

DOI:10.13652/j.issn.1003-5788.2021.08.014

# 橙汁饮料中橙与橘成分双重实时荧光定量 PCR 检测技术

Dual real-time fluorescence quantitative PCR method for the detection of orange and citrus components in orange juices

陈茵茵<sup>1</sup> 李娟<sup>2</sup> 周露<sup>1</sup> 陈丹霞<sup>1</sup>

CHEN Yin-yin<sup>1</sup> LI Juan<sup>2</sup> ZHOU Lu<sup>1</sup> CHEN Dan-xia<sup>1</sup>

韩志杰<sup>1</sup> 丁清龙<sup>1</sup>

HAN Zhi-jie<sup>1</sup> DING Qing-long<sup>1</sup>

(1. 广东省食品检验所, 广东 广州 510000; 2. 广东食品药品职业技术学院, 广东 广州 510000)

(1. Guangdong Provincial Institute of Food Inspection, Guangzhou, Guangdong 510000, China;

2. Guangdong Food and Drug Vocational-technical School, Guangzhou, Guangdong 510000, China)

**摘要:**目的:建立双重实时荧光定量 PCR 检测橙汁饮料中橙与橘成分的方法。方法:通过设计和筛选橙、橘成分的引物和探针,检测水果寻找橙和橘的荧光扩增规律,利用橙和橘在 FAM/VIC 两个荧光通道上的比值差异来判定橙、橘成分。采用模拟橙汁掺杂柑橘汁试验验证方法检测的最低掺杂比例,对市售橙汁饮料进行检验来验证方法可行性。结果:纯橙水果在 FAM 和 VIC 两通道均有荧光扩增曲线,FAM/VIC 通道荧光比值在  $0.5 \pm 0.2$  的范围内,而纯橘水果仅在 FAM 通道有很强的荧光扩增曲线。模拟掺杂试验中,可以检测出橙汁中掺有 10% 及以上的柑橘汁。结论:该方法能够检测橙汁饮料中的橙和橘成分,可用于市售橙汁饮料的鉴别。

**关键词:**橙汁饮料;橙橘成分;双重实时荧光定量 PCR;荧光比值

**Abstract: Objective:** To establish a dual real-time PCR method for the detection of orange and citrus components in orange juices.

**Methods:** Through the design and screening of primers and probes for orange and citrus components. Through the detection of fruits, found the rule of fluorescence amplification of orange and citrus. Using the ratio difference of orange and citrus in FAM/VIC two fluorescence channels to determine the

composition of orange and citrus. The lowest doping ratio detected by the method was verified by the experiment of orange juice adulteration, tested the commercial orange juice and verify the feasibility of the method. **Results:** There were fluorescence amplification curves in both FAM and Vic channels in pure orange fruits, and the fluorescence ratio of FAM/VIC channel was between  $0.5 \pm 0.2$ , while only FAM channel had strong fluorescence amplification curve in pure citrus fruits. In the simulation experiment, it could be detected that there are more than 10% citrus juice in orange juice. **Conclusion:** The results showed that this method can be used to detect the orange and citrus components in commercial orange juices, and can be used to identify the fake orange juices.

**Keywords:** orange juice beverage; orange components; double real time PCR; fluorescence ratio

随着人们生活水平的提高,果汁的需求量和消费量逐年增加,果汁掺假事件也频繁发生。据统计<sup>[1]</sup>,世界上约有 60%~80% 的果汁饮料存在不同程度的掺假现象。消费者很难通过外观、口感识别这些虚假标识、高价果汁掺杂低价果汁等的掺假果汁饮料。橙汁是国际上消费最广的果汁之一,其销量占全球果汁销量的 50% 以上<sup>[2]</sup>。但由于市面上橙类的价格要普遍高于橘类,存在部分不法商贩向橙汁中掺杂橘汁的行为。

目前中国对橙汁的鉴别标准有 NY/T 290—1995《绿色食品橙汁和浓缩橙汁》、GB/T 12143—2008《饮料通用分析方法》、GB/T 21731—2008《橙汁及橙汁饮料》、

**基金项目:**原广东省食品药品监督管理局科技创新项目(编号:2019TBD03)

**作者简介:**陈茵茵,女,广东省食品检验所工程师。

**通信作者:**周露(1982—),女,广东省食品检验所高级工程师,博士。E-mail:zhoulu1982@sohu.com

**收稿日期:**2020-04-15

GB/T 21730—2008《浓缩橙汁》,但均是通过感官和一些常规的理化指标来鉴别橙汁。为此,国内外学者研究了多种橙汁品质鉴别的方法,如:① 理化鉴别(测定糖<sup>[3-4]</sup>、有机酸<sup>[5]</sup>、氨基酸<sup>[6]</sup>等);② 特定有机物鉴别(测定果胶、黄酮类物质<sup>[7]</sup>等);③ 无机物鉴别(测定稳定同位素<sup>[8-9]</sup>等);④ 利用先进的设备测定特定成分鉴别(如液相色谱<sup>[10-11]</sup>、电感耦合等离子体质谱<sup>[12]</sup>、电子舌<sup>[13]</sup>等)。但由于水果成分易受品种、产地、季节、环境等因素的影响,以及果汁中掺杂的其他化学成分,给化学成分鉴定造成了困难<sup>[14]</sup>。

随着分子生物学技术的发展,常规 PCR、实时荧光 PCR、DNA 条形码等分子生物学方法已经被应用到果汁真伪鉴别中,如:Ng 等<sup>[15]</sup>利用分子生物学方法鉴定鲜榨和还原橙汁;梁宇斌等<sup>[16]</sup>建立了果汁中柑橘属植物成分的 SYB Green 实时荧光 PCR 检测方法;刘伟红等<sup>[17]</sup>建立了柑橘属植物成分的普通 PCR 检测方法等。以上学者的研究均基于单一水果品种的靶向检测,未能区分柑橘属植物成分中的橙和橘成分,在果汁鉴别中未能鉴别是否是高价果汁掺杂低价果汁。

试验拟设计并筛选橙、橘成分检测引物、探针,并建立双重实时荧光定量 PCR 的方法检测橙汁饮料中的橙与橘成分,以期实现橙汁饮料中橙和橘成分的检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

#### 1.1.1 样品

美国新奇士、印度伦晚脐橙、埃及橙、南非夏橙、广西砂糖橘、云南丑柑、柑橘、沃柑、黑加仑、红树莓、黄树莓、黄桃、蓝莓、葡萄鲜果及橙汁饮料(如表 1 所示);京东超市。

#### 1.1.2 主要试剂

深加工食品 DNA 提取试剂盒:北京天根生化科技有限公司;

异丙醇:分析纯,东莞市嘉诚化工有限公司;

无水乙醇:分析纯,佛山日月红化工有限公司;

2×Super Real Pre Mix (Probe):北京天根生化科技有限公司;

液氮:广州盛盈化工有限公司。

### 1.2 仪器与设备

生物安全柜:1379 型,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;

涡旋混匀器:MS 型,德国 IKA 公司;

台式离心机:Centrifuge 5430 型,德国艾本德股份公司;

冷冻离心机:Stratos 型,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;

表 1 橙汁饮料信息

Table 1 Orange juices information

样品	成分信息	果汁含量/%
橙汁饮料 1	浓缩橙汁	100
橙汁饮料 2	浓缩橙汁	100
橙汁饮料 3	浓缩橙汁	100
橙汁饮料 4	浓缩橙汁	100
都乐橙汁	浓缩橙汁	100
汇源橙汁	浓缩橙汁	100
良珍橙汁	浓缩橙汁	100
dana 橙子果汁饮料	浓缩橙汁	≥50
酷儿橙汁饮料	浓缩橙汁	≥10
美汁源果粒橙	浓缩橙汁	≥10
粒粒橙	浓缩橙汁+柑橘粒	≥10
咸柑橘水果饮料 1	柑橘汁	≥10
咸柑橘水果饮料 2	柑橘汁	≥10
芒果混合汁饮料	芒果汁	≥50
蓝莓汁饮料	蓝莓汁	≥50
桑果汁饮料	桑葚汁	≥20

恒温孵育装置:IKA F2.0 型,德国 IKA 公司;

微量核酸蛋白测定仪:Nano 型,日本岛津公司;

超低温冰箱:BioPlus RF 930 型,丹麦 GRAM 公司;

实时荧光 PCR 仪:QuantStudio 6 Flex 型,赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

### 1.3 方法

1.3.1 实时荧光定量 PCR 扩增产物合成 实时荧光定量 PCR 扩增引物和探针如表 2 所示,均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

#### 1.3.2 DNA 提取

(1) 水果样品前处理:取适量水果放入洁净的预先预冷的研钵中,加入适量的液氮进行研磨,反复重复此步骤至样品被研磨成粉末状态,迅速将样品移至预冷离心管中。不同水果之间的前处理要避免交叉污染,处理后的样品存放于超低温冰箱中备用。

(2) 果汁饮料前处理:取适量混匀后的果汁饮料于 50 mL 离心管中,4 °C 冷冻离心 15 min (9 000 ~ 10 000 r/min),弃上清,留沉淀或底部浊汁备用。

(3) DNA 提取:优化试剂盒法。① 取经过前处理后的水果样品约 500~700 mg、果汁饮料约 1 mL 于离心管中,加入异丙醇 1 mL,混匀后在室温放置 10 min,随后放入离心机于 12 000 r/min 离心 10 min,弃上清,重复此步骤 1 次;② 加入 500 μL 缓冲液 GMO1 和 20 μL Proteinase K (20 mg/μL),旋涡振荡 1 min,混合均匀;③ 在 56 °C 恒温条件下孵育 3 h,孵育过程每隔 15 min 振荡混合;④ 加入 200 μL 缓冲液 GMO2,充分混匀,涡旋振

荡 1 min 后,室温静置约 10 min;⑤ 12 000 r/min 离心 5 min,并将上清液转移至洁净无菌离心管中;⑥ 向上清液中加入 0.7 倍体积的异丙醇,混合均匀,置于-20 ℃冰箱内静止 30 min,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清,保存沉淀;⑦ 向沉淀物加入 700 μL 70%乙醇,混合均匀,静止 10 min,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,重复此步骤 1 次;⑧ 打开离心管管盖,在室温条件下放置 5~10 min,直至彻底晾干离心管中残余的乙醇;⑨ 加入 50~100 μL 的洗脱缓冲液 TE,旋涡振荡 1 min,最终得到 DNA 溶液。

1.3.3 DNA 提取效果验证

(1) 纯度验证:利用 Nano 核酸蛋白分析仪对提取的各个基因组 DNA 纯度(OD<sub>260 nm</sub>/OD<sub>280 nm</sub>)以及各自的浓

度进行测定,识别 DNA 提取过程是否受到污染。

(2) 可扩增性验证:参照 SN/T 1204—2016《植物及其加工产品中转基因成分实时荧光 PCR 定性检验方法》对所提取的 DNA 样品进行检测,以确定所提取 DNA 样品的可扩增性。所使用的引物和探针见表 3,反应体系见表 4,反应程序见表 5。

1.3.4 R22 引物、探针通用性和特异性验证 使用美国新奇士、印度伦晚脐橙、埃及橙、南非夏橙、广西砂糖橘、云南丑柑、柑橘、沃柑 8 种柑橘属植物作为验证样品,无菌超纯水为空白对照,验证 R22 引物和探针扩增柑橘属植物的通用性。使用黑加仑、红树莓、黄树莓、黄桃、葡萄、蓝莓 6 种常见的非柑橘属水果作为验证样品,砂糖橘

表 2 引物和探针

Table 2 Primers and probes

引物/探针名称	序列
上游引物 R22-F	5'-AACTGATAAAGGAAGAGAGAGAGAGG-3'
下游引物 R22-R	5'-CGTATTGTGTGTGTGTTGATTTTGTAGTTAGTTAG-3'
R22 FAM 探针	5'-FAM-CGCTGCGTATACCATAGATTAGTATCATAG A-MGB-3'
R22 VIC 探针	5'-VIC-CGCTGCGTATATATCATAGCTTA-M GB-3'

表 3 植物通用引物和探针

Table 3 General primers and probes for plants

目的基因	引物/探针名称	序列
真核生物 18S rRNA 基因	上游引物	5-CCTGAGAAACGGCTA CCAT -3'
	下游引物	5-CGTGTCAGGATTGGGTAAT -3'
	探针	5(FAM)-TGCGCGCTGCTGCCTTCCT-(BHQI)-3'

表 4 PCR 扩增反应体系

Table 4 PCR reaction system

试剂	浓度	添加量/μL
2xSuperRealPreMix	/	12.5
上游引物	10 μmol/L	0.4
下游引物	10 μmol/L	0.4
探针	10 μmol/L	0.2
DNA	30~100 ng/μL	2.0
ddH <sub>2</sub> O		9.5
合计		25.0

表 5 PCR 扩增反应程序

Table 5 Procedure of PCR amplification

温度/℃	时间/s	循环数
50	120	40
95	600	
95	15	
60	60	

和新奇士作为阳性对照,无菌超纯水作为空白对照,以确定引物和探针的特异性。反应体系见表 6,反应程序见表 5。

1.3.5 模拟橙汁掺杂柑橘汁试验 制备鲜榨纯橙样品(新奇士)和纯柑橘样品(青橘),将橙汁与柑橘汁按不同比例混合掺杂(V<sub>橙汁</sub>:V<sub>柑橘汁</sub>分别为 0:10,1:9,2:8,3:7,4:6,5:5,6:4,7:3,8:2,9:1,10:0)。对混

表 6 PCR 扩增反应体系

Table 6 PCR reaction system

试剂	浓度	添加量/μL
2xSuperRealPreMix	/	12.500
上游引物 R22-F	10 μmol/L	0.750
下游引物 R22-R	10 μmol/L	0.750
探针 P <sub>FAM</sub>	100 μmol/L	0.625
探针 P <sub>VIC</sub>	100 μmol/L	0.625
DNA	30~100 ng/μL	2.000
ddH <sub>2</sub> O		7.750
合计		25.000

合的果汁进行 DNA 提取和双重实时荧光 PCR 扩增试验。

1.3.6 双重实时荧光 PCR 法可行性验证 对市售饮料进行 DNA 提取和双重实时荧光 PCR 扩增检测,验证双重实时荧光 PCR 方法的可行性。

## 2 结果与分析

### 2.1 DNA 提取质量

2.1.1 DNA 纯度 用 Nano 核酸蛋白分析仪对美国新奇士、伦晚脐橙、埃及橙、南非夏橙、广西砂糖橘、云南丑柑、柑橘、沃柑、黑加仑、红树莓、黄树莓、黄桃、蓝莓、葡萄 14 种纯水果 DNA 进行纯度和质量浓度测定,所有样品的 DNA 纯度( $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ )均在 1.7~2.1 范围之内,纯度较好,DNA 提取过程不存在污染,结果见表 7。

2.1.2 DNA 可扩增性 应用植物通用 18S rRNA 基因引物和探针对所提取的 DNA 样品进行扩增,如图 1 所示,所有样品均扩增出典型的 S 型荧光曲线,阴性对照和空白对照均正常,结果表明所有样品均有适合 PCR 扩增的 DNA。

### 2.2 R22 引物、探针通用性

为确定所设计和筛选的 R22 引物和探针的通用性,首先使用典型的、具有代表性的纯橙样品(美国新奇士)和纯橘样品(广西砂糖橘)来确定 R22 引物和探针对橙和橘的典型扩增曲线图谱,结果见图 2。纯橘样品仅在 FAM 通道有扩增曲线,CT 值约为 14.51,荧光值约为 3 373 161.750,在 VIC 通道无荧光扩增曲线。纯橙样品在 VIC 通道和 FAM 通道均有扩增曲线,CT 值分别为 22.97,23.24,荧光值分别为 976 360.625,356 213.219,两

表 7 纯水果样品纯度及质量浓度

Table 7 Purity and concentration in pure fruit samples

样品	纯度( $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ )	质量浓度/( $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )
美国新奇士	1.86	38.85
印度伦晚脐橙	1.94	166.86
巴西橙	1.91	66.22
南非夏橙	1.87	57.07
广西砂糖橘	1.93	39.34
云南丑柑	1.93	106.33
柑橘	1.71	70.54
沃柑	1.75	70.54
黑加仑	1.90	119.20
红树莓	1.96	170.74
黄树莓	2.02	159.33
黄桃	2.07	145.91
蓝莓	1.87	68.09
葡萄	1.94	38.85

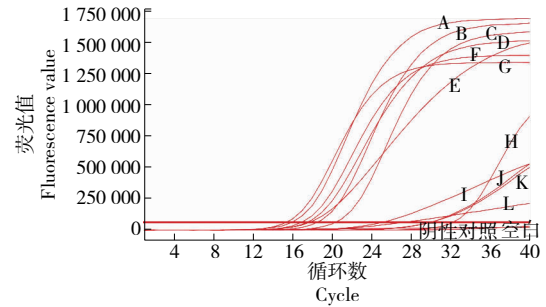


Figure 1 Fluorescent PCR amplification results of 18S rRNA gene primers and probes for fruit samples

通道荧光比值(FAM/VIC)约为 0.36,在  $0.5 \pm 0.2$  的范围内。

使用橙类的其他栽培品种(伦晚脐橙、埃及橙、南非夏橙)和橘类的其他栽培品种(云南丑柑、柑橘、沃柑)验证 R22 引物和探针的通用性,结果见图 3。

如图 3(a)所示,橙类的其他栽培种样品的荧光扩增曲线和纯橙(美国新奇士)的荧光扩增曲线相似,VIC 通道和 FAM 通道均有荧光扩增曲线,CT 值和荧光值如表 8 所示,两通道荧光比值(FAM/VIC)在  $0.5 \pm 0.2$  的范围内。

如图 3(b)所示,橘类的其他栽培品种样品的荧光扩增曲线和纯橘(广西砂糖橘)的荧光扩增曲线相似,仅在 FAM 通道有扩增曲线,VIC 通道无荧光扩增曲线,FAM 通道的 CT 值和荧光值如表 8 所示。

2.3 R22 引物、探针的特异性

为确定所设计和筛选的 R22 引物和探针的特异性,使用 R22 引物和探针对黑加仑、红树莓、黄树莓、黄桃、蓝莓、葡萄 6 种非柑橘属水果进行实时荧光 PCR 扩增,用典

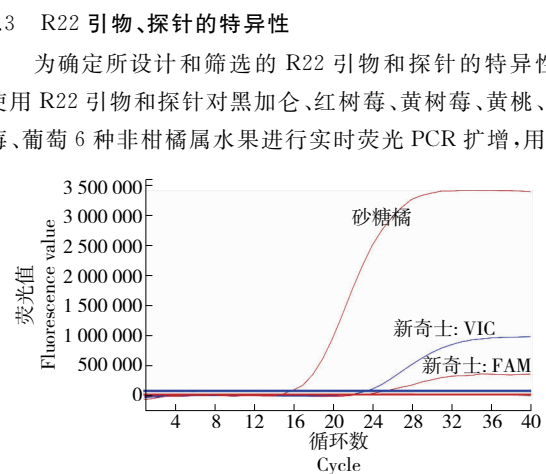


Figure 2 Fluorescence amplification spectra of pure orange and pure citrus samples

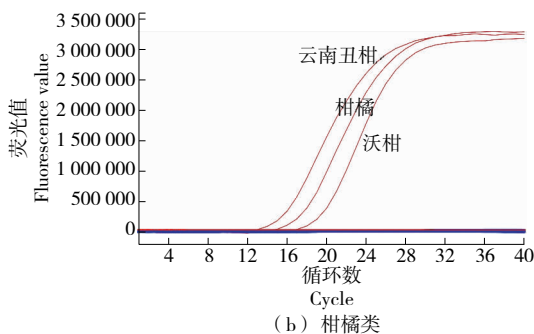
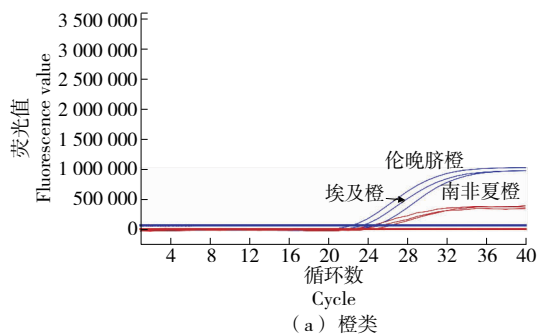


图 3 橙类和柑橘类其他栽培品种的荧光扩增曲线结果

Figure 3 The fluorescence amplification curve of other orange and citrus cultivars

表 8 橙类和柑橘类的其他栽培种荧光扩增 CT 值及荧光值

Table 8 CT value and fluorescence value of other orange and citrus cultivars

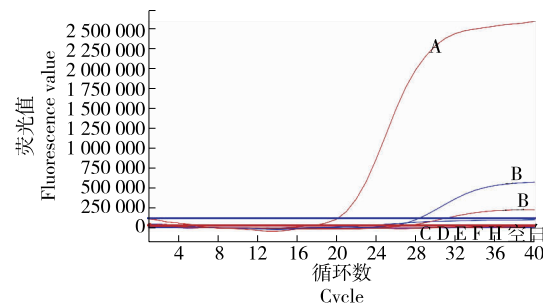
样品	通道	CT 值	荧光值	FAM/VIC 荧光比值
伦晚脐橙	VIC	22.18	1 028 018	0.37
	FAM	22.07	379 468	
埃及橙	VIC	23.34	976 360	0.36
	FAM	22.97	356 213	
南非夏橙	VIC	24.52	980 103	0.41
	FAM	24.27	401 800	
云南丑柑	FAM	12.54	3 233 769	>1
	VIC	/	/	
柑橘	FAM	14.01	3 281 489	>1
	VIC	/	/	
沃柑	FAM	16.43	3 174 287	>1
	VIC	/	/	

型样品纯橙(新奇士)和纯橘(砂糖桔)做阳性对照,结果见图 4。R22 引物和探针对黑加仑、红树莓、黄树莓、黄桃、蓝莓、葡萄 6 种非柑橘属水果的实时荧光 PCR 扩增结果均为阴性,说明 R22 引物和探针对非柑橘属类水果无扩增性,具有较好的特异性。

2.4 橙汁掺杂橘汁的模拟试验

为确定 R22 引物和探针的检测灵敏度,按不同的比例模拟橙汁掺杂橘汁试验,混合样品进行 DNA 提取后使用 R22 引物和探针进行实时荧光 PCR 扩增,扩增曲线见图 5,结果见表 9。

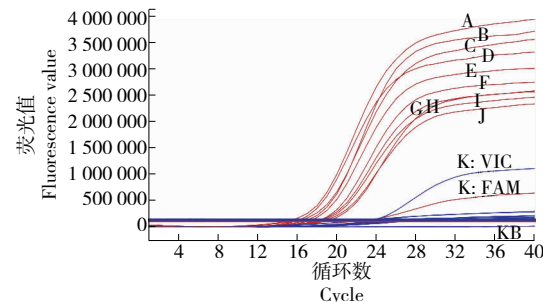
由图 5 及表 9 可知,橙汁中掺杂 10% 及以上比例的橘汁样品均有 FAM 通道荧光增强情况,且 FAM/VIC 通道荧光值比值 > 1, FAM 通道荧光值并随着橘汁掺杂的比例增加而增大。说明 R22 引物和探针可以灵敏地检测到 10% 掺杂比例的橙橘样品。



A. 砂糖橘 B. 新奇士 C. 黑加仑 D. 红树莓 E. 黄树莓 F. 黄桃 G. 蓝莓 H. 葡萄 空白. 超纯水

图 4 R22 引物和探针对 6 种非柑橘属水果的荧光扩增曲线

Figure 4 Fluorescence amplification curve of six non citrus fruits by R22 primer and probe



A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K 依次对应 V<sub>橙汁</sub> : V<sub>柑橘汁</sub> 为 0 : 10, 1 : 9, 2 : 8, 3 : 7, 4 : 6, 5 : 5, 6 : 4, 7 : 3, 8 : 2, 9 : 1, 10 : 0 的样品 KB. 空白

图 5 橙汁掺杂柑橘汁模拟试验荧光扩增图谱

Figure 5 Fluorescence amplification spectrum of orange juice mixed with citrus juice

2.5 市售饮料检测

对市售的 13 种橙汁饮料样品和其他非橙汁饮料进行 DNA 提取和荧光 PCR 扩增,结果见图 6、图 7 和表 10。

由图 6 和表 10 可知,10 种仅含有橙汁成分的饮料均产生与纯橙样品(新奇士)相同的荧光扩增曲线, FAM/VIC 荧光比值在 0.5 ± 0.2 的范围内,与纯橙样品的

表 9 不同比例橙汁柑橘汁掺杂试验结果

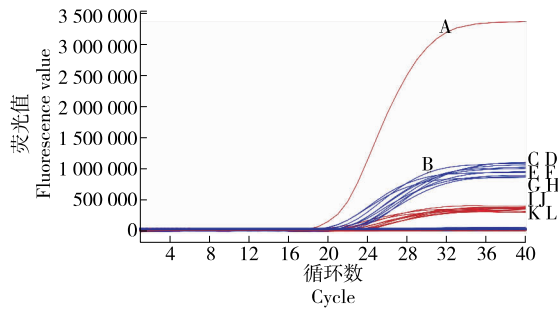
Table 9 Experimental results of different proportions of orange juice and citrus juice

$V_{\text{橙汁}} : V_{\text{柑橘汁}}$	荧光值		FAM/VIC	FAM/VIC	FAM/VIC
	FAM 通道	VIC 通道	荧光比值	荧光比值平均值	荧光比值范围
0 : 10	3 926 834	106 784	36.8		
	3 141 555	104 777	30.0	31.6	31.6±4.5
	3 670 096	130 240	28.2		
1 : 9	3 701 010	291 767	12.7		
	2 971 594	105 996	28.0	23.0	23.0±8.9
	3 627 343	128 144	28.3		
2 : 8	3 305 625	173 717	19.0		
	2 785 171	86 656	32.1	22.1	22.1±8.9
	3 418 447	226 841	15.1		
3 : 7	2 996 861	127 721	23.5		
	2 672 605	80 823	33.1	29.7	29.7±5.4
	2 804 528	85 929	32.6		
4 : 6	2 909 368	133 566	21.8		
	2 405 011	168 031	14.3	15.7	15.7±5.5
	3 010 754	270 200	11.1		
5 : 5	2 737 194	154 443	17.7		
	2 307 195	73 279	31.5	24.8	24.8±6.9
	2 533 050	101 048	25.1		
6 : 4	2 571 217	158 193	16.3		
	2 219 218	83 159	26.7	20.4	20.4±5.6
	2 610 707	144 124	18.1		
7 : 3	2 555 753	192 940	13.2		
	2 197 378	126 316	17.4	17.1	17.1±3.7
	2 326 594	112 464	20.7		
8 : 2	2 515 987	351 809	7.2		
	3 136 479	254 411	12.3	10.9	10.9±3.2
	3 581 277	273 918	13.1		
9 : 1	2 448 223	561 715	4.4		
	2 490 504	391 264	6.4	6.9	6.9±2.9
	3 180 333	316 734	10.0		
10 : 0	635 832	1 101 772	0.6		
	336 413	1 011 234	0.3	0.5	0.5±0.2
	518 394	1 094 327	0.5		

FAM/VIC 荧光比值相符。由图 7 和表 10 可知,3 种橙橘混合饮料均有 FAM、VIC 通道 PCR 荧光扩增曲线, FAM/VIC 荧光比值>1,检测成分均与标签标明的成分信息一致;其他非橙汁饮料无荧光扩增现象。说明所建立的双重荧光定量 PCR 方法能够检测市售饮料中的橙和橘成分,适用于市售橙汁饮料的鉴别。

### 3 结论

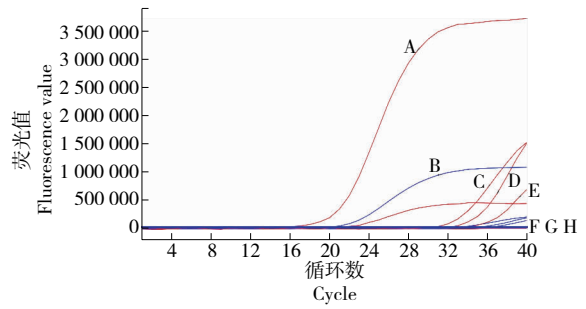
试验研究的双重实时荧光定量 PCR 法,在同一反应体系中,加入双引物和双探针,同时检测两个目的基因,实现一管多检,省时省力,大大提高了检验的时效性。该法使用通道荧光比值判断橙和橘成分,当 FAM/VIC 通道荧光比值在0.5±0.2的范围时,说明仅含有橙成分,



A. 砂糖橘 B. 新奇士 C. 橙汁饮料 1 D. 橙汁饮料 2 E. 橙汁饮料 3 F. 橙汁饮料 4 G. 都乐橙汁 H. 汇源橙汁 I. 良珍橙汁 J. dana 橙子果汁饮料 K. 酷儿橙汁饮料 L. 美汁源果粒橙

图 6 橙汁样品的荧光 PCR 扩增曲线

Figure 6 Fluorescence PCR amplification curve of orange juices



A. 砂糖橘 B. 新奇士 C. 粒粒橙 D. 咸柑橘饮料 1 E. 咸柑橘饮料 2 F. 芒果混合汁饮料 G. 蓝莓汁饮料 H. 桑葚汁饮料

图 7 混合饮料的荧光 PCR 扩增曲线

Figure 7 Fluorescence PCR amplification curve of mixed drinks

表 10 橙汁饮料的荧光 PCR 扩增结果

Table 10 Fluorescent PCR amplification results of orange juices

样品	CT 值		荧光值		FAM/VIC 荧光比值	橙汁成成	柑橘成分
	FAM	VIC	FAM	VIC			
橙汁饮料 1	23.3	21.8	373 043	1 102 560	0.34	+	-
橙汁饮料 2	20.6	19.6	397 878	1 086 455	0.37	+	-
橙汁饮料 3	21.9	20.4	358 342	1 023 254	0.35	+	-
橙汁饮料 4	21.8	20.4	352 962	1 004 819	0.35	+	-
都乐橙汁	23.0	21.3	312 526	955 023	0.33	+	-
汇源橙汁	22.8	20.8	319 009	875 207	0.36	+	-
良珍橙汁	20.1	18.9	299 804	940 447	0.32	+	-
dana 橙子果汁饮料	21.1	20.1	348 390	896 414	0.39	+	-
酷儿橙汁饮料	23.7	22.7	358 343	831 991	0.43	+	-
美汁源果粒橙	21.1	20.1	348 390	896 414	0.39	+	-
粒粒橙	31.7	35.0	15 824 098	2 656 002	5.96	+	+
咸柑橘饮料 1	33.5	36.1	11 985 952	2 131 576	5.62	+	+
咸柑橘饮料 2	35.6	38.6	10 713 556	1 837 734	5.83	+	+
芒果混合汁饮料	/	/	/	/	/	-	-
蓝莓汁饮料	/	/	/	/	/	-	-
桑果汁饮料	/	/	/	/	/	-	-
广西砂糖桔	17.5	/	3 362 066	/	/	-	+
美国新奇士	22.5	21.2	385 169	1 061 083	0.36	+	-

FAM/VIC 荧光比值 > 1, 则含有橘成分。与其他检验方法或标准使用实时荧光定量 PCR 方法检验时利用 CT 值判断结果有所不同, 打破了仅靠 CT 值判定结果的局限。

通过双重荧光定量 PCR 方法, 在设定的 R22 引物和探针以及反应体系下, 实现了柑橘属中橙和橘成分的区分。但试验对市售饮料的检验品种覆盖范围有限, 仍需进一步筛选和优化引物、探针和反应体系, 扩大饮料检验

品种, 进一步寻找特色的规律, 建立果汁中单一植物源性成分的靶向精准鉴别技术, 完善果蔬汁饮料鉴别的标准方法。

参考文献

[1] 牛灿杰, 张慧, 陈小珍. 果汁掺假鉴别检测技术研究进展[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(6): 292-294.

- NIU Can-jie, ZHAG Hui, CHEN Xiao-zhen. Research progress on identification and detection technology of adulterated fruit juice[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2015, 43(6): 292-294.
- [2] 刘哈璐, 张九凯, 韩建勋, 等. 基于 UPLC-QTOF-MS 代谢组学技术的 NFC 和 FC 橙汁差异成分比较[J]. 食品科学, 2021, 42(6): 229-237.
- LIU Han-lu, ZhANG Jiu-kai, HAN Jian-xun, et al. Comparison of different components of NFC and FC orange juice based on uplc-qt-of-ms metabonomics[J]. Food Science, 2021, 42(6): 229-237.
- [3] 于丽薇, 蒋丽萍. 果汁饮料真假的鉴别方法[J]. 哈尔滨学院学报(教育), 2002(8): 66-67.
- YU Li-wei, JIANG Li-ping. Identification method of fruit juice beverage[J]. Journal of Harbin University (Education), 2002(8): 66-67.
- [4] 马耀宏, 史建国, 杨俊慧, 等. 果汁饮料中还原糖快速测定技术的研究[J]. 食品与发酵工业, 2006(6): 104-106.
- MA Yao-hong, SHI Jian-guo, YANG Jun-hui, et al. Rapid determination of reducing sugar in juice drinks[J]. Food and Fermentation Industry, 2006(6): 104-106.
- [5] 韩雅珊, 崔雨林. 柑桔类水果及其果汁中 D-异柠檬酸的酶法测定[J]. 营养学报, 1996(1): 120-125.
- HAN Ya-shan, CUI Yu-lin. Enzymatic determination of D-isocitric acid in citrus fruits and their juice[J]. Acta Nutrica Sinica, 1996(1): 120-125.
- [6] D'ORAZIO Giovanni, CIFUENTES Alejandro, FANALI Salvatore. Chiral nano-liquid chromatography-mass spectrometry applied to amino acids analysis for orange juice profiling[J]. Food Chemistry, 2008, 108(3): 1 114-1 121.
- [7] PAN Geoffrey-g, KILMARTIN Paul-a, SMITH Bronwen-g, et al. Detection of orange juice adulteration by tangelo juice using multivariate analysis of polymethoxylated flavones and carotenoids[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2002, 82(4): 421-427.
- [8] ANTOLOVICH M, LI Xia, ROBARDS K. Detection of adulteration in australian orange juices by stable carbon isotope ratio analysis (SCIRA)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(5): 2 623-2 626.
- [9] ERIC Jamin, REGIS Guérin, MELINDA Rétif, et al. Improved detection of added water in orange juice by simultaneous determination of the oxygen-18/oxygen-16 isotope ratios of water and ethanol derived from sugars[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(18): 5 202-5 206.
- [10] ZUO Rui-ting, ZHOU Si, ZUO Yue-gang, et al. Determination of creatinineuric and ascorbic acid in bovine milk and orange juice by hydrophilic interaction HPLC[J]. Food Chemistry, 2015, 182: 242-245.
- [11] 李鑫, 刘柱, 蒋鑫, 等. 液相色谱/元素分析-同位素比率质谱联用法鉴定橙汁掺假[J]. 食品科技, 2013, 38(5): 323-327.
- LI Xin, LIU Zhu, JIANG Xin, et al. Identification of adulterated orange juice by liquid chromatography / elemental analysis isotope ratio mass spectrometry[J]. Food Science and Technology, 2013, 38(5): 323-327.
- [12] SIMPKINS Wayne-a, LOUIE Honway, WU Michael, et al. Trace elements in Australian orange juice and other products[J]. Food Chemistry, 2000, 71(4): 423-433.
- [13] 张森, 贾洪峰, 李燮昕, 等. 电子舌在鲜榨橙汁掺假识别中的应用研究[J]. 食品与机械, 2015, 31(6): 92-94, 207.
- ZHANG Miao, JIA Hong-feng, LI Xie-xin, et al. Application of electronic tongue in identification of adulterated fresh orange juice[J]. Food & Machinery, 2015, 31(6): 92-94, 207.
- [14] 陈颖, 吴亚君. 话说我国果汁业中的果汁掺假问题[J]. 中国果业信息, 2013, 30(6): 39-41.
- CHEN Ying, WU Ya-jun. On the adulteration of fruit juice in China's fruit juice industry[J]. China Fruit Industry Information, 2013, 30(6): 39-41.
- [15] NG Chang-Chai, CHANG Chen-Chin, WU I-Chieh, et al. Rapid molecular identification of freshly squeezed and reconstituted orange juice[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2006, 41(6): 646-651.
- [16] 梁宇斌, 牟靖芳, 李晓明, 等. 果汁中柑橘属成分实时荧光 PCR 检测方法[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(16): 84-90.
- LIANG Yu-bin, MOU Jing-fang, LI Xiao-ming, et al. Real time PCR detection of Citrus components in fruit juice [J]. Food Research and Development, 2014, 35(16): 84-90.
- [17] 刘伟红, 许文涛, 商颖, 等. 果汁 DNA 提取方法比较及柑橘属植物分子生物学检测技术的研究[J]. 中国食品学报, 2012, 12(4): 195-201.
- LIU Wei-hong, XU Wen-tao, SHANG Ying, et al. Comparison of DNA extraction methods and molecular biological detection techniques of Citrus[J]. Chinese Journal of Food, 2012, 12(4): 195-201.