

《大麦苗粉制品中大麦源性成分 PCR 检测方法》行业标准

（征求意见稿）编制说明

一、 工作简况

1、任务来源

2021 年 7 月，工信部发布《工业和信息化部办公厅关于印发 2021 年第二批行业标准制修订和英文版项目计划的通知》（工信厅科〔2021〕159 号），《大麦苗粉制品中大麦源性成分检测方法 PCR 法》（计划编号：2021-0845T-QB）列入轻工行业标准计划。主要起草单位包括中国食品发酵工业研究院等，本标准由全国特殊食品标准化技术委员会归口，完成年限 2023 年。

2、主要工作过程

起草阶段

计划下达后，工作组立即着手组织该项标准的制定工作，根据承担单位在项目立项前开展的基础研究情况，提出本标准的制定思路和框架，2022 年 7 月，秘书处组织通过网络会议形式召开了《大麦苗粉制品中大麦源性成分检测方法 PCR 法》行业标准起草启动会议，与会专家围绕本标准适用范围、其他检测方法及工作内容等进行充分讨论，并取得一致意见，并讨论后续工作安排和计划。

2022 年 7 月，工作组开展样品征集工作，为后续进行方法学研究提供了基础条件，本次从生产企业或自行采集样品共计 13 个，其中涵盖不同生产工艺和产品类型。2023 年 7-8 月，分别组织中国食品发酵工业研究院有限公司、天津科技大学、河北工程大学、浙江公正检验中心有限公司、安徽国泰众信检测技术有限公司和广州汇标检测技术中心等 6 家单位开展实验室间比对验证工作，所有样品由秘书处统一发送，各实验室按照标准草案中规定的实验方案进行验证，并按时返回实验结果，秘书处对比对结果汇总进行分析，各实验室比对结果结果较为一致，确认了利用特异性 PCR 技术和实时荧光 PCR 技术鉴别大麦源性成分的可行性、准确性、科学性，根据比对过程中各实验室操作中出现的状况，对标准草案进一步完善，并对上述所征集的所有样品进行普查，进一步验证本方法的适用性，初步了解我国大麦苗粉市场产品真实性的基本情况，形成标准征求意见稿。

二、 标准编制原则和主要内容

1、标准编制原则

- 1)、本标准以科学技术和实验数据为依据，结合产品实际情况，确保标准的科学性、先进性、可操作性。
- 2)、与现有的相关标准相配套与协调，进一步完善标准体系。
- 3)、保护消费者利益。
- 4)、促进行业的技术进步与健康发展，提升检测水平。

2、主要内容的论据

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）。

3、解决的主要问题

近年来，随着消费者对于绿色天然产品的需求逐步增强，大麦苗粉行业也在不断发展，市场上各种类似于大麦苗粉的产品开始不断涌现，大麦苗粉产品质量良莠不齐，市场上出现了小麦苗粉以及非大麦苗粉生产的产品冒充大麦苗粉，更有其他不同形态的蔬菜粉合成色素调成绿色充当大麦苗粉等现象。这些做法不但侵犯了消费者的合法权益，还会影响其身体健康，造成食品安全问题。我国也发布了 GB7718-2011《预包装食品标签通则》和 GB 13432-2013《预包装特殊膳食用食品标签通则》以及《食品标签国家标准实施指南》等相关标准法规，对产品标签及成分等进行了规定。

同时我国于 2021 年 5 月发布了《大麦嫩苗粉》行业标准，标准规定以大麦嫩苗为原料，经预处理、采用干燥、粉碎或破碎、灭菌等技术加工而成的粉末被称为大麦嫩苗粉，但是目前缺乏相应的检测标准。

因此本标准应用 PCR 扩增技术对大麦苗粉中的大麦源性成分进行快速、准确的检测，能够精准判定大麦苗粉产品是否与标签标注成分的一致性。可为监管部门提供技术支撑，同时对保障消费者的健康和权益，规范食品市场等具有十分重要的意义。

该标准的实施，将填补我国大麦苗粉制品中大麦源性成分检测方法标准的空白，为行业提供了一种快速、高精度、高灵敏性和低检出限的检测方法。大麦苗粉作为一种具有营养功能特性的食品，符合“健康中国”战略和“十三五”期间围绕大健康、大卫生和大医学的健康食品产业等提出的战略，积极推广和实施该标准，通过检测大麦苗粉中大麦源性成分的分析，对进一步提大麦苗粉产品质量，增强我国大麦苗粉市场竞争力具有十分重要的意义。

三、 主要试验（或验证）情况分析

第一法

本方法根据大麦Hordein基因设计并筛选出大麦特异性引物，建立了种属特异性PCR鉴别大麦苗粉制品中大麦源性成分检测方法，并通过特异性试验、灵敏性实验及市售样品进行检测试验，对PCR反应体系进行验证。结果显示该方法能够快速有效的检测出大麦苗粉制品中大麦源性成分，具有较强的特异性及灵敏性，灵敏度约为0.25 %（质量分数）。（详见附件1）。

第二法

本研究根据大麦基因设计并筛选出大麦特异性引物和探针及18s内参基因，进行荧光定量PCR扩增，建立了大麦源性成分检测方法。通过特异性、灵敏性及盲样检测试验，对体系进行验证。结果显示该方法能够快速有效的检测大麦苗粉制品中大麦源性成分，具有较强的特异性及灵敏性，灵敏度约为0.01 %（质量分数）；表明该体系可用于定性检测大麦苗粉制品中的大麦源性成分。（详见附件2）。

同时为验证法一（特异性 PCR 技术检测大麦苗粉中大麦源性成分检测方法）引物的特异性及方法稳定性、准确性和适用性，组织中国食品发酵工业研究院有限公司、天津科技大学、河北工程大学、浙江公正检验中心有限公司和广州汇标检测技术中心等 5 家单位对 12 种不同类型的大麦苗粉样品进行方法学验证比对，由秘书处统一盲样编号，发送各实验室，比对结果见表 1。

表 1 大麦苗粉制品中大麦源性成分检测结果汇总表

样品编号	配料表	Lab-1	Lab-2	Lab-3	Lab-4	Lab-5
DM-1	大麦苗	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
DM-2	大麦苗	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
DM-3	大麦苗	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
DM-4	大麦苗	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
DM-5	大麦苗	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
DM-6	大麦苗	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
DM-7	大麦嫩苗	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
DM-8	大麦苗	阳性	阳性	阴性	阳性	阳性
DM-9	大麦苗	阳性	阳性	阴性	阳性	阳性
DM-10	大麦苗	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
DM-11	小麦粉	阴性	阳性	阴性	阴性	阴性
DM-12	大麦苗	阳性	阳性	阴性	阳性	阳性

大麦苗粉样品 DM-1、DM-2、DM-3、DM-4、DM-5、DM-6、DM-7、DM-10 五家实验室对比检测结果均相同且与原料标注一致；CM-11 样品四家实验室比对检测结果相同且与原料标注一致，未在样品中检测出大麦源性成分，但 Lab-2 在 CM-11 样品中检测出了大麦源性成分，同时通过对 PCR 扩增片段测序后，与数据库中已有参考序列比对与大麦 X03103.1 基因序列相似性为 98.67%，因此考虑 CM-11 样品由于生产线上生产含有大麦源性成分造成污染或样品中含有大麦源性成分酶制剂、糊精等造成的假阳性的结果；同时 Lab-3 在 DM-8、DM-9 和 DM-12 样品中未检测到大麦源性成分，同时通过对几家实验室结果进行分析，考虑 DM-8、DM-9 和 DM-12 样品中 DNA 含量较低，同时由于 Lab-3 提取 DAN 的效率不高造成的假阴性的现象。

为验证法二（实时荧光 PCR 技术测大麦苗粉中大麦源性成分检测方法）中引物的特异性及方法稳定性、准确性和适用性，组织广州汇标检测技术中心、河北工程大学、天津科技大学、浙江公正检验中心有限公司和安徽国泰众信检测技术有限公司、等 5 家单位对由秘书处统一盲样编号，发送的 12 种大麦苗粉样品进行方法学验证比对，比对结果见表 2。

表 2 大麦苗粉制品中大麦源性成分检测结果汇总表

样品编号	配料表	Lab-2	Lab-3	Lab-4	Lab-5	Lab-6
DM-1	大麦苗	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
DM-2	大麦苗	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
DM-3	大麦苗	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
DM-4	大麦苗	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
DM-5	大麦苗	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
DM-6	大麦苗	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
DM-7	大麦苗	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
DM-8	大麦苗	阳性	阴性	阳性	阳性	阳性
DM-9	大麦苗	阳性	阴性	阳性	阳性	阳性
DM-10	大麦苗	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
DM-11	小麦粉	阳性	阴性	阴性	阴性	阳性
DM-12	大麦苗	阳性	阴性	阳性	阳性	阳性

应用法二对 12 个大麦苗粉样品进行检测，大麦苗粉样品 DM-1、DM-2、DM-3、DM-4、DM-5、DM-6、DM-7、DM-10 五家实验室对比检测结果均相同且与原料标注一致；CM-11 样品三家实验室比对检测结果相同且与原料标注一致，未在样品中检测出大麦源性成分，Lab-2 和 Lab-6 在 CM-11 样品中检测出了大麦源性成分，但其 Ct 值分别为 30.32 和 33.14，主要考虑是由于生产线上生产含有大麦源性成分造成污染或样品中含

有大麦源性分成酶制剂、糊精等造成的结果；Lab-3 其结果与第一法结果一致，在 DM-8、DM-9 和 DM-12 样品中未检测到大麦源性成分。同时通过对法一和法二的比较发现，法一和法二的检测结果较为一致，法一和法二均具有较好的稳定性和重复性。

四、 标准中涉及的专利的情况

本标准不涉及专利问题。

五、 预期达到的社会效益、对产业发展的作用等情况

该标准的实施，将填补我国大麦苗粉产品中大麦源性成分检测方法标准的空白，标准规定为行业提供了一种快速、高精度、高灵敏性和低检出限的检测方法。大麦苗粉作为一种具有营养功能特性的食品，符合“健康中国”战略和“十三五”期间围绕大健康、大卫生和大医学的健康食品产业等提出的战略。同时，《中国制造 2025》（国发〔2015〕28 号）中指出，加强标准体系建设，提高国家制造业创新能力；健全产品质量标准体系、政策规划体系和质量法律法规。此标准的制定有利于促进市场需求和产业发展，符合《中国制造 2025》（国发〔2015〕28 号）中的方针。积极推广和实施该标准，通过检测大麦苗粉中大麦源性成分的分析，对进一步提大麦苗粉产品质量，增强我国大麦苗粉市场竞争力具有十分重要的意义。

六、 与国际、国外比对情况

本标准没有采用国际标准。

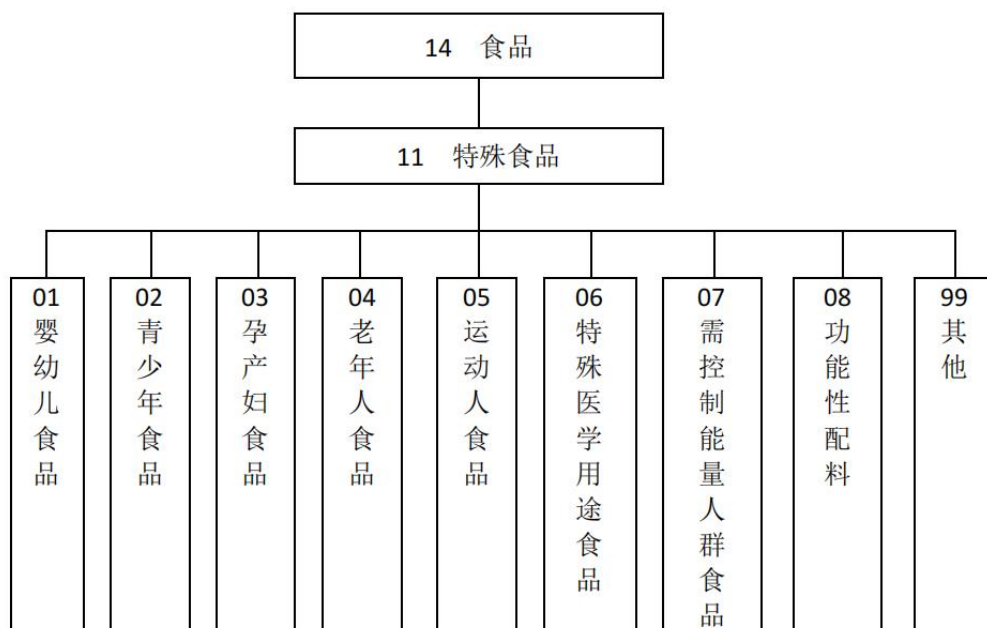
本标准制定过程中未查到同类国际、国外标准。

本标准制定过程中未测试国外的样品、样机。

本标准水平为国际水平。

七、在标准体系中的位置，与现行相关法律、法规、规章及标准，特别是强制性标准的协调性

本专业领域标准体系框图如图。



本标准属于食品标准体系“食品”大类，“特殊食品”中类，“其他”小类。

本标准与现行相关法律、法规、规章及相关标准协调一致。

八、重大分歧意见的处理经过和依据

无。

九、标准性质的建议说明

建议本标准的性质为推荐性行业标准。

建议本标准通过审核、批准发布之后，由相关部门组织力量对本标准进行宣贯，在行业内进行推广。

十、贯彻标准的要求和措施建议

建议本标准批准发布6个月后实施。

十一、废止现行相关标准的建议

无。

十二、其它应予说明的事项

全国食品工业标准化技术委员会罐头分技术委员会

2023年9月25日

第一法 种属特异性 PCR 法鉴别大麦苗粉制品中大麦源性成分

种属特异性PCR技术是一种放大扩增特定物种DNA片段的分子生物学技术，具有快速、灵敏、特异性高等特点，已被广泛应用于食品真实性鉴别检测中。本研究根据大麦Hordein基因设计并筛选出大麦特异性引物，建立了种属特异性PCR鉴别大麦苗粉制品中大麦源性成分检测方法，并通过特异性试验、灵敏性实验及市售样品进行检测试验，对PCR反应体系进行验证。结果显示该方法能够快速有效的检测出大麦苗粉制品中大麦源性成分，具有较强的特异性及灵敏性，灵敏度约为0.25%（质量分数）。

1 材料与方法

1.1 实验材料

新鲜菠菜、芹菜、西兰花、羽衣甘蓝采集自北京市超市和农贸市场，大麦苗粉样品一部分采集自生产企业、超市，一部分样品采集自网上渠道。

1.2 引物

根据大麦中的醇溶蛋白基因设计引物。引物由北京生工生物工程技术有限公司合成，各引物终浓度均为10 $\mu\text{mol/L}$ ，引物序列见表3。

表3 大麦特异性引物

物种	引物序列 (5'-3')	片段大小	来源
大麦	F:CTAGGTGGATGGATTCTCAC R: ATCATCGTATTCTCGCCTG	125bp	X03103

1.3 DNA 模板的提取

称取 30 mg~50 mg 样品于 1.5mL 离心管中，加入 700 μL 65 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 CTAB 缓冲液，混匀，置于 65 $^{\circ}\text{C}$ 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 700 μL 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。也可使用等效 DNA 试剂盒提取样品 DNA。

1.4 大麦源性成分 PCR 检测

PCR 反应采用 25 μL 体系：10 \times DNA buffer 2.5 μL ，模板 DNA 2 μL ，dNTPs (2.5mmol/L) 2 μL ，上、下游引物各 1 μL ，Taq DNA 聚合酶 0.3 μL ，ddH₂O 补足体积。扩增条件为：95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min，95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，35 个循环，72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min，扩增产物采用 2%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 引物特异性试验

分别以大麦苗粉制品、菠菜、芹菜、西兰花、羽衣甘蓝样品总 DNA 为扩增模板，使用 1.2 中大麦特异性引物对上述各种 DNA 进行 PCR 扩增反应，PCR 扩增产物采用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 灵敏性实验

将大麦和小麦苗烘干后研磨成粉，将大麦粉和小麦粉按质量混匀，制备出大麦苗成分占 2.5%、1%、0.5%、0.25% 的样品，将上述样品充分混匀，提取 DNA 为扩增模板，使用种属特异性引物进行 PCR 扩增。开展灵敏性试验获得本研究建立的种属特异性 PCR 检测方法的最低检测限。

1.7 市售样品检测

以市售的大麦嫩苗粉制品作为检测对象，根据商品的产品类别、制作工艺及产地，挑选出 12 种市售大麦嫩苗粉制品进行检测。提取出样品 DNA 并进行 PCR 扩增，设立以 ddH₂O 为模板的阴性对照，将扩增产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

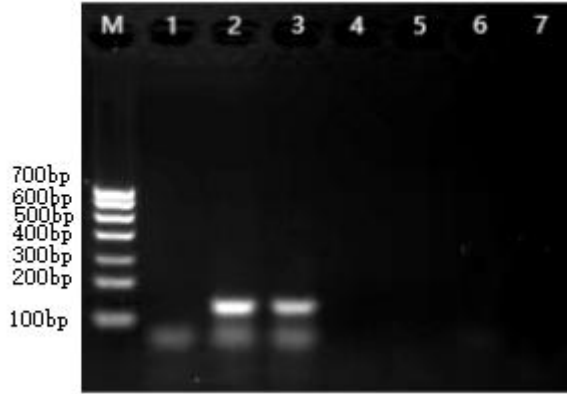
1.8 检测结果验证

为了验证 PCR 产物时引物特异性扩增的结果，避免假阳性，运用美国国家生物技术信息中心(US National Center for Biotechnology Information,NCBI)的 BLAST 程序，把样品的 PCR 产物测序结果与 Gen Bank 数据库中所收录的基因片段进行比对，从而保证 PCR 扩增的正确性。

2 结果与分析

2.1 特异性检测

使用大麦特异性引物对，分别以大麦苗、大麦苗粉制品、菠菜、芹菜、西兰花、羽衣甘蓝等样品总 DNA 为模板，进行 PCR 扩增反应，琼脂糖凝胶电泳结果见图 1。由图 1 可知，大麦苗和大麦苗粉样品对应的泳道上出现了大小为 125bp 的条带，只有大麦 DNA 可以被引物扩增，大麦引物特异性良好。

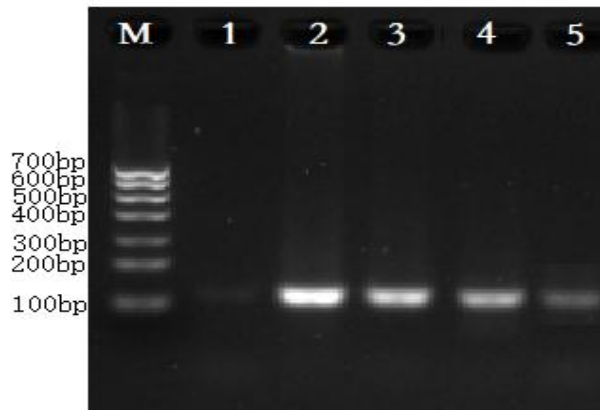


M-Marker; 1-阴性对照 (ddH₂O); 2-大麦苗; 3-大麦苗粉; 4-菠菜; 5-芹菜; 6-西兰花; 7-羽衣甘蓝

图 1 特异性实验

2.3 灵敏度试验

分别制得大麦占比为 2.5%、1%、0.5%、0.25%的 DNA 为扩增模板，进行 PCR 扩增，琼脂糖凝胶电泳结果如图 2 所示。结果显示大麦不同成分的含量为 0.25%的样品对应的泳道仍有明显条带，说明大麦源性成分检测灵敏度可达到 0.25%。0.25%大麦源性成分的掺杂对于商贩来说毫无利润，此方法检测限足够低，完全可以检测出市售商品中的大麦源性成分。



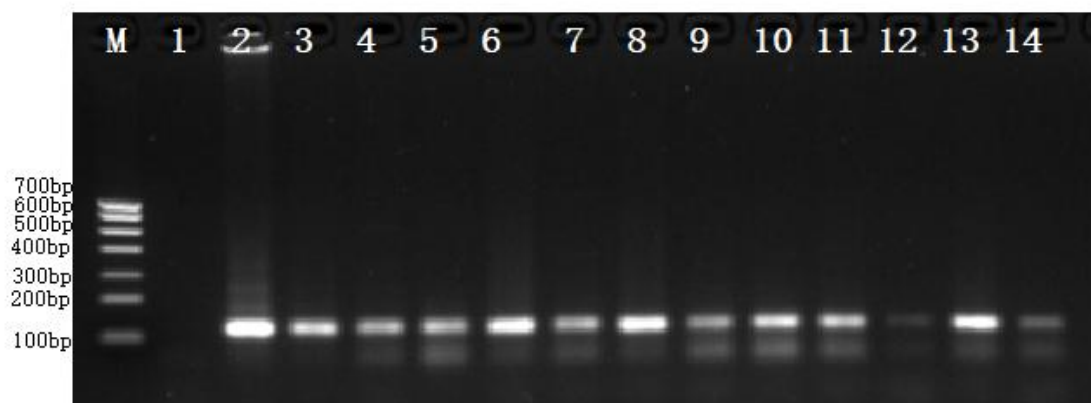
M-Marker; 1-阴性对照 (ddH₂O); 2-大麦含量 2.5%; 3-大麦含量 1%; 4-大麦含量 0.5%; 5-大麦含量 0.25%

图 2 灵敏性实验

2.4 市售样品的检测结果

以市售的大麦苗粉为检测对象，使用特异性引物对其 DNA 模板进行 PCR 扩增，引物扩增结果如图 3 所示。实验中大麦苗、12 种市售大麦嫩苗粉样品 PCR 扩增后电泳均出现目的片段大小的条带，且条带整齐明亮，空白对照为阴性，将上述 PCR 产物进行

测序，测序结果在 NCBI 上进行 BLAST 比对，比对结果见表 2。通过对 12 个市售样品进行检测发现，所有样品均检测出大麦源性成分，说明本方法适用于大麦苗粉中大麦源性成分的检测，且结果准确可靠，具有实际应用价值。



M-Marker; 1-阴性对照 (ddH₂O); 2-阳性对照; 3-大麦若叶青汁粉; 4-青汁; 5-大麦若叶青汁 100%粉; 6-大麦苗青汁粉; 7-大麦若叶青汁粉; 8-大麦若叶青汁固体饮料; 9-大麦若叶青汁粉; 10-大麦若叶青汁片; 11-麦绿素粉; 12-麦绿素粉; 13-麦绿素粉; 14-麦绿素粉;

图 3 大麦苗粉市售样品中大麦源性成分 PCR 扩增结果

表 4 大麦苗粉样品中大麦源性成分检测结果

编号	商品名称	相似序列	相似度/%	鉴别结果
1	大麦若叶青汁粉	X03103.1	100%	大麦
2	青汁	X03103.1	95.06%	大麦
3	大麦若叶青汁 100%粉	X03103.1	100%	大麦
4	大麦苗青汁粉	X03103.1	98.65%	大麦
5	大麦若叶青汁	X03103.1	96.6%	大麦
6	大麦若叶青汁固体饮料	X03103.1	96.05%	大麦
7	大麦若叶青汁粉	X03103.1	98.65%	大麦
8	麦绿素片片	X03103.1	98.63%	大麦
9	麦绿素粉	X03103.1	98.72%	大麦
10	麦绿素粉	X03103.1	100%	大麦
11	麦绿素粉	X03103.1	98.67%	大麦
12	麦绿素粉	X03103.1	98.63%	大麦

第二法 实时荧光 PCR 法鉴别大麦苗粉中大麦源性成分

由于实时荧光PCR 技术（Quantitative Real-time PCR）与普通PCR技术相比具有特异性强、准确性高、操作简便、速度快、结果判断直观，且其灵敏性高等特点，已逐渐成为食品真实性鉴别的主要方法。本研究根据大麦基因设计并筛选出大麦特异性引物和探针及18s内参基因，进行荧光定量PCR扩增，建立了大麦源性成分检测方法。通过特异性、灵敏性及盲样检测试验，对体系进行验证。结果显示该方法能够快速有效的检测大麦苗粉制品中大麦源性成分，具有较强的特异性及灵敏性，灵敏度约为0.01 %质量分数); 表明该体系可用于定性检测大麦苗粉制品中的大麦源性成分。

1 材料与方方法

1.1 实验材料

试验用菠菜、芹菜、西兰花、羽衣甘蓝采集自北京市超市和农贸市场，大麦苗粉样品一部分采集自生产企业、超市，一部分样品采集自网上渠道。

1.2 DNA 模板的提取

DNA 的提取同附件 1 中 1.3。

1.3 引物

18s内参基因以及大麦特异性引列见表5，各引物终浓度均为10 μ mol/L。

表5 种属特异性引物及探针序列

动物源性成分/内参	引物及探针名称	序列
18S	18SF	5'-CCTGAGAAACGGCTACCAT-3'
	18SR	5'-CGTGTCAGGATTGGGTAAT-3'
	18SP	5'FAM-TGCGCGCCTGCTGCCTTCCT-TAMRA3'
大麦	大麦F	5'-AACAGCTAAACCCATGCAAGGTA-3'
	大麦R	5'-GTTTCGGGGATTTGGGGTAGTTG-3'
	大麦P	5'-FAM-TCCTCCAGCAGCAGTGCAGCCCT-TAMRA-3'

1.4 实时荧光 PCR 扩增反应

1.4.1 实时荧光 PCR 反应体系

实时荧光PCR反应体系见表6。

表6实时荧光PCR 反应体系

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

1.4.2 实时荧光 PCR 反应条件

反应条件为：预变性 95°C，10 s；变性 95 °C，5 s；退火延伸 60°C，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。

1.4.3 引物与探针的特异性检测

分别以4种原料（菠菜、芹菜、西兰花、羽衣甘蓝）样品总DNA为扩增模板，使用表5中引物对上述各种DNA进行实时荧光PCR扩增反应，从而检测引物的特异性。

1.4.4 灵敏度检测

将大麦和小麦苗烘干后研磨成粉，将大麦粉和小麦粉按质量混匀，制成含大麦粉10%的混合样品。提取 DNA，将提取的 DNA 溶液进行连续 10 倍稀释，使其含量达到相当于实际样品大麦粉含量分别为 1%、0.1%、0.01%、0.001%、0.0001%，然后进行实时荧光 PCR 扩增。

2 结果与分析

2.1 特异性检测

结果表明设计的引物和探针具有高度的特异性，在实时荧光 PCR 反应体系中只能扩增出相应源性成分。结果见下图：

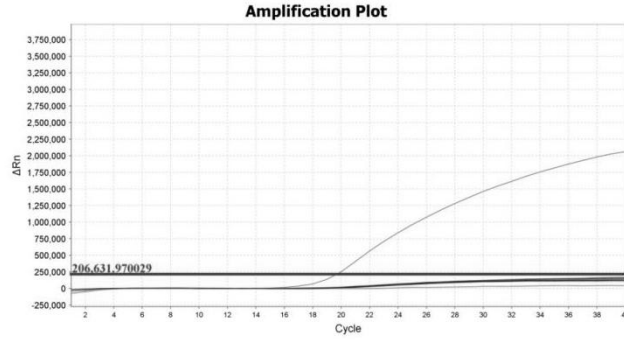


图4 性特异性检测结果

2.2 灵敏度检测结果

以制备好的大麦苗粉 DNA 样本作为模板进行实时荧光 PCR 扩增，结果见图 6-10。结果可见，当 DNA 样本浓度降低到 0.001%以下时，Ct 值降到 35 以下，并且偏差较大，因此本方法对于大麦源性的最低检出限为 0.01%，说明此方法有较好的检测灵敏度。

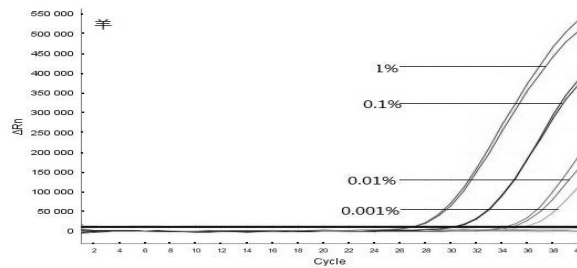


图5 灵敏度检测结果