

《常见动物源性成分快速测定 膜芯片法》

国家标准征求意见稿

编制说明

标准起草小组

二〇一七年七月六日

目 录

1. 概况
 - 1.1 任务来源
 - 1.2 标准起草单位
 - 1.3 工作概况
2. 背景及研究现状
 - 2.1 动物源成分检测研究概况
 - 2.2 主要检测方法
 - 2.3 膜芯片的来源与检测原理
- 3.标准编制原则
- 4.标准编制依据
- 5.标准制定过程
 - 5.1 标准基本框架及预研
 - 5.2 提交标准草案
 - 5.3 国家标准立项
 - 5.4 国家标准验证
 - 5.5 形成标准征求意见稿
6. 实验过程及参数确定
 - 6.1 动物源性成分检测膜芯片点阵
 - 6.2 PCR 反应使用的引物序列
 - 6.3 目标基因探针序列
 - 6.4 多重 PCR 反应体系
 - 6.5 PCR 反应参数
 - 6.6 膜芯片杂交
 - 6.6.1 杂交体系配制
 - 6.6.2 酶孵育体系配制
 - 6.6.3 膜芯片杂交
 - 6.6.3.1 手动杂交

6.6.3.2 自动杂交

6.7 膜芯片的结果判读

7.方法效果实验评估

7.1 特异性评估

7.2 可重复性和可再现性评估

7.3 灵敏度评估

7.4 稳定性评估

7.5 实际样品测试

7.6 验证

7.6.1 验证单位

7.6.2 验证结果

7.6.2.1 假阴性和假阳性结果测试

7.6.2.2 灵敏度和重复性结果测试

8.结论

8.1 验证结论

8.2 验证样本

《常见动物源性成分快速测定 膜芯片法》国家标准征求意见稿

编制说明

1.概况

1.1 任务来源

本国家标准的制定是根据国家标准化管理委员会：《关于下达 2017 年第一批国家标准制修订计划的通知》的通知：项目名称：“常见动物源性成分快速测定膜芯片法”，项目编号：20170498-T-424，计划执行日期为：2017-2018 年。

1.2 标准起草组

本标准起草单位包括中国标准化研究院、四川华汉三创生物科技公司、山东省食品药品检验研究院、安徽省食品药品检验研究院、安徽出入境检验检疫局、滨州市食品药品检验检测中心、成都市食品药品检验研究院、江西省食品药品检验研究院、上海市兽药饲料检测所等。

1.3 标准概况

在动物源性成分的测定中，已制定一系列国家标准:GB/T25165-2010 明胶中牛、羊、猪源性成分定性检测方法实时荧光 PCR 法；GB/T21101-2007 动物源性饲料中猪源性成分定性检测方法 PCR 法。基于核酸的检测方法和基于蛋白的检测方法是目前检测动物源成分的两种主要方法。传统的 PCR 方法存在检测效率低、假阳性高、易污染、成本高的缺点，很难满足批量大、高效快速的检验要求。而荧光 PCR 虽然检测速度较快，但是每次反应只能检测 1-3 种指标，指标较少，对于盲样检测，检测成本较高。相对于现行标准中公布的检测技术，膜芯片方法可以在进行多指标并行检测的同时，实现快速、灵敏、方便、成本低、准确、高通量、自动化、低假阳性和可视化的动物源成分测定。

在制定本标准时参阅了国内外 DNA 的提取技术、样品制备及相关的国家标准、应用及测定有关的技术文献和分析方法，确定本方法的基本原理和试验技术流程。

2.背景及研究现状

2.1 动物源成分检测研究概况

我国是禽畜产品生产和消费大国。食品及饲料中动物源性成分的检测关系食

品安全和畜牧业安全。近年来，市场上屡次出现不法分子在肉制品中掺杂掺假现象，更有甚者使用腐烂变质进行掺假，严重损害消费者权益甚至会影响食品安全。同时，在畜牧业生产中，为防止疯牛病发生，我国也出台相关法律禁止在反刍动物饲料中添加动物源性成分，因而，饲料中动物源性成分的检测也是防止疯牛病有效环节。目前国内外对于动物源性成分的检测报道主要有显微镜检法、红外光谱法、ELISA、普通 PCR、荧光定量 PCR 等方法，这些技术一般每次仅能检测一种或两种指标，无法同时分析检测食品中所涉及的多种动物源性成分，这些方法不能很好满足快速、大规模、高通量检测的需求。而基因芯片技术目前绝大多数还处于实验室阶段，更多的用于基础性研究。目前基因芯片法一般采用玻璃片作为固相支持物，实验过程需要相应的点样仪和芯片识读仪，成本较高。因此研发一种快速、方便、灵敏度高、成本低、可视化和高通量的检测方法将具有非常好的应用前景及市场推广力。本方法根据市场中常见禽畜产品中主要动物源性成分（包括猪、黄牛、羊、鸡、鸭、兔、驴、貂、狐、鼠、牦牛等）中的线粒体/核基因组基因物种特异性片段设计制成特异多重 PCR 引物和杂交探针，将 PCR 产物与膜芯片上固定排列的探针进行杂交，可一次性对样品的中多种动物源性成分进行筛检，单次反应检测基因的数量将得到很大提高，能克服动物源性成分检测的核心问题，极大地降低检测成本和工作量，提高检测效率和准确性。其技术优势如下：1) 操作简单，经过一次样本前处理，单管 PCR 扩增，单芯片杂交就可以同步检测样本中多种动物源性成分，具有平行分析和多重判断的特点；2) 检验对象完备，包含了当前市面上常见、常检的动物源性成分检测指标，并且可以很方便的加入新的检测指标；3) 系统在多重 PCR 扩增过程同时进行了非对称 PCR 扩增，提高了系统的灵敏度和准确性；4) 试剂盒采用了可视化膜芯片的检测方式，提高了系统的检测通量，并且检测结果可以直接用肉眼判断，方便，快捷；5) 试剂盒操作简单，经济，无需特殊的昂贵仪器，适用于食品中动物源性成分的大规模检测。

2.2 主要检测方法

近年来，食品安全问题层出不穷，食品及加工产品也出现掺假掺杂现象，尤其是牛羊肉中，经常被曝光其中掺杂了一些猪肉、鸭肉甚至狐狸肉、老鼠肉等，涉嫌虚假宣传欺诈消费者和侵犯消费者的合法权益，降低食品安全的公众信誉，

造成不良社会影响。与此同时，在国际贸易进出口贸易中，由疯牛病导致的畜牧业安全隐患依然存在。农业部发布的通知《关于禁止在反刍动物饲料中添加和使用动物源性饲料的通知》等均对饲料中动物源性成分进行强制要求，为更好保证食品安全和我国畜牧业安全生产，食品及饲料中动物源性成分检测涉及到生产、运输、销售以及加工等各环节。膜芯片技术因具有快速、便捷、高效、大规模、高通量、自动化等特点，已广泛应用于疾病诊断和治疗、食品安全监测、农作物育种、环境污染检测等与国民生活息息相关的领域，显示出了广阔的商业前景。膜芯片技术的飞速发展和应用为动物源成分的高通量检测提供了有效检测手段。食品及饲料中动物源性成分检测膜芯片的研制和检测标准化将为食品安全的有效监管提供可靠依据。

目前，动物源性成分检测主要包括基于蛋白的检测方法和基于核酸的检测方法。酶联免疫吸附法（ELISA）、免疫试纸条和 Western 杂交等方法是目前主要的基于蛋白的检测方法，其共同特点是需要通过一定的处理步骤从样品中释放出目标蛋白（抗原），然后利用抗体特异性的结合抗原蛋白，最后通过酶标或金属标偶联抗体与抗原抗体复合物结合，从而产生可检测的信号，该类方法的优点是检测速度快，缺点是检测灵敏度相对较低，并且需要制备高特异性抗体，同时检测受到多种因素的影响，容易出现假阳性。而基于核酸的检测方法是目前最普遍、最准确的检测技术，检测方法主要包括 PCR（聚合酶链式反应）技术和基于分子杂交的基因芯片技术。目前仍以 PCR 技术应用最为广泛，其常用的技术方法包括普通定性 PCR、巢式 PCR、多重 PCR、荧光定量 PCR 等方法。普通定性 PCR 方法检测效率低，尤其检测多指标样本时更加费时费力；巢式 PCR 引物设计难度较高，可以显著的提高检测灵敏度，但单次也仅能检测一个指标，同时还存在假阳性率高的缺点；多重 PCR 方法可以在一个反应中同时检测多个基因，实现多指标的并行检测，但常规的电泳检测结果很难判断，容易出现假阳性和假阴性结果；荧光定量 PCR 方法灵敏度高，但其成本高，并行检测的指标少，并且需要特殊检测仪器。基因芯片法目前一般采用玻璃片作为固相支持物，杂交点荧光强度作为读出信号，其操作相对复杂，检测成本高，实验过程需要相应的特殊仪器，如点样仪和激光共聚焦检测系统等。

因此目前需要开发一种快速、方便、灵敏、成本低、可视化、自动化和高通量的动物源检测技术。

2.3 膜芯片的来源与检测原理

膜芯片检测方法是分子杂交技术发展的产物，1992，E.H.Fiss 等人首先用反向斑点杂交膜芯片的方法检测分枝杆菌（*J Clin Microbiol.* 1992 May; 30(5): 1220–1224.），此后膜芯片检测技术逐步发展起来。膜芯片技术是利用反向斑点杂交原理，将一组寡核苷酸探针顺序排列于支持膜表面的特殊区域，形成低密度膜芯片探针阵列。待测样本同膜芯片杂交后经底物显色可形成肉眼可视化的检测结果。膜芯片检测流程一般包括样本处理、核酸提取、多重 PCR 扩增和反向斑点杂交，其中多重 PCR 扩增和反向斑点杂交是关键步骤。

多重 PCR 扩增技术原理是将多对引物放到同一个反应管中进行 PCR 扩增，达到同时扩增 2 种或两种以上目标 DNA 序列的目的。其技术特点是：一、高效性：在同一 PCR 反应管内同时扩增多种目的片段；二、经济简便性：多种目标物在同一反应管内同时扩增，将大大的节省时间，节省试剂，节约经费开支，提高整个检测过程的效率。

反向斑点杂交技术基于分子杂交原理，将一组针对特定目标 DNA 的单链寡核苷酸探针顺序排列于支持膜表面的特定区域，然后支持膜上的探针与待测的多重 PCR 产物杂交，未结合的 DNA 样品经洗涤去除。因待测 PCR 产物的 DNA 上带有分子标记（如生物素等），所以结合了待测 DNA 的探针点偶联上了分子标记物，再经相应的显色反应就能读取对应的杂交信号。由于支持膜上可以同时固定多个探针，多重 PCR 反应亦能同时扩增多个靶标基因，因此基于多重 PCR 反应的膜芯片技术具有较高的通量，可在单个实验中同时检测多个指标，且结果可靠。整个实验仅用到普通 PCR 反应试剂，硝酸纤维素膜或尼龙膜，外加少量人工合成的基因探针，再结合上自动的膜芯片杂交仪器，整个系统实现了准确、快速、低成本和自动化。其技术特点是：（1）高效性，可以并行多指标检测；（2）经济简便性，试剂和设备成本低，操作简单，快速且可视化；（3）通量高，可同时检测多个样本。

2.4 膜芯片的应用

自 1992 E.H.Fiss 等人首先利用膜芯片检测分枝杆菌以来，膜芯片技术已被

应用到生物科学众多的领域之中。这些应用主要包括病原体快速核酸检测、病原体耐药性突变位点快速核酸检测、遗传疾病基因快速核酸检测、基因分型检测、食源性有害微生物快速核酸检测、环境微生物检测、物种快速分类检测等方面。在医疗卫生、农业、畜牧业、环境检测、食品卫生监督、司法鉴定等领域有着广泛的应用。

在现代农业中，膜芯片技术可以被用于农作物的品种鉴定，寻找高产量、抗病虫、抗干旱、抗冷冻的种子资源，也可以用于商品检验检疫、转基因成分测定等领域。目前该领域的应用尚待开发。

3.标准制定原则

目前动物源性成分检测主要采用的是基于核酸的检测方法，具体包括普通定性 PCR、巢式 PCR、多重 PCR、荧光定量 PCR、基因芯片等方法。与传统方法相比，膜芯片方法通过样本处理、核酸抽提、多重 PCR 扩增、膜芯片反向斑点杂交等实验过程，当天可获得检测结果，大大缩短了检测周期。在检测项目方面，一张膜基因芯片可以同时多种靶基因并行检测，提高了检测通量。在检测结果判别方面，即可以进行肉眼可视化的结果判读，也可以配置芯片识读仪，自动扫描记录检测结果。在检测效率方面，通过配置全自动膜芯片检测仪，可以实现同时对多个样本的全自动高通量检测，一次实验即可得出全部结果，比传统方法简便、快捷、更节省人力。

使用膜芯片检测动物源成分的方法，还在起步当中。因膜芯片法具有灵敏度高、通量大、快速准确等特点，因此，本标准方法的制定，对于膜芯片方法的推广，提高检验检疫工作效率，推动我国对外经济贸易的发展具有重要意义。采用膜芯片法来制定成分的测定方法，可为实际工作带来很大便利，单个膜芯片可以实现一个样品中多个基因成分的检测，另外，自动化的杂交仪器还大大减少了操作人员的工作量并避免了实验的人为误差，方便、快捷、准确。因膜芯片法具有快速、简便、成本低、灵敏度高、假阳性率低、高通量、自动化等特点，因此，本标准方法的制定，对于膜芯片方法的推广，提高检验工作效率，推动我国对外经济贸易的发展具有重要意义。采用膜芯片法来制定动物源性成分的测定方法，在实际工作中具有很大的意义，同时对开发快速高通量多指标检测的方法具有广泛应用。

4.标准制定依据

本方法主要参考和借鉴国内外动物源性成分检测参考论文中发表的大量引物及探针序列，同时比对不同物种线粒体上基因，通过实验条件优化，最终筛选到一套适用于膜芯片杂交体系的引物及探针，将十一种动物源性成分物种特异性探针固定在同一张膜上，通过一次 PCR 反应即可同时筛检十一种动物源性成分，经过大量实验验证，其结果稳定，数据准确可靠，具有很好的市场前景，因而申请作为国家标准方法，规范方法标准操作，有利于该方法的进行推广应用。

5.标准编制过程

5.1 标准基本框架及预研

2016 年 1 月至 2016 年 7 月，标准起草单位组织相关技术人员，在充分调研当前动物源性成分筛检技术，结合我国现阶段在实际应用中遇到的问题，并综合现有标准和项目的研究成果的基础上，对“常见动物源性成分快速测定-膜芯片法”项目进行了预研，确定了技术路线、测定方法，完成了方法和样品的预试验。

5.2 提交标准建议草案

2016 年 8 月-9 月标准主要起草单位讨论形成国家标准建议草案，并通过了国标委组织的 2016 年第六次推荐性国家标准立项评估。

5.3 国家标准立项

2017 年 5 月 15 日国家标准委《国家标准委关于下达 2017 年第一批国家标准制修订计划的通知》立项，项目名称：“常见动物源性成分快速测定 膜芯片法”，项目编号为：20170498-T-424。

5.4 国家标准验证

2017 年 6 月起草组委托 9 家第三方检测实验室进行方法标准的特异性、灵敏度、可重复性和再现性、稳定性和可操作性等开展了独立验证。由国标研制组统一提供测试样本，总共 48 份 DNA 样本。在验证的基础上，进一步修改完善方法指标和参数。

5.5 形成标准征求意见稿

起草组先后组织召开了 2 次研讨会，对标准草案内容进行反复讨论，特别针对膜芯片法筛检的核心技术内容进行讨论并形成统一意见，同时邀请相关领域专家审阅标准草案，在反复优化的基础上，形成了征求意见稿。

6.实验过程及参数确定

按照草案中的“试验方法”对已知物种核酸提取 DNA 后，对核酸进行质量测定。针对 11 种物种特异性基因片段和 1 个内参基因设计引物以及探针，对基因组 DNA 进行多重 PCR 扩增及杂交检测。将扩增产物与固定有 11 种目标基因特异性探针的膜芯片进行反向斑点杂交，检测结果可以用肉眼直接判断，也可以用膜芯片识读仪对杂交芯片进行扫描并判定结果。

6.1 动物源性成分检测膜芯片点阵

采用微量喷点式膜芯片点样仪，将各个核苷酸探针分布在尼龙膜芯片上的特定位置区域。

点阵示意图分别列于图 1。

杂交阳性对照：PC，监测芯片杂交过程是否正常。

内参：指膜芯片上用来质控 PCR 扩增过程是否正常的对照，使用与动物特异性核基因扩增片段互补的一段寡核苷酸作为探针。

阴性对照：NC，指膜芯片上用来质控探针杂交特异性的对照。一般使用一段与靶标分子序列相近或无关的寡核苷酸作为探针。

内参	猪	黄牛	羊
鸡	兔	驴	貂
狐	鼠	牦牛	鸭
空白	空白	PC	NC

图 1 芯片点阵图

6.2 PCR 反应使用的引物序列

表 1 引物序列

物种	目标基因	引物名称	序列	扩增片段大小 (bp)
内参	18SrRN	Forward	5'- AGCCTGAGAAACGGCTACC -3'	180

	A	Reverse	5'-biotin- TGCTGGCACCAGACTTGC -3'	
猪	COX I	Forward	5'-ACCGTAGGAATAGACGTG -3'	154
		Reverse	5'-biotin- TGAAGCCCAGAGCTCATAG -3'	
黄牛	COX I	Forward	5'- TTACAACAATTATCAACATAA -3'	174
		Reverse	5'-biotin- CCGGGTCTGAAGAAGGTTGTA -3'	
羊	Cytb	Forward	5'- GGCCTATACTATGGATCATATAC -3'	159
		Reverse	5'-biotin- AATTGCTGAAAGGAGGTTGGT -3'	
鸡	Cytb	Forward	5'- CCACCTCACCTTCCTACAC -3'	77
		Reverse	5'-biotin- GAAATGGAATTTTGTC A -3'	
鸭	ATPase 6	Forward	5'- ACAGAAGGAAACCGAA -3'	112
		Reverse	5'-biotin- TCCGATGATCACGTGGAGTCC -3'	
兔	Cytb	Forward	5'-GAAACTGGCTCCAACAAC -3'	96
		Reverse	5'-biotin-AAGGAAACCTAGGGTGTCTT TG -3'	
驴	Cytb	Forward	5'-TACGCTCCATTCCCAACAAA -3'	134
		Reverse	5'-biotin-TTTTGACATGTGTAGGGTAGG G -3'	
貂	Cytb	Forward	5'-GTCATCTCAGCACTAGCAG -3'	107
		Reverse	5'-biotin-TAGGGGTGAAAGGGGATTT -3'	
狐	ATPase6	Forward	5'-TTTGCCCACTGATTCCCCTT -3'	93
		Reverse	5'-biotin-CATGTTCACCCCTACGAATAT -3'	
鼠	Cytb	Forward	5'-ACATACGAAAAACACACC -3'	107
		Reverse	5'-biotin-TCCTAGAAGGGACCCAA -3'	

牦牛	D-loop	Forward	5'-CTAACAACACACATCCCCAA-3'	175
		Reverse	5'-biotin-TTATGTACGATTAATAATT-3'	

6.3 目标基因探针序列

表 2 探针序列

名称	序列	修饰基团
18SrRNA	5'-TGCGCGCCTGCTGCCTTCCT-3'	5'-AminolinkerC6
猪	5'-GAGCATACTTTACATCTGCCACAATAATCATTGCTATTCCC-3'	5'-AminolinkerC6
黄牛	5'-AACCCCTCTATTCGTATGATCCG-3'	5'-AminolinkerC6
羊	5'-TGGATCATATACCTTCCTAGAAACATG-3'	5'-AminolinkerC6
鸡	5'-CCTAGGCATCTCATCCGACTC-3'	5'-AminolinkerC6
鸭	5'-ACCGCCCTACAAGCAATAGAGTACCATG-3'	5'-AminolinkerC6
兔	5'-ACAACCCACAGGAATTCCTTCAAAC-3'	5'-AminolinkerC6
驴	5'-GCCCTTATCCTTTCCATCTTAATCCTAG-3'	5'-AminolinkerC6
貂	5'-GGAATCCCATCTGATTCAGAC-3'	5'-AminolinkerC6
狐	5'-GGGCTACACCCTAAATGACACCTG-3'	5'-AminolinkerC6
鼠	5'-AAAATTATTAACCACTCAT-3'	5'-AminolinkerC6
牦牛	5'-CGGAGGAGAATGCTGTTGTTGTATCGGATGT-3	5'-AminolinkerC6
PC	5'-GCATCCAGATCAGAAGCAATAATGAGCAGTGCGAGAAGAACGAGTGTCCAAAGTACCAG-3'	5'-AminolinkerC6
NC	5'-GGTTCCTTGAGAAATGTTTTACGGGATTACTTCCATGTTTGTGGATGATCCTATTTTC-3'	5'-AminolinkerC6

注：阳性寡核苷酸单链 DNA (Positive-Oligo, 10 $\mu\text{mol/L}$): 核苷酸序列与阳性对照核酸探针 (PC) 序列互补, 用于膜芯片杂交过程质量控制, 5'端带生物素 (biotin) 标记, 序列如下: 5'-biotin-CTGGTACTTTGGACACTCGTTCTTCTCGCACTGCTCATTATTGCTTCTGATCTGGATGC-3'.

6.4 多重 PCR 反应体系

多重 PCR 反应体系如下所示:

Multiplex PCR Mix (多重 PCR 预混液)

25 μL

Multiplex PCR Primer Mix

5 μ L

内参基因	F	1 μ l(200 μ M)
内参基因	R	1 μ l(200 μ M)
猪	F	1 μ l(200 μ M)
猪	R	1 μ l(200 μ M)
黄牛	F	1 μ l(200 μ M)
黄牛	R	1 μ l(200 μ M)
羊	F	1 μ l(200 μ M)
羊	R	1 μ l(200 μ M)
鸡	F	1 μ l(200 μ M)
鸡	R	1 μ l(200 μ M)
兔	F	1 μ l(200 μ M)
兔	R	1 μ l(200 μ M)
驴	F	1 μ l(200 μ M)
驴	R	1 μ l(200 μ M)
貂	F	1 μ l(200 μ M)
貂	R	1 μ l(200 μ M)
狐	F	1 μ l(200 μ M)
狐	R	1 μ l(200 μ M)
鼠	F	1 μ l(200 μ M)
鼠	R	1 μ l(200 μ M)
牦牛	F	1 μ l(200 μ M)
牦牛	R	1 μ l(200 μ M)
鸭	F	1 μ l(200 μ M)
鸭	R	1 μ l(200 μ M)

加水定容至 50ul

基因组 DNA

200ng

ddH₂O

up to 50 μ L

6.5 PCR 反应参数

多重 PCR 反应参数列于表 3 中。

表 3.PCR 反应参数

步骤	温度	反应时间
1	37 °C	10 min
2	95 °C	10min
3	95 °C	30s
4	55 °C	30s
5	72 °C	15s
3、4、5 循环 35 次		
6	72 °C	10min
7 (推荐)	4°C	保温

6.6 膜芯片杂交

6.6.1 杂交体系配制

膜芯片杂交体系按照表4 配制。

表 4. 杂交体系

组 份	体 积 (μL)
杂交液 (2x SSPE, 0.1% SDS)	949
PCR 扩增产物	50
阳性寡核苷酸单链 DNA (Positive-Oligo, 10 μmol/L)	1
总体积	1000

6.6.2 酶孵育体系配制

按照表 5 配制酶孵育体系液，使用时重新配制。

表 5. 酶孵育体系

组 份	体 积 (μL)
孵育液 (2×SSPE, 0.5 % SDS)	999.5

碱性磷酸酶标记链霉亲和素 (AP-streptavidin)	0.5
总体积	1000

6.6.2 膜芯片杂交

6.6.2.1 手动杂交

将固定有核酸探针的膜芯片放入杂交盒内，芯片标签正面朝上，加入去活化液（2×SSPE, 0.1 % SDS）1 mL，37 °C 孵育8 min；加入去活化清洗液1 mL，60 °C，5 min；吸除去活化清洗液，加入杂交体系液1 mL，42 °C 水平摇床 90 rpm 孵育45 min；吸除杂交体系液，加入预热好的杂交清洗液（2×SSPE/0.5 % SDS）1 mL，52 °C 水平摇床 90 rpm，震荡清洗5 min，洗涤2次；吸除杂交清洗液，加入预热好的酶孵育液[Alkaline Phosphatase Streptavidin（碱性磷酸酶标记的链霉亲和素）1:2000 in 2×SSPE/0.5 % SDS] 1 mL，42 °C 水平摇床 90 rpm，震荡孵育30 min；吸除酶孵育液，加入预热好的孵育清洗液1（2×SSPE, 0.5 % SDS）1 mL，42 °C 水平摇床 90 rpm，震荡清洗5 min，洗涤2次；吸除孵育清洗液1，加入预热好的孵育清洗液2（2×SSPE）1 mL，37 °C 水平摇床 90 rpm，震荡清洗5 min，洗涤2次；吸除孵育清洗液2，加入显色液（BCIP/NBT，5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸和氯化硝基四氮唑兰）1 mL，室温静置显色 15 min，吸除显色液，加入去离子水1 mL 室温洗涤2次，待膜芯片干燥后进行结果判读。

6.6.2.2 自动杂交

按膜芯片自动杂交仪操作说明书开机，预热，之后将包装有膜芯片的杂交盒放入自动杂交仪中开始杂交过程，依次自动完成预处理、杂交、洗涤、酶孵育、显色等步骤，自动完成杂交过程。

具体过程如表 6 所示。

表 6. 自动杂交仪测定过程

程序名称	试剂名称	温度（°C）	时间（min）
去活化	去活化液	37	8
去活化清洗	去活化清洗液	60	5
杂交	杂交液	42	45

杂交清洗	杂交清洗液	52	5
杂交清洗	杂交清洗液	52	5
酶孵育	孵育液	42	30
孵育清洗 1	孵育清洗液 1	42	5
孵育清洗 1	孵育清洗液 1	42	5
孵育清洗 2	孵育清洗液 2	37	5
孵育清洗 2	孵育清洗液 2	37	5
显色	显色液	37	15
显色清洗	去离子水	37	5
显色清洗	去离子水	37	5
结果判读	根据杂交点显色情况进行结果判读		

6.7 膜芯片的结果判读

6.7.1 目测判读

显色后的膜芯片可以用肉眼直接判读检测结果。阳性杂交信号为肉眼明显可见的蓝色斑点。如果杂交点部位没有显色，和膜芯片背景相同，则判读为阴性杂交信号。

6.7.2 膜芯片识读仪判读

膜芯片显色后，使用芯片识读仪进行扫描分析。如果杂交点部位显色，则判读为阳性杂交信号。如果杂交点部位没有显色，和膜芯片背景相同，则判读为阴性杂交信号。

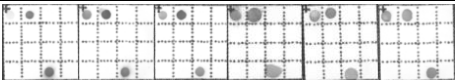
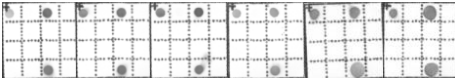
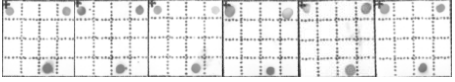
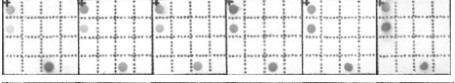
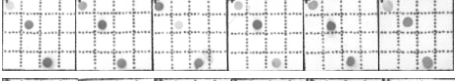

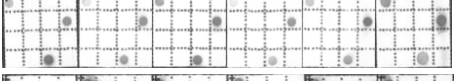
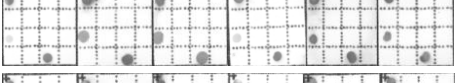
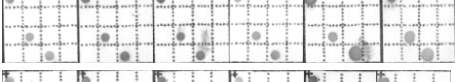
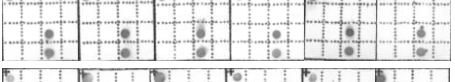
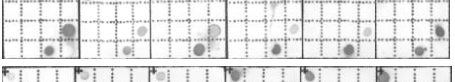
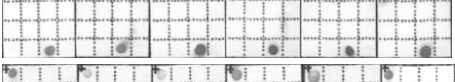
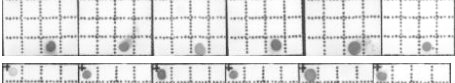
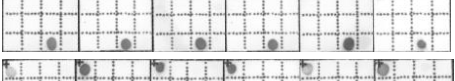
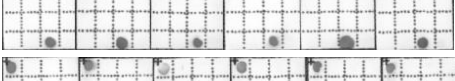
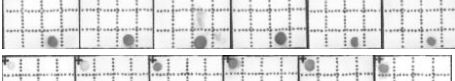
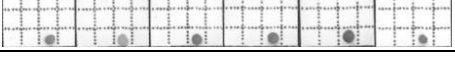
7.方法效果实验评估

7.1 特异性评估

取已知物种样品包括猪、黄牛、绵羊、山羊、鸡、鸭、兔、驴、貂、狐、鼠、牦牛、水牛、猫、貉、马、狗、鱼等 DNA，按照“试验方法”中所述检测样本中动物源性成分，每种样品重复测试 6 次。结果如图 2 所示。结果可见，各阳性杂交点显色清晰，无漏检、多检现象，6 次重复实验结果一致，说明方法具有良好的检测特异性。

结果见表 7。结果可见，动物源成分膜芯片检测结果准确，显示了良好的物种检测特异性。

表 7 膜芯片法特异性结果

样品	检测靶标	重复测试（6次重复）
猪	猪	
黄牛	黄牛	
羊	羊	
鸡	鸡	
兔	兔	
驴	驴	
貂	貂	
狐	狐	
鼠	鼠	
牦牛	牦牛	
鸭	鸭	
猫	无目标靶点	
貉	无目标靶点	
马	无目标靶点	
水牛	无目标靶点	
狗	无目标靶点	
鱼	无目标靶点	

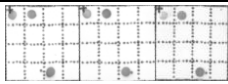
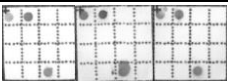
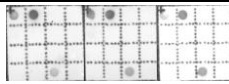
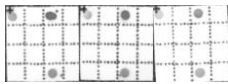
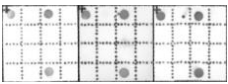
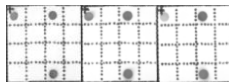
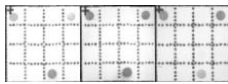
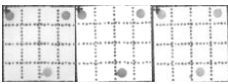

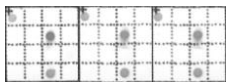
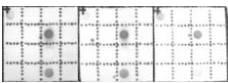
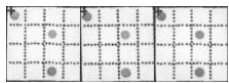
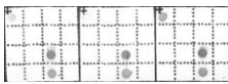
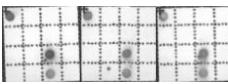
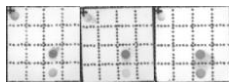
7.2 可重复性和可再现性评估

采用不同检测人员、不同批次检测试剂、不同检测场所，分三个批次测试膜

芯片法的可重复性和可再现性。检测样本采用猪、黄牛、羊、驴、牦牛五个样本，按照“试验方法”中所述检测样本中成分，单个批次中每种标准品重复测试 3 次。结果如表 8 所示。

结果可见，三个批次的重复实验结果一致，说明方法具有良好可重复性和可再现性。

表 8 膜芯片法可重复性和可再现性评估结果

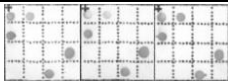
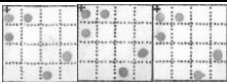
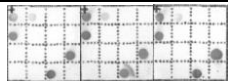
样品	检测靶标	测试一	测试二	测试三
猪	猪			
黄牛	黄牛			
羊	羊			
驴	驴			
牦牛	牦牛			

7.3 灵敏度评估

参照各国的标识制度评估膜芯片法的检测灵敏度。根据阈值范围选定三个值 5%、1%和 0.1%（质量分数）作为膜芯片法检测灵敏度的评估标准。检测样本按照“试验方法”中所述检测样本中成分，通过等比例鸡、鸭 DNA 对目标样本进行掺杂，分别制备为 5%、1%和 0.1%（质量分数）的各标准样品，每种标准品重复测试 3 次，结果如表 9 所示。结果可见，在 5%、1%和 0.1%三个评估标准下，检测符合度都良好。

为了进一步确认膜芯片法检测灵敏度，在 0.1 % 的评估标准下，每个样品重复检测 10 次，结果如表 10 所示。结果可见，检测符合度良好，说明方法灵敏度达到 0.1 %。

表 9 膜芯片法灵敏度评估结果（5%、1%和 0.1%评估标准）

样品	检测靶标	5% 掺假灵敏度	1% 掺假灵敏度	0.1% 掺假灵敏度
猪	猪			

黄牛	黄牛			
羊	羊			
兔	兔			
驴	驴			
貂	貂			
狐	狐			
鼠	鼠			
牦牛	牦牛			

表 10 膜芯片法灵敏度评估结果 (0.1% 评估标准)

样品	检测靶标	0.1% 掺假灵敏度
猪	猪	
黄牛	黄牛	
羊	羊	
兔	兔	
驴	驴	
貂	貂	
狐	狐	
鼠	鼠	
牦牛	牦牛	

7.4 稳定性评估


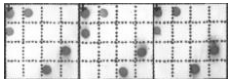
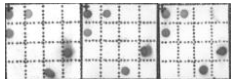
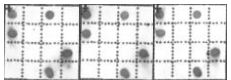
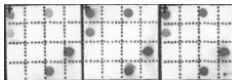
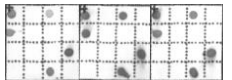
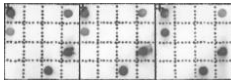
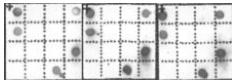
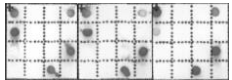
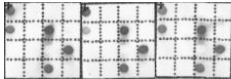
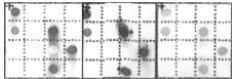
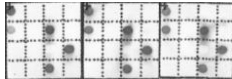
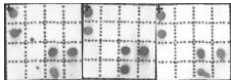

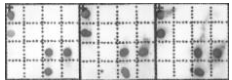
分别评估膜芯片法相关试剂的短期稳定性和长期稳定性。

短期稳定性评估：将多重 PCR 相关试剂置于 37 °C，碱性磷酸酶标记链霉亲和素 (AP-streptavidin) 和碱性磷酸酶化学显色液 NBT/BCIP 置于 4 °C，其他试剂

放于室温存放。分别在 0 天、7 天、14 天进行膜芯片检测，检测样本采用等比例鸡、鸭 DNA 对目标样本进行掺杂，分别制备为 0.1%猪、0.1%黄牛、0.1%羊、0.1%驴、0.1%牦牛标准品，按照“试验方法”中所述检测样本中动物源性成分，每种标准品重复测试 3 次。短期稳定性评估结果如表 11 所示。结果可见，试剂存放 14 天后检测信号无明显衰减，说明膜芯片法具有良好的短期稳定性。

长期稳定性评估：将多重 PCR 相关试剂分别置于 4 °C 和 -20 °C，碱性磷酸酶标记链霉亲和素 (AP-streptavidin) 和碱性磷酸酶化学显色液 NBT/BCIP 置于 4 °C，其他试剂放于室温存放。分别在 0 月、3 月、6 月进行膜芯片检测，检测样本采用等比例鸡、鸭 DNA 对目标样本进行掺杂，分别制备为 0.1%猪、0.1%黄牛、0.1%羊、0.1%驴、0.1%牦牛标准品，按照“试验方法”中所述检测样本中动物源性成分，每种标准品重复测试 3 次，检测样本动物源性成分长期 (4 °C) 稳定性评估结果如表 12 所示，动物源成分长期 (-20 °C) 稳定性评估结果如表 13 所示。结果可见，试剂存放 6 个月后检测信号无明显衰减，说明膜芯片法具有良好的长期稳定性。

表 11.膜芯片法短期稳定性评估结果

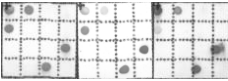
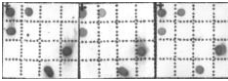
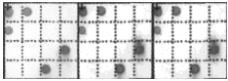
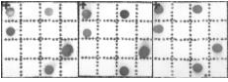
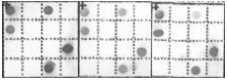
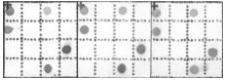
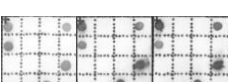
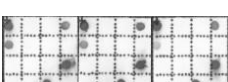
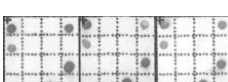
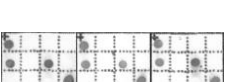
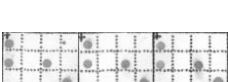
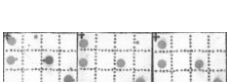



检测样本	靶标	0 天	7 天	14 天
0.1%猪	猪、鸡、鸭			
0.1%黄牛	黄牛、鸡、鸭			
0.1%羊	羊、鸡、鸭			
0.1%驴	驴、鸡、鸭			
0.1%牦牛	牦牛、鸡、鸭			

试剂

存放条件

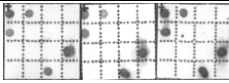
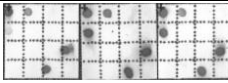
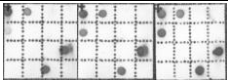
Multiplex PCR Reagent	37 °C
AP-streptavidin	4 °C
NBT/BCIP Substrates	4 °C
Other Reverse Dot-blot Reagent	Room Temperature

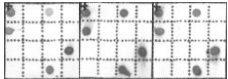
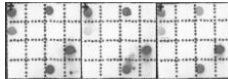
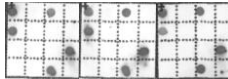
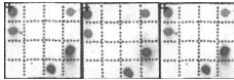
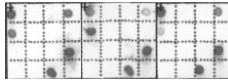
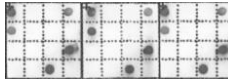
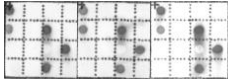
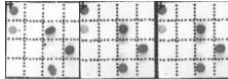
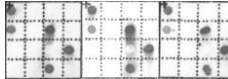
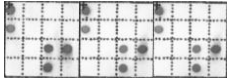
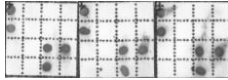
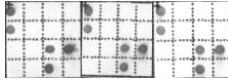
表 12 膜芯片长期稳定性评估 4 °C 结果

检测样本	靶标	0 月	3 月	6 月
0.1%猪	猪、鸡、鸭			
0.1%黄牛	黄牛、鸡、鸭			
0.1%羊	羊、鸡、鸭			
0.1%驴	驴、鸡、鸭			
0.1%牦牛	牦牛、鸡、鸭			

试剂	存放条件
Multiplex PCR Reagent	4 °C
AP-streptavidin	4 °C
NBT/BCIP Substrates	4 °C
Other Reverse Dot-blot Reagent	Room Temperature

表 13. 膜芯片法长期稳定性评估-20 °C 结果

检测样本	靶标	0 月	3 月	6 月
0.1%猪	猪、鸡、鸭			

0.1%黄牛	黄牛、鸡、鸭			
0.1%羊	羊、鸡、鸭			
0.1%驴	驴、鸡、鸭			
0.1%牦牛	牦牛、鸡、鸭			

试剂	存放条件
Multiplex PCR Reagent	-20 °C
AP-streptavidin	4 °C
NBT/BCIP Substrates	4 °C
Other Reverse Dot-blot Reagent	Room Temperature

7.5 实际样品测试

为了检验膜芯片法的实际应用效果,从市场上随机购买了 10 份肉制品及加工产品,包括两份火腿肠、三份牛肉干、两份驴肉、一份肉串、一份肉丸、一份卤肉,具体信息见表 14。

表 14 市场样本采集信息表

样品	产品类型	标签	采集地
样本 1	火腿肠	猪肉、鸡肉	山东济南
样本 2	鸡肉火腿肠	鸡肉	云南
样本 3	牛肉干	牛肉	四川成都
样本 4	牦牛肉干	牦牛肉	青海
样本 5	手撕牛肉干	牛肉	西藏
样本 6	驴肉火烧	驴肉	山东济南
样本 7	酱驴肉	驴肉	山东淄博
样本 8	羊肉串	羊肉	四川成都

样本 9	肉丸	猪肉	重庆
样本 10	卤肉	猪卤肉	四川成都

7.6 验证

为验证该国标方法的假阳性率、假阴性率、灵敏度、可重复性和可操作性等，起草组委托 9 家第三方检测实验室进行独立验证。由国标研制组统一提供测试样本，总共 48 份 DNA 样本。验证方法按照国标试验方法所述，进行 PCR 加样，膜芯片杂交等。

7.6.1 验证单位

9 家独立验证单位：

序号	单位名称
1	山东省农业科学院生物技术研究中心
2	山东省淡水渔业研究院（山东省淡水渔业检测中心水产品质检中心）
3	宁波检验检疫科学技术研究院
4	重庆出入境检验检疫局检验检疫技术中心
5	青海省食品检验研究院
6	安徽农业大学应用生物技术研究所
7	国家食品质量监督检验中心
8	国家农业标准化检测与研究中心（黑龙江）
9	甘肃省食品检验研究院

7.6.2 验证结果

7.6.2.1 假阴性和假阳性结果测试

取 20 个已知物种样本，包括 11 份阳性样本，9 份阴性样本，提取基因组 DNA 后，按照“试验方法”中所述进行试验操作。9 家验证单位的测试结果分别参见各单位提交的验证测试报告，膜基因芯片杂交结果图见各单位验证测试报告附录 A。

结果可见，9 家验证单位的测试结果一致，20 份样本中检测出成分阳性样 11

份阴性样本9份，阳性样本检出的成分与预先提供的已知成分符合率为100%，假阴性率为0；阴性样本未检出的动物源性成分，假阳性率为0。

7.6.2.2 灵敏度和重复性结果测试

取掺入比率分别为5%、1%和0.1%，在每个掺入比率下，对每个混合掺入样本重复测试6次，观察结果的重复性。9家验证单位的测试结果分别参见各单位提交的验证测试报告，膜基因芯片杂交结果图见各单位验证测试报告中附录A。

结果可见，9家验证单位的测试结果一致，阳性样本在5%、1%和0.1%掺入比下，6次重复测试均检测出阳性，并且检出的成分与预先提供的检测结果一致，重复性为100%，检测灵敏度达到0.1%。

8 结论

8.1 验证结论

通过技术论证和实样检测的结果显示，膜芯片法标准具有良好的特异性、可重复性、灵敏度和稳定性。膜芯片方法标准能够同时进行多样品、多项目检测，具有快速、灵敏、准确、高通量、低成本、可视化的特点，是目前传统方法所不具备的。通过技术论证和市场样本检测的结果显示，膜芯片法测定动物源成分具有良好的特异性、可重复性、灵敏度和稳定性。膜芯片法能够同时进行多样品、多项目检测，具有准确、快速、灵敏、方便、低成本、自动化、可视化、高通量的特点，是目前传统方法所不具备的。

8.2 验证样本

在方法学研究的过程中，针对不同地方品种样品的多样性，我们的验证样本同时收集来自山东、青海、四川、重庆、云南等地其它种类的地方样品：按照“试验方法”进行测定，可得到准确可靠的结果。

《常见动物源性成分快速测定 膜芯片法》标准起草组

二〇一七年七月六日