



中华人民共和国国家标准

GB/T 34797—2017

核酸引物探针质量技术要求

Quality technical requirements of primers and probes

2017-11-01 发布

2018-05-01 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

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由全国生化检测标准化技术委员会(SAC/TC 387)提出并归口。

本标准起草单位:中国测试技术研究院生物研究所、中国测试技术研究院、苏州金唯智生物科技有限公司、深圳华大基因研究院、深圳市计量质量检测研究院。

本标准起草人:周李华、李怀平、马丽侠、刘明东、郝军政、蒋慧、王智、叶德萍、史谢飞、杨国武、谭和平。

核酸引物探针质量技术要求

1 范围

本标准规定了 DNA 引物探针的质量评价指标、技术要求、试验方法、包装运输和储存要求。
本标准适用于 DNA 引物探针等寡核苷酸产品的质量评价及其检测。

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 191 包装储运图示标志

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 19495.1 转基因产品检测 通用要求和定义

GB/T 30988 多酚类植物基因组 DNA 提取纯化及测试方法

3 术语和定义

GB/T 19495.1 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

寡核苷酸 oligonucleotide

二至三十个核苷酸残基以磷酸二酯键连接而成的线性多核苷酸片段。寡核苷酸可由仪器自动合成,它可作为 DNA 合成的引物、基因探针等。

注:在使用这一术语时,对核苷酸残基的数目并无严格规定,在不少文献中,把含有三十甚至更多个核苷酸残基的多核苷酸分子也称作寡核苷酸。

3.2

引物 primer

人工合成的两段寡核苷酸序列,一段与目的基因一端的一条 DNA 模板链互补,另一端与目的基因另一端的另一条 DNA 模板链互补。

3.3

探针 probe

一段带有检测标记,且顺序已知的,与目的基因互补的核酸序列。

3.4

定制序列 custom sequence

客户提供的 DNA 序列及合成要求等信息。

3.5

定制引物 custom primer

客户提供的 DNA 引物序列及合成要求等信息。

3.6

定制探针 custom probe

客户提供的 DNA 探针序列、修饰集团及合成要求等信息。

3.7

1 OD 单位 1 OD

在 1 mL 体积 1 cm 光程标准比色皿中,260 nm 波长下吸光度为 1 的寡核苷酸溶液。

3.8

序列比对 alignment

为确定两个或多个序列之间的相似性和同源性,而将它们按照一定的规律排列并分析的过程。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DNA: 脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

DSL: 脱盐(desalination)

HAP: 新型寡核苷酸纯化(high affinity purification)

HPLC: 高效液相色谱(high performance liquid chromatography)

MS: 质谱(mass spectrometer)

OD: 光密度(optical density)

OPC: 寡核苷酸纯化柱(oligonucleotide purification cartridge)

PAGE: 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis)

5 质量评价要求

5.1 技术要求

DNA 引物探针产品质量控制指标及技术要求应符合表 1 的规定。

表 1 DNA 引物探针产品质量技术要求

产品种类	指标		要求
引物	总量 ^a OD		$\delta \leq 10\%$
	碱基准确性		与定制引物序列一致
	纯度 ^b	脱盐 ^c (如 DSL 等)	$\geq 75\%$
		过柱 ^d (如 OPC、HAP 等)	$\geq 85\%$
		PAGE 级	$\geq 90\%$
		HPLC 级	$\geq 95\%$
	碱基缺失率	脱盐(如 DSL 等)	$\leq 25\%$
		过柱(如 OPC、HAP 等)	$\leq 15\%$
		PAGE 级	$\leq 10\%$
		HPLC 级	$\leq 5\%$
相对分子质量 ^e		$\delta \leq 0.05\%$	

表 1 (续)

产品种类	指标		要求
探针 ^f	总量 ^a OD		$\delta \leq 10\%$
	碱基准确性		与定制探针序列一致
	纯度 ^b	HPLC 级	$\geq 95\%$
	碱基缺失率	HPLC 级	$\leq 5\%$
	修饰基团		与定制探针一致
	相对分子质量 ^c		$\delta \leq 0.05\%$
^{a, e} “ δ ”表示相对误差。 ^b 指碱基数 ≤ 40 引物纯度;当碱基数 ≥ 41 ,或当引物为修饰引物,或%GC $\geq 70\%$,或序列中有连续 5 个 G 以上时,其纯度值与表 1 规定纯度值差值的绝对值应 $\leq 5\%$ 。 ^{c, d} 进行脱盐或过柱方式纯化的产品,在实验没有相关要求的情况下,可不考虑纯度。 ^f 探针合成宜采用 HPLC 纯化方式。			

5.2 外观及性状

产品应为半透明或不透明的片状粉状物质、无异味,易溶于水和 TE 缓冲液。

5.3 引物探针的总量

引物探针的总量一般以 OD 来表示,合成产品 OD 测量值与定制序列 OD 值作比较,要求总量相对误差 $\leq 10\%$ 。

5.4 引物探针的相对分子质量

测得的引物探针相对分子质量(MW)与定制序列 MW 值作比较,要求相对分子质量相对误差 $\leq 0.05\%$ 。

5.5 碱基准确性(DNA 序列的一致性)

将合成的引物探针序列与定制序列进行比对,匹配度应达到 100%。

5.6 碱基缺失率

合成产品碱基缺失率应符合表 1 要求。

5.7 引物探针的纯度

引物探针纯度主要级别分为“脱盐”级、“过柱”级、PAGE 级、HPLC 级,应满足表 1 要求。

5.8 探针修饰基团的准确性

探针修饰基团定制序列应完全一致。

5.9 试验效果评估

将合成以后的引物探针进行 PCR 扩增以对其试验效果进行评估,包括特异性、效率、产物、引物二聚体带等。

6 质量检测试验方法

除非另有说明,在分析中仅使用分析纯试剂,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

6.1 外观及性状

感官判断。

6.2 合成 DNA 的总量检测

6.2.1 测定吸光度

利用紫外分光光度计测定合成 DNA 产品的 OD_{260} ,利用吸光度 A 等于 1 为 1OD 单位来计算合成 DNA 产品的总量。重复测定 3 次,结果取平均值。

6.2.2 试验方法

按照 GB/T 30988 执行。

6.3 核酸引物探针相对分子质量的检测

6.3.1 相对分子质量的直接计算

相对分子质量可根据引物探针合成单,按照式(1)直接计算。

$$MW = (A \times 313.21) + (C \times 289.18) + (G \times 329.21) + (T \times 304.19) - 61.94 \dots\dots\dots(1)$$

式中:

MW ——相对分子质量;

A、C、G、T ——各碱基对应的碱基数。

注:计算探针相对分子质量时,式(1)应加上相应的修饰基团相对分子质量。常见修饰基团相对分子质量参见表 A.1。

6.3.2 质谱测定相对分子质量

采用 ESI 源电离喷雾技术,负离子模式将样品转化为运动的带电气态离子碎片,按质核比(m/z)大小分离并记录,通过换算测得相对分子质量。HPLC 和 MS 的设备及流动相参数参见附录 B。

6.3.3 测定结果

采用 6.3.2 方法测得的相对分子质量与 6.3.1 中计算的相对分子质量相对误差应小于或等于 0.05%。

6.4 碱基准确性检测

产品序列和定制引物或定制探针序列的匹配程度,此序列由合成仪后台自动生成并验证。

6.5 碱基缺失率

通过质谱联用仪对合成的寡核苷酸序列进行测定,计算扣除目标峰以外的其他峰高占有所有峰高的比值。

6.6 引物探针的纯度检测

6.6.1 质谱法

采用 6.3.2 的方法测定,计算目标峰面积占所有峰面积比值得出纯度。

6.6.2 高效液相色谱法

采用高效液相色谱进行纯度测定,具体条件参见附录 B,计算峰面积,并与对照进行比较,得出引物探针纯度。纯度应符合表 1 的要求。

6.7 探针修饰基团的准确性

6.7.1 质谱法

采用 6.3.2 的方法测定,通过比较相对分子质量来确定是否含有定制探针的修饰基团。

6.7.2 荧光光谱法

采用荧光光谱仪,固定激发波长,并以激发波长为起始点对发射波长进行扫描(起始点至 900 nm),验证修饰基团的准确性。对应修饰基团的特征吸收峰参见表 C.1。

6.8 引物探针验证

6.8.1 总则

选择目标产品 DNA 作为阳性对照(如水稻、玉米、大豆等),以非目标产品 DNA 作为阴性对照,以灭菌去离子水为空白对照,进行 PCR 扩增(或实时荧光 PCR)试验,根据扩增结果判断试验效果。特异性验证试验应符合 GB/T 19495.1 的要求。

6.8.2 特异性和符合性判断

根据扩增图谱查看是否获得特异性条带(或是否有典型扩增曲线)。获得特异性条带(或有典型扩增曲线),即可判断产品符合要求,引物设计合理。记录格式参见表 D.1。

6.8.3 引物二聚体带

观察 PCR 扩增产物图谱未形成明显的引物二聚体带,空白对照和阴性对照未出现扩增现象,即可判断产品质量合格,引物设计合理。

6.9 样品保存

贮存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱,避免反复冻融。未稀释的干粉 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存不宜超过 1 年;稀释的母液宜小量分装, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 不宜超过半年;稀释的工作液在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 不宜超过 1 个月。

7 包装、运输、标志

7.1 包装

产品应使用 1.5 mL、2 mL 或 5 mL 的离心管分装,用 96 孔板固定,或按客户要求包装。

7.2 运输

干粉成品通过铁路、空运或快递方式常温运输。运输过程中应注意防止重压,避免日晒、雨淋,不

得与有毒有害物品同时运输。

7.3 标志

产品包装箱外使用标志按照 GB/T 191 的规定执行。

8 合成报告单

引物探针合成后应附合成报告单,或等同的指导性文件。文件内容应至少包括以下部分:

- a) 名称;
- b) 序列;
- c) 长度;
- d) 纯化方式;
- e) 修饰基团;
- f) ODs;
- g) μgs ;
- h) nmoles;
- i) %GC;
- j) TM;
- k) MW;
- l) OD per Vial;
- m) $\mu\text{gs per OD}$;
- n) nmoles per OD;
- o) 配制方法及浓度;
- p) 保存条件和有效期。

注:相关指标检测分析方法参见附录 E。

9 标签

试剂盒外包装应标示如下内容:产品名称、生产批号或生产日期、规格和数量、运输和保存温度、有效期、生产企业名称和地址。

附 录 A
(资料性附录)
修饰相对分子质量

表 A.1 常见修饰基团相对分子质量

修饰名称	相对分子质量	修饰名称	相对分子质量	修饰名称	相对分子质量
3'C6 Spacer	179.2	5' Methylene Blue	514	5' Biotin	405.4
3'C3 Spacer	138.1	5' Alexa Fluor 488	647.8	5' N3(叠氮)	289
3' ddc	273.2	5' JOE	666.4	5' BHQ2	540.5
3' inverted dT	303	5' NH2 C6	179.2	5' BHQ1	538.5
3' NH2 C6	179.2	5' AMCA	507	5' HS-SH	328.4
3' AMCA	507.8	5' Cy5	657.8	部分硫代(PS)	16.1
3' P	79.9	5' Cy3	506.6	2'-O-Methyl 碱基	14
3' Eclipse	537.9	5' Texas Red	881.5	Spacer9	212.1
3' BHQ2	556.5	5' ROX	695.8	C3 Spacer	138.1
3' BHQ1	554.5	5' TAMRA	591.6	Int Cy5 dT	633.74
3' SH C6	196.2	5' HEX	744.1	Int Cy3-G	606
3' SH C3	154.2	5' TET	675.2	Int Cy3-H	765.9
3' FE	419.2	5' 6-FAM(FITC)	537.6	Int TAMRA-dT	564.6
3' Methylene Blue	544	5' COOH(羧基)	262.2	Int 6-FAM-Dt	512.5
3' JOE	666.4	3' Biotin-TEG	569.6	Int Dig Dt	698
3' NH2 C7	209.2	3' Dabcyl	837.7	Int NH2 C6 dT	154.1
3' Cy5	687.8	3' Dabcyl-N	462.4	dSpacer	180.1
3' Cy3	644.6	3' TAMRA	1 000	Spacer18	344.3
3' Texas Red	911.5	3' TAMRA-N	621.6	C6 Spacer	179.2
3' ROX	725.8	5' CHO(醛基)	228.6	Int Biotin dT	380.5
3' HEX	774.1	5' CHCH(炔基)	160.1	2F-RNA	18
3' TET	705.2	5' Dig	722.9	5-Methyl dC	14
3' 6-FAM(FITC)	569.5	5' P	79.9	Int HS-SH	328.4
3' Dig	752.9	5' Dabcyl	430	Int BHQ1	656.4
3' Fluorescein	567.6	5' SH C6	196.2	2-Aminopurine	313
3' HS-SH	244.3	5' NH2 C12	263.3	Int FAM, Int TAMRA	1 077.1
3' Biotin	380.5	5' FE	389.2		

附录 B

(资料性附录)

HPLC 和 MS 的设备及条件

B.1 DNA 相对分子质量测定

采用 ESI 源电喷雾技术,负离子模式将样品转化为运动的带电气态离子碎片,按质核比(m/z)大小分离并记录,通过换算测得相对分子质量。条件如下:

a) 流动相配制参见表 B.1

表 B.1 流动相 A、流动相 B 配制

流动相 A(1 L)	0.075% HFIPA (750 μ L)	0.037 5% DIEA (375 μ L)	10 μ mol/L EDTA 10 mL	一级水 990 mL
流动相 B(1 L)	0.075% HFIPA (750 μ L)	0.037 5% DIEA (375 μ L)	10 μ mol/L EDTA 10 mL	ACN 800 mL 一级水 190 mL

- b) 柱温:40 $^{\circ}$ C;
 c) 色谱柱:XBridge Oligonucleotide BEH C_{18} Column, 130 \AA , 2.5 μ m, 4.6 mm \times 50 mm;
 d) 流速:0.3 mL/min;
 e) 梯度洗脱:流动相 B 从 5%到 30%,15 min;
 f) 质谱条件:采用液质联用飞行时间质谱仪(TOF);
 g) 毛细管电压:4 000 V;
 h) 雾化气压力:0.28 MPa;
 i) 雾化气温度:350 $^{\circ}$ C;
 j) 碎裂电压:150 V;
 k) 雾化气:氮气。

B.2 合成 DNA 产品纯度测定

采用高效液相色谱来进行纯度鉴定,条件如下:

- a) 色谱柱:XBridge Oligonucleotide BEH C_{18} Column, 130 \AA , 2.5 μ m, 4.6 mm \times 50 mm;
 b) 流动相 A: 0.1 mol/L TEAA; 流动相 B: 乙腈;
 c) 柱温: 60 $^{\circ}$ C;
 d) 流速:1.0 mL/min;
 e) 梯度洗脱:流动相 B 从 5%到 30%,15 min;
 f) 检测波长:260 nm。

注:色谱柱可以采用等效的 C_{18} 柱。

附 录 C
(资料性附录)
修饰基团特征吸收峰

表 C.1 修饰基团特征吸收峰一览表

修饰名称	激发波长 (EX)	发射波长 (EM)
3'TAMRA	560	582
5'ROX	578(567)	604(591)
5'HEX	535	553
5'6-FAM(FITC)	494	522
3'AMCA	345	425
3'JOE	520	548
3'NH ₂ C7	547	573
3'Cy5	649	670
3'Cy3	550	570
3'ROX	588	608
3'HEX	535	556
3'TET	521	536
3'6-FAM(FITC)	492	518
3'Fluorescein	497	519
5'Alexa Fluor 488	499	518
5'AMCA	347	444
5'Cy5	675	694
5'Cy3	581	596
5'TAMRA	548(542)	552(568)
5'TET	521	538

附录 D
(资料性附录)
引物探针验证记录格式

表 D.1 引物探针验证记录格式

名称	_____ DNA 成分检测 引物探针	规格	_____ OD	数量	_____ 套
厂商					
<p>验收参数及要求：</p> <p>空白对照 _____。</p> <p>阴性对照 _____。</p> <p>阳性对照 _____。</p>					
<p>检验依据：</p>					
<p>检验记录：</p> <p>该引物标识 _____, 外观和包装 _____。</p> <p>以 _____ DNA 为阳性对照, 以 _____ DNA 为阴性对照, 以灭菌去离子水为空白对照, 按照要求的反应体系和扩增程序进行 PCR 反应, 以验证该对引物扩增的有效性。</p> <p>其结果如下：</p> <p>阳性对照 _____, Ct 值：</p> <p>阴性对照 _____, Ct 值：</p> <p>空白对照 _____, Ct 值：</p>					
检验结论					

附 录 E
(资料性附录)

引物探针相关指标检测分析方法

E.1 Oligo DNA 质量数的计算

按照每个 OD 约等于 33 μg 来计算质量数(见示例 1)。

示例 1:

1 管 5 OD₂₆₀ 的 20 mer Oligo DNA

质量数=5×33=165 μg ;

摩尔数=165÷5 652.75=0.029 μmol =29 nmol;

若加双蒸无菌水 400 μL 溶解,则浓度为:29 nmol÷400 μL =72.5 $\mu\text{mol/L}$ 。

E.2 Oligo DNA 电泳分析

采用 7 mol/L 尿素的聚丙烯酰胺电泳和 1 倍 TBE Buffer 进行电泳。为防止加样时的扩散和二级结构的影响,样品上样前应加饱和尿素处理。

E.3 T_m 值的计算

T_m 值计算方法有以下几种:

a) 软件得出

T_m 值可以从引物评价分析软件中直接得出,如 Oligo 6 等。

b) 4(G+C)+2(A+T)法

长度在 25 mer 以下的引物, T_m 值可以按照式(E.1)计算得出:

$$T_m = 4(G + C) + 2(A + T) \dots\dots\dots (E.1)$$

c) GC 含量法

对于较长的寡聚核苷酸引物, T_m 值可以按照式(E.2)计算得出:

$$T_m = 81.5 + 16.6 \times \text{Log}_{10}[\text{Na}^+] + 0.41 \times (\%GC) - 600/\text{size} \dots\dots\dots (E.2)$$

式中:

size——引物长度。



中华人民共和国
国家标准
核酸引物探针质量技术要求
GB/T 34797—2017

*

中国标准出版社出版发行
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)

网址 www.spc.net.cn

总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238
读者服务部:(010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

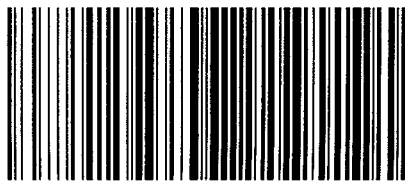
*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 24 千字
2017年11月第一版 2017年11月第一次印刷

*

书号: 155066·1-57681

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)68510107



GB/T 34797-2017