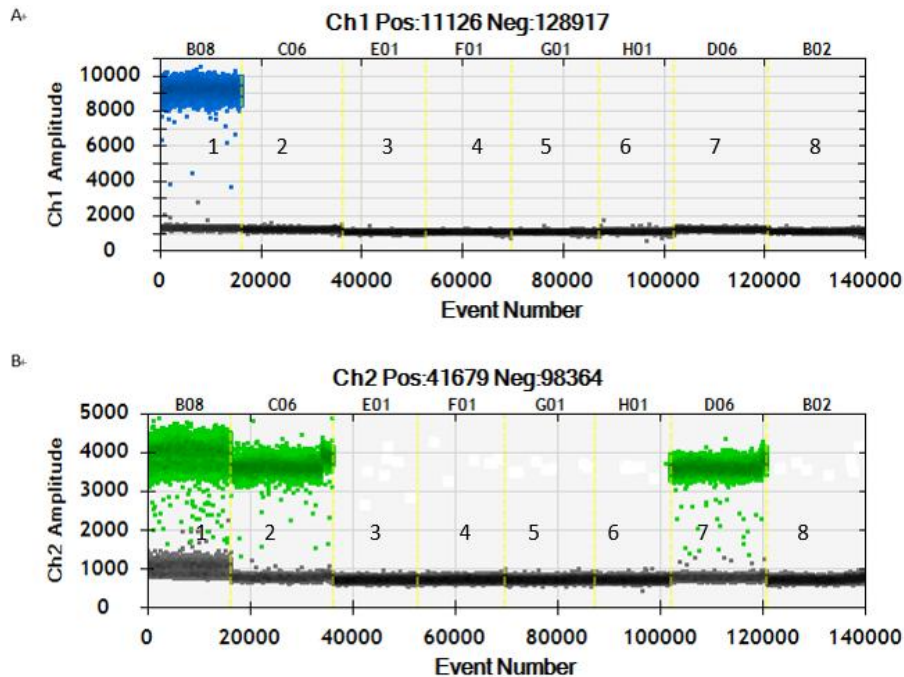


图 171 T25 微滴数字 PCR 特异性测试。

A, T25 微滴数字 PCR 一维热图; B, *zSSIb* 微滴数字 PCR 一维热图。样品顺序: 1. T25, 2. 其他转基因玉米混合样 3. 转基因大豆混合样, 4. 转基因水稻混合样, 5. 转基因油菜混合样, 6. 转基因棉花混合样, 7. 非转基因玉米, 8. 空

### 38.3 T25 /*zSSIb* 二重数字 PCR 的反应条件优化

转基因定量检测依赖于转基因 DNA 拷贝数和总 DNA 拷贝数的准确测量, 其中转基因 DNA 拷贝数通过转化体特异性 PCR 检测定量, 总 DNA 拷贝数定量通过内标基因测定。以 T25 纯合体基因组 DNA 为模板, 分别优化二重数字 PCR 中 T25 转化体和 *zSSIb* 内标基因的引物/探针浓度和退火/延伸温度, 改善阳性/阴性液滴的分辨率以减少雨滴对定量结果的影响, 同时测试二重数字 PCR 反应中转化体和内标基因是否具有相似的扩展效率。在 55°C 至 63°C 的不同退火温度下, *zSSIb* 内标基因和的 T25 转化体阳性液滴的荧光强度都能够

保持稳定（图 172a 和 3b）。在不同的退火温度下，T25 的阳性和阴性微滴都能明显区分，拷贝数比值在 1.02—1.085 的范围内波动，当退火温度在 60.1°C 时，测量的拷贝数比值为 1.02，非常接近理论值 1.0（图 172 c）。选择 60°C 作为 T25 转化体和 *zSSIIb* 内标基因二重数字 PCR 的退火温度。

T25 和内标基因的引物/探针浓度低于 400/200 nM 时，阳性、阴性液滴信号偏低，且难以明显区分（图 172d、e）；当两个靶标的引物/探针浓度均为 400/200 nM 时，阳性微滴和阴性微滴具有最佳的分辨率；当两个靶标的引物/探针浓度高于 400/200 nM 时，阴性微滴信号值升高，且阳性微滴群变宽。当两个靶标的引物/探针浓度均为 400/200 nM 时，测量的平均拷贝数比值为 1.045，接近理论值 1.0（图 172 f）。综合考虑引物探针用量和微滴荧光强度，二重数字 PCR 中 T25 和 *zSSIIb* 的引物/探针浓度均采用 400/200 nM。

在 60°C 退火、引物/探针浓度为 400/200 nM 的反应条件下，以纯合体基因组 DNA 为模板，进行 T25/*zSSIIb* 二重 ddPCR。二重数字 PCR 二维热图显示了 4 个明显的液滴簇，分别对应 FAM 阳性液滴簇、HEX 阳性液滴簇、双荧光液滴簇和阴性液滴簇（图 172 g），测量的拷贝数比值为 1.045，接近理论值 1.0，表明 T25/*zSSIIb* 二重 ddPCR 中 *zSSIIb* 内标基因与 T25 转化体具有相同的扩增能力。选择 60°C 作

为 T25/zSSIIb 二重 ddPCR 的最佳退火温度，T25 转化体和 zSSIIb 内标基因的引物/探针浓度均为 400/200 nM。

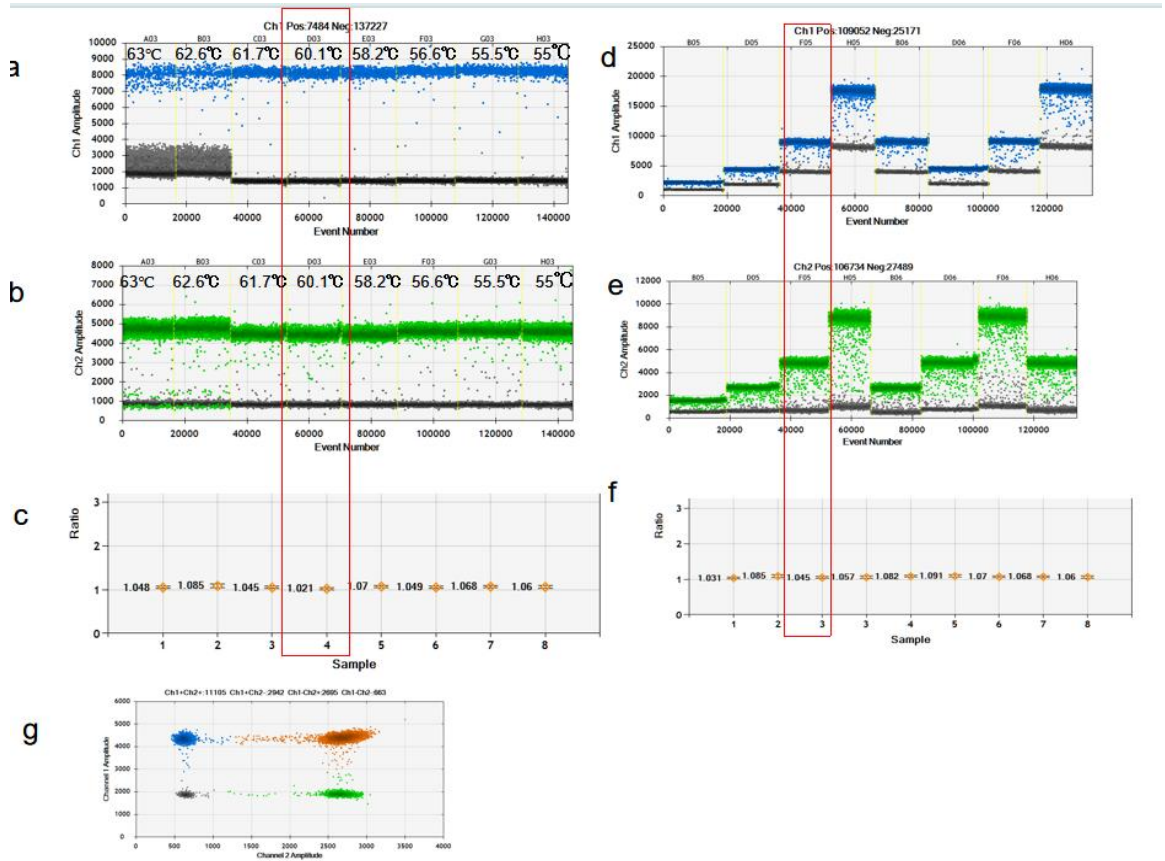


图 172 T25 /zSSIIb 二重 ddPCR 退火/延伸温度和引物/探针浓度的优化。

T25 (a) 和 zSSIIb (b) 在 55°C 至 63°C 不同退火温度下的一维 (1-D) 微滴图；c，不同退火温度下测量的 T25 /zSSIIb 拷贝数比值；T25 (d) 和 zSSIIb (e) 在不同引物/探针浓度下的一维微滴图，1-4 对应 T25 和 zSSIIb 的引物探针浓度相同，分别为 100/50, 200/100, 400/200, 800/400 nM；5-8 对应 T25 和 zSSIIb 不同的引物探针浓度，分别为 200/100 nM (zSSIIb)、400/200 nM (T25), 400/200 nM (zSSIIb)、200/100 nM (T25), 800/400 nM (zSSIIb)、400/200 nM (T25), 400/200 nM (zSSIIb)、800/400 nM (T25)；f，不同引物探针浓度下测量的 T25 /zSSIIb 拷贝数比值；g，在优化的反应体系和退火温度下，T25 /zSSIIb 二重 ddPCR 的二维微滴图。

### 38.4 T25 /zSSIIb 二重 ddPCR 的 LOD、LOQ 和动力学范围测试

在优化的 PCR 条件下，T25 基因组 DNA 的连续稀释液用于测试 T25/zSSIIb 二重 ddPCR 的动态范围、LOD 和 LOQ。不同浓度的微滴

热图见图 173，测量的拷贝数浓度以及 T25 /zSSIIb 的拷贝数比值显示在表 206 T25/zSSIIb 二重 ddPCR 测量梯度稀释 MZIR098 DNA 溶液的拷贝数浓度和比值中。当反应体系中模板拷贝数为 10 拷贝时，T25/zSSIIb 二重 ddPCR 3 个反应的阳性微滴数均超过 3 个，呈现阳性信号，LOD 确定为 10 个拷贝 T25 基因组 DNA。统计各个二重数字 PCR 反应测量 T25 拷贝数、zSSIIb 拷贝数、和 T25/zSSIIb 拷贝数比值，计算各模板量测量结果的相对标准差 (RSD) 和相对偏倚 (Bias%)。当反应体系中模板拷贝数为 40 拷贝时，测量结果的 RSD 值均小于 25%，Bias% 均在 ±25% 之间，LOQ 确定为 40 个拷贝 T25 基因组 DNA (表 206)。

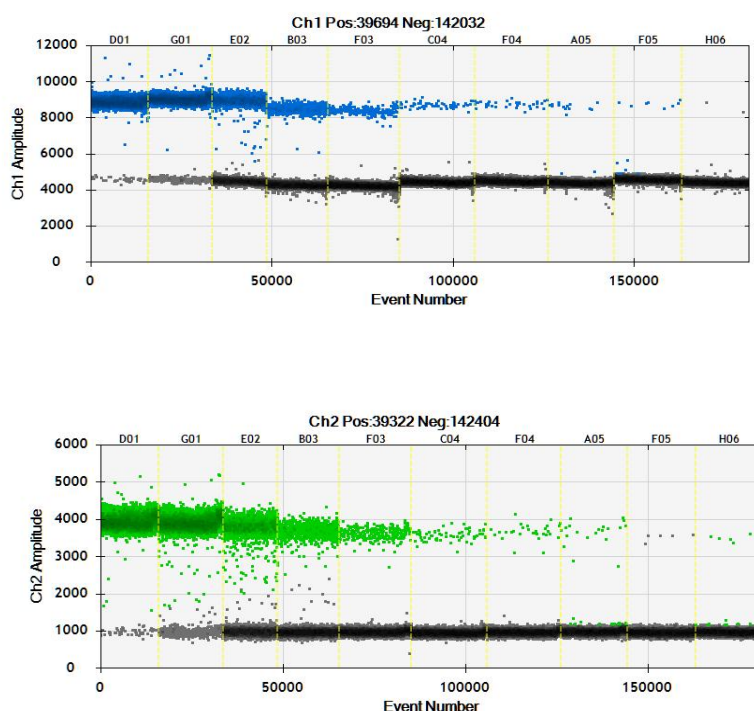


图 173 梯度稀释 DNA 溶液 T25 /zSSIIb 二重 ddPCR 的微滴热图。

A01-E06 的模板量依次为 60000、20000、4000、800、160、40、20、10、5、1copies。

表 210 T25/zSSIb 二重 ddPCR 测量梯度稀释 MZIR098 DNA 溶液的拷贝数浓度和比值

Target	Expected concentration (copie/ $\mu$ L)	Copy number concentration (copie/ $\mu$ L)						
		Rep1	Rep2	Rep3	Mean	SD	RSD (%)	Bias (%)
T25	60000	60875	60875	62475	61408.33	923.76	1.50	2.35
	20000	21915	21105	21455	21491.67	406.24	1.89	7.46
	4000	4305	4305	4285	4298.33	11.55	0.27	7.46
	800	845	781	795	807.00	33.65	4.17	0.88
	160	151	161	162	158.00	6.08	3.85	-1.25
	40	38	32	39	36.33	3.79	10.42	-9.17
	20	20	10	22	17.33	6.43	37.09	-13.33
	10	9	9	13	10.33	2.31	22.35	3.33
	5	4.5	9.9	5.4	6.60	2.89	43.83	32.00
	1	-	-	-	-	-	-	-
zSSIb	60000	57275	58775	60775	58941.67	1755.94	2.98	-1.76
	20000	20420	20160	20390	20323.33	142.24	0.70	1.62
	4000	3995	3985	4005	3995.00	10.00	0.25	-0.13
	800	735	705	757	732.33	26.10	3.56	-8.46
	160	173	171	174	172.67	1.53	0.88	7.92
	40	40	32	39	37.00	4.36	11.78	-7.50
	20	17	17	25	19.67	4.62	23.49	-1.67
	10	18	17	17	17.33	0.58	3.33	73.33
	5	7	-	11	9.00	2.83	31.43	80.00
	1	-	-	-	-	-	-	-
T25/ zSSIb ratio	60000	1.06	1.04	1.03	1.04	0.02	1.76	4.22
	20000	1.07	1.05	1.05	1.06	0.01	1.32	5.74
	4000	1.08	1.08	1.07	1.08	0.01	0.50	7.59
	800	1.15	1.11	1.05	1.10	0.05	4.53	10.26
	160	0.87	0.94	0.93	0.92	0.04	4.04	-8.49
	40	0.95	1.00	1.00	0.98	0.03	2.94	-1.67
	20	1.18	0.59	0.88	0.88	0.29	33.36	-11.84
	10	0.50	0.53	0.76	0.60	0.15	24.26	-40.20
	5	0.64	-	0.49	0.57	0.11	18.95	-43.31
	1	-	-	-	-	-	-	-

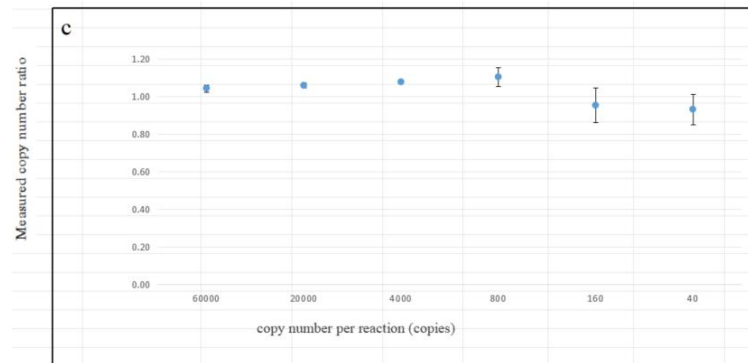
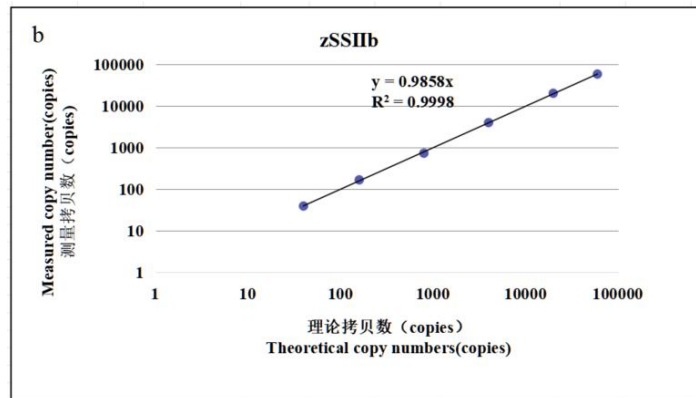
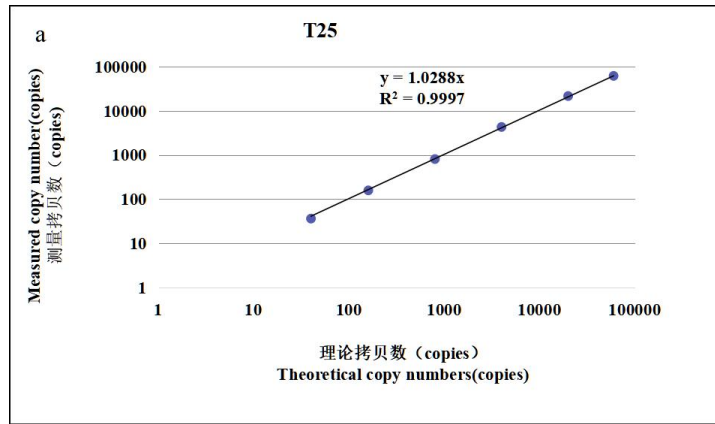


图 174 T25 /zSSIIB 二重 ddPCR 的动态范围和实测拷贝数比。

a, 二重 ddPCR 中 T25 在 40 到  $6.0 \times 10^4$  个拷贝的动态范围内测量拷贝数与预期拷贝数间有良好的线性关系; b, 二重 ddPCR 中 /zSSIIB 在 40 到  $6.0 \times 10^4$  个拷贝的动态范围内测量拷贝数与预期拷贝数间有良好的线性关系; c, 测得的 DNA 溶液的拷贝数比随着 DNA 浓度的降低显示出升高的标准差(SD), 垂直线段表示标准差。数据来自三个技术重复的平均值。

### 38.5 T25 /zSSIIb 二重 ddPCR 的测量准确性

通过天平称量法配制 5 个 T25 基因组 DNA 盲样(Sg1-Sg5)，拷贝数比值依次为 5.0%、3.0%、1.0%、0.5%、0.1%。用 T25 /zSSIIb 二重 ddPCR 对 5 个盲样进行定量。二重 ddPCR 的定量检测由不同的操作者在不同的日期进行了 3 次测量，测量结果如表 207 所示。计算 5 个盲样 T25 /zSSIIb 拷贝数比值的平均值，统计测量结果的重复性相对标准差 (RSD<sup>r</sup>)、重现性相对标准差 (RSD<sup>R</sup>)、和相对偏倚 (Bias)。测量平均值均接近预期含量，与预期值的相对偏倚在±25%的可接受范围内；重复性相对标准偏差 RSD<sup>r</sup>和再现性相对标准偏差 RSD<sup>R</sup>均小于 25%(表 208)。已建立的 T25 /zSSIIb 二重 ddPCR 实现了对 GMO 含量的准确定量，具有良好的重复性和重现性。

表 211 5 个盲样的测量结果

重复	PCR 平行	盲样				
		Sg1 (%)	Sg2 (%)	Sg3 (%)	Sg4 (%)	Sg5 (%)
1	1	5.07	3.09	1.08	0.55	0.10
	2	5.24	3.08	1.09	0.50	0.11
	3	5.10	2.99	0.99	0.56	0.10
2	1	5.13	3.12	0.99	0.49	0.09
	2	4.98	3.06	1.01	0.48	0.10
	3	5.05	3.04	1.08	0.58	0.10
3	1	5.06	3.03	1.02	0.49	0.11
	2	5.14	3.01	1.08	0.59	0.10
	3	5.16	3.13	1.06	0.55	0.11

表 212 T25/zSSIIb 二重 ddPCR 定量结果的重复性和重现性统计分析

Sample	Expected value (%)	Mean value (%)	S <sup>t</sup> (%)	RSD <sup>t</sup> (%)	S <sup>R</sup> (%)	RSD <sup>R</sup> (%)	Bias (%)
Sg1	5	5.10	0.07	1.46	0.08	1.47	2.07
Sg2	3	3.06	0.05	1.78	0.05	1.78	2.04
Sg3	1	1.04	0.05	4.35	0.05	4.35	4.44
Sg4	0.5	0.53	0.05	8.81	0.05	8.81	6.44
Sg5	0.1	0.10	0.01	5.65	0.01	6.79	2.22

### 38.6 结论

T25 /z*SSIIb* 二重 ddPCR 中的 T25 和 z*SSIIb* 采用与实时荧光 PCR 检测相同的引物/探针浓度，为 400/200 nM，反应体系见表 209。反应程序如下：94°C 变性 10 min; 50 个循环（94 °C 变性 30 s, 60°C 退火延伸 1 min); 98 °C 变性 10 min。DNA 模板量在 40 ~ 6.0×10<sup>4</sup> copies/反应，拷贝数浓度测量值与预期值具有良好的线性关系。

表 213 T25 /z*SSIIb* 二重微滴数字 PCR 反应体系

PCR 反应试剂	终浓度	体积(μL)
ddPCR Mix (2×)	1×	10
10 μmol/L T25-f1	0.4 μmol/L	0.8
10 μmol/L T25-r1	0.4 μmol/L	0.8
10 μmol/L T25-p1	0.2 μmol/L	0.4
10 μmol/L z <i>SSIIb</i> -3F	0.4 μmol/L	0.8
10 μmol/L z <i>SSIIb</i> -4R	0.4 μmol/L	0.8
10 μmol/L z <i>SSIIb</i> -HP	0.2 μmol/L	0.4
DNA 模板	25 ng/μl	2
ddH <sub>2</sub> O	/	4
合计	/	20

## 39. MIR604/Adh1 二重数字 PCR 方法

### 39.1 引物探针确认

MIR604 是先正达公司研发的抗虫转基因玉米，其转化体分子特征由先正达公司解析。首先对获得转基因材料的分子特征进行测序验证，确定转基因材料的转化体身份。MIR604 转化体和玉米 *Adh1* 内标准基因均选用已发布的标准方法《转基因产品检测 实时荧光定性聚合酶链式反应》（GBT 1949.5.4-2018），引物探针序列见表 210。

表 214 玉米转化体 MIR604 及 *Adh1* 内标基因引物和探针序列

转化体 (基因)	引物/探针名称及序列 (5'-3')	扩增片段大小 (bp)	序列来源
MIR604	MIR604 primer F:GCGCACGCAATTCAACAG	76	GBT 1949.5. 4-2018
	MIR604 primer R:GGTCATAACGTGACTCCCTTAATTCT		
	MIR604 Probe:FAM-AGGCGGGAAACGACAATCTGATCATG-BHQ1		
<i>Adh1</i>	Zm <i>adh1</i> - F:CGTCGTTCCCATCTCTTCCTCCT	135	
	Zm <i>adh1</i> - R: CCACTCCGAGACCCTCAGTC		
	Zm <i>adh1</i> - P: HEX-AATCAGGGCTCATTTTCTCGCTCCTCA-BHQ1		

在伯乐微滴式数字 PCR 平台 QX200 上，用通用的 PCR 反应体系（引物/探针浓度 400/200 nM）和退火温度（60°C），以 MIR604 杂合体基因组 DNA 为模板，进行 MIR604 /*Adh1* 基因的二重 ddPCR 扩增，对表 210 中的引物探针组合进行测试，设 2 个平行反应。

结果显示，MIR604 转化体和 *zSSIb* 基因二重微滴式数字 PCR 的一维微滴图谱（1-D）的阴性微滴和阳性微滴分界清晰，“雨滴”较少

(图 175A, B);MIR604 转化体和 *zSSIb* 基因拷贝数比值接近 0.50, 符合杂合体 MIR604 玉米分子特征 (图 175C)。综上, 确认表 210 玉米转化体 MIR604 及 *Adh1* 内标基因引物和探针序列的引物探针适用 MIR604 转化体/*zSSIb* 基因的二重 ddPCR 扩增。

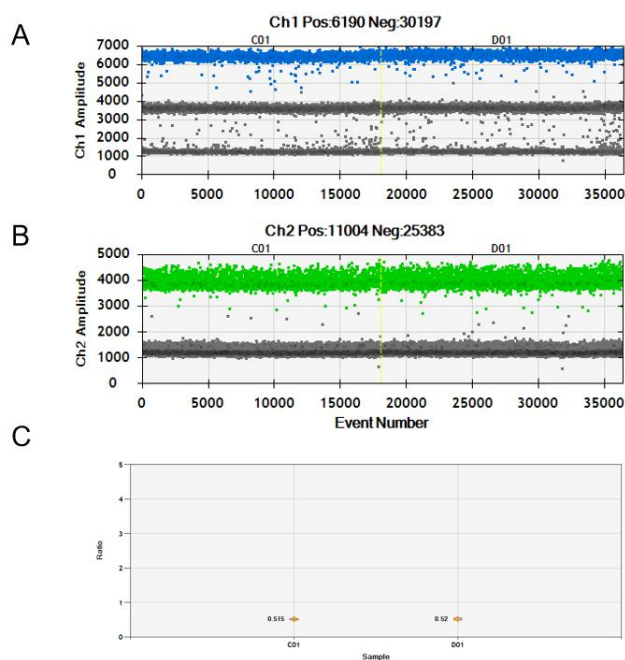


图 175 数字 PCR 引物探针确认

注: A 为 MIR604 玉米转化体特异性序列一维微滴图谱; B 为 *Adh1* 基因一维微滴图谱, C 为 MIR604 转化体和 *Adh1* 基因拷贝数比值。

### 39.2 MIR604 /*Adh1* 二重微滴数字 PCR 特异性测试

为了考察 MIR604/*Adh1* 二重数字 PCR 系统的扩增特异性, 分别以转基因玉米 MIR604、T25、MON863、MON810、NK603、MIR604、TC1507、非转基因玉米的基因组 DNA 和 ddH<sub>2</sub>O (空白对照) 为模板, 进行二重数字 PCR 扩增。*Adh1* 基因在空白对照中无阳性微滴, 但在转基因玉米和非转基因玉米中扩增正常。在 *Adh1* 基因扩增正常的情

况下，MIR604 数字 PCR 只有以 MIR604 基因组 DNA 为模板时，才有阳性微滴，而以其他转基因玉米、非转基因玉米基因组 DNA 和 ddH<sub>2</sub>O 为模板时，无阳性微滴或阳性微滴数小于 3，扩增结果为阴性（图 176）。扩增结果显示，MIR604/Adh1 二重数字 PCR 系统具有良好的扩增特异性。

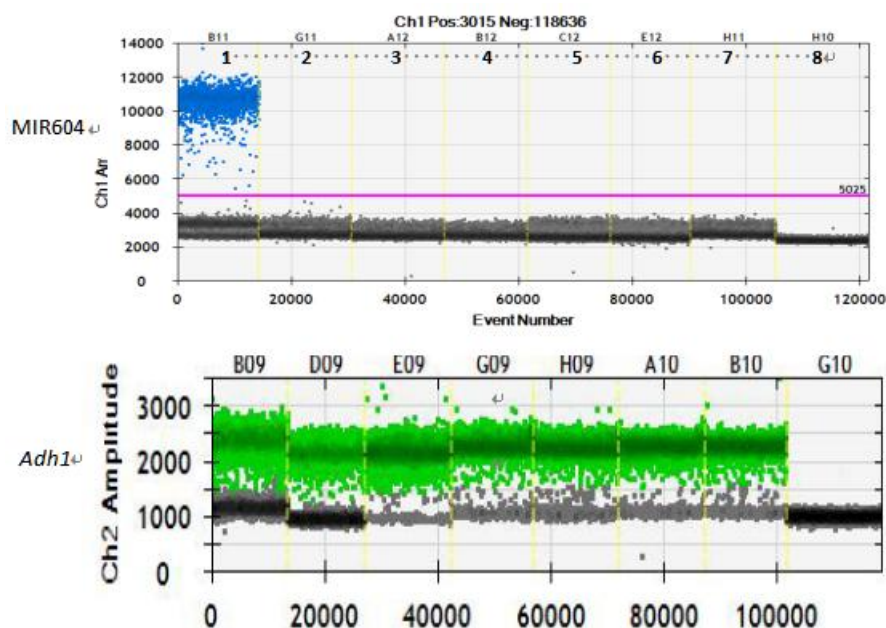


图 176 MIR604/Adh1 二重数字 PCR 特异性检测扩增热图。

注：1-8 样品顺序依次为 MIR604、MON863、MON810、NK603、T25 和 TC1507、非转基因玉米和空白对照

### 39.3 MIR604 /Adh1 二重数字 PCR 的反应条件优化

转基因定量检测依赖于转基因 DNA 拷贝数和总 DNA 拷贝数的准确测量，其中转基因 DNA 拷贝数通过转化体特异性 PCR 检测定量，总 DNA 拷贝数定量通过内标基因测定。以 MIR604 杂合体基因组 DNA 为模板，分别优化二重数字 PCR 中 MIR604 转化体和 *zSSIIb*

内标基因的引物/探针浓度和退火/延伸温度，改善阳性/阴性液滴的分辨率以减少雨滴对定量结果的影响，同时测试二重数字 PCR 反应中转化体和内标基因是否具有相似的扩展效率。在 55°C 至 63°C 的不同退火温度下，*zSSIIb* 内标基因和的 MIR604 转化体阳性液滴的荧光强度都保持稳定（图 177a、b）。在不同的退火温度下，MIR604 的阳性和阴性微滴都能明显区分，拷贝数比值在 0.509—0.58 的范围内波动，当退火温度在 60.1°C 时，测量的拷贝数比值为 0.509，非常接近理论值（图 177c）。选择 60°C 作为 MIR604 转化体和 *zSSIIb* 内标基因二重数字 PCR 的退火温度。

MIR604 和内标基因的引物/探针浓度低于 400/200 nM 时，阳性、阴性液滴信号偏低，且难以明显区分（图 177d、e）；当两个靶标的引物/探针浓度均为 400/200 nM 时，阳性微滴和阴性微滴具有最佳分辨率；当两个靶标的引物/探针浓度高于 400/200 nM 时，阴性微滴信号值升高，且阳性微滴群变宽。当两个靶标的引物/探针浓度均为 400/200 nM 时，测量的平均拷贝数比值为 0.516，接近理论值（图 177f）。综合考虑引物探针用量和微滴荧光强度，二重数字 PCR 中 MIR604 和 *zSSIIb* 的引物/探针浓度均采用 400/200 nM。

在 60°C 退火、引物/探针浓度为 400/200 nM 的反应条件下，以纯合体基因组 DNA 为模板，进行 MIR604/*zSSIIb* 二重 ddPCR。二重数字 PCR 二维热图显示了 4 个明显的液滴簇，分别对应 FAM 阳性液滴

簇、HEX 阳性液滴簇、双荧光液滴簇和阴性液滴簇（图 177 g），测量的拷贝数比值为 0.510，非常接近理论值 0.50，表明 MIR604/zSSIb 二重 ddPCR 中 zSSIb 内标基因与 MIR604 转化体具有相同的扩增能力。选择 60°C 作为 MIR604/zSSIb 二重 ddPCR 的最佳退火温度，MIR604 转化体和 zSSIb 内标基因的引物/探针浓度均为 400/200 nM。

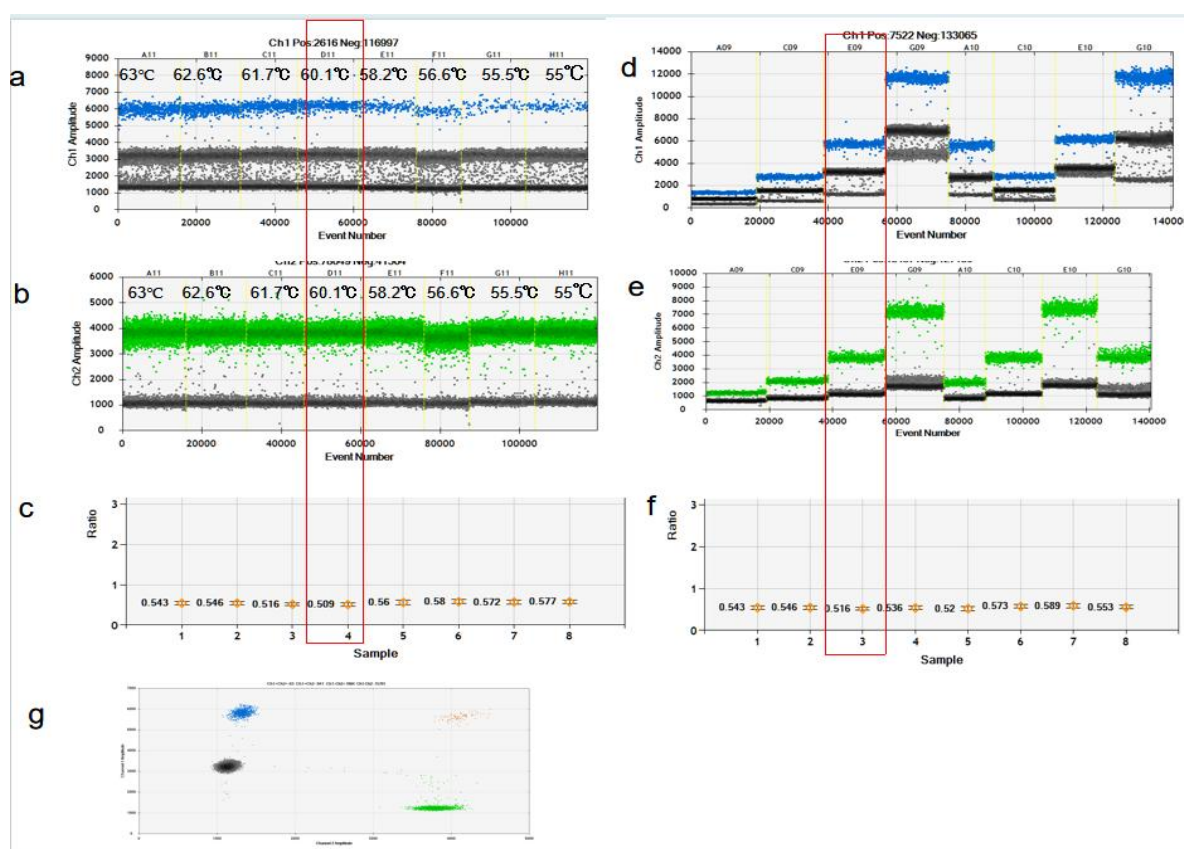
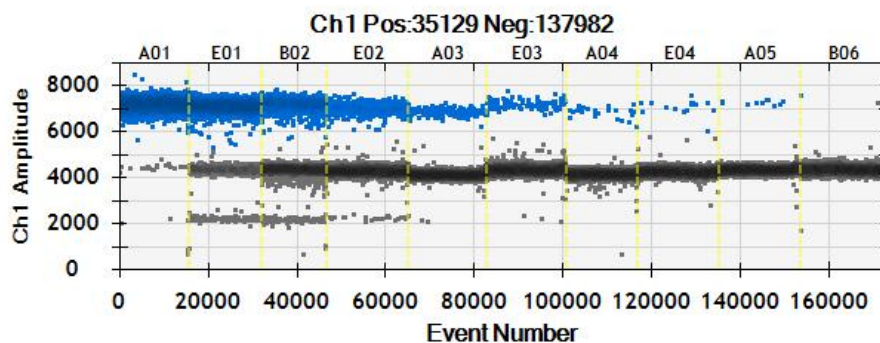


图 177 MIR604 /zSSIb 二重 ddPCR 退火/延伸温度和引物/探针浓度的优化。MIR604 (a)和 zSSIb (b) 在 55°C 至 63°C 不同退火温度下的一维 (1- D) 微滴图；c, 不同退火温度下测量的 MIR604 /zSSIb 拷贝数比值；MIR604 (d) 和 zSSIb (e)在不同引物/探针浓度下的一维微滴图,1-4 对应 MIR604 和 zSSIb 的引物探针浓度相同，分别为 100/50, 200/100, 400/200, 800/400 nM；5-8 对应 MIR604 和 zSSIb 不同的引物探针浓度，分别为 200/100 nM (zSSIb)、400/200 nM (MIR604 ), 400/200 nM (zSSIb)、200/100 nM (MIR604 ), 800/400 nM (zSSIb)、400/200 nM (MIR604 ), 400/200 nM (zSSIb)、800/400 nM (MIR604 )；f, 不同引物探针浓度下测量的 MIR604 /zSSIb 拷贝数比值；g, 在优化的反应体系和退火温度下，MIR604 /zSSIb 二重 ddPCR 的二维微滴图。

### 39.4 MIR604 /*Adh1* 二重 ddPCR 的 LOD、LOQ 和动力学范围

#### 测试

在优化的 PCR 条件下, MIR604 质粒 DNA 的连续稀释液用于测试 MIR604 /*Adh1* 二重 ddPCR 的动态范围、LOD 和 LOQ。不同浓度的微滴热图见图 178, 测量的拷贝数浓度以及 MIR604 /*Adh1* 的拷贝数比值显示在表 211 中。当反应体系中模板拷贝数为 10 拷贝时, MIR604 /*Adh1* 二重 ddPCR 3 个反应的阳性微滴数均超过 3 个, 呈现阳性信号, LOD 可以达到 5 个拷贝 MIR604 基因组 DNA, 为了能够稳定检出 MIR604 转化体, 确定 LOD 为 10 个拷贝 MIR604 基因组 DNA。统计各个二重数字 PCR 反应测量 MIR604 拷贝数、*zSSIb* 拷贝数、和 MIR604/*zSSIb* 拷贝数比值, 计算各模板量测量结果的相对标准差 (RSD) 和相对偏倚 (Bias%)。当反应体系中模板拷贝数为 20 拷贝时, 测量结果的 RSD 值均小于 25%, Bias% 均在 $\pm 25\%$ 之间, LOQ 可以达到 20 个拷贝 MIR604 基因组 DNA, 为了更能准确地定量 MIR604 转化体, 确定 LOQ 为 40 个拷贝 MIR604 基因组 DNA(表 211)



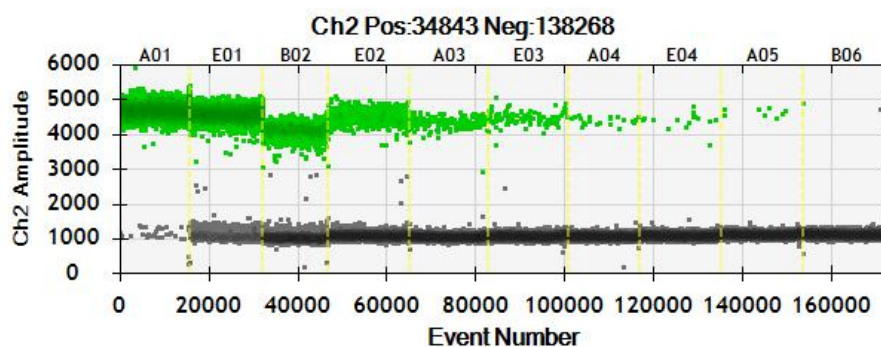


图 178 梯度稀释 DNA 溶液 MIR604/Adh1 二重 ddPCR 的微滴热图。

A01-E06 的模板量依次为 75000、25000、3000、600、120、40、20、10、5、1copies

表 215 MIR604/Adh1 二重 ddPCR 测量梯度稀释 MIR604 DNA 溶液的拷贝数浓度和比值

Target	Expected concentration (copie/μL)	Copy number concentration (copie/μL)						
		Rep1	Rep2	Rep3	Mean	SD	RSD (%)	Bias (%)
MIR604	75000	74800	78000	78100	76967	1877.05	2.44	2.62
	25000	24910	25330	25030	25090	216.33	0.86	0.36
	3000	3270	3300	3240	3270	30.00	0.92	9.00
	600	595	601	594	597	3.79	0.63	0.56
	120	115	106	114	112	4.93	4.42	6.94
	40	40	37	43	40	3.00	7.50	0.00
	20	19	21	18	19	1.53	7.90	3.33
	10	9.7	8	15	11	3.65	33.50	9.00
	5	1.8	1.8	3.1	2	0.75	33.61	55.33
	1	-	-	-	-	-	-	-
Adh1	75000	72100	74700	74700	73833	1501.11	2.03	1.56
	25000	24170	24420	24190	24260	138.92	0.57	2.96
	3000	3170	3170	3150	3163	11.55	0.37	5.44
	600	569	582	570	574	7.23	1.26	4.39
	120	111	102	114	109	6.24	5.73	9.17
	40	39	33	42	38	4.58	12.06	5.00
	20	15	18	17	17	1.53	9.17	16.67
	10	9.7	8	10	9	1.08	11.68	7.67
	5	1.8	1.8	3.1	2	0.75	33.61	55.33
	1	-	-	-	-	-	-	-

MIR604/ <i>zSSIb</i> ratio	75000	1.04	1.04	1.05	1.04	0.00	0.41	4.24
	25000	1.03	1.04	1.03	1.03	0.00	0.32	3.42
	3000	1.03	1.04	1.03	1.03	0.01	0.63	3.37
	600	1.05	1.03	1.04	1.04	0.01	0.65	4.01
	120	1.04	1.04	1.00	1.03	0.02	2.12	2.51
	40	1.02	1.12	1.03	1.06	0.06	5.28	5.62
	20	1.27	1.17	1.06	1.16	0.10	8.93	16.41
	10	1.00	1.00	1.50	1.17	0.29	24.74	16.67
	5	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00
1	-	-	-	-	-	-	-	

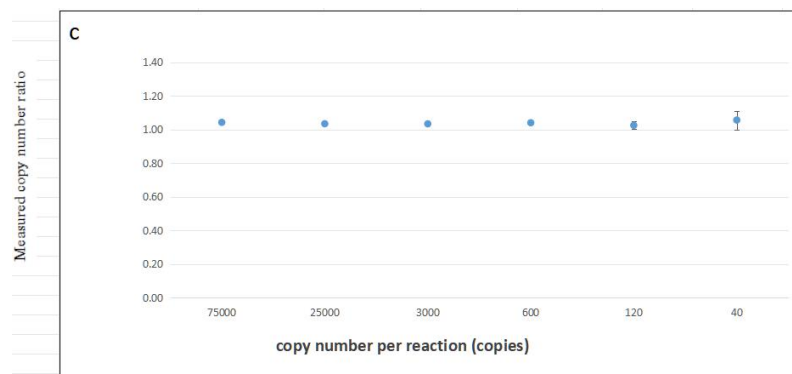
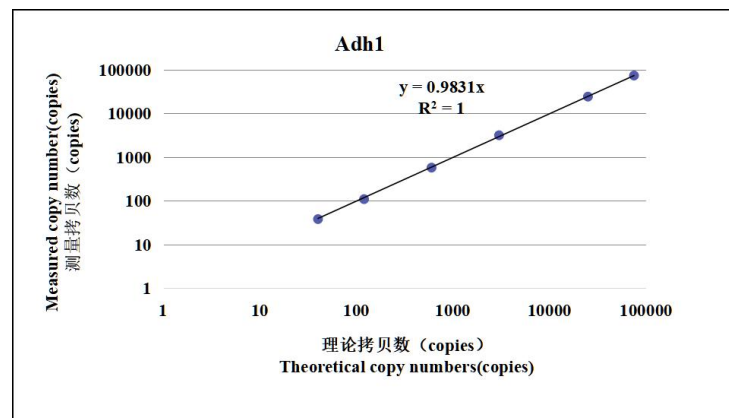
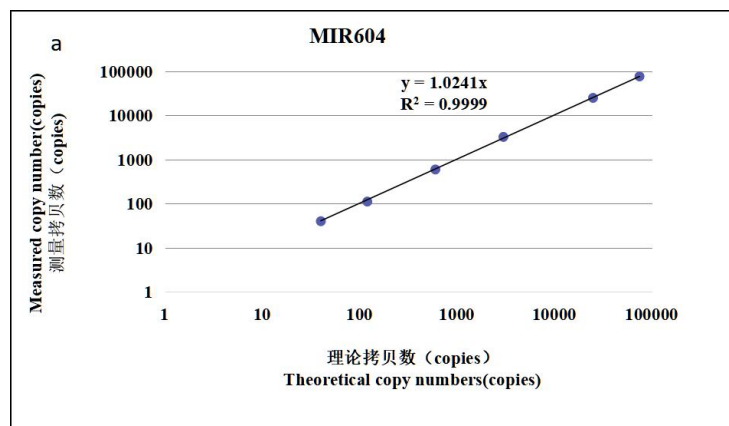


图 179 MIR604/*Adh1* 二重 ddPCR 的动态范围和实测拷贝数比。

a, 二重 ddPCR 中 MIR604 在 40 到  $7.5 \times 10^4$  个拷贝的动态范围内测量拷贝数与预期拷贝数间有良好的线性关系；b, 二重 ddPCR 中 *Adh1* 在 40 到  $7.5 \times 10^4$  个拷贝的动态范围内测量拷贝数与预期拷贝数间有良好的线性关系；c, 测得的 DNA 溶液的拷贝数比随着 DNA 浓度的降低显示出升高的标准差(SD), 垂直线段表示标准差。数据来自三个技术重复的平均值。

### 39.5 MIR604 /*Adh1* 二重 ddPCR 的测量准确性

通过天平称量法配制 5 个 MIR604 基因组 DNA 盲样(Sg1-Sg5), 拷贝数比值依次为 5.0%、3.0%、1.0%、0.5%、0.1%。用 MIR604 /*Adh1* 二重 ddPCR 对 5 个盲样进行定量。二重 ddPCR 的定量检测由不同的操作者在不同的日期进行了 3 次测量, 测量结果如表 212 所示。已建立的 MIR604 /*Adh1* 二重 ddPCR 实现了对 GMO 含量的准确定量, 具有良好的重复性和重现性。

表 216 5 个盲样的测量结果

重复	PCR 平行	盲样				
		Sg1 (%)	Sg2 (%)	Sg3 (%)	Sg4 (%)	Sg5 (%)
1	1	5.38	2.85	0.99	0.59	0.11
	2	4.96	2.92	0.93	0.56	0.10
	3	5.13	2.90	0.83	0.53	0.08
2	1	4.98	3.07	0.98	0.46	0.09
	2	5.13	2.93	0.88	0.58	0.12
	3	5.03	2.98	0.98	0.52	0.12
3	1	5.13	3.08	1.05	0.51	0.11
	2	5.21	3.13	1.11	0.49	0.09
	3	5.08	3.02	0.98	0.48	0.08

表 217 MIR604/*zSSIIb* 二重 ddPCR 定量结果的重复性和重现性统计分析

Sample	Expected value (%)	Mean value (%)	S <sup>f</sup> (%)	RSD <sup>f</sup> (%)	S <sup>R</sup> (%)	RSD <sup>R</sup> (%)	Bias (%)
--------	--------------------	----------------	--------------------	----------------------	--------------------	----------------------	----------

Sg1	5	5.11	0.14	2.64	0.14	2.64	2.29
Sg2	3	2.99	0.06	1.87	0.10	3.48	-0.44
Sg3	1	0.97	0.07	7.07	0.09	9.09	-3.00
Sg4	0.5	0.52	0.04	7.57	0.05	8.90	4.89
Sg5	0.1	0.10	0.02	15.99	0.02	15.99	0.00

### 39.6 结论

MIR604 /*Adh1* 二重 ddPCR 中的 MIR604 和 *Adh1* 采用与实时荧光 PCR 检测相同的引物/探针浓度, 为 400/200 nM, 反应体系见表 214。反应程序如下: 94°C 变性 10 min; 50 个循环 (94 °C 变性 30 s, 60°C 退火延伸 1 min) ; 98 °C 变性 10 min。DNA 模板量在 40 ~ 7.6×10<sup>4</sup> copies/反应, 拷贝数浓度测量值与预期值具有良好的线性关系。

表 218 MIR604 /*Adh1* 二重微滴数字 PCR 反应体系

PCR 反应试剂	终浓度	体积(μL)
ddPCR Mix (2×)	1×	10
10 μmol/L Zm adh1- F	0.4 μmol/L	0.8
10 μmol/L Zm adh1- R	0.4 μmol/L	0.8
10 μmol/L Zm adh1- P	0.2 μmol/L	0.4
10 μmol/L MIR604 primer F	0.4 μmol/L	0.8
10 μmol/L MIR604 primer R	0.4 μmol/L	0.8
10 μmol/L MIR604 Probe	0.2 μmol/L	0.4
DNA 模板	25 ng/μl	2
ddH <sub>2</sub> O	/	4
合计	/	20

## 40. MON87427/*zSSIb* 二重数字 PCR 方法

### 40.1 玉米内标基因的比较

玉米常见的内标基因有 *zein-ENDO*、*zein-taq*、*hmg*、*zSSIb* 和 *Adh1*，在进行二重 ddPCR 方法建立时，将 MON87427 转化体与不同的玉米内标基因组合，以标准质粒分子 pUC57-M 为模板进行二重 ddPCR 扩增，通过考察外源基因和内标基因的微滴信号强度、阳性微滴与阴性微滴的分辨率、中等信号强度雨滴数量、以及外源基因与内标基因拷贝数的比值，确定能与 MON87427 配组进行二重 ddPCR 扩增的最适内标基因。退火温度是影响 ddPCR 微滴信号强度和雨滴数量的关键因素，本研究设置了 8 个退火温度梯度（52°C、52.7°C、54°C、55.9°C、58.4°C、60.3°C、61.4°C、62°C），以确定 MON87427 转化体和内标基因二重 ddPCR 的最适退火温度。

ddPCR 一维热图显示，MON87427 转化体与不同的玉米内标基因组合，MON87427 转化体在同一退火温度下阳性微滴的信号强度相似，随着退火温度的降低，阳性微滴信号强度增强，当退火温度低至 58.4°C 时，阳性微滴信号强度趋于一致，但在 60.3°C 时，阳性和阴性微滴可以清楚的区分（图 180）。与 MON87427 转化体组合进行二重 ddPCR 反应，玉米内标基因 *zein-ENDO* 的阴性微滴和阳性微滴在任何温度下都不能清晰的区分（图 180A）；*Adh1* 在退火温度低于 58.4°C 时，阳性微滴和阴性微滴不能清晰的区分（图 180B）；

MON87427/*hmg* 二重 ddPCR 中，外源基因和内标基因的阳性微滴和阴性微滴虽能区分，但“下雨”现象严重（图 180C）；*zSSIIb* 和 *zein-taq* 在所有温度下都能清晰的区分阳性微滴和阴性微滴，微滴的信号强度也比较稳定，但与 *zein-taq* 相比，*zSSIIb* 的阳性微滴和阴性微滴的区分度更高，中等信号强度的雨滴相对更少（图 180D~E）。因此，初步选择 *zSSIIb* 作为候选内标基因，退火温度为 60°C。在 60°C 退火温度下，MON87427/*zSSIIb* 的二维热图中有 4 个清晰的微滴群，对应阴性微滴、FAM 荧光微滴、HEX 荧光微滴和双荧光微滴（图 180F）。统计 60°C 下，MON87427/*zSSIIb* 二重 ddPCR 的定值结果，MON87427 转化体与 *zSSIIb* 内标基因的拷贝数比值的平均值为  $1.06 \pm 0.02$ ，很接近理论值 1.0，MON87427 转化体和内标基因 *zSSIIb* 在该反应条件下具有相似的扩增能力。因此本研究选择 *zSSIIb* 作为 MON87427 二重 ddPCR 定量的内标基因，二重 ddPCR 的最适退火温度为 60°C。

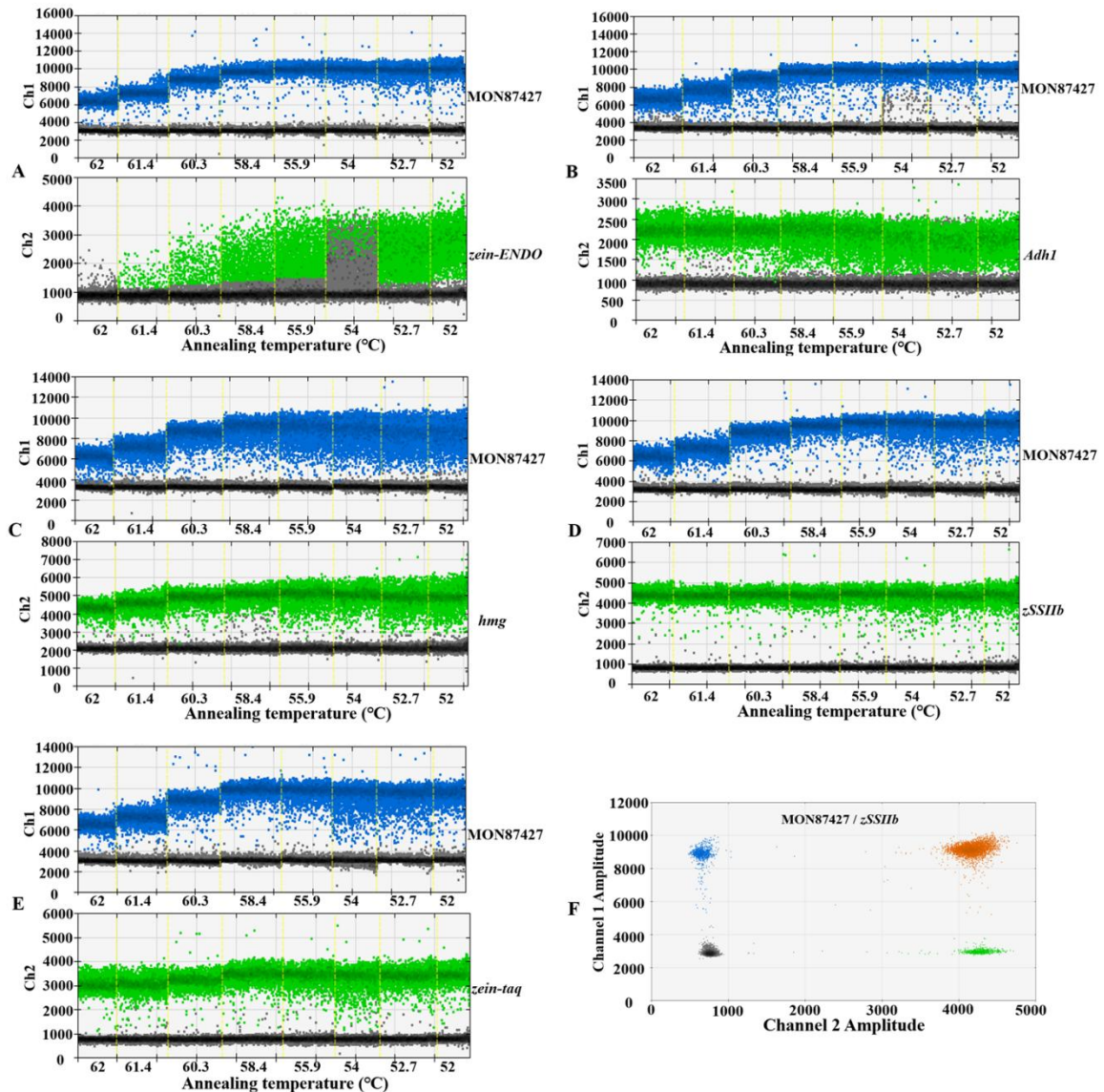


图 180 MON87427 与不同内标基因配组的二重 ddPCR 退火温度优化热图

注: A: MON87427/*Zein-ENDO* 二重 ddPCR 1-D 热图; B: MON87427/*Adh1* 双重 ddPCR 1-D 热图; C: MON87427/*hmg* 双重 ddPCR 一维热图; D: MON87427/*zSSIIB* 二重 ddPCR 一维热图; E: MON87427/*zein-taq* 二重 ddPCR 一维热图; F: 58.4°C 退火温度下 MON87427/*zSSIIB* 二重 ddPCR 的二维热图

## 40.2 MON87427/*zSSIIB* 二重 ddPCR 线性动力学范围

ddPCR 理论上可检测 1~100 000 拷贝的核酸分子, 为了测试 MON87427/*zSSIIB* 双重 ddPCR 的线性动力学范围, 用 ddH<sub>2</sub>O 将线性化的质粒 pUC57-M 进行梯度稀释, 加入模板量分别为  $3 \times 10^5$ 、 $6 \times 10^4$ 、

$3 \times 10^4$ 、 $6 \times 10^3$ 、 $1.2 \times 10^3$ 、 $2.4 \times 10^2$ 、48、9.6 拷贝/反应，每个梯度做 3 个平行。结果显示，当模板拷贝数浓度为  $3 \times 10^5$  拷贝/反应时，全部微滴均为阳性，超过了 ddPCR 的最高检测极限；当模板拷贝数浓度低至 9.6 拷贝/反应时，MON87427 和 *zSSIb* 均有阳性信号；当模板拷贝数浓度低至 48 拷贝/反应时，MON87427 和 *zSSIb* 均有阳性信号，且测量拷贝数的 RSD 值和 Bias% 绝对值均小于 25%；确定 MON87427/*zSSIb* 二重数字 PCR 的 LOD 为 10 copies/反应，LOQ 为 50 copies/反应。根据质粒模板预期浓度和测量浓度间的对应关系绘制 MON87427 和 *zSSIb* 的回归曲线，MON87427 回归曲线的决定系数  $R^2$  为 0.9982，内标基因 *zSSIb* 回归曲线的决定系数  $R^2$  为 0.9981，MON87427/*zSSIb* 二重数字的 PCR 的线性动力学范围在  $48 \sim 6 \times 10^4$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ，在此范围内模板拷贝数的测量值与理论值间具有良好的线性关系（图 181）。动力学范围测试结果表明，模板量在  $48 \sim 60\,000$  拷贝之间，测量值具有相对更高的正确度（bias）和精确度（RSD）。

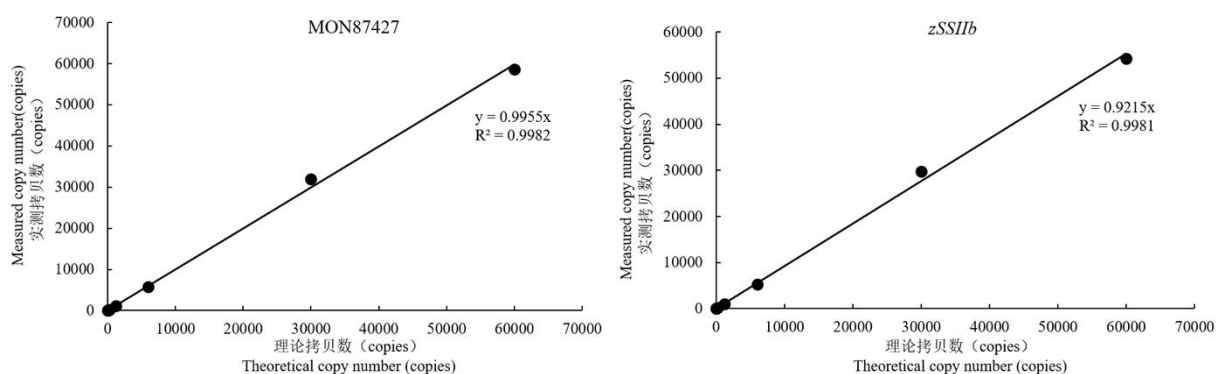


图 181 MON87427/*zSSIb* 双重 ddPCR 线性动力学范围

### 40.3 二重 ddPCR 定量检测盲样

用优化的 MON87427/*zSSIIb* 二重 ddPCR, 定量检测 MON87427 质量分数分别为 100% (S1) 和 6% (S2) 的盲样。ddPCR 的测量结果为 MON87427 转化体和内标基因 *zSSIIb* 的拷贝数百分比。2 个盲样的转基因含量分别为 49.14%、2.73%, 定量结果的相对标准偏差(RSD) 分别为 0.62%、7.04% (表 215), 都小于 25%, 在允许的范围。质量分数为 100%的 MON87427 种子 (S1) 的测量值为 49.14%, 接近 50%; 质量分数为 6%的样品 (S2) 测量值为 2.73%, 接近 3%; 表明 MON87427 种子确为杂合体, 与普通 PCR 的鉴定结果相吻合。检测结果表明 MON87427/*zSSIIb* 二重 ddPCR 可准确测量样品中转基因 DNA 的含量。

表 219 二重 ddPCR 和 qPCR 定量检测盲样中转基因玉米 MON87427 含量

方法	样品	质量分数	转基因 DNA 含量/%			平均值	SD	RSD /%
			平行 1	平行 2	平行 3			
ddPCR	S1	100	49.43	48.82	49.16	49.14	0.31	0.62
	S2	6	2.70	2.56	2.94	2.73	0.19	7.04

## 41. 数字 PCR 定量结果不确定度评定

### 41.1 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。用数字 PCR 进行转基因定量的数学模型清晰，本项目选择自下而上的方式进行不确定度评定。

### 41.2 定量结果的不确定度评定方法

#### 1. 拷贝数浓度测量模型

用数字 PCR 测量 DNA 的拷贝数浓度，原液中 DNA 拷贝数浓度计算为：

$$c_n = \lambda \times \left(\frac{10^3}{v_d}\right) \times D_{PCR} \times D_{sample} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

$c_n$ — DNA 的拷贝数浓度 (copies/uL)

$\lambda$ — 每个微滴（微反应室）中靶标分子数

$v_d$ — 微滴体积 (nL)

$D_{PCR}$ — 配制 PCR 反应体系 DNA 溶液的稀释因子

$D_{sample}$ — 配制 PCR 反应体系前 DNA 溶液的稀释因子

根据公式，拷贝数浓度不确定度主要来源于试样重复测量引入的不确定度 ( $u_R$ )、每个微滴（微反应室）中靶标分子数  $\lambda$  ( $\lambda = -\ln(1 - p) = -\ln(1 - \frac{N_p}{N_t})$ ) 引入的不确定度 ( $u_\lambda$ )、微滴体积 ( $v_d$ ) 引入的不确定度 ( $u_v$ )、和稀释因子 ( $D_{PCR}$ 、 $D_{sample}$ ) 引入的不确定度 ( $u_d$ )。

## 2. 拷贝数比值测量模型

在数字 PCR 平台上，通过分别测量试样中外源基因和内标基因的拷贝数浓度，进行试样拷贝数比值（转基因含量）的测量，试样中外源基因和内标基因拷贝数比值计算为：

$$c = \frac{c_1}{c_2} \dots\dots\dots (2)$$

若进行外源基因和内标基因的二重数字 PCR 扩增，数字 PCR 反应体系中加入的是同一份 DNA 模板，DNA 模板的稀释因子相同；外源基因和内标基因在同一微滴中反应，微滴体积相同；则试样中外源基因和内标基因的拷贝数比值（ $c$ ）计算为：

$$c = \frac{\lambda_1 \times \left(\frac{10^3}{v_d}\right) \times D_{PCR} \times D_{sample}}{\lambda_2 \times \left(\frac{10^3}{v_d}\right) \times D_{PCR} \times D_{sample}} = \frac{\lambda_1}{\lambda_2} = \frac{\ln\left(1 - \frac{N_{P1}}{N_T}\right)}{\ln\left(1 - \frac{N_{P2}}{N_T}\right)} \dots\dots\dots (4)$$

式中

- $c$ — 外源基因和内标基因的拷贝数比值
- $\lambda_1$ — 每个微滴（微反应室）中外源基因拷贝数
- $\lambda_2$ — 每个微滴（微反应室）中内标基因拷贝数

由二重数字 PCR 拷贝数比值的公式可知，拷贝数比值的不确定度与微滴体积和稀释因子无关。拷贝数比值定值的不确定度只包括 3 个分量，分别是重复测量精密度引入的不确定度（ $u_A$ ）、每个微滴（微反应室）中外源基因靶标分子数 $\lambda_1$ 引入的不确定度（ $u_{1,\lambda}$ ）和内标基因靶标分子数 $\lambda_2$ 引入的不确定度（ $u_{2,\lambda}$ ）。

## 3. 实验室内测量精密度引入的不确定度

在实验室内，从试样中取  $n$  个平行子样 ( $n=3$ ) 进行检测， $n$  每个子样的测定平均值为  $c_n$ ， $n$  个平行子样的总平均值为  $\bar{c}'$ ，则平行子样测定平均值的标准差计算为：

$$s' = \frac{c'_{max} - c'_{min}}{\bar{c}' \times f} \dots\dots\dots (7)$$

重复测量引入的相对不确定度  $u_{c_1,R,rel}$  计算为：

$$u_{A,rel} = \frac{s'_r}{\sqrt{n}} \dots\dots\dots (8)$$

式中：

$s'_r$  —  $n$  个平行子样检测数据的相对标准差 (%)；

$n$  — 平行子样个数， $n=3$

#### 4. 每个微滴（微反应单元）中靶标拷贝数 $\lambda$ 引入的不确定度

设数字 PCR 反应中，阳性微滴比率为  $p$  ( $p = \frac{N_P}{N_T}$ )，则  $\lambda$  计算为：

$$\lambda = -\ln(1 - p) \dots\dots\dots (9)$$

根据公式 9 及不确定度传播率， $\lambda$  的标准不确定度计算为：

$$u^2(\lambda) = c^2(p)u^2(p) \dots\dots\dots (10)$$

阳性微滴比率的不确定度  $u(p)$  包括了试样数字 PCR 反应中泊松分布导致的阳性微滴比率  $p$  的标准差  $s_{p,b}$ ，和阈值线设定导致的阳性微滴比率  $p$  的变异  $s_{p,thres}$ 。由于在方法优化过程中，要求阳性微滴和阴性微滴要明显区分，前期评定结果表明阈值值设定引入的不确定度通常小于 1%，因此该不确定度忽略不计。

阳性微滴比率  $p$  (数字 PCR 软件自动设置阈值线, 读取的数据) 的标准差  $s_{p,b}$ , 计算为:

$$s_{p,b} = \sqrt{\frac{p(1-p)}{N_t}} \dots \dots \dots (12)$$

$\lambda$  的标准不确定度计算为:

$$u(\lambda) = \frac{1}{1-p} \times u(p) = \frac{1}{1-p} s_{p,b} \dots \dots \dots (15)$$

$\lambda$  的相对不确定度计算为:

$$u_{\lambda,rel} = \frac{u(\lambda)}{\lambda} = \frac{1}{\lambda} \times \frac{1}{1-p} \sqrt{\frac{p(1-p)}{N_t}} = \frac{1}{-\ln(1-p)} \times \sqrt{\frac{p}{N_t(1-p)}} \dots \dots \dots (16)$$

式中:

- $\lambda$ —每个微滴中靶标 DNA 拷贝数
- $p$ —数字 PCR 反应中阳性微滴比率
- $N_t$  —总微滴数
- $u(\lambda)$ — $\lambda$  的标准不确定度
- $u_{\lambda,rel}$ — $\lambda$  的相对不确定度

分被评定转化体和内标基因  $\lambda$  的相对标准不确定度 ( $u_{1,\lambda,rel}$ ) 和 ( $u_{2,\lambda,rel}$ )。

### 5. 拷贝数比值的不确定度评定

拷贝数比值的相对标准不确定度 ( $u_{rel}$ ) 计算为:

$$u_{rel} = \sqrt{u_{A,rel}^2 + u_{1,\lambda,rel}^2 + u_{2,\lambda,rel}^2} \dots\dots\dots (12)$$

拷贝数比值的标准不确定度 ( $u$ ) 计算为:

$$u = \bar{c}^1 \times u_{rel} \dots\dots\dots (13)$$

取扩展因子  $k=2$ , 则试样定量结果的扩展不确定度 ( $U$ ) 计算为:

$$U = ku \dots\dots\dots (14)$$

式中:

$U$  —试样定量结果的扩展不确定度 (%) (保留 2 位有效数字);

$k$  —包含因子, 在 95% 的置信度下  $k=2$ ;

$u$  —试样定量结果的标准不确定度 (%)。

### 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

本项目绝大部分转化体特异性引物/探针组合均来自我国及欧盟已发布的检测标准, 引物探针组合的特异性、灵敏度已经过验证。在实验室内方法建立及确认部分也对二重数字 PCR 方法的特异性、检出限、定量限进行了进一步确认。本项目主要对二重数字 PCR 方法的定量准确性进行联合验证。部分转化体的二重数字 PCR 方法已经成功用于转基因检测有证标准物质的多家联合定值, 直接用

联合定值数据分析方法的定量准确性。对于没有联合验证数据的转化体，根据统筹安排，方法建立/确认单位制备含量分别是 3%和 1%的盲样，请另外 3 家有资质的单位进行方法的定量准确性验证。

### 1. DBN9936/zSSIIb 二重数字 PCR 方法联合验证结果分析

制备转基因含量（拷贝数比值）分别为 3%和 1%的样品，请 8 家实验室对样品转基因含量进行联合定量，8 家实验室的定量结果如表 216 所示。

表 220 多家实验室联合定量数据

样品	实验室	Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Rep5	Rep6	Rep7	Rep8	Avg	SD	RSD%
3%	A	3.58	3.58	3.42	3.35	3.59	3.34	3.63	3.53	3.50	0.12	3.29
	B	3.36	3.38	3.22	3.48	3.27	3.44	3.61	3.50	3.41	0.13	3.72
	C	3.45	3.34	3.42	3.44	3.22	3.31	3.48	3.31	3.37	0.09	2.69
	D	3.43	3.25	3.33	3.31	3.38	3.30	3.32	3.43	3.34	0.06	1.94
	E	3.27	3.33	3.43	3.41	3.49	3.35	3.35	3.31	3.37	0.07	2.13
	F	3.62	3.31	3.41	3.46	3.40	3.44	3.53	3.61	3.47	0.11	3.07
	G	3.29	3.45	3.36	3.21	3.27	3.25	3.24	3.44	3.31	0.09	2.84
	H	3.24	3.34	3.16	3.39	3.50	3.23	3.35	3.49	3.34	0.12	3.68
1%	A	1.11	1.21	1.14	1.15	1.19	1.18	1.17	1.17	1.16	0.03	2.60
	B	1.18	1.12	1.11	1.11	1.13	1.15	1.15	1.13	1.13	0.02	2.05
	C	1.12	1.07	1.08	1.14	1.15	1.08	1.10	1.11	1.11	0.03	2.58
	D	1.14	1.13	1.16	1.24	1.13	1.06	1.18	1.13	1.14	0.05	4.36
	E	1.14	1.14	1.05	1.04	1.11	1.13	1.20	1.13	1.12	0.05	4.56
	F	1.09	1.06	1.11	1.16	1.19	1.13	1.15	1.10	1.12	0.04	3.74
	G	1.13	1.17	1.16	1.10	1.15	1.12	1.16	1.10	1.14	0.03	2.38
	H	1.07	1.19	1.12	1.07	1.20	1.20	1.12	1.10	1.13	0.06	4.96

根据标准 GB/T6379.2-2004 或 ISO5725-2:1994，对定量数据进行进行分析，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，无异常值和歧离值，8 家实验室的数据均

为有效数据。对有效检测数据进行统计，分析方法的重复性和再现性。两个样品的重复性相对标准差分别为 2.98%和 3.60%，再现性相对标准差分别为 3.42%和 3.72%，均小于允许的 25%；相对偏倚分别为 12.98%和 13.30%，均小于 25%（表 217）。联合定值结果表明，本方法能够准确定量盲样中 DBN9936 转化体的含量，定量结果具有良好的准确性。

表 221 实验室联合验证数据的汇总分析结果

	测试样品预期值 (%)	
	3	1
返回数据实验室数	8	8
每个实验室平行样品个数	3	3
离群值数	0	0
平均值	3.39	1.13
重复性标准差 $s_r$	0.10	0.04
重复性相对标准差 $RSD_r$	2.98	3.60
再现性标准差 $s_R$	0.12	0.04
再现性相对标准差 $RSD_R$	3.42	3.72
偏倚 bias	0.39	0.13
相对偏倚 $bias_r$ (%)	12.98	13.30

## 2. DBN9858/zSSIIb 二重数字 PCR 方法联合验证结果分析

制备转基因含量（拷贝数比值）分别为 3%和 1%的样品，请 8 家实验室对样品转基因含量进行联合定量，8 家实验室的定量结果如表 218 所示。

表 222 多家实验室联合定量数据

量值	实验室	Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Rep5	Rep6	Rep7	Rep8	平均值	SD	RSD (%)
3%	A	2.93	2.98	2.94	2.98	2.95	3.05	2.97	2.90	2.984	0.025	0.842
	B	3.04	2.98	2.99	2.98	3.04	3.05	3.04	3.00			
	C	2.96	3.00	3.00	2.95	3.06	3.00	3.01	3.00			

	D	2.94	3.01	3.02	3.05	2.98	3.05	3.04	3.01			
	E	2.93	2.97	2.98	2.96	3.03	3.01	3.03	2.98			
	F	2.99	2.97	2.94	2.97	2.97	2.97	3.00	2.97			
	G	2.98	2.98	3.00	2.93	2.98	3.00	2.96	2.99			
	H	2.92	2.93	2.93	2.94	2.93	2.95	2.92	2.96			
	I	3.00	3.04	2.96	2.97	2.97	3.01	3.00	3.03			
1%	A	0.99	1.04	1.00	1.05	1.04	1.00	0.99	1.00	0.999	0.008	0.786
	B	0.97	1.02	1.01	1.00	1.04	1.00	1.00	1.00			
	C	0.98	0.96	1.00	0.98	1.01	1.03	0.97	1.01			
	D	0.98	0.98	1.00	1.04	1.01	0.96	1.03	0.98			
	E	1.02	0.98	1.01	1.01	1.03	0.97	1.00	0.99			
	F	1.00	1.00	0.99	0.97	0.99	0.97	1.02	0.99			
	G	1.05	0.95	0.99	1.02	0.95	1.01	1.00	0.96			
	H	0.98	0.96	0.98	1.00	1.02	0.97	1.01	1.01			
	I	1.01	1.00	0.99	1.02	0.99	1.02	1.01	1.00			

根据标准 GB/T6379.2-2004 或 ISO5725-2:1994，对定量数据进行分析，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，无异常值和歧离值，8 家实验室的数据均为有效数据。对有效检测数据进行统计，分析方法的重复性和再现性。两个样品的重复性相对标准差分别为 1.04%和 2.46%，再现性相对标准差分别为 1.32%和 2.44%，均小于允许的 25%；相对偏倚分别为 -0.59%和-0.20%，其绝对值均小于 25%（表 219）。联合定值结果表明，本方法能够准确定量盲样中 DBN9858 转化体的含量，定量结果具有良好的准确性。

表 223 实验室联合验证数据的汇总分析结果

	测试样品预期值 (%)	
	3	1
返回数据实验室数	8	8
每个实验室平行样品个数	8	8
离群值数	0	0

平均值	2.98	1.00
重复性标准差 $s_r$	0.03	0.02
重复性相对标准差 $RSD_r$	1.04	2.46
再现性标准差 $s_R$	0.04	0.02
再现性相对标准差 $RSD_R$	1.32	2.44
偏倚 bias	-0.02	0.00
相对偏倚 $bias_r$ (%)	-0.59	-0.20

### 3. DBN9501/zSSIIb 二重数字 PCR 方法联合验证结果分析

制备转基因含量（拷贝数比值）分别为 3%和 1%的样品，请 8 家实验室对 3%样品转基因含量进行联合定量，请 3 家实验室对 1%样品转基因含量进行联合定量，多家实验室的定量结果如表 220 所示。

表 224 多家实验室联合定量数据

实验室	Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Rep5	Rep6	Rep7	Rep8	Avg	SD	RSD%
A	2.83	2.93	3.28	3.16	3.03	3.25	3.15	3.35	3.12	0.18	5.76
B	2.97	3.15	2.97	2.77	2.87	3.01	3.17	2.98	2.99	0.13	4.51
C	2.71	2.90	3.07	2.97	3.18	3.21	3.31	3.33	3.09	0.21	6.92
D	3.08	3.08	3.08	3.14	3.06	3.01	3.01	3.09	3.07	0.04	1.39
E	2.87	2.89	3.27	3.03	3.03	3.16	2.99	2.90	3.02	0.14	4.64
F	3.05	3.06	3.05	3.10	3.25	3.25	2.94	3.00	3.09	0.11	3.63
G	3.06	3.11	3.14	2.91	3.18	2.94	3.01	2.93	3.03	0.10	3.36
H	3.18	2.97	3.12	3.24	2.96	3.35	3.36	3.33	3.19	0.16	5.09

根据标准 GB/T6379.2-2004 或 ISO5725-2:1994，对定量数据进行进行分析，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，无异常值和歧离值，各家实验室的数据均为有效数据。对有效检测数据进行统计，分析方法的重复性和再现性。

3%样品的重复性相对标准差为 4.69%、1%样品的重复性相对标准差为 xx%，再现性相对标准差分别为 4.85%和 xx%，均小于允许的 25%；相对偏倚分别为 2.46%和 xx%，其绝对值均小于 25%（表 221）。联合定值结果表明，本方法能够准确定量盲样中 DBN9501 转化体的含量，定量结果具有良好的准确性。

表 225 实验室联合验证数据的汇总分析结果

	测试样品预期值 (%)	
	3	1
返回数据实验室数	8	3
每个实验室平行样品个数	3	3
离群值数	0	0
平均值	3.07	
重复性标准差 $s_r$	0.14	
重复性相对标准差 $RSD_r$	4.69	
再现性标准差 $s_R$	0.15	
再现性相对标准差 $RSD_R$	4.85	
偏倚 bias	0.07	
相对偏倚 $bias_r$ (%)	2.46	

#### 4. 瑞丰 125/zSSIIb 二重数字 PCR 方法联合验证结果分析

验证工作由方法研制单位中国农业科学院油料作物研究所组织实施，选择 3 家已通过“双认证”的转基因生物安全检测机构对方法进行循环验证，分别为：农业农村部食品质量检验测试中心（成都）、农业农村部植物及植物用微生物生态环境安全检验测试中心（广州）和农业农村部植物生态环境安全检验测试中心（上海）。循环验证数据统计见表 222。

计算得到 2 个盲样瑞丰 125/zSSIIb 拷贝数比值的平均值，统计测量结果的相对标准差 (RSD) 和相对偏倚 (Bias)。结果显示，测量平均值均接近预期含量，与预期值的相对偏倚在±25%的可接受范围内；相对标准偏差 RSD 均小于 25%(表 223)。已建立的瑞丰 125/zSSIIb 双重 ddPCR 实现了对样品中瑞丰 125 转化体含量的准确定量，具有良好的重复性和重现性。

表 226 循环验证结果

验证机构	PCR 平行	盲样	
		SG1 (3%)	SG2 (1%)
实验室 1	1	3.15	1.20
	2	3.10	1.04
	3	3.09	1.12
实验室 2	1	3.05	1.06
	2	3.03	1.15
	3	2.79	0.94
实验室 3	1	3.22	1.11
	2	3.20	1.05
	3	3.26	1.09

表 227 循环验证结果统计分析

	测试样品预期值 (%)	
	3	1
返回数据实验室数	3	3
每个实验室平行样品个数	3	3
离群值数	0	0
平均值	3.10	1.08
重复性标准差 $s_r$	0.09	0.08
重复性相对标准差 $RSD_r$	2.82	7.23
再现性标准差 $s_R$	0.15	0.08
再现性相对标准差 $RSD_R$	4.94	7.23
偏倚 bias	0.099	0.084
相对偏倚 $bias_r$ (%)	3.30	8.44

## 5. 浙大瑞丰 8/zSSIIb 二重数字 PCR 方法联合验证结果分析

制备转基因含量（拷贝数比值）分别为 3%和 1%的样品，请 8 家实验室对样品转基因含量进行联合定量，8 家实验室的定量结果如表 224 所示。

表 228 多家实验室联合定量数据

样品	实验室	1	2	3	4	5	6	7	8	平均值	SD
3%	1	2.90	3.06	3.05	3.04	3.11	3.07	3.10	2.92	3.032	0.079
	2	3.26	2.91	3.00	2.98	3.08	3.04	2.83	2.81	2.989	0.143
	3	3.05	2.81	2.96	2.78	2.82	2.88	2.86	2.93	2.888	0.090
	4	3.10	3.17	3.09	2.81	3.15	2.95	2.89	2.80	2.994	0.152
	5	2.97	3.15	3.22	3.13	3.04	3.10	3.05	3.02	3.086	0.081
	6	2.87	3.20	3.00	3.24	2.94	3.17	3.04	3.09	3.069	0.133
	7	2.85	2.90	3.00	2.92	3.03	2.88	3.08	2.91	2.946	0.082
	8	3.12	3.03	2.91	3.06	2.97	3.00	3.02	3.12	3.029	0.074
1%	1	1.02	1.02	1.09	1.08	1.05	1.06	1.07	1.03	1.053	0.028
	2	1.01	0.94	0.99	1.11	0.92	1.03	1.09	0.91	1.000	0.076
	3	0.91	1.06	1.07	0.98	1.02	0.94	0.93	1.03	0.993	0.061
	4	1.16	1.11	1.13	0.97	1.07	0.98	0.97	1.13	1.066	0.079
	5	0.99	1.02	1.00	1.00	0.93	1.06	0.92	0.99	0.989	0.044
	6	1.08	1.16	1.16	1.13	1.10	1.15	1.14	1.15	1.134	0.028
	7	1.06	0.97	0.99	0.97	0.97	1.04	1.02	1.03	1.006	0.035
	8	1.08	1.13	1.03	0.99	1.09	1.13	1.04	1.11	1.075	0.051

根据标准 GB/T6379.2-2004 或 ISO5725-2:1994，对定量数据进行进行分析，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，无异常值和歧离值，8 家实验室的数据均为有效数据。对有效检测数据进行统计，分析方法的重复性和再现性。两个样品的重复性相对标准差分别为 3.60%和 5.19%，再现性相对标准差分别为 4.00%和 6.93%，均小于允许的 25%；相对偏倚分别为 0.13%和 3.92%，其绝对值均小于 25%（表 225）。联合定值结果表

明，本方法能够准确定量盲样中浙大瑞丰 8 转化体的含量，定量结果具有良好的准确性。

表 229 实验室联合验证数据的汇总分析结果

	测试样品预期值 (%)	
	3	1
返回数据实验室数	8	8
每个实验室平行样品个数	3	3
离群值数	0	0
平均值	3.00	1.04
重复性标准差 $s_r$	0.11	0.05
重复性相对标准差 $RSD_r$	3.60	5.19
再现性标准差 $s_R$	0.12	0.07
再现性相对标准差 $RSD_R$	4.00	6.93
偏倚 bias	0.004	0.04
相对偏倚 $bias_r$ (%)	0.13	3.92

## 6. nCX-1/zSSIIb 二重数字 PCR 方法联合验证结果分析

制备转基因含量（拷贝数比值）分别为 3%和 1%的样品，请 8 家实验室对样品转基因含量进行联合定量，8 家实验室的定量结果如表 226 所示。

表 230 多家实验室联合定量数据

样品	实验室	1	2	3	4	5	6	7	8	平均值	SD
3%	1	2.80	2.88	2.90	2.85	2.86	2.80	2.90	2.93	2.865	0.046
	2	3.00	2.99	2.97	3.10	3.04	2.91	2.95	2.94	2.987	0.060
	3	3.04	2.88	2.94	2.86	2.93	3.05	3.02	3.09	2.978	0.084
	4	2.99	2.82	2.84	2.79	2.96	2.85	2.79	3.00	2.879	0.088
	5	2.89	3.03	2.76	2.88	2.80	3.01	2.91	2.83	2.889	0.096
	6	3.16	2.95	3.01	3.10	3.06	3.17	3.00	3.20	3.080	0.092
	7	3.05	2.92	2.94	2.95	2.99	2.96	2.91	2.96	2.961	0.044
	8	3.19	3.13	2.98	2.99	3.09	2.85	3.14	3.05	3.055	0.109
1%	1	0.95	0.94	0.98	0.94	1.00	0.96	0.86	0.90	0.942	0.044
	2	0.98	0.93	0.94	0.98	0.93	0.93	0.95	0.98	0.954	0.024

3	1.03	0.94	0.97	0.89	0.97	0.98	0.94	0.97	0.961	0.040
4	0.88	1.05	0.86	0.95	0.96	0.95	0.94	0.86	0.931	0.063
5	1.02	1.03	0.89	1.03	0.97	1.08	0.88	1.05	0.993	0.072
6	1.02	1.02	0.88	0.86	0.91	0.89	0.98	0.88	0.929	0.065
7	0.99	0.95	0.98	1.03	1.00	1.02	1.05	0.99	1.000	0.034
8	1.06	0.96	0.93	0.94	1.05	1.06	1.05	0.92	0.998	0.064

根据标准 GB/T6379.2-2004 或 ISO5725-2:1994，对定量数据进行进行分析，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，无异常值和歧离值，8家实验室的数据均为有效数据。对有效检测数据进行统计，分析方法的重复性和再现性。两个样品的重复性相对标准差分别为 2.73%和 5.58%，再现性相对标准差分别为 3.72%和 6.06%，均小于允许的 25%；相对偏倚分别为 -1.29%和-3.66%，其绝对值均小于 25%（表 227）。联合定值结果表明，本方法能够准确定量盲样中 nCX-1 转化体的含量，定量结果具有良好的准确性。

表 231 实验室联合验证数据的汇总分析结果

	测试样品预期值 (%)	
	3	1
返回数据实验室数	8	8
每个实验室平行样品个数	3	3
离群值数	0	0
平均值	2.96	0.96
重复性标准差 $s_r$	0.08	0.05
重复性相对标准差 $RSD_r$	2.73	5.58
再现性标准差 $s_R$	0.11	0.06
再现性相对标准差 $RSD_R$	3.72	6.06
偏倚 bias	-0.039	-0.04
相对偏倚 $bias_r$ (%)	-1.29	-3.66

## 7. ND207/zSSIIb 二重数字 PCR 方法联合验证结果分析

验证工作由方法研制单位天津市农业科学院组织实施,选择3家已通过“双认证”的转基因生物安全检测机构对方法进行循环验证,分别为:农业农村部植物及植物用生态环境安全检验测试中心(北京)、农业农村部植物及植物用生态环境安全检验测试中心(广州)、农业农村部农产品及加工品质量检验测试中心(长春)。循环验证数据见表 228,数据分析见表 229。

计算得到2个盲样 ND207/zSSIIb 拷贝数比值的平均值,统计测量结果的相对标准差(*RSD*)和相对偏倚(*Bias*)。结果显示,测量平均值均接近预期含量,与预期值的相对偏倚在±25%的可接受范围内;相对标准偏差 *RSD* 均小于 25%(表 229)。已建立的 ND207/zSSIIb 双重 ddPCR 实现了对样品中 ND207 转化体含量的准确定量,具有良好的重复性和重现性。

表 232 循环验证结果

验证机构	PCR 平行	盲样	
		SG1 (3%)	SG2 (1%)
实验室 1	1	2.97	1.03
	2	3.13	1.02
	3	3.10	1.01
实验室 2	1	3.00	0.97
	2	2.99	1.02
	3	3.05	1.01
实验室 3	1	3.18	1.05
	2	3.19	1.05

	3	3.23	1.06
--	---	------	------

表 233 循环验证结果统计分析

	测试样品预期值 (%)	
	3	1
返回数据实验室数	3	3
每个实验室平行样品个数	3	3
离群值数	0	0
平均值	3.09	1.02
重复性标准差 $s_r$	0.05	0.02
重复性相对标准差 $RSD_r$	1.77	1.63
再现性标准差 $s_R$	0.11	0.03
再现性相对标准差 $RSD_R$	3.43	2.95
偏倚 $bias$	0.093	0.024
相对偏倚 $bias_r$ (%)	3.11	2.44

## 8. BFL4-2/zSSIIb 二重数字 PCR 方法联合验证结果分析

验证工作由方法研制单位天津农科院组织实施,选择 3 家已通过“双认证”的转基因生物安全检测机构对方法进行循环验证,分别为:农业农村部农产品及加工品质量检验测试中心(长春)、农业农村部植物生态环境安全检验测试中心(上海)和农业农村部植物生态环境安全检验测试中心(武汉)。循环验证数据见表 230,数据分析见表 231。

计算得到 2 个盲样 BFL4-2/zSSIIb 拷贝数比值的平均值,统计测量结果的相对标准差 ( $RSD$ ) 和相对偏倚 ( $Bias$ )。结果显示,测量平均值均接近预期含量,与预期值的相对偏倚在 $\pm 25\%$ 的可接受范围内;相对标准偏差  $RSD$  均小于 25%(表 231)。已建立的 BFL4-2/zSSIIb

双重 ddPCR 实现了对样品中 BFL4-2 转化体含量的准确定量,具有良好的重复性和重现性。

表 234 循环验证结果

验证机构	PCR 平行	盲样	
		SG1 (3%)	SG2 (1%)
实验室 1	1	3.14	1.08
	2	2.97	1.16
	3	3.06	1.06
实验室 2	1	3.05	1.02
	2	2.99	1.08
	3	2.97	1.10
实验室 3	1	2.87	1.02
	2	2.98	1.16
	3	2.87	1.12

表 235 循环验证结果统计分析

	测试样品预期值 (%)	
	3	1
返回数据实验室数	3	3
每个实验室平行样品个数	3	3
离群值数	0	0
平均值	2.99	1.09
重复性标准差 $s_r$	0.07	0.06
重复性相对标准差 $RSD_r$	2.20	5.23
再现性标准差 $s_R$	0.09	0.06
再现性相对标准差 $RSD_R$	3.12	5.23
偏倚 bias	-0.011	0.089
相对偏倚 $bias_r$ (%)	-0.37	8.89

## 9. LW2-1/zSSIIb 二重数字 PCR 方法联合验证结果分析

验证工作由方法确认单位吉林省农业科学院(中国农业科技东北创新中心)组织实施,选择 3 家已通过“双认证”的转基因生物安全检

测机构对方法进行循环验证，分别为：农业农村部农产品及加工品质量检验测试中心（天津）、农业农村部植物及植物用微生物生态环境安全检验测试中心（广州）和农业农村部农产品及加工品质量检验测试中心（杭州）。循环验证数据见表 232，数据分析见表 233。

计算得到 2 个盲样 LW2-1/zSSIIb 拷贝数比值的平均值，统计测量结果的相对标准差（RSD）和相对偏倚（Bias）。结果显示，测量平均值均接近预期含量，与预期值的相对偏倚在±25%的可接受范围内；相对标准偏差 RSD 均小于 25%（表 233）。已建立的 LW2-1/zSSIIb 双重 ddPCR 实现了对样品中 LW2-1 转化体含量的准确定量，具有良好的重复性和重现性。

表 236 循环验证结果

验证机构	PCR 平行	盲样	
		SG1 (3%)	SG2 (1%)
实验室 1	1	3.35	1.15
	2	2.99	1.11
	3	2.69	1.21
实验室 2	1	3.27	1.21
	2	3.27	1.24
	3	3.17	1.24
实验室 3	1	2.91	0.99
	2	2.62	1.03
	3	2.63	1.19

表 237 循环验证结果统计分析

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

离群值数	0	0
平均值	2.99	1.15
重复性标准差 $s_r$	0.22	0.07
重复性相对标准差 $RSD_r$	7.22	5.94
再现性标准差 $s_R$	0.31	0.10
再现性相对标准差 $RSD_R$	10.48	8.47
偏倚 $bias$	-0.011	0.152
相对偏倚 $bias_r$ (%)	-0.37	15.22

## 10. WYN17132/zSSIIB 二重数字 PCR 方法联合验证结果分析

验证工作由方法研制单位华南农业大学组织实施,选择3家已通过“双认证”的转基因生物安全检测机构对方法进行循环验证,分别为:农业农村部植物及植物用微生物生态环境安全检验测试中心(广州)、农业农村部农产品及加工品质量检验测试中心(天津)和农业农村部谷物及制品质量检验测试中心(哈尔滨)。循环验证数据见表 234,数据分析见表 235。

计算得到2个盲样 WYN17132/zSSIIB 拷贝数比值的平均值,统计测量结果的相对标准差 ( $RSD$ ) 和相对偏倚 ( $Bias$ )。结果显示,测量平均值均接近预期含量,与预期值的相对偏倚在 $\pm 25\%$ 的可接受范围内;相对标准偏差  $RSD$  均小于 25% (表 235)。已建立的 WYN17132/zSSIIB 双重 ddPCR 实现了对样品中 WYN17132 转化体含量的准确定量,具有良好的重复性和重现性。

表 238 循环验证结果分析

验证机构	PCR 平行	盲样	
		SG1 (3%)	SG2 (1%)

实验室 1	1	2.92	1.03
	2	2.72	1.00
	3	2.73	1.09
实验室 2	1	2.91	1.02
	2	2.70	1.02
	3	2.90	1.11
实验室 3	1	3.16	0.96
	2	2.82	1.00
	3	3.06	1.10

表 239 循环验证结果统计分析

	测试样品预期值 (%)	
	3	1
返回数据实验室数	3	3
每个实验室平行样品个数	3	3
离群值数	0	0
平均值	2.88	1.04
重复性标准差 $s_r$	0.14	0.06
重复性相对标准差 $RSD_r$	4.80	5.57
再现性标准差 $s_R$	0.16	0.06
再现性相对标准差 $RSD_R$	5.66	5.57
偏倚 bias	-0.120	0.037
相对偏倚 $bias_r$ (%)	-4.00	3.67

## 11. WYN041/zSSIIB 二重数字 PCR 方法联合验证结果分析

验证工作由方法研制单位黑龙江省农业科学院组织实施，选择 3 家已通过“双认证”的转基因生物安全检测机构对方法进行循环验证，分别为：农业农村部农产品及加工品质量安全检验测试中心（杭州）、农业农村部农产品及加工品质量检验测试中心（天津）和农业农村部植物及植物微生物生态环境安全检验测试中心（广州）。循环验证数据见表 236，数据分析见表 237。

计算得到盲样 WYN041/zSSIIb 拷贝数比值的平均值，统计测量结果的相对标准差 (*RSD*) 和相对偏倚 (*Bias*)。结果显示，测量平均值均接近预期含量，与预期值的相对偏倚在±25%的可接受范围内；相对标准偏差 *RSD* 均小于 25% (表 238)。已建立的 WYN041/zSSIIb 双重 ddPCR 实现了对样品中 WYN041 转化体含量的准确定量，具有良好的重复性和重现性。

表 240 循环验证数据

测试机构	测试样品	检测靶标	重复								转基因含量 (%)	
			1	2	3	4	5	6	7	8		均值
农业农村部农产品及加工品质量安全检验检测中心(杭州)	WYN041 (3%)	WYN041 转化体	448	413	402	394	431	406	403	411	414	3.02
		<i>zSSIb</i> 内标准基因	14555	13156	13323	13259	13878	13775	14040	13764	13719	
		WYN041/ <i>zSSIb</i> 拷贝数比值 (%)	3.08	3.14	3.02	2.97	3.11	2.95	2.87	2.99	3.02	
农业农村部农产品及加工品质量检验检测中心(天津)	WYN041 (3%)	WYN041 转化体	412	430	402	428	384	378	404	394	404	3.13
		<i>zSSIb</i> 内标准基因	12640	13100	12900	13240	13060	13120	12400	12680	12892.5	
		WYN041/ <i>zSSIb</i> 拷贝数比值 (%)	3.26	3.28	3.12	3.23	2.94	2.88	3.26	3.11	3.13	
农业农村部植物及植物微生物生态环境安全检验检测中心(广州)	WYN041 (3%)	WYN041 转化体	427	407	435	420	429	459	410	432	427	2.98
		<i>zSSIb</i> 内标准基因	14349	14187	14492	14590	14517	14555	14100	14023	14352	
		WYN041/ <i>zSSIb</i> 拷贝数比值 (%)	2.98	2.87	3.00	2.88	2.95	3.15	2.91	3.08	2.98	

表 241 循环验证结果分析

验证机构	盲样	PCR 平行							
		1	2	3	4	5	6	7	8
实验室 1	SG	3.08%	3.14%	3.02%	2.97%	3.11%	2.95%	2.87%	2.99%
实验室 2	SG	3.26%	3.28%	3.12%	3.23%	2.94%	2.88%	3.26%	3.11%
实验室 3	SG	2.98%	2.87%	3.00%	2.88%	2.95%	3.15%	2.91%	3.08%

表 242 重复性和重现性统计分析

盲样	预期拷贝数比值 (%)	测量平均值 (%)	RSD (%)	Bias (%)
SG	3.0	3.04	2.08	1.44

## 12. BBL2-2/zSSIIb 二重数字 PCR 方法联合验证结果分析

## 13. CC-2/zSSIIb 二重数字 PCR 方法联合验证结果分析

制备转基因含量（拷贝数比值）分别为 3%和 1%的样品，请 8 家实验室对样品转基因含量进行联合定量，8 家实验室的定量结果如表 239 所示。

表 243 多家实验室联合定量数据

样品	实验室	Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Rep5	Rep6	Rep7	Rep8	Avg	SD	RSD%
3%	A	3.04	3.01	3.03	3.26	2.95	3.22	3.05	3.10	3.08	0.10	3.23
	B	2.86	2.92	2.92	2.96	2.96	2.87	2.94	2.94	2.92	0.04	1.22
	C	2.99	3.26	3.25	3.17	3.31	3.20	3.26	2.93	3.17	0.13	4.07
	D	3.36	3.30	3.29	3.20	3.12	3.42	3.39	3.29	3.30	0.09	2.81
	E	3.08	3.06	3.00	2.99	3.02	3.00	3.03	2.96	3.02	0.04	1.20
	F	2.88	2.95	2.85	2.82	2.96	2.85	2.81	2.84	2.87	0.05	1.84
	G	2.91	2.94	2.94	2.98	2.90	3.00	2.97	3.00	2.96	0.04	1.22
	H	2.78	3.11	3.16	3.30	2.79	2.77	2.71	2.89	2.94	0.21	7.01
1%	A	1.03	1.00	1.10	1.10	1.05	0.90	1.08	0.87	1.02	0.08	8.13
	B	1.00	1.03	0.96	1.05	1.06	0.94	0.92	1.02	1.00	0.05	4.88
	C	1.13	1.15	1.20	1.13	1.22	1.17	1.17	1.17	1.17	0.03	2.52
	D	1.14	1.06	1.04	1.10	1.02	0.99	1.15	1.19	1.09	0.07	6.04
	E	1.01	0.91	0.95	1.03	1.04	0.99	0.93	1.12	1.00	0.06	6.39
	F	1.07	1.08	0.94	1.05	1.05	1.07	1.12	1.02	1.05	0.05	4.71
	G	0.97	1.05	0.99	1.01	1.05	0.98	0.97	0.96	1.00	0.03	3.35
	H	1.01	1.04	0.99	1.04	1.04	0.97	0.94	1.01	1.01	0.03	3.41

根据标准 GB/T6379.2-2004 或 ISO5725-2:1994，对定量数据进行进行分析，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，无异常值和歧离值，8 家实验室的数据均为有效

数据。对有效检测数据进行统计，分析方法的重复性和再现性。两个样品的重复性相对标准差分别为 2.98%和 3.60%，再现性相对标准差分别为 3.42%和 3.72%，均小于允许的 25%；相对偏倚分别为 12.98%和 13.30%，均小于 25%（表 240）。联合定值结果表明，本方法能够准确定量盲样中 DBN9936 转化体的含量，定量结果具有良好的准确性。

表 244 实验室联合验证数据的汇总分析结果

	测试样品预期值 (%)	
	3	1
返回数据实验室数	8	8
每个实验室平行样品个数	3	3
离群值数	0	0
平均值	3.03	1.04
重复性标准差 $s_r$	0.11	0.06
重复性相对标准差 $RSD_r$	3.62	5.53
再现性标准差 $s_R$	0.18	0.08
再现性相对标准差 $RSD_R$	5.83	7.80
偏倚 bias	0.032	0.04
相对偏倚 $bias_r$ (%)	1.05	3.97

#### 14. LP026-2/zSSIIb 二重数字 PCR 方法联合验证结果分析

验证工作由方法确认单位吉林省农业科学院（中国农业科技东北创新中心）组织实施，选择 3 家已通过“双认证”的转基因生物安全检测机构对方法进行循环验证，分别为：农业农村部植物生态环境检验检测中心（天津）、农业农村部植物生态环境安全检验检测中心（武汉）和农业农村部农产品质量安全检验检测中心（北京）。循环验证数据见表 241，数据分析见表 242。

计算得到 2 个盲样 LP026-2/zSSIIb 拷贝数比值的平均值，统计测量结果的相对标准差 (RSD) 和相对偏倚 (Bias)。结果显示，测量平均值均接近预期含量，与预期值的相对偏倚在±25%的可接受范围内；相对标准偏差 RSD 均小于 25% (表 242)。已建立的 LP026-2/zSSIIb 双重 ddPCR 实现了对样品中 LP026-2 转化体含量的准确定量，具有良好的重复性和重现性。

表 245 循环验证结果

验证机构	PCR 平行	盲样	
		SG1 (3%)	SG2 (1%)
实验室 1	1	2.77	0.95
	2	2.81	0.86
	3	3.21	0.91
实验室 2	1	2.67	0.83
	2	2.59	0.90
	3	2.71	0.77
实验室 3	1	2.50	0.75
	2	2.59	0.75
	3	2.79	0.78

表 246 循环验证结果统计分析

	测试样品预期值 (%)	
	3	1
返回数据实验室数	3	3
每个实验室平行样品个数	3	3
离群值数	0	0
平均值	2.74	0.83
重复性标准差 $s_r$	0.17	0.05
重复性相对标准差 $RSD_r$	6.15	5.61
再现性标准差 $s_R$	0.22	0.08

再现性相对标准差 $RSD_R$	7.90	9.92
偏倚 bias	-0.262	-0.167
相对偏倚 $bias_r$ (%)	-8.74	-16.67

### 15. KJ1003/zSSIIb 二重数字 PCR 方法联合验证结果分析

### 16. QY2569-42/zSSIIb 二重数字 PCR 方法联合验证结果分析

验证工作由方法研制单位天津市农业科学院组织实施，选择 3 家已通过“双认证”的转基因生物安全检测机构对方法进行循环验证，分别为：农业农村部植物生态环境检验检测中心（天津）、农业农村部植物生态环境安全检验检测中心（武汉）和农业农村部农作物生态环境安全检验检测中心（上海）。循环验证数据见表 243，数据分析见表 244。

计算得到 2 个盲样 QY2569-42/zSSIIb 拷贝数比值的平均值，统计测量结果的相对标准差 ( $RSD$ ) 和相对偏倚 ( $Bias$ )。结果显示，测量平均值均接近预期含量，与预期值的相对偏倚在  $\pm 25\%$  的可接受范围内；相对标准偏差  $RSD$  均小于 25% (表 244)。已建立的 QY2569-42/zSSIIb 双重 ddPCR 实现了对样品中 QY2569-42 转化体含量的准确定量，具有良好的重复性和重现性。

表 247 循环验证结果分析

验证机构	PCR 平行	盲样	
		SG1 (3%)	SG2 (1%)
实验室 1	1	2.98	0.98
	2	3.14	1.02
	3	3.00	0.93
实验室 2	1	2.55	0.94

	2	2.65	0.95
	3	2.53	0.88
实验室 3	1	2.84	0.99
	2	2.64	0.95
	3	2.89	1.03

表 248 循环验证结果统计分析

	测试样品预期值 (%)	
	3	1
返回数据实验室数	3	3
每个实验室平行样品个数	3	3
离群值数	0	0
平均值	2.80	0.96
重复性标准差 $s_r$	0.10	0.04
重复性相对标准差 $RSD_r$	3.52	4.27
再现性标准差 $s_R$	0.25	0.05
再现性相对标准差 $RSD_R$	8.76	5.05
偏倚 bias	-0.198	-0.037
相对偏倚 $bias_r$ (%)	-6.59	-3.67

## 17. ZZM03/zSSIIb 二重数字 PCR 方法联合验证结果分析

验证工作由方法研制单位天津市农业科学院组织实施，选择 3 家已通过“双认证”的转基因生物安全检测机构对方法进行循环验证，分别为：农业农村部植物及植物用生态环境安全检验测试中心（北京）、农业农村部植物生态环境安全检验测试中心（武汉）和农业农村部农作物生态环境安全检验测试中心（上海）。循环验证数据见表 245，数据分析见表 246。

计算得到 2 个盲样 ZZM032/zSSIIb 拷贝数比值的平均值，统计测量结果的相对标准差 (*RSD*) 和相对偏倚 (*Bias*)。结果显示，测量平均值均接近预期含量，与预期值的相对偏倚在±25%的可接受范围内；相对标准偏差 *RSD* 均小于 25% (表 246)。已建立的 ZZM032/zSSIIb 双重 ddPCR 实现了对样品中 ZZM032 转化体含量的准确定量，具有良好的重复性和重现性。

表 249 循环验证结果分析

验证机构	PCR 平行	盲样	
		SG1 (3%)	SG2 (1%)
实验室 1	1	2.81	1.04
	2	2.93	0.94
	3	2.85	1.05
实验室 2	1	2.83	0.98
	2	2.95	1.00
	3	2.91	0.93
实验室 3	1	2.83	1.08
	2	2.95	0.94
	3	3.15	0.99

表 250 循环验证结果统计分析

	测试样品预期值 (%)	
	3	1
返回数据实验室数	3	3
每个实验室平行样品个数	3	3
离群值数	0	0
平均值	2.91	0.99
重复性标准差 $s_r$	0.11	0.06
重复性相对标准差 $RSD_r$	3.63	5.82
再现性标准差 $s_R$	0.10	0.06

再现性相对标准差 $RSD_R$	3.58	5.82
偏倚 bias	-0.088	-0.006
相对偏倚 $bias_r$ (%)	-2.93	-0.56

## 18. MZIR260/zSSIIb 二重数字 PCR 方法联合验证结果分析

验证工作由方法研制单位天津市农业科学院组织实施，选择 3 家已通过“双认证”的转基因生物安全检测机构对方法进行循环验证，分别为：农业农村部植物及植物用生态环境安全检验测试中心（北京）、农业农村部植物生态环境安全检验测试中心（武汉）和农业农村部农作物生态环境安全检验测试中心（上海）。循环验证数据见表 247，数据分析见表 248。

计算得到 2 个盲样 MZIR260/zSSIIb 拷贝数比值的平均值，统计测量结果的相对标准差 ( $RSD$ ) 和相对偏倚 ( $Bias$ )。结果显示，测量平均值均接近预期含量，与预期值的相对偏倚在 $\pm 25\%$ 的可接受范围内；相对标准偏差  $RSD$  均小于 25% (表 248)。已建立的 MZIR260/zSSIIb 双重 ddPCR 实现了对样品中 MZIR260 转化体含量的准确定量，具有良好的重复性和重现性。

表 251 循环验证结果分析

验证机构	PCR 平行	盲样	
		SG1 (3%)	SG2 (1%)
实验室 1	1	2.81	0.99
	2	2.90	0.98
	3	2.92	0.99
实验室 2	1	2.90	0.85
	2	2.79	0.86

	3	2.84	0.88
实验室 3	1	3.03	0.85
	2	3.11	0.92
	3	3.01	1.02

表 252 循环验证结果统计分析

	测试样品预期值 (%)	
	3	1
返回数据实验室数	3	3
每个实验室平行样品个数	3	3
离群值数	0	0
平均值	2.92	0.93
重复性标准差 $s_r$	0.06	0.05
重复性相对标准差 $RSD_r$	1.90	5.42
再现性标准差 $s_R$	0.12	0.07
再现性相对标准差 $RSD_R$	4.10	8.00
偏倚 bias	-0.077	-0.073
相对偏倚 $bias_r$ (%)	-2.56	-7.33

### 19. Bt11/zSSIIb 二重数字 PCR 方法联合验证结果分析

验证工作由方法研制单位农业农村部农作物生态环境安全检验检测中心（上海）组织实施，选择 3 家已通过“双认证”的转基因生物安全检测机构对方法进行循环验证，分别为：农业农村部植物生态环境安全检验检测中心（杭州）、农业农村部植物生态环境安全检验检测中心（武汉）和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）。循环验证数据见表 249，数据分析见表 250。

计算得到 2 个盲样 Bt11/zSSIIb 拷贝数比值的平均值，统计测量结果的相对标准差（RSD）和相对偏倚（Bias）。结果显示，测量平均值

均接近预期含量，与预期值的相对偏倚在 $\pm 25\%$ 的可接受范围内；相对标准偏差 RSD 均小于 25%(表 250)。已建立的 Bt11/zSSIIb 双重 ddPCR 实现了对样品中 Bt11 转化体含量的准确定量，具有良好的重复性和重现性。

表 253 循环验证结果分析

验证机构	PCR 平行	盲样	
		SG1 (3%)	SG2 (1%)
实验室 1	1	3.03	1.00
	2	2.93	1.01
	3	3.03	0.96
实验室 2	1	3.09	0.95
	2	2.93	1.08
	3	3.06	0.97
实验室 3	1	3.20	0.99
	2	2.99	0.99
	3	3.17	1.06

表 254 循环验证结果统计分析

	测试样品预期值 (%)	
	3	1
返回数据实验室数	3	3
每个实验室平行样品个数	3	3
离群值数	0	0
平均值	3.05	1.00
重复性标准差 $s_r$	0.09	0.05
重复性相对标准差 $RSD_r$	2.90	4.90
再现性标准差 $s_R$	0.10	0.05
再现性相对标准差 $RSD_R$	3.17	4.90
偏倚 bias	0.048	0.001
相对偏倚 $bias_r$ (%)	1.59	0.11

## 20. MIR162/zSSIIB 二重数字 PCR 方法联合验证结果分析

验证工作由方法研制单位中国农业科学院油料作物研究所组织实施，选择 3 家已通过“双认证”的转基因生物安全检测机构对方法进行循环验证，分别为：农业农村部农产品及加工品质量检验测试中心（天津）、农业农村部植物生态环境安全检验测试中心（杭州）和深圳市农产品质量安全检验检测中心。循环验证原始数据见表 251，数据统计见表 252。

计算得到 2 个盲样 MIR162/zSSIIB 拷贝数比值的平均值，统计测量结果的相对标准差（RSD）和相对偏倚（Bias）。结果显示，测量平均值均接近预期含量，与预期值的相对偏倚在±25%的可接受范围内；相对标准偏差 RSD 均小于 25%（表 252）。已建立的 MIR162/zSSIIB 双重 ddPCR 实现了对样品中 MIR162 转化体含量的准确定量，具有良好的重复性和重现性。

表 255 循环验证结果分析

验证机构	PCR 平行	盲样	
		SG1 (3%)	SG2 (1%)
实验室 1	1	3.16	1.03
	2	3.27	1.08
	3	3.11	0.95
实验室 2	1	3.04	1.03
	2	2.87	1.00
	3	3.17	0.99
实验室 3	1	2.90	0.98
	2	3.21	0.96
	3	3.26	0.98

表 256 循环验证结果统计分析

	测试样品预期值 (%)	
	3	1
返回数据实验室数	3	3
每个实验室平行样品个数	3	3
离群值数	0	0
平均值	3.11	1.00
重复性标准差 $s_r$	0.15	0.04
重复性相对标准差 $RSD_r$	4.82	4.03
再现性标准差 $s_R$	0.15	0.04
再现性相对标准差 $RSD_R$	4.82	4.07
偏倚 bias	0.110	0.000
相对偏倚 $bias_r$ (%)	3.67	0.00

## 21. GA21/zSSIIb 二重数字 PCR 方法联合验证结果分析

验证工作由方法研制单位中国农业科学院油料作物研究所组织实施，选择 3 家已通过“双认证”的转基因生物安全检测机构对方法进行循环验证，分别为：农业农村部农产品及加工品质量检验检测中心（天津）、农业农村部植物生态环境安全检验检测中心（杭州）和深圳市农产品质量安全检验检测中心。循环验证原始数据见表 253，数据统计见表 254。

计算得到 2 个盲样 GA21/zSSIIb 拷贝数比值的平均值，统计测量结果的相对标准差（RSD）和相对偏倚（Bias）。结果显示，测量平均值均接近预期含量，与预期值的相对偏倚在±25%的可接受范围内；相对标准偏差 RSD 均小于 25%（表 254）。已建立的 GA21/zSSIIb 双重 ddPCR 实现了对样品中 GA21 转化体含量的准确定量，具有良好的重复性和重现性。

表 257 循环验证结果

验证机构	PCR 平行	盲样	
		SG1 (3%)	SG2 (1%)
实验室 1	1	3.24	1.02
	2	3.28	0.98
	3	3.19	1.08
实验室 2	1	2.88	0.99
	2	2.94	0.88
	3	2.82	0.92
实验室 3	1	2.90	0.98
	2	3.21	0.96
	3	3.26	0.98

表 258 实验室联合验证数据的汇总分析结果

	测试样品预期值 (%)	
	3	1
返回数据实验室数	3	3
每个实验室平行样品个数	3	3
离群值数	0	0
平均值	3.08	0.98
重复性标准差 $s_r$	0.12	0.04
重复性相对标准差 $RSD_r$	3.92	4.49
再现性标准差 $s_R$	0.21	0.06
再现性相对标准差 $RSD_R$	6.73	6.17
偏倚 bias	0.080	-0.023
相对偏倚 $bias_r$ (%)	2.67	-2.33

## 22. MON810/*zSSIIb* 二重数字 PCR 方法联合验证结果分析

验证工作由方法研制单位四川省农科院实施，选择 3 家已通过“双认证”的转基因生物安全检测机构对方法进行循环验证，循环验证数据见表 255。对数据进行分析，计算得到 2 个盲样 DAS40278-9/*zSSIIb* 拷贝数比值的平均值，统计测量结果的重复性相对标准差 ( $RSD_r$ )、再现性

相对标准差 (RSDR) 和相对偏倚 (Bias)。结果显示, 测量平均值均接近预期含量; 两个样品的重复性相对标准差分别为 2.48% 和 3.53%, 再现性相对标准差分别为 2.98% 和 3.53%, 均小于允许的 25%; 相对偏倚分别为 -1.89% 和 -3.67%, 均在  $\pm 25\%$  的可接受范围内 (表 256)。已建立的 DAS40278-9/zSSIIb 双重 ddPCR 实现了对样品中 DAS40278-9 转化体含量的准确定量, 具有良好的重复性和重现性。

表 259 3 家实验室循环验证结果

验证机构	PCR 平行	盲样	
		SG1 (3%)	SG2 (1%)
实验室 1	1	2.89	0.93
	2	3.02	1.00
	3	2.96	1.00
实验室 2	1	2.83	0.93
	2	2.80	0.96
	3	2.99	0.99
实验室 3	1	2.97	0.98
	2	2.99	0.92
	3	3.04	0.96

表 260 实验室联合验证数据的汇总分析结果

	测试样品预期值 (%)	
	3	1
返回数据实验室数	3	3
每个实验室平行样品个数	3	3
离群值数	0	0
平均值	2.94	0.96
重复性标准差 $s_r$	0.07	0.03
重复性相对标准差 $RSD_r$	2.48	3.53
再现性标准差 $s_R$	0.09	0.03
再现性相对标准差 $RSD_R$	2.98	3.53

偏倚 bias	-0.057	-0.037
相对偏倚 bias <sub>r</sub> (%)	-1.89	-3.67

### 23. Bt176/zSSIIb 二重数字 PCR 方法联合验证结果分析

验证工作由方法研制单位农业农村部农作物生态环境安全检验检测中心（上海）组织实施，选择 3 家已通过“双认证”的转基因生物安全检测机构对方法进行循环验证，分别为：农业农村部农产品及加工品质检验检测中心（长春）、农业农村部植物生态环境安全检验检测中心（武汉）、农业农村部农作物种子质量检验检测中心（深圳）。循环验证数据见表 257，数据分析见表 258。

计算得到 2 个盲样 Bt176/zSSIIb 拷贝数比值的平均值，统计测量结果的相对标准差（RSD）和相对偏倚（Bias）。结果显示，测量平均值均接近预期含量，与预期值的相对偏倚在±25%的可接受范围内；相对标准偏差 RSD 均小于 25%（表 258）。已建立的 Bt176/zSSIIb 双重 ddPCR 实现了对样品中 Bt176 转化体含量的准确定量，具有良好的重复性和重现性。

表 261 循环验证结果

验证机构	PCR 平行	盲样	
		SG1 (3%)	SG2 (1%)
实验室 1	1	3.34	0.93
	2	3.43	0.96
	3	3.19	1.00
实验室 2	1	2.75	1.10
	2	2.96	0.90
	3	2.89	1.10

实验室 3	1	3.05	1.04
	2	2.99	1.04
	3	3.34	1.04

表 262 循环验证结果统计分析

	测试样品预期值 (%)	
	3	1
返回数据实验室数	3	3
每个实验室平行样品个数	3	3
离群值数	0	0
平均值	3.10	1.01
重复性标准差 $s_r$	0.14	0.07
重复性相对标准差 $RSD_r$	4.60	6.88
再现性标准差 $s_R$	0.26	0.07
再现性相对标准差 $RSD_R$	8.23	7.01
偏倚 $bias$	0.104	0.012
相对偏倚 $bias_r$ (%)	3.48	1.22

## 24. TC1507/zSSIIb 二重数字 PCR 方法联合验证结果分析

由欧盟转基因检测网络实验室的 3 家检测机构对方法进行循环验证，循环验证数据见表 259。

计算得到 2 个盲样 TC1507/zSSIIb 拷贝数比值的平均值，统计测量结果的相对标准差 ( $RSD$ ) 和相对偏倚 ( $Bias$ )。结果显示，测量平均值均接近预期含量，与预期值的相对偏倚在  $\pm 25\%$  的可接受范围内；相对标准偏差  $RSD$  均小于 25% (表 260)。已建立的 TC1507/zSSIIb 双重 ddPCR 实现了对样品中 TC1507 转化体含量的准确定量，具有良好的重复性和重现性。

表 263 循环验证数据

测试机构	测试样品	检测靶标	重复				转基因含量 (%)
			1	2	3	均值	
斯洛文尼亚 NIB	TC1507 (3%)	TC1507 转化体	307.10	323.73	303.70	311.51	3.03
		<i>zSSIb</i> 内标准基因	10253.47	10329.00	10304.97	10295.81	
		TC1507/ <i>zSSIb</i> 拷贝数比值 (%)	3.00	3.13	2.95	3.03	
	TC1507 (1%)	TC1507 转化体	104.33	101.97	98.63	101.64	0.98
		<i>zSSIb</i> 内标准基因	10438.80	10667.27	9932.30	10346.12	
		TC1507/ <i>zSSIb</i> 拷贝数比值 (%)	1.00	0.96	0.99	0.98	
比利时 ILVO	TC1507 (3%)	TC1507 转化体	293.17	293.53	304.37	297.02	3.02
		<i>zSSIb</i> 内标准基因	9632.53	9628.43	10297.27	9852.74	
		TC1507/ <i>zSSIb</i> 拷贝数比值 (%)	3.04	3.05	2.96	3.02	
	TC1507 (1%)	TC1507 转化体	94.30	96.93	99.63	96.95	0.99
		<i>zSSIb</i> 内标准基因	9765.93	9731.47	9976.73	9824.71	
		TC1507/ <i>zSSIb</i> 拷贝数比值 (%)	0.97	1.00	1.00	0.99	
荷兰 RIKILT	TC1507 (3%)	TC1507 转化体	296.53	289.43	290.20	292.05	2.91
		<i>zSSIb</i> 内标准基因	10076.83	10008.50	9976.30	10020.54	
		TC1507/ <i>zSSIb</i> 拷贝数比值 (%)	2.94	2.89	2.91	2.91	
	TC1507 (1%)	TC1507 转化体	102.97	103.67	97.63	101.42	1.01
		<i>zSSIb</i> 内标准基因	10115.87	10447.63	9748.67	10104.06	
		TC1507/ <i>zSSIb</i> 拷贝数比值 (%)	1.03	0.99	1.00	1.01	

表 264 重复性和重现性统计分析

	测试样品预期值 (%)	
	3	1
返回数据实验室数	3	3
每个实验室平行样品个数	3	3
离群值数	0	0
平均值	2.99	0.99
重复性标准差 $s_r$	0.06	0.02
重复性相对标准差 $RSD_r$	2.09	1.99
再现性标准差 $s_R$	0.08	0.02
再现性相对标准差 $RSD_R$	2.71	2.02
偏倚 bias	-0.014	-0.007

相对偏倚 bias <sub>r</sub> (%)	-0.48	-0.67
----------------------------	-------	-------

## 25. MON863/zSSIIb 二重数字 PCR 方法联合验证结果分析

由欧盟转基因检测网络实验室的 3 家检测机构对方法进行循环验证，循环验证数据见表 261。

计算得到 2 个盲样 MON863/zSSIIb 拷贝数比值的平均值，统计测量结果的相对标准差 (*RSD*) 和相对偏倚 (*Bias*)。结果显示，测量平均值均接近预期含量，与预期值的相对偏倚在±25%的可接受范围内；相对标准偏差 *RSD* 均小于 25% (表 262)。已建立的 MON863/zSSIIb 双重 ddPCR 实现了对样品中 MON863 转化体含量的准确定量，具有良好的重复性和重现性。

表 265 循环验证数据

测试机构	测试样品	检测靶标	重复				转基因含量 (%)
			1	2	3	均值	
斯洛文尼亚 NIB	MON863 (3%)	MON863 转化体	288.4	307.8	279.2	291.80	2.99
		zSSIIb 内标准基因	10047.3	9696.8	9563.6	9769.23	
		MON863/zSSIIb 拷贝数比值 (%)	2.87	3.17	2.92	2.99	
	MON863 (1%)	MON863 转化体	105.3	114.3	101.3	106.97	1.03
		zSSIIb 内标准基因	9902	10716.5	10404.3	10340.93	
		MON863/zSSIIb 拷贝数比值 (%)	1.06	1.07	0.97	1.03	
比利时 ILVO	MON863 (3%)	MON863 转化体	296.6	316.9	310.7	308.07	3.09
		zSSIIb 内标准基因	9467.6	10262	10173.1	9967.57	
		MON863/zSSIIb 拷贝数比值 (%)	3.13	3.09	3.05	3.09	
	MON863 (1%)	MON863 转化体	108.3	101.3	110.4	106.67	1.02
		zSSIIb 内标准基因	10331.4	10366.3	10585.3	10427.67	
		MON863/zSSIIb 拷贝数比值 (%)	1.05	0.98	1.04	1.02	
荷兰 RIKILT	MON863	MON863 转化体	298.6	285.4	294.6	292.87	2.96

	(3%)	<i>zSSIb</i> 内标准基因	9708.6	9729.6	10237.7	9891.97	
		MON863/ <i>zSSIb</i> 拷贝数比值 (%)	3.08	2.93	2.88	2.96	
MON863	(1%)	MON863 转化体	112.4	104.3	106.3	107.67	1.05
		<i>zSSIb</i> 内标准基因	10713.4	9661.1	10336.9	10237.13	
		MON863/ <i>zSSIb</i> 拷贝数比值 (%)	1.05	1.08	1.03	1.05	

表 266 重复性和重现性统计分析

	测试样品预期值 (%)	
	3	1
返回数据实验室数	3	3
每个实验室平行样品个数	3	3
离群值数	0	0
平均值	3.01	1.04
重复性标准差 $s_r$	0.11	0.04
重复性相对标准差 $RSD_r$	3.75	3.98
再现性标准差 $s_R$	0.11	0.04
再现性相对标准差 $RSD_R$	3.79	3.98
偏倚 bias	0.013	0.037
相对偏倚 $bias_r$ (%)	0.44	3.67

## 26. 59122/*zSSIb* 二重数字 PCR 方法联合验证结果分析

由欧盟转基因检测网络实验室的 3 家检测机构对方法进行循环验证，循环验证数据见表 263。

计算得到 2 个盲样 59122/*zSSIb* 拷贝数比值的平均值，统计测量结果的相对标准差 ( $RSD$ ) 和相对偏倚 ( $Bias$ )。结果显示，测量平均值均接近预期含量，与预期值的相对偏倚在 $\pm 25\%$ 的可接受范围内；相对标准偏差  $RSD$  均小于 25% (表 264)。已建立的 59122/*zSSIb* 双重 ddPCR

实现了对样品中 59122 转化体含量的准确定量，具有良好的重复性和重现性。

表 267 循环验证数据

测试机构	测试样品	检测靶标	重复				转基因含量 (%)
			1	2	3	均值	
斯洛文尼亚 NIB	59122 (3%)	59122 转化体	299.80	308.07	292.87	300.25	3.03
		<i>zSSIb</i> 内标准基因	9769.23	9967.57	9991.97	9909.59	
		59122/ <i>zSSIb</i> 拷贝数比值(%)	3.07	3.09	2.93	3.03	
	59122 (1%)	59122 转化体	105.97	114.30	108.97	109.75	1.06
		<i>zSSIb</i> 内标准基因	10240.73	10264.90	10609.80	10371.81	
		59122/ <i>zSSIb</i> 拷贝数比值(%)	1.03	1.11	1.03	1.06	
比利时 ILVO	59122 (3%)	59122 转化体	291.13	299.17	298.93	296.41	3.03
		<i>zSSIb</i> 内标准基因	9801.37	9806.83	9783.50	9797.23	
		59122/ <i>zSSIb</i> 拷贝数比值(%)	2.97	3.05	3.06	3.03	
	59122 (1%)	59122 转化体	101.63	109.30	115.70	108.88	1.05
		<i>zSSIb</i> 内标准基因	10398.30	10367.33	10319.93	10361.85	
		59122/ <i>zSSIb</i> 拷贝数比值(%)	0.98	1.05	1.12	1.05	
荷兰 RIKILT	59122 (3%)	59122 转化体	299.07	298.53	299.97	299.19	2.92
		<i>zSSIb</i> 内标准基因	10899.50	9828.43	10016.83	10248.25	
		59122/ <i>zSSIb</i> 拷贝数比值(%)	2.74	3.04	2.99	2.92	
	59122 (1%)	59122 转化体	84.63	101.63	96.93	94.40	0.96
		<i>zSSIb</i> 内标准基因	9480.67	9987.07	9916.60	9794.78	
		59122/ <i>zSSIb</i> 拷贝数比值(%)	0.89	1.02	0.98	0.96	

表 268 重复性和重现性统计分析

	测试样品预期值 (%)	
	3	1
返回数据实验室数	3	3
每个实验室平行样品个数	3	3
离群值数	0	0

平均值	2.99	1.02
重复性标准差 $s_r$	0.11	0.06
重复性相对标准差 $RSD_r$	3.65	6.04
再现性标准差 $s_R$	0.11	0.07
再现性相对标准差 $RSD_R$	3.65	7.09
偏倚 $bias$	-0.007	0.023
相对偏倚 $bias_r$ (%)	-0.22	2.33

## 27. MON87460/*zSSIb* 二重数字 PCR 方法联合验证结果分析

## 28. MON89034/*zSSIb* 二重数字 PCR 方法联合验证结果分析

## 29. MON88017/*zSSIb* 二重数字 PCR 方法联合验证结果分析

验证工作由方法研制单位江苏省农业科学院组织实施，选择 3 家已通过“双认证”的转基因生物安全检测机构对方法进行循环验证，分别为：农业农村部农产品及加工品质量检验检测中心（长春）、农业农村部植物生态环境安全检验检测中心（上海）和农业农村部农产品质量安全检验检测中心（呼和浩特）。循环验证数据见表 265，数据分析见表 266。

计算得到 2 个盲样 MON88017/*zSSIb* 拷贝数比值的平均值，统计测量结果的相对标准差 ( $RSD$ ) 和相对偏倚 ( $Bias$ )。结果显示，测量平均值均接近预期含量，与预期值的相对偏倚在 $\pm 25\%$ 的可接受范围内；相对标准偏差  $RSD$  均小于 25% (表 267)。已建立的 MON88017/*zSSIb*

双重 ddPCR 实现了对样品中 MON88017 转化体含量的准确定量，具有良好的重复性和重现性。

表 269 循环验证数据

测试机构	测试样品	检测靶标	重复				转基因含量 (%)
			1	2	3	均值	
农业农村部农产品及加工品质量检验测试中心 (长春)	MON88017 (3%)	MON88017 转化体	320.5	310	353	327.8	3.12
		<i>zSSIb</i> 内标准基因	10765	10245	11605	10871.7	
		MON88017/ <i>zSSIb</i> 拷贝数比值 (%)	2.98	3.03	3.04	3.02	
	MON88017 (1%)	MON88017 转化体	118.5	119.5	113	117	1.03
		<i>zSSIb</i> 内标准基因	11555	11300	11470	11441.7	
		MON88017/ <i>zSSIb</i> 拷贝数比值 (%)	1.03	1.06	0.99	1.03	
农业农村部植物生态环境安全检验测试中心 (上海)	MON88017 (3%)	MON88017 转化体	303	310	310	307.67	2.81
		<i>zSSIb</i> 内标准基因	11120	11020	10670	10936.67	
		MON88017/ <i>zSSIb</i> 拷贝数比值 (%)	2.72	2.81	2.91	2.81	
	MON88017 (1%)	MON88017 转化体	108	108	117	111.00	1.05
		<i>zSSIb</i> 内标准基因	10030	10910	10680	10540.00	
		MON88017/ <i>zSSIb</i> 拷贝数比值 (%)	1.08	0.99	1.10	1.05	
农业农村部农产品质量安全检验测试中心 (呼和浩特)	MON88017 (3%)	MON88017 转化体	366.2	370.6	368.6	368.5	3.03
		<i>zSSIb</i> 内标准基因	12172.5	12160.1	12133.2	12155.3	
		MON88017/ <i>zSSIb</i> 拷贝数比值 (%)	3.01	3.05	3.04	3.03	
	MON88017 (1%)	MON88017 转化体	121.4	124.1	114.5	120.0	1.00
		<i>zSSIb</i> 内标准基因	11891.6	12410.6	11529.6	11943.9	
		MON88017/ <i>zSSIb</i> 拷贝数比值 (%)	1.02	1.00	0.99	1.00	

表 270 循环验证结果分析

验证机构	PCR 平行	盲样	
		SG1 (3%)	SG2 (1%)
实验室 1	1	2.98%	1.03%
	2	3.03%	1.06%
	3	3.04%	0.99%
实验室 2	1	2.72%	1.08%
	2	2.81%	0.99%
	3	2.91%	1.10%
实验室 3	1	3.01%	1.02%
	2	3.05%	1.00%
	3	3.04%	0.99%

表 271 重复性和重现性统计分析

	测试样品预期值 (%)	
	3	1
返回数据实验室数	3	3
每个实验室平行样品个数	3	3
离群值数	0	0
平均值	2.95	1.03
重复性标准差 $s_r$	0.06	0.04
重复性相对标准差 $RSD_r$	2.00	3.93
再现性标准差 $s_R$	0.13	0.04
再现性相对标准差 $RSD_R$	4.46	4.13
偏倚 bias	-0.046	0.029
相对偏倚 $bias_r$ (%)	-1.52	2.89

### 30. 3272/zSSIIb 二重数字 PCR 方法联合验证结果分析

验证工作由方法研制单位农业农村部农作物生态环境安全检验检测中心（上海）组织实施，选择 3 家已通过“双认证”的转基因生物安全检测机构对方法进行循环验证，分别为：农业农村部农产品及加工

品质量检验测试中心（长春）、农业农村部植物生态环境安全检验测试中心（上海）和农业农村部农产品质量安全检验测试中心（呼和浩特）。循环验证数据见表 268。

计算得到 2 个盲样 3272/zSSIIb 拷贝数比值的平均值，统计测量结果的相对标准差（RSD）和相对偏倚（Bias）。结果显示，测量平均值均接近预期含量，与预期值的相对偏倚在±25%的可接受范围内；相对标准偏差 RSD 均小于 25%(表 269)。已建立的 3272/zSSIIb 双重 ddPCR 实现了对样品中 3272 转化体含量的准确定量，具有良好的重复性和重现性。

表 272 循环验证结果

验证机构	PCR 平行	盲样	
		SG1 (3%)	SG2 (1%)
实验室 1	1	3.28	1.18
	2	3.24	1.09
	3	2.86	1.07
实验室 2	1	3.07	0.98
	2	2.96	1.01
	3	3.15	1.07
实验室 3	1	3.06	1.02
	2	3.10	1.02
	3	3.03	1.02

表 273 循环验证结果统计分析

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

离群值数	0	0
平均值	3.08	1.05
重复性标准差 $s_r$	0.15	0.04
重复性相对标准差 $RSD_r$	4.74	4.09
再现性标准差 $s_R$	0.15	0.06
再现性相对标准差 $RSD_R$	4.74	6.12
偏倚 $bias$	0.083	0.051
相对偏倚 $bias_r$ (%)	2.78	5.11

### 31. 5307/zSSIIb 二重数字 PCR 方法联合验证结果分析

验证工作由方法确认单位吉林省农业科学院（中国农业科技东北创新中心）组织实施，选择 3 家已通过“双认证”的转基因生物安全检测机构对方法进行循环验证，分别为：农业农村部农产品及加工产品质量检验检测中心（天津）、农业农村部植物生态环境安全检验检测中心（上海）和农业农村部植物生态环境安全检验检测中心（武汉）。循环验证数据见表 270，数据分析见表 271。

计算得到 2 个盲样 5307/zSSIIb 拷贝数比值的平均值，统计测量结果的相对标准差（RSD）和相对偏倚（Bias）。结果显示，测量平均值均接近预期含量，与预期值的相对偏倚在±25%的可接受范围内；相对标准偏差 RSD 均小于 25%（表 271）。已建立的 5307/zSSIIb 双重 ddPCR 实现了对样品中 5307 转化体含量的准确定量，具有良好的重复性和重现性。

表 274 循环验证结果

验证机构	PCR 平行	盲样	
		SG1 (3%)	SG2 (1%)

实验室 1	1	2.67	0.88
	2	2.56	0.84
	3	2.60	0.91
实验室 2	1	2.61	0.92
	2	2.58	0.89
	3	2.58	0.93
实验室 3	1	2.51	0.87
	2	2.55	0.79
	3	2.52	0.87

表 275 循环验证结果统计分析

	测试样品预期值 (%)	
	3	1
返回数据实验室数	3	3
每个实验室平行样品个数	3	3
离群值数	0	0
平均值	2.58	0.88
重复性标准差 $s_r$	0.04	0.04
重复性相对标准差 $RSD_r$	1.39	4.05
再现性标准差 $s_R$	0.05	0.05
再现性相对标准差 $RSD_R$	2.03	5.18
偏倚 bias	-0.424	-0.122
相对偏倚 $bias_r$ (%)	-14.15	-12.22

### 32. DAS-40278-9/zSSIIb 二重数字 PCR 方法联合验证结果分析

验证工作由方法研制单位中国水稻研究所组织实施，选择 3 家已通过“双认证”的转基因生物安全检测机构对方法进行循环验证，分别为：农业农村部农产品及加工品质量检验检测中心（长春）、农业农村部植

物生态环境安全检验检测中心（武汉）、农业农村部植物生态环境安全检验检测中心（上海）。循环验证数据见表 272。

计算得到 2 个盲样 DAS40278-9/zSSIIb 拷贝数比值的平均值，统计测量结果的相对标准差（*RSD*）和相对偏倚（*Bias*）。结果显示，测量平均值均接近预期含量，与预期值的相对偏倚在±25%的可接受范围内；相对标准偏差 *RSD* 均小于 25%（表 273）。已建立的 DAS40278-9/zSSIIb 双重 ddPCR 实现了对样品中 DAS40278-9 转化体含量的准确定量，具有良好的重复性和重现性。

表 276 循环验证结果

验证机构	PCR 平行	盲样	
		SG1 (3%)	SG2 (1%)
实验室 1	1	3.53	1.01
	2	2.85	1.05
	3	3.27	1.30
实验室 2	1	3.23	1.19
	2	2.85	1.13
	3	3.17	1.20
实验室 3	1	2.94	1.20
	2	3.09	1.33
	3	3.03	1.30

表 277 实验室联合验证数据的汇总分析结果

	测试样品预期值 (%)	
	3	1
返回数据实验室数	3	3
每个实验室平行样品个数	3	3
离群值数	0	0
平均值	3.11	1.19
重复性标准差 $s_r$	0.23	0.10

重复性相对标准差 $RSD_r$	7.55	8.51
再现性标准差 $s_R$	0.23	0.11
再现性相对标准差 $RSD_R$	7.55	9.65
偏倚 $bias$	0.107	0.190
相对偏倚 $bias_r$ (%)	3.56	19.00

### 33. DP4114/zSSIIb 二重数字 PCR 方法联合验证结果分析

验证工作由方法研制单位华南农业大学组织实施，选择 3 家已通过“双认证”的转基因生物安全检测机构对方法进行循环验证，分别为：农业农村部农产品及加工品质量检验测试中心（长春）、农业农村部植物生态环境安全检验测试中心（上海）和农业农村部植物生态环境安全检验测试中心（武汉）。循环验证数据见表 274。

计算得到 2 个盲样 DP4114/zSSIIb 拷贝数比值的平均值，统计测量结果的相对标准差 ( $RSD$ ) 和相对偏倚 ( $Bias$ )。结果显示，测量平均值均接近预期含量，与预期值的相对偏倚在 $\pm 25\%$ 的可接受范围内；相对标准偏差  $RSD$  均小于 25%(表 275)。已建立的 DP4114/zSSIIb 双重 ddPCR 实现了对样品中 DP4114 转化体含量的准确定量，具有良好的重复性和重现性。

表 278 循环验证结果分析

验证机构	PCR 平行	盲样	
		SG1 (3%)	SG2 (1%)
实验室 1	1	3.13	1.03
	2	3.08	1.09
	3	3.16	0.99
实验室 2	1	2.90	1.02
	2	3.07	0.96

	3	3.13	1.01
实验室 3	1	3.08	0.92
	2	2.87	0.96
	3	3.01	0.98

表 279 实验室联合验证数据的汇总分析结果

	测试样品预期值 (%)	
	3	1
返回数据实验室数	3	3
每个实验室平行样品个数	3	3
离群值数	0	0
平均值	3.05	1.00
重复性标准差 $s_r$	0.10	0.04
重复性相对标准差 $RSD_r$	3.13	3.89
再现性标准差 $s_R$	0.10	0.05
再现性相对标准差 $RSD_R$	3.42	5.26
偏倚 bias	0.048	-0.004
相对偏倚 $bias_r$ (%)	1.59	-0.44

### 34. MON87411/*zSSIIb* 二重数字 PCR 方法联合验证结果分析

验证工作由方法研制单位农业农村部农作物生态环境安全检验检测中心（上海）组织实施，选择 3 家已通过“双认证”的转基因生物安全检测机构对方法进行循环验证，分别为：农业农村部农产品及加工产品质量检验检测中心（长春）、农业农村部植物生态环境安全检验检测中心（上海）和农业农村部农产品质量安全检验检测中心（呼和浩特）。循环验证数据见表 276，数据分析见表 277。

计算得到 2 个盲样 MON87411/zSSIIb 拷贝数比值的平均值，统计测量结果的相对标准差 (RSD) 和相对偏倚 (Bias)。结果显示，测量平均值均接近预期含量，与预期值的相对偏倚在±25%的可接受范围内；相对标准偏差 RSD 均小于 25%(表 277)。已建立的 MON87411/zSSIIb 双重 ddPCR 实现了对样品中 MON87411 转化体含量的准确定量，具有良好的重复性和重现性。

表 280 循环验证结果

验证机构	PCR 平行	盲样	
		SG1 (3%)	SG2 (1%)
实验室 1	1	3.11	1.05
	2	3.08	1.19
	3	3.24	1.17
实验室 2	1	3.00	0.95
	2	3.09	0.99
	3	3.13	1.10
实验室 3	1	3.09	1.03
	2	3.09	1.02
	3	2.99	1.05

表 281 循环验证结果统计分析

	测试样品预期值 (%)	
	3	1
返回数据实验室数	3	3
每个实验室平行样品个数	3	3
离群值数	0	0
平均值	3.09	1.06
重复性标准差 $s_r$	0.07	0.06
重复性相对标准差 $RSD_r$	2.29	5.96
再现性标准差 $s_R$	0.07	0.08

再现性相对标准差 RSD <sub>R</sub>	2.39	7.91
偏倚 bias	0.091	0.061
相对偏倚 bias <sub>r</sub> (%)	3.04	6.11

### 35. MZIR098/zSSIIb 二重数字 PCR 方法联合验证结果分析

验证工作由方法研制单位农业农村部环境保护科研监测所组织实施，选择 3 家已通过“双认证”的转基因生物安全检测机构对方法进行循环验证，分别为：农业农村部农产品及加工品质量检验测试中心（长春）、农业农村部植物生态环境安全检验测试中心（上海）和农业农村部植物生态环境安全检验测试中心（武汉）。循环验证数据见表 278，数据分析见表 279。

计算得到 2 个盲样 MZIR098/zSSIIb 拷贝数比值的平均值，统计测量结果的相对标准差（RSD）和相对偏倚（Bias）。结果显示，测量平均值均接近预期含量，与预期值的相对偏倚在±25%的可接受范围内；相对标准偏差 RSD 均小于 25%（表 279）。已建立的 MZIR098/zSSIIb 双重 ddPCR 实现了对样品中 MZIR098 转化体含量的准确定量，具有良好的重复性和重现性。

表 282 循环验证结果汇总

验证机构	PCR 平行	盲样	
		Sg1 (3%)	Sg2 (1%)
农业农村部农产品及加工品质量检验测试中心 (长春)	1	3.11	0.95
	2	2.92	0.99
	3	3.08	1.01
农业农村部植物生态环境安全检验测试中心(上	1	3.22	1.18
	2	3.02	1.12

海)	3	3.21	1.15
农业农村部植物生态环	1	3.00	1.05
境安全检验检测中心(武	2	3.10	0.93
汉)	3	3.27	1.06

表 283 实验室联合验证数据的汇总分析结果

	测试样品预期值 (%)	
	3	1
返回数据实验室数	3	3
每个实验室平行样品个数	3	3
离群值数	0	0
平均值	3.10	1.05
重复性标准差 $s_r$	0.12	0.05
重复性相对标准差 $RSD_r$	3.80	4.63
再现性标准差 $s_R$	0.12	0.10
再现性相对标准差 $RSD_R$	3.80	9.27
偏倚 $bias$	0.103	0.049
相对偏倚 $bias_r$ (%)	3.44	4.89

### 36. DP202216/zSSIIb 二重数字 PCR 方法联合验证结果分析

验证工作由方法研制单位华南农业大学组织实施，选择 3 家已通过“双认证”的转基因生物安全检测机构对方法进行循环验证，分别为：农业农村部农产品及加工品质量检验检测中心（长春）、农业农村部植物生态环境安全检验检测中心（上海）和农业农村部植物生态环境安全检验检测中心（武汉）。循环验证数据见表 280，数据分析见表 281。

计算得到 2 个盲样 DP202216/zSSIIb 拷贝数比值的平均值，统计测量结果的相对标准差 ( $RSD$ ) 和相对偏倚 ( $Bias$ )。结果显示，测量平均值均接近预期含量，与预期值的相对偏倚在  $\pm 25\%$  的可接受范围内；

相对标准偏差  $RSD$  均小于 25% (表 280)。已建立的 DP202216/zSSIIb 双重 ddPCR 实现了对样品中 DP202216 转化体含量的准确定量, 具有良好的重复性和重现性。

表 284 循环验证结果分析

验证机构	PCR 平行	盲样	
		SG1 (3%)	SG2 (1%)
实验室 1	1	3.05	0.92
	2	3.11	0.91
	3	3.05	0.92
实验室 2	1	2.93	0.94
	2	3.19	0.98
	3	3.14	0.99
实验室 3	1	3.32	1.07
	2	3.43	1.11
	3	3.50	1.09
平均值		3.19	0.99

表 285 重复性和重现性统计分析

	测试样品预期值 (%)	
	3	1
返回数据实验室数	3	3
每个实验室平行样品个数	3	3
离群值数	0	0
平均值	3.19	0.99
重复性标准差 $s_r$	0.10	0.02
重复性相对标准差 $RSD_r$	3.05	1.96
再现性标准差 $s_R$	0.21	0.09
再现性相对标准差 $RSD_R$	6.61	9.09
偏倚 bias	0.191	-0.008
相对偏倚 $bias_r$ (%)	6.37	-0.78

### 37. NK603/zSSIIb 二重数字 PCR 方法联合验证结果分析

制备转基因含量（拷贝数比值）分别为 5%和 3%的样品，请 8 家实验室对样品转基因含量进行联合定量，8 家实验室的定量结果如表 282 所示。

表 286 多家实验室联合定量数据

样品	实验室	1	2	3	4	5	6	7	8	平均值	SD
3%	1	2.80	2.73	2.61	2.75	2.75	2.65	2.93	2.66	2.74	0.10
	2	2.71	2.73	2.62	2.79	2.87	2.77	2.80	2.81	2.76	0.08
	3	2.79	2.71	2.78	2.87	2.79	2.77	2.55	2.94	2.77	0.12
	4	2.79	2.77	2.71	2.81	2.85	2.87	2.76	2.77	2.79	0.05
	5	2.60	2.66	2.85	2.71	2.79	2.72	2.81	2.63	2.72	0.09
	6	2.66	2.60	2.82	2.64	2.78	2.90	2.71	2.69	2.73	0.10
	7	2.66	2.64	2.64	2.89	2.89	2.83	2.87	2.72	2.77	0.12
	8	2.65	2.67	2.72	2.74	2.65	2.68	2.73	2.71	2.69	0.04
5%	1	4.89	4.57	4.55	4.66	4.75	4.68	4.72	4.58	4.68	0.11
	2	4.84	4.69	4.62	4.75	4.74	4.73	4.84	4.89	4.76	0.09
	3	4.52	4.55	4.67	4.72	4.64	4.67	4.61	4.49	4.61	0.08
	4	4.84	4.74	4.82	4.70	4.75	4.72	4.67	4.72	4.74	0.06
	5	4.65	4.74	4.73	4.74	4.72	4.69	4.55	4.79	4.70	0.07
	6	4.64	4.63	4.74	4.76	4.75	4.64	4.72	4.64	4.69	0.06
	7	4.57	4.53	4.62	4.44	4.53	4.58	4.75	4.68	4.59	0.10
	8	4.70	4.57	4.81	4.62	4.57	4.63	4.62	4.67	4.65	0.08

根据标准 GB/T6379.2-2004 或 ISO5725-2:1994，对定量数据进行进行分析，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，无异常值和歧离值，8 家实验室的数据均为有效数据。对有效检测数据进行统计，分析方法的重复性和再现性。两个样品的重复性相对标准差分别为 3.26%和 1.77%，再现性相对标准差分别

为 3.27%和 2.11%，均小于允许的 25%；相对偏倚分别为-8.45%和-6.45%，其绝对值均小于 25%（表 283）。联合定值结果表明，本方法能够准确定量盲样中 NK603 转化体的含量，定量结果具有良好的准确性。

表 287 实验室联合验证数据的汇总分析结果

	测试样品预期值 (%)	
	3	5
返回数据实验室数	8	8
每个实验室平行样品个数	8	8
离群值数	0	0
平均值	2.75	4.68
重复性标准差 $s_r$	0.09	0.08
重复性相对标准差 $RSD_r$	3.26	1.77
再现性标准差 $s_R$	0.09	0.10
再现性相对标准差 $RSD_R$	3.27	2.11
偏倚 bias	-0.254	-0.32
相对偏倚 $bias_r$ (%)	-8.45	-6.45

### 38. T25/zSSIIb 二重数字 PCR 方法联合验证结果分析

验证工作由方法研制单位中国农业科学院油料作物研究所组织实施，选择3家已通过“双认证”的转基因生物安全检测机构对方法进行循环验证，分别为：农业农村部农作物生态环境安全检验检测中心（上海）、农业农村部农产品及加工品检验检测中心（南京）和农业农村部农产品质量安全检验检测中心（呼和浩特）。循环验证数据统计见表 284。

计算得到 2 个盲样 T25/zSSIIb 拷贝数比值的平均值，统计测量结果的相对标准差（RSD）和相对偏倚（Bias）。结果显示，测量平均值均接近预期含量，与预期值的相对偏倚在±25%的可接受范围内；相对标准

偏差 RSD 均小于 25% (表 285)。已建立的 T25/zSSIIb 双重 ddPCR 实现了对样品中 T25 转化体含量的准确定量,具有良好的重复性和重现性。

表 288 循环验证结果统计

验证机构	PCR 平行	盲样	
		SG1 (3%)	SG2 (1%)
实验室 1	1	2.95	0.84
	2	2.89	0.89
	3	3.12	0.88
实验室 2	1	3.01	1.00
	2	3.03	0.97
	3	3.02	0.96
实验室 3	1	2.92	0.97
	2	2.86	0.99
	3	2.96	0.96

表 289 循环验证结果统计分析

	测试样品预期值 (%)	
	3	1
返回数据实验室数	3	3
每个实验室平行样品个数	3	3
离群值数	0	0
平均值	2.97	0.94
重复性标准差 $s_r$	0.07	0.02
重复性相对标准差 $RSD_r$	2.52	2.27
再现性标准差 $s_R$	0.08	0.06
再现性相对标准差 $RSD_R$	2.76	6.71
偏倚 bias	-0.027	-0.060
相对偏倚 $bias_r$ (%)	-0.89	-6.00

### 39. MIR604/Adh1 二重数字 PCR 方法联合验证结果分析

验证工作由方法研制单位中国农业科学院油料作物研究所组织实施，选择 3 家已通过“双认证”的转基因生物安全检测机构对方法进行循环验证，分别为：农业农村部植物生态环境安全检验测试中心（上海）、农业农村部农产品及加工品检验测试中心（南京）和农业农村部农产品及加工品质量检验测试中心（长春）。循环验证数据统计见表 286。

计算得到 2 个盲样 MIR604/zSSIIb 拷贝数比值的平均值，统计测量结果的相对标准差（RSD）和相对偏倚（Bias）。结果显示，测量平均值均接近预期含量，与预期值的相对偏倚在±25%的可接受范围内；相对标准偏差 RSD 均小于 25%（表 287）。已建立的 MIR604/zSSIIb 双重 ddPCR 实现了对样品中 MIR604 转化体含量的准确定量，具有良好的重复性和重现性。

表 290 循环验证结果

验证机构	PCR 平行	盲样	
		SG1 (3%)	SG2 (1%)
实验室 1	1	3.02	1.01
	2	2.95	0.86
	3	2.95	0.81
实验室 2	1	3.07	1.04
	2	3.21	1.12
	3	3.12	1.14
实验室 3	1	3.04	1.02
	2	3.07	1.07
	3	3.08	1.01

表 291 循环验证结果统计分析

	测试样品预期值 (%)	
		3

返回数据实验室数	3	3
每个实验室平行样品个数	3	3
离群值数	0	0
平均值	3.06	1.01
重复性标准差 sr	0.05	0.07
重复性相对标准差 RSDr	1.59	6.93
再现性标准差 sR	0.09	0.12
再现性相对标准差 RSDR	2.93	11.89
偏倚 bias	0.057	0.009
相对偏倚 biasr (%)	1.89	0.89

#### 40. MON87427/*zSSIIB* 二重数字 PCR 方法联合验证结果分析

制备转基因含量（拷贝数比值）分别为 5%和 3%的样品，请 8 家实验室对样品转基因含量进行联合定量，8 家实验室的定量结果如表 288 所示。

表 292 多家实验室联合定量数据

样品	实验室	1	2	3	4	5	6	7	8	平均值	SD
3%	1	2.85	3.02	2.97	2.81	3.01	3.05	2.80	3.02	2.94	0.10
	2	2.58	2.68	2.70	2.68	2.65	2.73	2.65	2.67	2.67	0.04
	3	2.99	2.88	3.13	3.03	2.99	3.03	3.00	2.96	3.00	0.07
	4	3.09	3.05	3.00	2.99	2.88	2.94	3.02	2.97	2.99	0.07
	5	2.66	2.80	2.57	2.95	2.58	2.78	2.85	2.67	2.73	0.13
	6	3.16	3.14	3.07	3.23	3.09	3.24	3.17	3.07	3.14	0.07
	7	2.74	2.74	2.76	2.76	2.81	2.75	2.79	2.85	2.77	0.04
	8	3.31	3.17	3.19	3.24	2.90	3.10	3.20	3.04	3.14	0.13
5%	1	4.49	5.03	4.40	4.48	4.71	4.48	4.42	4.71	4.59	0.21
	2	4.39	4.49	4.55	4.20	4.31	4.61	4.35	4.65	4.44	0.16
	3	4.95	4.91	4.84	4.90	5.00	4.75	4.74	4.88	4.87	0.09
	4	5.22	5.15	5.14	4.80	5.07	5.11	5.01	5.27	5.10	0.14
	5	4.96	4.92	5.25	4.88	4.85	5.08	5.02	4.88	4.98	0.13

6	4.99	5.32	5.44	5.07	5.13	5.21	5.47	5.44	5.26	0.19
7	4.92	4.62	4.47	4.38	4.46	4.52	4.63	4.66	4.58	0.17
8	5.34	5.38	5.19	5.40	5.01	5.33	5.37	5.36	5.30	0.13

根据标准 GB/T6379.2-2004 或 ISO5725-2:1994，对定量数据进行进行分析，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，无异常值和歧离值，8家实验室的数据均为有效数据。对有效检测数据进行统计，分析方法的重复性和再现性。两个样品的重复性相对标准差分别为 3.02%和 3.22%，再现性相对标准差分别为 6.85%和 7.28%，均小于允许的 25%；相对偏倚分别为-2.50%和-2.20%，其绝对值均小于 25%（表 289）。联合定值结果表明，本方法能够准确定量盲样中 NK603 转化体的含量，定量结果具有良好的准确性。

表 293 实验室联合验证数据的汇总分析结果

	测试样品预期值 (%)	
	3	5
返回数据实验室数	8	8
每个实验室平行样品个数	8	8
离群值数	0	0
平均值	2.93	4.89
重复性标准差 $s_r$	0.09	0.16
重复性相对标准差 $RSD_r$	3.02	3.22
再现性标准差 $s_R$	0.20	0.36
再现性相对标准差 $RSD_R$	6.85	7.28
偏倚 bias	-0.075	-0.11
相对偏倚 $bias_r$ (%)	-2.50	-2.20

#### 4.标准文本方法验证结论

对 40 个转化体二重数字 PCR 方法的验证结果表明，用本项目研发/确认的二重数字 PCR 方法对盲样进行定量检测，检测数据具有良好重复性和重现性，能够准确定量玉米样品中各转化体的含量，符合相关标准的要求，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“8.2.1. 阳性定量质控品检测数据合格判定”执行。

#### （二）预期的经济效益、社会效益和生态效益

转基因检测标准是生物育种产业化、转基因品种知识产权保护以及转基因生物安全监管的重要技术支撑。农业农村部科技发展中心前期组织制定并发布的转基因大豆、玉米、水稻、油菜、小麦等植物及其产品检测标准，已为国家新品种生产性试验、主要农作物种子销售市场监管、加工产品监测检测提供了可靠的技术依据。在此基础上，本项目拟研制玉米转化体特异性数字 PCR 定量检测方法标准，涵盖我国已批准生产应用和进口用作加工原料的主要玉米转化体。本标准将为转基因玉米产品的精准定量检测提供统一、规范的技术依据，直接降低因检测方法不一

致带来的重复检测和争议成本。通过支撑转基因产品定量标识制度的修订与实施，本标准可对意外混杂转基因成分的农产品设定豁免阈值，避免对合规低含量产品的不必要处置，显著降低企业的标识合规成本和市场监管成本。此外，基于标准方法开发的商业化检测试剂盒及配套检测服务，将为全国各级检测机构创造可观的经济收益，推动检测技术服务市场的规范化发展。标准的实施还有助于保障农产品的正常国际贸易，减少因检测标准差异引发的贸易摩擦，维护我国农产品进出口企业的经济利益；为农业行政主管部门对生物技术产品实施有效监管、及时处置意外扩散事件提供关键技术支撑，有力保护消费者的知情权和选择权——定量标识制度结合精准检测方法，使消费者能够清晰知晓产品中转基因成分的实际含量。同时，标准方法可有效识别和遏制非法转基因品种的种植与流通，避免非法生产对合法市场造成的严重经济损失；护航生物育种产业健康发展，进而产生巨大的经济社会效益。

#### 四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况

本标准遵循我国已发布的“转基因植物及其产品成分检测数字 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，如二重数字 PCR 方法的特异性、检出限、定量限、准确性等，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

### （一）以国际标准为基础的起草情况

截至目前，欧盟等国外官方机构尚未正式发布任何用于转基因检测的二重数字 PCR 方法标准。在转基因检测标准化领域，当前具有代表性的国际规范性文件主要包括以下两类：

一是欧盟转基因检测实验室网络（ENGL）联合欧盟转基因食品饲料参考实验室（EURL GMFF）于 2023 年发布的《转基因检测分析方法最低性能要求补充文件》（**Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing part 2**，简称 MPR 2）。该文件在 2015 年版（主要针对实时荧光定量 PCR）基础上进行了扩展，首次系统规定了数字 PCR 方法在转基因检测中的应用应满足的性能参数和验证要求，涵盖特异性、灵敏度、定量限、线性范围、稳健性等关键指标。这是目前国际上关于转基因数字 PCR 检测方法最权威的指导性技术文件，但值得注意的是，该文件属于“性能要求指南”，而非具体的“检测方法标准”，其定位是为各实验室开发和验证数字 PCR 方法提供统一的技术框架和评价依据，而非规定某一特定转化体的具体检测操作规程。

二是德国《食品与饲料法典》（LFGB）第 64 条工作组于 2023 年制定的《转基因分析中数字 PCR 方法验证指南》（**Guideline for the Verification of Digital PCR Methods in Analytical GMO Testing**）。该指南为实验室将已获验证的实时荧光定量 PCR 方法转换为数字 PCR 方法提

供了具体的操作建议和验证流程，同样属于技术指南性质，而非正式的检测方法标准。

此外，在国际标准化组织（ISO）层面，目前发布的转基因检测相关标准仍以实时荧光定量 PCR 方法为主。例如，ISO/TS 21569-6:2026《分子生物标记物分析水平方法——转基因生物及衍生品检测分析方法——第 6 部分：基于实时荧光 PCR 的 cry1Ab/Ac 和 Pubi-cry DNA 序列筛选检测方法》即为 2026 年 1 月最新发布的技术规范，但仍采用实时荧光 PCR 技术平台，而非数字 PCR。

## （二）合规引用或采用国际国外标准情况

本项目在研制玉米转化体特异性二重数字 PCR 定量检测方法标准过程中，合规引用以下国际技术文件：

ENGL/EURL GMFF 发布的 MPR 2 文件（《转基因检测分析方法最低性能要求补充文件——数字 PCR 部分》）：作为方法性能参数设置、验证方案设计和结果评价的核心技术依据。该文件明确了数字 PCR 方法的特异性需通过评估阳性微滴与阴性微滴的聚类分离程度来判断；线性范围的定义和接受标准需根据数字 PCR 不同于实时荧光定量 PCR 的技术特点进行修订；定量限需满足单次 PCR 反应中包含不少于 50 个拷贝等具体要求。

德国 LFGB 第 64 条工作组《转基因分析中数字 PCR 方法验证指南》：作为方法从实时荧光定量 PCR 向数字 PCR 转换的操作性参考。该指南规定，在将已验证的实时荧光定量 PCR 方法转换为数字 PCR 方法时，

引物和探针序列及其浓度、退火温度等核心反应条件应予保持；探针标记、PCR 循环数、反应体系体积等技术参数可根据数字 PCR 平台要求进行调整而无需额外验证；验证过程中需重点考察分辨率与“雨滴”效应、灵敏度与定量限、精密度与准确度等性能指标。

本项目根据上述国际指南的要求，针对我国批准生产应用和进口用作加工原料的玉米转化体，建立并验证二重数字 PCR 定量检测方法，确保方法的性能参数符合国际通行标准。

### （三）未采用国际标准的原因

本项目未直接采用国际标准作为方法标准文本，主要原因如下：

1. 国际社会尚无正式发布的二重数字 PCR 转基因检测方法标准。目前，EURL GMFF 官方已发布的方法验证报告中，所有方法均采用实时荧光定量 PCR 技术平台开发并验证，尚未有数字 PCR 格式的方法通过官方验证并作为欧盟官方检测方法发布。尽管 ENGL 已于 2023 年发布了数字 PCR 的性能要求指南，但该指南属于“方法性能要求”而非“具体检测方法标准”，并未规定特定转化体的引物探针序列、反应体系和扩增程序等具体操作参数。

2. 现有国际方法均为单一 PCR 格式，无法满足二重检测需求。欧盟官方发布的转基因事件特异性检测方法均为单重实时荧光定量 PCR 方法，即外源基因和内标基因分别在不同的反应管中检测。这种方法在实际应用中存在耗时长、试剂消耗量大、样品用量多等局限。而本项目

拟建立的二重数字 PCR 方法将外源基因和内标基因置于同一反应体系中进行检测，在检测效率、经济性和样品适用性方面具有明显优势。

3. 国内转化体具有特异性，需建立适配我国监管需求的标准方法。欧盟等国际标准主要覆盖在欧盟申请上市的转基因转化体，而我国批准生产应用和进口用作加工原料的玉米转化体共有 40 余个，其中部分转化体（如国产自主研发的 DBN9936、瑞丰 125 等）未在欧盟等地区申请上市，因此缺乏相应的国际标准方法。为满足我国定量标识制度实施和产业化安全监管的需求，必须针对我国转化体清单建立专属的数字 PCR 检测方法标准。

4. 技术路线存在差异，二重数字 PCR 方法需额外验证。根据德国 LFGB 指南的建议，当实验室将已验证的单重实时荧光定量 PCR 方法转换为二重数字 PCR 格式时，由于反应条件发生了实质性变化（两套引物探针共存于同一体系），需要开展额外的验证工作以证明二重体系与原始单重体系在性能上的等效性。这也是本项目不同于简单采用国际标准的重要原因。

综上所述，本项目在遵循国际认可的性能要求和技术指南（如 MPR 2）的前提下，结合我国玉米转化体检测的实际需求，自主研发并验证二重数字 PCR 检测方法，形成具有自主技术内容的标准草案。该方法在性能参数上将与国际通行标准接轨，在技术内容和转化体覆盖范围上则体现我国监管需求和标准特色。

## 六、与现行标准、法律法规和强制性标准的关系

本标准研制工作紧密围绕我国转基因生物安全管理的法律法规体系展开，与现行法律法规具有明确的衔接关系。《农业转基因生物安全管理条例》是我国转基因生物安全管理的最高行政法规，明确建立了农业转基因生物标识制度。该条例第八条规定，国家对农业转基因生物实行标识制度，实施标识管理的农业转基因生物目录由国务院农业行政主管部门制定。本标准作为转基因玉米转化体定量检测的技术方法标准，为条例规定的标识制度提供了具体的技术支撑，是实现“依法标识”的技术前提。当前，农业农村部已发布《关于修改农业转基因生物标识管理办法的决定（征求意见稿）》，拟将定性标识修改为定量标识（阈值管理）。本标准研制的数字 PCR 定量检测方法，为即将实施的定量标识制度提供了关键技术支撑。《食品安全法》第六十九条规定“生产经营转基因食品应当按照规定显著标示”。转基因玉米加工食品（如玉米油、玉米粉及其制品）属于转基因食品范畴，应当依法标识。本标准的实施将为转基因玉米食品中转基因成分含量的精准测定提供方法依据，保障“显著标示”规定的有效执行。《种子法》规定销售转基因植物品种种子的，必须用明显的文字标注。本标准涵盖我国批准生产应用的玉米转化体，可为转基因玉米种子的转基因成分定量检测提供技术手段，支撑种子的依法标注和市场监管。

经检索，目前我国发布的转基因检测相关标准均为推荐性国家标准（GB/T）或行业标准（农业部公告标准），尚无强制性国家标准（GB）。本标准拟按推荐性国家标准申报，不属于强制性标准范畴。本标准与已发布的推荐性标准“转基因植物产品定量检测数字 PCR 法（GB/T 38132-2019）”和“转基因植物产品数字 PCR 检测方法（GB/T 33526-2017）”相比，涵盖更多的批准进口转化体，且涵盖了我国批准产业化应用的玉米转化体，规定了定量结果不确定度评定方法，在技术内容上更完善。

本标准遵循了欧洲转基因生物实验室网络于 2023 年发布了《转基因检测分析方法最低性能要求——第 2 部分：数字 PCR》（ENGL MPR Part 2 - dPCR）和 ISO 20395:2019 《 Biotechnology — Requirements for evaluating the performance of quantification methods for nucleic acid target sequences — qPCR and dPCR》中关于数字 PCR 性能评价的要求，确保方法的国际互认性。本标准推动转基因定量检测从实时荧光定量 PCR 平台向数字 PCR 平台的升级，实现从单重检测向二重/多重检测的技术跨越。

综上所述，本标准符合我国现行法律法规要求，与现行标准体系协调配套，填补了玉米转化体二重数字 PCR 定量检测方法的标准空白，是我国转基因检测标准体系的重要组成部分。

## 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

无。

## 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，尽快发布并实施本标准。发布后，通过科学设置实施过渡期、开展系统性宣贯培训、组织能力验证与实验室比对、建立标准维护机制等措施，确保标准的有效实施与应用。本标准的实施将为我国转基因玉米定量标识制度的落地和生物育种产业化的健康发展提供可靠的技术支撑，预期产生显著的社会效益和经济效益。

## 十、其他应说明的事项

无。

## 十一、参考文献

[1] 《转基因植物及其产品成分检测 DNA 提取和纯化》（农业部 1485 号公告—4—2010）

[2] 《转基因植物及其产品成分检测 数字 PCR 方法制定指南》（农业农村部公告第 323 号-21-2020）

[3] 《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）

[4] 《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）

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

[6] ENGL-GMFF. Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing part 2

[7] 《转基因检测非标方法确认评价指南》SN/T 4561—2016

[8] 《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

[9] 《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/T6379.2-2004

[10] 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）

## 十二、本文相关附件

### （一）文本验证方案（附件 1-1）