

中华人民共和国农业农村部行业标准

《饲料中抗生素滤渣的鉴别 实时荧光
PCR 法》

编制说明

（公开征求意见稿）

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

2025 年 2 月

目 录

一、工作简况	4
1.1 任务来源	4
1.2 制定背景	4
1.3 主要工作过程	6
二、标准编制原则和主要技术内容确定的依据	8
2.1 标准编制原则	8
2.2 主要技术内容的确定	9
2.2.1 样品	9
2.2.2 DNA 提取方法确定	10
2.2.3 实时荧光 PCR 检测方法的确定	10
2.2.4 方法评价	24
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	31
四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况	31
五、采用国际标准情况	31
六、与有关法律、法规的关系	31
七、重大分歧意见的处理经过和依据	32
八、涉及专利的有关说明	32

九、贯彻国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议
等措施建议 32

10. 其他应予说明的事项 32

参考文献 33

一、工作简况

1.1 任务来源

应行业监管需要，制订行业标准《饲料中抗生素滤渣的鉴别 实时荧光 PCR 法》，主要起草单位为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。本标准由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）归口。

1.2 制定背景

1.2.1 目的及意义

我国是全球最大的饲料生产国之一，饲料工业的快速发展为畜牧业现代化奠定了坚实基础，并推动了集约化、规模化和标准化进程。然而，随之而来的饲料安全问题日益突出^[1,2]，其中违规添加现象尤其严峻，严重影响了食品安全和人类健康^[3-5]。抗生素滤渣，作为抗生素发酵提取后的工业废弃物，富含粗蛋白，但同时也包含未完全提取的抗生素及大量未知的有害成分^[6,7]，因此需对其进行无害化处理，同时我国已明确禁止将抗生素滤渣作为饲料添加剂使用^[8]。然而，基于其高蛋白的营养价值和潜在的经济利益，近年来仍然出现将其违规添加到饲料中用于动物饲养的现象，给饲料安全和人类健康带来了严重威胁^[9,10]。因此，迫切需要对抗生素滤渣添加饲料进行有效监测，以保障饲料安全并维护公众健康。

传统的针对饲料中抗生素的检测方法由于以抗生素原型药作为测定对象^[11-13]，即使检出样品中存在抗生素残留，也无法判断是非法添加抗生素原型药还是添加抗生素发酵残留物所致，所以难以定性，

不能满足对违规添加抗生素滤渣饲料的检测需求。在抗生素发酵生产过程中会伴随一系列中间产物的产生,而此类中间产物最终会出现在抗生素滤渣中^[14,15],因此掺有抗生素滤渣的饲料中会含有此类中间产物,针对这一特点,李等开发了一种高分辨检测技术(LC/MS/MS)用于对饲料中违规添加链霉素菌渣进行检测^[16]。但由于该方法需要对样本进行复杂的前处理提取,且依赖高精尖的检测仪器以及专业的操作人员,并且检测时间较长,检测成本较高,使其在实际应用过程中的普遍推广受到了限制。目前我国对于饲料中违规添加抗生素滤渣的研究还较为有限,因此针对该领域建立高效且更加适用的检测方法是我国饲料安全监管有待解决的技术问题。

实时荧光 PCR (Real-Time PCR), 是一种用于检测核酸(DNA 或 RNA)的分子生物学技术, 其具有灵敏度高和检测准确等优点, 并且与其他依赖于高精密仪器的技术方法相比, 其检测仪器不仅具备较强的可获取性, 对操作人员的专业技能要求也相对较低, 因此目前该技术已广泛应用于基因研究、医学诊断、食品安全检测和环境监测等领域^[17-20]。在工业化生产抗生素的过程中, 企业为了降低成本并且增加效益, 往往会对用于生产特定抗生素的菌株进行突变改造, 以增强其产生相应抗生素的能力^[21-25], 因此经过突变后的菌株的基因型会与原始菌株有所区别。此外, 这类菌体也会出现在抗生素发酵后的菌渣中, 虽然经过灭活处理, 但 DNA 仍然存在且不会遭到破坏, 因此可以通过 PCR 的方法对其工程基因改造位点进行检测, 从实现对抗生素滤渣的准确定性分析。

本研究拟结合实时荧光 PCR 技术所呈现出的优势，针对青霉素、泰乐菌素、泰万菌素、四环素等产抗生素工业菌株，筛选特定区域并进行引物及探针设计，建立了一种实时荧光 PCR 的方法能够对饲料中是否违规添加抗生素滤渣进行快速定性分析。

1.2.2 国内外相关标准、法规

目前，针对饲料中抗生素滤渣的检测研究较少，且我国还缺乏饲料中抗生素滤渣检测方法的相关标准。

综上，本研究拟基于实时荧光 PCR 技术，针对青霉素、泰乐菌素、泰万菌素、四环素等产抗生素工业菌株，筛选特定区域并进行引物及探针设计，建立实时荧光 PCR 的方法，实现对饲料中是否违规添加抗生素滤渣进行快速定性分析。

1.3 主要工作过程

1.3.1 成立标准编制小组

本标准在项目任务下达之前，由中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所组织并成立了标准起草小组，小组成员信息见表 1。

表 1 标准起草小组成员信息和任务分工

姓名	职称/职务	任务分工
陈爱亮	研究员	项目主持人，负责项目的全面工作
樊霞	研究员	抗生素滤渣样品获取、标准文本和编制说明完善、方法 意见、征求意见
樊宇航	研究生	检测方法研究、样品检测、数据收集分析
张娟	助理研究员	样品检测、数据收集分析

田昊昀	学生	样品检测、数据收集分析
李阳	研究员	抗生素滤渣样品获取，方法意见
索德成	研究员	抗生素滤渣样品获取，方法意见
杨增玲	教授	抗生素滤渣样品获取，方法意见
...		

1.3.2 标准制定技术路线和方案制定

2024 年 6 月，通过检索收集国内外关于抗生素滤渣检测方法的相关标准、法规及研究材料，同时调研国内抗生素滤渣生产状况，由编制小组讨论形成标准制定的主要内容、技术路线。

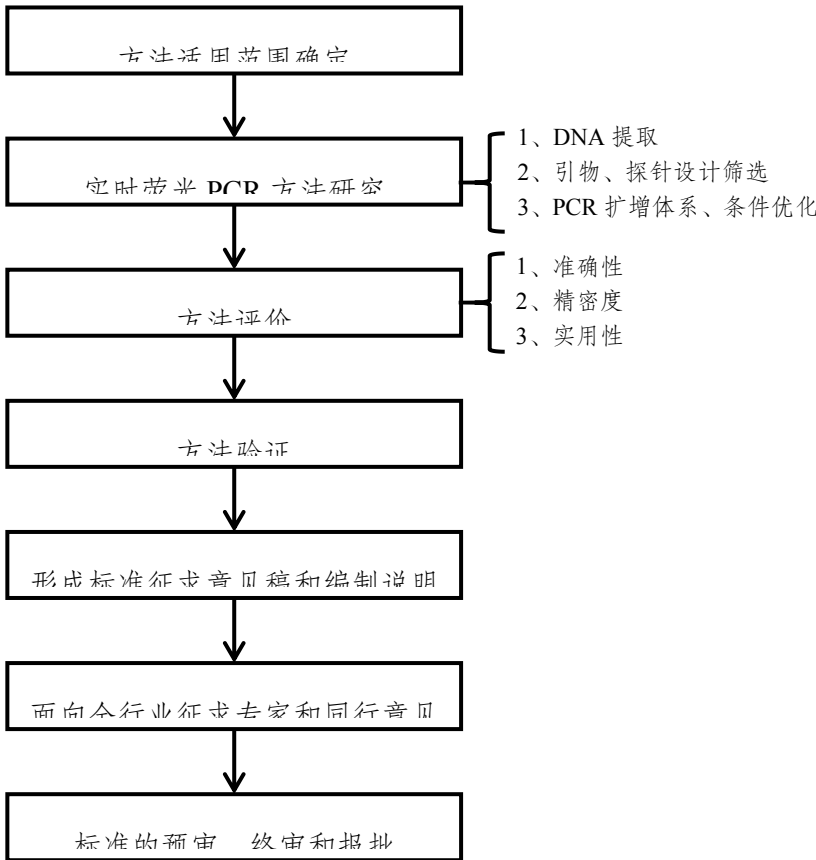


图 1 标准制定技术路线图

1.3.2 样品收集、方法学研究和实际样品检测

2024 年 6 月~2025 年 1 月，开展样品收集、方法学研究和实际样

品检测。

1.3.2 编写编制说明和征求意见稿、定向征求意见和标准验证

2025 年 1 月，标准编制小组完成标准文本、编制说明定向征求意见稿编制工作。

二、标准编制原则和主要技术内容确定的依据

2.1 标准编制原则

在标准的制定过程中严格遵守国家有关方针、政策、法规和规章，标准的结构、技术要素及表述方法按照 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》以及 GB/T 20001.4—2015《标准编制规则 第 4 部分：试验方法标准》的规定和要求编写。编制依据如下：

- (1) 遵循国家颁布的相关法律法规；
- (2) 有关国家或行业标准；
- (3) 国内外有关标准和参考文献；
- (4) 标准编制小组调研和实测的样品检测数据。

在标准制定过程中力求做到：技术内容的叙述正确无误；文字表达准确、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与规范。

本标准编制过程中，通过查阅国内外有关文献资料，结合国内外检测技术发展趋势和我国饲料行业发展现状，力求做到技术上先进、经济上合理，遵循“先进性、实用性、通用性、规范性”的原则，注重

方法的可操作性，完成了饲料中抗生素滤渣的鉴别 实时荧光 PCR 法检测的研究工作与验证工作，形成了标准征求意见稿和编制说明。

2.2 主要技术内容的确定

2.2.1 样品

（1）样品的确定

本标准适用于添加青霉素滤渣饲料、土霉素菌渣饲料、新霉素滤渣饲料、阿维菌素滤渣饲料等添加抗生素菌渣饲料的鉴别检测。

（2）样品采集

收集来自河北、山东、河南、内蒙古、浙江、湖北、福建等多个省份共 22 家抗生素生产厂家的不同处理工艺和不同生产批次的抗生素滤渣样本 44 个，种类及数量见表 2，共 19 类抗生素滤渣。

表 2 抗生素滤渣采集信息表

类别	抗生素滤渣名称	数量
氨基糖苷类	单硫酸卡那霉素滤渣	1
	硫酸新霉素滤渣	5
	硫酸安普霉素滤渣	2
	吉他霉素滤渣	1
	硫酸庆大霉素滤渣	1
	盐酸大观霉素滤渣	2
	硫酸链霉素滤渣	2
大环内酯类	酒石酸泰万菌素滤渣	4
	酒石酸泰乐菌素滤渣	4
	阿维菌素滤渣	3
	硫氰酸红霉素滤渣	1
截短侧耳素类	截短侧耳素滤渣	1
	泰妙菌素滤渣	1
四环素类	盐酸金霉素滤渣	3
	土霉素滤渣	4
林可酰胺类	盐酸林可霉素滤渣	1
多肽类	硫酸粘菌素滤渣	4
β-内酰胺类	青霉素滤渣	3

其它类	黄霉素滤渣	1
-----	-------	---

2.2.2 DNA 提取方法确定

(1) DNA 提取

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(离心柱式)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),提取完成后于-20℃保存备用。

2.2.3 实时荧光 PCR 检测方法的确定

2.2.3.1 引物及探针的确定

(1) 引物探针的设计与筛选

以 *orf70c*、*OxyA*、*neoN*、*aveD* 基因为生产青霉素、土霉素、新霉素及阿维菌素所对应的菌种的特异性基因,分别设计相应的引物及探针。引物和探针的序列如表 3 所示,由上海生工生物技术有限公司合成。

表 3 引物、探针信息表

种类	引物/探针名称	引物序列	目标基因	产物长度
青霉素	orf70c-F	5'-GAGCCTTCGGATTTTTCGCC-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'		

(2) 引物及探针的特异性验证

1) 环境样本及空白饲料的特异性验证

以青霉素滤渣及泰乐菌素滤渣 DNA 分别作为阳性模板，以自然环境土壤样品、鸭配合饲料 2 种、猪配合饲料 2 种、鱼配合饲料、添加枯草芽孢杆菌饲料、添加枯草芽孢杆菌、屎肠、酵母饲料 DNA 为阴性模板，验证所设计的青霉素滤渣引物的特异性。如图 2，只有青霉素滤渣具有明显的扩增信号。同时，其他非目标物的 DNA 没有荧光信号，从而避免了假阳性的可能性。这说明该引物对青霉素滤渣具有高度特异性，自然环境样本及空白饲料样品不会对检测结果造成干扰。

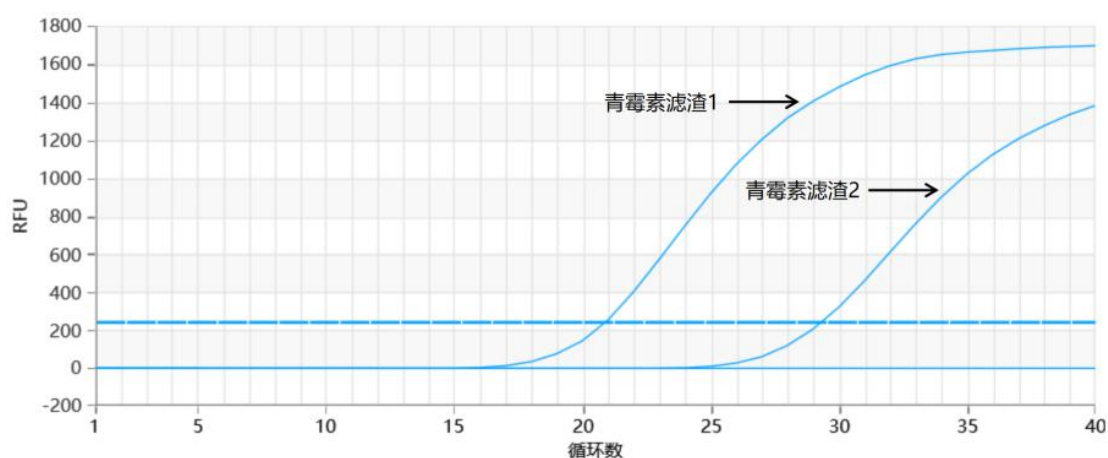


图 2 青霉素滤渣的特异性扩增曲线图

以土霉素滤渣 DNA 分别作为阳性模板，以自然环境土壤样品、鸭配合饲料 2 种、猪配合饲料 2 种、鱼配合饲料、添加枯草芽孢杆菌饲料、添加枯草芽孢杆菌、屎肠、酵母饲料 DNA 为阴性模板，验证所设计的土霉素滤渣引物的特异性。如图 3，只有土霉素滤渣具有明

显的扩增信号。同时，其他非目标物的 DNA 没有荧光信号，从而避免了假阳性的可能性。这说明该引物对土霉素滤渣具有高度特异性，自然环境样本及空白饲料样品不会对检测结果造成干扰。

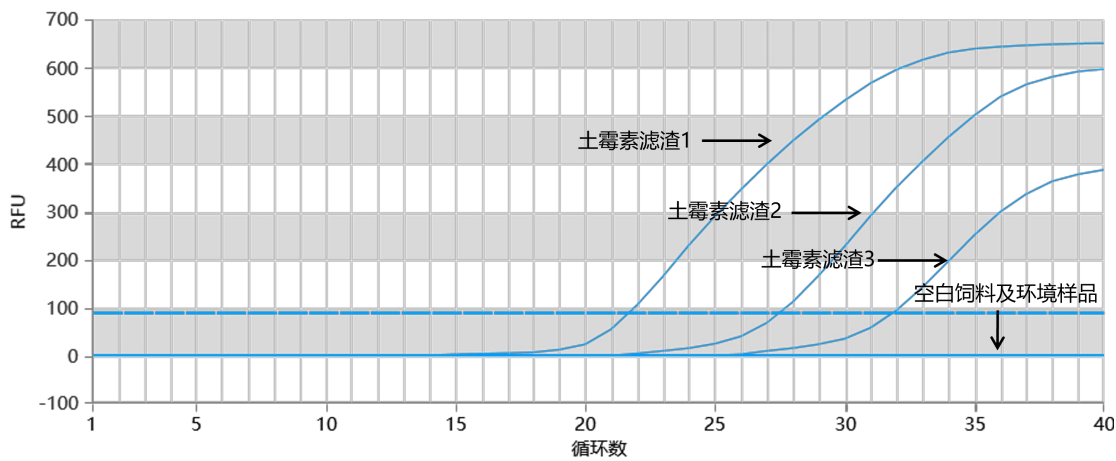


图 3 土霉素滤渣的特异性扩增曲线图

以新霉素滤渣 DNA 分别作为阳性模板，以自然环境土壤样品、鸭配合饲料 2 种、猪配合饲料 2 种、鱼配合饲料、添加枯草芽孢杆菌饲料、添加枯草芽孢杆菌、屎肠、酵母饲料 DNA 为阴性模板，验证所设计的新霉素滤渣引物的特异性。如图 4，只有新霉素滤渣具有明显的扩增信号。同时，其他非目标物的 DNA 没有荧光信号，从而避免了假阳性的可能性。这说明该引物对新霉素滤渣具有高度特异性，自然环境样本及空白饲料样品不会对检测结果造成干扰。

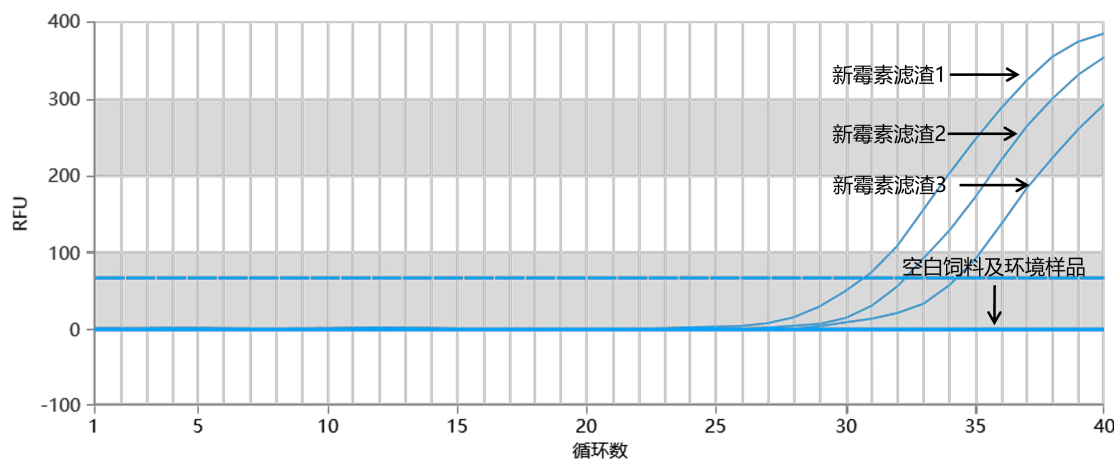


图 4 新霉素滤渣的特异性扩增曲线图

以阿维菌素滤渣 DNA 分别作为阳性模板,以自然环境土壤样品、鸭配合饲料 2 种、猪配合饲料 2 种、鱼配合饲料、添加枯草芽孢杆菌饲料、添加枯草芽孢杆菌、尿肠、酵母饲料 DNA 为阴性模板,验证所设计的阿维菌素滤渣引物的特异性。如图 5,只有阿维菌素滤渣具有明显的扩增信号。同时,其他非目标物的 DNA 没有荧光信号,从而避免了假阳性的可能性。这说明该引物对阿维菌素滤渣具有高度特异性,自然环境样本及空白饲料样品不会对检测结果造成干扰。

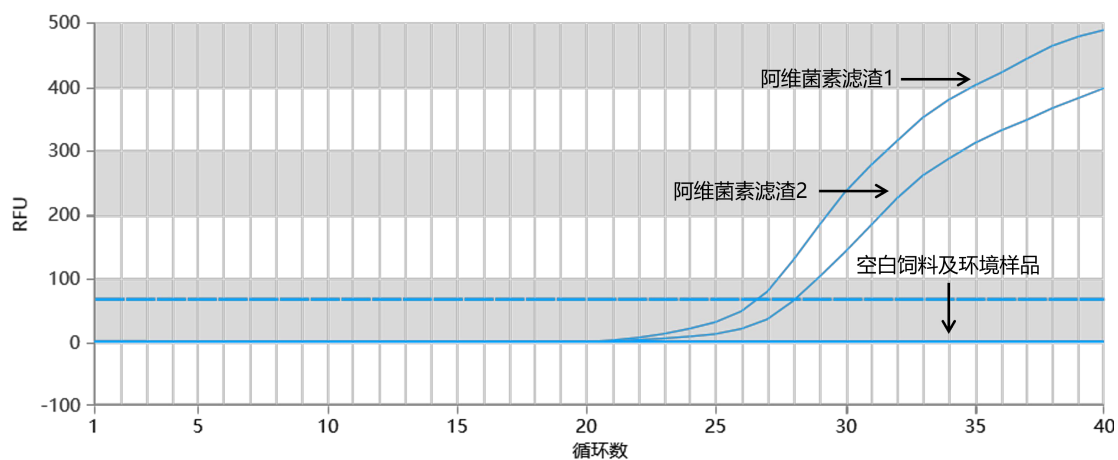


图 5 阿维菌素滤渣的特异性扩增曲线图

2) 4 种滤渣间的交叉反应性验证

以青霉素、土霉素、新霉素及阿维菌素的滤渣 DNA 分别作为模板,验证所设计的 4 种滤渣引物及探针间是否存在交叉反应。如图 6,只有目标引物及探针可以扩增对应滤渣,并且具有明显的扩增信号。同时,其他非目标物的 DNA 没有荧光信号,从而避免了假阳性的可能性。这说明相应引物及探针具有高度特异性,并且 4 种滤渣之间无交叉反应。

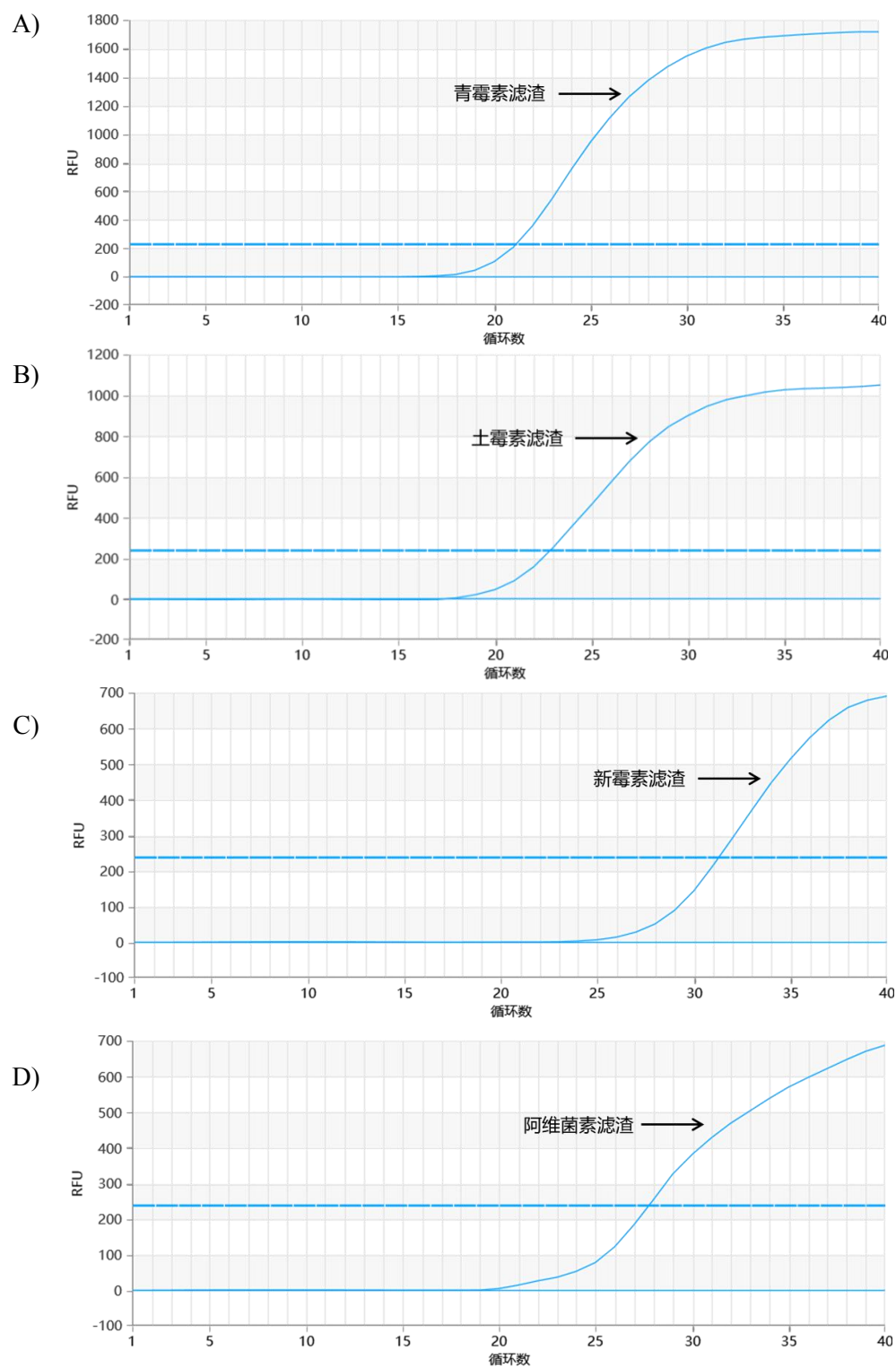


图 6 阳性滤渣间的交叉反应验证结果图
A:青霉素；B:土霉素；C:新霉素；D:阿维菌素；

(3) 引物及探针的优化

引物与探针的浓度比例以及引物的退火温度对 PCR 扩增曲线的质量具有显著影响。因此，需要对上述两个关键参数进行优化，以实现最佳的检测效果。

1) 青霉素滤渣引物与探针浓度的优化

以提取的青霉素滤渣的核酸样品作为扩增模板，通过正交试验设计，考察不同引物与探针浓度比例（ $0.4\ \mu\text{M}:0.4\ \mu\text{M}$ ， $0.8\ \mu\text{M}:0.8\ \mu\text{M}$ ， $0.4\ \mu\text{M}:0.1\ \mu\text{M}$ ， $0.8\ \mu\text{M}:0.2\ \mu\text{M}$ ， $0.4\ \mu\text{M}:0.2\ \mu\text{M}$ ， $0.8\ \mu\text{M}:0.4\ \mu\text{M}$ ）以及退火温度（ 58°C ， 60°C ， 62°C ， 64°C ）对扩增效果的影响。优化结果如图 7 示，综合考虑荧光强度、扩增曲线形状、Ct 值以及试剂成本等多个因素，最终确定引物与探针的浓度比为 $0.4\ \mu\text{M}:0.1\ \mu\text{M}$ ，引物退火延伸温度为 $58\sim 64^{\circ}\text{C}$ ，并将优化后的最佳参数条件应用于后续实验，从而确保试验的准确性与稳定性。

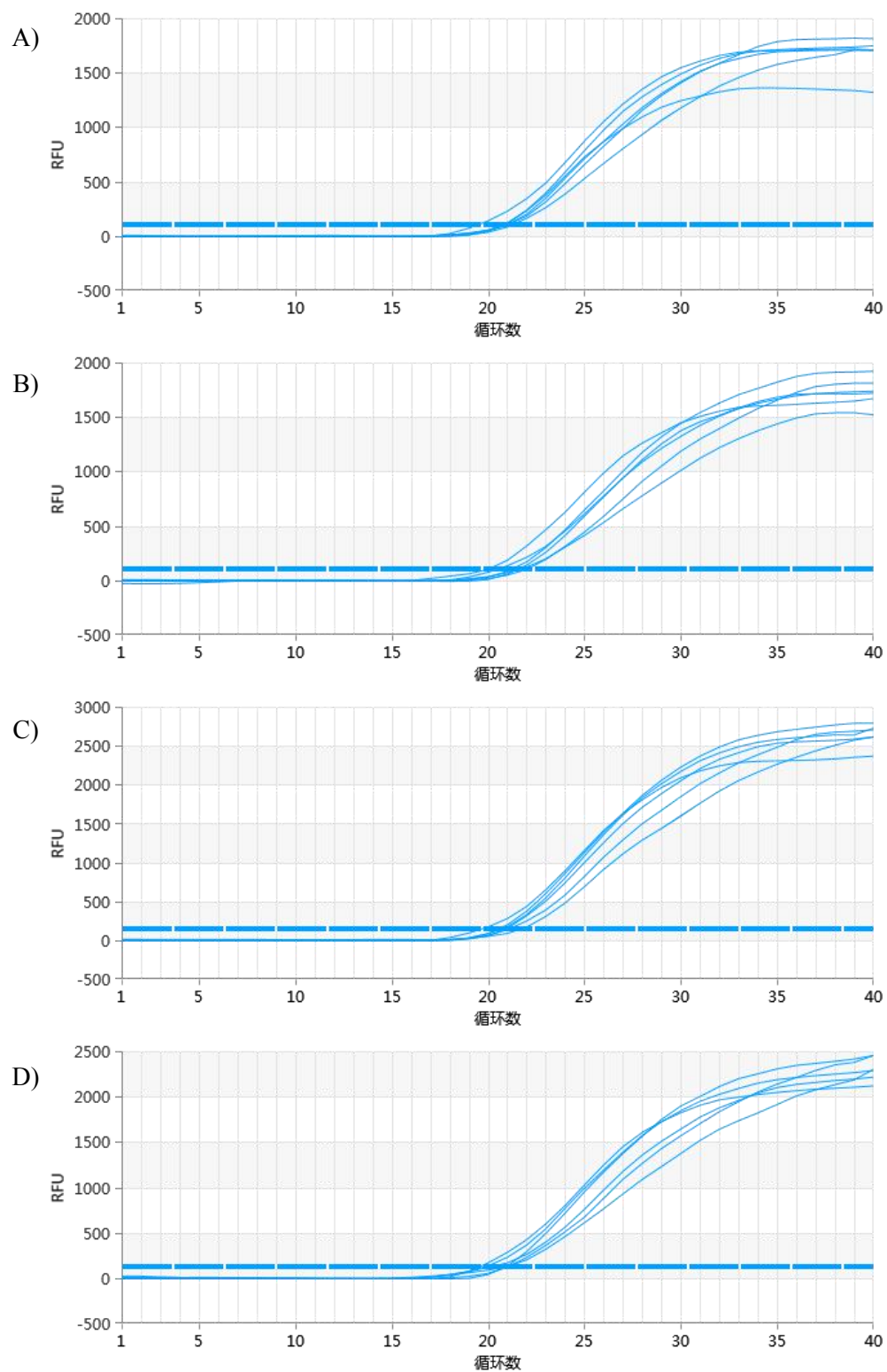


图 7 青霉素滤渣特异性引物、探针优化结果图

A:退火温度为 58℃;B:退火温度为 60℃;C:退火温度为 62℃;D:退火温度为 64℃;

2) 土霉素滤渣引物及探针浓度的优化

以提取的土霉素滤渣的核酸样品作为扩增模板,通过正交试验设计,考察不同引物与探针浓度比例(0.4 μM :0.4 μM , 0.8 μM :0.8 μM , 0.4 μM :0.1 μM , 0.8 μM :0.2 μM , 0.4 μM :0.2 μM , 0.8 μM :0.4 μM)以及退火温度(58 $^{\circ}\text{C}$, 60 $^{\circ}\text{C}$, 62 $^{\circ}\text{C}$, 64 $^{\circ}\text{C}$)对扩增效果的影响。优化结果如图 8 示,综合考虑荧光强度、扩增曲线形状、Ct 值以及试剂成本等多个因素,最终确定引物与探针的浓度比为 0.4 μM :0.1 μM ,引物退火延伸温度为 58~64 $^{\circ}\text{C}$,并将优化后的最佳参数条件应用于后续实验,从而确保试验的准确性与稳定性。

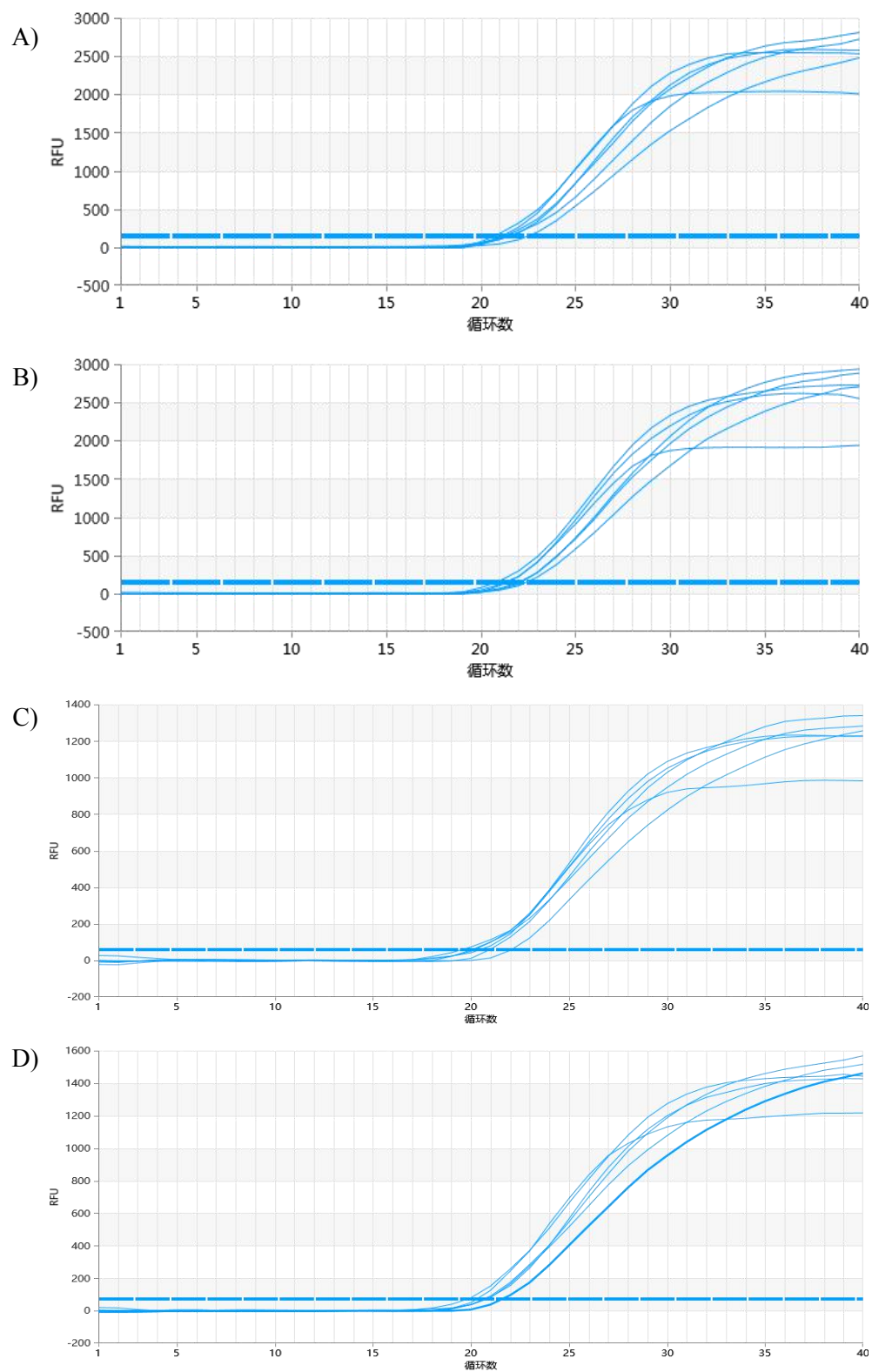


图 8 土霉素滤渣特异性引物、探针优化结果图

A:退火温度为 58℃;B:退火温度为 60℃;C:退火温度为 62℃;D:退火温度为 64℃;

3) 新霉素滤渣引物及探针浓度的优化

以提取的新霉素滤渣的核酸样品作为扩增模板,通过正交试验设计,考察不同引物与探针浓度比例(0.4 μM :0.4 μM , 0.8 μM :0.8 μM , 0.4 μM :0.1 μM , 0.8 μM :0.2 μM , 0.4 μM :0.2 μM , 0.8 μM :0.4 μM)以及退火温度(58 $^{\circ}\text{C}$, 60 $^{\circ}\text{C}$, 62 $^{\circ}\text{C}$, 64 $^{\circ}\text{C}$)对扩增效果的影响。优化结果如图 9 示,综合考虑荧光强度、扩增曲线形状及 Ct 值等多个因素,最终确定引物与探针的浓度比为 0.4 μM :0.1 μM ,引物退火延伸温度为 58~64 $^{\circ}\text{C}$,并将优化后的最佳参数条件应用于后续实验,从而确保试验的准确性与稳定性。

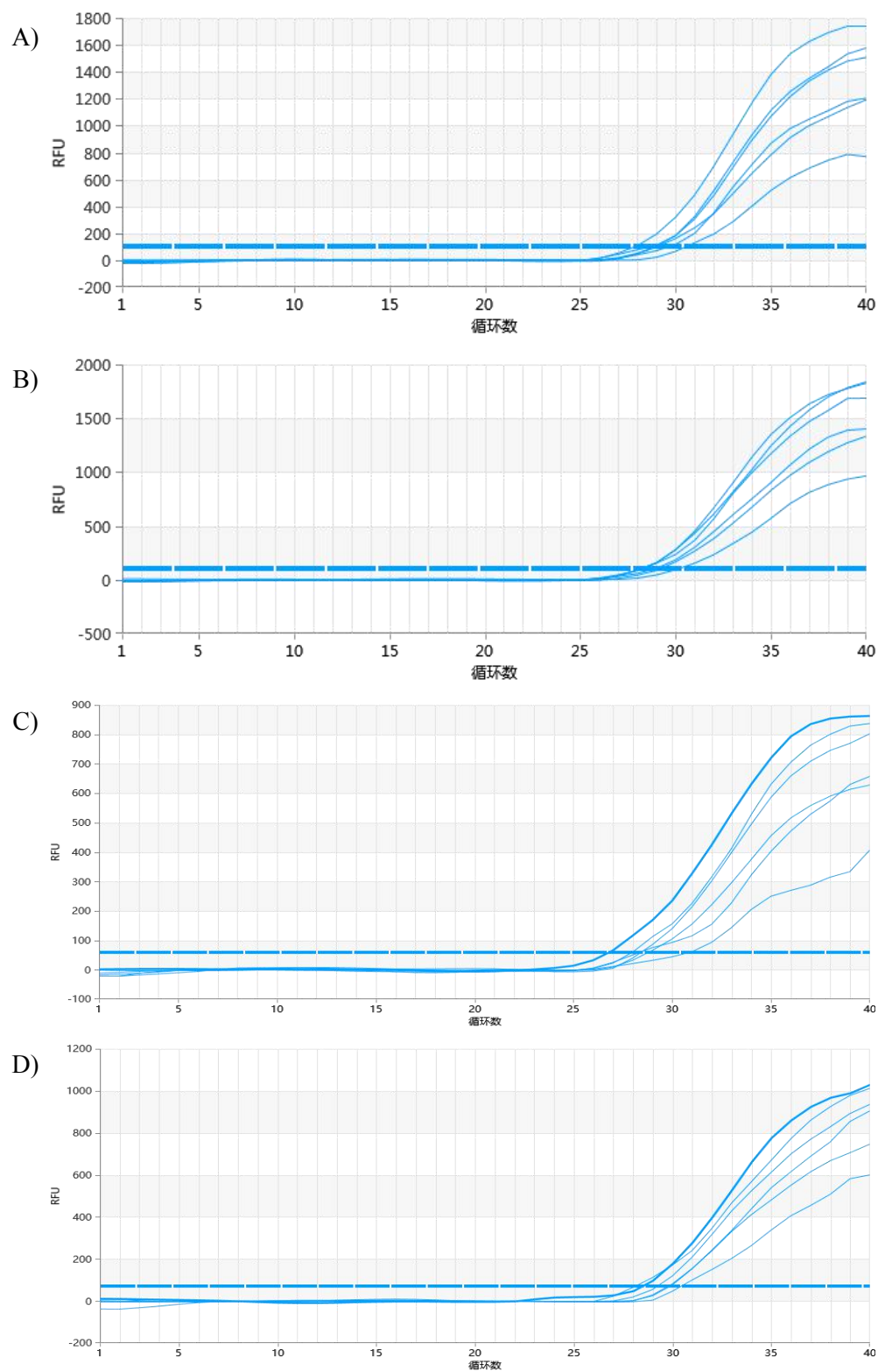


图 9 新霉素滤渣特异性引物、探针优化结果图

A:退火温度为 58℃;B:退火温度为 60℃;C:退火温度为 62℃;D:退火温度为 64℃;

4) 阿维菌素滤渣引物及探针浓度的优化

以提取的阿维菌素滤渣的核酸样品作为扩增模板,通过正交试验设计,考察不同引物与探针浓度比例(0.4 μM :0.4 μM , 0.8 μM :0.8 μM , 0.4 μM :0.1 μM , 0.8 μM :0.2 μM , 0.4 μM :0.2 μM , 0.8 μM :0.4 μM)以及退火温度(58 $^{\circ}\text{C}$, 60 $^{\circ}\text{C}$, 62 $^{\circ}\text{C}$, 64 $^{\circ}\text{C}$)对扩增效果的影响。优化结果如图 10 示,综合考虑荧光强度、扩增曲线形状及 Ct 值等多个因素,最终确定引物与探针的浓度比为 0.8 μM :0.2 μM ,引物退火延伸温度为 58~64 $^{\circ}\text{C}$,并将优化后的最佳参数条件应用于后续实验,从而确保试验的准确性与稳定性。

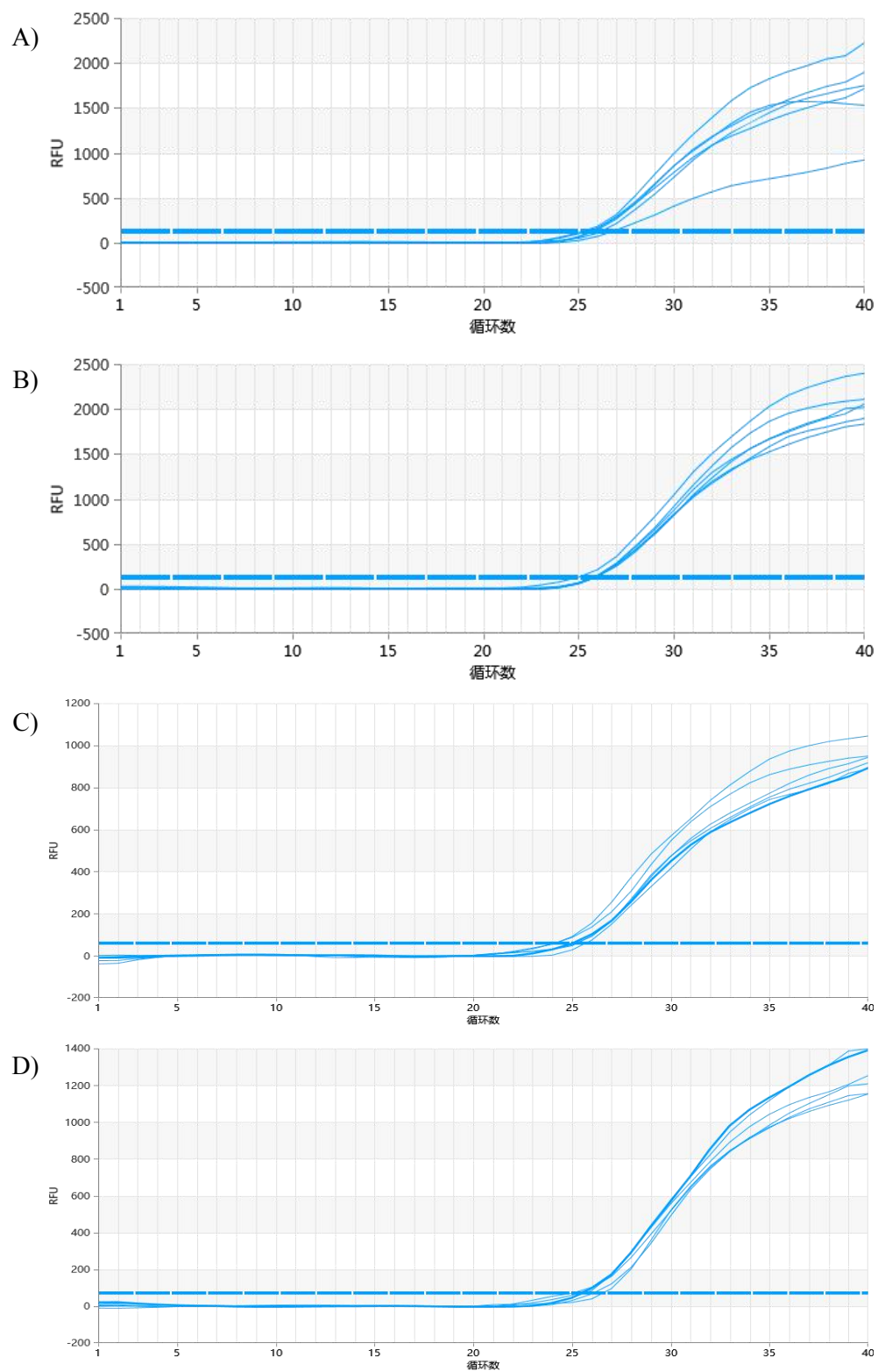


图 10 阿维菌素滤渣特异性引物、探针优化结果图

A:退火温度为 58℃;B:退火温度为 60℃;C:退火温度为 62℃;D:退火温度为 64℃;

2.2.3.2 实时荧光 PCR 反应体系和程序的确定

PCR 反应体系为：2×Taqman PCR Master Mix 12.5 μL，上下游引物（10 μM）、探针（10 μM）添加量见表 4，模板 DNA 5 μL，无菌 ddH₂O 4.5 μL。扩增程序见表 5。

表 4 实时荧光 PCR 参数

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

表 5 实时荧光 PCR 参数

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

2.2.4 方法评价

2.2.4.1 重复性测试

重复性测试能够检验 PCR 方法的可靠性和稳定性。

1) 饲料中青霉素滤渣的实时荧光 PCR 方法重复性测试

将青霉素菌渣核酸提取产物稀释为两个不同浓度（2 倍稀释，5 倍稀释）作为模板，每个浓度设置 3 次重复，进行组内重复性试验。同时，针对这两个浓度的样品，每个浓度均设置 3 个重复，每隔 3 天进行一次检测，连续检测 3 次，以评估组间重复性。通过 Ct 值结果，计算组内与组间的变异系数（CV）及标准偏差（SD），从而对该方法的可靠性和稳定性进行全面分析与评价。重复性试验结果如表 6 所示，批内 Ct 值的变异系数（CV）在 0.46 %~0.54 % 之间，批间 Ct 值的 CV 在 0.37~0.69 %。这一结果表明，本方法具有良好的重复性，因此在实际应用过程中具有较好的稳定性与可靠性。

表 6 饲料中青霉素滤渣的实时荧光 PCR 方法重复性测试结果

青霉素滤渣 DNA	批内		批间	
	Ct 值 ($\bar{x} \pm s$)	CV (%)	Ct 值 ($\bar{x} \pm s$)	CV (%)
2 倍稀释	30.40±0.14	0.46	30.37±0.11	0.37
5 倍稀释	31.19±0.17	0.54	31.24±0.21	0.69

2) 饲料中土霉素滤渣的实时荧光 PCR 方法重复性测试

将土霉素菌渣核酸提取产物稀释为两个不同浓度（2 倍稀释，5 倍稀释）作为模板，每个浓度设置 3 次重复，进行组内重复性试验。同时，针对这两个浓度的样品，每个浓度均设置 3 个重复，每隔 3 天进行一次检测，连续检测 3 次，以评估组间重复性。通过 Ct 值结果，计算组内与组间的变异系数（CV），从而对该方法的可靠性和稳定性进行全面分析与评价。重复性试验结果如表 7 所示，批内 Ct 值的变异系数(CV)在 0.71 %~1.8 % 之间,批间 Ct 值的 CV 在 0.53~0.77 %。这一结果表明，本方法具有良好的重复性，因此在实际应用过程中具

有较好的稳定性与可靠性。

表 7 饲料中土霉素滤渣的实时荧光 PCR 方法重复性测试结果

土霉素滤渣 DNA	批内		批间	
	Ct 值 ($\bar{x} \pm s$)	CV (%)	Ct 值 ($\bar{x} \pm s$)	CV (%)
2 倍稀释	23.71 $\pm$ 0.43	1.8	22.81 $\pm$ 0.12	0.53
5 倍稀释	25.18 $\pm$ 0.18	0.71	24.54 $\pm$ 0.19	0.77

3) 饲料中新霉素滤渣的实时荧光 PCR 方法重复性测试

将新霉素菌渣核酸提取产物稀释为两个不同浓度（2 倍稀释，5 倍稀释）作为模板，每个浓度设置 3 次重复，进行组内重复性试验。同时，针对这两个浓度的样品，每个浓度均设置 3 个重复，每隔 3 天进行一次检测，连续检测 3 次，以评估组间重复性。通过 Ct 值结果，计算组内与组间的变异系数（CV），从而对该方法的可靠性和稳定性进行全面分析与评价。重复性试验结果如表 8 所示，批内 Ct 值的变异系数(CV)在 0.03 %~0.63 % 之间,批间 Ct 值的 CV 在 0.11~0.65 %。这一结果表明，本方法具有良好的重复性，因此在实际应用过程中具有较好的稳定性与可靠性。

表 8 饲料中新霉素滤渣的实时荧光 PCR 方法重复性测试结果

新霉素滤渣 DNA	批内		批间	
	Ct 值 ($\bar{x} \pm s$)	CV (%)	Ct 值 ($\bar{x} \pm s$)	CV (%)
2 倍稀释	31.76 $\pm$ 0.01	0.03	30.72 $\pm$ 0.34	0.11
5 倍稀释	33.43 $\pm$ 0.21	0.63	32.18 $\pm$ 0.21	0.65

4) 饲料中阿维菌素滤渣的实时荧光 PCR 方法重复性测试

将阿维菌素菌渣核酸提取产物稀释为两个不同浓度（2 倍稀释，

5 倍稀释)作为模板,每个浓度设置 3 次重复,进行组内重复性试验。同时,针对这两个浓度的样品,每个浓度均设置 3 个重复,每隔 3 天进行一次检测,连续检测 3 次,以评估组间重复性。通过 Ct 值结果,计算组内与组间的变异系数(CV),从而对该方法的可靠性和稳定性进行全面分析与评价。重复性试验结果如表 9 所示,批内 Ct 值的变异系数(CV)在 0.48 %~1.04 % 之间,批间 Ct 值的 CV 在 0.72~0.79 %。这一结果表明,本方法具有良好的重复性,因此在实际应用过程中具有较好的稳定性与可靠性。

表 9 饲料中阿维菌素滤渣的实时荧光 PCR 方法重复性测试结果

阿维菌素滤渣 DNA	批内		批间	
	Ct 值 (x $\pm$ s)	CV (%)	Ct 值 (x $\pm$ s)	CV (%)
2 倍稀释	27.78 $\pm$ 0.29	1.04	27.77 $\pm$ 0.2	0.72
5 倍稀释	29.48 $\pm$ 0.14	0.48	29.05 $\pm$ 0.23	0.79

2.2.4.2 适用性和灵敏度测试

由于本方法的确立旨在针对含有青霉素菌渣饲料进行检测,因此需通过模拟制备样品并进行检测来评估其在实际应用中的适用性。

1) 添加青霉素滤渣的模拟真实样品的检测

将青霉素发酵残留物与空白鸭配合饲料按照 1:1、1:10、1:50、1:100、1:200、1:400 混合,制备不同浓度的含青霉素发酵残留物的鸭饲料样品。随后,采用优化后的 PCR 扩增参数条件对各样品的核酸提取物进行检测,验证所模拟制备的饲料样品能否检测出阳性扩增,从而证明本方法在实际应用过程中是否具备有效性与适用性。同时对本方法检测青霉素菌渣饲料的灵敏性进行确定。结果如图 11 所示。

在将青霉素发酵残留物与空白鸭配合饲料按 1:1、1:10、1:50、1:100、1:200 的比例进行混合添加检测时均会出现扩增曲线，混合比例为 1:400 时未出现扩增曲线，表明本方法具备对含有青霉素菌渣的饲料检测能力，并且最低能够检出饲料中 0.5%（1:200）含量的青霉素发酵菌渣添加，证明本方法在实际应用时具有适用性。

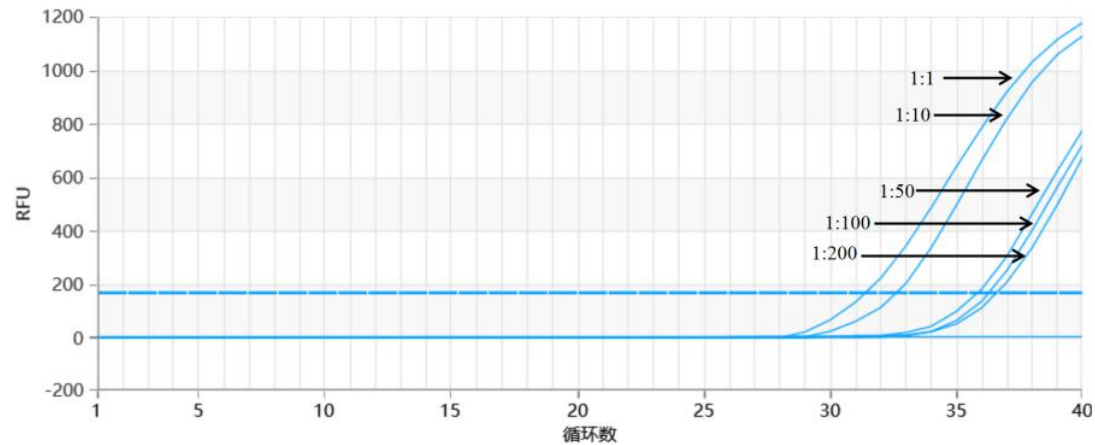


图 11 添加青霉素滤渣的模拟真实样品的检测结果

2) 添加土霉素滤渣的模拟真实样品的检测

将土霉素发酵残留物与空白鸭配合饲料按照 1:1、1:10、1:50、1:100、1:200、1:400 混合，制备不同浓度的含土霉素发酵残留物的鸭饲料样品。随后，采用优化后的 PCR 扩增参数条件对各样品的核酸提取物进行检测，验证所模拟制备的饲料样品能否检测出阳性扩增，从而证明本方法在实际应用过程中是否具备有效性与适用性。同时对本方法检测土霉素菌渣饲料的灵敏性进行确定。结果如图 12 所示。在将土霉素发酵残留物与空白鸭配合饲料按 1:1、1:10 的比例进行混合添加检测时均会出现扩增曲线，混合比例为 1:50 后均未出现扩增曲线，表明本方法具备对含有土霉素菌渣的饲料检测能力，并且最低能够检出饲料中 10%（1:10）含量的土霉素发酵菌渣添加，证明本方

法在实际应用时具有适用性。

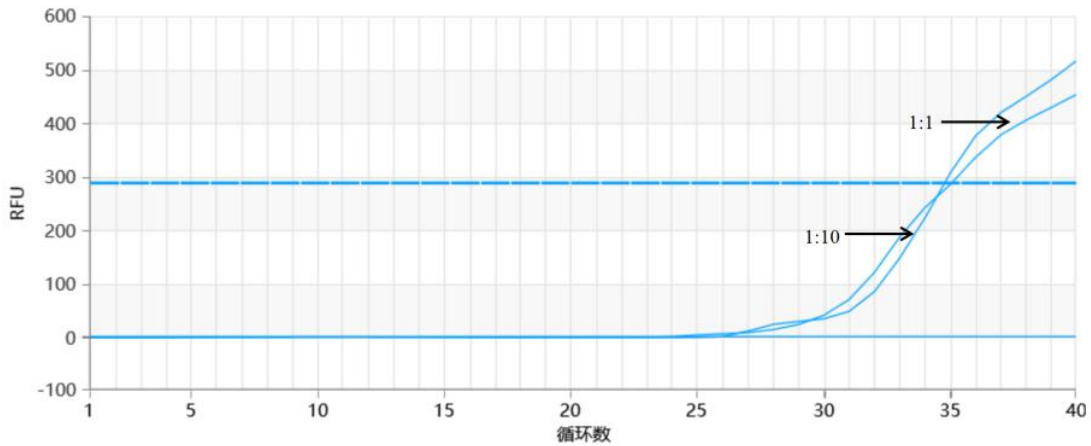


图 12 添加土霉素滤渣的模拟真实样品的检测结果

3) 添加新霉素滤渣的模拟真实样品的检测

将新霉素发酵残留物与空白鸭配合饲料按照 1:1、1:10、1:50、1:100、1:200、1:400 混合，制备不同浓度的含新霉素发酵残留物的鸭饲料样品。随后，采用优化后的 PCR 扩增参数条件对各样品的核酸提取物进行检测，验证所模拟制备的饲料样品能否检测出阳性扩增，从而证明本方法在实际应用过程中是否具备有效性与适用性。同时对本方法检测新霉素菌渣饲料的灵敏性进行确定。结果如图 13 所示。在将新霉素发酵残留物与空白鸭配合饲料按 1:1、1:10 的比例进行混合添加检测时均会出现扩增曲线，混合比例为 1:50 后均未出现扩增曲线，表明本方法具备对含有新霉素菌渣的饲料检测能力，并且最低能够检出饲料中 10%（1:10）含量的新霉素发酵菌渣添加，证明本方法在实际应用时具有适用性。

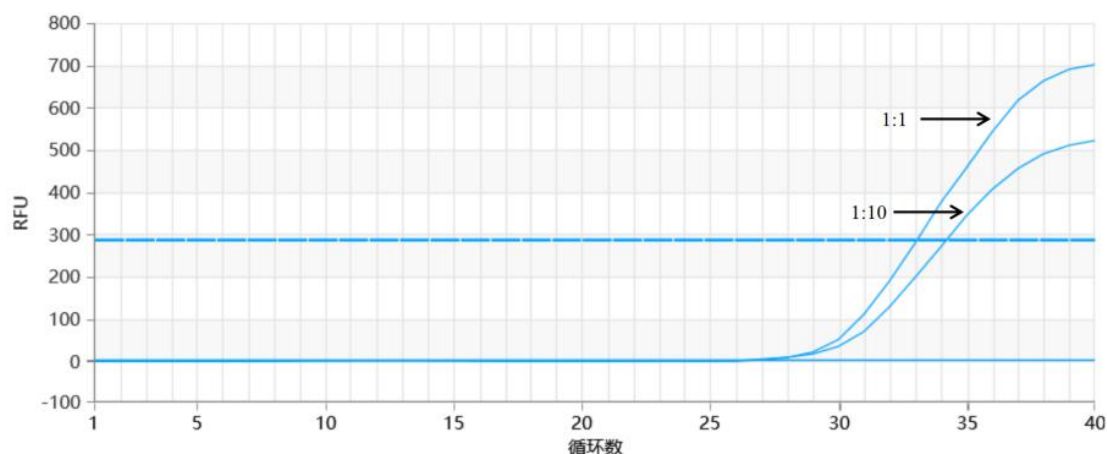


图 13 添加新霉素滤渣的模拟真实样品的检测结果

4) 添加阿维菌素滤渣的模拟真实样品的检测

将阿维菌素发酵残留物与空白鸭配合饲料按照 1:1、1:10、1:50、1:100、1:200、1:400 混合，制备不同浓度的含阿维菌素发酵残留物的鸭饲料样品。随后，采用优化后的 PCR 扩增参数条件对各样品的核酸提取物进行检测，验证所模拟制备的饲料样品能否检测出阳性扩增，从而证明本方法在实际应用过程中是否具备有效性与适用性。同时对本方法检测阿维菌素菌渣饲料的灵敏性进行确定。结果如图 14 所示。在将阿维菌素发酵残留物与空白鸭配合饲料按 1:1、1:10 的比例进行混合添加检测时均会出现扩增曲线，混合比例为 1:50 后均未出现扩增曲线，表明本方法具备对含有阿维菌素菌渣的饲料检测能力，并且最低能够检出饲料中 10% (1:10) 含量的阿维菌素发酵菌渣添加，证明本方法在实际应用时具有适用性。

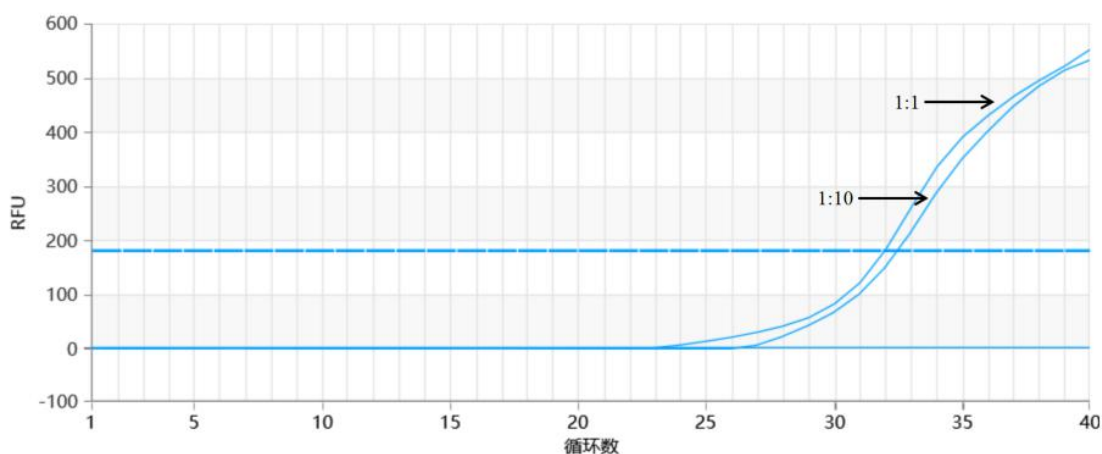


图 14 添加阿维菌素滤渣的模拟真实样品的检测结果

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

2025 年 1 月~2 月，标准编制小组委托单位 1、单位 2 和单位 3 完成本标准的复核验证工作。三家检测机构对本标准的复核验证结论为：经试验验证，采用该方法能满足饲料中抗生素滤渣的鉴别，故该方法通过验证，可作为饲料中抗生素滤渣的鉴别标准方法。详见附件。

四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况

五、采用国际标准情况

本标准未采用国际国外标准。

六、与有关法律、法规的关系

在标准的制订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和行业标准。与有关的各种基础标准相衔接，遵循了政策性和协调统一性的原则。本标准与现行法律、法规、规章

和政策以及有关基础和强制性标准不矛盾。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

无。

八、涉及专利的有关说明

本标准未明确涉及某一具体专利，但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。

九、贯彻国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议

（1）首先应在实施前保证文本的充足供应，让每个使用者都能及时得到文本；

（2）发布后、实施前应将信息在媒体上广为宣传，建议全国饲料工业标准化技术委员会组织标准起草单位通过标准培训、会议宣贯、影音文件等方式，积极开展本标准的宣贯工作。

（3）建议本标准正式发布后，设定 6 个月的过渡期，过渡 6 个月 after 实施。

10. 其他应予说明的事项

无。

参考文献

- [1] Li Y, Gao H, Wang R, et al. Deoxynivalenol in food and feed: Recent advances in decontamination strategies[J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1141378.
- [2] Gao J, Yang Z, Zhao C, et al. A comprehensive review on natural phenolic compounds as alternatives to in-feed antibiotics[J]. *Sci China Life Sci*, 2023, 66(7): 1518-1534.
- [3] Ayalew H, Zhang H, Wang J, et al. Potential Feed Additives as Antibiotic Alternatives in Broiler Production[J]. *Front Vet Sci*, 2022, 9: 916473.
- [4] Mantovani A, Aquilina G, Cubadda F, et al. Risk-Benefit Assessment of Feed Additives in the One Health Perspective[J]. *Front Nutr*, 2022, 9: 843124.
- [5] Li Z H, Hu X J, Lu Y F, et al. [Determination of sixteen antibiotics and four β -agonists in human urine samples using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry based on high-throughput automatic solid-phase extraction][J]. *Se Pu*, 2023, 41(5): 397-408.
- [6] Feng M, Liu Y, Yang L, et al. Antibiotics and antibiotic resistance gene dynamics in the composting of antibiotic fermentation waste - A review[J]. *Bioresour Technol*, 2023, 390: 129861.

- [7] Yin Y, Wang J. Production of medium-chain fatty acids by co-fermentation of antibiotic fermentation residue with fallen Ginkgo leaves[J]. *Bioresour Technol*, 2022, 360: 127607.
- [8] Wang Y, Wang Y, Zhang Z, et al. Combined hydrothermal treatment, pyrolysis, and anaerobic digestion for removal of antibiotic resistance genes and energy recovery from antibiotic fermentation residues[J]. *Bioresour Technol*, 2021, 337: 125413.
- [9] Ghimpețeanu O M, Pogurschi E N, Popa D C, et al. Antibiotic Use in Livestock and Residues in Food-A Public Health Threat: A Review[J]. *Foods*, 2022, 11(10).
- [10] Cazer C L, Eldermire E R B, Lhermie G, et al. The effect of tylosin on antimicrobial resistance in beef cattle enteric bacteria: A systematic review and meta-analysis[J]. *Prev Vet Med*, 2020, 176: 104934.
- [11] Song X, Xie J, Zhang M, et al. Simultaneous determination of eight cyclopolypeptide antibiotics in feed by high performance liquid chromatography coupled with evaporation light scattering detection[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2018, 1076: 103-109.
- [12] Qian M, Zhang X, Zhao H, et al. A high-throughput screening method for determination of multi-antibiotics in animal feed[J]. *J Sep Sci*, 2019, 42(18): 2968-2976.
- [13] Megoulas N C, Koupparis M A. Enhancement of evaporative light scattering detection in high-performance liquid chromatographic

determination of neomycin based on highly volatile mobile phase, high-molecular-mass ion-pairing reagents and controlled peak shape[J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1057(1-2): 125-31.

[14] Zhgun A a J F. *Pharmaceutical Fermentation: Antibiotic Production and Processing*[J], 2024, 10.

[15] Li X S, Zheng X H, Chen F, et al. A new secondary metabolite from the fermented mycelia of *Streptomyces* antibiotic H41-55[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2018, 20(8): 807-814.

[16] Li Y, Su X, Peng Q, et al. Method for determination of streptomycin and streptidine as markers for streptomycin industrial dregs monitoring in pig and poultry compound feeds[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2016, 1035: 84-90.

[17] De Souza M R, Araújo I P, Da Costa Arruda W, et al. RGeasy: a reference gene analysis tool for gene expression studies via RT-qPCR[J]. *BMC Genomics*, 2024, 25(1): 907.

[18] Della Terra P P, Gonsales F F, De Carvalho J A, et al. Development and evaluation of a multiplex qPCR assay for rapid diagnostics of emerging sporotrichosis[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2022, 69(4): e704-e716.

[19] Karaca B, Karakaya A, Ozcan B, et al. Rapid detection of *Geobacillus* and *Anoxybacillus* species by quantitative qPCR (qPCR) in commercial dairy products[J], 2022.

- [20] Banerji A, Deshpande R, Elk M, et al. Highlighting the promise of qPCR-based environmental monitoring: response of the ribosomal RNA:DNA ratio of calanoid copepods to toxic cyanobacteria[J]. *Ecotoxicology*, 2021, 30(3): 411-420.
- [21] Fierro F, García-Estrada C, Castillo N I, et al. Transcriptional and bioinformatic analysis of the 56.8 kb DNA region amplified in tandem repeats containing the penicillin gene cluster in *Penicillium chrysogenum*[J]. *Fungal Genet Biol*, 2006, 43(9): 618-29.
- [22] Van Den Berg M A, Westerlaken I, Leeftang C, et al. Functional characterization of the penicillin biosynthetic gene cluster of *Penicillium chrysogenum* Wisconsin54-1255[J]. *Fungal Genet Biol*, 2007, 44(9): 830-44.
- [23] Wang F Q, Zhong J, Zhao Y, et al. Genome sequencing of high-penicillin producing industrial strain of *Penicillium chrysogenum*[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15 Suppl 1(Suppl 1): S11.
- [24] Sawant A M, Vamkudoth K R. Biosynthetic process and strain improvement approaches for industrial penicillin production[J]. *Biotechnol Lett*, 2022, 44(2): 179-192.
- [25] Van Den Berg M A. Impact of the *Penicillium chrysogenum* genome on industrial production of metabolites[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 92(1): 45-53.