

红薯源性成分微滴式数字 PCR 的检测与定量分析

刘二龙¹, 卢丽², 凌莉², 关丽军², 李志勇²

(1. 黄埔海关, 广东广州 510730)

(2. 广州海关, 广东省动植物与食品进出口技术措施研究重点实验室, 广东广州 510623)

摘要: 本文根据红薯单拷贝物种基因 β -淀粉酶基因 (Ipomoea batatas beta-amylase gene, β -AMY) 特异性片段设计引物组和探针, 建立了红薯成分特异性定量检测的微滴数字 PCR 检测方法及 β -AMY 基因拷贝数浓度 (copy number/ μ L) 与红薯质量 (mg) 的线性关系, 并对方法的特异性、灵敏度和适应性均进行了测试。结果显示建立的红薯成分数字 PCR 检测方法特异于红薯成分检测, 在 20 μ L 反应体系中定量下限 (limit of quantitation, LOQ) 和检测下限 (limit of detection, LOD) 分别为 2.53 copies/ μ L 和 0.67 copies/ μ L。根据建立的拷贝数浓度 (copy number/ μ L) 与红薯质量 (mg) 的线性关系, 对红薯质量百分比为 5% 和 25% 的样本进行定量检测, 检测结果经换算得到的红薯含量分别为 4.15% 和 21.33%, 回收率分别为 83.06% 和 85.31%, RSD 值在 6.33%~6.95% 之间, 表明本方法可对质量百分比为 5% 及以上的红薯成分进行准确定量, 在定量检测方面具有较大应用潜力, 可为市场监管提供了技术支持。

关键词: 红薯; 数字 PCR; 物种鉴定; 定量

文章编号: 1673-9078(2019)07-273-277

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.7.038

Detection and Quantification of Sweet Potato Components by Droplet Digital PCR

LIU Er long¹, LU Li², LING Li², GUAN Li-jun², LI Zhi-yong²

(1. Huangpu Customs, Guangzhou 510730, China) (2. Guangzhou Customs, Guangdong Key Laboratory of Import and Export Technical Measures of Animal, Plant and Food, Guangzhou 510623, China)

Abstract: In this work, primers and probes were designed based on the specific fragment of Ipomoea batatas beta-amylase gene (β -AMY), and a droplet digital PCR method for detection of sweet potato was established. The specificity, sensitivity and adaptability of this method were tested. The results showed that the established method was specific to the detection of sweet potato components. The limit of quantitation (LOQ) and limit of detection (LOD) were 2.53 copies/ μ L and 0.67 copies/ μ L, respectively. According to the established linear relationship between copy number concentration (copy number/ μ L) and the sweet potato quality (mg), the quantitative analysis of 5% and 25% of the sweet potato mass percentage was performed, and the sweet potato content converted according to the linear relationship was 4.15% and 21.33%, respectively. The recovery rates were 83.06% and 85.31%, respectively, and the RSD values were between 6.33% and 6.95%. It showed that this method can accurately quantify sweet potato components with a mass percentage of 5% or more and it indicated that ddPCR method had strong potential in quantifying sweet potato. This method can provide technical support for market supervision of sweet potato and its products.

Key words: sweet potato; droplet digital PCR; species identification; quantification

红薯富含淀粉, 是农作物中营养种较多的食品之一。但目前市场上也存在两方面的问题: 一方面是红薯加工过程中混入掺杂其他来源, 如木薯、玉米淀粉等低价值淀粉损害消费者利益, 另一方面在一些成本相对较高的淀粉如马蹄淀粉中掺入价格较低的红薯淀

收稿日期: 2019-03-10

基金项目: 广东省科技计划项目 (2017B020207008); 广州市科技计划项目 (201704030125)

作者简介: 刘二龙 (1978-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 微生物与分子生物学

通讯作者: 李志勇 (1972-), 男, 博士, 研究方向: 食品安全快速检测技术

粉, 扰乱淀粉市场。因此鉴定和精确定量红薯成分在食品安全监管当中具有重要意义。国内外者对淀粉类产品鉴定主运用电镜和稳定碳同位素^[1]、红外光谱^[2,3]、淀粉肽指纹图^[4]等技术对淀粉种类掺杂进行了研究, 在实际应用过程中易受到仪器昂贵、取样均匀性、代表性及样品前处理复杂等问题的限制其应用, 此外, 有研究者采用实时荧光 PCR 方法进行了混合样品中食品成分进行定量研究^[5], 但该类方法受实时荧光 PCR 扩增效率等影响, 导致测得基因拷贝数与样品中的实际基因拷贝数偏差较大, 从而加大了定量结果的偏差^[6]。微滴式数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR)

是近年在发展起来的定量技术,其利用有限稀释分析和泊松分布分析来实现靶 DNA 拷贝数的绝对定量^[7],被称为“第三代 PCR”技术^[8],ddPCR 技术的兴起为解决食品的掺杂问题提供了新的解决方案,目前已应用于转基因产品含量^[9,10]及食品成分的定量检测^[11]。在食品鉴别及成分鉴定方面,ddPCR 技术在肉源性食品真伪鉴别领域研究较多,苗丽等^[12]建立了肉制品中牛源和猪源成分的定量分析方法,王强等^[13]建立了食品和饲料中鹅源性成分的微滴数字 PCR 检测方法,任君安等建立了微滴式数字聚合酶链式反应精准定量检测羊肉中掺杂猪肉,植物源性食品真伪鉴别领域有郭楠楠等^[14]立了杏仁和花生源成分的数字 PCR 检测方法,这些方法的探索有力地促进了数字 PCR 技术在食品成分鉴定和定量技术的应用。

单拷贝核基因相较于其他基因具有拷贝数少且数量相对恒定等特点,具有准确且稳定的检测优势,适用于建立定量检测方法^[15]。本文以红薯单拷贝基因 β -淀粉酶基因 (Ipomoea batatas beta-amylase gene, β -AMY) 的特异性序列为扩增目标,利用微滴式数字 PCR 技术开展红薯成分的微滴数字 PCR 定量检测研究,通过建立红薯源性成分拷贝数浓度 (copy/ μ L) 与样品质量 (mg) 之间的线性关系,从靶基因拷贝数到样品实际质量间的一步转化,实现对红薯成分的精确定量,为市场监管提供有力的技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

红薯、紫薯、木薯、马铃薯、藕、芋头、碗豆、高粱、胡萝卜、蕃茄、大米、大豆和大麦作物由本室购置保存。

Premix Ex TaqTM, 大连宝生物; Wizard Genomic DNA purification kit (Promega, A1120); MasterMix (2 \times), ddPCR Droplet Generation Oil、GD8 Cartridge 均购自伯乐公司; 引物和探针由闪晶生物公司合成,稀释为终浓度为 10 μ mol/L 的工作液使用。

1.2 主要仪器

微量分光光度计 nanodrop 2000 c, 美国 GE 公司; IKA 控制型研磨机, 德国 IKA 公司; ABI 7500 FAST, 美国 ABI 公司; QX 200 微滴式数字 PCR 系统, 美国伯乐公司。

1.3 方法

1.3.1 DNA 的提取

IKA 控制型研磨机研磨样品后,使用 Wizard Genomic DNA purification kit DNA 提取试剂盒并按照其操作说明书提取 DNA, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3.2 引物、探针设计及扩增体系

本文通过对红薯单拷贝基因-红薯 β -淀粉酶基因 (Ipomoea batatas beta-amylase gene, β -AMY, GenBank: D12882.1), 通过在 NCBI 上比对, 选择特异性片段 Primer Express[®] Software version 3.0 设计引物和探针, 引物探针序列及扩增体系见表 1。

QX200 数字 PCR 实验反应体系: ddPCRTM Supermix for Probes (2 \times) 10 μ L, β -AMY-F/ β -AMY-R/ β -AMY-P (10 μ mol/L) 分别为 0.5 μ L, DNA 模板 2 μ L, 补水至 20 μ L。反应程序: 95 $^{\circ}$ C, 5 min (1 $^{\circ}$ C/s); 94 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min (1 $^{\circ}$ C/s), 共 40 个循环; 98 $^{\circ}$ C 10 min (1 $^{\circ}$ C/s), 12 $^{\circ}$ C 保存反应产物。反应结束后将 96 孔反应板置微滴分析仪中读取数据, 应用 Quanta Soft V1.3.2 软件进行数据分析。

表 1 引物探针序列

Table 1 Primers and probe for dPCR

目标序列	引物探针序列 (5'-3')	扩增片段大小
β -AMY	β -AMY-F: GACCTCCATATTACTGAAAGGAAG	118 bp
	β -AMY-R: AGTAATTGCTCCATCCTGTTCA	
	β -AMY-P: FAM-TCTACGAAGTTTAAAGTATGTGCCGCTCTC-BHQ1	

1.3.3 引物探针和特异性验证

本实验根据红薯 β -AMY 特异性片段序列合成引物和探针 (见表 1), 在 NCBI 上进行同源性比较, 并在实时荧光 PCR 仪上采用红薯、紫薯、木薯、马铃薯、藕、芋头、碗豆、高粱、胡萝卜、蕃茄、大米、大豆和大麦作物进行特异性验证。

1.3.4 红薯质量 (mg) 与拷贝数浓度 (copies/ μ L) 的线性关系建立

称取梯度质量红薯粉样品 5 mg、15 mg、30 mg、40 mg、50 mg 提取基因组 DNA, 进行数字 PCR 反应, 每个梯度三个平行, 以其所得拷贝数浓度与质量建立线性关系, 相关系数 $R^2 \geq 98\%$ 作为线性关系良好的评价标准。

1.3.5 红薯成分定量检测限 LOQ 和检测限 LOD 测定及验证

将提取的红薯 DNA 用分光光度计测定后稀释成

梯度为 34, 6.8, 1.36, 0.27 和 0.09 ng/ μ L 5 个梯度, 每个梯度设三个平行进行数字 PCR 反应, 测定并验证其 LOQ 和 LOD。

1.3.6 适用性测试

以大豆粉为基质, 在其中掺入红薯粉使其质量百分比为 1%、5%和 25%, 用 IKA 研磨机进行混匀, 制备混合样各 10 g。每个样品称取 3 个平行, 每个平行 50 mg, 分别进行基因组 DNA 提取, 进行数字 PCR 测试。以回收率在 80%~120%和 $RSD \leq 25\%$ 作为质量百分比定量数据的评价标准。

2 结果与分析

2.1 引物探针和特异性验证

设计的引物探针(如表 1 所示)经 NCBI 上进行 Blast 结果表明其具有理论特异性, 该组引物和探针进行实时荧光 PCR 检测结果如表 2 所示, 13 种农作物仅红薯和紫薯有典型扩增, 红薯与其他作物无交叉反应, 表明本文设计的引物探针组的特异性良好, 适用于红薯成分的定量分析。

表 2 引物及探针种间特异性测试结果

Table 2 Specificity test results of the primer and probe

序号	作物	结果
1	红薯	+
2	紫薯	+
3	木薯	-
4	马铃薯	-
5	藕	-
6	芋头	-
7	碗豆	-
8	高粱	-
9	胡萝卜	-
10	蕃茄	-
11	大米	-
12	大豆	-
13	大麦	-

注: “+”, 检测到特异性扩增; “-”, 未检测到特异性扩增。

2.2 红薯质量 (mg) 与拷贝数浓度 (copies/ μ L)

的线性关系建立

按 1.3.4 进行数字 PCR 反应, 红薯在在 5~50 mg 之间, 红薯质量 (mg) 与拷贝数浓度 (copies/ μ L) 之间存在明显的线性关系, 如图 1 所示, 线性相关系数

$R^2=0.9807$, 符合本文 $R^2 \geq 98\%$ 要求, 红薯质量与拷贝数浓度的线性关系式为:

$$y=19.596x-21.83$$

其中: x 代表质量 (mg); y 代表所测得的拷贝数浓度 (copies/ μ L)。

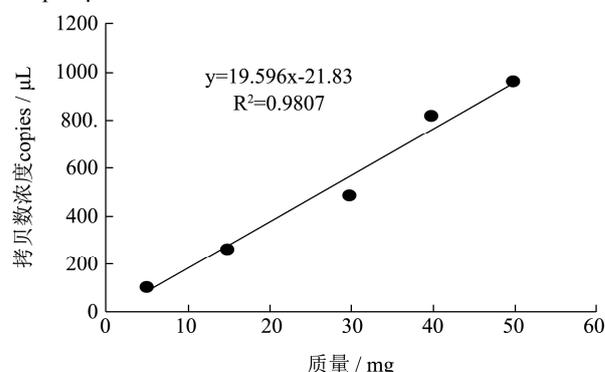


图 1 红薯质量 (mg) 与拷贝数浓度 (copies/ μ L) 线性关系

Fig.1 Linear relationship between ipomoea batatas quantity (mg) and target DNA copy number concentration (copies/ μ L)

2.3 LOD 和 LOQ 测定及验证

采用的判定的标准以检出率 $\geq 95\%$ 时最低拷贝数浓度为 LOD, 全部样品能检出且相对标准偏差 $RSD \leq 25\%$ 时的拷贝数浓度为 LOQ^[16]。

测试结果如表 3、表 4 所示, 由表 4 数据可知拷贝数浓度在 2.53 copies/ μ L 时, 三个平行的 RSD 为 17.80%, $RSD \leq 25\%$, 且由表 4 的验证数据可知, 其 10 个平行实验的拷贝数浓度的 RSD 小于 25%, 因此本文确定红薯数字 PCR 检测的 LOQ 为 2.53 copies/ μ L;

表 3 可知, 在最低拷贝数浓度为 0.67 copies/ μ L 时其三个平行均可检出, 经该拷贝数浓度的 10 个平行验证实验表明其 100% 检出(结果如表 4), 根据判定的标准, 本文红薯数字 PCR 检测的 LOD 为 0.67 copies/ μ L。

2.4 模拟样品测试结果

本文以回收率在 80%~120%和 $RSD \leq 25\%$ 作为有效定量质量百分比数据的评价标准。含红薯质量百分比分别 1%、5%和 25%的样品采用数字 PCR 检测的拷贝数浓度结果如表 5 所示, 经过 2.2 红薯质量 (mg) 与拷贝数浓度 (copies/ μ L) 的线性关系换算结果可知, 对于质量百分比分别 5%和 25%样本, ddPCR 测得质量百分比分别为 4.15%和 21.33%, 回收率分别 83.06%和 85.31%, 三个平行之间的 RSD 值在 6.33%~6.95%之间。根据评价标准, 本方法可对质量百分比为 5%及以上的红薯成分进行准确定量。热点图如图 2 所示。

表 3 LOD 和 LOQ 测试结果

Table 3 Results of the LOD and LOQ tests

DNA 浓度/(ng/μL)	拷贝数浓度/(copies/μL)			平均值/(copies/μL)	SD	相对标准偏差(RSD)
	1	2	3			
34.00	372.00	363.00	384.00	373.00	10.54	2.82%
6.80	69.00	74.10	74.10	72.40	2.94	4.07%
1.36	16.00	15.80	14.60	15.47	0.76	4.90%
0.27	2.50	2.10	3.00	2.53	0.45	17.80%
0.09	0.65	0.49	0.88	0.67	0.20	29.12%

表 4 LOD、LOQ 验证

Table 4 Verification test of the LOD and LOQ

验证项目	DNA 浓度/(copies/μL)	平行组/(copies/μL)										平均值/(copies/μL)	RSD/%
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
LOQ	2.53	2.60	3.10	3.20	3.00	2.60	2.80	2.80	2.80	3.00	1.80	2.77	14.24
LOD	0.67	0.62	0.85	0.84	0.95	0.81	0.85	1.07	0.70	0.93	0.45	0.81	21.99

表 5 样品测试结果

Table 5 Results of simulated sample

模拟样品	检测结果/(copies/μL)			平均值/(copies/μL)	RSD	质量百分比	回收率
	平行 1	平行 2	平行 3				
1%	5.6	7.1	5	5.90	18.33%	2.83%	283.20%
5%	18.3	18	20.2	18.83	6.33%	4.15%	83.06%
25%	202	179	180	187.00	6.95%	21.33%	85.31%

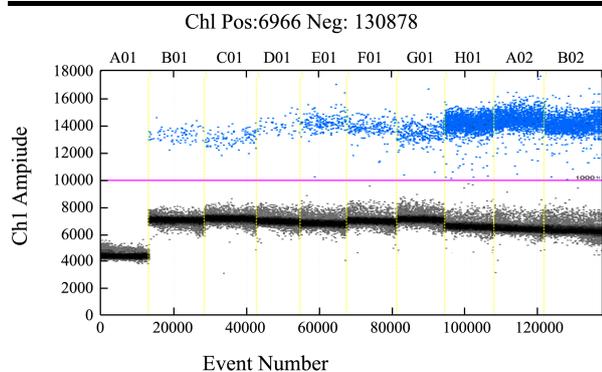


图 2 适应性测试

Fig.2 Test of applicability

注: B01、C01、D01 为质量百分比 1% 的样本, E01、F01、G01 为质百分比 5% 的样本, H01、B1、B02 为质量百分比 25% 的样本。

3 结论

3.1 在食品鉴别方面, 目前数字 PCR 技术在不同肉类成分含量的检测中有较多的研究, 一种思路是先建立质量与 DNA 含量(或浓度)的线性关系, 然后再建立 DNA 含量(浓度)和基因拷贝数浓度的线性关系, 由数字 PCR 测得的拷贝数浓度通过这两组线性关系的计算最后得到质量百分比含量^[12-14,17], 由于该方法需要建立两组标准曲线, 进行两步转化, 实验步骤

繁琐、工作量加大, 特别是在实际运用中, 不同提取试剂盒、不同的样品来源和成分, 在使用分光光度计测量提取的 DNA 含量(浓度)时不可避免产生误差, 导致 DNA 含量(浓度)与质量拟合的标准曲线不甚理想, 从而难以实现准确定量的目的。第二种思路是对于两种肉的混合样品, 直接采用不同比例样品, 同时测这两种肉类的拷贝数, 最终计算获得混合样中两种肉类的比值这一固定系数^[6], 其本质上也是质量与拷贝数的关系, 但这种思路只适合已经明确标识了的两种肉的混合样品的检测, 无法应用到三种及以上或未标识的混合样品中肉成分的定量检测; 第三种思路是 C. Floren 等^[18]采用比常用的 CYTB 基因更加稳定的单拷贝基因 F2 进行测试, 用 F2 基因拷贝数与基因组对应的关系, 使用 genome/genome 替代质量比。没有考虑不同组织、不同物种 DNA 含量的不同, 且检测的实际样品也局限于两种肉混合的量。

3.2 本文选择单拷贝基因 β-AMY 利用微滴式数字 PCR 技术通过构建红薯源性成分拷贝数浓度(copy/μL)与样品质量(mg)之间的线性关系实现红薯成分进行精确定量检测, 实现了从靶基因拷贝数到样品实际质量间的一步转化, 无需建立质量与 DNA 浓度的标准曲线, 简化了定量过程。该方法的检测下限(LOD)和定量检测下限(LOQ)分别检测下限和

定量检测下限分别为 2.53 copies/ μ L 和 0.67 copies/ μ L; 利用已知成分含量样品对方法的适用性进行了验证, 结果显示本方法可实现红薯含量在 5%以上的样品进行准确定量, 为食品鉴伪, 打击掺假、造假等监管中提供技术支持。

参考文献

- [1] 王绍清, 武士奎, 穆同娜, 等. 扫描电镜和稳定碳同位素比质谱法鉴别马铃薯淀粉中的掺假玉米淀粉[J]. 食品科学, 2010, 31(22): 332-335
WANG Shao-qing, WU Shi-kui, MU Tong-na, et al. Detection of adulterated maize starch in potato starch by scanning electron microscope and stable carbon isotope ratio analysis [J]. Food Science, 2010, 31(22): 332-335
- [2] Niu X Y, Zhao Z L, Jia K J, Li X T. Feasibility study on quantitative analysis of glucose and fructose in lotus root powder by FT-NIR spectroscopy and chemometrics [J]. Food Chemistry, 2012, 133: 592-597
- [3] Liu J, Wen Y, Dong N, et al. Authentication of lotus root powder adulterated with potato starch and/or sweet potato starch using Fourier transform mid-infrared spectroscopy [J]. Food Chemistry, 2013, 141: 3103-3109
- [4] Cho D H, Han J A, Lim S T. Identification of botanical origin of starch by using peptide mass fingerprinting of granule-bound starch synthase [J]. Journal of Cereal Science, 2013, 57: 264-266
- [5] López-Andreo M, Aldeguer M, Guillén I, et al. Detection and quantification of meat species by qPCR in heat-processed food containing highly fragmented DNA [J]. Food Chemistry, 2012, 134(1): 518-523
- [6] 任君安, 邓婷婷, 黄文胜, 等. 微滴式数字聚合酶链式反应精准定量检测羊肉中掺杂猪肉[J]. 食品科学, 2017, 38(2): 311-316
REN Jun-an, DENG Ting-ting, HUANG Wen-sheng, et al. A precise quantitative assay for measuring pork incorporated into mutton products by droplet digital PCR [J]. Food Science, 2017, 38(2): 311-316
- [7] Pinheiro L B, Coleman V A, Hindson C M, et al. Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification [J]. Analytical Chemistry, 2012, 84(2): 1003-1011
- [8] 刘津, 刘二龙, 谢力, 等. 数字聚合酶链式反应技术在食品安全检测领域的研究应用进展[J]. 食品科学, 2016, 37(17): 275-280
LIU Jin, LIU Er-long, XIE Li, et al. Progress in research and application of digital polymerase chain reaction (dPCR) in food safety detection [J]. Food Science, 2016, 37(17): 275-280
- [9] 刘二龙, 李婷, 高东微, 等. 转基因甜菜品系 H7-1 的数字 PCR 定量检测方法[J]. 现代食品科技, 2017, 33(7): 261-269
LIU Er-long, LI Ting, GAO Dong-wei, et al. Method for quantitative determination of genetically modified sugar beet line h7-1 by using digital polymerase chain reaction [J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(7): 261-269
- [10] Dobnik D, Spilberg B, Košir A B, et al. Multiplex quantification of 12 European Union authorized genetically modified maize lines with droplet digital polymerase chain reaction [J]. Analytical Chemistry, 2015, 87(16): 8218-8226
- [11] Morisset Dany, Štebih Dejan, Milavec Mojca, et al. Quantitative analysis of food and feed samples with droplet digital PCR [J]. PloS One, 2013, 8(5): 62583
- [12] 苗丽, 张秀平, 陈静, 等. 微滴数字 PCR 法对肉制品中牛源和猪源成分的定量分析[J]. 食品科学, 2016, 37(8): 187-191
MIAO Li, ZHANG Xiu-ping, CHEN Jing, et al. Quantitative analysis of bovine and porcine ingredients in meat products by droplet digital PCR [J]. Food Science, 2016, 37(8): 187-191
- [13] 王强, 蔡一村, 张扬, 等. 食品和饲料中鹅源性成分微滴式数字 PCR 检测与定量分析[J]. 现代食品科技, 2018, 34(10): 258-263, 178
WANG Qiang, CAI Yi-cun, ZHANG Yang, et al. Detection and quantification of goose-derived materials in food and feedstuffs by droplet digital PCR [J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(10): 258-263, 178
- [14] 郭楠楠, 张岩, 李永波, 等. 微滴式数字 PCR 定量检测杏仁露中杏仁、花生源性成分的分析研究[J/OL]. 食品科学: 1-15 [2019-03-10]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20181009.1447.026.html>
GUO Nan-nan, ZHANG Yan, LI Yong-bo, et al. Quantitative detection of almond and peanut-derived components in almond protein drink by droplet digital PCR [J]. Food Science: 1-15 [2019-03-10]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20181009.1447.026.html>
- [15] Rodriguez M A, Garcia T, Gonzalez I, et al. Identification of goose, mule duck, chicken, turkey, and swine in foiegras by species-specific polymerase chain reaction [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(6): 1524-1529

(下转第 285 页)