



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3496—2013

动物源性饲料中转基因成分实时荧光
PCR 检测方法

Protocol of the real-time PCR for detecting genetically modified component in
animal-originated-feedstuffs

2013-03-01 发布

2013-09-16 实施

中 华 人 民 共 和 国 发 布
国 家 质 量 监 督 检 验 检 疫 总 局

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国安徽出入境检验检疫局、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、中国农业大学、北京市畜牧兽医总站。

本标准主要起草人：刘建、林祥梅、朱振营、张永宁、王建武、吴绍强、郑海松、凌杏园、薛振华、张旻、于宁、王彩霞、李志辉、景宏丽。

动物源性饲料中转基因成分实时荧光 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了动物源性饲料中转基因成分的实时荧光 PCR 检验方法。
本标准适用于猪、牛、羊动物源性饲料中转基因成分实时荧光 PCR 检验。

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 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

$\beta 2 m$: $\beta 2$ 微球蛋白(β_2 -microglobulin)

bp:碱基对(base pair)

CMV:巨细胞病毒(cytomegalovirus)

Ct:每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数(cycle threshold)

dATP:脱氧腺苷三磷酸(deoxyadenosine triphosphate)

dCTP:脱氧胞苷三磷酸(deoxycytidine triphosphate)

dGTP:脱氧鸟苷三磷酸(deoxyguanosine triphosphate)

dNTP:脱氧核苷三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphate)

dTTP:脱氧胸苷三磷酸(deoxy thymidine triphosphate)

DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)。

GFP:绿色荧光蛋白(green fluorescent protein)

NPT II :新霉素-3'-磷酸转移酶基因(neomycin-3'-phosphotransferase gene)

PCR:聚合酶链反应(polymerase chain reaction)

SV40:猿猴空泡病毒 40(Simian Vacuolating virus 40)

Taq 酶:DNA 聚合酶。

TE:Tris-HCl、EDTA 缓冲液

Tris:三(羟甲基)氨基甲烷(tris hydroxymethyl aminomethane)

4 实验方法

4.1 主要仪器

4.1.1 实时荧光定量 PCR 仪。

4.1.2 超净工作台。

4.1.3 消毒灭菌锅。

4.1.4 旋涡振荡器。

- 4.1.5 高速冷冻离心机,台式小型离心机,Mini 个人离心机。
 4.1.6 低温冰箱。
 4.1.7 纯水器,双蒸水器。

4.2 主要试剂

除另有规定外,所有试剂均采用分析纯或生化试剂。

- 4.2.1 实验用水:应符合 GB/T 6682 中一级水的规格。
 4.2.2 PCR 缓冲液。
 4.2.3 氯化镁(MgCl₂)。
 4.2.4 dNTPs(dATP、dTTP、dCTP、dGTP)。
 4.2.5 *Taq* 酶。
 4.2.6 其他药品及试剂配制方法见附录 A。

4.3 引物和探针

按照表 1 中提供的引物及探针序列合成引物及探针(参见附录 B),加入无离子水配成 100 pmol/μL 贮存,配成直接用于 PCR 反应的 10 pmol/μL 的工作液。

表 1 检测转基因动物内、外源基因所需的引物及探针序列

被检测基因	基因来源	引物序列	探针序列	备注
牛 β2m	牛内源	5'-CTGCTATGTGTATGGGTTCC-3' 5'-GTAGAAAGACCAGTCCTTGC-3'	5'-AGACAGGTCTGACTG CTCCGATTTAATC-3'	内参照
猪 β2m	猪内源	5'-GAAGGTTTCAGGTTTACTCACG-3' 5'-TCAGCAAATCAATTTCAATCTGG-3'	5'-CCCAGCGGAAAACGG AAAGCCAA-3'	内参照
羊线粒体基因	羊内源	5'-TTTCGCCTTTCACTTTATTTTCCC-3' 5'-GGGTTGTTGGATCCTGTTCG-3'	5'-CGCAGCCCTCGCCAT AGTTCACCT-3'	内参照
SV40 polyA	外源	5'-TCACAAATTCACAAATAAAGC-3' 5'-ACATGATAAGATACATTGATGAG-3'	5'-CACTGCATTCTAGTTG TGGTTTGTCC-3'	筛查检测
NPT II	外源	5'-TATGACTGGGCACAACAGAC-3' 5'-CGTCTTGCAATTCATTGAG-3'	5'-CTGCTCTGATGCCGCC GTGTTCC-3'	筛查检测
CMV 启动子	外源	5'-GTTCCGCGTTACATAACTTACGG-3' 5'-AAGTCCCTATTGGCGTACTATGG-3'	5'-CCGCCTGGCTGACCG CCCAAC-3'	筛查检测
GFP	外源	5'-AACCGCATCGAGCTGAAG-3' 5'-GTTGTGGCGGATCTGAAG-3'	5'-ACCTTGATGCCGTTCT TCTGTTGTTCG-3'	筛查检测

4.4 实验步骤

4.4.1 DNA 提取与纯化

DNA 提取与纯化按以下步骤操作:

- a) 取动物源性饲料 0.1 g,液氮研磨后转入 1.5 mL 离心管中,加入 1 mL 的组织裂解缓冲液,加入蛋白酶 K(20 mg/mL)和胰 RNA 酶(20 mg/mL)各 5 μL,混匀。在 65 °C 恒温水浴锅中水浴

30 min,也可转入 37 ℃水浴 12 h~24 h,间歇振荡离心管数次。于台式离心机以 12 000 r/min 离心 5 min,取上清液转入另一离心管中。

- b) 加等量的酚:三氯甲烷:异戊醇振荡混匀,离心 12 000 r/min,5 min。
- c) 取上层溶液至另一管,加入等体积的三氯甲烷、异戊醇,振荡混匀,离心 12 000 r/min,5 min。
- d) 取上层溶液至另一管,加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc(pH 5.2),加入 2 倍体积的无水乙醇,混匀后室温沉淀 2 min,离心 12 000 r/min,10 min。
- e) 小心倒掉上清液,将离心管倒置于吸水纸上,将附于管壁的残余液滴除掉。
- f) 用 1 mL70%乙醇洗涤沉淀物 1 次,离心 12 000 r/min,5 min。
- g) 小心倒掉上清液,将离心管倒置于吸水纸上,将附于管壁的残余液滴除掉,室温干燥。
- h) 加 100 μ L TE 重新溶解沉淀物,然后置于 4 ℃或-20 ℃保存备用。

4.4.2 阴性对照、阳性对照和空白对照的设置

阴性对照:待测非转基因动物(如:猪、牛、羊)及其加工产品。

阳性对照:含有待测基因序列的动物及其加工产品。

空白对照:设两个,一是提取 DNA 时设置的提取空白对照(以水代替样品),二是 PCR 反应的空白对照(以水代替 DNA 模板)。

4.4.3 实时荧光 PCR 反应体系

实时荧光 PCR 反应体系见表 2,每个样品各做两个平行管。加样时应使样品 DNA 溶液完全落入反应液中,不要粘附于管壁上,加样后应尽快盖紧管盖。

表 2 实时荧光 PCR 反应体系

试剂名称	储备液浓度	25 μ L 反应体系加样体积/ μ L	50 μ L 反应体系加样体积/ μ L
10 \times PCR 反应缓冲液 (含 MgCl ₂)	—	2.5	5.0
dNTP Mixture	各 2.5 mmol/L	2.0	4.0
引物(上游)	10 μ mol/L	0.5	1.0
引物(下游)	10 μ mol/L	0.5	1.0
探针	10 μ mol/L	1	2
Taq 酶	5 U/ μ L	0.25	0.5
DNA 模板	50 ng/ μ L~100 ng/ μ L	1.0~2.0	2.0~4.0
补水至	—	25	50

注:表中 DNA 模板为原料的模板量,加工产品可视加工程度适当增加模板量。

4.4.4 实时荧光 PCR 反应参数

检测先对提取的 DNA 进行内对照基因的扩增,扩增出相应的内对照条带后可以进行筛查基因的检测,如果筛查基因为阳性,再进行鉴定基因的检测。如果筛查基因为阴性则直接报告结果。

不同内、外源基因在不同 PCR 管内分别扩增,实时荧光定量 PCR 的反应参数为:预变性 95 ℃,5 min;95 ℃,10 s;60 ℃,30 s;60 ℃退火延伸阶段采集荧光信号,40 个循环(不同仪器可根据仪器要求将反应参数作适当调整)。

4.4.5 仪器检测通道的选择

PCR 反应管荧光信号收集的设置,应与探针所标记的报告基团一致,报告基团为 FAM 时,荧光信号收集应设在 FAM 通道;报告基团为 HEX 时,荧光信号收集应设在 HEX 通道;其余类推。具体设置方法因仪器而异,可参照仪器使用说明书。

4.4.6 实时荧光 PCR 反应运行

按预先设定的样品摆放顺序将 PCR 反应管依次摆放(上机前注意检查各反应管是否盖紧,以免荧光物质泄露污染仪器),开始运行仪器进行实时荧光 PCR 反应。

4.5 结果分析

4.5.1 基线的设置

实时荧光 PCR 反应结束并分析结果后,应设置无效基线范围。无论采用任何荧光通道(FAM 或 HEX),基线范围选择在 3~15 个循环,如果有强阳性样本,应根据实际情况调整基线范围。阈值设置原则以基线刚好超过正常阴性对照扩增曲线的最高点,且 Ct 值=40 为准。

4.5.2 内参照基因 Ct 值与 DNA 浓度的关系

内参照基因 Ct 值大于或等于 40 时,PCR 过程中无目标 DNA 的扩增;Ct 值在 36~40 之间,且平行样的每个值之间的差异很大,表明 PCR 反应体系中的目标 DNA 量很少,应适当增加模板量。

5 实时荧光 PCR 检测的质量控制

空白对照:外源基因检测 Ct 值大于或等于 40,内参照基因检测 Ct 值大于或等于 40;

阴性对照:外源基因检测 Ct 值大于或等于 40,内参照基因检测 Ct 值在 20~30 之间;

阳性对照:外源基因检测 Ct 值小于或等于 34。

上述指标有一项不符合者,应重做实时荧光 PCR 扩增。

6 结果判定

6.1 待测样品外源基因检测 Ct 值大于或等于 40,内参照基因检测 Ct 值在 20~30 之间者,阴性对照、阳性对照和空白对照结果正常者,则可判定该样品未检出目的基因。

6.2 待测样品外源基因检测 Ct 值小于或等于 36,内参照基因检测 Ct 值在 20~30 之间者,阴性对照、阳性对照和空白对照结果正常者,则可判定该样品检出目的基因。

6.3 待测样品外源基因检测 Ct 值在 36~40 之间,应重做实时荧光 PCR 扩增。再次扩增后的结果 Ct 值仍小于 40,且阴性对照、阳性对照和空白对照结果正常,则可判定该样品检出目的基因;再次扩增后的结果 Ct 值大于 40,且阴性对照、阳性对照和空白对照结果正常,则可判定该样品未检出目的基因。

附 录 A
(规范性附录)
试剂配制

A.1 1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0):称取 121.1 g Tris,溶于 800 mL 双蒸水中,加入浓盐酸 42 mL,冷却至室温,用稀盐酸准确调节 pH 至 8.0,加双蒸水定容至 1 L,分装后高压灭菌备用。

A.2 500 mmol/L EDTA(pH 8.0):在 800 mL 水中加入 186.1 g(EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$),用磁力搅拌器剧烈搅拌,用氢氧化钠调节溶液 pH 至 8.0(约需 20 g 氢氧化钠颗粒),然后加双蒸水定容至 1 000 mL,分装后高压灭菌备用。

A.3 TE 缓冲液:量取 1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)5 mL,500 mmol/L EDTA(pH 8.0)1 mL 至 500 mL 烧杯中,向烧杯中加入约 400 mL 双蒸水均匀混合,将溶液定容到 500 mL 后,高温高压灭菌,室温保存。

A.5 10%SDS:称取 100 g SDS 加入 900 mL 灭菌双蒸水中,68 °C 助溶,用浓 HCl 调节 pH 至 7.2,定容至 1 L。

A.6 5 mol/L NaCl:称取 58.4 g NaCl 溶于 150 mL 灭菌双蒸水中,加水定容至 200 mL,高压灭菌,室温保存。

A.7 胰 RNA 酶:称取 20 mg 胰 RNA 酶溶于 1 mL 灭菌的双蒸水中, -20 °C 备用。

A.8 动物组织裂解缓冲液:量取 1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)10 mL,500 mmol/L EDTA (pH 8.0)10 mL,5 mol/L NaCl 30 mL,10%SDS 100 mL 至 800 mL(pH 8.0)灭菌双蒸水中用 5 mol/L 的 HCl 调制 pH 8.0,定容至 1 000 mL。

A.9 50 倍 TAE 电泳浓缩缓冲液:取 Tris 242 g、冰醋酸 57.1 mL、500 mmol/L EDTA 10 mL、用前用双蒸水 50 倍稀释即可。

A.10 3 mol/L(NaAc)溶液:称 40.8 g 的 $\text{NaAc} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 加 40 mL 去离子水溶解,用冰醋酸调节 pH 至 5.2,最后定容至 100 mL。

A.11 蛋白酶 K:称取 20 mg 蛋白酶 K 溶于 1 mL 灭菌的双蒸水中, -20 °C 备用。

附录 B
(资料性附录)
转基因动物常用载体基因

表 B.1 转基因动物常用载体基因

序号	物种	载体基因	载体	参考文献	文献出处
1	猪	SV40 polyA	pBluescript II KS	Functional expression of a Delta12 fatty acid desaturase gene from spinach in transgenic pigs	Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 01 (17):6361-6366
2	猪	CMV		Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure	AUGUST, 2001 VOLUME 19 nature biotechnology
3	猪	NPT II	pGalGT	Production of alpha-1, 3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning	Science,2002,295(5557):1089-1092
4	鱼	SV40 polyA	pRSV	Gene transfer, expression and inheritance of pRSV-rainbow trout-GH cDNA in the common carp, cyprinus carpio (Linnaeus)	Mol Reprod Dev, 1990,25(1):3-13
5	猪	CMV	pCR2.1-Topo	HLA-E/human 2-microglobulin transgenic pigs: protection against xenogeneic human anti-pig natural killer cell cytotoxicity	Transplantation 2009;87:35-43
6	猪	NPT II	pCAGGS-hfat-1	Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids	Nat Biotechnol,2006,24(4):435-436
7	猪	NPT II	p-GTIFneo and pGTKneo	Production of alpha-1,3-galactosyl transferase-knockout cloned pigs expressing human alpha-1,2-fucosyltransferase 1	BIOLOGY OF REPRODUCTION 69, 437-445 (2003)
8	牛	CMV	PlaeGfp-NEO	Expression and characterization of bioactive recombinant human alpha-lactalbumin in the milk of transgenic cloned cows	J Dairy Sci, 2008, 91 (12) : 4466-4476
9	牛			Antigen-specific human polyclonal antibodies from hyperimmunized cattle	Nat Biotechnol, 2009,27(2):173-181
10	牛	NPT II		Production of cattle lacking prion protein	Nat Biotechnol, 2007,25(1):132-138
11	牛	CMV、GFP、NPT II		Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta-casein and kappa-casein	Nat Biotechnol, 2003,21(2):157-162

表 B.1 (续)

序号	物种	载体基因	载体	参考文献	文献出处
12	牛	GFP、NPT II		Engineering disease resistant cattle	Transgenic Res, 2005, 14(5): 563-567
13	牛	CMV、GFP、NPT II	pCMV、EGFP	Cattle mammary bioreactor generated by a novel procedure of transgenic cloning for large-scale production of functional human lactoferrin	PLoS One, 2008, 3 (10) : e3453
14	羊	NPT II	pIRESHyg	Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells	NATURE, VOL 405, 29 JULY 2000
15	羊			Recombinant human antithrombin (ATryn)	The Medical Letter
16	小鼠 (猪)	CMV、NPT II	pPSPBGPNeo	Cloning of pig parotid secretory protein gene upstream promoter and the establishment of a transgenic mouse model expressing bacterial phytase for agricultural phosphorus pollution control	2006. 84: 513-519. J Anim Sci
17	猪	CMV、GFP、NPT II	pBC1	Production of recombinant human lysozyme in the milk of transgenic pigs	Transgenic Res DOI 10.1007/s 11248-010-9409-2
18	鱼	GFP		Establishment of a transgenic zebrafish line for superficial skin ablation and functional validation of apoptosis modulators in vivo	PLoS ONE, 1 May 2011, Volume 6, Issue 5, e20654
19	猪	CMV、NPT II	pCAGGS-sFat1-Neo	体细胞核移植生产转 ω -3 脂肪酸去饱和酶基因 sFat-1 克隆猪	中国科学 C 辑: 生命科学 2009, 39(3): 295-302
20	鱼	SV40 polyA		转基因鱼模型的建立	中国科学 B 辑 1989 年 2 月