

中华人民共和国国家标准

农业部 2031 号公告 — 14 — 2013

转基因动物及其产品成分检测 普通牛 (*Bos taurus*) 内标准基因 定性 PCR 方法

Detection of genetically modified animals and derived products—
Target–taxon–specific qualitative PCR method for *Bos taurus*

2013-12-04 发布

2013-12-04 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国农业转基因生物安全管理标准化技术委员会(SAC/TC 276)归口。

本标准起草单位:农业部科技发展中心、华中农业大学。

本标准主要起草人:刘榜、宋贵文、孙亚奇、张庆德、赵欣、陶晨雨、齐梓羽。

转基因动物及其产品成分检测 普通牛(*Bos taurus*)内标准基因定性 PCR 方法

1 范围

本标准规定了普通牛(*Bos taurus*)内标准基因 *TNFRSF10A* 的定性 PCR 检测方法。

本标准适用于转基因动物及其产品中普通牛(*Bos taurus*)成分的定性 PCR 检测。

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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

***TNFRSF10A* 基因** *tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10A gene* (Accession No.:XM_002699444)

编码肿瘤坏死因子受体超家族成员 10A 的基因。位于普通牛的 29 号染色体上,其第八外显子特异序列为单拷贝。

3.2

普通牛 *Bos taurus*

指哺乳纲(Mammalia)、偶蹄目(Artiodactyla)、牛科(Bovidae)、牛属(*Bos*)中的普通牛,包括黄牛、奶牛和肉牛。

4 原理

根据普通牛 *TNFRSF10A* 基因第八外显子序列设计特异性引物,对试样进行 PCR 扩增。依据是否扩增获得预期的特异性 DNA 片段,判断样品中是否含有普通牛成分。

5 试剂和材料

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 规定的一级水。

5.1 琼脂糖。

5.2 10 g/L 溴化乙锭溶液:称取 1.0 g 溴化乙锭(EB),溶解于 100 mL 水中,避光保存。

警告——溴化乙锭有致癌作用,配制和使用时应戴一次性手套操作,并妥善处理废液。

5.3 10 mol/L 氢氧化钠溶液:在 160 mL 水中加入 80.0 g 氢氧化钠(NaOH),溶解后,冷却至室温,再加水定容至 200 mL。

5.4 500 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠溶液(pH 8.0):称取 18.6 g 乙二胺四乙酸二钠(EDTA - Na₂),加入 70 mL 水中,再加入适量氢氧化钠溶液(5.3),加热至完全溶解后,冷却至室温,用氢氧化钠溶液(5.3)调 pH 至 8.0,加水定容至 100 mL。在 103.4 kPa(121℃)条件下灭菌 20 min。

- 5.5 1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷—盐酸溶液(pH 8.0):称取 121.1 g 三羟甲基氨基甲烷(Tris)溶解于 800 mL 水中,用盐酸(HCl)调 pH 至 8.0,加水定容至 1 000 mL。在 103.4 kPa(121℃)条件下灭菌 20 min。
- 5.6 5 mol/L 氯化钠溶液:称取 29.22 g 氯化钠(NaCl)溶于 80 mL 水中,加水定容至 100 mL。在 103.4 kPa 蒸汽压(121℃)条件下灭菌 20 min。
- 5.7 10% 十二烷基磺酸钠溶液:称取 10 g 十二烷基磺酸钠($C_{12}H_{25}O_4SNa$, SDS),加入 80 mL 水中,加热至完全溶解后,冷却至室温,加水定容至 100 mL。在 103.4 kPa 蒸汽压(121℃)条件下灭菌 20 min。
- 5.8 DNA 提取细胞裂解液:量取 200 mL 乙二铵四乙酸二钠溶液(5.4),200 mL 三羟甲基氨基甲烷—盐酸溶液(5.5),40 mL 氯化钠溶液(5.6),200 mL 十二烷基磺酸钠溶液(5.7),混合后用水定容至 1 000 mL,室温保存,备用。
- 5.9 20 mg/mL 蛋白酶 K 溶液:将 200 mg 蛋白酶 K(Proteinase K)溶于 9.5 mL 水中,轻摇至完全溶解后,加水定容至 10 mL。于-20℃保存备用。
- 5.10 3 mol/L 乙酸钠溶液:称取 40.8 g 三水乙酸钠($NaAc \cdot 3H_2O$)溶于 40 mL 水,用冰乙酸(HAc)调 pH 至 5.2,加水定容至 100 mL。在 103.4 kPa 蒸汽压(121℃)条件下灭菌 20 min。
- 5.11 Tris-饱和酚。
- 5.12 氯仿/异戊醇(24:1):将氯仿和异戊醇按照 24:1 的比例配制。
- 5.13 TE 缓冲液(pH 8.0):分别量取 10 mL 三羟甲基氨基甲烷—盐酸溶液(5.5)和 2 mL 乙二铵四乙酸二钠溶液(5.4),加水定容至 1 000 mL。在 103.4 kPa(121℃)条件下灭菌 20 min。
- 5.14 50×TAE 缓冲液:称取 242.2 g 三羟甲基氨基甲烷(Tris),先用 500 mL 水加热搅拌溶解后,加入 100 mL 乙二铵四乙酸二钠溶液(5.4),用冰乙酸调 pH 至 8.0,然后加水定容到 1 000 mL。使用时,用水稀释成 1×TAE。
- 5.15 加样缓冲液:称取 250.0 mg 溴酚蓝,加入 10 mL 水,在室温下溶解 12 h;称取 250.0 mg 二甲苯腈蓝,加 10 mL 水溶解;称取 50.0 g 蔗糖,加 30 mL 水溶解。混合以上三种溶液,加水定容至 100 mL,在 4℃下保存。
- 5.16 DNA 分子量标准:可清楚地区分 100 bp~1 000 bp 的 DNA 片段。
- 5.17 dNTPs 混合溶液:将浓度为 10 mmol/L 的 dATP、dTTP、dGTP、dCTP 四种脱氧核糖核苷酸溶液等体积混合。
- 5.18 Taq DNA 聚合酶、PCR 反应缓冲液及 25 mmol/L 氯化镁溶液。
- 5.19 *TNFRSF10A* 基因引物:
TNFR-F;5'-CAGTGAGGACATCAGCCTAGAGT-3';
TNFR-R;5'-CTGCTCCTAGCCATCAGTGGA-3';
预期扩增片段大小为 190 bp(参见附录 A)。
- 5.20 引物溶液:用 TE 缓冲液(5.13)或水分别将引物稀释到 10 μmol/L。
- 5.21 石蜡油。
- 5.22 DNA 提取试剂盒。
- 5.23 定性 PCR 反应试剂盒。
- 5.24 PCR 产物回收试剂盒。

6 仪器和设备

- 6.1 分析天平:感量 0.1 mg。

- 6.2 PCR 扩增仪:升降温速度 $>1.5^{\circ}\text{C}/\text{s}$,孔间温度差异 $<1.0^{\circ}\text{C}$ 。
- 6.3 电泳槽、电泳仪等电泳装置。
- 6.4 紫外透射仪。
- 6.5 紫外分光光度计。
- 6.6 凝胶成像系统或照相系统。
- 6.7 重蒸馏水发生器或纯水仪。
- 6.8 其他相关仪器设备。

7 分析步骤

7.1 试样

静脉血、组织样或其他送检样品,保存备用。

7.2 DNA 模板制备

7.2.1 根据样品类型不同,按以下方式之一进行预处理:

- a) 样品为血液时,取 $300\ \mu\text{L}$ 血样于 $1.5\ \text{mL}$ 离心管中,加入等体积 DNA 提取细胞裂解液(5.8), $20\ \mu\text{L}$ 蛋白酶 K 溶液(5.9),混匀, 55°C 水浴消化过夜;
- b) 样品为组织样或加工产品时,取适量试样在液氮中充分碾磨成粉末,称取 $0.05\ \text{g}$ 转移至 $1.5\ \text{mL}$ 离心管中,加入 10 倍体积 DNA 提取细胞裂解液, $20\ \mu\text{L}$ 蛋白酶 K 溶液,混匀, 55°C 水浴消化过夜。

7.2.2 将裂解液加入等体积的 Tris 饱和酚,缓慢颠倒混匀 $10\ \text{min}$, 4°C , $12\ 000\ g$ 离心 $10\ \text{min}$,将上清液移至新的 $1.5\ \text{mL}$ 离心管中。

7.2.3 加入 0.5 倍体积的 Tris 饱和酚和 0.5 倍体积的氯仿/异戊醇(24:1),缓慢颠倒混匀 $10\ \text{min}$, 4°C , $12\ 000\ g$ 离心 $10\ \text{min}$,将上清液移至新的 $1.5\ \text{mL}$ 离心管中。

7.2.4 加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1),缓慢颠倒混匀 $10\ \text{min}$, 4°C , $12\ 000\ g$ 离心 $10\ \text{min}$ 。

7.2.5 将上清液吸至 $1.5\ \text{mL}$ 离心管,加入 0.1 倍体积的乙酸钠溶液(5.10)和 2.5 倍体积 4°C 预冷的无水乙醇,轻轻颠倒至完全混匀,可见白色 DNA 絮状沉淀析出。

7.2.6 4°C 下 $12\ 000\ g$ 离心 $5\ \text{min}$,加入 $500\ \mu\text{L}$ 70%乙醇洗涤沉淀,弃去乙醇洗涤液。

7.2.7 室温下放置使残余乙醇完全挥发,加入 $50\ \mu\text{L}$ TE 缓冲液溶解 DNA 沉淀。

7.2.8 将 DNA 适当稀释或浓缩,使其 OD_{260} 值在 $0.1\sim 0.8$ 的区间内,测定并记录其在 $260\ \text{nm}$ 和 $280\ \text{nm}$ 的吸光度。以一个 OD_{260} 值相当于 $50\ \text{ng}/\mu\text{L}$ DNA 浓度来计算纯化 DNA 的浓度,并进行 DNA 凝胶电泳检测 DNA 完整性。DNA 溶液 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 值应在 $1.7\sim 2.0$ 之间,或质量能符合检测要求。

7.2.9 依据测得的浓度将 DNA 溶液用 TE 缓冲液稀释到 $20\ \text{ng}/\mu\text{L}$, -20°C 保存。

注:以上为 SDS 法提取基因组 DNA 的操作步骤,亦可使用经验证的适合转基因动物及其产品检测 DNA 提取和纯化的其他方法,如试剂盒方法等完成 DNA 模板的制备步骤。

7.3 PCR 反应

7.3.1 试样 PCR 反应

7.3.1.1 每个试样 PCR 反应设置 3 次平行。

7.3.1.2 在 PCR 反应管中按表 1 依次加入反应试剂,混匀,再加 $25\ \mu\text{L}$ 石蜡油(有热盖功能的 PCR 仪可不加)。也可采用经验证的、等效的定性 PCR 反应试剂盒配制反应体系。

表 1 PCR 检测反应体系

试 剂	体 积	终 浓 度
水	—	
10×PCR 缓冲液	2.5 μL	1×
25 mmol/L 氯化镁溶液	2.5 μL	2.5 mmol/L
dNTPs 混合溶液(各 2.5 mmol/L)	2.0 μL	各 0.2 mmol/L
10 μmol/L TNFR - F	0.5 μL	0.2 μmol/L
10 μmol/L TNFR - R	0.5 μL	0.2 μmol/L
Taq DNA 聚合酶	—	0.05 U/μL
20 ng/μL DNA 模板	2.5 μL	2.0 μmg/L
总体积	25.0 μL	
“—”表示体积不确定,如果 PCR 缓冲液中含有氯化镁,则不加氯化镁溶液,根据 Taq DNA 聚合酶的浓度确定其体积,并相应调整水的体积,使反应体系总体积达到 25.0 μL。		

- 7.3.1.3 将 PCR 管放在离心机上,500 g~3 000 g 离心 10 s,然后取出 PCR 管,放入 PCR 仪中。
- 7.3.1.4 进行 PCR 反应。反应程序为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,64℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 10 s,共进行 35 次循环;72℃ 延伸 3 min。
- 7.3.1.5 反应结束后取出 PCR 管,对 PCR 反应产物进行电泳检测。

7.3.2 对照 PCR 反应

在试样 PCR 反应的同时,应设置阴性对照、阳性对照和空白对照。以牛科牛属普通牛(奶牛、肉牛、黄牛)基因组 DNA 作为阳性对照;以非牛属动物或非牛科哺乳动物基因组 DNA 作为阴性对照;以水作为空白对照。

各对照 PCR 反应体系中,除模板外,其余组分及 PCR 反应条件与 7.3.1 相同。

7.4 PCR 产物电泳检测

按 20 g/L 的质量浓度称量琼脂糖,加入 1×AE 缓冲液中,加热溶解,配制成琼脂糖溶液。每 100 mL 琼脂糖溶液中加入 5 μL EB 溶液,混匀,稍适冷却后,将其倒入电泳板上,插上梳板,室温下凝固成凝胶后,放入 1×TAE 缓冲液中,垂直向上轻轻拨去梳板。取 12 μL PCR 产物与 3 μL 加样缓冲液混合后加入凝胶点样孔,同时在其中一个点样孔中加入 DNA 分子量标准,接通电源在 2 V/cm~5 V/cm 条件下电泳检测。

7.5 凝胶成像分析

电泳结束后,取出琼脂糖凝胶,置于凝胶成像仪上或紫外透射仪上成像。根据 DNA 分子量标准判断扩增条带的大小,将电泳结果形成电子文件存档或用照相系统拍照。如需通过序列分析确认 PCR 扩增片段是否为目的 DNA 片段,按照 7.6 和 7.7 的规定执行。

7.6 PCR 产物回收

按 PCR 产物回收试剂盒说明书,回收 PCR 扩增的 DNA 片段。

7.7 PCR 产物测序验证

将回收的 PCR 产物克隆测序,与普通牛内标准基因 *TNFRSF10A* 的序列(参见附录 A)进行比对,确定 PCR 扩增的 DNA 片段是否为目的 DNA 片段。

8 结果分析与表述

8.1 对照检测结果分析

阳性对照的 PCR 反应中,普通牛内标准基因 *TNFRSF10A* 特异性序列得到扩增,且扩增片段大小与预期片段大小一致,而阴性对照及空白对照中没有预期扩增片段,表明 PCR 反应体系正常工作,否则重新检测。

8.2 样品检测结果分析和表述

8.2.1 *TNFRSF10A* 基因特异性序列得到扩增,且扩增片段大小与预期片段大小一致,表明样品中检测出普通牛成分,表述为“样品中检测出普通牛成分”。

8.2.2 *TNFRSF10A* 基因特异性序列未得到扩增,或扩增片段大小与预期片段大小不一致,表明样品中未检测出普通牛成分,表述为“样品中未检测出普通牛成分”。

9 检出限

本标准方法的检出限为 0.1%。

附 录 A
(资料性附录)

普通牛内标准基因 *TNFRSF10A* 特异性核苷酸序列

1 CAGTGAGGAC ATCAGCCTAG AGTCGGTGGG GAGCTCCGCC CTGCTGGTCT CCACRGGCCC
61 TGGAGGTGCT GAGCTGCTGC AGGGGGCCAA CGGAAGTGTA GCAGTGCCGG GGGAGCAGGA
121 GAGCAGACCC GAAYGCTCGA GACCACCGGG CCAGGCAGGG CCATCCACCT CCACTGATGG
181 CTAGGAGCAG

注:划线部分为引物序列。
