

QB

中华人民共和国轻工行业标准

QB/T 5505—XXXX

肉类罐头中牛、羊、猪、鸡、鸭源性成分检测  
方法 PCR 法

Identification of bovine, sheep, porcine, chicken and duck- derived materials in canned  
meat- PCR method

报批稿

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中华人民共和国工业和信息化部 发布

## 前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009的规则起草。

本标准由中国轻工业联合会提出。

本标准由全国食品工业标准化技术委员会罐头分技术委员会（TC64/SC2）归口。

本标准起草单位：中国食品发酵工业研究院有限公司、广东省食品工业研究所有限公司、厦门市产品质量监督检验研究院、华测检测认证集团股份有限公司、大连市检验检测认证技术服务中心、北京市产品质量监督检验院、中国肉类食品综合研究中心、上海梅林正广和股份有限公司。

本标准主要起草人：孟镇、仇凯、谢雪钦、刘彦泓、许银叶、刘文秋、张媛媛、杜星、李家鹏、杨倩、陈煜、刘岑杰。

本标准首次发布。

# 肉类罐头中牛、羊、猪、鸡、鸭源性成分检测方法 PCR 法

## 1 范围

本标准规定了肉类罐头中牛、羊、猪、鸡、鸭源性成分的PCR检测方法。

本标准适用于肉类罐头中牛、羊、猪、鸡、鸭源性成分定性检测，方法检出限为1%（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 4789.26-2013 食品安全国家标准 食品微生物学检验 商业无菌检验

GB/T 6682-2008 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 34796 水溶液中核酸的浓度和纯度检测 紫外分光光度法

## 3 缩略语

下列缩略语适用于本文件

PCR: polymerase chain reaction, 聚合酶链式反应

DNA: deoxyribonucleic acid, 脱氧核糖核酸

Taq: thermus aquaticus, 水生栖热菌

dNTP: deoxy-ribonucleoside triphosphate, 脱氧核糖核苷三磷酸

dATP: deoxy-adenosine triphosphate, 脱氧腺苷三磷酸

dTTP: deoxy-thymidine triphosphate, 脱氧胸苷三磷酸

dCTP: deoxy-cytidine triphosphate, 脱氧胞苷三磷酸

dGTP: deoxy-guanosine triphosphate, 脱氧鸟苷三磷酸

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

EDTA: ethylene diamine tetraacetic acid, 乙二胺四乙酸

bp: base pair, 碱基对

Ct: cycle threshold, 阈值循环数

FAM: 6-carboxyfluorescein, 6-羧基荧光素

TAMRA: 6-carboxytetramethylrhodamine, 6-羧基四甲基罗丹明

UNG: uracil-N-glycosylase, 尿嘧啶-N-糖基化

18s rRNA: 18S ribosomal acid RNA, 18s 核糖体 RNA

## 4 第一法 特异性 PCR 法 仲裁法

### 4.1 方法提要

以提取的肉类罐头样品中的总DNA为模板，分别设计牛、羊、猪、鸡、鸭五种成分的特异性引物进行PCR扩增，以琼脂糖凝胶电泳检测是否出现预期目标片段，再利用限制性内切酶反应或测序进行确证，从而判定样品中是否含有相应动物源性成分。

## 4.2 试剂和材料

除另有说明外，试剂均为分析纯或生化试剂，实验用水为 GB/T 6682—2008 规定的一级水。

4.2.1 dNTPs: dATP、dTTP、dCTP、dGTP。

4.2.2 10×PCR 缓冲液: 含  $Mg^{2+}$ 。

4.2.3 TaqDNA 聚合酶。

4.2.4 浓盐酸。

4.2.5 氢氧化钠。

4.2.6 异硫氰酸胍 (GuSCN)。

4.2.7 聚乙二醇辛基苯基醚 (TritonX-100)。

4.2.8 氯仿: 异戊醇 (24:1, 体积比)。

4.2.9 异丙醇。

4.2.10 无水乙醇。

4.2.11 限制性内切酶: MnlI。

4.2.12 琼脂糖。

4.2.13 溴化乙锭或其他可替代的染料。

4.2.14 DNA 分子量标记:100bp。

4.2.15 6×loading buffer(上样液)。

4.2.16 TE 缓冲液: 在 800 mL 水中, 依次加入 10 mL 1 mol/L Tris-HCl 溶液和 2 mL 0.5 mol/L EDTA 溶液, 用水定容至 1 L, 121 °C 灭菌 15 min, 备用。

4.2.17 三羟甲基氨基甲烷盐酸 (Tris-HCl) 溶液, 0.5 mol/L (pH 8.0): 在 800 mL 的水中溶解 60.6 g 的三羟甲基氨基甲烷 (Tris), 冷却至室温后, 用浓盐酸调节溶液 pH 值至 8.0, 用水定容至 1 L, 121 °C 灭菌 15 min, 备用。

4.2.18 乙二胺四乙酸 (EDTA) 二钠盐溶液, 0.2 mol/L: 称取 74.45 g 二水乙二胺四乙酸二钠 ( $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ ), 加入 700 mL 水中, 在磁力搅拌器上搅拌, 用氢氧化钠调 pH 值至 8.0, 用水定容至 1 L, 121 °C 灭菌 15 min, 备用。

4.2.19 1×TAE 缓冲液: 称取 242 g Tris 和 37.2 g 的  $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$  放入烧杯中加入约 800 mL 水, 充分搅拌, 然后加入 57.1 mL 冰乙酸, 用水定容至 1 L, 配制成 50×TAE 缓冲液, 室温保存, 使用时用水稀释为 1×TAE 缓冲液。

4.2.20 异硫氰酸胍裂解液: 称取 59.1 g 的异硫氰酸胍放入试剂瓶中, 再分别加入 0.5 mol/L 的 Tris-HCl 溶液 10 mL 和 0.2 mol/L EDTA 溶液 10 mL, 然后加入 TritonX-100 1.3 mL, 用水定容到 100 mL, 121 °C 灭菌 15 min, 备用。

4.2.21 70%乙醇: 量取无水乙醇 70 mL, 用水定容至 100 mL。

4.2.22 琼脂糖凝胶：称取 2.0 g 琼脂糖于锥形瓶中，加入 98.0 mL 1×TAE 缓冲液，加热溶解。

4.2.23 无菌 PCR 反应管。

4.2.24 无菌离心管：1.5 mL、2 mL。

### 4.3 仪器和设备

4.3.1 超净工作台。

4.3.2 电子天平：感量 0.1 mg。

4.3.3 冷冻离心机。

4.3.4 恒温水浴锅。

4.3.5 PCR 扩增仪。

4.3.6 电泳仪。

4.3.7 紫外凝胶成像仪。

4.3.8 灭菌锅。

4.3.9 DNA 测序仪/基因分析仪

4.3.10 微量移液器：10  $\mu$ L、100  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1000  $\mu$ L。

### 4.4 分析步骤

#### 4.4.1 DNA 模板的提取

##### 4.4.1.1 样品前处理

按照 GB 4789.26-2013 中 6.4 规定的方法开启样品；无菌条件下，称取 2 g~3 g 固体样品于 10 mL 离心管中，加入 6 mL 的无菌水，上下颠倒充分混匀，室温条件下 9000 r/min 离心 5 min 并弃去上清液；再加入 6 mL 的氯仿，室温条件下 9000 r/min 离心 5 min 并弃去上清液；再用无菌去离子水清洗样品一次；以新鲜的牛肉、羊肉、猪肉、鸡肉、鸭肉为阳性样品同时进行处理。

##### 4.4.1.2 DNA 提取

分别称取 50 mg 由 4.4.1.1 制备的罐头样品和阳性样品于不同的 1.5 mL 离心管中，各离心管中分别加入 200  $\mu$  L TE 缓冲液，混匀；加入 400  $\mu$  L 异硫氰酸胍裂解液，室温放置 30 min 后，加入 400  $\mu$  L 氯仿：异戊醇（24:1，体积比），混匀；10000 r/min 室温离心 5 min，取上清液，加入 0.8 倍体积异丙醇，室温沉淀 1 h；10000 r/min 室温离心 5 min，弃上清液；70% 乙醇洗涤一次，晾干；加入 50  $\mu$  L TE 缓冲液，溶解后 -20  $^{\circ}$ C 保存备用。

注：也可用等效 DNA 提取试剂盒提取样品 DNA。

#### 4.4.2 DNA 浓度和纯度检测

按 GB/T 34796 规定的方法检测 DNA 浓度和纯度，使 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值在 1.7~1.9 之间。

#### 4.4.3 引物

猪、牛、羊、鸡、鸭的种属特异性引物序列信息及扩增目的片段长度见表1，各引物终浓度均为10 μmol/L。

表1 种属特异性引物

动物源性成分	引物序列 (5'-3')	预期目的片段/bp
猪	F:GCCTAAATCTCCCCTCAATGCTA	212
	R:ATGAAAGAGGCAAATAGATTTTCG	
牛	F:CACAATCCAGAACTGACAC	147
	R:GATGGCTTGGGAATAGTACGA	
羊	F:CCTCCAACAGTGAATACTT	202
	R:TCCTCCTCATAAAGGAATGGCC	
鸡	F:CTATAATCGATAATCCACGATTCA	131
	R:CTTGACCTGTCTTATTAGCGAGG	
鸭	F:CATCTATCCTGCTAGCCGCC	201
	R:TTGAGTGGAAGAATGCC	

#### 4.4.4 PCR 扩增

4.4.4.1 PCR 反应采用 25 μL 体系：10×PCR buffer 2.5 μL，dNTP (2.5 mmol/L) 2 μL，20 pmol/μL 引物各 1 μL，模板 DNA 1 μL，Taq DNA 聚合酶 0.3 μL (1.5 U)，MgSO<sub>4</sub> (50 mmol/L) 1 μL，ddH<sub>2</sub>O 补足体积。扩增条件为：94 °C 3 min，94 °C 30 s，57 °C 30 s，72 °C 30 s，35 个循环，72 °C 5 min。

4.4.4.2 每个 PCR 反应均设置两个平行试验，并设置空白对照、阳性对照和阴性对照，空白对照的 PCR 反应体系中使用无菌双蒸水代替 DNA 模板，阳性对照使用新鲜猪肉、鸡肉、鸭肉、牛肉、羊肉提取的 DNA 为模板或已知猪、鸡、鸭、牛、羊源性的 DNA 为模板，阴性对照采用已知不含猪、鸡、鸭、牛、羊序列的 DNA 为模板。

4.4.4.3 若牛、羊样品第一次 PCR 扩增结果经电泳检测无条带或条带不清晰，取 1 μL 第一次扩增产物为模板，在相同反应体系和扩增条件下再次扩增，以第二次 PCR 扩增结果进行判断。

#### 4.4.5 琼脂糖凝胶电泳检测

4.4.5.1 使用 1×TAE 缓冲液配制 2% (w/v) 琼脂糖凝胶，加热至沸腾溶解后，采取电泳前染色法，当凝胶温度在 55 °C~60 °C 时，微量移液器加入溴化乙锭或其他可替代的染料，使其终浓度达到 1 μg/mL 或工作浓度为 1×，趁热将琼脂糖溶液均匀倒入制胶器，室温冷却至凝固。

4.4.5.2 在电泳槽中加入 1×TAE 缓冲液，使溶液没过胶面，移取 5 μL DNA 扩增产物与 1 μL 6×loading buffer(上样液)混合均匀后，点样，同时在点样孔中加入 DNA 分子量标记，5 V/cm~10 V/cm，恒压，电泳 20 min~30 min。在紫外凝胶成像仪下观察电泳结果，拍照并记录结果。

#### 4.4.6 PCR 结果判断

当出现下列情况之一，则 PCR 结果无效，应重新进行试验：

- 两份平行测试样品的结果不一致；
- 空白对照或阴性对照出现条带；
- 阳性对照未出现目的条带。

#### 4.4.7 确证试验

若PCR扩增结果为阳性，可将所得产物直接进行测序或利用MnII进行酶切反应以确证，酶切反应体系（20 μL）：10×buffer 2 μL，MnII酶 1 μL，PCR产物 15 μL，ddH<sub>2</sub>O 2 μL；反应温度为37 ℃，反应时间为1 h，酶切产物采用琼脂糖凝胶电泳（4.4.4）或毛细管电泳进行检测。不同动物源成分目的片段及酶切片段大小信息见表2。

表2 不同动物源成分目的片段及酶切片段大小信息

动物源性成分	预期目的片段/bp	限制性内切酶	酶切片段大小/bp
猪	212	MnII	189+23
牛	147		89+32+26
羊	202		126+51
鸡	131		84+35
鸭	201		114+54+33

#### 4.5 结果判断

若样品PCR扩增结果出现预期长度的目的片段，且酶切结果符合表2中所对应的不同酶切片段大小，则判断样品含有相应动物源性成分；或将目的片段测序后，与数据库中已有参考序列比对，相似性在96%以上，确认动物源性成分种属信息。

## 5 第二法 实时荧光PCR法

### 5.1 方法提要

以提取肉类罐头样品中的总DNA为模板，分别根据五种动物源性成分的线粒体保守基因片段，设计引物及荧光探针，进行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样品中是否含有相应动物源性成分。

### 5.2 试剂和材料

#### 5.2.1 实时荧光 PCR 预混液

为Taq DNA 聚合酶（5 U/μL）、PCR反应缓冲液、MgCl<sub>2</sub>（3 mmol/L-7 mmol/L）、dNTPs（含dATP、dTTP、dCTP、dGTP）、UNG酶等混合配制的溶液。

5.2.2 荧光校正试剂：使用时稀释至 1×。

### 5.3 仪器和设备

5.3.1 超净工作台。

5.3.2 电子天平：感量 0.1 mg。

5.3.3 冷冻离心机。

5.3.4 恒温水浴锅。

5.3.5 实时荧光 PCR 仪。

5.3.6 灭菌锅。

5.3.7 微量移液器：2 μL、10 μL、100 μL、200 μL、1000 μL。

#### 5.4 分析步骤

##### 5.4.1 DNA 提取

同4.4.1。

##### 5.4.2 DNA 浓度和纯度的检测

同4.4.2。

##### 5.4.3 引物

18S rRNA内参基因以及猪、牛、羊、鸡、鸭的种属特异性引物及探针序列见表3，各引物终浓度均为10 μmol/L。

表3 种属特异性引物及探针序列

动物源性成分/内参	引物及探针名称	序列
18S	18SF	5'-CCTGAGAAACGGCTACCAT-3'
	18SR	5'-CGTGTTCAGGATTGGGTAAT-3'
	18SP	5'-FAM-TGCGCGCCTGCTGCCTTCCT-TAMRA3'
猪	猪F	5'-CAGTACAGCAACCAGAACAGTTTTG-3'
	猪R	5'-CCTTGGTGGTCGTGGTCACT-3'
	猪P	5'-FAM-CATGACTGCGTCAACATCACCGTCAA-TAMRA3'
牛	牛F	5'-CAGCCTGCAAACCTCCATCAG-3'
	牛R	5'-CCCATATTTGCTGTAGTATTCTTTCTCA-3'
	牛P	5'-FAM-TCCCGAGAATGTGCACAACGCG-TAMRA3'
羊	羊F	5'-AATAGCCCTCGCCGTACGA-3'
	羊R	5'-GCCCTCCGATTAAGTGAATT-3'
	羊P	5'-FAM-TGACAGCCAACATCACAGCAGGACAC-TAMRA3'
鸡	鸡F	5'-CAAACAACCCTGCAAACAAAATTA-3'
	鸡R	5'-GGGCTTGAGAATTGGTCAA-3'
	鸡P	5'-FAM-CCCCTGAACCTGACCATGAACCTAAGCTT-TAMRA3'
鸭	鸭F	5'-CACGAAGCCCCATTTTCAAT-3'
	鸭R	5'-TCCGGTGGCGACAAAGA-3'
	鸭P	5'-FAM-CCGACAGCGTCTACGGTCCACC-TAMRA3'

#### 5.5 实时荧光 PCR 扩增反应

##### 5.5.1 实时荧光 PCR 反应体系

实时荧光PCR反应体系见表4。

表4 实时荧光PCR 反应体系

试剂名称	储液浓度	终浓度
10×PCR缓冲液	10×	1×
MgCl <sub>2</sub>	25 mmol/L	2.5 mmol/L



dNTP (含UTP)	2.5 mmol/L	0.2 mmol/L
UNG酶	5 U/μL	0.075 U/μL
上游引物	10 μmol/L	100 nmol/L
下游引物	10 μmol/L	100 nmol/L
探针	10 μmol/L	0.4 mmol/L
Taq 酶	5 U/μL	0.05 U/μL
模板DNA	20 ng~50 ng	20 ng~50 ng
无菌水	—	补足至25 μL

注1: ROX荧光试剂仅在具有ROX校正通道的实时荧光PCR仪上进行扩增时添加, 否则用超纯水补足。  
注2: 反应体系中各试剂的量可根据具体情况或不同的反应总体积或不同的反应总体积进行适当调整。

### 5.5.2 实时荧光 PCR 反应条件

反应条件为: 预变性95℃, 10 min; 变性95℃, 30 s; 退火60℃, 30 s; 延伸72℃, 30 s, 进行40个循环。不同仪器可根据仪器要求适当调整参数。

### 5.5.3 质控设置

同4.4.4.2。

### 5.5.4 实时荧光 PCR 结果判断

当出现下列情况之一, 则结果无效, 应重新进行试验:

- 空白对照或阴性对照Ct值 < 30;
- 阳性对照Ct值 ≥ 30;
- 18S检验Ct值 ≥ 30。

### 5.6 结果判断

——空白、阳性对照试验和18S试验结果正常, 样品两次平行试验有明显荧光信号检出, 且Ct值均 < 35, 判断该样品中含有相应的动物源性成分; 样品两次平行试验无荧光信号检出, 且Ct值均 ≥ 40, 判断该样品中不含有相应的动物源性成分;

——空白、阳性对照试验和18S试验结果正常, 样品两次平行试验有明显荧光信号检出, Ct值在35~40, 应重新进行实时荧光PCR反应, 再次扩增后Ct值 < 40, 判断该样品中含有相应的动物源性成分; 否则判断该样品中不含有相应的动物源性成分。