



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2074—2008

主要食用菌中转基因成分定性 PCR 检测方法

Protocol of the qualitative polymerase chain reaction(PCR) for detecting
genetically modified component in familiar edible fungi

2008-04-29 发布

2008-11-01 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：中华人民共和国福建出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：陈文炳、邵碧英、江树勋、李寿崧、朱晓南、郭立新、杨婕。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

主要食用菌中转基因成分定性 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了主要食用菌中转基因成分检验的抽样、制样、定性 PCR 检测方法。

本标准适用于对主要食用菌(杏鲍菇、红菇、姬松茸、香菇、草菇、牛肝菌、鸡腿菇、金针菇、双孢蘑菇、猪肚菇、凤尾菇、小平菇、秀珍菇、猴头菇、金顶侧耳、茶树菇、竹荪、黑木耳、白木耳等)中转基因成分的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和实验方法(GB/T 6682—1992, neq ISO 3696:1987)

SN/T 1204 植物及其加工产品中转基因成分实时荧光 PCR 定性检验方法

3 缩略语

下列缩略语适用于本标准。

3.1

NOS *nopaline synthase gene from Agrobacterium tumefaciens*

来源于根癌农杆菌的胭脂碱合成酶基因。

3.2

BAR *phosphinothricin acetyltransferase gene from Bacillus amylolique faciens*

来源于杆菌 *Bacillus amylolique faciens* 草丁膦乙酰转移酶基因。

3.3

GUS *β-glucuronidase gene*

β-葡萄糖醛酸酶基因(作为植物基因表达的报告基因)。

3.4

NPT II *neomycin-3'-phosphotransferase gene*

来自大肠杆菌 K12 菌株的新霉素-3'-磷酸转移酶 II 基因。

3.5

18SrDNA

编码 18SrRNA(核糖体)的 DNA。

4 原理

样品经过提取 DNA 后,针对转基因食用菌所导入的常见外源基因的基因序列设计引物,通过 PCR 技术,对外源基因的 DNA 片段进行特异性扩增,根据实验结果,判定该食用菌样品是否含有外源基因成分。

5 试剂和材料

除另有规定外,所使用的试剂为分析纯或生化试剂,水为按照 GB/T 6682 规定的一级水。

- 5.1 2%CTAB 缓冲液:20 g/L CTAB,0.1 mol/L Tris-HCl(pH8.0),20 mmol/L EDTA(pH8.0)。
- 5.2 Tris 饱和酚或水饱和酚。
- 5.3 三氯甲烷。
- 5.4 异戊醇。
- 5.5 异丙醇。
- 5.6 无水乙醇。
- 5.7 70%乙醇。
- 5.8 TE 溶液(10 mmol/L Tris,1 mmol/L EDTA,pH8.0)。
- 5.9 Rnase A(10 μ g/mL)。
- 5.10 蛋白酶 K(20 mg/mL)。
- 5.11 琼脂糖:电泳纯。
- 5.12 三羟甲基氨基甲烷(Tris)。
- 5.13 氯化钠溶液(1.0 mol/L)。
- 5.14 EDTA(pH8.0):乙二胺四乙酸。
- 5.15 10 $\times$ PCR 缓冲液(含 25 mmol/L 氯化镁)。
- 5.16 dNTPs 溶液:dATP,dCTP,dGTP,dTTP 各 2.5 mmol/L。
- 5.17 *Taq* DNA 聚合酶。
- 5.18 引物:检测转基因食用茵内、外源基因的引物序列及相关信息见表 1。

表 1 PCR 引物与 PCR 产物

基因名称	基因来源	引 物 序 列	扩增长度/bp	退火温度/℃	提示
18SrDNA	内源	5'-TCT GCC CTA TGA ACT TTC GAT GGT A-3' 5'-AAT TTG CGC ATT GTG CGT CA-3'	137	54	
NOS	外源	5'-ATC GTT CAA ACA TTT GGC A-3' 5'-ATT GCG GGA CTC TAA TCA TA-3'	165	54	终止子
BAR	外源	5'-ACA AGC ACG GTC AAC TTC C-3' 5'-AAA CCC ACG TCA TGC CAG TTC-3'	398	54	目的基因
GUS	外源	5'-GGT CAG TCC CTT ATG TTA CG-3' 5'-GTG TAG AGC ATT ACG CTG CG-3'	545	54	报告基因
NPT II	外源	5'-AGG CTA TTC GGC TAT GAC TGG-3' 5'-GCG GTC CGC CAC ACC CAG CCG-3'	600	54	标记基因

5.19 研究转基因食用茵用的阳性质粒 p301-bG1,含有终止子 NOS、香菇三磷酸甘油醛脱氢酶(GPD)基因启动子、目的基因 BAR、报告基因 GUS 等元件,从中提取 DNA 溶液。

5.20 溴化乙锭(EB):10 mg/mL。

5.21 DNA 分子量标准。

5.22 5 $\times$ TBE 缓冲液:Tris 54 g,硼酸 275 g,0.5 mol/L EDTA(pH8.0)20 mL 加蒸馏水至 1 000 mL。

5.23 6 $\times$ 加样缓冲液(电泳前沿指示剂):0.25%溴酚蓝,0.25%二甲苯青 FF,30%甘油水溶液(或 40%蔗糖)。

5.24 Eppendorf 离心管:1.5 mL,2 mL 两种规格,用前须高压灭菌处理。

5.25 PCR 反应管:200 μ L,用前须高压灭菌处理。

6 仪器设备

6.1 研钵或电动研磨器。

6.2 恒温水浴锅或干式恒温器:恒温范围为室温 $\sim$ 100 $^{\circ}$ C,精度为 $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ C。

6.3 电子天平:感量为 0.001 g 与 0.000 1g。

6.4 台式高速离心机,低温冷冻高速离心机,小型瞬时离心机。

6.5 高温干燥箱。

6.6 冷冻、冷藏冰箱。

6.7 制冰机。

6.8 旋涡振荡器。

6.9 高压灭菌锅。

6.10 pH 计。

6.11 微量移液器:体积范围为 0.20 μ L $\sim$ 2.0 μ L,2 μ L $\sim$ 20 μ L,20 μ L $\sim$ 200 μ L,200 μ L $\sim$ 1 000 μ L,枪头用前应高压灭菌处理。

6.12 DNA 浓缩仪。

6.13 核酸蛋白分析仪。

6.14 纯水机。

6.15 PCR 超净工作台或生物安全柜。

6.16 PCR 仪。

6.17 微波炉。

6.18 电泳仪。

6.19 电泳槽。

6.20 凝胶分析成像系统。

7 测定方法

7.1 DNA 的抽提及浓度测定

7.1.1 DNA 的提取

称取约 50 g 烘干后的食用菌样品,经干热灭菌(150 $^{\circ}$ C 干热处理 2 h)或 120 $^{\circ}$ C、30 min 高压消毒处理的研钵或在粉碎机中研磨成颗粒大小约 0.5 mm 左右的粉末,备用。称取 100 mg 烘干后研磨成粉的样品于 1.5 mL 的离心管中,加 600 μ L 2%CTAB 缓冲液,5 μ L 蛋白酶 K(20 mg/mL),5 μ L Rnase A (10 μ g/mL),剧烈振荡 30 s 以上,65 $^{\circ}$ C 温浴 1 h,期间定期振荡。加 600 μ L 水饱和酚:三氯甲烷:异戊醇(25:24:1),剧烈振荡,1.2 $\times$ 10⁴ g 离心 15 min。取上清液,再加等体积的水饱和酚:三氯甲烷:异戊醇(25:24:1),振荡混匀,1.2 $\times$ 10⁴ g 离心 15 min。取上清液,加 0.8 倍体积异丙醇,混匀,1.2 $\times$ 10⁴ g 离心 10 min。取沉淀,加入 400 μ L 氯化钠(1 mol/L)于 65 $^{\circ}$ C 温浴中溶解,加等体积的水饱和酚:三氯甲烷:异戊醇(25:24:1),振荡,1.2 $\times$ 10⁴ g 离心 15 min。取上清液,加 2 倍体积的无水乙醇,轻微振荡,1.2 $\times$ 10⁴ g 离心 10 min。取沉淀,70%乙醇清洗 2 次,干燥,加 100 μ L TE(pH8.0)溶解。

每个样品设 2 个重复。也可使用市售的应用于真菌 DNA 提取的试剂盒。

7.1.2 DNA 的浓度与纯度测定

7.1.2.1 方法 1

样品 DNA 用核酸蛋白分析仪测定 260 nm 和 280 nm 处吸收值,分别计算 DNA 纯度与浓度,DNA 纯度等于 OD₂₆₀/OD₂₈₀,比值在 1.7 $\sim$ 2.0 之间较为理想。双链 DNA 浓度(μ g/mL)等于 50 倍 OD₂₆₀ 值。

7.1.2.2 方法 2

通过真核生物共有的核糖体 18SrDNA 基因的 PCR 扩增结果,判定从样品中提取的 DNA 是否适合于 PCR 检测,PCR 测试步骤按 7.2 规定的方法。

7.2 定性 PCR 检测

7.2.1 PCR 反应体系

检测食用菌中的内源 18SrDNA 基因与外源基因采用的 PCR 检测体系见表 2。每个样品反应体系设 2 个重复(同时做 2 管)。

表 2 定性 PCR 检测参考反应体系

试剂名称	储备液浓度	25 μL 反应体系 加样量/ μL	50 μL 反应体系 加样量/ μL
10 $\times$ PCR 缓冲液(含 25 mmol/L 氯化镁)	—	2.5	5.0
dNTPs	2.5 mmol/L	2.5	5.0
<i>Taq</i> 酶	5 U/ μL	0.2	0.4
正向引物	10 $\mu\text{mol/L}$	0.5	1.0
反向引物		0.5	1.0
DNA 模板	100 ng/ μL ~2 000 ng/ μL	1.0	2.0
双蒸水(ddH ₂ O)	—	补至 25	补至 50

7.2.2 PCR 反应体系对照的设置

进行 PCR 检测时设立置阳性对照、阴性对照和空白对照。

阳性对照:转基因食用菌的阳性质粒或转基因食用菌中提取的 DNA。

阴性对照:非转基因食用菌中提取的 DNA。

空白对照:用配制反应体系的实验用水代替模板。

7.2.3 PCR 反应热循环参数的设置

94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min。94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,54 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,40 个循环。72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。也可根据不同的基因扩增仪对 PCR 反应热循环参数做相应的调整。

7.2.4 PCR 扩增产物的电泳检测

用 0.5 $\times$ TBE 电泳缓冲液制备 2%的琼脂糖凝胶。将 8 μL ~10 μL 的 PCR 扩增产物分别与 1 μL ~2 μL 的 6 $\times$ 加样缓冲液(电泳前沿指示剂)混合后,在凝胶板上的孔中点样。用分子量大小适当的 DNA Marker 做分子量标记。选择合适的电压(3 V/cm~5 V/cm),电泳时间为 50 min~60 min。用凝胶成像仪观察、拍照、记录与分析。

8 结果判断

8.1 样品 DNA 抽提质量判断

按照真核生物共有的核糖体 18SrDNA 基因的序列设计的引物,对食用菌阴性样品与待测样品的 DNA 提取液进行 PCR 扩增。均应扩增出 137 bp 的片段,否则,说明提取的 DNA 质量有问题,或者是 DNA 溶液中存在 PCR 反应的抑制因子,应该重新纯化或提取 DNA,直至扩增出该 DNA 片段,防止检测中产生假阴性结果。

8.2 外源基因的检测

如果阴性对照与空白对照未扩增出 DNA 片段,阳性对照扩出预期的 DNA 片段,待测样品未扩增出预期的 DNA 片段,可以断定待测样品中不含有外源基因,如果扩出预期的 DNA 片段,则可初步判定

待测样品中含有可疑的外源基因,应进一步进行确证实验。

8.3 结果确证实验与结果表述

8.3.1 方法 1 实时荧光 PCR 检测方法

待测样品外源基因 PCR 扩增阳性结果的,按照 SN/T 1204 中规定的方法执行。

8.3.2 方法 2 PCR 扩增产物的 DNA 测序方法

外源基因 PCR 扩增阳性结果的,可委托有资质的生物技术公司对扩增产物进行测序,所获得的序列与已知的该外源基因相应序列进行比对加以确证。

注:可根据实验室条件任选一种方法进行确证。

8.3.3 结果表述

经 8.3.1 或 8.3.2 确证为阳性的,表述为:检出××××基因;确证为阴性的,表述为:未检出××××基因。

9 样品保存

9.1 保存条件

干燥样品保存在常温下,新鲜样品保存于-20℃下。

9.2 保存期限

保存期限为 3 个月。
