

T/NAIA

团体标准

T/NAIA 000-2024

植物源性食品中番茄源性成分的检测 实时荧光 PCR 法

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 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。

本文件由宁夏化学分析测试协会提出并归口。

本文件起草单位：宁夏回族自治区食品检测研究院、宁夏计量质量检验检测研究院、银川海关技术中心。

本文件主要起草人：岳苑、冯秀娟、何淑桢、苏洋、高俊峰、姚博伟，魏嘉雯、贺生芳。

植物源性食品中番茄源性成分的检测 实时荧光 PCR 法

1 范围

本标准规定了植物源性食品中番茄源性成分的实时荧光PCR检测方法。
本标准适用于植物源性食品中番茄源性成分的Taqman探针实时荧光PCR定性检测。

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 27403 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 实时荧光 PCR real-time PCR

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

3.2 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。

4 原理

提取试样中基因组DNA，以DNA为模板，利用番茄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。根据扩增的Ct值，判定试样中是否含有番茄源性成分。

5 试剂与材料

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

5.1 引物与探针

5.1.1 内参照（18S）

引物：5'-CCTGAGAAACGGCTACCA-3'
5'-CGTGTTCAGGATTGGGTAAT-3'
探针：VIC-TGCGCGCCTGCTGCCTTCCT-BHQ1

5.1.2 番茄源性成分

引物：5'-AGACCACGAGAACGATATTTGC-3'
5'-TTCTTGCCTTTTCATATCCAGACA-3'
探针：FAM-CTCTTTGCAGTCCTCCCTTGGGCT-BHQ1

- 5.2 植物基因组 DNA 提取试剂盒：提取步骤及使用注意事项参见附录 A。
 5.3 荧光定量 PCR 反应预混液：使用方法及使用注意事项参见附录 B。
 5.4 1.5mL 离心管，PCR 八联管
 5.5 微量可调移液器配制吸头：10μL，100μL，1000μL。

6 仪器设备

- 6.1 实时荧光定量 PCR 仪。
 6.2 高速冷冻离心机（>12000r/min）。
 6.3 核酸蛋白分析仪。
 6.4 微量可调移液器：量程 0.5μL~10μL；量程 10μL~100μL；量程 100μL~1000μL。
 6.5 恒温加热器。
 6.6 分析天平（感量 0.1mg）。
 6.7 高压灭菌器。
 6.8 干热灭菌器。

7 检验步骤

7.1 样品前处理

7.1.1 总则

对样品进行前处理，处理后的样品分成三等，包括待检样品、复检样品、留存样品。

7.1.2 制备

固态样粉碎后收集到50mL离心管或密封袋中，半固态与液态混匀后分装于50mL离心管或密封袋中，4~8℃保存。

7.2 DNA 提取

在样本制备区进行，采用等效的植物基因组DNA提取试剂盒进行DNA提取。每个样品应制备2个测试样品提取DNA。

7.3 DNA 浓度测定和定量

将DNA溶液做适当稀释,使用核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计分别检测260nm和280nm处的吸光值。 $1\text{OD}_{260\text{nm}}=50\mu\text{g/mL}$ 双链DNA或 $38\mu\text{g/mL}$ 单链DNA。DNA的浓度按照式(1)计算，当OD260/OD280比值在1.5~2.1之间时，适宜于PCR扩增。扩增前将所有样品DNA稀释至10ng/μL~50 ng/ μL。

$$C = \frac{A \times N \times 50}{1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

C——DNA浓度，单位为ng/μL

A——260nm处的吸光值

N——稀释倍数

8 实时荧光 PCR 检测

8.1 扩增试剂准备

为确保检测结果的准确性，在进行实际样品检测时，应设立空白对照、阴性对照和阳性对照实验。实时荧光PCR反应体系见表1。从荧光定量PCR反应预混液（参见附录B）中取出相应的实时荧光PCR反应应用试剂，融化后，瞬时离心5s后再用。每个样品设置2个平行重复。

表1 实时荧光 PCR 反应体系

试剂成分	体积 (μL)
2×预混液	12.5
引物混合液	1
探针	1
样品DNA	1
ddH ₂ O	至25
注1: 空白对照实验时, 用ddH ₂ O替代样品 DNA。 注2: 阴性对照实验时, 用非目标源性成分替代样品DNA。 注3: 阳性对照实验时, 用相应番茄的DNA替代样品DNA。	

8.2 实时荧光 PCR 反应程序

实时荧光PCR反应参数为: 95℃ 30s; 95℃ 5s、60℃ 30s, 40个循环, 在每次循环的退火时收集荧光。检测结束后, 根据扩增曲线和Ct值判定结果。

9 结果判定与表述

9.1 质量控制

以下条件有一条不满足时, 试验视为无效:

- 内参照: 有 VIC 荧光信号检出, 且出现典型的扩增曲线, Ct 值<30.0;
- 空白对照: 无 FAM 荧光信号检出, Ct 值≥40.0;
- 阴性对照: 无 FAM 荧光信号检出, Ct 值≥40.0;
- 阳性对照: 有 FAM 荧光信号检出, 且出现典型的扩增曲线, Ct 值≤35.0;

9.2 结果判定

在符合9.1的情况下, 检测结果如下判定:

- 如 Ct 值≤35.0, 则判定为被检样品阳性;
- 如 Ct 值≥40.0, 则判定为被检样品阴性;
- 如 35.0<Ct 值<40.0, 则重复试验一次。如再次扩增后 Ct 值仍为 35.0<Ct 值<40.0, 则判定被检样品阳性; 若再次扩增后 Ct 值≥40.0, 测判定被检样品阴性。

9.3 结果表述

9.3.1 结果为阳性者, 表述为“检出番茄源性成分”。

9.3.2 结果为阴性者, 表述为“未检出番茄源性成分”。

10 检测过程中防止交叉污染的措施

按照 GB/T 27403-2008 附录D执行。

11 废弃物处理

检测过程中的废弃物, 收集后在焚烧炉中焚烧处理。

附录 A

(资料性)

植物基因组 DNA 提取试剂盒（离心柱型）的提取步骤和注意事项

A.1 植物基因组 DNA 提取试剂盒

以某公司的植物基因组DNA提取试剂盒（离心柱型）为例。

A.2 提取步骤（以干燥样品为例）

A.2.1 称取10mg~50mg样品于1.5mL离心管中，加入600 μ L CSPL Buffer，充分剪碎混匀，确保打散所有组织块。

A.2.2 65℃孵育30min，期间涡旋混匀样品2次。

A.2.3 加入600 μ L 氯仿：异戊醇（24:1），高速涡旋混匀20s， $\geq 10000\times g$ 离心10min。

A.2.4 在新的1.5mL离心管中加入150 μ L CXD Buffer和300 μ L无水乙醇，振荡混匀。

A.2.5 小心移取300 μ L上清液到离心管中，确保不要转移到任何沉淀，振荡混匀。

A.2.6 把HiBind DNA结合柱套在2.0mL收集管中，将离心管中所有液体转移至柱子中。室温10000 $\times g$ 离心1min以结合DNA上柱，弃去滤过液。

A.2.7 将HiBind DNA结合柱套上同一个收集管，加入700 μ L DNA Wash Buffer（已用无水乙醇稀释）至柱子中，室温10000 $\times g$ 离心1min，弃去滤过液。

A.2.8 重复步骤7。

A.2.9 将HiBind DNA结合柱重新套回收集管中， $\geq 10000\times g$ 离心空柱2min以干燥柱子的基质。

A.2.10 将吸附柱转入一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加50 μ L~100 μ L 65℃预热的Elution Buffer，室温放置3min~5min，10000 $\times g$ 离心1min，将溶液收集到离心管中，即得到高质量的植物基因组DNA。

A.3 使用注意事项

A.3.1 取样时应多部位取样，注意样品的代表性。

A.3.2 进行样品处理时必须避免交叉污染。

A.3.3 操作时应带上无粉手套和口罩，避免DNA酶混入造成DNA分解。若污染皮肤、眼睛时，要立即用大量清水冲洗，必要时寻求医疗咨询。

附 录 B
(资料性)

荧光定量 PCR 反应预混液 Premix Ex Taq™ 的组成

B.1 荧光定量 PCR 反应预混液 Premix Ex Taq™

以某公司的荧光定量PCR反应预混液为例。

B.2 预混液试剂组成

预混液试剂组成见表B.1。

表B.1 预混液试剂组成

试剂组成	体 积
Premix Ex Taq™(Probe qPCR)(2× Conc.)*1	1mL
ROX Reference Dye (50× Conc.)*2	200μL
ROX Reference Dye II (50× Conc.)*2	200μL

B.3 使用注意事项

B.3.1 使用制品时，应轻轻上下颠倒混合均匀，避免起泡，并轻微离心后使用。 B.3.2 溶解后的试剂应于冰上放置。

B.3.2 本制品中不含有荧光探针等。

B.3.3 反应液的配制、分装应使用新的（无污染）枪头，Microtube等，尽量避免污染。