

基于苹果 DNA 的 NFC 苹果汁鉴伪方法的建立

邓红^{1,2,3} 刘靓¹ 雷佳蕾^{1,4} 梁佳蕊¹ 孟永宏^{1,2,3*} 郭玉蓉^{1,2,3}

(1. 陕西师范大学食品工程与营养科学学院, 陕西西安 710062; 2. 国家苹果加工技术研发专业中心, 陕西西安 710119; 3. 西部果品资源高值利用教育部工程研究中心, 陕西西安 710119; 4. 陕西理工大学, 陕西汉中 723001)

摘要 [目的]通过分析比较不同品种苹果的 NFC 与 FC 果汁在 DNA 方面的差异,为 NFC 果汁的真伪鉴别和 NFC 果汁标准的建立提供科学方法和试验依据。[方法]在传统 CTAB 提取 DNA 方法的基础上加入纳米硅基磁珠(Si-OH@Fe₃O₄ NPs)以提高苹果汁 DNA 的提取浓度,开发实时定量 PCR,以鉴别 NFC 苹果汁和掺假(AAJ)果汁。[结果]试验确定的磁珠提取 DNA 最佳条件是样品用量 1 mL 和颠倒混匀 3 min,提取出的 DNA 浓度均在 50~60 ng/mL;在 NFC 苹果汁中连续稀释 DNA 的 RT-PCR 扩增标准曲线是 $y = -2.095 9x + 30.714 0$, $R^2 = 0.998 5$;不同程度掺假 NFC 苹果汁中 DNA 的 RT-PCR 扩增曲线为 $y = 0.968 3x + 28.591 0$,相关性为 $R^2 = 0.981 9$ 。[结论]这种基于新的 DNA 提取方法的 RT-PCR 技术在 NFC 苹果鉴伪中有着良好的稳定性、可重复性、可靠性;试验建立的方法可为 NFC 果汁的鉴伪检验提供有用工具。

关键词 苹果; DNA; NFC 苹果汁; 掺假果汁; 鉴伪

中图分类号 TS255.7 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)09-0157-06

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.09.040



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Establishment of Authentication Detection Methods for NFC Apple Juice Based on DNA of Apples

DENG Hong^{1,2,3}, LIU Liang¹, LEI Jia-lei^{1,4} et al (1. College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi 710062; 2. National Research & Development Center of Apple Processing Technology, Xi'an, Shaanxi 710119; 3. Engineering Research Center of High Value Utilization of Western China Fruit Resources, Ministry of Education, Xi'an, Shaanxi 710119; 4. Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shaanxi 723001)

Abstract [Objective]The differences of DNA between NFC juice and FC juice from different apple varieties were analyzed and compared to provide scientific method and experimental basis for the authentication detection of NFC juice and the establishment of NFC juice standard. [Method]The extraction concentration of juice DNA can be greatly improved after adding silicon based magnetic beads (Si-OH@Fe₃O₄ NPs) based on CTAB for DNA traditional extraction method, then the real-time quantitative PCR was developed to identify NFC apple juice and adulterated apple juice. [Result]The experiment results showed the optimal conditions for extracting DNA in NFC apple juice by magnetic beads were 1 mL of sample dosage and 3 min of reverse mixing, and the extracted DNA concentration was 50-60 ng/mL under above operating conditions. The standard curve for RT-PCR amplification of continuously diluted DNA from NFC apple juice was $y = -2.095 9x + 30.714 0$, $R^2 = 0.998 5$. The RT-PCR amplification curve of DNA in adulterated fruit juice (AAJ) with different degrees adulterated FC juice was $y = 0.968 3x + 28.591 0$, $R^2 = 0.981 9$. [Conclusion]RT-PCR based on the new DNA extraction method has good stability, repeatability and reliability in NFC apple forgery identification. The method established in this experiment can provide useful tools for NFC apple fruit juice authentication detection.

Key words Apple; DNA; NFC apple juice; Adulterated apple juice; Authentication detection

近年来,随着人们健康意识的不断提高,完全保留了水果原有新鲜风味的 NFC(not from concentrate 非浓缩还原汁)苹果汁的销量日益增高。NFC 是将新鲜原果清洗后榨出果汁,经瞬间杀菌后直接罐装(不经过浓缩及复原)的纯鲜果汁。由于 NFC 果汁高昂的售价和广阔的市场背景,成为市场竞争不法之人掺假的目标^[1-2]。市场上绝大多数的所谓纯鲜果汁,其实是将 FC 果汁(Form concentrate 浓缩还原果汁)兑水加糖、防腐剂等制成的 AAJ 果汁(adulterated apple juice, 掺假果汁)。AAJ 果汁经过浓缩与还原的复杂加工,其新鲜度及口感均无法与 NFC 产品相比。

而作为我国苹果生产加工大省的陕西,2019 年苹果产量达到 1 135.58 万 t,种植面积 61.46 万 hm²。除部分鲜食出口外,很多品质良好但外形欠佳的苹果被加工为果汁^[3-4]。据统计,全球每年消耗超过 1 600 万 t 的果汁中,苹果汁占有重

要的市场份额,因此 NFC 苹果汁的真实性问题一直为广大消费者所关注。由于 NFC 与 FC 果汁的化学成分差异不大,传统的物理与化学分析方法很难区分 FC 与 NFC 果汁产品,所以目前主要利用稳定同位素技术(如同位素比率质谱法, isotope ratio mass spectrometry, IRMS)进行 FC 与 NFC 的鉴伪^[5-9]。这种方法已经获得了欧盟标准化委员会(法文缩写 CEN, Comité Européen de Normalisation)、美国分析化学师协会(Association of Official Agricultural Chemists, AOAC)的认可。然而,IRMS 方法用于 FC 与 NFC 的定性分析比较好,其定量分析效果仍不尽人意。

而利用基于 DNA 的分子生物学手段进行品种鉴定、掺假检测已经成为研究热点^[10-11]。高华^[11]利用 SSR 分子标记技术,以 40 个苹果栽培品种为试材,通过 PCR 反应体系优化、引物筛选和标记筛选,建立了一套适合于苹果 DNA 指纹图谱库构建的技术体系。刘伟红等^[12]以橙汁为研究对象,采用 CTAB 法、SDS-CTAB 法以及改良 CTAB 法(cetyltrimethylammonium ammonium bromide,十六烷基三甲基溴化铵)提取其 DNA,同时选取橙 UDP-葡萄糖基转移酶蛋白基因设计柑橘属植物特异性扩增引物,证明 UGT 基因特异性引物可用

基金项目 国家科技部重点研发计划(2017YFD0400700);农业农村部苹果产业体系项目(CARS-27)。

作者简介 邓红(1967—),女,湖南新化人,副教授,从事食品科学与工程研究。*通信作者,教授,从事食品科学与工程研究。

收稿日期 2021-08-09

于果汁中的柑橘属植物成分的检测及鉴别。目前有关不同品种苹果汁 NFC 与 FC 中 DNA 差异的研究在国内尚属空白,关键的 DNA 提取技术仍是瓶颈,因此提取苹果汁 DNA 进行苹果汁鉴别的研究目前鲜见报道。笔者利用改良 CTAB 法和纳米硅基磁珠(Si-OH@Fe₃O₄ NPs)吸附解决苹果汁中 DNA 的提取难题,通过 RT-PCR 技术对 NFC 和 FC 苹果汁中的 DNA 进行定量分析,实现 NFC 苹果汁的鉴别与鉴定,以期苹果 NFC 果汁的质量监控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 苹果原料品种 10 个(自由、延光、橘苹、富士、寒福、黛绿、嘎啦、首红、乔纳金、元帅),采于西北农林科技大学白水苹果试验站,并于 4 °C 冷藏保存。纳米硅基磁珠(Si-OH@Fe₃O₄ NPs) 磁力架,购于厦门普瑞迈格生物科技有限公司; 2×Easy Taq PCR SuperMix, DNA Marker, DNA free water, Plantzol 试剂盒, RNaseA 均购自北京全式金生物技术有限公司; 引物合成及 DNA 测序在金斯瑞公司进行。

PCR 仪,ABI 公司;电泳仪, BioRad 公司; SBA-40C 葡萄糖测定仪,山东省科学院;凝胶成像分析仪,上海培清科技公司; CFX96 Touch 实时荧光定量 PCR 仪, Bio-rad 公司; JEM-1230 透射电子显微镜,日本东京 JEOL 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 NFC、FC、AAJ 苹果汁的制备。 NFC、FC 苹果汁的制

备参考文献[2] AAJ 苹果汁的制备参见文献[9]。

1.2.2 不同品种苹果汁中 DNA 的提取与分析。

1.2.2.1 DNA 的提取。 参考文献[13-14],取 1 mL 样品, 12 000 r/min 离心 10 min 后弃上清液,然后加入 400 μL Plantzol 振荡混匀,使样品完全悬浮,再加入 7.5 μL RNaseA,充分混匀,55 °C 金属浴温育 15 min;加入 400 μL 酚-氯仿 振荡混匀,12 000 r/min 离心 10 min,小心吸取上层水相于干燥离心管中,加入 400 μL 异丙醇,再加入振荡混匀的 20 μL Si-OH@Fe₃O₄ NPs 颠倒混匀 2 min,将离心管置于磁力架上,静置 3 min,吸弃上清液;加入 800 μL 70%乙醇水溶液,振荡混匀,将离心管置于磁力架上,静置 3 min,吸弃上清液,再加入 800 μL 70%乙醇水溶液,重复操作 2 次;65 °C 金属浴干燥 8 min,挥发表面乙醇;移去磁力架,加入 50 μL TE 液,用移液枪吹打使其分布均匀,65 °C 金属浴温育 10 min,温育期间每隔 2~3 min 轻摇离心管混匀;将离心管置于磁力架上,静置 3 min,使磁珠吸附在离心管壁上。吸取上清液至一新的离心管,得到 DNA。其中, NFC 果汁即鲜榨苹果汁提取后得到的 DNA 浓度 ≥ 40 ng/μL。使用分光光度计,通过在 260 和 280 nm 处的吸光度读数控制总 DNA 的浓度和纯度。在吸附 DNA 之前和之后,在 JEM-1230 透射电子显微镜上对磁珠的 TEM 图像进行成像。Si-OH@Fe₃O₄ NPs 提取 DNA 的整个过程见图 1。

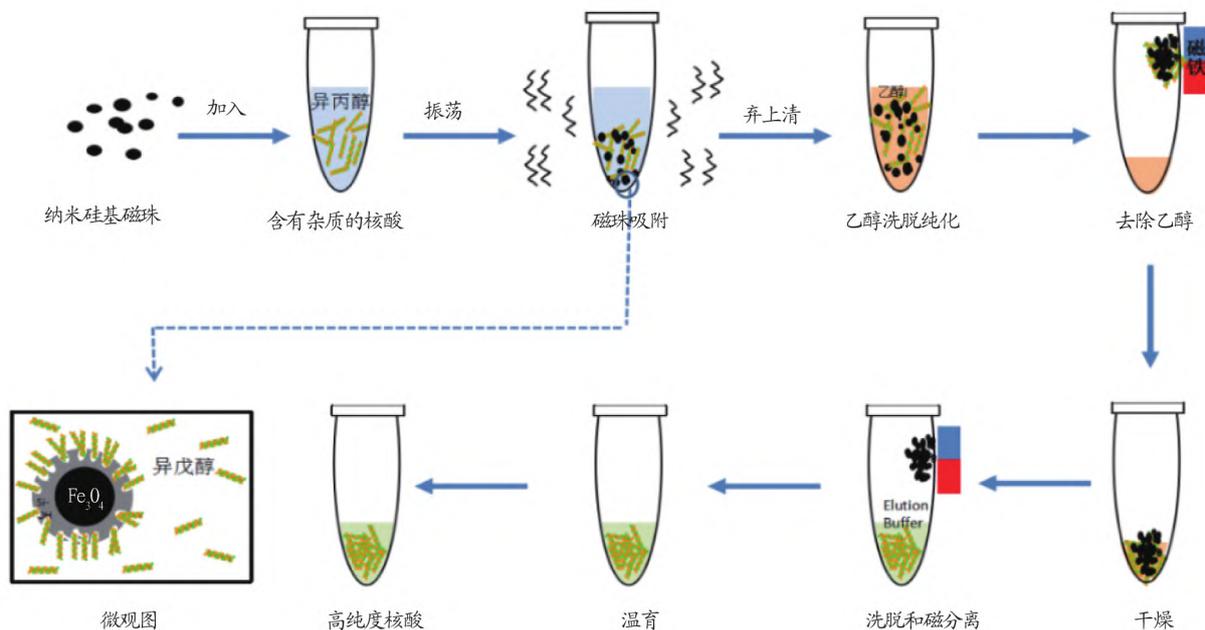


图 1 Si-OH@Fe₃O₄ NPs 提取基因组 DNA 示意

Fig.1 Schematic procedure for extraction of genomic DNA with Si-OH@Fe₃O₄ NPs

1.2.2.2 果汁 DNA 提取方法中样品剂量的确定。 按照上述提取方法分别取 0.2、0.4、1.0、1.5、2.0 和 2.5 mL 的汁液,并分别测量其浓度样品,重复 3 次。选择合适的样本量。

1.2.2.3 果汁 DNA 提取方法中磁珠吸附时间的确定。 添加磁珠后,取 5 个 1 mL 样品,分别颠倒混匀 10、30 s 和 1、3 和 5 min,其他提取条件不变。根据上述方法,提取 DNA 并检测其浓度,以确定合适的吸附时间。

1.2.2.4 NFC 苹果汁的特异性引物确定。 以步骤“1.2.2.1”提取的 DNA 为模板进行常规 PCR 扩增,PCR 扩增反应体系(25 μL): 12.5 μL 2× Easy Taq PCR SuperMix(+Dye), 1 μL 上游引物水溶液(碱基序列为 5'-AACGGCTACCACATCCAAGG-3'), 1 μL 下游引物水溶液(碱基序列为: 5'-ACCAGACTT-GCCCTCCAATG-3'), 1 μL DAN 模板, 9.5 μL 无菌双蒸水。PCR 扩增反应程序: 预变性 95 °C 5 min,变性 94 °C 30 s,55

℃退火 30 s, 72 ℃延伸 30 s, 共 35 个循环, 72 ℃延伸 5 min。扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳分析^[15]。

1.2.2.5 RT-PCR。 荧光定量 PCR 扩增反应体系 (20 μL): 10 μL 2×TransStart Top Green Qpcr superMix(+Dye), 1 μL 上游引物水溶液, 1 μL 下游引物水溶液, 1 μL DAN 模板, 7 μL RNase-free water。荧光定量 PCR 扩增反应程序: 预变性 94 ℃ 30 s, 变性 94 ℃ 5 s, 55 ℃退火 10 s, 72 ℃延伸 15 s, 共 40 个循环。

1.2.2.6 扩增效率和检出限。 通过分析 10 倍稀释的 DNA 溶液 (1:1~1:10 000, 对应于 50 ng/μL 到 5 pg/μL 的 DNA 浓度) 确定 18S rRNA 的扩增效率和检测限 (LOD)。从新鲜苹果汁中提取 DNA, 使用 SYBR Green 染料 (TransGen Biotech) 进行实时 PCR。通过将实时 PCR 分析的循环阈值 (C_t) 相对于 DNA 浓度的对数作图, 对每种稀释液进行 3 次重复, 以构建标准曲线。

1.2.2.7 制备定量校准曲线。 选择苹果特异的引物 18S rRNA, 通过扩增 18S rRNA 基因中的 164 bp 片段来检测新鲜苹果汁中的掺假程度。通过在新鲜苹果汁中掺入 0.5%、2.5%、10%、20%、30%、40%、50% 和 70% 的水掺混物来制备加标模型; 用蔗糖将可溶性固体回收至与新鲜苹果汁相同的水平, 每个样品重复 3 次。

分析标准 DNA 模板的特异性引物, 用来构建加标模型的校准曲线。以 PCR 系统获得的校准液组使用的 7 种标准液中新鲜苹果汁的百分比 (x 轴), 以平均 C_t 值 (y 轴) 的对数作图, 生成定量校准曲线。确定直线方程 ($y=mx+c$) 和测定系数 (R^2), 其中 x 为 \log (添加的掺假物百分比), 从实时 PCR 系统获得的平均 C_t 值为 y 。将最低性能标准应用于校正曲线 ($R^2 > 0.99$), 否则该试验不可靠^[16-17]。

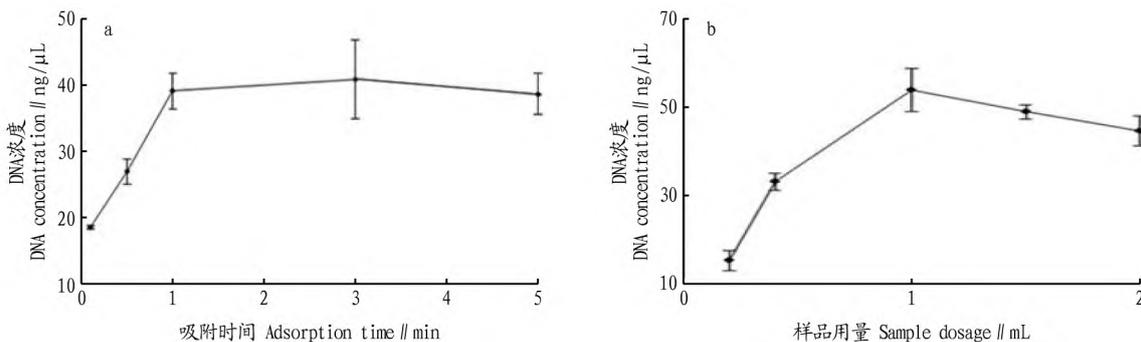


图 2 吸附时间 (a) 和样品用量 (b) 对 DNA 提取的影响

Fig.2 Effects of adsorption time (a) and sample dosage (b) on DNA extraction

2.2 从新鲜苹果汁中提取的 DNA 质量 DNA 浓度和纯度的测定对于后续试验 (如 PCR 和 RT-PCR) 至关重要, 浓度和纯度会因提取方法及所使用的 DNA 定量方法而异。试验中果汁样品 DNA 浓度为 50~60 ng/μL。苹果汁样品中的基因组 DNA 使用通用植物引物 18S rRNA 基因扩增, 琼脂糖凝胶电泳图谱见图 3。结果表明, 从苹果汁样品中提取的基因组 DNA 质量良好, 可用于后续 PCR 检测。

2.3 吸附 DNA 后的 Si-OH@Fe₃O₄NPs 磁珠表征 通过 TEM 图像研究了磁珠 Si-OH@Fe₃O₄NPs 的形态信息和粒径

1.2.2.8 方法验证。 为了进行这项工作中开发的实时 PCR 技术的验证, 研究了可靠性和可重复性。通过重复分析 ($n=10$) 掺入 5%、15% 或 20% 掺假水的新鲜苹果汁中的 DNA 提取物来研究实时 PCR 方法的可靠性。真实性和精确度是该方法的重要性能, 并通过估计相对偏差和系数变化进行分析。另外, 使用样本 t 检验测定新鲜苹果汁中掺假的实际百分比与估计值之间的显著差异。为了确定该方法的可重复性, 连续 3 d 在 3 次测定中分析连续稀释的 DNA 提取物 (50 ng/μL 的 1:10、1:100、1:500 和 1:5 000 稀释液)。分析 C_t 值的相对标准偏差 (RSD), 并将其用于反映实时 PCR 的重复性。

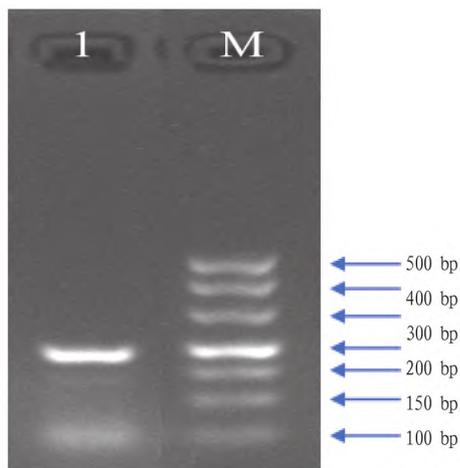
1.3 数据统计 使用 Origin 8.0 和 SPSS 12.0 软件进行数据分析, 结果表示为平均值±标准偏差 (SD), $P < 0.05$ 为影响显著。主成分分析 (PCA, principal component analysis) 被用作评估每个数据集, 以检测潜在异常值。

2 结果与分析

2.1 Si-OH@Fe₃O₄NPs 提取 DNA 的影响因素 磁珠吸附时间和果汁样品用量是影响 Si-OH@Fe₃O₄NPs 提取 DNA 性能的关键因素。优化吸附时间对 DNA 提取 Si-OH@Fe₃O₄NPs 浓度的影响, 同时保持 PBS 中 Si-OH@Fe₃O₄NPs 的含量为 20 μL, 样品中 DNA 的浓度为 1 mL, 结果见图 2a。从图 2a 可见, DNA 浓度随着吸附时间的延长而逐渐增大, 直到超过 3 min 反而稍有下降。因此, 选择 3 min 进行后续试验。试验记录了汁液样品剂量在 0.2~2.0 mL 时对 DNA 浓度的影响, 结果见图 2b。超过 1 mL 的样品剂量, DNA 提取浓度随样品剂量的增大而逐渐降低, 因此选择 1 mL 作为后续试验的样品用量。

以及 Si-OH@Fe₃O₄NPs 和 DNA 的结合物, 结果见图 4。从图 4a 可见, Si-OH@Fe₃O₄NPs 为球形, 直径约 400 nm。图 4a 和图 4b 显示了 Si-OH@Fe₃O₄NPs 被 Si-OH 包裹 (灰色), 且 Si-OH@Fe₃O₄NPs 为核-壳型结构。Si-OH@Fe₃O₄NPs 和 DNA 结合物的 TEM 图像 (图 4b) 证实了 Si-OH@Fe₃O₄NPs 可有效提取 DNA^[18]。

2.4 NFC 苹果汁特定引物的确定 受加热的影响, 苹果汁中提取的 DNA 序列发生大量缺失和断裂, 大多数引物片段不能通过 PCR 进行扩增。根据图 5, 当将果汁加热到 20 ℃



注: 18S-F: GCCCGTTGCTCTGATGAT; 18S-R: GGATGTGGTAGC-CGTTTCT; 1.新鲜苹果汁 DNA; M.分子量标记物 500 bp ,DNA 阶梯

Note: 18S-F: GCCCGTTGCTCTGATGAT; 18S-R: GGATGTGGTAGC-CGTTTCT.Lanes 1. Fresh apple juice DNA; M.Molecular weight marker 500 bp ,DNA ladder

图 3 苹果汁中 18S rRNA 基因引物扩增 PCR 产物电泳图谱

Fig.3 Electrophoresis profile of PCR products amplified by 18S gene primer in fresh apple juice

时,引物 1、2、3 和 5 产生亮带,当果汁温度为 30 ℃ 时,UBQ 的电泳带消失了,直到果汁加热到 50 ℃,肌动蛋白基因的电泳带消失,这说明高温灭菌后,鲜苹果汁中的引物 1 和 3 难以有效稳定扩增。引物 2(GAPDH) 和引物 5(18S rRNA) 在

常规 PCR 过程中稳定扩增。在图 5 中,使用 DNA 标记(M)来估计 DNA 片段的大小。从图 5 可以看出,引物 2 的条带比用 150 bp Maker 基因标记的电泳条带高得多。因此,未扩增与引物 2 相对应的 GAPDH 片段(145 bp),且该引物不能用作鉴定新鲜苹果汁的特异性引物。将扩增产物的测序结果与苹果汁在 NCBI 上的 18S rRNA(DQ341382.1) 基因序列进行比较(图 6),发现相似性达到 98%。通过一系列筛选,可以确定引物 5 为特异性引物。

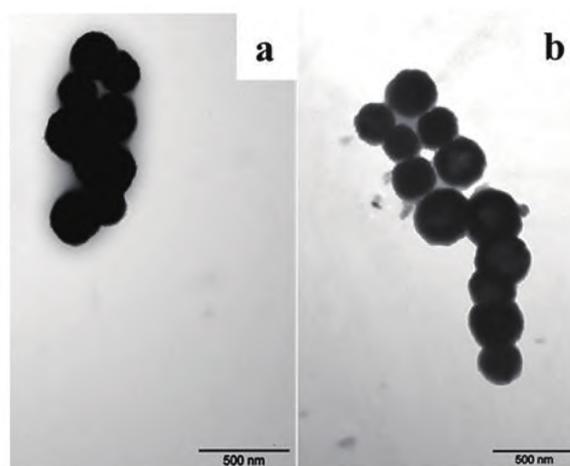
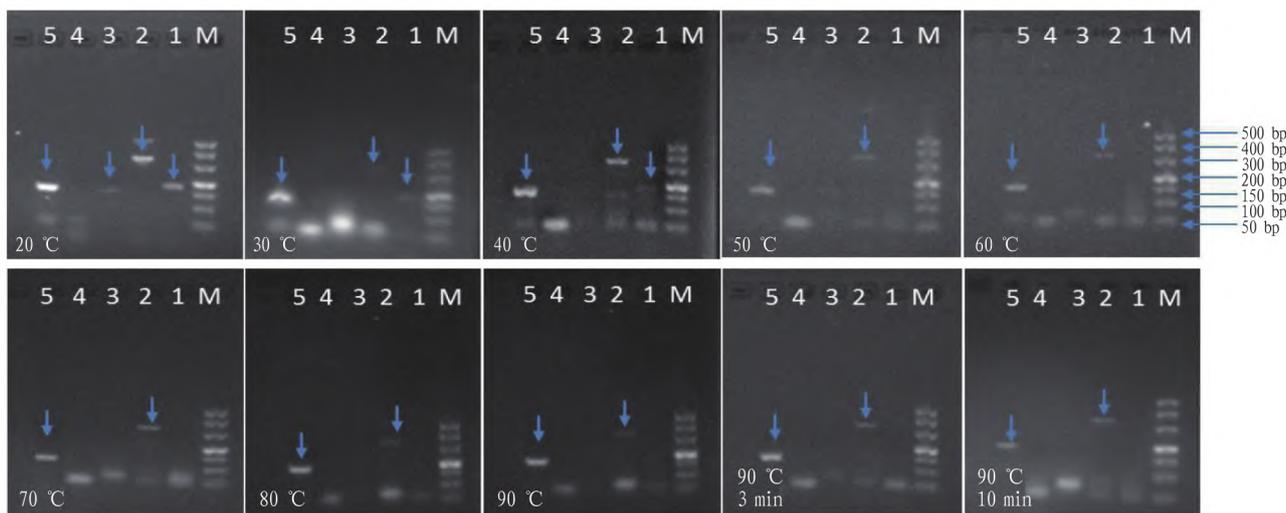


图 4 Si-OH@Fe₃O₄ NPs (a) 和 Si-OH@Fe₃O₄ NPs DNA 结合物 (b) 的 TEM 图像

Fig.4 TEM images of Si-OH@Fe₃O₄ NPs (a) and Si-OH@Fe₃O₄ NPs DNA conjugates (b)



注: 1.肌动蛋白基因; 2.GAPDH 基因; 3.UBQ 基因; 4.nad5 基因; 5.18S rRNA 基因; M.分子量标记(500 bp DNA 阶梯)

Note: 1.Actin gene; 2.GAPDH gene; 3.UBQ gene; 4.nad5 gene; 5.18S rRNA gene; M.molecular weight marker(500 bp DNA ladder)

图 5 5 个候选引物在不同加热温度下对 NFC 苹果汁中 DNA 进行 PCR 扩增的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.5 Agarose gel electrophoresis of five candidate primers for PCR amplification of DNA in NFC apple juice at different heating temperatures

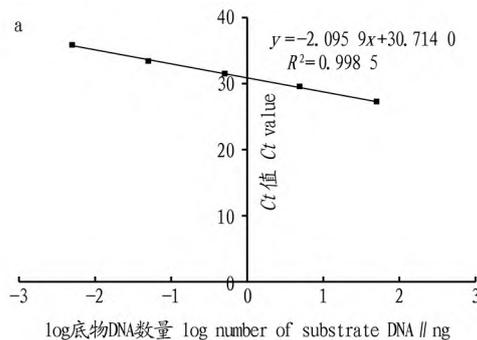
```

Query 4 AACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACGGGG 63
Sbjct 327 AACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTGACACGGGG 386
Query 64 AGGTAGTGACAATAAATAACAATACCGGGCTCTACGAGTCTGCGTAATTGTGAATGAGTA 123
Sbjct 387 AGGTAGTGACAATAAATAACAATACCGGGCTCTATGAGTCTG-GTAATTG-GAATGAGTA 444
Query 124 CAATCTAAATCCCTTAACGAGGATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGT 168
Sbjct 445 CAATCTAAATCCCTTAACGAGGATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGT 489
    
```

图 6 18S rRNA PCR 扩增产物测序结果与 18S rRNA(DQ341382.1) 的基因序列比较

Fig.6 Comparison of the sequencing results of the PCR amplified products of 18S rRNA with the gene

2.5 苹果汁定量检测结果 试验首先确定 SYBR Green PCR 的灵敏度。对来自 NFC 苹果汁的 10 倍系列稀释的 DNA 提取物进行分析,以确定基于 PCR 引物对 18S rRNA 的扩增效率和 LOD。将在连续稀释的果汁 DNA 提取物分析中获得的 C_t 值与初始 DNA 量的对数作图,得出线性标准曲线(图 7a)。由标准曲线(图 7a)可知,SYBR Green PCR 对 NFC 苹果汁中 DNA 的检测具有高度灵敏性,在不同稀释倍数下也呈现稳定的线性关系。图 7a 中标准曲线的斜率为-3.91,表示经过热处理的苹果汁的斜率和放大效率较低,结果正如预期。根据文献[19-20]可知,所获标准曲线的测定系数($R^2=0.9985$)和 LOD(5 pg)数据是可以接



受的,表明 SYBR Green PCR 系统具有很高的灵敏度,可用于进一步试验。

其次,试验建立了定量校准曲线。将加标样品的实时 PCR 分析中获得的 C_t 值(故意掺假)用于建立掺假校准曲线。将实时 PCR 分析中获得的 C_t 值相对于连续稀释的 NFC 苹果汁混合物加标水平对数作图,得到的定量校准曲线见图 7b。图 7b 显示出良好的测定系数($R^2=0.9819$)。根据这条曲线,在 NFC 苹果汁的掺假检测时,只需将果汁中 DNA 的荧光分析结果 C_t 值代入该曲线方程中,即可判断该果汁是否掺假和掺假程度。即当果汁掺假范围为 0.5%~70.0% 时,运用该方法可准确判断 NFC 苹果汁中掺假物的百分比。

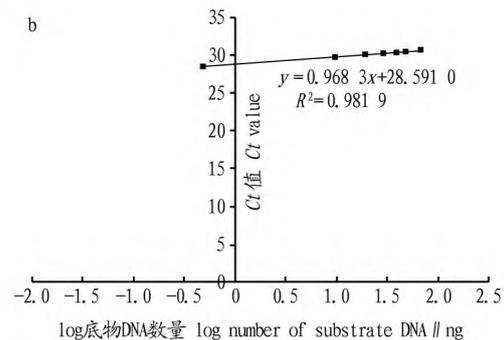


图 7 NFC 苹果汁(a)与掺假苹果汁(b)的 DNA 连续稀释提取液分析得到的标准曲线、循环阈值

Fig.7 Standard curve obtained by analyzing serially diluted DNA extracts from NFC(a) and adulterated apple juice(b)

2.6 试验方法的验证 通过重复分析($n=10$)5%、15%和 20%掺假样品中提取的 DNA 来研究实时 PCR 方法的可靠性,结果见表 1。由表 1 可知,在 3 种掺假苹果汁分析中发现了估计百分比与实际百分比之间的可比性,通过估计平均值,表明掺假度为 5%的果汁有最大偏差,这是由于掺假量相对较小,且对 DNA 扩增的影响较小。变异系数为 11.8%~29.8%。掺假水平较低的果汁样品通常显示出较差的可靠性和较大的偏差,因此掺假率分别达到 15%和 20%,可靠性得到了极大的提高。15%和 20%掺假样品的估计百分比无显著差异($P>0.05$),且实际值和估计值之间的差异很小。5%掺假度 $P<0.05$,这意味着 5%掺假苹果汁中掺假含量的估算不准确。

表 1 掺假苹果汁 DNA 提取物实时 PCR 方法的可靠性

Table 1 Reliability of the real-time PCR method with DNA extracts from adulterated apple juices

掺假度 Degree of adulteration//%	估计值 Estimated value//%	偏差 Bias %	变异系数 CV %	P 值 P value (t-test)
5	7.0	15.3	27.0	0.045
15	16.3	3.2	29.8	0.635
20	18.6	-2.4	11.8	0.583

由表 2 可知,将 50 ng/ μ L DNA 以不同比例稀释后,连续 3 d 进行实时荧光定量分析,发现其 C_t 值均在一定范围内。当 DNA 稀释倍数为 1:10 和 1:100 时 C_t 值的相对误差较小,分别为 0.18 和 0.91。但在稀释倍数为 1:500 和 1:5 000 时, C_t 值之间出现较大偏差但未超过 2%。基于磁珠提取 DNA

的实时荧光法检测 NFC 苹果汁的方法,可重复性的稀释因子高达 1:5 000,证明该方法具有高度的重复性,在样品 DNA 浓度为 10 pg/ μ L 检测也具有较好的重复性。

表 2 实时 PCR 检测的可重复性

Table 2 Repeatability of the real-time PCR assay

稀释倍数 Dilution multiple	DNA 浓度 DNA concentration pg/ μ L	C_t 值 C_t value			相对误差 SD %
		第 1 天 Day 1	第 2 天 Day 2	第 3 天 Day 3	
1:10	5 000	30.01	29.97	29.94	0.18
1:100	500	29.69	30.23	30.03	0.91
1:500	100	31.80	30.63	31.14	1.32
1:5 000	10	31.60	32.43	31.67	1.44

3 讨论

目前利用苹果 DNA 进行 NFC 果汁鉴伪的研究国内较少见,该研究不包括基于常规 PCR 的 NFC 苹果汁 DNA 掺假的定量分析。因为在大多数国家/地区,根据监管 NFC 果汁产品的法规,禁止掺假,因此没有必要使用 PCR 分析作为定性工具^[21-22];如有必要,应首选实时 PCR 定量检测掺假,因为常规 PCR 是半定量的,并且会受到许多因素的影响而产生假阳性,因此该试验采用灵敏度高的 SYBR Green PCR 进行分析。试验采用纳米硅基磁珠(Si-OH@Fe₃O₄ NPs)^[23] 吸附苹果汁 DNA,联合 RT-PCR 技术,提出了一种高效提取 NFC 苹果汁中 DNA 并鉴别掺假的方法,即将待测样品用组织裂解液与 RNase 裂解后,再用纳米硅基磁珠(Si-OH@Fe₃O₄ NPs)吸附苹果汁 DNA,后用洗脱液洗脱吸附的 DNA;将提取的 DNA 加入设计的特异性引物进行常规 PCR 扩增;

扩增产物用琼脂糖凝胶电泳分析;观察电泳结果是否出现 164 bp 条带;出现条带后将 PCR 扩增结果测序,测序结果输入 NCBI 查询与苹果的 18S rRNA(登录号: DQ341382.1)的重复率,判断是否掺假;将提取的 DNA 加入设计的特异性引物进行实时荧光 PCR 扩增,扩增结果的 C_t 值代入掺假的线性回归方程,测得出掺假量。试验认证 NFC 苹果汁的方法可以有效地用于 NFC 苹果汁的鉴别过程中,且可以准确有效地识别掺假。

4 结论

在 CTAB 提取 DNA 方法中,加入纳米硅基磁珠($\text{Si-OH}@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ NPs)可以有效吸附苹果汁 DNA,提高苹果汁 DNA 的浓度,其最佳的操作条件是样品用量 1 mL 和颠倒混匀 3 min 用 $\text{Si-OH}@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ NPs 提取(DNA 的浓度在 50 ~ 60 ng/ μL)。

NFC 苹果汁连续稀释 DNA 的 RT-PCR 扩增标准曲线为 $y = -2.095 9x + 30.714 0$, $R^2 = 0.998 5$;掺假苹果汁中 DNA 的 RT-PCR 扩增曲线为 $y = 0.968 3x + 28.591 0$, $R^2 = 0.981 9$ 。基于新的 DNA 提取方法的 RT-PCR 技术在 NFC 苹果汁鉴别中有着良好的稳定性、可重复性、可靠性,可能成为 NFC 果汁掺假检验中追溯苹果制品种源的有用工具。

参考文献

- [1] 邓红, 雷佳蕾, 杨天歌, 等. 超高压和高温短时杀菌对 NFC 苹果汁贮藏期品质的影响[J]. 中国农业科学, 2019, 52(21): 3903-3923.
- [2] SELLAMI I, MALL V, SCHIEBERLE P. Changes in the key odorants and aroma profiles of Hamlin and Valencia orange juices not from concentrate (NFC) during chilled storage[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2018, 66(28): 7428-7440.
- [3] 杨杰, 孟祥宁, 辛力. 2017~2019 年中国苹果市场分析[J]. 落叶果树, 2019, 51(5): 5-7.
- [4] 闫旭宇, 李玲, 李娟, 等. 基于文献计量分析的陕西苹果研究现状[J]. 延安大学学报(自然科学版), 2019, 38(1): 82-86, 93.
- [5] MAGDAS D, VEDEANU N, PUSCAS R. The use of stable isotopes ratios for authentication of fruit juices[J]. Chemical papers, 2012, 66(2): 152-155.
- [6] BONONI M, QUAGLIA G, TATEO F. Preliminary LC-IRMS characterization of Italian pure lemon juices and evaluation of commercial juices distributed in the Italian market[J]. Food analytical methods, 2016, 9(10): 2824-2831.
- [7] BRICOUT J. Control of authenticity of fruit juices by isotopic analysis[J]. Journal of AOAC international, 1973, 56(3): 739-742.
- [8] 牛丽影, 胡小松, 赵镭, 等. 稳定同位素比率质谱法在 NFC 与 FC 果汁鉴别上的应用初探[J]. 中国食品学报, 2009, 9(4): 192-197.
- [9] 雷佳蕾, 田丹, 薛佳, 等. δD , $\delta^{18}\text{O}$ 和 $\delta^{13}\text{C}$ 同位素比率质谱法在鲜榨苹果汁鉴别中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(9): 234-242.
- [10] 张海亮, 吴亚君, 陈银基, 等. 食用油中 DNA 提取方法的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(11): 128-132.
- [11] 高华. 苹果栽培品种的 DNA 指纹图谱构建及遗传多样性分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2010.
- [12] 刘伟红, 许文涛, 商颖, 等. 果汁 DNA 提取方法比较及柑橘属植物分子生物学检测技术的研究[J]. 中国食品学报, 2012, 12(4): 195-201.
- [13] QIE F X, ZHANG G X, HOU J X, et al. Extracting genomic DNA of food-stuff by polyamidoamine (PAMAM)-magnetite nanoparticles [J]. Talanta, 2012, 93: 166-171.
- [14] KUMAR M, MUGUNTHAN M. Evaluation of three DNA extraction methods from fungal cultures [J]. Medical journal armed forces India, 2018, 74(4): 333-336.
- [15] ROS-CHUMILLAS M, EGEA-CORTINES M, LOPEZ-GOMEZ A, et al. Evaluation of a rapid DNA extraction method to detect yeast cells by PCR in orange juice [J]. Food control, 2007, 18(1): 33-39.
- [16] GOLINELLI L P, CARVALHO A C, CASAES R S, et al. Sensory analysis and species-specific PCR detect bovine milk adulteration of fresh (fresh) goat cheese [J]. Journal of dairy science, 2014, 97(11): 6693-6699.
- [17] VOLK H, PISKERNIK S, KURIN ČI Č, M, et al. Evaluation of different methods for DNA extraction from milk [J]. Journal of food and nutrition research, 2014, 53(2): 97-106.
- [18] LI G P, SHEN B, HE N Y, et al. Synthesis and characterization of $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ core-shell magnetic microspheres for extraction of genomic DNA from human whole blood [J]. Journal of nanoscience and nanotechnology, 2011, 11(12): 10295-10301.
- [19] 高源, 王大江, 王昆, 等. 新疆野苹果叶绿体 DNA 变异与遗传进化分析[J]. 植物遗传资源学报, 2020, 21(3): 579-587.
- [20] 杜晓云, 宋来庆, 赵玲玲, 等. 红富士苹果芽变系 DNA 甲基化研究[J]. 园艺学报, 2019, 46(1): 107-120.
- [21] 岳鹏. 应用多重 PCR 方法鉴定蔬菜水果中的芽孢杆菌[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(13): 98-99, 106.
- [22] 李富威, 高琴, 张舒亚, 等. 实时荧光 PCR 方法在食品真伪辨别中的应用[J]. 食品工业科技, 2012, 33(14): 367-370.
- [23] 刘兴菊, 杨敏生, 梁海永, 等. 河北省地方标准苹果品种 DNA 指纹鉴定: DB13/T 1767—2013[S]. 河北省质量技术监督局, 2013.