



中华人民共和国国家标准

GB/T 38505—2020

转基因产品通用检测方法

General detection methods of genetically modified products

2020-03-06 发布

2020-03-06 实施



国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

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、深圳市易瑞生物技术股份有限公司、辽宁出入境检验检疫局检验检疫技术中心、甘肃中商食品质量检验检测有限公司、广西出入境检验检疫局检验检疫技术中心、吉林省农业科学院、上海市计量测试技术研究院、甘肃省商业科技研究所有限公司。

本标准主要起草人:付伟、王晨光、朱鹏宇、杜智欣、魏霜、朱海、洪霞、郑秋月、付辉、何海宁、李飞武、金虹、安小苹、朱水芳、马涛、刘刚、杨光瑞、曹际娟、袁顺捷、黄文胜。

转基因产品通用检测方法

1 范围

本标准规定了转基因产品的定性检测方法。

本标准适用于水稻、玉米、大豆、油菜、马铃薯、甜菜、苜蓿等及其加工产品中转基因成分的实时荧光PCR通用检测。

本标准方法的最低检出限为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

18S rRNA 基因 18S rRNA gene

转录自18S rDNA,细胞核糖体的组分之一,作为植物内源基因。

3.2

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

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

3.3

CaMV 35S 终止子 35S terminator from *Cauliflower mosaic virus*

来自花椰菜花叶病毒(*Cauliflower mosaic virus*, CaMV)的35S终止子。

3.4

NOS 终止子 terminator of nopaline synthase gene

来自胭脂碱合成酶基因的终止子。

3.5

E9 终止子 terminator of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase small subunit

来自豌豆核酮糖1,5-二磷酸羧化酶小亚基(ribulose-1,5-biphosphate carboxylase small subunit)基因的3'端终止序列。

3.6

pat 基因 phosphinothricin acetyltransferase gene

来自绿产色链霉菌(*Streptomyces viridochromogenes*),编码膦丝菌素乙酰转移酶(phosphinothricin

acetyltransferase, PAT)。

注: *pat* 基因对除草剂草甘膦(glufosinate)具有耐受性。

3.7

***Pin* II 终止子 terminator of proteinase inhibitor II**

来自马铃薯蛋白酶抑制剂 II (proteinase inhibitor II, *Pin* II) 的终止子。

3.8

***RbcS4* 启动子 promoter of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase small subunit 1A**

来自拟南芥核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶小亚基 1A (ribulose-1,5-biphosphate carboxylase small subunit 1A, *RbcS4*) 编码基因的启动子。

3.9

DAS40278 5' 边界序列 5'-end event-specific sequence of DAS40278

DAS40278 转化体外源插入片断 5' 端与玉米基因组的连接区序列。

注: 该序列包括外源插入片段的部分载体序列和玉米基因组的部分序列。

3.10

DP305423 3' 边界序列 3'-end event-specific sequence of DP305423

DP305423 转化体外源插入片断 3' 端与大豆基因组的连接区序列。

注: 该序列包括外源插入片段的部分载体序列和大豆基因组的部分序列。

3.11

CV127 5' 边界序列 5'-end event-specific sequence of CV127

CV127 转化体外源插入片断 5' 端与大豆基因组的连接区序列。

注: 该序列包括外源插入片段的部分载体序列和大豆基因组的部分序列。

3.12

Ct 值 cycle threshold

反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。

4 试剂与材料

除另有规定外,所有试剂均为分析纯或生化试剂。试验用水符合 GB/T 6682 中一级水的规格。

4.1 实时荧光 PCR 预混液

采用经验证符合实时荧光 PCR 要求的实时荧光 PCR 预混液。

4.2 500 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠溶液(pH 8.0)

称取 18.6 g 乙二胺四乙酸二钠,加入 70 mL 水中,并用 NaOH 溶液调 pH 值至 8.0,加水定容至 100 mL。在 103.4 kPa(121 °C)条件下灭菌 20 min。

4.3 1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐溶液(pH 8.0)

称取 121.1 g 三羟甲基氨基甲烷溶解于 800 mL 水中,用盐酸调 pH 值至 8.0,加水定容至 1 000 mL。在 103.4 kPa(121 °C)条件下灭菌 20 min。

4.4 TE 缓冲液(pH 8.0)

分别量取 10 mL 1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐溶液(4.3)和 2 mL 500 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠溶液(4.2),加水定容至 1 000 mL。在 103.4 kPa(121 °C)条件下灭菌 20 min。

4.5 引物和探针

内源和外源基因或元件检测引物和探针序列见表 1。引物和探针用 TE 缓冲液或双蒸水稀释，稀释浓度见表 1。探针的 5' 端标记荧光报告基团（如 FAM、HEX 等），3' 端标记荧光淬灭基团（如 TAMRA、BHQ1 等）。

表 1 引物和探针信息表

靶标	引物名称	序列 (5'-3')	稀释终浓度/ (nmol/L)	目的片段 大小/bp
18S rRNA 内源基因	上游引物	CCTGAGAAACGGCTACCAT	400	137
	下游引物	CGTGTCAAGGATTGGGTAAT	400	
	探针	TGCGCGCCTGCTGCCTTCCT	200	
CaMV 35S 启动子	上游引物	TTCCAACCACGTCTTCAAAGC	400	95
	下游引物	GGAAGGGTCTTGCGAAGGATA	400	
	探针	CCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCC	200	
CaMV 35S 终止子	上游引物	TCACCACTCTCTCTCTACAAATCTATC	400	101
	下游引物	CAACACATGAGCGAAACCTATAA	400	
	探针	TGTGTGAGTAGTTCCCAGATAAGGGAATTAGGGT	200	
NOS 终止子	上游引物	GCATGACGTTATTTATGAGATGGG	400	97
	下游引物	TCCTAGTTTGCAGCTATATTT	400	
	探针	AGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCG	200	
<i>pat</i> 基因	上游引物	GGAGAGGAGACCAGTTGAGATTAG	400	119
	下游引物	GTGTTTGTGGCTCTGTCCTAAAG	400	
	探针	ATCACAAACCGCGGCCATATCAGCTGC	200	
<i>Pin</i> II 终止子	上游引物	GACTTGTCATCTTCTGGATTGG	400	105
	下游引物	CACACAACCTTTGATGCCACAT	400	
	探针	AGTGATTAGCATGTCACTATGTGTGCATCC	200	
E9 终止子	上游引物	TCTTGTACCATTTGTTGTGCTTGT	400	108
	下游引物	GGACCATATCATTCACTTAACCTTCTCC	400	
	探针	CGGTTTTCGCTATCGAACTGTGAAATGGAAATGG	200	
<i>RbcS4</i> 启动子	上游引物	CCACTCCACCATCACACAATTTTC	400	112
	下游引物	GGAGAGGTGTTGAGACCCTTATC	400	
	探针	ACGTGGCATTATTCCAGCGGTTCAAGCC	200	
DAS40278 5' 边界序列	上游引物	CACGAACCATTGAGTTACAATC	400	88
	下游引物	TGGTTCATTGTATTCTGGCTTTG	400	
	探针	CGTAGCTAACCTTCATTGTATTCCG	200	

表 1 (续)

靶标	引物名称	序列 (5'-3')	稀释终浓度/ (nmol/L)	目的片段 大小/bp
DP305423 3' 边界序列	上游引物	CGTGTTCTCTTTTGGCTAGC	400	93
	下游引物	GTGACCAATGAATACATAACACAAACTA	400	
	探针	TGACACAAATGATTTTCATACAAAAGTCGAGA	200	
CV127 5' 边界序列	上游引物	AACAGAAGTTTCCGTTGAGCTTTAAGAC	400	98
	下游引物	CATTCTAGCTCGGATCGTGTAC	400	
	探针	TTTGGGGAAGCTGTCCCATGCCC	200	

对于不明确是否为转基因产品的样品,应选用上述所有内源和外源基因进行检测。对于确定物种的转基因样品,应根据表 2 选用基因或元件进行检测。

表 2 确定物种选用基因或元件

物种	选用基因/元件
大豆及其加工产品	内源基因、CaMV 35S 启动子、NOS 终止子、 <i>pat</i> 基因、 <i>Pin II</i> 终止子、 <i>E9</i> 终止子、 <i>RbcS4</i> 启动子、DP305423 3' 边界序列、CV127 5' 边界序列
玉米及其加工产品	内源基因、CaMV 35S 启动子、CaMV 35S 终止子、NOS 终止子、 <i>pat</i> 基因、 <i>Pin II</i> 终止子、DAS40278 5' 边界序列
油菜及其加工产品	内源基因、CaMV 35S 启动子、CaMV 35S 终止子、NOS 终止子、 <i>E9</i> 终止子、 <i>Pin II</i> 终止子
水稻及其加工产品	内源基因、CaMV 35S 启动子、CaMV 35S 终止子、NOS 终止子
马铃薯及其加工产品	内源基因、NOS 终止子、 <i>RbcS4</i> 启动子
苜蓿及其加工产品	内源基因、NOS 终止子、 <i>E9</i> 终止子
甜菜及其加工产品	内源基因、 <i>E9</i> 终止子

5 仪器与设备

- 5.1 分析天平:感量 0.1 mg。
- 5.2 生物安全柜。
- 5.3 实时荧光 PCR 仪。
- 5.4 纯水仪。
- 5.5 涡旋振荡仪。
- 5.6 微量移液器。

6 操作步骤

6.1 抽样

按照 GB/T 19495.1 和 GB/T 19495.7 的规定执行。

6.2 制样

按照 GB/T 19495.1 和 GB/T 19495.7 的规定执行。

6.3 试样预处理

按照 GB/T 19495.1 和 GB/T 19495.3 的规定执行。

6.4 DNA 模板制备

按照 GB/T 19495.1 和 GB/T 19495.3 的规定执行。或可采用具有相同效果的植物基因组 DNA 提取试剂盒进行 DNA 模板制备。

6.5 DNA 浓度测定

采用紫外分光光度法测定 DNA 浓度,将 DNA 溶液做适当的稀释,于 260 nm 处测定其吸光度,根据测定的 OD 值计算 DNA 浓度(260 nm 处 1 OD=50 $\mu\text{g/mL}$ 双链 DNA),OD 值应该在 0.2~0.8 的范围内。于 280 nm 处测定其吸光度,根据测定的 OD 值计算 DNA 溶液的 $\text{OD}_{260\text{ nm}}/\text{OD}_{280\text{ nm}}$ 比值,比值应在 1.8~2.0。

6.6 实时荧光 PCR 检测

6.6.1 阴性对照、阳性对照和空白对照的设置

以非转基因样品为阴性对照,以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,或含有上述片段的质粒标准分子 DNA 为阳性对照,以水或 TE 缓冲液为空白对照。

6.6.2 实时荧光 PCR 反应体系

PCR 反应体系见表 3 或按照经验证符合要求的试剂盒推荐体系进行配制。每个 DNA 样品做 2 个平行管。加样时应使样品 DNA 溶液完全加入反应液中,不要黏附于管壁上,加样后应尽快盖紧管盖。

表 3 实时荧光 PCR 反应体系

试剂名称	终浓度	加样体积/ μL
实时荧光 PCR 预混液	1×	12.5
上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.4 $\mu\text{mol/L}$	1
下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.4 $\mu\text{mol/L}$	1
探针(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.2 $\mu\text{mol/L}$	0.5
DNA 模板(50 ng/ μL)	4.0 ng/ μL	2
补水至	—	25 ^a

^a 反应体系中各试剂的量可根据反应体系的总体积进行适当调整。

6.6.3 仪器设置

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。

6.6.4 PCR 反应参数

实时荧光 PCR 扩增反应参数:50 °C/2 min;95 °C/10 min;95 °C/15 s,60 °C/60 s,大于或等于 40 个循环。

注:95 °C/10 min 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 扩增试剂体系不同做调整。

6.6.5 PCR 反应运行

将 PCR 反应管依次摆放至实时荧光 PCR 仪上(上机前注意检查各反应管是否盖紧,以免荧光物质泄漏污染仪器),开始运行仪器进行实时荧光 PCR 反应。

7 结果分析

7.1 阈值设定

实时荧光 PCR 反应结束后,设置荧光信号阈值,阈值设定原则根据仪器噪声情况进行调整,以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增曲线的最高点为准。

7.2 质量控制

空白对照:内参基因检测未出现典型扩增曲线,所有外源基因检测未出现典型扩增曲线,或 C_t 值大于或等于 40。

阴性对照:内参基因检测出现典型扩增曲线,且 C_t 值小于或等于 30,所有外源基因检测未出现典型扩增曲线,或 C_t 值大于或等于 40。

阳性对照:内参基因检测出现典型扩增曲线,且 C_t 值小于或等于 30,所有外源基因检测出现典型扩增曲线,且 C_t 值小于或等于 34。

8 结果判定与表述

8.1 结果判定

测试样品全部平行反应外源基因检测未出现典型扩增曲线,或 C_t 值大于或等于 40;内源基因检测出现典型扩增曲线,且 C_t 值小于或等于 30,则可判定该样品不含所检的外源基因。

测试样品全部平行反应外源基因检测出现典型扩增曲线, C_t 值小于或等于 36,内源基因检测出现典型扩增曲线, C_t 值小于或等于 30,判定该样品含有对应的外源基因。

测试样品全部平行反应外源基因检测出现典型扩增曲线,但 C_t 值在 36~40 之间,内源基因检测 C_t 值出现典型扩增曲线,且小于或等于 30,应在排除污染的情况下重新处理样品上机检测。再次扩增后的内源基因检测出现典型扩增曲线,且 C_t 值小于或等于 30,外源基因检测出现典型扩增曲线,且 C_t 值仍小于 40,则可判定为该样品含有所检的外源基因。再次扩增后的内源基因检测出现典型扩增曲线,且 C_t 值小于或等于 30,外源基因检测未出现典型扩增曲线,或 C_t 值大于或等于 40,则可判定为该样品不含所检的外源基因。

8.2 结果表述

如下所示:

样品未检出××外源基因。

样品检出××外源基因。

9 存查样品保存期限

存查样品保存期限按照 GB/T 19495.1 中的规定执行。

10 转化体信息

本标准覆盖的转化体信息参见附录 A。



附 录 A
(资料性附录)
标准覆盖转化体信息

标准覆盖转化体信息见表 A.1。

表 A.1 标准覆盖转化体信息

编号	物种	品系	CaMV 35S 启动子	CaMV 35S 终止子	NOS 终止子	E9 终止子	RbcS4 启动子	pat 基因	Pin II 终止子	DAS40278	DP305423	CV127
1	玉米	MON810	✓									
2		NK603	✓		✓							
3		MON89034	✓		✓							
4		MON88017	✓		✓							
5		MON87460	✓		✓							
6		MON87427	✓		✓							
7		MON863	✓		✓							
8		Bt11	✓		✓			✓				
9		3272			✓							
10		5307			✓							
11		MIR604			✓							
12		GA21			✓							
13		MIR162			✓							
14		Bt176	✓	✓								
15		TC1507	✓	✓				✓				
16		59122	✓	✓				✓	✓			
17		4114	✓	✓				✓	✓			
18		T25	✓	✓				✓				
19		98140							✓			
20		VCO-01981-5		✓								
21		DAS40278								✓		
22	大豆	GTS40-3-2	✓		✓							
23		MON89788				✓						
24		MON87701					✓					
25		MON87705				✓						
26		MON87708				✓						
27		MON87769				✓						
28		MON87751					✓					
29		DP305423									✓	
30		DP356043							✓			

表 A.1 (续)

编号	物种	品系	CaMV 35S 启动子	CaMV 35S 终止子	NOS 终止子	E9 终止子	RbcS4 启动子	pat 基因	Pin II 终止子	DAS40278	DP305423	CV127
31	大豆	A5547-127	✓	✓				✓				
32		A2704-12	✓	✓				✓				
33		SYHT0H2	✓		✓			✓				
34		FG72			✓							
35		DAS44406-6						✓				
36		DAS68416-4						✓				
37		DAS81419						✓				
38		CV127										✓
39	油菜	RT73(GT73)				✓						
40		MON88302				✓						
41		73496							✓			
42		RF3			✓		✓					
43		MS8			✓		✓					
44		Topas19/2	✓	✓				✓				
45		T45	✓					✓				
46		OXY-235	✓									
47		MS1			✓							
48		RF1			✓							
49		RF2			✓							
50	甜菜	H7-1				✓						
51	苜蓿	J101				✓						
52		J163				✓						
53		KK179			✓							
54	水稻	LLRICE62	✓	✓								
55		TT51-1		✓								
56	马铃薯	AM04-1020			✓				✓			
57		EH92-527-1			✓				✓			
58		PH05-026-0048			✓		✓		✓			
59		AV-42-6-G7							✓			

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
转基因产品通用检测方法
GB/T 38505—2020

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 字数 20 千字
2020年2月第一版 2020年2月第一次印刷

书号: 155066 • 1-63712 定价 18.00 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 38505-2020