



中华人民共和国国家标准

GB/T 35024—2018

常见畜禽动物成分检测方法 液相芯片法

Detection method of mammals and poultry ingredients—
Suspended bead array

2018-05-14 发布

2018-12-01 实施

国家市场监督管理总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由全国生物芯片标准化技术委员会(SAC/TC 421)提出并归口。

本标准起草单位：中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局、中华人民共和国上海出入境检验检疫局、中华人民共和国山东出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：陈颖、吴亚君、杨艳歌、韩建勋、刘鸣畅、王斌、黄文胜、曹际娟、王娉、张舒亚、高宏伟。

常见畜禽动物成分检测方法

液相芯片法

1 范围

本标准规定了畜禽产品中常见动物物种成分的液相芯片检测方法。

本标准适用于肉及加工品、乳、皮张、内脏、动物饲料等畜禽产品中哺乳动物和反刍动物成分,和 13 种常见肉品或掺杂成分(骆驼、马、驴、牦牛、水牛、狗、猪、马鹿、羊、鸡、鸭、大鼠、小鼠)动物物种成分的定性检测。方法的最低检出限为(质量百分比):水牛 5%,哺乳、反刍、狗、羊、鸡、大鼠、小鼠为 1%,骆驼、牦牛、马鹿、猪、马、驴、鸭的最低检测限为 0.1%。

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 14699.1 饲料 采样

GB/T 27403—2008 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

SN/T 3561 国境口岸卫生监督食品采样、送样规程

3 术语和定义、缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

液相芯片技术 **suspended bead array**

通过液相杂交将偶联有探针的微球与样品中靶基因序列结合,通过流式细胞技术对样品中的多种目标成分进行同时检测。

3.1.2

液相芯片探针 **suspended array probe**

固定于微球表面,能与目标成分亲和结合用于探测目标成分信息的核酸或蛋白分子。

3.1.3

质控探针 **quality control probe**

用来监控芯片反应是否正常的探针。

注:本标准使用的是人工合成的一段寡核苷酸探针(polyT₂₀polyA₂₀,5'端氨基标记)。

3.1.4

荧光强度中位值 **median fluorescence intensity**

液相芯片检测仪检测到的样品荧光信号值,即软件自动读取与样品结合的微球数量,并进行背景值校正后得到的数值。

3.1.5

阈值 cutoff value

判定阳性信号的最低荧光强度中位值。通过实验数据统计分析后得出,要求防止假阳性结果,同时保证灵敏度需求。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CTAB:十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide)

DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

dATP:脱氧腺苷三磷酸(deoxyadenosine triphosphate)

dCTP:脱氧胞苷三磷酸(deoxycytidine triphosphate)

dGTP:脱氧鸟苷三磷酸(deoxyguanosine triphosphate)

dTTP:脱氧胸苷三磷酸(deoxythymidine triphosphate)

EDC:1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐[N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide]

EDTA:乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid)

MES:2-吗啉乙磺酸[2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid]

SA-PE:链霉亲和素-藻红素(streptavidin-phycoerythrin)

SDS:十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate)

Taq:水生栖热菌(*Thermus aquaticus*)

TE:由 Tris 和 EDTA 配制而成的缓冲溶液(Tris-EDTA buffer solution)

TMAC:四甲基氯化铵(tetramethyl ammonium chloride)

Tris:三(羟甲基)氨基甲烷[tris(hydroxymethyl)aminomethane]

4 方法提要

对样品中的靶基因进行 PCR 扩增,通过液相杂交将偶联探针的微球与 PCR 扩增产物结合,采用流式细胞技术对目标成分进行检测。每一种带有独特色彩编号的微球固定一种探针,特异结合一种目标核酸序列。该核酸序列连接荧光标记物。单个的微球通过检测通道时被两束不同波长激光检测,一束激光检测微球的色标编码,另一束激光检测目标核酸序列荧光标记物。检测单一成分时,将该成分 PCR 产物与相应微球进行反应;检测多种成分时,可以将各个成分的 PCR 产物与微球混合物进行反应。检测实验室需达到 GB/T 27403—2008 的要求。

5 检测用引物和探针

质控探针及检测用哺乳动物通用引物探针,反刍动物通用引物探针,以及 13 种特异性引物和探针序列参见附录 A 中表 A.1。

6 试剂

6.1 Taq DNA 聚合酶。

6.2 10×PCR 缓冲液。

6.3 dNTPs (dATP、dCTP、dGTP、dTTP)。

6.4 琼脂糖。

- 6.5 溴化乙锭。
- 6.6 酚。
- 6.7 三氯甲烷。
- 6.8 异丙醇。
- 6.9 无水乙醇。
- 6.10 异戊醇。
- 6.11 分子量标准品(最小片段 ≥ 20 bp,最大片段 $\leq 2\,000$ bp)。
- 6.12 TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0,1 mmol/L EDTA)。
- 6.13 电泳缓冲液(10 $\times$ TBE:Tris 54 g,硼酸 27.5 g,20 mL 0.5 mol/L EDTA $\cdot$ Tris-HCl,pH 8.0,加水至 1 000 mL;50 $\times$ TAE:Tris 242 g,100 mL 0.5 mol/L EDTA,pH 8.0,冰乙酸,57.1 mL,加水至 1 L)。
- 6.14 加样缓冲液(0.25%溴酚蓝,40%蔗糖水溶液)。
- 6.15 非磁性微球(微球直径 5.6 μm ,羧基修饰,按比例掺入 660 nm 和 730 nm 两种分类荧光染色,每种荧光有 10 种浓度,根据比例不同可以把球型基质分类为 100 种)。
- 6.16 0.1 mol/L MES 溶液。
- 6.17 EDC 溶液(10 mg/mL)。
- 6.18 0.02% Tween-20。
- 6.19 0.1% SDS。
- 6.20 SA-PE 溶液。
- 6.21 TMAC 溶液(5 mol/L TMAC,20% N-月桂酰肌氨酸,1 mol/L Tris-HCl,pH 8.0,0.5 mol/L EDTA,pH 8.0)。
- 6.22 CTAB 提取液(20 g/L CTAB,1.4 mol/L NaCl,0.1 mol/L Tris-HCl,0.02 mol/L Na₂EDTA,pH 8.0)。
- 6.23 除另有规定外,所有试剂均为分析纯。实验用水符合 GB/T 6682 中二级水的要求。

7 仪器设备

- 7.1 PCR 仪。
- 7.2 液相芯片仪。
- 7.3 恒温箱。
- 7.4 离心机:离心力 15 000 g。
- 7.5 微量移液器:0.5 μL ~10 μL ,10 μL ~100 μL ,20 μL ~200 μL ,200 μL ~1 000 μL 。
- 7.6 核酸蛋白分析仪。
- 7.7 天平:感量 0.01 mg。

8 样品采集与制备

8.1 样品采集与前处理

采样、送样要求应符合 GB/T 14699.1 和 SN/T 3561 的规定。按照 8.1~8.2 进行前处理,处理后的样品分成三等份,包括检样、复检样和贮存样。

8.2 肉、皮张、内脏等

先依次用 70%乙醇和 ddH₂O 冲洗 2 次~3 次,洗去外源成分和调料等,控干水分,搅碎,收集到干净 50 mL 离心管或干净密封袋中,冻存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 。

8.3 乳、饲料等

混匀后直接分装到干净 50 mL 离心管或干净密封袋中,根据样品种类贮存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 。

9 检验步骤

9.1 DNA 提取

称取 1 g~2 g 处理好的样品于 50 mL 离心管中,加入 2 mL~5 mL CTAB 提取液,加入 20 μ L~100 μ L 的 20 mg/mL 蛋白酶 K, 65 $^{\circ}$ C 温育 1 h,期间不时震荡混匀,应保证样品自由悬浮于液体中,必要时再加入适量 CTAB 提取缓冲液。室温 12 000 g 离心 10 min,转移上清至 2 mL 离心管中,加入等体积的室温酚/三氯甲烷/异戊醇(25 : 24 : 1)颠倒混匀,室温 12 000 g 转速下离心 10 min。转移上清液至另一灭菌的离心管中,加入等体积的三氯甲烷/异戊醇(24 : 1),颠倒混匀,室温下 12 000 g 离心 10 min;转移上清至干净离心管中;加入等体积的 CTAB 沉淀液混匀,室温沉淀 1 h。加入 0.8 倍体积的异丙醇或 2 倍体积-20 $^{\circ}$ C 冰箱中预冷的无水乙醇混匀,-20 $^{\circ}$ C 放置 30 min~1 h,12 000 g 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min,弃上清,用 70% 乙醇洗涤沉淀一次,12 000 g 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min,弃上清,室温下晾干。加入 50 μ L~100 μ L 灭菌双蒸水,室温 10 min,混匀,-20 $^{\circ}$ C 保存。也可用等效 DNA 提取试剂盒提取模板 DNA。

9.2 DNA 定量

取 10 μ L DNA 溶液加蒸馏水稀释至 1 mL,使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。DNA 的浓度按照式(1)计算,当 OD_{260}/OD_{280} 比值在 1.7~2.1 之间时,适宜于 PCR 扩增。扩增前将所有样品 DNA 调至约 5 ng/ μ L~50 ng/ μ L。

$$c = \frac{A \times N \times 50}{1\,000} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

c ——DNA 浓度,单位为纳克每微升($\text{ng}/\mu\text{L}$);

A ——260 nm 处的吸光值;

N ——核酸稀释倍数。

9.3 PCR 扩增

9.3.1 PCR 体系

反应体系总体积为 25 μ L,其中包含:10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μ L,2.5 mmol/L dNTP 2 μ L,单一待检目标动物成分的上、下游引物(根据检测目标物种确定)各 0.5 μ L(引物浓度 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$),5 U/ μ L *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μ L,5 μ L DNA 模板(5 ng/ μ L~50 ng/ μ L),用灭菌双蒸水补足体积至 25 μ L。

9.3.2 PCR 参数

95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min;95 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,30 个循环(其中哺乳动物 40 个循环);72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min;4 $^{\circ}$ C 保存。

9.4 液相芯片检测

9.4.1 探针与微球偶联

取出微球存储管以最高转速涡旋 30 s,超声处理 15 s。选一种微球 50 μ L~1.5 mL 离心管中,10 000 g 离心 2 min,弃上清,用 50 μ L 0.1 mol/L MES(pH 4.5)重悬微球,彻底涡旋使微球分散成均匀的悬浊液状态,加入一种 0.5 μ L 预先稀释好的(0.05 nmol)探针。制备新鲜的 EDC 溶液(10 mg/mL),取 2.5 μ L EDC 至微球中,彻底混匀,室温避光摇动 30 min,重复此步骤一次。加入 1 mL 0.1% SDS,低速涡旋混匀,12 000 g 离心 2 min,小心移除上清,再加入 1 mL 0.02% Tween-20,低速涡旋重悬,

12 000 g 离心 2 min,小心移除上清,最后用 75 μ L TE 缓冲液重悬微球,4 $^{\circ}$ C 避光保存。

9.4.2 杂交反应

9.4.2.1 单微球探针

取样品的 PCR 产物 5 μ L 于 45 μ L 的无菌水中,涡旋混匀。将单一成分微球探针涡旋重悬,与 PCR 产物反应。反应体系为:微球 0.5 μ L,PCR 产物 1 μ L,1.5 $\times$ TMAC 33 μ L,用 1 $\times$ TE 15.5 μ L 调至 50 μ L,热反应条件为:95 $^{\circ}$ C 5 min,60 $^{\circ}$ C 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。

9.4.2.2 多微球探针

取样品的 PCR 产物 5 μ L 于 45 μ L 的无菌水中,涡旋混匀。将每一种微球探针均涡旋重悬,与 PCR 产物反应。反应体系为:每一种微球探针 0.5 μ L,每一种 PCR 产物 1 μ L,1.5 $\times$ TMAC 33 μ L,用 1 $\times$ TE 15.5 μ L 调至 50 μ L。热反应条件为:95 $^{\circ}$ C 5 min,60 $^{\circ}$ C 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。

9.4.3 上机检测

将杂交产物转到无菌抽滤板中,抽干,同时记录杂交体系对应孔位置。将 SA-PE 用 1 $\times$ TE 稀释到 4 ng/ μ L,每孔加入 50 μ L,避光震荡 2 min,再室温震荡 5 min。抽干滤孔板,用 125 μ L TE 洗三次,用 125 μ L TE 重悬。用矫正液矫正液相芯片仪,将上述处理好的样品上机检测。

10 质量控制

检测过程中分别设阳性对照、阴性对照、质控对照、空白对照。分别以目标引物探针对应的动物物种的肌肉或 DNA 溶液作为阳性对照,以提取的植物组织(大豆等任一植物)或 DNA 溶液作为阴性对照,用质控探针作检测体系的质控对照,用无菌双蒸水作空白对照。对照样品按照 9.1 步骤提取 DNA,也可使用购买的 DNA 溶液作为阳性或阴性对照。所有样品设 3 个重复,以荧光强度中位值的平均值作为样品读数。

11 结果判定与表述

11.1 结果判定

- 11.1.1 质控探针荧光强度中位值大于或等于空白对照 20 倍。
- 11.1.2 阳性对照荧光强度中位值大于阈值(各成分阈值设定参见附录 A 中表 A.2)。
- 11.1.3 阴性对照荧光强度中位值低于阈值。
- 11.1.4 在满足上述结果条件下,如果样品荧光强度中位值大于或等于阈值,判定为阳性;如果低于阈值,判定为阴性。

 11.2 结果表述

- 11.2.1 样品检测结果阳性,表述为该样品中含有某某成分。
- 11.2.2 样品检测结果阴性,表述为该样品中某某成分含量低于检测线。

12 检测过程中防止交叉污染的措施

按照 GB/T 27403—2008 中附录 D 的规定执行。

附 录 A
(资料性附录)

常见畜禽动物成分液相芯片扩增引物探针序列及检测阈值

表 A.1 注明了本标准所使用的哺乳动物、反刍动物、骆驼、马、驴、牦牛、水牛、狗、猪、马鹿、羊、鸡、鸭、大鼠、小鼠成分检测的引物探针序列,以及靶基因名称。表 A.2 规定了各靶标的检测信号阈值。

表 A.1 引物和探针序列

物种	序列(5'→3')	基因
驴	F:Biotin-CATCCTCATGTGCTATGTCAGTA	线粒体基因 tRNA-Thr 及 D-loop 区
	R:GCACGATGTACATAGGGTATTA	
	P:NH ₂ -TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTGAGCTGATATGGTGTTGTGCGGGG	
马	F:Biotin-CACCCTCATGTGCTATGTCAGTA	线粒体基因 tRNA-Thr 及 D-loop 区
	R:GCACGATGTACATAGGCCATTC	
	P:NH ₂ -TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTGAGGTGGGTATGGTGTTATGTGGGG	
猪	F:CAGACGGATGGGGCACCAACC	growth hormone (GH) gene
	R:Biotin-GCCGCATATCTAGGAGTAGATATC	
	P:NH ₂ -TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGGCTTTGGGGCTTCCGAATGTGAG	
牦牛	F:GACTAATATTCGAAAATCC	cytochrome b (cytb) gene
	R:Biotin-CTCCTAGGAGGGAGCCGAAGTTTCAC	
	P:NH ₂ -TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCAACGCATTCATTGACCTTCCAGCTCCAT	
水牛	F:CACCATCARCACCCAAAGCTG	线粒体基因 tRNA-Pro 及 D-loop 区
	R:Biotin-CTTGCTTATATGCATGGGGCATA	
	P:NH ₂ -TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCGGAGTGGTAAGACCATATGTTGTATGC CGTACATGCGAGG	
马鹿	F:AACACGTGATATAACCTTATGCGC	D-loop region
	R:Biotin- TATGTCCTATACACTAACTCATGTGC	
	P:NH ₂ - TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTGCTAGAACACGCATGTATAACAGCAC	
骆驼	F:AGCCTTCTCTTCAGTCGCAC	cytochrome b (cytb) gene
	R:Biotin-TGGGAGGACATAGCCCATGA	
	P:NH ₂ -TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCATCTGCCGAGATGTCAATTACGGCT	
羊	F:ACACAACCTTCTACCACAACCC	synthase F0 subunit 8 (ATP8) gene
	R:Biotin-AAACAATGAGGGTAACGAGGG	
	P:NH ₂ -TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTACACCGAAACAAAATACTCCTTGAGAAACA	
狗	F:TATTTGGAGCATGAGCCGGT	cytochrome oxidase subunit I (COI) gene
	R:Biotin-AGTAAAGTACCGGGCTGACC	
	P:NH ₂ -TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGCCTCCTCATCCGAGCCGAA	

表 A.1 (续)

物种	序列(5'→3')		基因
大鼠	F: TGCCGAGACGTAAACTACGG		cytochrome b (<i>cytb</i>) gene
	R: Biotin-CTCGTCCCACATGGAGGAAT		
	P: NH ₂ -TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTACTGATCCGATACCTACACGCCAACG		
小鼠	F: TGTCGAGACGTAAATTACGG		cytochrome b (<i>cytb</i>) gene
	R: CTCGTCCGACATGAAGGAAT		
	P: NH ₂ -TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTACTAATCCGATATATACACGCAAACG		
反刍	F: CACCATCARCACCCAAAGCTG		线粒体基因 tRNA-Pro 及 D-loop 区
	R: Biotin-CTTGCTTATATGCATGGGGCATA		
	P: NH ₂ -TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTGGTCTGTGTATGGGCGTGTTATGT TGGCTAGTGGTG		
哺乳	F: CCTCAGCAGGGTCTTCACCA		growth hormone (<i>GH</i>) gene
	R: Biotin-TTCAGCTTCTCGTAGACNCG		
	P: NH ₂ -TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCAGCCTGGTGTTTGGCACCTCGGA		
鸡	F: CAGGCTCAAACAACCCCCTA		cytochrome b (<i>cytb</i>) gene
	R: Biotin-GGGCTAGTGTTAGGAATGGGG		
	P: NH ₂ -TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTACTACTCCTTCAAAGACATTCTGGGCT		
鸭	F: CAGGCTCAAACAACCCCCTA		cytochrome b (<i>cytb</i>) gene
	R: Biotin-GGGCTAGTGCTATGAGGGGGG		
	P: NH ₂ -TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTACTTCTCCTTTAAGGACATCCTAGGAT		
质控	P-R: Biotin-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT		—
	P: NH ₂ -TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA		
注: P 表示探针,所有探针 5'端氨基化修饰,便于与羧基微球进行偶联;F 表示正向引物;R 表示反向引物;Biotin 表示生物素标记,便于与荧光报告分子结合。			

表 A.2 探针检测阈值

样品	哺乳	反刍	马	驴	骆驼	羊	猪	马鹿	水牛	牦牛	狗	大鼠	小鼠	鸡	鸭
阈值(荧光值与空白的倍数)	10×	20×	10×	10×	15×	50×	20×	18×	100×	20×	80×	120×	130×	80×	10×