

ICS65.020.01

B04

备案号:

DB

深 圳 市 农 业 地 方 标 准

DB440300/T 32.5—2007

农业转基因生物食用安全性检验 第 5 部分：非期望效应检验

Edible safety determination of agriculture genetically modified organisms—
Part V : Testing for unintended effects

2007-11-12 发布

2008-02-12 实施

深圳市质量技术监督局发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 项目与程序	4
5 表型性状检验	5
6 遗传性状检验	10
7 抗生素抗性基因水平转移检验	19

前 言

DB440300/T 32-2007 《农业转基因生物食用安全性检验》分成五个部分：

- 第1部分：样品制备；
- 第2部分：毒性检验；
- 第3部分：致敏性检验；
- 第4部分：抗营养作用检验；
- 第5部分：非期望效应检验。

本部分为DB440300/T 32的第5部分。

附录A为资料性附录。

本部分由深圳市农林渔业局和深圳市卫生局提出。

本部分由深圳市农林渔业局和深圳市卫生局负责解释。

本部分主要起草单位：深圳市疾病预防控制中心、深圳市农作物良种引进中心。

本部分主要起草人：邓平建 周向阳 杨冬燕 侯红利 杨永存 刘晋 杨小柯 王学林 李永红 吴水清
周鹏 杜忠

农业转基因生物食用安全性检验

第 5 部分：非期望效应检验

1 范围

本部分规定了农业转基因生物非期望效应检验的项目、程序和方法。

本部分适用于农业转基因生物非期望效应的检验。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

- GB 15193.1~15193.21 食品安全性毒理学评价程序和方法
- GB/T5009.5 食品中蛋白质的测定
- GB/T5009.124 食品中氨基酸的测定
- GB/T5009.9 食品中淀粉的测定
- GB/T5009.6 食品中脂肪的测定
- GB/T5009.3 食品中水分的测定
- GB/T5009.10 食品中粗纤维的测定
- GB/T5009.4 食品中灰分的测定
- GB/T5009.83 食品中胡萝卜素的测定
- GB/T5414.9 食品中维生素 D 的测定
- GB12390 食品中维生素B₁的测定
- GB12391 食品中维生素B₂的测定
- GB/T17408 食品中维生素B₆的测定
- GB12392 食品中维生素 C 的测定
- GB12395 食品中维生素 PP 的测定
- GB/T5009.92 食品中钙的测定
- GB/T5009.87 食品中磷的测定
- GB/T5009.91 食品中钾和钠的测定
- GB/T5009.90 食品中铁、铜、锰、镁、锌的测定
- GB/T5009.93 食品中硒的测定
- GB/T6682 分析实验室用水规格和实验方法
- NY/T1102—2006 转基因植物及其产品食用安检测 90 d 喂养试验
- SZJG 23 农业转基因生物食用安全性要求和评价
- DB440300/T 32.1 农业转基因生物食用安全性检验 第 1 部分 样品制备
- DB440300/T 32.3 农业转基因生物食用安全性检验 第 3 部分 致敏性检验
- 中华人民共和国卫生部 保健食品检验与评价技术规范（2003 年版）

3 术语和定义

SZJG 23 和以下确立的术语和定义均适用于本部分。

3.1

主要农艺性状 main agronomic features

农业转基因生物与农业生产或者农产品加工有关的生产性状、加工性状和经济性状，包括目标农艺性状（3.3）和非目标农艺性状（3.4）。

3.2

主要营养性状 main dietetic features

农业转基因生物自身产生的营养成分的种类、含量及功能，包括基因工程设计的目标营养性状（3.5）和其他非目标营养性状（3.6）。

3.3

目标农艺性状 target agronomic features

农业转基因生物与导入的外源基因的功能相关的农艺性状，包括目标整体性状（3.7）、目标细胞性状（3.8）和目标减害功能（3.9）。

3.4

非目标农艺性状 nontarget agronomic features

农业转基因生物与导入的外源基因的功能无关的农艺性状，包括非目标整体性状（3.10）和非目标细胞性状（3.11）。

3.5

目标营养性状 target dietetic features

农业转基因生物与导入的目的基因的功能相关的营养性状，包括目标营养成分（3.12）及相应的目标营养功能（3.13）和目标功效成分（3.14）及相应的目标保健功能（3.15）。

3.6

非目标营养性状 nontarget dietetic features

农业转基因生物与导入的目的基因的功能无关的营养性状，包括非目标营养成分（3.16）和非目标营养功能（3.17）。

3.7

目标整体性状 target integral features

农业转基因生物的个体在生长、发育和繁殖过程中所表现的，与导入的目的基因的功能相关的性状，如形态特征、生育特性和抗性（抗虫、抗病、抗除草剂、抗环境胁迫等）。

3.8

目标细胞性状 target cell features

农业转基因生物的细胞在培养、增殖和传代过程中所表现的，与导入的外源基因的功能相关的性状，如体细胞形态和生化特性（外源基因表达产物所具有的抗生素抗性、除草剂抗性、营养缺陷抗性及其他生物活性）。

3.9

目标减害功能 target hazard-reduction function

农业转基因生物通过导入目的基因消除或者降低受体生物中存在的天然毒素成分、生物致敏成分或抗营养因子含量的功能。

3.10

非目标整体性状 non-target integral features

农业转基因生物的个体在生长、发育和繁殖过程中所表现的，与导入的目的基因的功能无关的，受体生物应有的形态特征和生育特性。

3.11

非目标细胞性状 non-target cell features

农业转基因生物的细胞在培养、增殖和传代过程中所表现的，与导入的外源基因的功能无关的，受体生物细胞应有的性状。

3.12

目标营养成分 target nutrient components

农业转基因生物通过导入目的基因提高其含量或者改善其质量的，保证人类身体正常生长、发育及从事各项活动的常见营养素，如碳水化合物、蛋白质、脂类、无机盐（矿物质）和维生素等。

3.13

目标营养功能 target nutrient function

农业转基因生物与目标营养成分（3.12）的改变相关的生理作用。

3.14

目标功效成分 target efficacy components

农业转基因生物通过导入的目的基因新增或者提高其含量的，改善人类身体健康的生物活性物质。

3.15

目标保健功能 target health function

农业转基因生物与目标功效成分（3.14）的改变相关的生理作用。

3.16

非目标营养成分 non-target nutrient components

农业转基因生物中其种类或者含量与导入的目的基因的功能无关的，受体生物应有的保证人类身体正常生长、发育及从事各项活动的常见营养素，如碳水化合物、蛋白质、脂类、无机盐（矿物质）和维生素等。

3.17

非目标营养功能 non-target nutrient function

农业转基因生物与目标营养成分（3.12）的改变无关的，受体生物应有的生理作用。

3.18

外源基因整合性状 features of integrated exogenous

在农业转基因生物基因组中外源基因的整合种类（3.22）、整合拷贝数（3.23）、整合位点（3.24）、碱基对数（3.25）和核苷酸序列（3.26）。

3.19

目的基因转录性状 transcriptional features of target gene

目的基因转录产生的 mRNA 片段的长度（以碱基对计数，以 bp 为计量单位）和核苷酸排列顺序。

3.20

目的基因表达性状 expression features of target gene

目的基因的表达特性（3.27）、表达产物分子量（3.28）、表达产物氨基酸序列（3.29）和表达产物生物活性（3.30）。

3.21

基因组转录性状 genome transcriptional features

农业转基因生物基因组转录产生的 mRNA 序列的种类。

3.22

外源基因整合种类 type of exogenous gene integration

在农业转基因生物基因组中整合的外源基因的种类。

3.23

目的基因整合拷贝数 copy number of integrated target gene

在农业转基因生物基因组中整合的目的基因个数。

3.24

目的基因整合位点 target gene integration site

在农业转基因生物基因组中整合的目的基因的位置。

3.25

目的基因碱基对数目 number of base pairs in target gene

在农业转基因生物基因组中整合的目的基因片段的长度，以碱基对计数，以 bp 为计量单位。

3.26

目的基因核苷酸序列 nucleotide sequence of target gene

在农业转基因生物基因组中整合的目的基因的核苷酸排列顺序。

3.27

目的基因表达特性 expression features of target gene

目的基因的表达产物、表达量及组织特异性。

3.28

目的基因表达产物氨基酸序列 aminoacid sequences of target gene expression product

目的基因表达产物的氨基酸排列顺序。

3.29

目的基因表达产物分子量 molecular weight of target gene expression product

目的基因表达产物的分子质量，常以 Da 为计量单位。

3.30

目的基因表达产物生物活性 biological activity of target gene expression product

目的基因表达产物分子的物理性质和生物化学性质。

3.31

PCR polymerase chain reaction

聚合酶链反应的英文名词缩写，是以靶 DNA 链为模板，扩增靶 DNA 片段的技术，其扩增反应的特异性由扩增引物的结构决定。

3.32

RT-PCR reverse transcription PCR

逆转录聚合酶链反应的英文名词缩写，是以靶 RNA 链逆转录合成的 cDNA 为模板，扩增与靶 RNA 片段互补的 DNA 片段的技术，其扩增反应的特异性由扩增引物的结构决定。

3.33

IPCR Inverse PCR

反向聚合酶链反应的英文名词缩写，是以含有部分目的基因序列与插入区域两侧序列为模板，采用根据目的基因的序列设计的反向引物进行 PCR 扩增的技术，其扩增反应的特异性由扩增引物的结构决定。

4 项目与程序

4.1 检验项目

4.1.1 表型性状

4.1.1.1 农业转基因生物的各项表型性状及相互关系见图 1。

4.1.1.2 农业转基因生物表型性状检验的项目包括农艺性状（目标农艺性状、非目标农艺性状）和营养性状（目标营养性状、非目标营养性状）。其中：目标农艺性状检验目标整体性状、目标细胞性状或目标减害功能；非目标农艺性状检验非目标整体性状或非目标细胞性状；目标营养性状检验目标营养成分和目标营养功能，或者检验目标功效成分和目标保健功能；非目标营养性状检验非目标营养成分和非目标营养功能。

4.1.2 遗传性状

4.1.2.1 农业转基因生物的各项遗传性状及相互关系见图 2。

4.1.2.2 农业转基因生物遗传性状检验的项目包括外源基因的整合性状、目的基因转录性状、目的基因表达性状和基因组转录性状。其中：外源基因的整合性状检验外源基因整合种类、目的基因整合拷贝数、目的基因整合位点、目的基因碱基对数目和目的基因核苷酸序列；目的基因转录性状检验目的基因转录产生的 mRNA 序列的碱基对数和核苷酸排列顺序；目的基因表达性状检验目的基因表达特性、目的基因表达产物分子量、目的基因表达产物氨基酸序列和目的基因表达产物生物活性；基因组转录性状检验基因组转录产生的 mRNA 序列的种类。

4.1.3 抗生素抗性基因水平转移

4.1.3.1 农业转基因生物抗生素抗性基因水平转移的形式及相互关系见图 3。

4.1.3.2 农业转基因生物抗生素抗性基因水平转移检验的项目包括表达抗生素抗性产物的外源基因向环境中非靶生物细胞的转移和向动物胃肠道内非靶生物细胞的转移。

4.2 检验程序

4.2.1 农业转基因生物非期望效应的检验应包括表型性状检验、遗传性状检验和抗生素抗性基因水平转移检验 3 个部分的各个项目。

4.2.2 表型性状检验按目标农艺性状、目标营养性状、非目标农艺性状、非目标营养性状的顺序进行。

4.2.3 遗传性状检验按整合性状、目的基因转录性状、目的基因表达性状和基因组转录性状的顺序进行。

4.2.4 抗生素抗性基因水平转移检验按向环境中非靶生物细胞的转移、向动物胃肠道内非靶生物细胞的转移的顺序进行。

4.2.5 符合下列条件之一者，不再进行余下项目的检验：

4.2.5.1 农业转基因生物已检验的项目有一项发生变异，而且该变异对其食用安全性有不良影响。

4.2.5.2 农业转基因生物发生抗生素抗性基因水平转移。

5 表型性状检验

5.1 目标整体性状检验

5.1.1 原理

通过观察农业转基因生物与目的基因的设计功能相关的个体的目标性状，如形态特征、生育特性和抗性（抗虫、抗病、抗除草剂、抗环境胁迫等）是否表现，以及目标性状在传代过程中传递是否稳定，判定其目标整体性状是否发生偏离基因工程设计目标的显著改变。

5.1.2 检验方法

5.1.2.1 根据目的基因的作用机理，确定检验的目标整体性状。

5.1.2.2 以转基因生物为试验样品，以受体生物为对照样品，对待测的转基因生物的各代转基因生物目标整体性状的鉴定资料进行审查，对鉴定的数据和结果进行比对分析。

5.1.3 结果判定

5.1.3.1 试验样品具有目标整体性状，对照样品无此性状，或者试验样品中目标整体性状的表现显著强于对照样品，可判定试验样品的目标整体性状未发生偏离基因工程设计目标的显著改变；试验样品不具有目标整体性状，或者试验样品中目标整体性状的表现与对照样品无显著差异，可判定试验样品的目标整体性状发生偏离基因工程设计目标的显著改变。

5.1.3.2 试验样品的目标整体性状未发生偏离基因工程设计目标的显著改变，可判定农业转基因生物的目标农艺性状保持稳定；试验样品的目标整体性状发生偏离基因工程设计目标的显著改变，可判定农业转基因生物的目标农艺性状发生变异。

5.1.3.3 农业转基因生物的目标农艺性状发生变异，根据变异的情况，分析该变异对食用安全性的影响。

5.2 目标细胞性状检验

5.2.1 原理

通过检验农业转基因生物与外源基因的设计功能相关的体细胞的目标性状，如形态和生化特性（外源基因表达产物所具有的抗生素抗性、除草剂抗性、营养缺陷抗性及其他生物活性）是否表现，以及目标性状在传代过程中传递是否稳定，判定其目标细胞性状是否发生偏离基因工程设计目标的显著改变。

5.2.2 检验方法

5.2.2.1 根据外源基因的作用机理，确定检验的目标细胞性状。

5.2.2.2 以转基因生物为试验样品，以受体生物为对照样品，分别制备试验样品和对照样品的体细胞，采用适当的选择性培养基和培养条件，对体细胞进行培养、增殖及传代，观察细胞的生长形态，选择相应的检验方法，检测体细胞与外源基因表达产物相关的生物活性，对检验结果进行统计和比对分析。

5.2.3 结果判定

5.2.3.1 试验样品具有目标细胞性状，对照样品无此性状，或者试验样品中目标细胞性状的表现显著强于对照样品，可判定试验样品的目标细胞性状未发生偏离基因工程设计目标的显著改变；试验样品不具有目标细胞性状，或者试验样品中目标细胞性状的表现与对照样品无显著差异，可判定试验样品的目标细胞性状发生偏离基因工程设计目标的显著改变。

5.2.3.2 试验样品的目标细胞性状未发生偏离基因工程设计目标的显著改变，可判定农业转基因生物的目标农艺性状保持稳定；试验样品的目标细胞性状发生偏离基因工程设计目标的显著改变，可判定农业转基因生物的目标农艺性状发生变异。

5.2.3.3 农业转基因生物的目标农艺性状发生变异，根据变异的情况，分析该变异对食用安全性的影响。

5.3 目标减害功能检验

5.3.1 原理

通过检验农业转基因生物与目的基因的设计功能相关的消除或者降低受体生物中危害成分（如天然毒素成分、生物致敏成分或抗营养因子）的作用是否表现，判定其目标减害功能是否发生偏离基因工程设计目标的显著改变。

5.3.2 检验方法

5.3.2.1 根据目的基因的作用机理，确定检验的目标减害功能。

5.3.2.2 以转基因生物为试验样品，以受体生物为对照样品，选择相应的检验方法，检测试验样品和对照样品中危害成分的含量，对检验结果进行比对分析。

5.3.3 结果判定

5.3.3.1 试验样品未检出相应的危害成分，对照样品检出相应的危害成分，或者试验样品和对照样品均检出相应的危害成分，但试验样品中危害成分的含量显著低于对照样品，可判定试验样品的目标减害功能未发生偏离基因工程设计目标的显著改变；试验样品和对照样品均检出相应的危害成分，且含量无显著差异，可判定转基因生物的目标减害功能发生偏离基因工程设计目标的显著改变。

5.3.3.2 试验样品的目标减害功能未发生偏离基因工程设计目标的显著改变，可判定农业转基因生物的目标农艺性状保持稳定；试验样品的目标减害功能发生偏离基因工程设计目标的显著改变，可判定农业转基因生物的目标农艺性状发生变异。

5.3.3.3 农业转基因生物的目标农艺性状发生变异，根据变异的情况，分析该变异对食用安全性的影响。

5.4 非目标整体性状检验

5.4.1 原理

通过观察农业转基因生物除目标整体性状以外的其他非目标性状，如形态特征和生育特性是否表现，以及非目标性状在传代过程中传递是否稳定，判定其非目标整体性状是否发生显著的改变。

5.4.2 检验方法

5.4.2.1 根据受体生物的生产、加工和经济用途及特点，确定检验的非目标整体性状。

5.4.2.2 以转基因生物为试验样品，以受体生物为对照样品，对待测的转基因生物的各代转基因生物非目标整体性状的鉴定资料进行审查，对鉴定的数据和结果进行比对分析。

5.4.3 结果判定

5.4.3.1 试验样品所检验的非目标整体性状与对照样品相同或者相近，可判定转基因生物的非目标整体性状未发生显著改变；试验样品所检验的非目标整体性状与对照样品有显著不同，可判定转基因生物的非目标整体性状发生显著改变。

5.4.3.2 农业转基因生物的非目标整体性状未发生显著改变，可判定农业转基因生物的非目标农艺性状保持稳定；农业转基因生物的非目标整体性状发生显著改变，可判定农业转基因生物的非目标农艺性状发生变异。

5.4.3.3 对于非目标农艺性状发生变异的转基因生物，需要通过安全性毒理学试验判定变异对其食用安全性的影响。

5.5 非目标细胞性状检验

5.5.1 原理

通过检验农业转基因生物体细胞除目标细胞性状以外的其他非目标性状，如生长状态和形态是否表现，以及非目标性状在传代过程中传递是否稳定，判定其非目标细胞性状是否发生显著的改变。

5.5.2 检验方法

5.5.2.1 根据受体生物细胞的生长状态和形态特点，确定检验的非目标细胞性状。

5.5.2.2 以转基因生物为试验样品，以受体生物为对照样品，分别制备试验样品和对照样品的体细胞，采用适当的培养基和培养条件，对体细胞进行培养、增殖及传代，观察细胞的生长状态和形态，对检验结果进行统计和比对分析。

5.5.3 结果判定

5.5.3.1 试验样品所检验的非目标细胞性状与对照样品相同或者相近，可判定转基因生物的非目标细胞性状未发生显著改变；试验样品所检验的非目标细胞性状与对照样品有显著不同，可判定转基因生物的非目标细胞性状发生显著改变。

5.5.3.2 农业转基因生物的非目标细胞性状未发生显著改变，可判定农业转基因生物的非目标农艺性状保持稳定；农业转基因生物的非目标细胞性状发生显著改变，可判定农业转基因生物的非目标农艺性状发生变异。

5.5.3.3 对于非目标农艺性状发生变异的转基因生物，需要通过安全性毒理学试验判定变异对其食用安全性的影响。

5.6 安全性毒理学试验

5.6.1 原理

通过急性毒性试验和遗传毒性试验，判定农业转基因生物发生的非目标农艺性状变异对其食用安全性的影响。

5.6.2 试验方法

以发生非目标农艺性状变异的转基因生物为试验样品，以受体生物为对照样品，参照 GB 15193.3~15193.17 和 NY/T1102—2006 规定的方法，进行急性毒性试验、3 项致突变试验和 30 d 喂养试验。

5.6.3 结果判定

5.6.3.1 试验样品的LD₅₀显著小于对照样品，可判定试验样品发生的非目标农艺性状变异对其食用安全性有不良影响；试验样品的LD₅₀与对照样品相同或相近，试验样品可进入下一阶段毒理学试验。

5.6.3.2 在任何一项致突变试验中，试验样品表现的毒性显著强于对照样品，可判定试验样品发生的非目标农艺性状变异对其食用安全性有不良影响；试验样品表现的毒性与对照样品相同或相近，试验样品可进入下一阶段毒理学试验。

5.6.3.3 在30 d 喂养试验中, 试验样品最小观察到有害作用的剂量显著小于对照样品, 可判定转基因生物发生的非目标农艺性状变异对其食用安全性有不良影响; 试验样品最大未观察到有害作用的剂量与对照样品相同或相近, 可判定转基因生物发生的非目标农艺性状变异对其食用安全性无不良影响。

5.7 目标营养成分和目标营养功能检验

5.7.1 原理

通过检验农业转基因生物与目的基因的设计功能相关的营养成分的含量或质量, 判定其改善受体生物中目标营养成分的作用是否表现; 通过相应的目标营养功能试验, 判定其目标营养成分的改善是否产生相应的目标营养功能。

5.7.2 检验方法

5.7.2.1 目标营养成分检验

以转基因生物为试验样品, 以受体生物为对照样品, 选择相应的检验方法, 检验目标营养成分的含量或质量。

5.7.2.2 目标营养功能试验

根据目标营养成分确定相应的目标营养功能, 参照“保健食品检验与评价技术规范”规定的方法, 进行相应的目标营养功能试验。

5.7.3 结果判定

5.7.3.1 试验样品中目标营养成分的含量或质量与对照样品无显著差异, 可判定转基因生物无改善受体生物中目标营养成分的作用。

5.7.3.2 试验样品中目标营养成分的含量或质量显著高于对照样品, 可判定转基因生物有改善受体生物中目标营养成分的作用, 可进行相应的目标营养功能试验。

5.7.3.3 试验样品无改善受体生物中目标营养成分的作用, 或者试验样品无相应的目标营养功能, 可判定试验样品的目标营养性状发生变异, 并可判定该变异对其食用安全性有不良影响; 试验样品有改善受体生物中目标营养成分的作用, 并且有相应的目标营养功能, 可判定转基因生物的目标营养性状保持稳定。

5.8 目标功效成分和目标保健功能检验

5.8.1 原理

通过检验农业转基因生物与目的基因的设计功能相关的功效成分的含量, 判定其新增或者提高受体生物中目标功效成分的作用是否表现; 通过相应的目标保健功能试验, 判定其目标功效成分的改变是否产生相应的目标保健功能。

5.8.2 检验方法

目标功效成分检验: 以转基因生物为试验样品, 以受体生物为对照样品, 参照“保健食品检验与评价技术规范”规定的方法, 检验目标功效成分及其含量。

目标保健功能试验: 根据目标功效成分确定相应的目标保健功能, 参照“保健食品检验与评价技术规范”规定的方法, 进行相应的目标保健功能试验。

5.8.3 结果判定

5.8.3.1 试验样品中目标功效成分及其含量与对照样品无显著差异, 可判定转基因生物无新增或者提高受体生物中目标功效成分的作用。

5.8.3.2 试验样品中目标功效成分及其含量显著高于对照样品, 可判定转基因生物有新增或者提高受体生物中目标功效成分的作用, 可进行相应的目标保健功能试验。

5.8.3.3 无新增或者提高受体生物中目标功效成分的作用, 或者试验样品无相应的保健功能, 可判定转基因生物的目标营养性状发生变异, 并可判定该变异对其食用安全性有不良影响; 试验样品有新增或者提高受体生物中目标功效成分的作用, 并且有相应的目标保健功能, 可判定转基因生物的目标营养性状保持稳定。

5.9 非目标营养成分和非目标营养功能检验

5.9.1 原理

通过检验农业转基因生物除目标营养成分以外的其他非目标营养成分的含量,判定其非目标营养成分的含量是否发生显著的改变;通过生长发育功能试验,判定非目标营养成分含量的改变是否影响其营养功能。

5.9.2 检验方法

5.9.2.1 非目标营养成分检验

根据受体生物的生产、加工和经济用途及特点,确定检验的非目标营养成分。以转基因生物为试验样品,以受体生物为对照样品,选择相应的检验方法,检验非目标营养成分的含量。

5.9.2.1.1 蛋白质的测定:参照 GB/T5009.5—2003。

5.9.2.1.2 氨基酸的测定:参照 GB/T5009.124—2003。

5.9.2.1.3 淀粉的测定:参照 GB/T5009.9—2003。

5.9.2.1.4 脂肪的测定:参照 GB/T5009.6—2003。

5.9.2.1.5 水分的测定:参照 GB/T5009.3—2003。

5.9.2.1.6 粗纤维的测定:参照 GB/T5009.10—2003。

5.9.2.1.7 灰分的测定:参照 GB/T5009.4—2003。

5.9.2.1.8 脂肪酸的测定:参照实用食物营养成分分析手册(杨月欣,王光亚主编)—食物中脂肪酸的测定方法。

5.9.2.1.9 胡萝卜素的测定:参照 GB/T5009.83—2003。

5.9.2.1.10 维生素 A 和维生素 E 的测定:参照实用食物营养成分分析手册(杨月欣,王光亚主编)—维生素 A 和维生素 E 的测定方法。

5.9.2.1.11 维生素 D 的测定:参照 GB/T5414.9—1997。

5.9.2.1.12 维生素 K 的测定:参照实用食物营养成分分析手册(杨月欣,王光亚主编)—维生素 K 的测定方法。

5.9.2.1.13 维生素B₁的测定:参照GB12390—90。

5.9.2.1.14 维生素B₂的测定:参照GB12391—90。

5.9.2.1.15 维生素B₆的测定:参照GB/T17408—1998。

5.9.2.1.16 维生素B₁₂的测定:参照实用食物营养成分分析手册(杨月欣,王光亚主编)—维生素B₁₂的测定方法。

5.9.2.1.17 维生素 C 的测定:参照 GB12392—90。

5.9.2.1.18 维生素 PP 的测定:参照 GB12395—90。

5.9.2.1.19 叶酸的测定:参照实用食物营养成分分析手册(杨月欣,王光亚主编)—叶酸的测定方法。

5.9.2.1.20 生物素的测定:参照实用食物营养成分分析手册(杨月欣,王光亚主编)—食物中生物素的测定方法。

5.9.2.1.21 泛酸的测定:参照实用食物营养成分分析手册(杨月欣,王光亚主编)—食物中泛酸的测定方法。

5.9.2.1.22 总胆碱的测定:参照实用食物营养成分分析手册(杨月欣,王光亚主编)—总胆碱的测定方法。

5.9.2.1.23 钙的测定:参照 GB/T5009.92—2003。

5.9.2.1.24 磷的测定:参照 GB/T5009.87—2003。

5.9.2.1.25 钾和钠的测定:参照 GB/T5009.91—2003。

5.9.2.1.26 铁、铜、锰、镁、锌的测定:参照 GB/T5009.90—2003。

5.9.2.1.27 硒的测定:参照 GB/T5009.93—2003。

5.9.2.2 非目标营养功能试验

以发生非目标营养性状变异的转基因生物为试验样品,以受体生物为对照样品,参照“保健食品检

验与评价技术规范”规定的方法，进行生长发育功能试验。

5.9.3 结果判定

5.9.3.1 试验样品中所检验的非目标营养成分的含量与受体生物无显著差异，可判定转基因生物的非目标营养性状保持稳定；试验样品所检验的非目标营养成分中一种或多种的含量与受体生物有显著差异，可判定转基因生物的非目标营养性状发生变异。

5.9.3.2 试验样品组的试验结果与对照样品组无显著差异，可判定转基因生物的非目标营养性状变异对其食用安全性无不良影响；试验样品组的试验结果与对照样品组有显著差异，可判定转基因生物的非目标营养性状变异对其食用安全性有不良影响。

6 遗传性状检验

6.1 外源基因整合种类检验

6.1.1 原理

提取制备转基因生物细胞的总 DNA，根据待检转基因生物导入的各种外源基因的核酸序列，设计和合成相应的引物，以 PCR 在适当的条件下分别对各种外源基因进行扩增，采用琼脂糖凝胶电泳检测相应的条带。

6.1.2 试剂

10×PCR缓冲液：10 mmol/L 氯化钾，160 mmol/L 硫酸铵，20 mmol/L 硫酸镁，200 mmol/L Tris-HCl (pH8.0)，1%Triton X-100，1 mg/mL BSA；氯化镁 (MgCl₂)：25 mmol/L；dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dUTP) 溶液：各 10 mmol/L；Taq酶：5 U/μL；UNG酶：1 U/μL；溴化乙锭 (EB) (10 mg/mL) 或其他的染色剂；琼脂糖：电泳纯；50×TAE缓冲液：242 g Tris碱，57.1 mL冰乙酸，100 mL 0.5 mol/L EDTA (pH8.0) 加水至 1 000 mL；上样缓冲液；实验用水：按GB/T6682 的规定执行。

6.1.3 材料

转基因生物样品、受体生物样品、阳性质粒样品、DNA 分子量标记物：50 bp~300 bp、1.5 mL~5 mL 离心管、滤芯吸头 (10 μL, 20 μL, 100 μL, 200 μL, 1 000 μL) 及 PCR 反应管 (200 μL 和 500 μL)。

6.1.4 引物

根据待测的转基因生物中导入的外源基因种类，设计合成相应的引物。常见的外源基因及扩增所采用的引物见附录 A。按引物序列合成引物，加入无离子水配成 10 mmol/L 贮存。直接用于 PCR 反应的工作液配成 30 μmol/L。

6.1.5 仪器

同 DB440300/T 32.1 的 4.2 规定。

6.1.6 样品制备及 DNA 提取

以转基因生物为试验样品，受体生物为参照样品，含有相应外源基因的阳性质粒为阳性对照样品。按 DB 440300/T 32.1 规定的方法提取制备 DNA 样品。

6.1.7 测定

6.1.7.1 PCR 反应体系

PCR 检测反应体系见附录 A 的表 A.3。反应体系中各试剂的量根据反应体系的总体积进行适当调整。每个反应体系设置两个平行管。

6.1.7.2 反应体系对照设置

进行 PCR 检测时反应体系必须设置阳性对照和空白对照；阳性对照：用含有相应外源基因的阳性质粒提取的 DNA 作为模板；空白对照：用配制反应体系的实验用水代替模板。

6.1.7.3 扩增条件

PCR 扩增反应条件见附录 A 的表 A.4。

6.1.7.4 凝胶电泳检测 PCR 产物

方法同 DB 440300/T 32.1 的 4.5.2。

6.1.8 结果判定

6.1.8.1 试验样品出现基因工程导入的各外源基因对应的条带，阳性对照样品、参照样品种、空白样品结果正常，可判定试验样品中相应的外源基因整合种类保持稳定。

6.1.8.2 试验样品不出现基因工程导入的各外源基因相应的条带，或者出现的条带数目少于导入的外源基因数目，阳性对照样品、参照样品种、空白样品结果正常，可判定试验样品中相应的外源基因发生丢失变异。

6.1.8.3 试验样品丢失的外源基因属于标记基因或报告基因，可判定该变异对转基因生物的食用安全性无不良影响。

6.1.8.4 试验样品丢失的外源基因属于目的基因或调控元件，可判定该变异对转基因生物食用安全性有不良影响。

6.2 目的基因整合拷贝数检验

6.2.1 原理

提取制备转基因生物细胞的总 DNA，采用 IPCR 技术，针对待测的转基因生物的目的基因插入区域两侧序列上的酶切位点，采用限制酶进行酶切，然后用 T4DNA 连接酶进行连接，使含有目的基因的酶切片段形成环状 DNA。采用根据目的基因的序列设计的反向引物进行 PCR 扩增，扩增产物为线性 DNA 片段，其中含有部分目的基因序列与插入区域两侧序列。如果目的基因为单拷贝插入或多拷贝单位点插入，扩增产物在凝胶电泳上呈现单一条带；如果目的基因为多拷贝多位点插入，扩增产物在凝胶电泳上呈现多条带，条带数目等于目的基因插入的拷贝数。

6.2.2 试剂

Taq I 酶、T4 DNA 连接酶、*Sac* II 酶，其余同本部分 6.1.2。

6.2.3 材料

同本部分 6.1.3。

6.2.4 引物

根据目的基因的序列设计的反向引物；按引物序列合成引物，加入无离子水配成 10 mmol/L 贮存。直接用于 PCR 反应的工作液配成 30 μmol/L。

6.2.5 仪器

同本部分 6.1.5。

6.2.6 样品制备及 DNA 提取

以转基因生物为试验样品，受体生物为参照样品种，含有相应外源基因的阳性质粒为阳性对照样品。按 DB440300/T 32.1 规定的方法提取制备 DNA 样品。

6.2.7 测定

6.2.7.1 取 0.1 μg~0.2 μg 样品 DNA 经 *Taq* I 酶切后，用 T4 DNA 连接酶环化。

6.2.7.2 连接产物经 *Sac* II 酶切，乙醇沉淀后溶于 10 μL TE 溶液（10 mmol/L Tris-HCl、1 mmol/L EDTA，pH 7.4），保存于 -20 °C 冰箱中，作为 PCR 扩增模板。

6.2.7.3 PCR 反应体系

同本部分 6.1.7.1。

6.2.7.4 反应体系对照设置

同本部分 6.1.7.2。

6.2.7.5 扩增条件

同本部分 6.1.7.3。

6.2.7.6 凝胶电泳检测 PCR 产物

同本部分 6.1.7.4。

6.2.8 结果判定

6.2.8.1 试验样品呈现的条带数目与待测的转基因生物的拷贝数相同，可判定试验样品中目的基因整合拷贝数保持稳定。

6.2.8.2 试验样品呈现的条带数目与待测的转基因生物的拷贝数不同，可判定试验样品中目的基因整合拷贝数发生变异。

6.2.8.3 试验样品中目的基因整合拷贝数发生变异，可判定该变异对转基因生物的食用安全性有不良影响。

6.3 目的基因整合位点检验

6.3.1 原理

提取制备转基因生物细胞的总 DNA，以待测的转基因生物中目的基因插入位点两侧的边界序列设计的引物进行 PCR 扩增，使扩增产物含有两侧的边界序列和目的基因的部分序列。凝胶电泳分离后，收集相应的条带，用限制性内切酶进行酶切，将其克隆到一种合适的测序载体上，用 DNA 自动测序仪测定条带的序列，测定目的基因在受体生物基因组中整合位点两侧的边界序列。

6.3.2 试剂

同本部分 6.1.2。

测序试剂：按 DNA 自动测序仪的操作说明准备。

6.3.3 材料

测序载体；包括单链丝状噬菌体—M13 载体， λ 噬菌体载体— λ ZAP，pUC 系列，pGEM 系列等；其他材料同本部分 6.1.3。

6.3.4 引物

根据待检的转基因生物中目的基因插入位点两侧的边界序列，设计和合成相应的引物，使扩增产物含有两侧的边界序列和目的基因的部分序列；按引物序列合成引物，加入无离子水配成 10 mmol/L 贮存。直接用于 PCR 反应的工作液配成 30 μ mol/L。

6.3.5 仪器

DNA 自动测序仪；其他仪器同本部分 6.1.5。

6.3.6 样品制备及 DNA 提取

同本部分 6.1.6。

6.3.7 测定

同本部分 6.1.7.1。

6.3.8 测序

收集扩增产物或条带，用限制性内切酶进行酶切，将其克隆到一种合适的测序载体上。按 DNA 自动测序仪的操作程序进行测序。

6.3.9 结果判定

6.3.9.1 试验样品凝胶电泳目标条带的序列与待测的转基因生物的目的基因插入位点两侧的边界序列相同，可判定样品中目的基因的整合位点保持稳定。

6.3.9.2 试验样品凝胶电泳目标条带的序列与待测的转基因生物的目的基因插入位点两侧的边界序列不同，可判定样品中目的基因的整合位点发生变异。

6.3.9.3 试验样品中目的基因整合位点发生变异，可判定该变异对转基因生物的食用安全性有不良影响。

6.4 目的基因碱基对数目检验

6.4.1 原理

提取制备转基因生物细胞的总 DNA，根据待检转基因生物导入的目的基因的核酸序列，设计和合成相应的引物，以 PCR 在适当的条件下对目的基因全序列进行扩增，采用琼脂糖凝胶电泳检测相应的条带，对照 DNA 分子量标准，测定目的基因的碱基对数目。

6.4.2 试剂

同本部分 6.1.2。

6.4.3 材料

同本部分 6.1.3。

6.4.4 PCR 引物

根据待测的转基因生物中导入的目的基因全序列，设计合成相应的引物；按引物序列合成引物，加入无离子水配成 10 mmol/L 贮存。直接用于 PCR 反应的工作液配成 30 μ mol/L。

6.4.5 仪器

同本部分 6.1.5。

6.4.6 样品制备及 DNA 提取

以转基因生物为试验样品，受体生物为参照样品，含有相应目的基因的阳性质粒为阳性对照样品。按 DB440300/T 32.1 规定的方法提取制备 DNA 样品。

6.4.7 测定

同本部分 6.1.7。

6.4.8 结果判定

6.4.8.1 试验样品中目的基因相应条带的碱基对数与待测的转基因生物的理论值相同，可判定试验样品中目的基因的碱基对数保持稳定。

6.4.8.2 试验样品中目的基因相应条带的碱基对数大于待测的转基因生物的理论值，可判定试验样品中目的基因分子发生断裂变异。

6.4.8.3 试验样品中目的基因相应条带的碱基对数小于待测的转基因生物的理论值，可判定试验样品中目的基因分子发生截短变异。

6.4.8.4 试验样品中目的基因分子发生断裂变异或者截短变异，可判定该变异对转基因生物的食用安全性有不良影响。

6.5 目的基因核苷酸序列检验

6.5.1 原理

提取制备转基因生物细胞的总 DNA，根据待检转基因生物导入的目的基因的核苷酸序列，设计和合成相应的引物，以 PCR 在适当的条件下分别对目的基因全序列进行扩增，采用凝胶电泳分离相应的条带。收集相应的条带，用限制性内切酶进行酶切，将其克隆到一种合适的测序载体上，用 DNA 自动测序仪测定条带的核苷酸序列。

6.5.2 试剂

同本部分 6.1.2。测序试剂：按 DNA 自动测序仪的操作手册准备。

6.5.3 材料

测序载体：包括单链丝状噬菌体—M13 载体， λ 噬菌体载体— λ ZAP，pUC 系列，pGEM 系列等。其他材料同本部分 6.1.3。

6.5.4 PCR 引物

根据待测的转基因生物导入的目的基因全序列，设计合成相应的引物；按引物序列合成引物，加入无离子水配成 10 mmol/L 贮存。直接用于 PCR 反应的工作液配成 30 μ mol/L。

6.5.5 测序引物

根据待测目的基因在测序载体上插入位置两侧的核酸序列，设计相应的特异性引物；按引物序列合成引物，加入无离子水配成 100 μ mol/L 贮存。直接用于测序延伸反应的工作液配成 5 μ mol/L。

6.5.6 仪器

DNA 自动测序仪；其他仪器同本部分 6.1.5。

6.5.7 样品制备及 DNA 提取

以转基因生物为试验样品，受体生物为参照样品，含有相应目的基因的阳性质粒为阳性对照样品。

按 DB440300/T 32.1 规定的方法提取制备 DNA 样品。

6.5.8 测定

同本部分 6.1.7。

6.5.9 测序

收集扩增产物或条带，用限制性内切酶进行酶切，将其克隆到一种合适的测序载体上。按 DNA 自动测序仪的操作程序进行测序。

6.5.10 结果判定

6.5.10.1 试验样品中外源基因的测定序列与待测的转基因生物的设计序列相同，可判定试验样品中目的基因的序列保持稳定。

6.5.10.2 试验样品中外源基因的测定序列与待测的转基因生物的设计序列不同，可判定试验样品中目的基因的核苷酸序列发生变异。

6.5.10.3 目的基因核苷酸序列所发生的变异不导致其表达产物序列的改变，可判定该变异对转基因生物的食用安全性无不良影响。

6.5.10.4 目的基因核苷酸序列所发生的变异导致其表达产物序列的改变，可判定该变异对转基因生物的食用安全性有不良影响。

6.6 目的基因表达特性检验

6.6.1 原理

根据待检转基因生物目的基因的表达产物、表达量及组织特异性，以转基因生物靶器官组织为试验样品，以受体生物靶器官组织和转基因生物非靶器官组织为参照样品种，分别提取制备总蛋白质，采用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离测定目标蛋白质，比较试验样品与参照样品种中目标蛋白质的条带及强度。

6.6.2 试剂

30% 丙烯酰胺贮存液：29% 丙烯酰胺，1% N,N'-甲叉双丙烯酰胺，用去离子水配制，避光贮存于棕色瓶中，4℃保存；1.5 mol/L Tris-HCL (pH8.8) 和 1.0 mol/L Tris-HCL (pH6.8) 缓冲液：4℃保存；10% SDS：用去离子水配制，室温保存；TEMED：原液使用，4℃避光保存；10% 过硫酸铵：用去离子水配制，4℃保存，1周内使用；电泳缓冲液：25 mmol/L Tris碱，192 mmol/L 甘氨酸，0.1% SDS (pH8.3)，用去离子水或蒸馏水配制，室温保存；样品缓冲液：60 mmol/L Tris-HCL (pH6.8)，2% SDS，1.44 mmol/L β-巯基乙醇，25% 甘油，0.1% 溴酚蓝，用去离子水配制，避光贮存于棕色瓶中，4℃保存；2.5% 硝酸银；考马斯亮蓝G-250；实验用水：按GB/T6682的规定执行。

6.6.3 材料

转基因生物新鲜样品、受体生物新鲜样品、蛋白质分子量的标准物质、1.5 mL~5 mL 离心管及滤芯吸头（10 μL，20 μL，100 μL，200 μL，1 000 μL）。

6.6.4 仪器

小型垂直电泳装置、电子天平（感量为 0.001 g）、恒温孵育装置、普通离心机、低温冷冻高速离心机、微型离心机、研钵及粉碎装置、低温冰箱、普通冰箱、凝胶成像系统、100℃沸水浴、摇床、核酸蛋白分析仪、微量移液器、超净工作台及实验用水制备装置。

6.6.5 样品制备及蛋白质提取

以转基因生物靶器官组织为试验样品，以受体生物靶器官组织和转基因生物非靶器官组织为对照样品；按 DB440300/T 32.1 规定的方法提取制备样品的蛋白质。

6.6.6 测定

同 DB440300/T 32.3 中的附录 B。

6.6.7 结果判定

6.6.7.1 试验样品出现目的基因表达产物的条带，条带的分子量与待测的转基因生物的表达产物的理论分子量相同或相近，对照样品无此条带，空白样品结果正常，可判定试验样品中目的基因的表达特性保持稳定。

6.6.7.2 试验样品和对照样品均出现目的基因表达产物的条带，条带的分子量与待测的转基因生物的表达产物的理论分子量相同或相近，但试验样品、对照样品条带的强度差异显著，且与待测的转基因生物基因工程设计目标相同，空白样品结果正常，可判定试验样品中目的基因的表达特性保持稳定。

6.6.7.3 试验样品不出现目的基因表达产物的条带，或者条带的分子量与待测的转基因生物的表达产物的理论分子量不同，可判定试验样品中目的基因的表达特性发生变异。

6.6.7.4 试验样品和对照样品均出现目的基因表达产物的条带，条带的分子量与待测的转基因生物的表达产物的理论分子量相同或相近，但试验样品、对照样品条带的强度差异不显著，且与待测的转基因生物基因工程设计目标不同，空白样品结果正常，可判定试验样品中目的基因的表达特性发生变异。

6.6.7.5 外源基因的表达特性发生变异，可判定该变异对转基因生物食用安全性有不良影响。

6.7 目的基因表达产物分子量检验

6.7.1 原理

根据待检转基因生物目的基因表达产物的分子特性，以转基因生物组织或细胞为试验样品，制备目的基因表达产物样品，用基质辅助激光解吸电离质谱（MALDI-TOF-MS）测定表达产物的分子量。基质辅助激光解吸电离质谱（MALDI-TOF-MS）测定分子质量的准确度可达到0.1%~0.001%。

6.7.2 试剂

0.05%三氟乙酸（TFA）、乙腈、0.1%三氟乙酸（TFA）、CCA 基质液（50mmol/L 1-氰基-4-羟基肉桂酸，40%乙腈，60%三氟乙酸（0.1%），涡旋混合，12 000 r/min 离心 2min）、实验用水：按 GB/T6682 的规定执行。

6.7.3 材料

转基因生物新鲜样品、受体生物新鲜样品和ZIPTIP™ C18 微柱。

6.7.4 仪器

MALDI-TOF-MS 仪、旋涡混合器及冷冻干燥机。

6.7.5 制备目标蛋白质样品

按 DB440300/T 32.1 规定的方法从转基因生物制备表达产物。

6.7.6 测定

质谱样品的制备：将纯化蛋白质样品抽提液冷冻干燥后溶解于乙腈：0.1% TFA（30：70）中，涡旋混合，短时间离心；取上清液用ZIPTIP™ C18 微柱进行脱盐，再与CCA基质液混合，点样于不锈钢板上，空气中自然干燥后备用。

质谱分析：为 MALDI-TOF-MS 仪选择适当的参数和条件；制备好的样品置于仪器上分析。记录质谱峰。

6.7.7 结果判定

6.7.7.1 测定的表达产物分子量与待测的转基因生物的表达产物理论分子量相同，或两者的差异小于0.1%，可判定试验样品中目的基因表达产物的分子量保持稳定。

6.7.7.2 测定的表达产物分子量与待测的转基因生物的表达产物理论分子量的差异大于0.1%，可判定试验样品中目的基因表达产物的分子量发生变异。

6.7.7.3 试验样品中目的基因表达产物分子量发生变异，可判定该变异对转基因生物的食用安全性有不良影响。

6.8 目的基因表达产物氨基酸序列检验

6.8.1 原理

根据待检转基因生物外源基因表达产物的分子特性，以转基因生物组织或细胞为试验样品，制备目的基因表达产物样品，用自动氨基酸序列分析仪测定目标蛋白质的 N 末端序列或全序列。

6.8.2 试剂

溶液 A：100 mmol/L 醋酸，0.5%PVP-40；酶解缓冲液：10% 乙腈，0.1 mol/L 的碳酸氢铵缓冲液（pH8.0）；胰蛋白酶；溶剂 1:100%乙酸乙酯，0.0016% DTT；PITC 溶液（Edman 试剂）：0.5% 异硫

氰酸苯酯庚烷溶液；二异丙基乙胺（DIPEA）；100% 三氟乙酸；25% 三氟乙酸；氨基酸序列分析试剂：按自动氨基酸序列分析仪的操作手册准备。

6.8.3 材料

转基因生物新鲜样品、受体生物新鲜样品、PTH-氨基酸微型柱及 PVDF 膜。

6.8.4 仪器

自动氨基酸序列分析仪、冷冻干燥机。

6.8.5 样品准备

制备目的基因表达产物样品：按 DB 440300/T 32.1 规定的方法从转基因生物制备表达产物；蛋白质样品酶解：取纯化的表达产物样品 10 μg，用 5 μg~10 μg 胰蛋白酶（酶/底物：1:1~1:10），在 100 μL 酶解缓冲液中 37 °C 降解 24 h，同时振荡，制备肽溶液。

6.8.6 氨基酸序列的测定

按照仪器操作程序进行 N 末端序列或全序列的测定。

6.8.7 结果判定

6.8.7.1 测定的目的基因表达产物的氨基酸序列与待测的转基因生物的表达产物的理论氨基酸序列相同，可判定试验样品中目的基因表达产物的氨基酸序列保持稳定。

6.8.7.2 测定的目的基因表达产物的氨基酸序列与待测的转基因生物的表达产物的理论氨基酸序列不同，可判定试验样品中目的基因表达产物的氨基酸序列发生变异。

6.8.7.3 试验样品中目的基因表达产物的氨基酸序列发生变异，可判定该变异对转基因生物食用安全性有不良影响。

6.9 目的基因转录性状检验

6.9.1 原理

提取制备转基因生物细胞总 RNA，分离与纯化 mRNA，采用 RT-PCR 技术检测目的基因的转录产物。首先用根据目的基因转录产物 mRNA 3' 端序列设计的反转录引物，以 mRNA 为模板合成 cDNA 第一链，然后用根据目的基因转录产物 mRNA 5' 端和 3' 端序列设计的引物，采用 PCR 技术以 cDNA 第一链为模板扩增 DNA 片段，采用琼脂糖凝胶电泳分离和检测目标扩增产物的条带。

6.9.2 试剂

10×RT 缓冲液（500 mmol/L Tris-HCl (pH8.0)，0.6 mmol/L 氯化镁，400 mmol/L 氯化钾，10 mmol/L DTT）；10×PCR 缓冲液（100 mmol/L Tris-HCl (pH8.3)，500 mmol/L 氯化钾，0.1% 明胶）；dNTP（dATP，dCTP，dGTP，dUTP）溶液：各 2 mmol/L；M-MLV 反转录酶（100 U/μL）；氯化镁（25 mmol/L）；TaqDNA 聚合酶（5 U/μL）；UNG 酶（1 U/μL）；矿物油；溴化乙锭（EB）（10 mg/mL）或其他的染色剂；琼脂糖：电泳纯；50×TAE 缓冲液（242 g Tris 碱，57.1 mL 冰乙酸，100 mL 0.5 mol/L EDTA (pH8.0) 加水至 1 000 mL）及上样缓冲液；实验用水：按 GB/T6682 的规定执行，并且应除去水中的 RNase。

6.9.3 材料

转基因生物新鲜组织或细胞（试验样品）、受体生物新鲜组织或细胞（对照样品）、DNA 分子量标记物、0.5 mL~5 mL 离心管、滤芯吸头（10 μL，20 μL，100 μL，200 μL，1 000 μL）及 oligo(dT)。

6.9.4 引物

反转录引物：根据待测的转基因生物的目的基因转录产物 mRNA 3' 端序列设计合成反转录引物；扩增引物：根据待测的转基因生物的目的基因转录产物 mRNA 5' 端和 3' 端序列设计合成扩增引物，配成 100 ng/L。

6.9.5 仪器

同本部分 6.1.5。

6.9.6 RNA 样品制备

按 DB 440300/T 32.1 规定的方法法提取制备 mRNA 样品。

6.9.7 测定

6.9.7.1 反应体系对照设置

阴性对照：用实验用水代替 M-MLV 反转录酶；空白对照：用实验用水代替总 RNA 样品。

6.9.7.2 cDNA 第一链合成

取 0.5 mL 新的无菌硅化的Eppendorf管，加入 100 ng~5 μg的总RNA样品，再加入dH₂O至 12.5 μL，混匀；然后，加入 3 μL oligo(dT)，混匀，68 °C保温 5 min，降温至 30 °C，保温 5 min，最后降至 0 °C，保温 5 min；取出后加入如下试剂：dNTP 2 μL，10×RT缓冲液 2 μL，M-MLV反转录酶 0.5 μL，混匀，37 °C下反应 45 min，-20 °C放置。

6.9.7.3 PCR 反应

6.9.7.3.1 取 0.5 mL 新的无菌硅化的Eppendorf管，依次加入如下试剂：cDNA反应混合液 3 μL，10×PCR缓冲液 2 μL，25 mmol/L氯化镁溶液 1.2 μL，各 2 mmol/L dNTP溶液 2 μL，扩增引物 1 μL，5 U/μL TaqDNA聚合酶 0.3 μL，加dH₂O至 20 μL，混匀，加矿物油 1 滴（约 50 μL），置PCR扩增仪中。

6.9.7.3.2 扩增条件：见附录 A 的表 A.5，用 Parafilm 将矿物油移去。

6.9.7.4 凝胶电泳检测 PCR 产物

同本部分 6.1.7.4。

6.9.8 结果判定

6.9.8.1 试验样品出现相应的 DNA 条带，且碱基对数与待测的转基因生物的理论值相同或相近，对照样品无此条带，阴性对照和空白对照结果正常，可判定转基因生物目的基因的转录特性及转录产物碱基对数保持稳定。

6.9.8.2 试验样品和对照样品均不呈现相应的 DNA 条带，阴性对照和空白对照结果正常，可判定转基因生物目的基因的转录特性发生变异。

6.9.8.3 试验样品出现相应的 DNA 条带，但碱基对数目与待测的转基因生物的理论值有显著差异，对照样品无此条带，阴性对照和空白对照结果正常，可判定转基因生物目的基因的转录产物碱基对数目发生变异。

6.9.8.4 转基因生物目的基因的转录特性或者转录产物碱基对数目发生变异，可判定该变异对转基因生物的食用安全性有不良影响。

6.10 基因组转录性状检验

6.10.1 原理

生物细胞基因组的转录性状与其转录产生的mRNA的种类及丰度有直接的关系，通过比较转基因生物与受体生物细胞转录产生的mRNA种类的差异，可检测转基因生物基因组转录性状发生的变异。采用 RT-PCR技术，提取制备转基因生物细胞总RNA，分离与纯化mRNA，采用 3' 端锚定引物在反转录酶的作用下用PCR反应扩增出 cDNA链，采用 3' 端锚定引物和 5' 端随机引物组成的引物对，以mRNA：cDNA为模板进行PCR扩增，扩增产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，对待测样品与对照样品的电泳条带进行比对，找出新增的条带和消失的条带。回收差别的条带，通过 PCR扩增和产物纯化，分离差别条带的cDNA。对差别条带的cDNA进行测序和检索，确认对应的表达差异的基因。通过对差异基因的功能分析，判定转基因生物转录性状变异对食用安全性的影响。

6.10.2 试剂

PCR 采用反转录反应体系试剂盒，PCR 选择扩增试剂盒，随机引物 PCR 扩增试剂盒，10 mg/mL 糖原，其它试剂同本部分 6.5.2 和 6.9.2。

6.10.3 材料

同本部分 6.5.3 和 6.9.3。

6.10.4 引物

同本部分 6.9.4。

6.10.5 仪器

同本部分 6.1.5。

6.10.6 RNA 样品制备

按 DB440300/T 32.1 规定的方法提取制备 mRNA 样品。

6.10.7 建立反转录归类反应体系

取 5 μL 5 \times buffer、2 μL 0.1 mol/L DTT、1.6 μL 4 种 dNTP，于 Eppendorf 管中混匀；加入 0.2 μg 总 RNA 或 0.1 μg mRNA 样品，2 μL 引物 T₁₂MN，补 dH₂O 至余终体积为 19 μL ；置 65 $^{\circ}\text{C}$ 5 min，然后转入 37 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 进行退火；加 1 μL 反转录酶，混匀，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 50 min；95 $^{\circ}\text{C}$ 保温 5 min 使酶失活。可立即使用或于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 贮存 6 个月以内使用。

6.10.8 PCR 选择扩增

6.10.8.1 在 0.5 mL Eppendorf 管中按序加入以下试剂：dH₂O 9.2 μL 、5 \times buffer 2 μL 、250 $\mu\text{mol/L}$ 4 种 dNTP 1.6 μL （终浓度 2 $\mu\text{mol/L}$ ）、³²P-dATP 1 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ oligo dTMN 2 μL （终浓度 1 $\mu\text{mol/L}$ ）、cDNA 2 μL 、5 U/ μL Taq 聚合酶 0.2 μL 、2 $\mu\text{mol/L}$ 随机引物 2 μL ，总体积 20 μL ，混匀后加入 25 μL 矿物油。

6.10.8.2 按附录 A 的表 A.6 所列的参数进行循环反应。

6.10.9 凝胶电泳分离 PCR 产物

6.10.9.1 凝胶制备

同本部分 6.1.7.4。

6.10.9.2 取 3.5 μL PCR 扩增产物与 2 μL 甲酰胺加样液混匀，并于 80 $^{\circ}\text{C}$ 保温 2 min。

6.10.9.3 上样于 6% 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离，直至二甲苯腈（XC）泳动到胶底部。

6.10.9.4 比较待测样品与对照样品的条带，找出有差别的条带，即两者不相同的条带。

6.10.10 差别条带的回收

6.10.10.1 从聚丙烯酰胺凝胶上切下差别条带，放入 1.5 mL Eppendorf 管中。

6.10.10.2 用 1 mL TE 冲洗一遍，再加入 100 μL TE，碾碎胶条。室温下放置 15 min，100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min。

6.10.10.3 12 000 r/min 离心 2 min，上清液转至另一新的 Eppendorf 管中。

6.10.10.4 加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc（pH 4.8）、5 μL 糖原、250 μL 无水乙醇，混匀，-20 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀过夜。

6.10.10.5 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min。70% 乙醇洗涤沉淀 2 次，室温下轻度干燥后用 ddH₂O 溶解，-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

6.10.11 回收条带的 PCR 扩增

6.10.11.1 在 0.5 mL Eppendorf 管中按序加入以下试剂：ddH₂O 33.5 μL 、10 \times buffer 5 μL 、4 种 dNTP（2.5 mmol/L）2.5 μL 、T₁₂MN 引物 1 μL 、随机引物 2 μL 、回收的 cDNA 5 μL 、Taq 聚合酶（5 U/ μL ）1 μL ，总体积为 50 μL ，混匀，加 25 μL 矿物油，瞬时离心一下。

6.10.11.2 按附录 A 的表 A.7 所列的参数进行第一次循环扩增。

6.10.11.3 按附录 A 的表 A.8 所列的参数进行第二次循环扩增。

6.10.11.4 取 15 μL 扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

6.10.12 扩增产物的纯化

6.10.12.1 PCR 产物中加入 100 μL dH₂O。

6.10.12.2 用等体积的酚/氯仿/异戊醇抽提。

6.10.12.3 取上清加入 10 μL 3 mol/L NaAc（pH 5.2）、5 μL 糖原、250 μL 无水乙醇，混匀，-20 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀过夜。

6.10.12.4 12 000 r/min 离心 15 min。用 75% 乙醇洗涤沉淀 2 次，再溶解于适量的 ddH₂O 中，-20 $^{\circ}\text{C}$ 贮存备用。

6.10.13 扩增产物的序列测定

序列测定方法同本部分 6.5。

6.10.14 差异基因的确证

根据差别条带的序列，应用国际通用的生物信息学数据库（见本标准第2部分的5.1.2），检索差异表达的基因及其功能。分析差异基因转录性状的改变对转基因生物毒害成分或营养成分含量的影响。

6.10.15 结果判定

6.10.15.1 除外源基因的条带外，试验样品与对照样品的条带无差异，可判定转基因生物基因组的转录性状保持稳定；除外源基因的条带外，试验样品与对照样品的条带有差异，可判定转基因生物基因组的转录性状发生变异。

6.10.15.2 差异基因转录性状的改变不增加转基因生物毒害成分的含量和不降低营养成分的含量，可判定该变异对转基因生物的食用安全性无不良影响。

6.10.15.3 差异基因转录性状的改变增加转基因生物毒害成分的含量或降低营养成分的含量，可判定该变异对转基因生物的食用安全性有不良影响。

7 抗生素抗性基因水平转移检验

7.1 抗性基因向环境中非靶生物细胞转移检验

7.1.1 原理

农业转基因生物在环境释放过程中，整合于转基因生物染色体中的抗生素抗性基因，在一定条件下，可能通过转化、转导、接合等方式向环境中的接合菌转移，使接合菌获得相应的生物活性。根据转基因植物、动物、微生物的释放方法及整合的抗生素抗性基因可能发生转移的方式，设计相应的试验方法，收集试验环境土壤、垃圾、水体等样品，选择性培养接合菌，挑选具有相应生物活性的菌落，提取DNA，采用PCR特异扩增其抗生素抗性基因。

7.1.2 试剂

同本部分6.1.2。

7.1.3 材料

阳性参照样品种：含相应抗生素抗性基因的质粒样品；阴性参照接合菌：大肠杆菌TG1标准株；阳性参照接合菌：转相应外源基因的大肠杆菌TG1株。

7.1.4 引物

根据待测的转基因生物的转基因生物导入的抗生素抗性基因的序列，设计合成相应的引物；按引物序列合成引物，加入无离子水配成10 mmol/L 贮存。直接用于PCR反应的工作液配成30 μmol/L。

7.1.5 仪器

同本部分6.1.5。

7.1.6 样品收集

7.1.6.1 转基因植物种植前和种植30 d后，分别收集转基因植物田间试验场内的土壤、垃圾、水体等样品，种植前样品为对照样品，种植后为试验样品。

7.1.6.2 转基因动物饲养前和饲养30 d后，分别收集转基因动物饲养场内的土壤、垃圾、水体等样品，饲养前样品为对照样品，饲养后为试验样品。

7.1.6.3 将转基因微生物混入饲料中或饮用水中，供实验动物自由取食。饲养前和饲养30 d后，分别收集饲养场内的土壤、垃圾、水体等样品，饲养前样品为对照样品，饲养后为试验样品。

7.1.7 样品处理

7.1.7.1 取对照样品和试验样品各1克，用无菌水按1:5 (w/v) 混合，放置1 h，用倾泻法将上清液注入无菌容器中。

7.1.7.2 针对抗生素抗性的选择性培养：将样本悬液进行 $10^1 \sim 10^4$ 的10倍梯度稀释，取稀释后各级样本悬液10 μL注入LB平板，刮匀，37℃培养24 h，检查菌落数，选择适当稀释倍数。将被选的适当稀释倍数的样本吸取50 μL，在选择培养基（含转基因生物的抗生素抗性基因相应的抗生素）37℃培养36 h，检查菌落数，并挑选各种不同形态的菌落革兰氏染色后，镜下观察挑选接合菌—大肠杆菌在LB培养基进行纯培养。同时对阳性和阴性对照菌株进行选择培养。

7.1.8 DNA 提取

7.1.8.1 环境样品 DNA 提取

7.1.8.1.1 将从选择培养基挑选的大肠杆菌菌落在LB培养基中 30 °C 培养至饱和密度 ($A_{660}=1.1$)。

7.1.8.1.2 取 1.5 mL 饱和培养物 10 000 r/min 离心 1 min, 弃上清。

7.1.8.1.3 加入 1 mL TES (0.2 M Tris-HCl(pH 8.0), 0.5 mM EDTA (pH 8.0), 0.5 M 蔗糖) 悬浮细胞后, 加 100 μ L 溶菌酶, 室温保温 15 min。

7.1.8.1.4 混合物中加入等体积的酚/氯仿, 10 000r/min 离心 5 min, 取上清, 用 0.1 倍体积的醋酸铵和 0.6 倍体积的异丙醇, -20 °C, 沉淀 20 min。

7.1.8.1.5 -4 °C, 10 000 r/min 离心 10 min, 弃上清后, 用 70%的乙醇清洗 5 min, -4 °C, 10 000 r/min 离心 5 min, 沉淀风干。

7.1.8.1.6 沉淀溶解于 100 μ L TE, 加入 2 μ L RNase A 37 °C 保温 20 min。 -20 °C 储存。

7.1.8.2 参照样品 DNA 提取

参照 DB 440300/T 32.1 的方法分别提取阳性参照样品、阴性参照接合菌和阳性参照接合菌的 DNA。

7.1.9 PCR 检测

同本部分 6.1.7。

7.1.10 结果判定

7.1.10.1 试验样品检测结果阴性, 对照样品和参照样品检测结果正常, 可判定转基因生物的抗生素抗性基因未发生向环境中非靶生物细胞的转移。

7.1.10.2 试验样品检测结果阳性, 对照样品和参照样品检测结果正常, 可判定转基因生物的抗生素抗性基因发生向环境中非靶生物细胞的转移。

7.2 抗性基因向动物胃肠道内非靶生物细胞转移检验

7.2.1 原理

农业转基因生物在摄入动物体内过程中, 整合于转基因生物染色体中的抗生素抗性基因, 在一定条件下, 可能通过转化、转导、接合等方式向动物胃肠道内接合菌转移, 使接合菌获得相应的生物活性。根据转基因植物、动物、微生物的摄入方法及整合的抗生素抗性基因可能发生转移的方式, 设计相应的试验方法, 收集试验动物胃肠道内容物样品, 选择性培养接合菌, 挑选具有相应生物活性的菌落, 提取 DNA, 采用 PCR 特异扩增其抗生素抗性基因。

7.2.2 试剂

同本部分 6.1.2。

7.2.3 材料

同本部分 7.1.3。

7.2.4 引物

同本部分 7.1.4。

7.2.5 仪器

同本部分 6.1.5。

7.2.6 样品收集

将转基因生物混入饲料中或饮用水中, 供实验动物自由取食。饲养前和饲养 30 d 后, 分别收集实验动物的粪便和肠内容物等样品, 饲养前样品为对照样品, 饲养后为试验样品。

7.2.7 样品处理

同本部分 7.1.7。

7.2.8 DNA 提取

同本部分 7.1.8。

7.2.9 PCR 检测

同本部分 6.1.7。

7.2.10 结果判定

7.2.10.1 试验样品检测结果阴性，对照样品和参照样品检测结果正常，可判定转基因生物的抗生素抗性基因未发生向动物胃肠道内非靶生物细胞的转移。

7.2.10.2 试验样品检测结果阳性，对照样品和参照样品检测结果正常，可判定转基因生物的抗生素抗性基因发生向动物胃肠道内非靶生物细胞的转移。

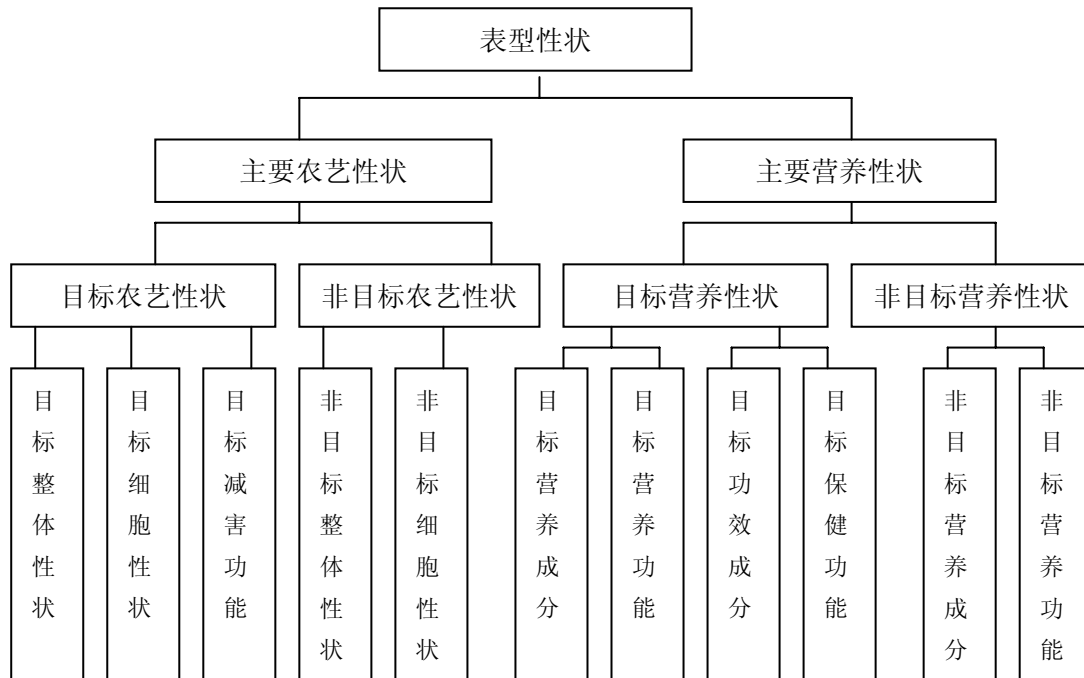


图 1 农业转基因生物的各项表型性状及相互关系

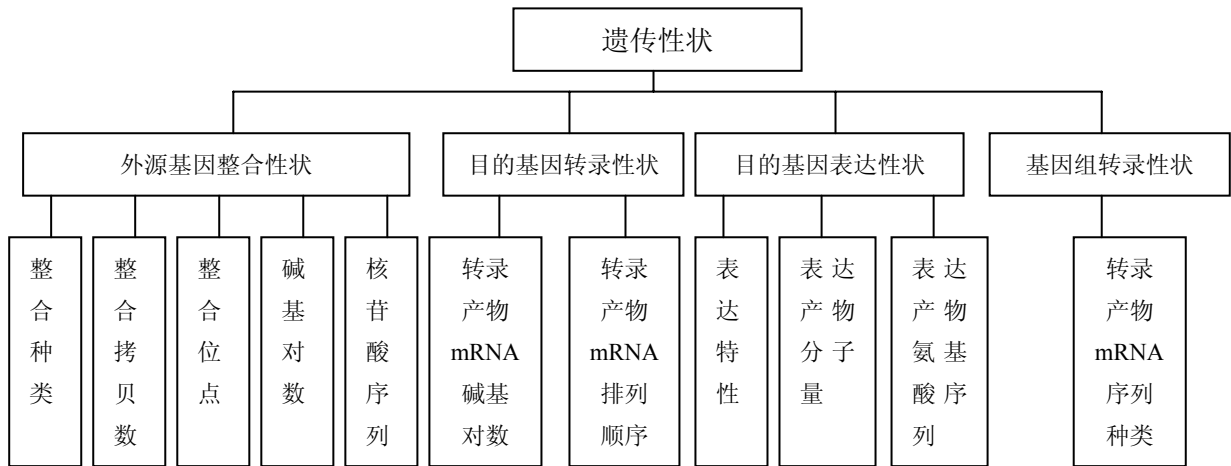


图 2 农业转基因生物的各项遗传性状及相互关系

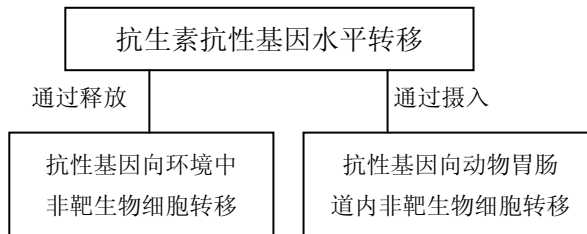


图 3 农业转基因生物抗性基因水平转移的形式及相互关系

附 录 A
(资料性附录)
A.1 常见的外源基因

1	CaMV 35S	花椰菜花叶病毒35S启动子, 为常见的调控基因。
2	NOS	来源于农杆菌的胭脂碱合成酶基因终止子, 为常见的调控元件。
3	FMV 35S	玄参花叶病毒 35S 启动子, 为常见的调控元件。
4	NPT II	新霉素-3-磷酸转移酶基因, 为常见的标记基因。
5	GUS	β -葡萄糖苷酸酶基因, 为常见的报告基因。
6	CP4 EPSPS	5-烯醇丙酮酸莽草酸-3-磷酸合成酶基因, 为常见的目的基因。
7	PAT	草丁膦乙酰转移酶基因, 为常见的目的基因、标记基因或报告基因。
8	BAR	草丁膦乙酰转移酶基因, 为常见的目的基因、标记基因或报告基因。
9	PLRVrep	马铃薯卷叶病毒重复序列, 为常见的目的基因。
10	PVYcp	马铃薯 Y 病毒外壳蛋白, 为常见的目的基因。
11	Bt	苏云金芽孢杆菌杀虫毒蛋白基因, 为常见的目的基因。
12	CryIA (b)	苏云金芽孢杆菌杀虫毒蛋白 <i>cryIA</i> (b) 基因, 为常见的目的基因。
13	Cry9C (b)	苏云金芽孢杆菌杀虫毒蛋白 <i>cry9c</i> 基因, 为常见的目的基因。
14	CryIA (b) - CryIA (c)	苏云金芽孢杆菌杀虫毒蛋白 <i>cryIA</i> (b) - <i>cryIA</i> (c) 基因, 为常见的目的基因。
15	CryIA (c)	苏云金芽孢杆菌杀虫毒蛋白 <i>cryIA</i> (c) 基因, 为常见的目的基因。
16	GOX	草苷膦氧化还原酶基因, 为常见的目的基因。
17	BARSTAR	barnase基因的特异抑制基因, 为常见的目的基因。
18	CMV-CP	黄瓜花叶病毒外壳蛋白基因, 为常见的目的基因。
19	TMV-54KD	烟草花叶病毒54KD蛋白基因, 为常见的目的基因。
20	TMV-CP	烟草花叶病毒外壳蛋白基因, 为常见的目的基因。
21	AP-D	来源于柞蚕或天蚕的抗菌肽 (Cecropin D) 基因, 为常见的目的基因。
22	PG	多聚半乳糖醛酸酶基因, 为常见的目的基因。

表 A.2 常见外源基因的扩增引物序列

检测基因	引物序列	扩增片段长度	基因类别
CaMV 35S	正: 5' -gat agt ggg att gtg cgt ca -3' 反: 5' -gct cct aca aat gcc atc a -3'	195 bp	调控基因
NOS	正: 5' -gaa tcc tgt tgc cgg tct tg -3' 反: 5' -tta tcc tag ttt gcg cgc ta -3'	180 bp	调控基因
FMV 35S	正: 5' -agt cca aag cct caa ggt c -3' 反: 5' -cat tag tga gtg ggc tgt cag g -3'	365 bp	调控基因
NPT II	正: 5' -agg atc tcg tcg tga ccc at -3' 反: 5' -gca cga gga agc ggt ca -3'	183 bp	标记基因
GUS	正: 5' -tca gcg cga agt ctt tat ac -3' 反: 5' -ttc agt tcg ttg ttc aca ca -3'	210 bp	报告基因

CP4 EPSPS	正: 5' -ctt ctg tgc tgt agc cac tga tgc-3' 反: 5' -cca cat tcc ttc gca aga ccc ttc c -3'	320 bp	目的基因
	正: 5' -cct teg caa gac cct tcc tct ata -3' 反: 5' -atc ctg gcg ccc atg gcc tgc atg -3'	513 bp	
PAT	正: 5' -gtc gac atg tct ccg gag ag -3' 反: 5' -gca acc aac caa ggg tat c -3'	191 bp	报告基因 标记基因 目的基因
PAT	正: 5' -cgc ggt ttg tga tat cgt taa c -3' 反: 5' -tct tgc aac ctc tct aga tca tca a -3'	108 bp	
BAR	正: 5' -aca agc acg gtc aac ttc c -3' 反: 5' -act cgg ccg tcc agt cgt a -3'	175 bp	
BAR	正: 5' -acc atc gtc aac cac tac atc g -3' 反: 5' -gct gcc aga aac cca cgt cat -3'	430 bp	
PLRVrep	正: 5' -tcg tca tta aac ttg acg ac -3' 反: 5' -ctt ctt tca cgg agt tcc ag -3'	172 bp	目的基因
PVYcp	正: 5' -gaa tca agg cta tca cgt cc -3' 反: 5' -cta ccg cac tgc ctc ata cc -3'	161 bp	目的基因
Bt	正: 5' -ccc act agt taa caa ttt gat tgg ga -3' 反: 5' -ccg gaa gct tta gga ctg tag gt -3'	299 bp	目的基因
CryIA(b)-CryIA (c)	正: 5' -gtt cgt tct cgg act agt tg -3' 反: 5' -gga gag ctg ggt tag tag ga -3'	215 bp	目的基因
CryIA (c)	正: 5' -gtt cca gct aca gct acc tcc -3' 反: 5' -cca cta aag ttt cta aca ccc ac -3'	119 bp	目的基因
Cry3A	正: 5' -aga gcc gtc aac acc aat c -3' 反: 5' -tct ggg tgc tgg cct cat cg -3'	112 bp	目的基因
GOX (修饰)	正: 5' -gtc ttc gtg ttg ctg gaa ccg tt -3' 反: 5' -gaa ctg gca gga gcg aga gct -3'	121 bp	目的基因
	正: 5' -ctc ttg ttt cgt cgt ttc atc -3' 反: 5' -gaa acc cat cca ctt gga gta -3'	450 bp	
BARNASE	正: 5' -ctg ggt ggc atc aaa ggg aac c -3' 反: 5' -tcc ggt ctg aat ttc tga agc ctg -3'	161 bp	目的基因
BARSTAR	正: 5' -tca gaa gta tca gcg acc tcc acc -3' 反: 5' -aag tat gat ggt gat gtc gca gcc -3'	236 bp	目的基因
CMV-CP	正: 5' -aag acg ttg gca gct ggt cg -3' 反: 5' -ctc gaa ttt gaa tgc gcg aa -3'	202 bp	目的基因
TMV-54KD	正: 5' -gag ttg tct ggc atc att ga -3' 反: 5' -aca atg gtc aaa gcc ggg ta -3'	295 bp	目的基因
TMV-CP	正: 5' -gtg ttc ttg tca tca gcg tgg gc -3' 反: 5' -cac cgt tgc gtc gtc tac tct acg -3'	327 bp	目的基因
AP-D	正: 5' -agt tgg aat gca ttc aag gaa -3' 反: 5' -tta ctt ggc caa ggc agt agc -3'	122 bp	目的基因
PG	正: 5' -gga tcc tta gaa gca tct agt -3' 反: 5' -cgt tgg tgc atc cct gca tgg -3'	180 bp	目的基因

表 A.3 PCR 检测反应体系 (25 μ L 体系)

试剂名称	加入 PCR 反应体系的量
10 \times PCR Buffer	2.5 μ L
MgCl ₂ (25 mmol/L)	2 μ L
dNTP (10 mmol/L)	0.5 μ L
Primer I + II (30 μ mol/L)	0.7 μ L
Taq 酶 (5 U/ μ L)	0.3 μ L
UNGE (1 U/ μ L)	0.4 μ L
Template	适量
H ₂ O	加至 25 μ L

表 A.4 PCR 扩增反应条件

变性	扩增	循环次数	最后延伸
37 $^{\circ}$ C, 3min	94 $^{\circ}$ C, 10 min 94 $^{\circ}$ C, 30 s 60 $^{\circ}$ C, 1 min 72 $^{\circ}$ C, 1 min	6	72 $^{\circ}$ C, 6 min
	94 $^{\circ}$ C, 30 s 55 $^{\circ}$ C, 1 min 72 $^{\circ}$ C, 1 min	40	

表 A.5 PCR 扩增反应条件

变性	扩增	循环次数	最后延伸
94 $^{\circ}$ C, 40 s	55 $^{\circ}$ C, 退火 1 min 72 $^{\circ}$ C, 延伸 1.5 min-2 min	25-35	72 $^{\circ}$ C, 10 min

表 A.6 PCR 扩增反应条件

变性	扩增	循环次数	最后延伸
94 $^{\circ}$ C, 10 min	94 $^{\circ}$ C, 变性 30 s 40 $^{\circ}$ C, 退火 2 min 72 $^{\circ}$ C, 延伸 30 s	40	72 $^{\circ}$ C, 5 min

表 A.7 PCR 扩增反应条件

变性	扩增	循环次数	最后延伸
94 $^{\circ}$ C, 10 min	94 $^{\circ}$ C, 变性 1 min 40 $^{\circ}$ C, 退火 90 s 72 $^{\circ}$ C, 延伸 90 s 72 $^{\circ}$ C, 1min	21	72 $^{\circ}$ C, 10 min

表 A.8 PCR 扩增反应条件

变性	扩增	循环次数	最后延伸
94 ℃, 10 min	94 ℃, 变性 1 min 42 ℃, 退火 90 s 72 ℃, 延伸 90 s 72 ℃, 1 min	20	72 ℃, 10 min

参考文献

- [1] 杨月欣, 王光亚主编. 实用食物营养成分分析手册. 北京: 中国轻工业出版社, 2002: 36-175
- [2] 邓平建, 赵锦, 刘建军, 等. 转基因食品安全性检验的核酸检测技术研究, 卫生研究, 2002, 31 (1): 37-40
- [3] 章冰, 黄健秋, 卫志明. 利用 Inverse PCR 快速筛选单个 T-DNA 拷贝转基因水稻植株的方法. 实验生物学报, 1999, 32 (2): 207-210
- [4] 杨冬燕, 邓平建, 房师松等, 转基因微生物扩散与外源基因转移试验模型的研究, 中国卫生检验杂志, 2004, 14 (2): 138-141
- [5] 卢圣栋主编. 现代分子生物学实验技术 (第二版). 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999: 88-92, 329-353, 382-387, 525-532
- [6] [美]J. 萨姆布鲁克, E.F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯著. 金冬燕, 黎孟枫, 等译. 分子克隆实验指南 (第二版), 北京: 科学出版社, 1999: 880-887
- [7] 刘建军, 邓平建, 房师松等, 转抗菌肽基因辣椒蛋白质检测技术研究, 卫生研究, 2003, 32 (2): 134~137
- [8] 房师松, 刘涛, 邓平建等, 抗菌肽 D 基因在毕赤酵母中的表达及鉴定, 卫生研究, 2004, 33 (1): 81~85
- [9] [美]F. 奥斯伯, R.E. 金斯顿, J.G. 塞德曼, 等著. 颜子颖, 王海林译. 精编分子生物学实验指南, 北京: 科学出版社, 1998: 120-130
- [10] 王关林, 方宏筠主编. 植物基因工程 (第二版). 北京: 科学出版社, 2002: 614-616, 758-761, 856-857
-