

液态食品中聚阳离子对外源 DNA 稳定性的影响

安然, 王春婷, 董平, 李敬, 梁兴国*

(中国海洋大学 食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 随着食品安全和追溯体系的建立和完善, 将 DNA 作为食品溯源内标物的新型技术逐渐兴起。但由于食品中存在核酸酶等多种核酸破坏因子, 使得 DNA 作为内标物的应用被大大限制。将 DNA 与壳聚糖、壳寡糖和精胺的混合物加入到液态食品中, 探究了聚阳离子化合物对 DNA 稳定性的影响。结果显示: 壳聚糖、壳寡糖和精胺都可显著提高质粒 DNA 和 PCR 产物在酒类、牛奶和酸味饮品等液态食品中的稳定性, 且壳聚糖对 DNA 的保护效果最好, 可实现 DNA 含量在液态食品中长期保持不变。将 DNA-壳聚糖复合物作为食品溯源内标物具有广阔的应用前景。

关键词: 食品安全; DNA 内标物; 聚阳离子; 壳聚糖; 液态食品

中图分类号: Q 819 文章编号: 1673-1689(2019)10-0001-07 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.10.001

Influence of Polycations on the Stability of Exogenous DNA in Liquid Food

AN Ran, WANG Chunting, DONG Ping, LI Jing, LIANG Xingguo*

(College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: With the establishment and improvement of food traceability and security system, it becomes popular that using exogenous DNA as internal standards for food tracing and fake detection. However, due to nucleic acid damaging factors in food products, such as nuclease and acidic environment, low stability of DNA strongly restricts its application as food tracing standards. In this study, the stability of DNA-polycation complexes was investigated in 8 kinds of liquid foods. The results showed that polycations, especially chitosan, significantly improved the stability of DNA in alcoholic drinks, milk and sour drinks. This study indicates that DNA-chitosan complex is potential to show broad application prospect as internal standards in food traceability system.

Keywords: food security, DNA internal standard, polycation, chitosan, liquid food

近年来, 由于食品市场的全球化发展及食品安全事件的频发, 建立并完善食品产业的溯源体系成为确保食品安全的一个重要措施。由于标签或外包

装防伪技术存在易损坏脱落或被伪造等缺陷^[1-2], DNA 指纹^[3-5]和 DNA 条形码^[6]等生物技术逐渐被用于食品原料的种质鉴定及产地溯源。然而这些方法

收稿日期: 2017-02-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(31571937); 中国博士后面上基金项目(2018M632718)。

作者简介: 安然(1989—), 女, 博士, 讲师, 主要从事食品安全检测方面研究。E-mail: ar@ouc.edu.cn

* 通信作者: 梁兴国(1971—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品安全与生物技术方面研究。E-mail: liangxg@ouc.edu.cn

引用本文: 安然, 王春婷, 董平, 等. 液态食品中聚阳离子对外源 DNA 稳定性的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(10): 1-7.

对于白酒、橄榄油等自身 DNA 含量极低或 DNA 被严重破坏的深加工食品,提取其自身 DNA 并进行鉴定也较为困难。因此,通过在食品中加入外源 DNA 作为溯源内标物的新型技术逐渐受到重视^[7-8]。

虽然相比于其他生物大分子,DNA 的理化性质较为稳定,但由于食品中存在多种核酸破坏因子(如核酸酶、自由基和酸等),DNA 在其中经长时间贮藏后会发生脱嘌呤、氧化或断裂等损伤,造成序列信息的丢失,最终导致检测的假阴性,这大大限制了其作为溯源标记物在食品中的应用。因此,目前亟需一种提高 DNA 稳定性的方法来实现其在食品中的长期稳定存在。

众所周知,核酸具有聚阴离子的特性,其磷酸基上的负电荷可通过静电相互作用与聚阳离子化合物携带的正电荷结合,从而达到提高核酸稳定性的目的^[8]。在细胞中,DNA 正是通过缠绕在带有多个正电荷的组蛋白上来提高 DNA 稳定性。目前已有研究表明,碱性多肽和精胺、亚精胺和腐胺等多胺类聚阳离子化合物可降低由辐射产生的 DNA 断裂损伤^[9-11];壳聚糖-DNA 纳米粒子可抵抗 DNase I^[12-14]、DNase II^[15]和 Exonuclease III^[16]等核酸酶的降解;壳聚糖^[17-19]和多胺类物质^[20]还可提高核酸对氧化和辐射的耐受性。此外,根据脱嘌呤的质子化机理^[21],聚阳离子可通过中和磷酸基上的负电荷来抑制核酸在酸性条件下的脱嘌呤反应。而且,由于具有聚阳离子性质的壳聚糖是一种天然的无毒无害的食品添加剂,很适合作为核酸保护剂应用于食品领域。

因此,本文作者选用了壳聚糖、壳寡糖和精胺 3 种分子量大小不同的聚阳离子化合物,探究了聚阳离子化合物对液态食品中 DNA 的保护作用,并评估了 DNA-聚阳离子复合物作为食品溯源标记物的可行性。不仅可为食品中核酸稳定性的提高提供一种新思路,还可扩大 DNA 标记物在食品中的应用范围。此外,对于 DNA-聚阳离子复合物稳定性的研究也可对壳聚糖-DNA 纳米营养体在液态食品中稳定性的研究提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验所用试剂 pUC18 质粒、λDNA、pfu DNA 聚合酶、DNase I 和 SYBR Select Master Mix 购自 Thermo Scientific 公司;引物订购自苏州金唯智

生物科技有限公司,序列见表 1;dNTPs(10 mmol/L)和精胺购自 Sigma 公司;壳寡糖(分子量:6 500 Da;脱乙酰度:91.1%)购自山东省莱州市海力生物制品有限公司;壳聚糖(分子量:50~100 kDa)购自浙江澳兴生物科技有限公司;其他试剂均为国产分析纯试剂;Piko Real 实时荧光定量 PCR 仪购自 Thermo Scientific 公司。

表 1 本研究中使用的引物序列

Table 1 Sequence of primers used in this study

引物	序列(5'→3')
pUC18-364s	CAGCTCACTCAAAGCGCGTA
pUC18-364a	TTGGAGCGAACGACCTACAC
pUC18-170s	CCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGT
pUC18-170a	TCATGTAACGCGCTTGATCGTTGG
PCR-156s	AAGATACCAGGCGTTTCCCC
PCR-156a	CGAACGACCTACACCGAACT

1.1.2 实验所用液态食品 本实验所使用的液态食品的保质期与 pH 值列于表 2 中。其中白酒品名为三井小刀,生产单位为河北三井酒业股份有限公司;葡萄酒品名为青岛华东干红葡萄酒,生产单位为青岛华东葡萄酒有限公司;牛奶品名为圣牧有机纯牛奶,生产单位为内蒙古圣牧高科奶业有限公司;乳酸菌饮料品名为伊利每益添低糖活性乳酸菌饮料,生产单位为内蒙古伊利实业集团股份有限公司;柠檬汁饮料品名为水溶 c100 柠檬味复合果汁饮料,生产单位为农夫山泉(淳安茶园)有限公司;白醋品名为海天 9 度纯酿米醋,生产单位为佛山市海天(高明)调味食品有限公司;苏打水产品名为崂山苏打水,生产单位为青岛崂山矿泉水有限公司;虫草酒品名为茅台北冬虫草酒,生产单位为贵州茅台酒厂(集团)保健酒业有限公司。

表 2 本研究中使用的液态食品

Table 2 Liquid foods used in this study

种类	保质期	pH
白酒(45%vol)	无	3.7
葡萄酒(13%vol)	10 a	3.1
牛奶	6 个月	6.8
乳酸菌饮料	6 个月	3.9
柠檬汁饮料	12 个月	3.0
白醋	24 个月	2.2
苏打水	24 个月	9.0
虫草酒(53%vol)	无	3.5

1.2 DNA-聚阳离子复合物的制备

PCR产物的制备:以pUC18质粒为模板(10^{10} 拷贝/ μL),pUC18-364a/s(表1)为引物进行PCR反应,目的产物长度为364 bp。50 μL PCR反应体系中含1 $\times$ pfu Buffer (20 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 mmol/L KCl, 0.1 mg/mL BSA, 1% (v/v) Triton X-100, 2 mmol/L MgSO_4 , pH 8.8@25 $^\circ\text{C}$), 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 引物, 0.2 mmol/L dNTPs, 2 U pfu DNA聚合酶。PCR参数为:72 $^\circ\text{C}$ 引物延伸5 min, 94 $^\circ\text{C}$ 预变性3 min, 94 $^\circ\text{C}$ 变性30 s, 59 $^\circ\text{C}$ 退火30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸90 s, 35个循环后72 $^\circ\text{C}$ 保温5 min。将得到的PCR产物进行纯化并用NanoDrop2000分光光度计(Thermo Scientific)测定浓度。

将 λ DNA、pUC18质粒DNA(pDNA)或PCR产物分别与壳寡糖、壳聚糖或精胺按照不同的氨基磷酸比混合后,于4 $^\circ\text{C}$ 放置12 h,使DNA与聚阳离子化合物充分作用,通过静电相互作用形成复合物。

1.3 复合物对DNase I的耐受性实验

将 λ DNA-壳寡糖复合物或 λ DNA-精胺复合物加入到含有DNase I的体系中,20 μL 酶切体系中含600 ng λ DNA, 0.02 U DNase I和1 $\times$ DNase I Buffer (10 mmol/L Tris-HCl, 2.5 mM MgCl_2 , 0.1 mmol/L CaCl_2 , pH 7.5@25 $^\circ\text{C}$)。37 $^\circ\text{C}$ 反应10 min后,在65 $^\circ\text{C}$ 下温浴10 min将酶灭活。通过琼脂糖凝胶电泳对 λ DNA的长度进行检测。

1.4 复合物在液态食品中的长期贮藏

取4 μL pDNA-聚阳离子复合物(氨基磷酸比为10:1)加入到396 μL 不同的液态食品(表2)中,使pDNA的终浓度达到290 pg/ μL ($\sim 10^8$ 拷贝/ μL)混匀后分别置于4、20 $^\circ\text{C}$ 和37 $^\circ\text{C}$ 下贮藏10~30 d。取1 μL PCR产物-聚阳离子复合物(氨基磷酸比为10:1)加入到1 mL虫草酒中,使PCR产物的浓度达到约0.4 pg/ μL ($\sim 10^6$ 拷贝/ μL),并置于室温下贮藏60~120 d。同时设置不添加聚阳离子化合物的对照组,即将质粒DNA或PCR产物直接加入到液态食品中,使DNA的终浓度与复合物中DNA的终浓度相同,其他贮藏条件完全相同。

1.5 荧光定量PCR法测定DNA含量

将含有质粒DNA或PCR产物的液态食品稀释100倍后作为荧光定量PCR(qPCR)反应的模板。针对pUC18质粒DNA设计的特异性引物为pUC18-170s/a,目的产物长度为170 bp;针对PCR产物设

计的特异性引物为PCR-156s/a,目的产物长度为156 bp(表1)。10 μL qPCR体系含5 μL 2 $\times$ SYBR Select Master Mix, 0.3 μM 特异性引物, 1 μL 稀释后的液态食品。荧光定量PCR参数为:95 $^\circ\text{C}$ 预变性2 min, 95 $^\circ\text{C}$ 变性20 s, 59 $^\circ\text{C}$ 退火20 s, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸20 s, 40个循环。

2 结果与分析

2.1 氨基磷酸比对 λ DNA-聚阳离子复合物稳定性的影响

氨基磷酸比(N/P)是复合物中聚阳离子化合物携带的氨基摩尔数与DNA携带的磷酸基摩尔数之比,它代表DNA-聚阳离子复合物中正负电荷的比例,是影响聚阳离子化合物与DNA静电相互作用的重要因素。

本实验制备了不同氨基磷酸比(1:1~100:1)的 λ DNA-壳寡糖和 λ DNA-精胺复合物,以DNase I的水解程度为指标,探究了氨基磷酸比对DNA-聚阳离子复合物稳定性的影响。图1中的结果显示,经DNase I酶解10 min后,大部分 λ DNA都被水解为500 bp以下的小片段;当N/P ≥ 10 时, λ DNA的条带位置与标准品位置一致,几乎不会被DNase I降解,说明壳寡糖对 λ DNA的保护效果较好。精胺对DNA的保护效果稍差于壳寡糖,当氨基磷酸比达到10:1时,有少部分 λ DNA被DNase I轻微降解,产生弥散条带。基于以上结果,后续实验中质粒DNA-聚阳离子复合物的制备选用的氨基磷酸比为10:1。

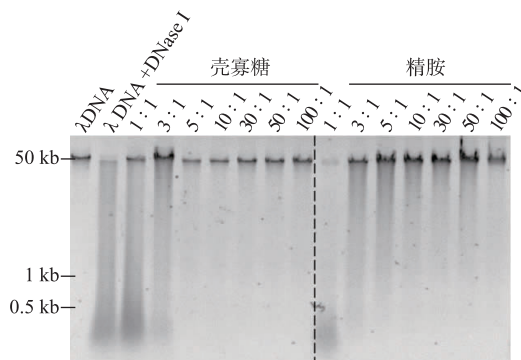


图1 不同氨基磷酸比的 λ DNA-聚阳离子复合物对DNase I的耐受性

Fig. 1 λ DNA-polycation complexes with various N/P hydrolyzed by DNase I

2.2 质粒 DNA-聚阳离子复合物在液态食品中的稳定性

本实验选取了 7 种不同的液态食品 (表 2), 其中包括酒类饮品、乳制饮品、酸味液态食品和碱性饮品。这些液态食品的理化性质特殊, 具有一定的代表性, 且几乎可囊括大部分液态食品的主要成分, 使用其探究 DNA-聚阳离子复合物在其中的稳定性具有一定的普遍意义。

为确定液态食品的成分以及聚阳离子化合物对于 qPCR 的影响, 本实验将含有质粒 DNA (pDNA)-聚阳离子复合物的液态食品分别稀释 100 和 1 000 倍后进行 qPCR 检测。结果显示, 不同液态食品经 100 倍稀释后 Ct 值有较大差异, 但经 1 000 倍稀释后 Ct 值则没有显著性差异 (数据未列出), 说明食品成分和聚阳离子化合物在充分稀释后对 qPCR 反应几乎无影响。因此, 此方法可以用于定量评价 pDNA 在液态食品中的稳定性。

2.2.1 在酒类饮品中的稳定性 本实验中分别测定了单独 pDNA 的对照组、pDNA-壳寡糖、pDNA-壳聚糖和 pDNA-精胺复合物在白酒和葡萄酒中的稳定性 (图 2)。结果显示, pDNA 在酒类饮品中的稳定性较差, 经 37 °C、10 d 的贮藏后, 对照组中白酒和葡萄酒的 pDNA 拷贝数由 10^8 拷贝/ μ L 降低至约 10^5 拷贝/ μ L, pDNA 含量仅分别为最初的 0.07% 和 0.08%。降低贮藏温度后, pDNA 的稳定性明显提高, 但在 20 °C 时, DNA 的破坏程度仍然较大。

将 pDNA-聚阳离子复合物加入酒类饮品中可明显提高 pDNA 的稳定性, 其中壳聚糖对 pDNA 的保护效果较好, 在 20 °C 时经 20 d 的贮藏后 pDNA-壳聚糖复合物在白酒和葡萄酒中的含量几乎没有数量级的变化。壳寡糖和精胺对酒类中的外源 DNA 也具有一定的保护作用。

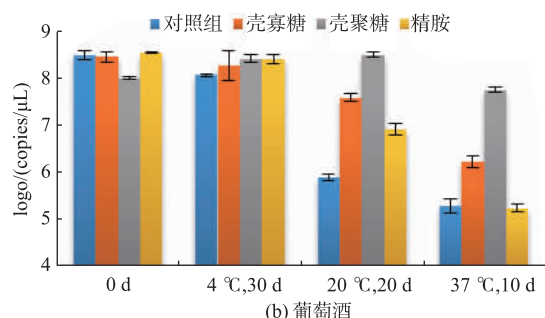
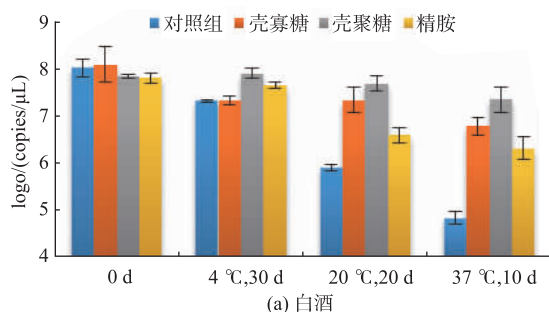


图 2 pDNA-聚阳离子复合物在酒类饮品中的稳定性

Fig. 2 Stability of pDNA-polycation complexes in alcoholic drinks

2.2.2 在乳制饮品中的稳定性 本实验选取了牛奶和乳酸菌饮料为两种代表性的乳制饮品。结果显示, pDNA 在牛奶中的稳定性较低, 经 37 °C 贮藏 10 d 后含量仅为最初的 0.9% (图 3 (a))。在其中加入 pDNA-壳寡糖复合物或 pDNA-壳聚糖复合物后, pDNA 的稳定性明显提高, 20 °C、20 d 贮藏后, pDNA 的含量几乎无数量级的变化。然而精胺在牛奶中对 DNA 的保护作用不明显。

虽然乳酸饮品的 pH 值较低 (pH 3.9), 但与牛奶不同的是, pDNA 在乳酸饮料中的稳定性较高, 经不同温度下长时间贮藏后对照组和 3 个实验组中的 pDNA 含量都几乎无变化 (图 3(b))。

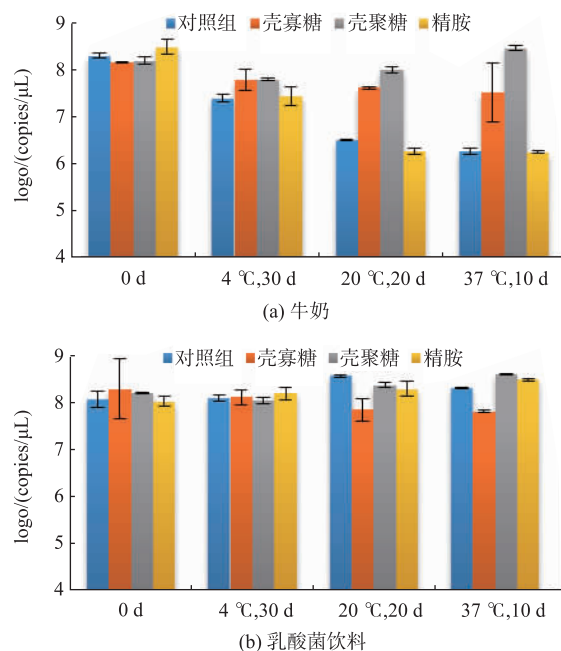


图 3 pDNA-聚阳离子复合物在乳制饮品中的稳定性

Fig. 3 Stability of pDNA-polycation complexes in dairy drinks

2.2.3 在酸味液态食品中的稳定性 本实验选取了 pH 值分别为 3.0 和 2.2 的柠檬汁饮料和白醋作为酸味液态食品的代表,探究 pDNA-聚阳离子复合物在酸味液态食品中的稳定性。

pDNA 在柠檬汁和白醋中的稳定性极差,经 37 °C 贮藏 10 d 后,柠檬汁饮料和白醋中的 pDNA 含量分别仅为最初的 0.2% 和 0.09% (图 4)。其中壳寡糖和壳聚糖对 pDNA 在柠檬汁饮料中的保护效果较好,在 4、20 °C 和 37 °C 下贮藏若干天后,pDNA 的含量几乎无变化。然而,白醋对 pDNA 的破坏性较强,在贮藏温度高于 20 °C 时,壳寡糖和精胺对于 DNA 的保护作用微弱。白醋中,壳聚糖对于 DNA 有一定的保护作用,但在 37 °C 贮藏 10 d 后,壳聚糖-DNA 复合物中的 DNA 仍有较明显的降解。

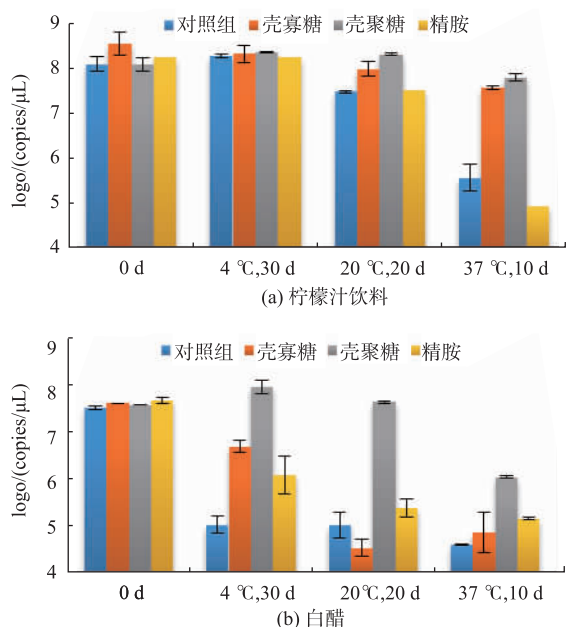


图 4 pDNA-聚阳离子复合物在酸味饮品中的稳定性

Fig. 4 Stability of pDNA-polycation complexes in sour drinks

2.2.4 在碱性饮品中的稳定性 苏打水提供的环境为核酸最稳定的弱碱性条件,因此核酸在其中的稳定性极好,在 4、20、37 °C 下长时间贮藏,外源 pDNA 的含量都几乎无变化 (图 5)。

2.3 PCR 产物-壳聚糖复合物在名贵白酒中的稳定性

基于以上结果,壳聚糖对于 DNA 在液态食品中的保护作用最强。因此本实验选取虫草酒作为代表性的名贵酒类饮品 (表 1),初步探究了成本较低

且安全性较高的 PCR 产物-壳聚糖复合物作为食品溯源内标物的应用可行性。图 6 中将含有 0.4 pg/μL PCR 产物的虫草酒在室温下贮藏 120 d 后,PCR 产物的浓度始终维持在 ~10⁶ 拷贝/μL,而未加入壳聚糖的对照组在贮藏 90 d 后 PCR 产物的含量已低于 qPCR 的检测限,造成检测的假阴性。

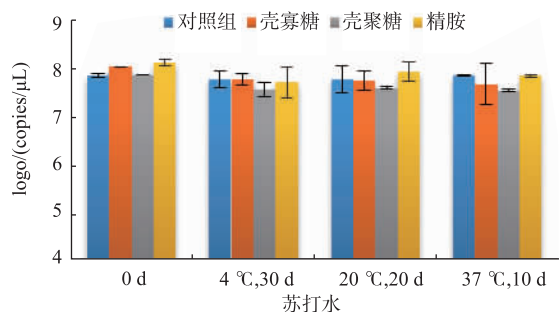


图 5 pDNA-聚阳离子复合物在苏打水中的稳定性

Fig. 5 Stability of pDNA-polycation complexes in alkaline drinks

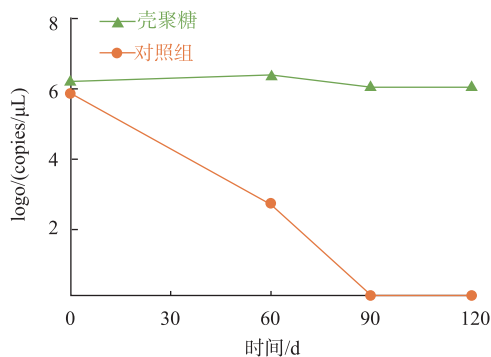


图 6 PCR 产物-壳聚糖复合物在虫草酒中的稳定性

Fig. 6 Stability of PCR products-chitosan complex in cordyceps liqueur

3 讨论

实验表明:DNA 在大部分液态食品中的稳定性较差,尤其是在酒类饮品、牛奶和酸味液态食品中,经 20 °C 贮藏 20 d 后,DNA 的含量不足最初的 1%。然而,聚阳离子化合物可在溶液中与 DNA 相互缠绕结合为复合物,通过空间包裹或静电相互作用阻碍核酸酶、自由基和质子等破坏因子对 DNA 的攻击,提高外源 DNA 在液态食品中的稳定性。使用的 3 种聚阳离子化合物中,壳聚糖对 DNA 的保护效果最好,壳寡糖其次,精胺较差。这可能是由于壳聚糖的分子量较大,其较长的链状结构易于与 DNA 链

缠绕形成较为稳定的复合物,而壳寡糖和精胺的分子尺寸较小,与 DNA 形成的复合物稳定性较差。

图 7 为 pDNA-壳聚糖复合物在不同 pH 值的液态食品中 20 °C 贮藏 20 d 后的 pDNA 拷贝数。酒类饮品的 pH 值较低,白酒的 pH 值为 3.7,葡萄酒的 pH 值为 3.1(表 2)。酸类物质为白酒中重要的呈味物质,白酒中含乳酸、乙酸、己酸和丁酸等 20 多种有机酸,总酸度为 0.6~1.5 g/L^[22]。葡萄酒的总酸度为 1.66~4.52 g/L,其中含酒石酸、苹果酸、乳酸和醋酸等^[23]。研究表明,DNA 在相同 pH 值的酸性乙醇和水中 DNA 的脱嘌呤速率差别不大^[24]。因此,外源 DNA 在白酒和葡萄酒中都会因脱嘌呤而发生较严重的降解,这可解释酸性液态食品中裸露 DNA 稳定性较差的原因。根据脱嘌呤的质子化机理^[21],聚阳离子化合物可与 DNA 的磷酸基团发生静电相互作用,从而减慢嘌呤碱的质子化反应,抑制 DNA 的脱嘌呤反应。因此,在酒类饮品中,聚阳离子化合物可能主要是通过抑制脱嘌呤反应来提高外源 DNA 的稳定性。

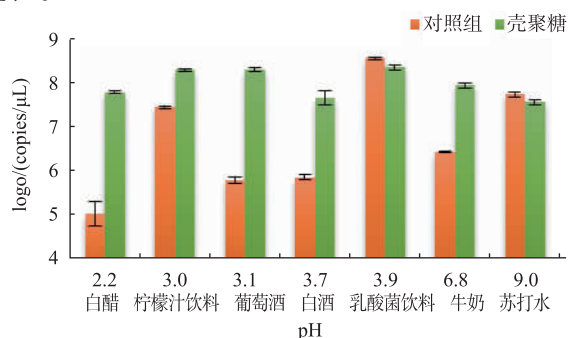


图 7 不同 pH 值对 pDNA-壳聚糖复合物稳定性的影响

Fig. 7 Stability of pDNA-chitosan complex in drinks with various pH

与酒精类饮品类似的是柠檬汁饮料和白醋,它们的 pH 值也较低,分别为 2.2 和 3.0,DNA 在其中极易发生脱嘌呤反应。研究表明,37°C 的条件下,DNA 在 pH 2.5 和 3.0 的水溶液中的脱嘌呤速率常数分别为 $7.5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 和 $2.3 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ^[21]。通过计算可得,DNA 在相同条件下 10 d 后的脱嘌呤百分比约为 99% 和 86%,因此在这两种液态食品中外源 DNA 的破坏作用主要由脱嘌呤反应引起的。

牛奶的 pH 值为 6.8,属于中性饮品,但 DNA 在

其中的稳定性较差。这可能是由于在牛奶的灭菌过程后仍有部分核酸酶保持活性,从而对 DNA 发生水解反应。壳聚糖和壳寡糖可有效抑制核酸酶的水解作用,从而大大提高牛奶中 DNA 的稳定性。乳酸菌饮料中 DNA 的稳定性较高,可能的原因是其中的牛乳蛋白大多已被水解为小片段的多肽,其中有些带有正电荷的多肽易于与 DNA 结合,从而对 DNA 起到与聚阳离子化合物相似的保护作用。

本研究选用对 DNA 保护效果最好的壳聚糖与 PCR 产物制成溯源内标物成功实现了其在虫草酒中的长期稳定存在。PCR 产物可通过对模板和引物的选择控制 DNA 的序列和来源(比如,模板可选用其他天然食品来源的 DNA),具有较高的安全性。壳聚糖无色无味,还具有调节脂类代谢、提高免疫力、抗菌抑菌及保护消化系统等多种生理作用^[25]。因此,极少量的 PCR 产物-壳聚糖内标物(<10 pM)不会影响食品的风味和口感,且安全可靠。此外,本方法无需对 DNA 进行提取,可通过直接稀释食品对 DNA 内标物进行检测,操作流程简便快捷,适用于食品溯源及防伪的快速检测。

4 结语

本研究的结果表明,外源 DNA 在多数液态食品中的稳定性较差,在保质期之内就会降解完全。壳聚糖、壳寡糖和精胺等聚阳离子化合物可大大提高 DNA 在液态食品中的稳定性,其中分子量最大的壳聚糖对 DNA 的保护效果最好,可以维持室温下大部分液态食品中外源 DNA 的含量长期保持不变。此外,由于壳聚糖为天然的多糖分子,无毒无害且具有多种生理功能,极其适合应用于食品当中。

DNA 可携带大量序列信息,在不同品牌、批次的产品中加入极少量不同序列的 DNA 就可可在不影响食品风味和品质的情况下建立信息完善的食品溯源体系。并且,由于实时荧光定量 PCR 具有高特异性、高通量检测等特点,可快速同时进行大批量产品的检测。因此,通过将 DNA-壳聚糖复合物加入到液态食品中作为食品溯源内标物具有十分广阔的应用前景。

参考文献:

[1] ABAD E, PALACIO F, NUIN M, et al. RFID smart tag for traceability and cold chain monitoring of foods: demonstration in an

- intercontinental fresh fish logistic chain[J]. **Journal of Food Engineering**, 2009, 93(4): 394-399.
- [2] CHEN R, CHEN C, YEH K, et al. Using RFID technology in produce traceability [J]. **Wseas Transactions on Information Science & Applications**, 2008, 5(11): 421-425.
- [3] HEATON M, HARHAY G, BENNETT G, et al. Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in U.S. beef cattle[J]. **Mammalian Genome**, 2002, 13(5): 272-281.
- [4] REHBEIN H, GONZALES S, PEREZ M, et al. Differentiation of sturgeon caviar by single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP)[J]. **Archiv Fur Lebensmittelhygiene**, 1999, 50(1): 13-17.
- [5] WANG Tongqiang, MA Xiaofeng, WU Youxiang. Fingerprints construction of hybrid parents in brassica napus of the series of Guiza and its utilization in hybrid purity test[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(3): 377-384. (in Chinese)
- [6] YANG Q, ZHAO S, KUCERAVA Z, et al. Validation of the 16S rDNA and COI DNA barcoding technique for rapid molecular identification of stored product psocids (Insecta: Psocodea: Liposcelididae) [J]. **Journal of Economic Entomology**, 2013, 106(1): 419-425.
- [7] 姚大伟, 杨德吉, 许家荣. 一种利用核酸检测技术鉴别白酒真伪的方法: CN, CN 101665825 A[P]. 2010.
- [8] WANG Pengfei, TAO Xianming, DONG Ping, et al. A novel and efficient primer-free DNA amplification technique for traceability of liquid food[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2014, 35(24): 167-171. (in Chinese)
- [9] NEWTON G. Effect of polyamine-induced compaction and aggregation of DNA on the formation of radiation-induced strand breaks; quantitative models for cellular radiation damage[J]. **Radiation Research**, 1997, 148(3): 272-284.
- [10] GUT I. Depurination of DNA and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry [J]. **International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes**, 1997, 169: 313-322.
- [11] D'AGOSTINO L, PIETRO M, LUCCIA A D. Nuclear aggregates of polyamines [J]. **International Union of Biochemistry & Molecular Biology Life**, 2006, 58(2): 75-82.
- [12] BOZKIR A, SAKA O. Chitosan-DNA nanoparticles: effect on DNA integrity, bacterial transformation and transfection efficiency [J]. **Journal of Drug Targeting**, 2004, 12(5): 281-288.
- [13] PLAPIED L, VANDERMEULEN G, VROMAN B, et al. Bioadhesive nanoparticles of fungal chitosan for oral DNA delivery[J]. **International Journal of Pharmaceutics**, 2010, 398(1): 210-218.
- [14] BAO J, SONG C. Assessment of protective effect of polycation on plasmid DNA attached on the metal surface by SPR [J]. **e-Polymers**, 2008, 8(1): 1441-1446.
- [15] RICHARDSON S, KOLBE H, DUNCAN R. Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA [J]. **International Journal of Pharmaceutics**, 1999, 178(2): 231-243.
- [16] D'AGOSTINO L, DI LUCCIA A. Polyamines interact with DNA as molecular aggregates[J]. **European Journal of Biochemistry**, 2002, 269(17): 4317-4325.
- [17] NAYVELT I, HYVONEN M, ALHONEN L, et al. DNA condensation by chiral α -methylated polyamine analogues and protection of cellular DNA from oxidative damage[J]. **Biomacromolecules**, 2009, 11(1): 97-105.
- [18] KHAN A, DI MASCIPO P, MEDEIROS M, et al. Spermine and spermidine protection of plasmid DNA against single-strand breaks induced by singlet oxygen[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 1992, 89(23): 11428-11430.
- [19] RIDER J, HACKER A, MACKINTOSH C, et al. Spermine and spermidine mediate protection against oxidative damage caused by hydrogen peroxide[J]. **Amino Acids**, 2007, 33(2): 231-240.
- [20] PRASHANTH K, DHARMESH S, RAO K, et al. Free radical-induced chitosan depolymerized products protect calf thymus DNA from oxidative damage[J]. **Carbohydrate Research**, 2007, 342(2): 190-195.
- [21] AN R, JIA Y, WAN B, et al. Non-enzymatic depurination of nucleic acids: factors and mechanisms [J]. **PloS one**, 2014, 9(12): e115950.
- [22] JIA Qiaohuan, REN Shigou. Influence of acids content, esters content, alcohols content on Chinese liquor[J]. **Food Engineering**, 2008(4): 12-13. (in Chinese)
- [23] SUI Zihua, LI Yan, DUAN Xuerong, et al. Study on the change rules of acids in merlot dry red grape wine during malolactic fermentation[J]. **Liquor-Making Science & Technology**, 2008(3): 53-55. (in Chinese)
- [24] LINDAHL T, NYBERG B. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid[J]. **Biochemistry**, 1972, 11(19): 3610-3618.
- [25] LU Danna, XU Li, LIU Zhengwei. Biological effects of chitosan and its metabolize research progress in vivo [J]. **China Animal Husbandry & Veterinary Medicine**, 2006, 33(8): 15-18. (in Chinese)