



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4849.2—2017

出口食品及饮料中常见小浆果成分的 检测方法 实时荧光 PCR 法 第 2 部分：树莓

Identification of the ingredients of common small berry fruits
in food and juice for export—Real-time PCR method—
Part 2: Raspberry

2017-07-21 发布

2018-03-01 实施

中 华 人 民 共 和 国 发 布
国家质量监督检验检疫总局

前 言

SN/T 4849《出口食品及饮料中常见小浆果成分的检测方法 实时荧光 PCR 法》系列标准共分为 6 部分：

- 第 1 部分：蓝莓；
- 第 2 部分：树莓；
- 第 3 部分：黑加仑；
- 第 4 部分：桑葚；
- 第 5 部分：蔓越莓和蓝莓；
- 第 6 部分：猕猴桃。

本部分为 SN/T 4849 的第 2 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分起草单位：中国检验检疫科学研究院。

本部分主要起草人：吴亚君、陈颖、杨艳歌、邓婷婷、黄文胜、刘鸣畅、王斌、张九凯、韩建勋。

出口食品及饮料中常见小浆果成分的 检测方法 实时荧光 PCR 法 第 2 部分：树莓

1 范围

SN/T 4849 的本部分规定了出口食品及饮料中树莓成分的检测方法 实时荧光 PCR 法。

本部分适用于鲜果、冷冻果、蜜饯、鲜榨果汁、果肉型果汁、混浊汁、果干、果酱、及其他以树莓为原辅料的食品及饮料中树莓成分的定性检测(清汁及果酒除外),包括红树莓、黄树莓、黑树莓。此部分所规定方法的红树莓最低检出限(LOD)为 1%(体积比),黄树莓和黑树莓的最低检出限(LOD)为 0.1%(体积比)。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 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

GB/T 27657—2011 树莓

3 术语和定义、缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

小浆果 small berry fruits

浆果是指由一个子房或联合其他花器发育成的柔软多汁的肉质单果,由一个或几个心皮形成。小浆果则泛指果实较小、多汁的一类浆果。

3.1.2

树莓 raspberry

根据 GB/T 27657—2011 描述,树莓是蔷薇科悬钩子属植物的果实,聚合果,形状有圆头形、圆锥形和半球形等,根据颜色分为红树莓(*Rubus idaeus*)、黄树莓(*Rubus xamhocarpus*)、黑树莓(*Rubus occidentalis*)、紫树莓(*Rubus neglectus*)4 个种群。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

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

Ct 值:每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数

dNTP:脱氧核苷酸三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphate)
dATP:脱氧腺苷三磷酸(deoxyadenosine triphosphate)
dCTP:脱氧胞苷三磷酸(deoxycytidine triphosphate)
dGTP:脱氧鸟苷三磷酸(deoxyguanosine triphosphate)
dTTP:脱氧胸苷三磷酸(deoxythymidine triphosphate)
UNG:尿嘧啶 N-糖基化酶(uracil N-glycosylase)
CTAB:十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide)
Tris:三羟甲基氨基甲烷[Tris(Hydroxymethyl)aminomethane]
EDTA:乙二胺四乙酸(Ethylene diaminetetraacetic acid)
Taq:水生栖热菌(*Thermus aquaticus*)
OD:光度密度(optical density)

4 方法提要

果实样品直接粉碎离心,果汁样品直接离心,提取沉淀 DNA,果干、果酱、蜜饯先用蒸馏水清洗再提取 DNA。以树莓果实为阳性对照,以其他水果 DNA 为阴性对照,无菌水作为空白对照。使用特异性引物探针进行实时荧光 PCR 扩增,通过实时荧光信号曲线判定是否存在树莓成分。

5 试剂和材料

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

5.1 检测用引物和探针:树莓成分扩增引物和探针、内参照(显花植物 NADH 基因)引物和探针详见表 1。树莓引物扩增的靶标序列参见附录 A。

表 1 树莓序列引物探针

物种名称	引物/探针序列(5'→3')	扩增片段长度	靶基因
内参照	F:GCTGAAGCAGCTACTTTTCGAAGTAACA	138 bp	NADH dehydrogenase subunit B(<i>ndhB</i>) gene
	R:AGGAGCCGTGTGAGATGAAAGTCTCA		
	P:FAM-TGGAGTGGGAGAGTCAGAGTCGAAAAGAGG-BHQ1		
树莓	F:GTTATTCGTTGGAACCGTAGGAA	160 bp	NADH dehydrogenase (<i>ndhF</i>) gene
	R:GACTGAAAAAACTGCATTTGTGA		
	P:FAM-ATTATCCAAATTGTTAACCCCGTCCATAAACCT -TAMAR		

- 5.2 三氯甲烷(氯仿)。
- 5.3 异丙醇。
- 5.4 CTAB 提取缓冲液:20 g/L CTAB,1.4 mol/L NaCl,0.1 mol/L Tris-HCl,0.02 mol/L Na₂EDTA, pH 8.0。
- 5.5 CTAB 沉淀液:5 g/L CTAB,40 mmol/L NaCl。
- 5.6 70%乙醇(体积分数)。
- 5.7 NaCl 溶液(1.2 mol/L)。

5.8 蛋白酶 K(20 mg/mL)。

5.9 实时荧光 PCR 反应混合液:12.5 μ L 反应体系包括:1 U~2 U(Unit,酶学单位)的 *Taq* 酶、1 \times PCR buffer、2.5 mmol/L~4.0 mmol/L 的 Mg^{2+} 、0.2 U~1 U 的 UNG 酶、0.2 mmol/L 的 d(A,C,G)TPs、0.2 mmol/L~0.4 mmol/L dUTP、400 nmol/L ROX 染料。

5.10 10 \times PCR 缓冲液:200 mmol/L Tris-HCl(pH 8.4),200 mmol/L KCl, 15 mmol/L $MgCl_2$ 。

6 仪器设备

6.1 实时荧光 PCR 仪。

6.2 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。

6.3 恒温水浴锅。

6.4 离心机:离心力 $\geq 12\,000\,g$ 。

6.5 微量移液器:0.5 μ L~10 μ L,10 μ L~100 μ L,20 μ L~200 μ L,200 μ L~1 000 μ L。

6.6 粉碎装置。

6.7 涡旋振荡器。

6.8 pH 计。

6.9 量筒:容量 50 mL。

6.10 烘箱。

7 检测步骤

7.1 样品前处理

鲜果、冷冻果样品直接粉碎,6 000 r/min 离心,取沉淀物部分。

果干、果酱、蜜饯类样品先用蒸馏水浸泡清洗 3 次,再粉碎。

果汁样品取适量 15 000 r/min 离心 30 min,取沉淀部分。

7.2 DNA 提取

取 50 mg~500 mg 样品,加入 1 mL CTAB 提取缓冲液,同时加入 0.01 倍体积的 20 mg/mL 蛋白酶 K,65 $^{\circ}$ C 温育 1 h~2 h,期间不时振荡混匀,应保证样品自由悬浮于液体中,必要时再加入适量 CTAB 提取缓冲液;取出后 12 000 r/min 离心 10 min,转移上清至 2 mL 离心管中,加入 0.7 倍体积的三氯甲烷,剧烈振荡混匀,12 000 r/min 转速下离心 10 min;转移上清至另一灭菌的离心管中,再加入 0.7 倍体积的三氯甲烷,剧烈振荡混匀,室温下 12 000 r/min 离心 10 min;转移上清至干净离心管中,加入等体积的 CTAB 沉淀液混匀,室温沉淀 1 h;13 000 r/min 的转速离心 10 min;弃上清,加入 350 μ L 1.2 mol/L NaCl 溶液,充分溶解沉淀;加入 0.8 倍体积的异丙醇或 2 倍体积-20 $^{\circ}$ C 冰箱中预冷的无水乙醇混匀,-20 $^{\circ}$ C 放置 30 min,12 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min,弃上清,用 70%乙醇洗涤沉淀一次,12 000 g 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min,弃上清,室温下晾干。加入 50 μ L~100 μ L 双蒸水,室温 10 min,混匀,-20 $^{\circ}$ C 保存。

上述模板 DNA 均可用等效 DNA 提取试剂盒提取。

7.3 DNA 浓度和纯度的测定

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 的浓度按照式(1)计算:

$$c = A \times N \times 50 / 1\,000 \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：
 c ——DNA 浓度，单位为微克每微升($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)；
 A ——260 nm 处的吸光值；
 N ——核酸稀释倍数。
当 A_{260}/A_{280} 比值在 1.7~2.0 之间时，适宜于 PCR 扩增。

7.4 实时荧光 PCR 扩增

- 7.4.1 每个试样 PCR 反应设置 3 个重复。
7.4.2 实时荧光 PCR 反应体系见表 2。

表 2 实时荧光 PCR 反应体系

试剂	体积
实时荧光 PCR 反应混合液	12.5 μL
正向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.5 μL
反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.5 μL
探针(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.5 μL
DNA 模板(5 ng/ μL ~100 ng/ μL)	5.0 μL
灭菌 ddH ₂ O	6.0 μL

7.4.3 实时荧光 PCR 反应程序按如下条件进行。内参和树莓 *ndhF* 基因均为：50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min；95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min；95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s，60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min，40 个循环。

7.5 对照反应

- 7.5.1 所有试样均应同时设置平行的内参照检测与树莓特异性检测，各体系中除引物探针外，其余组分及反应条件均与 7.4 一致。
7.5.2 在试样 PCR 反应的同时，应设置阴性对照、阳性对照和空白对照，各对照反应体系中，除模板外，其余组分及反应条件应与 7.4 一致。

8 质量控制

- 以下条件有一条不满足时，实验视为无效：
- a) 空白对照：无荧光对数增长，相应的 Ct 值 >40.0 。
 - b) 阴性对照：无荧光对数增长，相应的 Ct 值 >40.0 。
 - c) 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 。

9 结果判断与表述

9.1 结果判定

- 在符合第 8 章的情况下，结果判定如下：
- a) Ct 值 ≤ 35 ，则判定为阳性。
 - b) $35 < \text{Ct 值} < 40$ ，则重复实验一次。再次扩增后，Ct 值 < 40 ，应查看相应的扩增曲线并结合荧

光信号判定结果;Ct 值 ≥ 40 ,则判定为阴性。

c) Ct 值 ≥ 40 ,则判定为阴性。

9.2 结果表述

9.2.1 内参照阴性,目标成分阴性,表述为“未提取到植物 DNA 组分”。

9.2.2 内参照阳性,目标成分阳性,表述为“检出树莓成分”。

9.2.3 内参照阳性,目标成分阴性,表述为“未检出树莓成分”。

10 检测过程中防止交叉污染的措施

检测过程中防止交叉污染的措施按照 GB/T 27403—2008 中附录 D 的规定执行。

附 录 A
(资料性附录)

树莓 *ndhF* 基因扩增靶标参考序列 (GeneBank: U95233.1)

树莓 *ndhF* 基因扩增靶标参考序列 (GeneBank: U95233.1) 为
GTTATTCGTTGGAACCGTAGGAATTCCTTTCTTCAATCAGGAAGGAATAGATTTAGATAT
ATTATCCAAATTGTTAACCCCGTCCATAAACCTTTTACATCAAAATCGAACCCACCCTGTC
GATTGGTATGAATTTATCACAAATGCAGTTTTTTTCAGTC。

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
出口食品及饮料中常见小浆果成分的
检测方法 实时荧光 PCR 法
第 2 部分:树莓

SN/T 4849.2—2017

*

中国标准出版社出版
北京市朝阳区和平里西街甲 2 号(100029)
北京市西城区三里河北街 16 号(100045)
总编室:(010)68533533

网址 www.spc.net.cn

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 14 千字
2018 年 6 月第一版 2018 年 6 月第一次印刷
印数 1—500

*

书号: 155066 · 2-33295 定价 16.00 元



SN/T 4849.2—2017