



中华人民共和国国家标准

GB/T 25165—2010

明胶中牛、羊、猪源性成分的定性检测方法 实时荧光 PCR 法

Protocol of identification of bovine, caprine, ovine and porcine derived
materials in gelatin—Real time PCR method

2010-09-26 发布

2011-05-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会

发布

前 言

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国畜牧业标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：中国检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人：陈颖、吴亚君、袁飞、王晶、徐宝梁、张舒亚、杨海荣、王斌、赵勇胜。

明胶中牛、羊、猪源性成分的定性检测方法

实时荧光 PCR 法

1 范围

本标准规定了明胶中牛、羊、猪源性成分的实时荧光 PCR 检测方法。

本标准适用于明胶中牛、羊、猪源性成分的定性检测。

该方法的检出限为 0.1%。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 6783 食品添加剂 明胶

GB/T 14699.1 饲料 采样

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

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

实时荧光 PCR real time PCR

在 PCR 反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号的积累实时监控整个 PCR 扩增过程。

3.2

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。

4 原理

利用实时荧光 PCR 技术，根据不同物种的特异性基因序列对牛、羊、猪源性成分进行鉴定。利用裂解液破碎细胞，酚、三氯甲烷抽提蛋白质，异丙醇沉淀得到 DNA；以提取的 DNA 为模板进行内参照基因的实时荧光 PCR 检测，以确定样品 DNA 的提取效率；通过特异性引物和标记荧光物质探针进行牛、羊、猪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的强弱判定，实现对明胶中牛、羊、猪源性成分的定性分析。

5 检测用引物和探针

内参照引物探针序列及牛、羊、猪特异性引物探针序列见表 1。

表 1 检测用引物和探针

名称	序列	目的基因
内参照 5'端引物 内参照 3'端引物 内参照探针	5'-CCTGAGAAACGGCTACCAT-3' 5'-CGTGTCCAGGATTGGGTAAT-3' 5'-(FAM)-TGC CGCCTGCTGCCTTCT-(TAMRA)-3'	真核生物 18SrRNA 基因
牛 5'端引物 牛 3'端引物 牛探针	5'-CCGATGGATGTGTTCAGAGCT-3' 5'-GCCAAATGTCTGGGTGTAGATACC-3' 5'-(FAM)-TGGGCTTTAGGGCTTCCGAATGTGAA-(TAMRA)-3'	生长激素基因
羊 5'端引物 羊 3'端引物 羊探针	5'-ACACAATTCTACCACAACCC-3' 5'-AAACAATGAGGGTAACGAGGG-3' 5'-(FAM)-ACACCGAAACAAAATACTCCTTGAGAAACA-(TAMRA)-3'	线粒体细胞色素 b 基因
猪 5'端引物 猪 3'端引物 猪探针	5'-TTTGTGCATGACTGCGTCAAC-3' 5'-CTTGGTGGTCTGGTCACTGT-3' 5'-(FAM)-CACCGTCAAGCAGC-(NFQ)(MGB)-3'	肌蛋白基因

6 试剂

苯酚(Tris 饱和酚, pH8.0)、三氯甲烷、异戊醇、无水乙醇、异丙醇、70%乙醇。

除另有规定外,所有试剂均为分析纯。实验用水符合 GB/T 6682 中二级水的要求。

7 配制溶液

7.1 裂解液

成分包括:2%(质量浓度)CTAB(cetyltrimethylammonium bromide,十六烷基三甲基溴化铵),100 mmol/L Tris(tris hydroxymethyl aminomethane,三羟甲基氨基甲烷),1.4 mol/L NaCl,20 mmol/L EDTA(ethylene diaminetetraacetic acid,乙二胺四乙酸),用 HCl 调至 pH8.0。

7.2 实时荧光 PCR 反应混合液

12.5 μL 反应体系包括:1 U~2 U(Unit,酶学单位)的 *Taq* 酶、1 \times PCR buffer、2.5 mmol/L~4.0 mmol/L 的 Mg^{2+} 、0.2 U~1 U 的 UNG 酶、0.2 mmol/L 的 d(A, C, G)TPs、0.2 mmol/L~0.4 mmol/L dUTP、400 nmol/L ROX 染料(某些荧光 PCR 仪不需要 ROX 校正)。

8 仪器设备

8.1 实时荧光 PCR 仪。

8.2 恒温水浴锅。

8.3 离心机:离心力不小于 3 000g。

8.4 微量移液器:0.5 μL ~10 μL ,10 μL ~100 μL ,20 μL ~200 μL ,200 μL ~1 000 μL 。

8.5 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。

8.6 pH 计。

8.7 天平:感量 0.01 g。

9 样品采集

按照 GB 6783 对食用明胶采样,按照 GB/T 14699.1 对饲料明胶采样,将实验样品粉碎,充分混合均匀后待用。

10 检验步骤

10.1 DNA 提取

称取样品 500 mg 于 50 mL 离心管中,加入 5 mL 裂解液,室温过夜后置于 65 °C 恒温箱中温育 1 h~2 h,取出后迅速加入与裂解液等体积的室温酚-三氯甲烷-异戊醇(25:24:1)(注意:如果样品因温度下降凝固而无法获得上清,可将样品再次放入 65 °C 恒温箱中使其重新液化),颠倒混匀,室温下 12 000g 离心 10 min,转移上清至另一灭菌的离心管中,加入等体积的三氯甲烷-异戊醇(24:1),颠倒混匀,室温下 12 000g 离心 10 min,转移上清至另一灭菌的离心管中,加入 0.8 倍异丙醇或 2 倍体积的预冷无水乙醇混匀,-20 °C 放置 0.5 h~1 h,4 °C 下 12 000g 离心 10 min~15 min,弃上清,用 70%乙醇洗涤沉淀一次,4 °C 下 12 000g 离心 10 min,弃上清,室温下晾干。加入 50 μL 双蒸水,溶解沉淀,-20 °C 保存。

也可用等效 DNA 提取试剂盒提取模板 DNA。

DNA 提取过程中以水代替样品设置提取空白对照,并置于每个提取系列中的最后。

10.2 实时荧光 PCR 扩增

反应体系的体积为 25 μL,体系组成见表 2。

表 2 实时荧光 PCR 检测反应体系组成

试剂名称	贮备液浓度	加入 PCR 反应体系的体积/μL
反应混合液	—	12.5
5'端引物	10 μmol/L	1
3'端引物	10 μmol/L	1
探针	10 μmol/L	1
模板	—	5
双蒸水	—	补足至总体积为 25

实时荧光 PCR 反应条件随仪器不同略有改变,一般为:50 °C 2min;95 °C 10 min;95 °C 15 s,60 °C 1 min 45 个循环。

检测过程中分别设阳性对照、阴性对照和提取空白对照。用分别含牛、羊、猪成分的样品作阳性对照,用不含牛、羊、猪成分的样品作阴性对照。

样品设 3 个重复,对照设 2 个重复,以 Ct 平均值作为最终结果。

11 结果判定

11.1 PCR 有效性判定

空白对照:无 FAM 荧光信号,相应 Ct 值 > 40.0。

阴性对照:无 FAM 荧光信号,相应 Ct 值 > 40.0。

阳性对照:有 FAM 荧光信号,且 FAM 通道出现明显的扩增曲线,Ct 值 ≤ 36.0。

否则判定为 PCR 无效。

11.2 DNA 提取有效性判定

在同时进行的阴性、阳性、空白对照实验结果正常的情况下,被检测样品应有 FAM 荧光信号检出,且 FAM 通道出现明显的扩增曲线,Ct 值 ≤ 40.0。

否则 DNA 提取无效,应重新提取 DNA,直至 Ct 值 ≤ 40.0。

11.3 检测结果判定

在符合 11.1 和 11.2 的情况下,使用牛、羊、猪特异性引物和探针对被检样品进行检测:

如有 FAM 荧光检出,且 Ct 值 ≤ 36.0 ,则判定样品含有相应的动物源性成分;

如 Ct 值 > 40.0 ,则判定为不含相应的动物源性成分;

如 $36.0 < Ct \leq 40.0$,则需重复实验,再次扩增后的 Ct 值仍 < 40.0 ,且阴性对照、阳性对照和空白对照结果正常,则判定该样品含有相应的动物源性成分;再次扩增后结果 Ct 值 ≥ 40.0 ,且阴性对照、阳性对照和空白对照结果正常,则判定该样品不含相应的动物源性成分。

12 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。
