

贵州蓝莓蜜 TaqMan 探针实时荧光 PCR 检测方法的建立与应用

张致豪^{1,2}, 孙丽萍², 师丰丰^{2,3}, 黄家兴^{2*}, 韦小平^{4*}

(1. 黑龙江省农业科学院牡丹江分院, 黑龙江牡丹江 157000) (2. 中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093)
(3. 伊犁哈萨克自治州农业科学研究所, 新疆伊犁 835000)
(4. 贵州省农业科学院现代农业发展研究所, 贵州贵阳 550006)

摘要: 该研究利用 TaqMan 特异性探针实时荧光 PCR 检测手段, 建立了高效、精准鉴别贵州特色(中蜂)蓝莓蜜的方法。对贵州白竹林、麻卡和乌卡坪三个地域的蓝莓种植区蓝莓蜜进行采集(包括意蜂蓝莓蜜); 同时购买市售蜂蜜及加拿大蓝莓蜜, 该方法通过采集贵州麻江县白竹林地区蓝莓种植园及蜂场周围蓝莓同花期 26 种植物样本, 基于植物基因组中 trnL 基因序列的多序列比对, 设计蓝莓 trnL 基因特异性引物, 并进行 TaqMan 探针验证。结果表明, 本研究设计的 TaqMan 探针特异性强, 建立的 TaqMan 探针实时荧光 PCR 检测方法能检测到蓝莓花粉 DNA 最低浓度为 0.3 ng/μL; 利用建立的方法对 11 种市售蜂蜜和贵州蓝莓蜜样本进行检测, 发现贵州蓝莓蜜的 Ct 值为 24~26, 蓝莓花粉数在 800~1 700 颗, 其余蜂蜜 Ct 值在 30 以上, 表明该方法能够有效实现贵州蓝莓蜜和其他蜂蜜的区分, 具有良好的应用前景。

关键词: 蓝莓蜜; 实时荧光 PCR; TaqMan 探针; 蜜源植物

文章编号: 1673-9078(2024)03-342-349

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.3.0332

Establishment and Application of TaqMan Probe Real-time Fluorescent PCR Detection Method for Blueberry Honey in Guizhou

ZHANG Zhihao^{1,2}, SUN Liping², SHI Fengfeng^{2,3}, HUANG Jiaying^{2*}, WEI Xiaoping^{4*}

(1. Mudanjiang Branch, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Mudanjiang 157000, China)
(2. Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China)
(3. Institute of Agricultural Science of Ili Prefecture, Yili 835000, China)(4. Guizhou Institute of Integrated Agriculture Development, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550006, China)

Abstract: In this study, a highly efficient and accurate method was developed for identifying Guizhou characteristic blueberry honey (from honey bee *Apis cerana*) based on specific TaqMan probe of real-time fluorescent PCR. Blueberry

引文格式:

张致豪, 孙丽萍, 师丰丰, 等. 贵州蓝莓蜜 TaqMan 探针实时荧光 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 现代食品科技, 2024, 40(3): 342-349.

ZHANG Zhihao, SUN Liping, SHI Fengfeng, et al. Establishment and application of taqman probe real-time fluorescent pcr detection method for blueberry honey in Guizhou [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(3): 342-349.

收稿日期: 2023-03-20

基金项目: 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系资助项目 (CARS-44-SYZ4); 贵州喀斯特山区优势特色产业提质增效技术集成与示范 (2021YFD1100300); 黔科合支撑 [(2021) 160]

作者简介: 张致豪 (1991-), 男, 硕士, 研究实习员, 研究方向: 蜂产品品质, E-mail: 280945865@qq.com.

通讯作者: 黄家兴 (1979-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 蜜蜂生物学, E-mail: huangjiaying@caas.cn; 共同通讯作者: 韦小平 (1977-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 蜜蜂生物学、蜂产品品质, E-mail: 560631906@qq.com

honey samples (including *Apis mellifera*) were collected from the blueberry growing areas of Bai zhulin, Maka and Wukaping in Guizhou, meanwhile, commercial local honey and Canadian blueberry honey were also purchased. Twenty-six blueberry samples at the same flowering stage were collected from the blueberry gardens and the areas around the bee farms in the Baizhulin region of Majiang Town, Guizhou Province. The trnL gene in the sampling plant genome were sequenced. A trnL gene-specific primer of blueberry was designed based on the multiple sequence alignments of trnL gene sequences in the plant genome. TaqMan probe was used for validation. The results showed that the TaqMan probe had high specificity, and the minimum concentration of DNA as low as 0.3 ng/ μ L can be detected was in blueberry sample using the established TaqMan probe real-time fluorescent PCR detection method. Such an established method was used to test the samples of 11 kinds of commercial honey and Guizhou blueberry honey. It was found that the Ct value of Guizhou blueberry honey was 24~26, the number of blueberry pollen was 800~1 700, and the Ct values of other honey samples were over 30, indicating that this method can effectively distinguish Guizhou blueberry honey from other honeys, thereby having a good application prospect.

Key words: blueberry honey; real-time pcr; taqman probe; nectar plant

我国主要饲养的蜜蜂包括意大利蜜蜂 (*Apis mellifera*, 简称意蜂) 和中华蜜蜂 (*Apis cerana*, 简称中蜂) 两大种群^[1]。一般而言, 市场上中蜂蜂蜜售价高于意蜂蜂蜜, 受利益驱动, 市场中常以意蜂蜂蜜掺入或者冒充中蜂蜂蜜。蜂蜜掺假主要表现为添加外源的物质包括玉米糖浆、葡萄糖浆和蔗糖糖浆等^[2], 这些因素对养蜂业的发展产生了负面影响^[3]。

目前, 蜂蜜的真实性检测中, 孢粉学鉴定被广泛应用于确定蜂蜜的蜜源植物来源^[4,5], 而使用显微镜检测是一项耗时的工作, 并需要具备植物学的专业知识, 且往往不能提供具体的植物科或属水平的种类分析^[6,7]。光谱法、色谱法、核磁共振法和稳定同位素比值质谱法等也在蜂蜜真实性检测中被广泛应用。然而, 这些方法都存在一定缺陷, 如价格昂贵、费时等。因此, 亟需开发一种高效、精准的鉴别蜂蜜真实性的方法。DNA 方法相比较于仪器分析方法, 被认为是在动物产品和加工食品中明确识别物种的最合适工具^[8-10]。DNA 的方法与传统孢粉学方法相比, 核酸的稳定性更高, 利用花粉 DNA 鉴定的分子方法, 已被多次应用于对蜜蜂觅食行为学的研究, 并确定蜂蜜中蜜源植物种类和地理标识植物^[11-14]。

蜂蜜中的植物 DNA 来源主要是花粉和花蜜^[15], 在植物花粉分析鉴定中主要使用植物核糖体区域的内部转录间隔区 ITS1 和 trnL (UAA) 内含子序列 (以下称为 ITS1 和 trnL)。Baksay 等^[16]对 ITS1 和 trnL 进行比较, 表明 trnL 相对 ITS1 更加准确, 扩增趋于稳定, 受 PCR 偏差影响更小。Utzeri 等^[17]从 9 种蜂蜜中提取出 DNA, 并对内含子 trnL 序列进行 PCR 反应扩增, 共鉴定出 254 种植物。Laube

等^[18]成功地使用实时聚合酶链反应来鉴定 4 个不同地区蜂蜜中发现的植物物种, 并做以真实性评价。因其高灵敏度、高特异性以及可定量分析等优点的荧光定量 PCR 技术、高特异性以及可定量分析等优点, 成为检测食品的重要技术之一^[19-22]。其中 TaqMan 荧光探针方法具有特异性强、灵敏性高等优点, 能有效解决 PCR 产物污染问题, 在动植物种类鉴别和食品研究等方面广泛应用, 也用于蜂蜜中特定物质的检测中^[23,24]。

蓝莓作为贵州的主要经济作物之一, 蜜、粉资源丰富, 是蜜蜂在春季优良的蜜粉源植物。蓝莓蜜作为贵州的特色蜂蜜, 主要是由中华蜜蜂对蓝莓花腺中分泌的花蜜进行采集, 经过充分酿造而成, 呈浅琥珀色。蓝莓蜜中富含人体必需氨基酸、维生素和矿物质等营养物质, 深受广大消费者的喜爱^[25]。目前对于蓝莓蜜的真实性研究未见相关报道。因此, 本研究通过比对蓝莓种植园与实验蜂场周围的蓝莓同花期植物基因组中 trnL 基因的差异位点, 设计荧光 PCR 引物并筛选出特异性引物和探针, 使用蓝莓花粉基因组 DNA 扩增, 制作标准曲线, 建立一种高效快速、定量准确的检测方法, 为打造贵州地区特色蓝莓蜜品牌保护消费者利益提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 实验材料

蓝莓种植区域位于贵州省黔东南州麻江县麻卡、白竹林和乌卡坪, 其中蓝莓蜜于 2019 年和 2020 年 5 月采集于上述三个区域内, 蓝莓花采集于

白竹林蓝莓种植园内,中蜂与意蜂均为同一蜂场。蜂蜜样本详细信息如表1,编号LM1-LM5是贵州省黔东南州麻江县内采集,其中编号LM6是市售加拿大不列颠哥伦比亚省皮特草场蓝莓种植园蓝莓蜂蜜(意蜂),白竹林地域蜂蜜为42份,麻卡与乌卡坪地域各10份,共计72份蜂蜜样本,采集后置于-20℃冰箱贮藏。

购入市售11种蜂蜜(椴树蜜、洋槐蜜、百花蜜、荔枝蜜、野菊花蜜、枣花蜜、柑橘蜜、荆条蜜和黄芪蜜)共计84份样品。

植物样本共采集26种植物共103份(包含叶片或花),地点贵州省麻江县,集中于白竹林蓝莓种植园周围,采集时间4~5月,冷藏运输,实验室冰箱-80℃保存。

表1 样本采集地域以及相应编号

Table 1 Sample table collection area and corresponding number

编号	地域	蜂种	是否封盖
LM1	白竹林	中华蜜蜂	未封盖
LM2	白竹林	中华蜜蜂	封盖
LM3	麻卡	中华蜜蜂	封盖
LM4	白竹林	意大利蜜蜂	封盖
LM5	乌卡坪	中华蜜蜂	封盖
LM6	皮特草场	意大利蜜蜂	封盖

1.1.2 仪器设备与试剂

仪器设备: DYCP-31E 核酸电泳仪,北京六一仪器厂; GBox-F5E 凝胶成像仪, Gene company limited; JA2003B 电子天平,上海越平科学仪器有限公司; scientz-48 高通量组织研磨器,宁波新芝生物科技股份有限公司; FM40 制冰机,北京长流科学仪器有限公司; ETC811 型 PCR 仪,北京东胜创新生物技术有限公司; Nanodrop 2000 超微量分光光度计,美国赛默飞世尔科技公司; Eppendorf 5430 高速低温离心机,德国艾本德公司; 超净工作台,北京东联哈尔有限公司; DK-8D 水浴锅,上海森信实验仪器有限公司; Line-Gene 9620 荧光定量 PCR 检测仪,杭州博日科技有限公司。

试剂: 2×Taq PCR MasterMix II, 天根生化科技(北京)有限公司; 琼脂糖,西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; 核酸染料 GoldView,北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。

1.2 实验方法

1.2.1 植物基因组DNA提取和PCR扩增

取每个植物的叶片或花加入液氮在研钵中充分碾磨,精确称量100 mg,使用天根植物基因组DNA提取试剂盒 DP320,加入液氮充分碾磨,加入400 μL 缓冲液 LP1 和6 μL RNase A (10 mg/mL),旋涡振荡1 min,室温放置10 min。然后加入130 μL 缓冲液 LP2,充分混匀,旋涡振荡1 min。按照说明书步骤3到9操作,最后提取DNA保存于-20℃。进行PCR扩增。反应体系如下: 10 μL 的2×Taq PCR MasterMi-x II,正向和反向引物各1 μL (10 μm),3 μL 植物模板DNA和5 μL ddH₂O。条形码选用 trnL,引物序列为 cF: CGAAATCGGTAGACGCTACG, dR: GGGGATAGAGGGACTTGAAC, PCR 条件参考Hao 等^[26]并加以优化,92℃ 3 min; 92℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 45 s, 35个循环; 72℃ 5 min。

1.2.2 蓝莓花粉DNA的制备

将采集的蓝莓花,用镊子将花药和花粉分离,将分离的花药放到EP管中,并加入1 mL 无菌水。用镊子夹住花药在水中抖动,30 s,可清晰看到花粉团在水中沉落到管的底部,再进行第2个花药继续在1 mL 无菌水的EP管中抖动,直到全部的花药抖动完成。获取完成的花粉液,混匀后,每次取5 μL 在光镜下使用血球计数板进行计数,重复3次。8 000×g 离心15 min,弃上清,使用500 mL 天根深加工食品DNA提取试剂盒 DP326 裂解液(GM01)复溶管壁上的花粉。每个管中加入钢珠6颗,用组织破碎仪研磨3 min,频率70 Hz。45℃ 金属浴(震荡温育)1 h,加入RNA酶和蛋白酶K。56℃ 2 h,育化期间并不断进行混匀。然后加入GM02 200 μL,混匀1 min 静置10 min,然后13 400×g 离心5 min。抽取上清部分,有600 μL,加入异丙醇420 μL 混匀。把混合液加入DP320试剂盒中的离心柱(CB3)中,13 400×g 离心30 s,倒掉废液,吸附柱CB3放入收集管中。将600 μL 漂洗液PW加入到吸附柱CB3中,然后1 400×g 离心30 s 倒掉废液,在将收集管中放入倒掉废液的吸附柱CB3。重复漂洗液PW一次步骤相同,在将吸附柱CB3放回收集管中,13 400×g 离心2 min,倒掉废液。吸附柱CB3需要彻底晾干柱材中残余的漂洗液,室温倒置放数分钟。在一个干净的离心管中放入吸附柱CB3并在吸附膜中间的部位

悬空滴加 50 μL 洗脱缓冲液 TE, 室温放置 2~5 min, 13 400 $\times g$ 离心 2 min, 将溶液收集到离心管中。最终 TE 洗脱每个样品的体积为 50 μL 。

1.2.3 蜂蜜中花粉DNA的制备

分别取 LM1 到 LM6 蜂蜜样品 15 g, 加入 25 mL 无菌水, 充分振荡, 使蜂蜜完全溶解。8 000 $\times g$ 离心 30 min, 弃上清, 用 500 mL 试剂盒 DP326 裂解液 (GM01) 复溶管壁上的花粉, 剩下操作步骤如 1.2.2。

选取市售蜂蜜 11 种, 其中包含 11 种蜂蜜包括椴树蜜、3 种百花蜜、荔枝蜜、枣花蜜、柑橘蜜、黄芪蜜、荆条蜜、洋槐蜜、野菊花蜜。称取 15 g, 加入 25 mL 无菌水, 充分振荡, 使蜂蜜完全溶解。进行 DNA 提取, 操作步骤与 LM1-LM6 相同。

1.2.4 蓝莓引物探针筛选设计与条件优化

1.2.4.1 引物探针选择与设计

通过查询美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 数据库, 并比对 26 种植物的条形码数据序列, 分析蓝莓花期白竹林地域植物 trnL 序列, 寻找目标差异片段区。应用 Primer Premier 5.0 引物设计软件设计引物及特异性 TaqMan 探针, 表 2 为设计的蓝莓引物探针序列; 扩增的目的片段为 114 bp; 探针 5' 端标记 FAM 荧光报告基团, 3' 端标记 BHQ1 淬灭基团, 引物和探针由北京擎科生物有限公司合成。

表 2 引物和探针序列信息

Table 2 Primer and Probe sequence information

名称	引物序列 (5'→3')
trnL-F	GGCAAACAATAAAGATTCC
trnL-P	FAM-TCTACCAACGCAGTCAACTCCAT-BHQ1
trnL-R	TCGACGAAAGAATTCCTA

1.2.4.2 特异性验证

验证设计引物和探针的特异性, 选取蜂场周边植物, 共计 26 种植物, 提取这 26 种植物 DNA, 使用天根 DP320 试剂盒 (植物基因组 DNA 提取试剂盒)。使用 ddH₂O 代替体系内核酸作为对照, 实验重复 3 次, 每次 3 平行。如果结果为阴性, 证明该引物有效。

1.2.4.3 实时荧光 PCR 反应条件及优化

实时荧光 PCR 扩增反应体系使用实验方法 1.2.1 的 20 μL 体系 (表 3)。

表 3 TaqMan 荧光定量 PCR 反应体系

Table 3 PCR reaction system of TaqMan fluorescent quantitative

名称	体积/ μL
2 \times Taq PCR MasterMix II	10
PCR Forward Primer	1
PCR Reverse Primer	1
Probe	2
RNase Free dH ₂ O	4
total DNA	2
Total	20

退火温度: 设置 56、57、58、59、60、61、62、63 $^{\circ}\text{C}$ 共 8 组的退火温度梯度进行优化, 最终退火温度的优化条件以实时实时荧光 PCR 扩增曲线和 CT 值的结果来确定。实时荧光 PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 92 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 40 个循环, 根据 CT 值和扩增曲线的结果确定延伸时间与扩增循环数, 每个样品做 3 次平行。

1.2.5 实时荧光 PCR 定量检测方法的建立

1.2.5.1 标准曲线的建立

使用 NanoDrop 2000 测定蓝莓标花粉 DNA 的浓度, 其 A_{260}/A_{280} 比值应在 1.8~2.0 的蓝莓花粉 DNA 方可用于制作标准曲线。将提取的蓝莓花粉 DNA 用 dd H₂O 四倍梯度稀释, 质量浓度分别为: 66.5 ng/ μL 到 0.07 ng/ μL 。以稀释蓝莓花粉为模板, 按照荧光定量的程序, 在荧光定量 PCR 检测仪上反应, 60 $^{\circ}\text{C}$ 收集荧光信号。

1.2.5.2 实时荧光 PCR 检测方法灵敏度验证

使用蓝莓花粉 DNA, 用灭菌去离子水将提取的蓝莓花粉基因组 DNA (质量浓度为 204.17 ng/ μL) 4 倍梯度稀释成 6 个质量浓度, 分别为 266、66.50、16.62、4.15、1.40、0.25 ng/ μL , 进行 PCR 扩增, 实验重复 3 次, 每梯度浓度 3 平行。

1.2.6 蜂蜜样品检测

为了验证本方法对实际样本检测中的可行性, 将本实验建立的定量定性检测方法对 11 种市售蜂蜜进行检测。

1.2.7 数据处理

根据仪器的数据导入到 Excel 表格中, 通过 Excel 表格进行计算平均值 (mean) 与标准差 ($\pm\text{SD}$) 并绘制标准曲线。将花粉数量与 DNA 浓度数据倒入 word 形成公式并进行计算。

2 结果与讨论

2.1 蓝莓引物及探针设计

根据植物样本的测序结果参照美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 网站基因库 (Genbank) 比对, 使用 trnL 基因鉴定出 16 科 22 个属 26 种的植物, 分别为蓝莓 (*Vaccinium uliginosum*)、鼠曲草 (*Gnaphalium affine*)、白车轴草 (*Trifolium repens*)、鸢尾 (*Iris tectorum*)、火棘 (*Pyracantha fortuneana*)、马铃薯 (*Solanum tuberosum*)、大叶女贞 (*Ligustrum lucidum*)、红叶石楠 (*Photinia lanuginosa*)、构树 (*Broussonetia papyrifera*)、插田泡 (*Rubus coreanus*)、黄鹌菜 (*Youngia japonica*)、葎草 (*Humulus scandens*)、侧柏 (*Platycladus orientalis*)、白栎 (*Quercus fabri*)、白蔷薇 (*Rosa henryi*)、红蔷薇 (*Rosa rugosa*)、紫茎泽兰 (*Ageratina adenophora*)、银杏 (*Ginkgo biloba*)、马尾松 (*Pinus massoniana*)、小叶女贞 (*Ligustrum quihoui*)、毛茛 (*Ranunculus repens*)、板栗 (*Castanea mollissima*)、茅栗 (*Castanea seguinii*)、仿栗 (*Sloanea hemsleyana*)、栲栗 (*Castanopsis carlesii*) 和香椿 (*Toona sinensis*)。



图1 设计 trnL 引物扩增下的蓝莓花粉 DNA 与其他植物 DNA 凝胶电泳图

Fig.1 Gel electrophoresis map of blueberry pollen DNA and other plant DNA amplified by trnL primers

注: M: Marker; ck: 为空白对照; a: 马尾松; b: 白蔷薇; c: 红蔷薇; d: 鼠曲草; e: 红叶石楠; f: 香椿; g: 鸢尾; h: 火棘; i: 大叶女贞; j: 黄鹌菜; k: 栲栗; l: 仿栗; m: 锥栗; n: 构树; o: 板栗; p: 蓝莓; q: 葎草; r: 小叶女贞; s: 白栎; t: 马铃薯; u: 白车轴草; v: 毛茛; w: 插田泡; y: 侧柏; x: 银杏; z: 紫茎泽兰。

利用序列分析软件 BioEdit 对蓝莓花粉和 25 种

蓝莓同花期植物 trnL 序列进行比对, 寻找有差异碱基序列并合成引物, 在 PCR 扩增后其产物在琼脂糖电泳上检测, 结果见图 1, 蓝莓花粉 (p) 有明亮条带产生, 另外大叶女贞 (i), 仿栗 (l)、锥栗 (m) 和板栗 (o) 也有条带产生, 条带亮度略低于蓝莓花粉, 表明这四种植物属于干扰植物, 其他植物均未产生条带, 所以需要优化一下探针的设计。

2.2 特异性验证

通过使用蓝莓蜜 TaqMan 探针实时荧光 PCR 方法检测蓝莓花粉 DNA, 显示荧光扩增曲线呈 S 形, 其结果为阳性反应。当荧光强度为 200 时 Ct 值为 28.60; 未见特异性荧光扩增曲线, 均无荧光值增长, 表明其余 25 种植物和空白对照为阴性反应 (图 2), 说明探针特异性良好。

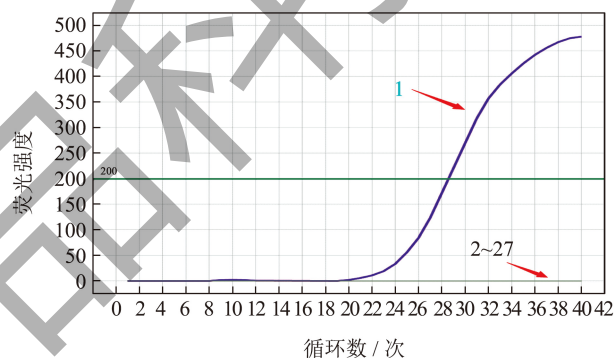


图2 TaqMan 探针特异性验证扩增曲线

Fig.2 TaqMan probe specificity verification amplification curve

注: 1. 蓝莓 trnL; 2~26. 25 种植物; 27. 空白对照。

2.3 蓝莓花粉标准曲线的建立

在进行实时荧光 PCR 扩增后, 结果显示当蓝莓花粉 DNA 质量浓度在 66.5、16.6、4.2、1.1、0.3 ng/μL 时, 扩增曲线的 Ct 均值依次为 21.34、24.91、28.16、30.82、35.27, 最低质量浓度 0.07 ng/μL 未出扩增曲线, 蓝莓花粉最低检测量为 0.3 ng/μL (图 3)。

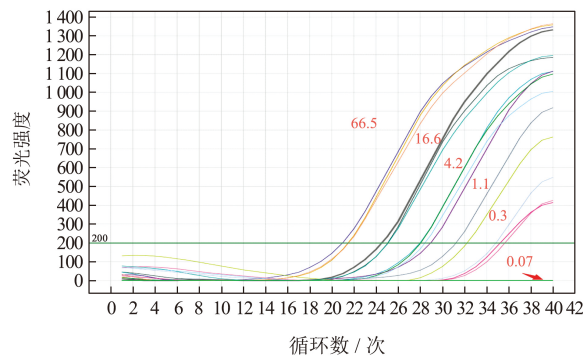


图3 蓝莓花粉的扩增曲线

Fig.3 Amplification curve in blueberry pollen standard curve

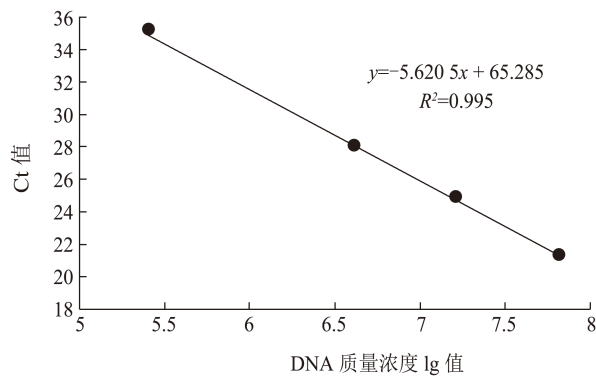


图4 Taq Man 荧光定量 PCR 标准曲线

Fig.4 Standard curve of Taq Man fluorescent quantitative PCR

根据蓝莓花粉 DNA 扩增曲线，以蓝莓花粉 DNA 质量浓度 lg 值为横坐标，以对应的 Ct 值为纵坐标作标准曲线得出图 4，Ct 值与蓝莓花粉 DNA 质量浓度 lg 值的线性方程为 $y = -5.6205x + 65.285$ ，相关系数为 $R^2 = 0.9950$ ，线性关系好，可用于准确定量。

2.4 蓝莓花粉数与花粉DNA浓度的标准曲线

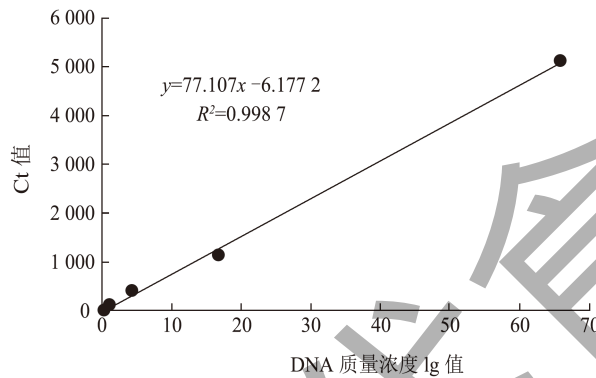


图5 蓝莓花粉数与 DNA 质量浓度值标准曲线

Fig.5 Standard curve of blueberry pollen number and DNA concentration value

通过光学显微镜下计数，蓝莓花粉约为 5 109 颗时 DNA 质量浓度是 66.5 ng/μL，4 倍稀释蓝莓花粉 DNA 进行荧光定量 PCR 实验，以蓝莓花粉的质量浓度值为 X 轴，蓝莓花粉数为 Y 轴，由图 5 可知，线性方程为 $y = 77.107x - 6.1772$ ，所建标准曲线相关系数为 $R^2 = 0.9987$ 。表明蓝莓花粉 DNA 质量浓度与蓝莓花粉颗粒数之间有明显的线性关系。

根据建立的蓝莓花粉 DNA 质量浓度与蓝莓花粉颗粒数函数关系 $y = 77.107x - 6.1772$ ，与 2.3 中 $y = -5.6205x + 65.285$ 蓝莓花粉 DNA 质量浓度 lg 值与 Ct 值函数关系相结合，两个函数关系以蓝莓花粉 DNA 作转化，得到蓝莓花粉颗粒数与 Ct 值之间的关系公式 (1)，可以由样品的荧光定量实时荧光

PCR 扩增的 Ct 值计算出所对应的蓝莓花粉颗粒数。

$$P = (77.107 \times 10^{\frac{65.285 - A}{5.6205}} - 6.1772) \times 10^{-6} \quad (1)$$

式中：

P——基于蓝莓花粉 DNA 质量浓度 lg 值换算的花粉数；

A——蓝莓蜜中花粉 DNA 扩增的 Ct 值。

由于 lg 值质量浓度单位 pg/mL，蓝莓花粉 DNA 质量浓度单位 ng/μL，结果需 $\times 10^6$ 为对应花粉数。

2.5 蜂蜜样品检测结果

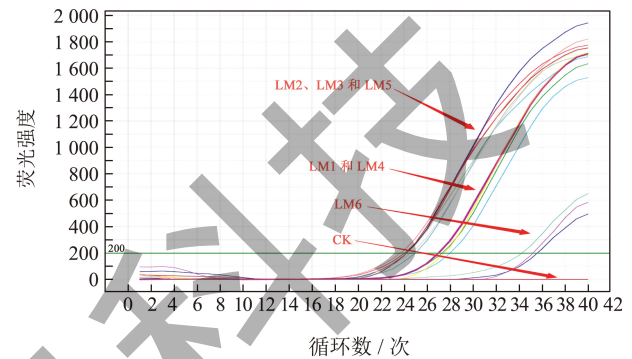


图6 蓝莓蜜扩增曲线图

Fig.6 Detection and amplification curve of blueberry honey samples

注：CK 为空白对照。

蜂蜜样品检测结果显示，所有蓝莓蜜样品通过蓝莓蜜特异性 TaqMan 探针实时荧光 PCR 检测方法检测，扩增曲线见图 6，通过公式 1 进行计算，得到样品 LM1 到 LM5 中的蓝莓花粉数。花粉数的计算意义在于不仅在 Ct 值范围内能够鉴定出蜂蜜，花粉含量也能鉴别。对蓝莓蜜样品 LM1 至 LM5 进行实时荧光定量 PCR 检测，其结果为 LM2 Ct 均值为 24.15、LM3 为 24.24、LM5 为 24.47 可以得出中蜂封盖蓝莓蜜 Ct 值范围 24~25，LM4（意蜂封盖蓝莓蜜）的 Ct 均值为 27.42、LM1（中蜂未封盖）的 Ct 均值为 28.44，意蜂蓝莓蜜和中蜂未封盖蓝莓蜜取值范围为 27~29（表 4）。

表 4 蓝莓蜜中花粉数计算

Table 4 Calculation of pollen number in blueberry honey

样品名	Ct 值	花粉粒数 / 颗
LM1	28.44±0.59	227~322
LM2	24.15±0.12	1 542~1 660
LM3	24.24±0.07	1 535~1 542
LM4	27.42±0.13	397~430
LM5	24.47±0.19	1 324~1 479
LM6	35.43±0.28	<100

通过用 15 g 贵州蓝莓蜜进行实时荧光 PCR, 其 Ct 值均小于 29, 空白对照组无曲线产生, 反应体系无污染, 因此将 15 g 贵州蓝莓蜜阈值设定为 Ct 值 29, 样品 LM6 的 Ct 值大于 30, 表明加拿大蓝莓蜜的 Ct 值比较贵州蓝莓, 表现为蜂蜜中蓝莓花粉含量不同, 地域差异明显。

市售其他 11 个蜂蜜实时荧光 PCR 扩增曲线见图 7。从图 7 中扩增曲线可见其他蜂蜜与贵州蓝莓蜜可明显分开, 而加拿大蓝莓蜜与其他蜂蜜混杂无法辨别。市售 11 个蜂蜜样品的实时荧光 PCR 扩增曲线的 Ct 值均大于 30, 枣花蜜 Ct 均值为 30、洋槐蜜和荔枝蜜均为 31、荆条蜜为 32、三种百花蜜分别为 31、34 和 34、野菊花蜜 33、柑橘蜜和黄芪蜜 34、椴树蜜和加拿大蓝莓蜜均为 35, 均没有达到检测阈值 29, 检测结果均为阴性。

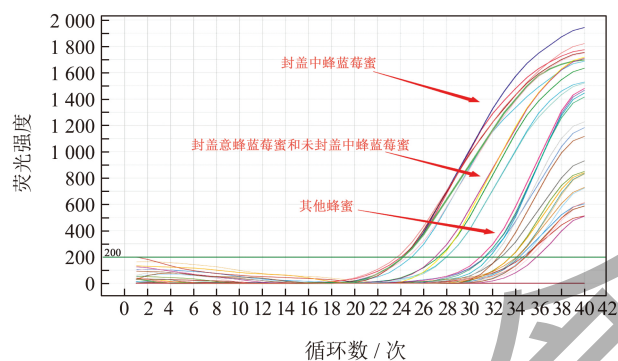


图 7 蓝莓蜜与其他蜂蜜扩增曲线图

Fig.7 Amplification curve of blueberry honey and other honey

通过公式 1 计算 15 g LMI 到 LM5 蜂蜜中花粉数, 结果显示花粉颗数趋于在浮动范围。蓝莓蜜中的花粉在光镜下计数时由于需要孢粉学专业背景知识, 蓝莓花粉的空间形态上有一定差异, 计数过程中可能存在误差, 可能导致计数相对偏高或偏低。从生物学角度分析蓝莓蜜 TaqMan 探针特异性实时荧光 PCR 检测方法, 蓝莓花粉 DNA 和蜂蜜中 DNA 获取是开展相关研究的首要的一个环节, 由于花粉在水中或者裂解液中都存在萌发或者未萌发的现象, 对于 DNA 的提取效率来说可能存在不稳定现象。公式中计算花粉数与蓝莓蜂蜜中在光镜下计数趋势相同, 从花粉数量的角度分析中蜂蓝莓蜜中蓝莓花粉数高于意蜂蓝莓蜜和未封盖蓝莓蜜。

3 结论

本研究选择 trnL 基因设计了蓝莓花粉 DNA 特异性引物和探针, 通过制备蓝莓花粉 DNA 来建立

标准曲线的方法对蓝莓蜂蜜中蓝莓花粉进行定量检测, 建立了贵州中蜂封盖蓝莓蜜 TaqMan 探针实时荧光 PCR 检测方法。优化了反应温度, 确认本方法的最佳反应条件。通过敏感性试验, 显示最小检出样品模板质量浓度为 0.3 ng/μL, 结果表明本方法的敏感性良好, 多次重复显示该法具有较好的稳定性。

综上所述, 本方法不需要具有孢粉学和植物分类学知识基础, 方法高效便利, 探针特异性好, 检测人员有分子生物学实验基础背景均可操作, 所获得的标准曲线线性关系良好, 相关系数 (R^2) 为 0.995; 灵敏度高, 花粉 DNA 浓度最低检测限为 0.3 ng/μL, Ct 阈值 29。将该方法应用于蜂蜜样品检测, 中蜂封盖蓝莓蜜 Ct 值为 24~26, 蓝莓花粉数约在 800~1 700 颗。可成功的将贵州蓝莓蜜与 11 种其他品种蜂蜜加以区分, 其他蜂蜜 Ct 值均大于 30; 并能成功地鉴别贵州麻江蓝莓蜜和加拿大蓝莓蜜, 贵州蓝莓蜂蜜的 Ct 值在 24~29 之间, 而加拿大蓝莓蜜的 Ct 值高达 35。本方法不仅能够准确鉴定贵州蓝莓蜜, 还能通过定量分析识别贵州蓝莓蜜样品的中蜂封盖蜜, 为地区特色蓝莓蜜品控提供技术支持。

参考文献

- [1] SOARES S, GRAZINA L, MAFRA I, et al. Novel diagnostic tools for Asian (*Apis cerana*) and European (*Apis mellifera*) honey authentication [J]. Food Research International, 2018, 105: 686-693.
- [2] WU LIMING, DU BING, VANDER H Y, et al. Recent advancements in detecting sugar-based adulterants in honey-A challenge [J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2017, 86: 25-38.
- [3] VALIDO A, RODRIGUEZ-RODRIGUEZ M C, JORDANO P. Honeybees disrupt the structure and functionality of plant-pollinator networks [J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 4711.
- [4] VON DER O W, PERSANO O L, PIANA M L, et al. Harmonized methods of melissopalynology [J]. Apidologie, 2004, 35(Suppl. 1): S18-S25.
- [5] ARONNE G, DE M V. Traditional melissopalynology integrated by multivariate analysis and sampling methods to improve botanical and geographical characterisation of honeys [J]. Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology, 2010, 144(4): 833-840.
- [6] GALIMBERTI A, DE M F, BRUNI I, et al. A DNA barcoding approach to characterize pollen collected by honeybees [J]. PLoS ONE, 2014, 9(10): e109363.
- [7] KRAAIJEVELD K, DE W L A, VENTAYOL G M, et al.

- Efficient and sensitive identification and quantification of airborne pollen using next-generation DNA sequencing [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2015, 15(1): 8-16.
- [8] CHIARA B, FRANCESCO C, FULVIO B, et al. Exploring the botanical composition of polyfloral and monofloral honeys through DNA metabarcoding [J]. *Food Control*, 2021, 128: 108175.
- [9] BOHME K, CALO-MATA P, BARROS-VELAZQUEZ J, et al. Review of recent DNA-based methods for main food-authentication topics [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(14): 3854-3864.
- [10] PARVEEN I, GAFNER S, TECHEN N, et al. DNA Barcoding for the Identification of Botanicals in Herbal Medicine and Dietary Supplements: Strengths and Limitations [J]. *Planta Medica*, 2016, 82(14): 1225-1235.
- [11] CORNMAN R S, OTTO C R V, IWANOWICZ D, et al. Taxonomic characterization of honey bee (*Apis mellifera*) pollen foraging based on non-overlapping paired-end sequencing of nuclear ribosomal loci [J]. *PLOS ONE*, 2015, 10(12): e0145365.
- [12] NURNBERGER F, KELLER A, HARTEL S, et al. Honey bee waggle dance communication increases diversity of pollen diets in intensively managed agricultural landscapes [J]. *Molecular Ecology*, 2019, 28(15): 3602-3611.
- [13] DE V N, JONES L E, GILMORE T, et al. Using DNA metabarcoding to investigate honey bee foraging reveals limited flower use despite high floral availability [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 42838.
- [14] BRUNI I, GALIMBERTI A, CARIDI L, et al. A DNA barcoding approach to identify plant species in multiflower honey [J]. *Food Chemistry*, 2015, 170: 308-315.
- [15] BAKSAY S, PORNON A, BURRUS M, et al. Experimental quantification of pollen with DNA metabarcoding using ITS1 and trnL [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 4202.
- [16] PROSSER S W J, HEBERT P D N. Rapid identification of the botanical and entomological sources of honey using DNA metabarcoding [J]. *Food Chemistry*, 2017, 214: 183-191.
- [17] UTZERI V J, RIBANI A, SCHIAVO G, et al. Application of next generation semiconductor based sequencing to detect the botanical composition of monofloral, polyfloral and honeydew honey [J]. *Food Control*, 2018, 86: 342-349.
- [18] LAUBE I, HIRD H, BRODMANN P, et al. Development of primer and probe sets for the detection of plant species in honey [J]. *Food Chemistry*, 2010, 118(4): 979-986.
- [19] MORISSET D, ŠTEBIH D, MILAVEC M, et al. Quantitative analysis of food and feed samples with droplet digital PCR [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(5): e62583.
- [20] DENG T T, HUANG W S, REN J A, et al. Verification and applicability of endogenous reference genes for quantifying GM rice by digital PCR [J]. *Analytical Biochemistry*, 2019, 587: 113442.
- [21] CAI Y C, HE Y P, LV R, et al. Detection and quantification of beef and pork materials in meat products by duplex droplet digital PCR [J]. *PLOS ONE*, 2017, 12(8): e0181949.
- [22] SHEHATA H R, LI J, CHEN S, et al. Droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) assays integrated with an internal control for quantification of bovine, porcine, chicken and turkey species in food and feed [J]. *PLOS ONE*, 2017, 12(8): e0182872.
- [23] 马月萍,戴思兰,马艳蓉. 荧光定量PCR技术在植物研究中的应用[J]. *生物技术通报*, 2011, 7: 37-45.
- [24] 孙涛,夏明星,孔德英,等. 五倍子蜂蜜TaqMan探针实时荧光定量PCR检测方法的建立[J]. *贵州农业科学*, 2016, 44(8): 15-18.
- [25] 张致豪,王蓓,师丰丰,等. 贵州蓝莓蜜营养成分分析[J]. *食品研究与开发*, 2022, 43(1): 152-159.
- [26] HAO D C, HUANG B L, CHEN S L, et al. Evolution of the chloroplast trnL-trnF region in the gymnosperm lineages taxaceae and cephalotaxaceae [J]. *Biochemical Genetics*, 2009, 47(5-6): 351-369.