

深圳市标准化指导性技术文件

SZDB/Z 335—2018

转基因玉米 Bt176 及其产品微滴式数字 PCR 定量检测方法

Detection of insect-resistant maize Bt176 and its derivatives products using droplet
digital PCR method

2018-12-05 发布

2018-12-30 实施

深圳市市场和质量监督管理委员会 发布

目 次

1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 原理	1
5 试剂耗材和主要仪器	1
5.1 试剂耗材	1
5.2 主要仪器	2
6 操作步骤	2
6.1 抽样	2
6.2 试样制备	2
6.3 试样预处理	2
6.4 DNA 模板制备	2
6.5 微滴式数字 PCR 反应	2
7 数据分析	3
7.1 设定阈值	3
7.2 质量控制	3
7.3 含量计算	3
8 结果分析与表述	3
9 检出限	3

前 言

本文件依据GB/T 1.1-2009规则编制。

本文件由深圳市经济贸易和信息化委员会提出并归口。

本文件起草单位：深圳市农业科技促进中心、深圳市标准技术研究院。

本文件主要起草人：邓汉超、莫洁华、李皓、侯红利、王学林、李永红、周志豪、周向阳、刘晋、周鹏、刘敏。

转基因玉米 Bt176 及其产品微滴式数字 PCR 定量检测方法

1 范围

本文件规定了转基因玉米Bt176及其产品微滴式数字PCR定量检测的原理、试剂耗材和主要仪器、操作步骤、数据分析、结果分析和表述及检出限。

本文件适用于转基因玉米Bt176及其产品的定量检测。

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，仅所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。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

农业部2031号公告—19—2013 转基因植物及其产品成分检测 抽样

农业部1485号公告—4—2010 转基因植物及其产品成分检测 DNA提取和纯化

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

zSS II b 基因 zSS II b gene

一种根部表达的玉米基因，本文件中用作内标准基因。

3.2

Bt176 结构特异性序列 structure-specific sequence of Bt176

Bt176 结构特异性序列为转入的抗虫基因 cry1Ab 与 pepc-intron 的边界序列。

3.3

微滴式数字 PCR droplet digital PCR

基于单模板分子 PCR 扩增并且对每个样品中的微滴逐个检测的一种核酸样品定量分析技术。

3.4

阈值 threshold

区分阳性微滴和阴性微滴的界限值。

4 原理

采用玉米内标基因zSS II b和玉米Bt176结构特异性序列引物和探针，对测试样、Bt176阳性对照、阴性对照及空白对照进行微滴式数字PCR扩增，根据阳性对照、阴性对照和空白对照确定阳性微滴和阴性微滴的阈值，分析软件自动计算测试样zSS II b基因和Bt176结构特异性序列的每微升体系所含拷贝数（拷贝数浓度copies/ μ L）。然后根据公式：转基因含量=（Bt176拷贝数浓度/ zSS II b拷贝数浓度） \times 100%，计算试样中转基因玉米Bt176的含量。

5 试剂耗材和主要仪器

5.1 试剂耗材

微滴式数字PCR反应试剂盒、微滴发生卡、微滴读取油、微滴生成油、96孔PCR板。

引物和探针见表1。

表1 引物探针名称、序列及片段大小

引物名称	产物大小	序列 (5'-3')
zSS II b-F	88bp	CGGTGGATGCTAAGGCTGATG
zSS II b-R		AAAGGGCCAGGTTTCATTATCCTC
zSS II b-P		HEX-TAAGGAGCACTCGCCGCCGATCTG-BHQ1
Bt176-F	100bp	TGTTCCACCAGCAGCAACCAG
Bt176-R		ACTCCACTTTGTGCAGAACAGATCT
Bt176-P		FAM-CCGACGTGACCGACTACCACATCGA-BHQ1

5.2 主要仪器

分析天平 (0.0001 g)、离心机、超微量紫外分光光度计、微滴发生器、微滴读取仪、普通PCR扩增仪、超纯水仪等仪器设备。

6 操作步骤

6.1 抽样

按农业部 2031 号公告—19—2013 的规定执行。

6.2 试样制备

按农业部 2031 号公告—19—2013 的规定执行。

6.3 试样预处理

按农业部 1485 号公告—4—2010 的规定执行。

6.4 DNA 模板制备

按农业部 1485 号公告—4—2010 的规定执行。

6.5 微滴式数字 PCR 反应

6.5.1 反应条件

在进行微滴式数字PCR反应时需同时进行试样、阳性对照、阴性对照和空白对照的PCR反应，每个PCR反应设置4次平行。

按照表2配制微滴式数字PCR反应体系，本文件用水符合GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法。

微滴式数字PCR扩增程序：1、95 °C，5 min (Ramp 2 °C/s)；2、95 °C，30 s (Ramp 2 °C/s)；3、58 °C，1 min；4、Go to 2，39X；5、98 °C，10 min (Ramp 2 °C/s)；6、15 °C，10 min (Ramp 1 °C/s)。该程序为优化后的条件，可根据不同的酶作适当调整。

表2 扩增反应体系

名称	储备液浓度	加样体积	反应浓度
Droplet PCR Supermix	2×	10 μ L	1×
zSS II b-F	20 μ mol/L	0.9 μ L	900 nmol/L
zSS II b-R	20 μ mol/L	0.9 μ L	900 nmol/L
zSS II b-P	20 μ mol/L	0.25 μ L	250 nmol/L
Bt176-F	20 μ mol/L	0.9 μ L	900 nmol/L
Bt176-R	20 μ mol/L	0.9 μ L	900 nmol/L
Bt176-P	20 μ mol/L	0.25 μ L	250 nmol/L
DNA 模板	10-100ng/ μ L	2 μ L	-
纯水	-	3.9 μ L	-
总体积	-	20 μ L	-

注：可根据使用的酶作相应的调整。

微滴式数字 PCR 的操作按照《Instruction Manual, QX100™ Droplet Generator》和《Instruction Manual, QX100™ Droplet Reader and QuantaSoft™ Software》执行。

6.5.2 对照设置

阳性对照：转基因玉米Bt176材料或阳性质粒；

阴性对照：非转基因玉米材料作为阴性对照，以非玉米的DNA作为zSS II b内标基因检测的阴性对照；

空白对照：无菌水。

7 数据分析

7.1 设定阈值

根据阳性对照、阴性对照和空白对照设定阳性微滴和阴性微滴的最优界限值。

7.2 质量控制

阴性对照和空白对照的阳性微滴数小于等于3copies（拷贝数浓度×反应总体积）；

平行反应之中组内RSD值应不大于25%；

同一样品不同重复的拷贝数重复性良好；

同时满足上述三个条件，否则重新检测。

7.3 含量计算

根据阳性对照、阴性对照和空白对照确定阳性微滴和阴性微滴的阈值，分析软件自动计算测试样zSS II b基因和Bt176结构特异性序列的每微升体系所含拷贝数（拷贝数浓度copies/μL）。然后根据公式：转基因含量=（Bt176拷贝数浓度/ zSS II b拷贝数浓度）×100%，计算试样中转基因玉米Bt176的含量。

8 结果分析与表述

定量检测结果有3种情况，每种检测结果应表述如表3

表3 定量结果表述

检测结果	结果表述
百分比含量≥0.5%	试样中转基因玉米 Bt176 含量为 X %
0%<百分比含量<0.5%	试样中转基因玉米 Bt176 含量低于 0.5%
百分比含量=0%	试样中转基因玉米 Bt176 含量为 0%

9 检出限

本文件方法的检测限（LOQ）为 0.5%。