

中华人民共和国国家标准

农业部 2259 号公告—12—2015

转基因植物及其产品成分检测 抗虫耐除草剂玉米双抗 12-5 及其衍生品种 定性 PCR 方法

Detection of genetically modified plants and derived products—
Qualitative PCR method for insect-resistant and herbicide-tolerant maize
Shuangkang 12-5 and its derivatives

2015-05-21 发布

2015-08-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国农业转基因生物安全管理标准化技术委员会(SAC/TC 276)归口。

本标准起草单位:农业部科技发展中心、中国农业科学院油料作物研究所、农业部环境保护科研监测所。

本标准主要起草人:吴刚、沈平、武玉花、李昂、修伟明、朱莉、李允静、李俊、沈旻伟。

转基因植物及其产品成分检测

抗虫耐除草剂玉米双抗 12-5 及其衍生品种定性 PCR 方法

1 范围

本标准规定了转基因抗虫耐除草剂玉米双抗 12-5 转化体特异性定性 PCR 检测方法。

本标准适用于转基因抗虫耐除草剂玉米双抗 12-5 及其衍生品种,以及制品中双抗 12-5 转化体成分的定性 PCR 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

农业部 1485 号公告—4—2010 转基因植物及其产品成分检测 DNA 提取和纯化

农业部 1861 号公告—3—2012 转基因植物及其产品成分检测 玉米内标准基因定性 PCR 方法

农业部 2031 号公告—19—2013 转基因植物及其产品成分检测 抽样

NY/T 672 转基因植物及其产品检测 通用要求

3 术语和定义

农业部 1861 号公告—3—2012 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

双抗 12-5 转化体特异性序列 event-specific sequence of Shuangkang 12-5

双抗 12-5 玉米基因组与外源插入片段 5' 端的连接区序列,包括玉米基因组序列与转化载体部分序列。

4 原理

根据转基因抗虫耐除草剂玉米双抗 12-5 转化体特异性序列设计特异性引物和探针,对试样进行 PCR 扩增。依据是否扩增获得预期的 DNA 片段或典型扩增曲线,判断样品中是否含有双抗 12-5 转化体成分。

5 试剂和材料

除非另有说明,仅使用分析纯试剂和重蒸馏水或符合 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 琼脂糖。

5.2 10 g/L 溴化乙锭溶液:称取 1.0 g 溴化乙锭(EB),溶解于 100 mL 水中,避光保存。

警告——溴化乙锭有致癌作用,配制和使用时应戴一次性手套操作并妥善处理废液。

5.3 10 mol/L 氢氧化钠溶液:在 160 mL 水中加入 80.0 g 氢氧化钠(NaOH),溶解后,冷却至室温,再加水定容到 200 mL。

5.4 500 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠溶液(pH 8.0):称取 18.6 g 乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na₂),加入 70 mL 水中,缓慢滴加氢氧化钠溶液直至 EDTA-Na₂ 完全溶解,用氢氧化钠溶液(5.3)调 pH 至 8.0,加水定容至 100 mL。在 103.4 kPa(121℃)条件下灭菌 20 min。

5.5 1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷—盐酸溶液(pH 8.0):称取 121.1 g 三羟甲基氨基甲烷(Tris)溶解于 800 mL 水中,用盐酸(HCl)调 pH 至 8.0,加水定容至 1 000 mL。在 103.4 kPa(121℃)条件下灭菌 20 min。

5.6 TE 缓冲液(pH 8.0):分别量取 10 mL 三羟甲基氨基甲烷—盐酸溶液和 2 mL 乙二铵四乙酸二钠溶液,加水定容至 1 000 mL。在 103.4 kPa(121℃)条件下灭菌 20 min。

5.7 50×TAE 缓冲液:称取 242.2 g 三羟甲基氨基甲烷(Tris),先用 500 mL 水加热搅拌溶解后,加入 100 mL 乙二铵四乙酸二钠溶液,用冰乙酸调 pH 至 8.0,然后加水定容到 1 000 mL。使用时用水稀释成 1×TAE。

5.8 加样缓冲液:称取 250.0 mg 溴酚蓝,加入 10 mL 水,在室温下溶解 12 h;称取 250.0 mg 二甲基苯腈蓝,加 10 mL 水溶解;称取 50.0 g 蔗糖,加 30 mL 水溶解。混合以上 3 种溶液,加水定容至 100 mL,在 4℃下保存。

5.9 DNA 分子量标准:可以清楚区分 100 bp~1 000 bp 的 DNA 片段。

5.10 dNTPs 混合溶液:将浓度为 10 mmol/L 的 dATP、dTTP、dGTP、dCTP 4 种脱氧核糖核苷酸溶液等体积混合。

5.11 Taq DNA 聚合酶、PCR 缓冲液及 25 mmol/L 氯化镁溶液。

5.12 *zSSIb* 基因引物

5.12.1 普通 PCR 方法引物:

zSSIb-1F:5'-CTCCCAATCCTTTGACATCTGC-3'

zSSIb-2R:5'-TCGATTTCTCTCTTGGTGACAGG-3'

预期扩增片段大小为 151 bp。

5.12.2 实时荧光 PCR 方法引物/探针:

zSSIb-3F:5'-CGGTGGATGCTAAGGCTGATG-3'

zSSIb-4R:5'-AAAGGGCCAGGTTTCATTATCCTC-3'

zSSIb-P:5'-FAM-TAAGGAGCACTCGCCGCCGCATCTG-BHQ1-3'

预期扩增片段大小为 88 bp。

5.13 双抗 12-5 转化体特异性序列引物

5.13.1 普通 PCR 方法引物:

SK12-5F:5'-CAACGTCGTGACTGGGAAAA-3'

SK12-5R:5'-TGGAAGACAAGTTCTACGGGCT-3'

预期扩增片段大小为 256 bp(参见附录 A)。

5.13.2 实时荧光 PCR 方法引物/探针:

qSK12-5F:5'-GTCGTTTCCCGCCTTCAGTT-3'

qSK12-5R:5'-GGTGCCTGGAAGACAAGTTCTA-3'

qSK12-5P:5'-FAM-AGCTCAACCACATCGCCCGACGC-BHQ1-3'

预期扩增片段大小为 94 bp(参见附录 A)。

5.14 引物溶液:用 TE 缓冲液或水分别将上述引物稀释到 10 μmol/L。

5.15 石蜡油。

5.16 DNA 提取试剂盒。

5.17 定性 PCR 试剂盒。

5.18 PCR 产物回收试剂盒。

5.19 实时荧光定量 PCR 试剂盒。

6 主要仪器和设备

- 6.1 分析天平:感量 0.1 g 和 0.1 mg。
- 6.2 PCR 扩增仪:升降温速度 $>1.5^{\circ}\text{C}/\text{s}$,孔间温度差异 $<1.0^{\circ}\text{C}$ 。
- 6.3 实时荧光定量 PCR 仪。
- 6.4 电泳槽、电泳仪等电泳装置。
- 6.5 紫外透射仪。
- 6.6 凝胶成像系统或照相系统。

7 分析步骤

7.1 抽样

按 NY/T 672 和农业部 2031 号公告—19—2013 的规定执行。

7.2 试样制备

按 NY/T 672 和农业部 2031 号公告—19—2013 的规定执行。

7.3 试样预处理

按农业部 1485 号公告—4—2010 的规定执行。

7.4 DNA 模板制备

按农业部 1485 号公告—4—2010 的规定执行。

7.5 PCR 扩增

7.5.1 普通 PCR 方法

7.5.1.1 试样 PCR 扩增

7.5.1.1.1 玉米内标准基因 PCR 扩增

按农业部 1861 号公告—3—2012 中 7.5.1.1.1 的规定执行。

7.5.1.1.2 转化体特异性序列 PCR 扩增

7.5.1.1.2.1 每个试样 PCR 设置 3 次平行。

7.5.1.1.2.2 在 PCR 扩增管中按表 1 依次加入反应试剂,混匀,再加 25 μL 石蜡油(有热盖功能的 PCR 仪可不加)。也可采用经验证的、等效的定性 PCR 试剂盒配制反应体系。

表 1 普通 PCR 检测反应体系

试 剂	终 浓 度	体 积
水		—
10 $\times$ PCR 缓冲液	1 $\times$	2.5 μL
25 mmol/L 氯化镁溶液	1.5 mmol/L	1.5 μL
dNTPs 混合溶液(各 2.5 mmol/L)	各 0.2 mmol/L	2.0 μL
10 $\mu\text{mol/L}$ SK12-5F	0.2 $\mu\text{mol/L}$	0.5 μL
10 $\mu\text{mol/L}$ SK12-5R	0.2 $\mu\text{mol/L}$	0.5 μL
Taq DNA 聚合酶	0.025 U/ μL	—
50 mg/L DNA 模板	4 mg/L	2.0 μL
总体积		25.0 μL
“—”表示体积不确定,如果 PCR 缓冲液中含有氯化镁,则不加氯化镁溶液,根据 Taq DNA 聚合酶的浓度确定其体积,并相应调整水的体积,使反应体系总体积达到 25.0 μL 。		

7.5.1.1.2.3 将 PCR 管放在离心机上,500 g $\sim$ 3 000 g 离心 10 s,然后取出 PCR 管,放入 PCR 仪中。

7.5.1.1.2.4 进行 PCR 扩增。反应程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸

30 s,共进行 35 个循环;72℃延伸 7 min。

7.5.1.1.2.5 PCR 结束后取出 PCR 管,对 PCR 产物进行电泳检测。

7.5.1.2 对照 PCR 扩增

在试样 PCR 扩增的同时,应设置阴性对照、阳性对照和空白对照。

以非转基因玉米基因组 DNA 作为阴性对照;以转基因玉米双抗 12-5 质量分数为 0.1%~1.0% 的基因组 DNA,或采用双抗 12-5 转化体特异性序列与非转基因玉米基因组相比的拷贝数分数为 0.1%~1.0% 的 DNA 溶液作为阳性对照;以水作为空白对照。

除 DNA 模板外,对照 PCR 扩增与 7.5.1.1 相同。

7.5.1.3 PCR 产物电泳检测

按 20 g/L 的质量浓度称量琼脂糖,加入 1×TAE 缓冲液中,加热溶解,配制成琼脂糖溶液。每 100 mL 琼脂糖溶液中加入 5 μL EB 溶液,混匀,稍适冷却后,将其倒入电泳板上,插上梳板,室温下凝固成凝胶后,放入 1×TAE 缓冲液中,垂直向上轻轻拔去梳板。取 12 μL PCR 产物与 3 μL 加样缓冲液混合后加入凝胶点样孔,同时在其中一个点样孔中加入 DNA 分子量标准,接通电源在 2 V/cm~5 V/cm 条件下电泳检测。

7.5.1.4 凝胶成像分析

电泳结束后,取出琼脂糖凝胶,置于凝胶成像仪上或紫外透射仪上成像。根据 DNA 分子量标准估计扩增条带的大小,将电泳结果形成电子文件存档或用照相系统拍照。如需通过序列分析确认 PCR 扩增片段是否为目的 DNA 片段,按照 7.5.1.5 和 7.5.1.6 的规定执行。

7.5.1.5 PCR 产物回收

按 PCR 产物回收试剂盒说明书,回收 PCR 扩增的 DNA 片段。

7.5.1.6 PCR 产物测序验证

将回收的 PCR 产物克隆测序,与转基因抗虫耐除草剂玉米双抗 12-5 转化体特异性序列(参见附录 A)进行比对,确定 PCR 扩增的 DNA 片段是否为目的 DNA 片段。

7.5.2 实时荧光 PCR 方法

7.5.2.1 试样 PCR 扩增

7.5.2.1.1 玉米内标准基因 PCR 扩增

按农业部 1861 号公告—3—2012 中 7.5.2.1 的规定执行。

7.5.2.1.2 转化体特异性序列 PCR 扩增

7.5.2.1.2.1 每个试样 PCR 设置 3 次平行。

7.5.2.1.2.2 在 PCR 扩增管中按表 2 依次加入反应试剂,混匀。也可采用经验证的、等效的实时荧光定量 PCR 试剂盒配制反应体系。

7.5.2.1.2.3 将 PCR 管放在离心机上,500 g~3 000 g 离心 10 s,然后取出 PCR 管,放入 PCR 仪中。

7.5.2.1.2.4 运行实时荧光 PCR。反应程序为 95℃变性 5 min;95℃变性 15 s,60℃退火延伸 60 s,共进行 40 个循环;在第二阶段的退火延伸(60℃)时段收集荧光信号。

注:不同仪器可根据仪器要求将反应参数做适当调整。

表 2 实时荧光 PCR 检测反应体系

试 剂	终 浓 度	体 积
水		—
10×PCR 缓冲液	1×	2.0 μL
25 mmol/L MgCl ₂	1.5 mmol/L	1.2 μL
10 mmol/L dNTPs	0.3 mmol/L	0.6 μL
10 μmol/L qSK12-5P	0.2 μmol/L	0.4 μL

表 2（续）

试 剂	终 浓 度	体 积
10 $\mu\text{mol/L}$ qSK12-5F	0.4 $\mu\text{mol/L}$	0.8 μL
10 $\mu\text{mol/L}$ qSK12-5R	0.4 $\mu\text{mol/L}$	0.8 μL
TaqDNA 聚合酶	0.04 U/ μL	—
50 mg/L DNA 模板	5 mg/L	2.0 μL
总体积		20.0 μL
“—”表示体积不确定。如果 PCR 缓冲液中含有氯化镁,则不加氯化镁溶液,根据 Taq DNA 聚合酶的浓度确定其体积,并相应调整水的体积,使反应体系总体积达到 20.0 μL 。		

7.5.2.2 对照 PCR 扩增

在试样 PCR 扩增的同时,应设置阳性对照、阴性对照和空白对照。
以非转基因玉米基因组 DNA 作为阴性对照;以转基因玉米双抗 12-5 质量分数为 0.1%~1.0% 的基因组 DNA,或采用双抗 12-5 转化体特异性序列与非转基因玉米基因组相比的拷贝数分数为 0.1%~1.0% 的 DNA 溶液作为阳性对照;以水作为空白对照。
除 DNA 模板外,对照 PCR 扩增与 7.5.2.1 相同。

8 结果分析与表述

8.1 普通 PCR 方法

8.1.1 对照检测结果分析

阳性对照 PCR 中,玉米内标准基因和双抗 12-5 转化体特异性序列均得到扩增,且扩增片段大小与预期片段大小一致,而阴性对照中仅扩增出玉米内标准基因片段,空白对照中没有预期扩增片段,表明 PCR 检测反应体系正常工作。否则,重新检测。

8.1.2 样品检测结果分析和表述

- 8.1.2.1 玉米内标准基因和双抗 12-5 转化体特异性序列均得到扩增,且扩增片段大小与预期片段大小一致,表明样品中检测出双抗 12-5 转化体成分,表述为“样品中检测出转基因抗虫耐除草剂玉米双抗 12-5 转化体成分,检测结果为阳性”。
- 8.1.2.2 玉米内标准基因片段得到扩增,且扩增片段大小与预期片段大小一致,而双抗 12-5 转化体特异性序列未得到扩增,或扩增片段大小与预期片段大小不一致,表明样品中未检测出双抗 12-5 转化体成分,表述为“样品中未检测出转基因抗虫耐除草剂玉米双抗 12-5 转化体成分,检测结果为阴性”。
- 8.1.2.3 玉米内标准基因片段未得到扩增,或扩增片段大小与预期片段大小不一致,表明样品中未检测出玉米成分,结果表述为“样品中未检测出玉米成分,检测结果为阴性”。

8.2 实时荧光 PCR 方法

8.2.1 阈值设定

实时荧光 PCR 结束后,以 PCR 刚好进入指数期扩增来设置荧光信号阈值,并根据仪器噪声情况进行调整。

8.2.2 对照检测结果分析

阳性对照 PCR 中,玉米内标准基因和双抗 12-5 转化体特异性序列均出现典型扩增曲线,且 C_t 值小于或等于 38,而阴性对照中仅玉米内标准基因出现典型扩增曲线,且 C_t 值小于或等于 36,空白对照中无典型扩增曲线,荧光信号低于设定的阈值,表明 PCR 检测反应体系工作正常。否则,重新检测。

8.2.3 样品检测结果分析和表述

- 8.2.3.1 玉米内标准基因和双抗 12-5 转化体特异性序列均出现典型扩增曲线,且 C_t 值小于或等于 38,表明样品中检测出双抗 12-5 转化体成分,表述为“样品中检测出转基因抗虫耐除草剂玉米双抗 12-5 转化体成分,检测结果为阳性”。

5 转化体成分,检测结果为阳性”。

8.2.3.2 玉米内标准基因出现典型扩增曲线,且 C_t 值小于或等于 36,而双抗 12-5 转化体特异性序列无典型扩增曲线或 C_t 值大于 38,表明样品中未检测出双抗 12-5 转化体成分,表述为“样品中未检测出转基因抗虫耐除草剂玉米双抗 12-5 转化体成分,检测结果为阴性”。

8.2.3.3 玉米内标准基因 C_t 值大于 36,表明样品中未检测出玉米成分,表述为“样品中未检测出玉米成分,检测结果为阴性”。

9 检出限

9.1 普通 PCR 方法的检出限为 0.1%(含靶序列样品 DNA / 总样品 DNA)。

9.2 实时荧光 PCR 方法的检出限为 0.05%(含靶序列样品 DNA / 总样品 DNA)。

注:本标准的检出限是以 PCR 检测反应体系中加入 100 ng DNA 模板进行测算的。

附 录 A
(资料性附录)

抗虫耐除草剂玉米双抗 12-5 转化体特异性序列

```
1  CAACGTCGTG ACTGGGAAAA CCCTGGCGTT ACCCAACTTA ATCGCCTTGC AGCACATCCC
61 CCTTTCGCCA GCTGGCGTAA TAGCGAAGAG GCCCGCACCG ATCGCCCTTC CCAACAGTTG
121 CGCAGCCTGA ATGGCGAATG CTAGAGCAGC TTGAGCTTGG ATCAGATTGT CGTTTCCCGC
181 CTTCAGTTTA AACTATCAGT CTCGTTGTAG CGTCGGGCGA TGTGGTTGAG CTCGAGCCCG
241 TAGAACTTGT CTTCCAGGCA CC
```

注 1:单下划线部分为普通 PCR 方法 SK12-5F 和 SK12-5R 引物序列,双下划线部分为实时荧光 PCR 方法 qSK12-5F 和 qSK12-5R 引物序列,方框内部分为实时荧光 PCR 方法 qSK12-5P 探针序列。

注 2:1~200 为外源插入片段部分序列,201~262 为玉米基因组部分序列。
