

抗虫玉米 Bt 蛋白表达量检测技术规范

Technical specification for quantitative detection of Bt proteins in
insect resistance maize

2019 - 05 - 27 发布

2019 - 06 - 17 实施

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准由吉林省农业农村厅提出并归口。

本标准起草单位：吉林省农业科学院。

本标准主要起草人：龙丽坤、夏蔚、李葱葱、刘娜、闫伟、董立明、邢珍娟、谢彦博、李飞武。

抗虫玉米 Bt 蛋白表达量检测技术规范

1 范围

本标准规定了抗虫玉米Bt蛋白表达量检测的总体要求、试验材料、试剂和材料、仪器设备、样品、检测程序、结果判定与表述。

本标准适用于转Bt基因抗虫玉米环境安全评价中检测外源Bt蛋白含量ELISA技术的实施和运用。

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 4404.1-2008 粮食作物种子 第1部分：禾谷类

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 19495.1 转基因产品检测 通用要求和定义

GB/T 19495.2 转基因产品检测 实验室技术要求

GB/T 19495.8 转基因产品检测 蛋白质检测方法

农业部953号公告-10.1-2007 转基因植物及其产品环境安全检测 抗虫玉米 第1部分：抗虫性

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

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

Bt 蛋白 Bt protein

来自苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 由Bt基因表达的一类杀虫蛋白。

3.2

ELISA enzyme linked immunosorbent assay

利用酶联抗体和底物形成有颜色反应的产物的一种定量分析方法，统称酶联免疫吸附分析。

3.3

检出限 limit of detection

样品中被稳定检出的最低蛋白含量或浓度。

3.4

定量限 limit of quantification

样品中被定量检出的最低蛋白含量或浓度。

3.5

变异系数 coefficient of variation

标准差与平均数的比值，用于衡量检测数据的离散程度。

4 总体要求

4.1 检测人员应具备转基因生物安全管理和检测的相关知识，并在开展取样和检测工作前，接受相关技术和业务知识培训。

4.2 检测实验室应符合 GB/T 19495.2 规定的要求。

4.3 检测过程应符合 GB/T 19495.1 规定的要求。

5 试验材料

5.1 受检材料为种植的待检测的玉米材料及受体对照材料。

5.2 种子质量应达到 GB 4404.1-2008 中二级以上玉米种子要求。

5.3 种植和管理参照农业部 953 号公告-10.1-2007 的要求。

6 试剂和材料

6.1 除非另有说明，仅使用分析纯试剂和重蒸馏水或符合 GB/T 6682 规定的二级水。

6.2 根据待检 Bt 蛋白的类型，选用对应的 ELISA 试剂盒，于保质期内验证试剂盒体系，并在有效期内使用。试剂盒的定量限 (LOQ) 应不大于 0.1 $\mu\text{g/L}$ 或 0.1 ng/g 。

6.3 蛋白提取缓冲液可使用 ELISA 试剂盒中提供的，或根据需要可选择效果相当的提取缓冲液。

7 仪器设备

7.1 分析天平，感量 0.01 g。

7.2 酶标仪，波长范围 360 nm ~ 640 nm。

7.3 超低温冰箱，-70 $^{\circ}\text{C}$ ~ -80 $^{\circ}\text{C}$ 。

7.4 低温离心机，4 $^{\circ}\text{C}$ 、转速 4 000 g ~ 10 000 g 。

7.5 恒温培养箱，37 $^{\circ}\text{C}$ 。

8 样品

8.1 取样

8.1.1 随机取样，每小区取样株数应不少于 10 株，同时采集同批待检测的玉米材料及受体对照材料，具体抽样数量和方法按照农业部 2031 号公告-19-2013 规定执行。

8.1.2 叶片、花丝、雌穗穗尖、茎秆、籽粒、根等玉米植株器官可作为蛋白检测的待测样品。

8.1.3 所采样品应单采单放，分别密封并置于恒定低温条件保存，避免污染。

8.2 样品制备

8.2.1 每个小区采集的样品分别在液氮中快速研磨成粉末，称取不少于 0.5 g。

8.2.2 按照 ELISA 检测试剂盒步骤，按一定的质量体积比加入蛋白提取缓冲液，制备样品蛋白溶液。

9 检测程序

9.1 一般要求

9.1.1 抗体、底物等的储藏条件和保质期应与生产商要求一致。

9.1.2 包括标准蛋白在内，每个测试样品不少于 3 个平行。

9.2 标准曲线的制作

9.2.1 用蛋白提取缓冲液进行标准蛋白的稀释，不少于 6 个浓度梯度。

9.2.2 标准曲线相关系数 $R^2 \geq 0.98$ 。

9.3 试样检测

9.3.1 根据蛋白标准品确定检测范围，以蛋白提取缓冲液将样品溶液稀释到合适的分析浓度。

9.3.2 按照选定的 ELISA 试剂盒操作说明操作。

9.3.3 使用酶标仪测定相应波长下的光密度值 (Optical density, OD)，并读取样品试液中 Bt 蛋白的浓度值。

9.4 主要参数要求

9.4.1 应以变异系数 (CV) 分析标准蛋白和阳性样品的平行间差异。标准曲线线性范围内同一样品平行间光密度值差异不得超过 15%，所得浓度差异不得超过 20%。如果超过 CV 百分数上限，须重新检测。

9.4.2 应确定方法定量限 (LOQ) 和检出限 (LOD)。

注：可采用标准曲线中线性范围内最低标准蛋白浓度为方法 LOQ。可采用标准曲线最低浓度标准蛋白继续稀释的方法确定 LOD，为光密度检测能达到不低于阴性对照 OD 值 2.1 倍的最低标准品浓度值，或选用其他有效确定方法。

9.5 结果计算

大于或等于 LOQ 的样品试液浓度值，应按式 (1) 计算待测样品中的 Bt 蛋白含量。

$$\omega = \frac{Y \times N}{X \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

ω ——待测样品中的 Bt 蛋白含量，单位为微克每克鲜重 ($\mu\text{g/g}$ 鲜重)；

Y ——试液中的蛋白浓度，单位微克每升 ($\mu\text{g/L}$)；

N ——样品溶液的稀释倍数；

X ——样品溶液的质量体积比，单位克每毫升 (g/mL)。

注：计算结果保留两位小数。

应采用统计学方法计算各小区样品的外源 Bt 蛋白含量平均值 ($\bar{\omega}$) 和标准差 (S)，外源 Bt 蛋白含量表示为 ($\bar{\omega} \pm S$) $\mu\text{g/g}$ 鲜重。

10 结果判定与表述

按表 1 进行结果判定和表述。

表1 结果判定和表述

样品试液测定值	结果判定与表述
$Y \geq LOQ$	样品中检测出××Bt 蛋白，含量为 $(\bar{\omega} \pm S)$ $\mu\text{g/g}$ 鲜重。
$Y < LOQ$ ，且 $Y \geq LOD$	样品中检测出××Bt 蛋白，含量低于方法定量限。
$Y < LOD$	样品中未检测出××Bt 蛋白。