



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1198—2003

马铃薯中转基因成分定性 PCR 检测方法

Protocol of the polymerase chain reaction for detecting
genetically modified components in potatoes

2003-03-17 发布

2003-09-01 实施

中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

前 言

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国山东出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：高宏伟、梁成珠、张艺兵、权洁霞。

本标准系首次发布的检验检疫行业标准。

马铃薯中转基因成分定性 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了马铃薯中的转基因成分的定性 PCR 检测方法。

本标准适用于转基因马铃薯品种 (NEW LEAF®) POTATO LINES BT-06, ATBT 04-06, ATBT 04-31, ATBT 04-36 AND SPBT 02-05; (NEW LEAF® PLUS) POTATO LINES PBMT 21-129, PBMT 21-350 AND PBMT 22-82; (NEW LEAF® Y) POTATO LINES RBMT 15-101, SEMT 15-02 AND SEMT 15-15 等品种的转基因马铃薯块茎、植株、生薯条、生薯片、淀粉的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

- GB/T 6682 分析实验室用水规格和实验方法
- SN/T 1193 基因检验实验室技术要求
- SN/T 1194 植物及其产品转基因成分检测抽样和制样方法
- SN/T 1204 植物及其加工产品转基因成分实时荧光 PCR 定性检验方法

3 术语、定义和缩略语

下列术语和定义(缩略语)适用于本标准。

3.1

转基因 transgene

将物种本身不具有的、来源于其他物种的功能 DNA 序列,通过各种导入手段,使其在该物种中进行表达,以便该物种获得新的品种特征。

3.2

聚合酶链式反应 polymerase chain reaction, PCR

模板基因序列先经高温变性成为单链,在 DNA 聚合酶作用和适宜的反应条件下,根据模板序列设计两条引物分别与模板 DNA 两条链上相应的一段互补序列发生退火而相互结合,接着在 DNA 聚合酶的作用下以四种脱氧核糖核酸(dNTP)为底物,使引物得以延伸,然后不断重复变性、退火和延伸这一循环,使欲扩增的基因片段以几何倍数扩增。

3.3 缩略语

- 3.3.1 Pata: 马铃薯种属特异性 DNA 引物,扩增的片段为马铃薯块茎贮藏蛋白 Patatin 基因片段。
- 3.3.2 CaMV 35S: promoter from cauliflomer mosaic virus, 花椰菜花叶病毒 35S 启动子。
- 3.3.3 NPT-Ⅱ: neomycin phosphotransferase-Ⅱ, 新霉素-3'-磷酸转移酶。
- 3.3.4 NOS: nopaline synthase terminator, 胭脂碱合成酶 3' 转录终止子。
- 3.3.5 PVYcp: potato Y virus coat protein, 马铃薯 Y 病毒外壳蛋白。
- 3.3.6 cry 3A: 一个由 *B. thuringiensis* subsp. *Tenebrionis* (B. t. t.) strain BI 256-82 的蛋白。这个蛋白具有抗虫活性,尤其是可以选择性的杀死科罗拉多马铃薯甲虫 (Colorado potato beetle larvae)。

3.3.7 CP4 EPSPS; 5-enolpyruylshikimate-3-phosphate synthase 5-enolpyruyl shikimate-3-phosphate synthase, 来源于农杆菌 *Agrobacterium* sp. Strain CP4 的 5-莽草酸-3-磷酸合成酶。

3.3.8 PLRVrep; potato leafroll virus, 马铃薯卷叶病毒重复序列。

3.3.9 E93'; the 3' non-translated region of the pea ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit (rbcS) E9 gene. , 来源于豌豆的核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶 E9 基因小亚基 3'端序列。

3.3.10 ArabSSU1A; arabidopsis thaliana ribulose-1'5-bisphosphate carboxylase (Rubisco) small subunit ats 1A promoter, arabidopsis thaliana 的核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶小亚基 1A 的启动子。

3.3.11 aad; (resides outside T-DNA) 在转座自大肠杆菌 Tn 7 中编码链霉素腺苷酰(基)转移酶的基因。

3.3.12 oriV; (resides outside T-DNA) 一个源自农杆菌 *Agrobacterium* 的 RK2 质粒的 1.3 kb 的复制区域。

3.3.13 ori 322; (resides outside T-DNA) 一个源自 pBR322 质粒的 1.8 kb 的片段, 其中包含复制区域和转移结合位点 bom。

3.3.14 FMV 35S; a promotor derived from figwort mosaic virus (FMV), 玄参花叶病毒 35S 启动子。

4 防污染措施

检测过程中防止交叉污染的措施按照 SN/T 1193 中的规定执行。

5 抽样与制样

对于转基因样品通用的抽样方法, 按照 SN/T 1194 的规定执行。

5.1 马铃薯产品抽样量

5.1.1 马铃薯块茎、生薯条、生薯片、植株抽样量。

按照表 1 中比例抽样。其中每包取样数的单位对于块茎、生薯条、生薯片为个, 对于植株为株。

表 1 马铃薯块茎、植株、生薯条的抽样量

批量/包	开包数目	每包取样数目
≤50	2	2
51~500	3	3
501~35 000	5	5
≥35 001	8	8

5.1.2 马铃薯淀粉抽样量。

按表 2 中比例抽样。

表 2 马铃薯淀粉的抽样量

批量/包	开包数目	每包取样数目/g
≤15	2	120
16~50	3	120
51~150	5	120
151~500	8	120
501~3 200	13	120
3 201~35 000	20	120
35 001~500 000	32	120
≥500 001	50	120

5.2 马铃薯试样制备

5.2.1 马铃薯块茎、生薯条、生薯片、植株的试样制备

对于同一批次的马铃薯块茎、生薯条、生薯片,把每个样品洗干净,在任意部位用小刀切下约 1 cm^3 的样品作为试样用于提取 DNA。

对于同一批次的马铃薯植株,取每个样品的一片叶片洗干净,用小刀切下 2 cm^2 的叶片作为试样用于提取 DNA。

5.2.2 马铃薯淀粉试样的制备

把每包取样的 120 g 淀粉充分混合,从每个 120 g 中取 100 mg 作为试样。

6 测定方法

6.1 原理

样品经过提取 DNA 后,针对转基因植物所插入的外源基因的基因序列设计引物,通过 PCR 技术,特异性扩增外源基因的 DNA 片断,根据 PCR 扩增结果,判断该样品中是否含有转基因成分。

6.2 试剂和材料

除另有规定外,其他试剂为分析纯或生化试剂,水为按照 GB/T 6682 规定的一级水。

6.2.1 引物:按照表 3 中提供的引物序列合成引物,加入无离子水配成 $100\text{ pmol}/\mu\text{L}$ 贮存,配成直接用于 PCR 反应的 $20\text{ pmol}/\mu\text{L}$ 的工作液。参见附录 A。

表 3 转基因马铃薯 PCR 检测用的引物序列及 PCR 产物的大小

引 物	来 源	引物序列	片 段	备 注
PATA	内源	F 5'-tga cct gga cac cac agt tat-3' R 5'-gtg gat ttc agg agt tct tcg-3'	216 bp	内对照
CaMV 35S	外源	F 5'-gct cct aca aat gcc atc a-3' R 5'-gat agt ggg att gtg cgt ca-3'	195 bp	筛选、鉴定检测 NEW LEAF®
FMV 35S	外源	F 5'-agt cca aag cct caa caa ggt c-3' R 5'-cat tag tga gtg ggc tgt cag g-3'	365 bp	筛选、鉴定检测 NEW LEAF® PLUS NEW LEAF® Y
NOS	外源	F 5'-gaa tcc tgt tgc cgg tct tg-3' R 5'-tta tcc tag ttt gcg cgc ta-3'	180 bp	筛选检测 NEW LEAF® PLUS NEW LEAF® Y NEW LEAF®
NPTII	外源	F 5'-gga tct cct gtc atc t-3' R 5'-gat cat cct gat cga c-3'	173 bp	筛选检测 NEW LEAF® PLUS NEW LEAF® Y NEW LEAF®
PLRVrep	外源	F 5'-tcg tca tta aac ttg acg ac-3' R 5'-ctt ctt tca cgg agt tcc ag-3'	172 bp	鉴定检测 NEW LEAF® PLUS
PVYcp	外源	F 5'-gaa tca agg cta tca cgt cc-3' R 5'-cat ccg cac tgc etc ata cc-3'	161 bp	鉴定检测 NEW LEAF® Y
Cry3A	外源	5'-aga gcc gtc gca aac acc aat c-3' 5'-tct ggg tgc tgg cct cat cg-3'	112 bp	鉴定检测 NEW LEAF® PLUS NEW LEAF® Y NEW LEAF®

- 6.2.2 *Taq* DNA 聚合酶。
- 6.2.3 dNTP:dATP、dTTP、dCTP、dGTP、dUTP。
- 6.2.4 琼脂糖:电泳纯。
- 6.2.5 溴化乙锭(EB)或其他染色剂。
- 6.2.6 三氯甲烷。
- 6.2.7 异丙醇。
- 6.2.8 70%乙醇。
- 6.2.9 分子量 Marker:50 bp~300 bp。
- 6.2.10 植物总 DNA 提取缓冲液:量取 100 mL 1mol/L Tris-Cl,50 mL 0.5 mol/L EDTA,称取 5.0 g 十二烷基硫酸钠(SDS),16.848 g 氯化钠,定容至 1 L,分装灭菌备用。
- 6.2.11 TE 缓冲液:10 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0;1 mmol/L EDTA,pH8.0。
- 6.2.12 10×PCR 缓冲液:100 mmol/L 氯化钾(KCl),160 mmol/L 硫酸铵 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,20 mmol/L 硫酸镁 (MgSO_4) ,200 mmol/L Tris-HCl(pH8.8),1% Triton X-100,1 mg/mL BSA。
- 6.2.13 5×TBE 缓冲液:Tris 54 g,硼酸 27.5 g,0.5 mol/L EDTA(pH8.0)20 mL,加蒸馏水至1 000 mL。
- 6.2.14 10×上样缓冲液:0.25%溴酚蓝,40%蔗糖。
- 6.2.15 RNA 酶(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。
- 6.2.16 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。
- 6.3 仪器
 - 6.3.1 固体粉碎机及研钵。
 - 6.3.2 高速冷冻离心机,台式小型离心机,Mini 个人离心机。
 - 6.3.3 水浴培养箱,恒温培养箱,恒温孵育箱。
 - 6.3.4 天平:感量 0.001 g。
 - 6.3.5 高压灭菌锅。
 - 6.3.6 高温干燥箱。
 - 6.3.7 纯水器、双蒸水器。
 - 6.3.8 冷藏、冷冻冰箱。
 - 6.3.9 制冰机。
 - 6.3.10 旋涡震荡器。
 - 6.3.11 微波炉。
 - 6.3.12 基因扩增仪。
 - 6.3.13 电泳仪。
 - 6.3.14 PCR 超净工作台。
 - 6.3.15 核酸蛋白分析仪。
 - 6.3.16 微量移液器:0.1 μL ~2 μL ,0.5 μL ~10 μL ,2 μL ~20 μL ,10 μL ~100 μL ,20 μL ~200 μL ,200 μL ~1 000 μL 。
 - 6.3.17 凝胶成像系统。
 - 6.3.18 实时荧光 PCR 仪。
 - 6.3.19 Eppendorf 管:1.5 mL~5 mL。
 - 6.3.20 PCR 反应管:200 μL ,500 μL 两种规格。

6.4 检测方法

6.4.1 样品 DNA 的提取与纯化

对于马铃薯块茎、生薯条、生薯片、植株,每个试样充分混合置于研钵,加液氮冷冻并迅速研磨成粉

末。将 100 mg 研磨的粉末或淀粉粉末分装于 1.5 mL 的 eppendorf 管中,加入 600 μL 预热的提取缓冲液,再加入 200 μL 20% 的 PVP,混匀,65℃保温 20 min,期间摇动数次。加入等体积的酚-三氯甲烷,轻轻颠倒混匀。10 000 r/min 离心 10 min。取上清液,加入三分之二倍体积的冰冷的异丙醇,混匀。10 000 r/min 离心 10 min。去掉上清液中的异丙醇,此时管底有白色沉淀。向白色沉淀中加入 10 μL 的 RNA 酶 (10 mg/mL),37℃保温 30 min。加入 1 mL 乙酸钾 (5 mol/L)。于 10 000 r/min 离心 10 min。去掉上清液,保留沉淀。用 70% 乙醇洗涤沉淀三次,干燥。用 100 μL TE 溶解沉淀,作为 PCR 反应的模板,4℃保存备用。

也可用相应市售 DNA 提取试剂盒提取 DNA。

6.4.2 PCR 扩增

6.4.2.1 实验对照的设立

每个样品必须有二个平行实验,同时每次检测必须设立三个对照:

——阳性对照,为包含要检测基因片段的转基因植物材料的 DNA 或包含要检测基因片段的阳性质粒 DNA;

——阴性对照,非转基因马铃薯基因组 DNA;

——空白对照(不含 DNA 模板)。

6.4.2.2 PCR 反应体系

在 0.2 mL PCR 反应管中,按表 4 所列顺序依次加入反应物,总体积为 25 μL 。

表 4 PCR 反应体系组成成分

组成成分	25 μL 反应体积
10×PCR 缓冲液	2.5 μL
4×dNTP(2.5 mmol/L)	2.0 μL
引物 1(20 pmol/ μL)	0.5 μL
引物 2(20 pmol/ μL)	0.5 μL
TaqDNA 聚合酶(5 U/ μL)	0.2 μL
UNG 酶(1 U/ μL)	0.2 μL
氯化镁(MgCl_2)(25 mmol/L)	2.0 μL
DNA 模板	0.5 μL ~2.0 μL (10 ng~50 ng DNA)
无离子水	使反应体积达到 25 μL

6.4.2.3 PCR 反应程序

检测不同外源基因,PCR 扩增条件略有不同,不同外源基因的具体扩增程序见表 5。

表 5 PCR 反应条件参数

被扩增的外源基因	变性	扩增	循环数	最终延伸
PATA	94℃,3 min	94℃,40 s;50℃,45 s;72℃,45 s	35	72℃,7 min
CaMV 35S,NOS,NPTII	94℃,3 min	94℃,40 s;54℃,45 s;72℃,45 s	35	72℃,7 min
FMV 35 S	94℃,3 min	94℃,40 s;60℃,45 s;72℃,45 s	35	72℃,7 min
PLRVrep,Cry 3Aa	94℃,3 min	94℃,40 s;55℃,45 s;72℃,45 s	35	72℃,7 min
PVYcp	94℃,3 min	94℃,40 s;63℃,40 s;72℃,40 s	35	72℃,7 min

6.4.2.4 PCR 扩增产物的凝胶电泳检测

用微波炉加热溶解琼脂糖凝胶,配制成 2.0% 浓度的琼脂糖凝胶。将配制好的琼脂糖凝胶放入 0.5×TBE 电泳缓冲液的电泳槽中,用移液器取 10 μL 扩增产物和 2 μL 6×载样缓冲液混合,点样到

2.0%的琼脂糖凝胶上。用 Marker 作分子标记。在 1 V/cm~5 V/cm 电压下电泳 40 min,EB 染色,然后用凝胶成像系统观察、照相、记录。

6.5 结果判断

6.5.1 内源基因的检测

对于马铃薯种属特异性内源基因 Patatin 片段的内参照引物 PATA 扩增样品的 DNA,如果阴性对照、样品和阳性对照的 PCR 产物都出现 214 bp 的条带,则表明提取的样品 DNA 符合 PCR 反应的要求,能用于外源基因检测;否则不能用于检测外源基因,应该重新提取样品 DNA,直到扩出 214 bp 的条带。

6.5.2 外源基因的检测

对马铃薯样品 DNA 提取液进行外源基因的 PCR 测试,如果阴性对照和空白对照未出现扩增条带,阳性对照和待测样品均出现预期大小的扩增条带(扩增片段大小见表 3),则可初步判定待测样品中含有可疑的该外源基因,应进一步进行确证试验,依据确证试验的结果最终报告;如果待测样品中未出现 PCR 扩增产物,则可断定待测样品中不含有该外源基因。

6.5.3 筛选检测和鉴定检测的选择

对马铃薯样品中转基因成分的检测,可参考附录 A 的内容,先筛选检测 CaMV 35S、FMV 35S、NOS、NPT II 基因,筛选检测结果阴性则直接报告结果。

若筛选检测结果阳性,则需进一步鉴定检测 PLRVrep、PVYcp、Cry3A 基因以确定是何种转基因马铃薯品系。

6.6 确证试验

确证试验方法按照 SN/T 1204 中规定的方法执行。

7 结果表述

7.1 未检出××××基因。

7.2 检出××××基因,(可进一步报告)该检测样品是××××转基因马铃薯品系。

附录 A

(资料性附录)

常见转基因马铃薯转入的外源基因的有关信息

表 A.1 常见转基因马铃薯转入的外源基因

序号	公司名称及株系	改良性状	启动子	结构基因	终止子	质粒
1	Monsanto 公司 NEW LEAF® PLUS RBMT 21-129	1) 抗马铃薯卷叶病 2) 抗马铃薯甲虫	1) FMV 35S 2) rabSSU1A 3) P-nos	1) PLRVrep 2) cry 3Aa, 3) NPTII	1) E9 3' 2) nos 3) nos	PV-STMT21
2	Monsanto 公司 NEW LEAF® PLUS RBMT 21-350	1) 抗马铃薯卷叶病 2) 抗马铃薯甲虫	1) FMV 35S 2) rabSSU1A 3) P-nos	1) PLRVrep 2) cry 3Aa, 3) NPTII	1) nos 2) nos 3) nos	PV STMT21
3	Monsanto 公司 NEW LEAF® PLUS RBMT 22-82	1) 抗马铃薯卷叶病 2) 抗马铃薯甲虫	1) FMV 35S 2) ArabSSU1A 3) FMV 35S	1) PLRVrep 2) cry 3Aa, 3) CP4 EPSPS 4) ori-322	1) E9 3' 2) nos 3) E9 3'	PV-STMT22
4	Monsanto 公司 NEW LEAF® Y RBMT 15-101	1) 抗马铃薯 Y 病毒 2) 抗马铃薯甲虫	1) FMV 35S 2) ArabSSU1A 3) P-nos	1) PVYcp 2) cry 3Aa, 3) NPTII	1) E9 3' 2) nos 3) nos	PV-STMT15
5	Monsanto 公司 NEW LEAF® Y SEMT 15-02	1) 抗马铃薯 Y 病毒 2) 抗马铃薯甲虫	1) FMV 35S 2) ArabSSU1A 3) P-nos	1) PVYcp 2) cry 3Aa, 3) NPTII 4) add 5) oriV 6) ori322	1) E9 3' 2) nos 3) nos	PV-STMT15
6	Monsanto 公司 NEW LEAF® Y SEMT 15-15	1) 抗马铃薯 Y 病毒 2) 抗马铃薯甲虫	1) FMV 35S 2) ArabSSU1A 3) P-nos	1) PVYcp 2) cry 3Aa, 3) NPTII 4) aad 5) oriV 6) ori322	1) E9 3' 2) nos 3) nos	PV-STMT15
7	Monsanto 公司 NEW LEAF® BT-06	1) 抗马铃薯甲虫	1) ArabSSU1A 2) CaMV 35S	1) cry 3Aa, 2) NPTII	1) E9 3' 2) nos	PV-STBT02

表 A.1 (续)

序号	公司名称及株系	改良性状	启动子	结构基因	终止子	质粒
8	Monsanto 公司 NEW LEAF® ATBT 04-06	1) 抗马铃薯甲虫	1) CaMV 35S 2) CaMV 35S	1) cry 3Aa, 2) NPTII	1) E9 3' 2) nos	PV-STBT04
9	Monsanto 公司 NEW LEAF® ATBT 04-31	1) 抗马铃薯甲虫	1) ArabSSU1A 2) CaMV 35S	1) cry 3Aa, 2) NPTII	1) E9 3' 2) nos	PV-STBT04
10	Monsanto 公司 NEW LEAF® ATBT 04-36	1) 抗马铃薯甲虫	1) ArabSSU1A 2) CaMV 35S	1) cry 3Aa, 2) NPTII 3) aad 4) oriV 5) ori322	1) E9 3' 2) nos	PV-STBT04
11	Monsanto 公司 NEW LEAF® SPBT 02-05	1) 抗马铃薯甲虫	1) CaMV 35S 2) CaMV 35S	1) cry 3Aa, 2) NPTII 3) oriV 4) ori322	1) E9 3' 2) nos	PV-STBT02