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—10—2020

转基因植物及其产品成分检测 耐除草剂大豆GTS40-3-2及其衍生品种定量PCR方法

Detection of genetically modified plants and derived products—Quantitative PCR method for herbicide-tolerant soybean GTS40-3-2 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、黑龙江省农业科学院农产品质量安全研究所、上海市农业科学院、中国农业科学院生物技术研究所、上海交通大学、天津市农业科学院。

本标准主要起草人：温洪涛、梁晋刚、丁一佳、张旭冬、刘华、杨洋、李亮、关海涛、樊春海、兰青阔、张瑞英。

转基因植物及其产品成分检测
耐除草剂大豆 GTS40-3-2 及其衍生品种定量 PCR 方法

1 范围

本标准规定了转基因耐除草剂大豆 GTS40-3-2 转化体特异性定量 PCR 检测方法。

本标准适用于转基因耐除草剂大豆 GTS40-3-2 及其衍生品种，以及制品中 GTS40-3-2 转化体的定量 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 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

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

GTS40-3-2 转化体特异性序列　event-specific sequence of GTS40-3-2

GTS40-3-2 的外源插入片段 5′端与大豆基因组的连接区序列，包括大豆基因组序列及转化载体 T-DNA 部分序列。

4 原理

根据耐除草剂大豆 GTS40-3-2 转化体特异性序列和 *Lectin* 内标准基因特异性序列设计引物和 *Taq*Man 荧光探针，对标准样品和试样同时进行实时荧光定量 PCR 扩增。根据标准样品模板拷贝数与 *Ct* 值间的线性关系，分别绘制外源基因和内标准基因的标准曲线。计算试样中 GTS40-3-2 转化体和 *Lectin* 内标准基因的拷贝数及其比值。

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　*Taq*Man 荧光定量 PCR 扩增试剂盒。

5.2　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。

5.3　500 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 5.2）直至 EDTA-Na_2 完全溶解，用氢氧化钠溶液（见 5.2）调 pH 至 8.0，加水定容至 100 mL。在 103.4 kPa（121℃）条件下灭菌 20 min。

5.4　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。

5.5　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 5.4）和 2 mL 乙二胺四乙酸二钠溶液（见 5.3），加水定容至 1 000 mL。在 103.4 kPa（121℃）条件下灭菌 20 min。

5.6 引物和探针

5.6.1 *Lectin* 基因

Lectin-F：5′-TGGTGAGCGTTTTGCAGTCT-3′；

Lectin-R：5′-CTGATCCACTAGCAGGAGGTCC-3′；

Lectin-P：5′-TGTTGTGCTGCCAATGTGGCCTG-3′。

预期扩增片段大小为 74 bp(参见附录 A 中的 A.1)。

注：*Lectin-P* 为 *Lectin* 基因的 *Taq*Man 探针，其 5′端标记荧光报告基团(如 FAM、HEX 等)，3′端标记对应的荧光淬灭基团(如 TAMRA、BHQ1 等)。

5.6.2 GTS40-3-2 转化体特异性序列

GTS40-3-2-F：5′-TTCATTCAAAATAAGATCATACATACAGGTT-3′；

GTS40-3-2-R：5′-GGCATTTGTAGGAGCCACCTT-3′；

GTS40-3-2-P：5′-CCTTTTCCATTTGGG-3′。

预期扩增片段大小为 84 bp(参见 A.2)。

注：GTS40-3-2-P 为 GTS40-3-2 转化体的 *Taq*Man 探针，其 5′端标记荧光报告基团(如 FAM、HEX 等)，3′端标记的荧光淬灭基团应选择 MGENFQ。

5.7 引物和探针溶液

用 TE 缓冲液(见 5.5)或水分别将上述引物和探针稀释到 10 μmol/L。

注：探针需避光保存。

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 实时荧光定量 PCR 扩增仪。

6.3 核酸定量仪。

6.4 重蒸馏水发生器或纯水仪。

7 操作步骤

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 的规定执行。

7.4 DNA 模板制备

7.4.1 试样 DNA 模板制备

按农业部 1485 号公告—4—2010 的规定执行。

7.4.2 标准样品 DNA 模板制备

7.4.2.1 标准曲线样品制备

采用相同的标准样品绘制 GTS40-3-2 转化体和 *Lectin* 基因的标准曲线。提取 GTS40-3-2 标准样品基因组 DNA，用 0.1×TE 或水稀释至 1.77×10^4 copies/μL～8.85×10^4 copies/μL(相当于 20 ng/μL～100 ng/μL)，作为初始模板。然后再用 0.1×TE 缓冲液梯度稀释初始模板，制备不同浓度的 GTS40-3-2 标准溶液。标准溶液至少涵盖 5 个 GTS40-3-2 浓度梯度，最低浓度等于或小于 20 copies/μL，最高浓度大于或等于 1.77×10^4 copies/μL。

7.4.2.2 定量极限对照样品制备

将 GTS40-3-2 标准样品基因组 DNA 用 0.1×TE 稀释到平均 20 copies/μL，作为定量极限对照样品。

7.4.2.3 **检测极限对照样品制备**

将 GTS40-3-2 标准样品基因组 DNA 用 0.1×TE 稀释到平均 3 copies/μL，作为检测极限对照样品。

7.4.2.4 **阴性对照样品制备**

提取非转基因大豆材料的 DNA，作为 GTS40-3-2 转化体检测的阴性对照；提取非大豆材料的 DNA（如鲑鱼精子 DNA），作为 *Lectin* 基因检测的阴性对照。

7.4.2.5 **空白对照样品制备**

用纯水作为空白对照样品。

7.5 **PCR 扩增**

7.5.1 同时进行标准样品和试样的 PCR 扩增，每个 PCR 扩增设置 3 次平行。

7.5.2 GTS40-3-2 转化体和 *Lectin* 基因实时荧光定量 PCR 扩增体系均按照表 1 在 PCR 扩增管中依次加入反应试剂，混匀。

7.5.3 将 PCR 管放在离心机上，500 *g*～3 000 *g* 离心 10 s，然后取出 PCR 管，放入实时荧光定量 PCR 仪中。

7.5.4 运行实时荧光定量 PCR 扩增。反应程序为：95℃、10 min，95℃、15 s，60℃、60 s，循环数 45；在第二阶段的退火延伸（60℃）时段收集荧光信号。

注：可根据仪器和试剂要求对反应参数作适当调整。

7.5.5 实时荧光定量 PCR 扩增至少重复 3 次实验。

表 1 实时荧光定量 PCR 扩增体系

试剂	终浓度	体积
*Taq*Man 反应液	1×	—
10 μmol/L GTS40-3-2-F	0.4 μmol/L	1.0 μL
10 μmol/L GTS40-3-2-R	0.4 μmol/L	1.0 μL
10 μmol/L GTS40-3-2-P	0.2 μmol/L	0.5 μL
DNA 模板		2.0 μL
ddH_2O		—
总体积		25.0 μL
根据仪器要求，可对反应体系做适当调整。“—”表示体积不确定。根据 *Taq*Man 反应液的浓度确定其体积，并相应调整 ddH_2O 的体积，使反应体系总体积达到 25.0 μL。		

7.6 **数据分析**

7.6.1 **设定阈值**

实时荧光定量 PCR 扩增结束后，以 PCR 刚好进入指数期扩增来设置荧光信号阈值，并根据仪器噪声情况进行调整。

7.6.2 **记录 *Ct* 值**

设定阈值后，荧光定量 PCR 仪的数据分析软件自动计算每个反应的 *Ct* 值，并记录。

7.6.3 **绘制标准曲线**

根据标准溶液的扩增 *Ct* 值和初始模板拷贝数的对数间的线性关系，分别绘制 GTS40-3-2 转化体和 *Lectin* 基因的标准曲线。

标准曲线按式(1)计算。

$$y = ax + b \quad \cdots\cdots (1)$$

式中：

y ——测试样品的 *Ct* 值；

a ——标准曲线的斜率；

x ——模板拷贝数以 10 为底数的对数；

b ——标准曲线的截距。

7.6.4 **数据可接受的标准**

7.6.4.1 GTS40-3-2 转化体和 *Lectin* 基因的阴性对照和空白对照无典型扩增曲线，或 *Ct* 值≥40。

7.6.4.2 GTS40-3-2 转化体和 *Lectin* 基因的检测极限对照有典型扩增曲线，且 *Ct* 值≤38。

7.6.4.3 标准曲线的 $R^2 \geqslant 0.98$，标准曲线斜率为−3.6～−3.1。

7.6.4.4 同时满足 7.6.4.1～7.6.4.3 的条件，进行结果计算；否则，重新进行 PCR 扩增。

7.6.5 **含量计算**

7.6.5.1 **试样中模板拷贝数的计算**

当 GTS40-3-2 转化体和 *Lectin* 基因的 *Ct* 值小于或等于定量极限对照样品的 *Ct* 值时，按式(2)计算试样中 GTS40-3-2 转化体和 *Lectin* 基因的模板拷贝数。

$$n = 10^{\frac{y-b}{a}} \quad \cdots\cdots (2)$$

式中：

n——模板拷贝数。

7.6.5.2 **试样中 GTS40-3-2 转化体含量的计算**

按式(3)计算试样中 GTS40-3-2 转化体的百分含量。

$$C = \frac{n_{GTS}}{n_{Lec}} \times 100 \quad \cdots\cdots (3)$$

式中：

C——试样中 GTS40-3-2 的百分含量，单位为百分号(%)；

n_{GTS}——GTS40-3-2 转化体拷贝数；

n_{Lec}——*Lectin* 基因拷贝数。

7.6.5.3 测量结果不确定度的计算

按式(4)计算测试重复性试验引入的不确定度，

$$U = 2\sqrt{0.0144^2 + (C \times 0.0625)^2} \quad \cdots\cdots (4)$$

式中：

U——扩展不确定度；

C——试样中 GTS40-3-2 的百分含量，单位为百分号(%)。

8 结果分析与表述

8.1 *Lectin* 基因和 GTS40-3-2 转化体均出现典型扩增曲线，且 *Ct* 值均小于或等于定量极限对照样品的 *Ct* 值，表明样品中检出耐除草剂大豆 GTS40-3-2 转化体，表述为“样品中检测出 GTS40-3-2 转化体，GTS40-3-2 转化体含量为 $C \pm U$”。

8.2 *Lectin* 基因和 GTS40-3-2 转化体出现典型扩增曲线，*Lectin* 内标准基因 *Ct* 值小于或等于定量极限对照样品的 *Ct* 值，GTS40-3-2 转化体 *Ct* 值大于定量极限对照样品的 *Ct* 值且小于或等于检测极限对照样品的 *Ct* 值，表明样品中检出耐除草剂大豆 GTS40-3-2 转化体，表述为“样品中检测出 GTS40-3-2 转化体，GTS40-3-2 转化体含量低于定量极限”。

8.3 GTS40-3-2 转化体未出现典型扩增曲线，或 *Ct* 值大于检测极限对照样品的 *Ct* 值，表明样品中耐除草剂大豆 GTS40-3-2 转化体含量低于检测极限，表述为“样品中未检测出 GTS40-3-2 转化体，检测结果为阴性”。

9 检出限

本标准方法的检测极限(LOD)为 6 个拷贝。

本标准方法的定量极限(LOQ)为 40 个拷贝。

附 录 A
(资料性附录)
大豆 *Lectin* 内标基因序列和耐除草剂大豆 GTS40-3-2 转化体特异性序列

A.1 大豆内标 *Lectin* 基因序列

1 CCAGCTTCGC CGCTTCCTTC AACTTCACCT TCTATGCCCC TGACACAAAA
51 AGGCTTGCAG ATGGGCTTGC CTTC

注 1:序列方向为 5′-3′。

注 2:5′端单下划线部分为 *Lectin*-F 引物序列,3′端单下划线部分为 *Lectin*-R 引物的反向互补序列,双划线部分为探针 *Lectin*-P 序列。

A.2 耐除草剂大豆 GTS40-3-2 转化体特异性序列

1 TTCATTCAAA ATAAGATCAT ACATACAGGT TAAAATAAAC ATAGGGAACC
51 CAAATGGAAA AGGAAGGTGG CTCCTACAAA TGCC

注 1:序列方向为 5′-3′。

注 2:5′端单下划线部分为 GTS40-3-2-F 引物序列,3′端单下划线部分为 GTS40-3-2-R 引物的反向互补序列,双划线部分为探针 GTS40-3-2-P 序列。

注 3:1～54 为大豆基因组部分序列,55～84 为外源插入片段部分序列。

农业农村部公告第323号—10—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
耐除草剂大豆GTS40-3-2及其衍生品种定量PCR方法
农业农村部公告第323号—10—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：16109·8265
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—10—2020