



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1198—2013
代替 SN/T 1198—2003

转基因成分检测 马铃薯检测方法

Detection of genetically modified components—
Potatoes test methods

2013-03-01 发布

2013-09-16 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 1198—2003《马铃薯中转基因成分定性 PCR 检测方法》。

本标准与 SN/T 1198—2003 相比,主要技术变化如下:

- 将原标准名称进行了修订;
- 将规范性引用文件进行了修订;
- 删除了原标准中抽样的具体步骤,改为参照 GB/T 19495.7《转基因产品检测 抽样和制样方法》进行抽样;
- 增加了鉴定检测马铃薯品系范围,马铃薯 EH92-527-1 品系转基因定性成分的检测;
- 增加了实时荧光 PCR 检测方法。

本标准参照欧盟联合研究中心转基因食物及饲料参考实验室(Community reference laboratory for GM food and feed Biotechnology & GMOs Unit)中转基因马铃薯 PCR 检测方法,增加了转基因马铃薯 EH92-527-1 品系鉴定检测方法。

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:中华人民共和国山东出入境检验检疫局、中国检验检疫科学研究院、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:高宏伟、林超、刘彩霞、孙敏、朱水芳、曹际娟。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- SN/T 1198—2003。

转基因成分检测 马铃薯检测方法

1 范围

本标准规定了马铃薯及其加工产品中转基因成分检测的 PCR 方法和实时荧光 PCR 方法。

本标准的筛选检测适用于马铃薯及其加工产品中转基因成分的定性检测。

本标准的鉴定检测适用于马铃薯 EH92-527-1 实时荧光 PCR 的品系鉴定。

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

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

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。

3.2

内源基因 endogenous gene

在栽培的物种中拷贝数恒定的、不显示等位基因变化的基因。该基因可用于对基因组中某一目的基因的定量分析。

3.3

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。

3.4

阳性目标 DNA 对照 positive DNA target control

参照 DNA 或从可溯源的标准物质提取的 DNA 或从含有已知序列阳性样品(或生物)中提取的 DNA。该对照用于证明测试样品的分析结果含有目标序列。

3.5

阴性目标 DNA 对照 negative DNA target control

不含外源目标核酸序列的 DNA 片段。可使用可溯源的阴性标准物质。

3.6

提取空白对照 extraction blank control

该对照为在 DNA 提取过程中,以水代替测试样品完成提取过程所有步骤,用以证明提取过程中没

有核酸污染。

以不同批次提取的 DNA 并进行多个 PCR 分析时,在做测试样品 PCR 时还应同时包括提取空白对照。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

AAD:resides outside T-DNA

在转座自大肠杆菌 Tn7 中编码链霉素腺苷酰(基)转移酶的基因

ArabSSU1A:arabidopsis thaliana ribulose-1'5-bisphosphate carboxylase(Rubisco)small subunit
ats 1A promoter

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶小亚基 1A 的启动子

CaMV35S:promoter from cauliflower mosaic virus

花椰菜花叶病毒 35S 启动子

CP4 EPSPS:5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate syn-
thase

来源于农杆菌 *Agrobacterium* sp. Strain CP4 的 5-莽草酸-3-磷酸合成酶

cry3A:cry3A delta-endotoxin

由 *Bacillus thuringiensis* subsp. *Tenebrionis*(B. T. T)strain BI 256-82 的蛋白。这个蛋白具有抗
虫活性,尤其是可以选择性杀死科罗拉多马铃薯甲虫(*Colorado potato beetle larvae*)

CTAB:hexadecyl trimethyl ammonium bromide

十六烷基三甲基溴化铵

E9 3': the 3' non-translated region of the pea ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small
subunit (rbcS) E9 gene

来源于豌豆的核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶 E9 基因小亚基 3'端序列

EDTA: ethylene diamine tetraacetic acid

乙二胺四乙酸

FMV35S;a promoter derived from figwort mosaic virus

玄参花叶病毒 35S 启动子

NOS:nopaline synthase terminator

胭脂碱合成酶 3'转录终止子

NPT-II;neomycin phosphotransferase-II

新霉素-3'-磷酸转移酶

oriV: resides outsideT-DNA

一个源自农杆菌 *Agrobacterium* 的 RK2 质粒的 1.3 kb 的复制区域

ori332:resides outsideT-DNA

一个源自 pBR322 质粒的 1.8 kb 的片段,其中包含复制区域和转移结合位点 bom

PLRVrep:potato leaf roll virus replicase

马铃薯卷叶病毒复制酶

PVYcp:potato Y virus coat protein

马铃薯 Y 病毒外壳蛋白

Tris:2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol

三羟甲基氨基甲烷

UGPase: UDP-glucose pyrophosphorylase
尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶

5 防污染措施

检测过程中防止交叉污染的措施按照 GB/T 19495.2 中的规定执行。

6 抽样与制样

6.1 抽样

按照 GB/T 19495.7 中规定的方法执行。

6.2 制样

6.2.1 马铃薯块茎、生薯条、生薯片、植株样品的制备

对于同一个批次的马铃薯块茎、生薯条、生薯片、植株样品,把每一个样品洗净,在任意部位用小刀切下约 1 cm^3 的样品,用液氮研磨成粉末制成小样,然后将所有小样混匀,取 1 g 用于提取 DNA。

6.2.2 马铃薯淀粉样品的制备

把每包取样的 120 g 淀粉充分混合,从中取 1 g 作为小样,然后将所有小样在一起充分混匀,取 1 g 用于提取 DNA。

7 普通 PCR 方法

7.1 原理

样品经过提取 DNA 后,针对转基因植物所插入的外源基因的基因序列设计引物,通过 PCR 技术,特异性扩增外源基因的 DNA 片断,根据 PCR 扩增结果,判断该样品中是否含有转基因成分。

7.2 试剂和材料

除另有规定外,其他试剂为分析纯或生化试剂,水为按照 GB/T 6682 规定的一级水。

7.2.1 引物:检测转基因马铃薯的引物及其信息见附录 A,并参见附录 B。

7.2.2 *Taq* DNA 聚合酶。

7.2.3 dNTPs: dATP、dTTP、dCTP、dGTP、dUTP。

7.2.4 琼脂糖:电泳纯。

7.2.5 溴化乙锭(EB)或其他染色剂。

7.2.6 三氯甲烷。

7.2.7 异戊醇。

7.2.8 异丙醇。

7.2.9 70%乙醇。

7.2.10 分子量 Marker:DL2000。

7.2.11 CTAB 提取缓冲液(pH8.0):称取 4.00 g CTAB, 16.38 g 氯化钠, 2.42 g Tris, 1.50 g Na_2EDTA (乙二胺四乙酸钠盐),用适量水溶解后,调节 pH 到 8.0,定容至 200 mL ,高压灭菌备用。

7.2.12 CTAB 沉淀缓冲液(pH8.0):称取 1.0 g CTAB, 0.50 g 氯化钠,用适量水溶解后,调节 pH 到

8.0,定容至 200 mL,高压灭菌备用。

7.2.13 TE 缓冲液:10 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0;1 mmol/L EDTA,pH8.0。

7.2.14 1.2 mol/L NaCl 溶液。

7.2.15 10×PCR 缓冲液:100 mmol/L KCl,160 mmol/L(NH₄)₂SO₄,20 mmol/L MgSO₄,200 mmol/L Tris-HCl(pH8.8),1% Triton X-100,1 mg/mL BSA。

7.2.16 5×TBE 缓冲液:Tris 54 g,硼酸 27.5 g,0.5 mol/L EDTA (pH8.0)20 mL,加蒸馏水至 1 000 mL。

7.2.17 10×上样缓冲液:0.25%溴酚蓝,40%蔗糖。

7.3 仪器

7.3.1 固体粉碎机及研钵。

7.3.2 高速冷冻离心机、台式小型离心机和 Mini 个人离心机。

7.3.3 水浴培养箱、恒温培养箱和恒温孵育箱。

7.3.4 天平:量程 210 g,感量 0.01 g。

7.3.5 高压灭菌锅。

7.3.6 高温干燥箱。

7.3.7 纯水器或双蒸水器。

7.3.8 冷藏、冷冻冰箱。

7.3.9 制冰机。

7.3.10 涡旋振荡器。

7.3.11 微波炉。

7.3.12 基因扩增仪。

7.3.13 电泳仪。

7.3.14 PCR 超净工作台。

7.3.15 核酸蛋白分析仪。

7.3.16 微量移液器(0.1 μL~2 μL,0.5 μL~10 μL,2 μL~20 μL,10 μL~100 μL,20 μL~200 μL,200 μL~1 000 μL)。

7.3.17 凝胶成像系统。

7.3.18 离心管:1.5 mL~5 mL。

7.3.19 PCR 反应管:200 μL,500 μL 两种规格。

7.4 样品 DNA 提取

7.4.1 CTAB 法

7.4.1.1 称取经过预处理的待测样本约 1.00 g,转入 50 mL 离心管中。

7.4.1.2 在 50 mL 离心管中加入 5 mL CTAB 提取缓冲液,20 μL 蛋白酶 K,充分混匀,65℃温育 30 min,上下颠倒振,若样品吸胀,则再加入 CTAB 提取缓冲液直至上下颠倒时样品移动无粘滞现象,65℃温育振荡过夜。

7.4.1.3 3 000 g 离心 20 min,取上清液 700 μL,加入等体积三氯甲烷,涡旋混匀。

7.4.1.4 12 000 g 离心 10 min,取上层水相到 2 mL Eppendorf 离心管中,加入两倍体积的 CTAB 沉淀缓冲液,涡旋混匀,室温下静置 60 min。

7.4.1.5 12 000 g 离心 5 min 弃去上清液,加入 350 μL,1.2 mol/L 氯化钠溶液,涡旋混匀,加入 350 μL 三氯甲烷,涡旋混匀。

7.4.1.6 12 000 g 离心 5 min,取上层水相到 1.5 mL Eppendorf 离心管中,加入 0.8 倍体积异丙醇溶

液,涡旋混匀,室温静置 60 min。

7.4.1.7 12 000 g 离心 5 min,弃去上清液,加入 70%乙醇 500 μL ,涡旋清洗沉淀;12 000 g 离心 5 min,弃去上清液,放入通风橱中干燥过夜(或者在 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中干燥)。

7.4.1.8 加入 100 μL 0.1 $\times$ TE 缓冲液,在 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min 溶解 DNA,所得溶液即为模板 DNA 溶液。

7.4.2 试剂盒提取样品 DNA

待测样品 DNA 的提取也可使用相应的市售 DNA 提取试剂盒或参照 GB/T 19495.3 执行。

7.4.3 PCR 扩增

7.4.3.1 PCR 反应体系

PCR 反应体系见表 1,每个样品各做两个平行管。加样后应短暂离心并振荡,使样品 DNA 溶液在反应液中混匀,不要粘附于管壁上,加样后应尽快盖紧管盖。反应中所用引物序列见表 A.1。

表 1 PCR 反应体系

试剂名称	贮备液浓度	25 μL 反应体系加样体积/ μL
dNTP 混合液	2.5 mmol/L	2
Taq 缓冲液	10 $\times$	2.5
Taq 酶	2.5 U/ μL	0.5
上游引物	10 pmol/ μL	1
下游引物	10 pmol/ μL	1
DNA 模板	(100 $\pm$ 30) ng	2
超纯水	—	10

7.4.3.2 反应循环参数

PCR 反应循环参数见表 2。也可根据不同的基因扩增仪对 PCR 反应循环参数做适当调整。

表 2 PCR 反应条件参数

被扩增的外源基因	预变性	扩增	循环数	最终延伸	备注
PATA	94 $^{\circ}\text{C}$, 3 min	94 $^{\circ}\text{C}$, 40 s; 50 $^{\circ}\text{C}$, 45 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 45 s	35	72 $^{\circ}\text{C}$, 7 min	内源基因
CaMV35S, NOS, NPT II	94 $^{\circ}\text{C}$, 3 min	94 $^{\circ}\text{C}$, 40 s; 54 $^{\circ}\text{C}$, 45 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 45 s	35	72 $^{\circ}\text{C}$, 7 min	筛选基因
FMV35S	94 $^{\circ}\text{C}$, 3 min	94 $^{\circ}\text{C}$, 40 s; 60 $^{\circ}\text{C}$, 45 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 45 s	35	72 $^{\circ}\text{C}$, 7 min	筛选基因
PLRVrep, Cry 3A	94 $^{\circ}\text{C}$, 3 min	94 $^{\circ}\text{C}$, 40 s; 55 $^{\circ}\text{C}$, 45 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 45 s	35	72 $^{\circ}\text{C}$, 7 min	筛选基因
PVYcp	94 $^{\circ}\text{C}$, 3 min	94 $^{\circ}\text{C}$, 40 s; 63 $^{\circ}\text{C}$, 40 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 40 s	35	72 $^{\circ}\text{C}$, 7 min	筛选基因

7.4.4 PCR 扩增产物电泳检测

用电泳缓冲液(1 $\times$ TBE 或 TAE)制备 2%琼脂糖凝胶(其中在 55 $^{\circ}\text{C}$ ~60 $^{\circ}\text{C}$ 左右加入 EB 或其他染色剂至终浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,也可在电泳后进行染色)。将 10 μL ~15 μL PCR 扩增产物分别和 2 μL

上样缓冲液混合,进行点样。用 2 000 bp DNA Marker 或相应合适的 DNA Marker 作分子量标记。
3 V/cm~5 V/cm 恒压,电泳 20 min~40 min。凝胶成像仪观察并分析记录。

7.5 质量控制

提取空白对照:内参照基因无扩增条带,待检基因无扩增条带;
阴性 DNA 对照:内参照基因有对应大小条带扩增,待检基因无条带扩增;
阳性 DNA 对照:内参照基因有对应大小条带扩增,待检基因有对应大小条带扩增。

7.6 结果判断

7.6.1 内源基因的检测

用针对马铃薯内源基因 Patatin 基因设计的引物对马铃薯 DNA 提取液进行 PCR 测试,待测样品应被扩增出 216 bp 的 PCR 产物。如未见有该 PCR 产物扩增,则说明 DNA 提取质量有问题,或 DNA 提取液中有抑制 PCR 反应的因子存在,应重新提取 DNA。

7.6.2 外源基因的检测

对马铃薯样品 DNA 提取液进行外源基因的 PCR 测试,如果阴性目标 DNA 对照和扩增试剂对照未出现扩增条带,阳性目标 DNA 对照和待测样品均出现预期大小的扩增条带(扩增片段大小见表 A.1),则可初步判定待测样品中含有可疑的该外源基因,应进一步进行确证试验,依据确证试验的结果最终报告;如果待测样品中未出现 PCR 扩增产物,则可断定该待测样品中不含有该外源基因。

7.6.3 筛选检测和鉴定检测的选择

对于马铃薯样品中转基因成分的检测,可先筛选检测 CaMV35S、FMV35S、NOS、NPT II 基因,筛选检测结果阴性则直接报告结果。

若筛选检测结果阳性,则需进一步检测 PLRVrep、PVYcp、Cry3A 基因以初步判定是何种转基因马铃薯品系。

8 实时荧光 PCR 法

8.1 原理

实时荧光 PCR 技术,是指在 PCR 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,最后通过扩增曲线对检测模板进行定性分析的方法。

8.2 主要仪器耗材

- 8.2.1 天平:量程 210 g,感量 0.01 g。
- 8.2.2 均质器。
- 8.2.3 水浴锅。
- 8.2.4 振荡器。
- 8.2.5 研钵或其他粉碎装置。
- 8.2.6 高速台式冷冻离心机。
- 8.2.7 荧光定量 PCR 仪。
- 8.2.8 微量可调移液器及配套吸头(50 μ L、100 μ L、200 μ L、1 000 μ L)。
- 8.2.9 50 mL 离心管。

8.2.10 离心管(1.5 mL 和 2 mL)。

8.3 试剂

除特别说明外,所用试剂均为分析纯。水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

8.3.1 CTAB 提取缓冲液(pH8.0):称取 4.00 g CTAB,16.38 g 氯化钠,2.42 g Tris,1.50 g Na₂EDTA(乙二胺四乙酸钠盐),用适量水溶解后,调节 pH 到 8.0,定容至 200 mL,高压灭菌备用。

8.3.2 CTAB 沉淀缓冲液(pH8.0):称取 1.0 g CTAB,0.50 g 氯化钠,用适量水溶解后,调节 pH 到 8.0,定容至 200 mL,高压灭菌备用。

8.3.3 TE 缓冲液(pH8.0)。

8.3.4 1.2 mol/L NaCl 溶液。

8.3.5 三氯甲烷。

8.3.6 异丙醇。

8.3.7 70%乙醇。

8.3.8 10×Taq 缓冲液(含 Mg²⁺)。

8.3.9 Taq 酶(2.5 U/μL)。

8.3.10 dNTP 混合液:将浓度为 100 mmol/L 的 ATP、TTP、CTP、GTP 溶液混匀制成浓度为 25 mmol/L 的 dNTP 储存液,再加超纯水配制用于 PCR 检测浓度为 2.5 mmol/L 的工作液。

8.3.11 引物和探针:根据表 A.1 的序列合成引物和探针,加超纯水配制成 100 pmol/L 储存液,用于 PCR 检测的工作液浓度为 10 pmol/L。

8.4 马铃薯 DNA 的提取

8.4.1 CTAB 法

8.4.1.1 称取经过预处理的待测样本约 1.00 g,转入 50 mL 离心管中。

8.4.1.2 在 50 mL 离心管中加入 5 mL CTAB 提取缓冲液,20 μL 蛋白酶 K,充分混匀,65 °C 温育 30 min,上下颠倒振,若样品吸胀,则再加入 CTAB 提取缓冲液直至上下颠倒时样品移动无粘滞现象,65 °C 温育振荡过夜。

8.4.1.3 3 000 g 离心 20 min,取上清液 700 μL,加入等体积三氯甲烷,涡旋混匀。

8.4.1.4 12 000 g 离心 10 min,取上层水相到 2 mL 离心管中,加入两倍体积的 CTAB 沉淀缓冲液,涡旋混匀,室温下静置 60 min。

8.4.1.5 12 000 g 离心 5 min,弃去上清液,加入 350 μL 1.2 mol/L 氯化钠溶液,涡旋混匀,加入 350 μL 三氯甲烷,涡旋混匀。

8.4.1.6 12 000 g 离心 5 min,取上层水相到 1.5 mL 离心管中,加入 0.8 倍体积异丙醇溶液,涡旋混匀,室温静置 60 min。

8.4.1.7 12 000 g 离心 5 min,弃去上清液,加入 70%乙醇 500 μL,涡旋清洗沉淀。

8.4.1.8 12 000 g 离心 5 min,弃去上清液,放入通风橱中干燥过夜(或者在 60 °C 烘箱中干燥)。

8.4.1.9 加入 100 μL 0.1×TE 缓冲液,在 65 °C 水浴 10 min 溶解 DNA,所得溶液即为模板 DNA 溶液。

8.4.2 试剂盒提取样品 DNA

待测样品 DNA 的提取也可使用相应的市售 DNA 提取试剂盒或参照 GB/T 19495.3 执行。

8.5 实时荧光 PCR 定性检测

8.5.1 实时荧光 PCR 反应体系

实时荧光 PCR 反应体系如表 3 所示。每个样品各做两个平行样。实时荧光 PCR 检测所用引物和探针序列见表 A.2。

表 3 实时荧光 PCR 反应体系

试剂名称	贮备液浓度	25 μ L 反应体系加样体积/ μ L
dNTP 混合液	2.5 mmol/L	2
Taq 缓冲液	10 $\times$	2.5
Taq 酶	2.5 U/ μ L	0.5
上游引物	10 pmol/ μ L	1
下游引物	10 pmol/ μ L	1
探针	10 pmol/ μ L	1
DNA 模板	100 ng $\pm$ 30 ng	2
超纯水	—	10

8.5.2 实时荧光 PCR 反应参数

实时荧光 PCR 反应参数如表 4 所示。

表 4 实时荧光 PCR 反应参数

方法	预变性	循环温度	循环数
两步法	95 $^{\circ}$ C 10 min	95 $^{\circ}$ C 15 s	40
		60 $^{\circ}$ C 60 s	
三步法	95 $^{\circ}$ C 10 min	95 $^{\circ}$ C 15 s	40
		60 $^{\circ}$ C 30 s	
		72 $^{\circ}$ C 30 s	

用 UGPase 和 EH92-527-1 的引物探针扩增反应建议用三步法,其余引物探针扩增反应建议用两步法。PCR 反应条件随仪器和试剂不同可略有改变。

8.5.3 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 TET 时,荧光信号收集应设在 TET 通道;余类推。具体设置方法因仪器而异,可参照仪器使用说明书。

8.5.4 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(上机前应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。

8.6 结果分析

8.6.1 基线的设置

实时荧光 PCR 反应结束并分析结果后,应设置无效基线范围。无论采用任何荧光通道(FAM 或 TET),基线范围选则在 3 个~15 个循环,如果有强阳性样本,应根据实际情况调整基线范围。阈值设置原则以基线刚好超过正常阴性目标 DNA 对照扩增曲线的最高点,且 $C_t=40$ 为准。

8.6.2 C_t 值与 DNA 浓度的关系

C_t 值大于或等于 40 时,PCR 过程中无目标 DNA 的扩增; C_t 值在 36~40 之间,且平行样的每个值之间的差异很大,表明 PCR 反应体系中的目标 DNA 量很少,应适当增加模板量。

8.7 质量控制

检测过程中分别设阳性 DNA 对照、阴性 DNA 对照和提取空白对照。

提取空白对照:内参照基因检测 C_t 值大于或等于 40,待检基因检测 C_t 值大于或等于 40;

阴性 DNA 对照:内参照基因检测 C_t 值小于 35,待检基因检测 C_t 值大于或等于 35;

阳性 DNA 对照:内参照基因检测 C_t 值小于 35,待检基因检测 C_t 值小于 35。

若有其中任何一个对照不成立,则检测结果无效,应重新进行 PCR 反应。

8.8 结果判定

待测样品外源基因检测 C_t 值大于或等于 40,内源基因检测 C_t 值小于或等于 35,设置的对照结果正常者,则可判定该样品未检出×××基因;

待测样品外源基因检测 C_t 值小于或等于 35,内源基因检测 C_t 值小于或等于 35,设置的对照结果正常者,则可判定该样品检出×××基因;

待测样品外源基因检测 C_t 值在 35~40 之间,应重做实时荧光 PCR 扩增,并适当加大体系中模板量。再次扩增后的结果 C_t 值仍小于 40,且设置的对照结果正常,则可判定该样品检出×××基因;再次扩增后结果 C_t 值大于 40,且设置的对照结果正常,可判定该样品未检出×××基因。

8.9 筛选检测和鉴定检测的选择

对于马铃薯样品中转基因成分的检测,可先筛选检测 CaMV35S、FMV35S、NOS、NPT II 基因,筛选检测结果阴性则直接报告结果。

若筛选检测结果阳性,则需进一步检测 PLRVrep、PVYcp、Cry3A 基因以初步判定是何种转基因马铃薯品系;同时检测品系特异性基因 EH92-527-1,若 EH92-527-1 为阳性,则可确定该样品中含有转基因品系马铃薯 EH92-527-1。

8.10 结果表述

××外源基因实时荧光 PCR 检测结果为阳性者判为检出转基因成分××,表述为对于马铃薯,检出转基因成分;若 EH92-527-1 为阳性,可进一步报告样品中含有 EH92-527-1 转基因马铃薯。

××外源基因实时荧光 PCR 检测结果为阴性者判为未检出转基因成分××,表述为对于马铃薯,未检出转基因成分。

附 录 A

(规范性附录)

PCR 与实时荧光 PCR 检测马铃薯中转基因成分的引物和探针序列

表 A.1 PCR 定性检测转基因马铃薯成分引物序列

基因	引物	序列(5'-3')	PCR 产物长度	备注
PATA (内参照)	上游引物	TGACCTGGACACCACAGTTAT	216 bp	内源基因
	下游引物	GTGGATTACAGGAGTTCTTCG		
CaMV35S (外源基因)	上游引物	GCTCCTACAAATGCCATCA	195 bp	筛选检测
	下游引物	GATAGTGGGATTGTGCGTCA		
FMV35S (外源基因)	上游引物	AGTCCAAAGCCTCAACAAGGTC	365 bp	筛选检测
	下游引物	CATTAGTGAGTGGGCTGTCAGG		
NOS (外源基因)	上游引物	GAATCCTGTTGCCGGTCTTG	180 bp	筛选检测
	下游引物	TTATCCTAGTTTGCGCGCTA		
NPT II (外源基因)	上游引物	GGATCTCCTGTCATCT	173 bp	筛选检测
	下游引物	GATCATCCTGATCGAC		
PLRVrep (外源基因)	上游引物	TCGTCATTAACTTGACGAC	172 bp	筛选检测
	下游引物	CTTCTTTCACGGAGTTCCAG		
PVYcp (外源基因)	上游引物	GAATCAAGGCTATCACGTCC	161 bp	筛选检测
	下游引物	CATCCGCACTGCCTCATACC		
Cry3A (外源基因)	上游引物	AGAGCCGTCGAAACACCAATC	112 bp	筛选检测
	下游引物	TCTGGGTGCTGGCCTCATCG		

表 A.2 实时荧光 PCR 定性检测转基因马铃薯成分引物和探针序列

基因	引物	序列(5'-3')	PCR 产物长度	备注
UGPase (内参照)	上游引物	GGACATGTGAAGAGACGGAGC	88 bp	内源基因
	下游引物	CCTACCTCTACCCCTCCGC		
	探针	FAM-CTACCACCATTACCTCGCACCTCCTCA-TAMRA		
CaMV35S (外源基因)	上游引物	GCTCCTACAAATGCCATCA	195 bp	筛选检测
	下游引物	GATAGTGGGATTGTGCGTCA		
	探针	FAM-TCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCA-TAMRA		
FMV35S (外源基因)	上游引物	AAGACATCCACCGAAGACTTA	209 bp	筛选检测
	下游引物	AGGACAGCTCTTTTCCACGTT		
	探针	FAM-TGGTCCCCACAAGCCAGCTGCTCGA-TAMPA		

表 A.2 (续)

基因	引物	序列(5'-3')	PCR 产物长度	备注
NOS (外源基因)	上游引物	GTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTG	151 bp	筛选检测
	下游引物	CGCTATATTTTGTCTTCTATCGCGT		
	探针	FAM-AGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA-TAMRA		
NPT II (外源基因)	上游引物	AAGATGGATTGCACGCAGGTT	182 bp	筛选检测
	下游引物	AGAGCAGCCGATTGTCTGTTG		
	探针	FAM-CCAGTCATAGCCGAATAGCCTCTCCACC-TAMRA		
CP4 EPSPS (外源基因)	上游引物	CCGACGCCGATCACCTA	86 bp	筛选检测
	下游引物	GATGCCGGGCGTGTTGAG		
	探针	FAM-CCGCGTGCCGATGGCCTCCGCA-TAMRA		
PLRVrep (外源基因)	上游引物	TCGTCATTAAACTTGACGAC	172 bp	筛选检测
	下游引物	CTTCTTTCACGGAGTTCCAG		
	探针	FAM-CAACCACCGCCGCTGCTTAC-TAMRA		
PVYcp (外源基因)	上游引物	GAATCAAGGCTATCACGTCC	161 bp	筛选检测
	下游引物	CATCCGCACTGCCTCATACC		
	探针	CCACAAGCAAGGGAGCAACCGTG		
Cry3A (外源基因)	上游引物	CCGCAGTTTACTCAGGCGTC	112 bp	筛选检测
	下游引物	CAAGAGACTGCGCCAACGT		
	探针	FAM-CGATCAGACGATGAGGCCA-TAMRA		
EH92-527-1 (外源基因)	上游引物	GTGTCAAAACACAATTTACAGCA	134 bp	品系鉴定
	下游引物	TCCCTTAATTCTCCGCTCATGA		
	探针	FAM-AGATTGTCGTTTCCCGCCTTCAGTT-TAMRA		

附 录 B
(资料性附录)

常见转基因马铃薯转入的外源基因的相关信息

表 B.1 常见转基因马铃薯转入的外源基因的相关信息

序号	事件	公司名称及品系	改良性状	启动子	结构基因	终止子	质粒
1	RBMT21-129, RBMT21-350, RBMT22-082	美国 Monsanto 公司 NEW LEAF® PLUS RBMT 21-129	1) 抗马铃 薯卷叶病; 2) 抗马铃 薯甲虫	1) FMV35s 2) rabSSU1A 3) P-NOS	1) PLRVrep 2) Cry 3A 3) NPT II	1) E9 3' 2) NOS 3) NOS	PV-STMT21
2		美国 Monsanto 公司 NEW LEAF® PLUS RBMT 21-350	1) 抗马铃 薯卷叶病; 2) 抗马铃 薯甲虫	1) FMV35s 2) rabSSU1A 3) P-NOS	1) PLRVrep 2) Cry 3A 3) NPT II	1) NOS 2) NOS 3) NOS	PV-STMT21
3		美国 Monsanto 公司 NEW LEAF® PLUS RBMT 22-82	1) 抗马铃 薯卷叶病; 2) 抗马铃 薯甲虫	1) FMV35s 2) ArabSSU1A 3) P-NOS	1) PLRVrep 2) Cry 3A 3) CP4 EPSPS 4) ori-332	1) E9 3' 2) NOS 3) E9 3'	PV-STMT22
4	RBMT15-101, SEMT15-02, SEMT15-15	美国 Monsanto 公司 NEW LEAF® PLUS Y 15-101	1) 抗马铃 薯 Y 病毒; 2) 抗马铃 薯甲虫	1) FMV35s 2) ArabSSU1A 3) P-NOS	1) PVYcp 2) Cry 3A 3) NPT II	1) E9 3' 2) NOS	PV-STMT15
5		美国 Monsanto 公司 NEW LEAF® PLUS Y SEMT 15-02	1) 抗马铃 薯 Y 病毒; 2) 抗马铃 薯甲虫	1) FMV35s 2) ArabSSU1A 3) P-NOS	1) PVYcp 2) Cry 3A 3) NPT II 4) aad 5) oriV 6) ori332	1) E9 3' 2) NOS	PV-STMT15
6		美国 Monsanto 公司 NEW LEAF® PLUS Y SEMT 15-15	1) 抗马铃 薯 Y 病毒; 2) 抗马铃 薯甲虫	1) FMV35s 2) ArabSSU1A 3) P-NOS	1) PVYcp 2) Cry 3A 3) NPT II 4) aad 5) oriV 6) ori332	1) E9 3' 2) NOS	PV-STMT15
7	BT6,BT10, BT12,BT16 BT17,BT18, BT23	美国 Monsanto 公司 NEW LEAF® PLUS BT-06	抗马铃薯 甲虫	1) Arab- SSU1A 2) CaMV 35S	1) Cry 3A 2) NPT II	1) E9 3' 2) NOS	PV-STBT02

表 B.1 (续)

序号	事件	公司名称及品系	改良性状	启动子	结构基因	终止子	质粒
8	ATBT04-6, ATBT04-27, ATBT04-30, ATBT04-31, ATBT04-36, SPBT02-5, SPBT02-7	美国 Monsanto 公司 NEW LEAF® PLUS ATBT 04-06	抗马铃薯 甲虫	CaMV 35S	1) Cry 3A 2) NPT II	1) E9 3' 2) NOS	PV-STBT04
9		美国 Monsanto 公司 NEW LEAF® PLUS ATBT 04-30	抗马铃薯 甲虫	CaMV 35S	1) Cry 3A 2) NPT II	1) E9 3' 2) NOS	PV-STBT04
10		美国 Monsanto 公司 NEW LEAF® PLUS ATBT 04-36	抗马铃薯 甲虫	1) ArabSSU1A 2) CaMV 35S	1) Cry 3A 2) NPT II 3) aad 4) oriV 5) ori332	1) E9 3' 2) NOS	PV-STBT04
11		美国 Monsanto 公司 NEW LEAF® PLUS SPBT 02-05	抗马铃薯 甲虫	CaMV 35S	1) Cry 3A 2) NPT II 3) oriV 4) ori332	1) E9 3' 2) NOS	PV-STBT02
12	EH92-527-1	德国 BASF 公司 Amflora	生产高比 例支链 淀粉	P-NOS	NPT II	NOS	pHoxwG