

ICS 67.050  
X 04



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 23814—2009

GB/T 23814—2009

## 莲蓉制品中芸豆成分定性 PCR 检测方法

Protocol of the polymerase chain reaction for  
detecting kidney beans components in lotus foods

中 华 人 民 共 和 国  
国 家 标 准  
莲蓉制品中芸豆成分定性 PCR 检测方法  
GB/T 23814—2009

\*

中国标准出版社出版发行  
北京复兴门外三里河北街16号  
邮政编码:100045

网址 [www.spc.net.cn](http://www.spc.net.cn)

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷  
各地新华书店经销

\*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 10 千字  
2009年8月第一版 2009年8月第一次印刷

\*

书号: 155066·1-38307 定价 16.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换

版权专有 侵权必究

举报电话:(010)68533533



GB/T 23814—2009

2009-05-27 发布

2009-09-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局  
中国国家标准化管理委员会 发布

## 前 言

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由中国标准化研究院提出并归口。

本标准负责起草单位：国家加工食品质量监督检验中心（广州）、广州市质量监督检测研究院、中华人民共和国深圳出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：蔡依军、覃芳芳、罗海英、邓鸿铃、郭新东、吴玉鑫、蓝芳。

表 3 各基因检测 PCR 反应条件

基因	变性	扩增	循环数	后延伸
莲子特异基因	94 °C/5 min	94 °C/30 s 58 °C/30 s 72 °C/30 s	35	72 °C/5 min
芸豆内源基因	94 °C/5 min	94 °C/30 s 56 °C/30 s 72 °C/30 s	35	72 °C/5 min

#### 6.4.4 PCR 扩增产物电泳检测

将适量的琼脂糖(6.2.2)加入 1×TAE 缓冲液(6.2.19)中,配制成浓度为 2%(质量浓度)的溶液,加热溶解,然后加入溴化乙锭溶液(6.2.23)至终浓度 0.5 μg/mL,混匀,稍适冷却后,倒入电泳板上,插上梳板,室温下凝固后,放入盛 1×TAE 缓冲液的电泳槽中,轻轻垂直向上拔去梳板。在每个泳道中加入适量的 PCR 产物与上样缓冲液(6.2.22)的混合液(10 μL~20 μL PCR 产物与上样缓冲液 2 μL 混合),其中一个泳道中加入 DNA 分子质量标准品(6.2.26)5 μL,接通电源电泳,按 2 V/cm 的电压电泳至溴酚蓝迁移至 3 cm~5 cm 处结束。凝胶成像仪观察并分析记录。

#### 6.4.5 结果分析

##### 6.4.5.1 莲蓉内源基因的检测

用针对莲蓉内源基因设计的引物对样品 DNA 提取液进行 PCR 扩增,阳性对照和待测样品均应被扩增出 142 bp 的 PCR 产物,阴性对照和空白对照不能扩增得到相应的 PCR 产物。如待测样品未见有该 PCR 扩增产物,则说明 DNA 提取质量有问题,或 DNA 提取液中有抑制 PCR 反应的因子存在,应重新提取 DNA,直到扩增出该 PCR 产物。

##### 6.4.5.2 芸豆基因的检测

对样品 DNA 进行芸豆内源基因的 PCR 扩增,如果阴性对照和空白对照未出现扩增条带,阳性对照和待测样品均出现预期大小的扩增条带(扩增片段大小 194 bp),则可初步判定待测样品中含有可疑的芸豆成分,应进一步进行确证实验,依据确证实验的结果最终报告;如果待测样品未出现 PCR 扩增产物,则可断定待测样品中不含有芸豆成分。

#### 6.4.6 确证实验

当 PCR 检测结果为阳性时,可通过酶切的方法或其他方法(如测序比对,序列参见附录 A)进行确证:

PCR 产物的限制性内切酶酶切分析;

用内切酶 ApaI 对 PCR 扩增产物进行酶切分析,阳性样品酶切片段大小为 81 bp 和 103 bp。

推荐酶切体系为 50 μL,PCR 扩增产物 20 μL,酶用量为 2U,酶切温度和时间为 37 °C 30 min,电泳方法参见 6.4.4。

### 7 结果表述

7.1 芸豆特异基因片段得到扩增,且扩增片段大小与预期片段大小一致,表明样品中检测出芸豆成分,结果表述为“样品中检测出芸豆成分,阴性对照、阳性对照及空白对照检测结果正常”。

7.2 莲蓉内源基因片段得到扩增,且扩增片段大小与预期片段大小一致,而芸豆特异基因片段未得到扩增,或扩增片段大小与预期片段大小不一致,表明样品中未检测出芸豆成分,结果表述为“样品中未检测出芸豆成分,阴性对照、阳性对照及空白对照检测结果正常”。

## 莲蓉制品中芸豆成分定性 PCR 检测方法

### 1 范围

本标准规定了莲蓉制品中芸豆成分的定性 PCR 检测方法。  
本标准适用于由莲蓉制品半成品和成品中芸豆成分的定性检测。  
本标准的检出限为 0.5 ng 芸豆 DNA。

### 2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法(GB/T 6682—2008,ISO 3696:1987,MOD)

GB/T 19495.1 转基因产品检测 通用要求和定义

GB/T 19495.2 转基因产品检测 实验室技术要求

GB/T 19495.7 转基因产品检测 抽样和制样方法

### 3 术语和定义

GB/T 19495.1 确立的术语和定义适用于本标准。

### 4 防污染措施

检测过程中防止交叉污染的措施按照 GB/T 19495.2 中的规定执行。

### 5 抽样和制样

按照 GB/T 19495.7 规定的方法执行。

### 6 测定方法

#### 6.1 原理

样品经 DNA 提取后,针对芸豆特异基因序列设计引物,通过 PCR 技术,特异性扩增芸豆基因的 DNA 片段,根据 PCR 扩增结果,判断该样品中是否含有芸豆成分。

#### 6.2 试剂和材料

除另有规定外,所用试剂为分析纯或生化试剂,水为按照 GB/T 6682 规定的一级水。

6.2.1 引物:检测莲蓉制品内源基因和芸豆特异基因的引物及其信息见表 1。

表 1 莲蓉制品内、外源基因所需的引物信息

检测基因	引物序列	PCR 产物大小/ bp	基因性质	适用范围
NNEA0732	正:5'-GTAGAATCGGCACTGGAGGTAG-3' 反:5'-CATGGGCTAACCAACTAGACAGC-3'	142	莲子特异基因	莲蓉制品
AB070627	正:5'-CAGACATTTTCATATCCAGGGAGG-3' 反:5'-TGAATTGTACGGTGAAGGATGG-3'	194	芸豆特异基因	莲蓉制品