



中国营养保健食品协会团体标准

T/CNHFA 002—2022

乳及乳制品中牛（家牛、牦牛和水牛）和羊 （山羊和绵羊）源性成分定性检测方法 实时荧光 PCR 法

Qualitative detection of bovine (*Bos taurus*, *Bubalus bubalus* and *Bos grunniens*) and
ovine (*Ovis aries* and *Capra hircus*) derived ingredients in milk and dairy
products—Real time PCR method

2022 - 06 - 22 发布

2022 - 07 - 01 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、中国检验检疫科学研究院粤港澳大湾区研究院。

本文件主要起草人：侯艳梅、杨艳歌、刘鸣畅、吴亚君、吴桐、王云帆、谢奎、王迎春、王洪越、王丹丹、吴占文、王帅。

乳及乳制品中牛（家牛、牦牛和水牛）和羊（山羊和绵羊）源性成分定性检测方法 实时荧光 PCR 法

1 范围

本文件规定了乳及乳制品中牛（家牛、牦牛和水牛）、羊（山羊和绵羊）源成分以及家牛、牦牛、水牛、山羊、绵羊单一乳源成分的实时荧光PCR定性检测方法，方法的最低检出限为1%（配料质量比）。

本文件适用于乳及乳制品中牛（家牛、牦牛和水牛）、羊（山羊和绵羊）以及家牛、牦牛、水牛、山羊、绵羊源性成分的定性检测，适用的产品类别包括液态乳（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 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

Ct 值 Cycle threshold (Ct)

每个反应管内的荧光信号到达设定的阈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 CTAB: cetyltrimethylammonium bromide, 十六烷基三甲基溴化铵。

4.2 *cytb*: cytochrome b, 线粒体细胞色素 b 基因。

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 GH: Growth Hormone, 生长激素基因。

- 4.11 PCR: polymerase chain reaction, 聚合酶链式反应。
- 4.12 Tris: Tris (Hydroxymethyl) aminomethane, 三羟甲基氨基甲烷。
- 4.13 Taq: *Thermus aquaticus*, 水生栖热菌。
- 4.14 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(家牛、牦牛和水牛)、羊(山羊和绵羊)、以及家牛、牦牛、水牛、山羊、绵羊单一乳源成分的特异性引物探针,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(家牛、牦牛和水牛)、羊(山羊和绵羊)、以及家牛、牦牛、水牛、山羊、绵羊单一乳源成分。

7 仪器设备

- 7.1 实时荧光 PCR 仪。
- 7.2 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。
- 7.3 分析天平: 精度 0.1 mg。
- 7.4 水浴锅。
- 7.5 离心机: 离心力≥12000 g。
- 7.6 微量移液器: 0.5 μL~10 μL, 10 μL~100 μL, 20 μL~200 μL, 100 μL~1000 μL。
- 7.7 涡旋混匀仪。
- 7.8 恒温孵育器。
- 7.9 pH 计。

8 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。

8.1 哺乳动物、牛(家牛、牦牛和水牛)、羊(山羊和绵羊)通用引物探针,以及家牛、牦牛、水牛、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	来源
质控	哺乳动物	F: CTCAGCAGGGTCTTCACCAACA R: TGCCTTCCTCTAGGTCCTTCAGC P: FAM-TGGTGTTTGGCACCTCGGACCGT-TAMRA	GH	82 bp	本文件
牛	家牛、水牛和牦牛	F: GTTGCCAGCCATCTGTTGTTTG R: ATTAGGAAAGGACAGTGGGAGTGG P: FAM-TCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGG-TAMRA	GH	81 bp	本文件
羊	山羊和绵羊	F: TGCCAGCCATCTGTTGTTACC R: AAAGGACAGTGGGCACTGGAG P: FAM-CCCGTGCCTTCCTAGACCCTGGAAG-TAMRA	GH	79 bp	本文件
家牛	家牛	F: GCAGGCATGCTGGGGATG R: CTAAGAACCAGGAGCGTGGACAG P: FAM-TACCCAGGTGCTGAAGAATTGACCCGG-TAMRA	GH	135 bp	本文件

名称	检测物种	引物序列 (5'--3')	靶基因	扩增长度	来源
水牛	水牛	F: TTCATTGAYCTCCCTGCTCC R: GGAATAGGCCGGTGAGGATT P: FAM-ACTTTGGCTCTCTCC-MGB	<i>cytb</i>	100 bp	SN/T3730.7-2013
牦牛	牦牛	F: AACTTCGGCTCCATAGTAGGAGTA R: CGTCTCGGCAGATATGGACA P: FAM-CGGAGGAGAATGCTGTTGTGTATCGGATGT-TAMRA	<i>cytb</i>	124 bp	BJS201904
山羊	山羊	F: GGAGGGAAGTGGAGACCTCAGTG R: GGTGTGTGGTTCCTCACTG P: FAM-CCTTATTCGGAACCTCCCCACCCCA-TAMRA	<i>GH</i>	121 bp	本文件
绵羊	绵羊	F: CGGAGTAATCCTCCTATTTGC R: CTAGGCTTGTGCCAATATATGGA P: FAM-TATTACCAACCTCCTTT-MGB	<i>cytb</i>	137 bp	GB38164-2019

8.2 三氯甲烷（氯仿）。

8.3 异丙醇。

8.4 *Taq* 酶：5 U/ μ L。

8.5 UNG 酶（尿嘧啶-N-糖基化酶）。

8.6 70%乙醇（V/V）。

8.7 NaCl 溶液：1.2 mol/L，灭菌后室温贮存。

8.8 $MgCl_2$ 溶液：2.5 mmol/L，灭菌后室温贮存。

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

8.10 蛋白酶 K 溶液：10 mg/mL，用 X mL 的无菌水或者蛋白酶 K 缓冲液溶解 10X mg 蛋白酶 K 粉末（如用 5 mL 的无菌水或者蛋白酶 K 缓冲液溶解 50 mg 的蛋白酶 K 粉末），涡旋混匀制备成浓度为 10 mg/mL 的蛋白酶 K 溶液，-20℃贮存。

8.11 CTAB 提取液：20 g/L CTAB，1.4 mol/L NaCl，0.1 mol/L Tris-HCl，0.02mol/L Na_2EDTA ，pH 8.0，灭菌后室温贮存。

8.12 CTAB 沉淀液：5 g/L CTAB，40 mmol/L NaCl，灭菌后室温贮存。

8.13 10×PCR 缓冲液： KCl 100 mmol/L， $(NH_4)_2SO_4$ 160 mmol/L， $MgSO_4$ 20 mmol/L，Tris-HCl (pH 8.8)。

8.14 实时荧光 PCR 反应混合液：12.5 μ L 反应体系包括 1 U~2 U 的 *Taq* 酶、2×PCR 缓冲液、2.5 mmol/L~4.0 mmol/L 的 $MgCl_2$ 、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。

9 检测步骤

9.1 样品前处理

9.1.1 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。

9.1.2 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。

9.2 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 μ L~100 μ L 蛋白酶 K（10 mg/mL）；置于 65℃ 恒温孵育器中 500 rpm~1000 rpm 震荡孵育 2 h 左右（或 200 rpm~300 rpm 震荡孵育过夜）；取出后 13000 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13000 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13000 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，13000 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℃冰箱中预冷的无水乙醇混匀，-20℃放置0.5 h~1 h，13000 g离心10 min~15 min，弃上清，用70%乙醇洗涤沉淀一次，12000 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℃保存。

也可用等效DNA提取试剂盒提取模板DNA。

9.3 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A₂₆₀和A₂₈₀。DNA的浓度按照公式（1）计算：

$$c = A \times N \times 50 / 1000 \cdots \cdots \cdots (1)$$

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。
当A₂₆₀/A₂₈₀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。
将DNA浓度稀释至5 ng/μL~10 ng/μL，用于后续实时荧光PCR扩增试验。

9.4 实时荧光 PCR 扩增

9.4.1 实验对照的设立

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，平行反应体系分别进行靶向基因与内参基因扩增，以Ct平均值作为最终结果。

9.4.2 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 μmol/L）	0.5 μL
反向引物（10 μmol/L）	0.5 μL
探针（10 μmol/L）	0.5 μL
DNA 模板（5 ng/μL~10 ng/μL）	5.0 μL
灭菌 ddH ₂ O	6.0 μL

9.4.3 实时荧光 PCR 反应程序

50℃ 2 min；95℃ 10 min；95℃ 15 s，60℃ 1 min，40个循环。

9.5 质量控制

- 以下条件有一条不满足时，实验视为无效：
- a) 空白对照：无荧光对数增长，相应的 Ct 值>40.0。
 - b) 阴性对照：无荧光对数增长，相应的 Ct 值>40.0。
 - c) 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。
 - d) 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。

9.6 结果判断与表述

9.6.1 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 ≤ 30 ，则判定被检样品阳性。
- b) 如 Ct 值 ≥ 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 ≥ 35 ，则判定被检样品阴性。

9.6.2 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”。

10 防止污染措施

防止污染措施应符合GB/T 27403附录D的规定。

附 录 A
(资料性)
扩增靶标参考序列

A. 1 哺乳动物 *GH* 基因扩增靶序列 (山羊 GeneBank: KU288612.1, 绵羊 GeneBank: EF077162.1, 家牛 GeneBank: M57764.1)

CTCAGCAGAGTCTTCACCAACAGCCTGGTGTGTTGGCACCTCGGACCGTGTCTATGAGAAGCTGAA
GGACCTGGAGGAAGGCA

A. 2 牛 *GH* 基因扩增靶序列 (家牛 GeneBank: M57764.1, 水牛 GeneBank: JF894306.1, 牦牛 GeneBank: AY271297.1)

GTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCA
CTGTCCTTTCCTAAT

A. 3 羊 *GH* 基因扩增靶序列 (山羊 GeneBank: KU288612.1, 绵羊 GeneBank: EF077162.1)

TGCCAGCCATCTGTTGTTACCCCTCCCCGTGCCTTCCTAGACCCTGGAAGGTGCCACTCCAGTGCC
CACTGTCCTTCC

A. 4 山羊 *GH* 基因扩增靶序列 (GeneBank: KU288612.1)

GGGAGGGAAGTGAAGACCTCAGTGGTATTTTATCCAAGTAAGGATGTGGTCAGGGGAGTAGAAA
TGGGGGTGTGTGGGGTGGGGAGGGTTCCGAATAAGGCAGTGAGGGGAACCACACACC

A. 5 绵羊 *cytb* 基因扩增靶序列 (GeneBank: KU899144.1)

CGGAGTAATCCTCCTATTTGCGACAATAGCCACAGCATTCATAGGCTACGTCTTACCATGAGGAC
AAATATCATTCTGAGGAGCAACAGTTATTACCAACCTCCTTTCAGCAATTCCATATATTGGCACA
AGCCTAG

A. 6 家牛 *GH* 基因扩增靶序列 (GeneBank: M57764.1)

GCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGCTGAAGAATTGACCCGGTTC
CTCCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCTTCTCTGTGACACACCCTGTCCACGCCCCTGGT
TCTTAG

A. 7 牦牛 *cytb* 基因扩增靶序列 (GeneBank: MT975686.1)

CGTCTCGGCAGATATGGGCAACGGAGGAGAATGCTGTTGTTGTATCGGATGTGTAGTGTATTGCT
AGGAATAGGCCTGTGAGGATTTGTAGGATTAAGCATACTCCTAGGAGGGAGCCGAAGTT

A. 8 水牛 *cytb* 基因扩增靶序列 (GeneBank: MH718885.1)

TTCATTGATCTCCCTGCTCCATCAAACATCTCATCATGATGAACTTTGGCTCTCTCCTAGGCATC
TGCTAATTCTGCAAATCCTCACCGGCCTATTCC