

表 3 结果的判定情况

FAM 荧光	HEX 荧光	结果判定情况
+	+	同时进行的阴性、阳性、空白对照实验结果正常,检测实际样品时,如果有 FAM 荧光和 HEX 荧光检出,且 Ct 值 \leq 35,判定为含有兔源性成分;如果 Ct 值 $>$ 35,可视为不含有兔源性成分。
+	-	同时进行的阴性、阳性、空白对照实验结果正常,检测实际样品时,HEX 荧光信号未检出,Ct 值 $>$ 35(如果检测样品浓度高会抑制内参照 DNA 的扩增);如果有 FAM 荧光检出,且 Ct 值 \leq 35,判定为含有兔源性成分;如果 FAM 荧光 Ct 值 $>$ 35,可视为不含有兔源性成分。
-	+	同时进行的阴性、阳性、空白对照实验结果正常,检测实际样品时有 HEX 荧光检出,无 FAM 荧光检出,判定为不含有兔源性成分。
-	-	PCR 反应失败。注意以下几个方面后再次进行反应。 ① 如果同时进行的阳性对照实验结果正常,则可能是样品 DNA 制备有问题,如样品中可能存在 PCR 反应的抑制物等。 ② 如果同时进行的阳性对照实验结果不正常,则可能是实验操作失败或试剂失活。

9.3 结果表述

检出兔源性成分。

未检出兔源性成分。

10 检测过程中防止交叉污染的措施

按照 SN/T 1193 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。

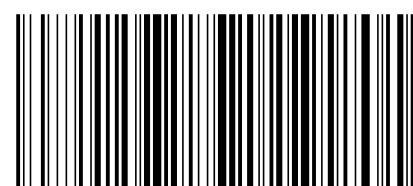


中华人民共和国国家标准

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

Identification of rabbit derived materials in animal-originated feedstuffs—
Real time PCR method



GB/T 21102-2007

版权专有 侵权必究

*

书号:155066·1-30290

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
动物源性饲料中兔源性成分定性
检测方法 实时荧光 PCR 方法

GB/T 21102—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 9 千字

2007年12月第一版 2007年12月第一次印刷

*

书号: 155066·1-30290 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 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,每隔 10 min 振荡混匀;12 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液至一新离心管中,加 400 μL 三氯甲烷+异戊醇(24+1),充分混匀;12 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液至一新离心管中,加 0.8 倍体积异丙醇,室温下沉淀 1 h~2 h;12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液;70%乙醇洗涤一次,晾干;加入 50 μL TE,溶解沉淀。

也可用等效的 DNA 提取试剂盒提取模板 DNA。

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 实时荧光 PCR 检测

8.3.1 反应体系的体积为 25 μL,2×兔源性检测预混合液加 12.5 μL,兔源性检测引物混合液和兔源性检测探针混合液各加 1 μL,样品 DNA(1 ng/μL~100 ng/μL)1μL,加双蒸水至 25 μL。

8.3.2 在各实时荧光 PCR 反应管中加入上述试剂后,盖紧管,离心 5s~10s。

8.3.3 将离心后的实时荧光 PCR 反应管放入实时荧光 PCR 检测系统内,记录样本摆放顺序。

8.3.4 实时荧光 PCR 反应参数可根据基因扩增仪型号的不同进行适当的调整。一般的反应程序为:95℃ 10s,1 个循环;95℃ 5s,60℃ 30s,40 个循环,在每次循环的退火时收集荧光。

8.3.5 检测结束后,根据扩增曲线和 Ct 值判定结果。

8.3.6 检测过程中分别设阳性对照、阴性对照和空白对照。用已知含兔源性成分的样品作阳性对照,用已知不含兔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。

注:也可用等效的兔源性成分实时荧光 PCR 检测试剂盒进行实时荧光 PCR 检测。

9 结果判断与表述

9.1 结果分析条件设定

直接读取检测结果。阈值设定原则根据仪器噪声情况进行调整。

9.2 结果判定

9.2.1 对照结果

空白对照:无 FAM 荧光信号检出。有 HEX 荧光信号检出,Ct 值应<35.0。

阴性对照:无 FAM 荧光信号检出。有 HEX 荧光信号检出,Ct 值应<35.0。

阳性对照:有 FAM 和 HEX 荧光信号检出。且 FAM 通道出现典型的扩增曲线,Ct 值<28.0。

否则,实验视为无效。

9.2.2 检测结果的判定

Ct 值≤35 为有效值,Ct 值>35 为无效值(详见表 3)。

- 5.1.2 异戊醇。
- 5.1.3 异丙醇。
- 5.1.4 70%乙醇。
- 5.1.5 裂解液:1% CTAB(cetyltrimethylammonium bromide,十六烷基三甲基溴化铵), 0.05 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)[Tris -:tris (hydroxymethyl) aminomethane,三(羟甲基)氨基甲烷], 0.7 mol/L NaCl, 0.01 mol/L EDTA (pH8.0)(ethylene diaminetetraacetic acid,乙二胺四乙酸)。
- 5.1.6 TE 缓冲液(Tris-HCl、EDTA 缓冲液):10 mmol/L Tris-HCl (pH8.0),1 mmol/L EDTA (pH8.0)。

5.2 实时荧光 PCR 兔 DNA 检测试剂盒

- 5.2.1 2×兔源性检测预混合液:含有 Ex Taq HS(终浓度 1.25 U/25 μL)、dNTPs(终浓度各 0.4 mmol/L)、Mg²⁺(终浓度 3 mmol/L)。
- 5.2.2 兔源性检测引物混合液:含有扩增兔基因组 DNA 及内参照的引物(序列详见表 1)、内参照(λ DNA)。各引物终浓度 0.1 μmol/L~1.0 μmol/L。

表 1 兔及内参照引物序列

名称	序列
兔 5'-引物	5'-TAATCGTCACCGCACATGCC-3'
兔 3'-引物	5'-CTATGTCAGGAGCCCAATTATCA-3'
内参照 5'-引物	5'-GGCTGATTGACCGGCAGATTA-3'
内参照 3'-引物	5'-GCGGGTATAGGTTTTATTGATGGC-3'

- 5.2.3 兔源性检测探针混合液:检测兔基因组 DNA 的探针及检测内参照的探针(序列详见表 2)。探针浓度与使用的实时荧光 PCR 扩增仪、荧光标记物质种类有关,实际使用时请参照仪器说明书,或各荧光探针的具体使用要求进行。

表 2 兔及内参照探针序列

名称	序列
兔探针	5'(FAM)-ACAAGCCAGTTCCTCCGAAGCCTCCA -3'(Eclipse)
内参照探针	5'(HEX)-CCGCCACGACGATGAACAGACGCT -3'(Eclipse)

- 5.2.4 阳性对照:用已知含哺乳动物源性成分样品作阳性对照。
- 5.2.5 双蒸水。

6 仪器设备

- 6.1 实时荧光 PCR 检测系统。
- 6.2 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。
- 6.3 电子天平:感量 0.01 g。
- 6.4 离心机:离心力 12 000 g。
- 6.5 微量移液器:0.5 μL~10 μL,10 μL~100 μL,10 μL~200 μL,100 μL~1 000 μL。
- 6.6 实时荧光 PCR 反应管。
- 6.7 恒温水浴箱。

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。

前 言

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。

本标准主要起草单位:中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局、宝生物工程(大连)有限公司、中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国山东出入境检验检疫局、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、中华人民共和国上海出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:郑秋月、李晶泉、王玉萍、徐昊、曹际娟、于爱丽、张舒亚、陈颖、徐宝梁、高宏伟、宗卉、金东权。

本标准首次发布。