

GB/T 25165—2010

如有 FAM 荧光检出,且 Ct 值 \leq 36.0,则判定样品含有相应的动物源性成分;

如 Ct 值 $>$ 40.0,则判定为不含相应的动物源性成分;

如 $36.0 < Ct \leq 40.0$,则需重复实验,再次扩增后的 Ct 值仍 $<$ 40.0,且阴性对照、阳性对照和空白对照结果正常,则判定该样品含有相应的动物源性成分;再次扩增后结果 Ct 值 \geq 40.0,且阴性对照、阳性对照和空白对照结果正常,则判定该样品不含相应的动物源性成分。

12 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。

GB/T 25165—2010

ICS 65.020.30
B 43

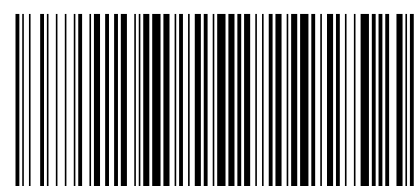


中华人民共和国国家标准

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

Protocol of identification of bovine, caprine, ovine and porcine derived
materials in gelatin—Real time PCR method



GB/T 25165—2010

版权专有 侵权必究

*

书号:155066·1-40627

定价: 14.00 元

2010-09-26 发布

2011-05-01 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
明胶中牛、羊、猪源性成分的定性检测方法
实时荧光 PCR 法
GB/T 25165—2010

*

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 7 千字
2010年11月第一版 2010年11月第一次印刷

*

书号: 155066·1-40627 定价 14.00 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

10 检验步骤

10.1 DNA 提取

称取样品 500 mg 于 50 mL 离心管中,加入 5 mL 裂解液,室温过夜后置于 65 °C 恒温箱中温育 1 h~2 h,取出后迅速加入与裂解液等体积的室温酚-三氯甲烷-异戊醇(25:24:1)(注意:如果样品因温度下降凝固而无法获得上清,可将样品再次放入 65 °C 恒温箱中使其重新液化),颠倒混匀,室温下 12 000g 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 000g 离心 10 min,转移上清至另一灭菌的离心管中,加入 0.8 倍异丙醇或 2 倍体积的预冷无水乙醇混匀,-20 °C 放置 0.5 h~1 h,4 °C 下 12 000g 离心 10 min~15 min,弃上清,用 70%乙醇洗涤沉淀一次,4 °C 下 12 000g 离心 10 min,弃上清,室温下晾干。加入 50 μL 双蒸水,溶解沉淀,-20 °C 保存。

也可用等效 DNA 提取试剂盒提取模板 DNA。

DNA 提取过程中以水代替样品设置提取空白对照,并置于每个提取系列中的最后。

10.2 实时荧光 PCR 扩增

反应体系的体积为 25 μL,体系组成见表 2。

表 2 实时荧光 PCR 检测反应体系组成

试剂名称	贮备液浓度	加入 PCR 反应体系的体积/μL
反应混合液	—	12.5
5'端引物	10 μmol/L	1
3'端引物	10 μmol/L	1
探针	10 μmol/L	1
模板	—	5
双蒸水	—	补足至总体积为 25

实时荧光 PCR 反应条件随仪器不同略有改变,一般为:50 °C 2min;95 °C 10 min;95 °C 15 s,60 °C 1 min 45 个循环。

检测过程中分别设阳性对照、阴性对照和提取空白对照。用分别含牛、羊、猪成分的样品作阳性对照,用不含牛、羊、猪成分的样品作阴性对照。

样品设 3 个重复,对照设 2 个重复,以 Ct 平均值作为最终结果。

11 结果判定

11.1 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。

11.2 DNA 提取有效性判定

在同时进行的阴性、阳性、空白对照实验结果正常的情况下,被检测样品应有 FAM 荧光信号检出,且 FAM 通道出现明显的扩增曲线,Ct 值≤40.0。

否则 DNA 提取无效,应重新提取 DNA,直至 Ct 值≤40.0。

11.3 检测结果判定

在符合 11.1 和 11.2 的情况下,使用牛、羊、猪特异性引物和探针对被检样品进行检测:

表 1 检测用引物和探针

名称	序列	目的基因
内参照 5'端引物 内参照 3'端引物 内参照探针	5'-CCTGAGAAACGGCTACCAT-3' 5'-CGTGTTCAGGATTGGGTAAT-3' 5'-(FAM)-TGCGCGCCTGCTGCCTTCCT-(TAMRA)-3'	真核生物 18SrRNA 基因
牛 5'端引物 牛 3'端引物 牛探针	5'-CCGATGGATGTGTTTCAGAGCT-3' 5'-GCCAAATGTCTGGGTGTAGATACC-3' 5'-(FAM)-TGGGCTTTAGGGCTTCCGAATGTGAA-(TAMRA)-3'	生长激素基因
羊 5'端引物 羊 3'端引物 羊探针	5'-ACACAACCTTCTACCACAACCC-3' 5'-AAACAATGAGGGTAACGAGGG-3' 5'-(FAM)-ACACCGAAACAAAATACTCCTTGAGAAACA-(TAMRA)-3'	线粒体细胞色素 b 基因
猪 5'端引物 猪 3'端引物 猪探针	5'-TTTGTGCATGACTGCGTCAAC-3' 5'-CTTGGTGGTCGTGGTCACTGT-3' 5'-(FAM)-CACCGTCAAGCAGC-(NFQ)(MGB)-3'	肌蛋白基因

6 试剂

苯酚(Tris 饱和酚,pH8.0)、三氯甲烷、异戊醇、无水乙醇、异丙醇、70%乙醇。

除另有规定外,所有试剂均为分析纯。实验用水符合 GB/T 6682 中二级水的要求。

7 配制溶液

7.1 裂解液

成分包括:2%(质量浓度)CTAB(cetyltrimethylammonium bromide,十六烷基三甲基溴化铵),100 mmol/L Tris(tris hydroxymethyl aminomethane,三羟甲基氨基甲烷),1.4 mol/L NaCl,20 mmol/L EDTA(ethylene diaminetetraacetic acid,乙二胺四乙酸),用 HCl 调至 pH8.0。

7.2 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~4.0 mmol/L 的 Mg²⁺、0.2 U~1 U 的 UNG 酶、0.2 mmol/L 的 d(A,C,G)TPs、0.2 mmol/L~0.4 mmol/L dUTP、400 nmol/L ROX 染料(某些荧光 PCR 仪不需要 ROX 校正)。

8 仪器设备

8.1 实时荧光 PCR 仪。

8.2 恒温水浴锅。

8.3 离心机:离心力不小于 3 000g。

8.4 微量移液器:0.5 μL~10 μL,10 μL~100 μL,20 μL~200 μL,200 μL~1 000 μL。

8.5 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。

8.6 pH 计。

8.7 天平:感量 0.01 g。

9 样品采集

按照 GB 6783 对食用明胶采样,按照 GB/T 14699.1 对饲料明胶采样,将实验样品粉碎,充分混合均匀后待用。

前 言

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国畜牧业标准化技术委员会归口。

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:陈颖、吴亚君、袁飞、王晶、徐宝梁、张舒亚、杨海荣、王斌、赵勇胜。