ICS 67.060
B 22

# 中华人民共和国国家标准

GB/T 7416—2008
代替 GB/T 7416—2000

# 啤酒大麦

**Malting barley**

2008-06-25 发布　　2009-06-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会　发布

食品伙伴网http://www.foodmate.net

# 目　次

前言 …… Ⅲ
1　范围 …… 1
2　规范性引用文件 …… 1
3　术语和定义 …… 1
4　产品分类 …… 2
5　要求 …… 2
6　分析方法 …… 3
7　检验规则 …… 7
8　标志、包装、运输和贮存 …… 8
附录A（资料性附录）　企业自控技术指标的分析方法 …… 9



食品伙伴网http://www.foodmate.net

# 前　言

本标准代替 GB/T 7416—2000《啤酒大麦》。

本标准与 GB/T 7416—2000 相比主要变化如下：

——术语和定义中，增加了啤酒大麦的定义，去掉了水敏感性的描述，对二棱、多棱大麦等其他定义描述作了适当修改；

——将表 1 中项目“感官”改为“外观”，其描述未作修改；

——将原表 2 拆分为两个表格，二棱、多棱大麦理化指标分别列入两个表中；

——二棱、多棱大麦优级和一级的千粒重指标各提高了 1 个百分点，二级不变；

——对二棱、多棱大麦的蛋白质指标分别作了调整；

——将选粒试验改为饱满粒和瘦小粒，二棱、多棱大麦优级和一级的饱满粒指标各提高了 3 个～4 个百分点，二级不变，增加了瘦小粒的要求；

——取消了“水敏感性”指标，但将其测定方法放入附录 A 中；

——测定三天、五天发芽率的两个方法，将平皿法作为第一法，漏斗法改为第二法；

——判定规则中，主要指标除五天发芽率外，另增加了水分指标；

——将生产企业需要自行控制的一些指标的分析方法，作为附录 A 列出，供企业参考；

——将原附录 A、附录 B 合并。

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由全国食品工业标准化技术委员会酿酒分技术委员会提出并归口。

本标准起草单位：中国食品发酵工业研究院、永顺泰麦芽集团有限公司、广州珠江啤酒股份有限公司、广州麦芽有限公司、北京燕京啤酒股份有限公司、宁波麦芽有限公司。

本标准主要起草人：张五九、康永璞、熊晓帆、方贵权、莫力、贾凤超、张海波、李惠萍、林艳、黄春燕、韩永红、古方红、柴凤萍。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB 7416—1987、GB/T 7416—2000。



食品伙伴网http://www.foodmate.net

# 啤 酒 大 麦

## 1 范围

本标准规定了啤酒大麦的术语和定义、产品分类、要求、分析方法、检验规则、标志、包装、运输和贮存。

本标准适用于啤酒酿造专用大麦的收购、检验与销售。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 191 包装储运图示标志

GB/T 601 化学试剂 标准滴定溶液的制备

GB/T 603 化学试剂 试验方法中所用制剂及制品的制备(GB/T 603—2002，ISO 6353-1:1982，NEQ)

GB 2715 粮食卫生标准

GB/T 5491 粮食、油料检验 扦样、分样法

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法(GB/T 6682—1992，neq ISO 3696:1987)

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

**啤酒大麦 malting barley**

经过一定程序认定的，适用于制麦和啤酒酿造的二棱大麦及多棱大麦。

3.2

**二棱大麦 2-row barley**

二棱大麦的麦穗呈扁形，沿穗轴只有对称的两行籽粒。

3.3

**多棱大麦 multi-row barley**

四棱和六棱大麦统称为多棱大麦。

3.3.1

**四棱大麦 4-row barley**

四棱大麦有两对籽粒互为交错，麦穗断面呈四角形。

3.3.2

**六棱大麦 6-row barley**

六棱大麦有六行麦粒围绕一根穗轴而生，麦穗断面呈六角形。

3.4

**千粒重 thousand kernels weight**

1 000 颗麦粒的绝干质量。



食品伙伴网http://www.foodmate.net

3.5

**三天发芽率　3-day germination rate**

三天后大麦发芽粒占总麦粒的百分数，主要表示大麦发芽的整齐程度。

3.6

**五天发芽率　5-day germination rate**

五天后大麦发芽粒占总麦粒的百分数，主要表示可发芽的大麦百分数。

## 4　产品分类

按麦穗形态分为：二棱大麦和多棱大麦（指四棱大麦和六棱大麦）。

按播种季节分为：春大麦和冬大麦。

## 5　要求

### 5.1　感官要求

感官要求应符合表1的规定。

**表1　感官要求**

| 项　目 | 优　级 | 一　级 | 二　级 |
|---|---|---|---|
| 外观 | 淡黄色具有光泽，无病斑粒[a] | 淡黄色或黄色，稍有光泽，无病斑粒[a] | 黄色，无病斑粒[a] |
| 气味 | 有原大麦固有的香气，无霉味和其他异味 | 无霉味和其他异味 | 无霉味和其他异味 |
| [a] 此处指检疫对象所规定的病斑粒。 | | | |

### 5.2　理化要求

#### 5.2.1　二棱大麦

二棱大麦应符合表2的规定。

**表2　二棱大麦理化要求**

| 项　目 | | 二棱大麦 | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 优　级 | 一　级 | 二　级 |
| 夹杂物/% | ≤ | 1.0 | 1.5 | 2.0 |
| 破损率/% | ≤ | 0.5 | 1.0 | 1.5 |
| 水分/% | ≤ | 12.0 | | 13.0 |
| 千粒重（以干基计）/g | ≥ | 38.0 | 35.0 | 32.0 |
| 三天发芽率/% | ≥ | 95 | 92 | 85 |
| 五天发芽率/% | ≥ | 97 | 95 | 90 |
| 蛋白质（以干基计）/% | | 10.0～12.5 | | 9.0～13.5 |
| 饱满粒（腹径≥2.5 mm）/% | ≥ | 85.0 | 80.0 | 70.0 |
| 瘦小粒（腹径<2.2 mm）/% | ≤ | 4.0 | 5.0 | 6.0 |

#### 5.2.2　多棱大麦

多棱大麦应符合表3的规定。



食品伙伴网http://www.foodmate.net

表 3　多棱大麦理化要求

| 项　　目 | | 多　棱　大　麦 | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 优　　级 | 一　　级 | 二　　级 |
| 夹杂物/% | ≤ | 1.0 | 1.5 | 2.0 |
| 破损率/% | ≤ | 0.5 | 1.0 | 1.5 |
| 水分/% | ≤ | 12.0 | | 13.0 |
| 千粒重(以干基计)/g | ≥ | 37.0 | 33.0 | 28.0 |
| 三天发芽率/% | ≥ | 95 | 92 | 85 |
| 五天发芽率/% | ≥ | 97 | 95 | 90 |
| 蛋白质(以干基计)/% | | 10.0～12.5 | | 9.0～13.5 |
| 饱满粒(腹径≥2.5 mm)/% | ≥ | 80.0 | 75.0 | 60.0 |
| 瘦小粒(腹径<2.2 mm)/% | ≤ | 4.0 | 6.0 | 8.0 |

### 5.3　卫生要求

参照 GB 2715 和相关标准执行。

## 6　分析方法

本方法中所用的水，在没有注明其他要求时，应符合 GB/T 6682 的要求。所用试剂，在未注明其他规格时，均指分析纯(AR)。配制的“溶液”，除另有说明外，均指水溶液。

同一检测项目，有两个或两个以上分析方法时，实验室可根据各自条件选用，但以第一法为仲裁法。

理化分析(除夹杂物、破损率外)所用的大麦样品一律采用除杂均匀的试样。

### 6.1　外观

在自然光线明亮的场所观察大麦的颜色，将大麦样品在手中握 5 min，并嗅其气味；观看颜色；记录有无光泽、病斑粒(检疫对象所规定的)、霉变粒、霉味或其他异味等情况。

### 6.2　夹杂物

称取样品 200 g(精确至 0.1 g)，拣出其他植物种子、秸秆、土石等非大麦物质及麸皮、病斑粒(非检疫对象所规定的)，在天平(感量 0.1 g)上称其质量，计算其所占的百分数。

所得结果表示至一位小数。

### 6.3　破损率

称取样品 200 g(精确至 0.1 g)，拣出破粒、半粒，在天平(感量 0.1 g)上称其质量，计算其所占的百分数。

所得结果表示至一位小数。

### 6.4　水分

#### 6.4.1　原理

样品于 105 ℃～107 ℃直接干燥，所失质量的百分数即为该样品的水分。

#### 6.4.2　仪器

6.4.2.1　分析天平：感量 0.1 mg。

6.4.2.2　电热干燥箱：控温精度±1 ℃。

6.4.2.3　称量皿：30 mm×50 mm。

6.4.2.4　Miag DLFU 盘式粉碎机或旋风磨。

6.4.2.5　干燥器：用变色硅胶作干燥剂。



食品伙伴网http://www.foodmate.net

6.4.3 分析步骤

6.4.3.1 细粉试样的制备

取一定量大麦试样，使用 Miag DLFU 盘式粉碎机，盘间距为 0.2 mm，进行粉碎后，即得到细粉试样。

6.4.3.2 测定

称取细粉试样 3 g～5 g(精确至 0.000 1 g)，置于已烘至恒重的称量皿中，连同盖一并放入 106 ℃±1 ℃ 电热干燥箱内，取下盖子，烘 3 h。趁热盖上盖子移入干燥器内冷却，30 min 后称量，然后再放入电热干燥箱内烘 1 h，称量，直至恒重。

6.4.4 结果计算

试样的水分按式(1)计算，数值以%表示。

$$X_1 = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m} \times 100 \qquad \cdots\cdots(1)$$

式中：

$X_1$——试样水分的质量分数，%；

$m_1$——干燥前称量皿加试样的质量，单位为克(g)；

$m_2$——干燥后称量皿加试样的质量，单位为克(g)；

$m$——称量皿的质量，单位为克(g)。

所得结果表示至一位小数。

6.4.5 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 2%。

6.5 千粒重

6.5.1 仪器

6.5.1.1 计数器。

6.5.1.2 天平：感量 0.1 g。

6.5.2 分析步骤

从拣出异物的大麦样品中直接随机数出 1 000 粒大麦颗粒，在天平上称其质量。至少做两次平行试验。

6.5.3 结果计算

试样的千粒重按式(2)计算，数值以克表示。

$$X_2 = X_{2'}(1 - X_1) \qquad \cdots\cdots(2)$$

式中：

$X_2$——试样的千粒重(以干基计)，单位为克(g)；

$X_{2'}$——直接称量得到的试样风干千粒重，单位为克(g)；

$X_1$——试样水分的质量分数，%。

所得结果表示至一位小数。

6.5.4 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 2%。

6.6 三天、五天发芽率

6.6.1 培养皿法

6.6.1.1 仪器

6.6.1.1.1 培养皿：直径 10 cm。

6.6.1.1.2 恒温恒湿培养箱。

6.6.1.1.3 滤纸：中速滤纸。



食品伙伴网http://www.foodmate.net

6.6.1.2 **分析步骤**

将两张直径 9 cm 的中速滤纸放入培养皿底部，加 4 mL 水均匀润湿滤纸。取 100 粒试样放在滤纸上，使每一麦粒的腹部很好地与滤纸接触，盖上培养皿盖，用薄膜封口以防止水蒸发，或将培养皿放入恒温恒湿培养箱中。在温度 18 ℃～20 ℃下，于暗处静置发芽。

6.6.1.3 **结果计算**

放置 72 h 后大麦发芽粒数为三天发芽率按式(3)计算，数值以%表示。

$$X_3 = 100 - n \qquad \cdots\cdots(3)$$

放置 120 h 后大麦发芽粒数为五天发芽率按式(4)计算，数值以%表示。

$$X_4 = 100 - n \qquad \cdots\cdots(4)$$

式中：

$X_3$——试样三天发芽率，%；

$n$——不发芽麦粒数；

$X_4$——试样五天发芽率，%。

所得结果表示至整数。

6.6.1.4 **精密度**

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 3%。

6.6.2 **漏斗法**

6.6.2.1 **仪器**

6.6.2.1.1 漏斗：直径 100 mm，在颈中有一扁平的小玻棒。

6.6.2.1.2 培养皿盖。

6.6.2.1.3 大烧杯。

6.6.2.1.4 喷雾器。

6.6.2.2 **分析步骤**

取 1 000 粒试样放在大烧杯内，用 18 ℃～20 ℃水浸渍 1 h。弃水，用自来水洗 5 次，再用 18 ℃～20 ℃ 水浸渍 6 h。弃水，转移麦粒到漏斗中，盖上培养皿盖，在 18 ℃～20 ℃下静置过夜。次日将麦粒倒出，混匀，用喷雾器喷水，使麦粒潮湿，再装回漏斗中。此操作于上下午各进行一次(两次操作间隔时间为 10 h～12 h)。

6.6.2.3 **结果计算**

浸渍开始后 72 h 大麦发芽粒数为三天发芽率按式(5)计算，数值以%表示。

$$X_3 = \frac{1\,000 - n}{10} \qquad \cdots\cdots(5)$$

浸渍开始后 120 h 大麦发芽粒数为五天发芽率按式(6)计算，数值以%表示。

$$X_4 = \frac{1\,000 - n}{10} \qquad \cdots\cdots(6)$$

式中：

$X_3$——试样三天发芽率，%；

$n$——不发芽麦粒数；

$X_4$——试样五天发芽率，%。

所得结果表示至整数。

6.6.2.4 **精密度**

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 2%。

6.7 **蛋白质**

6.7.1 **原理**

在催化剂作用下，用硫酸分解样品，使有机化合物中的氮转变成氨，以硼酸溶液吸收蒸馏出的氨，用



食品伙伴网http://www.foodmate.net

酸碱滴定法测定氮含量。

6.7.2 试剂和溶液

6.7.2.1 不含氨的水：按 GB/T 603 配制。

6.7.2.2 浓硫酸：95%～98%。

6.7.2.3 氢氧化钠溶液(400 g/L)：称取 400 g 氢氧化钠溶于 1 L 不含氨的水中，静置。吸取上层清液于带橡皮塞的瓶中。

6.7.2.4 硼酸溶液(20 g/L)：称取 20 g 硼酸，用水溶解，并定容至 1 L。

6.7.2.5 盐酸标准滴定溶液[$c$(HCl)=0.1 mol/L]：按 GB/T 601 配制与标定。

6.7.2.6 混合催化剂：将硫酸钾($K_2SO_4$)、硫酸铜($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)按 10+1 的比例混合，并研细。

6.7.2.7 溴甲酚绿指示液(1 g/L)：按 GB/T 603 配制。

6.7.2.8 甲基红指示液(1 g/L)：按 GB/T 603 配制。

6.7.2.9 溴甲酚绿混合指示液：按 10+4 的比例分别吸取溴甲酚绿乙醇溶液和甲基红乙醇溶液，并混匀。

6.7.3 仪器

6.7.3.1 凯氏定氮仪：自行组装的仪器或成套仪器。

6.7.3.2 天平：感量 0.1 mg。

6.7.3.3 酸式滴定管：50 mL。

6.7.4 分析步骤

成套仪器按使用说明书进行试样测定。自行组装的仪器按下述方法进行操作。

6.7.4.1 细粉试样的制备

同 6.4.3.1。

6.7.4.2 试样消化

称取细粉试样 1.5 g(精确至 0.000 2 g)，小心转移到已干燥的凯氏烧瓶中，加入混合催化剂 10 g，缓缓加入浓硫酸 20 mL，摇匀，在通风橱内文火加热至泡沫停止发生后，大火使之沸腾。待溶液清亮后，再继续加热 20 min～30 min。

6.7.4.3 试样蒸馏

待消化液冷却后，缓缓加入不含氨的水 250 mL，摇匀，冷却，并加入几块小瓷片。连接凯氏烧瓶与蒸馏装置，将馏出管的尖端插入已盛有 25 mL 硼酸溶液和 0.5 mL 溴甲酚绿混合指示液的锥形瓶中，馏出管尖端应在液面之下。通过加液漏斗加入 70 mL 氢氧化钠溶液于凯氏烧瓶中，轻轻摇匀，使内容物混匀，然后加热蒸馏。待馏出液达到 180 mL 时，停止蒸馏。

6.7.4.4 试样滴定

用盐酸标准滴定溶液滴定馏出液，颜色由绿色消失转变为灰色即为终点。记录消耗盐酸标准滴定溶液的毫升数。

按上述操作同时进行空白试验。

6.7.5 结果计算

试样的蛋白质按式(7)计算，数值以%表示。

$$X_5 = \frac{(V_2 - V_1) \times c \times 14}{m(1 - X_1) \times 1\,000} \times 6.25 \times 100 \quad \cdots\cdots(7)$$

式中：

$X_5$——试样蛋白质含量的质量分数(以干基计)，%；

$V_2$——试样滴定时消耗盐酸标准滴定溶液的体积，单位为毫升(mL)；

$V_1$——空白滴定时消耗盐酸标准滴定溶液的体积，单位为毫升(mL)；

$c$——盐酸标准滴定溶液的浓度，单位为摩尔每升(mol/L)；



食品伙伴网http://www.foodmate.net

14——氮的摩尔质量的数值，单位为克每摩尔(g/mol)[$M$(N)=14]；

$m$——称取试样的质量，单位为克(g)；

$X_1$——试样水分的质量分数，%；

6.25——氮与蛋白质的换算系数。

所得结果表示至一位小数。

6.7.6 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的4%。

6.8 饱满粒、瘦小粒

6.8.1 原理

大麦样品在一个具有不同孔径的三层筛板的振动中，按谷粒大小加以筛分。

6.8.2 仪器

6.8.2.1 天平：感量0.1 g。

6.8.2.2 选粒机：由电动机通过曲轴带动，装有3层筛板，上下间距为12 mm～25 mm，并有盖子和底盘。全机总高度80 mm～100 mm。

选粒机应符合以下要求：

筛板材料：由厚度为1.3 mm±0.1 mm的硬黄铜制成，上有条状孔，加工公差为0.03 mm。

筛板尺寸：长为43 cm，宽为15 cm。

筛孔尺寸：上面为长度25 mm，下面为长度22 mm。宽度，筛Ⅰ为2.8 mm，筛Ⅱ为2.5 mm，筛Ⅲ为2.2 mm。

筛孔数目：筛Ⅰ为28×13，筛Ⅱ为30×13，筛Ⅲ为32×13。

振荡速度：300 r/min～320 r/min。

平台移动的总长度：18 mm～22 mm。

筛面应在两个方向严格保持水平，孔径应经常用双脚规核对。

6.8.3 分析步骤

称取试样100 g(精确至0.1 g)，放入选粒机上层，加盖，开启电动机，准确振荡5 min。将2.5 mm以上的麦粒进行称量，以百分数表示。

所得结果表示至一位小数。

## 7 检验规则

### 7.1 组批

同一产地、同一品种、同一收获期、同等级、同货位、同车船(舱)的产品为一批。

### 7.2 抽样量

7.2.1 按表4抽取样本数。

表4 抽样表

| 批量/袋 | 抽取样本数/袋 | 合格判定数(Ac) | 不合格判定数(Re) |
|---|---|---|---|
| 26～150 | 5 | 1 | 2 |
| 151～500 | 8 | 1 | 2 |
| 501～3 200 | 13 | 2 | 3 |
| 3 201～35 000 | 20 | 3 | 4 |
| 注1："样本"系指产品的最大包装。<br>注2：散装大麦按GB/T 5491抽样，每次抽取的样品数不得少于5 kg。 | | | |



食品伙伴网http://www.foodmate.net

7.2.2 按表4抽取样本后，再从每个样本中抽取500 g样品，将所有抽取的样品混匀，用对角四分法分为两份，一份封存备查，另一份做感官和理化分析。

7.3 交收检验

7.3.1 交收时由相应质检部门负责按本标准规定逐批进行检验。

7.3.2 交收检验项目包括：净含量、感官要求、夹杂物、破损率、水分、千粒重、三天发芽率、五天发芽率、蛋白质、饱满粒、瘦小粒。

7.4 判定规则

7.4.1 按表4抽取样本，先进行包装和净含量的检查。若检验结果达到不合格判定数者，则判整批产品为不合格。

7.4.2 理化指标中的水分和五天发芽率为质量等级的主要指标，当其他指标都在同一级别时，而水分或五天发芽率指标有一项不在这一级别，则以该项指标所在级别为准。

7.4.3 理化指标中，所有其他指标都在同一级别，只有一项指标(除水分和五天发芽率外)低于该级别时，不作降级处理。但该项指标低于下一级别时，则降至下一级别。

7.4.4 理化指标中，所有其他指标都在同一级别，但有两项指标(除水分和五天发芽率外)低于该级别时，降至下一级别。

## 8 标志、包装、运输和贮存

8.1 标志

8.1.1 啤酒大麦运到粮库或规定地点，应标明产地、品种名称、收获时间、收购日期、类别、等级。

8.1.2 销售的产品应具有质量合格证，并标明生产厂名、厂址、产品名称及品种、批号、净重、执行标准代号。

8.1.3 储运图示的标志应符合GB/T 191的有关规定。

8.2 包装

8.2.1 无论采用何种包装形式，不同品种、不同产地不得混杂入库。

8.2.2 啤酒大麦可以散装，放入筒仓或粮垛。

8.2.3 啤酒大麦也可以用麻袋或编织袋包装入库。

8.3 运输

啤酒大麦运输时，车厢或其他运输工具应保持清洁、干燥，无外来气味和污染物。

8.4 贮存

8.4.1 保管大麦要做到先进先出，避免保管不妥，造成损失。

8.4.2 仓库要保持清洁、干燥、通风。要定期进行检查，要防潮湿、霉变、鼠虫害等。如发现问题，应及时处理。

8.4.3 每批大麦要标明产地、品种、数量、等级、收购日期。



食品伙伴网http://www.foodmate.net

# 附 录 A
（资料性附录）
企业自控技术指标的分析方法

## A.1 大麦中霉菌数的测定

### A.1.1 原理

通过无菌水的冲洗，将大麦表层的微生物冲于水中，然后在培养基上培养，根据菌落数判断大麦表面的霉菌污染程度。

### A.1.2 试剂和溶液

孟加拉红培养基(31.6 g/L)：称取 31.6 g 孟加拉红培养基，加入 1 000 mL 水溶化，分装，于 121 ℃ 20 min 高压灭菌备用。

### A.1.3 仪器

A.1.3.1 摇床：转速 180 r/min～200 r/min。

A.1.3.2 三角瓶：300 mL。

A.1.3.3 培养皿：直径 10 cm。

A.1.3.4 移液管：0.2 mL。

### A.1.4 分析步骤

A.1.4.1 称取麦粒试样 10 g(精确至 0.02 g)倒入盛有 90 mL 无菌水的三角瓶中，塞紧棉塞，置于摇床上，在 30 ℃，转速 180 r/min～200 r/min 下，振荡 30 min。

A.1.4.2 将孟加拉红培养基融化，在无菌条件下倒平皿，冷却为固体后备用。

A.1.4.3 在无菌条件下，用已灭菌的移液管吸取 A.1.4.1 液 0.2 mL 涂于平皿上(每个试样平行做 3 个平皿)，将平皿倒置，于 25 ℃培养 7 天。

A.1.4.4 数平皿的菌落数。

## A.2 大麦品种的鉴定

### A.2.1 凝胶电泳法

#### A.2.1.1 原理

通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)鉴定大麦品种，用板式凝胶电泳分离大麦的醇溶蛋白部分。

#### A.2.1.2 试剂和溶液

A.2.1.2.1 萃取液：称取 18 g 尿素和 0.01 g 甲基绿，用水溶解，然后加入 2-硫氢基乙醇 1 mL 和 2-氯乙醇 20 mL，再用水定容至 100 mL。

A.2.1.2.2 硫酸亚铁溶液(5 g/L)：按 GB/T 603 配制。

A.2.1.2.3 凝胶贮备液：称取 115.3 g 丙烯酰胺、4.6 g 亚甲叉双丙烯酰胺、69.2 g 尿素、1.2 g 甘氨酸、1.2 g 抗坏血酸，用水溶解，加入 3 mL 硫酸亚铁溶液(新配制的)、23 mL 冰乙酸，混匀，并定容至 1 L。抽滤后装入棕色瓶中，于 4 ℃下贮存，当月使用。

A.2.1.2.4 过氧化氢溶液：吸取 30%过氧化氢 2 mL，用水定容至 100 mL。

A.2.1.2.5 电极缓冲溶液：称取 2 g 甘氨酸，用水溶解，加入 20 mL 冰乙酸，再加水至 5 L。

A.2.1.2.6 三氯乙酸溶液(10 g/L)：称取 10 g 三氯乙酸，用水溶解，并定容至 100 mL。

A.2.1.2.7 考马斯亮蓝溶液(10 g/L)：称取 1 g 考马斯亮蓝，用 95%乙醇溶解，并定容至 100 mL。

A.2.1.2.8 染色溶液：吸取 20 mL 三氯乙酸溶液，加入 1 mL 考马斯蓝溶液，混合备用。



食品伙伴网http://www.foodmate.net

A.2.1.3 仪器

A.2.1.3.1 垂直板式凝胶电泳仪。

A.2.1.3.2 分析天平:感量 0.1 mg。

A.2.1.3.3 离心机:转速 5 000 r/min,离心管 Φ9 mm×35 mm;

A.2.1.4 分析步骤

A.2.1.4.1 样品数:取 100 粒大麦用于本测定。

A.2.1.4.2 萃取大麦醇溶蛋白:单独碾碎每粒大麦并放入离心管中,吸取 0.4 mL 萃取液混合,浸泡最少 16 h,使用前将离心管置于离心机中,在转速 5 000 r /min 下,离心 30 min。

A.2.1.4.3 凝胶的形成:于 100 mL 凝胶贮备液中加入 0.15 mL 过氧化氢溶液,混匀。将已充分混匀的溶液灌入灌胶模具中(要保证凝胶有 1.5 mm 厚度,10 cm～15 cm 长度),在几分钟内聚合即会发生。用一把梳子在凝胶内开槽,以便放置样品(梳子一定要在刚刚灌胶时放入)。

A.2.1.4.4 凝胶展层:撤掉梳子,吸取适量的萃取液 10 μL～20 μL 加入凝胶顶部的槽内(若条带分离不清,则取量可减少),将每一槽装上样品,把凝胶玻板垂直地放入缓冲溶液中,使槽在板的上侧,让自来水循环流过电泳仪的冷却装置,使溶液冷却并保持在 10 ℃～20 ℃。在 200 V 下凝胶展层 20 min,然后在 500 V 下继续展层,时间为色带(甲基绿)通过凝胶所需要时间的两倍。

A.2.1.4.5 凝胶展层后,将凝胶从玻璃板上取下,立即在染色液中染色,凝胶可持续染色一夜。

A.2.1.4.6 照相:凝胶染色后在蒸馏水中浸泡 1 h 脱色,然后取出放在灯箱上照相,胶板与镜头约 400 mm。

A.2.1.4.7 结果的显示:根据与用纯品种所得结果进行比较后,可对大麦样品中的各种品种做定性的阐明,为定出各种品种的量,要用存在于样品中的每一品种已确认的谷粒数除以谷粒的总数(100)。若做平行试验,则需用平均值表示(用百分数),并四舍五入至整数。

A.2.2 聚合酶链式反应法

A.2.2.1 原理

通过聚合酶链式反应(PCR)扩增技术,对大麦 DNA 进行体外酶促扩增。经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离扩增产物后,与原大麦纯品种基因图谱进行对照鉴定待测大麦样品。

A.2.2.2 试剂和溶液

A.2.2.2.1 Tris-盐酸溶液(1 mol/L,pH=8.0):称取 121.1 g 三羟甲基氨基甲烷(Tris),用 800 mL 去离子水溶解,冷却至室温后用浓盐酸调节溶液的 pH 值至 8.0(约需 42 mL 浓盐酸),加水定容至 1 L,分装后高压灭菌。

A.2.2.2.2 EDTA 溶液(0.5 mol/L,pH=8.0):称取 186.1 g 乙二胺四乙酸二钠(EDTA,$C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$),加入 800 mL 水中,在磁力搅拌器上搅拌,用氢氧化钠调节溶液的 pH 值至 8.0(约需 20 g NaOH 颗粒)然后定容至 1 L,分装后高压灭菌。

A.2.2.2.3 DNA 提取液:称取 46.75 g 氯化钠和 20 g 溴代十六烷基三甲胺(CTAB),加入 800 mL 去离子水,摇动容器使溶质完全溶解。然后加入 50 mL Tris-盐酸溶液(A.2.2.2.2)和 20 mL EDTA 溶液(A.2.2.2.2),用水定容至 1 L,分装后高压灭菌。

A.2.2.2.4 三氯甲烷-异戊醇溶液(24+1):量取 240 mL 三氯甲烷和 10 mL 异戊醇混匀。

A.2.2.2.5 核糖核酸酶 A(RNaseA,10 mg/mL):生化试剂公司购买。

A.2.2.2.6 PCR 扩增试剂:生化试剂公司购买[PCR 扩增试剂包括:*Taq* DNA 聚合酶、dNTP、氯化镁($MgCl_2$)、PCR 缓冲液(含 $MgCl_2$)、引物(Primer)]。

A.2.2.2.7 电泳缓冲液Ⅰ(10×TBE):称取 108 g Tris 碱、55 g 硼酸和 7.44 g EDTA 混合,用重蒸水溶解后,在定容至 1 L。

A.2.2.2.8 电泳缓冲液Ⅱ(50×TAE):称取 242 g Tris 碱和 37.2 g EDTA 混合,加入 57.1 mL 冰醋酸,用重蒸水溶解后,定容至 1 L。



食品伙伴网http://www.foodmate.net

A.2.2.2.9 TE缓冲液:在800 mL水中依次加入10 mL Tris-盐酸溶液(A.2.2.2.1)、2 mL EDTA溶液(A.2.2.2.2),加水定容至1 L,分装后高压灭菌。

A.2.2.2.10 无菌水:取重蒸水100 mL～200 mL,在121 ℃灭菌20 min。

A.2.2.2.11 变性上样缓冲液:称取10 g蔗糖、20 mg溴酚兰、20 mg二甲苯青,溶于90 mL去离子甲酰胺中,用重蒸水定容至100 mL。

A.2.2.2.12 固定液(10%):量取100 mL冰醋酸,加入900 mL重蒸水,混匀。

A.2.2.2.13 硫代硫酸钠溶液(10%):称取10 g硫代硫酸钠,加入100 mL重蒸水溶解。

A.2.2.2.14 凝胶液(6%):称取60 g丙烯酰胺、3.1 g亚甲叉双丙烯酰胺、420 g尿素和吸取50 mL电泳缓冲液Ⅰ(A.2.2.2.7)混合,用重蒸水溶解后,在定容至1 L。

A.2.2.2.15 凝胶染色液:称取1 g硝酸银,加入1 000 mL重蒸水,再加入1.5 mL甲醛,混匀。

A.2.2.2.16 凝胶显影液:称取30 g无水碳酸钠,加入1 000 mL重蒸水溶解后,再加入0.2 mL硫代硫酸钠(A.2.2.2.13)和1.5 mL甲醛,混匀。

A.2.2.2.17 琼脂糖凝胶(0.8%):称取0.8 g琼脂糖加入100 mL 1×TAE电泳缓冲液Ⅱ后,加热溶解。

A.2.2.2.18 乙醇(70%):吸取700 mL无水乙醇,加水定容至1 L。

**A.2.2.3 仪器**

A.2.2.3.1 PCR仪:温度梯度变化反应灵敏准确。

A.2.2.3.2 恒压电泳仪:电压10 V～3 000 V、电流2 mA～200 mA、功率5 W～200 W。

A.2.2.3.3 离心机:低温可达4 ℃以下、转速10 000 r/min。

A.2.2.3.4 恒温水浴:控温精度±0.1 ℃。

A.2.2.3.5 微量移液器:精确到0.1 mL。

A.2.2.3.6 凝胶成像仪:可连接电脑拍照。

A.2.2.3.7 电泳槽:垂直电泳槽和水平电泳槽。

A.2.2.3.8 回旋水平脱色摇床:转速1 000 r/min～10 000 r/min。

A.2.2.3.9 X光灯。

A.2.2.3.10 玻璃板。

A.2.2.3.11 离心管:1 mL～2 mL。

A.2.2.3.12 PCR薄壁管。

A.2.2.3.13 分析天平:感量0.1 mg。

**A.2.2.4 分析步骤**

**A.2.2.4.1 DNA的提取(CTAB法)**

a) 取适量大麦新鲜叶片在研钵中放入液氮后研磨,使其成细粉状。操作过程中小心冻伤。

b) 取0.5 g左右的大麦叶片组织放入一支2 mL灭菌离心管中,加入800 μL～900 μL DNA提取液(A.2.2.2.3),轻轻颠倒混匀后,在65 ℃恒温水浴中保温40 min～1 h,中间每隔10 min颠倒一次。

c) 从水浴中取出在冰上放置5 min,加入等体积的三氯甲烷-异戊醇溶液(A.2.2.2.4),颠倒混匀(先慢后快)10 min,在低温(4 ℃)下,8 000 r/min～10 000 r/min离心10 min。

d) 取上清液移入另一支2 mL灭菌离心管中,加入3 μL RNaseA,置于37 ℃恒温水浴30 min(去除DNA中的RNA)。

e) 在37 ℃保温后加等体积的三氯甲烷-异戊醇溶液(A.2.2.2.4),颠倒混匀(先慢后快)10 min,在低温(4 ℃)下,8 000 r/min～10 000 r/min离心10 min。

f) 取上清液移入另一支2 mL离心管中,加入2倍体积的无水乙醇(置于－20 ℃冷冻),颠倒混匀,室温下静止约3 min。



食品伙伴网http://www.foodmate.net

g) 用灭菌枪头挑出 DNA.，并用 70%乙醇漂洗 2～3 次，室温下放置干燥，乙醇挥发后加入 100 μL 1×TE 或者无菌水溶解。

h) 用琼脂糖凝胶(A.2.2.2.17)检测(约需 2 μL～3 μL)，电泳后放凝胶于凝胶成像仪拍照。样品于－20 ℃保存备用。

**A.2.2.4.2 PCR 扩增**

在 PCR 薄壁管中用微量移液器依次加入 12.8 μL 无菌水、2 μL PCR 缓冲液、2 μL 200 μmol/L dNTP、2 μL 500 μmol/L 引物、0.2 μL 1 U/μL *Taq* DNA 聚合酶，最后加入 1 μL 大麦 DNA(浓度 30 ng/μL～50 ng/μL)使终体积达 20 μL，加 5 μL 矿物油离心 10 s，混匀放入 PCR 仪扩增。

大麦模板先在 94 ℃预变性 5 min 后，按下列条件进行扩增循环 35 个轮次：

(1) 94 ℃变性 30 s；(2) 55 ℃退火 40 s；(3) 72 ℃延伸 40 s。最后在 72 ℃下保温 10 min 结束扩增程序，取出扩增产物放置于 4 ℃冰箱备用。

**A.2.2.4.3 聚丙烯酰胺凝胶板的制作**

a) 首先用自来水将玻璃平板和耳朵板冲洗干净。

b) 区分好两块玻璃板正反面后用乙醇分别擦拭一遍。

c) 待乙醇挥发后在平板一面用亲和硅烷均匀涂抹两次，耳朵板用剥离硅烷均匀涂抹两次(此操作在通风橱下操作，小心被腐蚀)。

d) 上述步骤完成后，将两片压条分别放于平板(涂亲和硅烷一面)两侧，并将耳朵板(涂剥离硅烷一面)盖于平板上面，用夹子加紧。

e) 将凝胶贮存液(A.2.2.2.14)沿两板之间的缝隙(耳朵板一侧)缓慢灌入，灌胶过程中勿使气泡产生，避免对实验产生影响(60 mL 凝胶贮存液＋200 μL 10%过硫酸胺＋100 μL TEMED)。

f) 胶灌好以后，将梳子(不带齿子一端)插入胶面，插入深度要适宜。

g) 室温放置 1 h～2 h 静止凝胶(依据温度确定凝胶时间)。

**A.2.2.4.4 预电泳**

a) 胶凝固定好以后将梳子拔出，平板一面向外，耳朵板一面向内放于垂直电泳槽内，两端用铁夹子加紧。

b) 将电泳缓冲液Ⅰ(A.2.2.2.7)稀释为 0.5×TBE，灌于垂直电泳槽上下槽内，吹净胶板上样端的碎胶。

c) 将电泳槽的电源线连接电泳仪后，通电。70 W 恒功率电泳 30 min。

**A.2.2.4.5 上样跑电泳**

a) 30 min 预电泳后断电，将梳子(有齿一端)插入胶板内，适宜深度。

b) 将 PCR 扩增产物加入变性上样缓冲液后，在 PCR 仪内 94 ℃变性 5 min，并迅速转移至冰水内冷却。

c) 取 3 μL～5 μL 变性扩增产物顺梳子孔加入，启动电源，70 W 恒功率电泳 45 min。

**A.2.2.4.6 银染显影**

a) 电泳后将玻璃板分开，把平板(粘有凝胶的玻璃板)放入装有固定液(A.2.2.2.12)的洗脱盒内，在回旋水平摇床上振荡 20 min～30 min，固定脱色。

b) 脱色后用重蒸水水洗 2 次～3 次，3 min/次～5 min/次。

c) 用凝胶染色液(A.2.2.2.15)染色 20 min～30 min。

d) 迅速用重蒸水水洗 8 s～10 s。

e) 用凝胶显影液(A.2.2.2.16)显影，直到可见清晰带为止。

f) 用 10%冰醋酸固定 3 min～5 min。

g) 用重蒸水水洗 3 min～5 min，室温下风干。



食品伙伴网http://www.foodmate.net

A.2.2.4.7 结果的显示

将风干后的玻璃板放在X光灯箱上，与已知大麦品种的原纯品种基因图谱进行观测比较，详细记录。

## A.3 水敏感性测定

### A.3.1 原理

取两组试样，分别加入4 mL和8 mL水，保温发芽，两组发芽麦粒的百分数之差，即为水敏感性。

### A.3.2 仪器

A.3.2.1 培养皿：直径10 cm。

A.3.2.2 刻度吸管：分度值0.1 mL。

### A.3.3 分析步骤

取两组培养皿，分别将两张9 cm的滤纸放入培养皿底部，再分别加入4.0 mL和8.0 mL水均匀润湿滤纸。各取100粒大麦试样放在滤纸上，使每一麦粒的腹部很好地与滤纸接触，盖上皿盖。将培养皿放入塑料袋密闭，以防止水蒸发。在温度18 ℃～20 ℃，于暗处培养。在浸渍开始后24 h、48 h和72 h各拣除一次发芽的麦粒。

### A.3.4 结果计算

加4 mL水，120 h大麦发芽的百分数($W_1$)按式(A.1)计算，数值以%表示。

$$W_1 = 100 - n \qquad \cdots\cdots (A.1)$$

加8 mL水，120 h大麦发芽粒的百分数($W_2$)按式(A.2)计算，数值以%表示。

$$W_2 = 100 - n \qquad \cdots\cdots (A.2)$$

试样的水敏感性($W_3$)按式(A.3)计算，数值以%表示。

$$W_3 = W_1 - W_2 \qquad \cdots\cdots (A.3)$$

式中：

$n$——不发芽粒数；

$W_3$——试样的水敏感性，%。

所得结果表示至整数。

### A.3.5 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的3%。

食品伙伴网http://www.foodmate.net