



中华人民共和国国家标准

GB/T 21104—2007

动物源性饲料中反刍动物源性成分 (牛、羊、鹿)定性检测方法 PCR 方法

Identification of Ruminantia derived materials
(Bovidae, Caprinae, Cervus) in animal-originated feedstuffs—PCR method

2007-10-24 发布

2008-04-01 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

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局提出。

本标准由全国饲料工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、中华人民共和国山东出入境检验检疫局、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：吴亚君、陈颖、徐宝梁、王晶、高宏伟、宗卉、曹际娟、黄文胜、袁飞、赵贵明。

本标准首次发布。

动物源性饲料中反刍动物源性成分 (牛、羊、鹿)定性检测方法 PCR 方法

1 范围

本标准规定了动物源性饲料中反刍动物(Ruminantia)源性成分(牛、羊、鹿)检测的 PCR 方法,该检测方法的检出限为 0.1% (质量分数)。

本标准适用于动物源性饲料中反刍动物源性成分(牛、羊、鹿)的定性检测。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 14699.1 饲料 采样(GB/T 14699.1—2005,ISO 6497:2002,IDT)

SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

聚合酶链式反应 polymerase chain reaction; PCR

用于扩增位于两段已知序列之间 DNA(deoxyribonucleosidea acid,脱氧核糖核酸)的方法。模板 DNA 经过高温变性成单链,在 DNA 聚合酶和适宜的温度下,两条互不互补的寡核苷酸片段即引物分别与模板 DNA 两条链上的一段互补序列发生退火,接着在 DNA 聚合酶的催化下以 4 种 dNTP(deoxyribonucleoside triphosphate,脱氧核苷酸三磷酸)为底物,使退火引物得以延伸,如此反复变性、退火和 DNA 合成这一循环,使位于两段已知序列之间的 DNA 片段呈几何倍数扩增,经 25 个~30 个扩增循环,扩增倍数达到约 10^6 。

4 原理

利用裂解液破碎细胞,三氯甲烷抽提蛋白质,无水乙醇沉淀得到 DNA;以提取的 DNA 为模板进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物;PCR 阳性产物应用限制性内切酶酶切反应进行确证。

5 试剂和材料

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

5.1 反刍动物源性成分检测用引物(对)序列为:

F:5'-TTTGGTCCCAGCCTTCCTGTT-3'

R:5'-CTTAGTCAAACCTTTCGTTT-3'

5.2 TaqDNA 聚合酶(Taq, *Thermus aquaticu*, 水生栖热菌)。

5.3 限制性内切酶:AluI 酶。

5.4 dNTPs: dATP(deoxyadenosine triphosphate, 脱氧腺苷三磷酸)、dTTP(deoxythymidine triphosphate, 脱氧胸苷三磷酸)、dCTP(deoxycytidine triphosphate, 脱氧胞苷三磷酸)、dGTP(deoxyguanosine triphosphate, 脱氧鸟苷三磷酸)。

5.5 琼脂糖:电泳纯。

5.6 溴化乙锭。

5.7 三氯甲烷。

5.8 无水乙醇。

5.9 70%乙醇。

5.10 DNA 分子量标准品(100 bp~600 bp)(bp:base pair, 碱基对)。

5.11 裂解液:1% CTAB(cetyltrimethylammonium bromide, 十六烷基三甲基溴化铵), 0.05 mol/L Tris-HCl(pH8.0)[Tris-:tris(hydroxymethyl) aminomethane, 三(羟甲基)氨基甲烷], 0.7 mol/L NaCl, 0.01 mol/L EDTA (pH8.0)(ethylenediaminetetraacetic acid, 乙二胺四乙酸)。

5.12 TE 缓冲液(Tris-HCl、EDTA 缓冲液):10 mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 1 mmol/L EDTA (pH8.0)。

5.13 10×PCR 缓冲液:100 mmol/L KCl, 160 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 mmol/L MgSO_4 , 200 mmol/L Tris-HCl (pH8.8), 1% Triton X-100(t-octylphenoxypolyethoxyethanol, 辛基苯氧基聚乙氧乙醇), 1 mg/mL BSA(bovine serum albumin, 牛血清蛋白)。

5.14 电泳缓冲液:Tris 54 g, 硼酸 27.5 g, 0.5 mol/L TE 缓冲液(pH8.0) 20 mL, 加蒸馏水至 1 000 mL;使用时 10 倍稀释。

5.15 溴化乙锭贮存液:用水配制成 10 mg/mL。

5.16 加样缓冲液:0.25%溴酚蓝, 40%(质量浓度)蔗糖水溶液。

5.17 酶切缓冲液:10 mmol/L Tris-HCl (pH7.5), 10 mmol/L MgCl_2 , 50 mmol/L NaCl, 0.1 mg/mL BSA。

6 仪器设备

6.1 DNA 热循环仪。

6.2 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。

6.3 恒温水浴锅。

6.4 离心机:离心力 12 000 g。

6.5 微量移液器(0.5 μL ~10 μL , 10 μL ~100 μL , 10 μL ~200 μL , 100 μL ~1 000 μL)。

6.6 电泳仪。

6.7 紫外检测仪。

6.8 pH 计。

6.9 天平:感量 0.01 g。

7 试样选取与制备

按照 GB/T 14699.1 采样,将实验室样品粉碎,充分混合均匀后待用。

8 检验步骤

8.1 样品的总 DNA 提取

样品粒度 100 目时最少称取 50 mg;60 目最少称取 100 mg;20 目最少称取 200 mg。

称取样品于微量离心管中,加入 600 μL ~800 μL 裂解液,65℃ 3 h,期间不时振荡混匀;12 000 g 离

心 5 min;转移上清于洁净离心管中,加等体积酚,混匀;12 000 g 离心 5 min,取上清液,加等体积三氯甲烷+异戊醇(24+1),混匀;12 000 g 离心 5 min,取上清液;加 2 倍体积冰预冷的无水乙醇,−20℃ 沉淀 1 h;12 000 g 离心 5 min,小心弃上清液;70%乙醇洗涤一次,晾干;加入 50 μL TE,溶解沉淀。

也可用等效 DNA 提取试剂盒提取模板 DNA。

8.2 DNA 浓度和纯度的测定

取 5 μL DNA 溶液加双蒸水稀释至 1 mL,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 A_{260} 和 A_{280} 。DNA 的浓度按式(1)计算:

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

式中:

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。

当 A_{260}/A_{280} 比值在 1.7~1.9 之间时,适宜于 PCR 扩增。

8.3 PCR 扩增

50 μL 反应体系:10×PCR 缓冲液 5 μL、dNTP (5 mmol/L) 1 μL、引物对(各 5 μmol/L) 2 μL、*Taq* DNA 聚合酶 3 U、模板 DNA 100 ng±50 ng。

一般反应程序:94℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,30 个循环。72℃延伸 5 min。4℃保存。

检测过程中分别设阳性对照、阴性对照和空白对照。用已知含反刍动物源性成分的样品作阳性对照,用已知不含反刍动物源性成分的样品作阴性对照,用等体积的双蒸水代替模板 DNA 作空白对照。

8.4 PCR 扩增产物电泳检测

取 2 g 琼脂糖,于 100 mL 电泳缓冲液中加热,充分熔化,加入溴化乙锭贮存液至终浓度为 0.5 μg/mL,制胶。在电泳槽中加入电泳缓冲液,使液面刚刚没过凝胶。将 5 μL~8 μL PCR 扩增产物分别和适量加样缓冲液混合,点样。9 V/cm 恒压电泳,直至溴酚蓝指示剂迁移至凝胶中部。紫外检测仪下观察电泳结果并记录。

8.5 限制性内切酶酶切及产物电泳检测

如果 PCR 扩增产物电泳检测结果阳性,进行限制性内切酶酶切反应。

反应体系(20 μL):*AluI* 酶 2 U,酶切缓冲液 2 μL,加入 PCR 扩增产物至总体积 20 μL。

酶切在 37℃ 下进行,2 h。酶切完成后电泳,方法见 8.4。

9 结果判断与表述

9.1 PCR 扩增产物电泳检测结果

牛、鹿 PCR 扩增产物为 202 bp(序列参考附件 A);

羊 PCR 扩增产物为 206 bp(序列参考附件 A)。

9.2 限制性内切酶酶切电泳检测结果

牛 PCR 产物采用内切酶 *AluI* 酶切后,酶切片段大小为 97 bp,80 bp 和 25 bp;

羊 PCR 产物采用内切酶 *AluI* 酶切后,酶切片段大小为 125 bp 和 81 bp;

鹿 PCR 产物采用内切酶 *AluI* 酶切后,酶切片段大小为 97 bp,81 bp 和 24 bp;

牛、羊、鹿 PCR 产物混合物采用内切酶 *AluI* 酶切后,酶切片段大小为 125 bp,97 bp,81(80) bp,25(24) bp。

9.3 结果表述

PCR 产物为阳性,同时酶切结果符合 9.2 中任何一种酶切模式者判为含有反刍动物源性成分,表

述为检出反刍动物源性成分；

PCR产物为阴性者判为不含有反刍动物源性成分，表述为未检出反刍动物源性成分。

10 检测过程中防止交叉污染的措施

按照 SN/T 1193 执行。

11 废弃物处理

检测过程中的废弃物，收集后在焚烧炉中焚烧处理。

附 录 A
(资料性附录)
PCR 产物测序结果

牛	TTTGGTCCCAGCCTTCCTGTAACTCTTAATAAACTTACACATGCAAGCATCTACACCCC
鹿	TTTGGTCCCAGCCTTCCTATTGACCTTTAATAGACTTACACATGCAAGCATCCACACTCC
羊	TTTGGTCCCAGCCTTCCTGTAACTTTCAATAGACTTATACATGCAAGCATCCACGCCCC
牛	AGTGAG-AATGCCCTCTAGGTTA -TTAAAATAAGAGGAGCTGGCATCAAGCACACACCC
鹿	AGTGAA-AATGCCCTCCAAGTTA -ATAAAACCAAGAGGAGCTGGTATCAAGCACACATCC
羊	GGTGAGTAACGCCCTTCGAATCACACAGGACTAAAAGGAGCAGGTATCAAGCACACACTC
牛	T-GTAGCTCACGACGCCTTGCTTAACCACACCCC -ACGGGAAACAGCAGTGACAAAAATT
鹿	-GTAGCTCACGACACCTTGCTCAGCCACACCCCCACGGGAGACAGCAGTGATAAAAATT
羊	TTGTAGCTCACAACGCCTTGCTTAACCACACCCCCACGGGAGACAGCAGTAACAAAAATT
牛	AAGCCATAAACGAAAGTTTGACTAAG 202
鹿	AAGCCATAAACGAAAGTTTGACTAAG 202
羊	AAGCCATAAACGAAAGTTTGACTAAG 206
