

中华人民共和国国家标准

农业部 953 号公告—5—2007

转基因动物及其产品成分检测 促生长转 ScGH 基因鲤鱼 定性 PCR 方法

Detection of genetically modified animals and derived products
Qualitative PCR method for growth promoting common carp

2007-12-18 发布

2008-03-01 实施



中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准由中华人民共和国农业部科技教育司提出。

本标准归口全国农业转基因生物安全管理标准化技术委员会。

本标准起草单位：农业部科技发展中心、中国水产科学研究院黑龙江水产研究所。

本标准主要起草人：梁利群、历建萌、孙效文、沈平、闫学春、常玉梅。

本标准为首次发布。

转基因动物及其产品成分检测

促生长 ScGH 基因鲤鱼定性 PCR 方法

1 范围

本标准规定了转 ScGH 基因促生长鲤鱼基因特异性定性 PCR 检测方法。
本标准适用于转 ScGH 基因促生长鲤鱼中转基因成分的定性 PCR 检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 18654.2 养殖鱼类种质检验 第 2 部分: 抽样方法
NY/T 672 转基因植物及其产品检测 通用要求
SC/T 3016 水产品抽样方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

cytb 基因 cytb gene

编码鲤鱼细胞色素 b 的基因。

3.2

ScGH 基因 ScGH gene

大麻哈鱼生长激素基因。

4 原理

针对转 ScGH 基因促生长鲤鱼含有的 ScGH 基因序列,设计基因特异性引物进行 PCR 扩增,以检测试样中是否含有 ScGH 基因。

5 试剂与材料

除非另有说明,仅使用分析纯试剂和重蒸蒸馏水。对实验室的要求按 NY/T 672 执行。

5.1 Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L)及 PCR 反应缓冲液(含 25 mmol/L Mg^{2+})。

5.2 DNA 分子量标准: 能够区分 50 bp~1 000 bp 的 DNA 片段。

5.3 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。

5.4 氯仿: 异戊醇(24 : 1, v/v)。

5.5 酚: 氯仿: 异戊醇(25 : 24 : 1, v/v)。

5.6 琼脂糖。

5.7 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。

农业部 953 号公告—5—2007

注:EB 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。

- 5.8 10 mol/L 氢氧化钠溶液:称取 80.0 g 氢氧化钠(NaOH),加入 160 mL 水中完全溶解,加水定容至 200 mL。
- 5.9 500 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(5.8),加热至完全溶解后,冷却至室温,用氢氧化钠溶液(5.8)调 pH 至 8.0,加水定容至 100 mL。在 103.4 kPa(121℃)条件下灭菌 20 min。
- 5.10 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,用盐酸调 pH 至 8.0,加水定容至 1 L。在 103.4 kPa(121℃)条件下灭菌 20 min。
- 5.11 1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸溶液(pH 7.5):称取 121.1 g 三羟甲基氨基甲烷(Tris)溶解于 800 mL 水中,用盐酸调 pH 至 7.5,加水定容至 1 L。
- 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(5.10)和 2 mL 乙二铵四乙酸二钠溶液(5.9),加水定容至 1 L。在 103.4 kPa(121℃)条件下灭菌 20 min。
- 5.13 TE 缓冲液(pH 7.5):分别量取 10 mL 三羟甲基氨基甲烷-盐酸溶液(5.11)和 2 mL 乙二铵四乙酸二钠溶液(5.9),加水定容至 1 L。在 103.4 kPa(121℃)条件下灭菌 20 min。
- 5.14 5×TBE 缓冲液:称取 54 g Tris,27.5 g 硼酸,加 500 mL 水搅拌溶解后,加入 20 mL 乙二铵四乙酸二钠溶液(5.9),然后用水定容到 1 L。
- 5.15 加样缓冲液:称取 250.0 mg 溴酚蓝,加 10 mL 水,在室温下溶解 12 h;称取 250.0 mg 二甲苯腈蓝,用 10 mL 水溶解;称取 50.0 g 蔗糖,用 30 mL 水溶解。混合三种溶液,加水定容至 100 mL,在 4℃ 下保存。
- 5.16 DNA 裂解液:0.5 mol/L EDTA(pH 8.0),200 mg/L 蛋白酶 K(Proteinase K),0.5%十二烷基硫酸钠(SDS)。
- 5.17 透析液:50 mL 1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸溶液(5.10),20 mL 500 mmol/L 乙二铵四乙酸二钠溶液(5.9),加水定容至 1 L。
- 5.18 1 mg/mL 无 DNA 的 RNA 酶:将 2 mg RNA 酶 A 溶于 2 mL TE(5.13)中,于 100℃ 加热 15 min,缓慢冷却至室温,保存于-20℃。
- 5.19 70%乙醇溶液:取 700 mL 无水乙醇,加水定容至 1 L。

5.20 引物

5.20.1 ScGH 基因。

GH-F: 5'—AGGATGAAACGGGTGGGT—3';

GH-R: 5'—GGGTAGGAGGTCGCCAAAA—3';

预期扩增片段 152 bp。

5.20.2 cytb 基因。

L: 5'—GACTTGAAAAACCACCGTTG—3';

H: 5'—CCTCAGAAGGATATTTGTCCTC—3';

预期扩增片段 475 bp。

5.21 引物溶液:用 1×TE 缓冲液(5.12)分别将上述引物稀释到 25 μmol/L。

6 仪器

6.1 PCR 扩增仪。

6.2 电泳槽、电泳仪等电泳装置。

6.3 凝胶成像系统或紫外透射仪。

- 6.4 重蒸馏水发生器或超纯水仪。
6.5 其他分子生物学实验室仪器设备。

7 操作步骤

7.1 抽样

按 GB/T 18654.2 和 SC/T 3016 执行。

7.2 制样

将待测样品(鱼肌肉、鳍条等组织)用消毒剪刀剪碎,颗粒大小在 4 mm 以下进行 DNA 提取。

7.3 DNA 模板制备

7.3.1 DNA 模板的提取

将剪碎样品 30 mg 放入 1.5 mL 离心管中,加入 300 μ L DNA 裂解液,50 $^{\circ}$ C 消化过夜,加入等体积的酚:氯仿:异戊醇溶液,震荡混匀,室温 2 500 g 离心 5 min,吸取上层水相,重复抽提两次。将上清液转入透析袋中进行数次透析,直到透析液 OD₂₇₀<0.05,将透析袋中的液体转入离心管中,加入无 DNA 的 RNA 酶,终浓度为 100 mg/L,37 $^{\circ}$ C 温浴 30 min。先用冰预冷的无水乙醇沉淀,4 $^{\circ}$ C,15 000 g 离心 20 min,弃上清液,用 70%乙醇洗涤沉淀,15 000 g 离心,2 次~3 次,室温干燥后加 TE(pH 8.0)溶解,并保存于 4 $^{\circ}$ C 备用。

7.3.2 DNA 溶液纯度的测定和保存

将 DNA 适当稀释,测定并记录其在 260 nm 和 280 nm 的紫外分光吸收率,以一个 OD₂₆₀ 值相当于 50 mg/L DNA 浓度来计算纯化的 DNA 浓度。要求 DNA 溶液 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值在 1.7~1.8 之间。依据测得的浓度将 DNA 溶液稀释至 25 mg/L~50 mg/L,于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

注:由于基因组 DNA 不宜反复冻融,建议多管分装保存,融化后应立即使用。剩余的 DNA 应在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中短期保存,存放时间不宜超过 14 d。

7.4 PCR 反应

7.4.1 试样的 PCR 反应

7.4.1.1 每个试样 PCR 反应设置三次重复。

7.4.1.2 在 PCR 反应管中按表 1 依次加入反应试剂,用手指轻弹混匀,再加 50 μ L 石蜡油(有热盖设备的 PCR 仪可以不加)。

表 1 PCR 检测反应体系

单位为微升

试剂	体积
无菌水	18.3
10 \times PCR 缓冲液	2.5
dNTPs 混合溶液	1
25 μ mol/L 上游引物	1
25 μ mol/L 下游引物	1
5 U/ μ L Taq 酶	0.2
25 mg/L DNA 模板	1.0
总体积	25

注:鲤鱼内标准基因 PCR 检测反应体系中上、下游引物分别为 L 和 H;ScGH 基因 PCR 检测反应体系上、下游引物分别为 GH-F 和 GH-R。

7.4.1.3 将 PCR 管在台式离心机上离心 10 s 后插入 PCR 仪中。

7.4.1.4 进行 PCR 反应。反应程序为:94 $^{\circ}$ C 变性 3 min;进行 35 次循环扩增反应(93 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C(ScGH 引物)或 58 $^{\circ}$ C(cytb 引物)退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s。根据不同型号的 PCR 仪,可将 PCR 反

应的退火和延伸时间适当延长); 72°C 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。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。以非转基因鲤鱼 DNA 作为阴性对照 PCR 反应体系的模板;以转 ScGH 基因促生长鲤鱼材料中提取的 DNA 作为阳性对照 PCR 反应体系的模板;以无菌水代替空白对照 PCR 反应体系的模板。

7.5 PCR 产物的电泳检测

按 15 g/L 的浓度称取琼脂糖加入 0.5×TBE 缓冲液中,加热溶解,配制成琼脂糖溶液。按每 100 mL 琼脂糖溶液中加入 5 μL EB 溶液的比例加入 EB 溶液,混匀,适当冷却后,将其倒入电泳板上,插上梳板,室温下凝固成凝胶后,放入 0.5×TBE 缓冲液中,垂直向上轻轻拔去梳板。取 7 μL PCR 产物与 3 μL 加样缓冲液混合后加入凝胶点样孔中,其中一个泳道中加入 DNA 分子量标准,接通电源在 2 V/cm~5 V/cm 条件下电泳。

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。根据琼脂糖凝胶电泳结果,按照 8 的规定对 PCR 扩增结果进行分析。如需确认 PCR 扩增片段是否为目的 DNA 片段,按照 7.7 和 7.8 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 产物的测序验证

将回收的 PCR 产物克隆测序,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 对照样品结果分析

阳性对照 PCR 反应中,cytb 内标准基因和 ScGH 基因均得到了扩增,且扩增片段大小与预期片段大小一致,而阴性对照中仅扩增出 cytb 基因片段,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

- a) cytb 内标准基因和 ScGH 基因均得到了扩增,且扩增片段大小与预期片段大小一致,表明试样中检测出 ScGH 基因,表述为“试样中检测出 ScGH 基因,检测结果为阳性”。
- b) cytb 内标准基因片段得到扩增,且扩增片段大小与预期片段大小一致,而 ScGH 基因未得到扩增,或扩增片段大小与预期片段大小不一致,表明试样中未检测出 ScGH 基因,表述为“试样中未检测出 ScGH 基因,检测结果为阴性”。