



中华人民共和国国家标准

GB/T 20190—2025

代替 GB/T 20190—2006



饲料中牛、绵羊和山羊源性成分的测定

Determination of bovine, ovine and goat-derived materials in feeds

2025-06-30 发布

2026-01-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件代替 GB/T 20190—2006《饲料中牛羊源性成分的定性检测 定性聚合酶链式反应(PCR)法》，与 GB/T 20190—2006 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 更改了适用范围和检出限(见第 1 章,2006 年版的第 1 章)；
- b) 增加了“缩略语”一章(见第 4 章)；
- c) 增加了“实时荧光聚合酶链式反应法”一章(见第 5 章)；
- d) 更改了聚合酶链式反应(PCR)法的原理、试剂与材料、DNA 提取方法、PCR 检测方法、结果判定和表述,增加了质量控制(见第 6 章,2006 年版的第 3 章、第 4 章、第 6 章、第 7 章)；
- e) 增加了“实验室污染防治措施”一章(见第 7 章)；
- f) 增加了“危害性废弃物处理”一章(见第 8 章)；
- g) 增加了牛、绵羊、山羊 PCR 检测内参对照基因及靶基因序列(见附录 B)。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)提出并归口。

本文件起草单位：上海海关动植物与食品检验检疫技术中心、新希望六和股份有限公司。

本文件主要起草人：潘良文、蔡一村、张语秋、韩伟、杨青、张晨、邵冰玉、许镇坚、宁雪、吕游。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2006 年首次发布为 GB/T 20190—2006；

——本次为第一次修订。

饲料中牛、绵羊和山羊源性成分的测定

1 范围

本文件描述了饲料中牛、绵羊和山羊源性成分的实时荧光聚合酶链式反应和聚合酶链式反应的检测方法。

本文件适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料、饲料原料、复合预混合饲料和混合型饲料添加剂中牛、绵羊和山羊源性成分的检测。

本文件的检出限为 0.1%。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;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 19495.3—2004 转基因产品检测 核酸提取纯化方法

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

GB/T 27403—2008 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

GB/T 35918—2018 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

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

bp:碱基对(base pair)

Ct:循环阈值(cycle threshold)

CTAB:十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide)

DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

EDTA:乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid)

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

Tris:三羟甲基氨基甲烷(trihydroxymethyl aminomethane)

5 实时荧光聚合酶链式反应法

5.1 原理

根据牛 β -actin 基因、绵羊催乳素受体基因和山羊 9 号染色体基因的特异性序列设计引物和探

针,采用实时荧光 PCR 技术进行扩增,依据扩增反应中产生的荧光信号和 Ct 值实现对牛、绵羊和山羊源性 DNA 成分的检测。

5.2 试剂或材料

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。所有试剂均使用无 DNA 酶污染的容器存储或分装。

5.2.1 水:GB/T 6682,一级。

5.2.2 2×实时荧光 PCR 预混液:含有 Taq DNA 聚合酶、实时荧光 PCR 缓冲液、MgCl₂ 和 dNTPs 等成分,不应含有牛血清白蛋白。

5.2.3 氢氧化钠溶液(10 mol/L):称取 400 g 氢氧化钠,加水定容至 1 L。

5.2.4 Tris-盐酸溶液(1 mol/L):称取 121.1 g Tris 溶解于 800 mL 水中,用盐酸调 pH 至 8.0,加水定容至 1 L。在 103.4 kPa,121 °C 灭菌 20 min,室温保存。

5.2.5 EDTA 溶液(0.5 mol/L):称取 186.1 g Na₂EDTA·2H₂O 溶解于 800 mL 水中,磁力搅拌器上剧烈搅拌,加入氢氧化钠约 20 g,再滴加氢氧化钠溶液(5.2.3)调 pH 至 8.0,定容至 1 L,在 103.4 kPa,121 °C 灭菌 20 min,室温保存。

5.2.6 Tris-EDTA(TE)缓冲液:分别量取 10 mL Tris-盐酸溶液(5.2.4)和 2 mL EDTA 溶液(5.2.5),加水定容至 1 L,混匀,在 103.4 kPa,121 °C 灭菌 20 min,备用。

5.2.7 引物和探针:用 TE 缓冲液(5.2.6)或水将每条引物或者探针分别配制成 10 μmol/L 工作溶液,备用。-18 °C 以下分装保存,避免多次冻融。序列见表 1。

5.2.8 阳性对照样品:含有牛、绵羊和山羊源成分的样品。

5.2.9 阴性对照样品:不含有牛、绵羊和山羊源成分但含有其他动物成分的样品。

表 1 实时荧光 PCR 检测引物和探针序列

目标物种	引物和探针名称	序列	基因序列号	片段大小/bp
18S rRNA	18S-179 bp-F	5'- AGAGGGAGCCTGAGAAACGG-3'	AF176811.1	179
	18S-179 bp-R	5'- CCAGACTGCCCCTCCAATGG-3'		
	18S-179 bp-P	5'-[FAM]-CCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCG-[TAMRA]-3'		
牛	Bov-62 bp-F	5'-GGCCTCGGAGTGTGTATTTCAG-3'	NC_037352.1	62
	Bov-62 bp-R	5'-GCCCCAGAATGAGGTTCACTT-3'		
	Bov-62 bp-P	5'-[FAM]-AGGTGCACAGTACGTTT-[NFQ-MGB]-3'		
绵羊	Ovine-88 bp-F	5'-CCAACATGCCTTTAAACCCTCAA-3'	NC_056069.1	88
	Ovine-88 bp-R	5'-GGAAGTGTAGCCTTCTGACTCG-3'		
	Ovine-88 bp-P	5'-[FAM]-TGCCTTTCCTCCCGCCAGTCTC-[TAMRA]-3'		
山羊	Goat-87 bp-F	5'-GGAAGGAAAGAGAATGGGATATGG-3'	NC_030816.1	87
	Goat-87 bp-R	5'-TCTCCACACAGCCAAAACC-3'		
	Goat-87 bp-P	5'-[FAM]-ATCCAICTCTCCCTCCACTCCCTGCCTAA-[TAMRA]-3'		

注:扩增靶标序列见附录 A。

5.3 仪器设备

5.3.1 实时荧光 PCR 仪。



5.3.2 分析天平:精度 0.1 mg。

5.3.3 离心机:离心速度不低于 14 000 r/min。

5.3.4 紫外分光光度计或微量核酸蛋白测定仪。

5.3.5 微量移液器:2.5 μL 、10 μL 、100 μL 、200 μL 、1000 μL 等规格。

5.4 样品

按照 GB/T 20195 规定制备试样,至少 200 g,粉碎或碾磨使其全部通过 0.25 mm 孔径的试验筛,充分混匀,装入密闭容器中,备用。也可采用经过验证等效的其他粉碎或碾磨方法。

同法制备阳性对照样品(5.2.8)和阴性对照样品(5.2.9),备用。

注:粉碎或碾磨一个样品后,清洗粉碎机或碾磨仪的容器和刀具,防止污染。

5.5 试验步骤

5.5.1 DNA 提取

平行做两份试验。称取试样 100 mg~200 mg,按照 GB/T 19495.3—2004 附录 C 中 C.6.2 的方法提取 DNA。也可采用经过验证可靠的 DNA 提取试剂盒进行 DNA 提取,具体参照说明书使用。提取空白对照除不加试样外,其他操作同试样一致。必要时,提取阳性对照样品和阴性对照样品的 DNA。提取的 DNA 如需保存,置于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下。

5.5.2 DNA 溶液浓度测定

用紫外分光光度计(波长:260 nm)或微量核酸蛋白测定仪(5.3.4)测定 DNA 溶液(5.5.1)的浓度。DNA 溶液质量浓度宜控制在 5 ng/ μL ~50 ng/ μL 。

5.5.3 对照设置

实时荧光检测过程中应设置阳性对照、阴性对照、扩增空白对照、提取空白对照(5.5.1)。用阳性样品(5.2.8)的 DNA 作阳性对照,用阴性样品(5.2.9)的 DNA 作阴性对照,用等体积的水代替 DNA 溶液作为扩增空白对照。

5.5.4 反应体系配制

按表 2 配制实时荧光 PCR 检测反应体系。

表 2 实时荧光 PCR 检测反应体系

试剂	试剂浓度	体积/ μL
2 \times 实时荧光 PCR 预混液(5.2.2)	2 \times	12.5
上游引物	10 $\mu\text{mol/L}$	1
下游引物	10 $\mu\text{mol/L}$	1
探针	10 $\mu\text{mol/L}$	0.5
DNA 溶液	5 ng/ μL ~50 ng/ μL	5
水	—	5

注:不同品牌的实时荧光 PCR 检测试剂,其反应缓冲液成分可能不同,具体操作参见产品使用说明书。

5.5.5 实时荧光 PCR 扩增

按表 3 反应参数在实时荧光 PCR 仪上进行扩增,以平行测定的 Ct 值的平均值作为最终结果。

表 3 实时荧光 PCR 反应参数

反应步骤	反应温度	反应时间	循环数
预变性	95 °C	10 min	1
热循环	95 °C	15 s	40
	60 °C	1 min	
注:不同品牌的实时荧光 PCR 检测试剂,对 PCR 反应程序的设置(如:变性温度)可能不同,具体操作参见产品使用说明书。			

5.6 质量控制

5.6.1 内参对照基因扩增

真核生物内参对照基因 18S rRNA 基因检测应符合下列条件,否则重新提取核酸样品:

- 提取空白对照:Ct 值 \geq 37.0 或无 Ct 值;
- 扩增空白对照:Ct 值 \geq 37.0 或无 Ct 值;
- 阴性对照:荧光通道有荧光信号检出,且出现典型的扩增曲线,Ct 值 \leq 28.0;
- 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 \leq 28.0;
- 待测样品:荧光通道有荧光信号检出,且出现典型的扩增曲线,Ct 值 \leq 33.0。

5.6.2 牛、绵羊和山羊源性特异基因扩增

牛、绵羊和山羊源性特异基因的实时荧光 PCR 检测应符合以下条件:

- 提取空白对照:Ct 值=40.0 或无 Ct 值;
- 扩增空白对照:Ct 值=40.0 或无 Ct 值;
- 阴性对照:Ct 值=40.0 或无 Ct 值;
- 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 \leq 35.0。

5.7 结果判定和表述

5.7.1 结果判定

符合 5.6 时,被测样品的检测结果按以下进行判定:

- Ct 值 \leq 35.0,则判定为被检样品阳性;
- Ct 值=40.0 或无 Ct 值,则判定为被检样品阴性;
- $35.0 < \text{Ct 值} < 40.0$,则需重新测定。如再次扩增后 Ct 值仍小于 40.0,判定被检样品阳性;如再次扩增后 Ct 值=40 或无 Ct 值,判定被检样品阴性。

5.7.2 结果表述

结果为阳性的表述为“检出××源性 DNA 成分”。

结果为阴性的表述为“未检出××源性 DNA 成分”。

6 聚合酶链式反应法

6.1 原理

根据牛、绵羊和山羊线粒体基因的特异性序列设计引物,采用 PCR 技术进行扩增。通过电泳分离 PCR 产物,与 DNA 分子量标记比较,并对 PCR 产物进行测序,与基因库中的物种参照序列进行比较,实现对牛、绵羊和山羊源性 DNA 成分的检测。

6.2 试剂与材料

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。所有试剂均使用无 DNA 酶污染的容器存储或分装。

6.2.1 水:GB/T 6682,一级。

6.2.2 正己烷。

6.2.3 异丙醇。

6.2.4 2×PCR 反应预混液:含有 *Taq* DNA 聚合酶、PCR 缓冲液、 $MgCl_2$ 和 dNTPs 等成分,不应含有牛血清白蛋白。

6.2.5 体积分数为 75% 的乙醇。

6.2.6 琼脂糖。

6.2.7 核酸染料 Goldview 溶液(10 000 ×)。

6.2.8 DNA 分子量标记(覆盖 100 bp~500 bp 的范围)。

6.2.9 PCR 产物回收纯化试剂盒:按使用说明操作。

6.2.10 DNA 测序试剂。

6.2.11 体积分数为 95% 的乙醇。

6.2.12 甲酰胺。

6.2.13 Tris-盐酸溶液(1 mol/L):同 5.2.4。

6.2.14 EDTA 溶液(0.5 mol/L):同 5.2.5。

6.2.15 溴代十六烷基三甲胺(CTAB)提取缓冲液:在 800 mL 去离子水中加入 46.75 g 氯化钠,20 g 溴代十六烷基三甲胺(CTAB),摇动容器使溶质完全溶解,然后加入 50 mL Tris-盐酸溶液(6.2.13)和 20 mL EDTA 溶液(6.2.14)用水定容至 1 L,分装后,在 103.4 kPa、121 °C 灭菌 20 min,备用。

6.2.16 Tris 饱和苯酚和三氯甲烷混合液, $V(\text{Tris 饱和苯酚}) + V(\text{三氯甲烷}) = 1 + 1$ 。

6.2.17 三氯甲烷和异戊醇混合液, $V(\text{三氯甲烷}) + V(\text{异戊醇}) = 24 + 1$ 。

6.2.18 乙酸钠溶液(3 mol/L):在 80 mL 水中,加入 40.81 g 三水合乙酸钠,溶解后用冰乙酸调节 pH 值到 5.2,用水定容到 100 mL,分装后,在 103.4 kPa、121 °C 灭菌 20 min,备用。

6.2.19 TE 缓冲液:同 5.2.6。

6.2.20 引物:用 TE 缓冲液(6.2.19)或水将每条引物分别配制成 10 $\mu\text{mol/L}$ 工作液,备用。-18 °C 以下分装保存,避免多次冻融。序列见表 4。

6.2.21 电泳缓冲液:称取 54 g Tris,27.5 g 硼酸,20 mL EDTA 溶液(6.2.14),然后用水定容到 1 L,使用时 10 倍稀释。

6.2.22 上样缓冲液:称取溴酚蓝 250 mg,加水 10 mL,在室温下过夜溶解;再称取二甲胍蓝 250 mg,用 10 mL 水溶解;称取蔗糖 50 g,用 30 mL 水溶解,合并三种溶液,用水定容至 100 mL 在 4 °C 中保存。

表 4 PCR 检测引物序列

目标物种	引物名称	序列	基因序列号	片段大小/bp
18S rRNA	18S-179 bp-F	5'-AGAGGGAGCCTGAGAAACGG-3'	AF176811.1	179
	18S-179 bp-R	5'-CCAGACTTGCCCTCCAATGG-3'		
牛	Bov-271 bp-F	5'-GCCATATACTCTCCTTGGTGACA-3'	NC_006853.1	271
	Bov-271 bp-R	5'-GTAGGCTTGGGAATAGTACGA-3'		
绵羊	Ovine-369 bp-F	5'-TATGATTGCTCTTCCATCCTT-3'	NC_001941.1	369
	Ovine-369 bp-R	5'-GAGCATTGACCGTAGAATAG-3'		
山羊	Goat-293 bp-F	5'-TATTAGGCCTCCCTTGT-3'	NC_005044.2	293
	Goat-293 bp-R	5'-CCCTGCTCATAAGGAATAGCC-3'		
注：扩增靶标序列见附录 B。				

6.3 仪器

- 6.3.1 实验室常用仪器设备。
- 6.3.2 紫外分光光度计或微量核酸蛋白测定仪。
- 6.3.3 PCR 扩增仪。
- 6.3.4 电泳仪。
- 6.3.5 凝胶成像仪。
- 6.3.6 DNA 序列分析仪。
- 6.3.7 高压灭菌锅。

6.4 样品

同 5.4。

6.5 试验步骤

6.5.1 DNA 提取

6.5.1.1 CTAB 提取方法

同 5.5.1。

6.5.1.2 油脂类饲料中 DNA 提取方法

平行做两份试验。取油脂饲料适量(液态油取 30 mL,磷脂类和固态油脂取 5 g)放入 250 mL 三角瓶中,加入 25 mL 正己烷(6.2.2),于磁力搅拌器上不断振荡混合 2 h 后,加入 25 mL CTAB 提取缓冲液(6.2.15),继续于磁力搅拌器上振荡混合 2 h。将溶液转入 100 mL 离心管中,于 8 000 r/min 离心 10 min,使有机相和水相分离,取水相,加入与水相溶液等体积的异丙醇(6.2.3)及水相溶液 1/10 体积的乙酸钠溶液(6.2.18),轻缓颠倒混匀,室温放置 10 min 后,12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,待沉淀干燥后用 200 μ L TE 缓冲液(6.2.19)溶解沉淀,加入 200 μ L Tris 饱和苯酚和三氯甲烷混合液(6.2.16),轻缓颠倒混匀溶液,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,加入与上清液等体积三氯甲烷和异戊醇混合液(6.2.17),轻缓颠倒混匀,12 000 r/min 离心 2 min 至分相。将上清液转移至干净的离心管

中,加入与溶液等体积的异丙醇(6.2.3)及溶液 1/10 体积的乙酸钠溶液(6.2.18),轻缓颠倒混匀。室温放置 10 min 后,12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液后,依次加入 800 μL 体积分数为 75% 的乙醇和 100 μL 体积分数为 75% 的乙醇(6.2.5)洗涤沉淀。12 000 r/min 离心 5 min,弃除乙醇溶液。待沉淀干燥后,DNA 沉淀溶解于 100 μL TE 缓冲液(6.2.19)中,待测或于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下保存备用。

也可采用经过验证可靠的 DNA 提取试剂盒,提取空白对照,除不加试样外,其他操作同试样一致。必要时,提取阳性对照样品和阴性对照样品的 DNA。

6.5.2 DNA 溶液浓度测定

同 5.5.2。

6.5.3 对照设置

同 5.5.3。

6.5.4 反应体系配制

按表 5 配制 PCR 检测反应体系。

表 5 PCR 检测反应体系

试剂	试剂浓度	体积/ μL
2 \times PCR 反应预混液(6.2.4)	2 \times	12.5
上游引物	10 $\mu\text{mol/L}$	1
下游引物	10 $\mu\text{mol/L}$	1
DNA 溶液	5 ng/ μL ~50 ng/ μL	5
水	—	5.5

注:不同品牌的 PCR 检测试剂盒,其反应缓冲液成分可能不同,具体操作参见产品使用说明书。

6.5.5 PCR 扩增

按表 6 的程序在 PCR 扩增仪(6.3.3)上进行 PCR 扩增。PCR 反应结束后,对反应物进行电泳检测或在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

表 6 PCR 反应程序

反应步骤	反应温度	反应时间	循环数
预变性	94 $^{\circ}\text{C}$	5 min	1
热循环	94 $^{\circ}\text{C}$	30 s	35
	56 $^{\circ}\text{C}$	30 s	
延伸	72 $^{\circ}\text{C}$	5 min	1

注:不同品牌的 PCR 检测试剂,对 PCR 反应程序的设置(如:变性温度)可能不同,具体操作参见产品使用说明书。

6.5.6 PCR 扩增产物的电泳检测

将适量的琼脂糖加入电泳缓冲液(6.2.21)中,加热将其溶解,配制成质量分数为 1.5%的琼脂糖(6.2.6)溶液,然后按每 100 mL 琼脂糖溶液中加入 5 μ L 核酸染料 Goldview 溶液(6.2.7)的比例,加入 Goldview 溶液,混匀,稍适冷却后,将其倒入电泳板上,室温下凝固成凝胶后,放入电泳缓冲液(6.2.21)中。取 10 μ L~15 μ L PCR 反应液,加入 3 μ L~5 μ L 上样缓冲液(6.2.22)并混合均匀,在每个泳道中加入取 10 μ L~15 μ L 的上述混合物,其中一个泳道中加入 DNA 分子量标记(6.2.8),接通电源,9 V/cm 电压,电泳 20 min~30 min。

电泳结束后,将琼脂糖凝胶置于凝胶成像仪(6.3.5)上成像。根据 DNA 分子量标记判断扩增出的目的条带的大小,将电泳结果形成电子文件存档或用照相系统拍照。

对 PCR 阳性结果的样品,要对 PCR 扩增产物进行 DNA 序列测定。

6.5.7 PCR 扩增产物直接测序

6.5.7.1 PCR 扩增产物的纯化

将 60 μ L PCR 反应液与上样缓冲液(6.2.22)混合后,加入预制好的含质量分数为 0.8%的琼脂糖凝胶的泳道中,在其中的一个泳道中加入 DNA 分子量标记,接通电源进行电泳。在凝胶成像仪下将 PCR 特异性增条带切割下来,以下步骤按 PCR 产物回收纯化试剂盒(6.2.9)说明进行。

6.5.7.2 测序扩增反应

反应体系(20 μ L):8 μ L DNA 测序试剂(6.2.10),200 ng~500 ng PCR 纯化产物,3.2 pmol 引物,水补足至 20 μ L;PCR 扩增程序:96 $^{\circ}$ C 10 s,50 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 4 min,25 个循环,扩增产物 4 $^{\circ}$ C 保存。

6.5.7.3 测序扩增产物的纯化

扩增管中加入 16 μ L 水、64 μ L 体积分数为 95%的乙醇(6.2.11),稍混匀,室温放置 15 min,12 000 r/min离心 20 min,去上清,加入 250 μ L 体积分数为 75%的乙醇(6.2.5),短暂混匀,12 000 r/min 离心 10 min,去上清,室温干燥。

6.5.7.4 测序

纯化产物中加入 170 μ L 甲酰胺(6.2.12),95 $^{\circ}$ C,5 min,迅速转移至冰上,2 min。分装样品测序仪的加样槽中,自动测序。

6.5.7.5 测序产物拼接

用正向和反向引物分别进行测序扩增反应、纯化和测序,将两次测得序列进行拼接,得到最终 PCR 产物测序结果。

6.5.8 PCR 扩增产物克隆测序

PCR 扩增产物克隆测序按照 GB/T 35918—2018 附录 D 执行。

6.6 质量控制

6.6.1 内参对照基因扩增的质量控制

当进行真核生物内参对照基因 18S rRNA 基因的实时荧光 PCR 检测时,应符合下列条件,否则要重新提取样品 DNA:

- a) 提取空白对照:无扩增条带,或条带比阴性对照、阳性对照和待测样品的扩增条带明显浅;
- b) 扩增空白对照:无扩增条带,或条带比阴性对照、阳性对照和待测样品的扩增条带明显浅;
- c) 阴性对照:出现 179 bp 片段长度的扩增条带;
- d) 阳性对照:出现 179 bp 片段长度的扩增条带;
- e) 待测样品:出现 179 bp 片段长度的扩增条带。

6.6.2 目标基因扩增的质量控制

当进行目标基因的实时荧光 PCR 检测时,应符合下列条件:

- a) 提取空白对照:无扩增条带;
- b) 扩增空白对照:无扩增条带;
- c) 阴性对照:无扩增条带;
- d) 阳性对照:检测牛、绵羊、山羊源性成分时,分别出现 271 bp、369 bp、293 bp 片段长度的扩增条带。

6.7 结果判定和表述

6.7.1 结果判定

6.7.1.1 待测样品的靶基因扩增 PCR 产物的电泳结果阴性,判定靶基因检测结果阴性。

6.7.1.2 待测样品的靶基因扩增 PCR 产物的电泳结果阳性,判定靶基因检测结果阳性。若需要进一步确证,需进行 DNA 测序,测序结果与在 GenBank 中通过 BLAST 功能搜索得到的牛、绵羊和山羊靶基因序列或与附录 B 中牛、绵羊和山羊的靶基因序列进行比较:

- 序列结果符合程度 $\geq 90\%$,确证靶基因检测结果阳性;
- 序列结果符合程度 $< 90\%$,确证靶基因检测结果阴性。

6.7.2 结果表述

结果为阳性的表述为“检出××源性 DNA 成分”。

结果为阴性的表述为“未检出××源性 DNA 成分”。

7 实验室污染防治措施

按 GB/T 27403—2008 附录 D 规定执行。

8 危害性废弃物处理

按 GB/T 27403—2008 中 5.5.2 规定执行。

附 录 A

(资料性)

牛、绵羊、山羊实时荧光 PCR 检测内参对照基因及靶基因序列

A.1 18S rRNA

18S rRNA 内参对照基因序列如下：

5'- AGAGGGAGCC TGAGAAACGG CTACCACATC CAAGGAAGGC AGCAGGCGCG CAAATTACCC ACTCCCGACC
CGGGGAGGTA GTGACGAAAA ATAACAATAC AGGACTCTTT CGAGGCCCTG TAATTGGAAT GAGTCCACTT TAAATCCTTC
CGCGAGGATC CATTGGAGGG CAAGTCTGG -3'

A.2 牛 (*Bos taurus*)

牛靶基因序列如下：

5'- GGCCTCGGAG TGTGTATTCA GTAGGTGCAC AGTACGTTCT GAAGTGAACC TCATTCTGGG GC -3'

A.3 绵羊 (*Ovis aries*)

绵羊靶基因序列如下：

5'- CCAACATGCC TTTAAACCCT CAAAAACCAT TGAGACTGGC GGGGAAGGAA AGGCAGCCAA ACAGAGCGAG
TCAGAAGGCT ACAGTTCC -3'

A.4 山羊 (*Capra hircus*)

山羊靶基因序列如下：

5'- GGAAGGAAAG AGAATGGGA TATGGAGGAA AATTTAGGCA GGGAGTGGAG GGAGAGATGG ATGTATGGTT
TTGGCTGTGT GTGGAGA -3'

注：单下划线为引物位置，双下划线为探针位置。

附 录 B

(规范性)

牛、绵羊、山羊 PCR 检测内参对照基因及靶基因序列

B.1 18S rRNA

18S rRNA 内参对照基因序列如下：

5'- AGAGGGAGCC TGAGAAACGG CTACCACATC CAAGGAAGGC AGCAGGCGCG CAAATTACCC ACTCCCGACC
 CGGGGAGGTA GTGACGAAAA ATAACAATAC AGGACTCTTT CGAGGCCCTG TAATTGGAAT GAGTCCACTT TAAATCCTTC
 CGCGAGGATC CATTGGAGGG CAAGTCTGG -3'

B.2 牛 (*Bos taurus*)

牛靶基因序列如下：

5'- GCCATATACT CTCCTTGGTG ACATGCCGCA ACTAGACACG TCAACATGAC TGACAATGAT CTTATCAATA
 TTCTTGACCC TTTTATCAT CTTTCAACTA AAAGTTTCAA AACACAACCTT TTATCACAAT CCAGAACTGA CACCAACAAA
 AATATTA AAA CAAAACACCC CTTGAGAAAC AAAATGAACG AAAATTTATT TACCTCTTTT ATTACCCTG TAATTTAGG
 TCTCCCTCTC GTAACCCTTA TCGTACTATT CCAAGCCTA C -3'

B.3 绵羊 (*Ovis aries*)

绵羊靶基因序列如下：

5'- TATGATTGCT CTCCATCCT TGCGAATCCT ATACATAATA GATGAAATCA ACAACCCATC TCTCACAGTA
 AAGACCATAG GGCATCAATG ATACTGAAGC TATGAATATA CAGATTATGA AGACCTAAGC TTCGATTCCT ATATAATCCC
 AACATCAGAA CTA AAACAGC GAGAACTGCG TTTACTAGAA GTAGACAACC GAGTTGTATT ACCCATGGAA ATAACAGTCC
 GAATACTAAT CTCTCCGAA GATGTCCTAC CCTCATGAGC AGTCCCTTCT CTAGGACTAA AAACAGACGC AATTCCAGGT
 CGTTTAAATC AAACAACCCT TATGTCAACT CGTCCAGGCC TATTCTACGG TCAATGCTC -3'

B.4 山羊 (*Capra hircus*)

山羊靶基因序列如下：

5'- TATTAGGCCT CCCCCTTGT ACCCTTATTA TTTTATTTC TAGCTTACTA TTCCCTCAT CAAACCGACT
 AATTAACAAC CGCCTCATCT CTCTCCAACA ATGGGCACTC CAACTCATAT CAAAACAAAT AATAAGTATT CATAACACCA
 AAGGACAAAC ATGAACATTA ATATTAATGT CCCTAATCCT ATTTATTGGA TCTACAAACC TATTAGGCCT TCTACCCAC
 TCATTTACAC CAACTACACA ACTATCAATA AATCTAGGCA TGGCTATTCC CTTATGAGCA GGG -3'

注：单下划线为引物位置。

参 考 文 献

- [1] ISO/TS 20224-1:2020 Molecular biomarker analysis—Detection of animal derived materials in foodstuffs and feedstuffs by real-time PCR—Part 1:Bovine DNA detection method
- [2] ISO/TS 20224-2:2020 Molecular biomarker analysis—Detection of animal derived materials in foodstuffs and feedstuffs by real-time PCR—Part 2:Ovine DNA detection method
- [3] ISO/TS 20224-5: 2020 Molecular biomarker analysis—Detection of animal derived materials in foodstuffs and feedstuffs by real-time PCR—Part 5:Goat DNA detection method
-

