

基于植物 *rbcL* 基因测序对茶叶进行掺杂检验

王旻璇, 张永杰

山西大学 生命科学学院, 山西 太原 030006

王旻璇, 张永杰. 基于植物 *rbcL* 基因测序对茶叶进行掺杂检验. 生物工程学报, 2018, 34(2): 275–281.

Wang MX, Zhang YJ. Adulteration detection of tea samples based on plant *rbcL* gene sequencing. Chin J Biotech, 2018, 34(2): 275–281.

摘要: 茶叶是世界上最受人们欢迎的饮品之一, 但茶叶中掺杂其他植物成分的现象时有发生。依靠传统的感官和理化检验方法难以准确判断茶叶中掺杂的植物种类。报道一种基于植物核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶大亚基 (*rbcL*) 基因序列进行茶叶掺杂定性检测的方法, 包括 *rbcL* 基因片段的扩增、测序和序列分析等步骤。利用所建立的方法对 7 份茶叶样品进行分析, 发现岳阳黄茶 (黄茶) 和信阳毛尖 (绿茶) 未掺杂其他植物成分, 而正山小种 (红茶)、铁观音 (乌龙茶)、太姥银针 (白茶)、六堡茶和普洱茶 (黑茶) 均一定程度上混杂有其他植物成分。所建立的检测方法对样品的需求量小, 操作简便, 检测结果可靠性高, 能定性检测各类茶叶中是否掺杂及掺杂了何种植物成分。

关键词: 茶叶, *rbcL* 基因, 克隆, 测序, 掺杂检测

Adulteration detection of tea samples based on plant *rbcL* gene sequencing

Minxuan Wang, and Yongjie Zhang

School of Life Sciences, Shanxi University, Taiyuan 030006, Shanxi, China

Abstract: Tea is one of the most popular drinks in the world, but counterfeit or adulterated tea can be found now and then on the tea market. The traditional methods dependent on sensory, physical and chemical tests cannot identify the composition of adulterated plant species accurately. We developed therefore a method for identification of adulterated plants in tea based on qualitative detection of plant *rbcL* (Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase large subunit) fragments, which involved amplification, sequencing and sequence analyses of *rbcL* fragments. Seven tea samples were analyzed with the established method. The results showed that Yueyanghuangcha (yellow tea) and Xinyangmaojian (green tea) were pure with only detection of the tea plant *Camellia sinensis*; Zhengshan Souzhong (black tea), Tieguanyin (oolong tea), Tailaoyinzen (white tea), Liupao and Pu-erh (dark tea) were, to a certain extent, adulterated with non-*Camellia sinensis* plants. The method

Received: September 22, 2017; **Accepted:** November 23, 2017

Supported by: Natural Science Foundation of Shanxi Province (No. 201601D011065), Fund Program for the Scientific Activities of Selected Returned Overseas Professionals in Shanxi Province, Research Project Supported by Shanxi Scholarship Council of China (No. 2017-015).

Corresponding author: Yongjie Zhang. Tel: +86-351-7010599; E-mail: zhangyj2008@sxu.edu.cn

山西省自然科学基金 (No. 201601D011065), 山西省留学回国人员科技活动择优资助项目, 山西省回国留学人员科研资助项目 (No. 2017-015) 资助。

introduced in this study only requires a small amount of tea samples, easy to operate and reliable. It can be used to determine if any tea samples are adulterated.

Keywords: tea, *rbcL* gene, clone, sequencing, adulteration detection

茶叶是我国具有传统优势的特色农产品,由茶树 *Camellia sinensis* 叶片经多种工艺加工而成,分成绿、黄、白、青、黑、红六大基本茶类^[1]。现代研究发现,茶叶中含有黄酮类、酚酸类、非蛋白氨基酸、生物碱、聚胺类等多种生物活性物质,对控制体重、II型糖尿病、心血管疾病等多种病症表现出有益的作用^[2]。作为中华民族的传统饮品,茶叶的质量和安​​全直接影响人体健康,事关整个产业的发展和国家声誉。随着茶叶需求量的不断增大,茶叶消费市场以次充好、假冒伪劣甚至掺杂掺假现象时有发生^[3-4],给正常的茶叶消费和进出口贸易造成不良的影响。茶叶掺假掺杂的常见方式有:用已陈化或发霉变质的茶叶冒充好的茶叶;用形态气味与茶叶相近的其他树叶冒充茶叶;用假茶、次茶掺入真茶当中;甚至重新晒干已经饮用过的茶叶来进行多次销售等^[5]。此外,还有报道在茶叶中掺入淀粉、沙土、木灰、煤屑等^[6]。在欧盟发布的有关“食品安全与食品掺假”的调查报告​​中,茶叶被列为欧盟市场易被掺假食品名单之一^[7]。

传统的茶叶掺假鉴别检验的方式主要是感官检验和理化检验^[5,8]。这些传统鉴别方式主要凭借业内人士的经验积累,普通消费者难以做到,并且难以准确鉴定出掺杂的植物种类。随着科学技术的发展,分子生物学鉴定技术逐渐渗透到各个生物领域,特别是聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 技术具有快速、灵敏、特异性高的特点,已广泛应用于植物性食品和药材中植物成分的检测^[9-12],但在茶叶真伪鉴别领域的应用还较少。

通过 PCR 技术扩增一至数个 DNA 片段,可以进行物种识别,并可避免在传统鉴别方法中人为因素所造成的主观错判,从而有效地提高鉴别的准确性和效率。要对物种进行准确的鉴定,必

须选择合适的 DNA 片段。2009 年,生命条形码联盟植物工作组推荐将编码叶绿体核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶大亚基 (Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase large subunit, *rbcL*) 和成熟酶 K (Maturase K, *matK*) 的基因作为陆生植物的 DNA 条形码序列^[15]。本研究报道一种基于植物叶绿体 *rbcL* 基因片段进行茶叶掺杂检测的方法,该方法能够定性判断茶叶中是否掺杂及所掺杂的具体植物成分,使茶叶的掺杂检测更加科学可靠。

1 材料与方法

1.1 研究材料

本研究共选用了 7 份茶叶样品 (表 1),涉及六大茶类。

表 1 本研究使用的茶叶样品信息

Table 1 Tea samples used in this study

Code	Tea name	Category	Production place	Year
M	Xinyangm aojian	Green tea	Xinyang, Henan	2015
H	Yueyang huangcha	Yellow tea	Yueyang, Hunan	2012
L	Tailao yinzen	White tea	Fuding, Fujian	2015
T	Tieguanyin	Oolong tea	Anxi, Fujian	2015
Z	Zhengshan Souzhong	Black tea	Wuyishan, Fujian	2015
B	Liupao	Dark tea	Wuzhou, Guangxi	2007
P	Pu-erh	Dark tea	Menghai, Yunnan	2004

1.2 茶叶总 DNA 的提取和 *rbcL* 基因片段的扩增
分别称取每种茶叶样品 0.13 g 于 1.5 mL Eppendorf 管中,用手持式 G50 研磨器 (卡尤迪生物科技有限公司) 研磨茶叶,并用 CTAB (十六烷基三甲基溴化铵) 法提取总 DNA^[16]。从提取的茶叶总 DNA 中使用 KOD-Plus DNA 聚合酶 (东洋纺

(上海) 生物科技有限公司) 在 T100 PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司) 上扩增 *rbcL* 基因片段, 共需进行两轮 PCR。第一轮 PCR 使用引物组合 *rbcLa_F*^[17] 和 724R^[18], 扩增产物约 750 bp; 第二轮 PCR 使用引物组合 *rbcLa_F* 和 *rbcLa_R*^[19], 扩增产物约 600 bp。引物序列信息见表 2。第一轮扩增以提取的茶叶总 DNA 为模板; 第二轮扩增以第一轮扩增产物稀释 50 倍的稀释液为模板。两轮 PCR 各进行 40 个循环, 退火温度分别为 54 °C 和 52 °C。将第二轮扩增所得的扩增产物全部用于琼脂糖凝胶电泳, 使用 Gel Extraction kit (OMEGA 公司) 进行切胶回收。

表 2 本研究使用的引物信息

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')
<i>rbcLa_F</i>	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC
724R	TCGCATGTACCTGCAGTAGC
<i>rbcLa_R</i>	GTAATAATCAAGTCCACCRCG
M13F	TGTAACGACGGCCAGT

1.3 *rbcL* 基因片段的克隆与测序

取 4 μL 切胶纯化的 DNA 片段与 1 μL pEASY-Blunt3 克隆载体 (全式金生物技术有限公司) 混合后 16 °C 过夜连接。连接产物用于转化大肠杆菌 DH5α 菌株, 随机挑选约 10 个阳性克隆用载体引物 M13F 或 PCR 引物 *rbcLa_F* 测序。同时, 将切胶纯化的 PCR 产物用 *rbcLa-F* 进行直接测序。

1.4 测序结果的分析

通过 FinchTV 软件 (<http://downloads.informer.com/finchtv/>) 观察 PCR 产物直接测序所得的测序峰图中是否有杂峰, 据此可粗略判断样品的纯度。精确判断时, 首先除去克隆测序所得序列中的载体序列, 然后对留下的 *rbcL* 序列在 GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 和/或 BOLD (http://www.barcodinglife.org/index.php/IDS_OpenIdEngine) 数据库中进行搜索 (基于局部比对算法的搜索分析) 搜索, 确定 *rbcL* 序列所代表的植物种类。利用

MEGA 6.06 软件^[20]对克隆获得的 *rbcL* 序列进行多重比对, 切齐两端序列后用邻接法构建系统发育树, 自展值 1 000 次重复。

2 结果与分析

2.1 *rbcL* 基因片段扩增结果

通过两轮 PCR 扩增, 从 7 份茶叶样品中都得到了明亮的 *rbcL* 扩增条带 (图 1), 可用于本研究的测序和克隆分析。

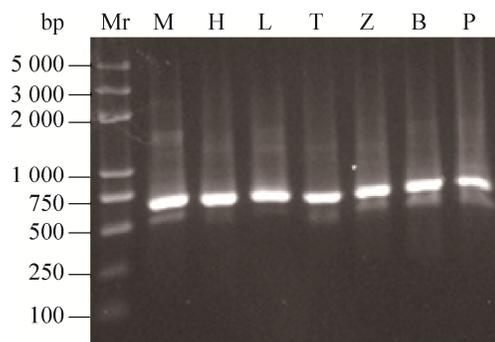


图 1 7 份茶叶样品 *rbcL* 扩增结果的电泳图

Fig. 1 Electrophoretic patterns of *rbcL* amplicons from seven tea samples. Please refer to Table 1 for codes of these tea samples. Mr indicates Trans2K Plus DNA Ladder.

2.2 信阳毛尖的检验结果

信阳毛尖 (M) 扩增产物直接测序的峰图中无套峰, 即测序图谱上每个位点只识别出一种碱基 (图 2)。将该扩增产物转化大肠杆菌后挑选 10 个阳性克隆 (M1-M10) 进行测序, 所得序列经 Blast 分析全部为茶树 *C. sinensis* 的序列。

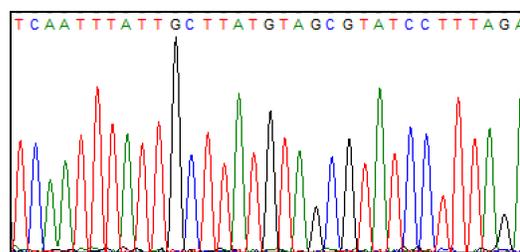


图 2 *rbcL* 扩增产物直接测序显示无套峰的图谱示例
Fig. 2 A representative chromatogram of direct sequencing of *rbcL* amplicons without heterozygous peaks.

2.3 岳阳黄茶的检验结果

岳阳黄茶 (H) 扩增产物直接测序的峰图同信阳毛尖一样, 没有显示套峰位点。挑选 8 个阳性克隆 (H1-H5, H7-H9) 进行测序, 所得序列全部为茶树 *C. sinensis*。

2.4 太姥银针的检验结果

太姥银针 (L) 扩增产物直接测序的峰图显示部分位置有套峰 (图 3)。对 10 个阳性克隆进行测序的结果显示, 3 个克隆 (L4、L7 和 L10) 为茶树 *C. sinensis* 的序列, 2 个克隆 (L1 和 L3) 为茶属 (*Camellia* spp.) 植物的序列 (其与茶树 *C. sinensis* 的序列相似性最高约 98%, 无法确切判断是否为茶树), 1 个克隆 (L8) 为芭蕉属 (*Musa* spp.) 植物的序列, 1 个克隆 (L2) 为伞形花科 (Apiaceae) 植物的序列, 1 个克隆 (L9) 为荚蒾属 (*Viburnum* spp.) 植物的序列 (与公共数据库中的 *rbcL* 序列相似性最高约 96%), 1 个克隆 (L5) 可能为金虎尾科 (Malpighiaceae) 植物的序列 (与公共数据库中的 *rbcL* 序列相似性最高约 95.5%), 1 个克隆 (L6) 为被子植物门 (Magnoliophyta) 植物的序列 (与公共数据库中的 *rbcL* 序列相似性最高只有 94%)。

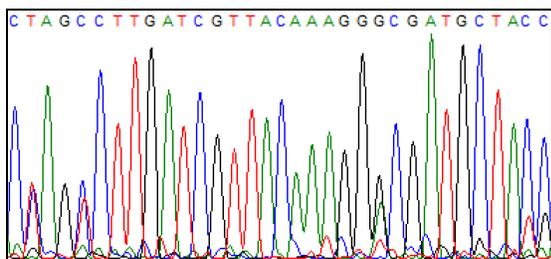


图 3 *rbcL* 扩增产物直接测序显示有套峰的图谱示例
Fig. 3 A representative chromatogram of direct sequencing of *rbcL* amplicons with heterozygous peaks.

2.5 铁观音的检验结果

铁观音 (T) 扩增产物直接测序的峰图显示部分位置有套峰 (类似图 3)。对 10 个阳性克隆进行测

序的结果显示, 7 个克隆 (T2-T6、T8 和 T9) 为茶树 *C. sinensis* 的序列, 1 个克隆 (T7) 为芭蕉属 (*Musa* spp.) 植物的序列, 1 个克隆 (T10) 为葫芦科的黄瓜 *Cucumis sativus*, 1 个克隆 (T1) 为双子叶植物纲 (Magnoliopsida) 某植物的序列 (与公共数据库中 *rbcL* 序列的相似性最高只有 97%, 无法确认到更低级的分类单元)。

2.6 正山小种的检验结果

正山小种 (Z) 扩增产物直接测序的峰图显示部分位置有杂峰 (类似图 3)。对 9 个阳性克隆进行测序的结果显示, 3 个克隆 (Z5、Z7 和 Z8) 为茶树 *C. sinensis* 的序列, 2 个克隆 (Z1 和 Z3) 为杨柳科柳属 (*Salix* spp.) 植物的序列, 2 个克隆 (Z4 和 Z10) 为伞形花科 (Apiaceae) 植物的序列, 1 个克隆 (Z2) 为葫芦科的黄瓜 (*C. sativus*), 1 个克隆 (Z6) 为芸香科 (Rutaceae) 植物的序列。

2.7 六堡茶的检验结果

六堡茶 (B) 扩增产物直接测序的峰图显示部分位置有套峰 (类似图 3)。对 10 个阳性克隆进行测序的结果显示, 2 个克隆 (B3 和 B4) 为茶树 *C. sinensis* 的序列, 2 个克隆 (B7 和 B9) 为伞形花科 (Apiaceae) 植物的序列, 2 个克隆 (B2 和 B8) 为豆科 (Fabaceae) 植物的序列, 2 个克隆 (B1 和 B5) 为葫芦科 (Cucurbitaceae) 植物的序列, 2 个克隆 (B6 和 B10) 为双子叶植物纲 (Magnoliopsida) 某植物的序列 (与公共数据库中的 *rbcL* 序列相似性最高只有 96.5%)。

2.8 宫廷普洱的检验结果

宫廷普洱 (P) 扩增产物直接测序的峰图显示部分位置有套峰 (类似图 3)。对 10 个阳性克隆进行测序的结果显示, 3 个克隆 (P6, P8 和 B10) 为茶树 *C. sinensis* 的序列, 2 个克隆 (P1 和 P7) 为胡麻科芝麻 *Sesamum indicum* 的序列, 2 个克隆 (P2 和 P3) 为唇形目 (Lamiales) 植物的序列, 1 个克隆 (P4) 为伞形花科 (Apiaceae) 植物的序列,

1 个克隆 (P5) 为蔷薇科 (Rosaceae) 植物的序列, 1 个克隆 (P9) 为芭蕉科芭蕉属 (*Musa* spp.) 植物的序列。

2.9 不同茶叶样品掺杂植物成分的比较

利用克隆测序所得的全部 *rbcL* 序列构建系统发育树 (图 4)。从中可知, 一些植物成分仅在

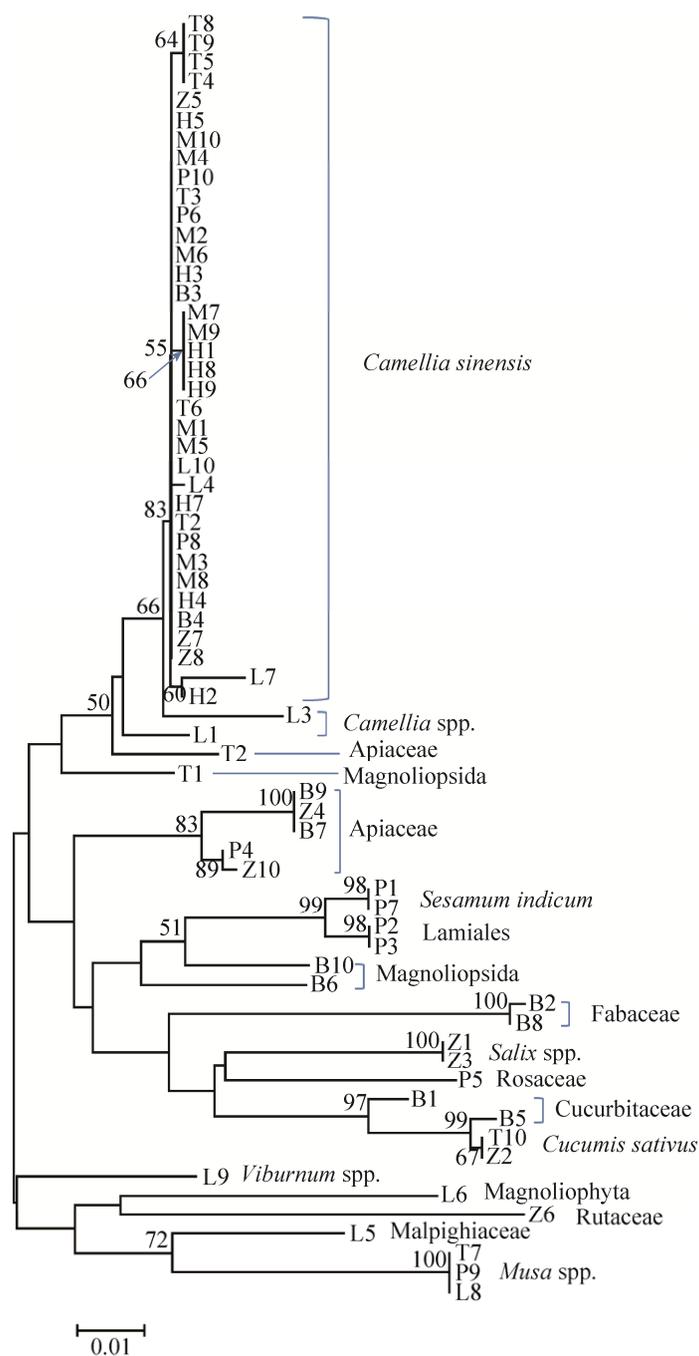


图 4 利用克隆检测到的 *rbcL* 序列构建的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree constructed using *rbcL* sequences generated from clone sequencing. Please note that when searching online reference databases, some *rbcL* sequences can only be identified to above-species level taxonomy.

特定的茶叶中检测到,如唇形目芝麻仅发现于普洱茶中,柳属植物仅发现于正山小种中;另一些植物成分可在不同的茶叶中同时检测到,如在正山小种和铁观音中都检测到黄瓜,在铁观音、普洱茶和太姥银针中都检测到某芭蕉属植物。

3 结论与讨论

对于茶叶中掺杂植物成分的检测,传统的方法是通过宏观和微观形态来识别其中的植物成分,然而有些茶叶经包装或粉碎后,很难辨认其中的植物成分。利用分子生物学方法进行检测,不受植物形态和加工过程的影响,可用于食物原材料的鉴定、溯源和掺伪检测等^[9-14],但在茶叶掺杂掺假检测方面的应用还比较少。本研究建立了基于植物 *rbcL* 基因序列定性检测茶叶中是否掺杂其他植物成分的方法。使用该方法时,直接观察 *rbcL* 的测序峰图,就可基本确定某茶叶样品是否掺杂;对 *rbcL* 扩增产物进行克隆测序和序列分析,可进一步确定掺杂的具体植物种类。理论上讲,另一个植物 DNA 条形码片段 *matK* 也应可用于本研究,但我们前期发现从茶叶样品中扩增 *matK* 的成功率不如 *rbcL* 高^[21],因此我们选用了 *rbcL* 进行研究。

利用所建立的方法对 7 份茶叶样品进行检测,发现正山小种、铁观音、太姥银针、六堡茶、宫廷普洱都不同程度地混杂有其他植物成分。从这 5 种茶叶中,共检测到近 20 种污染植物成分(图 4)。我们之前从部分普洱熟茶样品中检测到芭蕉属、松属 *Pinus* 和芸薹属 *Brassica* 的植物成分^[21]。本研究检测到了芭蕉属的植物,但没有检测到松属和芸薹属的植物。普洱茶和六堡茶作为后发酵茶,在加工过程中有“渥堆发酵”的过程^[22];渥堆发酵中用到的覆盖物和翻堆工具等都可能带进污染。其他茶叶中是如何掺杂进其他植物成分的,以及为什么要进行掺杂尚不清楚。尽管本研

究从茶叶中检测到多种植物成分,但其中并没有已知的明显产毒性物质的植物成分。

本研究的主要目的是建立检测茶叶中是否掺杂其他植物成分的方法,因此每一茶类只选取了 1-2 份代表性的茶叶样品。各类茶叶中掺杂植物成分的整体状况如何,有待今后通过对大量样品的检测分析才能知晓。可以预见,通过分析大量的茶叶样品后,还会从茶叶中检测出更多的植物成分。例如,本研究并没有检测到文献中所报道的杨树、小麦、玉米、大豆等植物成分^[3, 23]。

REFERENCES

- [1] Zhao HT. Development of tea categories and tea-drinking patterns in China. *Agric Archaeol*, 1991(2): 193-195 (in Chinese).
赵和涛. 我国茶类发展与饮茶方式演变. *农业考古*, 1991(2): 193-195.
- [2] Da Silva Pinto M. Tea: a new perspective on health benefits. *Food Res Int*, 2013, 53(2): 558-567.
- [3] Zhang LJ, Zhou HW. Investigation of food adulteration in some areas of Qinghai Province. *J Hygiene Res*, 1990, 19(4): 32-35 (in Chinese).
张立军, 周浩武. 青海省部分地区食品掺伪调查分析. *卫生研究*, 1990, 19(4): 32-35.
- [4] The State Bureau of Quality and Technical Supervision, Ministry of Health of the People's Republic of China. Notification on adulteration of melon seeds, Yuba, biscuits, tea and other food affecting people's health and safety at some regions. *Chin J Food Hygiene*, 2001, 13(2): 43-44 (in Chinese).
国家质量技术监督局, 中华人民共和国卫生部. 关于部分地区发现瓜子、腐竹、饼干、茶叶等食品掺杂使假影响群众健康安全有关情况的通报. *中国食品卫生杂志*, 2001, 13(2): 43-44.
- [5] Gao HS. Adulteration detection of tea samples. *Chin Native Produce*, 1996(3): 32-33 (in Chinese).
高海生. 茶叶掺假的鉴别检验. *中国土特产*, 1996(3): 32-33.
- [6] Lin RX. Rapid detection of starch in tea. *Tea Fujian*, 1992(1): 29 (in Chinese).
林瑞勋. 茶中掺淀粉的快速检验. *福建茶叶*,

- 1992(1): 29.
- [7] Anonymity. List of top 10 adulterated food from an EU survey. *China Stand Rev*, 2013(11): 13 (in Chinese).
佚名. 欧盟调查报告列出 10 大易掺假食品名单. 中国标准导报, 2013(11): 13.
- [8] Wang B, Zang GL. Quality and authenticity identification of tea. *Jiangsu Food Ferment*, 2002(2): 27–28 (in Chinese).
王兵, 臧光楼. 茶叶的品质鉴定和真假鉴别. 江苏食品与发酵, 2002(2): 27–28.
- [9] Galimberti A, de Mattia F, Losa A, et al. DNA barcoding as a new tool for food traceability. *Food Res Int*, 2013, 50(1): 55–63.
- [10] Bruni I, Galimberti A, Caridi L, et al. A DNA barcoding approach to identify plant species in multiflower honey. *Food Chem*, 2015, 170: 308–315.
- [11] Mishra P, Kumar A, Nagireddy A, et al. DNA barcoding: an efficient tool to overcome authentication challenges in the herbal market. *Plant Biotechnol J*, 2016, 14(1): 8–21.
- [12] Coutinho Moraes DF, Still DW, Lum MR, et al. DNA-based authentication of botanicals and plant-derived dietary supplements: where have we been and where are we going? *Planta Med*, 2015, 81(9): 687–695.
- [13] de Castro O, Comparone M, di Maio A, et al. What is in your cup of tea? DNA Verity Test to characterize black and green commercial teas. *PLoS ONE*, 2017, 12(5): e0178262.
- [14] Li M, Wong YL, Jiang LL, et al. Application of novel loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid authentication of the herbal tea ingredient *Hedyotis diffusa* Willd. *Food Chem* 2013, 141(3): 2522–2525.
- [15] CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(31): 12794–12797.
- [16] Zhang YJ, Zhang S, Liu XZ, et al. A simple method of genomic DNA extraction suitable for analysis of bulk fungal strains. *Lett Appl Microbiol*, 2010, 51(1): 114–118.
- [17] Levin RA, Wagner WL, Hoch PC, et al. Family-level relationships of Onagraceae based on chloroplast *rbcL* and *ndhF* data. *Am J Bot*, 2003, 90(1): 107–115.
- [18] Fay MF, Swensen SM, Chase MW. Taxonomic affinities of *Medusagyne oppositifolia* (Medusagynaceae). *Kew Bull*, 1997, 52(1): 111–120.
- [19] Kress WJ, Erickson DL, Jones FA, et al. Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(44): 18621–18626.
- [20] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*, 2013, 30(12): 2725–2729.
- [21] Zhang YJ, Skaar I, Sulyok M, et al. The microbiome and metabolites in fermented Pu-erh tea as revealed by high-throughput sequencing and quantitative multiplex metabolite analysis. *PLoS ONE*, 2016, 11(6): e0157847.
- [22] Yang XH, Lü BY, Mao QL, et al. Research progress of pile-fermentation of dark tea. *Guangdong Agric Sci*, 2014, 41(14): 95–99 (in Chinese).
杨新河, 吕帮玉, 毛清黎, 等. 黑茶渥堆研究进展. 广东农业科学, 2014, 41(14): 95–99.
- [23] Yu SQ, Zhang JH, Cui JX, et al. Rapid detection of soybean mixture in tea by loop-mediated isothermal amplification method. *Acta Agric Zhejiangensis*, 2015, 27(8): 1479–1483 (in Chinese).
余澍琼, 张吉红, 崔俊霞, 等. 利用环介导等温扩增技术检测茶叶中掺杂的大豆成分. 浙江农业学报, 2015, 27(8): 1479–1483.

(本文责编 陈宏宇)