

宋 君,郭灵安,雷绍荣. GLP 体系中转基因生物检测试验的质量保证:以转基因玉米 MON863 环境评价前期试验为例[J]. 江苏农业科学, 2016,44(8):336-338.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.097

# GLP 体系中转基因生物检测试验的质量保证: 以转基因玉米 MON863 环境评价前期试验为例

宋 君,郭灵安,雷绍荣

(四川省农业科学院质量标准与检测技术研究所,四川成都 610066)

**摘要:**转基因生物检测试验是转基因生物环境安全评价试验的前期小型短期试验,涉及到供试品和对照品的制备、基因组 DNA 的分离纯化以及目的核酸片段数量的放大和分离等步骤。在良好实验室规范(GLP)体系中,转基因生物检测试验的质量保证有其特殊性。为了加强转基因生物安全评价研究的质量保证,从转基因生物检测试验步骤、执行 GLP 的要求、试验关键阶段的检查、原始资料的审查等方面分析了转基因生物检测试验的质量保证要求和注意事项,为我国建设转基因生物安全评价 GLP 实验室提供有益探索。

**关键词:**转基因成分检测;质量保证;良好实验室规范

**中图分类号:** S513.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)08-0336-03

转基因生物是科学家根据现代社会发展对农作物提出的“高产、高抗和优质”等需求在实验室里采用“剪切和重组”甚

收稿日期:2015-06-23

基金项目:四川省质量技术监督局重要技术标准项目(编号:ZY-BZ2013-039)。

作者简介:宋 君(1973—),男,四川成都人,博士,副研究员,主要从事生物安全及分子鉴定研究。

通信作者:雷绍荣,研究员,主要从事食品安全及风险评估。

E-mail:leishaorong2004@163.com。

## 4 结论

烟叶叶片正背面都存在与叶绿素、类胡萝卜素含量显著相关的颜色参数,通过比较发现烟叶正面的颜色参数与色素含量的相关关系较背面高。而烟叶背面存在与主要化学成分含量显著相关的颜色参数,而正面颜色参数与主要化学成分含量的相关关系较小。烟叶的颜色参数与色素的含量关系密切,颜色参数可以指示烟叶色素含量的变化,可以将色差计作为判断鲜烟叶成熟度的辅助工具。

## 参考文献:

- [1] 蔡宪杰,王信民,尹启生,成熟度与烟叶质量的量化关系研究[J]. 中国烟草学报,2005,11(4):42-46.
- [2] 高汉杰,陈汉新,彭世阳,等. 烟叶成熟度鉴别方法与实用五段式烘烤新工艺应用研究的回顾[J]. 中国烟草科学,2002,23(4):39-41.
- [3] 韩锦峰,宫长荣,王瑞新,等. 烤烟叶片成熟度的研究 II. 烤烟成熟标准及不同成熟度烟叶烘烤效应的研究[J]. 中国烟草,1991(4):15-20.
- [4] 孙福山,王丽卿,刘 伟,等. 烟叶成熟度及烘烤关键指标与烟叶质量关系的研究[J]. 中国烟草科学,2002,23(3):25-27.
- [5] 龙明锦,厉福强,蒋玉梅,等. 烟叶不同田间成熟度外观评价指标

至“人工合成”等基因操作和化学合成等现代科学技术手段“制造”出的新型生物,包括转基因动物、植物和微生物。目前,转基因生物已经在全球推广种植约 20 多年<sup>[1]</sup>,但是由于潜在的安全问题<sup>[2-4]</sup>,转基因生物及产品仍然未被社会广泛接受。为了保护生物安全和生物多样性,我国农业部组建了 30 多家转基因生物安全检测实验室(包括扩项实验室),其中有 10 多家实验室具有转基因生物环境安全评价资质。目前,这些实验室都通过了基于 ISO/IEC 17025—2005《检测和校准实验室能力的通用要求》的实验室资质认定和部门审查认

研究[J]. 贵州农业科学,2007,55(6):35-37.

- [6] 李向阳,刘国顺,史 舟,等. 利用室内光谱红边参数估测烤烟叶片成熟度[J]. 遥感学报,2007,11(2):269-275.
- [7] 韩锦峰,宫长荣,黄海棠,等. 烤烟叶片成熟度的研究 I. 烤烟叶片成熟和衰老过程中某些生理生化变化的研究[J]. 中国烟草,1990(1):9-13.
- [8] 梁洪波,李念胜,元 建,等. 烤烟烟叶颜色与内在品质的关系[J]. 中国烟草科学,2002,23(1):9-11.
- [9] 刘新民. 烤烟颜色量化分析在烤烟品质评价中的应用研究[D]. 北京:中国农业科学研究院,2004:1-5.
- [10] 彭新辉,易建华,周清明,等. 同部位不同等级烤烟的色泽和化学成分及其关系[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版,2008,34(1):39-43.
- [11] 张军刚,王永利,吕国新,等. 烤烟成熟过程中鲜烟颜色值与色素含量变化及相关分析[J]. 中国烟草科学,2014,35(1):54-60.
- [12] 赵铭钦,王文基,刘国顺,等. 不同成熟度对烤后烟叶中质体色素及其降解产物的影响[J]. 植物生理通报,2009,45(1):8-12.
- [13] 霍开玲,宋朝鹏,武圣江,等. 不同成熟度烟叶烘烤中颜色值和色素含量的变化[J]. 中国农业科学,2011,44(10):2013-2021.
- [14] 张丽英,鲜兴明,杨 杰,等. 烘烤过程中烟叶颜色特征参数与色素含量的关系[J]. 烟草科技,2013(8):85-90.

可,但是转基因生物环境安全评价不纯粹是一项“产品检测”工作,而是一项研究周期至少长达 1 年,涉及植物保护学、生态学、栽培学、杂草学、昆虫学、动物分类学、分子生物学以及数理统计学等 8 门学科在内的研究。转基因生物环境安全评价是在对生物多样性影响、基因漂移和生存竞争力等田间试验以及大量的统计学数据基础上,获得转基因生物对生态环境影响的总体评价的研究结论,而不是单一的理化“检测数据”。“产品检测”(通过质量控制)强调检测数据的“准确性和重复性”,而转基因生物环境安全评价试验(通过质量保证)强调评价数据的真实性、可靠性和重现性,在此基础上通过客观、可靠的数据,科学得出转基因植物环境安全与非转基因植物环境安全的差异性结论。因此,良好的实验室规范(good laboratory practices, GLP)比 ISO/IEC 17025:2005 质量体系更适合转基因生物安全评价试验。

GLP 是指“有关机构运行以及非临床健康和环境安全研究的计划、实施、监督、记录、存档和报告的运行条件的一套质量体系”,适用于法规要求的所有非临床健康和环境安全研究,包括医药、农药、食品和饲料添加剂、化妆品、兽药和工业化学品的注册或申请许可证<sup>[5-8]</sup>。随着现代生物医学技术的发展和人类环境保护意识的加强,很多产品也需要进行生态毒理学评价<sup>[9]</sup>,如抗虫转基因作物对非靶标昆虫的毒理学评价。目前,国内外尚无关于转基因生物环境安全评价研究的 GLP 报道,本研究尝试按照 GLP 体系中质量保证的要求,对转基因玉米 MON863 环境安全评价研究的前期小型试验,转基因玉米 MON863“身份鉴定”试验的步骤、执行 GLP 的要求、试验关键阶段的检查和原始资料的审查等方面的质量保证进行了分析,以期为我国转基因生物安全检测机构的 GLP 建设奠定基础,加快我国与国际转基因生物安全评价的 MAD (mutual acceptance of data, 数据互认),缩短我国农产品出口周期,促进我国转基因生物产业健康发展。

## 1 转基因玉米 MON863 身份鉴定试验与执行 GLP 的要求

GLP 机构接受委托单位开展转基因玉米 MON863 环境安全评价研究,TFM (testing facility management, 机构负责人)与委托单位(sponsor)签署委托协议书。TFM 分别任命负责转基因玉米 MON863 环境安全评价的 SD (study director, 专题负责人)和 QAM (quality assurance management, 质量保证负责人)。SD 撰写试验计划书(试验方案),QAM 审核并保存计划书副本,TFM 审查批准计划书。SD 开始组织研究人员按照计划书开展试验(计划书中首要小型试验)。对转基因玉米 MON863 身份鉴定试验本质上是 GLP 机构对委托方提供的供试品身份确认。身份鉴定试验主要包括供试品制备、供试品 DNA 的分离纯化、MON863 转化事件核酸片段(目的片段)的扩增、电泳分离目的片段、染色与成像 6 个主要步骤。

为了保证研究质量,GLP 规定 QAU (quality assurance unit, 质量保证部门)应制订转基因玉米 MON863 身份鉴定试验的质量保证计划(通常基于研究的检查、设施的检查以及过程的检查);质量保证人员要对试验进行检查,以确定其是否遵守 GLP 原则,确定研究人员是否持有并遵守研究计划和标准操作程序;在检查中质量保证人员要详细记录检查的内容、发现的问题、采取的措施等并在记录上签名保存备查。此

外,由于 MON863 玉米身份鉴定是分子操作试验,容易污染实验室和试验体系导致假阳性结果。因此,在该试验的检查中还应重点检查安全卫生防护措施以避免试验中的任何污染,包括检查研究人员的着装、实验室正负压系统、操作间的分区等。

## 2 试验关键阶段的检查

试验关键阶段的研究质量直接影响整个试验的质量,因此对关键阶段的检查非常重要。质量保证人员首先要识别试验的关键段。MON863 身份鉴定试验共分为 6 个阶段,每个阶段都存在直接影响试验结果的干扰因素。在制样阶段,研究人员按照试验方案要对供试品进行粉碎。试验室的制样设备(干磨杯)不是一次性耗材,往往经过洗涤、烘干重复使用。若使用的干磨杯经清洗后仍然残留肉眼看不见的样品(如干燥的样品成分)就会污染下一次的试验样品。因此,质量保证人员在该阶段应重点检查研究人员是否执行干磨杯清洗标准操作程序(如笔者实验室的《干磨杯(制样仪)清洗标准操作规范》)及记录。检查研究人员的记录里有无证明干磨杯清洗后无原残留样品成分的证明试验及结果。笔者实验室用上一次试验样品的内源基因引物来扩增 MON863 玉米 DNA。若能扩增出上一次样品的内源基因,说明研磨 MON863 玉米的干磨杯没有洗净。在 DNA 提取阶段,样品间很容易交叉污染,所以质量保证人员还要检查 DNA 提取阶段是否设置了阴性、试剂空白以及提取空白对照。此外,从核酸分离、PCR 到凝胶电泳的每个阶段都应使用专用微量移液器,避免因使用过程中剧烈吸、排液体产生气溶胶从而污染移液器。质量保证人员应重点检查移液器的灭菌情况。PCR 体系的预混阶段也是最容易污染的环节,质量保证人员应根据标准操作手册检查 PCR 体系的“阳性、阴性、空白对照以及环境对照”是否设置;检查 PCR 体系预混室负压装置运行情况;是否使用专用移液器;根据标准操作规范,重点检查 PCR 体系配制与 PCR 体系的 DNA 模板加入是否分别在不同区间或超净工作台进行。PCR 体系配制完毕是否通过单向传递到扩增室。电泳、染色与成像 3 个阶段主要应检查:(1)是否根据扩增的预期 MON863 片段大小配制恰当的琼脂糖浓度;是否在考虑了电泳槽正负两极间的距离基础上,恰当设置了电压,以便合理控制目的片段在凝胶中的速度(除了凝胶的浓度外,分子运动速度也是影响电泳效果的因素);是否根据标准操作规范配制电泳缓冲液,重点检查电泳槽中正在使用的缓冲液使用时间是否超过规定的有效期(使用超过规定时间的缓冲液电泳,其缓冲能力下降会影响电泳效果甚至导致电泳失败)。(2)染色阶段重点检查正在使用的 EtBr 溶液使用时间(次数)是否超过标准操作规范规定的时间(EtBr 溶液浓度下降会影响染色效果);检查废弃的 EtBr 溶液是否无害化处置。(3)最后阶段重点检查是否正确设置成像系统的曝光时间以及废弃凝胶的无害化处理。

## 3 原始资料的审查

与 ISO/IEC17025 等其他质量体系相比,GLP 质量体系最大的特点就是研究质量的保证。GLP 不仅强调现场质量检查,也重视研究过程中所有的原始资料的审查。在本试验中,

质量保证人员应首先审查基于试验过程的原始资料,包括供试品制备、DNA 提取、PCR 扩增、电泳分离、染色以及成像等各环节的原始数据和记录,如样品制备记录、称量记录、DNA 提取记录、提取 DNA 质量检测记录、DNA 质量电子影像资料、PCR 扩增原始记录、PCR 产物影像资料。在审查这些资料时,要注意检查记录是否客观、完整;记录有无修改(修改是否规范);是否有记录日期以及研究人员签名等。总之,在 GLP 体系中记录审查的唯一指导思想是记录必须能真实反映试验的客观过程。除了基于研究过程的试验记录等原始资料的审查外,还应审查研究中设施运行的记录,比如实验室正、负压设施的运行记录等。

#### 4 讨论

GLP 质量体系与 ISO/IEC17025 质量体系是目前被国际上大多数实验室采用和通过认证的 2 种质量体系,但两者主要适用范围不同。前者主要是规范安全类研究实验室的行为,后者主要适用于检测与校准实验室。GLP 原则是在世界近代药害事件多次发生的基础上必然产生的保障药物非临床研究质量的管理体系。从概念上看,虽然 GLP 体系主要适用于药物和安全性研究的质量管理,但是 GLP 提出了一系列保证“研究质量”的原则,本质上适用于一切科学研究工作。GLP 的核心是建立一套保证试验操作规范、试验数据记录真实、研究结论科学的管理体系。

GLP 法规建立的初衷是为了杜绝人类临床用药前药物安全性评价中的数据伪造、毒理学试验的操作不规范等实验室不端行为。转基因生物安全包括食用安全和环境安全。转基因生物的食用安全一直是近年国际社会关注的热点,而转基因生物的环境安全主要是学术界争论和研究的焦点。目前,包括我国在内的国际社会尚未将转基因生物安全评价正式纳入 GLP 质量管理体系,可能是因为截止目前人类发生的疾病无一例是与食用转基因食品有关。以美国为首的转基因生物及产品生产和研发大国认为转基因食品实质等同于传统食品,所以没有像药物安全性评价那样将转基因生物安全评价纳入 GLP 体系管理。然而近年学术界关于转基因生物安全研究的失实报道层出不穷,尤其是连国际顶级学术杂志《自然》(Nature)上发表的关于转基因生物安全的科学论文也没能避免数据处理、试验方案设计不合理等问题,如“大斑蝶”<sup>[10]</sup>和“墨西哥玉米污染”<sup>[11]</sup>事件。后来经科学家审查发现“大斑蝶”论文作者 Losey 等的试验设计没有合理的对照和具体的供试花粉剂量及毒素浓度<sup>[10,12-13]</sup>;而“墨西哥玉米污染”论文作者 Quist 等则因为反向 PCR 引物设计不当,把从墨西哥当地玉米品种 K1、A3 中扩增出的产物误认为与转基因玉米品种中的 *adh1* 基因同源<sup>[11,14-15]</sup>。上述转基因生物环境安全评价研究<sup>[10-11]</sup>没有纳入 GLP 质量管理,在试验设计方案和试验数据得不到质量保证的情况下,研究人员就将研究结果在国际著名学术杂志《自然》(Nature)上发表。文章刊出后,作为 Bt 玉米主要生产商之一的 Monsanto 公司股价迅速下降了 10%;欧洲方面冻结了所有有关生产 Bt 玉米的申请;美国也对将要种植的 Bt 玉米品种作了延期处理<sup>[16]</sup>。目前,世界上有很多政府实验室和专门研究机构在开展转基因生物

安全评价研究工作<sup>[17-18]</sup>。为了规范这些实验室的研究行为,保证研究的质量,因此非常有必要将转基因生物安全评价纳入 GLP 法规管理。我国目前已经将药物、农药、化学品和化妆品等与人类生命直接相关的安全评价研究纳入 GLP 法规管理,转基因生物的安全评价暂时没有纳入 GLP 管理。本研究按照 GLP 原则,通过转基因生物安全评价前期试验的 GLP 实践,提出了在研究过程中的一些质量保证。这些质量保证可能尚未完全覆盖转基因生物安全评价试验的 GLP 要素,还需在执行 GLP 原则的研究实践中继续补充和完善。本研究报告的 GLP 质量保证在转基因生物安全评价研究中的应用是对 GLP 应用新领域的初步探讨,对建设高水平管理的转基因生物安全评价实验室有一定参考价值。

#### 参考文献:

- [1] 王根平,杜文明,夏兰琴. 植物安全转基因技术研究现状与展望[J]. 中国农业科学,2014,47(5):823-843.
- [2] 钱迎倩,马克平. 经遗传修饰生物体的研究进展及其释放后对环境的影响[J]. 生态学报,1998,18(1):1-9.
- [3] 钱迎倩,魏伟,田彦,等. 转基因作物在生产中的应用及某些潜在问题[J]. 应用与环境生物学报,1999,5(4):427-433.
- [4] 宋君,王东. 转基因玉米 MON863 品系特异定量 PCR 方法的建立[J]. 湖北农业科学,2011,50(24):5250-5253.
- [5] 陈铁春,周蔚. 我国农药 GLP 建设管理与发展[J]. 农药科学与管理,2009,30(6):14-16.
- [6] 李峰,宣尧仙. 实验室认可质量管理思想对完善我国良好实验室规范体系的借鉴[J]. 中国医药,2010,5(11):1098-1099.
- [7] 于文莲,陈会明,宋乃宁,等. 良好实验室规范与实验室认证[J]. 分析试验室,2010,29(5):120-122.
- [8] 关于公布良好实验室规范(GLP)及评价程序的有关文件的公告[Z]. 中国国家认证认可监督管理委员会,2008.
- [9] 韩铁. 我国 GLP 质量体系建设的现状、问题与对策[D]. 北京:军事医学科学院毒物药物研究所,2006.
- [10] Losey J E, Rayor L S, Carter M E. Transgenic pollen harms monarch larvae[J]. Nature, 1999, 399(6733):214.
- [11] Quist D, Chapela I H. Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico[J]. Nature, 2001, 414(6863):541-543.
- [12] Gatehouse A M, Ferry N, Raemaekers R J. The case of the monarch butterfly: a verdict is returned[J]. Trends in Genetics, 2002, 18(5):249-251.
- [13] Hodgson J. Monarch Bt corn paper questioned[J]. Nature Biotechnol, 1999, 17(7):627.
- [14] Metz M, Fattener J. Suspect evidence of transgenic contamination[J]. Nature, 2002, 416(6881):600-601.
- [15] Kaplinshy N, Braum D. Maize transgenic results in Mexico are artifacts[J]. Nature, 2002, 416(6881):601-602.
- [16] 陈茂,叶恭银,胡萃. 《Nature》有关转基因玉米生态安全争论性报道的回顾[J]. 生态学杂志,2004,23(2):80-85.
- [17] 周雪,王冀宁. 转基因食品安全监管的演化博弈分析[J]. 江苏农业科学,2014,42(10):463-466.
- [18] 王宇,沈文星. 国内外转基因作物发展状况比较分析[J]. 江苏农业科学,2014,42(6):6-9.