

ICS 67.050
CCS X 20

SC

中华人民共和国水产行业标准

SC/T 3062—2025

生金枪鱼肉种类鉴定方法 实时荧光PCR法

Identification of raw tuna meat species—Real-time PCR method

2025-01-09 发布

中华人民共和国农业农村部 发布



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。

本文件由农业农村部渔业渔政管理局提出。

本文件由全国水产标准化技术委员会水产品加工分技术委员会(SAC/TC 156/SC 3)归口。

本文件起草单位：中国水产科学研究院黄海水产研究所、国家水产品质量检验检测中心。

本文件主要起草人：姚琳、王联珠、曲梦、江艳华、朱文嘉、郭莹莹、柳淑芳、李娜、谭志军、宁劲松、王小娟。

本文件为首次发布。



生金枪鱼肉种类鉴定方法 实时荧光 PCR 法

1 范围

本文件描述了用实时荧光 PCR 法测定生金枪鱼肉种类的原理、试剂和材料、仪器设备、样品制备、DNA 提取、DNA 纯度和浓度测定、测定方法、质量控制与结果判定、防污染措施。

本文件适用于生金枪鱼肉产品种类的定性检测。包括马苏金枪鱼(*Thunnus maccoyii*)、大目金枪鱼(*Thunnus obesus*)、长鳍金枪鱼(*Thunnus alalunga*)、蓝鳍金枪鱼(*Thunnus thynnus*)、黄鳍金枪鱼(*Thunnus albacares*)的生鱼肉产品。本文件不适用于混合样品。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;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 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 19495.4 转基因产品检测 实时荧光定性聚合酶链式反应(PCR)检测方法

GB/T 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

3 术语和定义

GB/T 19495.4 界定的下列术语和定义适用于本文件。

3.1

实时荧光 PCR real-time polymerase chain reaction

实时荧光聚合酶链式反应。在聚合酶链式反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程,并通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。

3.2

Ct 值 cycle threshold

每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BSA:牛血清蛋白(bull serum albumin)

CTAB:十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide)

Ct:循环阈值(cycle threshold)

DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

DNase:脱氧核糖核酸酶(deoxyribonuclease)

dATP:脱氧腺苷三磷酸(deoxyadenosine triphosphate)

dCTP:脱氧胞苷三磷酸(deoxycytidine triphosphate)

dGTP:脱氧鸟苷三磷酸(deoxyguanosine triphosphate)

dNTPs:脱氧核苷酸三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphate)

dTTP:脱氧胸苷三磷酸(deoxythymidine triphosphate)

EDTA:乙二胺四乙酸(ethylene diaminetetraacetic acid)

FAM:羧基荧光素(carboxy fluorescein)

IU:酶活国际单位(International Unit)

MGB:小沟结合物(minor groove binder)
PCR:聚合酶链式反应(polymerase chain reaction)
RNA:核糖核酸(ribonucleic acid)
RNase H:核糖核酸酶 H(ribonuclease H)
ROX:羧基-X-罗丹明(carboxy-X-rhodamine)
SNP:单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism)
Taq:水生栖热菌(*Thermus aquaticus*)
Tris:三(羟甲基)氨基甲烷[tris(hydroxymethyl)aminomethane]
Tris-base:(三(羟甲基)氨基甲烷-碱)
Triton X-100:(聚乙二醇辛基苯基醚)
18S rRNA:18S 核糖体 RNA(18S ribosomal RNA)

5 原理

针对金枪鱼物种特异性 SNP 位点设计引物与探针,通过分析实时荧光 PCR 扩增曲线与 Ct 值,对生金枪鱼肉的种类进行定性判定。

6 试剂和材料

除另有规定外,所用试剂均为分析纯或生化试剂;实验用水为 GB/T 6682 中规定的一级水;所用试剂、材料均不应含 DNA 和 DNase。

6.1 试剂

- 6.1.1 苯酚。
- 6.1.2 浓盐酸。
- 6.1.3 氯仿。
- 6.1.4 异戊醇。
- 6.1.5 异丙醇。
- 6.1.6 无水乙醇。
- 6.1.7 CTAB。
- 6.1.8 氯化钠。
- 6.1.9 Tris-base。
- 6.1.10 Na_2EDTA 。
- 6.1.11 蛋白酶 K:40 IU/mg。
- 6.1.12 热启动 *Taq* DNA 聚合酶:5 IU/ μL 。
- 6.1.13 RNase H:5 IU/ μL 。
- 6.1.14 氯化钾。
- 6.1.15 硫酸铵。
- 6.1.16 七水硫酸镁。
- 6.1.17 Triton X-100。
- 6.1.18 BSA。
- 6.1.19 dNTPs。
- 6.1.20 dATP。
- 6.1.21 dCTP。
- 6.1.22 dGTP。
- 6.1.23 dTTP。

6.1.24 ROX。

6.1.25 引物与探针的名称及序列按附录 A。

6.2 溶液配制

6.2.1 苯酚:氯仿:异戊醇混合液:取 25 mL 苯酚(6.1.1)、24 mL 氯仿(6.1.3)与 1 mL 异戊醇(6.1.4)混匀,静置 12 h。

6.2.2 Triton X-100 溶液:取 100 μ L Triton X-100(6.1.17)与 9.9 mL 水混匀。

6.2.3 20 mg/mL BSA 溶液:取 0.2 g BSA(6.1.18)用水溶解并定容至 10 mL。

6.2.4 70%乙醇:取 70 mL 无水乙醇(6.1.6)与 30 mL 水混匀。

6.2.5 CTAB 裂解液:用 800 mL 水溶解 20.0 g CTAB(6.1.7),81.8 g 氯化钠(6.1.8),12.1 g Tris-base(6.1.9),7.5 g Na_2EDTA (6.1.10),调节 pH 值至 8.0,用水定容至 1 L,分装后高温高压灭菌。

6.2.6 CTAB 沉淀液:用 800 mL 水溶解 5.0 g CTAB(6.1.7),2.34 g 氯化钠(6.1.8),用水定容至 1 L,分装后高温高压灭菌。

6.2.7 20 mg/mL 蛋白酶 K 溶液:用 4 mL 水溶解 0.1 g 蛋白酶 K(6.1.11),用水定容至 5 mL,分装后保存于 $-18\text{ }^\circ\text{C}$,避免反复冻融。

6.2.8 1.2 mol/L 氯化钠溶液:用 80 mL 水溶解 7.02 g 氯化钠(6.1.8),用水定容至 100 mL,高温高压灭菌。

6.2.9 实时荧光 PCR 反应预混液 A($2\times$):12.5 μ L 反应预混液内含 1 U 的 *Taq* 酶,22.4 mmol/L 氯化钾,32 mmol/L 硫酸铵,3.5 mmol/L 硫酸镁,35 mmol/L Tris-HCl(pH 8.8),0.1 % Triton X-100,0.2 mg/mL BSA,0.2 mmol/L dNTPs 混合液(含等量的 dATP、dTTP、dCTP、dGTP)。部分实时荧光 PCR 仪需 ROX 校正,可按仪器生产厂家要求在反应预混液中添加。也可采用经验证可靠的实时荧光 PCR 商业化试剂盒(探针法),具体参照说明书使用。

6.2.10 实时荧光 PCR 反应预混液 B($2\times$):12.5 μ L 反应预混液内含 1 U 的热启动 *Taq* 酶,2.5 U 的 RNase H,25.6 mmol/L 氯化钾,38 mmol/L 硫酸铵,5 mmol/L 硫酸镁,51 mmol/L Tris-HCl(pH8.8),0.2 mmol/L 的 dNTPs 混合液(含等量的 dATP、dTTP、dCTP、dGTP)。部分实时荧光 PCR 仪需 ROX 校正,可按仪器生产厂家要求在反应预混液中添加。也可采用经验证可靠的实时荧光 PCR 商业化试剂盒(Cycling 探针法),具体参照说明书使用。

7 仪器设备

7.1 实时荧光 PCR 仪。

7.2 离心机:转速不小于 12 000 r/min。

7.3 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计:配 0.5 mL 或 1 mL 石英比色皿。

7.4 天平:感量分别为 0.1 g 和 0.001 g。

7.5 恒温水浴锅。

7.6 高压灭菌锅。

7.7 涡旋振荡器。

7.8 微量移液器:0.1 μ L~2.5 μ L,0.5 μ L~10 μ L,2 μ L~20 μ L,20 μ L~200 μ L,100 μ L~1 000 μ L。

7.9 pH 计。

8 样品制备

用灭菌手术刀(剪),剖开样品,挖取未被污染的鱼肉 1 g~2 g。用无菌研钵充分研磨样品至糜状。

9 DNA 提取

9.1 取 100 mg~200 mg 糜状试样至 2 mL 离心管中,加入 1 mL CTAB 裂解液(6.2.5)及 10 μ L 蛋白酶

K 溶液(6.2.7),65℃恒温水浴锅中消化 2 h,每隔 30 min 用涡旋振荡器振荡混匀一次。加入 700 μL 苯酚:氯仿:异戊醇混合液(6.2.1),振荡混匀 30 s,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液 650 μL 至另一 2 mL 离心管。加入 1 300 μL CTAB 沉淀液(6.2.6),混匀后于室温沉淀 1 h,12 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液。

9.2 在沉淀物中加入 350 μL 氯化钠溶液(6.2.8),溶解后加入 350 μL 氯仿(6.1.3),振荡混匀 30 s,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液 300 μL 至 1.5 mL 离心管。加入 240 μL 4℃异丙醇(6.1.5),混匀静置 1 h,12 000 r/min 离心 15 min,弃去上清液,加入 500 μL 4℃70%乙醇(6.2.4)振荡洗涤沉淀物,12 000 r/min 离心 15 min,弃去上清液,将沉淀物于室温晾干。加入 50 μL~100 μL 水溶解沉淀物,得到待测 DNA 溶液,进行实验或暂存于-18℃备用。

9.3 可采用经验证可靠的商业化 DNA 提取纯化方法或试剂盒,具体参照说明书使用。

10 DNA 浓度和纯度测定

10.1 取 5 μL 待测 DNA 溶液加水稀释至 1 mL,使用核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计,在 260 nm 和 280 nm 波长处测定吸光值。

10.2 DNA 纯度按公式(1)计算。

$$P = \frac{A_{260}}{A_{280}} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

P —— DNA 纯度;

A_{260} ——260 nm 处的吸光值;

A_{280} ——280 nm 处的吸光值。

10.3 DNA 浓度按公式(2)计算。

$$C = \frac{A_{260} \times N \times 50}{1\ 000} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

C ——DNA 浓度的数值,单位为微克每微升($\mu\text{g}/\mu\text{L}$);

A_{260} ——260 nm 处的吸光值;

N ——DNA 稀释倍数。

10.4 提取的 DNA 纯度在 1.7~1.9,浓度在 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ~0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时,适宜于实时荧光 PCR 检测。

11 测定方法

11.1 检测与对照设置

将待测 DNA 溶液按相应的反应体系与反应程序进行扩增,同时设置如下对照试验:

——阴性对照:以非目标鱼类提取的 DNA 溶液为模板,按相应的反应体系与反应程序扩增;

——阳性对照:以目标鱼类提取的 DNA 溶液为模板,按相应的反应体系与反应程序扩增;

——空白对照:以等体积水代替 DNA 溶液为模板,按相应的反应体系与反应程序扩增;

——内参对照:以样品提取的 DNA 溶液为模板,按相应的反应体系与反应程序扩增。

11.2 马苏金枪鱼源性成分检测

11.2.1 反应体系

在 PCR 反应管中,依次加入实时荧光 PCR 反应预混液 A(2×)(6.2.9)12.5 μL,上下游引物 MSF/MSR (10.0 μmol/L)各 0.4 μL,探针 MSP(10.0 μmol/L)0.3 μL,DNA 溶液 3.0 μL,用水将反应体系补足至 25.0 μL;每个样本做 3 个平行。

11.2.2 反应程序

95℃预变性 10 min 后进入循环:95℃变性 15 s,60℃退火延伸 1 min 后收集荧光信号。至少 40 个

循环。可根据实时荧光 PCR 仪、试剂盒的要求,对反应体系、反应程序进行适当调整。

11.2.3 内参基因检测

11.2.3.1 反应体系

在 PCR 反应管中,依次加入实时荧光 PCR 反应预混液 A(2×)(6.2.9)12.5 μL,上下游引物 18SF/18SR (10.0 μmol/L)各 0.5 μL,探针 18SP(10.0 μmol/L)0.6 μL,DNA 溶液 3.0 μL,用水将反应体系补足至 25.0 μL;每个样本做 3 个平行。

11.2.3.2 反应程序

按照 11.2.2 设置。

11.3 大目金枪鱼源性成分检测

11.3.1 反应体系

在 PCR 反应管中,依次加入实时荧光 PCR 反应预混液 A(2×)(6.2.9)12.5 μL,上下游引物 DMF/DMR (10.0 μmol/L)各 0.4 μL,探针 DMP(10.0 μmol/L)0.3 μL,DNA 溶液 3.0 μL,用水将反应体系补足至 25.0 μL;每个样本做 3 个平行。

11.3.2 反应程序

按照 11.2.2 设置。

11.3.3 内参基因检测

反应体系与反应程序按照 11.2.3 设置。

11.4 长鳍金枪鱼源性成分检测

11.4.1 反应体系

在 PCR 反应管中,依次加入实时荧光 PCR 反应预混液 A(2×)(6.2.9)12.5 μL,上下游引物 CQF/CQR (10.0 μmol/L)各 0.4 μL,探针 CQP(10.0 μmol/L)0.3 μL,DNA 溶液 3.0 μL,用水将反应体系补足至 25.0 μL;每个样本做 3 个平行。

11.4.2 反应程序

按照 11.2.2 设置。

11.4.3 内参基因检测

反应体系与反应程序按照 11.2.3 设置。

11.5 蓝鳍金枪鱼源性成分检测

11.5.1 反应体系

在 PCR 反应管中,依次加入实时荧光 PCR 反应预混液 B(2×)(6.2.10)12.5 μL,上下游引物 LQF/LQR (10.0 μmol/L)各 0.5 μL,探针 LQP(10.0 μmol/L)0.5 μL,DNA 溶液 3.0 μL,用水将反应体系补足至 25.0 μL;每个样本做 3 个平行。

11.5.2 反应程序

95 °C 预变性 30 s 后进入循环:95 °C 变性 5 s,55 °C 退火 10 s,72 °C 延伸 20 s 后收集荧光信号。至少 40 个循环。可根据实时荧光 PCR 仪、试剂盒的要求,对反应体系、反应程序进行适当调整。

11.5.3 内参基因检测

11.5.3.1 反应体系

在 PCR 反应管中,依次加入实时荧光 PCR 反应预混液 B(2×)(6.2.10)12.5 μL,上下游引物 18SF/18SR (10.0 μmol/L)各 0.5 μL,探针 18SP(10.0 μmol/L)0.6 μL,DNA 溶液 3.0 μL,用水补足至 25.0 μL;每个样品做 3 个平行。

11.5.3.2 反应程序

按照 11.5.2 设置。

11.6 黄鳍金枪鱼源性成分检测

11.6.1 反应体系

在 PCR 反应管中,依次加入实时荧光 PCR 反应预混液 B(2×)(6.2.10)12.5 μL,上下游引物 HQF / HQR(10.0 μmol/L)各 0.5 μL,探针 HQP(10.0 μmol/L)0.5 μL,DNA 溶液 3.0 μL,用水将反应体系补足至 25.0 μL;每个样本做 3 个平行。

11.6.2 反应程序

按照 11.5.2 设置。

11.6.3 内参基因检测

反应体系与反应程序按照 11.5.3 设置。

12 质量控制与结果判定

12.1 质量控制

当对照试验符合以下结果时,实验有效;有任一条不符合时,需重新进行提取、扩增。

——空白对照:无荧光对数增长,相应的 Ct 值 >40.0 。

——阴性对照:无荧光对数增长,相应的 Ct 值 >40.0 。

——阳性对照:有荧光对数增长,且荧光通道出现典型的扩增曲线,相应的 Ct 值 <30.0 。

——内参对照:有荧光对数增长,且荧光通道出现典型的扩增曲线,相应的 Ct 值 <30.0 。

12.2 结果判定

当过程质量控制符合要求时,可对样品检测结果进行判定:

——如果样品 Ct 值 ≤ 35.0 ,则判定被检样品阳性。

——如果样品 Ct 值 ≥ 40.0 ,则判定被检样品阴性。

——如果样品 $35.0 < \text{Ct 值} < 40.0$,则需重复检测一次。再次扩增后 Ct 值仍 <40.0 ,则判定被检样品阳性;如果再次扩增后 Ct 值 ≥ 40.0 ,则判定被检样品阴性。

13 防污染措施

检测过程中防止交叉污染的措施按照 GB/T 27403 的规定执行。

附 录 A
(规范性)
引物、探针信息表

A.1 引物与探针的名称及序列

检测中涉及的引物、探针信息见表 A.1。

表 A.1 引物与探针的名称及序列

名称	序列(5'→3')	用途
上游引物 MSF	CCACAACCTCTGAGTCTGAACCT	马苏金枪鱼 源性成分检测
下游引物 MSR	GCAAAGGCTGATAGTAAACAACAAAT	
探针 MSP	FAM-TTTCATTCTGCCACTGTG-MGB	
上游引物 DMF	GAGGGCAAAAAAAGCCATTG	大目金枪鱼 源性成分检测
下游引物 DMR	AGGTACCTGAGAGAGTAGCACATGTAGTA	
探针 DMP	FAM-CCTGTCTCAATTAC-MGB	
上游引物 CQF	TCTCCATATTCATACTCCCATTGTCT	长鳍金枪鱼 源性成分检测
下游引物 CQR	CTCTGCACATCCCTATTACCTACACA	
探针 CQP	FAM-AAACCATTCTCCTTTGA-MGB	
上游引物 LQF	GGAGGCACATACACTCATGAAACA	蓝鳍金枪鱼 源性成分检测
下游引物 LQR	CTCAGTATCATCCCATGATGAACAA	
探针 LQP ^a	FAM-cctgga(A)aca-Eclipse	
上游引物 HQF	GAGTTGTGATGCTTACATT	黄鳍金枪鱼 源性成分检测
下游引物 HQR	TATCAGTGGTACAAGAGC	
探针 HQP ^a	FAM-cacacata(G)ta-BHQ1	
上游引物 18SF	TCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTA	内参基因扩增
下游引物 18SR	AATTTGCGCGCTGCTGCCTTCCTT	
探针 18SP	FAM-CCGTTTCTCAGGCTCCCTCCGGAATCGAACC-TAMRA	

^a探针序列中小写字母代表 DNA 碱基,括号内的大写字母代表 RNA 碱基。