

# T/GXAS

团 体 标 准

T/GXAS 781—2024

## 肉类产品动物源性成分检测方法 扩增子测 序法

Identification of animal-derived ingredients in meat products—amplicon  
sequencing method

2024 - 07 - 23 发布

2024 - 07 - 29 实施

广西标准化协会 发布



## 前 言

本文件参照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。

本文件由广西壮族自治区药品监督管理局提出并宣贯。

本文件由广西标准化协会归口。

本文件起草单位：广西壮族自治区药品检验研究院、广西-东盟食品检验检测中心、广西爱生生命科技有限公司、深圳华大智造科技股份有限公司。

本文件主要起草人：甘永琦、张赞、朱斌、樊兰艳、韦涛、陈晓东、王逸丛、巫坚、罗卫飞、姚雪莹、谭慧敏、黄晓韵、陈晓春、郑义友、薛亚馨、芦志龙、陈小聪、庞世福、蒙丽丽、叶朋朋。



# 肉类产品动物源性成分检测方法 扩增子测序法

## 1 范围

本文件描述了肉类产品动物源性成分的扩增子测序检测方法。

本文件适用于以动物的肉、血液、毛发、角骨、内脏、皮张为来源的肉类产品中动物成分的定性检测，以及同类型动物组织制成的肉类产品中动物成分的定量检测。检出限为0.1%，定量限为5%（质量分数）。

## 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 9695.19 肉与肉制品 取样方法  
 GB 19489 实验室 生物安全通用要求  
 GB/T 30989 高通量基因测序技术规程  
 GB/T 40226 环境微生物宏基因组检测 高通量测序法  
 GB/T 40664—2021 用于高通量测序的核酸类样本质量控制通用要求  
 SN/T 3500 进出口食品安全生物学检测抽样规范  
 T/CSES 81 淡水生物监测 环境DNA宏条形码法

## 3 术语和定义

GB/T 30989、GB/T 40226和T/CSES 81界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**扩增子测序** **amplicon sequencing**

利用引物介导的多重寡核苷酸组合来选择和扩增目标区域，然后对捕获目标区域进行高通量测序。

### 3.2

**高通量基因测序** **high-throughput gene sequencing**

区别于传统Sanger（双脱氧法）测序，能够一次并行对大量核酸分子进行平行序列测定的技术，通常一次测序反应能产生不低于100 Mb的测序数据。

[来源：GB/T 30989—2014，3.19]

### 3.3

**碱基识别质量** **quality of base calling**

评价碱基准确识别的概率。

注：简称为Q，通常以数值表示。碱基识别质量值与碱基识别错误率负相关，二者遵循对数函数关系。碱基识别质量值越高，错误率越低。

[来源：GB/T 40226—2021，3.4]

### 3.4

**Q20**

测序数据中，碱基识别质量值为20的碱基识别准确率为99%，或错误率为1%。

[来源：GB/T 40226—2021，3.5]

### 3.5

**Q30**

测序数据中，碱基识别质量值为30的碱基识别准确率为99.9%，或错误率为0.1%。

[来源：GB/T 40226—2021，3.6]

### 3.6

#### DNA 条形码 DNA barcode

生物体细胞核或者细胞器中能够代表该物种的标准的、有足够变异的、易扩增的短DNA序列，可用于生物体的识别和鉴定。

[来源：T/CSES 81—2023, 3.3]

### 3.7

#### 16S 核糖体 DNA 16S ribosomal DNA; 16S rDNA

线粒体基因组上编码核糖体小亚基16S rRNA的DNA序列。

[来源：T/CSES 81—2023, 3.4, 有修改]

### 3.8

#### 操作分类单元 operational taxonomic unit; OTU

扩增子测序数据按照一定的序列相似性阈值进行聚类,获得的用于表征物种的分子水平的分类单元。

[来源：T/CSES 81—2023, 3.13, 有修改]

### 3.9

#### 分子分类单元 molecular taxonomic unit

扩增子测序监测分类工作中操作单位,有特定的名称和序列分类特征,如OTU。

[来源：T/CSES 81—2023, 3.15, 有修改]

### 3.10

#### 序列相对丰度 relative abundance of sequences

样本中分配到某一分类单元的序列数占该样品序列总数的比例。

[来源：T/CSES 81—2023, 3.17]

## 4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

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

DNA: 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic Acid)

Na<sub>2</sub>EDTA: 乙二胺四乙酸二钠 (Ethylene diaminetetraacetic acid disodium salt)

Tris: 三(羟甲基)氨基甲烷 [Tris (hydroxymethyl) Aminomethane]

## 5 原理

结合DNA条形码技术与高通量测序技术对样品中动物的目标基因进行扩增测序,将测序所得序列与现有数据库中序列进行比对,从而检测样品中所含动物物种源性成分和相对丰度。

## 6 实验条件

6.1 实验室应符合 GB 19489 的要求。

6.2 高通量基因测序设备的使用条件和工作条件应符合 GB/T 30989 的要求。

## 7 试剂

除另有规定外,所有试剂均为分析纯。实验用水符合GB/T 6682中二级水的要求。

7.1 DNA 磁珠纯化试剂。

7.2 测序文库制备试剂盒。

7.3 高通量测序试剂盒。

7.4 PCR 聚合酶混合液。

7.5 蛋白酶 K 溶液: 20 mg/mL, 酶活力 30 U/mg。

7.6 RnaseA: 10 mg/mL。

7.7 氢氧化钠溶液 (NaOH): 1 mol/L。

- 7.8 无水乙醇 (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH)。
- 7.9 异丙醇 (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O)。
- 7.10 三氯甲烷 (CHCl<sub>3</sub>)。
- 7.11 加样缓冲液 (6×DNA loading buffer)。
- 7.12 核酸染料。
- 7.13 琼脂糖。
- 7.14 CTAB 提取液: CTAB 20.0 g/L, 氯化钠 81.9 g/L, Tris 12.1 g/L, Na<sub>2</sub>EDTA 7.5 g/L, pH 8.0, 使用前加入终浓度为 2% 的 β-巯基乙醇。
- 7.15 CTAB 沉淀液: CTAB 5.0 g/L, 氯化钠 2.5 g/L, pH 8.0。
- 7.16 Tris 溶液: Tris 1.21 g/L, pH 8.5。
- 7.17 70% 乙醇 (体积分数): 取 700 mL 无水乙醇 (7.8), 加入 300 mL 水, 混匀。
- 7.18 80% 乙醇 (体积分数): 取 800 mL 无水乙醇 (7.8), 加入 200 mL 水, 混匀。
- 7.19 氯化钠溶液 (NaCl): 氯化钠 70.1 g/L。
- 7.20 无菌水: 水 121℃ 高压灭菌 20 min。

## 8 仪器设备

- 8.1 高通量基因测序仪。
- 8.2 PCR 仪。
- 8.3 电泳仪。
- 8.4 凝胶成像系统。
- 8.5 荧光定量仪。
- 8.6 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。
- 8.7 高速冷冻离心机: 最大转速 12 000 rpm 以上。
- 8.8 微量移液器。
- 8.9 电子天平: 精度 0.01 g。
- 8.10 磁力架: 适用于 1.5 mL~2 mL 离心管或 96 孔 PCR 板。
- 8.11 恒温水浴锅或金属浴。
- 8.12 冰箱: -20℃ 和 2℃~8℃。
- 8.13 超净工作台或生物安全柜。
- 8.14 高压灭菌器。

## 9 样品采集与处理

### 9.1 样品采集

样品的采集、运输、放置过程中应避免受到其它种类样品的污染。在采样过程中应确保采样器具清洁、干燥、无异味。采样、制样器具及样品容器所用材质不应为采集样品造成污染。为了避免交叉污染, 应使用不同的采样器具采集不同的样品。采样抽样按 GB/T 9695.19 和 SN/T 3500 的要求执行。

### 9.2 样品处理

#### 9.2.1 肉品、内脏、角骨、皮张

依次用 70% 乙醇 (7.17) 和无菌水 (7.20) 冲洗 2~3 次, 收集到离心管或密封袋中, -20℃ 以下冻存。

#### 9.2.2 毛发

依次用 70% 乙醇 (7.17) 和无菌水 (7.20) 冲洗 2~3 次, 收集到离心管或密封袋中, 4~8℃ 保存。

### 9.2.3 肉类加工产品

取0.5 g样品中入50 mL离心管，加入2倍体积的无菌水（7.20），上下颠倒充分混匀，8 500 rpm离心5 min并弃去上清液，重新加入2倍体积的无菌水（7.20），上下颠倒充分混匀，8 500 rpm离心5 min并弃去上清液，如样品仍残留有油脂可用三氯甲烷（7.10）清洗样品1次。

## 10 检测方法

### 10.1 实验设置

以无菌水（7.20）作为空白对照DNA提取1份，待测样品DNA平行提取2份；所有DNA样品的PCR扩增平行2份。

### 10.2 核酸提取

10.2.1 肉品、内脏、皮张、毛发的样品称取0.1 g~0.3 g；血液的样品吸取0.2 mL~0.3 mL；肉类加工产品的样品称取0.5 g。

10.2.2 将样品置于2 mL离心管中，并加入1 mL CTAB提取液（7.14）和40  $\mu$ L蛋白酶K溶液（7.5），置于65  $^{\circ}$ C孵育1 h，期间每隔10 min取出颠倒混匀，12 000 rpm离心10 min；吸取上清液转移至新的离心管中，加入700  $\mu$ L三氯甲烷（7.10），涡旋振荡30 s充分混匀，12 000 rpm离心15 min；转移上清液至新的离心管中，加入2倍体积的CTAB沉淀液（7.15），室温放置1 h，12 000 rpm离心5 min；弃上清液，加入350  $\mu$ L的氯化钠溶液（7.19）以及350  $\mu$ L三氯甲烷（7.10），涡旋振荡30 s，12 000 rpm离心10 min；转移上清液至新的离心管中，加入0.8倍体积的异丙醇（7.9），轻摇混匀，室温放置20 min，12 000 rpm离心10 min；弃上清液，加入500  $\mu$ L 70%乙醇（7.17），涡旋振荡30 s，12 000 rpm离心10 min；弃上清液，室温干燥沉淀，加入50  $\mu$ L无菌水（7.20）充分溶解；加入2  $\mu$ L~10  $\mu$ L的RNaseA（7.6），轻弹均匀后，37  $^{\circ}$ C酶解作用30 min；DNA置于-15  $^{\circ}$ C~-25  $^{\circ}$ C下储存待用。

注：上述方法均可使用等效的DNA提取试剂盒提取样品DNA。

10.2.3 使用核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计检测260 nm和280 nm处的吸光值 $A_{260}$ 和 $A_{280}$ ，每个样品重复测3次，取平均值。 $OD_{260}/OD_{280}$ 的比值应为1.6~2.0，基因组的完整性和浓度应符合GB/T 40664—2021中4.2要求。

### 10.3 PCR扩增

#### 10.3.1 引物

正向引物PR2-F和反向引物PR2-R（见表1）用于扩增各样品16S rDNA的目标片段。在扩增引物PR2的5'端加入标签序列和测序接头序列以区分不同样品或使用等效的PCR扩增试剂盒。

表1 引物序列

引物名称	引物序列5'-3'
PR2-F	ATAAGACGAGAAGACCCT
PR2-R	ACATCGAGGTCGTAAACC

#### 10.3.2 反应体系

在冰上（-10  $^{\circ}$ C~0  $^{\circ}$ C）制备以下PCR反应液并混匀：PCR聚合酶混合液（7.4）12.5  $\mu$ L、正反向引物（2.5  $\mu$ M/ $\mu$ L）各2  $\mu$ L、基因组DNA（1 ng/ $\mu$ L）2  $\mu$ L、无菌水（7.20）6.5  $\mu$ L，总体系为25  $\mu$ L。用无菌水（7.20）替代样品中基因组DNA作为空白对照，平行制备三份。

#### 10.3.3 反应参数

将制备好的反应液放置PCR仪中进行扩增，程序如下：

- a) 96  $^{\circ}$ C下保持5 min；
- b) 25个周期：
  - 1) 96  $^{\circ}$ C下持续45 s；



- 2) 45 °C下持续 45 s;
- 3) 72 °C下持续 45 s。
- c) 72 °C下 3 min;
- d) 保持在 10 °C;
- e) 进行下一步实验或置于-15 °C到-25 °C下储存。

### 10.3.4 电泳检测

称取适量的琼脂糖 (7.13) 粉末, 加入电泳缓冲液, 使琼脂糖终浓度为1%, 充分溶化, 加入核酸染料 (7.12), 制胶。取2 μL PCR扩增产物和适量加样缓冲液 (7.11) 混合, 点样, 9 V/cm电泳仪中恒压电泳, 直至溴酚蓝指示剂迁移至凝胶中部。用凝胶成像仪观察电泳结果并记录。

## 10.4 高通量测序

10.4.1 选择合适的 DNA 磁珠纯化试剂 (7.1) 对 PCR 产物进行纯化。取纯化后的 PCR 产物按照高通量测序仪说明书进行文库构建和文库质检。纯化后的 PCR 产物浓度应符合高通量测序仪的文库构建要求。当文库的片段长度分布符合预期, 且文库浓度符合高通量测序仪测序要求时, 文库质检合格。最后将多个质检合格的文库按比例混合后, 选择合适的测序读长进行高通量测序, 测序步骤见附录 A 或附录 B:

- a) 标准测序: 双端测序, 测序读长 400 bp;
- b) 快速测序: 单端测序, 测序读长 50 bp。

10.4.2 测序完成后, 应进行 Q30 的统计和评估。每个 DNA 样品可用数据对应的碱基识别质量值应为: 大于 Q30 的碱基比例 $\geq$ 80%。

## 11 生物信息学分析

### 11.1 一般要求

同一批实验数据, 生物信息学分析流程及关键参数应保持一致。

### 11.2 序列质量控制

双端测序应进行序列合并。通过搜索特定序列 (去除测序接头、样品索引和引物), 并基于剪辑识别质量 (一般 $>Q20$ ) 和序列长度 (一般大于预期长度的70%) 进行序列修剪。

### 11.3 序列聚类及质量控制

选用OTU方法进行序列聚类和质量控制, 获得分子分类单元, 并过滤错误序列。将相似性高于或等于阈值 (相似性阈值一般为97%) 的序列合并成OTUs, 将序列比对到每个OTU的代表序列, 获得每个OTU在每个样品中出现的reads数。空白对照中的reads数应小于样品reads数的10%, 并剔除样品中包含的空白对照序列。

### 11.4 物种注释

将OTU的序列与物种鉴定数据库进行比对分析, 使用数据库中序列相似度和覆盖度100%的物种信息进行注释。

### 11.5 序列相对丰度

统计注释到同一物种分类水平的有效OTU的reads数, 计算每个样品中物种的相对丰度结果, 即为物种在该样品中的相对定量比值。

## 12 结果比对

12.1 登录动物 DNA 宏条形码鉴定分析平台 (<http://www.gxyjs.org.cn:9003>)。将样品数据 FASTQ 文件上传至分析平台, 对测序数据进行比对分析。

12.2 得到的分析结果中每个样品可用于物种鉴定的总 reads 数应不低于 10000。物种序列中如出现 N, 则表示该位点的碱基未确定, 需根据样品质量情况进行确认。

12.3 动物目标基因片段得到扩增，且扩增片段大小与预期片段大小一致，测序得到的序列与数据库中序列进行比对后显示为特定动物物种，表明样品中检测出动物源性成分。若有多种动物源性成分检出，检测结果会显示所有动物源性成分，以及每一种动物源性成分的相对丰度比例。

### 13 结果表述

定性结果表述为“样品中检测出 XX动物源性成分，空白对照检测结果正常”；定量结果表述为“样品中检测出 XX动物源性成分，物种占比为 X%，空白对照检测结果正常”。

### 14 检测报告

检测报告应包括肉类样品中动物物种的中文名、拉丁名、物种占比、测序方法，并应至少包括下列内容：

- a) 检测机构名称、联系方式和地址、检测员、样品接收时间及报告时间；
- b) 测序平台与测序策略。

附录 A  
(资料性附录)  
基于 MiSeq™ 测序平台的测序策略

### A.1 PCR 产物纯化

- A.1.1 将AMPure XP磁珠 (7.1) 于室温放置30 min。使用前涡旋AMPure XP磁珠 (7.1) 1 min, 确保磁珠分散均匀。
- A.1.2 向1.5 mL离心管或微孔板的孔中加入45 μL AMPure XP磁珠 (7.1)。
- A.1.3 取25 μL PCR产物, 转移至含有AMPure XP磁珠 (7.1) 的管/孔中。
- A.1.4 轻轻上下吸吹每管/孔10次, 充分混匀。
- A.1.5 在室温下静置孵育10 min。
- A.1.6 将1.5 mL离心管或微孔板置于磁力架上, 室温放置2 min, 直至上清液澄清。
- A.1.7 吸取上清液并丢弃, 勿触碰磁珠。
- A.1.8 将1.5 mL离心管或微孔板置于磁力架上, 用新制备的80%乙醇 (7.18) 洗涤磁珠, 操作如下:
- a) 各样品管中加入 200 μL 新制备的 80%乙醇 (7.18);
  - b) 在磁力架上孵育 30 s;
  - c) 小心吸取并丢弃上清液, 勿触碰磁珠。
- A.1.9 重复步骤A.1.8一次, 共进行两次80%乙醇 (7.18) 清洗。
- A.1.10 在室温下将离心管或微孔板置于磁力架上晾干10 min~15 min。
- A.1.11 从磁力架上取出, 每管/孔加入20 μL Tris溶液 (7.16)。
- A.1.12 轻轻上下吸吹10次, 确保磁珠再悬浮。
- A.1.13 将离心管或平板在室温下孵育5 min。
- A.1.14 将离心管或平板置于磁力架上至少5 min, 直至上清液澄清。
- A.1.15 从每管/孔中小心转移18 μL的上清液, 至一个新的离心管或微孔板中。
- A.1.16 进行下一步实验或置于-25 °C~-15 °C下储存。

### A.2 文库定量

- A.2.1 取2 μL纯化后的PCR产物, 使用荧光定量仪进行文库定量。
- A.2.2 取1 μL纯化后的PCR产物, 使用1%琼脂糖凝胶电泳或在生物分析仪上运行, 以检查文库大小分布, 预期大小约为450 bp。
- A.2.3 文库通过质检后, 进行下一步实验或置于-25 °C~-15 °C下储存。

### A.3 文库均一化和混合

- A.3.1 根据PCR扩增子的大小计算DNA浓度C (nM):

$$C = \frac{Cr}{(660 \times L)} \times 10^6 \dots\dots\dots (A.1)$$

式中:

- C——DNA浓度, 单位为纳摩尔 (nM);
- Cr——测定的浓度, 单位为纳克/微升 (ng/μL);
- L——平均文库大小, 单位为碱基对 (bp)。

计算结果保留三位有效数字。

- A.3.2 使用Tris溶液 (7.16) 将每个浓缩的最终文库稀释至4 nM文库。
- A.3.3 从每个稀释文库 (4 nM) 中分装5 μL, 合并到离心管中。

### A.4 文库变性

1) 该测序策略是基于 MiSeq™ 测序平台的实验方案, MiSeq™ 是 Illumina 公司提供的产品的商品名。给出这些信息是为了方便本标准的使用者, 并不表示对该测序平台的认可。如果其他测序平台具有相同的效果, 则可使用这些等效的测序平台。

- A. 4. 1 取200  $\mu\text{L}$  氢氧化钠溶液 (7.7) 加入800  $\mu\text{L}$  水, 混匀, 制备成0.2 mol/L氢氧化钠, 12 h内有效。从测序试剂盒中拿出HT1恢复至室温, 储存在  $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 直到变性样品。
- A. 4. 2 取2  $\mu\text{L}$  的PhiX质控加入3  $\mu\text{L}$  10 mM Tris pH 8.5溶液, 将PhiX质控稀释到4 nM。
- A. 4. 3 在1.5 mL离心管中混合样品: 取5  $\mu\text{L}$  4 nM文库加入5  $\mu\text{L}$  0.2 mol/L氢氧化钠, 另取5  $\mu\text{L}$  4 nM PhiX质控加入 5  $\mu\text{L}$  0.2 mol/L氢氧化钠。
- A. 4. 4 轻轻漩涡, 2 000 rpm离心1 min, 室温静置5 min。
- A. 4. 5 加入990  $\mu\text{L}$  预冷的HT1到变性的文库中, 结果获得1 mL 20 pM的变性文库。
- A. 4. 6 根据表A. 1将变性的20 pM文库稀释到想要的浓度, 推荐浓度为样品8 pM, PhiX质控 8 pM。

表A. 1 文库稀释参考表

终浓度	6 pM	8 pM	10 pM
20 pM文库	180 $\mu\text{L}$	240 $\mu\text{L}$	300 $\mu\text{L}$
预冷的HT1	420 $\mu\text{L}$	360 $\mu\text{L}$	300 $\mu\text{L}$

- A. 4. 7 轻轻漩涡, 再轻离心。
- A. 4. 8 放在冰上。

#### A. 5 混合扩增文库和 PhiX 质控

- A. 5. 1 混合上述变性的PhiX质控和变性的扩增文库, 推荐扩增文库占比为50%~70%。例如: 变性的PhiX质控 350  $\mu\text{L}$ 加入变性的扩增文库350  $\mu\text{L}$ , 轻轻漩涡, 放置冰上。
- A. 5. 2 用加热模块加热以上混合物 $96\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 2 min。
- A. 5. 3 轻轻漩涡, 立即放置冰上。
- A. 5. 4 放置冰上5 min, 取600  $\mu\text{L}$ 混合物立即上机。

#### A. 6 测序仪运行设置

- A. 6. 1 在Illumina Experiment Manager中创建样品表如下: “MiSeq” > “Next” > “Other” > “FASTQ only” > “Next”。
- A. 6. 2 根据测序需要设置相应工作流程参数:
- 标准测序 (可获得完整的扩增子序列):
    - 采用 MiSeq 500 cycles 试剂盒上机测序;
    - Sample Prep Kit: 选择“Nextera XT v2”;
    - Index Reads: 选择“2”;
    - Read Type: 选择“Paired End”;
    - Cycles Read 1: 201 Cycles, Cycles Read 2: 201 Cycles。
  - 快速测序 (可在 6 h 完成测序):
    - 采用适宜的试剂盒上机测序 (MiSeq 50 cycles、MiSeq 150 cycles 等);
    - Sample Prep Kit: 选择“Nextera XT v2”;
    - Index Reads: 选择“2”;
    - Read Type: 选择“Single End”;
    - Cycles Read 1: 51 Cycles。

## 附录 B (资料性附录)

### 基于 DNBSEQ 测序平台的测序策略

#### B.1 PCR 扩增

B.1.1 正向引物PR2-F和反向引物PR2-R用于扩增各样品的目标片段，Spike-in-1F、Spike-in-1R和Spike-in-2F、Spike-in-2R正反向引物用于扩增外参照物 Lamda DNA，以定量样品中物种的真实拷贝数。在扩增引物PR2、Spike-in-1、Spike-in-2的5'端和3'端加入标签序列和测序接头以区分不同样品；或使用适配的扩增试剂盒。

B.1.2 在冰上制备以下PCR反应液并混匀：PCR聚合酶混合液(7.4) 12.5 μL、多重PCR防污染体系1 μL、上述3对引物混合液(10 μM/μL) 2 μL、基因组DNA(5ng/μL) 1 μL、Lamda DNA(10000拷贝) 1 μL、无菌水(7.20) 7.5 μL，总体系为25 μL；用无菌水(7.20)替代样品中gDNA作为空白对照(NTC)，平行制备三份。

B.1.3 将制备好的反应液放置PCR仪中进行一步PCR，程序如下：

- a) 37 °C下保持 5 min;
- b) 96 °C下保持 10 min;
- c) 30 个周期：
  - 1) 96 °C下持续 20 s;
  - 2) 55 °C下持续 30 s;
  - 3) 72 °C下持续 30 s。
- d) 72 °C下 30 s;
- e) 保持在 10 °C;
- f) 进行下一步实验或置于-25 °C~-15 °C下储存。

#### B.2 PCR 产物纯化

B.2.1 将DNA Clean Beads磁珠(7.1)于室温放置30 min。使用前涡旋DNA Clean Beads磁珠(7.1) 1 min，确保磁珠分散均匀。

B.2.2 向1.5 mL离心管或微孔板的孔中加入30 μL DNA Clean Beads磁珠(7.1)。

B.2.3 取25 μL PCR产物，转移至含有DNA Clean Beads磁珠(7.1)的管/孔中。

B.2.4 轻轻上下吸吹每管/孔10次，充分混匀。

B.2.5 在室温下静置孵育10 min。

B.2.6 将离心管或微孔板置于磁力架上，室温放置2 min~5 min，直至上清液澄清。

B.2.7 小心吸取并丢弃上清液，勿触碰磁珠。

B.2.8 将1.5 mL离心管或微孔板置于磁力架上，用新制备的80%乙醇(7.18)洗涤磁珠，操作如下：

- a) 各样品管中加入 200 μL 新制备的 80%乙醇(7.18)；
- b) 在磁力架上孵育 30 s；
- c) 小心吸取并丢弃上清液，勿触碰磁珠。

B.2.9 重复步骤B.2.8一次，共进行两次80%乙醇(7.18)清洗。尽量吸干管内液体，若管内仍残留液体，可短暂离心后用10 μL枪头吸净底部残留液体。

B.2.10 将离心管或微孔板置于磁力架上，室温干燥至磁珠表面无反光、无开裂。

B.2.11 将离心管或微孔板从磁力架上取出，每管/孔加入25 μL TE缓冲液。

B.2.12 轻轻上下吸吹10次，确保磁珠再悬浮。

B.2.13 将离心管或平板在室温下孵育5 min。

B.2.14 将离心管或平板置于磁力架上，室温放置2 min~5 min，直至上清液澄清。

B.2.15 从每管/孔中小心转移23 μL的上清液，至一个新的离心管或微孔板中。

1) 该测序策略是基于DNBSEQ测序平台的实验方案，DNBSEQ-E25RS和DNBSEQ-G99RS均是深圳华大智造科技股份有限公司提供的产品的商品名。给出这些信息是为了方便本标准的使用者，并不表示对该测序平台的认可。如果其他测序平台具有相同的效果，则可使用这些等效的测序平台。

B.2.16 进行下一步实验或置于-25℃~-15℃下储存。

**B.3 文库定量**

B.3.1 取2 μL纯化后的PCR产物，使用荧光定量仪进行文库定量。

B.3.2 取1 μL纯化后的PCR产物，使用1%琼脂糖凝胶电泳或在生物分析仪上运行，以检查文库大小分布，预期大小约为380 bp。

B.3.3 文库通过质检后，进行下一步实验或置于-25℃~-15℃下储存。

**B.4 文库均一化和混合**

B.4.1 将所需测序文库等质量进行混合，依照公式 (B.1)、(B.2) 计算单个文库取样体积*v*。

$$n = \frac{M}{N} \dots\dots\dots (B.1)$$

式中：

*n*——单个文库取样量，单位为纳克 (ng)；

*M*——单个反应所需混合文库的总量，单位为纳克 (ng)；

*N*——所需测序文库数目。

$$v = \frac{n}{c} \dots\dots\dots (B.2)$$

式中：

*v*——单个文库取样体积，单位为微升 (μL)；

*n*——单个文库取样量，单位为纳克 (ng)；

*c*——单个文库的浓度，单位为纳克/微升 (ng/μL)。

计算结果保留三位有效数字。

B.4.2 当样品量大时，为减少取样误差，可进行X倍的混合文库方案后，取1/X进行后续的一步法DNB制备步骤。

**B.5 一步法 DNB 的制备与定量**

B.5.1 取出 DNBSEQ一步法DNB制备试剂盒 (OS-SB)，在冰上制备以下反应液并混匀：取30 ng混合文库 *V* μL，加入TE缓冲液 (20-*V*) μL、DNB制备缓冲液 (OS-SB) 20 μL，共40 μL；另取30 ng适配DNBSEQ平台的标准文库试剂 *Z* μL，加入TE缓冲液 (20-*Z*) μL、DNB制备缓冲液 (OS-SB) 20 μL，共40 μL。

B.5.2 将制备好的反应液放置PCR仪中进行一步PCR，程序如下：

- a) 95℃下保持 3 min；
- b) 40℃下保持 3 min；
- c) 保持在 4℃。

反应温度到达4℃取出PCR管，立即进行下一步反应。

B.5.3 在冰上加入以下组分并混匀：DNB聚合酶混合液I (OS) 40 μL、DNB聚合酶混合液II (OS) 4 μL。

B.5.4 将制备好的反应液放置PCR仪中，30℃下保持25 min，随后保持在4℃。

B.5.5 当反应温度达到4℃后立即加入 20 μL DNB 终止缓冲液，用阔口吸头缓慢吹打混匀，DNB制备完成，DNB可置于4℃保存备用 (48 h内使用)。

B.5.6 取2 μL DNB，使用荧光定量仪进行文库定量。

**B.6 DNB 混合与加载体系配置**

B.6.1 将上述由混合文库和标准文库所制备的两个DNB进行混合，推荐标准文库DNB质量占比为50%。用阔口吸头缓慢吹打混匀，混合后的DNB可置于4℃保存备用 (48 h内使用)。

B.6.2 根据不同的测序平台，首先使用高通量测序试剂盒套装中的试剂，配置DNB加载体系。DNBSEQ-E25平台：取混合后的DNB 102 μL，加入DNB加载缓冲液II 34 μL，阔口吸头缓慢吹打混匀，等待加载测序；DNBSEQ-G99平台：取混合后的DNB 21 μL，加入DNB加载缓冲液II 7 μL、DNB聚合酶混合液II (LC) 1 μL，阔口吸头缓慢吹打混匀，等待加载测序。



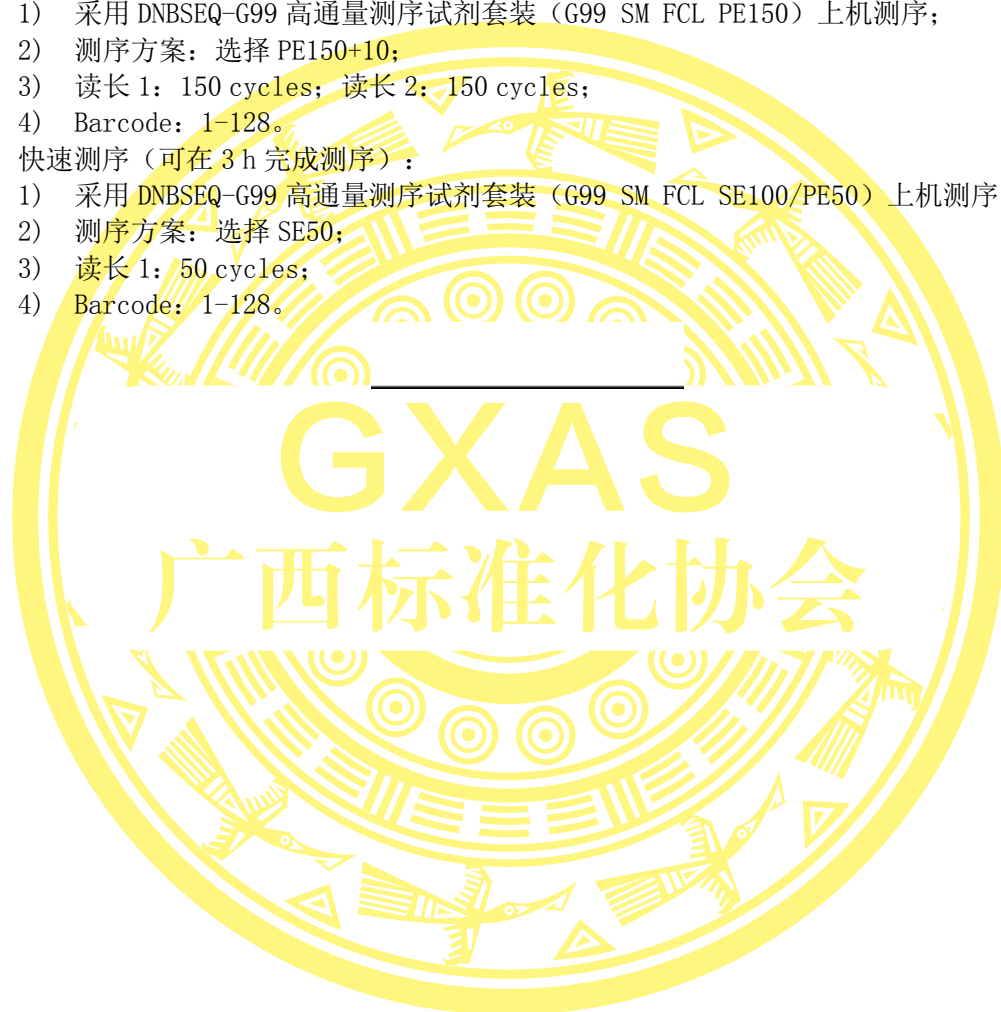
## B.7 测序仪运行设置

### B.7.1 DNBSEQ-E25平台测序仪运行设置如下：

- 快速测序：可在 4 h 完成测序；
- 采用 DNBSEQ-E25 高通量测序试剂套装（FCL SE100）上机测序；
- 测序方案：选择 SE100；
- 读长 1：50 cycles；
- Barcode：1-128。

### B.7.2 DNBSEQ-G99平台测序仪运行设置如下：

- a) 标准测序（可获得完整的扩增子序列）：
  - 1) 采用 DNBSEQ-G99 高通量测序试剂套装（G99 SM FCL PE150）上机测序；
  - 2) 测序方案：选择 PE150+10；
  - 3) 读长 1：150 cycles；读长 2：150 cycles；
  - 4) Barcode：1-128。
- b) 快速测序（可在 3 h 完成测序）：
  - 1) 采用 DNBSEQ-G99 高通量测序试剂套装（G99 SM FCL SE100/PE50）上机测序；
  - 2) 测序方案：选择 SE50；
  - 3) 读长 1：50 cycles；
  - 4) Barcode：1-128。



中华人民共和国团体标准  
肉类产品动物源性成分检测方法 扩增子测序法  
T/GXAS 781—2024  
广西标准化协会统一印制  
版权专有 侵权必究