

附件 4

食品中多种动物源性成分检测实时荧光 PCR 法

BJS 201904

1 范围

本方法规定了肉及肉制品中猪、驴、山羊、绵羊、牦牛、鼠源性成分检测的实时荧光 PCR 方法。

本方法适用于肉及肉制品中猪 (*Sus scrofa*)、驴 (*Equus asinus*)、山羊 (*Capra hircus*)、绵羊 (*Ovis aries*)、牦牛 (*Bos grunniens*)、鼠源性成分的一种或多种成分同时定性检测。

注：本方法中鼠源性成分包括海狸鼠 (*Myocastor coypus*)、小鼠 (*Mus musculus*)、大鼠 (*Rattus norvegicus*)、豚鼠 (*Cavia porcellus*) 和竹鼠 (*Rhizomy spruiosus*) 源性成分。

2 原理

提取样品DNA，通过特异性引物探针进行动物源性成分的实时荧光PCR扩增，根据PCR扩增反应中产物荧光信号及扩增曲线判定，实现对样品动物源性成分的定性分析。

3 试剂和材料

除另有规定外，本方法所用试剂为分析纯或生化试剂，实验用水应符合GB/T 6682的要求。所有试剂均用无DNA酶污染的容器分装。

3.1 检测用引物和探针

(a) 猪 *cytb* 基因检测用引物探针序列为：

5'端引物：5'-GCACTTTATCCTGCCATTCATCATT-3'

3'端引物：5'-GTACAAGGATTAGTAGGATTAGT-3'

探针：5'-FAM-CGCCCTCGCAGCCGTACATCTCCTA-BHQ1-3'

(b) 驴 *nad5* 基因检测用引物探针序列为：

5'端引物：5'-GCTAGCCTCATTATCAGTAT-3'

3'端引物：5'-GTGATGAGGATACGTGCT-3'

探针：5'-FAM-TCATATCATCAATCCTCAACACCCACA-BHQ1-3'

(c) 山羊 *cytb* 基因检测用引物探针序列为：

5'端引物：5'-CTTTATCCTCCCATTCATCATCA-3'

3'端引物：5'-GAATTCCTGTGGGGTTGTTC-3'

探针：5'-FAM-GCTCTCGCCATAGTCCACCTGCTTTTC-BHQ1-3'

(d) 绵羊 *cytb* 基因检测用引物探针序列为：

5'端引物：5'-CTCATGCTACTAGTACTATTTACG-3'

3'端引物：5'-GTACGCGAATAGGAAGTATCAT-3'

探针：5'-FAM-TGACTTACTCGGAGACCCAGACAACCTACAC-BHQ1-3'

(e) 牦牛 *cytb* 基因检测用引物探针序列为：

5'端引物：5'-AACTTCGGCTCCATAGTAGGAGTA-3'

3'端引物：5'-CGTCTCGGCAGATATGGACA-3'

探针：5'-FAM-CGGAGGAGAATGCTGTTGTTGTATCGGATGT-BHQ1-3'

(f) 鼠 *cytb* 基因检测用引物探针序列为：

5'端引物：5'-CTCCACGAGACAGGATCAAACAACCCATCAGGACTAAA-3'

3'端引物：5'-TCATTCTGGTTTGATGTGGGGTGGGGTATT-3'

探针：5'-FAM-TAGTGGGTTAGCAGGTGTGTAGTTGTCTGGGTCTC-BHQ1-3'

3.2 CTAB 裂解液：2% (w/v) CTAB, 1.4mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA, 100 mmol/L Tris, 用 10% 盐酸调节 pH 至 8.0, 121℃ 高压灭菌 20 min, 备用。

3.3 蛋白酶 K: 20mg/mL, -20℃ 保存备用。

3.4 苯酚：三氯甲烷：异戊醇（体积比 25：24：1）。

3.5 异丙醇，优级纯。

3.6 70%乙醇。

3.7 实时荧光 PCR 预混液。以 2× 预混液为例，成分为：PCR 缓冲液（终浓度 1×），氯化镁（终浓度 2.5 mmol/L），dNTP（终浓度 0.2mmol/L），*Taq*DNA 聚合酶（终浓度 1 U）。

3.8 TE 缓冲液（Tris-HCl、EDTA 缓冲液）：10mmol/L Tris-HCl (pH8.0)，1 mmol/L EDTA (pH8.0)。

4 仪器和设备

4.1 组织研磨器。

4.2 核酸蛋白分析仪。

4.3 恒温水浴锅。

4.4 离心机（最大离心力 $\geq 12000g$ ）。

4.5 微量移液器（0.1 μ L~2.5 μ L, 0.5 μ L~10 μ L, 10 μ L~100 μ L, 100 μ L~1000 μ L）。

4.6 实时荧光 PCR 仪。

4.7 涡旋振荡器。

4.8 电子天平：感量 0.01 g。

4.9 高压灭菌锅。

4.10 pH 计。

5 分析步骤

5.1 试样选取与制备

多点采取肌肉组织，选取适量具有代表性的样品进行均质处理。所用器皿应为一次性耗材，或经过彻底清洗和高压消毒并单独使用。用过的器皿应采取措施消除核酸的污染，否则不可重复使用。

5.2 DNA提取

称取解冻后的均质样品0.1g~0.2g，置于2mL离心管中，加入600 μ L CTAB裂解液和20 μ L 蛋白酶K，振荡混匀，65 $^{\circ}$ C孵育1h~2h，期间每隔10min振荡混匀；加入500 μ L的苯酚：三氯甲烷：异戊醇（25：24：1），充分振荡混匀，12000g离心5min；小心吸取上清液至洁净的1.5mL离心管内，加入等体积的异丙醇，振荡混匀，12000g离心5min；弃去上清液，500 μ L 70%乙醇洗涤2次，12000g离心5 min，弃上清液，晾干；加入50 μ L~100 μ L TE缓冲液或无菌双蒸水，溶解DNA，-20 $^{\circ}$ C保存备用。同法提取阳性对照、阴性对照及空白对照。

也可用等效商品化的试剂盒提取DNA。

5.3 DNA浓度和纯度的测定

使用核酸蛋白分析仪检测 DNA 浓度及纯度，DNA 浓度在 1ng/ μ L~100ng/ μ L 之间，A260/A280 值在 1.7~2.0 之间时，适宜于本方法。

5.4 实时荧光 PCR 扩增

各动物源性成分PCR扩增均采用20 μ L的反应体系，包括PCR反应预混液（2 \times ）10 μ L，5'端、3'端引物（10 μ mol/L）各0.2 μ L，探针（10 μ mol/L）0.1 μ L，DNA模板（1ng/ μ L~100ng/ μ L）1 μ L，用无菌双蒸水补足20 μ L。每个样品设置两个平行反应体系。

PCR扩增反应程序为：95 $^{\circ}$ C 5min；35个循环（95 $^{\circ}$ C 15s，58 $^{\circ}$ C 1min，收集荧光）。

也可用等效的商品化试剂盒进行扩增。

5.5 实验对照

实验过程分别设阳性对照、阴性对照、空白对照。用相应动物源性成分生鲜肉样品作为阳性对照，用不含相应动物源性成分的生鲜肉样品作为阴性对照，用等体积的无菌双蒸水代替模板DNA作为空白对照。

6 结果判断与表述

6.1 质量控制

- (a)空白对照：无FAM荧光信号检出；
 - (b)阴性对照：无FAM荧光信号检出；
 - (c)阳性对照：有FAM荧光信号检出，且出现典型的扩增曲线，Ct值 \leq 30.0。
- 否则判定为实验无效。

6.2 结果判定

- (a)如有FAM荧光信号检出，Ct值 \leq 30.0，且出现典型的扩增曲线，则判定为被检样品阳性；
- (b)如Ct值 \geq 35或无Ct值，则判定为被检样品阴性；

(c)如有FAM荧光信号检出，且 $30.0 < Ct值 < 35.0$ ，则重新进行实验。如再次扩增后Ct值仍 < 35.0 ，且有典型的扩增曲线，则判定被检样品阳性；否则判定被检样品阴性。

6.3 结果表述

结果为阳性者，表述为“检出XX源性成分”。

结果为阴性者，表述为“未检出XX源性成分”。

7 污染判定

在DNA浓度相对差值在20%以内的情况下，本方法所检测生鲜肉与阳性对照差值 > 6 ，或肉制品与阳性对照差值 > 10 ，且结果可独立重复，提示该源性成分含量低于2%。

8 防污染措施

检测过程中防止交叉污染的措施按照GB/T 27403中的规定执行。

本方法负责起草单位：成都市食品药品检验研究院、中国科学院成都生物研究所、北京维德维康生物技术有限公司。

验证单位：山东省食品药品检验研究院、中国检验检疫科学研究院、北京市食品安全监控和风险评估中心、河北省食品检验研究院、国家副食品质量监督检验中心，广州质量监督检测研究院。

主要起草人：梁恒兴、尚柯、段庆梓、唐卓、张彪、马立才。