

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3959—2014

甜菜中转基因成分检测 普通 PCR 方法和实时荧光 PCR 方法

Detection of genetically modified components in sugarbeet—Conventional PCR
method and real time PCR methods

2014-04-09 发布

2014-11-01 实施

中 华 人 民 共 和 国 发 布
国 家 质 量 监 督 检 验 检 疫 总 局

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：中华人民共和国上海出入境检验检疫局、中华人民共和国厦门出入境检验检疫局、中华人民共和国黑龙江出入境检验检疫局、中国检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人：张舒亚、陈双雅、吕蓉、李想、高琴、刘月明、杨捷琳、栾凤侠、朱水芳、潘良文。

甜菜中转基因成分检测 普通 PCR 方法和实时荧光 PCR 方法

1 范围

本标准规定了甜菜及加工产品中转基因成分检测的普通 PCR 和实时荧光 PCR 方法。
本标准适用于甜菜及加工产品中转基因成分的定性检测。

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/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

3 术语、定义和缩略语

下列术语、定义和缩略语适用于本文件。

3.1 术语和定义

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 fluorescent polymerase chain reaction; RT-PCR

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。

3.2 缩略语

Ct 值: cycle threshold, 每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数。

CTAB: cetyltrimethylammonium bromide, 十六烷基二甲基溴化铵。

EDTA: ethylene diaminetetraacetic acid, 乙二胺四乙酸。

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

TE 缓冲液: Tris-HCl, EDTA 缓冲液。

PCR: polymerase chain reaction, 聚合酶链式反应。

DNA: deoxyribonucleic acid, 脱氧核糖核酸。

dNTP: deoxyribonucleoside triphosphate, 脱氧核苷三磷酸。

dATP: deoxyadenosine triphosphate, 脱氧腺苷三磷酸。

dCTP: deoxycytidine triphosphate, 脱氧胞苷三磷酸。

dGTP: deoxyguanosine triphosphate, 脱氧鸟苷三磷酸。

dUTP: deoxyuridine triphosphate, 脱氧尿苷三磷酸。

Taq 酶: DNA 聚合酶。

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

bp: base pair, 碱基对。

GS: glutamine synthetase, 谷氨酰胺合成酶。

FMV 35S: 35S promoter from figwort mosaic virus, 玄参花叶病毒 35S 启动子。

CaMV 35S: 35S promoter from cauliflower mosaic virus, 花椰菜花叶病毒 35S 启动子。

EPSPS: 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene, 5-莽草酸-3-磷酸合酶基因。

E9 3': E9 3' terminator from pea, 豌豆的核酮糖-1,5 二磷酸羧化酶 E9 3' 终止子。

NOS: terminator of nopaline synthase gene, 胭脂碱合成酶基因终止子。

4 方法提要

样品经研磨后, 提取样品 DNA, 以 DNA 为模板, 采用内源基因和外源基因特异性检测引物和探针进行普通 PCR 或实时荧光 PCR 扩增, 观察电泳图谱或实时荧光 PCR 的增幅现象, 判断样品中是否存在外源基因。

5 试剂和材料

除另有规定外, 所有试剂均为分析纯或生化试剂。试验用水符合 GB/T 6682 的要求。所有试剂均用无 DNA 酶污染的容器分装。

5.1 CTAB 提取缓冲液: 20 g/L CTAB, 1.4 mol/L NaCl, 0.1 mol/L Tris-HCl, 0.02 mol/L Na₂EDTA, pH 8.0。

5.2 CTAB 沉淀液: 5 g/L CTAB, 40 mmol/L NaCl。

5.3 三氯甲烷(氯仿)。

5.4 异丙醇。

5.5 70%乙醇。

5.6 蛋白酶 K 溶液(20 mg/mL)。

5.7 NaCl 溶液(1.2 mol/L)。

5.8 TE 缓冲液(Tris-HCl、EDTA 缓冲液): 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1 mmol/L EDTA (pH 8.0)。

5.9 PCR 反应混合液: 12.5 μL 反应体系包括: 1 U 的 Taq 酶、1×PCR 缓冲液、2.5 mmol/L ~ 4.0 mmol/L 的 Mg²⁺、0.2 mmol/L 的 dNTPs。如果具有等效的试剂, 则可使用这些等效产品。

5.10 实时荧光 PCR 反应混合液: 12.5 μL 反应体系包括: 1 U ~ 2 U 的 Taq 酶、1×PCR 缓冲液、2.5 mmol/L ~ 4.0 mmol/L 的 Mg²⁺、0.2 U ~ 1 U 的 UNG 酶、0.2 mmol/L 的 d(A, C, G) TPs、0.2 mmol/L ~ 0.4 mmol/L dUTP、400 nmol/L ROX 染料(某些荧光 PCR 仪不需要 POX 校正)。如果具有等效的试剂, 则可使用这些等效产品。

5.11 双蒸水。

5.12 检测用引物和探针

用于普通 PCR 方法检测的引物和实时荧光 PCR 检测的引物和 Taq Man 探针见表 1。

表 1 用于普通 PCR 方法和实时荧光 PCR 方法检测的引物和探针

检测基因	核苷酸序列(5'-3')	反应体系 终浓度 (mol/L)	扩增产 物片段 大小/bp	备注
GS	GAC CTC CAT ATT ACT GAA AGG AAG	150	121	内源基因
	GAG TAA TTG CTC CAT CCT GTT CA	150		
	FAM-CTA CGA AGT TTA AAG TAT GTG CCG CTC-TAMRA	100		
FMV 35S	AAG ACA TCC ACC GAA GAC TTA	400	210	外源筛 选基因
	AGG ACA GCT CTT TTC CAC GTT	400		
	FAM-TGG TCC CCA CAA GCC AGC TGC TCG A-TAMRA	200		
E9 3'	TTA TGG CAT TGG GAA AAC TGT	400	146	外源筛 选基因
	GAG AAT GAA CAA AAG GAC CAT A	400		
	FAM-TCG GTT TTC GCT ATC GAA CTG TGA A-TAMRA	200		
CaMV 35S	CGA CAG TGG TCC CAA AGA	400	74	外源筛 选基因 (荧光 PCR 方法)
	AAG ACG TGG TTG GAA CGT CTT C	400		
	FAM-TGGACCCCCACCCACGAGGAGCATC-TAMRA	200		
CaMV 35S	GCTCCTACAAATGCCATCA	200	195	外源筛选基因 (普通 PCR 方法)
	GATAGTGGGATTGTGCGTCA	200		
NOS	ATC GTT CAA ACA TTT GGC A	400	165	外源筛 选基因
	ATT GCG GGA CTC TAA TCA TA	400		
	FAM-CAT CGC AAG ACC GGC AAC AGG-TAMRA	200		
EPSPS	GAC TTG CGT GTT CGT TCT TC	300	204	外源结 构基因
	AAC ACC GTT GAG CTT GAG AC	300		
	FAM-TGT TCC AGA AGA CCG TGC TC-TAMRA	100		
H7-1 品 系特异	TGG GAT CTG GGT GGC TCT AAC T	400	108	品系特 异基因
	AAT GCT GCT AAA TCC TGA G	400		
	FAM-AAG GCG GGA AAC GAC AAT CT-TAMRA	100		

6 仪器设备

6.1 PCR 仪。

6.2 实时荧光 PCR 仪。

6.3 紫外检测仪或凝胶电泳系统。

6.4 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。

- 6.5 恒温水浴锅。
- 6.6 离心机:离心力 12 000 *g*。
- 6.7 微量移液器。
- 6.8 研钵及粉碎装置。
- 6.9 涡旋振荡器。
- 6.10 pH 计。
- 6.11 天平:感量 0.01 *g*。

7 检验步骤

7.1 对照设置

检测过程中应按照 GB/T 19495.2 中的规定设置对照。

阴性对照:不含有外源目标核酸序列的材料或 DNA。

阳性对照:含有目标基因序列的阳性样品,或可溯源的标准物质或其 DNA。

空白对照:该对照包括除了测试样品 DNA 模板以外所有的试剂,在 PCR 反应体系中用相同体积的水(不含核酸)取代模板 DNA。

7.2 DNA 提取

将样品研磨后,称取 100 mg 左右样品于 2 mL 离心管中,加入 1.5 mL CTAB 提取缓冲液和 10 μ L 蛋白酶 K 溶液。60 $^{\circ}$ C 振荡过夜后 13 000 *g* 离心 10 min,转移上清液到新的离心管中。加入 750 μ L 三氯甲烷后用力振荡,13 000 *g* 离心 5 min,将上清转移到新的离心管中。加入 2 倍体积的 CTAB 沉淀溶液,室温静置 60 min,13 000 *g* 离心 15 min,弃去上清。加入 350 μ L NaCl 溶液将沉淀进行悬浮。再加入 350 μ L 三氯甲烷,涡旋振荡进行混匀,13 000 *g* 离心 10 min。转移上清后加入 0.6 倍体积的异丙醇用来沉淀核酸,室温放置 20 min,13 000 *g* 离心 10 min,弃去上清。加入 500 μ L 70%乙醇溶液洗涤沉淀,溶解于 200 μ L TE 缓冲液中。立即使用或-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

也可用等效的 DNA 提取方法提取模板 DNA。

7.3 DNA 浓度和纯度的测定

使用核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计分别检测 260 nm 和 280 nm 处的吸光值 A_{260} 和 A_{280} 。DNA 的浓度按照式(1)计算:

$$c = A \times N \times 50/1\ 000 \dots\dots\dots(1)$$

式中:

c ——DNA 浓度,单位为微克每微升(μ g/ μ L);

A ——260 nm 处的吸光值;

N ——核酸稀释倍数。

当 A_{260}/A_{280} 比值在 1.7~1.9 之间时,适宜于 PCR 扩增。

7.4 普通 PCR 扩增和检测

反应体系的体积为 25 μ L:2 \times PCR 混合液 12.5 μ L,正反向引物加样终浓度见表 1,模板 DNA 5 μ L,水补足至 25 μ L。

PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C,10 min;95 $^{\circ}$ C,20 s,60 $^{\circ}$ C(CaMV 35 S 检测的退火温度为 54 $^{\circ}$ C),40 s,72 $^{\circ}$ C,40 s,40 个循环。

每个样品设置两个平行的反应体系。

PCR 扩增产物电泳检测,配制含 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溴化乙锭的 2% 琼脂糖凝胶。在电泳槽中加入电泳缓冲液,使液面刚刚没过凝胶。将 5 μL ~8 μL PCR 扩增产物分别和适量加样缓冲液混合,点样。9 V/cm 恒压电泳,直至溴酚蓝指示剂迁移至凝胶中部。紫外检测仪下观察电泳结果并记录。

7.5 实时荧光 PCR 扩增

反应体系的体积为 25 μL ;实时荧光 PCR 混合液 12.5 μL ,正反向引物和探针加样终浓度见表 1,模板 DNA 5 μL ,水补足至 25 μL 。

实时荧光 PCR 反应条件:50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,40 个循环。

每个样品设置两个平行的反应体系。

8 质量控制

8.1 普通 PCR 质量控制

以下条件有一条不满足时,试验视为无效:

- 空白对照:无扩增条带;
- 阴性对照:无扩增条带;
- 阳性对照:有特异性扩增条带,相应基因的扩增片段大小见表 1;
- 内源基因:有特异性扩增条带(包括阴性对照),相应基因的扩增片段大小见表 1。

8.2 实时荧光 PCR 质量控制

以下条件有一条不满足时,试验视为无效:

- 空白对照:无荧光对数增长,相应的 Ct 值=40.0;
- 阴性对照:无荧光对数增长,相应的 Ct 值=40.0;
- 阳性对照:有荧光对数增长,且荧光通道出现典型的扩增曲线,相应的 Ct 值<30.0;
- 内源基因:有荧光对数增长(包括阴性对照),且荧光通道出现典型的扩增曲线,相应的 Ct 值<35.0。

9 结果判断与表述

9.1 普通 PCR 结果判定

9.1.1 同时进行的阴性、阳性、空白对照试验结果正常,检测样品 $\times\times$ 基因无特异性扩增片段,判断样品中未检出 $\times\times$ 基因。

9.1.2 同时进行的阴性、阳性、空白对照试验结果正常,检测样品 $\times\times$ 基因有特异性扩增片段,判断样品中检出 $\times\times$ 基因。

9.1.3 确证实验:以实时荧光 PCR 检测作为确证试验。

9.2 实时荧光 PCR 结果判定

9.2.1 同时进行的阴性、阳性、空白对照试验结果正常,检测样品 $\times\times$ 基因无荧光增幅现象,相应的 Ct 值=40,判断样品中未检出 $\times\times$ 基因。

9.2.2 同时进行的阴性、阳性、空白对照试验结果正常,检测样品 $\times\times$ 基因有明显的荧光增幅曲线,且 Ct 值 \leq 35,判断样品中检出 $\times\times$ 基因。

9.2.3 同时进行的阴性、阳性、空白对照试验结果正常,若检测样品××基因荧光增幅曲线的 Ct 值在 35~40 之间,则应重新进行实时荧光 PCR 反应。再次扩增后的结果 Ct 值仍在 35~40 之间,可判断样品中检出××基因,否则可判断样品中未检出××基因。

9.3 结果表述

9.3.1 结果为阳性者,表述为“检出××外源基因”。

9.3.2 结果为阴性者,表述为“未检出××外源基因”。

10 检测过程中防止交叉污染的措施

按照 GB/T 19495.2 执行。
