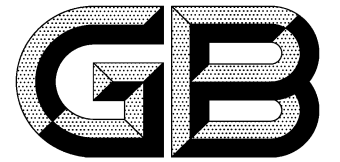


附录 A
(资料性附录)
PCR 产物测序结果

GCCTAAATCT CCCCTCAATG GTATGCCACA ACTAGATACA TCTACATGAT TCATTACAAT
TACATCAATA ATTATAACAT TATTIATTTT ATTCCAATA AAAATCTCAA ACTACTCATA
CCCAGCAAGC CCAGAATCAA CCGAACTCAA AACTCAAAAA CATAGCACCC CTTGAGAAAT
AAAATGAACG AAAATCTATT TGCCCTTTTC AT

GB/T 21101—2007

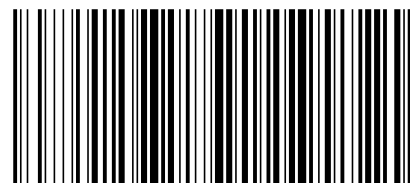


中华人民共和国国家标准

GB/T 21101—2007

动物源性饲料中猪源性成分定性检测 方法 PCR 方法

Identification of porcine derived materials in animal-originated
feedstuffs—PCR method



GB/T 21101—2007

版权专有 侵权必究

*

书号:155066·1-30289

定价: 10.00 元

2007-10-24 发布

2008-04-01 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
动物源性饲料中猪源性成分定性检测
方法 PCR方法
GB/T 21101—2007

*
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 0.5 字数 8 千字
2007年12月第一版 2007年12月第一次印刷

*
书号: 155066·1-30289 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

8.2 DNA 浓度和纯度的测定

取 5 μL DNA 溶液加双蒸水稀释至 1 mL,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 的浓度按式(1)计算:

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

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。

当 A_{260}/A_{280} 比值在 1.7~1.9 之间时,适宜于 PCR 扩增。

8.3 PCR 扩增

25 μL 的反应体系,在 0.2 mL 的 PCR 反应管中,引物 por F 和 por R 各 200 nmol/L,10×PCR 反应缓冲液,2 mmol/L MgCl_2 ,200 nmol/L dNTPs,1.5 U *Taq* DNA 聚合酶,1.0 μL DNA 模板(100 ng ± 50 ng DNA)。

PCR 反应条件随仪器不同略有改变,一般的反应程序为:94℃预变性 3 min。94℃变性 45 s,56℃退火 45 s,72℃延伸 45 s,35 个循环。72℃延伸 5 min。4℃保存。

检测过程中分别设阳性对照、阴性对照和空白对照。用已知含猪源性成分的样品作阳性对照,用已知不含猪源性成分的样品作阴性对照,用等体积的双蒸水代替模板 DNA 作空白对照。

8.4 PCR 扩增产物电泳检测

取 2 g 琼脂糖,于 100 mL 电泳缓冲液中加热,充分熔化,加入溴化乙锭贮存液至终浓度为 0.5 μg/mL,制胶。在电泳槽中加入电泳缓冲液,使液面刚刚没过凝胶。将 5 μL~8 μL PCR 扩增产物分别和适量加样缓冲液混合,点样。9 V/cm 恒压电泳,直至溴酚蓝指示剂迁移至凝胶中部。紫外检测仪下观察电泳结果并记录。

8.5 限制性内切酶酶切及产物电泳检测

如果 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。

反应体系(20 μL):*Mnl* I 酶 2U,酶切缓冲液 2 μL,加入 PCR 扩增产物至总体积 20 μL。

酶切在 37℃下进行,20 min。酶切完成后电泳,方法见 8.4。

9 结果判断与表述

9.1 PCR 扩增产物电泳检测结果

阳性样品的 PCR 扩增产物大小为 212 bp(序列参考附录 A)。

9.2 限制性内切酶酶切结果

阳性样品 PCR 产物采用内切酶 *Mnl* I 酶切后,酶切片段大小为 196 bp 和 16 bp。

9.3 结果表述

PCR 产物和酶切产物都为阳性者判为含有猪源性成分,表述为检出猪源性成分;PCR 产物为阴性者判为不含有猪源性成分,表述为未检出猪源性成分。

10 检测过程中防止交叉污染的措施

按照 SN/T 1193 要求执行。

11 废弃物处理

检测过程中的废弃物,收集后在焚烧炉中焚烧处理。

phate,脱氧胸苷三磷酸)、dCTP(deoxycytidine triphosphate,脱氧胞苷三磷酸)、dGTP(deoxyguanosine triphosphate,脱氧鸟苷三磷酸)。

- 5.5 琼脂糖:电泳纯。
- 5.6 溴化乙锭。
- 5.7 三氯甲烷。
- 5.8 异丙醇。
- 5.9 70%乙醇。
- 5.10 分子量标准品(100 bp ~2000 bp)(bp:base pair,碱基对)。
- 5.11 裂解液:1% CTAB(cetyltrimethylammonium bromide,十六烷基三甲基溴化铵),0.05 mol/L Tris-HCl(pH8.0)[Tris-,tris(hydroxymethyl)aminomethane,三(羟甲基)氨基甲烷],0.7 mol/L NaCl,0.01 mol/L EDTA(pH8.0)(ethylenediaminetetraacetic acid,乙二胺四乙酸)。
- 5.12 TE 缓冲液(Tris-HCl,EDTA 缓冲液):10 mmol/L Tris-HCl(pH8.0),1 mmol/L EDTA(pH8.0)。
- 5.13 10×PCR 缓冲液:100 mmol/L KCl,160 mmol/L (NH₄)₂SO₄,20 mmol/L MgSO₄,200 mmol/L Tris-HCl(pH8.8),1% Triton X-100(t-octylphenoxypolyethoxyethanol,辛基苯氧基聚乙氧乙醇),1 mg/mL BSA(bovine serum albumin,牛血清蛋白)。
- 5.14 电泳缓冲液:Tris 54 g,硼酸 27.5 g,0.5 mol/L TE 缓冲液(pH8.0)20 mL,加蒸馏水至 1 000 mL;使用时10 倍稀释。
- 5.15 溴化乙锭贮存液:用水配制成 10 mg/mL。
- 5.16 加样缓冲液:0.25%溴酚蓝,质量浓度为 40%的蔗糖水溶液。
- 5.17 酶切缓冲液:10 mmol/L Tris-HCl(pH7.5),10 mmol/L MgCl₂,50 mmol/L NaCl,0.1 mg/mL BSA。

6 仪器设备

- 6.1 DNA 热循环仪。
- 6.2 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。
- 6.3 恒温水浴锅。
- 6.4 离心机:离心力 12 000 g。
- 6.5 微量移液器。
- 6.6 电泳仪。
- 6.7 紫外检测仪。
- 6.8 pH 计。
- 6.9 天平:感量 0.01 g。

7 试样选取与制备

按照 GB/T 14699.1 采样,将实验室样品粉碎,充分混合均匀后待用。

8 检验步骤

8.1 样品的总 DNA 提取

称取适量饲料(饲料粒度为 100 目称取 50 mg;60 目称取 100 mg;20 目称取 200 mg)于 1.5 mL 离心管中,加入 600 μL~800 μL 裂解液,65℃ 30 min,期间不时振荡混匀;12 000 g 离心 5 min;转移上清于洁净离心管中,加 400 μL 三氯甲烷+异戊醇(24+1),混匀;12 000 g 离心 5 min,取上清液;加 0.8 倍体积异丙醇,沉淀;12 000 g 离心 5 min,弃上清液;70%乙醇洗涤一次,晾干;加入 50 μL TE,溶解沉淀。

也可用等效 DNA 提取试剂盒提取模板 DNA。

前 言

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局提出。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:中华人民共和国山东出入境检验检疫局、中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:高宏伟、梁成珠、王岩、于立新、徐宝梁、陈颖、吴亚君、宗卉、温燕辉、曹际娟。

本标准首次发布。