



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2668—2010

转基因植物品系特异性检测方法

Event-specific method for the detection of genetically modified plants

2010-11-01 发布

2011-05-01 实施

中 华 人 民 共 和 国 发 布
国家质量监督检验检疫总局

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：中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国厦门出入境检验检疫局、中华人民共和国北京出入境检验检疫局、中华人民共和国上海出入境检验检疫局、中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：陈红运、梁新苗、陈双雅、赵文军、黄文胜、曹际娟、潘良文、朱水芳、陈洪俊。

转基因植物品系特异性检测方法

1 范围

本标准规定了几种重要的转基因植物品系特异性(转化事件特异性)检测方法。

本标准适用于转基因玉米(Bt10, Bt11, GA21, Mon810, Mon863, NK603, T25, TC1507)、转基因大豆(GTS-40-3-2, A2704-12)、转基因油菜(RT73, T45, Ms8, Rf3)、转基因番茄(华番1号)和转基因马铃薯(EH92-527-1)的品系特异性检测。

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

SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

SN/T 1194 植物及其产品中转基因成分检测抽样和制样方法

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

转基因植物 **genetically modified plant**

目的基因(包括外源和内源基因两类)导入植物基因组并能在后代中稳定遗传的植物。

3.1.2

转基因植物品系 **genetically modified plant event**

目的基因成功导入植物基因组并能在后代中稳定遗传即获得转基因植物品系,同一基因的不同转化体视为不同的品系。品系特异性序列指外源插入片段与植物基因组的连接区序列,是转基因植物品系的鉴定依据。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

Adh1(alcohol dehydrogenase):乙醇脱氢酶基因,玉米内源基因

bp(base pair):碱基对

Ct 值(Cycle threshold):每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数

CruA(Cruciferin A gene):油菜种子贮存蛋白,油菜内源基因

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

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

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

DNA(deoxyribonucleic acid):脱氧核糖核酸

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

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

Hmg(high mobility group protein):高迁移率族蛋白,玉米内源基因

Lec(Lectin):凝集素基因,大豆内源基因

Pg(polygalacturonase):多聚半乳糖醛酸酶,番茄内源基因

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

Taq 酶:DNA 聚合酶。

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

TE(Tris-Cl):EDTA 缓冲液

UGPase(UDP-glucose pyrophosphorylase):尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶,马铃薯内源基因

UNG 酶(Uracil N-glycosylase):尿嘧啶-N-糖基化酶,也称为尿嘧啶 DNA 糖基化酶(UDG)

4 防污染措施

普通 PCR 和实时荧光 PCR 检验过程的防污染措施应符合 SN/T 1193 的规定。

5 抽样与制样

按照 SN/T 1194 的规定执行。

6 实验方法

6.1 原理

品系特异性检测,也称作转化事件特异性检测,是在品系特异性序列上设计一对特异性引物,两条引物分别位于外源 DNA 和植物基因组,通过 PCR 扩增即可判定样品中是否含有特定的转基因植物品系,在反应体系中加入荧光探针即可完成实时荧光 PCR 检测。

Taq Man 荧光探针技术,指在 PCR 反应体系中加入一对引物的同时再加入一条特异性的荧光探针,该探针为一寡核苷酸,两端分别标记一个报告荧光基团和一个淬灭荧光基团。探针完整时,报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收;PCR 扩增时,Taq 酶的 5'~3' 外切酶活性将探针酶切降解,使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离,从而荧光监测系统可接收到荧光信号,即每扩增一条 DNA 链,就有一个荧光分子形成,实现了荧光信号的累积与 PCR 产物形成完全同步。

6.2 主要仪器

6.2.1 PCR 仪。

6.2.2 实时荧光 PCR 仪。

6.2.3 超净工作台。

6.2.4 消毒灭菌锅。

6.2.5 制冰机。

6.2.6 核酸蛋白分析仪。

6.2.7 高速冷冻离心机,台式小型离心机,Mini 个人离心机。

6.2.8 低温冰箱,冷藏冷冻冰箱。

6.2.9 纯水器,双蒸水器。

6.2.10 旋涡振荡器。

6.2.11 微量进样器(2.5 μ L,10 μ L,20 μ L,100 μ L,200 μ L,1 000 μ L)。

6.2.12 光化学 PCR 反应管。

6.3 主要试剂

除另有规定外,所有试剂均为分析纯或生化试剂。

6.3.1 实验用水:应符合 GB/T 6682 中一级水的规格。

6.3.2 PCR 缓冲液。

6.3.3 氯化镁。

6.3.4 dNTPs(dATP,dCTP,dGTP,dUTP)。

6.3.5 UNG 酶。

6.3.6 *Taq* DNA 聚合酶。

6.3.7 引物和探针:常见转基因植物品系相关资料参见附录 A。转基因植物品系特异性检测所用引物和探针序列见表 B.1,植物内源基因检测用引物和探针序列见表 B.2。

6.4 实验步骤

6.4.1 阴性对照、阳性对照和空白对照的设置

阴性对照:以待测非转基因植物(如:大豆、玉米、油菜籽、马铃薯、番茄)基因组 DNA 为模板。

阳性对照:采用含有待测基因序列的植物及其加工产品 DNA 作为 PCR 反应的模板,或采用含有待测基因序列的质粒。

设两个空白对照:

——提取 DNA 时设置的提取空白对照(以水代替样品);

——PCR 反应的空白对照(以 DNA 溶解液代替 DNA 模板)。

6.4.2 PCR 反应体系

Bt10 用普通 PCR 检测,其余品系及内源基因用实时荧光 PCR 检测。PCR 反应体系见表 1。每个样品各做 2 个平行管。加样时应使样品 DNA 溶液完全加入反应液中,不要粘附于管壁上,加样后应尽快盖紧管盖。

表 1 PCR 反应体系

试剂名称	终浓度	
	实时荧光 PCR	普通 PCR(Bt10)
10×PCR 反应缓冲液	1×	1×
氯化镁	2.5 mmol/L	1.5 mmol/L
dNTP	0.2 mmol/L	0.16 mmol/L
UNG 酶	1 U	1 U
引物(上游)	表 B.1、表 B.2	表 B.1
引物(下游)	表 B.1、表 B.2	表 B.1
探针	表 B.1、表 B.2	—
<i>Taq</i> DNA 聚合酶	2.5 U	2.5 U
DNA 模板(20 ng/μL~30 ng/μL)	5 μL	5 μL
补水至	50 μL	50 μL
注:也可使用商品化的实时荧光 PCR 反应液(2×PCR Master Mix)。		

6.4.3 PCR 反应参数

实时荧光 PCR 扩增反应参数:50 °C/2 min;预变性 95 °C/10 min;95 °C/15 s,60 °C/1 min,40 个循环。

普通 PCR(Bt10)反应参数:预变性 94 °C/10 min;94 °C/25 s,62 °C/30 s,72 °C/45 s,40 个循环;72 °C/7 min。

注:不同仪器可根据仪器要求将反应参数作适当调整。

6.4.4 仪器检测通道的选择

PCR 反应管荧光信号收集的设置,应与探针所标记的报告基团一致。报告基团为 FAM 时,荧光信号收集应设在 FAM 通道;报告基团为 VIC 时,荧光信号收集应设在 VIC 通道。具体设置方法因仪器而异,可参照仪器使用说明书。

6.4.5 实时荧光 PCR 反应运行

按预先设定的样品摆放顺序将 PCR 反应管依次摆放(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。

6.5 质量控制

6.5.1 实时荧光 PCR 的质控标准

空白对照:无荧光增幅现象。

阴性对照:无荧光增幅现象。

阳性对照:外源基因检测 Ct 值小于或等于 36。

上述指标有一项不符合者,应重新作实时荧光 PCR 扩增。

6.5.2 普通 PCR(Bt10)质控标准

阴性对照和空白对照未出现特异性条带。

阳性对照出现预期的 130 bp 扩增条带。

7 结果判定

7.1 实时荧光 PCR

测试样品内源基因检测 Ct 值小于或等于 36,外源基因检测 Ct 值等于 40,判断该样品未检出×××品系。

测试样品内源基因检测 Ct 值小于或等于 36,外源基因检测 Ct 值小于或等于 36,判断该样品检出×××品系。

测试样品外源基因检测 Ct 值在 36~40 之间,应调整模板浓度,重做实时荧光 PCR。再次扩增后的外源基因检测 Ct 值仍小于 40,且阴性对照、阳性对照和空白对照结果达到质控要求,则可判定为该样品检出×××品系。再次扩增后的外源基因检测 Ct 值等于 40,且阴性对照、阳性对照和空白对照结果达到质控要求,则可判定为该样品未检出×××品系。

7.2 普通 PCR(Bt10)

对待检样品 DNA 提取液进行转基因玉米 Bt10 检测,测试样品出现预期的 130 bp 扩增条带,则可判定该样品中检出转基因玉米 Bt10。

8 样品保存

存查样品应视样品的状态采用相应的保存方式,妥善保存 6 个月。如检测为含有转基因成分,则样品保存期为 1 年,以备复验、谈判和仲裁。

附录 A
(资料性附录)
常见转基因植物品系相关资料

表 A.1 商品化的转基因植物品系外源基因的主要信息

植物名称	生产商	品系名称	转入的外源基因		
			启动子	目标基因	终止子
大豆	Monsanto	GTS-40-3-2	CaMV35S	CP4 epsps (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase)	NOS
大豆	Aventis	A2704-12	CaMV35S	pat (phosphinothricin N-acetyltransferase)	CaMV35S
玉米	Syngenta	BT10	CaMV35S	cryIAb, pat	NOS
玉米	Syngenta	BT11	CaMV35S	cryIAb, pat	NOS
玉米	Syngenta	GA21	rice actin I	epsps (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase)	NOS
玉米	Monsanto	MON810	CaMV35S	cryIAb	
玉米	Monsanto	MON863	CaMV35S	cry3Bb1	untranslated sequence of wheat heat shock protein 17.3 (tahsp17)
玉米	Monsanto	NK603	rice actin I ; CaMV35S	CP4 epsps (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase)	NOS
玉米	Bayer	T25	CaMV35S	pat (phosphinothricin N-acetyltransferase)	CaMV35S
玉米	Mycogen; Pioneer	TC1507	Ubiquitin; CaMV35S	cry1F, pat	3' polyadenylation signal from ORF25 (Agrobacterium tumefaciens); CaMV35S
马铃薯	BASF	EH92-527-1			

表 A.1 (续)

植物名称	生产商	品系名称	转入的外源基因		
			启动子	目标基因	终止子
油菜	Monsanto	RT73(GT73)	FMV35S	CP4 epsps (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase); goxv247 glyphosate oxidoreductase (Ochrobactrum anthropi)	
油菜	Bayer	T45(HCN28)	CaMV35S	pat	CaMV35S
油菜	Bayer	Ms8	pTa29 pollen specific promoter from <i>Nicotiana tabacum</i>	barnase ribonuclease (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)	
油菜	Bayer	Rf3	anther-specific promoter	barnase ribonuclease inhibitor (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)	
番茄	华中农业大学	华番 1 号	CaMV35S	Anti-sense type of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate (ACC) Synthase	CaMV35S

附录 B

(规范性附录)

转基因植物品系检测引物和探针序列

表 B.1 转基因品系特异性序列检测引物/探针

植物	品系名称	引物/探针序列	终浓度 nmol/L	产物 bp
大豆	GTS-40-3-2	上游引物:5'-TTC ATT CAA AAT AAg ATC ATA CAT ACA ggT T-3' 下游引物:5'-ggC ATT TgT Agg AgC CAC CTT-3' 探针:FAM-5'-CCT TTT CCA TTT ggg-3'-MGBNFQ	150 150 50	84
大豆	GTS-40-3-2	上游引物:5'-TAG CAT CTA CAT ATA GCT TC-3' 下游引物:5'-GAC CAG GCC ATT CGC CTC A-3' 探针:5'-FAM-ACA AAA CTA TTT GGG ATC GGA GAA GA-TAMRA-3'	750 750 200	85
大豆	A2704-12	上游引物:5'-gCA AAA AAg Cgg TTA gCT CCT-3' 下游引物:5'-ATT CAg gCT gCg CAA CTg TT-3' 探针:FAM-5'-Cgg TCC TCC gAT CgC CCT TCC-3'-TAMRA	400 400 200	64
玉米	Bt10	上游引物:5'-CAC ACA ggA gAT TAT TAT Agg g-3' 下游引物:5'-ggg AAT AAg ggC gAC ACg g-3'	600 600	130
玉米	Bt11	上游引物:5'-gCg gAA CCC CTA TTT gTT TA-3' 下游引物:5'-TCC AAg AAT CCC TCC ATg Ag-3' 探针:FAM-5'-AAA TAC ATT CAA ATA TgT ATC CgC TCA-3'-TAMRA	750 750 250	—
玉米	GA21	上游引物:5'-CgT TAT gCT ATT TgC AAC TTT AgA ACA-3' 下游引物:5'-gCg ATC CTC CTC gCg TT-3' 探针:FAM-5'-TTT CTC AAC AgC Agg Tgg gTC Cgg gT-3'-TAMRA	900 900 200	101
玉米	Mon810	上游引物:5'-TCg AAg gAC gAA ggA CTC TAA CgT-3' 下游引物:5'-gCC ACC TTC CTT TTC CAC TAT CTT-3' 探针:FAM-5'-AAC ATC CTT TgC CAT TgC CCA gC-3'-TAMRA	300 300 180	92
玉米	Mon863	上游引物:5'-gTA ggA TCg gAA AgC TTg gTA C-3' 下游引物:5'-TgT TAC ggC CTA AAT gCT gAA CT-3' 探针:FAM-5'-TgAACACCCATCCgAACAAgTAaggTCA-3'-TAMRA	150 150 50	84
玉米	NK603	上游引物:5'-ATg AAT gAC CTC gAg TAA gCT TgT TAA-3' 下游引物:5'-AAg AgA TAA CAg gAT CCA CTC AAA CAC T-3' 探针:FAM-5'-Tgg TAC CAC gCg ACA CAC TTC CAC TC-3'-TAMRA	150 150 50	108
玉米	T25	上游引物:5'-ACA AgC gTg TCg TgC TCC AC-3' 下游引物:5'-gAC ATg ATA CTC CTT CCA CCg-3' 探针:FAM-5'-TCA TTg AgT CgT TCC gCC ATT gTC g-3'-TAMRA	400 400 200	102
玉米	TC1507	上游引物:5'-TAG TCT TCg gCC AgA ATg g-3' 下游引物:5'-CTT TgC CAA gAT CAA gCg-3' 探针:FAM 5'-TAA CTC AAg gCC CTC ACT CCg-TAMRA-3'	300 300 150	58

表 B.1 (续)

植物	品系名称	引物/探针序列	终浓度 nmol/L	产物 bp
马铃薯	EH92-527-1	上游引物:5'-gTg TCA AAA CAC AAT TTA CAg CA-3' 下游引物:5'-TCC CTT AAT TCT CCg CTC ATg A-3' 探针:FAM-5'-AgA TTg TCg TTT CCC gCC TTC AgT T-3'-TAMRA	300 300 160	134
油菜	RT73	上游引物:5'-CCA TAT TgA CCA TCA TAC TCA TTg CT-3' 下游引物:5'-gCT TAT ACg AAg gCA AgA AAA ggA-3' 探针:FAM-5'-TTC CCg gAC ATg AAg ATC ATC CTC CTT-3'-TAMRA	150 150 50	108
油菜	T45	上游引物:5'-CAA Tgg ACA CAT gAA TTA TgC-3' 下游引物:5'-gAC TCT gTA TgA ACT gTT CgC-3' 探针:FAM 5'-TAg Agg ACC TAA CAg AAC TCg CCg T-3'-TAMRA	400 400 200	123
油菜	Ms8	上游引物:5'-gTT AgA AAA AgT AAA CAA TTA ATA TAg CCg g-3' 下游引物:5'-ggA ggg TgT TTT Tgg TTA TC-3' 探针:FAM-5'-AAT ATA ATC gAC ggA TCC CCg ggA ATT C-3'-TAMRA	400 400 200	129
油菜	Rf3	上游引物:5'-AgC ATT TAg CAT gTA CCA TCA gAC A-3' 下游引物:5'-CAT AAA ggA AgA Tgg AgA CTT gAg-3' 探针:FAM-5'-CgC ACg CTT ATC gAC CAT AAg CCC A-3'-TAMRA	400 400 200	139
番茄	华番 1 号	上游引物:5'-AAA CAg ACA AAA ATA ggC gg-3' 下游引物:5'-CCA AAC gTA AAA Cgg CTT g-3' 探针:5'-FAM-TgA gCg gAg AAT TAA ggg AgT CAC g-TAMRA-3'	200 200 100	108

表 B.2 植物内源基因序列检测引物/探针

植物	基因	引物/探针序列	终浓度 nmol/L	产物 bp
大豆	lec	上游引物:5'-CCA gCT TCg CCg CTT CCT TC-3' 下游引物:5'-gAA ggC AAg CCC ATC TgC AAg CC-3' 探针:FAM-5'-CTT CAC CTT CTA TgC CCC TgA CAC-3'-TAMRA	150 150 50	74
大豆	lec	上游引物:5'-CAC CTT TCT CgC ACC AAT TgA CA-3' 下游引物:5'-TCA AAC TCA ACA gCg ACg AC-3' 探针:FAM-5'-CCA CAA ACA CAT gCA ggT TAT CTT gg-3'-TAMRA	200 200 200	105
玉米	hmg	上游引物:5'-TTg gAC TAg AAA TCT CgT gCT gA-3' 下游引物:5'-gCT ACA TAg ggA gCC TTg TCC T-3' 探针:FAM-5'-CAA TCC ACA CAA ACg CAC gCg TA-3'-TAMRA	300 300 160	79
玉米	adh1	上游引物:5'-CCA gCC TCA Tgg CCA AA-3' 下游引物:5'-CCT TCT Tgg Cgg CTT ATC Tg-3' 探针:FAM-5'-CTT Agg ggC AgA CTC CCg TgT TCC CT-3'-TAMRA	150 150 50	70

表 B.2 (续)

植物	基因	引物/探针序列	终浓度 nmol/L	产物 bp
玉米	adh1	上游引物:5'-CgT CgT TTC CCA TCT CTT CCT CCT-3'	200	136
		下游引物:5'-CCA CTC CgA gAC CCT CAg TC-3'	200	
		探针:FAM-5'-AAT CAg ggC TCA TTT TCT CgC TCC TCA-3'-TAMRA	200	
马铃薯	UDPase	上游引物:5'-ggA CAT gTg AAg AgA Cgg AgC-3'	400	88
		下游引物:5'-CCT ACC TCT ACC CCT CCg C-3'	400	
		探针:FAM-5'-CTA CCA CCA TTA CCT CgC ACC TCC TCA-3'-TAMRA	200	
油菜	CruA	上游引物:5'-ggC CAg ggT TTC CgT gAT-3'	200	101
		下游引物:5'-CCg TCg TTg TAG AAC CAT Tgg-3'	200	
		探针:VIC-5'-AgT CCT TAT gTg CTC CAC TTT CTg gTg CA-3'-TAMRA	200	
番茄	pg	上游引物:5'-gCT CgA ATT CTT TAA ACT TgT TCT-3'	200	126
		下游引物:5'-gCA AAg ATg CTC TgA AAA TTA gA-3'	200	
		探针:5'-FAM-TgA Agg Agg TgT CAC AAA TgC ATC A-TAMRA-3'	100	