

SZDB/Z

深圳市标准化指导性技术文件

SZDB/Z 267—2017

肉食品中鸡源性成分实时荧光 PCR 检测方法

Real-time PCR for detection of chicken-derived ingredients in food

2017 - 09 - 12 发布

2017 - 10 - 01 实施

深圳市市场监督管理局 发布

目 次

目次	I
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	1
6 设备	2
7 主要器械和设备	2
8 检验步骤	2
9 质量控制	3
10 结果判定与表述	3
附 录 A	4

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。

本文件主要起草单位：深圳市检验检疫科学研究、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。

本文件主要起草人：张彩虹、阮周曦、叶奕优、花群义、谢丽琪、林燕奎、林彦星、曹琛福、黄超华、孙洁、杨俊兴、吕建强、曾少灵。

肉食品中鸡源性成分实时荧光 PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了肉食品中鸡源性成分实时荧光PCR检测方法。
本文件适用于肉食品中鸡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场地通用规范

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

COX3: 细胞色素C氧化酶III (cytochrome c oxidase subunit III)

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)

ROX: 6-羧基-X-罗丹明 (6-Carboxyl-X-Rhodamine)

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

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

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

5 原理

SZDB/Z 267—2017

样品经研磨混匀后，提取DNA，以DNA为模板，采用鸡线粒体COX3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鸡源性成分。

6 设备

6.1 试剂

裂解液（参见附录A），三氯甲烷，异丙醇，75%乙醇，双蒸水。

除另有规定外，试剂为分析纯或生化试剂，实验用水为GB/T 6682规定的二级水。所有试剂均用无DNA酶污染的容器盛装。

6.2 引物及探针序列

- a) 上游引物F: 5'-TCTCACTTACACTACTTGCCACATCTT-3'
- a) 下游引物R: 5'-CGTGTGTGCCTGTTTGGACTAG-3'
- b) 探针序列P: 5'-FAM-CACTGCAACCTACAGCCTCCGCATAAC-BHQ1-3'

7 主要器械和设备

高速离心机（最大离心力达12 000g以上），微量移液器（10 μL，100 μL，1000 μL），实时荧光PCR仪，恒温水浴锅，天平（感量0.001 g和0.1 g），涡旋振荡器，pH计。

8 检验步骤

8.1 样品制备

称取待检样品200 mg，研磨混匀待用。

8.2 核酸提取

称取上述混匀样品50 mg于1.5 mL离心管中，加入600 μL~800 μL裂解液，65 °C作用30 min，期间不时振荡混匀；12 000 r/min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；12 000 r/min离心5 min，取上清液；加0.8倍体积预冷的异丙醇，沉淀；12 000 r/min离心5 min，弃上清液；75%乙醇洗涤一次，晾干；加入50 μL双蒸水溶解沉淀，制成DNA溶液，保存-20 °C待用。也可用等效DNA提取试剂盒提取样品DNA。

8.3 实时荧光PCR扩增

反应体系：体积为20 μL，包括2×Probe qPCR MIX 10 μL（内含DNA聚合酶、dNTP等）、50×ROX Reference dye 0.04 μL、正向引物(10 μmol/L) 1 μL、反向引物(10 μmol/L) 1 μL、探针(10 μmol/L) 0.5 μL、模板DNA 0.8 μL、补足双蒸水至总体积20 μL。也可选用其它商品化实时荧光PCR反应预混液。

反应条件：95 °C 预变性20 s；95 °C 变性3 s，60 °C退火30 s，60 °C收集荧光，40个循环。

也可选用其它商品化实时荧光PCR反应预混液，并参照其说明书进行适当调整。

8.4 实验对照

检测过程中分别设阳性对照、阴性对照、空白对照，样品及对照均设两个重复，Ct值取两个重复的平均值作为最终结果。采用已知含有鸡源性成分的鸡肉提取的DNA作为阳性对照。采用已知不含鸡源性

成分的其它动物组织（如羊肉、鸭肉）提取的DNA作为阴性对照。采用与模板等体积的双蒸水作为空白对照。

9 质量控制

9.1 质控要求

同时满足以下条件时，实验有效：

- a) 空白对照：无荧光对数增长，无 Ct 值。
- b) 阴性对照：无荧光对数增长，无 Ct 值。
- c) 阳性对照：有荧光对数增长，且荧光通道出现典型的扩增曲线，相应的 Ct 值 <30.0 。

9.2 防污染措施

检测过程中防止交叉污染的措施按照 GB/T 27403 中的规定执行。

10 结果判定与表述

10.1 结果判定

在符合 9.1 条的情况下，被检样品进行检测时：

- a) 如 Ct 值 ≤ 35.0 ，且荧光通道出现典型的扩增曲线，则判定为被检样品阳性。
- b) 如无 Ct 值，则判定为被检样品阴性。
- c) 如 $35.0 < \text{Ct 值} < 40.0$ ，则重复一次。如再次扩增后 Ct 值 <40.0 ，则判定为被检样品阳性；如再次扩增后无 Ct 值，则判定被检样品阴性。

10.2 结果表述

结果为阳性者，表述为“检出鸡源性成分”；结果为阴性者，表述为“未检出鸡源性成分”。

附 录 A

(规范性附录)

裂解液配制方法

1% CTAB;
0.05 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) ;
0.7 mol/L NaCl;
0.01 mol/L EDTA (pH 8.0)。
