ICS 67.180.10
X 31

GH

中华人民共和国供销合作行业标准

GH/T ××××-201×

枇杷蜜植物源成分的检测　定量 PCR 法

Detection of Loquat Honey by Real-time PCR Method

（征求意见稿）

20××-××-××发布　　20××-××-××实施

中华全国供销合作总社　发布

前　言

本标准按照 GB/T 1.1-2020 给出的规则起草。

本标准由中华全国供销合作总社提出。

本标准由全国蜂产品标准化工作组（SAC/SWG2）归口。

本标准起草单位：

本标准主要起草人：

枇杷蜜植物源成分的检测　定量 PCR 法

1 范围

本标准规定了定量 PCR 法检测枇杷蜜中 DNA 成分的试验方法。

本标准适用于以枇杷作为蜜源的蜂蜜中特有枇杷植物源 DNA 成分的检测。

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实验方法

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

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

PCR 聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction)

Taq 酶 Taq DNA 聚合酶(Taq DNA polymerase)

DNA 脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic acid)

4 原理

蜜蜂采集枇杷花蜜时，会将枇杷花粉携带至枇杷蜂蜜中。从枇杷蜜中分离枇杷花粉并提取其 DNA，通过荧光定量 PCR 反应，定性定量检测枇杷蜜中是否含有枇杷植物源（枇杷花粉）DNA 成分，从而判定是否为天然枇杷蜜。

5 仪器设备

5.1 荧光定量 PCR 扩增仪

5.2 高速冷冻离心机

5.3 恒温水浴锅

5.4 微量移液器 量程：0.5μL－10μL，2μL－20μL，20μL－200μL，100μL－1000μL

6 试剂和材料

6.1 引物

上游引物：5’-GCCCGGCGTCCCCTTATC-3’

下游引物：5’-ATCGCATTTCGCTACGTTCTTCAT-3’

TaqMan探针：FAM-5’-CGTATTGCGCCAAGGAACTCGAACGAAAGAG-3’-TAMRA

6.2 枇杷蜜源蜂蜜阳性及阴性对照

以枇杷叶总DNA模板作为阳性对照，以水作为阴性对照。

6.3 试剂

除非另有规定，本方法中所用试剂均为分析纯，水应符合GB/T 6682一级水的规定。

6.3.1 *Premix Ex Taq*(Probe qPCR)(2×)

6.3.2 ROX Reference Dye(50×)

6.3.3 CTAB组合提取缓冲液（配制方法见附录A.1）

6.3.4 5 %十二烷基肌氨酸钠（配制方法见附录A.2）

6.3.5 亚硫酸氢钠（Sodium disulphite）

6.3.6 聚乙烯吡咯烷酮-40（PVP-40）

6.3.7 氯仿/异戊醇（体积比24:1）

6.3.8 异丙醇（-20℃预冷）

6.3.9 70% 乙醇

7 操作程序

7.1 提取工作液准备

7.1.1 各取41.7 mL CATB裂解和提取缓冲液，加入16 mL 5%十二烷基肌氨酸钠，再依次加入0.5 g亚硫酸氢钠和2 g聚乙烯吡咯烷酮-40，充分振荡混匀，制成100 ml提取工作液。工作液需现用现配。

7.2 样品处理和DNA提取

7.2.1 分别取20 mL蜂蜜样品，与30 mL无菌水混合，振荡混匀。8000 rpm离心25 min。

7.2.2 弃上清,将沉淀溶解于1 mL 7.1.1现配的工作液中。充分混匀后，于37℃水浴过夜。

7.2.3 次日，向样品中加入等体积氯仿/异戊醇（体积比24∶1），缓慢颠倒混匀30 min，4000 rpm离心20 min。

7.2.4 转移上清至新离心管中，加入等体积的，于4℃预冷的冷异丙醇。4000 rpm离心30 min。

7.2.5 弃上清，DNA位于沉淀中，样品中加入70 %乙醇反复吹打洗涤。

7.2.6 离心后弃去乙醇，室温或37℃烘干至乙醇完全挥发，加25 μL ddH2O溶解，保存在－20 ° C。

7.3 阴性对照及阳性对照样品准备

阴性对照：油菜叶。

阳性对照：枇杷花、枇杷叶。

空白对照：设两个，一个为提取DNA时以水代替样品，二是PCR反应是以水代替扩增DNA模板。

7.4 荧光定量 PCR 反应

7.4.1 荧光定量PCR反应体系

荧光定量PCR反应体系按表1规定配制，每个样品和参照重复3次。配制反应液时尽量避光且避免产生气泡。

表1 荧光定量PCR反应体系配制表

体系组分		用量	终浓度
荧光定量PCR反应液	*Premix Ex Taq*(Probe qPCR)(2×)	10.0 μL	
	ddH_2O	6.0 μL	
	上游引物F(10 μM)	0.4 μL	0.2 μmol/L
	下游引物R(10 μM)	0.4 μL	0.2 μmol/L
	TaqMan探针P	0.8 μL	0.4 μmol/L
	ROX Reference Dye(50×)	0.4 μL	
样品	DNA	2.0 μL	1.0 mg/L
总量		20 μL	

7.4.2 荧光定量PCR反应参数和条件

预变性95 ℃ 20 s，然后95 ℃ 1s、60 ℃ 20s，40个循环。试验过程中观察PCR荧光扩增曲线，根据循环数(Ct)值进行结果判定。

7.5 结果判定

7.5.1 阈值设定

试验结束后，根据收集的荧光曲线和Ct值直接读取检测结果，Ct值为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。阈值设定原则根据仪器噪声情况进行调整，以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增曲线的最高点为准。

7.5.2 质控标准

阴性对照和空白对照无典型的扩增曲线，Ct值较大，应分别为34和36左右，若二者Ct值分别显著＜34和36，试验无效。阳性对照Ct值应为25左右，并出现典型的扩增曲线，若Ct值显著＞25，试验无效。

7.5.3 结果描述及判定

7.5.3.1 阴性

无典型的扩增曲线或 Ct 值＞33，则判定为样品中无枇杷源成分。

7.5.3.2 阳性

按照7.5.2的参数和条件，被检测样品应符合Ct值＜33，并出现典型的扩增曲线，则判定为样品中有枇杷源成分，具体图谱参见附录B.1，若进一步验证，可对PCR扩增产物进行序列测定，目标序列参见附录B.2。

附录 A
（规范性附录）
溶液的配制

A.1 CTAB 裂解和提取缓冲液

CTAB 裂解缓冲液（2% CTAB，0.2 mol/L Tris·HCl pH 8.0，0.05 mol/L EDTA pH8.0，2 mol/L NaCl）

2% CTAB	4 g
0.2 mol/L Tris·HCl pH 8.0	4.8 g
0.05 mol/L EDTA pH8.0	2.9 g
NaCl	23.3 g

ddH_2O 溶解，用浓盐酸与 NaOH 将溶液 pH 调至 8.0，并定容至 200 mL，高压灭菌后 4℃保存。

提取缓冲液（0.35 mol/L 山梨醇，0.1 mol/L Tris·HCl pH 8.0，0.05 mol/L EDTA pH8.0）

山梨醇（Sorbitol）	12.75 g
0.2 mol/L Tris·HCl pH 8.0	2.4 g
0.005 mol/L EDTA pH8.0	0.29 g

ddH_2O 溶解，用浓盐酸与 NaOH 将溶液 pH 调至 8.0，并定容至 200 mL，高压灭菌后 4℃保存。

A.2 5 %十二烷基肌氨酸钠

十二烷基肌氨酸钠（Sarcosyl stock） 5 g

ddH_2O 溶解，定容至 100 mL，高压灭菌后 4℃保存。

附录 B

（资料性附录）

枇杷蜜植物源成分定量 PCR 检测扩增曲线、Ct 值及扩增序列

B.1 枇杷蜜植物源成分定量 PCR 检测扩增曲线示例图

枇杷蜜植物源成分定量 PCR 对照扩增曲线见图 B.1；所有枇杷蜜植物源成分 PCR 检测扩增曲线示例见图 B.2

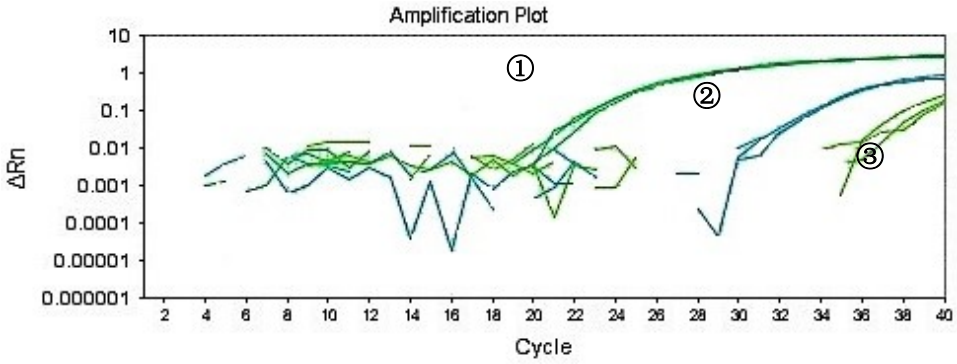

图 B.1 阴性对照组，阳性对照组与空白对照组的 qPCR 扩增曲线图

其中①为枇杷花（阳性对照组）扩增曲线，②为山茶叶片（阴性对照组）扩增曲线，③为空白对照组（以水代替模板）扩增曲线

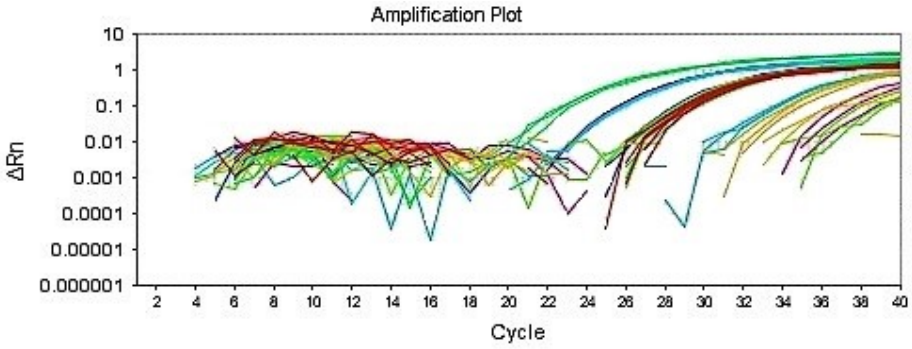

图 B.2 全部待测枇杷蜜样品 qPCR 扩增曲线图

其中纵轴ΔRn=R+n（每一点的荧光强度）－R-n（基线荧光强度），即 PCR 过程中产物增加的量，横轴为循环数。

B.2 荧光定量 PCR 扩增产物参考序列

GCCCGGCGTCCCCTTATCCCGGAAGCCTGCTTCCGGGCGTACAAACGAACACCGGCGCGTATTGCGCCAAGGAACTCGAACGAAAGAGCGAGCTCCCGTCGCCCCGGAAACGGTGCGCGCGCGGGTGCGTCGTCGTCTTCAGTACGTCAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGAT