

ICS 03.120

G 30

DB44

广东省地方标准

DB 44/T 1926—2016

合成基因 质量要求

Quality requirements for synthetic gene

2016-12-02 发布

2017-03-02 实施

广东省质量技术监督局 发布

目 次

目次	I
前言	II
合成基因 质量要求	1
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语、定义和缩略语	1
3.1 术语和定义	1
3.2 缩略语	2
4 质量评价要求	2
4.1 质量等级划分	2
4.2 合成 DNA 的纯度和总量	3
4.3 合成 DNA 完整性	3
4.4 DNA 序列的一致性	3
5 质量检测试验方法	3
5.1 合成 DNA 的纯度和总量检测	3
5.2 合成 DNA 完整性检测	4
5.3 测序	4
5.4 样品保存要求	4
5.5 检测环境要求	4
5.6 试剂要求	4
6 合成 DNA 检测报告	4
6.1 检测报告内容	5
6.2 结果描述	5
7 废弃物处理及防止交叉污染的措施	5
附 录 A（资料性附录） 电泳图谱	6
附 录 B（资料性附录） DNA 分离范围	8
附 录 C（资料性附录） 合成的 DNA 检测报告	9

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准由广东省质量技术监督局提出并归口。

本标准起草单位：深圳华大基因科技有限公司、广东省标准化研究院、广东产品质量监督检验研究院、深圳华大基因研究院。

本标准主要起草人：沈玥、胡葳、王娟、陈泰、王云、赵宏翠、谭嘉力、谢强、宋祚锬、杜佳婷、李倩一。

合成基因 质量要求

1 范围

本标准规定了合成基因产品的质量要求、质量检测试验方法及合成的DNA检测报告。
本标准适用于合成基因产品质量评价及其检测程序。

2 规范性引用文件

下列文件中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 19495.1 转基因产品检测 通用要求和定义
GB/T 19495.2 转基因产品检测 实验室技术要求
GB/T 19495.3 转基因产品检测 核酸提取纯化方法
YY/T 0087 电泳装置
YY/T 0657 医用离心机
JB/T 6777 紫外可见分光光度计

3 术语、定义和缩略语

标准GB/T 19495.1中界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1 术语和定义

3.1.1

定制序列 Custom sequence

客户提供的DNA序列及合成要求等信息。

3.1.2

OD_{260}/OD_{280}

260 nm处光密度与280 nm处光密度的比值。

注：在分光光度测定分析中，根据 OD_{260}/OD_{280} 的值可以估计DNA的纯度。

3.1.3

OD_{260}/OD_{230}

260 nm处光密度与230 nm处光密度的比值。

注：在分光光度测定分析中， OD_{230} 代表其他杂质（多糖等）的光密度。DNA纯品的 OD_{260}/OD_{230} 应大于或等于2。

3.1.4

质粒 plasmid

细菌细胞内一种自我复制的环状双链DNA分子。

注1：参见JJF 1265-2010。

注2：能稳定地独立存在于染色体外，并传递到子代，一般不整合到宿主染色体上。

3.1.5

琼脂糖凝胶电泳 agarose gel electrophoresis

一种简便高效的分离和纯化DNA片断的方法。

注1：参见 SN/T 2497.21-2010。

注2：由于 DNA 分子的双螺旋骨架两侧带有含负电荷的磷酸根残基，因此在电场中向正极移动。在一定的电场强度下，DNA 分子的迁移速度取决于分子筛效应。具有不同的相对分子质量的 DNA 泳动速度不一样，因而可依据 DNA 分子的大小来使其分离。在电泳过程中可以通过示踪染料或相对分子质量标准参照物和样品一起进行电泳而得到检测。

3.1.6

限制性核酸内切酶 restriction endonuclease

可以切割双链DNA序列的一类核酸酶。

3.1.7

DNA测序 DNA sequencing

分析特定DNA片段的碱基序列，即腺嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶与鸟嘌呤的排列方式的技术。

3.1.8

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技术。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

EB (Ethidium Bromide) ——溴化乙啶

OD (Optical Density) ——光密度

DNA (Deoxyribonucleic acid) ——脱氧核糖核酸

4 质量评价要求

4.1 质量等级划分

产品质量等级划分见表1：

表1 产品质量等级划分

检测产品种类	等级	指标
质粒 DNA 或合成的 DNA 片段	优	符合 4.2、4.3、4.4 要求
	合格	符合 4.2、4.4 要求

	不合格	不符合 4.2 或 4.4 要求
甘油菌液	合格	符合 4.4 要求
	不合格	不符合 4.4 要求

4.2 合成 DNA 的纯度和总量

4.2.1 合成的 DNA 纯度要求

样品溶解在 TE 溶液 (pH7~8.5) 中, OD_{260}/OD_{280} 的比值应在 1.8~2.0 之间, $OD_{260}/OD_{230} \geq 2.0$ 。表 2 所示为合成的 DNA 纯度要求。

表 2 DNA 纯度判断

结论	指标
纯度合格	$OD_{260}/OD_{280} = 1.8 \sim 2.0$; $OD_{260}/OD_{230} \geq 2.0$
纯度不合格	$OD_{260}/OD_{280} < 1.8$ 或 > 2.0 或 $OD_{260}/OD_{230} < 2.0$

4.2.2 DNA 总量要求

DNA 总量需大于或等于定制需求。

4.3 合成 DNA 完整性

合成 DNA 完整性判断, 采用 5.2 所规定的检测方法进行。根据产品形式上的差异, 需检测的合成 DNA 产品应分为两类, 相关要求如下:

——合成的 DNA 片段: 要求电泳图中条带单一, 无其他杂质污染;

——包含有合成 DNA 产品的质粒: 要求电泳图中应存在目标条带且条带明亮, 参考图谱参见附录 A。

质粒酶切检验后的电泳图谱中, 依据 DNA Marker 指示判断, 出现与合成的 DNA 产品大小一致的条带, 可参见附录 A 中质粒酶切电泳图。

4.4 DNA 序列的一致性

合成 DNA 序列与定制序列匹配度应达到 100%。

5 质量检测试验方法

5.1 合成 DNA 的纯度和总量检测

5.1.1 合成 DNA 的纯度检测须符合 GB/T 19495.3 要求, 为保证 OD_{260} 测量值有效性, 其测量值范围应为 0.05~1.0。如果不在此范围, 应对合成 DNA 进行适当的稀释或浓缩。

5.1.2 利用紫外分光光度计测定合成 DNA 产品的 OD_{260} 、 OD_{280} 、 OD_{230} 。计算 DNA 总量、判定 DNA 纯度即 OD_{260}/OD_{280} 、 OD_{260}/OD_{230} 的比值。

5.1.3 DNA 总量计算方法: 按照式 (1) 计算原溶液中 DNA 的浓度, 按照式 (2) 计算原溶液中 DNA 总量。

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

式中：

c —原溶液的DNA浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）；

N —样品稀释倍数；

F —转换因子，在标准厚度为1cm的比色杯中，双链DNA，当 $OD_{260}=1$ 时，测得的DNA浓度相当于 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

$$m = c \times v \dots\dots\dots (2)$$

式中：

m —合成的DNA产品原溶液总量，单位微克（ μg ）；

c —原溶液的DNA浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）；

v —原溶液体积，单位为毫升（ ml ）。

5.2 合成 DNA 完整性检测

5.2.1 合成 DNA 产品凝胶电泳检测

配制相应浓度的凝胶，对合成DNA产品进行琼脂糖凝胶电泳（参见附录B），并使用凝胶成像系统进行结果分析。

5.2.2 合成 DNA 产品酶切检测

利用限制性核酸内切酶对合成DNA产品进行酶切鉴定。

5.3 测序

对合成DNA产品进行测序分析，得到合成DNA产品的序列信息，并与定制序列进行序列比对，形成测序结果比对图。

5.4 样品保存要求

质粒DNA或合成的DNA片段应于 -20°C 贮存，菌液加入甘油（终浓度为15-25%）后应于 -80°C 贮存。

5.5 检测环境要求

实验室的设施和环境要求应符合GB/T 19495.2中的规定。实验室通用离心机应符合YY/T 0657的要求。紫外分光光度计应符合JB/T 6777的要求。垂直电泳槽及电泳仪应符合YY/T 0087的要求。

5.6 试剂要求

5.6.1 试剂除另有规定外，所有实验室使用的试剂等级应为不含DNA酶的分析纯或生化试剂。

5.6.2 商品试剂盒应注明到货日期，对所收到的试剂盒应按规定的贮存条件存放。

5.6.3 实验室配制的试剂应在容器上标明试剂名称、浓度、配制时间。除不宜高压灭菌的试剂应过滤（ $0.22\mu\text{m}$ ）除菌外，其他试剂溶液宜高压灭菌保存；DNA、酶溶液应避免反复冻融。

5.6.4 实验用水应符合GB/T 6682的要求。

6 合成 DNA 检测报告

6.1 检测报告内容

检测报告应包括下列信息，参考模版参见附录C：

- 检测机构名称、联系方式和地址、检测员和检测时间；
- 合成DNA名称、长度、克隆载体名称、酶切位点信息；
- 产品质量及等级，包括DNA完整性及纯度、总量、电泳图、测序结果比对图。

6.2 结果描述

6.2.1 优质产品

合成DNA片段的纯度和总量、完整性皆符合要求，与定制序列的匹配度100%，其产品质量等级为优。

6.2.2 合格产品

合成DNA片段的纯度和总量符合要求，与定制序列的匹配度100%，但样品轻微降解，其产品质量等级为合格。

6.2.3 不合格产品

合成DNA片段与定制序列的匹配度未达到100%，或其纯度和总量不符合要求，为不合格产品。

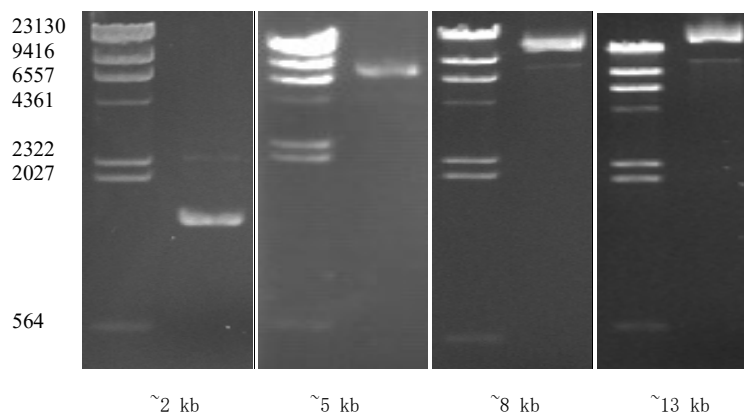
7 废弃物处理及防止交叉污染的措施

检测试验过程中产生的废弃物处理方式和防止交叉污染的措施应符合GB/T 19495.2的规定。

附录 A
(资料性附录)
电泳图谱

A.1 质粒DNA电泳图谱

质粒DNA电泳图谱（1%琼脂糖凝胶）见图A.1:



注：在质粒提取过程中，由于机械力、酸碱度、试剂等原因，可能使少量质粒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。

注：左一图中明亮的条带为超螺旋质粒DNA，较暗条带为开环质粒DNA；

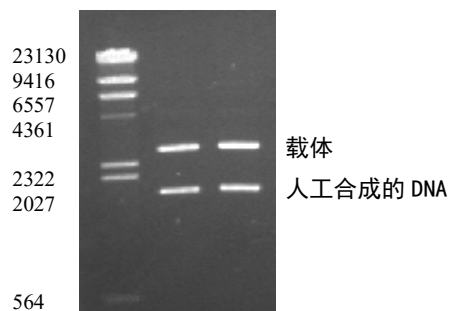
注：左二图中明亮条带为开环质粒DNA；

注：左三和左四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 电泳图谱（1%琼脂糖凝胶）

A.2 合成的DNA酶切电泳图谱

合成的 DNA 酶切电泳图谱（1%琼脂糖凝胶电泳）见图 A.2:

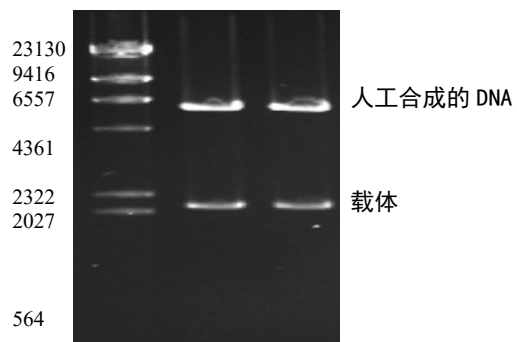


注：人工合成的DNA长约1.7kb，载体长约2.7kb。

图 A.2 合成的 DNA 酶切电泳图谱（1%琼脂糖凝胶电泳）

A.3 合成的DNA酶切电泳图谱

合成的DNA酶切电泳图谱（1%琼脂糖凝胶电泳）见图A.3:



注：人工合成的DNA长约6.1kb, 载体长约2.1kb。

图 A.3 合成的 DNA 酶切电泳图谱（1%琼脂糖凝胶电泳）

附 录 B
(资料性附录)
DNA 分离范围

DNA分离范围宜按表B.1规定的范围进行分离：

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

附 录 C
(资料性附录)
合成的 DNA 检测报告

合成的 DNA 检测报告可按如下格式进行编制：

合成的 DNA 检测报告		
检测机构： _____		
联系方式： _____		
地址： _____		
检验人： _____		
检测时间： _____		
产品检测报告		
产品名称： _____		长度： _____
克隆载体： _____		
检测项目	结果	标准要求
测序	一致性 _____ %	与定制序列一致性 100%
DNA 完整性	_____	电泳图谱中含有单一的合成 DNA 条带
DNA 纯度和总量	$OD_{260}/OD_{280} = \underline{\hspace{2cm}}$, $OD_{260}/OD_{230} = \underline{\hspace{2cm}}$, 总量 = _____ 。	纯度 $OD_{260}/OD_{280} = 1.8 \sim 2.0$, $OD_{260}/OD_{230} \geq 2.0$; 总量满足定制需求。
检测结果： _____		
DNA 电泳图		
DNA 测序结果比对图		