

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4853.3—2017

转基因大米定量检测 数字 PCR 法 第 3 部分:科丰 6 号品系

Quantitative detection of genetically modified rice—Digital PCR—
Part 3: Event KF6

2017-07-21 发布

2018-03-01 实施



中 华 人 民 共 和 国 发 布
国家质量监督检验检疫总局

前 言

SN/T 4853《转基因大米定量检测 数字 PCR 法》系列标准共分为 7 部分：

- 第 1 部分：TT51-1 品系；
- 第 2 部分：克螟稻品系；
- 第 3 部分：科丰 6 号品系；
- 第 4 部分：M12 品系；
- 第 5 部分：LL62 品系；
- 第 6 部分：T2A-1 品系；
- 第 7 部分：T1C-19 品系。

本部分为 SN/T 4853 标准的第 3 部分。

本部分按照 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。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分起草单位：中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国上海出入境检验检疫局、中华人民共和国吉林出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：黄文胜、陈颖、邓婷婷、吴亚君、付伟、聂丹丹、朱水芳、韩建勋、李想。

转基因大米定量检测 数字 PCR 法

第 3 部分:科丰 6 号品系

1 范围

本部分规定了稻谷和小米中科丰 6 号品系的数字 PCR 定量检测方法。
本部分适用于稻谷和小米中科丰 6 号品系特异性的数字 PCR 定量检测。
本方法的定量检测低限(LOQ)为 0.1%(质量分数)。

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 19495.1 转基因产品检测 通用要求和定义
- GB/T 19495.2 转基因产品检测 实验室技术要求
- GB/T 19495.3 转基因产品检测 核酸提取纯化方法
- GB/T 19495.5 转基因产品检测 核酸定量 PCR 检测方法
- GB/T 19495.7 转基因产品检测 抽样和制样方法
- SN/T 1194 植物及其产品转基因成分检测抽样和制样方法

3 术语和定义、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

SPS 基因 The gene of sucrose phosphate synthase
蔗糖磷酸合成酶基因,大米单拷贝内参照基因。

3.1.2

科丰 6 号转化体特异性序列 event-specific sequence of KF6
外源 DNA 插入受体大米基因组后经重组产生的邻接区序列。具体序列参见附录 A。

3.1.3

Taq 酶 Taq DNA polymerase
源于水生栖热菌的耐热 DNA 聚合酶。

3.1.4

模板 template
数字 PCR 引物/探针扩增检测的特定 DNA 片段。

3.1.5

定量检测低限 limit of quantification; LOQ

在相对标准差不超过 25% 的条件下,检测方法所能定量的最低转基因成分百分含量。

3.1.6

质控样品 quality control sample

具有确定的 SPS 基因和转化体特异性序列拷贝数的基因组 DNA。

3.1.7

微反应体系 tiny reaction system

将含有模板、引物/荧光探针、耐热 DNA 复制酶及其缓冲液充分混匀之后分配至体积相同且相互物理隔离的油包水液滴或其他微孔、微室中所形成的小体积荧光 PCR 反应体系。

3.1.8

转换系数 Conversion factor

将转化体特异性序列和内参照基因拷贝数之比转换为转基因成分含量(质量分数)时所用系数。

3.1.9

荧光标记探针 Fluorescently tagged probe

在 5' 末端和 3' 末端分别连接荧光报告基团和淬灭基团的寡核苷酸。PCR 扩增时, *Taq* 酶的 5'-3' 外切酶活性将探针水解,使报告基团和淬灭基团分离,从而释放出荧光信号。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

数字 PCR: 数字聚合酶链式反应(digital polymerase chain reaction)

DNA: 脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

dNTP: 脱氧核苷酸三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphate)

bp: 碱基对(base pair)

NC: 阴性对照(negative control)

NTC: 空白对照(no template control)

PC: 阳性对照(positive control)

4 防污染措施

数字 PCR 定量检测过程的防污染措施应符合 GB/T 19495.2 的规定。

5 原理

数字 PCR(digital PCR)是在荧光 PCR 基础上发展起来的基因拷贝数定量检测技术,用于核酸模板的绝对拷贝数的测定。通过将含有模板、引物/荧光探针、耐热 DNA 复制酶及其缓冲液的荧光 PCR 反应体系充分混匀之后等量均分为相互隔离的大数量(大于 10 000 个)微反应体系,使每个模板独立随机地分配至微反应体系中;所有微反应体系同时在相同的规定条件下进行 PCR 扩增反应之后,根据设定的荧光阈值判断每个微反应体系的扩增结果;依据微反应体系的阳性率和泊松分布公式计算得到数字 PCR 反应体系中的模板浓度。

依据样品 DNA 溶液中的转化体特异性序列(event specific sequence)和内参照基因(species specific gene)的模板浓度之比,得到样品中相应的转基因品系含量。

6 仪器和设备

- 6.1 超纯水发生器(分子生物学级别)。
- 6.2 分析天平:感量 0.1 g 和 0.1 mg。
- 6.3 生物安全柜。
- 6.4 PCR 扩增仪。
- 6.5 数字 PCR 系统:微反应体系发生器或其他具有同样功能的仪器、微反应体系荧光检测仪或其他具有同样功能的仪器。
- 6.6 恒温孵育箱:控温精度±1.0 ℃。
- 6.7 样品粉碎机:可将大米或稻谷样品磨成 60 目左右的粉末。
- 6.8 核酸定量仪:Nanodrop3000 或 Modulus 检测仪或其他核酸定量检测仪。
- 6.9 涡旋振荡仪。
- 6.10 离心机:最大离心加速度大于 15 000 g,并适用 0.2 mL 和 1.5 mL 离心管。
- 6.11 移液枪:量程 0.5 μL~10 μL;量程 10 μL~100 μL;量程 100 μL~1 000 μL。

7 试剂和材料

除另有规定外,试剂和材料质量应符合 GB/T 19495.1 的要求。

- 7.1 实验用水:应符合 GB/T 6682 中一级水的规格。
- 7.2 数字 PCR 预混液:含有镁离子、dNTPs 和具有 5'-3'外切活性的热启动 *Taq* DNA 聚合酶的数字 PCR 专用预混试剂。
- 7.3 引物和探针:SPS 基因和科丰 6 号转化体特异性序列的数字 PCR 检测引物和探针信息详见表 1。
- 7.4 数字 PCR 微反应体系生成联排管或芯片。
- 7.5 96 孔荧光定量 PCR 反应板和封膜。
- 7.6 0.2 mL 和 1.5 mL 离心管。
- 7.7 移液枪头,量程 0.5 μL~10 μL;量程 10 μL~100 μL;量程 100 μL~1 000 μL。

表 1 SPS 基因和科丰 6 号转化体特异性序列的引物和探针

扩增基因	名称	序列(5'-3')	PCR 扩增片段长度
SPS 基因	上游引物	GAGGTCACCAAGGCTGCCAGTG	122 bp
	下游引物	GCACTCCTGATTCTTCCAGGCTTC	
	探针	VIC-TAGGCTTCCCAGCAGGCAACCAA-BHQ1	
科丰 6 号转化体特异性序列	上游引物	GTGGTATCCTACCTCTCCCAGC	87 bp
	下游引物	CGCAGCATGGTTCTCAGTACA	
	探针	FAM-TACCGCCGTGTGCCCCGTGTC-BHQ1	
注 1:表中 PCR 体系中引物/探针的终浓度可根据每合成批次的验证结果进行适当调整。			
注 2:荧光探针的发光基团应与数字 PCR 仪的荧光通道匹配,通常用 5'-FAM/3'-BHQ1 或 5'-VIC/3'-BHQ1 方式标记。			
注 3:新合成的引物/探针干粉进行配制时,先将引物/探针贮存管短暂离心,然后开盖加纯水溶解,并稀释至 10 μmol/L后分装,-20 ℃避光保存。			

8 实验步骤

8.1 抽样

按照 GB/T 19495.7 的规定执行。

8.2 样品制备

除另有规定外,样品制备按照 GB/T 19495.7 或 SN/T 1194 的规定执行。

将样品适度破碎、均一化,取出至少 200 g,全部放入样品研磨机中,研磨至 60 目左右粒度。破碎和研磨过程中应调整设备的操作参数,避免过热并防止样品粘连。

8.3 核酸提取纯化

8.3.1 核酸提取及 PCR 抑制物的判断

除另有规定外,DNA 提取纯化及 PCR 抑制物的判断按照 GB/T 19495.3 中的规定执行。

称取 2 份(每份 2 g)研磨后样品作为测试样,分别提取基因组 DNA。

8.3.2 模板浓度控制

采用 PicoGreen dsDNA 荧光定量试剂盒或其他具有等效结果的仪器/方法测定 DNA 溶液的浓度,具体操作步骤参照相关仪器/试剂盒说明书。

数字 PCR 体系中的模板数应不高于微反应体系数的 5 倍。为保证定量结果的准确性,体系中总模板数应不低于 400 个拷贝。将样品 DNA 溶液作适度稀释,选择模板浓度在 100 拷贝/ μL ~20 000 拷贝/ μL 范围内的稀释液分别用于 SPS 基因拷贝数和转化体特异性序列拷贝数的数字 PCR 定量检测。

8.4 数字 PCR 扩增

8.4.1 数字 PCR 体系配制

按表 2 将各组分加入洁净离心管中,充分混匀。

表 2 数字 PCR 反应体系

试剂	终浓度
内源基因反应体系	
2×数字 PCR 预混液	1×
SPS 基因正向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.32 $\mu\text{mol/L}$
SPS 基因反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.32 $\mu\text{mol/L}$
SPS 基因荧光标记探针(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.12 $\mu\text{mol/L}$
DNA 模板	—
dH ₂ O(无菌水)	—
外源基因反应体系	
2×数字 PCR 预混液	1×
科丰 6 号正向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.32 $\mu\text{mol/L}$

表 2 (续)

试剂	终浓度
外源基因反应体系	
科丰 6 号反向引物(10 μmol/L)	0.32 μmol/L
科丰 6 号荧光标记探针溶液(10 μmol/L)	0.2 μmol/L
DNA 模板	—
dH ₂ O(无菌水)	—
注:数字 PCR 反应体系的总体积可根据不同厂家、型号的数字 PCR 仪作相应调整。PCR 体系配制及转移时尽量避免产生气泡。	

8.4.2 微反应体系生成、数字 PCR 扩增及结果读取

根据仪器要求,将配制好的数字 PCR 反应混合液,加入微反应体系生成装置的加样孔中,按仪器操作说明生成微反应体系。将微反应体系放置于 PCR 扩增仪中,按以下参数进行 PCR 扩增:95 ℃, 5 min(1 ℃/s),1 个循环;94 ℃,15 s,60 ℃,1 min(1 ℃/s),50 个循环;98 ℃ 10 min(1 ℃/s),1 个循环;12 ℃保存反应产物。对微反应体系进行荧光检测,记录阳性和阴性微反应体系数量及其比值。根据比值分别计算数字 PCR 反应体系中的 SPS 基因拷贝数(拷贝/μL)和科丰 6 号转化体特异性序列拷贝数(拷贝/μL)。

注:PCR 反应参数可根据基因扩增仪型号的不同进行适当的调整。

9 检测质量控制

9.1 对照设置

阴性对照(NC)、空白对照(NTC)和阳性对照(PC)的设置如下:

- a) NC:采用非转基因大米的基因组 DNA 作为数字 PCR 反应模板;
- b) NTC:采用水作为数字 PCR 反应模板;
- c) PC:采用质控样品的基因组 DNA 作为数字 PCR 反应模板。

每个测试样和 PC 的 SPS 基因或科丰 6 号转化体特异性序列的数字 PCR 需设置至少 3 个平行,且 3 个平行实验结果的相对标准偏差应不高于 20%。

9.2 检测结果有效性判定

以下结果中若有一项不符合,则样品检测结果无效,应查找原因并重做试验:

- a) NC 和 NTC 的科丰 6 号转化体特异性检测无阳性扩增;
- b) PC 的 SPS 基因或科丰 6 号转化体特异性序列检测有阳性扩增;
- c) PC 的定量结果与已知值相符。

10 结果计算

10.1 数字 PCR 仪运行后经软件计算得出每个测试样的 SPS 基因拷贝数和科丰 6 号转化体特异性序列拷贝数,取 3 个平行试验的均值,按照式(1)计算测试样的转基因成分含量:

$$A = \frac{B}{C \times D} \times 100\%$$

.....(1)

式中：

- A ——转基因大米品系科丰 6 号的含量，%；
- B ——KF6 转化体特异性序列拷贝数；
- C ——水稻内标准基因 SPS 拷贝数；
- D ——转换系数。

注：不同的大米或水稻样品有不同的转换系数，具体为：市售杂交稻种样品(F1 代)的转换系数为 0.33，市售杂交稻谷和 大米样品(F2 代)的转换系数为 0.50。

10.2 如两个测试样的科丰 6 号品系含量的相对相差大于或等于 35%，则测试结果应放弃，并应重做样品制备及后续试验。相对相差的计算参照 GB/T 19495.5 中的规定执行。

10.3 如两个测试样的科丰 6 号品系含量的相对相差小于 35%，则样品的定量检测结果等于两个测试样转基因大米品系科丰 6 号成分含量的平均值。

11 结果表述

定量检测结果有四种情况，每种检测结果的表述如表 3 所示。

表 3 结果表述

检测结果	结果表述
未检出 SPS 基因	未检出大米成分
检出 SPS 基因，但未检出科丰 6 号转化体特异性序列	未检出转基因大米科丰 6 号品系成分
检出 SPS 基因和科丰 6 号转化体特异性序列，但其含量小于定量方法检测低限	检出转基因大米科丰 6 号品系成分，但含量低于本定量方法的 LOQ(0.1%)
检出 SPS 基因和科丰 6 号转化体特异性序列，其含量大于定量方法检测低限	检出转基因大米科丰 6 号品系成分，含量为 X%

附 录 A
(资料性附录)

转基因大米科丰 6 号转化体特异性序列

转基因大米科丰 6 号转化体特异性序列 TGGTATCCTACCTCTCCCAGCGGCTACGTAGTAC
GTACCGCCGTGTGCCCCGTGTCCCCGC GCGTTGTACTGAGAACCATGCTGCGA

注：阴影部分为转基因大米品系科丰 6 号外源基因序列，带下划线部分为水稻基因组序列。

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
转基因大米定量检测 数字 PCR 法
第 3 部分:科丰 6 号品系

SN/T 4853.3—2017

*

中国标准出版社出版
北京市朝阳区和平里西街甲 2 号(100029)
北京市西城区三里河北街 16 号(100045)
总编室:(010)68533533

网址 www.spc.net.cn

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 16 千字
2018 年 6 月第一版 2018 年 6 月第一次印刷
印数 1—500

*

书号: 155066 • 2-33313 定价 16.00 元



SN/T 4853.3—2017