

T/GBC

广西物品编码与标准化促进会团体标准

T/GBC 92—2025

八角茴香真伪快速鉴别 实时荧光 PCR 法

Quick identification of authenticity of anisi stellati fructus—
Real-time PCR method

2025 - 09 - 22 发布

2025 - 10 - 22 实施

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

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专利的责任。

本文件由广西-东盟食品检验检测中心[国家市场监督管理总局技术创新中心（天然香料香精）]提出。

本文件由广西物品编码与标准化促进会归口。

本文件起草单位：广西-东盟食品检验检测中心[国家市场监督管理总局技术创新中心（天然香料香精）]、玉林市食品药品检验检测中心、广州双螺旋基因技术有限公司、广西民生中检联检测有限公司、广西壮族自治区标准技术研究院、广电计量检测（南宁）有限公司、玉林师范学院、江西省检验检测认证总院工业产品检验检测院、南通中智检测服务有限公司。

本文件主要起草人：李锐、陈宇、王海波、冯婷、巫坚、卢森华、樊文研、韦涛、张璜、陈灏挺、戴向东、韦春梦、韦兰青、陆柔、黄海霞、杨尚超、邓玉秀、韦升坚、谢庆剑、钟超凡、卢艺、赵刚、苏周雯、黄漫漫、杜妮、王书龙、丘一仙、唐明华、周晓婷、韦应、麦荣阳、陆峥莹、李玉群、雷奇焱、孙竟雅。

本标准版权为广西物品编码与标准化促进会所有，除了用于国家法律或事先得到广西物品编码与标准化促进会的许可外，不得以任何形式或任何手段复制、再版或使用本标准及其章节，包括电子版、影印件，或发布在互联网及内部网络等。

八角茴香真伪快速鉴别 实时荧光 PCR 法

1 范围

本文件界定了八角茴香真伪快速鉴别 实时荧光PCR法的术语和定义，规定了八角茴香真伪快速鉴别 实时荧光PCR法的缩略语、原理、试剂和材料、仪器设备、试样制备、检验步骤、质量控制措施、结果判定及表述和检测过程中防止交叉污染的措施。

本文件适用于八角茴香的原果、碎体及粉末真伪的实时荧光PCR鉴别，八角茴香鲜果可参照执行。检出限（LOD）5%（质量分数）。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 19495.3 转基因产品检测 核酸提取纯化方法

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

八角茴香 *anisi stellati fructus*

又称八角，为木兰科植物八角茴香 *Illicium verum* Hook. f. 的干燥成熟果实。秋、冬二季果实由绿变黄时采摘，置沸水中略烫后干燥或直接干燥。

3.2

实时荧光 PCR *Real-time PCR*

在PCR反应体系中加入荧光基团，通过荧光信号的积累实时监控整个PCR扩增过程。

[来源：GB/T 38164—2019, 3.1.1]

3.3

Ct 值 *cycle threshold*

每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。

[来源：GB/T 38164—2019, 3.1.2]

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DNA: 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic acid)

CTAB: 十六烷基三甲基溴化铵 (Cetyltrimethylammonium bromide)

RNA酶: 核糖核酸酶 (Ribonuclease)

TE: 三羟甲基氨基甲烷 乙二胺四乙酸 (Tris EDTA)

OD: 光密度值 (Optical density)

5 原理

基于CTAB前处理方式提取植物源性成分的特异核苷酸片段，以八角茴香DNA为模板，利用八角茴香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PCR扩增反应产物荧光信号及扩增曲线判定，实现对样品中植物源性成分的定性分析

6 试剂和材料

6.1 试剂

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中一级水的要求。试剂配制按照GB/T 19495.3执行。所有试剂均用无DNA酶污染的容器分装。

6.2 检测用引物和探针

引物和探针序列见表1。

表1 引物和探针序列

引物名称	序列	基因来源
八角茴香	F: TCGATGGTCCCTTGAGGAGTA	NCBI
	R: GCGCCGATGTTGTTGTT	NCBI
	P: FAM-AGAAACATGGGAGGGTGG-MGB	NCBI
注：F代表上游引物；R代表下游引物；P代表探针。		

6.3 材料

6.3.1 灭菌的离心管和移液器吸头。

6.3.2 2 mL 收集管。

7 仪器设备

7.1 实时荧光 PCR 仪。

7.2 核酸蛋白分析仪。

7.3 微量移液器（10 μ L、100 μ L、200 μ L、1000 μ L）。

7.4 恒温振荡水浴。

7.5 离心机（最大转速 14 000 r/min）。

7.6 涡旋振荡器。

7.7 组织粉碎机。

7.8 电子天平：感量 0.001 g。

7.9 高压灭菌锅。

8 试样制备

原料样品：用组织粉碎机把样品粉碎，备用。

9 检验步骤

9.1 样品 DNA 提取

在核酸提取区进行。称取15 mg~40 mg的样品或50 mg~150 mg的鲜果样品置于2 mL离心管中，加入600 μ L的CTAB-1提取缓冲液(pH8.0)和20 μ L的RNA酶，振荡混匀，65℃孵育45 min~60 min，期间每隔10 min振荡混匀；反应完后冷却10 min，加入500 μ L的苯酚[C₆H₅OH]：三氯甲烷[CHCl₃]：异戊醇[C₅H₁₂O]（25：24：1）充分振荡混匀，静置10 min，12 000r/min离心5 min；小心吸取250 μ L~400 μ L上

清液至洁净的1.5 mL离心管内，加入等体积的异丙醇[C₃H₈O]振荡混匀，12 000r/min离心5 min；弃去上清液，500 μL的70%乙醇[C₂H₆O]洗涤2次，12 000r/min离心5 min，弃上清液，晾干；加入50 μL~100 μL的TE缓冲液（pH8.0）或无菌双蒸水，溶解DNA，-20℃保存备用。同法提取阳性对照、阴性对照。或使用商品化的植物基因组DNA提取试剂盒进行提取。

9.2 DNA 浓度和纯度的测定

取1 μL的DNA溶液，使用核酸蛋白分析仪检测其浓度及质量，浓度大于30 ng/μL且OD₂₆₀/OD₂₈₀在1.7~1.9之间时，适宜于PCR扩增。

9.3 实时荧光 PCR 检测

反应体系总体积25 μL，2×实时荧光定量PCR反应液12.5 μL；上游引物（10 μmol/L）1 μL；下游引物（10 μmol/L）1 μL；探针（10 μmol/L）0.5 μL；样品DNA或对照5 μL；超纯水5 μL。也可使用等效的商品化扩增试剂盒。

反应参数：37℃ 10 min；95℃ 5 min；95℃ 15 s，60℃ 60 s，40个循环，在循环反应60℃ 60 s采集荧光信号。

9.4 实验对照

实验过程分别设阳性对照、阴性对照、空白对照。以八角茴香物种提取的DNA为阳性对照，以已知不含八角茴香的物种DNA为阴性对照，以灭菌水为空白对照。样品和对照应设置两个平行的反应体系。

10 质量控制措施

以下条件有一条不满足时，试验视为无效：

- a) 空白对照：无荧光信号检出，Ct 值应 ≥ 40.0 或无Ct 值；
- b) 阴性对照：无荧光信号检出，Ct 值应 ≥ 40.0 或无Ct 值；
- c) 阳性对照：有荧光信号检出，且出现典型的扩增曲线，Ct 值 < 35.0 。

上述三项若有一项不符合，应重新进行扩增；如再次扩增后依然不完全符合上述三点，则实验无效。

11 结果判定及表述

11.1 结果判定

在符合10中3个对照组的情况下，检测结果按以下进行判定：

- a) 如Ct 值 ≤ 35.0 ，曲线呈“S”型扩增曲线，可判定样品检出八角茴香源性成分；
- b) 如Ct 值 ≥ 40.0 或无Ct 值，曲线为直线或轻微斜线，无“S”型扩增曲线，可判定样品未检出八角茴香源性成分；
- c) 如 $35.0 < \text{Ct 值} < 40.0$ ，应调整模板浓度，重复一次。如再次扩增后Ct 值仍为 < 40.0 ，则判定样品检出八角茴香源性成分；如再次扩增后Ct 值 ≥ 40.0 ，则判定为样品未检出八角茴香源性成分。

11.2 结果表述

11.2.1 结果为阳性者，表述为“检出八角茴香源性成分”。

11.2.2 结果为阴性者，表述为“未检出八角茴香源性成分”。

12 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。