

动物源性产品中牛源性成分检测 数字 PCR 法

Detection of Bovine ingredient in animal driven products -- Digital PCR
method

2024 - 06 - 27 发布

2024 - 07 - 27 实施

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专利的责任。

本文件由浙江省农产品质量安全学会提出并归口。

本文件起草单位：浙江省农业科学院、迈克生物股份有限公司。

本文件主要起草人：纪艺、陈笑芸、付军、彭城、王晓雪、汪小福、徐俊锋。

浙江省农产品质量安全学会

动物源性产品中牛源性成分检测 数字 PCR 法

1 范围

本文件描述了使用数字 PCR 检测方法测定动物源性产品中牛源性（不适用水牛）DNA 成分的原理、试剂与材料、主要仪器和设备、操作步骤、结果分析与表述、定量限和检出限。

本文件适用于牛源性产品（不适用水牛）DNA 成分的定性和定量检测。

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。

农业部 2406 号公告-7-2016 转基因动物及其产品成分检测 DNA 提取和纯化。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

数字 PCR Digital PCR

一种核酸绝对定量的 PCR 技术。将 PCR 体系分配成大量微反应体系进行 PCR 扩增，扩增后对微反应体系进行荧光信号阅读，根据阴性反应确定样品拷贝数，通过泊松分布原理计算获得样品中靶序列拷贝数浓度。

4 原理

本文件针对牛种属特异序列选取特异性引物和探针进行数字 PCR 扩增，根据荧光阈值判断每个微反应体系的扩增结果，依据微反应体系的阴、阳性率和泊松分布公式计算得到数字 PCR 反应体系中的牛种属特异性基因拷贝数浓度。

5 试剂与材料

除非另有说明，所有试验仅使用分析纯及以上试剂和无 DNase/RNase 的重蒸馏水或符合 GB/T 6682 二级水以上标准的水。

5.1 基因组 DNA 提取相关试剂或动物成分相关 DNA 提取试剂盒

按照农业部 2406 号公告-7-2016 中 4 执行或采用等效的动物成分 DNA 提取试剂盒。

5.2 数字 PCR 反应试剂盒

按照不同的数字 PCR 平台的说明书选取其推荐的数字 PCR 反应试剂盒。

5.3 牛种属特异性序列引物/探针 (β -actin 基因)

β -actin-F: 5' -GGCCTCGGAGTGTGTATTTCAG-3'

β -actin-R: 5' -GCCCCAGAATGAGGTTCACTT-3'

β -actin-P: 5' -AGGTGCACAGTACGTTC-3'

注 1: 预期扩增片段大小为 62 bp (参见附录 A)。

注 2: β -actin-P 为牛种属特异性序列的 TaqMan 探针, 其 5'端标记荧光报告基团 (如 FAM、HEX 等), 3'端标记对应的荧光淬灭基团 (NFQ-MGB)。

6 主要仪器和设备

6.1 数字 PCR 系统: 包括微反应体系发生器或其他具有同样功能的仪器、PCR 扩增仪 (变温速率 $\leq 2^{\circ}\text{C}/\text{s}$, 孔间温度差异 $< 1.0^{\circ}\text{C}$) 和微反应体系荧光检测仪或其他具有同样功能仪器的系统。

6.2 生物安全柜或超净工作台。

6.3 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。

6.4 电子天平。

6.5 离心机。

6.6 微量移液器。

6.7 涡旋震荡仪。

7 操作步骤

7.1 试样制备

遵照农业部 2406 号公告-7-2016 中 6.1 规定执行。

7.2 DNA 模板制备

7.2.1 DNA 的提取与纯化

遵照农业部 2406 号公告-7-2016 中 6.3 执行或等效采用 DNA 提取试剂盒提取 DNA。

7.2.2 DNA 浓度和纯度的测定

遵照农业部 2406 号公告-7-2016 中 6.4 规定执行。

7.3 数字 PCR 扩增

7.3.1 对照

优先选用有证标准样品、有证标准物质或以含有牛源性成分的样品作为阳性对照, 以不含有牛源性成分的 DNA 样品 (如鲑鱼精 DNA) 作为阴性对照, 用等体积无菌水代替模板 DNA 作为空白对照。

同时进行对照和试样的数字 PCR 扩增, 试样设置 6 次重复, 对牛源性特异基因进行扩增, 以定量值的均值作为最终结果。

各对照 PCR 反应体系中, 除模板外, 反应体系和反应条件与 7.3.2 和 7.3.3 相同。

7.3.2 数字 PCR 反应体系

对样本的 PCR 扩增。牛种属特异性基因数字 PCR 扩增按表 1 在 PCR 反应管中加入反应试剂，涡旋混匀、离心。

表 1 牛种属特异性基因数字 PCR 反应体系

试剂	终浓度	体积
2×ddPCR Supermix for probes 预混液	1×	—
10 μmol/L <i>β-actin</i> -F	0.5 μmol/L	1.0 μL
10 μmol/L <i>β-actin</i> -R	0.5 μmol/L	1.0 μL
10 μmol/L <i>β-actin</i> -P	0.25 μmol/L	0.5 μL
DNA 模板		2 μL
无菌水		—
总体积		20.0 μL

注1：“—”表示体积不确定。
 注2：推荐市面上现售的数字PCR平台进行试验，并针对市面上现售的不同数字PCR平台，依据说明书调整反应体系的组分和最终体积，并保证表中所列组分的终浓度不变。
 注3：也可使用经验证适合动物组织数字PCR定量检测的试剂盒，按照试剂盒说明进行试验。

7.3.3 反应程序

设定 PCR 仪升降温速度设置为 2℃/s，扩增参数为：95℃，10 min（热激活），1 个循环；94℃，15s，60℃，1 min，40 个循环；98℃，10 min，1 个循环；4℃保存反应产物。扩增结束后读取荧光信号，用于后续数据分析。

注：不同PCR反应平台可以根据说明书对热启动步骤程序进行修改，但是不能对热循环（扩增程序）进行修改。

8 结果分析与表述

8.1 质量控制

数字 PCR 扩增结果，阴性对照组和空白对照组均未检出阳性微滴，阳性对照有明显阳性微滴，且核酸拷贝数浓度平均值大于 5 copies/μL，则试验成立。

8.2 阈值设定

数字 PCR 结果中，阴性微滴和阳性微滴明显分开，阈值设在阴性微滴和阳性微滴分开的区域。

8.3 拷贝数计算

微滴数字 PCR 仪运行后经软件计算得出每个试样牛种属特异性基因拷贝数。每份试样 6 个重复，共 6 组数据的相对标准偏差不超过 25%时，将 6 组检测结果的平均值作为样品的检测结果，记为拷贝每微升 (copies/μL)。

8.4 检测结果表述

阴性对照、阳性对照和空白对照检测结果符合 8.1 要求的情况下，分析试样结果：

——试样检测出 *β-actin* 基因阳性微滴，且核酸拷贝数浓度平均值 ≥ 5 copies/μL，则判定为阳性。表述为“样品中检出牛源性成分，浓度为 XX copies/μL”。

——若样品中检测出 *β-actin* 基因阳性微滴，且核酸拷贝数浓度平均值 < 5 copies/μL，则需复

检。若复检结果仍检测出阳性微滴，则判定为阳性，否则判定为阴性。若阳性表述为“样品中检出牛源性成分”，若阴性表述为“样品中未检出牛源性成分”。

——若样品中未检测出 β -*actin* 基因阳性微滴，则判定为阴性。表述为“样品中未检出牛源性成分”。

9 定量限和检出限

本标准定量限为 10 copies/ μ L；检出限为 5 copies/ μ L（指在数字 PCR 反应体系中）。

浙江省农产品质量安全学会

附录 A

(资料性)

牛种属特异性基因数字 PCR 扩增产物核苷酸序列

1 GGCTCGGAG TGTGATTCA GTAGGTGCAC AGTACGTTCTGAAGTGAACC51 TCATTCTGGG GC

注：划线部分为 β -actin-F 引物序列和 β -actin-R 引物反向互补序列，方框内为探针 β -actin-P 序列。

浙江省农产品质量安全学会