

### 畜禽肉及肉制品中牛羊猪鸡鸭源性成分 定性 PCR 检测方法

Detection of bovine, ovine, caprine, pig, chicken and duck derived materials in meats and meat products of livestock and poultry by qualitative polymerase chain reaction (PCR) method

地方标准信息服务平台

2020 - 07 - 07 发布

2020 - 11 - 07 实施

---

## 目 次

前言.....	II
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 原理.....	1
5 试剂和材料.....	1
6 仪器和设备.....	3
7 分析步骤.....	3
8 结果分析.....	5
9 结果判定与表述.....	5
10 PCR 产物测序结果判定与表述.....	5
11 检测过程中防止交叉污染的措施.....	5
12 废弃物处理.....	5
附录 A（资料性） 扩增产物序列（来源 NCBI）.....	7

地方标准信息服务平台

## 前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

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。

本文件由华中农业大学提出。

本文件由湖北省农业农村厅归口。

本文件起草单位：华中农业大学、武汉市动物疫病预防控制中心。

本文件主要起草人：刘榜，王文君，付明，周翔，陶利文，刘祖红，王小康，张庆德，阮征。

本文件实施中的疑问可咨询湖北省农业农村厅，联系电话：027-87665821，邮箱：hbsnab@126.com；华中农业大学，联系电话：027-87382290，邮箱：liubang@mail.hzau.edu.cn。对本文件的有关修改意见及建议请反馈至华中农业大学，联系电话：027-87282038，邮箱：xys@mail.hzau.edu.cn。

地方标准信息服务平台

# 畜禽肉及肉制品中牛羊猪鸡鸭源性成分 定性 PCR 检测方法

## 1 范围

本文件规定了牛（普通牛、瘤牛、牦牛和水牛）、羊（绵羊和山羊）、猪（家猪和野猪）、鸡、鸭源性成分的定性PCR检测方法。

本文件适用于牛（普通牛、瘤牛、牦牛和水牛）、羊（绵羊和山羊）、猪（家猪和野猪）、鸡、鸭的肉及肉制品中源性成分的定性PCR检测。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 19495.2 转基因产品检测 实验室技术要求

GB/T 27403-2008 实验室质量控制规范食品分子生物学检测

## 3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

## 4 原理

根据牛、羊、猪、鸡和鸭的物种特异性序列，设计特异性引物，对待检样品提取的DNA进行PCR扩增，依据扩增特异性片段的結果，判断待检样品中是否含有牛、羊、猪、鸡和鸭源性成分。

## 5 试剂和材料

5.1 除另有规定外，试剂为分析纯或生化试剂。实验用水符合 GB/T 6682 的要求。

5.2 琼脂糖。

5.3 GelRed 核酸染料。

注：根据需要可选择其他效果相当的核酸染料作为核酸电泳的染色剂。

5.4 10 mol/L 氢氧化钠溶液：在 160 mL 水中加入 80.0 g 氢氧化钠（NaOH），溶解后，冷却至室温，再加水定容至 200 mL。

5.5 0.5 mol/L 乙二铵四乙酸二钠溶液（pH 8.0）：称取 18.6 g 乙二铵四乙酸二钠（EDTA-Na<sub>2</sub>），加入 70 mL 水中，再加入适量氢氧化钠溶液（5.4），加热至完全溶解后，冷却至室温，用氢氧化钠溶液（5.4）调 pH 至 8.0，加水定容至 100 mL。在 103.4 kPa（121 °C）条件下灭菌 20 min。

!! FORMTEXT ¶      † !! FORMTEXT ¶ DB42/T 1591† —!! FORMTEXT ¶ 2020†

- 5.6 1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸溶液 (pH 8.0)：称取 121.1 g 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 溶解于 800 mL 水中，用盐酸 (HCl) 调 pH 至 8.0，加水定容至 1 000 mL。在 103.4 kPa (121 °C) 条件下灭菌 20 min。
- 5.7 5 mol/L 氯化钠溶液：称取 29.22 g 氯化钠 (NaCl) 溶于 80 mL 水中，加水定容至 100 mL。在 103.4 kPa 蒸汽压 (121 °C) 条件下灭菌 20 min。
- 5.8 10%十二烷基磺酸钠溶液：称取 10 g 十二烷基磺酸钠 (C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>SO<sub>4</sub>Na, SDS)，加入 80 mL 水中，加热至完全溶解后，冷却至室温，加水定容至 100 mL。在 103.4 kPa 蒸汽压 (121 °C) 条件下灭菌 20 min。
- 5.9 DNA 提取细胞裂解液：量取 200 mL 乙二铵四乙酸二钠溶液 (5.5)，200 mL 三羟甲基氨基甲烷-盐酸溶液 (5.6)，40 mL 氯化钠溶液 (5.7)，200 mL 十二烷基磺酸钠溶液 (5.8)，混合后用水定容至 1 000 mL，室温保存，备用。
- 5.10 20 mg/mL 蛋白酶 K 溶液：将 200 mg 蛋白酶 K (Proteinase K) 溶于 9.5 mL 水中，轻摇至完全溶解后，加水定容至 10 mL。于 -20 °C 保存备用。
- 5.11 Tris-饱和酚。
- 5.12 氯仿：异戊醇(24:1)：将氯仿和异戊醇按照 24:1 的比例配制。
- 5.13 无水乙醇。
- 5.14 75%乙醇。
- 5.15 TE 缓冲液 (pH 8.0)：分别量取 10 mL 三羟甲基氨基甲烷-盐酸溶液 (5.6) 和 2 mL 乙二铵四乙酸二钠溶液 (5.5) 溶液，加水定容至 1000 mL。在 103.4 kPa (121 °C) 条件下灭菌 20 min。
- 5.16 50×TAE 缓冲液：称取 242.2 g 三羟甲基氨基甲烷 (Tris)，先用 500 mL 水加热搅拌溶解后，加入 100 mL 乙二铵四乙酸二钠溶液 (5.5)，用冰乙酸调 pH 至 8.0，然后加水定容到 1 000 mL。使用时用水稀释成 1×TAE。
- 5.17 Taq 酶。
- 5.18 10×PCR 缓冲液。
- 5.19 dNTP 混合液。
- 5.20 6×DNA 上样缓冲液。
- 5.21 DNA 分子量标记：可清楚的区分 100 bp~1 000 bp 的 DNA 片段。
- 5.22 物种特异性引物 (表 1)。
- 5.23 引物溶液：用 TE 缓冲液 (5.15) 或水分别将引物稀释到 10 μmol/L。
- 5.24 PCR 产物回收试剂盒。

表 1 物种特异性引物信息

物种	引物名称	引物序列	片段大小/bp
牛	Bovinae-F	5' -CAGACAAAGGTCAGGAAGTAATC-3'	223
	Bovinae-R	5' -AGATGAGGGAAGAGCAGGTCTG-3'	
羊	Ovis-F	5' -GCAAGAATGGCACCCAAGAC-3'	237
	Ovis-R	5' -TGCCATGTGTGCCGATTTG-3'	
猪	Sus-F	5' -GCAATGCTCCAAGACTTAGTGA-3'	154
	Sus-R	5' -TGTGCTCAAATAGGAAGGTTGTCA-3'	
鸡	Gallus-F	5' -GCAAGGAGATGTAACCCAGTAAAG-3'	252
	Gallus-R	5' -AGAATCAATCAGAAAAATGAAGCC-3'	
鸭	Anas-F	5' -GTCAACGATTGCCCGAAAC-3'	222
	Anas-R	5' -GGGACTTTGACGGCATCTT-3'	

## 6 仪器和设备

- 6.1 分析天平：感量不小于0.1 mg。
- 6.2 PCR扩增仪：升降温速度 $>1.5$  °C/s，孔间温度差异 $<1.0$  °C。
- 6.3 电泳槽、电泳仪等电泳装置。
- 6.4 紫外透射仪。
- 6.5 紫外分光光度计。
- 6.6 凝胶成像系统或照相系统。
- 6.7 微量可调移液器：0.1  $\mu$ L~2.5  $\mu$ L，1  $\mu$ L~10  $\mu$ L，10  $\mu$ L~100  $\mu$ L，100  $\mu$ L~1 000  $\mu$ L。
- 6.8 涡旋振荡器。
- 6.9 高速冷冻离心机（最大离心力 $\geq 12\ 000\ g$ ）。
- 6.10 恒温水浴锅。

## 7 分析步骤

### 7.1 样品制备

采集一定量的畜禽肉或肉制品并匀浆， $-20$ °C保存备用。

### 7.2 DNA 模板制备

#### 7.2.1 试样 DNA 提取

试样 DNA 提取步骤如下：

- a) 称取上述匀浆样品 0.1 g，剪碎或在液氮中充分研磨成粉末后转移至 2 mL 离心管中（不需要研磨的试样直接加入）；
- b) 向样品加入 1 mL 细胞裂解液（5.9），然后加入 30  $\mu$ L 蛋白酶 K（5.10）溶液，混匀， $56$  °C 消化 6 h~10 h 至无明显组织块， $4$  °C， $12\ 000\ g$  离心 10 min，取上清液移至新的 2 mL 离心管中；
- c) 加入等体积的 Tris-饱和酚（5.11），缓慢颠倒混匀 10 min， $4$  °C， $12\ 000\ g$  离心 10 min，取上清液移至新的 2 mL 离心管中；
- d) 加入 0.5 倍体积的 Tris-饱和酚（5.11）和 0.5 倍体积的氯仿：异戊醇（24:1）（5.12），缓慢颠倒混匀 10 min， $4$  °C， $12\ 000\ g$  离心 10 min；
- e) 取上清液移至新的 2 mL 离心管中，加入等体积的氯仿：异戊醇（24:1）（5.12），缓慢颠倒混匀 10 min， $4$  °C， $12\ 000\ g$  离心 5 min；
- f) 多次重复操作步骤 e)，直到两相中间不能看到明显的变性蛋白质为止，取上清液移至新的 4 mL 离心管中；
- g) 加入 2 倍体积 $-20$  °C 预冷的无水乙醇（5.13），轻轻摇晃至絮状沉淀析出， $12\ 000\ g$  离心 5 min~10 min，倒掉上清液；
- h) 加入 1 mL 75%乙醇（5.14）洗涤沉淀， $12\ 000\ g$  离心 3 min，吸去上清液，重复 1 次~2 次；
- i) 室温下放置使残余乙醇完全挥发，加入 30  $\mu$ L~50  $\mu$ L TE 缓冲液（5.15）溶解 DNA 沉淀， $-20$  °C 保存 DNA 溶液。

#### 7.2.2 DNA 质量评估

使用紫外分光光度计对试样DNA的质量进行评估，检测260 nm和280 nm处的吸光值A<sub>260</sub>和A<sub>280</sub>，满足以下要求则适宜进行PCR扩增：

- a) DNA 浓度为 50 ng/μL~1 000 ng/μL;
- b) A260/A280 比值应在 1.8~2.0 之间。

### 7.3 PCR 反应

#### 7.3.1 试样 PCR 反应

7.3.1.1 每个试样 PCR 反应设置 3 个平行。

7.3.1.2 在 PCR 反应管中按表 2 依次加入反应试剂，混匀。也可采用经验证的、等效的定性 PCR 反应试剂盒配制反应体系。

7.3.1.3 将 PCR 反应管放入离心机，2 000 g 离心 1 min，取出后放入 PCR 仪。

7.3.1.4 进行 PCR 反应。反应程序为：95 °C 预变性 5 min；95 °C 变性 30 s，60 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 15 s，32 次循环；72 °C 终延伸 2 min；4 °C 降温 2 min。

7.3.1.5 反应结束后取出 PCR 管，对 PCR 反应产物进行电泳检测。

表 2 PCR 检测反应体系

试剂	用量/μL	终浓度
双蒸水	13.1	
10×Buffer	2	1×
dNTPs 混合液（各 2.5 mmol/L）	1.6	各 0.2 mmol/L
5 U/μL Taq 酶	0.1	0.025 U/μL
10 μmol/L 上游引物	0.6	0.3 μmol/L
10 μmol/L 下游引物	0.6	0.3 μmol/L
25 ng/μL DNA 模板	2.0	2.5 ng/μL
总体积	20.0	

注：若采用定性PCR试剂盒，则按试剂盒说明书的推荐用量配制反应体系，但正向引物和反向引物用量按表2执行。

#### 7.3.2 对照 PCR 反应

在试样PCR反应的同时，应设置阴性对照、阳性对照和空白对照。

分别以牛、羊、猪、鸡和鸭的基因组DNA作为阳性对照；以除上述目标物种以外的常见动物的基因组DNA作为阴性对照；以水作为空白对照。

各对照PCR反应体系中，除模板外，其余组分及PCR反应条件与试样PCR（7.3.1）相同。

### 7.4 PCR 产物电泳检测

称量琼脂糖（5.2）适量，加入1×TAE缓冲液（5.16）至终浓度为20 mg/mL，加热溶解，配制成琼脂糖溶液。每100 mL琼脂糖溶液中加入5 μL GelRed核酸染料（5.3），混匀，稍适冷却后，将其倒入电泳板上，插上梳板，室温下凝固成凝胶后，放入含1×TAE缓冲液（5.16）电泳槽中，垂直向上轻轻拔去梳板。取5 μL PCR 产物与1 μL 6×DNA上样缓冲液（5.18），混合后加入凝胶点样孔，同时在其中一个点样孔中加入DNA分子量标记（5.19），接通电源，在2 V/cm~5 V/cm条件下电泳检测。

### 7.5 凝胶成像分析

电泳结束后，取出琼脂糖凝胶，置于凝胶成像仪上成像。根据DNA分子量标记判断扩增目的条带的片段大小（表1），将电泳结果形成电子文件存档。如需通过序列分析确认PCR扩增片段是否为目的DNA片段，按照7.6和7.7的规定执行。

## 7.6 PCR产物回收

按PCR产物回收试剂盒说明书，回收PCR扩增的DNA片段。

## 7.7 PCR产物测序验证

将回收的PCR产物进行双向测序，PCR扩增引物作为测序引物，测序原理同Sanger测序法。将获得的序列分别与牛源性成分的PCR扩增产物序列、羊源性成分的PCR扩增产物序列、猪源性成分的PCR扩增产物序列、鸡源性成分的PCR扩增产物序列和鸭源性成分的PCR扩增产物序列(附录 A) 进行比对和结果判定。

## 8 结果分析

阳性对照的PCR反应中可扩增出与预期大小一致的DNA片段(牛、羊、猪、鸡、鸭的片段大小分别为：223 bp、237 bp、154 bp、252 bp、222 bp)，而阴性对照及空白对照中均未扩增出预期DNA片段，表明PCR反应体系正常工作，否则重新进行检测。

## 9 结果判定与表述

### 9.1 阳性结果判定与表述

试样中X的特异性DNA序列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X源性成分，表述为“样品中检测出X源性成分，结果为阳性”。

注：X代表牛、羊、猪、鸡、鸭中任一待测物种。

### 9.2 阴性结果判定与表述

试样中X的特异性DNA序列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X源性成分，表述为“样品中未检测出X源性成分，结果为阴性”。

注：3个PCR平行扩增的结果不一致的，应重复检测。重复检测结果仍不一致的，以多数结果为最终结果。

## 10 PCR产物测序结果判定与表述

若测序结果与附录A中对应物种的PCR扩增产物序列的符合程度在95%以上(含95%)，则判断为所扩增片段为对应物种DNA片段，即检测到对应物种源性成分；若符合程度在95%以下，则判断为所扩增片段不是对应物种DNA片段，即没有检测到对应物种源性成分。

## 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。

## 12 废弃物处理

检测过程中的废弃物，收集后按照GB/T 19495.2规定的废弃物处理要求进行无害化处理。

!! FORMTEXT ¶ ± !! FORMTEXT ¶ DB42/T 1591± —!! FORMTEXT ¶ 2020±

地方标准信息服务平台

## 附录 A

(资料性)

### 扩增产物序列 (来源 NCBI)

#### A.1 牛源性成分的PCR扩增产物序列 (223 bp):

1 CAGACAAAGG TCAGGAAGTA ATCCCAGCGC TCATCCCCC TGGGAAGCAC CCAGGGCTTG  
61 CCCAAGATG TGGCTCCAG TTCCCTGTCA AGACTGTAGC CCTACTAGGA GCTGCAGTCT  
121 GGCCCGAGG CCCCTGCTGG GTCTCAGCGG TCCCCTATCA GGGACCAGTG GGACCCTCTC  
181 TGAAGGGCT TCACCAACTC CCAGACCTGC TCTCCCTCA TCT

#### A.2 羊源性成分的PCR扩增产物序列 (237 bp):

1 GCAAGAATGG CACCCAAGAC ACCAACAGCA CCTAGCTCAA GAGAAACACC AGAGCTACCA  
61 GTGGCACCTG TGCCAATCAT GGAAAGAGCA GCACCCAGGG CTAGAGTGGC ATCAGAGACA  
121 CAAGCAGTAC CCAGGCCTAG AGTGGCACCC ATGCCACCTG TGTACCGAG GACAAGAGCT  
181 GCACAAGAGA CACCAGCCAC TCCTGTGACA CGTGCGGCAA ATGCGGCACA CATGGCA

#### A.3 猪源性成分的PCR扩增产物序列 (154 bp):

1 GCAATGCTCC AAGGACTTAG TGACTTTCCC CAATGTTTGT GAGTCTGGCA GGGTGCAAAT  
61 TACATCTGCA GTCTTTGCCA GCACCCGTGA CCATCCAGGT GGCTCTGCCT TCTCAGAAGT  
121 GCCCTGGACC TGACAACCTT CCTATTTGAG CACA

#### A.4 鸡源性成分的PCR扩增产物序列 (252 bp):

1 GCAAGGAGAT GTAACCCAGT AAAGCTGTGA TTTCCATTT ATACCATTTC ACATCTGAAA  
61 CAAATTCCAG TGGGCTTTTT TTTGTTCTTG CTGTTGTTGC TGTTTTCTTC TGAGGACTAG  
121 AAACAAACAA CGTTTTTAAA ATATCAAGCC ATTATTTAAA TAATCAGCGG CTGGGAGTAC  
181 AGTGACACTG ATTTAAAGGG ATTAAGCTCC AACCTTAAAG CTCAGCGGGG CTTCATTTTT  
241 CTGATTGATT CT

#### A.5 鸭源性成分的PCR扩增产物序列 (222 bp):

1 GTCAACGATT GCCCCGAAAC CATCATCAAA CGTGCCAAAG ACGTTGTCAA ACAGCCCCAA  
61 AACGTCAAAC ACCCCCAAAA AGTCATCAAA TGCCCCAAG CGTGTTGTAG AACACCCCAA  
121 AATGTCATCG ATCACCTGA GAACATCATC AAACGCCCC AAGACATCGT CAAACGCGCC  
181 AAAGATGTCG TCAAACGCGC CAAAGATGCC GTCAAAGTCC CC

注: 划线部分为引物序列所在位置。