

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1193—2003

基因检验实验室技术要求

General requirements for the laboratories for
gene detection and identification

2003-03-17 发布

2003-09-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

版权所有 · 禁止翻制、电子传阅、发售

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
基因检验实验室技术要求
SN/T 1193—2003

*

中国标准出版社出版
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045
电话:68523946 68517548
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 1/2 字数 10 千字
2003年6月第一版 2003年6月第一次印刷
印数 1—2 000

*

书号: 155066·2-15185 定价 6.00 元
网址 www.bzcbbs.com

版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68533533

前 言

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：国家质量监督检验检疫总局动植物检疫实验所、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、中华人民共和国广州出入境检验检疫局、中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：朱水芳、陈红运、黄文胜、覃文、章桂明、曹际娟。

本标准系首次发布的检验检疫行业标准。

基因检验实验室技术要求

1 范围

本标准规定了转基因产品检测实验室总体要求、质量控制和质量保证。
本标准适用于转基因产品检测实验室的建设和质量控制。

2 术语、定义和缩略语

下列术语、定义和缩略语适用于本标准。

2.1

转基因产品 genetic ally modified organisms,GMOs;biotechnology modified products

又叫生物技术产品。指用基因工程技术或者其他现代生物技术改变基因组构成的动物、植物、微生物及其产品。

2.2

聚合酶链式反应 polymerase chain reaction

聚合酶链式反应,简称 PCR。用一对寡核苷酸引物、四种脱氧核糖核苷酸(dNTPs),在合适的温度、离子条件及耐热 DNA 聚合酶催化下,在体外人工合成特异的模板 DNA 片段的过程。

2.3

实时荧光 PCR real-time fluorescent PCR,kinetic PCR,homogeneous PCR

在传统的 PCR 反应体系中,加入了扩增模板特异性的荧光标记杂交探针,同时在常规的 PCR 仪上增加了荧光信号检测系统,使得 PCR 扩增产物的特异性及数量检测与 PCR 扩增同步进行。实时荧光 PCR 探针有多种,常用的有分子信标(molecular beacon)、Taqman 探针和杂交双探针等。

2.4

dUTP-DNA 糖基化酶 UNG,Uracil-DNA glycosylase

一种特殊的 DNA 水解酶,它只水解掺有 dUTP 的 DNA。此酶防污染的条件是:在 PCR 扩增过程中用 dUTP 取代 dTTP;在 PCR 开始前用 UNG 酶处理 PCR 扩增反应液;在碱性条件下高温(95℃)断裂 DNA。

2.5 缩略语

2.5.1 PCR: polymerase chain reaction,聚合酶链式反应简称 PCR。

2.5.2 DNA:deoxyribonucleic acid,脱氧核糖核酸。

2.5.3 dNTP:deoxyribonucleoside triphosphate,脱氧核苷酸三磷酸。

2.5.4 UNG: uracil-DNA glycosylase,尿嘧啶 DNA-糖基化酶。

2.5.5 dATP:deoxyadenosine triphosphate,脱氧腺苷三磷酸。

2.5.6 dTTP:deoxythymidine triphosphate,脱氧胸苷三磷酸。

2.5.7 dUTP:deoxyuridine triphosphate,脱氧尿苷三磷酸。

2.5.8 bp: base pair,碱基对。

SN/T 1193—2003

3 实验室总体要求

3.1 基因检验实验室区域设置原则

转基因产品检测实验室分为五个隔开的工作区域:试剂贮存和准备区、样品粉碎区、样品制备区、扩增反应混合物配制和扩增区、扩增产物分析区。如果使用荧光 PCR 仪,扩增区和扩增产物分析区可以合并。

转基因产品检测实验室五个隔开的工作区域中每一区域都须有专用的仪器设备。

工作区域及各区域所用的仪器设备必须有明确的标记,避免不同工作区域内的设备、物品混用。

各区域实验台表面应可耐受次氯酸钠、双氧水等化学物质及紫外线的消毒清洁作用。

3.1.1 试剂贮存和准备区

本区的功能为:贮存试剂的制备、试剂的分装和主反应混合液的制备。

贮存试剂和用于样品制备的材料应直接运送至试剂贮存和准备区,不能经过产物分析区。试剂原材料必须贮存在本区内,并在本区内制备成所需的贮存试剂。当贮存试剂溶液经检查可用后,应将其分装贮存备用。

大多数用于扩增的试剂都应冰冻贮存。主贮存试剂,应分装冰冻贮存。贮存试剂的分装体积根据通常在实验室内一次测定所需的扩增反应数来决定。

主反应混合液的组成成分尤其是聚合酶的适用性和稳定性通过预试验来检查,评价结果必须有书面报告。对于“热启动”技术,聚合酶也可不包含在主反应混合液中。

3.1.2 样品粉碎区

本区的功能为:对样品进行粉碎。

样品在此区粉碎,转移到样品处理容器并加入适当核酸抽提溶液后,再进入样品制备区。

已粉碎好的样品,在此区抽取所需检测用的试样,转移到样品处理容器并加入适当核酸抽提溶液后,再进入样品制备区。将其余样品封存后送回样品制备区。

粉碎机要放置在排气的防污染操作台上,每个样品要单独使用已彻底清洗过的器皿。

粉碎要在单独的房间进行,并且要远离其他操作区域。

3.1.3 样品制备区

本区的功能为:待检样品的保存,核酸提取、贮存及其加入至扩增反应管。

样本处理对核酸扩增有很大影响,必须使用有效的核酸提取方法,可在开展检测前对提取方法进行评价。制备好的样品核酸要贮藏在超低温冰箱中。

本区可部分或全部设为正压条件。从试剂贮存和准备区拿来的主反应混合液,在此区正压条件下加入待测核酸后,必须盖好含反应混合液的反应管,再进入反应扩增区。

3.1.4 扩增区

本区的功能为:DNA 扩增。此外,已制备的 DNA 模板的加入和主反应混合液(来自试剂贮存和制备区)制备成反应混合液等也可在本区内进行。在巢式 PCR 测定中,通常在第一轮扩增后必须打开反应管,因此巢式扩增有较高的污染危险性,第二次加样必须在本区内进行。

3.1.5 扩增产物分析区

本区的功能为:扩增片段的测定。

核酸扩增后产物的分析方法多种多样,如膜上或微孔板上探针杂交方法(同位素标记或非同位素标记)、琼脂糖凝胶电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳、Southern 杂交、核酸测序方法等。

在使用 PCR-ELISA 方法检测扩增产物时,必须使用洗板机洗板。

本区是最主要的扩增产物污染来源,本区如采用负压条件或减压情况下(如安装排风扇)可减少扩增产物从本区扩散至前面区域的可能性。

3.2 基因检验实验室工作人员操作要求

进入各工作区域必须严格按照单一方向进行,即试剂贮存和准备区→样本制备区→扩增反应混合物配制和扩增区→扩增产物分析区。

不同的工作区域使用不同颜色的工作服。工作人员离开各工作区域时,不得将工作服带出。

实验室的清洁应按试剂贮存和准备区→扩增产物分析区的方向进行。不同的实验区域应有其各自的清洁用具。

实验操作过程中,操作者必须戴手套,并经常更换。此外,操作中使用一次性帽子也是一个有效的防止污染的措施。

严禁用嘴吸取液体,加样器和吸头等必须经高压处理。在操作过程中要正确使用加样器,避免在加样操作中产生气溶胶污染。

用过的加样器吸头必须放入专门的消毒容器(含 1%次氯酸钠溶液)内。实验室桌椅表面每次工作后都要清洁。含有 PCR 产物的任何废液必须收集到 1 mol/L 盐酸中,并且不能在实验室内倾倒,而应到远离 PCR 实验室的地方弃掉。污染了 PCR 产物的吸头也必须放到 1 mol/L 盐酸中浸泡后再放到垃圾袋中按程序处理(如焚烧)。

在样品粉碎、制样、核酸抽提等过程中出现实验材料散落或 PCR 产物外溅时,必须立即进行清洁处理并作出记录。

工作结束后必须立即对工作区进行清洁。

实验室及其设备的使用必须有日常记录。

3.3 安全防护

转基因产品检测实验室工作人员在整个实验操作过程中要戴手套,在强光、有害射线环境工作时要戴防护眼镜,防护服或采用其他安全有效措施。

3.4 废弃物处理

废弃物要进行高温消毒后再做处理,有毒有害废物要经过除害再做处理,处理要符合环保要求。

3.5 结果判断和验证

当一个样品同时检测出两个或两个以上外源基因时,可判断为转基因产品阳性,当检测出一个外源基因时,需进一步进行检测是否含有其他外源基因。用常规的 PCR-电泳方法检测出样品为阳性时,需进一步作验证实验,验证方法可选用实时荧光 PCR 方法和样品总核酸杂交方法。

4 质量控制与质量保证

4.1 室内质量控制

4.1.1 样品的测试过程中的质量控制

4.1.1.1 样品制备

常用 260 nm 和 280 nm 光密度的比值来检验样品核酸的纯度。纯的 DNA,其 OD_{260}/OD_{280} 应该在 1.75~2.0 之间。

样品制备时,每个样品都要取二至三个平行样,进行重复性实验。

4.1.1.2 阳性质控和阴性质控

使用内标法对核酸的扩增进行质控。扩增检测的内标通常为在整个细胞周期中均匀表达的 mRNA 或者某个基因 DNA 片段。当样品中存在扩增抑制物,或核酸提取中发生 DNA 降解,或 Taq 酶失活,内标即会表现为阴性结果。

在测定转基因作物的 GMO 含量时,应使用已知的低浓度的样品(如 0.1%的转基因作物)作为质控样本,与待测样品等同处理提取核酸及扩增,以判断扩增检测的效果。

每一个 PCR 实验中都必须设有外加阴性质控(污染监测质控),阴性质控可包括如下几种,即在样品制备的整个过程中所带的空白管、仅有扩增反应液但不含扩增模板的反应管、阴性样品等。这些质控

SN/T 1193—2003

样本在扩增检测时必须使用与待检的样品相同的主反应混合液。

4.1.1.3 污染的分析与处理

4.1.1.3.1 测定分析前的污染源

测定分析前实验材料的污染,主要来自非待检样品来源的核酸。

4.1.1.3.2 测定分析阶段的污染源

测定分析阶段的每一步都可能发生对样本的污染。反应混合液的任何成分及核酸的制备和反应建立阶段所涉及到的实验设备的任何部位都是可能的污染源。

4.1.1.3.3 污染的避免

为避免以前测定中所产生的扩增产物的污染,可在扩增反应中用 dUTP 取代部分 dTTP,扩增前在反应混合液中加入尿嘧啶糖苷酶(UNG),可破坏来自以前测定的扩增产物。

上述防污染方法能有效地降低污染,但不能用其来替代严格的实验室设置和管理,尤其是这些方法不能防止外来非扩增的天然 DNA 的污染。

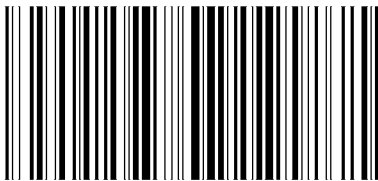
4.1.2 去除污染的措施

必须定期对实验室采取有效的去污染措施,结合各种不同的方法可达到最佳效果。去污染措施主要包括:

- a) 用 10%(体积分数)次氯酸钠或 3%双氧水清洁表面;
- b) 试验后长时间的紫外照射实验操作台面和其他表面(254 nm 波长紫外灯,相距 60 cm~90 cm,照射过夜);
- c) 实验设备如加样器的高压消毒;
- d) 用最终浓度为 1 mol/L 的盐酸浸泡实验废弃物。

4.2 室间质量评价

所有开展转基因产品检验的实验室都必须参加由中华人民共和国质量监督检验检疫总局有关部门组织的全国转基因产品检验项目的室间质量评价。



SN/T 1193-2003

版权专有 侵权必究

*

书号:155066·2-15185

定价: 6.00 元