

中华人民共和国国家标准

农业农村部公告第 XXX 号-X-XXXX

转基因植物及其产品成分检测 玉米转化体特异性数字 PCR 方法

Detection of genetically modified plants and derived products—
Event-specific digital PCR method for genetically modified maize and its
derivates

(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

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

中华人民共和国农业农村部 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：中国农业科学院油料作物研究所、农业农村部科技发展中心、天津市农业科学院、吉林省农业科学院（中国农业科技东北创新中心）、上海市农业科学院、上海交通大学、深圳市农产品质量安全检验检测中心（深圳市动植物疫病预防控制中心）、中国农业科学院水稻研究所、中国农业科学院生物技术研究所、中国农业科学院环境保护研究所、华南农业大学、江苏省农业科学院、浙江省农业科学院、四川省农业科学院、中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所、黑龙江省农业科学院、内蒙古自治区农牧业质量安全与检测研究所、中国农业科学院植物保护研究所。

本文件主要起草人：

转基因植物及其产品成分检测

玉米转化体特异性数字 PCR 方法

1 范围

本文件规定了转基因玉米转化体转化体特异性数字 PCR 定性和定量检测方法。
本文件适用于玉米及产品中 40 个玉米转化体成分（附录 A 中附表 A.1）的定性和定量检测。

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。

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 1861 号公告—3—2012 转基因植物及其产品成分检测 玉米内标基因定性 PCR 方法
农业部 2031 号公告—19—2013 转基因植物及其产品成分检测 抽样
农业农村部公告第 323 号-21-2020 转基因植物及其产品成分检测 数字 PCR 方法制定指南
NY/T 672 转基因植物及其产品检测 通用要求

3 术语和定义

农业部 1861 号公告—3—2012 和农业农村部公告第 323 号-21-2020 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

转化体特异性序列 event-specific sequence

转化体的外源插入片段 5' 端或（和）3' 端与玉米基因组的连接区序列，包括玉米基因组部分序列及外源插入片段部分序列。

3.2

阳性质控品 positive control

含有目标转化体和内标基因特异性序列的玉米样品或 DNA 溶液。

注：阳性质控品宜优先选用有证标准物质（标准样品），也可使用经充分验证的实验室配制样品，其转基因含量宜与标识阈值相当。

3.3

阴性质控品 negative control

不含有目标转化体特异性序列的非转基因玉米样品或 DNA 溶液。

3.4

空白质控品 blank control

以水代替玉米样品或 DNA 溶液。

3.5

子样 subsample

试样预处理后，从同一试样不同位置随机抽取的独立样品。

4 原理

数字 PCR 将 PCR 反应体系分割为成千上万个独立的微反应单元，通过对阳性单元的比例进行泊松校正，实现目标 DNA 的绝对定量。采用规定的引物和探针，在同一反应体系中对试样中玉米转化体特异性序列和内标基因进行二重数字 PCR 扩增。经 PCR 扩增后，对产生阳性荧光信号的微反应单元进行计数，基于泊松分布分别计算试样中玉米转化体特异性序列和内标基因的拷贝数，进而获得玉米转化体与内标基因的拷贝数比值，即试样中玉米转化体的含量。

5 试剂和材料

除非另有说明，仅使用分析纯试剂、蒸馏水或以上等级的水。

5.1 DNA 提取试剂盒：应针对不同的样品选取不同的基因组 DNA 提取试剂盒。

5.2 数字 PCR 预混液：含有镁离子、dNTPs 和具有 5'-3'外切活性的 Taq DNA 聚合酶的数字 PCR 专用预混试剂，按照不同的数字 PCR 系统选择适宜的数字 PCR 预混液。

5.3 引物/探针：玉米转化体特异性序列和玉米内标基因的引物/探针信息见附录 A 中的附表 A.1，扩增序列参见附录 B。

6 主要仪器和设备

6.1 分析天平：感量 0.1 g 和 0.1 mg。

6.2 数字 PCR 系统：微滴式数字 PCR 或芯片式数字 PCR 系统。

6.3 核酸定量仪。

6.4 离心机。

7 操作步骤

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。采用核酸定量仪测定 DNA 溶液的浓度，将样品 DNA 溶液调整到适宜浓度，用于数字 PCR 体系配制。

7.5 质控设置

使用阳性质控品、阴性质控品和空白质控品对检测过程进行质控。

7.6 数字 PCR 扩增

7.6.1 二重数字 PCR: MIR604 转化体与 *Adh1* 内标基因配组进行 MIR604/*Adh1* 二重数字 PCR 扩增, 其他 39 个转化体均与 *zSSIb* 内标基因配组进行转化体/内标基因二重数字 PCR 扩增。

7.6.2 数字 PCR 重复: 在数字 PCR 板上对试样、质控品的玉米转化体特异性序列及内标基因进行二重数字 PCR 扩增。每个试样设置 3 个平行子样, 每个子样进行 1 个数字 PCR 扩增; 质控品不设置平行子样, 进行 3 个重复数字 PCR 扩增。

7.6.2 数字 PCR 扩增体系

7.6.2.1 PCR 扩增体系总体积可根据不同厂家、型号的数字 PCR 仪做相应的调整, 保持各引物、探针的终浓度不变。

7.6.2.2 MIR604/*Adh1* 二重数字 PCR 按表 1 中引物、探针终浓度配制数字 PCR 扩增体系。

7.6.2.3 27 个玉米转化体, 包括 DBN9936、DBN9858、DBN9501、瑞丰 125、浙大瑞丰 8、nCX-1、BFL4-2、BBL2-2、KJ1003、Bt11、MIR162、GA21、MON810、Bt176、TC1507、MON863、59122、MON87460、MON89034、MON88017、3272、MON87411、MZIR098、DP202216、NK603、T25、MON87427, 其转化体/*zSSIb* 二重数字 PCR 按表 1 中引物、探针终浓度配制数字 PCR 扩增体系。

表 1 数字 PCR 扩增体系 I

试剂	终浓度	体积
ddH ₂ O		—
数字 PCR 预混液	1×	—
内标基因上游引物 (10 μmol/L)	0.4 μmol/L	0.8 μL
内标基因下游引物 (10 μmol/L)	0.4 μmol/L	0.8 μL
内标基因探针 (10 μmol/L)	0.2 μmol/L	0.4 μL
转化体上游引物 (10 μmol/L)	0.4 μmol/L	0.8 μL
转化体下游引物 (10 μmol/L)	0.4 μmol/L	0.8 μL
转化体探针 (10 μmol/L)	0.2 μmol/L	0.4 μL
DNA 模版 (50 ng/μL)	5.0 ng/μL	2.0 μL
总体积		20.0 μL
“—”表示体积不确定, 根据数字 PCR 预混液的浓度确定预混液的体积, 并相应调整 ddH ₂ O 的体积, 使反应体系总体积达到 20.0 μL。 此表是 1 个反应体系的体积, 应按照实际反应数量进行扩增体系配置。 空白质控品用水作模板。		

7.6.2.4 11 个玉米转化体, 包括 ND207、LW2-1、WYN17132、WYN041、CC-2、LP026-2、QY2569-42、ZZM032、MZIR260、5307、DP4114, 其转化体/*zSSIb* 二重数字 PCR 按表 2 中引物、探针终浓度配制数字 PCR 扩增体系。

表 2 数字 PCR 扩增体系 II

试剂	终浓度	体积
ddH ₂ O		—
数字 PCR 预混液	1×	—
内标基因上游引物 (10 μmol/L)	0.5 μmol/L	1.0 μL
内标基因下游引物 (10 μmol/L)	0.5 μmol/L	1.0 μL
内标基因探针 (10 μmol/L)	0.25 μmol/L	0.5 μL
转化体上游引物 (10 μmol/L)	0.5 μmol/L	1.0 μL
转化体下游引物 (10 μmol/L)	0.5 μmol/L	1.0 μL
转化体探针 (10 μmol/L)	0.25 μmol/L	0.5 μL
DNA 模版 (50 ng/μL)	5.0 ng/μL	2.0 μL
总体积		20.0 μL

“—”表示体积不确定，根据数字 PCR 预混液的浓度确定预混液的体积，并相应调整 ddH₂O 的体积，使反应体系总体积达到 20.0 μL。

此表是 1 个反应体系的体积，应按照实际反应数量进行扩增体系配置。

空白质控品用水作模板。

7.6.2.5 DAS-40278-9/zSSIIb 二重数字 PCR 按表 3 中引物、探针终浓度配制数字 PCR 扩增体系。

表 3 数字 PCR 扩增体系Ⅲ

试剂	终浓度	体积
ddH ₂ O		—
数字 PCR 预混液	1×	—
内标基因上游引物 (10 μmol/L)	0.5 μmol/L	1.0 μL
内标基因下游引物 (10 μmol/L)	0.5 μmol/L	1.0 μL
内标基因探针 (10 μmol/L)	0.25 μmol/L	0.5 μL
转化体上游引物 (10 μmol/L)	0.4 μmol/L	0.8 μL
转化体下游引物 (10 μmol/L)	0.4 μmol/L	0.8 μL
转化体探针 (10 μmol/L)	0.2 μmol/L	0.4 μL
DNA 模版 (50 ng/μL)	5.0 ng/μL	2.0 μL
总体积		20.0 μL

“—”表示体积不确定，根据数字 PCR 预混液的浓度确定预混液的体积，并相应调整 ddH₂O 的体积，使反应体系总体积达到 20.0 μL。

此表是 1 个反应体系的体积，应按照实际反应数量进行扩增体系配置。

空白质控品用水作模板。

7.6.3 微反应单元制备：将 PCR 板（管）放在离心机上，500 g~3 000 g 离心 10 s，去除气泡。然后将 PCR 反应液分割到大量独立的微反应单元中，微滴式数字 PCR 形成油包水微反应单元，芯片式数字 PCR 将反应液物理分割到芯片微孔或腔室中。具体按照不同数字 PCR 平台的说明书进行操作。

注：分体式数字 PCR 系统，需完成微反应单元制备后进行 PCR 扩增；一体式数字 PCR 系统，无需单独进行微反应单元制备。

7.6.4 数字 PCR 扩增。在一体式数字 PCR 仪或者普通 PCR 仪上进行 PCR 扩增。根据待测的玉米转化体，从表 4 中选择适宜的反应程序进行 PCR 扩增。可根据仪器和试剂要求对反应程序作适当调整，退火延伸温度不变。

表 4 数字 PCR 扩增程序

序号	转化体	酶激活	扩增			酶灭活
			变性	退火延伸	循环数	
1	DBN9936	95 °C, 10 min	94 °C, 30 s	60 °C, 60 s	50 个	98 °C, 10 min
2	DBN9858					
3	DBN9501					
4	瑞丰 125					
5	浙大瑞丰 8					
6	nCX-1					
7	ND207					
8	QY2569-42					
9	ZZM032					
10	MZIR260					
11	Bt11					
12	MIR162					
13	GA21					
14	MON810					
15	Bt176					
16	TC1507					
17	MON863					
18	59122					
19	3272					
20	DAS-40278-9					
21	MON87411					
22	MZIR098					
23	DP202216					
24	NK603					
25	T25					
26	MIR604					
27	MON87427					
28	WYN041	95 °C, 10 min	94 °C, 30 s	58 °C, 60 s	50 个	98 °C, 10 min
29	BBL2-2					
30	KJ1003					
31	LW2-1					
32	LP026-2					
33	5307					

34	MON89034	95 ℃, 10 min	94 ℃, 30 s	56 ℃, 60 s	50 个	98 ℃, 10 min
35	MON88017					
36	BFL4-2					
37	WYN17132					
38	CC-2					
39	MON8746					
40	DP4114					
若采用微滴数字 PCR 仪, 升降温速度 ≤2.5℃/s。						

7.7 荧光信号检测

7.7.1 数字 PCR 数据分析软件设置: PCR 扩增结束后, 利用数字 PCR 数据分析软件对微反应单元进行荧光信号检测。二重数字 PCR 根据 TaqMan 探针标记的荧光基团, 选择 2 个适宜的荧光通道, 其他参数根据说明书设置。

7.7.2 阈值设定: 通常数据分析软件会根据阳性和阴性微反应单元的荧光值, 自动设定区分阳性和阴性微反应单元的阈值线; 若部分 PCR 反应没有自动设定阈值线, 需同时参照阳性和阴性质控品的荧光值手动设定阈值线, 阈值线应将同一样品中阴性微反应单元和阳性微反应单元有效区分。

7.7.3 通过软件导出各二重数字 PCR 反应中总微反应单元数 (n_t)、玉米转化体特异性序列、内标基因阳性微反应单元比例 (p)、拷贝数浓度 (N) 和转化体/内标基因拷贝数比值 (c) 等数据。

注: 若不能通过软件直接导出转化体/内标基因拷贝数比值数据, 也可根据二者的拷贝数浓度计算。

8 结果分析与表述

8.1 数字 PCR 扩增合格判定

8.1.1 统计各 PCR 反应生成的有效微反应单元数, 若总数少于 10000 个/反应, 判定为无效反应。

8.1.2 阳性质控品中, 玉米转化体特异性序列和内标基因均有阳性微反应单元, 且与阴性微反应单元明显区分。

8.1.3 阴性质控品中, 玉米转化体特异性序列无阳性微反应单元, 且内标基因有阳性微反应单元。

8.1.4 空白质控品中, 玉米转化体特异性序列和内标基因均无阳性微反应单元。

8.1.5 同时满足 8.1.1~8.1.4 的条件, 可进行后续数据分析。否则, 分析具体情况, 重新进行检测。

8.2 检测数据合格判定

8.2.1 阳性定量质控品检测数据合格判定

8.2.1.1 方法选择

当使用有证标准物质作为阳性定量质控品时, 按 8.2.1.2 进行阳性定量质控品检测数据合格判定; 当使用实验室配制的样品作为阳性定量质控品时, 按 8.2.1.3 进行阳性定量质控品检测数据合格判定。

8.2.1.2 有证标准物质做阳性定量质控品

8.2.1.2.1 阳性定量质控品检测数据平均值的标准不确定度

按公式 (1), 计算阳性定量质控品 m 个重复 PCR 检测数据平均值的标准不确定度 (平均值的标准误差):

$$u(\bar{c}) = \frac{c_{max} - c_{min}}{f} \cdot \frac{1}{\sqrt{m}} \dots \dots \dots (1)$$

式中:

- $u(\bar{c})$ —阳性定量质控品 m 个重复 PCR 检测数据平均值的标准不确定度(平均值的标准误);
- c_{max} — m 个重复 PCR 中拷贝数比值最大值;
- c_{min} — m 个重复 PCR 中拷贝数比值最小值;
- f —极差系数, 当重复 PCR $m=3$ 时, $f=1.693$;
- m —阳性定量质控品 PCR 的重复次数, 本文件中规定 3 个重复 PCR (即 $m=3$)。

8.2.1.2.2 阳性定量质控品检测数据平均值偏倚的标准不确定度

按公式 (2), 计算阳性定量质控品 m 个重复 PCR 检测数据平均值偏倚的标准不确定度:

$$u_{bias} = \sqrt{u_{CRM}^2 + u^2(\bar{c})} \dots \dots \dots (2)$$

式中:

- u_{bias} —阳性定量质控品 m 个重复 PCR 检测数据平均值偏倚的标准不确定度;
- u_{CRM} —阳性定量质控品认定值的标准不确定度;
- $u(\bar{c})$ —阳性定量质控品 m 个重复 PCR 检测数据平均值的标准不确定度。

8.2.1.2.3 阳性定量质控品检测数据平均值与其认定值间的偏倚

按公式 (3) 计算阳性定量质控品 m 个重复 PCR 检测数据平均值与其认定值间的偏倚:

$$bias = \bar{c} - c_{CRM} \dots \dots \dots (3)$$

式中:

- $bias$ —阳性定量质控品检测数据 m 个重复 PCR 检测数据平均值与认定值间的偏倚;
- \bar{c} —阳性定量质控品 m 个重复 PCR 检测数据的平均值;
- c_{CRM} —阳性定量质控品认定值。

8.2.1.2.4 阳性定量质控品检测数据合格要求

若 $|bias| < 2 \times u_{bias}$ (扩展不确定度, 95%置信水平下包含因子为 2), 表明该次实验阳性定量质控品检测数据的偏倚不显著, 本次实验阳性定量质控品检测数据合格。

8.2.1.3 实验室配制的样品做阳性定量质控品

8.2.1.3.1 计算阳性定量质控品检测数据的标准差

按公式 (4) 计算阳性定量质控品 m 个重复 PCR 检测数据的标准差 (s):

$$s = \frac{c_{max} - c_{min}}{f} \dots \dots \dots (4)$$

8.2.1.3.2 计算阳性定量质控品检测数据的相对标准差 (变异系数)

按公式 (5) 计算阳性定量质控品 m 个重复 PCR 检测数据的相对标准差 (s_r):

$$s_r = \frac{s}{\bar{c}} \times 100\% \dots \dots \dots (5)$$

8.2.1.3.3 计算阳性定量质控品检测数据平均值与其预期值的相对偏倚

按公式 (6) 计算阳性定量质控品 m 个重复 PCR 平均值与其预期值的相对偏倚 ($bias_r$):

$$bias_r = \frac{\bar{c} - c_E}{c_E} \times 100\% \dots \dots \dots (6)$$

式中:

- $bias_r$ —阳性定量质控品 m 个重复 PCR 检测数据平均值与其预期值的相对偏倚 (%);
- \bar{c} —阳性定量质控品 m 个重复 PCR 检测数据的平均值;
- c_E —阳性定量质控品的预期值。

8.2.1.3.4 阳性定量质控品检测数据合格要求

若 $s_r \leq 25\%$, 且 $|bias_r| \leq 25\%$, 表明阳性定量质控品检测数据的偏倚不显著, 本次实验阳性定量质

控品检测数据合格。

8.2.2 试样检测数据合格判定

8.2.2.1 计算试样检测数据标准差

按公式 (7) 计算试样 n 个平行子样检测数据标准差:

$$s' = \frac{c'_{max} - c'_{min}}{f} \dots\dots\dots (7)$$

式中:

- s' — n 个平行子样检测数据的标准差;
- c'_{max} — n 个平行子样拷贝数比值最大值;
- c'_{min} — n 个平行子样拷贝数比值最小值;
- f — 极差系数, 当平行子样 $n=3$ 时, $f=1.693$ 。

8.2.2.2 试样检测数据的相对标准差 (变异系数)

按公式 (8) 计算试样 n 个平行子样检测数据的相对标准差:

$$s'_r = \frac{s'}{\bar{c}'} \times 100\% \dots\dots\dots (8)$$

式中:

- s'_r — n 个平行子样检测数据的相对标准差 (%) ;
- s' — n 个平行子样检测数据的标准差;
- \bar{c}' — n 个平行子样检测数据的平均值。

当试样检测数据平均值 $\bar{c}' \geq 0.1\%$, 即大于等于方法定量限条件下, 若试样 $s'_r \leq 25\%$, 本次试样检测数据合格; 当试样检测数据平均值 $\bar{c}' < 0.1\%$, 即小于方法定量限条件下, 直接按条款“8.4.2”进行结果分析与表述。

8.2.3 检测数据合格要求

分别按照 8.2.1 和 8.2.2 对阳性定量质控品和试样的检测数据进行合格判定, 若阳性定量质控品和试样的检测数据同时合格, 则表明本次检测数据有效, 根据 8.3 进行试样定量结果计算; 否则, 做好记录, 查找原因, 重新进行 PCR 扩增或重新制备试样, 直至获得有效检测数据。

8.3 试样定量结果计算

8.3.1 试样检测数据的平均值

计算 3 个平行子样检测数据的平均值 \bar{c}' 。

8.3.2 试样定量结果不确定度评定

检测实验室需自行评定测量不确定度, 可基于足够数量的阳性样品或有证标准物质, 采用自上而下的方式评定; 也可剖分测量过程中的各个不确定度分量, 采用自下而上的方式评定。

8.3.3 试样定量结果的标示

按公式 (9) 标示试样转化体含量的定量结果:

$$C = \bar{c}' \pm U \dots\dots\dots (9)$$

式中:

- C — 试样中玉米转化体含量的定量结果 (%) ;
- \bar{c}' — 试样 3 个平行子样数据平均值 (%) , 有效数字最后一位按不确定度有效数字最后一位修约;
- U — 试样定量结果的扩展不确定度 (%) , 保留 2 位有效数字。

8.4 结果表述

8.4.1 试样中玉米内标基因和玉米 XX 转化体特异性序列均有阳性微反应单元, 且计算的玉米 XX 转

化体含量 (C) 高于定量限, 表明试样中检测出玉米 XX 转化体成分。结果表述为“试样中检测出玉米 XX 转化体成分, 玉米 XX 转化体含量为 $\bar{c} \pm U$ ”。

8.4.2 试样中玉米内标基因和玉米 XX 转化体特异性序列均有阳性微反应单元, 且计算的玉米 XX 含量 (C) 低于定量限, 表明试样中检测出玉米 XX 转化体成分。结果表述为“试样中检测出玉米 XX 转化体成分, 但玉米 XX 转化体含量低于定量限”。

8.4.3 试样中玉米内标基因有阳性微反应单元, 而玉米 XX 转化体特异性序列无阳性微反应单元, 表明试样中未检测出玉米 XX 转化体成分。结果表述为“试样中未检测出玉米 XX 转化体成分, 检测结果为阴性”。

8.4.4 试样中玉米内标基因无阳性微反应单元, 表明试样中未检测出玉米基因组 DNA 成分。结果表述为“试样中未检测出玉米基因组 DNA 成分”。

9 检出限和定量限

本方法的检出限 (LOD) 为 0.05% (相当于反应体系中含有约 20 拷贝玉米转化体特异性序列), 定量限 (LOQ) 为 0.1% (相当于反应体系中含有约 40 拷贝玉米转化体特异性序列)。

注: 本方法的检出限、定量限是以 PCR 反应体系中加入 100 ng 玉米基因组 DNA 模板进行测算的。

附录 A
(规范性)

玉米转化体特异性序列和内标基因的引物、探针及扩增片段信息见表A.1。

表A.1 玉米转化体特异性序列和内标基因引物和探针组合信息表

序号	检测靶标	引物/探针	序列 (5'-3')	目的片段大小/ bp
1	DBN9936	DBN9936-qF	AGCGTCAATTTGTTACAC	76
		DBN9936-qR	CAGGGCAAGAAAACATC	
		DBN9936-qP	TCTTGTGTGCCCATGAGCCTA	
2	DBN9858	DBN9858-qF	TAAACCTAATCAGTCAGTGCCG	146
		DBN9858-qR	AGCGCTGATTCTCGAGTAAGG	
		DBN9858-qP	CCCAAACAACCAGCCCACCAG	
3	DBN9501	C0063.3-qF	AACGTGACTCCCTTAATTCTCC	96
		C0063.3-qR	CCGACTACTATACCATTATAGTTACA	
		C0063.3-qP	ACTGAAGGCGGGAAACGACAATCT	
4	瑞丰 125	RF125-dF	GATCGCCCTTCCCAACAGT	122
		RF125-dR	ATCGCCCGACGCTACAAC	
		RF125-dP	AGATTGTCGTTTCCCGCCTTCA	
5	浙大瑞丰 8	FR 8-qF	GTTGTCTAAGCGTCAATTTGTTTAC	92
		FR 8-qR	CAACTGGCGACACAGGGTG	
		FR 8-qP	CGACGGCTGAGATGAAGATACGA	
6	nCX-1	nCX-1-qF	CGCTAGTTCATCCTCTGACTGGTA	87
		nCX-1-qR	CTAAGCGTCAATTTGTTTACACCAC	
		nCX-1-qP	CGACCATAACCAGTTGCTCAGGTGCCT	
7	ND207	2A-7-qF	GATTAGAGTCCC GCAATTATACATTTAA	91
		2A-7-qR	TGCCGGAAGACCTCGTT	
		2A-7-qP	CCACGCGCATCACCTGCGTC	
8	BFL4-2	BFL4-2-QF	CGTCCGCAATGTGTTATT	74
		BFL4-2-QR	GCAACTACTTTGGATGAGG	
		BFL4-2-QP	CTAAGCGTCAATTTGTTTACACCAC	
9	LW2-1	LW2-1 -qF	TCTTAAACCCACCTTACATACTGA	86
		LW2-1 -qR	CGTGACTCCCTTAATTCTCCG	
		LW2-1 -qP	CAGATTGTCGTTTCCCGCCTTC	
10	WYN17132	WYN17132-qF	ACAAATAGGGTGTGGCTGTT	145
		WYN17132-qR	AACGTCCGCAATGTGTTATTAAG	
		WYN17132-qP	CAGCGTCTCGTACCGGTTTCGTTT	
11	WYN041	WYN041-QF	ATTCGGCGTTAATTCAGTACATTAATA	144

		WYN041-QR	CTTTCTTCTCCGTGAACCTGC	
		WYN041-QP	ATTAAGTTGTCTAAGCGCGGGATC	
12	BBL2-2	BBL2-2-QF	GTGATCTTGTTCGTTGTATTGG	119
		BBL2-2-QR	TTCGGCGTTAATTCAGTACAT	
		BBL2-2-QP	TCCCTGAGAGTCAACTGCCCC	
13	CC-2	CC-2 -qF	TGCAATGGGCCAGATCTAGTTA	107
		CC-2 -qR	GCTCACTGAATTAACGCCGA	
		CC-2 -qP	CCAGTACTAAAATCCAGATCCCCCGA	
14	LP026-2	LP026-2-qF	CTCGGACCCATCGAATGC	87
		LP026-2-qR	CTCCCTTAATTCTCCGCTCT	
		LP026-2-qP	TCAGATTGTCGTTTCCCGCCTT	
15	KJ1003	KJ1003 qF	GTCCTCGCTCCCTTTTCTCTT	158
		KJ1003 qR	ATAGCGCGCAAACCTAGGAT	
		KJ1003 qP	CAGATTGTCGTTTCCCGCCT	
16	QY2569-42	QY2569-qF	ATGTTTTAAACCATACTGTAATTCG	82
		QY2569-qR	TTAGCAGCTTGAGCTTGGATCAG	
		QY2569-qP	AAACTGAAGGCGGAAACGACAAT	
17	ZZM032	ZZM032-F	CGCAAACCTAGGATAAATTATCG	124
		ZZM032-R	TCGTCAAATTATAAATTGAGGG	
		ZZM032-P	CGCGGTGTCATCTATGTTACTAGATC	
18	MZIR260	MZIR260-F	GTTATTAAGTTGTCTAAGCGTCAATTTGTT	88
		MZIR260-R	CGCCATAGTGTACTTGACATCTTATGT	
		MZIR260-P	FAM-CACCACAATATAAAAAG-MGB	
19	Bt11	Bt11qF1	GCGGAACCCCTATTTGTTTA	109
		Bt11qR1	TCCAAGAATCCCTCCATGAG	
		Bt11qP1	AAATACATTCAAATATGTATCCGCTCA	
20	MIR162	MIR162-fl	GCGCGGTGTCATCTATGTTACTAG	86
		MIR162-r1	TGCCTTATCTGTTGCCTTCAGA	
		MIR162-p1	TCTAGACAATTCAGTACATTA AAAACGTCCGCCA	
21	GA21	esGA21-5F	CGTTATGCTATTTGCAACTTTAGAACA	124
		esGA21-5R	GCGATCCTCCTCGCGTT	
		esGA21-5P	TTTCTCAACAGCAGGTGGGTGCGGGT	
22	MON810	Mail-F1	TCGAAGGACGAAGGACTCTAACGT	92
		Mail-R1	GCCACCTTCCTTTTCCACTATCTT	
		Mail-S2	AACATCCTTTGCCATTGCCCAGC	
23	Bt176	Bt176 F	GGCCGTGAACGAGCTGTT	82

农业农村部公告第 XXXX 号-X-XXXX

		Bt176 R	GGAAGAAGCCTACATGTTTTCTAA	
		Bt-176 P	AGCAACCAGATCGGCCGACACC	
24	TC1507	TC1507-F1	TAGTCTTCGGCCAGAATGG	58
		TC1507-R3	CTTTGCCAAGATCAAGCG	
		TC1507-PS1	TAACTCAAGGCCCTCACTCCG	
25	MON863	MON863F	TGTTACGGCCTAAATGCTGAACT	84
		MON863R	GTAGGATCGGAAAGCTTGGTAC	
		MON863P	TGAACACCCATCCGAACAAGTAGGGTCA	
26	59122	59122-7-rb1f	GGGATAAGCAAGTAAAAGCGCTC	86
		59122-7-rb1r	CCTTAATTCTCCGCTCATGATCAG	
		59122-7-rb1s	TTTAAACTGAAGGCGGGAAACGACAA	
27	MON87460	87460 qF	CACGTTGAAGGAAAATGGATTG	82
		87460 qR	TCGCGATCCTCCTCAAAGAC	
		87460 qP	AGGGAGTATGTAGATAAATTTCAAAGCGTTA GACGGC	
28	MON89034	MON89034F	TTCTCCATATTGACCATCATACTCATT	76
		MON89034R	CGGTATCTATAATACCGTGGTTTTTAA	
		MON89034P	ATCCCCGGAAATTATGTT	
29	MON88017	MON88017F	GAGCAGGACCTGCAGAAGCT	95
		MON88017R	TCCGGAGTTGACCATCCA	
		MON88017P	TCCCGCCTTCAGTTTAAACAGAGTCGGGT	
30	3272	ES3272-F	TCATCAGACCAGATTCTCTTTTATGG	95
		ES3272-R	CGTTTCCCGCCTTCAGTTTA	
		ES3272-P	ACTGCTGACGCGGCCAAACTG	
31	5307	5307 qF	CATGGCCGTATCCGCAATGTG	107
		5307 qR	TGCACCCTTTGCCAGTGG	
		5307 qP	ACCACAATATACCCTCTTCCCTGGGCCAG	
32	DAS-40278-9	40278-9_5'-f1	CACGAACCATTGAGTTACAATC	98
		40278-9_5'-r3	TGGTTCATTGTATTCTGGCTTTG	
		40278-9_5'-S2	CGTAGCTAACCTTCATTGTATTCCG	
33	DP4114	4114 qF	CGCTACTAGACAATTGAG	102
		4114 qR	GAAGTTCTTATATCTGGCGAT	
		4114 qP	AGACAACCTAATAACACATTGCGGACG	
34	MON87411	87411 QF	CTCTGTAACAGAAAACACCATCTAGAG	102
		87411 QR	ACAAAAGTGAAGTAGTTCTAGGGTAGAT	
		87411 QP	CCGCGTTTAAACTATCAGTGTTTAGAGAAT	
35	MZIR098	MZIR qF	ATCTCAGACACCAAACCGAGATC	73

		MZIR qR	ACACCGTTAGGCTAGTGCCAGT	
		MZIR qP	CAAGTGACAGCGAACGGAGCTGGTTT	
36	DP202216	DP202216-qF	CTATTTCTTCCCATCTGAGGTCTGC	128
		DP202216-QR	GACTCCCTTAATTCTCCGCTCAT	
		DP202216-QP	TAAACTGAAGGCGGGAAACGAC	
37	NK603	NK603F	ATGAATGACCTCGAGTAAGCTTGTTAA	108
		NK603R	AAGAGATAACAGGATCCACTCAAACACT	
		NK603P	TGGTACCACGCGACACACTTCCACTC	
38	T25	MLD143	ACAAGCGTGTCTGCTCCAC	102
		MDB551	GACATGATACTCCTTCCACCG	
		TM016	TCATTGAGTCGTTCCGCCATTGTCTG	
39	MIR604	MIR604F	GCGCACGCAATTCAACAG	76
		MIR604R	GGTCATAACGTGACTCCCTTAATTCT	
		MIR604P	AGGCGGGAAACGACAATCTGATCATG	
40	MON87427	MON87427 qF	ACGGAAACGGTCGGGTCAAATG	95
		MON87427 qR	CCATGTAGATTTCCCGGTTTTCTC	
		MON87427 qP	TCGGGACAATATGGAGAAAAAGAAAGAG	
41	<i>zSSIb</i>	zSSIb-3F	CGGTGGATGCTAAGGCTGATG	88
		zSSIb-4R	AAAGGGCCAGGTTCAATTATCCTC	
		zSSIb-P	TAAGGAGCACTCGCCGCCGCATCTG	
42	<i>Adh1</i>	Zm adh1-F	CGTCGTTTCCCATCTTCTCTCC	135
		Zm adh1-R	CCACTCCGAGACCCTCAGTC	
		Zm adh1-P	AATCAGGGCTCATTTTCTCGCTCCTCA	
<p>探针均为TaqMan探针, 转化体5'端标记荧光报告基团FAM, 内标基因5'端标记荧光报告基团HEX; 瑞丰125、MZIR260和MON89034转化体3'端标记荧光淬灭基团MGBNFQ, 其他转化体3'端标记BHQ1。</p> <p>内标基因<i>zSSIb</i>与MIR604以外的玉米转化体配组, 进行二重数字PCR扩增。</p> <p>内标基因<i>Adh1</i>仅与MIR604转化体配组, 进行二重数字PCR扩增。</p>				

附录 B
(资料性)
玉米转化体和内标基因特异性序列

B.1 抗虫耐除草剂玉米DBN9936转化体特异性扩增序列

1 AGCGTCAATT TGTTTACACC ACAATGTGTC TTGTGTGCC ATGAGCCTAG CGTTTTGGGA
61 TGTTTTCTTG CCCCTG

注1: 该序列为DBN9936的5'端转化体特异性序列, 序列方向为5'-3'。

注2: 5'端单下划线部分为实时荧光PCR方法引物DBN9936-qF的序列, 3'端单下划线部分为实时荧光PCR方法引物DBN9936-qR的反向互补序列, 中间方框内部为实时荧光PCR方法探针DBN9936-qP的序列。

注3: 1~25为外源插入片段部分序列, 26~76为玉米基因组部分序列。

B.2 抗虫耐除草剂玉米DBN9858转化体特异性扩增序列

1 TAAACCTAAT CAGTCAGTGC CGGTGAGAGC GTAGCTGCCT GGAAGCGGCC TCGTCAGCCA
61 GTTGAGAGCA GTGAAGAGGG GCTTCAGATC CAGGCGCGC AAGGCCCAA CAACCAGCCC
121 ACCAGCCTTA CTCGAGAATC AGCGCT

注1: 该序列为DBN9858的3'端转化体特异性序列, 序列方向为5'~3'。

注2: 5'端单下划线部分为实时荧光 PCR检测方法引物DBN9858-QF的序列, 3'端单下划线部分为实时荧光PCR检测方法引物DBN9858-QR的反向互补序列, 中间方框内部为实时荧光PCR检测方法探针 DBN9858-QP的序列。

注3: 1~59为外源插入片段部分序列, 60~146为玉米基因组部分序列

B.3 耐除草剂玉米DBN9501转化体特异性扩增序列

1 AACGTGACTC CCTTAATTCT CCGCTCATGA TCAGATTGTC GTTTCCCGCC TTCAGTTTAA
61 ACTATCAGTG TAACTATAAA TGGTATAGTA GTCCGG

注 1: 该序列为 DBN9501 的 3'端转化体特异性序列, 序列的方向为 5'-3'。

注2: 5'端画线部分为实时荧光PCR方法引物DBN9501-qF的序列, 3'端画线部分为实时荧光PCR方法引物DBN9501-qR的反向互补序列, 中间方框内部为实时荧光PCR方法探针DBN9501-qP的反向互补序列。

注3: 1~65为外源插入片段部分序列, 66~96为玉米基因组部分序列。

B.4 抗虫耐除草剂玉米瑞丰125转化体特异性扩增序列

1 GATCGCCCTT CCCAACAGTT GCGCAGCCTG AATGGCGAAT GCTAGAGCAG CTTGAGCTTG
61 GATCAGATTG TCGTTTCCCG CCTTCAGTTT AA ACTATCAG TCTCGTTGTA GCGTCGGGCG
121 AT

注 1; 该序列为抗虫玉米瑞丰 125 的 3'端转化体特异性序列, 序列方向为 5'-3'。

注 2: 5 端单下划线部分为实时荧光 PCR 检测方法引物 RF125-qF 的序列, 3 端单下划线部分为实时荧光 PCR 检测方

法引物 RF125-qR 的反向互补序列,中部方框部分为实时荧光 PCR 检测方法探针 RF125-qP 的序列。

注 3:1~101 为外源插入片段部分序列, 102~122 为玉米基因组部分序列。

B.5 抗虫耐除草剂玉米浙大瑞丰8转化体特异性扩增序列

1 GTTGTCTAAG CGTCAATTTG TTTACACCAC AATGTTCCCA CGAATCCGAT CGTATCTTCA
61 TCTCAGCCGT CG ACACCCTG TGTCGCCAGT TG

注 1: 该序列为浙大瑞丰 8 的 3'端转化体特异性序列, 序列方向为 5'~3'。

注 2: 5'端阴影部分为实时荧光 PCR 检测方法引物 RF8-qF 的序列,3 端阴影部分为实时荧光 PCR 检测方法引物 RF8-qR 的反向互补序列, 中间方框内部为实时荧光 PCR 检测方法探针 RF8-qP 的序列。

注 3: 5'端序列中 1~32 为外源插入片段部分序列, 33~92 为玉米基因组序列。

B.6 抗虫耐除草剂玉米 nCX-1 转化体特异性扩增序列

1 CGCTAGTTCA TCCTCTGACT GGTAAGTAG CTG AGGCACC TGAGCAACTG GTATGGTCGC
61 TTGTGGTGTA AACAAATTGA CGCTTAG

注 1: 该序列为 nCX-1 的 5'端转化体特异性序列, 序列方向为 5'-3'

注 2: 5 端单下划线部分为实时荧光 PCR 检测方法引物 nCX-1-gF 的序列.3 端单下划线部分为实时荧光 PCR 检测方法引物 nCX-1-qR 的反向互补序列, 中间方框内部为实时荧光 PCR 检测方法探针 nCX-1-P 的序列。

注 3: 1~56 为玉米基因组部分序列, 57~87 为外源插入片段部分序列。

B.7 抗虫耐除草剂玉米ND207转化体特异性扩增序列

1 AATATAGCGC GCAATCCAGA TC CACGCGCA TCACCTGCGT CA CCGTGGGC AACGAGGTCT
61 TCTCCGGCAA CGACACGGCC ACGATGGCCA G

注1: 该序列为ND207的3'端转化体特异性序列, 序列方向为5'~3'。

注2: 5'端单下划线部分为实时荧光PCR检测方法引物ND207-qF的序列, 3'端单下划线部分为实时荧光PCR检测方法引物ND207-qR的反向互补序列, 方框内部为实时荧光PCR检测方法探针ND207-qP的序列。

注3: 1~66为外源插入片段部分序列, 67~91为玉米基因组部分序列。

B.8 抗虫耐除草剂玉米BFL4-2转化体特异性扩增序列

1 CGTCCGCAAT GTGTTATTAA GTTGT CTAAG CGTCAATTTG TTTACACCAC AATATAGCTT
61 CAAAGTCCCG GAGG

注 1: 该序列为 BFL4-2 的 3' 端转化体特异性序列, 序列方向为 5'-3'。

注 2: 5'端单下划线部分为数字 PCR 方法引物 BFL4-2-qF 的序列, 3'端单下划线部分为数字 PCR 方法引物 BFL4-2-qR

农业农村部公告第 XXXX 号-X-XXXX

的反向互补序列，中间方框内部为数字 PCR 方法探针 BFL4-2-qP 的反向互补序列。

注 3：1~60 为外源插入片段部分序列，61~74 为玉米基因组部分序列。

B.9 抗虫耐除草剂玉米LW2-1转化体特异性扩增序列

1 TCTTAAACCC ACCTTACATA CTGATAGTTT AAACTGAAGG CGGGAAACGA CAATCTGATC
61 AAGAGCGGAG AATTAAGGGA GTCACG

注 1：该序列为 LW2-1 的 5'端转化体特异性序列，序列方向为 5'-3'。

注 2：5'端单下划线部分为实时荧光PCR方法引物LW2-1-qF的序列，3'端单下划线部分为实时荧光PCR方法引物LW2-1-qR的反向互补序列，中间方框内部为实时荧光PCR方法探针LW2-1-qP的反向互补序列。

注 3：1~24为玉米基因组部分序列，25~86为外源插入片段部分序列。

B.10 抗虫耐除草剂玉米WYN17132转化体特异性扩增序列

1 ACAAATAGGG TG TGGCTGTT TTAAATCTGG GGCCGTTGGA TCGTGATCCG GCGGGCAGCG
61 TCTCGTACCG GTTCGTTTG AGTAGGATAT ATTGTGGTGT AAACAAATTG ACGCTTAGAC
121 AACTTAATAA CACATTGCGG ACGTT

注 1：该序列为 WYN17132 的 5'端转化体特异性序列，序列方向为 5'-3'。

注 2：5'端单下划线部分为实时荧光PCR方法引物WYN17132-qF的序列，3'端单下划线部分为实时荧光PCR方法引物WYN17132-qR的反向互补序列，方框内部为实时荧光PCR方法探针WYN17132-qP的序列。

注 3：1~88为玉米基因组部分序列，89~145为外源插入片段部分序列。

B.11 抗虫耐除草剂玉米WYN041转化体特异性扩增序列

1 ATTCGGCGTT AATTCAGTAC ATTA~~AAA~~AACG TCCGCAATGT GTATTAAGT TGTCTAAGCG
61 GCGGGATCTT TTTCAGGCAC TGAGCGGCGG GATTTTCCTT TCTTTGCCAG GAGCTAATCA
121 ATGCAGGTTC ACGGAGAAGA AAAG

注 1：该序列为 WYN041 的 3'端转化体特异性序列，序列方向为 5' -3' 。

注 2：5'端单下划线部分为实时荧光PCR方法引物WYN041-QF的序列，3'端单下划线部分为实时荧光PCR方法引物WYN041-QR的反向互补序列，方框内部为实时荧光PCR方法探针WYN041-QP的序列。

注 3：1~60为外源插入片段部分序列，61~144为玉米基因组部分序列。

B.12 抗虫耐除草剂玉米BBL2-2转化体特异性扩增序列

1 GTGATCTTGT TCGTTGTATT GGCCTCTAAT AATGTCCCTG AGAGTCAACT GCCCCAAAGA
61 CGCTTAGACA ACTTAATAAC ACATTGCGGA CGTTTTTAAT GTACTGAATT AACGCCGAA

注 1：该序列为 BBL2-2 的 5'端转化体特异性序列，序列方向为 5'-3'。

注 2：5'端单下划线部分为实时荧光PCR方法引物BBL2-2-QF的序列，3'端单下划线部分为实时荧光PCR方法引物BBL2-2-QR的反向互补序列，方框内部为实时荧光PCR方法探针BBL2-2-QP的序列。

注3: 1~58为玉米基因组部分序列, 59~119为外源插入片段部分序列。

B.13 抗虫耐除草剂玉米CC-2转化体特异性扩增序列

1 TGCAATGGGC CAGATCTAGT TAACACAAGT CTATTAATAC TCCTAAAACC AAAATCCAGT
61 ACTAAAATCC AGATCCCCCG AATTAATTCG GCGTTAATTC AGTGAGC

注1: 该序列为CC-2的5'端转化体特异性序列, 序列方向为5'~3'

注2: 5'端单下划线部分为实时荧光 PCR检测方法引物CC-2-qF的序列, 3'端单下划线部分为实时荧光PCR检测方法引物CC-2-qR的反向互补序列, 中间方框内部为实时荧光PCR检测方法探针CC-2-qP的序列。

注3: 1~40为玉米基因组部分序列, 41~107为外源插入片段部分序列。

B.14 抗虫耐除草剂玉米LP026-2转化体特异性扩增序列

1 CTCGGACCCA TCGAATGCCT CAAACACTGA TAGTTTAAAC TGAAGGCGGG AAACGACAAT
61 CTGATCAAGA GCGGAGAATT AAGGGAG

注1: 该序列为LP026-2的5'端转化体特异性序列, 序列方向为5'~3'。

注2: 5'端单下划线部分为实时荧光PCR方法引物LP026-2-qF的序列, 3'端单下划线部分为实时荧光PCR方法引物LP026-2-qR的反向互补序列, 中间方框内部为实时荧光PCR方法探针LP026-2-qP的反向互补序列。

注3: 1~19 为玉米基因组部分序列, 20~87为外源插入片段部分序列。

B.15 抗虫耐除草剂玉米KJ1003转化体特异性扩增序列

1 GTCCTCGCTC CCTTTTCTCT TCCCAACCG TGCCCGAGTT TGAGGCGTCC ATCGGGCAGT
61 CAAACACTGA TAGTTTAAAC TGAAGGCGGG AAACGACAAT CTGATCTAGT AACATAGATG
121 ACACCGCGCG CGATAATTTA TCCTAGTTT GCGGCTAT

注1: 该序列为KJ1003的5'端转化体特异性序列, 序列方向为5'~3'。

注2: 5'端单下划线部分为实时荧光PCR方法引物KJ1003 qF的序列, 3'端单下划线部分为实时荧光PCR方法引物KJ1003 qR的反向互补序列, 方框内部为实时荧光PCR方法探针KJ1003 qP的反向互补序列。

注3: 1~39 bp为玉米基因组部分序列, 40~58 bp为非预期整合或插入序列, 59~158 bp为外源插入片段部分序列。

B.16 抗虫耐除草剂玉米QY2569-42转化体特异性扩增序列

1 ATGTTTTAAA CCATACTGTA ATTCGCGCGT AGTTTAAACT GAAGGCGGGA AACGACAATC
61 TGATCCAAGC TCAAGCTGCT AA

注1: 该序列为QY2569-42的5'端转化体特异性序列, 序列方向为5'~3'。

注2: 5'端单下划线部分为数字 PCR方法引物QY2569-42-qF的序列, 3'端单下划线部分为数字PCR方法引物QY2569-42-qR的反向互补序列, 中间方框内部为数字PCR方法探针QY2569-42-qP的序列。

注3: 1~30为玉米基因组部分序列, 31~82为外源插入片段部分序列。

B.17 抗虫耐除草剂玉米ZMZ032转化体特异性扩增序列

1 CGCAAACTAG GATAAATTAT CGCGCGCGGT GTCATCTATG TTAGTAGATCGGGTTTAAAC
61 TATCAGTGTT TGAAAAACGT ACCTATTAC CCCCTCTAGG TGCCCTCAAT TTATAATTTG
121 ACGA

注1: 该序列为ZMZ032的3'端转化体特异性序列, 序列方向为5'-3'。

注2: 5'端单下划线部分为数字PCR方法引物ZMZ032-qF的序列, 3'端单下划线部分为数字PCR方法引物ZMZ032-qR的反向互补序列, 中间方框内部为数字PCR方法探针ZMZ032-qP的序列。

注3: 1~73为外源插入片段部分序列, 74~124为玉米基因组部分序列。

B.18 抗虫耐除草剂玉米MZIR260转化体特异性扩增序列

1 GTTATTAAGT TGTCTAAGCG TCAATTTGTT TACACCACAA TATAAAAAGTATTGTTTAAT
61 TACATAAGAT GTCAAGTACA CTATGGCG

注1: 该序列为MZIR260的3'端转化体特异性序列, 序列方向为5' -3'。

注2: 5'端单下划线部分为数字PCR方法引物MZIR260-QF的序列, 3'端单下划线部分为数字PCR方法引物MZIR260-QR的反向互补序列, 中间方框内部为数字PCR方法探针MZIR260-QP的序列。

注3: 1~44为外源插入片段部分序列, 45~88为玉米基因组部分序列。

B.19 抗虫耐除草剂玉米Bt11转化体特异性扩增序列

1 TGTGTGGCCA TTTATCATCG ACTTCCATGA CCAAATCCC TTAACGTGAG TTTTCGTTCC
61 ACTGAGCGTC AGACCCCGTA GAAAAGATCA AAGGATCTTC TTGAGATCC

注1: 该序列为Bt11的5'端转化体特异性序列, 序列方向为5'~3'。

注2: 5端单下划线部分为实时荧光PCR检测方法引物Br11-qF的序列, 3端单下划线部分为实时荧光PCR检测方法引物Bt11-qR的反向互补序列, 中间方框内部为实时荧光PCR检测方法探针Bt11-qP的反向互补序列。

注3: 1~23为玉米基因组部分序列, 24~109为外源插入片段部分序列。

B.20 抗虫耐除草剂玉米MIR162转化体特异性扩增序列

1 TCCCCGGGTC TAGACAATTC AGTACATTA AAACGTCCGC CATGGTCTGA AGGCAACAGA
61 TAAGGCATAC TGGGCCTTGT GGTAGT

注1: 该序列为MIR162的3'端转化体特异性序列, 序列方向为5'~3'。

注2: 5端单下划线部分为实时荧光PCR检测方法引物MIR162-qF的序列, 3端单下划线部分为实时荧光PCR检测方法引物MIR162-qR的反向互补序列, 中间方框内部为实时荧光PCR检测方法探针MIR162-qP的序列。

注3: 1~40为外源插入片段部分序列, 41~86为玉米基因组部分序列。

B.21 抗虫耐除草剂玉米GA21转化体特异性扩增序列

1 CCAATTTTGT AATGGGACCT TATCGTTATG CTATTTGCAA CTTTAGAACA TATACTAACT
61 CATATCTCTT TCTCAACAGC AGGTGGGTCC GGGTCGTGGG GGCCGGAAAC GCGAGGAGGA
121 TCGC

注1:该序列为GA21的5'端转化体特异性序列,序列方向为5'~3'。

注2:5'端单下划线部分为实时荧光PCR检测方法引物GA21-gF的序列.3'端单下划线部分为实时荧光PCR检测方法引物GA21-qR的反向互补序列,中间方框内部为实时荧光PCR检测方法探针GA21-qP的序列。

注3:1~75为玉米基因组部分序列,76~124为外源插入片段部分序列。

B.22 抗虫耐除草剂玉米MON810转化体特异性扩增序列

1 TCGAAGGACG AAGGACTCTA ACGTTTAACA TCCTTTGCCA TTGCCACGCT ATCTGTCACT
61 TTATTGTGAA GATAGTGGAA AAGGAAGGTG GC

注1:该序列为MON810的5'端转化体特异性序列,序列方向为5' -3'。

注2:5'端单下划线部分为数字PCR方法引物MON810-qF的序列,3'端单下划线部分为数字PCR方法引物MON810-qR的反向互补序列,中间方框内部为数字PCR方法探针MON810-qP的序列。

注3:1~37为玉米基因组部分序列,38~92为外源插入片段部分序列

B.23 抗虫耐除草剂玉米Bt176转化体特异性扩增序列

1 GGCCGTGAAC GAGCTGTTGT GGTGCGAGCAA CCAGATCGGC CGACACCGGA TCAGTAATTA
61 GAAAACATGT AGGCTTCTTC CC

注1:该序列为Bt176的3'端转化体特异性序列,序列方向为5'~3'。

注2:5'端单下划线部分为实时荧光PCR检测方法引物Bt176-qF的序列.3'端单下划线部分为数字PCR方法引物Bt176-qR的反向互补序列,中间方框内部为数字PCR方法探针Bt176-qP的序列。

注3:1~54为外源插入片段部分序列,55~82为玉米基因组部分序列。

B.24 抗虫耐除草剂玉米TC1507转化体特异性扩增序列

1 TAGTCTTCGG CCAGAATGGC CTAACTCAAG GCCCTCACTC CGCTTGATCT TGGCAAAG

注1:该序列为TC1507的5'端转化体特异性序列,序列方向为5'~3'。

注2:5'端单下划线部分为实时荧光PCR检测方法引物TC1507-qF的序列.3'端单下划线部分为数字PCR方法引物TC1507-qR的反向互补序列,中间方框内部为数字PCR方法探针TC1507-qP的序列。

注3:1~28为玉米基因组部分序列,29~58为外源插入片段部分序列。

B.25 抗虫耐除草剂玉米MON863转化体特异性扩增序列

农业农村部公告第 XXXX 号-X-XXXX

1 TGTTACGGCC TAAATGCTGA ACTAT TGACC CTACTTGTTT C GGATGGGTGT TCA CCCCAAA
61 GTGTACCAAG CTTTCCGATC CTAC

注1:该序列为MON863的5'端转化体特异性序列,序列方向为5'~3'。

注2:5端单下划线部分为实时荧光PCR检测方法引物MON863-qF的序列,3'端单下划线部分为数字PCR方法引物MON863-qR的反向互补序列,中间方框内部为数字PCR方法探针MON863-qP的序列。

注3:1~64为玉米基因组部分序列,65~84为外源插入片段部分序列。

B.26 抗虫耐除草剂玉米59122转化体特异性扩增序列

1 GGGATAAGCA AGTAAAAGCG CTCAAACACT GATAG TTTAA ACTGAAGGCG GGAAACGACA
61 ATCTGATCAT GAGCGGAGAA TTAAGG

注1:该序列为59122的5'端转化体特异性序列,序列方向为5'~3'。

注2:5端单下划线部分为实时荧光PCR检测方法引物59122-qF的序列,3'端单下划线部分为数字PCR方法引物59122-qR的反向互补序列,中间方框内部为实时荧光PCR检测方法探针59122-qP的序列。

注3:1~29为玉米基因组部分序列,30~86为外源插入片段部分序列。

B.27 抗虫耐除草剂玉米MON87460转化体特异性扩增序列

1 CACGTTGAAG GAAAATGGAT TGG AGGGAGT ATGTAGATAA ATTTTCAAAG CGTTAGACGG
61 CTGTCTTTGA GGAGGATCGC GA

注1:该序列为MON87460的5'端转化体特异性序列,序列方向为5'~3'。

注2:5端单下划线部分为实时荧光PCR检测方法引物MON87460-qF的序列,3端单下划线部分为实时荧光PCR检测方法引物MON87460-qR的反向互补序列,中间方框内部为实时荧光PCR检测方法探针MON87460-qP的序列。

注3:1~36为玉米基因组部分序列,37~82为外源插入片段部分序列。

B.28 抗虫耐除草剂玉米MON89034转化体特异性扩增序列

1 TTCTCCATAT TGACCATCAT ACTCATTGC A TCCCCGGAAA TTATGTT TTT TTA AAAACCA
61 CGGTATTATA GATACCG

注1:该序列为MON89034的3'端转化体特异性序列,序列方向为5'~3'。

注2:5端单下划线部分为实时荧光PCR检测方法引物MON89034-qF的序列,3端单下划线部分为实时荧光PCR检测方法引物MON89034-qR的反向互补序列,中间方框内部为实时荧光PCR检测方法探针MON89034-qP的序列。

注3:1~48为外源插入片段部分序列,49~76为玉米基因组部分序列。

B.29 抗虫耐除草剂玉米MON88017转化体特异性扩增序列

1 GAGCAGGACC TGCAGAAGCT AGCTTGATGG GGATCAGATT GTCGTT TCCC GCCTTCAGTT
61 TAAACAGAGT CGGGT TTGGA TGGTCAACTC CGGCT

注 1: 序列方向为 5'-3'。

注 2: 5'端单下划线部分为数字 PCR 方法引物 MON88017-qF 的序列, 3'端单下划线部分为数字 PCR 方法引物 MON88017-qR 的反向互补序列, 中间方框内部为数字 PCR 方法探针 MON88017-qP 的反向互补序列。

注 3: 1~65 为外源插入片段部分序列, 66~95 为玉米基因组部分序列。

B.30 抗虫耐除草剂玉米3272转化体特异性扩增序列

1 TCATCAGACC AGATTCTCTT TTATGGCCGG CCGGCCGCC CTGCTG ACTG CTGACGCGGC
61 CAAACACTGA TAGTTTAAAC TGAAGGCGGG AAACG

注1: 该序列为3272的3'端转化体特异性序列, 序列方向为5'~3'。

注2: 5端单下划线部分为实时荧光PCR检测方法引物3272-qF的序列, 3端单下划线部分为实时荧光 PCR检测方法引物3272-qR的反向互补序列, 中间方框内部为实时荧光PCR检测方法探针3272-qP的序列。

注3: 1~67为外源插入片段部分序列, 68~95为玉米基因组部分序列。

B.31 抗虫耐除草剂玉米5307转化体特异性扩增序列

1 CATGGCCGTA TCCGCAATGT GTTATTAAGT TGTCTAAGCG TCAATTTGTT TAC ACCACAA
61 TATACCCTCT TCCCTGGGCC AG GCTGGGCC CACTGGCAAA GGGTGCA

注1: 该序列为5307的3'端转化体特异性序列, 序列方向为5'~3'。

注2: 5端单下划线部分为实时荧光PCR检测方法引物5307-qF的序列, 3端单下划线部分为实时荧光 PCR检测方法引物5307-qR的反向互补序列, 中间方框内部为实时荧光PCR检测方法探针5307-qP的序列。

注3: 1~65为外源插入片段部分序列, 66~107为玉米基因组部分序列。

B.32 抗虫耐除草剂玉米DAS-40278-9转化体特异性扩增序列

1 CACGAACCAT TGAGTTACAA TCAACAGCAC CGTACCTTGA AG CGGAATAC AATGAAGGTI
61 AGCTACG ATT TACAGCAAAG CCAGAATACA ATGAACCA

注1: 该序列为DAS-40278-9的5'端转化体特异性序列, 序列方向为5'~3'。

注2: 5端单下划线部分为实时荧光PCR检测方法引物DAS-40278-9-qF的序列, 中间方框内部为实时荧光PCR检测方法探针DAS-40278-9-qP的序列。

注 3: 1~31 为玉米基因组部分序列, 32~98 为外源插入片段部分序列。

B.33 抗虫耐除草剂玉米DP4114转化体特异性扩增序列

1 CGCTACTAGA CAATTCAGTA CATTAAAAAC GTCCGCAATG TGTTATTAAG TTGTCT AAGC
61 GTCAATTTGG AACAAGTGGC TATCGCCAGA TATAAGAACT TC

农业农村部公告第 XXXX 号-X-XXXX

注1: 该序列为DP4114的3'端转化体特异性序列, 序列方向为5'~3'。

注2: 5'端单下划线部分为数字PCR方法引物4114-qF的序列, 3'端单下划线部分为数字PCR方法引物4114-qR的反向互补序列, 中间方框内部为数字PCR方法探针4114-qP的反向互补序列。

注3: 1~69为外源插入片段部分序列, 70~102为玉米基因组部分序列。

B.34 抗虫耐除草剂玉米MON87411转化体特异性扩增序列

1 CGCTACTAGA CAATTCAGTA CATTAAAAC GTCCGCAATG TGTTATTAAG TTGTCTAAGC
61 GTCAATTTGG AACAAGTGGC TATCGCCAGA TATAAGAACT TC

注1: 该序列为MON87411的3'端转化体特异性序列, 序列方向为5' -3'。

注2: 5'端单下划线部分为数字PCR方法引物4114-qF的序列, 3'端单下划线部分为数字PCR方法引物4114-qR的反向互补序列, 中间方框内部为数字PCR方法探针4114-qP的反向互补序列。

注3: 1~69为外源插入片段部分序列, 70~102为玉米基因组部分序列。

B.35 抗虫耐除草剂玉米MZIR098转化体特异性扩增序列

1 ATCTCAGACA CCAAACCGAG ATCCAAGTGA CAGCGAACGG AGCTGGTTA AACTGGCACT
61 AGCCTAACGG TGT

注1: 该序列为MZIR098的5'端转化体特异性序列, 序列方向为5'-3'。

注2: 5'端单下划线部分为实时荧光PCR检测方法引物MZIR-qF的序列, 3'端单下划线部分为实时荧光PCR检测方法引物MZIR-qR的反向互补序列, 中间方框内部为实时荧光PCR检测方法探针MZIR-qP的序列。

注3: 1~45为玉米基因组部分序列, 46~73为外源插入片段部分序列。

B.36 抗虫耐除草剂玉米DP202216转化体特异性扩增序列

1 CTATTTCTTC CCATCTGAGG TCTGCACTCT CACCGGTAGT ACAGCACAAA CAACACACTC
61 AAACACTGAT AGTTTAAACT GAAGGCGGGA AACGACAAATC TGATCATGAG CGGAGAATTA
121 AGGGAGTC

注1: 序列方向为5' -3'。

注2: 5'端单下划线部分为数字PCR方法引物DP202216-QF的序列, 3'端单下划线部分为数字PCR方法引物DP202216-QR的反向互补序列, 中间方框内部为数字PCR方法探针DP202216-QP的反向互补序列。

注3: 1~58为玉米基因组部分序列, 59~128为外源插入片段部分序列。

B.37 抗虫耐除草剂玉米NK603转化体特异性扩增序列

1 ATGAATGACC TCGAGTAAGC TTGTTAACGC GGCCGCCCTA GGGATATCAA GCTTGGTACC
61 ACGCGACACA CTTCCACTCTT AGTGTTTGAG TGGATCCTGT TATCTCTT

注1: 该序列为NK603的5'端转化体特异性序列, 序列方向为5'~3'。

注2:5端单下划线部分为实时荧光PCR检测方法引物NK603-qF的序列.3'端单下划线部分为数字PCR方法引物NK603-qR的反向互补序列,中间方框内部为实时荧光PCR检测方法探针NK603-qP的序列。

注3:1~65为玉米基因组部分序列,66~108为外源插入片段部分序列。

B.38 抗虫耐除草剂玉米T25转化体特异性扩增序列

1 ACAAGCGTGT CGTGCTCCAC CATGTTGACG AAGATTTTCT TCTTGTCATT GAGTCGTTCC
61 GCCATTGTCG CTGTGCACG GCGGTGGAAG GAGTATCATG TC

注1:该序列为T25的3'端转化体特异性序列,序列方向为5'~3'。

注2:5端单下划线部分为实时荧光PCR检测方法引物T25-qF的序列.3端单下划线部分为实时荧光PCR检测方法引物T25-qR的反向互补序列,中间方框内部为实时荧光PCR检测方法探针T25-qP的序列。

注3:1~57为外源插入片段部分序列,57~102为玉米基因组部分序列。

B.39 抗虫耐除草剂玉米MIR604转化体特异性扩增序列

1 GCGCACGCAA TTCAACAGAA GGCGGAAAC GACAATCTGA TCATGAGCGG AGAATTAAGG
61 GAGTCACGTT ATGACC

注1:该序列为MIR604的5'端转化体特异性序列,序列方向为5'~3'。

注2:5端单下划线部分为实时荧光PCR检测方法引物MIR604-qF的序列.3端单下划线部分为实时荧光PCR检测方法引物MIR604-qR的反向互补序列,中间方框内部为实时荧光PCR检测方法探针MIR604-qP的序列。

注3:1~38为玉米基因组部分序列,39~76为外源插入片段部分序列。

B.40 抗虫耐除草剂玉米MON87427转化体特异性扩增序列

1 ACGGAAACGG TCGGGTCAA TGTAGAAAAT CGGGACAATA TGGAGAAAAA GAAAGAGTAA
61 TTACCAATAT GGAGAAAACC GGGAAATCTA CATGG

注1:该序列为MON87427的5'端转化体特异性序列,序列方向为5'~3'。

注2:5端单下划线部分为实时荧光PCR检测方法引物MON87427-qF的序列.3端单下划线部分为实时荧光PCR检测方法引物MON87427-qR的反向互补序列,中间方框内部为实时荧光PCR检测方法探针MON87427-qP的序列。

注3:1~50为玉米基因组部分序列,51~95为外源插入片段部分序列。

B.41 zSSIb内标基因扩增序列

1 CGGTGGATGC TAAGGCTGAT GCAGCTCCGG CTACAGATGC GGCGGCGAGT GCTCCTTATG
61 ACAGGGAGGA TAATGAACCT GGCCCTTT

注1:该序列为zSSIb内标基因的核苷酸序列,序列方向为5'~3'。

注2:5端单下划线部分为实时荧光PCR检测方法引物zSSIb-3F的序列.3端单下划线部分为实时荧光PCR检测方法

农业农村部公告第 XXXX 号-X-XXXX

引物 zSSIIb-4R 的反向互补序列，中间方框内部为实时荧光 PCR 检测方法探针 zSSIIb-P 的序列。

B.42 *Adh1* 内标基因扩增序列

1 CGTCGTTTCC CATCTCTTCC TCCTTTAGAG CTACCACTAT ATA AATCAGG GCTCATTTC
61 TCGCTCCTCA CAGGCTCATC TCGCTTTGGA TCGATTGGTT TCGTAAGTGG TGAGGGACTG
121 AGGGTCTCGG AGTGG

注1: 该序列为*Adh1*内标基因的核苷酸序列，序列方向为5'~3'。

注 2: 5 端单下划线部分为实时荧光 PCR 检测方法引物 *Zm adh1*-F 的序列. 3 端单下划线部分为实时荧光 PCR 检测方法引物 *Zm adh1*-R 的反向互补序列，中间方框内部为实时荧光 PCR 检测方法探针 *Zm adh1*-P 的序列。
