



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 20190—2006

---

## 饲料中牛羊源性成分的定性检测 定性聚合酶链式反应(PCR)法

Detection of bovine, sheep and goat-derived material in feeds—  
Qualitative polymerase chain reaction(PCR)method

2006-05-17 发布

2006-09-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局  
中国国家标准化管理委员会 发布

## 前 言

本标准的附录 A 为规范性附录。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会提出。

本标准起草单位：国家饲料质量监督检验中心（北京）、中国农业科学院农业资源与农业区划研究所。

本标准主要起草人：杨曙明、宋荣、程宪国、高生、赖卫华、王彤。

## 引 言

含牛羊源性成分的动物源性饲料的使用,一直被认为是疯牛病传播的主要途径,禁止疫区含牛羊源性成分的动物源性饲料的生产、流通和使用,成为预防疯牛病感染、流行的主要手段之一。1996年欧盟提出了动物源性饲料中牛羊源性成分的检测方法(EUR 18096EN)。2002年我国发布了中国出入境检验检疫行业标准 SN/T 1119—2002 《进出口动物源性饲料中牛羊源性成分检测方法 PCR法》,用于检测动物源性饲料。

我国没有针对配合饲料和浓缩饲料等饲料产品中牛羊源性成分的检测标准, EUR 18096EN 和 SN/T 1119—2002 方法适用于动物源性饲料,在 DNA 提取上不适用于以植物为主要基质的配合饲料和浓缩饲料。本方法是在 SN/T 1119—2002、欧盟方法的基础上提出,在大量实验数据基础上建立起来的。

# 饲料中牛羊源性成分的定性检测

## 定性聚合酶链式反应(PCR)法

### 1 范围

本标准规定了 PCR 方法对饲料中牛羊源性成分定性检测。

本标准适用于饲料中牛羊源性成分的定性检测,本方法的最低检出限为 0.25%。

### 2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

### 3 原理

根据牛羊遗传物质的特异性,通过检索基因库或专利库,选择牛羊特异性的 DNA 序列,该序列必须同类动物(无论什么品种)中都具有高度保守性,而其他动物皆不含有。利用种属特异性的引物通过 PCR 扩增这一特定的 DNA 序列,通过电泳分离 PCR 产物,以标准长度的 PCR 产物作对照,检测 PCR 扩增出的这一特定的 DNA 片断,判断是否含有牛羊源性成分。此外,通过限制性内切酶酶切反应,进一步判断结果。通过对 PCR 扩增的特定 DNA 片断进行测序,与标准序列进行比较,来确认检测结果。

### 4 试剂与材料

除非另有说明,在分析中仅使用分析纯试剂,水应符合 GB/T 6682 一级水要求。

4.1 三羟甲基氨基甲烷(Tris-HCl)溶液,1 mol/L,pH 值为 8.0:在 800 mL 去离子水中溶解 121.1 g 三羟甲基氨基甲烷(Tris),冷却至室温后用浓盐酸调节溶液的 pH 值至 8.0,加水定容至 1 L,分装后高压灭菌。

4.2 三羟甲基氨基甲烷(Tris-HCl)溶液,1 mol/L,pH 值为 7.5:在 80 mL 去离子水中溶解 12.11 g Tris,冷却至室温后用浓盐酸调节溶液的 pH 值至 7.5,加水定容至 100 mL,分装后高压灭菌。

4.3 氯化钠溶液,5 mol/L:在 80 mL 水中溶解 29.22 g 氯化钠,加水定容至 100 mL。

4.4 乙二胺四乙酸二钠盐(EDTA)溶液,500 mmol/L:称取 186.1 g 二水乙二胺四乙酸二钠(EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ),加入 700 mL 水中,在磁力搅拌器上剧烈搅拌,用 10 mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 值至 8.0,用水定容到 1 L,分装后高压灭菌。

4.5 溴代十六烷基三甲胺(CTAB)提取缓冲液 I:在 800 mL 去离子水中加入 46.75 g 氯化钠,摇动容器使溶质完全溶解,然后加入 50 mL Tris-HCl 溶液(4.1)和 20 mL EDTA 溶液(4.4),然后定容至 1 L,分装后高压灭菌。

4.6 溴代十六烷基三甲胺(CTAB)提取缓冲液 II:在 800 mL 去离子水中加入 46.75 g 氯化钠,20 g 溴代十六烷基三甲胺(CTAB),摇动容器使溶质完全溶解,然后加入 50 mL Tris-HCl 溶液(4.1)和 20 mL EDTA 溶液(4.4),用水定容至 1 L,分装后高压灭菌。

4.7 核糖核酸酶 A(RNase A)贮备液:将 10 mg RNase A 溶解于 987  $\mu\text{L}$  水中,加入 10  $\mu\text{L}$  Tris-HCl