



中华人民共和国国家标准

GB/T 20190—2006

饲料中牛羊源性成分的定性检测 定性聚合酶链式反应(PCR)法

Detection of bovine, sheep and goat-derived material in feeds—
Qualitative polymerase chain reaction(PCR)method



2006-05-17 发布

2006-09-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会

发布

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
饲料中牛羊源性成分的定性检测
定性聚合酶链式反应(PCR)法
GB/T 20190—2006

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

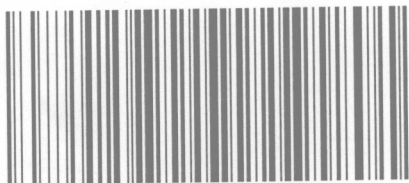
*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 13 千字
2006年9月第一版 2006年9月第一次印刷

*

书号: 155066 • 1-27978 定价 10.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68533533



GB/T 20190-2006

前 言

本标准的附录 A 为规范性附录。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会提出。

本标准起草单位：国家饲料质量监督检验中心（北京）、中国农业科学院农业资源与农业区划研究所。

本标准主要起草人：杨曙明、宋荣、程宪国、高生、赖卫华、王彤。

3 原理

本方法采用实时荧光定量 PCR 技术，对饲料中黄曲霉毒素 B₁ 进行检测。黄曲霉毒素 B₁ 是黄曲霉属真菌产生的一种次级代谢产物，具有强烈的致癌性。在饲料中，黄曲霉毒素 B₁ 主要存在于发霉的饲料中。本方法通过提取饲料中的黄曲霉毒素 B₁，然后进行 PCR 扩增，最后通过实时荧光定量 PCR 技术进行检测。该方法具有灵敏度高、特异性强、操作简便等优点。

4 试剂与材料

- 除另有说明，在分析中仅使用分析纯试剂，水应符合 GB/T 6682—2008 中三级水的规格。
- 4.1 三氯乙酸（TCA）溶液：1 mol/L，pH 值调至 2.0。将 100 g 三氯乙酸溶于 1 L 水中，搅拌均匀。
- 4.2 三氯乙酸乙酯（TCE）溶液：1 mol/L，pH 值调至 2.0。将 100 g 三氯乙酸溶于 1 L 水中，搅拌均匀。
- 4.3 三氯乙酸乙酯（TCE）溶液：1 mol/L，pH 值调至 2.0。将 100 g 三氯乙酸溶于 1 L 水中，搅拌均匀。
- 4.4 三氯乙酸乙酯（TCE）溶液：1 mol/L，pH 值调至 2.0。将 100 g 三氯乙酸溶于 1 L 水中，搅拌均匀。
- 4.5 三氯乙酸乙酯（TCE）溶液：1 mol/L，pH 值调至 2.0。将 100 g 三氯乙酸溶于 1 L 水中，搅拌均匀。
- 4.6 三氯乙酸乙酯（TCE）溶液：1 mol/L，pH 值调至 2.0。将 100 g 三氯乙酸溶于 1 L 水中，搅拌均匀。
- 4.7 三氯乙酸乙酯（TCE）溶液：1 mol/L，pH 值调至 2.0。将 100 g 三氯乙酸溶于 1 L 水中，搅拌均匀。

引 言

含牛羊源性成分的动物源性饲料的使用,一直被认为是疯牛病传播的主要途径,禁止疫区含牛羊源性成分的动物源性饲料的生产、流通和使用,成为预防疯牛病感染、流行的主要手段之一。1996 年欧盟提出了动物源性饲料中牛羊源性成分的检测方法(EUR 18096EN)。2002 年我国发布了中国出入境检验检疫行业标准 SN/T 1119—2002 《进出口动物源性饲料中牛羊源性成分检测方法 PCR 法》,用于检测动物源性饲料。

我国没有针对配合饲料和浓缩饲料等饲料产品中牛羊源性成分的检测标准,EUR 18096EN 和 SN/T 1119—2002 方法适用于动物源性饲料,在 DNA 提取上不适用于以植物为主要基质的配合饲料和浓缩饲料。本方法是在 SN/T 1119—2002、欧盟方法的基础上提出,在大量实验数据基础上建立起来的。

饲料中牛羊源性成分的定性检测 定性聚合酶链式反应(PCR)法

1 范围

本标准规定了 PCR 方法对饲料中牛羊源性成分定性检测。

本标准适用于饲料中牛羊源性成分的定性检测,本方法的最低检出限为 0.25%。

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,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

根据牛羊遗传物质的特异性,通过检索基因库或专利库,选择牛羊特异性的 DNA 序列,该序列必须同类动物(无论什么品种)中都具有高度保守性,而其他动物皆不含有。利用种属特异性的引物通过 PCR 扩增这一特定的 DNA 序列,通过电泳分离 PCR 产物,以标准长度的 PCR 产物作对照,检测 PCR 扩增出的这一特定的 DNA 片断,判断是否含有牛羊源性成分。此外,通过限制性内切酶酶切反应,进一步判断结果。通过对 PCR 扩增的特定 DNA 片断进行测序,与标准序列进行比较,来确认检测结果。

4 试剂与材料

除非另有说明,在分析中仅使用分析纯试剂,水应符合 GB/T 6682 一级水要求。

4.1 三羟甲基氨基甲烷盐酸(Tris-HCl)溶液,1 mol/L,pH 值为 8.0:在 800 mL 去离子水中溶解 121.1 g 三羟甲基氨基甲烷(Tris),冷却至室温后用浓盐酸调节溶液的 pH 值至 8.0,加水定容至 1 L,分装后高压灭菌。

4.2 三羟甲基氨基甲烷盐酸(Tris-HCl)溶液,1 mol/L,pH 值为 7.5:在 80 mL 去离子水中溶解 12.11 g Tris,冷却至室温后用浓盐酸调节溶液的 pH 值至 7.5,加水定容至 100 mL,分装后高压灭菌。

4.3 氯化钠溶液,5 mol/L:在 80 mL 水中溶解 29.22 g 氯化钠,加水定容至 100 mL。

4.4 乙二胺四乙酸二钠盐(EDTA)溶液,500 mmol/L:称取 186.1 g 二水乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na₂·2H₂O),加入 700 mL 水中,在磁力搅拌器上剧烈搅拌,用 10 mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 值至 8.0,用水定容至 1 L,分装后高压灭菌。

4.5 溴代十六烷基三甲胺(CTAB)提取缓冲液 I:在 800 mL 去离子水中加入 46.75 g 氯化钠,摇动容器使溶质完全溶解,然后加入 50 mL Tris-HCl 溶液(4.1)和 20 mL EDTA 溶液(4.4),然后定容至 1 L,分装后高压灭菌。

4.6 溴代十六烷基三甲胺(CTAB)提取缓冲液 II:在 800 mL 去离子水中加入 46.75 g 氯化钠,20 g 溴代十六烷基三甲胺(CTAB),摇动容器使溶质完全溶解,然后加入 50 mL Tris-HCl 溶液(4.1)和 20 mL EDTA 溶液(4.4),用水定容至 1 L,分装后高压灭菌。

4.7 核糖核酸酶 A(RNase A)贮备液:将 10 mg RNase A 溶解于 987 μL 水中,加入 10 μL Tris-HCl

溶液(4.2),加入 3 μ L 氯化钠溶液(4.3),于 100℃水浴中保温 15 min,冷却到室温后,分装成小份保存于-20℃。

4.8 Tris 饱和苯酚和三氯甲烷混合液, $V(\text{Tris 饱和苯酚})+V(\text{三氯甲烷})=1+1$ 。

4.9 三氯甲烷和异戊醇混合液, $V(\text{三氯甲烷})+V(\text{异戊醇})=24+1$ 。

4.10 异丙醇。

4.11 乙酸钠溶液,3 mol/L:在 80 mL 水中,加入 40.81 g 三水合乙酸钠,溶解后用冰乙酸调节 pH 值到 5.2,用水定容到 100 mL,分装后高压灭菌。

4.12 体积分数为 75%的乙醇。

4.13 Tris-EDTA(TE)缓冲液,pH 值为 8.0:在 800 mL 水中,依次加入 10 mL Tris-HCl 溶液(4.1)和 2 mL EDTA 溶液(4.4),用水定容至 1 L,分装后高压灭菌。

4.14 正己烷。

4.15 Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L)及 10 $\times$ PCR 反应缓冲液(含 25 mmol/L Mg^{2+})。

4.16 牛源性成分检测用引物(对)序列为:

5'-GCCATATACTCTCCTTGGTGACA-3'

5'-GTAGGCTTGGGAATAGTACGA-3'

4.17 羊源性成分检测用引物(对)序列为:

5'-TATTAGGCCTCCCCCTTGTT-3'

5'-CCCTGCTCATAAGGGAATAGCC-3'

4.18 引物溶液:用 TE 缓冲液分别将上述引物稀释到 25 μ mol/L。

4.19 各 10 mmol/L 的四种脱氧核糖核苷酸(dATP、dCTP、dGTP、dTTP)混合溶液。

4.20 10 mg/mL 溴化乙锭溶液。

注:溴化乙锭(EB)有致癌作用,使用时要戴一次性手套,使用后按安全规定处置。

4.21 DNA 分子量标记(50 bp~300 bp)。

4.22 电泳缓冲液:称取 54 g Tris,27.5 g 硼酸,20 mL EDTA 溶液(4.4),然后用水定容到 1 L,使用时 10 倍稀释。

4.23 加样缓冲液:称取溴酚蓝 250 mg,加水 10 mL,在室温下过夜溶解;再称取二甲胍蓝 250 mg,用 10 mL 水溶解;称取蔗糖 50 g,用 30 mL 水溶解,合并三种溶液,用水定容至 100 mL,在 4℃中保存。

4.24 琼脂糖。

4.25 PCR 产物回收纯化试剂盒:按使用说明操作。

4.26 限制性内切酶 *Sau3AI* 及反应缓冲液。

4.27 凝胶回收纯化试剂盒:按使用说明操作。

4.28 石蜡油。

4.29 DNA 测序试剂。

4.30 体积分数为 95%的乙醇。

4.31 甲酰胺。

5 仪器

5.1 实验室常用仪器设备。

5.2 PCR 扩增仪。

5.3 电泳仪。

5.4 凝胶成像仪或紫外透射仪。

5.5 DNA 序列分析仪。

5.6 高压灭菌锅。

6 操作步骤

6.1 试样的预处理

50 g 固体样品经粉碎,保持其颗粒大小在 0.125 mm 以下。

6.2 模板 DNA 的提取和纯化

6.2.1 CTAB 法提取模板 DNA

称取 100 mg 经预处理的试样,加 300 μL 冰上预冷的 CTAB 提取缓冲液 I (4.5)。加入 500 μL 65 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 CTAB 提取缓冲液 II (4.6),混匀,65 $^{\circ}\text{C}$ 保温 30 min~90 min,其间不时轻缓颠倒混匀。待冷却至室温后加入 5 μL RNase A 贮备液(4.7),室温下放置 30 min。12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,加入与上清液等体积 Tris 饱和苯酚+三氯甲烷(4.8),轻缓颠倒混匀溶液,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,加入等体积三氯甲烷+异戊醇(4.9),轻缓颠倒混匀溶液。12 000 r/min 离心 10 min。将上清液转移至干净的离心管中,依次加入等体积异丙醇(4.10)及 1/10 体积乙酸钠溶液(4.11),轻缓颠倒混匀。12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,加入 800 μL 体积分数为 75% 的乙醇(4.12)洗涤沉淀,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清液。再加入 100 μL 体积分数为 75% 的乙醇洗涤沉淀,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清液。除去残留的乙醇,待沉淀干燥后,DNA 沉淀溶解于 100 μL TE 缓冲液(4.13)中,待测或于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

6.2.2 油脂类饲料中模板 DNA 提取

取油脂饲料适量(液态油取 30 mL、磷脂类和固态油脂取 5 g)放入 250 mL 三角瓶中,加入 25 mL 正己烷(4.14),于磁力搅拌器上不断振荡混合 2 h 后,加入 25 mL CTAB 提取缓冲液 II (4.6),继续于磁力搅拌器上振荡混合 2 h。将溶液转入 100 mL 离心管中,于 8 000 r/min 离心 10 min,使有机相和水相分离,取水相,加入与水相溶液等体积的异丙醇(4.10)及水相溶液 1/10 体积的乙酸钠溶液(4.11),轻缓颠倒混匀,室温放置 10 min 后,12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,待沉淀干燥后用 200 μL TE 缓冲液(4.13)溶解沉淀,加入 200 μL Tris 饱和苯酚+三氯甲烷(4.8),轻缓颠倒混匀溶液,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,加入与上清液等体积三氯甲烷+异戊醇(4.9),轻缓颠倒混匀,12 000 r/min 离心 2 min 至分相。将上清液转移至干净的离心管中,加入与溶液等体积的异丙醇(4.10)及溶液 1/10 体积的乙酸钠溶液(4.11),轻缓颠倒混匀。室温放置 10 min 后,12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液后,依次加入 800 μL 体积分数为 75% 的乙醇和 100 μL 体积分数为 75% 的乙醇(4.12)洗涤沉淀。12 000 r/min 离心 5 min,弃除乙醇溶液。待沉淀干燥后,DNA 沉淀溶解于 100 μL TE 缓冲液(4.13)中,待测或于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

6.2.3 模板 DNA 提取的其他方法

可用等效 DNA 提取试剂盒提取模板 DNA。

6.3 试样的 PCR 反应

在 200 μL 或 500 μL 的 PCR 反应管中依次加入 10 $\times$ PCR 缓冲液 5 μL 、1 μL 各 10 mmol/L 的四种脱氧核糖核酸(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)混合溶液、引物溶液(含正向和反向引物)各 1 μL 、模板 DNA(25 ng~50 ng)10 μL 、Taq DNA 聚合酶 1 μL ,加入灭菌水,使 PCR 反应体系达到 50 μL 。再加约 50 μL 石蜡油(有热盖设备的 PCR 仪可以不加石蜡油)。每个试样 2 次重复。

以 4 000 r/min 离心 10 s 后,将 PCR 管插入 PCR 仪中。95 $^{\circ}\text{C}$ 恒温 1 min~3 min;进行 30 次扩增反应循环(95 $^{\circ}\text{C}$ 恒温 30 s~60 s、56 $^{\circ}\text{C}$ 恒温 30 s~60 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 恒温 30 s~60 s);然后 72 $^{\circ}\text{C}$ 恒温 5 min,取出 PCR 反应管,对反应物进行电泳检测或在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

在试样 PCR 反应的同时,应设置阴性对照、阳性对照和空白对照。

阴性对照是指不含牛或羊成分的饲料中提取的 DNA 作为 PCR 反应体系的 DNA 模板;阳性对照是指含牛或羊成分的饲料中提取的 DNA 作为 PCR 反应体系的模板;空白对照是指用无菌重蒸馏水或不含目的 DNA 的试剂作为 PCR 反应体系的 DNA 模板。上述对照 PCR 反应体系中,除模板外其余组

分相同。

6.4 PCR 产物的电泳检测

将适量的琼脂糖加入电泳缓冲液中,加热将其溶解,配制成质量分数为 1.5% 的琼脂糖溶液,然后按每 100 mL 琼脂糖溶液中加入 5 μ L 溴化乙锭溶液的比例,加入溴化乙锭溶液,混匀,稍适冷却后,将其倒入电泳板上,室温下凝固成凝胶后,放入电泳缓冲液中。在每个泳道中加入 5 μ L~8 μ L 的 PCR 产物(需和上样缓冲液混合),其中一个泳道中加入 DNA 分子量标记,接通电源,9 V/cm 电压,电泳 20 min~30 min。

电泳结束后,将琼脂糖凝胶置于凝胶成像仪或紫外透射仪上成像。根据 DNA 分子量标记判断扩增出的目的条带的大小,将电泳结果形成电子文件存档或用照相系统拍照。

6.5 PCR 产物的酶切检测

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。

将 30 μ L PCR 反应液按 PCR 产物回收纯化试剂盒说明进行。

牛、绵羊、山羊 PCR 产物均用 *Sau3AI* 进行酶切。具体操作为:将回收纯化的 PCR 产物放入酶切管中,加入 2 μ L 的限制性内切酶,再加入 5 μ L 反应酶切缓冲液,加入灭菌水,使酶切反应体系达到 50 μ L。在 37℃ 恒温水浴保温反应 3 h。将酶切反应液与上样缓冲液混合后加入预制好的含质量分数为 2.5% 的琼脂糖凝胶的一个泳道中,进行电泳分析及凝胶成像。

6.6 PCR 扩增产物测序

必要时,对 PCR 产物酶切检测阳性结果进行 PCR 扩增产物测序。

6.6.1 PCR 扩增产物的纯化

将 60 μ L PCR 反应液与上样缓冲液混合后,加入预制好的含质量分数为 0.8% 的琼脂糖凝胶的泳道中,在其中的一个泳道中加入 DNA 分子量标记,接通电源进行电泳。在凝胶成像仪或紫外透射仪下将特异性扩增条带切割下来,以下步骤按凝胶回收纯化试剂盒说明进行。

6.6.2 测序扩增反应

反应体系(20 μ L):8 μ L DNA 测序试剂,200 ng~500 ng PCR 纯化产物,3.2 pmol 引物,水补足至 20 μ L;PCR 扩增程序:96℃ 10 s,50℃ 5 s,60℃ 4 min,25 个循环,扩增产物 4℃ 保存。

6.6.3 测序扩增产物的纯化

扩增管中加入 16 μ L 水、64 μ L 体积分数为 95% 的乙醇,稍混匀,室温放置 15 min,12 000 r/min 离心 20 min,去上清,加入 250 μ L 体积分数为 75% 的乙醇,短暂混匀,12 000 r/min 离心 10 min,去上清,室温干燥。

6.6.4 测序

纯化产物中加入 170 μ L 甲酰胺溶液,95℃,5 min,迅速转移至冰上,2 min。分装样品测序仪的加样槽中,自动测序。

6.6.5 测序产物拼接

用正向和反向引物分别进行测序扩增反应、纯化和测序,将两次测得序列进行拼接,得到最终 PCR 产物测序结果。

7 结果分析和表述

7.1 PCR 扩增产物电泳结果

牛源性成分的 PCR 扩增产物为 271 bp;羊源性成分的 PCR 扩增产物,绵羊为 295 bp,山羊为 294 bp。

7.2 限制性内切酶酶切产物电泳结果

PCR 扩增产物 *Sau3AI* 限制性内切酶酶切产物:牛源性成分为 57 bp、214 bp;绵羊的为 91 bp、204 bp;山羊的为 92 bp、202 bp。

7.3 序列比较

PCR 扩增产物测序结果与附录 A 牛羊特定的 DNA 序列进行比较。

7.4 结果表述

PCR 扩增产物电泳检测结果阴性，未检出牛或羊源性成分。

PCR 扩增产物电泳检测结果阳性，限制性内切酶酶切产物片段大小正确，确认含有牛或羊源性成分；酶切产物片段大小不正确，确认不含有牛或羊源性成分。

若对酶切结果进行了测序确证，测序结果与附录 A 牛羊特定的 DNA 序列的符合程度在 90% 以上（含 90%），则确证为含有牛或羊源性成分；结果符合程度在 90% 以下，则确证为不含有牛或羊源性成分。

附 录 A
(规范性附录)
牛羊特定的 DNA 序列

A.1 牛源性成分的 PCR 扩增产物序列

GTAGGCTTGGGAATAGTACGATAAGGGCTACGAGAGGGAGACCTAAAATTACAGGGG
TAATAAAAGAGGTAAATAAATTTTCGTTCAATTTGTTTCTCAAGGGGTGTTTTGTTTTAA
TATTTTTGTTGGTGTCTAGTTCTGGATTGTGATAAAGGTTGTGTTTTGAAACTTTTAGTTG
AAAGATGATAAAAAGGGTCAAGAATATTGATAAGATCATTGTCAGTCATGTTGACGTGT
CTAGTTGCGGCATGTCACCAAGGAGAGTATATGGC

A.2 羊源性成分的 PCR 扩增产物序列

A.2.1 绵羊

CCCTGCTCATAAGGGAATAGCCATGCCTAGGTTTATTGATAGTTGTGTAGTTGGTGTA
AATGAGTGGGGTAGGAGGCCTAGTAGGTTTGTAGATCCAATAAATAAAATTAGGGACATT
AGTATTAATAGCTCATGTCTGTCCTTTGGTGTTATGAATGCTCATTATTTGTTTTGATACT
AATTGAAGTATTCAGTGTGGAGGGAGATGAGGCAGGTTGTTGACTAGTCGGCTTGATGT
GGGAAATAATAGGCTAGGGAATAAAACAATGAGGGTAACAAGGGGGAGGCCTAATA

A.2.2 山羊

CCCTGCTCATAAGGGAATAGCCCATGCCTAGATTTATTGATAGTTGTGTAGTTGGTGTA
AAATGAGTGGGGTAGAAGGCCTAATAGGTTTGTAGATCCAATAAATAGGATTAGGGACAT
TAATATTAATGTTTCATGTTTGTCTTTGGTGTTATGAATACTTATTATTTGTTTTGATAT
GAGTTGAAGTGCCCATTTGTTGGAGAGAGACGAGGCGGTTGTTAATTAGTCGGTTTGATGA
GGGAAATAGTAAGCTAGGAAATAAAATAATAAGGGTAACAAGGGGGAGGCCTAATA