

《转基因大豆定性鉴定 MNP 标记法》 农业行业标准编制说明（征求意见稿）

一、工作简况

（一）任务来源

根据农业农村部农产品质量安全监管司下发的《关于下达 2025 年第一批农业国家和行业标准制修订项目计划的通知》(农质标函[2025]63 号), 由江汉大学等单位承担《转基因大豆定性鉴定 MNP 标记法》行业标准(项目编号 NYB-25068)的制定工作。

（二）制定背景

第一个遗传修饰即转基因作物的商业化开发出现在 1996 年^[1], 该年转基因作物的种植面积仅为 170 万公顷。截至目前, 全球有 29 个国家批准种植转基因作物, 71 个国家和地区批准转基因产品商业化应用, 共种植 10 种不同的转基因作物, 面积高达 209.8 百万公顷, 增长 123 倍, 创造了转基因作物大规模商业化种植以来的新纪录。在转基因作物中, 大豆种植面积最大, 为 105.1 百万公顷。中国是全球最大的大豆进口国之一, 进口大豆以转基因大豆为主, 主要用于榨油和饲料加工。2024 年中国“转基因黄大豆”进口量达 10503.27 万吨, 进口金额达 527.26 亿美元。为了避免对国外大豆的过度依赖, 2020 年中央经济工作会议和 2021 年中央一号文件明确要求, 尊重科学、严格监管, 有序推进生物育种产业化应用。2023 年 12 月, 14 个转基因大豆品种通过国审。2024 年中央一号文件进一步强调“推动生物育种产业化扩面提速”。目前我国已经有 29 个转基因大豆转化体通过官方审定, 获得市场准入资格, 呈逐年增加趋势。

随着转基因大豆在我国的种植与流通, 转基因大豆的安全性也备受关注。为了保障消费者的知情权和选择权, 需要建立统一的检测标准来规范市场秩序, 防止非转基因大豆中混入转基因成分, 以及确保转基因大豆产品的标识符合规定, 维护市场的公平竞争。现有大豆转基因产品的检测标准主要基于 qPCR 方法和数字 PCR 方法制定, 一次定性筛查 1 个转化体^[2], 难以对所有已获市场准入的 29 种大豆转化体进行全面检测。尤其在批量抽检时, 全面及时检测所有转化体显得

尤为困难，亟需制定一次性鉴定我国所有审批转化体的标准，以满足生物技术产业化监管的迫切需求。

(三) 起草过程

1.起草阶段

1.1 起草单位

本文件由江汉大学、农业农村部科技发展中心、武汉明了生物技术有限公司中国农业科学院作物科学研究所四家单位共同联合起草。

表 1 主要起草人信息及任务分工

序号	姓名	工作单位	分工
1	彭 海	江汉大学	项目负责人
2	陈 红	农业农村部科技发展中心	标准测试负责人
3	陈利红	江汉大学	技术开发负责人
4	付 伟	农业农村部科技发展中心	标准测试
5	周俊飞	江汉大学	技术开发实验安排
6	陈红霖	中国农业科学院作物科学研究所	标准核对
7	方治伟	江汉大学	数据分析方法开发
8	李甜甜	江汉大学	标准方法开发资源协调
9	蒋红叶	农业农村部科技发展中心	标准测试
10	李 论	江汉大学	数据分析方法开发
11	傅芳奇	农业农村部科技发展中心	标准测试
12	陈子言	农业农村部科技发展中心	标准测试
13	高利芬	江汉大学	技术开发
14	张 静	江汉大学	标准测试
15	王刚	武汉明了生物技术有限公司	标准应用
16	张 娜	江汉大学	技术开发
17	万人静	江汉大学	品种标记筛选
18	肖华锋	江汉大学	标准应用
19	宋会银	江汉大学	技术开发
20	蔡 鹭	江汉大学	技术开发
21	肖紫兰	江汉大学	技术开发
22	张宝龙	江汉大学	技术开发
23	朱召禄	江汉大学	数据分析

1.2 前期准备

2024 年 12 月，在江汉大学和农业农村部的项目资助下，工作组通过开展文献检索，收集、整理了专利文献、期刊文献、标准和转基因检测相关数据库。利

用收集到的大豆转化体的序列、内标准基因、品种标记序列及人工序列，共设计了 150 个大豆转基因检测的 MNP 标记位点，初步建立了基于超多重 PCR、高通量测序和大数据处理技术的转基因大豆定性鉴定技术体系。该技术体系和转基因大豆的 MNP 标记数据为本标准的研制提供了技术支撑和大量数据基础，保障了标准制定的顺利完成。

1.3 技术确定

2025 年 1 月-2025 年 9 月，由江汉大学作为技术牵头单位，联合农业农村部科技发展中心、武汉明了生物科技有限公司、中国农业科学院作物科学研究所共同组建标准起草工作组。工作组制定了实施方案，重点开展了市场调研、转化体资料的收集、外部验证、数据分析与处理等工作。在实施阶段，明确了标准实验体系和验证方案，完成了 29 个大豆转化体高通量测序文库的构建和比对分析。在实验验证阶段，通过优化检测体系，最终确定标准采用 115 个 MNP 标记。

1.4 技术验证

2025 年 9 月委托上海交通大学、湖南杂交水稻研究中心、中国农业科学院生物技术研究所、中国质量检验检测科学研究院、天津市农业科学院、崖州湾分子检测鉴定中心、石家庄博瑞迪生物技术有限公司和北京通州国际种业实验室 8 家单位，对标准的可操作性和检测数据的可重现性进行了验证。8 家单位统一都采用了 6 个样品，对标准草案进行了验证。验证数据显示，按照标准草案中的方法一次多重 PCR 扩增了标准草案规定的所有转化体，转化体检出率为 100%，准确率 100%，转基因成分判定结论重现率为 100%。验证数据说明，标准草案规定的 PCR 扩增反应条件、扩增片段检测方法等具备可操作性，依据标准草案可在不同实验室间得出高度一致的转基因成分鉴定结论。

2.征求意见阶段

3.审查阶段

二、标准编制原则、主要内容及其确定依据

（一）标准编制原则

规范性原则：本标准的制定要求符合法律法规，符合有关标准要求，包括

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》、GB/T 6682《分析实验室用水规格和试验方法》、GB/T 38551《植物品种鉴定 MNP 标记法》等。

适用性原则：本标准要求尽量适用于历史和当前的大豆转基因成分的鉴定；对操作人员主观判定经验要求少，适用于所有转基因成分检验机构和企业。

统一性原则：本标准要求与现行相关标准协调统一，不发生冲突。

先进性原则：本标准采用 MNP 标记法，经过多位院士和专家鉴定评价，认为该技术填补了国内外实用精准高效植物品种 DNA 鉴定技术空白，整体达到国际领先水平；本标准采用多重 PCR 结合高通量测序技术，单个 PCR 反应同时扩增大豆转化体的 115 个 MNP 标记，扩增效率高；本标准采用高通量测序技术和计算机软件分析技术，单次可自动检测和分析数百个以上的样品和标记，检测和分析的效率高，自动化水平高；每个标记位点设定的测序数据量平均覆盖达到近 300000 条序列，每条序列精确到单个碱基，标记分型准确率达 99.80%以上；检测过程不需要标准样品实物进行平行实验，检测结果在不同实验室间高度一致，实现了实验室间的共享和共用。

(二) 标准主要内容及其确定依据

1. 转基因大豆 MNP 标记位点的筛选与引物设计的原则

本标准中 MNP 标记是指在一段核苷酸序列中，由一个或多个核苷酸变异引起的序列多态性。为了一次性检测多个转化体，我们收集了大豆 29 个转化体的转化体特异性序列及内标准基因序列，并设计了用于质控建库是否成功的外参核酸序列及对品种有区分能力的品种标记序列。根据收集的序列，筛选合适的 MNP 标记位点，并设计引物。本标准 MNP 标记的筛选与的引物设计主要采用如下原则：

(1) 内标准基因及品种标记的筛选：内标准基因的引物来源于文献^[3]，品种标记来源于国家标准 GB/T 38551-2020，实现了转基因鉴定结果与品种鉴定结果的兼容，这些标记在大豆基因组中为非重复序列区域，且标记的引物区与扩增区域在基因组上均为单拷贝；

(2) 转化体特异性标记的筛选：转化体特异性标记一般为覆盖外源载体及其插入受体基因组上的一段序列，但其它转化体标记的序列也可能作为转化体特异

性标记；

(3) 外参核酸序列标记的筛选：筛选的标记和引物均与已知的生物基因组不存在同源性，其序列不会干扰对任何待测样品检测数据的分析；

(4) 所有引物退火温度统一到 60 度；

(5) 所有扩增产物长度在 70 bp - 275 bp 之间，尽量保持在 200 bp 左右；

(6) 所有引物与引物之间，或扩增产物与扩增产物之间没有明显的二级结构；

(7) 遵守普通单引物设计原则。

2. 外参核酸在检验中使用拷贝数的确定

外参核酸三个作用：一是当待测样品 DNA 量过低时，可以作为扩增模板，确保可以获得基本的文库浓度，确保实验成功；二是可以质控高通量文库构建是否正确；三是避免模板 DNA 过低时，气溶胶污染物被过度扩增，产生假阳性。标准研制过程中制备了分别含有外参核酸拷贝数为 10000、50000 和 100000 的 3 种测试样品。按照本标准方法构建该 3 种测试样品的高通量测序文库，实验每天重复 3 次，连续重复 3 天，每种测试样品共检测了 9 次，获得了每个高通量测序文库的浓度。结果表明，外参核酸达到 50000 拷贝/标准反应时，获得的高通量测序文库浓度能稳定在 2 ng/μl 左右（图 1），可满足高通量测序的最低浓度要求。为确保实验成功率，以及待测样品在测序数据中占比高，本标准规定外参核酸用量为 50000 拷贝/反应。

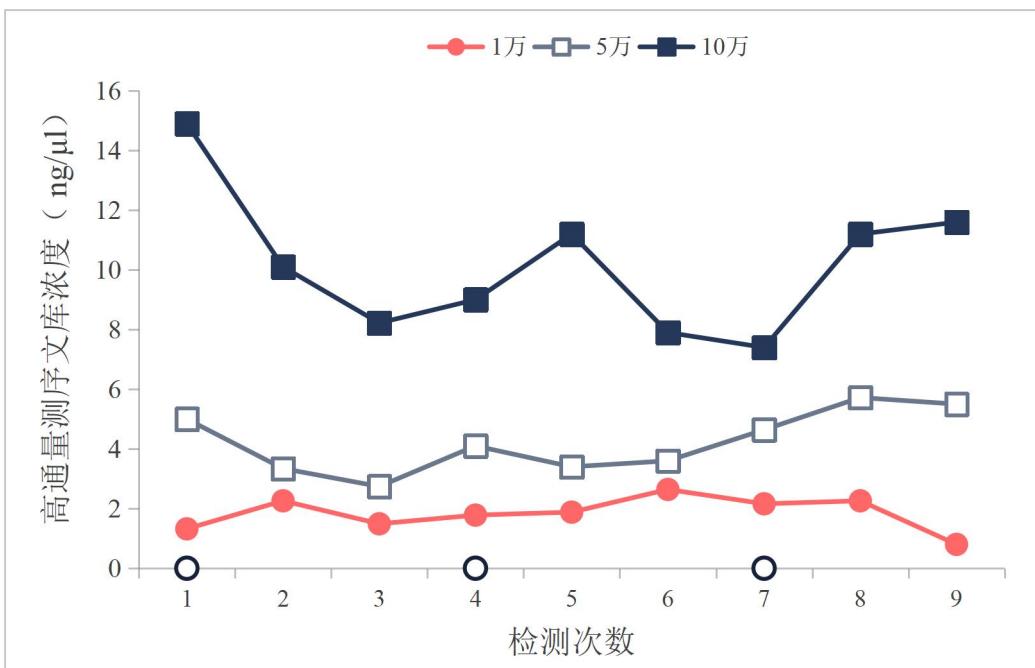


图 1 外参核酸不同拷贝数获得的高通量测序文库的浓度

3. 标准中各参数确定时所需转化体样品的制备

确定本标准的各相关参数时，需要有合适的试验材料进行测试。本标准的试验材料由农业农村部科技发展中心提供。由于标准研制中涉及到的转化体数目较多，若按照每个转化体均进行引物和检出限等实验测试，人财物将耗费较大。同时，现实中的实测样品也可能同时含有多个转体。因此，本标准将我国进口与自主研制的 29 种大豆转化体随机混合形成 3 个混样（SoyG1、SoyG2、SoyG3），每个混样含有的转化体的种类如表 1 所示，SoyG1 和 SoyG2 混样均含有 10 种转化体，SoyG3 混样含有 9 种转化体（具体见表 2）。

表 2 大豆 29 个转化体的随机制备的 3 个混样所含有的转化体种类

混样	含有的转化体	含有的转化体数目
SoyG1	MON87769、GTS40-3-2、MON89788、MON87705、356043、305423、CV127、MON87708、MON87701、FG72	10
SoyG2	A2704-12、A5547-127、DAS-68416-4、DAS-81419-2、DAS-44406-6、MON87751、SYHT0H2、CAL16、DBN9004、ZH10-6	10
SoyG3	SHZD32-1、ZUTS-33、DBN8002、WYN029GmA、WYN341GmC、DBN8205、GMB151、XP-2、IND-ØØ41Ø-5	9

首先将各个混样内的转化体按照一定的比例与非转基因大豆样品进行混合，制备成 10%，6%，4%，2%，1%与 0.5%（质量百分比）不同梯度的试样，每个梯度试样中每种转化体的含量相同。每个试样的命名规则为：Soy+转化体含量的百分比（百分号不要）+G+混样组别，如 SoyG1 混样 10%的梯度试样命名为 Soy10G1，名字中 Soy 代表大豆物种的缩写，10 代表该试样中各转化体的含量为 10%，1 代表混样的组别，即该试样含有 SoyG1 混样中的各个转化体，同理 SoyG2 混样各转化体含量为 4%的梯度试样的命名为 Soy4G2，本标准各参数测试所制备的试样如表 3 所示。10%梯度的 3 个试样 Soy10G1、Soy10G2 与 Soy10G3 用于测试引物的特异性；6%，4%，2%，1%与 0.5%的 5 个梯度试样 Soy6G1、Soy6G2、Soy6G3、Soy4G1、Soy4G2、Soy4G3、Soy2G1、Soy2G2、Soy2G3、Soy1G1、Soy1G2、Soy1G3、Soy0.5G1、Soy0.5G2、Soy0.5G3 用于检出限的初步测试；Soy1G1-y，Soy1G2-y，Soy1G3-y 试样用于检出限确定、稳健性测试与实验室间

验证。上述试样中，Soy1G1-y 和 Soy1G1 的唯一区别是：356043 转化体在 Soy1G1-y 试样中的含量是 2%，而不是 1%；Soy1G2-y 中 10 种转化体的含量也均为 1%，Soy1G2-y 和 Soy1G2 没有区别；Soy1G3-y 和 Soy1G3 的唯一区别是，IND-ØØ41Ø-5 转化体在 Soy1G1-y 试样中的含量是 2%，而不是 1%。本标准还制备了大豆阴性对照试样（阴性质控品），以用于各种测试实验。

表 3 本标准各参数设置时制备的转化体数目

试样名称	所含转化体（含量）
Soy0.5G1	MON87769（0.5%）、GTS40-3-2（0.5%）、MON89788（0.5%）、MON87705（0.5%）、356043（0.5%）、305423（0.5%）、CV127（0.5%）、MON87708（0.5%）、MON87701（0.5%）、FG72（0.5%）
Soy0.5G2	A2704-12（0.5%）、A5547-127（0.5%）、DAS-68416-4（0.5%）、DAS-81419-2（0.5%）、DAS-44406-6（0.5%）、MON87751（0.5%）、SYHT0H2（0.5%）、CAL16（0.5%）、DBN9004（0.5%）、ZH10-6（0.5%）
Soy0.5G3	SHZD32-1（0.5%）、ZUTS-33（0.5%）、DBN8002（0.5%）、WYN029GmA（0.5%）、WYN341GmC（0.5%）、DBN8205（0.5%）、GMB151（0.5%）、XP-2（0.5%）、IND-ØØ41Ø-5（0.5%）
Soy1G1	MON87769（1%）、GTS40-3-2（1%）、MON89788（1%）、MON87705（1%）、356043（1%）、305423（1%）、CV127（1%）、MON87708（1%）、MON87701（1%）、FG72（1%）
Soy1G2	A2704-12（1%）、A5547-127（1%）、DAS-68416-4（1%）、DAS-81419-2（1%）、DAS-44406-6（1%）、MON87751（1%）、SYHT0H2（1%）、CAL16（1%）、DBN9004（1%）、ZH10-6（1%）
Soy1G3	SHZD32-1（1%）、ZUTS-33（1%）、DBN8002（1%）、WYN029GmA（1%）、WYN341GmC（1%）、DBN8205（1%）、GMB151（1%）、XP-2（1%）、IND-ØØ41Ø-5（1%）
Soy2G1	MON87769（2%）、GTS40-3-2（2%）、MON89788（2%）、MON87705（2%）、356043（2%）、305423（2%）、CV127（2%）、MON87708（2%）、MON87701（2%）、FG72（2%）
Soy2G2	A2704-12（2%）、A5547-127（2%）、DAS-68416-4（2%）、DAS-81419-2（2%）、DAS-44406-6（2%）、MON87751（2%）、SYHT0H2（2%）、CAL16（2%）、DBN9004（2%）、ZH10-6（2%）
Soy2G3	SHZD32-1（2%）、ZUTS-33（2%）、DBN8002（2%）、WYN029GmA（2%）、WYN341GmC（2%）、DBN8205（2%）、GMB151（2%）、XP-2（2%）、IND-ØØ41Ø-5（2%）
Soy4G1	MON87769（4%）、GTS40-3-2（4%）、MON89788（4%）、MON87705（4%）、356043（4%）、305423（4%）、CV127（4%）、MON87708（4%）、MON87701（4%）、FG72（4%）

试样名称	所含转化体（含量）
Soy4G2	A2704-12（4%）、A5547-127（4%）、DAS-68416-4（4%）、DAS-81419-2（4%）、DAS-44406-6（4%）、MON87751（4%）、SYHT0H2（4%）、CAL16（4%）、DBN9004（4%）、ZH10-6（4%）
Soy4G3	SHZD32-1（4%）、ZUTS-33（4%）、DBN8002（4%）、WYN029GmA（4%）、WYN341GmC（4%）、DBN8205（4%）、GMB151（4%）、XP-2（4%）、IND-ØØ41Ø-5（4%）
Soy6G1	MON87769（6%）、GTS40-3-2（6%）、MON89788（6%）、MON87705（6%）、356043（6%）、305423（6%）、CV127（6%）、MON87708（6%）、MON87701（6%）、FG72（6%）
Soy6G2	A2704-12（6%）、A5547-127（6%）、DAS-68416-4（6%）、DAS-81419-2（6%）、DAS-44406-6（6%）、MON87751（6%）、SYHT0H2（6%）、CAL16（6%）、DBN9004（6%）、ZH10-6（6%）
Soy6G3	SHZD32-1（6%）、ZUTS-33（6%）、DBN8002（6%）、WYN029GmA（6%）、WYN341GmC（6%）、DBN8205（6%）、GMB151（6%）、XP-2（6%）、IND-ØØ41Ø-5（6%）
Soy10G1	MON87769（10%）、GTS40-3-2（10%）、MON89788（10%）、MON87705（10%）、356043（10%）、305423（10%）、CV127（10%）、MON87708（10%）、MON87701（10%）、FG72（10%）
Soy10G2	A2704-12（10%）、A5547-127（10%）、DAS-68416-4（10%）、DAS-81419-2（10%）、DAS-44406-6（10%）、MON87751（10%）、SYHT0H2（10%）、CAL16（10%）、DBN9004（10%）、ZH10-6（10%）
Soy10G3	SHZD32-1（10%）、ZUTS-33（10%）、DBN8002（10%）、WYN029GmA（10%）、WYN341GmC（10%）、DBN8205（10%）、GMB151（10%）、XP-2（10%）、IND-ØØ41Ø-5（10%）
Soy1G1-y	MON87769（1%）、GTS40-3-2（1%）、MON89788（1%）、MON87705（1%）、356043（2%）、305423（1%）、CV127（1%）、MON87708（1%）、MON87701（1%）、FG72（1%）
Soy1G2-y	A2704-12（1%）、A5547-127（1%）、DAS-68416-4（1%）、DAS-81419-2（1%）、DAS-44406-6（1%）、MON87751（1%）、SYHT0H2（1%）、CAL16（1%）、DBN9004（1%）、ZH10-6（1%）
Soy1G3-y	SHZD32-1（1%）、ZUTS-33（1%）、DBN8002（1%）、WYN029GmA（1%）、WYN341GmC（1%）、DBN8205（1%）、GMB151（1%）、XP-2（1%）、IND-ØØ41Ø-5（2%）
阴性质控品	

4. 大豆转化体 MNP 标记引物的特异性测试

利用制备好的各转化体含量为 10% 的 Soy10G1、Soy10G2 与 Soy10G3 三个阳性试样与大豆阴性对照试样来测试标准附录 A 中引物的特异性。通过高通量测序文库构建、测序与分析，获得每组阳性试样和阴性质控品试样的 3 个平行子样中的每个转化体的检出情况（表 4）。特异性是指测试方法能够正确排除负样本（真阴性）的能力。其计算公式为：特异性=真阴性/（真阴性+假阳性）。特异度越高，说明测试方法能够更准确地排除非阳性的个体，降低误判。从表 4 可以看出，每组阳性试样中检出且仅检出了预期的转化体数目及种类，阴性对照试样中未检出任何转化体，特异性为 100%，表明本标准附录 A 的引物特异性好。

表 4 引物特异性测试结果

试样		含有的转化体数目	检出的转化体数目	检出转化体	含有与检出的转化体的一致率	特异性
Soy10G1	平行子样 1	10	10	MON87769、GTS40-3-2、MON89788、MON87705、356043、305423、CV127、MON87708、MON87701、FG72	100%	100%
	平行子样 2	10	10	A2704-12、A5547-127、DAS-68416-4、DAS-81419-2、DAS-44406-6、MON87751、SYHT0H2、CAL16、DBN9004、ZH10-6	100%	
	平行子样 3	10	10	SHZD32-1、ZUTS-33、DBN8002、WYN029GmA、WYN341GmC、DBN8205、GMB151、XP-2、IND-ØØ41Ø-5	100%	
Soy10G2	平行子样 1	10	10	MON87769、GTS40-3-2、MON89788、MON87705、356043、305423、CV127、MON87708、MON87701、FG72	100%	
	平行子样 2	10	10	A2704-12、A5547-127、DAS-68416-4、DAS-81419-2、DAS-44406-6、MON87751、SYHT0H2、CAL16、DBN9004、ZH10-6	100%	
	平行子样 3	10	10	SHZD32-1、ZUTS-33、DBN8002、WYN029GmA、WYN341GmC、DBN8205、GMB151、XP-2、IND-ØØ41Ø-5	100%	
Soy10	平行子	9	9	MON87769、GTS40-3-2、	100%	

试样		含有的 转化体 数目	检出的 转化体 数目	检出转化体	含有与检 出的转化 体的一致 率	特异 性
G3	样 1			MON89788、MON87705、356043、305423、CV127、MON87708、MON87701、FG72		
	平行子 样 2	9	9	A2704-12、A5547-127、DAS-68416-4、DAS-81419-2、DAS-44406-6、MON87751、SYHT0H2、CAL16、DBN9004、ZH10-6	100%	
	平行子 样 3	9	9	SHZD32-1、ZUTS-33、DBN8002、WYN029GmA、WYN341GmC、DBN8205、GMB151、XP-2、IND-ØØ41Ø-5	100%	
阴性质 控品	平行子 样 1	0	0		100%	
	平行子 样 2	0	0		100%	
	平行子 样 3	0	0		100%	

5. 高通量测序文库样品投入量及构建扩增循环数的确定

理论上，高通量文库构建成功率与样品 DNA 的投入量及 PCR 循环的扩增循环数密切相关，因此，我们将这两个因素合并在一起进行实验。在前期植物品种鉴定标准（GB/T 38551）中样品 DNA 投入量与建库扩增循环数研究的基础上，利用制备好的各转化体含量为 1%的 Soy1G1、Soy1G2 与 Soy1G3 三个阳性试样与阴性质控品，来确定本标准中高通量文库构建时样品 DNA 的投入量与建库扩增循环数。植物品种鉴定标准中的 DNA 投入量一般是 50-200 ng，扩增循环不高于 20 个，因此本标准中三个阳性试样的每个平行子样中大豆核酸 DNA 的总投入量设置了三个梯度：分别为 50 ng、100 ng 和 150 ng；扩增循环数分别设置为 17，20，23。阴性质控品的每个平行子样的 DNA 总投入量均为 100 ng。

从表 5 可以看出，当扩增循环数到 23 时，平均有 0.77%的假阳性检测结果出现，而假阳性是转基因鉴定中应该严格避免的问题，因此，本标准没有采用 23 个及以上的扩增循环数。17 个和 20 个循环时，均没有假阳性问题，但 20 个循

环时，假阴性率为 1.53%，较 17 个循环的 2.30%低，因此，本标准采用 20 个扩增循环进行建库。

表 5 高通量文库构建样品 DNA 投入量与扩增循环数的确定

试样	平行子样	投入量 (ng)	循环数 目	试样中含有的 转化体数目	检出的转 化体数目	假阳性率	假阴性率
Soy1G1	平行子样 1	50	17	10	9	0%	10%
	平行子样 2			10	9	0%	10%
	平行子样 3			10	10	0%	0%
Soy1G2	平行子样 1	50	17	10	10	0%	0%
	平行子样 2			10	10	0%	0%
	平行子样 3			10	10	0%	0%
Soy1G3	平行子样 1	50	17	9	8	0%	11.11%
	平行子样 2			9	9	0%	0%
	平行子样 3			9	9	0%	0%
17 个循环，投入 50 ng 时小结：						0%	3.45%
Soy1G1	平行子样 1	100	17	10	10	0%	0%
	平行子样 2			10	10	0%	0%
	平行子样 3			10	9	0%	10%
Soy1G2	平行子样 1	100	17	10	10	0%	0%
	平行子样 2			10	10	0%	0%
	平行子样 3			10	10	0%	0%
Soy1G3	平行子样 1	100	17	9	9	0%	0%
	平行子样 2			9	8	0%	11.11%
	平行子样 3			9	9	0%	0%
17 个循环，投入 100 ng 时小结：						0%	2.30%
Soy1G1	平行子样 1	150	17	10	10	0%	0%
	平行子样 2			10	10	0%	0%
	平行子样 3			10	10	0%	0%
Soy1G2	平行子样 1	150	17	10	10	0%	0%

试样	平行子样	投入量 (ng)	循环数 目	试样中含有的 转化体数目	检出的转 化体数目	假阳性率	假阴性率
	平行子样 2			10	10	0%	0%
	平行子样 3			10	10	0%	0%
Soy1G3	平行子样 1	150	17	9	8	0%	11.11%
	平行子样 2			9	9	0%	0%
	平行子样 3			9	9	0%	0%
17 个循环，投入 150 ng 时小结：						0%	1.15%
阴性质控品	平行子样 1	100	17	/	/	0%	/
	平行子样 2			/	/	0%	/
	平行子样 3			/	/	0%	/
17 个循环，投入 50 ng、100 ng、150 ng 时小结：						100%	2.30%
Soy1G1	平行子样 1	50	20	10	10	0%	0%
	平行子样 2			10	10	0%	0%
	平行子样 3			10	10	0%	0%
Soy1G2	平行子样 1	50	20	10	10	0%	0%
	平行子样 2			10	10	0%	0%
	平行子样 3			10	10	0%	0%
Soy1G3	平行子样 1	50	20	9	8	0%	11.11%
	平行子样 2			9	8	0%	11.11%
	平行子样 3			9	9	0%	0%
20 个循环，投入 50 ng 时小结：						0%	2.30%
Soy1G1	平行子样 1	100	20	10	10	0%	0%
	平行子样 2			10	10	0%	0%
	平行子样 3			10	10	0%	0%
Soy1G2	平行子样 1	100	20	10	10	0%	0%
	平行子样 2			10	10	0%	0%
	平行子样 3			10	10	0%	0%

试样	平行子样	投入量 (ng)	循环数 目	试样中含有的 转化体数目	检出的转 化体数目	假阳性率	假阴性率
Soy1G3	平行子样 1	100	20	9	8	0%	11.11%
	平行子样 2			9	9	0%	0%
	平行子样 3			9	9	0%	0%
20 个循环，投入 100 ng 时小结：						0%	1.15%
Soy1G1	平行子样 1	150	20	10	10	0%	0%
	平行子样 2			10	10	0%	0%
	平行子样 3			10	10	0%	0%
Soy1G2	平行子样 1	150	20	10	10	0%	0%
	平行子样 2			10	10	0%	0%
	平行子样 3			10	10	0%	0%
Soy1G3	平行子样 1	150	20	9	9	0%	0%
	平行子样 2			9	8	0%	11.11%
	平行子样 3			9	9	0%	0%
20 个循环，投入 150 ng 时小结：						0%	1.15%
阴性质控品	平行子样 1	100	20	/	/	0%	/
	平行子样 2			/	/	0%	/
	平行子样 3			/	/	0%	/
20 个循环，投入 50 ng、100 ng、150 ng 时小结：						0%	1.53%
Soy1G1	平行子样 1	50	23	10	11	5.26%	0%
	平行子样 2			10	9	0%	10%
	平行子样 3			10	10	0%	0%
Soy1G2	平行子样 1	50	23	10	10	0%	0%
	平行子样 2			10	11	5.26%	0%
	平行子样 3			10	10	0%	0%
Soy1G3	平行子样 1	50	23	9	9	0%	0%
	平行子样 2			9	8	0%	11.11%

试样	平行子样	投入量 (ng)	循环数 目	试样中含有的 转化体数目	检出的转 化体数目	假阳性率	假阴性率
	平行子样 3			9	8	0%	11.11%
23 个循环，投入 50 ng 时小结：						1.15%	3.45%
Soy1G1	平行子样 1	100	23	10	10	0%	0%
	平行子样 2			10	10	0%	0%
	平行子样 3			10	10	0%	0%
Soy1G2	平行子样 1	100	23	10	10	0%	0%
	平行子样 2			10	10	0%	0%
	平行子样 3			10	10	0%	0%
Soy1G3	平行子样 1	100	23	9	9	0%	0%
	平行子样 2			9	9	0%	0%
	平行子样 3			9	8	0%	11.11%
23 个循环，投入 100g 时小结：						0%	1.15%
Soy1G1	平行子样 1	150	23	10	10	0%	0%
	平行子样 2			10	9	0%	10%
	平行子样 3			10	10	0%	0%
Soy1G2	平行子样 1	150	23	10	10	0%	0%
	平行子样 2			10	10	0%	0%
	平行子样 3			10	10	0%	0%
Soy1G3	平行子样 1	150	23	9	9	0%	0%
	平行子样 2			9	9	0%	0%
	平行子样 3			9	8	0%	11.11%
23 个循环，投入 150g 时小结：						0%	2.30%
阴性质控品	平行子样 1	100	23	/	/	0%	/
	平行子样 2			/	/	0%	/

试样	平行子样	投入量 (ng)	循环数 目	试样中含有的 转化体数目	检出的转 化体数目	假阳性率	假阴性率
	平行子样 3			/	/	0%	/
23 个循环，投入 50ng、100ng、150ng 时小结：						0.77%	2.30%

6. 高通量文库测序量的确定

一般情况下，样品中转化体含量越低，需要的测序量越大，本标准中利用各转化体含量为 1%（较低的浓度）的 Soy1G1、Soy1G2 与 Soy1G3 三个阳性试样进行高通量文库测序量的评估。首先获得 Soy1G1、Soy1G2 与 Soy1G3 三个阳性试样 9 个平行子样的测序数据，然后对每个平行子样抽取 2 M、2.5 M、3 M 的测序 reads 数，进行高通量测序文库测序量的评估。分析结果显示三组试样在 2 M 和 2.5 M 的测序 reads 数时（见表 6），均出现不同程度的漏检，呈现一定的假阴性，而在 3 M 测序 reads 数的情况下，各个 1%混样中的转化体均能稳定检出，且未出现假阳性与假阴性。在转化体含量为 1%的条件下能满足高通量文库测序量的需求，那么在转化体含量较高的样品中更能满足。因此本标准中的测序数据量要求不小于 3 M 测序 reads 数是相对较合理的。

表 6 高通量文库测序数据量的确定

试样	平行子样	测序数据 量 (M)	含有的转化体数目	检出的转化体 数目	假阳性 率	假阴性 率
Soy1G1	平行子样 1	2	10	10	0%	0%
	平行子样 2		10	10	0%	0%
	平行子样 3		10	10	0%	0%
Soy1G2	平行子样 1	2	10	10	0%	0%
	平行子样 2		10	10	0%	0%
	平行子样 3		10	10	0%	0%
Soy1G3	平行子样 1	2	9	9	0%	0%
	平行子样 2		9	8	0%	11.11%
	平行子样 3		9	8	0%	11.11%
测序量是 2 M 时小结：					0%	2.30%

试样	平行子样	测序数据量 (M)	含有的转化体数目	检出的转化体数目	假阳性率	假阴性率
Soy1G1	平行子样 1	2.5	10	10	0%	0%
	平行子样 2		10	10	0%	0%
	平行子样 3		10	10	0%	0%
Soy1G2	平行子样 1	2.5	10	10	0%	0%
	平行子样 2		10	10	0%	0%
	平行子样 3		10	10	0%	0%
Soy1G3	平行子样 1	2.5	9	9	0%	0%
	平行子样 2		9	8	0%	11.11%
	平行子样 3		9	9	0%	0%
测序量是 2.5 M 时小结:					0%	1.15%
Soy1G1	平行子样 1	3	10	10	0%	0%
	平行子样 2		10	10	0%	0%
	平行子样 3		10	10	0%	0%
Soy1G2	平行子样 1	3	10	10	0%	0%
	平行子样 2		10	10	0%	0%
	平行子样 3		10	10	0%	0%
Soy1G3	平行子样 1	3	9	9	0%	0%
	平行子样 2		9	9	0%	0%
	平行子样 3		9	9	0%	0%
测序量是 3 M 时小结:					0%	0%

7. 检出限的测试

7.1 检出限的初步测试

本标准用质量百分比为 6%，4%，2%，1%与 0.5%的 5 个梯度样品进行检出限的初步测试，同时设置了非转基因大豆的阴性质控品，每个样品至少做 10 个重复，其中每个样品中的 DNA 总投入量为 100 ng。检出限初始所用测试样品信息表如表 7 所示。

表 7 检出限初步测试所用样品信息

阳性样品数目	样品	转化体含量（质量百分比）	转化体数目
1	Soy0.5G1	0.50%	10
2	Soy0.5G2	0.50%	10
3	Soy0.5G3	0.50%	9
4	Soy1G1	1.00%	10
5	Soy1G2	1.00%	10
6	Soy1G3	1.00%	9
7	Soy2G1	2.00%	10
8	Soy2G2	2.00%	10
9	Soy2G3	2.00%	9
10	Soy4G1	4.00%	10
11	Soy4G2	4.00%	10
12	Soy4G3	4.00%	9
13	Soy6G1	6.00%	10
14	Soy6G2	6.00%	10
15	Soy6G3	6.00%	9

将上述 15 个阳性样品和一个阴性质控品按照本标准所述方法，进行高通量文库的构建、测序与分析，分析结果如表 8 所示。在各转化体含量为 0.5%的试样中，标准规定范围的 29 个转化体，有 3 个转化体出现漏检，即 356043、DAS-44406-6 与 IND-ØØ41-Ø-5；在各转化体含量为 1%的试样中，标准范围规定的 29 个转化体，有 2 个转化体出现漏检；在各转化体含量为 2%所有阳性试样的 10 次测试中，标准范围规定的 29 个转化体均能稳定检出，检测结果与参考值一致率为 100%。根据上述结果，初步把本标准中 356043 与 IND-ØØ41Ø-5 转化

体的检出限定位为 2%，标准范围规定的其它 27 个转化体的检出限定为 1%。

表 8 转化体检出限初步测试结果

转化体名称	测试总次数	质量百分比 0.5%		质量百分比 1%		质量百分比 2%		质量百分比 4%		质量百分比 6%	
		检测结果与参考值一致的次数	一致的比率	检测结果与参考值一致的次数	一致的比率	检测结果与参考值一致的次数	一致的比率	检测结果与参考值一致的次数	一致的比率	检测结果与参考值一致的次数	一致的比率
MON87769	10	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%
GTS40-3-2	10	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%
MON89788	10	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%
MON87705	10	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%
356043	10	7	70%	9	90%	10	100%	10	100%	10	100%
305423	10	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%
CV127	10	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%
MON87708	10	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%
MON87701	10	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%
FG72	10	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%
A2704-12	10	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%
A5547-127	10	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%
DAS-68416-4	10	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%
DAS-81419-2	10	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%
DAS-44406-6	10	8	80%	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%
MON87751	10	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%
SYHT0H2	10	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%
CAL16	10	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%
DBN9004	10	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%
ZH10-6	10	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%
SHZD32-1	10	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%
ZUTS-33	10	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%
DBN8002	10	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%

转化体名称	测试总次数	质量百分比 0.5%		质量百分比 1%		质量百分比 2%		质量百分比 4%		质量百分比 6%	
		检测结果与参考值一致的次数	一致的比率	检测结果与参考值一致的次数	一致的比率	检测结果与参考值一致的次数	一致的比率	检测结果与参考值一致的次数	一致的比率	检测结果与参考值一致的次数	一致的比率
WYN029G mA	10	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%
WYN341G mC	10	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%
DBN8205	10	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%
GMB151	10	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%
XP-2	10	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%	10	100%
IND-ØØ41 Ø-5	10	4	40%	7	70%	10	100%	10	100%	10	100%

7.2 检出限的确认

由于 356043 与 IND-ØØ41Ø-5 转化体的检出限为 2%，标准范围规定的其它 27 个转化体的检出限为 1%，因此本标准特别制备了 Soy1G1-y, Soy1G2-y, Soy1G3-y 三个样品用于检出限确认、稳健性测试与交叉验证等（见“3.标准中各参数确定时所需转化体样品的制备”部分）。Soy1G1-y, Soy1G2-y, Soy1G3-y 每个阳性试样测试 60 次，结果表明在 95%的置信度下（表 9），质量百分比为 2%的 356043 与 IND-ØØ41Ø-5 样品检测结果，及质量百分比为 1% 的其余 27 个转化体的样品中检测结果与参考值一致的概率均大于 95%。因此，确定了 356043 与 IND-ØØ41Ø-5 转化体的检出限为 2%，其余 27 个转化体的检出限为 1%。

表 9 转化体检出限确定的测试结果

转化体名称	测试总次数	检测结果与参考值一致的次数	一致的比率
MON87769	60	60	100%
GTS40-3-2	60	60	100%
MON89788	60	60	100%
MON87705	60	60	100%
356043	60	58	97%

转化体名称	测试总次数	检测结果与参考值一致的次数	一致的比率
305423	60	60	100%
CV127	60	60	100%
MON87708	60	60	100%
MON87701	60	60	100%
FG72	60	60	100%
A2704-12	60	60	100%
A5547-127	60	60	100%
DAS-68416-4	60	60	100%
DAS-81419-2	60	60	100%
DAS-44406-6	60	59	98%
MON87751	60	60	100%
SYHT0H2	60	60	100%
CAL16	60	60	100%
DBN9004	60	60	100%
ZH10-6	60	60	100%
SHZD32-1	60	60	100%
ZUTS-33	60	60	100%
DBN8002	60	60	100%
WYN029GmA	60	60	100%
WYN341GmC	60	60	100%
DBN8205	60	60	100%
GMB151	60	60	100%
XP-2	60	60	100%
IND-ØØ41Ø-5	60	58	97%

8. 稳健性测试

由两个不同操作人员，在两个不同时间段，利用两台不同的建库 PCR 仪分别对 40 份检出限样品及阴性质控品进行稳健性测试，其中检出限样品 Soy1G1-y, Soy1G2-y, Soy1G3-y 及阴性质控品各 10 份，由于每个转化体在各阳性试样与阴性质控品中均要检测，因此每个转化体在 Soy1G1-y, Soy1G2-y, Soy1G3-y 及阴性质控品试样中相当于共检测了 40 次。分析结果表明每个转化体在阳性试样及阴性质控品中两人检测结论的一致率均为 100%（表 10），表明标准稳健性较好。

表 10 稳健性测试结果

转化体名称	测试总次数	两人检测结论一致的次数	一致的比例
MON87769	40	40	100%
GTS40-3-2	40	40	100%
MON89788	40	40	100%
MON87705	40	40	100%
356043	40	40	100%
305423	40	40	100%
CV127	40	40	100%
MON87708	40	40	100%
MON87701	40	40	100%
FG72	40	40	100%
A2704-12	40	40	100%
A5547-127	40	40	100%
DAS-68416-4	40	40	100%
DAS-81419-2	40	40	100%
DAS-44406-6	40	40	100%
MON87751	40	40	100%
SYHT0H2	40	40	100%
CAL16	40	40	100%
DBN9004	40	40	100%
ZH10-6	40	40	100%
SHZD32-1	40	40	100%
ZUTS-33	40	40	100%
DBN8002	40	40	100%
WYN029GmA	40	40	100%
WYN341GmC	40	40	100%
DBN8205	40	40	100%
GMB151	40	40	100%
XP-2	40	40	100%
IND-ØØ41Ø-5	40	40	100%

9. 外参核酸和品种标记检出比例质控阈值的确定

本标准研制和验证过程中，在所有测序数据量质控合格的样品中，除 1 次外参核酸检出标记位点数目为 4 个外，其余所有样品中的外参核酸的检出标记位点数目均为 5 个全部检出；品种标记在所有样品的检出标记位点数目均大于 35 个，因此本标准将外参核酸和品种标记检出比例质控阈值设置为 80%。该阈值既可以保证实验过程正常，又能最大程度地避免重新实验。

10. 转化体存在于平行子样中概率 p_0 阈值的确定、转基因成分结论的判定

与表述

本标准研制和验证过程中，在所有标准样品中，真实存在的转化体在平行子样中概率 p_0 均大于 99%，而不存在的转化体，在平行子样中的概率 p_0 均小于 1%。因此，本标准所有子样中 p_0 均大于 99%和均小于 1%，可以最大程度地保证阳性与阴性判定结论正确，最大程度避免假阳性和假阴性。本标准中转基因成分结论的判定与表述如下：

- 1) 当试样的所有平行子样中转化体的概率 p_0 均大于等于 99%时，转基因成分的结论为阳性，结果表述为“样品中检出 XX 转化体”；
- 2) 当试样的所有平行子样中转化体的概率 p_0 均小于等于 1%时，转基因成分的结论为阴性，结果表述为“样品中未检出 XX 转化体”；
- 3) 其它情况，无法给出明确的转基因成分结论，结果表述为“样品中不确定是否检出 XX 转化体”。

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) 试验验证的分析、综述报告

本标准草案试验验证单位共 8 家，分别为上海交通大学、湖南杂交水稻研究中心、中国农业科学院生物技术研究所、中国质量检验检测科学研究院、天津市农业科学院、崖州湾分子检测鉴定中心、石家庄博瑞迪生物技术有限公司和北京通州国际种业实验室。验证了本标准草案中 29 种转化体检出率、检测正确率、重现率及检测下限。验证结果表明（见表 11）：8 家单位的所有 29 种目标转化体的鉴定结论正确率均为 100%。

表 11 八家单位实验室之间的验证结果

样品名称	平行子样	检出的转化体数目及种类是否与参考值完全一致 (√表示是，×表示否)							
		单位 1	单位 2	单位 3	单位 4	单位 5	单位 6	单位 7	单位 8
Soy1G1-y	平行子样 1	√	√	√	√	√	√	√	√
	平行子样 2	√	√	√	√	√	√	√	√
	平行子样 3	√	√	√	√	√	√	√	√

样品名称	平行子样	检出的转化体数目及种类是否与参考值完全一致 (√表示是, ×表示否)							
		单位 1	单位 2	单位 3	单位 4	单位 5	单位 6	单位 7	单位 8
Soy1G2-y	平行子样 1	√	√	√	√	√	√	√	√
	平行子样 2	√	√	√	√	√	√	√	√
	平行子样 3	√	√	√	√	√	√	√	√
Soy1G3-y	平行子样 1	√	√	√	√	√	√	√	√
	平行子样 2	√	√	√	√	√	√	√	√
	平行子样 3	√	√	√	√	√	√	√	√
阴性质控 样品 1	平行子样 1	√	√	√	√	√	√	√	√
	平行子样 2	√	√	√	√	√	√	√	√
	平行子样 3	√	√	√	√	√	√	√	√
阴性质控 样品 2	平行子样 1	√	√	√	√	√	√	√	√
	平行子样 2	√	√	√	√	√	√	√	√
	平行子样 3	√	√	√	√	√	√	√	√
阴性质控 样品 3	平行子样 1	√	√	√	√	√	√	√	√
	平行子样 2	√	√	√	√	√	√	√	√
	平行子样 3	√	√	√	√	√	√	√	√

(二) 技术经济论证

本标准采用 MNP 标记法, 经过多位院士和专家鉴定评价, 认为该技术填补了国内外实用精准高效植物品种 DNA 鉴定技术空白, 整体达到国际领先水平。相比于其它大豆转基因成分鉴定行业标准一次只能扩增一个或少量几个靶标标记, 本标准采用超多重扩增, 115 个靶标标记仅需要 2 次 PCR 扩增和纯化程序即可, 工作效率提升数百倍; 传统方法需要逐个检测和分析, 本标准采用高通量测序技术和计算机软件分析技术, 单次可自动检测和分析数百个以上靶标标记, 检测和分析的效率, 自动化水平高; 每个标记位点的设定测序数据量平均覆盖达到近 3 万条序列, 每条序列精确到单个碱基。一次性实验可以检测我国进口与自主研发的 29 种大豆转化体, 填补了国内外大豆转化体全面精准高效定性鉴定技术标准空白。首次突破了转基因鉴定精准数字化的技术难题, 不再需要统一实

验条件，不再要求实验技术人员具有丰富的经验，也不要求标准样品实物或参照样品实物进行平行实验，有利于检测结果的数字化、网络化和智能化，有利于本标准在种业行业的推广应用。

（三）预期的经济效益、社会效益和生态效益

本标准发布的检测技术相对于传统的 qPCR 技术，可节省检测费用、人力与时间 90%以上，为田间种植材料抽检、海关进出口、市场种子的全面监管及转基因标签制度的实施提供了技术支撑。技术体系知识产权完全独立自主，配套的试剂盒、工作站和测序分析整合系统均为国产，确保了我国转基因大豆监管完全自主可控；技术和标准均为原创，且具有国际领先性，有助于我国技术与标准走出去，实现国际引领。实施后还可降低对生态的潜在风险，推动我国转基因产业的可持续健康发展。

四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况

本标准内容没有对应的相关国际标准。

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

未以国际标准为基础起草。

六、与有关法律、行政法规及相关标准的关系

文本内容与现行法律、行政法规及相关标准不发生冲突，符合我国有关法律、法规 and 经济发展、科学技术发展的方针、政策的要求。目前国内暂无与本文件内容相关的强制性标准。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

八、涉及专利的有关说明

本文件编制过程中未识别出文件的内容涉及专利。

九、实施行业标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议

本文件作为我国转基因成分鉴定标准，为大豆转基因成分的精准鉴定提供了技术指导，建议作为推荐性标准发布。建议对其它有意愿开展转基因成分鉴定的机构检测人员进行理论和实操的培训，以更好地实施和应用标准。

随着转基因产业化在我国的有序推进，市场上各种转化体呈“井喷式”增长，为此 2023 年 10 月 20 号，农业农村部发布了关于《农业农村部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）》公开征求意见的通知。目前该征求意见已发布两年，为了支撑该转基因标签制度的落地实施，建议尽快实施该标准，为转基因标签制度的实施提供充足的技术保障。

十、其它应于说明的事项

无。

参 考 文 献

- [1] 2019 年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势[J]. 中国生物工程杂志, 2021, 41(01):114-119.
- [2] Park, S., Kim, J., Lee, D., Kim, J., Shin, M., & Kim, H. Development of a systematic qPCR array for screening GM soybeans. Foods, 2021, 10(3):610.
- [3] Bergerová, E., Hrnčířová, Z., Stankovská, M. et al. Effect of thermal treatment on the amplification and quantification of transgenic and non-transgenic soybean and maize DNA. Food Anal. Methods, 2010, 3:211–218.