

附件

植物蛋白饮料中植物源性成分鉴定

BJS 201707

1 范围

本方法规定了食品核桃源性成分、花生源性成分、杏仁源性成分、芝麻源性成分、榛子源性成分、大豆源性成分鉴定的实时荧光PCR方法。

本方法适用于核桃露（乳）、杏仁露、果仁露等复合植物蛋白饮料中标识含有核桃源性成分、花生源性成分、杏仁源性成分、芝麻源性成分、榛子源性成分、大豆源性成分的检测及鉴定。

2 原理

提取试样中基因组DNA，以DNA为模板，利用物种特异性引物及探针进行实时荧光PCR扩增检测，同时设置阳性、阴性及空白对照。根据扩增的Ct值，判定试样中是否含有该源性成分。

3 试剂和材料

除另有规定外，试剂为分析纯或生化试剂。实验用水符合GB 6682的要求。所有试剂均用无DNA酶污染的容器分装。

3.1 核桃源性成分 *Jugr2* 基因检测用引物对序列为：

核桃5'端引物:5'-CGCGCAGAGAAAGCAGAG-3'

核桃3'端引物:5'-GACTCATGTCTCGACCTAATGCT-3'

核桃探针：5'-FAM-TTGTGCCTCTGTTGCTCCTCTTCCC-TAMRA-3'

3.2 花生源性成分 *Ara b2* 基因检测用引物（对）序列为：

花生5'端引物:5'-GCAACAGGAGCAACAGTTCAAG-3'

花生3'端引物:5'-CGCTGTGGTGCCCTAAGG-3'

花生探针：5'-FAM-AGCTCAGGAACTTGCCTCAACAGTGCG-Eclipse-3'

3.3 杏仁源性成分 *Prudul* 基因检测用引物（对）序列为：

杏仁5'端引物:5'-TTTGGTTGAAGGAGATGCTC-3'

杏仁3'端引物:5'-TAGTTGCTGGTGCTCTTTATG-3'

杏仁探针：5'-FAM-TCCATCAGCAGATGCCACCAAC- Eclipse-3'

3.4 芝麻源性成分 2S albumin mRNA 基因检测用引物（对）序列为：

芝麻5'端引物:5'-CCAGAGGGCTAGGGACCTTC-3'

芝麻3'端引物:5'-CTCGGAATTGGCATTGCTG-3'

芝麻探针：5'-FAM-TCGCAGGTGCAACATGCGACC- TAMRA-3'

3.5 榛子源性成分 *oleosin* 基因检测用引物（对）序列为：

榛子5'端引物:5'-CCCCGCTGTTTGTGATAT-3'

榛子3'端引物:5'-ATGATAATAAGCGATACTGTGAT-3'

榛子探针：5'-FAM-TCCCGTTCTCGTCCCTGCGGT- Eclipse-3'

3.6 大豆源性成分 *Lectin* 基因检测用引物（对）序列为：

大豆5'端引物:5'-GCCCTCTACTCCACCCCA-3'

大豆3'端引物:5'-GCCCATCTGCAAGCCTTTTT-3'

大豆探针：5'-FAM-AGCTTCGCCGCTTCCTTCAACTTCAC- TAMRA-3'

3.7 真核生物 18SrRNA 内参照检测用引物（对）序列为：

内参照5'端引物: 5'-TCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTA-3'

内参照3'端引物: 5'-AATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTT-3'

内参照探针：5'-FAM-CCGTTTCTCAGGCTCCCTCTCCGAATCGAAC- TAMRA-3'

3.8 CTAB 缓冲液：55 mmol/L CTAB，1400 mmol/L NaCl，20 mmol/L EDTA，100 mmol/L Tris，用 10% 盐酸调节 pH 至 8.0，121°C 高压灭菌 20 min，备用。

3.9 蛋白酶 K：20mg/mL。

3.10 苯酚：氯仿：异戊醇（体积比：25:24:1）。

3.11 异丙醇。

3.12 70%乙醇。

3.13 Taq DNA 聚合酶。

3.14 dNTP 混合液。

3.15 TE 缓冲液（Tris-HCl、EDTA 缓冲液）：10mmol/L Tris-HCl（pH8.0），1 mmol/L EDTA（pH8.0）。

3.16 10×PCR 缓冲液：200 mmol/L KCl，15 mmol/L MgCl₂，200 mmol/L Tris-HCl（pH8.8）。

4 仪器和设备

4.1 组织研磨器。

4.2 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。

4.3 恒温水浴锅。

4.4 离心机：离心力 12,000g。

4.5 微量移液器（0.5μL~10μL，10μL~100μL，10μL~200μL，100μL~1000μL）。

4.6 实时荧光 PCR 仪。

4.7 涡旋振荡器。

4.8 天平：感量 0.01g。

5 分析步骤

5.1 试样总 DNA 的提取

固体样品：将样品粉碎后称取0.3~0.6 g，按下列方法提取DNA。也可用等效商品化DNA提取试剂盒提取DNA。

液体样品：取1 mL 样品于Eppendorf 管中，加入1 倍体积的异丙醇，混合均匀，室温下沉淀5 min，室温下以12,500 rpm 离心5 min，弃去上清液。重复此操作一次。所得的沉淀用于提取DNA。可按下列方法提取DNA，也可用等效商品化DNA提取试剂盒提取DNA。

(1) 将处理后的样品加入2 mL离心管中，加入600 μ L CTAB缓冲液和40 μ L 蛋白酶K溶液，振荡混匀，65 $^{\circ}$ C孵育1 h（过夜孵育更好），期间每隔10 min振荡混匀；

(2) 加入500 μ L的苯酚：氯仿：异戊醇（25:24:1），振荡抽提10 min，室温下以12,500 rpm 离心10 min；

(3) 小心吸取上清液，加入等体积的异丙醇，振荡均匀，12,500 rpm 离心10 min；

(4) 弃去上清液，用65 $^{\circ}$ C预热的TE缓冲液溶解DNA；

(5) 小心吸取上清，加入200 μ L氯仿：异戊醇（24:1），振荡抽提，室温下以12500 rpm 离心15 min；

(6) 小心吸取上清液，加入等体积的异丙醇，振荡均匀，12,500rpm 离心10 min；

(7) 弃去上清液，沉淀用70% 乙醇洗涤，离心1min，晾干，溶于50 μ L TE 缓冲液中。

5.2 DNA 浓度和纯度的测定

取 1 μ L DNA 溶液，使用核酸蛋白分析仪检测其浓度及质量，OD_{260/280} 值应在 1.7~1.9 之间时，适宜于 PCR 扩增。

5.3 实时荧光 PCR 扩增

反应体系总体积为25 μ L，其中10 \times PCR缓冲液5 μ L，正反向引物（10 μ mol/L）各1 μ L，探针（10 μ mol/L）1 μ L，dNTPs（10 μ mol/L）2 μ L，Taq DNA聚合酶（2.5U）0.2 μ L，DNA模板（10-100ng/ μ L）2 μ L，用灭菌去离子水补足至总体积25 μ L。真核生物内参照的反应体系同上，仅替换相应的引物和探针。也可使用相应的商品化扩增试剂盒。

反应参数：50 $^{\circ}$ C 2min； 95 $^{\circ}$ C 15min； 95 $^{\circ}$ C 15s， 60 $^{\circ}$ C 1min， 40个循环。

5.4 实验对照

检验过程分别设阳性对照、阴性对照、空白对照。以相应植物源物种提取的DNA为阳性对照，以已知不含该植物源的物种DNA为阴性对照，以灭菌水为空白对照。样品、内参照和对照设置两个平行的反应体系。

6 结果判断与表述

6.1 质量控制

以下条件有一条不满足时，结果视为无效：

(a)空白对照：无FAM荧光信号检出；

(b)阴性对照：无FAM荧光信号检出；

(c)阳性对照：有FAM荧光信号检出，且FAM通道出现典型的扩增曲线，Ct值 \leq 35.0；

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

6.2 结果判定

(a)如Ct值 \leq 35.0, 则判定为被检样品阳性;

(b)如Ct值 \geq 40.0, 则判定为被检样品阴性;

(c)如 $35.0 < \text{Ct值} < 40.0$, 则重复试验一次。如再次扩增后Ct值仍为 $35.0 < \text{Ct值} < 40.0$, 则判定被检样品可疑。

6.3 结果表述

结果为阳性者, 结合产品标识, 表述为“检出XX源性成分”。

结果为阴性者, 结合产品标识, 表述为“未检出XX源性成分”。

结果为可疑者, 结合产品标识, 表述为“XX源性成分可疑”。

7 防污染措施

检测过程中放置交叉污染的措施按照GB/T 27403中的规定执行。

本方法负责起草单位: 河北省食品检验研究院。

验证单位: 中国食品药品检验研究院、北京市食品安全监控和风险评估中心、湖北省食品质量安全监督检验研究院、武汉食品化妆品检验所、河北出入境检验检疫局检验检疫技术中心、中国肉类食品综合研究中心。

主要起草人: 周巍、王爽、章晶晶、崔生辉、李永波、孙勇。