

基于实时荧光PCR的粉丝粉条淀粉掺杂鉴定方法

朱召娣, 李晓琳, 黄匯帧, 吴昊, 郭良起

河南广电计量检测有限公司, 河南 郑州

收稿日期: 2023年11月9日; 录用日期: 2024年1月28日; 发布日期: 2024年2月5日

摘要

本实验拟采用实时荧光PCR技术, 根据粉丝粉条中主要淀粉及常见掺假淀粉之间基因组序列的差异, 建立一种快速灵敏的粉丝粉条中淀粉掺杂的鉴定方法, 为规范粉丝粉条市场, 打击假冒伪劣产品, 维护食品安全提供技术支持。

关键词

淀粉食品, 实时荧光PCR, DNA提取

Detection Method of Starch Doping in Vermicelli Based on Real-Time PCR

Zhaodi Zhu, Xiaolin Li, Huizhen Huang, Hao Wu, Liangqi Guo

Henan GRG Metrology & Test Co., Ltd., Zhengzhou Henan

Received: Nov. 9th, 2023; accepted: Jan. 28th, 2024; published: Feb. 5th, 2024

Abstract

In this study, real-time fluorescent PCR technology was used to establish a fast and sensitive method for the identification of starch doping in vermicelli noodles according to the differences between the main starch and common adulterated starch in vermicelli noodles, so as to provide technical support for regulating the vermicelli market, combating fake and shoal products, and maintaining food safety.

文章引用: 朱召娣, 李晓琳, 黄匯帧, 吴昊, 郭良起. 基于实时荧光 PCR 的粉丝粉条淀粉掺杂鉴定方法[J]. 食品与营养科学, 2024, 13(1): 26-30. DOI: 10.12677/hjfn.2024.131005

Keywords

Starch Food, Real-Time Fluorescent PCR, DNA Extraction

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

淀粉掺杂在食品加工中是一种较为普遍的现象,近年来国内外科研人员围绕淀粉掺杂鉴别问题已展开不少研究,如根据不同淀粉在颗粒超微形貌、结构等上的明显差别,运用扫描电镜、红外光谱等技术区分马铃薯淀粉、玉米淀粉、红薯淀粉、木薯淀粉、藕粉等[1][2]。另有学者利用淀粉肽指纹图谱鉴别红薯淀粉、马铃薯淀粉及木薯淀粉[3]。虽然上述方法在淀粉种类检测中取得了一定的进展,但在实际应用中仍存在各种问题。如光谱法虽能快速识别真假淀粉,但对于掺假物的具体定性仍存在不足。

实时荧光 PCR 技术通过分析物种 DNA 水平上的差异来鉴别物种属性,结果准确、可靠,且不受环境因素等影响[4],因此,基于 DNA 的实时荧光 PCR 等分子生物学技术在食品鉴伪,特别是加工食品中生物种类鉴定方面的应用越来越多,如鉴定燕窝制品中是否掺杂猪皮、鸡蛋清、琼脂等常见掺假物[5],区分肉制品中鹿肉、牛肉、猪肉成分等。但该技术应用于淀粉制品的掺假的鉴别上存在着一定的困难,这是因为淀粉制品如粉丝、粉条在采用常规方法提取 DNA 时,由于淀粉含量较高造成溶胀严重,往往不能提取出纯度浓度较好的 DNA,无法进行后续的 PCR 扩增。因此本项目拟开发一种基于实时荧光 PCR 技术简单快速准确鉴别粉丝粉条中淀粉掺杂的新方法,主要根据现有的 DNA 提取方法 CTAB 法,针对其步骤进行改良,以提高检测效率以及检测结果的准确性,避免出现假阴性的实验结果,获取高纯度、合适浓度的 DNA 进行实时荧光 PCR 检测。

2. 材料与amp;方法

2.1. 材料

虞城县王恩红薯粉皮加工厂、菏泽中晟经贸有限公司、菏泽市定陶区餐添香淀粉制品厂、汝州市庙下阁子粉皮加工店、曹县众乐嘉食品有限公司等粉皮样品 10 份、粉丝样品 40 份,用旋风磨研磨至粉末状,作为本实验的供试材料。

2.2. 试剂

Premix E TaqTM (Probe qPCR)试剂:宝生物公司;TAE 溶液(50×):Biosharp 公司;RNA 酶、RNase A、核酸助沉剂、2X (2%) CTAB 缓冲液等:Solarbio 公司;CTAB、氯仿、异戊醇、异丙醇、乙醇醋酸钠等均为市售分析纯。

2.3. 引物和探针

红薯特异性基因的引物探针来自于文献[6],由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

2.4. 仪器与设备

杭州奥盛: Nano-300 微量核酸蛋白分析仪、MSC-100 干式恒温器;德国耶拿: qTOWER3 荧光定量

基因扩增仪; LABDIKA 公司: AN CER 漩涡混合仪; SIGMA 公司: 3K15 高速冷冻离心机、Mini-15K 小型离心机; 嘉定公司: JXFM110 旋风磨。

2.5. 粉丝粉皮制品的 DNA 提取

2.5.1. 采用简易 CTAB 法提取样品 DNA [7] [8]

1) 取少量实验材料(约 200 mg)置于研钵中, 用液氮磨至粉状; 2) 转移至离心管中, 加入 2 mL CTAB 提取液和 10 μ L RNA 酶(10 mg/mL), 65 $^{\circ}$ C 温育 30 min; 3) 12000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min, 取上清 700 μ L, 转入新离心管, 加入 300 μ L 氯仿 - 异戊醇(24:1)抽提; 4) 12000 r/min 离心 5 min, 吸取上清 500 μ L, 转入新离心管, 加入 400 μ L 氯仿 - 异戊醇(24:1)抽提; 5) 12000 r/min 离心 5 min, 吸取上清 400 μ L; 6) 将上清转入新离心管, 加入 2.5 mL 异丙醇, -20 $^{\circ}$ C 静置 30 min; 7) 12000 r/min 离心 10 min, 弃上清; 8) 用 75%乙醇洗涤沉淀 2 遍, 静置 10 min; 9) 加入 50 μ L 0.5 \times TE (含 RNase)缓冲液, 使 DNA 溶解, 可置于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱约 15 h, 使 RNA 消解。

2.5.2. DNA 提取方法的比较[9]

1) 在相同背景条件下, 采用不同浓度的 CTAB (1%/2%/4%), 比较提取 DNA 质量; 2) 在相同背景条件下, 采用不同水浴温度(65 $^{\circ}$ C/70 $^{\circ}$ C), 比较提取 DNA 质量; 3) 在相同背景条件下, 采用不同水浴时间(10 min/20 min/30 min), 比较提取 DNA 质量; 4) 在相同背景条件下, 采用不同离心温度(4 $^{\circ}$ C/15 $^{\circ}$ C), 比较提取 DNA 质量; 5) 在相同背景条件下, 增加多糖(多糖水解酶)的去除步骤, 比较提取 DNA 质量; 6) 在相同背景条件下, 增加多酚(提取缓冲液中加入 1%~2% PVP)的去除步骤, 比较提取 DNA 质量; 7) 在相同背景条件下, 增加核酸助沉剂。

2.5.3. 特异性基因的检测

使用 Premix E TaqTM (Probe qPCR)试剂盒(宝生物), 扩增反应总体系为 25 μ L: Premix Ex Taq (Probe qPCR) (2 \times) 12.5 μ L, 上游引物 0.5 μ L, 下游引物 0.5 μ L, 探针 0.5 μ L, 模板 2 μ L, 无菌水 8.5 μ L, 进行实时荧光 PCR 程序设置: 1) 预变性 Cycle: 1, 95 $^{\circ}$ C, 30 sec; 2) PCR 反应 Cycle: 40, 95 $^{\circ}$ C, 5 sec, 60 $^{\circ}$ C 30 sec。仪器检测通道设置为 FAM 荧光。检验过程中设立阳性对照、阴性对照和空白对照。

3. 结果和讨论

DNA 提取条件的优化

使用微量核酸蛋白分析仪测定 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 确定核酸浓度与纯度、特异性基因的检测(图 1)比较提取 DNA 质量。结果见表 1。

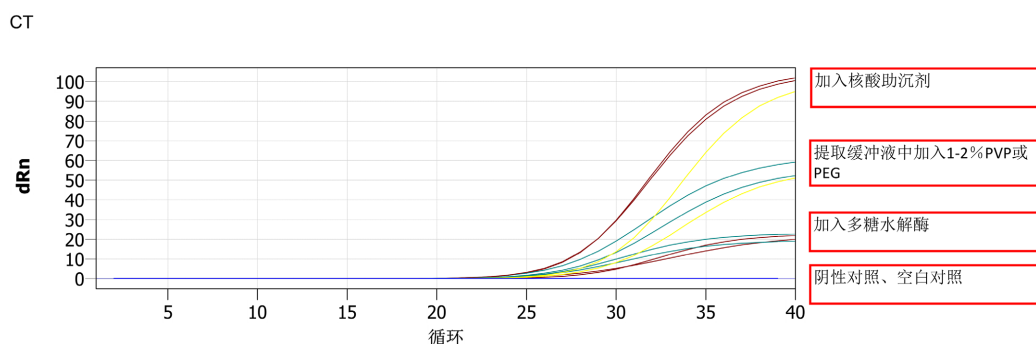
Table 1. Comparison of DNA extraction methods

表 1. DNA 提取方法的比较

序号	方法	浓度(μ g/mL)	纯度(OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀)	特异性基因检测
1	CTAB 浓度(1%)	10~35	1.0~1.2	未检出
2	CTAB 浓度(2%)	10~35	1.0~1.2	未检出
3	CTAB 浓度(4%)	10~35	1.0~1.2	未检出
4	水浴温度(65 $^{\circ}$ C)	10~35	1.0~1.2	未检出
5	水浴温度(70 $^{\circ}$ C)	10~35	1.0~1.2	未检出
6	水浴时间(10 min)	10~35	1.0~1.2	未检出

续表

7	水浴时间(20 min)	10~35	1.0~1.2	未检出
8	水浴时间(30 min)	10~35	1.0~1.2	未检出
9	离心温度(4℃)	10~35	1.0~1.2	未检出
10	离心温度(15℃)	10~35	1.0~1.2	未检出
11	加多糖(多糖水解酶)	65~100	1.5~1.7	检出
12	提取缓冲液中加入 1~2% PVP	80~120	1.5~1.7	检出
13	核酸助沉剂	300~500	1.8~2.0	检出



注：不同曲线代表在相同背景下，分别加多糖(多糖水解酶)、提取缓冲液中加入 1%~2% PVP、加入核酸助沉剂进行的实时荧光 PCR 反应。

Figure 1. Detection of specific genes

图 1. 特异性基因的检测

通过 DNA 提取方法的比较，在相同背景条件下，采用不同浓度的 CTAB (1%/2%/4%)、不同水浴温度(65℃/70℃)、不同水浴时间(10 min/20 min/30 min)、不同离心温度(4℃/15℃)，如表 1 中序号 1~10 实验结果所示对提取 DNA 质量影响不大，不能够提取出特异性基因；在相同背景条件下，增加多糖(多糖水解酶)的去步骤、增加多酚(提取缓冲液中加入 1~2% PVP)的去步骤，如表 1 中序号 11~12 实验结果所示对提取 DNA 质量能够提取出特异性基因，但是纯度较低；在相同背景条件下，增加核酸助沉剂，如表 1 中序号 13 实验结果所示对提取 DNA 质量能够提取出特异性基因，纯度较高。

4. 讨论与结论

粉丝粉条在用常规 DNA 提取方法进行提取时，由于淀粉含量较高造成溶胀严重，不能提取出纯度浓度较好的 DNA。因此本实验主要根据现有提取方法 CTAB 法，针对其步骤进行改良，发现在相同背景条件下，采用不同浓度的 CTAB (1%/2%/4%)、不同水浴温度(65℃/70℃)、不同水浴时间(10 min/20 min/30 min)、不同离心温度(4℃/15℃)，对提取 DNA 质量影响不大，不能够提取出内源基因；在相同背景条件下，增加多糖(多糖水解酶)的去步骤、增加多酚(提取缓冲液中加入 1~2% PVP)的去步骤，对提取 DNA 质量影响较大，能够提取出内源基因，但是纯度较低；在相同背景条件下，增加核酸助沉剂，对提取 DNA 质量影响较大，能够提取出内源基因，且纯度较高。但是本实验未将在相同背景条件下，同时增加多糖(多糖水解酶)的去步骤、多酚(提取缓冲液中加入 1~2% PVP)的去步骤、核酸助沉剂三个步骤进行实验，因为只增加核酸助沉剂就能够很好地提取出高纯度的 DNA。本实验提高了检测效率以及检测结果的准确性，避免出现假阴性的实验结果，获取高纯度、合适浓度的 DNA 进行实时荧光 PCR 检测，为市售粉丝

粉条提供快速、准确的鉴别技术手段。

本实验研究的局限性在于只是使用微量核酸蛋白分析仪测定 OD260/OD280 确定核酸浓度与纯度以及特异性基因的检测来判断 DNA 提取的效果,并未使用凝胶电泳方法来判断是否提取处理目的基因条带,在未来的研究方向考虑加入凝胶电泳方法来进一步判断并优化 DNA 提取的效果。

参考文献

- [1] 王绍清,王琳琳,范文浩,曹红,曹宝森.扫描电镜法分析常见可食用淀粉颗粒的超微形貌[J].食品科学,2011(15):74-79.
- [2] 张金亚,李海洋,孟红娟,闫君廉.基于红外光谱技术的淀粉种类的快速鉴别研究[J].现代园艺,2019(5):19-21.
- [3] 苏世伟,郭顺堂,张超,张婷,梁明.食源性生物活性肽指纹图谱的含义与构建[J].食品工业科技,2016,37(23):396-399.
- [4] 陈晓宇,陆利霞,熊雄,熊晓辉.实时荧光 PCR 技术鉴别流通环节的掺假牛肉及其制品[J].生物加工过程,2021(2):214-226.
- [5] 乌日罕,陈颖,吴亚君,葛毅强.燕窝 DNA 提取方法比较[J].食品与发酵工业,2008(3):33-36.
- [6] 韩建勋,陈颖,吴亚君,王斌,邓婷婷.实时荧光 PCR 法鉴定食用淀粉植物来源[J].中国食品学报,2019,19(2):291-300.
- [7] 孙敏,粟志平,梁成珠,郑小龙,高宏伟,徐彪,朱来华.粉丝类产品中转基因成分的检测[J].食品科学,2008,29(6):230-233.
- [8] 罗素梅,郭崇炎,刘小平,黄冬华,周勇辉,范方喜,赖金莉,张远福.5种金边瑞香基因组 DNA 提取方法比较研究[J].安徽农业科学,2023(5):74-77+88.
- [9] 蒋小刚,王华,周武先,由金文,张美德.白术叶片 DNA 提取方法的优化[J].安徽农业科学,2023(11):128-131.