



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2705—2010

调味品中转基因植物成分 实时荧光 PCR 定性检测方法

Protocol of the Real-time Fluorescence qualitative polymerase chain reaction
for detecting genetically modified plant components in condiments

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、北京望尔生物技术有限公司。

本标准主要起草人：李丹宁、高东微、钟玉清、张隼、万宇平、蔡颖、谢佩心、陈源树、庄逸林、冯才伟、钟国强、马骏。

调味品中转基因植物成分 实时荧光 PCR 定性检测方法

1 范围

本标准规定了调味品中转基因植物成分实时荧光 PCR 定性检测方法。

本标准适用于以玉米、大豆、油菜籽、马铃薯、大米、番茄等农产品及其加工产品为原料生产的调味品中转基因植物成分的实时荧光 PCR 定性检测。本标准适用的调味品按照 GB/T 20903, 分为酱类、豆豉、腐乳、蚝油、香辛料和香辛料调味品、复合调味料、火锅调料, 具体包括豆酱、面酱、番茄酱、辣椒酱、芝麻酱、花生酱、芥末酱, 豆豉, 腐乳, 蚝油, 香辛料、香辛料调味粉, 鸡精调味料、鸡粉调味料、牛肉粉调味料、海鲜调味料, 风味酱、沙拉酱、蛋黄酱, 火锅底料、火锅蘸料等。其他调味品参照使用。

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 20903 调味品分类

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 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

调味品 **condiment**

在饮食、烹饪和食品加工中广泛应用的, 用于调和滋味和气味并具有去腥、除膻、解腻、增香、增鲜等作用的产品。

3.1.2

DNA 的提取和纯化 **DNA extraction and purification**

从测试样品的各种成分中释放 DNA, 随后纯化 DNA 去除 PCR 反应抑制剂。

3.1.3

外源基因 **exogenous gene**

利用生物工程技术转入的其他生物基因, 使该生物品种表现新的生物学性状。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

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

GOS(A root-specific rice gene highly expressed in roots from seedlings and mature plants which encodes a 14 kDa protein):编码一个 14 kDa 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

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

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

tRNA^{Leu}:叶绿体亮氨酸转运核糖核酸基因

4 方法提要

调味品多属于深加工食品,一方面 DNA 在食品加工过程中受到破坏,另一方面调味品可能富含盐、糖、蛋白质、发酵产生的有色物质等,这些因素均会影响 DNA 提取纯化和 PCR 检测效果。本标准应用 CTAB-LA 协同沉淀和低温差速离心等实验技术,对调味品中的植物基因组 DNA 进行分离、纯化和浓缩,使之适用于 TaqMan 实时荧光 PCR 检测技术,通过检测其中是否含有各种外源基因,达到对调味品中转基因植物成分定性 PCR 检测的目的。

5 材料与试剂

5.1 设备和材料

- 5.1.1 高速冷冻离心机:最高转速 18 000 r/min。
- 5.1.2 台式离心机:最高转速 18 000 r/min。
- 5.1.3 微型个人离心机。
- 5.1.4 双温水浴:37 °C±1 °C、65 °C±1 °C。
- 5.1.5 制冰机。
- 5.1.6 冰箱:2 °C~8 °C、-20 °C、-80 °C。
- 5.1.7 核酸真空干燥系统。
- 5.1.8 核酸蛋白分析仪。
- 5.1.9 实时荧光 PCR 仪。
- 5.1.10 离心管:1.5 mL、2 mL、15 mL、50 mL。

5.2 试剂

- 5.2.1 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、储存应符合 GB/T 27025 规定。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。
- 5.2.2 植物基因组 DNA 纯化试剂盒¹⁾。
- 5.2.3 10×PCR 缓冲液(不含氯化镁)。
- 5.2.4 氯化镁溶液:25 mmol/L。
- 5.2.5 dNTP 溶液(dATP、dCTP、dGTP、dTTP 或 dUTP):各 2.5 mmol/L。

1) 植物基因组 DNA 纯化试剂盒由北京望尔生物技术有限公司提供。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。

5.2.6 UNG 酶(以 dUTP 代替 dTTP 时)²⁾。

5.2.7 *Taq* 酶。

5.2.8 引物和探针:调味品中转基因植物成分实时荧光 PCR 定性检测所用引物序列和探针序列见表 1。

表 1 实时荧光 PCR 所用引物和探针序列

检测基因	引物序列	探针序列	备 注
ZEIN	5'-tgaacccatgcatgcagt-3'	5'-tggcgtgtccgtccctgatgc-3'	玉米内源基因
	5'-ggcaagaccattggtga-3'		
Lectin	5'-cctcctcgggaaagttacaa-3'	5'-ccctcgtctcttggtcgcgcctct-3'	大豆内源基因
	5'-gggcatagaaggtgaagtt-3'		
PE3-PEPcase	5'-ccagtcttggagccgttga-3'	5'-caggctcgtatgcgactgcggagaca-3'	油菜籽内源基因
	5'-aagggccagtcctcaatgcaga-3'		
GOS	5'-ttagctcccgctgcaga-3'	5'-cggcagtggtgtggttcttcgg-3'	大米内源基因
	5'-agagtccacaagtgtcccg-3'		
tRNA ^{Leu}	5'-cgaaatcggtagacgtacg-3'	5'-gcaatcctgagccaaatcc-3'	高等植物内源基因
	5'-ttcattgagtctctgcacct-3'		
CaMV35S	5'-cgacagtgttcccaaaga-3'	5'-tggacccccaccacagaggagcatc-3'	外源基因
	5'-aagacgtggttggaaactcttc-3'		
FMV35S	5'-aagacatccaccaagactta-3'	5'-tggtccccacaagccagctgctcga-3'	外源基因
	5'-aggacagctctttccacgtt-3'		
NOS	5'-atcgttcaaacatttgga-3'	5'-catcgcaagaccggcaacagg-3'	外源基因
	5'-attcgggactctaatcata-3'		
NPTII	5'-aggatctcgtcgtgacccat-3'	5'-caccagccggccacagtcgat-3'	外源基因
	5'-gcacgaggaagcggta-3'		
Bar	5'-acaagcacggtaacttc-3'	5'-ccgagccgcaggaaccgcaggag-3'	外源基因
	5'-actcgccgtccagtcgta-3'		
PAT	5'-gtcgacatgtctcggagag-3'	5'-tggccgcggtttgtgatatcgtaa-3'	外源基因
	5'-gcaaccaaccaagggtatc-3'		
GOX	5'-gtcttcgtgtgtggaaccgtt-3'	5'-tgctcagttctctacactcgcgtcg-3'	外源基因
	5'-gaactggcaggagcgagagct-3'		
CryIA(b)	5'-cgcgactggatcaggtaca-3'	5'-ccgcccgcgagctgacctgacctgtg-3'	外源基因
	5'-tggggaacaggctcacgat-3'		
CryIA(c)	5'-gggaaatgcgtattcaattcaac-3'	5'-acatgaacagcgcttgaccacagc-3'	外源基因
	5'-ttctggactgcgaacaatgg-3'		

2) 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	引物序列	探针序列	备 注
CryIA(b/c)	5'-gggaaatgcgtattcaattcaac-3'	5'-acatgaacagcgccttgaccacagc-3'	外源基因
	5'-ttctggactgcgaacaatgg-3'		
Cry3A	5'-tccggttacgaggttctt-3'	5'-acctatgctcaagctgccaacaccc-3'	外源基因
	5'-ccatagatttgagcgtcctta-3'		
EPSPS	5'-ccgacgccgatcaccta-3'	5'-ccgcgtgccgatggcctccgca-3'	外源基因
	5'-gatgccgggcgtgttgag-3'		
注：调味品中转基因植物成分实时荧光 PCR 定性检测，应根据调味品配料表中列出的成分来源，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 防止污染措施

防止污染措施应符合 GB/T 19495.2 的规定。

7 抽样和制样

抽样和制样方法应符合 GB/T 19495.7 和 GB/T 19495.3 中相关规定。

8 检测

8.1 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 中相关规定。

8.2 样品前处理

8.2.1 调味品中富含的盐、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，应通过样品前处理尽量去除样品中的盐、糖和色素。

8.2.2 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。

8.2.3 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。重复该操作步骤 3 次~5 次。

8.2.4 经过数次洗涤的样品，可以进行 DNA 提取和纯化。

8.3 DNA 提取和纯化

建议选用北京望尔生物技术有限公司《植物基因组 DNA 纯化试剂盒》，也可选用其他等效市售试剂盒。DNA 提取和纯化过程中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。提取和纯化后的 DNA 溶液长期保存应储存于 -20 ℃ 或低于 -20 ℃ 中。

8.4 DNA 定量

DNA 定量方法按照 GB/T 19495.3 中相关规定。

8.5 实时荧光 PCR 检测

8.5.1 实时荧光 PCR 反应体系

实时荧光 PCR 反应体系见表 2。每个样品进行实时荧光 PCR 检测时应设置 2 个平行。实时荧光 PCR 检测过程中应设置 PCR 扩增试剂对照、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实时荧光 PCR 检测,具体方式按照 GB/T 19495.2 中相关规定。

表 2 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 μL
补水至	50 μL

注: 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。

8.5.2 实时荧光 PCR 反应参数

实时荧光 PCR 反应参数见表 3。使用不同实时荧光 PCR 仪,可对参数作适当调整。

表 3 实时荧光 PCR 反应参数³⁾

作 用	时间/ s	温度/ ℃
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。

3) 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。

8.5.3 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团一致。具体设置方法可参照仪器使用说明书。

9 结果分析、判断和表述⁴⁾

9.1 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。

9.2 质量控制

9.2.1 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 9.2.2~9.2.4 所述正常结果,应重做实验。

9.2.2 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 $C_t \geq 40$ 。

9.2.3 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 $20 \leq C_t \leq 36$ 。

9.2.4 PCR 扩增阳性目标 DNA 对照

外源基因检测结果 $C_t \leq 36$ 。

9.3 结果判断和表述

9.3.1 待测样品外源基因 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,此时可以判定该样品未检出 $\times \times \times$ 基因,检测结果表述为未检出 $\times \times \times$ 基因。

9.3.2 待测样品外源基因至少 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,可以判定该样品检出 $\times \times \times$ 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,可以判定该样品未检出 $\times \times \times$ 基因,检测结果表述为未检出 $\times \times \times$ 基因。

9.3.3 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,此时可以判定该样品检出 $\times \times \times$ 基因,检

4) 以 ABI Prism 7700/7900 SDS 仪器的实验结果为例。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。

测结果表述为检出×××基因。

10 检测低限

本方法未确定绝对检测低限和相对检测低限,但实验证明本方法能检测出含量为 0.01%的转基因玉米和大豆成分。
