

食用油 DNA 提取及检测技术的研究进展

何景¹, 许文涛^{1,2}, 黄昆仑^{1,2,*}

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083;

2. 农业部转基因生物食用安全监督检验测试中心(北京), 北京, 100083)

摘要:对食用油 DNA 提取方法、样品基质和食用油加工工艺对食用油 DNA 提取的影响进行了系统阐述;综述了检测基因、分光光度法、荧光光谱法、定性 PCR、实时定量 PCR 和分子标记技术在食用油 DNA 检测中的应用现状;讨论了食用油 DNA 提取和检测中存在的问题及未来的发展前景。

关键词:食用油, DNA 提取方法, 样品基质, 加工工艺, 检测技术

Research progress of DNA extraction and detection technique for edible oil

HE Jing¹, XU Wen-tao^{1,2}, HUANG Kun-lun^{1,2,*}

(1. College of Food Science and Nutrition Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. The Supervision, Inspection & Testing Center of Genetically Modified Food Safety, Ministry of Agriculture, Beijing 100083, China)

Abstract: The influences of DNA extraction method, sample matrix and edible oil processing on DNA extraction from edible oil were systematically illustrated. The application progress of chosengene of detection, spectrophotometry, fluorescence spectroscopy, qualitative PCR, real time PCR and molecular markers were reviewed. And the present problems and development prospects of DNA extraction from edible oil and detection technique were discussed.

Key words: edible oil; DNA extraction method; sample matrix; processing; detection technique

中图分类号: TS221

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)12-0382-06

现在市场上的精炼植物油主要有大豆油、玉米油、花生油、葵花油、橄榄油、菜籽油和芝麻油等及其调和油,其主要成分为甘油三酸酯,提供了人体自身无法合成的必需脂肪酸,如亚油酸、 α -亚麻酸等,及各种脂溶性维生素 A、D、E、K 等。各种食用油的营养价值不同,其中以橄榄油最佳,其不饱和脂肪酸高达 82%~87%,油酸、亚油酸、亚麻油酸含量的比例是最适合人体需要的比例^[1]。随着科技的进步和人们健康意识的增强,人们更加关注食品的质量和安。转基因的检测是人们对于食品质量与安全关注的重点之一,最主要的转基因作物是大豆,2010 年大豆的种植面积占全世界油料作物种植面积的 58%^[2]。大豆油是主要的食用油之一,在美国大豆提供的食用油脂占有所有油脂的 68%^[2],中国转基因大豆进口量逐年增加,目前中国市场上 70% 的大豆制品含有转基因成分^[3];另外,人们在食用油方面关注的问题是食用油掺假问题,由于不同食用油营养价值不同,价格差异很大,有些不法厂商为了追逐高利润,向高价

食用油中添加低价食用油,严重损害了消费者的利益。最常用检测转基因的方法是基于 DNA 的检测技术(如 PCR),基于蛋白质的检测技术并不适用于分析检测深加工食品。食用油掺假检测主要有理化检测方法、气相色谱法、近红外光谱技术、高效液相色谱法及同位素比值法^[3]或质子转移反应质谱(PTR-MS)、核磁共振光谱(NMR)^[4]等方法。虽然每种食用油化学组成不同,但化学分析方法分析食用油的起源和真实性并没有固定的指标,且其检测限不够低($\geq 5\%$)^[4-5],所以化学分析方法并不能满足食用油真实性的检测。基于 DNA 的检测技术检测线高且能更好的反应原料的真实性,所以分子手段更适合食用油掺假的检测,近几年,应用分子手段检测食用油掺假问题的研究主要在橄榄油方面^[6]。本文对食用油 DNA 提取及检测技术进行了详细综述。

1 食用油 DNA 的提取方法及其主要影响因素

1.1 DNA 提取方法

目前,关于食用油 DNA 提取方法的研究有很多,其中橄榄油研究的比较多,其次是大豆油,其他植物食用油研究的比较少。应用于食用油的 DNA 提取的方法有很多种,主要有试剂盒法、乳化法和冷冻干燥法。

DNA 提取的第一步是样品的制备,提取食用油

收稿日期:2011-08-16 * 通讯联系人

作者简介:何景(1986-),女,硕士研究生,研究方向:食品安全。

基金项目:国家高技术研究发展计划(863)项目(2006AA10Z440);国家自然科学基金(30800770);转基因生物重大专项(2008ZX08012-001)。

DNA 有两种样品制备方法,一是食用油直接作为样品,如果是市售食用油可以直接作为样品,因为其已经是具有代表性的均一样品;如果是实验室自制食用油或者食用油半成品则需要先把整个样品振荡混匀,再取适量用于 DNA 提取。另一种是先离心食用油,以得到的沉淀为样品,但市售食用油已经过离心等加工过程,所以离心几乎不能从市售食用油中得到沉淀。

1.1.1 试剂盒法 通过对试剂盒提取食用油 DNA 的比较研究,得出比较好的食用油 DNA 提取试剂盒有 the Qiagen QIAamp DNA stool extraction kit^[7-8]、the Nucleospin food kit^[9]、the Promega Wizard DPSF Kit^[10-11],其采用的方法分别是树脂法、离心柱法和磁珠法。试剂盒法直接以液态食用油为样品。

1.1.2 乳化法 目前乳化法提取食用油 DNA 的研究很多,但目前为止并没有固定公认的最佳的食用油 DNA 提取乳化法,且常常造成假阴性的结果。乳化法分为两类,一类是有机试剂法,另一类是直接提取液法。有机试剂法直接以食用油为样品,选择的有机试剂主要是正己烷,但 Bogani 等在提取脱胶大豆油 DNA 时选择的有机试剂是氯仿(代替了正己烷)^[12];Li 等在提取含有棕榈油的混合食用油 DNA 时有机试剂选择的是石油^[13];Doveri 等在提取实验室自制橄榄油 DNA 时选择的有机试剂是正庚烷^[8]。此外,虽然在很多研究中食用油 DNA 提取都使用有机试剂,但 Testolin 等^[14]以橄榄油为样品对有机试剂法进行优化实验,结果显示有机试剂正己烷并没有提高 DNA 提取率。直接提取液法的样品有两种,一种是离心食用油后得到的沉淀,另一种液态食用油。相对于有机试剂法,直接提取液法研究的比较少,且精炼食用油离心后得不到沉淀,但 Costa^[15-16]等用 Wizard、CTAB 和 Nucleospin 提取精炼食用油 DNA 时,采用了预先离心(18,5149 × g, 30min, 4℃)食用油取沉淀为样品的方法;Busconi^[17]等提取特级初榨橄榄油时也预先离心(14000 × g, 30min, 4℃)橄榄油取沉淀为样品。Torre^[18]等提取自制的橄榄油 DNA 时,直接磁力搅拌自制橄榄油和 TEA,且可以从 1g 橄榄油中提取到 0.1~0.5pg 的 DNA。所以乳化法提取食用油 DNA 还有待进一步研究。

乳化法中,沉淀时添加核酸助沉剂有助于提高 DNA 的提取率,目前核酸助沉剂市售和文献报道的有五种^[19],市售的核酸助沉剂有三种:核酸助沉剂 Acryl Carrier,核酸助沉剂 Glycogen,核酸助沉剂酵母 tRNA;文献报道的是其他物种的 DNA^[20]和聚丙烯酰胺溶液^[21-22]。氯仿/异戊醇或者酚/氯仿/异戊醇抽提对于食用油 DNA 纯化是必要的步骤^[4],有些研究中采用试剂盒提取食用油 DNA 时也会增加酚氯仿抽提步骤^[23]。试剂盒^[24]纯化食用油 DNA 可以提高 DNA 的纯度,但 DNA 的含量也会随着丢失,所以试剂盒纯化提取率对食用油 DNA 提取很重要。

1.1.3 冷冻干燥法 冷冻干燥法^[22]是白立群等提取精炼大豆油 DNA 时提出的一种新型食用油 DNA 提取方法,其主要优点是将大量含有 DNA 的溶液浓缩,减少了工作量,且成功检测出精炼大豆油 DNA

中的大豆内源 Lectin 基因,CaMV35S 启动子和 NOS 终止子。

1.2 样品基质对食用油 DNA 提取的影响

不同食用油的 DNA 提取效率不同。制取食用油的原料、原料处理、加工工艺和食用油储存条件以及储存时间长短都会导致食用油中 DNA 残留量不同。玉米胚芽油的原料是在制玉米糝和玉米淀粉过程中回收的玉米胚芽,橄榄油的原料是油橄榄鲜果直接压榨,大豆和花生油的原料都是完整的种子;食用油生产工艺有很多种,主要分为压榨和浸出两种,压榨又分为冷榨和热榨,Busconi^[17]等研究从初榨橄榄油提取 DNA 中,提出采用冷压榨技术生产的橄榄油(不包括离心和过滤步骤)更有利于 DNA 提取,且提取的 DNA 更有利于 PCR 等检测技术的应用。不同的食用油成分不同,如脂肪酸的饱和度、蛋白含量、游离脂肪酸和色素等都可能影响食用油 DNA 提取;同种食用油,不同品牌、不同生产批次、采用的原料产地、新鲜度和生产工艺及工艺参数等不同都将导致食用油组成有所差别,如葵花籽油中脂肪酸的构成因气候条件的影响,寒冷地区生产的葵花籽油含油酸 15%,亚油酸 70%左右;温暖地区生产的葵花籽油含油酸 65%左右,亚油酸 20%左右^[25],都有可能影响食用油 DNA 提取。王亚^[26]在食用油 DNA 提取方法的研究结果表明,油菜籽油的 DNA 产物浓度相对较高,其次是大豆油、棉籽油,玉米油的产率最低;Wu^[8]等用 Water-lineal polyacrymide 方法提取四种品牌的大豆油时,只成功从其中三种品牌的大豆油中提取出可扩增的 DNA,且这三种品牌的大豆油的 DNA 提取率也各不相同。食用油的品质和储存中的很多因素有关,如温度、光照和氧含量等,这些因素都会加速食用油氧化;且食用油本身含有的脂肪酸的组成也影响着食用油的氧化程度,含有大量饱和脂肪酸的比较稳定,含有大量不饱和脂肪酸的容易氧化。Pafundo^[23]等在橄榄油储存时间对 AFLP (Amplified Fragments Length Polymorphisms) 技术评价橄榄油 DNA 的影响的研究表明,采用分子手段鉴定橄榄油应该在橄榄油一个月的储存期内,如果超出一个月,从橄榄油中提取的 DNA 质量显著下降;Spaniolas^[27]等研究结果也表明,随着食用油储存时间的延长,DNA 降解的越严重,且提取的 DNA 溶液的 PCR 抑制效应也越大。

1.3 食用油加工步骤对食用油 DNA 提取的影响

市售的植物食用油主要有压榨食用油和浸出食用油。压榨油加工工艺是“物理压榨法”,其要求原料精选,油料经去杂、去石后进行破碎、蒸炒、挤压,让油脂从油料中分离出来,得到粗油。精炼过程主要有沉降、脱胶、脱酸、脱色、脱臭、脱蜡和脱致癌物等^[28]。

食用油精炼过程会严重降解去除粗油中的 DNA。针对食用油精炼过程对 DNA 提取和检测的影响的研究主要有大豆油。食用油精炼过程第一步为离心或者其他分离方法(如过滤),除去油中不溶性杂质(细胞或组织),绝大部分 DNA 在这一步随着沉

淀被分离除去,食用油中仅残留下微量的 DNA。1998年,Pauli^[29]等研究表明,对大豆粗油离心几乎可以完全除去其中的 DNA,巢式 PCR 扩增结果为阴性。

脱胶主要是将粗油中的胶溶性杂质(主要是磷脂和部分蛋白质)脱除的工艺过程,是向粗油中加入热水或通水蒸气,加热脂肪并在 50℃ 温度下搅拌混合,然后静置分层,分离水相^[28]。脱胶将使食用油中微量 DNA 再次随着极性水在高温下大量丢失,给食用油 DNA 提取带来巨大挑战。Gryson^[30]等可以从离心后的大豆粗油提取到大豆 Lectin 基因,但检测不到脱胶油中的 DNA,说明脱胶是去除粗油中 DNA 的重要一步;Gryson^[31]等加大了样品用量,从 250g 磷含量 72.4ppm 的脱胶大豆油中 PCR 扩增出 Lectin 基因,从 365g 磷含量 32.0ppm 的脱胶大豆油中 PCR 扩增出 Lectin 基因。综上所述,虽然离心和脱胶是去除粗油中大量 DNA 的重要步骤,但还是有可能提取得到 DNA,并可成功应用于 PCR 扩增。Bogani^[11]等从 5mL 脱胶大豆油中提取得到 1.7ng 大豆 DNA,并成功检测到了 Lectin 基因、外源 CP4 基因、35s 启动子基因、转化事件特异性基因。

除了脱胶过程,脱酸过程也是油水分离过程,其是向油相中加入碱溶液和游离脂肪酸,然后油水分离,油水分离后,再用热水洗涤中性油,静置离心,分离除去残留的皂脚。其他精炼过程,脱色、脱臭、脱蜡或脱致癌物,都会不同程度的降解去除食用油中的 DNA。

2 食用油 DNA 检测技术

2.1 检测基因的选择

分子技术应用于食用油的检测主要有三个方向:转基因方面,食用油掺假方面和鉴定食用油原料品种方面。研究食用油是否含有转基因成分主要针对大豆油,检测基因主要有 35S、NOS、CP4-EPSPS 及其物种转化事件特异性基因。食用油掺假涉及每种食用油,检测的基因是各自的物种特异性基因。鉴定食用油原料品种主要针对橄榄油,应用的分子标记技术主要有 SSR、SNP、RAPD、SCAR 和 AFLP 等。

检测食用油 DNA 质量的基因主要有叶绿体 ATP^[6,32]、RBCL^[32] 基因和物种特异性基因。叶绿体基因在多数植物中以多拷贝形式存在,所以对于 DNA 含量甚微的精炼食用油,比单拷贝或少拷贝的物种特异性基因,具有更高灵敏度的优势。由于 5S 基因拷贝数高(几千拷贝/单倍体),且在植物物种之间是很保守的区域,Doveri 等^[33]提出 5S 基因结合了叶绿体基因高拷贝和内标基因特异性的特点,是更理想的鉴定食品中物种成分的基因,且设计了扩增大豆、葵花、玉米和油菜的 5S 基因的物种特异性引物。

扩增片段大小和扩增基因组对 PCR 扩增精炼食用油 DNA 很重要。扩增片段越小,PCR 扩增成功率越高^[34],且 GC 含量高的 DNA 在加工工程中更稳定,内源基因比外源基因在加工过程中更稳定^[35]。所以 PCR 扩增食用油 DNA 应该选择片段小且 GC 含量高的基因组片段,转基因成分精确定量应慎重

选择扩增基因及其扩增片段。

2.2 食用油 DNA 检测技术

食用油 DNA 的检测分析技术主要有凝胶电泳、分光光度法、定性 PCR、实时荧光定量 PCR(检测片段大小不同)和分子标记技术,其中分子标记技术主要用于橄榄油品种鉴定,Agrimonti^[36]详细综述了分子标记技术在橄榄油中的应用。其中凝胶电泳并不适合评价精炼食用油 DNA,因为精炼食用油 DNA 降解特别严重,凝胶电泳检测不出精炼食用油 DNA,只适合评价非精炼食用油 DNA。

2.2.1 分光光度法和荧光光谱法 分光光度法和荧光光谱法可以快速确定溶液中的 DNA 浓度,所以可以用来比较不同食用油 DNA 提取方法的提取效率。分光光度法通过测定波长在 260nm 处的紫外吸收值确定 DNA 浓度,其操作简便、成本低,但其结果很容易受到溶液中其他物质的影响(如酚、乙醇、RNA 等),所以其不能准确反映溶液中的 DNA 浓度,只适合高纯度 dsDNA 的定量。在 DNA 浓度测定之前,应该漩涡振荡 DNA 溶液使 DNA 分布均匀。分光光度法也可以测定 DNA 溶液的纯度(A260/A230 和 A260/A280)。但在一些研究^[14]中,采用向 DNA 溶液中添加一定数量的纯度和质量都很好的 DNA 原液,然后通过 PCR 扩增的方法,比较 DNA 溶液和 DNA 原液的 PCR 扩增条带来反映是否存在有 PCR 抑制物,如果 DNA 溶液的 PCR 条带比 DNA 原液的 PCR 条带暗,说明 DNA 溶液中 PCR 抑制物存在,反则说明 DNA 溶液中没有 PCR 抑制物存在。

与分光光度法相比,荧光光谱法应用染料(如 PicoGreen、Hoechst 和 SYBRGreen 等)和双链 DNA 相结合后荧光信号增强,以 DNA 标准样品建立标准曲线后计算出样品 DNA 的浓度,其检测灵敏度高于分光光度法,也能一定程度上反映 DNA 的裂解程度,但其也受很多因素的影响,如模板 AT 含量、pH、盐浓度和有机试剂等^[35]。Ayed^[7]等成功应用 HoechstH33258 染料测定橄榄油 DNA 浓度,测定的浓度范围为 5~10ng/μL。但 Costa^[15]等研究中发现,Picogreen 测定 DNA 浓度的试剂盒并不适合测定大豆油 DNA 的浓度。所以荧光光谱法测定 DNA 浓度并不能广泛用于食用油 DNA 浓度测定。

2.2.2 定性 PCR 定性 PCR 是基于 DNA 检测法中的最常用的方法。定性 PCR 可以检测提取的食用油 DNA 质量或者确定每个食用油加工步骤对食用油 DNA 的影响程度。在 PCR 检测 DNA 质量时,目标基因的选择是非常重要的。如果采用高拷贝数的目标基因,如叶绿体基因,PCR 检测灵敏度会更高,但物种组织之间叶绿体基因拷贝数不同,食用油叶绿体基因残留量也就不同。所以目标基因应慎重选择,可以根据实验目的而选择合适的目的基因。

评价加工步骤对 DNA 质量的影响程度可以采用定性 PCR 扩增不同片段大小的相同基因的方法。DNA 降解越严重,残留 DNA 的片段越小,残留的大片断 DNA 也就越少,所以 PCR 扩增小片段 DNA 的

成功率高于 PCR 扩增大片段的成功率,从而评价 DNA 的不同降解程度。此外,很多研究应用定性 PCR 和毛细管凝胶电泳结合来评价食用油 DNA 质量^[7,14,37-38]。

定性 PCR 虽然很灵敏,但其需要凝胶电泳使其扩增片段可见,其整个检测分析时间长(和荧光定量 PCR 相比)、分辨率低、整个分析系统不能自动化、污染的可能性比定量 PCR 高,且凝胶电泳中使用有毒试剂(EB 等)使扩增片段可见。此外当其 DNA 模板中 DNA 含量差别不够大时,PCR 扩增条带的亮度没有差别,所以定性 PCR 并不是评价食用油 DNA 质量的理想方法。

2.2.3 实时荧光定量 PCR 目前主要有两种类型的荧光定量 PCR 方法:竞争性荧光定量 PCR 和实时荧光定量 PCR。实时荧光定量 PCR 是目前国际上转基因作物及其产品定量检测中使用最广的方法。实时荧光定量 PCR 被认为是准确、特异、无交叉污染和高通量的定量 PCR 方法,其原理是在 PCR 反应体系中加入荧光基因,利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析。实时荧光定量 PCR 的最低检测线可以达到 pg 级^[39]。

实时定量 PCR 有很多优点,如高灵敏性、特异性强、结果重复性好、模板拷贝数范围广。与定性 PCR 相比,定量 PCR 不需要后续处理,PCR 后交叉污染低。和竞争性荧光定量 PCR 相比,其更灵敏,更准确。

荧光定量 PCR 可以用来评价食用油加工工艺对食用油 DNA 的影响或食用油 DNA 提取方法的提取效率^[6]。由于定量 PCR 的灵敏度更高,所以其比定性 PCR 更适合评价食用油 DNA。当定量食用油转基因成分或者其他基因成分时,转基因基因或者其他基因的目标片段大小和对照基因的目标片段大小应该尽量一致,以保证两者扩增效率相近。由于食用油 DNA 含量少,实时荧光定量 PCR 的实验设计以及实验材料选择应该特别小心^[40]。

3 展望

目前,食用油 DNA 提取方法各式各样。试剂盒法,操作简单,且能流水线运作,适合大量样品的检测。但其成本高,提取的量较少,目前最常用于提取食用油 DNA 的试剂盒是 Qiagen QIAamp DNA stool,但在研究中其只被用于提取橄榄油 DNA,由于橄榄油 DNA 提取易于其他精炼食用油 DNA 提取,所以其是否适合其他食用油 DNA 提取还有待进一步研究。乳化法,步骤简单、成本低、也是有效的食用油 DNA 提取方法,且能适当增加或减少样品的用量,但目前乳化法各式各样,有待确定最佳的适合食用油 DNA 提取的乳化法。

食用油 DNA 提取研究最多的是橄榄油,其次是大豆油,其他食用油 DNA 提取研究的很少,且由于每种食用油原料不同,生产工艺不同,组成不同,储存条件及时间不同,DNA 残留量也不同,导致每种食用油最佳 DNA 提取方法不同或提取效率不同,所以

有待针对每种食用油 DNA 提取做系统的研究,确定适合于食用油 DNA 提取的通用方法或者每种食用油 DNA 提取的最佳 DNA 提取方法。

分子技术用于食用油方面主要有三个研究方向:转基因方面,食用油掺假方面和鉴定食用油原料品种方面,随着这些问题的出现,食用油快速检测技术也是食用油分子检测技术的热点之一。食用油 DNA 检测技术最常用的是分光光度法、定性 PCR、实时荧光定量 PCR 和分子标记技术,用于检测食用油 DNA 质量、各个因素对食用油 DNA 提取的影响;由于食用油 DNA 含量低,所以食用油 DNA 纯度低极易导致假阴性的结果,酚氯仿抽提可以满足去除食用油 DNA 中 PCR 抑制物的要求,但操作应该特别小心,避免酚残留及乙醇残留,否则导致 PCR 假阴性结果。定性 PCR、实时荧光定量 PCR 是研究转基因和食用油掺假的有效方法,由于食用油 DNA 被严重降解,DNA 片段相对较小,所以扩增片段大小严重影响着扩增成功率,当扩增片段过大时,则会导致 PCR 扩增失败。目前,应用于食用油 DNA 检测的分子技术还有多重 PCR^[5]、毛细管电泳^[7,14,37-38]、生物传感器^[11]和高效液相色谱法^[26]。

食用油 DNA 残留量少是制约 PCR 检测的重要因素之一,其可以通过高灵敏度的分子检测技术克服。目前,高灵敏度的分子检测技术有巢式 PCR,环介导等温 PCR 和纳米 PCR 等,巢式 PCR 比普通 PCR 法的检测线高 3~6 个数量级^[40],但由于其扩增两次,很容易由于交叉污染导致假阴性的结果,现在有单管巢式 PCR 法可以克服这个困难,其利用引物的不同退火温度来实现同一管中两对引物不同时间扩增;环介导等温 PCR(LAMP)检测线为 0.005%,比普通 PCR 法高 2~5 个数量级,其所需时间短,不需要特殊仪器,不需要后续琼脂糖凝胶电泳等操作,有利于快速食用油 DNA 检测^[41]。纳米 PCR(NP-PCR)虽然主要是提高 PCR 扩增特异性,但其也具有高灵敏度的特点。

食用油 DNA 转基因成分或者掺假成分的精准定量现在鲜有研究,食用油 DNA 含量少且质量差是食用油 DNA 精准定量面对的难题之一。由于食品油加工工艺,DNA 降解严重,且转基因成分比内源基因破坏的比较严重,将导致转基因成分过低评价^[35],所以食用油 DNA 转基因成分或者掺假成分的精准定量还有待进一步研究。Noutsias 提出 TaqMan 预扩增技术,其可以提高实时荧光定量 PCR 的灵敏度和准确度,Gaudio 等应用该技术于检测食品中的大豆和玉米成分^[42]。

参考文献

- [1] 李少华,阮海健.橄榄油的加工技术与开发利用研究[J].粮油加工与食品机械,2006(5):45-50.
- [2] Soy Stats [EB/OL]. 2011. <http://www.soystats.com/2011/Default-frames.htm>.
- [3] 徐俊锋,孙彩霞,陈笑芸.转基因食品现状及贸易措施分析[J].中国农学通报,2009,25(22):42-46.

- [4] 李昌,单良,王兴国.食用油掺假检测方法概述[J].农业工程技术·农产品加工,2007(5):30-34.
- [5] giménez M J, Pistón F, Martín P, et al. Application of real-time PCR on the development of molecular markers and to evaluate critical aspects for olive oil authentication [J]. Food Chemistry, 2010, 118: 482-487.
- [6] Consolandi C, Palmieri L, Severgnini M. A procedure for olive oil traceability and authenticity: DNA extraction, multiplex PCR and LDR-universal array analysis [J]. European Food Research and Technology, 2008, 227: 1429-1438.
- [7] Ayed R B, Kamounng, Moreau F, et al. Comparative study of microsatellite profiles of DNA from oil and leaves of two Tunisian [J]. European Food Research and Technology, 2009, 229: 757-762.
- [8] Doveri S, Sullivan D M O, Lee D. Non-concordance between genetic profiles of olive oil and fruit: a cautionary note to the use of DNA markers for provenance testing [J]. Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54: 9221-9223.
- [9] Wu Y, Chen Y, Ge Y, et al. Detection of olive oil using the Evagreen real-time PCR method [J]. European Food Research and Technology, 2008, 227: 1117-1124.
- [10] Breton C, Claux D, Metton, et al. Comparative study of methods for DNA preparation from olive oil samples to identify cultivar SSR Alleles in commercial oil samples: Possible forensic applications [J]. Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52: 531-537.
- [11] Muzzalupo I, Perri E. Recovery and characterization of DNA from virgin olive oil [J]. European Food Research and Technology, 2002, 214: 528-531.
- [12] Bogani P, Minunni M, Spiriti M M, et al. Transgenes monitoring in an industrial soybean processing chain by DNA-based conventional approaches and biosensors [J]. Food Chemistry, 2009, 113(2): 658-664.
- [13] Li Z, Wu g, Wu Y, et al. The gene MT3-B can differentiate palm oil from other oil samples [J]. Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(16): 7227-7232.
- [14] Testolin R, Lain O. DNA extraction from olive oil and PCR amplification of microsatellite markers [J]. Journal of Food Science, 2005, 70(1): 108-112.
- [15] Costa J, Mafra I, Amaral J S, et al. Monitoring genetically modified soybean along the industrial soybean oil extraction and refining processes by polymerase chain reaction techniques [J]. Food Research International, 2010, 43(1): 301-306.
- [16] Costa J, Mafra I, Amaral, et al. Detection of genetically modified soybean DNA in refined vegetable oils [J]. European Food Research and Technology, 2009, 230(6): 915-923.
- [17] Busconia M, Foronib C, Corradib M, et al. DNA extraction from olive and its use in the identification of the production cultivar [J]. Food Chemistry, 2003, 83: 127-134.
- [18] Torre F D L, Bautista B, Cánovas F M, et al. Isolation of DNA from olive oil and sediments; Application in oil fingerprinting [J]. Journal of Food Agriculture and Environment, 2004, 2(1): 84-89.
- [19] Hellebrand M, Nagy N, Moërsel J T. Determination of DNA traces in rapeseed oil [J]. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A, 1998, 206(4): 237-242.
- [20] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T 1023-2003 食用油脂中转基因植物成分定性 PCR 检测方法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [21] giménez M J, Pistón F, Martín P, et al. Application of real-time PCR on the development of molecular markers and to evaluate critical aspects for olive oil authentication [J]. Food Chemistry, 2010, 118: 482-487.
- [22] 白立群, 吴亚君, 韩建勋, 等. 一种有效的大豆精炼油 DNA 提取新方法——冷冻干燥法 [J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(12): 155-159.
- [23] Pafundo S, Busconi M, Agrimonti C, et al. Storage-time effects on olive oil DNA assessed by amplified fragments length polymorphism [J]. Food Chemistry, 2010, 123: 787-793.
- [24] Breton C, Claux D, Metton, et al. Comparative study of methods for DNA preparation from olive oil samples to identify cultivar SSR Alleles in commercial oil samples: Possible forensic applications [J]. Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52: 531-537.
- [25] 百度百科 [EB/OL]. <http://baike.baidu.com/view/47098.htm>.
- [26] 王亚. 食用油 DNA 提取方法及转基因成分检测技术的研究 [D]. 合肥: 安徽大学, 2007: 24-25.
- [27] Spaniolas S, Bazakos C, Ntouro T, et al. Use of lambda DNA as a marker to assess DNA stability in olive oil during storage [J]. European Food Research and Technology, 2008, 227: 175-179.
- [28] 阚健全. 食品化学 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002: 135-136.
- [29] Pauli U, Liniger M, Zimmermann A. Detection of DNA in soybean oil [J]. Z Lebensmittel Forsch A, 1998, 207: 264-267.
- [30] gryson N, Ronsse F, Messens K, et al. Detection of DNA during the refining of soybean oil [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2002, 79(2): 171-174.
- [31] gryson N, Ronsse F, Sewettinck K. Influence of different oil-refining parameters and sampling size on the detection of genetically modified DNA in soybean oil [J]. Journal of the American oil Chemists' Society, 2004, 81(3): 231-234.
- [32] 杨冬艳, 邓汉超, 杨永存, 等. 精炼食用植物油 PCR 检测技术研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(4): 700-702.
- [33] Doveri S, Lee D. Development of sensitive crop-specific polymerase chain reaction assays using 5S DNA: Applications in food traceability [J]. Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55: 4640-4644.
- [34] Cankar K, Tebih D, Dreo T, et al. Critical points of DNA quantification by real-time PCR - effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms [J]. BMC Biotechnology, 2006(6): 37-52.
- [35] Gryson N. Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based gMO analysis: A review [J].

- and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes [J]. *Endocr Rev*, 2002, 23(5): 599-622.
- [44] Coskun O, Kanter M, Korkmaz A, et al. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas [J]. *Pharmacol Res*, 2005, 51(2): 117-123.
- [45] Vessal M, Hemmati M, Vasei M. Antidiabetic effects of quercetin in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Comp Biochem and Physiol C: Toxicol & Pharmacol*, 2003, 135(3): 357-364.
- [46] Aoki F, Honda S, Kishida H, et al. Suppression by licorice flavonoids of abdominal fat accumulation and body weight gain in high-fat diet-induced obese C57BL/6J mice [J]. *Biosci Biotech Bioch*, 2007, 71(1): 206-214.
- [47] 刘智, 周晓霞, 苏佩清, 等. 黄芩茎叶总黄酮治疗 2 型糖尿病性高脂血症大鼠的实验研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2009, 20(1): 5-7.
- [48] Liu IM, Liou SS, Cheng JT. Mediation of beta-endorphin by myricetin to lower plasma glucose in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 104(1-2): 199-206.
- [49] Kwon DY, Jang JS, Lee JE, et al. The isoflavonoid aglycone-rich fractions of Chungkookjiang, fermented unsalted soybeans, enhance insulin signaling and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity in vitro [J]. *Biofactors*, 2006, 26(4): 245-258.
- [50] Mae T, Kishida H, Nishiyama T, et al. A licorice ethanolic extract with peroxisome proliferators-activated receptor-gamma ligand-binding activity affects diabetes in KK-Ay mice, abdominal obesity in diet-induced obese C57BL mice and hypertension in spontaneously hypertensive rats [J]. *J Nutr*, 2003, 133: 3369-3377.
- [51] 安小平, 崔庆荣. 黄连治疗糖尿病的研究进展 [J]. *甘肃中医*, 2008, 21(1): 57-58.
- [52] 殷俊, 胡仁明, 唐金凤. 小檗碱的体外降糖作用 [J]. *上海第二医科大学学报*, 2001, 21(5): 425-427.
- [53] 冷三华. 黄连解毒汤对 2 型糖尿病大鼠血糖和血脂代谢的影响 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2003, 9(4): 36-37.
- [54] Cyril W C Kendall, Amin E, David J A Jenkins. The link between dietary fiber and human health [J]. *Food Hydrocolloids*, 2010, 24(1): 42-48.
- [55] 薛雪, 杨道海. 麸皮控制血糖的机理及食用方法 [J]. *国际中医中药杂志*, 2008, 30(1): 23-30.
- [56] 刘青海, 杨性民, 邓红霞, 等. 紫菜多糖提取分离及纯化技术研究 [J]. *浙江大学学报: 农业与生命科学版*, 2005, 31(3): 293-297.
- [57] 孟宗元, 邢连宗. 茜草多糖的提取与分析 [J]. *北京中医*, 2005, 24(1): 35-36.
- [58] 孟江. 大枣多糖的化学研究及大枣渣多糖提取纯化的工艺研究 [D]. 郑州: 郑州河南中医学院, 2003.
- [59] 张彬. 茶多糖分离纯化工艺及其产品研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2008.
- [60] 李雷. 茶叶多糖食品功能性研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2006.
- [61] 张娟, 路金才. 皂苷的提取方法及含量测定研究进展 [J]. *中国现代中药*, 2006, 8(3): 25-28.
- [62] 葛发欢, 史庆龙. 超临界 CO₂ 从黄山药中萃取薯蓣皂素的工艺研究 [J]. *中草药*, 2000, 31(3): 181.
- [63] 黎海彬, 李琳, 胡松青, 等. 微波辅助提取罗汉果皂苷的研究 [J]. *食品科学*, 2003, 24(2): 92-95.
- [64] 原爱红, 黄哲, 马骏, 等. 桑叶黄酮的提取及其降糖作用的研究 [J]. *中草药*, 2004, 35(11): 1242-1243.
- [65] 田世龙, 李守强, 张永茂, 等. 苦荞中黄酮微波提取方法及其动态变化研究 [J]. *食品与机械*, 2008, 24(4): 149-152.
- [66] 陈从瑾, 黄克瀛, 杨国恩, 等. 香椿叶总黄酮不同提取方法的比较 [J]. *食品研究与开发*, 2008(3): 57-59.
- [67] 张德华, 黄仁术, 左露, 等. 生物碱的提取方法研究进展 [J]. *中国野生植物资源*, 2010, 29(5): 15-20.
- [68] 朱晓月, 刘虹, 郝彧, 等. 荷叶中生物碱提取及纯化工艺研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(9): 22-24.
- [69] 李军, 冷晓红, 郝彩琴, 等. 苦豆草生物碱提取方法的研究 [J]. *安徽农学通报*, 2010, 16(17): 47-48.
- [70] 符琼, 林录录, 鲁娜, 等. 膳食纤维提取的研究进展 [J]. *中国食物与营养*, 2010(3): 32-35.
- [71] Prakongpan T, Nitithamyong A, Luangpituksa P. Extraction and application of dietary fiber and cellulose from pineapple cores [J]. *J Food Sci*, 2002, 67(4): 1308-1313.
- [72] 张雪, 王斌. 柑橘果皮胶的提取工艺研究 [J]. *现代食品科技*, 2006(3): 144-147.
- [39] 黄昆仑, 许文涛. 转基因食品安全评价与检测技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2009: 190-198.
- [40] Ellison S L, English C A, Burns M J, et al. Routes to improving the reliability of low level DNA analysis using real-time PCR [J]. *BMC Biotechnology*, 2006(6): 33-44.
- [41] Guan X, Guo J, Shen P, et al. Visual and rapid detection of transgenetically modified soybean events using loop-mediated isothermal amplification method [J]. *Food Analytical Methods*, 2009, 3(4): 313-320.
- [42] Gaudio S D, Cirillo A, BernardogD, et al. A preamplification approach to MO detection in processed foods [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 396(6): 2135-2142.

(上接第 386 页)

Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009, 396(6): 2003-2022.

[36] Agrimonti C, Vietina M, Pafundo, et al. The use of foodgenomics to ensure the traceability of olive oil [J]. *Trends in Food Science and Technology*, 2011, 22: 237-244.

[37] Muzzalupo I, Pellegrino M, Perri E. Detection of DNA in virgin olive oils extracted from destined fruits [J]. *European Food Research and Technology*, 2007, 224: 469-475.

[38] Consolandi C, Palmieri L, Severgnini M. A procedure for olive oil traceability and authenticity: DNA extraction, multiplex PCR and LDR-universal array analysis [J]. *European Food Research and Technology*, 2008, 227: 1429-1438.