

# 中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1946—2010

---

## 饲料中牛羊源性成分检测 实时荧光聚合酶链反应法

**Determination of bovine and ovine material in feeds—  
Realtime PCR method**

2010-09-21 发布

2010-12-01 实施

---

**中华人民共和国农业部 发布**

## 前 言

本标准遵照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业部畜牧业司提出。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)归口。

本标准起草单位:上海市兽药饲料检测所、农业部饲料质量监督检验测试中心(西安)、新疆兽药饲料监察所、农业部饲料质量监督检验测试中心(成都)、天根生化科技(北京)有限公司。

本标准主要起草人:金陵艳、张文刚、顾欣、黄士新、王蓓、沈富林、陈莉、达列亚、程传民、蒋彦波。

# 饲料中牛羊源性成分检测 实时荧光聚合酶链反应法

## 1 范围

本标准规定了饲料中牛羊源性成分的实时荧光聚合酶链反应(PCR)检测方法及其结果判定。  
本标准适用于动物源性饲料、配合饲料、浓缩饲料、精料补充料中牛羊源性成分的定性检测。  
本方法的最低检出限为 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 20195 动物饲料 试样的制备

## 3 定义和缩略语

下列定义和缩略语适用于本文件。

### 3.1

**实时荧光聚合酶链反应** **real-time PCR**

聚合酶链反应(PCR)是通过特异性引物和模板 DNA 之间的序列特异性互补结合,在 DNA 聚合酶的作用下进行的定向酶促 DNA 片段扩增反应。实时荧光 PCR 技术是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累实时检测整个 PCR 进程,对未知模板进行定性或定量分析。

### 3.2

**循环阈值** **cycle threshold**

每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数。

### 3.3

**通用探针** **universal probe**

能够同时检测出牛源性成分和羊源性成分的探针。

### 3.4

**牛探针** **bovine probe**

只能够检测出牛源性成分的探针。

### 3.5

**羊探针** **ovine probe**

只能够检测出羊源性成分的探针。

### 3.6

**阳性对照** **positive control**

已添加 0.1%牛、羊源性成分样品。

### 3.7

**阴性对照 negative control**

已知不含牛、羊源性成分的样品。

**3.8**

**空白对照 blank control**

等体积的双蒸水代替模板 DNA

**3.9 缩略语**

Ct: Cycle threshold, 循环阈值

DNA: Deoxyribonucleic Acid, 脱氧核糖核酸

Tris: Tris-(hydroxymethyl) Aminomethane, 三羟甲基氨基甲烷

SDS: Sodium dodecyl sulfonate, 十二烷基磺酸钠

dNTP: Deoxyribonucleoside Triphosphate, 脱氧核苷三磷酸

UNG: Uracil DNA Glycosylase, 尿嘧啶 DNA 糖基酶

Taq: Thermus Aquaticus, 栖热水生菌

MGB: Minor Groove Binder, 小沟结合物

**4 原理**

根据牛、羊的线粒体 DNA 的 D-loop 区特征序列(参见附录 A)设计一对引物,同时扩增牛源性、羊源性线粒体 DNA,并与标记有荧光物质的牛、羊通用探针、牛探针、羊探针进行特异性结合,利用荧光信号积累实时观察 PCR 的扩增曲线,从而对饲料中的牛源性、羊源性成分进行定性检测。

**5 抽样和制样**

**5.1 抽样方法**

按 GB/T 14699.1 规定的方法进行样品采集。

**5.2 样品制备**

按 GB/T 20195 的规定制备试样。选取有代表性饲料样品至少 500 g,经粉碎机粉碎后,过孔径为 0.2 mm 的标准筛。混匀后,装入清洁容器内保存,防止交叉污染。

**5.3 样品保存**

样品于 4℃ 避光保存。

**6 试剂和材料**

除另有规定外,试剂为分析纯或生化试剂;实验用水应符合 GB/T 6682 一级水的要求。

**6.1 DNA 提取试剂盒试剂**

6.1.1 缓冲液 I: 50 mmol/L Tris-HCl 和 5% SDS, pH=8.0。称取 Tris 碱 6.057 g、SDS 50 g,加水 900 mL 使溶解,用浓盐酸(HCl)调 pH 至 8.0,加水稀释至 1 000 mL

6.1.2 缓冲液 II: 5 mmol/L 盐酸胍。称取盐酸胍 0.478 g,加水使溶解,并稀释至 1 000 mL

6.1.3 缓冲液 III: 3 mmol/L 盐酸胍。称取盐酸胍 0.287 g,加水使溶解,并稀释至 1 000 mL

6.1.4 漂洗液: 5 mmol/L Tris-HCl。称取 Tris 碱 0.606 g,加水 900 mL 使溶解,用浓盐酸(HCl)调 pH 至 8.0,加水稀释至 1 000 mL

6.1.5 洗脱缓冲液 TE: 10 mmol/L Tris-HCl, pH=8.0。称取 Tris 碱 1.211 g,加水 900 mL 使溶解,用浓盐酸(HCl)调 pH 至 8.0,加水稀释至 1 000 mL

6.1.6 蛋白酶 K 溶液: 10 mg/mL

**6.2 牛羊源性成分检测实时荧光 PCR 试剂盒试剂**

6.2.1 2×牛羊源性成分检测反应液

含有 Taq DNA 聚合酶(终浓度 1.25 U/25 μL)、UNG 酶(终浓度 0.25 U/25 μL)、Mg<sup>2+</sup> (终浓度 1.5 mmol/L)、dNTPs(终浓度各 0.2 mmol/L)。

6.2.2 牛羊源性成分检测引物混合液

含有扩增牛羊源性成分检测引物(序列详见表 1)。引物浓度与使用的实时荧光 PCR 扩增仪有关,实际使用时请参照仪器使用说明书,或按各引物的具体使用要求进行,参考浓度为 1 μmol/L

表 1 牛羊源性成分检测引物序列

|      | 序 列                                       |
|------|-------------------------------------------|
| 上游引物 | 5'GGG CTG ATT AGT/C CAT TAG TCC AT 3'     |
| 下游引物 | 5'CAG A/GCA TCT GGT TCT TTC TTC AGG GC 3' |

6.2.3 牛羊源性成分检测探针混合液

含有检测饲料中牛羊源性线粒体 DNA 的探针(序列详见表 2)。探针浓度与使用的实时荧光 PCR 仪有关,实际使用请参照仪器使用说明书,或按各探针的具体使用要求进行,参考浓度为 0.3 μmol/L~0.6 μmol/L

表 2 牛羊源性成分检测探针序列

| 名 称  | 序 列                                             |
|------|-------------------------------------------------|
| 牛探针  | 5'(FAM)-TGG ACC/G GTT TTA GA/GT GAG A-3'(MGB)   |
| 羊探针  | 5'(FAM)-TGG GCG ATT TTA GA/GT GAG A-3'(MGB)     |
| 通用探针 | 5'(FAM)-AGA TGT CTT ATT TAA GAG GAA AGA-3'(MGB) |

7 仪器和设备

- 7.1 实时荧光定量 PCR 仪:可检测荧光染料 FAM,温度,±0.3℃。
- 7.2 离心机:转速≥12 000 r/min
- 7.3 分析天平:感量 0.1 mg。
- 7.4 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计:波长 260 nm±1 nm,280 nm±1 nm
- 7.5 恒温水浴锅:温度,±1℃
- 7.6 高压灭菌锅:温度,115℃~135℃
- 7.7 鼓风干燥箱:温度,±1℃
- 7.8 冰箱:温度,-20℃~4℃。

8 步骤

8.1 DNA 的提取

称取约 50 mg 试样,装入 1.5 mL 已灭菌的离心管中,加入 320 μL 缓冲液 I (6.1.1),振荡至样品彻底悬浮;加入蛋白酶 K 溶液(6.1.6)20 μL,混匀。在 65℃水浴约 30 min,其间混匀 2 次~3 次;加入 340 μL 缓冲液 II (6.1.2),充分颠倒混匀,65℃水浴 10 min,其间混匀 2 次~3 次;置于离心机(7.2)12 000 r/min 离心 2 min,取 440 μL 上清液至另一个离心管中;向上清液中加入 220 μL 无水乙醇,充分颠倒混匀 6 次~8 次,此时可能会出现絮状沉淀;将所得溶液和絮状沉淀全部移入一个 DNA 吸附柱内(吸附柱放入收集管中),12 000 r/min 离心 2 min,倒掉废液,将吸附柱放回收集管中;向吸附柱内加入 500 μL 缓冲液 III (6.1.3)(使用前请按照缓冲液 III + 无水乙醇 = 13+17 的比例加入无水乙醇),12 000 r/min 离心 30 s,倒掉废液,将吸附柱放回收集管中;向吸附柱内加入 700 μL 漂洗液(6.14)(使用前请按照漂洗液 + 无水乙醇 = 1+4 的比例加入无水乙醇),12 000 r/min 离心 30 s,倒掉废液,将吸附柱放入收集管中;向

吸附柱内加入 500  $\mu\text{L}$  漂洗液(6.1.4), 12 000 r/min 离心 30 s, 倒掉废液; 将吸附柱放回收集管中, 12 000 r/min 离心 2 min, 倒掉废液。将吸附柱置于室温放置约 10 min, 以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液; 将吸附柱放入一个干净的离心管中, 向吸附膜的中间部位悬空滴加 50  $\mu\text{L}$ ~200  $\mu\text{L}$  洗脱缓冲液 TE (6.1.5), 室温放置约 5 min, 12 000 r/min 离心 2 min; 该 DNA 提取溶液于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

在提取样品 DNA 的同时, 对阳性对照和阴性对照进行同法操作。

也可用等效的 DNA 提取试剂盒提取 DNA。

## 8.2 试样中 DNA 浓度和纯度的测定

将提取的 DNA 溶液(8.1)用双蒸水进行适当稀释, 使用核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计在 260 nm 和 280 nm 处测定吸光值  $A_{260}$  和  $A_{280}$ 。

试样中 DNA 的浓度  $\rho$  按式(1)计算:

$$\rho = \frac{A_{260} \times N \times 50}{1\ 000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

$\rho$ ——DNA 浓度, 单位为微克每微升( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ );

$A_{260}$ ——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

本方法中, PCR 反应体系的总体积为 25  $\mu\text{L}$ 。配置方法如下: 2 $\times$ 牛羊源性成分检测反应液(6.2.1) 12.5  $\mu\text{L}$ 、牛羊源性成分检测引物混合液(6.2.2)和牛羊源成分检测探针混合液(6.2.3)各 1  $\mu\text{L}$ 、模板 DNA(1 ng/ $\mu\text{L}$ ~100 ng/ $\mu\text{L}$ ) 2  $\mu\text{L}$ , 灭菌双蒸水补足体系用量使总体积为 25  $\mu\text{L}$ 。

检测过程中分别设阳性对照、阴性对照和空白对照。

注 1: 反应体系的配制尽可能在冰浴条件下进行。

注 2: 检测多个样品时, 建议先将除模板 DNA 之外的试剂按上述比例混合以方便后续操作。

注 3: 根据仪器不同, 可用等效的实时荧光 PCR 反应体系。

注 4: 建议实验中先使用通用探针检测样品, 判断样品中是否含有牛、羊源性成分。若结果为阳性, 则再使用牛探针或羊探针进一步检测, 判定其成分; 若结果为阴性, 则表明样品中不含牛羊源性成分, 无需进一步实验。

注 5: 为了防止 PCR 反应及反应管、盖受到污染, 操作时应带无粉手套。

## 8.4 实时荧光 PCR 循环条件

将反应管放入实时荧光定量 PCR 仪, 设置反应循环条件, 进行实时荧光 PCR 扩增反应。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调整。一般反应条件为: 步骤一,  $50^{\circ}\text{C}$  2 min; 步骤二,  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 10 min; 步骤三,  $95^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,  $63^{\circ}\text{C}$  退火延伸 30 s, 40 个循环。

## 8.5 数据分析

实时荧光定量 PCR 仪自动进行数据处理, 并生成分析结果报告。

# 9 结果判定

## 9.1 结果表述及分析条件设定

实时荧光 PCR 循环结束后, 由荧光定量 PCR 仪自动生成分析结果报告, 以  $C_t$  平均值表述实验结果, 以扩增曲线和  $C_t$  值判定结果。荧光阈值要根据每次实验的具体数据调整, 一般取第 3 到第 15 个循环。

## 9.2 质量控制

在进行样品检测时, 必需同时做空白对照、阴性对照和阳性对照。

空白对照无  $C_t$  值并且无扩增曲线, 阴性对照无  $C_t$  值并且无扩增曲线, 0.1% 的阳性对照出现典型

的扩增曲线且  $C_t \leq 35$ 。实验应同时满足以上条件,否则,此次实验视为无效。

### 9.3 结果判定及表述

当通用探针的  $C_{t\text{样品}} > C_{t\text{阳性对照}}$ ,该样品为阴性,未检出牛源性和羊源性成分; $C_{t\text{样品}} \leq C_{t\text{阳性对照}}$ ,该样品为阳性,检出牛源性或羊源性成分。

当牛探针的  $C_{t\text{样品}} > C_{t\text{阳性对照}}$ ,该样品为阴性,未检出牛源性成分; $C_{t\text{样品}} \leq C_{t\text{阳性对照}}$ ,该样品为阳性,检出牛源性成分。

当羊探针的  $C_{t\text{样品}} > C_{t\text{阳性对照}}$ ,该样品为阴性,未检出羊源性成分; $C_{t\text{样品}} \leq C_{t\text{阳性对照}}$ ,该样品为阳性,检出羊源性成分。

## 10 废弃物处理措施

收集检测过程中的废弃物,用焚烧炉进行焚烧处理。

附 录 A  
(资料性附录)  
牛羊特定的 DNA 序列

A.1 牛源性成分的实时荧光 PCR 扩增产物序列

GGGCTGATTAGCCATTAGTCCATCGAGATGTCTTATTTAAGAGGAAAGARTGCACSGTTTTAGR  
TGAGATGGCCCTGAAGAAAGAACCAGATGYCTG

A.2 羊源性成分的实时荧光 PCR 扩增产物序列

GGGCTGATTAGTCATTAGTCCATCGAGATGTCTTATTTAAGAGGAAAGAGTGGGCGATTTTAGR  
TGAGATGGCCCTGAAGAAAGAACCAGATGYCTG

---