《转基因食品中gat基因实时荧光PCR检测法》

编制说明

目 录

[1. 标准立项的背景及意义 3](#_Toc128747487)

[1.1. 方法起草单位与主要起草人 3](#_Toc128747488)

[1.2. 目的和意义 3](#_Toc128747489)

[1.3. 起草过程 4](#_Toc128747490)

[2. 第一阶段 项目团体标准正式立项 5](#_Toc128747491)

[3. 与国内外有关法律法规和其它标准的关系 5](#_Toc128747492)

[4. 标准的制定与起草原则 6](#_Toc128747493)

[5. 实验结果 6](#_Toc128747494)

[5.1 材料与仪器 6](#_Toc128747495)

[5.2 方法 6](#_Toc128747496)

[5.3 转基因食品中gat基因实时荧光PCR检测法建立 7](#_Toc128747497)

[5.4 实际样品检测 8](#_Toc128747498)

[6. 起草过程中主要分歧意见的处理情况 9](#_Toc128747499)

# 标准立项的背景及意义

* 1. 方法起草单位与主要起草人

本方法主要起草单位：深圳市计量质量检测研究院

本方法主要起草人：朱成杰，林霖、王坤、曾玮、余灏、张世伟、赖心田、杨国武。

* 1. 目的和意义

目前获得农业部批准安全证书的转基因作物有大豆、油菜籽、玉米、大米等近100种。规定可作为加工原料使用。按照最新《食品安全法》规定，应对使用了转基因原料的食品标注含转基因成分，因此转基因检测的需求量逐年递增。

gat基因来源于地衣芽孢杆菌（*Bacillus licheniformis*），其表达产物是草甘膦N-乙酰转移酶（glyphosate N-acetyltransferase enzyme），能够通过转乙酰基的反应将草甘膦代谢为低毒物质乙酰草甘膦。若将该基因转入农作物中可使作物对草甘膦农药具有抗性。具有gat基因的大豆品系主要为杜邦公司的DP356043品系，目前已批准获得作为加工原料的农业转基因生物安全证书（进口）。国内进口该品系转基因大豆主要用于榨取食用油。现有标准中均无gat基因的实时荧光PCR检测方法，由于该基因是重要的结构基因，且国内各大型食用油生产厂商均要求对该基因进行监控，因此需形成该团体标准，弥补检测方法标准空缺。

* 1. 起草过程

为更好发挥市场在标准化资源配置中的决定性作用，增加标准有效供给，根据国务院《深化标准化工作改革方案》、国家质检总局和国家标委会《关于培育和发展团体标准的指导意见》、《深圳市团体标准管理暂行办法》等文件精神，深圳市分析测试协会发布征集2019年深圳市分析测试协会团体标准的通知，现我院根据该通知的要求开展了此项工作的研究。具体编制过程及所需材料详见表1。

表1 团体标准制修定过程档案资料清单

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **序号** | **标准起草阶段** | **归档资料名称** | **归档资料提交单位** |
| 1 | 团体标准的提案 | 1、团体标准征集通知 | 协会秘书处 |
| 2、附件1《深圳市分析测试协会团体标准制修订提案建议书》 | 起草单位 |
| 2 | 团体标准的立项 | 1、标准立项通知 | 协会秘书处 |
| 2、立项会议专家评审意见 | 协会秘书处 |
| 3 | 团体标准的起草 | 1、关于团体标准公开征求意见的通知 | 协会秘书处 |
| 2、团体标准草案（征求意见稿） | 起草单位 |
| 3、编制说明（征求意见稿） | 起草单位 |
| 4 | 团体标准的征求意见 | 1、2019年深圳市地方标准制修订计划项目汇总表 | 协会秘书处 |
| 2、标准文本（送审稿） | 起草单位 |
| 3、编制说明（送审稿） | 起草单位。 |
| 5 | 团体标准的技术审查 | 1、团体标准的技术审查通知 | 协会秘书处 |
| 2、验证报告（三家以上机构验证） | 协会秘书处 |
| 3、标准查新情况说明 | 起草单位 |
| 4、标准文本（报批稿） | 起草单位 |
| 5、编制说明（报批稿） | 起草单位 |
| 6 | 团体标准的审批 | 1、投票结果（附件7《深圳市分析测试协会团体标准发布验收投票表决票》汇总扫描） | 协会秘书处 |
| 2、团体标准正式发布通知 | 协会秘书处 |
| 3、标准正式发布挂网的文本版本 | 起草单位 |

# 第一阶段 项目团体标准正式立项

深圳市分析测试协会于2018年12月面向会员单位征集团体标准，项目组及时提出了团体标准制订立项申请。协会在2019年1月18日组织专家召开了立项评审会议，最后《转基因食品中gat基因实时荧光PCR检测法》项目通过专家组评审并获立项。

本方法主要起草单位：深圳市计量质量检测研究院。

本方法主要起草人：朱成杰，林霖，王坤，曾玮，余灏，张世伟，赖心田，杨国武。

第二阶段 形成《转基因食品中gat基因实时荧光PCR检测法》团体标准（征求意见稿）

根据第一阶段调研课题研讨会的各方意见，项目组对《转基因食品中gat基因实时荧光PCR检测法》进行了修改，并制定了团体标准（征求意见稿）。

# 与国内外有关法律法规和其它标准的关系

目前国内转基因植物的检测标准SN/T 1202-2010《食品中转基因植物成分定性PCR检测方法》、SN/T 1204-2016《植物及其加工产品中转基因成分实时荧光PCR定性检验方法》、GB/T 19495.4-2018《转基因产品检测 实时荧光定性聚合酶链式反应（PCR）检测方法》等均未见检测gat基因的项目。

国内外暂无相同标准。

# 标准的制定与起草原则

本方法基于gat基因DNA序列，对其设计特异性检测引物探针，并对该方法的特异性和灵敏度进行测试。通过对15个转基因大豆标准品进行检测，可特异检测含gat基因的DP356043品系，并且最低检出限可达0.01%（w/w）。本方法经过多家检验机构进行了实验室间验证，表现出了良好结果。本标准是按GB/T 1.1-2009《标准化工作导则第1部分：标准的结构和编写》给出的规则编写，技术内容是参照GB/T 20001.4-2015《标准编写规则第4部分:试验方法标准》确定。

# 实验结果

5.1 材料与仪器

DNeasy mericon Food Kit（QIAGEN 69514），实时荧光PCR反应试剂Premix ExTaq（2×），引物、探针（生工生物工程上海有限公司）。

7500实时荧光PCR仪（美国ABI公司）；SHP-250恒温培养箱、DK-8D水浴锅（上海精宏公司）；纯水机（美国Millipore公司）；Allegra 64R离心机（美国Bekman公司）；Qubit核酸蛋白检测仪：美国ABI公司。

5.2 方法

**5.2.1 DNA提取**

按照DNeasy mericon Food Kit（QIAGEN 69514）说明书操作。

**5.2.2实时荧光PCR反应**

反应体系（20 μL）：实时荧光PCR反应试剂（2×）10 μL，上游引物（10 μmol/L）0.4 μL，下游引物（10 μmol/L）0.4 μL，探针（10 μmol/L）0.2 μL，DNA模板1-10 ng（Qubit荧光法），灭菌超纯水补至20 μL。

反应程序：95℃ 15 s；95℃ 5 s，60℃ 34 s，40个循环。

结果判定：Ct值＜35时，可以判定检测结果为阳性；Ct值≥35时，可以判定检测结果为阴性。

5.3 转基因食品中gat基因实时荧光PCR检测法建立

（1）引物探针设计

基于gat基因DNA序列，设计引物探针（如表2）。

表2 引物探针列表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 名称 | 引物探针 | 序列 |
| gat | 上游引物 | 5，- CAGTACCAGCTCCGAGGTAT -3， | |
| 下游引物 | 5，- CGAAGAATTTCTTCAGCGTG -3， |
| 探针 | 5，- FAM- CCTTCTGCTCACGATAACCTTCCA-BHQ1-3， | |

（2）特异性测试

选取标准物质中心购买的转基因大豆标准品：GTS-40-3-2、MON89788、A2704、A5547-127、MON87708、DP356043、MON87701、DP305423、MON87705、MON87469、FG72、CV127、DAS-81419-2、DAS-68416-4、DAS4406-6。使用DNeasy mericon Food Kit（QIAGEN 69514）按说明书操作提取DNA，检测方法的特异性。检测的结果显示仅含有gat基因的抗草甘膦转基因大豆DP356043品系提取的DNA可检出（如表3）。

表3 引物探针特异性实验结果

|  |  |
| --- | --- |
| 大豆品系 | Ct值 |
| GTS-40-3-2 | >40 |
| MON89788 | >40 |
| A2704 | >40 |
| A5547-127 | >40 |
| MON87708 | >40 |
| DP356043 | 26 |
| MON87701 | >40 |
| DP305423 | >40 |
| MON87705 | >40 |
| MON87469 | >40 |
| FG72 | >40 |
| CV127 | >40 |
| DAS-81419-2 | >40 |
| DAS-68416-4 | >40 |
| DAS4406-6 | >40 |

（3）灵敏度测试

将DP356043转基因大豆标准品（转基因含量10%）与转基因大豆标准品（转基因含量0%）混合制成DP356043转基因大豆含量分别为0.01%的混合样品，使用DNeasy mericon Food Kit（QIAGEN 69514）按说明书操作提取DNA。

表4检出限验证实验结果

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 引物探针名称 | 平行样 | | | | | | 统计学参数 | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 均值 | 方差 | RSD |
| gat | 34.2 | 34.3 | 33.8 | 33.9 | 33.6 | 34.0 | 34.0 | 0.07 | 0.8% |

5.4 实际样品检测

购买10批次含DP356043转基因大豆样品，分别按照SN/T 1202-2010《食品中转基因植物成分定性PCR检测方法》中的Lectin引物探针检测大豆内源基因成分，并使用本方法检测外源基因gat成分。结果显示10份样品中均检出了内源基因和内源基因gat成分。

表5实际样品检测结果汇总

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **序号** | **样品名称** | **内源基因Lectin** | **外源基因**  **gat** |
| 1 | 大豆粉 | 检出 | 检出 |
| 2 | 大豆粉 | 检出 | 检出 |
| 3 | 大豆饲料 | 检出 | 检出 |
| 4 | 大豆饲料 | 检出 | 检出 |
| 5 | 大豆饲料 | 检出 | 检出 |
| 6 | 大豆 | 检出 | 检出 |
| 7 | 大豆 | 检出 | 检出 |
| 8 | 大豆 | 检出 | 检出 |
| 9 | 大豆 | 检出 | 检出 |
| 10 | 大豆 | 检出 | 检出 |

# 起草过程中主要分歧意见的处理情况

本标准制定过程中无重大分歧意见