



中华人民共和国国家标准

GB/T 21102—2007

动物源性饲料中兔源性成分定性 检测方法 实时荧光 PCR 方法

Identification of rabbit derived materials in animal-originated feedstuffs—
Real time PCR method

2007-10-24 发布

2008-04-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准由中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局提出。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会归口。

本标准主要起草单位：中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局、宝生物工程（大连）有限公司、中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国山东出入境检验检疫局、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、中华人民共和国上海出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：郑秋月、李晶泉、王玉萍、徐昊、曹际娟、于爱丽、张舒亚、陈颖、徐宝梁、高宏伟、宗卉、金东权。

本标准首次发布。

动物源性饲料中兔源性成分定性 检测方法 实时荧光 PCR 方法

1 范围

本标准规定了动物源性饲料中兔源性成分实时荧光 PCR 检测方法,该检测方法的检出限为 0.1%。

本标准适用于动物源性饲料中兔源性成分的定性检测。

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,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 14699.1 饲料 采样(GB/T 14699.1—2005,ISO 6497:2002,IDT)

SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

实时荧光 PCR real time PCR

实时荧光聚合酶链式反应。

3.2

Ct 值 cycle time

每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。

4 原理

采用 TaqMan 实时荧光 PCR 技术,根据线粒体 DNA 的细胞色素 C 氧化酶亚单位 I (cytochrome C oxidase subunit I, COX I) 基因上动物种间多态性的差异而进行兔源性成分鉴定。利用裂解液破碎细胞,三氯甲烷抽提蛋白质,异丙醇沉淀得到 DNA;以提取的 DNA 为模板进行实时荧光 PCR 扩增。本标准应用多色荧光检测技术,采用多重 PCR 方法,将所用试剂配制成预混合形式,组建成实时荧光 PCR 兔 DNA 检测试剂盒。对反应液中含有的两种不同荧光染料进行双通道同步检测,在同一反应管内对兔的 COX I 基因及内参照基因同时进行扩增,并通过标记两种不同荧光物质 6-羧基荧光素(6-carboxyfluorescein, FAM)、5-六氯荧光素(5-hexachloro-fluorescein, HEX)的探针进行特异性杂交,两色荧光同步检测。其中,对内参照反应的检测,可以监控反应是否正常进行,防止假阴性结果。观察实时荧光 PCR 的增幅曲线,从而对饲料中兔源性成分进行快速检测。

5 试剂与材料

除另有规定外,试剂为分析纯或生化试剂,实验用水符合 GB 6682 的要求。

5.1 DNA 提取用试剂

5.1.1 三氯甲烷。

- 5.1.2 异戊醇。
- 5.1.3 异丙醇。
- 5.1.4 70%乙醇。
- 5.1.5 裂解液：1% CTAB(cetyltrithylammonium bromide,十六烷基三甲基溴化铵), 0.05 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)[Tris -:tris (hydroxymethyl) aminomethane,三(羟甲基)氨基甲烷], 0.7 mol/L NaCl, 0.01 mol/L EDTA (pH8.0)(ethylene diaminetetraacetic acid,乙二胺四乙酸)。
- 5.1.6 TE 缓冲液(Tris-HCl、EDTA 缓冲液)：10 mmol/L Tris-HCl (pH8.0),1 mmol/L EDTA (pH8.0)。

5.2 实时荧光 PCR 兔 DNA 检测试剂盒

- 5.2.1 2×兔源性检测预混合液：含有 Ex Taq HS(终浓度 1.25 U/25 μL)、dNTPs(终浓度各 0.4 mmol/L)、Mg²⁺(终浓度 3 mmol/L)。
- 5.2.2 兔源性检测引物混合液：含有扩增兔基因组 DNA 及内参照的引物(序列详见表 1)、内参照(λ DNA)。各引物终浓度 0.1 μmol/L~1.0 μmol/L。

表 1 兔及内参照引物序列

名 称	序 列
兔 5'-引物	5'-TAATCGTCACCGCACATGCC-3'
兔 3'-引物	5'-CTATGTCAGGAGCCCCAATTATCA-3'
内参照 5'-引物	5'-GGCTGATTGACCGGCAGATTA-3'
内参照 3'-引物	5'-GCGGGTATAGGTTTTATTGATGGC-3'

- 5.2.3 兔源性检测探针混合液：检测兔基因组 DNA 的探针及检测内参照的探针(序列详见表 2)。探针浓度与使用的实时荧光 PCR 扩增仪、荧光标记物质种类有关,实际使用时请参照仪器说明书,或各荧光探针的具体使用要求进行。

表 2 兔及内参照探针序列

名 称	序 列
兔探针	5'(FAM)-ACAAGCCAGTTCCCGAAGCCTCCA -3'(Eclipse)
内参照探针	5'(HEX)-CCGCCACGACGATGAACAGACGCT -3'(Eclipse)

- 5.2.4 阳性对照：用已知含哺乳动物源性成分的样品作阳性对照。
- 5.2.5 双蒸水。

6 仪器设备

- 6.1 实时荧光 PCR 检测系统。
- 6.2 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。
- 6.3 电子天平：感量 0.01 g。
- 6.4 离心机：离心力 12 000 g。
- 6.5 微量移液器：0.5 μL~10 μL,10 μL~100 μL,10 μL~200 μL,100 μL~1 000 μL。
- 6.6 实时荧光 PCR 反应管。
- 6.7 恒温水浴箱。

7 试样选取与制备

按照 GB/T 14699.1 采样,将实验室样品粉碎,充分混合均匀后待用。

8 检验步骤

8.1 样品的总 DNA 提取

称取适量饲料(饲料粒度为 100 目称取 50 mg;60 目称取 100 mg;20 目称取 200 mg)于 1.5 mL 离心管中,加入 600 μ L~800 μ L 裂解液,65℃ 30 min,每隔 10 min 振荡混匀;12 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液至一新离心管中,加 400 μ L 三氯甲烷+异戊醇(24+1),充分混匀;12 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液至一新离心管中,加 0.8 倍体积异丙醇,室温下沉淀 1 h~2 h;12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液;70%乙醇洗涤一次,晾干;加入 50 μ L TE,溶解沉淀。

也可用等效的 DNA 提取试剂盒提取模板 DNA。

8.2 DNA 浓度和纯度的测定

取 5 μ L DNA 溶液加双蒸水稀释至 1 mL,使用核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计测 260 nm 和 280 nm 处的吸光值 A_{260} 和 A_{280} 。DNA 的浓度按式(1)计算:

$$c = A \times N \times 50 / 1\,000 \quad \text{.....(1)}$$

式中:

c ——DNA 浓度,单位为微克每微升(μ g/ μ L);

A ——260 nm 处的吸光值;

N ——核酸稀释倍数。

当 A_{260}/A_{280} 比值在 1.7~1.9 之间时,适宜于 PCR 扩增。

8.3 实时荧光 PCR 检测

- 8.3.1 反应体系的体积为 25 μ L,2 $\times$ 兔源性检测预混合液加 12.5 μ L,兔源性检测引物混合液和兔源性检测探针混合液各加 1 μ L,样品 DNA(1 ng/ μ L~100 ng/ μ L)1 μ L,加双蒸水至 25 μ L。
- 8.3.2 在各实时荧光 PCR 反应管中加入上述试剂后,盖紧管,离心 5s~10s。
- 8.3.3 将离心后的实时荧光 PCR 反应管放入实时荧光 PCR 检测系统内,记录样本摆放顺序。
- 8.3.4 实时荧光 PCR 反应参数可根据基因扩增仪型号的不同进行适当的调整。一般的反应程序为:95℃ 10s,1 个循环;95℃ 5s,60℃ 30s,40 个循环,在每次循环的退火时收集荧光。
- 8.3.5 检测结束后,根据扩增曲线和 Ct 值判定结果。
- 8.3.6 检测过程中分别设阳性对照、阴性对照和空白对照。用已知含兔源性成分样品作阳性对照,用已知不含兔源性成分样品作阴性对照,用等体积的双蒸水代替模板 DNA 作空白对照。

注:也可用等效的兔源性成分实时荧光 PCR 检测试剂盒进行实时荧光 PCR 检测。

9 结果判断与表述

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

9.2.1 对照结果

空白对照:无 FAM 荧光信号检出。有 HEX 荧光信号检出,Ct 值应<35.0。

阴性对照:无 FAM 荧光信号检出。有 HEX 荧光信号检出,Ct 值应<35.0。

阳性对照:有 FAM 和 HEX 荧光信号检出。且 FAM 通道出现典型的扩增曲线,Ct 值<28.0。

否则,实验视为无效。

9.2.2 检测结果的判定

Ct 值 $\leq$ 35 为有效值,Ct 值>35 为无效值(详见表 3)。

表 3 结果的判定情况

FAM 荧光	HEX 荧光	结果判定情况
+	+	同时进行的阴性、阳性、空白对照实验结果正常,检测实际样品时,如果有 FAM 荧光和 HEX 荧光检出,且 Ct 值 ≤ 35 ,判定为含有兔源性成分;如果 Ct 值 > 35 ,可视为不含有兔源性成分。
+	-	同时进行的阴性、阳性、空白对照实验结果正常,检测实际样品时,HEX 荧光信号未检出,Ct 值 > 35 (如果检测样品浓度高会抑制内参照 DNA 的扩增);如果有 FAM 荧光检出,且 Ct 值 ≤ 35 ,判定为含有兔源性成分;如果 FAM 荧光 Ct 值 > 35 ,可视为不含有兔源性成分。
-	+	同时进行的阴性、阳性、空白对照实验结果正常,检测实际样品时有 HEX 荧光检出,无 FAM 荧光检出,判定为不含有兔源性成分。
-	-	PCR 反应失败。注意以下几个方面后再次进行反应。 ① 如果同时进行的阳性对照实验结果正常,则可能是样品 DNA 制备有问题,如样品中可能存在 PCR 反应的抑制物等。 ② 如果同时进行的阳性对照实验结果不正常,则可能是实验操作失败或试剂失活。

9.3 结果表述

检出兔源性成分。
未检出兔源性成分。

10 检测过程中防止交叉污染的措施

按照 SN/T 1193 执行。

11 废弃物处理

检测过程中的废弃物,收集后在焚烧炉中焚烧处理。
