

# SN

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4782—2017

### 出口食品及调味品中罂粟成分检测方法 实时荧光 PCR 法

Detection of *Papaver* in export food and condiment—  
Real time PCR method

2017-05-12 发布

2017-12-01 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

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国上海出入境检验检疫局、中华人民共和国安徽出入境检验检疫局、中华人民共和国山东出入境检验检疫局、上海市质量监督检验技术研究院。

本标准起草人：杨捷琳、高琴、宗凯、刘洋、刘月明、吕蓉、李想、潘良文、何宇平。

# 出口食品及调味品中罂粟成分检测方法 实时荧光 PCR 法

## 1 范围

本标准规定了食品及调味品中罂粟成分检测的实时荧光 PCR 方法。

本标准适用于食品及调味品中罂粟成分定性检测。本标准所规定方法的最低检出限(LOD)为 0.01%(质量分数)。

## 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 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

SN/T 1193 基因分析检测实验室技术要求

## 3 术语和定义

下列术语及定义适用于本文件。

### 3.1

罂粟 *Papaver somniferum* L.

按《中国植物志》,特指鸦片罂粟,为一种直立的一年生罂粟属草本植物。

## 4 方法提要

本标准采用实时荧光 PCR 特异性检测食品及调味品中罂粟成分。设计了针对罂粟小檗碱桥酶基因的特异性引物探针,采用 Taqman 实时荧光方法进行检测。

## 5 试剂和材料

### 5.1 引物及探针(罂粟小檗碱桥酶基因 *Papaver somniferum* berberine bridge enzyme bbel):

——上游引物:5'-GTTCTTAGGCTTACACTTGGGACG-3';

——下游引物:5'-ACCGGGCTGTTCTGATAACATCT-3';

——探针:FAM-TTTCAAGAAATGAGTTGGGGTGAATCC-BHQ1。

### 5.2 石油醚。

5.3 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 Na<sub>2</sub>EDTA, pH8.0。

5.4 蛋白酶 K(20 mg/mL)。

5.5 三氯甲烷(氯仿)。

5.6 CTAB 沉淀液:5 g/L CTAB,40 mmol/L NaCl。

- 5.7 1.2 mol/L NaCl 溶液。
- 5.8 异丙醇。
- 5.9 70%乙醇。
- 5.10 质控物质:罂粟阳性物质。

## 6 仪器和设备

- 6.1 实时荧光 PCR 仪。
- 6.2 恒温水浴锅。
- 6.3 均质器。
- 6.4 涡旋震荡器。
- 6.5 离心机:最大转速 16 000g。
- 6.6 移液器:2.5  $\mu$ L、20  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1 000  $\mu$ L。
- 6.7 核酸浓度测定仪。
- 6.8 大体积浓缩仪。

## 7 检验步骤

### 7.1 样品前处理

#### 7.1.1 一般样品

取 25 g 样品,研磨均质,称取 200 mg 样品至 2 mL 离心管中,按照步骤 7.2 提取 DNA。

#### 7.1.2 高油脂含量样品

称取 250 g 样品(预包装产品可加热溶解),倒入 500 mL 烧杯中,静置 1 h~2 h,样品可分为 3 层,上层是油脂,中间是水相,下层是固体残渣。去除上层油脂,吸取水相到分液漏斗中,加入 100 mL 石油醚(5.2),震荡 5 min 后静置,收集下层水相。采用大体积浓缩仪,40  $^{\circ}$ C~60  $^{\circ}$ C 抽真空及低速离心条件下,将水相浓缩至 1 mL~5 mL。取浓缩后水相与固体残渣混合,转移到 100 mL 烧杯中,研磨均质,取 200 mg 到 2 mL 离心管中,采用 7.2 方法提取 DNA。

### 7.2 DNA 提取

按照下述 CTAB 法提取 DNA,也可采用等效的 DNA 提取试剂盒。

在样品中加入 1 mL CTAB 提取缓冲液(5.3)和 20  $\mu$ L 蛋白酶 K(5.4)溶液,混匀,65  $^{\circ}$ C 水浴 1 h。10 000g 离心 10 min,取上清转移至 2 mL 离心管中,加入 700  $\mu$ L 氯仿(5.5),涡旋震荡 30 s 混匀。10 000g 离心 10 min,收集上清至新的 2 mL 离心管中,加入 2 倍体积的 CTAB 沉淀液(5.6),室温放置 60 min。10 000g 离心 10 min,弃上清。沉淀溶于 350  $\mu$ L 1.2 mol/L NaCl 溶液(5.7),涡旋震荡 30 s 溶解沉淀。加入 350  $\mu$ L 氯仿,涡旋震荡 30 s 混匀,10 000g 离心 10 min。将上清转移至新的离心管中,加入 0.8 倍体积的异丙醇(5.8),室温放置 25 min。10 000g 离心 10 min,弃上清,加入 500  $\mu$ L 70%乙醇(5.9)洗涤沉淀。涡旋震荡 30 s,10 000g 离心 10 min,弃上清,室温干燥 10 min,加入 50  $\mu$ L~80  $\mu$ L 无菌水溶解 DNA。

提取的 DNA 用核酸浓度测定仪测定浓度后,调整 DNA 浓度至 20 ng/ $\mu$ L~100 ng/ $\mu$ L 之间。



### 7.3 实时荧光 PCR 检测

#### 7.3.1 反应体系

总体积为 25  $\mu\text{L}$ , 其中含:  $2\times\text{PCR}$  缓冲液(含 *Taq* DNA 聚合酶)12.5  $\mu\text{L}$ 、引物对(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 1  $\mu\text{L}$ 、探针(10  $\mu\text{mol/L}$ )1  $\mu\text{L}$ 、模板 DNA 5  $\mu\text{L}$ (模板量控制在 20  $\text{ng}/\mu\text{L}\sim 100\text{ ng}/\mu\text{L}$ ), 体积用水补足。

#### 7.3.2 反应条件

50  $^{\circ}\text{C}$  2 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  10 min; 扩增: 95  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 58  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 58  $^{\circ}\text{C}$  时收集荧光, 扩增步骤共进行 45 个循环。

### 7.4 质量控制

7.4.1 检测过程中分别设阳性对照、提取对照、空白对照。阳性对照(5.10)为罂粟阳性物质 DNA, 空白对照为无菌水, 提取对照为采用无菌水作为提取起始物得到的 DNA, 用于监测 DNA 提取过程中有无污染。

7.4.2 阳性对照  $C_t$  值  $< 35$ , 且有典型指数型扩增曲线。

7.4.3 空白对照无扩增。

### 7.5 结果与报告

7.5.1 在符合 7.4 质量控制要求情况下, 检测样本  $C_t$  值小于或等于 40.0 时, 报告检出罂粟成分。

7.5.2 检测样本  $C_t$  值大于 40.0 且小于 45.0 时, 重复一次, 如果  $C_t$  值仍小于 45.0, 且有典型指数型扩增曲线, 可报告检出罂粟成分, 否则报告未检出罂粟成分。

7.5.3 检测样本无明显扩增曲线时, 报告未检出罂粟成分。

### 7.6 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 和 SN/T 1193 的规定执行。

---

中华人民共和国出入境检验检疫  
行 业 标 准  
出口食品及调味品中罂粟成分检测方法  
实时荧光 PCR 法  
SN/T 4782—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](http://www.spc.net.cn)

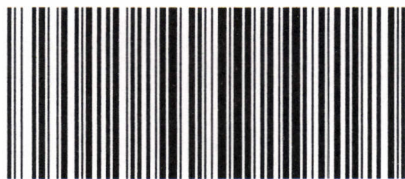
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

\*

开本 880×1230 1/16 印张 0.5 字数 8 千字  
2018 年 3 月第一版 2018 年 3 月第一次印刷  
印数 1—500

\*

书号: 155066 • 2-32785 定价 14.00 元



SN/T 4782-2017