《肉及奶制品中黄牛水牛DNA成分检测

--实时荧光PCR法》

编制说明

目 录

[1. 标准立项的背景及意义 3](#_Toc137546987)

[1.1. 方法起草单位与主要起草人 3](#_Toc137546988)

[1.2. 目的和意义 3](#_Toc137546989)

[1.3. 起草过程 3](#_Toc137546990)

[2. 第一阶段 项目团体标准正式立项 4](#_Toc137546991)

[3. 与国内外有关法律法规和其它标准的关系 5](#_Toc137546992)

[4. 标准的制定与起草原则 5](#_Toc137546993)

[5. 实验结果 5](#_Toc137546994)

[5.1 材料与仪器 5](#_Toc137546995)

[5.2 方法 6](#_Toc137546996)

[5.3肉及奶制品中黄牛水牛DNA成分检测--实时荧光PCR法建立 6](#_Toc137546997)

[5.4 实际样品检测 7](#_Toc137546998)

[6. 起草过程中主要分歧意见的处理情况 8](#_Toc137546999)

# 标准立项的背景及意义

* 1. 方法起草单位与主要起草人

本方法主要起草单位：深圳市计量质量检测研究院

本方法主要起草人：朱成杰，林霖，王坤，宋彩银，余灏，吴佳辉，张世伟，赖心田，杨国武。

* 1. 目的和意义

从最开始的欧洲“马肉风波”到中国的“假羊肉事件”，肉及肉制品掺伪事件数不胜数。黄牛，水牛，两者为不同的物种，由于肉质上的区别，黄牛肉较水牛肉贵，由于缺乏标识，消费者无法进行区分。

普通牛奶即黑白花奶牛（由纯种荷兰牛与本地黄牛经过高度选育繁殖的优良品种，经长期选育而成）所产的奶。水牛奶具有高营养价值，也是广东省特色小吃双皮奶和姜撞奶的重要加工原料，由于原料途径少，且饲养成本高导致了价格远高于普通牛奶，在对水牛奶产品的检测中发现，水牛奶常常被掺入普通牛奶。

根据《食品安全法》第三十四条规定：“禁止生产经营下列食品、食品添加剂、食品相关产品：（六）腐败变质、油脂酸败、霉变生虫、污秽不洁、混有异物、掺假掺杂或者感官性状异常的食品、食品添加剂”；第一百二十四条规定：“违法生产经营的食品、食品添加剂货值金额不足一万元的，并处五万元以上十万元以下罚款；货值金额一万元以上的，并处货值金额十倍以上二十倍以下罚款；情节严重的，吊销许可证”。根据GB7718-2011《预包装食品标签通则》4.1.2.1规定“应在食品标签的醒目位置，清晰地标示反映食品真实属性的专用名称”。

不法商家为了谋取更高的利润，可能存在以水牛肉冒充黄牛肉、普通牛奶掺伪或假冒水牛奶进行销售的行为。若该行为真实存在，是一种欺诈行为，其扰乱了市场经济秩序，损害了消费者的经济利益。

因此有必要建立能够特异识别肉及奶制品中黄牛和水牛的检测方法标准，对维护消费者权益、政府监管有重要的意义。

* 1. 起草过程

为更好发挥市场在标准化资源配置中的决定性作用，增加标准有效供给，根据国务院《深化标准化工作改革方案》、国家质检总局和国家标委会《关于培育和发展团体标准的指导意见》、《深圳市团体标准管理暂行办法》等文件精神，深圳市分析测试协会发布征集2019年深圳市分析测试协会团体标准的通知，现我院根据该通知的要求开展了此项工作的研究。具体编制过程及所需材料详见表1。

表1 团体标准制修定过程档案资料清单

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **序号** | **标准起草阶段** | **归档资料名称** | **归档资料提交单位** |
| 1 | 团体标准的提案 | 1、团体标准征集通知 | 协会秘书处 |
| 2、附件1《深圳市分析测试协会团体标准制修订提案建议书》 | 起草单位 |
| 2 | 团体标准的立项 | 1、标准立项通知 | 协会秘书处 |
| 2、立项会议专家评审意见 | 协会秘书处 |
| 3 | 团体标准的起草 | 1、关于团体标准公开征求意见的通知 | 协会秘书处 |
| 2、团体标准草案（征求意见稿） | 起草单位 |
| 3、编制说明（征求意见稿） | 起草单位 |
| 4 | 团体标准的征求意见 | 1、2019年深圳市地方标准制修订计划项目汇总表 | 协会秘书处 |
| 2、标准文本（送审稿） | 起草单位 |
| 3、编制说明（送审稿） | 起草单位。 |
| 5 | 团体标准的技术审查 | 1、团体标准的技术审查通知 | 协会秘书处 |
| 2、验证报告（三家以上机构验证） | 协会秘书处 |
| 3、标准查新情况说明 | 起草单位 |
| 4、标准文本（报批稿） | 起草单位 |
| 5、编制说明（报批稿） | 起草单位 |
| 6 | 团体标准的审批 | 1、投票结果（附件7《深圳市分析测试协会团体标准发布验收投票表决票》汇总扫描） | 协会秘书处 |
| 2、团体标准正式发布通知 | 协会秘书处 |
| 3、标准正式发布挂网的文本版本 | 起草单位 |

# 第一阶段 项目团体标准正式立项

深圳市分析测试协会于2019年8月面向会员单位征集团体标准，项目组及时提出了团体标准制订立项申请。协会在2019年9月16日组织专家召开了立项评审会议，最后《肉及奶制品中黄牛水牛DNA成分检测--实时荧光PCR法》项目通过专家组评审并获立项。

本方法主要起草单位：深圳市计量质量检测研究院。

本方法主要起草人：朱成杰，林霖，王坤，宋彩银，余灏，吴佳辉，张世伟，赖心田，杨国武。

第二阶段 形成《肉及奶制品中黄牛水牛DNA成分检测--实时荧光PCR法》团体标准（征求意见稿）

根据第一阶段调研课题研讨会的各方意见，项目组对《肉及奶制品中黄牛水牛DNA成分检测--实时荧光PCR法》进行了修改，并制定了团体标准（征求意见稿）。

# 与国内外有关法律法规和其它标准的关系

目前虽已有多种检测方法用于物种鉴别，但实时荧光PCR为标准中的主流方法。目前常用的牛DNA成分检测方法SN/T 2051-2008《食品、化妆品和饲料中牛羊猪源性成分检测方法 实时PCR法》虽然检测对象包含黄牛、水牛和牦牛但是不可以实现对三个物种的区分；而SN/T 3730.7-2013《食品及饲料中常见畜类品种的鉴定方法第7部分：水牛成分检测实时荧光PCR法》对黄牛DNA成分有非特异性扩增，不利于检测结果的判断；已发布实施的深圳市地方标准SZDB/Z 268-2017《动物产品及饲料中黄牛、水牛和牦牛源性成分实时荧光PCR检测方法》中，对黄牛的扩增曲线不典型，而对水牛的则无扩增曲线；GB/T 38164-2019《常见畜禽动物源性成分检测方法实时荧光PCR法》中有黄牛、水牛DNA成分检测，但该方法只限于单个物种的单管检测，即一个管孔中只能检测黄牛或水牛DNA成分。

国内外暂无相同标准。

# 标准的制定与起草原则

本方法通过全球公认的NCBI数据库中下载黄牛水牛线粒体基因组序列，使用Clustal X2进行序列比对，寻找特征序列，设计引物探针，并通过对探针设定不同的荧光标记，实现在单管中同时检测黄牛和水牛DNA成分并对其特异性和灵敏度进行检测。建立基于特征序列的黄牛水牛DNA成分实时荧光PCR检测方法。本方法经过多家检验机构进行了实验室间验证，表现出了良好结果。本标准是按GB/T 1.1-2009《标准化工作导则第1部分：标准的结构和编写》给出的规则编写，技术内容是参照GB/T 20001.4-2015《标准编写规则第4部分:试验方法标准》确定。

# 实验结果

5.1 材料与仪器

DNeasy mericon Food Kit（QIAGEN 69514），实时荧光PCR反应试剂Premix ExTaq（2×），引物、探针（生工生物工程上海有限公司）。

7500实时荧光PCR仪（美国ABI公司）；SHP-250恒温培养箱、DK-8D水浴锅（上海精宏公司）；纯水机（美国Millipore公司）；Allegra 64R离心机（美国Bekman公司）；Qubit核酸蛋白检测仪：美国ABI公司。

5.2 方法

**5.2.1 DNA提取**

按照DNeasy mericon Food Kit（QIAGEN 69514）说明书操作。

**5.2.2实时荧光PCR反应**

反应体系（20 μL）：实时荧光PCR反应试剂（2×）10 μL，上游引物（10 μmol/L）0.4 μL，下游引物（10 μmol/L）0.4 μL，探针（10 μmol/L）0.2 μL，DNA模板1-10 ng（Qubit荧光法），灭菌超纯水补至20 μL。

反应程序：95℃ 30 s；95℃ 5 s，60℃ 34 s，40个循环。

结果判定：Ct值＜35时，可以判定检测结果为阳性；Ct值≥35时，可以判定检测结果为阴性。

5.3肉及奶制品中黄牛水牛DNA成分检测--实时荧光PCR法建立

（1）引物探针设计

基于黄牛水牛线粒体基因组序列，设计引物探针（如表2）。

表2 引物探针列表

|  |  |
| --- | --- |
| 引物及探针 | 序列 |
| 上游引物 | 5 ’- GCCATATACTCTCCTTGGTGACA -3 ’ | |
| 下游引物 | 5 ’- GTAGGCTTGGGAATAGTACGA -3 ’ |
| 黄牛探针 | 5 ’- FAM-CAATCCAGAACTGACACCAAC-BHQ1 -3 ’, | |
| 水牛探针 | 5 ’- CY5-CATGAGCTGACAGTTTCGGTTGG-BHQ1 -3 ’ | |

（2）特异性测试

选取标准物质中心购买的标准品：黄牛、水牛、牦牛、山羊、绵羊、猪、马、骆驼、驴、兔、鼠、鸡、鸭、鹅、三文鱼。使用DNeasy mericon Food Kit（QIAGEN 69514）按说明书操作提取DNA，检测方法的特异性。检测的结果显示仅黄牛物种能检出黄牛DNA成分，仅水牛物种能检出水牛DNA成分，其余物种均未检出黄牛、水牛DNA成分（如表3）。

表3 引物探针特异性实验结果

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 物种名称 | 黄牛Ct值 | 水牛Ct值 |
| 黄牛 | 16 | >35 |
| 水牛 | >35 | 12 |
| 牦牛 | >35 | >35 |
| 山羊 | >35 | >35 |
| 绵羊 | >35 | >35 |
| 猪 | >35 | >35 |
| 马 | >35 | >35 |
| 骆驼 | >35 | >35 |
| 驴 | >35 | >35 |
| 兔 | >35 | >35 |
| 鼠 | >35 | >35 |
| 鸡 | >35 | >35 |
| 鸭 | >35 | >35 |
| 鹅 | >35 | >35 |
| 三文鱼 | >35 | >35 |

（3）灵敏度测试

将黄牛肉、水牛肉分别与鸡肉混合制成黄牛肉含量为1%，水牛肉含量为1%的混合样品，使用DNeasy mericon Food Kit（QIAGEN 69514）按说明书操作提取DNA，检测结果显示检出限可达1%。

表4检出限验证实验结果

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 样品含量 | 引物探针  名称 | 平行样 | | | | | | 统计学参数 | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 均值 | 方差 | RSD |
| 1%黄牛肉 | 黄牛 | 34.3 | 34.4 | 33.8 | 34.2 | 34.0 | 34.4 | 34.2 | 0.06 | 0.7% |
| 1%水牛肉 | 水牛 | 33.9 | 34.1 | 34.2 | 33.8 | 34.2 | 34.0 | 34.0 | 0.03 | 0.5% |

5.4 实际样品检测

购买10批次含黄牛、水牛样品，使用本方法检测黄牛水牛DNA成分。结果显示10份样品中均检出了相应的黄牛水牛成分。

表5实际样品检测结果汇总

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **序号** | **样品名称** | **黄牛** | **水牛** |
| 1 | 鲜水牛奶 | 未检出 | 检出 |
| 2 | 顺德水牛双皮奶 | 未检出 | 检出 |
| 3 | 部分脱脂灭菌水牛乳 | 未检出 | 检出 |
| 4 | 纯牛奶 | 检出 | 未检出 |
| 5 | 黄牛肉 | 检出 | 未检出 |
| 6 | 黄牛肉 | 检出 | 未检出 |
| 7 | 黄牛肉 | 检出 | 未检出 |
| 8 | 水牛肉 | 未检出 | 检出 |
| 9 | 水牛肉 | 未检出 | 检出 |
| 10 | 水牛肉 | 未检出 | 检出 |

# 起草过程中主要分歧意见的处理情况

本标准制定过程中无重大分歧意见