

可见/近红外光谱分析技术鉴别转基因番茄叶

谢丽娟, 应义斌*, 应铁进, 田海清, 牛晓颖, 傅霞萍

浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 浙江 杭州 310029

摘要 用可见/近红外光谱(Vis-NIR spectrum)漫反射方式对转基因番茄叶和非转基因番茄叶进行了快速、无损的定性分析。实验共对68个样品(转基因38个,非转基因30个)进行分类,用TQ 6.2.1光谱分析软件中集成的判别分析(Discriminant analysis)和偏最小二乘回归法(PLS)建立校正和预测模型。研究对比了不同光谱预处理方法(微分处理和多元散射校正(MSC))对分类结果的影响。实验结果发现用判别分析较最小二乘法判别结果较好,用InGaAs检测器获得的光谱经MSC后的分类结果最好,分类正确率为89.7%(转基因番茄叶86.8%,非转基因番茄叶93.3%)。结果表明VIS-NIR可以作为一种快速的无损检测方法鉴别转基因和非转基因番茄叶。

关键词 转基因番茄叶;可见/近红外光谱;分类;无损检测

中图分类号: S123 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2008)05-1062-05

引言

番茄富含类胡萝卜素、维生素C等多种营养元素,是一种极好的健康食品,深受消费者的喜爱,是世界上第二大消费最多的蔬菜,仅次于马铃薯。但是番茄仅有很短的成熟期,由于腐烂导致的损失是相当大的,因此必须想办法控制番茄的成熟。乙烯是植物控制自身生长发育、成熟衰老的5大激素之一,在水果蔬菜的成熟衰老过程中起着重要的作用。到目前为止,只有五种乙烯受体基因:ETR1(ethylene receptor 1), ETR2, EIN4(ethylene insensitive 4), ERS1(ethylene response sensor 1)以及ERS2被分离出来^[1]。两种或更多受体功能的损失就会引起一系列显型的改变,因此,每种受体在信号表达中都是起作用的^[2]。

植物分子生物学、基因工程和分子生物学的迅速发展对于提高农作物的产量和品质,增强农作物的抗逆性、延熟性、抗虫性、抗病性,增加营养成分等方面取得了长足的进步。但由于转基因农产品和食品是把一种外源基因片段转移到目的物种中,从而改变目的物种的性状,因此人们对转基因农产品、食品的安全性提出众多质疑,例如:转基因及其产物在环境中的残留;目标生物体对药物产生耐受性;增加农用化学品的使用;不可预知的转基因及其表达的不稳定性;产生超级杂草;作物营养价值下降;生物多样性下降;花粉或种子的扩散造成的遗传污染;转基因或启动子的水平

传递;转基因向微生物传递;通过重组产生新的病毒^[3-7]。消费者从自身健康考虑,提出转基因食品安全问题是非常自然的。转基因食品的安全性问题,已引发全球性争论,对转基因食品这一新生物做好安全性检测和评估是非常必要的。

对转基因食品的检测,包括聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)^[8-10]、酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assays, ELISAs)^[11,12]、生物传感器(biosensor)^[13]、Western印迹法^[14]等,而近红外光谱以其无损、快速、高效、非破坏性、无污染及无需样品预处理等特点,在食品分析、农产品、化工、纺织、化妆品及药品分析等方面得到了广泛的应用^[15]。Lowa州立大学谷物质量实验室已经成功地利用Roundup Ready大豆和传统种植的大豆光谱在910~1000 nm波长附近的一个偏移,用NIR区分Roundup Ready大豆和传统种植的大豆,并建立了数学模型,此模型对20个非Roundup Ready大豆的正确检出率为95%,而对19个Roundup Ready大豆的正确检出率为85%^[16]。芮玉奎等借助近红外光谱仪对转基因玉米及其亲本进行了识别分析,正确率达到100%^[17]。同时,他们又对转基因油菜、转基因棉花及其亲本进行了检测^[18,19]。应义斌等利用可见/近红外光谱技术,对不同的转反义基因番茄果实、番茄叶进行了分类^[20-22]。

本研究的目的就是要利用可见/近红外光谱技术,结合光谱预处理技术和化学计量学方法对转基因和非转基因番茄叶进行分类。

收稿日期:2006-11-29, 修订日期:2007-03-06

基金项目:国家自然科学基金项目(60778024)和国家科技支撑计划课题(2006BAD11A12)资助

作者简介:谢丽娟,女,1978年生,浙江大学生物系统工程与食品科学学院博士研究生 * 通讯联系人 e-mail: ybying@zju.edu.cn

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用的 38 片转基因番茄叶(导入了转反义 LeETR2 基因)和 30 片亲本由浙江大学生工食品学院食品科学系提供,从温室大棚采得后依次序做好标记,其中的 46 个样本(26 个转基因,20 个非转基因)用于建模,22 个样本(12 个转基因,10 个非转基因)用于模型预测。

1.2 实验方法

本实验所用的近红外光谱测量是通过一个专门的光纤传感系统来测定的,该系统包括一个宽波段的光源(50 W 石英卤素灯, Nicolet, 美国),一个石英光纤输出附件和固定支架。叶子平稳地放置在支架上,光源发出的光线通过入射光纤进入叶子并在叶内漫射,然后从叶内漫射出来的光从接收光纤射入进入 Nexus FTIR 光谱仪,该光谱仪配有两个检测器(Si: 670~1 110 nm; InGaAs: 800~2 630 nm)。参数设置包括光谱扫描次数(32 次),仪器分辨率(8.0 cm^{-1}),动镜速度($0.949 4 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$),光圈大小(32)。标准参考光谱是将一直径为 22 mm、高为 19 mm 的圆柱体聚四氟乙烯标准块直接置于支架上测量所得。使用 OMNIC 6.1a(Thermo Electron Corp., Madison, WI, 美国)进行光谱仪的参数设置和光谱存储。样品的光谱是对每片叶片进行两次光谱测量取平均。图 1 为测得的转基因和非转基因番茄叶的近红外漫反射原始光谱图。

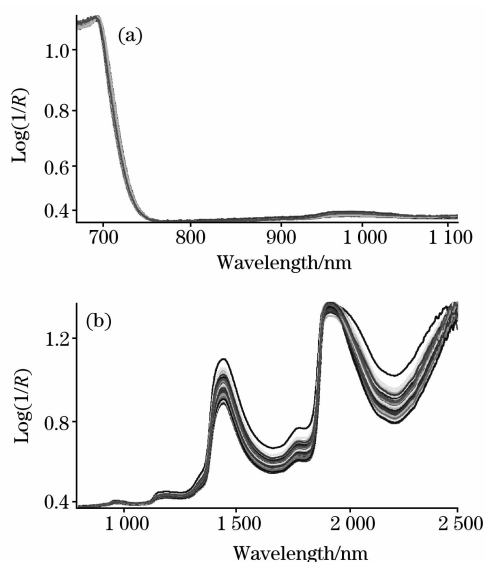


Fig. 1 Original diffuse reflectance spectra of transgenic and non-transgenic tomato leaves

(a): Si detector; (b): InGaAs detector

1.3 光谱处理和数据分析

商用的软件包 TQ Analyst v6.2.1(Thermo Nicolet Corporation, Madison, WI, USA)被用来对光谱数据进行预处理和分类。由于傅里叶变换近红外光谱仪的信噪比较高,能达到 10^4 以上,其光谱误差主要是系统误差,可以通过对光

谱数据求预处理的方法来消除或减少^[23]。同时,光谱受分析物化学成分浓度和物理特性(颗粒大小和分布)的影响,而光谱的变化主要受分析物物理特性的影响,化学成分浓度对光谱的影响相对较小。因此需要进行光谱预处理以减小散射的影响,提高化学成分的贡献^[24]。本次研究对原始光谱进行多元散射校正(MSC),然后分别进行一次和二级的微分,再将原始光谱和预处理后的光谱分别进行判别分析和最小二乘回归判别分析,从而对转基因和非转基因番茄叶进行分类。

2 结果与讨论

2.1 光谱差异

图 2 是将 38 片转基因番茄叶和 30 片非转基因番茄叶的原始光谱进行平均后获得的光谱。图 1 不能观察到明显的光谱差异,化学成分的差异也很难用肉眼观察出来。但是光谱平均之后光谱的差异就很明显了,特别是使用硅检测器所得的光谱图,整个转基因番茄叶子的吸光度值小于非转基因番茄叶子的吸光度值。但是在 1 380 nm 后趋势有所改变,也就是在 C—H 基的二级、三级和四级倍频区域,转基因番茄叶的吸光度值小于非转基因番茄叶的,而在 C—H 键伸缩振动的一级倍频吸收区和伸缩振动、弯曲振动的合频吸收带,趋势刚好相反。这可能是:1)由于导入了 LeETR2 的部分反义序列,从而导致了叶片内乙烯信号感受与转导系统的改变;2)由于能促进与成熟相关基因的形成和转化,其中包括与细胞壁衰老和类胡萝卜素生物合成等有关的基因^[25],因此,叶片所含的含量如类胡萝卜素可能改变。但是在 1 933 nm 波段,转基因番茄叶子的峰值却高于非转基因的。因此,尽管

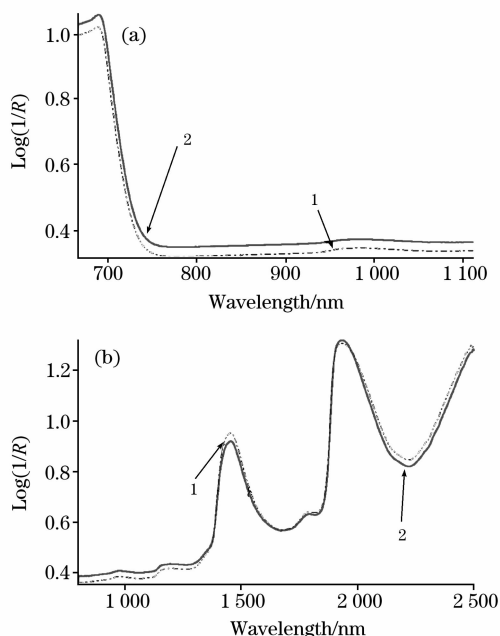


Fig. 2 The average raw spectra of transgenic and non-transgenic tomato leaves

(a): Si detector; (b): InGaAs detector

1: Transgenic tomato leaves; 2: Non-transgenic tomato leaves

近红外漫反射光谱相当复杂,但是两个样品之间的光谱差异提供了定性和定量分析的信息。

2.2 判别分析

判别分析是在主成分分析的基础上进行的,利用 TQ Analyst v6.2.1 提取了各个光谱的前 10 个主成分。对于利用硅检测器得到的光谱,其前 10 个主成分的累计贡献率为 99.965%,对于利用 InGaAs 检测器得到的光谱,其前 10 个主成分的累计贡献率为 99.944%。表 1 是利用硅检测器获得的光谱的分类错误个数,从表中可以看出,多元散射校正较其它方法的分类错误个数少。总共有 8 个样品被错误分类(转基因 3 个,非转基因 5 个),正确率为 88.2%(转基因 92.1%,非转基因 83.3%)。校正集中有 2 个转基因样品和 3 个非转基因样品被错误分类,而预测集中分别有 1 个转基因样品和 2 个非转基因样品分类错误。特别是多元散射校正与一阶、二阶导数一起处理数据时,错判率很高。

Table 1 Number of misclassification (Si detector)

	校正集		预测集	
	转基因	非转基因	转基因	非转基因
原始	3	1	1	4
一阶导数	9	8	4	7
二阶导数	10	9	4	5
MSC	2	3	1	2
MSC+一阶导数	10	6	2	6
MSC+二阶导数	8	10	8	5

表 2 是利用 InGaAs 检测器获得的光谱的分类错误个数,从表中可以看出,多元散射校正较其它方法的分类错误个数少。总共有 7 个样品被错误分类(转基因 5 个,非转基因 2 个),正确率为 89.7%(转基因 86.8%,非转基因 93.3%)。校正集中有 3 个转基因样品和 1 个非转基因样品被错误分类,而预测集中分别有 2 个转基因样品和 1 个非转基因样品分类错误。

Table 2 Number of misclassification (InGaAs detector)

	校正集		预测集	
	转基因	非转基因	转基因	非转基因
原始	4	2	3	2
一阶导数	3	4	2	4
二阶导数	4	5	3	0
MSC	3	1	2	1
MSC+一阶导数	4	3	2	2
MSC+二阶导数	4	3	1	0

图 3 和图 4 是 MSC 预处理数据后每个样品到两类的距离图。图 3 是使用硅检测器得到的结果,图 4 是使用 InGaAs 检测器得到的结果。图 3 中有个异常点,而图 4 中没有,这个结果跟图 1 中 a 没有,而 b 中有条光谱的吸光度值比其余光谱的高的结果一致,这个异常点可能是操作误差引起的。

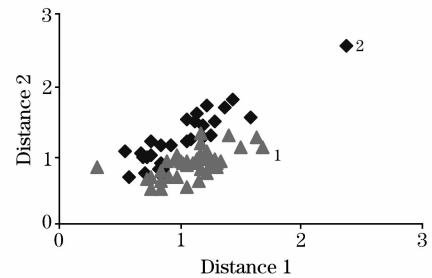


Fig. 3 Classification of transgenic and non-transgenic samples using DA method (Si detector)

1: Transgenic samples; 2: Non-transgenic samples

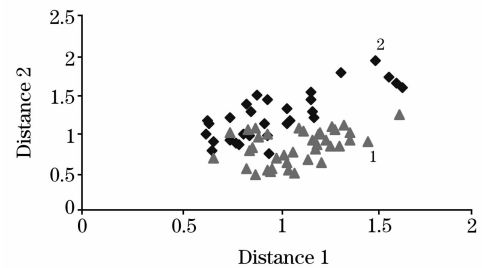


Fig. 4 Classification of transgenic and non-transgenic samples using DA method (InGaAs detector)

1: Transgenic samples; 2: Non-transgenic samples

2.3 最小二乘法判别

表 3 和表 4 是用最小二乘法获得的分类错误个数结果。从表 3 可以看出,使用硅检测器时转基因番茄叶的分类正确率较高,范围是 86.8%(33/38)到 97.4%(37/38)。非转基因番茄叶的分类正确率相对差一些,从 46.7%(14/30)到 80%(24/30)。数据经过一阶求导预处理或经过多元散射校正和一阶求导后得到的模型较好。从表 4 可以看出,使用 InGaAs 检测器时转基因番茄叶的分类正确率范围是 81.6%(31/38)到 92.1%(35/38)。非转基因番茄叶的分类正确率范围是 46.7%(14/30)到 93.3%(28/30)。数据经过多元散射校正和二阶求导后得到的模型较好。使用不同检测器所得到的分类正确率不同,这可能是因为在 InGaAs 检测器所对应波段的光谱数据中隐含的对区别转基因和非转基因番茄叶的敏感信息较多而使得判断结果更准确。

Table 3 Number of misclassification (Si detector)

	校正集		预测集	
	转基因	非转基因	转基因	非转基因
原始	2	8	2	8
一阶导数	0	4	1	3
二阶导数	0	6	1	7
MSC	3	6	2	3
MSC+一阶导数	0	3	2	3
MSC+二阶导数	0	4	2	8

Table 4 Number of misclassification (InGaAs detector)

	校正集		预测集	
	转基因	非转基因	转基因	非转基因
原始	2	10	1	6
一阶导数	2	4	4	1
二阶导数	4	1	3	1
MSC	3	5	2	4
MSC+一阶导数	3	4	3	1
MSC+二阶导数	3	1	3	1

3 结 论

本研究利用不同检测器(Si: 670~1 110 nm; InGaAs: 800~2 630 nm)在可见/近红外光谱范围内,结合光谱预处理和化学计量学方法,对转基因番茄叶和非转基因番茄叶进行了分类。实验共有 68 个番茄叶样品,其中 46 个样品用来建模,22 个用来预测。使用判别分析和最小二乘法进行分

类。实验结果发现用判别分析较最小二乘法判别结果好,对于配有硅检测器的光谱仪获得的光谱,用多元散射校正总共有 8 个样品被错误分类(转基因 3 个,非转基因 5 个),正确率为 88.2%(转基因 92.1%,非转基因 83.3%)。校正集中有 2 个转基因样本和 3 个非转基因样本被错误分类,而预测集中分别有 1 个转基因样本和 2 个非转基因样本分类错误。对于配有 InGaAs 检测器的获得的光谱,多元散射校正较其它方法的分类错误个数少。总共有 7 个样品被错误分类(转基因 5 个,非转基因 2 个),正确率为 89.7%(转基因 86.8%,非转基因 93.3%)。校正集中有 3 个转基因样本和 1 个非转基因样本被错误分类,而预测集中分别有 2 个转基因样本和 1 个非转基因样本分类错误。

结果表明 NIR 光谱分析技术可以作为一种可靠、准确、快速的无损检测方法来分类转基因番茄叶和非转基因番茄叶。进一步的实验可以将样品量扩大,并用于分类转基因和非转基因番茄果实上。

参 考 文 献

- [1] Jack Q Wilkinson, Michael B Lanahan, Hsiao-Ching Yen, et al. Science of the United States of America, 1995, 270: 1807.
- [2] Wang W, Hall A E, O'Malley R, et al. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003, 100: 352.
- [3] ZHU Zhen, LIU Xiang(朱 祯, 刘 翔). Journal of Agricultural Biotechnology(农业生物技术学报), 2000, 8(1): 1.
- [4] Andow D A, Zwahlen C. Ecology Letters, 2006, 9(6): 196.
- [5] Anil K Deisingh, Neela Badrie. Food Research International, 2005, 38: 639.
- [6] Sand P H. Review of European Community and International Environmental Law, 2006, 15(2): 185.
- [7] Anil K, Neela B. Food Research International, 2005, 38: 639.
- [8] Taverniers I, Van Bockstaele E, De Loose M. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2004, 378(5): 1198.
- [9] Hubner P, Studer E, Luthy J. Food Control, 1999, 10(6): 353.
- [10] Zimmermann A, Lüthy J, Pauli U. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie, 2000, 33(3): 210.
- [11] Brunnert H-J, Spener F, Borchers T. European Food Research and Technology, 2001, 213(4-5): 366.
- [12] Liu G, Su W, Xu Q, et al. Food Control, 2004, 15(4): 303.
- [13] Mannelli I, Minunni M, Tombelli S, et al. IEEE Sensors Journal, 2003, 3(4): 369.
- [14] Rogan G J, Dudin Y A, Lee T C, et al. Food Control, 1999, 10: 407.
- [15] LIU Yan-de, YING Yi-bin(刘燕德, 应义斌). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(8): 1454.
- [16] Sylvie A Roussel, Connie L Hardy, Charles R Hurburgh, et al. Applied Spectroscopy, 2001, 55(10): 1425.
- [17] RUI Yu-kui, LUO Yun-bo, HUANG Kun-lun, et al(芮玉奎, 罗云波, 黄昆仑, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(10): 1581.
- [18] RUI Yu-kui, HUANG Kun-lun, WANG Wei-min, et al(芮玉奎, 黄昆仑, 王为民, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(12): 2190.
- [19] RUI Yu-kui, HUANG Kun-lun, TIAN Hui-qin, et al(芮玉奎, 黄昆仑, 田惠琴, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(1): 35.
- [20] Xie L, Ying Y, Ying T, et al. Analytica Chimica Acta, 2007, 584: 379.
- [21] Xie L, Ying Y, Ying T. J. Food Engineering, 2007, 80: 395.
- [22] Xie L, Ying Y, Ying T. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55: 4645.
- [23] YAN Yan-lu, ZHAO Long-lian, HAN Dong-hai, et al(严衍禄, 赵龙莲, 韩东海, 等). Fundamental and Application of Near Infrared Spectroscopy Analysis(近红外光谱分析基础与应用). Beijing: China Light Industry Press(北京: 中国轻工业出版社), 2005. 147.
- [24] Marie E Lafargue, Max Feinber, Jean-Jacques Daudin, et al. J. Near Infrared Spectrosc., 2003, 11: 109.
- [25] Lister S J, Dhanoa M S, Stewart J L, et al. Animal Feed Science and Technology, 2000, 86: 221.

Application of Vis/NIR Diffuse Reflectance Spectroscopy to the Detection and Identification of Transgenic Tomato Leaf

XIE Li-juan, YING Yi-bin* , YING Tie-jin, TIAN Hai-qing, NIU Xiao-ying, FU Xia-ping

College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China

Abstract The feasibility of Vis/NIR spectroscopy technique for rapid and non-invasive detection of transgenic tomato leaves from conventional ones was investigated by means of spectral diffuse reflectance mode. A total of 68 samples (38 transgenic ones and 30 non-transgenic ones) were used for classification. The calibration and validation results were analyzed via discriminant analysis (DA) and partial least squares (PLS) discriminant method using TQ 6.2.1 quantitative software. Models based on the different spectral pre-processing methods (multiplicative signal correction (MSC), first and second derivative) were compared. It was found that the classification accuracy using DA was higher than that using PLS and the best results were gained by using spectra after MSC with InGaAs detector and the classification accuracy was 89.7% (accuracy of 86.8% for transgenic samples and 93.3% for non-transgenic ones). The results show that Vis-NIR diffuse reflectance spectroscopy technique is a feasible and fast method for non-invasive detection of transgenic and non-transgenic tomato leaves.

Keywords Transgenic tomato leaf; Vis/NIR spectroscopy; Classification; Non-invasive detection

(Received Nov. 29, 2006; accepted Mar. 6, 2007)

* Corresponding author