

中华人民共和国国家标准

农业农村部公告第 864 号 —8—2024

转基因植物及其产品成分检测 耐除草剂大豆外源蛋白表达量检测 技术规范

Detection of genetically modified plants and derived products—
Technical specification for quantitative detection of exogenous proteins in
herbicide-tolerant soybean

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、黑龙江省农业科学院、天津市农业科学院、山东省农业科学院、中国农业科学院植物保护研究所、吉林省农业科学院。

本文件主要起草人：刘卫晓、张旭冬、金芃军、黄耀辉、沈平、张瑞英、温洪涛、王永、赵新、刘娜、路兴波、徐晓辉、谢家建、李飞武、陈秀萍、李葱葱、兰青阔。



转基因植物及其产品成分检测

耐除草剂大豆外源蛋白表达量检测技术规范

1 范围

本文件规定了耐除草剂大豆不同生育期组织和器官中外源蛋白表达的 ELISA 定量检测技术规范。
本文件适用于耐除草剂大豆不同生育期组织和器官中外源蛋白表达的 ELISA 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。

GB 4404.2 粮食作物种子 第2部分:豆类

农业部 2031 号公告—1—2013 转基因植物及其产品环境安全检测 耐除草剂大豆 第1部分:除草剂耐受性

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

耐除草剂大豆 herbicide-tolerant Glycine max

利用基因工程技术将耐除草剂基因导入受体大豆基因组获得的具有耐除草剂性状的大豆。

3.2

耐除草剂蛋白 herbicide-tolerant protein

导入受体植物的耐除草剂基因所表达的具有除草剂耐受性的蛋白。

4 原理

在适宜生态区种植受检耐除草剂大豆品种(系)及其对应的对照大豆品种(系)。根据受检耐除草剂大豆品种(系)目标性状特点,分别采集不同发育时期的不同组织器官;采用酶联免疫方法(ELISA)检测外源耐除草剂蛋白的表达量,测定受检大豆材料外源耐除草剂蛋白表达水平。

5 仪器和设备

5.1 分析天平:感量 0.001 g。

5.2 酶标仪。

5.3 超低温冰箱。

5.4 超低温冷冻研磨仪。

5.5 低温离心机。

5.6 低温摇床。

5.7 移液器。

6 试验材料与种植管理

6.1 试验材料

受检耐除草剂大豆品种(系)和对应的对照大豆品种(系)的种子应符合 GB 4404.2 的质量要求。

6.2 田间种植与管理

按照农业部 2031 号公告—1—2013 的规定,田间小区种植布局采取随机区组设计,将每份实验材料分别按照 3 次重复(即 3 个小区)种植,每个小区面积不小于 20 m²。按当地大豆常规播种时期、播种方式和播种量进行播种,常规田间管理。

6.3 资料记录

6.3.1 试验地名称与位置

记录试验所在地的名称、试验的具体地点、经纬度,绘制小区播种示意图。

6.3.2 气象资料

记录试验期间试验地降水(降水类型、日降水量,以 mm 表示)和温度(日平均温度、最高和最低温度、积温,以℃表示)的资料。记录影响整个试验期间试验结果的恶劣气候因素,如严重或长期的干旱、暴雨、冰雹等。

7 取样

在大豆不同生长时期,分别从种植受检耐除草剂大豆品种(系)、对应的对照大豆品种(系)的全部小区进行样品采集,每小区随机选择 20 株生长正常的大豆植株。具体采样时期、组织器官见附录 A。根取须根中间较为粗壮的部位,茎取顶端第 1~2 节茎,叶取新生展平三出复叶,花取新鲜盛开的花,豆荚取籽粒开始发育但尚未鼓起的豆荚,鼓粒期籽粒取体积膨大接近最大的籽粒,成熟期籽粒取成熟种子。将每个小区采集的同一时期、同一组织器官的样品作为一个样本,密封包装后做好标记;将样本迅速带回实验室检测,或用液氮速冻后放入-80℃超低温冰箱中保存并尽快检测。

8 外源蛋白表达量检测

8.1 试样制备

采用液氮人工研磨或超低温冷冻研磨仪将每个样品研磨至均匀的粉末。

每个样品称取不少于 0.1 g(精确到 0.001 g)研磨后的样品粉末于适宜大小的离心管中,按质量体积比 1:10 加入提取缓冲液,充分混匀后置于 4℃下孵育 60 min,取出离心管置于 4℃预冷的低温离心机中,8 000 g 离心 20 min,吸取上清液移入另一干净的离心管,待测。上清液可在 2℃~8℃储存,时间不超过 24 h。

8.2 试剂盒的选择

根据待检外源耐除草剂蛋白的类型,选用经验证适用于大豆外源耐除草剂蛋白检测的 ELISA 试剂盒。

8.3 检测

按照 ELISA 试剂盒操作说明书,检测试样上清液中外源耐除草剂蛋白含量,得到相应的光密度值(Optical density, OD)。

8.4 标准回归方程建立

将标准蛋白稀释成系列浓度梯度,与提取的受检耐除草剂大豆品种(系)、对应的对照大豆品种(系)的上清液(根据含量进行必要的稀释,稀释倍数为 n)和空白对照一起加入到酶标板内相应位置。每个样品设置 3 个平行,按照 8.3 步骤进行检测,得到相应的光密度值(X)。对应的对照大豆品种(系)样品光密度值应小于标准蛋白稀释液最低浓度的光密度值,否则重新检测。根据标准蛋白浓度与光密度值的相关性建立标准回归方程 $Y=a+bX$,回归方程的相关系数 $R^2\geq 0.98$,否则重新检测。

8.5 结果计算

按公式(1)计算蛋白含量。

$$\omega = \frac{(a + bX) \times n \times V}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

ω ——蛋白浓度,单位为纳克每克鲜重(ng/g 鲜重);

a ——截距;

b ——斜率;

X ——光密度值;

n ——稀释倍数;

V ——试样提取时加入的提取缓冲液体积的数值,单位为毫升(mL);

m ——试样质量的数值,单位为克(g)。

注:计算结果保留小数点后 2 位数字。

计算 3 个小区样本外源耐除草剂蛋白含量平均值($\bar{\omega}$)和标准差(s)。

9 结果表述

结果表述为:受检材料($\times\times$ 时期、 $\times\times$ 组织器官)中 $\times\times$ 外源耐除草剂蛋白含量为($\bar{\omega}\pm s$) ng/g 鲜重。

注:若受检材料中外源目标蛋白含量较高,单位可换算成 $\mu\text{g/g}$ 。

附 录 A
(规范性)
大豆取样时期和器官参照表

大豆取样时期和器官参照表见表 A.1。

表 A.1 大豆取样时期和器官参照表

发育阶段	器官					
	根	茎	叶	花	豆荚	籽粒
苗期	√	√	√			
开花结荚期	√	√	√	√	√	
鼓粒期	√	√	√			√
成熟期	√	√	√			√
注 1:“√”表示需取样检测。						
注 2:根据目的基因、标记基因表达特性,可以依据检测要求,酌情确定取样时期及器官。						