

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1204—2016
代替 SN/T 1204—2003

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

Protocol of the real-time PCR method for detecting genetically modified
plants and their derived products

2016-06-28 发布

2017-02-01 实施



中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
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

SN/T 1204—2016

*

中国标准出版社出版
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)
总编室:(010)68533533

网址 www.spc.net.cn

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 1.5 字数 42 千字
2017 年 10 月第一版 2017 年 10 月第一次印刷
印数 1—1 100

*

书号: 155066·2-31325 定价 24.00 元

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 1204—2003《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》。

本标准与 SN/T 1204—2003 相比,主要修改如下:

——增加了植物内源基因的检测方法。

——增加了转基因植物筛选基因的检测方法。

——增加了大豆、玉米、油菜、棉花、水稻、马铃薯、亚麻、甜菜等作物的品系特异性检测方法。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准主要起草单位:中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国山东出入境检验检疫局、中华人民共和国上海出入境检验检疫局,深圳市检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人:黄新、朱水芳、高宏伟、李想、潘良文、陈洪俊、陈枝楠。

本标准所代替标准历次版本发布情况为:

——SN/T 1204—2003。

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

1 范围

本标准规定了植物及其加工产品中转基因成分筛选和品系鉴定实时荧光 PCR 检测方法。

本标准适用于大豆、玉米、油菜籽、水稻、棉花、马铃薯、亚麻、甜菜、苜蓿、番茄、木瓜、苹果、菊苣、剪股颖、烟草、李子、甜瓜、小麦、茄子和桉树转基因筛选检测,也适用于大豆、玉米、油菜、水稻、棉花、马铃薯、亚麻和甜菜等作物的品系特异性实时荧光 PCR 检验。

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 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

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 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。

3.1.2

实时荧光 PCR real-time polymerase chain reaction

实时荧光聚合酶链式反应。是指在聚合酶链式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,荧光信号的强弱直接反映模板数量。

3.1.3

内源基因 endogenous gene

在检测物种中拷贝数恒定的、不显示等位基因变化的基因。该基因可用于判定物种特异性。

3.1.4

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。

3.1.5

Ct 值 cycle threshold

每个反应管内的荧光信号达到设定的域值时所经历的循环数。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

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

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

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

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

DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

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

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

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

bp:碱基对(base pair)

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

UDG:尿嘧啶 DNA-糖基酶(uracil DNA glycosylase)

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

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

SDS:十二烷基磺酸钠(sodium dodecylsulfate)

Taq:DNA 聚合酶(Taq DNA polymerase)

TE:Tris-HCl、EDTA 缓冲液

PE3-PEPcase:磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(Phosphoenolpyruvate-Carboxylase)

tRNA^{Leu}:植物叶绿体基因

BARNASE:来源于解淀粉芽孢杆菌的核糖核酸酶基因(ribonuclease gene from *Bacillus amyloliquefaciens*)

BARSTAR:来源于解淀粉芽孢杆菌的 BARNASE 基因的特异抑制基因(specific inhibitor of the barnase gene from *Bacillus amyloliquefaciens*)

BXN:来源于肺炎克雷伯杆菌臭鼻亚种的腈水解酶基因(nitrilase enzyme gene from *Klebsiella pneumoniae subsp. Ozaenae*)

CryIA(b):苏云金芽孢杆菌杀虫毒蛋白 cryIA(b) 基因(A synthetic gene encodes the first 648 amino acids, insecticidal-active truncated product identical to that of cry IA(b) gene of *Bacillus thuringiensis subsp*)

18s rRNA:真核生物 18s 核糖体 RNA 基因

HMGI/Y:高移动性蛋白家族基因(High mobility group protein gene)

PEP:磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因(phosphoenolpyruvate carboxylase gene)

CruA:油菜种子储藏蛋白基因(Cruciferin A gene)

adh1:乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase)

zSSIb:编码玉米淀粉合酶异构体 zSTSII-2 的基因(zein starch synthase, granule-bound starch synthase)

Lectin:植物凝集素基因

LAT52:番茄花药(粉)特异性表达基因

SPS:蔗糖合成酶(sucrose phosphate synthase)

- PLD:磷脂酶 D 家族基因(phospholipase D family)
- GOX:草甘膦氧化还原酶基因(glyphosate oxidoreductase gene)
- UGPase:尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶(UDP-glucose pyrophosphorylase(cytoplasm marker))
- SAH7:陆地棉的 SAH7 基因(SAH7 protein gene of *Gossypium hirsutum*)
- GLuA3:大米谷蛋白基因(rice Glutelin Gene)
- GAG56:一种醇溶蛋白基因(one of γ -gliadin genes)
- Wx012:编码小麦蜡质基因(Waxy wheat genes)
- Alfalfa-Acc:(苜蓿乙酰辅酶 a 羧化酶)Alfalfa Acetyl-CoA carboxylase
- pCaMV 35S:花椰菜花叶病毒 35S 启动子(35S promoter from cauliflower mosaic virus)
- pFMV 35S:玄参花叶病毒 35S 启动子(35S promoter from a modified figwort mosaic virus)
- tNOS:来源于农杆菌的胭脂碱合成酶基因终止子(terminator of nopaline synthase gene from *Agrobacterium tumefaciens*)
- NPT II :新霉素-3'-磷酸转移酶基因(neomycin-3'-phosphotransferase gene)
- BAR:磷化麦黄酮乙酰转移酶基因(phosphinothricin acetyltransferase gene)
- PAT:草丁膦乙酰转移酶基因(Phosphinothricin acetyltransferase gene)
- GOX:葡萄糖氧化酶基因(glucose oxidase gene)
- CP4-EPSPS:根癌农杆菌 CP4 蛋白基因和 5-莽草酸-3-磷酸合成酶基因 (*Agrobacterium tumefaciens* strain CP4 Product: herbicide tolerant form of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase)
- EPSPS:5-莽草酸-3-磷酸合成酶基因(5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene)
- Cry3A:抗虫毒蛋白,选择性毒杀科罗拉多马铃薯甲虫(Colorado potato beetle larvae) (*B. thuringiensis* subsp. *Tenebrionis* (B.t.t.) strain BI 256-82)
- pNOS:来源于农杆菌的胭脂碱合成酶基因启动子(promoter of nopaline synthase gene from *Agrobacterium tumefaciens*)
- pSSuAra:来自拟南芥的小亚基启动子(the small subunit promoter of *Arabidopsis*)
- pTA29:来源于烟草的花蕊特异性 TA29 基因的发育调节启动子(developmentally regulated promoter from anther-specific TA29 gene from *Nicotiana tabacum*)
- pUbi:玉米泛素基因的启动子(promoter of maize Ubiquitin)
- t35S:花椰菜花叶病毒终止子(Cauliflower Mosaic Virus 35 terminator)
- Te9:为来源于豌豆二磷酸核酮糖羧化酶基因的终止子
- tOCS:章鱼碱合成酶终止子(terminator of octopine synthase)
- tg7:谷氨酰胺转移酶 7 (Transglutaminase 7 gene)
- PMI:6-磷酸甘露糖异构酶基因(Phosphomannose-isomerase)

4 方法提要

提取样品 DNA 后,采用实时荧光 PCR 技术对样品 DNA 筛选基因或品系特异性片段扩增,根据实时荧光扩增曲线,判断该样品中是否含有转基因成分。

对外源基因检测阳性的样品,或已知为转基因阳性的样品,如需进一步进行品系鉴定,则采用品系特异性实时荧光 PCR 扩增品系特异性片段,根据 PCR 扩增结果(实时荧光扩增曲线),判定该样品中含有哪(些)种转基因品系成分。

5 仪器设备

- 5.1 实时荧光 PCR 仪。
- 5.2 样品粉碎仪或研磨机。
- 5.3 天平:感量 0.01 g。
- 5.4 水浴锅或恒温孵育器。
- 5.5 冷冻离心机。
- 5.6 高压灭菌锅。
- 5.7 涡旋振荡器。
- 5.8 生物安全柜。
- 5.9 pH 计。
- 5.10 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。
- 5.11 微量移液器(2 μL 、10 μL 、100 μL 、200 μL 、1 000 μL)。

6 试剂和材料

除特别说明外,所有试剂均为分析纯或生化试剂,实验用水应符合 GB/T 6682 中一级水的规格。

6.1 实时荧光 PCR 预混液

Taq DNA 聚合酶(5 U/ μL)、PCR 反应缓冲液、氯化镁、dNTPs(含 dATP,dUTP,dCTP,dGTP)和 UNG 酶按比例配制的溶液。

6.2 荧光校正试剂(ROX)

50 倍。

6.3 引物和探针

6.3.1 筛选检测

对于不知道是否为转基因产品的样品,按照表 1 选用筛选基因进行检测。基因的引物和探针按照附录 A 中序列合成,加超纯水配制成 100 $\mu\text{mol/L}$ 储备液,实时荧光 PCR 扩增的引物和探针工作液浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。

表 1 转基因筛选检测基因选用

物 种	选 用 基 因
大豆及其加工品	内源基因,pCaMV35S,pFMV35S,tNOS,BAR,PAT,GOX,CP4-EPSPS,CTP2-CP4-EPSPS,tE9
玉米及其加工品	内源基因,pCaMV35S,pFMV35S,tNOS,NPT II,BAR,PAT,GOX,CP4-EPSPS,CTP2-CP4-EPSPS,Cry3A,tCaMV35S,PMI,CryIA(b),CryIAC,pRice-Eactin
油菜及其加工品	内源基因,pCaMV35S,pFMV35S,tNOS,NPT II,BAR,PAT,GOX,CP4-EPSPS,CTP2-CP4-EPSPS,pNOS,pSsuAra,pTA29,tCaMV35S,tE9,tOCS,tg7

表 1 (续)

物 种	选用基因
水稻及其加工品	内源基因, pCaMV35S, tNOS, BAR, CryIA(b), CryIAc
棉花及其加工品	内源基因, pCaMV35S, pFMV35S, tNOS, NPT II, BAR, PAT, CP4-EPSPS, pUbi, tE9, CryIA(b), CryIAc
马铃薯及其加工品	内源基因, pCaMV35S, pFMV35S, tNOS, NPT II, CP4-EPSPS, Cry3A, pNOS
亚麻及其加工品	内源基因, pCaMV35S, pFMV35S, tNOS, NPT II
甜菜及其加工品	内源基因, pCaMV35S, pFMV35S, tNOS, NPT II, PAT, CP4-EPSPS, CTP2-CP4-EPSPS
苜蓿及其加工品	内源基因, pFMV35S, CTP2-CP4-EPSPS, tE9
番茄	pCaMV35S, pFMV35S, tNOS, NPT II, CryIAc
苹果	pCaMV35S, pFMV35S, tNOS, NPT II
菊苣	pCaMV35S, pFMV35S, tNOS, BAR, NPT II
剪股颖	pCaMV35S, pFMV35S, tNOS, CP4-EPSPS
烟草	pCaMV35S, pFMV35S, tNOS, NPT II
李子	pCaMV35S, pFMV35S, tNOS, NPT II
甜瓜	pCaMV35S, pFMV35S, tNOS, NPT II
木瓜	pCaMV35S, pFMV35S, tNOS, NPT II
小麦	pCaMV35S, pFMV35S, tNOS, CP4-EPSPS
茄子	pCaMV35S, pFMV35S, tNOS, NPT II, CRYIAc
桉树	pCaMV35S, pFMV35S, tNOS, NPT II

6.3.2 品系特异性检测

根据需要检测的品系,按照附录 B 中给出的序列合成引物和探针,加超纯水配制成 100 μmol/L 储备液,实时荧光 PCR 扩增的引物和探针工作液浓度为 10 μmol/L。

7 检测步骤

7.1 取样和制样

按照 GB/T 19495.7 中规定的方法执行。

7.2 样品 DNA 的提取与纯化

按照 GB/T 19495.3 的方法或采用具有相同效果的植物基因组 DNA 提取试剂盒进行 DNA 提取。

7.3 DNA 浓度测定和定量

样品 DNA 用紫外分光光度计测定 260 nm 和 280 nm 处吸收值,分别计算核酸的纯度和浓度,计算公式如下:

$$\begin{aligned}\text{DNA 纯度} &= OD_{260} / OD_{280} \\ \text{DNA 浓度 (mg/mL)} &= 50 \times OD_{260}\end{aligned}$$

DNA 的纯度比值应在 1.7~1.9 之间,浓度不低于 20 ng/ μ L。

7.4 实时荧光 PCR 检测

7.4.1 实时荧光 PCR 反应体系

实时荧光 PCR 反应体系配制见表 2。每个样品设置 2 个平行重复。

表 2 实时荧光 PCR 检测体系

名称	储液浓度	终浓度
10 $\times$ PCR 缓冲液	10 $\times$	1 $\times$
MgCl ₂ 溶液	25 mmol/L	2.5 mmol/L
dNTP(含 dUTP)	2.5 mmol/L	0.2 mmol/L
UNG 酶	5 U/ μ L	0.075 U/ μ L
上游引物	10 μ mol/L	见附录 A、附录 B
下游引物	10 μ mol/L	见附录 A、附录 B
探针	10 μ mol/L	见附录 A、附录 B
Taq 酶	5 U/ μ L	0.05 U/ μ L
DNA 模板	—	50 ng~250 ng
超纯水	—	补足至 25 μ L

注 1: 可选用含有 PCR 缓冲液、MgCl₂、dNTP 和 Taq 酶等成分的基于 Taqman 探针的实时荧光 PCR 预混液进行实时荧光 PCR 扩增。

注 2: ROX 荧光试剂仅在具有 ROX 校正通道的实时荧光 PCR 仪上进行扩增时添加,否则用超纯水补足。

注 3: 反应体系中各试剂的量可根据具体情况或不同的反应总体积进行适当调整。

7.4.2 实时荧光 PCR 反应程序

实时荧光 PCR 反应参数为:50 $^{\circ}$ C/2 min;95 $^{\circ}$ C/10 min;95 $^{\circ}$ C/15 s;60 $^{\circ}$ C/60 s,40 个循环。

注: 95 $^{\circ}$ C/10 min 的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 扩增试剂体系不同作调整。

7.4.3 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。

7.4.4 实验对照的设立

每个样品应有 2 个平行实验,同时每次检测必须设立 3 个对照:

- 阳性对照,为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;
- 阴性对照,非转基因植物样品 DNA;
- 空白对照,设两个,一是提取 DNA 时设置的提取空白对照(以水代替样品),二是 PCR 反应的空白对照(以水代替 DNA 模板)。

8 质量控制

空白对照:内源基因检测 Ct 值大于或等于 40,外源基因或品系特异性检测 Ct 值大于或等于 40;

阴性对照:内源基因检测 Ct 值小于或等于 30,转化事件特异性检测 Ct 值大于或等于 40;

阳性对照:内源基因检测 Ct 值小于或等于 30,转化事件特异性检测 Ct 值小于或等于 35;

上述指标有一项不符合者,说明 PCR 反应体系不正常,应重新进行实时 PCR 扩增。

9 结果判定及表述

9.1 实时荧光 PCR 结果判定

测试样品检测 Ct 值大于或等于 40,内源基因检测 Ct 值小于或等于 30,则可判定该样品不含所检基因或品系。

测试样品检测 Ct 值小于或等于 36,内源基因检测 Ct 值小于或等于 30,判定该样品含有所检基因或品系。

测试样品检测 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,则可判定为该样品含有所检基因或品系。再次扩增后的外源基因检测 Ct 值大于或等于 40,则可判定为该样品不含所检基因或品系。

9.2 结果表述

结果为阳性的,表述为“检出×××外源基因”或“检出×××转基因品系”;

结果为阴性的,表述为“未检出×××外源基因”或“未检出×××转基因品系”。

10 防污染措施

检测过程中防止交叉污染的措施按照 GB/T 27403 和 GB/T 19495.2 中的规定执行。

11 最低检出限

各基因片段的实时荧光 PCR 扩增的最低检出限(LOD)为 0.01%。

附 录 A
(规范性附录)

植物转基因成分检测实时荧光 PCR 检测引物和探针

表 A.1 植物转基因成分检测实时荧光 PCR 检测引物和探针

序号	基因/品系 名称	引物/探针序列(5'-3')		终浓度 nmol/L	产物 大小 bp	适用范围		
1	18SrRNA	F	cctgagaaacggctacca	400	65	植物内源基因		
		R	cgtgtcaggattgggtaat	400				
		P	FAM-tgcgcgcctgctgccttct-BHQ1	200				
2	HMG1/Y	F	ggtcgtcctcctaaggcgaaag	400	99	油菜内源基因		
		R	cttcttcggcggtcgtccac	400				
		P	FAM-cggagccactcgggtgccgcaactt-BHQ1	200				
3	PEP	F	cccttgtaagctcgacatc	400	110		油菜内源基因	
		R	cttgctctctgaccatttttgt	400				
		P	FAM-ccgaccgtcacaccgatgttttaga-BHQ 1	200				
4	CruA	F	ggccagggtttccgtgat	200	101			油菜内源基因
		R	ccgtcgtttagaaccattgg	200				
		P	FAM-agtccttatgtgtctcaactttctgggtgca-BHQ1	200				
5	adh1	F	cgtcgtttcccatcttctctcc	300	135	玉米内源基因		
		R	ccactcgcgagaccctcagtc	300				
		P	FAM-aatcagggtcattttctcgtctctca-BHQ1	200				
6	zSSIb	F	ctc cca atc ctt tga cat ctg c	500	151		玉米内源基因	
		R	tgc att tct ctc ttg gtg aca gg	500				
		P	FAM-agc aaa gtc aga gcg crg caa tgca-TAMRA	200				
7	Lectin	F	cctcctcgggaaagttaaa	150	74	大豆内源基因		
		R	gggcataagaaggtaagtt	150				
		P	FAM-ccctcgtctcttggtcgcgccctct-BHQ1	50				
8	Lectin-KVM	F	caactttctgcaccaattgaca	200	104		大豆内源基因	
		R	tcaaactcaacagcgacgac	200				
		P	FAM-ccacaacacatgcaggttatcttgg-BHQ1	200				
9	LAT52	F	agaccacgagaacgatatttgc	400	92	番茄内源基因		
		R	ttcttgcttttcatatccagaca	400				
		P	FAM-ctctttgcagtcctccttgggct-BHQ1	200				

表 A.1 (续)

序号	基因/品系名称	引物/探针序列(5'-3')		终浓度 nmol/L	产物 大小 bp	适用范围
10	SPS	F	cacctttctcgaccaattgaca	200	104	水稻内源基因
		R	tcaaaactcaacagcgacgac	200		
		P	FAM-tccgagccgtccgtgcgtc-BHQ1	200		
11	PLD	F	tggtgagcgttttgcagtct	200	64	
		R	ctgatccactagcaggaggctcc	200		
		P	FAM-tgttgctgctccaatgtggcctg-BHQ1	200		
12	GOS	F	tggtgagcgttttgcagtct	200	67	
		R	ctgatccactagcaggaggctcc	200		
		P	tgttgctgctccaatgtggcctg	200		
13	UGPase	F	ggacatgtgaagagacggagc	400	88	马铃薯内源基因
		R	cctacctctaccctccgc	400		
		P	FAM-ctaccaccattacctcgacctctca-BHQ1	200		
14	SAH7	F	agtttgtaggttttgatgttacattgag	350	115	棉花内源基因
		R	gcattttgaaccgcctactg	250		
		P	FAM-aaacataaaaataatgggaacaacctgacatgt-BHQ1	175		
15	GLuA3	F	gacctccatattactgaaaggaag	150	121	甜菜内源基因
		R	gagtaattgtccatcctgttca	150		
		P	FAM-ctacgaagttaaagtatgtgccgctc-BHQ1	100		
16	Alfalfa-Acc	F	gatcagtgaaactcgcaaagtac	150	91	苜蓿内源基因
		R	caacgacgtgaacactacaac	150		
		P	FAM-tgaatgctcctgtgatctgccatgc-TAMRA	50		
17	GAG56D	F	caacaattttctcagccccaaca	200	121	小麦属内源基因
		R	tcttgcatgggttcacctgtt	200		
		P	FAM-ttcccgagccccaacaaccgc-BHQ1	200		
18	Wx012	F	gtcgcgggaacagagggtgt	500	102	小麦种内源基因
		R	gggtgtcctccattgcgaaa	500		
		P	FAM-caaggcggccgaaataagttgcc-BHQ1	200		
19	pCaMV35S	F	gcctctgccgacagtgtt	100	82	转基因大豆、玉米、油菜、棉花、水稻、番茄、马铃薯、木瓜、亚麻、甜菜、苹果、菊苣、剪股颖、烟草、李子、甜瓜、小麦、茄子和桉树等外源筛选基因
		R	aagacgtggttggaaacgtcttc	100		
		P	FAM-caaagatggacccccaccacg-BHQ1	100		

表 A.1 (续)

序号	基因/品系名称	引物/探针序列(5'-3')		终浓度 nmol/L	产物 大小 bp	适用范围
20	pFMV35S	F	cgaagacttaaagtagtgggcatct	400	79	同序号 18 的范围
		R	ttttgtctgggtccccacaa	400		
		P	FAM-tgaaagtaattctgtcaacatcgagcagctgg-BHQ1	200		
21	tNOS	F	catgtaatgcatgacgttattatg	400	165	同序号 18 的范围
		R	ttgttttctatcgctattaaatgt	400		
		P	FAM-atgggtttttatgattagagtcccgcaa-BHQ1	100		
22	NPT II	F	aggatctcgtcgtgacccat	400	183	转基因大豆、玉米、油菜、棉花、水稻、番茄、马铃薯、木瓜、亚麻、甜菜、苹果、菊苣、烟草、李子、甜瓜、茄子和桉树等外源筛选基因
		R	gcacgaggaagcgggtca	400		
		P	FAM-cacccagccggccacagtcgat-BHQ1	200		
23	BAR	F	acaagcacggtcaacttc	140	175	转基因油菜、玉米、小麦、棉花、水稻、大豆等筛选检测
		R	gaggtcgtccgtccactc	140		
		P	FAM-taccgagccgcaggaacc-BHQ1	100		
24	PAT	F	gtcgacatgtctccggagag	400	191	转基因油菜、玉米、棉花、大豆、甜菜等筛选检测
		R	gcaaccaaccaagggtatc	400		
		P	FAM-tggccgcggtttggatattcgtaa-BHQ1	200		
25	GOX	F	gtcttcgtgttgctggaaccgtt	400	121	转基因油菜、玉米、甜菜等筛选检测
		R	gaactggcaggagcgagagct	400		
		P	FAM-tgctcacgttctctacactegcgtcg-BHQ1	200		
26	CP4-EPSPS	F	gcaaatcctctggcctttcc	100	146	转基因油菜、大豆、玉米、棉花、马铃薯、甜菜、小麦、剪股颖等筛选检测
		R	cttgcccgattgatgacgctc	100		
		P	FAM-tcatgttcggcggtctcgcg-BHQ1	200		
27	CTP2-CP4-EPSPS	F	gggatgacgttaattggctctg	400	88	转基因玉米、大豆、油菜、甜菜、苜蓿等筛选检测
		R	ggctgcttgccacgtgaag	400		
		P	FAM-cacgccgtggaaacagaagacatgacc-BHQ1	200		

表 A.1 (续)

序号	基因/品系名称	引物/探针序列(5'-3')		终浓度 nmol/L	产物 大小 bp	适用范围
28	Cry3A	F	Tccggttacgaggttctt	400	86	转基因玉米、马铃薯等筛选检测
		R	ccatagatttgagcgctctta	400		
		P	FAM-acctatgctcaagctgccaacccc-BHQ1	200		
29	pNOS	F	gtgaccttagcgacttttgaa	340	79	转基因油菜, 马铃薯
		R	cgcggtttctggagtttaa	340		
		P	FAM-cgcaataatggtttctgacgtatgtgcttagc-BHQ1	400		
30	pSsuAra	F	ggcctaaggagaggtgtggaga	340	95	转基因油菜、对拟南芥是内源基因
		R	ctcatagataacgataagattcatggaatt	340		
		P	FAM-ccttatcggttgaaccgtggaataa-BHQ1	400		
31	pTA29	F	gaagctgtgctagagaagatgtttattc	340	117	转基因油菜, 对烟草是内源基因
		R	gctcgaagtatgcacatttagcaa	340		
		P	FAM-agtcagccacccaccttatgcaagtc-BHQ1	400		
32	pUbi	F	gagtagataatgccagctgttaa	340	76	转基因棉花, 对玉米是内源基因
		R	acgcgacgtcgtggtt	340		
		P	FAM-cgtcgacgagtctaacggacaccaac-BHQ1	400		
33	tCaMV35S	F	ggggtttcttatatgctcaacacatg	340	118	转基因玉米、油菜
		R	tcaccagtctctctacaaatctatcac	340		
		P	FAM-aaacctataagaacctaatcccttatctggga-BHQ1	400		
34	tE9	F	tgagaatgaacaaaggaccatatca	200	87	转基因玉米、大豆、油菜、棉花、苜蓿、对豌豆是内源基因
		R	tttttattcggttttctgtatcg	200		
		P	FAM-tcattaactcttctccatccatttccatttcacagt-BHQ1	200		
35	tOCS	F	cgggtcaaacctaaaagactgattaca	340	85	转基因油菜
		R	cgctcggtgtcgtagatact	340		
		P	FAM-tcttattcaaatttcaaaagtgtccccagg-BHQ1	400		
36	tg7	F	atgcaagtttaaattcagaaatatttcaa	340	97	转基因油菜
		R	atgtattacacataatcgcactcagtct	340		
		P	FAM-actgattatcagctggtacattgccgtagatga-BHQ1	400		
37	PMI	F	Cgggtgaatcagcggtt	200	59	转基因玉米
		R	Gccgtggcctttgacagt	200		
		P	FAM-tgccgccaacgaatcaccgg-BHQ1	200		

表 A.1 (续)

序号	基因/品系名称	引物/探针序列(5'-3')		终浓度 nmol/L	产物 大小 bp	适用范围
38	CryIA(b)	F	cgcgactggatcaggtaca	400	75	转基因大米、玉米、棉花等外源筛选基因
		R	tggggaacaggctcacgat	400		
		P	ccgccgcgagctgaccctgaccgtg	200		
39	CryIA (c)	F	cggaaatgcgtattcaattcaac	400	71	转基因水稻、玉米、棉花、茄子、番茄等外源筛选基因
		R	ttctggactgcgaacaatgg	400		
		P	FAM-acatgaacagcgccttgaccacagc-BHQ1	200		
		F	gaccctcacagttttggacattg	400	93	
		R	atttctctggtaagttgggacact	400		
		P	FAM-tcccgaactatgactccagaacctaccctatcc-BHQ1	200		
40	pRice-Eactin	F	tcgaggtcattcatatgcttgag	340	95	转基因玉米,对大米是内源基因
		R	ttttaactgatgttttcacttttgacc	340		
		P	FAM-agagagtcgggatagtcctcaaaataaaacaaaggta-BHQ1	400		

附 录 B

(规范性附录)

转基因作物品系特异性检测方法一览表

表 B.1 转基因作物品系特异性检测方法一览表

作物	品系名称	引物/探针序列(5'-3')		终浓度 nmol/L	产物 大小 bp
大豆	GTS40-3-2	F	ttcattcaaaataagatcatcacataggtt	150	84
		R	ggcattttagtagagccacctt	150	
		P	FAM-ccctttccatttggg-MGBNFQ	50	
	MON89788	F	tcccgtcttagcgcttcaat	150	139
		R	tcgagcaggacctgcagaa	150	
		P	FAM-ctgaaggcgggaaacgacaatctg-TAMRA	50	
	A2704-12	F	gcaaaaaagcggtagctcct	400	64
		R	attcaggctgcgcaactgtt	400	
		P	FAM-cggctcctcgatcgcccttc-TAMRA	200	
	A5547-127	F	gctatttggtggcatttttcca	400	75
		R	cactgcggccaacttactct	400	
		P	FAM-ccgcaatgtcataccgctcatcgtgt-TAMRA	200	
	DP305423	F	cgtgttctctttttggctage	800	93
		R	gtgaccaatgaatacataacacaaaacta	500	
		P	FAM-tgacacaaatgattttcatacaaaagtcgaga-TAMRA	220	
	DP356043	F	gtcgaataggctaggtttacgaaaaa	750	99
		R	tttgatattcttgagtagacgagagtgt	750	
		P	FAM-ctctagagatccgtcaacatggtggagcac-TAMRA	200	
	MON87701	F	cgtttccgccttcagtttaaa	600	89
		R	tggtagatgaagatacatgcttagcat	600	
		P	FAM-tcagtgtttgacacacacactaagcgtgcc-TAMRA	250	
	CV127	F	aacagaagttccgttgagctttaagac	400	88
		R	cattcgtagctcggatcgtgtac	400	
		P	FAM-tttggggaagctgtcccatgcc-TAMRA	100	
	MON87705	F	ttccggacatgaagccatttac	450	86
		R	acaacggtgccttgcccaaaag	450	
		P	FAM-aagagactcagggtgtgttatcactgcgg-TAMRA	250	

表 B.1 (续)

作物	品系名称	引物/探针序列(5'-3')		终浓度 nmol/L	产物 大小 bp
大豆	MON87769	F	catactcattgctgatccatgtagatt	600	87
		R	gcaagttgctcgtgaagttttg	600	
		P	FAM-cccggacatgaagccatttacaattgac-TAMRA	200	
	FG72	F	agatttgatcgggctgcagg	400	70
		R	gcacgtattgatgaccgcatta	400	
		P	FAM-aatgtggttcacgcgtt-MGBNFQ	200	
	MON87708	F	tcatactcattgctgatccatgtag	300	91
		R	agaacaaattaacgaaagacagaaacg	300	
		P	FAM-tcccggaacttttagctcaaaatgcatgta-TAMRA	150	
	DAS-81419-2	F	tctagctatatttagcatttgatattcat	400	105
		R	gcttcaagatcccaacttgcg	400	
		P	FAM-atcaacaggcaccgatgcgcaccg-TAMRA	120	
	DAS-68416-4	F	gtacattaaaaacgtccgcaatgtgt	550	130
		R	gtttaagaattagttcttacagtttatgttag	550	
		P	FAM-ttaagttgtctaagegtcaata-MGBNFQ	150	
	DAS-44406-6	F	ttatgttcttgttttctctcttagg	300	99
		R	cctcaattgcgagctttctaat	300	
		P	FAM-atteggacctcattgatgaccttaccgtt-TAMRA	180	
玉米	GA21	F	cgttatgctatttgcaactttagaaca	150	112
		R	gcgactcctctcgcgtt	150	
		P	FAM-tttctcaacagcagggtgggtccgggt-TAMRA	50	
	NK603	F	atgaatgacctegagtaagcttgtaa	150	108
		R	aagagataacaggatccactcaaacact	150	
		P	FAM-tggtaccacgcgacacttccactc-TAMRA	50	
	Bt11	F	tgtgtggccatttatcatcga	200	68
		R	cgctcagtggaaacgaaaactc	200	
		P	FAM-ttccatgacaaaatcccttaacgtgagt-TAMRA	150	
	Bt176	F	ggccgtgaacgagctgtt	300	82
		R	gggaagaagcctacatgttttctaa	300	
		P	FAM-agcaaccagatcgccgacacc-TAMRA	200	
	MON810	F	tcgaaggacgaaggactctaacgt	300	92
		R	gccaccttcttttccactatctt	300	
		P	FAM-aacatcttttgccattgcccagc-TAMRA	180	

表 B.1 (续)

作物	品系名称	引物/探针序列(5'-3')		终浓度 nmol/L	产物 大小 bp
玉米	MON863	F	gtaggatcggaagcttggtac	150	70
		R	tgttacggcctaaatgctgaact	150	
		P	FAM-tgaacacccatccgaacaagtaggtca-TAMRA	50	
	T25	F	acaagcgtgtgtgtctccac	400	102
		R	gacatgatactcttccaccg	400	
		P	FAM-tcattgagtcgttcgccattgtcg-TAMRA	200	
	CBH351	F	Tgttactagatcgcatctctct	400	96
		R	ctagaaggcaattctaattgac	400	
		P	FAM-gtcgacctgcaggcatgcaaggaattccatt-TAMRA	200	
	TC1507	F	tagtcttcggccagaatgg	300	58
		R	ctttgccaagatcaagcg	300	
		P	FAM-taactcaaggccctcactccg-TAMRA	150	
	59122	F	gggataagcaagtaaaagcgctc	250	86
		R	ccttaattctcgcctcatgatcag	250	
		P	FAM-tttaaactgaaggcgggaaacgacaa-TAMRA	200	
	MIR604	F	gcgcacgcnaattcaacag	600	76
		R	ggtcataacgtgactcccttaattct	300	
		P	FAM-aggcgggaaacgacaatctgatcatg-TAMRA	200	
	3272	F	tcacagaccagattctctttatgg	50	95
		R	cgtttcccgcttcagttta	900	
		P	FAM-actgctgacgcggccaacactg-TAMRA	200	
	LY038	F	tgggttcagtcgcgaatgtt	150	111
		R	aggaattcgatatcaagcttatcga	150	
		P	FAM-cgagcggagtttatgggtcgacgg-TAMRA	50	
	MON89034	F	ttctccatattgaccatcatactcatt	450	77
		R	ccggtatctataataccgtggtttttaa	450	
		P	FAM-atccccggaaattatgtt-MGBNFQ	100	
	MON88017	F	gagcaggacctgcagaagct	150	95
		R	tccggagttgaccatcca	150	
		P	FAM-tccgccttcagtttaacagagtcgggt-TAMRA	50	
	98140	F	gtgtgtatgtctctttgttggtctt	500	80
		R	gattgtcgtttccgccttc	500	
		P	FAM-ctctatcgatccccctctttgatagttaaact-TAMRA	200	

表 B.1 (续)

作物	品系名称	引物/探针序列(5'-3')		终浓度 nmol/L	产物 大小 bp
玉米	MIR162	F	gcgcgggtgtcatctatgttactag	300	92
		R	tgcttatctgttgccctcaga	300	
		P	FAM-tctagacaattcagtaacattaaaaacgtccgcca-TAMRA	150	
	DAS-40278-9	F	cacgaaccattgagttacaatc	350	98
		R	tggttcattgtattctggtttg	350	
		P	FAM-cgtagctaaccttcattgtattccg-TAMRA	150	
	MON87460	F	cacgttgaaggaaaaatggattg	600	82
		R	tcgcgatcctcctcaaagac	600	
		P	FAM-aggagatgtagataaaatttcaaagcgttagacggc-TAMRA	250	
	DAS59132 (Event 32)	F	ccgcaatgtgttattaagtgtctaag	400	—
		R	ggtgaatgtcgccgtgtgt	400	
		P	FAM-caattgttttacaccagaggccgacacg-TAMRA	200	
	TC-6275	F	agatctgcgcgcgatcgata	400	192
		R	tcggcgcgggtgcattgcata	400	
		P	FAM-ggatgcaaactgtaccgtataaattgacgc-TAMRA	200	
	5307	F	catggccgtatccgcaatgtg	350	107
		R	tgacacctttgccagtgg	350	
		P	FAM-accacaatataacctcttccctgggccag-TAMRA	125	
	MON 87427	F	acggaaacggtcgggtcaaatg	450	95
		R	ccatgtagatttcccggttttctc	450	
		P	FAM-tcgggacaatatggagaaaaagaaagag-TAMRA	200	
棉花	MON531	F	tccattcgagtttctcacgt	150	72
		R	aaccaatgccacccactga	150	
		P	FAM-ttgtccctccactttctctc-TAMRA	50	
	MON1445	F	ggagtaagacgattcagatcaaacac	150	87
		R	atcgacctgcagcccaagct	150	
		P	FAM-atcagattgtcgtttcccgccttcagttt-TAMRA	50	
	MON15985	F	gttactagatcggggatattcc	150	82
		R	aagggttgctaaatggatggga	150	
		P	FAM-ccgctctagaactagtggatctgcactgaa-TAMRA	50	
	MON88913	F	ggctttggctaccttaagagagtc	500	94
		R	caaattaccattaagtagccaaattac	500	
		P	FAM-aactatcagtgtttgactacat-MGBNFQ	100	

表 B.1 (续)

作物	品系名称	引物/探针序列(5'-3')		终浓度 nmol/L	产物 大小 bp
棉花	LLCotton25	F	cagattttgtgggattggaattc	400	79
		R	caaggaactattcaactgag	400	
		P	FAM-cttaacagtactcgccgctgaccgc-TAMRA	200	
	GHB614	F	caaatacacttgaacgacttcgt	400	119
		R	gcaggcatgcaagcttttaa	400	
		P	FAM-ctccatggcgatcgctacgttctagaatt-TAMRA	200	
	281-24-236	F	ctcattgctgatccatgtagatttc	350	111
		R	ggacaatgctgggctttgtg	450	
		P	FAM-ttgggttaataaagtcagattagaggagacaa-TAMRA	175	
	3006-210-23	F	aaatattaacaatgcattgagtagatg	400	90
		R	actctttcttttctccatattgacc	400	
		P	FAM-tactcattgctgatccatgtagatttcccg-TAMRA	150	
	T304-40	F	agcgcgcaaaactaggataaatt	400	78
		R	cctagatcttgggataacttgaaga	400	
		P	FAM-tcgcgcggtgtcatctatctc-TAMRA	200	
	GBH119	F	ccagtactaaaaatccagatcatgca	400	90
		R	gaaattgcgtgactcaaatcc	400	
		P	FAM-cctgcaggctcgacggccgagtag-TAMRA	200	
水稻	TT51-1 (Bt63)	F	agagactgggtgatttcagcggg	400	119
		R	gcgtccagaaggaaaaggaata	400	
		P	FAM-atctgcccagcactcgtccg-TAMRA	200	
	LLRice62	F	agctggcgtaatagcgaagagg	400	88
		R	tgctaacgggtgcatgtcta	400	
		P	FAM-cgcaccgattatttatacttttagtccacct-TAMRA	200	
	LLRice601	F	tctaggatccgaagcagatcgt	400	68
		R	ggagggcgcggagtgt	400	
		P	FAM-ccacctcccaacaataaaagcgctg-TAMRA	200	
	114-7-2	F	ccgacgcggaggaagac	400	69
		R	cgtttcccgccttcagtta	400	
		P	FAM-cggaggcggcgtcaaacactg-TAMRA	200	
	Kefeng6	F	gcttggatcagattgtcgttt	400	154
		R	gtcagataaactgattggtctgat	400	
		P	FAM-cgacaaaagatcaggattggg-ECLIPSE	200	

表 B.1 (续)

作物	品系名称	引物/探针序列(5'-3')		终浓度 nmol/L	产物 大小 bp
水稻	Kefeng8	F	atattctgaagtggcctgtt	400	171
		R	cgaccatgatgctgttctgc	400	
		P	FAM-cgttattttatgagatgggtgatctcaccatgcttg-TAMRA	200	
	KMD1	F	tccgcaatgtgttattaagtgtctaa	300	78
		R	cggatagcctgcccatct	900	
		P	FAM-cgtcaattgtttacaccacaatatatcccg-TAMRA	100	
油菜	RT73(GT73)	F	ccatattgaccatcatactcattgct	150	108
		R	gcttatacgaaggcaagaaaagga	150	
		P	FAM-ttcccgacatgaagatcatctctt-TAMRA	50	
	MS8	F	gttagaaaaagtaacaattaatagccgg	400	130
		R	ggagggtgttttgggtatc	400	
		P	FAM-aatataatcgacggatccccgggaattc-TAMRA	200	
	MS1	F	acgtcgggacatctacatt	400	187
		R	ctagatcggaagctgaagatgg	400	
		P	FAM-ctcattgctgatccacctagecgaatt-TAMRA	200	
	RF1	F	ctaaggagggtcaagatgtagc	400	113
		R	cgggcctaacttttgggtgtg	400	
		P	FAM-ctcatcatccacccagtcagcatca-TAMRA	200	
	RF2	F	gggtgagacaatatatcgacg	200	104
		R	gggcategcaccggtgag	200	
		P	FAM-caccggccaaattcgctttagcgt-TAMRA	200	
	RF3	F	cataaaggaagatggagacttgag	400	139
		R	agcatttagcatgtaaccatcagaca	400	
		P	FAM-cgcacgcttatcgaccataagccca-TAMRA	200	
	Oxy235	F	ctaacttttgggtgtgatgctga	400	124
		R	cgatagatgggtgtgtgagtcttg	400	
		P	FAM-agctgatggcaagttaatctccccgaagtcg-TAMRA	200	
	T45(HCN28)	F	caatggacacatgaattatgc	400	123
		R	gactctgtatgaactgttcgc	400	
		P	FAM-tagaggacctaacagaactcgccgt-TAMRA	200	
	Topas19/2 (HCN92)	F	gcggttctgtcagtt	400	95
		R	cgaccggcgtgatatatga	400	
		P	FAM-tcccgcgtcatcggcgg-TAMRA	200	

表 B.1 (续)

作物	品系名称	引物/探针序列(5'-3')		终浓度 nmol/L	产物 大小 bp
油菜	DP-073496-4	F	gttcttctcttcatagtcattacagtttt	600	84
		R	caaacctccatagagttcaacatcttaa	600	
		P	FAM-ttagttagatcaggatattcttg-MGBNFQ	250	
	MON88302	F	tccttgaaccttattttatagtcaca	450	101
		R	tcagattgtcgtttccgccttca	450	
		P	FAM-T tagtcatcatgttgaccacttcaaacact-TAMRA	200	
	DP-073496-4	F	gttcttctcttcatagtcattacagtttt	600	84
		R	caaacctccatagagttcaacatcttaa	600	
		P	FAM-ttagttagatcaggatattcttg-MGBNFQ	250	
马铃薯	EH92-527-1	F	gtgtcaaaacacaatttacagca	300	134
		R	tcccttaatttctccgctcatga	300	
		P	FAM-agattgtcgtttccgccttcagtt-TAMRA	160	
亚麻	Fp967	F	agcgcgcaactaggataaa	800	105
		R	accttcgggtcgatgtcta	800	
		P	FAM-cgcgcggtgtcatctatg-BHQ1	100	
甜菜	H7-1	F	tgggatctgggtggctctaact	400	108
		R	aatgtgctaaatcctgag	400	
		P	FAM-aaggcgggaaacgacaatct-TAMRA	100	

参 考 文 献

- [1] Validated Method of European Union Reference Laboratory for Food and Feed
- [2] GrohmannL, Brunen-NiewelerC, NemethA, Waiblinger HU. Collaborative trial validation studies of real-time PCR-based GMO screening methods for detection of the bar gene and the ctp2-cp4epsps construct. J Agric Food Chem 2009, 57:8913-8920
- [3] Frederic Debode Eric Janssen Gilbert Berben. Development of 10 new screening PCR assays for GMO detection targeting promoters (pFMV, pNOS, pSSuAra, pTA29, Pubi, Price actin) and terminators (t35S, tE9, tOCS, tg7). Eur Food Res Technol (2013) 236: 659-669
- [4] ISO 21569:2005/Amd. 1:2013 Foodstuffs-Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products-Qualitative nucleic acid based methods Amendment 1, 2013-4-1
-



SN/T 1204-2016

书号:155066 • 2-31325

定价: 24.00 元