|  |  |
| --- | --- |
| ICS | 点击此处添加ICS号 |
| CCS | |  | | --- | | D:\000000部门项目\09标准化插件开发\程序源代码\StandardEditor_ShanDongKeXieYuan\团标首页面字母T.pngD:\000000部门项目\09标准化插件开发\程序源代码\StandardEditor_ShanDongKeXieYuan\团标首页面字母T后面的反斜杠.png |   点击此处添加CCS号 |

团体标准

T/      XXXX—XXXX

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年7月11日

XXXX - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

广西物品编码与标准化促进会  发布

1. 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。

本文件主要起草人：李锐、陈宇、王海波、邓玉秀、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、韦升坚、谢庆剑、钟超凡、卢艺、赵刚、苏周雯、黄漫漫、杜妮。

八角茴香真伪快速鉴别

实时荧光PCR法

* 1. 范围

本文件规定了八角茴香（anisi stellati fructus）真伪快速鉴别的实时荧光PCR方法。

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鉴定。

检出限（LOD）5%（质量分数）。

* 1. 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

* 1. 术语、定义和缩略语

术语和定义

下列术语和定义 适用于本文件。

八角茴香（anisi stellati fructus）

为木兰科植物八角茴香（*Illicium verum* Hook.f.）的干燥成熟果实。

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。

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。

* + 1. 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DNA：脱氧核糖核酸（Deoxyribonucleic acid）

PVP-40:聚乙烯吡咯烷酮(Polyvinyl pyrrolidone)

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

RNase: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)

* 1. 原理

使用基于硅胶柱纯化技术和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DNA为模板，利用八角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

* 1. 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中一级水的要求。所有试剂均用无DNA酶污染的容器分装。

* + 1. 检测用引物和探针

引物和探针序列见表1

1. 引物和探针序列

| 引物名称 | 序列 | 基因来源 |
| --- | --- | --- |
| verum -1-F | TCGATGGTCCCTTGAGGAGTA | NCBI |
| verum -1-R | GCGCCGATGTTGGTTGTT | NCBI |
| verum -1-P | FAM- AGAAACATGGGAGGGTGG -MGB | NCBI |
| 1. F代表上游引物；R代表下游引物；P代表探针。 | | |

2-巯基乙醇(2-Me)和PVP-40。

灭菌的离心管和枪头。

2mL收集管。

核酸吸附柱。

植物基因组DNA提取试剂盒。

* 1. 仪器设备

实时荧光PCR仪。

核酸蛋白分析仪

微量移液器（10 μL、100 μL、200 μL、1000 μL）。

恒温振荡金属浴。

离心机（最大离心力≥12 000 g）。

涡旋振荡器。

组织粉碎机。

电子天平：感量0.001 g。

高压灭菌锅。

* 1. 试样制备

原料样品：用组织粉碎机把样品粉碎，将制备好的样品放入50 mL离心管中，备用。

粉末制品：直接称取置于50 mL离心管中,备用。

* 1. 检验步骤
     1. 样品DNA提取

在核酸提取区进行。称取50～150 mg新鲜/冻藏样品或15～40 mg干燥样品置于2 mL离心管中，加入600 μL CTAB裂解液和20μL RNase，振荡混匀，65 ℃孵育45 min～1 h，期间每隔10 min振荡混匀;反应完后冷却10 min，加入500 μL的苯酚:三氯甲烷:异戊醇(25:24:1)充分振荡混匀，静置10 min，12000g离心5 min;小心吸取上清液至洁净的1.5 mL离心管内，加入等体积的异丙醇振荡混匀，12 000g离心5 min;弃去上清液，500μL 70%乙醇洗涤2次，12 000 g离心5 min，弃上清液，晾干;加入50 μL～100 μL TE缓冲液或无菌双蒸水，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组织基因组DNA提取试剂盒进行提取。

* + 1. DNA浓度和纯度的测定

取1 μL DNA溶液，使用核酸蛋白分析仪检测其浓度及质量， OD260/280值应在1.7～1.9之间时，适宜于PCR扩增。

* + 1. 实时荧光PCR检测
       1. 实时荧光PCR反应体系。

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，30个循环,在循环反应60 ℃ 60 s采集荧光信号。

* + 1. 实验对照

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

* 1. 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。

* 1. 结果判定及表述
     1. 结果判定

1. 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。
2. 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或含量低于检出限。
3. 如35.0＜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，则判定为被检样品未检出八角茴香源性成分或含量低于检出限。
   * 1. 结果表述

结果为阳性者，表述为“检出八角茴香成分”。

结果为阴性者，表述为“未检出八角茴香成分”。

* 1. 检测过程中防止交叉污染的措施

按照GB/T 27403执行。

