葡萄酒中葡萄的DNA提取和分子鉴定研究进展

高苏娟¹, 李志勇², 高东微², 刘津^{2,*}

(1.仲恺农业工程学院轻工食品学院, 广东 广州 510225; 2.广东检验检疫技术中心, 广东 广州 510623)

摘要: 分子生物学技术能够对葡萄酒真伪和品质鉴别提供直接的判别依据。解决葡萄酒中葡萄DNA提取的技术难题, 并以此为基础利用分子标记技术进行葡萄酒中葡萄品种的鉴定, 具有重大的研究和应用价值。因此, 本文综述了近10余年来分子生物学技术在葡萄酒分子鉴定方面的研究进展, 从葡萄酒中葡萄DNA提取、DNA质量评价和品种鉴定三方面进行了阐述, 尤其是将文献中的DNA提取和下游检测技术方案进行了系统比较, 就DNA提取部分按照葡萄DNA的富集、DNA粗提和多糖多酚的去除以及DNA纯化回收3个步骤进行了深入的分析, 并详细介绍了以微卫星标记为代表的品种鉴定技术现状。在此基础上, 本文还探讨了基因检测技术在葡萄酒真伪和品质鉴定方面的应用前景。

关键词: 葡萄酒; DNA提取; 微卫星标记; 品种鉴定

A Review on Grape (*Vitis vinifera* L.) DNA Extraction and Molecular Identification for Wines

GAO Sujuan¹, LI Zhiyong², GAO Dongwei², LIU Jin^{2,*}

(1. College of Food Science and Technology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China; 2. Guangdong Inspection and Quarantine Technology Center, Guangzhou 510623, China)

Abstract: Molecular biology techniques can provide direct authenticity and quality identification of wines. The resolution of technical problems on grape DNA extraction from wines and the subsequent application of molecular marker techniques in grapevine identification are of great interest among researchers and of high practical value. A literature review on molecular biology techniques used for grapevine identification for wines in recent decades is given in this paper, including grape DNA extraction from wines, DNA quality evaluation and grapevine identification. A systematic comparison of DNA extraction and downstream detection protocols reported in the literature is provided as well as a detailed analysis of the three steps involved in DNA extraction namely DNA enrichment, crude DNA extraction and subsequent removal of polyphenol and polysaccharide, and DNA purification. The technical advances in grapevine identification represented by microsatellite marker technology are displayed. Meanwhile, the application prospects of gene detection technologies in authenticity and quality identification of wines are discussed in this paper.

Key words: wine; DNA extraction; microsatellite marker; grapevine identification

中图分类号: TS255.7

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2015)15-0282-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201515052

葡萄酒已然成为百姓餐桌上不可或缺的饮品, 近两年, 我国进口葡萄酒总销量达325亿元, 增长超过70%^[1], 然而“以假充真”、“以次充好”等频频见诸报端的葡萄酒品质安全问题, 不仅侵害到消费者的利益, 也严重制约了葡萄酒行业的健康发展。

葡萄酒的价值与其品质密切相关, 高品质的葡萄酒如庄园酒和特定产区的葡萄酒价值从一瓶几百元到上万元不等, 而普通的餐酒许多只需几十元, 即使享誉世

界的法国拉菲庄园出产的波尔多葡萄酒也有不同级别档次, 其定价也从两三百元到万余元不等, 葡萄酒品质鉴定则能为有效规范葡萄酒销售市场提供科学依据和技术支撑。实际上, 葡萄酒的品质与葡萄品种、产地微气候、酿造技术及其风味有密切关系, 其中最基本的、也是最容易量化考核的即是酿酒所用的葡萄品种及比例。目前, 基于化学分析的葡萄酒品质检测技术已相对成熟, 迄今蛋白质或氨基酸^[2-5]、酚类物质^[6]、矿物质^[7]和芳

收稿日期: 2014-08-08

基金项目: 国家质检总局科技计划项目(2014IK102); 广东出入境检验检疫局科技计划项目(2013GDK24);

仲恺农业工程学院大学生创新基金项目(2014A17)

作者简介: 高苏娟(1981—), 女, 讲师, 博士, 研究方向为生物工程。E-mail: gaoshj@126.com

*通信作者: 刘津(1983—), 女, 工程师, 硕士, 研究方向为食品检测。E-mail: ivfhone@126.com

香类物质^[8]已用来分析和鉴定葡萄的品种或地理来源。多元醇、有机酸、多酚、单宁等多种葡萄酒中主要风味化学成分的分析技术已经建立并广泛应用于葡萄酒行业^[9-12],但葡萄酒中上述化学物质的存在与多寡易受土壤成分、温度条件以及发酵和陈酿过程的影响,只能从侧面、间接地反映葡萄酒的真伪和品质^[13]。由于酿酒葡萄品种对于葡萄酒品质至关重要^[14],基于基因水平的、能够提供相对直观鉴别依据的葡萄酒真伪和品质分析技术备受关注。随着葡萄品种基因鉴别方法的逐步发展和渐成体系,其在葡萄酒真伪和品质鉴别方面的应用性研究已有突破性的进展。随着葡萄酒中葡萄DNA提取技术的建立,以分子标记为代表的葡萄酒鉴别检测技术也逐渐发展起来。本文对近10余年来葡萄酒中葡萄DNA的提取和分子鉴定的研究进展进行综合评述,旨在为葡萄酒基因鉴别技术的研究提供参考。

1 概述

葡萄酒的分子鉴定包括葡萄酒中葡萄DNA的提取和下游分子生物学分析两个部分,其中从葡萄酒中获得高质量的葡萄DNA是进行下游分子生物学分析的基础。植物基因组DNA提取方法已较为成熟,基于十六烷基三甲基溴化铵法(cetyltrimethyl ammonium bromide, CTAB)^[15]和十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)法^[16]等传统方法,适于不同类型植物材料的DNA提取方法^[17-18]已经广泛应用,甚至开发成为商品化的植物DNA提取试剂盒^[18]。然而,这些DNA提取方法均不适用于葡萄酒中的葡萄DNA提取。葡萄酒为高度深加工产品,其生产过程历经发酵、转瓶、陈酿、澄清和过滤等诸多环节,成品葡萄酒中DNA含量极微,且由葡萄浆果引入葡萄酒中的大量的多酚类(单宁)、多糖、有机酸等复杂的化学物质,严重影响DNA提取质量及下游的分子生物学分析,目前尚未见报道一种能够达到应用水平的葡萄酒DNA提取方法,也没有成熟的商品化试剂盒。2000年至今,关于果汁、新酒或陈酿的葡萄酒中DNA提取及分析的研究报道^[19-22]层出不穷。已有研究^[13,23-27]表明:即使经过发酵,葡萄酒中依然存在微量的葡萄DNA,采用分子生物学手段进行用果汁或葡萄酒中的葡萄DNA分析是可行的;从葡萄酒中提取出足量且优质的葡萄DNA和筛选出葡萄特异性的聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)引物是应用分子生物学手段鉴别葡萄酒中葡萄品种的前提,也是目前葡萄酒基因鉴别技术研究的关键点和难点;在成功地提取出适宜进行下游分子生物学实验的葡萄DNA后,可以进行葡萄特异性基因的检测,以判断是否用葡萄原汁酿造;可以进行微卫星位点扩增,通过与相关葡萄微卫星位点数据库比对,从而鉴别出葡萄酒中的葡萄品种。

2 葡萄酒中葡萄DNA的提取

2.1 酿造环节对葡萄酒中葡萄DNA的影响

研究表明,葡萄酒生产过程的发酵、转瓶、陈酿、澄清和过滤等步骤都会减少葡萄酒中葡萄DNA的含量并破坏其质量。在葡萄酒发酵过程的不同阶段取样提取DNA的效果差别很大:在发酵进行的初期,虽然细胞被破坏、发酵的葡萄组织逐渐消融,但是提取的葡萄DNA却有所上升;但是在发酵的中后期,DNA的质和量都急剧下降^[19]。大多数研究者认为在进行澄清和过滤等步骤后,葡萄酒中的DNA含量会骤然减少^[22],但是Drábek等^[28]认为澄清和过滤的步骤对葡萄酒中DNA的含量影响不大,因为大多数葡萄DNA已经在澄清步骤之前损失,能够存留的DNA则完全溶解于液相,直径只有2 nm,能够通过孔径0.4 μm的滤膜^[12,28]。市售葡萄酒装瓶的时间越久,从中提取出葡萄DNA的难度越大^[13,19,25]。

Siret等^[19,20]从发酵阶段的葡萄酒中每天取样并提取其DNA,发现在整个发酵过程中,利用从发酵罐里的固相中提取获得的DNA能够有效地进行微卫星序列扩增,而从液相中提取的DNA在进行微卫星序列扩增时重复性较差。对不同加工工艺的市售葡萄酒进行DNA提取和微卫星序列扩增,提取和扩增效果类似于发酵阶段液相中的情况。Savazzini等^[25]从发酵后陈酿一年的葡萄酒中提取出了葡萄DNA并进行了微卫星位点分析。Pereira等^[13]从处于发酵阶段的葡萄酒以及装瓶后2~6 a的市售葡萄酒中均成功提取了葡萄DNA,并能成功地进行微卫星序列的扩增。

可见,从初始发酵的葡萄果汁至发酵各个阶段乃至市售的陈年葡萄酒中均可能提取得到适于微卫星序列扩增的葡萄DNA,这是对葡萄酒进行葡萄基因鉴别检测的物质基础。只有解决了葡萄酒中葡萄DNA提取的难题,开展葡萄酒基因鉴别技术研究才有探讨的可能。

2.2 葡萄酒DNA提取及纯化

葡萄酒中葡萄DNA提取是葡萄酒基因鉴别技术研究首要解决的问题,主要的难点有两方面:即如何将微量DNA从相对大量的酒样中富集,以及如何将DNA与葡萄酒中大量的多酚类、多糖等杂质分离。本文将目前已报道文献中的葡萄酒中DNA提取方法按照DNA富集、DNA粗提、DNA纯化回收3个阶段进行了分类汇总列于表1。目前已报道的葡萄酒或葡萄汁中DNA提取方法可分为三类,即以CTAB法为基础进行改良的方法^[13,19-22,25,28,31-32]、以SDS法为基础改良的方法^[26-27]和硅石(silica)吸附法^[23],其中以CTAB法改良的报道居多。除了采用硅石吸附法^[23]提得的DNA未进行下游的分子生物学实验外,其余方法均用提取得到的DNA成功进行微卫星序列分析,少部分文献中^[25,27-28,31]还成功地进行了葡萄特异性基

表1 葡萄果汁和葡萄酒中葡萄DNA提取和下游检测技术方案
Table 1 Summaries of DNA extraction and downstream detection protocols for grape juice and wines

实验材料	DNA富集	DNA提取		DNA纯化回收	下游检测	参考文献
		提取缓冲液	DNA与杂质分离			
葡萄果汁	加入2% β -巯基乙醇; 离心收集沉淀; TE缓冲液洗涤2次	10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1.4 mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA, 2 g/100 mL CTAB, 2% β -巯基乙醇, 6 g/100 mL PVPP	氯仿-异戊醇抽提: 0.7 倍体积异丙醇沉淀后, TE溶解	用1/2 体积5 mol/L NaCl和2 倍体积无水乙醇沉淀。0.1×TE或无菌水溶解	卫星位点分析	[21]
葡萄果汁、葡萄酒	离心、沉淀直接提取; 上清用含0.3 mol/L 醋酸钠的等体积异丙醇-70 °C 沉淀1 h后离心得沉淀	1.0 mol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1.4 mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA, 3 g/100 mL CTAB, 1% β -巯基乙醇	氯仿-异戊醇抽提1次; 苯酚-氯仿-异戊醇抽提1次	2 倍体积冷的95%乙醇 (含2 mol/L 醋酸钠) 进行沉淀, 风干后TE溶解	卫星位点分析	[19]
葡萄果汁、发酵阶段葡萄酒	100 mL 样品离心收集沉淀	1.0 mol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1.4 mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA, 3 g/100 mL CTAB, 1% β -巯基乙醇, 线性聚丙烯酰胺	氯仿-异戊醇抽提1次; 苯酚-氯仿-异戊醇抽提1次	新型植物基因组DNA快速提取试剂盒	卫星位点分析	[20]
葡萄果汁、葡萄酒	加入2% β -巯基乙醇; 离心收集沉淀; TE缓冲液洗涤2次	10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1.4 mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA, 2 g/100 mL CTAB, 2% β -巯基乙醇, 6 g/100 mL PVPP	氯仿-异戊醇抽提: 0.7 倍体积异丙醇沉淀后, TE溶解	新型植物基因组DNA快速提取试剂盒	卫星位点分析	[22]
葡萄果汁	加入2% β -巯基乙醇; 离心收集沉淀; TE缓冲液洗涤2次	10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1.4 mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA, 2 g/100 mL CTAB, 2% β -巯基乙醇, 6 g/100 mL PVPP	氯仿-异戊醇抽提: 0.7 倍体积异丙醇沉淀后, TE溶解	新型植物基因组DNA快速提取试剂盒	卫星位点分析、毛细管凝胶电泳	[29]
葡萄果汁、葡萄酒	离心收集沉淀	100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.5), 0.1 mol/L NaCl, 50 mmol/L EDTA, 2 g/100 mL SDS, 2% β -巯基乙醇	苯酚-氯仿-异戊醇和氯仿-异戊醇各抽提1次; 0.6 倍异丙醇-20 °C 沉淀2 h; 70% 乙醇洗涤后TE溶解; 用苯酚-氯仿-异戊醇抽提并收集上清	加入0.1 倍体积的3 mol/L 醋酸钠 (pH 5.2) 和2 倍体积无水乙醇, -20 °C 过夜, 离心收集沉淀, 并用70%乙醇洗涤	细胞核、线粒体及叶绿体卫星位点分析	[26]
果汁、葡萄酒	分别用1/9 体积1.2 mol/L NaCl、0.7 倍体积异丙醇和1/6 倍体积的3 mol/L 醋酸钠 (pH 5.2), -20 °C 沉淀1~2 周。收集沉淀	1.0 mol/L Tris-HCl (pH 8.0), 2 mol/L NaCl, 25 mmol/L EDTA, 3 g/100 mL CTAB, 0.2% β -巯基乙醇, 1 g/100 mL PVPP	等体积的苯酚-氯仿-异戊醇抽提1次	0.6 倍体积的异丙醇-20 °C 沉淀; 离心收集沉淀; 70%乙醇洗涤	荧光定量PCR; 葡萄卫星位点分析	[25]
市售葡萄酒	将酒冷冻干燥得粉末	0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mol/L NaCl, 加入热稳定R-淀粉酶80 °C 水浴1 h; 加入蛋白酶K和0.2 g/100 mL SDS, 于55 °C 放置1 h	冷的70%乙醇0 °C 放置10 min, 加入1/10 体积3 mol/L 醋酸钠和2 倍体积异丙醇沉淀; TE溶解, 中性苯酚和苯酚-氯仿各抽提1次	0.2 mol/L NaCl和2 倍体积的冷异丙醇沉淀DNA; 70%乙醇洗涤沉淀后用TE溶解DNA	PCR检测葡萄内源基因	[27]
发酵阶段葡萄酒	加入0.5 mol/L EDTA和线性聚丙烯酰胺, 真空干燥至一定质量	50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 20 mmol/L EDTA, 0.7 mol/L NaCl, 0.4 mol/L LiCl, 1 g/100 mL CTAB, 1 g/100 mL PVP40; 2 g/100 mL SDS, 1% β -巯基乙醇	氯仿抽提1次, 0.65 倍体积异丙醇沉淀。用TEN 配制的80%乙醇洗涤1次; 重复氯仿抽提1次	柱式DNA快速纯化试剂盒	荧光定量PCR分析葡萄VvNCED基因	[28]
葡萄果汁	加入2% β -巯基乙醇; 离心收集沉淀; TE缓冲液洗涤2次	10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1.4 mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA, 2 g/100 mL CTAB, 2% β -巯基乙醇, 6 g/100 mL PVPP	氯仿-异戊醇抽提: 0.7 倍体积异丙醇沉淀后, TE溶解	用1/2 体积5 mol/L NaCl和2 倍体积无水乙醇沉淀。0.1×TE或无菌水溶解	卫星位点定量分析葡萄品种	[30]
发酵及市售葡萄酒	0.7 倍体积异丙醇-20 °C 沉淀2 周	10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1.4 mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA, 2 g/100 mL CTAB, 蛋白酶K, 1% β -巯基乙醇, 2 g/100 mL PVP	氯仿-异戊醇抽提1次; 中性苯酚抽提1次	0.6 倍体积的异丙醇-20 °C 过夜沉淀; 76%乙醇、10 mmol/L 醋酸钠洗涤	卫星位点分析	[13]
葡萄果汁	冷冻干燥得粉末	0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1.4 mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA, 2 g/100 mL CTAB	氯仿抽提: 2 倍体积CTAB缓冲液 (5 g/L CTAB, 0.04 mol/L NaCl, pH 8.0) 沉淀1 h; 1.2 mol/L NaCl溶解, 氯仿抽提1次	0.8 倍体积异丙醇-20 °C 沉淀1 h, 70%乙醇洗涤后0.1×TE溶解	PCR检测葡萄内源类甜蛋白基因	[31]
葡萄酒	10 mol/L的NaOH溶液调葡萄酒pH值至8.0, 1 g/100 mL CTAB, 1.0 mol/L NaCl, 0.2% β -巯基乙醇	加入硅石悬浮液, 室温保存2 h, 收集沉淀; 用含0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1 g/100 mL CTAB, 1 mol/L NaCl的冲洗液洗1~2 次。加入纯水65 °C 热洗脱DNA	等体积氯仿抽提1次, 根据需要可重复抽提或增加苯酚抽提	异丙醇沉淀; 70%乙醇洗涤后0.1×TE溶解		[23]

注: EDTA. 乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid); PVPP. 聚乙烯吡咯烷酮 (polyvinylpyrrolidone); PVP. 聚乙烯吡咯烷酮 (polyvinylpyrrolidone); TE. 由 Tris 和 EDTA 配制而成; TEN. Tris-EDTA-NaCl。

因的PCR或实时荧光定量PCR分析, 表明基因水平进行葡萄酒品质分析鉴别尽管难度较大但并非不可行。表1中各种葡萄酒中DNA提取方法中采用的技术策略分析如下。

2.2.1 葡萄酒中DNA富集

葡萄酒中微量DNA片段的富集是DNA提取的第一个关键环节。由表1可知, 4 °C 低温离心取沉淀、真空冷冻干燥以及硅石吸附是目前富集葡萄酒中DNA的3种有效

方式。为了更充分富集溶于液相中分子量较小的DNA片段, 提高DNA的得率, Savazzini等^[25]在原酒中分别加入1/9 体积1.2 mol/L NaCl、0.7 倍体积异丙醇或1/6 体积醋酸钠并于-20 °C 放置1~2 周, 然后进行DNA提取, 结果表明3种试剂均能显著提高DNA得率, 且异丙醇沉淀后提取的DNA得率稍逊于NaCl和醋酸钠沉淀, 但纯度较高; Pereira等^[13]比较了添加0.7 倍体积异丙醇-20 °C 放置24 h、48 h、1 周或2 周对DNA得率以及下游PCR效果的

影响,认为-20℃放置2周为最佳,对于红葡萄酒尤其如此。Drábek等^[28]在真空冷冻干燥市售葡萄酒时,加入0.5 mol/L的EDTA和线性聚丙烯酰胺,也获得了可用于荧光定量PCR分析的DNA。

2.2.2 DNA粗提以及多糖和多酚的去除

葡萄酒中富含源于葡萄浆果的多糖和多酚等物质^[33],不仅干扰DNA的提取,也抑制下游的分子生物学检测^[27]。CTAB是一种去污剂,它既可以裂解细胞,又可以有效沉淀多糖,因此,在Tris-HCl-EDTA (pH 8.0)的弱碱性缓冲液中,1~3 g/100 mL的CTAB配合1.4 mol/L NaCl是普遍采用的葡萄酒中DNA提取缓冲液(表1),Zeng Jie等^[34]认为对于多糖与次生物质含量较高的材料, DNA提取液中提高CTAB质量浓度至3 g/100 mL则效果更好。SDS法是经典的DNA提取方法,由于SDS不具有沉淀多糖的能力,较少用于多糖多酚含量较多的材料中DNA的提取^[17],但经改良(加入2% (体积分数,下同)β-巯基乙醇)可以从葡萄酒和葡萄汁中提取获得可用于微卫星位点分析的DNA^[26],另有Nakamura等^[27]将SDS法与耐热R-淀粉酶和蛋白酶K合用,从市售葡萄酒中提取获得了DNA,并成功进行葡萄特异性基因的PCR分析。

由表1可知,数种改良的CTAB法和SDS方法中,普遍添加了1%~2% β-巯基乙醇、PVP40或PVPP 1~6 g/100 mL。因为β-巯基乙醇为抗氧化剂,可避免酚类氧化;PVP或PVPP则能络合多酚和萜类物质,可阻止多酚物质氧化为醌,两者配合使用能有效防止多酚的污染^[13,17]。经DNA提取缓冲液裂解得粗提DNA后,通常用苯酚-氯仿-异戊醇(25:24:1, V/V)抽提或者中性水饱和苯酚与氯仿-异戊醇(24:1)分次抽提,以去除蛋白质和多糖等杂质。Pereira等^[13]通过实验表明,尽管酚抽提会增加DNA中酚污染的机率,但该环节依然是葡萄酒中DNA提取过程中不可或缺的,另外加入蛋白酶K以去除蛋白也是必要的。

2.2.3 DNA纯化回收

通常采用添加0.6~0.8倍体积异丙醇或2倍体积无水乙醇至DNA粗提液,并于低温-20℃过夜沉淀的方式获得相对较纯的DNA,NaCl、醋酸铵以及醋酸钠等盐类物质能够帮助达到更好的沉淀效果(表1);另外,商业化的DNA提取或纯化试剂盒被用来进一步纯化所提得的DNA,以满足下游微卫星位点分析或荧光定量PCR实验对DNA纯度的需求^[20,22,28-29]。

3 DNA质量评价

在优化葡萄酒中DNA提取条件的过程中,合适的DNA质量评价指标尤为重要。分子生物学实验中通常采用分光光度法测定提取产物260 nm与280 nm波长处的吸

光度,据此计算DNA的浓度并初步判定其纯度。然而,从葡萄酒中提取的DNA,除了含有源于葡萄浆果的葡萄DNA,还有源于发酵过程中酵母等微生物的DNA,因此,分光光度法并不能判定提取的DNA是否含有葡萄内源DNA。采用微卫星序列分析、普通PCR或荧光定量PCR进行葡萄特异性基因分析则能够直接判定所提得的DNA中是否含有葡萄特异性基因。表2列出了目前文献中报道的可用于葡萄酒中葡萄特异性基因分析的PCR引物与探针信息,以供参考。

表2 葡萄内源基因PCR引物和探针

Table 2 Primers and probes for PCR of endogenous genes in grape

目的基因	引物及探针序列	产物长度/bp	序列来源	参考文献
VvNCE2	正向引物: 5'-ATGGCGACGGTATGGTCA-3'	94	GenBank: AY337614	[25]
	反向引物: 5'-CGCTCCTGGACCAATCTCTG-3'			
	探针: Fam-AGTCACCCCTTAATGGCGGTTTC-Famra			
葡萄白藜芦醇合酶基因	正向引物: 5'-CGAGGAATTTAGAAACGCTCAAC-3'	63	GenBank: KC417319.1	[28]
	反向引物: 5'-GCTGTCCAATGGCTAGGA-3'			
	探针: BHQ1-TGCCAAGGGTCCGGCCACC-FAM			
葡萄类甜蛋白基因	正向引物: 5'-GCACCGTTTTCAGACCGAT-3'	93	GenBank: XM002282952.2	[31]
	反向引物: 5'-CATCAGGGCACCTAGTCTTG-3'			

4 葡萄品种的鉴定

葡萄酒的品质与葡萄品种、水土和酿造技术等密切相关,特别是高品质葡萄酒对酿酒采用的葡萄品种及其配比有着严格的要求。为了保障高级葡萄酒的品质,许多国家如法国、意大利和葡萄牙等都实行了原产地保护规定,只允许使用特定产区有限的少数几个葡萄品种进行酿酒^[14]。近年来,分子标记技术如限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、随机扩增多态性DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)、扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)和微卫星标记(simple sequence repeats, SSR)等已经成功的应用于葡萄品种鉴定^[35]。SSR标记技术利用SSR两端的保守序列设计出一对特异性引物进行PCR扩增,将扩增产物通过凝胶电泳或毛细管电泳等手段检测出扩增条带的多态性,从而鉴别出不同的葡萄品种。SSR分子标记技术具有对DNA的浓度和纯度要求较低,即便部分降解的DNA也能进行分析鉴定等特点,因此广泛应用于葡萄酒中葡萄品种的鉴定。

Siret等^[20]利用从发酵阶段的葡萄酒中提取的DNA,用VVMD5、VVMD7、VVMD21、VVMD24和VVMD32这5个微卫星位点进行检测,能够有效的鉴别单一品种发酵葡萄酒中的Chardonnay B、Clairette B、Syrah N和Grenache,对两个葡萄品种混合发酵的葡萄酒能够成功的鉴别出含量为30%的异源葡萄品种。Siret等^[20]还提出对于葡萄酒这种深加工的产品,应该将检测目标针对线

粒体DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 或叶绿体DNA (chloroplast DNA, cpDNA), 因其含量相对于细胞核DNA更丰富, 且线粒体和叶绿体DNA为环形, 对热处理等具有较高的抗性。Savazzini等^[25]能够成功地从发酵后超过1 a的葡萄酒中扩增出微卫星序列, 但用Genotyper软件分析发现扩增得到的微卫星序列与不同葡萄品种叶片的微卫星序列仍存在差异, 认为可能与低DNA浓度和高多酚、多糖和其他PCR抑制剂有关; Baleiras-Couto等^[26]应用6种细胞核SSR和2种叶绿体SSR微卫星标记对5种单一品种发酵和2种双品种混合发酵葡萄酒进行了分析, 发现在双品种发酵的葡萄酒中某一葡萄品种比例越高则扩增信号越强, 且叶绿体SSR比细胞核SSR更适用于葡萄酒的检测。García-Beneytez等^[22]在一个PCR反应体系中同时扩增VVS5、VVMD7、VVS2、VVMD5、ZAG47、ZAG62、ZAG79和VVS29共7个微卫星序列, 并成功地鉴别了单一品种发酵的葡萄酒中葡萄品种, 该方法依据上述微卫星位点扩增产物片段大小差异或PCR时标记的荧光不同, 可以在同一反应体系中同时进行不同微卫星位点的检测, 从而有效地节省DNA、时间和金钱, 在微卫星标记鉴别未知样品中存在的多种葡萄品种方面也具有较好的应用潜力。

获取SSR分子标记的相关信息可以通过查阅文献, 也可以通过访问SSR分子标记数据库, 主要的公开的葡萄微卫星标记数据库见表3。瑞士葡萄SSR分子标记数据库 (Swiss Vitis Microsatellite Database) 截至2014年6月收录了171份本国葡萄品种的SSR信息, 该数据库中利用6个SSR标记 (VVMD5、VVMD7、VVMD27、VVS2、VrZAG62、VrZAG79), 区分了171份葡萄品种。意大利葡萄SSR分子标记数据库 (Grape Microsatellite Collection, GMC) 能通过葡萄品种名称、微卫星位点和名称首字母进行检索, 检索的结果包括微卫星位点、等位基因1和2的长度、品种名称、作者、引用文献和片段分析方法这7项内容。

表3 葡萄微卫星标记数据库
Table 3 Databases of grapevine microsatellite markers

数据库名称	地址	网址	基因型数据量
The Swiss Vitis Microsatellite Database	Université de Neuchâtel, Switzerland	http://www1.unine.ch/svmd	171
The Greek Vitis Database	University of Crete, Heraklion, Greece	http://gvd.biology.uoc.gr/gvd/index.htm	298
Grape Microsatellite Collection (GMC)	IASMA, San Michele, Italy	http://meteo.iasma.it/genetica/gmc.html	718
Identificación de Variedades de vid Caracterizadas Mediante Microsatélites	Departamento de Biología Vegetal Universidad Politécnica de Madrid, Spain	http://sivvem.monbyte.com/sivvem.asp	574

5 结语

随着人们对葡萄酒文化的逐渐熟悉和钟爱, 我国进口葡萄酒消费市场急速膨胀。令人不齿的是, 市场上出

现了“以假乱真”、“以次充好”、甚至“葡萄酒里不含葡萄原汁”等种种乱象, 深刻影响了葡萄酒文化的宣传推广, 极大打击了葡萄酒消费市场的健康发展, 严重侵害了消费者的正当权益。面对目前葡萄酒鱼龙混杂的局面, 研究并建立葡萄酒真伪和品质鉴别检验技术能够为葡萄酒市场的科学监管提供有效的技术武器。

高品质葡萄酒对葡萄品种及比例均有具体的要求, 通过基因检测技术可以有效的鉴别出葡萄酒中所含有的葡萄品种及其比例, 从而能够为鉴别葡萄酒的真伪和品质提供一种直接判定的依据。经过诸多研究者的共同努力, 葡萄酒中葡萄的DNA提取和分子鉴定已取得喜人进展, 主要表现为: 1) 果汁和发酵阶段葡萄酒中葡萄DNA提取以及SSR技术鉴定部分葡萄品种的方法已基本确立 (表1); 2) 能够从市售葡萄酒中提取获得葡萄的DNA, 并在品种鉴定方面进行了有益尝试。

同时, 从已有的研究报道中也凸显出实现从基因水平简便、快速、直接地对葡萄酒品质进行鉴别仍有不少技术难题亟待解决: 1) 目前尚无成熟稳定的葡萄酒DNA提取方法体系建立, 尤其是市售和红葡萄酒中高质量DNA提取仍是发展葡萄酒基因鉴别技术的关键及限速环节。在该环节, 可以从以下方面进行有益的尝试, 诸如通过温度梯度控制或加入糖原等助沉剂以缩短DNA富集 (沉淀) 时间; 选用磁珠和特异性吸附膜等方法进行DNA的纯化, 以避免常规纯化过程中大量使用苯酚、氯仿等有机试剂造成的污染; 针对不同发酵阶段、白葡萄酒或红葡萄酒DNA提取的共性难点开发相应的DNA提取试剂盒等方面以优化DNA的提取。2) 葡萄酒中葡萄DNA品种鉴别依旧困难重重, 其主要限制性体现在难以获得葡萄品种特异性的基因序列, 且各品种微卫星位点扩增产物差异较小, 某些品种间产物大小差异仅为几个碱基对, 甚至仅是个别碱基的不同, 即使借助于分辨率相对较高的毛细管电泳或芯片凝胶电泳也难以鉴别, 而将扩增产物测序, 通过序列分析确定品种则不失为更可行的方法。因此, 建立并共享酿酒葡萄微卫星序列数据库势在必行。

综上所述, 基因检测技术将在葡萄酒的真伪和品质鉴别检测方面发挥越来越重要的作用, 随着研究方法和技术的日新月异, 从基因水平简便、快速、直接地判别葡萄酒是否由葡萄原汁酿制, 以及由何种酿制, 建立葡萄酒“指纹”体系指日可待。

参考文献:

- [1] 张亮. 进口葡萄酒: 繁荣之下难掩“泡沫”[J]. 中国检验检疫, 2014(2): 46-47.
- [2] GONZALEZ-LARA R, CORREA I, POLO M C, et al. Classification of variety musts by statistical analysis of their electrophoretic protein pattern[J]. Food and Chemical Toxicology, 1989, 34: 103-110.

- [3] PUEYO E, POLO M C, DIZY M. Varietal differentiation of musts and wines by means of protein fraction[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 1993, 44: 255-260.
- [4] MORENO-ARRIBAS M V, CABELLO F, POLO M C, et al. Assessment of the native electrophoretic analysis of total grape must proteins for the characterization of *Vitis vinifera* L. cultivars[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47(1): 114-120.
- [5] VASCONCELLOS A M P, CHAVES das NEVES H J. Characterization of elementary wines of *Vitis vinifera* varieties by pattern recognition of three amino acids profiles[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1989, 37: 931-937.
- [6] CABELLO F, REVILLA E, GARCIA-BENEYTEZ E, et al. Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them[J]. Journal of Chromatography A, 2001, 915(1/2): 53-60.
- [7] DAY M P, ZHANG B L, MARTIN G J. The use of trace element data to complement stable-isotope methods in the characterization of grape musts[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 1994, 45: 79-85.
- [8] GONZALEZ-BARREIRO C, RIAL-OTERO R, CANCHO-GRANDE B, et al. Wine aroma compounds in grapes: a critical review[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2015, 55(2): 202-218.
- [9] COETZEE P P, VANHAECKE F. Classifying wine according to geographical origin via quadrupole-based ICP-mass spectrometry measurements of boron isotope ratios[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2005, 383(6): 977-984.
- [10] MONACI F, BARGAGLI R, FOCARDI S. Element concentrations in Chianti Classico appellation wines[J]. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2003, 17(Suppl 1): 45-50.
- [11] GARCIA-BENEYTEZ E, CABELLO F, REVILLA E. Analysis of grape and wine anthocyanins by HPLC-MS[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(19): 5622-5629.
- [12] ALMEIDA C M, VASCONCELOS M T. Multielement composition of wines and their precursors including provenance soil and their potentialities as fingerprints of wine origin[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(16): 4788-4798.
- [13] PEREIRA L, GUEDES-PINTO H, MARTINS-LOPES P. An enhanced method for *Vitis vinifera* L. DNA extraction from wines[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2011, 62(4): 547-552.
- [14] 崔熏, 李海英, 吴少惠. 与葡萄酒的相遇[M]. 济南: 山东人民出版社, 2009: 92-98.
- [15] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochemical Bulletin, 1987, 19: 11-15.
- [16] 蔡朝辉, 李萍, 董婷霞, 等. 贝母的分子生物学鉴定方法的研究[J]. 药学学报, 2000, 35(4): 309-312.
- [17] 孙璐宏, 鲁周民, 张丽. 植物基因组DNA提取与纯化研究进展[J]. 西北林学院学报, 2010, 25(6): 102-106.
- [18] 李金璐, 王硕, 于婧, 等. 一种改良的植物DNA提取方法[J]. 植物学报, 2013, 48(1): 72-78.
- [19] SIRET R, BOURSIQUOT J M, MERLE M H, et al. Toward the authentication of varietal wines by the analysis of grape (*Vitis vinifera* L.) residual DNA in must and wine using microsatellite markers[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(10): 5035-5040.
- [20] SIRET R, GIGAUD O, ROSEC J P, et al. Analysis of grape *Vitis vinifera* L. DNA in must mixtures and experimental mixed wines using microsatellite markers[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(13): 3822-3827.
- [21] FARIA M A, MAGALHAES R, FERREIRA M A, et al. *Vitis vinifera* must varietal authentication using microsatellite DNA analysis (SSR)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(4): 1096-1100.
- [22] GARCÍA-BENEYTEZ E, MORENO-ARRIBAS M V, BORREGO J, et al. Application of a DNA analysis method for the cultivar identification of grape musts and experimental and commercial wines of *Vitis vinifera* L. using microsatellite markers[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(21): 6090-6096.
- [23] 叶永忠, 李春奇, 王伟. 葡萄酒中DNA的提取方法: 中国, 200610128466.5[P]. 2008-07-02.
- [24] STUMMER B E, ZANKER T, HARVEY P R, et al. Detection and quantification of *Erysiphe necator* DNA in wine grapes and resultant must and juice[J]. Mycological Research, 2006, 110(Pt 10): 1184-1192.
- [25] SAVAZZINI F, MARTINELLI L. DNA analysis in wines: development of methods for enhanced extraction and real-time polymerase chain reaction quantification[J]. Analytica Chimica Acta, 2006, 563(1/2): 274-282.
- [26] BALEIRAS-COUTO M M, EIRAS-DIAS J E. Detection and identification of grape varieties in must and wine using nuclear and chloroplast microsatellite markers[J]. Analytica Chimica Acta, 2006, 563: 583-591.
- [27] NAKAMURA S, HARAGUCHI K, MITANI N, et al. Novel preparation method of template DNAs from wine for PCR to differentiate grape (*Vitis vinifera* L.) cultivar[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(25): 10388-10395.
- [28] DRÁBEK J, STÁVEK J, JALŮVKOVÁ M, et al. Quantification of DNA during winemaking by fluorimetry and *Vitis vinifera* L.-specific quantitative PCR[J]. European Food Research and Technology, 2008, 226: 491-497.
- [29] RODRÍGUEZ-PLAZA P, GONZÁLEZ R, MORENO-ARRIBAS M V, et al. Combining microsatellite markers and capillary gel electrophoresis with laser-induced fluorescence to identify the grape (*Vitis vinifera*) variety of musts[J]. European Food Research and Technology, 2006, 223: 625-631.
- [30] FARIA M A, NUNES E, OLIVEIRA M B P P. Relative quantification of *Vitis vinifera* L. varieties in musts by microsatellite DNA analysis[J]. European Food Research and Technology, 2008, 227: 845-850.
- [31] HAN Jianxun, WU Yajun, HUANG Wensheng, et al. PCR and DHPLC methods used to detect juice ingredient from 7 fruits[J]. Food Control, 2012, 25: 696-703.
- [32] ENGLER M D, KELLEY L C. A rapid DNA isolation procedure for the identification of *Campylobacter jejuni* by the polymerase chain reaction[J]. Letters in Applied Microbiology, 2000, 31(6): 421-426.
- [33] CABANIS J C, CABANIS M T, CHEYNIER V, et al. Tables de composition[M]//FLANZY C. Oenologie: fondements scientifiques et technologiques. Paris: Techniques et Documentation, 1999: 315-336.
- [34] ZENG Jie, ZOU Yuping, BAI Jiayu, et al. Preparation of total DNA from recalcitrant plant taxa[J]. Acta Botanica Sinica, 2002, 44(6): 694-697.
- [35] ROUBELAKIS-ANGELAKIS K A. Grapevine molecular physiology and biotechnology[M]. 2nd ed. Netherlands: Kluwer Academic Publication, 2009: 565-586.