

# SN

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1196—2012  
代替 SN/T 1196—2003

### 转基因成分检测 玉米检测方法

Detection of genetically modified components—Maize test methods

2012-12-12 发布

2013-07-01 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

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 SN/T 1196—2003《玉米中转基因成分定性 PCR 检测方法》。

本标准与 SN/T 1196—2003 相比,主要技术变化如下:

——将原标准中、英文名称进行了修订;

——增加了鉴定检测玉米品系范围,补充了 MON863、NK603、TC1507、MON88017、59122、MIR604、MTR162、DBT418、MON89034、LY038、ES3272、Bt10、DP98140 品系转基因成分的定性检测。

——增加了第二法实时荧光 PCR 方法。

本标准参照 ISO 标准和欧盟联合研究中心转基因食物及饲料参考实验室(Community reference laboratory for GM food and feed Biotechnology & GMOs Unit)中转基因玉米 PCR 检测方法,在第一法普通 PCR 方法中增加了 MON863、NK603、TC1507、Bt10 品系转基因成分的定性检测,增加了第二法实时荧光 PCR 方法。

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:中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局,中国检验检疫科学研究院,中华人民共和国山东出入境检验检疫局,中华人民共和国福建出入境检验检疫局,中华人民共和国深圳出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:曹际娟、徐君怡、赵昕、黄新、高宏伟、陈文炳、闫平平、凌杏园、邵璧英、朱水芳。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

——SN/T 1196—2003。

# 转基因成分检测 玉米检测方法

## 1 范围

本标准规定了玉米及其加工产品中转基因成分检测的 PCR 方法和实时荧光 PCR 方法。

本标准的筛选检测适用于玉米及其加工产品中转基因成分的定性检测。

本标准的鉴定检测适用于玉米 MON810、Bt11、Bt176、T14/T25、CBH351、GA21、MON863、NK603、TC1507、MON88017、59122、MIR604、MIR162、DBT418、MON89034、LY038、ES3272、Bt10、DP98140 品系转基因成分的定性检测。

## 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 19495.7 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 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

#### 3.1.1

**转基因 transgene**

将物种本身不具有的、来源于其他物种的功能 DNA 序列，通过各种导入手段，使其在该物种中进行表达，以便该物种获得新的品种特征。

#### 3.1.2

**内源基因 endogenous gene**

在栽培的物种中拷贝数恒定的、不显示等位基因变化的基因。该基因可用于对基因组中某一目的基因的定量分析。

### 3.2 缩略语

GB/T 19495.1 界定的以及下列缩略语适用于本文件。

CaMV 35S:35S promoter from Cauliflower mosaic virus, 来自于花椰菜花叶病毒的 35S 启动子。

CDPK: calcium-dependent protein kinase (CDPK) gene, 钙依赖蛋白激酶基因

CryIA(b): a synthetic gene encodes the first 648 amino acids, insecticidal-active truncated product identical to that of *cryIA(b)* gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. 苏云金芽孢杆菌杀虫毒蛋白 *cryIA(b)* 基因

Cry9C:insecticidal-active truncated product identical to that of *Cry9C* gene of *Bacillus thuringiensis* subsp, 苏云金芽孢杆菌杀虫毒蛋白 *Cry9C* 基因

Ct 值:C:Cycle,t:threshold,每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数

EDTA: ethylene diaminetetraacetic acid, 乙二胺四乙酸

HSP70:0.8 Kb intron from the *hsp 70* gene (heat-shock protein),来自热休克蛋白(*hsp 70*)基因的 0.8 Kb 基因内区

IVR:invertase 1 gene from maize,玉米的转化酶 1 基因

IVS2:intron from the maize alcohol dehydrogenase gene,玉米乙醇脱氢酶基因的基因内区 2

mEPSPS:maize 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase,来源于玉米的莽草酸羟基乙酰转移酶

NOS:terminator of nopaline synthase gene,胭脂碱合成酶基因终止子

NPTII: neomycin-3'-phosphotransferase gene,新霉素-3'-磷酸转移酶基因

OTP:optimized transit peptide gene,优化运输肽基因

P actin 1:the promoter derived from the rice(*Oryza sativa*) actin 1 gene,来源于玉米肌动蛋白 1 基因的启动子

PAT:phosphinothricin acetyltransferase gene,草丁膦乙酰转移酶基因

PCR:polymerase chain reaction,简称 PCR

TE: Tris-HCl,EDTA 缓冲液

Tris:tris(hydroxymethyl)aminomethane,三(羟甲基)氨基甲烷

Taq:*Thermus aquaticu*,水生热栖菌

Zein:玉米醇溶蛋白基因

#### 4 防污染措施

检测过程中防止交叉污染的措施按照 GB/T 19495.2 中的规定执行。

#### 5 抽样和制样

##### 5.1 取样

按照 GB/T 19495.7 中规定的方法执行。

##### 5.2 制样

称取约 50 g 玉米样品,经干热灭菌(150 °C 干热预处理 2 h)或 120 °C、30 min 高压消毒处理的碾钵或粉碎机中碾磨至样品粉末颗粒约 0.5 mm 左右大小。

#### 6 普通 PCR 方法

##### 6.1 原理

样品经过提取 DNA 后,针对转基因植物所插入的外源基因的基因序列设计引物,通过 PCR 技术,特异性扩增外源基因的 DNA 片断,根据 PCR 扩增结果,判断该样品中是否含有转基因成分。

##### 6.2 试剂和材料

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

- 6.2.1 引物:检测转基因玉米内、外源基因的引物及其信息见附录 A。
- 6.2.2 *Taq* DNA 聚合酶。
- 6.2.3 dNTPs:dATP、dTTP、dCTP、dGTP、dUTP。
- 6.2.4 琼脂糖:电泳纯。
- 6.2.5 溴化乙锭(EB)或其他染色剂。
- 6.2.6 三氯甲烷。
- 6.2.7 异戊醇。
- 6.2.8 异丙醇。
- 6.2.9 70%乙醇。
- 6.2.10 相对分子质量 Marker:50 bp~300 bp。
- 6.2.11 CTAB 裂解液:3%(质量浓度)CTAB,1.4 mol/L NaCl,0.2%(体积分数)巯基乙醇,20 mmol/L EDTA,100 mmol/L Tris-HCl,pH8.0。
- 6.2.12 TE 缓冲液:10 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0;1 mmol/L EDTA,pH 8.0。
- 6.2.13 10×PCR 缓冲液:100 mmol/L KCl,160 mmol/L(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,20 mmol/L MgSO<sub>4</sub>,200 mmol/L Tris-HCl(pH 8.8),1% TritonX-100,1 mg/mLBSA。
- 6.2.14 5×TBE 缓冲液:Tris 54 g,硼酸 275 g,0.5 mol/L EDTA (pH 8.0)20 mL,加蒸馏水至1 000 mL。
- 6.2.15 10×上样缓冲液:0.25%溴酚蓝,40%蔗糖。
- 6.2.16 RNA 酶(10 μg/mL)。
- 6.2.17 UNG 酶(Uracil N-glycosylase)。

### 6.3 仪器

固体粉碎机及研钵;高速冷冻离心机,台式小型离心机、Mini 个人离心机;水浴培养箱、恒温培养箱、恒温孵育箱;天平:感量 0.001 g;高压灭菌锅;高温干燥箱;纯水器或双蒸水器;冷藏、冷冻冰箱;制冰机;旋涡振荡器;微波炉;基因扩增仪;电泳仪;PCR 超净工作台;核酸蛋白分析仪;微量移液器(0.1 μL~2 μL,0.5 μL~10 μL,2 μL~20 μL,10 μL~100 μL,20 μL~200 μL,200 μL~1 000 μL);凝胶成像系统;离心管:1.5 mL~5 mL;PCR 反应管:200 μL,500 μL 两种规格。

### 6.4 检测步骤

#### 6.4.1 对照的设置

检测过程中应按照 GB/T 19495.2 中的规定设置对照。

阴性目标 DNA 对照:不含外源目标核酸序列的 DNA 片段。

阳性目标 DNA 对照:参照 DNA、或从可溯源的标准物质提取的 DNA 或从含有已知序列阳性样品(或生物)中提取的 DNA。

扩增试剂对照:该对照包括除了测试样品 DNA 模板以外所有的反应试剂,在 PCR 反应体系中用相同体积的水(不含核酸)取代模板 DNA。

#### 6.4.2 模板 DNA 提取

称取 1 g 粉样于 10 mL 离心管中,加入 5 mL CTAB 裂解液(含适量 RNA 酶),混匀,60 °C 水浴振荡保温 1 hr;2 000 r/min 离心 5 min;取上清液,加等体积三氯甲烷/异戊醇(体积分数:24/1)混匀,静置 5 min,8 000 r/min 离心 5 min;小心取离心上清液,再加等体积三氯甲烷/异戊醇(体积分数:24/1)混匀,静置 5 min,8 000 r/min 离心 5 min;取离心上清液加 0.65 倍体积的异丙醇,混匀,12 000 r/min 4 °C 离心 10 min;弃上清液,加 500 μL 70%冰乙醇洗涤一次,12 000 r/min 4 °C 离心 5 min;弃上清液,将沉淀晾干,加入 50 μLTE,溶解沉淀(4 °C 过夜,或 37 °C 保温 1 h);此即为总 DNA 提取液。

也可用相应市售 DNA 提取试剂盒提取 DNA,或按照 GB/T 19495.3 执行。

## 6.4.3 PCR 扩增

## 6.4.3.1 PCR 反应体系

PCR 反应体系见表 1, 每个样品各做两个平行管。加样时应使样品 DNA 溶液完全落入反应液中, 不要粘附于管壁上, 加样后应尽快盖紧管盖。

表 1 PCR 反应体系

试剂名称	贮备液浓度	25 $\mu\text{L}$ 反应体系	50 $\mu\text{L}$ 反应体系
		加样体积 $\mu\text{L}$	加样体积 $\mu\text{L}$
10 $\times$ PCR 缓冲液		2.5	5.0
MgCl <sub>2</sub>	25 mmol/L	2.5	5.0
dNTP(含 dUTP)	2.5 mmol/L	2.5	5.0
Taq 酶	5 U/ $\mu\text{L}$	0.2	0.4
UNG 酶	1 U/ $\mu\text{L}$	0.2	0.4
引物	20 pmol/ $\mu\text{L}$	0.5	1.0
模板 DNA	0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ~6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0.5	1.0
双蒸水		补至 25 $\mu\text{L}$	补至 50 $\mu\text{L}$

注: 表中 DNA 模板为原料的模板量, 加工产品可视加工程度适当增加模板量; 也可根据具体情况或不同的反应总体积进行适当调整。

## 6.4.3.2 PCR 反应循环参数

50  $^{\circ}\text{C}$  PCR 前去污染 2 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 40 s, 55  $^{\circ}\text{C}$ ~58  $^{\circ}\text{C}$  退火 60 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 60 s, 35 个循环。72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。4  $^{\circ}\text{C}$  保存。也可根据不同的基因扩增仪对 PCR 反应循环参数做适当调整。

## 6.4.4 PCR 扩增产物电泳检测

用电泳缓冲液(1 $\times$ TBE 或 TAE)制备 2% 琼脂糖凝胶(其中在 55  $^{\circ}\text{C}$ ~60  $^{\circ}\text{C}$  左右加入 EB 或其他染色剂至终浓度为 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 也可在电泳后进行染色)。将 10  $\mu\text{L}$ ~15  $\mu\text{L}$  PCR 扩增产物分别和 2  $\mu\text{L}$  上样缓冲液混合, 进行点样。用 100 bp Ladder DNA Marker 或相应合适的 DNA Marker 作相对分子质量标记。3 V/cm~5 V/cm 恒压, 电泳 20 min~40 min。凝胶成像仪观察并分析记录。

## 6.5 结果判断

## 6.5.1 内源基因的检测

用针对玉米内源基因 IVR 基因(或 Zein 基因)设计的引物对玉米 DNA 提取液进行 PCR 测试, 待测样品应被扩增出 226 bp(或 173 bp)的 PCR 产物。如未见有该 PCR 产物扩增, 则说明 DNA 提取质量有问题, 或 DNA 提取液中有抑制 PCR 反应的因子存在, 应重新提取 DNA, 直到扩增出该 PCR 产物。

## 6.5.2 外源基因的检测

对玉米样品 DNA 提取液进行外源基因的 PCR 测试, 如果阴性目标 DNA 对照和扩增试剂对照未

出现扩增条带,阳性目标 DNA 对照和待测样品均出现预期大小的扩增条带(扩增片段大小见表 A.1),则可初步判定待测样品中含有可疑的该外源基因,应进一步进行确证试验,依据确证试验的结果最终报告;如果待测样品中未出现 PCR 扩增产物,则可断定该待测样品中不含有该外源基因。

### 6.5.3 筛选检测和鉴定检测的选择

对玉米样品中转基因成分的检测,可按附录 A 的内容,先筛选检测 CaMV 35S、NOS、NPTII、PAT、BAR 基因,筛选检测结果阴性则直接报告结果。

若筛选检测结果阳性,则需进一步鉴定检测 MON810、Bt11、Bt176、T14/T25、CBH351、GA21、TC1507、MON863、NK603、Bt10 的结构特异性基因或品系特异性基因,以确定是何种转基因玉米品系。

### 6.6 确证试验

确证试验按照第 7 章实时荧光 PCR 方法执行。

## 7 实时荧光 PCR 方法

### 7.1 原理

实时荧光 PCR 技术,是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程,最后通过扩增曲线对检测模板进行定性分析的方法。

### 7.2 主要仪器

实时荧光定量 PCR 仪;超净工作台;消毒灭菌锅;制冰机;核酸蛋白分析仪;高速冷冻离心机、台式小型离心机、Mini 个人离心机;低温冰箱、冷藏冷冻冰箱;纯水器或双蒸水器;旋涡振荡器;微量进样器(0.5  $\mu\text{L}$ , 2  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$ , 20  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$ , 1 000  $\mu\text{L}$ );光化学 PCR 反应管。

### 7.3 主要试剂

除另有规定外,所有试剂均为分析纯或生化试剂。

实验用水:应符合 GB/T 6682 中一级水的规格;PCR 缓冲液;MgCl<sub>2</sub>;dNTPs: dATP、dTTP、dCTP、dGTP、dUTP;UNG 酶(Uracil N-glycosylase);Taq 酶;引物和探针;玉米转基因成分实时荧光 PCR 检测所用引物和探针序列见表 A.2。

### 7.4 实验步骤

#### 7.4.1 对照的设置

见 6.4.1。

#### 7.4.2 模板 DNA 提取

见 6.4.2。

#### 7.4.3 实时荧光 PCR 反应体系

实时荧光 PCR 反应体系见表 2、表 3(可根据实际需要任选其一),每个样品各做两个平行管。加样时应使样品 DNA 溶液完全落入反应液中,不要粘附于管壁上,加样后应尽快盖紧管盖。

表 2 实时荧光 PCR 反应体系(1)

试剂名称	终浓度	$\mu\text{L}/\text{反应}$
10×PCR 反应缓冲液	1×	5
MgCl <sub>2</sub> (25 mmol/L)	2.5 mmol/L	5
dATP(10 mmol/L)	200 nmol/L	1
dGTP(10 mmol/L)	200 nmol/L	1
dCTP(10 mmol/L)	200 nmol/L	1
dTTP(10 mmol/L)	100 nmol/L	0.5
dUTP(10 mmol/L)	200 nmol/L	1
UNG 酶(1 U/ $\mu\text{L}$ )	0.5 U	0.5
上游引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ )	200 nmol/L	1
下游引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ )	200 nmol/L	1
探针(5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ )	100 nmol/L	1
Taq 酶(5 U/ $\mu\text{L}$ )	2.5 U	0.5
DNA 模板(40 ng/ $\mu\text{L}$ ~50 ng/ $\mu\text{L}$ )	—	5
补水至	—	50

注：表中 DNA 模板为原料的模板量，加工产品可视加工程度适当增加模板量；也可根据具体情况或不同的反应总体积进行适当调整。

表 3 实时荧光 PCR 反应体系(2)

试剂名称	终浓度	$\mu\text{L}/\text{反应}$
TaqMan® Universal PCR Master Mix(2×)	1×	25
上游引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ )	150 nmol/L	0.75
下游引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ )	150 nmol/L	0.75
探针(5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ )	50 nmol/L	0.50
DNA 模板(40 ng/ $\mu\text{L}$ ~50 ng/ $\mu\text{L}$ )	—	4.0
补水至	—	50

注：表中 DNA 模板为原料的模板量，加工产品可视加工程度适当增加模板量；也可根据具体情况或不同的反应总体积进行适当调整。

#### 7.4.4 实时荧光 PCR 反应参数

实时荧光定量 PCR 的反应参数为：50 °C PCR 前去污染 2 min；预变性 95 °C 10 min；95 °C 15 s，60 °C 1 min，45 个循环。

注：不同仪器可根据仪器要求将反应参数作适当调整。

#### 7.4.5 仪器检测通道的选择

PCR 反应管荧光信号收集的设置，应与探针所标记的报告基团一致。报告基团为 FAM 时，荧光信



号收集应设在 FAM 通道;报告基因为 TET 时,荧光信号收集应设在 TET 通道;余类推。具体设置方法因仪器而异,可参照仪器使用说明书。

#### 7.4.6 实时荧光 PCR 反应运行

按预先设定的样品摆放顺序将 PCR 反应管依次摆放(上机前应注意检查各反应管是否盖紧,以免荧光物质泄漏污染仪器),开始运行仪器进行实时荧光 PCR 反应。

#### 7.4.7 结果分析

##### 7.4.7.1 基线的设置

实时荧光 PCR 反应结束并分析结果后,应设置无效基线范围。无论采用任何荧光通道(FAM 或 TET),基线范围选择在 3~15 个循环,如果有强阳性样本,应根据实际情况调整基线范围。阈值设置原则以基线刚好超过正常阴性目标 DNA 对照扩增曲线的最高点,且 Ct 值=40 为准。

##### 7.4.7.2 Ct 值与 DNA 浓度的关系

Ct 值大于或等于 40 时,PCR 过程中无目标 DNA 的扩增;Ct 值在 36~40 之间,且平行样的每个值之间的差异很大,表明 PCR 反应体系中的目标 DNA 量很少,应适当增加模板量。

#### 7.5 实时荧光 PCR 检测的质量控制

扩增试剂对照:外源基因检测 Ct 值大于或等于 40,内源基因检测 Ct 值大于或等于 40。

阴性目标 DNA 对照:外源基因检测 Ct 值大于或等于 40。

阳性目标 DNA 对照:外源基因检测 Ct 值小于或等于 34。

上述指标有一项不符合者,应重做实时荧光 PCR 扩增。

#### 7.6 筛选检测和鉴定检测的选择

对玉米样品中转基因成分的检测,可参考附录 B 的内容,先筛选检测 CaMV 35S、NOS、NPTII、PAT、BAR、CryIA(b)基因,筛选检测结果阴性则直接报告结果。

若筛选检测结果阳性,则需进一步鉴定检测 MON810、Bt11、Bt176、T14/T25、CBH351、GA21、MON863、NK603、TC1507、MON88017、59122、MIR604、MIR162、DBT418、MON89034、LY038、ES3272、Bt10、DP98140 品系特异性基因,以确定是何种转基因玉米品系。

#### 7.7 结果判断

待测样品外源基因检测 Ct 值大于或等于 40,内源基因检测 Ct 值小于或等于 24,设置的对照结果正常者,则可判定该样品未检出×××基因;

待测样品外源基因检测 Ct 值小于或等于 36,内源基因检测 Ct 值小于或等于 24,设置的对照结果正常者,则可判定该样品检出×××基因;

待测样品外源基因检测 Ct 值在 36~40 之间,应重做实时荧光 PCR 扩增。再次扩增后的结果 Ct 值仍小于 40,且设置的对照结果正常,则可判定该样品检出×××基因;再次扩增后结果 Ct 值大于 40,且设置的对照结果正常,可判定该样品未检出×××基因。

#### 8 结果记录

检测过程中,应根据实验的具体操作程序和结果做好详细的实验记录。

## 9 结果表述

9.1 未检出××××基因。

9.2 检出××××基因,(可进一步报告)该样品中含有××××转基因玉米品系。

附 录 A  
(规范性附录)  
引 物

表 A.1 检测转基因玉米内、外源基因所需的引物信息

基因名称	类别	引物序列	扩增长度 bp	提示	备注
IVR	内源	5'-ccgctgtatcacaagggtggtacc-3' 5'-ggagcccggttagagcatgacgac-3'	226	内源基因	任选其一
Zein	内源	5'-tgaaccatgcatgcagt-3' 5'-ggcaagaccattggtga-3'	173	内源基因	任选其一
CaMV 35S	外源	5'-gctcctacaaatgccata-3' 5'-gatagtgggattgtgcgca-3'	195	筛选检测	任选其一
CaMV 35S	外源	5'-tcacccctacgtcagtgag-3' 5'-ccatcatgcgataaaggaaa-3'	165	筛选检测	任选其一
NOS	外源	5'-gaatcctggtccggtcttg-3' 5'-ttatcctagtttgccgcta-3'	180	筛选检测	任选其一
NOS	外源	5'-atcgttcaaaatttgca-3' 5'-attcgggactctaatacata-3'	165	筛选检测	任选其一
NPTII	外源	5'-ctcacattgctactgacgaga-3' 5'-cgcttgagcctggcgaacag-3'	215	筛选检测	
PAT	外源	5'-gtcgcacatgtctcggagag-3' 5'-gcaaccaaccaagggtac-3'	191	筛选检测	
BAR	外源	5'-acaagcaggtraacttc-3' 5'-actcggccgcccagtcgta-3'	175	筛选检测	
IVS2/PAT	外源	5'-ctgggagccaaggtatcfaat-3' 5'-gctgctgtagctggcctaact-3'	189	鉴定检测 Bt11	
Maize genome/ CaMV35S	外源	5'-tcgaaggacgaaggactcaac-3' 5'-tccatctttgggaccactgtcg-3'	170	鉴定检测 MON810	品系
HSP70/ CryIA(b)	外源	5'-agtttcctttttgtctctct-3' 5'-gatgtttgggtttgttccat-3'	194	鉴定检测 MON810	
CDPK/ CryIA(b)	外源	5'-ctctcggcgttcattgttct-3' 5'-ggtcaggctcaggctgatgt-3'	211	鉴定检测 Bt176	
PAT/ CaMV35S!	外源	5'-atggtggatggcatgatgtt-3' 5'-tgagcgaaaccctataagaacc-3'	209	鉴定检测 T14/T25	

表 A.1 (续)

基因名称	类别	引物序列	扩增长度 bp	提示	备注
CaMV35S/ PAT	外源	5'-ccttcgcaagacccttctctata-3' 5'-agatcatcaatccactcttgtggtg-3'	231	鉴定检测 T14/T25	
CaMV35S/ Cry9C	外源	5'-ccttcgcaagacccttctctata-3' 5'-gtagctgtcgggtgtagtcctcgt-3'	170	鉴定检测 CBH-351	
Cry9C/ CaMV35S!	外源	5'-tactacatcgaccgcacga-3' 5'-cctaattcccttatctggga-3'	171	鉴定检测 CBH-351	
P actin 1/ mEPSPS	外源	5'-tctcgatctttggccttgga-3' 5'-tgcagcccagcttatcgtcta-3'	430	鉴定检测 GA21	
OTP/ mEPSPS	外源	5'-acggtggaagagtcaatgtatg-3' 5'-tctccttatgggctgca-3'	270	鉴定检测 GA21	
PAT/Cry 1F	外源	5'-cttgtggtgtttgtgctct-3' 5'-tggctcctcctcgtatgt-3'	279	鉴定检测 TC1507	
CaMV 35S/ NPTII	外源	5'-gcactcaaagacctggcgaatga-3' 5'-ccatcttgggacctgtcg-3'	411	鉴定检测 MON863	
EPSPS/NOS	外源	5'-atgaatgacctcgagtaactttgtaa-3' 5'-aagagataacaggatccactcaaact-3'	108	鉴定检测 NK603	
IVS2/PAT	外源	5'-cacacaggagattattatagggtactca-3' 5-gggaataaggcgacacgg-3'	130	鉴定检测 Bt10	

表 A.2 实时荧光 PCR 实验所用引物和探针序列

基因或品系名称	引物序列	探针序列	适用范围
		5'标记 FAM;3'标记 TAMRA 或 Eclipse	
ZEIN (内源基因)	5'-tgaacctatgcatgcagt-3' 5'-ggcaagaccattggtga-3'	5'-tggcgtgtccgtcctgatgc-3'	任选其一
Adh1 (内源基因)	5'-cgtegttcccatctcttctcc-3' 5'-ccactcggagacctcagtc-3'	5'-aatcagggetcattttctcgtcctca-3'	
CaMV35S	5'-cgacagtgggtcccaaga-3' 5'-aagacgtggttggaaactcttc-3'	5'-tggacccccaccacgaggagc-3'	筛选
NOS	5'-atcgttcaaacattggca-3' 5'-attgctggactctaatacata-3'	5'-catcgcaagaccggcaacagg-3'	筛选
Bar	5'-acaagcacggtcaacacc-3' 5'-actcggcgtccagtcgta-3'	5'-ccgagccgcaggaaccgcaggag-3'	筛选
PAT	5'-gtgacatgtctccggagag-3' 5'-gcaaccaaccaagggtatc-3'	5'-tggcccggtttgtgatatcgttaa-3'	筛选

表 A.2 (续)

基因或品系名称	引物序列	探针序列	适用范围
		5'标记 FAM;3'标记 TAMRA 或 Eclipse	
NPTII	5'-aggatctcgtcgtgacccat-3' 5'-gcacgaggaagcggta-3'	5'-caccagccggccacagtcgat-3'	筛选
CryIA(b)	5'-cgcgactggatcaggtaca-3' 5'-tggggaacaggctcagat-3'	5'-ccgccgagctgacctgacctg-3'	筛选
BT11 品系	5'-tgtgtggcatttatcatcga-3' 5'-cgctcagtgaacgaaaactc-3'	5'-ttcatgaccaaataccttaactgagt-3'	品系鉴定
BT176 品系	5'-gactcagcctccggctact-3' 5'-gtgcatcaatggaggagagaac-3'	5'-tctcggtgacgggcaggacc-3'	品系鉴定
CBH351 品系	5'-agcgcgcaactaggataaa-3' 5'-cgttctgggaaggatagaatcgtc-3'	5'-cgcgcgctgtgtcatctatg-3'	品系鉴定
GA21 品系	5'-cttategttatgctatttgaactttaga-3' 5'-tggctcgcgatcctcct-3'	5'-cataataactcatatctctttcaacagcaggtgggt-3'	品系鉴定
MON810 品系	5'-gatgccttctcctagtgttga-3' 5'-ggatgcactcgttgatgtttg-3'	5'-agataccaagcggccatggacaacaa-3'	品系鉴定
MON863 品系	5'-gtaggatcggaagcttggtac-3' 5'-tgttacggcctaataatgctgaact-3'	5'-tggaacaccatccgaacaagtaggtca-3'	品系鉴定
MON89034 品系	5'-tttccatattgaccatcatactcatt-3' 5'-cggatctataataccgtggtttttaa-3'	5'-atccccgaaattatgtt-3' MGBNFQ	品系鉴定
TC1507 品系	5'-tagtctcggccagaatgg-3' 5'-ctttgccaagatcaagcg-3'	5'-taactcaaggcctcactccg-3'	品系鉴定
NK603 品系	5'-atgaatgacctcgagtaagctgttaa-3' 5'-aagagataacaggatccactcaaacact-3'	5'-tggaccacgcgacactccactc-3'	品系鉴定
T25 品系	5'-acaagcgtgtcgtgctccac-3' 5'-gacatgatactcctccaccg-3'	5'-tcattgagtcgttcccatgtg-3'	品系鉴定
Bt10 品系	5'-cacacaggagattattatagggttactca-3' 5'-acacggaatgttgaatactcatactct-3'	5'-aataacctgataaatgcttca-3'	品系鉴定
MON88017 品系	5'-gagcaggacctgcagaagct-3' 5'-tccggagttgacatcca-3'	5'-tccccttcagtttaaacagagtcgggt-3'	品系鉴定
59122 品系	5'-gggataagcaagtaaaagcgtc-3' 5'-ccttaattctcgcctcatgatcag-3'	5'-tttaactgaaggcgggaaacgacaa-3'	品系鉴定
MIR604 品系	5'-gcgacgcaattcaacag-3' 5'-ggtcataacgtgactcccttaattct-3'	5'-aggcgggaaacgacaatctgatcag-3'	品系鉴定
MIR162 品系	5'-caccttcagcaaccgaaacta-3' 5'-gcttagcctccacgatcattt-3'	5'-gtcctcgtcgtgccttcaact-3'	品系鉴定

表 A.2 (续)

基因或品系名称	引物序列	探针序列	适用范围
		5'标记 FAM;3'标记 TAMRA 或 Eclipse	
DBT418 品系	5'-gtcatttcaggaccaggattcac-3' 5'-cctctattctggatggtttgcc-3'	5'-ggaggcgacttggttagctgaattcttc-3'	品系鉴定
LY038 品系	5'-tgggttcagctcgcgaatgtt-3' 5'-aggaattcgatatcaagcttatcga-3'	5'-cgagcggagtttatgggtcgacgg-3'	品系鉴定
3272 品系	5'-tcacagaccagattctcttttatgg-3' 5'-cgtttccgccttcagtta-3'	5'-actgctgacgcggccaacaactg-3'	品系鉴定
DP98140 品系	5'-ctctatcgatccccctttga-3' 5'-gactcccttaattctccgctca-3'	5'-tcagattgctgtttccgccttcagt-3'	品系鉴定

附录 B  
(资料性附录)

商品化的转基因玉米转入的外源基因的主要信息

表 B.1 商品化的转基因玉米转入的外源基因的主要信息

植物名称	品系名称	转入的外源基因		
		启动子	结构基因	终止子
玉米	Bt176	P-35S, P-PPC, P-CDPK	bar, cry1Ab, cry1Ab, bla	T-35S, T-35S, T-35S
	676, 678, 680	P-35S, pat, dam	pat, dam	T-35S, pin II
	B16(DLL25)	P-35S	bar, bla	Tr7
	BT11 (X4334CBR, X4734CBR)	P-35S, P-35S	cry1Ab, pat	NOS, NOS
	CBH-351	P-35S, P-35S	bar, cry9c, bla	NOS, T-35S
	GA21	P-ract1/tact1, intron	mEPSPS	NOS
	MON80100	P-e35S, P-35S, P-35S, P-35S	cp4 epsps, cry1Ab, gox, npt II	NOS, NOS, NOS, NOS
	MON802	P-e35S, P-35S, P-35S, P-35S	cp4 epsps, cry1Ab, gox, npt II	NOS, NOS, NOS, NOS
	MON809	P-e35S, P-35S, P-35S	cp4 epsps, cry1Ab, gox	NOS, NOS, NOS
	MON810	P-35S	cry1Ab	T-35S
	MON832	P-e35S, P-35S, P-35S	cp4 epsps, gox, npt II	NOS, NOS, NOS
	MS3	P-35S, Ta29	bar, barnase, bla	NOS, NOS
	MS6	P-35S, Ta29	bar, barnase, bla	NOS, NOS
	NK603	P-ract1/tact1, intron, P-35S	cp4 epsps, cp4 epsps	NOS, NOS
	T14/T25	P-35S	pat, bla	T-35S
	TC1507	Ubi Zm1, P-35S	cry1F, pat	ORF25 polyA, T-35S
	MON863	P-35S, ASI, P-35S	cry3Bb1, nptII	T-hsp, NOS
	MON89034	P-35S, FMV-35S	chs, cry1A, 105, cry2Ab2	T-hsp17.3, NOS
	Bt10	P-35S, P-35S	cry1Ab, pat	NOS, NOS
	MON88017	P-ract1/tact1, intron, P-35S, ASI	cry3Bb1, cp4 epsps	NOS, T-hsp
	59122	Ubi Zm1, P-peroxidase, P-35S	cry3AAb1, cry35Ab1, pat	pin II, pin II, T-35S
	MIR604	P-mt, Ubi Zm1	cry3A, pmi	NOS, NOS
	MIR162	P-mt	vip3Aa20, pmi	NOS
	DBT418	P-35S, P-35S, P-35S	bar, cry1Ac, pinII, bla	Tr7, pin II, Tr7
LY038	P-glb1	cor dapA	glb1 3'	
3272	P-GZein/PEPC9, ZmUbiInt	amy797E, pmi	T-35S, NOS	
DP98140	ZmUbiint, CaMV35S	gat4621, als	pin II, pin II	
MON87460	P-35S	不详	NOS, NOS	
TC6257(DAS06257-8)	P-35S	Bar, cry1F	pin II, pin II	
DP-098140-6	P-35S	gat4621, zm-hra	pin II, pin II	

参 考 文 献

- [1] Protocol for event-specific quantitation of Bt11 in maize, EU-CRL.
- [2] Foodstuffs-Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products-qualitative nucleic acid based methods, prEN ISO 21570.
- [3] Event-specific method for the quantitation of maize line TC 1507 using real-time PCR Protocol, EU CRL.
- [4] Event-specific method for the quantitation of maize line MON 863 using real-time PCR, EU CRL.
- [5] Event-specific Method for the Quantification of Maize Line MON 89034 Using Real-time PCR, EU CRL.
- [6] Event-specific method for the quantitation of maize line NK603 using real-time PCR, EU-CRL.
- [7] Event-specific method for the quantitation of maize line GA21 using real-time PCR, EU-CRL.
- [8] Event-specific method for the quantitation of maize line T25 using real-time PCR, EU-CRL.
- [9] Event-specific method for the quantitation of maize line MON 88017 using real-time PCR, EU-CRL.
- [10] Event-specific method for the quantitation of maize 59122 using real-time PCR, EU-CRL.
- [11] Event-specific method for the quantitation of maize line MIR604 using real-time PCR, EU-CRL.
- [12] Long, N. , Pulliam, D. , Bottoms, J. , Meghji, M. , Hart, H. and Que, Q. 2007. Corn event MIR162. International Patent Application(WIPO WO 2007/142840 A2).
- [13] Betz, F. S. , Hammond, B. G. & Fuchs, R. L. 2000. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. *Regulatory Toxicology* 32, 156-173.
- [14] Event-specific method for the quantitation of maize line LY038 using real-time PCR, EU-CRL.
- [15] Event-specific method for the quantitation of maize event 3272 using real-time PCR, EU-CRL.
- [16] Chicoine, Timothy K. et al. 2007. Maize event DP-098140-6 and compositions and methods for the identification and/or detection thereof. United States Patent Application 20080108072.
- [17] R. Reiting, H. Broll, H.-U. Waiblinger, L. Grohmann. 2007. Collaborative Study of a T-nos Real-Time PCR Method for Screening of Genetically Modified Organisms in Food Products. *J. Verbr. Lebensm.* 2, 116-121.
- [18] M. Querci, N. Foti, A. Bogni, et al. 2009. Real-Time PCR-Based Ready-to-Use Multi-Target Analytical System for GMO Detection. *Food Anal. Methods.* 2;325-336.
-