



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 21107—2025

代替 GB/T 21107—2007



## 饲料中马、驴源性成分的测定

Determination of horse and donkey-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 21107—2007《动物源性饲料中马、驴源性成分定性检测方法 PCR 方法》，与 GB/T 21107—2007 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,2007 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) 更改了样品(见 6.4,2007 年版的第 7 章)；
- e) 更改了结果判定与表述(见 6.6,2007 年版的第 9 章)；
- f) 更改了实验室污染防治措施(见第 7 章,2007 年版的第 10 章)；
- g) 增加了“危害性废弃物处理”一章(见第 8 章)。

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：蔡一村、潘良文、韩伟、李勇、许镇坚、杨青、张语秋、张晨、邵冰玉、薛俊欣、林颖峥。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

- 2007 年发布的 GB/T 21107—2007；
- 本次为第一次修订。

# 饲料中马、驴源性成分的测定

## 1 范围

本文件描述了饲料中马、驴源性成分的实时荧光聚合酶链式反应和聚合酶链式反应检测方法。

本文件中实时荧光 PCR 法适用于配合饲料、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马、驴源性成分的定性检测；PCR 法适用于动物源性饲料原料中马、驴源性成分的检测。

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

GBT 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

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 值: 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

根据马和驴的特异性 DNA 片段设计引物和探针，采用实时荧光 PCR 技术进行扩增，根据扩增反应中产生的荧光信号和 Ct 值实现对马、驴源性 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、MgCl<sub>2</sub> 和 dNTPs 等成分。

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 Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O 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:含有马、驴源成分样品。

5.2.9 阴性对照样品:不含有马、驴源成分但含有其他动物成分的样品。

表 1 引物探针序列

目标物种	引物探针名称	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'-CCAGACTTGCCCTCCAATGG-3'		
	18S-179 bp-P	5'-[FAM]-CCACATCCAAGGAAGGCAGCAGCGG-[TAMRA]-3'		
马	Horse-125 bp-F	5'-ACTCATCAAACGCCGCTCTC-3'	NC_009171.3	125
	Horse-125 bp-R	5'-GCTGTGAAGACCCCGTTGG-3'		
	Horse-125 bp-P	5'-[FAM]-CCAGGGCTCGGTCTCCAATCGC-[TAMRA]-3'		
驴	Donkey-95 bp-F	5'-TGAGTCAGGTGCTCCTTGAAC-3'	NC_052194.1	95
	Donkey-95 bp-R	5'-CTGAGGCACTCGTCTCTCTTG-3'		
	Donkey-95 bp-P	5'-[FAM]-CCGCTTCCCGTCAGTTGTGTCTTAGTTG-[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、1 000 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和碾磨方法。

同法制备阳性对照样品(5.2.8)和阴性对照样品(5.2.9)。

注:粉碎或研磨一个样品后,清洗粉碎机或研磨仪的容器和刀具,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 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。

注:提取出的 DNA 如需保存,置于-18℃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)的质量浓度。DNA 溶液质量浓度宜控制在 5 ng/ $\mu$ L~50 ng/ $\mu$ L。



### 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

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/ $\mu$ L
2 $\times$ 实时荧光 PCR 预混液(5.2.2)	2 $\times$	12.5
上游引物	10 $\mu$ mol/L	1
下游引物	10 $\mu$ mol/L	1
探针	10 $\mu$ mol/L	0.5
DNA 溶液	5 ng/ $\mu$ L~50 ng/ $\mu$ L	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 马、驴源性特异基因扩增

马、驴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  $< 40.0$ ，判定被检样品阳性；如再次扩增后 Ct 值 = 40.0 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

利用裂解液破碎细胞,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 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。

### 6.2 试剂或材料

除非另有规定外,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 马、驴源性成分检测用引物(对)序列为:F:5'-TGC CAC AGT TGG ATA CAT CAA C-3'  
R:5'-ATT GAG ATT AGG CGA TTG TT-3'。

6.2.3 *Taq* DNA 聚合酶(*Thermus aquaticus*,水生栖热菌)。

6.2.4 限制性内切酶:*Sau*3A I 酶,*Alu* I 酶。

6.2.5 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)。

6.2.6 琼脂糖:电泳纯。

6.2.7 溴化乙锭。

6.2.8 三氯甲烷。

6.2.9 异丙醇。

6.2.10 体积分数为 70%乙醇。

6.2.11 分子量标准品(100 bp~2 000 bp)。

6.2.12 裂解液:1% CTAB(cetyltrimethylammonium bromide,十六烷基三甲基溴化铵),0.05 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)[Tris:tris(hydroxymethyl)aminomethane,三(羟甲基)氨基甲烷],0.7 mol/L NaCl,0.01 mol/L EDTA(pH 8.0)(ethylene diaminetetraacetic acid,乙二胺四乙酸)。

6.2.13 TE 缓冲液(Tris-HCl,EDTA 缓冲液):10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0),1 mmol/L EDTA(pH 8.0)。

6.2.14 10×PCR 缓冲液:100 mmol/L KCl,160 mmol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,20 mmol/L MgSO<sub>4</sub>,200 mmol/L Tris-HCl(pH 8.8),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)。

6.2.15 电泳缓冲液:Tris 54 g,硼酸 27.5 g,0.5 mol/L TE 缓冲液(pH 8.0)20 mL,加蒸馏水至 1 000 mL;使用时 10 倍稀释。

6.2.16 溴化乙锭贮存液:用水配制成 10 mg/mL。

6.2.17 加样缓冲液:0.25%溴酚蓝,质量分数为 40%的蔗糖水溶液。

6.2.18 酶切缓冲液:10 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5),10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,50 mmol/L NaCl,0.1 mg/mL BSA。

### 6.3 仪器设备

6.3.1 DNA 热循环仪。

6.3.2 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。

6.3.3 恒温水浴锅。

6.3.4 离心机:离心力 12 000 g。

6.3.5 微量移液器。

6.3.6 电泳仪。

6.3.7 紫外检测仪。

6.3.8 pH计。

6.3.9 天平:精度 0.1 mg。

6.4 样品

同 5.4。

6.5 试验步骤

6.5.1 总 DNA 提取

称取 100 mg 试样于 1.5 mL 离心管中,加入 600 μL ~ 800 μL 裂解液,涡旋混匀,置于 65 °C 恒温水浴中保持 30 min,期间不时振荡混匀;12 000g 离心 5 min,转移上清液于洁净离心管中,加 400 μL 三氯甲烷+异戊醇(24+1),混匀;12 000g 离心 5 min,取上清液;在上清液中加入等于该上清液体积 0.8 倍的异丙醇,沉淀;12 000g 离心 5 min,弃上清液;体积分数为 70% 的乙醇洗涤一次,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。

6.5.2 DNA 浓度和纯度测定

取 5 μL DNA 溶液加水稀释至 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 的质量浓度按公式(1)计算:

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

式中:

$c$  ——DNA 质量浓度,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  $A_{280}/A_{260}$  比值在 1.7~1.9 之间时,适宜于 PCR 扩增。

6.5.3 PCR 扩增

25 μL 的反应体系,在 0.2 mL 的 PCR 反应管中,加入上下游引物各 200 nmol/L,10×PCR 反应缓冲液,2 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ ,200 nmol/L dNTPs,1.5U *Taq* DNA 聚合酶,1.0 μL DNA 模板(100 ng ± 50 ng DNA)。

PCR 反应条件随仪器不同略有改变,一般的反应程序为:94 °C 预变性 1 min~3 min,94 °C 变性 30 s~60 s,57 °C 退火 30 s~60 s,72 °C 延伸 30 s~60 s,30 个循环,72 °C 延伸 5 min。4 °C 保存。

检测过程中分别设阳性对照、阴性对照和空白对照。用已知含马或驴源性成分的样品作阳性对照,用已知不含马和驴源性成分但含有其他动物成分的样品作阴性对照,用等体积的水代替模板 DNA 作空白对照。

6.5.4 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质量浓度为 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。

### 6.5.5 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(50  $\mu\text{L}$ ):*Sau*3A I 酶或 *Alu* I 酶 1  $\mu\text{L}$ (10 U/ $\mu\text{L}$ ),酶切缓冲液 5  $\mu\text{L}$ ,PCR 扩增产物 20  $\mu\text{L}$ ,水 24  $\mu\text{L}$ 。充分混匀反应液,37  $^{\circ}\text{C}$  水浴 1 h,65  $^{\circ}\text{C}$  水浴 5 min 终止酶切反应。酶切完成后电泳,方法见 6.5.4。

## 6.6 结果判定与表述

### 6.6.1 PCR 扩增产物电泳检测结果

若 PCR 扩增产物大小为 294 bp(序列参考附录 B),需要进行酶切;

若无 PCR 扩增条带为阴性。

### 6.6.2 限制性内切酶酶切电泳检测结果

PCR 扩增产物经 *Sau*3A I 限制性内切酶酶切后,片段大小是 226 bp 和 68 bp 为马阳性,否则为阴性。

PCR 扩增产物经 *Alu* I 限制性内切酶酶切后,片段大小是 113 bp 和 181 bp 为驴阳性,否则为阴性。

### 6.6.3 结果表述

PCR 扩增产物电泳检测结果阴性者判为不含有马、驴源性成分,表述为未检出马、驴源性成分。

PCR 扩增产物电泳检测结果片段大小正确且限制性内切酶酶切产物片段大小正确,判为含有马或驴源性成分,表述为检出马或驴源性成分。

## 7 实验室污染防治措施

按照 GB/T 27403—2008 附录 D 的规定执行。

## 8 危害性废弃物处理

按照 GB/T 27403—2008 中 5.5.2 的规定执行。

附 录 A

(资料性)

马、驴实时荧光 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 马 (*Equus caballus*)

马靶基因序列如下：

5'- ACTCATCAAA CGCCGCTCTC GAGATCCGTG CACATCGTTC  AATGGAAACT TCATTTTAAA AAAGAGAAAA AGGCGATTGG  
AAGCACCGAG CCCTGGGTAG CGTGTGCCAA CGGGGTCTTC ACAGC -3'

A.3 驴 (*Equus asinus*)

驴靶基因序列如下：

5'- TGAGTCAGGT GTCCTTGAA CAGCCGCTTC CCGTCAGTTG TGCCTTAGT TGGCAACACG GTTGAGAAGG ATCTCAAGAG  
AGACGAGTGC CTCAG -3'

注：单下划线为引物位置，双下划线为探针位置。

**附 录 B**  
(资料性)  
**PCR 产物测序结果**

**B.1 马(*Equus caballus*)**

马靶基因序列如下：

5'- TGCCACAGTTG GATACATCAA CATGATTTAT TAATATCGTC TCAATAATCC TAACTCTATT TATTGTATTT  
CAACTAAAAA TCTCAAAGCA CTCCTATCCG ACACACCCAG AAGTAAAGAC AACCAAAATA ACAAACACT CTGCCCTTG  
AGAATCAAAA TGAACGAAAA TCTATTCGCC TCTTTCGCTA CCCCAACAAT AGTAGGCCTC CCTATTGTAA TTCTGATCAT  
CATATTTCCC AGCATCCTAT TCCCTCACC CAACCGACTAA TCAACAATCG CCTAATCTCA AT -3'

**B.2 驴(*Equus asinus*)**

驴靶基因序列如下：

5'- TGCCACAGTTG GATACATCAA CATGATTTAT TAATATCGTC TCAATAATCC TAACTCTATT TATTGTATTCC  
AACTAAAAAT TTCAAAGCAC TCTTATCCAA TACACCCAGA AGCTAAAACA ACTAAAATAG CTAAACGCCT TACCCCTGA  
GAATCAAAA TGAACGAAAA TCTATTCGCC TCTTTCGCTA CCCCAACAAT AATAGGCCTC CCTATTGTAA TCCTAATCAT  
TATATTTCCC AGCATCCTAT TCCCTCATC CAACCGACTAA TTAACAATCG CCTAATCTCA AT -3'

注：单下划线为引物位置。

参 考 文 献

- [1] ISO/TS 20224-6:2020 Molecular biomarker analysis—Detection of animal derived materials in foodstuffs and feedstuffs by real-time PCR—Part 6:Horse DNA detection method
- [2] ISO/TS 20224-7:2020 Molecular biomarker analysis—Detection of animal derived materials in foodstuffs and feedstuffs by real-time PCR—Part 7:Donkey DNA detection method
-