



中华人民共和国国家标准

GB/TXXXXX—XXXX

常见畜禽动物源性成分检测方法 实时荧光 PCR 方法

Identification of animal ingredient from common livestock and poultry

Real-time PCR

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

(征求意见稿)

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX

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

本标准按照 GB/T1.1-2009 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：

本标准主要起草人：

常见畜禽动物源性成分检测方法 实时荧光 PCR 方法

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。

本标准适用于食品、饲料、动物组织、动物产品及制品中常见畜禽（水牛、黄牛、牦牛、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）及其他可能掺假品种（猫、狐狸、水貂、貉、鼠）物种成分的 Taqman 探针实时荧光 PCR 定性检测，最低检出限（LOD）达 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 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

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。

3.2

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常见畜禽动物源性成分进行鉴定。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 的提取质量；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的强弱判定，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。探针5'端标记荧光报告基团，3'端标记荧光淬灭基团。

表 1 引物探针序列

靶标物种	序列	基因来源
内参照	F: TCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTA R: AATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTT P: CCGTTTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAATCGAACC	18S rRNA 基因
黄牛	F: GGTTTCATTTTAGCAATAGCATGG R: GTCCAATCAAGGGTATGTTTGAG P: ACAAATCTCAATACCTGAGACCTCCAACAGA	NADH dehydrogenase subunit 5 (ND5) 基因
牦牛	F: GACTAATATTCGAAAATCC R: CTCCTAGGAGGGAGCCGAAGTTTCAC P: CAACGCATTCAATTGACCTTCCAGCTCCAT	Cytb 基因
水牛	F: TTCATTGAYCTCCCTGCTCC R: GGAATAGGCCGGTGAGGATT P: ACTTTGGCTCTCTCC	ATPase 8 基因
骆驼	F: ATTCTTTGCCTTCCACTTCA R: AGCGTATGCGAATAGGAAAT P: CCTACACGAAACAGGCTCTAATAACCCGAC	Cytb 基因
梅花鹿	F: CCTACCACCGAAGCAATAGTGG R: GGTGCACTCTCAATAACTTCTGAGA P: CACTGTAGCTACTCAAGAAGC	COI 基因
马鹿	F: TAGTTATGTAAACAAGACTG R: ATAGACTGTAGTAGCAAGGAA P: AGGACTTGCGGGTGCTTTAT	12S rRNA 基因
驯鹿	F: CTCCCAGTACGAAAGGACCA R: GGGCGGGATATGTTTGTGTA P: CCAACTTTAATCAAGCGCCT	16S rRNA 基因
山羊	F: TGGAGTAATCCTCCTGCTC R: GGATTGCTGAAAGAAGATTA P: CATAG GCTAT GTTT ACCAT GAG	Cytb 基因
绵羊	F: ACACAACCTTCTACCACAACCC R: AAACAATGAGGGTAACGAGGG P: ACACCGAAACAAAATACTCCTTGAGAAACA	Cytb 基因
鸽	F: GAGCAACCCCTCAACGTA R: ACCTCCTCGTCGATATGGACTC P: CCCCTCAACGTAACAGTAACCAGAC	16S rRNA 基因
鸭	F: GGCCACACAAATCCTCACAG R: TGTGTTGGCTACTGAGGAGAAA P: CCTACTGGCTATGCACTACCCGAGAC	Cytb 基因
鹅	F: CCACCGCAATCCTCAAT R: TCTTGTTTTTGGAGGATTTGTTCTC P: CCATCGCAGAGCCTGGTCGATATTTTT	mtDNA 基因
鹌鹑	F: GGATCACTTTGCCCACTTTAA	12S rRNA 基因

	R: GGGTGACGGGCGGTATG P: ATGGCCCTGAGGCAC	
水貂	F: GCTTCAATCCTCTATTTCATAA R: GCTTCTTCCTTGAGTCTTA P: CCTCCTAGTCTTCATGCCAATCGT	Cytb 基因
猫	F: CTGCTGTCTTACTACTTCTA R: GGTGTTTAGGTTTCGATC P: CACTTCCAGTCTTAGCAGCGG	COI 基因
兔	F: TAATCGTCACCGCACATGCC R: CTATGTCAGGAGCCCAATTATCA P: ACAAGCCAGTTCCTCGAAGCCTCCA	COI 基因
猪	F: ATCTACATGATTCATTACAATTAC R: CTATGTTTTGAGTTTTGAGTTCA P: ATCTCAAATACTCATAACCCA	atp8 基因
狗	F: TCCAGGTAAACCCTTCTTCCC R: TTACGAGCAAGGGTTGATGGT P: GCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGC	D-loop 基因
狐狸	F: TGGAGCATCAGTAGACCTTACAATTT R: GGCGGGAGGTTTTATATTGATAATAG P: CCCTGCACCTGGCCGGAGTC	COI 基因
貉	F: AATCTTGCCTGGGTTTGGAA R: CAGTAAATATGTGGTGGGCTCACA P: CATACTACTCCGGGAAAA	COI 基因
鸡	F: CCCTCCTCCTTTCATCCTCAT R: GTCATAGCGGAACCGTGGATA P: CTATGAATCCGGGCCTC	NADH dehydrogenase subunit 1 (ND1) 基因
火鸡	F: GCCCTAACCCCTTAAGAAAAGAAT R: AGTTGCTATGGCTAAGTCAAGTTTACAC P: CTTGCTTGAGCCACACC	12S rRNA 基因
鼠	F: ATTCCGCCCAATCACCCAAA R: TTGGCCTCCGATT CATGTTAAGA P: TACTGAATYCTAGTAGCCAACCT	Cytb 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

三氯甲烷、异丙醇、无水乙醇、盐酸、氯化钠、氢氧化钠等。

除另有规定外，所有试剂均为分析纯。实验用水符合GB/T 6682中一级水的要求。

7 配置溶液

7.1 主要试剂

CTAB 提取缓冲液: 20 g/L CTAB (cetyltrimethylammonium bromide, 十六烷基三甲基溴化铵), 1.4 mol/L NaCl, 0.1 mol/L Tris (tris hydroxymethyl aminomethane, 三羟甲基氨基甲烷), 0.02 mol/L Na₂EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, 乙二胺四乙酸二钠), 调节 pH 至 8.0; CTAB 沉淀液: 5 g/L CTAB, 40 mmol/L NaCl; 70% 乙醇 (V/V); NaCl 溶液 (1.2 mol/L); 蛋白酶 K 溶液 (10 mg/mL)。

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×PCR buffer、2.5 mmol/L~4.0 mmol/L 的 Mg²⁺、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 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。

8.3 恒温水浴锅。

8.4 离心机: 离心力≥12000 *g*。

8.5 pH 计。

8.6 烘箱。

8.7 天平: 感量 0.01 g。

9 检验步骤

9.1 样品处理方法

将食品、饲料、动物组织、动物制品等待检样品研磨均匀, 分装三份, 其中一份为检样, 另外两份为留存样品。

9.2 DNA 提取

称取 100 mg 样品至一洁净 2.0 mL 离心管中, 加入 1000 μL CTAB 提取缓冲液和 10 μL 蛋白酶 K 溶液, 置于 65°C 裂解 1 h, 期间混匀几次; 取出后 12 000 *g* 离心 10 min, 取上清液至一洁净 2.0 mL 离心管中; 加入 0.7 倍体积的三氯甲烷, 振荡混匀 30 s, 12 000 *g* 离心 10 min; 取上清液 600 μL 至一洁净 2.0 mL 离心管中, 加入 2 倍体积 CTAB 沉淀液, 振荡混匀 30 s, 室温静置 1 h, 12 000 *g* 离心 10 min; 弃上清液, 加入 350 μL 1.2 mol/L NaCl 溶液, 充分溶解沉淀后加入 350 μL 三氯甲烷, 振荡混匀 30 s; 12 000 *g* 离心 10 min, 取上清液; 加入 0.8 倍体积的异丙醇或 2 倍体积 -20°C 冰箱中预冷的无水乙醇混匀, -20°C 放置 1 h, 12 000 *g* 离心 15 min, 弃上清, 用 70% 乙醇洗涤沉淀一次, 12 000 *g* 离心 10 min, 弃上清, 室温下晾干; 加入 100 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。

9.3 DNA 浓度和纯度的测定

使用核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计分别检测 260 nm 和 280 nm 处的吸光值 A₂₆₀ 和 A₂₈₀。DNA 的浓度按照式 (1) 计算, 每个样品重复测定三次, 取平均值。通过 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值判断提取 DNA 的纯度。若 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值在 1.7~2.1, 浓度在 5~100 ng/μL, 适宜实时荧光 PCR 扩增。

$$C = A \times N \times 50/1\ 000 \quad \dots\dots\dots (1)$$

C——DNA 浓度，单位为微克每微升 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)；

A——260 nm 处的吸光值；

N——核酸稀释倍数。

9.4 实时荧光 PCR 扩增

检测过程中分别设置阳性对照、阴性对照和空白对照。以目标物种提取的DNA为阳性对照，以已知不含目标物种成分的样品提取的DNA为阴性对照，以无菌水为空白对照。样品、内参照和对照设置两个平行的反应体系，以Ct平均值作为最终结果。反应体系的体积为25 μL ，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	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 $\mu\text{mol/L}$	1
3'端引物	10 $\mu\text{mol/L}$	1
探针	10 $\mu\text{mol/L}$	1
DNA模板	5~100 $\text{ng}/\mu\text{L}$	5
无菌水	—	补足至总体积为25

表 3 实时荧光 PCR 反应参数

待测物	反应参数
内参照	95°C 10 min; 95°C 15 s, 60°C 1 min, 40 个循环
黄牛	95°C 10 min; 95°C 15 s, 60°C 1 min, 40 个循环
牦牛	95°C 10 min; 95°C 15 s, 60°C 1 min, 40 个循环
水牛	95°C 10 min; 95°C 15 s, 60°C 1 min, 40 个循环
骆驼	95°C 10 min; 95°C 15 s, 60°C 1 min, 40 个循环
梅花鹿	95°C 10 min; 95°C 15 s, 60°C 1 min, 40 个循环
马鹿	95°C 10 min; 95°C 15 s, 60°C 1 min, 40 个循环
驯鹿	95°C 10 min; 95°C 15 s, 60°C 1 min, 40 个循环
山羊	95°C 10 min; 95°C 15 s, 60°C 1 min, 40 个循环
绵羊	95°C 10 min; 95°C 15 s, 60°C 1 min, 40 个循环
猪	95°C 10 min; 95°C 15 s, 60°C 1 min, 40 个循环
狗	95°C 10 min; 95°C 15 s, 60°C 1 min, 40 个循环
鸽	95°C 10 min; 95°C 15 s, 60°C 1 min, 40 个循环
火鸡	95°C 10 min; 95°C 15 s, 60°C 1 min, 40 个循环
鼠	95°C 10 min; 95°C 15 s, 60°C 1 min, 40 个循环
狐狸	95°C 5 min; 95°C 15 s, 60°C 40 s, 40 个循环
貉	95°C 5 min; 95°C 15 s, 60°C 40 s, 40 个循环
鸡	95°C 5 min; 95°C 15 s, 60°C 40 s, 40 个循环
鸭	95°C 2min; 95°C 15s, 65°C 80s, 40 个循环
鹅	95°C 2min; 95°C 15s, 65°C 80s, 40 个循环

鹌鹑	95°C 2min; 95°C 15s, 65°C 80s, 40 个循环
兔	95°C 10 s; 95°C 5s, 60°C 30s, 40 个循环
水貂	95°C 10 s; 95°C 5s, 52°C 10 s, 72°C 34s, 40 个循环
猫	95°C 10 s; 95°C 5s, 52°C 10 s, 72°C 34s, 40 个循环
注：反应参数可以适当调整	

10 质量控制

以下条件有一条不满足时，实验视为无效：

- a) 空白对照：荧光通道无荧光信号检出，Ct值应 ≥ 40.0 ；
- b) 阴性对照：荧光通道无荧光信号检出，Ct值应 ≥ 40.0 ；
- c) 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 ；
- d) 内参对照：有荧光对数增长，且荧光通道出现典型的扩增曲线，Ct值 < 30.0 。

11 结果判定及表述

11.1 结果判定

在符合第10章的情况下，被检样品进行检测时：

- a) 如Ct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Ct值 ≥ 40.0 ，则判定为被检样品阴性；
- c) 如 $35.0 < \text{Ct值} < 40.0$ ，则重复一次。如再次扩增后Ct值仍为 < 40.0 ，则判定被检样品阴性；如再次扩增后Ct ≥ 40.0 ，则判定被检样品阴性。

11.2 结果表述

11.2.1 结果为阳性者，表述为“检出目标物种成分”。

11.2.2 结果为阴性者，表述为“未检出目标物种成分”。

12 检测过程中防止交叉污染的措施

按照GB/T 27403中附录D的规定执行。

附录 A

(资料性附录)

黄牛成分的基因扩增靶标参考序列 (GenBank: MF169209.1)

ggtttcattttagcaatagcatggttcctaacaatctcaatacctgagacctccaacagatcttcatactaaaccaagcgactcaaacatacccttgattggac

牦牛成分的基因扩增靶标参考序列 (GenBank: GQ464309.1)

gactaatattcgaaaatcccattccactaataaaaattgtaaacacgcattcattgacctccagctccatcaaacattcatcatgggaaactcggctccctcctag
gag

水牛成分的基因扩增靶标参考序列 (GenBank: MH880269.1)

ttcattgatctccctgctccatcaaacatctcatgatgaaacttggctctctcctagacctgcttaattctgcaaatcctcaccggcctattcc

骆驼成分的基因扩增靶标参考序列 (GenBank: MH110007.1)

attcttgccttcacttcatctgccafttattatcacggccctagtagccgtacacctatttctacacgaaacaggctctaataaccgacaggaatctcctcag
acatagacaaaatcccattccaccctactacacaatfaagacatcctaggagcactgctactaatattaattccttattctcgtactgttctcaccagacttattag
gagatcctgacaactatactcccgtacccccctcaatacaccaccacacattaagccggaatgatatttctattcgcatacgcct

梅花鹿成分的基因扩增靶标参考序列 (GenBank: D14379.2)

cctaccaccgaagcaatagtgacactgtagctactcaagaagcttctcagaagtattgagagtgcacc

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

tagttatgtaacaagactgttccagagtactaccggcaatgcttaaaactcaaggacttggcgggtcttatacccttctagaggcctgttctataatcgat
aaaccccgataaacctcaccattcctgctactacagtctat

驯鹿成分的基因扩增靶标参考序列 (GenBank: GU220719.1)

ctcccagtagaaaggaccagagaaaataaggccaacttaatacagcgcctaaatfaactaatgatttcatcttaattagatacacaacatatcccggccc

山羊成分的基因扩增靶标参考序列 (GenBank: LS992662.1)

tggagtaactctctgctcgcgacaatggccacagcattcatagcctatgtttaccatgaggacaaatcattttgaggggcaacagtcactaactctcttcca
gcaatcc

绵羊成分的基因扩增靶标参考序列 (GenBank: KY786037.1)

Acacaacttaccacaaccagaattaataacaacaaaaacaccgaaacaaaatactccttgagaacaaaatgaacgaaaatctattgcctctttcattacccc
tataatatttggctccccctcgtaccctcattgttt

鸽成分的基因扩增靶标参考序列 (GenBank: GQ240309.1)

gagcaaccctcaacgtactaacagtaaccagaccaatataattgaccaatggaccaagctacccagggataacagcgaatctcctccaagagtccatc
gacgaggagg

鸭成分的基因扩增靶标参考序列 (GenBank: EU914150.1)

ggccacacaaatcctcacaggcctcctactggctatgcactacaccgcagacacatccctgcttctcctcagtagccaacaca

鹅成分的基因扩增靶标参考序列 (GenBank: AF363031)

ccaccgcgaatcctcaatcaacccccactggggcactaccatcgagagcctggctgatattttcggtggggcgacctggaggagaacaaatcctcaaaa
acaaga

鹌鹑成分的基因扩增靶标参考序列 (GenBank: AM902516)

ggatcactttgccactttaagatggccctgaggcacgtacataccgccgctcacc

水貂成分基因扩增靶标参考序列 (GenBank: HM106322.1)

gcttcaatcctctatttcataatcctcctagctctcatgccaatcgtcagyattattgaaaataatctattaaaatgaagagctttgtagtatatcaattacyttggtctgt
aaacaaaaatggagaaccctatctccctaagactcaaggaagaagc

猫成分的基因扩增靶标参考序列 (GenBank: U20753.1)

ctgctgttactacttctatcactccagtcttagcagcgggaatcactatattattaacagatcgaacctaacc

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

taatcgtcaccgcacatgcctttgtaataatctctttatagtcagcctattataattggaggcttcgggaactggcttccccctgataattggggctcctgacatag

猪成分的基因扩增靶标参考序列(Genbank: KY964306.1)

Atctacatgattcattacaattacatcaataattataacattattttttattccaactaaaaatctcaaaactactcataccagcaagcccagaat
caaccgaactcaaaactcaaaaacatag

狗成分的基因扩增靶标参考序列(Genbank: KY700649.1)

tccaggtaaacccttctccctccctatgtacgtcgtgcattaatggttgccccatgcataaagcatgtacataatattatcttcatagga
catatcaactcaatctcacaattcattgatctgtcagcagatcaaatgcatacacttagtccaataagggcttaaccatgcctcgagaaac
catcaacccttgcctgtaa

狐狸成分的基因扩增靶标参考序列 (GenBank: JF443559.1)

tggagcatcagtagaccttacaattttccctgcacctggccggagtctcttcaattttaggagctattaatttcactactattatcaatataaacctcccgc

貉成分的基因扩增靶标参考序列 (GenBank: AF028197.1)

aatcttgctgggttggaaataattcccatatcgttacatactactccgggaaaaagaaccttttggttacataggaatagctgagcaataatctattgattctta
ggctttatcgtgtgagcccaccacatattactg

鼠成分的基因扩增靶标参考序列 (GenBank: KY611388.1)

attccgccaatcacccaaacctatactgaattctagtagccaacctcttcattttaacatgaatcggaggccaa

鸡成分的基因扩增靶标参考序列 (Genbank: KY039437)

ccccttaatgacatgcccaattaacccaaacccatgattctccatcatactcctaactgattcaccttctctctgcttatccaacccaaactcttctcattcactctaa
caaacaaccctgcaaaaaaattacaacaactaaaccacccc

火鸡成分的基因扩增靶标参考序列 (GenBank: U83741.1)

gccctaacccttaagaaaagaataaaggagcaggtatcaggcacactctaattgtagccaagacgccttgcttgagccacacccccacgggtattcag
cagtaattaaccttaagcaataagtgtaaactgacttagccatagcaact
