



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4849.6—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 6 部分：猕猴桃

Identification of the ingredients of common small berry fruits
in food and juice for export—Real-time PCR method—
Part 6: Kiwi

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 6 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。

本部分由中华人民共和国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：陈颖、邓婷婷、黄文胜、吴亚君、杨艳歌、刘鸣畅、韩建勋、张九凯、王斌。

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 6 部分：猕猴桃

1 范围

SN/T 4849 的本部分规定了出口食品及饮料中猕猴桃成分的检测方法 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、果干、果酱等以猕猴桃为原辅料的初加工食品及饮料中猕猴桃成分的定性检测(清汁及果酒除外)。本部分所规定方法的最低检出限(LOD)为 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

3 术语、定义和缩略语

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

猕猴桃 **kiwi**

藤黄目猕猴桃科猕猴桃属植物果实,果形一般为椭圆状,内部为绿色(或红色)果肉和一排黑色或者红色的种子。拉丁文名: *Actinidia Chinensis*。

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域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。以猕猴桃果实为阳性对照,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猕猴桃成分。

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:猕猴桃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。猕猴桃引物扩增的靶标序列参见附录 A。

表 1 猕猴桃序列引物探针

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:GCTGAAGCAGCTACTTTCGAAGTAACA	138 bp	NADH dehydrogenase subunit B(<i>ndhB</i>) gene
	R:AGGAGCCGTGTGAGATGAAAGTCTCA		
	P:FAM-TGGAGTGGGAGAGTCAGAGTCGAAAAGAGG-BHQ1		
猕猴桃	F:GCCCCATGGGTGACACTCT	69 bp	Internal Transcribed Spacer(<i>ITS</i>) gene
	R:AAGTTCCTTGACGCGTTTCG		
	P:FAM-CCGGTCAAACAACGAACCCCGG-BHQ1		

- 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 N_{a_2} EDTA, 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 蛋白酶 K(20 mg/mL)。
- 5.8 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。

5.9 10×PCR 缓冲液:200 mmol/L Tris-HCl(pH 8.4),200 mmol/L KCl,15 mmol/L MgCl₂。

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:最大离心力不小于 12 000 g。

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

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

取粉碎后的样品 50 mg~200 mg,加入 1 mL 裂解液,同时加入 0.01 倍体积的 20 mg/mL 蛋白酶 K,65 ℃温育 1 h~2 h,期间不时震荡混匀,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,剧烈震荡混匀,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,剧烈震荡混匀,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;弃上清,加入 350 μL 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 ℃冰箱中预冷的无水乙醇混匀,-20 ℃放置 30 min,12 000 r/min 4 ℃离心 10 min,弃上清,用 70%乙醇洗涤沉淀一次,12 000 g 4 ℃离心 10 min,弃上清,室温下晾干。加入 5 μL~100 μL 双蒸水,室温 10 min,混匀,-20 ℃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 $\mu\text{mol/L}$)	1.0 μL
反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)	1.0 μL
探针(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.5 μL
DNA 模板(5 ng/ μL)	5.0 μL
灭菌 ddH ₂ O	5.0 μL

7.4.3 实时荧光 PCR 反应程序按如下条件进行。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桑葚特异性检测,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“检出猕猴桃成分”。

9.2.3 内参照阳性,目标成分阴性,表述为“未检出猕猴桃成分”。

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)

猕猴桃 *ITS* 基因扩增靶标参考序列(Genebank:KC519784.1)

猕猴桃 *ITS* 基因扩增靶标参考序列(Genebank:KC519784.1)为

GCCCCATGGGTGACACTCTCATTCCCCGGTCAAACAACGAACCCCGGCGCGAAACGCGT
CAAGGAACTT。

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 6 部分:猕猴桃
SN/T 4849.6—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 5 月第一版 2018 年 5 月第一次印刷
印数 1—500

*

书号: 155066 · 2-33299 定价 16.00 元



SN/T 4849.6-2017