ICS 65.020.01
B 04

中华人民共和国国家标准

农业农村部公告第323号—16—2020

转基因植物及其产品成分检测 抗虫耐除草剂玉米GH5112E-117C及其衍生品种定性PCR方法

Detection of genetically modified plants and derived products—Qualitative PCR method for insect-resistant and herbicide-tolerant maize GH5112E-117C and its derivates

2020-08-04 发布　　2020-11-01 实施

中华人民共和国农业农村部 发布

前　言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由中华人民共和国农业农村部提出。

本标准由全国农业转基因生物安全管理标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：农业农村部科技发展中心、吉林省农业科学院、农业农村部环境保护科研监测所。

本标准主要起草人：李飞武、宋贵文、李葱葱、章秋艳、龙丽坤、董立明、闫伟、邢珍娟、刘娜、夏蔚、谢彦博、谭喜昌。

转基因植物及其产品成分检测
抗虫耐除草剂玉米 GH5112E-117C 及其衍生品种定性 PCR 方法

1 范围

本标准规定了转基因抗虫耐除草剂玉米 GH5112E-117C 转化体特异性定性 PCR 检测方法。

本标准适用于转基因抗虫耐除草剂玉米 GH5112E-117C 及其衍生品种，以及制品中 GH5112E-117C 转化体成分的定性 PCR 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。

农业部 1485 号公告—4—2010 转基因植物及其产品成分检测 DNA 提取和纯化

农业部 1861 号公告—3—2012 转基因植物及其产品成分检测 玉米内标准基因定性 PCR 方法

农业部 2031 号公告—19—2013 转基因植物及其产品成分检测 抽样

NY/T 672 转基因植物及其产品检测 通用要求

3 术语和定义

农业部 1861 号公告—3—2012 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

GH5112E-117C 转化体特异性序列 event-specific sequence of GH5112E-117C

GH5112E-117C 的外源插入片段 5′端与玉米基因组的连接区序列，包括玉米基因组序列及转化载体 T-DNA 部分序列。

4 原理

根据抗虫耐除草剂玉米 GH5112E-117C 转化体特异性序列设计特异性引物，对试样进行 PCR 扩增。依据是否扩增获得预期的 DNA 片段，判断样品中是否含有抗虫耐除草剂玉米 GH5112E-117C 转化体成分。

5 试剂和材料

除非另有说明，仅使用分析纯试剂和重蒸馏水。

5.1 琼脂糖。

5.2 10 g/L 溴化乙锭(EB)溶液：称取 1.0 g 溴化乙锭，溶解于 100 mL 水中，避光保存。

警告——溴化乙锭有致癌作用，配制和使用时应戴一次性手套操作并妥善处理废弃物。

注：根据需要可选择其他效果相当的核酸染料代替溴化乙锭作为核酸电泳的染色剂。

5.3 10 mol/L 氢氧化钠(NaOH)溶液：在 160 mL 水中加入 80.0 g 氢氧化钠，溶解后，冷却至室温，再加水定容至 200 mL。

5.4 500 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na_2)溶液(pH 8.0)：称取 18.6 g 乙二胺四乙酸二钠，加入 70 mL 水中，缓慢滴加氢氧化钠溶液(见 5.3)直至 EDTA-Na_2完全溶解，用氢氧化钠溶液(见 5.3)调 pH 至 8.0，加水定容至 100 mL。在 103.4 kPa(121℃)条件下灭菌 20 min。

5.5 1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl)溶液(pH 8.0)：称取 121.1 g 三羟甲基氨基甲烷溶解于 800 mL 水中，用盐酸调 pH 至 8.0，加水定容至 1 000 mL。在 103.4 kPa(121℃)条件下灭菌 20 min。

5.6 TE缓冲液(pH 8.0):分别量取10 mL三羟甲基氨基甲烷-盐酸溶液(见5.5)和2 mL乙二胺四乙酸二钠溶液(见5.4),加水定容至1 000 mL。在103.4 kPa(121℃)条件下灭菌20 min。

5.7 50×TAE缓冲液:称取242.2 g三羟甲基氨基甲烷(Tris),先用500 mL水加热搅拌溶解后,加入100 mL乙二胺四乙酸二钠溶液(见5.4),用冰乙酸调pH至8.0,然后加水定容至1 000 mL。使用时用水稀释成1×TAE。

5.8 加样缓冲液:称取250.0 mg溴酚蓝,加入10 mL水,在室温下溶解12 h;称取250.0 mg二甲基苯腈蓝,加10 mL水溶解;称取50.0 g蔗糖,加30 mL水溶解。混合以上3种溶液,加水定容至100 mL,在4℃下保存。

5.9 DNA分子量标准:可以清楚地区分100 bp~1 000 bp的DNA片段。

5.10 dNTPs混合溶液:将浓度为10 mmol/L的dATP、dTTP、dGTP、dCTP 4种脱氧核糖核苷酸溶液等体积混合。

5.11 *Taq* DNA聚合酶、PCR扩增缓冲液及25 mmol/L氯化镁($MgCl_2$)溶液。

5.12 **玉米内标准基因*zSSIIb*基因引物(见农业部1861号公告—3—2012)**

zSSIIb-1F:5′-CTCCCAATCCTTTGACATCTGC-3′;

zSSIIb-2R:5′-TCGATTTCTCTCTTGGTGACAGG-3′。

预期扩增片段大小为151 bp。

5.13 **GH5112E-117C转化体特异性序列引物**

GH5112E-117C-F:5′-ACCAGCACCAGGTCCGAGTTGAGA-3′;

GH5112E-117C-R:5′-CCCAGGTACATTAAAAACGTCCGC-3′。

预期扩增片段大小为179 bp(参见附录A)。

5.14 引物溶液:用TE缓冲液(见5.6)或水分别将上述引物稀释到10 μmol/L。

5.15 石蜡油。

5.16 植物DNA提取试剂盒。

5.17 定性PCR扩增试剂盒。

5.18 PCR产物回收试剂盒。

6 主要仪器和设备

6.1 分析天平:感量0.1 g和0.1 mg。

6.2 PCR扩增仪:升降温速度>1.5℃/s,孔间温度差异<1.0℃。

6.3 电泳槽、电泳仪等电泳装置。

6.4 凝胶成像系统或照相系统。

7 分析步骤

7.1 抽样

按NY/T 672和农业部2031号公告—19—2013的规定执行。

7.2 试样制备

按NY/T 672和农业部2031号公告—19—2013的规定执行。

7.3 试样预处理

按农业部1485号公告—4—2010规定执行。

7.4 DNA模板制备

按农业部1485号公告—4—2010规定执行。

7.5 PCR扩增

7.5.1 试样PCR扩增

7.5.1.1 **玉米内标准基因 PCR 扩增**

按农业部 1861 号公告—3—2012 中的 7.5.1 规定执行。

7.5.1.2 **转化体特异性序列 PCR 扩增**

7.5.1.2.1 每个试样 PCR 扩增设置 3 个平行。

7.5.1.2.2 在 PCR 管中按表 1 依次加入反应试剂，混匀，再加 25 μL 石蜡油(有热盖功能的 PCR 仪可不加)。也可采用经验证的、效果相当的定性 PCR 试剂盒配制反应体系。

表 1 定性 PCR 扩增体系

试剂	终浓度	体积
ddH_2O		—
10×PCR 缓冲液	1×	2.5 μL
25 mmol/L 氯化镁溶液	1.5 mmol/L	1.5 μL
dNTPs 混合溶液(各 2.5 mmol/L)	0.2 mmol/L	2.0 μL
10 μmol/L GH5112E-117C-F	0.2 μmol/L	0.5 μL
10 μmol/L GH5112E-117C-R	0.2 μmol/L	0.5 μL
Taq DNA 聚合酶	0.025 U/μL	—
25 mg/L DNA 模板	2.0 mg/L	2.0 μL
总体积		25.0 μL

"—"表示体积不确定，如果 PCR 缓冲液中含有氯化镁，则不加氯化镁溶液，根据 *Taq* 酶的浓度确定其体积，并相应调整 ddH_2O 的体积，使反应体系总体积达到 25.0 μL。

若采用定性 PCR 试剂盒，则按试剂盒说明书的推荐用量配制反应体系，但上下游引物用量按表 1 执行。

7.5.1.2.3 将 PCR 管放在离心机上，500 *g*～3 000 *g* 离心 10 s，然后取出 PCR 管，放入 PCR 仪中。

7.5.1.2.4 进行 PCR 扩增。反应程序为：94℃变性 5 min；94℃变性 30 s，58℃退火 30 s，72℃延伸 30 s，共进行 35 次循环；72℃延伸 5 min；10℃保存。

7.5.1.2.5 反应结束后取出 PCR 管，对 PCR 扩增产物进行电泳检测。

7.5.2 **对照 PCR 扩增**

在试样 PCR 扩增的同时，应设置 PCR 阳性对照、PCR 阴性对照和 PCR 空白对照。

以抗虫耐除草剂玉米 GH5112E-117C 为阳性对照(抗虫耐除草剂玉米 GH5112E-117C 的质量分数为 0.1%～1.0%的玉米基因组 DNA，或抗虫耐除草剂玉米 GH5112E-117C 转化体特异性序列与玉米基因组内标准基因相比的拷贝数分数为 0.1%～1.0%的 DNA 溶液)；以非转基因玉米基因组 DNA 作为阴性对照；以水作为空白对照。

除模板外，对照 PCR 扩增与试样 PCR 扩增相同(见 7.5.1)。

7.6 PCR 产物电泳检测

按 20 g/L 的质量浓度称量琼脂糖，加入 1×TAE 缓冲液中，加热溶解，配制成琼脂糖溶液。每 100 mL琼脂糖溶液中加入 5 μL EB 溶液或适量的其他核酸染料，混匀，稍适冷却后，将其倒入电泳板上，插上梳板，室温下凝固成凝胶后，放入 1×TAE 缓冲液中，垂直向上轻轻拔去梳板。取 8 μL PCR 产物与 2 μL加样缓冲液混合后加入凝胶点样孔，同时在其中一个点样孔中加入 DNA 分子量标准，接通电源在 2 V/cm～5 V/cm 条件下电泳检测。

7.7 凝胶成像分析

电泳结束后，取出琼脂糖凝胶，置于凝胶成像仪上成像。根据 DNA 分子量标准估计扩增条带的大小，将电泳结果形成电子文件存档或用照相系统拍照。如需通过序列分析确认 PCR 扩增片段是否为目的 DNA 片段，按照 7.8 和 7.9 的规定执行。

7.8 PCR 产物回收

按 PCR 产物回收试剂盒说明书，回收 PCR 扩增的 DNA 片段。

7.9 PCR 产物测序验证

将回收的 PCR 产物克隆测序，与抗虫耐除草剂玉米 GH5112E-117C 转化体特异性序列(参见附录 A)

进行比对，确定 PCR 扩增的 DNA 片段是否为目的 DNA 片段。

8 结果分析与表述

8.1 对照检测结果分析

PCR 扩增中，阳性对照玉米内标准基因和抗虫耐除草剂玉米 GH5112E-117C 转化体特异性序列均得到扩增，而阴性对照仅扩增出玉米内标准基因片段，空白对照没有扩增片段，表明 PCR 检测反应体系正常工作，方可按 8.2 进行判断。否则，重新检测。

8.2 样品检测结果分析和表述

8.2.1 试样玉米内标准基因和抗虫耐除草剂玉米 GH5112E-117C 转化体特异性序列均得到扩增，表明样品中检测出抗虫耐除草剂玉米 GH5112E-117C 转化体成分，表述为“样品中检测出抗虫耐除草剂玉米 GH5112E-117C 转化体成分，检测结果为阳性”。

8.2.2 试样玉米内标准基因片段得到扩增，而抗虫耐除草剂玉米 GH5112E-117C 转化体特异性序列未得到扩增，表明样品中未检测出抗虫耐除草剂玉米 GH5112E-117C 转化体成分，表述为“样品中未检测出抗虫耐除草剂玉米 GH5112E-117C 转化体成分，检测结果为阴性”。

8.2.3 试样玉米内标准基因片段未得到扩增，表明样品中未检测出玉米成分，表述为“样品中未检测出玉米基因组 DNA 成分，检测结果为阴性”。

注：3 个平行的 PCR 扩增结果出现不一致的，应重做 PCR 扩增样品 2 次，最终以多数结果为准。

9 检出限

本标准方法的检出限为 0.1%（含靶序列样品 DNA/总样品 DNA）。

注：本标准的检出限是以 PCR 检测反应体系中加入 50 ng DNA 模板进行测算的。

AGRICULTURAL STANDARD PUBLISHING RESEARCH CENTER

附 录 A
（资料性附录）
抗虫耐除草剂玉米 GH5112E-117C 转化体特异性序列

1 ACCAGCACCA GGTCCGAGTT GAGATCGAGT CCCTCTTTGA CGGGACCGAC
51 TTCTCGGAGC CGCTGACCCG TGCCAGGTTT GAGGAGCTGA ACAACGATCT
101 GTTCCGCAAA TTGTGGTGTA AACAAATTGA CGCTTAGACA ACTTAATAAC
151 ACATTGCGGA CGTTTTTAAT GTACCTGGG

注 1：序列方向为 5′-3′。

注 2：5′端下划线部分为 GH5112E-117C-F 引物序列，3′端下划线部分为 GH5112E-117C-R 引物的反向互补序列。

注 3：1～109 为玉米基因组序列，110～179 为外源插入片段部分序列。

农业农村部公告第323号—16—2020

中华人民共和国
国家标准
转基因植物及其产品成分检测　抗虫耐除草剂
玉米GH5112E-117C及其衍生品种定性PCR方法
农业农村部公告第323号—16—2020
*　*　*
中国农业出版社出版
（北京市朝阳区麦子店街18号楼）
（邮政编码：100125　网址：www.ccap.com.cn）
北京印刷一厂印刷
新华书店北京发行所发行　各地新华书店经销
*　*　*
开本 880mm×1230mm 1/16　印张 0.75　字数 15千字
2020年10月第1版　2020年10月北京第1次印刷
书号：16109·8239
定价：18.00元

版权专有　侵权必究
举报电话：(010) 59194261

农业农村部公告第323号—16—2020