4 种植物源性成分多重real-time PCR检测方法的建立及其在食用淀粉中的应用

范 维，高晓月，董雨馨，刘虹宇，李贺楠，赵文涛，郭文萍*
（中国肉类食品综合研究中心，北京食品科学研究院，北京 100068）

摘 要：建立一种可同时快速检测红薯、木薯、马铃薯、玉米源性成分的多重实时聚合酶链式反应（real-time polymerase chain reaction，real-time PCR）方法。分别以红薯*g3pdh*基因、木薯*g3pdh*基因、马铃薯*UGPase*基因、玉米*zSSIIb*基因为靶基因设计特异性引物和*Taq*Man探针，以18S rRNA基因为内参基因，建立多重real-time PCR方法，开展方法学验证，并对不同掺入比例模拟样品和实际淀粉样品进行检测。结果显示，该方法具有高通量、特异性强、灵敏度高等优点。与15 种非目标源性均无交叉反应；对目标DNA的检测灵敏度可达到3×10^{-3} ng/μL，且具有良好的线性关系和扩增效率；对淀粉样品的检出限可达0.1%，对50 份实际样品进行检测，结果与参比方法一致，说明建立的多重real-time PCR法可用于食用淀粉种类掺假鉴别检测。

关键词：多重实时聚合酶链式反应；食用淀粉；木薯；红薯；马铃薯；玉米

Establishment of a Multiplex Real-Time PCR Method for Detection of Four Plant-Derived Components and Its Application to Edible Starches

FAN Wei, GAO Xiaoyue, DONG Yuxin, LIU Hongyu, LI Henan, ZHAO Wentao, GUO Wenping*
(China Meat Research Center, Beijing Academy of Food Sciences, Beijing 100068, China)

Abstract: A multiplex real-time polymerase chain reaction (PCR) method for simultaneous and rapid detection of components derived from sweet potato, cassava, potato, and corn was established. The *g3pdhs* gene of sweet potato and cassava, the *UGPase* gene of potato and the *zSSIIb* gene of corn were used as target genes to design specific primers and *Taq*Man probe, and the 18S rRNA gene was used as the internal reference gene. Methodological validation was performed, and the proposed method was applied to simulated samples with different mixing ratios and actual starch samples. The results showed that this method was high-throughput, sensitive and specific. No cross-reaction was found with 15 non-target sources. The detection sensitivity for template DNA was 3×10^{-3} ng/μL, and the proposed method had a good linear relationship and high amplification efficiency. The detection limit for edible starch samples was 0.1%. The results of the PCR method for 50 actual samples were consistent with those of the reference method, indicating that this method could be used for the detection of common adulterants in edible starches.

Keywords: multiplex real-time polymerase chain reaction; edible starch; cassava; sweet potato; potato; corn
DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230315-149
中图分类号：TS251.7 文献标志码：A 文章编号：1002-6630（2024）01-0210-07
引文格式：
范维, 高晓月, 董雨馨, 等. 4 种植物源性成分多重real-time PCR检测方法的建立及其在食用淀粉中的应用[J]. 食品科学, 2024, 45(1): 210-216. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230315-149. http://www.spkx.net.cn
FAN Wei, GAO Xiaoyue, DONG Yuxin, et al. Establishment of a multiplex real-time PCR method for detection of four plant-derived components and its application to edible starches[J]. Food Science, 2024, 45(1): 210-216. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230315-149. http://www.spkx.net.cn

收稿日期：2023-03-15
基金项目：北京市科技计划项目（Z221100007122010）；“十三五”国家重点研发计划重点专项（2018YFC1603400）；北京市优秀人才培养资助青年骨干个人项目（2017754154700G101）
第一作者简介：范维（1989—）（ORCID: 0000-0001-6122-4727），女，高级工程师，硕士，研究方向为食品科学与工程。E-mail: fw837093515@163.com
*通信作者简介：郭文萍（1970—）（ORCID: 0000-0002-9677-0397），女，高级工程师，学士，研究方向为食品安全。E-mail: 956920027@qq.com

淀粉一直是人们日常饮食中较为常见的食品。现阶段的淀粉已经不局限于为人们日常烹饪所用，更是作为一种工业原料在食品生产、化学化工领域得以广泛使用[1-2]。目前，主要的淀粉种类有红薯淀粉、马铃薯淀粉、玉米淀粉、木薯淀粉、小麦淀粉等[3]。由于各类淀粉原料成本和加工工艺不同[4-5]，使其在价格上存在明显差异，加之不同淀粉颗粒的感官性状，物化指标较为相近，消费者很难辨识，这就导致淀粉及其制品中蓄意掺假的行为越发严重[6-7]。这不仅给消费者带来利益损失、干扰食品行业有序发展，更有甚者可引起食品安全问题[8]。近些年，我国深化改革，大力加强食品安全监管和检测技术支撑能力建设，并于2022年发布了《“十四五”推动高质量发展的国家标准体系建设规划》，力求通过落实“四个最严”要求，切实保障群众“舌尖上的安全”。但是，目前针对淀粉中植物源性成分鉴定，我国尚无现行有效的标准方法，存在标准留白的情况。因此，亟需建立一种准确可靠、高通量，且便于推广使用的淀粉种类掺假鉴别方法，为我国标准体系进一步完善添砖加瓦。

目前，国内外对于淀粉种类掺假鉴别检测方法的研究主要集中在近红外光谱[9-10]、扫描电镜[11-12]、高光谱成像[13-14]、傅里叶变换红外光谱[15-16]等方法。如Khamsopha[17]利用近红外高光谱成像技术对木薯淀粉中常见的掺假成分进行鉴定；常云彩等[18]利用扫描电镜对常见的19 种食用淀粉颗粒结构、基本特性以及掺假检测方法进行了研究。这些方法主要是通过淀粉颗粒的性状（如形态、结构等）来鉴别不同的淀粉，但在实际应用中易受到品种、产地、加工方式的影响，也存在依赖昂贵仪器设备、需建立复杂数学模型、对人员技术要求高等问题[19-21]。相较之下，多重实时聚合酶链式反应（real-time polymerase chain reaction，real-time PCR）技术是通过分析物种基因水平上的差异鉴定其真实属性，具有高通量，结果准确、可靠，不易受加工工艺和环境等因素影响，仪器普及率高等优势[22]，可作为一种有效的淀粉种类高通量鉴别标准方法在监管部门、中小型企业及一般检测实验室得到推广使用。

当前，采用real-time PCR技术对淀粉中植物源性成分进行鉴定的研究多集中在单重成分鉴定方面，如韩建勋等[23]建立了一种可快速检测食用淀粉中木薯成分的real-time PCR法；姚晓静等[24]利用real-time PCR技术对复配粉中马铃薯成分进行了鉴定。对于利用多重*Taq*Man探针real-time PCR技术同时检测木薯、红薯、马铃薯、玉米源性成分的研究较少。因此，本研究旨在建立一种高通量、快速、准确的木薯、红薯、马铃薯、玉米源性成分多重*Taq*Man探针real-time PCR方法，使其可以应用于市场上可食用淀粉及其制品的种类掺假鉴别，弥补目前标准中的空缺，以期为监管部门开展食品安全掺假鉴别风险监测提供强有力的技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

用于对照或模拟样品制备的27 种原料及原料制成的淀粉由北京市食品质量监督检验三站提供，均为单一成分，包括：红薯（烟薯25、普薯32、北京553）、木薯（面包木薯、华南9号、华南6068）、马铃薯（中薯5号、华薯1号、晋薯2号）、玉米（农华101、登海618、京科968）、小麦、大麦、黑麦、荞麦、大米、薏米、小米、芋头、山药、燕麦、莲藕、绿豆、红豆、黄豆、豌豆及其淀粉。用于实际样品测定的50 份淀粉购自北京农贸市场或超市。

深加工食品DNA提取试剂盒、多糖多酚植物基因组DNA提取试剂盒、植物基因组DNA提取试剂盒（离心柱型） 天根生化科技（北京）有限公司；2×PCR Premix Ex *Taq*™ 大连宝生物科技有限公司；引物、探针合成 北京华大基因科技有限公司；试剂盒A：植物定性检测红薯源性成分核酸检测试剂盒、试剂盒C：掺假掺杂木薯源性成分检测试剂盒 广州双螺旋基因技术有限公司；试剂盒B：红薯源性成分检测PCR试剂盒 上海雅吉生物科技有限公司；试剂盒D：木薯源性成分探针法荧光定量PCR试剂盒 上海联迈生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

FTC-3000P型实时荧光PCR仪 加拿大Funglyn公司；微量核酸分析测定仪 美国BioTek公司；3-30K台式高速冷冻离心机 德国Sigma公司；DK-80恒温金属浴 上海一恒仪器有限公司；Thermostat plus振荡器 赛默飞世尔科技有限公司；ZK系列小型高速万能粉碎机 上海达平仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 引物与*Taq*Man探针设计

从GenBank上查找并下载红薯*g3pdh*基因（GenBank.EF119215）、木薯*g3pdh*基因（GenBank.MK129037）、马铃薯*UGPase*基因（GenBank.U20345）、玉米*zSSIIb*基因（GenBank.AF019297）序列，参考近年文献发表的相关序列，使用SnapGene软件进行序列比对，筛选出种内保守、种间差异性区域片段，使用Primer Express和Primer Premier 5.0软件设计引物探针，再通过SnapGene软件检测引物和探针的可行性，具体序列见表1。植物内参照引物及探针来自文献[25]。

表1 实验所用引物及*Taq*Man探针序列

Table 1 Primer and *Taq*Man probe sequences used in this study

源性	引物/探针名称	序列（5′-3′）	目的基因
红薯	H-F	AAAACAAAAGCACGGCACTA	*g3pdh*
	H-R	AGAGCGAGAGAGTAAGTTGAAG	
	H-探针	CY5-TCACACCTAACCCCCAGCA-BHQ2	
马铃薯	Ma-F	TTGGACATGTGAAGAGACGGA	*UGPase*
	Ma-R	ACTCCTTCCTATCTAGAGTCATGT	
	Ma-探针	HEX-GAGGTGCGAGGTAATGGTGGTAGGGGGT-BHQ1	
木薯	Mu-F	TGAATTGATGTATACCAGTTTACCA	*g3pdh*
	Mu-R	GCCATTCCAGTCAATTTTCCG	
	Mu-探针	FAM-GATCTGCGTGAGTAATTTGTACAT-BHQ1	
玉米	Y-F	ATGCTAAGGCTGATGCAGC	*zSSIIb*
	Y-R	ACATTCAGAAGCCACCACGAC	
	Y-探针	ROX-CAGATGCGGCGGCGAGTGCTCCTTA-BHQ3	
内参基因	Nc-F	TCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTA	18S rRNA
	Nc-R	AATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTT	
	Nc-探针	HEX-CCGTTTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAATCGAACC-BHQ1	

1.3.2 样品前处理

鲜原料样品：去皮后用自来水进行简单冲洗，清洗掉样品表面可能沾染的其他源性组织或细胞。取原料内部组织，用清洗干净的剪刀、高速粉碎机等将其研磨成糜（或粉）状。

淀粉样品：充分混匀后进行取样。不同源性的样品使用不同的器具，防止交叉污染。

1.3.3 DNA提取方法选择

鲜原料样品：按照植物基因组DNA提取试剂盒（离心柱型）说明书进行提取并测定DNA纯度。

淀粉样品：分别用深加工食品DNA提取试剂盒、多糖多酚植物基因组DNA提取试剂盒、植物基因组DNA提取试剂盒（离心柱型）对1.0 g淀粉进行提取，并用微量核酸分析测定仪进行DNA质量评估，选出最适的淀粉样品DNA提取方法。

DNA的$OD_{260\ nm}/OD_{280\ nm}$在1.8～2.0之间、$OD_{260\ nm}/OD_{230\ nm}$在2.0～2.4之间，可用于DNA扩增。将提取出的样品和对照DNA均稀释成30 ng/μL，作为扩增模板，置于−20 ℃冰箱备用。

1.3.4 多重real-time PCR体系及扩增条件优化

多重反应体系为50 μL：25 μL 2×PCR Premix Ex *Taq*™；红薯、马铃薯、木薯、玉米探针（10 μmol/L）加入量在0.4、0.6、0.8、1.0 μL 4个梯度内调整；上、下游引物（10 μmol/L）加入量在0.6、0.8、1.0 μL 3个梯度内调整；DNA模板2.0 μL；根据引物探针加入量补水至50 μL。依据控制变量法则，每次试验只设一个变量，以扩增效率、特异性、灵敏度为考察依据，确定最佳多重反应体系参数。

内参基因反应体系为50 μL：25 μL 2×PCR Premix Ex *Taq*™；探针（10 μmol/L）1 μL；上、下游引物（10 μmol/L）各1 μL；DNA模板2.0 μL，补水至50 μL。

扩增条件：95 ℃预变性10 min；95 ℃变性15 s，58 ℃退火60 s，40个循环，在每个循环退火阶段收集荧光信号。

1.3.5 多重real-time PCR特异性及包容性实验

提取12种目标原料（不同品种）和15种非目标原料的DNA，并以此为模板，进行红薯、木薯、马铃薯、玉米源性成分的多重real-time PCR扩增，验证本方法的特异性及包容性。

1.3.6 多重real-time PCR灵敏度实验

分别将4种鲜原料提取出的DNA用TE缓冲溶液进行10倍系列梯度稀释至3×10^{-3} ng/μL，取同等稀释水平的4种DNA按等体积进行混合，以各稀释度混合后的DNA为模板进行多重real-time PCR扩增，各稀释度进行3次平行，同时进行阴性和空白对照实验。以质量浓度的对数为横坐标，Ct值为纵坐标制作标准曲线，并按下式计算扩增效率，以此考察该方法的DNA灵敏度。

扩增效率/%＝（$10^{-1/斜率}$−1）×100

1.3.7 多重real-time PCR检出限实验

1.3.7.1 不同掺入比例模拟样品制备

以红薯淀粉为本源，按5个不同的质量比（0.01%、0.1%、1%、10%、100%），分别向其中掺入木薯淀粉、马铃薯淀粉和玉米淀粉。不同红薯淀粉掺入比例模拟样品以小麦淀粉为本源。参照Chen Xiaoyu等[26]的方法进行不同比例模拟样品的制备：使用高速破碎机将1 g木薯淀粉与9 g红薯淀粉间歇性混合6 min，得到木薯淀粉添加量为10%的样品（编码为A1）；从A1样品中取出1 g与9 g红薯淀粉间歇性混合6 min，得到木薯淀粉添加量为1%的样品（编码为A2）；从A2样品中取出1 g与9 g红薯淀粉间歇性混合6 min，得到木薯淀粉添加量为0.1%的样品（编码为A3），同样方法依次制备0.01%样品以及其他源性混合样品。每个样品中两种淀粉的总质量为10 g，每组混合样品设10个平行。

1.3.7.2 检出限测定

取不同掺入比例混合后的淀粉样品各1.0 g进行DNA提取，并采用本实验建立的多重real-time PCR方法进行检测。根据≥95%置信水平法则[26]，在10次平行实验中，10次结果均为检出的最低目标源性掺入量即为该目标源性的检出限。

1.3.8 实际样品检测

从农贸市场或超市购买淀粉样品共计50份，包括红薯淀粉20份（编号1～20）、木薯淀粉10份（编号21～30）、马铃薯淀粉10份（编号31～40）、玉米淀粉10份（编号41～50）。取混匀后的各样品1.0 g进行DNA提取，之后采用建立的多重real-time PCR方法对红薯、木

薯、马铃薯、玉米源性成分进行检测。同时用标准方法SN/T 1198—2013《转基因成分检测 马铃薯检测方法》[27]和SN/T 1196—2018《转基因成分检测 玉米检测方法》[28]进行马铃薯和玉米源性结果验证；采用试剂盒A和试剂盒B进行红薯源性结果验证；采用试剂盒C和试剂盒D进行木薯源性结果验证。

1.3.9　结果判定

内参对照、阳性对照：荧光通道有荧光信号检出，且出现典型的扩增曲线，Ct值≤35.0；空白对照、阴性对照：荧光通道无荧光信号检出，相应Ct值＞40.0；样品判定：荧光通道有荧光信号检出，相应Ct值≤40.0，判定为阳性；荧光通道无荧光信号检出，相应Ct值＞40.0，判定为阴性。

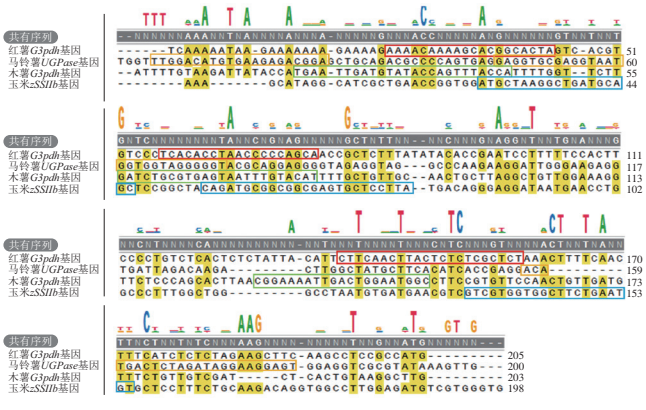
1.4　数据统计

数据以$\bar{x}\pm s$表示。用SPSS 22.0软件分析数据，测试水平为$\alpha=0.05$，$P<0.05$表示具有统计学意义。

2　结果与分析

2.1　引物、*Taq*Man探针设计结果

使用SnapGene软件对红薯*g3pdh*基因（GenBank.EF119215）、木薯*g3pdh*基因（GenBank.MK129037）、马铃薯*UGPase*基因（GenBank.U20345）、玉米*zSSIIb*基因（GenBank.AF019297）序列进行比对，并将设计的引物、探针导入软件中，对其可行性进行分析，结果见图1。所设计的4 组引物、探针均可以在各自对应的靶基因序列中搜索到，且均在序列差异性区域内。说明4 组引物探针可以用于红薯、木薯、马铃薯、玉米4 种目标源性的特异性检测。



红色框标记的为红薯源性的引物、探针序列；黄色框标记的为马铃薯源性的引物、探针序列；绿色框标记的为木薯源性的引物、探针序列；蓝色框标记的为玉米源性的引物、探针序列；黄色代表3 个或以上一致的碱基。

图1　引物、*Taq*Man探针可行性分析

Fig. 1　Feasibility analysis of primers and *Taq*Man probes

2.2　DNA提取方法选择结果

淀粉样品本身含有大量蛋白质、多糖等成分，且属于经过粉碎、精制、干燥等加工过程的深加工食品[24]，因而在DNA提取方面存在难度。为获得高质量的模板DNA，本实验分别采用3 种试剂盒对其进行提取，并对提取出的DNA质量进行评估。由表2可知，采用深加工食品DNA提取试剂盒（试剂盒A）提取的DNA，其纯度（$OD_{260\ nm}/OD_{280\ nm}$及$OD_{260\ nm}/OD_{230\ nm}$）满足real-time PCR方法对于模板DNA的要求，且在相同取样量的条件下，试剂盒A提取出的DNA质量浓度更高。

综上，选择深加工食品DNA提取试剂盒（试剂盒A）进行淀粉样品的DNA提取。

表2　不同DNA提取试剂盒提取效果对比

Table 2　Comparison of efficiencies of different DNA extraction kits

试剂盒	质量浓度/（ng/μL）	$OD_{260\ nm}/OD_{280\ nm}$	$OD_{260\ nm}/OD_{230\ nm}$	$OD_{260\ nm}$	$OD_{280\ nm}$
试剂盒A	58.1	1.88	2.27	1.16	0.62
试剂盒B	35.4	1.86	1.93	0.71	0.38
试剂盒C	7.2	1.70	1.44	0.14	0.08

2.3　多重real-time PCR体系优化结果

以最高扩增效率、对非目标源性无交叉反应、高灵敏度为考察依据，对引物探针加入量进行了筛选和优化，确定最佳多重real-time PCR反应体系为：25 μL 2×PCR Premix Ex *Taq*™；红薯、马铃薯、木薯探针（10 μmol/L）各0.8 μL，玉米探针（10 μmol/L）1.0 μL；上、下游引物（10 μmol/L）各1.0 μL；DNA模板2.0 μL，补水至50 μL。

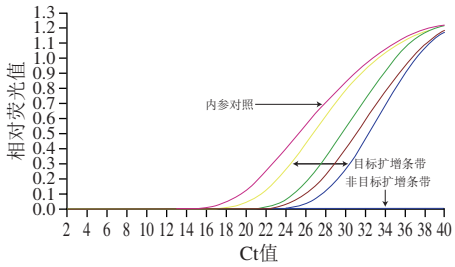
2.4　多重real-time PCR特异性及包容性实验结果

表3　方法特异性及包容性实验结果

Table 3　Specificity and inclusiveness of the proposed method

源性	检测结果（Ct值）		源性	检测结果（Ct值）	
	多重real-time PCR	内参对照		多重real-time PCR	内参对照
红薯（烟薯25）	24.72±0.39（CY5）	16.12±0.24	黑麦	—	17.53±0.39
红薯（普薯32）	25.69±0.64（CY5）	18.03±0.42	荞麦	—	15.61±0.13
红薯（北京553）	24.98±0.41（CY5）	16.76±0.10	大米	—	17.89±0.28
木薯（面包木薯）	22.99±0.37（FAM）	17.18±0.53	薏米	—	16.74±0.50
木薯（华南9号）	23.58±0.56（FAM）	16.60±0.36	小米	—	18.06±0.19
木薯（华南6068）	24.07±0.56（FAM）	17.95±0.19	芋头	—	16.78±0.38
马铃薯（中薯5号）	18.30±0.24（HEX）	15.96±0.23	山药	—	17.39±0.21
马铃薯（华薯1号）	18.65±0.66（HEX）	18.57±0.49	燕麦	—	18.42±0.24
马铃薯（晋薯2号）	19.37±0.37（HEX）	17.78±0.50	莲藕	—	16.93±0.45
玉米（农华101）	26.42±0.51（ROX）	18.64±0.21	绿豆	—	17.50±0.37
玉米（登海618）	25.98±0.48（ROX）	17.08±0.37	红豆	—	16.82±0.34
玉米（京科968）	25.77±0.30（ROX）	16.53±0.18	黄豆	—	18.77±0.23
小麦	—	17.30±0.34	豌豆	—	19.23±0.40
大麦	—	18.55±0.23	空白对照	—	—

注：—.未检出Ct值，表5同。FAM.木薯源性对应通道；HEX.马铃薯源性对应通道；ROX.玉米源性对应通道；CY5.红薯源性对应通道。



“S型”曲线从左到右依次为：内参对照扩增曲线，以红薯为例（HEX通道，粉色）、马铃薯源性扩增曲线（HEX通道，黄色）、木薯源性扩增曲线（FAM通道，绿色）、红薯源性扩增曲线（CY5通道，棕色）、玉米源性扩增曲线（ROX通道，蓝色）、非目标扩增曲线（阴性对照+空白对照）。

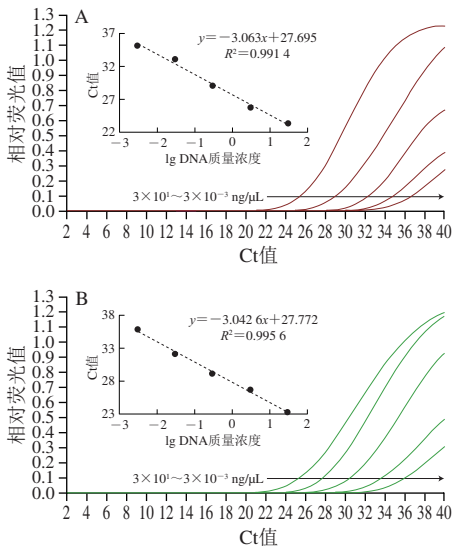
图 2 引物、*Taq*Man探针特异性效果分析

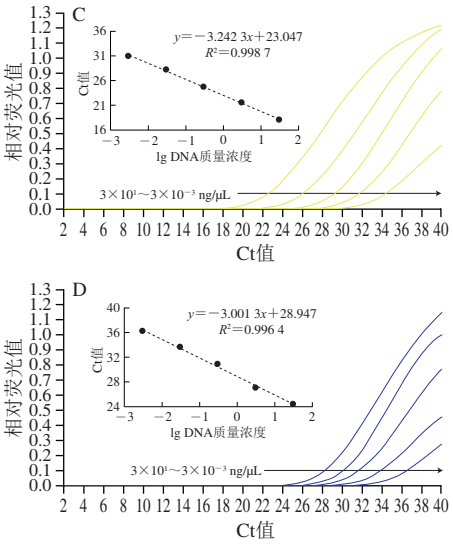
Fig. 2 Specificity analysis of primers and *Taq*Man probes

通过12 种目标源性和15 种非目标源性的多重real-time PCR检测结果发现（表3、图2），本实验开发的方法对常见的红薯、木薯、马铃薯、玉米品种均可检出，且当添加的DNA模板初始质量浓度为30 ng/μL时，非特异性信号Ct值均大于40.0。由此可知，建立的四重体系具有较好包容性，且对非目标源性无交叉反应。

2.5 多重real-time PCR灵敏度实验结果

按1.3.6节方法进行标准曲线绘制，结果如图3所示。4 种源性DNA在质量浓度范围3×10^{1}～3×10^{-3} ng/μL内具有良好的线性相关性。红薯源性标准曲线为$y=-3.063x+27.695$，$R^2=0.991\ 4$，扩增效率=108.9%；木薯源性标准曲线为$y=-3.042\ 6x+27.772$，$R^2=0.995\ 6$，扩增效率=110.2%；马铃薯源性标准曲线为$y=-3.242\ 3x+23.047$，$R^2=0.998\ 7$，扩增效率=99.5%；玉米源性标准曲线为$y=-3.001\ 3x+28.947$，$R^2=0.996\ 4$，扩增效率=113.7%。由此可知，本实验开发的多重real-time PCR方法对目标DNA的检测灵敏度可达3×10^{-3} ng/μL，高于韩建勋等[29]的研究。而当模板DNA质量浓度低于该质量浓度时，仍有扩增，但不呈线性关系，且重复性和准确性差。





图中“S型”曲线从左到右依次对应DNA质量浓度为3×10^{1}、3×10^{0}、3×10^{-1}、3×10^{-2}、3×10^{-3} ng/μL；A. CY5通道扩增图和红薯源性标准曲线；B. FAM通道扩增图和木薯源性标准曲线；C. HEX通道扩增图和马铃薯源性标准曲线；D. ROX通道扩增图和玉米源性标准曲线。

图 3 4 种目标源性扩增曲线及标准曲线图

Fig. 3 Amplification curves and standard curves for four target plant sources

2.6 多重real-time PCR检出限实验结果

表 4 不同源性多重real-time PCR样品检出限结果

Table 4 Detection limits of the multiple real-time PCR for four adulterated plant sources

目标源性	掺入比例/%	平均Ct值	10 次平行实验检出次数
红薯	100	27.77±0.31	10
	10	30.26±0.50	10
	1	32.93±0.26	10
	0.1	34.61±0.33	10
	0.01	36.93±0.75	8
木薯	100	26.42±0.49	10
	10	28.98±0.16	10
	1	31.07±0.51	10
	0.1	34.78±0.32	10
	0.01	35.94±0.63	7
马铃薯	100	23.97±0.27	10
	10	26.46±0.62	10
	1	29.19±0.17	10
	0.1	31.73±0.43	10
	0.01	33.81±0.68	9
玉米	100	28.62±0.35	10
	10	31.23±0.18	10
	1	33.71±0.21	10
	0.1	35.59±0.47	10
	0.01	37.03±0.63	7

从表4可知，当掺入比例≥0.1%时，4 种目标源性10 次平行实验的检出次数均可以达到10 次，满足不小于95%置信区间的测试要求，表明该掺入比例可以检出且实验的重复性较好；而当掺入比例为0.01%时，红薯、

表 5 实际样品中不合格样品的PCR检测结果

Table 5 Results of detection of unqualified samples by the PCR method

样品编号	标签成分	本实验建立的多重real-time PCR方法					参比方法				
		检测结果（Ct值）				结果判定	检测结果（Ct值）				结果判定
		红薯	木薯	马铃薯	玉米		红薯	木薯	马铃薯	玉米	
2	红薯淀粉	—	26.63±0.25	—	—	检出木薯源	—	27.12±0.37	—	—	检出木薯源
7	红薯淀粉	—	—	24.03±0.38	—	检出马铃薯源	—	—	26.41±0.55	—	检出马铃薯源
8	红薯淀粉	32.44±0.68	27.38±0.19	—	—	检出红薯、木薯源	31.07±0.34	25.97±0.42	—	—	检出红薯、木薯源
11	红薯淀粉	31.95±0.43	28.61±0.24	—	—	检出红薯、木薯源	32.26±0.13	29.57±0.60	—	—	检出红薯、木薯源
16	红薯淀粉	—	26.37±0.38	—	—	检出木薯源	—	28.03±0.41	—	—	检出木薯源
34	马铃薯淀粉	—	27.43±0.16	26.11±0.30	—	检出马铃薯、木薯源		25.69±0.46	27.73±0.57	—	检出马铃薯、木薯源
37	马铃薯淀粉	—	26.07±0.42	—	—	检出木薯源	—	25.13±0.39	—	—	检出木薯源

木薯、马铃薯、玉米源性的检出次数分别为8、7、9、7 次，存在未检出的情况，若以0.01%掺入量作为方法的检出限，会造成假阴性结果的产生。综上，为了确保使用本方法进行淀粉样品检测时的准确性，现规定本方法对于淀粉样品的检出限为0.1%。该检出限低于姚晓静等[24]研究的2%及韩建勋[29]、Wang Deguo[30]等研究的1%。

2.7 实际样品检测结果

采用本实验建立的多重real-time PCR方法与参比方法同时对50 份实际样品中的红薯、木薯、马铃薯、玉米源性成分进行检测。其中马铃薯和玉米源性分别采用标准方法SN/T 1198—2013[27]和SN/T 1196—2018[28]作为参比方法；由于红薯和木薯源性没有对应的标准方法，因此采用市售的2 种不同品牌的试剂盒作为参比方法。从表5可知，本方法与参比方法结果一致，均有7 个淀粉样品检出含有与标签成分不符的其他源性成分，不合格率为14%（7/50）。7 个不合格样品包括5 个红薯淀粉和2 个马铃薯淀粉。其中5 个不合格红薯淀粉中有2 个只检出了木薯源性，1 个只检出马铃薯源性，2 个既检出红薯又检出木薯源性；2 个不合格马铃薯淀粉中有1 个只检出木薯源性，1 个既检出马铃薯又检出木薯源性。综上可知，两种方法的检测结果一致，说明所建方法结果准确可靠；同时，检测4 种目标源性成分所用的时间仅为参比方法的1/4，且检测成本远低于试剂盒法。因此，所建方法可作为一种有效技术手段用于市售淀粉的种类掺假鉴别检测。此外，通过不合格样品检测结果还发现，用木薯淀粉代替或将木薯淀粉掺入到红薯淀粉、马铃薯淀粉中是目前主要的掺假手段。

3 结 论

本研究通过筛选靶基因、对比目标区域片段、设计特异性引物探针，建立了一种可同时对红薯、木薯、马铃薯、玉米源性成分进行检测的四重*Taq*Man探针real-time PCR方法，实现同一体系同时扩增4 种目标源性，达到了缩短检测时间、提高检测效率的目的。考虑到淀粉是一类深加工食品，本研究选取的目标序列均小于150 bp，可以有效防止因DNA降解造成的假阴性结果[31]。同时，还充分考虑了不同DNA提取试剂盒对淀粉样品DNA提取质量的影响，为该方法的应用范围从鲜原料进一步扩展到深加工淀粉制品提供研究基础。本方法具有较强的特异性和包容性，对于常见的目标源性品种均可检出，且与15 种非目标源性均无交叉反应。此外，本方法还具有较高的灵敏度，可检测到质量浓度为3×10^{-3} ng/μL的模板DNA，且对于淀粉样品的检出限可达0.1%，满足目前各标准中对4 种目标源性检出限的要求。用该方法对50 份实际淀粉样品进行检测，结果均与参比方法一致，而用时仅为参比方法的1/4，且检测成本远低于试剂盒方法。综上，本研究建立的四重*Taq*Man探针real-time PCR方法可以作为一种有效的检测手段，应用于市场上淀粉种类的真伪性鉴别，为完善标准体系建设、打击非法掺假欺诈、规范市场秩序和保障人民食品安全提供技术支持。

参考文献：

[1] 李兵, 肖香兰, 杨永红, 等. 国内外淀粉含量的检测标准现状及检测方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(9): 3830-3837. DOI:10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.2021.09.059.

[2] ZHANG Y Q, WANG Y Z, YANG X M, at al. Development of a ladder-shape melting temperature isothermal amplification (LMTIA) assay for the identifification of cassava component in sweet potato starch noodle[J]. Molecules, 2022, 27: 3414-3420. DOI:10.3390/molecules27113414.

[3] HANCOCK S, ZINN C, SCHOFIFIELD G, at al. The consumption of processed sugar and starch-containing foods, and dental caries: a systematic review[J]. European Journal of Oralsciences, 2020, 128: 467-475.

[4] 余以, 高德, 张萍. 加工工艺对淀粉分子结构及米制品品质影响研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(23): 295-302. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.021243.

[5] HONG Y, LI L, YU W W, at al. Autoclaved rice: the textural property and its relation to starch leaching and the molecular structure of leached starch[J]. Food Chemistry, 2019, 283: 199-205. DOI:10.1016/j.foodchem.2019.01.030.

[6] CARDOSO V, POPPI R J. Cleaner and faster method to detect adulteration in cassava starch using Raman spectroscopy and one-

class support vector machine[J]. Food Control, 2021, 125: 107917. DOI:10.1016/j.foodcont.2021.107917.

[7] 任顺成, 曹悦, 常云彩. 近红外光谱技术对马铃薯掺假淀粉的检测[J]. 粮食与油脂, 2021, 34(5): 156-159. DOI:10.3969/j.issn.1008-9578.2021.05.039.

[8] WANG J, LIU Y, LI J, et al. Mechanism of bluish pigment formation in lotus rhizome starch with ferrous sulfate and its application in rapid detection of adulteration[J]. International Journal of Food Properties, 2022, 25: 1203-1214. DOI:10.1080/10942912.2022.2074035.

[9] 张北举, 陈松树, 李魁印. 基于近红外光谱的高粱籽粒直链淀粉、支链淀粉含量检测模型的构建与应用[J]. 中国农业科学, 2022, 55(1): 26-35. DOI:10.3864/j.issn.0578-1752.2022.01.003.

[10] CHEN H, TAN C, LIN Z, LI H J, at al. Quantifying several adulterants of Noto ginseng powder by near-infrared spectroscopy and multivariate calibration[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2018, 211: 280-286. DOI:10.1016/j.saa.2018.12.003.

[11] 王书雅, 翟晨, 时超, 等. 基于X-射线衍射及扫描电子显微镜的马铃薯淀粉掺伪鉴别[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(10): 2311-2315.

[12] 张明珠, 郝明欣, 桑喆, 等. 玉米淀粉的扫描电镜分析方法[J]. 理化检验: 物理分册, 2022, 58(8): 21-24; 28.

[13] HUANG H P, HU X J, TIAN J P, et al. Rapid and nondestructive prediction of amylose and amylopectin contents in sorghum based on hyperspectral imaging[J]. Food Chemistry, 2021, 359(8): 129954. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.129954.

[14] 补友华, 姜鑫娜, 田建平, 等. 高光谱结合优化算法的多品种高粱混合的淀粉含量检测[J]. 中国粮油学报, 2022, 37(11): 236-244.

[15] ISHIKAWA D, YANG J, FUJII T, at al. Quantification of starch order in physically modified rice flours using small-angle X-ray scattering (SAXS) and Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy[J]. Applied Spectroscopy, 2021, 75(8): 1033-1042. DOI:10.1177/00037028211028278.

[16] NWAKEGO A O H, OPEYEMI J O, OLUFEMI A O, et al. Physicochemical, functional, pasting properties and Fourier transform infrared spectroscopy of native and modified *Cardaba banana* (Musa ABB) starches[J]. Food Chemistry Advances, 2022, 1: 100076. DOI:10.1016/j.focha.2022.100076.

[17] KHAMSOPHA S. Utilizing near infrared hyperspectral imaging for quantitatively predicting adulteration in tapioca starch[J]. Food Control, 2021, 1: 123-131.

[18] 常云彩, 胡海洋, 任顺成. 食用淀粉颗粒特性分析及掺假检测研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2019, 40(5): 46-52. DOI:10.16433/j.cnki.issn1673-2383.2019.05.008.

[19] 王建伟, 叶升. 近红外光谱技术在食品成分检测中的研究进展[J]. 中国调味品, 2021, 46(9): 171-177. DOI:10.3969/j.isssn.1000-9973.2021.09.033.

[20] KAR S, TUDU B, JANA A, at al. FT-NIR spectroscopy coupled with multivariate analysis for detection of starch adulteration in turmeric powder[J]. Food Additives & Contaminants, 2019(6): 863-875. DOI:10.1080/19440049.2019.1600746.

[21] 常云彩. 常见食用淀粉特性及掺假检测方法研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2015.

[22] MIYAZAKI A, WATANABE S, OGATA K, et al. Real-time PCR detection methods for food allergens (wheat, buckwheat, and peanuts) using reference plasmids[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(19): 5680-5686. DOI:10.1021/acs.jafc.9b01234.

[23] 韩建勋, 吴亚君, 王 斌, 等. 实时荧光PCR法快速检测食用淀粉中的木薯成分[J]. 检验检疫学刊, 2015, 25(6): 4-8.

[24] 姚晓静, 张泓, 张春江, 等. 复配粉中马铃薯成分实时荧光PCR检测方法的建立[J]. 核农学报, 2018, 32(2): 297-303. DOI:10.11869/j.issn.100-8551.2018.02.0297.

[25] 周巍, 王爽, 章晶晶, 等. 植物蛋白饮料中植物源性成分鉴定: BJS 201707[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.

[26] CHEN X Y, LU L X, XIONG X H, at al. Development of a real-time PCR assay for the identifcation and quantifcation of bovine ingredient in processed meat products[J]. Scientific Reports, 2020, 10: 2052-2060. DOI:10.1038/s41598-020-59010-6.

[27] 国家标准化管理委员会. 转基因成分检测 马铃薯检测方法: SN/T 1198—2013[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013.

[28] 国家标准化管理委员会. 转基因成分检测 玉米检测方法: SN/T 1196—2018[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.

[29] 韩建勋, 陈颖, 吴亚君, 等. 实时荧光PCR法鉴定食用淀粉植物来源[J]. 中国食品学报, 2019, 19(2): 291-300. DOI:10.16429/j.1009-7848.2019.02.037.

[30] WANG D G, WANG Y Z, ZHU K, at al. Detection of cassava component in sweet potato noodles by real-time loop-mediated isothermal amplifification (real-time LAMP) method[J]. Molecules, 2019, 24: 2043-2051. DOI:10.3390/molecules24112043.

[31] CHEN J, ZHANG Y L, CHEN C, et al. Identification and quantification of cassava starch adulteration in different food starches by droplet digital PCR[J]. PLoS ONE, 2020, 15(2): e0228624. DOI:10.1371/journal.pone.0228624.