ICS 65.020.01
B 04

中华人民共和国国家标准

农业农村部公告第323号—9—2020

转基因植物及其产品成分检测 环介导等温扩增方法制定指南

Detection of genetically modified plants and derived products—Guidelines for establishing loop-mediated isothermal amplification method

2020-08-04 发布　　2020-11-01 实施

中华人民共和国农业农村部　发布

前　言

本标准按照 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。

本标准由中华人民共和国农业农村部提出。

本标准由全国农业转基因生物安全管理标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：农业农村部科技发展中心、上海交通大学、中国农业科学院生物技术研究所。

本标准主要起草人：杨立桃、王颢潜、宛煜嵩、章秋艳、张大兵、宋贵文。

农业农村部公告第 323 号—9—2020

转基因植物及其产品成分检测 环介导等温扩增方法制定指南

1 范围

本标准规定了转基因植物及其产品成分检测的环介导等温扩增方法制定的要求和程序。

本标准适用于转基因植物及其产品成分检测的环介导等温扩增方法的制定。

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。

农业部 2259 号公告—4—2015 转基因植物及其产品成分检测 定性 PCR 方法制定指南

农业部 2259 号公告—5—2015 转基因植物及其产品成分检测 实时荧光定量 PCR 方法制定指南

NY/T 672 转基因植物及其产品检测 通用要求

3 术语和定义

NY/T 672、农业部 2259 号公告—4—2015、农业部 2259 号公告—5—2015 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

环介导等温扩增方法 loop-mediated isothermal amplification, LAMP

利用序列特异性引物，在具有链置换活性的 DNA 聚合酶(Bst DNA polymerase)作用下，在最优温度条件下(60℃～65℃)对靶序列进行恒温非线性化扩增的一种方法。

4 要求

4.1 转基因植物环介导等温扩增方法的制定单位应是具备条件和能力的技术机构。

4.2 转基因植物环介导等温扩增方法的制定单位应具备开展转基因生物检测工作所需的仪器设备和环境设施。

4.3 转基因植物环介导等温扩增方法的研制人员应具备转基因生物检测相关业务知识。

5 技术路线

根据拟制定的标准方法的目的，制定标准方法研制的技术路线。技术路线主要包括方法建立和实验室间验证等内容，如图 1 所示。

6 方法建立

6.1 实验材料选择

根据方法扩增的靶序列的类型，如筛选检测方法、基因特异性检测方法、构建特异性检测方法、转化体特异性检测方法等，选择合适的实验材料用于检测方法的建立。实验材料至少应包括：

a) 含有靶序列的转基因植物及其加工产品；

b) 不含靶序列的转基因植物；

c) 不含靶序列的非转基因植物。

6.2 技术参数确定

6.2.1 靶序列选择确认



图 1 标准方法研制的技术路线

根据预期拟制定的方法，选择合适的转基因外源插入序列、转化体特异性序列和内标准基因，通过文献检索、测序及序列比对等方式，确定等温扩增的候选靶序列的正确性。

6.2.2 引物设计和筛选

6.2.2.1 环介导等温扩增引物的设计一般由内侧和外侧 2 对引物和/或第 3 对环引物组成。

6.2.2.2 环介导等温扩增的靶序列长度一般为 150 bp～250 bp。

6.2.2.3 环介导等温扩增引物的设计可以用专业软件设计完成。

6.2.2.4 筛选的引物应保证其对靶序列具有严格的特异性扩增和符合要求的检测灵敏度。

6.2.3 反应体系和反应程序确定

6.2.3.1 环介导等温扩增反应体系生化和化学试剂组成相对固定，但各成分之间的比例可以根据靶序列和引物进行优化。

6.2.3.2 环介导等温扩增反应体系中的模板 DNA 质量不宜超过 100 ng，反应体系总体积不宜超过 50 μL。

6.2.3.3 环介导等温扩增反应温度为 60℃～65℃，扩增时间一般为 20 min～60 min。

6.2.3.4 环介导等温扩增反应中，应对引物、甜菜碱、镁离子、Bst DNA 聚合酶等组分含量及反应温度进行实验优化和验证，以确定最适宜的扩增反应体系和反应温度。

6.2.4 扩增结果判断

6.2.4.1 凝胶电泳

环介导等温扩增反应产物可以利用琼脂糖凝胶电泳、毛细管凝胶电泳等电泳技术进行分析。阳性扩增产物典型的琼脂糖凝胶电泳分析结果是梯度条带，阴性结果无条带。

注：环介导等温扩增反应非常灵敏，扩增产物在凝胶电泳分析时，易产生污染。实验操作时，需做好必要的防污染措施。

6.2.4.2 颜色反应

在环介导等温扩增反应体系中加入荧光或化学指示剂，根据扩增反应是否发生颜色反应和颜色变化判断扩增结果。例如，在反应体系中加入 SybrGreen Ⅰ荧光染料时，阳性扩增反应颜色将由橙色变为绿色，阴性扩增反应颜色保持橙色不变。

6.2.4.3 其他方法

根据浑浊度的数值和变化判断阳性和阴性扩增结果等。

6.3 方法特异性测试

根据靶序列类型，选择最合适的、具有代表性的实验材料作为测试样品，确定方法的特异性。

仅有含靶序列的测试样品获得预期的特异性扩增，而其他样品未获得预期特异性扩增，表明方法特异性符合要求。

6.4 方法灵敏度测试和表述

6.4.1 利用含有靶序列的转基因植物或含有靶序列的重组DNA分子，制备含有靶序列的绝对量或浓度的系列梯度稀释测试样品，根据测试结果，确定方法的检测灵敏度。

6.4.2 灵敏度测试时，每个测试样品的平行次数不低于60次。

6.4.3 检测灵敏度用可检测出的最低靶序列的绝对分子数表示，或含有靶序列的DNA量与总DNA量的比值表示。

6.5 方法再现性测试

在同一实验室，由不同操作人员，在不同时间段，利用不同的仪器设备，对同一样品进行测试；根据测试的结果考察制定的方法在实验室内的再现性。

7 实验室间验证

7.1 样品设计

7.1.1 实验室间验证样品应该包括阳性对照样品、阴性对照样品、空白对照样品、特异性测试样品和灵敏度测试样品。

7.1.2 阳性对照样品：含有靶序列的转基因植物或其加工产品，或含有靶序列的质粒DNA分子。

7.1.3 阴性对照样品：不含靶序列的非转基因植物。

7.1.4 空白对照样品：灭菌水或者片段化的鲑鱼精子DNA溶液。

7.1.5 特异性测试样品：不含靶序列的转基因植物、转基因植物加工产品或含有非靶序列的外源基因的DNA样品。

7.1.6 灵敏度测试样品：系列不同浓度/拷贝数梯度含有靶序列的转基因植物或转基因植物基因组DNA样品。

7.2 验证项目

按照优化建立的方法参数，分别对实验室间验证样品进行检测，验证方法的特异性、灵敏度和再现性。

7.3 结果分析

依据验证单位出具的验证报告，从以下方面对所制定的方法进行综合分析：

a) 特异性分析：只有阳性对照样品和含有靶序列的特异性测试样品检测出预期DNA片段及带型，其他样品未检测出预期DNA片段及带型，表明方法的特异性符合要求；

b) 灵敏度分析：根据验证单位灵敏度测试样品的结果进行统计分析，确定方法的灵敏度；

c) 再现性分析：根据特异性和灵敏度样品验证结果的符合性和一致情况，分析方法的实验室间再现性。

农业农村部公告第323号—9—2020

中华人民共和国
国家标准
转基因植物及其产品成分检测
环介导等温扩增方法制定指南
农业农村部公告第323号—9—2020
*　　*　　*
中国农业出版社出版
（北京市朝阳区麦子店街18号楼）
（邮政编码：100125　　网址：www.ccap.com.cn）
北京印刷一厂印刷
新华书店北京发行所发行　各地新华书店经销
*　　*　　*
开本 880mm×1230mm 1/16　　印张 0.5　　字数 10千字
2020年10月第1版　　2020年10月北京第1次印刷
书号：16109·8264
定价：12.00元

版权专有　侵权必究
举报电话：（010）59194261

农业农村部公告第323号—9—2020