

中华人民共和国国家标准

农业农村部公告第 864 号 —4— 2024

转基因植物及其产品成分检测 耐除草剂玉米DBN9858转化体特异性 PCR方法

Detection of genetically modified plants and derived products—
Event-specific PCR method for herbicide-tolerant maize DBN9858

2024-12-30 发布

中华人民共和国农业农村部

发布



前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

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专利的责任。

本文件由中华人民共和国农业农村部提出。

本文件由全国农业转基因生物安全管理标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：中国农业科学院生物技术研究所、农业农村部科技发展中心、天津市农业科学院种质资源与生物技术研究所、北京大北农生物技术有限公司。

本文件主要起草人：苗朝华、梁晋刚、檀覃、金芄军、高芳瑞、董美、郑戈、宛煜嵩、王永、兰青阔、汤波、文婷婷。



转基因植物及其产品成分检测

耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性 PCR 方法

1 范围

本文件规定了耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性 PCR 定性和定量检测方法。

本文件适用于玉米及其制品中 DBN9858 转化体成分的定性和定量检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;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。

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 1861 号公告—3—2012 转基因植物及其产品成分检测 玉米内标准基因定性 PCR 方法

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

农业部 1861 号公告—3—2012 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性序列 event-specific sequence of herbicide-tolerant maize DBN9858

耐除草剂玉米 DBN9858 转化体的外源插入片段 5'端或(和)3'端与玉米基因组的连接区序列,包括玉米基因组部分序列及转化载体 T-DNA 部分序列。

3.2

阳性质控品 positive control

用于质量控制的阳性样品,分为用于定性检测的阳性阳性质控品和定量检测的阳性定量质控品。

注:阳性质控品宜优先选用有证标准物质,也可使用经充分验证的实验室配制样品。阳性阳性质控品的转基因含量为 0.1%~1.0%,阳性定量质控品的转基因含量值宜与标识阈值相当。

3.3

校准品 calibrator

用于绘制标准曲线的梯度稀释样品,用纯合转化体基因组 DNA 或转基因含量较高的有证标准物质或阳性样品稀释制备,确认后至少含 5 个有效浓度。宜优先选择有证标准物质。

3.4

子样 subsample

试样预处理后,从同一试样不同位置随机抽取的独立样品。

3.5

ΔC_t 值 ΔC_t value

实时荧光 PCR 扩增中样品转化体特异性序列平均 C_t 值与内标准基因平均 C_t 值的差值。

3.6

$\Delta\Delta C_t$ 值 $\Delta\Delta C_t$ value

实时荧光 PCR 扩增中试样的 ΔC_t 值与阳性定量质控品的 ΔC_t 值的差值。

4 通用要求

4.1 检测方法

第 5 章至第 7 章分别规定了耐除草剂玉米 DBN9858 转化体成分的实时荧光 PCR 定性检测、实时荧光 PCR 定量检测(转化体拷贝数比值)、普通 PCR 定性检测 3 种方法,可根据实际检测需求选用。

4.2 试剂、材料、模板

第 5 章至第 7 章介绍的 3 种不同方法间的试剂、材料、试样模板、质控品模板,在满足试验条件的情况下可以通用。

5 实时荧光 PCR 定性检测方法(方法一)

5.1 原理

采用规定的引物和探针对试样中玉米内标准基因和耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性序列,进行实时荧光 PCR 扩增。依据是否扩增获得预期的典型扩增曲线,判断试样中是否含有耐除草剂玉米 DBN9858 转化体成分。若试样中含有耐除草剂玉米 DBN9858 转化体成分,计算试样与阳性定量质控品的 $\Delta\Delta C_t$ 值,判定试样与阳性定量质控品相比转化体成分含量的高低。

5.2 试剂和材料

除非另有说明,仅使用分析纯试剂、蒸馏水或以上等级的水。

5.2.1 DNA 提取试剂盒

5.2.2 PCR 扩增试剂: *Taq* DNA 聚合酶、PCR 扩增缓冲液、25 mmol/L 氯化镁($MgCl_2$)溶液、dNTPs 溶液(浓度为 10 mmol/L 的 dATP、dTTP、dGTP、dCTP4 种脱氧核糖核苷酸溶液等体积混合)。

注:若不采用上述 PCR 扩增试剂,也可选用实时荧光 PCR 试剂盒。

5.2.3 玉米内标准基因 *zSSIb* 基因引物/探针

zSSIb-3F: 5'-CGGTGGATGCTAAGGCTGATG-3';

zSSIb-4R: 5'-AAAGGGCCAGGTTTCATTATCCTC-3';

zSSIb-P: 5'-TAAGGAGCACTCGCCGCCGCATCTG-3'。

注 1:预期扩增片段大小为 88 bp。

注 2:*zSSIb*-P 为 *zSSIb* 基因的 *TaqMan* 探针,其 5'端标记荧光报告基团(如 FAM、HEX 等),3'端标记对应的荧光淬灭基团(如 TAMRA、BHQ1 等)。

[来源:农业部 1861 号公告—3—2012,5.13]

5.2.4 耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性序列引物/探针

DBN9858-qF: 5'-TAAACCTAATCAGTCAGTGCCG-3';

DBN9858-qR: 5'-AGCGCTGATTCTCGAGTAAGG-3';

DBN9858-qP: 5'-CCCAAACAACCAGCCCACCAG-3'。

注 1:预期扩增片段大小为 146 bp(见附录 A 中的 A.1)。

注 2:DBN9858-qP 为耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性序列的 *TaqMan* 探针,其 5'端标记荧光报告基团(如 FAM、HEX 等),3'端标记对应的荧光淬灭基团(如 TAMRA、BHQ1 等)。

5.2.5 10 mol/L 氢氧化钠(NaOH)溶液:在 160 mL 水中加入 80.0 g 氢氧化钠,溶解后,冷却至室温,再加水定容至 200 mL。

5.2.6 500 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠($EDTA-Na_2$)溶液(pH 8.0):称取 18.6 g 乙二胺四乙酸二钠,加入 70 mL 水中,缓慢滴加氢氧化钠溶液(见 5.2.5)直至乙二胺四乙酸二钠完全溶解,用氢氧化钠溶液(见 5.2.5)调 pH 至 8.0,加水定容至 100 mL。在 103.4 kPa(121 °C)条件下灭菌 20 min。

5.2.7 1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl)溶液(pH 8.0):称取 121.1 g 三羟甲基氨基甲烷溶解于 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 °C)条件下灭菌 20 min。

5.2.8 TE 缓冲液:分别量取 10 mL 三羟甲基氨基甲烷-盐酸溶液(见 5.2.7)和 2 mL 乙二醇四乙酸二钠溶液(见 5.2.6),加水定容至 1 000 mL。在 103.4 kPa(121 ℃)条件下灭菌 20 min。

5.2.9 引物/探针溶液:用 TE 缓冲液(见 5.2.8)或水分别将上述引物或探针溶解并稀释至 10 μmol/L。

5.3 主要仪器和设备

5.3.1 分析天平:感量 0.1 g 和 0.1 mg。

5.3.2 实时荧光 PCR 仪。

5.3.3 核酸定量仪。

5.3.4 离心机。

5.4 操作步骤

5.4.1 抽样

按 NY/T 672 和农业部 2031 号公告—19—2013 中第 8 章的程序执行。

5.4.2 试样制备

按 NY/T 672 和农业部 2031 号公告—19—2013 中第 9 章的程序执行。

5.4.3 试样预处理

按农业部 1485 号公告—4—2010 中 6.2 的规定执行。

5.4.4 试样 DNA 模板制备

按农业部 1485 号公告—4—2010 中 6.3、6.4 和 6.5 规定的方法执行。每个试样取 3 个子样分别进行 DNA 提取和纯化,作为测试的 3 个平行子样用于 PCR 扩增。

5.4.5 质控设置

5.4.5.1 阴性质控品

以非转基因玉米作为阴性质控品。

5.4.5.2 空白质控品

用水作为空白质控品。

5.4.5.3 阳性质控品

以耐除草剂玉米 DBN9858 转化体含量为 0.1%~1.0%的标准物质(标准样品)或经验证的实验室配制样品作为阳性质控品。如需初步判定试样的转基因含量,还应设置转基因含量与标识阈值相当的阳性定量质控品。

5.4.6 PCR 扩增

5.4.6.1 对试样和质控品的内标准基因和 DBN9858 转化体特异性序列进行 PCR 扩增。每个试样至少设置 3 个平行子样,每个子样进行 1 次 PCR 扩增;每个质控品设置 1 个样品,不设置子样,至少重复 3 次 PCR 扩增。

5.4.6.2 实时荧光 PCR 扩增体系:当使用实时荧光 PCR 扩增试剂时,按表 1 配制扩增体系;当使用实时荧光 PCR 试剂盒时,按表 1 规定的引物浓度、探针浓度和 DNA 模板量配制扩增体系,其余成分参照试剂盒说明书。

表 1 实时荧光 PCR 定性扩增体系

试剂	终浓度	体积
ddH ₂ O		—
10×PCR 缓冲液	1×	2.5 μL
25 mmol/L 氯化镁溶液	2.5 mmol/L	2.5 μL
dNTPs 混合溶液(各 2.5 mmol/L)	0.2 mmol/L	2.0 μL
10 μmol/L 上游引物	0.4 μmol/L	1.0 μL
10 μmol/L 下游引物	0.4 μmol/L	1.0 μL

表 1（续）

试剂	终浓度	体积
10 $\mu\text{mol/L}$ 探针	0.2 $\mu\text{mol/L}$	0.5 μL
<i>Taq</i> DNA 聚合酶	0.04 U/ μL	—
50 mg/L DNA 模板	4.0 mg/L	2.0 μL
总体积		25.0 μL
“—”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 <i>Taq</i> DNA 聚合酶的浓度确定其体积,并相应调整 ddH₂O 的体积,使反应体系总体积达到 25.0 μL。 玉米内标准基因 PCR 扩增体系中,上、下游引物和探针分别为 zSSIIB-3F、zSSIIB-4R 和 zSSIIB-P;DBN9858 转化体特异性序列 PCR 扩增体系中,上、下游引物和探针分别为 DBN9858-qF、DBN9858-qR 和 DBN9858-qP。 PCR 扩增体系可根据仪器及试剂耗材的实际使用情况,进行相应调整。 此表是 1 个反应体系的体积,应按照实际反应数量进行 PCR 扩增体系配制。 空白质控品用 2.0 μL 的水作模板。		

5.4.6.3 将 PCR 板(管)放在离心机上,500 $g \sim 3\,000\,g$ 离心 10 s,然后取出 PCR 板(管),放入实时荧光 PCR 仪中。

5.4.6.4 进行实时荧光 PCR 扩增。反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min(第一阶段);95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 60 s,循环数 ≥ 40 (第二阶段);退火延伸后每个循环收集荧光信号。

注:可根据仪器和试剂要求对反应参数作适当调整。

5.4.6.5 设定阈值:实时荧光 PCR 扩增结束后,以 PCR 扩增刚好进入指数期来设置荧光信号阈值,并根据仪器噪声情况进行调整。

5.4.6.6 记录 C_t 值:设定阈值后,荧光定量 PCR 仪的数据分析软件自动计算每个反应的 C_t 值,并记录。

5.4.7 PCR 扩增检测合格判定标准

5.4.7.1 阳性质控品中,玉米内标准基因和耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性序列均有典型扩增曲线,且 C_t 值 ≤ 36 。

5.4.7.2 阴性质控品中,玉米内标准基因有典型扩增曲线,且 C_t 值 ≤ 36 ;耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性序列无典型扩增曲线,或 C_t 值 > 36 。

5.4.7.3 空白质控品中,玉米内标准基因和耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性序列均无典型扩增曲线,或 C_t 值 > 36 。

5.4.7.4 同时满足 5.4.7.1 $\sim$ 5.4.7.3 的条件,可按 5.5 进行结果分析与表述。否则,分析具体情况,重新按 5.4.4 或 5.4.6 进行检测。

5.5 结果分析与表述

5.5.1 试样中玉米内标准基因和耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性序列均出现典型扩增曲线且 C_t 值 ≤ 36 ,表明试样中检测出耐除草剂玉米 DBN9858 转化体成分,结果表述为“试样中检测出耐除草剂玉米 DBN9858 转化体成分,检测结果为阳性”。

5.5.2 在符合 5.5.1 的情况下,若需判定试样与阳性定量质控品相比转化体含量高低,则计算试样与阳性定量质控品的 $\Delta\Delta C_t$ 值。当 $\Delta\Delta C_t$ 值 ≤ -0.4 时,表明试样中检测出耐除草剂玉米 DBN9858 转化体成分,含量高于(等于)阳性定量质控品,结果表述为“试样中检测出耐除草剂玉米 DBN9858 转化体成分,检测结果为阳性,含量高于(等于) X ”;当 $\Delta\Delta C_t$ 值 > 0.4 时,表明试样中检测出耐除草剂玉米 DBN9858 转化体成分,含量低于阳性定量质控品,结果表述为“试样中检测出耐除草剂玉米 DBN9858 转化体成分,检测结果为阳性,含量低于 X ”。

注: X 为阳性定量质控品中耐除草剂玉米 DBN9858 转化体成分含量,如果 $|\Delta\Delta C_t| \leq 0.4$ 时,需采用方法二测定试样中耐除草剂玉米 DBN9858 转化体成分含量。

5.5.3 试样中玉米内标准基因出现典型扩增曲线且 C_t 值 ≤ 36 ,而耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性序列无典型扩增曲线或 C_t 值 > 36 ,表明试样中未检测出耐除草剂玉米 DBN9858 转化体成分,结果表述为“试样中未检测出耐除草剂玉米 DBN9858 转化体成分,检测结果为阴性”。

5.5.4 试样中玉米内标准基因未出现典型扩增曲线或 C_t 值 >36 , 表明样品中未检测出玉米基因组 DNA 成分, 结果表述为“试样中未检测出玉米基因组 DNA 成分, 检测结果为阴性”。

注: 试样 PCR 扩增结果不一致的, 以多数结果为准。

5.6 检出限

本方法的检出限(LOD)为 0.05%(相当于反应体系中含有约 20 拷贝的耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性序列)。

注: 本方法的检出限是以 PCR 检测反应体系中加入 100 ng 耐除草剂玉米 DBN9858 转化体基因组 DNA 模板进行测算的。

6 实时荧光 PCR 定量检测方法(方法二)

6.1 原理

采用规定的引物和探针对校准品和试样中玉米内标准基因和耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性序列进行实时荧光 PCR 扩增。根据校准品模板拷贝数对数与 C_t 值间的线性关系, 分别绘制耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性序列和玉米内标准基因的标准曲线; 将试样的 C_t 值代入标准曲线, 计算试样中耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性序列和玉米内标准基因的拷贝数及其比值, 获得试样中耐除草剂玉米 DBN9858 转化体的含量。

6.2 试剂和材料

除非另有说明, 仅使用分析纯试剂、蒸馏水或以上等级的水。

6.2.1 DNA 提取试剂盒: 同 5.2.1。

6.2.2 PCR 扩增试剂: 同 5.2.2。

6.2.3 玉米内标准基因 $\approx SSIIb$ 基因引物/探针: 同 5.2.3。

6.2.4 耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性序列引物/探针: 同 5.2.4。

6.2.5 TE 缓冲液: 同 5.2.8。

6.2.6 引物/探针溶液: 用 TE 缓冲液(见 6.2.5)或水分别将上述引物或探针稀释至 10 $\mu\text{mol/L}$ 。

6.3 主要仪器和设备

同 5.3。

6.4 操作步骤

6.4.1 抽样

同 5.4.1。

6.4.2 试样制备

同 5.4.2。

6.4.3 试样预处理

同 5.4.3。

6.4.4 试样 DNA 模板制备

同 5.4.4。

6.4.5 质控设置

6.4.5.1 阴性质控品

以非转基因玉米作为阴性质控品。

6.4.5.2 空白质控品

以水作为空白质控品。

6.4.5.3 阳性定量质控品

以耐除草剂玉米 DBN9858 转化体质量分数或拷贝数比值与标识阈值相当的标准物质(标准样品), 或经验证的实验室配制样品作为阳性定量质控品。

注:各类质控品均只取 1 个样品,不设置子样。

6.4.6 校准品制备

提取耐除草剂玉米 DBN9858 转化体基因组 DNA,测量 DNA 浓度,将 DNA 适当稀释或浓缩;然后,用 1×TE 缓冲液或水梯度稀释 DNA,制备不同浓度的耐除草剂玉米 DBN9858 转化体 DNA 溶液。DNA 溶液至少涵盖 5 个耐除草剂玉米 DBN9858 转化体浓度梯度,最低浓度等于或小于定量限(约 40 拷贝)且大于检测限(约 20 拷贝),最高浓度大于测试样品 DNA 浓度。采用相同的 DNA 溶液分别绘制玉米内标准基因和耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性序列的标准曲线。

6.4.7 PCR 扩增

6.4.7.1 在同一块 PCR 板上对校准品、试样、质控品的内标准基因和 DBN9858 转化体特异性序列进行 PCR 扩增。每个试样设置 3 个平行子样,每个试样的 3 个平行子样应在同一次 PCR 扩增中进行,每个子样至少重复 3 次 PCR 扩增;各质控品、校准品每个浓度梯度均设置 1 个样品,不设置子样,至少重复 3 次 PCR 扩增。

6.4.7.2 实时荧光 PCR 扩增体系:当使用实时荧光 PCR 扩增试剂时,按表 2 配制扩增体系;当使用实时荧光 PCR 试剂盒时,按表 2 规定的引物浓度、探针浓度和 DNA 模板量配制扩增体系,其余成分参照试剂盒说明书。

表 2 实时荧光 PCR 定量扩增体系

试剂	终浓度	体积
ddH ₂ O		—
10×PCR 缓冲液	1×	2.5 μL
25 mmol/L 氯化镁溶液	2.5 mmol/L	2.5 μL
dNTPs 混合溶液(各 2.5 mmol/L)	0.2 mmol/L	2.0 μL
10 μmol/L 上游引物	0.4 μmol/L	1.0 μL
10 μmol/L 下游引物	0.4 μmol/L	1.0 μL
10 μmol/L 探针	0.2 μmol/L	0.5 μL
Taq DNA 聚合酶	0.04 U/μL	—
DNA 模板		2.0 μL
总体积		25.0 μL
“—”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 ddH₂O 的体积,使反应体系总体积达到 25.0 μL。试样和校准品反应体系中 DNA 模板量不大于 200 ng;试样 DNA 模板为 100 ng。 玉米内标准基因 PCR 扩增体系中,上、下游引物和探针分别为 zSSIb-3F、zSSIb-4R 和 zSSIb-P;DBN9858 转化体特异性序列 PCR 扩增体系中,上、下游引物和探针分别为 DBN9858-qF、DBN9858-qR 和 DBN9858-qP。 PCR 扩增体系可根据仪器及试剂耗材的实际使用情况,进行相应调整。 此表是 1 个反应体系的体积,应按照实际反应数量进行 PCR 扩增体系配制。 空白质控品用 2.0 μL 的水作模板。		

6.4.7.3 将 PCR 板(管)放在离心机上,500 g~3 000 g 离心 10 s,然后取出 PCR 板(管),放入实时荧光 PCR 仪中。

6.4.7.4 进行实时荧光 PCR 扩增。反应程序为:95℃变性 5 min(第一阶段);95℃变性 15 s,60℃退火延伸 60 s,循环数≥40(第二阶段);退火延伸后每个循环收集荧光信号。

注:可根据仪器和试剂要求对反应参数作适当调整。

6.4.7.5 设定阈值:实时荧光 PCR 扩增结束后,以 PCR 扩增刚好进入指数期来设置荧光信号阈值,并根据仪器噪声情况进行调整。

6.4.7.6 记录 Ct 值:设定阈值后,荧光定量 PCR 仪的数据分析软件自动计算每个反应的 Ct 值,并记录。

6.4.7.7 绘制标准曲线:根据校准品的 Ct 值和初始模板拷贝数的对数间的线性关系,分别绘制玉米内标准基因和耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性序列的标准曲线。标准曲线按公式(1)绘制。

$$C_t = a + b \lg c \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- C_t ——样品的 C_t 值;
- a ——标准曲线的截距;
- b ——标准曲线的斜率;
- c ——初始模板拷贝数。

6.4.8 PCR 扩增合格判定标准

6.4.8.1 最低浓度校准品中,玉米内标准基因和耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性序列均有典型扩增曲线,且 C_t 值 ≤ 36 。

6.4.8.2 阴性质控品中,玉米内标准基因有典型扩增曲线,且 C_t 值 ≤ 36 ;耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性序列无典型扩增曲线,或 C_t 值 > 36 。

6.4.8.3 空白质控品中,玉米内标准基因和耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性序列均无典型扩增曲线,或 C_t 值 > 36 。

6.4.8.4 标准曲线的决定系数(R^2) ≥ 0.98 ; $-3.1 \geq$ 标准曲线斜率(b) ≥ -3.6 。

6.4.8.5 若同时满足 6.4.8.1~6.4.8.4 的条件,可按 6.4.9 计算每个子样所有重复耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性序列拷贝数平均值和玉米内标准基因拷贝数平均值的比值。否则,分析具体情况,重新按 6.4.4 或 6.4.7 进行检测。

6.4.9 各子样转化体序列和玉米内标准基因的拷贝数比值

6.4.9.1 将各反应(含阳性定量质控品和试样)玉米内标准基因或耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性序列的 C_t 值代入相应的标准曲线公式计算各反应耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性序列和玉米内标准基因拷贝数。

6.4.9.2 按公式(2)计算各子样耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性序列和玉米内标准基因的拷贝数比值(以下称“检测数据”)。

$$\bar{c}_k = \frac{\bar{c}_{1,k}}{\bar{c}_{2,k}} \times 100 \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- $\bar{c}_k$ ——平行子样 k 各重复耐除草剂玉米 DBN9858 转化体序列和玉米内标准基因的拷贝数平均值的比值,单位为百分号(%);
- k ——各平行子样的顺序号,记为 1、2、3;阳性定量质控品仅有 1 个平行子样,记为 1;
- $\bar{c}_{1,k}$ ——平行子样 k 各重复耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性序列拷贝数平均值;
- $\bar{c}_{2,k}$ ——平行子样 k 各重复玉米内标准基因 $zSSIb$ 拷贝数平均值。

注:阳性定量质控品分别计算 3 个 PCR 扩增重复的拷贝数比值。

6.4.10 检测数据合格判定标准

6.4.10.1 阳性定量质控品检测数据合格判定

6.4.10.1.1 方法选择

当使用有证标准物质作为阳性定量质控品时,按 6.4.10.1.2 进行阳性定量质控品检测数据合格判定;当使用实验室配制的样品作为阳性定量质控品时,按 6.4.10.1.3 进行阳性定量质控品检测数据合格判定。

6.4.10.1.2 有证标准物质作阳性定量质控品

6.4.10.1.2.1 阳性定量质控品检测数据平均值的标准不确定度(平均值的标准误)

按公式(3)计算阳性定量质控品 n 次 PCR 扩增重复检测数据平均值的标准不确定度(平均值的标准误)。

$$u(\bar{c}) = \frac{c_{\max} - c_{\min}}{f} \cdot \frac{1}{\sqrt{n}} \dots\dots\dots (3)$$

式中:

- $u(\bar{c})$ ——阳性定量质控品 n 次 PCR 扩增重复检测数据平均值的标准不确定度(平均值的标准误);
- $c_{\max}$ —— n 次 PCR 扩增重复检测数据中耐除草剂玉米 DBN9858 转化体序列和玉米内标准基因的拷贝数比值最大值;
- $c_{\min}$ —— n 次 PCR 扩增重复检测数据中耐除草剂玉米 DBN9858 转化体序列和玉米内标准基因的拷贝数比值最小值;
- f ——极差系数(f 因子),当 $n=3$ 时, $f=1.693$;
- n ——阳性定量质控品 PCR 扩增重复次数,本文件中规定 3 次 PCR 扩增重复(即 $n=3$)。

6.4.10.1.2.2 阳性定量质控品检测数据平均值偏倚的标准不确定度(平均值差数的标准误)

按公式(4)计算阳性定量质控品 n 次 PCR 扩增重复检测数据平均值偏倚的标准不确定度。

$$u_{bias} = \sqrt{u_{CRM}^2 + u^2(\bar{c})} \dots\dots\dots (4)$$

式中:

- u_{bias} ——阳性定量质控品 n 次 PCR 扩增重复检测数据平均值偏倚的标准不确定度;
- u_{CRM} ——阳性定量质控品认定值的标准不确定度。

6.4.10.1.2.3 阳性定量质控品检测数据平均值与其认定值间的偏倚(平均值差数)

按公式(5)计算阳性定量质控品 n 次 PCR 扩增重复检测数据平均值与其认定值间的偏倚。

$$bias = \bar{c} - c_{CRM} \dots\dots\dots (5)$$

式中:

- $bias$ ——阳性定量质控品检测数据 n 次 PCR 扩增重复检测数据平均值与其认定值间的偏倚;
- $\bar{c}$ ——阳性定量质控品 n 次 PCR 扩增重复检测数据的平均值;
- c_{CRM} ——阳性定量质控品认定值。

6.4.10.1.2.4 阳性定量质控品检测数据合格判定

若 $|bias| < 2 \times u_{bias}$ (扩展不确定度,95%置信水平下包含因子为 2),表明该次实验阳性定量质控品检测数据的偏倚不显著,本次实验阳性定量质控品检测数据合格。

6.4.10.1.3 实验室配制的样品作阳性定量质控品

6.4.10.1.3.1 阳性定量质控品检测数据标准差

按公式(6)计算阳性定量质控品 n 次 PCR 扩增重复检测数据标准差。

$$s = \frac{c_{\max} - c_{\min}}{f} \dots\dots\dots (6)$$

式中:

- s ——阳性定量质控品 n 次 PCR 扩增重复检测数据标准差。

6.4.10.1.3.2 阳性定量质控品检测数据的相对标准差(变异系数)

按公式(7)计算阳性定量质控品 n 次 PCR 扩增重复检测数据的相对标准差。

$$sR = \frac{s}{\bar{c}} \times 100 \dots\dots\dots (7)$$

式中:

- sR ——阳性定量质控品 n 次 PCR 扩增重复检测数据的相对标准差(变异系数),单位为百分号(%)。

6.4.10.1.3.3 阳性定量质控品检测数据平均值与其预期值的相对偏倚(相对偏差)

按公式(8)计算阳性定量质控品 n 次 PCR 扩增重复平均值与其预期值的相对偏倚(相对偏差)。

$$biasR = \frac{\bar{c} - c_E}{c_E} \times 100 \dots\dots\dots (8)$$

式中:

$biasR$ ——阳性定量质控品 n 次 PCR 扩增重复检测数据平均值与其预期值的相对偏倚(相对偏差), 单位为百分号(%);

c_E ——阳性定量质控品预期值。

6.4.10.1.3.4 阳性定量质控品检测数据合格判定

若 $sR \leq 25\%$, 且 $|biasR| \leq 25\%$, 表明阳性定量质控品检测数据的偏倚不显著, 本次实验阳性定量质控品检测数据合格。

6.4.10.2 试样检测数据合格判定

6.4.10.2.1 试样检测数据标准差

按公式(9)计算试样 m 个平行子样检测数据标准差。

$$s' = \frac{\bar{c}'_{\max} - \bar{c}'_{\min}}{f} \dots\dots\dots (9)$$

式中:

s' —— m 个平行子样检测数据标准差;

$\bar{c}'_{\max}$ —— m 个子样各自平均拷贝数比值的最大值;

$\bar{c}'_{\min}$ —— m 个子样各自平均拷贝数比值的最小值。

6.4.10.2.2 试样检测数据的相对标准差(变异系数)

按公式(10)计算试样 m 个平行子样检测数据的相对标准差。

$$sR' = \frac{s'}{\bar{c}} \times 100 \dots\dots\dots (10)$$

式中:

sR' —— m 个平行子样检测数据的相对标准差(变异系数), 单位为百分号(%);

$\bar{c}$ —— m 个平行子样检测数据的平均值, $m=3$, 单位为百分号(%)。

当试样检测数据平均值 $\bar{c} \geq 0.1\%$, 即大于等于标准定量限条件下, 若试样 $sR' \leq 25\%$, 本次试样检测数据合格; 当试样检测数据平均值 $\bar{c} < 0.1\%$, 即小于标准定量限条件下, 直接按 6.5.2 进行结果分析与表述。

6.4.10.3 检测数据合格判定

分别按照 6.4.10.1 和 6.4.10.2 对阳性定量质控品和试样的检测数据进行合格判定。若阳性定量质控品和试样的检测数据同时合格, 则表明本次检测数据有效, 可按 6.4.11 进行试样定量结果计算; 否则, 做好记录, 查找原因, 重新进行 PCR 扩增或重新制备试样, 直至获得有效检测数据。

6.4.11 试样定量结果计算

6.4.11.1 试样检测数据的平均值

阳性定量质控品和试样的检测数据同时合格, 计算 3 个子样检测数据的平均值 $\bar{c}$ 。

6.4.11.2 试样定量结果不确定度评定

实验室可根据本文件验证时多家联合验证数据预评定的绝对标准不确定度(u_0)和相对标准不确定度(u_r)进行定量结果的不确定度评定。经计算, u_0 值为 0.012 7, u_r 值为 0.077 9, 按公式(11)评定试样定量结果的标准不确定度:

$$u = \sqrt{0.012\,7^2 + (0.077\,9 \times \bar{c})^2} \dots\dots\dots (11)$$

式中:

u ——试样定量结果的标准不确定度, 单位为百分号(%), 保留 2 位有效数字, 单位为百分号(%)。

取扩展因子 $k=2$, 则试样定量结果的扩展不确定度(U)表示为公式(12)。

$$U = ku \dots\dots\dots (12)$$

式中:

U ——试样定量结果的扩展不确定度, 保留 2 位有效数字, 单位为百分号(%);

k ——包含因子,在 95%的置信度下 $k=2$ 。

注:上述不确定度是基于多家实验室联合验证数据的结果。若需自行评定本实验室的测量不确定度,实验室可基于足够数量的阳性样品或有证标准物质,采用自上而下或自下而上的方法进行。

6.4.11.3 试样定量结果的标示

按公式(13)标示试样转化体含量的定量结果。

$$C = \bar{c} \pm U \dots\dots\dots (13)$$

式中:

C ——试样中耐除草剂玉米 DBN9858 转化体含量的定量结果,有效数字最后一位按不确定度有效数字最后一位修约。

6.5 结果分析与表述

6.5.1 试样中玉米内标准基因和耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性序列均出现典型扩增曲线,且计算的耐除草剂玉米 DBN9858 转化体含量(C)高于定量限,表明试样中检测出耐除草剂玉米 DBN9858 转化体成分。结果表述为“试样中检测出耐除草剂玉米 DBN9858 转化体成分,耐除草剂玉米 DBN9858 转化体含量为 $\bar{c} \pm U$ ”。

6.5.2 试样中玉米内标准基因和耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性序列均出现典型扩增曲线,但计算的耐除草剂玉米 DBN9858 转化体含量(C)低于定量限,表明试样中检测出耐除草剂玉米 DBN9858 转化体成分。结果表述为“试样中检测出耐除草剂玉米 DBN9858 转化体成分,但耐除草剂玉米 DBN9858 转化体含量低于定量限”。

6.5.3 试样中玉米内标准基因出现典型扩增曲线且 C_t 值 ≤ 36 ,而耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性序列无典型扩增曲线或 C_t 值 > 36 ,表明试样中未检测出耐除草剂玉米 DBN9858 转化体成分。结果表述为“试样中未检测出耐除草剂玉米 DBN9858 转化体成分”。

6.5.4 试样中玉米内标准基因未出现典型扩增曲线或 C_t 值 > 36 ,表明试样中未检测出玉米基因组 DNA 成分。结果表述为“试样中未检测出玉米基因组 DNA 成分”。

6.6 检出限

本方法的检出限(LOD)为 0.05%(相当于反应体系中含有约 20 拷贝的耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性序列)。

注:本方法的检出限是以 PCR 检测反应体系中加入 100 ng 耐除草剂玉米 DBN9858 基因组 DNA 模板进行测算的。

6.7 定量限

本方法的定量限(LOQ)为 0.1%(相当于反应体系中含有约 40 拷贝的耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性序列)。

注:本方法的定量限是以 PCR 检测反应体系中加入 100 ng 耐除草剂玉米 DBN9858 基因组 DNA 模板进行测算的。

7 普通 PCR 定性检测方法(方法三)

7.1 原理

采用规定的耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性序列引物,对试样进行 PCR 扩增。依据是否扩增获得预期的 DNA 片段,判断试样中是否含有耐除草剂玉米 DBN9858 转化体成分。

7.2 试剂和材料

除非另有说明,仅使用分析纯试剂、蒸馏水或以上等级的水。

7.2.1 DNA 提取试剂盒:同 5.2.1。

7.2.2 PCR 扩增试剂:同 5.2.2。

注:若不采用 PCR 扩增试剂,也可选用定性 PCR 试剂盒。

7.2.3 玉米内标准基因 *zSSIb* 基因引物

zSSIb-1F:5'-CTCCAATCCTTTGACATCTGC-3';

zSSIb-2R:5'-TCGATTTCTCTCTTGGTGACAGG-3'。

注:预期扩增片段大小为 151 bp。

[来源:农业部 1861 号公告—3—2012,5.12]

7.2.4 耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性序列引物

DBN9858-F:5'-AGGAGGCCCTTGTTTTGTGA-3';

DBN9858-R:5'-ACGGCGAGTTCTGTTAGGTC-3'。

注:预期扩增片段大小为 239 bp(见 A.2)。

7.2.5 TE 缓冲液:同 5.2.8。

7.2.6 引物溶液:用 TE 缓冲液(见 7.2.5)或水分别将上述引物稀释至 10 μ mol/L。

7.2.7 石蜡油。

7.2.8 50 $\times$ 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 乙二胺四乙酸二钠溶液(见 5.2.6),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 $\times$ TAE。

7.2.9 琼脂糖。

7.2.10 10 g/L 溴化乙锭(EB)溶液:称取 1.0 g 溴化乙锭,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弃物。

注:根据需要可选择其他效果相当的核酸染料代替溴化乙锭作为核酸电泳的染色剂。

7.2.11 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 3 种溶液,加水定容至 100 mL,在 4 $^{\circ}$ C 下保存。

7.2.12 DNA 分子量标准:可以清楚区分 100 bp~1 000 bp 的 DNA 分子量标准。

7.2.13 PCR 产物回收试剂盒。

7.3 主要仪器和设备

7.3.1 分析天平:感量 0.1 g 和 0.1 mg。

7.3.2 PCR 扩增仪:升降温速度 >1.5 $^{\circ}$ C/s,孔间温度差异 <1.0 $^{\circ}$ C。

7.3.3 电泳槽、电泳仪等电泳装置。

7.3.4 凝胶成像系统或照相系统。

7.3.5 核酸定量仪。

7.3.6 离心机。

7.4 操作步骤

7.4.1 抽样

同 5.4.1。

7.4.2 试样制备

同 5.4.2。

7.4.3 试样预处理

同 5.4.3。

7.4.4 试样 DNA 模板制备

同 5.4.4。

7.4.5 质控设置

7.4.5.1 阴性质控品

以非转基因玉米作为耐除草剂玉米 DBN9858 转化体检测的阴性质控品。

7.4.5.2 空白质控品

以水作为空白质控品。

7.4.5.3 阳性质控品

以耐除草剂玉米 DBN9858 转化体含量为 0.1%~1.0%的标准物质(标准样品)或经验证的实验室配制样品作为阳性质控品。

7.4.6 PCR 扩增

7.4.6.1 对试样和质控品的内标准基因和 DBN9858 转化体特异性序列进行 PCR 扩增,每个试样至少设置 3 个平行子样,每个子样进行 1 次 PCR 扩增;每个质控品设置 1 个样品,不设置子样,至少重复 3 次 PCR 扩增。

7.4.6.2 普通 PCR 扩增体系;当使用 PCR 扩增试剂时,按表 3 配制扩增体系;当使用定性 PCR 试剂盒时,按表 3 规定的引物浓度和 DNA 模板量配制扩增体系,其余成分参照试剂盒说明书。

表 3 普通 PCR 扩增体系

试剂	终浓度	体积
ddH ₂ O		—
10×PCR 缓冲液	1×	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)	0.2 mmol/L	2.0 μL
10 μmol/L 上游引物	0.4 μmol/L	1.0 μL
10 μmol/L 下游引物	0.4 μmol/L	1.0 μL
Taq DNA 聚合酶	0.025 U/μL	—
50 mg/L DNA 模板	4.0 mg/L	2.0 μL
总体积		25.0 μL
“—”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 ddH₂O 的体积,使反应体系总体积达到 25.0 μL。 玉米内标准基因 PCR 扩增体系中,上、下游引物分别为 zSSIb-1F、zSSIb-2R;DBN9858 转化体特异性序列 PCR 扩增体系中,上、下游引物分别为 DBN9858-F、DBN9858-R。 PCR 扩增体系可根据仪器及试剂耗材的实际使用情况,进行相应调整。 此表是 1 个反应体系的体积,应按照实际反应数量进行 PCR 扩增体系配制。 空白质控品用 2.0 μL 的水作模板。		

7.4.6.3 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 仪中。

7.4.6.4 进行 PCR 扩增。反应程序为:94 ℃变性 5 min;94 ℃变性 30 s,58 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,共进行 35 次循环;72 ℃延伸 5 min;10 ℃保存。

7.4.6.5 反应结束后取出 PCR 管,对 PCR 扩增产物进行电泳检测。

7.4.7 PCR 扩增产物电泳检测

按 20 g/L 的质量浓度称量琼脂糖,加入 1×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 溶液或适量的其他核酸染料,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×TAE 缓冲液中,垂直向上轻轻拔去梳板。取 12 μL PCR 扩增产物与 3 μL 加样缓冲液混合后加入凝胶点样孔,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 条件下电泳检测。

7.4.8 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。若需通过序列分析确认 PCR 扩增片段是否为目的 DNA 片段,按照 7.4.9 和 7.4.10 的规定执行。

7.4.9 PCR 扩增产物回收

按 PCR 扩增产物回收试剂盒说明书,回收 PCR 扩增的目的 DNA 片段。

7.4.10 PCR 扩增产物测序验证

将回收的 PCR 扩增产物测序,与耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性序列(见 A.2)进行比对,确定

PCR 扩增的 DNA 片段是否为目的 DNA 片段。

7.4.11 PCR 扩增合格的判定标准

7.4.11.1 阳性质控品中,玉米内标准基因和耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性序列均得到扩增。

7.4.11.2 阴性质控品中,玉米内标准基因得到扩增;耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性序列未得到扩增。

7.4.11.3 空白质控品中,玉米内标准基因和耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性序列检测的均未得到扩增。

7.4.11.4 若同时满足 7.4.11.1~7.4.11.3 的条件,可按 7.5 进行结果分析与表述。否则,分析具体情况,重新按 7.4.4 或 7.4.6 进行检测。

7.5 结果分析与表述

7.5.1 试样中玉米内标准基因和耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性序列均得到扩增,表明试样中检测出耐除草剂玉米 DBN9858 转化体成分,结果表述为“试样中检测出耐除草剂玉米 DBN9858 转化体成分,检测结果为阳性”。

7.5.2 试样中玉米内标准基因得到扩增,而耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性序列未得到扩增,表明试样中未检测出耐除草剂玉米 DBN9858 转化体成分,结果表述为“试样中未检测出耐除草剂玉米 DBN9858 转化体成分,检测结果为阴性”。

7.5.3 试样中玉米内标准基因未得到扩增,表明试样中未检测出玉米基因组 DNA 成分,结果表述为“试样中未检测出玉米基因组 DNA 成分,检测结果为阴性”。

注:试样 PCR 扩增结果不一致的,以多数结果为准。

7.6 检出限

本方法的检出限(LOD)为 0.1%(相当于反应体系中含有约 20 拷贝的耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性序列)。

注:本方法的检出限是以 PCR 检测反应体系中加入 50 ng 耐除草剂玉米 DBN9858 基因组 DNA 模板进行测算的。

附 录 A

(资料性)

耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性序列

A.1 耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性实时荧光 PCR 序列

1 TAAACCTAAT CAGTCAGTGC CGGTGAGAGC GTAGCTGCCT GGAAGCGGCC TCGTCAGCCA
61 GTTGAGAGCA GTGAAGAGGG GCTTCAGATC CAGGGCGCGC AAGG CCCAAA CAACCAGCCC
121 ACCAG CCTTA CTCGAGAATC AGCGCT

注 1:该序列为 DBN9858 的 3'端转化体特异性序列,序列方向为 5'~3'。

注 2:5'端单下划线部分为实时荧光 PCR 检测方法引物 DBN9858-qF 的序列,3'端单下划线部分为实时荧光 PCR 检测方法引物 DBN9858-qR 的反向互补序列,中间方框内部为实时荧光 PCR 检测方法探针 DBN9858-qP 的序列。

注 3:1~59 为外源插入片段部分序列,60~146 为玉米基因组部分序列。

A.2 耐除草剂玉米 DBN9858 转化体特异性普通 PCR 序列

1 AGGAGGCCCT TGT TTTGTGA GACTTTTGTC TGCCTGTATT GTACTAATAT AGTATTCTGA
61 ATTCGTATTC GTATATACTT TCTGGATAAT ATGAATCGAT CAAAGGATAT ATTGTGGTGT
121 AAACAAATTG ACGCTTAGAC AACTTAATAA CACATTGCGG ATACGGCCAT GCTGGCCGCC
181 CATATAAGGC GCGCCATGGA GTCAAAGATT CAAATAGAG G ACCTAACAGA ACTCGCCGT

注 1:该序列为 DBN9858 的 5'端转化体特异性序列,序列方向为 5'~3'。

注 2:5'端单下划线部分为普通 PCR 定性检测方法引物 DBN9858-F 的序列,3'端单下划线部分为普通 PCR 定性检测方法引物 DBN9858-R 的反向互补序列。

注 3:1~93 为玉米基因组部分序列,94~239 为外源插入片段部分序列。