

茶叶中掺杂大米成分实时荧光 PCR 检测方法的建立和应用

黄迎波, 黄才新, 江杰, 袁小雅, 朱金国 (长沙海关, 湖南长沙 410004)

摘要 为探索茶叶中掺杂大米的快速检测方法, 根据大米内源 PLD 基因建立茶叶掺杂大米成分的实时荧光 PCR 检测方法。通过对样品前处理、方法特异性、方法灵敏度、污染因素的分析, 认为该方法用于检测茶叶中掺杂大米成分可以达到理想效果, 操作简便, 检测结果可靠性高, 重复性好, 结果判读直观无污染。利用所建立的方法对 36 份茶叶样品进行分析, 发现 6 批次产品一定程度上掺杂了大米成分。

关键词 茶叶; 大米; PLD 基因; 实时荧光 PCR; 检测方法

中图分类号 TS272.7 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)20-0174-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.20.045



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Establishment and Application of Real-time Fluorescent PCR Detection Method for Doped Rice Components in Tea

HUANG Ying-bo, HUANG Cai-xin, JIANG Jie et al (Changsha Customs, Changsha, Hunan 410004)

Abstract In order to explore the rapid detection method of doped rice in tea, a real-time fluorescent PCR detection method based on rice endogenous PLD gene was established. Through the analysis of sample pretreatment, method specificity, method sensitivity and pollution factors, it was considered that the method could be used to detect the doped rice components in tea, which could achieve ideal results, easy operation, high reliability and good repeatability. The interpretation was intuitive and pollution-free. Using the established method to analyze 36 tea samples, it was found that the 6 batches of products were doped with rice ingredients to some extent.

Key words Tea; Rice; PLD gene; Real-time fluorescent PCR; Detection method

近年来随着茶叶需求量不断增长, 茶叶消费市场以次充好、假冒伪劣甚至掺杂掺假时有发生, 给正常的茶叶消费和进出口贸易造成不良影响^[1-2]。其中茶叶中掺假问题越来越严重, 一些不法商贩为获得高利润在茶叶中掺杂各种谷类物质, 于茶叶初制或加工过程中加入, 其目的是将茶叶重新造型, 促成条状; 或使粗老茶、回笼茶扭成条, 增进重实感; 或是利用谷物淀粉糊的黏性, 掺入一些沙土、木灰、煤屑等; 或上述掺伪兼而有之^[3-4]。

随着科学技术的发展, 分子生物学鉴定技术逐渐渗透到各个生物领域, 特别是 PCR 技术具有快速、灵敏、特异性高的特点, 已广泛应用于食品、饲料中外源成分的鉴定^[2-12]。目前, 鲜见应用该技术检测茶叶中掺杂大米成分的报道。该

研究根据大米内源 PLD 基因建立茶叶中掺杂大米的实时荧光 PCR 检测方法, 以期能够快速、准确地检测出茶叶中掺杂的大米成分。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试材。 36 份茶叶抽取自茶叶生产企业, 从市场采购的大米作为阳性对照、金银花作为阴性对照。

1.1.2 试剂。 PCR 试剂购置 Promega 公司, 植物 DNA 提取试剂盒购置天根公司。大米 PLD 内源基因实时荧光 PCR 引物探针见表 1。

1.1.3 仪器。 LightCycler 480 II (96) 荧光定量 PCR 仪, NANOVue 微量分光光度计, Retsch GM 200 粉碎破碎机。

表 1 大米 PLD 基因实时荧光 PCR 引物探针

Table 1 Real-time fluorescent PCR primer probe for rice PLD gene

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	引物来源 Primer source
PLD 上游引物	5'-TGGTGAGCGTTTTGCAGTCT-3'	SN/T 2584—2010 ^[15]
PLD 下游引物	5'-CTGATCCACTAGCAGGAGGTCC-3'	SN/T 2584—2010 ^[15]
PLD 探针	5'-FAM-TGTTGTCTGCCAATGTGGCCTG-TAMRA-3'	SN/T 2584—2010 ^[15]

1.2 试验方法

1.2.1 样品前处理。

(1) 手工研磨法。随机选取 4 份茶叶(编号分别为 073、513、514、519)和含 10% 大米成分的茶叶, 分别称取约 1 g 于研钵中, 加入液氮迅速研磨成茶粉。

(2) 机器打碎法。随机选取 4 份茶叶(编号分别为 073、

513、514、519)和含 10% 大米成分的茶叶, 分别称取约 100 g, 用 Retsch GM 200 粉碎破碎机进行打碎, 直至茶叶打成粉末状。

1.2.2 基因组 DNA 的提取。 采用天根植物基因组 DNA 提取试剂盒提取茶叶、大米和金银花中的 DNA; 同时将不同质量的大米磨成粉末状掺入到茶叶中, 设置 4 个梯度, 分别为 10.0%、3.0%、1.0% 和 0.1%, 采用机器打碎法粉碎样品, 再用天根植物基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA; 提取的 DNA 在 NANOVue 微量分光光度计上测定基因组 DNA 的浓度。

1.2.3 实时荧光 PCR 检测。 20 μL 反应体系: Promega GoTaq

基金项目 海关总署动植司科研项目“‘一带一路’检验检疫能力提升”。

作者简介 黄迎波(1979—), 女, 湖南浏阳人, 高级农艺师, 硕士, 从事农产品中转基因成分检测和科研工作。

收稿日期 2021-11-15; **修回日期** 2021-12-16

qPCR Master Mix (2×) 10 μL、10 μmol/L 的上下游引物各 1 μL、10 μmol/L 的荧光探针 1 μL、Rnase-free water 2 μL, 最后加入 DNA 模板 5 μL。各样品设一个平行反应, 并设置阴性、阳性和空白对照。反应程序: 50 °C 2 min, 95 °C 10 min; 然后 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 共 40 个循环。使用 Lightcycler 480 II 荧光定量 PCR 仪进行实时荧光 PCR 扩增并观察记录结果。

1.2.4 方法的特异性和灵敏度。 选取未含大米成分的茶叶样品、金银花和含 10% 大米成分的茶叶样品进行实时荧光 PCR 扩增, 用大米 DNA 作阳性对照, 检测引物探针特异性。用含 10.0%、3.0%、1.0% 和 0.1% 大米成分的茶叶样品进行灵敏度试验。

1.2.5 模拟生产污染因素。 根据茶叶生产过程中可能存在污染的情况, 对可能涉及污染的环节进行模拟试验。用粉碎过大米的破碎机杯体不经洗涤直接粉碎未掺大米成分的茶叶样品, 用粉碎过掺杂大米成分茶叶的破碎机配套杯体不经洗涤直接粉碎未掺大米成分的茶叶样品, 再将这 2 个样品与阴性茶叶样品、掺杂 0.1% 大米的茶叶样品、大米样品一起进行荧光定量 PCR 检测。

1.2.6 茶叶抽检。 从 30 家茶叶企业抽取 36 批次产品, 包括绿茶、红茶、黑茶、白茶、眉茶、茯砖等种类, 开展茶叶掺杂使假专项检测; 基于该研究所建立的大米内源 PLD 基因实时荧光 PCR 检测方法对茶叶进行掺杂大米成分检验。

2 结果与分析

2.1 不同前处理方法提取 DNA 的浓度 茶叶中掺杂大米成分的量对检测结果的判定有直接影响, 所以前处理样品的取样量十分关键。该研究采用 2 种常用方法对随机选取的 4 份茶叶 (编号分别为 073, 513, 514, 519) 和含 10% 大米成分的茶叶进行前处理和 DNA 浓度比较分析, 手工研磨法取样量少, 提取的 DNA 浓度较低; 机器打碎法取样量大, 提取的 DNA 浓度较高, 具体结果见表 2。

2.2 PLD 基因实时荧光 PCR 扩增的特异性和灵敏度 用 2 种前处理方法 (手工研磨法、机器打碎法) 粉碎含 10% 大米成分的茶叶样品都有明显的扩增曲线, 破碎机打碎法的扩增曲线更显著 (图 1)。用未含大米成分的茶叶样品、金银花和含 10% 大米成分的茶叶样品进行实时荧光 PCR 扩增结果见图 2, 可见引物和探针仅对大米阳性对照和含 10% 大米成分的茶叶扩增阳性, 有明显的“S”型扩增曲线, 对未含大米成分的茶叶和金银花扩增阴性, 表明该引物和探针特异好。

将含 10.0%、3.0%、1.0% 和 0.1% 大米成分的茶叶样品提取 DNA 后进行实时荧光 PCR 扩增, 扩增曲线见图 3。从图 3 可以看出, 含 10.0%、3.0%、1.0% 和 0.1% 大米的茶叶基因组 DNA 都有显著的“S”型扩增曲线, 因此实时荧光 PCR 的灵敏度能达到 0.1%。

2.3 生产污染对检测结果的影响 模拟生产污染的 2 个样品与掺杂 0.1% 大米的茶叶样品同时进行实时荧光定量 PCR 检测, 结果见图 4。从图 4 可以看出, 用粉碎过掺杂大米成分

茶叶的破碎机配套杯体不经洗涤直接粉碎的阴性茶叶样品无扩增曲线, 用粉碎过大米的破碎机杯体不经洗涤直接粉碎的阴性茶叶样品在 35 个循环以后有扩增, 而掺杂 0.1% 大米的茶叶样品在 32 个循环左右出现扩增, 表明生产污染对使用该方法检测茶叶掺杂大米成分试验结果基本无影响。

表 2 机器打碎和手工研磨方法提取茶叶样本基因组 DNA 的浓度
Table 2 The concentration of genomic DNA in tea samples extracted by machine crushing and manual grinding

样本编号 Sample No.	OD _{260 nm/280 nm}	浓度 Concentration μg/mL
073-1	1.822	133.0
073-2	1.869	92.5
073-3	1.887	58.5
073-4	1.851	43.5
513-1	1.837	79.0
513-2	1.833	73.0
513-3	1.857	32.5
513-4	1.825	49.5
514-1	1.847	90.5
514-2	1.838	107.5
514-3	1.835	89.0
514-4	1.850	37.0
519-1	1.838	68.0
519-2	1.881	55.5
519-3	1.829	37.5
519-4	1.878	38.5
含 10% 大米茶叶-1 Contains 10% rice tea-1	1.859	125.5
含 10% 大米茶叶-2 Contains 10% rice tea-2	1.871	94.5
含 10% 大米茶叶-3 Contains 10% rice tea-3	1.838	34.0
含 10% 大米茶叶-4 Contains 10% rice tea-4	1.878	69.5

注: 编号为 X-1, X-2 的样本为机器打碎样; 编号为 X-3, X-4 的样本为手工研磨样

Note: The samples numbered X-1 and X-2 are machine crushing samples; the samples numbered X-3 and X-4 are manual grinding samples

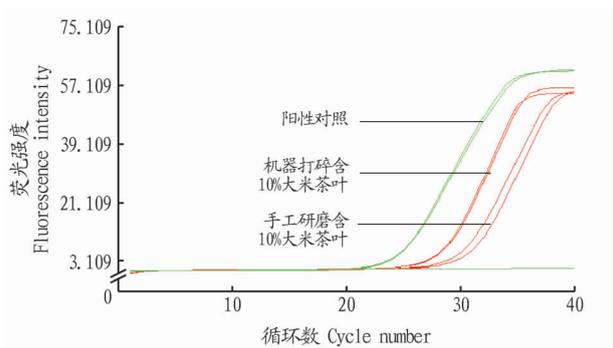


图 1 2 种方法前处理含 10% 大米茶叶样品基因组 DNA 的实时荧光 PCR 扩增

Fig.1 Real-time fluorescent PCR amplification of genomic DNA of tea samples containing 10% rice tea samples pretreated by two methods

2.4 茶叶抽检结果 对 30 家茶叶企业抽检的 36 批茶叶样品进行实时荧光定量 PCR 检测, 其中 6 批样品检出大米 PLD 基因且均为绿茶, 检出率为 17% (表 3); Ct 值均在 31 以下,

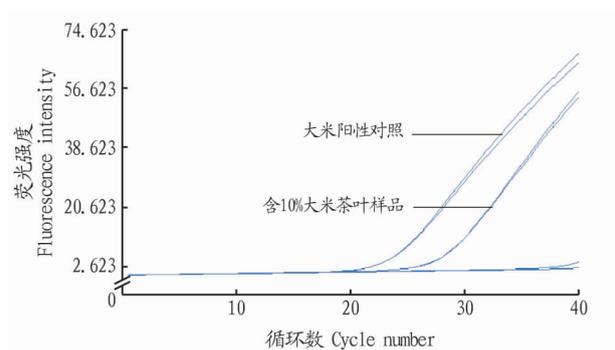


图2 实时荧光 PCR 引物探针特异性试验扩增曲线

Fig.2 Real-time fluorescent PCR primer probe specific test amplification curve

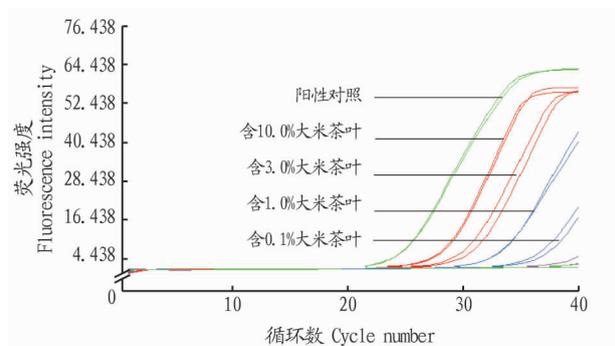


图3 实时荧光 PCR 灵敏度试验扩增曲线

Fig.3 Real-time fluorescence PCR sensitivity test amplification curve

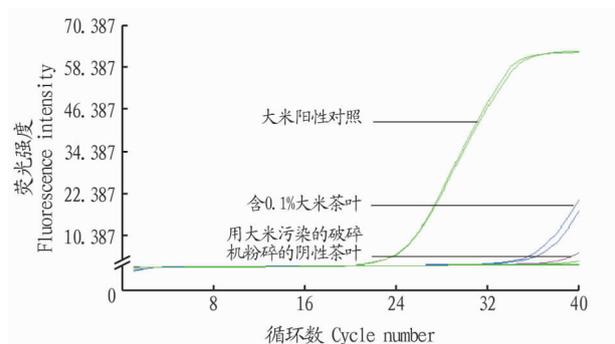


图4 生产污染模拟试验实时荧光 PCR 扩增曲线

Fig.4 Real-time fluorescent PCR amplification curve of production pollution simulation test

分别来自 5 家企业。

3 小结与讨论

该研究建立了基于 PLD 基因检测茶叶中是否掺杂大米成分的实时荧光 PCR 检测方法,研究了方法的特异性和灵敏度,模拟生产污染环节排除假阳性可能。使用该方法时,仅直接观察实时荧光扩增曲线图,2 h 就可以准确检测某茶叶样品是否掺杂大米成分,灵敏度能达到 0.1%。该方法具有较高的检测灵敏度和准确度,操作简便,不容易出现假阳

性,可作为茶叶样品中掺杂大米成分的快速检测方法,在茶叶掺杂谷物类物质检测把关上具有较好的应用前景。

表3 茶叶抽检结果汇总

Table 3 Summary of tea sampling results

产品 Sample	掺米糊检测批次 Mixed rice cereal testing batch	掺米糊不合格批次 Unqualified batches mixed with rice paste	不合格率 Unqualified rate // %
绿茶(绿碎) Green tea (green crushed)	23	6	26
红茶(红碎) Black tea (red crushed)	2	0	0
黑茶 Black tea	10	0	0
白茶 White tea	1	0	0
合计 Total	36	6	17

利用所建立的方法对 36 份茶叶样品进行了检测,发现 5 家企业的 6 批次茶叶产品都不同程度检出含有大米成分,检出率为 17%。经对检出原因进行调查分析,6 批次产品中,有 1 批次茶叶由于生产企业已经销售完毕,无法实现进一步追溯调查,有 4 批次茶叶原料使用了珠茶原料或珠茶副产品,不属于违规行为(食品安全标准中明确珠茶在整型过程中可依据传统工艺添加糯米糊);有 1 批次茶叶是由于原料供应商为了塑形在加工过程中违规添加糯米糊。向绿茶(眉茶)里混入加工过的大米成分的违规行为,在今后的茶叶掺杂使假专项检测活动中应重点关注。

参考文献

- [1] 叶素琼.19 世纪中英茶叶贸易中的掺假作伪问题研究[D].长沙:湖南师范大学,2017.
- [2] 王旻璇,张永杰.基于植物 rbcL 基因测序对茶叶进行掺杂检验[J].生物工程学报,2018,34(2):275-281.
- [3] 张吉红,潘登,余澍琼,等.茶叶中掺杂小麦 DNA 的提取及检测方法的比较[J].贵州农业科学,2013,41(6):148-150,154.
- [4] 余澍琼,张吉红,赵旭东,等.掺杂玉米茶叶的基因组 DNA 提取与 PCR 检测方法建立[J].湖北农业科学,2013,52(22):5615-5617.
- [5] 高琴,宗凯,杨捷琳,等.食品及调味品中罂粟成分的实时荧光 PCR 检测方法[J].中国调味品,2016,41(12):113-117.
- [6] 林瑞助.茶中掺淀粉的快速检验[J].福建茶叶,1992(1):29.
- [7] 王兵,臧光楼.茶叶的品质鉴定和真假鉴别[J].江苏食品与发酵,2002(2):27-28.
- [8] GALIMBERTI A, DE MATTIA F, LOSA A, et al. DNA barcoding as a new tool for food traceability[J]. Food Res Int, 2013, 50(1):55-63.
- [9] MISHRA P, KUMAR A, NAGIREDDY A, et al. DNA barcoding: An efficient tool to overcome authentication challenges in the herbal market[J]. Plant Biotechnol J, 2016, 14(1):8-21.
- [10] DE CASTRO O, COMPARONE M, DI MAIO A, et al. What is in your cup of tea? DNA Verity Test to characterize black and green commercial teas[J]. PLoS One, 2017, 12(5):1-17.
- [11] LI M, WONG Y L, JIANG L L, et al. Application of novel loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid authentication of the herbal tea ingredient *Hedyotis diffusa* Willd. [J]. Food Chem, 2013, 141(3):2522-2525.
- [12] 余澍琼,张吉红,崔俊霞,等.利用环介导等温扩增技术检测茶叶中掺杂的大豆成分[J].安徽农业科学,2015,27(8):1479-1483.
- [13] 陈红运,梁新苗,陈双雅,等.水稻及其产品中转基因成分实时荧光 PCR 检测方法:SN/T 2584—2010[S].北京:中国标准出版社,2010.