

农业行业标准

《奶真实性鉴定 PCR 方法》

（公开征求意见稿）

编制说明

XXXX
XXXX
XXXX
XXXX
XXXX

一、工作简况

（一）任务来源

2017 年 10 月，XXXX 完成了《奶真实性鉴定方法》标准草案和项目建议书等书面材料，向全国畜牧业标准化技术委员会提出申报。2018 年 6 月，农业农村部以《奶真实性鉴定方法》（农办质标函〔2018〕20 号）批准项目立项，项目计划编号：农质标函〔2018〕20 号 201820，标准起草单位为 XXXX 等，首席专家是 XXX。

（二）制定背景

随着生活水平的提高，人们越来越注重食物的营养价值，追求食物的多样性。羊奶、骆驼奶、牦牛奶、水牛奶等特色畜奶，因其特有的营养功能而越来越受到推崇。但由于这些特色奶的奶源有限，奶产量相对于牛奶较低，价格较高，难以满足产业的发展需要，XXXX 近年来对我国特色乳进行调研和监测中发现存在许多掺假的现象。但我国尚未有相关的标准或技术规范，影响了特色奶质量安全的监管。

“工欲善其事，必先利其器”，食品品种检测之“器”在于准确、快速和方便使用的技术和方法。由于不同的物种具有其特异性的生物遗传信息-基因，使用分子生物学手段 PCR 方法结合电泳检测手段，通过检测样品的特异性基因信息，可以实现准确鉴定品种的目的。应用 PCR 方法，建立检测奶真实性的方法，使掺假无处遁。

另外，针对动物奶源的研究多集中于两种或三种奶源种属相近样品间检测，成体系的牛奶与特色奶间的鉴别方法较少，一次性实现对各奶样的鉴别检测较困难。多重 PCR 检测技术作为检测食品掺假的有效手段，该技术在同一 PCR 体系中加入不同种属特异性基因的特异性引物，可同时扩增多个模板的不同区域，得到相应的而不

同长度 PCR 产物，以此来检测目标物是否存在。基于特异性引物的 qPCR 方法在鉴别奶源成分时，需要进行复杂的引物设计，在进行多重检测时需要添加多对引物，使得反应体系复杂、优化困难且浪费试剂。通用引物克服了特异性引物的不足，不需要复杂的引物设计及优化就能实现在同一反应体系中检测多个目标物。本研究将通用引物与 TaqMan 探针相结合，利用线粒体 DNA 分子量小、分子进化速度快、不同物种之间差异大、种内稳定性好等特点，对 8 种畜奶（奶牛奶、水牛奶、牦牛奶、山羊奶、绵羊奶、马奶、驴奶和骆驼奶）进行鉴别，鉴定与区分不同畜奶源性成分，为维护消费者合法权益以及奶制品市场有序发展提供技术支撑。

XXXX，多年来一直致力于提高奶产品质量及安全性研究，在羊奶、牛奶等相互掺假检测技术研发方面开展了探索性研究，在 2017 年发布了《羊奶真实性鉴定技术规范》。标准起草组在实验室已有研究成果基础上，结合国内外相关研究资料，开展特色奶真实性鉴定技术的研究，利用奶牛特异性引物和物种特异性 TaqMan 探针，分别建立了基于普通 PCR 和多重实时荧光 PCR 法两种鉴定方法，解决了特色畜种乳来源识别的技术难题，对促进奶业高质量发展提供了重要的技术支撑。

（三）起草过程

第一阶段：起草阶段

1) 成立起草组

在接到标准制定任务后，2023 年 4 月成立标准起草组，包括 XXX、XXX、XXX、XXX 等共 9 人，见表 1。2023 年 6 月，围绕不同畜种奶的牛源性成分和识别 8 种畜种奶的动物源性成分等方面，制定了详细的实施方案和技术路线。

表 1 标准起草组成员及分工

序号	姓名	单位	分工
1	XXX	XXXX	组织实施标准制定
2	XXX	XXXX	整体方案设计、材料完善
3	XXX	XXXX	标准征求意见、方法验证
4	XXX	XXXX	标准征求意见、方法验证
5	XXX	XXXX	方法优化，组织协调
6	XXX	XXXX	方法优化、材料完善
7	XXX	XXXX	材料检查修改
8	XXX	XXXX	材料检查修改
9	XXX	XXXX	材料检查修改

2) 收集和分析相关参考文献

2018 年 6 月到 12 月，收集到如下国内国外相关法律法规、标准、书、文章，为标准起草提供了参考。

- [1] GB/T 20190-2006。中华人民共和国国家标准。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。2006，05。
- [2] 崔艳华，马莺，曲晓军，李海梅，何胜华。牦牛乳中 DNA 提取方法的建立与优化。哈尔滨工业大学学报，2011，2（43）：66-69。
- [3] 张军伟。牛奶中基因组 DNA 提取方法的建立及中国荷斯坦奶牛两个候选基因多态性研究[硕士学位论文]。武汉：华中农业大学，2009。
- [4] 苗金梁，张九凯，周正火，等。不同乳源动物成分鉴别技术研究进展[J]。食品安全质量检测学报，2021，12(18): 7314-7323。
- [5] Angela D P, Valentina T, Patrizia M, Marilisa B, Anna M, Giancarlo B, Elisabetta B, Edmondo C, Giuseppina T. DNA-based approach for species identification of goat-milk products. Food Chemistry, 2017, 229:93-97.

- [6] Caterina A, Andrea P, Marta M, Nelson M. A quadruplex PCR (qPCR) assay for adulteration in dairy products. *Food Chemistry*, 2015, 187:58-64.
- [7] Costa N, Ravasco F, Miranda R, Duthoit M, Roseiro L B. Evaluation of a commercial ELISA method for the quantitative detection of goat and cow milk in ewe milk and cheese. *Small Ruminant Research*, 2008, 79(1): 73-79.
- [8] Dalmaso A, Civera T, La Neve F, Bottero M T. Simultaneous detection of cow and buffalo milk in mozzarella cheese by Real-Time PCR assay. *Food Chemistry*, 2011, 124(1):362-366.
- [9] Deng L, Li A, Gao Y, et al. Detection of the bovine milk adulterated in camel, horse, and goat milk using duplex PCR[J]. *Food Analytical Methods*, 2020, 13: 560-567.
- [10] Guo L, Qian J-P, Guo Y-S, et al. Simultaneous identification of bovine and equine DNA in milks and dairy products inferred from triplex TaqMan real-time PCR technique[J]. *Journal of dairy science*, 2018, 101(8): 6776-6786.
- [11] Hurley I P, Coleman R C, Ireland H E, Williams J H H. Measurement of bovine IgG by indirect competitive ELISA as a means of detecting milk adulteration. *Journal of Dairy Science*, 2004, 87(3): 543-549.
- [12] Hinz K, O'Connor P M, Huppertz T, Ross R P, Kelly A L. Comparison of the principal proteins in bovine, caprine, buffalo, equine and camel milk. *Journal of Dairy Research*, 2012, 79(2):

185-191.

- [13] Hai X, Liu G-Q, Luo J-X, et al. Triplex real-time PCR assay for the authentication of camel-derived dairy and meat products[J]. *Journal of dairy science*, 2020, 103(11): 9841-9850.
- [14] Maskova E, Paulickova I. PCR-based detection of cow's milk in goat and sheep cheeses marketed in the Czech Republic. *Czech Journal of Food Science*, 2006: 24(3), 127-132.
- [15] Phuvadol T, Jirapa D, Ruttayaporn N, Thitika K. Direct pentaplex PCR assay: An adjunct panel for meat species identification in Asian food products. *Food Chemistry*, 2019, 271:767-772.
- [16] Song H X, Xue H Y, Han Y. Detection of cow's milk in Shaanxi goat's milk with an ELISA assay. *Food Control*, 2011, 22(6): 883-887.
- [17] Stefaniak T, Chrzanowska J, Nikolajczuk M. Immunological and electrophoretic detection of adulterations in goats milk and its products by cow's milk. *Medycyna Weterynaryjna*, 2000, 56(8): 505-509.
- [18] Zhang Y, Zhu L, Zhang Y, He P, Wang Q. Simultaneous detection of three foodborne pathogenic bacteria in food samples by microchip capillary electrophoresis in combination with polymerase chain reaction. *Journal of Chromatography A*, 2018, 1555:100-105.
- [19] Zhu L, Zhang Y, He P, Zhang Y, Wang Q. A multiplex PCR amplification strategy coupled with microchip electrophoresis for simultaneous and sensitive detection of three foodborne bacteria.

Journal of Chromatography B, 2018, 1093-1094:141-146.

由于本文件涉及的内容在奶业发达国家已经具有成熟的研究基础,考虑到我国奶业发展现状以及与国际奶业发达国家有效接轨,标准起草组首先查阅了以上相关参考文献,认为以上文献中引物设计和 PCR 扩增内容对起草本标准具有参考引用价值。

3) 实验工作, 方法建立

标准起草组在广泛查阅收集国内外相关技术资料 and 标准基础上,拟定了样品前处理方法和仪器检测条件等初步实验方案,开展了鉴定不同畜种奶的牛源性成分的 PCR 法以及识别 8 种畜种奶的动物源性成分的实时荧光 PCR 法。

本方法主要围绕生乳、巴氏杀菌乳、高温杀菌乳、超高温灭菌乳和乳粉中掺入牛源性奶成分的定性检测方法以及生乳、巴氏杀菌乳、高温杀菌乳、超高温灭菌乳和乳粉中奶牛、水牛、牦牛、山羊、绵羊、马、驴和骆驼物种成分的 TaqMan 探针实时荧光 PCR 检测。从方法选择性、方法线性范围、方法检出限、实际样品的测定等多个方面对奶真实性鉴定法进行了优化实验和验证实验。

4) 试验验证情况

2023 年—2024 年,委托新疆农业科学院农业质量标准与检测技术研究所、唐山市农产品质量安全检验检测中心、农业农村部乳品质量检验检测中心(北京)三家检测机构对标准方法的检测灵敏度、检测限、重复性、重现性、检测范围进行复核验证实验。验证结果表明,该方法设计合理,实用有效。

5) 形成标准征求意见稿

在以上收集和分析相关参考文献,调研、试验验证工作的基础上,起草组按照 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》的规定起草编写标准文本内容和编制说明内容，并组织开展2次专家讨论会。

2023年7月12日，XXXX组织召开视频研讨会，XXX、XXX、XXX、XXX等10人讨论了标准的框架、关键环节和关键点，标准起草组根据反馈意见对征求意见稿进行了修改。

2023年8月4日，XXXX召开线上讨论会，会议邀请了农业农村部乳品质量安全监督检验测试中心、新疆大学生命科学与技术学院、全国畜牧总站、内蒙古自治区农牧业科学院农牧业质量安全与检测研究所、新疆农业科学院农业质量标准与检测技术研究所、内蒙古蒙牛乳业（集团）股份有限公司、南京卫岗乳业有限公司、福建长富乳品有限公司、光明乳业股份有限公司等单位相关专家对标准的文本框架、编制说明、前期修改情况进行了讨论。

第二阶段：定向征求意见阶段

2024年5月，在全国范围内堪选了20个科研院校、技术推广检测技术等领域单位及专家、有针对性地进行定向征求意见。征求意见的单位见表2，不同领域类型情况见表3。

表 2 征求意见单位名称

序号	单位名称	备注
1	农业农村部乳品质量监督检验测试中心（北京）	/
2	农业农村部乳品质检中心	/
3	唐山市农产品质量安全检验检测中心	/
4	中国农业大学	/
5	广东省农业科学院动物科学研究所	/
6	中优乳奶业研究院（天津）有限公司	/
7	河南科技大学	/
8	农业农村部乳品质量监督检验测试中心（哈尔滨）	/

9	新疆农业大学	/
10	内蒙古蒙牛乳业（集团）股份有限公司	/
11	内蒙古自治区农牧业科学院	/
12	福建长富乳品有限公司	/
13	青岛农业大学	/
14	河南农业大学	/
15	西北农林科技大学	/
16	新疆农科院农业质量标准与检测技术研究所	/
17	山东省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所	/
18	新疆大学生命科学与技术学院	/
19	全国畜牧局总站	/
20	安徽农业大学	/

表 3 不同领域单位类型情况

序号	单位类型	单位数量
1	教学机构	7
2	科研机构	5
3	技术推广机构	6
4	生产企业	2

收到 20 家单位及专家回函，共收到意见 51 条。经过研究和甄别，采纳 28 条意见，部分采纳 1 条，不采纳 22 条意见，并经过对征求意见稿进行修改完善，形成预审稿。

第三阶段 预审阶段

2024 年 11 月 22 日，标准起草组组织召开了标准预审会，邀请郑小平、郑百芹、李俊玲、许文涛、单吉浩、牟玉莲、许晓敏 7 位专家，对标准预审稿进行了认真审查。在听取标准起草组汇报的基

基础上，专家组审查了标准文本及编制说明，提出如下主要修改意见：一是建议标准名称修改为“奶真实性鉴定 PCR 方法”；二是方法一适用范围修改为“特色畜种生乳、巴氏杀菌乳、高温杀菌乳、超高温灭菌乳和乳粉中奶牛源性成分的检测”；三是将检出限调整至附录 A 中表述；四是修改表 1 引物探针序列表达方式；五是按 GB/T 1.1、GB/T 20001.4 的要求进一步规范标准文本。预审意见汇总处理表见附件 1。

第四阶段 公开征求意见阶段

二、标准编制原则、主要内容及其确定依据

（一）标准编制原则

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，同时遵循以下原则：

（1）政策性：制定本文件直接关系到国家和广大人民群众的利益。因此，在制定过程中严格贯彻国家有关方针、政策、法规和规章。

（2）先进性：对本文件中有关内容的确定，力求反映本研究领域的国内外先进技术和经验，使标准中所规定的技术内容有利于奶真实性的鉴定。

（3）规范性：在本文件征求意见稿的编制过程中力求做到技术内容的叙述正确无误，文字表达准确和简明易懂，标准的构成严谨合理；内容编排、层次划分等符合逻辑。

（4）可操作性：可操作性是制定标准的必备因素，因此，在制定标准的过程中，始终把经济实用和可操作性作为重要的依据，以便在执行中容易操作。

（二）主要内容及其确定依据

1.聚合酶链式反应（PCR）法

1.1 样品制备

标准制定中的样品依据目前实际存在的掺假情况制备，具体方法为：取生特色奶与生牛奶按一定比例充分混合，以及取生特色奶与牛奶粉按一定比例混合，用于生奶掺假实验；取巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌特色奶与奶牛源性生乳、巴氏杀菌乳、高温杀菌乳、超高温灭菌乳按一定比例充分混合，以及取巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌特色奶与牛奶粉按一定比例混合，用于生奶掺假实验；取特色乳粉和牛乳粉按一定比例充分混合，用于乳粉掺假实验。具体制备比例见表 4。

表 4 样品配制类型及比例（质量分数）

类别	物种	添加生牛乳比例	添加巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌牛乳比例	添加牛乳粉比例
生乳	羊	0%、0.2%、0.5%、1%、5%、10%、100%		0%、0.2%、0.5%、1%、5%、10%、100%
	水牛	0%、0.2%、0.5%、1%、5%、10%、100%		0%、0.2%、0.5%、1%、5%、10%、100%
	骆驼	0%、0.2%、0.5%、1%、5%、10%、100%		0%、0.2%、0.5%、1%、5%、10%、100%
	驴	0%、0.2%、0.5%、1%、5%、10%、100%		0%、0.2%、0.5%、1%、5%、10%、100%
	牦牛	0%、0.2%、0.5%、1%、5%、10%、100%		0%、0.2%、0.5%、1%、5%、10%、100%
	马	0%、0.2%、0.5%、1%、5%、10%、100%		0%、0.2%、0.5%、1%、5%、10%、100%
巴氏杀菌、高温	羊		0%、0.2%、0.5%、1%、5%、10%、100%	
	牦牛		0%、0.2%、0.5%、1%、5%、10%、100%	

杀菌、		5%、10%、100%
超高	水牛	0%、0.2%、0.5%、1%、
温灭		5%、10%、100%
菌乳	骆驼	0%、0.2%、0.5%、1%、
		5%、10%、100%
	驴	0%、0.2%、0.5%、1%、
		5%、10%、100%
	羊	0%、0.2%、0.5%、1%、
		5%、10%、100%
	牦牛	0%、0.2%、0.5%、1%、
		5%、10%、100%
乳粉	水牛	0%、0.2%、0.5%、1%、
		5%、10%、100%
	骆驼	0%、0.2%、0.5%、1%、
		5%、10%、100%
	驴	0%、0.2%、0.5%、1%、
		5%、10%、100%

1.2 主要技术指标及相关要求

本方法的主要技术指标是通过 PCR 方法对提取的奶中体细胞中的 DNA 进行扩增，要求能够分离出样品中的体细胞，不受蛋白含量的污染，且保留尽可能高浓度的完整 DNA 片段，并有效地扩增。适用于掺假的产品包括：生乳（羊乳、水牛乳、骆驼乳、驴乳、牦牛乳、马乳）、巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌乳（羊、水牛、骆驼、驴、牦牛、马）、乳粉（羊、水牛、骆驼、驴、牦牛、马）中掺入牛源性奶成分的定性检测。

1.3 实施此项工作的各步骤及具体操作

实施此项工作的步骤包括生奶、巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌奶及奶粉中体细胞的提取、体细胞中 DNA 的提取及纯化、PCR 扩增优化条件、电泳测定 PCR 扩增产物优化条件、结果的鉴定序列

分析、方法的检出限、重复性和再现性等，技术路线图图 1 如下：

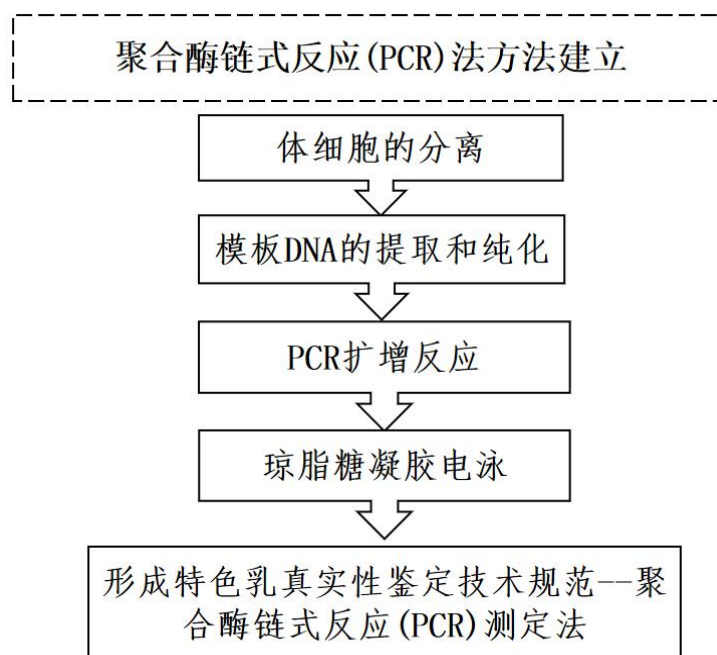


图 1 技术路线

1.4 优化实验结果及检出限、重复性和比对实验结果

1.4.1 体细胞分离

平行做两份试验。取 50 mL 样品于 3000 r/min 4℃ 离心 15 min，用 1mL PBS 缓冲液将底部沉淀悬浮，转移于 1.5 mL 离心管中，3 000 r/min 4℃ 离心 10 min，弃去上清液。向离心管中加入 1 mL PBS 缓冲液悬浮沉淀，1000 r/min 离心 10 min，弃去上清液。加入 150 μL 乳化缓冲液及 1mL PBS 缓冲液悬浮沉淀，于 40℃ 恒温水浴锅加热 10 min 后，3000 r/min 离心 10min，弃去上清液。加入 1 mL PBS 缓冲液洗涤沉淀，12 000 r/min 离心 10 min，得到体细胞。

1.4.2 DNA 提取和测定

向上述得到的体细胞中加入 800 μL CTAB 提取缓冲液，60 μL 蛋白酶 K，60℃ 恒温水浴锅中加热 2h，其间不时轻弹混匀。12 000

r/min 离心 10min, 除去杂质。

吸取上清液于 2 mL 离心管中, 加入等体积的 Tris 饱和苯酚、三氯甲烷和异戊醇混合液, 轻缓颠倒混匀后, 12 000 r/min 离心 15min。吸取上清液, 置于另一支 2 mL 离心管中, 加入等体积的 Tris 饱和苯酚、三氯甲烷和异戊醇混合液, 12 000 r/min 离心 10 min。将上清液转移于 1.5 mL 离心管中, 加入两倍体积的无水乙醇溶液, 混匀后于—20 °C 放置 30 min。12 000r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 加入 1mL 75%乙醇洗涤沉淀, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液。室温下挥发干残留乙醇, 加入 30 μ L~50 μ L TE 缓冲液溶解 DNA 沉淀。可利用核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计测定提取 DNA 浓度及纯度。按照 GB/T 34796 方法测定并计算 DNA 的浓度, 判定 DNA 浓度和纯度, 当 A260/A280 比值在 1.7~1.9 之间时, 适用于 PCR 扩增。

1.4.3 目的片段扩增验证

1.4.3.1 引物设计

从 GenBank 数据库下载线粒体细胞色素 b (cytb) 序列: 分别为奶牛 (序列 ID: NC_006853.1)、水牛 (序列 ID: NC_006295.1)、牦牛 (序列 ID: NC_025563.1)、山羊 (序列 ID: NC_005044.2)、绵羊 (序列 ID: NC_001941.1)、马 (序列 ID: NC_001640.1)、驴 (序列 ID: NC_001788.1) 和骆驼 (序列 ID: NC_009629.2)。通过软件 Primer Premier 3.0 比对分析物种基因序列, 选取匹配度低、差异大的序列片段, 使用 Primer Premier 6.0 软件在基因保守区域设计奶牛的引物。通过 PCR 扩增方法优化引物不同退火温度, 使目的

条带达到条带均一性。同时将 PCR 产物进行一代测序, 验证为目的片段。引物序列为: 正向: 5'-TAGTCGGAATGAATCTGAGAC-3'; 反向: 5'-AATATTATGCTTCGTTGTTTGGCG-3'), 扩增产物长度为 482 bp。

1.4.3.2 PCR 扩增条件优化

在 50 μ L PCR 反应管中依次加入浓度为 10 μ mol/L 正向和反向引物 (牛源性奶成分检测用引物 (对) 序列: 各 2.5 μ L, 2 $\times$ Taq Mix 缓冲液 25 μ L, 模板 DNA 4 μ L, 灭菌水补足体积至 50 μ L。每个试样 2 个重复, 同时进行以灭菌水作为模板的空白对照。掌式离心机离心 10 s 后, 插入 PCR 仪中进行扩增。PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 62 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.4.3.3 PCR 扩增产物电泳检测

按 20 g/L 的质量浓度称量琼脂糖, 加入 1 $\times$ TAE 缓冲液, 加热溶解, 配制成琼脂糖溶液。每 100 mL 琼脂糖溶液加入 5 μ L 核酸荧光染料, 摇匀冷却后倒入电泳板, 放置合适的梳子, 制成约 5 mm 厚的凝胶, 室温下遮光冷却至凝固。取下梳子, 放入含有 1 $\times$ TAE 电泳缓冲液的电泳槽中, 液面高于凝胶 2 mm~3 mm。将 5 μ L~8 μ L PCR 扩增产物与 1 μ L 6 $\times$ 上样缓冲液混合后加入点样孔中。同时, 加入 5 μ L DNA 分子量标记于每个点样孔中。5 V/cm~8 V/cm 恒压电泳, 时间 20 min~30 min。结束后, 将凝胶取出置于凝胶成像仪进行成像, 根据 DNA 分子量标记判断目的条带大小。

1.4.3.4 引物退火温度确定

54 $^{\circ}$ C 退火温度检出结果见图 2, 除牛源性阳性对照较稳定外,

生羊乳稳定性较差，故舍弃此条件。

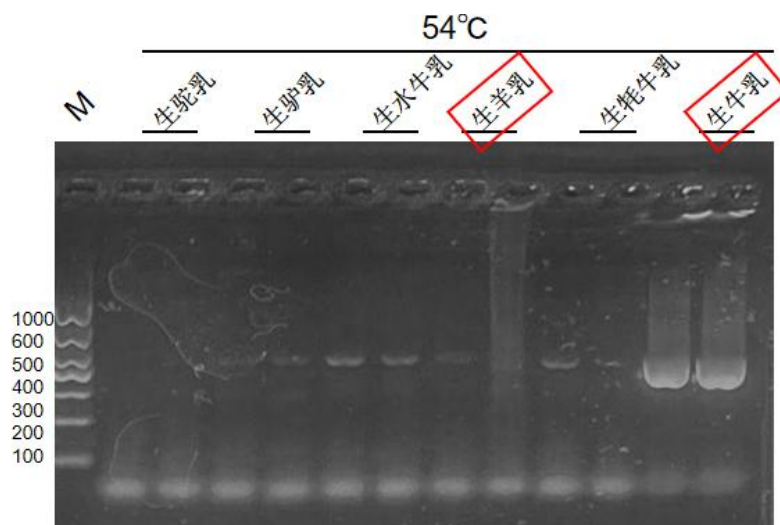


图 2 54°C退火温度检测结果

56°C退火温度检出结果见图 3，仅牛源性阳性对照成分扩增成功，稳定性较差。

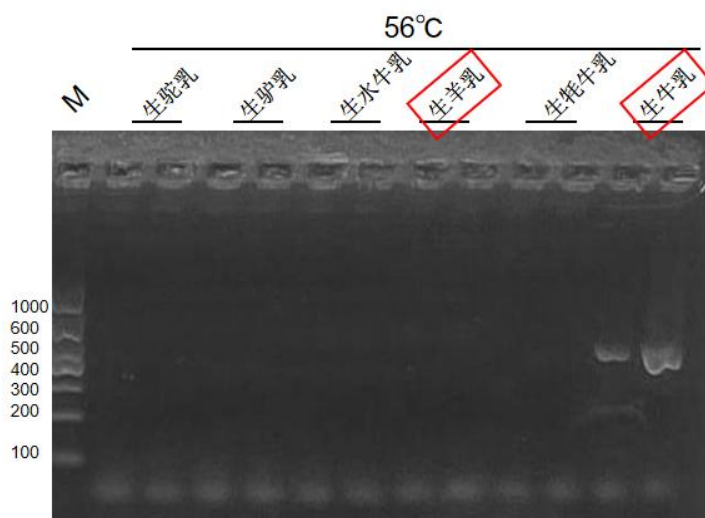


图 3 56°C退火温度检测结果

58°C退火温度检出结果见图 4，仅牛源性阳性对照成分扩增成功，稳定性较好。

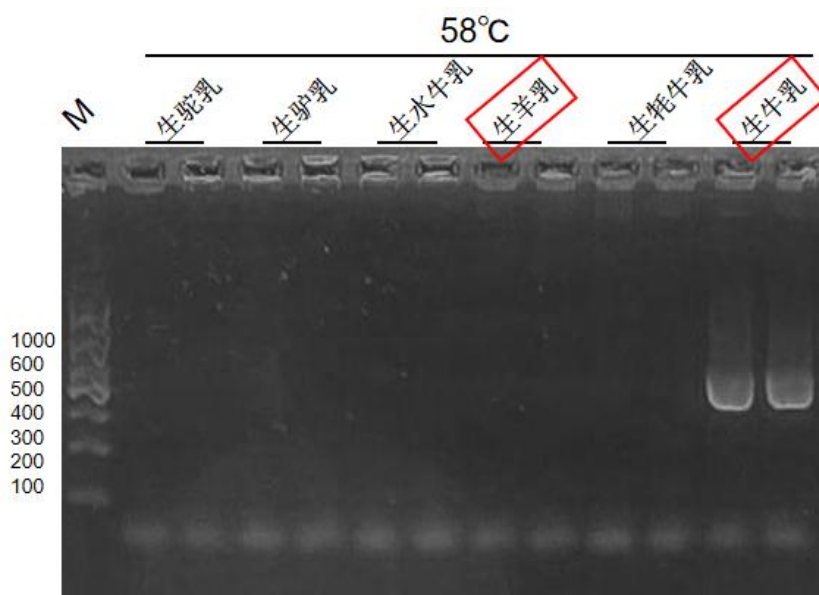


图 4 58°C退火温度检测结果

4 种不同退火温度下检出结果比较（见图 5），发现，仅牛源性成分扩增成功,且当退火温度到达 62°C时，条带出现稳定性、特异性最佳，故选择 62°C作为扩增最佳退火温度。

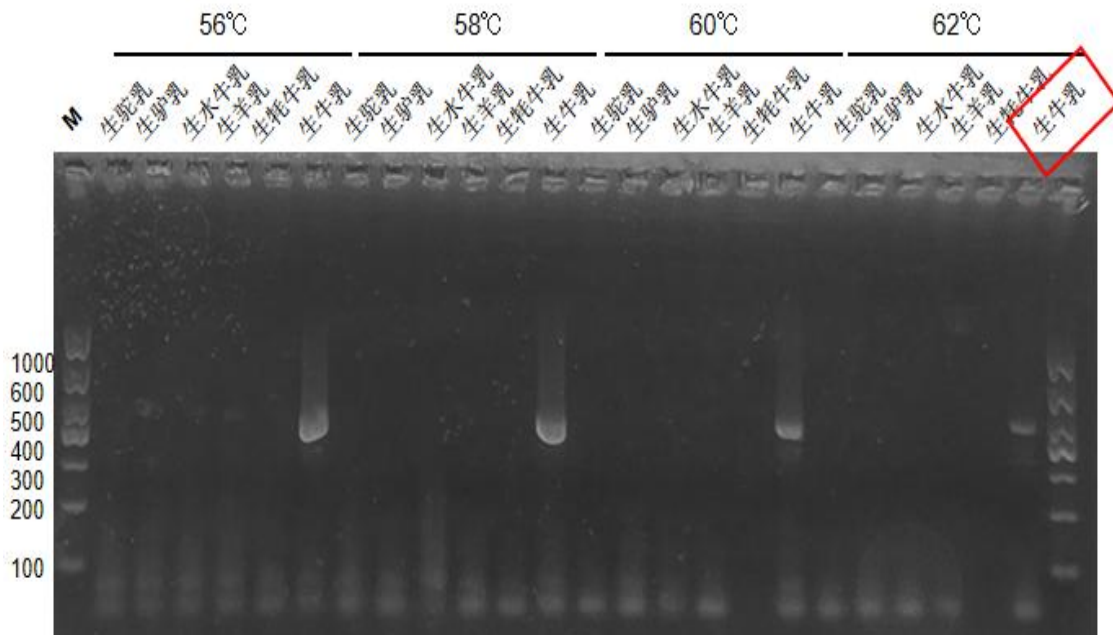


图 5 不同退火温度下对各特色乳检出结果

1.4.3.5 牛源性扩增产物测序验证

将扩增产物送往北京六合华大基因科技股份有限公司进行测

序，结果如下：

```
CCGATTCCCTACCCTAGTTAATATTAACGAAAACAACCCCCTTCTGATCAACTC
TATCAAACGCTTACTAATTGGAAGCCTCTTCGCAGGATACATCATTTCCAACAATAT
TCCTCCAACAACAATTCCCCAAATAACTATGCCCTACTACCTAAAAACAACAGCCC
TAATTGTTACAATCCTAGGCTTCATCTTAGCCCTAGAAATCAGTAATATAACTAAAA
ATCTAAAATATCACTACCCCTCAAACGCCTTCAAGTTCTCAACCTTGCTAGGATATT
TCCCCACAATTATACATCGCCTAGCTCCATACATAAATTTATCAATAAGCCAAAAAT
CAGCATCCTCCCTTCTAGACCTAATCTGACTAGAAGCCATCCTACCAAAAACCATCT
CACTCGCCCAAATAAAAAGCATCTACCCTGGTCACAAACCAAAAAGGCCTGATCAAA
CTATATTCCTCTCCTTCTTAATCACAATCC
```

测序结果显示，检出限样品的结果与阳性对照结果符合度均在98%以上。说明，本标准的PCR方法对掺假牛奶的定性检测准确，结果可靠。

1.4.4 特色生乳掺假生牛乳检出限确定及验证

本实验对PCR法适用于的3种产品（生奶、巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌奶、奶粉）的不同掺假类型进行检出限的确认，并对初步确定的检出限上下浓度进行平行测定以验证检出限，具体如下。

1.4.4.1 生羊乳中掺假生牛乳检出限确定及验证

将含有0.2%、0.5%、1.0%、5.0%和10.0%的生羊乳掺假生牛乳样品用已确定方法提取DNA并进行PCR扩增后，通过凝胶电泳结果确定检出限，见图6、图7。

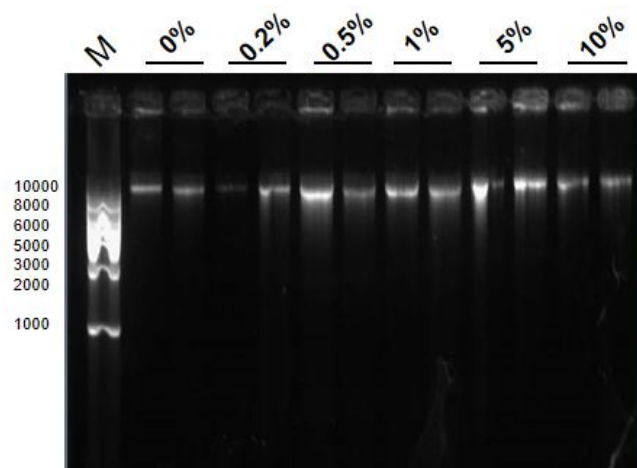


图 6 生羊乳掺假生牛乳 DNA 提取

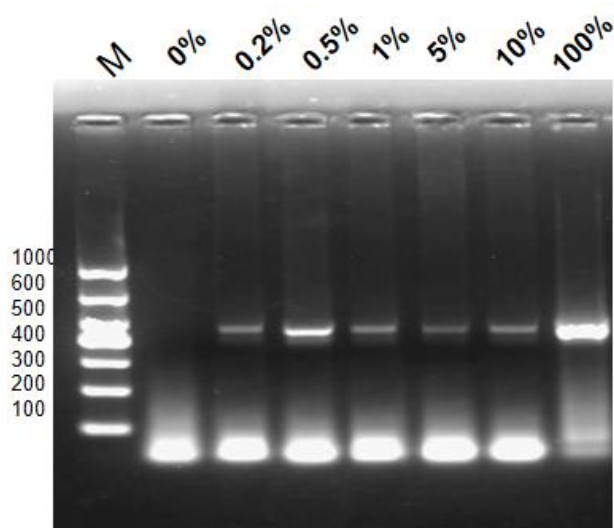


图 7 生羊乳掺假生牛乳 PCR 检出限结果

图 6、图 7 结果显示，大于 0.2 %水平的掺假均能检出，检出限初步设定为 0.2 %。3 次对提取的 DNA 经 PCR 扩增后，凝胶电泳结果显示，0.2%的样品均能检出。因此，生羊乳中掺入生牛乳的检出限确定为 0.2 %。

1.4.4.2 生水牛乳中掺假生牛乳检出限确定及验证

将含有 0.2 %、0.5 %、1.0%、5.0 %和 10.0 %的生水牛乳掺假生牛乳样品用已确定方法提取 DNA 并进行 PCR 扩增后，通过凝胶电泳结果确定检出限，见图 8、图 9。

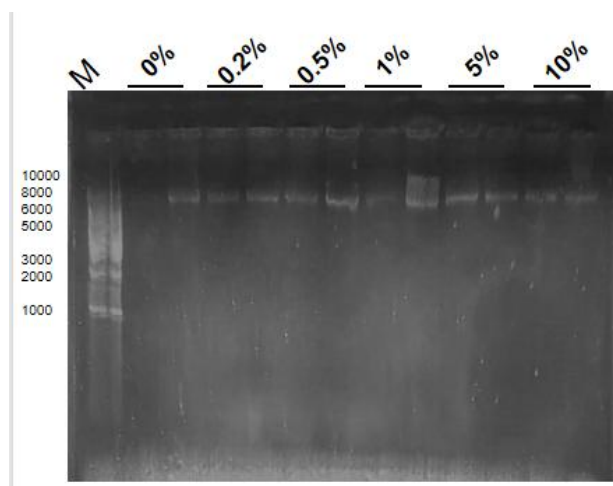


图 8 生水牛乳掺假牛乳 DNA 提取

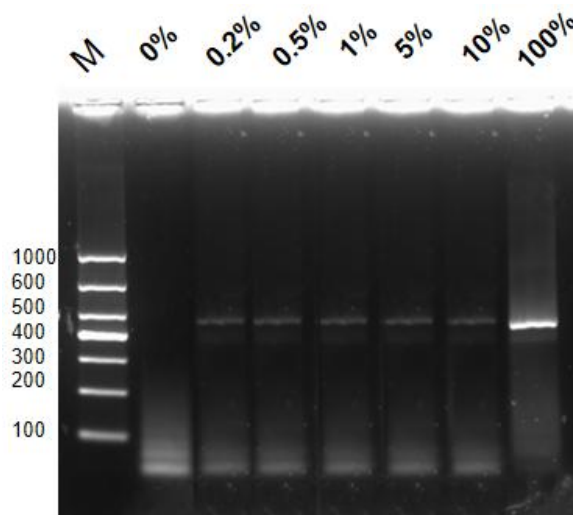


图 9 生水牛乳掺假牛乳 PCR 检出限结果

图 8、图 9 结果显示，大于 0.2 %水平的掺假均能检出，检出限初步设定为 0.2 %。3 次对提取的 DNA 经 PCR 扩增后，凝胶电泳结果显示，0.2%的样品均能检出。因此，生水牛乳中掺入生牛乳的检出限确定为 0.2 %。

1.4.4.3 生驼乳中掺假生牛乳检出限确定及验证

将含有 0.2 %、0.5 %、1.0%、5.0 %和 10.0 %的生驼乳掺假生牛乳样品用已确定方法提取 DNA 并进行 PCR 扩增后，通过凝胶电泳结果确定检出限，见图 10、图 11。

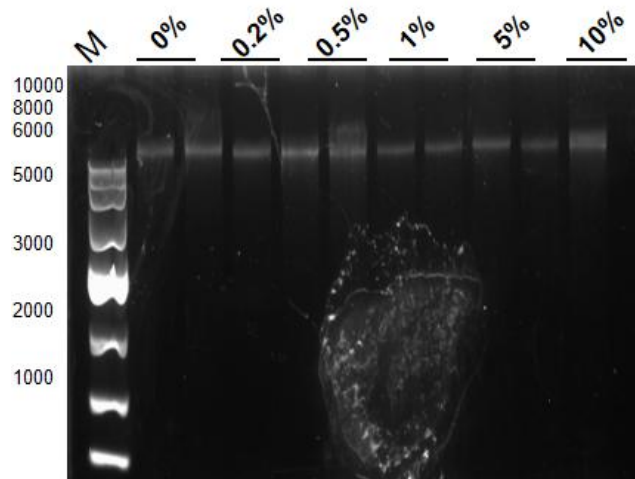


图 10 生驼乳掺假牛乳 DNA 提取

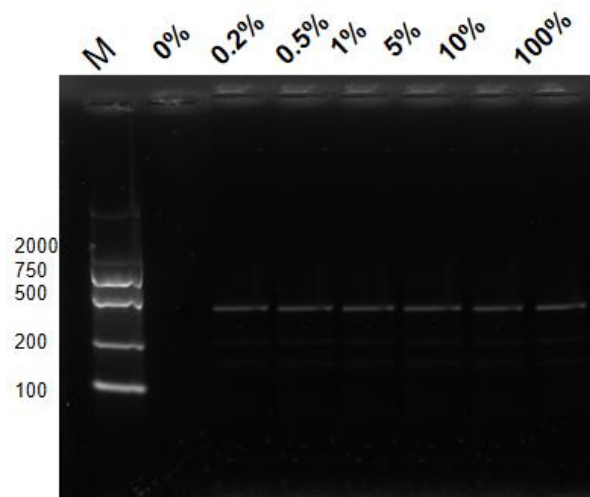


图 11 生驼乳掺假牛乳 PCR 检出限结果

图 10、图 11 结果显示，大于 0.2 %水平的掺假均能检出，检出限初步设定为 0.2 %。3 次对提取的 DNA 经 PCR 扩增后，凝胶电泳结果显示，0.2%的样品均能检出。因此，生驼乳中掺入生牛乳的检出限确定为 0.2 %。

1.4.4.4 生驴乳中掺假生牛乳检出限确定及验证

将含有 0.2 %、0.5 %、1.0%、5.0 %和 10.0 %的生驴乳掺假生牛乳样品用已确定方法提取 DNA 并进行 PCR 扩增后，通过凝胶电泳结果确定检出限，见图 12、图 13。

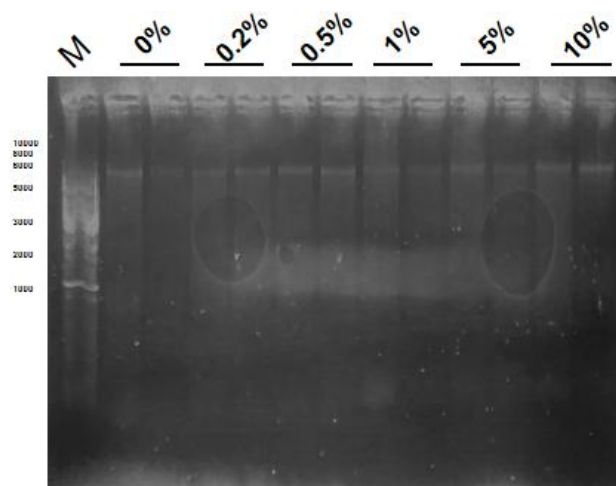


图 12 生驴乳掺假牛乳 DNA 提取

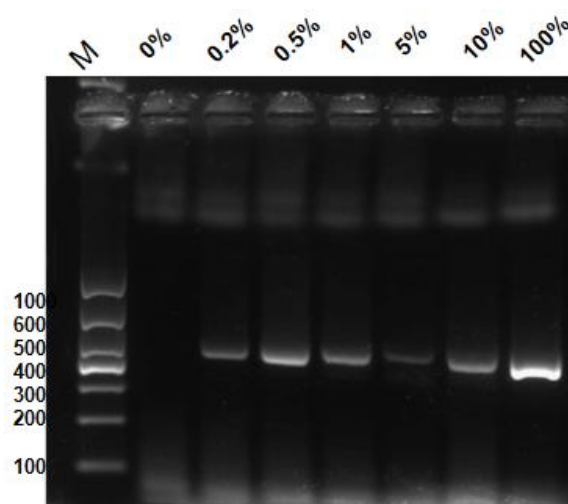


图 13 生驴乳掺假牛乳 PCR 检出限结果

图 12、图 13 结果显示，大于 0.2 %水平的掺假均能检出，检出限初步设定为 0.2 %。3 次对提取的 DNA 经 PCR 扩增后，凝胶电泳结果显示，0.2%的样品均能检出。因此，生驴乳中掺入生牛乳的检出限确定为 0.2 %。

1.4.4.5 生牦牛乳中掺假生牛乳检出限确定及验证

将含有 0.2 %、0.5 %、1.0%、5.0 %和 10.0 %的生牦牛乳掺假生牛乳样品用已确定方法提取 DNA 并进行 PCR 扩增后，通过凝胶电泳结果确定检出限，见图 14、图 15。

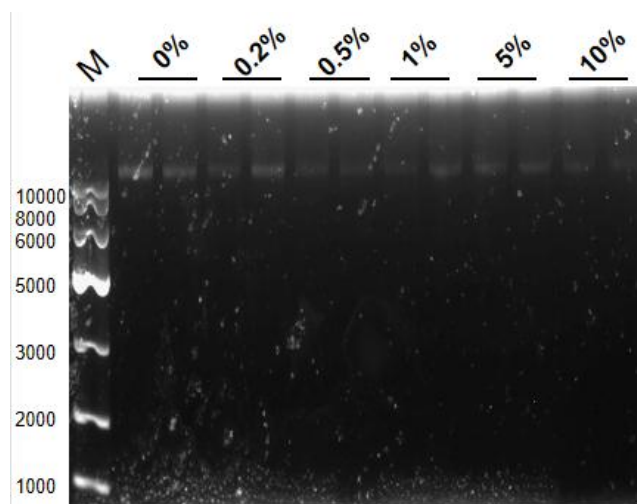


图 14 生牦牛乳掺假牛乳 DNA 提取

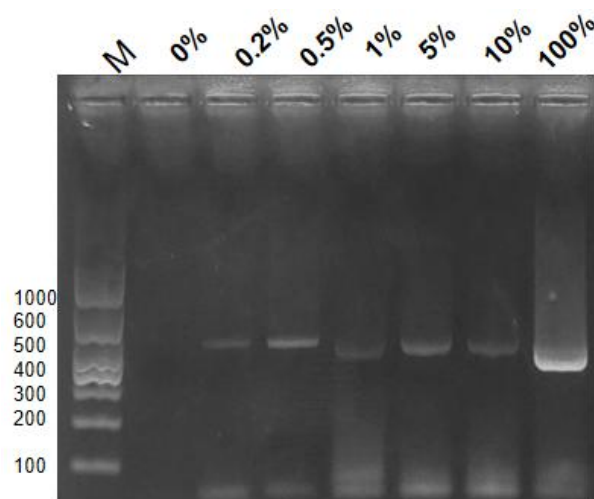


图 15 生牦牛乳掺假牛乳 PCR 检出限结果

图 14、图 15 结果显示，大于 0.2 %水平的掺假均能检出，检出限初步设定为 0.2 %。3 次对提取的 DNA 经 PCR 扩增后，凝胶电泳结果显示，0.2%的样品均能检出。因此，生牦牛乳中掺入生牛乳的检出限确定为 0.2 %。

1.4.4.6 生马乳中掺假生牛乳检出限确定及验证

将含有 0.2 %、0.5 %、1.0%、5.0 %和 10.0 %的生马乳掺假生牛乳样品用已确定方法提取 DNA 并进行 PCR 扩增后，通过凝胶电泳结果确定检出限，见图 16、图 17。

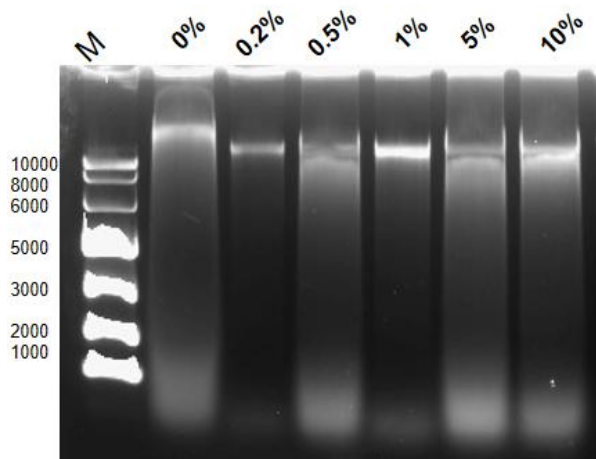


图 16 生马乳掺假牛乳 DNA 提取

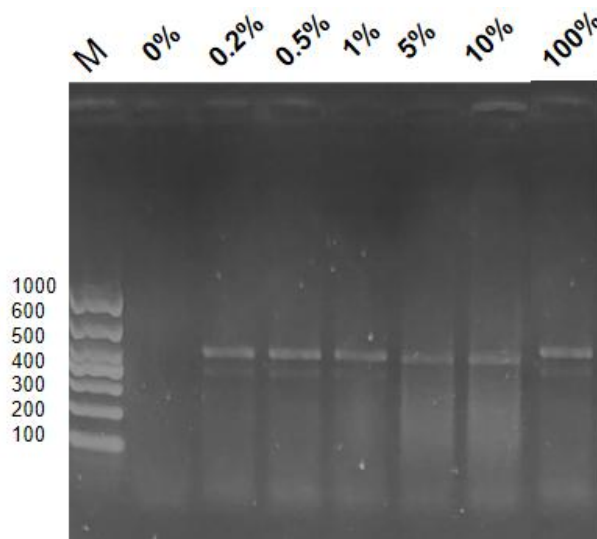


图 17 生马乳掺假牛乳 PCR 检出限的确定

图 16、图 17 结果显示，大于 0.2 %水平的掺假均能检出，检出限初步设定为 0.2 %。3 次对提取的 DNA 经 PCR 扩增后，凝胶电泳结果显示，0.2%的样品均能检出。因此，生马乳中掺入生牛乳的检出限确定为 0.2 %。

1.4.4.7 特色生乳掺假生牛乳小结

特色生乳掺假生牛乳的检出限均为 0.20%，如图表 5 所示。

表 5 特色生乳添加不同浓度生牛乳的检出限结果

生乳种类	检出限
------	-----

生羊乳	0.20%
生水牛乳	0.20%
生驼乳	0.20%
生驴乳	0.20%
生牦牛乳	0.20%
生马乳	0.20%

1.4.5 特色生乳掺假牛乳粉检出限确定及验证

1.4.5.1 生羊乳掺假牛乳粉检出限确定及验证

将含有 0.2 %、0.5 %、1.0%、5.0 %和 10.0 %的生羊乳掺假牛乳粉样品用已确定方法提取 DNA 并进行 PCR 扩增后，通过凝胶电泳结果确定检出限，见图 18、图 19。

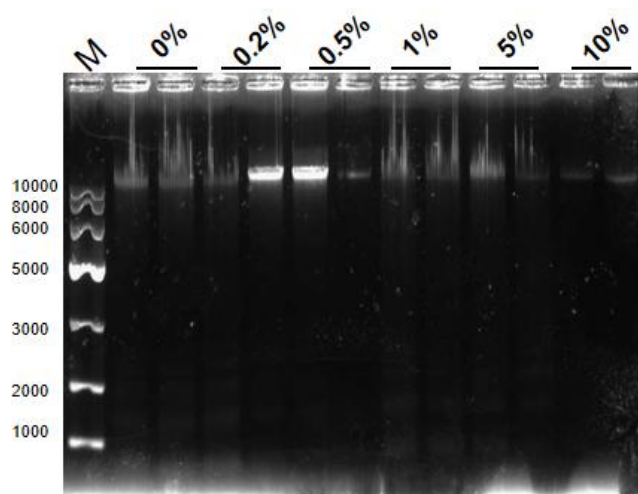


图 18 生羊乳掺假牛乳粉 DNA 提取

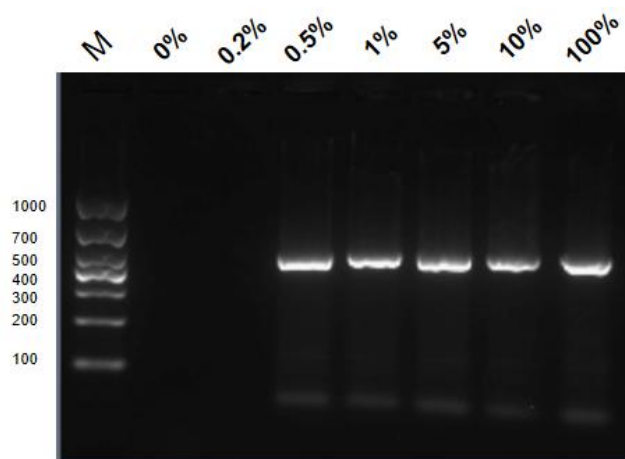


图 19 生羊乳掺假牛乳粉 PCR 检出限结果

图 18、图 19 结果显示，在生羊乳中掺假牛乳粉大于 0.5 %水平的掺假均能检出，检出限初步设定为 0.5 %。3 次对提取的 DNA 经 PCR 扩增后，凝胶电泳结果显示，0.5%的样品均能检出。因此，生羊乳中掺入牛乳粉的检出限确定为 0.5 %。

1.4.5.2 生牦牛乳掺假牛乳粉检出限确定及验证

将含有 0.2 %、0.5 %、1.0%、5.0 %和 10.0 %的生牦牛乳掺假牛乳粉样品用已确定方法提取 DNA 并进行 PCR 扩增后，通过凝胶电泳结果，初步确定检出限，见图 20、图 21。

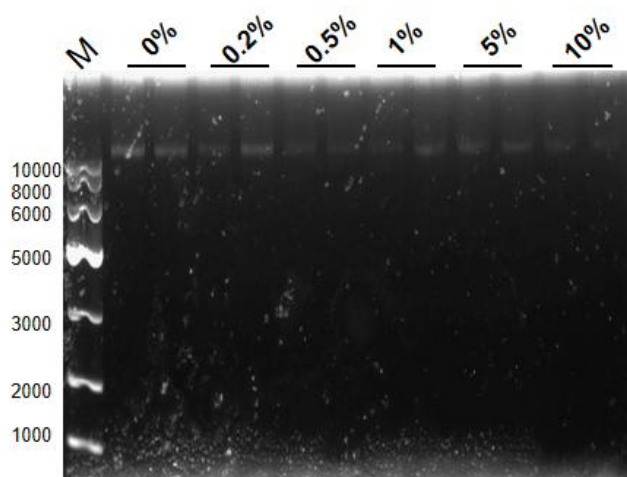


图 20 生牦牛乳掺假牛乳粉 DNA 提取

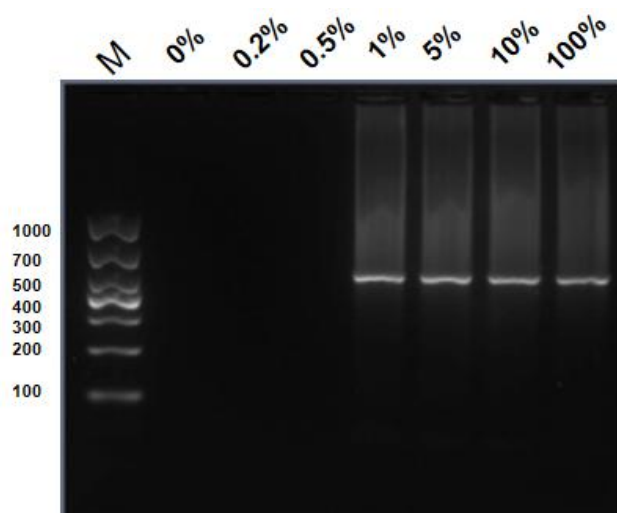


图 21 生牦牛乳掺假牛乳粉 PCR 检出限结果

图 20、图 21 结果显示，在生牦牛乳中掺假牛乳粉大于 1.0 %水平的掺假均能检出，检出限初步设定为 1.0%。3 次对提取的 DNA 经 PCR 扩增后，凝胶电泳结果显示，1.0%的样品均能检出。因此，生牦牛乳中掺入牛乳粉的检出限确定为 1.0 %。

1.4.5.3 生水牛乳掺假牛乳粉检出限确定及验证

将含有 0.2 %、0.5 %、1.0%、5.0 %和 10.0 %的生水牛乳掺假牛乳粉样品用已确定方法提取 DNA 并进行 PCR 扩增后，通过凝胶电泳结果确定检出限，见图 22、图 23。

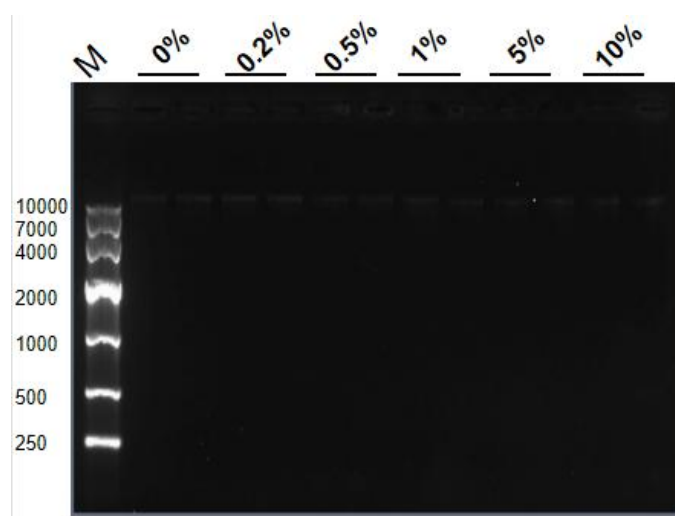


图 22 生水牛乳掺假牛乳粉 DNA 提取

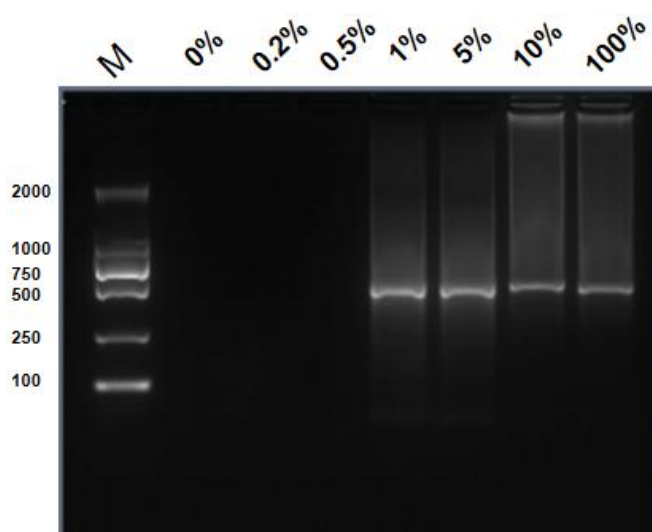


图 23 生水牛乳掺假牛乳粉 PCR 检出限结果

图 22、图 23 结果显示，在生水牛乳中掺假牛乳粉大于 1.0%水平的掺假均能检出，检出限初步设定为 1.0%。3 次对提取的 DNA 经 PCR 扩增后，凝胶电泳结果显示，1.0%的样品均能检出。因此，生水牛乳中掺入牛乳粉的检出限确定为 1.0 %。

1.4.5.4 生驼乳掺假牛乳粉检出限确定及验证

将含有 0.2 %、0.5 %、1.0%、5.0 %和 10.0 %的生驼乳掺假牛乳粉样品用已确定方法提取 DNA 并进行 PCR 扩增后，通过凝胶电泳结果确定检出限，见图 24、图 25。

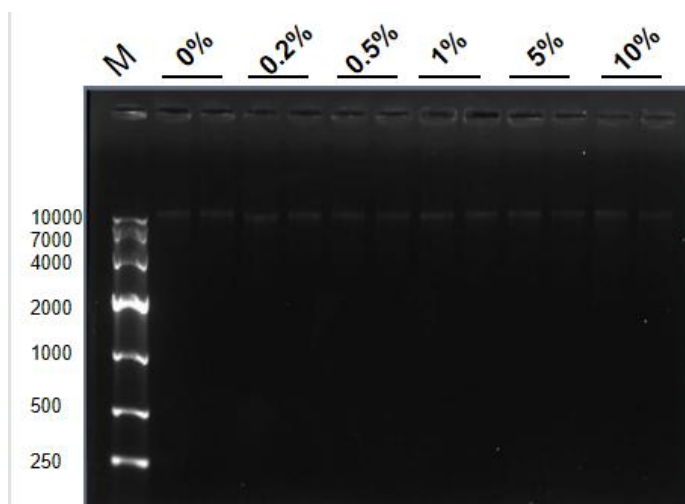


图 24 生驼乳掺假牛乳粉 DNA 提取

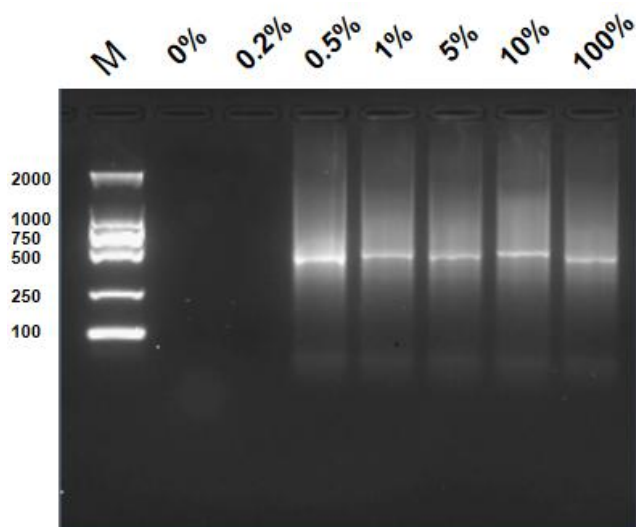


图 25 生驼乳掺假牛乳粉 PCR 检出限结果

图 24、图 25 结果显示，在生驼乳中掺假牛乳粉大于 0.5 %水平的掺假均能检出，检出限初步设定为 0.5 %。3 次对提取的 DNA 经 PCR 扩增后，凝胶电泳结果显示，0.5%的样品均能检出。因此，生驼乳中掺入牛乳粉的检出限确定为 0.5%。

1.4.5.5 生驴乳掺假牛乳粉检出限确定及验证

将含有 0.2 %、0.5 %、1.0%、5.0 %和 10.0 %的生驴乳掺假牛乳粉样品用已确定方法提取 DNA 并进行 PCR 扩增后，通过凝胶电泳结果确定检出限，见图 26、图 27。

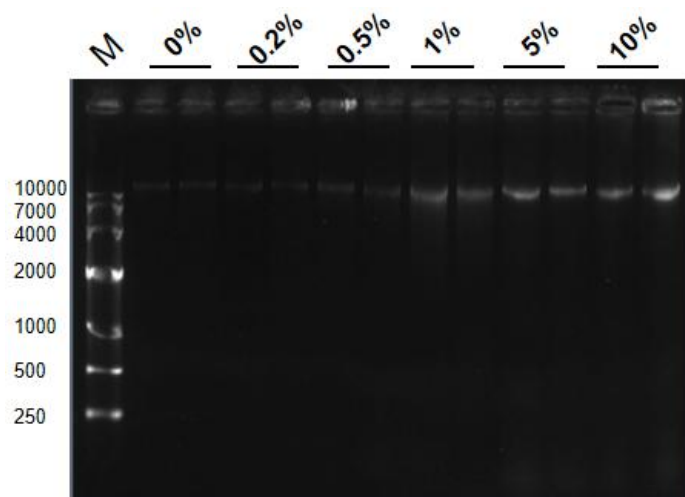


图 26 生驴乳掺假牛乳粉 DNA 提取

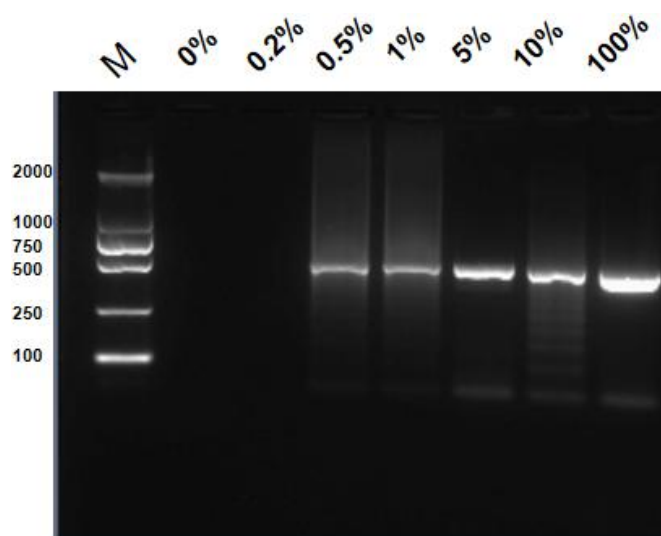


图 27 生驴乳掺假牛乳粉 PCR 检出限结果

图 26、图 27 结果显示，在生驴乳中掺假牛乳粉大于 0.5 %水平的掺假均能检出，检出限初步设定为 0.5 %。3 次对提取的 DNA 经 PCR 扩增后，凝胶电泳结果显示，0.5%的样品均能检出。因此，生驴乳中掺入牛乳粉的检出限确定为 0.5%。

1.4.5.6 生马乳掺假牛乳粉检出限确定及验证

将含有 0.2 %、0.5 %、1.0%、5.0 %和 10.0 %的生马乳掺假牛乳粉样品用已确定方法提取 DNA 并进行 PCR 扩增后，通过凝胶电泳结果确定检出限，见图 28、图 29。

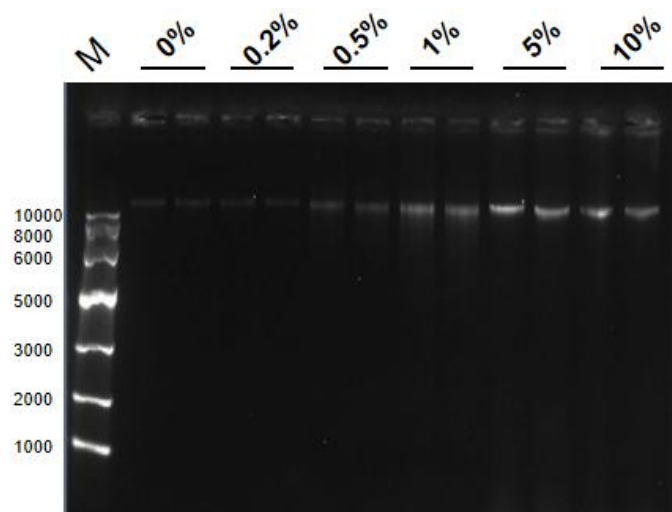


图 28 生马乳掺假牛乳粉 DNA 提取

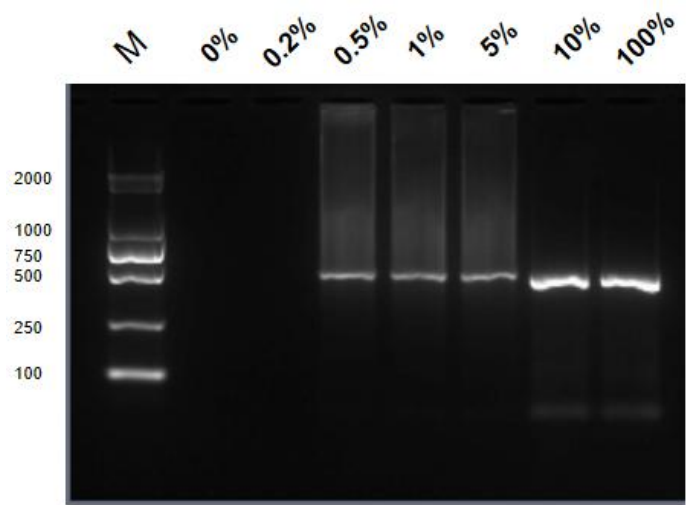


图 29 生马乳掺假牛乳粉 PCR 检出限结果

图 28、图 29 结果显示，在生马乳中掺假牛乳粉大于 0.5 %水平的掺假均能检出，检出限初步设定为 0.5 %。3 次对提取的 DNA 经 PCR 扩增后，凝胶电泳结果显示，0.5%的样品均能检出。因此，生马乳中掺入牛乳粉的检出限确定为 0.5%。

1.4.5.7 特色生乳掺假牛乳粉结果小结

除生水牛乳和生牦牛乳掺假牛乳粉检出限为 1.0%之外，其余的特色乳检出限均为 0.5%。如图表 6 所示。

表 6 特色生乳中添加不同浓度牛乳粉检出限结果

生乳种类	牛乳粉检出限
生羊乳	0.50%
生牦牛乳	1.00%
生水牛乳	1.00%
生驼乳	0.50%
生驴乳	0.50%
生马乳	0.50%

1.4.6 巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌特色乳掺假巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌牛乳检出限确定及验证

1.4.6.1 巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌羊乳掺假巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌牛乳检出限确定及验证

将含有 0.2 %、0.5 %、1.0%、5.0 %和 10.0 %的巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌羊乳掺假巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌牛乳样品用已确定方法提取 DNA 并进行 PCR 扩增后，通过凝胶电泳结果确定检出限，见图 30、图 31。

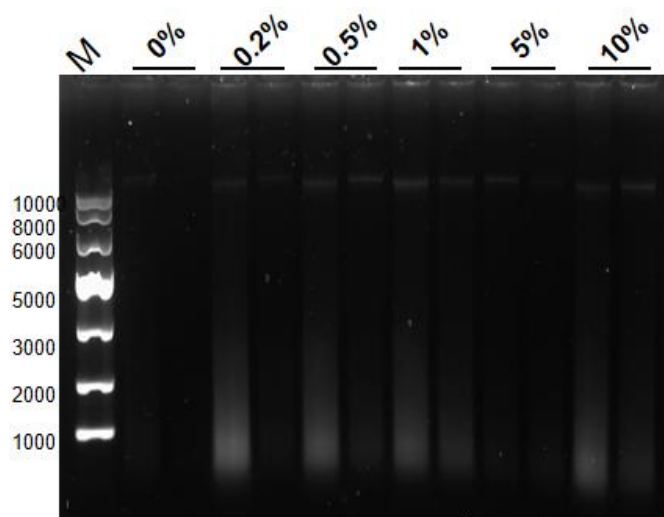


图 30 巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌羊乳掺假巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌牛乳 DNA 提取

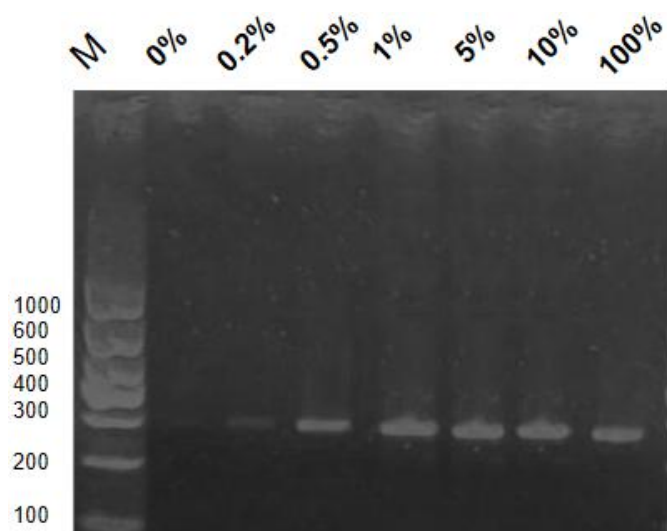


图 31 巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌羊乳掺假巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌牛乳 PCR 检出限的确定

图 30、图 31 结果显示，大于 0.2 %水平的掺假均能检出，检出限初步设定为 0.2 %。3 次对提取的 DNA 经 PCR 扩增后，凝胶电泳结果显示，0.2%的样品均能检出。因此，巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌生羊乳中掺入巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌牛乳检出限确定为 0.2 %。

1.4.6.2 巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌牦牛乳掺假巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌牛乳检出限确定及验证

将含有 0.2 %、0.5 %、1.0%、5.0 %和 10.0 %的巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌牦牛乳掺假巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌牛乳样品用已确定方法提取 DNA 并进行 PCR 扩增后，通过凝胶电泳结果确定检出限，见图 32、图 33。

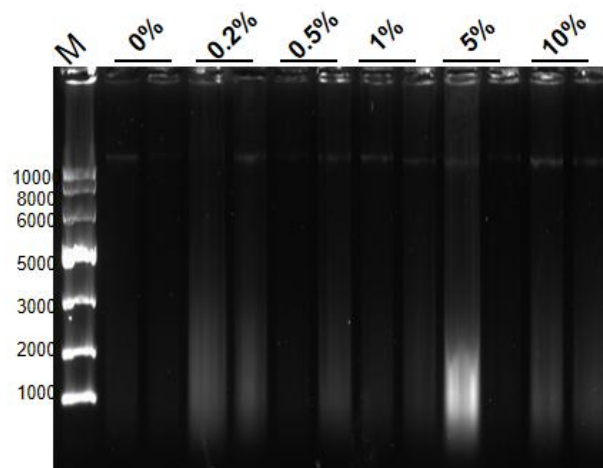


图 32 巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌牦牛乳掺假巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌牛乳 DNA 提取

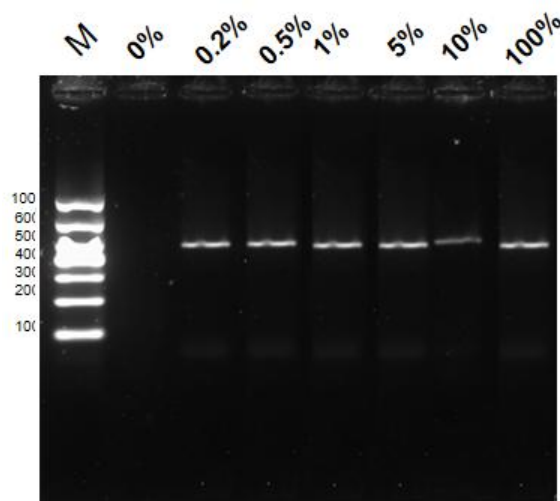


图 33 巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌牦牛乳掺假巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌牛乳 PCR 检出限结果

图 32、图 33 结果显示，大于 0.20%水平的掺假均能检出，检出限初步设定为 0.2 %。3 次对提取的 DNA 经 PCR 扩增后，凝胶电泳结果显示，0.2%的样品均能检出。因此，巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌牦牛乳中掺入巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌牛乳的检出限确定为 0.2 %。

1.4.6.3 巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌水牛乳掺假巴氏杀菌、

高温杀菌、超高温灭菌牛乳检出限确定及验证

将含有 0.2 %、0.5 %、1.0%、5.0 %和 10.0 %的巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌水牛乳掺假巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌牛乳样品用已确定方法提取 DNA 并进行 PCR 扩增后，通过凝胶电泳结果确定检出限，见图 34、图 35。

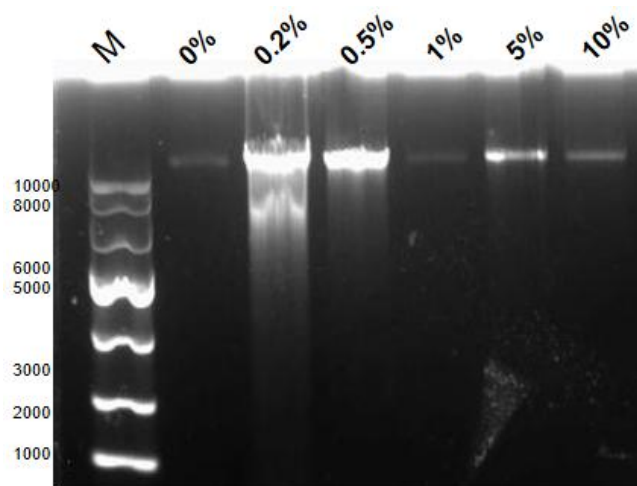


图 34 巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌水牛乳掺假巴氏杀菌、高温杀菌、超

高温灭菌牛乳 DNA 提取

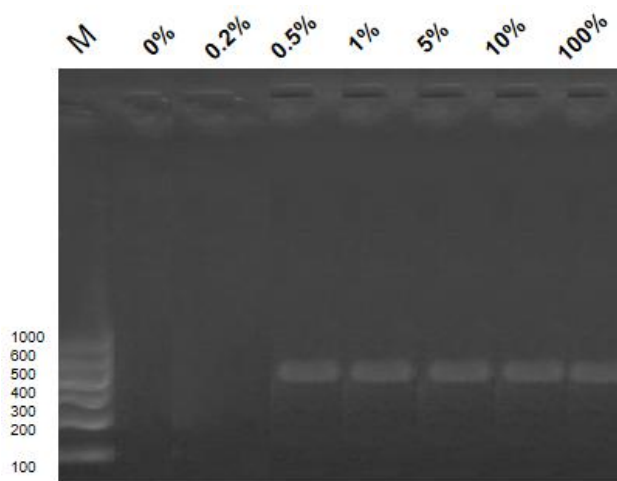


图 35 巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌水牛乳掺假巴氏杀菌、高温杀菌、超

高温灭菌牛乳 PCR 检出限结果

图 34、图 35 结果显示，大于 0.5 %水平的掺假均能检出，检出限初步设定为 0.5 %。3 次对提取的 DNA 经 PCR 扩增后，凝胶电泳

结果显示，0.5%的样品均能检出。因此，巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌水牛乳中掺入巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌牛乳的检出限确定为 0.5%。

1.4.6.4 巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌驼乳掺假巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌牛乳检出限确定及验证

将含有 0.2 %、0.5 %、1.0%、5.0 %和 10.0 %的巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌驼乳掺假巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌牛乳样品用已确定方法提取 DNA 并进行 PCR 扩增后，通过凝胶电泳结果确定检出限，见图 36、图 37。

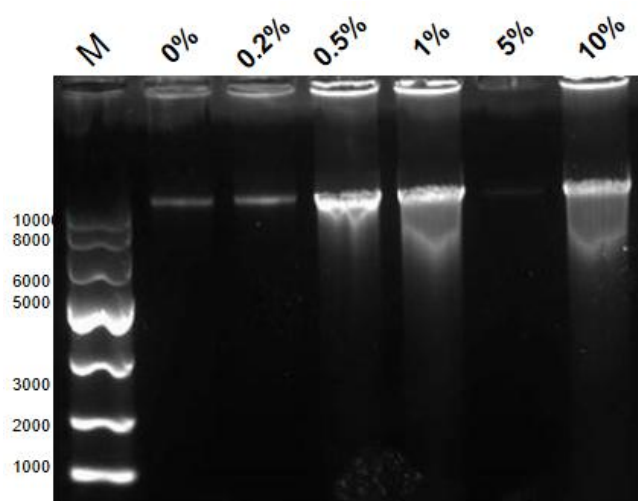


图 36 巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌驼乳掺假巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌牛乳 DNA 提取

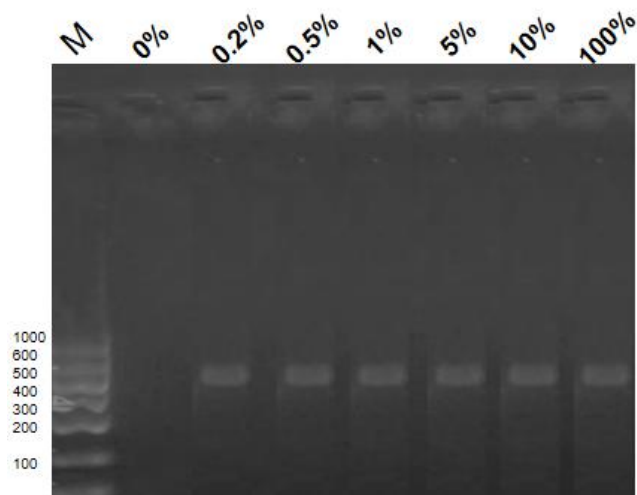


图 37 巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌驼乳掺假巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌牛乳 PCR 检出限结果

图 36、图 37 结果显示，大于 0.2 %水平的掺假均能检出，检出限初步设定为 0.2 %。3 次对提取的 DNA 经 PCR 扩增后，凝胶电泳结果显示，0.2%的样品均能检出。因此，巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌驼乳中掺入巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌牛乳的检出限确定为 0.2 %。

1.4.6.5 巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌驴乳掺假巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌牛乳检出限确定及验证

将含有 0.2 %、0.5 %、1.0%、5.0 %和 10.0 %的巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌驴乳掺假巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌牛乳样品用已确定方法提取 DNA 并进行 PCR 扩增后，通过凝胶电泳结果确定检出限，见图 38、图 39。

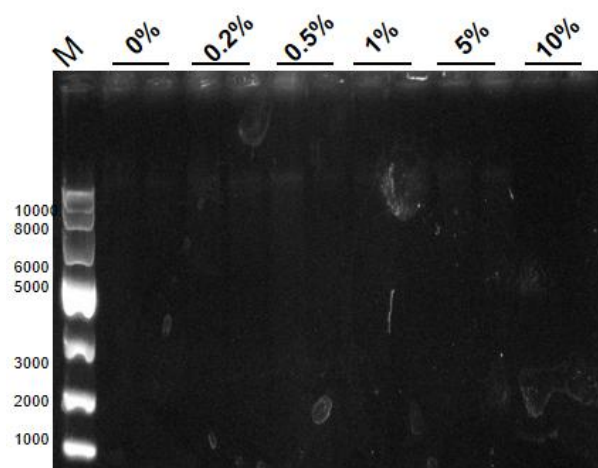


图 38 巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌乳掺假巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌牛乳 DNA 提取

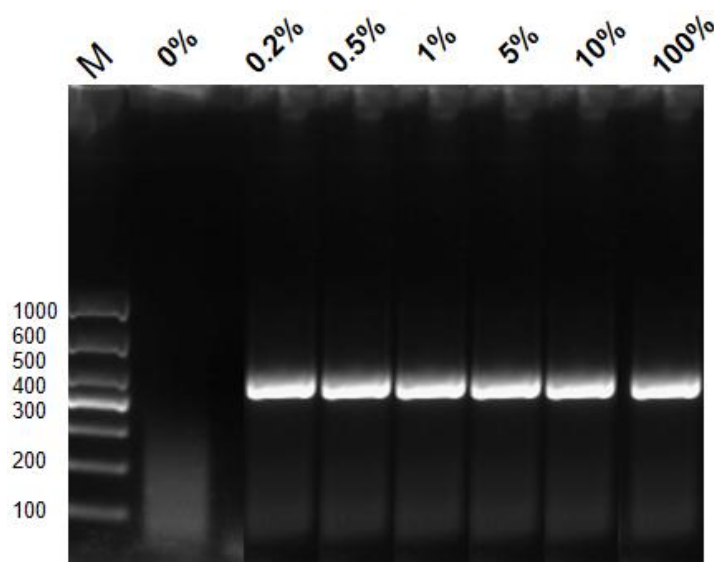


图 39 巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌乳掺假巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌牛乳 PCR 检出限结果

图 38、图 39 结果显示，大于 0.2 %水平的掺假均能检出，检出限初步设定为 0.2 %。3 次对提取的 DNA 经 PCR 扩增后，凝胶电泳结果显示，0.2%的样品均能检出。因此，巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌乳中掺入巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌牛乳的检出限确定为 0.2 %。

1.4.6.6 巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌特色乳掺假巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌牛乳小结

除巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌水牛乳掺假巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌牛乳的检出限为 0.5%之外，其余的巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌特色乳检出限均为 0.2%，如图表 7 所示。

表 7 各巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌特色乳中添加不同浓度巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌牛乳检出限结果

巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌特色乳分类	巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌牛乳检出限
羊乳	0.20%
牦牛乳	0.20%
水牛乳	0.50%
驼乳	0.20%
驴乳	0.20%

1.4.7 特色乳乳粉掺假牛乳粉检出限确定及验证

1.4.7.1 羊乳粉掺假牛乳粉检出限确定及验证

将含有 0.2 %、0.5 %、1.0%、5.0 %和 10.0 %的羊乳粉掺假牛乳粉样品用已确定方法提取 DNA 并进行 PCR 扩增后，通过凝胶电泳结果确定检出限，见图 40、图 41。

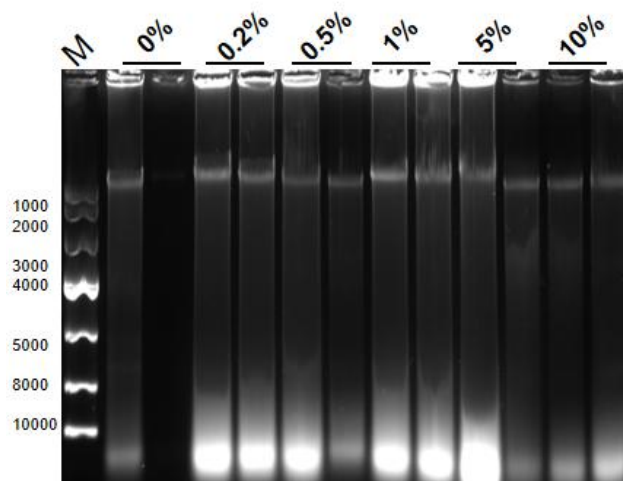


图 40 羊乳粉掺假牛乳粉 DNA 提取

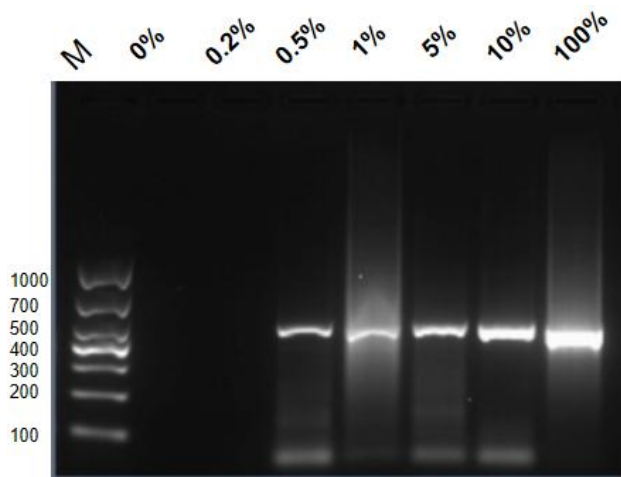


图 41 羊乳粉掺假牛乳粉 PCR 检出限结果

图 40、图 41 结果显示，大于 0.5 %水平的掺假均能检出，检出限初步设定为 0.5 %。3 次对提取的 DNA 经 PCR 扩增后，凝胶电泳结果显示，0.5%的样品均能检出。因此，羊乳粉中掺假牛乳粉的检出限确定为 0.5 %。

1.4.7.2 牦牛乳粉掺假牛乳粉检出限确定及验证

将含有 0.2 %、0.5 %、1.0%、5.0 %和 10.0 %的牦牛乳粉掺假牛乳粉样品用已确定方法提取 DNA 并进行 PCR 扩增后，通过凝胶电泳结果确定检出限，见图 42、图 43。

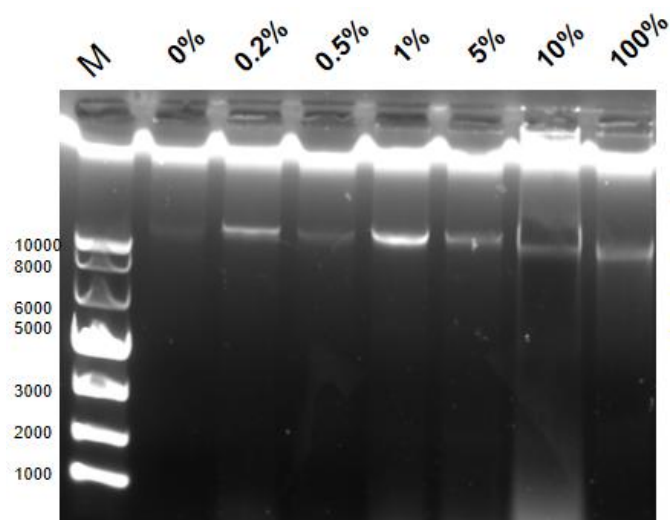


图 42 牦牛乳粉掺假牛乳粉 DNA 提取

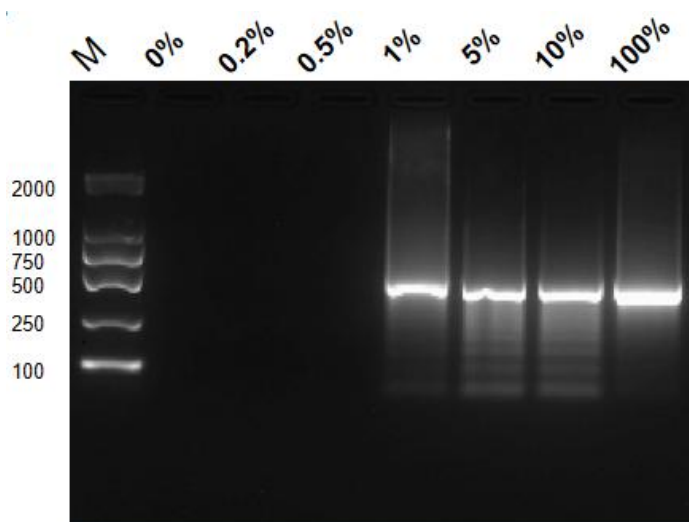


图 43 牦牛乳粉掺假牛乳粉 PCR 检出限结果

图 42、图 43 结果显示，大于 1.0 %水平的掺假均能检出，检出限初步设定为 1.0 %。3 次对提取的 DNA 经 PCR 扩增后，凝胶电泳结果显示，1.0%的样品均能检出。因此，牦牛乳粉中掺假牛乳粉的检出限确定为 1.0%。

1.4.7.3 水牛乳粉掺假牛乳粉检出限确定及验证

将含有 0.2 %、0.5 %、1.0%、5.0 %和 10.0 %的水牛乳粉掺假牛乳粉样品用已确定方法提取 DNA 并进行 PCR 扩增后，通过凝胶电

泳结果确定检出限，见图 44、图 45。

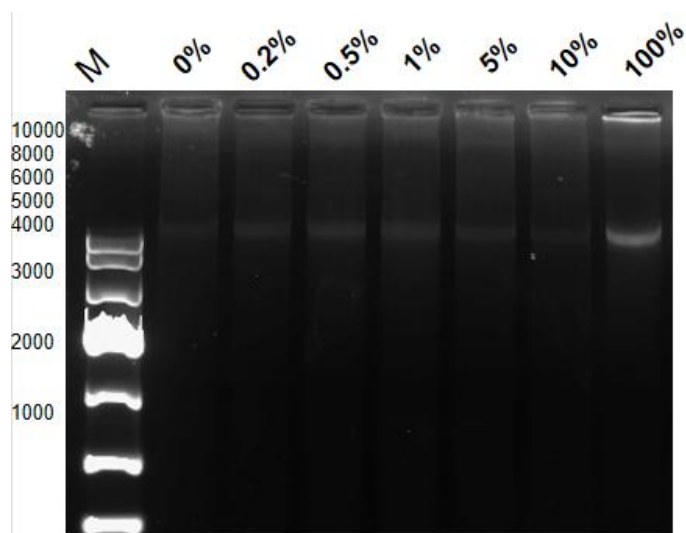


图 44 水牛乳粉掺假牛乳粉 DNA 提取

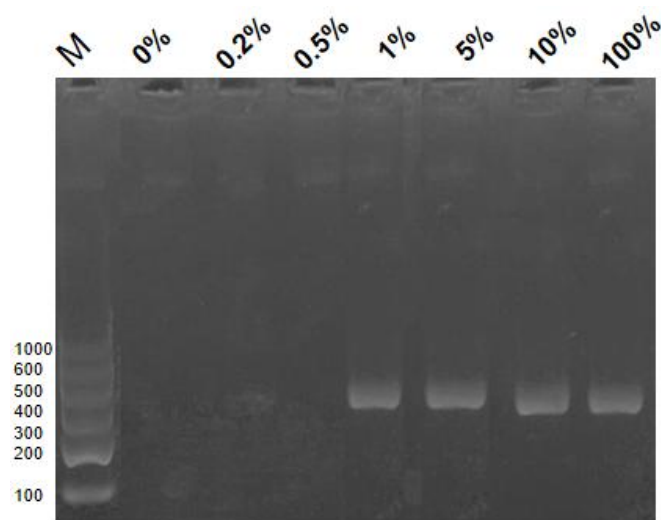


图 45 水牛乳粉掺假牛乳粉 PCR 检出限结果

图 44、图 45 结果显示，大于 1.0 %水平的掺假均能检出，检出限初步设定为 1.0 %。3 次对提取的 DNA 经 PCR 扩增后，凝胶电泳结果显示，1.0%的样品均能检出。因此，水牛乳粉中掺假牛乳粉的检出限确定为 1.0 %。

1.4.7.4 驼乳粉掺假牛乳粉检出限确定及验证

将含有 0.2 %、0.5 %、1.0%、5.0 %和 10.0 %的驼乳粉掺假牛乳

粉样品用已确定方法提取 DNA 并进行 PCR 扩增后，通过凝胶电泳结果确定检出限，见图 46、图 47。

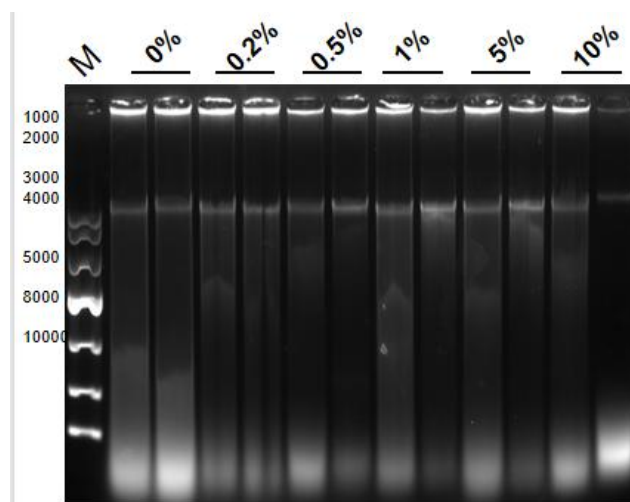


图 46 驼乳粉掺假牛乳粉 DNA 提取

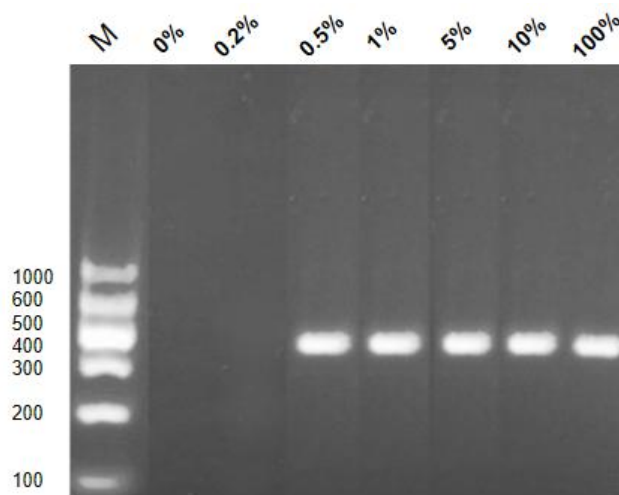


图 47 驼乳粉掺假牛乳粉 PCR 检出限结果

图 46、图 47 结果显示，大于 0.5 %水平的掺假均能检出，检出限初步设定为 0.5%。3 次对提取的 DNA 经 PCR 扩增后，凝胶电泳结果显示，0.5%的样品均能检出。因此，驼乳粉中掺假牛乳粉的检出限确定为 0.5%。

1.4.7.5 驴乳粉掺假牛乳粉检出限确定及验证

将含有 0.2 %、0.5 %、1.0%、5.0 %和 10.0 %的驴乳粉掺假牛乳粉样品用已确定方法提取 DNA 并进行 PCR 扩增后，通过凝胶电泳

结果确定检出限，见图 48、图 49。

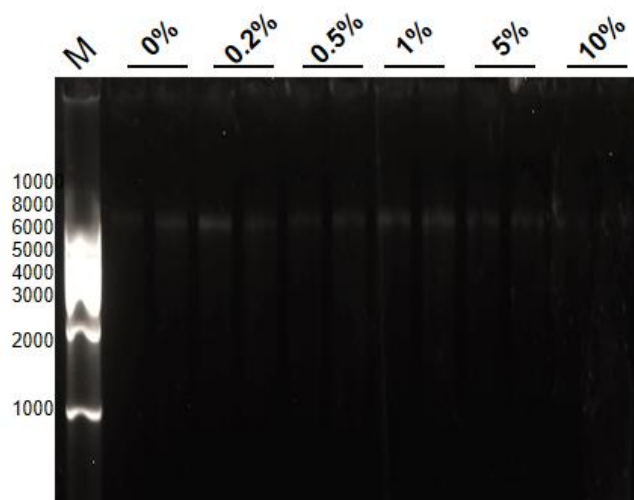


图 48 驴乳粉掺假牛乳粉 DNA 提取

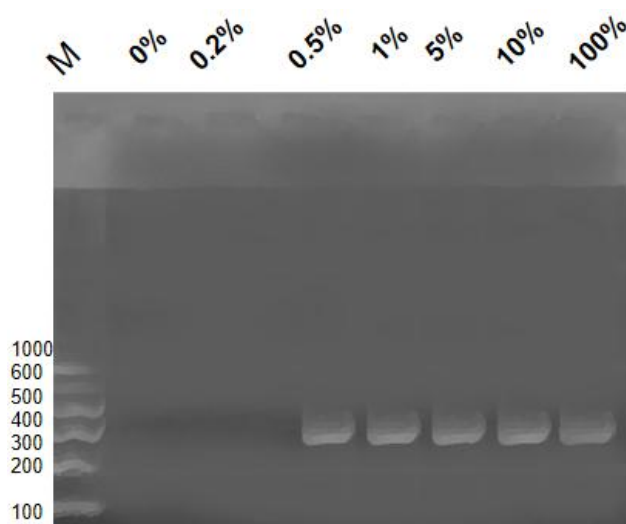


图 49 驴乳粉掺假牛乳粉 PCR 检出限的确定

图 48、图 49 结果显示，大于 0.5 %水平的掺假均能检出，检出限初步设定为 0.5%。3 次对提取的 DNA 经 PCR 扩增后，凝胶电泳结果显示，0.5%的样品均能检出。因此，驴乳粉中掺假牛乳粉的检出限确定为 0.5 %。

1.4.7.6 特色乳乳粉掺假牛乳粉小结

除牦牛乳粉和水牛乳粉掺假牛乳粉的检出限为 1.0%之外，其余

的特色乳粉检出限均为 0.5%，如图表 8 所示。

表 8 特色乳乳粉中添加不同浓度牛乳粉检出限结果

特色乳乳粉分类	牛乳粉检出限
羊乳粉	0.50%
牦牛乳粉	1.00%
水牛乳粉	1.00%
驼乳粉	0.50%
驴乳粉	0.50%

1.4.8 各类特色乳掺假各类牛乳检出限

第一法中生羊乳、生水牛乳、生骆驼乳、生驴乳、生牦牛乳和生马乳中生牛乳的检出限为 0.2%；生羊乳、生骆驼乳、生驴乳、生马乳中牛乳粉的检出限为 0.5 %；生水牛乳和生牦牛乳中牛乳粉的检出限为 1%；巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌羊乳、骆驼乳、驴乳、牦牛乳中巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌牛乳的检出限为 0.2 %；巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌水牛乳中巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌牛乳的检出限为 0.5%；羊乳粉、骆驼乳粉和驴乳粉中牛乳粉的检出限为 0.5%，水牛乳粉和牦牛乳粉中牛乳粉的检出限为 0.1%。

2 多重实时荧光 PCR 法

2.1 主要技术指标及相关要求

本方法的主要技术指标是通过多重 qPCR 方法对提取的奶中体细胞中的 DNA 进行扩增，要求能够分离出样品中的体细胞，不受蛋白含量的污染，且保留尽可能高浓度的完整 DNA 片段，并有效

地扩增。适用于掺假的产品包括：生乳（奶牛乳、水牛乳、牦牛乳、山羊乳、绵羊乳、马乳、驴乳、骆驼乳）、巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌乳（奶牛乳、水牛乳、牦牛乳、山羊乳、绵羊乳、马乳、驴乳、骆驼乳）、乳粉（奶牛乳、水牛乳、牦牛乳、山羊乳、绵羊乳、马乳、驴乳、骆驼乳）中掺入动物源性奶成分的定性检测。

2.2 实施此项工作的各步骤及具体操作

实施此项工作的步骤包括生奶、巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌奶及奶粉中体细胞的提取、体细胞中 DNA 的提取及纯化、qPCR 扩增优化条件、qPCR 扩增、方法的检出限、重复性和再现性等，技术路线图（图 50）如下：

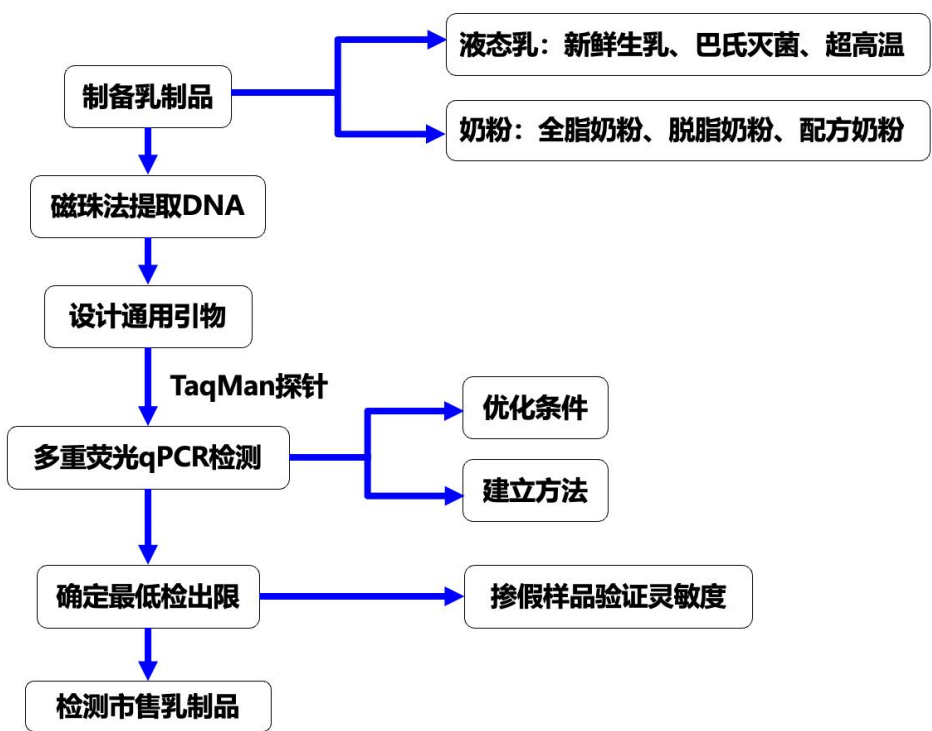


图 50 技术路线

2.3 优化实验结果及检出限、重复性和比对实验结果

2.3.1 模板 DNA 提取

移取待测奶样 1 mL，或将乳粉样品用双蒸水溶解配制成复原乳

后取 1mL，置于干净离心管中，6000 r/min 离心 10 min；弃去上层脂质层与中间层液体，加入 1 mL TE 缓冲液反复冲洗沉淀，6000 r/min 离心 10 min；弃去清液，加入 1 mL PBS 缓冲液反复冲洗沉淀，6000 r/min 离心 10 min；弃去清液，加入 500 μ L PBS 缓冲液反复冲洗沉淀，6000 r/min 离心 10 min；弃去清液，加入 200 μ L PBS 缓冲液反复冲洗沉淀。参照《磁珠法基因组 DNA 提取试剂盒说明书》进行 DNA 的提取。

从生乳样品、模拟掺假生乳样品和乳制品中提取总基因组 DNA。根据 260 nm 处的吸光度值以及 260 nm 和 280 nm 处的吸光度比值来确定提取的 DNA 浓度和纯度。提取的生乳样品和模拟掺假生乳样品的 DNA 浓度范围为 10–100 ng/ μ L；乳制品样品 DNA 浓度范围为 5–50 ng/ μ L。乳制品中提取的 DNA 浓度低可能是因为其在加工过程中需要经过热处理，导致 DNA 断裂或者降解为许多仅有几百个碱基的小片段。但本实验使用的多重 qPCR 同样可以成功扩增。同时，所有 DNA 样品的纯度均满足后续扩增要求（ $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}=1.7-2.0$ ），表明从所有类型样品中成功提取了高质量的 DNA。

2.3.2 阳性质粒控制

设计并合成了用于多重 qPCR 系统的重组 IPC。合成奶牛、水牛、牦牛、山羊、绵羊、马、驴和骆驼的靶 DNA 序列并克隆到大肠杆菌 pUC57 载体中以产生多靶标准 DNA 质粒。测序证实每个物种仅插入了预期序列的单拷贝，未发现缺失或插入突变。

2.3.3 单重 qPCR 及特异性试验

从 GenBank 数据库下载线粒体细胞色素 b (cytb) 序列，登录号同 1.4.3.1。通过软件 Primer Premier 3.0 比对分析物种基因序列，选取匹配度低、差异大的序列片段，使用 Primer Premier 6.0 软件在基因保守区域设计引物和探针（表 10）。探针在 5'端用荧光报道分子 6-羧基荧光染料（6-carboxyfluorescein, FAM）、黑色素扩增体（hexachlorofluorescein, HEX）、磺基罗丹明 101（Sulforhodamine 101 acid chloride, Texas Red）和花青素荧光染料（Cyanine5, CY5）修饰。因此在设计筛选引物探针时控制靶序列长度在 250bp 以内，以保证不同加工程度乳品的检测需求。本实验在 2 个反应体系中同时进行四重 qPCR。

分别以 8 个物种基因组 DNA 为模板进行扩增。20 μ L 扩增体系：10 μ L 2 $\times$ TaqMan Fast qPCR Master Mix，0.4 μ L 上游引物（0.2 μ mol/L），0.4 μ L 下游引物（0.2 μ mol/L），0.3 μ L 探针（0.2 μ mol/L），1 μ L 模板 DNA（5 ng/ μ L），加 RNase free ddH₂O 至 20 μ L。反应程序参考 2 $\times$ TaqMan Fast qPCR Master Mix 试剂说明书，具体如下：94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min，然后 94 $^{\circ}$ C 变性 5 s、57 $^{\circ}$ C 退火 15 s 和延伸 30 s，共 40 个循环，在每个循环的退火延伸阶段收集荧光信号。以双蒸水为空白对照，以不含目标成分样品 DNA 作为阴性对照，用含目标片段的阳性质粒作为阳性对照。

表 9 引物探针序列

编号	物种	序列 (5'-3')	扩增/bp
1	牛	F1: CCTAGCAATACACTACACATCCG	116
2	水牛	R1: TTGAAGCTCCGTTTGCGT	
3	牦牛	奶牛-P: Texas	

Red-TCTGTTACCCATATCTGCCGAGACGTG-BHQ2		
	水牛-P: FAM-CGTGAACTATGGATGAA-MGB	
	牦牛-P: HEX-CTCCGTTGCCCATAT-MGB	
4	山羊	F2: ATAGGCTATGTTTTACCATGAGGAC
		R2: CATTGACTAGGTTTGTGCCA
	山羊-P: Texas	104
5	绵羊	Red-ACAGTCATCACTAATCTTCTTTCAGCAATCCC-BHQ2
	绵羊-P: CY5-TATTACCAACCTCCTTTC-MGB	
6	马	F3: AGACCCAGACAACTACACCCC
		R3: TTGTTGGGAATGGAGCGTA
		108
7	驴	马-P: FAM-TACTTCCTGTTTGCCTAC-MGB
	驴-P: HEX-TTCCTATTTGCTTACGCC-MGB	
		F4: ACAGGCTCTAATAACCCGACAG
8	骆驼	R4: GGTGAGAACAGTACGAGAATAAGG
	骆驼-P: CY5- CTCCTCAGACATAGACA-MGB	134
注: F 代表上游引物, R 代表下游引物, P 代表探针		

2.3.4 多重实时荧光 PCR 体系的优化

以单重 qPCR 反应体系为基础, 对 8 个物种引物和探针的使用量进行优化, 确认最优多重 qPCR 反应体系。

引物浓度优化: 以提取的奶 DNA 为模板, 3 反应体系中其他成分不变, 将正反引物浓度设置 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 、0.4 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.5 $\mu\text{mol/L}$, 根据扩增反应的循环阈值 (Ct 值) 和扩增曲线的荧光信号值 (RFU) 选择最佳引物浓度。

探针浓度优化：以提取的奶样 DNA 为模板，根据选择好的最佳正反向引物终浓度 2 $\mu\text{mol/L}$ ，进一步进行探针浓度的确定，探针浓度设置为 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 、0.30 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.35 $\mu\text{mol/L}$ ，根据扩增反应的 Ct 值和扩增曲线的 RFU 选择最佳探针浓度。

2.3.5 引物和探针的特异性试验

为了分析特异性，针对 5 个非目标物种（大豆、玉米、小麦、红薯和大米）的模板 DNA 进行多重 qPCR 测定。阳性质粒为阳性对照，非目标物种 DNA 作为阴性对照，双蒸水作为空白对照。在优化的退火温度（57°C）、引物浓度（300 nM）和探针浓度（300 nM）下，仅奶牛、水牛、牦牛、山羊、绵羊、马、驴、骆驼的 *Cytb* 基因和阳性对照产生扩增曲线，扩增 Ct 值在 20.43~25.35 之间（表 10），并且与非靶标乳源物种之间无交叉反应，阴性对照和空白对照也均无扩增，说明设计的引物和探针特异性良好。

表 10 特异性引物和探针单重实时 PCR 检测

样 品	Ct 值								
	阳性对 照	奶牛	水牛	牦牛	山羊	绵羊	马	驴	骆驼
奶 牛	20.57± 0.21	20.63± 0.26	—	—	—	—	—	—	—
水 牛	25.34± 0.46	—	25.35± 0.07	—	—	—	—	—	—

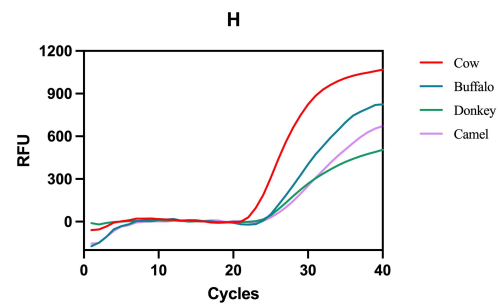
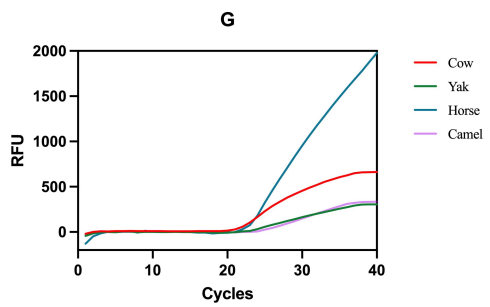
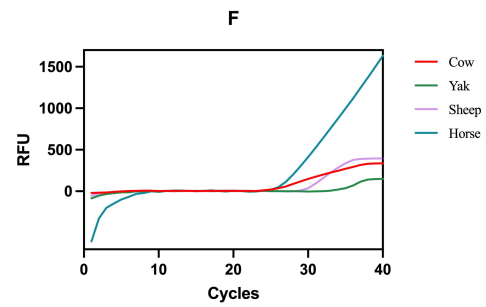
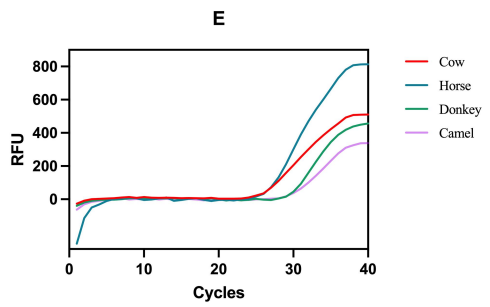
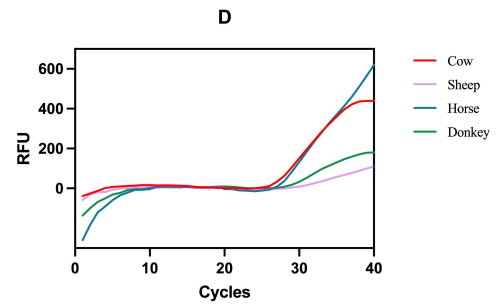
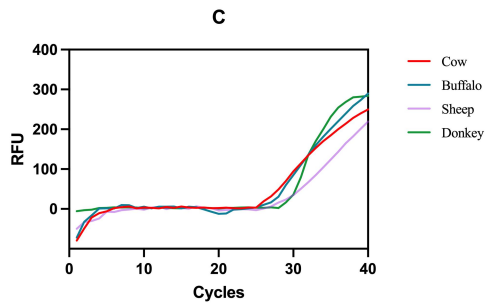
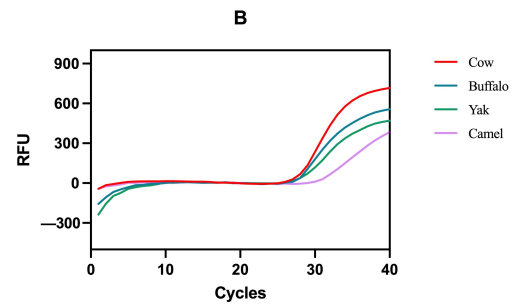
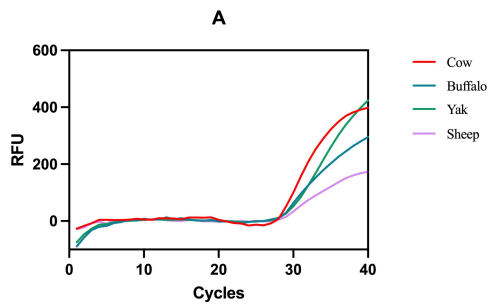
牦牛	22.05± 0.02	—	—	22.06± 0.04	—	—	—	—	—
山羊	20.99± 0.37	—	—	—	20.53± 0.18	—	—	—	—
绵羊	20.73± 0.22	—	—	—	—	20.43± 0.13	—	—	—
马	23.20± 1.31	—	—	—	—	—	23.80± 0.10	—	—
驴	24.93± 0.24	—	—	—	—	—	—	24.64± 0.13	—
骆驼	24.27± 0.00	—	—	—	—	—	—	—	24.33± 0.28
阴性对照	—	—	—	—	—	—	—	—	—
空白对照	—	—	—	—	—	—	—	—	—

注：“—”表示 40 个循环中未检出荧光信号。

2.3.6 多重实时荧光 PCR 交叉反应性

按照 qPCR 仪的 4 种荧光系统，对 8 种乳源的探针分别用 FAM、HEX、Texas Red 和 CY5 进行荧光标记并编号，编号如表 9 所示。根据荧光基团的不同将 8 种乳源进行组合，共产生 16 种组合：即 1234、1247、1238、1278、1346、1368、1467、1678、2345、2358、2457、2578、3456、3568、4567、5678。8 种乳 DNA 均调至 5 ng/μL，将每种组合对应的 4 种 DNA 进行等体积混合作为模板（DNA 终质量浓度 1.25 ng/μL），阴性对照 DNA 调至 12.5 ng/μL 并进行等体积混合作为阴性对照（保证反应体系中每个物种终质量浓度一致），以阳性质粒为阳性对照，以无菌 ddH₂O 为空白对照，进行多重 qPCR 检测，每个样品 3 个平行。

根据发光基团的不同，将 8 种靶标乳源探针（表 9）的 16 种组合进行多重 qPCR 交叉反应性检测。结果表明，16 种组合均可检测到对应的目标物种，但图 51 A（牦牛）、图 51 C（奶牛、水牛、绵羊）、图 51 D（马、绵羊）、图 51 F 和图 51 G（马）、图 51 I（山羊、绵羊）、图 51 K（山羊）、图 51 L（骆驼）、图 51 O 和图 51 P（驴）组合均存在非典型的 S 型曲线，且 RFU 值偏低，说明在 10 种组合出现了交叉反应，扩增受到抑制。其他反应体系中只有图 51 H（1278）和图 51 N（3456）这种组合可以同时保证 8 种乳源均具有良好的扩增效果，说明该混合体系之间未产生交叉反应，故确定以 1278 和 3456 这种组合作为 8 种乳源多重 qPCR 检测体系。



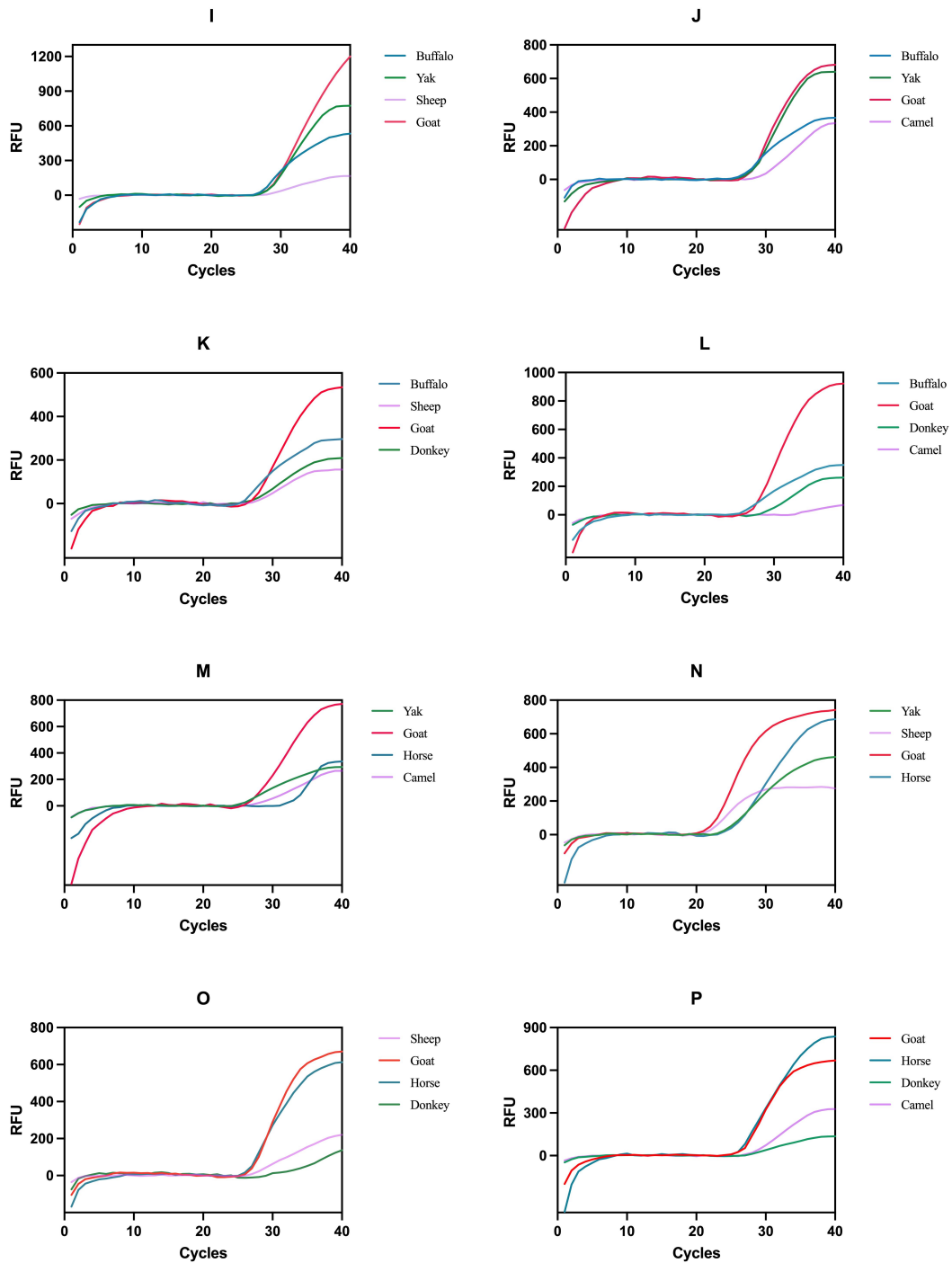


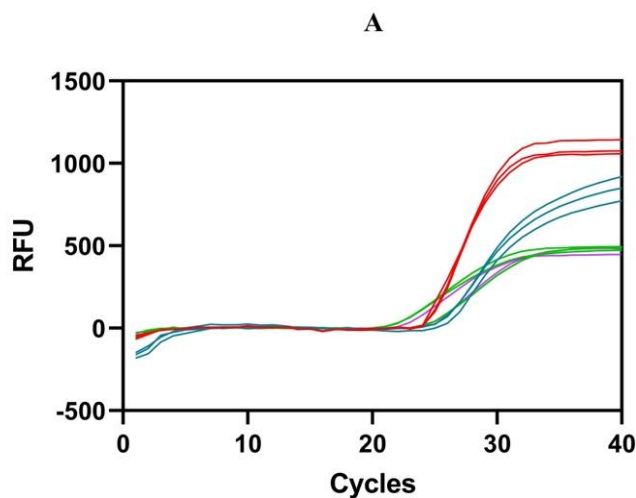
图 51 16 种组合多重 qPCR 扩增结果

图 1. 16 种组合的多重 qPCR 扩增结果。(A - P) 16 种组合: 1234、1247、1238、1278、1346、1368、1467、1678、2345、2358、2457、2578、3456、3568、4567、5678。

2.3.7 多重实时荧光 PCR 系统的特异性

通过 4 种不同的荧光报告染料 (FAM、HEX、Texas Red 和

CY5) 在同一反应管区分多个扩增子 (表 11)。使用 8 个目标物种的引物和探针对每个物种的单重 qPCR 系统进行逐一优化, 然后将其他物种的引物和探针依次添加到反应混合物中以优化最终多重 qPCR 系统。获得的扩增曲线清楚地表明了物种特异性扩增曲线以及 40 个循环 PCR 测定中相关物种的背景荧光, 证实不存在任何交叉扩增 (图 52), 表明引物和探针对于多重检测具有很强的特异性。奶牛、水牛、牦牛、山羊、绵羊、马、驴和骆驼的多重 qPCR 检测的扩增信号 (Ct 值) 分别为 20.47 ± 0.50 、 25.07 ± 0.68 、 22.36 ± 0.16 、 20.13 ± 0.06 、 20.41 ± 0.81 和 23.46 ± 0.26 、 24.21 ± 0.81 和 24.63 ± 0.93 , 同时, 非目标物种在检测过程中未产生任何可检测到的 Ct 值 (表 11)。



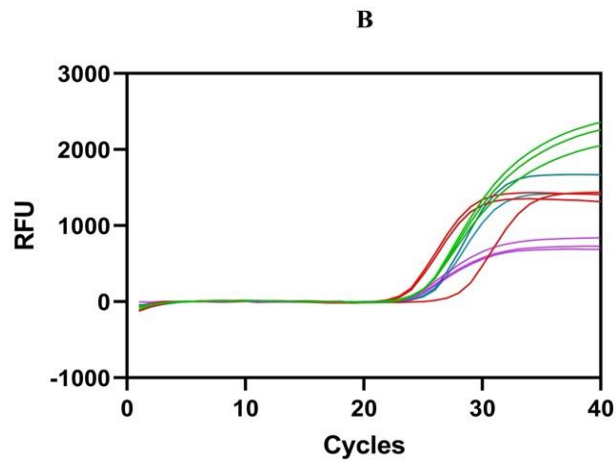


图 52 多重 qPCR 特异性验证

注：图 A 四个目标分别表示为红色（奶牛）、蓝色（水牛）、绿色（驴）和紫色（骆驼）。图 B 四个目标分别表示为红色（山羊）、蓝色（马）、绿色（牦牛）和紫色（绵羊）。

图 11 多重 qPCR 的特异性

物种	多重 qPCR 系统	
	荧光信号	平均值 ± 标准差
奶牛	+	20.47±0.50
水牛	+	25.07±0.68
牦牛	+	22.36±0.16
山羊	+	20.13±0.06
绵羊	+	20.41±0.81
马	+	23.46±0.26
驴	+	24.21±0.81
骆驼	+	24.63±0.93
大豆	—	—
玉米	—	—
小麦	—	—

红薯	—	—
大米	—	—

注：“+”为 PCR 结果阳性（Ct 值<40），“—”为 40 个循环内荧光信号无增加。

2.3.8 标准曲线的生成以及目标 DNA 和 PCR 效率的定量

为了确定所开发的多重 qPCR 检测的检测限(LOD)，使用 5 倍连续稀释液对目标物种的总 DNA 进行稀释。最初，使用等量的混合物（1: 1: 1: 1）从 4 个目标物种中提取浓度为 20 ng/μL 的基因组模板 DNA。然后，用无核酸酶水将 4 个物种的总 DNA 连续稀释至 4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128 ng/μL。因此，将 4 μL 每种稀释的 DNA 溶液添加到 20 μL 多重反应混合物中，使反应混合物中每种目标物种的 DNA 含量分别为 4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128 ng，用优选的组合对每个稀释度进行多重 qPCR 反应，并且每个稀释模板进行 3 次重复测定。

扩增图反映了 20 ng/μL 到 0.00128 ng/μL DNA 的所有浓度的可检测 Ct 值（图 53），结果表明，多重 qPCR 体系可以检测和定量 20 μL 反应混合物中至少 0.0064 ng/μL 的奶牛乳和水牛乳的 DNA，以及至少 0.00128 ng/μL 的牦牛乳、山羊乳、绵羊乳、马乳、驴乳和骆驼乳的 DNA。

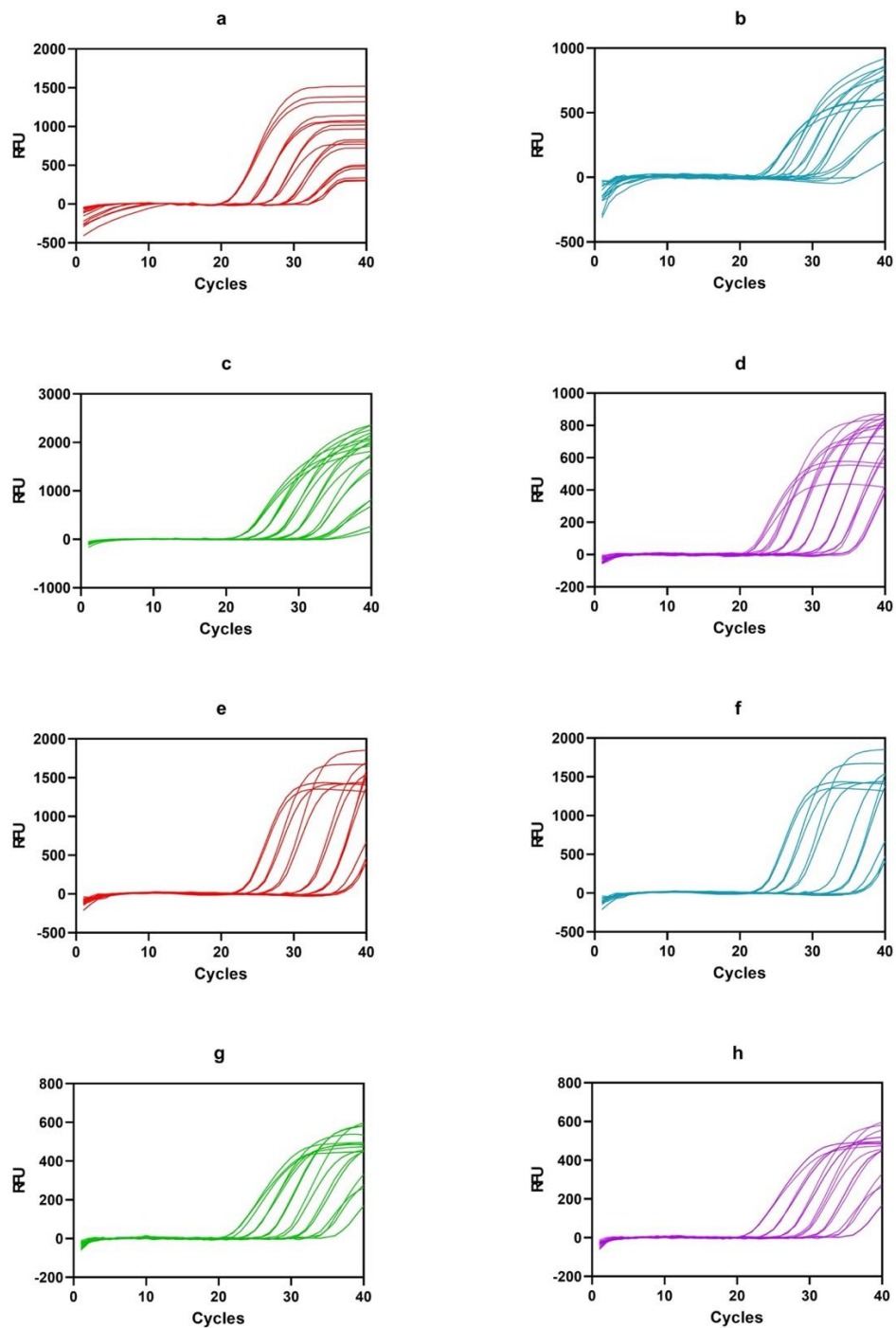


图 53 8 个奶源物种的多重 qPCR 灵敏度扩增曲线

注：a 和 e 为奶牛和山羊在 Texas Red 通道的灵敏度扩增曲线，b 和 f 为水牛和马在 FAM 通道的灵敏度扩增曲线，c 和 g 为牦牛和驴在 HEX 通道的灵敏度扩增曲线，d 和 h 为绵羊和骆驼在 CY5 通道的灵敏度扩增曲线。

构建标准曲线以确定多重 qPCR 效率并量化 PCR 目标, 这些目标是从生乳混合物 (1:1:1:1) 中提取的 DNA 生成的。用去离子蒸馏水将稀释样品连续稀释 5 倍 (20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128 ng/μL), 并将各 4 μL 添加到 20 μL 反应混合物中。以浓度的对数为横坐标, Ct 值为纵坐标制作标准曲线, 并按公式 $Eff\% = (10^{-1/\text{斜率}} - 1) \times 100\%$ 计算扩增效率。PCR 效率的接受范围在 90% 至 110% 之间, 对应的回归斜率在 -3.1 至 -3.6 之间 ($R^2 \geq 0.98$)。未知样品中 8 种靶标乳 DNA 的数量是根据各自的 Ct 值确定的: $Ct = m \log[x] + C$, 其中, m 为斜率, C 为截距。

标准曲线可以观察到良好的线性回归 (图 54), 奶牛、水牛、牦牛、山羊、绵羊、马、驴和骆驼的回归系数(R^2)分别为 0.9914、0.9956、0.9957、0.99、0.9965、0.9911、0.9967 和 0.9932, 对应的斜率分别为 -3.3758、-3.5683、-3.5169、-3.5818、-3.3806、-3.5528、-3.4092 和 -3.5664。计算得出的 PCR 效率分别达到 97.80%、90.65%、92.46%、90.19%、97.61%、91.19%、96.48% 和 90.72%, 根据乳真实性检测的最低性能标准, 标准曲线的相关系数应高于 0.98, PCR 效率在 90% 至 110% 之间, 斜率范围为 -3.6 至 -3.1。因此, 我们的结果表明, 开发的多重 qPCR 检测方法具有较高的扩增效率, 且可获得良好的线性关系。

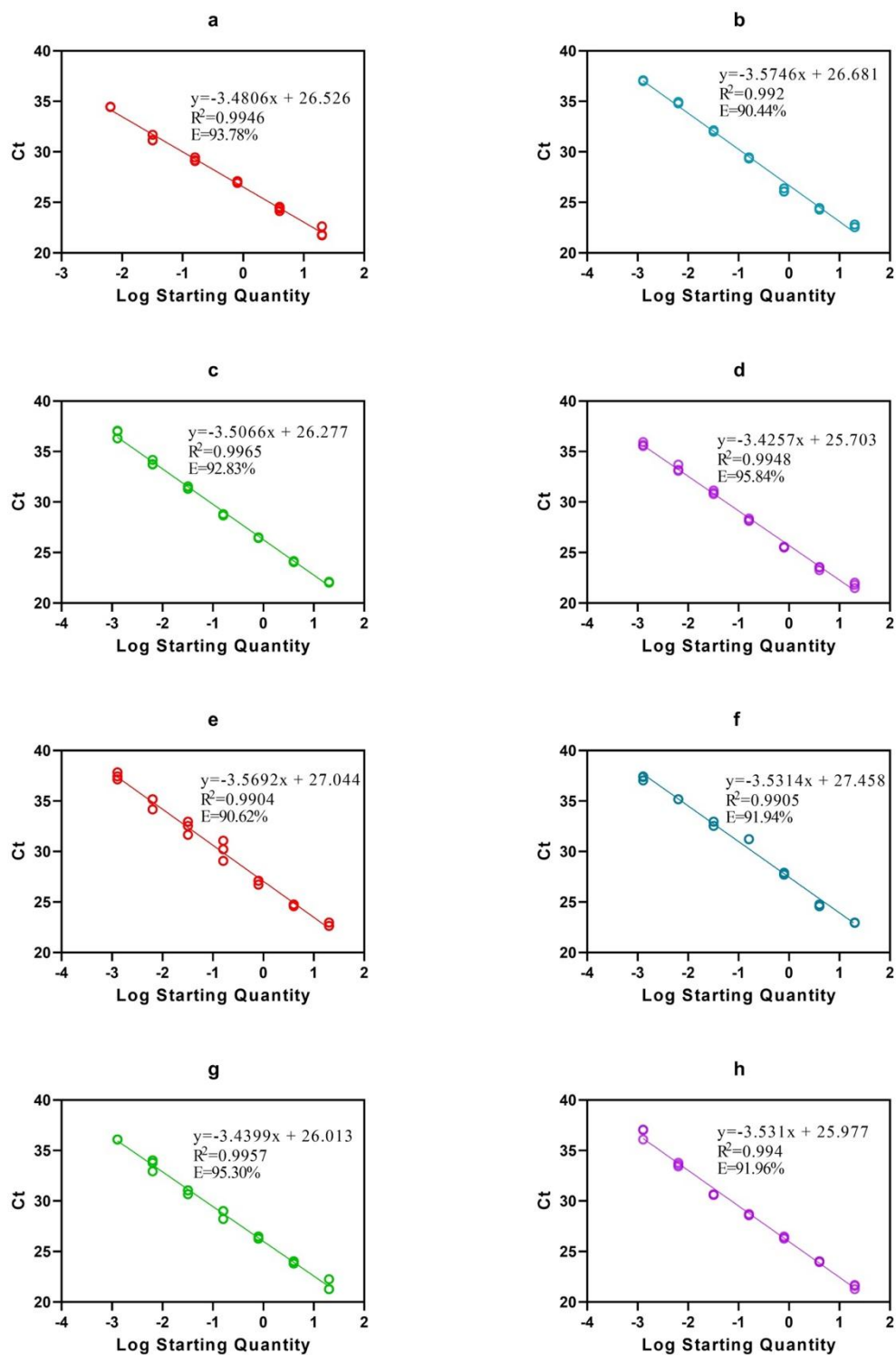


图 54 8 个奶源物种的多重 qPCR 扩增效率

图 54. 奶源多重 qPCR 标准曲线；(a—h) 分别为奶牛、水牛、牦牛、绵羊、山羊、马、驴和骆驼奶源在多重 qPCR 扩增中的标准曲线。

2.3.9 掺假样品的检出限试验

为分析建立的多重实时荧光 PCR 体系对混合样品检测检出限，将优选组合对应的靶标乳先等体积混合，以非靶标乳为基质，按照每种靶标乳含量 90%，50%，10%，5%，1%，0.5%，0.1%，0.01% 的比例制备混合乳品。即以山羊乳为基质添加牛乳/水牛乳/驴乳/骆驼乳混合乳，以骆驼乳为基质添加牦牛乳/山羊乳/绵羊乳/马乳混合乳，以对应的基质 DNA 为阴性对照，以 ddH₂O 为空白对照，对目标物种成分进行多重 qPCR 检测，每个反应设置 3 个平行。结果表明（表 12），牛奶、牦牛奶、山羊奶、绵羊奶和骆驼奶（0.01%）的最低可检测 Ct 值范围为 27.036±0.200 至 34.568±0.068。水牛奶和马奶（0.5%）的最低可检测 Ct 值分别为 33.948±0.415 和 33.547±0.242。驴奶（5%）的最低可检测 Ct 值为 35.628±0.099。根据不同添加水平的模拟掺假乳制品的平均 Ct 值计算 RSD，范围为 0.09%至 3.62%。这些结果明确说明了所开发的多重 qPCR 系统具有强大的灵敏度、特异性和可靠性，可以可靠地检测到低至 0.01%浓度的所有八个目标物。

表 12 不同生乳 DNA 扩增的 Ct 值

样品	掺假水平 (%)	平均值			标准差	相对标准 偏差
		第一天	第二天	第三天		
牛奶	90	20.128	19.203	19.269	0.422	2.16
	50	20.109	20.214	20.209	0.048	0.24
	10	23.882	23.303	23.779	0.252	1.07
	5	24.066	24.043	24.382	0.155	0.64
	1	27.243	27.816	27.899	0.291	1.05

水牛奶	0.5	28.562	28.431	29.628	0.536	1.86
	0.1	29.161	29.754	29.127	0.288	0.98
	0.01	32.183	32.688	31.546	0.467	1.45
	90	20.321	20.243	20.399	0.064	0.31
	50	21.640	22.020	21.182	0.343	1.59
	10	22.321	22.785	21.228	0.653	2.95
	5	21.621	22.699	22.042	0.444	2.01
	1	24.597	24.656	24.626	0.024	0.10
	0.5	33.948	34.363	33.534	0.339	1.00
	0.1	—	—	—	—	—
驴奶	0.01	—	—	—	—	—
	90	22.647	22.305	22.990	0.280	1.24
	50	23.158	22.691	23.492	0.329	1.42
	10	31.946	31.975	31.917	0.024	0.07
	5	35.530	35.628	35.727	0.081	0.23
	1	—	—	—	—	—
	0.5	—	—	—	—	—
	0.1	—	—	—	—	—
	0.01	—	—	—	—	—
	90	24.690	23.980	23.780	0.390	1.62
骆驼奶	50	23.182	23.182	23.414	0.109	0.47
	10	23.411	23.865	23.700	0.188	0.79
	5	23.381	25.041	24.340	0.680	2.80
	1	25.492	26.433	25.749	0.397	1.53

	0.5	27.090	27.029	26.400	0.312	1.16
	0.1	32.862	31.507	32.469	0.569	1.76
	0.01	34.308	34.499	34.636	0.135	0.39
	90	22.243	21.545	21.894	0.285	1.30
	50	22.755	22.849	22.427	0.181	0.80
	10	24.289	24.134	24.218	0.063	0.26
	5	26.187	26.990	26.463	0.333	1.25
牦牛奶	1	27.150	26.674	26.536	0.263	0.98
	0.5	27.439	27.370	27.765	0.172	0.63
	0.1	28.253	28.043	28.083	0.091	0.32
	0.01	29.619	29.945	29.058	0.367	1.24
	90	18.746	18.434	18.407	0.154	0.83
	50	19.977	19.962	19.839	0.062	0.31
	10	22.611	23.038	22.706	0.183	0.80
	5	23.665	23.764	23.841	0.072	0.30
山羊奶	1	25.814	24.607	24.576	0.576	2.30
	0.5	26.661	26.016	25.801	0.365	1.40
	0.1	27.099	26.363	26.207	0.389	1.46
	0.01	29.826	29.508	29.865	0.160	0.54
	90	19.493	19.694	19.413	0.118	0.60
	50	21.906	21.277	21.159	0.328	1.53
绵羊奶	10	21.634	21.758	20.557	0.539	2.53
	5	24.486	23.445	23.238	0.546	2.30
	1	26.217	26.103	26.228	0.056	0.22

马奶	0.5	24.486	24.330	24.521	0.083	0.34
	0.1	27.289	27.335	27.310	0.019	0.07
	0.01	26.834	27.234	27.040	0.163	0.60
	90	22.443	22.424	22.521	0.042	0.19
	50	23.258	23.132	23.279	0.065	0.28
	10	25.202	25.816	25.365	0.260	1.02
	5	26.116	25.607	26.126	0.242	0.93
	1	27.776	28.281	27.865	0.220	0.79
	0.5	33.321	33.803	33.517	0.198	0.59
	0.1					
	0.01					

2.3.10 重复性试验

分别以两个组合的同一批次和不同批次制备的不同浓度（4 ng/μL、0.8 ng/μL、0.16 ng/μL、0.032 ng/μL）DNA 作为模板，用优化后的条件分别进行批内和批间重复性试验，每个模板分别做 6 个重复，计算批内及批间重复性试验的 Ct 平均值（Mean）、标准偏差（Standard deviation，SD）和变异系数（Coefficient of variation，CV/%）。

通过计算标准偏差（SD）和相对标准偏差（RSD）来评估精密度。结果显示（表 13 和表 14），8 种乳 DNA 的批内 RSD 值＜5.20%，批间 RSD 值＜3.11%，批内和批间 RSD 值均小于 10%，表明本试验所建立的多重 qPCR 检测方法具有良好的稳定性及重复性。

表 13-1 多重实时荧光 PCR 批内重复性试验

DNA	奶牛	水牛	驴	骆驼
-----	----	----	---	----

模 板								
浓 度 / ng/μL	Mean±SD	RSD/%	Mean±SD	RSD/%	Mean±SD	RSD/%	Mean±SD	RSD/%
4	24.15±0.51	2.13	24.44±0.82	3.36	25.46±0.40	1.59	23.95±0.13	0.53
0.8	24.44±0.82	3.36	26.39±1.37	5.20	28.52±0.14	0.51	26.37±0.11	0.40
0.16	29.47±0.30	1.03	29.45±0.65	2.22	31.76±0.30	0.94	28.61±0.39	1.38
0.032	32.14±0.57	1.78	32.45±0.83	2.56	33.34±1.00	2.99	30.61±0.47	1.54

表 13-2 多重实时荧光 PCR 批内重复性试验

DNA 模	牦牛		山羊		绵羊		马	
板 浓 度 / ng/μL	Mean±SD	CV/%	Mean±SD	CV/%	Mean±SD	CV/%	Mean±SD	CV/%
4	24.15±0.08	0.32	26.81±0.27	1.00	23.58±0.36	1.54	24.51±0.18	0.72
0.8	26.48±0.21	0.81	31.02±0.22	0.71	25.59±0.15	0.59	28.08±0.07	0.24
0.16	28.69±0.17	0.60	33.79±0.22	0.65	28.21±0.14	0.50	32.62±0.07	0.21
0.032	31.31±0.26	0.84	35.24±0.06	0.18	30.93±0.19	0.62	36.43±0.40	1.09

表 14-1 多重实时荧光 PCR 批间重复性试验

DNA	奶牛		水牛		驴		骆驼	
模 板 浓 度 / ng/μL	Mean±SD	CV/%	Mean±SD	CV/%	Mean±SD	CV/%	Mean±SD	CV/%
4	23.90±0.72	3.03	24.34±0.25	1.03	26.20±0.35	1.32	23.33±0.29	1.23
0.8	27.01±0.12	0.43	27.04±0.30	1.10	28.52±0.59	2.06	26.49±0.50	1.91

0.16	29.41±0.33	1.11	29.86±0.59	1.97	31.88±0.53	1.65	28.76±0.61	2.14
0.032	31.49±0.24	0.75	32.04±0.10	0.33	34.07±0.19	0.55	31.14±0.13	0.41

表 14-2 多重实时荧光 PCR 批间重复性试验

DNA	牦牛		山羊		绵羊		马	
模 板								
浓 度 /	Mean±SD	CV/%	Mean±SD	CV/%	Mean±SD	CV/%	Mean±SD	CV/%
ng/μL								
4	24.14±0.15	0.63	26.46±0.18	0.68	23.54±0.33	1.41	24.25±0.18	0.76
0.8	26.49±0.53	1.99	29.96±0.26	0.86	25.31±0.44	1.74	28.25±0.31	1.08
0.16	28.77±0.45	1.56	33.28±0.00	0.01	28.44±0.18	0.63	32.43±1.01	3.11
0.032	31.58±0.45	1.41	35.74±0.07	0.21	31.30±0.51	1.64	36.42±0.22	0.60

2.3.11 实际样品检测

应用建立的多重 qPCR 法对市场采购的 54 份样品进行乳源成分分析,判定与所贴标签是否相符,同时验证所建立的检测方法推广使用的可行性。DNA 的提取和多重 qPCR 反应如上所述进行。样品包括 7 份水牛乳产品、15 份牦牛乳产品、8 份山羊乳产品、4 份绵羊乳产品、6 份马乳产品、6 份驴乳产品以及 8 份骆驼乳产品。种类包括液态鲜奶、酸奶、奶粉、婴配,涉及的加工方式包括巴氏杀菌、发酵、高温灭菌、超高温灭菌、高温喷雾干燥等。

使用开发的多重 qPCR 方法进行 8 种动物乳源的真实性的检测(表 15)。结果显示,有 18 份乳制品检出非标识物种成分,掺伪率达

33.33%，主要是水牛乳制品、牦牛乳制品、山羊乳制品、绵羊乳制品及驴乳制品。其中，7份水牛乳制品有4份检出非标识奶牛成分，不符率达57.14%；15份牦牛乳制品有8份检出非标识奶牛成分或山羊成分，不符率达53.33%；8份山羊乳制品有2份检出非标识奶牛成分，不符率为25%；4份绵羊乳制品有1份检出非标识奶牛成分，不符率为25%；6份驴乳制品有3份检出非标识奶牛成分，不符率为50%；马和骆驼乳制品未检出非标识乳源成分，符合其乳源标识。

表 15 市售乳制品乳源动物物种成分检测

编号	乳源	乳源标识	检出乳源	Ct 值		
				乳源	奶牛	山羊
1	水牛	生水牛乳	水牛	22.68		
2		纯水牛奶粉	奶牛		23.10	
3		纯水牛乳	奶牛		20.74	
4		纯水牛乳	水牛	24.09		
5		生水牛乳	奶牛		25.2	
6		生水牛乳	奶牛		18.3	
7		生水牛乳	水牛	18.9		
8	牦牛	全脂牦牛奶	奶牛、山羊		18.33	27.00
9		纯牦牛奶粉	奶牛、山羊		20.61	26.67
10		纯牦牛奶粉	牦牛	22.86		
11		纯牦牛奶粉	牦牛	19.81		
12		纯牦牛奶粉	奶牛、山羊		20.50	28.34
13		纯牛奶	奶牛、山羊		22.63	28.32
14		有机纯牛奶	牦牛	23.52		
15		全脂牦牛奶粉	奶牛、山羊		18.32	30.80
16		纯牦牛奶粉	牦牛	23.38		
17		纯牦牛奶粉	牦牛、奶牛、山羊	23.26	20.07	28.97
18		纯牦牛奶粉	牦牛、奶牛、山羊	23.38	19.60	28.11
19		纯牦牛奶粉	牦牛、奶牛、山羊	22.72	20.05	28.27
20		纯牛奶	牦牛	25.66		
21		纯牛奶	牦牛	18.70		

22		纯牛奶	牦牛	24.88		
23		羊奶粉	山羊、奶牛		25.52	25.08
24		全脂山羊奶	山羊、奶牛		25.66	19.99
25		纯山羊粉	山羊	20.68		
26	山羊	巴氏杀菌山羊奶	山羊	18.99		
27		巴氏杀菌山羊奶	山羊	17.30		
28		巴氏杀菌山羊奶	山羊	21.81		
29		纯山羊粉	山羊	18.71		
30		纯山羊粉	山羊	18.87		
31		全脂羊乳粉	绵羊	22.18		
32	绵羊	全脂羊乳粉	绵羊	23.29		
33		巴氏杀菌绵羊奶	绵羊	23.43		
34		巴氏杀菌绵羊奶	绵羊、奶牛	25.43	21.86	
35		马奶酒	马	31.53		
36		马奶牛	马	24.14		
37	马	酸马奶	马	24.77		
38		酸马奶	马	24.52		
39		酸马奶	马	25.72		
40		酸马奶	马	26.02		
41		鲜驴乳	奶牛		19.96	
42		全脂乳粉	奶牛		19.76	
43	驴	全脂乳粉	驴	24.83		
44		全脂乳粉	奶牛		19.43	
45		鲜驴乳	驴	28.32		
46		全脂乳粉	驴	25.18		
47		纯骆驼奶	骆驼	25.04		
48		生鲜骆驼	骆驼	22.69		
49		纯骆驼奶	骆驼	20.42		
50	骆驼	全脂乳粉	骆驼	23.01		
51		全脂乳粉	骆驼	21.24		
52		灭菌驼乳	骆驼	21.91		
53		纯驼粉	骆驼	23.99		
54		纯驼乳	骆驼	22.22		

三、 试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的

经济效益、社会效益和生态效益。

（一） 试验验证的分析、综述报告

1、聚合酶链式反应（PCR）法

本方法分别在 3 家实验室进行比对验证实验，以验证其重现性。三家实验室分别为农业农村部农产加工质量监督检验测试中心（北京）、农业农村部乳品质量检验测试中心（北京）和唐山市农产品质量安全检验测试中心。验证实验 1（图 55-58）：含有 0%、0.2%、0.5%、1.0%、5.0%、10.0%和 100%的生乳掺假生牛乳样品、生乳掺假生牛乳粉的检出限为 0.2 %；对于巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌特色乳掺假牛乳后处理样品的检出限，除水牛乳在大于 0.5%水平的掺假检出外，其余大于 0.2 %水平的掺假均能检出；对于乳粉掺假牛乳粉样品的检出限，其中水牛乳粉掺假牛乳粉在大于 1%水平的掺假能检出，驼乳粉和驴乳粉中掺假牛乳粉在大于 0.5%水平的掺假均能检出，其余大于 0.2 %水平的掺假均能检出。验证实验 2（图 59-62）：含有 0%、0.2%、0.5%、1.0%、5.0%、10.0%和 100%的生乳掺假生牛乳样品、生乳掺假生牛乳粉的检出限为 0.2 %；对巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌于特色乳掺假牛乳的检出限，除水牛乳在大于 0.5%水平的掺假检出外，其余大于 0.2 %水平的掺假均能检出；对于乳粉掺假牛乳粉样品的检出限，其中水牛乳粉掺假牛乳粉在大于 1%水平的掺假能检出，驼乳粉和驴乳粉中掺假牛乳粉在大于 0.5%水平的掺假均能检出，其余大于 0.2 %水平的掺假均能检出。验证实验 3（图 63-66）：含有 0%、0.2%、0.5%、1.0%、5.0%、10.0%和 100%的生乳掺假生牛乳样品、生乳掺假生牛乳粉的检出限为 0.2 %；对于巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌特

色乳掺假牛乳的检出限，除水牛乳在大于 0.5%水平的掺假检出外，其余大于 0.2 %水平的掺假均能检出；对于乳粉掺假牛乳粉样品的检出限，其中水牛乳粉掺假牛乳粉在大于 1%水平的掺假能检出，驼乳粉和驴乳粉中掺假牛乳粉在大于 0.5%水平的掺假均能检出，其余大于 0.2 %水平的掺假均能检出。表明本方法具有良好的重现性。

1.1 验证实验 1:

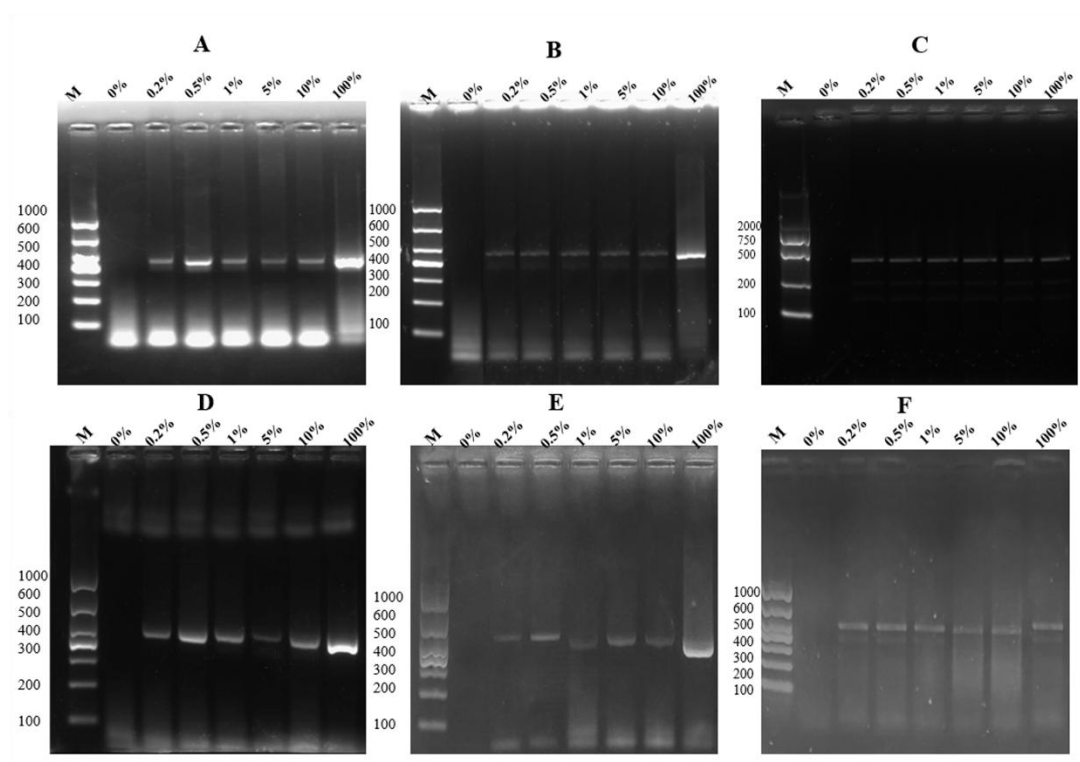


图 55 特色生乳掺假牛乳的凝胶电泳结果

注：A 为生羊乳中掺假不同浓度梯度生牛乳检出限图；B 为生水牛乳中掺假不同浓度梯度生牛乳检出限图；C 为生驼乳中掺假不同浓度梯度生牛乳检出限图；D 为生驴乳中掺假不同浓度梯度生牛乳检出限图；E 为生牦牛乳中掺假不同浓度梯度生牛乳检出限图；F 为生马乳中掺假不同浓度梯度生牛乳检出限图。

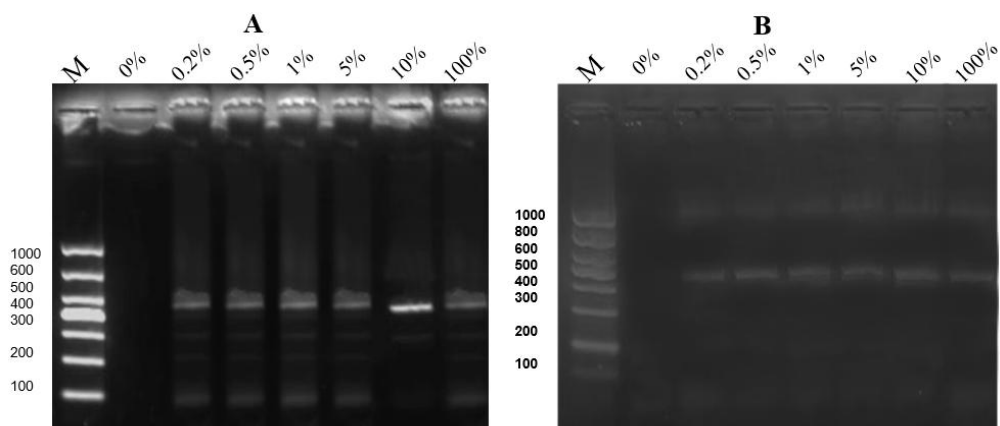


图 56 特色生乳掺假牛乳粉的凝胶电泳结果

注：A 为生羊乳中掺假不同浓度梯度牛乳粉检出限图；B 为生牦牛乳中掺假不同浓度梯度牛乳粉检出限图。

图 57 巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌特色乳掺假牛乳的凝胶电泳结果

注：A 为巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌羊乳掺假不同浓度梯度灭菌牛乳后处理检出限

图；B 为巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌牦牛乳掺假不同浓度梯度灭菌牛乳检出限图；C 为巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌水牛乳掺假不同浓度梯度灭菌牛乳检出限图；D 为巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌驼乳掺假不同浓度梯度灭菌牛乳检出限图；E 为巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌驴乳掺假不同浓度梯度灭菌牛乳后检出限图。

图 58 特色乳粉掺假牛乳粉的凝胶电泳结果

注：A 为羊乳粉掺假不同浓度梯度牛乳粉检出限图；B 为牦牛乳粉掺假不同浓度梯度生牛乳检出限图；C 为水牛乳粉掺假不同浓度梯度牛乳粉检出限图；D 为驼乳粉掺假不同浓度梯度牛乳粉检出限图；E 为驴乳粉掺假不同浓度梯度牛乳粉检出限图。

1.2 验证实验 2:

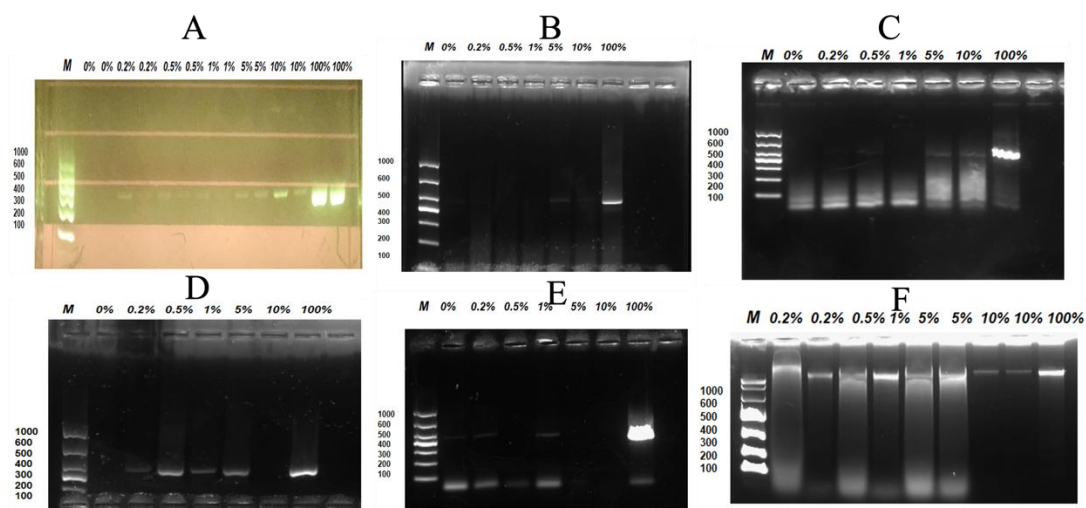


图 59 特色生乳掺假牛乳的凝胶电泳结果

注：A 为生羊乳中掺假不同浓度梯度生牛乳检出限图；B 为生水牛乳中掺假不同浓度梯度生牛乳检出限图；C 为生驼乳中掺假不同浓度梯度生牛乳检出限图；D 为生驴乳中掺假不同浓度梯度生牛乳检出限图；E 为生牦牛乳中掺假不同浓度梯度生牛乳检出限图；F 为生马乳中掺假不同浓度梯度生牛乳检出限图。

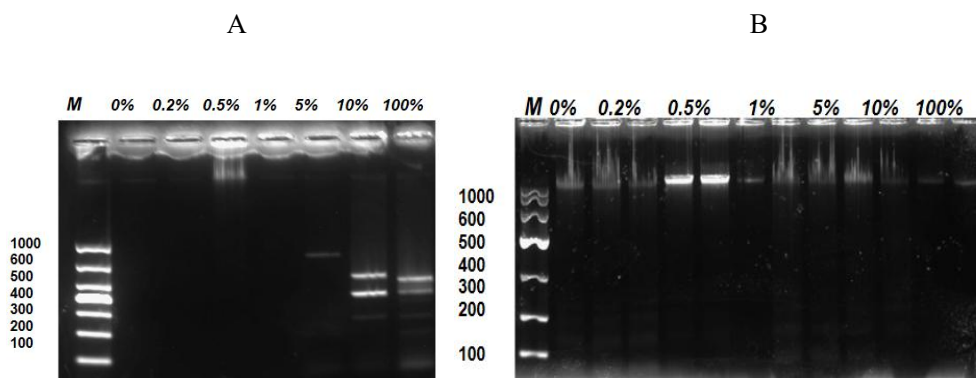


图 60 特色生乳掺假牛乳粉的凝胶电泳结果

注：A 为生羊乳中掺假不同浓度梯度牛乳粉检出限图；B 为生牦牛乳中掺假不同浓度梯度牛乳粉检出限图。

A

B

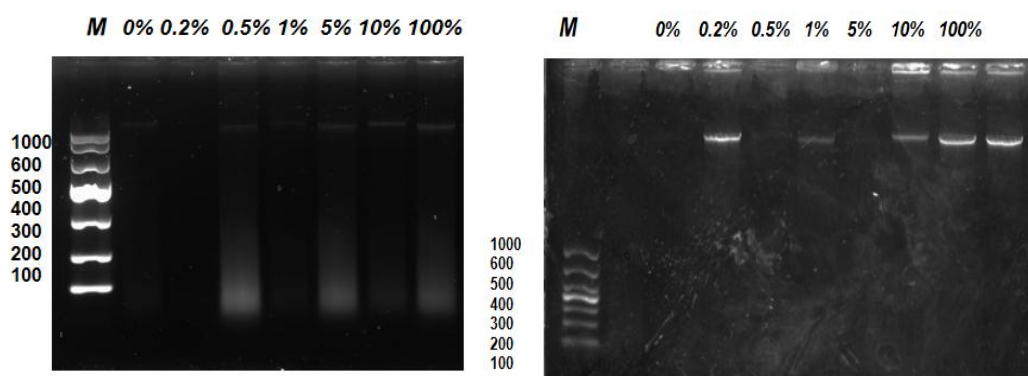


图 61 特色生乳掺假巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌牛乳的凝胶电泳结果

注：A 为巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌羊乳掺假不同浓度梯度灭菌牛乳检出限图；B 为巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌驼乳掺假不同浓度梯度灭菌牛乳检出限图。

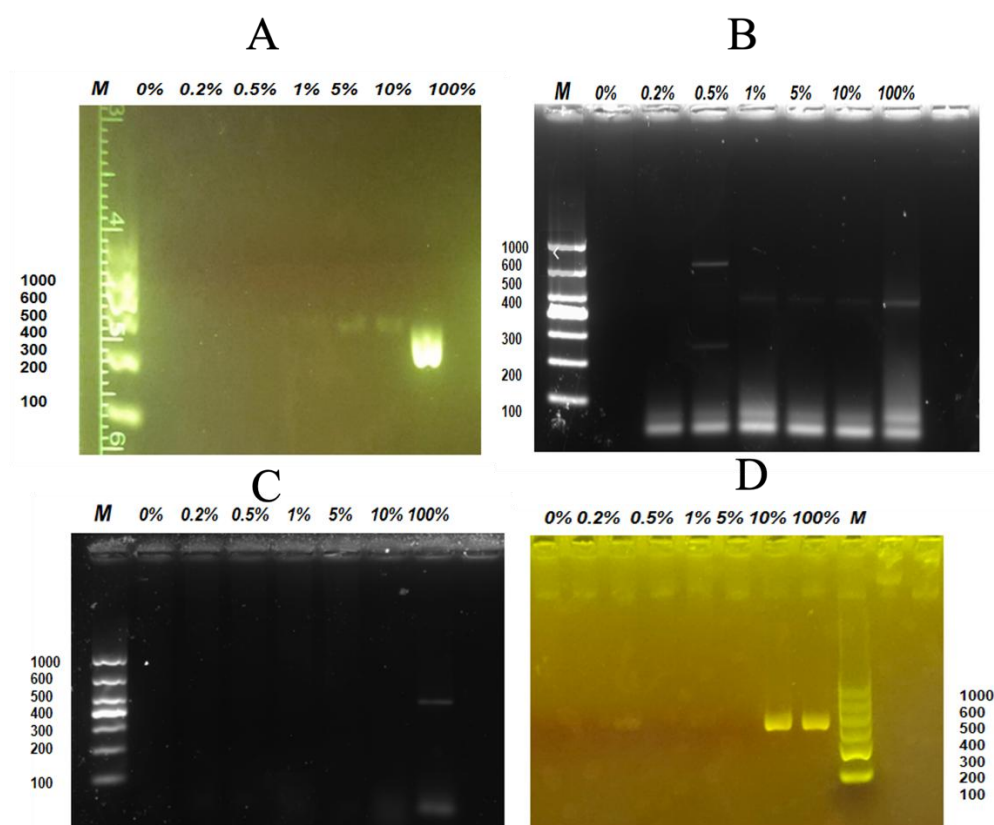


图 62 特色乳粉掺假牛乳粉的凝胶电泳结果

注：A 为羊乳粉掺假不同浓度梯度牛乳粉检出限图；B 为牦牛乳粉掺假不同浓度梯度生牛乳检出限图；C 为驼乳粉掺假不同浓度梯度牛乳粉检出限图；D 为驴乳粉掺假不同浓度梯度牛乳粉检出限图。

1.3 验证实验 3:

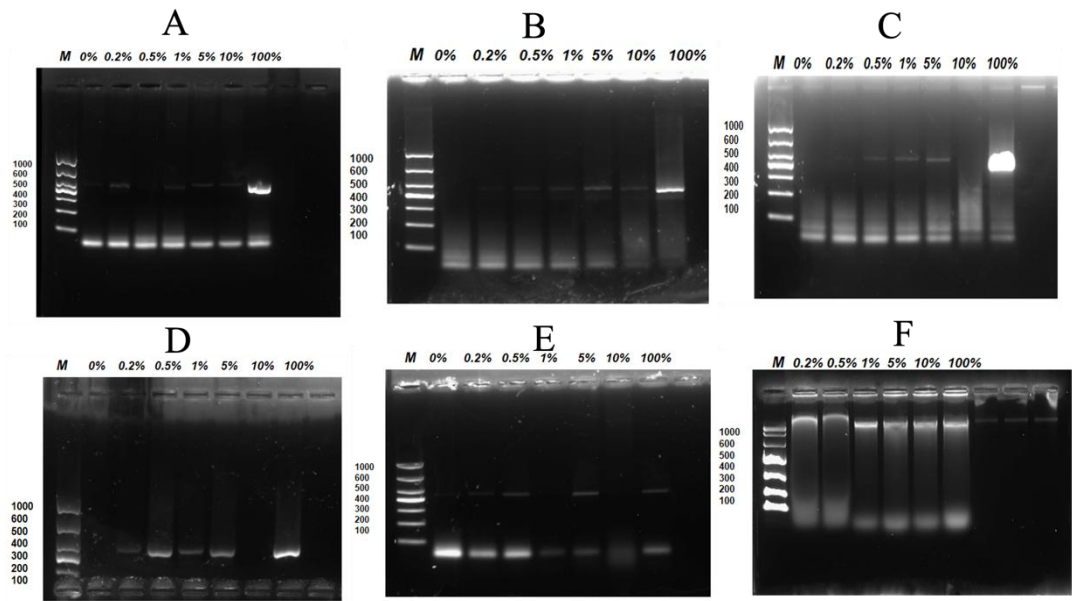


图 63 特色生乳掺假牛乳的凝胶电泳结果

注：A 为生羊乳中掺假不同浓度梯度生牛乳检出限图；B 为生水牛乳中掺假不同浓度梯度生牛乳检出限图；C 为生驼乳中掺假不同浓度梯度生牛乳检出限图；D 为生驴乳中掺假不同浓度梯度生牛乳检出限图；E 为生牦牛乳中掺假不同浓度梯度生牛乳检出限图；F 为生马乳中掺假不同浓度梯度生牛乳检出限图。

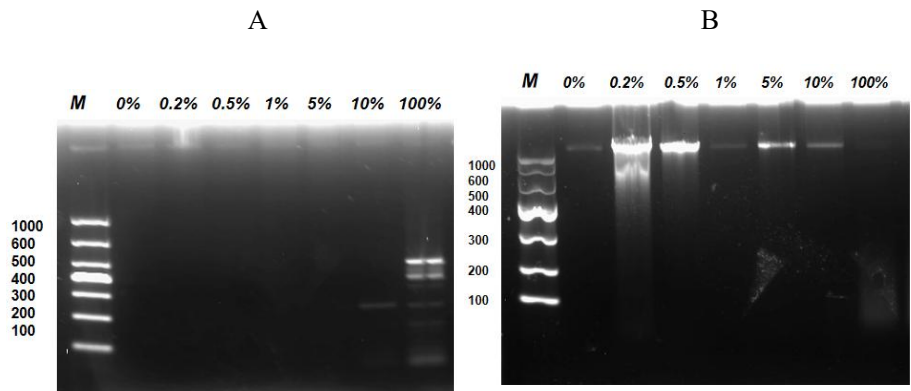


图 64 特色生乳掺假牛乳粉的凝胶电泳结果

注：A 为生羊乳中掺假不同浓度梯度牛乳粉检出限图；B 为生牦牛乳中掺假不同浓度梯度牛乳粉检出限图。

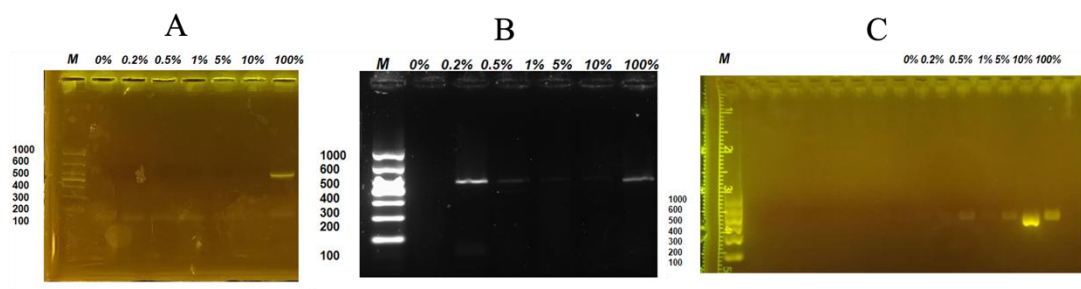


图 65 巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌特色乳掺假灭菌牛乳的凝胶电泳结果

注：A 为巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌羊乳掺假不同浓度梯度灭菌牛乳检出限图；B 为巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌水牛乳掺假不同浓度梯度灭菌牛乳检出限图；C 为巴氏杀菌、高温杀菌、超高温灭菌驼乳掺假不同浓度梯度灭菌牛乳检出限图。

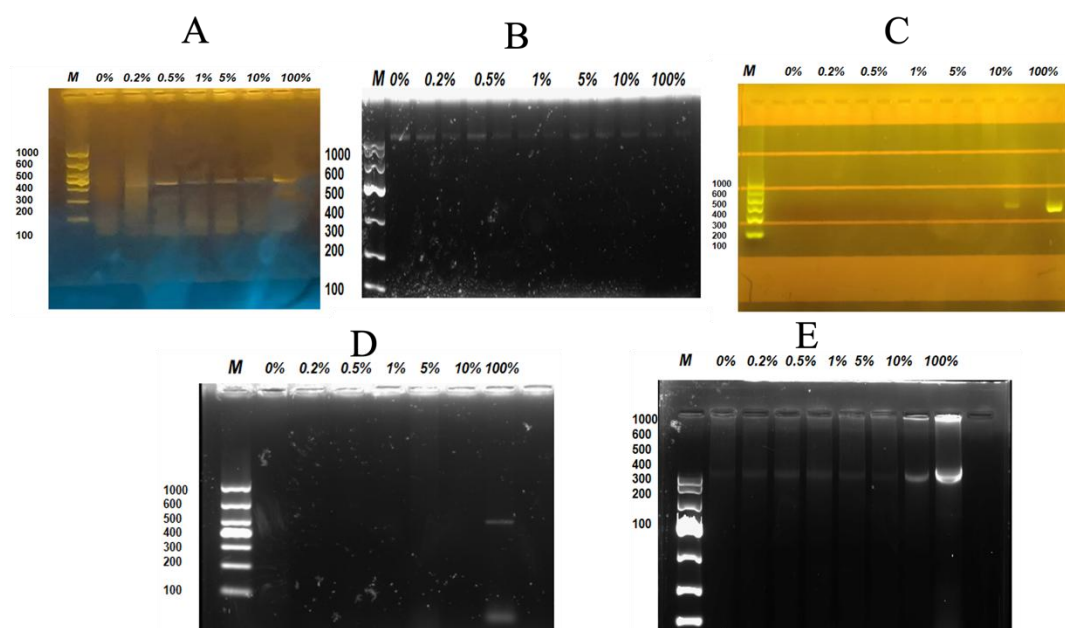


图 66 特色乳粉掺假牛乳粉的凝胶电泳结果

注：A 为羊乳粉掺假不同浓度梯度牛乳粉检出限图；B 为牦牛乳粉掺假不同浓度梯度生牛乳检出限图；C 为水牛乳粉掺假不同浓度梯度牛乳粉检出限图；D 驼乳粉掺假不同浓度梯度牛乳粉检出限图；E 为驴乳粉掺假不同浓度梯度牛乳粉检出限图。

2、多重实时荧光 PCR 法

本方法分别在 3 家实验室进行比对验证实验，以验证其重现性。三家实验室分别为农业农村部农产加工质量监督检验测试中心

(北京)、农业农村部乳品质量检验测试中心(北京)和唐山市农产品质量安全检验测试中心。建立的多重实时 PCR 体系对混合乳品检测的检出限,制备了 10 种目标乳含量为 90%、70%、50%、30%、10%、5%、1%、0.5%、0.1%和 0.01%的混合样品。多重实时 PCR 检测结果显示(表 16),奶牛乳的检出限为 0.1%,水牛乳和马乳的检出限为 0.5%,牦牛乳、山羊乳、绵羊乳和骆驼乳的检出限为 0.01%,驴乳的检出限为 1%,检测 Ct 值在 26.83~33.95 之间,可以满足检测需求。表明本方法具有良好的重现性。

表 16 灵敏度和检出限(Lab1、Lab2 和 Lab3)

项目	物种	标准曲线	R ²	扩增效率/%	灵敏度 /ng/μL	检出限
第三方	奶牛	$y=-3.4989x+26.479$	0.9948	93.11	0.00640	0.1%
	水牛	$y=-3.5583x+26.670$	0.9902	91.00	0.00640	0.5%
	牦牛	$y=-3.5286x+26.265$	0.9953	92.04	0.00128	0.01%
	山羊	$y=-3.5643x+27.225$	0.9914	90.79	0.00128	0.01%
	绵羊	$y=-3.4649x+25.812$	0.9922	94.36	0.00128	0.01%
	马	$y=-3.5576x+29.944$	0.9908	91.02	0.00128	0.5%
	驴	$y=-3.5352x+26.011$	0.9986	91.81	0.00128	0.5%
	骆驼	$y=-3.5443x+26.011$	0.9920	91.49	0.00128	0.01%
第三方	奶牛	$y=-3.5672x+26.462$	0.9991	90.69	0.00640	0.1%
	水牛	$y=-3.5832x+26.673$	0.9901	90.14	0.00640	0.5%
	牦牛	$y=-3.4744x+26.804$	0.9986	94.01	0.00128	0.01%
	山羊	$y=-3.5617x+26.693$	0.9909	90.88	0.00128	0.01%
	绵羊	$y=-3.4317x+25.561$	0.9976	95.61	0.00128	0.01%
	马	$y=-3.4839x+29.949$	0.9901	93.66	0.00128	0.5%
	驴	$y=-3.3752x+26.243$	0.9973	97.82	0.00128	0.5%
	骆驼	$y=-3.4823x+25.936$	0.9976	93.72	0.00128	0.01%
第三方	奶牛	$y=-3.5152x+26.706$	0.9964	92.52	0.0064	0.1%
	水牛	$y=-3.5583x+26.865$	0.9965	91.00	0.0064	0.5%
	牦牛	$y=-3.4811x+26.160$	0.9910	93.76	0.00128	0.01%
	山羊	$y=-3.5026x+27.185$	0.9957	92.98	0.00128	0.01%
	绵羊	$y=-3.2452x+25.832$	0.9967	103.30	0.00128	0.01%

马	$y=-3.4782x+29.846$	0.9948	93.87	0.00128	0.5%
驴	$y=-3.3776x+25.740$	0.9933	97.73	0.00128	0.5%
骆驼	$y=-3.3577x+23.804$	0.9935	98.53	0.00128	0.01%

（二）、技术经济论证

奶真实性鉴定是乳制品质量评判的重要指标之一。2024 年，中国乳制品市场呈现出多样化的发展趋势，特别是在特色和功能性乳制品方面。随着消费升级和国民健康意识的提升，消费者对乳制品的需求变得更加多样化。这些变化为乳制品市场注入了新的发展动力。例如，市场上出现了针对特定消费群体的特色乳制品，如无糖低脂酸奶、新疆地区的特色乳制品以及牦牛奶和牦牛奶粉等。

在我国，特色奶畜及其奶产品种类丰富，包括山羊奶、绵羊奶、水牛奶、牦牛奶、马奶、驴奶、骆驼奶等。特色奶是我国奶产业的重要组成部分，具有稀缺性和功能性的优势，对满足人民群众追求美好生活、不断强壮体魄具有极其重要的现实意义。中国奶业协会方面提供的一份内部数据显示：在世界范围内，特色奶的占比正在上升。在我国，2022 年特色奶总产量约为 94.9 万吨，占我国奶类总产量的 2.4%。以水奶牛为例，据有关部门统计，2018 年水牛乳加工产值 4 亿元，2019 年水牛乳加工产值 22 亿元，2023 年水牛乳加工产值 60 多亿元，产值逐年增加，竞争优势和加工经济效益显著。因此，开发奶及奶制品中真实性鉴定的高灵敏检测方法，对促进奶业高质量发展提供了重要的技术支撑。

四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况

经查，国内外均没有《奶真实性鉴定》此类标准，本文件不存在采标问题。

五、以国际标准为基础的起草情况，以及是否合规引用或者采用国际国外标准，并说明未采用国际标准的原因。

经查，国内外均没有《奶真实性鉴定》此类标准，本文件不存在采标问题。

六、与有关法律、行政法规及相关标准的关系

在本文件制定过程中严格贯彻国家有关方针、政策、法律和规章，严格执行强制性国家标准、行业标准。与相关的各种基础标准相衔接，遵循政策性和协调统一性的原则。本文件与现行法律法规和相关标准无重复交叉。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

本文件在制定（修订）过程中不存在重大分歧意见。

八、涉及专利的有关说明

经查，未识别到与本文件技术内容有关的专利。

九、贯彻标准的要求和措施建议

组织标准学习，加大对标准的宣传及贯彻力度，建议农业行政主管部门采用本文件对奶真实性的检测方法进行指导。

十、其他应予说明的事项

本文件没有其他说明的事项。

附件 1

预审会议审查意见汇总处理表

标准名称：奶真实性鉴定 PCR 方法

共 3 页

标准项目承担单位：XXXX

2024 年 11 月 22 日填写

序号	标准章条编号	意见内容	提出单位	处理意见	备注
1	名称	修改为“奶真实性鉴定 PCR 方法”。	专家组	采纳	
2	1	范围修改为“特色畜种生乳、巴氏杀菌乳、高温杀菌乳、超高温灭菌乳和乳粉中奶牛源性成分”。	专家组	采纳	
3	1	范围中增加“本文件的检出限见附录 A”。	专家组	采纳	
4	5.12、5.13、5.14、5.15、5.17	明确高压灭菌温度和时间。	专家组	采纳	
5	7.1.1	明确样品处理方法。	专家组	采纳	
6	7.5	“离心机离心 10 s 后”修改为“将 PCR 管放置离心机上，500 g~3000 g 离心 10 s”。	专家组	采纳	
7	7.6	明确琼脂糖配制内容。	专家组	采纳	
8	8.14	“结果分析及表述”改为“结果判定及表述”。	专家组	采纳	
9	8.2	删除“如需进一步确认，对 PCR 产物进行测序，与奶牛特定的标准 DNA 序列（见	专家组	采纳	

		附录 B)，表明含有奶牛源性奶成分。”			
10	9	修改表格格式。	专家组	采纳	
11	11.6	删除“血液”。	专家组	采纳	
12	11.9	修改引物探针序列表。	专家组	采纳	
13	13.1	“量取”修改为“移取”。	专家组	采纳	
14	13.3.3	“灭菌水”修改为“双蒸水”。	专家组	采纳	
15	13.4.1	“根据表 2 配制加奶牛、水牛、驴、和骆驼引物、探针的四重 PCR 扩增体系，根据表 3 配制加牦牛、山羊、绵羊、和马引物、探针的四重 PCR 扩增体系。”修改为“根据表 2 配制加奶牛、水牛、驴和骆驼的引物和探针的四重 PCR 扩增体系，根据表 3 配制加牦牛、山羊、绵羊和馬的引物和探针的四重 PCR 扩增体系。”	专家组	采纳	
16	13.4.1	“超纯去离子水”修改为“水”。	专家组	采纳	
17	13.4.2	“57 °C 退火和延伸 45 s”修改为“57 °C退火 15 s 和延伸 30 s”。	专家组	采纳	
18	表 3、表 4	增加一行内容为“合计 20 μL”。	专家组	采纳	
19	附录 B	“8 种畜奶物种源性成分”修改为“奶牛、水牛、牦牛、山羊、绵羊、马、驴和骆驼源性成分”。	专家组	采纳	
20	附录 B	参考序列添加序号：C.1、C.2、C.3、C.4、C.5、C.6、C.7、C.8。	专家组	采纳	

注:提出单位为专家组。