

中华人民共和国国内贸易行业标准

SB/T 10923—2012

肉及肉制品中动物源性成分的测定 实时荧光 PCR 法

Identification of animal derived materials in meat and meat products

Real-time PCR method

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

(报批稿)

(本稿完成日期：2012 年 12 月 20 日)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中华人民共和国商务部

发布

目 次

前言	III
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	1
4 原理	2
5 试剂和材料	2
6 仪器和设备	3
7 样品制备	3
8 检验步骤	3
9 结果判定	5
10 测定下限	5
11 防止污染的措施	5
附录 A (资料性附录) DNA 提取裂解液配制	6
附录 B (资料性附录) 检测用引物及探针序列	7
附录 C (资料性附录) 检测靶基因参考序列	8

前 言

本标准的附录A为资料性附录。

本标准按照GB/T 1.1-2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国商务部提出并归口。

本标准起草单位： 商务部流通产业促进中心。

本标准主要起草人： 郑志明、郝瑞颖、张新玲、李乐、刘华琳、赵箭。

本标准系首次发布的国内贸易行业标准。

肉及肉制品中动物源性成分的测定 实时荧光 PCR 法

1 范围

本标准规定了肉及肉制品中猪、牛、羊、马、驴、鸡、鸭、鹅和兔源性成分的实时荧光PCR检测方法。

本标准适用于肉及肉制品中猪、牛、羊、马、驴、鸡、鸭、鹅、兔源性成分的定性检测。

注：本标准中“肉及肉制品”主要指鲜（冻）肌肉组织或经过初步加工的鲜（冻）生肉制品。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本标准。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

SN/T 1193 基因检测实验室技术要求

GB/T 21103-2007 动物源性饲料中哺乳动物源性成分定性检测方法 实时荧光PCR方法

3 术语、定义和缩略语

3.1 术语和定义

3.1.1

实时荧光 PCR real-time PCR

实时荧光聚合酶链式反应。

3.1.2

Ct 值 cycle threshold value

每个实时荧光PCR反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。

3.2 缩略语

3.2.1

DNA, deoxyribonucleic acid

脱氧核糖核酸

3.2.2

FAM, carboxyfluorescein

羧基荧光素

3.2.3

TAMRA, carboxy tetramethyl rhodamine
羧基四甲基罗丹明

3.2.4

Cytb, cytochrome oxidase subunit b
细胞色素氧化酶亚单位b

3.2.5

ROX, carboxy-X-rhodamine
羧基-X-罗丹明

3.2.6

CTAB, hexadecyltrimethyl ammonium bromide
十六烷基三甲基溴化铵

3.2.7

Tris, tris (hydroxymethyl) aminomethane
三(羟甲基)氨基甲烷

3.2.8

EDTA, ethylene diaminetetraacetic acid
乙二胺四乙酸

4 原理

采用TaqMan实时荧光PCR技术,根据线粒体DNA的细胞色素氧化酶b亚基(*Cyt b*)基因上畜禽各物种间序列差异而进行动物源性成分的检测。以GenBank上公布的猪(X56295)、牛(GU249568.1)、羊(AF010406)、马(JF511458.1)、驴(JF718884.1)、鸡(X52392)、鸭(EU755252)、鹅(AY552163.1)、兔(AJ001588)的*Cyt b*基因序列为模板,设计并合成各自的特异性引物对及探针;利用裂解液破碎细胞,三氯甲烷抽提去除蛋白质,异丙醇沉淀得到DNA;以提取的DNA为模板,分别使用各物种的特异性引物对及探针进行实时荧光PCR扩增,并通过标记报告基因羧基荧光素(FAM)、淬灭基因羧基四甲基罗丹明(TAMRA)的探针进行特异性杂交。根据实时荧光PCR的扩增曲线和Ct值,对肉及肉制品中的动物源性成分进行检测。

5 试剂和材料

试剂的配制及试验中的操作规范应按GB/T 27403-2008和SN/T 1193的规定执行。

除另有规定外,试剂应为分析纯,实验用水应符合GB/T 6682的要求。

DNA提取裂解液的配制方法可参考附录A的介绍。

引物及探针序列参考附录B,检测靶基因序列参考附录C。

5.1 液氮。

5.2 DNA 提取试剂:

1%CTAB, 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.7 mol/L NaCl, 0.01 mol/L EDTA (pH 8.0), 苯酚, 三氯甲烷, 异戊醇, 无水乙醇, 70%乙醇, 醋酸钠, TE缓冲液 (Tris-HCl、EDTA缓冲液): 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1 mol/L EDTA (pH 8.0)。

5.3 TaqMan 通用 PCR 扩增预混试剂

6 仪器和设备

6.1 电子天平

量程 2 kg, 感量 0.1 g; 量程 100 g, 感量 0.001 g。

6.2 组织捣碎机。

6.3 研钵 (应在 160 °C 烘烤 2 h)。

6.4 恒温水浴锅。

6.5 台式冷冻离心机

离心力 12000 g。

6.6 微量移液器

量程分别为 0.1 μL~2.5 μL、0.5 μL~10 μL、10 μL~100 μL、50 μL~200 μL。

6.7 pH 计。

6.8 核酸蛋白分析仪。

6.9 实时荧光 PCR 检测系统。

6.10 实时荧光 PCR 反应管 (光学)。

6.11 易耗性耗材

应一次性使用, 其他不宜烘烤或高压处理的器皿可使用 1%次氯酸钠溶液浸泡 6 h 后用蒸馏水冲洗干净, 去除残留氯。

7 样品制备

7.1 在样品粉碎区进行样品的制备。

7.2 取样应同批多点采取肌肉组织, 样品均质后, 按照 8.1 的方法提取 DNA。

注: 采样过程应快速完成, 将采取样品迅速放入组织捣碎机中均质成糜状。取 0.1 g 均质样品, 放入研钵中, 加入液氮, 待样品冷冻完全后快速、用力研磨至粉末状。研磨时应间断加入液氮以防止材料融化。

8 检验步骤

检验过程中，参照《GB/T 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测》的规定进行。

8.1 样品的总 DNA 提取

- a) 在样品制备区进行，同时设立质控对照，阳性对照和样品分别用同样方法提取 DNA。
- b) 将研钵内研磨物转移到 1.5 mL 离心管中，加入 700 μL DNA 提取裂解液，置于 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 3 h，期间不时振荡混匀；
- c) 12000 r/min 离心 5 min，取上清至新的 1.5 mL 离心管内；
- d) 加入等体积苯酚，充分混匀后，12000 r/min 离心 5 min；
- e) 取上清，加等体积三氯甲烷与异戊醇的混合溶液（三氯甲烷:异戊醇的体积比为 24:1），充分混匀，12000 r/min 离心 5 min；
- f) 取上清，加入 1/10 体积的 3 mol/L 醋酸钠溶液，混匀后再加入 2 倍体积预冷的无水乙醇，-20 $^{\circ}\text{C}$ 静置 1 h，12 000 r/min 离心 5 min，弃去上清；
- g) 用 70% 乙醇洗涤二次，超净台内室温下晾干，加入 50 μL TE 缓冲液溶解沉淀；
- h) 运用核酸蛋白分析仪对提取的 DNA 进行测定，OD260 /OD280 在 1.8-2.0 之间，浓度在 10-100 ng/ μL 时，适宜于实时荧光 PCR 扩增。

注：也可用等效的商品化试剂盒提取组织DNA。

8.2 实时荧光 PCR 检测

8.2.1 扩增试剂准备

在扩增区进行扩增试剂准备，在冰盒中配制如下反应体系。每个样品测试反应体系配制如下（20 μL 反应体系）：

Master Mix (2 \times)	10.0 μL
上游引物FP (900 nM)	2.0 μL
下游引物RP (900 nM)	2.0 μL
探针Probe (250 nM)	2.0 μL
模板DNA Template (10-100 ng)	1.2 μL
无菌双蒸水	2.8 μL

向每个实时荧光PCR反应管中加入以上反应混合液，转移至样品制备区。

注：阳性对照用相应成分样品的DNA作为模板，阴性对照用不含相应成分样品的DNA作为模板，空白对照用等体积去离子水作为模板。

8.2.2 加样

在样品制备区进行加样。

在各设定的实时荧光PCR反应管中分别加入制备好的模板DNA溶液，盖紧管后混匀，3000 r/min离心 5 s~10 s。

8.2.3 实时荧光 PCR 检测

在检测区进行实时荧光PCR检测。

- a) 将 8.2.2 中离心后的实时荧光 PCR 反应管放入实时荧光 PCR 检测系统内，记录样本摆放顺序。
- b) 实时荧光 PCR 反应条件随仪器不同略有改变，一般为：50 $^{\circ}\text{C}$ 2min \rightarrow 95 $^{\circ}\text{C}$ 10min \rightarrow 40 \times (95 $^{\circ}\text{C}$ 15s \rightarrow 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min) 收集荧光。
- c) 检测结束后，根据扩增曲线和 Ct 值判定结果。

8.2.4 质控标准

- a) 检验过程中应设立阳性对照、阴性对照和空白对照。阳性对照用相应组织的 DNA 作为模板，用不含相应成分样品的 DNA 作为阴性对照，用等体积去离子水作为模板空白对照。
- b) 样品设 3 个重复，对照设 2 个重复，以 Ct 值的平均值作为最终结果。

9 结果判定

9.1 结果分析条件设定

直接读取检测结果。阈值设定原则根据仪器噪声情况进行调整。

9.2 结果判定与表述

9.2.1 结果的判定

9.2.1.1 有效性原则

- a) 空白对照：无 FAM 荧光信号检出或 Ct 值 ≥ 35.0 ，未出现典型的扩增曲线。
- b) 阴性对照：无 FAM 荧光信号检出或 Ct 值 ≥ 35.0 ，未出现典型的扩增曲线。
- c) 阳性对照：有 FAM 荧光信号检出，并出现典型的扩增曲线，Ct 值 < 30.0 。
- d) 以上应同时满足，否则本次实验无效。

9.2.1.2 样品

- a) 当猪、牛、羊、马、驴、鸡、鸭、鹅、兔源性成分检测体系的 Ct 值 < 30.0 时，有 FAM 荧光信号检出，并出现典型的扩增曲线，判断样品为阳性。
- b) 当 $30.0 \leq \text{Ct 值} \leq 35.0$ 时，且有典型的扩增曲线时，则需重复实验。再次扩增后检测体系的 Ct 值仍 ≤ 35.0 ，且有典型的扩增曲线，则判定该样品含有相应的动物源性成分。当再次扩增后，检测体系 Ct 值 > 35.0 ，或无典型的扩增曲线，则判定该样品不含相应的动物源性成分。

9.2.2 结果的表述

阳性结果表述为“检出猪、牛、羊、马、驴、鸡、鸭、鹅、兔源性成分”。

阴性结果表述为“未检出猪、牛、羊、马、驴、鸡、鸭、鹅、兔源性成分”。

10 测定下限

在上述条件下，本方法对牛肉中掺杂猪肉、羊肉中掺杂猪肉、牛肉中掺杂鸭肉、羊肉中掺杂鸭肉、驴肉中掺杂猪肉、驴肉中掺杂鸭肉的测定下限为 0.5% (m/m)。

11 防止污染的措施

检验过程中应严格防止交叉污染，防止交叉污染的措施按照 SN/T 1193 执行。

附 录 A
(资料性附录)
DNA 提取裂解液配制

A. 1 DNA提取裂解液

A. 1.1 成分

1% (W/V) CTAB, 十六烷基三甲基溴化铵
0.05 mol/L Tris, 三(羟甲基)氨基甲烷
0.7 mol/L NaCl
0.01 mol/L Na₂EDTA, 乙二胺四乙酸二钠。

A. 1.2 配制

称量CTAB 10 g, Tris 6.1 g, NaCl 41 g, Na₂EDTA 3.7 g 置于1 L烧杯中, 加入去离子水约 800 mL, 充分搅拌混匀, 加去离子水定容至1 L后, 室温保存。

附录 B
(资料性附录)
检测用引物及探针序列

畜禽种类	引物、探针序列	Tm 值 ℃	参考基因 序列号	扩增位置及 预期大小
猪 Porcine	FP: CGACAAAGCAACCCTCACAC	59	X56295	509-579 bp 71 bp
	RP: TGCGAGGGCGGTAATGAT	58		
	Probe: FAM-CTTCGCCTTCCACTTTATCCTGCCATTC-TAMRA	68		
牛 Bovine	FP: CTCCTCGGAGACCCAGATAAC	59	GU249568. 1	744-822 bp 79 bp
	RP: AGAAGTATCACTCGGGTTTG	59		
	Probe: FAM-CCAGCCAATCCACTCAACACACCC -TAMRA	70		
羊 Sheep	FP: CAGCCCTCGCCATAGTTCAC	59	AF010406	569-666 bp 98 bp
	RP: AGGGTGGAAGGGAATTTTATCTG	58		
	Probe: TCTTCCTCCACGAAACAGGATCCAACA	68		
马 Horse	FP: CCAATGCGTATTCTGACTCTTAGTG	59	JF511458.1	962-105 bp 81 bp
	RP: CGATAATTACGTATGGGTGTTCC	58		
	Probe: FAM-CTGACACTAACATGAATCGGCGGACAGC-TAMRA	68		
驴 Donkey	FP: CCTCAGCACTCCCCCTCAT	60	JF718884.1	782-869 bp 87 bp
	RP: AAGGATAAGGGCTAATACACCA	59		
	Probe: FAM-CCAGAATGGTATTTCTATTTGCTTACGCC-TAMRA	69		
鸡 chicken	FP: CGACAACCCAACCCTTACC	59	X52392	512-601 bp 89 bp
	RP: AGGAAGGTGAGGTGGATGATA	59		
	Probe: FAM- ACACTTCCTCCTCCCCTTTGCAATCGC-TAMRA	69		

123-239 bp 85 bp	鸭 Duck	FP: GGGCAGACAGAAATCGCTGACAG RP: TCTCTCTTGGCTTGTGAGSAGAA Probe: FAM-CCTACTGGGTATGCACTACAGGGGAGAC-TAMRA	59 59 69	X56295	509-579 bp 71 bp
512-588 bp 77 bp	鹅 Geese	FP: AGACAATCCAACCTTAACCEGA RP: GGACTAGGGTGATTECTGCA Probe: FAM-CCAATCCACTTCCACTGCCCTTCTTA-TAMRA	59 58 68	AY552163. 1	512-601 bp 89 bp
978-1058 bp 73 bp	兔 Rabbit	FP: GTTCTCGTCGCAGATCTTCTCA RP: TAGTTGTCCAATGGTGATGAAC Probe: FAM-CACTCACATGAATCGGAGGCCAACCAGTA-TAMRA	58 58 68	AJ001588	962-105 bp 81 bp

附 录 C
(资料性附录)
检测靶基因参考序列

C.1 猪源性成分的实时荧光PCR扩增产物序列

cgacaaagcaaccctcacacgattcttctgcttccactttatcctgccattcatcattaccgccctcgcag

C.2 牛源性成分的实时荧光PCR扩增产物序列

ctcctcggagaccagataactacaccccagccaatccactcaacacaccccctcacatcaaaccgagtgatacttct

C.3 羊源性成分的实时荧光PCR扩增产物序列

cagccctgccatagttcacctacttctcctccacgaaacaggatccaacaaccccacaggaattccatcggacacagataaaat
tccttccacct

C.4 马源性成分的实时荧光PCR扩增产物序列

ccaatgcgtattctgactcttagtggcagacttactgacactaacatgaatcggcggacagccagtggaacaccatacgttaatt
atcg

C.5 驴源性成分的实时荧光PCR扩增产物序列

cctcagcactccccctcatattaagccagaatggtatttctatttgcttacgccatcctacgtccattcccaacaaactaggt
ggtgtattagccc ttatcctt

C.6 鸡源性成分的实时荧光PCR扩增产物序列

cgacaaccaacccttaccggattcttctgctttacacttctcctcccccttgcaatcgcaggtattactatcatccacctcacc
ttcct

C.7 鸭源性成分的实时荧光PCR扩增产物序列

ggccacacaaatcctcacaggcctcctactggctatgcactacaccgcagacacatcccttgctttctcctcagtagccaacaca

C.8 鹅源性成分的实时荧光PCR扩增产物序列

agacaatc caacctaac cggattcttctgcatcact tctactgcc ctctctaatt gcaggaatca ccctagtcc

C.9 兔源性成分的实时荧光PCR扩增产物序列

附 录 C
(资料性附录)
检测靶基因参考序列

C.1 猪源性成分的实时荧光PCR扩增产物序列

cgacaaagcaaccctcacacgattcttctgcttccactttatcctgccattcatcattaccgccctcgcag

C.2 牛源性成分的实时荧光PCR扩增产物序列

ctcctcggagaccagataactacaccccagccaatccactcaacacaccccctcacatcaaaccgagtgatacttct

C.3 羊源性成分的实时荧光PCR扩增产物序列

cagccctgccatagttcacctacttctcctccacgaaacaggatccaacaaccccacaggaattccatcggacacagataaaat
tccttccaccct

C.4 马源性成分的实时荧光PCR扩增产物序列

ccaatgcgtattctgactcttagtggcagacttactgacactaacatgaatcggcggacagccagtggaacaccatacgttaatt
atcg

C.5 驴源性成分的实时荧光PCR扩增产物序列

cctcagcactccccctcatattaagccagaatggtatttctatttgcttacgccatcctacgtccattcccaacaaactaggt
ggtgtattagccc ttatcctt

C.6 鸡源性成分的实时荧光PCR扩增产物序列

cgacaaccaacccttaccggattcttctgctttacacttctcctcccccttgcaatcgcaggtattactatcatccacctcacc
ttcct

C.7 鸭源性成分的实时荧光PCR扩增产物序列

ggccacacaaatcctcacaggcctcctactggctatgcactacaccgcagacacatcccttgctttctcctcagtagccaacaca

C.8 鹅源性成分的实时荧光PCR扩增产物序列

agacaatc caacctaac cggattcttctgcatcact tctactgcc cttcctaatt gcaggaatca ccctagtcc

C.9 兔源性成分的实时荧光PCR扩增产物序列

gttctcgtcgcagatcttctcacactcacatgaatcggaggccaaccagtagaacacccggtcatcaccattggacaagta
