ICS 65.020.01
CCS B 16

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 5334.8—2020

转基因植物产品的数字 PCR 检测方法 第 8 部分：转基因甜菜

Protocol of digital PCR for quantitatively detecting genetically modified plants and their derived products—Part 8: *Genetically modified sugarbeet*

以正式出版文本为准

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 8 部分。

本文件按照 GB/T1.1—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、中华人民共和国广州海关检验检疫技术中心。

本文件主要起草人：高东微、刘津、付伟、李志勇、李婷、朱水芳、董洁。

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 8 部分：转基因甜菜

1 范围

本文件规定了进、出口甜菜中转基因品系特异性的数字 PCR（dPCR）定量检测方法。

本文件适用于甜菜中转基因 H7-1 品系特异性的成分定量检测。本文件的定量检测低限为 2.8 拷贝 /μL，定性检测低限为 0.56 拷贝 /μL。

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 转基因产品定量检测数字 PCR 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：内标准基因为谷氨酰胺合成酶基因（GS）；外源序列为 H7-1 品系特异性序列外源基因插入位点 5’ 端跨界序列。转基因甜菜 H7-1 品系特异性基因序列参见附录 A，特异性 dPCR 定量检测所用引物探针序列见表 1。

表 1　引物和探针序列

基因 / 品系名称	序列		扩增长度 /bp	类型
GS	上游引物（F）	GACCTCCATATTACTGAAAGGAAG	118	内标准基因
	下游引物（R）	AGTAATTGCTCCATCCTGTTCA		
	探针（P）	VIC-TCTACGAAGTTTAAAGTATGTGCCGCTCTC-BHQ1		
H7-1 品系特异性	上游引物（F）	GGGATCTGGGTGGCTCTAACT	107	外源基因
	下游引物（R）	ACGAATGCTGCTAAATCCTGAG		
	探针（P）	FAM-AAGGCGGGAAACGAC-MGBNFQ		

5.2　其他设备及试剂要求见 SN/T 5334.1 的规定。

以正式出版文本为准

6 方法操作步骤

6.1 一般性操作步骤

一般性操作步骤见 SN/T 5334.1 的规定。

6.2 数字 PCR 反应体系

按照表 2 配制数字 PCR 的最终反应体系。

表 2 数字 PCR[a] 实验反应体系

试剂[b]	储备液浓度	体积	终浓度
MasterMix	2 ×	10 μL	1 ×
内标准基因 -F	10 μmol/L	0.8 μL	0.4 μmol/L
内标准基因 -R	10 μmol/L	0.8 μL	0.4 μmol/L
内标准基因 -P	10 μmol/L	0.4 μL	0.2 μmol/L
外源基因 -F	10 μmol/L	0.8 μL	0.4 μmol/L
外源基因 -R	10 μmol/L	0.8 μL	0.4 μmol/L
外源基因 -P	10 μmol/L	0.4 μL	0.2 μmol/L
DNA 模板	—	2	—
水	—	补水至 20 μL	—

a：推荐使用市面上现售的数字 PCR 平台进行实验。
b：最终反应体系中试剂添加的种类和总体系体积可能会根据不同的数字 PCR 平台产生差异。进行不同数字 PCR 平台的体系配置时，需要参照不同平台数字 PCR 仪说明书，并且需要保证表 1 中所列组分的终浓度不变。

6.3 数字 PCR 反应程序

按照表 3 的程序进行数字 PCR 扩增。

表 3 数字 PCR 反应程序

	反应温度	反应时间	循环数
热启动[a]	95 ℃	5 min	1
热循环（扩增）[b]	94 ℃	15 s	49
	60 ℃	1 min	

a：根据不同数字 PCR 平台的要求，可以对反应程序中热启动步骤进行修改，但是不得修改热循环（扩增）步骤。
b：根据不同数字 PCR 平台的要求，有可能要在热循环（扩增）步骤结束后进行后处理，本后处理步骤按照不同数字 PCR 平台说明书进行。

7 结果判定与表述

结果计算和判定见 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，说明该样品未检出甜菜内标准 GS 基因，表述为“该样品未检出甜菜成分”；

以正式出版文本为准

——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，说明该样品检出甜菜内标准 GS 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甜菜 XXX 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，说明该样品转基因甜菜 XXX 品系检测为阳性且满足定量要求，表述为“该样品检出转基因甜菜 XXX 品系成分，含量为 ×%”。

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。

以正式出版文本为准

附　录　A
（资料性附录）
转基因甜菜 H7-1 品系特异性基因序列

转基因甜菜 H7-1 品系外源基因和甜菜边界序列（来自 US7335816B2）

1 CTCGAGCGGC CGCCAGTGTG ATGGATATCT GCAGAATTCG CCCTTATGTT ATCTTTACCA
61 CAGTTTGTTG CTCTGACACA ACCGGTAAAT GCATTGGCCT TTGTTTTTGA TGGCATCAAC
121 TTTGGAGCAT CTGATTTTGC ATATTCAGCC TTTTCCATGG TAATTCTTTT ACAAGAATTT
181 TCATTCTTTC TTAAGTATAA ACACTTAGCT TGGGACAAAC TTCTGATCCT ATTTCTTAAT
241 TTTTGCAGGT GATGGTGGCT GTTATGAGCA TTTTGTGTTT GATGTTTCTT TCTTCTCATT
301 ACGGTTTTAT TGGGATCTGG GTGGCTCTAA CTATTTACAT GAGCCTCCGC GCGTTTGCTG
361 AAGGCGGGAA ACGACAATCT GATCCCCATC AAGCTTGAGC TCAGGATTTA GCAGCATTCC
421 AGATTGGGTT CAATCAACAA GGTACGAGCC ATATCACTTT ATTCAAATTG GTATCGCCAA
481 AACCAAGAAG GAACTCCCAT CCTCAAAGGT TTGTAAGGAA GAATTCTCAG TCCAAAGCCT

注：带下划线部分为甜菜基因组序列，阴影部分分别为上下游引物序列，带方框部分为探针序列，扩增产物片段 107 bp。

以正式出版文本为准

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 8 部分：转基因甜菜
SN/T 5334.8—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

