

蜂蜜中蜜源植物成分的微流体芯片检测方法研究

季小荣¹, 徐文君², 李洁莉¹, 朱晓军¹, 邹洁¹, 周玮^{1*}

(1. 江苏省产品质量监督检验研究院, 南京 210007; 2. 江苏省食品药品监督检验研究院, 南京 210000)

摘要: **目的** 建立微流体芯片检测方法, 用于蜂蜜掺伪的鉴别。**方法** 本研究使用纳米技术提取蜂蜜中的核酸, 建立了包括8种蜜源植物和4种糖浆来源植物特征序列的微流体芯片检测方法, 并对该方法的特异性进行测试。同时以桉树为例, 对方法的灵敏度进行测试, 并对收集的64个蜂蜜样品进行检测。**结果** 测试结果表明, 该方法可以有效区分蜂蜜中12种植物成分, 且桉树样本DNA含量(ng)的对数值与Ct值呈负相关关系, 并初步得出其检出限约为 1.0×10^{-5} ng。64个样品中有47个样品提取出符合要求的DNA。使用微流体芯片结合荧光PCR技术可一次性从提出的核酸中检测蜂蜜中8种常见的蜜源植物成分和4种糖浆来源植物, 15个样品检测结果为阳性。**结论** 该方法具有简便快捷、高灵敏度、高通量的特点, 可以用于蜂蜜中蜜源植物检测和掺伪的鉴定。

关键词: 蜂蜜; 核酸提取; 蜜源植物; 微流体芯片

Study on microfluidic chip detection method of honey plant species in honey

Ji Xiao-Rong¹, Xu Wen-Jun², Li Jie-Li¹, Zhu Xiao-Jun¹, Zou Jie¹, Zhou Wei^{1*}

(1. Jiangsu Product Quality Testing and Inspection Institute, Nanjing 210007, China; 2. Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a microfluidic chip detection method for the identification of honey adulteration. **Methods** The nucleic acid in honey was extracted by nanotechnology, and a microfluidic chip detection method including the characteristic sequences of 8 kinds of honey derived plants and 4 kinds of syrup derived plants was established, and the specificity of this method was tested. At the same time, the sensitivity of the method was tested with *Eucalyptus* as an example, 64 honey samples collected were tested. **Results** The test results showed that this method could effectively distinguish 12 kinds of plant components in honey, and the DNA content of *Eucalyptus* samples had a negative correlation with Ct value, and preliminarily concluded that the limit of detection was about 1.0×10^{-5} ng. Forty-seven of the 64 samples were able to extract DNA that met the requirements. Microfluidic chip combined with fluorescence PCR technology could be used to detect 8 kinds of common honey plant species and 4 kinds of syrup plant components at one time, and 15 samples were all positive. **Conclusion** This method is quick, high sensitivity and high throughput, and can be used for the detection and identification of honey plant species in honey.

KEY WORDS: honey; DNA extract; honey plant species; microfluidic chip

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFC1605100)、江苏省市场监督管理局科技计划项目(KJ196040)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2019YFC1605100), and the Science and Technology Planning Project of Jiangsu Market Supervision and Administration Bureau (KJ196040)

*通信作者: 周玮, 硕士, 正高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: 29427500@qq.com

*Corresponding author: ZHOU Wei, Master, Senior Engineer, Jiangsu Product Quality Testing and Inspection Institute, No.5, Guanghua East Road, Nanjing 210007, China. E-mail: 29427500@qq.com

0 引言

蜂蜜作为一种由蜜蜂采集植物的花蜜或者分泌物, 经自身含有的特殊物质酿造而成的甜味物质, 含有糖类、水分、矿物质、维生素、蛋白质、氨基酸、黄酮等 180 种物质, 具有独特的食疗保健功效^[1-3]。蜂蜜根据来源不同可分为单花种蜂蜜和杂蜂蜜, 单花种蜂蜜是指以某一植物花期为主的蜂蜜^[4]。我国大约有 30 种单花种蜂蜜, 如洋槐蜜、椴树蜜、紫云英蜜、龙眼蜜、荔枝蜜等^[5]。不同植物来源的单花种蜂蜜的营养成分、口感等的差异较大, 因此价格存在较大差异^[6]。2012 年的一项调查显示, 洋槐蜜、紫云英蜜和椴树蜜是我国价格较高的蜜种^[7]。由于蜂蜜是仅有的天然产生而无需进行深加工的有机甜味剂, 具有良好的经济价值, 蜂蜜掺伪问题成为全球蜂蜜行业共同需要面对的问题^[8]。目前蜂蜜掺伪有 3 种主要形式: 天然蜂蜜中添加甜味剂、用低价值的蜂蜜替代高价值的蜂蜜、用甜味剂(通常是糖浆)来饲喂蜜蜂^[9]。前两种掺伪方式比较常见。研究表明, 肝脏最易受蜂蜜掺假物影响, 其次是肾脏、心脏和大脑^[10]。为了及时发现及时阻止蜂蜜掺伪行为, 研发蜂蜜掺伪检测方法十分有必要。

目前, 蜂蜜掺伪检测方法主要包括感官鉴别、化学检测法和分子生物学检测法。感官鉴别需要由具有相当经验的专家根据蜂蜜的黏度、绵性或使用显微镜观察蜂蜜中花粉粒的数量和形态来进行鉴别^[11]。化学检测法主要是检测蜂蜜或蜂蜜掺假化合物的一些特征性化合物含量, 如通过淀粉酶含量的测定推测是否添加了淀粉酶水解糖浆, 通过 C4-植物糖的测定来推测是否添加了 C4 植物(玉米和甘蔗)来源的糖浆, 通过 C3-植物糖的测定来推测是否添加了 C3 植物(大米和甜菜)来源的糖浆^[12]。通过对蜂蜜化学组分的分析可以获知蜂蜜产品及其植物来源的相关信息, 蜂蜜中的挥发性有机物、多酚、糖类及其他成分都与蜂蜜的植物来源有关, 植物来源是决定蜂蜜成分的重要因素之一^[13]。目前常用的化学检测法包括薄层色谱法^[14]、稳定碳同位素比率法^[15-16]、气相色谱法^[17]、气相色谱-质谱法^[18]、液相色谱-质谱法^[19]、离子色谱法^[20]、核磁共振法^[21-22]、拉曼光谱法^[23]、红外光谱法^[24-25]、紫外光谱法^[26]等。近年, 蜂蜜掺伪技术日益专业化和规模化^[27-28], 掺假蜂蜜和真蜂蜜的理化指标具有极高的相似度, 掺假蜂蜜虽然在技术指标上符合国家标准, 但不具有天然蜂蜜的营养保健价值, 因此已经不能简单地通过理化指标的差异进行真假鉴别^[29]。分子生物学检测手段是确定食品来源的有效手段, 近年来, 基于蜂蜜中所含的来源于蜜蜂或蜜源植物的花蜜或花粉中的少量蛋白质和核酸的分子生物学检测法也被用来进行蜜源植物成分分析, 同种蜜源植物具有遗传相似性, 同一种蜜源植物遗传上的次生代谢物没有显著差异, 如 PROSSER 等^[30]建立了一种基于分子生物学的蜂蜜鉴别方

法, 该方法应该是通过 3 个基因片段来区分 7 种不同蜜蜂采集的不同植物来源的蜂蜜。我国原国家质量监督检验检疫总局于 2017 年发布了 SN/T 4848 系列基于荧光聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)的蜂蜜中蜜源植物鉴定的标准方法, 这些标准方法可以用于蜂蜜中某种蜜源植物成分的检测, 但无法适用于非单一蜜源植物蜂蜜。而且, 每个行业标准提供的方法都是孤立的, 无法同时进行多种植物源成分的同时鉴定, 且各方法之间的循环阈值(cycle threshold, 简称 Ct 值)并非出自同一个实验体系, 故而没有可比性, 无法比较蜂蜜中蜜源植物成分的相对含量。

微流体芯片有 8 个加样孔, 可同时检测 8 种不同的样本, 每个加样孔对应 48 个体积为 1 μL 的小孔, 每个小孔预包埋引物和探针, 只需加入样品核酸和预混液, 因此每个检测孔位相当于 1 μL 反应体系的实时荧光定量 PCR 反应。该方法可以提供与实时荧光定量 PCR 一致的检测精度和灵敏度以及远超出一般芯片检测平台的检测灵敏度; 可跨越 9 个 log 的动态动力学检测范围, 样本无需浓缩或稀释即可精确地进行检测; 可以在 99.7% 的置信度区分 2 倍差异的起始模板, 无需后续验证, 即可精确确认表达差异, 仅一个碱基差别的模板也可精确进行分辨。

为解决以上问题, 本研究参照上述标准的方法, 拟建立一种纳米技术提取蜂蜜中的核酸, 用微流体芯片针对蜂蜜中的植物源成分进行多个位点同时检测的高通量检测方法, 并将方法应用于实际样品检测, 为蜂蜜中蜜源植物检测和掺伪鉴定提供新方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

蜂蜜、大米、小麦、玉米和甜菜样品购自南京市超市和农贸市场。

Taq Man™ Gene Expression Custom Array Card(货号: 4346798)、Taq Man® Fast Virus 1-Step Master Mix(货号: 4444432)(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 无核酸酶水、纳米核酸提取试剂盒(批号: C20H001)(嘉兴杰赛生物科技有限公司); 8 种蜜源植物特征序列构建的质粒(阳性测试样本, 南京英骏生物科技有限公司合成)。

1.2 仪器与设备

QuantStudio 7 Flex 实时定量荧光 PCR 仪(配 TLDA 模块)、NanoDrop 紫外分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Allegrax-30R 高速冷冻离心机(美国 Beckman Coulter 公司); L550 离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 核酸提取

使用核酸提取试剂盒从样品中提取核酸, 所有样品

均按照试剂盒要求进行提取。

1.3.2 微流体芯片的设计

微流体芯片设计的关键是引物及探针序列,本研究中荆条、油菜、洋槐、桉树、椴树、龙眼、荔枝和紫云英的引物及探针序列参照 SN/T 4848.1~SN/T 4848.8 系列标准确定,同理,参考 SN/T 4848.1~SN/T 4848.8 系列标准设置植物内参基因 NADH 作为内标。除了常见的蜜源植物的序列以外,本研究增加了大米、小麦、甜菜和玉米等序列,大米序列参考农业部 1861 号公告-1-2012,小麦序列参考 SN/T 1943—2019《小麦及其制品中转基因成分普通 PCR 和实时荧光 PCR 定性检测方法》,甜菜序列参考 SN/T

5334.8—2020《转基因植物产品的数字 PCR 检测方法 第 8 部分:转基因甜菜》,玉米序列参考 SN/T 1204—2016《植物及其加工产品中转基因成分实时荧光 PCR 定性检验方法》,这几种植物通常是各种糖浆的主要来源。芯片中 CrI-18S 序列用于生成质控,监控微流体芯片不同批次的质量;NADH 序列作为内参照用于检测显花植物基因,评估样品核酸的质量。所以当 CrI-18S 和 NADH 位点均为阳性时,说明扩增体系是有效的,才能判断其他位点的情况。

微流体芯片中每孔设计一个 PCR 反应,每 3 孔为一个重复,具体引物及探针序列信息见表 1。设计好的芯片由 Thermo Fisher Scientific 公司合成。

表 1 微流体芯片引物及探针序列
Table 1 Primers and probe sequences for microfluidic chip

孔号	名称	序列
1	NADH	F primer GCTGAAGCAGCTACTTTCGAAGTAACA
		R primer AGGAGCCGTGTGAGATGAAAGTCTCA
		QSY probe FAM-TGGAGTGGGAGAGTCAGAGTCGAAAAGAGG-QSY
2	荆条	F primer GGAGCAATAAAATCTTTC
		R primer ACAATACCACTAAAAACGGGCT
		QSY probe FAM-GAGGGGTATTGCTCCTTTATTTT-QSY
3	油菜	F primer GAGGATAACCCCGCACTAGC
		R primer GGTGGGAGCCAAGAGACTTC
		QSY probe FAM-TTTTCATTTGGTGCCCTGAAGAAGAAGG-QSY
4	CTL-18S ^a	Hs99999901_s1 /
5	洋槐	F primer GCTCAACCAGGAACGATC
		R primer GCAGCATTTGACTACGTACCA
		QSY probe FAM-CATAAACCTATTATCCGAACATTCAATTCA-QSY
6	桉树 1	F primer ATTGTAGCAACTGAAATCTTTCTTA
		R primer GTATTGATGCTTTATTACTGCCT
		QSY probe FAM-ATGCAGATAAAGGGAAGGTTGAGAGAA-QSY
7	桉树 2	F primer ATTGTAGCAACTGAAATCTTTCTTA
		R primer GTATTGATGCTTTATTACTGCCT
		QSY probe FAM-TGCAGATGGAGGGAAGGTTGAGAGAA-QSY
8	椴树	F primer GGGCATCGAACATGAGCTTT
		R primer TTCACGAGTTTGCATGGGA
		QSY probe FAM-AAAGAAGATGCGCCTACAAGACCTGTTGC-QSY
9	龙眼	F primer CCCAAGCTTCTGATTGGGT
		R primer AGGTGGTGTGTGCGCTTCT
		QSY probe FAM-CTTCATTGAAAGAAAGGCATAACTAG-QSY
10	荔枝和龙眼	F primer TCATGTGTGGTCTCAACCCG
		R primer CGTCGCGACTGGAAGATA
		QSY probe FAM-TTACACAAAGATTCTATCAACTTCTGGGC-QSY
11	紫云英	F primer CGAAATGTCAAAAAGCATAAAACG
		R primer ATTCCATCTGGCTGAAAGAAAT
		QSY probe FAM-TTCCAATGGACCCAACGAAGAAAGTAAATAA-QSY
12	玉米	F primer CGTCGTTTCCCATCTCTTCCCTCC
		R primer CCACTCCGAGACCCTCAGTC
		QSY probe FAM-AATCAGGGCTCATTCTCTCGCTCA-QSY
13	水稻	F primer TTGCGCCTGAACGGATAT
		R primer CGGTTGATCTTTTCGGGATG
		QSY probe FAM-TCCGAGCCGTCCTGCGTC-QSY
14	小麦	F primer CAACAATTTTCTAGCCCCAACA
		R primer TTCTTGCATGGGTTACCTGTT
		QSY probe FAM-TTCCCGAGCCCCAACAACCGC-QSY
15	甜菜	F primer GACCTCCATATTACTGAAAGGAAG
		R primer AGTAATTGCTCCATCTGTTCA
		QSY probe FAM-TCTACGAAGTTAAAGTATGTGCCGCTC-QSY
16	IPC-DNA- Xeno ^b	Ac00010014_a1 /

注: ^a 为芯片自带内参基因片段, ^b 为外源校准基因用于验证提取效率, / 表示无此项。

1.3.3 芯片检测

反应体系于 1.5 mL 离心管中配制体系, 每个反应体系包括 5 μ L 样品核酸提取液、25 μ L TaqMan® Fast Virus 1-Step 预混液, 用无核酸酶的水补足 100 μ L。将装载上述试剂的 1.5 mL 离心管涡旋振荡 10 s, 混匀后置于冰上待用。用 100 μ L 移液器配合带滤芯的吸头, 将配制好的 100 μ L 的反应液从芯片上的加样孔中注入。加样时, 吸头插入加样孔, 与板成 45°夹角, 缓缓注入, 避免溶液溢出和产生气泡。若一次实验未做足 8 个样本, 往芯片余下的加样孔中注入 100 μ L 去离子水以配平。对于离心配平的空白芯片, 往 8 个加样孔中分别注入 100 μ L 去离子水。将芯片加样孔一侧朝外(远离离心机转轴)放入离心篮的适配器中, 并将适配器印有字的一面朝外(远离离心机转轴)放入离心吊篮中。在对称的吊篮适配器中放入用于配平的空白芯片。其余的吊篮中放入空适配器。芯片放置妥当后, 331 \times g 或 1200 r/min 离心两次, 每次 1 min。将离心后的芯片倒扣安放在芯片封板机上, 手握把手, 下压用力, 匀速将把手由芯片板的末端前推到位。将芯片取下, 用锋利的剪刀齐边将加样孔从芯片上剪下, 即完成芯片的封板。将封好的芯片板插入 Q7 plus 实时定量荧光 PCR 仪的 TLDA 模块芯片插孔, 设置 PCR 反应程序 50°C 2 min; 95°C 预变性 10 min; 95°C 15 s, 60°C 1 min, 40 个循环。

1.3.4 特异性实验

每个样本以一个目标植物基因作为阳性对照进行芯片检测, 观察目标植物基因是否出现阳性结果, 其余目标基因是否出现阴性结果。荆条、油菜、洋槐、桉树、椴树、

龙眼、荔枝和紫云英以含目标片段的阳性质粒作为阳性对照, 具体植物成分的基因扩增靶标参考序列见表 2。玉米、水稻、小麦和甜菜用含目标成分的样品作为阳性对照。

将 12 个目标植物基因的阳性参照进行等量混合后进行芯片检测, 以 12 个目标植物基因检出情况来判断该方法在复杂样品中检出某种特定基因的能力。

1.3.5 灵敏度实验

以桉树为例, 对桉树的阳性样本进行 10 倍稀释, 进行荧光 PCR 扩增反应, 反应体系中桉树样本 DNA 含量为 1.0×10^1 、 1.0×10^0 、 1.0×10^{-1} 、 1.0×10^{-2} 、 1.0×10^{-3} 、 1.0×10^{-4} 、 1.0×10^{-5} ng。测定不同核酸稀释度下 Ct 值, 判断该方法的检出限。将各稀释度的对数值与 Ct 值进行线性回归, 计算出线性回归方程和线性相关系数。

1.3.6 样品验证

查看各样品(每两行为同一检测样品)扩增曲线的形态及对应的 Ct 值。遵循先查看扩增曲线形态的原则, 对符合要求的样本(存在指数扩增), 再结合仪器检测到的 Ct 值, 以 Ct<35 判定为阳性, 其余情况判定为阴性。

2 结果与分析

2.1 特异性实验结果

每个样本以一个目标植物基因作为阳性对照, 均检出目标植物基因, 其余 11 个植物基因均未检出。具体实验结果见表 3。12 个目标植物基因的阳性参照进行等量混合, 12 个目标植物基因均检出。综上, 本研究所建立的方法具有良好的特异性, 符合检测要求。

表 2 植物成分的基因扩增靶标参考序列
Table 2 Reference sequences for plant components

序号	名称	序列
1	荆条	GGAGCAATAAAATTCTTTCTTGGTCTATCAAGAGGGGTTATTGCTCCTTTATTTTCTTTTCAATTAGTAGC CCGTTTTAGTGGTATTGT
2	油菜	GAGGATAACCCCGCACTAGCAGCAGCTGCTCGGAAGGATCAGTCTTCCCTGTTTTTCAT TTGGTGCCCTGAAGAAGAAGGCCAGTTTCATCCAGGAAGAGCTTCAAGATGGTGGATGAA ACAGTCTCTTGCTCATTTGAACCAATCCTTGAAGTCTCTTGCTCCCACC
3	洋槐	GCTCAACCAGGAACGATCCACATAAACCTATTATCCGAACATTCATTTCACTTTTTAG GCTATTTTTTAAATGTGCGACTAAATCGTTCAGTGGTACGTAGTCAAATGCTGC
4	桉树	ATTGTAGCAACTGAAATCTTTCTTACATAAAACAAAAAATCAATCTGATTATGATATA AAAAAAGTATGCAGATAAAGGGAAGGTTGAGAGAAAAGAAAAAGAATATCAATGA TATAGGATTCGAATATATGTAAGGTTTAGGAGTCATCTCATAAAAGGCAGTGAATAAA GCATCAATAC
5	椴树	GGGCATCGAACATGAGCTTTTTAGCTCCTATTAAGAAGATGCGCCTACAAGACCTGT TGCGCTGGTTCACGTGAGAAAATCCCATGCAAACTCGTTGAA
6	龙眼	CCCAAGCTTCCTGATTGGGTAAGTTAGCTTCATTGAAAGAAAGGCATAACTAGCTTGT TTATCCATTACCCTTAATCTTTTTTAATTTTTTCAGAAGCGACAAACACCACCT
7	荔枝	TCATGTGTGGTCTCAACCCGGAAGGGTTCATATAAACCACTTACACAAAGATTCTATCA ACTTTCTGGGCTATCTTTCCAGTCGGCGACG
8	紫云英	CGAAATGTCAAAAGCATAAAACGTGTTTTTGTGAGAGTACCTATTTTGGTACTAAAAAC ATTCCCTTTTTTATCCTCATGAATCTGACAATACTATGCTATTTTCTATGCTTGGATTAG TATTATTTACTTTCTCGTTGGGTCCATTGGAATTTCTTTTCAGCCAAGATGGAAT

表 3 特异性实验结果
Table 3 Results of the specific experiments

序号	目标植物基因	Ct 检测结果
1	桉树	桉树 1: 26.644; 桉树 2: 25.660; 其余植物成分未检出
2	油菜	油菜: 26.20; 其余植物成分未检出
3	荆条	荆条: 27.182; 其余植物成分未检出
4	洋槐	洋槐: 26.676; 其余植物成分未检出
5	椴树	椴树: 24.578; 其余植物成分未检出
6	荔枝	荔枝: 28.983; 其余植物成分未检出
7	紫云英	紫云英: 27.565; 其余植物成分未检出
8	龙眼	龙眼: 27.352; 其余植物成分未检出
9	玉米	玉米: 24.032; 其余植物成分未检出
10	大米	大米: 34.403; 其余植物成分未检出
11	小麦	小麦: 20.400; 其余植物成分未检出
12	甜菜	甜菜: 24.700; 其余植物成分未检出

2.2 灵敏度实验

2.2.1 灵敏度分析

以桉树为例, 对桉树的阳性样本进行 10 倍稀释, 具体实验结果见图 1, 反应体系中桉树样本 DNA 含量低于 1.0×10^{-5} ng, Ct 值将大于 35。因此初步得出其检出限约为 1.0×10^{-5} ng。

2.2.2 扩增效率分析

以反应体系中桉树样本 DNA 含量 (ng) 的对数值 (X) 和 Ct 值 (Y) 之间关系建立标准曲线方程, 标准曲线方程为 $Y = -3.2669X + 16.43$, $r^2 = 0.9949$, 具体分析如下: 桉树的标准

曲线方程斜率为 -3.2669 。根据斜率计算的 PCR 扩增效率为 102.3%, 符合农业部 2259 号公告-5-2015《转基因植物及其产品成分检测 实时荧光定量 PCR 方法制定指南》中大于 90% 和小于 110% 的要求。线性相关系数 $r^2 = 0.9949$, 符合农业部 2259 号公告-5-2015《转基因植物及其产品成分检测 实时荧光定量 PCR 方法制定指南》中 $r^2 \geq 0.98$ 的要求。因此, 反应体系中桉树样本 DNA 含量和 Ct 之间存在着良好的线性关系, 线性范围为 $1.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^1$ ng, 所建立的标准曲线方程可用于实验结果分析。

2.3 样品核酸提取结果

在超市和网络上购买了 64 批次样品, 其中 48 批次蜂蜜、11 批次蜂蜜制品和 5 批次糖浆样品。具体样品中核酸提取情况见表 4。64 批次样品中 17 批次样品未提取出核酸, 占比 26.6%。48 批次蜂蜜样品中 10 批次未提取出核酸, 蜂蜜提取出核酸的质量浓度范围为 $0.75 \sim 707.80$ ng/ μ L; 11 批次蜂产品中 7 批次未提出核酸, 蜂蜜制品提取出核酸的质量浓度范围为 $2.45 \sim 6.80$ ng/ μ L; 5 批次糖浆样品均提取出核酸, 糖浆提取出核酸的范围为 $1.05 \sim 905.50$ ng/ μ L。综上, 蜂蜜制品核酸提取效果较差, 可能由于蜂蜜制品蜂蜜含量较低, 甚至可能未添加蜂蜜。另外由于蜂蜜所含成分复杂, 所以会出现蜂蜜核酸较难提取, 以及提取后部分样本核酸浓度低、纯度低的现象。

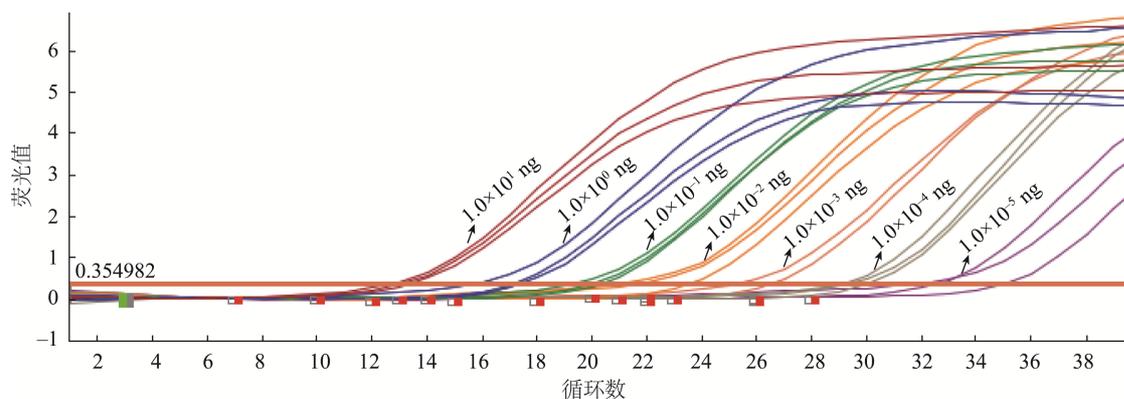


图 1 桉树梯度浓度核酸扩增结果

Fig.1 Results of nucleic acid amplification at various concentrations of *Eucalyptus* sp.

表 4 样品核酸提取情况
Table 4 Nucleic acid extraction of samples

样品类别	样品数	未提取出核酸样品数	提取出的核酸浓度范围/(ng/ μ L)
蜂蜜	48	10	0.75~707.80
蜂蜜制品	11	7	2.45~6.80
糖浆	5	0	1.05~905.50
合计	64	17	0.75~905.50

2.4 芯片检测结果

47 批次提取出核酸样品的 NADH 和 CTL-18S 基因检测均为阳性, 显示该检测体系是有效的。47 批次样品中只有 15 个样品的芯片测试结果检出了阳性结果, 同时根据上述参考标准中的方法对实验结果进行了验证, 本实验方法与标准方法的实验结果保持一致, 具体检测结果见表 5, 其中包含 14 批次蜂蜜、1 批次蜂蜜制品。14 批次蜂蜜中 2 批次蜂蜜只检出标示的蜜源成分; 9 批次蜂蜜检出标示的

蜜源成分同时检出其他蜜源成分; 1 批次蜂蜜只检出未标示的蜜源成分; 2 批次蜂蜜所有蜜源成分均未检出, 只检出小麦成分。1 批次蜂蜜制品检出标示的蜜源成分以及小麦和甜菜成分。蜂蜜检出标示的蜜源成分同时检出其他蜜源成分, 可能是因蜜蜂采蜜不会只采一种蜜源植物, 所以有些样本中检出多种蜜源成分; 小麦和甜菜是制作糖浆的原料, 在蜂蜜产品中检测出小麦和甜菜的核酸成分, 可能代表该品种蜂蜜中加入了糖浆的成分, 存在掺假行为。本研究采集的 5 个糖浆样品均提取出了核酸, 但未扩增出阳性组分, 其中的原因还有待进一步研究。

表 5 阳性样品检测结果
Table 5 Test results of positive samples

商品名称	DNA 质量浓度 (ng/ μ L)	样品类别	检测结果
洋槐蜂蜜	48.30	蜂蜜	洋槐、紫云英、荔枝、 龙眼、小麦
洋槐蜜宝	6.80	蜂蜜制品	洋槐、小麦、甜菜
洋槐蜂蜜	3.35	蜂蜜	小麦
洋槐蜂蜜	2.00	蜂蜜	小麦
椴树蜂蜜	285.70	蜂蜜	椴树、洋槐
龙眼蜂蜜	4.20	蜂蜜	龙眼、荔枝
龙眼蜂蜜	44.80	蜂蜜	荔枝、桉树、龙眼
荔枝蜂蜜	8.80	蜂蜜	荔枝、油菜、龙眼、 紫云英
紫云英蜂蜜	707.80	蜂蜜	紫云英
紫云英蜂蜜	596.95	蜂蜜	紫云英
紫云英蜂蜜	641.50	蜂蜜	紫云英、油菜
紫云英蜂蜜	7.40	蜂蜜	洋槐、紫云英
枣花蜂蜜	4.50	蜂蜜	洋槐
荆条蜜	66.25	蜂蜜	荆条、油菜、椴树、 荔枝、龙眼、紫云英、 小麦
油菜花蜜	19.20	蜂蜜	油菜、荔枝、龙眼、 紫云英

3 讨论与结论

本研究使用的是 384 孔微流体芯片检测方法, 2 h 内即可获得检测结果, 相比于普通 PCR, 可一次实现多靶标的检测, 缩短了筛查时间。该方法是结合了生物芯片分析的高通量的优势, 以及实时荧光 PCR 的高灵敏度、高精度和结果可靠的优势, 从而能获得一致且可靠的结果。该方法具有标准化操作流程, 操作简单且结果不受操作者熟练程度的影响。由于该芯片需要定制, 所以单块板子的成本较高, 但在对样品进行高通量检测时, 其成本低于实时荧光 PCR 法。

本研究方法的建立是在 DNA 提取的基础上开展的, 所以 DNA 提取的质量是关键。本研究中 64 批次样品中 17 批次样品未提取出核酸, 因此在后面的研究还需进一步对本研究使用核酸提取的方法进行优化, 对于提取效果不理想的样品, 还可采用其余提取方法, 保证核酸提取质量。本研

究方法已使用玉米、水稻、小麦和甜菜用含目标成分的样品作为阳性对照, 验证了此方法的特异性, 而荆条、油菜、洋槐、椴树、椴树、龙眼、荔枝和紫云英这 8 种蜜源植物成分是以含目标片段的阳性质粒作为阳性对照, 因此还需使用这 8 种蜜源植物成分的全基因组 DNA 的阳性样品进一步验证该方法的特异性。但阳性样品以及典型样品的获取比较困难, 市场上随机抽取的样品, 无法保证其所含植物成分的准确性, 因此在后续的研究中还需解决阳性样品获取的问题。另外, 针对目前市场上存在的不掺糖浆但人为添加花粉的蜂蜜样品, 本研究方法尚无法有效鉴别, 需要进一步研究。

目前, 已报道蜂蜜掺假技术只检测标示的蜜源成分或者只检测可能掺假的糖浆成分, 而本研究可以同时检测 8 种蜜源植物成分和 4 种糖浆成分, 更能全面分析蜂蜜中掺假的情况。总而言之, 本研究开发了一种通过基于荧光 PCR 的微流体芯片来判断蜂蜜中植物来源组分的高通量检测方法, 该方法直接基于蜜源植物本身的遗传物质, 可为蜜源植物的来源提供直接证据。该方法具有简便快捷、高灵敏度、高通量的特点, 且具有良好的特异性, 可以有效区分蜂蜜中 12 种植物成分, 可以用于蜂蜜中蜜源植物检测和掺假的鉴定。

参考文献

- [1] 张睿. 蜂产品检测技术指南[M]. 南京: 南京大学出版社, 2013.
ZHANG R. Guide book for honey test technical [M]. Nanjing: Nanjing University Press, 2013.
- [2] 袁琛凯, 陈彬, 石敏, 等. 蜂蜜产业及质量安全概况和检测技术研究进展[J]. 当代畜牧, 2021, (6): 30-34.
YUAN CK, CHEN B, SHI M, *et al.* General situation of honey industry and quality safety and research progress on detection technology [J]. Contemp Anim Husb, 2021, (6): 30-34.
- [3] 吴坤, 周贻兵, 赵君. 探讨蜂蜜掺假现状及有效识别方法[J]. 广东化工, 2020, 47(17): 91-92.
WU K, ZHOU YB, ZHAO J. Discussion of honey adulteration situation and effective identification methods [J]. Guangdong Chem Ind, 2020, 47(17): 91-92.
- [4] 雷鸣. 六种单花种蜂蜜掺假情况的分析检测研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2013.
LEI M. Analysis and detection of six kinds of monofloral honey adulteration [D]. Hangzhou: Zhejiang Polytechnical University, 2013.
- [5] 张言政. 中蜂蜂蜜与意蜂蜂蜜蜂种来源真实性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2019.
ZHANG YZ. Studies on the entomological source authenticity of *Apis cerana cerana* honey and *Apis mellifera ligustica* honey [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2019.
- [6] 袁玉伟, 张志恒, 叶雪珠, 等. 蜂蜜掺假鉴别技术的研究进展与对策建议[J]. 食品科学, 2010, 31(9): 318-322.
YUAN YW, ZHANG ZH, YE XZ, *et al.* Research progress in the detection of honey adulteration [J]. Food Sci, 2010, 31(9): 318-322.
- [7] 高芸. 北京蜂蜜产品价格调查报告[J]. 中国蜂业, 2012, 10(10): 46-47.
GAO Y. Investigation report on the price of honey products in Beijing [J]. Apicul China, 2012, 10(10): 46-47.
- [8] SOARES S, AMARAL JS, OLIVERIRA MB, *et al.* A comprehensive

- review on the main honey authentication issue: Production and origin [J]. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2017, 16(5): 1072–1100.
- [9] KUAN WS, ROSWANIRA AW, SYARIFFAH NSSY, *et al.* Detection techniques for adulterants in honey: Challenges and recent trends [J]. *J Food Compos Anal*, 2019, 80: 16–32.
- [10] RAFIEH F, JINAP S, ALFI K, *et al.* The toxic impact of honey adulteration: A review [J]. *Foods*, 2020, 9(11): 1538–1559.
- [11] 王丹丹, 任虹, 李婷, 等. 蜂蜜掺假鉴别检测技术研究进展[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(16): 362–367.
WANG DD, REN H, LI T, *et al.* Review of identification technology for honey adulteration [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2016, 37(16): 362–367.
- [12] 王永健, 钱宁, 施滔, 等. 联合 EA-IRMS 和 LC-MS/MS 技术构建蜂蜜掺假基本鉴定体系[J]. *中国口岸科学技术*, 2021, 3(5): 88–95.
WANG YJ, QIAN N, SHI T, *et al.* The basic identification system of adulteration of honey by combining EA-IRMS with LC-MS/MS method [J]. *China Port Sci Technol*, 2021, 3(5): 88–95.
- [13] 梁馨文, 李强强, 王凯, 等. 蜂蜜溯源特征标记物研究进展[J]. *食品科学*, 2018, 39(15):343–348.
LIANG XW, LI QQ, WANG K, *et al.* A review of characteristic markers for honey traceability [J]. *Food Sci*, 2018, 39(15): 343–348.
- [14] PUSCAS A, HOSU A, CIMPOIU C. Application of a newly developed and validated high-performance thin-layer chromatographic method to control honey adulteration [J]. *J Chromatogr A*, 2013, 1272: 132–135.
- [15] BONTEMPO L, CAMIN F, ZILLER L, *et al.* Isotopic and elemental composition of selected types of Italian honey [J]. *Measurement*, 2015, 98: 283–289.
- [16] 季美全, 姜珊, 胡国绅, 等. 元素分析-同位素质谱法鉴定麦卢卡蜂蜜中碳-4 植物糖掺假[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(19): 6921–6925.
JI MQ, JIANG S, HU GS, *et al.* Identification of Manuka honey C-4 sugars adulteration by elementary analysis-isotope ratio mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(19): 6921–6925.
- [17] RUIZ-MATUTE AI, RODRIGUEZ-SANCHEZ S, SANZML, *et al.* Detection of adulterations of honey with high fructose syrups from inulin by GC analysis [J]. *J Food Compos Anal*, 2010, 23: 273–276.
- [18] RUIZ-MATUTE AI, SORIA AC, MARTINEZ-CASTRO I, *et al.* A new methodology based on GC-MS to detect honey adulteration with commercial syrups [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55: 7264–7269.
- [19] KIM EH, SEO HS, KI NY, *et al.* Reliable screening and confirmation of 156 multi-class illegal adulterants in dietary supplements based on extracted common ion chromatograms by ultra performance liquid chromatography-quadrupole/time of flight-mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2017, 1491: 43–56.
- [20] MEGHERBI M, HERBRETEAU B, FAURE R, *et al.* Polysaccharides as a marker for detection of corn sugar syrup addition in honey [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57: 2105–2111.
- [21] SPITERI M, JAMIN E, THOMAS F, *et al.* Fast and global authenticity screening of honey using ¹H-NMR profiling [J]. *Food Chem*, 2015, 189: 60–66.
- [22] ELISABETTA S, MARCO S, VALENTINA Z, *et al.* NMR carbohydrate profile in tracing acacia honey authenticity [J]. *Food Chem*, 2020, 309: 125–788.
- [23] PANDEY R, PAIDI SK, VALDEZ TA, *et al.* Noninvasive monitoring of blood glucose with Raman spectroscopy [J]. *Accounts Chem Res*, 2017, 50: 264–272.
- [24] SE KW, RAJA IRK, WAHAB RA, *et al.* Accurate evaluation of sugar contents in stingless bee (*Heterotrigona itama*) honey using a swift scheme [J]. *J Food Compos Anal*, 2018, 66, 46–54.
- [25] DUMANCAS G, ELLIS H, NEUMANN J, *et al.* Comparison of various signal processing techniques and spectral regions for the direct determination of syrup adulterants in honey using Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics [J]. *Chemosensors*, 2022, 10(51): 1–14.
- [26] 李杰, 吕琳, 陈蕊, 等. 蜂蜜掺假检测现状及一种快速鉴别方法探讨[J]. *中国调味品*, 2020, 45(7): 164–167.
LI J, LV L, CHEN R, *et al.* Current situation of honey adulteration detection and discussion on a fast identification method [J]. *China Cond*, 2020, 45(7): 164–167.
- [27] 姚庆伟, 李锋. 掺假蜂蜜的快速鉴定[J]. *食品工业科技*, 1998, (5): 66–67.
YAO QW, LI F. Rapid identification of adulterated honey [J]. *Sci Technol Food Ind*, 1998, (5): 66–67
- [28] ZHU Q, WANG BN, LIANG Y, *et al.* Progress of research on detection of honey adulteration [J]. *China's Bee Ind*, 2008, (10): 35–37.
- [29] 孙潇慧, 李新玲, 霍胜楠, 等. 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳技术及国内外蜂蜜掺伪检测技术研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(16): 5288–5292.
SUN XH, LI XL, HUO SN, *et al.* Research progress on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis technology and honey adulteration detection technology at home and abroad [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(16): 5288–5292.
- [30] PROSSER SWJ, HEBERT PDN. Rapid identification of the botanical and entomological sources of honey using DNA metabarcoding [J]. *Food Chem*, 2017, 214: 183–191.

(责任编辑: 郑丽韩晓红)

作者简介



季小荣, 工程师, 主要研究方向为食品微生物检测、食品基因检测。

E-mail: 1051012397@qq.com



周玮, 硕士, 正高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: 29427500@qq.com