



# 基于联合验证数据评定转化体定量检测结果测量不确定度

赵新<sup>1</sup>, 张华<sup>2</sup>, 武玉花<sup>3</sup>, 李飞武<sup>4</sup>, 沈平<sup>2</sup>, 兰青阔<sup>1</sup>, 徐利群<sup>2</sup>, 王永<sup>1</sup>

(1. 天津市农业科学院, 天津 300384; 2. 农业农村部科技发展中心, 北京 100176; 3. 中国农业科学院 油料作物研究所, 湖北 武汉 430062; 4. 吉林省农业科学院 农业质量标准与检测技术研究所, 吉林 长春 130033)

**摘要:**随着转基因生物及产品定量标识制度的不断完善, 大批转化体定量检测方法的建立迫在眉睫, 为了在实验数据积累不足的情况下, 在检测方法建立初期及时评定测量不确定度, 本研究以耐除草剂大豆 DBN9004 定量检测方法为例, 在检测实验室积累到足够检测数据之前, 在 8 家实验室对 5 种转基因含量样品进行联合验证, 分析试验数据的再现性标准偏差, 形成“自上而下”的不确定度预评定方法。结果显示: 经格拉布斯法和科克伦法检验 8 家实验室数据, 实验室 5 的数据存在离群值和歧离值, 故剔除, 7 家实验室 5 个含量样品的再现性相对标准差  $RSD_{JR}$  为 6.025% ~ 11.532%, 均小于规定的 35%, 说明该方法具有良好的精密度。根据上述分析数据绘制回归曲线方程为  $s_{JR} = 0.0783 \times \bar{c}_j - 0.0104$ , 计算的相对标准不确定度分量  $u_r = 0.0783$ ,  $u_0 = 0.012$ , 进而将试样检测结果的平均值 ( $\bar{c}$ ) 带入公式, 计算定量结果的标准不确定度  $u = \sqrt{u_0^2 + (u_r \times \bar{c})^2} = \sqrt{0.012^2 + (0.0783 \times \bar{c})^2}$ 。结果表明基于联合验证数据评定转化体定量检测结果测量不确定度, 为转化体定量检测方法建立初期提供了科学有效的实验室自行评定方法, 为转基因生物及产品的安全监管提供了技术保障。

**关键词:**测量不确定度; 预评定; 联合验证; 转基因; 耐除草剂大豆 DBN9004; 安全监管

## Evaluation of Measurement Uncertainty of Transformation Quantitative Detection Results Based on Joint Validation Measurement Data

ZHAO Xin<sup>1</sup>, ZHANG Hua<sup>2</sup>, WU Yuhua<sup>3</sup>, LI Feiwu<sup>4</sup>, SHEN Ping<sup>2</sup>, LAN Qingkuo<sup>1</sup>, XU Liqun<sup>2</sup>, WANG Yong<sup>1</sup>

(1. Tianjin Academy of Agricultural Sciences, Tianjin 300384, China; 2. Development Center of Science and Technology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100176, China; 3. Oil Crops Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430062, China; 4. Institute of Agricultural Quality Standards and detection technology, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

**Abstract:** With the continuous improvement of the quantitative identification system of transgenic organisms and products, it is urgent to establish a large number of quantitative detection methods for transformation. In order to evaluate the measurement uncertainty in time at the early stage of method establishment when experimental data accumulation is insufficient, it is urgent to establish a scientific and effective evaluation method. This study takes the quantitative detection method of herbicide-resistant soybean DBN9004 as an example. It introduces a method of using 8 laboratories to conduct standard establishment joint validation on 5 kinds of transgenic content samples before the detection laboratory accumulates enough detection data. It analyzes the reproducibility standard deviation of experimental data, and conducts a "top-down" pre-evaluation of uncertainty. The results showed that after Grubbs and Cochran tests of the data from 8 laboratories, the data from laboratory 5 had outliers and were excluded. The relative standard deviation of reproducibility of the 5 content samples from the remaining 7 laboratories was between 6.025% and 11.532%, which was less than the specified 35%, indicating that the method has good precision.

Based on the above analysis data, the regression curve equation was  $s_{JR} = 0.0783 \times \bar{c}_j - 0.0104$ , and the relative standard uncertainty component  $u_r = 0.0783$ ,  $u_0 = 0.012$ . Then, the average value of the sample detection results ( $\bar{c}$ ) was substituted into the formula to calculate the standard uncertainty of the quantitative results  $u = \sqrt{u_0^2 + (u_r \times \bar{c})^2} = \sqrt{0.012^2 + (0.0783 \times \bar{c})^2}$ . The experiment shows that the evaluation of measurement uncertainty of transgenic quantitative detection results based on joint validation data provides a scientific and effective self-evaluation method for the establishment of transgenic quantitative detection methods in the early stage, and provides technical support for the safety regulation of transgenic organisms and products.

**Keywords:** measurement uncertainty; pre-evaluation; joint verification; genetically modified organism (GMO); herbicide-tolerant soybean DBN9004; safety supervision

随着生物育种产业化的进程不断推进, 越来越多的转基因产品进入市场和餐桌, 转基因产品的食用安全、环境风险等问题被社会普遍关注<sup>[1]</sup>。其中大

豆是主要的生物技术作物, 种植面积达到 9 190 万  $\text{hm}^2$ , 占全球生物技术作物面积的 48%; 2019 年转基因大豆的应用率为 78%, 共有 31 个国家/地区

收稿日期: 2023-10-04

基金项目: 农业生物育种重大项目 (2022ZD040201103)。

第一作者: 赵新 (1983—), 女, 硕士, 副研究员, 主要从事农产品分子检测技术研究。E-mail: zhaoxin2008999@126.com。

通讯作者: 王永 (1977—), 男, 博士, 研究员, 主要从事农产品安全质量分子检测技术研究。E-mail: wytaas@126.com;

徐利群 (1969—), 男, 硕士, 研究员, 主要从事农业转基因生物安全检测研究。E-mail: gmoetest@126.com。

批准了 38 个转基因大豆转化体,主要包括 GTS 40-3-2、MON89788、A2704-12、MON88017 等转化体<sup>[2]</sup>。截至 2013 年,全球 60 多个国家和地区制定了相关的法律和法规,要求对转基因生物及其产品(包括食品和饲料)进行标识管理<sup>[3]</sup>。我国于 2001 年和 2002 年先后发布了《农业转基因生物安全管理条例》及农业转基因生物标识管理办法等配套管理办法<sup>[2]</sup>,明确规定对进入我国流通市场的转基因生物及产品实施标识制度,并且逐步由定性标识向定量标识过渡<sup>[4]</sup>。由此标识阈值作为判定转基因产品身份的标尺成为实施转基因产品标识管理的关键点。

转基因含量定量检测结果均应提供测定值和测定值的不确定度<sup>[5]</sup>。测量不确定度是衡量检测质量的重要指标,能定量表征检测数据的分散范围,其取代了传统所采用的“误差”概念,对测量结果的精度给出了相应的评定方式,同时提出了具体的测量不确定度评价模型,有助于判断“临界值”的符合性<sup>[6-7]</sup>。为了评估检测结果的质量、可靠性以及数据的可比较性,《检验检测机构资质认定评审准则》要求实验室在特定情况下,在出具检测结果的同时给出检测结果的不确定度。然而,目前测量不确定度在化学领域的应用较为广泛,但在转基因成分定量检测中的应用却报道不多<sup>[8-9]</sup>,大多数从事转基因生物及产品的试验人员对不确定度知识及其评定方法的了解甚少或不够全面<sup>[10]</sup>。因此,建立科学全面的转基因定量检测不确定评定方法已

成为转基因生物标识制度的技术要求。

目前,测量不确定度评定方法主要是 GUM (Guide to the Uncertainty in Measurement)<sup>[10]</sup>,GUM 法主要基于“自下而上”(bottom up)的识别、计算和合成不确定度分量,是单个实验室开展测量不确定度评定的常规方法<sup>[11-12]</sup>。对于实验室间的测量不确定度评定,国际上主要采用“自上而下”(top down)方法<sup>[13-14]</sup>。而在转基因检测领域,定量检测结果不确定度评定方法的缺乏,严重阻碍了定量检测标准及定量标识制度的实施。本研究以 GB/T 27418-2017《测量不确定度评定和表示》<sup>[15]</sup>、JJF1059.1-2012《测量不确定度评定与表示》<sup>[16]</sup>为依据,以耐除草剂大豆 DBN9004 定量检测方法为示例,探讨在检测实验室开始检测工作积累到足够检测数据之前,采用多家实验室联合验证数据的再现性标准偏差“自上而下”的测量不确定度的预评定方法,旨在为我国转基因生物及产品的安全监管提供科学方法和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

耐除草剂大豆 DBN9004 纯合种子和非转基因受体大豆 Jack 种子粉末由北京大北农生物技术有限公司提供;耐除草剂大豆 DBN9004 的 5%、2%、1%、0.5% 和 0.1% 测试样及标准品 G1 ~ G5 由本实验室配制,详见表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 方法验证样品  
Table 1 Samples verified by real-time fluorescence quantitative PCR

序号 Serial number	样品名称 Sample name	样品内容 Sample content
1	空白对照	用水作为空白对照
2	阴性对照	DBN9004 非转基因受体大豆基因组 DNA
3	阳性定量质控品	以耐除草剂大豆 DBN9004 转化体质量分数或拷贝数比值与标识阈值相当的样品或标准物质作为阳性定量质控样品
4	试样 q <sub>1</sub>	拷贝数分数为 5% 的耐除草剂大豆 DBN9004 基因组 DNA
5	试样 q <sub>2</sub>	拷贝数分数为 2% 的耐除草剂大豆 DBN9004 基因组 DNA
6	试样 q <sub>3</sub>	拷贝数分数为 1% 的耐除草剂大豆 DBN9004 基因组 DNA
7	试样 q <sub>4</sub>	拷贝数分数为 0.5% 的耐除草剂大豆 DBN9004 基因组 DNA
8	试样 q <sub>5</sub>	拷贝数分数为 0.1% 的耐除草剂大豆 DBN9004 基因组 DNA,该样品为转化体实时荧光 PCR 方法定量限样品
9	校准品 G1	G1 为初始浓度 25 ng · μL <sup>-1</sup> 的 100% DBN9004 转化体成分含量大豆基因组 DNA,反应体系中 DNA 含量 50 ng 相当于 41 600 copies,该拷贝数应高于试样 S1
10	校准品 G2	G1 和 G5 满足要求的前提下,选择适宜的梯度进行稀释
11	校准品 G3	G1 和 G5 满足要求的前提下,选择适宜的梯度进行稀释
12	校准品 G4	G1 和 G5 满足要求的前提下,选择适宜的梯度进行稀释
13	校准品 G5	G5 为校准品最低浓度,其拷贝数应低于试样 S5,同时满足等于或小于定量限(约 20 copies · μL <sup>-1</sup> )且大于检测限(约 10 copies · μL <sup>-1</sup> )

1.2 主要试剂与仪器

1.2.1 试剂 植物基因组 DNA 提取试剂盒、DL2000 Marker,购自天根生化科技(北京)有限公司;Takara 2 × Premix Ex Taq (probe qPCR) Mix 试剂盒,购自上海宝生物技术有限公司;引物及 Taq-Man 探针,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成和纯化;其它生化试剂均为进口分装或国产分析纯。

1.2.2 仪器 BIO-RAD CFX96 实时荧光 PCR 仪 (Bio-Rad,美国);Quantus Fluotometer 荧光法核酸定量仪 (Promega,美国);Allegra 21R Centrifuge 高速冷冻离心机 (BECKMAN,美国)。

1.3 方法

1.3.1 联合验证 选择不少于 8 家已通过“双认证(计量认证和农业部审查认可)”的转基因生物安全检测机构,采用耐除草剂大豆 DBN9004 实时荧光定量 PCR 检测方法建立时规定的大豆内标准基因

和 DBN9004 转化体特异性序列引物和探针<sup>[17]</sup>,对 5 个已知转基因含量的试样进行联合验证。应用 Primer Express 3.0 引物设计软件,设计转化体特异引物和探针,引物探针序列详见表 2,DBN9004 转化体和大豆内标准基因的反应体系和程序相同,荧光定量 PCR 反应体系:2 × TagMan Universal PCR Master Mix 12.5 μL,正向引物和反向引物各 1.0 μL、探针 0.5 μL,DNA 模板 2 μL,加 ddH<sub>2</sub>O 至总体积 25 μL。反应程序:95 ℃变性 5 min;95 ℃变性 15 s,60 ℃退火延伸 60 s,共进行 45 个循环;在第二阶段的退火延伸(60 ℃)时段收集荧光信号。经实时荧光 PCR 扩增,绘制标准曲线,计算各试样中 DBN9004 转化体特异性序列和大豆内标准基因的拷贝数及其比值,获得各试样中 DBN9004 转化体的含量。统计分析 8 家实验室各自对统一提供的 5 个已知转基因含量样品检测数据。

表 2 PCR 引物和探针序列  
Table 2 PCR primers and probe sequences

名称 Name	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')	片段大小 Fragment size/bp	序列来源 Sequence source
Lectin 基因	QF:5'-GCCCTCTACTCCACCCCA-3'	118	农业部 2031 号公告-8-2013
Lectin gene	QR:5'-GCCCATCTGCAAGCCTTTT-3'		
	QP:5'-FAM- AGCTTCGCCGCTTCCTTCAACTTCAC - BHQ1-3'		
3'端转化体特异性序列	QF:5'-AACGCGGCCGCTCTAG -3'	165	自行设计
3'-terminal transformant	QR:5'-ATTATGTGGAAAGAAATGACCGAAA-3'		
specific sequence	QP:5'-FAM- CGCCGGGTCCCGTTTAACTATCAGT - BHQ1-3'		

1.3.2 标准曲线分析与合格判定 每个实验室采用 5 个水平校准品,根据模板拷贝数对数与 Ct 值间的线性关系,分别绘制 DBN9004 转化体特异性序列和大豆内标准基因的标准曲线,根据 PCR 板的数量收集相关标准曲线数据。根据 2259 号公告—5—2015 的要求<sup>[18]</sup>,转化体特异性序列和内标基因的标准曲线合格标准为:斜率 b 值均应位于 -3.6 ~ -3.1 区间内;决定系数 R<sup>2</sup>可接受的最低值 0.98;PCR 扩增效率 E 应位于 90% ~ 110% 的区间内。

1.3.3 检测数据统计 按照耐除草剂大豆 DBN9004 实时荧光定量 PCR 检测方法,8 个实验室各自对统一提供的 5 个已知转基因含量样品进行检测,每个水平的样品设 3 个平行子样,每个子样至少重复 3 次 PCR,每个反应的转基因含量检测数据记为  $c_{ijkl}$  (转化体拷贝数/内标准基因拷贝数),下标 i 为实验室顺序号,分别记为 1 至 8,  $p = 8$ ; j 为各水平顺序号,分别记为 1 至 5,  $q = 5$ ; k 为各平行子样的顺序号,分别记为 1 至 3,  $m = 3$ ; l 为各 PCR 重复的顺序号,分别记为 1 至 3,  $n = 3$ 。

每个实验室根据提供的各个含量样品的测定的 Ct 值和绘制的标准曲线,计算各个含量样品的转基因含量。每个子样 3 次重复 PCR 测定含量的平均值作为该水平试样的 1 次平行的结果,  $\bar{c}_{ijk} = \frac{1}{n} \sum_{l=1}^n c_{ijkl}$  (其中  $n = 3$ ),式中, n 是第 i 个实验室第 j 个水平试样中的第 k 个平行子样的重复 PCR 次数。

1.3.4 检测数据离群值分析 根据标准 GB/T6379.2 - 2004《测量方法与结果的准确度(正确度与精密度)第 2 部分:确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法》,采用科克伦法(Cochran's test)和格拉布斯法(Grubbs tests)<sup>[19]</sup>检测各实验室检测数据是否存在离群值。如果检验统计量小于或等于 5% 临界值,则接受被检验项目为正确值;如果检验统计量大于 5% 临界值,但小于或等于 1% 临界值,则称被检验项目为歧离值,该歧离值保留,并用于后续计算;若检验统计量大于 1% 临界值,则被检验项目称为统计离群值,要剔除该离群值。

计算各个含量样品在各实验室 3 个平行子样检



测结果的标准差  $s_{ij}$ ,按照 8 个实验室的  $s_{ij}$  进行从大到小排序,找出的最大标准差  $s_{\max,j}$ ,计算检验统计量值  $C_j$ 。计算各水平的科克伦检验统计量  $C_j = \frac{s_{\max,j}^2}{\sum_{i=1}^p s_{ij}^2}$ ,式中,  $C_j$  为每个含量样品的科克伦检验统计量,  $s_{\max,j}$  为各实验室第  $j$  水平  $m$  个平行子样测量结果标准差中的最大值(共 8 个实验室,8 个数据比较),  $s_{ij}$  为第  $i$  个实验室第  $j$  个含量样品  $m$  个平行子样检测结果的 标准 差。  $s_{ij} = \sqrt{\sum_{k=1}^m (\bar{c}_{ijk} - \bar{\bar{c}}_{ij})^2 / (m-1)}$ , 式中  $p$  为实验室个数。

对每个含量样品,分别将各个实验室 3 个平行子样转基因含量的平均值按大小升序排列,检验最大平均值  $\bar{\bar{c}}_{\max,j}$  和最小平均值  $\bar{\bar{c}}_{\min,j}$  是否为离群值。计算  $j$  含量样品最大平均值格拉布斯检验统计量  $G_{\max,j} = \frac{\bar{\bar{c}}_{\max,j} - \bar{\bar{c}}_j}{s_j}$ , 式中,  $G_{\max,j}$  为第  $j$  水平最大平均值格拉布斯检验统计量,  $\bar{\bar{c}}_{\max,j}$  为第  $j$  水平每个实验室平均值。在 8 个实验室中选其平均值最大的 1 个,  $\bar{\bar{c}}_j$  为第  $j$  水平 8 个实验室 3 个平行子样的总平均值(即 24 个结果的平均值),  $s_j$  为第  $j$  水平 8 个实验室平均值的标准差。其中  $s_j = \sqrt{\sum_{i=1}^8 (\bar{\bar{c}}_{ij} - \bar{\bar{c}}_j)^2 / (8-1)}$ , 第  $j$  水平最小平均值格拉布斯检验统计量,  $G_{\min,j} = \frac{\bar{\bar{c}}_j - \bar{\bar{c}}_{\min,j}}{s_j}$ , 式中,  $\bar{\bar{c}}_{\min,j}$  为第  $j$  水平每个实验室平均值中被选中最小的值,  $\bar{\bar{c}}_j$  为第  $j$  水平 8 个实验室总平均值,  $s_j$  为第  $j$  水平 8 个实验室平均值的标准差。

1.3.5 正确度分析 计算实验室测量总平均值与标准值的偏倚  $bias_j$  和相对偏倚  $bias_{Rj}$ ,判定验证检测结果的正确度。  $bias_j = \bar{\bar{c}}_j - c_{E,j}$ ,  $bias_{Rj} = \frac{\bar{\bar{c}}_j - c_{E,j}}{c_{E,j}} \times 100\%$ , 式中,  $bias_j$  为  $j$  含量样品测量平均值的偏倚,  $bias_{Rj}$  为  $j$  含量样品测量平均值的相对偏倚,  $\bar{\bar{c}}_j$  为  $j$  含量样品的测量总平均值,  $c_{E,j}$  为  $j$  含量样品标准值。

1.3.6 精密度分析 根据 GB/T6379.2-2004《测量方法与结果的准确度》,对有效检测数据进行统计,分析方法的重复性和再现性。分两种情况,一是理想情况下,即各实验室各含量样品子样个数相等(相当于重复测量次数相等);二是无论各实验室重复次数  $m_{ij}$  是否相等,均可根据扩展通用公式,按 5 个统计量进行简便计算。本研究以第二种情况为例,进行精密度分析。

统计量的简便计算:以第  $j$  水平为例,无论各实验室平行子样个数  $m_{ij}$  是否相等,均可按 5 个统计量简便计算验证结果的重复性方差  $s_{jr}^2$ 、实验室间方差  $s_{jL}^2$  和再现性方差  $s_{jR}^2$ ,  $T_{1j} = \sum_{i=1}^p m_{ij} \bar{\bar{c}}_{ij}$ ,  $T_{2j} = \sum_{i=1}^p m_{ij} \bar{\bar{c}}_{ij}^2$ ,  $T_{3j} = \sum_{i=1}^p m_{ij}$ ,  $T_{4j} = \sum_{i=1}^p m_{ij}^2$  和  $T_{5j} = \sum_{i=1}^p (m_{ij} - 1) s_{ij}^2$ 。其中,  $s_{ij} = \sqrt{\sum_{k=1}^{m_{ij}} (\bar{c}_{ijk} - \bar{\bar{c}}_{ij})^2 / (m_{ij} - 1)}$ , 式中,  $T_{1j}$ 、 $T_{2j}$ 、 $T_{3j}$ 、 $T_{4j}$  和  $T_{5j}$  分别为  $j$  水平的  $T_1$ 、 $T_2$ 、 $T_3$ 、 $T_4$  和  $T_5$  统计量,  $m_{ij}$  为  $i$  实验室  $j$  水平的平行子样个数,  $\bar{\bar{c}}_{ij}$  为  $i$  实验室  $j$  水平检测结果平均值(平行子样的平均值),  $s_{ij}^2$  为  $i$  实验室  $j$  水平 3 个平行子样检测结果的方差,  $p$  为参加联合验证的实验室个数。

方差(variance)组分估计:重复性方差(实验室内方差)计算公式为  $s_{jr}^2 = MS_r = \frac{\sum_{i=1}^p \sum_{k=1}^{m_{ij}} (\bar{c}_{ijk} - \bar{\bar{c}}_{ij})^2}{pm - p} = \frac{\sum_{i=1}^p (m_{ij} - 1) s_{ij}^2}{\sum_{i=1}^p m_{ij} - p} = \frac{T_{5j}}{T_{3j} - p}$ 。当各实验室重复数  $m_{ij}$  不等时,需要先计算平均的重复数,  $\bar{m}_j = \frac{1}{p-1} \times [\sum_{i=1}^p m_{ij} - \frac{(\sum_{i=1}^p m_{ij})^2}{\sum_{i=1}^p m_{ij}}] = \frac{T_{3j}^2 - T_{4j}}{(p-1) \cdot T_{3j}}$ , 再计算实验室间方差,  $s_{jL}^2 = (\frac{\sum_{i=1}^p m_{ij} (\bar{\bar{c}}_{ij} - \bar{\bar{c}}_j)^2}{p-1} - s_{jr}^2) / m_j = (\frac{\sum_{i=1}^p m_{ij} (\bar{\bar{c}}_{ij} - \bar{\bar{c}}_j)^2}{p-1} - s_{jr}^2) / \bar{m}_j = (\frac{\sum_{i=1}^p m_{ij} \bar{\bar{c}}_{ij}^2 - \frac{(\sum_{i=1}^p m_{ij} \bar{\bar{c}}_{ij})^2}{\sum_{i=1}^p m_{ij}}}{p-1} - s_{jr}^2) / \bar{m}_j = (\frac{\sum_{i=1}^p m_{ij} \sum_{k=1}^{m_{ij}} \bar{c}_{ijk}^2 - (\sum_{i=1}^p m_{ij} \bar{\bar{c}}_{ij})^2}{(p-1) \sum_{i=1}^p m_{ij}} - s_{jr}^2) / \bar{m}_j = (\frac{\sum_{i=1}^p m_{ij} \sum_{k=1}^{m_{ij}} \bar{c}_{ijk}^2 - (\sum_{i=1}^p m_{ij} \bar{\bar{c}}_{ij})^2}{(p-1) \sum_{i=1}^p m_{ij}} - s_{jr}^2) / \bar{m}_j = [\frac{T_{2j} T_{3j} - T_{1j}^2}{(p-1) T_{3j}} - s_{jr}^2] / [\frac{(p-1) \cdot T_{3j}}{T_{3j}^2 - T_{4j}}]。$

再现性方差计算: $s_{jr}^2 = s_{jL}^2 + s_{jr}^2$ 。

相对标准差计算:无论使用哪种方式计算,当获得重复性方差 $s_{jr}^2$ 和再现性方差 $s_{jR}^2$ 后,即可开方获得其相应的标准差,即重复性标准差 $s_{jr}$ 和再现性标准差 $s_{jR}$ ,从而可以计算出重复性相对标准差 $RSD_{jr}$ 和再现性相对标准差 $RSD_{jR}$ , $RSD_{jr} = \frac{s_{jr}}{\bar{c}_j} \times 100\%$ , $RSD_{jR} = \frac{s_{jR}}{\bar{c}_j} \times 100\%$ ,式中, $s_{jr}$ 为第 $j$ 水平的重复性标准差, $\bar{c}_j$ 为第 $j$ 水平的总平均值, $s_{jR}$ 为第 $j$ 水平的再现性标准差。

1.3.7 测量不确定度评定 依据国家标准 GB/T 6379.2-2004,计算实时荧光 PCR 定量方法实验室间统一验证样品(各水平顺序号用 $j$ 表示,共 $q$ 个水平)的检测数据再现性标准差 $s_{jR}$ 与平均值 $\bar{c}_j$ ,确定绝对标准不确定度 $u_0$ 和相对标准不确定度 $u_r$ , $s_{jR} = u_r \times \bar{c}_j + u_0$ 。式中: $s_{jR}$ 为再现性标准差; $u_r$ 为回归曲线的斜率,用作定量结果的相对标准不确定度分量; $\bar{c}_j$ 为联合验证试样 $j$ 水平检测数据(3个子样每个子样3次重复)平均值(多个实验室检测数据,每个试样3个平行子样、每个子样3次重复); $u_0$ 为回归曲线的截距,用作定量结果的绝对标准不确定度分量。如果回归曲线的截距 $u_0$ 是负值,取最低浓度试样的再现性标准差 $s_{jR}$ 作为 $u_0$ 的估计值。并绘制再现性标准差 $s_{jR}$ 与各水平( $q=5$ )验证样品检测数据平均值( $\bar{c}_j$ )的回归曲线,确定定量结果的相对标准

不确定度分量 $u_r$ 和绝对标准不确定度分量 $u_0$ 。

标准不确定度 $u$ 的合成:根据回归曲线的截距 $u_0$ 和斜率 $u_r$ ,评定试样定量结果的标准不确定度, $u = \sqrt{u_0^2 + (u_r \times \bar{c})^2}$ ,式中, $u$ 为试样定量结果的标准不确定度,为回归直线的截距,即绝对标准不确定度, $u_r$ 为回归直线的斜率,即相对标准不确定度, $\bar{c}$ 为检测试样(不是不确定度评定试样)3个平行子样3次重复检测数据平均值试样、3次重复3个平行检测数据平均值。

扩展不确定度的表示:取扩展因子 $k=2$ ,则试样定量结果的扩展不确定度表示为 $U=ku$ 。

2 结果与分析

2.1 标准曲线合格判定

经统计,8个实验室耐除草剂大豆 DBN9004 转化体特异性序列和 *Lectin* 内标基因的标准曲线斜率分别为-3.566~-3.182和-3.541~-3.186,位于可接受区间-3.6~-3.1;决定系数 $R^2$ 分别为0.995~1.000和0.993~1.000,大于可接受的最低值0.98;PCR扩增效率分别为90.7%~106.2%和91.6%~106.0%,位于允许区间90%~110%,符合2259号公告-5-2015《转基因植物及其产品成分检测 实时荧光定量 PCR 方法制定指南》的要求,满足验证样品的定量需求。

2.2 检测数据统计

统计8家实验室对5个含量样品各子样转基因含量的检测结果如表3所示。

表3 8个实验室对5个含量样品各3个子样的检测结果统计汇总  
Table 3 Statistical summary of test results of 3 sub-samples of 5 content samples from 8 laboratories 单位:%

实验室子样值 Laboratory subsample values		样品转基因含量标称值 Nominal transgenic content of sample				
		5.0%	2.0%	1.0%	0.5%	0.1%
实验室 1 Lab 1	子样 1 Subsample 1	5.03	2.14	1.07	0.51	0.11
	子样 2 Subsample 2	5.02	2.16	1.09	0.50	0.11
	子样 3 Subsample 3	5.26	2.22	1.08	0.50	0.10
实验室 2 Lab 2	子样 1 Subsample 1	4.96	2.03	1.03	0.50	0.09
	子样 2 Subsample 2	5.00	2.03	1.03	0.51	0.11
	子样 3 Subsample 3	4.94	2.02	1.01	0.50	0.09
实验室 3 Lab 3	子样 1 Subsample 1	5.36	2.12	1.12	0.52	0.13
	子样 2 Subsample 2	4.75	1.85	0.95	0.49	0.09
	子样 3 Subsample 3	5.26	2.17	1.13	0.44	0.10
实验室 4 Lab 4	子样 1 Subsample 1	5.82	2.28	1.10	0.57	0.11
	子样 2 Subsample 2	5.67	2.26	1.07	0.56	0.10
	子样 3 Subsample 3	5.47	2.23	1.14	0.58	0.12

表 3 (续)

实验室子样值 Laboratory subsample values		样品转基因含量标称值 Nominal transgenic content of sample				
		5.0%	2.0%	1.0%	0.5%	0.1%
实验室 5 Lab 5	子样 1 Subsample 1	4.72	1.92	1.07	0.50	0.11
	子样 2 Subsample 2	4.15	1.69	0.83	0.47	0.09
	子样 3 Subsample 3	5.54	2.36	1.20	0.59	0.13
实验室 6 Lab 6	子样 1 Subsample 1	4.82	2.04	0.99	0.50	0.10
	子样 2 Subsample 2	4.93	1.97	0.99	0.53	0.10
	子样 3 Subsample 3	4.89	1.92	0.98	0.47	0.09
实验室 7 Lab 7	子样 1 Subsample 1	4.73	2.04	1.14	0.46	0.10
	子样 2 Subsample 2	4.48	1.90	1.04	0.46	0.09
	子样 3 Subsample 3	4.26	2.02	1.10	0.44	0.11
实验室 8 Lab 8	子样 1 Subsample 1	5.45	1.98	0.93	0.49	0.09
	子样 2 Subsample 2	5.52	2.09	1.03	0.54	0.11
	子样 3 Subsample 3	5.12	2.03	1.01	0.50	0.09

注:实验室子样值为每个子样的 3 次重复转化体拷贝数平均值与内标准基因拷贝数平均值的比值作为该子样 1 个平行的值。  
Note: The laboratory subsample value is the ratio of the mean copy number of the 3-repeat transformant for each subsample to the mean copy number of the internal standard gene as a parallel value for this subsample.

2.3 检测数据离群值分析结果

科克伦检验结果表明,对 5.0%、2.0% 和 1.0% 样品,实验室 5 的检验统计量值 > 1% 临界值 0.615,为离群值;对 0.5% 样品,实验室 5 的检验统

计量值 > 5% 临界值为 0.516, < 1% 临界值 0.615, 为歧离值,歧离值保留参与后续计算;对 0.1% 样品,无歧离值或离群值。实验室 5 共有 3 组数据为离群值,1 组数据为歧离值,因此应剔除。

表 4 各含量样品标准差最大的实验室及其检验统计量

Table 4 Laboratories with the largest standard deviations of each content sample and their test statistics

序号 Serial number	样品水平标称值 Sample level nominal value	$S_{ij}$ 最大实验室( $s_{\max,j}$ )	检验统计量值 $C_j$ Test the statistical value $C_j$	5% 临界值	1% 临界值
		$S_{ij}$ Maximum laboratory		5% critical value	1% critical value
		( $s_{\max,j}$ )		实验室 p = 8、平行 m = 3 时 Laboratory p = 8, parallel m = 3	
1	5.0%	实验室 5	0.651		
2	2.0%	实验室 5	0.723		
3	1.0%	实验室 5	0.674	0.516	0.615
4	0.5%	实验室 5	0.525		
5	0.1%	实验室 3	0.317		

参试的 5 个样品最大平均值格拉布斯检验统计量依次为 1.707,1.944,1.239,1.955 和 1.176;最小平均值格拉布斯检验统计量依次为 1.573,0.841,1.331,1.576 和 1.037。当实验室个数 p = 8、子样个数 m = 3 时,格拉布斯检验 5% 临界值为2.126;1% 临界值为 2.274。对 5 个含量样品,最大平均值格拉布斯检验统计量和最小平均值格拉布斯检验统计量均小于格拉布斯检验 5% 临界值2.126,表明

8 个实验室数据无离群值或歧离值。

2.4 正确度分析结果

计算样品各水平下,7 个实验室测量总平均值与标称值的偏倚 $bias_j$ 和相对偏倚 $bias_{Rj}$ ,汇总结果详见表 5。5 个含量样品检测结果总平均值与标称值的相对偏倚 $bias_{Rj}$ 为 0.667% ~ 4.905%,在允许的  $\pm 25\%$  区间内,表明 DBN9004 转化体荧光定量 PCR 方法检测结果具有良好的正确度。

表5 5个含量样品测量总平均值的偏倚分析

Table 5 Bias analysis of the total mean values measured for 5 content samples

单位: %

统计量 Statistic	水平 Level				
	1	2	3	4	5
标称值 Nominal value	5.0	2.0	1.0	0.5	0.1
总平均值 Total mean	5.083	2.071	1.049	0.503	0.102
偏倚 $bias_j$	0.083	0.071	0.049	0.003	0.002
相对偏倚 $bias_{Rj}$	1.657	3.571	4.905	0.667	1.905

2.5 精密度分析结果

2.5.1 检测结果的平均值和标准差

统计各实验室(共7个)、各水平(含量)样品(共5个)的检测结

果平均值( $\bar{c}_{ij}$ )和标准差( $s_{ij}$ )表明:5.0%水平样品

检测结果的平均值为4.880%~5.653%,标准差为

0.031%~0.327%;2.0%水平样品检测结果的平均

值为1.977%~2.257%,标准差为0.006%~0.172%;

1.0%水平样品检测结果的平均值为0.987%~

1.103%,标准差为0.006%~0.101%;0.5%和

0.1%水平样品检测结果的平均值分别为0.453%~

0.570%和0.097%~0.110%,标准差分别为

0.006%~0.040%和0.006%~0.021%(表6和7)。

表6 7个实验室5个含量样品的检测平均值( $\bar{c}_{ij}$ )和平行子样个数( $m_{ij}$ )

Table 6 Average values of 5 samples in 7 laboratories( $\bar{c}_{ij}$ ) and number of parallel subsamples ( $m_{ij}$ )

实验室 Laboratory	不同含量样品标称转基因含量 Nominal transgenic content of samples with different content									
	5.0%		2.0%		1.0%		0.5%		0.1%	
	$\bar{c}_{ij}$	$m_{ij}$	$\bar{c}_{ij}$	$m_{ij}$	$\bar{c}_{ij}$	$m_{ij}$	$\bar{c}_{ij}$	$m_{ij}$	$\bar{c}_{ij}$	$m_{ij}$
Lab 1	5.103	3	2.173	3	1.080	3	0.503	3	0.107	3
Lab 2	4.967	3	2.027	3	1.023	3	0.503	3	0.097	3
Lab 3	5.123	3	2.047	3	1.067	3	0.483	3	0.107	3
Lab 4	5.653	3	2.257	3	1.103	3	0.570	3	0.110	3
Lab 6	4.880	3	1.977	3	0.987	3	0.500	3	0.097	3
Lab 7	4.490	3	1.987	3	1.093	3	0.453	3	0.100	3
Lab 8	5.363	3	2.033	3	0.990	3	0.510	3	0.097	3

表7 各实验室5个含量样品检测数据的标准差( $s_{ij}$ )和平行子样个数( $m_{ij}$ )

Table 7 Standard deviation( $s_{ij}$ ) and number of parallel subsamples( $m_{ij}$ ) of 5 content samples detected in each laboratory

实验室 Laboratory	不同含量样品标称转基因含量 Nominal transgenic content of samples with different content									
	5.0%		2.0%		1.0%		0.5%		0.1%	
	$s_{ij}$	$m_{ij}$	$s_{ij}$	$m_{ij}$	$s_{ij}$	$m_{ij}$	$s_{ij}$	$m_{ij}$	$s_{ij}$	$m_{ij}$
Lab 1	0.136	3	0.042	3	0.010	3	0.006	3	0.006	3
Lab 2	0.031	3	0.006	3	0.012	3	0.006	3	0.012	3
Lab 3	0.327	3	0.172	3	0.101	3	0.040	3	0.021	3
Lab 4	0.176	3	0.025	3	0.035	3	0.010	3	0.010	3
Lab 6	0.056	3	0.060	3	0.006	3	0.030	3	0.006	3
Lab 7	0.235	3	0.076	3	0.050	3	0.012	3	0.010	3
Lab 8	0.214	3	0.055	3	0.053	3	0.026	3	0.012	3

2.5.2 各含量样品的统计量和方差 计算得到 5 个含量样品的统计量如表 4 所示。并由此计算  $j$  水平下重复性方差  $s_{jr}^2$ 、实验室间方差  $s_{jL}^2$  差和再现性方差  $s_{jR}^2$  (表 8)。

表 8 5 个含量样品重复性和再现性统计分析  
Table 8 Statistical analysis of repeatability and reproducibility of 5 content samples

统计量 Statistic	水平 Level				
	1	2	3	4	5
标称值 Nominal value/%	5.0	2.0	1.0	0.5	0.1
$T_{1j}$	106.74	43.50	22.03	10.57	2.14
$T_{2j}$	544.98	90.30	23.15	5.34	0.22
$T_{3j}$	21	21	21	21	21
$T_{4j}$	63	63	63	63	63
$T_{5j}$	0.5225	0.0889	0.0341	0.0071	0.0019
重复性方差 $s_{jr}^2$ Repeatability variance	0.0373	0.0063	0.0024	0.0005	0.0001
实验室间方差 $s_{jL}^2$ Inter-laboratory variance	0.1229	0.0087	0.0016	0.0011	0*
再现性方差 $s_{jR}^2$ Reproducibility variance	0.1603	0.0151	0.0010	0.0016	0.0001

注: \* 计算值为  $-1.323 \times 10^{-5}$ , 结果小于 0, 按 0 报告。  
Note: \* The calculated value is  $-1.323 \times 10^{-5}$ , the result is less than 0, press 0 to report.

2.5.3 各含量样品重复性和再现性的标准差和相对标准差 计算 5 个含量样品检测数据的重复性标准差  $s_{jr}$ 、重复性相对标准差  $RSD_{jr}$ 、再现性标准差  $s_{jR}$  和再现性相对标准差  $RSD_{jR}$  结果如表 9 所示; 5 个含量样品的重复性相对标准差  $RSD_{jr}$  在 3.801% ~ 11.532% 之间, 均小于规定的 25%; 再现性相对标准差  $RSD_{jR}$  在 6.025% ~ 11.532% 之间, 均小于规定的 35%; 重复性和再现性分析结果表明 DBN9004 转化体荧光定量 PCR 方法测量结果具有良好的精密度。

表 9 5 个含量样品的重复性和再现性分析  
Table 9 Repeatability and reproducibility analysis of 5 content samples

统计量 Statistic	水平 Level				
	1	2	3	4	5
标称值 Nominal value	5.0	2.0	1.0	0.5	0.1
检测总平均值 Total mean value of detection	5.083	2.071	1.049	0.503	0.102
重复性标准差 $s_{jr}$ Repetitive standard deviation	0.193	0.080	0.049	0.022	0.012
重复性相对标准差 $RSD_{jr}$ Repetitive relative standard deviation/%	3.801	3.846	4.707	4.464	11.532
再现性标准差 $s_{jR}$ Reproducibility standard deviation	0.400	0.123	0.063	0.040	0.012
再现性相对标准差 $RSD_{jR}$ Reproducibility relative standard deviation/%	7.876	5.923	6.025	7.872	11.532

2.6 准确度分析结果

方法的准确度包括正确度和精密度。汇总表 4、表 5 和表 8 的数据, 形成实验室联合验证数据的汇总分析结果如表 10 所示; 5 个含量样品 7 个实验室的测量平均值分别为 5.083%、2.071%、1.049%、0.503% 和 0.102%, 检测平均值相对偏倚  $bias_{Rj}$  为 0.667% ~ 4.905%, 位于  $\pm 25\%$  的区间内, 正确度符合要求。重复性相对标准差  $RSD_{jr}$  均小于 25%, 再现性相对标准差  $RSD_{jR}$  均小于 35%, 精密度符合要求。鉴于结果的正确度和精密度指标均符合农业部 2259 号公告 - 5 - 2015 的要求, 说明本方法具有良好的准确度。



表 10 实验室联合验证数据的汇总分析结果

Table 10 Summary analysis results of laboratory joint validation data

项目 Item	测试样品预期值 Expected value of test sample				
	5.0%	2.0%	1.0%	0.5%	0.1%
返回数据实验室数	8	8	8	8	8
Returns the number of data laboratories					
每个实验室平行样品个数	3	3	3	3	3
Number of parallel samples per lab					
离群值数	1	1	1	1 <sup>*</sup>	1 <sup>#</sup>
Number of outliers					
剔除离群值原因	科克伦检验				—
Eliminate the cause of outliers					
平均值	5.083	2.071	1.049	0.503	0.102
Mean value					
重复性标准差 $s_{jr}$	0.193	0.080	0.049	0.022	0.012
Repetitive standard deviation					
重复性相对标准差 $RSD_{jr}$	3.801	3.846	4.707	4.464	11.532
Repetitive relative standard deviation					
再现性标准差 $s_{jR}$	0.400	0.123	0.063	0.040	0.012
Reproducibility standard deviation					
再现性相对标准差 $RSD_{jR}$	7.876	5.923	6.025	7.872	11.532
Reproducibility relative standard deviation					
偏倚 $bias_j$	0.083	0.071	0.049	0.003	0.002
Relative bias $bias_{Rj}$ (%)	1.657	3.571	4.905	0.667	1.905

注：\* 表示在 0.5% 水平上,实验室 5 的测试结果为岐离值,但由于该实验室有 3 组数据为离群值,该组数据一起剔除;# 表示在 0.1% 水平上,实验室 5 的测试结果为正常值,但由于该实验室有 3 组数据为离群值,该组数据一起剔除。

Note: \* indicate at the 0.5% level, the test result of laboratory 5 is an outlier, but because three sets of data in this laboratory are outliers, this set of data is excluded; # indicate at the 0.1% level, Lab 5's test result is normal, but because 3 sets of data in this lab are outliers, this set of data is excluded.

2.7 测量不确定度评定

2.7.1 绝对标准不确定度 $u_0$ 和相对标准不确定度 $u_r$ 的确定 根据表 9 中的数据绘制的回归曲线如图 1 所示。回归曲线为 $s_{jR}=0.0783\times\overline{\overline{c}}_j-0.0104$ ,

计算的相对标准不确定度分量 $u_r=0.0783$ ,由于回归曲线的截距为 $-0.0104$ ,为负值,取最低浓度试样(0.1%)的再现性标准差 $s_R$ (0.012)作为 $u_0$ 的估计值,所以 $u_0=0.012$ 。

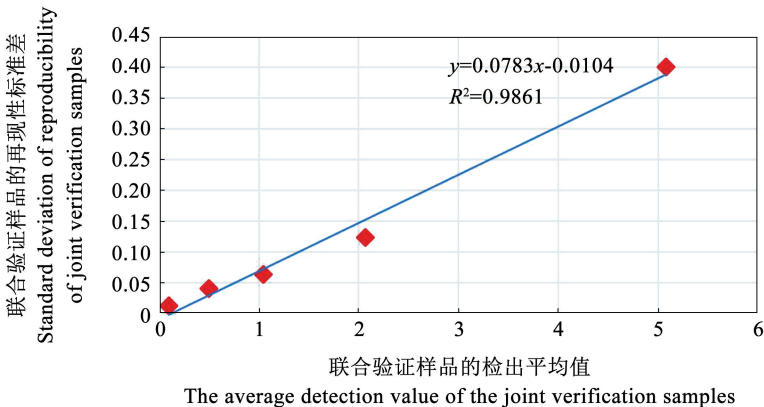


图 1 实验室间联合验证结果再现性标准差与验证样品检测平均值间的线性关系

Fig.1 The linear relationship between the reproducibility standard deviation of the results of the inter-laboratory joint validation and the mean value of the test samples

2.7.2 标准不确定度  $u$  的合成 检测结束后,检测实验室将试样检测结果的平均值( $\bar{c}$ )带入公式  $u = \sqrt{u_0^2 + (u_r \times \bar{c})^2} = \sqrt{0.012^2 + (0.078\ 3 \times \bar{c})^2}$ , 计算定量结果的标准不确定度。

2.7.3 扩展不确定度  $U$  的计算 取扩展因子  $k=2$ , 则试样定量结果的扩展不确定度为  $U=ku$ 。

3 讨论

伴随各国转基因阈值管理和标识制度的实施,转基因产品进行定量检测是产业发展的必然要求<sup>[20]</sup>。测量不确定度是评估检测结果可靠性的重要参数,尤其是当检测结果位于限量值附近时,对产品的“符合性”判断必须依靠检测结果的不确定度才能做出正确、科学的判断。本研究的评定方法是在转化体实时荧光定量检测方法建立时的测量不确定度预评定方法,即在检测实验室开始检测工作积累到足够检测数据之前,采用多家实验室联合验证的再现性标准偏差自上而下预评定的不确定度报告结果,其优势在于可以在方法建立时,及时配套给出其测量不确定度的评定方法,满足检测需求,而不足之处在于其为非自行评定方法,并不代表各实验室自身的定量检测方法测量不确定度的评定水平。因此,当检测工作积累到足够数据时,实验室应采用自行评定的不确定度报告结果。自行评定不确定度的方法可以选择自上而下或自下而上中的任一方式进行,自下而上通常采用 GUM 法, GB/T 27418 - 2017 和 JJF 1059.1 - 2012《测量不确定度评定与表示》均有规定,GUM 法是所有测量不确定度评定的基础,但其难度较大,要求操作者深入了解测量方法,并建立特性值和其输入量之间的数学模型,应用门槛较高;自上而下与 GUM 法相比,不确定度评定方法大大简化了不确定度评定程序,便于检测实验室采用,并且以成功应用于医学检测。因此,建议检测实验室宜优先选择自上而下的方式进行评定。

在采用多家实验室联合验证的再现性标准偏差预评定测量结果的不确定度时,为减小实验室间检测数据差异性,需满足以下条件以确保评定方法的科学性和有效性:第一,多家实验室联合验证用样品(统一提供的样品)与实验室检测的试样类型相似;第二,各实验室检测数据经科克伦法(Cochran's test)和格拉布斯法(Grubbs tests)检测符合有效检测数据要求;第三,实验室内试样检测数据的重复性相对标准差与多家实验室联合验证样品检测数据的重复性相对标准差相近;第四,实验

室内试样检测数据再现性相对标准差不大于多家实验室联合验证样品检测数据的再现性标准差;第五,若用有证标准物质作阳性定量质控品,阳性定量质控品检测结果的偏倚不显著,即阳性定质控品的检测结果在标准物质标准值的扩展不确定度范围内;第六,联合验证样品提供了标准值,本方法验证样品满足该条件;第七,联合验证实验室应采取适当措施确保测量过程处于性能持续确认的统计控制状态,如使用任何相对稳定、均匀的测试样品或物料对实验室偏倚和精密度进行定期核查;人员定期培训,持证上岗等质量保证。

本研究阐述了基于转基因检测实验室联合验证数据评定测量不确定度的方法及结果的表示。适用于尚未标准化的或非常规使用的测量方法进行初步精密度估计时,参与联合验证的每家实验室均对测试样本的相同水平进行测试并使用相同数目的测试结果进行数据分析,通过确定重复性和再现性标准差预评定的测量不确定度。为转基因成分定量检测领域和从事转基因生物及产品的试验人员提供了转基因成分定量检测结果测量不确定度评定的一种思路和方法,为进一步建立科学全面的转基因定量检测不确定评定方法服务转基因生物标识监管提供技术支撑。

4 结论

本研究以耐除草剂大豆 DBN9004 实时荧光定量 PCR 检测方法为例,联合 8 家通过“双认证(计量认证和农业部审查认可)”的转基因生物安全检测机构对该定量检测方法进行联合验证,收集 8 家实验室各自对统一提供的 5 个已知转基因含量样品检测数据进行分析,由此对该定量方法的测量不确定度进行预评定。经检测数据分析,5 个含量样品的重复性相对标准差  $RSD_{jr}$  为 3.801% ~ 11.532%,均小于规定的 25%,再现性相对标准差  $RSD_{JR}$  为 6.025% ~ 11.532%,均小于规定的 35%,表明该方法具有良好的精密度。根据上述分析数据绘制回归曲线为  $s_{jr} = 0.078\ 3 \times \bar{c}_j - 0.010\ 4$ , 相对标准不确定度分量  $u_r = 0.078\ 3$ 、 $u_0 = 0.01\ 2$ ,进而得出该定量方法的测量不确定度为  $U = 2u = 2 \sqrt{u_0^2 + (u_r \times \bar{c})^2} = 2 \sqrt{0.012^2 + (0.078\ 3 \times \bar{c})^2}$ 。本方法可为耐除草剂大豆 DBN9004 实时荧光定量检测方法,在检测实验室开始检测工作积累到足够检测数据之前,提供检测结果的测量不确定度预评定方法,为转基因生物及产品的安全监管提供技术保障。

参考文献

[1] 国际农业生物技术应用服务组织. 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(1): 114-119. ( International Agricultural Biotechnology Application Services Organization. Global biotechnology/GM crop commercialization development trend in 2019 [J]. China Biotechnology, 2021, 41(1): 114-119. )

[2] 宋君, 李洁, 常丽娟, 等. 转基因玉米 MON88017 测量不确定度的评定[J]. 四川师范大学学报(自然科学版), 2018, 41(5): 681-689. ( SONG J, LI J, CHANG L J, et al. Measurement uncertainty from genetically modified maize MON88017 estimated by two methods [J]. Journal of Sichuan Normal University (Natural Science), 2018, 41(5): 681-689. )

[3] JAMES C. Brief 46: global status of commercialized biotech/GM crops: 2013 [EB/OL]. <https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/46/download/isaaa-brief-46-2013.pdf>.

[4] 熊娟, 黄启红, 伍玲燕, 等. 实时荧光定量 PCR 检测转基因玉米 Bt176 测量不确定度分析[J]. 安徽农业大学学报, 2017, 44(1): 119-123. ( XIONG J, HUANG Q H, WU L Y, et al. Uncertainty in detecting event-specific fragments of genetically modified maize BT176 by quantitative real time PCR[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2017, 44(1): 119-123. )

[5] KIM J H, PARK S B, ROH H J, et al. A simplified and accurate detection of the genetically modified wheat MON71800 with one calibrator plasmid[J]. Food Chemistry, 2015, 176: 1-6.

[6] WU G, WU Y, NIE S, et al. Real-time PCR method for detection of the transgenic rice event TT51-1 [J]. Food Chemistry, 2010, 119(1): 417-422.

[7] 穆生乐, 李昕, 李颖, 等. 测量不确定度评定方法分析与展望[J]. 电子技术, 2023, 52(2): 232-233. ( MU S L, LI X, LI Y, et al. Analysis and prospect of measurement uncertainty evaluation methods[J]. Application, 2023, 52(2): 232-233. )

[8] 宋君, 叶先林, 尹全, 等. 采用蒙特卡洛法评定转基因玉米 DAS-4-40278-9 的测量不确定度[J]. 浙江农业学报, 2018, 30(5): 681-687. ( SONG J, YE X L, YIN Q, et al. Measurement uncertainty in genetically modified maize DAS-4-40278-9 estimated by Monte Carlo method [J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2018, 30(5): 681-687. )

[9] SONG J, NIU B, WANG D, et al. Quantifying the measurement uncertainty of the nopaline synthase terminator in mixed samples of genetically modified rice using a bottom-up approach [J]. Food Control, 2017, 73: 1548-1555.

[10] 陶猛, 任思源, 劳娟娟. 常用测量不确定度评定方法概述与比较[J]. 计量科学与技术, 2024, 68(6): 40-48. ( TAO M, REN S Y, LAO C J. Overview and comparison of common measurement uncertainty evaluation methods [J]. Metrology Science and Technology, 2024, 68(6): 40-48.

[11] 宋君, 常丽娟, 张富丽, 等. 采用蒙特卡洛法评定转基因水稻样品中 NOS 终止子的测量不确定度[J]. 计量学报, 2019, 40(1): 164-171. ( SONG J, CHANG L J, ZHANG F L, et al. Measurement uncertainty in NOS Terminator from genetically modified rice estimated by Monte Carlo method [J]. Acta Metrologica Sinica, 2019, 40(1): 164-171. )

[12] SEGA M, PENNECCHI F, RINALDI S, et al. Uncertainty evaluation for the quantification of low masses of benzo[a]pyrene: comparison between the law of propagation of uncertainty and the monte carlo method[J]. Analytica Chimica Acta, 2016, 920: 10-17.

[13] 翟洪稳, 范素芳, 王娟, 等. 测量不确定度在食品检验中的应用及进展[J]. 食品科学, 2021, 42(5): 314-320. ( ZHAI H W, FAN S F, WANG J, et al. Recent progress in measurement uncertainty and its application in food inspection and detection [J]. Food Science, 2021, 42(5): 314-320. )

[14] 李俊, 赵新, 陈红, 等. 转基因定量检测结果测量不确定度的自上而下评定方法研究及应用[J]. 中国农业科学, 2023, 55(7): 114-120. ( LI J, ZHAO X, CHEN H, et al. Development and application of top-down approaches for estimating measurement uncertainty of GMO quantitative results [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2023, 55(7): 114-120. )

[15] 国家法制计量管理计量技术委员会. 测量不确定度评定与表示: JJF1059.1-2012[S]. 北京: 国家质量监督检验检疫总局, 2012. ( National Technical Committee for Metrology Management and Metrology. Assessment and representation of measurement uncertainty: JJF1059.1-2012 [S]. Beijing: The State General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine, 2012. )

[16] 国家质量监督检验检疫总局. 测量不确定度评定和表示: GB/T 27418-2017[S]. 北京: 国家标准化管理委员会, 2017. ( The State General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine. Measurement uncertainty evaluation and representation: GB/T 27418-2017 [S]. Beijing: National General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine, 2017. )

[17] 赵新, 刘双, 刘娜, 等. 耐除草剂大豆‘DBN9004’精准定量检测方法的建立[J]. 农业生物技术学报, 2022, 30(12): 2446-2455. ( ZHAO X, LIU S, LIU N, et al. Establishment of accurate quantitative detection method for herbicide-tolerant soybean ( Glycine max ) ‘DBN9004’ [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2022, 30(12): 2446-2455. )

[18] 中华人民共和国农业部. 转基因植物及其产品成分检测 实时荧光定量 PCR 方法制定指南: 农业部 2259 号公告-5-2015 [S]. 北京: 农业部, 2015. ( Ministry of Agriculture of the People’s Republic of China. Detection of genetically modified organisms and derived products-Technical guidelines for development of real-time quantitative PCR methods: Bulletin No. 2259 of the Ministry of Agriculture -5-2015 [S]. Beijing: Ministry of Agriculture of the People’s Republic of China, 2015. )

[19] 国家质量监督检验检疫总局. 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/T 6379.2-2004[S]. 北京: 国家标准化管理委员会, 2004. ( The State General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine. Accuracy ( trueness and precision ) of measurement methods and results-Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method: GB/T 6379.2-2004 [S]. Beijing: National General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine, 2004. )

[20] ZHUANG Y, YU W. Improving the enforceability of the genetically modified food labeling law in China with lessons from the European union [J]. Vermont Journal of Environmental Law, 2013, 14(3): 465.