



中华人民共和国国家标准

GB/T 38132—2019

转基因植物品系定量检测数字 PCR 法

Quantitative determination of genetically modified plants by digital PCR method

2019-10-18 发布

2019-10-18 实施

国家市场监督管理总局
中国国家标准化管理委员会 发布

订单号: 0100200628063435 防伪编号: 2020-0628-0608-2403-9612 购买单位: 北京中培质联

北京中培质联 专用

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由全国生化检测标准化技术委员会(SAC/TC 387)提出并归口。

本标准起草单位:上海市计量测试技术研究院、苏州百源基因技术有限公司、中国检验检疫科学研究院、中国农业科学院生物技术研究所、中国测试技术研究院生物研究所、甘肃国研检验检测有限公司、四川出入境检验检疫局检验检疫技术中心、中国科学院上海高等研究院。

本标准主要起草人:梁文、付伟、李亮、刘刚、李妍、车团结、周李华、林华、杨镇州、朱鹏宇、马丽侠、樊春海、王丽华、张莹。

北京中培质联 专用

订单号: 0100200628063435 防伪编号: 2020-0628-0608-2403-9612 购买单位: 北京中培质联

北京中培质联 专用

转基因植物品系定量检测数字 PCR 法

1 范围

本标准规定了转基因植物品系的数字 PCR 定量检测方法。

本标准适用于种子及物理加工种子样品中转基因玉米 MON810 品系、MON89034 品系、MIR162 品系,转基因大豆 GTS-40-3-2 品系,转基因水稻克螟稻品系,转基因棉花 GHB119 品系,转基因油菜 RT73 品系的数字 PCR 法定量检测。

本方法的定量检测限为 0.1%(质量分数)。

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
- 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
- SN/T 4853(所有部分) 转基因大米定量检测 数字 PCR 法

3 术语和定义、缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

品系特异序列 event specific sequence

外源 DNA 片段插入受体作物基因组后重组产生的邻接区序列。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

- Adh-1:玉米乙醇脱氢酶基因(Alcohol dehydrogenase 1)
- Adhc:乙醇脱氢酶 C 基因(Alcohol dehydrogenase C gene)
- PCR:聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction)
- PEP:磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因(Phosphoenolpyruvate carboxylase gene)
- PLD:磷脂酰胆碱磷脂水解酶基因(Phospholipase D gene)

4 原理

数字 PCR 其技术原理是通过将原始 PCR 反应体系进行分割,进而对所有小的反应体系进行扩增并后续检测。通过对反应体系进行有限的分割,从而使整个反应体系可以更加耐受核酸抑制因子,并且更加稳定、准确、快速地对痕量的转基因成分进行精准鉴定。

目前数字 PCR 包括芯片式数字 PCR 和微滴式数字 PCR 两种。芯片式数字 PCR 通过微流控芯片实现对原始反应体系的分割,这种分割方式具有稳定性好、均一性好的优点,但试验成本相对较高;微滴式数字 PCR 通过产生微小油包水体系实现反应体系的分割,这种分割方式反应速度快,分割成本更低。

为了实现转基因植物品系数字 PCR 定量检测,本标准通过数字 PCR 扩增反应直接得出转基因植物外源基因(品系特异序列)和植物内源基因的拷贝数含量。样品 DNA 中的外源基因和内源基因的拷贝数的比值(百分数)即为样品中相应的转基因植物品系的相对百分含量。

5 试剂和材料

除另有说明,本方法使用的试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 植物基因组 DNA 提取试剂盒:推荐针对不同的样品选取不同的基因组提取试剂盒。

5.2 数字 PCR 预混液:含有镁离子、dNTPs 和具有 5'-3'外切活性的热启动 *Taq* DNA 聚合酶的数字 PCR 专用预混试剂,推荐按照不同的数字 PCR 仪说明书选择。

5.3 引物及探针:检测不同植物品系的引物探针序列具体信息见表 1。扩增序列的信息参见附录 A。

表 1 转基因植物外源基因及内源基因的引物和探针序列

靶标	类别	名称	序列
玉米 MON810 品系 特异序列	外源	上游引物	GATGCCTTCTCCCTAGTGTTGA
		下游引物	GGATGCACTCGTTGATGTTTG
		探针	FAM-AGATACCAAGCGGCCATGGACAACAA-BHQ1
玉米 MON89034 品系特异序列	外源	上游引物	TTCTCCATATTGACCATCATACTCATT
		下游引物	CGGTATCTATAATACCGTGGTTTTTAAA
		探针	FAM-ATCCCCGGAAATTATGTT-MGB
玉米 MIR162 品系 特异序列	外源	上游引物	CACCTTCAGCAACCCGAACATA
		下游引物	GCTTAGCCTCCACGATCATCTT
		探针	FAM-GTCCTCGTCGCTGCCCTTACCT-BHQ1
玉米基因 Adh-1	内源	上游引物	CGTCGTTTCCCATCTCTTCTCCTCC
		下游引物	CCACTCCGAGACCCTCAGTC
		探针	VIC-AATCAGGGCTCATTCTCTCGCTCCTCA-BHQ1
大豆 GTS-40-3-2 品系特异序列	外源	上游引物	TAGCATCTACATATAGCTTC
		下游引物	GACCAGGCCATTCGCCTCA
		探针	FAM-ACAAAACATTTGGGATCGGAGAAGA-BHQ1
大豆基因 Lectin-1	内源	上游引物	GCCCTCTACTCCACCCCA
		下游引物	GCCATCTGCAAGCCTTTTT
		探针	VIC-AGCTTCGCCGCTTCTTCAACTTCAC-BHQ1
水稻克螟稻品系 特异序列	外源	上游引物	TCCGCAATGTGTATTAAGTTGTCTAA
		下游引物	CCGATATGCCTGCCATCT
		探针	FAM-CGTCAATTTGTTTACACCACAATATATCCCG-BHQ1

表 1 (续)

靶标	类别	名称	序列
水稻基因 PLD	内源	上游引物	TGGTGAGCGTTTTGCAGTCT
		下游引物	CTGATCCACTAGCAGGAGGTCC
		探针	VIC-TGTTGTGCTGCCAATGTGGCCTG-BHQ1
棉花 GHB119 品系 特异序列	外源	上游引物	CCAGTACTAAAATCCAGATCATGCA
		下游引物	GAAATTGCGTGACTCAAATCC
		探针	FAM-CCTGCAGGTCGACGGCCGAGTAC-BHQ1
棉花基因 Adhc	内源	上游引物	CACATGACTTAGCCCATCTTTGC
		下游引物	CCCACCCTTTTTTGGTTTAGC
		探针	FAM-TGCAGGTTTTTGGTGCCACTGTGAATG-BHQ1
油菜 RT73 品系 特异序列	外源	上游引物	CCATATTGACCATCATACTCATTGCT
		下游引物	GCTTATACGAAGGCAAGAAAAGGA
		探针	FAM-TTCCCGGACATGAAGATCATCCTCCTT-BHQ1
油菜基因 PEP	内源	上游引物	CCCTTGTAAGCTCGACATC
		下游引物	CTTGTCTCTGACCATTCTTTGT
		探针	FAM-CCGACCGTCACACCGATGTTTTAGA-BHQ1

6 仪器与设备

- 6.1 数字 PCR 仪。
- 6.2 分析天平:感量 0.1 mg。
- 6.3 生物安全柜。
- 6.4 核酸定量仪。
- 6.5 涡旋振荡仪。
- 6.6 移液枪:量程 0.1 μL ~2.5 μL ;量程 0.5 μL ~10 μL ;量程 10 μL ~100 μL ;量程 100 μL ~1 000 μL 。

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 DNA 模板制备

按照 GB/T 19495.1 和 GB/T 19495.3 的规定执行。

7.4 DNA 模板浓度控制

采用 PicoGreen dsDNA 荧光定量试剂盒或其他具有等效结果的核酸定量仪或方法测定 DNA 溶液的浓度,具体操作步骤参照相关仪器或试剂盒说明书。然后根据植物基因组的相对分子质量大小计算 DNA 的拷贝数浓度。浓度要求符合 SN/T 4853 的规定。

7.5 数字 PCR 扩增方法

7.5.1 数字 PCR 反应体系

转基因玉米 MON810 品系、MON89034 品系、MIR162 品系,转基因大豆 GTS-40-3-2 品系,转基因水稻克螟稻品系采用双重数字 PCR 反应体系见表 2。转基因棉花 GHB119 品系,转基因油菜 RT73 品系采用单重数字 PCR 反应体系见表 3。数字 PCR 反应体系的总体积可根据不同厂家、型号的数字 PCR 仪做相应调整,并保持各引物探针组分终浓度不变。每个 DNA 模板应进行 3 个平行数字 PCR 扩增反应。

表 2 双重数字 PCR 反应体系

PCR 反应试剂	终浓度	体积
内源基因上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.5 $\mu\text{mol/L}$	1 μL
内源基因下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.5 $\mu\text{mol/L}$	1 μL
内源基因探针(5 $\mu\text{mol/L}$)	0.1 $\mu\text{mol/L}$	0.4 μL
外源基因上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.5 $\mu\text{mol/L}$	1 μL
外源基因下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.5 $\mu\text{mol/L}$	1 μL
外源基因探针(5 $\mu\text{mol/L}$)	0.1 $\mu\text{mol/L}$	0.4 μL
2 \times 数字 PCR 预混液	1 \times	10 μL
DNA 模板	—	2 μL
ddH ₂ O(无菌水)	—	3.2 μL

表 3 单重数字 PCR 反应体系

PCR 反应试剂	终浓度	体积
2 \times 数字 PCR 预混液	1 \times	10 μL
外源/内源基因上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.9 $\mu\text{mol/L}$	1.8 μL
外源/内源基因下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.9 $\mu\text{mol/L}$	1.8 μL
探针(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.25 $\mu\text{mol/L}$	0.5 μL
DNA 模板	—	2 μL
ddH ₂ O(无菌水)	—	3.9 μL

7.5.2 数字 PCR 反应程序

数字 PCR 反应程序如表 4 和表 5 所示。

表 4 微滴数字 PCR 的反应程序

步骤	时间和温度	循环数
热激活及变性	10 min/95 °C	1
退火延伸	1 min/56 °C	39
变性	30 s/94 °C	
酶失活	10 min/98 °C	1

表 5 芯片数字 PCR 反应程序

步骤	时间和温度	循环数
热激活及变性	10 min/96 °C	1
退火延伸	2 min/60 °C	39
变性	30 s/98 °C	
退火延伸	2 min/60 °C	1

注：不同芯片平台可根据说明书对除退火延伸外步骤中的温度和时间做相应调整。

7.5.3 对照数字 PCR 反应的设定

试验中应设置阳性对照、阴性对照和空白对照。用食品系特异序列的转基因植物品系基因组 DNA 做阳性对照，含相同内源基因的非转基因植物基因组 DNA 做阴性对照，以水作为空白对照。各对照 PCR 反应体系中，除模板外，其余组分及 PCR 反应条件与 7.5.1 和 7.5.2 相同。

8 结果分析与表述

8.1 质量控制

根据数字 PCR 结果中阴性对照的终点荧光值设定阈值限，该阈值限应将同一样品中阴性反应微小单元和阳性反应微小单元有效区分。

阴性对照有内源基因扩增且阴性对照和空白对照均无外源基因扩增。

扩增平行重复测试结果(转基因品系百分含量)的相对标准偏差应小于或等于 25%。

以上要求其中一条不符合，应重新进行试验，重新进行的试验应从制备测试样品开始。

8.2 结果分析

按照式(1)计算测试样品的转基因品系百分含量：

$$P = \frac{A}{B} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中：

P ——转基因植物品系的百分含量；

A ——转基因植物品系外源基因拷贝数；

B ——转基因植物内源基因拷贝数。

8.3 结果表述

8.3.1 检出物种内源基因,但未检出品系特异序列,结果表述为“样品未检出×品系转基因成分。定量方法的检测限为0.1%”。

8.3.2 检出物种内源基因,同时也检出品系特异序列,结果表述为“样品中×品系转基因成分的含量为×%”。

附录 A

(资料性附录)

转基因植物品系特异性扩增序列

A.1 转基因玉米 MON810 品系特异性序列

GATGCCTTCTCCCTAGTGTTGACCAGTGTTACTCACATAGTCTTTGCTCATTTCATTGT
AATGCAGATGCCAAGCGG CCATGGACAACAACCCAAACATCAACGAGTGCATCC

A.2 转基因玉米 MON89034 品系特异性序列

TTCTCCATATTGACCATCATACTCATGCATCCCCGGTTATA TATGTTTTTTTAAACCA
CGGTATTATAGATACCG

A.3 转基因玉米 MIR162 品系特异性序列

CACCTTCAGCAACCCGAACACTACGCCAAGGTGAAGGGCAGCGACGAGGACGCCAAGATG
ATCGTGGAGGCTAAGC

A.4 转基因大豆 GTS-40-3-2 品系特异性序列

AGCATCTACATATAGCTTCTCGTTGTTAGAAAAACAAAACATAT TTGGGATCGGAGAA
GAACTGTTTGAGGCGAATGGC CTGGTC

A.5 转基因水稻克螟稻品系特异性序列

TCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTCTAAGCGTCAATTTGTTTACCCACAATATATCC CG
AGATGGGCAGGCATATCGG

A.6 转基因棉花 GHB119 品系特异性序列

CCAGTACTAAAATCCAGATCATGCATGGACCTGCAGGTGACGGCCGAGTACTG TTTT
ATTTTTAACAGGAATTTGAGTCACGCAATTC

A.7 转基因油菜 RT73 品系特异性序列

CCATATTGACCATCATACTCATTGCTGATCCATGTAGATTTCCCGGACATGAAG ATCA
TCCTCCTTCCTTTCCCTTGCCCTTTCCCTTCTTTCTTGCCCTTCGTATAAGC

注：阴影部分为转基因品系外源基因序列，带下划线部分为植物基因组内源基因序列。

 **版权声明**

中国标准在线服务网(www.spc.org.cn)是中国标准出版社委托北京标科网络技术有限公司负责运营销售正版标准资源的网络服务平台,本网站所有标准资源均已获得国内外相关版权方的合法授权。未经授权,严禁任何单位、组织及个人对标准文本进行复制、发行、销售、传播和翻译出版等违法行为。版权所有,违者必究!

中国标准在线服务网
<http://www.spc.org.cn>

标准号: GB/T 38132-2019
购买者: 北京中培质联
订单号: 0100200628063435
防伪号: 2020-0628-0608-2403-9612
时 间: 2020-06-28
定 价: 21元



GB/T 38132-2019

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
转基因植物品系定量检测数字 PCR 法
GB/T 38132—2019

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址: www.spc.org.cn

服务热线: 400-168-0010

2019年10月第一版

*

书号: 155066·1-63713

版权专有 侵权必究