



中华人民共和国轻工行业标准

QB/T XXXX—XXXX

大麦苗粉制品中大麦源性成分检测方法 PCR 法

Detection of barley derived from the products made from barley grass powder PCR
method

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中华人民共和国工业和信息化部 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。

本文件由中国轻工业联合会提出。

本文件由全国特殊食品标准化技术委员会（SAC/TC 466）归口。

本文件起草单位：。

本文件主要起草人：。

本文件为首次发布。

大麦苗粉制品中大麦源性成分检测方法 PCR 法

1 范围

本文件描述了采用PCR法检测大麦苗粉制品中大麦源性成分的方法。

本文件适用于大麦苗粉制品中大麦源性成分定性检测，方法检出限为 0.25%（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 6682-2008 分析实验室用水规格和试验方法

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

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

bp: 碱基对 (base pair)

Ct: 阈值循环数 (cycle threshold)

DNA: 脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid)

dATP: 脱氧腺苷三磷酸 (deoxy-adenosine triphosphate)

dCTP: 脱氧胞苷三磷酸 (deoxy-cytidine triphosphate)

dGTP: 脱氧鸟苷三磷酸 (deoxy-guanosine triphosphate)

dNTPs: 脱氧核糖核苷酸

dTTP: 脱氧胸苷三磷酸 (deoxy-thymidine triphosphate)

EDTA: 乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid)

FAM: 6-羧基荧光素 (6-carboxyfluorescein)

PCR: 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction)

TAMRA: 6-羧基四甲基罗丹明 (6-carboxytetramethylrhodamine)

Taq: 水生栖热菌 (thermus aquaticus)

Tris: 三(羟甲基)氨基甲烷 (tris(hydroxymethyl) aminomethane)

UNG: 尿嘧啶-N-糖基化 (uracil-N-glycosylase)

18s rRNA: 18s 核糖体 RNA (18S ribosomal acid RNA)

5 防止污染措施

防止污染措施应遵守GB/T 27403-2008中附录D的规定。

6 第一法 特异性 PCR 法

6.1 原理

以提取的大麦苗粉制品样品中的总DNA为模板，设计大麦源性成分的特异性引物进行PCR扩增，以琼脂糖凝胶电泳检测是否出现预期目标片段，或利用测序进行确证，从而判定样品中是否含有相应的源性成分。

6.2 试剂和材料

除另有说明外，试剂均为分析纯或生化试剂，实验用水为GB/T 6682-2008规定的一级水。

6.2.1 dNTPs: dATP、dTTP、dCTP、dGTP。

6.2.2 10×PCR 缓冲液。

6.2.3 TaqDNA 聚合酶。

6.2.4 冰乙酸。

6.2.5 氢氧化钠。

6.2.6 溴代十六烷基三甲基铵（CTAB）。

6.2.7 异丙醇。

6.2.8 琼脂糖。

6.2.9 溴化乙锭或其他可代替的染料。

6.2.10 6×loading buffer(上样液)。

6.2.11 DNA 分子量标记: 100 bp。

6.2.12 TE 缓冲液: 在 800 mL 水中, 依次加入 1mol/L Tris-HC 溶液 10mL 和 0.5 mol/LEDTA 溶液 2mL, 用水定容至 1L, 121C 灭菌 15min, 备用。

6.2.13 1×TAE 缓冲液: 称取 242g Tris 和 37.2g 的 Na₂EDTA·2H₂O 放入烧杯中加入约 800mL 水, 充分搅拌, 然后加入 57.1mL 冰乙酸, 用水定容至 1L, 配制成 50×TAE 缓冲液, 室温保存, 使用时用水稀释为 1×TAE 缓冲液。

6.2.14 2%琼脂糖凝胶: 称取 0.8 g 琼脂糖于锥形瓶中, 加入 40.0mL 1×TAE 缓冲液, 加热溶解。

6.2.15 1mol/L Tris-HCL 溶液: 称取 60.55g Tris-base 溶于适量水中, 加 1mol/L HCl 调 pH 至 8.0, 定容至 500 mL, 103.4kPa 灭菌。

6.2.16 0.5mol/L EDTA 溶液: 称取 186.1g Na₂EDTA·2H₂O 溶于 800 mL 水中, 用 1mol/L NaOH 调 pH 至 8.0, 定容至 1000 mL, 在 103.4kPa 灭菌。

6.2.17 CTAB 缓冲液：称取 1 mol/L Tris-HCl 83.5mL, 5 mol/L NaCl 235 mL, 0.5 mol/L EDTA 33.4mL, CTAB 固体 20 g 定容至 1000 mL。其中, 292.5g NaCl(MW=58.44)+ddH₂O 至终体积 1000 mL, 103.4 kPa 灭菌, 即为 5mol/L NaCl 溶液。

6.2.18 0.8 g 琼脂糖于锥形瓶中, 加入 40.0mL 1×TAE 缓冲液, 加热溶解。

6.2.19 无菌 PCR 反应管。

6.2.20 无菌离心管：1.5mL、2mL。

6.3 仪器和设备

6.3.1 超净工作台。

6.3.2 电子天平：感量 0.1mg。

6.3.3 冷冻离心机。

6.3.4 恒温水浴锅。

6.3.5 PCR 扩增仪。

6.3.6 电泳仪。

6.3.7 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。

6.3.8 紫外凝胶成像仪。

6.3.9 灭菌锅。

6.3.10 DNA 测序仪/基因分析仪。

6.3.11 微量移液器：2 μL、10 μL、100 μL、200 μL、1000 μL。

6.4 样品制备

将样品混合均匀后称取3g~5g（若样品为片状等其他状态则用研钵或粉碎装置粉碎至粉末状），备用。样品制备应小心操作确保防止任何的污染和样品组分的改变。

6.5 分析步骤

6.5.1 DNA 模板的提取

称取 30 mg~50 mg 于 6.4.中制备的样品于 1.5mL 离心管中, 加入 700 μL 65 °C 预热的 CTAB 缓冲液, 混匀, 置于 65°C 水浴锅中水浴加热 30 min, 期间不时轻轻倒转混匀; 待冷却至室温后加入 700μL 氯仿: 异戊醇 (24:1, 体积比), 轻轻倒转混匀 5 min ~10 min 后 12 000 rpm (室温) 离心 10 min, 小心地转移上清液于洁净离心管中, 加入 0.8 倍体积异丙醇, 轻轻混匀, -20°C 沉淀 10 min; 12 000 rpm (室温) 离心 10 min, 弃上清液; 1mL 70%乙醇洗涤 2 次, 晾干; 加入适量 TE 缓冲液, 溶解后-20°C 保存备用。

注：也可用等效 DNA 提取试剂盒提取样品 DNA。

6.5.2 DNA 浓度和纯度的测定

取适量 DNA 溶液原液加双蒸水稀释一定倍数后,使用核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计分别检测 260 nm 和 280 nm 处的吸光值 A_{260} 和 A_{280} 。DNA 的浓度按式 (1) 计算:

$$c = A \times N \times 50 \dots\dots\dots (1)$$

式中:

c ——DNA 浓度, 单位为微克每毫升 ($\mu\text{g/mL}$);

A ——260 nm 处的吸光值;

N ——核酸稀释倍数。

当浓度为 $10 \mu\text{g/mL} \sim 100 \mu\text{g/mL}$, A_{260}/A_{280} 比值在 1.7~1.9 之间时, 适宜用于 PCR 扩增。

6.5.3 引物

大麦特异性引物序列信息及扩增目的片段长度见表 1, 各引物终浓度均为 $10 \mu\text{mol/L}$ 。

表 1 特异性引物

基因	引物序列 (5'-3')	预期目的片段/bp
大麦	F: CTAGGTGGATGGATTCTCAC	125bp
	R: ATCATCGTATTCTCGCCTG	

6.5.4 PCR 扩增

6.5.4.1 PCR 反应采用 $25 \mu\text{L}$ 体系: $10\times\text{DNA buffer } 2.5 \mu\text{L}$, 模板 DNA $2 \mu\text{L}$, dNTPs (2.5mmol/L) $2 \mu\text{L}$, 上、下游引物各 $1 \mu\text{L}$, Taq DNA 聚合酶 $0.3 \mu\text{L}$, ddH₂O 补足体积。

6.5.4.2 扩增条件为: $95^\circ\text{C } 10\text{min}$, $95^\circ\text{C } 30\text{s}$, $60^\circ\text{C } 30\text{s}$, $72^\circ\text{C } 30\text{s}$, $72^\circ\text{C } 10 \text{min}$, 35 个循环。

6.5.4.3 每个 PCR 反应均设置两个平行试验, 并设置空白对照、阳性对照和阴性对照, 空白对照的 PCR 反应体系中使用无菌双蒸水代替 DNA 模板, 阳性对照使用新鲜大麦苗提取的 DNA 为模板或已知大麦源性的 DNA 为模板, 阴性对照采用已知不含大麦序列的 DNA 为模板。

6.5.4.4 若样品第一次 PCR 扩增结果经电泳检测无条带或条带不清晰, 取 $1 \mu\text{L}$ 第一次扩增产物为模板, 在相同反应体系和扩增条件下再次扩增, 以第二次 PCR 扩增结果进行判断。

6.5.5 琼脂糖凝胶电泳检测

6.5.5.1 使用 $1\times\text{TAE}$ 缓冲液配制 2% (w/v) 琼脂糖凝胶, 加热至沸腾溶解后, 采取电泳前染色法, 当凝胶温度在 $55^\circ\text{C} \sim 60^\circ\text{C}$ 时, 微量移液器加入溴化乙锭或其他可替代的染料, 使其终浓度达到 $1 \mu\text{g/mL}$ 或工作浓度为 $1\times$, 趁热将琼脂糖溶液均匀倒入制胶器, 室温冷却至凝固。

6.5.5.2 在电泳槽中加入 $1\times\text{TAE}$ 缓冲液, 使溶液没过胶面, 移取 $5 \mu\text{L}$ DNA 扩增产物与 $1 \mu\text{L } 6\times\text{loading buffer}$ (上样液) 混合均匀后, 点样, 同时在点样孔中加入 DNA 分子量标记, 80V , 恒压, 电泳 $20\text{min} \sim 30\text{min}$ 。在紫外凝胶成像仪下观察电泳结果, 拍照并记录结果。

6.5.6 PCR 结果判断

当出现下列情况之一, 则 PCR 结果无效, 应重新进行试验:

- 两份平行测试样品的结果不一致;
- 空白对照或阴性对照出现条带;
- 阳性对照未出现目的条带。

6.5.7 确证试验

若PCR扩增结果为阳性，可将所得产物直接进行测序。

6.6 结果判断

若样品PCR扩增结果出现预期长度的目的片段，判断样品含有相应源性成分；或将目的片段测序后，与数据库中已有参考序列比对，相似性 $\geq 96\%$ 以上，确认源性成分种属信息。

7 第二法 实时荧光PCR法

7.1 原理

以提取的大麦苗粉制品样品中的总DNA为模板，设计大麦源性成分的特异性引物及荧光探针，进行PCR扩增，根据PCR扩增反应中每一个循环产物荧光信号的强弱判定样品中是否含有相应的源性成分。

7.2 试剂和材料

7.2.1 实时荧光 PCR 预混液

为Taq DNA 聚合酶（ $5U/\mu L$ ）、PCR反应缓冲液、 $MgCl_2$ （ 3 mmol/L - 7 mmol/L ）、dNTPs（含dATP、dTTP、dCTP、dGTP）、UNG酶等混合配制的溶液或等效的商品化实时荧光PCR反应预混液。

7.2.2 荧光校正试剂：使用时稀释至1 \times 。

7.3 仪器和设备

7.3.1 超净工作台。

7.3.2 电子天平：感量0.1mg。

7.3.3 冷冻离心机。

7.3.4 恒温水浴锅。

7.3.5 实时荧光PCR仪。

7.3.6 高压灭菌锅。

7.3.7 微量移液器：2 μL 、10 μL 、100 μL 、200 μL 、1000 μL 。

7.4 分析步骤

7.4.1 样品制备与保存

7.4.1.1 样品制备

同6.4

7.4.2 DNA 模板的提取

同6.5.1。

7.4.3 DNA 浓度和纯度的检测

同 6.5.2。

7.4.4 引物

18s rRNA内参基因以及大麦特异性引物与探针序列见表2，各引物终浓度均为10 μmol/L。

表2 特异性引物及探针序列

源性成分/内参	引物序列 (5'-3')
18S	18S F: 5'-CCTGAGAAACGGCTACCAT-3'
	18S R: 5'-CGTGTTCAGGATTGGGTAAT-3'
	18S P: 5'-FAM-TGCGCGCCTGCTGCCTTCCT-TAMRA-3'
大麦	大麦 F: 5'-AACAGCTAAACCCATGCAAGGTA-3'
	大麦 R: 5'-GTTTCGGGGATTTGGGGTAGTTG-3'
	大麦 P: 5'-FAM-TCCTCCAGCAGCAGTGCAGCCCT-TAMRA-3'

7.5 实时荧光 PCR 扩增反应

7.5.1 实时荧光 PCR 反应体系

实时荧光PCR反应体系见表3。

表3 实时荧光PCR反应体系

试剂名称	储存浓度	体积 (μL)
10×PCR 反应缓冲液	10×	2.5
dNTP(含 UTP)	10 μmol/L	1
上游引物	10 μmol/L	1
下游引物	10 μmol/L	1
探针	10 μmol/L	0.5
Taq DNA 聚合酶	5 U/μL	0.5
模板 DNA	10 μg/mL~100 μg/mL	2
ddH ₂ O		补足至 25

注：反应体系中各试剂的量可根据具体情况或不同的反应总体积或不同的反应总体积进行适当调整。

7.5.2 实时荧光 PCR 反应条件

反应条件为：预变性 95℃，10 s；变性 95℃，5 s；退火延伸 60℃，34 s，进行 40 个循环。不同仪器可根据仪器要求适当调整参数。

7.5.3 实时荧光 PCR 结果判断

以下条件有一条不满足时，实验视为无效：

- 空白对照：无荧光对数增长，相应的Ct值 >40.0 ；
- 阴性对照：无荧光对数增长，相应的Ct值 >40.0 ；
- 阳性对照：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 ；
- 18s内参照：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 。

7.6 结果判断

——空白、阳性对照试验和18s试验结果正常，样品两次平行试验有明显荧光信号检出，且Ct值均 ≤ 35.0 ，则判定被检样品阳性，判断该样品中含有大麦源性成分；样品两次平行试验无荧光信号检出，且Ct值均 ≥ 40 ，则判定被检样品阴性，判断该样品中不含有大麦源性成分；

——空白、阳性对照试验和18s试验结果正常，样品两次平行试验有明显荧光信号检出，Ct值在35~40，应重新进行实时荧光PCR反应，再次扩增后Ct值 <40 ，判断该样品中含有大麦源性成分；否则判断该样品中不含有大麦源性成分。
