

# SN

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4737—2016

### 猪及其产品中特定转基因成分 实时定量 PCR 检测方法

Protocol of the real-time PCR for detecting genetically modified component in  
pigs and their derived products

2016-12-12 发布

2017-07-01 实施



中 华 人 民 共 和 国  
国家质量监督检验检疫总局 发 布

## 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、中国农业科学研究院北京畜牧兽医研究所、中华人民共和国山东出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：林祥梅、王勤、李晓琳、朱振营、刘建、李奎、潘登科、孙敏、付伟、刘晓飞、梅琳、刘丹丹、仇松寅。

# 猪及其产品中特定转基因成分 实时定量 PCR 检测方法

## 1 范围

本标准规定了猪及其产品中特定转基因成分的实时定量 PCR 检测方法。

本标准适用于转脂肪酸去饱和酶基因、转植酸酶基因、肌肉生长抑制素基因敲除猪及其产品的检测。

## 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

GB/T 19495.2 转基因产品检测 实验室技术要求

## 3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

APPA:植酸酶(Phytase)

MSTN:肌肉生长抑制素(Myostatin)

PCR:聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction)

sFat-1:w-3 脂肪酸去饱和酶基因(omega-3 fatty acid desaturase)

TE:Tris-HCl、EDTA 缓冲液

## 4 防污染措施

猪及其产品中特定转基因成分实时定量 PCR 检测过程的防污染措施应符合 GB/T 19495.2 的规定。

## 5 实时定量 PCR 试验

### 5.1 主要仪器

5.1.1 实时荧光定量 PCR 仪。

5.1.2 超净工作台。

5.1.3 消毒灭菌锅。

5.1.4 核酸蛋白分析仪。

5.1.5 高速冷冻离心机,台式小型离心机,Mini 个人离心机。

5.1.6 低温冰箱,冷藏冷冻冰箱。

5.1.7 纯水器,双蒸水器。

5.1.8 漩涡震荡器。

5.1.9 微量进样器:2.5  $\mu$ L、10  $\mu$ L、20  $\mu$ L、100  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1 000  $\mu$ L。

## 5.2 主要试剂

5.2.1 实验用水:符合 GB/T 6682 中一级水的规格。

5.2.2 *Taq* DNA 聚合酶,三氯甲烷,异丙醇,异戊醇,70%乙醇,TE 缓冲液,50 倍 TAE 电泳浓缩缓冲液,细胞裂解缓冲液,蛋白酶 K,醋酸钠(NaAc)。药品及试剂配制方法见附录 A。

## 5.3 引物和探针

按照表 1 中提供的引物和探针序列合成引物及探针,配制成 10 pmol/ $\mu$ L 用于 PCR 检测,扩增序列参见附录 B。

表 1 检测转基因猪内外基因所需的引物序列

被检测基因	基因来源	引物序列	探针序列	备注
Sus $\beta$ 2M	猪内源	5'GAAGGTTTCAGGTTTACTCACG3' 5'TCAGCAAATCAATTTCAATCTG3'	5'CCCAGCGGAAAACGG AAAGCCAA3'	内参照
MSTN	内源	5'AGGGTAGGAAAGTGATTCAGGATCT3' 5'CAGACTGCCTTGGGAAAAGC3'	5'TGCAGGTCAATTCT MGB3'	MSTN 基因 敲除猪检测
APPA	外源	5'TGTTCGTTGGCAGGTTTTAC3' 5'AGATGGCTGGCAACTAGAAG3'	5'TGAATGAAGCACGCA TACCGGC3'	转植酸酶 基因猪检测
sFat-1	外源	5'TGTACGAGGCTGATGAATGG3' 5'TGTCCGTCTGTGATATGGTG3'	5'TGTGTCCAATCCGAGT CCATAGTAACGA3'	转 w-3 脂 肪酸去饱和酶 基因检测

## 5.4 试验步骤

### 5.4.1 样品采集

采集动物的组织块作为检测样品,将其放入无菌 Eppendorf 管中,编号备用。

采集过程中样品不得交叉污染,采集及样品前处理过程中应戴一次性手套。

### 5.4.2 样品存放

对于采集的样品放置在 $-70^{\circ}\text{C}$ 冰箱或液氮中,但应避免反复冻融(最多冻融 3 次)。

### 5.4.3 样品核酸的提取

5.4.3.1 取新鲜或冰冻动物组织块 0.1 g(0.5  $\text{cm}^3$ ),尽量剪碎。置于玻璃匀浆器中,加入 1 mL 的细胞裂解缓冲液匀浆至不见组织块,转入 1.5 mL 离心管中,加入蛋白酶 K(20 mg/mL)和胰 RNA 酶(20 mg/mL)各 5  $\mu$ L,混匀。在  $65^{\circ}\text{C}$  恒温水浴锅中水浴 30 min,也可转入  $37^{\circ}\text{C}$  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。

5.4.3.2 加 2 倍体积异丙醇,倒转混匀后,可以看见丝状物,用 100  $\mu$ L 吸头挑出,晾干,用 200  $\mu$ L TE 重新溶解(可进行 PCR 反应等,需要进一步纯化的按下列步骤进行)。

5.4.3.3 加等量的酚:三氯甲烷:异戊醇(25:24:1)至上清液中,振荡混匀,离心 12 000 r/min,



- 5 min。
- 5.4.3.4 取上层溶液至另一管,加入等体积的三氯甲烷、异戊醇(24 : 1),振荡混匀,离心 12 000 r/min, 5 min。
- 5.4.3.5 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。
- 5.4.3.6 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。
- 5.4.3.7 用 1 mL 70%乙醇洗涤沉淀物 1 次,离心 12 000 r/min,5 min。
- 5.4.3.8 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。
- 5.4.3.9 加 100  $\mu$ L TE 重新溶解沉淀物。
- 5.4.3.10 也可采用其他等效的商业化试剂盒。

5.4.4 阴性对照、阳性对照和空白对照的设置

阴性对照:非转基因猪及其加工产品。

阳性对照:阳性转基因猪及其加工产品。

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)。

5.4.5 实时定量 PCR 反应体系

实时定量 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,离心机离心使溶液落于反应管底部。

表 2 实时定量 PCR 反应体系

试剂名称	使用浓度	25 $\mu$ L 反应体系加样体积/ $\mu$ L
TaqMan 探针法预混液	—	12.5 $\mu$ L
引物(上游)	10 pmol/ $\mu$ L	1 $\mu$ L
引物(下游)	10 pmol/ $\mu$ L	1 $\mu$ L
探针	10 pmol/ $\mu$ L	1 $\mu$ L
DNA 模板	(20 ng/ $\mu$ L~30 ng/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L~2 $\mu$ L
补水至	—	25 $\mu$ L
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。		

5.4.6 实时定量 PCR 反应参数

预变性 95  $^{\circ}$ C,3 min;95  $^{\circ}$ C,5 s,59  $^{\circ}$ C,15 s,72  $^{\circ}$ C,15 s,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。

5.4.7 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(可自由选择报告基团或者淬灭基团)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;余类推,淬灭基团为 TAMRA。具体设置方法因仪器而异,可参照仪器使用说明书。

SN/T 4737—2016

#### 5.4.8 实时定量 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定量 PCR 反应。

### 5.5 结果分析

#### 5.5.1 结果分析条件设定

阈值设定原则:根据仪器噪声情况进行调整,以阈值线刚好超过阴性对照样品扩增曲线的最高点,且相交于阳性对照扩增曲线的指数增长期为准。

#### 5.5.2 实时定量 PCR 检验的质量控制

空白对照:内参照基因检测  $C_t$  值大于或等于 40,并且无特定扩增曲线。

阴性对照:内参照基因检测  $C_t$  值小于 30,外源基因检测  $C_t$  值大于或等于 40,并且无特定扩增曲线。

阳性对照:内参照基因检测  $C_t$  值  $< 30$ ,外源基因检测  $C_t$  值小于或等于 34,并且出现特定扩增曲线。

上述指标有一项不符合者,应重做。

#### 5.5.3 结果描述与判定

在空白对照、阴性对照和阳性对照且内参照基因正常的情况下:

阴性:待测样品外源基因检测  $C_t$  值大于或等于 40,判定该样品不含有相应基因。

阳性:待测样品外源基因检测  $C_t$  值小于或等于 36,判定该样品含有相应基因。

可疑:待测样品外源基因检测  $C_t$  值在 36~40 之间,判为可疑;可疑样品应重做,重做结果  $C_t$  值大于 40 为该样品不含有相应基因,否则判定该样品含有相应基因。

附 录 A  
(规范性附录)  
药品及试剂配制方法

**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(浓度为 38% 的盐酸溶液) 42 mL, 冷却至室温, 用浓度为 10% 的盐酸溶液准确调节 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至完全溶解, 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 L, 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~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.4 酚 : 三氯甲烷 : 异戊醇(25 : 24 : 1)**

将 Tris-HCl 平衡苯酚与等体积的三氯甲烷/异戊醇(24 : 1)混合均匀后, 移入棕色玻璃瓶中 4 °C 保存。

**A.5 50 倍 TAE 电泳浓缩缓冲液**

配制方法为: 取 Tris 242 g 冰醋酸 57.1 mL、0.5 mol/L EDTA 10 mL, 用 5 mol/L 的 HCl 调制 pH 8.0, 定容至 1 000 mL。用前用双蒸水 50 倍稀释即可。

**A.6 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.7 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.8 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。



SN/T 4737—2016

#### A.9 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(pH8.0)10 mL,5 mol/L NaCl 30 mL,10% SDS 100 mL~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.10 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。

#### A.11 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。



附 录 B

(资料性附录)

实时定量 PCR 扩增的 DNA 序列

B.1 猪  $\beta$ 2M 基因序列(GenBank:AF452448.1:3790-4006),

GAAGG TTCAGGTTTACTCACGCCACCCAGCGGAAAACGGAAAGCCAAATTACCTGAACT  
GCTATGTATCTGGGTTCCATCCGCCCCAGATTGAAATTGATTTGCTGA

B.2 转植酸酶基因猪实时定量 PCR 扩增的 DNA 序列

TGTTTCGTTGGCAGGTTTTACGCAAATCGTGAATGAAGCACGCATACCCGCTTGCAGTTTGT  
AAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCT

B.3 转  $\omega$ -3 脂肪酸去饱和酶基因猪实时定量 PCR 扩增的 DNA 序列

TGTACGAGGCTGATGAATGGAGCTTCGTCCGTGGACAAACCCAAACCATCGATCGTTACT  
ATGGACTCGGATTGGACACAACGATGCGCACCATATCACAGACGGACA

B.4 肌肉生长抑制素基因敲除猪实时定量 PCR 扩增的 DNA 序列

AGGGTAGGAAAGTGATTTCAGGATCTATTGCTCGAGATAACTTCGTATAATGTATGC  
TATACGAAGTTATGTCGAGGGCCCCTGCAGGTCAATTCTACCGGGTAGGGGAGG  
CGCTTTTCCCAAGGCAGTCTG

---

中华人民共和国出入境检验检疫  
行 业 标 准  
猪及其产品中特定转基因成分  
实时定量 PCR 检测方法

SN/T 4737—2016

\*

中国标准出版社出版  
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)  
北京市西城区三里河北街16号(100045)  
总编室:(010)68533533

网址 [www.spc.net.cn](http://www.spc.net.cn)

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

\*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 16 千字  
2017年12月第一版 2017年12月第一次印刷  
印数 1—500

\*

书号: 155066 • 2-32380 定价 16.00 元



SN/T 4737—2016