

中华人民共和国国家标准

农业部 2122 号公告—2—2014

转基因动物及其产品成分检测 羊内标准基因定性 PCR 方法

Detection of genetically modified animals and derived products—
Target-taxon-specific qualitative PCR method for *Ovis aries* and
Capra aegagrus hircus

2014-07-07 发布

2014-08-01 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、中国农业科学院北京畜牧兽医研究所。

本标准主要起草人:敖红、宋贵文、李奎、沈平、崔文涛、周荣、赵拴平、赵为民。

转基因动物及其产品成分检测 羊内标准基因定性 PCR 方法

1 范围

本标准规定了羊内标准基因 *PHPAP* 的定性 PCR 检测方法。
本标准适用于转基因动物及其产品中羊成分的定性 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(包括所得的修改单)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

绵羊 *ovis aries*

哺乳纲(Mammalia)、偶蹄目(Artiodactyla)、牛科(Bovidae)、羊亚科(Caprinae)、绵羊属(*Ovis*)、家养绵羊种(*Ovis aries*)

3.2

山羊 *capra aegagrus hircus*

哺乳纲(Mammalia)、偶蹄目(Artiodactyla)、牛科(Bovidae)、羊亚科(Caprinae)、山羊属(*Capra*)、山羊种(*Capra aegagrus*)、家山羊亚种(*Capra aegagrus hircus*)

3.3

PHPAP 基因 *PHPAP gene*

编码类远古内源性逆转录病毒基因(putative HERV-K_5q13.3 provirus ancestral Env polyprotein-like)。

4 原理

根据羊 *PHPAP* 基因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 DNA 片段,判断试样中是否含有羊成分。

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),溶解后再加水定容至 200 mL。

- 5.4 500 mmol/L 乙二铵四乙酸二钠溶液(pH 8.0):称取 18.6 g 乙二铵四乙酸二钠(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(C₁₂H₂₅O₄SNa, 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 Tris-饱和酚。
- 5.11 氯仿/异戊醇(24:1):将氯仿和异戊醇按照 24:1 的比例配制。
- 5.12 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。
- 5.13 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。
- 5.14 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。
- 5.15 DNA 分子量标准:可以清楚地区分 100 bp~1 000 bp 的 DNA 片段。
- 5.16 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等体积混合。
- 5.17 Taq DNA 聚合酶、PCR 反应缓冲液及 25 mmol/L 氯化镁溶液。
- 5.18 羊 PHPAP 基因引物:
PHPAP - F:5'-CGGTGTATCGGCAAGTAATC-3'
PHPAP - R:5'-CAAAAGGGGTGTCCTCCTAT-3'
预期扩增片段大小为 237 bp(参见附录 A)。
- 5.19 引物溶液:用 TE 缓冲液(5.12)分别将上述引物稀释到 10 μmol/L。
- 5.20 石蜡油。
- 5.21 基因组 DNA 提取试剂盒。
- 5.22 定性 PCR 反应试剂盒。
- 5.23 PCR 产物回收试剂盒。

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 PCR 扩增仪:升降温速度>1.5℃/s,孔间温度差异<1.0℃。
- 6.3 电泳槽、电泳仪等电泳装置。
- 6.4 紫外透射仪。
- 6.5 凝胶成像系统或照相系统。
- 6.6 重蒸馏水发生器或纯水仪。

7 分析步骤

7.1 抽样

静脉采血 5 mL,采集组织样(肌肉、皮肤等)或动物加工产品,称取 1 g,保存备用。

7.2 试样预处理

7.2.1 血液样品

取 300 μ L 血样于 1.5 mL 离心管中,加入等体积 DNA 提取细胞裂解液(5.8),20 μ L 蛋白酶 K 溶液(5.9),混匀,55℃水浴消化过夜。

7.2.2 组织样品和动物加工产品

取适量样品在液氮中充分碾磨成粉末,称取 0.05 g 转移至 1.5 mL 离心管中,加入 10 倍体积 DNA 提取细胞裂解液,20 μ L 蛋白酶 K 溶液,混匀,55℃水浴消化过夜。

7.3 DNA 模板制备

7.3.1 将消化后的试样加入等体积的 Tris-饱和酚(5.10),缓慢颠倒离心管 10 min,4℃,12 000 g 离心 10 min,将上清液移至另一 1.5 mL 离心管中。

7.3.2 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),缓慢颠倒离心管 10 min,4℃,12 000 g 离心 10 min,将上清液移至另一 1.5 mL 离心管。

7.3.3 加入等体积的氯仿/异戊醇(24:1),缓慢颠倒离心管 10 min,4℃,12 000 g 离心 10 min。

7.3.4 将上清液吸至 1.5 mL 离心管,加入 2 倍体积的低温无水乙醇,轻轻颠倒离心管至完全混匀,可见白色絮状沉淀析出。

7.3.5 4℃,12 000 g 离心 5 min,加入 500 μ L70%乙醇洗 2 次,直接倾倒。

7.3.6 室温下放置使残余乙醇完全挥发,加入 50 μ L TE 缓冲液(5.12)溶解 DNA 沉淀。

7.3.7 将 DNA 适当稀释或浓缩,使其 OD₂₆₀ 值在 0.1~0.8 的区间内,测定并记录其在 260 nm 和 280 nm 的吸光度。以一个 OD₂₆₀ 值相当于 50 ng/ μ 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 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值应在 1.7~2.0,或质量能符合检测要求。

7.3.8 依据测得的浓度将 DNA 溶液用 TE 缓冲液稀释到 25 ng/ μ L,-20℃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。

7.4 PCR 反应

7.4.1 试样 PCR 反应

7.4.1.1 每个试样 PCR 反应设置 3 次平行。

7.4.1.2 在 PCR 反应管中按表 1 依次加入反应试剂,混匀,再加 25 μ L 石蜡油(有热盖设备的 PCR 仪可以不加)。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	终浓度	体积
水		—

表 1 (续)

试剂	终浓度	体积
10×PCR 缓冲液	1×	2.5 μL
25 mmol/L 氯化镁溶液	1.5 mmol/L	1.5 μL
dNTPs 混合溶液(各 2.5 mmol/L)	各 0.2 mmol/L	2.0 μL
10 $\mu\text{mol/L}$ PHPAP-F	0.2 $\mu\text{mol/L}$	0.5 μL
10 $\mu\text{mol/L}$ PHPAP-R	0.2 $\mu\text{mol/L}$	0.5 μL
Taq DNA 聚合酶	0.025 U/ μL	—
25 mg/L DNA 模板	2 mg/L	2.0 μL
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 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 。		

7.4.1.3 将 PCR 管放在离心机上,500 g ~3 000 g 离心 10 s 后取出 PCR 管,放入 PCR 仪中。

7.4.1.4 进行 PCR 反应。反应程序为:94℃变性 5 min;94℃变性 30 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,共进行 35 次循环;72℃延伸 5 min。

7.4.1.5 反应结束后取出 PCR 反应管,对 PCR 反应产物进行电泳检测。

7.4.2 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。

以不含羊源性材料提取的 DNA 样品(如小鼠、鸭 DNA)作为阴性对照;以含有羊源性材料提取的质量分数为 0.1%~1.0%的动物 DNA 作为阳性对照;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 7.4.1 相同。

7.5 PCR 产物电泳检测

按 20 g/L 的质量浓度称量琼脂糖,加入 1×TAE 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。

7.6 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 分子量标准估计扩增条带的大小,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 7.7 和 7.8 的规定执行。

7.7 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。

7.8 PCR 产物测序验证

将回收的 PCR 产物克隆测序,与羊内标准基因序列(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 对照试样结果分析

阳性对照 PCR 反应中,羊 *PHPAP* 内标准基因得到了扩增,且扩增片段大小与预期片段大小一致,而阴性对照和空白对照中没有任何扩增片段,表明 PCR 反应体系正常工作;否则,重新检测。

8.2 试样检测结果分析和表述

8.2.1 羊 *PHPAP* 内标准基因序列得到了扩增,且扩增片段大小与预期片段大小一致,表明样品中检

测出羊成分,结果表述为“样品中检测出羊成分”。

8.2.2 羊 *PHPAP* 内标准基因片段未得到扩增,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羊成分,结果表述为“样品中未检测出羊成分”。

9 检出限

本标准方法的检出限为 1 g/kg。

附 录 A
(资料性附录)
羊内标准基因特异性序列

1 CGGTGTATCG GCAAGTAATC ATACATATTG GGCATATATA CCTAATCCCC
51 CATTAGTAAG AGCAGTTTCC TGGGGGGAAC CAGAAGTGCA GGTATGTACT
101 AATGAGACTG CCTTCTTTCC CCCGCCAGCT TCGGGGGGAA TAGAACAACT
151 ATCTCATCAT AAACAACAAT ATAATATTAG TAATTTGACC ATTGCAGTGG
201 AAGGTATTCC TTTGTGCATA GGAGGACACC CCTTTTG

注:划线部分为 PHPAP-F 和 PHPAP-R 引物序列。
