

黑松露成分 TaqMan 探针实时荧光 PCR 检测方法的建立与应用

杨爱馥¹, 孙 赞¹, 万 超¹, 刘雪华¹, 邵丽梅², 王 玫^{1*}

(¹大连海关技术中心 辽宁大连 116001

²中华全国供销合作总社昆明食用菌研究所 昆明 650033)

摘要 以黑松露核糖体内转录间隔区基因为靶基因设计特异性引物和探针, 建立黑松露成分的 TaqMan 实时荧光 PCR 检测方法, 并进行物种特异性验证。同时对不同掺入比例的模拟样品和市售黑松露及制品进行检测。结果表明: 该方法特异性强, 仅对黑松露基因组 DNA 出现特异性扩增曲线, 与其它食用菌和异源性动植物样品无非目标扩增; 检测灵敏度为 1×10^{-3} ng/ μ L 黑松露基因组 DNA 或质量分数 0.01% 的黑松露粉。对 120 份市售黑松露(鲜品、冻品、干品、粉末)、黑松露制品(黑松露酱和黑松露调味粉)以及不含黑松露成分的杂菌包进行检测, 在 70 份黑松露(鲜品、冻品、干品、粉末)和 10 份黑松露制品中检出黑松露成分, 其它样品均未检出黑松露成分, 检测结果与商品标识一致。该方法灵敏度高, 特异性强, 可快速精准地进行黑松露成分的真实性甄别。

关键词 黑松露; ITS 基因; TaqMan 实时荧光 PCR; 快速检测

文章编号 1009-7848(2023)07-0403-07 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.07.041

块菌(*Tuber* spp.), 在商业上称为松露, 是一类生于地表下与树木共生的、珍贵的食药两用真菌^[1]。松露具有独特的香气和风味, 营养价值高, 是美食界的顶级食材, 在欧美被冠以“地下黄金”“上帝的食物”“黑色金刚石”等美称, 尤以法国黑孢块菌(*T. melanosporum*)和意大利白块菌(*T. magnatum*)最为珍贵^[2-3]。以印度块菌复合群(*T. indicum* complex)为代表的中国黑松露(黑块菌)主要分布于我国西南地区(云南和四川), 是块菌属在我国产量最大、分布最广且大宗出口的野生贸易食用菌种类。主要包括印度块菌(*T. indicum* Cooke & Massee)、*T. sinense*、喜马拉雅块菌(*T. himalayense*)^[4]、假喜马拉雅块菌(*T. pseudohimalayense*)^[5]和 *T. formosanum*^[6] 5 个菌种^[1,7]。

作为欧洲黑松露的替代品, 自 20 世纪 90 年代初以来, 亚洲黑松露已出口到欧洲, 并在当地市场销售^[8]。中国松露贸易种印度块菌复合群(*T. indicum* complex)是由一类形态上高度相似、基因序列相似度高的 2~4 个隐形种组成。基因图谱显

示, 中国的印度块菌(*T. indicum* Cooke & Massee)和法国黑孢松露的基因相似度达到 96% 以上, 二者在子囊果形态及孢子显微特征方法极为相似^[1], 香味和营养价值也几乎没有区别。基于形态学和分子序列特征, 证实属于该复合群的假凹陷块菌(*T. pseudoexcavatum*)和假喜马拉雅块菌(*T. pseudohimalayense*)为同种^[1,7,9-10], 中国块菌(*T. sinense*)作为印度块菌(*T. indicum* Cooke & Massee)的异名^[1,7,9-14], *T. formosanum* 是喜马拉雅块菌(*T. himalayense*)的异名^[7,11-15]。

松露的生长需要极其特殊的生长环境, 无法进行人工培育且产量稀少, 导致其价格昂贵, 具有极高的经济价值。此外, 黑松露除了含有丰富的蛋白质、氨基酸(包括人体不能合成的 8 种必需氨基酸)、不饱和脂肪酸、维生素、微量元素外, 还具有良好的生物活性, 主要活性成分有块菌多糖、神经酰胺、 α -雄烷醇、麦角甾醇等^[16], 不仅具有抗氧化、抗诱变、抑菌、抗肿瘤等方面的药理作用, 还具有调理内分泌, 防治心脑血管疾病, 增强免疫力, 抗衰老, 抗疲劳等方面的营养保健价值^[17-21]。

黑松露在国际市场上长期受到追捧, 价格居高不下, 其经济价值日益突显。中国产黑松露大约是全球产量的 40% 以上, 是出口欧洲的主要菌类食品。目前尚无黑松露的检测标准, 市场上销售的黑松露制品真假难辨, 其进出口贸易受到一定的

收稿日期: 2022-07-27

基金项目: 海关技术规范制(修)订计划项目(2020B160); 海关总署科研项目(2021HK189); 大连海关科研项目(2021DK10, 2022DK05)

第一作者: 杨爱馥, 女, 博士, 高级工程师

通信作者: 王玫 E-mail: 1109404462@qq.com

制约。本研究靶向黑松露物种特异序列,建立一种快速、精准鉴定黑松露成分的分子生物学检测方法,以适用于黑松露及其制品鉴伪的定性检测。

1 材料与方法

1.1 试验材料

广泛收集黑松露样品及其它食用菌和异源性动植物样品,样品采集信息见表1。采用ITS和LSU(Nuclear large subunit ribosomal DNA,核糖体大亚基)基因序列^[22]做分子鉴定标记,分别用引物ITS5/ITS4和LR0R/LR5对样品进行PCR扩增,测序后登陆NCBI数据库进行BLAST比对,以进行样品真实性鉴定。

1.2 试剂与仪器

动物源性植物饲料基因组DNA提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;Premix ExTaq™ Probe qPCR,宝生物工程(大连)有限公司;合成引物、探针及测序,华大基因有限公司。

QuantStudio 6 Flex QS6实时荧光定量PCR仪,美国ABI公司;NanoDrop Lite超微量分光光度计,美国ThermoFisher公司;5415R小型高速离心机,德国Eppendorf公司;WNB7恒温水浴锅,德国Mettler公司。

1.3 方法

1.3.1 DNA提取 按照试剂盒操作说明进行DNA提取,并进行DNA纯度及浓度的测定。

1.3.2 引物和探针设计 从GenBank上查找并下载印度块菌(*T. indicum* Cooke & Masee)、中国块菌(*T. sinense*)、喜马拉雅块菌(*T. himalayense*)、假凹陷块菌(*T. pseudoexcavatum*)、假喜马拉雅块菌(*T. pseudohimalayense*)和黑孢块菌(*T. melanosporum*)以及网盖牛肝菌(*Boletus reticuliceps*)、皱盖疣柄牛肝菌(*Leccinum duriusculum*)、黑斑厚瓢牛肝菌(*Hourangia nigropunctata*)、褐牛肝菌(*Boletus aereus*)、黑木耳(*Auricularia auricula*)、香菇(*Lentinula edodes*)、羊肚菌(*Morchella sextelata*)等物种的ITS基因序列。使用Clustal X软件进行序列比对,根据差异性原则,利用Primer Premier 5.0软件在黑松露与其它食用菌序列的差异处设计特异性引物和探针,并在GenBank上进行Blast比对检测引物和探针的可行性。序列如

表1 样品信息表

Table 1 Sample information

样品编号	样品名称(拉丁学名)	样品来源
1	黑松露(<i>T. indicum</i>)	云南、四川
2	黑松露(<i>T. sinense</i>)	四川
3	黑松露(<i>T. pseudohimalayense</i>)	云南、四川
4	黑松露(<i>T. pseudoexcavatum</i>)	云南、四川
5	黑松露(<i>T. himalayense</i>)	云南
6	黑松露(<i>T. melanosporum</i>)	法国
7	黑木耳(<i>Auricularia auricula</i>)	云南
8	皱盖牛肝菌(<i>Rugiboletus extremiorientalis</i>)	云南
9	褐盖牛肝菌(<i>Boletus umbrinipileus</i>)	云南
10	白牛肝菌(<i>Boletus bainiugan</i>)	四川
11	黑牛肝菌(<i>Neoboletus obscureumbrinus</i>)	云南
12	黄牛肝菌(<i>Leccinum aurantiacum</i>)	云南
13	竹荪(<i>Dictyophora indusiata</i>)	云南
14	香菇(<i>Lentinula edodes</i>)	云南
15	金针菇(<i>Flammulina yunnanensis</i>)	云南
16	羊肚菌(<i>Morchella sextelata</i>)	云南
17	黑皮鸡枞(<i>Oudemansiella raphanipies</i>)	云南
18	黑虎掌菌(<i>Sarcodon aspratus</i>)	云南
19	红菇(<i>Russula nigricans</i>)	云南
20	鸡油菌(<i>Cantharellus yunnanensis</i>)	云南
21	杏鲍菇(<i>Pleurotus eryngii</i>)	云南
22	姬松茸(<i>Agaricus blazei</i>)	云南
23	茶树菇(<i>Agrocybe salicaciola</i>)	四川
24	银耳(<i>Tremella fuciformis</i>)	四川
25	猴头菌(<i>Hericiium erinaceus</i>)	四川
26	大豆(<i>Glycine max</i>)	辽宁
27	玉米(<i>Zea mays</i>)	辽宁
28	大米(<i>Oryza sativa</i>)	辽宁
29	鳕鱼(<i>Gadus macrocephalus</i>)	辽宁

下:上游引物:5'-CTGTTTCGAGCGTCACTACACAC-3';下游引物:5'-TGATATGCTTAAGTTCA GCGGTA-3';探针:FAM-5'-CAATATTTGTG GTCTTGGCAGGAGTGAATT-3'-TAMRA。

1.3.3 实时荧光PCR检测方法建立 实时荧光PCR反应体系25 μL,包括:PCR反应混合液(2×)12.5 μL、上游引物(10 μmol/L)1.0 μL、下游引物(10 μmol/L)1.0 μL、TaqMan探针(10 μmol/L)0.5

μL 、DNA 模板 $2.0 \mu\text{L}$ 、无菌水将体系补充至总体积 $25 \mu\text{L}$ 。

扩增条件为: 95°C 预变性 10 min (1 个循环); 95°C 变性 5 s , 60°C 退火 30 s (40 个循环), 荧光阈值为设备默认值, 在每个循环退火阶段收集荧光信号。

1.3.4 特异性试验 利用 1.3.1 节中的 DNA 提取方法提取表 1 中所列出 6 种黑松露目标样品和 23 种非目标源性样品的基因组 DNA, 并以此为模版进行实时荧光 PCR 扩增, 以双蒸水为空白对照, 验证本方法的特异性。

1.3.5 灵敏度试验 将黑松露基因组 DNA 进行 10 倍梯度稀释至质量浓度分别为 $10, 1.0, 1.0 \times 10^{-1}, 1.0 \times 10^{-2}, 1.0 \times 10^{-3}, 1.0 \times 10^{-4} \text{ ng}/\mu\text{L}$, 各质量浓度 3 个平行进行灵敏度检测试验。

不同掺入比例模拟样品灵敏度试验: 以黑松露粉为本源, 分别以大豆粉和易混食用菌 (黑木耳和牛肝菌混合物) 为基质做添加试验, 制备黑松露/基质的质量分数分别为 $100\%, 10\%, 1\%, 0.1\%, 0.01\%$ 5 个不同比例的模拟样品, 提取 DNA 并作为灵敏度检测模板进行实时荧光 PCR 检测。

1.3.6 重复性和稳定性试验 将黑松露基因组 DNA 进行 10 倍梯度稀释至质量浓度分别为 $10, 1.0, 1.0 \times 10^{-1} \text{ ng}/\mu\text{L}$, 进行实时荧光 PCR 检测, 每个样品 3 个平行, 以不同浓度基因组 DNA 获得的 Ct 值计算其平均数和变异系数, 进行重复性和稳定性分析。

1.3.7 市售样品检测 购置市售黑松露鲜品 (20 份)、冻品 (20 份)、干品 (20 份), 黑松露粉末 (10 份)、黑松露酱 (5 份) 和黑松露调味粉 (5 份) 以及不含黑松露成分的杂菌包 (20 份)、杂菌碎 (20 份) 样品, 检测其是否含有黑松露成分。同时采用 DNA 条形码方法^[22]对阳性样品进行 ITS 基因序列扩增并测序, 对比两种方法检测结果的差异。

1.3.8 数据处理 数据以“平均值 \pm 标准偏差”表示, 利用 Microsoft Excel 2016 对试验数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 真核生物 18S rRNA 内参基因检测结果

以真核生物 18S rRNA 基因作为内参基因对

本试验所提取的所有样品 DNA 溶液进行实时荧光 PCR 检测, 结果显示所有 DNA 溶液均出现扩增曲线, Ct 值均小于 30, 说明所有用于黑松露成分特异性检测的 DNA 样品均适用于 PCR 检测 (图 1)。

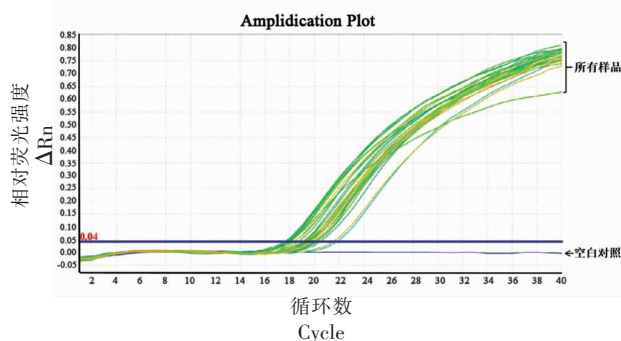


图 1 黑松露和其它样品 18S rRNA 内参基因检测结果
Fig.1 Detection results of 18S rRNA gene in black truffles and other materials

2.2 黑松露成分实时荧光 PCR 特异性验证结果

检测收集到的 6 个黑松露物种样品: 印度块菌 (*T. indicum* Cooke & Massee)、中国块菌 (*T. sinense*)、喜马拉雅块菌 (*T. himalayense*)、假凹陷块菌 (*T. pseudoexcavatum*)、假喜马拉雅块菌 (*T. pseudohimalayense*) 和黑孢块菌 (*Tuber melanosporum*), 同时以 23 种其它食用菌以及异源性动植物样品作为阴性对照, 进行实时荧光 PCR 扩增, 检测引物和探针的特异性。结果显示, 6 个黑松露物种样品印度块菌 (*T. indicum* Cooke & Massee)、中国块菌 (*T. sinense*)、喜马拉雅块菌 (*T. himalayense*)、假凹陷块菌 (*T. pseudoexcavatum*)、假喜马拉雅块菌 (*T. pseudohimalayense*) 和黑孢块菌 (*Tuber melanosporum*) 均出现明显的扩增曲线 (图 2、图 3), 23 种对照样品基因组 DNA 均无扩增检测结果 (图 3), 非目标源性无交叉反应, 说明该方法具有很好的特异性。

2.3 黑松露成分实时荧光 PCR 灵敏度检测

以 $1 \mu\text{L}$ 质量浓度分别为 $10, 1.0, 1.0 \times 10^{-1}, 1.0 \times 10^{-2}, 1.0 \times 10^{-3}, 1.0 \times 10^{-4} \text{ ng}/\mu\text{L}$ 的黑松露基因组 DNA 为模板, 进行灵敏度试验。结果显示该方法的最低检出限为 $1.0 \times 10^{-3} \text{ ng}/\mu\text{L}$ 基因组 DNA (图 4)。

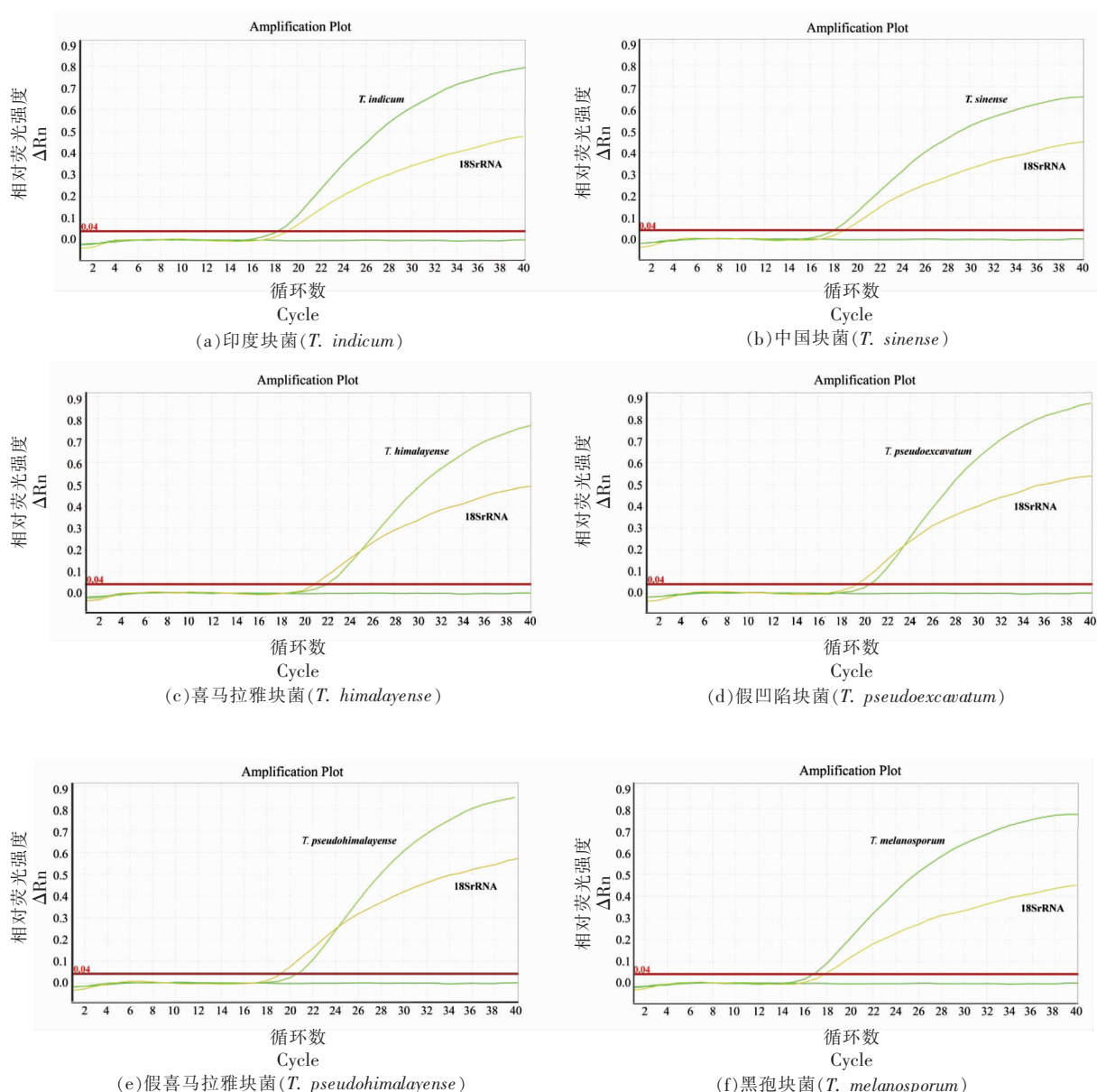


图2 6种黑松露的实时荧光PCR特异性检测结果

Fig.2 Specific detection results of 6 species of black truffles by real-time PCR

黑松露样品分别与大豆基质或易混食用菌基质按不同质量分数(100%,10%,1%,0.1%,0.01%)混合,灵敏度检测试验结果如图5、图6所示,当黑松露/基质的质量分数为0.01%时,出现典型的扩增曲线,因此该方法的灵敏度可稳定达到0.01%。

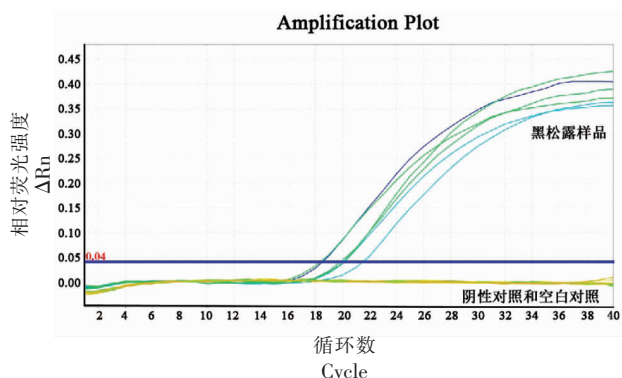
2.4 重复性和稳定性试验

以1 μL质量浓度范围为10,1,0.1 ng/μL 3个连续稀释梯度的黑松露基因组DNA为模板进

行实时荧光PCR检测,每个浓度梯度进行3次平行试验,根据Ct值计算其平均数和变异系数,进行重复性和稳定性分析。结果显示,批内变异系数在0.47%~0.88%,批间变异系数在1.12%~2.71%(表2),说明该方法有较好的重复性和稳定性。

2.5 黑松露成分实时荧光PCR法实际应用检测

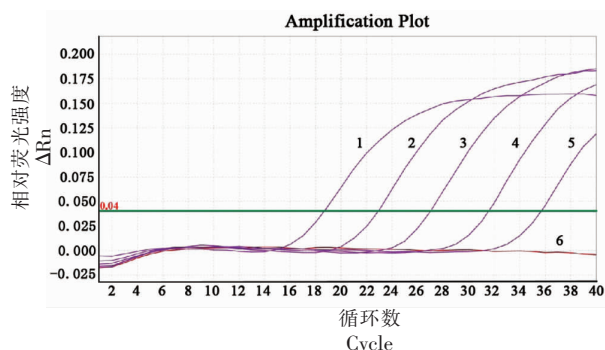
对120份市售黑松露及制品进行检测,结果见表3。商品标识为黑松露(鲜品、冻品、干片、粉



注：黑松露样品包括 *T.indicum*、*T. sinense*、*T. himalayense*、*T. pseudoexcatatum*、*T. pseudohimalayense* 和 *T. melanosporum*；阴性对照：黑木耳、皱盖牛肝菌、褐盖牛肝菌、白牛肝菌、黑牛肝菌、黄牛肝菌、竹荪、香菇、金针菇、羊肚菌、黑皮鸡枞、黑虎掌菌、红菇、鸡油菌、杏鲍菇、姬松茸、茶树菇、银耳、猴头菌、大豆、玉米、大米和鲑鱼；空白对照为双蒸水。

图 3 黑松露的实时荧光 PCR 特异性检测结果

Fig.3 Specific detection results of black truffles by real-time PCR



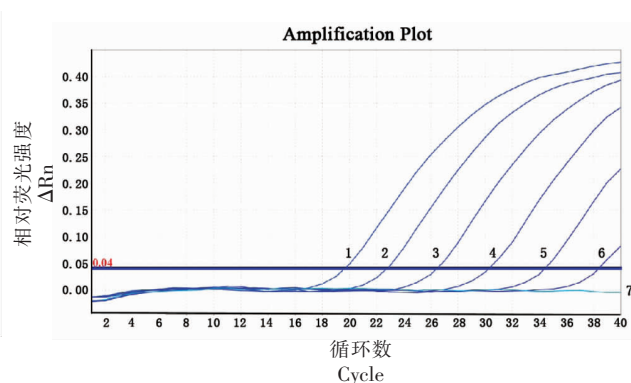
注：1~5 分别为质量分数 100%、10%、1%、0.1%、0.01% 的黑松露；6 为空白对照。

图 5 模拟添加大豆粉灵敏度检测结果

Fig.5 Sensitivity test results of simulated added soybean powder

表 2 黑松露实时荧光 PCR 重复性和稳定性分析
Table 2 Repeatability and stability of real-time PCR for black truffle detection

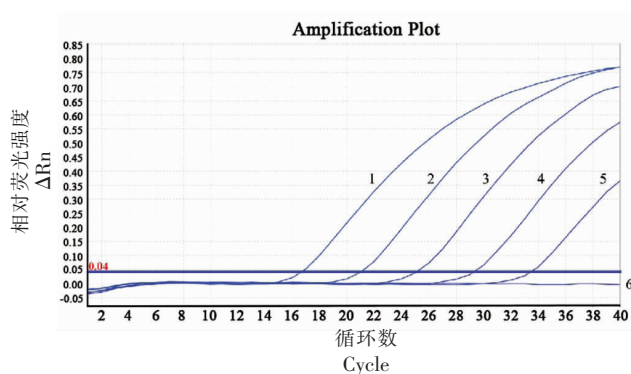
	DNA 质量浓度/ ng·μL ⁻¹	Ct 值平均值	变异系数 (CV)/%
批内重复	10	19.74 ± 0.09	0.47
	1	24.37 ± 0.19	0.77
	0.1	29.28 ± 0.26	0.88
批间重复	10	19.56 ± 0.22	1.12
	1	24.66 ± 0.67	2.71
	0.1	29.76 ± 0.69	2.31



注：1~6 的 DNA 质量浓度分别为 10、1.0、1.0×10⁻¹、1.0×10⁻²、1.0×10⁻³、1.0×10⁻⁴ ng/μL；7 为空白对照。

图 4 不同 DNA 浓度灵敏度检测结果

Fig.4 Sensitivity test results of different DNA concentrations



注：1~5 分别为质量分数 100%、10%、1%、0.1%、0.01% 的黑松露；6 为空白对照。

图 6 模拟添加易混食用菌灵敏度检测结果

Fig.6 Sensitivity test results of simulated mixed edible fungi

表 3 市售黑松露商品检测结果

Table 3 Detection results of commercial black truffle

样品	数量/份	黑松露成分 阳性数量/份	阳性比例/ %
黑松露鲜品	20	20	100
黑松露冻品	20	20	100
黑松露干片	20	20	100
黑松露粉末	10	10	100
黑松露酱	5	5	100
黑松露调味粉	5	5	100
杂菌包干货	20	0	0
杂菌碎干货	20	0	0

末)或含有黑松露成分的样品(黑松露酱和黑松露调味粉)均出现典型的扩增曲线,阳性比例为100%,不含黑松露成分的杂菌包干货、杂菌碎干货样品均为阴性结果,检测结果与商品标识一致。同时采用DNA条形码方法对阳性样品进行ITS基因序列扩增并测序,结果为印度块菌(*T. indicum* Cooke & Masee),说明本文建立的实时荧光PCR检测方法结果可靠,在黑松露成分真实性鉴定中具有很强的实际应用价值。

3 结论

本研究建立了鉴定黑松露成分的TaqMan探针实时荧光PCR检测方法,具有较强的特性和较高的灵敏度,与23种其它常见食用菌和异源性动植物样品均无交叉反应,检测灵敏度可达到 1.0×10^{-3} ng/ μ L,黑松露基因组DNA或质量分数0.01%的黑松露粉。对120份市售黑松露实际样品的检测结果均与商品标识一致,黑松露检测结果的阳性样品与DNA条形码标准方法检测结果一致,说明本方法检测结果准确可靠,适用范围从黑松露鲜品、冻品、干品到深加工黑松露制品,在黑松露成分真实性鉴定中具有很强的实际应用价值。本方法的建立将填补我国黑松露检测的空白,可作为有效的检测手段应用于口岸及市场上黑松露及制品的真伪鉴别,为标签符合性查验、打击掺假欺诈、规范市场秩序提供技术支持,对促进我国黑松露产业和进出口贸易的稳定发展具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] 陈娟,李淑超,李佳梅,等.中国“黑块菌”(黑松露)新分布地区确认及物种多样性保护[J].中国科学:生命科学,2018,48(3):319-331.
CHEN J, LI S C, LI J M, et al. Distribution, biological diversity, and conservation of Chinese black truffle[J]. *Scientia Sinica Vitae*, 2018, 48(3): 319-331.
- [2] MELLO A, MURAT C, BONFANTE P. Truffles: Much more than a prized and local fungal delicacy [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 260(1): 1-8.
- [3] MARTIN F, KOHLER A, MURAT C, et al. Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis[J]. *Nature*, 2010, 464(7291): 1033-1038.
- [4] ZHANG B C, MINTER D W. *Tuber himalayense* sp.nov. with notes on Himalayan truffles[J]. *Transactions of the British Mycological Society*, 1988, 91(4): 593-597.
- [5] MORENO G, MANJON J L, DIEZ J, et al. *Tuber pseudohimalayense* sp. nov. An Asiatic species from China commercialized in Spain similar to the ‘perigord’ truffle[J]. *Mycotaxon*, 1997, 63: 217-224.
- [6] HU H T. *Tuber formosanum* sp.nov. and its mycorrhizal associations[J]. *Journal of Exp Forest. National Taiwan University*, 1992, 2: 79-82.
- [7] 李淑超,乔鹏,刘思思,等.块菌属分子系统学及菌根共生机制研究进展[J].菌物学报,2017,36(2): 131-144.
LI S C, QIAO P, LIU S S, et al. Research progress in the molecular systematics and symbiotic mechanism of *Tuber* (Tuberaceae, Ascomycota)[J]. *Mycosystema*, 2017, 36(2): 131-144.
- [8] RUBINI A, PAOLOCCI F, GRANETTI B, et al. Single step molecular characterization of morphologically similar black truffle species[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1998, 164(1): 7-12.
- [9] MANJON J, GARCIA-MOTERO L, ALVARADO P, et al. *Tuber pseudoexcavatum* versus *T. pseudohimalayense*-new data on the molecular taxonomy and mycorrhizae of Chinese truffles[J]. *Mycotaxon*, 2009, 110: 399-412.
- [10] CHEN J, LIU P G. Delimitation of *Tuber pseudohimalayense* and *T. pseudoexcavatum* based on morphological and molecular data[J]. *Cryptogamie Mycologie*, 2011, 32(1): 83-93.
- [11] KINOSHITA A, NARA K, SASAKI H, et al. Using mating-type loci to improve taxonomy of the *Tuber indicum* complex, and discovery of a new species, *T. longispinosum*[J]. *PLoS One*, 2018, 13(3): e0193745.
- [12] CHEN J, GUO S X, LIU P G. Species recognition and cryptic species in the *Tuber indicum* complex[J]. *PLoS One*, 2011, 6(1): e14625.
- [13] WANG Y J, TAN Z M, ZHANG D C, et al. Phylogenetic and populational study of the *Tuber indicum* complex [J]. *Mycological Research*, 2006, 110(Pt 9): 1034-1045.
- [14] ZHANG L F, YANG Z L, SONG D S. A phyloge-

- netic study of commercial Chinese truffles and their allies: Taxonomic implications[J]. FEMS Microbiological Letters, 2005, 245(1): 85–92.
- [15] 范黎. 亚洲黑松露(块菌)系统分类和地理分布研究进展[J]. 菌物研究, 2021, 19(1): 6–11.
FAN L. Current taxonomic and geographic situation on Asian black truffles[J]. Journal of Fungal Research, 2021, 19(1): 6–11.
- [16] RUBINI A, BELFIORI B, RICCIONI C, et al. Isolation and characterization of MAT genes in the symbiotic ascomycete *Tuber melanosporum* [J]. New Phytologist, 2011, 189(3): 710–722.
- [17] 张红, 都君, 陈屏, 等. 块菌属真菌的化学成分及生物活性研究进展[J]. 食品工业科技, 2018, 39(17): 313–318.
ZHANG H, DU J, CHEN P, et al. Research advances on chemical constituents and bioactivities of truffle fungus [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(17): 313–318.
- [18] 李杨, 郭顺星, 陈娟. 珍稀名贵食药真菌块菌属的化学成分及药理活性研究进展[J]. 菌物学报, 2021, 40(4): 873–894.
LI Y, GUO S X, CHEN J. Research progress
- chemical constituents and pharmacological effects of *Tuber* (Pezizales, Ascomycota) [J]. Mycosystema, 2021, 40(4): 873–894.
- [19] 张智超, 王宏越, 路晓玉. 块菌的研究现状及药用价值[J]. 当代化工研究, 2018, 11: 169–170.
ZHANG Z C, WANG H Y, LU X Y. Research status and medicinal value of truffle [J]. Modern Chemical Research, 2018, 11: 169–170.
- [20] LEE H, NAM K, ZAHRA Z, et al. Potentials of truffles in nutritional and medicinal applications: A review[J]. Fungal Biology and Biotechnology, 2020, 7(9): 1–17.
- [21] SELOSSE M. Truffles 2020 [J]. Current Biology, 2020, 30(9): 382–383.
- [22] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. DNA条形码筛选与质量要求: SN/T 4625–2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017: 2–3.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Principles of screening for DNA barcode quality elements: SN/T 4625–2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017: 2–3.

Development and Application of a TaqMan Real-time PCR Assay for Rapid Detection of Black Truffles Derived Ingredients

Yang Aifu¹, Sun Yun¹, Wan Chao¹, Liu Xuehua¹, Tai Limei², Wang Mei^{1*}

(¹Technology Center of Dalian Customs District, Dalian 116001, Liaoning

²Kunming Edible Fungi Institute of All China Federation of Supply and Marketing Cooperatives, Kunming 650033)

Abstract In this study, a TaqMan real-time PCR method was established for rapid detection of black truffle derived ingredients. Specific primers and probes were designed according to conserved sequence of ITS gene of *Tuber indicum* complex to test the target gene fragment in the samples, and species-specific detection, sensitivity detection and practical application detection were carried out. Results showed that this real-time PCR method had strong specificity, only showed specific amplification curves for black truffle genomic DNA, but there was no amplification curve for other edible fungi, animal and plant materials. The limit of detection was 1.0×10^{-3} ng/ μ L genomic DNA or 0.01% (mass fraction) per reaction. The feasibility of the method was further verified by detecting 120 commercial black truffles (fresh, frozen, dry and powder), black truffle products (black truffle sauce and black truffle seasoning powder) and miscellaneous bacteria bags without black truffle components. The black truffle components were detected in 70 black truffles and 10 black truffle products. This method has the characteristics of strong specificity, high sensitivity, rapidity and high sufficiency, and is suitable for rapid identification of black truffles ingredients.

Keywords black truffles; ITS gene; TaqMan real-time PCR; rapid detection