DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20251205007
引用格式: 吴倩, 杨金田, 张建, 等. 单链 DNA 结合蛋白辅助增强型变性泡介导链交换扩增法快速鉴定蜂蜜花源成分[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(10): 130–139.
WU Q, YANG JT, ZHANG J, *et al*. Rapid identification of floral origin in honey by single strand DNA-binding protein -enhanced denaturation bubble-mediated strand exchange amplification [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(10): 130–139. (in Chinese with English abstract).

单链 DNA 结合蛋白辅助增强型变性泡介导链交换扩增法快速鉴定蜂蜜花源成分

吴 倩[1,2], 杨金田[2], 张 建[3], 孙凤霞[3], 曾德新[4], 陈 伟[2*], 余晓峰[4*]

(1. 蚌埠学院食品科学与工程学院, 蚌埠 233000; 2. 合肥工业大学食品科学与工程学院, 合肥 230000; 3. 石河子大学食品学院, 石河子 832003; 4. 合肥海关技术中心, 合肥 230000)

摘 要: 目的 建立一种基于蜂蜜花粉基因检测的等温扩增方法, 结合时间分辨荧光微球试纸条(time-resolved fluorescent microspheres lateral flow strip, TR-LFS), 实现对蜂蜜花源真实性的快速鉴别。**方法** 通过构建蜂蜜中花粉 DNA 快速提取方法, 在 20 min 内获得有效的洋槐成熟酶 K (maturase K, *matK*)目标基因模板。采用变性泡介导的链交换扩增(denaturation bubble-mediated strand exchange amplification, SEA), 在约 65 ℃恒温条件下实现目标序列的指数扩增。为提高扩增效率, 加入单链结合蛋白(single strand DNA-binding protein, SSB)以抑制单链非特异性退火, 显著提高了引物杂交效率与扩增特异性。当蜂蜜中存在目标花粉 DNA 时, SEA 生成两端标记的双链产物, 该产物通过 TR-LFS 实现可视化荧光检测。**结果** 利用 TR-LFS 的荧光信号强度, 可直观判定蜂蜜花源的真实性。以洋槐蜂蜜为例, 本方法对目标物含量的肉眼检测灵敏度可达 1% (*V*:*V*)且与同其他花源蜂蜜无交叉反应。**结论** 本研究建立的检测方法通过引入 SSB 显著提升了 SEA 技术的扩增效率, 结合 TR-LFS 高灵敏与稳定的荧光输出特性, 无需复杂热循环设备, 适用于现场快速检测, 为蜂蜜花源的真实性鉴别提供了可靠的技术支持。

关键词: 蜂蜜真实性; 分子扩增; 单链结合蛋白; 试纸条; 现场快速检测

Rapid identification of floral origin in honey by single strand DNA-binding protein-enhanced denaturation bubble-mediated strand exchange amplification

WU Qian[1,2], YANG Jin-Tian[2], ZHANG Jian[3], SUN Feng-Xia[3], ZENG De-Xin[4], CHEN Wei[2*], YU Xiao-Feng[4*]

收稿日期: 2025-12-05
基金项目: 八师石河子市重点领域科技攻关项目(2023GY02); 高层次人才引进经费项目(2025GQD015)
第一作者: 吴倩(1994—), 女, 博士, 主要研究方向为食品安全快速检测。E-mail: 2939763006@qq.com
***通信作者:** 陈伟(1982—), 男, 教授, 主要研究方向为食品安全快速检测。E-mail: chenweishnu@163.com
余晓峰(1967—), 男, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: amyxf@126.com

(1. *College of Food and Bioengineering*, *Bengbu University*, *Bengbu* 233000, *China*; 2. *School of Food Science & Biological Engineering*, *Hefei University of Technology*, *Hefei* 230000, *China*; 3. *School of Food Science & Technology*, *Shihezi University*, *Shihezi* 832003, *China*; 4. *Technical Center of Hefei Custom*, *Hefei* 230000, *China*)

ABSTRACT: Objective　To establish a rapid identification method for the authenticity of honey botanical origin, based on an isothermal amplification approach for honey pollen gene detection, combined with a time-resolved fluorescent microsphere lateral flow strip (TR-LFS). **Methods**　A rapid DNA extraction method for honey pollen was constructed to obtain the effective maturase K (*matK*) target gene template of *Robinia pseudoacacia* within 20 min. Denaturation bubble-mediated strand exchange amplification (SEA) was employed to achieve exponential amplification of the target sequence under a constant temperature of approximately 65 °C. To enhance amplification efficiency, single strand DNA-binding protein (SSB) was added to inhibit non-specific annealing of single strands, significantly improving primer hybridization efficiency and amplification specificity. When target pollen DNA was present in the honey, the SEA amplification generated double-stranded products labeled at both ends, which were subsequently detected visually via the TR-LFS based on fluorescence. **Results**　The fluorescence signal intensity of the TR-LFS allowed for visual determination of honey botanical origin authenticity. Using *Robinia pseudoacacia* honey as a model, the naked-eye detection sensitivity of this method for the target content reached 1% (*V:V*), and no cross-reaction was observed with other botanical honey sources. **Conclusion**　The detection method established in this study significantly enhances the amplification efficiency of SEA technology through the introduction of SSB. Combined with the high sensitivity and stable fluorescence output characteristics of TR-LFS, and eliminating the need for complex thermal cycling equipment, this method is suitable for on-site rapid detection, providing reliable technical support for authenticating honey floral sources.

KEY WORDS: honey authenticity; molecular amplification; single strand DNA-binding protein; lateral flow strip; *on-site* rapid detection

0　引　言

蜂蜜作为一种深受消费者青睐的天然营养食品, 其花源真实性直接决定其品质特征、风味属性及市场价值[1–2]。以洋槐蜜为代表的单花蜜由于具备独特风味和特殊功效而备受推崇, 市场价格较高, 但也因此成为掺假仿冒的重灾区, 严重损害消费者权益与市场秩序[3–4]。因此, 建立准确、高效的蜂蜜花源鉴别方法对保障食品质量安全与市场诚信具有重要意义。

传统蜂蜜的鉴别方法, 如感官评价、理化指标分析及花粉形态鉴定等[5–10], 在准确性、重现性和操作效率方面存在一定局限性。蜂蜜中所含的花粉颗粒携带植物来源的 DNA 信息, 因其在加工与储存过程中仍能保持较高稳定性, 为分子检测提供良好途径[11–12]。目前, 已有研究利用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)及 DNA 条形码技术对蜂蜜中植物源成分进行分析检测[13–17]。这类方法不仅能判定蜂蜜的植物来源, 还可用于鉴别其是否掺假或掺杂其他来源的蜂蜜。然而, 常规 PCR 技术严重依赖热循环仪, 流程烦琐且耗时较长, 难以满足现场快速检测需求[18]。

近年来, 等温扩增技术因其恒温、快速的特点, 为开发简便、高效的分子检测手段提供了新路径[19–20]。其中, 变性泡介导的链交换扩增(denaturation bubble-mediated strand exchange amplification, SEA)技术利用 DNA 在约 65 ℃条件下可以形成局部变性泡, 在聚合酶的作用下实现目标序列的指数扩增[21–24]。然而, 该技术在实际应用中易受单链 DNA 非特异性折叠或退火等因素的干扰, 导致扩增效率下降, 限制了其在复杂样本中的稳定性和高效性。为攻克此瓶颈, 本研究引入单链结合蛋白(single strand DNA-binding protein, SSB), 利用其高度特异性结合单链 DNA 的能力[25–26], 以稳定扩增中间体, 防止非特异性结构形成, 从而显著提升 SEA 反应的扩增效率与稳定性。

侧向层析试纸条(lateral flow strip, LFS)作为一种成熟的商业化快速检测工具, 已在食品安全、临床诊断及疫情防控等多个领域广泛应用[27]。然而, 传统胶体金 LFS 在定量分析中存在灵敏度低、难以准确定量以及抗基质干扰能力较弱等局限性[28–29]。时间分辨荧光微球试纸条(time-resolved fluorescent microspheres lateral flow strip, TR-LFS) 的引入为解决上述问题提供了新的途径。与传统荧光微球相比, 时间分辨荧光微球(time-resolved fluorescent microspheres lateral flow strip, TRFM)具有更长的荧光信号寿命, 通常为 10~2000 μs, 约为传统荧光微球的 10^3 倍, 通过延迟检测窗口可有效规避短寿命背景荧光

的干扰, 从而显著提高信噪比[30]。此外, 其聚苯乙烯网状结构能够高效包裹大量镧系螯合物, 不仅保护荧光中心免受环境淬灭, 还可以进一步提升了标记物的稳定性[31]。基于这些特性, TR-LFS 在检测灵敏度、定量能力与抗干扰性能方面均显著优于传统胶体金 LFS, 在复杂基质样本的高精度快速检测中展现出广阔的应用前景。

基于此, 本研究创新性地将经 SSB 增强的 SEA 技术(SSEA)与 TR-LFS 相结合, 构建了 SSEA-TR-LFS 检测方法。该方法旨在实现蜂蜜中特定花粉 DNA 的超灵敏、快速检测, 为蜂蜜花源的真实性鉴定提供可靠、实用的技术解决方案。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

所有蜂蜜样品均由合肥海关技术中心提供并确认。

1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐[1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride, EDC]、N-羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, NHS)、乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium Bromide, CTAB)耐热单链结合蛋白、双蒸水(double-distilled water, ddH_2O)、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl)酪蛋白(Casein)、酪蛋白钠(Casein-Na)、牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)、4S Red plus 核酸染料(1000×)、10× 磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)、1 mol/L Tris-HCl、1×三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸缓冲液[1×Tris(hydroxymethyl) aminomethane-ethylenediaminetetraacetic acid buffer, TE]、蛋白酶 K(质量浓度 20 mg/mL)、快速实时荧光定量 PCR 预混液(TaqMan Fast qPCR Master Mix)、链酶亲和素(streptavidin, SAV)、Bst 2.0 DNA 聚合酶(1600 U)、琼脂糖、6×Loading buffer(上海生工生物工程有限公司); 异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)抗体(杭州傲敏科技有限公司); 时间分辨荧光微球、羧基化磁性纳米颗粒(carboxylated magnetic nanoparticles, MNPs)(长沙美牛生物科技有限公司); 聚乙二醇 20000 (polyethylene glycol 20000, PEG 20000)、氯化钠(NaCl)、无水乙醇、表面活性剂(surfactant S9, S9)、硼砂($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$)、硼酸(H_3BO_3)、Tween-20、TritonX-100、氯化镁($MgCl_2$)(国药集团化学试剂有限公司); LFS 的所有组件(包括塑料底板、样品垫、结合垫、硝化纤维素膜 CN 95、吸收垫, 上海捷宁生物技术有限公司)。

叶绿体 DNA 在花粉中具有高度稳定性, 不易降解, 这为从蜂蜜中提取和扩增该 DNA 提供了可靠的模板。成熟酶 K (maturase K, *matK*)是植物 DNA 条形码的核心基因之一, 其序列在物种间呈现较高的变异度, 适用于区分近缘植物物种; 而在物种内部则相对保守。本研究针对洋槐叶绿体 *matK* 基因, 基因序号为 OR464933.1 设计特异的引物对, 并由通用生物合成和修饰, 具体序列见表 1。

1.2 仪器与设备

JA3003 分析天平(精度 0.01 mg, 上海力辰仪器科技有限公司); MIX-Multi 迷你涡旋混合仪(杭州瑞诚仪器有限公司); IKA MS3 漩涡混合器(德国 IKA 公司); M1416R 高速低温离心机(浙江新春兰科技有限公司); A200 便携式 PCR 仪(杭州傲敏生物科技有限公司); XYZ3050 定量喷膜仪、ZQ4200 数控感应斩切机(杭州峰航科技有限公司); WL02B 紫外灯(让奇上海科技有限公司); KQ5200 超声波仪(上海易鑫科技有限公司); SIN-pH 8.0 pH 计(杭州联测自动化技术有限公司); DYCP-31DN/CN(电泳仪北京六一仪器厂); ZF-258 凝胶成像分析仪(上海金鹏分析仪器有限公司); Roche480 qPCR 仪(南充实维仪器有限公司)。

表 1 本研究所用引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

名称	序列(5'-3')	长度/nt
引物对 1(Primer 1)	FITC-GGGCTCAACCAGGAACGATC	20
	Biotin-ACCACTGAACGATTTAGTCGCACATTTA	28
引物对 2(Primer 2)	FITC-CCTATTATCCGAACATTCATTTCACTTT	28
	Biotin-TGACTACGTACCACTGAACGATTTAGTC	28
引物对 3(Primer 3)	FITC-CCTATTATCCGAACATTCATTTCACTTT	28
	Biotin-TTTGACTACGTACCACTGAACGATTTAG	28
引物对 4(Primer 4)	FITC-AACCTATTATCCGAACATTCATTTCACTTT	30
	Biotin-GTACCACTGAACGATTTAGTCGCACATTTA	30
引物对 5(Primer 5)	FITC-AACCTATTATCCGAACATTCATTTCACTTT	30
	Biotin-CTACGTACCACTGAACGATTTAGTCGCACA	30
qPCR-上游引物	GCTCAACCAGGAACGATC	18
qPCR-下游引物	GCAGCATTTGACTACGTACCA	21
Taqman 探针	FAM-CATAAACCTATTATCCGAACATTCATTTCA-BHQ	30

注: 定量聚合酶链反应(quantitative polymerase chain reaction, qPCR)。

1.3　实验方法

1.3.1　蜂蜜花粉 DNA 的提取

所有蜂蜜样品均由合肥海关技术中心提供并鉴定。为评估方法实用性, 选取洋槐蜂蜜、油菜蜂蜜、榛子蜂蜜、荆条蜂蜜、枣花蜂蜜及其混合物进行分析。取 500 μL 蜂蜜样品, 加入 30 μL 蛋白酶 K (20 mg/mL)与 700 μL 细胞裂解缓冲液[10 mmol/L Tris-HCl, 200 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 1%十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS), pH 8.0], 混匀后超声处理(5 min), 再于 4 ℃、13000 r/min 离心 8 min。取上清, 加入 10 μg MNPs 及 350 μL 包被缓冲液(2 mol/L NaCl, 30% PEG 20000), 室温反应 4 min, 经磁性分离收集结合花粉 DNA 的 MNPs, 并用 70%乙醇洗涤两次以去除杂质。最后, 将 MNPs 重悬于 25 μL TE 溶液(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0), 65 ℃金属浴加热 4 min, 使 DNA 从 MNPs 解离并溶于 TE 溶液中。

1.3.2　TRFM 与抗体偶联的制备

将 0.1% TRFM 超声分散 5 min 后, 取 5 μL TRFM 加入 1 mL 0.02 mol/L 硼酸-硼砂缓冲液(pH 8.2), 并依次加入 20 μL EDC (10 mg/mL)与 20 μL NHS (10 mg/mL), 涡旋混合后超声 20 s, 于 3D 涡旋仪中活化羧基 30 min。随后经 13000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 以相同缓冲液复溶并超声分散, 再加入 10 μL FITC 抗体(1 mg/mL), 反应 60 min 以实现抗体氨基与 TRFM 羧基的偶联。之后加入 100 μL 10% BSA 或 HSA 封闭剩余活性位点(反应 60 min), 经 13000 r/min 离心 15 min 后弃上清, 以 100 μL 重悬液复溶并超声分散 6 s。最终将偶联物按 4 μL/垫滴加至结合垫, 烘干后用于 LFS 组装。

1.3.3　TR-LFS 的构建

为实现蜂蜜花粉来源的快速分析, 本研究构建了 TR-LFS 检测系统。具体构建方法如下: 样品垫(20 mm×300 mm, 硝酸纤维素膜)经样品垫处理液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.2, 含 0.15 mmol/L NaCl、0.25% Triton X-100 及 1% S9)浸泡 2 h 后烘干; 结合垫(6 mm×300 mm, 硝酸纤维素膜)经处理液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 含 2.5%蔗糖、2.5%海藻糖及 0.3% Tween-20)浸泡 2 h, 烘干后切为 6 mm×3 mm, 滴加 TRFM-抗体偶联物并于 27℃干燥; NC 膜上以 0.5 μL/cm 速度分别喷涂 1 mg/mL SAV (T 线)与羊抗鼠二抗(C 线), 32 ℃烘干 3 h 后避光保存。最后, 将吸水垫、NC 膜、结合垫与样品垫依次叠放于黑色聚氯乙烯(poly vinyl chloride, PVC)底板上, 各组件重叠 2 mm, 切成 3 mm 宽试条后密封室温保存。

1.3.4　SSEA 扩增及 TR-LFS 分析。

为实现蜂蜜中洋槐花粉 DNA 的快速检测, 采用 SSEA 结合 TRFM-LFS 进行分析检测。SSEA 反应体系为 25 μL, 含 2.5 μL 10×Bst DNA 聚合酶缓冲液[200 mmol/L Tris-HCl, pH 8.8, 100 mmol/L KCl, 100 mmol/L $(NH_4)_2SO_4$, 20 mmol/L $MgSO_4$, 1% Triton X-100)、1 μL Bst 2.0 DNA 聚合酶、1 μL SSB (1 μg/μL]、1 μL $MgSO_4$ (25 mmol/L)、1 μL 甜菜碱(5 mmol/L)、1 μL PEG 200 (10%)、0.8 mmol/L dNTP、0.5 μL (10 μmol/L)上下游引物及 2 μL DNA 模板, 补水至 25 μL。扩增程序为 63 ℃反应 30 min。取 4 μL 扩增产物滴加于 TR-LFS 样品垫, 加入 50 μL 加载缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L KCl, 5 mmol/L $MgCl_2$, 2×SSC, 0.5% PEG 20000, 1% BSA, 1% CTAB, 1% Tween-20, pH 7.4)促进免疫侧向层析。反应 5 min 后于紫外灯下观察: 若 C 线与 T 线均显色, 表明样品中含洋槐花粉 DNA; 仅 C 线显色则表明样品中不含洋槐花粉 DNA。

1.3.5　qPCR 扩增

(1) qPCR 扩增体系(总体系 25 μL)

包括 12.5 μL 2×TaqMan Fast qPCR Master Mix, 0.5 μL 上游引物(10 μmol/L), 0.5 μL 下游引物(10 μmol/L), 0.5 μL 探针(5 μmol/L), 2.5 μL DNA 模板和 8.5 μL ddH_2O。

(2) qPCR 扩增程序

在 95 ℃下变性 10 min, 然后进行 40 个循环, 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 1 min。

1.3.6　可行性验证

按照 1.3.1 蜂蜜样品 DNA 的提取方法提取洋槐蜂蜜和枣花蜂蜜的样品 DNA 模板分别当作实验的阳性模板和阴性模板, 并进行 SSEA 扩增和普通 SEA 扩增。

将 SSEA 扩增产物和普通 SEA 扩增产物进行 TR-LFS 分析对比。

1.3.7　SSEA-TR-LFS 最佳反应条件优化

为实现蜂蜜花源的快速鉴定, 本研究以枣花蜂蜜 DNA 作为阴性对照, 洋槐蜂蜜 DNA 作为阳性对照, 系统优化了 SSEA 与 TR-LFS 的关键参数。具体优化过程如下:

扩增引物对优化: 分别采用 5 组不同引物(Primer 1~5)进行 SSEA 扩增, 通过 TR-LFS 中 C 线与 T 线的荧光信号强度筛选最佳引物对;

引物浓度优化: 在 0.2~2.2 μmol/L 范围内设置 5 个梯度, 考察不同引物浓度对扩增效果的影响;

反应温度优化: 设定 60、61、62、63 和 64 ℃ 5 个温度进行扩增;

PEG 分子量优化: 比较不添加 PEG 及添加 PEG 200、600、6000 和 20000 等不同分子量 PEG 对扩增效率的影响;

PEG 200 浓度优化: 设置 0%、2%、4%、6%和 8% 5 个浓度梯度, 选择最佳添加浓度;

扩增时间优化: 分别进行 15、30、40、50 和 60 min 扩增, 评估时间对产物积累的影响;

产物上样量优化: 取 0.5、1.0、3.0、5.0 和 7.0 μL 扩增产物进行 TR-LFS 检测, 确定最佳上样体积;

偶联抗体浓度优化: 采用 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0 μL FITC 抗体(1 mg/mL)与 TRFM 偶联, 筛选获得最佳信号强

度的抗体用量。

所有优化实验均以 TR-LFS 上 C 线与 T 线的荧光信号强度作为评价指标, 以确定各参数最优条件。

1.3.8 SSEA-TR-LFS 灵敏度的检测与标准曲线的建立

采用 SSEA-TR-LFS 技术对蜂蜜花源真实性进行可视化快速鉴别。通过在紫外灯下直接观察 NC 膜上 C 线与 T 线的荧光信号强度, 可对蜂蜜花源作出初步定性判断; 并使用 ImageJ 1.54 f 软件分析图片的结果, 对 TR-LFS T 线荧光信号强度进行定量。具体步骤如下:

样品制备: 将洋槐蜂蜜按 0%、0.5%、1.0%、5.0%、10.0%、20.0%和 30.0%的体积比例与枣花蜂蜜混合, 充分振荡混匀, 作为梯度检测样本;

DNA 提取与扩增: 按 1.3.1 方法提取花粉 DNA, 依照 1.3.4 条件进行 SSEA 扩增;

TR-LFS 检测: 取 5 μL 扩增产物滴加于 TR-LFS 样品垫, 再加入 50 μL 加载缓冲液推动侧向层析, 5 min 后于紫外灯下观察 C 线与 T 线荧光, 判断蜂蜜花源;

信号采集与定量: 使用相机拍摄 TR-LFS 结果, 通过 ImageJ 软件分析 T 线荧光强度;

标准曲线建立: 采用 Origin 2020 软件, 以洋槐蜂蜜含量为横坐标(X, %)、T 线荧光强度为纵坐标(Y), 绘制定量标准曲线。

1.3.9 SSEA-TR-LFS 的特异性验证

参照 1.3.1 方法, 分别提取洋槐蜜、枣花蜜、荆条蜜、榛子蜜、油菜蜜及其混合蜂蜜(洋槐蜜占比 20%)的花粉 DNA; 随后按照 1.3.4 节方法对所得 DNA 进行 SSEA 扩增; 最后采用 TR-LFS 对扩增产物进行分析, 并拍照记录其最终结果。

1.3.10 SSEA-TR-LFS 的重复性验证

参照 1.3.1 方法, 提取洋槐蜂蜜含量为 0%、10%和 30%样品的 DNA 作为模板进行 SSEA 扩增; 每个浓度设 10 次独立重复, 扩增产物分别进行 TR-LFS 检测并采集图像; 采用 ImageJ 软件分析图像, 获取 T 线荧光强度值, 并通过计算各浓度下的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD), 评估方法的重复性。

1.3.11 SSEA-TR-LFS 的稳定性结果的验证

按照 1.3.1 步骤中提取含有 0%、10%以及 30%的洋槐蜂蜜的 DNA 作为 SSEA 扩增模板进行扩增;

制备条件一致的 TR-LFS 后, 将其分别再室温的条件下保存 0、10、15、20、30 d;

将已经放置不同天数的 TR-LFS 分析测试上述浓度的 DNA 扩增后的产物, 再用相机拍照记录其最终结果;

将得到的图片结果用 ImageJ 1.54 f 软件分析扫描, 得到 T 线具体的信号强度值。

1.3.12 SSEA-TR-LFS 的实际样品验证

从当地超市购入 28 种标示为洋槐蜂蜜的商品样品, 采用 SSEA-TR-LFS 方法对其花源真实性进行验证。具体步骤如下: 首先提取样品中花源性 DNA 并进行 SSEA 扩增; 扩增产物经 TR-LFS 检测, 反应 5 min 后采集 T 线荧光信号图像; 采用 ImageJ 1.54 f 软件定量分析 T 线荧光强度; 最后以 qPCR 方法检测同一批 DNA 模板, 以验证 SSEA-TR-LFS 检测结果的准确性。

1.4 数据处理

本研究每组实验重复 3 次, 使用 ImageJ 1.54 f 软件试纸条荧光图像进行定量分析: 先将图像转换为 8-bit 灰度图, 在 T 线位置固定大小的矩形区域内测量平均灰度值, 并扣除邻近背景区域的灰度值, 所得结果即为经背景校正的 T 线信号强度。本研究直接采用该信号强度进行分析, 未使用 C 线信号进行标准化, 因为 C 线作为质控线主要用于验证层析过程是否完成, 其在有效试纸条间的信号较为稳定, 不宜作为定量归一化依据。最终数据绘图与处理在 Origin 2020 软件中完成。

2 结果与分析

2.1 SSEA-TR-LFS 的实验原理

尽管 DNA 双链整体结构因碱基互补配对而保持稳定, 但单个碱基对之间的作用力较弱, 使得双链可在局部发生瞬时解旋, 形成单链区域, 即“DNA 呼吸”现象。在约 65 ℃的条件下, 此类动态行为可进一步促使局部区域形成变性泡。DNA 双链形成变性泡的速率受 GC 含量和温度的共同调控。与依赖温度循环实现变性与延伸的传统 PCR 技术相比, 常规 SEA 扩增在效率与稳定性方面存在一定局限。为此, 本研究开发了一种新型等温核酸扩增技术——SSEA, 该技术利用单链结合蛋白在恒定温度下促进 DNA 双链局部解离, 从而实现 SSEA 高效扩增。

如图 1 所示, SSEA 反应基于 DNA 在恒定温度下自发形成变性泡的能力。SSB 可特异性结合变性泡区域所产生的单链结构, 阻止其复性或降解, 进而促进 Bst DNA 聚合酶结合并启动链合成, 在低于 DNA 熔解温度的条件下完成扩增, 无需依赖热变性步骤。在扩增过程中, 上下游引物持续扩增合成, 生成大量带有 FITC 与生物素双标记的双链 DNA 产物。扩增结束后, 采用 TR-LFS 对扩增产物进行分析: 双标记双链 DNA (double-stranded DNA, dsDNA)的 FITC 端与 TRFM 标记的 FITC 抗体结合, 随后在检测线处由 SAV 捕获其生物素标记端, C 线则结合过量的抗体偶联物作为质控。在紫外灯照射下, 可肉眼观察到 C 线与 T 线的红色荧光信号强度。若样品中不存在目标花粉 DNA, SSEA 不产生双标记产物, 此时仅 C 线显色, T 线无信号。该方法无需热循环设备, 即可实现对蜂蜜花源成分的准确鉴别。

2.2　SSEA 方法可行性验证结果及分析

为验证 SSEA 检测方法的可行性，首先对分别标记 FITC 与生物素的上、下游引物的扩增能力进行测试。如图 2 所示，阴性对照组(泳道 1)未观察到扩增条带，而阳性对照组(泳道 2)可见清晰的目标条带，表明该引物对适用于 SEA 扩增体系。进一步在反应体系中添加不同质量浓度的 SSB 蛋白，结果显示，当体系中 SSB 质量浓度为 0.02 mg/mL 时，SSEA 反应效率已明显提升；在 0.04 mg/mL 时反应效率达到最高；继续增加 SSB 质量浓度则反应效率下降，推测可能是由于过量的 SSB 蛋白占据了过多的单链 DNA 区域，从而阻碍了引物与模板的有效结合。此外，引入 SSB 蛋白后，阴性对照与阳性对照间的信号强度差异显著增大，进一步说明 SSB 蛋白能够有效增强 SSEA 的反应效率，证明了该方法的可行性。

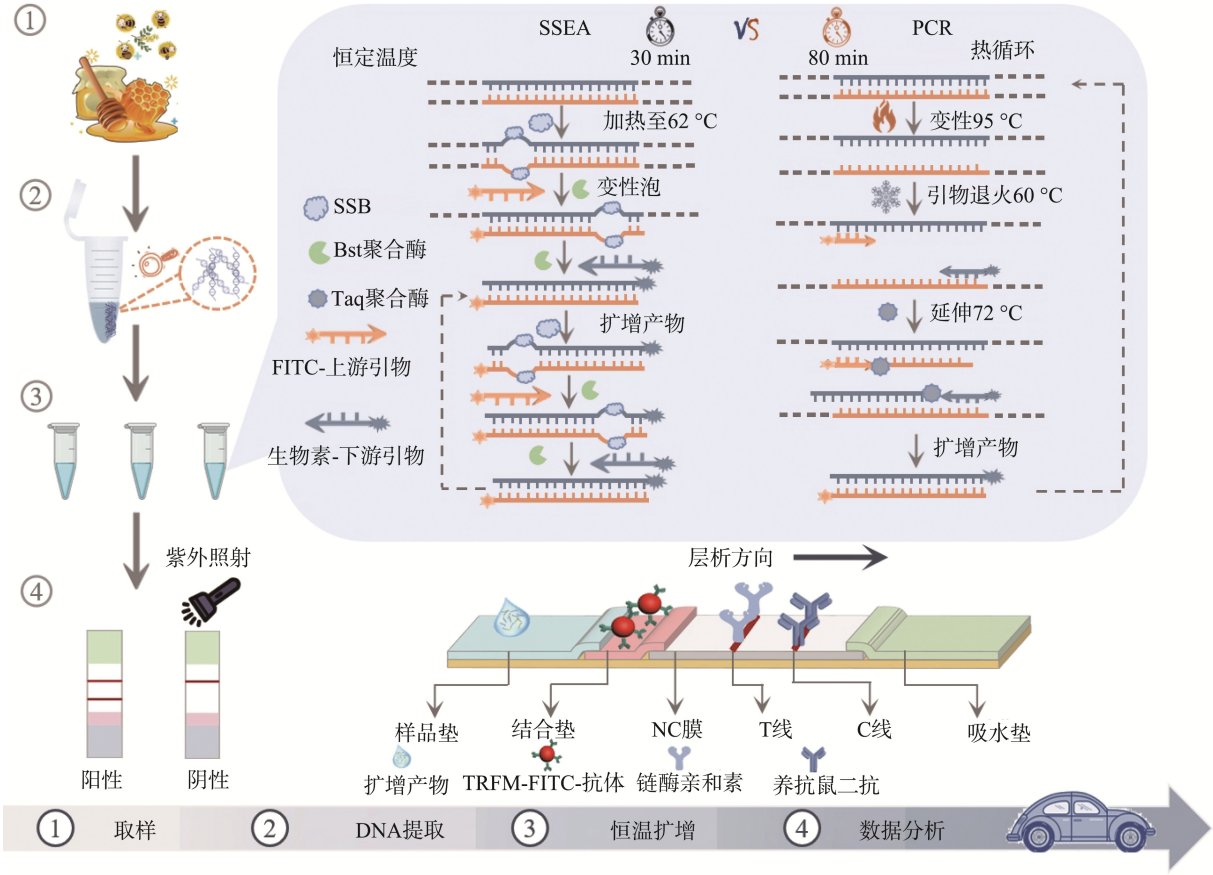
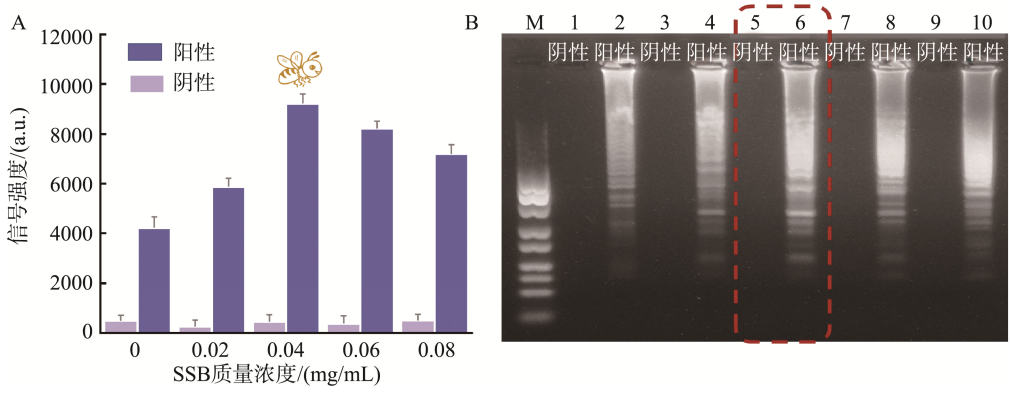


图 1　SSEA-TR-LFS 原理示意图

Fig.1　Schematic diagram of the SSEA-TR-LFS



注：M 为 marker。

图 2　SSEA 中 SSB 蛋白浓度的影响(n=3)

Fig.2　Effects of SSB protein concentration in SSEA (n=3)

2.3 SSEA-TR-LFS 的最佳反应条件优化结果及分析

为系统优化 SSEA-TR-LFS 检测体系的性能，本研究对引物序列、引物浓度、扩增温度、PEG 种类与浓度、扩增时间、产物上样量及抗体偶联量等关键条件进行了系统筛选与优化。首先，基于洋槐特异性基因设计 5 对引物，经 SSEA 扩增比较，发现 Primer 4 扩增效率最高，且阴阳性信号差值最大，故选定其用于后续实验(图 3A)。进一步对引物浓度进行优化，结果显示在 1.2 μmol/L 条件下信号差值最大(图 3B)。扩增温度优化实验表明，在 63 ℃时阴阳性信号差异最为显著(图 3C)，因此后续 SSEA 反应均采用该温度。在 PEG 种类筛选中，PEG 200 表现出最佳的扩增促进效果(图 3D)；进一步对其浓度进行优化，发现添加 2% PEG 200 可显著提升反应效率(图 3E)。扩增时间优化结果显示，50 min 可在保持较高信号强度的同时兼顾检测效率(图 3F)。最后，对扩增产物上样量与 FITC 抗体偶联量进行优化，确定 5.0 μL 扩增产物与 4.0 μL FITC 抗体(1 mg/mL)为最优条件(图 3G, H)。通过上述多参数系统优化，最终确立了 SSEA-TR-LFS 检测的最佳反应体系。

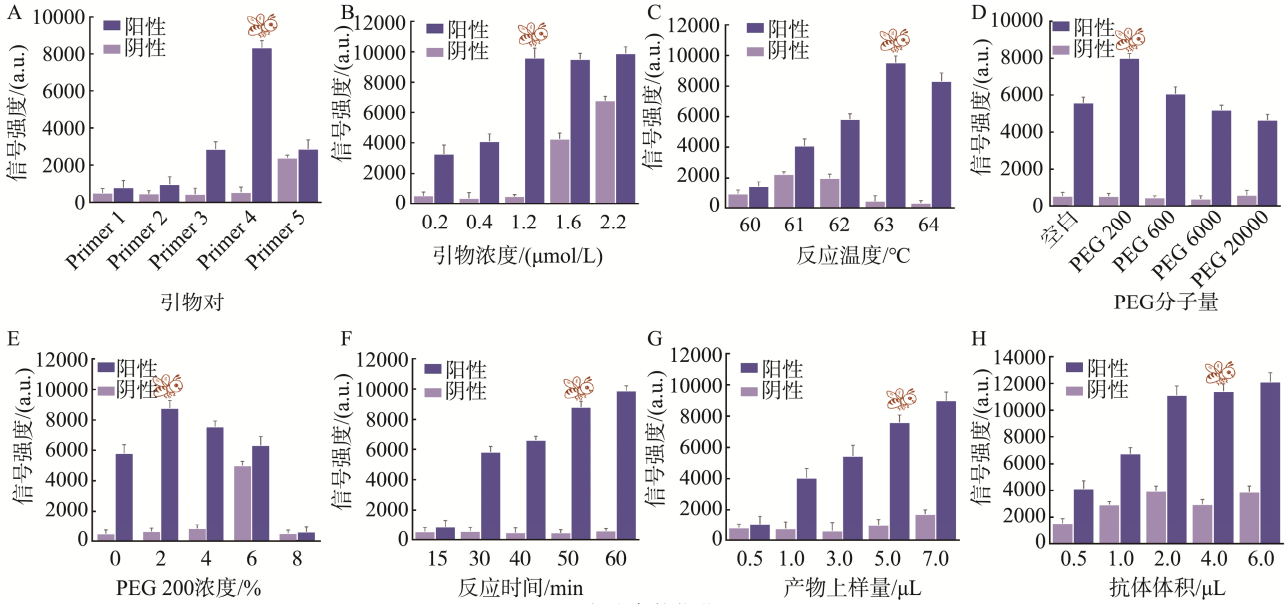


图 3 实验参数优化(n=3)

Fig.3 Optimization of experimental parameters (n=3)

2.4 SSEA-TR-LFS 灵敏度的检测与标准曲线结果及分析

在最优条件下，采用梯度稀释的洋槐蜂蜜样品(0、0.5%、1.0%、5.0%、10.0%、20.0%、30.0%, V:V)评估所构建 SSEA-TR-LFS 方法的灵敏度。随着样品中洋槐蜂蜜比例的增加，引物与模板结合更高效，产生的双标记扩增子增多，从而增强了 TR-LFS T 线处的荧光信号。如图 4 所示，随着洋槐蜂蜜比例自 0%增至 1.0%, TR-LFS 试纸条 T 线处可见明显荧光信号，表明方法对目标成分具有较高检测灵敏度。进一步增加洋槐蜂蜜比例至 30.0%使得 TR-LFS T 线上的信号强度逐渐增强。利用相机采集 TR-LFS 检测结果，并通过 ImageJ 1.54 f 软件进行信号定量分析。在洋槐蜂蜜比例为 0%~30.0%范围内, T 线荧光强度与洋槐蜂蜜比例呈现良好线性关系，回归方程为 Y=186.3682X+1259.2262，决定系数 r^2=0.9623，其中检出限(limit of detection, LOD)≈3.3×σ/k，(σ为背景信号强度值的标准偏差，k 为标准曲线的斜率)。计算得出 LOD≈0.32% (V:V)。这种良好的线性响应进一步验证了该方法对样品中洋槐蜂蜜百分比进行半定量分析的可靠性。

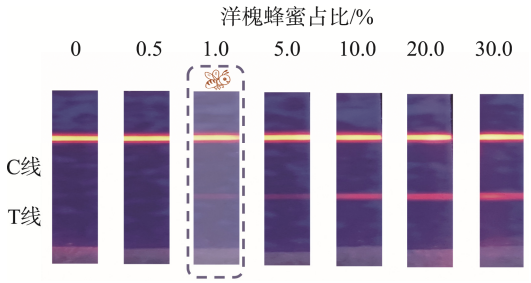


图 4 SSEA-TR-LFS 平台对不同洋槐蜂蜜比例的灵敏度验证结果

Fig.4 Sensitivity validation results of the SSEA-TR-LFS platform with different *Robinia* honey ratios

2.5 SSEA-TR-LFS 的特异性验证结果及分析

为验证 SSEA-TR-LFS 方法的特异性，本研究选取油菜花蜂蜜、荆条蜂蜜、枣花蜂蜜和榛子蜂蜜作为非目标对照样品，与目标洋槐蜂蜜同步进行前处理、扩增及 TR-LFS 检测。结果如图 5 所示，所有非目标蜂蜜样品在 TR-LFS 上仅 C 线出现荧光信号，T 线未见可见信号；而洋槐蜂蜜样品在 C 线与 T 线均显示清晰荧光信号。为验证复杂基质中

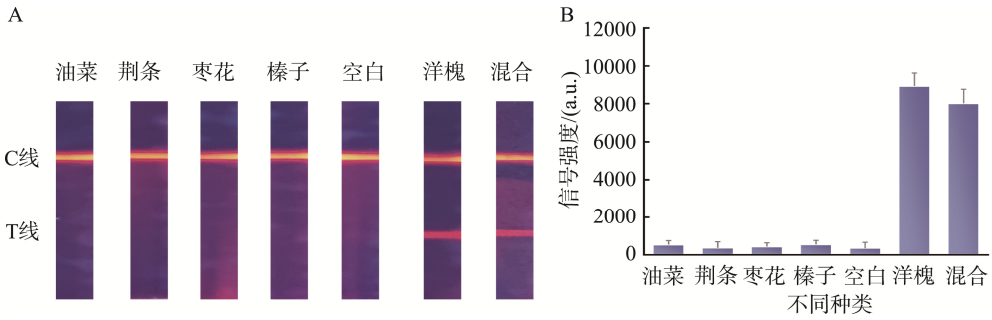


图 5　SSEA-TR-LFS 的特异性验证结果

Fig.5　Specific verification results of SSEA-TR-LFS

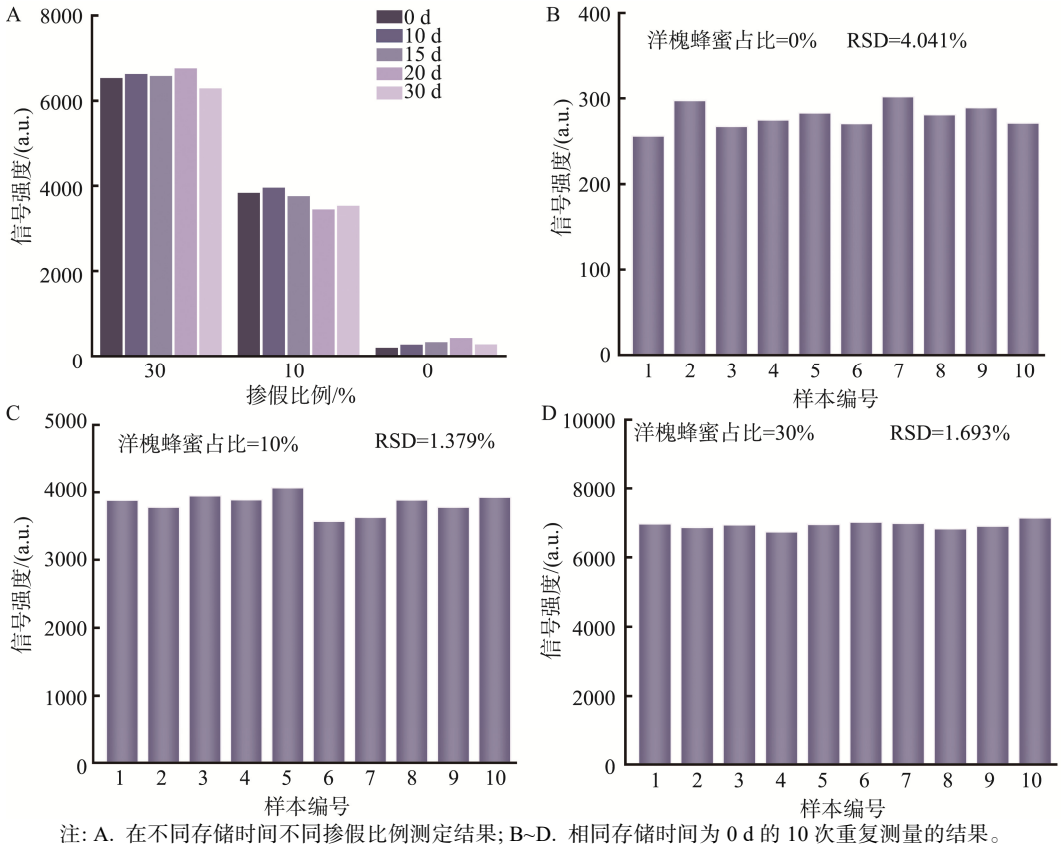
的检测特异性, 将洋槐蜂蜜与油菜花蜜、荆条蜂蜜、枣花蜂蜜和榛子蜂蜜按等体积(各 10 mL)混合后进行分析。结果显示, 混合样品在 C 线和 T 线均呈现清晰的荧光信号, 证明非目标成分未引起明显干扰。以上结果证明, SSEA-TR-LFS 方法具有良好的特异性, 适用于实际样品中洋槐蜂蜜的鉴别分析。

2.6　SSEA-TR-LFS 的重复性和稳定性验证结果及分析

在验证方法高灵敏度与优异特异性的基础上, 进一步对 SSEA-TR-LFS 的稳定性和重复性进行评价, 以确认其在实际应用中的可靠性与有效性。将同一批次制备的 TR-LFS 试纸条于室温下分别保存 0、10、15、20 及 30 d, 随后用于检测洋槐蜂蜜含量为 0%、10%和 30%的样品。结果如图 6A 所示, 即使储存 30 d, 试纸条 T 线荧光强度仍保持相对稳定, 未见明显下降。进一步对上述储存时间点下的试纸条进行 10 次重复测定, 结果显示(图 6B~D), 在 0%、10%和 30% 3 个浓度水平下, T 线荧光强度的 RSD 分别为 4.041%、1.379%与 1.693%, 表明该方法具有良好的重复性与储存稳定性。

2.7　SSEA-TR-LFS 的实际样品验证结果

为验证所构建 SSEA-TR-LFS 方法在实际样品检测中的适用性, 将其应用于市售洋槐蜂蜜产品的花源真实性鉴定。结果如图 7 所示, 1%洋槐蜂蜜样品在 TR-LFS 的 T 线处可见微弱荧光信号, 据此设定视觉检测阈值为 1%, 即 T



注: A. 在不同存储时间不同掺假比例测定结果; B~D. 相同存储时间为 0 d 的 10 次重复测量的结果。

图 6　SSEA-TR-LFS 稳定性和重复性的验证结果

Fig.6　Verification results of the stability and repeatability of SSEA-TR-LFS

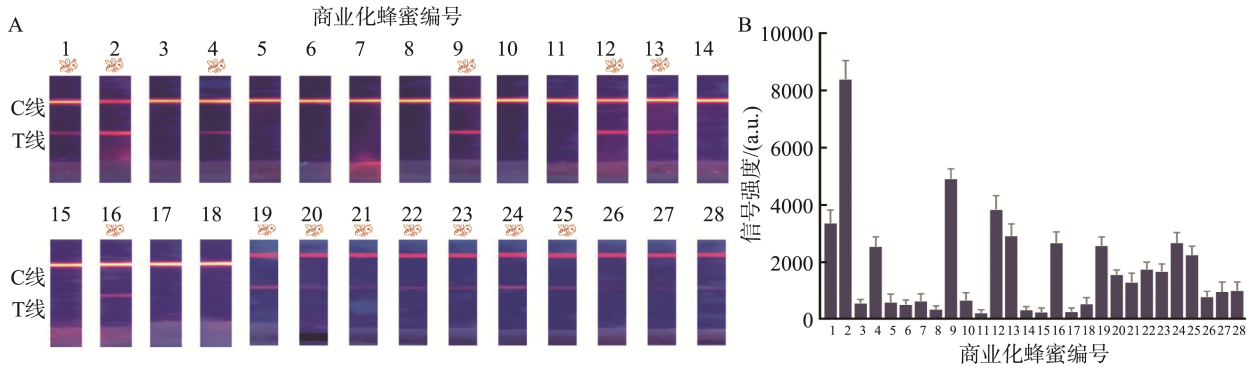


图 7 SSEA-TR-LFS 检测商业蜂蜜的检测结果(n=3)

Fig.7 Test results of commercial honey detected by SSEA-TR-LFS (n=3)

线无肉眼可见荧光信号表明样品中洋槐蜂蜜含量低于 1%，存在高度掺假风险。在 28 个市售样品中，共有 14 个样品 T 线未见明显荧光信号，表面这些样品中洋槐蜂蜜成分含量低于检测阈值或不存在。

为验证上述结果，进一步采用中华人民共和国出入境检验检疫行业标准中(SN/T 4848.3—2017《出口蜂蜜中常见蜜源植物成分的检测方法实时荧光 PCR 法》)的 qPCR 方法对同批样品进行平行检测。以定量循环数(quantification cycle, Cq)=32 为判定阈值，结果显示样品 3、5、6、7、8、10、11、14、15、17、18、20、21、26、27、28 的 Cq 值大于 32，判定为掺假样品，其余样品则被确认为以洋槐蜂蜜为主要成分。对 28 个实际样品的“真/假”判定结果进行了 Kappa 分析，计算得 Kappa 系数为 0.8572，表明两种方法具有几乎完美的一致性(表 2)。表明 SSEA-TR-LFS 在蜂蜜花源真实性鉴定方面具有可靠的实用价值。

表 2 qPCR 检测商业蜂蜜的检测结果(n=3)

Table 2 Test results of commercial honey detected by qPCR (n=3)

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Cq	29.4	24.4	>40	28.6	>40	>40	38.8	39.3	26.8	>40	>40	27.6	29.1	37.6
编号	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Cq	39.7	28.7	34.6	>40	28.9	32.5	32.6	30.4	30.6	29.2	30.5	36.8	35.9	34.2

3 讨论与结论

本研究成功构建了一种基于 SSB 增强型 SSEA-TR-LFS 相结合的检测平台，用于蜂蜜花源真实性的快速鉴定。本方法通过引入 SSB 有效提升了扩增反应的效率与稳定性，在恒定温度条件下即可完成目标核酸序列的扩增，克服了传统 PCR 对热循环仪的依赖，同时保持了较高的检测灵敏度与特异性。实验结果表明，该方法对洋槐蜂蜜的视觉检出限可达 1% (V:V)，整个检测过程操作简便、设备便携，适用于现场快速筛查。

与传统蜂蜜花源检测技术相比，本研究方法体现出显著优势。相较于依赖精密仪器的传统 PCR 技术，本方法无需热循环，大幅降低设备成本与操作复杂度；而与胶体金免疫试纸条等免疫学方法相比，本方法基于核酸检测，具有更高的特异性与可设计性，不易受蜂蜜中相似蛋白成分干扰。因此，SSEA-TR-LFS 技术在保持分子检测高灵敏度的同时，显著降低了对设备与环境的要求，拓宽了分子检测在基层与现场场景中的应用范围。尽管本研究可以在实际场景中应用，仍存在一定局限性，例如尚未系统验证其在多花源混合蜜中的分辨能力，也未开展深度的定量分析。下一步，研究将重点拓展该方法在复杂混合基质中的适用性，探索其与重组酶聚合酶扩增、环介导等温扩增等其他等温扩增技术联用的潜力，以进一步提升方法的通用性与检测灵敏度。同时，研究也将致力于建立标准化的定量或半定量分析流程，以完善该技术在蜂蜜真实性鉴别中的应用体系。

综上所述，本研究为食品真实性鉴别提供了一种具有良好应用前景的现场分子检测工具。未来，通过在多花源混合鉴定、定量标准化及技术联用等方面的深入探索，该方法有望在食品溯源、品质监控等领域发挥更大作用。

参考文献

[1] CHRISTOS S, ELISAVET S, ELPIDA G, *et al*. Honey’s antioxidant and antimicrobial properties: A bibliometric study [J]. Antioxidants, 2023, 12(2): 414.

[2] VALVERDE S, ARES AM, ELMORE JS, *et al*. Recent trends in the analysis of honey constituents [J]. Food Chemistry, 2022, 387: 132920.

[3] 冀乐, 祁珊珊, 郑红星, 等. 蜂蜜营养成分及其功能活性研究进展[J]. 食品与发酵科技, 2024, 60(2): 101–107.

JI L, QI SS, ZHENG HX, *et al*. Research progress on nutritional composition and functional activity of honey [J]. Food and Fermentation Science & Technology, 2024, 60(2): 101–107.

[4] GIROLAMOO FD, D'AMATO A, RIGHETTI PG. Assessment of the floral origin of honey via proteomic tools-science direct [J]. Journal of Proteomics, 2012, 75(12): 3688–3693.

[5] 张晓华. 蜂蜜中糖类的高效液相色谱测定及其在蜂蜜品质控制中的应用研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(16): 74–79.
ZHANG XH. Determination of sugars in honey by high performance liquid chromatography and its application in honey quality control [J]. Food Research and Development, 2019, 40(16): 74–79.

[6] 张路遥, 陈瑞盈, 张萌, 等. 基于固相萃取-薄层色谱图像分析法鉴别糖浆掺假蜂蜜[J]. 中国食品学报, 2021, 21(3): 263–273.
ZHANG LY, CHEN RY, ZHANG M, *et al*. Identification of syrup adulterated honey based on solid phase extraction-thin layer chromatography image analysis [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(3): 263–273.

[7] 龙门, 李旺旺, 方志澳, 等. 基于气相色谱-离子迁移谱法快速鉴别油菜蜜混合洋槐蜜[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(21): 201–209.
LONG M, LI WW, FANG ZAO, *et al*. Identification of rape honey mixed with locust honey based on gas chromatography-ion mobility spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2023, 14(21): 201–209.

[8] EI-SOFANY A, NAGGAR YA, NAIEM E, *et al*. Authentication of the botanical and geographic origin of Egyptian honey using pollen analysis methods [J]. Journal of Apicultural Research, 2020, 59(5): 946–955.

[9] 寇泽坤, 陈国通, 李思雨, 等. 拉曼光谱结合化学计量学方法鉴别糖浆掺假蜂蜜[J]. 食品科学, 2024, 45(1): 254–260.
KOU ZK, CHEN GT, LI SY, *et al*. Identification of honey adulterated with syrup by Raman spectroscopy and chemometrics [J]. Food Science, 2024, 45(1): 254–260.

[10] 张星联, 张慧媛, 宋华欣, 等. 蜂蜜掺假的脆弱性评估技术研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(24): 9187–9193.
ZHANG XL, ZHANG HY, SONG HX, *et al*. Vulnerability assessment of honey adulteration [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(24): 9187–9193.

[11] DRIVELOS SA, DANEZIS GP, HALAGARDA M, *et al*. Geographical origin and botanical type honey authentication through elemental metabolomics via chemometrics [J]. Food Chemistry, 2021, 338: 127936.

[12] 高西贝, 杜欣玥, 王琪琦, 等. 蜂蜜的真实性鉴别方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(18): 5842–5848.
GAO XB, DU XY, WANG QQ, *et al*. Research progress on the detection technologies of honey authenticity [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2022, 13(18): 5842–5848.

[13] HARBANE S, ESCUREDO O, NAKIB R, *et al*. Volatile profile characterization of ten Algerian unifloral honeys: Uncovering the connection to botanical sources [J]. Food Chemistry, 2025, 496(2): 146791.

[14] WU Q, CHEN Q, YAN C, *et al*. Accurate and rapid genetic tracing the authenticity of floral originated honey with the molecular lateral flow strip [J]. Biosensors, 2022, 12: 971.

[15] WU Q, XU JG, YAO L, *et al*. Accuracy and stability enhanced honey authenticity visual tracing method via false positive-eradicating PCR assisted nucleic acid-capturing lateral flow strip [J]. Food Chemistry, 2024, 435: 137587.

[16] BRUNI I, GALIMBERTI A, CARIDI L, *et a*l. A DNA barcoding approach to identify plant species in multiflower honey [J]. Food Chemistry, 2015, 170: 308–315.

[17] PROSSER SWJ, HEBERT PDN. Rapid identification of the botanical and entomological sources of honey using DNA metabarcoding [J]. Food Chemistry, 2017, 214: 183–191.

[18] ZHENG T, LI X, SI Y, *et al*. Specific lateral flow detection of isothermal nucleic acid amplicons for accurate point-of-care testing [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2023, 222: 114989.

[19] YAN S, LI C, LAN H, *et al*. Comparison of four isothermal amplification techniques: LAMP, SEA, CPA, and RPA for the identification of chicken adulteration [J]. Food Control, 2024, 159: 110302.

[20] SUN Y, QIN P, HE J, *et al*. Rapid and simultaneous visual screening of SARS-CoV-2 and influenza virufses with customized isothermal amplification integrated lateral flow strip [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2022, 197: 113771.

[21] ZHANG M, WANG X, HAN L, *et al*. Rapid detection of foodborne pathogen *Listeria monocytogenes* by strand exchange amplification [J]. Analytical Biochemistry, 2018, 545: 38–42.

[22] ZHAO Y, ZHUANG L, TIAN P, *et al*. Rapid diagnosis of acute myocardial infarction based on reverse transcription-accelerated strand exchange amplification of miR-208a [J]. Analytical Methods, 2023, 15(35): 4442–4451.

[23] ZHUANG L, SONG C, SUN L, *et al*. One-step narrow-thermal-cycling strand exchange amplification for sensitive detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. Archives of Microbiology, 2025, 207: 151.

[24] ZHANG J, HAN X, WANG Y, *et al*. Rapid and sensitive detection of Staphylococcus aureus via an all-in-one staggered strand exchange amplification platform [J]. Analyst, 2023, 148(9): 1970–1977.

[25] NATHAN H, ALEXANDER RK. Solid-state nanopore detection of partially denatured dsDNA with single-strand binding protein: A preliminary analysis [J]. BioRxiv-Biophysics 2024, 1: 577651.

[26] MICHAEL MM, JAN R, OSAMA KZ. Nanopore analysis of single-stranded binding protein interactions with DNA [J]. Langmuir, 2015, 31: 4582–4588.

[27] ZENG L, GUO L, WANG Z, *et al*. Gold nanoparticle-based immunochromatographic assay for detection *Pseudomonas aeruginosa* in water and food samples [J]. Food Chemistry: X, 2021, 9: 100117.

[28] LIU X, CHEN Y, BU T, *et al*. Nanosheet antibody mimics based label-free and dual-readout lateral flow immunoassay for *Salmonella enteritidis* rapid detection [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2023, 229: 115239.

[29] WANG J, JIANG C, YUAN J, *et al*. Hue recognition competitive fluorescent lateral flow immunoassay for aflatoxin M_1 detection with improved visual and quantitative performance [J]. Analytical Chemistry, 2022, 94(30): 10865–10873.

[30] WANG Y, SHEN J, SONG R, *et al*. Highly bright and stable CsPbBr3 perovskite nanocrystals with amphiphilic polymer binding based dual-readout lateral flow immunoassay for detection of carcinoembryonic antigen [J]. Talanta, 2024, 266: 125017.

[31] WU Q, YAO LI, QIN PZ, *et al*. Time-resolved fluorescent lateral flow strip for easy and rapid quality control of edible oil [J]. Food Chemistry, 2021, 357: 129739.

(责任编辑: 韩晓红　蔡世佳)