



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(Ethylene diaminetetraacetic 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:AATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTT P:5'FAM-CCGTTTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAATCGAACC-3'TAMRA	18S rRNA 基因
黄牛	F:TGGAGTAATCCTTCTGCTCACAGT R:TGACTGTTGCTCCTCAGAATGATA P:5'FAM-AGCATTTATAGGATACGTCC-3'MGBNFG	<i>cytb</i> 基因
牦牛	F:GACTAATATTCGAAAATCC R:CTCCTAGGAGGGAGCCGAAGTTTCAC P:5'FAM-CAACGCATTTCATTGACCTTCCAGCTCCAT-3'TAMRA	<i>cytb</i> 基因
水牛	F:TTCATTGAYCTCCCTGCTCC R:GGAATAGGCCGGTGAGGATT P:5'FAM-ACTTTGGCTCTCTCC-3'MGBNFG	ATP8 基因
骆驼	F:ATTCTTTGCCTTCCACTTCA R:AGCGTATGCGAATAGGAAAT P:5'FAM-CCTACACGAAACAGGCTCTAATAACCCGAC-3'TAMRA	<i>cytb</i> 基因
梅花鹿	F:CCTACCACCGAAGCAATAGTGG R:GGTGCCTCTCAATAACTTCTGAGA P:5'FAM-CACTGTAGCTACTCAAGAAGC-3'TAMRA	COI 基因
马鹿	F:TAGTTATGTAAACAAGACTG R:ATAGACTGTAGTAGCAAGGAA P:5'FAM-AGGACTTGGCGGTGCTTTAT-3'TAMRA	12S rRNA 基因
驯鹿	F:CTCCCAGTACGAAAGGACCA R:GGGCGGGATATGTTTGTGTA P:5'FAM-CCAACCTTTAATCAAGCGCCT-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-CATAGGCTATGTTTTACCATGAG-3'TAMRA	<i>cytb</i> 基因
绵羊	F:CGGAGTAATCCTCCTATTTGC R:CTAGGCTTGTGCCAATATATGGA P:5'FAM-TATTACCAACCTCCTTT-3'MGBNFG	<i>cytb</i> 基因
鸽子	F:GAGCAACCCCTCAACGTACT R:ACCTCCTCGTCGATATGGACTC P:5'FAM-CCCCTCAACGTACTAACAGTAACCAGAC-3'TAMRA	16S rRNA 基因
鸭	F:GGCCACACAAATCCTCACAG R:TGTGTTGGCTACTGAGGAGAAA P:5'FAM-CCTACTGGCTATGCACTACACCGCAGAC-3'Eclipse	<i>cytb</i> 基因
鹅	F:CCACCGGAATCCTCAAT R:TCTTGTGTTTTGGAGGATTTGTTCTC P:5'FAM-CCATCGCAGAGCCTGGTCGATATTTTT-3'Eclipse	16S rRNA 基因
鹌鹑	F:GGATCACTTTGCCCACTTTAA R:GGGTGACGGGCGGTATG P:5'FAM-ATGGCCCTGAGGCAC-3'Eclipse	12S rRNA 基因
水貂	F:GCTTCAATCCTCTATTTTCATAA R:GCTTCTTCCTTGAGTCTTA P:5'FAM-CCTCCTAGTCTTCATGCCAATCGT-3'Eclipse	<i>cytb</i> 基因
猫	F:CTGCTGTCTTACTACTTCTA R:GGTGTTTAGGTTTCGATC P:5'FAM-CACTTCCAGTCTTAGCAGCGG-3'Eclipse	COI 基因
兔	F:TAATCGTCACCGCACATGCC R:CTATGTCAGGAGCCCCAATTATCA P:5'FAM-ACAAGCCAGTCCCCGAAGCCTCCA-3'Eclipse	COI 基因
猪	F:ATCTACATGATTCATTACAATTAC R:CTATGTTTTTGAGTTTTGAGTTCA P:5'FAM-ATCTCAAACACTCATACCCA-3'TAMRA	ATP8 基因
狗	F:TCCAGGTAAACCCTTCTTCCC R:TTACGAGCAAGGGTTGATGGT P:5'FAM- ATCACTTAGTCCAATAAGG-3'MGBNFG	D-loop 基因
狐狸	F:TGGAGCATCAGTAGACCTTACAATTT R:GGCGGGAGGTTTTATATTGATAATAG P:5'FAM-CCCTGCACCTGGCCGGAGTC-3'TAMRA	COI 基因
貉	F:AATCTTGCTGGGTTTGAA R:CAGTAAATATGTGGTGGGCTCACA P:5'FAM-CATACTACTCCGGGAAAA-3'MGBNFG	COI 基因

表 1 (续)

目标物种	序 列	基因来源
鸡	F:CCCTCCTCCTTTCATCCTCAT R:GTCATAGCGGAACCGTGGATA P:5'FAM-CTATGAATCCGGGCCTC-3'TAMRA	ND1 基因
火鸡	F:GCCCTAACCCCTTAAGAAAAGAAT R:AGTTGCTATGGCTAAGTCAAGTTTACAC 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 $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 溶液(500 mmol/L,pH 8.0):称取 18.6 g $\text{Na}_2\text{-EDTA}$,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 °C)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 °C)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 $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 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 °C)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 °C)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 °C。

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 $\geq 12\,000\,g$ 。

- 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 25μL,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 ℃ 10 min; 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 1 min, 40 个循环
黄牛	95 ℃ 10 min; 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 1 min, 40 个循环
牦牛	95 ℃ 10 min; 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 1 min, 40 个循环
水牛	95 ℃ 10 min; 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 1 min, 40 个循环
骆驼	95 ℃ 10 min; 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 1 min, 40 个循环
梅花鹿	95 ℃ 10 min; 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 1 min, 40 个循环
马鹿	95 ℃ 10 min; 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 1 min, 40 个循环
驯鹿	95 ℃ 10 min; 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 1 min, 40 个循环
山羊	95 ℃ 10 min; 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 1 min, 40 个循环
绵羊	95 ℃ 10 min; 95 ℃ 15 s, 62 ℃ 1 min, 40 个循环
猪	95 ℃ 10 min; 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 1 min, 40 个循环
狗	95 ℃ 10 min; 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 1 min, 40 个循环
鸽子	95 ℃ 10 min; 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 1 min, 40 个循环
火鸡	95 ℃ 10 min; 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 1 min, 40 个循环
狐狸	95 ℃ 5 min; 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 40 s, 40 个循环
貉	95 ℃ 5 min; 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 40 s, 40 个循环
鸡	95 ℃ 5 min; 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 40 s, 40 个循环
鼠	95 ℃ 10 min; 95 ℃ 15 s, 62 ℃ 40 s, 40 个循环
鸭	95 ℃ 2 min; 95 ℃ 15s, 65 ℃ 80 s, 40 个循环
鹅	95 ℃ 2 min; 95 ℃ 15s, 65 ℃ 80 s, 40 个循环
鹌鹑	95 ℃ 2 min; 95 ℃ 15s, 65 ℃ 80 s, 40 个循环
兔	95 ℃ 10 s; 95 ℃ 5 s, 60 ℃ 30 s, 40 个循环
水貂	95 ℃ 10 s; 95 ℃ 5 s, 52 ℃ 10 s, 72 ℃ 34 s, 40 个循环
猫	95 ℃ 10 s; 95 ℃ 5 s, 52 ℃ 10 s, 72 ℃ 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:

- 内参照:荧光通道有荧光信号检出,且出现典型的扩增曲线,Ct 值 <30.0 ;
- 空白对照:荧光通道无荧光信号检出,Ct 值应 ≥ 40.0 ;
- 阴性对照:荧光通道无荧光信号检出,Ct 值应 ≥ 40.0 ;
- 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,Ct 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 C_t 值 ≤ 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 C_t 值 ≥ 40.0 , 则判定为被检样品阴性;
- c) 如 $35.0 < C_t$ 值 < 40.0 , 则重复一次。如再次扩增后 C_t 值仍为 < 40.0 , 则判定被检样品阳性; 如再次扩增后 C_t 值 ≥ 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 $\times \times \times$ (目标物种) 成分”。

10.2.2 结果为阴性者, 表述为“未检出 $\times \times \times$ (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):tgagtaatccttctgtcacagtaatagccacagcattt
ataggatacgtcctaccatgaggacaaatatcattctgaggagcaacagtca

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

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

骆驼成分的基因扩增靶标参考序列(GenBank:MH110007.1):attctttgccttcacttcactcctgccattttattatcacggc
cctagtagccgtacacctattattcctacacgaacaggtctataataaccgacaggaatctcctcagacatagacaaaatcccatccaccctactaca
caattaaagacatcctaggagcactgctactaatattaattctccttattctcgtactgttctcaccagacttattaggagatcctgacaactatactccgc
taacccctcaatacaccaccacacattaagccggaatgatatttctatttcgcatacgt

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

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

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

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

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

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

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

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

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

水貂成分的基因扩增靶标参考序列(GenBank:AB052720.1):gcttcaatcctctatttcataatcctcctagtcttcatgcca
tcgtcagyattattgaaaataatctattaaaatgaagagtctttgtagtatatcaattacyttggtcttgtaaaccaaaaatggagaacctatctccctaa
gactcaaggaagaagc

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

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

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

狗成分的基因扩增靶标参考序列(GenBank:KY700649.1):tccaggtaaacccttcttcctccctatgtacgtcgtgcatta
atggtttgccecatgcataaagcatgtacataatattatattcttacataggacatatcaactcaatcacaattcattgatctgtcagcagtatcaaag
catatcacttagtccaataagggcttaatcaccatgcctcgagaaacatcaacccttgctcgtaa

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

貉成分的基因扩增靶标参考序列(GenBank:AF028197.1):aatcttgccctgggtttggaataatttccatcgttacatact
actccgggaaaaaagaaccttttggttacataggaatagtctgagcaataatatctattggattcttaggctttatcgtgtgagcccaccacatattactg

鼠成分的基因扩增靶标参考序列(GenBank:KY611388.1):attccgccaatcacccaaacctatactgaattcttagtagcc
aacctcttcattttaacatgaatcggaggccaa

鸡成分的基因扩增靶标参考序列(GenBank:KY039437):ccctcctccttcctcctcatttctatgaatccgggcctcatatcca
cggttccgctatgac

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

