

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T XXXX—202X

转基因大豆定性鉴定 MNP 标记法

Qualitative identification of genetically modified soybean using MNP labeling method

(征求意见稿)

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

中华人民共和国农业农村部

发布

目 次

前 言II

1 范围3

2 规范性引用文件 3

3 术语和定义 3

4 原理4

5 试剂和材料 4

6 仪器设备 4

7 测定步骤 4

8 数据分析 5

9 质量控制 5

10 结果计算 5

11 结果判定与表述6

12 防污染措施 6

附 录 A 7

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

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。

本文件由中华人民共和国农业农村部提出。

本文件由全国农业转基因生物安全管理标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：江汉大学、农业农村部科技发展中心、武汉明了生物技术有限公司。

本文件主要起草人：彭 海、陈 红、陈利红、付 伟、周俊飞、王颢潜、方治伟、李甜甜、李 论、高利芬、张静、王刚、蒋红叶、傅芳奇、张娜、陈子言、张 华、万人静、赵桐桐、肖华锋、裴欣瑶、宋会银、高芳瑞、王 丹、蔡 鹭、肖紫兰、江晓丹、张宝龙、朱召禄。

转基因大豆定性鉴定 MNP 标记法

1 范围

本文件规范了应用多核苷酸多态性（Multiple Nucleotide Polymorphism, MNP）标记法进行转基因大豆定性鉴定的原理、操作程序、质量控制、结果计算和结果判定。

本文件适用于大豆转化体成分定性鉴定，其中，转化体包括MON87769、GTS40-3-2、MON89788、MON87705、356043、305423、CV127、MON87708、MON87701、FG72、A2704-12、A5547-127、DAS-68416-4、DAS-81419-2、DAS-44406-6、MON87751、SYHT0H2、CAL16、DBN9004、ZH10-6、SHZD32-1、ZUTS-33、DBN8002、WYN029GmA、WYN341GmC、DBN8205、GMB151、XP-2、IND-ØØ41Ø-5。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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
GB/T 38570 植物转基因成分测定 目标序列测序法
GB/T 38551 植物品种鉴定 MNP 标记法
GB/T 19495.2 转基因产品检测实验室技术要求
NY/T 672 转基因植物及其产品检测 通用要求
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
农业部 2031 号公告—19—2013 转基因植物及其产品成分检测 抽样

3 术语和定义

3.1

多核苷酸多态性 multiple nucleotide polymorphism, MNP

在一段核苷酸序列中，由一个或多个核苷酸变异引起的序列多态性。

[来源：GB/T 38551，3.1，有修改]

3.2

外参核酸 external reference nucleic acid

与已知的生物基因组不存在同源性的人工合成DNA。

注：外参核酸主要用于实验质量控制。

3.3

外参标记 markers for external reference nucleic acid identification

用于鉴定外参核酸的MNP标记。

3.4

品种标记 markers for variety identification

在目标物种基因组中普遍存在且可以区分不同品种的MNP标记。

3.5

转化体标记 markers for the genetically modified species

仅在该转化体中存在的MNP标记

注：转化体MNP标记可以是外源基因与受体品种基因组的连接序列，也可以是在该转化体中存在但在其它转化体中不存在的外源基因序列。

3.6

检出标记 detected markers

测序片段数目不少于5条的标记。

4 原理

利用超多重扩增、高通量测序和生物信息学方法，扩增、检测和分析待测样品中数百个MNP标记，获得每个MNP标记检测结果，通过统计学方法获得待测样品的转化体定性鉴定结论。

5 试剂和材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂，实验用水符合GB/T 6682中规定的一级水的要求。

5.1 多重 PCR 扩增与文库构建试剂盒

应匹配MNP标记和标记检测引物，以及高通量测序试剂盒。

5.2 高通量测序试剂盒

应匹配高通量测序仪。

5.3 MNP 标记和标记检测引物

应符合附录A的要求。

6 仪器设备

6.1 离心机

最大转速度不小于12000 rpm。

6.2 电泳仪

6.3 PCR 扩增仪

6.4 高通量测序仪

测序读长不低于300 bp。

6.5 计算机服务器

7 测定步骤

7.1 抽样

按NY/T 672和农业部2031号公告—19—2013中第8章的程序执行。

7.2 试样制备

按NY/T 672和农业部2031号公告—19—2013中第9章的程序执行。

7.3 试样预处理

按农业部1485号公告—4—2010中6.2的规定执行。

7.4 试样 DNA 模板制备

按农业部1485号公告—4—2010中6.3、6.4和6.5规定的方法执行。每个试样取3份平行子样分别进行DNA提取和纯化，用于文库构建。

7.5 质控设置

以非转基因大豆DNA作为阴性质控品。

7.6 多重PCR扩增与文库构建

向平行子样与阴性质控品中加入50000个外参核酸分子/反应，混合均匀，成为扩增模板；利用附录A的引物和扩增模板，按多重PCR扩增与文库构建试剂盒的说明书构建高通量测序文库；高通量测序文库构建过程中的多重PCR的扩增循环数不宜高于20个。

7.7 高通量测序

按高通量测序试剂盒和高通量测序仪的操作说明，对7.6中获得的高通量测序文库进行高通量测序。高通量测序的数据量设置为每个文库不小于3 M的reads数量 (1 M = 1000 000)。

8 数据分析

将测序数据同源比对到标记位点上，记录每个标记的测序片段数目。

9 质量控制

9.1 环境

样品准备、DNA提取、多重PCR扩增、文库构建和高通量测序宜在规定的区域或相互隔离的区域按单一方向进行操作，不同区域的仪器设备需专用。

9.2 阴性质控品

阴性质控品检出的外参标记和品种标记比例均大于或等于80%时，且阴性质控品未检出转化体成分，判定阴性质控品质控合格；否则，对平行子样及阴性质控品从7.5或之前的步骤重新开始试验。

9.3 平行子样

平行子样中检出的外参标记和品种标记比例均大于或等于80%时，判定该平行子样质控合格；否则，对该平行子样从7.5或之前的步骤重新开始试验。

10 结果计算

10.1 标记检出量

标记检出量按式（1）计算

$$CM_i = \frac{Sn_i}{SnV} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

式中：

CM_i ——特定平行子样中第*i*个标记的检出量；

Sn_i ——特定平行子样中第*i*个标记的测序片段的数目；

SnV ——特定平行子样中品种标记测序片段的平均数目。

10.2 转化体标记假阳性发生频率

转化体标记假阳性发生频率按式（2）计算

$$fp_i = \frac{Np_i}{Np} \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

式中:

fp_i ——第*i*个转化体标记在平行子样中为假阳性的概率;

Np_i —— $CM_i(h) \geq CM_i(t)$ 的实验次数,其中, $CM_i(h)$ 指第*i*个转化体标记在不含有该转化体标记样品中的检出量, $CM_i(t)$ 指第*i*个转化体标记在平行子样中的检出量;

Np ——第*i*个转化体标记在不含有该转化体标记样品中的检测实验总数。

10.3 转化体存在于平行子样中的概率

转化体存在于平行子样中的概率按式(3)计算。

$$P_0 = 1 - \sum_{k=m}^n \binom{n}{k} \prod_{i=1}^k fp_i \times \begin{cases} \prod_{i=k+1}^n (1 - fp_i), & k < n \\ 1, & k = n \end{cases} \dots\dots\dots (3)$$

式中:

P_0 ——转化体存在于平行子样中的概率;

n ——该转化体的转化体标记的数目;

m ——该转化体检出的转化体标记的数目;

fp_i ——第*i*个转化体标记假阳性发生频率。

11 结果判定与表述

11.1 当试样的3个平行子样转化体 P_0 均大于等于99%时,结果表述为“样品中检出XX转化体”;

11.2 当试样的3个平行子样转化体 P_0 均小于等于1%时,结果表述为“样品中未检出XX转化体”;

11.3 其它情况,结果表述为“样品中不确定是否检出XX转化体”。

12 检出限

本方法的检出限(LOD)为1%(质量百分比)。

注:本方法的检出限是以检测反应体系中加入100 ng大豆基因组DNA模板进行测算的。

13 防污染措施

检测过程中防止交叉污染的措施按照GB/T 27403的有关规定执行。

附 录 A
(规范性)
MNP 标记和标记检测引物

MNP标记和引物序列见表A.1。

表 A. 1 MNP 标记和标记检测引物（示例）

编号	正向引物 (5'—3')	反向引物 (5'—3')	标记注释
1	AACGTCCGCAATGTGTTATTAAGTT	AGAATTAGTTCCTTACAGTTTATTGTTAGATT	DAS-68416-4
2	TCCGCTACTTGCTCTTGTCG	CGGCTAAGAGCGAATTTGGC	DAS-68416-4
3	AGCACTTGATATTCATGAATCAAAC	CTTCAAGATCCCAACTTGCGC	DAS-81419-2
4	AGATGCACTCGAAATCAGCCA	TGTTCCACACCTAGATCCG	DAS-81419-2
5	AGATGCACTCGAAATCAGCCA	TACATCACAACCTCGGCGACC	DAS-44406-6
6	GGAACCTACATGTAAACGGTAAGGT	CCTCAATTGCGAGCTTTCTAATTC	DAS-44406-6
7	TTGTAGATATTTCCCTCACTTTG	CTAACTTTTGGTGTGATGATGCTGA	MON87751
8	ACGCTGCGGACATCTACATT	TTGACCGAGCTGTCTTGTC	MON87751
9	CATGGCCGTATCCGCAATGTGTTA	TGTGTGCCATTGGTTTAGGGTTT	SYHT0H2
10	GGCACCAACATTCTTGTTGGT	ATGGCCGTATCCGCAATGT	SYHT0H2
11	TTAGGTGCATGAAGGCTTAAGTTTG	ATCCAGTACTAAAATCCAGATCCCC	SHZD32-1
12	TGGCGTAATAGCGAAGAGGC	CTCCACCCTCCTCTCCATCA	SHZD32-1
13	ACGTCGGAGAAGAAGAAGCTG	AAAAACGTCCGCAATGTGTT	ZUTS-33
14	GAGCTTGGATCAGATTGTCGTTTC	TATCAAATCCTTCTGAGCAGTAGGG	ZUTS-33
15	AAGGTCTTTGGTTGGATTATCGGTA	GTTTCCCGCCTTCAGTTTAACTAT	DBN8002
16	TTAGCTAGTTAGGACGTTAACAGGG	AATGTCATTCTCAAGTGTCCATA	DBN8002
17	TCATTCTTTGATTAGTAGGAGGCGA	AGCTTTCTCACTAATTAATTCGGCG	WYN341GmC
18	AGCGCGCAAACCTAGGATAAATTATC	ATCGCCTACAATTTTTCGCTATTA	WYN341GmC
19	GTCATCCGTTTAATTTACTCGCACT	CCACCATGTTGACGAAGATTTTCTT	WYN029GmA
20	GAAAACAAAATATAGCGCGCAAAC	CGTGTGGATCCCAACAAATAATGAA	WYN029GmA
21	GAAGGAGAAGAAGTTGGTTGAACAG	TATTAATGTTTTTGCCGGGGATCC	MON87769
22	CATTGCTGATCCATGTAGATTTCCC	CCCCATTCTTGACATTCTTCAAACA	MON87769
23	ACCTGTGCAAATTATTCAAACCCCT	TTCCTTTATCGCAATGATGGCATT	GTS40-3-2
24	CCCTAATAGGCAACAGCATGAAAAA	GGCTTAAGATCAGAGACAGAGAGAG	GTS40-3-2
25	GGCACAAATTAACAACATGGCAC	TTGACCGTGAAGCATGCA	GTS40-3-2
26	GCGACACCTGGATCATCGAT	ACAGCAGAGATCCCCAGGAA	GTS40-3-2
27	CCCTCTTGCTTTTCTAAGTTTGAG	CCTTGACTGAGAATTAGCTTCCAC	MON89788
28	GACACGTCGAAATAAAGATTTCCGA	GCAGCTATCACATATGGTTGAAGTC	MON89788
29	CATTGCTGATCCATGTAGATTTCCC	TGATAACAACACCCTGAGTCTCTTC	MON87705
30	CTTCAGAGGGAGGTTGGTCC	GCTGATCCATGTAGATTTCCCG	MON87705
31	AAGTGAGTTATTTATCAGCCAAGCA	ATCTTTGACTCCATGGGAATTCAC	A2704-12
32	ACTGCCACTAAATCTTCCCCC	TAACAAGGGTCAAGGTCGGC	A2704-12
33	TTTCTACGGGTCTGACGC	GGTGAATCCAAACATGTGCTCA	A2704-12
34	TTTCCAAAACCCGCAATGTCATA	CTGCCATAACCATGAGTGATAACAC	A5547-127
35	TGATCCCCCATGTTGTGCAA	TCAAACGTGACCCTGAATATGA	A5547-127
36	TTAGGTCGAATAGGCTAGGTTTACG	TTGATATTCTTGAGTAGACGAGAG	356043
37	CGTCAGGAATAAAGGAAGTACAGTA	GCCCTAAAGGATGCGTATAGAGTAA	305423
38	GCCCTCCTTATTTATCCCTTAGTT	AGCAGGTTCGTTTAAAGGATGAAAAT	CV127
39	GTTCTTGAGAACCGAGCGGA	GGCTACCCATTCTGATGCTC	CV127
40	CCATCATACTATTGCTGATCCATG	AATCTCAGAACTGTCCGAATTTTC	MON87708
41	GCATCCACGAGCTTATCCGA	AGATTGTGCTTTCCCGCCTT	MON87708
42	ACGCTGCGGACATCTACATT	CAGTAATCGCGCTCAACACG	MON87701

编号	正向引物 (5'—3')	反向引物 (5'—3')	标记注释
43	ACGCTTAGTGTGTGTGTCAAAC	CTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTG	MON87701
44	CAGGAATTAATGTGGTTCATCCGTC	ATGTGATAGCAAAATCCAACAAGCA	FG72
45	CAACAGTTCGGGTGCAACAG	CGGTTCTATGTCCGGGAAA	FG72
46	CCATTGCGTCCACAAAACGT	TCAAGATGGGCAGTGTCTTCC	356043
47	TGAGATGTCATCACACAACCTCTGA	CGCTAAGGCCGAATGCAAAAG	305423
48	CGGTCATACCCGTGCCTATC	TCACAACAAAGTTGGCCACC	305423
49	CGCTAAGGCCGAATGCAAAAG	ATTTTGCATATGAGATTTATGTCAAATAGA	305423
50	CCTCCACTCAGCCAAACCAT	ACGCTTTCCCCCTTCTTTGA	305423
51	ACCTCTGACACATGCAGCTC	TCTCAAACCAAGCATCCCCT	305423
52	TACCTGCTCTGTCCCCTTCA	AGGGTGGAAGATGTTACCATGT	305423
53	AAATTGTTGGCGGGGTTGAT	TTTTTGAAACGCCACCATCAA	305423
54	GCCGGGTCCCGTTTAAACTA	TGTAGTCGACCCACCTAGT	DBN9004
55	CGGGACTTGATGAAAGAAGAG	GGTTTCGCTCATGTGTTGAG	DBN9004
56	ATCGCCCTTCCCAACAGTT	TGTGAAATGTGAACGCCGC	ZH10-6
57	GCACGCGCATACTTTGACAT	AAAAACGTCCGCAATGTGTT	ZH10-6
58	CCTCTCTCGGATTCTTCGCC	AGATTGTCGTTTCCCGCCTT	ZH10-6
59	CCTTCGGTTCCACCCTTGTT	TCCCAGCTGTATGAATGCAA	ZH10-6
60	CTCTTGTGTGTTTGTCTCCTTCTC	CCGCCTTCAGTTTAAACTATCAGTG	CAL16
61	AGTACATTA AAAACGTCCGCAATGT	TCACTACTTTCATTCTGCCTTAGGA	CAL16
62	GGACTCCAACGAGCAAGTCA	AGATTGTCGTTTCCCGCCTT	DBN8205
63	GCCGTATCCGCAATGTGTTA	AAGTTAATGCTTTTATAAATTTGGTCTGT	DBN8205
64	TCAGAGTCAAATCAACATGGGTG	TCGAGCCCATTGTGCTGAAT	GMB151
65	CCACTGTCGGTAGAGGCATC	TGTTTCGTCGCTTCTGGTGG	GMB151
66	AAAAACGTCCGCAATGTGTT	AGGAGGAGTCAGGTAAGCTGT	XP-2
67	TCAGTACATTA AAAACGTCCGCA	AGGAGGAGTCAGGTAAGCTGT	XP-2
68	CTCAGTTGGGTCAGCCTGAG	AAAAACGTCCGCAATGTGTT	IND-00410-5
69	GCTTGAGCTTGGATCAGATTGT	ACGCAACTGAACTCAGACCA	IND-00410-5
70	AAAAACAATTTAGCACAACTTTGAAATCATTAAA	GGGATTTGACCAAAAAGGATATCTTCATTTAAAAT	品种标记 1
71	AAAATGTTTGGCACGCATAGACAG	TCTGCAAAATTTCCAAAAATTCCAAATCTTA	品种标记 2
72	AAAATTTGCTGAAGCTGTTATTTCCAAATATACTC	AAAAATTGTTGGAGTCTAAGTATGAAATGAAATC	品种标记 3
73	AACAAGCGTAGACAATCTGAATCCAC	GCCAATTGAAATTTCTGTTTTCTCATAACATTT	品种标记 4
74	AACCTATAAACCCCTTCAACACAGATTCAAA	TCAGCCTAGATACAAAACACATGTGTCG	品种标记 5
75	ACAATAAATCACTAAGACACTTTTCTTGTTTAGC	GTTTTTAAACACTTTCTTACGCTCTCATAAATTA	品种标记 6
76	ACATCATGAACATCAAAAATAAGCAAAAACAGG	GTGCATGCAGAAAATGATGTGATTATTCG	品种标记 7
77	ACCAAGATCATGATGATATTGATGATGTCAT	CAAATGAGGTTGGTCCTTTACAAACATTTAG	品种标记 8
78	ACCTCGTGTGTGAATCTTATAAATTTCTGAT	CCCTGGTTTCCCTGCTATCTTTTTT	品种标记 9
79	ACGAAGACTAGAGTGTGTGAGTCAC	CAGGAGTGATCAAGGATACTTTAATCGATTA	品种标记 10
80	AGAGTCAACATCTCTTCAATAACGTACATGT	GTGTGTTTTGGATGAAGATTTAGAAACTGAA	品种标记 11
81	ATTTAACAAATGTTGTTGGCGAACAAATGT	CAGAACTATCTAATAATTTCTCGACACATACGTA	品种标记 12
82	CATTCCATTTTGCAGAAATGAGCTA	TGTAAGTTCCTAGTTAGGAACCGTGTTAAA	品种标记 13
83	CCAACCACACCACTAGGAGAATAAAC	CCTCAAAGGCCAAGATTCATTAATTTCATAC	品种标记 14
84	CCAGTTTACTGGCGAGAACTT	CAGAATCAAAATAAGTGTGTGCCATGAAATT	品种标记 15
85	CCTCTAAGGTATGCGTTTATTGCATAAAAA	CAGCCATTTTGGTAACGGAATAAATACC	品种标记 16
86	CGAGGAAGCCAAACCAAGATTTTT	TTTTTAGTGCTTATTGCAATATTATGCTTGTAGT	品种标记 17
87	CGGCGATGACTTTTTATATCGGTT	TTTTTCGTCCTCATAACTATAAAAAATGTTCAAAA	品种标记 18
88	CGTGCTATCATGCTTTGAGTATTAGAGTT	CCGAGTGGTTATCCGTTTAACTTTATCTTG	品种标记 19
89	GACATGGACACTTGTGTCTACGTG	CACCTGTGATCTCTGACCTATGACAAAAAA	品种标记 20
90	GACGTCGGAACCACTACGTTT	TTTTTCTTCGTCCTCTTAACCAAATAGAAAA	品种标记 21
91	GAGGTTTAATCCCTTCTCTTTCGCTC	CCTCAAACAATTTACACAATCATATAGGAATA	品种标记 22

编号	正向引物 (5'—3')	反向引物 (5'—3')	标记注释
92	GCAATGGATGTATAGTTTTTGTGAACATGAA	GTTTATGGCATTGTGATACTACGCTTGG	品种标记 23
93	GCAGTTGTACTCGATTTTAATTTTGATAACCAA	GAACACCAAGCAAACGGATTCTTTTC	品种标记 24
94	GGAGTGGTTGTTTGATTTTAGCTTTGAA	TGGACCATGACCAATGGGTCTAA	品种标记 25
95	GGCCTTGTGCACTCTTAAGCATAC	CGGTTTGACAAAACCAATGTTACCTACG	品种标记 26
96	GGGTGAAAGAAATAATGGGAATAATAAAAACAA	GCACGAAGAAGCAGAAATCGTTACG	品种标记 27
97	GGTGAAACACACCCATCCTACCC	AAGTCAATTGCTACCTTTACTGAATGTAGTTTAA	品种标记 28
98	GGTTATCCGTACAAAGACAACATCTATTGAT	TTGAATGCTACCTGACTTCTCACAGG	品种标记 29
99	GGTTGTGGCCACACTGTG	GAGACTAAAGAGATATGAAAACACTTAAGGTGAA	品种标记 30
100	GTGTAATGGTATGTACTATGTAGTCAACATGTA	CATTTAGCTCTCCAAAATTTTGTCTAATTATT	品种标记 31
101	TACTCGCTGTTTAATTTACAAAGACAAACAACC	GAATTATAGTGACTTCAAGTCAAAGGACTACTAT	品种标记 32
102	TAGCGCATATCTGTTGTGGTTATCATT	GTTATCTGTATAACGGTTCAAAGCATCAAGC	品种标记 33
103	TCAAAAAGTGGGTGACTAAACAAATCTCAC	CACAGAAGTATGCCACTAAGTCATAATACAA	品种标记 34
104	TCCCTTCTAATAGTAAGAACCTCACACAAT	GTTAGTCAAAGAGTGATTAAGCCATTGAATT	品种标记 35
105	TCTACATGCAAATATAATTTGTCATTTTGGGT	TAGTGTTTTATGTCATCAGAAAGTGATTGTCTTT	品种标记 36
106	TGGTAGTCGCTCTTGAGTCTCAT	AAAAAGTGATTTTGAATCTTTGCATTGTATATGC	品种标记 37
107	TTGAATTTTGATAAGAGTTGCCATAGCAACA	CGGGCTGAGAAGTTAGGTACTTGC	品种标记 38
108	TTGCAAAATCACAAGTGTGTTGGTACTTG	ACATTGTTTAGTTGGAAACACAAACAAGAA	品种标记 39
109	TTTTTACCAACAGGATTTAAAAGAAGAAAATGAC	GCGAAATAGAAAAGATAGAGGAGGAGACC	品种标记 40
110	TGGGACAAAGAAACCGGTAG	GTCAAACCTAACAGCGACGA	内标准基因
111	CAGCCTTTTCTTATGGACCTTGAAG	TGAGGGAGATCACGCACTAAATTAA	外参标记 1
112	AGCTGATAACAAATTTGCACTGACT	AGTTCTTGAACCTCCTCTTGTCTGA	外参标记 2
113	TAGAGTATCATGACGTTTCGTGTTGT	TGGTACTGCCAGTTGAATCTGAG	外参标记 3
114	GACTTCCTATGGTGCTAACAAAGA	CTTGAGGAAGTTGTAGCACGATTG	外参标记 4
115	CTCTTCTCGTTCCTCATCACGTAG	CTCAAGCTGGTTCAATCTGTCAAG	外参标记 5