

基于植物 DNA 条形码技术对杏仁露中花生源性成分的鉴别研究

韩晴¹, 王赞², 章晶晶², 李月华², 杨岚², 周巍², 张岩², 张志胜¹

(1. 河北农业大学食品科技学院, 河北保定 071000)

(2. 河北省食品检验研究院, 河北省食品安全重点实验室, 河北石家庄 050071)

摘要: 杏仁露含有丰富的植物蛋白, 深受广大消费者的喜爱, 拥有广阔的消费市场, 同时其成分与配料表是否相符也备受消费者关心。本研究基于植物 DNA 条形码技术与 PCR 技术, 设计、筛选同时能对杏仁、花生、核桃、大豆、芝麻和榛子六个物种进行扩增的通用引物, 并将其应用于杏仁露中花生源性成分的检测。试验表明引物 *ITS2-2* 和 *trnH-psbA-1* 分别对六个物种的扩增成功率和测序成功率均较高; 通过计算杏仁、花生的基因组 DNA 提取率, 设计掺假模型在提取的杏仁基因组 DNA 中掺入花生基因组 DNA, 引物 *ITS2-2* 对于掺入 85.80% 的花生检测结果为杏仁, *trnH-psbA-1* 对于掺入 6.94% 的花生检测结果为花生。引物 *ITS2-2* 和 *trnH-psbA-1* 可作为鉴别杏仁露中花生源性成分的植物 DNA 条形码组合。本研究为该类食品检测提供了新的思路, 可作为相关研究的参考。

关键词: 植物 DNA 条形码; 杏仁露; 花生; 通用引物; 检测

文章编号: 1673-9078(2018)02-232-240

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.2.036

Identification of Peanuts in Almond Juice Based on Plant DNA Barcode Technology

HAN Qing¹, WANG Zan², ZHANG Jing-jing², LI Yue-hua², YANG Lan², ZHOU Wei², ZHANG Yan², ZHANG Zhi-sheng¹

(1. College of Food Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, China)

(2. Hebei Food Inspection and Research Institute, Hebei Food Safety Key Laboratory, Shijiazhuang 050071, China)

Abstract: Almond juice is rich in plant protein. It is loved by a number of consumers and has a broad consumer market. Meanwhile, whether almond juice was adulterated or not was concerned by consumers. In this study, universal primers for 6 species of almonds, peanuts, almonds, peanuts, walnuts, soybeans, sesame and hazelnuts were designed and screened by using plant DNA barcoding technology and PCR technology to detect the peanuts in almond juice. The results showed that both *ITS2-2* and *trnH-psbA-1* had higher success rate of amplification and sequencing for six species. A hybrid model was designed with peanut genome DNA mixed in almond genome DNA by calculating the extraction rate of peanut genome DNA and almond genome DNA, and the primer *ITS2-2* in 85.80% peanut was almond and primer *trnH-psbA-1* in 6.94% peanut was peanut. *ITS2-2* and *trnH-psbA-1* could be used as a plant DNA barcode combination to identify peanut in almond juice. This study provides a new idea for the detection of such food, which could be used as a reference for relevant researches.

Key words: plant DNA barcoding; almond juice; peanut; universal primers; detection

DNA 条形码类似于商品条形码, 可以有效的辨别各种动物、植物^[1-3]。它是现今可用于生物多样性、生态学、食品检测、生物检验检疫等方面的一种新兴技术。其在动物源性食品中的应用已相对成熟, 目前常

收稿日期: 2017-09-01

基金项目: 科技部公益性行业科研专项 (201510208-08); 河北省食药局科技计划项目 (QN2015004)

作者简介: 韩晴 (1992-), 女, 在读硕士, 研究方向: 食品加工与安全

通讯作者: 张岩 (1979-), 男, 博士, 正高级工程师, 研究方向: 食品安全;

张志胜 (1970-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品科学

用于动物 DNA 条形码的基因为 *COI*。而在植物源性食品中的应用正在迅猛发展^[4-9], 常用于植物 DNA 条形码的基因组有 *ITS*、*matK*、*rbcL*、*trnH-psbA*, 它们被认为是潜在的优秀的植物 DNA 条形码候选序列^[10-12]。DNA 条形码技术虽多在动植物分类学上有所应用^[13,14], 但在国外该技术也成功的应用在了某些食品中植物源性成分的鉴定^[15,16]。

杏仁露作为植物蛋白饮料中的一种, 老少皆宜。同时也是一种深加工食品, 有着复杂的加工工艺, 使它失去了本身的性状, 应用传统的分类学无法对其辨

别。这就给了不法商家可乘之机,进行掺假造假,损害消费者的利益。找到行之有效的鉴别方法,对保护广大消费者的权益意义重大。

目前对于工艺复杂的深加工食品掺假检测常采用设计特异性引物对提取的样品总基因组 DNA 进行 PCR 扩增的方法,但需要根据可能掺入的物种去设计不同的特异性引物,如魏晓璐等^[17]对核桃露中花生和大豆源性成分进行检测,分别设计了核桃、花生、大豆的特异性引物;覃芳芳等^[18]用了大豆和杏仁的内源基因设计引物对杏仁产品中杏仁成分检测。而应用植物 DNA 条形码技术设计的通用引物可以达到一次检测出结果的目的,更加方便快捷、检测效率更高。在以上研究基础上,本研究利用植物 DNA 条形码技术对杏仁露中花生源性成分进行鉴别,建立一种检测方法,同时也为相关领域检测提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

杏仁、花生、核桃、大豆、芝麻、榛子,力兴源杏仁露、热河杏仁露、太平洋杏仁露、桦维杏仁露、露美达杏仁露、露露杏仁露、哈露杏仁露、乐野杏仁露;石家庄农贸市场、超市。

深加工食品 DNA 提取试剂盒:天根公司;酚:氯仿:异戊醇(25:24:1):北京酷来博科技有限公司;异丙醇(分析纯):天津市光复科技发展有限公司;无水乙醇(分析纯):天津欧博凯化工有限公司;Premix TaqTM: TaKaRa; 2xSuperReal PreMix(Probe):天根公司;杏仁、花生特异性引物和探针的合成、PCR 扩增所用通用引物合成、PCR 产物测序:上海生工公司;GelRedTM: Biotium; 50x TAE Buffer: 生工公司;琼脂糖: Vivantis; 100 bp、1 kb DNA Ladder: Thermo。

1.2 仪器与设备

分析天平(BS-124S):北京赛马利公司;手掌型离心机(LX-100):江苏其林贝尔公司;恒温振荡器(SHA-AD):金坛市华城敏科实验仪器厂;微量核酸蛋白测定仪(NanoDrop Lite):美国 Thermo 公司;荧光定量 PCR 系统(LightCycler® 480):瑞士罗氏公司;基因扩增仪(S1000 thermal cycler)、电泳系统(PowerpacTmBasic)、全能型凝胶成像系统(Bio-rad ChemiDocTmMp):美国伯乐公司。

1.3 方法

1.3.1 基因组 DNA 的提取

样本基因组 DNA 的提取方法,均采用优化后的试剂盒法进行提取:(1)取经液氮充分研磨后的样本组织约 100 mg 至灭菌离心管中,加入 500 μ L 缓冲液 GMO1 和 20 μ L 的 Proteinase K(20 mg/ μ L),涡旋震荡 1 min;(2)56 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,其间每隔 15 min 将其上下颠倒震荡一次;(3)等体积加入酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),充分混匀,12000 r/min 离心 5 min;(4)将上层水相转移至新的离心管中,加入 200 μ L 的缓冲液 GMO2,充分混匀,涡旋震荡 1 min,静置 10 min;(5)12000 r/min 离心 5 min,将上清转移至新的离心管中;(6)向上清液中加入 0.7 倍体积的异丙醇,充分混匀,-20 $^{\circ}$ C 静置 30 min,12000 r/min 离心 3 min,弃上清,保留沉淀;(7)加入 700 μ L 的 70%乙醇,涡旋震荡 5 s,12000 r/min 离心 2 min,弃上清;(8)重复(7);(9)开盖,室温放置至彻底晾干残留的乙醇;(10)加入 50 μ L 的洗脱缓冲液 TE,涡旋震荡 1 min,即为提取的基因组 DNA 溶液。杏仁露样品的提取方法:先对杏仁露进行预处理

(1)取 2 mL 样品于离心管中,加入等体积异丙醇,混匀后静置 15 min,12000 r/min 离心 10 min,弃上清;(2)重复步骤(1);其余步骤同上所述提取过程。

1.3.2 样本准确性的测定

为保证样本准确性,利用 NanoDrop Lite 测定提取的基因组 DNA 的 A_{260}/A_{280} 值和浓度。以提取的基因组 DNA 为模板,以杏仁、花生、核桃、大豆、芝麻、榛子的特异性引物和探针(参见标准 SN/T 1961.9-2013、SN/T 1961.2-2007、SN/T 1961.6-2013、SN/T 1961.19-2013、SN/T 1961.12-2013 和 SN/T 1961.8-2013)进行实时荧光 PCR 扩增,观察增幅情况,以确定样本的准确性。采用 25 μ L 的扩增体系中添加 12.5 μ L 2xSuperReal PreMix(Probe)、0.75 μ L 上游引物(10 μ mol/L)、0.75 μ L 下游引物(10 μ mol/L)、0.5 μ L 探针(10 μ mol/L)、2.0 μ L DNA 模板(30 μ g/mL~100 μ g/mL)、8.5 μ L ddH₂O。反应程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 15 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 3 s, 60 $^{\circ}$ C 退火/延伸 20 s 采集荧光信号,共 40 个循环。

1.3.3 引物设计

引物 *ITS2-1*、*ITS2-2*、*ITS2-3*、*matK-2*、*matK-3*、*rbcL-1*、*trnH-psbA-1*、*trnH-psbA-2*: 参考于文献^[19-24],其中引物 *trnH-psbA-1* 参考于对陆生植物 DNA 条形码的相关研究,引物 *rbcL-1* 适用于除早熟禾、莴苣属、佩兰属、栎属、蒲黄、桦木属外物种的研究,引物 *ITS2-1*、*ITS2-2*、*ITS2-3*、*matK-2*、*matK-3*、*trnH-psbA-2* 分别为对芸香科植物、杜鹃属植物、蒲黄、蕨类、茄属茄科、苦苣菜属和石榴这些物种的研究。引物序列见表 1。引物 *matK-1*、*rbcL-2*: 通过 BOLD 数据库

(<http://www.barcodinglife.org>)引物检索筛选 Primer, 引物序列见表 1。

表 1 基因引物序列

Table 1 Primer sequences of genes

引物名称	上游引物 (F-Primer 5'-3')	下游引物 (R-Primer 5'-3')
<i>ITS2-1</i>	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	GCATCGATGAAGAACGCAGC
<i>ITS2-2</i>	GCGATACTTGGTGTGAAT	GACGCTTCTCCAGACTACAAT
<i>ITS2-3</i>	TAGCTACTTCTTCGCAGC	GGTCCAGTCCGCCCTGATGG
<i>matK-1</i>	ATCCATCTGGAAATCTTAGTTC	CTTCCTCTGTAAAGAATTC
<i>matK-2</i>	CGATCTATTCAATCAATATTC	TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT
<i>matK-3</i>	CCTATCCATCTGGAAATCTTAG	GTTCTAGCACAAAGAAAGTCG
<i>rbcL-1</i>	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	CTTCTGCTACAAATAAGAATCGATCTC
<i>rbcL-2</i>	ATGTCACCACAAACAGAGACT	CCTTCATTACGAGCTTGACACAC
<i>trnH-psbA-1</i>	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	CGCGCATGGTGGATTCAACAATCC
<i>trnH-psbA-2</i>	ACTGCCTTGATCCACTTGGC	CGAAGCTCCATCTACAAATGG

1.3.4 PCR 扩增

利用设计的各引物与各样本进行 PCR 扩增, 50 μ L 的扩增体系中添加 25 μ L Premix TaqTM、2 μ L 上游引物(10 μ mol/L)、2 μ L 下游引物(10 μ mol/L)、4 μ L DNA 模板(30 μ g/mL~100 μ g/mL)、17 μ L ddH₂O。反应程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 然后进入循环: 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s、50 $^{\circ}$ C (*ITS2-1*、*ITS2-3*、*matK-1*、*matK-2*、*matK-3*、*rbcL-1*)或 55 $^{\circ}$ C (*ITS2-2*、*rbcL-2*、*trnH-psbA-1*、*trnH-psbA-2*)退火 30 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 共 40 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 总延伸 10 min。待反应完成后取 7 μ L PCR 扩增产物用琼脂糖凝胶进行电泳检测。

1.3.5 PCR 产物测序及比对

将扩增后的 PCR 产物置于 -20 $^{\circ}$ C 冷冻, 然后装入提前加入冰袋的保温箱中送上海生工公司进行双向测序, 测序引物同于扩增引物。所得的测序结果删除两端引物序列, 在 NCBI 上进行 BLAST 比对, 同时结合 BOLD 数据库(<http://www.boldsystems.org>)对样品的序列进行鉴定分析。

2 结果与分析

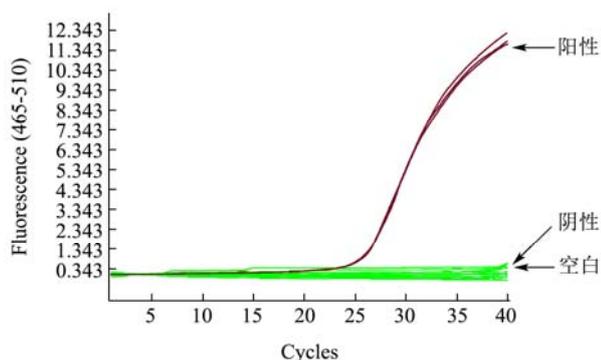


图 1 实时荧光 PCR 检测提取的杏仁基因组 DNA 结果

Fig.1 Almond genome DNA by real time fluorescence PCR

2.1 样本准确性的测定

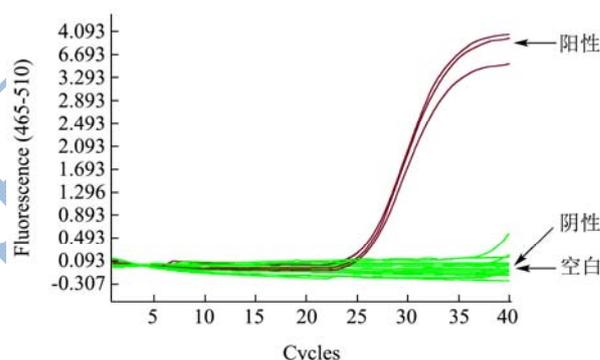


图 2 实时荧光 PCR 检测提取的花生基因组 DNA 结果

Fig.2 Peanut genome DNA by real time fluorescence PCR

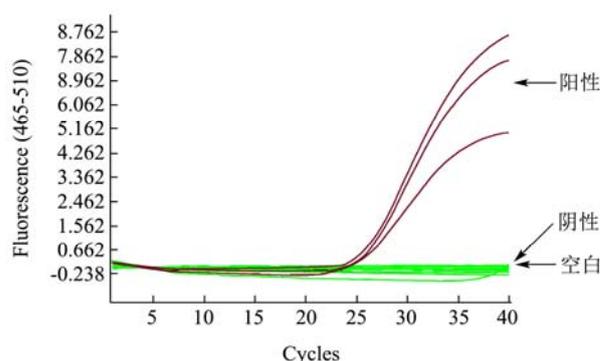


图 3 实时荧光 PCR 检测提取的核桃基因组 DNA 结果

Fig.3 Walnut genome DNA by real time fluorescence PCR

对提取的基因组 DNA 的 A_{260}/A_{280} 值和浓度进行测定, A_{260}/A_{280} 值为 1.7~2.0, 浓度控制在 30 μ g/mL~100 μ g/mL, 有利于试验后续进行^[24]。为保证样本的准确性, 利用实时荧光 PCR 技术对提取的杏仁、花生、核桃、大豆、芝麻和榛子基因组 DNA 进行鉴定, 结果见图 1~6 所示。

根据标准当 Ct 值 < 30.0 (杏仁、芝麻)、Ct 值 \leq 35.0 (核

桃、大豆、榛子)、Ct 值≤40.0 (花生), 则判定为阳性, 由图 1 和图 6 显示 Ct 值均小于 30.0, 阴性和空白对照均无起跳, 证明本试验的样本均准确, 可用于后续试验。

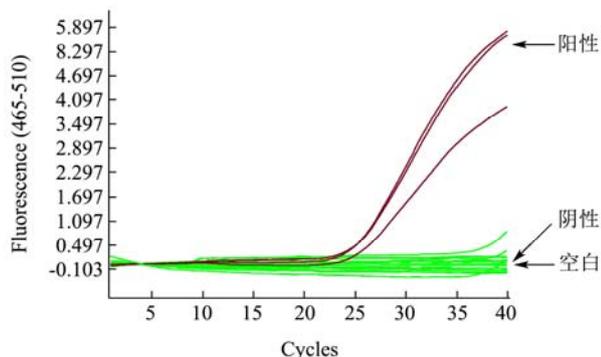


图 4 实时荧光 PCR 检测提取的大豆基因组 DNA 结果

Fig.4 Soybean genome DNA by real time fluorescence PCR

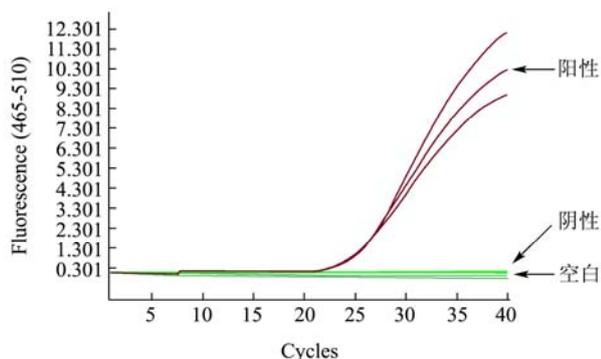


图 5 实时荧光 PCR 检测提取的芝麻基因组 DNA 结果

Fig.5 Sesame genome DNA by real time fluorescence PCR

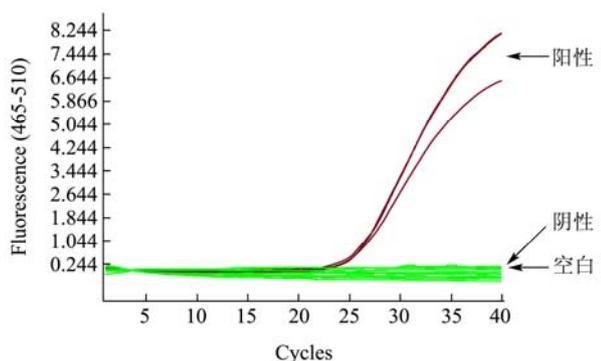


图 6 实时荧光 PCR 检测提取的榛子基因组 DNA 结果

Fig.6 Hazelnut genome DNA by real time fluorescence PCR

2.2 PCR 扩增效果

分别以文献和 BLOD 提供的引物与六类物种的基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 并以无菌双蒸水作为空白对照^[25], 扩增产物用琼脂糖凝胶电泳进行检测。试验条件经过多次优化后, 结果表明引物 *ITS2-1*、*ITS2-3*、*matK-1*、*matK-2*、*matK-3*、*rbcL-1* 不能完全扩增出六个物种, 这几对引物通用性较差, 在后续实验中被排

除。引物 *ITS2-2*、*rbcL-2*、*trnH-psbA-1*、*trnH-psbA-2* 能全部扩增出六个物种, 经过琼脂糖凝胶电泳检测后结果见图 7~10。

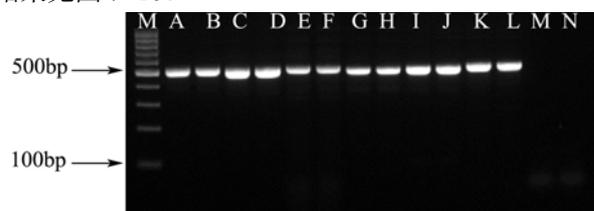


图 7 引物 *ITS2-2* 与六个样本 DNA 扩增的结果

Fig.7 Result of primer *ITS2-2* in six samples

注: M 为 marker, A、B 为核桃, C、D 为杏仁, E、F 为花生, G、H 为大豆, I、J 为芝麻, K、L 为榛子, N、O 为空白。

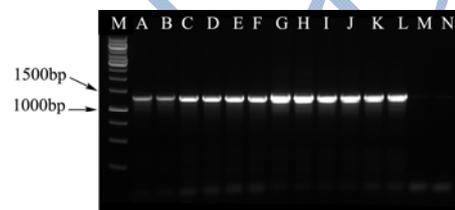


图 8 引物 *rbcL-2* 与六个样本 DNA 扩增的结果

Fig.8 Result of primer *rbcL-2* in six samples

注: M 为 marker, A、B 为核桃, C、D 为杏仁, E、F 为花生, G、H 为大豆, I、J 为芝麻, K、L 为榛子, N、O 为空白。

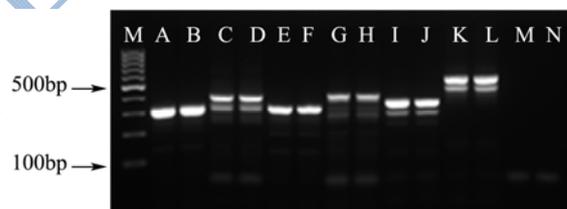


图 9 引物 *trnH-psbA-1* 与六个样本 DNA 扩增的结果

Fig.9 Result of primer *trnH-psbA-1* in six samples

注: M 为 marker, A、B 为核桃, C、D 为杏仁, E、F 为花生, G、H 为大豆, I、J 为芝麻, K、L 为榛子, N、O 为空白。

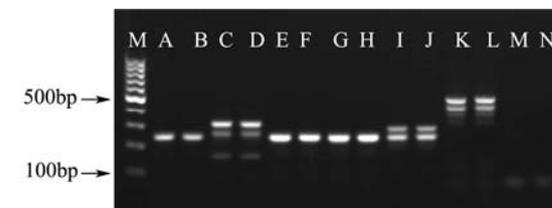


图 10 引物 *trnH-psbA-2* 与六个样本 DNA 扩增的结果

Fig.10 Result of primer *trnH-psbA-2* in six samples

注: M 为 marker, A、B 为核桃, C、D 为杏仁, E、F 为花生, G、H 为大豆, I、J 为芝麻, K、L 为榛子, N、O 为空白。

2.3 PCR 产物测序及分析

将引物 *ITS2-2*、*rbcL-2*、*trnH-psbA-1*、*trnH-psbA-2* 与六个样本扩增后 PCR 产物送上海生工公司进行双向测序, 测序结果删除两端引物序列, 提交 NCBI 进行 BLAST 比对, 同时使用 BOLD 数据库比对分析^[26]。

结果表明比对结果均成功, 其中引物 *trnH-psbA-2* 比对结果相似度在 90% 以下, 其余引物比对结果相似度均在 97% 及以上, 后续试验排除引物 *trnH-psbA-2*; 因引物 *rbcL-2* 扩增的目的片段较长, 超过 1000 bp, 不便于测序工作进行, 故后续试验中也被排除。经过以上试验过程与结果分析, 引物 *ITS2-2*、*trnH-psbA-1* 可应用于六类物种的鉴别。

2.4 掺假模型的建立

因试验不可能完全模拟实际生产, 试验所用样品量较少, 若直接通过原料水平掺假必然造成很大的误差, 所以本试验中采取 DNA 水平掺假, 再经换算得到原料水平掺假。

在杏仁基因组 DNA 中人为掺入花生基因组 DNA, 其中花生基因组 DNA 占总基因组 DNA 的比例分别为 90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20% 和 10%^[27]。

分别提取 125 mg、100 mg、75 mg、50 mg 和 25 mg 杏仁和花生基因组 DNA, 提取方法参照 1.3.1 所述方法, 不同质量的样本均按比例添加各试剂。通过对样本提取率的计算, 可从 DNA 水平推算到原料水平。根据公式 1, 计算各样本的提取率 T。

$$T = \frac{m_{DNA}}{m} \% \quad (1)$$

式中: T 为提取率; m_{DNA} 为提取的样本总 DNA 量; m 为样本质量。

对不同质量的杏仁和花生提取基因组 DNA 时, 均做三组平行试验, 提取率见表 2 所示。

由表 2 可知在该方法下对杏仁和花生的基因组 DNA 进行提取, 所得杏仁提取率为 5.91×10^{-4} 、花生的提取率为 8.81×10^{-4} 。

根据杏仁、花生的提取率和公式 1 进行 DNA 水平到原料水平的换算, 换算公式见公式 2:

$$\frac{T_{杏仁}}{T_{花生}} = \frac{m_{DNA杏仁}}{m_{DNA花生}} \times \frac{m_{花生}}{m_{杏仁}} \quad (2)$$

式中: $T_{杏仁}$ 为杏仁提取率; $m_{DNA杏仁}$ 为提取的杏仁样本总 DNA 量; $m_{杏仁}$ 为杏仁质量; $T_{花生}$ 为花生提取率; $m_{DNA花生}$ 为提取的花生样本总 DNA 量; $m_{花生}$ 为花生质量。

其中杏仁的提取率为 5.91×10^{-4} 、花生的提取率为 8.81×10^{-4} , 将二者带入公式 2 得到公式 3。

$$\frac{m_{杏仁}}{m_{花生}} = 1.49 \times \frac{m_{DNA杏仁}}{m_{DNA花生}} \quad (3)$$

将 DNA 水平的各掺假比例换算到原料水平后的比例, 见表 3。

由筛选出的通用引物分别与不同水平掺假的基因组 DNA 模型进行 PCR 扩增, 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 将扩增出清晰明亮条带的样品送测序公司进行测序。

表 2 杏仁、花生基因组 DNA 提取率

Table 2 Extraction rate of peanut genome DNA and almond genome DNA

样本名称	基因组 DNA 含量/ng	基因组 DNA 含量平均值/ng	原料质量/mg	提取率/%	提取率平均值/%
杏仁	76231.25	76154.17	125	6.09×10^{-2}	5.91×10^{-2}
	74662.50				
	77568.75				
	62230.00	56820.00	100	5.68×10^{-2}	
	54580.00				
	53650.00				
	37395.00	43331.25	75	5.78×10^{-2}	
	49552.5				
	43046.25				
	29687.50	31665.83	50	6.33×10^{-2}	
	34012.50				
	31297.50				
	13945.00	14230.42	25	5.69×10^{-2}	
	14128.75				
	14617.50				

转下页

接上页

	107037.50			
	95512.50	102066.67	125	8.17×10^{-2}
	103650.00			
	92265.00			
	89875.00	95806.67	100	9.58×10^{-2}
	105280.00			
	62190.00			
花生	63183.75	61811.25	75	8.24×10^{-2}
	60060.00			8.81×10^{-2}
	37595.00			
	43975.00	41746.67	50	8.35×10^{-2}
	43670.00			
	23042.50			
	27447.50	24245.83	25	9.70×10^{-2}
	22247.50			

表 3 DNA 水平到原料水平换算和引物 *ITS2-2*、*trnH-psbA-1* 检测结果

Table 3 Conversion of DNA level to raw material level and test results of primers *ITS2-2* and *trnH-psbA-1*

DNA 水平掺假比例/%	原料水平掺假比例/%	<i>ITS2-2</i> 检测结果	<i>trnH-psbA-1</i> 检测结果
90	85.80	杏仁	花生
80	72.86	杏仁	花生
70	61.03	杏仁	花生
60	50.17	杏仁	花生
50	40.16	杏仁	花生
40	30.91	杏仁	花生
30	22.34	杏仁	花生
20	14.37	杏仁	花生
10	6.94	杏仁	花生

注：以上掺假比例均为花生在总体中所占的比例。

结果见表 3，由表 3 可知用引物 *ITS2-2* 检测掺入 90% 及以下花生基因组 DNA (85.80% 及以下花生原料) 时测序结果为杏仁，虽然该引物与单一一个物种均能扩增成功，但掺假后对花生的检测灵敏度低，出现这样的结果可能是杏仁较花生对该引物竞争性更强，该引物更容易与杏仁进行扩增；

用引物 *trnH-psbA-1* 检测掺入 10% 及以上花生基因组 DNA (6.94% 及以上花生原料) 时测序结果为花生，说明此引物对花生检测的灵敏度高，即对杏仁产品中掺入花生原料时检出限为 6.94%，可用于对杏仁产品中花生源性成分的检测。为保证试验的准确性，采用引物 *ITS2-2*、*trnH-psbA-1* 二者组合作为通用引物使用，提高结果的可信度。

2.5 采样进行检测及分析

对采集的 11 个不同批次杏仁露待测样品进行基

因组 DNA 的提取，以真核生物 18S rRNA 基因对提取的杏仁露基因组 DNA 进行实时荧光 PCR 扩增，结果见图 11，由图可知各样品均发生起跳，且 Ct 值 < 30.0，说明样品基因组 DNA 符合 PCR 扩增要求。

分别以引物 *ITS2-2*、*trnH-psbA-1* 与提取的杏仁露基因组 DNA 进行扩增，无菌双蒸水做空白对照^[17]。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳进行检测，结果见图 12~13。

由图 12~13 可知 11 个样品与两对引物分别扩增出清晰明亮的条带，其中样品 2~11 与引物 *trnH-psbA-1* 扩增两个条带，其余样品均扩增出一个条带。将 PCR 扩增产物送上海生工公司进行双向测序并分析测序结果。测序结果见表 4。

由表 4 可知引物 *ITS2-2*、*trnH-psbA-1* 与各样品扩增产物测序结果一致，其中样品 2~11 检测结果均为杏仁，说明这几个批次杏仁露没有掺假与产品标示相符。

样品 1 检测结果均为花生, 与产品标示不符, 属于欺瞒消费者行为。

分析产生这种结果可能有以下原因: 不同品牌的杏仁露加工工艺不同, 对原料的破坏程度不同, 使得在相同方法下提取的基因组 DNA 有所差异; 不同批次的产品均一性不好; 所测杏仁露中不含杏仁源性成分或者含量极少, 添加了其他成分代替杏仁露的口感或者掺杂了除杏仁和花生外的其他物种欺瞒消费者。

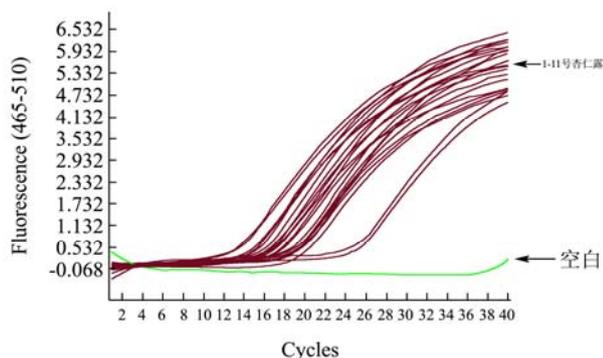


图 11 实时荧光 PCR 检测提取的杏仁露基因组 DNA 结果

Fig.11 Almond genome DNA by real time fluorescence PCR

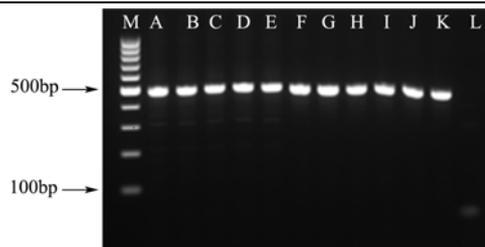


图 12 引物 ITS2-2 对不同杏仁露样品 DNA 扩增的结果

Fig.12 PCR result of primer ITS2-2 in different almond juice

注: M 为 marker, A-K 为样品, L 为空白。

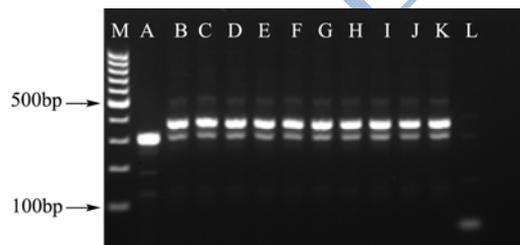


图 13 引物 trnH-psbA-1 对不同杏仁露样品 DNA 扩增的结果

Fig.13 PCR result of primer trnH-psbA-1 in different almond juice

注: M 为 marker, A-K 为样品, L 为空白

表 4 采样产品鉴定结果

Table 4 Identification results of samples

样品编号	样品名称	配料表中植物源性成分	引物 ITS2-2 检测 比对结果及相似度/%	引物 trnH-psbA-1 检测 比对结果及相似度/%	鉴定结果
1	杏仁露(无糖型)	杏仁	花生 97	花生 99	不符合
2	杏仁露	杏仁	杏仁 99	杏仁 98	符合
3	杏仁露(乳)	杏仁	杏仁 97	杏仁 99	符合
4	无糖杏仁露	杏仁	杏仁 98	杏仁 99	符合
5	杏仁露	杏仁	杏仁 97	杏仁 99	符合
6	杏仁露	杏仁	杏仁 99	杏仁 99	符合
7	杏仁露(无糖型)	杏仁	杏仁 99	杏仁 97	符合
8	杏仁露	杏仁	杏仁 94	杏仁 99	符合
9	杏仁露(低糖)	杏仁	杏仁 99	杏仁 99	符合
10	杏仁露(无糖)	杏仁	杏仁 99	杏仁 99	符合
11	杏仁露	杏仁	杏仁 99	杏仁 97	符合

3 结论

3.1 随着 DNA 条形码技术的发展, 在植物界的研究范围越来越广, 目前有一些应用较多的基因序列, 如 ITS、matK、rbcL 和 trnH-psbA 等, 但仍未达到成熟阶段。本试验针对杏仁和花生两个物种, 通过参考文献和数据库下载的 10 对引物分别对它们进行 PCR 扩增, 其中有两对引物 ITS2-2、trnH-psbA-1 对它们的扩增成功率与测序成功率较高, 可作为通用引物使用。

3.2 目前对于植物蛋白饮料鉴定真伪的相关技术报道较少, 该类因加工工艺导致难以用常规的分类

学手段辨别, 而利用植物 DNA 条形码技术应用到此类食品的检测上, 可有效地辨识出所含物种。本试验模拟人为在杏仁中掺入花生, 利用引物 ITS2-2 检测掺入 90% 及以下花生基因组 DNA (85.80% 及以下花生原料) 时测序结果为杏仁; 用引物 trnH-psbA-1 检测掺入 10% 及以上花生基因组 DNA (6.94% 及以上花生原料) 时测序结果为花生, 可将二者结合应用于杏仁露产品中花生源性成分掺假的检测。

3.3 本试验虽找到两对引物, 但对于某些含杏仁、花生源性成分很低的产品的检测灵敏度仍然不够, 有待继续研究, 找到灵敏度更高的通用引物。同时二者作

为过敏原对于某些人群来说误食将有损身体健康, 该研究也可为相关食品检测其中的过敏原成分提供一定的理论基础。

参考文献

- [1] 刘宇婧,刘越,黄耀江,等.植物 DNA 条形码技术的发展及应用[J].植物资源与环境学报,2011,20(1):74-82,93
LIU Jing-yu, LIU Yue, HUANG Yao-jiang, et al. Progress and application of DNA barcoding technique in plants [J]. Journal of Plants and Environment, 2011, 20(1): 74-82, 93
- [2] LIU J, SHI L, HAN J, et al. Identification of species in the angiosperm family apiaceae using DNA barcodes [J]. Molecular Ecology Resources, 2014, 16(6): 1231-8
- [3] Galimberti A, De Mattia F, Lose A, et al. DNA barcoding as a new tool for food traceability [J]. Food Research International, 2013, 50(1): 55-63
- [4] 吕冬梅,黄原,文慧,等.DNA 条形码技术在食品鉴定中的应用[J].食品科学,2015,36(9):248-253
LV Dong-mei, HUANG Yuan, WEN Hui, et al. Application of DNA barcoding in authentication of food product [J]. Food Science, 2015, 36(9): 248-253
- [5] 张裕君,刘跃庭,廖芳,等.DNA 条形码技术研究进展及其在植物检疫中的应用展望[J].中国植保导刊,2010,30(4):15-17
ZHANG Yu-jun, LIU Yue-ting, LIAO Fang, et al. Research progress of DNA bar code technology and prospect of its application in plant quarantine [J]. China Plant Protection, 2010, 30(4): 15-17
- [6] 侯新东,尹帅,盛桂莲,等.基于 *ITS* 序列探讨 10 种荨麻科植物的系统发育关系[J].生物技术通报,2013,8:68-73
HOU Xin-dong, YIN Shuai, SHENG Gui-lian, et al. Study on phylogenetic relationship of ten urticaceae species based on nrDNA *ITS* sequences [J]. Biotechnology Bulletin, 2013, 8: 68-73
- [7] Haye P A, Segovia R D, Ventolero M F H, et al. Detection of mislabeled commercial fishery by products in the philippines using DNA barcodes and its implications to food traceability and safety [J]. Food Control, 2013, 33(1): 119-125
- [8] LIU ZH, ZHENG X, YANG D, et al. Applying DNA barcodes for identification of plant species in the family araliaceae [J]. Gene, 2012, 499(1): 76-80
- [9] 裴男才,陈步峰.生物 DNA 条形码: 十年发展历程、研究尺度和功能[J].生物多样性,2013,21(5):616-627
PEI Nan-cai, CHEN Bu-feng. DNA barcoding of life: a classification of uses according to function and scale after ten years of development [J]. Biodiversity Science, 2013, 21(5): 616-627
- [10] 伏建国,杨晓军,钱路,等.植物 DNA 条形码技术在出入境检验检疫领域的应用[J].植物检疫,2012,26(2):64-69
FU Jian-guo, YANG Xiao-jun, QIAN Lu, et al. Application of plant DNA barcoding in inspection and quarantine [J]. Plant Quarantine, 2012, 26(2): 64-69
- [11] 王晓明,姬可平,牛宪力,等.DNA 条形码与动植物分类学的研究[J].生物信息学,2012,10(2):83-86
WANG Xiao-ming, JI Ke-ping, NIU Xian-li, et al. Study of DNA barcoding about taxonomy of plants and animals [J]. Chinese Journal of Bioinformatics, 2012, 10(2): 83-86
- [12] 陈亚辉,朱海军,生静雅,等.DNA 条形码序列对不同品种美国山核桃的鉴定[J].江苏农业学报,2013,29(6):1445-1450
CHEN Ya-hui, ZHU Hai-jun, SHENG Jing-ya, et al. Identification of pecan varieties by DNA barcoding [J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2013, 29(6): 1445-1450
- [13] 李新光,王璐,赵峰,等.DNA 条形码技术在鱼肉及其制品鉴别中的应用[J].食品科学,2013,34(18):337-342
LI Xin-guang, WANG Lu, ZHAO Feng, et al. Application of DNA barcoding to identify commercial fish and fish products [J]. Food Science, 2013, 34(18): 337-342
- [14] 欧阳解秀,王立贤.DNA 条形码技术在地方猪种质资源保护中的应用[J].农业生物技术学报,2013,21(3):348-354
OUYANG Xie-xiu, WANG Li-xian. The progress and application of DNA barcoding in genetic resources conservation for local pig [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2013, 21(3): 348-354
- [15] Cutarelli A, Amoroso M G, De Roma A, et al. Italian market fish species identification and commercial frauds revealing by DNA sequencing [J]. Food Control, 2014, 37: 46-50
- [16] ZHU S, FU J, WANG Q, et al. Identification of *Channa* Species Using the Partial Cytochrome C oxidase Subunit I (*CO I*) Gene as a DNA Barcoding marker [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2013, 51: 117-122
- [17] 魏晓璐,黄鑫,冯悦,等.核桃乳(露)饮品中花生、大豆成分的 PCR 检测方法[J].食品工业科技,2014,35(13):288-291,295
WEI Xiao-lu, HUANG Xin, FENG Yue, et al. Detection of peanut and soybean in walnut milk using PCR [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(13): 288-291, 295
- [18] 覃芳芳,邓鸿铃,罗海英,等.杏仁产品杏仁成分的 PCR 检测方法研究[J].现代食品科技,2008,24(6):603-605
TAN Fang-fang, DENG Hong-ling, LUO Hai-ying, et al. Application of PCR assays in detection of amygdaline

- components in amygdaline food [J]. Modern Food Science and Technology, 2008, 24(6): 603-605
- [19] 罗焜,陈士林,陈科力,等.基于芸香科的植物通用DNA条形码研究[J].中国科学:生命科学,2010,40(4):342-358
LUO Kun, CHEN Shi-lin, CHEN Ke-li, et al. Assessment of candidate plant DNA barcodes using the Rutaceae family [J]. Sci. China Life Sci., 2010, 40(4): 342-358
- [20] 林春,梁宗锁,韩建萍,等.基于杜鹃属植物的DNA条形码序列筛选[J].世界科学技术-中医药现代化,2009,11(1): 54-57
SHI Lin-chun, LIANG Zong-suo, HAN Jian-ping, et al. Screening potentia DNA barcode regions in rhododendron [J]. Modemization of Traditional Chinese Medicine and Materia Media-World Science and Technology, 2009, 11(1): 54-57
- [21] 张裕君,刘跃庭,廖芳,等.基于 *rbcL* 基因序列的欧洲菟丝子分子检测[J].植物保护,2009,35(4):110-113
ZHANG Yu-jun, LIU Yue-ting, LIAO Fang, et al. Molecular detection of *Cuscuta Eurepean* based on *rbcL* sequence [J]. Plant Protection, 2009, 35(4): 110-113
- [22] Kress W J, Erickson D L. A Two-locus Global DNA Barcode for Land Plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region [J]. PLoS One, 2007, 2(6): e508
- [23] Fazekas A J, Burgess K S, Kesanakurti P R, et al. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well [J]. PLoS One, 2008, 3: e2802
- [24] 高连明,刘杰,蔡杰,等.关于植物DNA条形码研究技术规范[J].植物分类与资源学报,2012,34(6):592-606
GAO Lian-ming, LIU Jie, CAI Jie, et al. A synopsis of technical notes on the standards for plant DNA barcoding [J]. Plant Diversity and Resources, 2012, 34(6): 592-606
- [25] 王爽,李永波,马超峰,等.DNA条形码 *COI* 序列在常见肉类鉴别中的应用研究[J].现代食品科技,2016,32(1):188-193
WANG Shuang, LI Yong-bo, MA Chao-feng, et al. Study on selection of efficient DNA barcoding *COI* for identification of common meat species [J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(1): 188-193
- [26] 侯新东,韩大永,曾莉,等.荨麻科植物DNA条形码的筛选[J].南方农业学报,2014,45(2):178-183
HOU Xin-dong, HAN Da-yong, ZENG Li, et al. Screening potential DNA barcode regions for urticaceae plants [J]. Journal of Southern Agricultural, 2014, 45(2): 178-183
- [27] 田晨曦,周巍,王爽,等.基于DNA条形码技术常见肉类掺假鉴别技术的研究[J].现代食品科技,2016,32(8):295-301
TIAN Chen-xi, ZHOU Wei, WANG Shuang, et al. Techniques for identifying common meat adulterations based on DNA barcoding [J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(8): 295-301