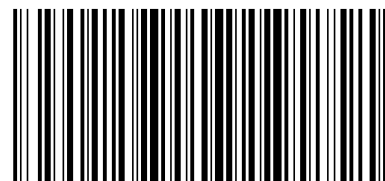


表 A.5 (续)

试剂名称	终浓度	加入体积( $\mu\text{L}$ )
反应参数	二步法(适合 ABI 仪器)	预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ /3 min,1 个循环;95 $^{\circ}\text{C}$ /15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ /60 s,40 个循环
	三步法(只适合 LightCycler 仪器)	预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ /10 min,1 个循环;95 $^{\circ}\text{C}$ /5 s,50 $^{\circ}\text{C}$ /5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ /20 s,40 个循环
注 1: 实时荧光 PCR 建议最好使用市售 real-time PCR 专用试剂,反应体系和反应参数可直接参考试剂盒说明书。		
注 2: 不同型号仪器的使用可直接参考仪器使用操作说明。		
注 3: 当外源基因和内源基因标记相同的荧光报告基团时,应在不同反应管中分别加入外源基因和内源基因的引物、探针,分别进行检测。		
注 4: DNA 模板的加入量可适当调节。合适的 DNA 模板量应该是:内源基因检测的 Ct 值在 15~36 之间,外源基因检测的 Ct 值在 27~36 之间。否则应进一步增加/减少或纯化 DNA。		
注 5: 表中给出的 PCR 反应体系和反应参数可根据仪器要求的不同进行适当调整。		

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1943—2007

小麦中转基因成分 PCR 和  
实时荧光 PCR 定性检测方法Protocol of polymerase chain reaction and real-time PCR for qualitative  
detecting genetically modified components in transgenic wheat

SN/T 1943-2007

书号:155066·2-18225

定价: 8.00 元

2007-08-06 发布

2008-03-01 实施

中华人民共和国  
国家质量监督检验检疫总局 发布

表 A.3 小麦内外源基因定性 PCR 检测的反应体系

试剂名称	储备液浓度	加入体积/ $\mu\text{L}$
10×PCR Buffer	—	2.5
氯化镁( $\text{MgCl}_2$ )	25 mmol/L	2.5
dNTP	2.5 mmol/L	2.0
引物(上游、下游)	10 pmol/ $\mu\text{L}$	1.0
<i>Taq</i> 酶	5 U/ $\mu\text{L}$	0.2
DNA 模板	0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ~6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	2.0
ddH <sub>2</sub> O	—	补足总体积为 25 $\mu\text{L}$

注：反应体系中各试剂的量可根据反应体系的总体积进行适当调整。

表 A.4 小麦内外源基因定性 PCR 检测的反应参数

被检测基因	预变性	扩 增	循环数	后延伸
bar	94℃, 5 min	94℃, 30 s; 58℃, 40 s; 72℃, 1.5 min	35	72℃, 10 min
NOS	94℃, 3 min	94℃, 20 s; 54℃, 40 s; 72℃, 1 min	40	72℃, 3 min
uidA	94℃, 5 min	94℃, 1 min; 62℃, 1 min; 72℃, 1.5 min	40	72℃, 10 min
ubiquitin	94℃, 5 min	94℃, 30 s; 54℃, 30 s; 72℃, 1 min	35	72℃, 10 min
Wx012	95℃, 10 min	95℃, 30 s; 63℃, 30 s; 72℃, 30 s	40	72℃, 7 min
GAG56D	94℃, 5 min	94℃, 30 s; 61℃, 1 min; 72℃, 1.5 min	35	72℃, 10 min

注：PCR 反应循环参数可根据基因扩增仪器型号的不同进行适当调整。

表 A.5 实时荧光 PCR 定性检测小麦内外源基因的反应体系和反应参数

试剂名称	终 浓 度	加入体积( $\mu\text{L}$ )
10×PCR Buffer	1×	2.5
氯化镁( $\text{MgCl}_2$ )(25 mmol)	2.5 mmol/L	2.5
dNTP(含 dUTP)(2.5 mmol)	0.2 mmol/L	2.0
UNG 酶(5 U/ $\mu\text{L}$ )	0.075 U	0.375
上游引物(10 pmol/ $\mu\text{L}$ )	0.2 pmol/ $\mu\text{L}$	1.0
下游引物(10 pmol/ $\mu\text{L}$ )	0.2 pmol/ $\mu\text{L}$	1.0
探针(5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ )	0.2 pmol/ $\mu\text{L}$	1.0
<i>Taq</i> 酶(5 U/ $\mu\text{L}$ )	2.5 U	0.25
DNA 模板	50 ng/ $\mu\text{L}$	1.0 $\mu\text{L}$
补水至		补足水至 25 $\mu\text{L}$

中华人民共和国出入境检验检疫  
行 业 标 准  
小麦中转基因成分 PCR 和  
实时荧光 PCR 定性检测方法  
SN/T 1943—2007

\*  
中国标准出版社出版  
北京复兴门外三里河北街 16 号  
邮政编码:100045  
网址 www.spc.net.cn  
电话:68523946 68517548  
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

\*  
开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 16 千字  
2007 年 11 月第一版 2007 年 11 月第一次印刷  
印数 1—2 000

\*  
书号: 155066·2-18225 定价 8.00 元

附录 A  
(规范性附录)

小麦中转基因成分 PCR 定性检测方法参照表

表 A.1 定性 PCR 检测小麦内外源基因所需的引物序列

被检测基因	基因来源	引物序列	扩增长度/bp
NOS	外源	5'-gaatcctgttgccggtttg-3' 5'-ttatcctagtttgccgcta-3'	180
bar	外源	5'-gtctgcaccatcgtaacc-3' 5'-gaagtccagctgccagaac-3'	445
		5'-acaagcacggtcaacttc-3' 5'-actcgccgtccagtcgta-3'	175
uidA	外源	5'-agtgtacgtatcaccgtttgtgtaac-3' 5'-atgcccgtttggacataccatccgta-3'	1 056
ubiquitin <sup>a</sup>	外源	5'-aacactggcaagtttagcaat-3' 5'-ccgtaataatagacacc-3'	314
GAG56D	小麦属内源	5'-ccaacaacaaccaccgttca-3' 5'-tggccctggacgagagtacct-3'	328
Wx012	小麦种内源	5'-gtcggggaacagaggtgt-3' 5'-ggtgttctccattgcgaaa-3'	102

<sup>a</sup> ubiquitin 只可用于不含玉米成分的多组分小麦样品和单一组分小麦样品的筛选基因。

表 A.2 实时荧光定性 PCR 检测小麦内外源基因的引物和探针序列

被检测基因	基因来源	引物序列	探针序列	扩增长度/bp
GAG56D	小麦属内源	5'-caacaatttctcagcccaaca-3' 5'-ttcttgcattgggttcacctgtt-3'	5'-ttcccgcagcccaacaaccgc-3'	121
Wx012	小麦种内源	5'-gtcggggaacagaggtgt-3' 5'-ggtgttctccattgcgaaa-3'	5'-caaggcggccgaaataagttgcc-3'	102
bar	外源	5'-acaagcacggtcaacttc-3' 5'-actcgccgtccagtcgta-3'	5'-ccgagccgaggaaccgaggag-3'	175
ubiquitin <sup>a</sup>	外源	5'-gtccagaggcagcagaca-3' 5'-cgagtagataatgccagcctgta-3'	5'-tgccgtgccgtctgcttcgctt-3'	126
NOS	外源	5'-atcgttcaaacattggca-3' 5'-attgcccgaacttaatacata-3'	5'-catcgaagaccggcaacagg-3'	165

注：探针的 5'端标记 FAM 荧光报告基因,3'端标记 TAMRA 等荧光淬灭基因。

<sup>a</sup> ubiquitin 只可用于不含玉米成分的多组分小麦样品和单一组分小麦样品的筛选基因。

## 前 言

本标准的附录 A 为规范性附录。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准由中华人民共和国黑龙江出入境检验检疫局、中国检验检疫研究院负责起草。

本标准主要起草人：栾凤侠、张洪祥、白月、高勇、黄文胜、徐宝梁。

本标准中如涉及国内已申请的专利，专利持有人声明放弃在中国境内的使用。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。