

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3767.29—2014

出口食品中转基因成分环介导 等温扩增(LAMP)检测方法 第 29 部分:甜菜 H7-1 品系

Loop-mediated isothermal amplification detection method for genetically
modified components in food for export—
Part 29: Sugarbeet H7-1

2014-01-13 发布

2014-08-01 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

SN/T 3767《出口食品中转基因成分环介导等温扩增(LAMP)检测方法》共分为 30 部分:

- 第 1 部分:通用要求和定义;
- 第 2 部分:筛选方法;
- 第 3 部分:玉米 Bt-11 品系;
- 第 4 部分:玉米 Bt176 品系;
- 第 5 部分:玉米 GA21 品系;
- 第 6 部分:玉米 MIR162 品系;
- 第 7 部分:玉米 MIR604 品系;
- 第 8 部分:玉米 MON810 品系;
- 第 9 部分:玉米 MON863 品系;
- 第 10 部分:玉米 MON88017 品系;
- 第 11 部分:玉米 MON89034 品系;
- 第 12 部分:玉米 T-25 品系;
- 第 13 部分:玉米 3272 品系;
- 第 14 部分:玉米 59122 品系;
- 第 15 部分:大豆 A2704-12 品系;
- 第 16 部分:大豆 A5547-127 品系;
- 第 17 部分:大豆 DP356043 品系;
- 第 18 部分:大豆 GTS40-3-2 品系;
- 第 19 部分:大豆 MON89788 品系;
- 第 20 部分:水稻 Bt-63 品系;
- 第 21 部分:水稻 KF6 品系;
- 第 22 部分:水稻 KF8 品系;
- 第 23 部分:水稻 KMD 品系;
- 第 24 部分:水稻 LLRICE62 品系;
- 第 25 部分:水稻 M12 品系;
- 第 26 部分:水稻 T1C-19 品系;
- 第 27 部分:水稻 T2A-1 品系;
- 第 28 部分:小麦 B73-6-1 品系;
- 第 29 部分:甜菜 H7-1 品系;
- 第 30 部分:油菜 RT-73 品系。

本部分为 SN/T 3767 的第 29 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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这些专利的责任。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分起草单位:中华人民共和国上海出入境检验检疫局、中华人民共和国吉林出入境检验检疫局、中华人民共和国广东出入境检验检疫局、广州迪澳生物科技有限公司。

本部分主要起草人:张舒亚、李晓虹、刘金华、李富威、吕蓉、李想、谌鸿超、宋青、高东微、李志勇、石磊。

出口食品中转基因成分环介导 等温扩增(LAMP)检测方法 第 29 部分:甜菜 H7-1 品系

1 范围

SN/T 3767 的本部分规定了甜菜中转基因甜菜 H7-1 品系特异性的环介导等温扩增(LAMP)初筛检测方法。

本标准适用于甜菜及其制品中转基因甜菜 H7-1 品系特异性的定性检测。

本方法的定性检测低限为 0.5%(质量分数)。

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 19495.2 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

SN/T 3767.2—2014 出口食品中转基因成分环介导等温扩增(LAMP)检测方法 第 2 部分:筛选方法

3 防污染措施

环介导等温扩增检测过程的防污染措施应符合 GB/T 19495.2 的规定。

4 抽样与制样

按照 GB/T 19495.7 的规定执行。

5 核酸提取纯化

按照 GB/T 19495.3 的规定执行。

6 LAMP 检测方法

6.1 原理

6.1.1 一般原理

根据转基因甜菜 H7-1 品系外源基因和甜菜边界序列设计特异性内引物、外引物和环引物各一对,

特异性目标序列和引物碱基序列参见附录 A。引物特异性识别目标序列上的六个独立区域,利用 *Bst* 酶启动循环链置换反应,在甜菜 H7-1 品系特异目标序列启动互补链合成,在同一链上互补序列周而复始形成有很多环的花椰菜结构的茎-环 DNA 混合物,加入显色液,即可通过颜色变化观察判定结果。

6.1.2 显色液显色原理

SYBR Green I 是一种高灵敏的 DNA 荧光染料,可以嵌入方式结合到双链 DNA 的小沟内。当它与双链 DNA 结合时,荧光信号是游离状态的 800~1 000 倍。在不发生扩增反应时,SYBR 染料分子的荧光信号不发生改变,颜色显现为橙色;当发生扩增反应时,随着双链 DNA 的增加,SYBR 染料的荧光信号也随之大幅度增强,其信号强度可代表双链 DNA 分子的数量,同时颜色由橙色变为绿色。

6.2 仪器和设备

6.2.1 超纯水发生器。

6.2.2 水浴锅或加热模板:63.0 °C ± 0.5 °C 和 80.0 °C ± 0.5 °C。

6.2.3 离心管:0.1 mL、1.5 mL。

6.2.4 移液器:量程 0.5 μL~10 μL;量程 10 μL~100 μL;量程 100 μL~1 000 μL。

6.2.5 计时器。

6.3 试剂和材料

除另有规定外,所有试剂均为分析纯或生化试剂。

6.3.1 实验用水:应符合 GB/T 6682 中一级水的规格。

6.3.2 dNTPs 溶液:每种核苷酸浓度 10 mmol/L。

6.3.3 *Bst* DNA 聚合酶(如:NEB 公司或具有同等效果的 DNA 聚合酶):酶浓度 8 U/μL。

6.3.4 10 ThermolPol 缓冲液:含 200 mmol/L Tris-HCl(pH8.8)、100 mmol/L 硫酸铵、100 mmol/L 氯化钾、20 mmol/L 硫酸镁、1% Triton X-100。

6.3.5 硫酸镁溶液:150 mmol/L。

6.3.6 甜菜碱:5 mol/L。

6.3.7 显色液:SYBR Green I 荧光染料,1 000。

6.3.8 引物:根据转基因甜菜 H7-1 品系外源基因和甜菜边界序列设计一套特异性引物,包括外引物 1,外引物 2,内引物 1 和内引物 2,环引物 1 和环引物 2。

外引物扩增片段长度:237 bp

外引物 1(F3,5'-3'):AACACTTAGCTTGGGACAA

外引物 2(B3,5'-3'):TGATTGAACCCAATCTGGA

内引物 1(FIP,5'-3'):CCGTAATGAGAAGAGAGAAACATCATATTTCTTAATTTTTGTCAGGCGA

内引物 2(BIP,5'-3'):TCTGGGTGGCTCTAACTATTTACATTTTCTCAAGCTTGATGGGGAT

环引物 1(FLP,5'-3'):AACACAAAATGCTCATAACAGCCAC

环引物 2(BLP,5'-3):CTGAAGGCGGGAAACGACAA

6.4 检测步骤

6.4.1 阴性对照、阳性对照和空白对照的设置

6.4.1.1 阴性对照:

采用不含有待测基因序列的植物基因组 DNA 为模板。

6.4.1.2 阳性对照:

采用含有待测基因序列的植物 DNA 作为模板或含有目的基因序列的质粒 DNA 代替 DNA 模板。

6.4.1.3 设两个空白对照：

- 提取 DNA 时设置的提取空白对照(以水代替样品)；
- LAMP 反应的空白对照(以 DNA 溶解液代替 DNA 模板)。

6.4.2 内源基因检测

LAMP 检测前应先进行内源基因检测,结果阳性则表明从样品中提取的 DNA 可以进行外源基因检测;否则应重新进行 DNA 提取和纯化。内源基因的检测参照 SN/T 3767.2—2014 的规定进行。

6.4.3 甜菜 H7-1 品系 LAMP 反应体系

LAMP 反应体系见表 1。每个样品各做 2 个平行管。加样时应使样品 DNA 溶液完全加入反应液中,不要粘附于管壁上。在反应体系配制完成后,将 1 μL 显色液滴在管盖内侧,盖管盖时应小心,防止显色液混合进入反应液中。

表 1 甜菜 H7-1 品系 LAMP 反应体系

组分	工作液浓度	加样量/ μL	反应体系终浓度
ThermolPol 缓冲液	10	2.5	1
外侧上游引物(F3)	10 $\mu\text{mol/L}$	0.5	0.2 $\mu\text{mol/L}$
外侧下游引物(B3)	10 $\mu\text{mol/L}$	0.5	0.2 $\mu\text{mol/L}$
内侧上游引物(FIP(F1c+F2))	40 $\mu\text{mol/L}$	1.0	1.6 $\mu\text{mol/L}$
内侧下游引物(BIP(B1c+B2))	40 $\mu\text{mol/L}$	1.0	1.6 $\mu\text{mol/L}$
环引物 1(FLP,5'-3)	40 $\mu\text{mol/L}$	0.5	0.8 $\mu\text{mol/L}$
环引物 2(BLP,5'-3)	40 $\mu\text{mol/L}$	0.5	0.8 $\mu\text{mol/L}$
dNTPs	10 mmol/L	4	1.6 mmol/L
甜菜碱	5 mol/L	4	0.8 mol/L
硫酸镁	150 mmol/L	1	6 mmol/L
<i>Bst</i> DNA 聚合酶	8 U/ μL	1	0.32 U/ μL
DNA 模板	100 ng/ μL	2	8 ng/ μL
水	—	补足至 25.0	—

6.4.4 LAMP 反应参数

63.0 $^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ $^{\circ}\text{C}$ 恒温扩增 60 min,80.0 $^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ $^{\circ}\text{C}$ 5 min 使酶灭活,反应结束。

6.4.5 显色反应

反应结束后,将显色液与反应液上下颠倒轻轻混匀,立即在黑色背景下进行颜色观察。

6.5 质量控制

6.5.1 基本原则:实验室中设置的各种对照 LAMP 检测结果应符合以下情况。否则,任一种对照如果出现非下述正常结果,应重做实验。

6.5.2 空白对照:反应管中液体呈橙色。

6.5.3 阴性对照:反应管中液体呈橙色。

6.5.4 阳性对照:反应管中液体呈绿色。

7 结果判断和确证

7.1 待检样品 2 个平行样反应管中液体均呈橙色,同时各种实验对照结果正常,可判断该样品检测结果为阴性。

7.2 待检样品 2 个平行样反应管中液体至少 1 管呈绿色,同时各种实验对照结果正常,可判断该样品转基因甜菜 H7-1 品系初筛阳性,还应通过对外引物 PCR 扩增产物的序列测定进行确证(见附录 A)。

8 结果表述

8.1 检测结果为阴性,表述为“该样品未检出转基因甜菜 H7-1 品系”。

8.2 检测结果为转基因甜菜 H7-1 品系初筛阳性的样品,应按照确证实验情况进行结果判断和表述。



附 录 A
(资料性附录)
转基因甜菜 H7-1 品系基因序列

A.1 转基因甜菜 H7-1 品系外源基因和甜菜边界序列

AACACTTAGCTTGGGACAACTTCTGATCCTATTTCTTAATTTTTGCAGGCGATGGTGGCTGTTAT
GAGCATTGTTGTGTTTGATGTTTCTCTCTTCTCATTACGGTTTTATTGGGATCTGGGTGGCTCTAACT
ATTTACATGAGCCTCCGCGCGTTTGCTGAAGGCGGGAAACGACAATCTGATCCCCATCAAGCTT
GAGCTCAGGATTTAGCAGCATTCCAGATTGGGTTC AATCA

A.2 引物碱基序列及构成

F3: AACACTTAGCTTGGGACAA

B3: TGATTGAACCCAATCTGGA

FIP: ←^{F1c} CCGTAATGAGAAGAGAGAAACATCA ^{F2} TATTTCTTAATTTTTGCAGGCGA →

BIP: ^{B1c} TCTGGGTGGCTCTAACTATTTACA ^{B2} CTCAAGCTTGATGGGGAT

FLP: AACACAAAATGCTCATAACAGCCAC

BLP: CTGAAGGCGGGAAACGACAA