



# 中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

## 转基因苜蓿实时荧光 PCR 检测方法

Genetic Modified Alfalfa Detection Method by Real-time PCR

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

(征求意见稿)

— XX — XX 发布

XXXX — XX — XX 实施

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

## 前 言

本标准由全国生化检测标准化技术委员会提出并归口。

本标准主要起草单位：

本标准主要起草人：

# 转基因苜蓿实时荧光 PCR 检测方法

## 1 范围

本标准规定了转基因苜蓿成分检测的实时荧光PCR方法。

本标准适用于种子，饲料中的转基因苜蓿的实时荧光PCR方法检测。

## 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试验方法

GB/T 19495.1 转基因产品检测 通用要求和定义

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 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1 ACC(acetyl CoA carboxylase)基因：编码乙酰辅酶 A 羧化酶的基因，在本标准中作为苜蓿的内标准基因

3.2 18s rRNA：编码真核生物 18s 核糖体 RNA 的基因，本标准中作为苜蓿的内标准基因。

3.3 FMV35S (35S promoter from a modified figwort mosaic virus)基因：编码玄参花叶病毒的 35S 启动子的基因，在转基因苜蓿 J101 和 J163 中作为启动子。

3.4 E9 3(3' termination region from pea ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase):来源于源自豌豆核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶小亚基 (rbcS) E9 基因的 3' 非翻译区，存在于转基因苜蓿 J101 与 J163 品系中。

3.5 CP4-EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene): 源自 Agrobacterium CP4 菌株的天然 CP4 EPSPS 蛋白编码序列，存在于转基因苜蓿 J101 与 J163 品系中。

3.6 CTP2 (chloroplast transit peptide coding sequence, isolated from Arabidopsis thaliana EPSPS)基因：源自 Arabidopsis thaliana EPSPS 的叶绿体转运肽，引导 CP4 EPSPS 蛋白在芳香族氨基酸合成场所叶绿体上的定位，存在于转基因苜蓿 J101 与 J163 品系中。

3.7 NOS 终止子：来自根癌农杆菌 pTi 的胭脂碱合酶 (nos) 基因的 3'UTR 序列区，编码 NOS，用来指导聚腺苷酸化，存在于转基因苜蓿 KK179 品系中。

3.8 Pal2 基因：来自菜豆的 Pal2 基因启动子，含有指导植物细胞转录的编码苯丙氨酸解氨酶，存在于转基因苜蓿 KK179 品系中。

## 4 实验原理

应用TaqMan 探针技术,根据常用的筛选基因(启动子,终止子等)序列、品系特异性序列和苜蓿内源基因序列,设计引物和荧光探针,对样品中基因组 DNA 进行 PCR 扩增。在 PCR 反应过程中,荧光信号的累积与 PCR 产物形成完全同步,因此可根据荧光信号的强度判定样品中 是否含有特定的基因。

## 5 试剂与材料

除非有特殊说明，仅使用分析纯实际和重蒸馏水或符合GB/T 6682规定的一级水。

### 5.1 DNA 提取试剂盒

### 5.2 实时荧光定量 PCR MasterMix

### 5.3 内标准基因引物和探针

#### 5.3.1 ACC基因引物和探针

ACC-F: 5'- GATCAGTGAACCTCGCAAAGTAC -3'

ACC-R: 5'- CAACGACGTGAACACTACAAC -3'

ACC-P: 5'-FAM- TGAATGCTCCTGTGATCTGCCCATGC -BHQ1-3'

#### 5.3.2 18s rRNA基因引物和探针

18s -F: 5'- CCTGAGAAACGGCTACCA -3'

18s -R: 5'- CGTGTCTCAGGATTGGGTAAT -3'

18s -P: 5'-FAM- TGCGCGCCTGCTGCCTTCCT -BHQ1-3'

### 5.4 外源基因引物和探针

#### 5.4.1 J101 转化事件特异性基因引物和探针

J101-F: 5'- GTACTGATCTTGTGTCATAGTTTC -3'

J101-R: 5'- ACTGAGAATTAGCTTCCACTC -3'

J101-P: 5'-FAM- ACTGAAGGCGGGAAACGACAATCT -BHQ1-3'

#### 5.4.2 J163 转化事件特异性基因引物和探针

J163-F: 5'- GCCGGGACAAGGTCATC -3'

J163-R: 5'- TGGACTGAGAATTAGCTTCCAC -3'

J163-P: 5'-FAM- TGAAGTGTTCGGTGGGAAACGACA -BHQ1-3'

#### 5.4.3 KK179 转化事件特异性基因引物和探针

KK179-F: 5'- AGGACCTGCAGAAGCTA -3'

KK179-R: 5'- CTAGGCTAAAGTAAGATATCGAAGA -3'

KK179-P: 5'-FAM- TCAGATTGTCGTTTCCCGCCTTCA -BHQ1-3'

#### 5.4.4 FMV35S 启动子基因引物和探针

FMV35S-F: 5'-TGACAGCCCACTCACTAA-3'

FMV35S-R: 5'-CAATCTGGAATGCTGCTAAATC-3'

FMV35S-P: 5'-FAM-TATGACGAACGCAGTGACGACCAC-BHQ1-3'

#### 5.4.5 CPT2 基因引物和探针

CPT2-F: 5'-GAAATCCAGTCAACGCAAATC-3'

CPT2-R: 5'-CATCCCACTCTTCTTCAATCC-3'

CPT2-P: 5'-FAM-ATCGGTTTCTCTGAAGACGCAGCA-BHQ1-3'

#### 5.4.6 CP4-EPEPS 基因引物和探针

EPEPS-F: 5'-CAGCATCCACGAGCTTATC-3'

EPEPS-R: 5'-GGAAACAGAAGACATGACCTTA-3'

EPEPS-P: 5'-FAM-ACGTCATCCCACTCTTCTTCAATCCC-BHQ1-3'

#### 5.4.7 E9 基因引物和探针

E9-F: 5'-GTACCATTTGTTGTGCTTGTA-3'

E9-R: 5'-GGACCATATCATTCAATTAATCTTC-3'

E9-P: 5'-FAM-TCGCTATCGAACTGTGAAATGGAAATGGA-BHQ1-3'

#### 5.4.8 pal2 基因引物和探针

pal2-F: 5'-GCATCGTTACCACCCTTTAT-3'

pal2-R: 5'-GTAGTGCCTAATGTGGTGAA-3'

pal2-P: 5'-FAM-ACCAGACACCAACGCTCCAGATTT-BHQ1-3'

#### 5.4.9 NOS 终止子基因引物和探针

TNOS-F: 5'-ATCGTTCAAACATTTGGCA-3'

TNOS-R: 5'-ATTGCGGGACTCTAATCATA-3'

TNOS-P: 5'-FAM-CATCGCAAGACCGGCAACAGG-BHQ1-3'

### 5.5 耗材

5.5.1 1.5mL 离心管;

5.5.2 不同量程移液器以及配套枪头;

## 6 仪器与设备

6.1 分析天平: 感量 0.1mg。

6.2 生物安全柜。

6.3 实时荧光 PCR 扩增仪。

6.4 重蒸馏水发生器或纯水仪。

6.5 涡旋震荡仪。

6.6 其他相关仪器和设备。

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 实时荧光 PCR 检测

7.5.1 实时荧光 PCR 反应对照组设置

每个样品应有3个平行实验，同时每次检测必须设立3个对照：

- (1) 阳性对照，为对应的转基因植物样品品系或含有相应外源基因的转基因植物样品基因组DNA，或含有上述片段的质粒标准分子DNA；
- (2) 阴性对照，非转基因植物样品样品DNA；
- (3) 空白对照，PCR反应的空白对照（以水代替DNA模板）。

7.5.2 实时荧光 PCR 反应体系

实时荧光PCR反应体系配制见表1。每个样品设置3个平行重复。

表1 实时荧光PCR反应体系

反应组分	储存浓度	上样体系/μL	终浓度
2×MasterMix	2×	10	1×
上游引物	10 μmol/L	1	0.5 μmol/L
下游引物	10 μmol/L	1	0.5 μmol/L
探针	10 μmol/L	0.5	0.25 μmol/L
DNA模板	--	2	50-250ng
超纯水			补齐20μL

注1：可选择单独的PCR扩增酶以及相应的扩增缓冲液，dNTP等反应组分进行实验，以上组分的添加量按照产品说明书使用；

注2：反应体系中的各组分可根据不同最终反应体系进行区分，但是需保持所有组分终浓度一致。

7.5.3 实时荧光 PCR 扩增程序

实时荧光 PCR 反应参数为：50 ℃/2min；95 ℃/10min；95 ℃/15s，60 ℃/60s，40 个循环。

注：95℃/10min的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扩增试剂体系的不同进行调整。

#### 7.5.4 实时荧光 PCR 荧光基团的选择

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。

## 8 结果分析与表述

### 8.1 对照组检测结果分析

空白对照：内源基因检测Ct值大于或等于40，外源基因或品系特异性检测Ct值大于或等于40；

阴性对照：内源基因检测Ct值小于或等于30，转化事件特异性检测Ct值大于或等于40；

阳性对照：内源基因检测Ct值小于或等于30，转化事件特异性检测Ct值小于或等于30；

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。

### 8.2 试样检测结果分析和表述

8.2.1 内标准基因扩增曲线形状良好，扩增 Ct 值小于等于 30；外源基因扩增曲线形状良好，扩增 Ct 值大于或等于 40，这表明中试样中该样品不含所检基因或品系，表述为“试样中未检测出 XXX 基因成分”。

8.2.2 内标准基因扩增曲线形状良好，扩增 Ct 值小于等于 30；外源基因扩增曲线形状良好，扩增 Ct 值小于或等于 36，这表明试样中检测出了所检基因或品系基因成分，表述为“试样中检测出 XXX 基因成分”

8.2.3 测试样品检测 Ct 值在 36-40 之间，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基因或品系。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基因或品系。