

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3690—2013

转基因大米 PCR-DHPLC 检测方法

PCR-DHPLC method for detection of genetically modified rice

2013-08-30 发布

2014-03-01 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：深圳出入境检验检疫局、深圳市检验检疫科学研究院、中国检验检疫科学研究院、国家纳米科学中心、深圳博睿祥晖生物技术有限公司、辽宁农业科学研究院。

本标准主要起草人：凌杏园、章桂明、朱水芳、潘广、向才玉、程颖慧、龙海、黄新、汪朝晖、朱劲松、欧阳辉、缪建锟。

转基因大米 PCR-DHPLC 检测方法

1 范围

本标准规定了产品中转基因大米成分的 PCR-DHPLC 检测方法。

本标准适用于产品中转基因水稻品系 LLRice62、科丰 6 号、科丰 8 号、克螟稻 KMD1 和 Bt 汕优 63 大米的检测。

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

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

SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

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。

变性高效液相色谱技术 Denaturing High-performance Liquid Chromatography; DHPLC

一种应用离子对反相液相色谱原理对 DNA 片段进行分离的简单、快速、非凝胶的核酸分析方法。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

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

bp:碱基对(base pair)

CaMV35S:来自于花椰菜花叶病毒的 35S 启动子(35S promoter from cauliflower mosaic virus)

CryIA(b):苏云金芽孢杆菌杀虫毒蛋白 *cryIA(b)* 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(b)/CryIA(c):苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白 *cryIA(b)* 和 *cryA(c)* 融合基因

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*]

Ct 值:每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数(C:Cycle, t: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)
dTTP:脱氧胸苷三磷酸(deoxythymidine triphosphate)
dUTP:脱氧尿苷三磷酸(deoxyuridine triphosphate)
EDTA:乙二胺四乙酸(ethylene diaminetetraacetic acid)
Gos9:一种水稻根部表达的基因
GUS: β -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)
PCR:简称 PCR(polymerase chain reaction)
TEAA:三乙基铵醋酸盐
Taq:水生栖热菌(*Thermus aquaticus*)
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)

4 方法提要

采用普通 PCR 方法对样品中转基因大米成分的各检测位点进行扩增,扩增产物通过 DHPLC(变性高效液相色谱技术 Denaturing High-performance Liquid Chromatography)进行分析。DHPLC 是一种应用离子对反相液相色谱原理对 DNA 片段进行分离的简单、快速、非凝胶的核酸分析方法。样品扩增 DNA 的碱基对数量决定样品峰的洗脱顺序,随着洗脱时流动相中乙腈浓度的提高,扩增 DNA 片段将按分子量从小到大的顺序被洗脱下来。通过与标准分子量比较确定得到洗脱峰 DNA 片段大小,从而判定样品是否含有转基因大米成分和其所来源的转基因水稻品系。

5 主要设备及试剂

5.1 主要设备

PCR 仪;变性高效液相色谱分析仪;低温冷冻高速离心机;紫外分光光度计;制冰机;纯水机;移液器(2 μ L,10 μ L,20 μ L,100 μ L,200 μ L,1 000 μ 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。

5.2.1 CTAB 提取缓冲液:CTAB 20 g/L,氯化钠 81.9 g/L,Tris 12.1 g/L,Na₂-EDTA 7.5 g/L,PVP-40 20 g/L,pH8.0,高压灭菌,使用前加终浓度 2%的 β -巯基乙醇。

5.2.2 TE 缓冲液:Tris 1.21 g/L,Na₂-EDTA 0.372 g/L,pH8.0。

5.2.3 pH7.0 Tris 饱和酚。

5.2.4 三氯甲烷/异戊醇(24:1)。

5.2.5 70%乙醇。

5.2.6 RNA 酶:10 mg/mL。

- 5.2.7 蛋白酶 K:20 mg/mL。
- 5.2.8 TEAA 液:三乙基铵醋酸盐液。
- 5.2.9 DHPLC 缓冲液 A:50 mL TAEE 和 250 μ L 乙腈混合,加水定容至 1 000 mL。
- 5.2.10 DHPLC 缓冲液 B:50 mL TAEE 和 250 mL 乙腈混合,加水定容至 1 000 mL。
- 5.2.11 DHPLC 缓冲液 D:75%乙腈。
- 5.2.12 Taq DNA 聚合酶。
- 5.2.13 UNG 酶(以 dUTP 代替 dTTP 时使用)。
- 5.2.14 10 \times PCR 缓冲液。
- 5.2.15 氯化镁溶液:25 mmol/L。
- 5.2.16 dNTP 溶液:dGTP,dCTP,dATP,dTTP 或 dUTP 各 2.5 mmol/L。
- 5.2.17 PCR 所用引物:检测转基因大米内、外源基因和转基因水稻品系各引物信息见表 1。

表 1 检测引物信息一览表

基因/品系名称	引物名称	引物序列(5'-3')	扩增产物/bp	备注
Gos9	F	CGTGGCCTCGCGATCTGACTATTTTC- CGCACGTCCTTGC	96	内源基因
	R	CTCAGCGGCGGAGCTACAGACCCT- TCACGAATTCCTGAGA		
CryIA(b)/ CryIA(c)	F	CGTGGCCTCGCGATCTGACTCCAATA- CAGTTCCAGCTACAGCTA	151	外源基因
	R	CTCAGCGGCGGAGCTACAGACAC- CCACGATGTTACCGAGT		
CryIA(b)	F	CGTGGCCTCGCGATCTGACTATCAAC- CAGAGGATCGAAGAGT	174	内源基因
	R	CTCAGCGGCGGAGCTACAGATCGCG- GAGAGCTGGGTTA		
CryIA(c)	F	CGTGGCCTCGCGATCTGACTGAGTC- CGTGGATGCTTTGTTC	111	外源基因
	R	CTCAGCGGCGGAGCTACAGAATCATG- GCGATGTTGGTGTC		
Bar	F	CGTGGCCTCGCGATCTGACTGCAC- CATCGTCAACCACTACA	180	外源基因
	R	CTCAGCGGCGGAGCTACAGAGAC- CTCGCCGTCCACCTC		
CaMV35S	F	CGTGGCCTCGCGATCTGACTAAGAT- GCCTCTGCCGACAGT	196	外源基因
	R	CTCAGCGGCGGAGCTACAGAGCGAAG- GATAGTGGGATTGT		
NOS	F	CGTGGCCTCGCGATCTGACTTGAATC- CTGTTGCCGGTCTT	188	外源基因
	R	CTCAGCGGCGGAGCTACAGACGTAT- TAAATGTATAATTGCGGGAC		

表 1 (续)

基因/品系名称	引物名称	引物序列(5'-3')	扩增产物/bp	备注
NPT II	F	CGTGGCCTCGCGATCTGACTCGAT- CAGGATGATCTGGACG	275	外源基因
	R	CTCAGCGGCGGAGCTACAGACTCT- TCAGCAATATCACGGGTAG		
GUS	F	CGTGGCCTCGCGATCTGACTCG- TATCGTGCTGCGTTTCG	218	外源基因
	R	CTCAGCGGCGGAGCTACAGATCTGC- CAGTTCAGTTCGTTGTT		
LLRICE62	F	AGCTGGCGTAATAGCGAAGAGG	260	品系
	R	GGTGCTGACCGGAAGCAACGG		
Bt 汕优 63	F	CGTGGCCTCGCGATCTGACTTG- GAGCTGGGCTACAGTCGT	220	品系 (任选一)
	R	CTCAGCGGCGGAGCTACAGATCTTTG- GAAGCGGAGGGAG		
	F	CGTGGCCTCGCGATCTGACTTG- GAGCTGGGCTACAGTCGT	337	
	R	CTCAGCGGCGGAGCTA- CAGAATTTCACTTTGGGCCACCTTT		
科丰 6 号	F	CGTGGCCTCGCGATCTGACTATTGC- CGTGGTATCCTACCTCT	212	品系 (任选一)
	R	CTCAGCGGCGGAGCTACAGAGCAAGC- CGAGTGACACGAAT		
	F	CGTGGCCTCGCGATCTGACTACACCCT- GACCTAGTTGAGCAA	346	
	R	CTCAGCGGCGGAGCTACAGACT- CACGTTCCTTTGCGCTCCC		
科丰 8 号	F	CGTGGCCTCGCGATCTGACT- CATTTACAGAGCACACATGCATAAG	315	品系 (任选一)
	R	CTCAGCGGCGGAGCTACAGATAAT- AGCGAAGAGGCCCGC		
	F	CGTGGCCTCGCGATCTGACTATGAT- GACTCAAGCGATGAACCT	199	
	R	CTCAGCGGCGGAGCTACAGAGGCGAC- CATGATGCTGTTCT		
克螟稻 KMD1	F	CGTGGCCTCGCGATCT- GACTCTTTTCTGGCTGTCTCGGCT	337	品系 (任选一)
	R	CTCAGCGGCGGAGCTACAGAAGGCG- GTGAAGGGCAATC		
	F	CGTGGCCTCGCGATCTGACTCAGCT- CACGCACGACGAT	342	
	R	CTCAGCGGCGGAGCTACAGAGGATTT- GGGGGAGATCTGGT		

6 抽样与制样

按 GB/T 19495.7 中的要求执行。

7 DNA 提取及浓度测定

7.1 DNA 提取

7.1.1 CTAB 方法

称取 150 mg 磨碎的样品,迅速转入 2 mL 离心管中,加 65 °C 预热的 CTAB 提取液 700 μ L,2 μ L 蛋白酶 K,混匀,65 °C 水浴 30 min。加 5 μ L RNA 酶,37 °C 水浴 30 min。加入等体积 Tris 饱和酚,充分混匀,12 000 r/min 离心 15 min。取上清液,加入等体积的三氯甲烷/异戊醇(24:1)混匀,12 000 r/min 离心 10 min。取上清液,加入等体积的三氯甲烷/异戊醇(24:1)混匀,12 000 r/min 离心 10 min。加入等体积 70% 预冷的异丙醇,轻轻摇晃,置于-20 °C 冰箱静置 30 min,12 000 r/min 离心 10 min。弃上清液,保留沉淀,加入 70% 乙醇 500 μ L,12 000 r/min 离心 3 min,去上清液,重复 2 次。得到 DNA 沉淀,用冷冻干燥仪进行干燥,加入 50 μ L~100 μ L TE 或无菌去离子水,充分溶解后,测定 DNA 的纯度和浓度,后置于-20 °C 冰箱中保存。

7.1.2 试剂盒法

采用不同试剂盒提取基因组 DNA 时,按其操作说明书操作。

7.2 DNA 浓度测定

样品 DNA 用紫外分光光度计测定 260 nm 和 280 nm 处吸收值,分别计算核酸的纯度和浓度,计算公式如下:

DNA 纯度以 OD_{260}/OD_{280} 比值表示。

DNA 浓度 = $50 \times OD_{260}$ mg/mL。

DNA 的纯度比值应在 1.7~1.9 之间,浓度不低于 10 ng/ μ L。

8 PCR-DHPLC 检测步骤

8.1 对照设置

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。

8.2 PCR 扩增

8.2.1 PCR 扩增反应体系

普通 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 普通 PCR 反应体系

试 剂	反应体系中的终浓度
10 \times PCR 缓冲液(不含氯化镁)	1 \times
氯化镁溶液(25 mmol/L)	2.0 mmol/L

表 2 (续)

试 剂	反应体系中的终浓度
dNTP 溶液(2.5 mmol/L)	各 2.0 mmol/L
UNG 酶	0.075 U
正向引物(20 μ mol/L)	0.2 μ mol/L
反向引物(20 μ mol/L)	0.2 μ mol/L
Taq DNA 聚合酶	2.5 U
DNA 模板(50 ng/ μ L~100 ng/ μ L)	3.0 μ L
补水至	50 μ L
注: 实验室采用加 UNG 酶作为消除污染措施时, 反应体系加 UNG 酶, 并用 dUTP 代替 dTTP。如不采用加 UNG 酶作为消除污染措施, 反应体系不加 UNG 酶, 也不用 dUTP 代替 dTTP。	

8.2.2 PCR 扩增反应条件

反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 进行 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存反应产物。

8.3 DHPLC 分析

8.3.1 DHPLC 分析条件

DHPLC 分析条件如下:

- 选择合适的 DHPLC 色谱柱;
- 柱温: 50 $^{\circ}$ C;
- 流动相: 61% 缓冲溶液 A, 39% 缓冲溶液 B;
- 流速: 0.9 mL/min;
- 检测器: UV/可见光检测器;
- 分析片段设计: 通过软件设计分析片段方法时可选择仪器的单核酸片段分析功能; 也可选择多核酸片段分析功能, 同时设定最大片段为 600 bp, 最小片段为 70 bp;
- 样品用量: PCR 产物 5 μ L~10 μ L。

8.3.2 DHPLC 分析步骤

将含 PCR 产物的反应管开盖, 置于 DHPLC 分析仪的自动进样平台上; 打开 DHPLC 分析仪器控制软件, 根据分析条件最终建立分析程序; 先运行两个空针以平衡色谱柱, 运行一个分子量标准, 再依次对待测样本进行分析。

9 结果判定与表述

9.1 结果判定

观察 DHPLC 分析得到的洗脱峰, 通过与标准分子量比对及仪器自动分析确定洗脱峰位置的 DNA 片段大小, 据此进行判断。

该标准内、外源基因和品系检测为单位点检测, 反应阳性对照应得到一个洗脱峰, 且峰高不低于 1 mV, 阴性对照及空白对照无洗脱峰。在此基础上, 确定被测样品洗脱峰位置的 DNA 片段大小, 如片

段大小同时与阳性对照和表中相应外源基因或品系扩增产物大小一致,可判定样品含该相应外源基因或相应转基因水稻品系大米。

9.2 结果表述

样品中检出外源基因×××,或样品中检出转基因水稻品系×××。

10 防污染措施

检测过程中防止交叉污染的措施按照 SN/T 1193 中的规定执行。
