

ICS 67.050
B 04



中华人民共和国国家标准

GB/T 19495.6—2004

GB/T 19495.6—2004

转基因产品检测 基因芯片检测方法

Detection of genetically modified organisms and derived products—
Gene-chip detection

中华人民共和国
国家标准
转基因产品检测 基因芯片检测方法
GB/T 19495.6—2004

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.bzcb.com

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 1.5 字数 36 千字
2007年2月第一版 2007年2月第一次印刷

*

书号:155066·1-21100 定价 14.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究

举报电话:(010)68533533



GB/T 19495.6—2004

2004-04-13 发布

2004-04-13 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

D.4 基因芯片的质控

D.4.1 基片的质控

用 $2.5 \mu\text{mol/L}$ 定位探针针对基片进行点样,每张基片在点样区域均匀点样 3 行 20 列。并按 D.3.4 进行点样后处理。随后用去离子水 $6 \mu\text{L}$ 、 $0.1 \mu\text{mol/L}$ Cy5 标记的定位探针的互补链 $2 \mu\text{L}$ 和 $2\times$ 基因芯片杂交液 $8 \mu\text{L}$ 进行杂交。置于杂交仪内 54°C 杂交 1 h,洗涤后扫描并进行数据分析,如基片杂交图像经软件分析后计算其杂交信噪比大于 5.0 为合格。同时观察点的成型是否圆整,点大小是否均一。

D.4.2 基因芯片的质控

同一批基因芯片产品应随机抽取 5% 进行质检(每批检测数目不少于 2 片)。

基因芯片的质控采用阳性标准物质杂交法。

阳性标准物质杂交法:用阳性标准物质 DNA 对已点样的基因芯片进行杂交检测。

将沉淀后的 PCR 产物经 $13\ 000 \text{ r/min}$ 离心 15 min,弃上清,避光晾干,加入 $6 \mu\text{L}$ 双蒸水重悬沉淀后,再加入 $6 \mu\text{L}$ 50°C 预热的杂交液;最后加入 $1 \mu\text{L}$ Cy5 标记的定位探针互补链溶液,混匀后 95°C 放置 3 min, 0°C 放置 5 min,然后全部转移到芯片的点样区域,加盖玻片;将芯片水平放置在可密封的杂交容器内,加水保湿,然后放进 55°C 杂交仪内保温 1 h。

杂交结束后,取出芯片,用洗脱液冲掉盖玻片,然后把芯片放入盛有洗脱液的清洗槽中 5 min,用双蒸水冲洗两遍。避光干燥。

用扫描仪分析杂交结果,目标基因探针杂交信噪比均值大于 5.0,阴性质控探针和基因芯片空白质控点杂交信噪比均值小于 3.5 判定为合格。

前 言

GB/T 19495《转基因产品检测》为系列标准:

- GB/T 19495.1—2004 转基因产品检测 通用要求和定义;
- GB/T 19495.2—2004 转基因产品检测 实验室技术要求;
- GB/T 19495.3—2004 转基因产品检测 核酸提取纯化方法;
- GB/T 19495.4—2004 转基因产品检测 核酸定性 PCR 检测方法;
- GB/T 19495.5—2004 转基因产品检测 核酸定量 PCR 检测方法;
- GB/T 19495.6—2004 转基因产品检测 基因芯片检测方法;
- GB/T 19495.7—2004 转基因产品检测 抽样和制样方法;
- GB/T 19495.8—2004 转基因产品检测 蛋白质检测方法。

本部分的附录 A、附录 B、附录 C 和附录 D 为规范性附录。

本部分由中华人民共和国国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分由中华人民共和国质量监督检验检疫总局批准发布。

本部分主要起草单位:中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、国家质量监督检验检疫总局动植物检疫实验所。

本部分参与起草单位:北京师范大学、中华人民共和国广东出入境检验检疫局、中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局、上海博星基因芯片有限责任公司。

本部分主要起草人:章桂明、黄文胜、程英豪、覃文、曹际娟、朱水芳、李瑶、缪海珍、余道坚、陈枝楠、孙增强、谢月华。

本部分系首次发布的国家标准。

C.3.4 多重 PCR 扩增

C.3.4.1 多重 PCR 反应参数

多重 PCR 反应参数为:50℃ 5 min; 94℃ 5 min;94℃ 10 s,55℃ 10 s,72℃ 30 s,35 个循环;72℃ 10 min;4℃ 保存。

注:不同的基因扩增仪可根据仪器的要求将反应参数做适当的调整。

C.3.4.2 品系鉴定检测多重 PCR

将表 C.1 和 C.2 所列的品系鉴定检测的引物和阳性对照引物同时加入多重 PCR 反应体系中(见表 C.3),按 C.3.4.1 多重 PCR 的反应参数进行反应。

C.3.5 PCR 产物的沉淀

将多重 PCR 反应产物加 2 倍体积的无水乙醇、1/10 体积的 3 mol/L NaAC(pH5.2),置于-20℃ 避光沉淀 30 min 以上,供基因芯片杂交检测用。

C.3.6 杂交

C.3.6.1 杂交反应

沉淀后 PCR 产物经 13 000 r/min 15 min 离心,弃上清,避光晾干,加经 55℃ 预热的杂交液 6 μL,混匀后 95℃ 3 min、0℃ 5 min 后全部转移到芯片的点样区域,加盖玻片。在杂交舱里加几滴水,以保持湿度。将芯片放入杂交舱,密封杂交舱,然后放进 50℃ 水浴内保温 1 h。

C.3.6.2 洗片

打开杂交舱,取出芯片,用 0.2% SDS 冲掉盖玻片,然后把芯片放入盛有 0.2% SDS 的染色缸,放置 5 min,用双蒸水冲洗两遍。室温避光干燥。

C.3.7 扫描检测

将杂交后的基因芯片放入扫描仪内扫描,并分析结果,控制扫描仪的软件应具有信噪比分析功能。

C.3.8 扫描结果的判定

首先阴性质控探针杂交信噪比均值等于小于 3.5,基因芯片空白质控点杂交信噪比均值等于小于 3.5,阳性质控探针杂交信噪比大于 5.0 判定为杂交合格,在此基础上,目标基因探针杂交信噪比均值大于等于 5.0 判定为阳性信号,在 3.5 与 5.0 之间判定为可疑阳性,小于等于 3.5 判定为阴性。

C.3.9 可疑数据的确证

对于可疑的数据,确证实验按照 GB/T 19495.5—2004 中规定的方法执行。

C.4 结果报告

检出×××基因,定位探针杂交点、芯片空白质控点、阴性质控探针杂交点、阳性质控探针杂交点的检测结果正常。

未检出×××基因,定位探针杂交点、芯片空白质控点、阴性质控探针杂交点、阳性质控探针杂交点的检测结果正常。

如果 DNA 样本没有检测出阳性质控探针杂交信号,应重复一次,若结果相同,则判定实验不成功。

转基因产品检测 基因芯片检测方法

1 范围

GB/T 19495 的本部分规定了转基因产品基因芯片检测方法。

本部分适用于用基因芯片对转基因产品的筛选基因、物种结构特异性基因、品系鉴定检测基因和内源基因等的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过 GB/T 19495 的本部分的引用而成为本部分的条款。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部分,然而,鼓励根据本部分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部分。

GB/T 19495.1—2004	转基因产品检测	通用要求和定义
GB/T 19495.2—2004	转基因产品检测	实验室技术要求
GB/T 19495.3—2004	转基因产品检测	核酸提取纯化方法
GB/T 19495.4—2004	转基因产品检测	核酸定性 PCR 检测方法
GB/T 19495.5—2004	转基因产品检测	核酸定量 PCR 检测方法
GB/T 19495.7—2004	转基因产品检测	抽样和制样方法

3 术语、定义和缩略语

本部分采用下列术语、定义和缩略语。

3.1 术语和定义

GB/T 19495.1 确立的以及下列术语和定义适用于 GB/T 19495 的本部分。

3.1.1

基片 substrate

基因芯片中用于固定探针的基质,通常采用标准的“载玻片或其他固体载体”,经过化学修饰制备而成。

3.1.2

基因芯片探针 DNA microarray probe

基因芯片中固定于基质表面、能与样本 DNA 互补、用于探测样本 DNA 信息的核酸分子,本部分采用寡核苷酸片段作探针。

3.1.3

定位探针 positive position probe

是一段与待检基因无关的寡核苷酸,通过和标记的定位探针互补链杂交显示信号,用于点样矩阵位置的确定。

3.1.4

阳性质控探针 positive quality control probe

用于样品抽提、PCR、杂交的反应体系的监控,一般用生物的管家基因来设计阳性质控探针。