

ICS 65.020.01 (黑体五号)

CCS X XX (黑体五号)

T/GDNB

广东省农业标准化协会团体标准

T/GDNB XXXX—2023

农产品中转基因成分 CP4 EPSPS 的 快速检测 胶体金免疫层析法

Rapid detection of transgenic component CP4 EPSPS in agricultural products, colloidal gold immunochromatographic assay

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XX- XX- XX 发布

XX-XX-XX 实施

广东省农业标准化协会 发布

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专利的责任。

本文件由广东省农业标准化协会提出并归口。

本文件起草单位：广州万联生物科技有限公司、华南农业大学、中国农业大学、李锦记（新会）食品有限公司、广东海天集团股份有限公司、广东省食品工业研究所有限公司、广东仙津保健饮料食品有限公司、广州市宜健医学技术发展有限公司、利诚检测认证集团股份有限公司、国检测试控股集团京诚检测有限公司、深圳凯吉星农产品检测认证有限公司。

本文件主要起草人：李斌、徐振林、程楠、江林峰、孙胜枚、刘璇、陈昱铮、黄家怡、邓志华、梅邢、龚晓莹、刘强、黄智威、田莉、肖毅美、谭秀华、邵仕萍、汪莘、钟景凤、苏丽兴、栾建文、孙远明。

农产品中转基因成分 CP4 EPSPS 的快速检测

胶体金免疫层析法

1 范围

本标准规定了农产品转基因成分 cp4-epsps 试纸条法的检测方法、结果判断。

本标准适用于表达 cp4-epsps 蛋白的转基因植物及其初级加工产品中 cp4-epsps 蛋白的快速筛查。

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。

农业部 1861 号公告-5-2012 转基因植物及其产品成分检测 CP4-epsps 基因定性 PCR 方法。

3 术语与定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

检测线 test Line (T 线)

反映检测卡检测结果的线。

3.2

质控线 control Line (C 线)

反映检测卡质量的线。

4 方法原理

采用胶体金免疫层析法进行检测。检测时，样品中的 CP4 EPSPS 蛋白与胶体金标记的特异性抗体结合，通过层析流动至固相载体膜上包被的特异性蛋白偶联物相结合，从而导致检测线（T 线）颜色变化。检测线（T 线）在规定时间内不显色，结果为阴性；反之，检测线（T 线）显色，结果为阳性。通过上述现象对待测样中 CP4 EPSPS 蛋白进行定性判定。

5 试剂和材料

5.1 试剂

5.1.1 盐酸。

5.1.2 氯化钠。

5.1.3 氯化钾。

5.1.4 十二水合磷酸氢二钠。

5.1.5 磷酸二氢钾。

注：除另有规定外，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的二级水。

5.2 溶液配置

提取液：称取 8.00g 氯化钠（5.1.2），0.20g 氯化钾（5.1.3），0.27g 磷酸二氢钾（5.1.5）及 2.87g 十二水合磷酸氢二钠（5.1.4）溶解于 900 mL 水中，混匀，用盐酸（5.1.1）调节 pH 为 7.4，用水稀释至 1L，混匀。

5.3 标准溶液配制

CP4 EPSPS 蛋白标准工作液（10 μ g/mL）：精密移取 100 μ L CP4 EPSPS 蛋白标准溶液（1.0 mg/mL）置于 10 mL 容量瓶中，用提取液稀释至刻度，摇匀，配制成浓度为 10 μ g/mL 的标准工作液。-20℃ 避光保存，有效期 3 个月。

5.4 材料

CP4 EPSPS 快速检测盒（含胶体金试纸条或检测卡及配套的试剂）。

6 仪器设备

- 6.1 天平：感量为 0.1 mg 和 0.01 g。
- 6.2 涡旋混合器。
- 6.3 移液器：10 μ L~100 μ L，100 μ L~1000 μ L，1 mL~5 mL。
- 6.4 均质器。
- 6.5 离心机。
- 6.6 pH 计。

7 分析步骤

7.1 取样

按照农业部 2031 号公告-19-2013 中的规定执行。

7.2 样本处理

将取样样品用均质器进行均质（种子直接取 ≥ 10 粒研磨粉碎）。称取 1 g 均质后的样品粉末，放入 10 mL 离心管中，加入 5 mL 提取液，剧烈震荡混匀 2 min，将离心管静置 2 min 后，上清液即为待测液。若提取液混浊或杂质太多可过滤（或者 4000 转离心 3 min）后再测。

7.3 试样测定

取 100 μ L 样品待测液加入到检测卡的加样孔中，5 min ~8 min 根据示意图判定结果。

注：测定步骤建议按照试剂盒说明书。

7.4 质控实验

每批样品应同时进行空白实验和质控实验。

7.4.1 空白实验

准确称取固体空白试样，按照 7.2 和 7.3 步骤与试样同法操作。

7.4.2 质控实验

准确称取固体空白试样 1.00 g \pm 0.01 g 空白试样于 10 mL 离心管中，加入适量标准工作液（5.4），使 CP4 EPSPS 蛋白浓度为 100 μ g/g，按照 7.2 和 7.3 步骤与试样同法操作。

8 结果判定

通过对比 C 线和 T 线的颜色深浅进行结果判定。目视判定示意图见图 1 或 2。结果判定也可根据产品说明书进行。

8.1 无效

C线不显色，表明不正确操作或试纸条/检测卡无效。

8.2 阴性结果

C线显色，T线颜色比C线颜色深或T线颜色与C线颜色相当，均表示样品中不含待测组分或含量低于方法检测限，判为阴性。

8.3 阳性结果

C线显色，T线颜色比C线颜色明显浅或T线不显色，均表示样品中待测组分含量高于方法检测限，判为阳性。

8.4 质控实验要求

空白试验测定结果应为阴性，加标质控试验测定结果应为阳性。

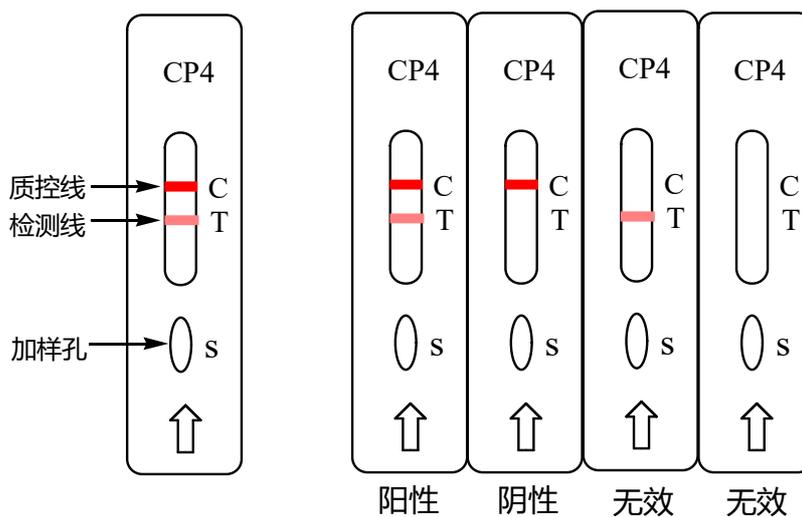


图1 检测卡目视判定示意图

9 结论

当检测结果为阳性时，采用参比方法进行确证。

10 性能指标

10.1 性能指标计算方法按照附录 A 执行。

10.2 检出限：0.1 $\mu\text{g/g}$ 。

10.3 灵敏度： $\geq 99\%$ 。

10.4 特异性： $\geq 95\%$ 。

10.5 假阴性率： $\leq 1\%$ 。

10.6 假阳性率： $\leq 5\%$ 。

11 其他

本方法所述试剂、试剂盒信息及操作步骤是为给方法使用者提供方便，在使用本方法时不做限定。方法使用者在使用替代试剂、试剂盒或操作步骤前，须对其进行考察，应满足本方法规定的各项性能指标。

本方法参比方法为农业部1861号公告-5-2012《转基因植物及其产品成分检测 CP4-epsps 基因定性PCR方法》和 DB12T 842-2018《转基因植物及其产品成分筛查 cp4--epsps 试纸条法》。

附 录 A
(规范性)
快速检测方法性能指标计算表

快速检测方法按照表 A.1 执行。

表A.1 性能指标计算方法

样品情况 ^a	检测结果 ^b		总数
	阳性	阴性	
阳性	N11	N12	N1. =N11+N12
阴性	N21	N22	N2. =N21+N22
总数	N. 1=N11+N12	N. 2=N21+N22	N=N1. +N2. 或 N. 1+N. 2
显著性差异 (X^2)	$X^2 = (N12 - N21 - 1)^2 / (N12 + N21)$, 自由度 (df) = 1		
灵敏度 (p+, %)	p+ = N11 / N1.		
特异性 (p-, %)	p- = N22 / N2.		
假阴性率 (pf-, %)	pf- = N12 / N1. = 100 - 灵敏度		
假阳性率 (pf+, %)	pf+ = N21 / N2. = 100 - 特异性		
相对准确度, % ^c	(N11 + N22) / (N1. + N2.)		
注: ^a 由参比方法检验得到的结果或者样品中实际的公议值结果; ^b 由待确认方法检验得到的结果。灵敏度的计算使用确认后的结果。 N 任何特定单元的结果数, 第一个下标指行, 第二个下标指列。例如: N11 表示第一行, 第一列, N1. 表示所有的第一行, N. 2 表示所有的第二列; N12 表示第一行, 第二列。 ^c 为方法的检测结果相对准确性的结果, 与一致性分析和浓度检测趋势情况综合评价。			