



团 体 标 准

T/CGTA 10—2025

国产大豆转基因成分的快速检测 环介导等温扩增（LAMP）检测法

Rapid detection for Genetically Modified Domestic Soybeans
Loop-mediated isothermal amplification detection method

2023 - 03 - 16 发布

2023- 03 - 16 实施

中国粮食商业协会 发 布

目 次

前 言 - 2 -

1 范围 - 3 -

2 规范性引用文件 - 3 -

3 术语和定义 - 3 -

 3.1 转基因 transgene - 3 -

 3.2 环介导等温扩增 long-mediated isothermal amplification - 3 -

 3.3 CP4-EPSPS - 3 -

 3.4 G2-EPSPS - 3 -

 3.5 质控线 control line (C 线) 错误!未定义书签。

4 环介导等温扩增 (LAMP) 检测方法 错误!未定义书签。

 4.1 仪器与设备 - 4 -

 4.2 试剂和材料 错误!未定义书签。

 4.3 溶液配制 - 4 -

 4.4 检测步骤 错误!未定义书签。

 4.5 结果表述 - 6 -

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。

本文件由百沃特（天津）生物技术有限公司提出。

本文件由中国粮食商业协会归口。

本文件起草单位：北京XX发展有限公司、XX有限公司、宁夏XX有限公司、安徽省XX限公司、宁夏XX有限公司、青铜峡市XX开发有限公司。

本文件主要起草人：XX、XX、XX、XX、XX、XX、XX、XX、XX、XX、XX、XX、XX。

CGTA

国产大豆转基因成分的快速检测 环介导等温扩增（LAMP）检测 法

1 范围

本文件规定了国产大豆中转基因成分环介导等温扩增快速检测方法的术语和定义、原理、试剂与材料、仪器与设备、样品制备、检验方法和判定规则的要求。

本文件适用于国产大豆中转基因成分的快速检测。

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 19495.7-2004 转基因产品检测 抽样和制样方法

GB/T 10362 术语、定义和缩略语

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

转基因 transgene

将植物本身不具有的、来源于其他物种的功能DNA序列，通过生物工程技术，使其在该物种中进行表达，以便使该物种获得新的品种特征。

3.2

环介导等温扩增 long-mediated isothermal amplification

利用DNA聚合酶和特异性引物在恒温条件下通过循环扩增反应快速、高效地扩增目标DNA序列的核酸扩增技术。

3.3

CP4-EPSPS

土壤农杆菌CP4蛋白基因和5-莽草酸-3-磷酸合成酶基因 *Agrobacterium tumefaciens* strain CP4 Product: herbicide tolerant form of 5-enolpyruvulshikimate-3-phosphate synthase。

3.4

G2-EPSPS

荧光假单胞杆菌G2蛋白基因和5-莽草酸-3-磷酸合成酶基因 *Agrobacterium tumefaciens* strain CP4 Product: herbicide tolerant form of 5-enolpyruvulshikimate-3-phosphate synthase。

4 原理

根据国产大豆转基因成分EP4-EPSPS及G2-EPSPS序列设计特异性内引物和外引物各一对，特异性引物碱基序列参见5 试剂，表1。建立LAMP反应体系，恒温反应结束后根据添加的染料显色情况进行结果判断。

5 试剂

5.1 试剂

- 除另有规定外，所有试剂均为分析纯或生化试剂。
- 5.1.1 试验用水：应符合GB/T 6682中的一级水。
 - 5.1.2 CTAB（十六烷基三甲基溴化铵）
 - 5.1.3 1M Tris-HCl（pH 8.0）
 - 5.1.4 0.5M EDTA（乙二胺四乙酸二钠，pH 8.0）
 - 5.1.5 NaCl（氯化钠）
 - 5.1.6 dNTPs溶液：每种核苷酸浓度10 mmol/L
 - 5.1.7 Bst DNA聚合酶大片段（如：NEB公司或具有同等效果的DNA聚合酶）：酶浓度8U/μL。
 - 5.1.8 10×ThermoPol Reaction Buffer：含200 mmol/L Tris-HCl（pH 8.8）、100 mmol/L KCl、100 mmol/L (NH₄)₂SO₄、20mmol/L MgSO₄、1% Triton X-100。
 - 5.1.9 MgSO₄溶液：150mmol/L。
 - 5.1.10 甜菜碱溶液：5mol/L。
 - 5.1.11 酚红溶液：10%。
 - 5.1.12 引物：CP4-EPSPS/G2-EPSPS环介导等温扩增（LAMP）检测方法作用引物见表1。

表1 LAMP反应引物序列

序号	基因名称	引物序列（5'-3'）	
1	CP4-EPSPS	F3	CGTACCATCCGTCTTGAAGG
		B3	AGACGTGGGTTGATCACTTC
		FIP (F1c+F2)	GCAGCAACCAATGGGAAAGCGAGTGGTAAGCTCACCGGTCA
		BIP (B1c+B2)	CAGGTTCCGACGTCACCATCCCACCCATTTCTGCAGAGTC
2	G2-EPSPS	F3	GCACGCTTTATCGTTGACGT
		B3	CGGTCACGGTTTTCTGCG
		FIP (F1c+F2)	AACACGCCATGCTTGTGCGAGTGTGCGAGCAAGCTCTGC
		BIP (B1c+B2)	GCCTGATGATTCGGGTCCGCTCAAGGTACAAGGCTCCTG

5.2 溶液配制

5.2.1 裂解液 量取10mL 1M Tris-HCl (pH 8.0)、0.8mL EDTA (pH 8.0)、81.86g NaCl、2g CTAB加入烧杯中，加入约800 mL超纯水，搅拌溶解。用稀盐酸或NaOH调节pH至8.0，加超纯水定容至1L，混匀。

5.2.2 复溶液 量取10mL 10M Tris-HCl (pH 8.0)、2mL 0.5M EDTA (pH 8.0)，加入烧杯中，加入800mL超纯水，搅拌混匀。用稀盐酸或NaOH调节pH至8.0，加超纯水定容至1L，混匀。

5.2.3 扩增反应液 CP4-EPSPS环介导等温扩增 (LAMP) 反应液配制见表2。配制扩增反应液后按照25 μ L/管分装至0.2mL离心管中，-80摄氏度快速冷冻30分钟，预冷冻后的试剂转移至冻干机-40℃保持2小时，启动真空泵将压力降至0.1mBar以下，缓慢升温 (0.5℃/min) 至-20℃，使冰晶逐渐升华。再将温度 (0.2℃/min) 逐渐升至20℃，保持真空状态2小时后关闭真空泵，充入惰性气体恢复常压。取出冻干后的试剂，盖上离心管盖。

表 2 LAMP 反应液配制体系

组分	工作液浓度	加样量/ μ L	反应体系终浓度
10 \times ThermoPol Reaction Buffer	10	2.5	1
外侧上游引物 (F3)	10 μ mol/L	0.5	0.2 μ mol/L
外侧下游引物 (B3)	10 μ mol/L	0.5	0.2 μ mol/L
内侧上游引物 (FIP)	40 μ mol/L	1	1.6 μ mol/L
内侧下游引物 (BIP)	40 μ mol/L	1	1.6 μ mol/L
dNTPs	10 mmol/L	2	0.8 mmol/L
甜菜碱	5mol/L	5	1.0 mmol/L
MgSO ₄	150mmol/L	1	6mmol/L
Bst DNA 聚合酶	8U/ μ L	1	0.32U/ μ L
酚红	10%	0.5	0.2%
水	-	补足至 25	-

6 仪器及材料

6.1 水浴锅或加热模块：65℃ \pm 0.5℃。

6.2 离心管：5mL、1.5mL、200 μ L。

6.3 移液器：量程10-100 μ L；量程100-1000 μ L；量程1-5mL。

6.4 计时器。

6.5 天平：2000g/0.01g。

6.6：容量瓶：1L。

6.7：烧杯：1L。

6.8：玻璃棒：20cm。

6.9: 真空冷冻干燥机。

7 样品制备

7.1 抽样和制样

样品的抽样和制备按照GB/T 19495.7-2004《转基因产品检测 抽样和制样方法》进行。

7.2 样品前处理

7.2.1 裂解: 取 $0.20\text{g} \pm 0.05\text{g}$ 籽粒粉末于5mL离心管中, 加4mL裂解液, 上下颠倒混匀(或涡旋混匀30秒)。

7.2.2 复溶: 取25 μL 裂解液加入一个新的1.5mL的离心管中, 再向离心管中加入1mL复溶液中, 上下颠倒混匀(或涡旋混匀10秒), 备用。

8 样品测定

8.1 配制试剂

更换移液器吸头, 取25 μL 复溶液加入冻干管中, 再取25 μL 封闭剂加入冻干管中, 换4联管盖, 盖紧管盖后上下颠倒混匀(或涡旋混匀10秒), 用手将液体甩至管底(注意液体不要有气泡)。

8.2 核酸扩增

65°C恒温扩增30min, 反应结束。

8.3 结果判断

试剂为黄色或橘黄色, 可判断所检基因阳性; 试剂为红色, 则可判断所检基因阴性。

9 结果表述

9.1 检测结果为阴性, 可表述为“未检出CP4-EPSPS或G2-EPSPS基因”。

9.2 检测结果为阳性, 可表述为“检出CP4-EPSPS或G2-EPSPS基因”。