

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 3475—2019

饲料中貂、狐、貉源性成分的定性检测 实时荧光PCR法

Identification of martes, fox and *Nyctereutes procyonoides*—
originated ingredients in feeds—Real time PCR method

2019-08-01 发布

2019-11-01 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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由农业农村部畜牧兽医局提出。

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:山东省饲料质量检验所。

本标准主要起草人:冯鑫磊、李会荣、宫玲玲、李祥明、李俊玲、杨智国、朱良智。

饲料中貂、狐、貉源性成分的定性检测 实时荧光 PCR 法

1 范围

本标准规定了饲料中貂、狐和貉源性成分的实时荧光 PCR 法定性检测。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和动物源性饲料原料(动物油脂除外)中貂、狐和貉源性成分的定性检测。

本标准的检出限为 0.5%。

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

GB/T 27403 实验室质量控制规范食品分子生物学检测

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

Ct 值 循环阈值 **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 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

RNA:核糖核酸(ribonucleic acid)

dNTP:脱氧核苷酸三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphate)

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)

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

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

EDTA:乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid)

Taq:水生栖热菌(*thermus aquaticu*)

FAM:羧基荧光素(carboxyfluorescein)

TAMRA:羧基四甲基罗丹明(carboxy-tetramethyl-rhodamine)

ROX:6-羧基-X-罗丹明(6-carboxyl-X-rhodamine)

BHQ2:black hole quencher 2

JOE:2,7-二甲基-4,5-二氯-6-羧基荧光素(6-carboxy-4',5'-dichloro-2',7'-dimethoxyfluorescein, succinimidyl ester)

5 原理

用裂解液裂解试样中的细胞,用三氯甲烷去除蛋白等杂质,再用异丙醇沉淀得到 DNA,进一步用乙醇溶液纯化 DNA。用特异性检测引物和探针对 DNA 进行实时荧光 PCR 扩增,根据扩增曲线与 C_t 值对试样中貂、狐、貉源性成分进行定性检测。

6 试剂或材料

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂。所有试剂溶液均用无 DNA 酶和 RNA 酶污染的容器分装。

6.1 水:符合 GB/T 6682 规定的一级水。

6.2 异丙醇。

6.3 蛋白酶 K(20 mg/mL)。

6.4 *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μ L)。

6.5 dNTP 溶液(含 dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 2.5 mmol/L)。

6.6 $MgCl_2$ 溶液(25 mmol/L)。

6.7 10 $\times$ PCR 缓冲溶液。

6.8 Tris-HCl 溶液(1 mol/L):称取 121.1 g Tris,加 800 mL 水溶解,冷却至室温后,用浓盐酸调节溶液的 pH 至 8.0,加水定容至 1 L,121 $^{\circ}C$ 高压灭菌 20 min 备用。

6.9 EDTA 溶液(500 mmol/L):称取 186.1 g EDTA- $Na_2 \cdot 2H_2O$,加 800 mL 水溶解,用 10 mol/L 氢氧化钠溶液调节溶液的 pH 至 8.0,加水定容至 1 L,121 $^{\circ}C$ 高压灭菌 20 min 备用。

6.10 CTAB 裂解溶液:称取 10.02 g CTAB、40.91 g NaCl,加 800 mL 水溶解,加入 50 mL Tris-HCl 溶液(6.8)和 20 mL EDTA 溶液(6.9),用水定容至 1 L,121 $^{\circ}C$ 高压灭菌 20 min 备用。

6.11 TE 缓冲溶液:在 800 mL 水中,依次加入 10 mL Tris-HCl 溶液(6.8)和 2 mL EDTA 溶液(6.9),用水定容至 1 L,121 $^{\circ}C$ 高压灭菌 20 min 备用。

6.12 检测用引物和探针序列见附录 A。

6.13 乙醇溶液:无水乙醇+水=7+3。

6.14 三氯甲烷和异戊醇混合溶液:三氯甲烷+异戊醇=24+1。

6.15 基因组 DNA 提取试剂盒。

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:波长(260 $\pm$ 1) nm,(280 $\pm$ 1) nm。

7.3 分析天平:感量 0.1 mg。

7.4 台式离心机:转速不低于 12 000 r/min。

7.5 恒温水浴锅:65 $^{\circ}C$,精度为 $\pm$ 1 $^{\circ}C$ 。

7.6 高压灭菌锅。

7.7 涡旋振荡器。

8 样品

8.1 试样的制备

按 GB/T 14699.1 的规定,抽取有代表性的饲料样品,用四分法缩减取样。按 GB/T 20195 的规定制备试样,过 0.15 mm 孔径筛后充分混匀,装入磨口瓶中备用。

8.2 对照样品的选择

以已知含有貂、狐、貉成分的样品(纯肉粉或含相应源性成分 $\geq 0.5\%$ 的饲料)为阳性对照。以已知不含有貂、狐、貉成分的样品为阴性对照。

9 试验步骤

9.1 DNA 提取

平行做 2 份试验。称取 50 mg 试样(精确至 0.1 mg)于 1.5 mL 离心管中,加入 600 μL ~800 μL CTAB 裂解溶液(6.10)和 20 μL 蛋白酶 K(6.3),涡旋混匀;在 $(65\pm 1)^\circ\text{C}$ 下水浴 30 min,期间每隔 10 min 颠倒混匀 1 次;12 000 r/min 离心 5 min,吸取全部上清液至另一 1.5 mL 离心管中,加入 400 μL 三氯甲烷和异戊醇混合溶液(6.14),充分混匀。

9.2 DNA 纯化

将按 9.1 操作所得溶液 12 000 r/min 离心 5 min,吸取全部上层水溶液至另一 1.5 mL 离心管中,加入上层水溶液 0.6 倍体积的异丙醇,室温下沉淀 15 min~30 min;12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液;加入 1 mL 乙醇溶液(6.13)轻缓颠倒混匀,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,除去残余的乙醇;待沉淀干燥后,加入 80 μL TE 缓冲溶液(6.11),溶解沉淀,获得试样 DNA 溶液,置于 -20°C 保存备用。

注:可用等效的基因组 DNA 提取试剂盒(6.15)替代 9.1 和 9.2。

9.3 对照样品处理

称取阳性对照样品和阴性对照样品各 50 mg(精确至 0.1 mg)分别置于 1.5 mL 离心管中,按 9.1~9.2 步骤同步提取 DNA。

9.4 DNA 浓度的测定

准确移取 5 μL 试样 DNA 溶液(9.2)加水稀释至 1 mL,用核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计,在 260 nm 和 280 nm 波长处测定吸光值 A_{260} 和 A_{280} 。

A_{260}/A_{280} 比值在 1.7~1.9,适宜于实时荧光 PCR 扩增。

试样 DNA 溶液中 DNA 的浓度 ω 以质量分数计,单位为微克每微升($\mu\text{g}/\mu\text{L}$),按式(1)计算。

$$\omega = \frac{A_{260} \times N \times 50}{1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

A_{260} ——260 nm 处的吸光值;

N ——试样 DNA 稀释倍数;

50/1 000—— A_{260} 为 1 时对应的双链 DNA 浓度,单位为微克每微升($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)。

在进行实时荧光 PCR 扩增时,需要根据所用仪器对模板 DNA 浓度的要求,对试样 DNA 溶液用水进行稀释。

9.5 检测

9.5.1 参考 PCR 反应体系

实时荧光 PCR 反应参考体系见表 1。

表 1 实时荧光 PCR 反应参考体系

试剂名称	添加量, μL	终浓度
10 $\times$ PCR 缓冲溶液	2.5	1 $\times$
上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$,貂或狐或貉)	0.5	0.2 $\mu\text{mol/L}$
下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$,貂或狐或貉)	0.5	0.2 $\mu\text{mol/L}$
探针(10 $\mu\text{mol/L}$,貂或狐或貉)	0.5	0.2 $\mu\text{mol/L}$
dNTP 溶液(含 dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 2.5 mmol/L)	2.0	0.2 mmol/L
<i>Taq</i> DNA 聚合酶(5 U/ μL)	0.3	0.06 U/ μL
MgCl ₂ 溶液(25 mmol/L)	1.2	1.2 mmol/L
H ₂ O	补水至 25	—

表 1(续)

试剂名称	添加量, μL	终浓度
模板 DNA	2	—

注:真核生物 18S 内参照的反应体系同上,仅以 18S 内参照引物和探针替换上述引物和探针。

9.5.2 参考 PCR 扩增条件

95℃预变性 10 min;95℃变性 10 s,58℃退火 35 s,45 个循环。

9.5.3 试验对照

试验过程中,同步测定貂、狐、貉的阳性对照和阴性对照,以水为空白对照。

10 质量控制

10.1 PCR 的有效性判定

10.1.1 空白对照:无貂、狐、貉、18S 荧光信号。

10.1.2 阴性对照:无貂、狐、貉荧光信号,有 18S 荧光信号,且呈 S 形对数曲线, C_t 值 ≤ 35.0 。

10.1.3 阳性对照:有对应貂、狐、貉目的基因荧光信号、有 18S 荧光信号,且呈 S 形对数曲线, C_t 值 ≤ 35.0 。

PCR 扩增结果应同时满足以上条件,否则判定 PCR 无效。

10.2 DNA 提取的有效性判定

在同时进行的空白对照、阴性对照、阳性对照结果正常的情况下,被检测样品应有 18S 内参照基因荧光信号检出,且呈 S 形对数曲线, C_t 值 ≤ 35.0 。

11 试验数据处理

11.1 结果判定

在符合第 10 章的情况下:

a) 如 C_t 值 ≤ 35.0 ,则判定被检样品阳性;

b) 如 C_t 值 ≥ 40.0 ,则判定被检样品阴性;

c) 如 $35.0 < C_t$ 值 < 40.0 ,则进行重复测定,再次扩增后,如 C_t 值仍为 < 40.0 ,则判定被检样品阳性;如 C_t 值 ≥ 40.0 ,则判定被检样品阴性。

注:如有进一步确认要求,可对 PCR 产物进行测定,PCR 产物序列参见附录 B。

11.2 结果表述

结果为阳性者,表述为“检出貂(或狐或貉)源性成分”。

结果为阴性者,表述为“未检出貂(或狐或貉)源性成分”。

12 防止交叉污染措施

检测过程中,防止交叉污染的措施按照 GB/T 27403 的规定执行。

附 录 A
(规范性附录)
检测用引物和探针序列

检测用引物和探针序列见表 A. 1。

表 A. 1 检测用引物和探针序列

名 称	序 列 (5'-3')
18S 内参照 5'端引物 18S 内参照 3'端引物 18S 内参照探针	TCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTA AATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTT FAM-CCGTTTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAATCGAACC-Eclipse
貂 5'端引物 貂 3'端引物 貂探针	TCCATCAAACATTTCCGCA CGTAGTTGACGTCTCGGCA ROX-CCATACACTACACATCAGACACAGCTACAGCC-BHQ2
狐 5'端引物 狐 3'端引物 狐探针	TGGAGCATCAGTAGACCTTACAATTT GGCGGGAGGTTTTATATTGATAATAG FAM-CCCTGCACCTGGCCGGAGTC-TAMRA
貉 5'端引物 貉 3'端引物 貉探针	CTTCCCGTGAAGAGGCGGGAATAC TCCGAGGTCACCCCAACCTAAA JOE-CTTTAATTACTTAACCCAAATTTATGGCCAA-BHQ2
注:荧光标记物可根据实际需求自行调整。	

附 录 B
(资料性附录)
基因扩增靶标参考序列

B.1 貂成分基因扩增靶标参考序列

TCCATCAAACATTTCCGCATGATGAACTTCGGGTCCCTACTCGGAATCTGCCTAATTCT
TCAAATTCTTACAGGCTTATTCTTAGCCATACACTACACATCAGACACAGCTACAGCCTTTT
CATCAGTCACTCATATTTGCCGAGACGTCAACTACG

B.2 狐成分基因扩增靶标参考序列

TGGAGCATCAGTAGACCTTACAATTTTCTCCCTGCACCTGGCCGGAGTCTCTTCAATTTT
AGGAGCTATTAATTTTCATCACTACTATTATCAATATAAAACCTCCCGCC

B.3 貉成分基因扩增靶标参考序列

GAAGAGGCGGGAATACCACAATAAGACGAGAAGACCCTATGGAGCTTTAATTACTTAAC
CCAAATTTATGGCCAACACCCACCTACCAGGCATAAAATACTACCATTATTATGGGTTAAC

中 华 人 民 共 和 国
农 业 行 业 标 准
饲料中貂、狐、貉源性成分的
定性检测 实时荧光 PCR 法

NY/T 3475—2019

* * *

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 0.75 字数 15 千字

2019 年 10 月第 1 版 2019 年 10 月北京第 1 次印刷

书号: 16109·4840

定价: 18.00 元

版权专有 侵权必究
举报电话: (010) 59194261



NY/T 3475—2019