

ICS 65.120

CCS B46

N

中华人民共和国农业行业标准

NY/T XXXX—202×

饲料中抗生素滤渣的鉴别 实时荧光 PCR 法

Identify of antibiotic filter in feed
—Real-time fluorescent polymerase chain reaction (PCR) method

(公开征求意见稿)

202×-××-×××× 发布

202×-××-×××× 实施

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。

本文件由中华人民共和国农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）归口。

本文件起草单位：中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所，中国农业大学。

本文件主要起草人：陈爱亮，樊霞，樊宇航，张娟，田昊昀，李阳，索德成，杨增玲。

饲料中抗生素滤渣的鉴别 实时荧光 PCR 法

1 范围

本文件描述了饲料中抗生素滤渣实时荧光 PCR 法鉴别方法。

本文件适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和饲料原料中抗生素滤渣的鉴别。

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 20195 动物饲料 试样的制备

GB/T 27403—2008 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

实时荧光 PCR *real-time fluorescent polymerase chain reaction*

在 PCR 反应体系中引入荧光标记探针，利用荧光信号的积累实时监测整个 PCR 进程，通过连续监测绘制反应动力曲线，从而对样本中被扩增模板 DNA 的初始含量进行计算。

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 原理

利用青霉素 *orf70c*、土霉素 *oxyA*、新霉素 *neoN*、阿维菌素 *aveD* 基因设计特异性引物探针，对待测样进行实时荧光 PCR 扩增，根据扩增反应中产生的荧光信号增幅和 Ct 值实现对产青霉素、土霉素、新霉素、阿维菌素等抗生素滤渣成分的鉴别。

5 仪器设备

5.1 实时荧光 PCR 仪。

5.2 电子天平：精确为 0.1 mg。

5.3 离心机：离心速度不低于 14 000 r/min。

5.4 可调移液器：量程为 0.5 μL ~ 10 μL，10 μL ~ 100 μL，100 μL ~ 1000 μL。

6 试剂或材料

除另有规定，仅使用分析纯试剂。所有试剂均使用无 DNA 酶污染的容器存储或分装。

6.1 水：GB/T 6682，一级。

6.2 实时荧光 PCR 试剂（2×实时荧光 PCR 预混液）。

6.3 Tris-HCl 溶液（1 mol/L, pH=8.0）：称取 6.06 g 三羟甲基氨基甲烷(Tris)，加水(6.1)40 mL 溶解，用 HCl 调 pH 至 8.0，定容至 50 mL。

6.4 EDTA 溶液（0.5 mol/L, pH=8.0）：称取 9.306 g 二水乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na₂·2H₂O)，加水(6.1)35 mL，用 NaOH 调 pH 至 8.0，定容至 50 mL。

6.5 Tris-EDTA 缓冲液（pH=8.0）：量取 10 mL Tris-HCl 溶液(6.3)，2 mL EDTA 溶液(6.4)，加水(6.1)定容至 1 L。

6.6 引物和探针：用 Tris-EDTA 缓冲液(6.5)或水(6.1)将每条引物或者探针分别配制成 100 μmol/L 储存液备用，置于 -18℃ 以下冻存，避免多次冻融。序列见表 1。

6.7 阳性对照样品：含有目标抗生素滤渣的饲料样品。

6.8 阴性对照样品：不含抗生素滤渣的饲料样品。

表 1 引物探针序列

目标物	名称	序列	基因来源	片段大小
青霉素	orf70c-F	5'-GAGCCTTCGGATTTTCGCC-3'	<i>orf70c</i>	112 bp
	orf70c-R	5'-GCCAGCTCGCCTTACTACAA-3'		
	orf70c-P	5'-FAM-TGGCTCGGACATCCATGCCCT-BHQ1-3'		
土霉素	OxyA-F	5'-CATGACGATGAGCCTGGACC-3'	<i>oxyA</i>	114 bp
	OxyA-R	5'-GACGAGGGCACGAAGTAGTC-3'		
	OxyA-P	5'-FAM-GGCTGTGGCAGGTGGACGAC-BHQ1-3'		
新霉素	neoN-F	5'-TCAACGCCTACATCGACCTG-3'	<i>neoN</i>	181 bp
	NeoN-R	5'-CCGGTCTCGAAGATGTGGTT-3'		
	NeoN-P	5'-FAM-GCTGACCGTGAACCTGCGCT-BHQ1-3'		
阿维菌素	aveD-F	5'-CGATGAGGAGATCGGTGAGC-3'	<i>aveD</i>	140 bp
	AveD-R	5'-AGTGGGGGACTACTACGACC-3'		
	AveD-P	5'-FAM-TTGCCCGGTGAACTGCCGTC-BHQ1-3'		

注：扩增靶标序列参见附录 A

7 样品

试样制备按 GB/T 20195 执行，样品粉碎过孔径 0.5 mm 筛后保存。保存时要保持干燥、避免阳光直射，宜在 4℃ 环境下保存。

8 试验步骤

8.1 DNA 提取

平行做两份试验。DNA 提取方法参见附录 B。提取出的 DNA 如需保存，应置于 -18℃ 以下。

8.2 对照设置

试样检测过程应同时设置阴性对照、阳性对照、扩增空白对照和提取空白对照。用不含抗生素滤渣的饲料样品作为阴性对照；用含目标抗生素滤渣成分的饲料样品作为阳性对照；用等体积水替代DNA溶液作为扩增空白对照。

8.3 实时荧光 PCR 检测

8.4.1 反应体系

PCR反应体系为：2×实时荧光PCR预混液(6.2) 12.5 μL，上下游引物(10 μmol/L)、探针(10 μmol/L)添加量见2，模板DNA 5 μL，水(6.1)补足 25 μL。

表2 引物、探针添加量

目标物	引物添加量	引物添加量
青霉素	1 μL	0.25 μL
土霉素	1 μL	0.25 μL
新霉素	1 μL	0.25 μL
阿维菌素	2 μL	0.5 μL

8.4.2 反应程序

按照表3的程序在实时荧光PCR仪(5.1)上进行实时荧光PCR扩增。

表3 实时荧光 PCR 反应程序

目标物	反应参数
青霉素	95℃预变性5分钟，95℃变性15秒，58~64℃退火延伸1分钟，共40个循环
土霉素	95℃预变性5分钟，95℃变性15秒，58~64℃退火延伸1分钟，共40个循环
新霉素	95℃预变性5分钟，95℃变性15秒，58~64℃退火延伸1分钟，共40个循环
阿维菌素	95℃预变性5分钟，95℃变性15秒，58~64℃退火延伸1分钟，共40个循环

9 质量控制

当进行靶标特异性基因的实时荧光PCR检测时，应符合以下条件：

- a) 提取空白对照：Ct值 = 40或无Ct值；
- b) 扩增空白对照：Ct值 = 40或无Ct值；
- c) 阴性对照：荧光通道无荧光信号检出，Ct值 = 40或无Ct值；
- d) 阳性对照：荧光通道有荧光信号检出，且出现典型的扩增曲线，Ct值 ≤ 35.0。

10 结果判定和表述

10.1 结果判定

在反应体系有效的情况下，对样品的检测结果按以下进行判定：

- a) 有荧光信号检出，Ct值 ≤ 35.0，则判定为被检样品阳性；
- b) Ct值 = 40或无Ct值，则判定为被检样品阴性；

c) $35.0 < Ct \text{值} < 40.0$ ，则需重新测定。如再次扩增后Ct值仍为 < 40.0 ，则判定被检样品阳性；如再次扩增后Ct值 = 40或无Ct值，则判定被检样品阴性。

10.2 结果表述

结果为阳性的表述为“检出×××抗生素滤渣成分”。

结果为阴性的表述为“未检出×××抗生素滤渣成分”。

11 实验室污染防治措施

按照GBT 27403 – 2008 附录D规定执行。

12 废弃物处理

检测过程中的废弃物以及一切可能被污染的物品，收集后做无害化处理。

附录 A

(资料性)

抗生素滤渣靶标序列

A.1 青霉素 *orf70c*

靶基因参考序列如下:

5' -GAGCCTTCGG ATTTTTCGCC AACTTGGCTC GGACATCCAT GCCCTTAGCA CCGCTGATGT
ACTGATGTTT GCGCTCAATT GCAATGATAT GCTTGTAGTA AGGCGAGCTG GC-3'

A.2 土霉素 *oxyA*

靶基因参考序列如下:

5' CATGACGATG AGCCTGGACC GCGAGTACGC GGTGGTCAGC GACGAGGGCC GGCTGTGGCA
GGTGGACGAC GCCCATGGGG TGCCGTACCT CTACGACTAC TTCGTGCCCT CGTC-3'

A.3 新霉素 *neoN*

靶基因参考序列如下:

5' TCAACGCCTA CATCGACCTG CTGGAGTCCC GCGGCTACCG GGGACTGCTC CACTTCATGC
CGCTGCTGGC CTTCAAGGGC CGGCCGCTGA CCGTGAACCT GCGCTACCAG GACCTGCACC
CGGCGGACTT CCTGGCGCCG CCGGAGTACT TCCGCCGCTG GAACCACATC TTCGAGACCG G-3'

A.4 阿维菌素 *aveD*

靶基因参考序列如下:

5' CGATGAGGAG ATCGGTGAGC CGGTCGGCGG CCTTGCCCGG TGAAGTGCCG TCCCCCGGCT
GCGGCCAGTA TCCGAGGTGG GTGTTCCAC CCAGCGCACGA TTCATGAGGTC GGTCAAACGGT
CGTAGTAGTC CCCCACT-3'

附录 B

(资料性)

抗生素滤渣 DNA 提取方法

B.1 抗生素滤渣 DNA 提取方法

称取大于 20 mg 样品于 1.5 mL 离心管中，按照天根生化科技（北京）有限公司细菌基因组 DNA 提取试剂盒（DP302）的标准步骤进行核酸提取（预处理样品在上柱之前需进行离心操作）。
