



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 5334.1—2020

转基因植物产品的数字 PCR 检测方法 第 1 部分：通用要求和定义

Protocol of digital PCR for quantitatively detecting genetically
modified plants and their derived products—
Part 1: General requirements and definitions

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》共分为 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 1 部分。

本文件按照 GB/T1.1—2020 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、中华人民共和国南宁海关技术中心、中华人民共和国广州海关技术中心。

本文件主要起草人：付伟、朱鹏宇、杜智欣、魏霜、王晨光、郑明慧、朱水芳、黄文胜。

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 1 部分：通用要求和定义

1 范围

本文件规定了转基因植物产品的转基因成分数字 PCR 检测方法的范围、规范性引用文件、缩略语、术语和定义、原理、方法建立步骤、结果判定和样品保存的内容。

本文件适用于转基因植物产品中转基因成分数字 PCR 定量检测。

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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和实验方法
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 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

转基因 transgene

将亲本物种中本来不具有的、来源于其他物种的功能基因序列，通过各种手段导入亲本物种的基因组中，使其在亲本物种中表达，以获得相对应的性状。

3.2

转基因植物品系 genetically modified plant events

通过转基因技术，将功能基因片段导入亲本植物基因组中，使亲本植物获得可遗传的目的性状。获得目的性状的亲本植物成为转基因植物品系。

3.3

转基因转化事件特异性检测 event-specific GMO content detection

转基因植物品系中，外源基因旁边的植物内源基因序列称为侧翼序列。对于不同的转基因植物品系，侧翼序列是唯一的。因此，扩增目的片段位于外源基因与侧翼序列交界处的检测方法称为转基因转化事件特异性检测方法。

3.4

数字 PCR digital PCR

一种绝对定量的 PCR 技术。将 PCR 体系分配成大量微反应体系进行 PCR 扩增，扩增后对微反应

体系进行荧光信号阅读，通过阳性率和泊松分布计算获得样品中靶序列拷贝数浓度。

3.5

转换系数 multiplication factor

将转化体特异性序列和内标准基因拷贝数浓度之比转换为转基因成分含量（W/W）时所用系数。

3.6

定量限 limit of quantitation

线性动态范围内，符合精密度条件的最低拷贝数浓度。

3.7

检出限 limit of detection

线性动态范围内，能稳定检出最少 2 个微反应体系为阳性信号的最低拷贝数浓度。

3.8

再现性 repeatability

由两个不同操作人员，在两个不同时间段，对相同质量分数的样品（包括目标浓度样品、检出限样品、定量限样品和阴性样品）进行测试所取得的结果。

4 原理

数字 PCR 是在荧光 PCR 基础上发展起来的基因拷贝数定量检测技术，用于核酸模板的绝对拷贝数的测定。通过将含有模板、引物 / 荧光探针、耐热 DNA 复制酶及其缓冲液的荧光 PCR 反应体系充分混匀，等量均分为相互隔离的大数量（大于 10 000 个）微反应体系，使每个模板独立随机地分配至微反应体系中；所有微反应体系同时在相同的规定条件下进行 PCR 扩增反应，根据设定的荧光阈值判断每个微反应体系的扩增结果；依据微反应体系的阳性率和泊松分布公式计算得到数字 PCR 反应体系中的模板浓度。

5 仪器设备、试剂及耗材

5.1 仪器设备

5.1.1 分析天平：感量 0.1 mg。

5.1.2 生物安全柜（超净工作台）。

5.1.3 数字 PCR 系统：微反应体系发生器或其他具有同样功能的仪器、微反应体系荧光检测仪或其它具有同样功能的仪器。

5.1.4 PCR 扩增仪。

5.1.5 恒温孵育器：控温精度 $\pm 1.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

5.1.6 样品粉碎机：可将棉籽、棉籽粕等样品磨成 60 目左右的粉末。

5.1.7 微量移液器：100 μL ~1 000 μL 、20 μL ~200 μL 、10 μL ~100 μL 、0.5 μL ~10 μL 、0.1 μL ~2.5 μL 。

5.1.8 重蒸馏水发生器或纯水仪。

5.1.9 涡旋振荡仪。

5.1.10 核酸检测仪：核酸 / 蛋白含量测定分光光度计、微量分光光度计或其他核酸检测仪。

5.1.11 离心机：离心力 $\geq 12\ 000\text{ g}$ 。

5.2 试剂及耗材

除非有特殊说明，试剂和材料质量应符合 GB/T 19495.1 的要求。重蒸馏水或符合 GB/T 6682 规定的一级水要求。

5.2.1 CTAB 法基因组提取试剂或等效的 DNA 提取试剂盒。

5.2.2 数字 PCR 微反应体系生成联排管及覆膜或芯片。

5.2.3 96 孔荧光定量 PCR 反应板和封膜。

5.2.4 0.2 mL 和 1.5 mL 离心管。

5.2.5 数字 PCR 反应预混液：含有镁离子、dNTPs 和具有 5'-3' 外切活性的热启动 *Taq* 酶及缓冲液的数字 PCR 专用预混试剂。

6 一般性操作步骤

6.1 抽样

按照 GB/T 19495.1 和 GB/T 19495.7 的规定执行。

6.2 制样

按照 GB/T 19495.1 和 GB/T 19495.7 的规定执行。

6.3 试样预处理

按照 GB/T 19495.1 和 GB/T 19495.3 的规定执行。

6.4 DNA 模板制备

按照 GB/T 19495.1 和 GB/T 19495.3 的方法或采用具有相同效果的植物基因组 DNA 提取试剂盒进行 DNA 提取。提取后的 DNA 用紫外分光光度计测定 260 nm 和 280 nm 处吸收值，分别计算核酸的纯度和浓度：DNA 纯度以 OD_{260}/OD_{280} 表示，该值应在 1.7~1.9；DNA 浓度 $=50 \times OD_{260}$ mg/mL，浓度不低于 20 ng/L。

7 方法建立步骤

7.1 一般性要求

检测样品中 DNA 的提取和含量测定应按照 GB/T 19495.3 的规定执行。对样品进行 DNA 提取时要保证 DNA 的质量和浓度的稳定，以保证数字 PCR 反应的稳定性和可重复性。检测样品 DNA 进行数字 PCR 检测时需要进行平行实验。

数字 PCR 反应体系中包括数字 PCR 扩增预混液、外源基因以及内标准基因的引物和探针、DNA 模板和水。其中数字 PCR 扩增预混液终浓度为 $1 \times$ ，外源基因与内标准基因引物终浓度在 $0.3 \mu\text{mol/L} \sim 1 \mu\text{mol/L}$ ，探针终浓度在 $0.15 \mu\text{M} \sim 0.5 \mu\text{M}$ ，DNA 模板的量在 10 ng ~100 ng。反应程序根据不同引物探针以及扩增片段而不同，退火温度在 $55^\circ\text{C} \sim 65^\circ\text{C}$ ，延伸时间根据片段长度而定。

7.2 数字 PCR 反应设计

7.2.1 引物探针要求

7.2.1.1 引物设计原则

引物设计应遵循以下原则：

- a) 引物设计以各个品系的转化事件特异性序列为模板设计。与常规定量 PCR 类似，要求扩增片段需要小于 200 bp，最短不得低于 50 bp；
- b) 用于进行数字 PCR 定量的引物序列长度应该在 15 bp~30 bp，所使用探针长度应在 20 bp~35 bp；
- c) 引物、探针中的 GC 含量应该在 40%~60%；
- d) 数字 PCR 引物 T_m 值应在 55 ℃~65 ℃；探针 T_m 值应在 65 ℃~75 ℃。

7.2.1.2 引物的验证

引物的验证如下：

- a) 引物、探针的验证需要分为两步，首先为理论特异性验证，其次为实验特异性验证；
- b) 理论性评价至少应该在一个主要的核酸序列数据库（如 GenBank 等）里面进行 Blast 序列同源性比对，评价其他生物体中是否具有该引物的同源序列；
- c) 实验特异性验证主要确认该引物探针在其他转基因品系的交叉扩增反应情况。

7.2.2 数字 PCR 方法验证

对建立的数字 PCR 方法，在实验室内进行确认时，应达到以下要求：

- a) 精密度（重复性的相对标准偏差 RSD_r）：线性动态范围内的重复性相对标准偏差 RSD_r 一般应 ≤ 25%；
- b) 正确度：在整个线性动态范围内，用正确度表示多次测试的均值与采纳的标准值之间的接近程度，且偏差不应超过标准值的 25%；
- c) 再现性：由两个不同操作人员，在两个不同时间段，对不同质量分数的样品（包括目标浓度样品、检出限样品、定量限样品和阴性样品）进行测试。若全部测试样品的测试结果与预期一致，表明方法再现性符合要求。否则，重新进行相关测试。

7.2.3 质控组

数字 PCR 反应需设立至少包括一个标准参照样品质控组、一个阴性质控组和一个空白试剂质控组，质控组的设置应符合 GB/T 19495.1 的规定。

8 结果判定

8.1 结果计算

8.1.1 体系中目的分子拷贝数的计算

根据泊松分布，体系中内标准基因分子或者外源基因分子可以根据阳性体系个数以及总体系个数得到。按照式（1）和（2）计算：

$$A = -\ln\left[\frac{N-X}{N}\right] \times N \quad \dots\dots\dots (1)$$

$$B = -\ln\left[\frac{N-Y}{N}\right] \times N \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中：

A——代表体系中内标准基因分子的绝对拷贝数；

N——总分割体系数。

X——代表内标准基因分子的阳性体系数；

B——代表体系中外源基因分子的绝对拷贝数；

Y——代表外源基因分子的阳性体系数；

结果四舍五入取整。

8.1.2 单孔转基因 XXX 成分含量的计算

试样中转基因成分外源基因拷贝数质量分数按照式（3）计算：

$$\text{转基因} \times \times \times \text{成分拷贝数质量分数} = [A/B] \times 100\% \quad \dots\dots\dots (3)$$

样品中转基因成分质量百分比通过不同作物中的转化系数进行评价。

8.1.3 试样中转基因 XXX 成分含量的计算

试样组数字 PCR 反应设置 3 组平行，在保证实际计算拷贝数大于 10，并且阳性体系数量低于总体体系数量的 80% 的前提下，按式（4）计算相对标准偏差：

$$RSD = \left[\sqrt{\frac{(X_1 - X)^2 + (X_2 - X)^2 + (X_3 - X)^2}{3}} / X \right] \times 100\% \quad \dots\dots\dots (4)$$

式中：

X_1, X_2, X_3 ——分别为三次所测平行组的转基因成分含量；

X ——三次平行组的平均转基因成分含量。

若平行组内相对标准偏差（RSD）值应小于 25%，其三次平行所测得的平均值作为该组试样的转基因成分含量进行后续分析。

两个试样转基因成分含量的相对相差按式（5）计算：

$$\text{相对相差} = \frac{|b-a|}{m} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (5)$$

式中：

a, b ——两次试样的平均转基因成分定量结果；

m —— a 和 b 的平均数。

如相对相差大于或等于 35%，则测试结果应放弃，并重做样品制备及后续实验。

如两个试样的相对相差小于 35%，则样品的测试结果按式（6）计算：

$$X = (a+b)/2 \quad \dots\dots\dots (6)$$

8.2 质量控制

数字 PCR 体系分割过程中产生的有效微小体系的总数量不得低于平台理论数的 60%；阳性体系的数量不得超过总体体系数量的 80%。

数字 PCR 空白和阴性对照理论检测结果应为零。但在实际检测中，允许有极少量阳性体系数出现。阴性对照与空白对照中阳性小体系数应小于实际有效体系数的 0.03%。

以上质控条件中有一项不符合者，试验结果应放弃，并重新进行数字 PCR 试样组以及对照组的实验。

9 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。

10 样品保存

存查样品应视样品的状态采用相应的保存方式，妥善保存 6 个月。如检测为含有转基因成分，则样品保存期为 1y，以备复验、谈判和仲裁。

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 1 部分：通用要求和定义
SN/T 5334.1—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 0.75 字数 16 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 16.00 元



SN/T 5334.1—2020