

中华人民共和国国家标准

农业部 953 号公告—3—2007

转基因植物及其产品成分检测 耐除草剂油菜 T45 及其衍生品种定性 PCR 方法

Detection of genetically modified plants and derived products
Qualitative PCR method for herbicide-tolerant canola T45 and its derivatives

2007-12-18 发布

2008-03-01 实施



中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准由中华人民共和国农业部科技教育司提出。

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：农业部科技发展中心、上海交通大学、上海市农业科学院。

本标准主要起草人：杨立桃、沈平、张大兵、潘爱虎、厉建萌。

本标准为首次发布。

转基因植物及其产品成分检测

耐除草剂油菜 T45 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油菜 T45 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油菜 T45 及其衍生品种,以及制品中 T45 的定性 PCR 检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注明日期的引用文件,其最新版本适合于本标准。

NY/T 672 转基因植物及其产品检测 通用要求

NY/T 673 转基因植物及其产品检测 抽样

NY/T 674 转基因植物及其产品检测 DNA 提取和纯化

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

HMG I/Y 基因 HMG I/Y gene

编码高移动簇蛋白 I/Y 的基因。

3.2

T45 转化体特异性序列 event-specific sequence of T45

外源插入片段 5'端与油菜基因组的连接区序列,包括 CaMV 35S 启动子 5'端部分序列和油菜基因组的部分序列。

4 原理

根据转基因耐除草剂油菜 T45 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 233 bp 的特异性 DNA 片段,判断试样中是否含有转基因耐除草剂油菜 T45。

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 琼脂糖。

5.2 10 g/L 溴化乙锭溶液:称取 1.0 g 溴化乙锭(EB),溶于 100 mL 水中。

注: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:称取氢氧化钠(NaOH)80.0 g,先用 160 mL 水溶解后,再加水定容到 200 mL。

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,再加入适量氢氧化钠溶液(5.3),加热至完全溶解后,冷却至室温,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 300 mL 水加热搅拌溶解后,加 100 mL 乙二铵四乙酸二钠溶液(5.4),用冰乙酸调 pH 至 8.0,然后加水定容到 1 000 mL。使用时用水稀释成 1×TAE 缓冲液。

5.8 加样缓冲液:称取 250.0 mg 溴酚蓝,加 10 mL 水,在室温下溶解 12 h;称取 250.0 mg 二甲基苯腈蓝,用 10 mL 水溶解;称取 50.0 g 蔗糖,用 30 mL 水溶解,混合三种溶液,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 50 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(5 U/ μ L)及 PCR 反应缓冲液。

5.12 引物。

5.12.1 HMG I/Y 基因。

hmg - F:5'- TCCTTCCGTTTCCTCGCC - 3';

hmg - R:5'- TTCCACGCCCTCTCCGCT - 3';

预期扩增片段大小 206 bp。

5.12.2 T45 转化体特异性序列。

T45 - F:5'- TCCCATTTATTTACGGTCAC - 3';

T45 - R:5'- CCATGGGAATTCATTTACAA - 3';

预期扩增片段大小为 233 bp。

5.13 引物溶液。

用 TE 缓冲液(5.6)分别将上述引物稀释到 10 μ mol/L。

5.14 石蜡油。

5.15 PCR 产物回收试剂盒。

6 仪器

6.1 分析天平,感量 0.1 mg。

6.2 PCR 扩增仪。

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 重蒸馏水发生器或超纯水仪。

6.7 其他分子生物学实验室仪器设备。

7 操作步骤

7.1 抽样

按 NY/T 672 和 NY/T 673 规定执行。

7.2 制样

按 NY/T 672 和 NY/T 673 规定执行。

7.3 试样预处理

按 NY/T 674 规定执行。

7.4 DNA 模板制备

按 NY/T 674 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 反应设置三次重复。

7.5.1.2 在 PCR 反应管中按表 1 依次加入反应试剂,用手指轻弹混匀,再加 50 μL 石蜡油(有热盖设备的 PCR 仪可不加)。

7.5.1.3 将 PCR 管放入台式离心机中离心 10 s 后插入 PCR 仪中。

7.5.1.4 运行 PCR 反应。反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min;进行 35 次循环扩增反应(94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s。根据不同型号的 PCR 仪,可将 PCR 反应的退火和延伸时间适当调整);72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。

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

表 1 PCR 检测反应体系

试 剂	终 浓 度	体 积
无菌水		31.75 μL
10 \times PCR 缓冲液	1 \times	5 μL
25 mmol/L 氯化镁溶液	2.5 mmol/L	5 μL
dNTPs	0.2 mmol/L	1 μL
10 $\mu\text{mol/L}$ 上游引物	0.5 $\mu\text{mol/L}$	2.5 μL
10 $\mu\text{mol/L}$ 下游引物	0.5 $\mu\text{mol/L}$	2.5 μL
5 U/ μL Taq 酶	0.025 U/ μL	0.25 μL
25 mg/L DNA 模板	1 mg/L	2.0 μL
总体积		50 μL

注:1. 如果 PCR 缓冲液中含有氯化镁,则不加氯化镁溶液,加等体积无菌水。
2. 油菜内标准基因 PCR 检测反应体系中,上下游引物分别为 hmg-F 和 hmg-R;转基因油菜 T45 转化体 PCR 检测反应体系中,上下游引物分别为 T45-F 和 T45-R。

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,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。以非转基因油菜材料中提取的 DNA 作为阴性对照 PCR 反应体系的模板;以 T45 油菜 DNA 含量为 0.1%~1.0%的油菜 DNA 作为阳性对照 PCR 反应体系的模板;空白对照中用无菌水代替 PCR 反应体系模板。

7.6 PCR 产物电泳检测

按 20 g/L 的浓度称取琼脂糖,加入 1 \times TAE 缓冲液中,加热溶解,配制成琼脂糖溶液。按每 100 mL 琼脂糖溶液中加入 5 μL EB 溶液的比例加入 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 7 μL PCR 产物与 3 μL 加样缓冲液混合后加入点样孔中,同时在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。

7.7 凝胶成像分析

电泳结束后,取出琼脂糖凝胶,置于凝胶成像仪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。根据琼脂糖凝胶电泳结果,按照 8 的规定对 PCR 扩增结果进行分析。如需确认 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 产物的测序验证

将回收的 PCR 产物克隆测序,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 对照样品结果分析

阳性对照 PCR 反应中,*HMG I/Y* 内标准基因和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,而阴性对照中仅扩增出 *HMG I/Y* 基因片段,空白对照中没有任何扩增片段,表明 PCR 反应体系正常工作,否则重新检测。

8.2 试样检测结果分析和表述

- a) *HMG I/Y* 内标准基因和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,表明试样中检测出转基因耐除草剂油菜 T 45,表述为“试样中检测出转基因耐除草剂油菜 T 45,检测结果为阳性”。
 - b) *HMG I/Y* 内标准基因片段得到扩增,且扩增片段大小与预期片段大小一致,而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,表明试样中未检测出转基因耐除草剂油菜 T 45,表述为“试样中未检测出转基因耐除草剂油菜 T 45,检测结果为阴性”。
 - c) *HMG I/Y* 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,表明试样中未检测出油菜成分,表述为“试样中未检测出油菜成分,检测结果为阴性”。
-