

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2584—2010

水稻及其产品中转基因成分 实时荧光 PCR 检测方法

Protocol of real time polymerase chain reaction for detecting genetically modified
components in rice and its derived products

2010-05-27 发布

2010-12-01 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：中华人民共和国厦门出入境检验检疫局、中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国北京出入境检验检疫局、中华人民共和国湖北出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：陈红运、梁新苗、陈双雅、王振华、李玲、黄文胜、胡小钟、朱水芳、陈洪俊。

水稻及其产品中转基因成分 实时荧光 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了水稻及米制品中转基因成分的检测方法。

本标准适用于转 Bt 基因抗虫水稻 (TT51-1, 克螟稻, II 优科丰 6 号) 和耐除草剂转基因水稻 (LLRICE62, LLRICE601) 的检测, 也适用于米制品中转基因成分的检测。

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 6682 分析实验室用水规格和实验方法

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 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

3.1

cryIAc 基因 cryIAc gene

编码苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) CryIAc 杀虫晶体蛋白的基因。

3.2

cryIAb 基因 cryIAb gene

编码苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) CryIAb 杀虫晶体蛋白的基因。

3.3

cryIAb/cryIAc 融合基因 cryIAb/cryIAc fusion gene

cryIAb 基因与 cryIAc 基因经人工拼接形成的基因。

3.4

sps 基因 sucrose phosphate synthase

蔗糖磷酸合酶基因, 在本标准中用作水稻内标准基因。

3.5

gos9 基因 gos gene

一个根部表达的水稻基因, 在本标准中用作水稻内标准基因。

3.6

PLD 基因 phospholipase D gene

磷脂酶 D 基因。

3.7

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, 某些品牌的定量 PCR 仪也称为 Cp (cross point) 值。

4 原理

应用 TaqMan 探针技术,根据常用的筛选基因(启动子,终止子等)序列、构建特异性序列(启动子或终止子与目标基因之间的序列)、转化体特异性序列和水稻内源基因序列,设计引物和荧光探针,对试样中基因组 DNA 进行 PCR 扩增。在 PCR 反应过程中,荧光信号的累积与 PCR 产物形成完全同步,因此可根据荧光信号的强度判定样品中是否含有特定的基因。

5 仪器和试剂

5.1 主要仪器

定量 PCR 仪;冷冻研磨仪;消毒灭菌锅;制冰机;核酸蛋白分析仪;高速冷冻离心机,台式小型离心机,Mini 个人离心机;低温冰箱;旋涡振荡器;微量移液器。

5.2 主要试剂

除另有规定外,所有试剂均为分析纯或生化试剂。实验用水应符合 GB 6682 中一级水的规格。主要试剂见附录 A。水稻内源基因和检测用外源基因的引物和探针序列见表 1。

表 1 引物和探针序列

| 检测基因 | 引物/探针序列(5'-3') | 终浓度/ (nmol/L) | 用途 |
|---------|--------------------------------------|------------------|--|
| sps | 上游引物:ttgcgccctgaacggatat | 400 | 水稻内源基因。 任选其一 |
| | 下游引物:cggttgatcttttgggatg | 400 | |
| | 探针:tccgagccgtccgtgcgtc | 200 | |
| gos9 | 上游引物:ttagcctcccctgcaga | 300 | |
| | 下游引物:agagtcacacaagtgtcccg | 300 | |
| | 探针:cggcagtggtggtttcttcgg | 100 | |
| PLD | 上游引物:tggtagcgttttgcagtct | 200 | |
| | 下游引物:ctgatccactagcaggaggctcc | 200 | |
| | 探针:tgtgtgctgccaatgtggcctg | 200 | |
| CaMV35S | 上游引物:cgacagtggtcccaaga | 200 | 进出口水稻及米制品中转基因成分筛选检测 |
| | 下游引物:aagacgtggttgaacgtcttc | 200 | |
| | 探针:tggacccccacccacaggagcacc | 100 | |
| NOS | 上游引物:atcgttcaaacatttggca | 200 | |
| | 下游引物:attcgggactctaata | 200 | |
| | 探针:catcgcaagaccggcaacagg | 100 | |
| Bt | 上游引物:gggaaatgcgtattcaattcaac | 400 | 出口水稻及米制品中 Bt 基因 (cryIAb, cryIAc 或 cryIAb/cryIAc) 筛选检测。 任选其一 |
| | 下游引物:ttctggactgcaacaatgg | 400 | |
| | 探针:acatgaacagcgccctgaccacagc | 200 | |
| | 上游引物:gaccctcacagtttggacatig | 400 | |
| | 下游引物:atttctctggtaagtgggacact | 400 | |
| | 探针:tcccgaactatgactccagaacctaccctatcc | 200 | |

表 1 引物和探针序列(续)

| 检测基因 | 引物/探针序列(5'-3') | 终浓度/ (nmol/L) | 用途 |
|---------------------------|--------------------------------------|------------------|--|
| cryIAb/cryIAc-NOS | 上游引物:gactgctggagtgattatcgacaga | 300 | 转基因水稻 TT51-1(Bt 63)构建特异性检测。欧盟官方指定的检测方法 |
| | 下游引物:agctcggctacctcgacttattcag | 300 | |
| | 探针:tcgagttcattccagttactgcaaacactcgag | 100 | |
| flanking genomic sequence | 上游引物:agagactgggtgatttcagcggg | 800 | 转基因水稻 TT51-1(Bt 63)转化体特异性检测 |
| | 下游引物:gcgccagaaggaaaaggaaata | 800 | |
| | 探针:atctgccccagcactcgtccg | 400 | |
| LLRICE62 | 上游引物:agctggcgtaatagcgaagagg | 400 | 耐除草剂转基因水稻“LLRICE62”转化体特异性检测 |
| | 下游引物:tgctaacgggtgcaicgtcta | 400 | |
| | 探针:cgcaccgattattatacttttagtccacct | 200 | |
| LLRICE601 | 上游引物:tctaggatccgaagcagatcgt | 400 | 耐除草剂转基因水稻“LLRICE601”转化体特异性检测 |
| | 下游引物:ggagggcgcggagtgt | 400 | |
| | 探针:ccacctcccaacaataaaagcgctg | 200 | |

6 抽样与制样

6.1 抽样

按照 SN/T 1194 中的规定执行。

6.2 制样

称取约 200 g 样品,用粉碎机或冷冻研磨仪将样品粉碎至细粉状。

7 检测

7.1 防污染措施

检测过程中防污染措施按照 SN/T 1193 中的规定执行。

7.2 DNA 提取

7.2.1 DNA 模板制备

每个样品提取 2 个平行管。称取 200 mg 粉碎的样品,加入 1 mL 预冷至 4 °C 的抽提液,剧烈摇动混匀后,在冰上静置 5 min,4 °C 条件下 10 000g 离心 15 min,弃上清液;加入 600 μL 预热到 65 °C 的裂解液,充分重悬沉淀,在 65 °C 恒温保持 40 min,期间颠倒混匀 5 次;室温条件下,10 000g 离心 10 min,取上清液转至另一新离心管中;加入 5 μL RNase A,37 °C 恒温保持 30 min。分别用等体积苯酚:异戊醇溶液和三氯甲烷:异戊醇溶液各抽提一次;室温条件下,10 000g 离心 10 min,取上清液转至另一新离心管中;加入三分之二体积异丙醇,十分之一体积 3 mol/L 乙酸钠溶液(pH5.6),-20 °C 放置 2 h~3 h;在 4 °C 条件下,10 000g 离心 15 min,弃上清液,用 70%乙醇洗涤沉淀一次,倒出乙醇,晾干沉淀;加

入 50 μL TE(pH8.0)溶解沉淀,所得溶液即为样品 DNA 溶液。

注:也可使用等效的 DNA 提取试剂盒。

7.2.2 DNA 浓度测定

采用紫外分光光度法测定 DNA 浓度,所测得 OD 值为核酸总量。紫外分光光度法检测核酸浓度的最佳范围是 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,OD 值应该在 0.05~1 的区间内。

将 DNA 溶液做适当的稀释,放入紫外分光光度计的比色皿中,于 260 nm 处测定其吸收峰,1OD_{260 nm}=50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 双链 DNA 或 38 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 单链 DNA。PCR 级 DNA 溶液的 OD_{260 nm}/OD_{280 nm} 比值为 1.7~2.0。

7.3 PCR 反应

7.3.1 阴性对照、阳性对照和空白对照的设置

以非转基因水稻为阴性对照,以转基因水稻为阳性对照,以水或 TE 溶液为空白对照。

7.3.2 PCR 反应体系

PCR 反应体系见表 2。每个 DNA 样品做 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 2 PCR 反应体系

| 试剂名称 | 终浓度 |
|--|--|
| TaqMan Universal Master Mix(2 \times) | 1 \times |
| 引物(上游) | 0.2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ~0.8 $\mu\text{mol}/\text{L}$ |
| 引物(下游) | 0.2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ~0.8 $\mu\text{mol}/\text{L}$ |
| 探针 | 0.1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ~0.4 $\mu\text{mol}/\text{L}$ |
| DNA 模板(20 ng~30 ng/ μL) | 5 μL |
| 补水至 | 50 μL |

7.3.3 仪器设置

设定样品名称、报告基团和淬灭基团的种类、荧光信号收集等。

7.3.4 PCR 反应参数

实时荧光 PCR 扩增反应参数见表 3。

表 3 实时荧光 PCR 反应参数

| 作用 | 时间/s | 温度/ $^{\circ}\text{C}$ |
|----------------|------|------------------------|
| UNG 酶消除残留污染 | 120 | 50 |
| 活化 DNA 合成酶/预变性 | 600 | 95 |
| PCR(40 个循环) | | |
| 变性 | 15 | 95 |
| 退火/延伸/荧光信号收集 | 60 | 60 |

7.3.5 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。

8 结果分析

8.1 阈值设定

实时荧光 PCR 反应结束后,设置荧光信号阈值,阈值设定原则根据仪器噪声情况进行调整,以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增曲线的最高点为准。

8.2 质量控制

空白对照:内源基因和外源基因均无荧光增幅现象。

阴性对照:内源基因有荧光增幅现象且 Ct 值小于或等于 36,外源基因无荧光增幅现象。

阳性对照:内源基因和外源基因均有荧光增幅现象,且 Ct 值小于或等于 36。

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 结果判定与表述

9.1 结果判定

测试样品外源基因检测 Ct 值等于 40,判断该样品不含所检的外源基因。

测试样品外源基因检测 Ct 值小于或等于 36,判断该样品含有所检的外源基因。

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,则可判定为该样品检出×××基因。再次扩增后的外源基因检测 Ct 值等于 40,则可判定为该样品未检出×××基因。

9.2 结果表述

该样品未检出×××基因(品系)。

该样品检出×××基因(品系)。

附录 A
(规范性附录)
主要试剂

A.1 10 mol/L 氢氧化钠(NaOH)溶液

在 160 mL 水中加入 80 g 氢氧化钠,溶解后加水定容至 200 mL,塑料瓶中保存。

A.2 0.5 mol/L EDTA 溶液(pH8.0)

称取二水乙二胺四乙酸二钠($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)18.6 g,加入 70 mL 水中,加入少量 10 mol/L 氢氧化钠溶液,加热至完全溶解后,冷却至室温,用 10 mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 至 8.0,加水定容至 100 mL。在 103.4 kPa(121 °C)条件下灭菌 20 min。

A.3 1 mol/L Tris-HCl 溶液(pH8.0)

称取 121.1 g 三羟甲基氨基甲烷(Tris)溶解于 800 mL 水中,用浓盐酸调 pH 至 8.0,加水定容至 1 L。在 103.4 kPa(121 °C)条件下灭菌 20 min。

A.4 1 mol/L Tris-HCl(pH7.5)

称取 121.1 g Tris 碱溶解于 800 mL 水中,用浓盐酸调 pH 至 7.5,用水定容至 1 L。在 103.4 kPa(121 °C)条件下灭菌 20 min。

A.5 10 mg/mL RNase A

将胰 RNA 酶(RNase A)溶于 10 mmol/L Tris-HCl(pH7.5)、15 mmol/L 氯化钠中,配成 10 mg/mL 的浓度,于 100 °C 加热 15 min,缓慢冷却至室温,分装成小份保存于 -20 °C。

A.6 3 mol/L 乙酸钠(pH5.6)

称取 408.3 g 三水乙酸钠溶解于 800 mL 水中,用冰乙酸调 pH 至 5.6,用水定容至 1 L。在 103.4 kPa(121 °C)条件下灭菌 20 min。

A.7 抽提液

在 600 mL 水中加入 69.3 g 葡萄糖,20 g 聚乙烯吡咯烷酮(K30)(PVP),1 g 二乙胺基二硫代甲酸钠(Sodium diethyldithiocarbonate,DIECA),充分溶解,然后加入 1 mol/L Tris-HCl(pH7.5)100 mL,0.5 mol/L EDTA(pH8.0)10 mL,加水定容至 1 L,4 °C 保存,使用时加入 0.2%(体积分数)的 β -巯基乙醇。

A.8 裂解液

在 600 mL 水中加入 81.7 g 氯化钠,20 g 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB),20 g 聚乙烯吡咯烷酮(K30)(PVP),1 g 二乙胺基二硫代甲酸钠(Sodium diethyldithiocarbonate,DIECA),充分溶解,然后加入 1 mol/L Tris-HCl(pH7.5)100 mL,0.5 mol/L EDTA(pH8.0)4 mL,加水定容至 1 L,室温保存,使用时加入 0.2%(体积分数)的 β -巯基乙醇。

A.9 TE 缓冲液(pH8.0)

分别加入 1 mol/L Tris-HCl(pH8.0)10 mL 和 0.5 mol/L EDTA(pH8.0)溶液 2 mL,加水定容至 1 000 mL。在 103.4 kPa(121 °C)条件下灭菌 20 min。

A.10 苯酚:三氯甲烷:异戊醇溶液

将苯酚、三氯甲烷和异戊醇按照 25:24:1 的体积比混合。

A.11 三氯甲烷:异戊醇溶液

将三氯甲烷和异戊醇按照 24:1 的体积比混合。

A.12 异丙醇。

A.13 70%乙醇(体积分数)。

中华人民共和国出入境检验检疫
行业标准
水稻及其产品中转基因成分
实时荧光 PCR 检测方法
SN/T 2584—2010

*

中国标准出版社出版
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 13 千字
2010年10月第一版 2010年10月第一次印刷
印数 1—1 600

*

书号: 155066·2-21189 定价 16.00 元



SN/T 2584-2010