



# 中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

## 转基因植物品系定量检测数字 PCR 法

Quantitative Determination of genetically modified plants by digital PCR method

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

(征求意见稿)

(本稿完成日期：2018 年 09 月 26 日)

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局  
中国国家标准化管理委员会 发布

## 前 言

本标准根据GB/T1.1-2009 给出的规则起草。

本标准由全国生化检测标准化技术委员会（SAC/TC387）提出并归口。

本标准起草单位：

本标准主要起草人：

# 转基因植物品系定量检测数字 PCR 法

## 1 范围

本标准规定了转基因植物品系的数字PCR定量检测方法。

本标准适用于食品、饲料、种子及环境材料中转基因玉米MON810品系、MON89034品系、MIR162品系和转基因大豆GTS-40-3-2品系，转基因水稻克螟稻品系，转基因棉花GHB119品系，转基因油菜RT73品系的数字PCR法定量检测及定性PCR检测结果的确证检测。

本方法的定量检测限为 0.1%（质量分数）。

## 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 19495.1 转基因产品检测通用要求和定义

GB/T 19495.3 转基因产品检测核酸提取纯化方法

GB/T 19495.5 转基因产品检测核酸定量PCR检测方法。

GB/T 19495.7 转基因产品检测 抽样和制样方法

SN/T 4853（所有部分）转基因大米定量检测 数字PCR法

## 3 原理

数字PCR技术是将实时荧光定量PCR体系等量均分到相互隔离的大数量（大于10000个）微小的反应单元（芯片微孔或者微滴液珠），经过PCR扩增反应，反应单元相应的表现为有荧光(阳性)或无荧光（阴性），通过统计微反应单元的阳性率和泊松分布概率函数计算出核酸模板的拷贝数。数字PCR的技术特点是，不需要建立工作曲线，具有相对较高的准确度，是一种潜在的绝对定量方法。

为了实现转基因植物品系数字PCR定量检测，本标准在反应体系中加入两套标记不同荧光信号的引物探针，分别用于扩增被检测样品DNA中转基因成分和植物内源基因成分。通过统计数字PCR扩增反应后两种荧光信号的阳性率，计算出转基因植物外源基因（品系特异序列）和植物内源基因的拷贝数含量。依据样品DNA溶液中的外源基因和内源基因的模板浓度之比，得到样品中相应的转基因植物品系含量。

## 4 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

### 4.1 品系特异序列 Event specific sequence

包括转基因植物侧翼序列和外源插入序列。针对该序列进行检测，可以确定植物品系的存在。

### 4.2 Adh-1 (alcohol dehydrogenase 1)：玉米乙醇脱氢酶基因，常作为玉米的内源基因。

- 4.3 Lectin-1: 大豆凝集素基因, 常作为大豆的内源基因。
- 4.4 PEP: 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因, 常作为油菜的内源参照基因, 。
- 4.5 Adhc: Alcohol dehydrogenase C gene, 乙醇脱氢酶 C 基因, 常作为棉花的内源基因。
- 4.6 BHQ1: Black hole quencher 1, 黑洞猝灭基团 1。

## 5 试剂和材料

除另有说明, 本方法使用的试剂均为分析纯, 水为GB/T 6682规定的一级水。

- 5.1 植物基因组 DNA 提取试剂盒。
- 5.2 数字 PCR 预混液: 含有镁离子、dNTPs 和具有 5'-3'外切活性的热启动 Taq DNA 聚合酶的数字 PCR 专用预混试剂。
- 5.3 引物及探针: 检测不同植物品系的引物探针序列具体信息见表 1。
- 5.4 数字 PCR 微反应体系生成联排管或芯片。
- 5.5 96 孔荧光定量 PCR 反应板和封膜。
- 5.6 0.2 mL 和 1.5 mL 离心管。
- 5.7 移液枪头, 量程 0.5  $\mu$ L~10  $\mu$ L; 量程 10  $\mu$ L~100  $\mu$ L; 量程 100  $\mu$ L~1000  $\mu$ L。

表 1. 转基因植物外源基因及内源基因的引物和探针序列

基因	名称	序列
玉米 MON810 品系特异序列	上游引物	GATGCCTTCTCCCTAGTGTTGA
	下游引物	GGATGCACTCGTTGATGTTTG
	探针	FAM-AGATACCAAGCGCCATGGACAACAA-BHQ1
玉米 MON89034 品系特异序列	上游引物	TTCTCCATATTGACCATCATACTCATT
	下游引物	CGGTATCTATAATACCGTGGTTTTTAAA
	探针	FAM-ATCCCCGGAAATTATGTT-MGB
玉米 MIR162 品系特异序列	上游引物	CACCTTCAGCAACCCGAACTA
	下游引物	GCTTAGCCTCCACGATCATCTT
	探针	FAM-GTCCTCGTCGCTGCCCTTCACCT-BHQ1
玉米内源基因 Adh-1	上游引物	CGTCGTTTCCCATCTCTTCTCC
	下游引物	CCACTCCGAGACCCTCAGTC
	探针	VIC-AATCAGGGCTCATTTTCTCGCTCCTCA-BHQ1
大豆 GTS-40-3-2 品系特异序列	上游引物	TAGCATCTACATATAGCTTC
	下游引物	GACCAGGCCATTTCGCCTCA
	探针	FAM-ACAAAATATTTGGGATCGGAGAAGA-BHQ1
大豆内源基因 Lectin-1	上游引物	GCCCTCTACTCCACCCCA
	下游引物	GCCCATCTGCAAGCCTTTTT
	探针	VIC-AGCTTCGCCGCTTCCTTCAACTTCAC-BHQ1
水稻克螟稻特异序列	上游引物	TCCGCAATGTGTATTAAGTTGTCTAA
	下游引物	CCGATATGCCTGCCCATCT
	探针	FAM-CGTCAATTTGTTTACACCACAATATATCCCG-BHQ1
水稻内源基因	上游引物	TGGTGAGCGTTTTGCAGTCT

rice	下游引物	CTGATCCACTAGCAGGAGGTCC
	探针	VIC-TGTTGTGCTGCCAATGTGGCCTG-BHQ1
油菜 RT73 品系 特异序列	上游引物	CCATATTGACCATCATACTCATTGCT
	下游引物	GCTTATACGAAGGCAAGAAAAGGA
	探针	FAM-TTCCCGGACATGAAGATCATCCTCCTT-BHQ1
油菜内源基因 PEP	上游引物	CCCTTGTGAAGCTCGACATC
	下游引物	CTTGTCTCTGACCAATCTTTGT
	探针	FAM-CCGACCGTCACACCGATGTTTTAGA-BHQ1
棉花 GHB119 品系 特异序列	上游引物	CCAGTACTAAAATCCAGATCATGCA
	下游引物	GAAATTGCGTGACTCAAATTCC
	探针	FAM-CCTGCAGGTCGACGGCCGAGTAC -BHQ1
棉花内源基因 Adhc	上游引物	CACATGACTTAGCCATCTTTGC
	下游引物	CCCACCCTTTTTTGGTTTAGC
	探针	FAM-TGCAGGTTTTGGTGCCACTGTGAATG-BHQ1

## 6 仪器与设备

实验室常规设备及下列各项：

- 6.1 数字 PCR 系统：包括 PCR 仪、微反应体系发生器或其它具有同样功能的仪器、微反应体系荧光检测仪或其它具有同样功能的仪器。
- 6.2 分析天平：感量 0.1 mg。
- 6.3 生物安全柜。
- 6.4 核酸定量仪。
- 6.5 涡旋震荡仪。
- 6.6 移液枪：量程 0.1  $\mu\text{L}$ ~2.5  $\mu\text{L}$ ；量程 0.5  $\mu\text{L}$ ~10  $\mu\text{L}$ ；量程 10  $\mu\text{L}$ ~100  $\mu\text{L}$ ；量程 100  $\mu\text{L}$ ~1000  $\mu\text{L}$ 。

## 7 操作步骤

### 7.1 抽样

按照 GB/T 19495.1 和 GB/T 19495.7 的规定执行。

### 7.2 制样

按照 GB/T 19495.1 和 GB/T 19495.7 的规定执行。

### 7.3 DNA 模板制备

按照 GB/T 19495.1 和 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。

### 7.4 DNA 模板浓度控制

按照 SN/T 4853 的规定，为了满足泊松分布要求，数字 PCR 体系中的模板数应不高于微反应体系数的 5 倍。为保证定量结果的准确性，体系中总模板数应不低于 400 个拷贝。

## 7.5 数字 PCR 扩增方法

每个试样数字 PCR 反应设置 3 个平行。

### 7.5.1 数字 PCR 反应体系

双重数字PCR反应体系见表2，适用于转基因玉米MON810品系、MON89034品系、MIR162品系和转基因大豆GTS-40-3-2品系，转基因水稻克螟稻品系。单重数字PCR反应体系见表3，适用于转基因棉花GHB119品系，转基因油菜RT73品系。

表2 双重数字 PCR 反应体系<sup>注1</sup>

PCR 反应试剂	终浓度
内源基因上游引物(10 μmol/L)	0.5 μmol/L
内源基因下游引物(10 μmol/L)	0.5 μmol/L
内源基因探针(5 μmol/L)	0.1 μmol/L
外源基因上游引物(10 μmol/L)	0.5 μmol/L
外源基因下游引物(10 μmol/L)	0.5 μmol/L
外源基因探针(5 μmol/L)	0.1 μmol/L
2×数字 PCR 预混液 <sup>注2</sup>	1×
DNA 模板	/
ddH <sub>2</sub> O(无菌水)	/

表3单重数字PCR反应体系

试剂	终浓度
2×数字 PCR 预混液 <sup>注1</sup>	1×
上游引物(10 μmol/L)	0.9 μmol/L
下游引物(10 μmol/L)	0.9 μmol/L
荧光标记探针(10 μmol/L)	0.25 μmol/L
DNA 模板	/
dH <sub>2</sub> O(无菌水)	/

注1：数字 PCR 反应体系的总体积可根据不同厂家、型号的数字 PCR 仪作相应调整，并保持各引物探针组分终浓度不变。

注2：根据仪器的不同，2×数字 PCR 预混液有所不同，需根据仪器说明书使用。

### 7.5.2 数字 PCR 反应程序

数字PCR反应程序如表4和表5所示。

表4 微滴数字 PCR 的反应程序

步骤	时间和温度	循环数	升降温速率
1 热激活	10min/95°C	1	2°C/s
2 变性	30s/94°C	39	2°C/s
3 退火延伸	1min/56°C		
4 酶失活	10min/98°C	1	2°C/s

表 5 芯片数字 PCR 反应程序

步骤	时间和温度	循环数	升降温速率
1 热激活及变性	10min/96°C	1	0.8°C/s
2 退火延伸	2min/60°C	39	1.2°C/s
3 变性	30s/98°C		0.8°C/s
4 退火延伸	2min/60°C	1	1.2°C/s

注：不同芯片平台可根据说明书对步骤中的温度和时间做相应调整，但不能对步骤2中的退火温度做调整。

### 7.5.3 数字 PCR 反应的对照实验

实验中应设置阳性对照，阴性对照和空白对照。用含目标基因的植物基因组 DNA 做阳性对照，非转基因植物基因组 DNA 作为阴性对照；以水作为空白对照。阳性对照中数字 PCR 荧光信号分析图中，荧光值阈值线能将阴性反应单元和阳性反应单元有效区分。阴性对照有内源基因扩增且阴性对照和空白对照均无外源基因扩增。各对照 PCR 反应体系中，除模板外，其余组分及 PCR 反应条件与 7.5.1 和 7.5.2 相同。

## 8 结果分析与表述

### 8.1 结果分析

按照公式（1）计算测试样品的转基因成分含量：

$$m = \frac{A}{B} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

式中：

$m$ ——转基因植物品系的转基因含量（%）；

$A$ ——转基因植物品系外源基因拷贝数；

$B$ ——转基因植物内源基因拷贝数；

（注：由于利用杂交优势，一般情况下，转基因产品多为 F1 代杂交种子的 F2 代分离群体。如 F1 代杂交种子为转基因杂合子，则 F2 后代 25% 为转基因纯合子，50% 为转基因杂合子，25% 为非转基因纯合子。测定结果显示转基因含量为 50%，但杂合子中品系特异序列只有纯合子的一半，且两者均定义为转基因成分，因而转基因含量被低估 25%。如 F1 代种子为转基因纯合子，F2 后代 100% 为转基因纯合子，转基因含量为 100%，未被低估。）

### 8.2 结果表述

8.2.1 未检出物种内源基因，结果表述为“样品中未检出×植物成分”。

8.2.2 检出物种内源基因，但未检出品系特异基因，结果表述为“样品未检出×品系转基因成分。定量方法的检测限为0.1%”。

8.2.3 检出物种内源基因，同时也检出品系特异基因，结果表述为“样品中×品系转基因成分的含量为×%”。