

中华人民共和国国家标准

农业部 2122 号公告—6—2014

转基因植物及其产品成分检测 耐除草剂苜蓿 J163 及其衍生品种定性 PCR 方法

Detection of genetically modified plants and derived products—
Qualitative PCR method herbicide-resistant alfalfa J163 and its derivatives

2014-07-07 发布

2014-08-01 实施

中华人民共和国农业部 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(SAC/TC 276)归口。

本标准起草单位:农业部科技发展中心、农业部环境保护科研监测所。

本标准主要起草人:修伟明、沈平、杨殿林、尹全、赵建宁、章秋艳、李刚、王慧。

转基因植物及其产品成分检测

耐除草剂苜蓿 J163 及其衍生品种定性 PCR 方法

1 范围

本标准规定了转基因耐除草剂苜蓿 J163 转化体特异性定性 PCR 检测方法。

本标准适用于转基因耐除草剂苜蓿 J163 及其衍生品种,以及制品中 J163 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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

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

Acc 基因 Acc gene

编码乙酰辅酶 A 羧化酶(acetyl CoA carboxylase)的基因,在苜蓿基因组中单倍体的拷贝数为 2,本标准中作为苜蓿内标准基因。

3.2

J163 转化体特异性序列 event - specific sequence of J163

外源插入片段 3'端与苜蓿基因组的连接区序列,包括外源插入片段的部分载体序列和苜蓿基因组的部分序列。

4 原理

根据转基因耐除草剂苜蓿 J163 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 J163 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或符合 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 琼脂糖。

5.2 10 g/L 溴化乙锭溶液:称取 1.0 g 溴化乙锭(EB),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液。

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

农业部 2122 号公告—6—2014

- 5.4 500 mmol/L 乙二铵四乙酸二钠溶液(pH 8.0):称取 18.6 g 乙二铵四乙酸二钠(EDTA - Na₂),加入 70 mL 水中,缓慢滴加氢氧化钠溶液(5.3)直至 EDTA - Na₂完全溶解,用氢氧化钠溶液(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—盐酸溶液(pH 8.0):称取 121.1 g 三羟甲基氨基甲烷(Tris)溶解于 800 mL 水中,用盐酸(HCl)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(5.5)和 2 mL 乙二铵四乙酸二钠溶液(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 乙二铵四乙酸二钠溶液(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。混合以上三种溶液,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 四种脱氧核糖核苷酸溶液等体积混合。
- 5.11 Taq DNA 聚合酶、PCR 反应缓冲液及 25 mmol/L 氯化镁溶液。
- 5.12 Acc 基因引物:
Acc - F:5'- GATCAGTGAACCTTCGCAAAGTAC - 3'
Acc - R:5'- GAGGGATGCTGCTACTTTGATG - 3'
预期扩增片段大小为 154 bp(参见附录 A 中 A.1)。
- 5.13 J163 转化体特异性序列引物:
J163 - F:5'- CCCCATTTGGACGTGAATGTAGAC - 3'
J163 - R:5'- CACGTGGTGTGTTAATTATCATGGT - 3'
预期扩增片段大小为 241 bp(参见附录 A 中 A.2)。
- 5.14 引物溶液:用 TE 缓冲液(5.6)或水分别将上述引物稀释到 10 μmol/L。
- 5.15 石蜡油。
- 5.16 DNA 提取试剂盒。
- 5.17 定性 PCR 反应试剂盒。
- 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 紫外透射仪。
- 6.5 凝胶成像系统或照相系统。
- 6.6 重蒸馏水发生器或纯水仪。

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 的规定执行。

7.4 DNA 模板制备

按农业部 1485 号公告—4—2010 的规定执行。

7.5 PCR 反应

7.5.1 试样 PCR 反应

7.5.1.1 每个试样 PCR 反应设置 3 次平行。

7.5.1.2 在 PCR 反应管中按表 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、等效的定性 PCR 反应试剂盒配制反应体系。

表 1 PCR 检测反应体系

试剂	终浓度	体积
水		—
10 \times PCR 缓冲液	1 \times	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)	各 0.2 mmol/L	2.0 μL
10 $\mu\text{mol/L}$ 上游引物	0.6 $\mu\text{mol/L}$	1.5 μL
10 $\mu\text{mol/L}$ 下游引物	0.6 $\mu\text{mol/L}$	1.5 μL
Taq DNA 聚合酶	0.025 U/ μL	—
25 mg/L DNA 模板	2 mg/L	2.0 μL
总体积		25.0 μL
<p>“—”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 DNA 聚合酶的浓度确定其体积,并相应调整水的体积,使反应体系总体积达到 25.0 μL。</p> <p>注:苜蓿内标准基因 PCR 检测反应体系中,上、下游引物分别为 Acc-F 和 Acc-R;J163 转化体 PCR 检测反应体系中,上、下游引物分别为 J163-F 和 J163-R。</p>		

7.5.1.3 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 扩增仪中。

7.5.1.4 进行 PCR 反应。反应程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,共进行 35 次循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。

7.5.1.5 反应结束后取出 PCR 管,对 PCR 反应产物进行电泳检测。

7.5.2 对照 PCR 反应

在试样 PCR 反应的同时,应设置阴性对照、阳性对照和空白对照。

以非转基因苜蓿基因组 DNA 作为阴性对照;以含有转基因耐除草剂苜蓿 J163 质量分数为 0.1%~1.0% 的苜蓿基因组 DNA 作为阳性对照,或采用耐除草剂苜蓿 J163 转化体特异性序列与非转基因苜蓿基因组相比的拷贝数分数为 0.1%~1.0% 的 DNA 溶液作为阳性对照;以水作为空白对照。

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 相同。

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 \times 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,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 \times TAE 缓冲液中,垂直向上轻轻拔去梳板。取 12 μL PCR 产物与 3 μL 加样缓冲液混合后加入凝胶点样孔,同时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,置于凝胶成像系统或紫外透射仪上成像。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,与抗除草剂苜蓿 J163 转化体特异性序列(参见附录 A 中 A.2)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

阳性对照的 PCR 反应中,Acc 内标准基因和 J163 转化体特异性序列得到扩增,且扩增片段大小与预期片段大小一致,而阴性对照中仅扩增出 Acc 内标准基因片段,空白对照中没有预期扩增片段,表明 PCR 反应体系正常工作;否则,重新检测。

8.2 样品检测结果分析和表述

8.2.1 Acc 内标准基因和 J163 转化体特异性序列均得到扩增,且扩增片段大小与预期片段大小一致,表明样品中检测出 J163 转化体成分,表述为“样品中检测出转基因耐除草剂苜蓿 J163 转化体成分,检测结果为阳性”。

8.2.2 Acc 内标准基因得到扩增,且扩增片段大小与预期片段大小一致,而 J163 转化体特异性序列未得到扩增,或扩增片段大小与预期片段大小不一致,表明样品中未检测出 J163 转化体成分,表述为“样品中未检测出转基因耐除草剂苜蓿 J163 转化体成分,检测结果为阴性”。

8.2.3 Acc 内标准基因片段未得到扩增,或扩增片段大小与预期片段大小不一致,表明样品中未检测出苜蓿成分,结果表述为“样品中未检测出苜蓿成分,检测结果为阴性”。

9 检出限

本标准方法的检出限为 1 g/kg。

附 录 A
(资料性附录)

Acc 基因序列和耐除草剂苜蓿 J163 转化体特异性序列

A. 1 *Acc* 基因(GenBank accession No. L25042)

1 GATCAGTGAA CTTCGCAAAG TACTCGGTTA GTAGACAGTG AATGCTCCTG TGATCTGCCC
61 ATGCACTCAT GTTGTAGTGT TCACGTCGTT GATACATGAC CATATAGAAA TGTATCCATT
121 TTACGATGTT ATCATCAAAG TAGCAGCATC CCTC

注:划线部分为引物序列。

A. 2 抗除草剂苜蓿 J163 转化体特异性序列

1 CCCATTG ACGTGAATGT AGACACGTCG AAATAAAGAT TTCCGAATTA
51 GAATAATTTG TTTATTGCTT TCGCCTATAA ATACGACGGA TCGTAATTTG
101 TCGTTTTATC AAAATGTACT TTCATTTTAT AATAACTTCC ATTTTTTTTT
151 TCTTTTCTT TTATAATAAC AGAAAAAGAA AAAGAAAGAT GATGAAAAGA
201 GAAAAGAGAA AACCGAACCA TGATAATTAA CACACCACGT G

注 1:划线部分为引物序列。

注 2:1~136 为外源插入片段的部分载体序列;137~241 为苜蓿基因组部分序列。