

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 3309—2018

肉类源性成分鉴定 实时荧光定性PCR法

Identification of animal-derived materials in meat—
Qualitative realtime PCR method

2018-12-19 发布

2019-06-01 实施



中华人民共和国农业农村部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由农业农村部畜牧兽医局提出。

本标准由全国畜牧业标准化技术委员会(SAC/TC 274)归口。

本标准起草单位:山东省农业科学院生物技术研究中心、山东省食品药品检验研究院。

本标准主要起草人:步迅、张全芳、刘艳艳、范阳阳、霍胜楠、张卉、马德源、卞如如、陈杰、杨雪、李燕、杨连群。

肉类源性成分鉴定 实时荧光定性 PCR 法

1 范围

本标准规定了对羊(绵羊、山羊)、狐狸、鸡、牛(普通牛、黄牛)、马、鸭、水貂、猪和大鼠 9 种动物源性成分进行鉴定的实时荧光 PCR 法。

本标准适用于生鲜肉、冷冻肉及肉制品中羊(绵羊、山羊)、狐狸、鸡、牛(普通牛、黄牛)、马、鸭、水貂、猪和大鼠 9 种动物源性成分的鉴定。

本方法检出限为 1%。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 9695.19 肉与肉制品 取样方法

GB/T 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

农业部 2406 号公告—7—2016 转基因动物及其产品成分检测 DNA 提取和纯化方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

实时荧光 PCR **qualitative realtime PCR**

在 PCR 反应体系中加入荧光基因,利用荧光信号积累实时监控整个 PCR 进程,对未知模板进行定性或定量分析。

3.2

Ct 值 **cycle threshold**

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

根据线粒体 16S rDNA 基因在不同物种间保守区设计通用引物,在可变区设计物种特异性探针,采用 TaqMan 实时荧光 PCR 技术进行扩增,根据 PCR 扩增反应的荧光信号及循环阈值,判定羊(绵羊、山羊)、狐狸、鸡、牛(普通牛、黄牛)、马、鸭、水貂、猪和大鼠 9 种动物源性成分。

5 试剂或材料

除另有规定外,仅使用分析纯试剂。

5.1 水:GB/T 6682,一级。

5.2 生理盐水:称取 0.85 g NaCl 加 20 mL 水溶解,然后加水定容至 100 mL,103.4 kPa 蒸汽压(121℃)条件下灭菌 20 min。

5.3 1 mol/L Tris-HCl(pH 6.4)溶液:称取 12.1 g Tris 置于 100 mL 烧杯中,加入 80 mL 水,用浓 HCl 调节 pH 至 6.4,加水定容至 100 mL,103.4 kPa 蒸汽压(121℃)灭菌 20 min,室温保存待用。

- 5.4 10 mol/L NaOH 溶液:称取 80 g NaOH 溶解于 160 mL 水中,冷却至室温,再加水定容至 200 mL。
- 5.5 0.5 mol/L EDTA- Na_2 (pH 8.0)溶液:称取 18.6 g EDTA- Na_2 溶解于 70 mL 水中,用 10% 的 NaOH 溶液,调节 pH 至 8.0,加水定容至 100 mL,103.4 kPa 蒸汽压(121℃)条件下灭菌 20 min,室温保存待用。
- 5.6 10%十二烷基磺酸钠(SDS)溶液:称取 10 g SDS 溶解于 80 mL 灭菌水中,加热至完全溶解后,冷却至室温,加水定容至 100 mL,103.4 kPa 蒸汽压(121℃)灭菌 20 min,室温保存待用。
- 5.7 5 mol/L NaCl 溶液:称取 29.22 g NaCl 溶解于 80 mL 无菌水中,加水定容至 100 mL,103.4 kPa 蒸汽压(121℃)灭菌 20 min,室温保存待用。
- 5.8 细胞裂解液(Lysis Buffer):取 1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)溶液 20 mL,0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)溶液 5 mL,5.0 mol/L NaCl 溶液 10 mL,10% SDS 溶液 5 mL,加水定容至 100 mL,混匀。
- 5.9 20 mg/mL 蛋白酶 K 溶液:称量 0.2 g 蛋白酶冻干品,加无菌水溶解,加水定容至 10 mL,分装后于 -20℃ 保存。
- 5.10 RNA 酶溶液:将 1 g 冻干品 RNA 酶 A 溶解于 6 mL 无菌水中,于 100℃ 加热 15 min,缓慢冷却至室温,加水定容至 10 mL,分装成小份存于 -20℃。
- 5.11 氯仿+异戊醇混合液:将氯仿和异戊醇按照 24+1 的体积比例配制。
- 5.12 70%乙醇:量取 70 mL 无水乙醇,加入 30 mL 水。
- 5.13 TE 缓冲液:将 0.5 mL 的 10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)溶液、0.1 mL 的 0.5 mol/L EDTA(pH 8.0)溶液加入到 50 mL 容量瓶中,调 pH 8.0,加水定容,103.4 kPa 蒸汽压(121℃)灭菌 20 min,降至室温,4℃ 保存备用。
- 5.14 羊(绵羊、山羊)、狐狸、鸡、牛(普通牛、黄牛)、马、鸭、水貂、猪和大鼠 9 种动物源性实时荧光 PCR 检测试剂盒试剂:2×TaqManMaster Mix,含有 Taq DNA 聚合酶(终浓度 1 U/20 μL)、 Mg^{2+} (终浓度 2.0 mmol/ μL)、dNTPs(终浓度 0.2 mmol/ μL)。羊(绵羊、山羊)、狐狸、鸡、牛(普通牛、黄牛)、马、鸭、水貂、猪和大鼠 9 种动物源性基因组 DNA 阳性标准品。

6 仪器设备

- 6.1 实时荧光定量 PCR 仪:4 通道以上。
- 6.2 紫外分光光度计:波长 190 nm~900 nm。
- 6.3 分析天平:感量 0.1 mg。
- 6.4 台式离心机、低温离心机:13 000 g。
- 6.5 水浴锅。
- 6.6 高压灭菌锅。
- 6.7 冰箱:-20℃~4℃。
- 6.8 微量移液器:100 μL ~1 000 μL ,10 μL ~200 μL ,2 μL ~20 μL ,0.5 μL ~10 μL 。

7 检测用引物和探针

内参引物探针序列及羊(绵羊、山羊)、狐狸、鸡、牛(普通牛、黄牛)、马、鸭、水貂、猪和大鼠 9 种动物的通用引物和特异性探针序列见附录 A 中的表 A.1。引物探针在序列中的位置参见附录 B。

8 试验步骤

8.1 取样

对鲜肉、冻肉及肉制品的取样方法按 GB/T 9695.19 的规定执行。

8.2 试样制备

8.2.1 整块肉,取 3 g 肉块,用生理盐水(5.2)清洗,在液氮中研磨成粉末。

8.2.2 碎肉、肉片或肉卷等冷冻混合肉,混匀后,称取 10 g 样品,用生理盐水(5.2)清洗,在液氮中研磨成粉末。

8.3 DNA 提取

DNA 提取及纯化方法按农业部 2406 号公告—7—2016 的规定执行。

8.4 实时荧光 PCR 反应

8.4.1 试样实时荧光 PCR 检测

8.4.1.1 多重实时荧光 PCR:分 A、B、C 3 组 PCR 反应体系进行多重实时荧光 PCR。A 组包括羊(绵羊、山羊)、狐狸和鸡;B 组包括牛、马和鸭;C 组包括猪、水貂和大鼠。每组 PCR 反应体系中包含 3 种动物源性的特异探针,并加入内参。3 组 PCR 反应体系见表 A.2、表 A.3、表 A.4。

8.4.1.2 单重实时荧光 PCR:9 种动物单重实时荧光 PCR 反应体系见表 A.5。

8.4.2 对照实时荧光 PCR 反应体系

在试样 PCR 反应的同时,设置如下阴性对照、空白对照和阳性对照。

- a) 阴性对照:以 9 种动物之外的动物基因组 DNA 为阴性对照;
- b) 空白对照:以水作为空白对照;
- c) 阳性对照:将羊(绵羊、山羊)、狐狸、鸡、牛(普通牛、黄牛)、马、鸭、水貂、猪和大鼠 9 种动物基因组 DNA 等量混匀作为阳性对照。

注:每个 PCR 反应设置 3 次平行。

8.4.3 实时荧光 PCR 反应体系配制

分别按照表 A.2、表 A.3、表 A.4 和表 A.5 依次加入试剂,配制 PCR 反应体系,混匀离心分装至 PCR 反应管中,加入模板 DNA,3 000 g 离心 1 min,取出 PCR 管,放入荧光定量 PCR 仪中。

8.4.4 实时荧光 PCR 反应程序

95℃预变性 3 min;95℃变性 10 s;60℃退火延伸 35 s(收集荧光信号),40 个循环。

9 试验数据处理

9.1 对照检测结果分析

空白对照、阴性对照和阳性对照全部满足下述条件,表明 PCR 体系有效:

- a) 空白对照:A、B、C、D 4 组 PCR 体系对应的反应孔均无 FAM、JOE、CY3 和 CY5 荧光的典型扩增曲线;
- b) 阴性对照:A、B、C、D 4 组 PCR 体系对应的反应孔均无 FAM、JOE、CY3 荧光的典型扩增曲线;而 CY5 有典型扩增曲线,且 C_t 值 ≤ 35.0 ;
- c) 阳性对照:A、B、C、D 4 组 PCR 体系对应的反应孔中均出现 FAM、JOE、CY3 和 CY5 荧光的典型扩增曲线,且 C_t 值 ≤ 35.0 。

9.2 样品检测结果分析和表述

9.2.1 在 PCR 反应体系有效且内参基因出现典型扩增曲线(C_t 值 ≤ 35.0)的情况下,当有 FAM、JOE、CY3 荧光典型扩增曲线出现,若 C_t 值 ≤ 35.0 ,则判定样品中检出相应的动物源性成分;若无典型扩增曲线,则判定样品中未检出相应的动物源性成分。

9.2.2 在 PCR 反应体系有效且内参基因出现典型扩增曲线(C_t 值 ≤ 35.0)的情况下,当有 FAM、JOE、CY3 荧光扩增曲线出现,但 $35.0 < C_t$ 值 < 40.0 ,则需要重新提取 DNA 加大模板量进行 PCR 反应。若再次扩增后的 C_t 值 < 40.0 ,则判定样品中检出相应的动物源性成分;若再次扩增后无典型扩增曲线,则判定样品中未检出相应的动物源性成分。

9.2.3 对各种样品检测结果的判定,见表 A. 6。

10 检测过程中防止交叉污染的措施

按 GB/T 27403 的规定执行。

附 录 A
(规范性附录)
实时荧光定性 PCR 引物/ 探针序列、反应体系和结果判定

A. 1 实时荧光定性 PCR 引物和探针序列

见表 A. 1。

表 A. 1 实时荧光定性 PCR 引物/ 探针序列

引物探针名称	缩写	序列(5′-3′)	扩增片段 bp
通用引物上游	UNF	AAGACGAGAAGACCCTTGACTTTA	228~241
通用引物下游	UNR	GATTGCGCTGTTATCCCTAGGGTA	
内参引物上游	16SF	CCTAGCGATAACAGGGCAATC	120
内参引物下游	16SR	TTAAGCCTTGAACAAACGAACC	
马特异引物上游	LMF1	TTTCTCCTCGCATAAGCCTATATC	152
马特异引物下游	LMR1	GTTCTTTTACTTCTTTTAATCTTTCCT	
羊源性探针	MY-P	5′JOE-CCACCAAGGGATAACAACACTCTGGTGG-3′DAB	
狐狸源性探针	H-P	5′FAM-CAAACCCCTCCGGAATAACTTACT-3′DAB	
鸭源性探针	Ya-P	5′CY3-CGGGGCTACAGACATCGCAGAG-3′DAB	
水貂源性探针	SD-P	5′CY3-TCTAACACAACATTATTACTGGGT-3′BHQ2	
马源性探针	M-P	5′FAM-AAAAACAACACACAAACCTAACCTTCA-3′DAB	
猪源性探针	Z-P	5′JOE-CAACTCAACCACAAAGGGATAAAAC-3′BHQ2	
鸡源性探针	J-P	5′CY3-CGGGTCTGGTTACTGTTGGTACTTTGAGAGACCCG-3′BHQ2	
牛源性探针	N-P	5′JOE-ACAATCTCCATGAGTTGGTAGTTTCGG-3′DAB	
大鼠源性探针	S-P	5′FAM-CGCGCGTCTCCGAATGATTTTAACCTAGACTCGCGCG-3′DAB	
内参探针	16SP	5′CY5-ACGACCTCGATGTTGGATCAGGAC-3′BHQ2	

注:通用引物 UNF/ UNR 用于羊(绵羊、山羊)、狐狸、鸡、牛(普通牛、黄牛)、鸭、猪、水貂和大鼠 8 种动物源性成分检测,引物 LMF1/ LMR1 用于马源性成分检测。

A. 2 实时荧光 PCR 反应体系

见表 A. 2、表 A. 3、表 A. 4 和表 A. 5。

表 A. 2 A 组多重荧光 PCR 反应体系

试剂名称	工作浓度	加入体积,μL	终浓度
Takara 酶	5 U/μL	0.2	1 U
Master Mix	10×	2	1×
UNF	5 μmol/L	1	0.25 μmol/L
UNR	5 μmol/L	1	0.25 μmol/L
MY-P(JOE) ^a	1 μmol/L	1	0.05 μmol/L
H-P(FAM) ^b	2 μmol/L	2	0.20 μmol/L
J-P(CY3) ^c	5 μmol/L	1	0.25 μmol/L
16SF	5 μmol/L	1	0.25 μmol/L

表 A.2 (续)

试剂名称	工作浓度	加入体积, μL	终浓度
16SR	$5\text{ }\mu\text{mol/L}$	1	$0.25\text{ }\mu\text{mol/L}$
16SP(CY5) ^d	$2\text{ }\mu\text{mol/L}$	1	$0.10\text{ }\mu\text{mol/L}$
DNA 模板	$0.1\text{ ng}/\mu\text{L}\sim 50\text{ ng}/\mu\text{L}$	2	$0.2\text{ ng}/\mu\text{L}\sim 100\text{ ng}/\mu\text{L}$
ddH ₂ O		补齐至 $20\text{ }\mu\text{L}$	
注:本组体系用于检测羊(绵羊、山羊)、狐狸和鸡 3 种动物源性成分。			
^a 羊源性探针; ^b 狐狸源性探针; ^c 鸡源性探针; ^d 内参探针。			

表 A.3 B 组多重荧光 PCR 反应体系

试剂名称	工作浓度	加入体积, μL	终浓度
Takara 酶(5 U)	$5\text{ U}/\mu\text{L}$	0.2	1 U
10×Master Mix	10×	2	1×
UNF	$5\text{ }\mu\text{mol/L}$	1	$0.25\text{ }\mu\text{mol/L}$
UNR	$5\text{ }\mu\text{mol/L}$	1	$0.25\text{ }\mu\text{mol/L}$
LMF1	$5\text{ }\mu\text{mol/L}$	1	$0.25\text{ }\mu\text{mol/L}$
LMR1	$5\text{ }\mu\text{mol/L}$	1	$0.25\text{ }\mu\text{mol/L}$
N-P(JOE) ^a	$1\text{ }\mu\text{mol/L}$	1	$0.05\text{ }\mu\text{mol/L}$
M-P(FAM) ^b	$2\text{ }\mu\text{mol/L}$	1	$0.10\text{ }\mu\text{mol/L}$
Ya-P(CY3) ^c	$5\text{ }\mu\text{mol/L}$	1	$0.25\text{ }\mu\text{mol/L}$
16SF	$5\text{ }\mu\text{mol/L}$	1	$0.25\text{ }\mu\text{mol/L}$
16SR	$5\text{ }\mu\text{mol/L}$	1	$0.25\text{ }\mu\text{mol/L}$
16SP(CY5)	$2\text{ }\mu\text{mol/L}$	1	$0.10\text{ }\mu\text{mol/L}$
DNA 模板	$0.1\text{ ng}/\mu\text{L}\sim 50\text{ ng}/\mu\text{L}$	2	$0.2\text{ ng}/\mu\text{L}\sim 100\text{ ng}/\mu\text{L}$
ddH ₂ O		补齐至 $20\text{ }\mu\text{L}$	
注:本组体系检测马、牛和鸭 3 种动物源性成分。			
^a 牛源性探针; ^b 马源性探针; ^c 羊源性探针。			

表 A.4 C 组多重荧光 PCR 反应体系

试剂名称	工作浓度	加入体积, μL	终浓度
Takara 酶(5 U)	$5\text{ U}/\mu\text{L}$	0.2	1 U
10×Master Mix	10×	2	1×
UNF	$5\text{ }\mu\text{mol/L}$	1	$0.25\text{ }\mu\text{mol/L}$
UNR	$5\text{ }\mu\text{mol/L}$	1	$0.25\text{ }\mu\text{mol/L}$
S-P(FAM) ^a	$1\text{ }\mu\text{mol/L}$	1	$0.05\text{ }\mu\text{mol/L}$
SD-P(CY3) ^b	$5\text{ }\mu\text{mol/L}$	1	$0.25\text{ }\mu\text{mol/L}$
Z-P(JOE) ^c	$1\text{ }\mu\text{mol/L}$	1	$0.05\text{ }\mu\text{mol/L}$
16SF	$5\text{ }\mu\text{mol/L}$	1	$0.25\text{ }\mu\text{mol/L}$
16SR	$5\text{ }\mu\text{mol/L}$	1	$0.25\text{ }\mu\text{mol/L}$
16SP(CY5)	$2\text{ }\mu\text{mol/L}$	1	$0.10\text{ }\mu\text{mol/L}$
DNA 模板	$0.1\text{ ng}/\mu\text{L}\sim 50\text{ ng}/\mu\text{L}$	2	$0.2\text{ ng}/\mu\text{L}\sim 100\text{ ng}/\mu\text{L}$
ddH ₂ O		补齐至 $20\text{ }\mu\text{L}$	
注:本组体系检测大鼠、水貂、猪 3 种动物源性成分。			
^a 大鼠源性探针; ^b 水貂源性探针; ^c 猪源性探针。			

表 A.5 D 组单重荧光 PCR 反应体系

试剂名称	工作浓度	加入体积, μL	终浓度
Takara 酶(5 U)	5 U/ μL	0.2	1 U
Master Mix	10 $\times$	2	1 $\times$
UNF	5 $\mu\text{mol/L}$	1	0.25 $\mu\text{mol/L}$
UNR	5 $\mu\text{mol/L}$	1	0.25 $\mu\text{mol/L}$
16SF	5 $\mu\text{mol/L}$	1	0.25 $\mu\text{mol/L}$
16SR	5 $\mu\text{mol/L}$	1	0.25 $\mu\text{mol/L}$
16SP(CY5)	2 $\mu\text{mol/L}$	1	0.10 $\mu\text{mol/L}$
目标探针	2 $\mu\text{mol/L}$	1	0.10 $\mu\text{mol/L}$
DNA 模板	0.1 ng/ μL ~50 ng/ μL	2	0.2 ng/ μL ~100 ng/ μL
ddH ₂ O		补齐至 20 μL	
注:本体系适用于 9 种动物源性检测。			

A.3 对各种样品检测结果的判定

见表 A.6。

表 A.6 实时荧光 PCR 定性检测方法的各种实验结果判定

项目	FAM 荧光	JOE 荧光	CY3 荧光	CY5 荧光	结果判定	
					Ct 值 ≤ 35	Ct 值 > 40
多重 PCR 体系 A	+	—	—	+	检出狐狸源性成分	未检出狐狸源性成分或含量低于检测界限
多重 PCR 体系 B	+	—	—		检出马源性成分	未检出马源性成分或含量低于检测界限
多重 PCR 体系 C	+	—	—		检出大鼠源性成分	未检出大鼠源性成分或含量低于检测界限
多重 PCR 体系 A	—	+	—		检出羊源性成分	未检出羊源性成分或含量低于检测界限
多重 PCR 体系 B	—	+	—		检出牛源性成分	未检出牛源性成分或含量低于检测界限
多重 PCR 体系 C	—	+	—		检出猪源性成分	未检出猪源性成分或含量低于检测界限
多重 PCR 体系 A	—	—	+		检出鸡源性成分	未检出鸡源性成分或含量低于检测界限
多重 PCR 体系 B	—	—	+		检出鸭源性成分	未检出鸭源性成分或含量低于检测界限
多重 PCR 体系 C	—	—	+		检出水貂源性成分	未检出水貂源性成分或含量低于检测界限
多重 PCR 体系 A	+	+	—		同时检出羊源性和狐狸源性成分	未检出羊源性和狐狸源性成分或含量低于检测界限
多重 PCR 体系 B	+	+	—		同时检出牛源性和马源性成分	未检出牛源性和马源性成分或含量低于检测界限
多重 PCR 体系 C	+	+	—		同时检出猪源性和大鼠源性成分	未检出猪源性和大鼠源性成分或含量低于检测界限
多重 PCR 体系 A	—	+	+		同时检出羊源性和鸡源性成分	未检出羊源性和鸡源性成分或含量低于检测界限
多重 PCR 体系 B	—	+	+		同时检出牛源性和鸭源性成分	未检出牛源性和鸭源性成分或含量低于检测界限
多重 PCR 体系 C	—	+	+		同时检出猪源性和水貂源性成分	未检出猪源性和水貂源性成分或含量低于检测界限

表 A.6 (续)

项目	FAM 荧光	JOE 荧光	CY3 荧光	CY5 荧光	结果判定	
					Ct 值≤35	Ct 值>40
多重 PCR 体系 A	+	—	+		同时检出狐狸源性和鸡源性成分	未检出狐狸源性和鸡源性成分或含量低于检测界限
多重 PCR 体系 B	+	—	+		同时检出马源性和鸭源性成分	未检出马源性和鸭源性成分或含量低于检测界限
多重 PCR 体系 C	+	—	+		同时检出大鼠源性和水貂源性成分	未检出大鼠源性和水貂源性成分或含量低于检测界限
多重 PCR 体系 A	+	+	+		同时检出羊源性、狐狸源性和鸡源性成分	未检出羊源性、狐狸源性和鸡源性成分或含量低于检测界限
多重 PCR 体系 B	+	+	+		检出牛源性、马源性和鸭源性成分	未检出牛源性、马源性和鸭源性成分或含量低于检测界限
多重 PCR 体系 C	+	+	+		检出猪源性、大鼠源性和水貂源性成分	未检出猪源性、大鼠源性和水貂源性成分或含量低于检测界限
单重 PCR 体系 D	+	—	—		检出狐狸源性或大鼠源性或马源性成分	未检出狐狸源性、大鼠源性和马源性成分或含量低于检出限
单重 PCR 体系 D	—	+	—		检出羊源性或猪源性或牛源性成分	未检出羊源性、猪源性和牛源性成分或含量低于检出限
单重 PCR 体系 D	—	—	+		检出鸭源性或水貂源性或鸡源性成分	未检出鸭源性、水貂源性和鸡源性成分或含量低于检出限
多重 PCR 体系 A	—	—	—		如果同时进行的阳性对照实验结果正常,检测实际样品时只有 CY5 荧光检出,无 FAM、JOE、CY3 荧光检出,判定为未检出羊、狐狸、鸭、水貂、马、猪、鸡、牛和大鼠 9 种动物源性成分	
多重 PCR 体系 B	—	—	—	+		
多重 PCR 体系 C	—	—	—	—		
多重 PCR 体系 A	—	—	—	—	PCR 反应失败,注意以下几个方面后再次进行反应: a) 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,如样品中可能存在抑制物等 b) 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	
多重 PCR 体系 B	—	—	—	—		
多重 PCR 体系 C	—	—	—	—		

附 录 B
(资料性附录)
目的基因扩增靶标参考序列

B.1 普通牛(*Bos taurus*) PCR 产物序列 (GenBank: KT827216.1)

AAGACGAGAAGACCCTATGGAGCTTTAACTAACCAACCCAAAGAGAATAAATTTAACCTTAAGGAGTAACAACAATCTCCATGAG
TTGGTAGTTTCGGTTGGGGTGACCTCGGAGAATAAAAAACCTCCGAGCGATTTAAAGACTAGACCCACAAGTCAAATCACTCTA
TCGCTCATTGATCCAAAACTTGATCAACGGAACAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATC

B.2 山羊(*Capra hircus*) PCR 产物序列 (GenBank: KY523511.1)

AAGACGAGAAGACCCTATGGAGCTTTAACTAACTAGTCCAAAAGAAATAAATTTAACCTAAGGGATAACAACATCCTTTATGGA
CTAGCAGTTTTGGTTGGGGTGACCTCGGAGAACAGAGATCTCCGAGCGATTTAAAGACTAGACTTACAAGTCAAATCAAATTA
TCGCTTATTGATCCAAAACTTGATCAACGGAACAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATC

B.3 绵羊(*Ovis aries*) PCR 产物序列 (GenBank: KP702285.1)

AAGACGAGAAGACCCTATGGAGCTTTAACTAAGTAAGTCAAGGAAAATAAATTCACCAAGGGATAACAACACTCCTTATGAG
TTAACAGTTTCGGTTGGGGTGACCTCGGAGAACAGAAAATCTCCGAGCGATTTAAAGACTAGACTAACAGTCAAACCAAACCA
TCGCTTATTGATCCAAAACTTGATCAACGGAACAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATC

B.4 马(*Equus caballus*) PCR 产物序列 (GenBank: LC147067.1)

AAGACGAGAAGACCCTATGGAGCTTTAATTAAGTATTACAAAAACAACACACAAACCTAACCTTCAGGGACAACAAAATTTT
GATTGAATCAGCAATTTTCGGTTGGGGTGACCTCGGAGAACAAAAACCTCCGAGTGATTTAAATCCAGACTAACAGTCAAATA
AATAATCACTTATTGATCCAAACATTGATCAACGGAACAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATC

B.5 水貂(*Mustela vison*) PCR 产物序列 (GenBank: DQ334816.1)

AAGACGAGAAGACCCTATGGAGCTTTAATTAAGTAAACCCATAATAATTTATAAACTCACCTACCAGGTCTAACACAACATTATTAC
TGGTTAACAAATTTAGTTGGGGTGACCTCGGAGAATAAAACAACCTCCGAGTGATTAATCAGACAAACAGTCGAAGCATT
TATCATTTATTGATCCAATATCTTGATCAACGGAACAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATC

B.6 猪(*Sus domesticus*) PCR 产物序列 (GenBank: KX982652.1)

AAGACGAGAAGACCCTATGGAGCTTTAATTAAGTACTCCAAAAGTTAAACAATTCAACCACAAAGGGATAAAACATAACTTAACAT
GGACTAGCAATTTTCGGTTGGGGTGACCTCGGAGTACAAAAACCTCCGAGTGATTTAATCTAGACAAACAGTCAAAATAACCA
TAAATCACTTATTGATCCAAAATTTTGATCAACGGAACAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATC

B.7 狐狸(*Vulpes vulpes*) PCR 产物序列 (GenBank: DQ334815.1)

AAGACGAGAAGACCCTATGGAGCTTTAATTAATTAGCCAAACTTATGAACCTCAAACCCCTCCGGAATAACTTACTACCATGT
TATGGGCTAACAAATTTAGTTGGGGTGACCTCGGAATATAAAAAACTCCGAGTGATTAATTTAGACCTACCAGTCAAAATGT
ACCATCACTTATTGATCCAATAATCTTGATCAACGGAACAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATC

B.8 鸡(*Gallus gallus*) PCR 产物序列 (GenBank: KX987152.1)

AAGACGAGAAGACCCTGTGGAACTTAAAAATCACGACCACCTTACAACCTTACACAGCCCCACTGGGTCCACCCACACATAAAACC
CTGGTCGACATTTTCGGTTGGGGCGACCTTGGAGAAAAAAATCCTCAAACCCACAGACCACAACCTTTCACTAAGACCAACT
CCTCAAAGTACCAACAGTAACCAGACCCAATATAATTGAGCAATGGACCAAGCTACCCCAGGGATAACAGCGCAATC

B. 9 鸭(*Anas platyrhynchos*)PCR 产物序列(GenBank: KX592536. 1)

AAGACGAGAAGACCCTGTGGAACTTAAAAATCAACGGCCACCGGAACCTAAGACTAAACCCACCGGGGCTACAGACATCGCAGAG
CATGGCCGATATTTTCGGTTGGGGCGACCTTGGAGAACACAGATCCTCAAAAACAAGACCACACCTTTTACTTAGAGCCACC
CCTCAAAGTGCTAATAGTGACCAGACCCAATATAATTGATTAATGGACCAAGCTACCCCAGGGATAACAGCGCAATC

B. 10 大鼠(*Rattus norvegicus*)PCR 产物序列(GenBank: KP233827. 1)

AAGACGAGAAGACCCTATGGAGCTTAATTTACTAGTTCAACTTATATAAAAACAACCTAATGGGCTAAAACAAATAAATATGAA
CTAAAAAATTCGGTTGGGGTGACCTCGGAGAATAAAAAATCCTCCGAATGATTTTAACCTAGACTCACAAGTCAAAGTAATACTA
ATATCTTATTGACCAATTATTGATCAACGGACCAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATC

注:下划线为引物位置,阴影部分为探针位置。

中 华 人 民 共 和 国
农 业 行 业 标 准
肉 类 源 性 成 分 鉴 定
实 时 荧 光 定 性 PCR 法

NY/T 3309—2018

* * *

中 国 农 业 出 版 社 出 版

(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)

(邮政编码: 100125 网址: www.ccap.com.cn)

北 京 印 刷 一 厂 印 刷

新 华 书 店 北 京 发 行 所 发 行 各 地 新 华 书 店 经 销

* * *

开 本 880mm×1230mm 1/16 印 张 1 字 数 20 千 字

2019 年 4 月 第 1 版 2019 年 4 月 北 京 第 1 次 印 刷

书 号: 16109·4753

定 价: 24.00 元



NY/T 3309—2018

版 权 专 有 侵 权 必 究

举 报 电 话: (010) 59194261