



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 5601—2024

菌菇制品中香菇成分定性检测方法 实时荧光 PCR 法

Qualitative detection of shiitake ingredient in mushroom products—
Real-time PCR method

2024-12-31 发布

2025-07-01 实施

中华人民共和国海关总署 发布

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。

本文件由中华人民共和国海关总署提出并归口。

本文件起草单位：中华人民共和国青岛海关、江南大学、韶关学院（广东省粤北食药资源利用与保护重点实验室）。

本文件主要起草人：高宏伟、郭亚辉、王萍、张霞、李东元、马振华、孙敏、孟昭宇、孙雯娴、林青宇、姜英辉、殷培军。

菌菇制品中香菇成分定性检测方法 实时荧光 PCR 法

1 范围

本文件描述了香菇粉中含有木质素的掺杂物显微镜检测方法和菌菇制品中香菇成分的荧光 PCR 定性检测方法。

本文件适用于香菇粉中含有木质素的掺杂物显微镜检测,适用于菌菇制品中香菇成分的定性检测。本方法所规定检测含有木质素掺杂物方法的检出限(LOD)为 10%(质量百分比),香菇成分定性检测方法的检出限(LOD)为 0.1%(质量百分比)。

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

香菇成分 **shiitake mushroom ingredient**
菌菇制品中来源于香菇(*Lentinus edodes*)子实体、菌丝体的部分。

3.2

Ct 值 **cycle threshold value**
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。

3.3

阳性对照样品 **positive control sample**
经过形态学或者分子生物学鉴定的香菇子实体组织。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

- bp:碱基对(base pair)
- CTAB:十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide)
- DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)
- dATP:脱氧腺苷三磷酸(deoxyadenosine triphosphate)
- dCTP:脱氧胞苷三磷酸(deoxycytidine triphosphate)

dGTP:脱氧鸟苷三磷酸(deoxyguanosine triphosphate)
dUTP:脱氧尿苷三磷酸(deoxyuridine triphosphate)
EDTA:乙二胺四乙酸(ethylene diaminetetraacetic acid)
Hyd1:香菇细胞核基因(hydrophobin1)
PCR:聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction)
Tris:三羟甲基氨基甲烷[tris (hydroxymethyl) aminomethane]

5 方法提要

香菇粉中常见的掺杂物麦麸粉、木屑粉、棉籽壳粉含有木质素。木质素可以被间苯三酚染成红色，而香菇中无木质素，纯香菇粉不被染色。利用该特征，对样品进行间苯三酚处理，在显微镜下观察是否存在被间苯三酚染成深色不透明的组分，判断样品中是否存在含有木质素的掺杂物。

提取菌菇制品的 DNA，以香菇的 DNA 为阳性对照，以其他物种的 DNA 为阴性对照，以无菌水作为空白对照，使用香菇特异性引物和探针进行实时荧光 PCR 扩增，观察实时荧光 PCR 的扩增信号，判断样品中是否含有香菇成分。

6 试剂和材料

除另有规定外，试验用水应符合 GB/T 6682 中一级水的规格，所有试剂均为分析纯或生化试剂。

- 6.1 盐酸溶液:12 mol/L。
- 6.2 间苯三酚试液:5%(质量分数)间苯三酚的 95%乙醇溶液，棕色瓶避光保存。
- 6.3 二氯甲烷。
- 6.4 异丙醇。
- 6.5 乙醇:95%浓度。
- 6.6 NaCl 溶液:1.2 mol/L。
- 6.7 蛋白酶 K:20 mg/mL。
- 6.8 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 Na₂EDTA，pH8.0。
- 6.9 CTAB 沉淀液:5 g/L CTAB、40 mmol/L NaCl。
- 6.10 实时荧光 PCR 预混液:*Taq* DNA 聚合酶、PCR 反应缓冲液、MgCl₂、dNTPs(含 dATP、dUTP、dCTP、dGTP))和 UNG 酶按比例配制的溶液。
- 6.11 引物和探针:根据表 1 的序列合成引物和探针，加超纯水配制成 100 μmol/L 储备液，引物和探针工作液浓度为 10 μmol/L。香菇 hyd1 引物扩增的目标序列见附录 A。

表 1 香菇成分实时荧光 PCR 引物探针序列信息

名称	序列 5'→3'	基因来源	片段大小
目标基因	香菇 hyd1-F:AATGGAGCGGTGGAGGA	Hyd1	107 bp
	香菇 hyd1-R:AGTAGGAGAAGAGGCGGTGA		
	香菇 hyd1-P:FAM-TCGCTGTTACTAACCGTCGT-BHQ1		
内参照基因	18S-F:TCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTA	18S rRNA	137 bp
	18S-R:AATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTT		
	18S-P:FAM-CCGTTTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAATCGAACC-BHQ1		

7 仪器与设备

- 7.1 天平:0.01 g。
- 7.2 光学倒置显微镜:10 倍目镜,10 倍物镜。
- 7.3 研磨仪:出样孔径 $\leq 270\ \mu\text{m}$ 。
- 7.4 恒温水浴锅:65 $^{\circ}\text{C} \pm 1\ ^{\circ}\text{C}$ 。
- 7.5 实时荧光 PCR 仪。
- 7.6 离心机:离心力 $\geq 12\ 000g$ 。
- 7.7 涡旋振荡器。
- 7.8 核酸蛋白分析仪或者具有 260 nm 和 280 nm 波长的紫外分光光度计。
- 7.9 单道移液器:2 $\mu\text{L} \sim 20\ \mu\text{L}$ 、10 $\mu\text{L} \sim 100\ \mu\text{L}$ 、50 $\mu\text{L} \sim 200\ \mu\text{L}$ 、100 $\mu\text{L} \sim 1\ 000\ \mu\text{L}$ 。

8 检测步骤

8.1 香菇粉中掺杂物的显微镜检测

只有需要检测香菇粉中是否存在含有木质素的掺杂物时,才进行显微镜检测。将样品研磨至粒径低于 0.300 mm(50 目),用解剖针挑取约 10 mg 香菇粉样品置于载玻片的中央,滴加浓盐酸(12 mol/L) 1 滴,浸没切片 3 min,加间苯三酚试液 2 滴,放置 5 min 后封片。每个样品制备 2 个平行装片,每个装片在显微镜下使用 10 倍目镜、10 倍物镜观察 10 个视野,观察是否有深色不透明的物质。掺杂物显微镜图片见附录 B。

8.2 香菇成分检测制样

市售香菇子实体,去菌脚处培养基等杂物后用作实时荧光 PCR 检测实验的阳性对照样品。块状菌菇制品样品干燥后研磨至粒径低于 0.300 mm(50 目),称量 0.1 g 用于提取样品 DNA。粉状菌菇制品样品,称量 0.1 g 用于提取样品 DNA。取 1.2 mL 液体菌菇制品样品至 1.5 mL 带盖小试管中,12 000g 离心 15 min,移出上层液体 900 μL ,下层留 300 μL 用于提取样品 DNA。用于提取 DNA 的试样,均设置两个平行。

8.3 DNA 提取

样品加入 600 μL CTAB 提取缓冲液,置于 65 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h,13 000g 离心 10 min。转移上清液至 2 mL 离心管中;加入 0.7 倍体积的二氯甲烷,剧烈振荡混匀,室温 13 000g 离心 10 min。加入等体积 CTAB 沉淀液混匀,13 000g 离心 10 min。弃上清,加入 350 μL 1.2 mol/L NaCl 溶液,充分溶解沉淀。加入 1 倍体积的异丙醇混匀,-20 $^{\circ}\text{C}$ 放置 0.5 h~1 h,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 13 000g 离心 15 min。弃上清,用 70% 乙醇洗涤沉淀一次,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 13 000g 离心 10 min。弃上清,室温下晾干。加入 50 $\mu\text{L} \sim 100\ \mu\text{L}$ 双蒸水,溶解沉淀,该溶液为 DNA 溶液,可在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存 7 d。也可用等效的商品化植物基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA。

8.4 DNA 纯度与浓度测定

使用核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计分别检测 260 nm 和 280 nm 处的吸光值 A_{260} 和 A_{280} 。DNA 的浓度按照式(1)计算:

$$c = \frac{A \times N \times 50}{1\ 000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：
 c ——DNA 浓度，单位为微克每微升($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)；
 A ——260 nm 处的吸光值；
 N ——核酸稀释倍数。
当 A_{260}/A_{280} 比值在 1.7~2.0 之间时，适宜于 PCR 扩增。

8.5 实时荧光 PCR 扩增

8.5.1 反应体系

反应体系配制见表 2。每个样品的 2 个 DNA 提取平行样，分别进行荧光 PCR 检测。

表 2 荧光 PCR 反应体系

香菇 Hyd1		内参照真核生物 18S rRNA	
试剂	终浓度	试剂	终浓度
实时荧光 PCR 预混液	1×	实时荧光 PCR 预混液	1×
香菇 hyd1-F	0.5 $\mu\text{mol/L}$	18S-F	0.5 $\mu\text{mol/L}$
香菇 hyd1-R	0.5 $\mu\text{mol/L}$	18S-R	0.5 $\mu\text{mol/L}$
香菇 hyd1-P	0.5 $\mu\text{mol/L}$	18S-P	0.5 $\mu\text{mol/L}$
DNA 模板	50 ng~250 ng	DNA 模板	50 ng~250 ng
ddH ₂ O	补至 25 μL	ddH ₂ O	补至 25 μL
注：可以选用商品化实时荧光 PCR 预混液。			

8.5.2 反应参数

95 ℃ 2 min;95 ℃ 15 s,60 ℃ 45 s,45 个循环。
注：不同型号仪器的反应参数可参考仪器使用操作说明。

8.5.3 试验对照

检测过程中分别设阳性对照、阴性对照和空白对照。以含有目标基因的香菇基因组 DNA 或人工合成的质粒 DNA 为阳性对照。以其他植物的基因组 DNA 为阴性对照。以灭菌水为空白对照。

9 质量控制

- 以下条件有一条不满足时，试验视为无效：
- a) 空白对照：无荧光对数增长，相应的 Ct 值 >40.0 ；
 - b) 阴性对照：无荧光对数增长，相应的 Ct 值 >40.0 ；
 - c) 阳性对照：有荧光对数增长，且荧光通道出现典型的扩增曲线，相应的 Ct 值 <30.0 ；
 - d) 内参照：有荧光对数增长，且荧光通道出现典型的扩增曲线，相应的 Ct 值 <30.0 。

10 结果判定与表述

10.1 结果判定

10.1.1 显微镜检测结果判断如下。

- a) 如 2 个平行装片都观察到至少 1 个视野有不透明深色的组分,则判定显微镜检测结果阳性。
- b) 如 2 个平行装片中只有 1 个装片观察到至少 1 个视野有不透明深色的组分,则重复显微镜检测 1 次。再次在至少 1 个装片的至少 1 个视野中观察到不透明深色的组分,判定显微镜检测结果阳性,否则判定显微镜检测结果为阴性。
- c) 如 2 个平行装片都未观察到不透明深色的组分,判定显微镜检测结果为阴性。

10.1.2 实时荧光 PCR 检测结果判定

在符合第 9 章的情况下,被检样品进行检测时:

- a) 如 Ct 值 ≤ 35 ,则判定为实时荧光 PCR 检测结果阳性;
- b) 如 Ct 值 ≥ 40 ,则判定为实时荧光 PCR 检测结果阴性;
- c) 如 $35 < \text{Ct 值} < 40$,则重复检测 1 次。如再次检测 Ct 值 < 40 ,则判定为实时荧光 PCR 检测阳性;如再次检测 Ct 值 ≥ 40 ,则判定为实时荧光 PCR 检测阴性。

10.2 结果表述

- 10.2.1 显微镜检测结果为阳性,表述为“检出含有木质素的掺杂物”。
- 10.2.2 显微镜检测结果为阴性,表述为“未检出含有木质素的掺杂物”。
- 10.2.3 实时荧光 PCR 内参照基因阴性,结果表述为“未能有效提取样品 DNA”。
- 10.2.4 实时荧光 PCR 内参照基因阳性,目标基因阳性,表述为“检出香菇成分”。
- 10.2.5 实时荧光 PCR 内参照基因阳性,目标基因阴性,表述为“未检出香菇成分”。

11 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。

附 录 A

(资料性)

香菇成分 Hyd1 基因扩增目标序列

香菇成分 Hyd1 基因扩增目标序列(GenBank:AF217807.1)如下:

AATGGAGCGGTGGAGGAACACGTACGGGTTTATTCAATGACTGTCTGGTCCGTCGCT
GTTACTAACCGTCGT ACAGGACCGTCACCGTCACCGCCTCTTCTCCTACT

附 录 B
(资料性)

间苯三酚显微镜检测图和检测混合样品的对照图

间苯三酚显微镜检测图(含有木质素的掺杂物在视野里为深色不透明物质)见图 B.1。

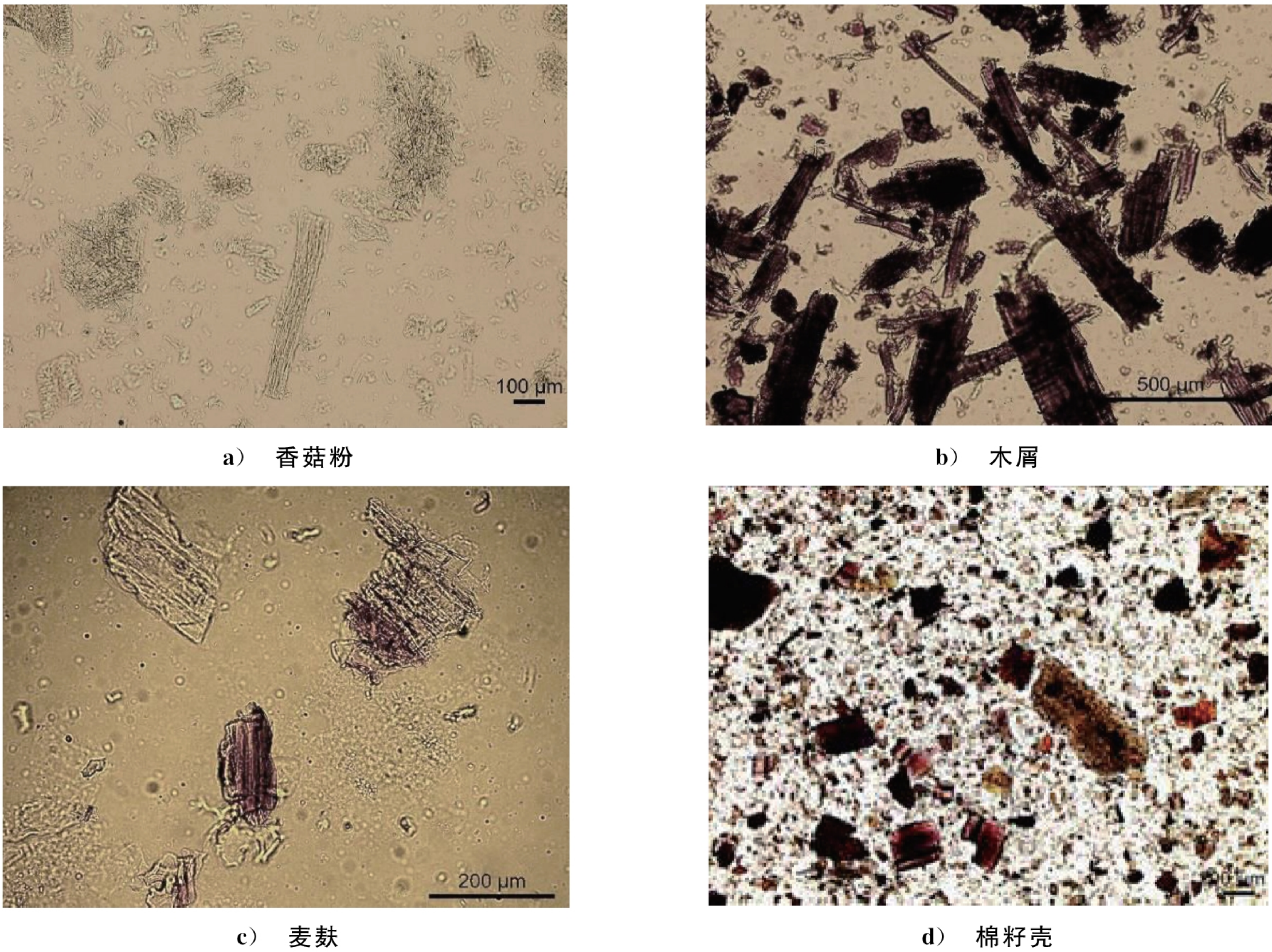


图 B.1 间苯三酚显微镜检测图(含有木质素的掺杂物在视野里为深色不透明物质)

间苯三酚显微镜检测混合样品的对照图(含有木质素的掺杂物在视野里为深色不透明物质)见图 B.2。

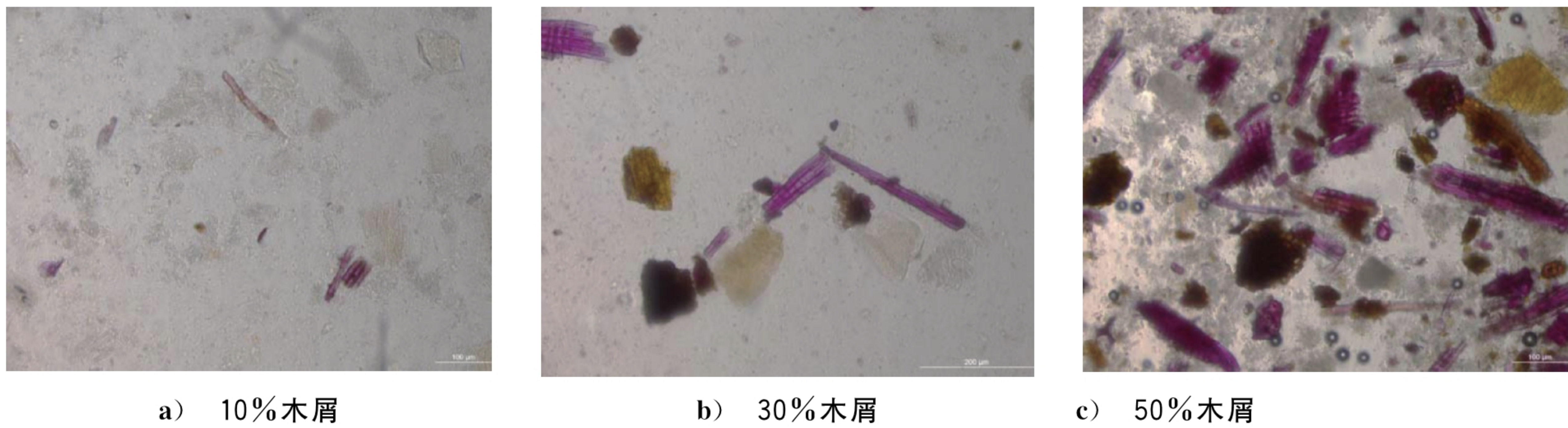
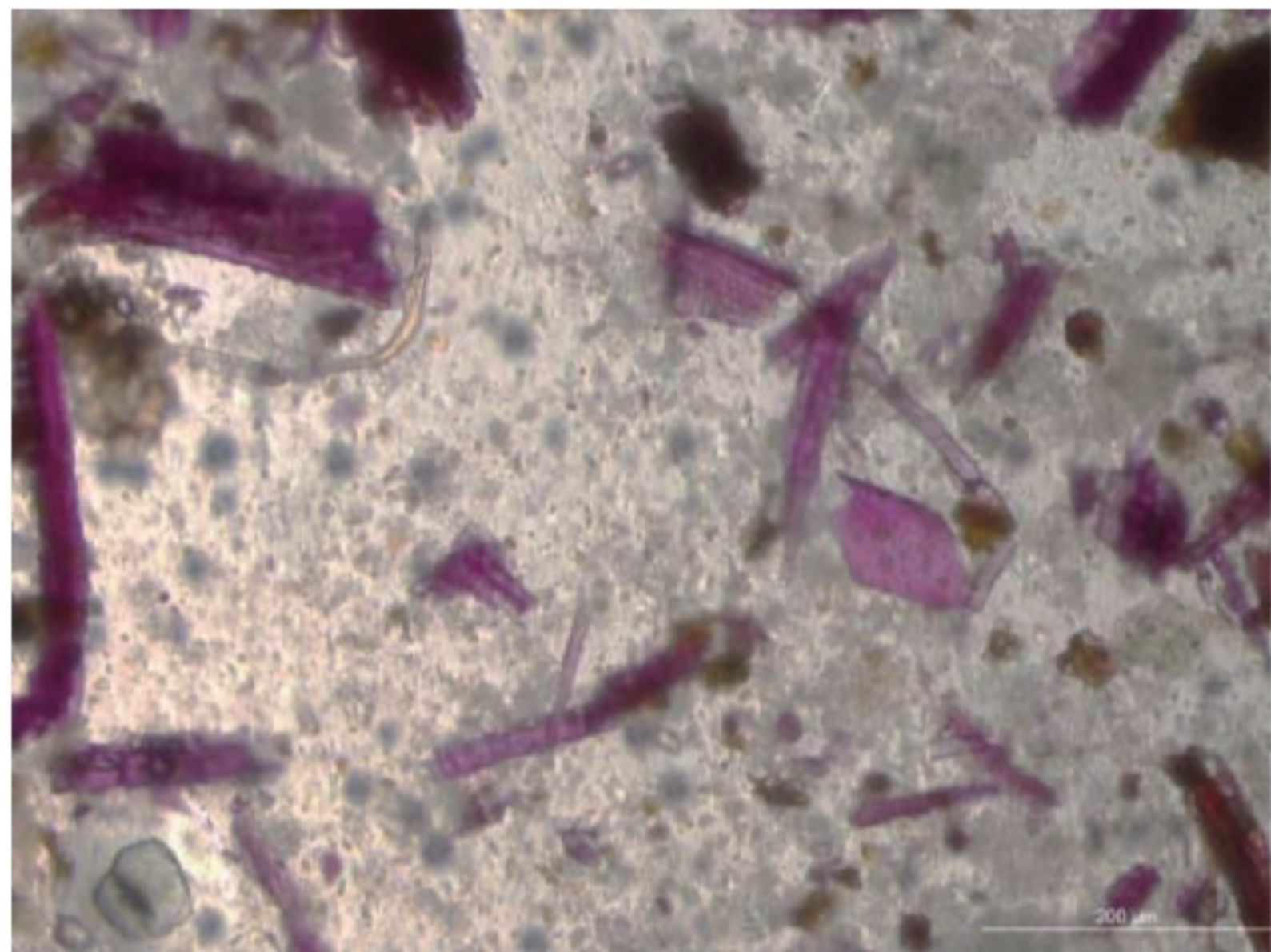
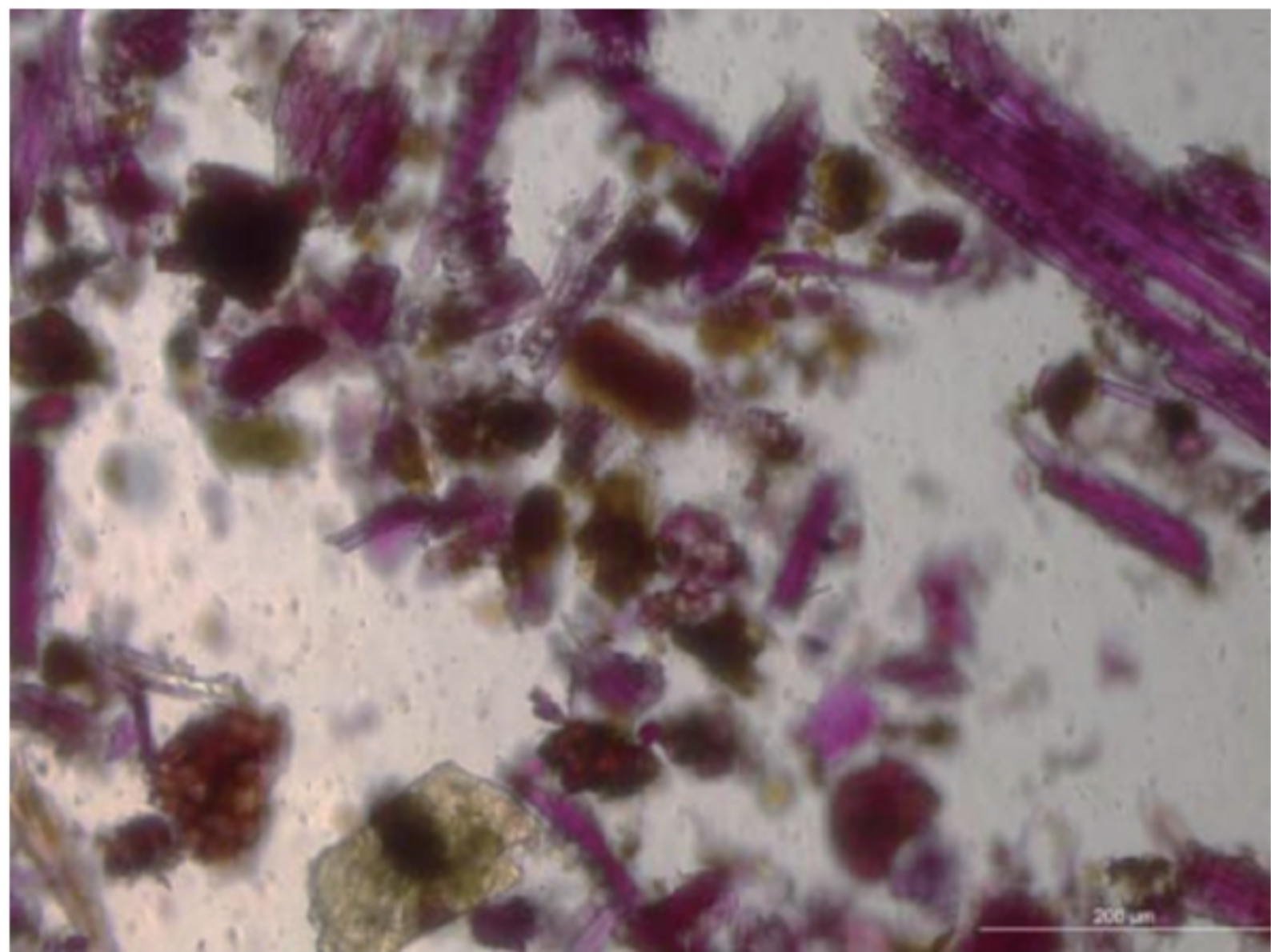


图 B.2 间苯三酚显微镜检测混合样品的对照图(含有木质素的掺杂物在视野里为深色不透明物质)



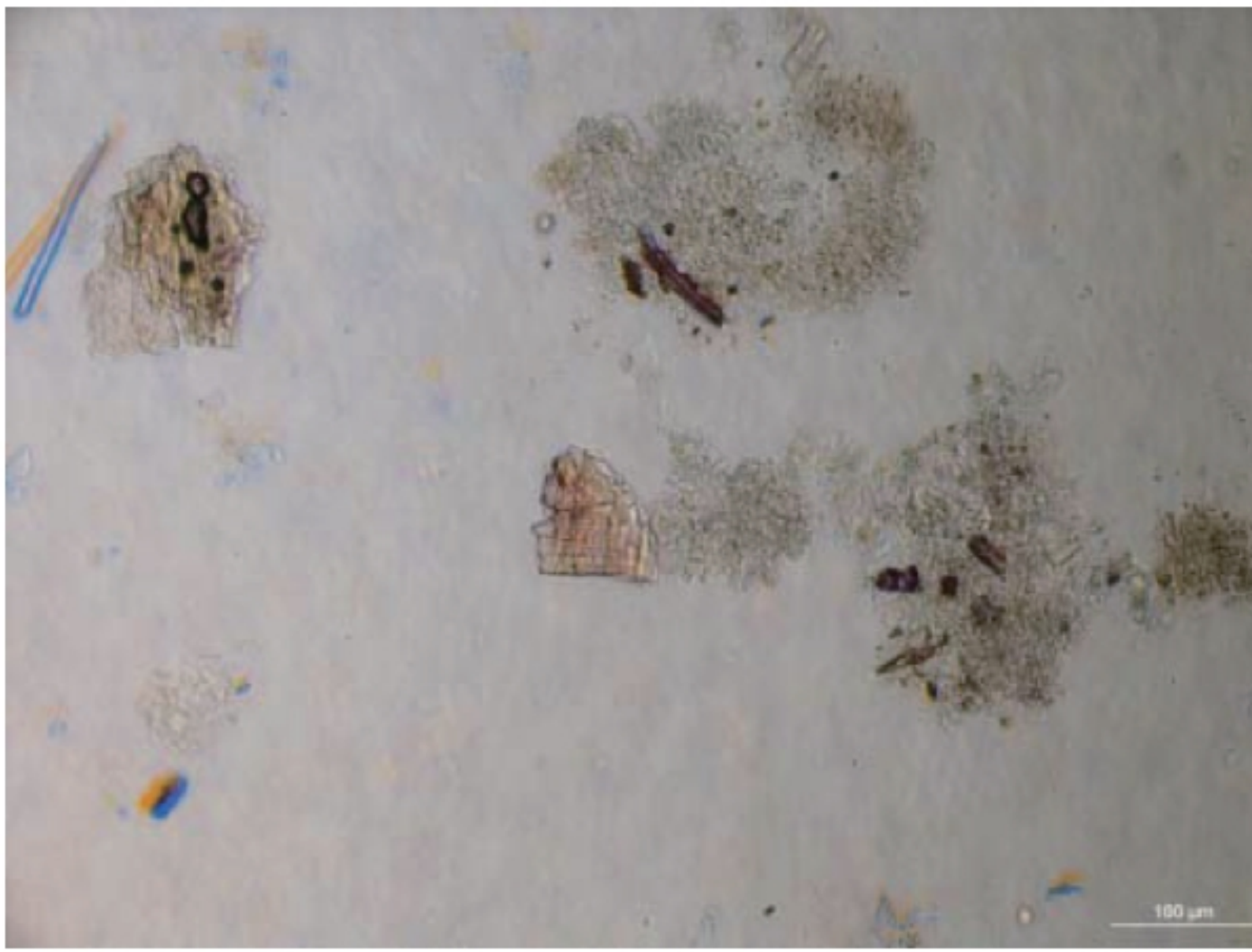
d) 70%木屑



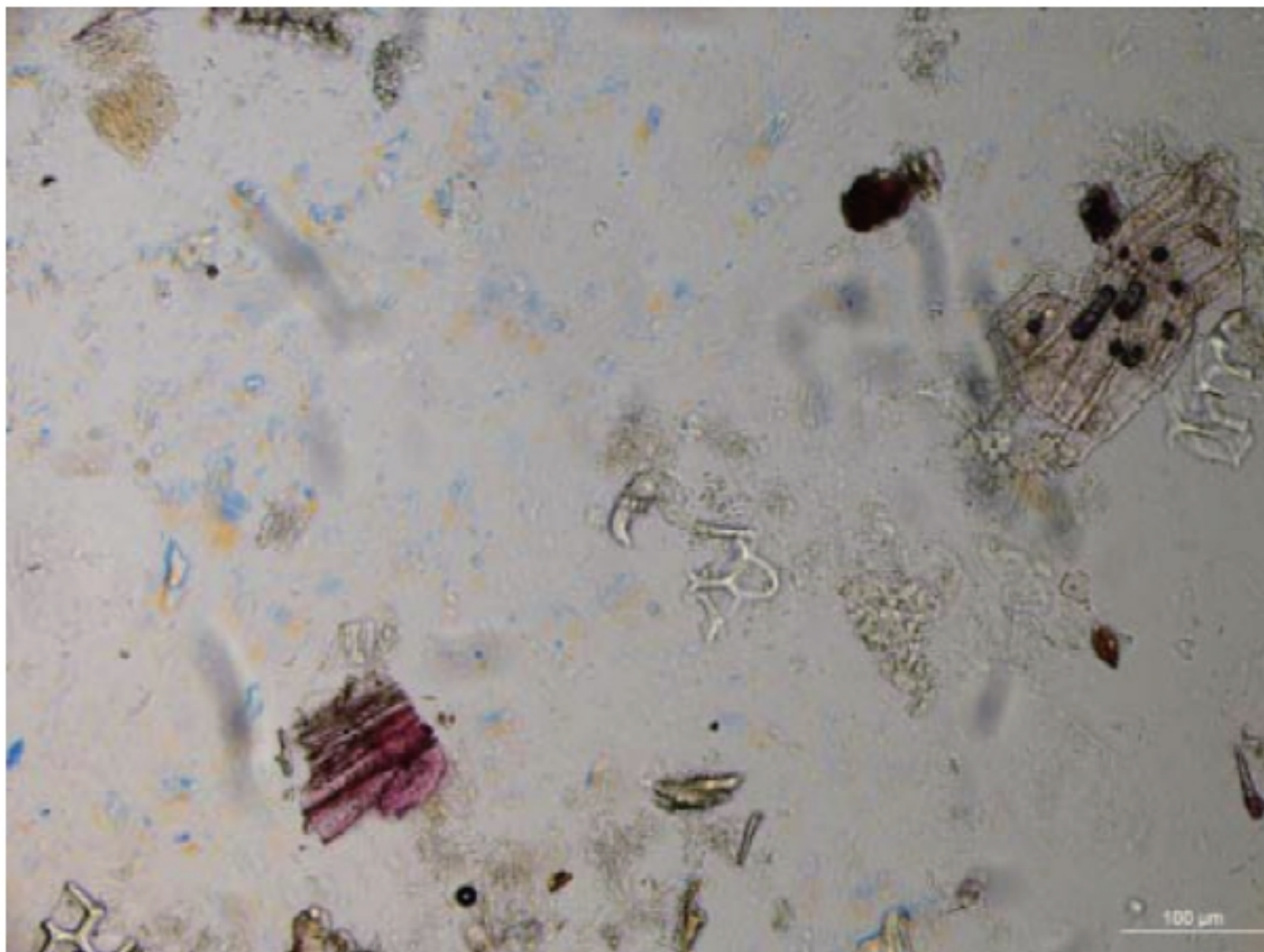
e) 100%木屑



f) 10%麦麸粉



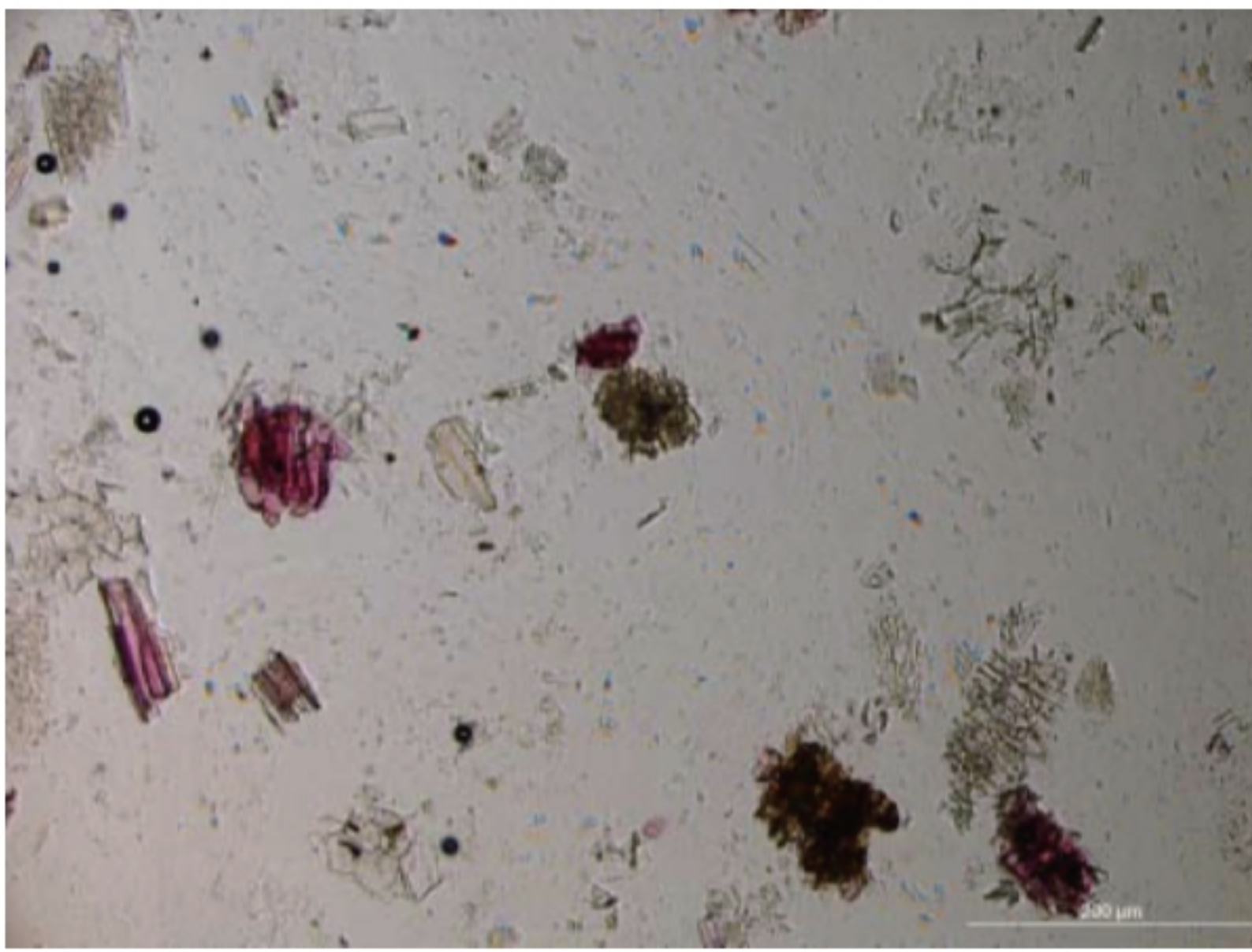
g) 30%麦麸粉



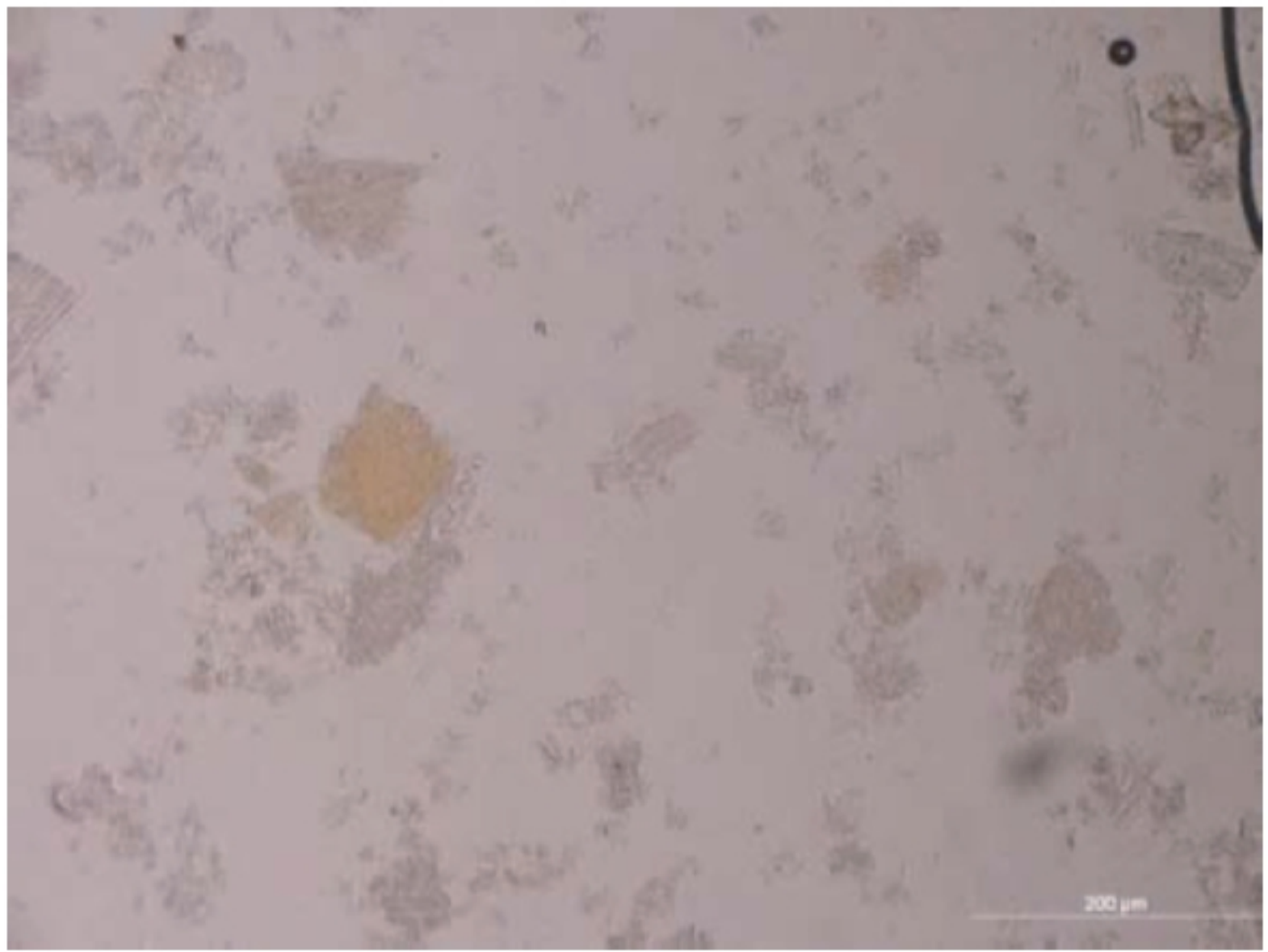
h) 50%麦麸粉



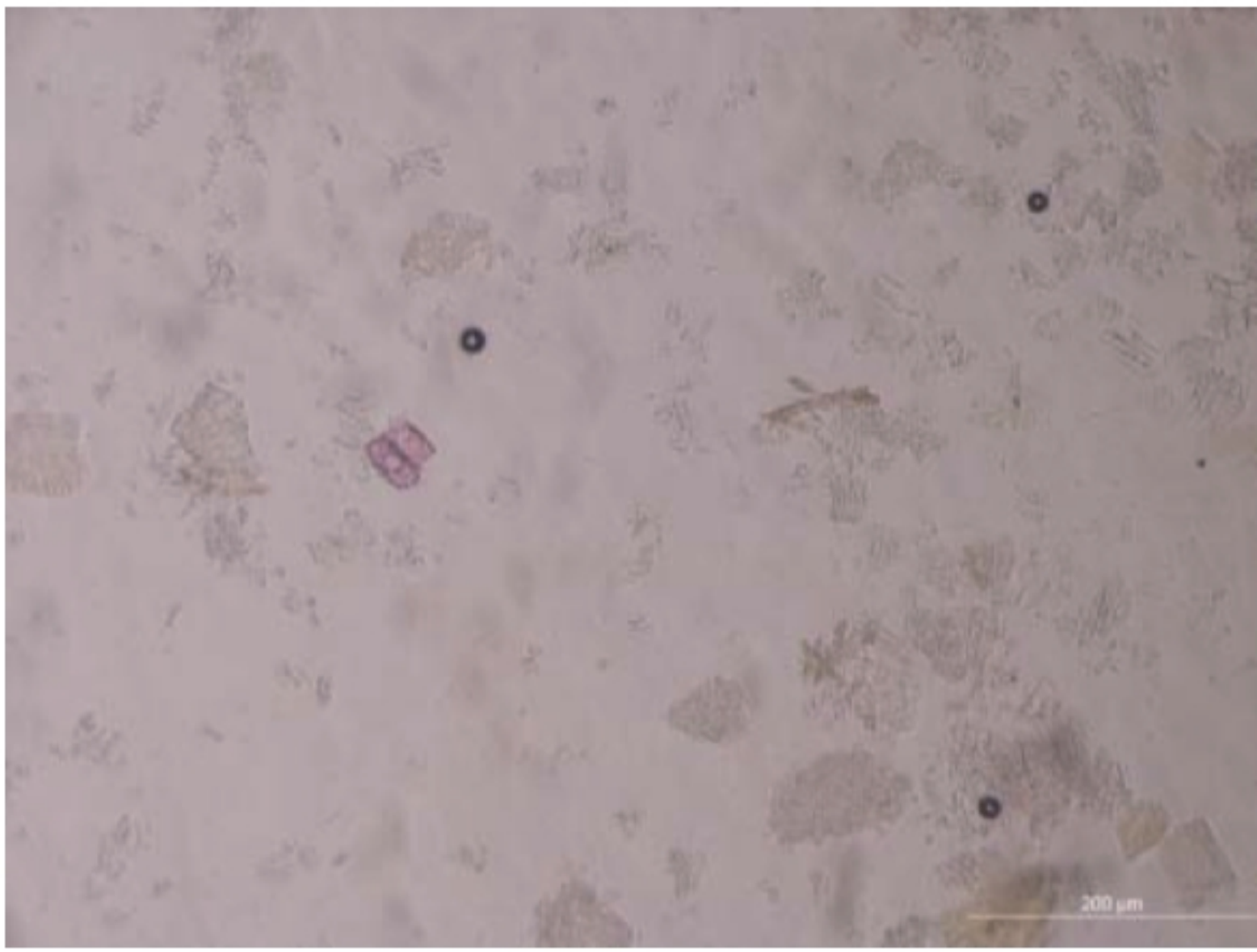
i) 70%麦麸粉



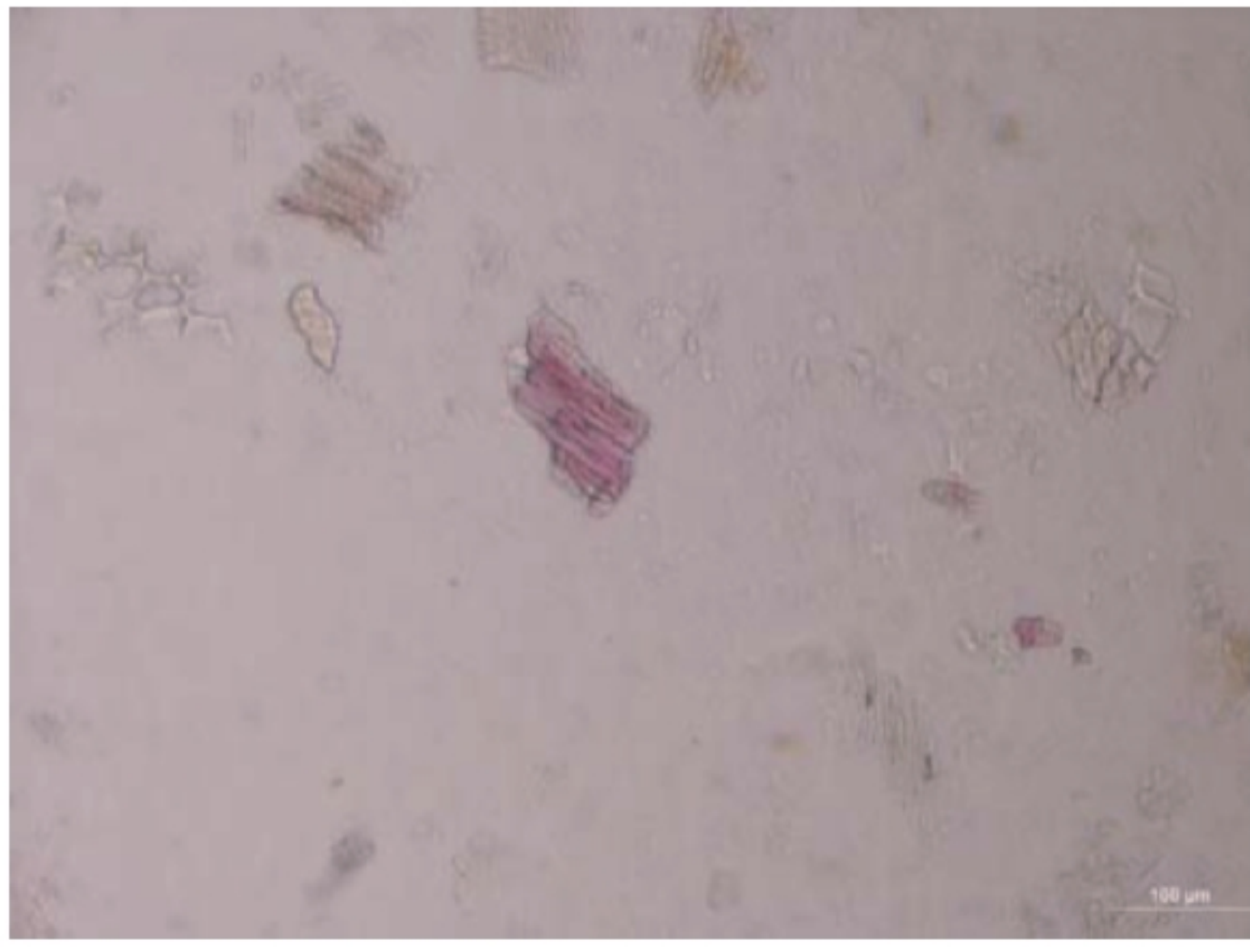
j) 100%麦麸粉



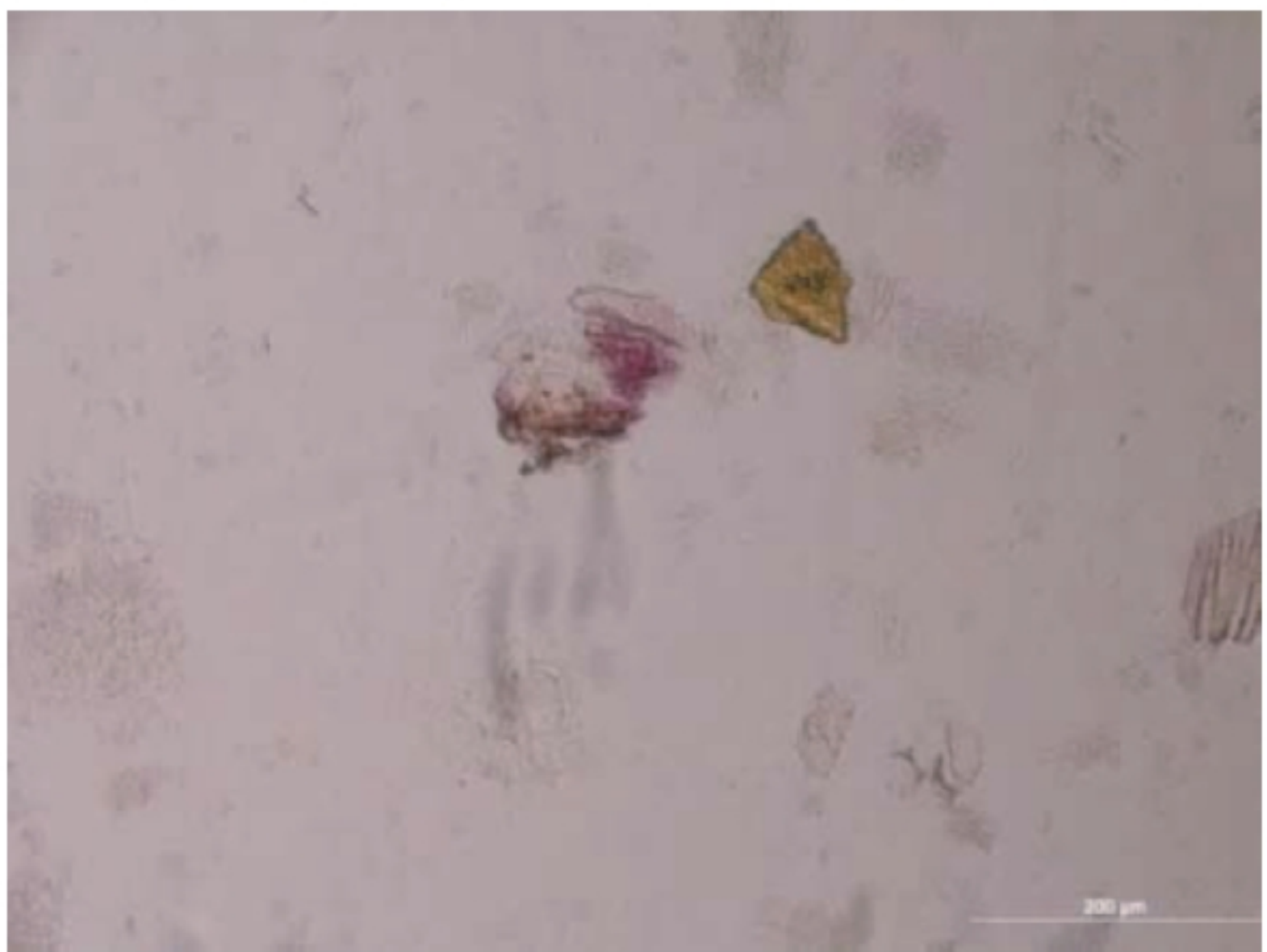
k) 10%棉籽壳



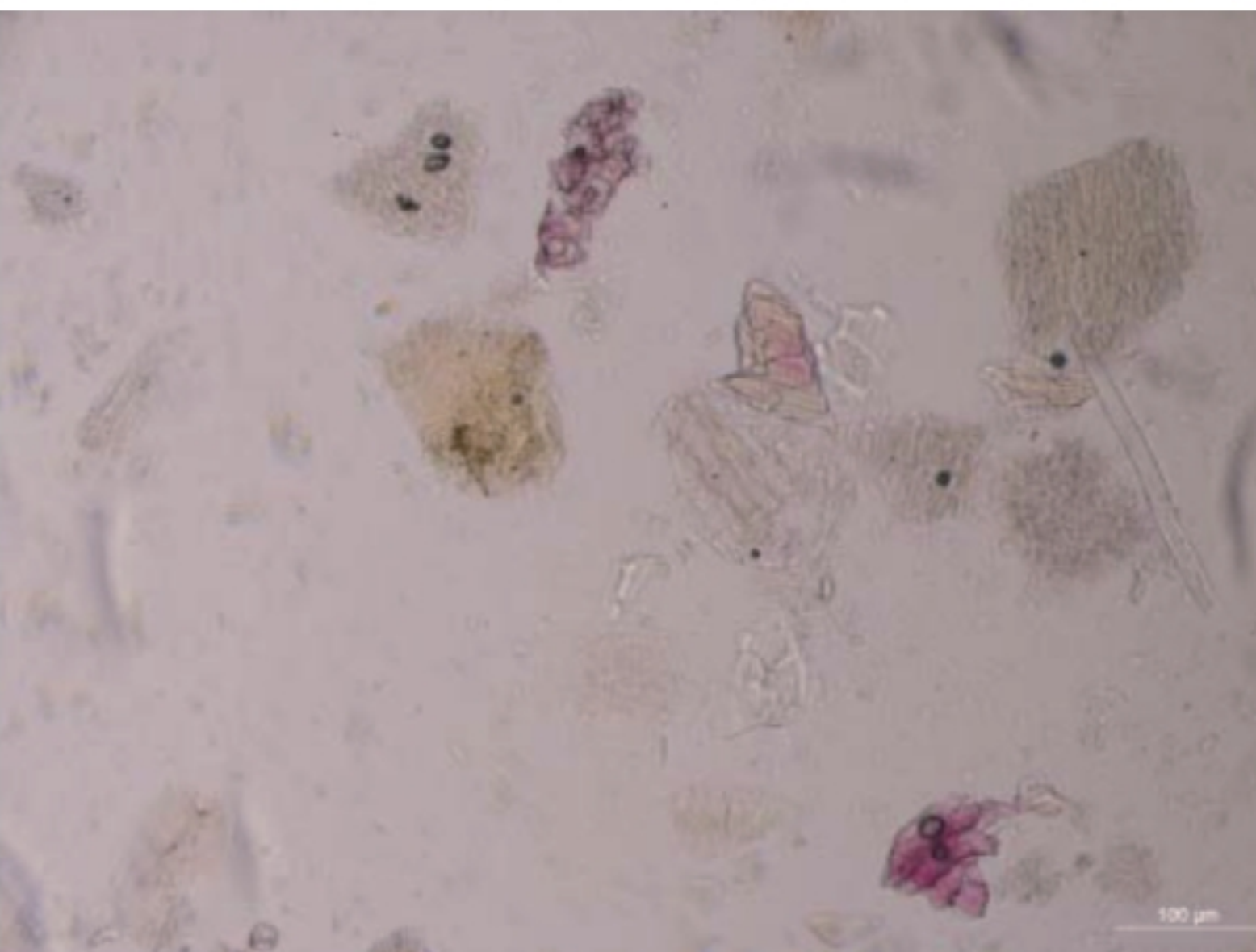
l) 30%棉籽壳



m) 50%棉籽壳



n) 70%棉籽壳



o) 100%棉籽壳

图 B.2 间苯三酚显微镜检测混合样品的对照图(含有木质素的掺杂物在视野里为深色不透明物质)(续)