



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 5334.5—2020

转基因植物产品的数字 PCR 检测方法 第 5 部分：转基因棉花

Protocol of digital PCR for quantitatively detecting genetically
modified plants and their derived products—
Part 5: *Genetically Modified Cotton*

2020-12-30 发布

2021-07-01 实施

中华人民共和国海关总署 发布

以正式出版文本为准

前 言

SN/T 5334—2020《转基因植物产品的数字 PCR 检测方法》分为 8 个部分：

- 第 1 部分：通用要求及定义；
- 第 2 部分：转基因大豆；
- 第 3 部分：转基因玉米；
- 第 4 部分：转基因油菜；
- 第 5 部分：转基因棉花；
- 第 6 部分：转基因马铃薯；
- 第 7 部分：转基因苜蓿；
- 第 8 部分：转基因甜菜。

本文件为 SN/T 5334—2020 的第 5 部分。

本文件按照 GB/T 1.1—2020 给出的规则起草。

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。

本文件由中华人民共和国海关总署提出并归口。

本文件起草单位：中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国上海海关。

本文件主要起草人：李想、黄新新、刘静远、蔡一村、蒋静、左翠花、郭德华、朱雅君、付伟、何宇平、刘月明、朱鹏宇、黄文胜、朱水芳。

以正式出版文本为准

以正式出版文本为准

转基因植物产品的数字 PCR 检测方法

第 5 部分：转基因棉花

1 范围

本文件规定了 GHB119、T304-40、GHB614、LLCotton25、MON1445、MON15985-7、MON88913 等 7 个转基因棉花品系的转化事件特异性数字 PCR 检测方法。

本文件适用于棉籽、棉籽粕、棉花叶子中上述 7 个转基因棉花品系的检测。本文件的定量检测下限为 40 pg（约 20 拷贝）棉花基因组 DNA 或 0.1%（w/w）含量转基因棉花品系成分。

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而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。

SN/T 5334.1 转基因植物产品的数字 PCR 检测方法 第 1 部分：通用要求及定义

3 术语和定义

SN/T 5334.1 界定的术语与定义适用于本文件。

4 方法原理

见 SN/T 5334.1

5 主要设备及试剂

5.1 内源基因和外源基因：内源基因为 *Adhc* 基因；外源序列为品系 GHB614、MON1445、MON88913 外源基因插入位点 5' 端跨边界序列，品系 GHB119、T304-40、LLCotton25、MON15985-7 外源基因插入位点 3' 端跨边界序列。引物及探针序列参见附录 A。

5.2 其他设备及试剂要求见 SN/T 5334.1 的规定。

6 方法操作步骤

6.1 一般性操作步骤

一般性操作步骤按照 SN/T 5334.1 的规定执行。

6.2 数字 PCR 反应体系配制

按表 1 将各组分加入洁净离心管中，充分混匀。PCR 体系配制及转移时尽量避免产生气泡。每个测试样和质控样品的 *Adhc* 基因及转化体特异性序列的数字 PCR 应设置至少 3 个平行重复。

表 1 数字 PCR 反应体系

试剂	终浓度
2 × 数字 PCR 预混液	1 ×
上游引物（10 μmol/L）	0.9 μmol/L
下游引物（10 μmol/L）	0.9 μmol/L
荧光标记探针（10 μmol/L）	0.25 μmol/L
DNA 模板	—
dH ₂ O（无菌水）	—
注：数字 PCR 反应体系的总体积可根据不同厂家、型号的数字 PCR 仪作相应调整。PCR 体系配制及转移时尽量避免产生气泡。	

6.3 数字 PCR 反应程序

根据仪器要求，将配制好的数字 PCR 反应混合液，加入微反应体系生成装置的加样孔中，按仪器操作说明生成微反应体系。将微反应体系放置于 PCR 扩增仪中，按以下参数进行 PCR 扩增：95 ℃，5 min（1 ℃/s），1 个循环；94 ℃，15 s，59 ℃，1 min（1 ℃/s），40 个循环；98 ℃ 10 min（1 ℃/s），1 个循环；12 ℃ 保存反应产物。对微反应体系进行荧光检测，记录阳性和阴性微反应体系数量及其比值。根据比值分别计算数字 PCR 反应体系中的 Adhc 基因拷贝数（copies/μL）和品系特异性序列拷贝数（copies/μL）。

注：PCR 反应参数可根据基因扩增仪型号的不同进行适当的调整。

7 结果判定与表述

结果计算见 SN/T 5334.1。

——检测结果中内标准基因与外源基因均符合阴性以及空白的质量控制要求，说明该样品未检出棉花内标准 Adhc 基因，表述为“该样品未检出棉花成分”；

——检测结果中，内标准基因结果为阳性，但是外源基因符合阴性以及空白的质量控制要求，说明该样品检出棉花内标准 Adhc 基因，但未检出品系特异性序列，表述为“该样品未检出转基因棉花 XX 品系成分”；

——检测结果中，内标准基因与外源基因均符合数字 PCR 检测的质量控制要求，说明该样品转基因棉花 XXX 品系检测为阳性且满足定量要求，表述为“该样品检出转基因棉花 XXX 品系成分，含量为 XX%”。

8 防污染措施

防污染措施见 SN/T 5334.1 的规定。

9 样品保存

样品保存见 SN/T 5334.1 的规定。

附 录 A
(资料性附录)
转基因棉花品系特异性序列

A.1 品系特异性序列

A.1.1 转基因棉花 GHB119 3' 端品系特异性序列

CCAGTACTAAAATCCAGATCATGCATGGACCTGCAGGTCGACGGCCGAGTACTGTTTTATTTTAAAC
AGGAATTTGAGTCACGCAATTTC

A.1.2 转基因棉花 T304-40 3' 端品系特异性序列

AGCGCGCAAAGTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATCTCCTTTTTCTTTTCAAGTTATCCC
AAGATCTAGG

A.1.3 转基因棉花 GHB614 5' 端转化体特异性序列

CAAATACACTTGGAACGACTTCGTTTTAGGCTCCATGGCGATCGCTACGTTCTAGAATTCCTGCAGG
TCGAGTCGCGACGTACGTTTCAACAATTGGTTTTAAAAGCTTGCATGCCTGC

A.1.4 转基因棉花 LLCotton25 3' 端转化体特异性序列

CAAGGAACTATTCAACTGAGCTTAACAGTACTCGGCCGTCGACCGCGGTACCCGGAATCCAATCCC
ACAAAAATCTG

A.1.5 转基因棉花 MON1445 5' 端转化体特异性序列

GGAGTAAGACGATTCAGATCAAACACTGATAGTTTAAACTGAAGGCGGGAAACGACAATCTGATCC
CAGCTTGGGCTGCAGGTCGAT

A.1.6 转基因棉花 MON15985-7 3' 端转化体特异性序列

GTTACTAGATCGGGGATATCCCCGGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCTGCACTGAAATCCCAT
CCATTTAGCAACCTT

A.1.7 转基因棉花 MON88913 5' 端转化体特异性序列

CAAATTACCCATTAAAGTAGCCAAATTACAAATTTTAATTCAATGTAGTCAAACACTGATAGTTTAAA
CATGACTCTCTTAAGGTAGCCAAAGCC

注：阴影部分为转基因棉花品系外源插入片段序列，带下划线部分为棉花基因组序列。

A.2 引物及探针序列

引物及探针序列见表 A.1。

表 A.1 引物和探针序列

扩增基因	名称	序列 (5'-3')	PCR 扩增片段长度 /bp
棉花内参照基因 Adhc	上游引物	CACATGACTTAGCCCATCTTTGC	73
	下游引物	CCCACCCTTTTTTGGTTTAGC	
	探针	FAM-TGCAGGTTTTTGGTGCCACTGTGAATG-BHQ1	
GHB119 3' 端转化 体特异性序列	上游引物	CCAGTACTAAAAATCCAGATCATGCA	90
	下游引物	GAAATTGCGTGACTCAAATTCC	
	探针	FAM-CCTGCAGGTCGACGGCCGAGTAC-BHQ1	
T304-40 3' 端转化 体特异性序列	上游引物	AGCGCGCAAAGTACGATAAAATT	78
	下游引物	CCTAGATCTTGGGATAAATTGAAAAGA	
	探针	FAM-CGGTGTCATCTATCTC-MGB	
GHB614 5' 端转化 体特异性序列	上游引物	CAAATACACTTGGAACGACTTCGT	120
	下游引物	GCAGGCATGCAAGCTTTTAAA	
	探针	FAM-CTCCATGGCGATCGCTACGTTCTAGAATT-BHQ1	
LLCotton25 3' 端转化 体特异性序列	上游引物	CAGATTTTTGTGGGATTGGAATTC	78
	下游引物	CAAGGAACTATTCAACTGAG	
	探针	FAM-CTTAACAGTACTCGGCCCTCGACCCG-BHQ1	
MON1445 5' 端转化 体特异性序列	上游引物	GGAGTAAGACGATTTCAGATCAAACAC	87
	下游引物	ATCGACCTGCAGCCCAAGCT	
	探针	FAM-ATCAGATTGTCCTTTCCCGCCTTCAGTTT-BHQ1	
MON15985-7 3' 端 转化体特异性序列	上游引物	GTTACTAGATCGGGGATATCC	82
	下游引物	AAGGTTGCTAAATGGATGGGA	
	探针	FAM-CCGCTCTAGAAGTGTGATCTGCACTGAA-BHQ1	
MON88913 5' 端转化 体特异性序列	上游引物	GGCTTTGGCTACCTTAAGAGAGTC	94
	下游引物	CAAATTACCCATTAAAGTAGCCAAATTAC	
	探针	FAM-AACTATCAGTGTGTTGACTACAT-MGB	

以正式出版文本为准

以正式出版文本为准

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
转基因植物产品的数字 PCR 检测方法
第 5 部分：转基因棉花
SN/T 5334.5—2020

*

中国海关出版社有限公司出版发行
北京市朝阳区东四环南路甲 1 号（100023）
编辑部：（010）65194242-7509
网址 www.customskb.com/book
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.5 字数 14 千字
2021 年 6 月第一版 2021 年 6 月第一次印刷
印数 1—000

*

书号：000·000 定价 14.00 元



SN/T 5334.5-2020