SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1961.10—2013

出口食品过敏原成分检测 第10部分：实时荧光PCR方法 检测虾/蟹成分

Detection of allergen components in food for export—Part 10: Real time PCR method for detecting shrimp & crab components

2013-03-01 发布　　2013-09-16 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局　发布

前　言

SN/T 1961《出口食品过敏原成分检测》共分为19部分：

——第1部分：酶联免疫法检测花生成分；

——第2部分：实时荧光PCR法检测花生成分；

——第3部分：酶联免疫吸附法检测荞麦蛋白成分；

——第4部分：实时荧光PCR方法检测腰果成分；

——第5部分：实时荧光PCR方法检测开心果成分；

——第6部分：实时荧光PCR方法检测胡桃成分；

——第7部分：实时荧光PCR方法检测胡萝卜成分；

——第8部分：实时荧光PCR方法检测榛果成分；

——第9部分：实时荧光PCR方法检测杏仁成分；

——第10部分：实时荧光PCR方法检测虾/蟹成分；

——第11部分：实时荧光PCR方法检测麸质成分；

——第12部分：实时荧光PCR方法检测芝麻成分；

——第13部分：实时荧光PCR方法检测小麦成分；

——第14部分：实时荧光PCR方法检测鱼成分；

——第15部分：实时荧光PCR方法检测芹菜成分；

——第16部分：实时荧光PCR方法检测芥末成分；

——第17部分：实时荧光PCR方法检测羽扇豆成分；

——第18部分：实时荧光PCR方法检测荞麦成分；

——第19部分：实时荧光PCR方法检测大豆成分。

本部分为SN/T 1961的第10部分。

本部分按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

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这些专利的责任。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分主要起草单位：中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国江苏出入境检验检疫局、中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局、中华人民共和国浙江出入境检验检疫局、上海辉睿生物科技有限公司。

本部分主要起草人：祝长青、郑秋月、李可、吴福平、蒋原、陈颖、石建华、徐宝梁、曹际娟、张睿、沈崇钰、邵景东、张晓峰、吴亚君、杨海荣、栾军、周阳、蔡宝亮、李辉、徐君怡。

出口食品过敏原成分检测
第10部分：实时荧光PCR方法
检测虾/蟹成分

1 范围

SN/T 1961的本部分规定了食品中过敏原虾/蟹成分的实时荧光PCR检测方法。

本部分适用于食品及其原料中过敏原虾/蟹成分的定性检测。

本部分所规定方法的最低检出限(LOD)为0.01%(质量分数)。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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

过敏原 allergen

又称致敏原或变应原，是指能够引起变态反应的抗原。

3.2

致敏原虾/蟹成分 allergen shrimp & crab compound

致敏原又称过敏原或变态反应原，是指能够使人发生过敏的抗原。虾/蟹含有多种复杂致敏成分，蛋白是其主要的致敏成分。其食用致敏症状主要表现为产生不同程度的皮肤过敏现象，如浑身发痒和红斑等症状。本标准中致敏原虾/蟹成分即指虾/蟹特异性DNA片段。

3.3

实时荧光PCR real time PCR

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

3.4

Ct值 cycle threshold

每个反应管内的荧光信号达到设定的域值时所经历的循环数。

4 方法提要

样品均质后，提取DNA，以DNA为模板，分别采用虾(16S rRNA)/蟹(细胞色素和16S rRNA)基因的各自特异性检测引物和探针进行实时荧光PCR扩增，观察任一对引物和探针的实时荧光PCR的

增幅现象，判断样品中是否存在致敏原虾/蟹成分。

5 试剂和材料

除另有规定外，试剂为分析纯或生化试剂。实验用水应符合 GB/T 6682 中一级水的规格。所有试剂均用无 DNA 酶污染的容器分装。

5.1 检测用引物和探针

5.1.1 虾的引物和探针

5.1.1.1 虾 16S rRNA 基因的第一对检测引物和探针序列

正向引物：5'-GAT TAA GTT ACT TTA GGG ATA ACA GCG-3'
反向引物：5'-TAA AGG TCG AAC AGA CCTTCT CAC T-3'
探针：5'-荧光基团-CTT CCT TGA AAG TTC ATA TCG ACA GGA AGG G-淬灭基团-3'

5.1.1.2 虾 16S rRNA 基因的第二对检测引物和探针序列

正向引物：5'-AAG TCT AGC CTG CCC ACT G-3'
反向引物：5'-GTC CAA CCA TTC ATA CAA GCC-3'
探针：5'-荧光基团-AGA CTA ATG ATT ATG CTA CCT TCG CAC GGT C-淬灭基团-3'

5.1.1.3 北极虾 16S rRNA 基因的检测引物和探针序列

正向引物：5'-ATT AAG TTA CTT TAG GGA TAA CAG C-3'
反向引物：5'-ACC TTA ATT CAA CAT CGA GGT C-3'
反向引物：5'-CTT AAT TCA ACA TCG AGG TCG C-3'
探针：5'-荧光基团-ACT CCC GTC GAT AAG AAC TCT CAG GG-淬灭基团-3'

注：5.1.1.1 检测引物对海蟹有非特异性扩增。5.1.1.2 检测引物对虾/蟹爬、虎头蟹、赤甲蟹有非特异性扩增。

5.1.2 蟹的引物和探针

5.1.2.1 蟹 16S rRNA 基因的检测引物和探针序列

正向引物：5'-AATTGAAAACTTGTATGGATGG-3'
反向引物：5'-GGTCTTATCGTCCCTCTAAAG-3'
探针：5'-荧光基团-TAAGCCTTTTCACTTARAAGTTAA-MGB-3'

5.1.2.2 蟹细胞色素基因的检测引物和探针序列

正向引物：5'-CAACTCCCTCATTAACCGCTAT-3'
反向引物：5'-TTGCATCGGCTTTAATACCTAA-3'
探针 1：5'-荧光基团-CCTGATATTTCCAGCTCATTGGATG-淬灭基团-3'
探针 2：5'-荧光基团-TCTTTATTGCTTTACCATCCCTTCGCTT-淬灭基团-3'

5.2 裂解液

1%CTAB，0.05 mol/L Tris-HCl(pH8.0)，0.7 mol/L NaCl，0.0 1 mol/L EDTA(pH8.0)。

5.3 **TE 缓冲液(Tris-Cl、EDTA 缓冲液)**

10 mmol/L Tris-HCl(pH8.0),1 mmol/L EDTA(pH8.0)。

5.4 三氯甲烷。

5.5 异戊醇。

5.6 异丙醇。

5.7 70%乙醇。

5.8 *Taq* DNA 聚合酶。

5.9 dNTPs 混合液。

5.10 **10×PCR 缓冲液**

200 mmol/L Tris-HCl(pH8.4),200 mmol/L KCl,15 mmol/L $MgCl_2$。

6 仪器和设备

6.1 实时荧光 PCR 仪。

6.2 离心机:离心力≥12 000*g*。

6.3 微量移液器:10 μL、100 μL、200 μL、1 000 μL。

6.4 冰箱:2 ℃～8 ℃,－20 ℃。

6.5 高压灭菌器。

6.6 研钵及粉碎装置。

6.7 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计。

6.8 pH 计。

6.9 恒温水浴箱。

6.10 天平:感量 0.01 g。

7 检验步骤

7.1 制样方法

称取约 200 g 样品,用研钵或粉碎装置将样品粉碎至粉末状。

7.2 样品的总 DNA 提取

7.2.1 称取 2.0 g 已制备好的样品于 50 mL 离心管中,加入 10 mL 裂解液,65 ℃温育 1 h,每隔 10 min 振荡混匀;

7.2.2 7 000*g* 离心 5 min,吸取上清液至一新离心管中,加入 400 μL 三氯甲烷和异戊醇的混合液,体积比为 24∶1,充分混匀;

7.2.3 12 000*g* 离心 5 min,吸取上清液至一新离心管中,加 0.8 倍体积异丙醇,室温下沉淀 1 h～2 h;

7.2.4 12 000*g* 离心 10 min,弃上清液;

7.2.5 70%乙醇洗涤一次,12 000*g* 离心 5 min,弃上清液,晾干;

7.2.6 加入 50 μL TE,溶解 DNA 沉淀。也可用等效的商品化核酸提取试剂盒提取模板 DNA。

7.3 DNA 浓度和纯度的测定

取适量 DNA 溶液原液加双蒸水稀释一定倍数后,使用核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计测 260 nm

和 280 nm 处的吸收值。DNA 的浓度按照式(1)计算。

$$c = A_{260} \times N \times 50 \quad \cdots\cdots(1)$$

式中：

c ——DNA 浓度，单位为微克每毫升(μg/mL)；

A_{260} ——260 nm 处的吸光值；

N ——核酸稀释倍数。

当浓度为 10 μg/mL～100 μg/mL，A_{260}/A_{280} 比值在 1.7～1.9 之间时，适宜于实时荧光 PCR 扩增。

7.4 实时荧光 PCR 检测

7.4.1 实时荧光 PCR 反应体系

过敏原虾/蟹成分荧光 PCR 反应体系见表 1。

表 1 过敏原虾/蟹成分荧光 PCR 反应体系

组分	工作液浓度	加样量(25 μL)	反应体系终浓度
PCR 缓冲液	10×	2.5	1×
上游引物	10 μmol/L	0.75	0.3 μmol/L
下游引物	10 μmol/L	0.75	0.3 μmol/L
探针	10 μmol/L	0.5	0.2 μmol/L
dNTPs	10 mmol/L	2.0	0.8 mmol/L
Taq DNA 聚合酶	2.5 U/μL	0.2	0.02 U/μL
DNA 模板	—	100 ng～200 ng	—
去离子水	—	用水补足反应体积	—
注：各组分的用量可根据反应体积进行适当的调整。			

7.4.2 实时荧光 PCR 反应参数

预变性 95 ℃/30 s，1 个循环；95 ℃/15 s，60 ℃/40 s，45 个循环，在每次循环的退火时收集荧光信号。反应参数可根据基因扩增仪型号以及所使用试剂的不同而进行适当的调整。

7.4.3 质控设置

每个样品设置两个平行反应体系。检测过程中应分别设立阳性对照、阴性对照和空白对照。用已知含虾/蟹成分的样品作阳性对照，用已知不含虾/蟹成分的样品作阴性对照，用等体积的 ddH_2O 代替模板 DNA 作空白对照。

8 结果判断及表述

8.1 结果分析条件设定

直接读取检测结果。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对照扩增曲线(无规则的噪音线)的最高点，且 Ct 值不出现任何数值为准。

8.2 结果判定

8.2.1 对照结果

对照结果如下：

a) 阴性对照：无荧光增幅现象；

b) 空白对照：无荧光增幅现象；

c) 阳性对照：有明显的荧光增幅现象；

d) 以上指标有一项不符合均视为此次实验无效。

8.2.2 结果判定

8.2.2.1 同时进行的阴性、阳性、空白对照实验结果正常，检测样品无荧光增幅现象，判断样品中未检出致敏原虾/蟹成分。

8.2.2.2 同时进行的阴性、阳性、空白对照实验结果正常，检测样品有明显的荧光增幅曲线，且 Ct 值≤35，判断样品中检出致敏原虾/蟹成分。

8.2.2.3 同时进行的阴性、阳性、空白对照实验结果正常，若检测样品荧光增幅曲线的 Ct 值在 35～40 之间，则应重新进行实时荧光 PCR 反应。再次扩增后的结果 Ct 值仍在 35～40 之间，可判断样品中检出致敏原虾/蟹成分，否则可判断样品中未检出致敏原虾/蟹成分。

8.2.2.4 在 5.1 的相应引物与探针中，若其中的一对引物与探针检测结果为阳性，即可判断该样品中检出致敏原虾/蟹成分。

8.3 结果表述

8.3.1 结果为阳性者，表述为“检出过敏原虾/蟹成分”。

8.3.2 结果为阴性者，表述为“未检出过敏原虾/蟹成分”。

9 防污染措施

检测过程中防止交叉污染的措施按照 GB/T 27403 中的规定执行。