

T/CNHFA

中国营养保健食品协会团体标准

T/CNHFA XXXX—XXXX

羊乳及其制品中牛和羊（山羊和绵羊）源性 成分定性检测方法 （实时荧光 PCR 法和毛细管凝胶电泳法）

Qualitative detection of ingredient from bovine and sheep (Ovis aries and Capra hircus) in sheep dairy products
(Real time PCR and Capillary gel electrophoresis method)

（报批稿）

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中国营养保健食品协会发布 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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由海普诺凯营养品有限公司提出。

本文件由中国营养保健食品协会归口。

本文件起草单位：海普诺凯营养品有限公司、中国检验检疫科学研究院。

本文件主要起草人：侯艳梅、杨艳歌、刘鸣畅、吴亚君、吴桐、谢奎、王洪越、王迎春。

羊乳及其制品中牛和羊（山羊和绵羊）源性成分定性检测方法 （实时荧光 PCR 法和毛细管凝胶电泳法）

1 范围

本文件规定了羊乳及其制品中牛、羊、山羊和绵羊源性成分的实时荧光PCR和毛细管凝胶电泳法定性检测方法，方法的最低检出限为1%（质量比）。

本文件适用于羊乳及其制品中牛、羊、山羊和绵羊源性成分的定性检测，适用的产品类别包括液体乳（巴氏杀菌乳、高温杀菌乳、调制乳、灭菌乳、发酵乳），乳粉（全脂乳粉、脱脂乳粉、部分脱脂乳粉、调制乳粉、乳清粉），婴幼儿配方乳粉等。

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 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 27403-2007 实验室质量控制规范 食品分子生物学检验

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

实时荧光 PCR Real-time PCR

在PCR反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号积累实时监测整个PCR进程，实现对起始模板的定量及定性分析。

3.2

毛细管凝胶电泳 Capillary gel electrophoresis (CGE)

将起分子筛作用的凝胶聚合物灌注于毛细管中，以高压直流电场为驱动力的对生物大分子进行分析检测的技术。

3.3

Ct 值 Cycle threshold (Ct)

每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

4.1 BSA: Bovine serum albumin, 牛血清白蛋白。

4.2 CTAB: cetyltrimethylammonium bromide, 十六烷基三甲基溴化铵。

4.3 dATP: deoxyadenosine triphosphate, 脱氧腺苷三磷酸。

4.4 dCTP: deoxycytidine triphosphate, 脱氧胞苷三磷酸。

4.5 dGTP: deoxyguanosine triphosphate, 脱氧鸟苷三磷酸。

4.6 DNA: deoxyribonucleic acid, 脱氧核糖核酸。

4.7 dNTP: deoxyribonucleoside triphosphate, 脱氧核苷酸三磷酸。

- 4.8 dTTP: deoxythymidine triphosphate, 脱氧胸苷三磷酸。
- 4.9 EDTA: Ethylene diaminetetraacetic acid, 乙二胺四乙酸。
- 4.10 kD: kilodalton, 千道尔顿。
- 4.11 PCR: polymerase chain reaction, 聚合酶链式反应。
- 4.12 SDS: Sodium dodecyl sulfate, 十二烷基硫酸钠。
- 4.13 Tris: Tris (Hydroxymethyl) aminomethane, 三羟甲基氨基甲烷。
- 4.14 *Taq*: *Thermus aquaticus*, 水生栖热菌。
- 4.15 UNG: uracil N-glycosylase, 尿嘧啶 N-糖基化酶。

5 生物安全措施

为了保护实验室人员的安全和防止污染,应由具备资格的工作人员检测,所有生物安全防护的设施、设备和安全管理的基本要求按照GB 19489有关规定执行。

6 方法原理

基于实时荧光PCR的检测原理,采用哺乳动物通用和牛、羊、山羊、绵羊特异性的引物探针,对样品中提取的DNA模板进行实时荧光PCR反应。根据反应结果判定羊乳样品中是否含有牛、羊、山羊、绵羊乳源成分。

对于呈现牛阳性信号的样品,依据检测需求,可进一步采用毛细管凝胶电泳法,通过SDS对样品中蛋白质组分进行变性和附加电荷的处理,采用毛细管电泳仪对蛋白质组分进行分离,依据牛乳酪蛋白特异性蛋白峰的信号,判定样品是否含有牛乳来源酪蛋白成分。

7 仪器设备

- 7.1 实时荧光 PCR 仪。
- 7.2 毛细管电泳仪: 配备二极管阵列检测器或相同功能的仪器。
- 7.3 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。
- 7.4 分析天平: 精度 0.1 mg。
- 7.5 水浴锅。
- 7.6 离心机: 离心力 $\geq 12000 g$ 。
- 7.7 微量移液器: 0.5 μL ~10 μL , 10 μL ~100 μL , 20 μL ~200 μL , 100 μL ~1000 μL 。
- 7.8 涡旋混匀仪。
- 7.9 恒温孵育器。
- 7.10 pH 计。
- 7.11 冷冻干燥仪。

8 实时荧光 PCR 测定方法

8.1 方法提要

对样品进行DNA提取,通过实时荧光PCR,检测其中是否含有牛、羊、山羊、绵羊特异性基因序列,达到对羊乳及其制品乳源物种成分定性检测的目的。

8.2 试剂和材料

除另有规定外,所有试剂均为分析纯或生化试剂。实验用水符合GB/T 6682的要求。所有试剂均用无DNA酶污染的容器分装。

- 8.2.1 哺乳动物、牛、羊、山羊、绵羊成分扩增引物和探针详见表 1。

表1 检测用引物和探针

名称	检测物种	引物序列(5'--3')	靶基因	扩增长度
质控	哺乳动物	F: CTCAGCAGGGTCTTCACCAACA R: TGCCTTCCTCTAGGTCCTCAGC P: FAM-TGGTGTGTTGGCACCTCGGACCGT-TAMRA	<i>GH</i>	82 bp
牛	牛、水牛、牦牛	F: GGAGGAAACTGAGGAGTTCAGCC R: GGTGCGCGGTTCTCTTCCC P: FAM-AGGGATGTGGTTAGGGGAGCAGAAACG-TAMRA	<i>GH</i>	81 bp
羊	山羊、绵羊	F: TGCCAGCCATCTGTTGTTACC R: AAAGGACAGTGGGCACTGGAG P: FAM-CCCGTGCCTTCTAGACCCTGGAAG-TAMRA	<i>GH</i>	79 bp
山羊	山羊	F: GGAGGGA ACTGAGGACCTCAGTG R: GGTGTGTGGTTCCCCTCACTG P: FAM-CCTTATTCGGAACCTCCCCACCCCA-TAMRA	<i>GH</i>	139 bp
绵羊	绵羊	F: CGGAGTAATCCTCCTATTTGC R: CTAGGCTTGTGCCAATATATGGA P: FAM-TATTACCAACCTCCTTT-MGB	<i>cytb</i>	137 bp

8.2.2 三氯甲烷（氯仿）。

8.2.3 异丙醇。

8.2.4 *Taq* 酶（5 U/μL）。

8.2.5 UNG 酶（尿嘧啶-N-糖基化酶）。

8.2.6 70%乙醇（V/V）。

8.2.7 NaCl 溶液：1.2 mol/L。

8.2.8 MgCl₂ 溶液：2.5 mmol/L。

8.2.9 dNTP 溶液（dGTP、dCTP、dATP、dTTP 或 dUTP）：各 2.5 mmol/L。

8.2.10 CTAB 提取液：20 g/L CTAB, 1.4 mol/L NaCl, 0.1 mol/L Tris-HCl, 0.02 mol/L Na₂EDTA, pH 8.0。

8.2.11 CTAB 沉淀液：5 g/L CTAB, 40 mmol/L NaCl。

8.2.12 10×PCR 缓冲液：KCl 100 mmol/L, (NH₄)₂SO₄ 160 mmol/L, MgSO₄ 20 mmol/L, Tris-HCl (pH 8.8)

8.2.13 实时荧光 PCR 反应混合液：12.5 μL 反应体系包括 1 U~2 U 的 *Taq* 酶、1×PCR 缓冲液、2.5 mmol/L~4.0 mmol/L 的 MgCl₂、0.2 U~1 U 的 UNG 酶、0.2 mmol/L 的 d(A, C, G) TPs、0.2 mmol/L~0.4 mmol/L dUTP、400 nmol/L ROX 染料（某些荧光 PCR 仪不需要 ROX 校正）；也可用等效的实时荧光 PCR 预混液。

8.3 检测步骤

8.3.1 样品前处理

8.3.1.1 乳粉

将样品充分混匀，取 3 g~6 g，均分成三份，分别为测试样品、复检样品和保存样品，并装入离心管或密封袋中，加封后，标明标记，4℃储存。

8.3.1.2 液态乳

将样品充分混匀，分别取 30 mL~60 mL，均分成三份，分别为测试样品、复检样品和保存样品，并装入离心管或密封袋中，加封后，标明标记，4℃储存。

以上前处理过程中应小心操作，确保防止任何交叉污染和样品组分的改变。

8.3.2 DNA 提取

取处理好的样品（固体 1 g~2 g，液体 10 mL~20 mL）于 50 mL 离心管中，固体加入 3 mL~5 mL CTAB 提取液，液体加入等体积的 CTAB 提取液，60 μL~100 μL 蛋白酶 K（10 mg/mL）；置于 65℃ 恒温孵育器中震荡孵育 2 h 左右（或孵育过夜），转速 600 g~800 g；取出后 13 000 g 离心 10 min，小心用洁净纸刮去表面油脂，转移清液至 50 mL 超速离心管中；加入 0.7 倍体积的三氯甲烷，剧烈震荡混匀，室温下 13 000 g 离心 10 min；每次转移 800 μL 上清液至 1.5 mL 离心管中，每管加入 0.7 倍体积的三氯甲烷，剧

烈震荡混匀，室温下13 000 g离心10 min；每次转移700 μL 上清液至1.5 mL离心管中，每管加入等体积CTAB沉淀液混匀，13 000 g离心10 min；弃上清，加入350 μL 1.2 mol/L NaCl溶液，充分溶解沉淀；加入0.8倍体积的异丙醇或2倍体积-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中预冷的无水乙醇混匀，-20 $^{\circ}\text{C}$ 放置0.5 h~1 h，13 000 g离心10 min~15 min，弃上清，用70%乙醇洗涤沉淀一次，12 000 g离心10 min，弃上清，室温下晾干。每管加入20 μL ~50 μL 双蒸水溶解沉淀，多管合并到1管混匀，-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

也可用等效DNA提取试剂盒提取模板DNA。

8.3.3 DNA浓度和纯度的测定

使用核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计分别检测260 nm和280 nm处的吸光值 A_{260} 和 A_{280} 。DNA的浓度按照公式（1）计算：

$$c = A \times N \times 50/1\,000 \dots\dots\dots(1)$$

式中：

c= DNA浓度，单位为微克每微升（ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ）；

A= 260 nm处的吸光值；

N=核酸稀释倍数。

当 A_{260}/A_{280} 比值在1.7~2.1之间时，适宜于PCR扩增。

也可采用全自动微量核酸蛋白浓度测定仪，直接测定DNA浓度和纯度。

8.3.4 实时荧光PCR扩增

8.3.4.1 反应体系

实时荧光PCR反应体系如下表2。

表2 实时荧光PCR反应体系

试剂	体积
实时荧光PCR反应混合液	12.5 μL
正向引物（10 $\mu\text{mol/L}$ ）	0.5 μL
反向引物（10 $\mu\text{mol/L}$ ）	0.5 μL
探针（10 $\mu\text{mol/L}$ ）	0.5 μL
DNA模板（5-10 ng/ μL ）	5.0 μL
灭菌 ddH ₂ O	6.0 μL

8.3.4.2 实时荧光PCR反应程序

50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min；95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min；95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s，60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min，40个循环。

8.3.4.3 实验对照的设置

以目标引物探针对应样品的DNA溶液作为阳性对照，以非目标成分样品的DNA溶液作为阴性对照，以无菌水为空白对照，分别设置3个平行。

8.4 质量控制

以下条件有一条不满足时，实验视为无效：

- 空白对照：无荧光对数增长，相应的Ct值 >40.0 。
- 阴性对照：无荧光对数增长，相应的Ct值 >40.0 。
- 阳性对照：有荧光对数增长，且荧光通道出现典型的扩增曲线，相应的Ct值 <30.0 。
- 哺乳动物物质控检测：有荧光对数增长，且荧光通道出现典型的扩增曲线，相应的Ct值 <30.0 。

8.5 结果判断与表述

8.5.1 结果判定

在符合质量控制的情况下，被检样品进行乳源动物成分检测时：

- a) 如 Ct 值 \leq 30, 则判定被检样品阳性。
- b) 如 Ct 值 \geq 35, 则判定被检样品阴性。
- c) 如 $30 < \text{Ct 值} < 35$, 则重复一次。如再次扩增后 Ct 值仍为 <35 , 则判定被检样品阳性; 如再次扩增后 Ct 值 \geq 35, 则判定被检样品阴性。

8.5.2 结果表述

- a) 样品阳性, 表述为“检出 XX 源性 DNA 成分”;
- b) 样品阴性, 表述为“未检出 XX 源性 DNA 成分”。

9 毛细管凝胶电泳测定方法

9.1 方法提要

对于实时荧光PCR检出牛源性DNA成分的样品, 可进一步采用毛细管凝胶电泳法检测牛源性酪蛋白成分。

9.2 试剂和材料

9.2.1 β -巯基乙醇。

9.2.2 十二烷基磺酸钠 (SDS)。

9.2.3 SDS-MW 凝胶缓冲溶液: pH=8, 0.2% SDS 140 mL。

9.2.4 SDS-MW 样品缓冲液: 100 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0), 1% SDS 50 mL。

9.2.5 10 kD 蛋白内标, 5 mg/mL, 0.4 mL。

9.2.6 分子量标记蛋白组标样 (10 kD-225 kD), 16 mg/mL, 100 μ L。

9.2.7 0.1 mol/L HCl 溶液: 100 mL。

9.2.8 0.1 mol/L NaOH 溶液: 100 mL。

9.2.9 毛细管电泳分析预备液: 以 SDS-MW 样品缓冲液与 10 kD 蛋白内标为 84: 1 的体积比例, 按照当天准备分析样品数量加一的数量配制毛细管电泳分析预备液。

9.3 制样

9.3.1 干粉或固态样品制备

称取一定量固态样品 (配方乳粉、全脂乳粉 500 mg, 乳清蛋白粉、脱脂乳粉 135 mg), 置于 10 mL 离心管中, 加入水到 5 mL 刻度, 涡旋振荡, 至充分溶解并混合均匀 (含有大约 15 mg/mL 蛋白质), 其中乳酪样品需在涡旋震荡前超声溶解 5 分钟。

9.3.2 反应液配制

用移液器将 10 μ L 制备的样品溶液或液体乳样品 (巴氏杀菌乳、高温杀菌乳、调制乳、灭菌乳、发酵乳), 移入至 2.0 mL 离心管中, 然后相继加入 85 μ L 毛细电泳分析预备液、5 μ L β -巯基乙醇, 混合并涡旋振荡, 盖紧瓶盖。

9.3.3 沸水浴

在水浴中加热样品 $100^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 10 min, 冷却样品至室温, 快速离心, 使液体聚集至管底。

9.3.4 上样

涡旋振荡, 用移液器将 90 μ L 样品转移至 200 μ L PCR 管底部, 注意避免气泡产生。将微量样品管插入通用样品瓶内, 使用通用瓶盖并盖紧。

9.3.5 样品检测时限

样品在 24 h 内可以保持稳定。

9.4 电泳参数

- a) 非涂层石英毛细管：50 μm × 30 cm（有效长度：20 cm）；
- b) 检测器：二极管阵列（PDA），检测波长：220 nm；
- c) 运行电压：-15 kV（484 V/cm）；
- d) 毛细管温控：20 $^{\circ}\text{C}$ ± 2 $^{\circ}\text{C}$ ；
- e) 样品温控：20 $^{\circ}\text{C}$ ± 2 $^{\circ}\text{C}$ ；
- f) 电进样：5 kV，20 s；
- g) 窗口狭缝：2（100 μm × 200 μm ）；

9.5 电泳程序

9.5.1 平衡程序

30 psi下0.1 mol/L NaOH碱洗 10 min, 30 psi下0.1 mol/L HCl酸洗 5 min, 30 psi下去离子水冲洗5 min, 50 psi下SDS凝胶灌注10 min, 5.0 kV电压分离10 min, 采用检测器为光电二极管阵列（PDA）检测器, 在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下运行。

9.5.2 电泳程序

50 psi下0.1 mol/L NaOH碱洗 5 min, 50 psi下0.1 mol/L HCl酸洗 2 min, 50 psi下去离子水冲洗2 min, 50 psi下SDS凝胶灌注10 min, 5.0 kV电压上样20 s, 5.0 kV电压分离30 min, 采用检测器为光电二极管阵列（PDA）检测器, 在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下检测, 获取数据。

9.6 质量控制

- a) 用分子量标记蛋白组标样测试系统适用性：
 - 1) 系统适用性的验收条件为：蛋白内标的迁移时间应该在 12.3 min ± 0.5 min
 - 2) 七个分子量标记蛋白（10 kD、20 kD、35 kD、50 kD、100 kD、150 kD 和 225kD）应该在 30 min 内彻底分离。
- b) 单针运行可接受标准：内标峰的迁移时间应在 12.3 min ± 0.5 min。
- c) 以牛乳为阳性对照品，羊乳为阴性对照品，水为空白对照品。
 - 1) 阳性对照品和阴性对照品的蛋白峰图谱与标准图谱（见附录 A）一致；
 - 2) 空白对照不出现蛋白峰。

9.7 结果判断与表述

9.7.1 结果判定

在符合质量控制的情况下，被检样品出现与牛乳特征性酪蛋白峰位置一致的蛋白峰，则判定为阳性，否则判定阴性。

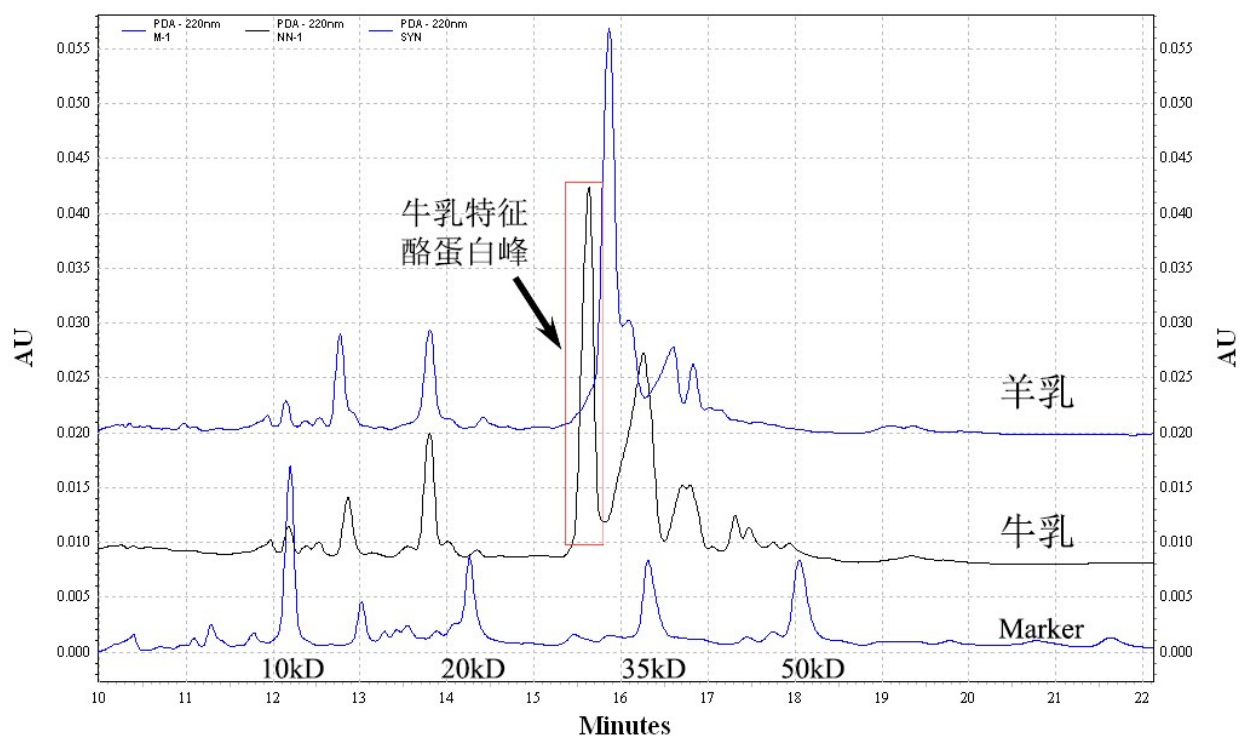
9.7.2 结果表述

- a) 样品阳性，表述为“检出牛乳源性酪蛋白成分”；
- b) 样品阴性，表述为“未检出牛乳源性酪蛋白成分”。

10 防止污染措施

防止污染措施应遵守GB/T 27403-2008附录D的规定。

附录 A
(资料性)
毛细管电泳标准图谱



图A.1 毛细管电泳标准图谱