

多重荧光 PCR 鉴别羊肉掺假

杨冬燕^{1*}, 韦梅霞², 杨永存¹, 李浩¹, 邓平建¹

(1. 深圳市疾病预防控制中心, 深圳 518055; 2. 桂林医学院, 桂林 450300)

摘要: **目的** 建立可同时检测掺入羊肉中的猪、马、牛、鸭成分的多重荧光 PCR 检测体系。**方法** 配制掺入猪、马、牛、鸭源性成分的模拟羊肉掺假样品, 掺假比例 17%~45%。筛选特异性强、敏感度高的猪、马、牛、鸭物种特异性基因, 优化反应体系, 建立了针对猪、牛、马、鸭两两配对的两重荧光 PCR 检测体系和其中 3 个任意组合的三重荧光 PCR 检测体系。**结果** 模拟羊肉掺假样品两重荧光 PCR 检测结果显示, 包括单个成分掺入比例低至 7% 的样品, 其检测准确率为 100%。而三重荧光 PCR 检测同时检测猪、牛、马、鸭四种肉品中的 3 种, 其中猪肉、牛肉和马肉的掺假比例均为 8%~15%; 鸭牛肉掺假比例为 5%~10%。三重荧光 PCR 检测结果显示, 所有掺假样品中的各种掺假组分都被准确检出。**结论** 本研究建立的多重荧光 PCR 检测体系能准确检出配制的模拟掺假羊肉制品中的猪、马、牛、鸭成分, 可进一步研究以应用于市场肉制品及加工肉制品掺假的检测。

关键词: 羊肉; 掺假; 多重荧光 PCR

Identification of mutton adulteration by multiplex fluorescent PCR

YANG Dong-Yan^{1*}, WEI Mei-Xia², YANG Yong-Cun¹, LI Hao¹, DENG Ping-Jian¹

(1. Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518055, China; 2. Guilin Medical College, Guilin 450300, China)

ABSTRACT: Objective To establish multiplex fluorescent polymerase chain reaction (PCR) system, and simultaneously detect pig, horse, cattle and duck meat mixed in mutton. **Methods** Mutton samples were mixed with 17%~45% pig, horse, cattle and duck meat. The specific species genes were selected with good specificity and sensitivity to form random duplex and triplex fluorescent PCR detection system for pig, cattle, horse and duck. **Results** The duplex fluorescent PCR system could identify single added component as low as 7% for 100% accuracy. The triplex fluorescent PCR system could identify 8%~15% pig, cattle, horse and 5%~10% duck in any combination for 100% accuracy. **Conclusion** The established multiplex fluorescent PCR system can detect pig, horse, cattle and duck meat mixed in prepared mutton samples accurately. It can be further researched to application in market meat and processed meat adulteration detection.

KEY WORDS: mutton; adulteration; multiplex fluorescent PCR

基金项目: 深圳市医疗卫生类科研项目(201302149)

Fund: Supported by Shenzhen Medical Research Project (201302149).

*通讯作者: 杨冬燕, 硕士, 主任技师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: szyang6699@126.com

*Corresponding author: YANG Dong-Yan, Master, Director Senior Technician, Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, No 8 Longyuan Road, Longzhu Avenue, Shenzhen 518055, China. E-mail: szyang6699@126.com

1 引言

肉类食品安全是世界范围面临的共同问题。去年涉及 16 个欧洲国家的“马肉风波”震惊整个欧洲。欧盟素以严格的食品安全制度著称, 尚未能阻止“马肉事件”的发生, 国人不禁对我国的肉类食品安全更增加了几分担忧。在我国, “挂羊头卖狗肉”的肉类掺假掺杂事件近年来曾被媒体多次曝光。不法企业使用相对廉价的马肉、猪肉、鸭肉等肉类原料, 通过各种手段的加工, 冒充牛肉、羊肉制品进行销售以谋取不当利益, 从而严重侵犯消费者的合法权益。

传统的依靠感官与经验的肉类形态学鉴别手段已远不能满足对肉类食品掺假进行控制和监管的需求^[1]。自从 Tartaglia^[2]首先报道了用 PCR 方法检测饲料中的牛、羊源性成分至今, 聚合酶链式反应(PCR)技术的快速发展使其成为食品中肉类种属鉴定的核心方法^[3-5]。尽管大量研究报道了应用 PCR 及荧光 PCR 方法可以对多种肉类本质进行鉴别^[6-8], 但由于不法分子制售的伪劣肉制品可能掺入猪肉、马肉、骆驼肉、鸭肉、狗肉、鸡肉等肉品中的 1 种或多种, 且不固定, 这给每次只针对 1 个靶标基因进行扩增的常规普通 PCR 及荧光 PCR 检测带来诸多不便, 往往需要针对不同物种基因扩增多次才能确定样品所含的涉假成分, 尽管如此, 由于尝试几次找不到靶标对象而出现假阴性的错误时有发生。

本研究针对掺假事件频发的羊肉制品, 采用多重荧光 PCR 技术, 通过一次 PCR 反应同时扩增掺入的猪、马、牛、鸭源性基因中的 2 个或 3 个靶标 DNA。该方法的建立将有效缩短和简化羊肉制品掺假检测的步骤, 并显著提高检测的准确性。

2 材料与方 法

2.1 样 品

本研究样品为多种禽畜类动物的肌肉组织, 包括羊肉、猪肉、鸭肉、牛肉和马肉, 由深圳市动物检疫所友情提供。模拟掺假肉制品由多种肉类按重量百分比配比混合而成, 包括以下 2 类: (1)在羊肉中掺入猪肉、鸭肉、牛肉和马肉中的 2 种, 这类样品共 12 个, 编号分别为 YD01-YD12, 总掺假比例 17%~45%; (2)在羊肉中掺入猪肉、鸭肉、牛肉和马肉中的 3 种, 这类样品共 8 个, 编号分别为 YT01-YT08, 总掺假比

例 26%~35%。模拟掺假样品具体配制信息见表 1。

表 1 模拟羊肉掺假样品的配制信息
Table 1 The preparing information of simulated mutton adulteration samples

编号	各种肉品掺入比例(%)				总掺假比例(%)
	猪	牛	马	鸭	
YD01	7	10	—	—	17
YD02	8	—	12	—	20
YD03	25	—	—	20	45
YD04	—	15	10	—	25
YD05	—	15	—	10	25
YD06	—	—	10	10	20
YD07	10	15	—	—	25
YD08	10	—	15	—	25
YD09	10	—	—	10	20
YD10	—	12	15	—	27
YD11	—	10	—	8	18
YD12	—	—	20	10	30
YT01	10	10	15	—	35
YT02	8	15	—	5	28
YT03	10	—	8	8	26
YT04	—	8	15	10	33
YT05	15	8	8	—	31
YT06	10	14	—	6	30
YT07	15	—	10	7	32
YT08	—	10	10	6	26

注: “—”表示该样品不含此成分。

2.2 仪器与试剂

主要仪器包括荧光 PCR 仪(ABI7500, 美国)和核酸蛋白分析仪(Eppendorf, 德国)。核酸提取试剂由上海生物工程公司提供; Taq DNA 聚合酶(TAKARA, 大连), 引物探针来源及序列信息见表 2, 由大连宝生物公司合成, 探针报告基团标记包括 JOE, FAM 及 CY5, 淬灭基团为 TAMRA。

2.3 DNA 提取

用电子天平按比例称取各物种动物肌肉组织, 分别加入同一 2 mL EP 管, 使样品总量达到 100 g, 然后加入细胞裂解缓冲液(提取试剂之一)和磁珠, 用

表 2 荧光 PCR 引物和探针序列信息
Table 2 Primer and probe sequence information for fluorescence PCR

引物、探针名称	引物序列(5'-3')	片段大小(bp)	序列信息来源文献
猪源性基因	正向引物: AAAGGACTTGGCGGTGCTT 反向引物: GTTACGACTTGTCTCTTCGTGCA 探针: TAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATAAAACCCCG	411	[9]
牛源性基因	正向引物: AAAGGACTTGGCGGTGCTT 反向引物: TGGTTTCATAATAACTTTCGCGCT 探针: TAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATAAAACCCCG	252	[9]
马源性基因	正向引物: TGTAGCCCTAGCCGTGCGGCTAACC 反向引物: TAGGATGATAAACGTAATAAGGGCTG 探针: CGCCGGACACCTCCTAATACACCTC	120	[10]
鸭源性基因	正向引物: CACGAAGCCCCATTTTCAAT 反向引物: TCCGGTGGCGACAAAGA 探针: CCGACAGCGTCTACGGCTCCACC	80	[11]

生物组织破碎仪破碎后, 按照参考文献^[12]中的动物组织基因组 DNA 提取方法进行基因组 DNA 提取。

2.4 核酸纯度及浓度测定

提取的样品 DNA 浓度及纯度采用核酸蛋白分析仪, 以紫外分光光度法测定。核酸提取液 DNA 浓度 30 ~ 50 ng/ μ L, A260/A280 的比值介于 1.8 ~ 1.9, A260/A230 的比值大于 2.0 的核酸提取液用于后续 PCR 扩增。

2.5 荧光 PCR 反应体系

两重和三重荧光 PCR 反应体系中每种试剂浓度相同, 三重 PCR 体系中只是增加了 2 条引物和 1 对探针, 并相应调整去离子水的用量。25 μ L 荧光 PCR 反应体系中含 10 \times PCR Buffer 2.5 μ L; MgCl₂(25 mmol/L)3 μ L; dNTP (10 mmol/L)按体积比 1:1:1:1 混合, 共 5 μ L; 引物 (30 μ mol/L)每条 1 μ L; 探针(30 μ mol/L)每条 0.3 μ L; Taq 酶(5 U/ μ L) 1 μ L; DNA 模板(30 ~ 50 ng/ μ L)9 μ L。

2.6 荧光 PCR 扩增条件

荧光 PCR 扩增条件设置为 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s、60 $^{\circ}$ C 34s, 40 个循环。

2.7 荧光 PCR 质量控制

每个样品的荧光 PCR 检测均设置平行样品, 扩增 Ct 值取 2 个平行样的 Ct 值均值, 多重荧光 PCR 扩增以每个扩增靶标相应物种的样品 DNA 提取物为阳性对照, 以去离子蒸馏水作为荧光 PCR 扩增的空白对照。

3 结果

3.1 试验条件优化

本研究在进行多重荧光 PCR 检测之前, 首先在单重荧光 PCR 检测条件下对于 4 个靶标片段的灵敏度和特异性进行验证, 然后通过调整 PCR 扩增体系中的 Mg²⁺、dNTP 及引物、探针浓度比例和 PCR 扩增条件, 通过大量优化和验证, 最终选定上述荧光 PCR 反应体系和扩增条件。

3.2 模拟羊肉掺假样品的两重荧光 PCR 扩增结果

本研究用于两重 PCR 检测的模拟羊肉掺假样品分别掺入猪、牛、马、鸭中的 2 种成分, 样品总掺假在 17%~45%之间, 其中猪肉掺假比例为 7%~25%; 牛肉掺假比例为 10%~15%; 马牛肉掺假比例为 10%~20%; 鸭牛肉掺假比例为 8%~20%。两重荧光 PCR 同时扩增 2 种被掺入肉品相应物种源性的基因片段, 各扩增靶标片段的 Ct 值见表 3, 其实时扩增曲线见图 1 和图 2。

3.3 模拟羊肉掺假样品的三重荧光 PCR 扩增结果

本研究用于三重 PCR 检测的模拟羊肉掺假样品分别掺入猪、牛、马、鸭中的 3 种成分, 样品总掺假在 26%~35%之间, 其中猪肉、牛肉和马肉的掺假比例均为 8%~15%; 鸭牛肉掺假比例为 5%~10%。三重荧光 PCR 同时扩增 3 种被掺入肉品相应物种源性的基因片段, 各扩增靶标片段的 Ct 值见表 4, 其实时扩增曲线见图 3。

表 3 模拟羊肉掺假样品的两重荧光 PCR 扩增 Ct 值
Table 3 The Ct values by duplex fluorescent PCR of simulated mutton adulteration samples

样品编号	各物种特异性基因扩增 Ct 值			
	猪	牛	马	鸭
YD01	24.86	22.07	—	—
YD02	22.45	—	19.43	—
YD03	18.11	—	—	9.19
YD04	—	19.36	15.68	—
YD05	—	20.45	—	13.25
YD06	—	—	15.14	12.22
YD07	20.43	19.45	—	—
YD08	21.77	—	17.68	—
YD09	21.49	—	—	12.53
YD10	—	21.42	18.44	—
YD11	—	22.78	—	14.29
YD12	—	—	13.57	12.86

注：“—”表示该样品不含此成分，没有针对该物种基因片段的扩增。

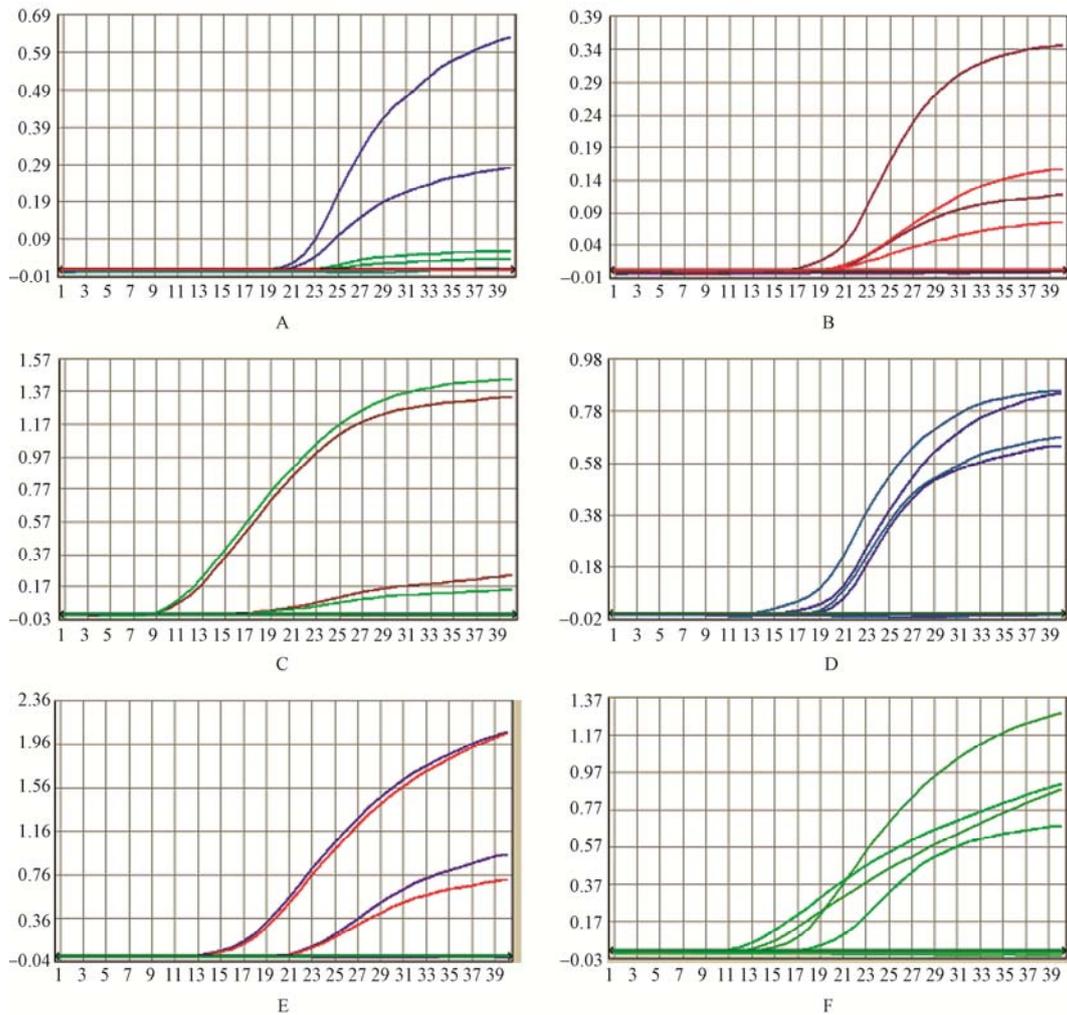


图 1 YD01~YD06 模拟羊肉掺假样品荧光 PCR 实时扩增曲线图(A-F 依次为 YD01~YD06)

Fig. 1 The duplex fluorescent amplification curves of the samples No YD01~YD06

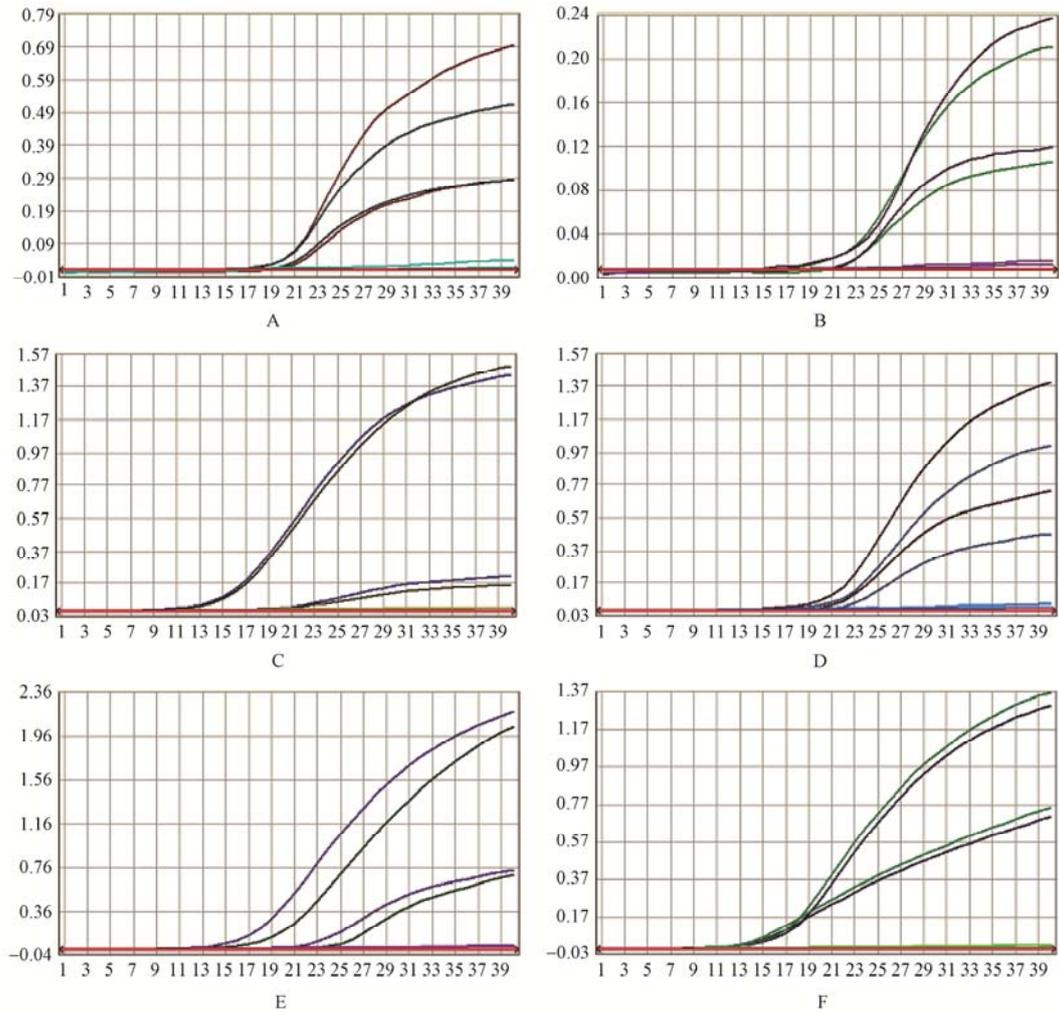


图 2 YD07~YD12 模拟羊肉掺假样品荧光 PCR 实时扩增曲线图(A-F 依次为 YD07~YD12)

Fig. 2 The duplex fluorescent amplification curves of the samples No YD07~YD12

表 4 模拟羊肉掺假样品的三重荧光 PCR 扩增 Ct 值

Table 4 The Ct values by triplex fluorescent PCR of simulated mutton adulteration samples

样品编号	各物种特异性基因扩增 Ct 值			
	猪	牛	马	鸭
YT01	20.22	17.26	13.47	—
YT02	22.41	19.15	—	15.77
YT03	21.39	—	14.56	14.25
YT04	—	15.69	13.42	13.23
YT05	17.25	15.74	15.18	—
YT06	21.63	19.49	—	15.53
YT07	17.78	—	15.77	15.14
YT08	—	17.86	15.83	15.61

注 “—”表示该样品不含此成分, 没有针对该物种基因片段的扩增。

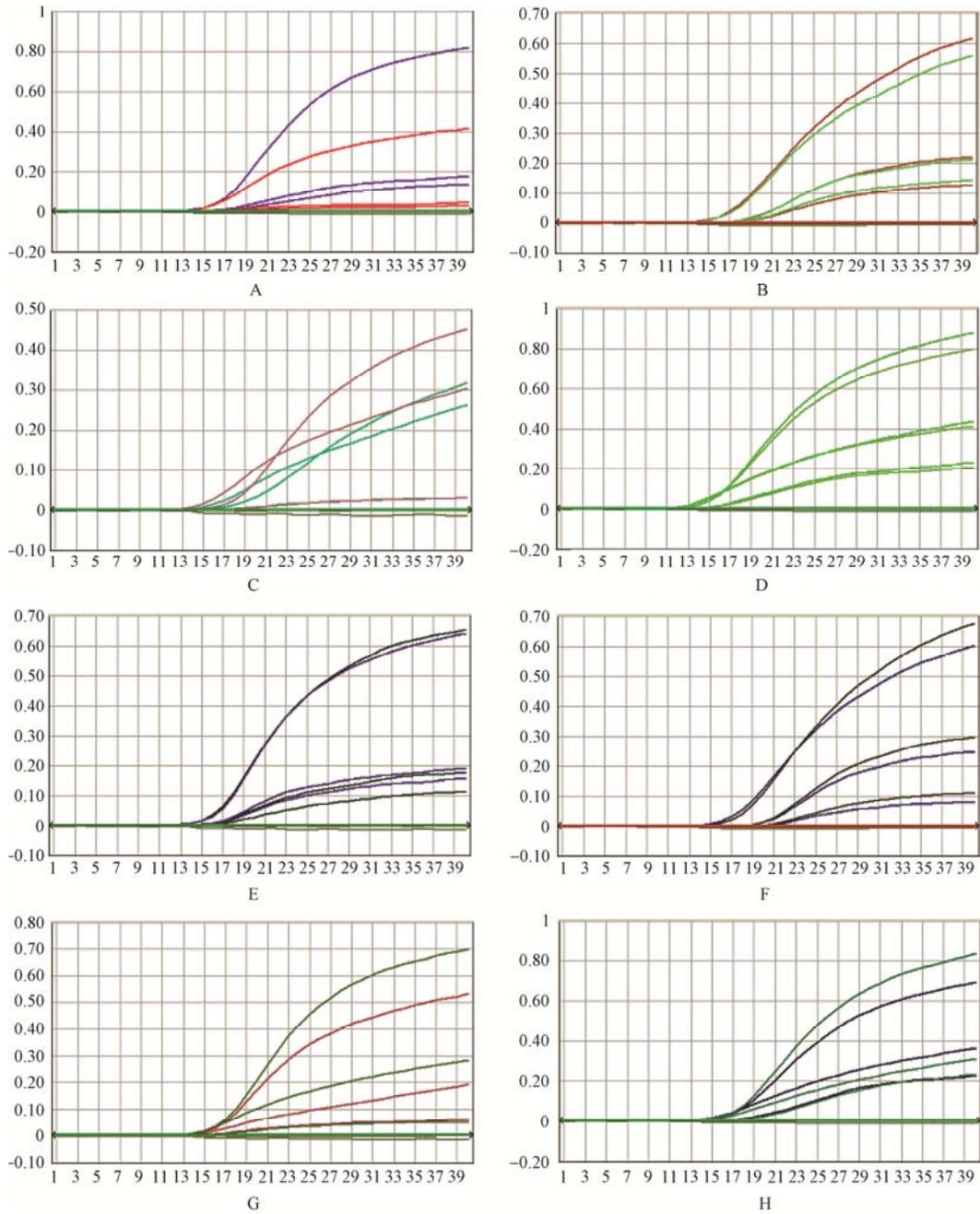


图 3 模拟羊肉掺假样品的三重荧光 PCR 实时扩增曲线图(A-H 依次为 YT01~YT08)

Fig. 3 The triplex fluorescent amplification curves of the samples No YT01~YT08

4 讨论

4.1 肉类掺假的核酸检测技术比较

目前, 基于 PCR 和实时荧光 PCR 方法检测肉制品中的动物源性成分已经得到了较多的关注^[13-15], 国内也已经建立一系列采用核酸方法进行种属鉴别的国家标准和行业标准。但这些方法大多为普通 PCR 方法, 该方法操作简单、成本低, 且通过电泳片段回

收测序进行结果确认所需要的时间较长。与普通相比, 实时荧光 PCR 技术在特异性、灵敏度和准确性方面均显示了巨大优势。然而, 普通 PCR 和荧光 PCR 针对 1 个靶标基因进行扩增, 对于可能混杂多种其他肉品或检测人员尚不明确掺入何种涉假肉品的情况下, 应用普通 PCR 和实时荧光 PCR 检验掺假肉制品往往显得力不从心。本研究首次建立了针对猪、牛、马、鸭两两配对的两重荧光 PCR 检测体系和其中 3 个任

意组合的三重荧光 PCR 检测体系, 同时检测样品中掺入的猪、牛、马、鸭 4 种肉品中的 2 种或 3 种。与通过单重 PCR 检测以上靶标基因相比, 两重和三重荧光 PCR 检测效率显著提高。

4.2 靶标基因扩增片段的选择

特异性物种基因的选择是动物源性成分核酸检测技术的关键, 而多重荧光 PCR 由于同时扩增同一反应体系中的多个靶标基因, 因此对靶标基因的选择有更高的敏感性要求。本研究从近年来报道的大量用于饲料中动物源性成分溯源及肉制品掺假鉴别研究中, 筛选出经过严格的特异性和敏感度验证试验的猪、牛、马、鸭物种特异性基因^[6-8]。此外, 由于掺假肉制品可能是经过加工的、其核酸被一定程度降解的半熟或熟肉制品, 其核酸片段结构不完整, 因此, 本研究选择的四种动物源性基因的扩增靶标片段均小于 450 bp, 从而保证了加工肉制品检测的敏感性需求。

4.3 检测结果灵敏度和准确性分析

本研究所建立的扩增体系中, 由于猪、牛、马、鸭 4 种成分扩增的靶标序列的灵敏度和拷贝数的差异, 致使相同含量的各成分的扩增 Ct 值不同。例如, 同样是含量 10% 的猪、牛、马、鸭的扩增 Ct 值分别为 21.77(YD08), 21.42(YD11), 15.68(YD04) 和 12.22(YD06)。可见鸭源性成分扩增敏感度最高, 而猪、牛成分扩增敏感度较低。因此, 通过不同靶标序列扩增 Ct 值无法比较各成分在样品中的含量。然而, 不同样品中针对同一扩增靶标的扩增 Ct 值与样品含量具有一致性, 例如, 对于掺假成分不同的各个样品中的猪源性成分, 含量从 7% 到 25%, 其扩增从 24.86 降至 18.11, 且对于另外三种成分也具有相同的规律性, 提示不同样品基质对扩增效率影响较小。

尽管 4 种低价肉品的扩增灵敏度有差异, 然而, 对于本研究所有掺假样品, 无论两重还是三重荧光 PCR 检测均准确检出模拟羊肉掺假制品中的猪、牛、马、鸭成分, 定性检测准确率为 100%。猪、牛、马、鸭成分的最低检出含量分别为 7%, 8%, 8% 和 5%。考虑到一方面含量过低可能造成混样均一性的困难; 另一方面, 掺假含量过低致使在实际掺假非法活动中获利微薄, 因此实际应用价值较小, 本研究没有对含量更低的样品进行测试。

本研究建立的两重和三重荧光 PCR 检测体系,

可以准确检出模拟羊肉掺假制品中的猪、牛、马、鸭成分。基于此, 课题组今后将进一步探索该方法在加工肉制品及市场肉制品检测方面的研究和应用。

参考文献

- [1] 何玮玲, 黄明, 张弛. 食品中肉类成分种属鉴别技术研究进展 [J]. 食品科学, 2012, 33(3): 304-307.
He WL, Huang M, Zhang C. Recent technological advances for identification of meat species in food products [J]. Food Sci, 2012, 33(3): 304-307.
- [2] Tartaglia M, Saulle E, Pestalozza S, *et al.* Detection of bovine mitochondrial DNA in ruminant feeds: a molecular approach to test for the presence of bovine-derived materials [J]. J Food Protect, 1998, 61(5): 513-518.
- [3] Yin RH, Bai WL, Wang JM, *et al.* Development of an assay for rapid identification of meat from yak and cattle using polymerase chain reaction technique [J]. Meat Sci, 2009, 83(1): 38-44.
- [4] Fujimura T, Tanabe S, Mormatsu F, *et al.* Specific discrimination of chicken DNA from other poultry DNA in processed foods using the polymerase chain reaction [J]. Biotechnol Biochem, 2008, 72(3): 909-913.
- [5] Nagappa SK, Singh SP, Deepak K, *et al.* Development and application of highly specific PCR for detection of chicken (*Gallus gallus*) meat adulteration [J]. Eur Food Res Technol, 2013, 236(1): 129-134.
- [6] Girish PS, Anjaneyulu ASR, Bhilegaonkar KN, *et al.* Molecular detection of meat adulteration: a review [J]. Indian Food Ind, 2005, 24(4): 60-64.
- [7] Soares S, Amaral JS, Mafra I, *et al.* Quantitative detection of poultry meat adulteration with pork by a duplex PCR assay [J]. Meat Sci, 2010, 85(3): 531-536.
- [8] Ballin NZ, Vogensen FK, Karlsson AH. Species determination—Can we detect and quantify meat adulteration? [J]. Meat Sci, 2009, 83(2): 165-174.
- [9] López-Calleja I, González I, Fajardo V, *et al.* Real-time TaqMan PCR for quantitative detection of cows' milk in ewes' milk mixtures [J]. Int Dairy J, 2007, 17 (7): 729-736.
- [10] 曹琛福, 宗卉, 刘建利, 等. 马或马源性成分实时荧光 PCR 检测方法 & 检测用引物和探针: 中国, 201110255658[P] [2012-01-11]. <http://www.apchina.com/zhuanli/7051815/>
Cao CF, Zong H, Liu JL, *et al.* The method and the primers and probes used for the detection of horses or horse derived components by real-time fluorescent PCR. China, 201110255658 [P] [2012-01-11]. <http://www.apchina.com/zhuanli/7051815/>
- [11] 杨滴, 刘彦泓, 刘岑杰, 等. 实时荧光 PCR 检测饲料中鸭源性成分 [J]. 粮食与饲料工业, 2012, 11: 62-63.
Yang D, Liu YH, Liu CJ, *et al.* The detection of duck derived

- components in feed by real-time fluorescent PCR [J]. Grain Feed Ind, 2012, 11: 62-63.
- [12] 动物组织细胞基因组DNA提取[EB/OL]. 2008,10,13. <http://www.bb100.com/experiment/10-364-1.html>
- Genomic DNA extraction from animal tissues and cells[EB/OL]. 2008,10,13. <http://www.bb100.com/experiment/10-364-1.html>
- [13] 孙艳华, 张智禹, 牛晋阳, 等. PCR 法检测肉制品中肉类来源的灵敏度研究[J]. 食品工业, 2010, (3): 93-94.
- Sun YH, Zhang ZY, Niu JY, *et al.* Sensitivity of PCR method for detecting meat source in processed meat [J]. Food Ind, 2010, (3): 93-94.
- [14] Girish PS, Anjaneyulu ASR, Viswasb KN, *et al.* Meat species identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP)of mitochondrial 12S rRNA gene [J]. Meat Sci, 2005, 70(1): 107-112.
- [15] Zhang CL, Fowler MR, Scott NW. A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses [J]. Food Control, 2007, 18 (9): 1149-1158.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



杨冬燕, 硕士, 主任技师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: szyang6699@126.com