

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1204—2003



植物及其加工产品中转基因成分 实时荧光 PCR 定性检验方法

Protocol of the real-time PCR for detecting genetically
modified plants and their derived products

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

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准由中华人民共和国质量监督检验检疫总局动植物检疫实验所、中华人民共和国广东出入境检验检疫局、中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、中华人民共和国上海出入境检验检疫局负责起草。

本标准主要起草人：朱水芳、覃文、曹际娟、章桂明、潘良文、黄文胜、陈红运。

本标准系首次发布的检验检疫行业标准。

植物及其加工产品中转基因成分 实时荧光 PCR 定性检验方法

1 范围

本标准规定了植物及其加工产品中转基因成分的实时荧光 PCR 定性检验方法。

本标准适用于玉米、大豆、油菜籽、马铃薯、番茄、棉花、烟草及其加工产品中转基因成分实时荧光 PCR 定性检验或者其他检验方法检测结果为阳性的确证实验。

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 植物及其产品中转基因成分检测抽样和制样方法

3 缩略语

下列缩略语适用于本标准。

- 3.1 AmpErase UNG 酶:uracil N-glycosylase。
- 3.2 C_t 值:C:cycle,t:threshold,每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数。
- 3.3 IPC:internal positive control,内参照。
- 3.4 NTC:no template control,空白对照。
- 3.5 PCR:polymerase chain reaction,简称 PCR。
- 3.6 DNA:deoxyribonucleic acid,脱氧核糖核酸。
- 3.7 dNTP:deoxyribonucleoside triphosphate,脱氧核苷三磷酸。
- 3.8 dATP:deoxyadenosine triphosphate,脱氧腺苷三磷酸。
- 3.9 dCTP:deoxycytidine triphosphate,脱氧胞苷三磷酸。
- 3.10 dGTP:deoxyguanosine triphosphate,脱氧鸟苷三磷酸。
- 3.11 dUTP:deoxyuridine triphosphate,脱氧尿苷三磷酸。
- 3.12 bp:base pair,碱基对。
- 3.13 *Taq* 酶:DNA 聚合酶。
- 3.14 Tris:tris(hydroxymethyl) aminomethane,三(羟甲基)氨基甲烷。
- 3.15 TE:Tris-Cl、EDTA 缓冲液。
- 3.16 Lectin:植物凝集素。
- 3.17 ZEIN:植物醇溶蛋白。
- 3.18 PE3-PEPcase:phosphoenilpyruvate-carboxylase,磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶。
- 3.19 tRNA^{Leu}:植物叶绿体基因。

- 3.20 18s rRNA:真核生物 18 s 核糖体 RNA 基因。
- 3.21 CaMV 35S:35S promoter from cauliflower mosaic virus,来自于花椰菜花叶病毒的 35S 启动子。
- 3.22 NOS:terminator of nopaline synthase gene,胭脂碱合成酶基因终止子。
- 3.23 FMV35S:35S promoter from a modified figwort mosaic virus(caulimovirus group),玄参花叶病毒 35S 启动子。
- 3.24 NPTII:neomycin-3'-phosphotransferase gene,新霉素-3'-磷酸转移酶基因。
- 3.25 BAR:phosphinothricin acetyltransferase gene from *Bacillus amyloliquefaciens*,来源于杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* 草丁膦乙酰转移酶基因。
- 3.26 PAT:phosphinothricin acetyltransferase gene,草丁膦乙酰转移酶基因。
- 3.27 GOX:glyphosate oxidoreductase gene,草甘膦氧化还原酶基因。
- 3.28 CryIA(b):a synthetic gene encodes the first 648 amino acids, insecticidal-active truncated product identical to that of *cryIA(b)* gene of *Bacillus thuringiensis* subsp,苏云金芽孢杆菌杀虫毒蛋白 *cryIA(b)* 基因。
- 3.29 Cry3A:*B. thuringiensis* subsp, *Tenebrionis*(*B. t. t.*) strain BI 256-82 抗虫毒蛋白,选择性毒杀科罗拉多马铃薯甲虫(Colorado potato beetle larvae)。
- 3.30 EPSPS:5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene,5-莽草酸-3-磷酸合成酶基因。

4 防污染措施

植物及其加工产品中转基因成分实时荧光 PCR 定性检验过程的防污染措施应符合 SN/T 1193 的规定。

5 抽样与制样

植物及其加工产品中转基因成分实时荧光 PCR 定性检验按照 SN/T 1194 规定的方法执行。

6 实验方法

6.1 原理

实时荧光定量 PCR 技术,是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。

PCR 扩增时在加入一对引物的同时加入一个特异性的荧光探针,该探针为一寡核苷酸,两端分别标记一个报告荧光基团和一个淬灭荧光基团。探针完整时,报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收;PCR 扩增时,*Taq* 酶的 5'端-3'端外切酶活性将探针酶切降解,使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离,从而荧光监测系统可接收到荧光信号,即每扩增一条 DNA 链,就有一个荧光分子形成,实现了荧光信号的累积与 PCR 产物形成完全同步。

6.2 主要仪器

- 6.2.1 实时荧光定量 PCR 仪。
- 6.2.2 超净工作台。
- 6.2.3 消毒灭菌锅。
- 6.2.4 制冰机。
- 6.2.5 核酸蛋白分析仪。
- 6.2.6 高速冷冻离心机,台式小型离心机,Mini 个人离心机。
- 6.2.7 低温冰箱,冷藏冷冻冰箱。
- 6.2.8 纯水器,双蒸水器。
- 6.2.9 旋涡震荡器。

6.2.10 微量进样器:0.5 μL、2 μL、10 μL、20 μL、100 μL、200 μL、1 000 μL。

6.2.11 光化学 PCR 反应管。

6.3 主要试剂

除另有规定外,所有试剂均采用分析纯或生化试剂。

6.3.1 实验用水:应符合 GB/T 6682 中一级水的规格。

6.3.2 PCR 缓冲液。

6.3.3 氯化镁(MgCl₂)。

6.3.4 dNTPs(dATP、dUTP、dCTP、dGTP)。

6.3.5 UNG 酶(Uracil N-glycosylase)。

6.3.6 *Taq* 酶。

6.3.7 引物和探针

植物及其加工产品中转基因成分实时荧光 PCR 检测所用引物和探针序列见表 1。

表 1 实时荧光 PCR 实验所用引物和探针序列

检测基因	引物序列	探针序列	适用范围
ZEIN	5'-tgaacccatgcatgcagt-3'	5'-tggcgtgctcgcctccatgatc-3'	玉米及其加工产品 (内源基因)
	5'-ggaagaccattggtga-3'		
Lectin	5'-cctcctcgggaaagttaaa-3'	5'-ccctcgtctcttggctcgcctct-3'	大豆及其加工产品 (内源基因)
	5'-gggcatagaaggtgaagt-3'		
PE3-PEPcase	5'-tcagttcttgagcgcctga-3'	5'-caggctcctatgcactcggagaca-3'	油菜籽及其加工产品 (内源基因)
	5'-aaggccagtcctcaatgcaga-3'		
tRNA ^{Leu}	5'-cgaaatcggtagacgctacg-3'	5'-gcaatctgagccaaatcc-3'	植物 (内参照基因)
	5'-ttcattgagtctctgcacct-3'		
18 s rRNA	5'-ccctgagaacgctaccat-3'	5'-tgcgcctgctgccttct-3'	真核生物 (内参照基因)
	5'-cgtgtcaggattgggtaat-3'		
CaMV35S	5'-cgacagtggcccaaga-3'	5'-tggaccaccaccagaggagcatc-3'	转基因大豆、玉米、油菜籽、 番茄、马铃薯及其加工产品
	5'-aagacgtggttgaacgtcttc-3'		
NOS	5'-atcgttcaaacattggca-3'	5'-catcgaagaccggcaacagg-3'	转基因大豆、玉米、油菜籽、 番茄、马铃薯及其加工产品
	5'-attgcccgaactctaatcata-3'		
FMV35S	5'-aagacatccaccgaagactta-3'	5'-tggccccacaagccagctgctga-3'	转基因油菜籽、马铃薯、番 茄和棉花(籽)及其加工 产品
	5'-aggacagctctttccacgtt-3'		
NPTII	5'-aggatctcgtcgtgacccat-3'	5'-caccagccggccacagtcgat-3'	转基因油菜籽、番茄、马铃 薯及其加工产品
	5'-gcacgaggaagcggta-3'		
Bar	5'-acaagcaggtcaacttc-3'	5'-ccgagcccgaggaaccgcaggag-3'	转基因油菜籽、玉米及其加 工产品
	5'-actcggccgtccagtcgta-3'		
PAT	5'-gtcagatgtctccggagag-3'	5'-tggcccggtttgtgatctgtaaa-3'	转基因大豆、玉米、油菜籽 及其加工产品
	5'-gcaaccaaccaagggtatc-3'		
GOX	5'-gtctctgtgttctggaaccgtt-3'	5'-tgctcagttctctacactcgcgctcg-3'	转基因油菜籽、玉米及其加 工产品
	5'-gaactggcaggagcagagct-3'		

表 1(续)

检测基因	引物序列	探针序列	适用范围
Cry3A	5'-tccggttacgaggttctt-3'	5'-acctatgctcaagctccaacaccc-3'	转基因马铃薯及其加工产品
	5'-ccatagatttgagcgtcetta-3'		
CryIA(b)	5'-cgcgactggatcaggtaca-3'	5'-ccgccgcgagctgaccctgaccgtg-3'	转基因玉米及其加工产品
	5'-tggggaacaggctcagat-3'		
EPSPS	5'-ccgacgccgatcaccta-3'	5'-ccgcgtgccgatggcctccgca-3'	转基因大豆及其加工产品
	5'-gatgccggcggtgttgag-3'		

6.4 实验步骤

6.4.1 阴性对照、阳性对照和空白对照的设置

6.4.1.1 阴性对照

以待测非转基因植物(如大豆、玉米、油菜籽、马铃薯、番茄、烟草)及其加工产品 DNA 为模板。

6.4.1.2 阳性对照

采用含有待测基因序列的植物及其加工产品 DNA 作为 PCR 反应的模板,或采用含有待测基因序列的质粒。

6.4.1.3 空白对照

设两个,一是提取 DNA 时设置的提取空白对照(以水代替样品),二是 PCR 反应的空白对照(以水代替 DNA 模板)。

6.4.2 实时荧光 PCR 反应体系

实时荧光 PCR 反应体系见表 2,每个样品各做二个平行管。加样时应使样品 DNA 溶液完全落入反应液中,不要粘附于管壁上,加样后应尽快盖紧管盖。

表 2 实时荧光 PCR 反应体系

试剂名称	终浓度
10×PCR 反应缓冲液	1×
氯化镁(MgCl ₂)	2.5 mmol/L
dNTPs(含 dUTP)	0.2 mmol/L
UNG 酶	0.075 U
引物(上游)	0.2 μmol/L
引物(下游)	0.2 μmol/L
探针	0.1 μmol/L
Taq 酶	2.5 U
DNA 模板(20 ng~30 ng/μL)	5 μL
补水至	50 μL

注:表中 DNA 模板为原料的模板量,加工产品可视加工程度适当增加模板量。

6.4.3 实时荧光 PCR 反应参数

实时荧光定量 PCR 的反应参数为:37℃,5 min;预变性 95℃,3 min;95℃,15s,60℃,1 min,40 个循环。

注:不同仪器可根据仪器要求将反应参数作适当调整。

6.4.4 仪器检测通道的选择

PCR 反应管荧光信号收集的设置,应与探针所标记的报告基团一致。报告基团为 FAM 时,荧光信号收集应设在 FAM 通道;报告基团为 TET 时,荧光信号收集应设在 TET 通道;余类推。具体设置方法因仪器而异,可参照仪器使用说明书。

6.4.5 实时荧光 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。

6.5 结果分析

6.5.1 基线的设置

实时荧光 PCR 反应结束并分析结果后,应设置无效基线范围。无论采用任何荧光通道(FAM 或 TET),基线范围选择在 3 个~15 个循环,如果有强阳性样本,应根据实际情况调整基线范围。阈值设置原则以基线刚好超过正常阴性对照扩增曲线的最高点,且 C_t 值=40 为准。

6.5.2 C_t 值与 DNA 浓度的关系

C_t 值大于或等于 40 时,PCR 过程中无目标 DNA 的扩增; C_t 值在 36~40 之间,且平行样的每个值之间的差异很大,表明 PCR 反应体系中的目标 DNA 量很少,应适当增加模板量。

7 实时荧光 PCR 定性检验的质量控制

空白对照:外源基因检测 C_t 值大于或等于 40,内参照基因检测 C_t 值大于或等于 40;
 阴性对照:外源基因检测 C_t 值大于或等于 40,内参照基因检测 C_t 值在 20~30 之间;
 阳性对照:外源基因检测 C_t 值小于或等于 34。
 上述指标有一项不符合者,应重做实时荧光 PCR 扩增。

8 结果判断与表述

8.1 结果判断

待测样品外源基因检测 C_t 值大于或等于 40,内参照基因检测 C_t 值在 20~30 之间者,阴性对照、阳性对照和空白对照结果正常者,则可判定该样品未检出×××基因。

待测样品外源基因检测 C_t 值小于或等于 36,内参照基因检测 C_t 值在 20~30 之间者,阴性对照、阳性对照和空白对照结果正常者,则可判定该样品检出×××基因。

待测样品外源基因检测 C_t 值在 36~40 之间,应重做实时荧光 PCR 扩增。再次扩增后的结果 C_t 值仍小于 40,且阴性对照、阳性对照和空白对照结果正常,则可判定该样品检出×××基因;再次扩增后结果 C_t 值大于 40,且阴性对照、阳性对照和空白对照结果正常,可判定该样品未检出×××基因。

8.2 结果表述

检出×××基因;
 未检出×××基因。