



中华人民共和国国家标准

GB/T 38421—2019

毛皮 源性成分检测 实时荧光定性 聚合酶链式反应(PCR)检测方法

Fur—Detection of animal derived material—Qualitative real-time
polymerase chain reaction (PCR) methods

2019-12-31 发布

2020-07-01 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中国轻工业联合会提出。

本标准由全国皮革工业标准化技术委员会(SAC/TC 252)归口。

本标准起草单位:广州检验检测认证集团有限公司、国家皮革质量监督检验中心(浙江)、深圳华大基因科技服务有限公司、浙江方圆检测集团股份有限公司、中国皮革制鞋研究院有限公司、陕西科技大学、中国计量大学、东莞市惟思德科技发展有限公司。

本标准主要起草人:覃芳芳、黄新霞、孙海陆、陈宗良、王学川、冯爱明、张弛、孙霞、赵洋、章文福。

毛皮 源性成分检测 实时荧光定性 聚合酶链式反应(PCR)检测方法

1 范围

本标准规定了天然毛皮中动物源性成分定性分析的实时荧光 PCR 检测方法。
本标准适用于八种天然毛皮(水貂、兔、貉子、浣熊、马、牛、山羊和绵羊)的源性成分定性检测。

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 19495.2 转基因产品检测 实验室技术要求

GB/T 21102—2007 动物源性饲料中兔源性成分定性检测方法 实时荧光 PCR 方法

GB/T 25165—2010 明胶中牛、羊、猪源性成分的定性检测方法 实时荧光 PCR 法

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

实时荧光聚合酶链式反应 **real-time polymerase chain reaction**

在聚合酶链式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 进程,并通过扩增曲线对未知模板进行定性分析的方法。

注:改写 GB/T 19495.4—2018,定义 3.1.2。

3.1.2

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。

[GB/T 19495.4—2018,定义 3.1.5]

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)

DTT:二硫苏糖醇(dithiothreitol)

dNTPs:脱氧核苷三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphate)

FAM:6-羧基荧光素(6-carboxy-fluorescein)

Na₂EDTA:乙二胺四乙酸钠盐(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt)

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

SDS:十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate)

TAMRA:6-羧基四甲基若丹明(6-carboxy-tetramethyl rhodamine)
Taq 酶:DNA 聚合酶(*Taq* DNA polymerase)
Tris:三羟甲基氨基甲烷[(hydroxymethyl)methyl aminomethane]
18S rRNA:真核生物核糖体小亚基 18S 基因(18S ribosomal RNA)

4 原理

提取动物毛皮试样中的 DNA,针对水貂、兔、貉子、浣熊、马、牛、山羊、绵羊物种特异性的内源基因序列设计引物,通过特异性引物和标记荧光物质探针,对动物源性的 DNA 进行实时荧光 PCR 扩增,根据 PCR 扩增反应中每一个循环产物荧光信号的强弱判定,实现对毛皮中动物源性成分的定性分析。

5 试剂和材料

- 5.1 一般规定:除非另有说明,所用试剂均为分析纯,试验用水应符合 GB/T 6682 中一级水的规定。
- 5.2 灭菌水。
- 5.3 氢氧化钠(NaOH)。
- 5.4 三羟甲基氨基甲烷(Tris)。
- 5.5 盐酸(HCl)。
- 5.6 乙二胺四乙酸钠盐(Na_2EDTA)。
- 5.7 十二烷基硫酸钠(SDS)。
- 5.8 氯化钠。
- 5.9 乙酸钠。
- 5.10 冰乙酸。
- 5.11 蛋白酶 K(20 mg/mL), $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下保存。
- 5.12 二硫苏糖醇(DTT)。
- 5.13 苯酚(Tris 平衡酚,pH 7.0~8.0)。
- 5.14 三氯甲烷。
- 5.15 异丙醇。
- 5.16 无水乙醇。
- 5.17 乙醇溶液(体积分数 75%):取 75 mL 无水乙醇(5.16),加水定容至 100 mL。
- 5.18 Tris-HCl 缓冲液(1 mol/L ,pH =7.6 和 pH= 8.0):称取 121.1 g 三羟甲基氨基甲烷(5.4),溶于 800 mL 水中,冷却至室温,用盐酸(5.5)调节 pH 至所需值,加水定容至 1 L,121 $^\circ\text{C}$ 条件下高压灭菌 20 min。
- 5.19 Na_2EDTA 溶液(0.5 mol/L,pH= 8.0):称取 186.1 g Na_2EDTA (5.6),溶于 700 mL 水中,用氢氧化钠(5.3)调节 pH 至 8.0,加水定容至 1 L,121 $^\circ\text{C}$ 条件下高压灭菌 20 min。
- 5.20 氢氧化钠溶液(5 mol/L):称取 40 g 氢氧化钠(5.3)溶于 100 mL 水中,冷却后,加水定容至 200 mL。
- 5.21 氯化钠溶液(5 mol/L):称取 58.44 g 氯化钠(5.8)溶于 100 mL 水中,加水定容至 200 mL。
- 5.22 SDS 裂解缓冲液:在 500 mL 水中分别加入 100 mL pH 为 7.6 的 Tris-HCl 缓冲液(5.18)、100 mL Na_2EDTA 溶液(5.19)、100 mL 氯化钠溶液(5.21)和 5 g SDS(5.7),完全溶解后加水定容至 1 L,121 $^\circ\text{C}$ 条件下高压灭菌 20 min。
- 5.23 乙酸钠溶液(3 mol/L,pH= 5.2):称取 49.21 g 乙酸钠(5.9),溶于 120 mL 水中,用冰乙酸(5.10)调节 pH 至 5.2,加水定容至 200 mL。
- 5.24 TE 缓冲液:在 800 mL 水中分别加入 10 mL pH 为 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液(5.18)和 2 mL Na_2EDTA 溶液(5.19),加水定容至 1 L,121 $^\circ\text{C}$ 条件下高压灭菌 20 min。
- 5.25 DNA 吸附柱。

- 5.26 DNA 提取试剂盒。
- 5.27 实时荧光 PCR 试剂盒,包括 *Taq* 酶、dNTPs、PCR 体系缓冲液等,按试剂盒要求保存。
- 5.28 水貂、兔、貉子、浣熊、马、牛、山羊和绵羊基因组 DNA, 0 °C~4 °C 条件下保存。
- 5.29 引物和探针:所需引物和探针信息见表 1, -20 °C 条件下保存。

表 1 引物和探针信息

引物名称	引物和探针序列(5'-3')		目标基因
内参引物探针 ^a	正向	CCTGAGAAACGGCTACCAT	真核生物 18S rRNA 基因(内参基因)
	反向	CGTGTCAGGATTGGGTAAT	
	探针	(FAM)TGC GCGCCTGCTGCCTTCCT(TAMRA)	
水貂引物探针	正向	CCACTAACATCATCCATCACCA	水貂内源基因 (线粒体基因)
	反向	AATGAGTGGGTAGGGCATGG	
	探针	(FAM)CTCCCATCCTAGCCCTAACACTAGCCCTT(TAMRA)	
兔引物探针 ^b	正向	TAATCGTCACCGCACATGCC	兔内源基因 (线粒体基因)
	反向	CTATGTCAGG AGCCCAATT ATCA	
	探针	(FAM)ACAAGCCAGT TCCCGAAGCC TCCA(Eclipse)	
貉子引物探针	正向	CCTATCCCTCTCCCACGTATGAA	貉子内源基因 (线粒体基因)
	反向	TTAGGGATGAAACCGGATAGTGG	
	探针	(FAM)CATTGATAACCTCCGTCATCCTGGCCC(TAMRA)	
浣熊引物探针	正向	GCTGACTTCCAATCAACTAGTTCTG	浣熊内源基因 (线粒体基因)
	反向	AGCTGTGGTAATCAGAACGCGAT	
	探针	(FAM)CCTACTTACCAACACACTCCTAGCCTCC(TAMRA)	
马引物探针	正向	CTTCAACCCACAGCGTCCATCA	马内源基因 (线粒体基因)
	反向	AGCGATCATCATTAACTCATAACAC	
	探针	(FAM)TACTCAGAAGTGGAATGGTGTGAG(TAMRA)	
牛引物探针 ^c	正向	CCGATGGATGTTTCAGAGCT	牛内源基因 (生长激素基因)
	反向	GCCAAATGTCTGGGTGTAGATACC	
	探针	(FAM)TGGGCTTTAGGGCTTCCGAATGTGAA(TAMRA)	
山羊引物探针	正向	TGCACTAACCACCCTAACCTAT	山羊内源基因 (线粒体基因)
	反向	AAAGGCACATGAAACGACCGT	
	探针	(FAM)CCGCACCCATCATAATAACCAACCTCAAT(TAMRA)	
绵羊引物探针 ^d		ACACA ACTTCTACCACAACCC	绵羊内源基因 (线粒体基因)
		AAACAATGAGGGTAACGAGGG	
		(FAM)ACACCGAAACAAAATACTCCTTGAGAAACA (TAMRA)	

^a 该引物和探针见 GB/T 25165—2010。

^b 该引物和探针见 GB/T 21102—2007。

^c 该引物和探针见 GB/T 25165—2010。

^d 该引物和探针见 GB/T 25165—2010。

6 仪器与设备

- 6.1 分析天平,精度为 0.01 g。
- 6.2 pH 计,精度为 0.1。
- 6.3 高压灭菌锅。
- 6.4 剪刀。
- 6.5 恒温水浴箱。
- 6.6 涡旋振荡器。
- 6.7 高速冷冻离心机。
- 6.8 微量可调移液器:0.1 μL ~2.5 μL 、1 μL ~10 μL 、2 μL ~20 μL 、20 μL ~200 μL 、100 μL ~1 000 μL 。
- 6.9 超微量核酸蛋白分析仪。
- 6.10 超净工作台。
- 6.11 实时荧光 PCR 热循环仪(发射波长:500、533、568、610、640、670;单位:nm)。

7 试验步骤

7.1 DNA 提取

7.1.1 试样 DNA 提取

将试样去毛后剪碎(小于 2 mm \times 2 mm),称取 1 g~2 g 试样,放入 50 mL 离心管中,加入 5 mL 预热至 65 $^{\circ}\text{C}$ 氢氧化钠溶液(5.20),混匀(混匀时间不宜超过 10 s),立即加入 10 mL 灭菌水(5.2)。12 000 r/min 离心 5 min,倾去上层液体。

加入 15 mL 灭菌水(5.2),混匀后 12 000 r/min 离心 5 min,倾去上层液体。浅色试样重复本操作 1 次~2 次,深色样品重复本操作 3 次~4 次。

加入 2.5 mL~3.0 mL SDS 裂解缓冲液(5.22),混匀后用冰乙酸(5.10)或乙酸钠溶液(5.23)调节 pH 为 7.0~7.5,加入 50 μL 蛋白酶 K(5.11)和 50 μL DTT(5.12),58 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴 4 h(或 42 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴 6 h~24 h),期间振荡混匀 3 次~6 次。取出,室温放置 5 min,12 000 r/min 离心 5 min。

取 2 mL 上清液,加入等体积苯酚(5.13),振荡混匀 5 min,12 000 r/min 离心 15 min,然后取 2 mL 上清液重复操作一次。

取上清液,加入等体积三氯甲烷(5.14),振荡混匀 5 min,12 000 r/min 离心 10 min,然后取上清液重复操作一次。

取上清液,加入等体积异丙醇(5.15),混匀后冰上静置 2 h 以上。将混合液转入 DNA 吸附柱(5.25),室温放置 2 min,12 000 r/min 离心 30 s,倾去液体。

加入 600 μL 75%乙醇溶液(5.17),12 000 r/min 离心 30 s。倾去液体后重复操作一次。

12 000 r/min 继续离心 2 min 加快乙醇挥发,然后将 DNA 吸附柱放入新的 1.5 mL 离心管中,室温放置 5 min,使乙醇挥发完全。加入 50 μL TE 缓冲液(5.24),室温静置 5 min,12 000 r/min 离心 2 min,取上清液,即为试样 DNA 溶液,待测。

注:除上述方法外,也可用等效的 DNA 提取方法提取试样 DNA。

7.1.2 阴性对照模板 DNA 提取

以滤纸代替试样,按 7.1.1 的方法提取 DNA 溶液,作为 PCR 扩增的阴性对照。

7.1.3 DNA 质量评估

用超微量核酸蛋白分析仪(6.9)对试样 DNA 的质量进行评估,分别检测 230 nm、260 nm 和 280 nm 波长处的吸光值 OD_{230} 、 OD_{260} 和 OD_{280} ,若同时满足以下要求则适宜 PCR 扩增:

$$10 \text{ ng}/\mu\text{L} \leq \text{DNA 浓度} \leq 20 \text{ ng}/\mu\text{L};$$

$$1.6 \leq OD_{260}/OD_{280} \leq 2.0;$$

$$OD_{260}/OD_{230} \geq 1.0。$$

若按照 7.1.1 的方法提取的试样 DNA 不能满足以上要求时,应将 DNA 进一步纯化。

注:可根据试样的具体情况选择苯酚-三氯甲烷抽提、DNA 纯化柱等方式进行纯化。

7.2 实时荧光 PCR 检测

7.2.1 内参基因检测

可先将试样 DNA 进行内参基因的实时荧光 PCR 检测,若检测结果为阳性,表明提取的试样 DNA 适宜进行 PCR 检测,可以进行动物内源基因的检测;若检测结果为阴性,表明提取的 DNA 不适宜进行 PCR 检测,应重新提取 DNA。若重新检测结果仍为阴性,则本方法不适用于该试样检测。

7.2.2 实时荧光 PCR 扩增体系

为确保检测结果的准确性,在进行试样检测时,应同时设立空白对照、阴性对照和阳性对照试验。

在超净工作台(6.10)中按表 2 配制实时荧光 PCR 扩增体系,每个试样 DNA 的 PCR 平行扩增 2 次。

表 2 实时荧光 PCR 扩增体系

试剂名称	体积
10×PCR 缓冲液	2.0 μL
dNTPs(2.5 mmol/L)	2.0 μL
引物(20 pmol/ μL)	正向:0.5 μL
	反向:0.5 μL
探针(10 pmol/ μL)	0.2 μL
Ex <i>Taq</i> 酶(5 U/ μL)	0.2 μL (1U)
模板 DNA	1 μL (10 ng~20 ng)
灭菌水	补足总体积至 20.0 μL
注 1: 空白对照试验时,用灭菌水(5.2)代替试样 DNA。 注 2: 阴性对照试验时,用模板 DNA(7.1.2)代替试样 DNA。 注 3: 阳性对照试验时,用水貂、兔、貉子、浣熊、马、牛、山羊和绵羊基因组 DNA(5.28)。	

7.2.3 实时荧光 PCR 扩增循环参数

混匀离心后置于实时荧光 PCR 仪上进行 PCR 扩增,PCR 扩增参数根据不同仪器有所不同。一般反应参数为:94 °C 预变性 5 min 后,按 94 °C/10 s,60 °C/30 s,45 个循环,最后于 4 °C 结束反应。

7.3 平行试验

每个试样应至少平行试验 2 次。

8 结果分析

8.1 质量控制

8.1.1 实时荧光 PCR 有效性判定

空白对照:无 FAM 荧光信号,相应 Ct 值 ≥ 40.0 。

阴性对照:无 FAM 荧光信号,相应 Ct 值 ≥ 40.0 。

阳性对照:有 FAM 荧光信号,且 FAM 通道出现明显的扩增曲线,Ct 值 ≤ 36.0 。

否则判定为 PCR 无效。

8.1.2 DNA 提取有效性判定

取内参照引物对试样 DNA 提取液进行 PCR 扩增,在符合 8.1.1 的情况下,被检测试样 DNA 应有 FAM 荧光信号检出,且 FAM 通道出现明显的扩增曲线,Ct 值 ≤ 36.0 。

否则 DNA 提取无效,应重新提取 DNA,直至 Ct 值 ≤ 36.0 。

8.2 动物内源基因的检测判定

在符合 8.1.2 的情况下,对试样 DNA 提取液进行各动物内源基因的实时荧光 PCR 扩增检测:

如有 FAM 荧光检出,且 Ct 值 ≤ 36.0 ,则判断该试样检出该动物源性成分。

如 Ct 值 ≥ 40.0 ,则判断该试样未检出该动物源性成分。

如 $36.0 < \text{Ct 值} \leq 40.0$,则需重复试验。再次扩增后 Ct 值 < 40.0 ,且阳性对照、阴性对照和空白对照正常,则判断该试样检出该动物源性成分;再次扩增后,Ct 值 ≥ 40.0 ,且阳性对照、阴性对照和空白对照正常,则判断该试样未检出该动物源性成分。

9 结果表述

试样 DNA 内参基因的检测结果为阴性,则表述为“该试样不适用于本方法检测”。

试样 DNA 内参基因的检测结果为阳性且某种动物(如水貂)内源基因的检测结果为阳性,则表述为“该试样检出该动物(如水貂)源性成分”;试样 DNA 内参基因的检测结果为阳性且某种动物(如水貂)内源基因的检测结果为阴性,则表述为“该试样未检出该动物(如水貂)源性成分”。

10 防护设施和废弃物处理

检测过程中各种防护设施和废弃物处理按 GB/T 19495.2 的规定进行。

11 试验报告

试验报告应包含以下内容：

- a) 本标准编号；
 - b) 样品来源及描述；
 - c) 结果表述；
 - d) 试验过程中所出现的异常现象；
 - e) 实测方法与本标准不同之处。
-

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准

毛皮 源性成分检测 实时荧光定性
聚合酶链式反应(PCR)检测方法

GB/T 38421—2019

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址:www.spc.org.cn

服务热线:400-168-0010

2020年1月第一版

*

书号:155066·1-64041

版权专有 侵权必究



GB/T 38421—2019