

ICS 67.120.10

X 73

备案号：

QB

中华人民共和国轻工行业标准

QB/T XXXX—XXXX

鱼类罐头中金枪鱼品种鉴别方法

Method for Identification of tuna species in canned fish

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：。

鱼类罐头中金枪鱼品种鉴别方法

1 范围

本标准规定了鱼类罐头中金枪鱼品种鉴别方法。

本标准适用于鱼类罐头中长鳍金枪鱼（*Thunnus alalunga*）、大目金枪鱼（*Thunnus obesus*）、青干金枪鱼（*Thunnus tongoe*）、鲣鱼（*Katsuwonus pelamis*）、东方狐鲣（*Sarda orientalis*）、巴鲣（*Euthynnus affinis*）、圆舵鲣（*Auxis rochei*）、扁舵鲣（*Auxis thazard*）等金枪鱼类的定性鉴别。

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 mtDNA: Mitochondrial DNA, 线粒体 DNA。
- 3.4 Taq: thermus aquaticu, 水生栖热菌。
- 3.5 Genbank: 基因库。
- 3.6 EMBL: The european molecular biology laboratory, 欧洲分子生物学实验室。
- 3.7 DDBJ: DNA data bank of japan, 日本 DNA 数据库。
- 3.8 dNTP: deoxy-ribonucleoside triphosphate, 脱氧核糖核苷三磷酸。
- 3.9 dATP: deoxy-adenosine triphosphate, 脱氧腺苷三磷酸。
- 3.10 dTTP: deoxy-thymidine triphosphate, 脱氧胸苷三磷酸。
- 3.11 dCTP: deoxy-cytidine triphosphate, 脱氧胞苷三磷酸。
- 3.12 dGTP: deoxy-guanosine triphosphate, 脱氧鸟苷三磷酸。
- 3.13 Tris: tris(hydroxymethyl) aminomethane, 三（羟甲基）氨基甲烷。
- 3.14 EDTA: ethylene diamine tetraacetic acid, 乙二胺四乙酸。

3.15 TE: Tris-HCl、EDTA 缓冲液。

3.16 bp: base pair, 碱基对。

4 方法提要

通过提取金枪鱼罐头样品中的总DNA,以提取的DNA为模板,以鱼类线粒体DNA(mtDNA)为目标片段设计通用进行PCR扩增,琼脂糖凝胶电泳检测出现预期目标片段后进行测序,将所得序列与核酸序列数据库进行同源性比对,获得金枪鱼品种种属信息。

5 试剂和材料

5.1 鱼类线粒体基因组(mtDNA)通用引物:

序列F: 5'-AAACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTC-3';

序列R: 5'-GCTGGTACCTCTACAAAGAAACATGAAACA-3'。

5.2 dNTP: dATP、dTTP、dCTP、dGTP。

5.3 10×PCR 缓冲液: 含 Mg^{2+} 。

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 CTAB 提取液[4%CTAB, 100mmol/L Tris-HCl(pH8.0), 1.4mol/L NaCl, 20mmol/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

- a) 按照GB 4789.26-2013中6.2规定的方法开启样品，并混合均匀；
- b) 称取300mg金枪鱼罐头肌肉组织样品和阳性样品（新鲜金枪鱼肉）于2mL离心管中，加入1mL氯仿/甲醇/水（1:2:0.8，体积比），室温静置过夜，5000g室温离心3min，弃上清，再用无菌去离子水清洗样品；
- c) 分别称取100mg b)中制备的罐头样品和阳性样品，置于2mL离心管中，加入1mLCTAB提取液 [4%CTAB, 100mmol/LTris-HCl(pH8.0), 1.4mol/LNaCl, 20mmol/L EDTA (pH 8.0)]，置于65 $^{\circ}$ C恒温水浴槽中，温育1-2h，期间每隔15min颠倒混匀一次，直至样品完全消化；
- d) 温育后，10000g室温离心5min后取上清液至一新的2mL离心管中，加与上清液等体积的氯仿：异戊醇（24:1）溶液缓慢震荡，10000g室温离心5min，重复该步骤一次；
- e) 吸取上清液于另一2mL离心管中，加2/3体积预冷的异丙醇沉淀DNA，-20 $^{\circ}$ C，1h；
- f) 10000g室温离心5min后弃去上清液，加入 800 μ L 预冷的70%乙醇进行洗涤两次，然后10000g室温离心5min弃去乙醇，所得沉淀在室温下干燥；
- g) 沉淀用100 μ LTE缓冲液溶解，-20 $^{\circ}$ C保存备用。

7.2 PCR 扩增

PCR扩增体系（25 μ L）：10 \times PCR buffer (Mg²⁺) 2.5 μ L，dNTP (2.5mmol/L) 2 μ L，20pmol/ μ L引物各1 μ L，模板DNA 2 μ L，Taq DNA聚合酶 0.3 μ L (1.5U)，ddH₂O 16.2 μ L。PCR扩增条件为：94 $^{\circ}$ C 5min，94 $^{\circ}$ C 30s，50 $^{\circ}$ C 30s，72 $^{\circ}$ C 30s，35个循环，最后在72 $^{\circ}$ C延伸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，阳性对照使用新鲜金枪鱼肉提取的DNA为模板，阴性对照采用已知不含金枪鱼序列的DNA为模板。

7.3 琼脂糖凝胶电泳检测

使用1×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°C~60°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1μg/mL或工作浓度为1×，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×TAE缓冲液，使溶液没过胶面，移取5μL DNA扩增产物与1μL 6×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。

7.4 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。

8 序列测定与比对

将所得PCR产物进行测序，返回序列后，将所得序列输入核酸序列数据库（如Genbank、EMBL、DDBJ等），与已知金枪鱼品种序列进行同源性比对，当序列序列相似性≥97%时，报告金枪鱼品种种名。
