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 albumim 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’-GCCCTCTACTCCACCCCCA-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-CCGTTTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAATCGAAC- 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℃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Eppordorf 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 μL CTAB缓冲液和40 μL 蛋白酶K溶液，振荡混匀，65℃孵育1 h（过夜孵育更好）, 期间每隔10 min振荡混匀；

（2）加入500 μL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℃预热的TE缓冲液溶解DNA；

（5）小心吸取上清，加入200 μL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50μLTE 缓冲液中。

5.2 DNA浓度和纯度的测定

取1μL DNA溶液，使用核酸蛋白分析仪检测其浓度及质量，OD260/280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25μL， 其中10×PCR缓冲液5μL，正反向引物（10μmol/L）各1μL，探针（10μmol/L）1μL，dNTPs（10μmol/L）2μL ，Taq DNA聚合酶（2.5U）0.2 μL，DNA模板（10-100ng/μL）2μL，用灭菌去离子水补足至总体积25μL。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℃ 2min； 95℃ 15min； 95℃ 15s， 60℃ 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≤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≤35.0，则判定为被检样品阳性；

(b)如Ct值≥40.0，则判定为被检样品阴性；

(c)如35.0＜Ct值＜40.0，则重复试验一次。如再次扩增后Ct值仍为35.0＜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。