

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1202—2010
代替 SN/T 1202—2003

食品中转基因植物成分定性 PCR 检测方法

Protocol of the qualitative polymerase chain reaction for detecting
genetically modified plant components in food

2010-11-01 发布

2011-05-01 实施

中 华 人 民 共 和 国
国 家 质 量 监 督 检 验 检 疫 总 局 发 布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 SN/T 1202—2003《食品中转基因植物成分定性 PCR 检测方法》。

本标准与 SN/T 1202—2003 相比,主要技术变化如下:

- 规范了专业用语和表述方式;
- 调整了标准的适用范围(2003 年版的第 1 章;本版的第 1 章),删除了以菜籽油和棉籽油为原料的食品,删除了食品添加剂,增加了以水稻、小麦为原料的食品;
- 调整了规范性引用文件(2003 年版的第 2 章;本版的第 2 章),采用了 GB/T 19495 系列标准;
- 对待检样品的制备(2003 年版的 6.4.1;本版的 6.4.1)的表述方式重新编排,增加了特定类型样品的前处理方法;
- 对食品中 DNA 的提取,采用 CTAB 法的部分(2003 年版的 6.4.2.1 和 6.4.2.2;本版的 6.4.2.1)采用 GB/T 19495.3 中规定的方法;
- 对食品中核酸的定量(2003 年版的 6.4.3;本版的 6.4.3)采用 GB/T 19495.3 中规定的方法;
- 修改了定性 PCR 检测步骤中 PCR 扩增反应类型(2003 年版的 6.4.4;本版的 6.4.4),删除了荧光 PCR 法(参入法),增加了实时荧光 PCR 方法,并在结果判断步骤中(2003 年版的 6.5;本版的 6.5)相应增加了实时荧光 PCR 检测结果判断方法;
- 对普通 PCR 扩增反应及其结果判断(2003 年版的 6.3.14、6.4.4、6.5、表 1 和表 4;本版的 6.3.20、6.4.4.1、6.5.1、表 1、表 3 和表 4)的表述方式重新编排,修改了反应体系,增加了引物序列,并修改了确证实验方法。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位:中华人民共和国广东出入境检验检疫局、中国检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人:高东微、李丹宁、陈永红、钟玉清、张隽、董洁、徐宝梁、陈源树、谢佩心。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- SN/T 1202—2003。

食品中转基因植物成分定性 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了食品中转基因植物成分的定性 PCR 检测方法。

本标准适用于以大豆、玉米、番茄、马铃薯、水稻、小麦等农产品及其加工产品为原料生产的食品半成品和成品中转基因大豆(Roundup Ready)、玉米(176、Bt11、Mon810、T14/T25、GA21、CBH351)、番茄(1345-4、351N、5345、8338、FLAVR SAVR、BioScien、8805R、Zeneca®)、马铃薯(NewLeaf® Y、NewLeaf® Plus、NewLeaf®)、水稻(Bt63)、小麦成分的定性 PCR 检测。本标准适用的食品半成品和成品不包括调味品和食用油脂。

本标准能够检测出以大豆、玉米、番茄、马铃薯、水稻、小麦为主要原料生产的食品中 0.1% 转基因成分。

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 27025 检测和校准实验室能力的通用要求

SN/T 1204 植物及其加工产品中转基因成分实时荧光 PCR 定性检验方法

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BAR(phosphinothricin acetyltransferase gene from *Bacillus amyloliquefaciens*):淀粉液化芽孢杆菌草丁膦乙酰转移酶基因

bp(base pair):碱基对

Btc(the construct specific DNA sequence of transgenic rice event Bt63):转基因水稻品系 Bt63 结构特异性基因序列

CaMV 35S(35S promoter from cauliflower mosaic virus):花椰菜花叶病毒 35S 启动子

CTAB(hexadecyltrimethyl ammonium bromide):十六烷基三甲基溴化铵

CryIA(b)(the cryIAbl gene encoding an insecticidal crystal protein from *Bacillus thuringiensis*):编码苏云金杆菌杀虫结晶蛋白的 cryI Ab1 基因,又称 CryIA(b)基因

CryIA(b/c)[a synthetic gene encoding the insecticidal crystal protein through the fusion of CryIA(b)gene and CryIA(c)gene from *Bacillus thuringiensis*]:编码苏云金杆菌杀虫结晶蛋白的 CryIA(b)和 CryIA(c)融合基因

CryIA(c)(the cry1Acl gene encoding an insecticidal crystal protein from *Bacillus thuringiensis*): 编码苏云金杆菌杀虫结晶蛋白的 cry1Acl 基因, 又称 CryIA(c) 基因

CryⅢA(the cry3Aal gene encoding an insecticidal crystal protein from *Bacillus thuringiensis*): 编码苏云金杆菌杀虫结晶蛋白的 cry3Aal 基因, 又称 CryⅢA 基因

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

EPSPS(5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene): 5-莽草酸-3-磷酸合酶基因

FAM(6-carboxyfluorescein): 6-羧基荧光素

FMV35S(35S promoter from a modified figwort mosaic virus): 经修饰的玄参花叶病毒 35S 启动子

GOS(a root-specific rice gene highly expressed in roots from seedlings and mature plants which encodes a 14kDa protein): 编码一个 14kDa 蛋白质、在幼苗和成熟植株根部高度表达的水稻种属特异性基因

HEX(5-hexachloro-fluorescein): 5-六氯荧光素

Lectin: 植物凝集素基因

LA(linear acrylamide): 线状丙烯酰胺

NOS(terminator of nopaline synthase gene): 胭脂碱合酶基因终止子

NPTⅡ(neomycin phosphotransferaseⅡ gene or aminoglycoside-3'-phosphotransferaseⅡ gene): 新霉素磷酸转移酶基因, 也称氨基糖苷-3'-磷酸转移酶基因

PAT(phosphinothricin acetyltransferase gene): 草丁膦乙酰转移酶基因

Patatin(the gene encoding an approximately 40-kDa glycoprotein which constitutes up to 40% of the soluble potato tuber protein): 编码一种分子量约 40kDa 的糖蛋白的基因, 该糖蛋白占马铃薯块茎贮藏蛋白 40%

PG(polygalacturonase gene): 多聚半乳糖醛酸酶基因

PLD(rice specific phospholipase D gene): 水稻特异性磷脂酶 D 基因

SPS(rice specific sucrose phosphate synthase gene): 水稻特异性蔗糖磷酸合酶基因

PVY-cp(potato Y virus coat protein gene): 马铃薯 Y 病毒外壳蛋白基因

ROX(carboxy-X-rhodamine): 羧基-X-罗丹明

Taq(*Thermus aquaticus*): 水生栖热菌

TAMRA(carboxy-tetramethyl-rhodamine): 羧基四甲基罗丹明

TE: Tris-HCl、EDTA 缓冲液

tRNA^{Leu}: 叶绿体亮氨酸转运核糖核酸基因

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

UNG 酶(Uracil-N-glycosylase): 尿嘧啶 DNA-糖基化酶

ZEIN: 玉米醇溶蛋白基因。

4 防止污染措施

防止污染措施应符合 GB/T 19495.2 的规定。

5 抽样与制样

抽样与制样方法应符合 GB/T 19495.7 和 GB/T 19495.3 中的相关规定。

6 测定方法

6.1 原理

对样品进行 DNA 提取和纯化,使之适用于 PCR 检测技术,通过普通 PCR 或实时荧光 PCR,检测其中是否含有各种外源基因,达到对食品中转基因植物成分定性 PCR 检测的目的。

6.2 主要仪器

- 6.2.1 均质器(可拆卸、可清洗、可高压灭菌)或研钵。
- 6.2.2 电子天平:感量 0.001 g。
- 6.2.3 高速冷冻离心机(最高转速 55 000g)。
- 6.2.4 台式离心机(最高转速 15 000g)。
- 6.2.5 微型个人离心机。
- 6.2.6 双温水浴(37 °C±1 °C、65 °C±1 °C)。
- 6.2.7 制冰机。
- 6.2.8 涡旋振荡器。
- 6.2.9 冰箱(2 °C~8 °C、-20 °C、-80 °C)。
- 6.2.10 超纯水发生器(分子生物学级别)。
- 6.2.11 双蒸水器。
- 6.2.12 生物安全柜。
- 6.2.13 高压灭菌锅。
- 6.2.14 核酸真空干燥系统。
- 6.2.15 核酸蛋白分析仪。
- 6.2.16 PCR 仪。
- 6.2.17 实时荧光 PCR 仪。
- 6.2.18 电泳仪。
- 6.2.19 凝胶成像仪。
- 6.2.20 微量可调移液器及配套吸头(2.5 μL~10 μL、2 μL~20 μL、10 μL~100 μL、50 μL~200 μL、100 μL~1 000 μL、500 μL~5 000 μL)。
- 6.2.21 离心管(1.5 mL、2 mL、15 mL、50 mL)。
- 6.2.22 光化学 PCR 反应管。

6.3 主要试剂

- 6.3.1 除另有规定外,所有实验使用的试剂等级应为不含 DNA 和 DNase 的分析纯或生化试剂。条件许可的情况下推荐使用优级纯试剂。试剂的选购、验收、贮存应符合 GB/T 27025 的规定。
- 6.3.2 实验用水:应符合 GB/T 6682 中一级水的规格。去离子水电阻应达到 18.2 Ω。
- 6.3.3 琼脂糖。
- 6.3.4 RNase A 酶溶液:冻干品,不含 DNase,用高压灭菌的去离子水或双蒸水溶解为 10 g/L 的溶液,分装后于 -20 °C 保存,避免反复冻融。
- 6.3.5 CTAB-1 提取缓冲液:CTAB 20 g/L,氯化钠 81.9 g/L,Tris 12.1 g/L,Na₂-EDTA 7.5 g/L,PVP-40 20 g/L,pH 8.0,高压灭菌。使用前加入终浓度为 2% 的 β-巯基乙醇。
- 6.3.6 CTAB-2 提取缓冲液:CTAB 20 g/L,氯化钠 81.9 g/L,Tris 12.1 g/L,Na₂-EDTA 7.5 g/L,pH 8.0,高压灭菌。

- 6.3.7 CTAB 沉淀液:CTAB 5 g/L,氯化钠 2.5 g/L,pH 8.0,高压灭菌。
- 6.3.8 氯化钠溶液:1.2 mol/L。
- 6.3.9 蛋白酶 K 溶液:冻干品,用高压灭菌的去离子水或双蒸水溶解为 20 mg/mL 的溶液,分装后于 -20 °C 保存,避免反复冻融。
- 6.3.10 淀粉酶溶液:冻干品,用高压灭菌的去离子水或双蒸水溶解为 10 mg/mL 的溶液,分装后于 -20 °C 保存,避免反复冻融。
- 6.3.11 TE 缓冲液:Tris 1.21 g/L,Na₂-EDTA 0.372 g/L,pH 8.0。
- 6.3.12 无水乙醇、异丙醇等有机试剂。
- 6.3.13 商品化植物基因组 DNA 提取纯化试剂盒。
- 6.3.14 10×PCR 缓冲液:氯化钾 100 mmol/L,硫酸铵 160 mmol/L,硫酸镁 20 mmol/L,Tris-HCl (pH 8.8)200 mmol/L,Triton X-100 1%,BSA 1 mg/mL。
- 6.3.15 氯化镁溶液:2.5 mmol/L。
- 6.3.16 dNTP 溶液(dGTP、dCTP、dATP、dTTP 或 dUTP):各 2.5 mmol/L。
- 6.3.17 *Taq* 酶。
- 6.3.18 UNG 酶(以 dUTP 代替 dTTP 时)。
- 6.3.19 50×TAE 电泳缓冲液或 5×TBE 电泳缓冲液:50×TAE 电泳缓冲液(pH8.5):Tris 242 g/L,冰乙酸 57.1 mL/L,EDTA 0.1 mol/L;5×TBE 电泳缓冲液:Tris 54 g/L,硼酸 275 g/L,EDTA (pH8.0)0.01 mol/L。
- 6.3.20 10×电泳上样缓冲液:Ficoll 400 20%,EDTA(pH8.0)0.1 mol/L,SDS 1.9%,溴酚蓝 0.25%,二甲苯青 0.25%。
- 6.3.21 引物和探针:食品中转基因植物成分定性 PCR 检测所用引物序列和探针序列见表 1 和表 2。

表 1 食品中转基因植物成分普通 PCR 检测所用引物序列

检测基因 ^a	引物序列	PCR 产物大小/bp	备注
Lectin	5'-gccctctactcaccatcc-3' 5'-gcccatctgcaagcctttgtg-3'	118	大豆内源基因
IVR	5'-ccgtgtatcacagggtggtacc-3' 5'-ggagcccggttagagcatgacatc-3'	226	玉米内源基因
ZEIN	5'-tgaacctgcatgcagc-3' t'-ggcaagaccattggtga-3'	173	玉米内源基因
Patatin	5'-tgacctggacaccagttat-3' 5'-gtggatttcaggagtcttcga-3'	216	马铃薯内源基因
PG	5'-ggatccttagaagcatctagt-3' 5'-cgttggtgcatccctgcatgg-3'	383	番茄内源基因
GAG56D	5'-ccaacaacaaccagttca-3' 5'-tggcctggacgagagtacct-3'	328	小麦属内源基因
Wx012	5'-gtcgcgggaacagaggtgt-3' 5'-ggtgttctccattgcgaaa-3'	102	小麦内源基因
tRNA ^{Leu}	5'-cgaaatcggtagacgctacg-3' 5'-ttccattgagtctctgcacct-3'	180	高等植物内源基因

1) UNG 酶在活化条件下可以降解含有 dU 的双链或单链 DNA。在 PCR 扩增反应液中加入 UNG 酶可以有效防止以前以 dUTP 代替 dTTP 合成的 PCR 扩增产物所致的遗留污染。

表 1(续)

检测基因 ^a	引物序列	PCR产物大小/bp	备注
CaMV35S	5'-gctectacaaatgccatca-3' 5'-gatagtgggattgtgcgtca-3'	195	筛选检测转基因大豆、玉米、番茄、马铃薯
FMV35S	5'-aagacatccaccgaagactta-3' 5'-aggacagctctttccacgtt-3'	210	筛选检测转基因番茄、马铃薯
	5'-aagcctcaacaaggtcag-3' 5'-ctgctcgatgttgacaag-3'	196	
NOS	5'-gaatcctgttgcgggtctt-3' 5'-ttatcctagtttggcgcta-3'	180	筛选检测转基因大豆、玉米、番茄、马铃薯、小麦
	5'-atcgttcaaacattggca-3' 5'-attgctgggactctaatacata-3'	165	
NPT II	5'-ctcacttgcctcctccgaga-3' 5'-cgccttgagcctggcggacag-3'	215	筛选检测转基因玉米、番茄、马铃薯
PAT	5'-gtcgacatgtctccggagag-3' 5'-gcaaccaaccaagggtatc-3'	191	筛选检测转基因大豆、玉米
BAR	5'-acaagcacggtcaactcc-3' 5'-actcggcgcctccagtcgta-3'	175	筛选检测转基因玉米、小麦
35S/Petu	5'-tgatgtgatctcactgacg-3' 5'-tgtatcccttgagccatgtgt-3'	171	转基因大豆
HSP70/ CryIA(b)	5'-agtttctttttgttctctct-3' 5'-gatgtttgggtgtgtgccat-3'	194	转基因玉米
CDPK/ CryIA(b)	5'-ctctcgccttcatgttctg-3' 5'-ggtcaggtcaggctgatgt-3'	211	转基因玉米
PAT/ CaMV35S!	5'-atggtggatggcatgatgtt-3' 5'-tgagcgaaaacctataagaacc-3'	209	转基因玉米
CaMV35S /PAT	5'-ccttcgaagaccttctctata-3' 5'-agatcatcaatccactcttgggtg-3'	231	转基因玉米
CaMV35S /Cry9C	5'-ccttcgaagaccttctctata-3' 5'-gtagctgtcgggtgtagtctct-3'	170	转基因玉米
Cry9C/ CaMV35S!	5'-tactacatcgaccgcatcga-3' 5'-cctaattcccttatctggga-3'	171	转基因玉米
P actin 1/ mEPSPS	5'-tctgatctttggccttggtta-3' 5'-tgcagcccagcttatctctta-3'	430	转基因玉米
OTP/ mEPSPS	5'-acggtggaagagttcaatgtatg-3' 5'-tctccttgatgggctgca-3'	270	转基因玉米
CaMV35S/PG	5'-ccaactgacgtaagggatgacg-3' 5'-aggggaaagtggaaaaccatc-3'	383 和 180 ^b	转基因番茄
PG/NOS	5'-ggatccttagaagcatctagt-3' 5'-catcgcaagaccggcaacag-3'	350	转基因番茄

表 1(续)

检测基因 ^a	引物序列	PCR 产物大小/bp	备 注
CryIAc	5'-gttcagctacagctacctcc-3' 5'-ccaactaaagtttctaaccacccac-3'	119	转基因番茄
ACCD(EFE)	5'-aacagacaaaaataggcgg-3' 5'-ccaaacgtaaacggcttg-3'	108	转基因番茄
PLRVrep	5'-tcgtcattaaacttgacgac-3' 5'-cttcttcacggagtccag-3'	172	转基因马铃薯
PVY-cp	5'-gaatcaaggctatcacgtcc-3' 5'-catccgactgcctcatacc-3'	161	转基因马铃薯
Cry III A	5'-agagccgtcgcaaacaccaatc-3' 5'-tctgggtgctggcctcatcg-3'	112	转基因马铃薯

^a 食品中转基因植物成分普通 PCR 检测,应根据食品成分来源,确定检测基因的种类和选择相应的引物序列。
^b 转基因番茄 Zeneca[®]的基因组 DNA 使用该对引物进行普通 PCR 反应可以同时扩增出 383 bp 和 180 bp 两个不同大小的 DNA 片段;非转基因番茄的基因组 DNA 只能扩增出 383 bp 大小的 DNA 片段。

表 2 食品中转基因植物成分实时荧光 PCR 检测所用引物序列和探针序列

检测基因 ^a	引物序列	探针序列	备 注
Lectin	5'-cctcctcgggaaagttaca-3'	5'-ccctcgtctcttggtcgcgccctct-3'	大豆内源基因
	5'-gggcatagaaggtgaagt-3'		
ZEIN	5'-tgaacccatgcatgcagt-3'	5'-tggcgtgtccgtccctgatgc-3'	玉米内源基因
	5'-ggcaagaccattggtga-3'		
GOS	5'-ttagcctcccctgcaga-3'	5'-cggcagtggtgtggtttcttcgg-3'	水稻内源基因
	5'-agagtcacaaagtgtccc-3'		
SPS	5'-ttgcctgaacggatat-3'	5'-gacgcacggacgacggctcga-3'	水稻内源基因
	5'-cggttgatctttcgggatg-3'		
PLD	5'-tggtgagcgttttcagctct-3'	5'-tgttgctgctccaatgtggcctg-3'	水稻内源基因
	5'-ctgatccactagcaggaggtcc-3'		
GAG56D	5'-caacaattttcagcccaaca-3'	5'-ttcccagcccaacaaccgc-3'	小麦属内源基因
	5'-ttcttgcatgggttcacctgt-3'		
Wx012	5'-gtcgcgggaacagaggtgt-3'	5'-caaggcggcgaataagtgcc-3'	小麦内源基因
	5'-ggtgttccctcattgcgaaa-3'		
tRNA ^{Leu}	5'-cgaatcggtagacgctacg-3'	5'-gcaatcctgagccaaatcc-3'	高等植物内源基因
	5'-ttccattgagtctctcacct-3'		
CaMV35S	5'-cgacagtggcccaaga-3'	5'-tggacccccaccacgaggagcatc-3'	筛选检测转基因大豆、玉米、番茄、马铃薯
	5'-aagacgtggttgaacgtcttc-3'		

表 2 (续)

检测基因 ^a	引物序列	探针序列	备注
FMV35S	5'-aagacatccaccgaagactta-3'	5'-tggccccacaagccagctgctcga-3'	筛选检测转基因 番茄、马铃薯
	5'-aggacagctctttccacgtt-3'		
NOS	5'-atcgttcaaacatttgca-3'	5'-catcgaagaccggcaacagg-3'	筛选检测转基因 大豆、玉米、番茄、 马铃薯、水稻、小麦
	5'-attgcgggactctaata-3'		
NPT II	5'-aggatctcgtcgtagccat-3'	5'-caccagccggccacagtcgat-3'	筛选检测转基因 玉米、番茄、马铃薯
	5'-gcacgaggaagcggta-3'		
Bar	5'-acaagcacggtcaactcc-3'	5'-ccgagcccggaaccgcaggag-3'	筛选检测 转基因玉米、小麦
	5'-actcgccgctccagtcga-3'		
PAT	5'-gtcagatgtctccggagag-3'	5'-tggecgcggtttgtgatcgttaa-3'	筛选检测 转基因大豆、玉米
	5'-gcaaccaaccaagggtatc-3'		
EPSPS	5'-ccgacgccgatcaccta-3'	5'-ccgctgccgatggcctccga-3'	转基因大豆
	5'-gatccggcggtgttgag-3'		
CryIA(b)	5'-cgcgactggatcaggtaca-3'	5'-ccgccgcgagctgacctgacctg-3'	转基因玉米
	5'-tggggaacaggtcacgat-3'		
Cry3A	5'-tccggttacgaggttctt-3'	5'-acctatgctcaagtgccaacacc-3'	转基因马铃薯
	5'-ccatagattgagcgtccta-3'		
CryIA(b/c)	5'-gggaaatgcgtattcaattcaac-3'	5'-acatgaacagcgcttgaccacagc-3'	转基因水稻
	5'-ttctggactgcaacaatgg-3'		
Btc	5'-gactgctggagtattatcgacaga-3'	5'-tcgagttcattccagttactgcaacactcgag-3'	转基因水稻
	5'-agctcggtacctgacttattcag-3'		
	5'-atgctggcggcgctgttctg-3'		

^a 食品中转基因植物成分实时荧光 PCR 定性检测,应根据食品成分来源,确定检测基因的种类和选择相应的引物和探针序列。具体方法可按照 SN/T 1204 中有关的规定。

6.4 检测步骤

6.4.1 对照设置

检测过程中应设置核酸提取空白对照、PCR 扩增试剂空白对照、PCR 扩增阴性目标 DNA 对照、PCR 扩增阳性目标 DNA 对照,具体方式按照 GB/T 19495.2 中的相关规定。

6.4.2 待检样品的制备

6.4.2.1 器具清洁和灭菌

所有制备样品使用的器具在使用前应充分清洗或使用一次性用品,可经过 121 °C、30 min 高压灭菌。

6.4.2.2 样品前处理

加工食品可能富含盐、糖、植物色素和发酵产生的有色物质等,会影响下游实验操作,应通过洗涤方式的样品前处理尽量去除样品中的盐、糖和色素。取适量样品加入 50 mL 离心管,加入约 2 倍体积的双蒸水,上下颠倒充分混匀,7 200g 离心 5 min 并弃去上清液,重新加入约 2 倍体积的双蒸水,上下颠倒混匀,7 200g 离心 5 min 并弃去上清液;重复洗涤操作步骤 3 次~5 次。乳浊或悬浊状的液体食品样品,如茄汁、番茄酱(稀)、豆奶、豆浆等,可以通过物理方式破坏胶体稳定性并分离、浓缩。取适量样品加入 2mL 离心管,7 200g 离心 5 min 并弃去上清液;再次加入适量样品,7 200g 离心 5 min 并弃去上清液;重复上述操作步骤 3 次~5 次。

6.4.2.3 样品均质

采用均质器、搅拌机、研钵等实验器具对样品进行均质处理。

6.4.3 DNA 提取和纯化

6.4.3.1 空白对照的设置

DNA 提取和纯化过程应设置核酸提取空白对照,具体方式按照 GB/T 19495.2 中相关规定进行。

6.4.3.2 DNA 溶液的保存

提取和纯化后的 DNA 溶液长期保存应储存 -20°C 或低于 -20°C 。

6.4.3.3 CTAB 法

按照 GB/T 19495.3 中规定的方法进行。

6.4.3.4 试剂盒法

采用商品化的植物基因组 DNA 提取纯化试剂盒,按照试剂盒使用说明提取 DNA。

6.4.4 DNA 定量

DNA 定量方法按照 GB/T 19495.3 中相关规定进行。

6.4.5 定性 PCR 检测

6.4.5.1 对照设置

PCR 检测过程中应设置 PCR 扩增试剂空白对照、PCR 扩增阴性目标 DNA 对照、PCR 扩增阳性目标 DNA 对照,并对 DNA 提取和纯化过程中设置的核酸提取空白对照同时进行 PCR 检测,具体方式按照 GB/T 19495.2 中相关规定。

6.4.5.2 PCR 分类

食品中转基因植物成分的定性 PCR 检测,按照 PCR 反应类型,分为普通 PCR 检测和实时荧光 PCR 检测。普通 PCR 检测阳性结果应进一步进行确证实验,实时荧光 PCR 检测阳性结果无需进行其他确证实验。

6.4.5.3 内源基因检测

为降低检测成本、避免无效操作,定性 PCR 检测时可先进行内源基因检测,检测结果阳性表明从样

品中提取出适宜进行 PCR 检测的 DNA, 可以进行外源基因检测; 否则表明未能从样品中提取出适宜进行 PCR 检测的 DNA, 应重新进行 DNA 提取和纯化。

6.4.5.4 普通 PCR 检测

6.4.5.4.1 适用范围

普通 PCR 检测适用于 DNA 破碎程度较低、DNA 含量较高的食品样品, 如食品原料和粗加工食品。

6.4.5.4.2 普通 PCR 反应体系

普通 PCR 反应体系见表 3。每个样品进行普通 PCR 检测时应设置 2 个平行。

表 3 普通 PCR 反应体系

试 剂	反应体系中的终浓度
10×PCR 缓冲液(不含氯化镁)	1×
氯化镁溶液(25 mmol/L)	2.5 mmol/L
dNTP 溶液(各 2.5 mmol/L)	各 0.2 mmol/L
UNG 酶	0.075 U
正向引物(20 μmol/L)	0.2 μmol/L
反向引物(20 μmol/L)	0.2 μmol/L
Taq 酶	2.5 U
DNA 模板(100 ng/μL)	3.0 μL
补水至	50 μL

注 1: UNG 酶在活化条件下可以降解含有 dU 的双链或单链 DNA。在 PCR 扩增反应液中加入 UNG 酶, 可以有效防止以前以 dUTP 代替 dTTP 合成的 PCR 扩增产物所致的遗留污染。实验室如果选择采用 UNG 酶作为防止污染措施, 可在每次 PCR 反应的反应体系中以 dUTP 代替 dTTP 并加入 UNG 酶; 否则, 反应体系中不必加入 UNG 酶, dNTP 溶液为 dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP 的混合物。

注 2: 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。

6.4.5.4.3 普通 PCR 反应循环参数

普通 PCR 反应循环参数见表 4。使用不同 PCR 仪, 可对参数作适当调整。

表 4 普通 PCR 反应循环参数

检测基因	反应循环参数
Lectin	95 °C 预变性 5 min。95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 35 个循环。72 °C 延伸 3 min。4 °C 保存
IVR ZEIN	95 °C 预变性 5 min。95 °C 变性 30 s, 64 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 35 个循环。72 °C 延伸 10 min。4 °C 保存
Patatin PVY-cp	94 °C 预变性 3 min。94 °C 变性 40 s, 55 °C 退火 60 s, 72 °C 延伸 60 s, 35 个循环。72 °C 延伸 5 min。4 °C 保存

表 4 (续)

检测基因	反应循环参数
PG	94 °C 预变性 3 min。94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 30 个循环。72 °C 延伸 5 min。4 °C 保存
GAG56D	94 °C 预变性 5 min。94 °C 变性 30 s, 61 °C 退火 60 s, 72 °C 延伸 90 s, 35 个循环。72 °C 延伸 10 min。4 °C 保存
Wx012	95 °C 预变性 10 min。95 °C 变性 30 s, 63 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 40 个循环。72 °C 延伸 7 min。4 °C 保存
tRNA ^{Leu}	94 °C 预变性 4 min。95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 30 个循环。72 °C 延伸 5 min。4 °C 保存
CaMV35S NOS 35S/Petu	94 °C 预变性 3 min。94 °C 变性 20 s, 54 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 60 s, 40 个循环。72 °C 延伸 3 min。4 °C 保存
FMV35S	95 °C 预变性 5 min。94 °C 变性 20 s, 60 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 40 s, 40 个循环。72 °C 延伸 3 min。4 °C 保存
NPT II	94 °C 预变性 5 min。94 °C 变性 60 s, 58 °C 退火 60 s, 72 °C 延伸 60 s, 35 个循环。72 °C 延伸 7 min。4 °C 保存
PAT BAR	94 °C 预变性 2 min。94 °C 变性 40 s, 56 °C 退火 60 s, 72 °C 延伸 60 s, 35 个循环。72 °C 延伸 5 min。4 °C 保存
HSP70/CryIA(b) CDPK/CryIA(b) PAT/CaMV35S! CaMV35S/PAT CaMV35S/Cry9C Cry9C/CaMV35S! Pactin 1/mEPSPS OTP/mEPSPS	94 °C 预变性 2 min。94 °C 变性 40 s, 55 °C 退火 60 s, 72 °C 延伸 60 s, 35 个循环。72 °C 延伸 5 min。4 °C 保存
CaMV35S/PG PG/NOS	95 °C 预变性 5 min。94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 60 s, 72 °C 延伸 60 s, 35 个循环。72 °C 延伸 6 min。4 °C 保存
CryIAc	94 °C 预变性 10 min。94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 60 s, 40 个循环。72 °C 延伸 5 min。4 °C 保存
ACCD(EFE)	95 °C 预变性 10 min。94 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 60 s, 40 个循环。72 °C 延伸 5 min。4 °C 保存
PLRVrep CryIII A	94 °C 预变性 3 min。94 °C 变性 40 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 45 s, 35 个循环。72 °C 延伸 7 min。4 °C 保存

6.4.5.4.4 普通 PCR 扩增产物的凝胶电泳检测

用 1×TAE 或 1×TBE 电泳缓冲液制备 2% 的琼脂糖凝胶, 在凝胶 55 °C~60 °C 时加入 EB 至终浓度 0.5 μg/mL 或其他染色剂至其要求的工作浓度。将 PCR 扩增产物与上样缓冲液混合, 混合后上样

缓冲液浓度为 1×。将混合物点样,并根据 PCR 扩增目标片段大小选择合适的 DNA 分子量标记点样。8 V/cm~10 V/cm 恒压电泳 20 min~40 min。用凝胶成像仪观察、记录并分析结果。

6.4.5.4.5 确证实验

普通 PCR 扩增产物经凝胶电泳检测为阳性结果的,还应通过下列的方法之一进行确证:

- 用特异 DNA 探针进行杂交;
- PCR 产物的限制性内切酶酶切分析;
- PCR 产物序列测定;
- 实时荧光 PCR 检测(采用 6.4.4.2 的方法);
- 其他验证方法。

6.4.5.5 实时荧光 PCR 检测

6.4.5.5.1 适用范围

实时荧光 PCR 检测适用于 DNA 破碎程度较高、DNA 含量较低的食品样品,如食品成品和深加工食品。

6.4.5.5.2 实时荧光 PCR 反应体系。实时荧光 PCR 反应体系见表 5。每个样品进行实时荧光 PCR 检测时应设置 2 个平行。

表 5 实时荧光 PCR 反应体系

试 剂	反应体系中的终浓度
10×PCR 缓冲液(不含氯化镁)	1×
氯化镁溶液(25 mmol/L)	2.5 mmol/L
dNTP 溶液(各 2.5 mmol/L)	各 0.2 mmol/L
UNG 酶	0.075 U
正向引物(20 μmol/L)	0.2 μmol/L
反向引物(20 μmol/L)	0.2 μmol/L
探针(10 μmol/L)	0.1 μmol/L
Taq 酶	2.5 U
DNA 模板(100 ng/μL)	3.0 μL
补水至	50 μL

注 1: UNG 酶在活化条件下可以降解含有 dU 的双链或单链 DNA。在 PCR 扩增反应液中加入 UNG 酶,可以有效防止以前以 dUTP 代替 dTTP 合成的 PCR 扩增产物所致的遗留污染。实验室如果选择采用 UNG 酶作为防止污染措施,可在每次 PCR 反应的反应体系中以 dUTP 代替 dTTP 并加入 UNG 酶;否则,反应体系中不必加入 UNG 酶,dNTP 溶液为 dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP 的混合物。

注 2: 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。

6.4.5.5.3 实时荧光 PCR 反应循环参数

实时荧光 PCR 反应循环参数见表 6。使用不同 PCR 仪,可对参数作适当调整。

表 6 实时荧光 PCR 反应循环参数²⁾

作用	时间/s	温度/°C
去污染	120	50
活化 DNA 合成酶和预变性	600	95
PCR(40 个循环)		
变性	15	95
延伸	60	60
注：反应体系中不使用 UNG 酶时，反应参数仍按照表中条件。		

6.4.5.5.4 仪器检测通道的选择

设置 PCR 反应管荧光信号收集条件，应与探针标记的报告基因一致。具体设置方法可参照仪器使用说明书。

6.5 结果判断

6.5.1 普通 PCR 检测结果判断

6.5.1.1 质量控制

6.5.1.1.1 基本原则

实验中设置的各种对照 PCR 扩增产物凝胶电泳检测结果应符合以下情况。否则，任一种对照如果出现非 6.5.1.1.2~6.5.1.1.4 所述正常结果，应重做实验。

6.5.1.1.2 核酸提取空白对照和 PCR 扩增试剂空白对照

内源基因检测结果阴性，外源基因检测结果阴性。

6.5.1.1.3 PCR 扩增阴性目标 DNA 对照

内源基因检测结果阳性，外源基因检测结果阴性。

6.5.1.1.4 PCR 扩增阳性目标 DNA 对照

内源基因检测结果阳性，外源基因检测结果阳性。

6.5.1.2 结果判断

6.5.1.2.1 样品内源基因检测结果阴性，表明未能从样品中提取出适宜进行普通 PCR 检测的 DNA 或所提取的 DNA 中存在 PCR 反应抑制因子，应重新提取 DNA。

6.5.1.2.2 样品内源基因检测结果阳性，外源基因检测结果阴性，表明从样品中提取出适宜进行普通 PCR 检测的 DNA，可以判断样品中未检出×××基因。

6.5.1.2.3 样品内源基因检测结果和外源检测结果均为阳性，表明从样品中提取出适宜进行普通 PCR 检测的 DNA，且样品 DNA 中可能含有×××基因，应进一步进行确证实验。确证实验结果阳性，可以判断样品中检出×××基因。否则，可以判断样品中未检出×××基因。

2) ABI Prism 7700/7900 SDS 仪器默认反应参数。给出这一信息是为了方便本标准的使用者，并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果，则可使用这些等效产品。

6.5.2 实时荧光 PCR 检测结果判断³⁾

6.5.2.1 基线和阈值的设置

实时荧光 PCR 反应结束并分析结果时,应设置基线和阈值。基线范围设置在 3 个~15 个循环。基线阈值设置在基线刚好超过正常阴性目标 DNA 对照扩增曲线最高点且 $C_t=40$,通常情况下可以采用仪器默认的基线阈值,即采用 3 个~15 个循环的阴性目标 DNA 对照的 10 倍标准差作为阈值。

6.5.2.2 质量控制

6.5.2.2.1 基本原则

实验中设置的各种对照 PCR 检测结果应符合以下情况。否则,任一种对照如果出现非下述正常结果,应重做实验。

6.5.2.2.2 核酸提取空白对照和 PCR 扩增试剂对照空白对照

外源基因检测结果 $C_t \geq 40$,内源基因检测结果 $C_t \geq 40$ 。

6.5.2.2.3 PCR 扩增阴性目标 DNA 对照

外源基因检测结果 $C_t \geq 40$,内源基因检测结果 $20 \leq C_t \leq 36$ 。

6.5.2.2.4 PCR 扩增阳性目标 DNA 对照

外源基因检测结果 $C_t \leq 36$ 。

6.5.2.3 结果判断和表述

6.5.2.3.1 样品外源基因 2 个平行样检测结果 $C_t \geq 40$,内源基因检测 $20 \leq C_t \leq 36$ 并出现典型的扩增曲线,同时各种实验对照结果正常,此时可以判断样品未检出 $\times \times \times$ 基因,结果表述为未检出 $\times \times \times$ 基因。

6.5.2.3.2 样品外源基因至少 1 个平行样检测结果 $36 < C_t < 40$ 并出现典型的扩增曲线,内源基因检测 $20 \leq C_t \leq 36$ 并出现典型的扩增曲线,同时各种实验对照结果正常,此时应适当增加 DNA 模板量后重做实时荧光 PCR 检测。再次检测结果外源基因仍然 $C_t < 40$ 并出现典型的扩增曲线,同时各种实验对照结果正常,可以判断样品检出 $\times \times \times$ 基因;再次检测结果外源基因 $C_t \geq 40$,同时各种实验对照结果正常,可以判断样品未检出 $\times \times \times$ 基因,结果表述为未检出 $\times \times \times$ 基因。

6.5.2.3.3 待测样品外源基因 2 个平行样检测结果 $C_t \leq 36$ 并出现典型的扩增曲线,内源基因检测 $20 \leq C_t \leq 36$ 并出现典型的扩增曲线,同时各种实验对照结果正常,此时可以判断样品检出 $\times \times \times$ 基因,结果表述为未检出 $\times \times \times$ 基因。

3) ABI Prism 7700/7900 SDS 仪器检测结果判断方法示例。给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效产品。