

# 基因轉殖作物定量檢測之 量測不確定度評估與應用

沈翰祖<sup>1</sup>、陳哲仁<sup>2</sup>、張翊庭<sup>3</sup>、郭寶錚<sup>4</sup>

## 一、前言

基因轉殖，是以人爲的方法改變物種的基因序列，將某種生物其中的特定基因選殖(clone)出來，導入另一種生物體內，稱爲基因轉移(gene transfer)，又稱基因改造。藉由外來基因的表現，達成改變生物性狀的目的，所得的生物稱爲基因改造生物體(Genetically Modified Organisms, GMOs)。由正面的角度來看，GMO作物有許多優點，但其涉及遺傳物質在物種間移植，因此仍存在基因流佈及食用安全的疑慮，對環境與生態上也可能帶來負面的衝擊。針對GMO作物相關的安全疑慮與道德爭議，世界各國均制定相關法規加以管制。

因應各國對GMO成份含量的標示規範，相關之定量檢測分析便格外重要，定量結果將會決定檢測樣品是否符合規定。目前GMO定量檢測的方法，以即時定量聚合酶連鎖反應(Real-time polymerase chain reaction, Real-time PCR)爲最常使用的方法，具有高準確度、高敏感度及高效率等優點，惟檢測成本較高。由於Real-time PCR屬定量檢測，需經由評估量測不確定度(measurement uncertainty)，以其數值大小表示定量結果的合理分散程度。

## 二、量測不確定度定義

根據1995年國際標準化組織(International Organization for Standardization, ISO)公布的量測不確定度表示指引(Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, GUM)，說明量測不確定度之定義爲：「與量測結果有關的一個參數，此參數可合理的用來表示受測量值的離散程度。」簡而言之，是將整個分析過程中會對結果產生誤差的來源表現爲一個單一數值，現今，一個分析結果若無包含量測不確定度，會被認爲其量測考慮並不完備，因此，對於分析者來說，量測不確定度的估計便成爲一個重要的議題。量測的結果，除限於人員、熟練度、儀器精準度、系統偏差、樣品代表性外，還受主、客觀等無法掌握之因素影響，導致量測所得之初始值，「幾乎」不能代表真正的數值。因此，採用不確定度來表示「真值」合理的範圍區間、分散模式與可接受的可靠度值，方能使量測結果經過一些統計、分析的模組後，變得可信、安全、經濟且具可行性，否則空有量測數據，將無法落實在執行面，同時量測作業亦失去意義。

## 三、量測不確定度評估程序

如果您手上持有一份實驗室的報告或是任何一個使用儀器及其他合理方法所測得之數據值，首先可能必須對這個量測或觀察所得之值，抱持一個懷疑的態度：它準確嗎？有多少誤差？在什麼範圍內它是

1 種苗改良繁殖場種苗經營課 副研究員兼課長

2 種苗改良繁殖場生物技術課 助理研究員

3 國立中興大學農藝學系 研究生

4 國立中興大學農藝學系 教授

可被接受的？……等等。

為什麼會這樣呢？這是因為任何量測行為所得之結果，只是「唯一真值」的近似值或評估值、估計值而已；再進一步說明，我們會發現不同實驗室、不同操作人員、不同的儀器、不同的規範……甚至相同的操作人員作多次的重複量測作業，均無法百分之百保證獲得相同的量測值。因此，若欲完整地表示或說明GMO樣品Real-time PCR量測結果，至少應包括下列三項評估程序才能算得上合理而真實，並具使用價值，即（一）、量測不確定度評估之前置作業，（二）、針對已知含量之GMO樣品定量分析結果評估量測不確定度，及（三）、針對未知含量之GMO樣品定量分析結果評估量測不確定度。現分述如下：

## （一）量測不確定度評估之前置作業

針對GMO作物Real-time PCR檢測技術，進行GMO定量檢測之量測不確定度估算，須先經過2大步驟篩選，淘汰無效不可信的量測值，才開始進行相關評估，首先，第一個步驟量測結果須達到「GMO定量分析方法之最低要求確認」：主要是針對動態範圍（dynamic range）、偵測極限（limit of detection, LOD）、定量極限（limit of quantification, LOQ）、擴增效率（amplification efficiency）、決定係數  $R^2$  值、精確度（precision）和真實度（trueness）等數據值作為依據，其次第二步驟為「剔除離群值」：利用 Cochran's 離群值檢測方式進行，若統計量（ratio）小於臨界值（critical）時，表示沒有離群值的存在，可直接進行量測不確定度的評估步驟；但當統計量（ratio）大於臨界值

（critical）時，表示有離群值存在，需剔除具有最大變方的樣本。

## （二）針對已知含量之GMO樣品定量分析結果評估量測不確定度

為評估操作人員或實驗室檢測能力，針對已知含量之GMO樣品定量檢測結果進行分析，資料須先經過離群值檢測，並計算絕對差量、濃度平均、絕對差量/濃度平均比值之總和、重複分析樣本數（即為剔除離群值後之樣本數）、中間精密度（即為組合標準不確定度）、擴充不確定度等，而擴充不確定度即代表GMO定量檢測之量測不確定度。

| 樣本 | 濃度    |
|----|-------|
| 2  | 1.128 |
| 3  | 1.693 |
| 4  | 2.859 |
| 5  | 2.326 |
| 6  | 2.934 |
| 7  | 2.764 |
| 8  | 2.847 |
| 9  | 2.976 |
| 10 | 3.878 |

擴充不確定度=(中間精密度)×k

k：涵蓋因子(coverage factor)，95%  
信心水準下，k=2

## （三）針對未知含量之GMO樣品定量分析結果評估量測不確定度

針對定量檢測結果進行分析，資料須先經過離群值檢測，並計算絕對差量、濃度平均、回收率、標準不確定度（實驗室階段的相對標準不確定度）、樣本製備的相對標準不

確定度、擴充不確定度、樣本製備所占百分比（擴充不確定度中，樣本製備所貢獻之比例）、分析方法所占百分比（擴充不確定度中，分析方法所貢獻之比例）等，擴充不確定度即為定量檢測之量測不確定度。

## 四、量測不確定度評估案例

基因轉殖大豆品項 305423 是由先鋒種子公司（Pioneer Hi-Breed）所開發的產品，利用基因轉殖方法導入源自大豆的 *fad2-1* 及 *hra* 基因，其中 *fad2-1* 基因改變大豆油脂合成酵素表現，結果大幅增加油酸（Oleic acid，單元不飽和脂肪酸）含量，有助於改善油脂風味、氧化穩定性以及櫥架使用期限，此外，*hra* 基因產生乙醯乳酸合成酵素（acetolactate synthase），使得大豆植株能抗 Sulfonyleurea（硫醯尿素類）類型的殺草劑。

針對已知含量之 GMO 樣品定量分析結果，若完全未經過量測不確定度前置作業之擴充不確定度為 27.75%（表一）；先檢視是否達到 GMO 定量分析方法之最低要求，剔除 6 個測量值，但未去除離群值之擴充不確定度為 25.29%（表二）；最後，除了滿足 GMO 定量分析方法之最低要求，並剔除 3 個離群值後估計擴充不確定度為 22.52%（表三），顯示出經過適當的前處

理可確實達到降低擴充不確定度之目的。

根據重複測試對於基因轉殖大豆 DP-305423 品項定量結果標準差的量測不確定度，估算所得之擴充不確定度數值為 24.71%，進一步將量測不確定度劃分為分析方法與樣本製備之量測不確定度，其中 5.27% 的變異來源是來自分析方法，94.73% 變異來源是來自樣本製備（表四）。因此，如欲降低量測不確定度，其關鍵因子為如何降低樣本製備時所產生的誤差，即在可允許的範圍內提高檢體在核酸萃取時之樣品均勻度與取樣量。

## 五、結論

基因轉殖作物帶來糧食、經濟與環境等可觀利益，但也因為其潛藏研究尚未完全證實的安全性爭議，因此各國皆對基因轉殖作物訂定相關之規範。針對各國所訂定之規範，除了須在檢測上精準定量之外，也可經由評估量測不確定度，以量測不確定度數值大小表示定量結果的合理分散程度。

由於目前針對基因轉殖作物的定量檢測，尚無法以 ISO 組織所提出之量測不確定度評估指引方法進行，所以須從許多替代方法中，建立適合的評估方法。根據量測數據之獲得背景與來源，選擇適當的評估方式，得到更符合該檢測的量測不確定度，提供給相關單位或人員在做結果判定時的參考依據。

表一、完全未經過量測不確定度前置作業之擴充不確定度結果（以大豆品項 DP-305423 之樣品分析）

| 樣品編號 | 定量結果 1 | 定量結果 2 | 絕對差量     | 濃度平均   | 絕對差量/濃度平均   |
|------|--------|--------|----------|--------|-------------|
| 1    | 11.80% | 9.26%  | 0.025423 | 10.53% | 0.24147563  |
| 2    | 12.45% | 9.18%  | 0.03263  | 10.82% | 0.301689404 |
| 3    | 10.70% | 10.67% | 0.000218 | 10.68% | 0.002041435 |
| 4    | 9.56%  | 8.85%  | 0.007036 | 9.20%  | 0.076440095 |
| 5    | 9.45%  | 10.01% | 0.005557 | 9.73%  | 0.057113779 |
| 6    | 8.54%  | 8.66%  | 0.001197 | 8.60%  | 0.013917995 |

| 樣品編號 | 定量結果 1 | 定量結果 2 | 絕對差量     | 濃度平均   | 絕對差量/濃度平均   |
|------|--------|--------|----------|--------|-------------|
| 7    | 8.93%  | 8.48%  | 0.004518 | 8.70%  | 0.051904897 |
| 8    | 12.23% | 10.55% | 0.0168   | 11.39% | 0.021755603 |
| 9    | 11.28% | 10.52% | 0.0076   | 10.90% | 0.004861544 |
| 10   | 10.72% | 10.99% | 0.002641 | 10.85% | 0.024334007 |
| 11   | 10.53% | 10.60% | 0.000676 | 10.56% | 0.006400957 |
| 12   | 15.28% | 11.22% | 0.040662 | 13.25% | 0.306854871 |
| 13   | 1.16%  | 0.98%  | 0.001724 | 1.07%  | 0.161296624 |
| 14   | 1.26%  | 0.97%  | 0.002919 | 1.11%  | 0.262552392 |
| 15   | 1.39%  | 1.14%  | 0.002423 | 1.27%  | 0.19142358  |
| 16   | 0.93%  | 0.98%  | 0.000437 | 0.96%  | 0.045741573 |
| 17   | 1.12%  | 1.66%  | 0.005372 | 1.39%  | 0.385811847 |
| 18   | 1.70%  | 1.11%  | 0.005884 | 1.41%  | 0.417943994 |
| 19   | 1.42%  | 1.17%  | 0.002511 | 1.29%  | 0.193983538 |
| 20   | 5.33%  | 2.55%  | 0.0278   | 3.94%  | 0.497848437 |
| 21   | 3.50%  | 1.52%  | 0.0198   | 2.51%  | 0.622275837 |
| 22   | 1.00%  | 1.25%  | 0.002422 | 1.12%  | 0.215378487 |
| 23   | 0.49%  | 0.46%  | 0.000221 | 0.48%  | 0.0465446   |
| 24   | 0.78%  | 0.52%  | 0.002629 | 0.65%  | 0.406368261 |
| 25   | 0.49%  | 0.41%  | 0.000794 | 0.45%  | 0.175119277 |
| 26   | 0.43%  | 0.49%  | 0.000628 | 0.46%  | 0.136642351 |
| 27   | 0.49%  | 0.41%  | 0.000794 | 0.45%  | 0.175119277 |
| 28   | 0.43%  | 0.49%  | 0.000628 | 0.46%  | 0.136642351 |
| 29   | 0.63%  | 0.56%  | 0.000713 | 0.59%  | 0.120343786 |
| 30   | 0.51%  | 0.51%  | 4.5E-06  | 0.51%  | 0.000882543 |
| 31   | 0.53%  | 0.59%  | 0.000571 | 0.56%  | 0.101573614 |
| 32   | 0.64%  | 0.62%  | 0.000207 | 0.63%  | 0.033121639 |
| 33   | 0.65%  | 0.58%  | 0.000712 | 0.62%  | 0.115082827 |
| 34   | 0.66%  | 0.59%  | 0.000653 | 0.62%  | 0.104553916 |
| 35   | 0.88%  | 1.55%  | 0.0067   | 1.22%  | 0.304086437 |
| 36   | 1.67%  | 0.58%  | 0.0109   | 1.13%  | 0.938745679 |

|                 |             |
|-----------------|-------------|
| 絕對差量/濃度平均比値之總和  | 555.05%     |
| 重複分析樣品數         | 36          |
| 調整因子            | 1.128       |
| 中間精密度（組合標準不確定度） | 0.136684571 |
| 擴充不確定度          | 27.34%      |

表二、僅利用GMO定量分析方法之最低要求確認，未去除離群值之擴充不確定度結果（以大豆品項DP-305423之樣品分析）

|                 |               |
|-----------------|---------------|
| 絕對差量/濃度平均比值之總和  | 427.90%       |
| 重複分析樣品數         | 30            |
| 調整因子            | 1.128         |
| 中間精密度（組合標準不確定度） | 0.126448      |
| 擴充不確定度          | <b>25.29%</b> |

表三、利用GMO定量分析方法之最低要求確認，並剔除離群值之擴充不確定度結果（以大豆品項DP-305423之樣品分析）

|                 |               |
|-----------------|---------------|
| 絕對差量/濃度平均比值之總和  | 342.90%       |
| 重複分析樣品數         | 27            |
| 調整因子            | 1.128         |
| 中間精密度（組合標準不確定度） | 0.112587672   |
| 擴充不確定度          | <b>22.52%</b> |

表四、針對未知含量之GMO樣品定量分析結果評估量測不確定度，已完全符合前置作業進行量測不確定度分析（以大豆品項DP-305423之樣品分析）

|                        |               |
|------------------------|---------------|
| 絕對差量/濃度平均比值之平方和        | 0.8243        |
| 重複分析樣本數                | 27            |
| 回收率變異數                 | 0.02664       |
| 分析方法的相對標準不確定度（回收率）     | 0.02837       |
| 標準不確定度（實驗室階段的相對標準不確定度） | 0.12355       |
| 樣本製備的相對標準不確定度          | 0.12025       |
| 擴充不確定度                 | <b>24.71%</b> |
| 樣本製備所佔之百分比             | 94.73%        |
| 分析方法所佔之百分比             | 5.27%         |