

## 实时荧光跨越式滚环等温扩增技术检测蜂蜜掺伪大米糖浆

杨浩<sup>1</sup>, 徐慧<sup>2</sup>, 李欣妍<sup>2</sup>, 卢鑫<sup>2</sup>, 杨倩<sup>5</sup>, 张伟<sup>1,3,4\*</sup>

<sup>1</sup>河北农业大学食品科技学院 河北保定 071000

<sup>2</sup>河北农业大学理工系 河北沧州 061100

<sup>3</sup>河北农业大学生命科学学院 河北保定 071000

<sup>4</sup>河北省人畜共患病原微生物分析与防控重点实验室 河北保定 071000

<sup>5</sup>河北大学公共卫生学院 河北保定 071000

**摘要** 将跨越式滚环等温扩增技术(SRCA)与荧光技术相结合,建立一种实时荧光 SRCA 技术检测蜂蜜掺伪大米糖浆的方法。对 DNA 提取方案进行评估,以大米特异性基因(*PDL*、*SPS*、*rbcL*、*GOS9*)为靶序列设计引物,筛选适宜的引物,优化扩增反应条件结合荧光技术建立检测蜂蜜掺伪大米糖浆的方法,并对该方法进行评价。结果表明,建立的实时荧光 SRCA 方法检测大米 DNA 的灵敏度为  $8.45 \times 10^1$  fg/ $\mu$ L,经特异性评价证实其特异性良好,在人工模拟掺伪检测中建立掺伪比例的对数与 Ct 值的线性关系,线性方程为  $y=6.618x+7.651$  ( $R^2=0.993$ ),可准确检出蜂蜜中低至 1% 的大米糖浆成分。该方法灵敏度高,检出限低,能够快速、准确检测蜂蜜掺伪大米糖浆,为蜂蜜掺伪的快速检测提供了新思路。

**关键词** 蜂蜜掺伪; 深加工食品; 跨越式滚环等温扩增(SRCA)

文章编号 1009-7848(2024)01-0242-10 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.01.025

蜂蜜是蜜蜂从各种植物分泌物中酿造产生的天然甜味物质,具有较高的营养价值和良好的感官性能<sup>[1]</sup>。随着国内外对蜂蜜需求量日益增加,蜂蜜的市场供不应求<sup>[2]</sup>。在巨大的利益驱动下导致其掺伪现象严重<sup>[3]</sup>。这不仅损坏消费者利益,而且沉重打击了合规蜂企和蜂农的利益。目前市场中约有 90% 的蜂蜜掺伪与甜味剂有关,最常见的为大米糖浆<sup>[4]</sup>。由于蜂蜜掺伪鉴别难度大,现有的检测技术很难做到简便、快速的鉴别<sup>[4-5]</sup>,且国内外对于蜂蜜掺伪的检测标准并不完善,因此,开发一种简单、快速的检测蜂蜜掺伪方法成为研究热点。

近年来,许多分析技术被用于蜂蜜的真实性检测<sup>[6-7]</sup>。核磁共振法(Nuclear magnetic resonance,

NMR)被认为是最有效的方法之一<sup>[8]</sup>,然而其成本高,耗时长。气相色谱-质谱(Gas chromatography-mass spectrometry,GC-MS)<sup>[9]</sup>、高效液相色谱(High performance liquid chromatography,HPLC)<sup>[10]</sup>这些方法在应用于热处理食品检测时存在一定局限,且步骤繁琐,不能满足快速检测要求。近红外光谱技术(Near infra-red spectroscopy,NIRS)<sup>[11-13]</sup>、傅里叶变换拉曼光谱(Fourier transform-Raman spectroscopy,FTRS)<sup>[14-15]</sup>、稳定性碳同位素质谱(Stable carbon isotope mass spectrometry,SCIMS)<sup>[16]</sup>等技术都需要专业的操作人员,限制了其在常规检测中的应用。基于 DNA 检测的聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction,PCR)、实时荧光定量 PCR 已在蜂蜜掺伪检测中得到应用。如 Sobrino-Gregorio 等<sup>[17]</sup>通过实时 PCR 定量检测蜂蜜掺伪大米糖浆的相对灵敏度为 2%~5%,灵敏度高,特异性良好,然而反应需要复杂的变温过程。随着分子生物学技术的发展,核酸等温扩增技术发展迅速。

本研究团队基于 *Bst* 酶扩增 DNA 的一个新特性,创建了跨越式滚环等温扩增技术,其原理如图 1 所示。与滚环扩增(Rolling circle amplification,RCA)相比<sup>[18-19]</sup>,SRCA 省时、简便,无需人为环化模板;与环介导等温扩增(Loop-mediated

收稿日期: 2023-01-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(32172288,31371772); 河北省自然科学基金重点项目(C2019204342); 中央引导地方科技发展资金项目(216Z5501G, 226Z5503G,236Z5502G); 河北省外专百人计划(360-0803-JSN-3YGS); 河北省重点研究开发计划项目(18275501D); 河北省教育厅科研项目(QN2022073); 河北省自然科学基金项目(C2019204284)

第一作者: 杨浩,男,硕士生

通信作者: 张伟 E-mail: zhangwei631126@163.com

isothermal amplification, LAMP) 相比<sup>[20-21]</sup>, 不需要设计复杂的引物, 仅需 1 对引物便可完成对线性 DNA 的扩增, 已在掺伪检测方面得到应用, 如可视化 SRCA 检测羊肉中鸭肉源成分<sup>[22]</sup>, 猪肉掺伪检测<sup>[23]</sup>等肉类产品的真实性评估。本研究针对 3

种 DNA 提取方法, 优选最佳 DNA 提取方法。以大米的 4 种特异性基因 (*PDL*、*SPS*、*rbcl*、*GOS9*) 为靶序列筛选适宜的引物。将 SRCA 与荧光技术相结合, 建立检测蜂蜜掺伪大米糖浆的方法, 为蜂蜜掺假的快速检测提供新方法。

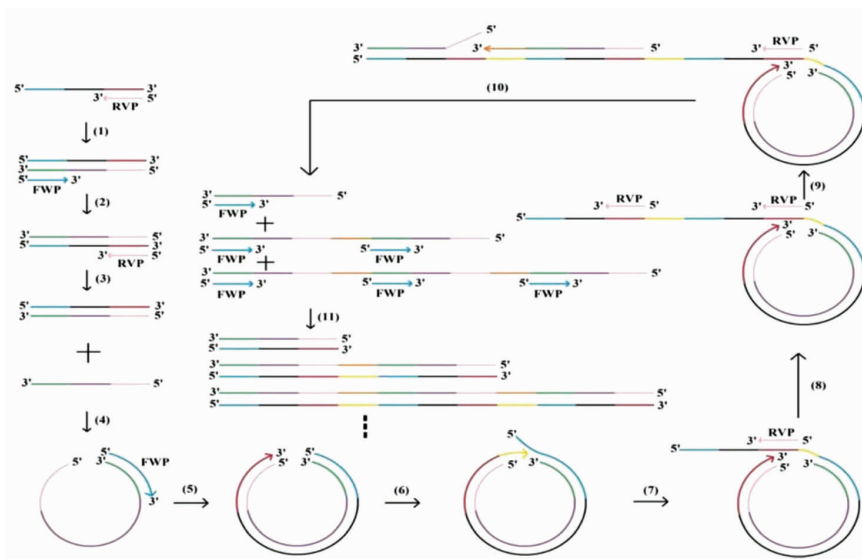


图 1 SRCA 原理图

Fig.1 SRCA schematic

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

5 种植物糖浆 (大米糖浆、玉米糖浆、甜菜糖浆、麦芽糖浆、甘蔗糖浆)、槐花蜂蜜均购于当地大型市场与电商平台; 商业试剂盒“NucleoSpin Food”, 基因生物技术国际贸易 (上海) 有限公司; 深加工食品 DNA 提取试剂盒 (Processed food DNA Extraction Kit), 上海冀杰生物科技有限公司; *Bst* DNA 聚合酶及其缓冲液, 大连宝生物工程有限公司; EvaGreen 荧光染料, 上海开放生物科技有限公司; 磷酸盐 (PBS) 缓冲液、十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 等购于当地试剂公司。

### 1.2 仪器与设备

荧光定量 PCR 仪, 中国 Archimed Analyzer 公司; TGL16A 台式离心机, 上海卢湘仪离心机仪器有限公司; DXY-33A 型电泳仪, 北京六一仪器厂; StepOnePlus qPCR 仪, 美国 Applied biosystems 公司; H1850R 台式高速冷冻离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; Nanodrop 2000 核酸蛋白测

定义, Gene company Limited 基因有限公司。

### 1.3 DNA 的提取

使用合适的 DNA 提取方法, 提取出较高产量与纯度的 DNA 是 SRCA 成功的关键<sup>[17,24]</sup>。对比 3 种 DNA 提取方法 (改良的深加工食品 DNA 提取试剂盒、改进的 CTAB 法、“NucleoSpin Food”商业试剂盒<sup>[25]</sup>)。在预处理的过程中, CTAB 沉淀液具有沉淀 DNA 的作用, 加之糖浆液体比较黏稠, 结果并不理想, 因此, 采用 PBS 缓冲液对样品进行预处理, 因其具有调节盐平衡、调节适宜 pH 值、保护溶液生物活性物质的特点。准备大米糖浆样品 48 mL, 分装于 6 个 50 mL 的离心管中 (每管 8 mL), 经 PBS 缓冲液预处理, 对比 3 种方法, 分别进行 DNA 的提取。将提取的模板 DNA 经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 在凝胶成像仪的紫外光下观察电泳条带。

### 1.4 DNA 浓度与纯度的测定

对于深加工产品而言, 提取的 DNA 需要消除 SRCA 反应的抑制剂, 才可用于后续 SRCA 反应<sup>[17]</sup>。用分光光度计测定大米基因组 DNA 浓度和纯度

( $A_{260/280}$ ),当纯度( $A_{260/280}$ )在1.8~2.1之间时,可用于SRCA反应,如表1所示。最后-20℃保存水稻基因组DNA,备用。

### 1.5 引物的设计与筛选

大米糖浆的DNA在加工过程中会高度裂解,为确保检测结果的准确性,选择具有种内保守性、

种间特异性的大米基因;为保证目的序列的完整性,在NCBI中分别选择大米的4种特异性基因(*PDL*、*SPS*、*rbcL*、*GOS9*)为靶序列设计引物,在BLAST上进行同源性比对,使用DNAMAMN软件设计引物,引物序列详细信息见表1。

表1 水稻引物组信息

Table 1 Rice primer set information

水稻特异性基因型	引物名称	引物序列(5'→3')	引物长度/bp	目的片段长度/bp
<i>PDL</i>	FWP	AGAGGAGATTGACAGATGGC	20	81
	RVP	CAAGATCCATGTGAAGCTTCAG	22	
<i>rbcL</i>	FWP	GGAGTACGAAACCAAGGAC	20	109
	RVP	AGTAGAAGATTCGGCAGCT	18	
<i>GOS9</i>	FWP	ACAGTATAGGCACCTAGCTG	20	80
	RVP	ACTGAGGGCTAATTAATCCA	20	
<i>SPS</i>	FWP	TGGCCCACCGACTTACACA	19	86
	RVP	TTGGAGGAGTTCGGGGCT	20	

### 1.6 实时荧光SRCA的反应体系和条件

实时荧光SRCA反应总体系为20μL,包括MgSO<sub>4</sub>(20.0 mmol/L)3μL,dNTPs(2.5 mmol/L)5μL,10×ThermoPol Reaction Buffer 2.0μL,正反向引物(1μmol/L)1μL,大米模板DNA为1μL,Bst DNA聚合酶(8 000 U/mL)1.5μL,无菌去离子水4.5μL,EvaGreen荧光染料1μL。将大米DNA模板置于94℃条件下,预变性3 min,加入反应体系混合液与EvaGreen荧光染料,利用荧光定量PCR仪进行反应,62℃反应40 min,设置每1 min执行采集1次荧光信号值,随后在80℃条件下放置5 min,防止反应继续发生,最后置于4℃冰箱以终止反应。

### 1.7 SRCA扩增产物的序列分析

将SRCA扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳,观察紫外光下的电泳条带得到结果。电泳结束后切取胶块底部3条DNA片段,进行纯化、连接、转化,送往华大基因公司测序分析。

### 1.8 实时荧光SRCA定量检测方法的优化

在预试验反应体系的基础之上,通过单因素实验进行反应体系与反应条件的优化。反应体系中添加EvaGreen荧光染料<sup>[26]</sup>,采用实时荧光SRCA进行添加量梯度的优化方式,分别对Mg<sup>2+</sup>添加量(1,2,3,4,5μL)、反应温度(60,61,62,63,64

℃)、酶的添加量(0.5,1.0,1.5,2.0,2.5μL)、dNTPs的添加量(3.0,4.0,5.0,6.0,7.0μL)进行优化,设置每1 min执行采集1次荧光信号值。

### 1.9 实时荧光SRCA特异性试验

将5种植物糖浆(玉米糖浆、甜菜糖浆、麦芽糖浆、甘蔗糖浆、大米糖浆)进行基因组DNA的提取,每种植物糖浆分别准备5份不同样品,并在上述最适的反应条件下,进行实时荧光SRCA反应,通过扩增曲线验证样品,以评估实时荧光SRCA定量方法检测蜂蜜中大米糖浆成分的特异性,每个样品重复3次。

### 1.10 实时荧光SRCA灵敏度及检出限试验

为了评估SRCA检测方法的灵敏度,利用无菌、无酶水对大米模板DNA进行梯度稀释,其初始质量浓度为84.5 ng/μL,然后采用10倍梯度稀释法,将大米模板DNA依次稀释至8.45×10<sup>7</sup>~8.45×10<sup>0</sup> fg/μL,通过实时荧光SRCA对大米模板DNA的系列稀释液进行检测,以评价该方法的灵敏度,每个样品重复3次。

### 1.11 人工模拟掺伪检测试验

为了验证实时荧光SRCA定量方法对检测蜂蜜掺伪大米糖浆的实用性,进行人工模拟掺伪检测试验。在纯槐花蜂蜜中掺入不同比例的纯大米糖浆,按照相应的掺伪质量分数(0.5%,1%,5%,

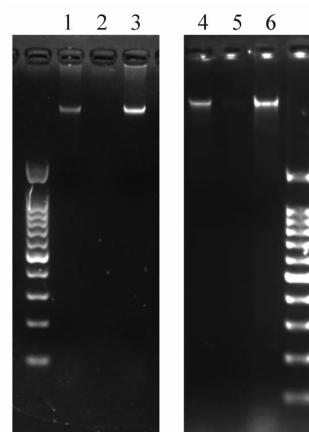
10% ,20% ,50%) 进行评估,通过实时荧光 SRCA 对不同掺伪比例的混合样品进行定量检测,每个样品重复 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 DNA 提取方法的选择

蜂蜜与大米糖浆中的高碳水化合物和酚类化合物的存在是影响 DNA 提取与扩增的主要因素,酚类化合物被氧化后与 DNA 结合形成不可逆复合物,使提取的 DNA 活性降低;高碳水化合物如多糖,易形成胶状物,很难从 DNA 中完全分离出来,DNA 洗脱液中残留的多糖成分,会赋予洗脱液一定的黏性,从而抑制聚合酶、限制性内切酶等多种生物酶的活性,因此,DNA 提取方法的优选,直接影响该方法的实用性<sup>[27-29]</sup>。

通过对比 3 种 DNA 的提取方法,提取大米糖浆 I 与大米糖浆 II 的模板 DNA,获得的琼脂糖凝胶图像,结果如图 2 所示。泳道 2 与泳道 5 为改良的 CTAB 方法提取大米糖浆 I 与大米糖浆 II 的模板 DNA,出现了较浅的 DNA 条带;泳道 1 与泳道 4 为改良的深加工食品 DNA 提取试剂盒对大米糖浆 I 与大米糖浆 II 模板 DNA 的提取,出现了较明显的 DNA 条带;泳道 3 与泳道 6 为商业试剂盒



注:泳道 1~3 为改良的深加工食品 DNA 提取试剂盒、改良的 CTAB、商业试剂盒提取大米糖浆 I 的 DNA 模板胶图;泳道 4~6 为改良的深加工食品 DNA 提取试剂盒、改良的 CTAB、商业试剂盒提取大米糖浆 II 的 DNA 模板胶图。

图 2 模板 DNA 胶图

Fig.2 Template DNA glue diagram

提取方法,在大米糖浆 I 与大米糖浆 II 的模板 DNA 提取结果检测中均出现明显的 DNA 条带。如表 2 所示,为使用分光光度剂测量 3 种方法提取 DNA 的浓度与纯度( $A_{260/280}$ )。结果表明,相比其它 2 种方法,商业试剂盒方法提取大米 DNA 更高效。

表 2 DNA 质量浓度与纯度测定

Table 2 DNA mass concentration and purity were determined

提取方法	大米糖浆 I		大米糖浆 II	
	质量浓度/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	纯度( $A_{260/280}$ )	质量浓度/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	纯度( $A_{260/280}$ )
CTAB(改进)	-	-	$25.63 \pm 1.72$	$1.70 \pm 0.07$
深加工食品 DNA 提取试剂盒(改进)	$35.87 \pm 5.39$	$1.91 \pm 0.07$	$45.53 \pm 9.55$	$2.04 \pm 0.06$
商业试剂盒“NucleoSpin Food”	$68.07 \pm 2.40$	$1.99 \pm 0.04$	$79.77 \pm 5.73$	$2.00 \pm 0.06$

注:结果为“平均值±的标准偏差(3 次分析中的每个提取方案)”。

### 2.2 引物的筛选

使用 4 种特异性引物(*PDL*、*SPS*、*rbcL*、*GOS9*)对 3 种方法提取的 DNA 进行 SRCA 反应。如表 3 所示。改良的 CTAB 方法提取的大米 DNA 进行实时荧光 SRCA 反应时,4 组引物均未出现扩增现象,说明该方法提取的大米 DNA 不适用于 SRCA 扩增反应,故舍弃。

改良的深加工食品 DNA 提取试剂盒提取的大米 DNA 进行实时荧光 SRCA 反应时,*PDL*、*SPS*、*GOS9* 引物对大米糖浆 I 的模板 DNA 出现了

扩增现象,且 *PDL* 引物的 Ct 值最小,*GOS9* 引物的 Ct 值最大,对大米糖浆 II 的模板 DNA 检测中,只有 *PDL* 引物与 *GOS9* 引物产生扩增结果,*SPS* 引物并未扩增,结果可能是大米糖浆 II 在加工处理过程中因加热导致 DNA 降解现象较为严重,或改良的深加工食品 DNA 提取试剂盒提取 DNA 采用非离心柱的分离方式,操作过程中杂质分离不彻底,模板 DNA 中残留少量的 DNA 反应抑制剂,对 SRCA 反应起抑制作用。

商业试剂盒提取的大米 DNA 进行实时荧光



SRCA 反应时, *PLD*、*SPS*、*GOS9* 引物对大米糖浆 I 与大米糖浆 II 的模板 DNA 均产生扩增现象。*PDL* 引物的 Ct 值均最小, *GOS9* 引物的 Ct 值最大。*rbcL*

引物对大米糖浆(I 和 II)均未显示扩增结果,因此该引物特异性较差。结果表明,相比于其它 3 种引物, *PLD* 引物具有良好的特异性。

表 3 SRCA 引物的筛选

Table 3 Screening of SRCA primers

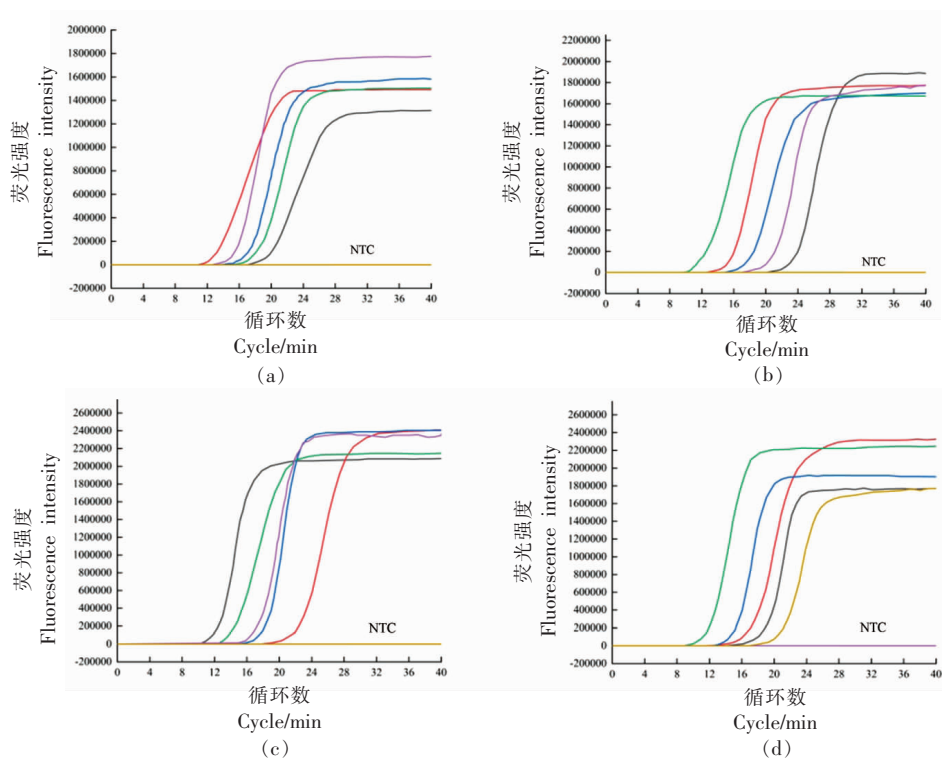
	大米糖浆 I				大米糖浆 II			
	<i>PLD</i>	<i>SPS</i>	<i>rbcL</i>	<i>GOS9</i>	<i>PLD</i>	<i>SPS</i>	<i>rbcL</i>	<i>GOS9</i>
CTAB(改进)	-	-	-	-	-	-	-	-
深加工试剂盒(改进)	14.858	17.661	-	19.177	16.805	-	-	20.654
商业试剂盒“NucleoSpin Food”	11.622	15.168	-	17.357	14.510	18.322	-	21.246

注:反应结果为 3 次结果 Ct 值的平均值,“-”表示未发生反应。

### 2.3 SRCA 反应条件优化

采用实时荧光 SRCA 进行反应体系与反应条件的优化。结果如图 3 所示,当  $Mg^{2+}$  添加量为 3  $\mu L$ , 荧光曲线的 Ct 值最小, 扩增效率最高; 当反应

温度为 62  $^{\circ}C$ , 荧光曲线的 Ct 值最小, 具有最好的酶活性; *Bst* DNA 聚合酶的最适添加量 1.5  $\mu L$ ; dNTPs 的最适添加量为 5.0  $\mu L$ 。



注:(a) $Mg^{2+}$ 添加量的优化,曲线从左至右分别为 3,2,4,5,1  $\mu L$ ;(b)反应温度的优化,曲线从左至右分别为 62,63,61,64,60  $^{\circ}C$ ;(c)*Bst* DNA 聚合酶添加量的优化,曲线从左至右分别为 1.5,2,2.5,10,5  $\mu L$ ;(d)dNTPs 添加量的优化,曲线从左至右分别为 5,6,4,7,3  $\mu L$ ;NTC 为阴性对照。

图 3 SRCA 反应体系与反应条件优化

Fig.3 Optimization of SRCA reaction system and reaction conditions

### 2.4 测序结果分析

如图 4 所示,SRCA 扩增条带为梯形条带,结

果与目的片段一致,为进一步验证结果的准确性,进行测序分析,测序结果蓝色代表正向引物



图 4 SRCA 扩增电泳图与测序结果分析

Fig.4 Analysis of SRCA amplified electrophoresis and sequencing results

(FWP), 红色代表反向引物(RVP)的反向互补序列, 目的序列片段长度为 82 bp。随机添加序列为 4 bp, 产物为含有目的序列的串联重复片段, 结果表明, SRCA 的扩增产物与大米 PLD 靶区匹配良好。

## 2.5 特异性试验

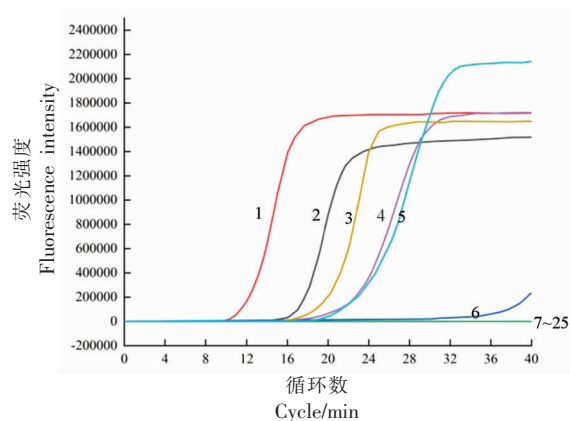
由图 5 可知, 5 种大米糖浆样品检测到了扩增信号, 判定为阳性, 其它植物糖浆样品(玉米糖浆、麦芽糖浆、甜菜糖浆、甘蔗糖浆)均未出现扩增曲线, 即未发生扩增反应, 判定为阴性, 结果表明, 该方法具有良好的特异性, 可用于大米糖浆成分的鉴定。

## 2.6 灵敏度及检出限试验

由图 6a 可知, 当大米 DNA 质量浓度为  $8.45 \times 10^7 \sim 8.45 \times 10^1$  fg/ $\mu$ L 时, 可检测到大米 DNA 的荧光扩增信号, 且 Ct 值逐渐增大; 当 DNA 质量浓度为  $8.45 \times 10^0$  fg/ $\mu$ L 时, 没有产生扩增曲线, 即未发生扩增反应, 因此该检测方法的灵敏度为 84.5 fg/ $\mu$ L。由于大米糖浆在加工处理的过程中, 造成 DNA 降解的现象较为严重, 然而其仍具有良好的灵敏度。如图 6b 所示, 大米 DNA 质量浓度的对数与 Ct 值存在线性关系, 线性方程为  $y = -2.209x + 27.438$  ( $R^2=0.995$ ), 结果表明, 该方法检测大米 DNA 具有良好的灵敏度。

## 2.7 人工模拟掺伪试验

图 7a 为纯槐花蜂蜜和掺入不同百分比纯大米糖浆的实时荧光 SRCA 结果图像。对蜂蜜中人工掺伪大米糖浆的不同质量比例(0.5%, 1%, 2%,



注: 曲线 1~5 为 5 种大米糖浆; 曲线 6~10 为 5 种玉米糖浆; 曲线 11~15 为 5 种甜菜糖浆; 曲线 16~20 为 5 种麦芽糖浆; 曲线 21~25 为 5 种甘蔗糖浆。

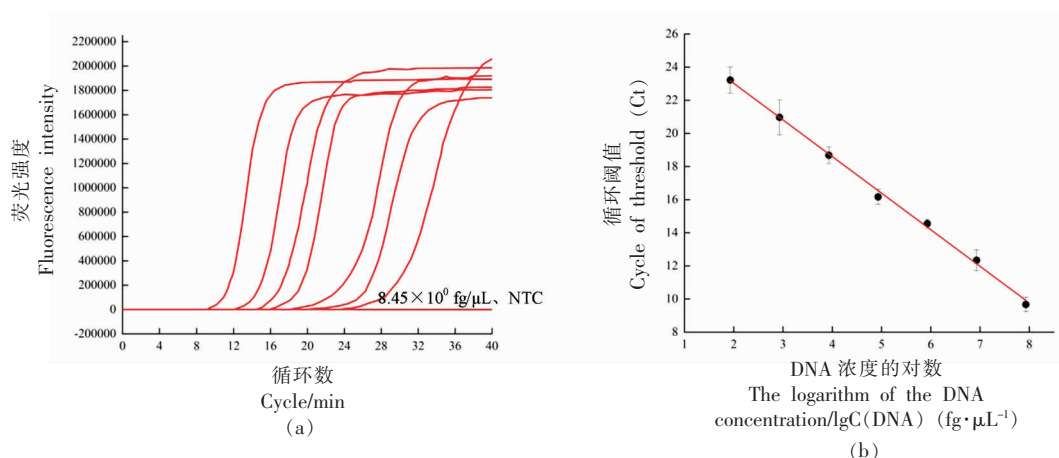
图 5 特异性试验

Fig.5 Specific test

5%, 10%, 20%, 50%) 进行评估, 对混合样品的大米糖浆含量进行定量检测, 掺伪质量比与其对应 Ct 值如下: 50% (9.981), 20% (12.340), 10% (14.510), 5% (16.122), 2% (18.435), 1% (21.055), 0.5% (0), 质量比在 50%~1% 时, 产生荧光信号, 且 Ct 值逐渐增大, 掺假比例在 0.5% 时, 未产生荧光信号, 说明不能区分 0.5% 的掺伪率, 而可以检测到 1% 的掺假率, 因此, 该方法可以检测到蜂蜜中大米糖浆的掺假水平为 1%。如图 7b 所示, 质量比的对数与其对应的 Ct 值线性关系良好, 建立的线性方程  $y = 6.618x + 7.651$ , 相关系数  $R^2=0.993$ , 线性关系良好。相比于 Sobrino-Gregorio 等<sup>[7]</sup>通过实时 PCR 检测蜂蜜中大米糖浆 (定量水平为 2%~

5%),实时荧光 SRCA 灵敏度更高,因为 SRCA 检测方法能够扩增较小的 DNA 片段(60~120 bp)或

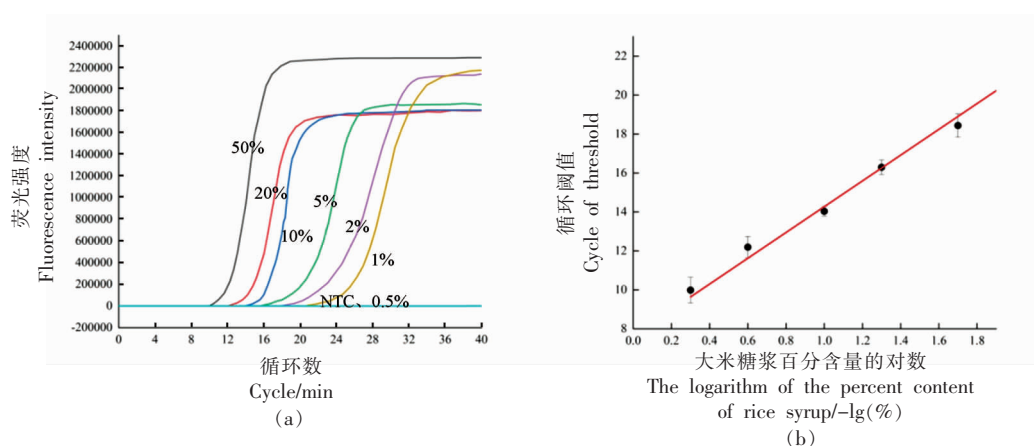
高度降解的 DNA<sup>[1]</sup>。



注:(a)大米 DNA 的 10 倍梯度稀释实时荧光 SRCA 图像,曲线从左到右分别为  $8.45 \times 10^7$ ,  $8.45 \times 10^6$ ,  $8.45 \times 10^5$ ,  $8.45 \times 10^4$ ,  $8.45 \times 10^3$ ,  $8.45 \times 10^2$ ,  $8.45 \times 10^1$   $\text{fg}/\mu\text{L}$ ,未扩增的曲线为  $8.45 \times 10^0$   $\text{fg}/\mu\text{L}$  与阴性对照(NTC);(b)Ct 值与不同质量浓度的大米 DNA 对数的线性关系。

图 6 灵敏度分析

Fig.6 Sensitivity analysis



注:(a)人工掺伪的实时荧光 SRCA 图像,曲线从左到右分别为 50%,20%,10%,5%,2%,1%,未扩增的曲线为 0.5%与阴性对照(NTC);(b)Ct 值与 $-\lg$ (不同掺伪比例的大米糖浆)的线性关系。

图 7 人工模拟掺伪检测及检出限测定

Fig.7 Artificial simulation detection of adulteration and detection limit

### 3 结论与讨论

蜂蜜与大米糖浆中高碳水化合物、酚类化合物的存在是影响 DNA 提取与扩增的主要因素<sup>[30]</sup>。在预处理过程中,CTAB 沉淀液具有沉淀 DNA 的作用,而糖浆制品的 DNA 破坏比较严重,而且糖浆液体比较黏稠,提取效果并不理想,PBS 缓冲液具有调节适宜 pH 值、调节盐平衡、保护溶液生物活性物质的特点。因此,采用 PBS 缓冲液进行样品预处理,并评估 3 种 DNA 提取方法,对比结果表

明,商业试剂盒“NucleoSpin Food”的 DNA 提取效率最好,且操作简单,用时更少。大米特异性基因的选择同样是实时荧光 SRCA 检测植物源成分的关键。本研究以 4 种特异性基因为靶序列,分别设计引物,结果表明,在大米 PDL 的特异性基因上设计的引物效果最好,经特异性试验证实引物的特异性良好。

本研究构建了实时荧光 SRCA 技术定量检测蜂蜜掺伪大米糖浆的方法,灵敏度试验表明,该方

法检测到大米 DNA 的灵敏度为  $8.45 \times 10^1 \text{ fg}/\mu\text{L}$ , 人工掺伪样品检测试验表明, 该方法可准确检出蜂蜜中低至 1% 的大米糖浆成分, 建立的线性方程为  $y = 6.618x + 7.651 (R^2 = 0.993)$ , 相比于实时 PCR<sup>[3]</sup> 可检测掺伪比例为 2%~5%, SRCA 具有更高的灵敏度, 因为 SRCA 可扩增 DNA 片段长度 60~120 bp 或高度裂解的 DNA, 目前在蜂蜜掺伪植物糖浆检测方法中很难检出低于 10% 的植物糖浆成分。因此, 该方法具有更低的定量检出限。综上所述, SRCA 技术可用于蜂蜜掺伪的定量检测, 具有良好的特异性和更高的灵敏度。整套检测仅需 2.5 h, 耗时短, 为蜂蜜掺伪的快速定量检测提供了一种新策略。

### 参 考 文 献

- [1] SERAGLIO S K T, SILVA B, BERGAMO G, et al. An overview of physicochemical characteristics and health-promoting properties of honeydew honey [J]. *Food Research International*, 2019, 119: 44–66.
- [2] 刘朋飞, 李海燕. 世界蜂蜜生产与贸易发展状况分析[J]. *世界农业*, 2015(10): 108–113.  
LIU P F, LI H Y. Analysis on the development of world honey production and trade[J]. *World Agriculture*, 2015(10): 108–113.
- [3] CALLAO M P, RUISÁNCHEZ I. An overview of multivariate qualitative methods for food fraud detection[J]. *Food Control*, 2018, 86: 283–293.
- [4] SOBRINO-GREGORIO L, VARGAS M, CHIRALT A, et al. Thermal properties of honey as affected by the addition of sugar syrup[J]. *Journal of Food Engineering*, 2017, 213: 69–75.
- [5] 杜新法. 中国蜂蜜质量值得信赖[J]. *中国蜂业*, 2018, 69(11): 50–51.  
DU X F. The quality of Chinese honey is trustworthy[J]. *China Bee Industry*, 2018, 69(11): 50–51.
- [6] NAILA A, FLINT S H, SULAIMAN A Z, et al. Classical and novel approaches to the analysis of honey and detection of adulterants[J]. *Food Control*, 2018, 90: 152–165.
- [7] TOSUN M, KELES F. Investigation methods for detecting honey samples adulterated with sucrose syrup [J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2021, 101: 103941.
- [8] 吴迪, 李丽君, 王丹丹, 等. 核磁共振技术在蜂蜜植物糖浆掺假检测应用的研究进展[J]. *检验检疫学刊*, 2020, 30(3): 153–156.  
WU D, LI L J, WANG D D, et al. Research progress on the application of nuclear magnetic resonance technology in the detection of adulteration of honey plant syrup [J]. *Journal of Inspection and Quarantine*, 2020, 30(3): 153–156.
- [9] SEISONEN S, KIVIMA E, VENE K. Characterisation of the aroma profiles of different honeys and corresponding flowers using solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry/olfactometry[J]. *Food Chemistry*, 2015, 169: 34–40.
- [10] WANG S, GUO Q, WANG L, et al. Detection of honey adulteration with starch syrup by high performance liquid chromatography [J]. *Food Chemistry*, 2015, 172: 669–674.
- [11] 张妍楠, 陈兰珍, 薛晓锋, 等. 基于近红外光谱检测技术鉴别洋槐蜜中掺入大米糖浆的可行性研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2015, 35(9): 2536–2539.  
ZHANG Y N, CHEN L Z, XUE X F, et al. Feasibility study on identification of rice syrup in acacia honey based on near-infrared spectroscopy [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2015, 35(9): 2536–2539.
- [12] 黄富荣, 宋晗, 郭嫫, 等. 近红外光谱结合化学计量学的常见中国蜂蜜掺杂糖浆鉴别[J]. *光谱学与光谱分析*, 2019, 39(11): 3560–3565.  
HUANG F R, SONG H, GUO L, et al. Identification of common Chinese honey-doped syrups by near-infrared spectroscopy combined with chemometrics[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2019, 39(11): 3560–3565.
- [13] VALINGER D, LONGIN L, GRBEŠ F, et al. Detection of honey adulteration—The potential of UV–VIS and NIR spectroscopy coupled with multivariate analysis[J]. *LWT*, 2021, 145: 111316.
- [14] OROIAN M, ROPCIUC S. Botanical authentication of honeys based on Raman spectra [J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2018, 12(1): 545–554.
- [15] CORVUCCI F, NOBILI L, MELUCCI D, et al. The discrimination of honey origin using melissopalynology and Raman spectroscopy techniques coupled with multivariate analysis[J]. *Food Chemistry*, 2015, 169:



- 297–304.
- [16] LI H, WU M, SHE S, et al. Study on stable carbon isotope fractionation of rape honey from rape flowers (*Brassica napus* L.) to its unifloral ripe honey[J]. *Food Chemistry*, 2022, 386: 132754.
- [17] SOBRINO –GREGORIO L, VILANOVA S, PROHENS J, et al. Detection of honey adulteration by conventional and real-time PCR[J]. *Food Control*, 2019, 95: 57–62.
- [18] XU L L, DUAN J X, CHEN J M, et al. Recent advances in rolling circle amplification –based biosensing strategies –A review[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2020, 12: 062.
- [19] XU X Y, SU Y, ZHANG Y Z, et al. Novel rolling circle amplification biosensors for food –borne microorganism detection[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2021, 141(7): 116293.
- [20] NUPUR G, FARHAN J A, SUDESHNA K. Recent advances in loop –mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid and efficient detection of pathogens [J]. *Current Research in Microbial Sciences*, 2022, 3: 100120.
- [21] AHUJA A, SOMVANSHI V S. Diagnosis of plant –parasitic nematodes using loop –mediated isothermal amplification (LAMP): A review[J]. *Crop Protection*, 2021, 147: 105459.
- [22] 李韦霖, 郭威, 梁梓薇, 等. 跨越式滚环等温扩增可视化检测羊肉中鸭肉源成分[J]. *食品科技*, 2022, 47(3): 311–317.
- LI W L, GUO W, LIANG Z W, et al. Visual detection of duck meat –derived components in mutton by leaping rolling circle isothermal amplification[J]. *Food Science and Technology*, 2022, 47(3): 311–317.
- [23] 胡学佳, 卢鑫, 张蕴哲, 等. 可视化跨越式滚环等温扩增技术在猪肉掺假检测中的应用[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(24): 75–80.
- HU X J, LU X, ZHANG Y Z, et al. Application of visual leaping rolling circle isothermal amplification technology in detection of pork adulteration[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2020, 41(24): 75–80.
- [24] LÓPEZ–ANDREO M, ALDEGUER M, GUILLÉN I, et al. Detection and quantification of meat species by qPCR in heat –processed food containing highly fragmented DNA[J]. *Food Chemistry*, 2012, 134(1): 518–523.
- [25] SOARES S, AMARAL J S, OLIVEIRA M B P P, et al. Improving DNA isolation from honey for the botanical origin identification[J]. *Food Control*, 2015, 48: 130–136.
- [26] MEIRA L, COSTA J, VILLA C, et al. EvaGreen real –time PCR to determine horse meat adulteration in processed foods[J]. *LWT*, 2017, 75: 408–416.
- [27] 张莹. 天然深加工食品开发和检测分析[J]. *轻工科技*, 2018, 34(1): 1–2.
- ZHANG Y. Development and detection and analysis of natural deep –processed food [J]. *Light Industry Science and Technology*, 2018, 34(1): 1–2.
- [28] PRANDI B, LAMBERTINI F, FACCINI A, et al. Mass spectrometry quantification of beef and pork meat in highly processed food: Application on Bolognese sauce[J]. *Food Control*, 2017, 74: 61–69.
- [29] SEGURA –GIL I, GALAN –MALO P, MATA L, et al. A novel ELISA test to detect soy in highly processed foods [J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2022, 106: 104303.
- [30] 李梅阁, 吴亚君, 杨艳歌, 等. 浆果基因组 DNA 提取方法比较及 PCR 优化[J]. *中国食品学报*, 2018, 18(6): 8.
- LI M G, WU Y J, YANG Y G, et al. Comparison of berry genomic DNA extraction methods and PCR optimization [J]. *Chinese Journal of Food Science*, 2018, 18(6): 8.

### Detection of Honey Adulterated Rice Syrup by Real-time Fluorescence Spanning Rolling Circle Isothermal Amplification

Yang Hao<sup>1</sup>, Xu Hui<sup>2</sup>, Li Xinyan<sup>2</sup>, Lu Xin<sup>2</sup>, Yang Qian<sup>5</sup>, Zhang Wei<sup>1,3,4\*</sup>

<sup>1</sup>College of Food Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei

<sup>2</sup>Department of Science and Engineering, Hebei Agricultural University, Cangzhou 061100, Hebei

<sup>3</sup>College of Life Sciences, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei

<sup>4</sup>Key Laboratory of Analysis and Prevention and Control of Pathogenic Microorganisms Caused by Zootopia

in Hebei Province, Baoding 071000, Hebei

<sup>5</sup>School of Public Health, Hebei University, Baoding 071000, Hebei)

**Abstract** In this study, It combined saltatory rolling circle amplification (SRCA) with fluorescence technology to establish a real-time fluorescence SRCA technique for detection of honey adulterated rice syrup. Three DNA extraction protocols were evaluated, four specific genes of rice (*PDL*, *SPS*, *rbcl*, *GOS9*) were used as target sequences to design primers, suitable primers were screened, amplification reaction conditions were optimized, and a method for detection of honey adulterated rice syrup was established in combination with fluorescence technology. The results showed that the sensitivity of the established real-time fluorescence SRCA method for the detection of rice DNA was  $8.45 \times 10^1$  fg/ $\mu$ L, and its good specificity was confirmed by the specificity evaluation. The linear relationship between the logarithm of the proportion of adulteration and the Ct value was established in the manual simulated adulteration detection test, and the linear equation was  $y=6.618x+7.651$  ( $R^2=0.993$ ), which can accurately detect the components of rice syrup in honey down to 1%. The method is sensitive, with low detection limit, and can quickly and accurately quantify the adulteration of honey with rice syrup, which provides a new idea for the rapid quantitative detection of honey adulteration.

**Keywords** adulterated honey; deeply processed food; saltatory rolling circle amplification (SRCA)