

SZDB/Z

深圳市标准化指导性技术文件

SZDB/Z 268—2017

动物产品及饲料中黄牛、水牛和牦牛源性成分实时荧光 PCR 检测方法

Real-time PCR method for detection of cattle, buffalo and yak -derived ingredients
in animal products and feeds

2017 - 09 - 12 发布

2017 - 10 - 01 实施

深圳市市场监督管理局 发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 缩略语	1
5 原理	2
6 仪器、材料与试剂	2
7 样品制备	3
8 核酸提取	3
9 实时荧光 PCR 检测	4
10 结果分析与判定表述	5
附 录 A (规范性附录)相关试剂配制	7
附 录 B (资料性附录)实时荧光 PCR 反应体系配制	9
附 录 C (资料性附录)黄牛、水牛和牦牛扩增靶标参考序列	11

前 言

本文件按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本文件的附录A为规范性附录，附录B和附录C为资料性附录。

本文件由深圳市检验检疫科学研究院提出。

本文件由中华人民共和国深圳出入境检验检疫局归口。

本文件起草单位：深圳市检验检疫科学研究院、深圳出入境检验检疫局动植物检验检疫技术中心、深圳出入境检验检疫局食品检验检疫技术中心、中国检验检疫科学研究院。

本文件主要起草人：曾少灵、叶奕优、花群义、谢丽琪、唐金明、阮周曦、吴绍精、曹琛福、林彦星、侯乐锡、孙洁、廖立珊、王勤。

动物产品及饲料中黄牛、水牛和牦牛源性成分实时荧光 PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了动物产品及饲料中黄牛、水牛和牦牛源性成分实时荧光 PCR 检测方法。
本文件适用于动物产品及饲料中黄牛、水牛和牦牛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 饲料采样标准

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，利用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 缩略语

COX1: 细胞色素C氧化酶 I (cytochrome coxidase subunit I)

DNA: 脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid)

dNTP: 脱氧核糖核苷三磷酸 (deoxy-ribonucleoside triphosphate)

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

Tris: 三(羟甲基)氨基甲烷[tris (hydroxymethyl) aminomethane]

EDTA: 乙二胺四乙酸 (ethylene diaminetetraacetic acid)

PBS: 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline)

SZDB/Z 268—2017

TE: 三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸二钠盐溶液 [Tris-EDTA, Tris(hydroxymethyl) aminomethane-eathylene diamine tetraacetic acid]

FAM: 6-羧基荧光素 (6-carboxy-fluorescein)

HEX: 六氯-6-甲基荧光素 (hexachloro fluorescein)

CY5: 5-氢-吡啶菁染料 (CyDye5)

BHQ: 黑洞淬灭基团 (black hole quenchers)

5 原理

样品经研磨混匀后, 提取 DNA, 以 DNA 为模板, 同时采用黄牛和牦牛线粒体细胞色素 b 基因特异性检测引物和探针、水牛线粒体 *cox I* 基因特异性检测引物和探针进行实时荧光 PCR 扩增, 根据 Ct 值, 判断样品中是否存在黄牛、水牛和牦牛源性成分。

6 仪器、材料与试剂

6.1 仪器

实时荧光 PCR 仪;

高速冷冻离心机 (最高离心力达 12 000 g 以上);

核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计;

电子天平 (感量 0.01 g);

恒温水浴锅;

混匀器;

冰箱 (2°C~8°C, -20°C, -80°C);

微量可调移液器 (10 μL, 100 μL, 1000 μL)。

6.2 材料

a) 灭菌剪刀;

b) 灭菌研钵;

c) 离心管;

d) PCR 光学反应管;

e) 微量带滤芯吸嘴 (10 μL, 100 μL, 1000 μL)。

6.3 试剂

6.3.1 试剂级别

除另有规定, 本方法试验用水应符合 GB/T 6682 规定的二级水, 所用化学试剂均为分析纯。

6.3.2 引物与探针

6.3.2.1 黄牛和牦牛源性成分检测简并引物溶液的使用浓度均为 20 μmol/L, 序列为:

a) 上游引物 *cyt-p1*: 5' -C(AT)TACACCTTCCTAGAAACATGAAA(CT)-3'

b) 下游引物 *cyt-p2*: 5' -TGG(CT)AGTAC(AG)TA(CT)CCTAT(AG)AATGCTGT(AG) -3'

6.3.2.2 水牛源性成分检测引物溶液的使用浓度均为 20 μmol/L, 序列为:

- a) 上游引物 cox-p1: 5' -CTATATTTTAATTTACCCGG-3'
- b) 下游引物 cox-p2: 5' -CTATGTATCCGAATTGTTCTT-3'

6.3.2.3 各检测探针的使用浓度均为10 μmol/L, 序列及标记物为:

- a) 黄牛源性成分检测探针 cattle-p: 5' -FAM-TAATCCTTCTGCTCAC-BHQ-3'
- b) 水牛源性成分检测探针 buffalo-p: 5' -HEX-TAATCTCCCACATTGTA-BHQ-3'
- c) 牦牛源性成分检测探针 yak-p: 5' -CY5-TGGAGTAATTCTTCTACTTAC-BHQ-3'

6.3.3 PCR 检测试剂盒

6.3.4 其他试剂

裂解液 I (配制方法见附录 A);
三氯甲烷;
异丙醇;
无水乙醇;
70% 乙醇 (用新开启的灭菌双蒸水配制, -20℃预冷保存备用);
0.01 mol/L PBS (pH7.4, 配制方法见附录 A)。

7 样品制备

- 7.1 饲料样品按照 GB/T 14699.1 进行采样, 将试样充分粉碎, 混合均匀后待用。
- 7.2 其他动物产品样品采集试样后需充分研磨, 混合均匀后待用。

8 核酸提取

8.1 核酸抽提

- 8.1.1 称取已经破碎充分的待检样品、阳性对照 (黄牛肉、水牛肉、牦牛肉) 和阴性对照 (如: 猪肉) 各适量 (50 mg~100 mg), 分别置于新的 1.5 mL 离心管中, 做好标记。
- 8.1.2 每管分别加入 600 μL~800 μL 裂解液 I, 65℃水浴 30 min, 每隔 10 min 振荡混匀一次。
- 8.1.3 100℃沸水浴 5 min。
- 8.1.4 12 000 rpm/min 离心 5 min, 吸取上清液至新离心管中, 每管加入 400 μL 三氯甲烷+异戊醇混合液 (见附录 A), 充分混匀。
- 8.1.5 12 000 rpm/min 离心 5 min, 吸取上清液至新离心管中, 每管加入管中原液体 0.8 倍体积的异丙醇, -20℃低温下沉淀 DNA 至少 30 min。
- 8.1.6 12 000 rpm/min 离心 10 min, 弃去上清液。
- 8.1.7 70%乙醇 (见附录 A) 轻柔地洗涤沉淀一次, 12 000 rpm/min 离心 10 min, 倒去液体, 晾干。
- 8.1.8 加入 50~100 μL 的 TE 溶液 (见附录 A), 充分溶解沉淀, -20℃保存备用。

8.2 其他核酸抽提方法

阳性对照、阴性对照和待检样品的DNA提取，也可以采用等效的DNA提取试剂盒及方法，或采用自动化核酸抽提仪和配套核酸抽提试剂进行核酸的抽提。

8.3 DNA 浓度和纯度的测定

取 5 μL 的 DNA 模板溶液加灭菌双蒸水稀释至 1 mL，使用核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计测定 260 nm 和 280 nm 处的吸光值 A_{260} 和 A_{280} 。DNA 的浓度按公式 (1) 进行计算：

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

式中：

c ——DNA 浓度，单位为微克每微升 (μg/μL)；

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，DNA 模板适用于 PCR 扩增。

9 实时荧光 PCR 检测

9.1 反应体系配制

反应体系总体积为 25 μL。根据需检测的牛源性成分种类，加入相应的检测引物和探针溶液各 0.5 μL，模板液加入 2~5 μL，再参照选用的 PCR 检测试剂盒说明书加入其它相关试剂和模板液进行体系的配制，最终加灭菌双蒸水至 25 μL (附录 B 以 Invitrogen 公司 Applied Biosystems® AmpliTaq Gold® 360 PCR Master Mix 试剂盒为例，列出反应体系配制表，仅供参考)。同时设置阳性对照、阴性对照和空白对照。各反应管做好标记，将 PCR 管内试剂充分混匀，瞬时离心后放入荧光 PCR 检测仪内，记录样本放置的顺序。

9.2 设置实验对照

9.2.1 阴性对照

设置阴性对照时，以其他动物肉品 (如：猪肉等) 提取的 DNA 作为模板。

9.2.2 空白对照

设置空白对照时，以灭菌双蒸水作为模板。

9.2.3 阳性对照

9.2.3.1 同时检测黄牛、水牛和牦牛三种源性成分时，分别以黄牛肉、水牛肉和牦牛肉提取 DNA，等比例混合后作为模板。

9.2.3.2 只检测黄牛、水牛或牦牛其中一种或两种源性成分时，则采用需检测的牛肉种类提取 DNA，作为模板。

9.3 扩增检测

9.3.1 反应条件设定

反应程序可根据具体的荧光 PCR 检测仪型号来设定，在一般反应程序基础上做适当调整。一般反应程序为：95℃ 5 min；95℃ 5 s，56℃ 40 s，40 个循环；在每个循环的 56℃ 退火阶段收集荧光。

9.3.2 荧光通道的选择

报告荧光 (report dye) 分别按需检测的牛源性成分探针标记物的种类进行设定, 其中黄牛源性检测选定FAM, 水牛源性检测选定HEX, 牦牛源性检测选定CY5。淬灭荧光 (quench dye) 设定为None。可根据不同品牌仪器说明等效设置相关参数。

10 结果分析与判定表述

10.1 阈值设定

综合分析仪器给出的各项结果, 基线 (baseline) 以仪器给出的默认值作为参考, 阈值 (threshold) 设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照样品扩增曲线的最高点为准, 具体还需根据仪器噪音情况进行调整。

10.2 质控

10.2.1 阴性对照

无FAM、HEX或CY5荧光信号检出, 无Ct值, 无扩增曲线。

10.2.2 空白对照

无FAM、HEX或CY5荧光信号检出, 无Ct值, 无扩增曲线。

10.2.3 阳性对照

对使用黄牛肉、水牛肉和牦牛肉三种DNA混合液作为模板的阳性对照, 应同时有FAM、HEX和CY5三种荧光信号的检出, 且三者均有明显扩增曲线, Ct值均 ≤ 35.0 。对分别只使用黄牛肉、水牛肉或牦牛肉中的一种或两种提取的DNA作为模板的阳性对照, 应只有对应的一种或两种荧光信号的检出, 对应的荧光信号有明显的扩增曲线, 且Ct值 ≤ 35.0 。

10.2.4 如阴性对照、空白对照和阳性对照结果不满足上述条件, 此次实验视为无效。

10.3 结果判定与表述

10.3.1 阳性结果的判定

Ct值 ≤ 35.0 且呈现典型扩增曲线, 可判为阳性结果, 表明从样品中检出对应牛种类的源性成分。

10.3.2 阴性结果的判定

Ct值 > 38.0 或无Ct值且不出现扩增曲线, 可判为阴性结果, 表明从样品中未检出对应牛种类的源性成分。

10.3.3 可疑结果的判定

当出现 $35.0 < \text{Ct值} \leq 38.0$ 时, 判为结果可疑, 需重新检测。对于可疑结果的样品, 应按本文件第6款至第8款操作步骤再次进行实时荧光PCR检测。如果重复检测的Ct值仍小于 38.0 , 且呈现典型扩增曲线, 则判为阳性结果, 表明从样品中检出对应牛种类的源性成分。否则判为阴性结果, 表明从样品中未检出对应牛种类的源性成分。

10.3.4 黄牛、水牛和牦牛源性成分检测结果的判定与表述详见下表1。

表1 结果的判定与表述

FAM 荧光	HEX 荧光	CY5 荧光	结果判定	结果表述
+	+	+	有 FAM、HEX 和 CY5 荧光同时被检出, Ct 值均 ≤ 35.0 且呈现典型扩增曲线, 判定为阳性。	表明从样品中同时检出黄牛、水牛和牦牛源性成分。
+	+	—	有 FAM 和 HEX 荧光同时被检出, Ct 值均 ≤ 35.0 且呈现典型扩增曲线, 但无 CY5 荧光, 判定为阳性。	表明从样品中同时检出黄牛和水牛源性成分, 但未检出牦牛源性成分。
+	—	+	有 FAM 和 CY5 荧光同时被检出, Ct 值均 ≤ 35.0 且呈现典型扩增曲线, 但无 HEX 荧光, 判定为阳性。	表明从样品中同时检出黄牛和牦牛源性成分, 但未检出水牛源性成分。
—	+	+	有 HEX 和 CY5 荧光同时被检出, Ct 值均 ≤ 35.0 且呈现典型扩增曲线, 但无 FAM 荧光, 判定为阳性。	表明从样品中同时检出水牛和牦牛源性成分, 但未检出黄牛源性成分。
+	—	—	只有 FAM 荧光被检出, Ct 值 ≤ 35.0 且呈现典型扩增曲线, 但无 HEX 和 CY5 荧光, 判定为阳性。	表明从样品中只检出黄牛源性成分, 但未检出水牛和牦牛源性成分。
—	+	—	只有 HEX 荧光被检出, Ct 值 ≤ 35.0 且呈现典型扩增曲线, 但无 FAM 和 CY5 荧光, 判定为阳性。	表明从样品中只检出水牛源性成分, 但未检出黄牛和牦牛源性成分。
—	—	+	只有 CY5 荧光被检出, Ct 值 ≤ 35.0 且呈现典型扩增曲线, 但无 FAM 和 HEX 荧光, 判定为阳性。	表明从样品中只检出牦牛源性成分, 但未检出黄牛和水牛源性成分。
—	—	—	无 FAM、HEX 或 CY5 荧光被检出, Ct 值 >38.0 或无 Ct 值且无扩增曲线, 判定为阴性。	表明从样品中未检出黄牛、水牛或牦牛源性成分。

注: 1. “+”表示阳性, “—”表示阴性。
2. 上述判定和表述均在阴性对照、空白对照和阳性对照同时成立的前提下进行。

附 录 A
(规范性附录)
相关试剂配制

A.1 1.0 mol/L、pH8.0 三(羟甲基)氨基甲烷盐酸溶液 (Tris-HCl溶液)

三(羟甲基)氨基甲烷 (Tris)	121.10 g
双蒸水 (ddH ₂ O)	800 mL
冷却至室温后用浓盐酸调 pH 值至	8.0
加双蒸水 (ddH ₂ O) 定容至	1000 mL
200 mL/瓶分装, 湿热法高压灭菌	121℃ 15 min

A.2 Tris饱和苯酚和三氯甲烷 (Tris-HCl) 混合液

Tris 饱和苯酚 (Tris-Phenol)	100 mL
三氯甲烷 (CHCl ₃)	100 mL
等体积混合。	

A.3 0.5 mol/L、pH8.0 乙二胺四乙酸二钠盐溶液 (EDTA溶液)

二水乙二胺四乙酸二钠 (EDTA-Na ₂ ·2H ₂ O)	186.10 g
双蒸水 (ddH ₂ O)	700 mL
充分溶解, 10 mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 值至 8.0	
加双蒸水 (ddH ₂ O) 定容至	1000 mL
200 mL/瓶分装, 湿热法高压灭菌	121℃ 15 min

A.4 裂解液 I

氯化钠 (NaCl)	40.95 g
双蒸水 (ddH ₂ O)	800 mL
十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB)	10.00 g
完全溶解后	
Tris 饱和苯酚和三氯甲烷混合液 (Tris-HCl)	50 mL
0.5 mol/L、pH8.0 乙二胺四乙酸二钠盐溶液 (EDTA 溶液)	20 mL
加双蒸水 (ddH ₂ O) 定容至	1000 mL
200 mL/瓶分装, 湿热法高压灭菌	121℃ 15 min

A.5 三氯甲烷和异戊醇混合液

三氯甲烷 (CHCl ₃)	48 mL
异戊醇 (C ₅ H ₁₂ O)	2 mL
充分混合。	

A.6 磷酸盐缓冲溶液 (0.01mol/L pH7.4 PBS)

无水磷酸氢二钠 (Na ₂ HPO ₄)	1.44 g
无水磷酸二氢钾 (KH ₂ PO ₄)	0.24 g
氯化钾 (KCl)	0.2 g
氯化钠 (NaCl)	8.00 g

SZDB/Z 268—2017

蒸馏水 1000 mL

称取各组分溶于 800 mL 蒸馏水中，用 HCl 调节溶液的 pH 值至 7.4，最后加蒸馏水定容至 1 L 即可。
在 1.034×10^5 Pa 高压（121℃）下蒸气灭菌（至少 20 min），室温或 4℃ 冰箱中保存。

A.7 70%乙醇溶液

无水乙醇 (C₂H₆O) 70 mL

双蒸水 (ddH₂O) 30 mL

充分混合。

A.8 pH8.0 TE缓冲液

双蒸水 (ddH₂O) 800 mL

1.0 mol/L、pH8.0 Tris-HCl 溶液 10 mL

0.5 mol/L、pH8.0 EDTA 溶液 2 mL

加双蒸水 (ddH₂O) 定容至 1000 mL

200 mL/瓶分装，湿热法高压灭菌 121℃ 15 min

附 录 B
(资料性附录)

实时荧光 PCR 反应体系配制

采用 Applied Biosystems® AmpliTaq Gold® 360 PCR Master Mix 试剂盒配制每份检测样品的实时荧光 PCR 体系，反应体系为 25 μL 。

B.1 同时检测黄牛、水牛和牦牛的重实时荧光PCR反应体系的配制

表2 三重实时荧光 PCR 反应体系配制表

组 分	体积 (μL)
2× AmpliTaq Gold 360 Master Mix	12.5
AmpliTaq Gold 360 DNA 聚合酶	0.5
上游引物 cyt-p1 (20 $\mu\text{mol}/\text{mL}$)	0.5
下游引物 cyt-p2 (20 $\mu\text{mol}/\text{mL}$)	0.5
上游引物 cox-p1 (20 $\mu\text{mol}/\text{mL}$)	0.5
下游引物 cox-p2 (20 $\mu\text{mol}/\text{mL}$)	0.5
检测探针 cattle-p (10 $\mu\text{mol}/\text{mL}$)	0.5
检测探针 buffalo-p (10 $\mu\text{mol}/\text{mL}$)	0.5
检测探针 yak-p (10 $\mu\text{mol}/\text{mL}$)	0.5
总体积	16.5

在上述配制好的PCR反应液中，按实验设置，加入下列相应的模板液：

- a) 样品检测：加入样品 DNA 模板液 5.0 μL ，再加灭菌双蒸水 3.5 μL ，补充反应总体积至 25 μL 。
- b) 阳性对照：分别加入黄牛、水牛和牦牛 DNA 模板液各 2.0 μL ，再加灭菌双蒸水 2.5 μL ，补充反应总体积至 25 μL 。
- c) 阴性对照：加入其他动物（如：猪）的 DNA 模板液 5.0 μL ，再加灭菌双蒸水 3.5 μL ，补充反应总体积至 25 μL 。
- d) 空白对照：加入灭菌双蒸水 8.5 μL ，补充反应总体积至 25 μL 。

B.2 检测黄牛源性成分的实时荧光PCR反应体系的配制（单一源性成分检测示例）

表3 实时荧光 PCR 反应体系配制表

组 分	体积 (μL)
2× AmpliTaq Gold 360 Master Mix	12.5
AmpliTaq Gold 360 DNA 聚合酶	0.5
上游引物 cyt-p1 (20 $\mu\text{mol}/\text{mL}$)	0.5
下游引物 cyt-p2 (20 $\mu\text{mol}/\text{mL}$)	0.5
检测探针 cattle-p (10 $\mu\text{mol}/\text{mL}$)	0.5
灭菌双蒸水	5.5

在上述配制好的PCR反应液中，按实验设置，加入下列相应的模板液：

- a) 样品检测：加入样品 DNA 模板液 5.0 μL 。
- b) 阳性对照：加入黄牛 DNA 模板液 5.0 μL 。
- c) 阴性对照：加入其他动物（如：猪）的 DNA 模板液 5.0 μL 。
- d) 空白对照：加入灭菌双蒸水 5.0 μL 。

附 录 C

(资料性附录)

黄牛、水牛和牦牛扩增靶标参考序列

C.1 黄牛扩增靶标参考序列

catacaccttcctagaacatgaaacattggagtaatccttctgctcacagtaatagccacagcatttataggatacgtactgc
ca

C.2 水牛扩增靶标参考序列

ctatattttaattttaccggttcggtataatctcccacattgtaacctactactcaggaaaaaagaacaattcggatacat
ag

C.3 牦牛扩增靶标参考序列

cttacaccttcctagaacatgaaatattggagtaattcttctacttacagtaatagctacagcattcatagggtatgtactac
ca
