

中华人民共和国国家标准

GB/T 38133—2019

转基因苜蓿实时荧光 PCR 检测方法

Genetically modified alfalfa detection method by real-time PCR

2019-10-18 发布

2019-10-18 实施

国家市场监督管理总局 发布
中国国家标准化管理委员会

订单号: 0100200628063436 防伪编号: 2020-0628-0609-2469-4145 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:中国检验检疫科学研究院、广州海关技术中心、广西出入境检验检疫局检验检疫技术中心、辽宁出入境检验检疫局检验检疫技术中心。

本标准主要起草人:付伟、朱鹏宇、刘津、魏霜、杜智欣、王晨光、朱水芳、黄文胜、郑秋月、曹际娟。

北京中培质联 专用

订单号: 0100200628063436 防伪编号: 2020-0628-0609-2469-4145 购买单位: 北京中培质联

订单号: 0100200628063436 防伪编号: 2020-0628-0609-2469-4145 购买单位: 北京中培质联

北京中培质联 专用

转基因苜蓿实时荧光 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了苜蓿转基因成分的实时荧光聚合酶链式反应(PCR)定性检测方法。

本标准适用于种子、饲料中的转基因苜蓿 J101、J163 以及 KK179 品系的实时荧光 PCR 方法检测。

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

GB/T 19495.1 转基因产品检测 通用要求和定义

GB/T 19495.2 转基因产品检测 实验室技术要求

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

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

ACC 基因 *acetyl CoA carboxylase*

编码乙酰辅酶 A 羧化酶的基因。

注:在本标准中作为苜蓿的内标准基因。

3.2

18S 核糖体 RNA *18S rRNA*

编码真核生物 18S 核糖体 RNA 的基因。

注 1:在本标准中作为苜蓿的内标准基因。

注 2:实际检测中,3.1 和 3.2 选择一种使用即可。

3.3

FMV35S 启动子 *35S promoter from a modified Figwort mosaic virus*

编码玄参花叶病毒的 35S 启动子的基因。

注:在本标准中作为转基因苜蓿 J101 和 J163 的启动子。

3.4

E9 终止子 *3' termination region from pea ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase*

来源于源自豌豆核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶小亚基(*RbcS*)E9 基因的 3'非翻译区,存在于转基因苜蓿 J101 与 J163 品系中。

3.5

CP4-EPSPS 基因 *5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene*

源自 *Agrobacterium* CP4 菌株,用于编码莽草酸途径中的关键酶的基因,存在于转基因苜蓿 J101 与 J163 品系中。

3.6

CTP2 基因 chloroplast transit peptide coding sequence

源自 *Arabidopsis thaliana* EPSPS 的叶绿体转运肽,用于引导 CP4-EPSPS 蛋白在芳香族氨基酸合成的基因。

3.7

NOS 终止子 nos terminator

来自根癌农杆菌 pTi 的胭脂碱合酶(*nos*)基因的 3'UTR 序列区,用于编码 NOS,指导聚腺苷酸化的基因,存在于转基因苜蓿 KK179 品系中。

3.8

Pal2 启动子 Pal2 promoter

来自菜豆的 *Pal2* 基因启动子,含有指导植物细胞转录的编码苯丙氨酸解氨酶的基因,存在于转基因苜蓿 KK179 品系中。

4 试验原理

应用 TaqMan 探针技术,根据常用的筛选基因(启动子、终止子等)序列、品系特异性序列和苜蓿内源基因序列,设计引物和荧光探针,对样品中基因组 DNA 进行 PCR 扩增。在 PCR 反应过程中,荧光信号的累积与 PCR 产物形成完全同步,因此可根据荧光信号的强度判定样品中是否含有特定的基因。

5 试剂与材料

除另有说明,本方法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 DNA 提取试剂盒。

5.2 实时荧光 PCR 预混液。

5.3 内标准基因引物和探针(探针 5'端标记荧光基团,3'端标记荧光淬灭基团)。

5.3.1 ACC 基因引物和探针:

上游引物 ACC-F:5'-GATCAGTGAACCTTCGCAAAGTAC-3'

下游引物 ACC-R:5'-CAACGACGTGAACACTACAAC-3'

探针 ACC-P:5'-TGAATGCTCCTGTGATCTGCCCATGC-3'

5.3.2 18S rRNA 基因引物和探针:

上游引物 18S-F:5'-CCTGAGAAACGGCTACCA-3'

下游引物 18S-R:5'-CGTGTCAGGATTGGGTAAT-3'

探针 18S-P:5'-TGCGCGCCTGCTGCCTTCCT-3'

5.4 外源基因引物和探针(探针 5'端标记荧光基团,3'端标记荧光淬灭基团)。

5.4.1 J101 转化事件特异性序列引物和探针:

上游引物 J101-F:5'-GTAAGTATCTTGTGTCATAGTTTC-3'

下游引物 J101-R:5'-ACTGAGAATTAGCTTCCACTC-3'

探针 J101-P:5'-ACTGAAGGCGGGAAACGACAATCT-3'

5.4.2 J163 转化事件特异性序列引物和探针:

上游引物 J163-F:5'-GCCGGGACAAGGTCATC-3'

下游引物 J163-R:5'-TGGACTGAGAATTAGCTTCCAC-3'

探针 J163-P:5'-TGAAGTGTTCGGTGGGAAACGACA-3'

5.4.3 KK179 转化事件特异性序列引物和探针:

上游引物 KK179-F: 5'-AGGACCTGCAGAAGCTA-3'

下游引物 KK179-R: 5'-CTAGGCTAAAGTAAGATATCGAAGA-3'

探针 KK179-P: 5'-TCAGATTGTCGTTTCCCGCCTTCA-3'

5.4.4 FMV35S 启动子基因引物和探针:

上游引物 FMV35S-F: 5'-TGACAGCCCACTCACTAA-3'

下游引物 FMV35S-R: 5'-CAATCTGGAATGCTGCTAAATC-3'

探针 FMV35S-P: 5'-TATGACGAACGCAGTGACGACCAC-3'

5.4.5 CTP2 基因引物和探针:

上游引物 CTP2-F: 5'-GAAATCCAGTCAACGCAAATC-3'

下游引物 CTP2-R: 5'-CATCCCACTCTTCTTCAATCC-3'

探针 CTP2-P: 5'-ATCGGTTTCTCTGAAGACGCAGCA-3'

5.4.6 CP4-EPSPS 基因引物和探针:

上游引物 EPSPS-F: 5'-CAGCATCCACGAGCTTATC-3'

下游引物 EPSPS-R: 5'-GGAAACAGAAGACATGACCTTA-3'

探针 EPSPS-P: 5'-ACGTCATCCCACTCTTCTTCAATCCC-3'

5.4.7 E9 基因引物和探针:

上游引物 E9-F: 5'-GTACCATTGTTGTGCTTGTA-3'

下游引物 E9-R: 5'-GGACCATATCATTCATTAATCTTC-3'

探针 E9-P: 5'-TCGCTATCGAACTGTGAAATGGAAATGGA-3'

5.4.8 Pal2 基因引物和探针:

上游引物 Pal2-F: 5'-GCATCGTTACCACCCTTTAT-3'

下游引物 Pal2-R: 5'-GTAGTGCGTAATGTGGTGAA-3'

探针 Pal2-P: 5'-ACCAGACACCAACGCTCCAGATTT-3'

5.4.9 NOS 终止子基因引物和探针:

上游引物 TNOS-F: 5'-ATCGTTCAAACATTTGGCA-3'

下游引物 TNOS-R: 5'-ATTGCGGGACTCTAATCATA-3'

探针 TNOS-P: 5'-CATCGCAAGACCGGCAACAGG-3'

6 仪器与设备

- 6.1 分析天平: 感量 0.1 mg。
- 6.2 生物安全柜。
- 6.3 实时荧光 PCR 扩增仪。
- 6.4 重蒸馏水发生器或纯水仪。
- 6.5 涡旋振荡仪。
- 6.6 其他相关仪器和设备。
- 6.7 不同量程移液器。

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。

北京中培质联 专用

订单号: 0100200628063436 防伪编号: 2020-0628-0609-2469-4145 购买单位: 北京中培质联

7.2 制样

按照 GB/T 19495.1 和 GB/T 19495.7 的规定执行。

7.3 试样预处理

按照 GB/T 19495.1 和 GB/T 19495.3 的规定执行。

7.4 DNA 模板制备

按照 GB/T 19495.1 和 GB/T 19495.3 的方法或采用具有相同效果的植物基因组 DNA 提取试剂盒进行 DNA 提取。提取后的 DNA 用紫外分光光度计测定 260 nm 和 280 nm 处吸收值,分别计算核酸的纯度和浓度:DNA 纯度以 OD_{260}/OD_{280} 比值表示,该比值应在 1.7~1.9 之间;DNA 浓度 = $50 \times OD_{260}$ ng/ μ L,浓度不低于 20 ng/ μ L。

7.5 实时荧光 PCR 检测

7.5.1 实时荧光 PCR 反应对照组设置

每个样品设 3 个平行试验,同时每次检测设立 3 个对照:

- a) 阳性对照:为对应的转基因植物样品品系或含有相应外源基因的转基因植物样品基因组 DNA,或含有上述片段的有证标准物质/样品;
- b) 阴性对照:为非转基因苜蓿提取的基因组;
- c) 空白对照:PCR 反应的空白对照(以重蒸馏水代替 DNA 模板)。

7.5.2 实时荧光 PCR 反应体系

实时荧光 PCR 反应体系配制见表 1,每个样品设 3 个平行。

表 1 实时荧光 PCR 反应体系

反应组分	储存浓度	加样体系/ μ L	终浓度
实时荧光 PCR 预混液	—	—	1 $\times$
上游引物	10 μ mol/L	1	0.5 μ mol/L
下游引物	10 μ mol/L	1	0.5 μ mol/L
探针	10 μ mol/L	0.5	0.25 μ mol/L
DNA 模板	—	2	50 ng~250 ng
超纯水	—	补齐 20	—
注 1: 实时荧光 PCR 预混液中包含有 PCR 扩增酶、扩增缓冲液以及 dNTP 等组分,可选择单独的 PCR 扩增酶以及相应的扩增缓冲液、dNTP 等反应组分进行试验,以上组分的添加量按照产品说明书使用。			
注 2: 反应体系中的各组分可根据不同最终反应体系进行区分,但是需保持所有组分终浓度一致。			

7.5.3 实时荧光 PCR 扩增程序

实时荧光 PCR 反应参数为:50 $^{\circ}$ C/2 min;95 $^{\circ}$ C/10 min;95 $^{\circ}$ C/15 s,60 $^{\circ}$ C/60 s,40 个循环。

注: 95 $^{\circ}$ C/10 min 的专门适用于化学变构的热启动 Taq 酶。以上参数可根据不同型号实时荧光 PCR 仪和所选 PCR 扩增试剂体系的不同进行调整。若未加入尿嘧啶-N-糖基化酶则不需要 50 $^{\circ}$ C/2 min 步骤。

7.5.4 实时荧光 PCR 仪荧光基团的设置

设置 PCR 反应管荧光信号收集条件,应与探针标记的报告基团一致。具体设置方法可参照仪器使用说明书。

8 结果分析与表述

8.1 对照组检测结果分析

空白对照:内源基因检测 Ct 值大于或等于 40,外源基因或品系特异性检测 Ct 值大于或等于 40。

阴性对照:内源基因检测 Ct 值小于或等于 30,转化事件特异性检测 Ct 值大于或等于 40。

阳性对照:内源基因检测 Ct 值小于或等于 30,转化事件特异性检测 Ct 值小于或等于 30。

上述指标有一项不符合者,说明 PCR 反应体系不正常,应重新进行实时 PCR 扩增。

8.2 试样检测结果分析和表述

8.2.1 内标准基因扩增曲线形状良好,扩增 Ct 值小于或等于 30;外源基因扩增曲线形状良好,扩增 Ct 值大于或等于 40,这表明试样中该样品不含所检基因或品系,表述为“未检测出×××基因成分”。

8.2.2 内标准基因扩增曲线形状良好,扩增 Ct 值小于或等于 30;外源基因扩增曲线形状良好,扩增 Ct 值小于或等于 36,这表明试样中检测出了所检基因或品系基因成分,表述为“检出×××基因成分”。

8.2.3 测试样品检测 Ct 值在 36~40 之间,应调整模板浓度,重做实时荧光 PCR。再次扩增后的外源基因检测 Ct 值仍小于 40,则可判定为该样品含有所检基因或品系。再次扩增后的外源基因检测 Ct 值大于或等于 40,则可判定为该样品不含所检基因或品系。

8.3 筛选检测和鉴定检测的选择

对苜蓿样品中转基因成分的检测,可参考附录 A,先筛选检测 FMV35S 启动子基因、E9 基因、CP4-EPSPS 基因、CTP2 基因、NOS 终止子、Pal2 启动子,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 J101、J163 以及 KK179 品系特异性基因,以确定是何种转基因苜蓿品系。

9 防污染措施

检测过程中防止交叉污染的措施按照 GB/T 19495.2 中的规定执行。

10 样品和原始数据保存

10.1 样品保存

存查样品应视样品的状态采用相应的保存方式,妥善保存 6 个月。如发现转基因,该样品保存 1 年,以备复验、谈判和仲裁。保存期满后,需经处理。

10.2 原始数据保存

转基因样品检测结束后,其原始记录单和检验报告或证书应归档,妥善保管,以备复验、谈判和仲裁。

附录 A
(资料性附录)

本标准中的外源筛选基因在商业化转基因苜蓿中的信息

A.1 本标准中的外源筛选基因在商业化转基因苜蓿中的覆盖情况

见表 A.1。

表 A.1 本标准中的外源筛选基因在商业化转基因苜蓿中的覆盖情况

品系名称	外源基因		
	启动子	结构基因	终止子
J101	FMV35S 启动子基因	CP4-EPSPS 基因、CTP2 基因	E9 基因
J163	FMV35S 启动子基因	CP4-EPSPS 基因、CTP2 基因	E9 基因
KK179	Pal2 启动子	—	NOS 终止子

A.2 本标准中的外源筛选基因在商业化转基因苜蓿中的序列信息

A.2.1 转基因苜蓿 J101 转化事件特异性目标序列(来自 US20060272042)

GTACTGATCTTGTGTCATAGTTTCAAACACTGATAGTTTAAACTGAAGGCGGGAAAC
GACAATCTGATCCCCATCAAGCTTCTGCAGGTCCTGCTCGAGTGGAAGCTAATTCTCAGT

注：单下划线区域为 J101-F 以及 J101-R 区域，双下划线区域为 J101-P 区域。

A.2.2 转基因苜蓿 J163 转化事件特异性目标序列(来自 US20060272042)

GCCGGGACAAGGTCATCCAAACTGAAGTGTTTCGGTGGGAAACGACACTCTGATCCCCA
TCAAGCTTCTGCAGGTCCTGCTCGAGTGGAAGCTAATTCTCAGTCCA

注：单下划线区域为 J163-F 以及 J163-R 区域，双下划线区域为 J163-P 区域。

A.2.3 转基因苜蓿 KK179 转化事件特异性目标序列(来自 US20140259227)

AGGACCTGCAGAAGCTAGCTTGATGGGGATCAGATTGTCGTTTCCCGCCTTCAAAACC
TCTTTTAATCTTCGATATCTTACTTTAGCCTAG

注：单下划线区域为 KK179-F 以及 KK179-R 区域，双下划线区域为 KK179-P 区域。

A.2.4 FMV35S 启动子目标序列

TGACAGCCCACTCACTAATGCGTATGACGAACGCAGTGACGACCACAAAAGAATTAGC
TTGAGCTCAGGATTTAGCAGCATTCAGATTG

注：单下划线区域为 FMV35S-F 以及 FMV35S-R 区域，双下划线区域为 FMV35S-P 区域。

A.2.5 CTP2 基因目标序列

GAAATCCAGTCAACGCAAATCTCCCTTATCGGTTTCTCTGAAGACGCAGCAGCATCCA

CGAGCTTATCCGATTTTCGTCGTCGTGGGGATTGAAGAAGAGTGGGATG

注：单下划线区域为 *CTP2*-F 以及 *CTP2*-R 区域，双下划线区域为 *CTP2*-P 区域。

A.2.6 *CP4-EPSPS* 基因目标序列

CAGCATCCACGAGCTTATCCGATTTTCGTCGTCGTGGGGATTGAAGAAGAGTGGGATGA
CGTTAATTGGCTCTGAGCTTCGTCTCTTAAGGTCATGTCTTCTGTTTCC

注：单下划线区域为 *EPSPS*-F 以及 *EPSPS*-R 区域，双下划线区域为 *EPSPS*-P 区域。

A.2.7 *E9* 基因目标序列

GTACCATTTGTTGTGCTTGTAATTTACTGTGTTTTTTATTCGGTTTTTCGCTATCGAAC
TGTGAAATGGAAATGGATGGAGAAGAGTTAATGAATGATATGGTCC

注：单下划线区域为 *E9*-F 以及 *E9*-R 区域，双下划线区域为 *E9*-P 区域。

A.2.8 *Pal2* 基因目标序列

GCATCGTTACCACCCTTTATACCCACCTACCAGACACCAACGCTCCAGATTTGCTTCGG
CCCTAACACTCTCCGTTATATATAACCCCTTCATGAACAAGGCTAATCATTCACCACATTA
CGCACTAC

注：单下划线区域为 *Pal2*-F 以及 *Pal2*-R 区域，双下划线区域为 *Pal2*-P 区域。

A.2.9 *NOS* 终止子目标序列

ATTGCGGGACTCTAATCATAAAAAACCCATCTCATAAATAACGTCATGCATTACATGTT
AATTATTACATGCTTAACGTAATTCAACAGAAATTATATGATAATCATCGCAAGACCGGC
AACAGGATTCAATCTTAAGAACTTTATTGCCAAATGTTTGAACGAT

注：单下划线区域为 *NOS*-F 以及 *NOS*-R 区域，双下划线区域为 *NOS*-P 区域。

A.2.10 *ACC* 基因目标序列

GATCAGTGAACCTTCGCAAAGTACTCGGTTAGTAGACAGTGAATGCTCCTGTGATCTGC
CCATGCACTCATGTTGTAGTGTTACGTCGTTG

注：单下划线区域为 *ACC*-F 以及 *ACC*-R 区域，双下划线区域为 *ACC*-P 区域。

A.2.11 18S rRNA 基因目标序列

CCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCT
AACACG

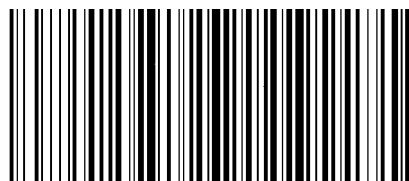
注：单下划线区域为 18S-F 以及 18S-R 区域，双下划线区域为 18S-P 区域。

 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 38133-2019
购买者: 北京中培质联
订单号: 0100200628063436
防伪号: 2020-0628-0609-2469-4145
时 间: 2020-06-28
定 价: 21元



GB/T 38133-2019

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
转基因苜蓿实时荧光 PCR 检测方法
GB/T 38133—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 • 1-63694

版权专有 侵权必究