

实时荧光定量 PCR 技术在食用油脂检测中的应用

刘鹏飞¹, 马静¹, 江晓颖², 刘静雯^{1,3}, 苏国成^{1,4}, 李健^{1,3,4*}

(1. 集美大学食品与生物工程学院, 厦门 361021; 2. 厦门中集信检测技术有限公司, 厦门 361021;
3. 厦门市海洋功能食品重点实验室, 厦门 361021; 4. 厦门市食品科技研发检测中心, 厦门 361021)

摘要: 荧光定量 PCR 检测技术具有快速、准确的优点, 在转基因食品检测等领域得到了广泛的应用。采用荧光定量 PCR 技术进行油脂转基因、掺假检测也成为研究热点。利用不同油料作物所含有的独特核酸序列, 采用荧光定量 PCR 技术可简单、高效、快速地检测出油脂中所含的特定核酸成分, 从而判定油脂原料的构成, 为打击食用油脂掺假造假提供判定依据。植物油的加工过程中都经过多个步骤的处理, 其中的核酸降解严重, 含量极低, 所以从植物油中提取出较高质量的 DNA 是对油脂进行荧光定量 PCR 检测鉴定的关键。本文主要对油脂 DNA 提取方法及存在的难点、引物设计特点和结果分析进行了论述, 以期今后荧光定量 PCR 检测技术进一步推广与应用提供思路。

关键词: 实时荧光定量 PCR; 食用油脂; DNA 提取

Application of real-time fluorescent quantitative PCR technology in the detection of edible oils

LIU Peng-Fei¹, MA Jing¹, JIANG Xiao-Ying², LIU Jing-Wen^{1,3}, SU Guo-Cheng^{1,4}, LI Jian^{1,3,4*}

(1. College of Food and Bioengineering, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Xiamen Zhongjixin Testing Co., Ltd., Xiamen 361021, China; 3. Xiamen Key Laboratory of Marine Functional Food, Xiamen 361021, China; 4. Xiamen Food Research and Inspection Center, Xiamen 361021, China)

ABSTRACT: Fluorescence quantitative PCR technology has been widely used in the detection of genetically modified food and other fields for its quickness and accuracy, and it also becomes popular in transgenic detection and adulteration detection of edible oil. By taking advantage of the unique nucleic acid sequence of different species, the specific nucleic acid composition contained in different oil crops can be detected, and the raw material constituent of edible oil can be predicated, so as to provide the evidence for administrative organization to punish the adulterations of edible oil. The quantity and integrity of DNA of edible oil is very low due to the multiple refined processes. It is critical to get high quality DNA from edible oils for real-time fluorescent quantitative PCR analysis. This article mainly reviewed methods and existing problems of DNA extraction, primer design characteristics and result analysis, so as to provide perspectives for further application of real-time fluorescent quantitative PCR in future.

KEY WORDS: real-time fluorescent quantitative PCR; edible oils; DNA extraction

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金、福建省教育厅科研项目 (JA15276)、厦门南方海洋研究中心项目 (13PZP002SF24、14CZP047HJ21)、集美大学科研基金资助

Fund: Supported by the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry, Foundation of Education Department of Fujian Province (JA15276), Xiamen Southern Oceanographic Center (13PZP002SF24, 14CZP047HJ21) and the Scientific Research Foundation of Jimei University

*通讯作者: 李健, 副教授, 主要研究方向为食品安全、食品生物技术、天然化合物, E-mail: lijian2013@jmu.edu.cn

*Corresponding author: LI Jian, College of Food and Bioengineering, Jimei University, Xiamen Key Laboratory of Marine Functional Food, Xiamen Food Research and Inspection Center, Xiamen 361021, China. E-mail: lijian2013@jmu.edu.cn

1 引言

食用油是居民饮食中不可缺少的一部分,为有效监控食用油脂安全,监管部门和研究者提出了多种检测方法^[1,2]。通常主要的油脂检测指标有酸价^[3]、胆固醇^[4]、过氧化值^[5]、挥发性成分^[6]等,主要检测技术有近红外光谱^[7]、电导率与极性物质测定^[8]、气相色谱^[9]和质谱法^[10]等。随着各种检测方法的优化,一些新型的检测技术也逐渐出现,诸如电子鼻^[11]、快速检测试纸^[12]、核磁共振^[13]等。具体的方法应用有:利用分光光度法特征波长检测花生油中的棉籽油^[14]、红外光谱法鉴定橄榄油^[6]、气相色谱法构建特征模型检测大豆油中的棕榈成分^[15]等。上述方法有其使用的优点,但也有其局限性,如无法检测油脂的转基因成分,无法鉴别使用油脂的掺假使假,不能分辨出地沟油中的微生物污染,电子设备检测所需的成本较高在实际应用时不具普遍性等。

核酸作为每个物种的“身份证”,具有性质稳定、特异性好、PCR 扩增后产生特征片段明显等特点,尤其在临床检测方面的应用广泛。在转基因食品成为热门话题的今天,转基因成分的潜在危险性不明,有些产品没有明确标识转基因成分而对消费者产生误导等负面影响。由于食用油脂生产原料包括转基因大豆、油菜籽等,使得荧光定量 PCR 技术成为食用油脂的转基因成分检测首选技术,实现油脂分子水平检测成为发展趋势^[16]。该技术操作简便,通过设备的自动分析可同时检测几十个样品,整个检测过程耗时短。本文主要从食用油脂中 DNA 的提取、引物设计、荧光定量 PCR 在油脂检测中的具体应用和结果分析等方面介绍实时荧光定量 PCR 技术及其在食用油脂安全检测中的应用。

2 食用油脂中 DNA 的提取

食用油脂包括可食用动物油脂和植物油脂,植物油脂根据提取工艺不同又分为压榨型和浸提型,制取时精炼程度的不同使得压榨型较浸提型油脂中核酸含量高。但无论是动物油还是植物油在生产过程中均要经历高温、脱色和脱臭等处理,核酸片段在各个阶段发生不同程度的降解,破碎后的 DNA 片段小于 200 bp,因此实现 DNA 分子的富集是实现荧光定量 PCR 技术在油脂检测中应用的前提。

在提取过程中如何富集和脱脂是能否成功提取到核酸的关键。核酸易溶于水或缓冲液,油样中核酸提取液多采用无菌水、十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethyl ammonium bromide, CTAB)缓冲液和三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸(Tris-EDTA, TE)缓冲液。振荡提取时,由于振荡过高易产生乳化层,因此需要利用有机溶剂消除乳化,有机试剂可选用正己烷、乙醚和丙酮等;而对于蛋白含量

较高的原料,为了减少蛋白质对核酸测定及 PCR 过程的干扰,将会进一步用氯仿-酚纯化 DNA。一般要求用于 PCR 扩增的模板 DNA 纯度 OD_{260}/OD_{280} 值在 1.8~2.0,若低于 1.8 说明存在蛋白或苯酚的残留,模板纯度不高。对油脂 DNA 提取而言,彻底除去苯酚是纯化 DNA 的关键步骤。

在 DNA 粗提阶段,通常采用提取液体积与油样体积比例为 1:10。食用原油中 DNA 残留量较为理想,而对于精炼程度很高的商品油可能需要增加油样比例富集 DNA。水油混合振荡利于 DNA 分子萃取,而此过程易形成乳化层,造成水油分相困难,在后续的研究中还应确定合适的振荡条件,某些颜色较深的原油还会有色素沉淀,需要根据不同油样种类作相应调整,同时配合有机试剂处理。

一般油样提取步骤如下:①1 mL 提取液加入 1 g 猪油溶化猪油,室温振荡 10 min;②12000 r/min 离心 10 min,弃去上层油脂,再加入溶化猪油,重复 10 次左右,提取液与猪油比例约 1:10;③利用 CATB 法^[17]进行后续处理,氯仿-异戊醇-酚除去有机溶剂,异丙醇或乙醇沉淀 DNA;④复溶 DNA。同时可以配合离心柱,使获得的 DNA 纯度更高。

3 引物设计^[18,19]

设计引物是实现荧光 PCR 技术应用的另一个难点。油脂中残留的核酸特点是含量低、片段小和特异性不明。设计时应根据各物种的特征,寻找保守区间且基因片段较短。通过对本文引用的引物对做了统计归纳,植物基因扩增产物片段分布见图 1,常用油料作物的引物见表 1,其中涵盖了大豆、花生、油菜籽、棕榈、芝麻、棉花、玉米、橄榄和葵花籽等常用油料作物。常用植物内参基因如表 2 所示。为了检测转基因原料使用情况,还设计了专门针对油料作物的引物以及其内参基因(表 3)。为了检测食用油脂中可能添加的动物源性油脂,设计了专门针对动物油脂检测的引物及内参基因(表 4)。

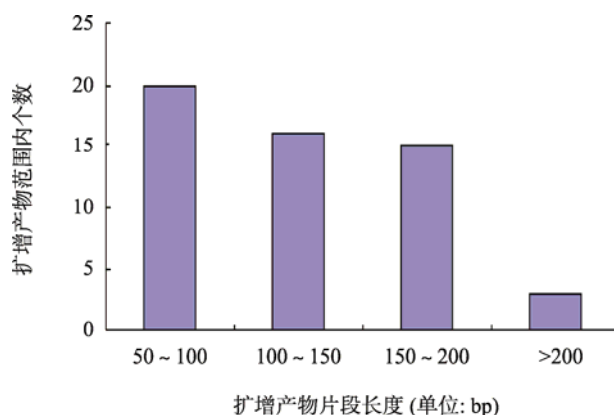


图 1 植物基因扩增产物片段分布

Fig. 1 Fragment distribution of amplified plant genes

表 1 常用油料作物的引物
Table 1 Primers for regular oil-bearing crops

NCBI 序列号	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	扩增产物 (bp)	来源	
XM_003518752.2	GCCCTCTACTCCACCCCATCC	GCCCATCTGCAAGCCTTTTGTG	118	[20]	
大豆	XM_003518752.2	GCCCATCTGCAAGCCTTTT	GCCGAAGCAACCAAACATG	294	[21]
	XM_003518752.2	GATGGATCTGATAGAATTGAC	CTCTACTCCACCCCATC	233	[21]
	XM_003518752.2	TCGCCGCTTCCTTCAACTT	GCCCATCTGCAAGCCTTTT	77	[21]
	HQ439774.1	GGTGCCAACACAACTCCAAC	GTTACTCCCATAGCCAATCTTCAA	81	[20]
花生	FJ713110.1	GCAACAGGAGCAACAGTTCAAG	CGCTGTGGTGCCCTAAGG	72	[22]
		TCAGAATCCCATCCGGTTTC	GTGTAAACGCGCATGGAGAT	91	[23]
	D13987.1	CCAGTTCTTGAGCCGCTTGA	AAGGGCCAGTCCAAATGCAGA	121	[20]
油菜籽	AF127919.1	GGTCGTCTCCTAAGGCGAAAG	CTTCTTCGGCGGTCTGCCAC	99	[24]
	X77576.1	GGTGAGCTGTATAATCGAGCGA	GGCGCAGCATCGGCT	104	GB/T 19495.5-2004 ^[25]
棕榈	AJ236914.1	AGGGCAATTCCTAATGTATTGGAC	CGCAGTTAGAGCCGCATTT	109	[20]
芝麻	AF240005.1	CCAGAGGGCTAGGGACCTTC	CTCGGAATTGGCATTGCTG	62	SN/T1961.12-2013 ^[26]
	AF240005.1	TTACCAGAGGGCTAGGGACCTT	AACTCGGAATTGGCATTGCT	66	[21]
棉花		CGTGGCCTCGCATCTGA	CTCAGCGCGGAGCTACAG	89	SN/T3577-2013 ^[27]
		CTTCCATGCCGCTCACAAG	ACCCAGCCCTCCAAAAGATT		
玉米	JQ083080.1	TGAACCCATGCATGCAGT	GGCAAGACCATTGGTGA	190	SN/T 1203-2010 ^[17]
	BT065903.1	CGGTGGATGCTAAGGCTGATG	AAAGGGCCAGGTTTATTATCCTC	88	[21]
	AJ131373.1	TTGGACTAGAAATCTCGTGCTGA	GCTACATAGGGAGCCTTGTCCT	79	GB/T19495.5-2004
	BT065903.1	CTCCAATCCTTTGACATCTGC	TCGATTTCTCTTTGGTGACAGG	151	GB/T19495.5-2004
	JF738736.1	AATCTTCTACTGGTACATGGAC	AGTAACAGAACCCTCTTCAAAT	164	
橄榄		ACTCGCACACTCCCTTTC	TTTTTAGCTCACTGGCCATCC	115	[28]
	AJ001766	GGTGTTATCCCGTGGCTTCAG	ACGGAATCATCCCCAAAGATCTC	80	[29]
	AJ001766	AAAGGGCGATGCTACCATATTGA	GGGATTCGCAGATCTTCCAGAC	182	[29]
	AJ416321	GTTCCGCAAAAAGACCGACAT	GCCAGACATGGTGCAGCAGTT	82	[29]
	AJ416321	TACACCACGGTCATGCAAGTCC	TGGCGAACAGAAGACCGATAATG	193	[29]
葵花籽		CTCGAGCACCTCCGGCT	GGATTGGATGGCATTCCGG	60	[21]

表 2 植物内参基因引物
Table 2 Primers for plant housekeeping genes

NCBI 序号	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	扩增长度(bp)	来源
HM850302.1	AATGAAGGACGTGATCTTGC	AGTTCAGGACTCCATTTC	71	[30]
AB861614.1	TCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTA	AATTTGCGCGCTGCTGCCTTCCTT	137	[31]
KF600709.1	CGAAATCGGTAGACGCTACG	TTCCTAAGAGTCTCTGCACCT	199	SN/T1204-2003 ^[32]

表 3 植物中转基因成分引物
Table 3 Primers for transgenic ingredients

	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	扩增产物(bp)	来源
	CCGACGCCGATCACCTA	GATGCCGGGCGTGTGAG	87	SN/T 1204-2003
	CATTTGGAGAGGACACGCTGA	GAGCCATGTTGTTAATTTGTGCC	74	GB/T19495.5-2004
大豆	CCTTTAGGATTCAGCATCAGTGG	GACTTGTCCCGGGAATG	121	GB/T19495.5-2004
	TAGCATCTACATATAGCTTC	GACCAGGCCATTCCGCTCA	85	GB/T19495.5-2004
	TCATCCCTTACGTCAGTGAG	CCATCATTGCGATAAAGGAAA	165	专利 201010596930.X ^[33]
油菜籽	GTCTTCGTGTTGCTGGAACCGTT	GAAGTGGCAGGAGCGAGAGCT	121	GB/T 19495.5-2004
	CGTGGCCTCGCGATCTGACT AAGATGCCTCTGCCGACAGT	CTCAGCGCGGAGCTACAGA GCGAAGGATAGTGGGATTGT	196	SN/T3577-2013
	CGTGGCCTCGCGATCTGACT TGAATCCTGTTGCCGGTCTT	CTCAGCGCGGAGCTACAGACG TATTAATGTATAATTGCGGGA	184	SN/T3577-2013
	CGTGGCCTCGCGATCTGACT GAGTCCGTGGATGCTTTGTTC	CTCAGCGCGGAGCTACAGA ATCATGGCGATGTTGGTGTC	111	SN/T3577-2013
棉花	CGTGGCCTCGCGATCTGACTCC AATACAGTTCAGCTACAGCTA	CTCAGCGCGGAGCTACAGA CACCCACGATGTTACCGAGT	151	SN/T3577-2013
	CGTGGCCTCGCGATCTGACTT TGAAATTAACCAATGCCAC	CTCAGCGCGGAGCTACAGAGA TGTTAGTTTCCCATTGAGTTT	133	SN/T3577-2013
	CGTGGCCTCGCGATCTGACTGG CTAACATAAGTAGCTGTGAGTGA	CTCAGCGCGGAGCTACAGA AGATTGTCGTTTCCCCT	194	SN/T3577-2013
	CGTGGCCTCGCGATCTGACTT GTCATCTATGTTACTAGATCGGGG	CTCAGCGCGGAGCTACAGAG CCGAACGCTGTTATCCTCAT	206	SN/T3577-2013
	CGCGACTGGATCAGGTACA	TGGGGAACAGGCTCACGAT	76	SN/T 1204-2003
	TCGAAGGACGAAGGACTCTAACG	GCCACCTTCCTTTTCCACTATCTT	92	GB/T19495.5-2004
	GATGCCTTCTCCCTAGTGTGA	GGATGCACTCGTTGATGTTTG	113	GB/T19495.5-2004
玉米	CCCATCGACATCAGCCTGAGC	CAGGAAGGCGTCCCCTGGC	129	GB/T19495.5-2004
	TGTTACCAGCAGCAACCAG	ACTCCACTTGTGCAGAACAGATCT	100	GB/T19495.5-2004
	AAAAGACCACAACAAGCCGC	CAATGCGTTCTCCACCAAGTACT	127	GB/T19495.5-2004
	GAAGCCTCGCAACGTCA	ATCCGTTGAAAGCGACTT	133	GB/T19495.5-2004
	GCCAGTTAGGCCAGTTACCCA	TGAGCGAAACCCTATAAGAACCCT	149	GB/T19495.5-2004
	AGGATCTCGTCGTGACCCAT	GCACGAGGAAGCGGTCA	183	SN/T1204-2003
	ACAAGCACGGTCAACTTCC	ACTCGGCCGTCCAGTCGTA	175	SN/T1203-2010
内参基因	GTCTACATGTCTCCGGAGAG	GCAACCAACCAAGGGTATG	191	SN/T1203-2010
引物	ATCGTTCAAACATTTGGCA	ATTGCGGACTCTAATCATA	165	SN/T1203-2010
	CGACAGTGGTCCCAAAGA	AAGACGTGGTTGGAACGTCTTC	74	SN/T1203-2010

表 4 动物源性引物
Table 4 Primers for animal ingredients

名称	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	扩增产物 (bp)	来源
牛 β 2m	CTGCTATGTGTATGGGTTC	GTAGAAAGACCAGTCCTTGC	115	SN/T3496-2013 ^[34]
猪 β 2m	GAAGGTCAGGTTTACTCACG	TCAGCAAATCAATTTCAATCTGG	107	SN/T3496-2013
羊线粒体	TTTCGCCTTTCACTTTATTTTCCC	GGGTTGTTGGATCCTGTTTCG	90	SN/T3496-2013
MGH 牛生长激素基因	CCTCAGACGGGTCTTCACCA	CGTGTACAGGATTGGGTAAT		SN/T2557-2010 ^[35]
BGH 牛生长激素基因	CCGATGGATGTGTTTCAGAGCT	GCCAAATGTCTGGGTGTAGATACC		SN/T2557-2010
牛源性	CAACAGGAATCTCCTCAGACGTAGA	GCTAGAATTAGTAAGAGGGCCCTAA	91	[36]
HOXC5 基因	CGTAGCCAATTCATTCTATA	TGGGAAAGTGATGCTTAA	138	[37]
SV40polyA 猿猴空泡病毒	TCACAAATTCACAAATAAAGC	ACATGATAAGATACATTGATGAG	82	SN/T3496-2013
NPT II 新霉素-3-磷酸转移酶基因	TATGACTGGGCACAACAGAC	CGTCTTGCAGTTCATTACAGG	124	SN/T3496-2013
CMV 启动子	GTTCCGCGTTACATAACTTACGG	AAGTCCCTATTGGCGTACTATGG	113	SN/T3496-2013
GFP 绿色荧光蛋白	AACCGCATCGAGCTGAAG	GTTGTGGCGGATCTTGAAG	150	SN/T3496-2013
内参基因引物	AAGACGAGAAGACCCCTTGGACTTTA	GATTGCGCTGTATCCCTAGGGTA	234~262	[38]
	AGGATAACAGCGCAAT	GTTCTGAACTCAGATCACGTAGGACT	149	[39]

引物长度一般在 20~30 bp, 扩增产物在 50~300 bp。如图 1 所示, 扩增片段长度多集中于 50~150 bp, 更多的在 100 bp 左右, 用于临床检测的引物产生的片段都大于 200 bp^[18,19]。这说明经过多重精炼工艺加工的油脂中所含的基因破坏程度高, 与其他荧光 PCR 技术应用对象相比, 基因模板片段更短, 但结构稳定, 最终被保留于油脂中, 可作为 PCR 应用依据。

通常荧光定量 PCR 的反应程序需经过 94 °C 预变性 5 min 后, 94 °C 30 s; 50 °C 60 s; 72 °C 40 s; 运行 40 个循环, 72 °C 延伸 5 min。退火温度是反应过程至为重要的环节, 合适的退火温度可保证模板不断增量, 产生荧光值, 因此本文对比了植物物种与其他物种的退火温度, 为将来实时荧光 PCR 应用于油脂检测提供参考依据, 见图 2。

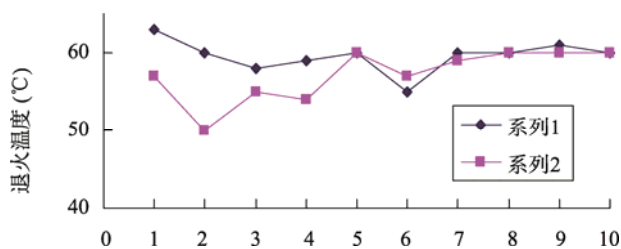


图 2 退火温度对比

Fig. 2 Comparison of annealing temperature (系列 1: 其他物种退火温度; 系列 2: 植物物种退火温度; 图中样本选自本文列出的引物反应条件。)

分别列取了 10 种植物物种和其他物种的退火温度, 从图线趋势看出, 大部分退火温度在 60 °C 附近, 系列 2 曲线位于系列 1 下方, 表现出温度降低, 这是由于相应的降低退火温度可增加扩增产量, 而油脂中残留的 DNA 模板整体质量不高, 适当的减低退火温度利于荧光值产生, 但过度降低会造成非特异性扩增, 使结果呈现假阳性。因此在引物设计时, 保证引物长度在 25 bp, 扩增产物长度在 100 bp, 退火温度在 55~60 °C, 可有效达到扩增目的。

4 荧光定量 PCR 在油脂检测中的具体应用

4.1 油脂中动物成分检测

在检测植物油脂中的动物源成分时, 王立平等^[40]建立的方法可有效检测猪油-大豆油(质量分数 1%)中的猪油成分, 并确定提取液选择 TE 缓冲液, 振摇时间不得低于 10 min, 要求油样体积至少 20 mL。范丽丽等^[36]建立了对市售产品中牛源性成分的检测方法, 其荧光探针法检测体系的检测限低至 0.5%, 可检测 1 pg 牛源 DNA 的存在, 设计引物的扩增片段为 91 bp, 可为油脂中动物成分检测提供依据。

4.2 油脂中转基因成分检测

在油脂中检测转基因成分时, 传统方法采用 CTAB、SDS 裂解液预处理油样, 水相提取液水浴 65 °C、30 min

后加入沉淀剂。闻伟刚等^[41]建立的 DNA 提取方法和试剂盒提取效果相当, 最终经过 PCR 鉴定, 检测出每毫升大豆原油中的核酸含量为 2×10^{-5} ng。但试剂盒价格较高, 不利于基层检测工作开展。陈颖等^[42]通过模拟转基因食用油, 分别提取转基因大豆和非转基因大豆的 DNA 添加于大豆油中, 建立的方法可检测出 0.01% 的转基因成分。

4.3 植物油脂中其他类植物油脂成分检测

周慧等^[43]利用实时荧光定量 PCR 方法检测花生油中掺入的棕榈油成分, SN/T 1203-2010 提取油脂中 DNA, 当掺入的棕榈含量达到 5% 时, 花生油中检出棕榈成分 17.431 copies/mL, 含量在 3.19 ng 左右。此方法将棕榈中提取的核酸混入到花生油中, 模板破坏程度低, 不能完全模拟棕榈油, 但在实际运用中可将此法作为参考。油脂制备原料状态对荧光检测结果的灵敏度也有影响, 以花生为例, 经过部分脱水后的花生其核酸提取率要高于生花生, 同理通过冷榨技术或浸提法的花生油其核酸残留量低, 实验模拟当大豆油中的花生油含量低于 20% 时便不能被检出混入的花生成分^[23]。

5 结果分析

5.1 样品处理条件确定

实时荧光定量 PCR 技术用于食用油脂成分检测为油脂品控提供了参考依据。改良 CTAB 法对油脂中 DNA 的提取效果较好, 以 CTAB 缓冲液为提取液, 油样体积不少于 20 mL, 每次振摇时间不少于 10 min, 高速离心使得 DNA 溶解于水相后, 冷冻过夜并结合 DNA 提取试剂盒进行 DNA 纯化, 离心过柱浓缩 DNA 提取液。通常认为, 提取液体积越大, 油样越多, 提取到 DNA 的可能性就越高。但当提取液体积大于 10 mL 时, 过离心柱(约 1 mL 容量)的次数增加, 耗时也相应增加, 往往会造成 DNA 损失; 而减少提取液体积, 多次混合振荡后, 离心分层后水相会伴随油样被吸出, 最终的提取液中所溶解的 DNA 量会有所降低。对于水油混合可采用摇床振荡和磁力搅拌的方法, 促进油脂中 DNA 溶于提取液。精炼食用油 500 mL, 用 1000 mL PBS 缓冲液可提取出 0.4 μ g DNA^[44]。

5.2 引物设计

根据已报道的 NCBI 号, 可查找相应的基因序列, 通过设定条件产生的引物序列可能被 PCR 所用。设计引物碱基数不宜过多, 避免引物二聚体产生, 扩增产物不宜过小, 否则易产生假阳性。根据油脂 DNA 的特点, 为了达到良好 PCR 扩增效果, 引物设计长度应在 25 bp, 产物大小为 100 bp, 设定退火温度为 55~60 $^{\circ}$ C。

5.3 结果判断

与传统 PCR 技术相比, 实时荧光定量 PCR 技术具有

特异性强、重复性好、定量准确、PCR 污染少和自动化程度高等优点^[45]。整个 PCR 过程可通过扩增曲线实时监控, 产物量的对数值与起始模板量之间存在线性关系, 可实现定量分析。

常规 PCR 以电泳结果为准, 将扩增条带与 DNA Marker 分子量标准对比, 一般认为在对应的分子量区有条带产生, 则说明扩增成功。荧光定量 PCR 技术以扩增曲线为判断准则, 可进行绝对定量和相对定量。绝对定量可准确测出 DNA 含量, 判断结果准确, 而相对定量法中主要以 Ct 值判断, 通常当 Ct > 40 时, 结果为阴性; Ct 值 < 36 时, 结果为阳性; 36 < Ct < 40 时, 实验应重复后再判断结果。无论是绝对定量还是相对定量, 直观的曲线信息可减少实验误差。常用的荧光定量 PCR 方法主要有染料法和探针法。在染料法中, 荧光染料不存在特异性, 仅识别 DNA 分子中双键, 对产生的二聚体等非特异性产物也有荧光信号, 结果易有假阳性; 而探针法中所设计的核酸探针仅特异性扩增某段区域, 其结果更为可靠。目前国家标准中也多采用探针法进行定量。

6 总结

食用油脂中核酸片段小、纯度低, 但经过长期试验证明荧光定量 PCR 技术可实现油脂品质控制, 尤其是食用原油。现已建立的油脂 DNA 提取方法使 DNA 质量在 pg 级也可满足荧光定量 PCR 的要求; 但在 DNA 提取中存在着影响 PCR 过程的因素如酚类、醇类等残留, 应充分除去以确保 DNA 纯度。此外, 对于精炼程度高的油脂需要大量原料富集, 且提取液的量也会相应增加, 适当次数的离心过柱可有效提取其中的核酸, 应设计较大容量的离心柱。同时合适的引物也是 PCR 过程必不可少的。不少植物物种已经公布全序列基因信息, 可选择代表物种属性且稳定性高的基因区间作为设计引物依据, 引物不宜过长, 避免二聚体产生, 同时不断丰富引物信息, 真正实现采用荧光定量 PCR 技术对食用油脂的安全监控。

参考文献

- [1] 王世成, 王颜红, 龙婕玲, 等. 大豆油中掺混地沟油的 FTIR 定量分析模型[J]. 分析试验室, 2013, 32(3): 51-55.
Wang SC, Wang YH, Long JL, et al. Quantitative model for illegal cooking oil in soybean oil by FTIR [J]. Chin J Anal Lab, 2013, 32(3): 51-55.
- [2] 徐伟丽, 杜明, 徐德昌. 色拉油中转基因成分的 PCR 检测[J]. 生物信息学, 2009, 7(3): 238-239, 242.
Xu WL, Du M, Xu DC. PCR Detection of transgenic foreign component in salad oil [J]. China J Bioinf, 2009, 7(3): 238-239, 242.
- [3] 胡培勤, 张春和, 叶敏, 等. 散装劣质再生油、煎炸老油与合格植物油的鉴别[J]. 现代预防医学, 2006, 33(12): 2461-2462.
Hu PQ, Zhang CH, Ye M, et al. Identification study of hogwash fat in bulk, fried old oil and eligibility vegetable oil [J]. Mod Prev Med, 2006, 33(12):

- 2461–2462.
- [4] 陈红, 杨梅, 朱蓉, 等. 超高效液相色谱三重四极杆质谱法测定火锅油、泔水油及地沟油中胆固醇含量[J]. 中国食品卫生杂志, 2011, 23(5): 429–432.
- Chen H, Yang M, Zhu R, *et al.* Ultra performance liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry in the determination of cholesterol in hotpot oil, hogwash oil and waste oil [J]. *Chin J Food Hyg*, 2011, 23(5): 429–432.
- [5] 刘志金, 郑雪玉, 潘红芝, 等. 泔水油与合格食用油鉴别方法的研究[J]. 武汉工业学院学报, 2006, 25(4): 9–11.
- Liu ZJ, Zheng XY, Pan HZ, *et al.* The research on discrimination method of hog wash fat and edible oil [J]. *J Wuhan Inst Ind*, 2006, 25(4): 9–11.
- [6] Armenta S, Garrigues S, dela Guardia M. Determination of edible oil parameters by near infrared spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 2007, 596(2): 330–337.
- [7] Vlachos N, Skopelitis Y, Psaroudaki M, *et al.* Applications of fourier transform-infrared spectroscopy to edible oils [J]. *Anal Chim Acta*, 2006, 573–574.
- [8] 朱锐, 王馨, 杨小京, 等. 电导率测定在鉴别食用植物油掺伪应用研究[J]. 粮食与油脂, 2008, (11): 42–43.
- Zhu R, Wang D, Yang XJ, *et al.* Application of electrical conductivity measurement in qualified edible oil adulteration identification [J]. *Cereals Oils*, 2008, (11): 42–43.
- [9] Hajimahmoodi M, Vander HY, Sadeghi N, *et al.* Gas-chromatographic fatty-acid fingerprints and partial least squares modeling as a basis for the simultaneous determination of edible oil mixtures [J]. *Talanta*, 2005, 66(5): 1108–1116.
- [10] Goodacre R, Vaidyanathan S, Bianchi G, *et al.* Metabolic profiling using direct infusion electrospray ionization mass spectrometry for the characterization of olive oils [J]. *Analyst*, 2002, 127: 1457–1462.
- [11] Cerrato OMC, Pérez Pavón JL, Pinto CG, *et al.* Electronic nose based on metal oxide semiconductor sensors as a fast alternative for the detection of adulteration of virgin olive oils [J]. *Anal Chim Acta*, 2002, 459(2): 219–228.
- [12] 蒋方群, 李宗伟, 王雁萍, 等. 地沟油的快速检测技术及资源化利用[J]. 食品工业科技, 2011, 32(10): 467–469.
- Jiang FQ, Li ZW, Wang YP, *et al.* Fast monitoring and resource utilization of restaurant waste oil [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2011, 32(10): 467–469.
- [13] 张钟华, 贺青, 李正坤. 核磁共振法快速测量大豆含油量[J]. 现代科学仪器, 2006, 16(1): 6–9
- Zhang ZH, He Q, Li ZK. The rapid measurement of oil content in soybean by NMR method [J]. *Mod Sci Instrum*, 2006, 16(1): 6–9.
- [14] 班晓伟, 王绪勉. 花生油掺入棉籽油定性定量检测[J]. 山东食品科技, 2000, 2(2): 20–21
- Ban XW, Wang XM. Quantitative detection of cottonseed oil blended with peanut oil [J]. *Shandong J Food Sci Technol*, 2000, 2(2): 20–21.
- [15] 邹洁, 赵维佳, 汪海峰, 等. 大豆油中掺伪棕榈油的检测方法研究[J]. 中国油脂, 2009, 34(4): 73–76.
- Zou J, Zhao WJ, Wang HF, *et al.* Determination of palm oil adulterated in soybean oil [J]. *China Oils Fats*, 2009, 34(4): 73–76.
- [16] Levin RE. The Application of real-time PCR to food and agricultural systems. a review [J] *Food Biotechnol*, 2005, 18(1): 97–133.
- [17] SN/T 1203-2010 食用油脂中转基因植物成分实时荧光 PCR 定性检测方法[S].
- SN/T 3577-2013 Detection of the transgenic plants in edible oil by real-time fluorescent PCR [S].
- [18] 程悦, 左浩江, 廖虹瑜, 等. 肠道常见菌群荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 现代预防医学, 2014, 41(23): 4338–4341, 4359.
- Cheng Y, Zuo HJ, Liao HY, *et al.* Establishment of real-time PCR method for detection of intestinal bacteria [J]. *Mod Prev Med*, 2014, 41(23): 4338–4341, 4359.
- [19] 王吉, 卫礼, 付瑞, 等. 猫疱疹病毒 I 型实时荧光定量 PCR 方法的建立及初步应用[J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(12): 47–54.
- Wang J, Wei L, Fu R, *et al.* Establishment and preliminary application of a real-time fluorescent quantitative PCR assay for detection of feline herpesvirus I [J]. *Chin J Compar Med*, 2014, 24(12): 47–54.
- [20] 杨冬燕, 杨永存, 杨小柯, 等. 物种特异性基因扩增鉴别掺假食用植物油[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(9): 2120–2122, 2125.
- Yang DY, Yang YC, Yang XK, *et al.* Species-specific PCR for the identification of the adulterant in edible vegetable oils [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2011, 21(9): 2120–2122, 2125.
- [21] He J, Xu W, Shang Y, *et al.* Development and optimization of an efficient method to detect the authenticity of edible oils [J]. *Food Control*, 2013, 31(1): 71–79.
- [22] 王殿夫. 实时荧光 PCR 法检测食品中花生和芹菜成分[J]. 食品科学, 2009, 30(14): 261–263
- Wang DF. Real-time Fluorescent PCR detection of peanut and celery ingredients in foods [J]. *Food Sci*, 2009, 30(14): 261–263.
- [23] 覃文, 董洁, 邓鸿铃. 实时荧光 PCR 定性定量检测混合食用油脂中的花生油成分[J]. 中国油脂, 2006, 31(10): 73–76
- Qin W, Dong J, Deng HL. Qualitative and quantitative detection of peanut oil in blend oil by real-time PCR [J]. *China Oils Fats*, 2006, 31(10): 73–76.
- [24] 潘良文, 田风华, 张舒亚. 转基因抗草丁膦油菜籽中 B amase 基因的实时荧光定量 PCR 检测[J]. 中国油料作物学报, 2006, 28(2): 194–198.
- Pan LW, Tian FH, Zhang SY. Real-time quantitative PCR detection of the B amase gene in genetically modified phosphinothricin-tolerant canola [J]. *Chin J Oil Crop*, 2006, 28(2): 194–198.
- [25] GB/T 19495.5-2004 转基因产品检测 核酸定量 PCR 检测方法[S].
- GB/T 19495.5-2004 Genetically modified product testing Nucleic acid quantitative PCR detection method [S].
- [26] SN/T 1961.12-2013 出口食品过敏原成分检测 第 12 部分: 实时荧光 PCR 方法检测芝麻成分[S].
- SN/T 1961.12-2013 Export food allergen composition testing Section 12: Detection of sesame ingredients by real-time fluorescent polymerase chain reaction (PCR) [S].
- [27] SN/T 3577-2013 转基因成分检测 棉花 PCR-DHPLC 检测方法[S].
- SN/T 3577-2013 Genetically modified product testing Detection of cotton by PCR-DHPLC [S].
- [28] 杨冬燕, 邓汉超, 杨永存, 等. 精炼食用植物油 PCR 检测技术研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(4): 700–702.
- Yang DY, Deng HC, Yang YC, *et al.* A study on PCR amplification for refined edible vegetable oil [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2010, 20(4): 700–702.
- [29] Giménez M J, Pistón F, Martín A, *et al.* Application of real-time PCR on the development of molecular markers and to evaluate critical aspects for

- olive oil authentication [J]. *Food Chem*, 2010, 118(2): 482–487.
- [30] 张海亮, 吴亚君, 鞠兴荣, 等. 1 种检测橄榄油掺假的新方法-PCR-CE-SSCP 法[J]. *中国食品学报*, 2012, 12(3): 151–159.
Zhang HL, Wu YJ, Ju XR, *et al.* A New method for detecting olive oil authentication-PCR-CE-SSCP method [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol* [J]. 2012, 12(3): 151–159.
- [31] 郭云霞, 张舒亚, 谯鸿超, 等. SYBR Green 实时荧光 PCR 检测食品中鲨鱼源性成分真实性方法的建立[J]. *食品与生物技术学报*, 2012, 31(12): 1300–1306.
Guo YX, Zhang SY, Chen HC, *et al.* Authentication of shark derived material in food using SYBR green fluorescence real-time PCR [J]. *J Food Sci Biotechnol*, 2012, 31(12): 1300–1306.
- [32] SN/T 1204-2003 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[S].
SN/T 1204-2003 Testing method of genetically modified ingredients in plants and its processed products by real-time fluorescent PCR qualitative [S].
- [33] 潘建青, 吴慧英, 王立平, 等. 食用油中脱氧核糖核酸的提取方法: 中国, 201010596930.X [P]. 2010-12-20.
Pan JQ, Wu HY, Wang LP, *et al.* Extraction method of DNA in edible oil: CN, 201010596930.X [P]. 2010-12-20.
- [34] SN/T 3496-2013 动物源性饲料中转基因成分实时荧光 PCR 检测方法[S].
SN/T 3496-2013 Detection of the transgenic ingredients in animal derived feedstuffs by real-time fluorescent PCR [S].
- [35] SN/T 2557-2010 畜肉食品中牛成分定性检测方法 实时荧光 PCR 法[S].
SN/T 2557-2010 Qualitative detection method of cattle component in the livestock meat real-time fluorescent PCR [S].
- [36] 范丽丽, 李培, 丁洪流, 等. 实时荧光 PCR 技术快速检测食品中的牛源成分[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(12): 65–67.
Fan LL, Li P, Ding HL, *et al.* Detection for bovine-derived ingredients in foods with real-time polymerase chain reaction method [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2013, 34(12): 65–67.
- [37] 杨永存, 杨冬燕, 李浩, 等. 实时荧光 PCR 检测动物源性基因鉴定地沟油[J]. *中国卫生检验杂志*, 2013, 23(18): 3514–3517.
Yang YC, Yang DY, Li H, *et al.* Identification of hogwash oil through animal-original genes detection with real-time PCR [J]. *Chin J Health Lab Tech*, 2013, 23(18): 3514–3517.
- [38] Bottero MT, Civera T, Nucera D, *et al.* Design of universal primers for the detection of animal tissues in feedstuff [J]. *Vet Res Commun*, 2003, 27(1): 667–669.
- [39] 田力, 宋小红, 云利兵, 等. 线粒体 16srRNA 和 ND4 基因在种属鉴定中的应用研究[J]. *中国法医学杂志*, 2006, 21(5): 272–274.
Tian L, Song XH, Yun LB, *et al.* A study of 16srRNA and ND4 genes in mitochondrial DNA for forensic species identification [J]. *Chin J Forensic Med*, 2006, 21(5): 272–274.
- [40] 王立平, 刘晓莉, 曹悦, 等. PCR 法检测食用植物油中动物源性成分[J]. *粮油食品科技*, 2013, 21(4): 95–98.
Wang LP, Liu XL, Cao Y, *et al.* Detection of animal-derived ingredients in edible vegetable oils by PCR method [J]. *Sci Technol Cereals, Oils Foods*, 2013, 21(4): 95–98.
- [41] 闻伟刚, 崔俊霞, 赵秀玲. 大豆油中转基因成分的 Nested PCR 和 Semi-nested PCR 检测方法研究[J]. *生物技术通报*, 2005, 6: 84–87.
Wen WG, Cui JX, Zhao XL. Detection of transgenic ingredient from soybean oil by nested PCR and semi-nested PCR [J]. *Biotechnol Bull*, 2005, 6: 84–87.
- [42] 陈颖, 徐宝梁, 苏宁, 等. 实时荧光定量 PCR 技术检测转基因大豆方法的建立[J]. *食品与发酵工业*, 2003, 29(8): 65–69.
Chen Y, Xu BL, Su N, *et al.* Real-time quantitative polymerase chain reaction methods for genetically modified soybean[J]. *Food Ferment Ind*, 2003, 29(8): 65–69.
- [43] 周慧, 梁宇斌, 吴苏喜, 等. TaqMan 探针荧光定量 PCR 检测花生油中掺入棕榈油的研究[J]. *中国油脂*, 2011, 36(8): 84–87.
Zhou H, Liang YB, Wu SX, *et al.* Determination of palm oil adulterated in peanut oil with the TaqMan probe-based RT-PCR method [J]. *China Oils Fats*, 2011, 36(8): 84–87.
- [44] 程红梅, 彭于发, 金尧军, 等. 一种快速、简便提取大豆油 DNA 的方法及转基因大豆油的检测[J]. *中国农业科学*, 2007, 40(5): 1069–1072.
Cheng HM, Peng YF, Jin WJ, *et al.* A simple and rapid method for isolation of DNA from and detection of transgene sequences in soybean oil [J]. *Sci Agric Sin*, 2007, 40(5): 1069–1072.
- [45] 周晓丽, 朱国坡, 李雪华, 等. 实时荧光定量 PCR 技术原理与应用[J]. *中国畜牧兽医*, 2010, 37(2): 87–89.
Zhou XL, Zhu GP, Li XH, *et al.* Principles and application of real-time fluorescent quantitative PCR technique [J]. *Chin Anim Husb Vet Med*, 2010, 37(2): 87–89.

(责任编辑: 姚 菲)

作者简介

刘鹏飞, 硕士研究生, 学士, 主要研究方向为食品安全检测技术、天然活性物质。
E-mail: 1163245636@qq.com

李 健, 副教授, 主要研究方向为食品安全、食品生物技术、天然化合物。
E-mail: lijian2013@jmu.edu.cn.