

DNA条形码技术在淀粉掺假鉴别中的应用

陈佳¹, 王爽², 周巍³, 张岩^{3,*}, 桑亚新^{1,*}

(1. 河北农业大学食品科技学院, 河北 保定 071000; 2. 山东省标准化研究院, 山东 济南 250000;

3. 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: 基于植物DNA条形码技术建立淀粉及其加工制品成分鉴别检测方法。通过提取淀粉5大物种苜蓿、马铃薯、木薯、番薯和玉米的基因组DNA为模板, 分别以ITS2、*matK*、*rbcL*和*trnH-psbA*基因通用引物进行聚合酶链式反应扩增, 并将测序结果提交GenBank数据库BLAST比对, 评价不同植物DNA条形码序列对其鉴别能力。筛选出ITS2+*trnH-psbA*为较适组合序列, 并对自行采购的5个淀粉样品和4个粉条样品进行检测。

关键词: DNA条形码; 淀粉; 粉条; 掺假鉴定

Application of DNA Barcoding in Detection of Starch Adulteration

CHEN Jia¹, WANG Shuang², ZHOU Wei³, ZHANG Yan^{3,*}, SANG Yaxin^{1,*}

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

2. Shandong Institute of Standardization, Jinan 250000, China;

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

Abstract: This study reported on the application of plant DNA barcoding technique to detect adulteration of starch and starch products. Genomic DNA samples were extracted from alfalfa, potato, cassava, sweet potato and maize and were used as templates for PCR amplification with the universal primers ITS2, *matK*, *rbcL* and *trnH-psbA*. The sequences were aligned using the basic local alignment search tool (BLAST) with those deposited in the GenBank database. The identification abilities of 4 DNA fragments were compared by success rate. Five starch samples and 4 vermicelli samples we collected were detected using the group of ITS2 + *trnH-psbA* with higher efficiency.

Keywords: DNA barcoding; starch; vermicelli; adulteration detection

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180611-159

中图分类号: TS237

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2019) 16-0281-05

引文格式:

陈佳, 王爽, 周巍, 等. DNA条形码技术在淀粉掺假鉴别中的应用[J]. 食品科学, 2019, 40(16): 281-285. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180611-159. <http://www.spkx.net.cn>

CHEN Jia, WANG Shuang, ZHOU Wei, et al. Application of DNA barcoding in detection of starch adulteration[J]. Food Science, 2019, 40(16): 281-285. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180611-159. <http://www.spkx.net.cn>

淀粉是现代食品加工业中一种重要的生产原料, 也可以作为一种重要的工业原料用于胶黏、填充等途径中^[1]。目前常见的淀粉种类有马铃薯淀粉、番薯淀粉、木薯淀粉、玉米淀粉、麦类淀粉等。其超微形态、糊化温度等理化性质存在一定的差异, 原材料成本及加工工艺的不同也造成了价格大有差别^[2-5]。随着淀粉加工、深加工

产品的丰富, 淀粉伪造或掺假问题日益突出。目前市场上发现的掺假淀粉总体分为两类, 一类是在淀粉及淀粉制品中掺入滑石粉、白陶土、非食用色素等杂质以次充好, 一类是掺入价格较低廉的植物淀粉投机销售, 如在马铃薯淀粉中掺入玉米^[6]、苜蓿、荞麦等。虽然后者的掺假现象等不会对人体健康造成严重影响, 但理化性质的

收稿日期: 2018-06-11

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项 (2017YFC1601700)

第一作者简介: 陈佳 (1982—) (ORCID: 0000-0001-9714-1843), 女, 博士研究生, 研究方向为食品安全。

E-mail: chenjia_0311@163.com

*通信作者简介: 张岩 (1979—) (ORCID: 0000-0002-2947-1629), 男, 正高级工程师, 博士, 研究方向为食品安全。

E-mail: snowwinglv@126.com

桑亚新 (1973—) (ORCID: 0000-0003-1071-8297), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品微生物。

E-mail: sangyaxin@sina.com

差异会影响食品的成色、品质,并且冒充高价格的淀粉销往市场谋取非法利润,严重扰乱市场秩序,对合法生产者和消费者来说都是一种损害。

因此,加强对淀粉及其制品的鉴别检验极为重要。淀粉的检测主要由感官指标、理化指标和卫生指标3项综合指标组成^[1]。感官检测方法简单但检测结果仅能作为辅助参考。理化检测耗时费力,并且对于第2类掺假问题难以准确鉴别。目前对淀粉掺假研究的检测方法有扫描电镜、稳定碳同位素比质谱技术^[7]、碘试剂显色反应等。准确判定淀粉掺假,确保食品标签制度的有效实施,需要灵敏、可靠的检测方法鉴定植物源食品的物种来源。

DNA条形码技术基本原理是利用标准的、具有足够变异的、易扩增且相对较短的DNA片段在种内的特异性和种间多样性,实现对物种的快速自动鉴定^[8-10]。目前该技术在植物领域的研究和应用稍落后于动物类群的研究^[11-17],植物DNA条形码的选择及评价缺乏统一的标准。目前植物领域DNA条形码候选片段主要集中于叶绿体和核糖体中,主要包括成熟酶K蛋白(maturase K protein, *matK*)、质体间隔区、1,5-二磷酸核酮糖羧化酶(*ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase*, *rbcL*)、核糖体内转录间隔区(internal transcribed spacers, ITS)等其他单片段^[9,18-19]。但大量研究结果表明,单片段的植物DNA条形码存在一定局限性而分辨率较低,因此有研究^[20-21]提出植物条形码片段组合理念,利用优势互补提高植物种类的鉴定识别率。研究表明陆地植物中较为可行的组合是*rbcL*(科级)+*matK*(属级)+ITS和(种级)^[8]。目前国内对于DNA条形码技术的研究重要集中在单一科属动植物的分类鉴定^[22-23],对于食品掺假鉴定的相关文献较少^[24-25],尤其是植物性食品掺假鉴定方面鲜有报道。

本研究使用ITS2、*rbcL*、*matK*、*trnH-psbA*序列的通用引物对苜蓿、马铃薯、木薯、番薯、玉米5大淀粉原物种进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增和测序比对,比较各序列的扩增效率和测序成功率,评价不同DNA条形码候选序列对淀粉原物种的鉴别能力,筛选出较适合的DNA条形码组合,并对市售淀粉及粉条制品进行物种鉴定和掺假判定,为植物DNA条形码技术在植物源食品的检测技术提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

研究用样本主要选择淀粉加工类品种,苜蓿(青海苜蓿、本草苜蓿)、马铃薯(系薯1号、安薯56号、晋薯5号)、木薯(华南7号、华南8号、面包木薯)、番薯

(商薯9号、漯薯10号、徐薯32号、渝薯17号)、玉米(良玉99、登海6702、中单909)由河北农业大学提供,待测样本5种淀粉、4种粉条制品均为市购。

植物基因组DNA提取试剂盒、Premix Taq、Marker(1 000 bp) 宝生物工程(大连)有限公司; GelRed、琼脂糖 生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 仪器与设备

LX-100手掌型离心机 海门市其林贝尔仪器制造有限公司; DYY-III2稳压稳流电泳仪 北京六一仪器厂; BS-124S分析天平 北京赛马利公司; 紫外凝胶成像系统、S1000 thermal cycler基因扩增仪 美国伯乐公司; 1-15pk冷冻离心机 德国Sigma公司; NanoDrop 1000微量核算蛋白测定仪 美国Thermo公司。

1.3 方法

1.3.1 DNA提取

阳性样本及待测样本基因组DNA提取均采用植物基因组DNA提取试剂盒,按照试剂盒使用说明书进行基因组DNA提取。

1.3.2 PCR扩增

PCR扩增所用通用引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物序列见表1。

表1 基因引物序列
Table 1 Primer sequences used in this study

基因	上游引物 (F-Primer 5'-3')	下游引物 (R-Primer 5'-3')	退火温度/℃
ITS2	GACGCTTCTCCAGACTACAAT	ATGCGATCTTGGTGTGAAT	54
matK	ATTCTCGCTTTGATTGTCG	CAAAGATTACACCTGAGCC	56
rbcL	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	CTTCTGTACAATAAGAATCGATCTC	56
trnH-psbA	CGCGCATGGTGATTCACAATCC	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	58

PCR体系(50 μL): 模板DNA 5 μL; Premix Taq 25 μL; 正向引物(10 μmol/L) 2 μL; 反向引物(10 μmol/L) 2 μL; 无菌水定容到50 μL。PCR扩增程序: 95℃预变性5 min; 95℃变性30 s, 54~58℃退火30 s, 72℃延伸40 s, 反应36个循环; 72℃延伸10 min。

PCR扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳分离,使用凝胶成像系统分析扩增产物。

1.3.3 PCR产物测序及比对

PCR产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行双向测序,测序引物同于扩增引物。所得的测序结果经拼接并删除两端引物序列,提交GenBank进行BLAST比对。

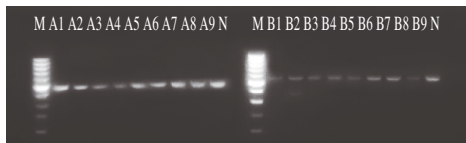
1.3.4 引物通用性验证

将苜蓿、马铃薯、木薯、番薯、玉米分别按照1.3.1节进行基因组DNA提取,经PCR扩增和产物测序比对后验证选择引物对的通用性。

909) 进行DNA条形码的引物验证。由表4可知, 苜蓿、番薯、玉米3个物种的不同品种均能通过*ITS2*引物扩增并完成比对鉴定, 苜蓿、马铃薯、木薯、番薯4个物种的不同品种均能通过*trnH-psbA*引物扩增并完成比对鉴定, 因此可以说明*ITS2*和*trnH-psbA*引物组合的通用性良好。

2.4 实际样品的DNA鉴定

试剂盒法提取抽检的4个粉条样品和5个淀粉样品的基因组DNA, 分别利用*ITS2*基因和*trnH-psbA*基因引物进行PCR扩增, 并以无菌水作DNA模板进行阴性对照^[26], 扩增结果如图2所示。阴性对照组无扩增条带, 证明PCR体系未污染。粉条和淀粉样品均扩增出400~600 bp大小的条带, 且条带清晰未有杂带, 扩增效率较高。



A. *ITS2*基因; B. *trnH-psbA*基因; 1~9.粉条1~4和淀粉1~5样品。

图2 待测样品基因片段的PCR扩增电泳图

Fig. 2 Electrophoresis profiles of genes amplified by PCR from samples

将上述PCR扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行双向测序, 并将测序结果提交GenBank进行BLAST比对分析, 比对结果均为苜蓿属, 结果如表5所示。

表5 抽检样品物种鉴定结果
Table 5 Species identification of samples

样品	粉条				淀粉				
	1	2	3	4	1	2	3	4	5
<i>ITS2</i>	苜蓿	苜蓿	苜蓿	苜蓿	苜蓿	苜蓿	苜蓿	苜蓿	苜蓿
<i>trnH-psbA</i>	苜蓿	苜蓿	苜蓿	苜蓿	苜蓿	苜蓿	苜蓿	苜蓿	苜蓿
MuXu	苜蓿	苜蓿	苜蓿	N	苜蓿	苜蓿	苜蓿	苜蓿	苜蓿

为进一步验证结果的可靠性, 根据苜蓿叶绿体间隔区序列(HQ199041.1)设计苜蓿特异性引物Primer-F: 5'-GACGTGTTTCGTAAAG-3', Primer-R: 5'-CTCGAAAAAGCCTTCT-3', 进行PCR扩增验证。如表5所示, 5个淀粉样品和3个粉条样品测序比对均为苜蓿, 粉条4样品因PCR扩增效率低未得到结果。综合分析以上结果, 自行购买的粉条和淀粉样品均掺有苜蓿成分, 与样品包装标签成分不符, 可判定为掺假样品。

3 讨论

DNA条形码技术是当今生物研究的热点之一, 它操作简单, 不受个体发育阶段和形态特征的限制, 并可

以作为传统分类学的辅助手段, 解决物种鉴定分类等难题^[9]。理想的DNA条形码应符合一些基本标准: 1) 具有足够的遗传变异性和一定的分化度; 2) 标准的DNA片段; 3) 包含足够的系统进化信息; 4) 便于通用引物设计; 5) 目标DNA足够短, 便于提取和扩增。虽然DNA条形码的研究仍存在一定的争议, 但其在动物分类学中的研究已相对成熟, 并选取动物细胞色素C氧化酶I基因(*coi*)作为动物界标准基因^[27]。生命条形码联盟植物工作组决定将叶绿体中的*rbcL*和*matK*两个基因片段作为植物DNA条形码核心条码, 核基因的*ITS*片段和叶绿体中的*trnH-psbA*片段作为补充条码^[11]。

本研究结果显示, *ITS*和*trnH-psbA*序列有效获得率较高, 并筛选出*ITS2*和*trnH-psbA*为较适片段组合, 这与前人的研究结果一致。Kress等^[18]认为多基因片段组合可实现植物类群的条形码鉴定, 并提出*ITS*和*trnH-psbA*是较好的选择。陈之端等^[27]利用*rbcL*和*ITS*两个DNA片段对桦木科6属36种个体取样分析, 建立了桦木科的系统发育, 揭示了桦木科属间系统关系。陈士林等^[28-29]在药用植物中筛选DNA条形码, 发现*ITS2*在种级水平上的分辨率可以达到92.7%。侯新东等^[30]对荨麻科植物DNA条形码筛选的研究中发现, *trnH-psbA*、*ITS2*、*rbcL*和*matK*序列有效获得率分别为95.4%、92.3%、90.1%和0%, 且*trnH-psbA*、*ITS2*、*rbcL*可作为鉴别荨麻科植物的有效DNA组合。

植物性食源物种种类多且复杂, 加工工艺的提高使得植物性制品的原料很难通过形态特征等判定。食品加工制造业的不法商家在加工品中掺杂使假、以次充好, 以低价原料冒充高价原料加工销售, 扰乱公平竞争社会风气, 损害消费者和守法生产商的利益。本研究结合*ITS2*和*trnH-psbA*组合对抽检的淀粉和粉条制品进行鉴定, 经测序比对发现均掺有苜蓿成分。苜蓿与其他植物源材料相比, 价格低廉。虽然掺入的苜蓿成分对人体无害, 但其与产品标签标注不符, 存在商业欺诈行为。植物DNA条形码技术的应用前景广, 但需要DNA条形码数据库序列的不断完善, 因此目前DNA条形码在产品鉴定中的应用较少。本研究为植物DNA条形码技术在植物源食品物种鉴定方面的应用提供一定参考。

参考文献:

- [1] 潘显玲, 朱凤玲, 张延文. 浅谈淀粉掺假使杂的快速检测方法[J]. 山东食品发酵, 2003(3): 43-44.
- [2] 白洁, 彭义文, 刘丽莎, 等. 薯类原料膨化特性及其膨化粉品质特性[J]. 食品科学, 2018, 39(15): 48-53. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201815007.
- [3] 汪兰, 任斯忱, 杜欣, 等. 不同品种马铃薯淀粉物化特性与组成结构的关系[J]. 食品科学, 2010, 31(21): 39-44. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201021008.
- [4] 赵米雪, 包亚莉, 刘培玲. 淀粉颗粒微观精细结构研究进展[J]. 食品科学, 2018, 39(11): 284-294. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201811044.

- [5] 赵蓓蓓, 贾祥泽, 孙思薇, 等. 淀粉-多酚复合物理化及功能特性的研究进展[J]. 食品科学, 2018, 39(13): 297-303. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201813044.
- [6] 孙琛, 石地娟, 杨文英. 木薯淀粉中掺杂普通玉米淀粉的检测方法研究[J]. 粮食与饲料工业, 2013(11): 28-29; 34. DOI:10.7631/j.issn.1003-6202.2013.11.008.
- [7] 王绍清, 武士奎, 穆同娜, 等. 扫描电镜和稳定碳同位素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.
- [8] 任保青, 陈之端. 植物DNA条形码技术[J]. 植物学报, 2010, 45(1): 1-12. DOI:10.3969/j.issn.1674-3466.2010.01.001.
- [9] 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.
- [10] 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. DOI:10.3969/j.issn.1672-5565.2012.02.05.
- [11] 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. DOI:10.3969/j.issn.1000-4440.2013.06.042.
- [12] HEBERT P D N, PENTON E H, BURNS J M, et al. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(41): 14812-14817. DOI:10.1073/pnas.0406166101.
- [13] 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. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201509046.
- [14] 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. DOI:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2013.08.008.
- [15] HAYE P A, SEGOVIA R D, VENTOLEROA 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. DOI:10.1016/j.foodcont.2013.02.018.
- [16] 裴勇才, 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. DOI:10.3724/SP.J.1003.2013.12059.
- [17] LIU Z H, 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. DOI:10.1016/j.gene.2012.02.016.
- [18] 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. DOI:10.1371/journal.pone.0000508.
- [19] KIM K J, KRESS W J, SCHNEIDER H, et al. A DNA barcode for land plants[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America, 2009, 106(31): 12794-12797. DOI:10.1073/pnas.0905845106.
- [20] TAVARES E S, BAKER A J. Single mitochondrial gene barcodes reliably identify sister-species in diverse clades of birds[J]. BMC Evolutionary Bioinformatics, 2008, 8: 81. DOI:10.1186/1471-2148-8-81.
- [21] WARD R D, ZEMLAK T S, INNES B H, et al. DNA barcoding Australia's fish species[J]. Philosophical Transactions Royal Society: Biological Sciences, 2005, 360(1462): 1847-1857. DOI:10.1098/rstb.2005.1716.
- [22] 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. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.1.030.
- [23] 李燕, 吴丁, 高连朋. 裸子植物DNA条形码ITS2高通用性引物的筛选[J]. 植物分类与资源学报, 2013, 35(6): 751-760. DOI:10.7677/ynzwjy201313190.
- [24] 许亮, 刘春生, 杨燕云, 等. DNA条形码技术鉴定一种植物样品的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(7): 127-129. DOI:10.13422/j.cnki.Syfix.2014070127.
- [25] 李楠, 江涛, 沈青, 等. 应用DNA条形码技术鉴定烤鱼片、鱼干中河鲀鱼种[J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(2): 111-114. DOI:10.3969/j.issn.1009-4393.2012.33.058.
- [26] 邱德义, 胡佳, 刘德星, 等. DNA条形码技术在肉品防欺诈鉴别中的应用[J]. 肉类研究, 2013, 27(4): 40-43.
- [27] 陈之瑞, 路安民. 桦木科植物的系统发育和演化[J]. 中国科学院院刊, 2001(3): 188-191.
- [28] 陈士林, 宋经元, 姚辉, 等. 药用植物DNA条形码鉴定策略及关键技术分析[J]. 中国天然药物, 2009, 7(5): 322-327.
- [29] CHEN S L, YAO H, HAN J P, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species[J]. PLoS ONE, 2010, 5(1): e8613. DOI:10.1371/journal.pone.0008613.
- [30] 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. DOI:10.3969/j.issn.2095-1191.2014.2.178.