ICS 67.060
CCS X 11

T/CS

中 国 商 品 学 会 团 体 标 准

T/CS XXX—202X

甘薯/马铃薯淀粉制品中木薯淀粉和玉米淀粉的鉴别技术规程

Technical code for the Identification of Cassava Starch and Corn Starch in Sweet Potato/Potato Starch Products

202X-XX-XX 发布　　202X-XX-XX 实施

中国商品学会 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这些专利的责任。

本文件由中国商品学会归口。

本文件起草单位：XX。

本文件主要起草人：XX。

本文件于 202X 年 XX 月 XX 日首次发布。

甘薯/马铃薯淀粉制品中木薯淀粉和玉米淀粉的鉴别技术规程

1 范围

本文件规定了甘薯/马铃薯淀粉制品术语和定义、木薯淀粉和玉米淀粉鉴别原理、技术要求、试剂与材料、仪器设备、操作步骤及结果判定。

本文件适用于以甘薯或马铃薯及其淀粉为主要原料生产的粉条、粉丝、粉皮、大拉皮等淀粉制品中掺杂木薯、玉米淀粉的鉴别。

本文件采用第一法与第二法相结合的方式进行定性与相对定量检测，其中木薯淀粉、玉米淀粉的检出限为 1%（质量分数，以淀粉原料总质量计）。

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

中华人民共和国药典 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 甘薯淀粉制品 Sweet potato starch products

以甘薯及其淀粉为主要原料生产的甘薯粉条、甘薯粉丝、甘薯粉皮、甘薯大拉皮等淀粉制品。

3.2 马铃薯淀粉制品 Potato starch products

以马铃薯及其淀粉为主要原料生产的马铃薯粉条、马铃薯粉丝、马铃薯粉皮、马铃薯大拉皮等淀粉制品。

第一法 银染电泳法

4 原理

利用超声辅助方法从淀粉制品中提取蛋白，采用聚丙烯酰胺凝胶电泳对提取的蛋白样品进行分离，并通过银染显色方法使蛋白条带可视化。通过对比待测样品的蛋白条带图谱与甘薯、马铃薯及可能掺杂的木薯、玉米标准样品的蛋白条带图谱，依据条带的位置、数量及分布特征，判定样品中是否含有木薯淀粉、玉米淀粉成分。

5 试剂或材料

5.1 蛋白提取液：将 2.0 g 十二烷基硫酸钠、4.0 g 甘油、3.0 g 二硫苏糖醇溶于磷酸盐缓冲液（10 mmol/L，pH 7.4），并用磷酸盐缓冲液定容至 100 mL。分装后-20 ℃保存，避免反复冻融。

其他试剂或材料详见附录 A。

6 仪器和设备

6.1 水浴式超声波发生器。

6.2 分析天平：感量 0.0001 g。
6.3 万能粉碎仪。
6.4 磁力搅拌器。
6.5 离心机：转速可达 12 000 g 以上，温度可调至 4 ℃。
6.6 真空离心浓缩仪。
6.7 电泳仪。
6.8 凝胶成像系统。

7 测定步骤

7.1 试样处理

将样品干燥、粉碎后，过 100 目筛，称取 0.5 g~5.0 g 样品粉末，加入 1.0 mL~10.0 mL 蛋白提取液，混合均匀后于超声波功率密度为 50 W/L、温度为 30 ℃条件下处理 30 min~60 min，于 10 000 g、4 ℃下离心 10 min 取上清液，并用真空离心浓缩仪浓缩。

7.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

取 8 μL 上清液与 2 μL 样品缓冲液（5×）混合，上样进行 15%聚丙烯酰胺凝胶电泳，上样量 10 μL，电泳在恒流 30 mA 下进行，直至溴酚蓝指示剂迁移至凝胶底部，电泳完毕后采用银染法对蛋白进行染色与判定。

7.3 银染处理

将电泳胶片浸入固定液中固定 5 min；取出用蒸馏水清洗 3 次，每次 30 s；继续浸入预处理溶液 A 中处理 5 min，再浸入预处理溶液 B 处理 1 min；再次用蒸馏水清洗 3 次，每次 30 s；然后将胶片浸入硝酸银溶液中，避光处理 8 min；取出后浸入显色液中，密切观察，待条带清晰显现后（通常 30~90 s），立即浸入终止液中终止显色，处理 1 min。

8 结果判定

8.1 若待测样品中甘薯或马铃薯特征性蛋白对应位置有条带，判定该样品检出甘薯或马铃薯淀粉。
8.2 若待测样品中木薯或玉米特征性蛋白对应位置有条带，判定该样品检出木薯或玉米淀粉。

第二法 实时荧光定量 PCR 法

9 原理

针对甘薯、马铃薯及可能掺杂的木薯、玉米等的特异性基因序列设计引物，通过实时荧光定量 PCR 进行扩增检测。分析待测样品的荧光信号并与标准样品比对，判定样品中是否含有木薯淀粉、玉米淀粉成分。

10 试剂或材料

10.1 实时荧光定量 PCR 反应预混液（2×）：1 U~2 U 的 *Taq* DNA 聚合酶、2×PCR 缓冲液、2.5 mmol/L~4.0 mmol/L 镁离子、0.2 U~1 U 尿嘧啶-N-糖基化酶、0.2 mmol/L 的脱氧腺苷三磷酸、脱氧胞苷三磷酸与脱氧鸟苷三磷酸混合物【d(A, C, G)TPs】、0.2 mmol/L~0.4 mmol/L 脱氧尿苷三磷酸（dUTP）、双链嵌合荧光染料 SYBR Green（终浓度 0.4×~1×）、400 nmol/L ROX 染料（某些荧光 PCR 仪不需要 ROX 校正）。
10.2 引物：甘薯、马铃薯、木薯、玉米实时荧光定量 PCR 所用引物序列见表 1。

表 1 特异性引物序列

成分	序列（5'-3'）	靶基因	扩增长度（bp）
甘薯	F：TGCATATCTTCGAGCCGTGC R：TGGTAATCCCGCCTGACCT	ITS	106
马铃薯	F：CAAAGAAGCCCGGTTACTCCT R：TTCGTTCAAGAAGGGCTCCA	matK	156
木薯	F：AAGGTCGGGGAGGCATGA R：CATGTTCCTTGGCGCTTCTC	ITS	100
玉米	F：ACAAAACAGACCGCGAACGA R：GCCGTGGGTTCTTTTTCGC	ITS	108

其他试剂或材料详见附录 B。

11 仪器设备

11.1 微量分光光度计。
11.2 实时荧光定量 PCR 仪。
11.3 万能粉碎仪。
11.4 分析天平：感量 0.0001 g。
11.5 恒温水浴锅。
11.6 涡旋振荡器。
11.7 离心机：转速可达 12000 g 以上，温度可调至 4 ℃。

12 检测步骤

12.1 DNA 提取

将样品用万能粉碎仪粉碎或加入液氮充分研磨后，称取 2 g~4 g。取 10~20 mL 十六烷基三甲基溴化铵缓冲液装入 50 mL 离心管中，临用前加入 5 μL β-巯基乙醇，将称好的样品加入并混匀。涡旋 1 min，在 65 ℃水浴下孵育 45 min，期间每 10 min 颠倒混匀 1 次。然后于 8 000 g 下室温离心 5 min 取上清。向上清中加入等体积氯仿：异戊醇（24:1），轻轻颠倒混匀 1 min，于 8 000 g 室温下离心 10 min。小心转移上清（水相）至新管，加入 0.7 倍水相体积的冰冷异丙醇，于-20 ℃下孵育 45 min（或过夜）以沉淀 DNA，然后于 8 000 g、4 ℃下离心 10 min 得到 DNA 沉淀。向 DNA 沉淀中加入 1 mL70%乙醇，于 6 000 g、4 ℃下离心 5 min，小心吸弃上清液以去除乙醇。开盖室温干燥约 5~10 min，至管内无液体流动、沉淀呈半透明状（切勿完全干裂）。最后，加入 100 μL~200 μL 无菌水溶解，即为 DNA，置于-20 ℃下储存备用。

12.2 DNA 浓度与纯度的测定

使用微量分光光度计分别检测 DNA 浓度（ng/μL）和纯度（A_{260}/A_{280} 比值）。

12.3 实时荧光定量 PCR 扩增

12.3.1 实时荧光定量 PCR 反应体系

实时荧光定量 PCR 反应预混液（2×）：10.0 μL
正向引物（10 μmol/L）：0.3 μL
反向引物（10 μmol/L）：0.3 μL
DNA 模板（50 ng/μL）：1.0 μL
无核酸酶水：8.4 μL

12.3.2 实时荧光定量 PCR 反应程序

95 ℃预变性 3 min；95 ℃，15 s，60 ℃，30 s，40 个循环。

13 结果判定

13.1 定性结果判定

13.1.1 若待测样品中甘薯或马铃薯基因循环阈值（Ct 值）小于 30，判定该样品检出甘薯或马铃薯淀粉。
13.1.2 若待测样品中木薯或玉米基因 Ct 值不大于实验中木薯或玉米淀粉标准品基因的 Ct 值，判定该样品检出木薯或玉米淀粉。
13.1.3 若待测样品中木薯或玉米基因 Ct 值大于实验中木薯或玉米淀粉标准品基因的 Ct 值，判定该样品未检出木薯或玉米淀粉。

13.2 定量结果判定

13.2.1 制作木薯或玉米淀粉不同占比（以淀粉原料重量计）的粉条，提取 DNA 并扩增，以木薯淀粉或玉米淀粉含量（%）的对数值为横坐标，Ct 值为纵坐标作标准曲线，相关系数（R^2）应≥0.99。
13.2.2 将待测样品的 Ct 值代入标准曲线，计算木薯淀粉或玉米淀粉的近似含量。

附 录 A

（资料性）
银染电泳法试剂或材料

A.1　盐酸溶液（6 mol/L）：取浓盐酸与水 1:1 体积比混合。

A.2　磷酸盐缓冲液（10 mmol/L，pH 7.4）：称取 1.44 g 无水磷酸氢二钠、0.24 g 无水磷酸二氢钾、8.0 g 氯化钠、0.2 g 氯化钾，加水溶解，用 6 mol/L 盐酸溶液调节 pH 至 7.4，并定容至 1000 mL。

A.3　丙烯酰胺溶液：称取 44.4 g 丙烯酰胺、1.2 g N,N'-亚甲基双丙烯酰胺，加水溶解并定容至 100 mL，置于棕色瓶中于 4 ℃冰箱中保存。

A.4　1.5 mol/L 三羟甲基氨基甲烷缓冲液（pH 8.8）：称取 18.17 g 三羟甲基氨基甲烷，溶于 70 mL 水中，用 6 mol/L 盐酸溶液调节 pH 至 8.8，定容至 100 mL，4 ℃下保存。

A.5　0.5 mol/L 三羟甲基氨基甲烷缓冲液（pH 6.8）：称取 6.06 g 三羟甲基氨基甲烷，溶于 70 mL 水中，用 6 mol/L 盐酸溶液调节 pH 至 6.8，定容至 100 mL，4 ℃下保存。

A.6　10%过硫酸铵溶液：称取 100 mg 过硫酸铵溶于 1 mL 水中，如析出应重新配制。

A.7　十二烷基硫酸钠溶液（10%）：取 5.0 g 十二烷基硫酸钠，加水溶解并定容至 50 mL。

A.8　电泳缓冲液（pH 8.3）：称取 3.03 g Tris、14.4 g 甘氨酸，加 500 mL 水溶解后，加入 10 mL 10%十二烷基硫酸钠溶液，混匀后加水定容至 1000 mL。

A.9　氢氧化钠溶液（1 mol/L）：称取 4.0 g 氢氧化钠，加水溶解并定容至 100 mL。

A.10　乙二胺四乙酸二钠溶液（60 mmol/L，pH 8.8）：称取 2.23 g 乙二胺四乙酸二钠，加水溶解，用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 8.8，定容至 100 mL。

A.11　样品缓冲液（5×）： 取 25 mL 十二烷基硫酸钠溶液（10%，w/v）、2.5 mL β-巯基乙醇、5 mL 0.5 mol/L 三羟甲基氨基甲烷缓冲液（pH 6.8）、12.5 mL 乙二胺四乙酸二钠溶液（60 mmol/L，pH 8.8）、30.0 g 蔗糖，混匀后，加水定容至 50 mL。

A.12　溴酚蓝溶液：称取 10 mg 溴酚蓝、1 g 蔗糖，加 0.2 mL 0.5 mol/L 三羟甲基氨基甲烷缓冲液（pH 6.8）和 9.0 mL 蒸馏水，混合均匀，置于配有螺旋瓶盖的耐热玻璃管中。

A.13　15%聚丙烯酰胺分离胶：取 3.4 mL 丙烯酰胺溶液、2.5 mL 1.5 mol/L 三羟甲基氨基甲烷缓冲液（pH 8.8）、3.9 mL 水、0.1 mL 十二烷基硫酸钠溶液（10%，w/v）、0.1 mL 过硫酸铵溶液、10 μL 四甲基乙二胺混合均匀，现配现用。

A.14　5%聚丙烯酰胺浓缩胶：取 1.1 mL 丙烯酰胺溶液、2.5 mL 0.5 mol/L 三羟甲基氨基甲烷缓冲液（pH 6.8）、6.2 mL 水、0.1 mL 十二烷基硫酸钠溶液（10%，w/v）、0.1 mL 过硫酸铵溶液、10 μL 四甲基乙二胺混合均匀，现配现用。

A.15　固定液：取 48 mL 丙酮、3 mL 三氯乙酸溶液（50%，v/v）、50 μL 甲醛溶液（37%，v/v），加水稀释至 120 mL，混合均匀。

A.16　预处理溶液 A：取丙酮 48 mL，加水稀释至 120 mL，混合均匀。

A.17　预处理溶液 B：取 200 μL 硫代硫酸钠溶液（10%，w/v），加水稀释至 120 mL，混合均匀。

A.18　硝酸银溶液：称取硝酸银 0.24 g，加入 1.2 mL 甲醛溶液（37%，v/v），加水稀释至 120 mL，混合均匀。必须临用前配制，避光操作，且配制后立即使用，不可储存。

A.19　显色液：取 2.4 g 碳酸钠，加水 120 mL 使溶解；临用前加入 50 μL 甲醛溶液（37%，v/v）、50 μL 硫代硫酸钠溶液（10%，w/v），混合均匀，立即使用。

A.20　终止液：取冰醋酸 50 mL，加水稀释至 1000 mL，混合均匀。

附 录 B

（资料性）
实时荧光定量 PCR 法试剂或材料

B.1　盐酸溶液（6 mol/L）：取 12 mol/L 的浓盐酸与水按 1:1 的体积比混合即可。
B.2　氢氧化钠溶液（1 mol/L）：称取 4.0 g 氢氧化钠，加水溶解并定容至 100 mL。
B.3　十六烷基三甲基溴化铵缓冲液：称取 10.0 g 十六烷基三甲基溴化铵、40.9 g 氯化钠、6.05 g 三羟甲基氨基甲烷、3.7 g 乙二胺四乙酸二钠，加 250 mL 水溶解，用 6 mol/L 盐酸溶液或 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 8.0，加水定容至 500 mL。
B.4　10×PCR 缓冲液：200 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷缓冲液、200 mmol/L 氯化钾溶液、15 mmol/L 氯化镁溶液。