

团 体 标 准

T/CNFIA 109—2018

豆制品业用大豆

Food-grade soybean

2018-07-01 发布

2018-10-01 实施

中国食品工业协会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中国食品工业协会豆制品专业委员会提出。

本标准由中国食品工业协会归口。

本标准起草单位：苏州金记食品有限公司、中国食品工业协会豆制品专业委员会、祖名豆制品股份有限公司、上海清美绿色食品有限公司、深圳市福荫食品集团有限公司、上海艺杏食品有限公司、黑龙江省北大荒绿色健康食品有限责任公司、山东禹王生态食业有限公司、益海嘉里食品营销有限公司、四川徽记食品股份有限公司、上海千慕生物科技有限公司、四川省食品药品检验检测院、上海市豆制品行业协会、合肥市豆制品协会。

本标准主要起草人：吴月芳、金兴仓、韩晓华、许晓华、杨金平、单志明、范志军、刘军、杨晓明、钟威、蒋润楠、岳清洪、张建秋、张之斌。

引 言

大豆原料对豆制品终端产品的品质起到了至关重要的作用,豆制品企业通常通过中间贸易商采购大豆,然而,大豆在流通过程中经常出现诸如转基因混杂的现象。目前我国制定了 GB 1352—2009《大豆》的质量标准,但是对于食品用大豆流通过程中的诸如转基因混杂率没有指标设定。为了适应市场的要求,满足消费者的自由选择权,创建公平的市场贸易环境,促进行业健康有序发展,中国食品工业协会豆制品专业委员会根据《中国食品工业协会团体标准管理规范》章程及有关政策要求提出并制定本标准。

豆制品业用大豆

1 范围

本标准规定了豆制品业用大豆的分类、质量要求、食品安全要求、检验方法、检验规则、标签标识、包装、储存和运输。

本标准适用于豆制品业用大豆。

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 1352—2009 大豆

GB 2715 食品安全国家标准 粮食

GB/T 6682—2008 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 19495.2 转基因产品检测 实验室技术要求

GB/T 19495.3 转基因产品检测 核酸提取纯化方法

GB/T 19495.7 转基因产品检测 抽样和制样方法

GB/T 23750 植物性产品中草甘膦残留量的测定 气相色谱-质谱法

3 术语和定义

GB 1352—2009 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

转基因大豆 **GMO soybean**

利用基因工程技术改变基因组构成而生产的大豆。

3.2

转基因混杂率 **GMO impurities**

含有转基因成分的百分率。

4 分类

应按照 GB 1352—2009 的规定执行。

5 质量要求

5.1 应符合 GB 1352—2009 中 5.1 的要求。

5.2 转基因自然混杂率应 \leq 0.5%。

5.3 草甘膦应 \leq 5 mg/kg。

6 食品安全要求

应符合 GB 2715 及有关规定。

7 检验方法

7.1 转基因成分含量应符合附录 A 的规定。

7.2 草甘膦含量应符合 GB/T 23750 的规定。

7.3 其他指标的检验方法应符合 GB 1352—2009 的规定。

8 检验规则

应符合 GB 1352—2009 的规定。

9 标签标识

应符合 GB 1352—2009 的规定。

10 包装、储存和运输

10.1 包装

应符合 GB 1352—2009 中 9.1 的规定。

10.2 储存

10.2.1 当不同批次的大豆原料进行混合时，筒仓的记录应确定批次构成和比例。不同批次的大豆混合，如在筒仓内两个批次间，当筒仓还没空时，所有的原料到货批次应记录并且能追溯到所有发出的批次。对于每一个生产的产品批次应清楚知道来自哪批原料，反之亦然。如果某批产品确定了被转基因大豆等非豆制品业用大豆混杂污染，在该筒仓内的所有批次和由该筒仓内的原料生产出的所有产品批次应确定，并且降级为非豆制品业用大豆批次。

10.2.2 应保留所有输入大豆来源的文件记录，包括可追踪性(批号)、运输工具的清洁、传统产品和转基因大豆等非豆制品业用大豆产品的隔离。

10.2.3 筒仓/仓库应明确标识。

10.2.4 所有加工设备和储存设施的清洁应制定有效冲洗计划和检验程序。

10.2.5 应制定文件计划，包括对被转基因产品等非豆制品业用大豆污染混杂的预防措施、关键控制点(CCP)的描述、标准和允许范围，以及对关键控制点(CCP)的监督控制方案。

10.3 运输

10.3.1 承担豆制品业用大豆运输的人员应携带产品持有者对产品的质量规格的描述文件。

10.3.2 如该运输工具曾经装载过转基因大豆或者其他转基因农产品等非豆制品业用原料，应清洁运输工具并进行记录，并保留所有运输工具清洁记录文件。

10.3.3 承担豆制品业用大豆运输的车辆不应同时装载其他非豆制品业用农产品(如转基因大豆等)。如果必须同时装载其他农产品时则应有效隔离。

10.3.4 应做好产品的识别,溯源和分离的程序和记录。

10.3.5 应制定运输文件计划,包括运输过程中对被转污染(如基因产品)的豆制品业用大豆产品及过程进行危害分析,包括预防措施、关键控制点(CCP)的描述、标准和允许范围,以及对关键控制点(CCP)的监督控制计划。

附录 A

(规范性附录)

转基因大豆实时荧光 PCR 定量检测方法

A.1 范围

本附录规定了大豆及其加工产品中转基因大豆 GTS 40-3-2、MON89788、A2704-12、A5547-127、MON87701、356043、MON87705、MON87708、MON87769、SYHT0H2、MON87751、MON87712、G94-19、G-168、G94-6、G94-1 成分的实时荧光 PCR 定量检测方法。

本附录适用于豆制品业用大豆。

本方法的定量极限(limit of quantification, LOQ)为 0.085%。

A.2 缩略语

下列缩略语适用于本附录。

AgroBorder II :来源于根癌农杆菌 Ti 质粒

CaMV 35S:花椰菜花叶病毒 35S 启动子(35S promoter from cauliflower mosaic virus)

IPC:内部阳性对照(Internal Positive Control)

A.3 防止污染措施

应按 GB/T 19495.2 的规定执行。

A.4 抽样与制样

应按 GB/T 19495.7 和 GB/T 19495.3 的规定执行。

A.5 测定

A.5.1 原理

实时荧光 PCR 定量检测是在 PCR 反应体系中,除采用特异性的引物外,还增加了与模版 DNA 匹配的、两端有荧光基团标记的探针。PCR 每进行一次循环,合成的新链数与释放的荧光基团数呈对应关系,即 PCR 产物的量与荧光信号的强度呈对应关系。当荧光信号超过所有设定的阈值时,荧光信号可被检测出来,此时所经历的 PCR 循环数称为 Ct 值。

Ct 值与模版起始拷贝数的对数呈现线性关系。在检测未知含量的样品时,以 Ct 值为纵坐标、以阳性标准物质(含量)或阳性标准分子(拷贝数)的对数为横坐标绘制标准曲线,只要获得测试样品的 Ct 值,就可以利用标准曲线计算出该样品中目标核酸的绝对含量。

AgroBorder II、35S、IPC 在同一个 PCR 反应管中同时扩增(多重 PCR)。实时荧光 PCR 定量系统会作出三条标准曲线:35S 标准曲线、AgroBorder II 标准曲线以及大豆内源 lectin 1 基因标准曲线。待

测样品的转基因含量将被计算为单个转基因靶标含量与大豆内源 DNA 含量的比值(35S /大豆内源基因; AgroBorder II /大豆内源基因)。

A.5.2 试剂

除特别说明外,使用的试剂均为不含 DNA 和 DNA 酶的分析纯或生化试剂,实验用水应符合 GB/T 6682—2008 中一级水的规定,所用试剂均用无 DNA 酶污染的容器分装。

A.5.2.1 35S/ AgroBorder II 大豆转基因定量检测试剂盒。

A.5.2.2 BasicMix 预混液: DNA 聚合酶、PCR 缓冲液、氯化镁按照一定比例配制的溶液。

A.5.2.3 OligoMix 预混液:脱氧核糖核苷三磷酸、特异性引物、Taqman 探针按照一定比例配制的溶液。

A.5.2.4 校准标准液。

A.5.2.5 定量对照液:含 1%转基因大豆(35S/AgroBorder II)的对照 DNA。

A.5.2.6 FAM(35S 和大豆内源基因的荧光报告染料)。

A.5.2.7 R6G(AgroBorder II 的荧光报告染料)。

A.5.2.8 Cy5(IPC 的荧光报告染料)。

A.5.2.9 ROX(归一化染料)。

A.5.3 主要仪器和耗材

A.5.3.1 光学级 PCR 反应板、光学级封板膜或相应封板耗材。

A.5.3.2 移液器(5 μ L、20 μ L)。

A.5.3.3 涡旋振荡器。

A.5.3.4 冷冻离心机、台式小型离心机。

A.5.3.5 实时荧光 PCR 仪。

A.5.3.6 样品粉碎机或研磨机。

A.5.3.7 天平。

A.5.3.8 生物安全柜。

A.5.3.9 高压灭菌锅。

A.5.4 实验步骤

A.5.4.1 取样和制样

应按 GB/T 19495.7 的规定执行。

A.5.4.2 样品 DNA 的提取和纯化

应按 GB/T 19495.2 的方法或采用具有相同效果的植物基因组 DNA 提取试剂盒进行 DNA 提取。

A.5.4.3 实时荧光 PCR 反应体系

实时荧光 PCR 反应体系见表 A.1。

表 A.1 实时荧光 PCR 反应体系

反应类型		运行的样品数量			
		1		9	
		转基因反应	大豆特异性反应	转基因反应	大豆特异性反应
样品 DNA 两份提取物 (两个稀释度)	DNA #1A (dil.1)	1	1	9	9
	DNA #1A (dil.2)	1	1	9	9
	DNA #1B (dil.1)	1	1	9	9
	DNA #1B (dil.2)	1	1	9	9
校准标准品	转基因标准	8	—	8	—
	大豆标准	—	8	—	8
对照	无模板对照 (NTC)	2	2	2	2
	定量对照	2	2	2	2
移液误差补偿	额外加	1	1	2	2
反应个数合计		17	17	50	50
MasterMix [®] 总体积		340 μ L	340 μ L	1 mL	1 mL
BasicMix		212.5 μ L	212.5 μ L	625 μ L or 1 tube	625 μ L or 1 tube
Oligo Mix		127.5 μ L	127.5 μ L	375 μ L or 1 tube	375 μ L or 1 tube

^a MasterMix 是由 Eurofins GeneScan 公司提供的商品名,给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不代表该产品的唯一认可,如果其他等效产品具有相同的效果,则可以使用这些等效产品。

A.5.4.4 实时荧光 PCR 反应参数

实时荧光 PCR 反应参数为:95 $^{\circ}$ C, 10 min;95 $^{\circ}$ C, 15 s;60 $^{\circ}$ C, 90 s;45 个循环。

以上参数可根据不同型号的 PCR 仪和所选 PCR 扩增体系不同做调整。

A.5.5 结果分析计算

A.5.5.1 定量结果

PCR 系统将获得 4 个校准点的 Ct 值(lectin 1, 35S/AgroBorder II)用于计算三条标准曲线:一条为大豆内源 lectin 1 基因标准曲线,一条为 35S 标准曲线,一条为 AgroBorder II 标准曲线。通过 Ct 值与 lg(拷贝数)拟合出线性回归方程。

随后根据线性回归方程,由实验测定的 Ct 值计算待测样品中靶序列的拷贝数。

将 35S 和 AgroBorder II 的拷贝数除以大豆内源 lectin 1 基因的拷贝数,计算每个样品中 35S 和 AgroBorder II 的相对含量(%). 这些值均在相同体积、相同稀释度的相同样品中测定。

随后,计算所有重复样品中转基因大豆/大豆内源 lectin 1 基因的比值并计算平均值。

PCR 分析包含有已知转基因含量的样品(以标准物质 CRM 制备的含有 1% RR-Soy 和 1% MON 89788 DNA 的样品),该样品作为校准和定量过程的对照,其偏差不应超过 30%。

相关详细信息,请参阅使用的 PCR 循环仪手册。可向 Eurofins GeneScan 索取 Excel 数据评价表。

A.5.5.2 计量单位

计量单位为拷贝比,校准标准品是采用 35S : AgroBorder II : lectin 1 的比例为 1 : 1 : 1 的质粒 DNA 制备的。定量结果反映 35S/AgroBorder II 与 lectin 的比值,作为拷贝比。

A.5.5.3 最终结果

计算每个样品中转基因(35S 或 AgroBorder II)的相对含量,用转基因(35S 或 AgroBorder II)的 DNA 量(拷贝数)除以大豆内源 lectin1 基因的 DNA 量(拷贝数),得到一个比值。使用电子表格,以百分比计算转基因大豆 DNA 的相对含量。可向 Eurofins GeneScan 索取 Excel 数据评价表。

A.5.5.4 参数和允许范围

各项参数应符合以下要求:

- 回归线相关系数 (R^2) ≥ 0.98 ;
- 标准曲线斜率在 $-3.1 \geq \text{斜率} \geq -3.6$ 范围内,对应 90%~110% 的扩增效率;
- 扩增效率 = $(10^{-1/\text{斜率}} - 1) \times 100\%$;
- 定量对照(由被认证的标准物质 CRM 制备而来)的定量结果偏差不超过 $\pm 30\%$;
- 无模板对照 (NTC) 未扩增。

A.5.5.5 不对称靶标数

如果某个反应体系的检测结果显示:一个转基因靶标超过 4 000 拷贝/反应,另一个转基因靶标呈阳性结果,这可能是出现了偏差,宜再次单独检测该阳性转基因靶标以确认。

A.5.5.6 均质性

如果独立提取的“A”和“B”得出的数据结果显示有偏差,这可能是由于样品材料不均匀(如定量结果显示有差异)或 DNA 提取效率不一致(如测得的拷贝数显示有差异)所导致的。如果两个定量结果和(或)DNA 拷贝数显示出明显的差异,可彻底地均质化样品,重新提取 DNA。

A.5.5.7 样品稀释抑制对照

至少需要检测 2 份 DNA 稀释液以确定是否有抑制子。作为抑制对照,采用下式计算大豆内源 lectin 1 基因以及转基因检测系统中根据实验确定的稀释因子:

$$\text{稀释因子} = \frac{\text{未稀释样品的拷贝数}}{\text{稀释样品的拷贝数}}$$

将计算出的稀释因子与样品的稀释度进行比较,允许 $\pm 20\%$ 的偏差。