

## 中华人民共和国国内贸易行业标准

SB/T 10923—2012

---

### 肉及肉制品中动物源性成分的测定 实时荧光 PCR 法

Identification of animal derived materials in meat and meat products

Real-time PCR method

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

(报批稿)

(本稿完成日期：2012 年 12 月 20 日)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

---

中华人民共和国商务部

发布

## 目 次

前言 .....	III
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语、定义和缩略语 .....	1
3.1 术语和定义 .....	1
3.2 缩略语 .....	1
4 原理 .....	2
5 试剂和材料 .....	2
6 仪器和设备 .....	3
7 样品制备 .....	3
8 检验步骤 .....	3
9 结果判定 .....	5
10 测定下限 .....	5
11 防止污染的措施 .....	5
附录 A（资料性附录） DNA 提取裂解液配制 .....	6
附录 B（资料性附录） 检测用引物及探针序列 .....	7
附录 C（资料性附录） 检测靶基因参考序列 .....	8

## 前 言

本标准的附录A为资料性附录。

本标准按照GB/T 1.1-2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国商务部提出并归口。

本标准起草单位： 商务部流通产业促进中心。

本标准主要起草人： 郑志明、郝瑞颖、张新玲、李乐、刘华琳、赵箭。

本标准系首次发布的国内贸易行业标准。

# 肉及肉制品中动物源性成分的测定 实时荧光 PCR 法

## 1 范围

本标准规定了肉及肉制品中猪、牛、羊、马、驴、鸡、鸭、鹅和兔源性成分的实时荧光PCR检测方法。

本标准适用于肉及肉制品中猪、牛、羊、马、驴、鸡、鸭、鹅、兔源性成分的定性检测。

注：本标准中“肉及肉制品”主要指鲜（冻）肌肉组织或经过初步加工的鲜（冻）生肉制品。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本标准。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

SN/T 1193 基因检测实验室技术要求

GB/T 21103-2007 动物源性饲料中哺乳动物源性成分定性检测方法 实时荧光PCR方法

## 3 术语、定义和缩略语

### 3.1 术语和定义

#### 3.1.1

实时荧光 PCR real-time PCR

实时荧光聚合酶链式反应。

#### 3.1.2

Ct 值 cycle threshold value

每个实时荧光PCR反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。

### 3.2 缩略语

#### 3.2.1

DNA, deoxyribonucleic acid

脱氧核糖核酸

#### 3.2.2

FAM, carboxyfluorescein

羧基荧光素

### 3.2.3

TAMRA, carboxy tetramethyl rhodamine  
羧基四甲基罗丹明

### 3.2.4

Cytb, cytochrome oxidase subunit b  
细胞色素氧化酶亚单位b

### 3.2.5

ROX, carboxy-X-rhodamine  
羧基-X-罗丹明

### 3.2.6

CTAB, hexadecyltrimethyl ammonium bromide  
十六烷基三甲基溴化铵

### 3.2.7

Tris, tris (hydroxymethyl) aminomethane  
三(羟甲基)氨基甲烷

### 3.2.8

EDTA, ethylene diaminetetraacetic acid  
乙二胺四乙酸

## 4 原理

采用TaqMan实时荧光PCR技术,根据线粒体DNA的细胞色素氧化酶b亚基(*Cyt b*)基因上畜禽各物种间序列差异而进行动物源性成分的检测。以GenBank上公布的猪(X56295)、牛(GU249568.1)、羊(AF010406)、马(JF511458.1)、驴(JF718884.1)、鸡(X52392)、鸭(EU755252)、鹅(AY552163.1)、兔(AJ001588)的*Cyt b*基因序列为模板,设计并合成各自的特异性引物对及探针;利用裂解液破碎细胞,三氯甲烷抽提去除蛋白质,异丙醇沉淀得到DNA;以提取的DNA为模板,分别使用各物种的特异性引物对及探针进行实时荧光PCR扩增,并通过标记报告基因羧基荧光素(FAM)、淬灭基因羧基四甲基罗丹明(TAMRA)的探针进行特异性杂交。根据实时荧光PCR的扩增曲线和Ct值,对肉及肉制品中的动物源性成分进行检测。

## 5 试剂和材料

试剂的配制及试验中的操作规范应按GB/T 27403-2008和SN/T 1193的规定执行。

除另有规定外,试剂应为分析纯,实验用水应符合GB/T 6682的要求。

DNA提取裂解液的配制方法可参考附录A的介绍。

引物及探针序列参考附录B,检测靶基因序列参考附录C。

### 5.1 液氮。

## 5.2 DNA 提取试剂:

1%CTAB, 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.7 mol/L NaCl, 0.01 mol/L EDTA (pH 8.0), 苯酚, 三氯甲烷, 异戊醇, 无水乙醇, 70%乙醇, 醋酸钠, TE缓冲液 (Tris-HCl、EDTA缓冲液): 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1 mol/L EDTA (pH 8.0)。

## 5.3 TaqMan 通用 PCR 扩增预混试剂

# 6 仪器和设备

## 6.1 电子天平

量程 2 kg, 感量 0.1 g; 量程 100 g, 感量 0.001 g。

## 6.2 组织捣碎机。

## 6.3 研钵 (应在 160 °C 烘烤 2 h)。

## 6.4 恒温水浴锅。

## 6.5 台式冷冻离心机

离心力 12000 g。

## 6.6 微量移液器

量程分别为 0.1 μL~2.5 μL、0.5 μL~10 μL、10 μL~100 μL、50 μL~200 μL。

## 6.7 pH 计。

## 6.8 核酸蛋白分析仪。

## 6.9 实时荧光 PCR 检测系统。

## 6.10 实时荧光 PCR 反应管 (光学)。

## 6.11 易耗性耗材

应一次性使用, 其他不宜烘烤或高压处理的器皿可使用 1%次氯酸钠溶液浸泡 6 h 后用蒸馏水冲洗干净, 去除残留氯。

# 7 样品制备

## 7.1 在样品粉碎区进行样品的制备。

## 7.2 取样应同批多点采取肌肉组织, 样品均质后, 按照 8.1 的方法提取 DNA。

注: 采样过程应快速完成, 将采取样品迅速放入组织捣碎机中均质成糜状。取 0.1 g 均质样品, 放入研钵中, 加入液氮, 待样品冷冻完全后快速、用力研磨至粉末状。研磨时应间断加入液氮以防止材料融化。

# 8 检验步骤

检验过程中，参照《GB/T 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测》的规定进行。

## 8.1 样品的总 DNA 提取

- a) 在样品制备区进行，同时设立质控对照，阳性对照和样品分别用同样方法提取 DNA。
- b) 将研钵内研磨物转移到 1.5 mL 离心管中，加入 700  $\mu\text{L}$  DNA 提取裂解液，置于 65  $^{\circ}\text{C}$  水浴 3 h，期间不时振荡混匀；
- c) 12000 r/min 离心 5 min，取上清至新的 1.5 mL 离心管内；
- d) 加入等体积苯酚，充分混匀后，12000 r/min 离心 5 min；
- e) 取上清，加等体积三氯甲烷与异戊醇的混合溶液（三氯甲烷:异戊醇的体积比为 24:1），充分混匀，12000 r/min 离心 5 min；
- f) 取上清，加入 1/10 体积的 3 mol/L 醋酸钠溶液，混匀后再加入 2 倍体积预冷的无水乙醇，-20  $^{\circ}\text{C}$  静置 1 h，12 000 r/min 离心 5 min，弃去上清；
- g) 用 70% 乙醇洗涤二次，超净台内室温下晾干，加入 50  $\mu\text{L}$  TE 缓冲液溶解沉淀；
- h) 运用核酸蛋白分析仪对提取的 DNA 进行测定，OD260 /OD280 在 1.8-2.0 之间，浓度在 10-100 ng/ $\mu\text{L}$  时，适宜于实时荧光 PCR 扩增。

注：也可用等效的商品化试剂盒提取组织DNA。

## 8.2 实时荧光 PCR 检测

### 8.2.1 扩增试剂准备

在扩增区进行扩增试剂准备，在冰盒中配制如下反应体系。每个样品测试反应体系配制如下（20  $\mu\text{L}$  反应体系）：

Master Mix (2 $\times$ )	10.0 $\mu\text{L}$
上游引物FP (900 nM)	2.0 $\mu\text{L}$
下游引物RP (900 nM)	2.0 $\mu\text{L}$
探针Probe (250 nM)	2.0 $\mu\text{L}$
模板DNA Template (10-100 ng)	1.2 $\mu\text{L}$
无菌双蒸水	2.8 $\mu\text{L}$

向每个实时荧光PCR反应管中加入以上反应混合液，转移至样品制备区。

注：阳性对照用相应成分样品的DNA作为模板，阴性对照用不含相应成分样品的DNA作为模板，空白对照用等体积去离子水作为模板。

### 8.2.2 加样

在样品制备区进行加样。

在各设定的实时荧光PCR反应管中分别加入制备好的模板DNA溶液，盖紧管后混匀，3000 r/min离心 5 s~10 s。

### 8.2.3 实时荧光 PCR 检测

在检测区进行实时荧光PCR检测。

- a) 将 8.2.2 中离心后的实时荧光 PCR 反应管放入实时荧光 PCR 检测系统内，记录样本摆放顺序。
- b) 实时荧光 PCR 反应条件随仪器不同略有改变，一般为：50 $^{\circ}\text{C}$  2min $\rightarrow$ 95 $^{\circ}\text{C}$  10min $\rightarrow$ 40 $\times$  (95 $^{\circ}\text{C}$  15s $\rightarrow$ 60 $^{\circ}\text{C}$  1 min) 收集荧光。
- c) 检测结束后，根据扩增曲线和 Ct 值判定结果。



#### 8.2.4 质控标准

- a) 检验过程中应设立阳性对照、阴性对照和空白对照。阳性对照用相应组织的 DNA 作为模板，用不含相应成分样品的 DNA 作为阴性对照，用等体积去离子水作为模板空白对照。
- b) 样品设 3 个重复，对照设 2 个重复，以 Ct 值的平均值作为最终结果。

### 9 结果判定

#### 9.1 结果分析条件设定

直接读取检测结果。阈值设定原则根据仪器噪声情况进行调整。

#### 9.2 结果判定与表述

##### 9.2.1 结果的判定

###### 9.2.1.1 有效性原则

- a) 空白对照：无 FAM 荧光信号检出或 Ct 值  $\geq 35.0$ ，未出现典型的扩增曲线。
- b) 阴性对照：无 FAM 荧光信号检出或 Ct 值  $\geq 35.0$ ，未出现典型的扩增曲线。
- c) 阳性对照：有 FAM 荧光信号检出，并出现典型的扩增曲线，Ct 值  $< 30.0$ 。
- d) 以上应同时满足，否则本次实验无效。

###### 9.2.1.2 样品

- a) 当猪、牛、羊、马、驴、鸡、鸭、鹅、兔源性成分检测体系的 Ct 值  $< 30.0$  时，有 FAM 荧光信号检出，并出现典型的扩增曲线，判断样品为阳性。
- b) 当  $30.0 \leq \text{Ct 值} \leq 35.0$  时，且有典型的扩增曲线时，则需重复实验。再次扩增后检测体系的 Ct 值仍  $\leq 35.0$ ，且有典型的扩增曲线，则判定该样品含有相应的动物源性成分。当再次扩增后，检测体系 Ct 值  $> 35.0$ ，或无典型的扩增曲线，则判定该样品不含相应的动物源性成分。

##### 9.2.2 结果的表述

阳性结果表述为“检出猪、牛、羊、马、驴、鸡、鸭、鹅、兔源性成分”。

阴性结果表述为“未检出猪、牛、羊、马、驴、鸡、鸭、鹅、兔源性成分”。

### 10 测定下限

在上述条件下，本方法对牛肉中掺杂猪肉、羊肉中掺杂猪肉、牛肉中掺杂鸭肉、羊肉中掺杂鸭肉、驴肉中掺杂猪肉、驴肉中掺杂鸭肉的测定下限为 0.5% (m/m)。

### 11 防止污染的措施

检验过程中应严格防止交叉污染，防止交叉污染的措施按照 SN/T 1193 执行。



附 录 A  
(资料性附录)  
DNA 提取裂解液配制

A. 1 DNA提取裂解液

A. 1.1 成分

1% (W/V) CTAB, 十六烷基三甲基溴化铵  
0.05 mol/L Tris, 三(羟甲基)氨基甲烷  
0.7 mol/L NaCl  
0.01 mol/L Na<sub>2</sub>EDTA, 乙二胺四乙酸二钠。

A. 1.2 配制

称量CTAB 10 g, Tris 6.1 g, NaCl 41 g, Na<sub>2</sub>EDTA 3.7 g 置于1 L烧杯中, 加入去离子水约 800 mL, 充分搅拌混匀, 加去离子水定容至1 L后, 室温保存。

附 录 B  
(资料性附录)  
检测用引物及探针序列

畜禽种类	引物、探针序列	T <sub>m</sub> 值 ℃	参考基因 序列号	扩增位置及 预期大小
猪 Porcine	FP: CGACAAAGCAACCCTCACAC	59	X56295	509-579 bp 71 bp
	RP: TGCGAGGGCGGTAATGAT	58		
	Probe: FAM-CTTCGCCTTCCACTTTATCCTGCCATTC-TAMRA	68		
牛 Bovine	FP: CTCCTCGGAGACCCAGATAAC	59	GU249568. 1	744-822 bp 79 bp
	RP: AGAAGTATCACTCGGGTTTG	59		
	Probe: FAM-CCAGCCAATCCACTCAACACACCC -TAMRA	70		
羊 Sheep	FP: CAGCCCTCGCCATAGTTCAC	59	AF010406	569-666 bp 98 bp
	RP: AGGGTGGAAGGGAATTTTATCTG	58		
	Probe: TCTTCCTCCACGAAACAGGATCCAACA	68		
马 Horse	FP: CCAATGCGTATTCTGACTCTTAGTG	59	JF511458.1	962-105 bp 81 bp
	RP: CGATAATTACGTATGGGTGTTCC	58		
	Probe: FAM-CTGACACTAACATGAATCGGCCGGACAGC-TAMRA	68		
驴 Donkey	FP: CCTCAGCACTCCCCCTCAT	60	JF718884.1	782-869 bp 87 bp
	RP: AAGGATAAGGGCTAATACACCA	59		
	Probe: FAM-CCAGAATGGTATTTCTATTTGCTTACGCC-TAMRA	69		
鸡 chicken	FP: CGACAACCCAACCCTTACC	59	X52392	512-601 bp 89 bp
	RP: AGGAAGGTGAGGTGGATGATA	59		
	Probe: FAM- ACACTTCCTCCTCCCCTTTGCAATCGC-TAMRA	69		
鸭 Duck	FP: GGCCACACAAATCCTCACAG	59	EU755252	125-209 bp 85 bp
	RP: TGTGTTGGCTACTGAGGAGAAA	59		
	Probe: FAM-CCTACTGGCTATGCACTACACCGCAGAC-TAMRA	69		
鹅 Goose	FP: AGACAATCCAACCTTAACCCGA	59	AY552163. 1	512-588 bp 77 bp
	RP: GGACTAGGGTGATTCCTGCA	58		
	Probe: FAM-CCATCCACTTCTACTGCCCTTCTTA-TAMRA	68		
兔 Rabbit	FP: GTTCTCGTCGCAGATCTTCTCA	58	AJ001588	978-1058 bp 73 bp
	RP: TACTTGTCCAATGGTGATGAAC	58		
	Probe: FAM-CACTCACATGAATCGGAGGCCAACCAGTA-TAMRA	68		

附 录 C  
(资料性附录)  
检测靶基因参考序列

C.1 猪源性成分的实时荧光PCR扩增产物序列

cgacaaagcaaccctcacacgattcttctgcttccactttatcctgccattcatcattaccgccctcgcag

C.2 牛源性成分的实时荧光PCR扩增产物序列

ctcctcggagaccagataactacaccccagccaatccactcaacacaccccctcacatcaaaccgagtgatacttct

C.3 羊源性成分的实时荧光PCR扩增产物序列

cagccctgccatagttcacctacttctcctccacgaaacaggatccaacaaccccacaggaattccatcggacacagataaaat  
tccttccaccct

C.4 马源性成分的实时荧光PCR扩增产物序列

ccaatgcgtattctgactcttagtggcagacttactgacactaacatgaatcggcggacagccagtggaacaccatacgttaatt  
atcg

C.5 驴源性成分的实时荧光PCR扩增产物序列

cctcagcactccccctcatattaagccagaatggtatttctatttgcttacgccatcctacgtccattcccaacaaactaggt  
ggtgtattagccc ttatcctt

C.6 鸡源性成分的实时荧光PCR扩增产物序列

cgacaaccaacccttaccggattcttctgctttacacttctcctcccccttgcaatcgcaggtattactatcatccacctcacc  
ttcct

C.7 鸭源性成分的实时荧光PCR扩增产物序列

ggccacacaaatcctcacaggcctcctactggctatgcactacaccgcagacacatcccttgctttctcctcagtagccaacaca

C.8 鹅源性成分的实时荧光PCR扩增产物序列

agacaatc caacctaac cggattcttctgcatcact tctactgcc cttcctaatt gcaggaatca ccctagtcc

C.9 兔源性成分的实时荧光PCR扩增产物序列

附 录 C  
(资料性附录)  
检测靶基因参考序列

C.1 猪源性成分的实时荧光PCR扩增产物序列

cgacaaagcaaccctcacacgattcttctgcttccactttatcctgccattcatcattaccgccctcgcag

C.2 牛源性成分的实时荧光PCR扩增产物序列

ctcctcggagaccagataactacaccccagccaatccactcaacacaccccctcacatcaaaccgagtgatacttct

C.3 羊源性成分的实时荧光PCR扩增产物序列

cagccctgccatagttcacctacttctcctccacgaaacaggatccaacaaccccacaggaattccatcggacacagataaaat  
tccttccaccct

C.4 马源性成分的实时荧光PCR扩增产物序列

ccaatgcgtattctgactcttagtggcagacttactgacactaacatgaatcggcggacagccagtggaacaccatacgttaatt  
atcg

C.5 驴源性成分的实时荧光PCR扩增产物序列

cctcagcactccccctcatattaagccagaatggtatttctatttgcttacgccatcctacgtccattcccaacaaactaggt  
ggtgtattagccc ttatcctt

C.6 鸡源性成分的实时荧光PCR扩增产物序列

cgacaaccaacccttaccggattcttctgctttacacttctcctcccccttgcaatcgcaggtattactatcatccacctcacc  
ttcct

C.7 鸭源性成分的实时荧光PCR扩增产物序列

ggccacacaaatcctcacaggcctcctactggctatgcactacaccgcagacacatcccttgctttctcctcagtagccaacaca

C.8 鹅源性成分的实时荧光PCR扩增产物序列

agacaatc caacctaac cggattcttctgcatcact tctactgcc cttcctaatt gcaggaatca ccctagtcc

C.9 兔源性成分的实时荧光PCR扩增产物序列

gttctcgtcgcagatcttctcacactcacatgaatcggaggccaaccagtagaacacccggtcatcaccattggacaagta

---