

DBS22

吉 林 省 地 方 标 准

DBS22/018—2013

食品安全地方标准
鲜(冻)畜肉中鸭源性成分的定性检测
PCR 方法

2013-10-08 发布

2013-10-08 实施

吉林省卫生厅 发布

前 言

本标准的附录A为资料性附录。

本标准主要起草单位：吉林省产品质量监督检验院、中华人民共和国吉林出入境检验检疫局、吉林农业大学。

本标准主要起草人：史艳宇，刘金华，邴炜，华蕾，王莹，金哲勇，张庆波，吕航，赵立群。

食品安全地方标准

鲜(冻) 畜肉中鸭源性成分的定性检测 PCR 方法

1 范围

本方法规定了鲜(冻) 畜肉中鸭源性成分的PCR定性分析方法。
本方法适用于生鲜、冷冻畜肉中鸭源性成分定性检测。

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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
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

鸭源性成分 duck-derived materials
鸭种属特异性DNA片段。

4 原理

对样品进行DNA提取, 通过PCR扩增, 检测鸭特异性基因片段。

5 试剂和材料

除特别说明以外, 所有试剂均为分析纯, 水为按照GB/T 6682规定的一级水。所有试剂均用无DNA酶污染的容器分装。

5.1 鸭源性成分检测用引物(对) 序列为:

上游引物: 5'-CATCTATCCTGCTAGCCGCC-3'

下游引物: 5'-GGCTTGAGTGGAAGAATGCC-3'

5.2 Taq DNA 聚合酶。

5.3 限制性内切酶: Stu I 酶。

5.4 dNTP: dATP、dCTP、dGTP、dTTP。

5.5 食物基因组 DNA 提取纯化试剂盒。

5.6 分子量标记: 100 bp~3 000 bp DNA Marker。

5.7 CTAB 裂解液: 1%CTAB (cetyltrimethylammonium bromide, 十六烷基三甲基溴化铵), 0.05 mol/L Tris-HCl (pH8.0) [Tris-: tris (hydroxymethyl) aminomethane, 三(羟甲基) 氨基甲烷], 0.7 mol/L NaCl, 0.01 mol/L EDTA (pH8.0) (ethylene diaminetetraacetic acid, 乙二胺四乙酸)。

5.8 CTAB 沉淀液: CTAB 5 g/L, 氯化钠 0.04 mol/L, pH 8.0, 高压灭菌。

- 5.9 氯化钠溶液：1.2 mol/L。
- 5.10 蛋白酶 K 溶液：冻干品，用高压灭菌的去离子水溶解为 20 mg/mL 的溶液，分装后于-20 ℃保存，避免反复冻融。
- 5.11 三氯甲烷、无水乙醇、异丙醇等有机试剂。
- 5.12 10×PCR 缓冲液：200 mmol/L Tris-HCl (pH8.4)，200 mmol/L 氯化钾，15 mmol/L 氯化镁。
- 5.13 琼脂糖：电泳纯。
- 5.14 电泳缓冲液：Tris 54 g，硼酸 27.5 g，0.5 mol/L TE 缓冲液 (pH8.0) 20 mL，加蒸馏水至 1 000 mL；使用时 10 倍稀释。
- 5.15 溴化乙锭贮存液：用水配制成 10 mg/mL。
- 5.16 加样缓冲液：0.25%溴酚蓝，40%（质量浓度）蔗糖水溶液。
- 5.17 酶切缓冲液：10 mmol/L Tris-HCl (pH7.5)，10 mmol/L MgCl₂，50 mmol/L NaCl，0.1 mg/mL BSA。

6 仪器和设备

- 6.1 PCR 仪。
- 6.2 生物安全柜。
- 6.3 恒温水浴锅。
- 6.4 离心机：转速≥12 000 r/min。
- 6.5 移液器：0.5 μL~10 μL、10 μL~100μL、20μL~200μL、200μL~1 000μL。
- 6.6 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。
- 6.7 电泳仪。
- 6.8 凝胶成像系统。
- 6.9 搅碎机。
- 6.10 pH 计。
- 6.11 天平：感量 0.01 g。
- 6.12 振荡器。
- 6.13 冰箱：-20 ℃~2 ℃。
- 6.14 高压灭菌器。
- 6.15 干热灭菌器。
- 6.16 离心管：1.5 mL、2 mL。

7 采样

7.1 采样工具

下列采样工具应经160 ℃±2 ℃，2 h高温灭菌：剪刀、镊子、钎子。

7.2 样品采集与储运

待检样品装入一次性密闭的塑料袋内或其他清洁容器(一个采样点的样品放入一个塑料袋或容器)，编号，冷藏保存和运输。

7.3 试样制备与保存

生鲜肉直接进行试样制备，冷冻肉于室温融化后进行制样。将可食部分用绞碎机绞碎，充分混匀，用四分法缩分出不少于500 g作为试样，装入清洁容器中，加封后，标明标记。将试样于-20 °C冷冻保存。

8 检测步骤

8.1 DNA 提取和纯化

8.1.1 CTAB 法

称取500 mg待检试料于2 mL离心管中，加入1 mL CTAB裂解液和20 μL蛋白酶K溶液，65 °C温育1 h，期间震荡混匀3~5次，应保证样品自由悬浮于液体中，必要时，再加入适量CTAB裂解液；12 000 r/min离心5 min，取1 mL上清于2 mL离心管中，加700 μL三氯甲烷，漩涡震荡30 s，12 000 r/min离心10 min，收集600 μL~650 μL上清液到新的2 mL离心管中，加入2倍体积的CTAB沉淀液，室温60 min；12 000 r/min离心5 min，去除上清液，加350 μL氯化钠溶液溶解沉淀，加等体积三氯甲烷，漩涡震荡30 s，12 000 r/min离心10 min，转移上清液到新的离心管。加0.8倍体积异丙醇，室温20 min，12 000 r/min离心10 min，加500 μL70%乙醇水溶液，漩涡震荡30 s，12 000 r/min离心10 min，去除上清液，室温条件下过夜或者60 °C烘15 min~25 min，注意不要让沉淀过干。加50 μL去离子水溶解沉淀，-20 °C保存。

8.1.2 试剂盒法

采用商品化的食品基因组DNA提取纯化试剂盒，按照试剂盒使用说明提取DNA。

8.2 DNA 浓度和纯度的测定

取10 μL DNA溶液加蒸馏水稀释至1 mL，使用核酸蛋白仪或紫外分光光度计分别检测260 nm和280 nm处的吸光值。DNA的浓度按照式（1）计算，当 A_{260}/A_{280} 比值在1.5~2.1之间时，适宜于PCR扩增。扩增前将所有样品DNA调至约10 ng/μL~50 ng/μL。

$$c = \frac{A \times N \times 50}{1000} \dots\dots\dots(1)$$

式中：

c —— DNA浓度，单位为纳克每微升（ng/μL）；

A —— 260 nm处的吸光值；

N —— 核酸稀释倍数。

8.3 PCR 检测

8.3.1 PCR 反应体系

PCR反应体系见表1。每个样品设置2个平行。

表1 PCR反应体系

试剂	加入量 (μL)
10×PCR 缓冲液	2.5
dNTP 溶液(10 mmol/L)	0.5
<i>Taq</i> DNA 聚合酶 (5 U/μL)	0.2
上游引物(10 μmol/L)	1.0
下游引物(10 μmol/L)	1.0
DNA 模板 (50 ng/μL)	2.0
补水至	25

8.3.2 PCR 扩增条件

94 °C 预变性5 min, 94 °C 变性30 s, 58 °C 退火30 s, 72 °C 延伸30 s, 共35个循环, 最后72 °C 延伸10 min。4 °C 保存。

不同仪器、不同 *Taq* DNA 聚合酶可根据要求将反应条件做适当调整。

检测过程中设置核酸提取空白对照、PCR 扩增空白对照、PCR 扩增阴性对照、PCR 扩增阳性对照。用已知含有鸭源性成分样品作阳性对照, 用已知不含有鸭源性成分样品作阴性对照, 用等体积的双蒸水代替模板DNA作空白对照。

8.3.3 PCR 扩增产物电泳检测

取2 g 琼脂糖, 于100 mL 电泳缓冲液中加热, 充分融化, 加入溴化乙锭贮存液至终浓度为0.5 μg/mL, 制胶。在电泳槽中加入电泳缓冲液, 使液面刚刚没过凝胶。将5 μL~8 μL PCR 扩增产物分别和适量加样缓冲液混合, 点样, 用100 bp DNA Marker 作参照。9 V/cm 恒压电泳, 直至溴酚蓝指示剂迁移至凝胶中部, 电泳检测结果用凝胶成像分析系统记录并保存。

8.3.4 限制性内切酶酶切及产物电泳检测

如果PCR 扩增产物电泳检测结果阳性, 进行限制性内切酶酶切反应或进行测序(序列参考附录A)。

酶切反应体系(20 μL): *Stu*I 酶2 U, 酶切缓冲液2 μL, 加入PCR 扩增产物至总体积20 μL。

酶切在37 °C 下进行, 20 min。酶切完成后电泳, 方法见8.3.3。

9 结果判断与表述

9.1 PCR 扩增产物电泳检测结果

阳性样品的PCR 扩增产物大小为201 bp (序列参考附录A)。

9.2 限制性内切酶酶切结果

阳性样品PCR 产物采用内切酶 *Stu*I 酶切后, 酶切片段大小为118 bp 和 83 bp。

9.3 结果表述

PCR 产物为阳性, 同时酶切结果正确者判为含有鸭源性成分, 表述为检出鸭源性成分;

PCR 产物为阴性者判定不含有鸭源性成分, 表述为未检出鸭源性成分。

10 检测过程中防止交叉污染的措施

按照GB/T 27403执行。

11 废弃物处理

检测过程中的废弃物无害化处理。

附 录 A
(资料性附录)
PCR 产物测序结果

CATCTATCCT GCTAGCCGCC GGCCTCTTAT CAATGCTCCT AGTGATACTC CAATGATGAC GGGACATTGT CCGAGAGAGC
ACCTTCCAAG GCCACCACAC ACCTACAGTC CAAAAAGGCC TACGATACGG CATAATCCTC TTCATCACAT CCGAAGCTTT
CTTCTTCCTA GGATTTTCT GGCATTCTT CCACTCAAGC C
