



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4418—2016

出口食品中骆驼源性成分的检测 实时荧光 PCR 法

Detection of *Camelus* ingredient in export food—Real-time PCR method

2016-03-09 发布

2016-10-01 实施



中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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这些专利的责任。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中国检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人：吴亚君、陈颖、杨艳歌、王斌、王娉、刘鸣畅、韩建勋、黄文胜、邓婷婷。

出口食品中骆驼源性成分的检测

实时荧光 PCR 法

1 范围

本标准规定了食品中骆驼源性成分的实时荧光 PCR 检测方法,可以对食品中骆驼源性成分进行定性检测,在检测范围和技术指标方面可满足食品的检测需求。

本标准适用于乳品,新鲜、冷冻和加工的肉品中骆驼源性成分的定性检测。本标准所规定方法的最低检出限(LOD)为 0.01%(质量分数)。

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 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、缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

骆驼 camelus

偶蹄目骆驼科骆驼属,包括单峰骆驼和双峰骆驼。

3.1.2

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,实现对起始模板的定量及定性分析。

3.1.3

Ct 值 cycle threshold

每个反应管内的荧光信号达到设定阈值时所经历的循环数。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

dNTP:脱氧核苷酸三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphate)

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)

SN/T 4418—2016

Taq:水生栖热菌(Thermns aquaticus)
OD:光度密度(optical density)
Cytb:线粒体细胞色素 b 基因(cytochrome b)
GH:生长激素基因(growth hormone gene)

4 方法提要

提取 DNA,采用骆驼的特异性检测引物和探针进行实时荧光 PCR 扩增,观察实时荧光 PCR 信号,对食品中骆驼成分进行定性检测。

5 试剂和材料

除另有规定外,所有试剂均为分析纯或生化试剂。实验用水符合 GB/T 6682 的要求。所有试剂均用无 DNA 酶污染的容器分装。

5.1 检测用引物和探针:骆驼源性成分扩增引物和探针、内参照引物和探针详见表 1。骆驼引物扩增的靶标序列参见附录 A。

表 1 骆驼 Cytb 基因序列引物探针

物种名称	引物/探针序列(5'→3')	扩增片段长度	靶基因
哺乳动物 (内参照)	F:CCTCAGCAGGGTCTTCACCA	66 bp	GH
	R:TTCAGCTTCTCGTAGACNCG		
	P:FAM-CAGCCTGGTGTTTGGCACCTCGGA-TAMAR		
骆驼	F:ATTCTTYGCCTTCCAYTTCA	307 bp	Cytb
	R:AGCGTATGCGAAYAGGAART		
	P:(FAM)-CCTACACGAAACAGGYTCTAATAACCCGAC-(TAMRA)		

- 5.2 三氯甲烷(氯仿)。
- 5.3 异丙醇。
- 5.4 CTAB 提取液:20 g/L CTAB,1.4 mol/L NaCl,0.1 mol/L Tris-HCl,0.02 mol/L Na₂EDTA,pH8.0。
- 5.5 CTAB 沉淀液:5 g/L CTAB,40 mmol/L NaCl,pH8.0。
- 5.6 酚-三氯甲烷-异戊醇溶液:按照 Tris 饱和酚:三氯甲烷:异戊醇溶液体积比为 25 : 24 : 1 进行配制。
- 5.7 三氯甲烷-异戊醇溶液:按照三氯甲烷:异戊醇溶液体积比为 24 : 1 进行配制。
- 5.8 70%乙醇(体积分数)。
- 5.9 NaCl 溶液(1.2 mol/L)。
- 5.10 蛋白酶 K(20 mg/mL)。
- 5.11 实时荧光 PCR 反应混合液:12.5 μL 反应体系包括:1 U~2 U(Unit,酶学单位)的 Taq 酶、1×PCR buffer、2.5 mmol/L 的 Mg²⁺、0.2 U UNG 酶、0.2 mmol/L 的 d(A,C,G)TPs、0.2 mmol/L dUTP、400 nmol/L ROX 染料(某些荧光 PCR 仪不需要 ROX 校正)。
- 5.12 10×PCR 缓冲液:200 mmol/L Tris-HCl(pH8.4),200 mmol/L KCl,15 mmol/L MgCl₂。
- 5.13 dNTP 混合液。

6 仪器设备

- 6.1 实时荧光 PCR 仪。
- 6.2 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。
- 6.3 恒温箱。
- 6.4 离心机:离心力 $\geq 16\,000\,g$ 。
- 6.5 微量移液器:0.5 μL ~10 μL ,10 μL ~100 μL ,20 μL ~200 μL ,200 μL ~1 000 μL 。
- 6.6 研钵及粉碎装置。
- 6.7 涡旋震荡器。
- 6.8 pH 计:精度 0.01。
- 6.9 离心管:50 mL、15 mL、2 mL、1.5 mL。
- 6.10 PCR 管。
- 6.11 天平:感量 0.01 mg。

7 检测步骤

7.1 样品处理方法

将肉制品和奶片等固状待检样品研磨混匀,分装三份,其中一份为检样,另外两份为留存样品。液状样品直接分装。

7.2 DNA 提取

7.2.1 肉制品样品

称取 100 mg 肉制品于 2 mL 离心管中,加入 1 mL CTAB 提取液,加入 100 μg 蛋白酶 K,65 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h,期间不时震荡混匀,应保证样品自由悬浮于液体中,必要时再加入适量 CTAB 提取缓冲液;取出后 12 000 g 离心 10 min,转移上清至 2 mL 离心管中,加入等体积的室温酚-三氯甲烷-异戊醇(25 : 24 : 1)颠倒混匀,12 000 g 转速下离心 10 min;转移上清至另一灭菌的离心管中,加入等体积的三氯甲烷-异戊醇(24 : 1),颠倒混匀,室温下 12 000 g 离心 10 min;转移上清至干净离心管中,加入等体积的 CTAB 沉淀液混匀,室温沉淀 1 h;加入 0.8 倍体积的异丙醇或 2 倍体积-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中预冷的无水乙醇混匀,-20 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min,12 000 g 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min,弃上清,用 70%乙醇洗涤沉淀一次,12 000 g 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min,弃上清,室温下晾干。加入 50 μL 双蒸水,室温 10 min,混匀,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

7.2.2 乳制品样品

量取 20 mL 液态乳于 50 mL 离心管中(乳片称取 2 g 于 15 mL 离心管中),加入等体积的 CTAB 提取液(乳片加入 5 mL),加入 2 mg 蛋白酶 K(乳片加入 500 μg);65 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h,期间不时震荡混匀,取出后 12 000 g 离心 10 min,转移中间层清液至 2 mL 离心管中;加入 0.7 倍体积的三氯甲烷,充分震荡混匀,室温下 12 000 g 离心 10 min,转移上清至另一灭菌的 2 mL 离心管中;再次加入 0.7 倍体积的三氯甲烷,充分震荡混匀,室温下 12 000 g 离心 10 min;加入等体积 CTAB 沉淀液混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜沉淀,用 13 000 g 的转速离心 10 min;弃上清,加入 350 μL 1.2 M NaCl 溶液,充分溶解沉淀;加入 0.8 倍体积的异丙醇或 2 倍体积-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中预冷的无水乙醇混匀,-20 $^{\circ}\text{C}$ 放置 0.5 h~1 h,12 000 g 转速下 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min~15 min,弃上清,用 70%乙醇洗涤沉淀一次,12 000 g 转速下 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min,弃上清,室温下晾干。加入 50 μL 双蒸水,溶解沉淀,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

SN/T 4418—2016

上述方法均可用等效 DNA 提取试剂盒提取模板 DNA。

注：乳制品 DNA 提取是针对乳中细胞的 DNA 进行提取。

7.3 DNA 浓度和纯度的测定

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 的浓度按照式(1)计算,当 A_{260}/A_{280} 比值在 1.7~2.2 之间时,适宜于 PCR 扩增。

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

式中：

- c ——DNA 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。

7.4 实时荧光 PCR 扩增

7.4.1 实时荧光 PCR 反应体系

设置阳性对照(骆驼 DNA),阴性对照(非骆驼的哺乳动物 DNA),空白对照。所有样品重复两次,见表 2。

表 2 实时荧光 PCR 反应体系

试剂	体积
实时荧光 PCR 反应混合液	12.5 μL
正向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	1 μL
反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	1 μL
探针(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.25 μL
DNA 模板(5 ng/ μL)	5.0 μL
灭菌 ddH ₂ O	5.25 μL

7.4.2 实时荧光 PCR 反应程序

50 $^{\circ}\text{C}$, 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$, 10 min; 40 个循环的 95 $^{\circ}\text{C}$, 15 s; 60 $^{\circ}\text{C}$, 1 min。

8 质量控制

- 8.1 空白对照:无荧光对数增长,Ct 值 ≥ 40.0 。
- 8.2 阴性对照:无荧光对数增长,Ct 值 ≥ 40.0 。
- 8.3 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,Ct 值 ≤ 30.0 。
- 8.4 内参照基因:有荧光对数增长,且荧光通道出现典型的扩增曲线,Ct 值 ≤ 30.0 。

9 结果判断与表述

9.1 结果判定

在符合第 8 章的情况下：

- a) 样品 C_t 值 ≤ 35 , 则判定为阳性。
- b) 样品 C_t 值 ≥ 40 , 则判定为阴性。
- c) 样品 $35.0 < C_t \text{ 值} < 40.0$, 则需重复实验。如再次扩增后 C_t 值仍 < 40 , 则判定待检样品为阳性; 如再次扩增后 C_t 值 ≥ 40 , 则判定待检样品为阴性。
- d) 重复样品结果不一致, 需要重新扩增。

9.2 结果表述

9.2.1 样品阳性, 表述为“检出骆驼成分”。

9.2.2 样品阴性, 表述为“未检出骆驼成分”。

10 检测过程中防止交叉污染的措施

检测过程中防止交叉污染的措施按照 GB/T 27403—2008 中附录 D 的规定执行。

SN/T 4418—2016

附 录 A
(资料性附录)
骆驼源性成分靶标参考序列

A.1 双峰驼 (GenBank:FJ171713.1)

ATTCTTTGCCTTCCACTTCATCCTGCCATTTATTATCACGGCCCTAGTAGCCGTACACC
TATTATTCCTACACGAAACAGGCTCTAATAACCCGACAGGAATCTCCTCAGACATAGACAA
AATCCCATTCCACCCCTACTACACAATTAAAGACATCCTAGGAGCACTGCTACTAATATTA
ATTCTCCTTATTCTCGTACTGTTCTCACCAGACTTATTAGGAGATCCTGACAACTATACTC
CCGCTAACCCCTCAATACACCACCACACATTAAGCCGGAATGATATTTCTTATTCGCATAC
GCT

A.2 单峰驼 (GenBank:AY126630.1)

ATTCTTCGCCTTCCATTTTCATCCTACCATTTCATTATCACGGCTCTAGTGGCCGTACACC
TACTATTTCTACACGAAACAGGTTCTAATAACCCAACAGGAATTCCTCAGACATAGATA
AAATCCCATTCCATCCCTATTACACGATTAAAGATATCCTAGGAGCACTACTACTGATGCT
AGCCCTACTTATCCTCGTATTATTCTCACCAGACTTATTAGGAGACCCTGACAACTACACT
CCCGCCAACCCCTCAATACACCACCACATATCAAGCCGGAATGATATTTCTGTTCGCATA
CGCT
