

陆川猪肉及其制品的 DNA 分子鉴定方法

DNA molecular identification method of Luchuan pig meat and its products

地方标准信息服务平台

2018 - 03 - 25 发布

2018 - 04 - 25 实施

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 原理	2
5 仪器与试剂	2
6 鉴定步骤	2
7 结果判定与表述	3
8 实验室防污染措施	4
附录 A (资料性附录) 陆川猪肉特异性条带的核苷酸序列信息	5
附录 B (规范性附录) PCR 所用引物序列	6
附录 C (资料性附录) 样品 DNA 提取方法	7
附录 D (资料性附录) 1.8%琼脂糖凝胶的制备	8

地方标准信息服务平台

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由广西大学提出。

本标准起草单位：广西大学、广西分析测试研究中心、广西经贸职业技术学院、广西陆川县质量技术监督局。

本标准主要起草人：黄丽、滕建文、杨磊、黄岛平、庞理松、夏宁、林葵、韦保耀、庞丽、李中宇。

地方标准信息服务平台

陆川猪肉及其制品的DNA分子鉴定方法

1 范围

本标准规定了陆川猪肉及其制品的DNA分子鉴定的术语和定义、原理、仪器与试剂、鉴定步骤、结果判定与表述和实验室防污染措施的要求。

本标准适用于广西壮族自治区内陆川猪肉及其制品的DNA分子鉴定。

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，仅所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。

GB/T 6682 分析实验用水规格和试验方法

GB/T 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

NY/T 2993 陆川猪

3 术语和定义

以下术语和定义适用于本文件。

3.1

陆川猪肉 Luchuan pig meat

来源于NY/T 2993中纯种陆川猪生猪，以及以纯种陆川猪为母系进行杂交后的杂元陆川猪生猪的胴体。

注：杂元陆川猪包括二元杂陆川猪和三元杂陆川猪。

3.2

陆川猪肉制品 meat products of Luchuan pig

以陆川猪肉为原料，经过相应工艺加工制成的扣肉、腊肉、腊肠、猪蹄等肉制品的总称。

3.3

聚合酶链反应 polymerase chain reaction; PCR

由“热变性→复性→延伸”三步反应组成一个循环，经过多次循环反应，使目标DNA得以大量扩增的一种在体外快速扩增特定基因或DNA片段的方法。

3.4

特异性引物 specific primer

在PCR反应中与模板DNA两端分别特异性结合，针对特定模板DNA片段设计的两段与模板两端分别互补的一对寡核苷酸序列。

4 原理

利用DNA提取试剂盒，提取样品中的DNA，以提取的DNA为模板进行PCR扩增，琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物，从而对生鲜猪肉及制品的原料属性是否归属陆川猪肉进行判断。特异性条带的核苷酸序列信息参见附录A。

5 仪器与试剂

5.1 主要仪器及耗材

- 5.1.1 PCR 仪。
- 5.1.2 电泳仪。
- 5.1.3 凝胶成像仪。
- 5.1.4 高速冷冻离心机。
- 5.1.5 小型离心机（7 000 rpm）。
- 5.1.6 冷藏冷冻冰箱。
- 5.1.7 漩涡振荡器。
- 5.1.8 微量移液器（10 μ L、100 μ L、1 000 μ L）。
- 5.1.9 0.2 mL 普通 PCR 管。
- 5.1.10 一次性 PE 手套。
- 5.1.11 1.5 mL 离心管。

5.2 主要试剂

- 5.2.1 除另有规定外，所有试剂均为分析纯或者生化试剂。
- 5.2.2 实验用水：应符合 GB/T 6682 中一级水的规格。
- 5.2.3 DNA 提取试剂盒。
- 5.2.4 1 \times TAE 缓冲液。
- 5.2.5 2 \times Es PCR Master Mix（含溴酚蓝染料）。
- 5.2.6 Marker 为 100 bp Plus DNA ladder。
- 5.2.7 琼脂糖；电泳纯。
- 5.2.8 溴化乙锭（EB）。

5.3 特异性引物

根据陆川猪线粒体TYRP1基因的核苷酸序列设计的引物，WM12扩增陆川猪的基因片段大小为1 500 bp，WM14扩增非纯种陆川猪的基因片段大小为800 bp~900 bp。PCR所用引物序列见附录B，使用前先对其进行预处理，使用小型离心机对引物进行2 s左右离心，后加入说明书上标注的各引物稀释所需体积的ddH₂O，使引物浓度达到10 μ M，完成后将引物放入-20 $^{\circ}$ C冰箱中保存备用。

6 鉴定步骤

6.1 样品 DNA 提取

依照DNA提取试剂盒中DNA提取操作进行提取，方法参照附录C。

6.2 PCR 反应

在冰浴条件下，按25 μ L的PCR反应体系用量在PCR反应管中分别加入各PCR试剂，每个样本做三个平行，同时PCR扩增阴性对照和空白对照。配置体系时依照表1，最后加入模板DNA。

表1 PCR 反应体系

试剂名称	剂 量
引物（上游）	0.5 μ L
引物（下游）	0.5 μ L
2 \times Es Taq Master Mix	12.5 μ L
模板 DNA	1.0 μ L
补 ddH ₂ O 至	25.0 μ L

6.3 PCR 反应程序

95 $^{\circ}$ C/5min预变性；95 $^{\circ}$ C/30s变性，40 $^{\circ}$ C/30s退火，72 $^{\circ}$ C/2min延伸，35~40个循环；72 $^{\circ}$ C/5min总延伸；4 $^{\circ}$ C/5min结束扩增。PCR产物直接进行琼脂糖凝胶电泳分析或置于4 $^{\circ}$ C保存备用。

6.4 实验对照

6.4.1 阴性对照：将不含陆川猪血缘的猪肉或肉制品按6.1提取DNA，按6.2配置PCR反应体系，按6.3程序进行PCR扩增。

6.4.2 空白对照：以灭菌水代替DNA模板，按6.2配置PCR反应体系，按6.3程序进行PCR扩增。

6.5 琼脂糖电泳检测

PCR扩增完成后，尽快进行琼脂糖电泳检测，使用微量移液器取3 μ L扩增产物，加入到浓度为1.8%的琼脂糖凝胶（1.8%琼脂糖凝胶制备参见附录D）的上样孔中，同时加入3.5 μ L的Marker，用1 \times TAE作为缓冲液，按4 V/cm设定电压，电泳2 h。

6.6 紫外成像拍照

电泳结束后，小心地将凝胶从电泳槽中取出，放入盛有适当浓度溴化乙锭的避光容器里染色15min左右，染色完成后将凝胶转移到凝胶成像仪中观察拍照。拍照获得相应的电泳图进行结果判定。若不能及时进行紫外拍照观察，应将凝胶放入1 \times TAE缓冲液中暂时保存，但不宜超过4h，超过应按步骤6.4和6.5重做。

7 结果判定与表述

7.1 质量控制

以下条件有一条不满足时，结果视为无效：

——空白对照：目标基因琼脂糖电泳检测无条带；

——阴性对照：WM12 目标基因琼脂糖电泳检测无 1 500 bp 对应条带。

7.2 结果判定

将电泳后的琼脂糖凝胶置于凝胶成像仪内观察，观察测试样品琼脂糖电泳检测图，按照以下方法进行判定：

- 如测试样品 WM12 目标基因琼脂糖电泳检测有 1 500 bp 对应条带，则被检样品为陆川猪肉及其制品；
- 如测试样品 WM12 目标基因琼脂糖电泳检测无 1 500 bp 对应条带，则被检样品为非陆川猪肉及其制品；
- 如测试样品 WM12 目标基因琼脂糖电泳检测有 1 500 bp 对应条带，WM14 目标基因琼脂糖电泳检测没有 800 bp~900 bp 对应条带，则被检样品为纯种陆川猪肉及其制品；
- 如测试样品 WM12 目标基因琼脂糖电泳检测有 1500 bp 对应条带，WM14 目标基因琼脂糖电泳检测有 800 bp~900 bp 对应条带，则被检样品为杂元陆川猪肉及其制品。

8 实验室防污染措施

按照GB/T 27403的规定执行。

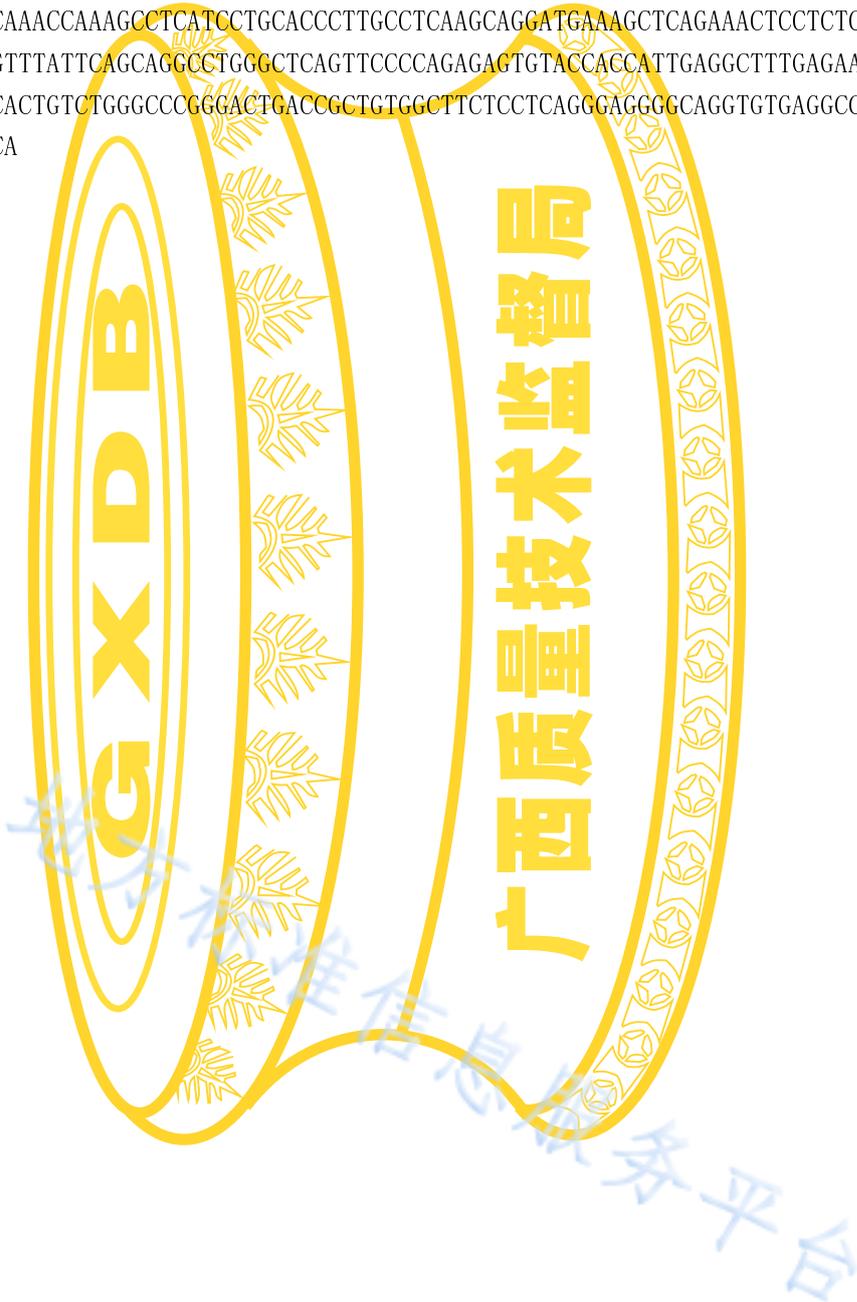
地方标准信息服务平台

附录 A
(资料性附录)

陆川猪肉特异性条带的核苷酸序列信息

陆川猪肉特异性条带的核苷酸序列信息为：

ACAAAGGGCTACAAACCAAGCCTCATCCTGCACCCTTGCCCTCAAGCAGGATGAAAGCTCAGAACTCCTCTCTCTGGGGTACAC
TTTCTTGCTCTGCTGTTTATTCAGCAGGCCTGGGCTCAGTTCCCCAGAGAGTGACCACATTGAGGCTTTGAGAAGTGGGGTATGTT
GCCAGATCTGTCCCACCTGTCTGGGCCCGGGACTGACCGCTGTGGCTTCTCCTCAGGGAGGGGCAGGTGTGAGGCCGTGACAGCAGAC
TCCCGACCCACAGCCA



附录 B
(规范性附录)
PCR 所用引物序列

表B.1给出了PCR引物序列。

表B.1 PCR 所用引物序列

引物名称	引物序列
WM12	上游 5' -CACCACCACGC-3'
	下游 5' -CACCACCACGC-3'
WM14	上游 5' -CTCCTCCTCGC-3'
	下游 5' -CTCCTCCTCGC-3'

地方标准信息服务平台

附 录 C
(资料性附录)
样品 DNA 提取方法

C.1 方法说明

依照DNA提取试剂盒中DNA提取说明进行操作。

C.2 操作方法

C.2.1 将待检猪肉或肉制品，去除肥肉后，用灭菌刀切分。提取时切取0.5 g肉样，剪碎后用干净镊子或药匙转移至干净的离心管中。

C.2.2 向离心管中加入400 μL Buffer L1和20 μL Foregene Protease，涡旋混匀，放置于65 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴或水浴中25 min~30 min，其间每间隔10 min涡旋混匀一次。

C.2.3 加入400 μL Buffer L2，颠倒混匀至分层消失，置于65 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴或水浴中10 min，然后12 000 rpm室温离心5 min~10 min，收集上清液。

C.2.4 将上清液用移液器转移到离心柱中，再将离心柱放入收集管中，12 000 rpm室温离心1 min，弃掉收集管中的废液。

C.2.5 向离心柱中加入500 μL Buffer PW，12 000 rpm室温离心1 min，弃掉收集管中的废液。

C.2.6 再向离心柱中加入700 μL Buffer WB，12 000 rpm离心1 min，弃掉收集管中的废液；将离心柱放回收集管中，12 000 rpm空管离心2 min，弃掉离心柱中残余的Buffer WB。

C.2.7 将离心柱移至新的1.5 mL离心管中，向膜中央悬空滴加100 μL 已于65 $^{\circ}\text{C}$ 预热的Buffer EB，室温放置5 min，12 000 rpm离心1 min，收集洗脱液。再次向膜中央悬空滴加100 μL 已预热的Buffer EB，12 000 rpm离心1 min，收集洗脱液；将两次收集的洗脱液合并，即得样品DNA。DNA提取后置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

附录 D

(资料性附录)

1.8%琼脂糖凝胶的制备

- D.1 将凝胶托架两端用胶带封闭并水平放置在工作台上，放上梳子，使梳齿下沿距托架板 0.5mm~1.0 mm。
- D.2 配制凝胶：称取 1.8 g 琼脂糖于三角瓶中，加入 100 mL 1×TAE 电泳缓冲液，加热溶解琼脂糖。
- D.3 待琼脂糖溶液冷至 50 ℃时，将胶液沿托架胶板边缓慢连续注入，让胶液自由流向各方，凝胶厚度控制在 3 mm~5 mm 之间。待凝胶完全凝固后，撤去两端胶带。将托架放入电泳槽中，加入 1×TAE 电泳缓冲液，使之浸过胶面，拔出梳子，待用。
-

地方标准信息服务平台

地方标准信息平台

中华人民共和国广西地方标准

陆川猪肉及其制品的 DNA 分子鉴定方法

DB45/T 1669—2018

广西壮族自治区质量技术监督局统一印刷

版权专有 侵权必究