

ICS 67.050
CCS X 04

T

团 体 标 准

T/GFPU 2001-2022

植物蛋白饮料多种植物源性成分快速检测 数字微流控芯片法

Rapid determination of plant-derived ingredients in plant protein
beverages—Digital microfluidic chip method

2022-11-30 发布

2022-11-30 实施

广东省食品行业协会 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专利的责任。

本文件由广东省食品行业协会提出并归口。

本文件主要起草单位：广东省食品行业协会质量专业委员会、广州市食品检验所、珠海市迪奇孚瑞生物科技有限公司、无限极（中国）有限公司、广州质量监督检测研究院、广东省食品检验所、广州海关技术中心、广东省粮食科学研究所、珠海市香洲区疾病预防控制中心、东莞市蜂也保健食品有限公司。

本文件主要起草人：张俊修、肖剑、陈天蓝、黄延盛、梁美丹、陈荣桥、丁清龙、凌莉、郭超、彭程、刘耀军、冼钰茵、苏妙贞、胡均鹏、陆智、陈楷、林秀敏、寇秀颖、张少波、郑砚泽、曾初欢、汪良清。

本文件为首次发布。

植物蛋白饮料多种植物源性成分快速检测 数字微流控芯片法

1 范围

本文件规定了植物蛋白饮料中大豆、核桃、榛子、花生、杏仁和椰子6种成分的快速检测方法（数字微流控芯片法）。

本文件适用于植物蛋白饮料中上述6种植物源性成分的快速定性检测。

本文件中植物蛋白饮料6种植物源性成分的检出限：大豆、核桃、榛子、花生均为0.5%（质量分数），杏仁、椰子均为1%（质量分数）。

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 19489 实验室生物安全通用要求

GB/T 19495.2 转基因产品检测 实验室技术要求

GB/T 27403 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

3 术语、定义和缩略词

3.1 术语与定义

下列术语与定义适用于本文件。

微流控芯片技术 Microfluidic chip

采用微机电系统技术在数平方厘米大小的芯片上加工微米至纳米尺度的微通道网络，通过对微米或纳米尺度下液体的精确操控，在芯片上实现样品引入、混合、化学反应、分离、检测等功能，其系统具有微量、高效、高通量、低成本、微型化、集成化和自动化等特点。

环介导等温扩增技术 Loop-mediated isothermal amplification

利用具有链置换特异性的 *Bst* DNA 聚合酶和四条能够特异性识别靶标序列上多个特异性区域（F3、F2、F1、B1、B2、B3）的引物，开启循环链置换反应，从而实现等温条件下的连续快速反应。

数字微流控芯片技术 Digital microfluidic chip

利用液滴在疏水表面的介电湿润现象，通过电子电路控制液体表面张力，实现离散液滴的精准控制，结合引物试剂预包装、LAMP 扩增技术，实现将配液、分装、检测等操作在封闭的芯片内自动进行。

3.2 缩略词

下列缩略词适用于本文件。

Bst: 嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*)

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

DNA: 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic acid)

DNase: 脱氧核糖核酸酶 (Deoxyribonuclease)

CTAB: 十六烷基三甲基溴化铵 (Cetyltrimethylammonium bromide)

Tris: 三羟甲基氨基甲烷 [Tris (Thdroxymethyl) aminomethane]

Tris-HCl: 三羟甲基氨基甲烷一盐酸 [Tris (Thdroxymethyl) aminomethane-hydrochloric acid]

EDTA: 乙二胺四乙酸 (Ethylenediamine tetraacetic acid)

Na₂EDTA: 乙二胺四乙酸二钠 (Ethylenediamine tetraacetic acid disodium)

Tt: 时间阈值 (Time threshold)

4 原理

将植物蛋白饮料常见的大豆、核桃、榛子、花生、杏仁、椰子源性成分 LAMP 特异性引物，分别包埋在微流控芯片的相应位置，将提取样本的 DNA 与恒温扩增反应液混合后，加入微流控芯片中进行 63 °C 恒温扩增反应，通过微流控芯片检测仪实时检测荧光信号，根据扩增产物荧光信号出现的时间、强度和位置，判断样本中是否含有目标植物源性成分。

5 试剂与材料

除另有说明外，所用试剂、耗材均应不含 DNA 和 DNase；试剂为分析纯、生化试剂；实验用水为 GB/T 6682 中规定的一级水。

5.1 阴性对照、阳性对照的成分。

a) 阴性对照：用非目标源性成分提取的核酸；

b) 阳性对照：从含有 6 种目标成分阳性样本中提取的核酸，或含有人工合成的 6 种目标核酸序列的 DNA 片段。

5.2 RNA 酶 (10 mg/μL)。

5.3 蛋白酶 K (20 mg/mL)。

5.4 异丙醇 (分析纯)。

5.5 硅羟基磁珠。

5.6 70 %乙醇 (V/V)。

5.7 三氯甲烷 (分析纯)。

- 5.8 氯仿：异戊醇（V/V，24:1）。
- 5.9 氯化钠溶液：1mol/L。
- 5.10 数字微流控芯片法检测反应体系、引物配制及引物序列：见附录 A。
- 5.11 十六烷基三甲基溴化铵提取液（CTAB 提取液）：成分和配制方法见附录 B 中 B.1。
- 5.12 十六烷基三甲基溴化铵沉淀液（CTAB 沉淀液）：成分和配制方法见附录 B 中 B.2。
- 5.13 TE 溶液（Tris-HCl、EDTA 缓冲液）：成分和配制方法见附录 B 中 B.3。
- 5.14 数字微流控芯片结构及排布示意图：见附录 C。

6 仪器设备

- 冰箱：2 °C~8 °C、-20 °C±5 °C；
- 漩涡混合仪；
- 电子天平：感量 0.01 g；
- 高速离心机：12 000 r/min；
- 恒温金属浴：65 °C±1 °C；
- 生物安全柜；
- 高压灭菌锅；
- 核酸蛋白分析仪；
- 磁力架；
- 微流控芯片检测仪；
- 微量移液器：0.5 μL~10 μL、2 μL~20 μL、10 μL~100 μL、20 μL~200 μL、100 μL~1000 μL。

7 检测流程

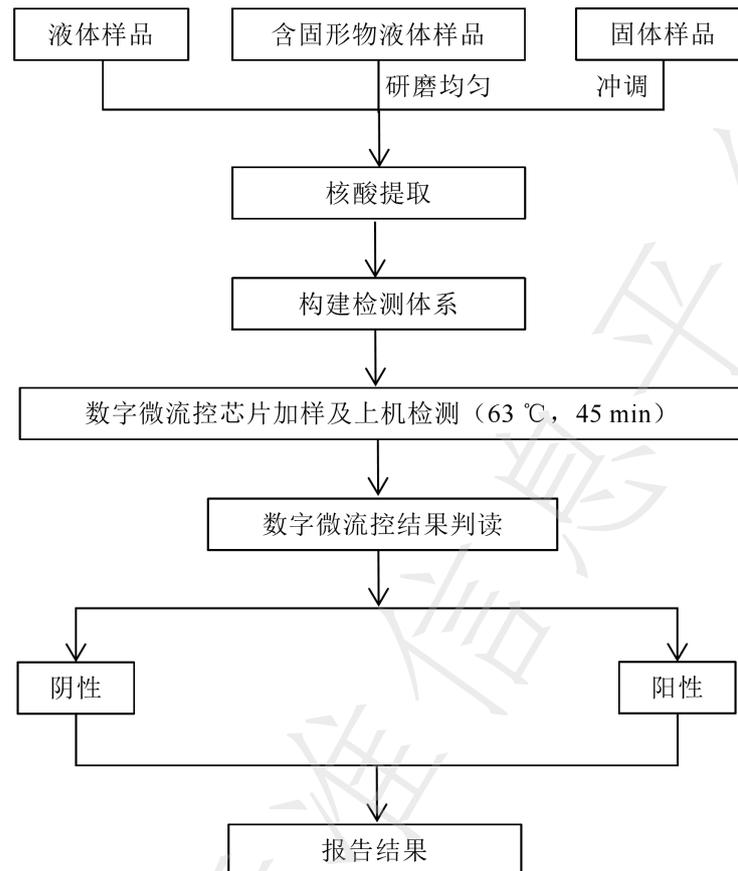


图 1 数字微流控芯片法检测流程

8 操作步骤

8.1 核酸提取

(1) 固体样品按照产品标签标示冲调比例稀释至液体状态，含固型物样品则将固型物均质后取样，液体样品摇匀后吸取 0.5 mL~1 mL 至灭菌离心管中。

(2) 加入 1 mL CTAB 提取缓冲液，10 μL RNA 酶和 20 μL 蛋白酶 K，振荡混匀，65 $^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 以上，期间上下颠倒混匀 4 次~5 次。

(3) 加入 600 μL 氯仿/异戊醇混合液，充分振荡混匀 30 s，12 000 r/min 离心 10 min，取上清液于洁净的离心管中，注意不要吸到上清液下面的蛋白层。

注意：脂肪含量高的植物蛋白饮料（花生、核桃等），需要增加以下步骤，具体方法为：加入 2 倍体积 CTAB 沉淀液，混匀后室温静置 60 min 后，12 000 r/min 离心 10 min；弃去上清液，加入 350 μL 1 mol/L NaCl 溶液充分溶解沉淀；加入 350 μL 三氯甲烷，高速漩涡振荡混匀，12 000 r/min 离心 10 min，取上清液。

(4) 加入等 0.8 倍体积冰上预冷的异丙醇，15 μL 磁珠悬浮液，充分混匀后，静置 15 min，将离心管置于磁力架静置 1 min，弃去废液。

(5) 加入 70 %乙醇，充分混匀后，将离心管置于磁力架静置 1 min，弃去废液。

(6) 重复操作步骤 5，将吸附 DNA 的磁珠于室温干燥 5 min。

(7) 加入 50 μL TE 溶液，65 $^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 温浴 3 min，将离心管置于磁力架静置 1 min，吸取溶液于洁净的 1.5 mL 离心管中，即得到样品 DNA。可立即用于实验，也可保持于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 条件备用。

注：也可使用等效的其他 DNA 提取方法或商品化 DNA 提取试剂盒。

8.2 DNA 浓度和纯度测定

使用核酸蛋白分析仪检测其浓度及质量， $\text{OD}_{260/280}$ 值应在 1.7~2.0 之间。

8.3 恒温扩增

8.3.1 试剂配制

从 -20 $^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ 冰箱取出试剂，将各试剂于室温下解冻，充分混匀并离心后备用。取出 200 μL PCR 管，按照附录 A 构建检测体系，漩涡振荡混匀并瞬时离心，总体积为 25 μL 。

8.3.2 数字微流控芯片加样

用移液枪吸取 550 μL 白油，从数字微流控芯片的进油口缓慢加入，使芯片全部浸润白油为止，用移液枪吸取 18 μL 配制好的反应试剂从芯片的弧形进液口缓慢加入。

8.3.3 上机测试

将加样后的芯片连同卡托一同放入微流控芯片检测仪中，反应温度和程序如表 1：

表 1 恒温扩增反应条件

温度	反应时间	荧光采集
63 $^{\circ}\text{C}$	45 min	每分钟采集 1 次

8.4 结果判断

8.4.1 阈值线设置

手动设置为扩增曲线荧光强度的 1/10 左右，或以阈值线刚好超过非典型 S 型扩增的最高点为设定原则，仪器配套软件自动分析结果。

8.4.2 结果判定

任意一个反应孔或多个反应孔中荧光信号出现典型扩增曲线，且 T_t 值 ≤ 40 ，则该反应孔对应检测判断为阳性，即该样本中含有对应检测项目的核酸；未出现典型扩增曲线或 T_t 值 > 40 的反应孔判断为阴性，即该样本不含有对应检测项目的核酸。

9 质量控制

通过设置空白对照、阴性对照和阳性对照进行反应的控制，具体判断如下：

空白对照：反应时间 45 min 内，荧光信号未出现典型扩增曲线；

阴性对照：反应时间 45 min 内，荧光信号未出现典型扩增曲线；

阳性对照：反应时间 45 min 内，荧光信号出现典型扩增曲线， T_t 值 < 40 。

以上条件有一条不满足时，实验视为无效。

10 结果表述

结果为阴性，表述为“未检出××成分”；

结果为阳性，表述为“检出××成分”。

11 防止污染措施

实验室操作和废弃物处理应符合 GB/T 19495.2 的规定，应严格按照 GB/T 27403 的要求操作。

附录 A

(规范性)

数字微流控芯片检测试剂体系及引物配制

A.1 数字微流控芯片检测反应体系组分表

表 A.1 数字微流控芯片检测反应体系组分表

组分	体积 (μL)
缓冲液 (10 \times)	2.5
甜菜碱 (5 mol/L)	6
dNTPs (10 mmol/L)	3
MgSO ₄ (100 mmol/L)	1
<i>Bst</i> DNA 聚合酶 (8 U/ μL)	1
SYTO-9 染料 (20 $\mu\text{mol/L}$)	0.5
样品 DNA 模板	5
ddH ₂ O	6
总体积	25

注: 缓冲液 (10 \times): 200 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8), 100 mmol/L KCl, 100 mmol/L(NH₄)₂SO₄, 1 % Triton X-100。引物已预先固定到微流控芯片上, 最终微流控芯片中的反应体系含反应所需的引物。检测试剂也可使用其他等效商品化试剂盒。

A.2 数字微流控芯片的引物混合固定体系

表 A.2 数字微流控芯片的引物混合固定体系

组分	体积 (μL)
F3 (Forward Outer Primer) 上游外部引物 (100 $\mu\text{mol/L}$)	0.05
B3 (Backward Outer Primer) 下游外部引物 (100 $\mu\text{mol/L}$)	0.05
FIP (Forward Inner Primer) 上游内部引物 (200 $\mu\text{mol/L}$)	0.2
BIP (Backward Inner Primer) 下游内部引物 (200 $\mu\text{mol/L}$)	0.2
LF (Forward Ring Primer) 上游环引物 (200 $\mu\text{mol/L}$)	0.1
LB (Backward Ring Primer) 下游环引物 (200 $\mu\text{mol/L}$)	0.1
ddH ₂ O	0.3

A.3 植物源性成分基因检测用引物序列

表 A.3 植物源性成分基因检测用引物序列

物种	靶标基因	引物名称	引物序列
大豆	<i>Lectin</i>	F3	GGCAAATAATATGATACCTGAACT
		B3	AGAGTGAAAAGCTACCCAAT
		FIP	GAGTACCAAAGCTTGCAATGCGCACTTACATTGTCAACAAGG
		BIP	AGGAGGTAGTTGTCAGAATTTTCTTAGAGTTTACCTCAGAACTATCG
		LB	AGAGGAAACTGCCATGCACC
核桃	<i>vicilin-like protein precursor</i>	F3	TCCCAGAGCATTAGGTCTGA
		B3	ACTAAGGTGAGGGTCTGCC
		FIP	CACGAAGGAGCTCGGTTCTCTCTGAGTCCGAGGAAGGTGAAG
		BIP	TCCTAACACCTCCATGCTCCCATCCTCTTGTGACTACGGCA
		LF	CATCACAAAGATGCGGAATCTGT
榛子	<i>Ca8</i>	F3	CATGAGTCTGATCTCTCTTCA
		B3	GTGAGCGTAGCTGTGAGA
		FIP	TTGCATGTAGACGAAGGGGCACAGACTTAAATCAGACAAAAAGC
		BIP	CTGCATGAAAACCTCCTAACACGTGGGTTTTATATAGAAGGAGGCT
		LB	CCCCTTTTCAACACGCACC
花生	<i>Arah 2.02</i>	F3	AACATCTCATTGATTATACCACA
		B3	GGTATTTATAGGTGAAAGGAGG
		FIP	CTTCCACGTTACATTTTCATGCAAAACAACATGGCATGCTTAGG
		BIP	TAATGAAGCAAACACAGCCACCATTTTGCATGTGAGGTACG
		LF	GTCCAAGATGCCTTTTTGTTGGTA
		LB	CTCCTTCCCCCTTCCCTT
杏仁	<i>PR5-1</i>	F3	TCAACCACAGGGTTCAAGTT
		B3	GCTAAAGTTGTCGGCGGAAT
		FIP	CATCCAGTTCGGGCCAGAAAGCCCCATGCTAGATTCAAGCT
		BIP	TATGGAAAGTTCGTCTGCGCCAGACCGTTACCGTTGCACTT
		LF	ATGGCACCGGAGTGTGT
		LB	CAGACTGTGCCTCCGGTCAG
椰子	<i>Hd3a</i>	F3	CTCCAAGTCCAAGTGACC
		B3	GTGGAGCTAGTTTTGTTCC
		FIP	CATGGCTTCCCAGTGGGTACCTCAGGGAGTATTGCACTG
		BIP	GCTATATATTGGGCCGACTTCGCAATCTCTTCTCTTCCCTGT
		LF	ACTCTTCAGCGGGTGCTTAC

附录 B

(规范性)

试剂配制

B.1 十六烷基三甲基溴化铵提取液 (CTAB 提取液)

CTAB	20.0 g
NaCl	81.9 g
0.5 mol/L Na ₂ EDTA	40 mL
1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)	100 mL

先加入 500mL 超纯水充分溶解, 用 10 % 盐酸调节 pH 至 8.0, 最后定容至 1000 mL, 121 °C 高压灭菌 15 min, 室温保存。

B.2 十六烷基三甲基溴化铵沉淀液 (CTAB 沉淀液)

CTAB	5.0 g
NaCl	2.34 g
超纯水	加至 1000 mL

充分溶解, 121 °C 高压灭菌 15 min, 室温保存。

B.3 TE 溶液 (Tris-HCl、EDTA 缓冲液)

1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)	10 mL
0.5 mol/L EDTA (pH 8.0)	2 mL
超纯水	加至 1000 mL

充分溶解, 121 °C 高压灭菌 15 min, 室温保存。

附录 C

(资料性)

数字微流控芯片结构及模拟示意图，见图 C.1

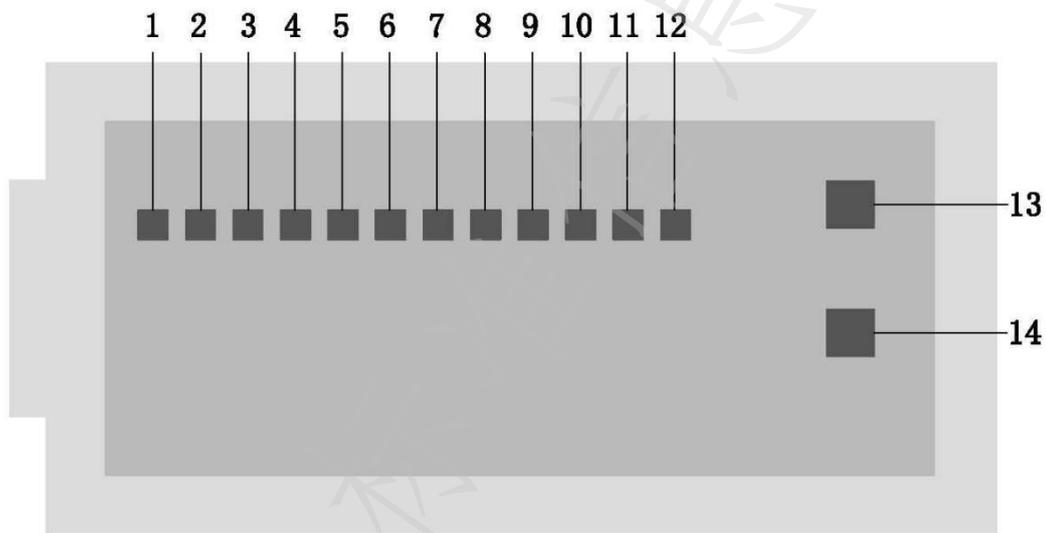


图 C.1 数字微流控芯片结构及排布模拟示意图

注：1-12——反应孔，每个反应孔可预包埋相应植物源性成分引物混合液，提供扩增反应的场所，根据检测需求，设置使用预包埋孔位；13——加油口；14——进样口。

附录 D
(资料性)
数字微流控芯片的制作与质量控制

D.1 数字微流控芯片的制作

采用微量点样仪，将各个引物均匀点布在数字微流控芯片的特定位置，每个反应孔添加引物工作液 1 μL ，将加好引物工作液的芯片置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温干燥箱干燥 15 min，确保干燥后封装芯片。

D.2 数字微流控芯片质量控制

外观检查：数字微流控芯片金手指正常，无胶水黏附、条纹清晰、无变形及缺口；芯片内移液通道清晰，芯片玻璃表面无缺口和裂纹。

技术验收：数字微流控芯片点样后无漏点，检测方法为封装后恒温扩增植物源性成分 6 项阳性质控样品和阴性质控样品，植物源性成分 6 项阳性质控样品荧光信号出现典型扩增曲线，对应的 6 个孔位均为阳性；阴性质控样品荧光信号未出现典型扩增曲线，对应的 6 个孔位均为阴性。

满足以上条件即为合格。
