



中华人民共和国国家标准

GB/T 38164—2019

常见畜禽动物源性成分检测方法 实时荧光 PCR 法

Identification of animal ingredient from common livestock and poultry—
Real-time PCR

2019-10-18 发布

2019-10-18 实施

国家市场监督管理总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前　　言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由全国生化检测标准化技术委员会(SAC/TC 387)提出并归口。

本标准起草单位:中国检验检疫科学研究院、大连海关、青岛海关、上海海关、沈阳海关。

本标准主要起草人:陈颖、韩建勋、郑秋月、高宏伟、张舒亚、王娉、孙敏、邢冉冉、张九凯、邓婷婷、王金玲、徐君怡。



常见畜禽动物源性成分检测方法

实时荧光 PCR 法

1 范围

本标准规定了常见畜禽动物源性成分的实时荧光 PCR 检测方法。

本标准适用于肉及加工品、内脏、乳、动物饲料中黄牛、牦牛、水牛、绵羊、山羊、猪、骆驼、马鹿、梅花鹿、驯鹿、兔、狗、鸡、鸭、鹅、鹌鹑、鸽子、火鸡、猫、狐狸、水貂、貉、鼠物种成分的 Taqman 探针实时荧光 PCR 定性检测。

检出限(LOD)1%(质量分数)。

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 27403—2008 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

GB/T 34796 水溶液中核酸的浓度和纯度检测 紫外分光光度法

GB/T 35918 动物制品中动物源性检测基因条码技术 Sanger 测序法

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

实时荧光 PCR real-time PCR

在 PCR 反应体系中加入荧光基团,通过荧光信号的积累实时监控整个 PCR 扩增过程。

3.1.2

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。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

ATP8: ATP 合成酶亚基 8(ATP synthase subunit 8)

COI :细胞色素 C 氧化酶亚基 I (Cytochrome C oxidase I)

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

cytb:细胞色素 b(Cytochrome b)

DNA:脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic acid)

D-loop:D-环区(Displacement loop region)

EDTA:乙二胺四乙酸(Ethylenediaminetetraacetic acid)

Na₂-EDTA:乙二胺四乙酸二钠(Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt)

ND1:烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化还原酶亚基1(Nicotinamide adenine dinucleotide oxidoreductase subunit 1)

Taq DNA 聚合酶:耐热 DNA 聚合酶(*Taq* DNA polymerase)

Tris:三羟甲基氨基甲烷(Tris hydroxymethyl aminomethane)

4 原理

通过物种特异性引物及探针进行畜禽动物源性成分的实时荧光 PCR 扩增,根据 PCR 扩增反应中每一个循环产物荧光信号进行判定,实现对常见畜禽动物源性成分的定性检测。

5 检测用引物和探针

内参照引物探针序列和常见畜禽动物特异性引物探针序列见表 1。



表 1 引物探针序列

| 目标物种 | 序 列 | 基因来源 |
|------|---|----------------|
| 内参基因 | F:TCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTA R:AATTTCGCGCCCTGCTGCCTTCCTT P:5'FAM-CCGTTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAATCGAAC-3'TAMRA | 18S rRNA 基因 |
| 黄牛 | F:TGGAGTAATCCTTCTGCTCACAGT R:TGACTGTTGCTCCTCAGAATGATA P:5'FAM-AGCATTATAGGATACGTCC-3'MGBNFG | <i>cytb</i> 基因 |
| 牦牛 | F:GACTAATATTCGAAAATCC R:CTCCTAGGAGGGAGCCGAAGTTTCAC P:5'FAM-CAACGCATTATTGACCTCCAGCTCCAT-3'TAMRA | <i>cytb</i> 基因 |
| 水牛 | F:TTCATTGAYCTCCCTGCTCC R:GGAATAGGCCGGTGAGGATT P:5'FAM-ACTTGGCTCTCTCC-3'MGBNFG | ATP8 基因 |
| 骆驼 | F:ATTCTTGCTTCCACTTCA R:AGCGTATGCGAATAGGAAAT P:5'FAM-CCTACACGAAACAGGCTCTAATAACCCGAC-3'TAMRA | <i>cytb</i> 基因 |
| 梅花鹿 | F:CCTACCACCGAAGCAATAGTGG R:GGTGCACTCTCAATAACTTCTGAGA P:5'FAM-CACTGTAGCTACTCAAGAAC-3'TAMRA | CO I 基因 |
| 马鹿 | F:TAGTTATGTAACAAAGACTG R:ATAGACTGTAGTAGCAAGGAA P:5'FAM-AGGACTTGGCGGTGCTTAT-3'TAMRA | 12S rRNA 基因 |
| 驯鹿 | F:CTCCCAGTACGAAAGGACCA R:GGGCAGGATATGTTGTGA P:5'FAM-CCAACTTAACGCGCCT-3'TAMRA | 16S rRNA 基因 |

表 1(续)

| 目标物种 | 序 列 | 基因来源 |
|------|---|----------------|
| 山羊 | F:TGGAGTAATCCTCCTGCTC R:GGATTGCTGAAAGAAGATTA P:5'FAM-CATAGGCTATGTTTACCATGAG-3'TAMRA | <i>cytb</i> 基因 |
| 绵羊 | F:CGGAGTAATCCTCCTATTGC R:CTAGGCTTGCCAAATATATGGA P:5'FAM-TATTACCAACCTCCTT-3'MGBNFG | <i>cytb</i> 基因 |
| 鸽子 | F:GAGCAACCCCTAACGTACT R:ACCTCCTCGTCGATATGGACTC P:5'FAM-CCCCTAACGTACTAACAGTAACCAGAC-3'TAMRA | 16S rRNA 基因 |
| 鵝 | F:GCCACACAAATCCTCACAG R:TGTGTTGGCTACTGAGGAGAAA P:5'FAM-CCTACTGGCTATGCACTACACCGCAGAC-3'Eclipse | <i>cytb</i> 基因 |
| 鹅 | F:CCACCGCGAACCTCAAT R:TCTGTTTTGGAGGAGTTGTTCTC P:5'FAM-CCATCGCAGAGCCTGGTCGATATTTT-3'Eclipse | 16S rRNA 基因 |
| 鹌鹑 | F:GGATCACTTGCCCACTTAA R:GGGTGACGGGCGGTATG P:5'FAM-ATGCCCTGAGGCAC-3'Eclipse | 12S rRNA 基因 |
| 水貂 | F:GCTTCAATCCTCTATTCATAA R:GCTTCTTCCTTGAGTCTTA P:5'FAM-CCTCCTAGTCTCATGCCAACCGT-3'Eclipse | <i>cytb</i> 基因 |
| 貓 | F:CTGCTGTCTTACTACTTCTA R:GGTGTAGGAGTTTCGATC P:5'FAM-CACTCCAGTCTTAGCAGCGG-3'Eclipse | CO I 基因 |
| 兔 | F:TAATCGTCACCGCACATGCC R:CTATGTCAGGAGCCCCATTATCA P:5'FAM-ACAAGCCAGTCCCCGAAGCCTCCA-3'Eclipse | CO I 基因 |
| 猪 | F:ATCTACATGATTCAATTACAATTAC R:CTATGTTTGAGTTTGAGTTCA P:5'FAM-ATCTCAAACACTCATACCCA-3'TAMRA | ATP8 基因 |
| 狗 | F:TCCAGGTAAACCCCTTCTTCCC R:TTACGAGCAAGGGTTGATGGT P:5'FAM- ATCACTTAGTCCAATAAGG-3'MGBNFG | D-loop 基因 |
| 狐狸 | F:TGGAGCATCAGTAGACCTTACAATT R:GGCGGGAGGTTTATATTGATAATAG P:5'FAM-CCCTGCACCTGGCCGGAGTC-3'TAMRA | CO I 基因 |
| 貉 | F:AATCTTGCCTGGGTTGGAA R:CAGTAAATATGTGGTGGGCTCACA P:5'FAM-CATACTACTCCGGGAAAA-3'MGBNFG | CO I 基因 |

表 1(续)

| 目标物种 | 序 列 | 基因来源 |
|------|--|----------------|
| 鸡 | F:CCCTCCTCCTTCATCCTCAT R:GTCATAGCGAACCGTGGATA P:5'FAM-CTATGAATCCGGGCCTC-3'TAMRA | ND1 基因 |
| 火鸡 | F:GCCCTAACCCCTTAAGAAAAGAAT R:AGTTGCTATGGCTAACGTCAAGTTACAC P:5'FAM-CTTGCTTGAGCCACACC-3'MGBNFG | 12S rRNA 基因 |
| 鼠 | F:CCGCCCAATCACCCAAA R:GCCTCCGATT CATGTTAAGA P:5'FAM-TACTGAATYCTAGTAGCCAACCT-3'MGBNFG | <i>cytb</i> 基因 |

注: F 代表上游引物; R 代表下游引物; P 代表探针。

6 试剂

- 除另有规定外,所有试剂均为分析纯。试验用水符合 GB/T 6682 中一级水的要求。
- 6.1 三氯甲烷。
- 6.2 异丙醇。
- 6.3 无水乙醇。
- 6.4 氢氧化钠溶液(10 mol/L):在 160 mL 双蒸水中加入 80.0 g 氢氧化钠(NaOH),溶解后,冷却至室温,再加双蒸水定容至 200 mL。
- 6.5 Na₂-EDTA 溶液(500 mmol/L,pH 8.0):称取 18.6 g Na₂-EDTA,加入 70 mL 双蒸水中,再加入适量氢氧化钠溶液(6.4),加热至完全溶解后,冷却至室温,用氢氧化钠溶液(6.4)调 pH 至 8.0,加双蒸水定容至 100 mL。在 103.4 kPa(121 ℃)条件下灭菌 20 min。
- 6.6 Tris-HCl 溶液(1 mol/L,pH 8.0):称取 121.1 g Tris 溶解于 800 mL 双蒸水中,用 HCl 调 pH 至 8.0,加双蒸水定容至 1000 mL。在 103.4 kPa(121 ℃)条件下灭菌 20 min。
- 6.7 CTAB 提取缓冲液(pH 8.0):称取 4.0 g CTAB,16.364 g NaCl,加入 20 mL 1 mol/L Tris-HCl 溶液(pH 8.0)(6.6),8 mL 500 mmol/L Na₂-EDTA 溶液(pH 8.0),先用 70 mL 双蒸水溶解,再定容至 200 mL,在 103.4 kPa(121 ℃)条件下灭菌 20 min。
- 6.8 CTAB 沉淀液:称取 1.0 g CTAB,0.467 g NaCl,先用 70 mL 双蒸水溶解,再定容至 200 mL,在 103.4 kPa(121 ℃)条件下灭菌 20 min。
- 6.9 蛋白酶 K(670 U/mL):称取 0.10 g 酶活为 33.5 U/mg(Unit,酶学单位)的蛋白酶 K 干粉,加入 5 mL 双蒸水,轻轻摇动,直至蛋白酶 K 完全溶解,分装成小份贮存于 -20 ℃。
- 6.10 PCR Master Mix(2×),也可用等效的实时荧光 PCR 预混液。

7 仪器设备

- 7.1 实时荧光 PCR 仪。
- 7.2 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。
- 7.3 恒温水浴锅。
- 7.4 离心机:离心力≥12 000 g。

7.5 pH 计;0.01 级。

7.6 天平:感量 0.1 g、0.01 g、0.001 g。

8 检验步骤

8.1 样品前处理

8.1.1 总则

对样品进行前处理,处理后的样品分成三等份,包括待检样品、复检样品和留存样品。

8.1.2 固体样品

依次用 70% 乙醇和双蒸水冲洗 2 次~3 次,收集到干净 50 mL 离心管或干净密封袋中,−20 ℃以下冻存。

8.1.3 半固体、液体样品

混匀后直接分装到干净 50 mL 离心管或干净密封袋中,−20 ℃以下冻存。

8.2 DNA 提取

按照 GB/T 35918 的方法提取。

也可用等效 DNA 提取试剂盒提取 DNA。

8.3 DNA 浓度和纯度的测定

按照 GB/T 34796 方法测定并计算 DNA 的浓度,判定 DNA 和纯度。

注:实测荧光 PCR 扩增试验前,宜将 DNA 浓度稀释至 5 ng/μL~50 ng/μL 范围。

8.4 实时荧光 PCR 扩增

检测过程中设置阳性对照、阴性对照和空白对照。

用含目标成分的样品或含目标片段的阳性质粒作为阳性对照,以不含目标成分的样品或不含目标片段的阴性质粒作为阴性对照,以双蒸水为空白对照。

样品和对照设置 2 个平行的反应体系,分别进行靶向基因和内参基因扩增,以 Ct 平均值作为最终结果。反应体系的体积为 25 μL,体系组成见表 2,反应参数见表 3。

表 2 实时荧光 PCR 反应体系组成

| 试剂名称 | 终浓度 | 体积/μL |
|---------------------------|------------|-------|
| PCR Master Mix(2×) | 1× | 12.5 |
| 上游引物 (10 μmol/L) | 200 nmol/L | 0.5 |
| 下游引物 (10 μmol/L) | 200 nmol/L | 0.5 |
| 探针 (10 μmol/L) | 200 nmol/L | 0.5 |
| DNA 模板 (5 ng/μL~50 ng/μL) | — | 5.0 |
| 双蒸水 | — | 6.0 |

表 3 实时荧光 PCR 反应参数

| 待测物 | 反应参数 |
|-----|---|
| 内参照 | 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40 个循环 |
| 黄牛 | 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40 个循环 |
| 牦牛 | 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40 个循环 |
| 水牛 | 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40 个循环 |
| 骆驼 | 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40 个循环 |
| 梅花鹿 | 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40 个循环 |
| 马鹿 | 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40 个循环 |
| 驯鹿 | 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40 个循环 |
| 山羊 | 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40 个循环 |
| 绵羊 | 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 62 °C 1 min, 40 个循环 |
| 猪 | 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40 个循环 |
| 狗 | 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40 个循环 |
| 鸽子 | 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40 个循环 |
| 火鸡 | 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40 个循环 |
| 狐狸 | 95 °C 5 min; 95 °C 15 s, 60 °C 40 s, 40 个循环 |
| 貉 | 95 °C 5 min; 95 °C 15 s, 60 °C 40 s, 40 个循环 |
| 鸡 | 95 °C 5 min; 95 °C 15 s, 60 °C 40 s, 40 个循环 |
| 鼠 | 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 62 °C 40 s, 40 个循环 |
| 鸭 | 95 °C 2 min; 95 °C 15 s, 65 °C 80 s, 40 个循环 |
| 鹅 | 95 °C 2 min; 95 °C 15 s, 65 °C 80 s, 40 个循环 |
| 鹌鹑 | 95 °C 2 min; 95 °C 15 s, 65 °C 80 s, 40 个循环 |
| 兔 | 95 °C 10 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环 |
| 水貂 | 95 °C 10 s; 95 °C 5 s, 52 °C 10 s, 72 °C 34 s, 40 个循环 |
| 猫 | 95 °C 10 s; 95 °C 5 s, 52 °C 10 s, 72 °C 34 s, 40 个循环 |

9 质量控制

以下条件有一条不满足时, 试验视为无效:

- a) 内参照: 荧光通道有荧光信号检出, 且出现典型的扩增曲线, C_t 值 < 30.0 ;
- b) 空白对照: 荧光通道无荧光信号检出, C_t 值应 ≥ 40.0 ;
- c) 阴性对照: 荧光通道无荧光信号检出, C_t 值应 ≥ 40.0 ;
- d) 阳性对照: 荧光通道有荧光信号检出, 且出现典型的扩增曲线, C_t 值 ≤ 35.0 。

10 结果判定及表述

10.1 结果判定

在符合第 9 章的情况下, 检测结果按以下进行判定:

- a) 如 Ct 值 $\leqslant 35.0$, 则判定为被检样品阳性, 扩增靶标序列参见附录 A;
- b) 如 Ct 值 $\geqslant 40.0$, 则判定为被检样品阴性;
- c) 如 $35.0 < \text{Ct} \text{ 值} < 40.0$, 则重复一次。如再次扩增后 Ct 值仍为 < 40.0 , 则判定被检样品阳性; 如再次扩增后 Ct 值 $\geqslant 40.0$, 则判定被检样品阴性。

10.2 结果表述

10.2.1 结果为阳性者, 表述为“检出×××(目标物种)成分”。

10.2.2 结果为阴性者, 表述为“未检出×××(目标物种)成分”。

11 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)
各动物源性成分基因扩增靶标序列

黄牛成分的基因扩增靶标参考序列(GenBank: MK028750.1): tggagtaatcctctgctcacagtaatgccacagcattt ataggatacgctaccatgaggacaatcattctgaggagaacagtca

牦牛成分的基因扩增靶标参考序列(GenBank: GQ464309.1): gactaatattcgaaaatccatccactaataaaaattgtaa acaacgcatttcattgacccatcaaacattcatcatgtgaaacttcggctccctcttaggag

水牛成分的基因扩增靶标参考序列(GenBank: MH880269.1): ttcatgtatccctgtccatcaaacatctcatcatgtat aaacttttgtctctcttaggcattgcataattctgcaaatcctcacccgcatttcc

骆驼成分的基因扩增靶标参考序列(GenBank: MH110007.1): attctttgccttccacttcattctgtccatattatcacggc ccttagccgtacaccttatttcatacggaaacaggcttaataaccgcacaggaaatctctcagacatagacaaatccattccacccctactaca caattaaagacatcttaggagcactgtactaataatttcatttctgtactgttctaccagactttaggagatctgacaactatactccgc taaccctcaatacaccaccacattaagccgaatgatatttcatttgcatacgt

梅花鹿成分的基因扩增靶标参考序列(GenBank: D14379.2): cttaccaccgaagcaatgtggacactgttagctactcaag aagctttcagaagttattgagagtgcacc

马鹿成分的基因扩增靶标参考序列(GenBank: NC_039923.1): tagttatgtaaacaagactgttgcgcagagtactaccgg caatagcttaaaactcaaaggacttggcggtgtttataccctttagaggagcctgttataatcgataaaacccgataaacctcaccattccttgata ctacagtctat

驯鹿成分的基因扩增靶标参考序列(GenBank: GU220719.1): ctcccagtacgaaaggaccagagaataaggccaactttt aatcaaggcgttaattaactaatgattcatctttaatttagatacacaatccgc

山羊成分的基因扩增靶标参考序列(GenBank: LS992662.1): tggagtaatcctctgctcgacaaatggccacagcattca taggctatgtttaccatgaggacaatcatttgaggggcaacagtcatcataattttttcagaaatcc

绵羊成分的基因扩增靶标参考序列(GenBank: KY786037.1): cggagtaatcctcttattgcgcacaatagccacagcattca taggctacgttaccatgaggacaatcattctgaggacaacagtattaccacccctttagcaattccatataattggcacaaggctag

鸽子成分的基因扩增靶标参考序列(GenBank: GQ240309.1): gagcaaccctcaacgtactaacagtaaccagacccaata taattgaccaatggaccaagctacccaggataacagcgaatctcccaagagtccatategcacgaggaggt

鸭成分的基因扩增靶标参考序列(GenBank: EU914150.1): ggccacacaaatcctcacaggcctctactggctatgcactacc accgcacacatccctgtttctctcagtagccaacaca

鹅成分的基因扩增靶标参考序列(GenBank: AF363031): ccacccgcaatctcaatcaacccactggggccactaccatcgca agaggcctggcgtatttcggtggggcgttggaggagaacaatccctaaaaacaaga

鹌鹑成分的基因扩增靶标参考序列(GenBank: AM902516): ggatcaatttgcctactttaagatggccctgaggcacgtacatcaccgcgtcaccc

水貂成分的基因扩增靶标参考序列(GenBank: AB052720.1): gcttcaatccttatttcataatccctctgttcatgc当地 tcgtcagyattattgaaaataatctttaaaatgaagagtctttagtatcaattcyttgtttaaaacccatggagaaccctatctccctaa gactcaagagaaga

猫成分的基因扩增靶标参考序列(GenBank: U20753.1): ctgcgttctactacttctatcacttcagtcgttgcggaaatc actatattattaacagatcgaaacctaacc

兔成分的基因扩增靶标参考序列(GenBank: NC_001913.1 COX1): taatcgacccgcacatgccttgcataatcttcttataatcgcatgccttattataattggaggcttcggaaactggcgttgcataatttgcataatcgcatgccttattataattggggctctgacatag

猪成分的基因扩增靶标参考序列(GenBank: KY964306.1): atctacatgatttattacaattacatcaataattataacattatttatttattccaaactaaaaatctcaaactactcatacccgaaagcccagaatcaaccgaactcaaaaactcaaaaacatag

狗成分的基因扩增靶标参考序列(Genbank:KY700649.1):tccaggtaaacccttccctccctatgtacgtcgtcatta
atggtttgcgccatgecatataagecatataattatattcttacataggacatataactcaatcacaattcattgatctgcagcagtatcaaatg
catatcaacttagtccaataaggcttaatcaccatgcctcgagaaaccatcaacccttgctgtaa

狐狸成分的基因扩增靶标参考序列(GenBank:JF443559.1):tggagcatcagtagacccataatttcctgcacctggc
cgaggtcttcaattttaggagcttatttcatcactactattatcaataaaaacctcccgec

貉成分的基因扩增靶标参考序列(GenBank:AF028197.1):aatctgcctggggttggataattccatatcggtacataact
actccggaaaaagaacccttggttacataggaatagtctgagcaataatctattggattcttaggcttacgtgtgagccaccatattactg
鼠成分的基因扩增靶标参考序列(GenBank:KY611388.1):attccgcccatacccaaacccataactgaattcttagtagcc
aacctttcatttacatgaatcgaggccaa

鸡成分的基因扩增靶标参考序列(Genbank:KY039437):ccctcttcatttcatttcatttatgaatccggcctcatatcca
cggtccgcgtatgac

火鸡成分的基因扩增靶标参考序列(GenBank:U83741.1):gccctaacccttaagaaaagaataaaggagcaggtatcagg
cacactctaattgttagcccaagacgccttgcttgagccacacccccacgggtattcagcagtaattaaccttaagcaataagtgtaaacttgacttagccat
agcaact

