



中华人民共和国国家标准

GB/T 31730—2015

水稻中转基因成分测定 膜芯片法

Detection of genetically modified components in rice—
Membrane-based array method

2015-06-02 发布

2015-09-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中国标准化研究院归口。

本标准起草单位：四川华汉三创生物科技有限公司、中国标准化研究院、黑龙江省粮油卫生检验监测站。

本标准主要起草人：黄广平、云振宇、尹志坚、胡太贵、孙昭、张瑶、王勇强、董玖红、宋廷瑞、张金龙、刘贞。

水稻中转基因成分测定 膜芯片法

1 范围

本标准规定了水稻及水稻加工产品中转基因成分的检测方法。

本标准适用于转 BAR 基因耐除草剂水稻和转 Bt 基因 (Cry1Ab/Cry1Ac) 抗虫水稻中转基因成分的快速定性检测,也适用于水稻加工产品中以上成分的快速定性检测。

本标准规定的转基因成分最低检测限量是 1 g/kg。

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 19495.6 转基因产品检测 基因芯片检测方法

GB/T 19495.7 转基因产品检测 抽样和制样方法

3 术语、定义和缩略语

3.1 术语和定义

GB/T 19495.1、GB/T 19495.6 界定的术语和定义适用于本文件。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

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

dATP:脱氧腺苷三磷酸(deoxyadenosine triphosphate)

dCTP:脱氧胞苷三磷酸(deoxycytidine triphosphate)

dGTP:脱氧鸟苷三磷酸(deoxyguanosine triphosphate)

dTTP:脱氧胸苷三磷酸(deoxythymidine triphosphate)

dUTP:脱氧尿苷三磷酸(deoxyuridine triphosphate)

bp:碱基对(base pair)

BAR:草丁膦乙酰转移酶基因(phosphinothricin acetyltransferase gene)

Cry1Ab:苏云金芽孢杆菌杀虫毒蛋白 *cry1A(b)* 基因 [*Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin *cry1A(b)* gene]

Cry1Ac:苏云金芽孢杆菌杀虫毒蛋白 *cry1A(c)* 基因 [*Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin *cry1A(c)* gene]

CaMV35S-P:花椰菜花叶病毒的 35S 启动子(promoter from cauliflower mosaic virus)
 NOS-3':胭脂碱合成酶基因终止子(termination sequence of the nopaline synthase gene)
 CaMV35S-T:花椰菜花叶病毒的 35S 终止子(termination sequence from cauliflower mosaic virus)
 GOS9:水稻 *gos9* 基因[*Oryza sativa* (rice) *gos9* gene]
 PC:阳性对照(positive control)
 NC:阴性对照(negative control)
 UNG 酶:尿嘧啶-*N*-糖基化酶(UNG 酶)(uracil *N*-glycosylase)
 Taq 酶:*Thermus aquaticus* DNA 聚合酶(*Thermus aquaticus* DNA polymerase)
 AminolinkerC6:6 个碳原子作为连接臂的氨基标记(C6 Amino linker)

4 原理

根据转基因水稻中常见转基因片段和调控元件设计特异性多重 PCR 引物,对样本进行多重 PCR 扩增。PCR 引物上修饰有生物素。若样本中出现目标片段而得到 PCR 扩增产物,PCR 产物与固定有目标基因特异性探针的膜芯片进行杂交。杂交点上的生物素和碱性磷酸酶标记链霉亲和素反应,以及碱性磷酸酶化学显色底物进行化学显色,则可在杂交点上形成肉眼可见的杂交信号。依据膜芯片上杂交点的显色情况,判断样本中是否含有待检转基因成分,检测结果可以用肉眼直接判断,或用芯片识读仪对杂交芯片进行扫描并判定结果。

5 试剂与标准品

5.1 试剂

5.1.1 试剂组分

本标准中试剂组分和存放条件参见附录 A 和 5.1.2~5.1.4 的规定。除非另有规定,本方法中所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的二级水。

5.1.2 引物

PCR 反应使用的引物序列应符合表 1 的规定。

表 1 PCR 反应使用的引物序列

目标基因	引物名称	序 列	扩增片段大小
BAR	Forward	5'-CACCTGCTGAAGTCCCTGGA-3'	193 bp
	Reverse	5'-biotin-GTACCGGCAGGCTGAAGTCCA-3'	
Cry1Ab	Forward	5'-GACATGAACAGCGCCTTGAC-3'	164 bp
	Reverse	5'-biotin-TTGATGGTTGCAGCATCGAA-3'	
Cry1Ac	Forward	5'-GTTAGACTCAACAGCAGTGGA-3'	161 bp
	Reverse	5'-biotin-GAGAAGATGGATGAATTACCCCA-3'	
CaMV35S-P	Forward	5'-GGCCATCGTTGAAGATGCCTC-3'	144 bp
	Reverse	5'-biotin-TCATCCCTTACGTCAGTGGA-3'	

表 1 (续)

目标基因	引物名称	序 列	扩增片段大小
NOS-3'	Forward	5'-TGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTT-3'	113 bp
	Reverse	5'-biotin-GCGCGCGATAATTTATCCTAGTTT-3'	
CaMV35S-T	Forward	5'-CCAGATAAGGGAATTAGGGTTC-3'	132 bp
	Reverse	5'-biotin-ACTGGATTTTGGTTTTAGGAATTAGA-3'	
GOS9	Forward	5'-GACGATCCGTAGTGGAGC-3'	117 bp
	Reverse	5'-biotin-GTAATCGTAGTTGGATTTCACC-3'	

5.1.3 探针

膜芯片表面包被的目标基因探针序列应符合表 2 的规定。

表 2 目标基因探针序列

名称	序 列	修饰基团
BAR	5'-CGCGGCATGCTGCGGGCGGCCGCTTCAAGCACGGGAAGTGGCATGACGTGGGTTTCTG-3'	5'-AminolinkerC6
Cry1Ab	5'-GCAGCTAATCTTCACCTCAGCGTGCTTCGAGACGTTAGCGTGTTTGGGCAAAGGTGGGG-3'	5'-AminolinkerC6
Cry1Ac	5'-TCTACCAGATATAGAGTTCGTGTGAGGTATGCTTCTGTGACCCCTATTCACCTCAACGT-3'	5'-AminolinkerC6
CaMV35S-P	5'-AGGAGCATCGTGGAAGAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATG-3'	5'-AminolinkerC6
NOS-3'	5'-TTATGATTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAA-CAAAATATAGCGC-3'	5'-AminolinkerC6
CaMV35S-T	5'-AGCATATAAGAAACCCTTAGTATGTATTTGTATTTGTAAAATACTTCTATCAATAAAAT-3'	5'-AminolinkerC6
GOS9	5'-GCCTTTACATACGTTGGCACGGACGGAATGAACATCTTGCAGGTCC-TTGGGGTGGTGG-3'	5'-AminolinkerC6
PC	5'-GCATCCAGATCAGAAGCAATAATGAGCAGTGCAGAGAAGAACGAGGTG-TCCAAAGTACCAG-3'	5'-AminolinkerC6
NC	5'-GGTTCCTTGAGAAATGTTTTACGGGATTACTTCCATGTTTGTGATGATGATCCTATTTTC-3'	5'-AminolinkerC6
注：阳性寡核苷酸单链 DNA(Positive-Oligo, 10 $\mu\text{mol/L}$)，核苷酸序列与阳性对照核酸探针(PC)序列互补，用于膜芯片杂交过程质量控制，5'端带生物素(biotin)标记，序列如下： 5'-biotin-CTGGTACTTTGGACACTCGTTCTTCTCGCACTGCTCATTATTGCTTCTGATCTGGATGC-3'		

5.1.4 其他试剂

5.1.4.1 碱性磷酸酶标记链霉亲和素(AP-streptavidin)。

5.1.4.2 碱性磷酸酶化学显色底物 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸和氯化硝基四氮唑蓝(BCIP/NBT)。

- 5.1.4.3 磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)。
- 5.1.4.4 乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na, $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8$)。
- 5.1.4.5 十二烷基磺酸钠(SDS, $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_3\text{Na}$)。
- 5.1.4.6 氢氧化钠(NaOH)。
- 5.1.4.7 氯化钠(NaCl)。
- 5.1.4.8 多重 PCR 即用型预混液(Multiplex PCR Master Mix): MgCl_2 3 mmol/L, dATP、dCTP、dGTP、dTTP 和 dUTP 各 0.4 mmol/L, UNG 酶 4×10^4 U/L, *Taq* 酶 8×10^4 U/L。
- 5.1.4.9 多重 PCR 引物预混液(Multiplex PCR Primer Mix): 每条引物 2 $\mu\text{mol/L}$ 。
- 5.1.4.10 20×SSPE 缓冲液: 3 mol/L NaCl, 200 mmol/L NaH_2PO_4 , 20 mmol/L EDTA, pH7.4。
- 5.1.4.11 去活化液: 100 mmol/L NaOH。
- 5.1.4.12 去活化清洗液: 2×SSPE, 0.1% SDS。
- 5.1.4.13 杂交液: 2×SSPE, 0.1% SDS。
- 5.1.4.14 杂交清洗液: 2×SSPE, 0.5% SDS。
- 5.1.4.15 酶孵育液: 2×SSPE, 0.5% SDS。
- 5.1.4.16 孵育清洗液 1: 2×SSPE, 0.5% SDS。
- 5.1.4.17 孵育清洗液 2: 2×SSPE。
- 5.1.4.18 底物显色液: 碱性磷酸酶化学显色底物 NBT/BCIP, 含 0.15 mg/mL BCIP, 0.30 mg/mL NBT, 100 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L MgCl_2 , pH9.5。

5.2 标准品

- 5.2.1 LLRice62 Rice 转基因水稻标准品 LLRice62 品系, 包含 BAR, CaMV35S-P, CaMV35S-T 转基因成分。
- 5.2.2 BT63 Rice 转基因水稻标准品 BT63 品系, 包含 Cry1Ab, Cry1Ac, NOS-3' 转基因成分。
- 5.2.3 Non-Modified Rice 非转基因水稻标准品。

6 仪器与设备

- 6.1 基因扩增仪。
- 6.2 核酸微量分光光度计。
- 6.3 纯水仪。
- 6.4 分析天平: 精确到 0.001 g。
- 6.5 膜芯片识读仪。
- 6.6 台式离心机: 转速 12 000 r/min。
- 6.7 分子杂交炉。
- 6.8 其他相关仪器和设备。

7 试验方法和流程

7.1 膜芯片检测流程

膜芯片法检测流程参见附录 B。

7.2 防污染措施

检测过程中防止交叉污染的措施应按照 GB/T 19495.2 的规定执行。

7.3 抽样和样品制备要求

7.3.1 实验室抽样要求

实验室样品代表性应符合 GB/T 19495.7 的规定。

7.3.2 样品的保存

标准品、实验室样品及测试样品的保存应按照 GB/T 19495.1 的规定执行。

7.3.3 样品的制备

所有测试样品的制备操作应按照 GB/T 19495.2 的规定执行,小心操作确保防止任何的污染和样品组分的改变。

7.3.4 DNA 的提取

样品中 DNA 的提取,应按照 GB/T 19495.3 中的规定执行,或采用同等功能的植物基因组 DNA 提取试剂盒。并对提取后的样品 DNA 进行定量。每个测试样品提取时应做两个提取重复。

7.3.5 PCR 扩增

7.3.5.1 PCR 反应体系

按照表 3 配制 PCR 反应体系。每次实验中,利用转基因水稻标准品的基因组 DNA 作为阳性质控,非转基因水稻标准品的基因组 DNA 作为阴性质控,核酸提取空白作为空白质控,以对后续的 PCR 扩增体系、膜芯片杂交反应进行质控。

表 3 PCR 反应体系体积(50 μL)

反应液组成	检测反应	阳性质控	阴性质控	空白质控
Multiplex PCR Master Mix	25 μL	25 μL	25 μL	25 μL
Multiplex PCR Primer Mix	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL
检测样品基因组 DNA	200 ng	—	—	—
转基因水稻标准品基因组 DNA	—	200 ng	—	—
非转基因水稻标准品基因组 DNA	—	—	200 ng	—
核酸提取空白	—	—	—	10 μL
无核酸酶灭菌水	补水至 50 μL	补水至 50 μL	补水至 50 μL	补水至 50 μL
注: PCR 体系最终含有 MgCl_2 1.5 mmol/L, dATP、dCTP、dGTP、dTTP 和 dUTP 各 0.2 mmol/L, UNG 酶 1 U, Taq 酶 2 U, 每条引物 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 。				

7.3.5.2 PCR 反应循环参数

按照表 4 设计 PCR 反应参数。

表 4 PCR 反应参数

步骤	温度	反应时间
1	37 ℃	10 min
2	95 ℃	10 min
3	95 ℃	30 s
4	55 ℃	30 s
5	72 ℃	30 s
6	72 ℃	10 min
7	4 ℃	∞
注：步骤 3、4、5 循环 40 次。		

7.4 膜芯片杂交

7.4.1 膜芯片制备

膜芯片制作和质量控制参见附录 C。

7.4.2 杂交体系

按照表 5 配制杂交体系液。

表 5 杂交体系

组 分	体 积/ μL
杂交液($2\times\text{SSPE}$, 0.1% SDS)	979
PCR 扩增产物	20
阳性寡核苷酸单链 DNA(Positive-Oligo 10 $\mu\text{mol/L}$)	1
总体积	1 000

7.4.3 酶孵育体系

按照表 6 配制酶孵育体系液,用前新鲜配制。

表 6 酶孵育体系

组 分	体 积/ μL
孵育液($2\times\text{SSPE}$, 0.5% SDS)	999.5
碱性磷酸酶标记链霉亲和素(AP-streptavidin)	0.5
总体积	1 000

7.4.4 杂交、酶联及显色

7.4.4.1 杂交检测方式:

本步骤有手动操作和自动杂交仪测定两种选择。

7.4.4.2 手动过程：

将膜芯片置于杂交盒内，按表 7 进行手动杂交。杂交过程在分子杂交炉中进行，类似仪器应满足实验要求。

表 7 膜芯片手动杂交过程

过程名称	步 骤
去活化	加入去活化液, 37 ℃, 8 min, 吸除去活化液
去活化清洗	加入去活化清洗液, 60 ℃, 5 min, 吸除去活化清洗液
杂交	加入杂交体系液, 42 ℃, 45 min, 吸除杂交体系液
杂交清洗(2次)	加入杂交清洗液, 52 ℃, 5 min, 吸除杂交清洗液, 该过程重复 2 次
酶孵育	加入酶孵育体系液, 42 ℃, 30 min, 吸除酶孵育体系液
孵育清洗 1(2次)	加入孵育清洗液 1, 42 ℃, 5 min, 吸除孵育清洗液 1, 该过程重复 2 次
孵育清洗 2(2次)	加入孵育清洗液 2, 37 ℃, 5 min, 吸除孵育清洗液 2, 该过程重复 2 次
显色	加入显色液, 37 ℃, 静止显色 15 min, 吸除显色液
显色清洗(2次)	加入去离子水, 37 ℃, 5 min, 吸除去离子水, 该过程重复 2 次
结果判读	根据杂交点显色情况进行结果判读

7.4.4.3 自动杂交仪测定过程：

具有自动杂交、清洗反应功能的仪器，可以按照表 8 流程所示，依次自动完成去活化、杂交、清洗、酶孵育、显色等步骤。

表 8 自动杂交仪测定过程

程序名称	试剂名称	温度/℃	时间/min
去活化	去活化液	37	8
去活化清洗	去活化清洗液	60	5
杂交	杂交液	42	45
杂交清洗	杂交清洗液	52	5
杂交清洗	杂交清洗液	52	5
酶孵育	孵育液	42	30
孵育清洗 1	孵育清洗液 1	42	5
孵育清洗 1	孵育清洗液 1	42	5
孵育清洗 2	孵育清洗液 2	37	5
孵育清洗 2	孵育清洗液 2	37	5
显色	显色液	37	15
显色清洗	去离子水	37	5
显色清洗	去离子水	37	5
结果判读	根据杂交点显色情况进行结果判读		

7.5 膜芯片结果判读

7.5.1 目测判读

显色后的膜芯片可以用肉眼直接判读检测结果。阳性杂交信号为肉眼明显可见的蓝色斑点。如果杂交点部位没有显色,和膜芯片背景相同,则判读为阴性杂交信号。

7.5.2 膜芯片识读仪判读

膜芯片显色后,使用膜芯片识读仪进行扫描分析,根据杂交点的信号值判断检测结果,阳性杂交信号的判断阈值是3倍背景信号值加上3倍背景信号值标准差。

8 结果判断

8.1 质量控制

8.1.1 核酸提取空白对照和多重PCR扩增试剂空白对照

膜芯片上内源基因探针点杂交信号阴性,转基因探针点杂交信号阴性,阳性对照探针点杂交信号阳性,阴性对照探针点杂交信号阴性。

8.1.2 非转基因标准品对照

膜芯片上内源基因探针点杂交信号阳性,转基因探针点杂交信号阴性,阳性对照探针点杂交信号阳性,阴性对照探针点杂交信号阴性。

8.1.3 转基因标准品对照

膜芯片上内源基因探针点杂交信号阳性,标准品中所含转基因探针点杂交信号阳性,阳性对照探针点杂交信号阳性,阴性对照探针点杂交信号阴性。

8.2 膜芯片结果判读

8.2.1 样本检测结果中内源基因探针点杂交信号阴性,表明未能从样本中提取出适宜多重PCR扩增的核酸模板,需要重新进行样本核酸提取和多重PCR扩增。

8.2.2 样本检测结果中内源基因探针点杂交信号阳性,转基因探针点杂交信号阴性,表明样本核酸提取、多重PCR扩增和膜芯片杂交过程正常,判断样本中未检出测定转基因成分。

8.2.3 样本检测结果中内源基因探针点杂交信号阳性,各转基因探针点杂交信号部分或全部阳性,表明样本核酸提取、多重PCR扩增和膜芯片杂交过程正常,判读样本中存在阳性信号点对应的转基因成分。

8.2.4 膜芯片杂交检测结果应符合8.1.1~8.1.3对照情况。否则应判断实验不成功,需重做实验。

9 结果表述

9.1 未检出

在阴性质控探针杂交点、阳性质控探针杂交点检测结果正常的情况下,未检出本标准所包括的转基因成分。

9.2 检出

检出××××基因,阴性质控探针杂交点、阳性质控探针杂交点的检测结果正常。

附 录 A
(资料性附录)

膜芯片法试剂组分和存放条件

膜芯片法试剂组分和存放条件参见表 A.1。

表 A.1 膜芯片法试剂组分和存放条件

序号	试剂组分	存放条件
1	多重 PCR 即用型预混液	—20 ℃
2	多重 PCR 引物预混液	—20 ℃
3	无核酸酶灭菌水	—20 ℃
4	转基因标准品基因组 DNA(50 ng/μL)	—20 ℃
5	阳性寡核苷酸单链 DNA	—20 ℃
6	去活化液	室温
7	去活化清洗液	室温
8	杂交液	室温
9	杂交清洗液	室温
10	酶孵育液	室温
11	碱性磷酸酶标记的链霉亲和素	4 ℃
12	孵育清洗液 1	室温
13	孵育清洗液 2	室温
14	BCIP/NBT 显色底物	4 ℃
15	膜芯片	室温

附 录 B
(资料性附录)
膜芯片法检测流程

膜芯片法检测按照图 B.1 流程进行。

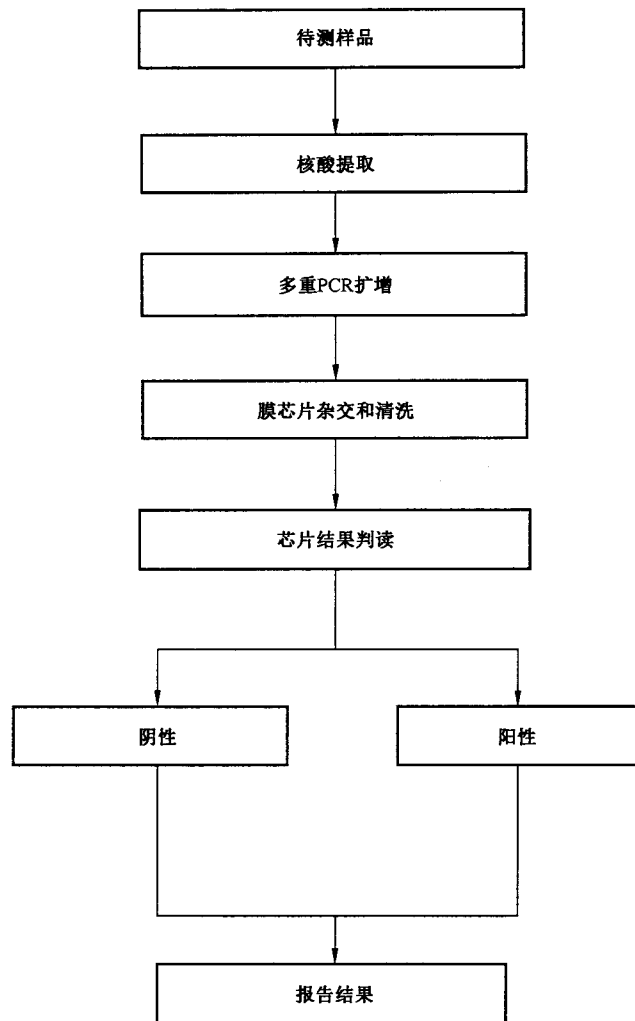


图 B.1 膜芯片法检测流程

附 录 C
(资料性附录)
膜芯片制作与质量控制

C.1 膜芯片制作

采用微量喷点式膜芯片点样仪,将各个核苷酸探针(探针浓度 25 μmol/L)分布在带负电荷尼龙膜芯片上的特定位置区域。芯片表面包被的探针布局如图 C.1 所示。

杂交阳性对照:PC,监测芯片杂交过程是否正常。

内对照:GOS9,指膜芯片上用来质控 PCR 扩增过程是否正常的对照,使用水稻特异性内源基因 *gos9* 扩增片段互补的一段寡核苷酸作为探针。

阴性对照:NC,指膜芯片上用来质控探针杂交特异性的对照。一般使用一段与任何靶标分子序列无关的寡核苷酸作为探针。

 GOS9	 BAR	 Cry1Ab
 Cry1Ac	 CaMV35S-P	 NOS-P3'
 CaMV35S-T	 PC	 NC

图 C.1 膜芯片探针布局

C.2 膜芯片的质量控制

膜芯片点样后扫描无漏点、连点,位点规则,大小均匀一致,点与点的距离为 300 μm~500 μm;杂交后阳性质控实验杂交信号清晰可见。
