

文章编号:1003-8701(2010)06-0021-04

# 转基因植物成分检测实验室的污染控制

李葱葱,李飞武,刘娜,康岭生,邢珍娟,张明\*

(吉林省农业科学院,长春 130033)

**摘要:**介绍了转基因植物检测实验室中污染相关的问题;通过对转基因植物检测实验室环境条件、人员的操作水平、仪器和标准参照物的使用等因素的详细分析,对污染的来源、处理及监测、预防技术进行研究,以期有效控制污染,实现实验室的质量控制,保证检测结果的准确性和可靠性。

**关键词:**污染;转基因植物检测;实验室;质量控制

中图分类号:G482

文献标识码:A

## Pollution Control in GMO Detection Laboratory

LI Cong-cong, LI Fei-wu, LIU Na, KANG Ling-sheng, XING Zhen-juan, ZHANG Ming\*

(Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province, Changchun 130033, China)

**Abstract:** Problems resulting in pollution in the GMO detection lab were discussed in the paper. By analysis of environmental conditions in the lab, the staffs' abilities and the using of instruments and standard controls, we determined the causes of occurrence, the technology of handling, inspection and precaution of the pollution, which will be very helpful to the elimination of pollution in the lab and guarantee the accuracy and reliability of the experimental results.

**Keywords:** Pollution; Detection of transgenic plants; Laboratory; Quality control

转基因植物检测实验室是对转基因植物进行身份验证、成分检测等工作的生物化学实验室。实验室的检测结果不仅依赖于检测方法的准确进行,而且与实验室的环境条件、标准参照物的使用、仪器的准确度和人员的操作水平等因素也有着密切的关系。在转基因植物成分检测过程中,最大的问题之一就是污染的控制。

本文通过分析污染的来源情况,从环境、程序和人员操作控制3方面达到对污染发生的预防,并对确定为污染的情况作出分析并提出具体解决办法。

## 1 污染的来源

### 1.1 样品间的交叉污染

检测样品在粉碎、DNA提取、往PCR反应体系

加模板过程中由于粉末的漂移、容器的使用、样品密封不严溢出容器、模板制备中移液器在使用过程中均会产生交叉污染,导致样品出现假阳性。

### 1.2 PCR试剂污染

在进行PCR试剂配制的过程中,因移液器、容器被污染导致PCR用的双蒸水及其它溶液被PCR核酸模板污染,或在操作中剧烈地摇动反应管,开盖时、吸样时及移液器的反复吸样都可形成气溶胶,导致空气污染。

### 1.3 PCR扩增产物的污染

这是PCR反应中最主要最常见的污染问题。因为PCR产物拷贝量大(一般为 $10^{13}$ 拷贝/mL),远高于PCR检测数个拷贝的极限,所以极轻微的PCR产物的污染,即可造成假阳性污染。最可能造成PCR产物污染的原因仍然是气溶胶。

### 1.4 人员操作的污染

进行PCR操作时,操作人员应该严格遵守操作规程,最大程度降低可能出现的PCR污染或杜绝污染的出现。操作不当就会造成污染,编号错误、未更

收稿日期 2010-04-28

作者简介 李葱葱(1979-),男,助理研究员,主要从事转基因成分检测。

通讯作者 张明,男,研究员 E-mail: zhangming5451@sina.com

换移液器枪头、未戴一次性手套等操作不当造成的污染。

## 2 污染的预防

对于可能产生污染的原因,有针对性的采取一些防止污染的措施,是控制污染发生的前提和最主要的手段。一般分为环境控制、程序控制和人员操作控制3类。

### 2.1 环境控制

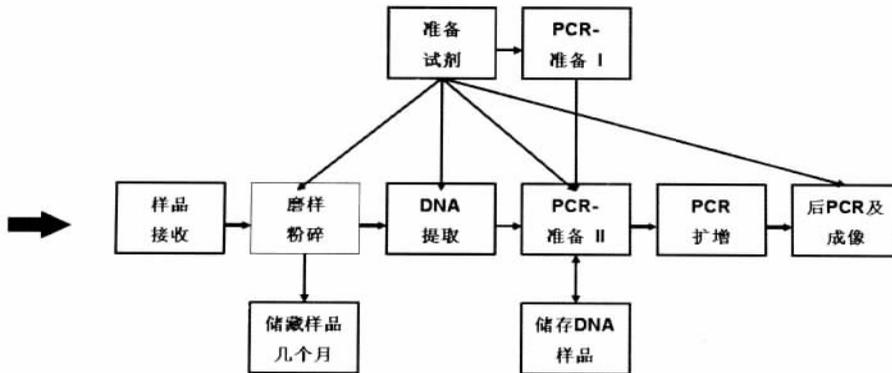


图1 单向操作实验室设计框图

#### 2.1.2 实验室正负压设计

如果条件允许,可以在PCR前处理区(磨样室、DNA提取室)、PCR准备一室和PCR准备二室设置正压通风系统;在后PCR室(PCR仪器室及电泳室)设置负压通风系统,因为此步骤产生大量游离分子及气溶胶,容易对其它实验室造成环境污染。在磨样室、DNA提取室、PCR准备一室和PCR准备二室中设置通风柜或生物反应柜造成局部负压。

### 2.2 程序控制

#### 2.2.1 外部服务和供应品采购

对检验工作质量有影响的采购和供给进行控制,以确保设备、消耗性材料等在选择、购买、验收和贮存过程中符合质量标准。因此一般选择值得信赖或经过质量认证的厂家,排除从药品及试剂方面的污染来源。

#### 2.2.2 试剂的验证和分装

新购买的试剂需进行实验前验证,即在进行正式检测之前需对药品进行预实验,确保药品的有效性。试剂的分装应在装有紫外灯的超净工作台上进行,保证每管药品均不被污染。双蒸水、引物和dNTPs等试剂均应分装成小管储存,并标明日期,每次使用取出一管融化后使用,避免反复冻融,并防止污染。

#### 2.2.3 标准物质的管理

将标准物质始终处于受控状态并保持完好,防

#### 2.1.1 实验室设计要求分区

转基因成分检测对检测实验室的环境及硬件设施要求较高,一般采用单向操作(ONE-WAY-SYSTEM),即在连续而独立的实验室内完成不同的、连续的实验步骤,在实验分析开始后严禁返回已经完成操作的实验室(图1)。因此在工作流程方面要求设计合理、工作区域相互隔离、区域分工明确,并且需配备传递仓、缓冲间、紫外灯等设备,这样能够在整体布局、环境控制及硬件方面有效预防污染的产生。

止因标准阳性样品产生的污染。标准物质应遵循说明书中的要求和保存规定进行贮存,超过保质期的标准物质,应当立即停止使用。过期阳性参照物质要集中单独处理,防止交叉污染其它检测样品。

#### 2.2.4 检验样品处置和管理

在检验样品接收、流转等各环节实施有效的质量控制,要检查送检样品的完好性,记录接收转台及样品贮存、流转、处置过程的转移,防止在流通过程中出现编号不统一,样品与编号不一致等情况的产生,检测结果为阳性的样品应参照标准物质处理方法进行处理,防止人为造成污染及交叉污染。

### 2.3 人员操作控制

#### 2.3.1 仪器的操作

各仪器应保持清洁,不允许有粉尘存在,检测工作开始前应保证正负压设备及空调系统正常运行,保证实验环境符合检验要求,粉碎机使用后,对其各零件及实验台彻底清洁(条件允许可配备专门的阳性样品粉碎机),定时对实验室进行紫外照射消毒。

#### 2.3.2 检测人员的操作习惯

操作人员养成良好习惯,是避免人为污染的重要元素之一。首先应在不同实验区配备专用实验服,配戴并经常更换一次性手套,防止实验室间的交叉污染,吸头一次性使用,不要长时间暴露于空气中,避免气溶胶污染。实验前后对仪器及工作区进行紫外灭菌或其它防污染措施;使用经灭菌处理的移液

器,不同实验区配备专用移液器,PCR 操作以及电泳过程中的移液器不交叉使用等良好习惯均能够对污染的发生起到抑制作用。

### 3 污染的监测

一次检测过程是否发生污染情况,最有效的手段就是设置对照。转基因检测一般分为提取对照(包括空白提取对照、阳性提取对照和阴性提取对照)和扩增反应对照(包括 DNA 阳性对照、DNA 阴性对照、空白对照和 PCR 抑制物对照)。

#### 3.1 空白提取对照

用纯水代替测试样品进行 DNA 提取,并以此作为模板进行扩增,判定在 DNA 提取过程中是否存在污染。在提取过程中,如有必要可进行一个空白提取对照。

#### 3.2 阳性提取对照

在 DNA 提取过程中,提取一份阳性样品为模板进行扩增,作为对照,此对照将证明提取所用试剂和提取过程是否有误。当使用一批新的提取试剂时,需先进行阳性提取对照。

#### 3.3 阴性提取对照

在 DNA 提取过程中,提取一份阴性样品为模板进行扩增,此对照将证明提取过程是否存在污染。

#### 3.4 DNA 阳性对照

以含有目的片段的 DNA(或质粒)作为模板进行扩增,证明 PCR 试剂是否有效、扩增过程是否正确及待测样品中是否含有目的片段。因阳性样品扩增效率高,应严格控制,避免其成为潜在的污染源。建议 DNA 阳性对照使用含量为 1% 的阳性 DNA,这样可以减少气溶胶和 PCR 扩增过程中的污染的发生。

#### 3.5 DNA 阴性对照

以不含有目的片段的阴性样品作为模板进行扩

增,用于证明扩增过程中无假阳性现象。

#### 3.6 空白对照

以纯水作为模板进行扩增,用于证明扩增过程中无假阳性现象。

#### 3.7 PCR 抑制物对照

在与阳性对照相同的反应体系中,加入相同数量的待测样品 DNA,如果未扩增出目的片段,证明此待测样品 DNA 中存在 PCR 抑制物。

#### 3.8 PCR 平行反应

在进行 PCR 反应中,同一样品可设置 3 个平行扩增反应管,根据 3 个平行管的扩增结果判断是否存在污染的发生。

## 4 污染的确定及处理方法

确定检测过程是否存在污染,就是通过对检测过程中各种对照的结果进行分析,看其是否存在异常。如果阴性对照经过 PCR 扩增后在电泳图谱中却有和目的片段大小相同的条带出现,这个对照就可以确定为被污染了。如果需要进一步确认,就需对此 PCR 产物进行回收测序,验证序列是否与目的片段扩增序列相同。如果阳性对照经过 PCR 扩增后在电泳图谱中却没有出现和目的片段大小相同的条带出现,说明此次检测出现了假阴性,可能试剂、人员操作或者在 DNA 提取过程中出现了抑制物等情况的发生,需要对试剂进行确认或进行 PCR 抑制物的扩增,以确定污染源,进行处理。

污染发生后,发现人员在操作过程或在执行其它程序中出现不合格程序项,并且因此可能造成污染或检测工作无法继续进行,要进行内部管理体系审核,制定纠正措施,明确完成日期,组织实施,排除污染,恢复正常的检测工作。根据不同对照所对应的污染源进行排查,查出污染源所在,并清除污染,以保证检测结果的准确性。具体情况见表 1。

表 1 污染的处理

对照	扩增结果	可能的污染源	解决办法
空白提取对照	阳性	DNA 提取试剂	重新配制 DNA 提取所需所有试剂
阳性提取对照	阴性	提取过程可能有误	重新提取 DNA、更换提取试剂或使用其它提取方法
阴性提取对照	阳性	提取过程可能有误,发生交叉或粉尘污染	重新提取 DNA
DNA 阳性对照	阴性	PCR 试剂或扩增过程存在问题	验证 PCR 试剂、验证引物、调整扩增体系与程序
DNA 阴性对照	阳性	PCR 试剂受到污染,或者扩增过程存在问题	排除被 PCR 试剂污染、验证引物特异性、调整扩增体系与程序
空白对照	阳性	PCR 试剂被污染	更换新的 PCR 试剂,扩增时设立不同的反应管,逐个对每一试剂进行排除,检出被污染试剂
PCR 抑制物对照	阴性	待测样品 DNA 中存在 PCR 抑制物	将 DNA 进行稀释、纯化再进行 PCR 扩增或重新提取 DNA

## 5 讨论

随着全球转基因技术的研发与产业化发展,给转基因生物安全领域带来前所未有的挑战,因此

对转基因检测实验室的能力要求也越来越高。转基因成分检测在转基因检测工作和环境安全评价过程中均发挥了极大的作用,在检测过程中,最常见的污染也成为了最难解决的问题之一。因此,从实验室设

计划、建设等硬件措施的环境控制到实验人员的操作控制等方面环节均要得到充分重视,实验室的质量控制也很重要,维持并提高实验室的检测能力,对实验室的管理及检测操作程序进行审核和监督,能够有效控制污染,保证实验室质量管理体系的正常运行。只有这样,才能有效的控制污染的发生。随着 PCR 技术的不断完善及应用领域的不断扩大,防止 PCR 污染的措施将不断完善,对污染源的处理措施也将不断更新。PCR 技术在转基因成分检测方面的应用也将更加广泛。

#### 参考文献:

- [1] 靳冬,王建召. 动物疾病诊断中应用 PCR 时的污染控制[J]. 河南畜牧兽医, 2007, 10(28): 23-25.  
 [2] 田国宁,张金玲. 动物疫病 PCR 检测实验室的污染与对策[J]. 中

国畜牧兽医, 2007, 34(6): 88-89.

- [3] 张永江. 复合型二、三级动物生物安全实验室(ABSL-2、3)工艺设计实例[J]. 畜牧兽医科技信息, 2005(12): 53-57.  
 [4] 刘友清,凌宗帅. 浅述三级生物安全实验室建设[J]. 中国动物检疫, 2004, 21(5): 12-13.  
 [5] 张 颖,廖百森. 实验室生物安全管理体系建立、运行和持续改进初探[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(3): 526-528.  
 [6] 刘礼平,李文俊. 实验室生物安全设施及管理要求[J]. 华南预防医学, 2008, 34(2): 68-71.  
 [7] 梁建波,韩喜连. 兽医检测实验室的质量控制[J]. 中国畜牧医学, 2008, 35(1): 146-147.  
 [8] 李惠萍,王有福. 植物检疫实验室人员能力评价的研究[J]. 2005(5): 40-42.  
 [9] 王延华. Pierre Dubus. PCR 理论与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2005.  
 [10] 段武德. 转基因植物检测[M]. 北京: 中国农业出版社, 2009.

(上接第 3 页)

表 5 大豆繁育能力调查结果(第 1, 2 次播种)

播种方式	品种	出苗期(月·日)	始花期(月·日)	盛花期(月·日)	终花期(月·日)	成熟期(月·日)	单株粒数
高密常规	大豆 HOA <sub>80</sub>	06·05	06·28	07·12	07·23	09·18	23.66± 11.0 a
第 1 次	大豆 SW80	06·05	06·28	07·11	07·23	09·18	24.66± 7.57 a
播 种	吉育 71	06·07	06·30	07·13	07·25	09·21	18.33± 3.51 b
低密常规	大豆 HOA <sub>80</sub>	06·04	06·26	07·10	07·21	09·17	23.33± 3.51 a
第 1 次	大豆 SW80	06·04	06·26	07·10	07·21	09·17	20.33± 5.68 a
播 种	吉育 71	06·06	06·28	07·12	07·23	09·20	16.66± 5.68 b
高密常规	大豆 HOA <sub>80</sub>	07·02	07·21	08·06	08·17	/	/
第 2 次	大豆 SW80	07·02	07·21	08·06	08·17	/	/
播 种	吉育 71	07·03	07·23	08·08	08·19	/	/
低密常规	大豆 HOA <sub>80</sub>	07·01	07·20	08·04	08·15	/	/
第 2 次	大豆 SW80	07·01	07·20	08·04	08·15	/	/
播 种	吉育 71	07·02	07·21	08·06	08·18	/	/

### 3 结论与讨论

3.1 在荒地地表撒播条件下,转基因大豆与非转基因大豆一样,均不能出苗(出苗率为 0),不会与杂草发生任何生存竞争。

3.2 在荒地正常播种条件下,高油酸转基因大豆 HOA<sub>80</sub> 同受体大豆 SW80 比较,大豆株高、覆盖度等方面无差异;与对照大豆吉育 71 比较,大豆繁殖能力方面存在差异。但是,无论是高密度或低密度处理小区,大豆生长受杂草的严重影响,不能全部正常发育成熟,即使能极少量正常成熟的植株也表现为矮小、分支少、茎细、生长势弱,不具备演化成超级杂草的可能。

3.3 在荒地条件下,田间发生杂草种类、密度的不同,对大豆出苗、生长、成熟等影响也不同。其中杂草覆盖度是主要影响因子,覆盖度大,大豆生长就弱,二者之间影响程度呈负相关。

综上所述,在荒地条件下,高油酸转基因大豆 HOA<sub>80</sub> 在株高、覆盖度、复叶动态、繁殖能力、单株粒数等方面,与受体大豆 SW80 比较无差异。与对照大豆吉育 71 比较,生长发育相似,可以成熟。说明目的基因的导入,没有改变受体大豆的其它农艺形状(除油酸含量增加外),而且与杂草比较,生长速度、覆盖度等方面很差,不具备竞争能力,更没有演变成杂草的趋势,因而对农业环境生态安全无任何影响。

#### 参考文献:

- [1] 闫新浦. 转基因植物[M]. 北京: 科技出版社, 2002: 484-493.  
 [2] 南京农业大学. 田间试验和统计方法[M]. 北京: 农业出版社, 1990: 271-278.  
 [3] 周 波,陶 波,栾凤侠,等. 抗草甘膦转基因大豆安全性综述[J]. 作物杂志, 2006(2): 19-21.  
 [4] 蔡一荣,李望丰,刘立侠,等. 大豆品质改良的基因工程育种概况[J]. 大豆科学, 2006, 25(1): 62-66.  
 [5] 闫晓艳,刘凤珍,邱 强,等. 吉林省大豆栽培技术演变与发展趋势[J]. 吉林农业科学, 2006, 31(1): 27-29, 46.