



中华人民共和国国家标准

GB/T 33526—2017

转基因植物产品数字 PCR 检测方法

Genetically modified organism detection method by digital PCR

2017-02-28 发布

2017-09-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

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。

本标准主要起草单位:中国检验检疫科学研究院、广西出入境检验检疫局检验检疫技术中心、中国农业大学、中国农业科学院油菜作物研究所。

本标准主要起草人:付伟、杜智欣、王勤、王慧煜、许文涛、吴刚、朱水芳、刘晓飞。

转基因植物产品数字 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了转基因成分检测的数字 PCR 方法。

本标准适用于玉米、大豆、油菜、水稻、马铃薯、苜蓿、棉花等转基因植物及其产品的转基因成分数字 PCR 检测。

本标准所能达到的检测低限为 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

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

18srRNA 基因 18srRNA gene

转录自 18srDNA,是细胞核糖体的组分之一。

3.2

CaMV35s 启动子基因 CaMV35s promotor

来自花椰菜花叶病毒(Cauliflower mosaic virus, CaMV)的 35s 启动子。

3.3

NOS 终止子基因 NOS terminator

来自胭脂碱合成酶基因 NOS 的终止子。

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。

现阶段数字 PCR 的实现形式包括芯片式数字 PCR 与微滴式数字 PCR 两种。其中芯片式数字 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,但是这种分割方式的实验成本相对较高;微滴式数字 PCR 平台通过产生微小油包水体系实现反应体系的分

割。这种分割方式具有反应速度快,分割成本低的优点,但是相对来说,这种分割方法的稳定性较差,而且对于数据分析的要求也相对较高。由于数字 PCR 的平台差异,对不同数字 PCR 平台进行的数据协同分析也成为了目前数字 PCR 检测方法发展的关键。

本标准针对通用筛选元件 CaMV35s 启动子和 NOS 终止子设计选取特异性引物和探针进行数字 PCR 扩增,并根据扩增结果来判定 CaMV 35s 启动子和 NOS 终止子的外源筛选元件成分。另外,通过芯片式数字 PCR 和微滴式数字 PCR 的协同比对,本标准方法可以在两种平台中达到同样的检测目的。

5 试剂与材料

除非有特殊说明,仅使用分析纯试剂和符合 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 DNA 提取试剂盒

推荐针对不同的样品基质类型选取不同的基因组提取试剂盒。

5.2 数字 PCR 反应试剂盒

推荐按照不同的数字 PCR 平台的说明书选取其推荐的数字 PCR 反应试剂盒。

5.3 18srRNA 基因引物和探针

18s-F:5'-CCTGAGAAACGGCTACCAT-3'

18s-R:5'-CGTGTCAGGATTGGGTAAT-3'

18s-P:5'-VIC-TGCGCGCCTGCTGCCTTCCT-BHQ1-3'

5.4 CaMV35s 启动子基因引物和探针

p35s-F:5'-ATTGATGTGATATCTCCACTGACGT-3'

p35s-R:5'-CCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCT-3'

p35s-P:5'-VIC-CCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCT-BHQ1-3'

5.5 NOS 终止子基因引物和探针

TNOS-F:5'-ATCGTTCAAACATTTGGCA-3'

TNOS-R:5'-ATTGCGGGACTCTAATCATA-3'

TNOS-P:5'-VIC-CATCGCAAGACCGGCAACAGG-BHQ1-3'

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 数字 PCR 扩增仪。

6.4 纯水仪。

6.5 核酸定量仪。

6.6 涡旋震荡仪。

6.7 其他相关仪器和设备。

6.8 离心管。

6.9 不同量程移液器以及配套吸头如下：

- a) 量程为 20 μL ~200 μL , 10 μL ~100 μL 和 2 μL ~20 μL 的移液器以及配套的 200 μL 吸头；
- b) 量程为 0.5 μL ~10 μL 和 0.1 μL ~2.5 μL 的移液器以及配套的 10 μL 吸头。

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 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 的规定执行。

7.5 数字 PCR 扩增方法

7.5.1 试样数字 PCR 反应

7.5.1.1 内标准基因数字 PCR 反应

每个试样内标准基因数字 PCR 反应设置 3 个平行。并按照表 1 的组分和终浓度配置数字 PCR 反应体系。反应体系配置完成后,进行反应体系的分割,其中芯片法数字 PCR 通过微流控芯片实现本步骤,微滴法数字 PCR 通过形成油包水结构实现体系的分割。该步骤按照不同数字 PCR 平台的说明书进行操作。数字 PCR 反应的有效分割体系系数不得低于理论分割体系系数的 60%。

表 1 数字 PCR 反应体系

试剂	终浓度	体系
2×反应 Mix ^a	1×	2 μL
20 $\mu\text{mol/L}$ zSSIIb-F/p35s-F/ TNOS-F	0.45 $\mu\text{mol/L}$	0.09 μL
20 $\mu\text{mol/L}$ zSSIIb-R/p35s-R/ TNOS-R	0.45 $\mu\text{mol/L}$	0.09 μL
20 $\mu\text{mol/L}$ zSSIIb-P/p35s-P/ TNOS-P	0.1 $\mu\text{mol/L}$	0.02 μL
50 ng/ μL DNA 模板	12.5 ng/ μL	1 μL
水		补齐 4 μL
总体系		4 μL
^a 推荐市面上现售的数字 PCR 平台进行实验,并针对市面上现售的不同数字 PCR 平台,依据说明书调整反应体系的组分和最终体积,并保证表中所列组分的终浓度不变。		

体系分割完成后,进行数字 PCR 反应。荧光分析步骤采用 VIC 单荧光通道,反应程序如表 2 所示。

表 2 数字 PCR 反应程序

步骤	温度	持续时间	循环数
热激活	50 ℃	2 min	1
	95 ℃	5 min	
变性	95 ℃	15 s	40
退火延伸	60 ℃	1 min	
注：不同 PCR 反应平台可以根据说明书对热启动步骤程序进行修改,但是不能对扩增程序进行修改。			

7.5.1.2 外源基因 p-35s 与 T-NOS 基因数字 PCR 反应

每个试样外源基因数字 PCR 反应设置 3 个平行。外源基因扩增所用反应体系与反应程序与 7.5.1.1 相同,扩增所使用的引物探针为 5.4 与 5.5 所述引物探针。

7.5.2 对照数字 PCR 反应

在试样数字 PCR 的同时,应设置阴性对照与空白对照。
以与试样相同种类的非转基因植物基因组 DNA 作为阴性对照;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 相同。

8 结果分析与表述

8.1 阈值的设定

根据数字 PCR 结果中扩增曲线的基线或者体系中阴性分割体系的终点荧光值设定荧光的阈值限。阈值限需要对阴性和阳性扩增结果进行明显的区分。

8.2 对照组检测结果分析

阴性对照组只有内标准基因的扩增,空白对照组没有任何扩增现象,这表明数字 PCR 反应体系正常工作,否则需要进行重新检测。

8.3 试样检测结果分析和表述

- 8.3.1 内标准基因得到了明显的扩增,并且外源 p-35s 或 NOS 基因的任何一个出现明显的扩增现象,阳性扩增体系内扩增曲线形状良好或者其终点荧光信号值超过荧光阈值,这表明试样中检测出了 p-35s 或 T-NOS 基因,表述为“试样中检测出了 p-35s 或 NOS 基因成分,检测结果为阳性”。
- 8.3.2 内标准基因得到了明显的扩增,且其扩增曲线形状良好并超过阈值限,而 p-35s 或 T-NOS 基因都没有得到扩增,扩增终点荧光信号值位于阈值限之下,这表明试样中未检测出 p-35s 或 T-NOS 基因

成分,表述为“试样中未检测出 p-35s 或 T-NOS 基因成分,检测结果为阴性”。

8.3.3 内标准基因没有得到扩增,扩增终点荧光信号值位于阈值限之下,这表明试样中未检测对应植物成分,结果表述为“试样未检出对应植物成分,检测结果为阴性”。

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
转基因植物产品数字 PCR 检测方法
GB/T 33526—2017

*

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

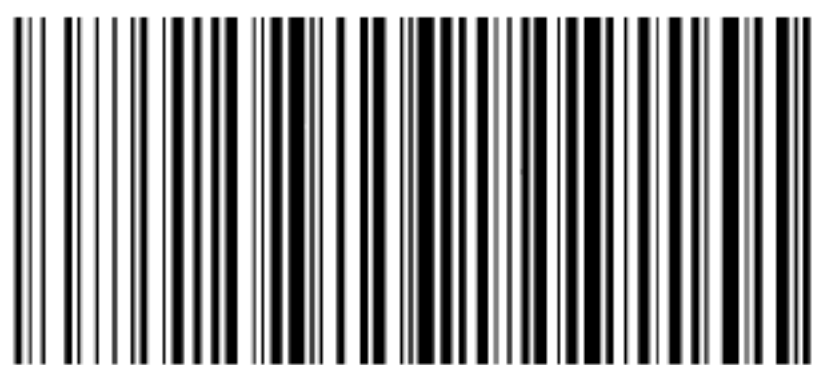
服务热线: 400-168-0010

2017 年 3 月第一版

*

书号: 155066 · 1-55864

版权专有 侵权必究



GB/T 33526-2017