

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4848.3—2017

出口蜂蜜中常见蜜源植物成分的检测方法 实时荧光 PCR 法 第 3 部分:洋槐

Identification of common honey plant species in export honey—
Real-time PCR method—
Part 3: Locust tree

2017-07-21 发布

2018-03-01 实施

中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布



前 言

SN/T 4848《出口蜂蜜中常见蜜源植物成分的检测方法 实时荧光 PCR 法》共分为 8 部分：

- 第 1 部分：荆条；
- 第 2 部分：油菜；
- 第 3 部分：洋槐；
- 第 4 部分：桉树；
- 第 5 部分：椴树；
- 第 6 部分：龙眼；
- 第 7 部分：荔枝和龙眼；
- 第 8 部分：紫云英。

本部分为 SN/T 4848 的第 3 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、中华人民共和国安徽出入境检验检疫局。

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

出口蜂蜜中常见蜜源植物成分的检测方法

实时荧光 PCR 法

第 3 部分:洋槐

1 范围

SN/T 4848 的本部分规定了出口蜂蜜中洋槐成分的实时荧光 PCR 检测方法。

本部分适用于出口蜂蜜中洋槐成分的定性检测。本部分所规定方法的最低检出限(LOD)为 0.1% (质量百分比)。

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 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

蜂蜜 honey

蜜蜂采集植物的花蜜、分泌物或蜜露,与自身分泌物混合后,经充分酿造而成的天然甜物质。

3.2

洋槐 locust tree

洋槐(*Robinia pseudoacacia* L.),又名刺槐,豆科、蝶形花亚科、刺槐属植物。

3.3

实时荧光 PCR real time PCR

在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号的积累实时监控整个 PCR 扩增过程,实现对起始模板的定量及定性分析。

3.4

Ct 值 cycle threshold

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。

4 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)

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(cetyltrithylammonium 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)
FAM:羧基荧光素(Carboxyfluorescein)
TAMRA:羧基四甲基罗丹明(Carboxy-tetramethyl-rhoda mine)
BHQ1:黑洞猝灭基团 1(Black hole quencher1)

5 方法提要

提取样品 DNA,以洋槐来源 DNA 为阳性对照,以其它蜜源植物 DNA 为阴性对照,无菌水作为空白对照,使用特异性引物和探针进行实时荧光 PCR 扩增,观察实时荧光 PCR 的增幅现象判定是否存在洋槐成分。

6 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。

6.1 检测用引物和探针:洋槐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。洋槐引物扩增的靶标序列参见附录 A。

表 1 洋槐基因扩增引物探针序列

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:GCTGAAGCAGCTACTTTCTGAAGTAACA	138 bp	NADH dehydrogenase subunit B(<i>ndhB</i>)gene
	R:AGGAGCCGTGTGAGATGAAAGTCTCA		
	P:FAM-TGGAGTGGGAGAGTCAGAGTCGAAAAGAGG-BHQ1		
洋槐	F:GCTCAACCAGGAACGATC	112 hp	maturase-lik protein (<i>matK</i>)gene
	R:GCAGCATTTGACTACGTACCA		
	P:FAM-CATAAACCTATTATCCGAACATTCATTTC-TAMRA		

- 6.2 三氯甲烷(氯仿)。
6.3 异丙醇。
6.4 体积分数为 70%的乙醇。
6.5 NaCl 溶液(1.2 mol/L)。

- 6.6 蛋白酶 K(20 mg/mL)。
- 6.7 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。
- 6.8 CTAB 沉淀液:5 g/L CTAB,40 mmol/L NaCl。
- 6.9 10×PCR 缓冲液:200 mmol/L Tris-HCl(pH 8.4),200 mmol/L KCl,15 mmol/L MgCl₂。
- 6.10 实时荧光 PCR 反应混合液:12.5 μL 反应体系包括:1 U~2U (Unit,酶学单位)的 *Taq* 酶、1× PCR buffer、2.5 mmol/L~4.0 mmol/L 的 Mg²⁺、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(某些荧光 PCR 仪无需 ROX 校正)。

7 仪器设备

- 7.1 实时荧光 PCR 仪。
- 7.2 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。
- 7.3 恒温水浴锅。
- 7.4 离心机:离心力≥12 000 *g*。
- 7.5 微量移液器:0.5 μL~10 μL,10 μL~100 μL,20 μL~200 μL,200 μL~1 000 μL。
- 7.6 恒温混匀仪。
- 7.7 涡旋震荡器。
- 7.8 pH 计。
- 7.9 量筒:容量 50 mL。
- 7.10 烘箱。

8 检测步骤

8.1 DNA 提取

8.1.1 蜂蜜沉淀 DNA 提取

- 8.1.1.1 蜂蜜样品 50 °C 水浴 20 min 至充分融化,上下颠倒混匀。
- 8.1.1.2 取 20 mL 蜂蜜样品,分成 2 管,每管 10 mL 于 50 mL 离心管中,加入无菌双蒸水至 30 mL,涡旋混匀,4 000 r/min 离心 10 min,吸出上清(4 °C 贮存备用)。
- 8.1.1.3 沉淀部分用 1 mL 无菌水洗脱,分装于 2 mL 离心管中,12 000 r/min 离心 5 min,去除上清。
- 8.1.1.4 加入 600 μL CTAB 提取缓冲液,置于 65 °C 恒温混匀仪中温育 1 h~2 h,转速为 650 r/min;12 000 r/min 离心 10 min。
- 8.1.1.5 转移上层清液至 2 mL 离心管中;加入 0.7 倍体积的三氯甲烷,剧烈震荡混匀,室温下 12 000 r/min 离心 10 min。
- 8.1.1.6 加入等体积 CTAB 沉淀液混匀,13 000 r/min 离心 10 min。
- 8.1.1.7 弃上清,加入 350 μL 1.2 mol/L NaCl 溶液,充分溶解沉淀。
- 8.1.1.8 加入 0.8 倍体积的异丙醇混匀,-20 °C 放置 0.5 h~1 h,12 000 r/min 转速 4 °C 离心 10 min~15 min。
- 8.1.1.9 弃上清,用 70%乙醇洗涤沉淀一次,12 000 r/min 转速下 4 °C 离心 10 min。
- 8.1.1.10 弃上清,室温下晾干。加入 50 μL~100 μL 双蒸水,溶解沉淀,-20 °C 保存。

8.1.2 蜂蜜上清 DNA 提取

将上清分装到 2 个 50 mL 离心管中,每管 20 mL,参照附录 B 步骤进行核酸 DNA 提取,DNA 存放

于-20℃保存。

8.2 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：

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

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。

8.3 实时荧光 PCR 扩增

8.3.1 实时荧光 PCR 反应体系

实时荧光 PCR 反应体系的反应条件见表 2。

表 2 实时荧光 PCR 反应体系

试 剂	体 积	
	内参照	洋槐
实时荧光 PCR 反应混合液	12.5 μL	12.5 μL
正向引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)	0.5 μL	0.5 μL
反向引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)	0.5 μL	1 μL
探针(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)	0.5 μL	0.25 μL
DNA(模板 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ ~200 $\text{ng}/\mu\text{L}$)	5.0 μL	5.0 μL
无菌 ddH ₂ O	6 μL	5.75 μL

8.3.2 实时荧光 PCR 反应程序

内参照基因和洋槐 *matK* 基因扩增程序均为：50℃ 2 min；95℃ 预变性 10 min；95℃ 15 s，60℃ 1 min，40 个循环。

9 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 C_t 值>40.0。
 - b) 阴性对照：无荧光对数增长，相应的 C_t 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 C_t 值≤30.0。

10 结果判断与表述

10.1 结果判定

在符合第 9 章的情况下，结果判定如下：

- a) Ct 值 ≤ 35 ,则判定为阳性。
- b) Ct 值 ≥ 40 ,则判定为阴性。
- c) $35 < \text{Ct 值} < 40$,则重复实验一次。再次扩增后 Ct 值 < 40 ,则判定为阳性;Ct 值 ≥ 40 ,则判定为阴性。

10.2 结果表述

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

10.2.2 内参照阳性,目标成分阳性,表述为“检出洋槐成分”。

10.2.3 内参照阳性,目标成分阴性,表述为“未检出洋槐成分”。

11 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)

洋槐成分的基因扩增靶标参考序列(GenBank:HM851141.1)

洋槐成分的基因扩增靶标参考序列(GenBank:HM851141.1)为:

GCTCAACCAGGAACGATCCACATAAACCTATTATCCGAACATTCATTTCACTTTTGTAG
GCTATTTTTTTAAATGTGCGACTAAATCGTTCAGTGGTACGTAGTCAAATGCTGC。

附 录 B
(资料性附录)
试剂盒组成及使用说明

B.1 试剂盒组成

表 B.1 Wizard® Magnetic 食品 DNA 纯化试剂盒组成

试剂名称	体积	产品分类编号
裂解液 A/L ysis Buffer A, Food	100 mL	A8191
裂解液 B/L ysis Buffer B, Food	100 mL	Z3191
沉淀溶液/precipitation Solution, Food	150 mL	Z3201
注：以 Promega 公司 Wizard® Magnetic 食品 DNA 纯化试剂盒 (Genomic DNA from Food) 为例。也可采用其他等效试剂盒。		

B.2 操作步骤

上清分装到 2 个 50 mL 离心管中,每管 20 mL,分别加入 4 mL 裂解液 A、2 mL 裂解液 B,充分混匀,静置 10 min。加入 5 mL 沉淀溶液,震荡混匀。加入 150 μ L 磁珠和 0.9 倍体积的异丙醇,室温静置 1 h,期间不时颠倒,置磁力架上 5 min,小心去除水相,其余步骤参照试剂盒说明书。

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
出口蜂蜜中常见蜜源植物成分的检测方法
实时荧光 PCR 法
第 3 部分:洋槐
SN/T 4848.3—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 16 千字
2018 年 8 月第一版 2018 年 8 月第一次印刷
印数 1—500

*

书号: 155066 · 2-33267 定价 16.00 元



SN/T 4848.3—2017