



中华人民共和国国家标准

GB/T 23815—2009

猪肉制品中植物成分定性 PCR 检测方法

Protocol of the polymerase chain reaction for detecting plant components in meat

2009-05-27 发布

2009-09-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由中国标准化研究院提出并归口。

本标准负责起草单位：国家加工食品质量监督检验中心（广州）、广州市质量监督检测研究院、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：郭新东、邓鸿铃、覃芳芳、罗海英、袁洁、吴玉銮、谢文斌。

猪肉制品中植物成分定性 PCR 检测方法

1 范围

本标准规定了猪肉制品中植物成分的定性 PCR 检测方法。

本标准适用于由猪肉制成的半成品和成品中植物成分的定性检测。

本标准的检出限为 0.5 ng 植物 DNA。

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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法(GB/T 6682—2008,ISO 3696:1987,MOD)

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 19495.7 转基因产品检测 抽样和制样方法

3 术语和定义

GB/T 19495.1 确立的术语和定义适用于本标准。

4 防污染措施

检测过程中防止交叉污染的措施按照 GB/T 19495.2 中的规定执行。

5 抽样和制样

按照 GB/T 19495.7 规定的方法执行。

6 测定方法

6.1 原理

样品经过提取 DNA 后,针对植物特异基因的序列设计引物,通过 PCR 技术,特异性扩增植物基因的 DNA 片段,根据 PCR 扩增结果,判断该样品中是否含有植物成分。

6.2 试剂和材料

除另有规定外,所用试剂为分析纯或生化试剂,水为按照 GB/T 6682 规定的一级水。

6.2.1 引物:检测猪肉制品内源和外源基因的引物及其信息见表 1。

表 1 猪肉制品内、外源基因所需的引物信息

检测基因	引物序列	PCR 产物大小/ bp	基因性质	适用范围
tRNA _{Leu}	正:5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3' 反:5'-TTCCATTGAGTCTCTGCACCT-3'	193	植物叶绿体	猪肉制品
mitochondrion	5'-AAGTTAGAGATCGGGAGCCTAA-3' 5'-AAGGTGACAATAGGTAGTCC-3'	264	猪内源线粒体基因	猪肉制品

- 6.2.2 琼脂糖:电泳纯。
- 6.2.3 Tris 饱和酚。
- 6.2.4 三氯甲烷。
- 6.2.5 冰乙酸。
- 6.2.6 无水乙醇。
- 6.2.7 异戊醇。
- 6.2.8 异丙醇。
- 6.2.9 氢氧化钠(NaOH)。
- 6.2.10 盐酸(HCl)。
- 6.2.11 三羟甲基氨基甲烷(Tris)。
- 6.2.12 乙二胺四乙酸钠盐(Na_2EDTA)。
- 6.2.13 蔗糖。
- 6.2.14 溴酚蓝。
- 6.2.15 乙酸钠(NaAc)。
- 6.2.16 苯酚+三氯甲烷+异戊醇(25+24+1,体积比)。
- 6.2.17 三氯甲烷+异戊醇(24+1,体积比)。
- 6.2.18 乙酸钠溶液:3 mol/L 乙酸钠溶液,乙酸调节 pH 为 5.2。
- 6.2.19 $1\times\text{TAE}$ 电泳缓冲液:取 $50\times\text{TAE}$ (242 g Tris, 57.1 mL 冰乙酸, 100 mL 0.5 mol/L Na_2EDTA , 用 HCl 或 NaOH 调节 pH 至 8.0, 定容至 1 L) 按比例稀释。
- 6.2.20 TE 缓冲液:Tris 0.01 mol/L, Na_2EDTA 0.001 mol/L, 用 HCl 或 NaOH 调节 pH 至 8.0。
- 6.2.21 PCR 试剂盒:Taq 酶, dNTPs, $10\times\text{Buffer}$, 氯化镁(MgCl_2)。
- 6.2.22 上样缓冲液:0.25% 溴酚蓝, 40% (质量浓度) 蔗糖溶液。
- 6.2.23 溴化乙锭溶液:1 mg/mL。
- 6.2.24 70% 乙醇。
- 6.2.25 等效 DNA 提取试剂盒。
- 6.2.26 DNA 分子质量标准品(50 bp)。
- 6.3 主要仪器
 - 6.3.1 PCR 热循环仪。
 - 6.3.2 电泳仪。
 - 6.3.3 凝胶成像系统。
 - 6.3.4 离心机:12 000 r/min。
 - 6.3.5 涡旋振荡器。
 - 6.3.6 分析天平:0.1 g。
 - 6.3.7 微量可调移液器:0.5 μL , 2 μL , 10 μL , 20 μL , 100 μL , 200 μL , 1 000 μL 。
 - 6.3.8 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。
- 6.4 检测步骤
 - 6.4.1 模板 DNA 的提取
 - 6.4.1.1 对照
 - 阳性对照:猪基因组 DNA、植物基因组 DNA;
 - 阴性对照:已知以不含该基因的样品提取的 DNA;
 - 空白对照:双蒸水(ddH_2O)。
 - 6.4.1.2 提取步骤
 - a) 样品 DNA 提取时设双平行;

- b) 将样品粉碎,取适量样品放入 2.0 mL 离心管,加入 400 μ L TE 缓冲液(6.2.20),于 65 $^{\circ}$ C 水浴中溶解 10 min,上下颠倒混匀;
- c) 加入与溶液等体积苯酚+三氯甲烷+异戊醇(25+24+1)(6.2.16),摇晃混匀 10 min;
- d) 12 000 r/min 室温离心 10 min,将上清液转移至另一干净的 1.5 mL 离心管中;
- e) 加入上清液等体积三氯甲烷+异戊醇(24+1)(6.2.17),摇晃混匀 10 min;
- f) 12 000 r/min 室温离心 10 min,小心吸取上清液;
- g) 加入上清液 1/10 体积乙酸钠溶液(6.2.18)、2 倍~2.5 倍体积经-20 $^{\circ}$ C 预冷的无水乙醇(6.2.6),颠倒混匀后-20 $^{\circ}$ C 静置 1 h;或加入等体积异丙醇(6.2.8),混匀后室温静置 10 min;
- h) 12 000 r/min 室温离心 10 min,弃去上清液;
- i) 70%乙醇(6.2.24)洗涤沉淀 2 次~3 次,干燥 DNA;
- j) 50 μ L 0.1 $\times$ TE(6.2.20)溶解沉淀,4 $^{\circ}$ C 保存。

也可以用等效 DNA 提取试剂盒(6.2.25)提取 DNA,按试剂盒操作说明书指示进行操作。

6.4.2 DNA 质量的测定

样品中提取的 DNA 质量的测定用核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计(6.3.8)进行测定。

取适量 DNA 溶液加 TE 缓冲液(6.2.20)进行稀释,用核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计分别检测 260 nm 和 280 nm 处的吸光值 A_{260} 和 A_{280} 。DNA 的浓度按式(1)计算:

$$c = A \times N \times 50 / 1\,000 \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- c ——DNA 浓度, 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 1.4 以上时,可用于 PCR 扩增,1.7~2.0 之间时,PCR 扩增效果好。

6.4.3 PCR 扩增

6.4.3.1 PCR 反应体系

检测肉制品内、外源基因的 PCR 反应体系见表 2。每个反应体系应设置两个平行反应。同时设置阳性对照、阴性对照和空白对照。

表 2 PCR 反应体系

试剂名称	贮备液浓度	加入 PCR 反应体系的体积/ μ L
10 $\times$ PCR Buffer	—	2.5
MgCl ₂	25 mmol/L	2.5
dNTP	2.5 mmol/L	2.0
Primers	20 pmol/ μ L	正:0.25
		反:0.25
Taq	5 U/ μ L	0.15
Template	0.1 μ g / μ L~0.2 μ g / μ L	1
ddH ₂ O	—	补足反应体系总体积为 25

6.4.3.2 PCR 反应循环参数

见表 3。

表 3 各基因检测 PCR 反应条件

基因	变性	扩增	循环数	后延伸
植物叶绿体 tRNA ^{Leu} 基因	94 ℃/5 min	94 ℃/30 s 60 ℃/30 s 72 ℃/30 s	35	72 ℃/5 min
猪内源基因	94 ℃/5 min	94 ℃/30 s 54 ℃/30 s 72 ℃/30 s	35	72 ℃/5 min

6.4.4 PCR 扩增产物电泳检测

将适量的琼脂糖(6.2.2)加入 1×TAE 缓冲液(6.2.19)中,配制成浓度为 2%(质量浓度)的溶液,加热溶解,然后加入溴化乙锭溶液(6.2.23)至终浓度 0.5 μg/mL,混匀,稍适冷却后,倒入电泳板上,插上梳板,室温下凝固后,放入盛 1×TAE 缓冲液的电泳槽中,轻轻垂直向上拔去梳板。在每个泳道中加入适量的 PCR 产物与上样缓冲液(6.2.22)的混合液(10 μL~20 μL PCR 产物与上样缓冲液 2 μL 混合),其中一个泳道中加入 DNA 分子质量标准品(6.2.26)5 μL,接通电源电泳,按 2 V/cm 的电压电泳至溴酚蓝迁移至 3 cm~5 cm 处结束。凝胶成像仪观察并分析记录。

6.4.5 结果分析

6.4.5.1 内源基因的检测

用针对猪内源基因设计的引物对样品 DNA 提取液进行 PCR 测试,以猪肉 DNA 为阳性对照,阳性对照和待测样品均应被扩增出 264 bp 的 PCR 产物。如未见有该 PCR 扩增产物,则说明 DNA 提取质量有问题,或 DNA 提取液中有抑制 PCR 反应的因子存在,应重新提取 DNA,直到扩增出该 PCR 产物。

6.4.5.2 植物基因的检测

对样品 DNA 提取液进行植物特异基因的 PCR 测试,以植物 DNA 作为阳性对照,如果阴性对照和空白对照未出现扩增条带,阳性对照和待测样品均出现预期大小的扩增条带(扩增片段大小为 193 bp),则可初步判定待测样品中含有可疑的植物成分,应进一步进行确证实验,依据确证实验的结果最终报告;如果待测样品未出现 PCR 扩增产物,则可断定待测样品中不含有植物成分。

6.4.6 确证实验

当 PCR 检测结果为阳性时,可通过实时荧光 PCR 方法或其他方法(如测序比对,序列参见附录 A)进行确证试验;

推荐实时荧光 PCR 探针序列 5'-GCAATCCTGAGCCAAATCC-3'。

7 结果表述

7.1 植物特异基因片段得到扩增,且扩增片段大小与预期片段大小一致,表明样品中检测出植物成分,结果表述为“样品中检测出植物成分,阴性对照、阳性对照及空白对照检测结果正常”。

7.2 猪内源基因片段得到扩增,且扩增片段大小与预期片段大小一致,而植物特异基因片段未得到扩增,或扩增片段大小与预期片段大小不一致,表明样品中未检测出植物成分,结果表述为“样品中未检测出植物成分,阴性对照、阳性对照及空白对照检测结果正常”。

附 录 A
(资料性附录)
扩增片段序列

A.1 植物叶绿体 tRNA^{Leu} 基因片段(193 bp)

CGAAATCGGT AGACGCTACG GACTTAATTG GATTGAGCCT TAGTATGGAA
ACTTACTAAG TGATAACTTT CAAATTCAGA GAAACCCAGG AATTAAAAAT
GGGCAATCCT GAGCCAAATC CTCTTCTCCT TTCCAAGAAC AAACAGGGGT
TCAGAAAGCG AAAAAGGGGG ATAGGTGCAG AGACTCAATG GAA

A.2 mitochondrion 基因片段(264 bp)

AAGTTAGAGA TCGGGAGCCT AAATCTCCCC TCAATGGTAT GCCACAAC TA
GATACATCCA CATGATTCAT TACAATTACA TCAATAATTA TAACATTATT
TATTTTATTC CAACTAAAAA TCTCAAAC TA CTCATACCCA GCAAGCCCAG
AATCAATTGA ACTCAAAACT CAAAAACATA GCACCCCTTG AGAAATAAAA
TGAACGAAAA TCTATTTGCC TCTTTTATTG CCCCCACGAT AATAGGACTA
CCTATTGTCA CCTT
