《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。其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，并呈逐年增加的趋势。

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。然而，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，一次仅能定性筛查 1 个转化体[2]，难以对所有已获市场准入的大豆转化体进行批量抽检，因此亟需尽快制定一次性定性鉴定我国所有审定转化体的标准，以满足生物技术产业化中最常见的转基因大豆定性鉴定的需求。

（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3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	总负责人
2	陈 红	农业农村部科技发展中心	文本起草
3	陈利红	江汉大学	文本起草
4	付 伟	农业农村部科技发展中心	文本起草
5	周俊飞	江汉大学	方法研究
6	王颢潜	农业农村部科技发展中心	文本起草
7	方治伟	江汉大学	数据分析
8	李甜甜	江汉大学	文本修改
9	李 论	江汉大学	数据分析
10	高利芬	江汉大学	方法研究
11	张 静	江汉大学	方法研究
12	王刚	武汉明了生物技术有限公司	方法研究
13	蒋红叶	农业农村部科技发展中心	方法研究
14	傅芳奇	农业农村部科技发展中心	方法研究
15	张 娜	江汉大学	文库构建
16	陈子言	农业农村部科技发展中心	文本起草
17	张 华	农业农村部科技发展中心	文本修改
18	万人静	江汉大学	文库测序
19	赵桐桐	农业农村部科技发展中心	文本修改
20	肖华锋	江汉大学	文本修改
21	裴欣瑶	农业农村部科技发展中心	方法研究
22	宋会银	江汉大学	DNA 提取
23	高芳瑞	农业农村部科技发展中心	方法研究
24	王 丹	农业农村部科技发展中心	方法研究
25	蔡 鹭	江汉大学	文库构建
26	肖紫兰	江汉大学	DNA 提取
27	江晓丹	农业农村部科技发展中心	方法研究
28	张宝龙	江汉大学	文库构建
29	朱召禄	江汉大学	数据分析

1.2 前期准备

2024 年 12 月，江汉大学和农业农村部科技发展中心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，最终确定标准采用的 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，执行标准草案规定的 DNA 提取、PCR 扩增、高通量测序和数据分析流程，对大豆的 29 个转化体的 MNP 标记进行了多重 PCR 扩增和二代高通量测序。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

按照农业农村部制定的NY/T 2594《植物品种鉴定 DNA分子标记法 总则》标准编写要求，采用以下原则编写《转基因大豆定性鉴定 MNP标记法》：

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 3543.2《农作物种子检验规程 扦样》、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》。

适用性原则：本标准要求尽量适用于历史、当前和未来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；每个标记位点的测序数据量平均覆盖达到500条序列以上，每条序列精确到单个碱基，检测结果准确率达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建、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个转化体的转化体内标准基因及转化体特异性序列，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一定区分能力的品种标记。根据收集的序列，筛选合适的MNP标记位点，并设计引物。本标准采用如下MNP标记筛选与引物设计的主要原则：

(1) 内标准基因及品种标记的筛选与引物设计：内标准基因的引物来源于文

献[3]，品种标记设计在大豆基因组中非重复序列区域，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与引物设计：转化体特异性标记一定要覆盖外源载体及其插入受体基因组上的一段序列，根据筛选的标记进行引物设计；

(3) 外参核酸序列标记的筛选与引物设计：筛选的标记和引物均与已知的生物基因组不存在同源性；

(4) 标记的引物退火温度统一到 60 度；

(5) 扩增产物长度在 70 bp - 275 bp 之间；

(6) 遵守普通引物设计的其它规则。

2. 外参核酸在检验中使用拷贝数的确定

外参核酸可以质控高通量文库构建是否成功，并降低气溶胶污染，因此本标准制备了分别含有外参核酸拷贝数为 10000、50000 和 100000 的 3 种空白对照样品。按照本标准方法构建该 3 种空白对照样品的高通量测序文库，实验每天重复 3 次，连续重复 3 天，检测获得的每个高通量测序文库的浓度。结果表明，空白对照中外参核酸达到 50000 拷贝/标准反应时，获得的高通量测序文库浓度能稳定达到 2 ng/ul（图 1），可满足高通量测序的最低浓度要求。为确保外参核酸可被正常检出，且待测样品测序数据中外参核酸的测序数据占比最低，本标准规定外参核酸用量为 50000 拷贝/标准反应。

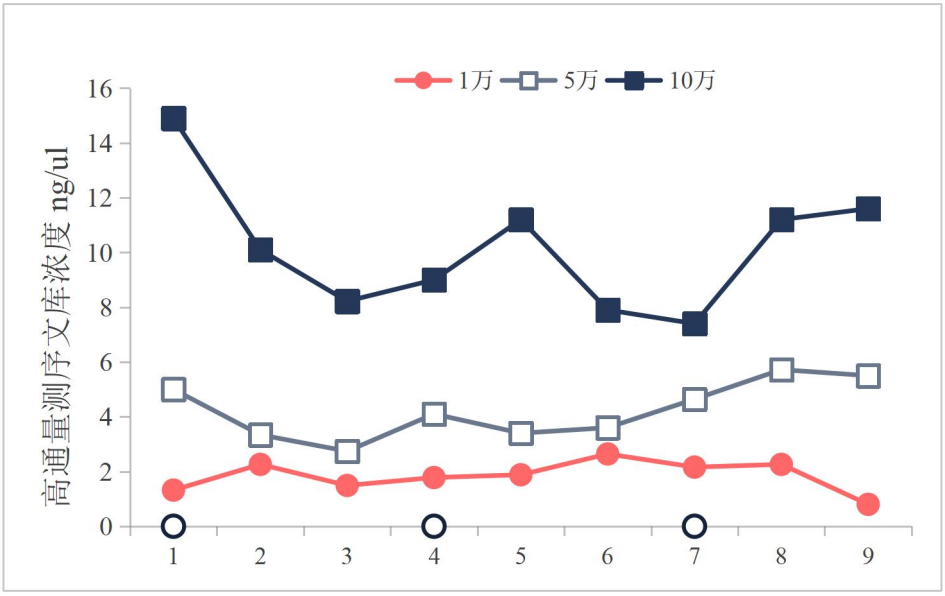

图 1 空白对照中外参核酸拷贝数与获得的高通量测序文库的浓度

3. 29 个转化体的分组情况和各种测试样品的制备

本标准的试验材料由农业农村部科技发展中心提供。由于标准研制中转化体数目较多，若按照每个转化体进行引物和检出限等实验进行测试，人财物均耗费较大，因此特将我国进口与自主研制的 29 种大豆转化体分为 3 组，第一和第二组均含有 10 种转化体，第三组含有 9 种转化体（具体见表 2）。各组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%，0.5%与 0.1%（质量百分比）共 7 个梯度的试样，其中每个梯度的试样中每种转化体的含量相同。每组试样的命名规则为：Soy 转化体含量的百分比（百分号不要）+G+组别，如第一组 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 代表转化体的组别，即该试样含有表 1 第一组中的转化体种类，同理第二组各个转化体含量为 4%的梯度试样的名字为 Soy4G2。

检出限确定、稳健性与交叉验证试样的分组情况和上述试样一样，只是每组内转化体的含量不是完全相同的，而是根据检出限初试结果进行单独配制的，分别命名为 Soy1G1-y，Soy1G2-y，Soy1G3-y。其中，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 和 Soy1G2 没有区别，10 种转化体的含量也均为 1%；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%。除了阳性样品试样外，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 2 大豆 29 个转化体的分组情况

组别	每组样品含有的转化体种类									
第一组	MON87769	GTS40-3-2	MON89788	MON87705	356043	305423	CV127	MON87708	MON87701	FG72
第二组	A2704-12	A5547-127	DAS-68416-4	DAS-81419-2	DAS-44406-6	MON87751	SYHT0H2	CAL16	DBN9004	ZH10-6
第三组	SHZD32-1	ZUTS-33	DBN8002	WYN029GmA	WYN341GmC	DBN8205	GMB151	XP-2	IND-ØØ41Ø-5	-

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 三组阳性试样与阴性对照试样对上述合成的引物进行特异性测试，通过对这些试样进行高通量测序文库的构建、测序与分析，获得每组阳性试样、阴性质控品的各转化体检出情况，其中每个试样设置了 3 个平行子样。特异性测试分析结果如表 3 所示，每组阳性试样中检出的转化体数目及种类与参考值均一致，29 个转化体全部有效检出，阴性对照未检出任何转化体。

表 3 引物特异性测试结果

试样（转化体含量 10%）	各组样品中实际含有的转化体数目	平行子样 1		平行子样 2		平行子样 3	
		检出的转化体数目	检测结果是否正确	检出的转化体数目	检测结果是否正确	检出的转化体数目	检测结果是否正确
Soy10G1	10	10	正确	10	正确	10	正确
Soy10G2	10	10	正确	10	正确	10	正确
Soy10G3	9	9	正确	9	正确	9	正确
阴性质控品	0	0	正确	0	正确	0	正确

5. 高通量测序文库样品投入量、构建扩增循环数及测序量的确定

转基因植物 PCR 检测方法的检出限与定量限通常使用检测目标 DNA 片段的拷贝数比值或拷贝数进行表示，但由于不同植物的基因组 DNA 大小不一致，需要将测试的 DNA 样品进行质量与拷贝数的换算，本标准使用以下公式进行样品质量与拷贝数的换算：样品中植物基因组拷贝数=样品 DNA 质量（g）×6.02×10^{23}/（植物单倍体基因组的大小×324.5×2）。本标准中试验材料为大豆，其参考单倍体基因组大小为 1115 M bp，由此计算出 1 ng 的纯合大豆基因组 DNA 约含有 832 ($10^{-9}\times6.02\times10^{23}/(1115\times10^{6}\times2\times324.5)$)个拷贝的目标 MNP 片段。按照此方法，利用制备好的各转化体含量为 1%的 Soy10G1、Soy10G2 与 Soy10G3 三组阳性试样与阴性对照试样，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。其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（416 拷贝）、100 ng（832 拷贝）和 150 ng（1248 拷贝）；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 50 ng（416 拷贝）。所用其余方法均与本标准记载的方法相同。

分析结果如表 4 所示，阴性质控品中无论构建高通量测序文库的循环数高与低，均未检出任何转化体。阳性试样中当扩增循环数较低为 17 个，即使总投入量达到 150 ng 时，部分试样中的转化体依然会漏检（如 Soy1G3 平行子样 1 漏检了 IND-ØØ41Ø-5）。当扩增循环数目达到 23 个时，部分试样中可能由于存在气溶胶污染，检出非靶标转化体；而部分样品可能由于引物扩增的偏好性，反而漏检某种转化体，最终均导致无法正常获得正确的转基因成分鉴定结论。为安全起见和确保检测的成功率，本标准规定构建高通量测序文库的 PCR 扩增循环数不宜超过 20 个。当扩增循环数控制在 20 个，每个平行子样中大豆(转基因含量 1%）核酸 DNA 的总投入 50 ng 时，试样 3 的两个平行子样均漏检了 1 个，而投入量为 100 ng 和 150 ng 时，均只有 1 个平行子样漏检了 1 个转化体，综合考虑转化体的检出率与样品 DNA 的投入量，本标准中文库构建时的 DNA 投入量最好不低于 100 ng。

表 4 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（copy）	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	检出的转化体与实际转化体种类是否一致	备注
Soy1G1	平行子样 1	416	50	17	10	9	否	漏检 1 个
	平行子样 2				10	9	否	漏检 1 个
	平行子样 3				10	10	是	
Soy1G1	平行子样 1	832	100	17	10	10	是	
	平行子样 2				10	10	是	
	平行子样 3				10	9	否	漏检 1 个
Soy1G1	平行子样 1	1248	150	17	10	10	是	
	平行子样 2				10	10	是	
	平行子样 3				10	10	是	
Soy1G2	平行子样 1	416	50	17	10	10	是	
	平行子样 2				10	10	是	
	平行子样 3				10	10	是	
Soy1G2	平行子样 1	832	100	17	10	10	是	
	平行子样 2				10	10	是	
	平行子样 3				10	10	是	
Soy1G2	平行子样 1	1248	150	17	10	10	是	
	平行子样 2				10	10	是	
	平行子样 3				10	10	是	
Soy1G3	平行子样 1	416	50	17	9	8	否	漏检 1 个
	平行子样 2				9	9	是	
	平行子样 3				9	9	是	
Soy1G3	平行子样 1	832	100	17	9	9	是	
	平行子样 2				9	8	否	漏检 1 个

试样	平行子样	投入量（copy）	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	检出的转化体与实际转化体种类是否一致	备注
	平行子样 3				9	9	是	
Soy1G3	平行子样 1	1248	150	17	9	8	否	漏检 1 个
	平行子样 2				9	9		
	平行子样 3				9	9	是	
阴性质控品	平行子样 1	416	50	17	/	/	是	
	平行子样 2				/	/	是	
	平行子样 3				/	/	是	
Soy1G1	平行子样 1	416	50	20	10	10	是	
	平行子样 2				10	10	是	
	平行子样 3				10	10	是	
Soy1G1	平行子样 1	832	100	20	10	10	是	
	平行子样 2				10	10	是	
	平行子样 3				10	10	是	
Soy1G1	平行子样 1	1248	150	20	10	10	是	
	平行子样 2				10	10	是	
	平行子样 3				10	10	是	
Soy1G2	平行子样 1	416	50	20	10	10	是	
	平行子样 2				10	10	是	
	平行子样 3				10	10	是	
Soy1G2	平行子样 1	832	100	20	10	10	是	
	平行子样 2				10	10	是	
	平行子样 3				10	10	是	
Soy1G2	平行子样 1	1248	150	20	10	10	是	
	平行子样 2				10	10	是	
	平行子样 3				10	10	是	
Soy1G3	平行子样 1	416	50	20	9	8	否	漏检 1 个
	平行子样 2				9	8	否	漏检 1 个
	平行子样 3				9	9	是	
Soy1G3	平行子样 1	832	100	20	9	8	否	漏检 1 个
	平行子样 2				9	9	是	
	平行子样 3				9	9	是	
Soy1G3	平行子样 1	1248	150	20	9	9	是	
	平行子样 2				9	8	否	
	平行子样 3				9	9	是	
阴性质控品	平行子样 1	416	50	20	/	/	是	
	平行子样 2				/	/	是	
	平行子样 3				/	/	是	
Soy1G1	平行子样 1	416	50	23	10	11	否	污染 1 个
	平行子样 2				10	9	否	漏检 1 个
	平行子样 3				10	10	是	
Soy1G1	平行子样 1	832	100	23	10	10	是	
	平行子样 2				10	10	是	

试样	平行子样	投入量（copy）	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	检出的转化体与实际转化体种类是否一致	备注
	平行子样 3				10	10	是	
Soy1G1	平行子样 1	1248	150	23	10	10	是	
	平行子样 2				10	9	否	漏检 1 个
	平行子样 3				10	10	是	
Soy1G2	平行子样 1	416	50	23	10	10	是	
	平行子样 2				10	11	否	污染 1 个
	平行子样 3				10	10	是	
Soy1G2	平行子样 1	832	100	23	10	10	是	
	平行子样 2				10	10	是	
	平行子样 3				10	10	是	
Soy1G2	平行子样 1	1248	150	23	10	10	是	
	平行子样 2				10	10	是	
	平行子样 3				10	10	是	
Soy1G3	平行子样 1	416	50	23	9	9	是	
	平行子样 2				9	8	否	漏检 1 个
	平行子样 3				9	8	否	漏检 1 个
Soy1G3	平行子样 1	832	100	23	9	9	是	
	平行子样 2				9	9	是	
	平行子样 3				9	8	否	漏检 1 个
Soy1G3	平行子样 1	1248	150	23	9	9	是	
	平行子样 2				9	9	是	
	平行子样 3				9	8	否	漏检 1 个
阴性质控品	平行子样 1	416	50	23	/	/	是	
	平行子样 2				/	/	是	
	平行子样 3				/	/	是	

对这三组试样在扩增循环 20 个情况下，获得对应平行子样的样品测序数据。然后对每个平行子样抽取 2 M、2.5M、3 M 的测序 reads 数，进行高通量测序文库测序量的评估。结果发现三组试样在 2 M 和 2.5 的测序 reads 数时（见表 5），均出现不同程度的漏检，而在 3 M 测序 reads 数的情况下，各组转化体均能稳定检出，因此本标准中的测序数据量要求不小于 3 M 测序 reads 数。

表 5 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）	试样中含有的转化体数目	检出的转化体数目	检出的转化体与实际转化体种类是否一致	备注
Soy1G1	平行子样 1	2	10	10	是	
	平行子样 2		10	10	是	
	平行子样 3		10	10	是	
Soy1G1	平行子样 1	2.5	10	10	是	
	平行子样 2		10	10	是	

试样	平行子样	测序数据量（M）	试样中含有的转化体数目	检出的转化体数目	检出的转化体与实际转化体种类是否一致	备注
	平行子样 3		10	10	是	
Soy1G1	平行子样 1	3	10	10	是	
	平行子样 2		10	10	是	
	平行子样 3		10	10	是	
Soy1G2	平行子样 1	2	10	10	是	
	平行子样 2		10	10	是	
	平行子样 3		10	10	是	
Soy1G2	平行子样 1	2.5	10	10	是	
	平行子样 2		10	10	是	
	平行子样 3		10	10	是	
Soy1G2	平行子样 1	3	10	10	是	
	平行子样 2		10	10	是	
	平行子样 3		10	10	是	
Soy1G3	平行子样 1	2	9	9	是	
	平行子样 2		9	8	否	漏检 1 个
	平行子样 3		9	8	否	漏检 1 个
Soy1G3	平行子样 1	2.5	9	9	是	
	平行子样 2		9	8	否	漏检 1 个
	平行子样 3		9	9	是	
Soy1G3	平行子样 1	3	9	9	是	
	平行子样 2		9	9	是	
	平行子样 3		9	9	是	

6. 检出限的测试

6.1 检出限的初步测试

检出限测试时，样品的设置必须包含 5 个样品。由于我国转基因标签征求意见稿中的阈值是 3%（质量百分比），因此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。检出限初始所用到测试样品信息表如表 6 所示。

表 6 检出限初步测试所用到样品信息

阳性样品数目	样品	DNA 梯度（质量百分比）	转化体组别	转化体数目
1	Soy6G1	6.0%	1	10
2	Soy6G2	6.0%	2	10
3	Soy6G3	6.0%	3	9
4	Soy4G1	4.0%	1	10
5	Soy4G2	4.0%	2	10

阳性样品数目	样品	DNA 梯度（质量百分比）	转化体组别	转化体数目
6	Soy4G3	4.0%	3	9
7	Soy2G1	2.0%	1	10
8	Soy2G2	2.0%	2	10
9	Soy2G3	2.0%	3	9
10	Soy1G1	1.0%	1	10
11	Soy1G2	1.0%	2	10
12	Soy1G3	1.0%	3	9
13	Soy0.5G1	0.5%	1	10
14	Soy0.5G2	0.5%	2	10
15	Soy0.5G3	0.5%	3	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 7，在各转化体含量不低于 2%的所有测试样品及含量为 1% Soy1G2 各测试样品中，它们检出的转化体种类均与参考值一致，而 Soy1G1、Soy1G3、Soy0.5G1、Soy0.5G2、Soy0.5G3 的各测试样品中均有一定程度的漏检，Soy0.5G3 在 10 次测试实验中，8 次出现漏检。第二组 Soy0.5G2 的转化体漏检率最低，只漏检了 1 次。Soy1G1 和 Soy1G3 在 10 次测试重复实验中，分别漏检 2 次与 3 次，其中 Soy1G1 漏检了转化体 356043，Soy1G3 漏检了 IND-ØØ41Ø-5。根据上述结果，初步确定本标准中 356043 与 IND-ØØ41Ø-5 转化体的检出限为 2%（对应转化体为 1664 拷贝），表 2 中剩余其它 27 个转化体的检出限为 1%（对应转化体为 832 个拷贝）。

表 7 转化体检出限初步测试结果

样品	每个重复检出的转化体数目及种类是否与参考值均一致（√表示是，×表示否）									
	重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	重复 5	重复 6	重复 7	重复 8	重复 9	重复 10
Soy6G1	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
Soy6G2	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
Soy6G3	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
Soy4G1	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
Soy4G2	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
Soy4G3	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
Soy2G1	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
Soy2G2	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
Soy2G3	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
Soy1G1	×	√	√	√	√	√	√	√	×	√
Soy1G2	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
Soy1G3	√	√	×	√	×	×	√	√	√	√

样品	每个重复检出的转化体数目及种类是否与参考值均一致（√表示是，×表示否）									
	重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	重复 5	重复 6	重复 7	重复 8	重复 9	重复 10
Soy0.5G1	√	√	√	×	√	√	√	√	×	√
Soy0.5G2	√	√	√	√	√	√	×	√	√	√
Soy0.5G3	√	×	×	×	×	×	√	×	×	×
阴性质控品	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√

6.2 检出限的确认

由于 356043 与 IND-ØØ41Ø-5 转化体的检出限为 2%，而表 2 中剩余其它 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. 29 个转化体的分组情况和各种测试样品的制备**”部分）。Soy1G1-y，Soy1G2-y，Soy1G3-y 每个阳性样品测试 60 次。确认结果表明在 95%的置信度下（表 8），质量百分比为 2%的 356043 与 IND-ØØ41Ø-5 的样品中，及质量百分比为 1% 的其余 27 个转化体的样品中检出结果与参考值一致的概率大于 95%。因此确定本标准中的 356043 与 IND-ØØ41Ø-5 转化体的检出限可达到 2%，其余 27 个转化体的检出限可达到 1%，满足我国定量标签阈值的要求。

表 8 转化体检出限确定的测试结果

测试次数	Soy1G1-y		Soy1G2-y		Soy1G3-y	
	检出转化体数目	检测结果是否与参考值一致	检出转化体数目	检测结果是否与参考值一致	检出转化体数目	检测结果是否与参考值一致
1	10	是	10	是	9	是
2	10	是	10	是	9	是
3	10	是	10	是	9	是
4	10	是	10	是	9	是
5	10	是	10	是	9	是
6	10	是	10	是	9	是
7	10	是	10	是	9	是
8	10	是	10	是	9	是
9	10	是	10	是	9	是
10	10	是	10	是	9	是
11	10	是	10	是	9	是
12	10	是	10	是	9	是
13	10	是	10	是	9	是
14	10	是	10	是	9	是
15	10	是	10	是	9	是

测试次数	Soy1G1-y		Soy1G2-y		Soy1G3-y	
	检出转化体数目	检测结果是否与参考值一致	检出转化体数目	检测结果是否与参考值一致	检出转化体数目	检测结果是否与参考值一致
16	10	是	10	是	9	是
17	10	是	10	是	9	是
18	10	是	10	是	9	是
19	10	是	10	是	9	是
20	10	是	10	是	9	是
21	10	是	10	是	9	是
22	10	是	10	是	9	是
23	10	是	10	是	9	是
24	10	是	10	是	9	是
25	10	是	10	是	9	是
26	10	是	10	是	9	是
27	10	是	10	是	9	是
28	10	是	10	是	9	是
29	10	是	10	是	9	是
30	10	是	10	是	9	是
31	10	是	10	是	9	是
32	10	是	10	是	9	是
33	10	是	10	是	9	是
34	10	是	10	是	9	是
35	10	是	10	是	9	是
36	10	是	10	是	9	是
37	10	是	10	是	9	是
38	10	是	10	是	9	是
39	9	否	10	是	9	是
40	10	是	10	是	9	是
41	10	是	10	是	9	是
42	10	是	10	是	9	是
43	10	是	10	是	9	是
44	10	是	10	是	9	是
45	10	是	10	是	9	是
46	10	是	10	是	9	是
47	10	是	10	是	9	是
48	10	是	10	是	9	是
49	10	是	10	是	8	否
50	10	是	10	是	9	是
51	10	是	10	是	9	是
52	10	是	10	是	9	是

测试次数	Soy1G1-y		Soy1G2-y		Soy1G3-y	
	检出转化体数目	检测结果是否与参考值一致	检出转化体数目	检测结果是否与参考值一致	检出转化体数目	检测结果是否与参考值一致
53	10	是	10	是	9	是
54	10	是	10	是	9	是
55	10	是	10	是	9	是
56	10	是	10	是	9	是
57	10	是	10	是	9	是
58	10	是	10	是	9	是
59	10	是	10	是	9	是
60	10	是	10	是	9	是

6. 稳健性测试

由两个不同操作人员，在两个不同时间段，利用两台不同的建库 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。测试结果（表 9）与预期一致，表明方法稳健性符合要求。

表 9 稳健性测试结果

测试份数	测试人员 1				测试人员 1			
	检出的转化体数目及种类是否与参考值均一致（√表示是，×表示否）				检出的转化体数目及种类是否与参考值均一致（√表示是，×表示否）			
	Soy1G1-y	Soy1G2-y	Soy1G3-y	阴性质控品	Soy1G1-y	Soy1G2-y	Soy1G3-y	阴性质控品
1	√	√	√	√	√	√	√	√
2	√	√	√	√	√	√	√	√
3	√	√	√	√	√	√	√	√
4	√	√	√	√	√	√	√	√
5	√	√	√	√	√	√	√	√
6	√	√	√	√	√	√	√	√
7	√	√	√	√	√	√	√	√
8	√	√	√	√	√	√	√	√
9	√	√	√	√	√	√	√	√
10	√	√	√	√	√	√	√	√

7. 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

显示 PCR 扩增正常，又能最大程度地避免重新实验。

8. 转化体存在于平行子样中概率 p0 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，在所有测序数据量质控合格的样品中，转化体存在于平行子样中概率 p0 均大于了 99%，因此本标准 p0 的阈值设置为 99%。转基因成分结论的判定与表述如下：

1）当试样的 3 个平行子样转化体 p0 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 3 个平行子样转化体均小于等于 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 10）：8 家单位 29 种转化体的检出率为 100%，对待测样品中的所有 29 种目标转化体的鉴定结论正确率均为 100%，检测结果重现率为 100%，检出限与与实验室内部测试结果相符。

表 10 八家单位的交叉验证结果

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均一致（√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均一致（√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，检测和分析的效率高，自动化水平高；每个标记位点的测序数据量平均覆盖达到 500 条序列以上，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制的 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。

此外，本标准实施只要求实验区域分区、过程单向流动、设备器具专用且保

持通风，这些要求在普通实验室可以满足，提高了本标准实施可行性，可以在更多实验室更方便地实施。

（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 95%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、法规和经济发展、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。MNP 标记法也是一个相对较新的标记方法，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., Hrnčírová, 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.