



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4419.8—2016

出口食品常见过敏原 LAMP 系列 检测方法 第 8 部分:澳洲坚果

Food allergen detection with LAMP methods for export—
Part 8: Macadamia nut

2016-03-09 发布

2016-10-01 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 4419《出口食品常见过敏原 LAMP 系列检测方法》由下列部分组成：

- 第 1 部分：开心果；
- 第 2 部分：腰果；
- 第 3 部分：胡桃；
- 第 4 部分：榛果；
- 第 5 部分：杏仁；
- 第 6 部分：扁桃仁；
- 第 7 部分：巴西坚果；
- 第 8 部分：澳洲坚果；
- 第 9 部分：栗子；
- 第 10 部分：大豆；
- 第 11 部分：羽扇豆；
- 第 12 部分：花生；
- 第 13 部分：葵花籽；
- 第 14 部分：芝麻；
- 第 15 部分：大麦；
- 第 16 部分：小麦；
- 第 17 部分：荞麦；
- 第 18 部分：芥末；
- 第 19 部分：胡萝卜；
- 第 20 部分：芹菜；
- 第 21 部分：牛奶；
- 第 22 部分：虾。

本部分为 SN/T 4419 的第 8 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。

本部分起草单位：中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国广东出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：刘津、李志勇、李婷、张隽、黄文胜、陈颖、高东微、席静、刘青、关丽军。

出口食品常见过敏原 LAMP 系列 检测方法 第 8 部分:澳洲坚果

1 范围

SN/T 4419 的本部分规定了食品中过敏原澳洲坚果成分环介导等温扩增(LAMP)检测方法。

本部分适用于食品及其原料中过敏原澳洲坚果成分定性检测。

本部分所规定方法的最低检测限(LOD)为 0.5%(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—2008 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

3 术语、定义和缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

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。

3.1.2

澳洲坚果 macadamia nut

澳洲坚果又名昆士兰栗、澳洲胡桃、昆士兰果、夏威夷果等,是山龙眼科澳洲坚果属植物 *Macadamia ternifolia* 的可食用种仁。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

dNTP(deoxyribonucleoside triphosphate):脱氧核苷三磷酸

LAMP(loop-mediated isothermal amplification):环介导等温扩增

Triton X-100:聚乙二醇辛基苯基醚

4 防污染措施

环介导等温扩增检测过程的防污染措施应符合 GB/T 27403—2008 中附录 D 的规定。

5 方法提要

样品经研磨后,提取 DNA,以 DNA 为模板,采用澳洲坚果 AMP2 豌豆球蛋白基因特异性检测引物

进行 LAMP 扩增,通过颜色变化观察判定是否存在过敏原澳洲坚果成分。

6 LAMP 检测方法

6.1 原理

根据澳洲坚果 AMP2 豌豆球蛋白基因序列设计特异性内引物、外引物和环引物各一对,特异性识别靶序列上的 6 个独立区域,在链置换型 *Bst* DNA 聚合酶的作用下启动循环链置换反应,在特异靶序列启动互补链合成,在同一链上互补序列周而复始形成有很多环的花椰菜结构的茎-环 DNA 混合物;从 dNTP 析出的焦磷酸根离子与反应溶液中的 Mg^{2+} 结合,产生副产物(焦磷酸镁)形成乳白色沉淀,加入显色液,即可通过颜色变化观察判定结果。

显色液显色原理:SYBR Green I 是一种高灵敏的 DNA 荧光染料,可以嵌入方式结合到双链 DNA 的小沟内。当它与双链 DNA 结合时,荧光信号是游离状态的 800~1 000 倍。在不发生扩增反应时,SYBR Green I 染料分子的荧光信号不发生改变,颜色显现为橙色;当发生扩增反应时,随着双链 DNA 的增加,SYBR 染料的荧光信号也随之大幅度增强,其信号强度可代表双链 DNA 分子的数量,同时颜色由橙色变为绿色。

6.2 仪器和设备

6.2.1 水浴锅或加热模板:63 °C±1 °C 和 80 °C±1 °C。

6.2.2 离心管:0.1 mL、1.5 mL。

6.2.3 计时器。

6.2.4 移液枪:量程 0.5 μL~10 μL、量程 10 μL~100 μL、量程 100 μL~1 000 μL。

6.3 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。

6.3.1 实验用水:应符合 GB/T 6682 中一级水的规格。

6.3.2 CTAB 提取缓冲液(20 g/L CTAB, 1.4 mol/L NaCl, 0.1 mol/L Tris-HCl, 0.02 mol/L Na_2EDTA , pH 8.0)。

6.3.3 CTAB 沉淀液(5 g/L CTAB, 40 mmol/L NaCl)。

6.3.4 NaCl 溶液:1.2 mmol/L。

6.3.5 蛋白酶 K(20 mg/mL)。

6.3.6 dNTPs 溶液:每种核苷酸浓度 10 mmol/L。

6.3.7 *Bst* DNA 聚合酶:酶浓度 8 U/μL。

6.3.8 10×ThermolPol 缓冲液:含 200 mmol/L Tris-HCl(pH 8.8)、100 mmol/L 硫酸铵、100 mmol/L 氯化钾、20 mmol/L 硫酸镁、1% Triton X-100。

6.3.9 硫酸镁溶液:50 mmol/L。

6.3.10 甜菜碱:5 mol/L。

6.3.11 显色液:SYBR Green I 荧光染料,1 000×。

6.3.12 引物:根据澳洲坚果 AMP2 豌豆球蛋白基因设计一套特异性引物,包括外引物 F3/B3,内引物 FIP/BIP,环引物 FLP/BLP,见表 1。

表 1 引物序列

名称	编号	序列
LAMP 引物序列	外侧上游引物(F3)	5'-GTGAGTCAGTGCATAAGAG-3'
	外侧下游引物(B3)	5'-TCATATCTCCTCTCGCAGC-3'
	内侧上游引物(FIP)	5'-TGGCAGTATTGTTGCTGACGT GATCCTCAGACGGAATGC-3'
	内侧下游引物(BIP)	5'-ACGACGCTGCAAGGAAATATGT TGACATTGCTCGTATTGCT-3'
	上游环引物(FLP)	5'-ATCGCCTCTGGCATTGTT-3'
	下游环引物(BLP)	5'-CCGACAACGTGATCCACA-3'

6.4 DNA 提取

6.4.1 称取 100 mg 已制备好的样品至 1.5 mL 离心管中,加入 1 mL CTAB 提取缓冲液和 10 μ L 蛋白酶 K,65 $^{\circ}$ C 1 h,期间每隔 10 min 振荡混匀。

6.4.2 12 000 g 离心 10 min,吸取上清液 700 μ L 至一新 1.5 mL 离心管中。

6.4.3 加入 490 μ L 三氯甲烷,振荡混合后,12 000 g 离心 10 min。

6.4.4 吸取 500 μ L 上清液至一新 1.5 mL 管中。

6.4.5 加入 2 倍体积 CTAB 沉淀液,混匀后室温静置 60 min,12 000 g 离心 10 min。

6.4.6 弃去上清液,加入 350 μ L 1.2 mmol/L NaCl 溶液充分溶解沉淀;

6.4.7 加入 350 μ L 三氯甲烷,高速涡旋振荡混匀,12 000 g 离心 10 min。

6.4.8 吸取上清液至一新 1.5 mL 管中,加入 0.8 倍体积异丙醇,混匀,-20 $^{\circ}$ C 静置 20 min,12 000 g 离心 10 min。

6.4.9 弃去上清液,用 70%乙醇洗涤沉淀一次,12 000 g 离心 10 min。

6.4.10 弃去上清液,晾干,加入 50 μ L TE 缓冲液,溶解 DNA 沉淀,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

6.5 实验步骤

6.5.1 阴性对照、阳性对照和空白对照的设置

阴性对照:采用不含有待测基因序列的植物基因组 DNA 为模板。

阳性对照:采用含有待测基因序列的植物 DNA 作为模板或含有目的基因序列的质粒 DNA 代替 DNA 模板。

设两个空白对照:

——提取 DNA 时设置的提取空白对照(以水代替样品);

——LAMP 反应的空白对照(以 DNA 溶解液代替 DNA 模板)。

6.5.2 澳洲坚果 LAMP 反应体系

LAMP 反应体系见表 2。每个样品各做 2 个平行管。加样时应使样品 DNA 溶液完全加入反应液中,不要粘附于管壁上。在反应体系配制完成后,将 1 μ L 显色液滴在管盖内侧,盖管盖时应小心,防止显色液混合进入反应液中。

表 2 过敏原澳洲坚果成分 LAMP 反应体系

组分	工作液浓度	加样量/ μL	反应体系终浓度
ThermoPol 缓冲液	10×	2.5	1×
外侧上游引物(F3)	5 $\mu\text{mol/L}$	1.0	0.2 $\mu\text{mol/L}$
外侧下游引物(B3)	5 $\mu\text{mol/L}$	1.0	0.2 $\mu\text{mol/L}$
内侧上游引物(FIP)	40 $\mu\text{mol/L}$	1.0	1.6 $\mu\text{mol/L}$
内侧下游引物(BIP)	40 $\mu\text{mol/L}$	1.0	1.6 $\mu\text{mol/L}$
上游环引物(FLP)	20 $\mu\text{mol/L}$	1.0	0.8 $\mu\text{mol/L}$
下游环引物(BLP)	20 $\mu\text{mol/L}$	1.0	0.8 $\mu\text{mol/L}$
dNTPs	10 mmol/L	4	1.6 mmol/L
甜菜碱	5 mol/L	5	1.0 mol/L
硫酸镁	100 mmol/L	1	6 mmol/L (包括缓冲液中所含硫酸镁)
<i>Bst</i> DNA 聚合酶	8 U/ μL	1	0.32 U/ μL
DNA 模板	100 ng/ μL	2	8 ng/ μL
水	—	3.5	—

6.5.3 LAMP 反应参数

63 °C 恒温扩增 45 min, 80 °C 5 min 使酶灭活, 反应结束。

6.5.4 显色反应

反应结束后, 将显色液与反应液上下颠倒轻轻混匀, 在黑色背景下立即进行颜色观察。

6.6 质量控制

6.6.1 基本原则: 实验室中设置的各种对照 LAMP 检测结果应符合以下情况。否则, 任一种对照如果出现非下述正常结果, 应重做实验。

6.6.2 空白对照: 反应管中液体呈橙色。

6.6.3 阴性对照: 反应管中液体呈橙色。

6.6.4 阳性对照: 反应管中液体呈绿色。

7 结果判断和确证

7.1 待检样品 2 个平行样反应管中液体均呈橙色, 同时各种实验对照结果正常, 可判断该样品检测结果为阴性。

7.2 待检样品 2 个平行样反应管中液体至少 1 管呈绿色, 同时各种实验对照结果正常, 可判断该样品过敏原澳洲坚果成分初筛阳性, 还应通过下列方法之一进行确证:

- 实时荧光 PCR 检测；
- 可对 PCR 产物进行测序测定参照附录 A 中序列比对；
- 其他验证方法。

8 结果表述

- 8.1 对 LAMP 检测结果为阴性的样品,可表述为该样品未检出过敏原澳洲坚果成分。
- 8.2 对 LAMP 检测结果为初筛阳性的样品,应按照确证实验情况进行结果判断和表述。

附 录 A
(资料性附录)
扩增产物参考序列

澳洲坚果外测引物扩增序列信息 (Accession no. AF161883.1)

GTGAGTCAGT GCGATAAGAGATTTGAAGAGGATATAGATTGGTCTAAGTATGATAAC
CAAGAGGATCCTCAGACGGAATGCCAACAATGCCAGAGGCGATGCAGGCAGCAGGAGAGT
GGCCACGTCAGCAACAATACTGCCAACGACGCTGCAAGGAAATATGTGAAGAAGAAGAA
GAATATAACCGACAACGTGATCCACAGCAGCAATACGAGCAATGTCAGAAGCACTGCCAAC
GGCGCGAGACAGAGCCACGTCACATGCAAACATGTCAACAACGCTGCGAGAGGAGATATGA
