

BJS

食 品 补 充 检 验 方 法

BJS 202605

代替 BJS 201904

食品中多种动物源性成分检测

2026-06-25 发布

国家市场监督管理总局 发 布

前 言

本方法代替 BJS 201904《食品中多种动物源性成分检测 实时荧光 PCR 法》。

本方法与 BJS 201904 相比,除结构调整和编辑性改动外,主要技术变化如下:

- 增加了牛、羊、黄牛、水牛、鸡、鸭、鹅、马、兔 9 种检测源性,更改了适用范围(见第 1 章,2019 年版的第 1 章);
- 更改了样品前处理方法(见 5.1,2019 年版的 5.1);
- 更改了实时荧光 PCR 扩增(见 5.4,2019 年版的 5.4);
- 更改了试验对照(见 5.5,2019 年版的 5.5);
- 更改了结果判定(见 7.1,2019 年版的 6.2);
- 删除了污染判定(见 2019 年版的第 7 章);
- 增加了方法检出限(见第 9 章)。

食品中多种动物源性成分检测

1 范围

本方法规定了牛、羊、猪(*Sus scrofa*)、黄牛(*Bos taurus*)、水牛(*Bubalus bubalis*)、牦牛(*Bos grunniens*)、山羊(*Capra hircus*)、绵羊(*Ovis aries*)、鸡(*Gallus gallus*)、鸭(*Anas platyrhynchos*)、鹅(*Anser cygnoides*)、驴(*Equus asinus*)、马(*Equus caballus*)、兔(*Oryctolagus cuniculus*)、鼠源性成分的实时荧光 PCR 检测方法。

本方法适用于畜禽肉及副产品、肉制品、乳制品、复合调味料、畜禽肉罐头,及其他含动物成分的食品中牛、羊、猪、黄牛、水牛、牦牛、山羊、绵羊、鸡、鸭、鹅、驴、马、兔、鼠源性成分的定性检测。

注:本方法中牛源性成分包括黄牛(*Bos taurus*)、水牛(*Bubalus bubalis*)和牦牛(*Bos grunniens*)源性成分;羊源性成分包括山羊(*Capra hircus*)和绵羊(*Ovis aries*)源性成分;鼠源性成分包括海狸鼠(*Myocastor coypus*)、小鼠(*Mus musculus*)、大鼠(*Rattus norvegicus*)、豚鼠(*Cavia porcellus*)和竹鼠(*Rhizomy spruiosus*)源性成分。

2 原理

通过物种特异性引物、探针对样品中的 DNA 进行实时荧光 PCR 扩增,根据实时荧光 PCR 反应中荧光信号的扩增曲线和 Ct 值判定,实现对样品动物源性成分的定性分析。

3 试剂和材料

除另有规定外,本方法所用试剂均为分析纯,试验用水符合 GB/T 6682《分析实验室用水规格和试验方法》中一级水的要求。所有试剂均用无 DNA 酶污染的容器分装。

3.1 引物和探针序列

检测用引物和探针序列见表 1。

表 1 引物和探针序列

目标物种	序列(5'→3')	基因来源
牛	F:CCCATATCTGCCGAGACGTG	cytb 基因
	R:CCCGTCCTACGTGCATATATAA	
	P:FAM-ATTGAAGCTCCGTTTGCGTGTATGTATCG-BHQ1	
羊	F:GGTCTATATTATGGATCATATAACC	cytb 基因
	R:CTATGAATGCTGTGGCCATTGT	
	P:FAM-TAGAAACATGAAACATCGGAGTAATCCTCCT-BHQ1	

表 1 引物和探针序列 (续)

目标物种	序列(5'→3')	基因来源
黄牛	F:GTACTAGCCCTAGCCTTCTCT	<i>cytb</i> 基因
	R:CAATAGGTCTGCTACTAGGGC	
	P:FAM-ATTCTTGCTCTAATCCCCCTACTACACACC-BHQ1	
水牛	F:AGGGGTTCTAGCCCTAGTTC	<i>cytb</i> 基因
	R:CTGAATGGCCGGAACATCATA	
	P:FAM-CCTCATTTCTCATGCCCCTGCTACATACAT-BHQ1	
牦牛	F:AACTTCGGCTCCATAGTAGGAGTA	<i>cytb</i> 基因
	R:CGTCTCGGCAGATATGGACA	
	P:FAM-CGGAGGAGAATGCTGTTGTTGTATCGGATGT-BHQ1	
山羊	F:CTTTATCCTCCCATTCATCATCA	<i>cytb</i> 基因
	R:GAATTCCTGTGGGGTTGTTC	
	P:FAM-GCTCTCGCCATAGTCCACCTGCTTTTC-BHQ1	
绵羊	F:CTCATGCTACTAGTACTATTTACG	<i>cytb</i> 基因
	R:GTACGCGAATAGGAAGTATCAT	
	P:FAM-TGACTTACTCGGAGACCCAGACAACACTACAC-BHQ1	
猪	F:GCACTTTATCCTGCCATTCATCATT	<i>cytb</i> 基因
	R:GTACAAGGATTAGTAGGATTAGT	
	P:FAM-CGCCCTCGCAGCCGTACATCTCCTA-BHQ1	
鸡	F:AGTAATCCTCCTCCTCACACTC	<i>cytb</i> 基因
	R:GGTTTGTGATAACGGTGGCC	
	P:FAM-CACCGCCTTTGTGGGCTATGTTCTCC-BHQ1	
鸭	F:CTTCGCCATTCACTTCCTACTA	<i>cytb</i> 基因
	R:ATTTTGTACAGTCTGATACAAGA	
	P:FAM-TTTAATCGCAGGAATCACCTAGTCCACTT-BHQ1	
鹅	F:TACACCGCAGACACTTCACTC	<i>cytb</i> 基因
	R:GCAGATAAAGAAGAGCGAAGCA	
	P:FAM-CATGCCGAGACGTCCAGTACGGATGGC-BHQ1	
驴	F:GCTAGCCTCATTATCAGTAT	<i>nad5</i> 基因
	R:GTGATGAGGATACGTGCT	
	P:FAM-TCATATCATCAATCCTCAACACCCACA-BHQ1	
马	F:TCAGGAATCCCATCCGATATG	<i>cytb</i> 基因
	R:CCGAGTTAGTAGGAGCAAGATC	
	P:FAM-CCCATTCCACCCATATTATACAATTAAAGAC-BHQ1	

表 1 引物和探针序列 (续)

目标物种	序列 (5'→3')	基因来源
兔	F:GAGTCCTGGCTCTGGTCCTA	cytb 基因
	R:ATGGGTCGGAATATCCTGCTA	
	P:FAM-CCTTGTTCTAGCCTTCATCCCATTCTTCA-BHQ1	
鼠	F:CTCCACGAGACAGGATCAAACAACCCATCAGGACTAAA	cytb 基因
	R:TCATTCTGGTTTGATGTGGGGTGGGGTATT	
	P:FAM-TAGTGGGTTAGCAGGTGTGTAGTTGTCTGGGTCTC-BHQ1	
注 1: F 为上游引物;R 为下游引物;P 为探针;扩增靶标序列见附录 A。 注 2: 牛:检测牛源性成分时使用,不判定牛的具体品种。 注 3: 羊:检测羊源性成分时使用,不判定羊的具体品种。 注 4: 黄牛、水牛、牦牛、山羊、绵羊:分别检测相应具体品种时使用。		

3.2 试剂

- 3.2.1 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB, $C_{19}H_{42}BrN$)。
- 3.2.2 氯化钠(NaCl)。
- 3.2.3 乙二胺四乙酸二钠盐(Na_2EDTA , $C_{10}H_{16}N_2O_8Na_2$)。
- 3.2.4 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris · HCl, $C_4H_{11}NO_3 \cdot HCl$)。
- 3.2.5 盐酸(HCl)。
- 3.2.6 苯酚(C_6H_5OH)。
- 3.2.7 三氯甲烷($CHCl_3$)。
- 3.2.8 异戊醇($C_5H_{12}O$)。
- 3.2.9 无水乙醇(C_2H_5OH)。
- 3.2.10 异丙醇(C_3H_8O)。
- 3.2.11 蛋白酶 K:20 mg/mL。
- 3.2.12 实时荧光 PCR 预混液($2\times$),也可用等效的实时荧光 PCR 预混液。

3.3 试剂配制

- 3.3.1 CTAB 裂解液:称取 4.00 g CTAB,16.38 g NaCl,1.50 g Na_2EDTA ,3.15 g Tris · HCl,用适量水溶解后,调节 pH 至 8.0,定容至 200 mL,121 °C 高压灭菌 20 min。
- 3.3.2 苯酚-三氯甲烷-异戊醇(25 : 24 : 1,体积比):将苯酚、三氯甲烷、异戊醇按 25 : 24 : 1 的体积混合均匀。
- 3.3.3 TE 缓冲液(Tris · HCl,EDTA 缓冲液):10 mmol/L Tris · HCl(pH 8.0),1 mmol/L Na_2EDTA (pH 8.0)。
- 3.3.4 70%乙醇:将无水乙醇、水按 70 : 30 的体积比混合均匀。

4 仪器和设备

- 4.1 组织均质器。
- 4.2 电子天平:感量 0.01 g、0.001 g。

- 4.3 恒温水浴装置:室温 $\sim$ 100℃。
- 4.4 离心机(最大离心力 $\geq$ 12 000*g*)。
- 4.5 核酸蛋白分析仪。
- 4.6 移液器(0.1 μ L $\sim$ 2.5 μ L、0.5 μ L $\sim$ 10 μ L、10 μ L $\sim$ 100 μ L、100 μ L $\sim$ 1 000 μ L)。
- 4.7 涡旋振荡器。
- 4.8 实时荧光 PCR 仪。
- 4.9 高压灭菌器(温度 105℃ $\sim$ 135℃,压力 0 MPa $\sim$ 0.4 MPa)。
- 4.10 pH 计:精度 0.01,仪器应有温度补偿系统,若无温度补偿系统,应在(25 $\pm$ 1)℃使用。

5 分析步骤

5.1 样品前处理

固体、半固体样品:多部位取适量样品(优先取样品的肌肉组织、肉糜、动物副产品或动物性产品部分)至洁净离心管或密封袋中,均质混匀,−20℃保存备用。

液体样品:混匀后直接分装至洁净离心管或密封袋中,−20℃保存备用。

注:多部位取样不少于 6 个点位。

5.2 DNA 提取

可按下列方法提取 DNA,也可用等效的商品化试剂盒提取 DNA。

- 取均质(混匀)后的样品 0.1 g(100 μ L),置于 2 mL 离心管中,加入 600 μ L CTAB 裂解液(3.3.1)和 20 μ L 蛋白酶 K(3.2.11),振荡混匀,65℃孵育 1 h $\sim$ 2 h,期间每隔 10 min 振荡混匀若干次。
- 加入 500 μ L 的苯酚-三氯甲烷-异戊醇(3.3.2),充分振荡混匀,12 000*g* 离心 5 min。
- 小心吸取上清液至洁净的 1.5 mL 离心管内,加入等体积的异丙醇(3.2.10),振荡混匀,12 000*g* 离心 5 min,弃去上清液。
- 用 500 μ L 70%乙醇(3.3.4)洗涤沉淀,12 000*g* 离心 1 min,弃去上清液。重复此步骤一次。
- 室温放置 3 min $\sim$ 5 min,晾干;加入 50 μ L $\sim$ 100 μ L TE 缓冲液(3.3.3),溶解 DNA。−20℃保存备用。

5.3 DNA 浓度和纯度的测定

使用核酸蛋白分析仪检测 DNA 溶液浓度及纯度。DNA 浓度宜在 1 ng/ μ L $\sim$ 100 ng/ μ L 之间, A_{260}/A_{280} 宜在 1.5 $\sim$ 2.0 之间。

5.4 实时荧光 PCR 扩增

各动物源性成分 PCR 扩增均采用 25 μ L 的反应体系,体系组成见表 2。

表 2 实时荧光 PCR 反应体系组成

试剂名称	终浓度	体积/ μ L
实时荧光 PCR 预混液(2 $\times$)	1 $\times$	12.5
上游引物(10 μ mol/L)	160 nmol/L	0.4
下游引物(10 μ mol/L)	160 nmol/L	0.4

表 2 实时荧光 PCR 反应体系组成 (续)

试剂名称	终浓度	体积/ μL
探针(10 $\mu\text{mol/L}$)	160 nmol/L	0.4
DNA 模板(1 ng/ μL ~100 ng/ μL)	—	1.0
灭菌去离子水	—	10.3

PCR 扩增反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;35 个循环(95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,收集荧光)。可依据荧光 PCR 仪的使用说明进行调整。

5.5 试验对照

检验过程分别设置阳性对照、阴性对照和空白对照。

以含目标源性成分的样品为阳性对照,以不含目标源性成分的样品为阴性对照,用等体积的灭菌去离子水代替模板 DNA 作为空白对照。依据 5.2 制备阳性对照和阴性对照 DNA。

样品、阳性对照、阴性对照和空白对照设置两个平行的反应体系,取平均 Ct 值作为最终结果。

6 质量控制

以下条件有一项不满足时,结果视为无效:

- a) 空白对照:无 FAM 荧光信号检出;
- b) 阴性对照:无 FAM 荧光信号检出;
- c) 阳性对照:有 FAM 荧光信号检出,且出现典型的扩增曲线,Ct 值 ≤ 30.0 。

7 结果判定与表述

7.1 结果判定

7.1.1 如有 FAM 荧光信号检出,Ct 值 ≤ 30.0 ,则判定为被检样品阳性。

7.1.2 如 Ct 值 ≥ 35.0 ,则判定为被检样品阴性。

7.1.3 如 $30.0 < \text{Ct 值} < 35.0$,则需按照第 5 章重复试验。如再次扩增后 Ct 值仍 < 35.0 ,则判定被检样品阳性;如再次扩增后 Ct 值 ≥ 35.0 ,则判定被检样品阴性。

7.2 结果表述

结果为阳性者,表述为“检出 $\times\times$ 源性成分”。

结果为阴性者,表述为“未检出 $\times\times$ 源性成分”。

8 防污染措施

检测过程中防止交叉污染的措施按照 GB/T 27403《实验室质量控制规范 食品分子生物学检测》中的规定执行。

9 其他

本方法的检出限为 1%(质量分数)。

附 录 A

(资料性)

各动物源性成分基因扩增靶标序列

牛源性成分基因扩增靶标参考序列(黄牛 GenBank:MH714783.1;水牛 GenBank:MT182642.1;牦牛 GenBank:AB542193.1):CCCATATCTGCCGAGACGTGAACTACGGCTGAATCATCCGATACATACACGCAAACGGAGCTTCAATGTTTTTATCTGCTTATATATGCACGTAGGACGAG。

羊源性成分基因扩增靶标参考序列(山羊 GenBank:EU130780.1;绵羊 GenBank:MW677369.1):GGTCTATATTATGGATCATATACCTTTCTAGAAACATGAAACATTGGAGTAATCCTCCTGCTCGCAACAATGGCTACAGCATTTCATAG。

黄牛源性成分基因扩增靶标参考序列(GenBank:MH714783.1):GTACTAGCCCTAGCCT-TCTCTATCCTAATTCTTGCTCTAATCCCCCTACTACACACCTCCAAACAACGAAGCATAATATTCCGACCACTCAGCCAATGCCTATTCTGAGCCCTAGTAGCAGACCTATTG。

水牛源性成分基因扩增靶标参考序列(GenBank:MT182642.1):AGGGGTTCTAGCCCTAGT-TCTCTCCATCCTAATCCTCATTCTCATGCCCCTGCTACATACATCCAAACAACGAAGTATGATGTTCCGGCCATTTCAG。

牦牛源性成分基因扩增靶标参考序列(GenBank:AB542193.1):AACTTCGGCTCCATAGTAG-GAGTATGCTTAATCCTACAAATCCTCACAGGCCTATTCTAGCAATACACTACACATCCGATACAACAACAGCATTCTCCTCCGTTGTCCATATCTGCCGAGACG。

山羊源性成分基因扩增靶标参考序列(GenBank:EU130780.1):CTTTATCCTCCCATTTCAT-CATCACAGCTCTCGCCATAGTCCACCTGCTTTTCCTCCACGAAACAGGATCGAACAACCCCACAGGAATTC。

绵羊源性成分基因扩增靶标参考序列(GenBank:MW677369.1):CTCATGCTACTAGTAC-TATTTACGCCTGACTTACTCGGAGACCCAGACAACCTACACCCCAGCAAACCCACTTAACACTCCCCCTCACATCAAACCTGAATGATACTTCCTATTTCGCGTAC。

猪源性成分基因扩增靶标参考序列(GenBank:X56295.1):GCACTTTATCCTGCCATTTCAT-CATTACCGCCCTCGCAGCCGTACATCTCATATTCCTGCACGAAACCGGATCCAACAACCCTACCGGAATCTCATCAGACATAGACAAAATTCCATTTACCCATACTACACTATTAAAGACA TTCTAGGAGCCTTATTTATAATACTAATCCTACTAATCCTTGTAC。

鸡源性成分基因扩增靶标参考序列(GenBank:KF954727.1):AGTAATCCTCCTCCTCA-CACTCATAGCCACCGCCTTTGTGGGCTATGTTCTCCCATGGGGCCAAATATCATTTCTGAGGGCCACCGTTATCACAAACC。

鸭源性成分基因扩增靶标参考序列(GenBank:EU755252.1):CTTCGCCATTCACTTCCTAC-

TACCCTTTTTAATCGCAGGAATCACCCCTAGTCCACTTAACCTTCCTACACGAATCAGGCTC
AAACAACCCCCTAGGTCTTGTATCAGACTGTGACAAAAT。

鹅源性成分基因扩增靶标参考序列 (GenBank: AY552163.1): TACACCGCAGACACT-
TCACTCGCCTTCTCCTCAGTAGCTCACACATGCCGAGACGTCCAGTACGGATGGCTCATCC
GCAACCTCCACGCCAACGGTGCTTCGCTCTTCTTTATCTGC。

驴源性成分基因扩增靶标参考序列 (GenBank: KT829532.1): GCTAGCCTCATTATCAG-
TATTA ACTCTACCAATCATATCATCAATCCTCAACACCCACAAAAACAGCACGTATCCTC
ATCAC。

马源性成分基因扩增靶标参考序列 (GenBank: JF511458.1): TCAGGAATCCCATC-
CGATATGGACAAAATCCCATTCCACCCATATTATACAATTAAAGACATCCTAGGACTCCT
CCTCCTGATCTTGCTCCTACTAACTCTA。

兔源性成分基因扩增靶标参考序列 (GenBank: AY292717.1): GAGTCCTGGCTCTGGTC-
CTATCCATCCTTGTTCTAGCCTTCATCCCATTCTTCATATGTCTAAACAACGTAGCAGGA
TATTCCGACCCAT。

鼠源性成分基因扩增靶标参考序列 (海狸鼠 GenBank: EU544663.1; 大鼠 GenBank: GU592997.1;
 小鼠 GenBank: KF839629.1; 竹鼠 GenBank: AF326274.1; 豚鼠 GenBank: HM447187.1): CTCCAC-
GAGACAGGATCAAACAACCCATCAGGACTAAACTCAGATTTCAGACAAAATTCCATTTAC-
CCATATTATACAATCAAGGATATCCTAGGACTATTATTCTACTAATGCTTCTCATACTA
TTAGTACTATTCTCCCCTGACCTCCTAGGAGACCCAGACA ACTATACTCCTGCTAACCCAT
TAAATACCCACCCACATCAAACCAGAATGA

本方法起草单位: 成都市食品检验研究院 (段庆梓、尚柯、孙宏虎、王巍、张梦姣、肖全伟、蔡炯、
 李绍波、赵红阳、吴文林、王同智、张敏)。