

ICS  
B

# 团体标准

T/CAA XXX-XXXX

## 驴肉及其制品中马源性成分测定 实时荧光 PCR 法

Identification of Horse-Derived Ingredients in Donkey Meat Materials  
and Products Realtime PCR Method

(征求意见稿)

2021-XX-XX 发布

2021-XX-XX 实施

中国畜牧业协会 发布

## 前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由中国畜牧业协会提出并归口。

本文件起草单位：山东省农业科学院生物技术研究中心、聊城大学、山东东阿国胶堂阿胶药业有限公司、山东天道牧本农业科技有限公司、山东东阿天龙食品有限公司、内蒙古阿鲁科尔沁旗太极天驴有限公司、山东骏驰牧业有限公司、山东阿多宝驴产业科技有限公司、禹城市惠民农业科技有限公司（德州黑驴保种繁育基地）。

本文件主要起草人：胡悦、张全芳、范阳阳、刘国霞、陈雪燕、刘艳艳、谭晴晴、杨雪、刘桂芹、李兰杰、李艳、卢宗福、钟勇、李建军、马骁、司家勇、董书光、孟朝红、张明泉、贾涛、王长法、步迅。

# 驴肉及其制品中马源性成分测定实时荧光 PCR 法

## 1 范围

本文件规定了驴肉及其制品中马源性成分测定的原理、试剂或材料、仪器设备、样品、DNA 提取实时荧光 PCR 反应、试验数据处理和防止交叉污染的措施。

本文件适用于驴生鲜肉、冷冻肉及肉制品中马源性成分的测定。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 9695.19 肉与肉制品 取样方法

GB/T 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

## 3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

## 4 原理

根据驴、马ckm基因的序列差异，设计通用引物及不同荧光信号的驴、马特异性探针，采用TaqMan实时荧光PCR技术进行扩增，根据荧光信号及循环阈值，判定动物源性成分。

## 5 试剂或材料

5.1 试剂。除非另有规定外，仅适用分析纯试剂。

5.2 水。应符合 GB/T 6682 中一级水的要求。

5.3 生理盐水。称取 29.2 g NaCl 溶解于 80.0 mL 水中，加水定容至 100.0 mL，103.4 kPa 蒸汽压(121 ℃)灭菌 20 min，室温保存待用。

5.4 动物组织 DNA 提取试剂盒。

5.5 实时荧光 PCR 检测试剂盒-Taqman 探针法。

5.6 实时荧光 PCR 引物和探针。实时荧光 PCR 引物和探针序列见附录 A，目的基因扩增靶标参考序列参见附录 B。

5.7 内参质粒。利用水将人工合成的外源质粒稀释至  $2.0 \times 10^{-4}$  ng/μL，作为内参质粒，序列参见附录 B。

## 6 仪器设备

T/CAAA XXX-XXXX

6.1 荧光定量 PCR 仪。3 通道以上（应能检测 JOE、FAM 及 CY5 荧光）。

6.2 紫外分光光度计。

6.3 分析天平。感量 0.01 mg。

6.4 离心机。最大转速不应小于 13 000 r/min。

6.5 水浴锅。

6.6 高压灭菌锅。

## 7 样品

### 7.1 取样

应按 GB/T 9695.19 的规定执行。

### 7.2 试样制备

7.2.1 整块肉取 3.0 g，用生理盐水清洗后，放入研钵中。在研钵中倒入液氮，将样品在液氮中研磨成粉末或用冷冻研磨仪研磨成粉末。

7.2.2 碎肉、肉片或肉卷等冷冻混合肉，混匀后，称取 10.0 g 样品，用生理盐水清洗，放入研钵中。在研钵中倒入液氮，将样品在液氮中研磨成粉末。

7.2.3 阳性对照样品的制备。取驴肉块、马肉块各 3.0 g，分别用生理盐水清洗后，放入研钵中。在研钵中倒入液氮，将样品在液氮中研磨成粉末。

7.2.4 阴性对照样品的制备。取牛肉块 3.0 g，用生理盐水清洗后，放入研钵中，在研钵中倒入液氮，将样品在液氮中研磨成粉末。

## 8 DNA 提取

### 8.1 样品 DNA 提取

应采用市售的动物组织 DNA 提取试剂盒提取。

### 8.2 DNA 浓度与纯度的检测

用紫外分光光度计检测提取 DNA 的浓度与纯度，A260/A280 应在 1.8~2.0 之间，调整 DNA 浓度到 0.1ng/μL~50.0ng/μL 范围内。

## 9 实时荧光 PCR 反应

### 9.1 试样源性鉴定实时荧光 PCR 反应

PCR 反应体系见附录 A，将试剂混匀离心分装至 PCR 反应管中，放入荧光定量 PCR 仪，每个 PCR 反应设置 3 次平行。

### 9.2 对照实时荧光 PCR 反应体系设置

在试样 PCR 反应的同时，设置阴性对照、空白对照和阳性对照，每个 PCR 反应设置 3 次平行。具体如下：

——阴性对照。模板为牛的基因组 DNA 的反应体系作为阴性对照。

——空白对照。以水作为空白对照。

——阳性对照。模板为等量混合的驴、马基因组 DNA 的反应体系作为阳性对照。

### 9.3 实时荧光 PCR 反应程序

95 °C 预变性 3 min, 95 °C 变性 10 s, 63 °C 退火延伸 35 s (收集荧光信号), 40 个循环。

## 10 试验数据处理

### 10.1 体系有效性分析

空白对照、阴性对照和阳性对照全部满足下述条件, 表明 PCR 体系有效:

——空白对照。PCR 体系对应的反应孔均无 JOE、FAM 及 CY5 荧光的典型扩增曲线。

——阴性对照。PCR 体系对应的反应孔均无 JOE、FAM 荧光的典型扩增曲线; 但有 CY5 荧光的典型扩增曲线, 且 Ct 值  $\leq 35.0$ 。

——阳性对照 PCR 体系对应的反应孔中出现 JOE、FAM 和 CY5 荧光的典型扩增曲线, 且 Ct 值  $\leq 35.0$ 。

### 10.2 结果判定

10.2.1 若只有 CY5、JOE 典型荧光扩增曲线, 且 Ct 值  $\leq 35.0$ , 则应判定驴肉样品中没有马源性成分。

10.2.2 若只有 CY5、FAM 典型荧光扩增曲线, 且 Ct 值  $\leq 35.0$ , 则应判定样品中只有马源性成分, 无驴源性成分。

10.2.3 若只有 CY5 典型荧光扩增曲线, 且 Ct 值  $\leq 35.0$ , 无 JOE、FAM 典型扩增曲线, 则应判定样品中未检出驴、马源性成分。

10.2.4 若有 CY5、JOE、FAM 典型荧光扩增曲线, 且 Ct 值  $\leq 35.0$ , 则应判定驴肉样品中混合了马源性成分。

10.2.5 若有 JOE 和 FAM 荧光扩增曲线, 但  $35.0 < \text{Ct 值} < 40.0$ , 则需要加大模板量进行 PCR 反应。若再次扩增后的 Ct 值  $< 40.0$ , 则根据 10.2.1~10.2.4 判定样品中的动物源性成分, 若 Ct 值  $\geq 40.0$ , 则应判定样品中未检出驴、马源性成分。

## 11 防止交叉污染的措施

应按 GB/T 27403 的规定执行。

## 附录 A

(规范性)

## 实时荧光定性PCR引物/探针序列、反应体系

## A.1 实时荧光 PCR 引物和探针序列

实时荧光 PCR 引物和探针序列见表 A.1。

表A.1 实时荧光定性 PCR 引物和探针序列

引物探针名称	简写	序列 (5' -3')	扩增片段 bp
通用引物-上游	CKMF	5'-TCATCGTAGCATCGAGGGG-3'	228~246
通用引物-下游	CKMR	5'-AGCAGAGCAGGAAGGGAGTT-3'	
内参引物-上游	IMF	5'-AGACCACCAAATGCCCTATC-3'	140
内参引物-下游	IMR	5'-CGAGATTGAGATCTTCTGCGAC-3'	
内参探针	IMP	5' CY5-GCAGGTCCCCTAGAAGAAGAACTCCCTCGC-3' DAB	
驴源性探针	Lv-P	5' JOE-ATAGTTGAAGTTCTGAAAATTTTAGGCAAAGCCT-3' BHQ2	
马源性探针	M-P	5' FAM-ATAGTTGAAGCTTCTGAAAATTTTAGGTAAAGCCT-3' DAB	

## A.2 试样源性鉴定实时荧光 PCR 反应体系

试样源性鉴定实时荧光 PCR 反应体系见表 A.2。

表A.2 试样源性鉴定实时荧光 PCR 反应体系

试剂名称	工作浓度	加入体积 μL	终浓度
2×TaqManMaster Mix		10	1×
CKMF/R	5 μmol/L	2	0.50 μmol/L
IMF/IMR	1 μmol/L	2	0.10 μmol/L
Lv-P (JOE)	1 μmol/L	2	0.10 μmol/L
M-P (FAM)	2 μmol/L	2	0.20 μmol/L
IMP (CY5)	1 μmol/L	1	0.10 μmol/L
内参质粒CK <sup>-3</sup>		1	10 <sup>-3</sup> ng/μL
基因组DNA模板		2	1.0 ng~100 ng
注：JOE、FAM分别检测驴源性和马源性，CY5为内参探针。			

附 录 B  
(资料性)  
目的基因扩增靶标参考序列

**B.1 驴 (*Equus asinus*) PCR 产物序列 (Genbank: HQ336263.1)**

TTCCCGAATTGCCTGCGACTCATCGTAGCATCGAGGGGAGAGGCTCTCTCTTTCCCGCCTCTCTCTCCCATCTCGGAAATAACTGG  
ATCTTTTAAGTCTCTGCTTATCTGTGGGAGCTGATAGTTGAAGTTCTGAAAATTTTAGGCAAAGCCTCCAGGATTTGGGGACTCTGA  
AATGGGAATACTTTTCGTACCTTGCTACTGGCCCCCTGAAACTCCCTTCTGCTCTGCT

**B.2 马 (*Equus caballus*) PCR 产物序列 (Genbank: JQ065978.1)**

TCATCGTAGCATCGAGGGGAGAGGCTCTCTCTTTCCCGCCTCTCTCTCCCATCTCGGAAACAACCGGATCTTTCAAGTCTCTGCTTA  
TCTGTGGGAGCTGATAGTTGAAGCTTCTGAAAATTTTAGGTAAGCCTCCAGGATTTGGGGACTCTGAAATGGGAATACTTTTCATAC  
CTTGCTACTGGCCCCCTGAAACTCCCTTCTGCTCTGCTGGCCCCC

**B.3 内参质粒**

AGACCACCAAATGCCCTATCTTATCAACACTTCCGAAACTACTGTTGTTAGACGAAGAGGCAGGTCCCCTAGAAGAAGAACTCCCTC  
GCCTCGCAGACGAAGGTCTCAATCGCCGCTCGCAGAAGATCTCAATCTCG

注：下划线为引物位置，阴影部分为探针位置。

---