

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 数据处理 5

9 质量控制 5

10 结果计算 5

11 结果表述 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、中国农业科学院作物科学研究所。

本文件主要起草人：彭 海、陈 红、陈利红、付 伟、周俊飞、陈红霖、方治伟、李甜甜、蒋红叶、李 论、傅芳奇、高利芬、张静、陈子言、王刚、张娜、万人静、肖华锋、宋会银、蔡 鹭、肖紫兰、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、试剂和材料、仪器设备、测定步骤、质量控制、数据处理、结果计算、结果表述、检出限和防污染措施。

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和IND-00410-5。

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 38551 植物品种鉴定 MNP 标记法

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

在大豆基因组中普遍存在且可以区分不同大豆品种的MNP标记。

注：品种标记来源于GB/T 38551，附录A。

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条的转化体标记，或测序片段数目不少于20条的外参标记或品种标记。

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，获得每个标记的检测结果，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、标记检测引物和外参核酸序列

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；利用扩增模板和附录A的引物，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 = 1000000)。

8 数据处理

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 ——平行子样中第*i*个标记的检出量；

Sn_i ——平行子样中第*i*个标记的测序片段的数目；

SnV ——平行子样中品种标记测序片段的平均数目。

10.2 转化体标记假阳性的发生概率

转化体标记假阳性的发生概率按式（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。

注： Np 统计范围为距离待测样品检测实验最近的30天内。

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 ——该转化体的检出转化体标记的数目；

fp_i ——第*i*个检出转化体标记假阳性发生频率。

11 结果表述

11.1 当试样的平行子样转化体 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

本方法对于转化体 356043 和 IND-ØØ41Ø-5，检出限（LOD）为 2%（质量百分比），对于本标准范围规定的其它 27 种转化体，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、标记检测引物和外参核酸序列

A.1: MNP标记和标记检测引物序列见表A.1

表 A. 1 MNP 标记和标记检测引物

编号	正向引物 (5'→3')	反向引物 (5'→3')
1	AACGTCCGCAATGTGTTATTAAGTT	AGAATTAGTCTTACAGTTTATTGTTAGATTT
2	TCCGCTACTTGCTCTTGTCG	CGGCTAAGAGCGAATTTGGC
3	AGCACTTGATATTCATGAATCAAAC	CTTCAAGATCCCAACTTGCGC
4	AGATGCACTCGAAATCAGCCA	TGTTTCCACACCCTAGATCCG
5	AGATGCACTCGAAATCAGCCA	TACATCACAACCTCGGCGACC
6	GGAACCTACATGTAAACGGTAAGGT	CCTCAATTGCGAGCTTTCTAATTTT
7	TTTGTAGATATTTCCCTCACTTTG	CTAACTTTTGGTGTGATGATGCTGA
8	ACGCTGCGGACATCTACATT	TTGACCGAGCTGTCTTGTC
9	CATGGCCGTATCCGCAATGTGTTA	TGTGTGCCATTGGTTTAGGGTTT
10	GGCACCAACATTCTTGTTG	ATGGCCGTATCCGCAATGT
11	TTAGGTGCATGAAGGCTTAAGTTTG	ATCCAGTACTAAAATCCAGATCCCC
12	TGGCGTAATAGCGAAGAGGC	CTCCACCTCCTCTCCATCA
13	ACGTCGGAGAAGAAGAAGCTG	AAAAACGTCCGCAATGTGTT
14	GAGCTTGATCAGATTGTCGTTT	TATCAAACTCTTCTGAGCAGTAGGG
15	AAGGTCTTTGGTTGGATTATCGGTA	GTTTCCCGCCTTCAGTTTAACTAT
16	TTAGCTAGTTAGGACGTAAACAGGG	AATGTCATTCTCAAGTGTCCATA
17	TCATTCTTTGATTAGTAGGAGCGA	AGCTTTCTCACTAATTAATTCGGCG
18	AGCGCGCAAACTAGGATAAATTATC	ATCGCCTACAATTTTTCGCTATTA
19	GTCATCCGTTAATTTACTCGCACT	CCACCATGTTGACGAAGATTTCTT
20	GAAAACAAAATATAGCGCGCAAACT	CGTGTGGATCCCAACAAATAATGAA
21	GAAGGAGAAAGAGTTGGTTGAACAG	TATTAATGTTTTTGCCGGGGATCC
22	CATTGCTGATCCATGTAGATTTCCT	CCCCATTCTTGACATTCTTCAAACA
23	ACCTTGTCGAAATATTCAAACCT	TTCTTTATCGCAATGATGGCATT
24	CCCTAATAGGCAACAGCATGAAAAA	GGCTTAAGATCAGAGACAGAGAGAG
25	GGCACAATTAACAACATGGCAC	TTGCACCGTGAAGCATGCA
26	GCGACACCTGGATCATCGAT	ACAGCAGAGATCCCCAGGAA
27	CCCTCTTGCTTTTCTAAGTTTGAG	CTTTGGACTGAGAATTAGCTTCCAC
28	GACACGTCGAAATAAAGATTTCGGA	GCAGCTATCACATATGGTTGAAGTC
29	CATTGCTGATCCATGTAGATTTCCT	TGATAACAACACCCTGAGTCTCTTC
30	CTTCAGAGGGAGGTTGGTCC	GCTGATCCATGTAGATTTCCTCG
31	AAGTGAGTTATTTATCAGCCAAGCA	ATCTTTGACTCCATGGGAATTCCT
32	ACTGCCACTAAATCTTCCCCC	TAACAAGGGTCAAGGTCGGC
33	TTTTCTACGGGTCTGACGC	GGTGAATCCAAACATGTGCTCA
34	TTTTCCAAAAACCCGCAATGTCATA	CTGCCATAACCATGAGTGATAACAC
35	TGATCCCCCATGTTGTGCAA	TCAAACGTGACCCTGAATATGA
36	TTAGGTCGAATAGGCTAGGTTTACG	TTGATATTCTTGGAGTAGACGAGAG
37	CGTCAGGAATAAAGGAAGTACAGTA	GCCCTAAAGGATGCGTATAGAGTAA
38	GCCCTCCTTATTTATCCCTTAGTT	AGCAGGTTTCGTTAAGGATGAAAAT
39	GTTCTTGAGAACCGAGCGGA	GGCCTACCCATTCGTAGCTC
40	CCATCATACTCATTGCTGATCCATG	AATCTCAGAACTGTCCGCAATTTTC
41	GCATCCACGAGCTTATCCGA	AGATTGTCGTTTCCCGCCTT
42	ACGCTGCGGACATCTACATT	CAGTAATCGCGCTCAACACG
43	ACGCTTAGTGTGTGTCAAAC	CTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTG
44	CAGGAATTAATGTGGTTTATCCGTC	ATGTGATAGCAAAATCCAACAGCA
45	CAACAGTTCGGGTGCAACAG	CGGTTCTATGTCCGGGAAA

编号	正向引物 (5'→3')	反向引物 (5'→3')
46	CCATTGCGTCCACAAAACGT	TCAAGATGGGCAGTGTCTTCC
47	TGAGATGTCATCACACAACTCTGA	CGCTAAGGCCGAATGCAAAG
48	CGGTCATACCCGTGCCTATC	TCACAACAAAGTTGGCCACC
49	CGCTAAGGCCGAATGCAAAG	ATTTTGCATATGAGATTTATGTCAAATAGA
50	CCTCCACTCAGCCAAACCAT	ACGCTTTCCTTCTTTTGA
51	ACCTCTGACACATGCAGCTC	TCTCAAACCAAGCATCCCTT
52	TACCTGCTCTGTCCCTTCA	AGGGTGGAAGATGTTACCATGT
53	AAATTGTTGGCGGGTTGAT	TTTTTGAAACGCCACCATCAA
54	GCCGGTCCCGTTTAAACTA	TGTAGTCGACCCACCTAGT
55	CGGGACTTGATGAAAGAAGAG	GGTTTCGCTCATGTGTTGAG
56	ATCGCCCTTCCAACAGTT	TGTGAAATGTGAACGCCGC
57	GCACGCGCATACTTTGACAT	AAAAACGTCCGCAATGTGTT
58	CCTCTCTCGGATTCTTCGCC	AGATTGTCGTTTCCCGCCTT
59	CCTTCGGTTCACCTTGTT	TCCCAGCTGTATGAATGCAA
60	CTCTTGTTGTTTGTCTCTCTTC	CCGCCTTCAGTTTAAACTATCAGTG
61	AGTACATTAACAAACGTCCGCAATGT	TCACTACTTTCATTCTTGCCCTTAGGA
62	GGACTCCAACGAGCAAGTCA	AGATTGTCGTTTCCCGCCTT
63	GCCGTATCCGCAATGTGTTA	AAGTTAATGCTTTTATAAATTTGGTCTGT
64	TCAGAGTCAAATCAACATGGGTG	TCGAGCCCATTGTGCTGAAT
65	CCACTGTCGGTAGAGGCATC	TGTTTCGTCGTTCTGTTGGG
66	AAAAACGTCCGCAATGTGTT	AGGAGGAGTCAGGTAAGCTGT
67	TCAGTACATTAACAAACGTCCGCA	AGGAGGAGTCAGGTAAGCTGT
68	CTCAGTTGGGTGAGCCTGAG	AAAAACGTCCGCAATGTGTT
69	GCTTGAGCTTGATCAGATTGT	ACGCAACTGAACTCAGACCA
70	AAAAACAATTTAGCACAACTTTGAAATCATTAAA	GGGATTTGACCAAAAGGATATCTTCATTAAAAAT
71	AAAATGTTTTGCCACGCATAGACAG	TCTGCAAAATTTCCAAAAATTCAAATCTTA
72	AAAATTTGCTGAACTGTTATTTCCAAATATACTC	AAAAATTTGTTGGAGTCTAAGTATGAAATGAAATC
73	AACAAGCGTAGACAATCTGAATCCAC	GCCAATGAAATTTCTGTTTTTCTCATAACATTT
74	AACCTATAAACCTTCAACACAGATTCAA	TCAGCCTAGATACAAAACACATGTGTCG
75	ACAATAAATCACTAAGACACTTTTCTTGTTAGC	GTTTTTAAACACTTCTTACGCTCTCATAAATTA
76	ACATCATGAACATCAAACTAAGCAAAAACAGG	GTGCATGCAGAAAATGATGTGTATTTGC
77	ACCAAGATCATGATGATATTGATGATGTCAT	CAAAATGAGGTTGGTCTTTACAAACATTTAG
78	ACCTCGTGTGTAATCTTATAAATTTCTGAT	CCCTGGTTTCCCTGCTATCTTTTTT
79	ACGAAGACTAGAGTGTGTGAGTCAC	CAGGAGTGATCAAGGATACTTAATCGATTA
80	AGAGTCAACATCTCTTCAATAACGTACATGT	GTGTGTTTTGGATGAAGATTTAGAACTGAA
81	ATTTAACAAATGTTGTTGGCGAACAATGT	CAGAACTATCTAATAATTTCTCGACACATACGTA
82	CATTCCATTTTGGGAGAATGAGCTA	TGTAAGTTCCTAGTTAGGAACCGTGTAAA
83	CCAACCACACCACTAGGAGAATAAAC	CCTCAAAGGCCAAGATTCATTAATTTCATAC
84	CCAGTTTGACTGGCGAGAACTT	CAGAAATCAAATAAGTGTGTGCCATGAAATT
85	CCTCTAAGGTATGCGTTTATTGCATAAAAA	CAGCCATTTTGGTAACGGTAACATAAATACC
86	CGAGGAAGCCAAACCAAGATTTTT	TTTTTAGTGCTTATTGCAATATTATGCTGTAGT
87	CGGCGATGACTTTTTATATCGGTT	TTTTTCGTCCTCATAACTATAAAAAATGTTCAAAA
88	CGTGCTATCATGCTTTGAGTATTAGAGTT	CCGAGTGTTATCCGTTTAAACTTTATCTTG
89	GACATGGACACTTGTGTCTACGTG	CACTTGTGATCTCTGACCTATGACAAAAAA
90	GACGTCGGAACCACTACGTTT	TTTTTCTCGTCCTCTTAACCAATAGAAAA
91	GAGGTTTAATCCCTTCTTTTCGCTC	CCTCAAACAATTTACACAATCATATAGGAATA
92	GCAATGGATGTATAGTTTTTGTGAACATGAA	GTTTATGGCATTGTGATACTACGCTTGG
93	GCAGTTGTACTCGATTTTAATTTTGATAACCAA	GAACACCAAGCAAACGGATTCTTTTC
94	GGAGTGGTTGTTGATTTTAGCTTTGAA	TGGACCATGACCAATGGGTCTAA
95	GGCCTTGTGCACTCTTAAGCATAC	CGGTTTTGACAAAACCAATGTTACCTACG
96	GGGTGAAAGAAATAATGGGAATAATAAAACAA	GCACGAAGAAGCAGAAATCGTTACG
97	GGTGAAACACACCCATCCTACCC	AAGTCAATTGCTACCTTTACTGAATGTAGTTTAA
98	GGTTATCCGTACAAAGACAACATCTATTGAT	TTGAATGCTACCTGACTTCTCACAGG
99	GGTTGTGGCCACACTGTG	GAGACTAAAGAGATATGAAAACACTTAAGGTGAA
100	GTGTAATGGTATGTACTATGTAGTCAACATGTA	CATTAGCTCTCCAAAAATTTGTCTTAATTATT

编号	正向引物 (5'→3')	反向引物 (5'→3')
101	TACTCGCTGTTTAATTTACAAAGACAAACAACC	GAATTATAGTGACTTCAAGTCAAAGGACTACTAT
102	TAGCGCATATCTGTTGTGGTTATCATT	GTTATCTGTATAACGGTTCAAAGCATCAAGC
103	TCAAAAGTGGGTGACTAAACAAATCTCAC	CACAGAAGTATGCCACTAAGTCATAATACAA
104	TCCCTTCTAATAGTAAGAACCTCACACAAT	GTTAGTCAAAGAGTGATTAAGCCATTGAATT
105	TCTACATGCAAATATAATTTGTCATTTTGGGT	TAGTGTTTATGTCATCAGAAAGTGATTGTCITT
106	TGGTAGTCGCTCTTGAGTCTCAT	AAAAAGTGATTTTGAATCTTGCATTGTATATGC
107	TTGAATTTTGATAAGAGTTGCCATAGCAACA	CGGGCTGAGAAGTTAGGTACTTGC
108	TTGCAAAATCACAAGTGTTTGGTACTTG	ACATTTGTTTAGTTGGAAACACAAACAAGAA
109	TTTTTACCAACAGGATTTAAAGAAGAAAATGAC	GCGAAATAGAAAGAATAGAGGAGGAGACC
110	TGGGACAAAGAAACCGGTAG	GTCAAACCTCAACAGCGACGA
111	CAGCCTTTTCTTATGGACCTTGAAG	TGAGGGAGATCACGCACTAAATTAA
112	AGCTGATAACAAATTTGCACTGACT	AGTTCTTGAACCTCCTCTTGTCTGA
113	TAGAGTATCATGACGTTTCGTGTTGT	TGGTTACTGCCAGTTGAATCTGAG
114	GACTTCCCTATGGTGCTAACAAAGA	CTTGAGGAAGTTGTAGCACGATTG
115	CTCTTCTCGTTTCTCATCACGTAG	CTCAAGCTGGTTCAATCTGTCAAG

A.2: 外参核酸序列如下:

CAGCCTTTTCTTATGGACCTTGAAGGAAAACAGGGTCTTAGTAATTTCAAAAATTAAGAGGAATTTGTGTTTATTATTGATGGTA
AAATATATTCTAAGCACACGCCTATTAATTTAGTGCGTGATCTCCCTCAAGCTGATAACAAATTTGCACTGACTTGCTTTAGCATT
GCTTCTCAATTTGCTTGTAAGGAGTCTGACGGCAAGTTACGTCTATCGTGCCAGATCAGTTTCACCTAAACTGTTTCATCAGACAAG
AGGAAGTTCAAGAACTTAGAGTATCATGACGTTTCGTGTTGTTTATGATTTCAAACTAATCTAAACGAACAATGGAAAATGTCTGA
TCAGCGACCAAAATCATGACCCCGCATTACGTTTGGTGGACCTCAGATTCAACTGGCAGTAACCAGACTTCCCTATGGTGCTAA
CAAAGACGGCATCATAGAGGGATGGGTTGCAACTACCAAAGCCTTGAATACGGGCACATCACATTCGCAATCCTGCTAACAATGC
TGCAATCGTGCTACAACCTCCTCAAGCTCTTCTCGTTCCTCATCACGTAGTCGCAACAGTTCTCCAGCAAGAAATTCAAGGAACGTG
CAGCAGTAGGCGAATGTCCTGCTACTGGCAATGGCGGTGATGCTGCTCTTGTCTGCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAG