

中华人民共和国国家标准

GB/T 37873—2019

合成基因质量评价通则

General assessment of quality evaluation for synthesized genes

2019-08-30 发布

2019-08-30 实施

国家市场监督管理总局
中国国家标准化管理委员会 发布

目 次

前言	Ⅲ
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 质量要求	1
4.1 总则	1
4.2 纯度	1
4.3 总量	1
4.4 完整性	2
4.5 序列一致性	2
5 评价方法	2
5.1 样品与试剂	2
5.2 纯度检测	2
5.3 总量检测	2
5.4 完整性检测	3
5.5 序列一致性检测	3
附录 A (资料性附录) 合成基因电泳图	4
附录 B (资料性附录) 琼脂糖凝胶电泳检测方法	5

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家标准物质研究中心提出并归口。

本标准起草单位：深圳华大生命科学研究院(原深圳华大基因研究院)、中国计量科学研究院、深圳华大基因科技有限公司、青岛华大基因研究院。

本标准主要起草人：王云、王晶、沈玥、傅博强、赵宏翠、龚剑辉、陈泰、刘心、杜佳婷、谢强、牛春艳。

合成基因质量评价通则

1 范围

本标准规定了合成基因的术语和定义、质量要求、评价方法。
本标准适用于基于生物化学合成的合成基因(100 bp~20 kb)DNA 的质量评价。

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 34796—2017 水溶液中核酸的浓度和纯度检测 紫外分光光度法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

合成基因 synthesized gene

用生物化学方法,按照设定的核苷酸序列人工合成的双链 DNA。

3.2

DNA 测序 DNA sequencing

对 DNA 分子的核苷酸排列顺序的测定,也就是测定组成 DNA 分子的 A、T、G、C 的排列顺序。常用的方法有桑格-库森法和马克萨姆-吉尔伯特法等。

[JJF 1265—2010,定义 5.17]

3.3

序列比对 sequence alignment

比较两个或两个以上核苷酸或者氨基酸序列间相似性的过程。

[GB/T 29859—2013,定义 2.2.1]

4 质量要求

4.1 总则

合成基因的 DNA 序列,在符合国际基因合成联盟(IGSC)生物安全要求条件下,其质量要求,包括 DNA 纯度、总量、完整性与序列一致性。

4.2 纯度

在 pH 值为 7.0~8.5 条件下,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值在 1.8~2.0 之间,且 OD₂₆₀/OD₂₃₀ ≥ 2.0,符合 GB/T 34796—2017 中 8.3.2 的要求。

4.3 总量

合成基因 DNA 的总质量,不低于客户需求。一般不低于 1 μg。

4.4 完整性

合成基因 DNA 完整性,反映了合成基因 DNA 的降解情况。经琼脂糖凝胶电泳检测,电泳图中明亮条带大小与目标条带一致,且亮度集中程度高,明亮条带间的亮度低,表明 DNA 完整性高。

合成基因主要包括线性的合成基因片段与环状的合成基因质粒两种类型,要求如下:

- a) 合成基因片段:条带单一,无其他杂质条带;
- b) 合成基因质粒:存在目标条带且条带明亮。酶切后,存在与合成基因 DNA 大小一致的条带,参见附录 A。

4.5 序列一致性

合成基因 DNA 的测序序列与设定序列完全匹配。

5 评价方法

5.1 样品与试剂

5.1.1 样品

基于生物化学合成的合成基因样品,应于-20℃贮存。

5.1.2 试剂

实验室使用的试剂为不含 DNA 酶的分析纯化学试剂或生化试剂。实验室配制的试剂应有明晰标识,包括试剂名称、浓度、配制时间等。

5.2 纯度检测

采用分光光度法测定合成基因 DNA 的 OD_{260} 、 OD_{280} 、 OD_{230} 。 OD_{260} 测量值范围应为 0.05~1.0;当不在此范围时,应对合成基因 DNA 溶液进行稀释或浓缩,以达到检测值范围。

首先用溶解合成基因样品相同的缓冲液(如去离子水、TE 缓冲液)校正紫外分光光度计,分别在 230 nm、260 nm 和 280 nm 波长下调零。取 2 μ L 样品,测定 230 nm、260 nm 和 280 nm 波长下吸光值。根据测量值计算 260 nm 光密度与 280 nm 光密度的比值(OD_{260}/OD_{280})和 260 nm 光密度与 230 nm 光密度的比值(OD_{260}/OD_{230})。

在分光光度纯度分析中,核酸在 260 nm 处达到最大吸收峰,蛋白质、其他多糖杂质分别在 280 nm 和 230 nm 处有最大吸收峰,根据 OD_{260}/OD_{280} 和 OD_{260}/OD_{230} 的值估计 DNA 样品的纯度。高纯度 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 值为 1.8~2.0, OD_{260}/OD_{230} 大于或等于 2。

5.3 总量检测

根据分光光度计测得的 OD_{260} ,按照式(1)计算样本中 DNA 的质量浓度(ρ),按照式(2)计算样本中 DNA 总质量(m)。

$$\rho = OD_{260} \times N \times F \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

ρ ——DNA 的质量浓度,单位为微克每毫升(μ g/mL);

N ——样本稀释倍数;

F ——转换因子,双链 DNA 转换因子为 50 μ g/mL。

$$m = \rho \times V \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中：

m ——DNA 总质量,单位为微克(μg)；

ρ ——DNA 的质量浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$)；

V ——样本体积,单位为毫升(mL)。

5.4 完整性检测

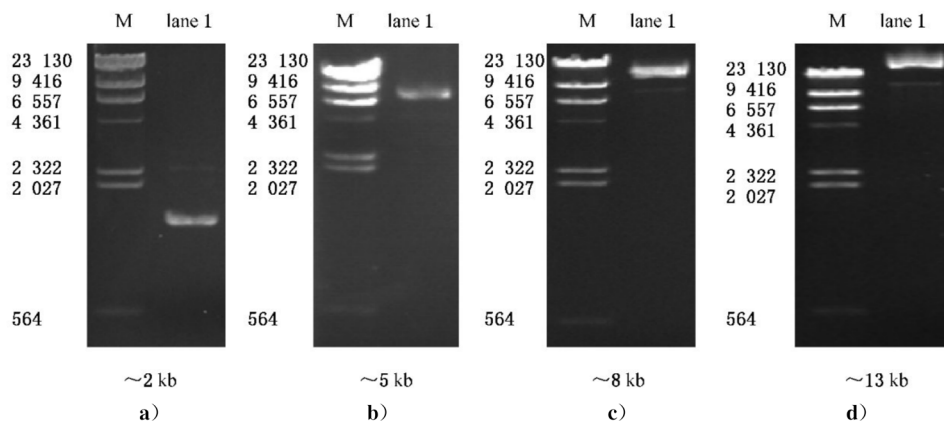
对合成基因 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳,并使用凝胶成像系统进行结果分析,参见附录 B。利用限制性核酸内切酶对合成基因 DNA 进行酶切鉴定。

5.5 序列一致性检测

对合成基因 DNA 样品进行测序分析,得到合成基因的序列信息,并与设定序列进行序列比对,形成测序结果比对图。

附录 A
(资料性附录)
合成基因电泳图

合成基因电泳图见图 A.1~图 A.2。

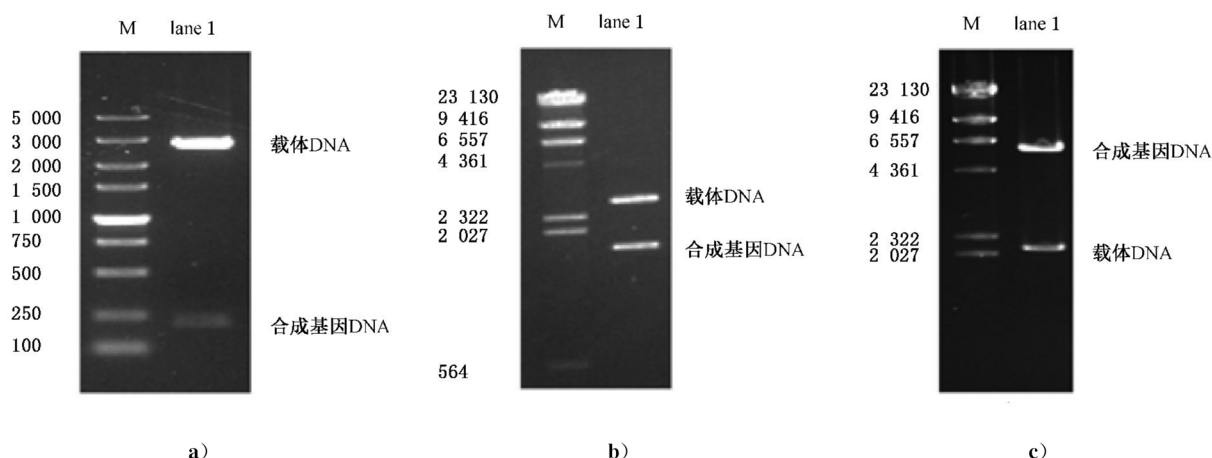


图中所示为不同长度质粒 DNA 的电泳图,其中 a)图中 lane1 样品为载有~2 kb 长度合成基因的质粒 DNA;b)图中 lane1 样品为载有~5 kb 长度合成基因的质粒 DNA;c)图中 lane1 样品为载有~8 kb 长度合成基因的质粒 DNA;d)图中 lane1 样品为载有~13 kb 长度合成基因的质粒 DNA。图中的“M”表示 Lambda DNA/HindIII Marker。

注:在质粒提取过程中,由于机械力、酸碱度、试剂等原因,可能使质粒 DNA 链发生断裂,所提取的质粒通常呈现三种构型,包括超螺旋质粒 DNA、线性质粒 DNA、开环质粒 DNA。

- a) 图中明亮的条带为超螺旋质粒 DNA,较暗条带为开环质粒 DNA;
- b) 图中明亮条带为开环质粒 DNA;
- c) 和 d)图中明亮条带为开环质粒 DNA,较暗条带为线性质粒 DNA。

图 A.1 质粒 DNA 电泳图(1%琼脂糖凝胶)



图中所示为载有不同长度合成基因的质粒酶切电泳图,其中 a)图中 lane1 样品为合成基因 DNA 长约 246 bp,载体 DNA 长约 3.1 kb 的质粒酶切 DNA;b)图中 lane1 样品为合成基因 DNA 长约 1.7 kb,载体 DNA 长约 2.7 kb 的质粒酶切 DNA;c)图中 lane1 样品为合成基因 DNA 长约 6.1 kb,载体 DNA 长约 2.1 kb 的质粒酶切 DNA。图中的“M”表示 DNA Marker,其中 a)图中为 250bp-II DNA ladder,b),c)图中为 Lambda DNA/HindIII Marker。

图 A.2 合成基因酶切电泳图(1%琼脂糖凝胶)

附录 B

(资料性附录)

琼脂糖凝胶电泳检测方法

B.1 凝胶制备

B.1.1 琼脂糖凝胶配制

按表 B.1 选择凝胶浓度,计算后称取相应质量的琼脂糖,放入锥形瓶中,加入适量的 $1\times$ TAE 电泳缓冲液。置于微波炉中加热至完全溶化,加入核酸染料(如溴化乙锭等)。水平放置托盘于制胶模具内,在一端插好梳子,缓慢倒入已冷至 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右的胶液,使之形成均匀水平的胶面。

凝胶凝固后,缓慢拔起梳子,放进电泳槽内,使加样孔端置于阴极端。在槽内加入 $1\times$ TAE 电泳缓冲液直至液面覆盖过胶面。

表 B.1 琼脂糖凝胶电泳分离范围

琼脂糖凝胶浓度/%	可分辨的线性 DNA 大小范围/kb
0.4	5~60
0.7	0.8~10
1.0	0.4~6
1.5	0.2~4
1.75	0.2~3
2.0	0.1~3

B.1.2 凝胶孔加样

把待检测样品,按以下量混匀,用移液枪加至凝胶的加样孔中。 $1\text{ }\mu\text{L}$ 加样缓冲液($6\times$) + $5\text{ }\mu\text{L}$ 待测 DNA 样品(总量 $100\text{ ng}\sim 500\text{ ng}$)。

B.2 凝胶电泳

接通电泳仪和电泳槽并接通电源,调节稳压输出,电压最高不超过 5 V/cm ,开始电泳。点样端放阴极端。当溴酚蓝移动至距胶板前沿约 1 cm 处,即可停止电泳。

B.3 电泳成像

将凝胶放在凝胶成像系统内的样品台,关上样品室外门,打开程序,调整清晰度等参数,拍照留存。

B.4 结果分析

利用凝胶成像系统软件分析目标 DNA 条带大小,并判断区分合成基因条带。

中 华 人 民 共 和 国

国 家 标 准

合成基因质量评价通则

GB/T 37873—2019

*

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.org.cn

服务热线: 400-168-0010

2019年7月第一版

*

书号: 155066 · 1-62714

版权专有 侵权必究



GB/T 37873-2019