



# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2867—2011

---

## 饲料中鱼源性成分定性检测方法 PCR 方法

Qualitative identification of fish derived material in feedstuff—  
PCR method

2011-05-31 发布

2011-12-01 实施

---

中 华 人 民 共 和 国  
国 家 质 量 监 督 检 验 检 疫 总 局 发 布

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国上海出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：张舒亚、熊炜、蒋静、潘良文。

# 饲料中鱼源性成分定性检测方法

## PCR 方法

### 1 范围

本标准规定了饲料中鱼源性成分检测的 PCR 方法,该检测方法的检出限为 0.1%。  
本标准适用于饲料中鱼源性成分的定性检测。

### 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 14699.1 饲料 采样

SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

### 3 缩略语

PCR(polymerase chain reaction):聚合酶链式反应

DNA(deoxyribonucleic acid):脱氧核糖核酸

### 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 阳性产物应用核苷酸序列测定进行确证。

### 5 试剂和材料

除另有规定外,所有试剂均为分析纯或生化试剂。实验用水符合 GB/T 6682 的要求。所有试剂均用无 DNA 酶污染的容器分装。

#### 5.1 检测用引物包括:

a) 正向引物:5'-TAA gAg ggC Cgg TAA AAC TC-3'

b) 反向引物:5'-gTg ggg TAT CTA ATC CCA g-3'

5.2 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)。

5.3 三羟甲基氨基甲烷(Tris)。

5.4 乙二胺四乙酸(EDTA)。

5.5 氯化钠(NaCl)。

5.6 三氯甲烷(氯仿)。

5.7 异丙醇。

- 5.8 无水乙醇。
- 5.9 70%乙醇。
- 5.10 裂解液:1%CTAB(十六烷基三甲基溴化铵),0.05 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)[Tris-,三(羟甲基)氨基甲烷],0.7 mol/L 氯化钠,0.01 mol/L EDTA(pH 8.0 乙二胺四乙酸)。
- 5.11 氯化钠溶液(1.2 mol/L)。
- 5.12 TE 缓冲液(Tris-Cl、EDTA 缓冲液):10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0),1 mmol/L EDTA (pH 8.0)。
- 5.13 分子量标准品(100 bp~2 000 bp)。
- 5.14 Taq DNA 聚合酶。
- 5.15 dNTPs(脱氧核苷三磷酸):dATP(脱氧腺苷三磷酸)、dTTP(脱氧胸苷三磷酸)、dCTP(脱氧胞苷三磷酸)、dGTP(脱氧鸟苷三磷酸)。
- 5.16 琼脂糖:电泳纯。
- 5.17 溴化乙锭(或用其他代替品)。
- 5.18 10×PCR 缓冲液:100 mmol/L 氯化钾,160 mmol/L 硫酸铵,20 mmol/L 硫酸镁,200 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8),1% Triton X-100,1 mg/mL BSA(牛血清蛋白)。
- 5.19 电泳缓冲液:Tris 54 g,硼酸 27.5 g,0.5 mol/L EDTA、Tris-HCl(pH 8.0)20 mL,加蒸馏水至 1 000 mL;使用时 10 倍稀释。
- 5.20 加样缓冲液:0.25%溴酚蓝,40%(质量浓度)蔗糖水溶液。

## 6 仪器设备

- 6.1 PCR 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 高速离心机。
- 6.5 微量移液器(2.5  $\mu$ L、20  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1 000  $\mu$ L)。
- 6.6 研钵及粉碎装置。
- 6.7 涡旋振荡器。
- 6.8 pH 计。
- 6.9 电泳仪。
- 6.10 紫外检测仪。
- 6.11 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

称取适量样品(饲料粒度为 100 目时最少称取 50 mg;60 目时至少称取 100 mg;20 目时至少称取 200 mg)于 1.5 mL 离心管中,加入 600  $\mu$ L~800  $\mu$ L 裂解液,65  $^{\circ}$ C 30 min 以上,期间不时振荡混匀;

12 000 g 离心 5 min;转移上清液于洁净离心管中,加 400  $\mu\text{L}$  三氯甲烷+异戊醇(24+1),混匀;12 000 g 离心 5 min,取上清液;加 0.8 倍体积异丙醇,沉淀;12 000 g 离心 5 min,弃上清液;70%乙醇洗涤一次,晾干;加入 50  $\mu\text{L}$  TE 溶解沉淀,此即为 DNA 提取液。DNA 提取液可保存于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  备用以待检测。

也可用等效的商业化 DNA 提取试剂盒提取模板 DNA。

## 8.2 DNA 浓度和纯度的测定

取 5  $\mu\text{L}$  DNA 提取液加双蒸水稀释至 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 的浓度按照式(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,适用于 PCR 扩增。

## 8.3 PCR 扩增

8.3.1 25  $\mu\text{L}$  的反应体系:10 $\times$ PCR 反应缓冲液(含  $\text{Mg}^{2+}$ )2.5  $\mu\text{L}$ 、dNTP(5 mmol/L)1  $\mu\text{L}$ 、引物对(各 5  $\mu\text{mol/L}$ )2  $\mu\text{L}$ 、*Taq* DNA 聚合酶 1 U、DNA 模板(100 ng $\pm$ 50 ng)。

8.3.2 PCR 反应参数:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min,94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,55  $^{\circ}\text{C}$  退火 45 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 45 s,40 个循环。72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min,4  $^{\circ}\text{C}$  保存。

8.3.3 检测过程中分别设阳性对照、阴性对照和空白对照。用已知含鱼源性成分的样品作阳性对照,用已知不含鱼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

配制溴化乙锭 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 2% 琼脂糖凝胶。在电泳槽中加入电泳缓冲液,使液面刚刚没过凝胶。将 5  $\mu\text{L}$ ~8  $\mu\text{L}$  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 核苷酸序列测定

PCR 扩增产物电泳检测结果阳性,对 PCR 产物测序。

## 9 结果判断与表述

### 9.1 PCR 扩增产物电泳检测结果

阳性对照出现 224 bp 特异性 PCR 扩增条带(序列参见附录 A),阴性对照和空白对照未有特异性扩增条带。

阳性对照、阴性对照和空白对照 PCR 扩增结果正常,待测样品出现 224 bp 扩增条带,判断该待测样品 PCR 扩增为阳性。

阳性对照、阴性对照和空白对照 PCR 扩增结果正常,待测样品未出现 224 bp 扩增条带,判断该待测样品 PCR 扩增为阴性。

## 9.2 结果表述

待测样品 PCR 产物为阳性,核苷酸序列与鱼源性成分序列一致,表述为检出鱼源性成分。

待测样品 PCR 产物为阴性,表述为未检出鱼源性成分。

## 10 检测过程中防止交叉污染的措施

按照 SN/T 1193 执行。

附 录 A  
(资料性附录)  
PCR 产物测序结果

TGGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTGTGTCTAAGCTTTCGTGGGTTTCAGGTGTAATAAA  
GCCACTTTCGTAGGTGTGCTTCTTATTTTCGTGAGCGTATAACAGCTTAGTAAGTGTT  
CGGCTTTAGTTATTTGTTGTCCCTTAACCACGCTTTACGCCGGAGCCTATCAACTTGGG  
CCTCTCGTATAACCGCGGTAGCTGGCACGAGTTTTACCGGCCCTCTAA

---