

# SN

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1201—2014  
代替 SN/T 1201—2003

### 饲料中转基因植物成分 PCR 检测方法

PCR protocol for detection of genetically modified plant ingredients in feed

2014-11-19 发布

2015-05-01 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。

本标准代替 SN/T 1201—2003《植物性饲料中转基因成分定性 PCR 检测方法》。

本标准与 SN/T 1201—2003 相比,主要技术变化如下:

- 增加了植物的品种,由原标准的大豆、玉米和油菜扩展到水稻、苜蓿、棉花和小麦等;
- 增加了基因特异性筛查的范围,由原标准的 6 个外源基因扩展到 12 个外源基因;
- 增加了转基因品系鉴定的种类,由原标准的 1 个品系(抗农达转基因大豆 RRS)增加到 56 个品系;
- 原标准采用普通 PCR 方法,本标准全部采用实时荧光 PCR 方法,方法更灵敏,检测更快速。

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:中华人民共和国深圳出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:章桂明、凌杏园、潘广、向才玉、程颖慧、康林、余道坚、龙海、郑耘、陈枝楠。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- SN/T 1201—2003。

# 饲料中转基因植物成分 PCR 检测方法

## 1 范围

本标准规定了饲料中转基因植物成分的定性实时荧光 PCR 检测方法。

本标准适用于饲料中大豆、玉米、水稻、油菜、棉花、苜蓿和小麦等转基因植物成分的定性检测和相关品系的鉴定。

本标准同样适用于玉米酒糟粕转基因成分的定性检测和相关品系的鉴定。

## 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

GB/T 19495.7 转基因产品检测 抽样和制样方法

## 3 术语、定义和缩略语

### 3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

#### 3.1.1

**饲料 feed**

所有人饲养的动物的食物的总称,比较狭义的一般饲料主要指农业或牧业饲养的动物的食物。

#### 3.1.2

**实时荧光 PCR real-time fluorescent polymerase chain reaction**

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。

### 3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

Acpl:酸性磷酸酶 1 基因(acid phosphatase 1)

BAR:磷化麦黄酮乙酰转移酶基因(phosphinothricin acetyltransferase gene)

BnACCg8:油菜乙酰辅酶 A 羧化酶基因(acetyl-CoA carboxylase gene)

bp:碱基对(base pair)

Btc:转基因水稻品系 TT51-1 和 Bt 汕优 63 结构特异性基因序列(the construct specific DNA sequence of transgenic rice TT51-1 and Bt shanyou 63)

- CaMV35S:来自于花椰菜花叶病毒的 35S 启动子(35S promoter from cauliflower mosaic virus)
- CP4-EPSPS:5-莽草酸-3-磷酸合成酶基因(5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene)
- CryIA(b):苏云金芽孢杆菌结晶蛋白(cry)I 型毒素抗虫基因[a synthetic gene encoded the first 648 amino acids, insecticidal-active truncated product identical to that of *cryIA(b)* gene of *Bacillus thuringiensis* subsp, Kurstaki strain HD-1]
- CryIA(c):苏云金芽孢杆菌杀虫毒蛋白 *cryIA(c)* 基因[a synthetic gene encoded the 29 to 613 amino acids, insecticidal-active truncated product identical to that of *cryIA(c)* gene of *Bacillus thuringiensis*]
- CryIA(b)/CryIA(c):苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白 *cryIA(b)* 和 *cryIA(c)* 融合基因
- Ct 值: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(cycle threshold)
- CTAB:十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide)
- dATP:脱氧腺苷三磷酸(deoxyadenosine triphosphate)
- dCTP:脱氧胞苷三磷酸(deoxycytidine triphosphate)
- dGTP:脱氧鸟苷三磷酸(deoxyguanosine triphosphate)
- DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)
- dNTP:脱氧核苷三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphate)
- dUTP:脱氧尿苷三磷酸(deoxyuridine triphosphate)
- EDTA:乙二胺四乙酸(ethylene diaminetetraacetic acid)
- FMV35S:玄参花叶病毒的 35S 启动子(35S promoter from a modified figwort mosaic virus)
- Gos9:一种水稻根部表达蛋白基因
- GOX:草甘磷氧化还原酶基因(glyphosate oxidoreductase gene)
- GUS: $\beta$ -D-葡萄糖醛酸酶基因(beta-D-glucuronidase gene)
- NOS:胭脂碱合酶基因终止子(terminator of nopaline synthase gene)
- NPT II:新霉素-3'-磷酸转移酶基因(neomycin-3'-phosphotransferase gene)
- PAT:来源于杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* 草丁膦乙酰转移酶基因(phosphinothricin acetyltransferase gene from *Bacillus amyloliquefaciens*)
- PCR:聚合酶链式反应(polymerase chain reaction)
- PE3-PEPcase:磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate-carboxylase)
- PLD:磷脂酶 D 基因(phospholipase D)
- Taq 酶:源于水生栖热菌的耐热 DNA 聚合酶
- TE:Tris-HCl、EDTA 缓冲液
- TM:溶解温度(melting temperature)
- Tris:三(羟甲基)氨基甲烷[tris (hydroxymethyl) aminomethane]
- UNG 酶:尿嘧啶-N-糖基化酶(UNG)酶(uracil-N-glycosylase)
- Wx012:小麦蜡质基因
- Zein:玉米醇溶性蛋白基因
- zSS II b:玉米淀粉合酶异构体 zSTSII-2 基因

#### 4 原理

实时荧光定量 PCR 技术,是指在 PCR 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,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。

PCR 扩增时在加入一对引物的同时加入一个特异性的荧光探针,该探针为一寡核苷酸,两端分别标记一个报告荧光基团和一个淬灭荧光基团。探针完整时,报告基因发射的荧光信号被淬灭基团吸收;

PCR 扩增时, *Taq* 酶的 5'端-3'端外切酶活性将探针酶切降解,使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离,从而荧光监测系统可接收到荧光信号,即每扩增一条 DNA 链,就有一个荧光分子形成,实现了荧光信号的积累与 PCR 产物形成完全同步。

## 5 主要设备和试剂

### 5.1 主要设备

实时荧光 PCR 仪、制冰机、核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计、恒温水浴锅、离心机、研钵及粉碎装置、涡旋振荡器、微量移液器(2.5  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 1 000  $\mu$ L)。

### 5.2 主要试剂

除另有规定外,所有实验使用的试剂等级应为不含 DNA 和 DNase 的分析纯或生化试剂。实验用水应符合 GB/T 6682 中一级水的规格,所有试剂均用无 DNA 酶污染的容器分装。

5.2.1 CTAB 提取液:20 g/L CTAB,1.4 mol/L NaCl,0.1 mol/L Tris-HCl,0.02 mol/L Na<sub>2</sub>-EDTA, pH 8.0。

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

5.2.3 蛋白酶 K 溶液:20 mg/mL。

5.2.4 RNase A:100 mg/mL。

5.2.5 NaCl 溶液:1.2 mol/L。

5.2.6 三氯甲烷(氯仿):(氯仿:异戊醇=24:1)。

5.2.7 异丙醇。

5.2.8 70%无水乙醇。

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

5.2.10 实时荧光 PCR 反应混合液:12.5  $\mu$ L 反应体系包括:1 U~2 U 的 *Taq* 酶、2 $\times$ PCR 缓冲液、2.5 mmol/L~4.0 mmol/L 的 Mg<sup>2+</sup>、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 的 dUTP、100 nmol/L 的 ROX 染料(某些荧光 PCR 仪不需要 ROX 校正)。如有等效的商品化试剂盒,则可使用这些等效产品。

5.2.11 引物和探针:用于实时荧光 PCR 检测的引物和 TaqMan 探针见表 1。

表 1 用于实时荧光 PCR 方法检测的引物和探针

检测基因和品系	引物序列(5'-3')	探针序列(5'-3')	备注
18S rRNA	正:cctgagaascggctaccat 反:cgtgtcaggattgggtaat	FAM-tgcgcgcctgtgccttct-TAMRA	真核生物内源基因
tRNA <sup>Leu</sup>	正:cgaatcggttagacgctacg 反:ttcattgagtctctgcacct	FAM-gcaatcctgagccaaatcc-TAMRA	高等植物内源基因
Lectin	正:cctcctcgggaaagttaaa 反:gggcatagaagggtgaagtt	FAM-ccctcgtctcttggctgcgccctct-TAMRA	大豆内源基因
Gos9	正:ttagectcccgetgcaga 反:agagtcacacagtgctcccg	FAM-cggcagtggtgtggtttctctgg-TAMRA	水稻内源基因

表 1 (续)

检测基因 和品系	引物序列(5'-3')	探针序列(5'-3')	备注
PLD	正: tggtagcgcttttcagctc 反: ctgatccactagcaggaggctcc	FAM-tgttgctgctgccaatgtggcctg-TAMRA	水稻内源基因
BnACCg8	正: ggtgagctgtataatcgagcg 反: ggccgagcatcgct	FAM-aacacctattagacattcgttcattggctcga-TAMRA	油菜内源基因
PE3-PEPcase	正: ccagttcttggagccgcttga 反: aaggccagtcacaatgcaga	FAM-caggctgctatgcactcggagaca-TAMRA	油菜内源基因
Wx012	正: gtcgcggaacagagggt 反: ggtgttctccattgcgaaa	FAM-caaggcggccgaantaagtgtcc-TAMRA	小麦内源基因
ZEIN	正: tgaaccatgcatcgagt 反: ggcaagaccattgggta	FAM-tggcgtgtcgtccctgatgc-TAMRA	玉米内源基因
zSS II b	正: ctcccaatcctttgacatctgc 反: tcgatttetcttgggtgacagg	FAM-agcaagtcagagcgtgcaatgca-TAMRA	玉米内源基因
Aep1	正: tcccatcgagtttctcagct 反: ettgaacagttgtgatggattgtg	FAM-attgtctcttccaccgtgatccgaa-TAMRA	棉花内源基因
Alfalfa-Acc	正: gatcagtgaaacttgcgaagtac 反: caacgaagtgaaactacaac	FAM-tgaatgctctgtgatctgcccagc-TAMRA	苜蓿内源基因
CaMV35S	正: cgacagtggtcccaaga 反: aagacgtgggtggaacgtcttc	FAM-tggacccccaccacgaggagcgc-TAMRA	外源基因
FMV35S	正: aagacatcccaagaaactta 反: aggacagctcttttccagtt	FAM-tggtecccccaagccagctgctcga-TAMRA	外源基因
GUS	正: tacaccacgccgaacct 反: tcaacgctgacatcaaccattg	FAM-aaccacgcgtctgttgaactggcag-TAMRA	外源基因
Nos	正: atcgttcaaacatttggca 反: attgcccgaactctaatcata	FAM-catcgcaagaccggcaacagg-TAMRA	外源基因
NPT II	正: aggatctcgtctgaccat 反: gcacgaggaagcggtca	FAM-caaccagccggccacagtcgat-TAMRA	外源基因
BAR	正: acaagcaggtcaacttc 反: actcggccgtccagtcgta	FAM-ccgagcgcaggaaccgcaggag-TAMRA	外源基因
CP4-EPSPS	正: catttggagaggacacgctga 反: gagecatgttgaatttgtgcc	FAM-caagctgactctagcagatcttcc-TAMRA	外源基因
GOX	正: gtcttcgttctgctggaaccgtt 反: gaactggcaggagcgagaget	FAM-tgctcagttctctacactcgcctcgc-TAMRA	外源基因
PAT	正: gtcgacatgtctcggagag 反: gcaaccaaccaagggtatc	FAM-tggcccggtttgtgatctgtaa-TAMRA	外源基因

表 1 (续)

检测基因 和品系	引物序列(5'-3')	探针序列(5'-3')	备注
CryIA(b)	正:cgcgactggatcagggtaca 反:tggggaacaggctcacgat	FAM-ccgcccggagctgacctgacctgtg-TAMRA	外源基因
CryIA(c)	正:tacttgggtggagaacgcattgaa 反:gatgtcaactagtcgagaacgaa	FAM-cacctggcagcaactcgctgagca-TAMRA	外源基因
CryIA(b)/ CryIA(c)	正:gacctcacagttttggacattg 反:atttctctgttaagttgggacact	FAM-tcccgaactatgactecagaacctacctatcc-BHQ1	外源基因
A2704-12 A2704-21	正:gcaaaaaagcggtttagctcct 反:attcaggctgcgcaactggt	FAM-cggctctccgatcgccttcc-TAMRA	大豆品系
DP356043	正:gtcgaataggctaggtttacgaaaaa 反:tttgatattcttggagtagacgagagtgt	FAM-ctctagagatccgtcaacatggtggagcac-TAMRA	大豆品系
GTS 40-3-2	正:tagcatctacatatagcttc 反:gaccaggccattcgcctca	FAM-aaaaactatttgcgatcggagaaga-TAMRA	大豆品系
MON89788	正:tccgctctagccttcaat 反:tcgagcaggacctgcagaa	FAM-ctgaaggcgggaascgacaatctg-TAMRA	大豆品系
A5547-127	正:getatttgggtggcatttttcca 反:cactcggccaacttacttct	FAM-ccgcaatgcaataccgtcagttgt-TAMRA	大豆品系
BPS-CV127-9	正:aacagaagtttccgttgagctttaagac 反:cattcgtagctcggatcgtgtac	FAM-tttggggaagctgtcccagccc-TAMRA	大豆品系
DP-305423	正:cgtgttctctttttggctagc 反:gtgaccaatgaatacacaacaaacta	FAM-tgacacaaatgatttcatacaaaagtcgaga-TAMRA	大豆品系
FG72	正:agatttgatcgggctgcagg 反:gcaactattgataccgcat	FAM-aatgtggttcatccgtt-MGBNFQ	大豆品系
MON87701	正:cgtttcccgccttcagtttaaa 反:tggtgatatgaagatacatgcttagcat	FAM-tcagtgttgacacacacactaagcgtgcc-TAMRA	大豆品系
MON 87705	正:tccggacatgaagccatttac 反:acaacgggtccttggcccaag	FAM-aagagactcaggggtgttatcactcggg-TAMRA	大豆品系
MON87769	正:catactcattgetgatccatgtagatt 反:gcaagttgctcgtgaagttttg	FAM-cccggacatgaagccatttacaattgac-TAMRA	大豆品系
59122	正:gggataagcaagtaanagcctc 反:ccttaattctcgetcatgatcag	FAM-tttaactgaaggcgggaaacgacaa-TAMRA	玉米品系
Bt11	正:gcggaacccctatttgtta 反:tccsagaatccctcatgag	FAM-aaatcattcaaatatgtatccgctca-TAMRA	玉米品系
Bt176	正:ggccgtgaacgagctgtt 反:gggaagaagcctacatgttttctaa	FAM-agcaaccagatcggccgacacc-TAMRA	玉米品系

表 1 (续)

检测基因 和品系	引物序列(5'-3')	探针序列(5'-3')	备注
GA21	正:cgttatgctatttgcactttagaaca 反:gcgatcctcctcgcggt	FAM-tttctcaacagcagggtgggtccggg-TAMRA	玉米品系
MIR604	正:gcgacagcaattcaacag 反:ggtcataacgtgactccttaattct	FAM-aggcgggaaacgacaatctgatcatg-TAMRA	玉米品系
MON810	正:tcaaggacgaaggactcaacgt 反:gcaactcctctttcactatctt	FAM-aacatcctttgcrattgcccagc-TAMRA	玉米品系
MON863	正:gtaggatcggaaagctgggtac 反:tgttacggccttantgctgaact	FAM-tgaacaccrctcgaacaaagtgggtca-TAMRA	玉米品系
MON88017	正:gagcaggacctgcagaagct 反:tccggagttgacctcca	FAM-tccggcctttagtttaaacagagtcgggt-TAMRA	玉米品系
MON89034	正:ttctecatattgaccatctactcatt 反:cggtatctataataccgggtttttsaa	FAM-atacccggaattatgtt-MGBNFQ	玉米品系
NK603	正:atgaatgacctcgagtaagctgttaa 反:aagagataacaggatcactcaaacact	FAM-tggtaccacgcgacacacttcactc-TAMRA	玉米品系
T25	正:acaagcgtgtcgtgctccac 反:gacatgatactccttcaaccg	FAM-tcattgagtgttccgccattgtcg-TAMRA	玉米品系
TC1507	正:tagtcttcggccagaatgg 反:ctttgccaagatcaagcg	FAM-taactcaaggccctcactcc-TAMRA	玉米品系
3272	正:tcatecagaccagatctctttatgg 反:cgtttcccgcttcagttta	FAM-actgtctgacgcggcccaaacctg-TAMRA	玉米品系
CBH351	正:gcgcggtgtcactctatgita 反:acaacggggagttgtatgct	FAM-agactccttttcgggagcgattcact-TAMRA	玉米品系
DAS59132	正:ccccaatgtttattaagtgtctaaag 反:gggtaatgtcgcggtgtgt	FAM-caattgtttacaccgaggccgacacg-TAMRA	玉米品系
DP-098140-6	正:ggtgtatgtctctttgcttgggttt 反:gattgtggtttcccgcttc	FAM-ctctatcgatccccctctttgatagtttaact-TAMRA	玉米品系
MIR162	正:gcgcggtgtcactctatgttactag 反:tgccttactgtttgccttcaga	FAM-tctagacaattcagtaattaaaaacgtcccca-TAMRA	玉米品系
MON 87460	正:acgttgaaggaaaatggattg 反:tcggatcctcctcaaacac	FAM-aggagatgtatgataaaatttcaaacggttagacggc-TAMRA	玉米品系
TC-6275	正:agatctgcgcgatcgata 反:tcggcgcggtgcaattgcata	FAM-ggatgcaaacgtaccgtaataaattgacgc-TAMRA	玉米品系
RT73	正:ccatattgaccatcatactcattgct 反:gcttatacgaaggcaagaasagga	FAM-ttcccgacatgaagatcactcctt-TAMRA	油菜品系



表 1 (续)

检测基因和品系	引物序列(5'-3')	探针序列(5'-3')	备注
MS1 x RF1	正: agacctcaattgagacttttetaat 反: ggtgactacacgcgactcat	FAM-catectcaccagtcagcatcatcac-TAMRA	油菜品系
MS1 x RF2	正: ctgtggctcagatggatcattaa 反: atcgactatatastagctgtgccag	FAM-ctcaccggccaaattcctcttagccg-TAMRA	油菜品系
MS8 x RF3	正: ttcttcaagatgggaattaaactct 反: ttgtacanaacttggacccctaggt	FAM-igcctttctctatcgagatgaaaggc-TAMRA	油菜品系
OXY-235	正: attgaccataactcattgctga 反: agagaatcgtgaaattaictctaccg	FAM-ccatgttagatttcccggacatgaagcc-TAMRA	油菜品系
T45 (HCN28)	正: caatggacacatgaattatgc 反: gaactgtatgaactgttctgc	FAM-tagaggacttacagaactcgcct-TAMRA	油菜品系
Ms8	正: gttagaaaaagtaacsattatagccgg 反: ggagggtgtttttggttate	FAM-aatataatcgacggatcccgggaattc-TAMRA	油菜品系
Rf3	正: agcatttagcatgtaccatcagaca 反: cataaaggaagatggagaacttggg	FAM-cgcacgcttatcgaccataagcca-TAMRA	油菜品系
Topas19/2 (HCN92)	正: gttgcggttctgtcagttcc 反: cgaccggcgctgatatatga	FAM-tcccggctcatcgggg-TAMRA	油菜品系
Ms1	正: acgctcggacatctaat 反: ctagatcggaagctgagatgg	FAM-cacattgctgatccactagctgactt-TAMRA	油菜品系
Rf1 (B93-101)	正: ctangggaggtcagatgtage 反: cgggcetaacttttggtgtg	FAM-ctctcactctcaccagtcagatca-TAMRA	油菜品系
Rf2 (B94-2)	正: gggtagacaatatacgaag 反: gggcctcgcaccggtag	FAM-caccggccaaattcctcttagccg-TAMRA	油菜品系
HCN92 (Topas19/2)	正: agttccaaacgtaaaacggctt 反: cggccttaatcccacccag	FAM-tcccggctatatacagcggggtc-TAMRA	油菜品系
LLRICE06 (LLRICE62)	正: agctggcgtaatagcgaagagg 反: tgtaacgggtgcatcgtcta	FAM-cgacccgattattatacttttagtcacct-TAMRA	水稻品系
LLRICE601	正: tctaggatcgaagecagatcgt 反: ggaggggcggaggtgt	FAM-ccacctcccaacaataaaagcgctg-TAMRA	水稻品系
TT51-1	正: agagactgggtattcagcggg 反: gcgtccagaaggaaagggaata	FAM-stctgcccagcaactcgtccg-BHQ	水稻品系
M12	正: gagaacaagaagccccctctgtctcg 反: saggtactaaagcttgaatacctaagge	FAM-cacattcggcagtgaaactcttgagcggc-BHQ	水稻品系
MON88913	正: ggctttggctaccttaagagagtc 反: caaattaccattaagtagccaantac	FAM-aactatcagttttagctacat-MGBNFQ	棉花品系

表 1 (续)

检测基因 和品系	引物序列(5'-3')	探针序列(5'-3')	备注
MON531 (MON757)	正:teccatttegagtttctcactg 反:aaccaatgccaceccaactga	FAM-ttgteccctccacttctctc-TAMRA	棉花品系
MON15985	正:gttactagatcggggataacc 反:aagggttgctaaatggatggga	FAM-ccgctctagaactagtgatctgactgaa-TAMRA	棉花品系
MON1445 (MON1698)	正:aantgctggattttctgctgtg 反:tcasaaagtcateatcttctca	FAM-acagcccccaaatgtcaataggtgcg-TAMRA	棉花品系
LLCotton25	正:cagatttttgtgggattggaattc 反:caaggaactattcaactgag	FAM-cttaacagctactcggecgtegaccg-TAMRA	棉花品系
GHB614	正:csaatacacttgggaacgacttctg 反:gcaggcatgcaagcttttaaa	FAM-ctccatggcgatcgctactgttagaatt-TAMRA	棉花品系
GHB119	正:ccagtaactaaaatccagatcatgca 反:gaatggcgtgactcaaatcc	FAM-ctcgaggtcgacggccgagtag-TAMRA	棉花品系
281-24-236	正:ctcattgctgatccatgtagatttc 反:ggacaatgctgggctttgtg	FAM-tgggttaataaagttagattagaggagacaa-TAMRA	棉花品系
3006-210-23	正:aaatattaacaatgcattgagtatgatg 反:actctttctttctccatattgacc	FAM-tactcattgctgatccatgtagatttccg-TAMRA	棉花品系
CTP-CP4- EPSPS	正:cttttaggatttcgcatcagtg 反:gacttgtegccgggaatg	FAM-cgcaaccgcccgaatcc-TAMRA	苜蓿品系 J101、 J163 外源基因

## 6 防污染措施

检测过程中防止交叉污染的措施按照 GB/T 19495.2 中的规定执行。

## 7 抽样与制样

### 7.1 抽样

按照 GB/T 19495.7 中的规定执行。

### 7.2 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。每样品取 2 个~4 个平行样提取核酸。

## 8 检验步骤

### 8.1 样品前处理

饲料种类繁多,成分极其复杂,除含有各种不同的植物成分外,可能还含有多种预混剂如蛋白粉、骨粉、氨基酸、维生素、抗生素(或兽药)、矿物质、防霉剂、驱虫剂、着色剂、调味料、粘结剂以及发酵产物等成分。饲料样品中的这些盐、糖、色素等化学物质会影响后续基因组 DNA 的提取,甚至可能抑制后续 PCR 反应等,它们应通过洗涤等方法加以去除。取 200 mg 粉碎饲料样品,加入 2 mL 离心管中,加 1.5 mL 双蒸水,上下颠倒后漩涡混匀,12 000 g 离心 5 min,弃上清液,沉淀加 1.5 mL 双蒸水,重复上述洗涤过程 3 次~5 次。最后所得沉淀用于基因组 DNA 的提取。

### 8.2 DNA 提取

#### 8.2.1 CTAB 法

CTAB 提取方法如下:

- 在上述 200 mg 前处理后样品中,加入 1 000  $\mu\text{L}$  CTAB 提取缓冲液和 2  $\mu\text{L}$  蛋白酶 K 溶液,65  $^{\circ}\text{C}$  温育 60 min,期间颠倒混匀 3 次~5 次;或 65  $^{\circ}\text{C}$  温育过夜。12 000 g 离心 10 min,转移上清液至另一干净的 2 mL 离心管中。
- 加入与上清液等体积的三氯甲烷,颠倒混匀后,12 000 g 离心 10 min,取上清液到另一 2 mL 离心管。
- 加入 2 倍体积的 CTAB 沉淀液,颠倒混匀后,室温静置 30 min,12 000 g 离心 10 min,去上清液。
- 向沉淀中加入 500  $\mu\text{L}$  氯化钠溶液以溶解沉淀。
- 加 2  $\mu\text{L}$  RNase A,37  $^{\circ}\text{C}$  温育 30 min。
- 加入等体积的三氯甲烷,颠倒混匀后,12 000 g 离心 10 min,取上清液到另一 1.5 mL 离心管。
- 加入 0.7 倍体积 4  $^{\circ}\text{C}$  预冷的异丙醇,颠倒混匀后,于 4  $^{\circ}\text{C}$  静置 30 min,12 000 g 离心 10 min,去上清液。
- 加入 500  $\mu\text{L}$  4  $^{\circ}\text{C}$  预冷的 70%乙醇,轻轻转动离心管 2 次~3 次,12 000 g 离心 10 min,小心去除上清液,并在室温或在真空干燥系统中干燥。
- 加入 50  $\mu\text{L}$  TE 缓冲液溶解 DNA,置 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存备用。

#### 8.2.2 试剂盒法

采用磁珠法和离心柱吸附法等不同试剂盒提取基因组 DNA 时,按其操作说明书操作。

### 8.3 DNA 浓度和纯度的测定

样品 DNA 用紫外分光光度计测定 260 nm 和 280 nm 处吸收值,按式(1)和式(2)分别计算 DNA 纯度和浓度:

$$\text{DNA 纯度} = \text{OD}_{260} / \text{OD}_{280} \quad \dots\dots\dots(1)$$

$$\text{DNA 浓度} = 50 \times \text{OD}_{260} \quad \dots\dots\dots(2)$$

DNA 的纯度比值应在 1.7~1.9 之间,浓度不低于 10 ng/ $\mu\text{L}$ 。

### 8.4 引物和探针的选择

表 1 用于实时荧光 PCR 检测的引物和 TaqMan 探针很多,其选择依检测样品和目的而定。第一

步;选用检测外源基因的引物和探针,以确定饲料样品是否含有转基因成分;第二步:选用检测内源基因的引物和探针,以确定饲料含有哪些植物成分;第三步:选用品系特异性检测的引物和探针,以进一步鉴定该植物转基因成分来源于哪一个特定的转基因品系。

### 8.5 对照设计

检测过程应设置核酸提取空白对照、PCR 扩增试剂空白对照、PCR 扩增阴性目标 DNA 对照、PCR 扩增阳性目标 DNA 对照,具体方式按照 GB/T 19495.2 中的有关规定。

### 8.6 荧光 PCR 反应体系

实时荧光 PCR 反应体系见表 2,每个提取 DNA 样品检测时设置 2 个平行反应。

表 2 实时荧光 PCR 反应体系

试剂名称	终浓度	反应体积 μL
实时荧光 PCR 反应混合液	1×	12.5
上游引物 (10 μmol/L)	200 nmol/L	1.00
下游引物 (10 μmol/L)	200 nmol/L	1.00
探针 (5 μmol/L)	100 nmol/L	0.5
DNA 模板 (40 ng/μL~50 ng/μL)	—	4.0
补水至		25

注 1: DNA 模板为原料的模板量,加工产品可视加工程度适当增加模板量,也可根据具体情况或不同的反应总体积进行适当调整。  
注 2: 实时荧光 PCR 反应混合液可用等效的商品化试剂盒代替。

### 8.7 荧光 PCR 反应参数

实时荧光 PCR 反应条件随仪器不同略有改变,一般为:50℃ 2 min;95℃ 10 min;95℃ 15 s,60℃ 1 min,40 个循环。

## 9 结果判定与表述

### 9.1 质量控制

空白对照:外源基因检测 Ct 值大于或等于 40,内参照基因检测 Ct 值大于或等于 40。

阴性对照:外源基因检测 Ct 值大于或等于 40,内参照基因检测 Ct 值在 20~30 之间。

阳性对照:外源基因检测 Ct 值小于或等于 36。

上述指标有一项不符合者,应重做实时荧光 PCR 扩增。

### 9.2 结果判定

待测样品外源基因或品系检测 Ct 值大于或等于 40,内源基因检测 Ct 值在 20~34 之间,阴性对照、阳性对照和空白对照结果正常者,则可判定该样品未检出××基因或××品系。

待测样品外源基因或品系检测 Ct 值小于或等于 36,内源基因检测 Ct 值小于或等于 36,阴性对照、阳性对照和空白对照结果正常者,则可判定该样品检出××基因或××品系。

待测样品外源基因检测 Ct 值在 36~40 之间,应重做实时荧光 PCR 扩增。再次扩增后的结果 Ct 值仍小于 40,且阴性对照、阳性对照和空白对照结果正常,则可判定该样品检出××基因或××品系;再次扩增后的结果 Ct 值大于 40,且内源基因检测 Ct 值在 20~34 之间,阴性对照、阳性对照和空白对照结果正常,则可判定该样品未检出××基因或××品系。

### 9.3 结果表述

结果表述如下:

- 检出××基因或××品系;
- 未检出××基因或××品系。

## 10 样品保存

存查样品应视样品的状态采用相应的保存方式,妥善保存 6 个月。如检测为含有转基因成分,则样品保存期为 1 年,以备复验、谈判和仲裁。

---