

玉米转基因成分检测操作技术规程

Technical specification for detection of genetically modified components in Maize

XXXX - X - X 发布

XXXX - X - X 实施

辽宁省市场监督管理局 发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则编写。

本标准由辽宁省农业农村厅提出并归口。

本标准起草单位：辽宁省农业科学院。

本标准起草人：李会、王建忠、王颖、任志莹、陈芳芳、王在亮。

本标准发布实施后，任何单位和个人如有问题和意见建议，均可以通过来电和来函等方式进行反馈，我们将及时答复并认真处理，根据实际情况依法进行评估及复审。

归口管理部门通讯地址：辽宁省农业农村厅（沈阳市和平区太原北街2号），联系电话：024-23447862

标准起草单位通讯地址：辽宁省农业科学院（沈阳市沈河区东陵路84号），联系电话：024-31021049

玉米转基因成分检测操作技术规程

1 范围

本标准规定了玉米转基因成分检测过程中抽样、样品接收、样品处理、关键试剂验证、检测、结果判定与复验、检测后样品的保存及处置、废弃物处理等内容。

本标准适用于 PCR 方法和试纸条方法检测玉米及其产品转基因成分的操作规程。

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，仅所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 19495.8 转基因产品检测 蛋白质检测方法

SN/T 4835 实验室生物废弃物管理要求

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

农业部2259号公告-4-2015 转基因植物及其产品成分检测 定性PCR方法制定指南

3 术语与定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

阳性 PCR 对照 positive PCR control

用含有目的序列的样品 DNA 进行 PCR 扩增。

3.2

阴性 PCR 对照 negative PCR control

用不含有目的序列的样品 DNA 进行 PCR 扩增。

3.3

PCR 空白对照 PCR blank ,negative reagent control

以水或不含目的 DNA 试剂进行 PCR 反应，以验证 PCR 反应过程中未被污染。

3.4

检测试纸条 dip stick format

应用双抗体夹心免疫层析的原理，试纸条包装上明确标注了保质期、稳定性试验证明、生产厂家、限量值等内容，适合快速定性分析的侧向流动试纸条。

3.5

抽样 sampling

采用适合的工具按照规定的方法，从市场或田间随机采集样品的活动。

3.6

送样 Sample sending

送检单位自行抽取和标识，符合转基因检测样品要求，自行送到转基因检测机构委托检测的活动。

3.7

DNA提取试剂盒 DNA Extraction Kit

通过物理和化学方法使DNA从样品的不同组分中分离出来，利用不同的纯化方法获得纯化DNA，商业化生产的一组试剂或耗材。

4 抽样

4.1 总体要求

按照农业部 2031 号公告-19-2013 的规定执行。

4.2 种子及其加工品

4.2.1 种子及其加工品抽样时，按照指定区域随机购买产品即可，每份样品抽取量不少于2Kg。

4.2.2 所需物品：抽样工作单、洁净无污染物的样品袋等。

4.2.3 抽样工作单根据实际情况，包含以下内容：样品名称、样品编号、商标、型号规格、生产日期或批号、抽样数量、抽样场所、受检单位情况（受检单位名称、通讯地址、法定代表人、联系人、电话）、生产单位情况（单位名称、通讯地址、联系人、电话）、抽样单位情况（单位名称、联系人、电话、通讯地址）、受检人签字、受检单位负责人签字、受检单位（公章）、抽样人签字、抽样单位（公章）、抽样日期、备注。

4.3 叶片

4.3.1 每份样品随机抽取 20 个单株的叶片混合，每片叶片取顶端约 5cm 长的叶尖。

4.3.2 根据实际需要，所需物品如下：GPS 定位仪、采样信息表、自封袋、离心管、离心管架、塑料滴管、小烧杯、剪刀、称量纸、试纸条、玻璃研磨棒等。

4.3.3 采样信息表根据实际情况包含以下内容：单位名称（公章）、序号、样品编号、取样地点（市、县、乡）、GPS 信息、试纸条检测参数及结果、抽样日期、抽样人员、备注。

5 样品接收

5.1 所送样品按照样品接收所规定的要求执行。

5.2 样品接收应登记以下项目：样品名称、样品编号、检验类型、样品重量、样品状态、时间要求、是否保留副样、报告领取方式、提供报告要求、检测依据、检测项目、委托单位、联系电话、付费总额、付费方式、委托人、到样日期、收样人、备注。

5.3 在检出限量为 0.1%的情况下，要求送检玉米样品数量应达到 3000 粒或重量达到 1000g。如果送检玉米样品不能达到规定数量或重量，则应注明不能复检。其它限量时需要的样品数量可以按照农业部 2031 号公告-19-2013 的规定执行。

5.4 样品接收时注意包装是否完好，如有破损应及时更换样品，对纱网袋包装的样品装入洁净无污染的样品袋后再进行编号。

5.5 样品由接样人员接收，登记，编号后，交由样品保管员入库管理。检测人员检测时填写样品领取返还记录表。

6 样品处理

6.1 每份样品处理要使用独立的研磨杯，研磨杯在使用前应先刷洗，并使用次氯酸钠溶液或者商业化的含有 DNA 酶的试剂浸泡 10 分钟，再用清水冲洗干净，最后用蒸馏水漂洗，晾干备用。

6.2 固体样品研磨处理成颗粒状，直径在 2mm 以下。

6.3 样品处理的研磨过程需在负压或局部负压环境下操作。

6.4 每个样品研磨后，使用次氯酸钠溶液进行环境清洁，防止交叉污染。注意通风橱台面和研磨机机体等位置的擦拭，防止样品处理过程中交叉污染。

6.5 样品研磨后的粉末为正样，用于检测，剩余的样品为副样，样品应粘贴明确的状态标识，信息包括“待检、在检和检毕”。正样和副样应妥善保管，用于复验和复检。

6.6 称取 0.1g~0.5g 研磨好的样品,或遵照所使用的 DNA 提取方法规定的样品量称取样品,用于 DNA 的提取。

7 关键试剂验证

7.1 试剂包括: DNA 提取试剂盒、引物、PCR 反应体系相关试剂和试纸条。

7.2 每批试剂到货后均需进行验证,验证可以使用已知的转基因阳性样品,对新购试剂进行验证。

8 检测

8.1 DNA 提取

8.1.1 DNA提取方法可以选用农业部1485号公告-4-2010中适合的方法进行,也可以选用经过验证的商业化DNA提取试剂盒进行提取。

8.1.2 样品DNA的提取纯度 OD_{260}/OD_{280} 值应在1.7~2.0之间,超出范围的应重新进行提取。提取好的DNA按照公式:加水量(μL) = (DNA浓度 $\text{ng}/\mu\text{L} \div 25 - 1$) \times 吸取DNA量(μL),稀释至25 $\text{ng}/\mu\text{L}$,置于冰箱冷藏箱内备用。

8.2 样品的试纸条检测

8.2.1 试纸条检测可以按照GB/T 19495.8 转基因产品检测 蛋白质检测方法中的方法进行。

8.2.2 商业化的试纸条在使用前需用已知转基因阳性样品进行验证,合格后再使用。

8.2.3 叶片进行试纸条检测时,可先将叶片剪成小块,装入离心管中,加入适量纯净水,使用研磨棒研磨至水呈黄绿色,即可进行试纸条检测。

8.3 引物设计与合成

8.3.1 需要进行引物设计时,按照农业部2259号公告-4-2015 转基因植物及其产品成分检测 定性PCR方法制定指南的规定进行设计和验证。

8.3.2 引物需按现行有效的标准进行合成。

8.3.3 引物一般采用外协的方式进行合成,应保留委托方提供的引物合成的质量记录,即在每批引物使用前进行质量合格的验证。

8.4 PCR扩增

8.4.1 PCR扩增体系的配制和DNA样品加入应在不同的超净工作台或生物安全柜内进行。

8.4.2 PCR扩增体系中,应包括PCR空白对照、阴性PCR对照、阳性PCR对照,且扩增结果必须与预期结果一致。

8.4.3 玉米样品的PCR扩增参数包括: *CaMV35S*启动子、*NOS*终止子、*bar* 或 *pat* 基因和玉米内标准基因等。

8.5 琼脂糖凝胶电泳

8.5.1 根据选用参数的扩增片段,选择合适的Marker,一般选用 DL2000Marker。

8.5.2 配制的琼脂糖凝胶浓度为2%，即每100mL电泳液中加入2g琼脂糖。

8.5.3 配制琼脂糖凝胶的溶液须与电泳的电极缓冲液一致，可直接购买50×TAE，稀释至1×备用。琼脂糖凝胶板应提前制作好，至少冷却30min以上才能使用。

8.5.4 DNA向电泳的正极泳动，点样孔放置于负极方向。

8.5.5 电源控制在2 V/cm ~5 V/cm，胶板长度在12 cm左右时，电压一般在80V~110V，电泳时间为40min~60min。

9 结果判定与复验

9.1 筛选因子检测结果为阴性的，即可判定为转基因阴性样品。筛选因子检测结果出现一个或多个因子为阳性的，需要进行复验。

9.2 复验结果与初检结果一致时，即可确认为阳性结果，并需进一步确认转基因玉米样品的转化体。

9.3 复验结果与初检结果不一致时，需取正样进行第三次复验，结果以两次相同结果为准。

9.4 根据筛选因子的阳性结果，通过转基因玉米的分子特征，选择相对应的转化体进行确认。常见转基因玉米的分子特征及对应的转基因玉米品种见附录A。

10 检测后样品的保存及处置

10.1 保存

10.1.1 样品在检毕区保存。

10.1.2 样品保存区域应具有防盗和监控设施。

10.1.3 样品检测后将阳性样品和阴性样品分开保存，阳性样品保存于可以上锁的装置中，钥匙由样品保管员保管，样品封闭好包装袋，避免交叉污染。

10.1.4 阴性样品保存三个月，阳性样品保存6个月，以备复检。

10.1.5 种子样品冰箱冷藏保存，叶片样品冰箱冷冻保存。

10.2 处置

10.2.1 超过保留期的样品，在丢弃之前应进行详细的记录，内容包括：中心编号，样品名称，样品状态，样品重量，样品处理方法，样品保管人，申请处理时间，批准人，备注等项目。

10.2.2 超过保留期的阴性玉米样品，包括正样和副样，按照实验室样品处理程序执行。

10.2.3 超过保留期的阳性玉米产品，正样和副样经121℃高压灭活，再按照实验室样品处理程序执行。

11 废弃物处理

11.1 实验过程中产生的废液主要为DNA提取过程中的废液，需由有资质的回收企业进行回收，统一处理。

11.2 使用过的移液器吸头、PCR扩增后的产物应放入次氯酸钠溶液的容器内浸泡,浸泡时间不少于24h,进行无害化处理之后按照SN/T 4835 实验室生物废弃物管理要求进行处理。

11.3 在进行琼脂糖凝胶电泳时,尽量避免使用EB(溴化乙锭)进行染色,如必需使用时,应将使用后的电泳液进行活性炭吸附过滤,进行无害化处理之后按照SN/T 4835 实验室生物废弃物管理要求进行处理。

附录 A
(资料性附录)
常见转基因玉米分子特征

常见转基因玉米分子特征信息见表 A. 1.

表 A. 1 常见转基因玉米分子特征

转化事件	转化方法	基因 1			基因 2			基因 3		
		启动子	外源基因	终止子	启动子	外源基因	终止子	启动子	外源基因	终止子
Bt11	基因枪	<i>CaMV35S</i>	<i>cry1Ab</i>	<i>NOS</i>	<i>CaMV35S</i>	<i>pat</i>	<i>NOS</i>			
Bt176	基因枪	<i>P-CDPK</i>	<i>cry1Ab</i>	<i>CaMV35S</i>	<i>P-PPC</i>	<i>cry1Ab</i>	<i>CaMV35S</i>	<i>CaMV35S</i>	<i>Bar</i>	<i>CaMV35S</i>
GA21	基因枪	<i>PractI/RuBiSCo</i>	<i>m-epsps</i>	<i>NOS</i>						
MON810	基因枪	<i>CaMV35S</i>	<i>cry1Ab</i>							
MON863	基因枪	<i>CaMV35S</i>	<i>cry3Bb1</i>	<i>T-hsp</i>	<i>CaMV35S</i>	<i>nptII</i>	<i>NOS</i>			
NK603	基因枪	<i>eCaMV35S</i>	<i>Cp4-epsps</i>	<i>NOS</i>	<i>PractI/CTP2</i>	<i>Cp4-epsps</i>	<i>NOS</i>			
T25	化学介导	<i>CaMV35S</i>	<i>pat</i>	<i>CaMV35S</i>						
TC1507	基因枪	<i>Ubi Zm1</i>	<i>cry1F</i>	<i>ORF25polyA</i>	<i>CaMV35S</i>	<i>pat</i>	<i>CaMV35S</i>			
59122	农杆菌	<i>Ubi Zm1</i>	<i>cry34Ab1</i>	<i>PinII</i>	<i>P-peroxidase</i>	<i>cry35Ab1</i>	<i>pinII</i>	<i>CaMV35S</i>	<i>pat</i>	<i>CaMV35S</i>
MON89034	农杆菌	<i>eCaMV35S</i>	<i>cry1A. 105</i>	<i>Hsp17</i>	<i>FMV35S</i>	<i>cry2Ab</i>	<i>NOS</i>	<i>CaMV35S</i>	<i>NptII</i>	<i>NOS</i>
MON88017	农杆菌	<i>CaMV35S</i>	<i>cry3Bb1</i>	<i>T-hsp</i>	<i>P-ract1/CTP2</i>	<i>Cp4-epsps</i>	<i>NOS</i>			
MIR604	农杆菌	<i>Pmi</i>	<i>cry3A</i>	<i>NOS</i>	<i>Ubi Zm1</i>	<i>mpi</i>	<i>NOS</i>			
MIR162	农杆菌	<i>ZmUbiInt</i>	<i>vip3Aa19e</i>	<i>CaMV35S</i>	<i>ZmUbiInt</i>	<i>pmi</i>	<i>NOS</i>			

转化事件	转化方法	基因 1			基因 2			基因 3		
		启动子	外源基因	终止子	启动子	外源基因	终止子	启动子	外源基因	终止子
3272	农杆菌	<i>Gzein</i>	<i>amy797E</i>	<i>CaMV35S</i>	<i>ZmUbi</i>	<i>pmi</i>	<i>NOS</i>			
BVLA430101	基因枪	<i>LEG</i>	<i>phyA</i>	<i>LEG</i>						
MON87460	农杆菌	<i>P-Ract1, CaMV35S</i>	<i>CS-cspB, nptII</i>	<i>T-tr7, NOS</i>						