



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 36433—2018

---

## 纺织品 山羊绒和绵羊毛的 混合物 DNA 定量分析 荧光 PCR 法

Textiles—DNA quantitative analysis of cashmere and wool mixture—  
Fluorescence PCR method

2018-06-07 发布

2019-01-01 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。

本标准由中国纺织工业联合会提出。

本标准由全国纺织品标准化技术委员会(SAC/TC 209)归口。

本标准起草单位:上海出入境检验检疫局、中纺标检验认证股份有限公司。

本标准主要起草人:费静、谢瑞蔓、隋阳华、斯颖、唐敏峰、陆维民。

图书情报  
用



# 纺织品 山羊绒和绵羊毛的 混合物 DNA 定量分析 荧光 PCR 法

## 1 范围

本标准规定了采用荧光 PCR 法测定纺织品中山羊绒、绵羊毛的 DNA 定量检测方法。

本标准适用于纺织品混合物中两组分山羊绒、绵羊毛含量的检测。

本标准不适用于回用、剥色的山羊绒和绵羊毛纤维,以及安哥拉山羊毛。

## 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 16988 特种动物纤维与绵羊毛混合物含量的测定

GB/T 19495.1 转基因产品检测 通用要求和定义

GB/T 19495.2 转基因产品检测 实验室技术要求

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**聚合酶链式反应** polymerase chain reaction, PCR

在 DNA 聚合酶催化下,以母链 DNA 为模板,以特定引物为延伸起点,以 4 种单核苷酸(dNTP)为底物,通过变性、退火、延伸的循环反应,使极少量的 DNA 的特定片段,在数小时内扩增出百万倍的 DNA 的体外扩增链式反应。

### 3.2

**实时荧光定量 PCR** real-time fluorescence PCR

在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程,再通过曲线对未知模板进行定量或定性分析的 DNA 扩增方法。

### 3.3

**引物** primer

在核酸合成反应时,作为每个多核苷酸链进行延伸的出发点并起作用的一小段单链 DNA 或 RNA。

### 3.4

**TaqMan 探针** TaqMan probe

一种荧光基团连接在探针的 5' 末端,而淬灭基团则在 3' 末端的寡核苷酸链。

注: PCR 扩增时在加入一对引物的同时加入一个特异性的荧光探针,探针完整时,报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收;PCR 扩增时, Taq 酶的 5'-3' 外切酶活性将探针酶切降解,使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离,从而荧光监测系统可接收到荧光信号,即每扩增一条 DNA 链,就有一个荧光分子形成,实现了荧光信号的累积与

PCR 产物形成完全同步。

### 3.5

#### 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。

## 4 原理

针对山羊、绵羊的线粒体 DNA 序列设计物种特异的引物和探针,利用实时荧光 PCR 技术,建立起山羊绒、绵羊毛混合物与它们的 DNA 之间的对应关系。通过对混合纤维抽提出的 DNA 中的山羊成分、绵羊成分进行特异性扩增,根据得到的 Ct 值,计算该样品中山羊绒、绵羊毛的相对含量。

## 5 试剂

除非另有说明,在分析中仅使用分析纯试剂,水应符合 GB/T 6682 一级水要求。

- 5.1 蛋白酶 K 溶液:称取 180 mg 的蛋白酶(>30 U/mg),溶于 10 mL 水中,分装后置于-20℃冻存。
  - 5.2 二硫苏糖醇(DTT)溶液:称取 1.5 g DTT 溶于 10 mL 水中,分装后置于-20℃冻存。
  - 5.3 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB);纯度>98%。
  - 5.4 乙二胺四乙酸(EDTA);纯度>98%。
  - 5.5 氯化钠。
  - 5.6 氢氧化钠。
  - 5.7 三羟甲基氨基甲烷(Tris-HCl);纯度>98%。
  - 5.8 苯酚。
  - 5.9 三氯甲烷。
  - 5.10 70%冰乙醇(体积分数):-20℃冷藏。
  - 5.11 石油醚。
  - 5.12 CTAB 裂解液(pH=8.0):含有 2%CTAB(质量体积比,g/L);0.1 mol/L tris-HCl;20 mmol/L EDTA;1.4 mol/L NaCl。
  - 5.13 2×TaqMan 荧光定量预混液(2×TaqMan universal Master Mix):4℃保存,或其他等效产品。
- 警告:2×TaqMan universal Master Mix 对眼睛和呼吸道有轻微刺激,使用时应采取完善的保护措施。
- 5.14 引物、探针序列信息:见表 1。

## 6 仪器和器具

- 6.1 冰箱:-20℃~4℃。
- 6.2 天平:分度值 0.001 g。
- 6.3 空气浴振荡仪:能控制温度 56℃±2℃。
- 6.4 冷冻离心机:-20℃~40℃。
- 6.5 涡旋仪。
- 6.6 微量移液器及吸头:0.2 μL~2 μL、1 μL~10 μL、2 μL~20 μL、20 μL~200 μL、200 μL~1 000 μL。
- 6.7 离心管:1.5 mL、2.0 mL。
- 6.8 实时荧光 PCR 光学反应管或光学 96 孔板。



- 6.9 实时荧光定量 PCR 仪。
- 6.10 索氏抽提装置。
- 6.11 液氮冷冻研磨仪。

## 7 取样和试样的预处理

### 7.1 取样

按照 GB/T 16988 规定取样品,使其具有代表性,并足以提供全部所需试样,每个试样至少两份,每份试样不少于 0.2 g。

### 7.2 试样的预处理

对于经不溶性浆料、树脂等处理过的样品,如果需要可按以下方法进行预处理。

称取试样 1 g 左右,放在索氏萃取器中,用石油醚(5.11)萃取 1 h,每小时至少循环 6 次。待试样中石油醚挥发后,把试样浸入冷水中,浸泡 1 h,再在  $65\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  水中浸泡 1 h,浴比为 100:1,时时搅拌,然后抽吸或离心脱水、晾干。如试样上的水不溶性浆料、树脂等非纤维物质不能用石油醚和水萃取掉,则要用对纤维组成没有影响的特殊方法处理。

## 8 试验条件

试验条件满足 GB/T 19495.1 和 GB/T 19495.2 的规定。

## 9 试验步骤

### 9.1 标准曲线的建立

使用直径相近的 100% 山羊洗净绒、100% 绵羊洗净毛自制标准混合样。分别称取羊绒含量为 10%、30%、50%、70%、90%,总质量为 0.5 g 山羊绒、绵羊毛混合物,将它们用液氮冷冻研磨仪(6.11)粉碎,用以提取 DNA。按 9.2 和 9.3 中所述试验步骤进行操作。

对仪器采集到的针对每个标准混合物的 Ct 值,求得  $C_{t\text{cashmere}} - C_{t\text{wool}}$  两者的差值  $\Delta C_t$  为横坐标,以  $\lg(1/9)$ 、 $\lg(3/7)$ 、 $\lg(5/5)$ 、 $\lg(7/3)$ 、 $\lg(9/1)$  的值为纵坐标,进行曲线拟合,建立线性的羊绒羊毛定量标准曲线。参见附录 A 标准曲线建立的示例。

### 9.2 DNA 的抽提

9.2.1 将所取试样(7.1)用剪刀尽量剪碎至纤维长度 0.2 mm 以下,也可使用液氮冷冻研磨仪(6.11)进行研磨。

9.2.2 称取试样 30 mg,并将其置于 2 mL 的离心管,使用微量移液器(6.6)加入 0.9 mL CTAB 裂解液(5.12),再加入 50  $\mu\text{L}$  蛋白酶 K 溶液(5.1)及 150  $\mu\text{L}$  DTT 溶液(5.2),使用涡旋仪(6.5)混匀。

9.2.3 将离心管置于 56  $^{\circ}\text{C}$  空气浴振荡仪(6.3),以 500 r/min

9.2.4 取出反应完成后的离心管,将其置于离心机(6.4)以 10 000 r/min 室温离心 3 min 后,取上清液 900  $\mu\text{L}$  移置另一个新的离心管。加入 450  $\mu\text{L}$  苯酚,剧烈振荡。再加入 450  $\mu\text{L}$  氯仿,将混合液上下剧烈颠倒 20 s。

9.2.5 将离心管于室温离心,10 000 r/min,10 min。取 300  $\mu\text{L}$  的上清液至新的离心管。

9.2.6 重复 9.2.4(苯酚 400  $\mu\text{L}$ 、氯仿 400  $\mu\text{L}$ )和 9.2.5,最后吸取 750  $\mu\text{L}$  上清液至新的离心管。