ICS 65.020.01
B 16

中华人民共和国国家标准

GB/T 19495.5—2018
代替 GB/T 19495.5—2004

转基因产品检测 实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)检测方法

Detection of genetically modified organisms and derived products—Quantitative real-time polymerase chain reaction(PCR) methods

2018-09-17 发布　　2019-04-01 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

网站www.cnfw315.com
电话4006982315
刮涂层 查真伪

前　言

GB/T 19495《转基因产品检测》分为如下几部分：

——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 19495.4　转基因产品检测　实时荧光定性聚合酶链式反应(PCR)检测方法；

——GB/T 19495.5　转基因产品检测　实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)检测方法；

——GB/T 19495.6　转基因产品检测　基因芯片检测方法；

——GB/T 19495.7　转基因产品检测　抽样和制样方法；

——GB/T 19495.8　转基因产品检测　蛋白质检测方法；

——GB/T 19495.9　转基因产品检测　植物产品液相芯片检测方法。

本部分为 GB/T 19495 的第 5 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本部分代替 GB/T 19495.5—2004《转基因产品检测　核酸定量 PCR 检测方法》。与 GB/T 19495.5—2004 相比，除编辑性修改外主要技术变化如下：

——修改了标准的适用范围；

——增加了分别基于基体标准物质以及质粒标准分子对样品中转基因植物品系进行定量检测的操作规程；

——增加了大豆、玉米、油菜、棉花、水稻、马铃薯、甜菜和木瓜等转基因植物品系拷贝数百分含量的定量检测方法。

本部分由全国植物检疫标准化技术委员会(SAC/TC 271)提出并归口。

本部分起草单位：中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国上海出入境检验检疫局、中华人民共和国山东出入境检验检疫局、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：黄新、李想、高宏伟、凌杏园、朱水芳、陈洪俊、潘良文、曹际娟、章桂明。

本部分所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB/T 19495.5—2004。

转基因产品检测
实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)
检测方法

1 范围

GB/T 19495 的本部分规定了大豆、玉米、油菜、水稻(大米)、棉花、马铃薯、甜菜、木瓜等植物及其产品中转基因品系含量的实时荧光 PCR 定量检测方法。

本部分适用于上述植物及其产品中转基因品系拷贝数百分含量的定量检测方法。

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 19495.2 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

GB/T 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

JJF 1059.1 测量不确定度评定与表示

SN/T 4562 转基因检测实验室测量不确定度评估指南

3 术语、定义和缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

转基因 transgene

将物种本身不具有的、来源于其他物种的功能 DNA 序列,通过生物工程技术,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的技术。

3.1.2

品系特异性 event-specific

外源 DNA 插入受体作物基因组后经重组产生的邻接区序列。

3.1.3

实时荧光 PCR real-time polymerase chain reaction

在聚合酶链式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,并通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。

3.1.4

内标准基因 endogenous reference gene

在检测物种中拷贝数恒定的、不显示等位基因变化的基因。该基因可用于判定物种特异性。

3.1.5

Ct 值　cycle threshold

每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。

3.1.6

定量下限　limit of quantification；LOQ

在准确度和精确度处于可接受范围内时，样品中可稳定定量的分析物最低量或浓度。

3.1.7

标准物质　reference material

具有一种或多种足够稳定、均一和确定的特性值，用以对设备进行校准、对测量方法进行评价或为材料定值的物质或材料。

3.1.8

基体标准物质　matrix reference material

来源于植物原材料(如植物种子、叶子、根茎等)，通过对转基因品系及与其对应的非转基因品种材料通过一定质量比进行混合而制成的具有一定转基因成分百分比含量的标准物质。

3.1.9

质粒标准分子　plasmid reference molecule

一种稳定存在的重组质粒分子，其包含了转基因检测的目标序列片段(如筛选基因片段、功能基因片段或品系特异性片段等)，以及物种特异的内标准基因片段，可用于转基因产品定性定量检测。

3.2　缩略语

下列缩略语适用于本文件。

ACP1：酰基载体蛋白基因(acyl carrier protein 1)

ADH1：乙醇脱氢酶 1 基因(alcohol dehydrogenase 1)

BHQ1：黑洞猝灭基团 1(black hole quencher 1)

bp：碱基对(base pair)

Cf：采用质粒标准分子作为标准物质进行转基因成分定量检测的转换系数(conversion factor)

CHY：木瓜凝乳蛋白酶基因(chymopapain gene)

Cru A：油菜种子储藏蛋白基因(cruciferin A gene)

DNA：脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

dATP：脱氧腺苷三磷酸(deoxyadenosine triphosphate)

dCTP：脱氧胞苷三磷酸(deoxycytidine triphosphate)

dGTP：脱氧鸟苷三磷酸(deoxyguanosine triphosphate)

dNTP：脱氧核苷三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphate)

dUTP：脱氧尿苷三磷酸(deoxyuridine triphosphate)

EDTA：乙二胺四乙酸(ethylene diaminetetraacetic acid)

FAM：羧基荧光素(6-carboxyfluorescein)

GS：谷氨酸合酶基因(glutamine synthase gene)

Lectin：植物凝集素基因

MGBNFQ：小沟结合物无荧光猝灭基团(minor groove binder nonfluorescent quencher)

PCR：聚合酶链式反应(polymerase chain reaction)

PLD：磷脂酶 D 家族基因(phospholipase D family gene)

ROX：一种荧光染料(carboxy-X-rhodmine)

SAH7：类拟兰芥属同源序列 7 的棉花内源基因(sinapis arabidopsis homolog 7 gene)

SPS:蔗糖磷酸盐合成酶基因(sucrose phosphate synthase gene)

Taq:DNA 聚合酶(*Taq* DNA polymerase)

Tris:三(羟甲基)氨基甲烷[tris (hydroxymethyl)aminomethane]

UDG:尿嘧啶 DNA-糖基酶(uracil DNA glycosylase)

UGPase:马铃薯 UDP-葡萄糖焦磷酸化酶基因(UDP-glucose pyrophosphorylase gene from *Solanum tuberosum*)

UNG 酶:尿嘧啶-*N*-糖基化酶(uracil-*N*-glycosylase)

4 方法原理

实时荧光 PCR 定量检测是在 PCR 反应体系中,除采用特异的引物外,还加入了与模板 DNA 匹配的具有荧光标记的探针,随着 PCR 反应的进行,PCR 反应产物不断累计,荧光信号强度也等比例增加。每经过一个循环,收集一个荧光强度信号,这样就可以通过荧光强度变化监测产物量的变化,从而得到一条荧光扩增曲线。当荧光信号超过所设定的阈值(Threshold)时,荧光信号可被检测出来。

每个模板的 Ct 值与该模板起始拷贝数的对数存在线性关系,起始拷贝数越多,Ct 值越小。利用已知起始拷贝数的基体标准物质或质粒标准分子可制备标准曲线,其中横坐标代表起始拷贝数的对数,纵坐标代表 Ct 值。因此,只要获得未知样品的 Ct 值,即可通过制备的标准曲线计算出该样品的内标准基因和某品系的起始拷贝数,计算出的两个目标核酸拷贝数的比值(百分数)即为测定品系的相对百分含量。

5 仪器设备和试剂

5.1 仪器设备

5.1.1 样品粉碎仪或研磨机。

5.1.2 恒温孵育器或水浴锅。

5.1.3 实时荧光 PCR 仪。

5.1.4 离心机。

5.1.5 高压灭菌锅。

5.1.6 涡旋振荡器。

5.1.7 生物安全柜。

5.1.8 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。

5.1.9 微量移液器(2 μL、10 μL、100 μL、200 μL、1 000 μL)。

5.2 主要试剂

除特别说明外,所有试剂均为分析纯或生化试剂,实验用水应符合 GB/T 6682 中一级水的规格。

5.2.1 实时荧光 PCR 预混液:为 *Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL)、PCR 反应缓冲液、$MgCl_2$(3 mmol/L～7 mmol/L)、dNTPs(含 dATP,dUTP,dCTP,dGTP)、UNG 酶等混合配制的溶液。

5.2.2 ROX:荧光校正试剂(50×,使用时稀释至 1×)。

5.2.3 引物和探针:根据附录 A 表 A.1 的序列合成引物和探针,加双蒸水配制成 100 μmol/L 储备液,用于实时荧光 PCR 扩增的引物和探针浓度为 10 μmol/L。

6 检测步骤

6.1 取样和制样

按照 GB/T 19495.7 中规定的方法执行。

6.2 样品 DNA 的提取与纯化

按照 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。每个样品应制备 3 个测试样品提取 DNA(提取平行重复)。

6.3 DNA 浓度测定和定量

按照 GB/T 19495.3 中规定的方法执行。

6.4 实时荧光 PCR 扩增

6.4.1 实时荧光 PCR 反应体系

实时荧光 PCR 反应体系配制见表 1。每个提取平行重复分别进行至少 3 次内标准基因和品系特异性序列的扩增反应(扩增平行重复)。

表 1 实时荧光 PCR 反应体系

名称	储液浓度	终浓度
10×PCR 缓冲液含量[a]	10×	1×
$MgCl_2$[a]	25 mmol/L	2.5 mmol/L
dNTP(含 dUTP)[a]	2.5 mmol/L	0.2 mmol/L
UNG 酶[a]	5 U/μL	0.075 U/μL
上游引物	10 μmol/L	参考附录 A
下游引物	10 μmol/L	参考附录 A
探针	10 μmol/L	参考附录 A
Taq 酶[a]	5 U/μL	0.05 U/μL
ROX[b]	50×	1×
DNA 模板[c]	—	参考附录 B 进行计算
双蒸水	—	补足至 25 μL

反应体系中各试剂的量可根据具体情况或不同的反应总体积进行适当调整。

[a] 可选用含有 PCR 缓冲液、$MgCl_2$、dNTP 和 *Taq* 酶等成分的基于 Taqman 探针的实时荧光 PCR 预混液进行实时荧光 PCR 扩增。

[b] ROX 荧光试剂仅在具有 ROX 校正通道的实时荧光 PCR 仪上进行扩增时添加,否则用双蒸水补足。

[c] DNA 模板加入量参考附录 B 的说明。

6.4.2 实时荧光 PCR 反应程序

实时荧光 PCR 反应参数为:50 ℃/2 min;95 ℃/10 min;95 ℃/15 s,60 ℃/60 s,40 个循环。

注：以上参数可根据不同型号实时荧光 PCR 仪和所选 PCR 扩增体系不同作适当调整。

6.4.3 仪器检测通道的选择

设置 PCR 反应荧光信号收集条件，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。

6.4.4 实验对照的设立

实验设立以下对照：

——阳性对照，为目标转基因植物品系基因组 DNA，或含有上述片段的质粒标准分子 DNA；

——阴性对照，相应的非转基因植物样品 DNA；

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

6.5 标准曲线制备

6.5.1 通用要求

制备标准曲线时需设置至少 5 个浓度点，且设置的最低浓度点应该尽量接近该扩增目标的定量下限。标准曲线上的每个浓度应至少做 3 个平行重复。

6.5.2 基于基体标准物质的标准曲线制备

将基体标准物质基因组 DNA（或基因组 DNA 标准物质）稀释至合适浓度，后做梯度稀释。如可采用 5 倍梯度对 DNA 模板进行稀释至 4×10^4 拷贝、8 000 拷贝、1 600 拷贝、320 拷贝和 25 拷贝，其中 25 拷贝为定量下限模板浓度，必须设置。采用稀释后的 DNA 溶液进行实时荧光 PCR 扩增制备标准曲线。每个浓度模板 DNA 设置至少 3 个平行重复扩增。扩增后，根据扩增 Ct 值与样品浓度（拷贝数）对数值间的线性关系制备标准曲线。标准曲线即以 DNA 拷贝数的对数作为横坐标，Ct 值作为纵坐标作图，并获得标准曲线方程。

6.5.3 基于质粒标准分子的标准曲线制备

6.5.3.1 标准曲线制备

将含有目标转基因品系和植物内标准基因的质粒标准分子 DNA 溶液进行梯度稀释。如可采用 10 倍梯度稀释至 10^6 拷贝、10^5 拷贝、10^4 拷贝、10^3 拷贝、10^2 拷贝和 25 拷贝，其中 25 拷贝为定量下限模板浓度，必须设置。采用稀释后的 DNA 溶液进行实时荧光 PCR 扩增制备标准曲线。每个浓度模板 DNA 设置至少 3 个平行重复扩增。扩增后，根据扩增 Ct 值与样品浓度（拷贝数）对数值间的线性关系制备标准曲线。标准曲线即以 DNA 拷贝数的对数作为横坐标，Ct 值作为纵坐标作图，并获得标准曲线方程。

6.5.3.2 Cf 值测定

在对实际样品中转基因品系进行定量时，需要测定 Cf 值，以弥补质粒 DNA 与植物基因组 DNA 的背景差异。采用一定百分比含量的转基因植物材料（包括基体标准物质）基因组 DNA（浓度在 10^2 拷贝至 10^5 拷贝之间）进行 Cf 值的测定。即采用基因组 DNA 分别扩增内标准基因和品系特异性序列，扩增反应均设置 3 个平行重复。然后根据上述基于质粒标准分子获得的标准曲线方程计算出基因组 DNA 的内标准基因和品系特异性序列拷贝数，再根据式（1）计算 Cf 值：

$$Cf=\frac{cp_{evnt}}{cp_{ref}\times pct_{gmo}} \qquad \cdots\cdots(1)$$

式中：

cp_{evnt} ——品系特异性序列拷贝数；

cp_{ref} ——内标准基因拷贝数；

pct_{gmo}——转基因植物材料目标品系含量，如采用纯合转基因植物材料进行 Cf 值测定，则目标品系含量为 100%。

7 结果分析与计算

7.1 质量控制

下述指标有一项不符合者，需重新进行实时荧光 PCR 扩增：

——空白对照：内标准基因扩增 Ct 值≥40，品系特异性序列扩增 Ct 值≥40；

——阴性对照：内标准基因扩增 Ct 值≤30，品系特异性序列扩增 Ct 值≥40；

——阳性对照：内标准基因扩增 Ct 值≤30，品系特异性序列扩增 Ct 值≤35。

被检测的样品核酸浓度应在标准曲线测定范围内，如不在标准曲线测定范围内，则需对样品核酸浓度进行适当调整后重新进行检测。

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≥25%，或提取平行重复的测试结果(转基因品系百分含量)的相对标准偏差≥35%，则应重新进行实验，重新进行的实验应从制备测试样品开始。标准偏差(SD)和相对标准偏差(RSD)的计算如式(2)和式(3)所示：

$$SD=\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(X_i-\overline{X})^2}{n-1}} \qquad \cdots\cdots(2)$$

$$RSD=\frac{SD}{\overline{X}}\times 100\% \qquad \cdots\cdots(3)$$

式中：

n ——重复次数；

X_i——各测定值；

$\overline{X}$ ——测定值的平均值。

7.2 结果计算

7.2.1 样品 DNA 浓度与拷贝数间的换算

将样品 DNA 浓度换算为 DNA 拷贝数可参照式(4)进行计算：

$$cp_{DNA}=\frac{6.022\times 10^{23}\times cont_{DNA}}{len_{DNA}\times 10^{9}\times 660} \qquad \cdots\cdots(4)$$

式中：

cp_{DNA} ——DNA 拷贝数；

$cont_{DNA}$——DNA 量，单位为纳克(ng)；

len_{DNA} ——基因组 DNA 长度(bp)。

7.2.2 样品中目标转基因品系百分含量计算

当采用基体标准物质(包括基因组 DNA 标准物质)制备标准曲线时，样品中目标转基因品系百分含量按照式(5)进行计算：

$$pct_{tgt} = \frac{cp_{evnt}}{cp_{ref}} \times 100\% \quad \cdots\cdots (5)$$

式中：

pct_{tgt}——目标转基因品系含量；

cp_{evnt}——品系特异性序列拷贝数；

cp_{ref}——内标准基因拷贝数。

当采用质粒标准分子制备标准曲线时，样品中目标转基因品系百分含量按照式(6)进行计算：

$$pct_{tgt} = \frac{cp_{evnt}}{cp_{ref} \times Cf} \times 100\% \quad \cdots\cdots (6)$$

式中：

pct_{tgt}——目标转基因品系含量；

cp_{evnt}——品系特异性序列拷贝数；

cp_{ref}——内标准基因拷贝数。

7.2.3 样品转基因成分含量计算

每个提取平行重复的转基因品系含量为3次扩增平行重复计算出的转基因成分含量的平均值。样品的转基因品系含量(%)为3个提取平行重复转基因品系含量(%)的平均值。平均值的计算方法如式(7)所示。

$$pct_{fnl} = (pct_{rpt1} + pct_{rpt2} + pct_{rpt3})/3 \quad \cdots\cdots (7)$$

式中：

pct_{fnl}——转基因品系含量；

pct_{rpt1}——重复1转基因含量；

pct_{rpt2}——重复2转基因含量；

pct_{rpt3}——重复3转基因含量。

注：市场上的水稻、玉米和油菜等种子往往是杂交种，单一转基因品系有纯合体和杂合体之分。

对于纯合体，其以品系特异性序列拷贝数为依据测得的含量与以重量为依据测得的含量相同。

对于杂合体，其以品系特异性序列拷贝数为依据测得的含量仅为以重量为依据测得含量的一半。

8 结果表述

8.1 定量检测结果表述

定量检测结果有3种可能，分别表述如表2所示。

表2 定量检测结果表述

检测结果	结果表述
检出物种内标准基因，但未检出目标品系特异性序列	未检出转基因××(植物名称)××品系(品系名称)
检出物种内标准基因和品系特异性序列，但含量小于定量下限	检出转基因××(植物名称)××品系(品系名称)
检出物种内标准基因和目标品系特异性序列，含量在标准曲线测定范围内	检出转基因××(植物名称)××品系(品系名称)，含量为×%

8.2 不确定度计算

按照JJF 1059.1、SN/T 4562的要求计算方法不确定度。

9 防污染措施

检测过程中防止交叉污染的措施按照 GB/T 27403 和 GB/T 19495.2 中的规定执行。

10 定量检测限

各品系特异性序列的实时荧光 PCR 扩增定量检测限(LOQ)为 0.1%(拷贝数百分比)。

附 录 A
（资料性附录）
实时荧光定量 PCR 检测引物/探针

实时荧光定量 PCR 检测引物/探针序列和加入浓度见表 A.1。

表 A.1 实时荧光定量 PCR 检测引物/探针序列和加入浓度

物种	内标准基因或品系	引物/探针	序列(5′-3′)	终浓度(nM)	产物大小/bp	备注
水稻	SPS	正向	ttgcgcctgaacggatat	400	81	内标准基因
		反向	cggttgatcttttcgggatg	400		
		探针	FAM-tccgagccgtccgtgcgtc-BHQ1	200		
	PLD	正向	tggtgagcgttttgcagtct	200	64	
		反向	ctgatccactagcaggaggtcc	200		
		探针	FAM-tgttgtgctgccaatgtggcctg-BHQ1	200		
	TT51-1（Bt63）	正向	agagactggtgatttcagcggg	400	119	
		反向	gcgtccagaaggaaaaggaata	400		
		探针	FAM-atctgccccagcactcgtccg-BHQ1	200		
	LLRice62	正向	agctggcgtaatagcgaagagg	400	88	
		反向	tgctaacgggtgcatcgtcta	400		
		探针	FAM-cgcaccgattatttatacttttagtccacct-BHQ1	200		
	LLRice601	正向	tctaggatccgaagcagatcgt	400	68	
		反向	ggagggcgcggagtgt	400		
		探针	FAM-ccacctcccaacaataaaagcgcctg-BHQ1	200		
	科丰 6	正向	gcttggatcagattgtcgttt	400	154	
		反向	gtcagataaactgattggtctgat	400		
		探针	FAM-cgacaaaagatcaggatttggg-BHQ1	200		
	克螟稻 1 号	正向	tccgcaatgtgttattaagttgtctaa	300	78	
		反向	ccgatatgcctgcccatct	900		
		探针	FAM-cgtcaatttgtttacaccacaatatatcccg-BHQ1	100		
	Golden Rice 2	正向	tggccgtatccgcaatgtg	300	121	
		反向	gctgcgcctctaaccaggtat	300		
		探针	FAM-tcgatatgattccttcatcgagcgagc-BHQ1	150		
棉花	ACP1	正向	attgtgatgggacttgaggaaga	150	76	内标准基因
		反向	cttgaacagttgtgatggattgtg	150		
		探针	FAM-attgtcctcttccaccgtgattccgaa-BHQ1	50		

表 A.1（续）

物种	内标准基因或品系	引物/探针	序列(5′-3′)	终浓度(nM)	产物大小/bp	备注
棉花	SAH7	正向	agtttgtaggttttgatgttacattgag	350	115	内标准基因
		反向	gcatctttgaaccgcctactg	250		
		探针	FAM-aaacataaaataatgggaacaaccatgacatgt-BHQ1	175		
	MON531	正向	tcccattcgagtttctcacgt	150	72	
		反向	aaccaatgccaccccactga	150		
		探针	FAM-ttgtccctccacttcttctc-BHQ1	50		
	MON1445	正向	ggagtaagacgattcagatcaaacac	150	87	
		反向	atcgacctgcagcccaagct	150		
		探针	FAM-atcagattgtcgtttcccgccttcagttt-BHQ1	50		
	MON15985	正向	gttactagatcggggatatcc	150	82	
		反向	aaggttgctaaatggatggga	150		
		探针	FAM-ccgctctagaactagtggatctgcactgaa-BHQ1	50		
	MON88913	正向	ggctttggctaccttaagagagtc	500	94	
		反向	caaattacccattaagtagccaaattac	500		
		探针	FAM-aactatcagtgtttgactacat-MGBNFQ	100		
	LLCotton25	正向	cagatttttgtgggattggaattc	400	79	
		反向	caaggaactattcaactgag	400		
		探针	FAM-cttaacagtactcggccgtcgaccgc-BHQ1	200		
	GHB614	正向	caaatacacttggaacgacttcgt	400	119	
		反向	gcaggcatgcaagcttttaaa	400		
		探针	FAM-ctccatggcgatcgctacgttctagaatt-BHQ1	200		
	281-24-236	正向	ctcattgctgatccatgtagatttc	350	111	
		反向	ggacaatgctgggctttgtg	450		
		探针	FAM-ttgggttaataaagtcagattagagggagacaa-BHQ1	175		
	3006-210-23	正向	aaatattaacaatgcattgagtatgatg	400	90	
		反向	actctttctttttctccatattgacc	400		
		探针	FAM-tactcattgctgatccatgtagatttcccg-BHQ1	150		
	T304-40	正向	agcgcgcaaactaggataaatt	400	78	
		反向	cctagatcttgggataacttgaaaaga	400		
		探针	FAM-tcgcgcgcggtgtcatctatctc-BHQ1	200		
	GBH119	正向	ccagtactaaaatccagatcatgca	400	90	
		反向	gaaattgcgtgactcaaattcc	400		
		探针	FAM-cctgcaggtcgacggccgagtac-BHQ1	200		

表 A.1（续）

物种	内标准基因或品系	引物/探针	序列(5′-3′)	终浓度(nM)	产物大小/bp	备注
棉花	MON88701	正向	catactcattgctgatccatgtaga	300	84	
		反向	agtgttaaacaagttatgttctagagc	300		
		探针	FAM-ttcccggacatgaagccttaattcaat-BHQ1	250		
玉米	ADH1	正向	ccagcctcatggccaaag	150	70	内标准基因
		反向	ccttcttggcggcttatctg	150		
		探针	FAM-cttaggggcagactcccgtgttccct-BHQ1	50		
	59122	正向	gggataagcaagtaaaagcgctc	250	86	
		反向	ccttaattctccgctcatgatcag	250		
		探针	FAM-tttaaactgaaggcgggaaacgacaa-BHQ1	200		
	Bt11	正向	gcggaacccctatttgttta	750	70	
		反向	tccaagaatccctccatgag	750		
		探针	FAM-aaatacattcaaatatgtatccgctca-BHQ1	250		
	Bt176	正向	ggccgtgaacgagctgtt	100	82	
		反向	gggaagaagcctacatgttttctaa	600		
		探针	FAM-agcaaccagatcggccgacacc-BHQ1	200		
	MON87411	正向	ctctgtaacagaaaacaccatctagag	450	109	
		反向	acaaaagtgaactagttctagggtagat	450		
		探针	FAM-ccgcgtttaaactatcagtgtttagagaat-BHQ1	200		
	DAS40278	正向	cacgaaccattgagttacaatc	350	98	
		反向	tggttcattgtattctggctttg	350		
		探针	FAM-cgtagctaaccttcattgtattccg-BHQ1	150		
	98140	正向	gtgtgtatgtctctttgcttggtctt	500	80	
		反向	gattgtcgtttcccgccttc	500		
		探针	FAM-ctctatcgatccccctctttgatagtttaaact-BHQ1	200		
	GA21	正向	cttatcgttatgctatttgcaactttaga	150	112	
		反向	tggctcgcgatcctcct	150		
		探针	FAM-catatactaactcatatctctttctcaacagcaggtgggt-BHQ1	50		
	LY038	正向	tgggttcagtctgcgaatgtt	150	111	
		反向	aggaattcgatatcaagcttatcga	150		
		探针	FAM-cgagcggagtttatgggtcgacgg-BHQ1	50		
	MIR162	正向	gcgcggtgtcatctatgttactag	300	92	
		反向	tgccttatctgttgccttcaga	300		
		探针	FAM-tctagacaattcagtacattaaaaacgtccgcca-BHQ1	150		

表 A.1（续）

物种	内标准基因或品系	引物/探针	序列(5′-3′)	终浓度(nM)	产物大小/bp	备注
玉米	MIR604	正向	gcgcacgcaattcaacag	600	76	
		反向	ggtcataacgtgactcccttaattct	300		
		探针	FAM-aggcgggaaacgacaatctgatcatg-BHQ1	200		
	MON810	正向	tcgaaggacgaaggactctaacgt	300	92	
		反向	gccaccttccttttccactatctt	300		
		探针	FAM-aacatcctttgccattgcccagc-BHQ1	180		
	MON863	正向	gtaggatcggaaagcttggtac	150	84	
		反向	tgttacggcctaaatgctgaact	150		
		探针	FAM-tgaacacccatccgaacaagtagggtca-BHQ1	50		
	MON87460	正向	cacgttgaaggaaaatggattg	600	82	
		反向	tcgcgatcctcctcaaagac	600		
		探针	FAM-agggagtatgtagataaattttcaaagcgttagacggc-BHQ1	250		
	MON88017	正向	gagcaggacctgcagaagct	150	95	
		反向	tccggagttgaccatcca	150		
		探针	FAM-tcccgccttcagtttaaacagagtcgggt-BHQ1	50		
	MON89034	正向	ttctccatattgaccatcatactcatt	450	77	
		反向	cggtatctataataccgtggtttttaaa	450		
		探针	FAM-atccccggaaattatgtt-MGBNFQ	100		
	NK603	正向	atgaatgacctcgagtaagcttgttaa	150	108	
		反向	aagagataacaggatccactcaaacact	150		
		探针	FAM-tggtaccacgcgacacacttccactc-BHQ1	50		
	T25	正向	acaagcgtgtcgtgctccac	400	102	
		反向	gacatgatactccttccaccg	400		
		探针	FAM-tcattgagtcgttccgccattgtcg-BHQ1	200		
	TC1507	正向	tagtcttcggccagaatgg	300	58	
		反向	ctttgccaagatcaagcg	300		
		探针	FAM-taactcaaggccctcactccg-BHQ1	150		
	3272	正向	tcatcagaccagattctcttttatgg	250	95	
		反向	cgtttcccgccttcagttta	250		
		探针	FAM-actgctgacgcggccaaacactg-BHQ1	200		
	VCO-01981-5	正向	ccactgaacgtcaccaagaaga	300	85	
		反向	gccgctactcgagggattta	300		
		探针	FAM-cagtactcaaacactgatag-MGBNFQ	200		

表 A.1（续）

物种	内标准基因或品系	引物/探针	序列(5′-3′)	终浓度(nM)	产物大小/bp	备注
玉米	5307	正向	catggccgtatccgcaatgtg	350	107	
		反向	tgcacccttgccagtgg	350		
		探针	FAM-accacaatataccctcttccctgggccag-BHQ1	125		
	MON87427	正向	acggaaacggtcgggtcaaatg	450	95	
		反向	ccatgtagatttcccggttttctc	450		
		探针	FAM-tcgggacaatatggagaaaaagaaagag-BHQ1	200		
油菜	CruA	正向	ggccagggtttccgtgat	200	101	内标准基因
		反向	ccgtcgttgtagaaccattgg	200		
		探针	FAM-agtccttatgtgctccactttctggtgca-BHQ1	200		
	GT73(RT73)	正向	ccatattgaccatcatactcattgct	150	108	
		反向	gcttatacgaaggcaagaaaagga	150		
		探针	FAM-tccatgtagatttcccggacatgaagatca-BHQ1	50		
	MS8	正向	ccttgaggacgctttgatcatatt	400	130	
		反向	cctttcttatcgaccatgtactc	400		
		探针	FAM-ccgagttcgacggccgagtactg-BHQ1	200		
	RF3	正向	agcatttagcatgtaccatcagaca	400	139	
		反向	cataaaggaagatggagacttgag	400		
		探针	FAM-cgcacgcttatcgaccataagccca-BHQ1	200		
	MS1	正向	acgctgcggacatctacatt	400	187	
		反向	ctagatcggaagctgaagatgg	400		
		探针	FAM-ctcattgctgatccacctagccgactt-BHQ1	200		
	RF1	正向	ctaagggaggtcaagatgtagc	400	113	
		反向	cgggcctaacttttggtgtg	400		
		探针	FAM-ctcatcatcctcacccagtcagcatca-BHQ1	200		
	RF2	正向	gggtgagacaatatatcgacg	400	101	
		反向	gggcatcgcaccggtgag	400		
		探针	FAM-caccggccaaattcgctcttagccgt-BHQ1	200		
	T45	正向	caatggacacatgaattatgc	400	123	
		反向	gactctgtatgaactgttcgc	400		
		探针	FAM-tagaggacctaacagaactcgccgt-BHQ1	200		
	73496	正向	gttcttctcttcatagctcattacagtttt	600	84	
		反向	caaacctccatagagttcaacatcttaa	600		
		探针	FAM-ttagttagatcaggatattctt-MGB	250		

表 A.1（续）

物种	内标准基因或品系	引物/探针	序列(5′-3′)	终浓度（nM）	产物大小/bp	备注
油菜	Topas19/2	正向	gttgcggttctgtcagttcc	400	95	
		反向	cgaccggcgctgatatatga	400		
		探针	FAM-tcccgcgtcatcggcgg-BHQ1	200		
	MON88302	正向	tccttgaaccttattttatagtgcaca	450	101	
		反向	tcagattgtcgtttcccgccttca	450		
		探针	FAM-tagtcatcatgttgtaccacttcaaacact-BHQ1	200		
	OXY-235	正向	ctaacttttggtgtgatgatgctga	500	124	
		反向	cgatagatggtggtgtgagtcttg	500		
		探针	FAM-agctgatggcaagttaatctccccgaagtcg-BHQ1	250		
大豆	Lectin	正向	ccagcttcgccgcttccttc	650	74	内标准基因
		反向	gaaggcaagcccatctgcaagcc	650		
		探针	FAM-cttcaccttctatgcccctgacac-BHQ1	180		
	GTS40-3-2	正向	ttcattcaaaataagatcatacatacaggtt	150	84	
		反向	ggcatttgtaggagccacctt	150		
		探针	FAM-ccttttccatttggg-MGBNFQ	50		
	MON87769	正向	catactcattgctgatccatgtagatt	600	87	
		反向	gcaagttgctcgtgaagttttg	600		
		探针	FAM-cccggacatgaagccatttacaattgac-BHQ1	200		
	A2704-12	正向	gcaaaaaagcggttagctcct	400	64	
		反向	attcaggctgcgcaactgtt	400		
		探针	FAM-cggtcctccgatcgcccttcc-BHQ1	200		
	A5547-127	正向	gctatttggtggcatttttcca	400	75	
		反向	cactgcggccaacttacttct	400		
		探针	FAM-cggtcctccgatcgcccttcc-BHQ1	200		
	DP305423	正向	cgtgttctctttttggctagc	550	93	
		反向	gtgaccaatgaatacataacacaaacta	550		
		探针	FAM-tgacacaaatgattttcatacaaaagtcgaga-BHQ1	100		
	DP356043	正向	gtcgaataggctaggtttacgaaaaa	750	99	
		反向	tttgatattcttggagtagacgagagtgt	750		
		探针	FAM-ctctagagatccgtcaacatggtggagcac-BHQ1	200		
	FG72	正向	agatttgatcgggctgcagg	400	70	
		反向	gcacgtattgatgaccgcatta	400		
		探针	FAM-aatgtggttcatccgtctt-MGBNFQ	200		

表 A.1（续）

物种	内标准基因或品系	引物/探针	序列(5′-3′)	终浓度(nM)	产物大小/bp	备注
大豆	MON89788	正向	tcccgctctagcgcttcaat	150	139	
		反向	tcgagcaggacctgcagaa	150		
		探针	FAM-ctgaaggcgggaaacgacaatctg-BHQ1	50		
	MON87705	正向	ttcccggacatgaagccatttac	450	86	
		反向	acaacggtgccttggcccaaag	450		
		探针	FAM-aagagactcagggtgttgttatcactgcgg-BHQ1	250		
	MON87701	正向	tggtgatatgaagatacatgcttagcat	600	89	
		反向	cgtttcccgccttcagtttaaa	600		
		探针	FAM-tcagtgtttgacacacacactaagcgtgcc-BHQ1	250		
	CV127	正向	aacagaagtttccgttgagctttaagac	400	88	
		反向	cattcgtagctcggatcgtgtac	400		
		探针	FAM-tttggggaagctgtcccatgccc-BHQ1	100		
	MON87708	正向	tcatactcattgctgatccatgtag	300	91	
		反向	agaacaaattaacgaaaagacagaacg	300		
		探针	FAM-tcccggacttagctcaaaatgcatgta-BHQ1	150		
	DAS68416-4	正向	gtacattaaaaacgtccgcaatgtgt	550	130	
		反向	gtttaagaattagttcttacagtttattgttag	550		
		探针	FAM-ttaagttgtctaagcgtcaata-MGBNFQ	150		
	DAS81419	正向	tctagctatatttagcacttgatattcat	400	105	
		反向	gcttcaagatcccaacttgcg	400		
		探针	FAM-atcaacaggcaccgatgcgcaccg-BHQ1	120		
	DAS44406-6	正向	ttattgttcttgttgtttcctctttagg	300	99	
		反向	cctcaattgcgagctttctaattt	300		
		探针	FAM-attcggacctccatgatgaccttaccgtt-BHQ1	180		
	MON87751	正向	ctaaattgctctttggagtttattttgtag	500	87	
		反向	ggcctaacttttggtgtgatgatg	500		
		探针	FAM-tgactggagatctccaaagtgaggggaaa-BHQ1	300		
	SYHT0H2	正向	gggaattgggtaccatgcc	600	88	
		反向	tgtgtgccattggtttagggt	600		
		探针	FAM-ccagcatggccgtatccgcaa-BHQ1	200		
马铃薯	UGPase	正向	ggacatgtgaagagacggagc	400	88	内标准基因
		反向	cctacctctacccctccgc	400		
		探针	FAM-ctaccaccattacctcgcacctcctca-BHQ1	200		

表 A.1（续）

物种	内标准基因或品系	引物/探针	序列(5′-3′)	终浓度(nM)	产物大小/bp	备注
马铃薯	EH92-527-1	正向	gtgtcaaaacacaatttacagca	300	134	
		反向	tcccttaattctccgctcatga	300		
		探针	FAM-agattgtcgtttcccgccttcagtt-BHQ1	160		
甜菜	GS	正向	gacctccatattactgaaaggaag	150	118	内标准基因
		反向	gagtaattgctccatcctgttca	150		
		探针	FAM-ctacgaagtttaaagtatgtgccgctc-BHQ1	100		
	H7-1	正向	tgggatctgggtggctctaact	400	108	
		反向	aatgctgctaaatcctgag	400		
		探针	FAM-aaggcgggaaacgacaatct-BHQ1	100		
木瓜	CHY	正向	ccatgcggatcctccca	500	74	内标准基因
		反向	catcgtagccattgtaacactagctaa	500		
		探针	FAM-ttcccttcatccattcccactcttgaga-BHQ1	200		
	Huanong No.1	正向	gacgagtacaaggagacgcc	400	174	
		反向	gttgtcactgaagcgggaag	400		
		探针	FAM-tggctgctattgggcgaatcaactac-BHQ1	200		

附 录 B
（资料性附录）
植物基因组 DNA 大小和扩增模板加入量

植物基因组 DNA 大小和实时荧光 PCR 模板加入量见表 B.1。

表 B.1 植物基因组 DNA 大小和实时荧光 PCR 模板加入量

物种名称	基因组 DNA 大小/Mb	定量下限为 0.1%时 DNA 模板最低加入量/ng（按照可准确定量的基因组 DNA 为 25 拷贝计算）
大豆	1 115	30
玉米	2 292	62.8
棉花	2 118	58
油菜	1 100	30.1
水稻(籼稻)	466	12.8
马铃薯	1 597	43.8
甜菜	507	13.9

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
转基因产品检测
实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)
检测方法
GB/T 19495.5—2018
*
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.net.cn
总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238
读者服务部:(010)68523946
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销
*
开本 880×1230 1/16 印张 1.5 字数 36 千字
2018年9月第一版 2018年9月第一次印刷
*
书号:155066·1-61162 定价 24.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107

GB/T 19495.5-2018