

多重 qPCR 法鉴定麦卢卡蜂蜜

马 丽¹, 罗奎莉¹, 孙锡淳¹, 龙云凤¹, 刘 芸¹, 丁 涛¹, 张 娜¹, 厉蓉蓉¹,
王毅谦^{1*}, 唐茂芝², 王茂华²

(1. 南京海关动植物与食品检测中心, 南京 210001;
2. 国家认证认可监督管理委员会认证认可技术研究所, 北京 100020)

摘要: 目的 运用新西兰政府初级产业部(Ministry of Primary Industry, MPI)提出的多重 qPCR 方法鉴定麦卢卡蜂蜜。**方法** 参照 MPI 提出的多重 qPCR 方法, 建立麦卢卡标准曲线, 提取 15 个未知来源的蜂蜜样品样品中的花粉 DNA, 进行样品多重 qPCR 检测分析。**结果** 建立麦卢卡标准曲线获得 Manuka 通道的阈值范围, 可以用于今后蜂蜜样品的麦卢卡特异性分析。M2-4 蜂蜜样品中的花粉 DNA 不来自麦卢卡树 *Leptospermum scoparium*。**结论** 本研究对 MPI 提出的鉴定麦卢卡蜂蜜方法起到很好的推动及指导作用。

关键词: 麦卢卡蜂蜜; 麦卢卡树; 花粉 DNA; 多重 qPCR

Identification of Manuka honey by multiplex qPCR method

MA Li¹, LUO Kui-Li¹, SUN Xi-Chun¹, LONG Yun-Feng¹, LIU Yun¹, DING Tao¹, ZHANG Na¹,
LI Rong-Rong¹, WANG Yi-Qian^{1*}, TANG Mao-Zhi², WANG Mao-Hua²

(1. Animal, Plant and Food Inspection Center of Nanjing Customs, Nanjing 210001, China; 2. China Certification & Accreditation Institute, Beijing 100020, China)

ABSTRACT: Objective To identify Manuka honey by applying the multiple qPCR method proposed by the Ministry of Primary Industries (MPI) of the New Zealand government. **Methods** With referencing to the multiple qPCR method proposed by MPI, the Manuka standard curve was established. A total of 15 honey samples of unknown origin were detected, the pollen DNA in the samples was extracted, and the samples were analyzed by multiple qPCR. **Results** The Manuka standard curve was established to obtain the threshold range of the Manuka channel. It could be used for Manuka-specific analysis of future honey samples. The pollen DNA in M2-4 honey sample did not come from *Leptospermum scoparium*. **Conclusion** This article plays a very good role in promoting and guiding the identification method of Manuka honey proposed by MPI.

KEY WORDS: Manuka honey; *Leptospermum scoparium*; pollen DNA; multiplex qPCR

1 引言

新西兰麦卢卡蜂蜜主产区土著居民毛利人早在几个世纪前就已经发现麦卢卡树是一种神奇的“药用植物”,

是我国高端蜂蜜市场的主要销售产品之一,常被用于治疗各种伤口感染、皮肤溃疡、湿疹等。麦卢卡蜂蜜是一种药食同源食品,具有润肠、护肝、护心、抗菌、消炎等作用^[1,2]。麦卢卡蜂蜜的抗菌作用主要由其理化性质决定,大量研究

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFF0215605)

Fund: Supported by the National Key R&D Program of China(2018YFF0215605)

*通讯作者: 王毅谦, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检验检测研究。E-mail: W1000319@163.com

*Corresponding author: WANG Yi-Qian, Senior Engineer, Animal, Plant and Food Inspection Center of Nanjing Customs, 39 Chuangzhi Road, Jianye District, Nanjing 210001, China. E-mail: W1000319@163.com

表明麦卢卡蜂蜜对鼻咽癌放疗后的鼻窦炎有减轻作用^[3]。

麦卢卡蜂蜜能够提供足够的非过氧化氢抗菌成分^[4,5],其抗菌成分独特麦奴卡因子(unique manuka factor, UMF)不受人体内非过氧化氢酶影响,可有效对抗抗生素耐药菌株,包括引起肠胃疾病的幽门螺旋杆菌和耐药性很强的金色葡萄球菌等,UMF成分即使稀释 50 倍以上,依然可以和抗生素耐药菌株的细菌进行抗菌作业^[6-9]。

近年来,麦卢卡蜂蜜在我国进口蜂蜜中所占的比重越来越大,据统计,新西兰每年大约只出产 1700~2000 吨的麦卢卡蜂蜜^[10],但在全球范围内,每年以麦卢卡名义出售的蜂蜜高达 1 万吨以上,这意味假冒品比例极高^[11]。不同级别的麦卢卡蜂蜜价格差异巨大,虚假标示抗菌活性等级甚至完全没有抗菌活性的麦卢卡蜂蜜掺假现象时有报道。国外研究者围绕麦卢卡蜂蜜的特征标志物^[12]、质量评价、真伪鉴别技术进行了比较深入的研究;国内研究者近年来对麦卢卡蜂蜜也进行了一些研究,但起步较晚。

麦卢卡蜂蜜成分较为复杂,对其质量评价体系和真伪鉴别的方法仍在不断地研究和探索中,目前对麦卢卡蜂蜜的主要鉴别方法有:(1)对蜂蜜样品中金黄色葡萄球菌的非过氧化氢抗菌活性的检测^[13];(2)甲基乙二醛(methylglyoxal, MGO)含量测定^[14];(3)碳-4 植物糖的检测^[15];(4)特征标志物(丁香酸甲酯、leptosperin 等)的检测^[16]。由于麦卢卡蜜中二羟基丙酮(dihydroxyacetone, DHA)会在储存和加热培养阶段转化为 MGO^[17,18],不仅会使得样品中 MGO 含量增加,也会增强样品的抗菌活性,干扰方法(1)和(2)的检测结果;并且由于 DHA 和 MGO 已商品化,容易获得,存在添加掺假的问题。而碳-4 植物糖检测方法仅适用于碳-4 植物糖浆的掺假检测^[12],具有局限性,并且对于麦卢卡蜂蜜检测常出现假阳性结果,影响结果的准确性。为了规范麦卢卡蜂蜜的鉴定方法,新西兰政府初级产业部(Ministry of Primary Industry, MPI)于 2014 年创立了“麦卢卡蜂蜜科学项目”,提出了多重 PCR 方法和化学方法作为鉴定麦卢卡蜂蜜的标准。其中多重 PCR 方法是一种多重定量聚合酶链式反应(qPCR 或者实时 PCR)用来特异性检测、鉴别和定量分析麦卢卡树(*Leptospermum scoparium*)DNA 以区别于其他植物^[19]。实时 PCR 技术是基于达到定量检测限所需 PCR 放大循环次数对目标 DNA 含量进行间接检测,因此循环数越多,蜂蜜所含目标 DNA 浓度越低,反之越高。实验中使用的引物探针具有高度特异性,能区别其他树种如 *L. polygalifolium* (jellybush), *L. laevigatum*, *L. grandifolium*, *L. lanigerum*, *L. petersonii* 以及坤希草(kunzea),苜蓿(clover),桃金娘科植物(pohutukawa)等在新西兰作为蜂蜜蜜源植物的物种^[19]。2018 年王雪婷等^[20]着重介绍了 4 个化学指标,目前未有著作介绍多重 qPCR 方法。本研究具体介绍参照 MPI 提出的分子生物学实验室方法从蜂蜜含有的花粉中提取

DNA,然后应用多重 qPCR 检测麦卢卡成分 DNA 的含量,并对实验结果进行分析,以实现鉴定麦卢卡蜂蜜的目的。

2 材料与方法

2.1 材料

15 份未知来源的蜂蜜样品,由 MPI 提供。

2.2 仪器

Vortex Genie 2 涡旋振荡器(美国 Scientific Industries 公司); Thermo Scientific 恒温金属浴(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); ABI ViiATM7 荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Bio systems 公司); ATH Scientific 控温旋转温育仪(中国艾泰赫生化科技有限公司)。

2.3 试剂

DNA 提取试剂盒(Geneaid Genomic DNA Honey Kit)、PCR 试剂盒(ManKanTM Honey real time PCR kit)、标准品、ManKanTM 阳性质控(新西兰 DENATURE 公司);无水乙醇(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。

2.4 多重 qPCR 方法的构建

2.4.1 蜂蜜中花粉 DNA 提取纯化

参照 Geneaid Genomic DNA Honey Kit 试剂盒的英文说明书,结合实验室中现有的仪器提取蜂蜜样品中的花粉 DNA。

取 1.4 g 混匀蜂蜜,加入 900 μ L PCR-级别水,放入 55 $^{\circ}$ C 控温旋转温育仪中,10 r/min 运转 10 min,15000 g 离心 5 min,弃上清,向沉淀中加入 400 μ L Pol buffer(纯化试剂盒自带),短暂涡旋至沉淀溶解,15000 g 离心 5 min,弃上清,向沉淀中加入 400 μ L GT buffer(纯化试剂盒自带),轻轻吹吸底部的沉淀。将所有混合液加入研磨珠套管中,用胶带固定在振荡器上,全速振荡 3 min,之后放在 65 $^{\circ}$ C 金属浴上孵育,振速设为 1200 r/min。10 min 后 15000 g 离心 1 min,在套管中吸取 200 μ L 上清并转移到新的离心管,加入 200 μ L GBT Buffer(纯化试剂盒自带),65 $^{\circ}$ C 孵育 10 min,振速设为 1200 r/min。10 min 后简短离心,加入 200 μ L 无水乙醇,吹吸 2~3 次。将混合液放入 GS column 中(GS column 事先放入 2 mL 收集管中),15000 g 离心 1 min,弃废液,加入 400 μ L W1 Buffer,15000 g 离心 30 s,抛弃收集管中的液体,加入 600 μ L Wash Buffer,15000 g 离心 30 s,倒掉收集管中的液体后加入 200 μ L Wash Buffer,15000 g 离心 2 min。抛弃收集管,将 GS column 放入新的离心管中,加入 50 μ L 事先预热至 65 $^{\circ}$ C 的 Elution Buffer 至过滤基质中心,65 $^{\circ}$ C 孵育 5 min,15000 g 离心 30 s,丢弃 GS column,离心管中的液体即为目标 DNA。

2.4.2 多重 qPCR 检测

多重 qPCR 反应体系 10 μ L,其中 DNA 模板 2 μ L、20X

Oligo mix 0.5 μL 、5X Mastermix 2 μL 、PCR 级别水 5.5 μL 。

ABI 荧光定量 PCR 仪设置: 关闭 ROX 校正, 把它作为内部质控通道(internal), VIC 用作 Kanuka 检测通道, FAM 用作 Manuka 检测通道, 用 3 种不同的颜色代表 3 种检测通道。

反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 40 个循环扩增反应: 96 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 62 $^{\circ}\text{C}$ 30 s。

2.5 麦卢卡标准曲线

麦卢卡标准品是确证来自新西兰的麦卢卡蜂蜜花粉中提取的 DNA, 取 5 μL 麦卢卡标准品与 45 μL PCR-级别水充分混匀, 依次梯度稀释 10 倍, 获得 5 个标准溶液: S1、S2、S3、S4、S5。PCR 反应管中加入 2 μL 标准品稀释液及 8 μL PCR 预混液, 按 2.4.2 设置多重 qPCR 反应, 关闭 ROX 通道后, 选取 FAM 作为 Manuka 通道, 结果只需显示 Manuka 通道结果。

2.6 样品检测

参照 2.4.1 提取 15 个蜂蜜样品中所含的花粉 DNA, 每个样品称取 2 份, 做双平行检测。参照 2.4.2, 依据样品数量配置 PCR 预混液, 分别加入 PCR 反应管中。PCR 加样前简短涡旋, 分别选择样品 DNA、阳性质控 DNA、PCR 级别水作为 DNA 模板, 其中 PCR 级别水用作空白对照。参照 2.4.2 选取 3 个检测通道, 40 个循环, 进行多重 qPCR 检测。

3 结果与分析

3.1 麦卢卡标准曲线

将麦卢卡标准品与 PCR-级别水混匀, 梯度稀释后获得 5 个标准溶液 S1~S5, 其多重 qPCR 结果中 Manuka 通道的结果见图 1。

图 1 中 S1~S5 对应的 qPCR 具体循环数(Cq 值)见表 1。

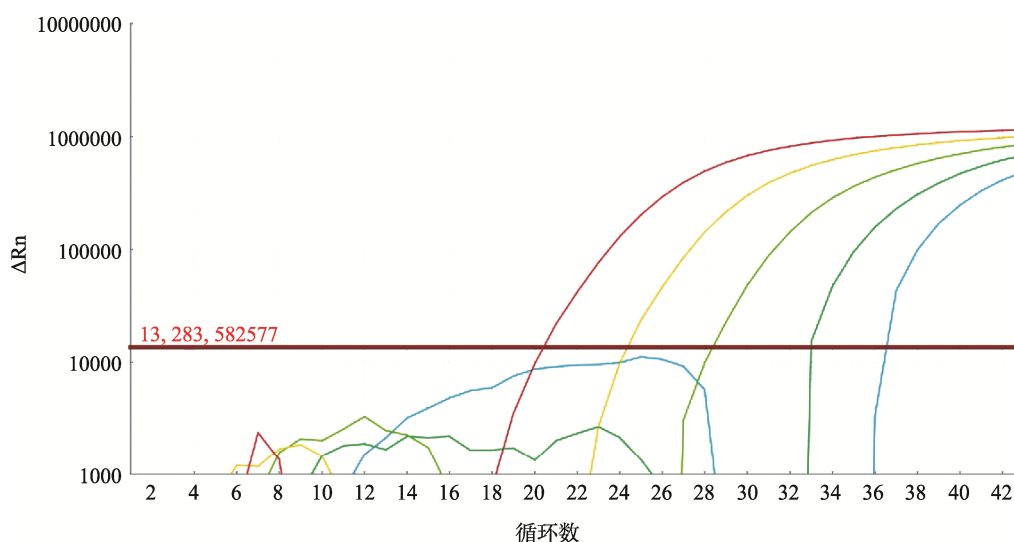


图 1 麦卢卡标准溶液的 Manuka 通道的多重 qPCR 结果

Fig.1 Multiplex qPCR result of Manuka standard solutions for Manuka channel

表 1 麦卢卡标准溶液的 Manuka 通道的 Cq 值

Table 1 Cq values of Manuka standard solutions for Manuka channel

麦卢卡标准溶液	Cq 值	判定标准范围 ^[19]
S1	21.64	22.2±0.72
S2	25.22	25.8±0.72
S3	28.98	29.5±0.72
S4	32.77	33.1±0.74
S5	36.45	35.7±0.75

上下调整图 1 中的横线, 高于下方的背景干扰曲线,

并使 S1~S5 的 Cq 值全部满足表 1 所示的判定标准范围, 例如经调整后 S5 的 Cq 值是 36.45, 在 35.7±0.75 的范围内, 符合要求。而图 1 所示横线上的 13283582577 即为 ABI 荧光定量 PCR 仪 Manuka 通道(FAM 通道)的阈值, 此阈值将适用于此后所有蜂蜜样品的多重 qPCR 检测。每个荧光定量 PCR 仪只需要定义 1 次阈值, 以后的实验都可以以此为标准。

3.2 样品的多重 qPCR 检测结果

应用多重 qPCR 方法检测 15 个未知来源的蜂蜜样品中的花粉 DNA, 使用图 1 所示阈值, 检测结果如下表 2。

表 2 15 个蜂蜜的内标、Kanuka、Manuka 通道 qPCR 结果
Table 2 qPCR results of 15 honeys for internal channel, Kanuka channel and Manuka channel

样品编号	Cq 值						重复性相对偏差/%
	Internal 通道		Kanuka 通道		Manuka 通道		
	平行 1	平行 2	平行 1	平行 2	平行 1	平行 2	
空白对照	UND	UND	UND	UND	UND	UND	/
阳性对照	34.45	33.67	29.56	29.66	28.83	28.43	1.40
M1-1	25.73	25.65	24.29	24.10	23.45	23.64	0.81
M1-2	25.96	27.30	22.30	23.19	27.13	28.28	4.24
M1-3	23.31	25.84	19.71	20.57	23.63	23.89	1.10
M1-4	24.51	24.29	29.62	30.67	33.41	31.52	5.66
M1-5	23.81	23.45	26.74	26.87	35.50	30.28	14.70
M2-1	23.61	23.46	18.97	18.98	20.64	20.62	0.10
M2-2	28.84	28.39	28.15	27.41	30.71	30.33	1.24
M2-3	24.70	24.85	21.66	21.70	27.50	27.58	0.29
M2-4	25.23	25.14	UND	UND	UND	UND	/
M2-5	27.40	27.46	28.16	28.39	32.18	32.98	2.49
M3-1	26.26	26.27	23.66	23.83	30.39	30.64	0.82
M3-2	25.60	25.23	26.01	25.60	22.56	22.17	1.73
M3-3	23.42	23.77	18.91	18.90	20.21	20.77	2.77
M3-4	24.60	24.62	22.60	22.72	25.82	25.66	0.62
M3-5	22.32	22.85	25.76	26.32	21.72	22.02	1.38

注: UND: 未检出。

空白对照的 3 个信号通道的结果是 UND, 即在 3 个荧光通道上没有产生扩增信号, 说明整个实验是有效的。M2-4 的蜂蜜样品 internal 通道值为 25.23/25.14, 符合 Cq 值 ≤ 36 , 是有效的, 但 Kanuka 和 Manuka 通道的结果都为 UND。其余 14 个蜂蜜的 internal 通道, Kanuka 通道和 Manuka 通道的 Cq 值均小于等于 36, 符合判定要求。

每个蜂蜜样品需要 2 个平行检测, 结果重复性相对偏差(relative percent deviation, RPD)计算公式如下:

$$RPD(\%) = \frac{\text{Value } A - \text{Value } B}{\frac{(A+B)}{2}} \times 100 \quad [19]$$

依据除 M2-4 以外 14 个蜂蜜的 Manuka 通道的 qPCR 结果, 得出重复性结果(见表 2 RPD): 结果显示, M1-4 和 M1-5 蜂蜜样品的 RPD 分别为 5.66 和 14.70, 都大于 5%, 说明 2 个蜂蜜样品的结果存在显著性差异, 结果不可信。其余蜂蜜样品的 RPD < 5%, 说明样品的重复性很好, 符合检测要求。

4 结论与讨论

由 15 个蜂蜜样品的多重 qPCR 检测结果得知, M2-4

的 Kanuka 通道和 Manuka 通道的 Cq 值大于设定的 40 个循环, 不符合 Manuka 蜂蜜的判定要求, 说明 M2-4 不是麦卢卡蜂蜜。M1-4 和 M1-5 的 internal 通道和 Kanuka 通道的重复性结果 < 5%, 但其 Manuka 通道的 RPD > 5%, 结果不可取。因此实验室重新提取 M1-4 和 M1-5 蜂蜜样品 DNA, 重新进行多重 qPCR 检测, 结果显示 M1-4 和 M1-5 的 internal 通道和 Kanuka 通道的 Cq 值 < 36, 其重复性结果小于 5%, M1-4 的 Manuka 通道的 Cq 值分别为 34.76 和 35.24, M1-5 的 Manuka 通道的 Cq 值分别为 30.87 和 30.85, 计算出 M1-4 和 M1-5 的 RPD 分别为 1.38 和 0.06, 都符合检测要求。综上所述, 除 M2-4 不是麦卢卡蜂蜜外, 其余 14 个蜂蜜均满足麦卢卡蜂蜜多重 qPCR 的判定结果。另外, 4 个化学指标的实验结果显示 M2-2、M2-4、M2-5 的甲氧基苯乙酮和甲基苯甲酸的含量均小于 1 mg/kg, 不符合麦卢卡蜂蜜化学指标的判定标准^[20]。综上所述 M2-2、M2-4、M2-5 不是麦卢卡蜂蜜。本研究对分子生物学方法在麦卢卡蜂蜜鉴定上的应用为首次介绍, 随着麦卢卡蜂蜜进口量的增加, MPI 提出的 4+1 的鉴定麦卢卡蜂蜜的方法将会进一步推广, 为今后麦卢卡蜂蜜的检测起到很好的指导作用。

参考文献

- [1] Minden-Birkenmaier BA, Smith RA, Radic MZ, *et al.* Manuka honey reduces NETosis on an electrospun template within a therapeutic window [J]. *Polymers*, 2020, 12(6): 1430.
- [2] Minden-Birkenmaier BA, Meadows MB, Cherukuri K, *et al.* Manuka honey modulates the release profile of a dHL-60 neutrophil model under anti-inflammatory stimulation [J]. *J Tissue Viabil*, 2020, 29(2): 91–99.
- [3] Meera S, Vandana RM, Sreedhar C, *et al.* A review on the therapeutic effects of NetiKriya with special reference to JalaNeti [J]. *J AyuIntegra Med*, 2020, 11(2): 91–99.
- [4] Bouzo D, Cokcetin NN, Li L, *et al.* Characterizing the mechanism of action of an ancient antimicrobial, Manuka honey, against *Pseudomonas aeruginosa* using modern transcriptomics [J]. *Systems*, 2020, 5(3): 1–2.
- [5] Meroni G, Cardin E, Rendina C, *et al.* *In vitro* efficacy of essential oils from *Melaleuca alternifolia* and *Rosmarinus officinalis*, Manuka honey-based gel, and propolis as antibacterial agents against canine *Staphylococcus pseudintermedius* strains [J]. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 2020, 9(6): 1–2.
- [6] 马丽, 栾军, 刘芸, 等. 改良琼脂扩散法鉴定麦卢卡蜂蜜[J]. *食品安全质量检测学报*, 2016, 7(11): 4504–4508.
Ma L, Luan J, Liu Y, *et al.* Identification of Manuka honey by improved agar diffusion method [J]. *J Food Saf Qual*, 2016, 7(11): 4504–4508.
- [7] Ankley LM, Monteiro MP, Camp KM, *et al.* Manuka honey chelates iron and impacts iron regulation in key bacterial pathogens [J]. *J Appl Microbiol*, 2020, 128(4): 1–2.
- [8] Lu S, Lu A, Paslin D. A comparison of the wound healing efficacy of trolamine emulsion, Manuka gel, and polymyxin-bacitracin ointment [J]. *Adv Wound Care*, 2020, 33(4): 1–2.
- [9] 王桃红, 崔宗岩, 徐立英, 等. 麦卢卡蜂蜜挥发性成分的测定及其与抗菌性相关性分析[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 7(14): 1–12.
Wang TH, Cui ZY, Xu LY, *et al.* Determination of volatile compounds in Manuka honeys and analysis of its correlation with antibacterial properties [J]. *Food Ferment Ind*, 2020, 7(14): 1–12.
- [10] Anonymous. China chamber of commerce for import and export of food and beverage [J]. *J Bee*, 2015, 35(4): 6.
- [11] 思娟娟, 胡福良. 核磁共振氢谱与化学计量学相结合鉴别麦卢卡蜂蜜[J]. *中国蜂业*, 2017, 68(3): 63.
Si JJ, Hu FL. Identification of Manuka honey by combination of proton magnetic resonance spectroscopy and stoichiometry [J]. *Apicul Chin*, 2017, 68(3): 63.
- [12] Chernyshev A, Braggins T. Investigation of temporal apparent C4 sugar change in Manuka honey [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(14): 4261–4267.
- [13] Jervis BJ, Foreman A, Bray S, *et al.* Methylglyoxal-infused honey mimics the anti-*Staphylococcus aureus* biofilm activity of Manuka honey: Potential implication in chronic rhinosinusitis [J]. *Laryngoscope*, 2011, 121(5): 1104–1107.
- [14] 赵琼晖, 金晓蕾, 胡晓苑, 等. 超高效液相色谱法快速检测麦卢卡蜂蜜中丙酮[J]. *食品安全质量检测学报*, 2014, 5(11): 3482–3486.
Zhao QH, Jin XL, Hu XY, *et al.* Determination of methylglyoxal in Manuka honey by ultra performance liquid chromatography [J]. *J Food Saf Qual*, 2014, 5(11): 3482–3486.
- [15] Siddiqui AJ, Musharraf SG, Choudhary MI, *et al.* Application of analytical methods in authentication and adulteration of honey [J]. *Food Chem*, 2017, 217: 687–698.
- [16] Kato Y, Umeda N, Maeda A, *et al.* Identification of a novel glycoside, leptosperin, as a chemical marker of Manuka honey [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(13): 3418–3423.
- [17] Adams CJ, Manley-Harris M, Molan PC. The origin of methylglyoxal in New Zealand Manuka (*Leptospermum scoparium*) honey [J]. *Carbohydr Res*, 2009, 344(8): 1050–1053.
- [18] Atrott J, Haberlau S, Henle T. Studies on the formation of methylglyoxal from dihydroxyacetone in Manuka (*Leptospermum scoparium*) honey [J]. *Carbohydr Res*, 2012, 361: 7–11.
- [19] Ministry for primary industries. Multiplex qPCR for detection of *Leptospermum Scoparium* DNA from pollen in honey [DB/OL]. MPI Technical Paper No: 2017/31.
- [20] 王雪婷, 丁涛, 吴斌, 等. 高效液相色谱-荧光检测法测定麦卢卡蜂蜜中的特征标志物[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(23): 6140–6144.
Wang XT, Ding T, Wu B, *et al.* Determination of characteristic compound in Manuka honey by high performance liquid chromatography with fluorescence detector [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(23): 6140–6144.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



马丽, 工程师, 主要研究方向为食品掺假与食品检验检疫。
E-mail: mariejfr@163.com



王毅谦, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检验检测研究。
E-mail: W1000319@163.com