ICS 67.120.30
X 73

QB

中 华 人 民 共 和 国 轻 工 行 业 标 准

QB/T 5504—XXXX

鱼类罐头中金枪鱼品种鉴别方法 PCR 法

Method for identification of tuna species in canned fish-PCR method

报批稿

工业和信息化部行业标准报批公示

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。

本标准由中国轻工业联合会提出。

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（TC64/SC2）归口。

本标准起草单位：中国食品发酵工业研究院有限公司、广东省食品工业研究所有限公司、厦门市产品质量监督检验研究院、华测检测认证集团股份有限公司、中国罐头工业协会、大连市检验检测认证技术服务中心、大连辽渔远洋食品有限公司、北京市产品质量监督检验院、中国肉类食品综合研究中心、北京市理化分析测试中心、广东左博法政研究院有限公司。

本标准主要起草人：谢雪钦、孟镇、仇凯、谢忠阳、晁曦、杨滴、张媛媛、王帅、林兆盛、蒋世卫、肖辉南、王大伟。

本标准为首次发布。

工业和信息化部行业标准报批公示

鱼类罐头中金枪鱼品种鉴别方法 PCR 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*)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

GB/T 6682-2008 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 34796 水溶液中核酸的浓度和纯度检测 紫外分光光度法

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件

PCR：polymerase chain reaction，聚合酶链式反应

DNA：deoxyribonucleic acid，脱氧核糖核酸

mtDNA: Mitochondrial DNA，线粒体 DNA

Taq：thermus aquaticus，水生栖热菌

Genbank：基因库

EMBL：The european molecular biology laboratory，欧洲分子生物学实验室

DDBJ：DNA data bank of japan，日本 DNA 数据库

dNTP：deoxy-ribonucleoside triphosphate，脱氧核糖核苷三磷酸

dATP：deoxy-adenosine triphosphate，脱氧腺苷三磷酸

dTTP：deoxy-thymidine triphosphate，脱氧胸苷三磷酸

dCTP：deoxy-cytidine triphosphate，脱氧胞苷三磷酸

dGTP：deoxy-guanosine triphosphate，脱氧鸟苷三磷酸

EDTA：ethylene diamine tetraacetic acid，乙二胺四乙酸

TE：Tris-HCl、EDTA，三羟甲基氨基甲烷盐酸、乙二胺四乙酸

TAE：Tris-HCl、Acetic acid、EDTA，三羟甲基氨基甲烷盐酸、乙酸、乙二胺四乙酸

CTAB：Cetyltrimethylammonium bromide，溴代十六烷基三甲基铵

bp：base pair，碱基对

4 方法提要

工业和信息化部行业标准报批公示

提取金枪鱼罐头样品中的总DNA，以其为模板，以鱼类线粒体基因组（mtDNA）cytB基因为目标片段设计通用引物进行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

除另有说明外，试剂均为分析纯或生化试剂，实验用水为GB/T 6682-2008规定的一级水。

5.1 鱼类线粒体基因组（mtDNA）通用引物：

序列为：5′-AAACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTC-3′；

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 浓盐酸。

5.6 氢氧化钠。

5.7 溴代十六烷基三甲基铵（CTAB）。

5.8 异丙醇。

5.9 无水乙醇。

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 氯仿：异戊醇（24:1，体积比）溶液。

5.15 氯仿：甲醇：水（1:0.8:0.2，体积比）溶液。

5.16 三羟甲基氨基甲烷盐酸（Tris-HCl）溶液，1mol/L（pH 8.0）：在 800mL 的水中溶解 121.1g 的三羟甲基氨基甲烷（Tris），冷却至室温后，用浓盐酸调节溶液 pH 值至 8.0，用水定容至 1L，121℃灭菌 15min，备用。

5.17 乙二胺四乙酸（EDTA）二钠盐溶液，0.5mol/L ：称取 186.1g 二水乙二胺四乙酸二钠（$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$），加入 700mL 水中，在磁力搅拌器上搅拌，用氢氧化钠调 pH 值至 8.0，用水定容至 1L，121℃灭菌 15min，备用。

5.18 氯化钠（NaCl）溶液，14 mol/L：称取 818.2g 的 NaCl，加入 800mL 水溶解，用水定容至 1L，121℃灭菌 15min，备用。

5.19 TE 缓冲液：在 800mL 水中，依次加入 10mL 1mol/L Tris-HCl 溶液和 2mL 0.5mol/L EDTA 溶液，用水定容至 1L，121℃灭菌 15min，备用。

5.20　1×TAE 缓冲液：称取 242g Tris 和 37.2g 的 $Na_2EDTA\cdot 2H_2O$ 放入烧杯中加入约 800mL 水，充分搅拌，然后加入 57.1mL 冰乙酸，用水定容至 1L，配制成 50×TAE 缓冲液，室温保存，使用时用水稀释为 1×TAE 缓冲液。

5.21　CTAB 提取液：称取 4g 的 CTAB 放入试剂瓶中，再分别加入 10mL 1mol/L 的 Tris-HCl 溶液，70mL 14 mol/L 的 NaCl 溶液和 4mL 0.5mol/LEDTA 溶液，用水定容至 100mL，121℃灭菌 15min，备用。

5.22　70%乙醇：量取 70mL 无水乙醇，用水定容至 100mL。

5.23　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。

5.24　无菌 PCR 反应管。

5.25　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　基因测序仪。

6.10　微量移液器：10μL、100μL、200μL、1000μL。

7　分析步骤

7.1　DNA 模板的提取

a）按照 GB 4789.26-2013 中 6.4 规定的方法开启样品；

b）称取金枪鱼罐头肌肉组织样品 300mg 于 2mL 无菌离心管中，加入 1mL 氯仿：甲醇：水（1:2:0.8，体积比）溶液，室温静置过夜，5000r/min 室温离心 3min，弃上清，再用无菌去离子水清洗样品。同时称取 300mg 金枪鱼阳性样品进行处理；

c）分别称取 100mg b）中制备的罐头样品和阳性样品，置于不同的 2mL 离心管中，分别加入 1mL CTAB 提取液，置于 65℃恒温水浴锅中，温育 1h~2h，期间每隔 15min 颠倒混匀一次；

d）温育后，10000 r/min 室温离心 5min 后移取上清液至一新的 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，10000r/min 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 体积预冷的异丙醇在-20℃下静置 1h；

f）10000r/min 室温离心 5min 后弃去上清液，加入 800μL 预冷的 70%乙醇进行洗涤两次，然后 10000r/min 室温离心 5min 弃去乙醇，所得沉淀在室温下干燥；

g）沉淀用 100μLTE 缓冲液或无菌双蒸水溶解，-20℃保存备用；

h）按 GB/T 34796 规定的方法检测 DNA 浓度和纯度，使 OD260/OD280 比值在 1.7~1.9 之间。

注：也可使用等效DNA试剂盒提取样品DNA。

7.2 PCR 扩增

7.2.1 PCR 扩增体系（25μL）：10×PCR buffer（Mg^{2+}）2.5 μL，dNTP（2.5mmol/L）2 μL，20 pmol/μL 引物各 1 μL，模板 DNA 2 μL，Taq DNA 聚合酶 0.3 μL（1.5U），ddH_2O 16.2 μL。PCR 扩增条件为：94℃ 5 min，94 ℃ 30 s，50 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，35 个循环，最后在 72 ℃延伸 5min。

7.2.2 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，阳性对照使用阳性样品提取的 DNA 或金枪鱼 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

7.3.1 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 ℃~60 ℃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。

7.3.2 在电泳槽中加入 1×TAE 缓冲液，使溶液没过胶面，移取 5 μL DNA 扩增产物与 1 μL 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 ~30 min。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 结果判断

将所得PCR产物利用基因测序仪进行双向测序，并将序列进行拼接，对照测序峰图进行校正，得到准确序列，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，综合分析比对结果，报告样品中金枪鱼的种属信息。

工业和信息化部行业标准报批公示