

# SN

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1816—2006

### 番茄中转基因成分定性 PCR 检测方法

Method of polymerase chain reaction for detecting genetically modified components in tomato



2006-08-28 发布

2007-03-01 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：中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国新疆出入境检验检疫局、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：陈颖、张祥林、徐宝梁、高宏伟、王振国、王晶、吴亚君、黄文胜。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

## 番茄中转基因成分定性 PCR 检测方法

### 1 范围

本标准规定了番茄中转基因成分检验的 PCR 检测方法。

本标准适用于商品化种植的转基因番茄 1345-4、351N、5345、8338、ZenecaB, Da, 282F、FLAVR SAVR、BioScien 等品系的番茄果实、种子、植株、酱制品等转基因成分定性检测。

### 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。凡是注明日期的引用文件,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。

SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

SN/T 1204 植物及其加工产品中转基因成分实时荧光 PCR 定性检测方法

### 3 术语、定义和缩略语

下列术语、定义和缩略语适用于本标准。

#### 3.1 术语和定义

##### 3.1.1

**转基因 transgene**

将本物种不具有的、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,以便使该物种获得新的品种特征。

##### 3.1.2

**聚合酶链反应 polymerase chain reaction, PCR**

模板基因序列先经过高温变性成为单链,在 DNA 聚合酶作用和适宜的反应条件下,根据模板序列设计的两条引物分别于模板 DNA 两条链上的一段互补序列发生退火而相互结合,接着在 DNA 聚合酶的催化下以四种脱氧核糖核苷酸(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呈几何倍数扩增。

#### 3.2 缩略语

##### 3.2.1

**CaMV 35S 35S promoter from Cauliflower mosaic virus**

花椰菜花叶病毒 35S 启动子。

##### 3.2.2

**FAM35S/HSP70 35S promoter from a modified figwort mosaic virus/0.8 kb intron from hsp70 gene(heat-shock protein)**

玄参花叶病毒启动子/热休克蛋白基因的 0.8 kb 内含子序列。

##### 3.2.3

**CMV Cucumber mosaic virus**

黄瓜花叶病毒。

3.2.4

**Ocs octopine synthase gene**

章鱼碱合成酶基因。

3.2.5

**Nos terminator of nospaline synthase gene**

胭脂碱合成酶基因。

3.2.6

**mas mannopine synthase gene**

甘露碱合成酶基因。

3.2.7

**NPTII neomycin-3'-phosphotransferase gene**

新霉素-3'-磷酸转移酶基因。

3.2.8

**PG antisense polygalacturonase gene**

多聚半乳糖醛酸酶基因。

3.2.9

**ACCD(EFE) 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase**

1-氨基-环丙烷-1-羧酸脱氨酶。

3.2.10

**ACCS 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthetase**

1-氨基-环丙烷-1-羧酸合成酶。

3.2.11

**CryIAc a synthetic gene encodes insecticidal-active truncated product identical to that of cryIA(c) gene of *Bacillus thuringiensis* subsp, *Kurstaki* strain HD-73**

苏云金芽孢杆菌杀虫毒蛋白。

3.2.12

**Sam-K S-adenosylmethionine hydrolase**

S-腺苷甲硫胺酸水解酶。

3.2.13

**rbcS ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit gene**

植物叶绿体核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶小亚基基因。

3.2.14

**rbcL ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit gene**

植物叶绿体核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶大亚基基因。

3.2.15

**aad aminoglycoside adenylyltransferase**

氨基糖苷腺嘌呤转移酶。

3.2.16

**Tml**

来自农杆菌的未命名蛋白。

#### 4 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 片段,根据 PCR 扩增结果,判断该样品中是否含有该转基因成分。

检测先对提取的 DNA 进行内对照的扩增,扩出相应的内对照条带后可以筛选基因的检测,如果筛选基因为阳性,再进行鉴定基因的检测。如果筛选基因为阴性则直接报告结果。

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 试剂

### 5.1 PCR 用引物

按照表 1 中提供的引物序列合成引物,加入无离子水配成 100 pmol/ $\mu$ L 贮存,配成直接用于 PCR 反应的 20 pmol/ $\mu$ L 的工作液。

表 1 检测转基因番茄内,外源基因所需的引物序列

被检测基因	基因来源	引物序列	扩增长度/ bp	退火温度/ $^{\circ}$ C	备注
<i>rbcL</i>	叶绿体 DNA	5' cttgattttaccaagatgatga 3' 5' ttcttcgcatgtaccgcgag 3'	159	54	DNA 提取效率检测
PG	内源	5' ggatccttagaagcatctagt 3' 5' cgttggtgcatcctgcatgg 3'	383 <sup>a</sup>	60	DNA 提取效率检测
CaMV35S	外源	5'-tcatccottacgtcagtggag-3' 5'-ccatcattgcgataaaggaaa-3'	165	54	筛选检测 (品系 351N 除外) 选择其一
		5' gctectacaaatgccatca 3' 5' gatagtgggattgtgcgtea 3'	195	54	
Nos	外源	5' gaatcctgttccgggtttg 3' 5' ttatectagtttgcgcgcta 3'	180	54	筛选检测 (品系 351N、8338 和 FLAVR SAVR 除外) 选择其一
		5' gccggtcttgcgatgattat 3' 5' ttatectagtttgcgcgcta 3'	170	60	
NPTII	外源	5'-ggatcctctgctatct-3' 5'-gatcctcctgatcgac-3'	173	58	筛选检测 选择其一
		5' etcacctgtctctcggaga 3' 5' cgcttgagcctggcggacag 3'	215	54	
CaMV35S/PG	外源	5' ccaactgacgtaaggatgacg 3' 5' aggggaaagtggaaaaccatc 3'	383 和 180 <sup>a</sup>	54	检测 FLAVR SAVR <sup>TM</sup> tomato
PG/NOS	外源	5' ggatccttagaagcatctagt 3' 5' catcgcaagaccggcaacag 3'	350	54	检测 Zeneca Tomato nema282F
CryIAc	外源	5' gttccagctacagctacctcc 3' 5' ccaactaaagtttctaaccaccac 3'	119	60	Tomato5345
ACCD (EFE)	外源	5' aaacagacaaaaataggcgg 3' 5' ccaaacgtaaaacggcttg 3'	108	60	华番一号,8338

<sup>a</sup> 转基因番茄可同时扩增出 383 bp 和 180 bp 两个不同大小的 DNA 片段,非转基因番茄只能扩增出 383 bp 的 DNA 片段。

## 5.2 药品及试剂

5.2.1 *Taq* DNA 聚合酶,琼脂糖(电泳纯)溴化乙锭,三氯甲烷,异丙醇,异戊醇 70%乙醇,分子量标准(100 bp~2 000 bp),RNaseA 酶,Tris 饱和酚。

5.2.2 TE 缓冲液:10 mmol/L Tris-HCl(pH8.0),1 mmol/L EDTA(pH8.0)。

5.2.3 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( $\text{MgSO}_4$ ),200 mmol/L Tris-HCl(pH8.8),1% TritonX-100,1 mg/mL BSA。

5.2.4 电泳缓冲液:Tris 54 g,硼酸 27.5 g,0.5 mol/L EDTA,Tris-HCl(pH8.0)20 mL,加蒸馏水至 1 000 mL;使用时 10 倍稀释。

5.2.5 溴化乙锭贮存液:用双蒸水配制成 10 mg/mL。

5.2.6 dNTPs:dATP、dTTP、dCTP、dGTP。

5.2.7 CTAB 裂解液:2% CTAB(质量浓度),1.4 mol/L 氯化钠(NaCl),40 mmol/L 巯基乙醇,20 mmol/L EDTA,100 mmol/L Tris-Cl(pH 8.0)。

5.2.8 1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH8.0):称取 121.1 g Tris,溶于 800 mL 水中,加入浓盐酸 42 mL,冷却至室温,用稀盐酸准确调节 pH 值至 8.0,加水定容至 1 L,分装后高压灭菌备用。

5.2.9 0.5 mol/L EDTA(pH8.0):在 800 mL 水中加入 186.1 g(EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ),用磁力搅拌器剧烈搅拌,用氢氧化钠调节溶液 pH 值至 8.0(约需 20 g 氢氧化钠颗粒),然后加水定容至 1 L,分装后高压灭菌备用。

5.2.10 3 mol/L 乙酸钠(NaAc)溶液:408 g 乙酸钠( $\text{NaAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )溶解加水至 1 000 mL,用冰乙酸调 pH 值至 4.8。

## 6 仪器

固体粉碎机或研钵,高速冷冻离心机,台式小型离心机,Mini 个人离心机,天平(感量 0.001 g),旋涡振荡器,PCR 仪,电泳仪,超净工作台,核酸蛋白分析仪,微量移液器,凝胶成像系统,离心管(Eppendorf 管,1.5 mL~5 mL),PCR 反应管(200  $\mu\text{L}$ ~500  $\mu\text{L}$ )。

## 7 检测方法

### 7.1 样品 DNA 的提取与纯化

称取充分混匀的待测样品 100 mg,加入至 1.5 mL 的 Eppendorf 离心管中,加入 65℃ 预热的 600  $\mu\text{L}$  CTAB 裂解液,振荡混匀,置于 65℃ 水浴中处理 30 min,期间每隔 10 min 混匀 1 次;取出冷却至室温后,加入等体积的三氯甲烷/异戊醇(24:1),充分混匀,室温,15 000 g 离心 15 min;小心吸取上清液(约 600  $\mu\text{L}$ )至一新的 1.5 mL 离心管,加入 2.5 倍体积的预冷的无水乙醇或 0.8 倍体积的异丙醇,再加入 1/10 体积的 3 mol/L 乙酸钠(pH4.8),充分混匀,-20℃(加入无水乙醇时)或 4℃(加入异丙醇时)放置 30 min 以上;4℃,15 000 g 离心 15 min,弃去上清液;加入 70%的乙醇 500  $\mu\text{L}$ ,洗涤沉淀两次,室温,15 000 g 离心 5 min 弃上清(注意不要把沉淀倒出),晾干沉淀,至乙醇挥发殆尽后,加入 50  $\mu\text{L}$  的去离子水或 TE 缓冲液溶解沉淀,-20℃ 保存待用。

也可用相应市售 DNA 提取试剂盒提取 DNA。

### 7.2 PCR 扩增

#### 7.2.1 实验对照的设立

每个样品应有 2 个平行实验,同时每次检测必须设立 3 个对照:

——分子量标准;

——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,非转基因番茄基因组 DNA;

——空白对照(不含 DNA 模板)。

### 7.2.2 PCR 反应体系

检测转基因番茄内、外源基因的 PCR 反应体系(见表 2)。

表 2 检测转基因番茄内、外源基因的 PCR 反应体系

试剂名称	储备液浓度	25 $\mu\text{L}$ 反应体系 加样体积/ $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$ 反应体系 加样体积/ $\mu\text{L}$
10 $\times$ PCR 缓冲液	—	2.5	5.0
MgCl <sub>2</sub>	25 mmol/L	2.5	5.0
dNTP(含 dUTP)	2.5 mmol/L	2.0	4.0
Taq 酶	5 U/ $\mu\text{L}$	0.2	0.4
UNG 酶	1 U/ $\mu\text{L}$	0.2	0.4
引物	20 pmol/ $\mu\text{L}$	0.5	1.0
		0.5	1.0
DNA 模板	50~100 ng/ $\mu\text{L}$	1~2	2.0
双蒸水	—	补至 25 $\mu\text{L}$	补至 50 $\mu\text{L}$

### 7.2.3 PCR 反应程序

不同外源基因的具体扩增程序见表 3。PCR 循环参数可根据基因扩增仪扩增型号的不同进行适当调整。

表 3 检测转基因番茄内、外源基因的 PCR 反应循环参数

被检测基因	预变性	扩 增	循环次数	终延伸
<i>rbcL</i>	94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min	94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s	30	72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min
PG	94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min	94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s	30	72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min
CaMV35S	94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min	94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s	30	72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min
NOS	94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min	94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s	30	72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min
NPTII	94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min	94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s	30	72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min
CryIAc	94 $^{\circ}\text{C}$ 10 min	94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s	40	72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min
CaMV35S/PG	94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min	94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s	30	72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min
PG/NOS	94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min	94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s	30	72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min
ACCD(EFE)	95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min	94 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s	40	72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min

### 7.3 PCR 扩增产物的凝胶电泳检测

称取 2.0 g 琼脂糖,于 100 mL 电泳缓冲液(0.5 $\times$ TBE)中,用微波炉加热溶解琼脂糖,冷却至 55 $^{\circ}\text{C}$ ~

60℃左右加入溴化乙锭(EB)至终浓度为0.5 μg/mL,制胶。在电泳槽中加入电泳缓冲液(0.5×TBE),使液面刚刚没过凝胶。将8 μL~10 μL PCR扩增产物和2 μL加样缓冲液混合,点样。每行胶孔中选一个胶孔,在其中加入DNA分子量标记以判断PCR扩增产物大小。电压大小一般控制在3 V/cm~5 V/cm,电泳时间约35 min或者根据溴酚蓝的移动位置来确定,电泳结果用凝胶成像仪记录并保存。

## 8 结果判断

### 8.1 判断提取的DNA质量

使用内参照引物 *rbcl* 基因或 PG 基因片段设计的引物对番茄样品 DNA 提取液进行 PCR 扩增,阴性对照、阳性对照和待测样品均应被扩增出 159 bp 或 383 bp 的 PCR 产物;否则不能用于检测外源基因,应该重新提取样品 DNA。

### 8.2 筛选基因的判定

对番茄样品 DNA 提取液进行外源基因的 PCR 检测,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 1),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做出最终判断;如果待测样品中未出现相应 PCR 扩增条带,则可判定待测样品中不含有该外源基因。

### 8.3 筛选检测和鉴定检测的选择

对番茄样品中转基因成分的检测,可参考附录 A 的内容。

首先筛选检测所有转基因番茄中都存在的 NPTII 基因,检测结果阴性,则直接报告检测结果;检测结果阳性,则检测 CaMV35S 启动子基因,若未检出 CaMV35S 启动子基因,则可确定样品为品系 351N,若检出 CaMV35S 启动子基因,则进一步检测其他外源目的基因,以确定为何种转基因番茄。

## 9 确证实验

确证实验方法按照 SN/T 1204 中规定的方法执行。

附录 A  
(资料性附录)

## 商品化的转基因番茄转入的外源基因的主要信息

表 A.1

品系名称	目的基因及其调控元件			筛选基因及其调控元件			备注
	启动子	目的基因	终止子	启动子	筛选基因	终止子	
1345-4	CaMV 35S	氨基环丙烷羧酸合成酶 (ACCS)	Nos	Nos	NPTII	Ocs	DNA plant technology corporation, 美国 1994 年批准用于食品和饲料, 1995 年用于种植。加拿大 1995 年批准用于饲料。
351N	未知	S-腺苷甲硫胺酸水解酶 (Sam-K)	未知	Nos	NPTII	Ocs	Agrirope Inc. 美国 1996 年批准用于食品、饲料和种植。
5345	CaMV 35S	Bt 毒素蛋白基因 CryIAc 和氨基糖苷腺嘌呤转移酶 aad (aad 基因在植物中不表达, 仅用于重组质粒的筛选)	大豆球蛋白终止子	CaMV 35S	NPTII	Nos	1987 Monsanto 公司, 美国 1998 年用于食品、饲料和种植。加拿大 2000 年用于饲料。
8338	FMV35S/HSP70	氨基环丙烷羧酸脱羧酶 (ACCD) 或乙烯形成酶 (EFE)	rbcS 终止子	CaMV 35S	NPTII	Ocs	Monsanto 公司, 美国 1994 年批准用于食品和饲料, 1995 年用于种植。
B, Da, F	CaMV 35S	反义多聚半乳糖醛酸酶 (PG) 基因	Nos	CaMV 35S	NPTII	Ocs	Zeneca Seeds, 美国 1994 年批准用于食品和饲料, 1995 年用于种植, 加拿大 1996 年用于饲料。
FLAVR SAVR	CaMV 35S	反义多聚半乳糖醛酸酶 (PG) 基因	Tml	mas 启动子 (甘露碱合成酶)	NPTII	mas 终止子 (甘露碱合成酶)	1994 美国加利福尼亚基因公司育成 Flavr Savr, 成为转基因植株商品化的首例。美国 1994 年批准用于食品和饲料, 加拿大和墨西哥于 1995、日本于 1997 年用于饲料。

表 A.1 (续)

品系名称	目的基因及其调控元件			筛选基因及其调控元件			备 注
	启动子	目的基因	终止子	启动子	筛选基因	终止子	
BioScien (华 番 1 号, 商 品 名: 百 日 鲜)	CaMV 35S	氨基环丙烷羧酸氧化酶(ACCD)或乙烯形成酶(EFE)	Nos	CaMV 35S	NPTII	Nos	1995 年通过中国农业 部专家鉴定, 1996 年 获农业部农业生物基 因工程安全委员会 批准。
8805R	CaMV 35S	黄瓜花叶病毒(Cu- cumber mosaic vi- rus, CMV)外壳蛋白	Nos	CaMV 35S	NPTII	Nos	—