ICS 65.020.20

CCS B 05

|  |
| --- |
|       |

DB21

辽宁省地方标准

DB 21/ TXXXX—xxxx

|  |
| --- |
|       |

转基因玉米实时荧光定量PCR检测操作技术规程

Technical specification for real-time PCR detection of transgenic corn

（征求意见稿）

|  |
| --- |
|  |
|  |

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。

本文件由辽宁省农业农村厅提出并归口。

本文件起草单位：辽宁省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所。

本文件主要起草人：李会、任志莹、陈芳芳、王颖、郭春景、王建忠、刘万国、王在亮。

本文件发布实施后，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。

文件起草单位通讯地址：辽宁省农业科学院（沈阳市沈河区东陵路84号），联系电话：024-31021035。

转基因玉米实时荧光定量PCR检测操作技术规程

1范围

本文件规定了转基因成分检测中使用实时荧光定量方法进行转基因玉米含量的绝对定量检测时试剂选择、体系配制、标准曲线设置、转基因品系百分含量计算等技术要求。

本文件适用于转基因玉米转基因含量绝对定量的操作。

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2259号公告-5-2015 转基因植物及其产品成分检测 实时荧光定量PCR方法制定指南

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

3术语和定义

下列术语和定义适用于本文本

3.1

玉米转化体 event-specific of Maize

外源DNA插入玉米作物基因组后经重组产生的邻接区序列，也称为品系特异性。

3.2

内标准基因 endogenous reference gene

在检测物种中拷贝数恒定的、不显示等位基因变化的基因。该基因可用于判定物种特异性。

3.3

荧光定量探针型试剂 qPCR MasterMix(Probe)

试剂公司生产销售，专门用于Taqman探针方法的荧光定量PCR试剂。

4方法和原理

**采用规定的引物和探针对试样中玉米内标准基因和转化体特异性序列进行实时荧光PCR扩增，依据是否获得预期的典型扩增曲线，判断样品中是否含有转化体成分。根据标准曲线样品模板拷贝数对数与Ct值间的线性关系，分别绘制转化体特异性序列和玉米内标准基因的标准曲线，计算试样中转化体特异性序列和玉米内标准基因的拷贝数及其比值，获得样品中转化体的含量。**

5仪器设备和试剂

5.1主要仪器

5.1.1分析天平：感量0.1g

5.1.2实时荧光PCR仪

5.1.3超微量分光光度计

5.2 试剂

5.2.1DNA提取试剂盒

5.2.2荧光定量PCR试剂，采用探针型试剂

5.2.3PCR级无菌水

6.操作步骤

6.1抽样

按农业部2031号公告-19-2013 转基因植物及其产品成分检测 抽样。

6.2样品制备

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。

6.3DNA模板制备

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。

6.4标准品DNA模板制备

6.4.1采用相同的标准样品同时制备转化体和内标准基因的标准曲线。

6.4.2样品中植物基因组拷贝数=样品DNA质量（g）×6.02×1023/（植物单倍体基因组的大小×324.5×2），玉米基因组拷贝数为 2319Mbp Copies/μL，由此计算出1 ng的纯合体玉米基因组DNA约含有400个拷贝的目标PCR产物片段。DNA浓度与拷贝数的对应关系见附录A。

6.4.3将标准品稀释至合适浓度，使其梯度稀释后满足标准曲线梯度需求。

6.5 标准曲线的制备

6.5.1按所采标准的扩增体系配制标准曲线的扩增体系。

6.5.2先进行标准品DNA模板稀释，再进行荧光定量PCR反应体系配制。

6.5.3使用同一把移液枪连续移液所需稀释液（一般为水或0.1×TE缓冲液），如10×稀释先在各稀释梯度中加入90μL水。

6.5.4将稀释到合适浓度的标准品DNA模板作为起始浓度，即第一梯度。将起始浓度DNA模板涡旋20s，迷你离心机离心10s，备用。

6.5.5吸取适量上述起始浓度DNA模板加入稀释液中，如10×稀释将10μLDNA模板加入预先加好的90μL水中，涡旋20s，迷你离心机离心10s，完成一个梯度的稀释过程，即第二梯度。

6.5.6吸取适量第二梯度DNA模板，重复6.5.5的稀释过程，直至完成全部稀释梯度。

6.5.7标准曲线模板至少涵盖5个浓度梯度，最低浓度等于或小于20 Copies/μL，且大于或等于5 Copies/μL，最高浓度大于或等于8×103 Copies/μL。每个梯度设置3个平行。

注：最低浓度也可以按所采标准的定量下限来确定。

6.5.8标准品DNA模板稀释完成后应立即进行标准曲线制备。

6.6PCR扩增

6.6.1将待使用的DNA、水、PCR试剂、引物涡旋20s，迷你离心机离心10s，备用。

6.6.2使用6.6.1准备好的试剂和水配制样品PCR体系和标准曲线PCR体系。

6.6.3将试样，转化体标准曲线，内标准基因标准曲线同时进行PCR扩增。

6.6.4PCR反应体系及扩展条件按所采用标准进行即可。

6.7 结果判定

6.7.1测试样品，转化体标准曲线，内标准基因标准曲线模板均应获得预期的典型扩增曲线，且Ct值≦36。

6.7.2按照荧光定量PCR的仪器软件读取标准曲线的扩增效率，R2，斜率及拷贝数，其中扩增效率为90-110%之间，R2≥0.98，斜率≥-3.6且≦-3.1。扩增效率越接近于100%，R2越趋近于1，斜率越趋近于-3.4越佳。若需公式计算可参照GB/T19495.5-2018中的公式进行计算。

6.7.3荧光定量PCR扩增三次平行结果Ct值的SD值≦0.5

6.7.4转化体百分含量按如下公式计算：

$C=\frac{n\_{转化体}}{n\_{内标}}$×100%

C——试样中转化体的百分含量，单位为百分号（%）

n——拷贝数

6.7.5最终结果需在重复条件下进行3次独立测定，取平均值获得，3次独立结果的相对标准差（RSD）不得超过25%。

6.7.6结果表述为“样品中检测出XX转化体成分，转化体含量为百分之XX。

7检出限

 按所采用标准的规定进行确定。

附 录 A

玉米DNA浓度及对应的拷贝数

 玉米DNA浓度及对应的拷贝数见表A.1

表A.1 玉米DNA浓度及对应的拷贝数

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| DNA浓度（ng/μL） | 拷贝数（copies/μL） | DNA浓度（ng/μL） | 拷贝数（copies/μL） |
| 20 | 8000 | 95 | 38000 |
| 25 | 10000 | 100 | 40000 |
| 30 | 12000 | 110 | 44000 |
| 35 | 14000 | 120 | 48000 |
| 40 | 16000 | 130 | 52000 |
| 45 | 18000 | 140 | 56000 |
| 50 | 20000 | 150 | 60000 |
| 55 | 22000 | 160 | 64000 |
| 60 | 24000 | 170 | 68000 |
| 65 | 26000 | 180 | 72000 |
| 70 | 28000 | 190 | 76000 |
| 75 | 30000 | 200 | 80000 |
| 80 | 32000 | 210 | 84000 |
| 85 | 34000 | 220 | 88000 |
| 90 | 36000 | 230 | 92000 |

注：加入PCR体系中的拷贝总数应用表中数值乘以加入体积得到。

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_