



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103540673 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 29

(21) 申请号 201310521842. 7

(22) 申请日 2013. 10. 30

(71) 申请人 昆明理工大学

地址 650093 云南省昆明市五华区学府路
253 号

(72) 发明人 刘丽 魏晓璐 黄鑫 夏雪山
冯悦 张阿梅

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页
序列表2页 附图2页

(54) 发明名称

核桃乳饮品中大豆、花生成分的双重 PCR 检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种运用双重 PCR 技术同时检测核桃乳中掺入大豆和花生成分的方法,该方法针对大豆、花生成分设计特异性引物,建立核桃乳中主要掺杂成分大豆、花生的双重 PCR 检测方法,包括设计的针对大豆、花生成分的特异性引物以及与之配套的 PCR 反应条件,本方法设计的引物与其他常见豆科植物以及花生、榛子、核桃、松子、开心果、碧根果、腰果、杏仁、芝麻、苹果等非豆科植物没有交叉反应,具有良好特异性;本发明方法可以用于同时检测核桃乳主要掺杂的大豆、花生成分,结果快速准确可靠,对市面上检测大豆和花生蛋白代替核桃蛋白具有实际应用价值。同时,可对其他低价植物蛋白代替核桃蛋白及相关乳制品的快速、特异性检测有重要参考价值。

1. 一种核桃乳饮品中大豆、花生成分的双重 PCR 检测方法,其特征在于:以待测样品的 DNA 为模板,以如下所示的大豆引物、花生引物进行双重 PCR 扩增检测;若发生特异性扩增条带,则表明待测样品中包含大豆或花生成分;

大豆引物:

Bd 28K-F:5' -GCAGCATTGACCCCTCTACAAGC-3',

Bd 28K-R:5' -TTCGAATCCAGAAAGCACCGAGT-3',

花生引物:

Ara h1-F:5' -GCCATCAACGCTTCCTCCGAACTCC-3',

Ara h1-R:5' -TTCACCCGACCCAGGAATGCT-3'。

2. 根据权利要求 1 所述核桃乳饮品中大豆、花生成分的双重 PCR 检测方法,其特征在于: PCR 反应体系如下:

2×Premix Taq (TaKaRa)	12.5 μ l
引物 Bd 28K-F (10 μ M)	0.5 μ l
引物 Bd 28K-R (10 μ M)	0.5 μ l
引物 Ara h1-F (10 μ M)	0.5 μ l
引物 Ara h1-R (10 μ M)	0.5 μ l
DNA 样品	1.0 μ l
Rnase Free dH ₂ O	9.5 μ l
总体积	25 μ l 。

3. 根据权利要求 1 所述核桃乳饮品中大豆、花生成分的双重 PCR 检测方法,其特征在于: PCR 扩增程序为:94°C 10min;94°C 30s,58°C 30s,72°C 30s,40 个循环;72°C 7min。

核桃乳饮品中大豆、花生成分的双重 PCR 检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于食品质量安全监测技术领域,具体地说涉及应用双重 PCR 法对核桃乳饮品中掺入的大豆、花生成分的同时快速检测方法。

背景技术

[0002] 随着人们生活水平的日益提高,对保健营养食品的需求越来越大;随着人们消费意识的转变,追求“营养、安全、健康”的消费意识也更加浓厚。核桃是一种营养丰富的食品原料,不含胆固醇,含有丰富的核黄素、卵磷脂、微量元素、维生素、氨基酸及大量不饱和脂肪酸,可以防止机体早衰、促进脑细胞发育、减少胆固醇的合成、防止动脉硬化,是一种理想的营养保健食品。而核桃蛋白中含有对人体有益的多种氨基酸成分,核桃乳饮料凭借其健康、营养、安全、时尚的优势得到迅猛发展,核桃乳饮品的产业化发展令人瞩目,市场前景十分广阔。在以核桃为主要成分的食品未加工前,根据形态很容易将核桃和其他物种进行鉴别,但在食品加工处理后,往往失去直观的可鉴别特征。不法商家为追求眼前利益,采用价格相对低廉的大豆、花生仿造核桃乳饮料,以次充好并以低价争抢市场,严重侵害了消费者的合法权益,甚至给消费者的健康安全带来威胁,也严重影响了核桃产业的健康发展。目前核桃乳(露)执行的检测标准,以物理和化学法检测核桃乳的感官和各种理化值,如:蛋白质、脂肪等,虽能对其作出初步判断,但理论依据不充分,不能适应现今社会发展的需要。在文献报道及国家相关植物蛋白饮料标准中,都没有同时对核桃乳中掺入大豆、花生蛋白进行快速鉴别的有效方法。

[0003] 目前国内对含核桃成分食品中核桃蛋白成分的鉴定主要为以抗体-抗原特异性识别为基础的酶联免疫吸附(ELISA)检测,对于掺入常见低价蛋白如大豆、花生蛋白的 DNA 检测仍未见报道。由于在核桃乳的生产过程中,在饮品中有少量残留的原材料 DNA,且 DNA 比蛋白稳定,所以 PCR 方法较 ELISA 方法更为准确,并且避免了对大量抗体的需求。本研究针对大豆、花生成分设计特异性引物,建立了运用双重 PCR 技术同时检测核桃乳中掺入大豆、花生成分的方法。

发明内容

[0004] 针对上述情况,本发明克服了现有技术中的缺点,目的就在于建立一种运用 PCR 技术快速同时检测核桃乳中主要掺杂物大豆和花生成分的方法,为各类核桃蛋白食品和保健品中掺假成分的鉴别提供技术支持。为实现上述目的,本发明的方法为:针对大豆设计一组特异性引物 Bd 28K-F 和 Bd 28K-R;针对花生设计一组特异性引物 Arah1-F 和 Arah1-R;提取不同植物乳品的 DNA,利用两对引物进行双重 PCR 扩增,对引物进行物种特异性的验证,观察是否有大豆特异性扩增条带(216bp)和花生特异性扩增条带(150bp);提取不同核桃乳材料中的 DNA,利用参照引物即植物通用引物(CP03-F、CP03-R)对所提取 DNA 进行 PCR 扩增,观察是否有 123bp 条带扩增,防止假阴性,利用所设计两对引物进行目的基因的 PCR 特异性扩增;对 PCR 扩增结果进行分析。

[0005] 本发明技术内容包括：

(一) 该方法使用大豆、花生特异性引物对不同植物乳饮品进行双重 PCR 检测：

大豆引物：

Bd 28K-F :5' -GCAGCATTGACCCCTCTACAAGC-3'，

Bd 28K-R :5' -TTCGAATCCAGAAAGCACCGAGT-3'，

花生引物：

Ara h1-F :5' -GCCATCAACGCTTCCTCCGAACTCC-3'，

Ara h1-R :5' -TTCACCCGACCCAGGGAATGCT-3'。

[0006] 本发明中双重 PCR 反应体系中各组分构成比例如下：

成分	加样量	
2×Premix Taq (TaKaRa)	12.5 μ l	
引物 Bd 28K-F (10 μ M)	0.5 μ l	
引物 Bd 28K-R (10 μ M)	0.5 μ l	
引物 Ara h1-F (10 μ M)	0.5 μ l	
引物 Ara h1-R (10 μ M)	0.5 μ l	
DNA 样品		1.0 μ l
Rnase Free dH2O		9.5 μ l
总体积	25 μ l。	

[0007] 本发明双重 PCR 方法中扩增程序为：

(1) 94°C 10min

(2) 94°C 30s

(3) 58°C 30s

(4) 72°C 30s

(5) 回到第 2 步, 重复 40 次。

[0008] (6) 72°C 7min。

[0009] (二) 使用植物通用引物对不同植物乳饮品进行 PCR 检测：

通用引物：

CP03-F :5' -CGGACGAGAATAAAGATAGAGT-3'

CP03-R :5' -TTTTGGGGATAGAGGGACTTGA-3'

本发明中 PCR 反应体系中各组分构成比例如下：

成分	加样量	
2×Premix Taq (TaKaRa)	12.5 μ l	
引物 CP03-F (10 μ M)	0.5 μ l	
引物 CP03-R (10 μ M)	0.5 μ l	
DNA 样品		1.0 μ l
Rnase Free dH2O		10.5 μ l
总体积	25 μ l	

植物通用 PCR 方法扩增程序为：

(1) 94°C 10min

- (2) 94°C 30s
- (3) 56°C 30s
- (4) 72°C 30s
- (5) 回到第 2 步, 重复 40 次
- (6) 72°C 7min

本发明的方法具体包括以下步骤:

(1) 基于从 NCBI 下载的大豆基因序列设计大豆特异性 PCR 引物:

Bd 28K-F: 5' -GCAGCATTGACCCCTCTACAAGC-3',

Bd 28K-R: 5' -TTCGAATCCAGAAAGCACCGAGT-3' ;

(2) 基于从 NCBI 下载的花生基因序列设计花生特异性 PCR 引物:

Ara h1-F: 5' -GCCATCAACGCTTCCTCCGA ACTCC-3',

Ara h1-R: 5' -TTCACCCGACCCAGGGAATGCT-3' ;

(3) 查阅文献, 利用植物通用 PCR 引物:

CP 03-F: 5' -CGGACGAGAATAAAGATAGAGT-3',

CP 03-R: 5' -TTTTGGGGATAGAGGGACTTGA-3' ;

(4) 提取核桃乳样品中的 DNA, 按双重 PCR 反应体系和扩增程序, 利用大豆和花生特异性引物进行双重 PCR, 根据条带大小判断核桃乳中是否掺入大豆、花生成分, 扩增条带大小为 216bp 时, 证明有大豆成分; 扩增条带大小为 150bp 时, 证明有花生成分;

(5) 从各类核桃乳饮品中提取的 DNA, 用植物通用引物及相应 PCR 反应成分组成与程序进行扩增, 产物条带大小单一均为 123bp 时, 说明 DNA 提取成功, 符合 PCR 反应要求。

[0010] 本方法与常见豆科植物以及常见坚果类如榛子、板栗、核桃、松子、开心果、碧根果、腰果、杏仁、非坚果类如苹果等没有交叉反应, 具有特异性。与现有技术相比, 由于产品中蛋白质遭到破坏, ELISA 方法不能有效检出的食品中大豆、花生成分, 本发明利用双重 PCR 可以同时检测以蛋白成分为主要原料的核桃乳饮品掺入的大豆、花生成分。本发明用多重 PCR 的方法扩增靶基因, 避免了 ELISA 方法反应的复杂处理过程, 同时检测两种成分, 节约时间; PCR 鉴定方法受到的其他蛋白的干扰较小, 比 ELISA 方法更为准确。

[0011] 附图说明

图 1 是本发明大豆、花生双重 PCR 引物对于常见豆科植物的特异性验证电泳图, M: 2000bp ladder DNA maker; 1- 黄大豆; 2- 青大豆; 3- 黑大豆; 4- 扁豆; 5- 绿豆; 6- 蚕豆; 7- 白芸豆; 8- 红芸豆; 9- 豌豆; 10- 麻豇豆; 11- 豇豆; 12- 红小豆; 13- 赤豆; 14- 阴性对照;

图 2 是本发明大豆、花生双重 PCR 引物对于其他常见非豆科植物的特异性验证电泳图, M: 2000bp ladder DNA maker; 1- 黄大豆; 2- 腰果; 3- 核桃; 4- 花生; 5- 燕麦; 6- 香蕉; 7- 白芝麻; 8- 榛子; 9- 碧根果; 10- 苹果; 11- 开心果; 12- 瓜子; 13- 黑芝麻; 14- 杏仁; 15- 松子; 16- 阴性对照;

图 3 是本发明植物通用引物扩增不同品牌核桃乳电泳图; M: 500bp ladder DNA maker; 1~22: 不同品牌核桃乳; 23- 阴性对照;

图 4 是大豆、花生双重 PCR 引物扩增不同品牌核桃乳电泳图; M: 2000bp ladder DNA maker; 1~22: 不同品牌核桃乳; 23- 阴性对照。

具体实施方式

[0012] 下面通过附图和实施例对本发明作进一步详细说明,但本发明保护范围不局限于所述内容。

[0013] 实施例 1:

1、引物设计

通过文献查阅及 BLAST 比对,参考 NCBI 序列号为 EU493455、EU493457、EU493458、EU493459、EU493460、EU493461,利用 Primer Premier 5.0 和 Oligo 6.0 软件进行引物设计,设计大豆特异性引物由华大基因生物有限公司合成,引物序列如下:

Bd 28K-F:5' -GCAGCATTGACCCCTCTACAAGC-3',

Bd 28K-R:5' -TTCGAATCCAGAAAGCACCGAGT-3';

通过文献查阅及 BLAST 比对,参考 NCBI 序列号为 AF43223, AB440237, AY581852, HM640249,利用 Primer Premier 5.0 和 Oligo6 软件进行引物设计;设计好的花生特异性引物由华大基因生物有限公司合成,引物序列如下:

Ara h1-F:5' -GCCATCAACGCTTCCTCCGA ACTCC-3',

Ara h1-R:5' -TTCACCCGACCCAGGGAATGCT-3'。

[0014] 2、DNA 的提取

样品:豆科类如黄大豆、青大豆、黑大豆、扁豆、绿豆、蚕豆、白芸豆、红芸豆、豌豆、麻豇豆、豇豆、红小豆、赤豆;坚果类如花生、松子、杏仁、腰果、碧根果、开心果、榛子、瓜子、核桃;非坚果类如燕麦、苹果、香蕉、白芝麻、黑芝麻。

[0015] 分别取上述适量样品,在加入液氮的研钵中迅速研磨成粉末,分别称量 100mg 样品粉末转移至 1.5mlEP 管中,使用天根公司离心柱型植物基因组 DNA 提取试剂盒完成样品中 DNA 的提取,具体操作步骤如下:

(1) 将已加入 0.70ul 巯基乙醇的 700 μ 1GP1 分别加入到各个含 100mg 样品粉末的 EP 管中,颠倒混匀,65°C 水浴 20min;

(2) 向各个 EP 管中加入等体积氯仿混匀,沉淀数分钟待分层后,12000rpm 离心 5 min;

(3) 将上层水相转入新离心管,加入 700ul 缓冲液 GP2 混匀;

(4) 混匀液体加入 CB3 柱,12000 rpm 离心 1min,弃液;

(5) 向 CB3 中加 500ul GD 液,12000rpm 离心 1min,弃液,将 CB3 柱放入收集管;

(6) 向 CB3 柱中加 700ul PW 液,12000rpm 离心 1min,弃液,将 CB3 柱放入收集管;

(7) 向 CB3 柱加 500ul PW 液,12000rpm 离心 1min,弃液;

(8) 将 CB3 柱放回收集管,12000rpm 离心 2min,弃液,CB3 柱置于室温放置晾干;

(9) CB3 柱转入新离心管中,加 50ul TE 洗脱液,室温放置 5min,12000rpm 离心 2min;

(10) 将第 9 步得到的收集液再加入 CB3 柱中,12000rpm 离心 2min;

(11) 将产物储存于 -80°C,待用。

[0016] 3、PCR 扩增

(1) 使用大豆、花生引物对所提取的 DNA 样本进行双重 PCR 检测,PCR 反应体系中各组分构成比例如下:

本发明中双重 PCR 反应体系中各组分构成比例如下:

成分	加样量
----	-----

2×Premix Taq (TaKaRa)	12.5 μ l	
引物 Bd 28K-F (10 μ M)	0.5 μ l	
引物 Bd 28K-R (10 μ M)	0.5 μ l	
引物 Ara h1-F (10 μ M)	0.5 μ l	
引物 Ara h1-R (10 μ M)	0.5 μ l	
DNA 样品		1.0 μ l
Rnase Free dH ₂ O		9.5 μ l
总体积	25 μ l ;	

双重 PCR 方法中扩增程序为：

- (1) 94°C 10min
- (2) 94°C 30s
- (3) 58°C 30s
- (4) 72°C 30s
- (5) 回到第 2 步,重复 40 次。

[0017] (6) 72°C 7min。

[0018] 4、电泳检测

取 6 μ L 扩增产物在 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳,用 TAE 作为电泳缓冲液,120V 下电泳 20min,EB 染色,紫外灯下观测并用凝胶分析系统照相,如图 1、图 2。图 1 中仅大豆 DNA 即泳道 1、泳道 2、泳道 3 出现特异性条带为 216bp,图 2 中黄大豆 DNA 即泳道 1 出现特异性条带为 216bp,花生 DNA 泳道 4 出现特异性条带为 150bp,说明引物特异性强。

[0019] 实施例 2：

样本：市售 22 种不同品牌标明含核桃蛋白成分的核桃乳饮品,产地分布在云南省、河北省、山西省、内蒙古等地。

[0020] 1、DNA 的提取

将不同待测核桃乳样品冷冻干燥,分别称量 100mg 样品粉末转移至 1.5mlEP 管中,使用天根公司离心柱型植物基因组 DNA 提取试剂盒完成样品中 DNA 的提取,具体操作步骤同实施例 1 步骤 2。

[0021] 2、PCR 扩增

(1) 用植物通用引物及相应 PCR 反应成分组成与程序对所提取 DNA 样本进行扩增,产物条带大小单一均为 123bp 时,说明 DNA 提取成功,符合 PCR 反应要求。

[0022] PCR 反应体系中各组分构成比例如下：

成分	加样量	
2×Premix Taq (TaKaRa)	12.5 μ l	
引物 CP03-F (10 μ M)	0.5 μ l	
引物 CP03-R (10 μ M)	0.5 μ l	
DNA 样品		1.0 μ l
Rnase Free dH ₂ O		10.5 μ l
总体积	25 μ l	

植物通用引物 PCR 方法扩增程序为：

- ① 94℃ 10min
- ② 94℃ 30s
- ③ 56℃ 30s
- ④ 72℃ 30s
- ⑤ 回到第 2 步,重复 40 次
- ⑥ 72℃ 7min

(2) 使用大豆和花生引物对所提取的 DNA 样本进行双重 PCR 检测；
双重 PCR 反应体系中各组分构成比例如下：

成分	加样量
2×Premix Taq (TaKaRa)	12.5 μ l
引物 Bd 28K-F (10 μ M)	0.5 μ l
引物 Bd 28K-R (10 μ M)	0.5 μ l
引物 Ara h1-F (10 μ M)	0.5 μ l
引物 Ara h1-R (10 μ M)	0.5 μ l
DNA 样品	1.0 μ l
Rnase Free dH ₂ O	9.5 μ l
总体积	25 μ l。

[0023] 双重 PCR 方法中扩增程序为：

- ① 94℃ 10min
- ② 94℃ 30s
- ③ 58℃ 30s
- ④ 72℃ 30s
- ⑤ 回到第 2 步,重复 40 次
- ⑥ 72℃ 7min。

[0024] 3、电泳检测

取 6 μ L 扩增产物在 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳,用 TAE 作为电泳缓冲液,120V 下电泳 20min,EB 染色,紫外灯下观测并用凝胶分析系统照相,如图 3、图 4。图 3 中除阴性对照(泳道 23)其他均为阳性条带 123bp,说明核桃乳 DNA 提取成功。图 4 中泳道 23 为阴性对照,泳道 1、22 出现大豆特异性条带 216bp,泳道 1、5、8、12、14、18、21 出现花生特异性条带 150bp,说明样品 1 含有大豆和花生成分,符合产品标识;样品 22 含有大豆成分,产品标识则为纯核桃乳,结果与产品标识不符,说明有大豆成分掺假。样品 5、8、12、14、18、21 出现花生成分条带,其中只有样品 5、18、21 标明含有花生成分,而样品 8、12、14 未标明含花生成分,说明有花生成分掺假,样品 2、3、4、6、7、9、10、11、13、15、16、17、19、20 符合产品标识。

序列表

<110> 昆明理工大学

<120> 核桃乳饮品中大豆、花生成分的双重 PCR 检测方法

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

gcagcattga cccctctaca agc

23

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

ttcgaatcca gaaagcaccg agt

23

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

gccatcaacg cttcctccga actcc

25

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

ttcacccgac ccaggaatg ct

22

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 5

cggacgagaa taaagataga gt

22

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 6

ttttggggat agaggactt ga

22

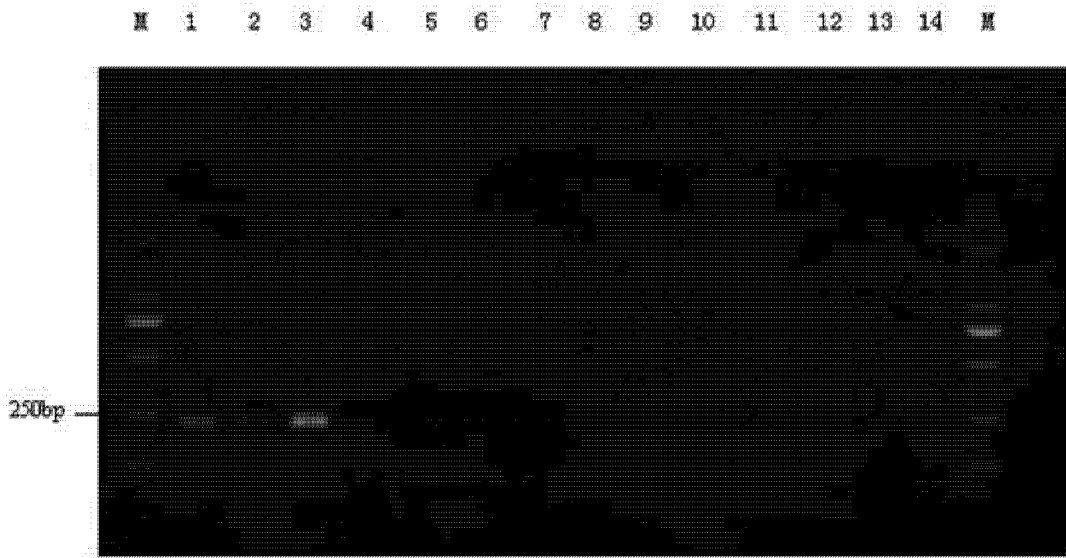


图 1

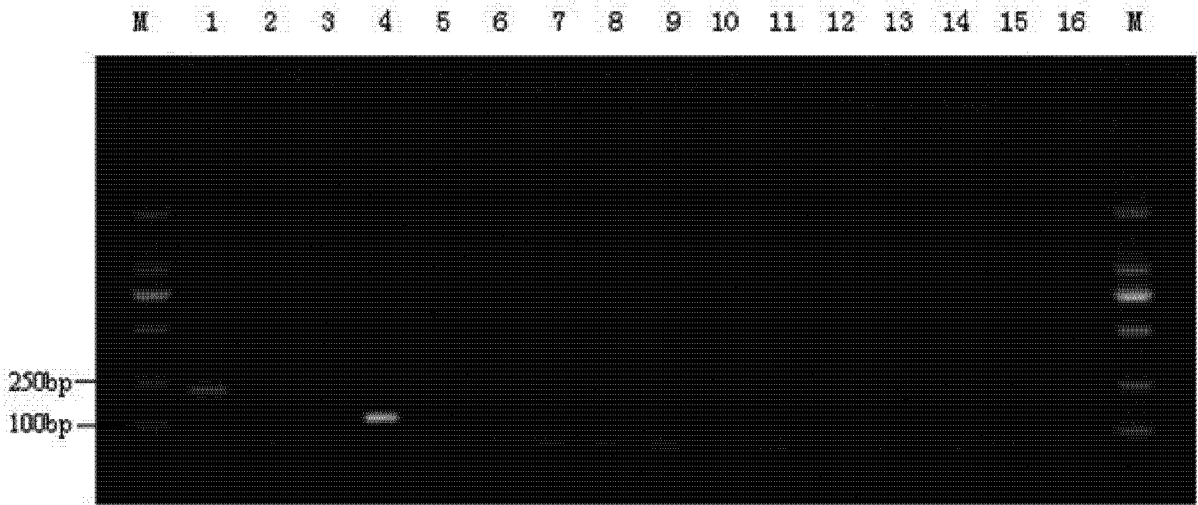


图 2

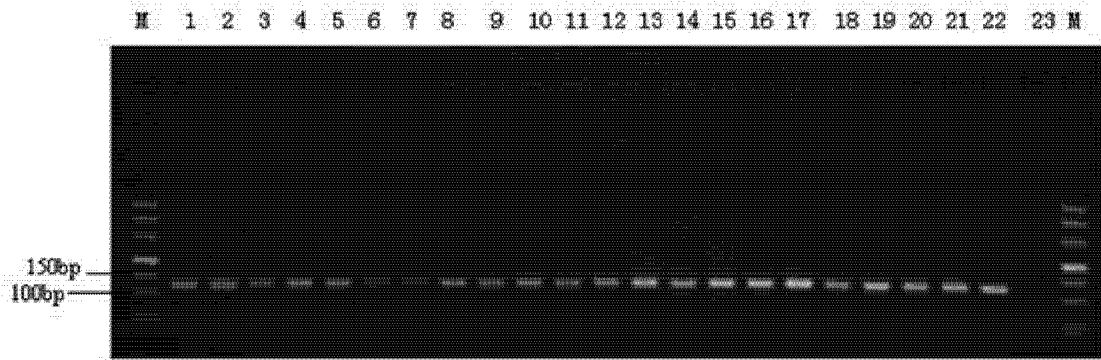


图 3

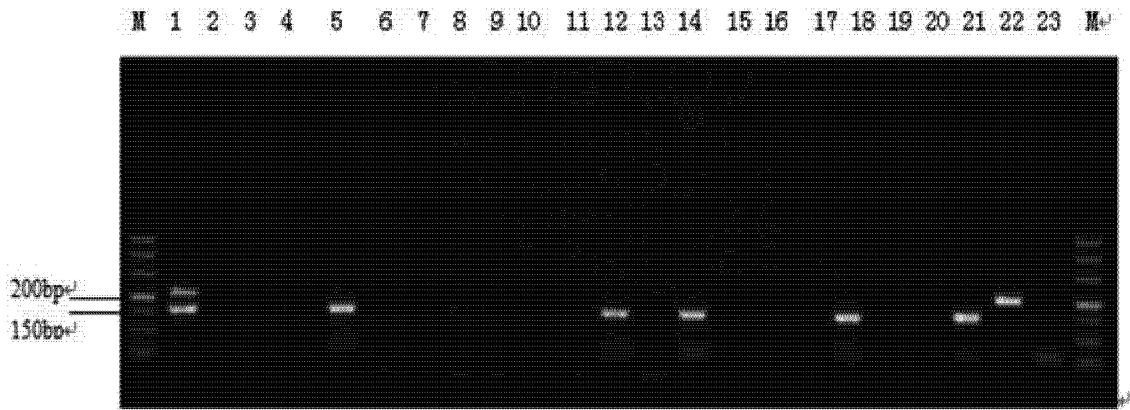


图 4