



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

转基因产品通用检测方法

Digital PCR monitoring methods for monitoring transgenic plants

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

（征求意见稿）

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

目 次

前言 II

引言 III

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和缩略语 1

4 原理 2

5 仪器和试剂 2

6 防污染措施 2

7 抽样与制样 2

8 检测 2

9 结果分析 4

10 结果判定与表述 4

附录 A（资料性附录） 主要试剂..... 5

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准由全国生化检测标准化技术委员会（SAC/TC 387）提出并归口。

本标准起草单位：

本标准主要起草人：

转基因植物通用检测方法

1 范围

本标准规定了转基因植物的成分检测方法。

本标准适用于植物及其加工产品中转基因成分的实时荧光PCR检测方法。

本标准所能达到的检测低限为0.1%（w/w）。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和实验方法

GB/T 19495.1 转基因产品检测 通用要求和定义

GB/T 19495.2 转基因产品检测 实验室技术要求

GB/T 19495.3 转基因产品检测 核酸提取纯化方法

GB/T 19495.7 转基因产品检测 抽样和制样方法

3 术语和缩略语

下列术语和缩略语适用于本标准。

3.1

18srRNA 基因 18srRNA gene

转录自18srDNA，是细胞核糖体的组分之一。

3.2

CaMV35S 启动子基因 35S promoter from cauliflower mosaic virus (CaMV)

来自花椰菜花叶病毒（Cauliflower mosaic virus, CaMV）的35S启动子

3.3

CaMV35S 终止子基因 35S terminator from cauliflower mosaic virus (CaMV)

来自花椰菜花叶病毒（Cauliflower mosaic virus, CaMV）的 35S 终止子

3.4

NOS 终止子基因 terminator from nopaline synthase gene

来自胭脂碱合成酶基因 NOS 的终止子。

3.5

E9 终止子 terminator of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase small subunit

来自豌豆核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶小亚基 (ribulose-1,5-biphosphate carboxylase small subunit) 基因的 3'端终止序列。

3.6

PAT基因 phosphinothricin acetyltransferase gene

来自绿产色链霉菌 (Streptomyces viridochromogenes) pat基因的Bg/11-SsII片段编码膦丝菌素乙酰转移酶(phosphinothricin acetyltransferase)

3.7

PinII终止子 terminator of proteinase inhibitor II

来自马铃薯蛋白酶抑制剂II (proteinase inhibitor) 终止子。

3.8

RbcS4启动子 promoter of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase small subunit 1A

来自拟南芥核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶/加氧酶小亚基1A(ribulose-1,5-biphosphate carboxylase small subunit 1A)的启动子。

3.9

DAS-40278-9转化体特异性序列 event-specific sequence of DAS40278

DAS-40278-9外源插入片断5'端与玉米基因组的连接区序列, 包括玉米基因组序列与转化载体部分序列。

3.10

DP305423转化体特异性序列 event-specific sequence of DP305423

DP305423外源插入片断3'端与大豆基因组的连接区序列, 包括大豆基因组序列与转化载体部分序列。

3.11

CV127 转化体特异性序列 event-specific sequence of DP305423

CV127 外源插入片断5'端与大豆基因组的连接区序列, 包括大豆基因组序列与转化载体部分序列。

3.12

Ct 值 Cycle threshold

每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数。

4 原理

根据国内外已商业化转基因作物中外源插入基因的情况,针对外源基因选取10个能覆盖所有转基因品系的片段作为筛选元件,通过生物信息学分析获得该10个筛选元件的保守序列,根据序列设计特异性引物进行实时荧光PCR扩增。根据扩增结果判断样品是否含有转基因成分。

5 试剂与材料

除另有规定外,所有试剂均为分析纯或生化试剂。实验用水应符合GB 6682中一级水的规格。

5.1 DNA 提取试剂盒(保持标准的一致性)

推荐针对不同的样品基质类型选取不同的基因组提取试剂盒。

5.2 实时荧光 PCR 预混液: *Taq* DNA 聚合酶 (5U/μL)、PCR 反应缓冲液、MgCl₂ (3-7mM)、dNTPs (含 dATP, dUTP, dCTP, dGTP) 和 UNG 酶按比例配制的溶液。

5.3 主要试剂

主要试剂参见附录A。内源和外源基因检测用的引物和探针序列见表1。

表1 引物和探针序列

基因	引物名称	序列 (5'-3')	终浓度 (nmol/L)	目的片段大小 (bp)
18SrRNA 内源基因	18sr-F	CCTGAGAAACGGCTACCAT	400	137
	18sr-R	CGTGTCAGGATTGGGTAAT	200	
	18sr-P	VIC-TGCGCGCCTGCTGCCTTCCT -BHQ1	200	
CaMV 35S 启动子	P35S-F	TTCCAACCACGTCTTCAAAGC	400	95
	P35S-R	GGAAGGGTCTTGCGAAGGATA	400	
	P35S-P	FAM-CCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCC-TAMRA	200	
CaMV 35S 终止子	T35S-F	TCACCAGTCTCTCTCTACAAATCTATC	400	101
	T35S-R	CAACACATGAGCGAAACCCTATAA	400	
	T35S-P	FAM-TGTGTGAGTAGTTCCCAGATAAGGGAATTAGGGT-TAMRA	200	
NOS 终止子	TNOS-F	GCATGACGTTATTATGAGATGGG	400	97
	TNOS-R	TCCTAGTTTGCGCGCTATATTT	400	
	TNOS-P	FAM-AGAGTCCC GCAATTATACATTTAATACGCG-TAMRA	200	

PAT 基因	PAT-F	GGAGAGGAGACCAGTTGAGATTAG	400	119
	PAT-R	GTGTTTGTGGCTCTGTCCTAAAG	400	
	PAT-P	FAM-ATCACAAACCGCGCCATATCAGCTGC-TAMRA	200	
PinII 终止子	PINII-F	GACTTGTCCATCTTCTGGATTGG	400	105
	PINII-R	CACACAACCTTGATGCCCACAT	400	
	PINII-P	FAM-AGTGATTAGCATGTCACTATGTGTGCATCC-TAMRA	200	
E9 终止子	E9-F	TCTTGTACCATTGTGTGCTTGT	400	108
	E9-R	GGACCATATCATTCATTAACCTTCTCC	400	
	E9-P	FAM-CGGTTTTTCGCTATCGAACTGTGAAATGGAAATGG-TAMRA	200	
RbcS4 启动子	RbcS4-F	CCACTCCACCATCACACAATTC	400	112
	RbcS4-R	GGAGAGGTGTTGAGACCCCTTATC	400	
	RbcS4-P	FAM-ACGTGGCATTATTCCAGCGGTTCAAGCC-TAMRA	200	
DAS40278 5' 边界序列	40278-F	CACGAACCATTGAGTTACAATC	400	88
	40278-R	TGGTTTCATTGTATTCTGGCTTTG	400	
	40278-P	FAM-CGTAGCTAACCTTCATTGTATTCCG-TAMRA	200	
DP305423 3' 边界序列	305423-F	CGTGTTCTCTTTTTGGCTAGC	400	93
	305423-R	GTGACCAATGAATACATAACACAACTA	400	
	305423-P	FAM-TGACACAAATGATTTTCATACAAAAGTCGAGA-TAMRA	200	
CV127 5' 边界序列	CV127-F	AACAGAAGTTTCCGTTGAGCTTTAAGAC	400	98
	CV127-R	CATTCGTAGCTCGGATCGTGTAC	400	
	CV127-P	FAM-TTTGGGGAAGCTGTCCCATGCCC-TAMRA	200	

对于不知道是否为转基因产品的样品,请选用上述所有内源和外源基因进行检测。对于确定物种的转基因样品,可根据下表选用基因进行检测:

表2 确定物种基因选用

物种	选用基因
大豆及其加工产品	内源基因、CaMV 35S启动子、NOS终止子、PAT基因、PinII终止子、E9终止子、RbcS4启动子、DP305423边界序列、CV127边界序列
玉米及其加工产品	内源基因、CaMV 35S启动子、CaMV 35S终止子、NOS终止子、PAT基因、PinII终止子、DAS40278边界序列
油菜及其加工产品	内源基因、CaMV 35S启动子、CaMV 35S终止子、NOS终止子、E9终止子、PinII终止子
水稻及其加工产品	内源基因、CaMV 35S启动子、CaMV 35S终止子、NOS终止子
马铃薯及其加工产品*	内源基因、NOS终止子、RbcS4启动子
苜蓿及其加工产品	内源基因、NOS终止子、E9终止子
甜菜及其加工产品	内源基因、E9终止子

*PinII终止子为马铃薯蛋白酶抑制剂II终止子,不适用于马铃薯及其加工产品的转基因成分检测,但可为其他物种检测用。

6 仪器与设备

6.1 分析天平：感量 0.1 mg。

6.2 生物安全柜。

6.3 数字 PCR 扩增仪。

6.4 纯水仪。

6.5 核酸定量仪。

6.6 涡旋震荡仪。

6.7 其他相关仪器和设备。

6.8 离心管。

6.9 不同量程移液器以及配套吸头。

a) 量程为 20-200 μL ，10-100 μL 和 2-20 μL 的移液器以及配套的 200 μL 吸头。

b) 量程为 0.5-10 μL 和 0.1-2.5 μL 的移液器以及配套的 10 μL 吸头。

7 操作步骤

7.1 抽样

按照 GB/T 19495.1 和 GB/T 19495.7 的规定执行。

7.2 制样

按照 GB/T 19495.1 和 GB/T 19495.7 的规定执行。

7.3 试样预处理

按照 GB/T 19495.1 和 GB/T 19495.3 的规定执行。

7.4 DNA 模板制备

按照 GB/T 19495.1 和 GB/T 19495.3 的规定执行。

7.5 DNA 浓度测定

采用紫外分光光度法测定 DNA 浓度，将 DNA 溶液做适当的稀释，放入紫外分光光度计的比色皿中，于 260nm 处测定其吸收峰， $\text{OD}_{260\text{nm}} = 50 \mu\text{g/mL}$ 双链 DNA，所测得 OD 值为核酸总量，OD 值 (optical density) 应该在 0.2 ~ 0.8 的范围内，PCR 级 DNA 溶液的 $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ 比值为 1.8~2.0。

7.6 PCR 反应

7.6.1 阴性对照、阳性对照和空白对照的设置

以非转基因样品为阴性对照，以带有上述十种筛选元件的植物样品为阳性对照，以水或 TE 溶液为空白对照。

7.6.2 PCR 反应体系

PCR反应体系见表3、表4（可根据实际需要任选其一）。每个DNA样品做3个平行管。加样时应使样品DNA溶液完全加入反应液中，不要粘附于管壁上，加样后应尽快盖紧管盖。

表3 实时荧光PCR反应体系（1）

试剂名称	终浓度	加样体积（ μL ）
TaqMan Universal Master Mix(2 \times)	1 \times	12.5
上游引物（10 $\mu\text{mol/L}$ ）	0.4 $\mu\text{mol/L}$	1
下游引物（10 $\mu\text{mol/L}$ ）	0.4 $\mu\text{mol/L}$	1
探针（10 $\mu\text{mol/L}$ ）	0.2 $\mu\text{mol/L}$	0.5
DNA 模板（40-50 ng/ μL ）	200 ng~300 ng	5
补水至	-----	25

表4 实时荧光PCR反应体系（2）

试剂名称	终浓度	加样体积（ μL ）
10 \times PCR反应缓冲液	1 \times	5
MgCl ₂ （25mmol/L）	2.5mmol/L	5
dATP（10mmol/L）	200nmol/L	1
dGTP（10mmol/L）	200nmol/L	1
dCTP（10mmol/L）	200nmol/L	1
dTTP（10mmol/L）	100nmol/L	0.5
dUTP（10mmol/L）	200nmol/L	1
UNG酶（1U/ μL ）	0.5U	0.5
上游引物（10 $\mu\text{mol/L}$ ）	400nmol/L	2
下游引物（10 $\mu\text{mol/L}$ ）	400nmol/L	2
探针（10 $\mu\text{mol/L}$ ）	200nmol/L	1
Taq酶（5U/ μL ）	2.5U	0.5
DNA模板（40-50 ng/ μL ）	200~300ng	5
补水至	-	50

7.6.3 仪器设置

设置PCR反应管荧光信号收集条件，应与探针标记的报告基团一致。具体设置方法可参照仪器使用说明书。

7.6.4 PCR 反应参数

实时荧光PCR扩增反应参数：：50 $^{\circ}\text{C}$ /2min；95 $^{\circ}\text{C}$ /10min；95 $^{\circ}\text{C}$ /15s，60 $^{\circ}\text{C}$ /60s，40个循环。

注：95 $^{\circ}\text{C}$ /10min专门适用于化学变构的热启动Taq酶。以上参数可根据不同型号实时荧光PCR仪和所选PCR扩增试剂体系不同作调整。

7.6.5 PCR 反应运行

按预先设定的样品摆放顺序将PCR反应管依次摆放（上机前注意检查各反应管是否盖紧，以免荧光物质泄漏污染仪器），开始运行仪器进行实时荧光PCR反应。

8 结果分析

8.1 阈值设定

实时荧光PCR反应结束后，设置荧光信号阈值，阈值设定原则根据仪器噪声情况进行调整，以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增曲线的最高点为准。

8.2 质量控制

空白对照：内参基因检测Ct值小于或等于34，所有外源基因检测Ct值大于或等于40；

阴性对照：内参基因检测Ct值小于或等于34，所有外源基因检测Ct值大于或等于40；

阳性对照：内参基因检测Ct值小于或等于34，所有外源基因检测Ct值小于或等于34；

上述指标有一项不符合者，说明PCR反应体系不正常，应重新进行实时PCR扩增。

9 结果判定与表述

9.1 结果判定

测试样品至少一个外源基因检测Ct值大于或等于40，内源基因检测Ct值小于或等于30，则可判定该样品不含所检的外源基因。

测试样品至少一个外源基因检测Ct值小于或等于36，内源基因检测Ct值小于或等于30，判定该样品含有对应的外源基因。

测试样品至少一个外源基因检测Ct值在36～40之间，内源基因检测Ct值小于或等于30，应调整模板浓度，重做实时荧光PCR。再次扩增后的外源基因检测Ct值仍小于40，则可判定为该样品含有所检的外源基因。再次扩增后的外源基因检测Ct值大于或等于40，则可判定为该样品不含所检的外源基因。

9.2 结果表述

该样品未检出××基因。

该样品检出××基因，含有转基因成分。

附 录 A
(资料性附录)
主要试剂

A.1 10 mol/L 氢氧化钠 (NaOH) 溶液

在 160 mL 水中加入 80 g NaOH, 溶解后加水定容至 200 mL, 塑料瓶中保存。

A.2 0.5 mol/L EDTA 溶液 (pH 8.0)

称取二水乙二胺四乙酸二钠 ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 18.6 g, 加入 70 mL 水中, 加入少量 10 mol/L NaOH 溶液, 加热至完全溶解后, 冷却至室温, 用 10 mol/L NaOH 溶液调 pH 至 8.0, 加水定容至 100 mL。在 103.4 kPa (121℃) 条件下灭菌 20 min。

A.3 1 mol/L Tris-HCl 溶液 (pH 8.0)

称取 121.1 g 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 溶解于 800 mL 水中, 用浓盐酸调 pH 至 8.0, 加水定容至 1 L。在 103.4 kPa (121℃) 条件下灭菌 20 min。

A.4 1 mol/L Tris-HCl (pH 7.5)

称取 121.1 g Tris 碱溶解于 800 mL 水中, 用浓盐酸调 pH 至 7.5, 用水定容至 1 L。在 103.4 kPa (121℃) 条件下灭菌 20 min。

A.5 10 mg/mL RNase A

将胰 RNA 酶 (RNase A) 溶于 10 mmol/L Tris-HCl (pH7.5)、15 mmol/L NaCl 中, 配成 10 mg/mL 的浓度, 于 100℃ 加热 15min, 缓慢冷却至室温, 分装成小份保存于 -20℃。

A.6 3 mol/L 乙酸钠 (pH 5.6)

称取 408.3g 三水乙酸钠溶解于 800 mL 水中, 用冰乙酸调 pH 至 5.6, 用水定容至 1 L。在 103.4 kPa (121℃) 条件下灭菌 20 min。

A.7 抽提液

在 600 mL 水中加入 69.3 g 葡萄糖, 20 g 聚乙烯吡咯烷酮 (K30) (PVP), 1 g 二乙氨基二硫代甲酸钠 (Sodium diethyldithiocarbonate, DIECA), 充分溶解, 然后加入 1 mol/L Tris-HCl (pH7.5) 100 mL, 0.5 mol/L EDTA (pH8.0) 10 mL, 加水定容至 1 L, 4℃ 保存, 使用时加入 0.2% (V/V) 的 β -巯基乙醇。

A.8 裂解液

在 600 mL 水中加入 81.7 g 氯化钠, 20 g 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB), 20 g 聚乙烯吡咯烷酮 (K30) (PVP), 1 g 二乙氨基二硫代甲酸钠 (Sodium diethyldithiocarbonate, DIECA), 充分溶解, 然后加入 1 mol/L Tris-HCl (pH7.5) 100 mL, 0.5 mol/L EDTA (pH8.0) 4 mL, 加水定容至 1 L, 室温保存, 使用时加入 0.2% (V/V) 的 β -巯基乙醇。

A. 9 TE缓冲液 (pH 8.0)

分别加入 1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 10 mL 和 0.5 mol/L EDTA (pH8.0) 溶液 2 mL, 加水定容至 1000 mL。在 103.4 kPa (121℃) 条件下灭菌 20 min。

A. 10 苯酚: 氯仿: 异戊醇溶液

将苯酚、氯仿和异戊醇按照25: 24: 1的体积比混合。

A. 11 氯仿: 异戊醇溶液

将氯仿和异戊醇按照24: 1的体积比混合。

A. 12 异丙醇**A. 13 70%乙醇(V:V)**
