

ICS 67.120.10

X 71

备案号：

QB

中华人民共和国轻工行业标准

QB/T XXXX—XXXX

肉类罐头中牛、羊、猪、鸡、鸭源性成分检测方法

Detection of bovine, sheep, porcine, chicken and duck- derived materials in canned meat

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

征求意见稿

(本稿完成日期：)

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。

本标准由全国食品工业标准化技术委员会提出。

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归口。

本标准起草单位：。

本标准主要起草人：。

肉类罐头中牛、羊、猪、鸡、鸭源性成分检测方法

1 范围

本标准规定了肉类罐头中牛、羊、猪、鸡、鸭源性成分检测方法。

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，仅所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

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

- 3.1 PCR: polymerase chain reaction, 聚合酶链式反应。
- 3.2 DNA: deoxyribonucleic acid, 脱氧核糖核酸。
- 3.3 Taq: thermus aquaticu, 水生栖热菌。
- 3.4 dNTP: deoxy-ribonucleoside triphosphate, 脱氧核糖核苷三磷酸。
- 3.5 dATP: deoxy-adenosine triphosphate, 脱氧腺苷三磷酸。
- 3.6 dTTP: deoxy-thymidine triphosphate, 脱氧胸苷三磷酸。
- 3.7 dCTP: deoxy-cytidine triphosphate, 脱氧胞苷三磷酸。
- 3.8 dGTP: deoxy-guanosine triphosphate, 脱氧鸟苷三磷酸。
- 3.9 Tris: tris(hydroxymethyl) aminomethane, 三（羟甲基）氨基甲烷。
- 3.10 EDTA: ethylene diamine tetraacetic acid, 乙二胺四乙酸。
- 3.11 bp: base pair, 碱基对。

4 方法提要

通过提取肉类罐头样品中的总DNA，以提取的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，琼脂糖凝胶电泳检测是否出现预期目标片段以判定样品中是否含有相应动物源性成分，同时利用限制性内切酶反应或测序进行确证。

5 试剂和材料

- 5.1 dNTP: dATP、dTTP、dCTP、dGTP。
- 5.2 10×PCR 缓冲液: 含 Mg^{2+} 。
- 5.3 10×buffer。
- 5.4 TaqDNA 聚合酶。
- 5.5 氯仿。
- 5.6 异戊醇 (24:1, 体积比)。
- 5.7 异丙醇。
- 5.8 无水乙醇。
- 5.9 限制性内切酶: MnlI。
- 5.10 琼脂糖。
- 5.11 溴化乙锭或其他可替代的染料。
- 5.12 DNA 分子量标记:100bp。
- 5.13 6×loading buffer (上样液)。
- 5.14 TE 缓冲液: 10mmol/L Tris-HCl (pH=8.0)、1mmol/L EDTA (pH=8.0)。
- 5.15 1×TAE 缓冲液: 称取 242g Tris 碱, 吸取 57.1mL 冰乙酸, 加入 100mL 0.5mmol/L EDTA (pH=8.0), 用蒸馏水定容至 1000mL, 配制成 50×TAE 缓冲液, 室温保存, 使用时用蒸馏水稀释为 1×TAE 缓冲液。
- 5.16 异硫氰酸胍裂解液 [5mol/L GuSCN, 0.05mol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1.3% Triton-X 100, 0.02mol/L EDTA (pH 8.0)]。
- 5.17 琼脂糖凝胶: 称取 2.0g 琼脂糖于锥形瓶中, 加入 98.0mL 1×TAE 缓冲液, 加热溶解。
- 5.18 无菌 PCR 反应管。
- 5.19 无菌离心管: 1.5mL、2mL。

6 仪器和设备

- 6.1 超净工作台。
- 6.2 电子天平: 感量 0.1mg。
- 6.3 冷冻离心机。
- 6.4 恒温水浴锅。
- 6.5 PCR 扩增仪。

6.6 电泳仪。

6.7 紫外凝胶成像仪。

6.8 灭菌锅。

6.9 微量移液器：10 μ L、100 μ L、200 μ L、1000 μ L。

7 分析步骤

7.1 DNA 模板的提取

7.1.1 样品前处理

按照GB 4789.26-2013中6.4规定的方法开启样品，并混合均匀；无菌条件下，称取2g固体样品于10mL离心管中，加入6mL的无菌去离子水，上下颠倒充分混匀，室温条件下9 000g离心5min并弃去上清液；再加入6mL的氯仿，室温条件下9 000g离心5min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。

7.1.2 DNA 提取

分别称取50mg由7.1.1制备的罐头样品和阳性样品于不同的1.5mL离心管中，各离心管中分别加入200 μ L TE缓冲液，混匀；加入400 μ L异硫氰酸胍裂解液，室温放置30min后，加入400 μ L氯仿：异戊醇（24:1，体积比），混匀；10 000g 室温离心5min，取上清液，加入0.8倍体积异丙醇，室温沉淀1小时；10 000g室温离心5min，弃上清液；70%乙醇洗涤一次，晾干；加入50 μ L TE缓冲液，溶解后待用。

7.2 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 μ mol/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	

7.3 PCR 扩增

7.3.1 猪、鸡、鸭成分 PCR 扩增

PCR反应采用25 μ L体系：10 \times PCR buffer 2.5 μ L，dNTP（2.5mmol/L）2 μ L，20pmol/uL引物各1 μ L，模板DNA 1 μ L，Taq DNA聚合酶 0.3 μ L（1.5U），MgSO₄（50mmol/L）1 μ L，ddH₂O补足体积。扩增条件为：94 $^{\circ}$ C 3min，94 $^{\circ}$ C 30s，57 $^{\circ}$ C 30s，72 $^{\circ}$ C 30s，35个循环，72 $^{\circ}$ C 5min。每个PCR反应均设置2个平行实验，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、鸭肉提取的DNA为模板，阴性对照采用已知不含猪、鸡、鸭序列的DNA为模板。

7.3.2 牛、羊成分 PCR 扩增

PCR反应采用25 μ L体系：10 \times PCR buffer 2.5 μ L，dNTP（2.5mmol/L）2 μ L，20pmol/uL引物各1 μ L，模板DNA 1 μ L，Taq DNA聚合酶 0.3 μ L（1.5U），MgSO₄（50mmol/L）1 μ L，ddH₂O补足体积。扩增条件为：94 $^{\circ}$ C 3min，94 $^{\circ}$ C 30s，57 $^{\circ}$ C 30s，72 $^{\circ}$ C 30s，35个循环，72 $^{\circ}$ C 5min。二次扩增时取1 μ L第一次扩增产物为模板，在相同条件下再次扩增。每个PCR反应均设置2个平行实验，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，阳性对照使用新鲜牛肉、羊肉提取的DNA为模板，阴性对照采用已知不含牛、羊序列的DNA为模板。

7.3.3 琼脂糖凝胶电泳检测

使用1 \times 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 $^{\circ}$ C~60 $^{\circ}$ 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 μ g/mL或工作浓度为1 \times ，趁热将琼脂糖溶液均匀倒入制胶器，室温冷却至凝固。在电泳槽中加入1 \times TAE缓冲液，使溶液没过胶面，移取5 μ L DNA扩增产物与1 μ L 6 \times 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 ~10v/cm，恒压，电泳20 min ~30min。在紫外凝胶成像仪下观察电泳结果，拍照并记录结果。

7.3.4 PCR 结果判断

当出现下列情况之一，则PCR结果无效，应重新进行实验：

- 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。

7.4 限制性内切酶酶切及电泳检测

若PCR扩增结果为阳性，将所得产物利用MnII进行酶切反应，酶切反应体系（20 μ L）：10 \times buffer 2 μ L，MnII酶 1 μ L，PCR产物 15 μ L，ddH₂O 2 μ L；反应温度为37 $^{\circ}$ C，反应时间为1小时，酶切产物采用琼脂糖凝胶电泳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

8 结果判断与表述

若样品PCR扩增结果出现预期长度的目的片段，且酶切结果符合对应的不同酶切片段大小，具体信息见表2，则判断样品含有相应动物源性成分或将目的片段直接测序，与数据库中已有参考序列比对，相似性 $\geq 99\%$ 以上，确认动物源性成分种属信息。
