

应用 PCR 技术检测掺假肉类

郭凤柳, 熊蕊, 刘晓慧*, 赵同欣, 王娜, 颜红

(保定出入境检验检疫局, 保定 071051)

摘要: **目的** 建立5种动物源性成分的普通PCR检测方法, 4种动物源性成分的实时荧光PCR检测方法, 为食品安全服务。**方法** 提取各肉制品的基因组DNA, 合成PCR检测引物和荧光探针, 优化反应条件和反应体系建立各动物源性成分的检测方法, 分析市场上肉类掺假状况。**结果** 建立了几种动物源性成分的检测方法, 根据已建方法对保定辖区采集的样品进行检测, 羊肉制品56份, 掺假率为75%; 驴肉制品15份, 掺假率为6.7%; 牛肉制品5份, 掺假率为20%; 兔肉制品2份, 掺假1份。这些结果表明辖区市场上存在较多的肉类掺假问题, 尤其是来自自由市场和烧烤摊的样品, 掺假现象严重损坏了消费者的权益。**结论** 建立的PCR检测方法获取DNA快速, 检测灵敏度可以达到pg或fg级别, 适用于大量肉制品的检测。

关键词: PCR检测方法; 检测; 掺假

Application of PCR technique for the detection of meat source components

GUO Feng-Liu, XIONG Rui, LIU Xiao-Hui*, ZHAO Tong-Xin, WANG Na, YAN Hong

(Baoding Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Baoding 071051, China)

ABSTRACT: Objective To establish an ordinary PCR method to detect 5 kinds of animal origin ingredients, a real time fluorescent PCR method to detect 4 kinds of animal origin ingredients, and serve the food safety.

Methods Genomic DNA were extracted from the meat, PCR detection primers and fluorescent probes were synthesized, and the reaction conditions and reaction system were optimized to establish the detection method of animal origin, so as to analyze the meat adulteration in market. **Results** The measuring method for several kinds animal origin ingredients was established. According to the established method, the adulteration rate for lamb products, donkey products, beef products, and rabbit meat products collected from Baoding area were 75%, 6.7%, 20%, 50%, respectively. The results showed that the adulteration problem existed in Baoding area market, especially in the free market and barbecue samples. The adulteration was serious damage to consumers' rights. **Conclusion** The established PCR method can obtain DNA quickly, its detection sensitivity can achieve pg or fg level, and is suitable for detecting a large number of meat products.

KEY WORDS: PCR detection method; detection; adulteration

随着经济的高速发展、人民收入水平的提高和饮食结构的改善, 我国居民对肉类食品的需求逐年增加。消费者对食品质量与安全性的要求也越来越高。

我国已先后颁布《产品标示标注规定》、GB 7718-2004《预包装食品标签通则》及修订后的《预包装食品标签通则》(GB 7718-2011), 用以规范食品市场, 维护

基金项目: 河北出入境检验检疫局自主立项项目(HE2011K019)

Fund: Supported by Autonomy Projects of Baoding Entry-Exit Inspection and Quarantine (HE2011K019)

*通讯作者: 刘晓慧, 博士, 主要研究方向为动物检疫。E-mail: drlxh@163.com

*Corresponding author: LIU Xiao-Hui, PhD, Baoding Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Baoding 071051, China. E-mail: drlxh@163.com

消费者权益^[1]。食品标签在一定程度上起到了维护消费者知情权、保护消费者健康和利益的作用,然而在利益的驱使下,市场肉制品的生产与销售中,钻法律法规的漏洞,利用掺杂掺假、以次充好等手段欺骗消费者而牟取暴利的事件屡屡出现^[2,3]。这不仅涉及经济、营养价值和食品安全等问题,更直接影响消费者的健康,尤其是对某些食物过敏的消费者。此外,在清真食品中掺杂猪肉涉及宗教信仰等问题,冒犯了具有伊斯兰教等宗教信仰的消费者,不利于社会和谐安定。因此,对食品中原料肉的种源进行准确、快速鉴定显得十分必要。

本研究主要针对国内消费量高的肉类作为研究对象,通过设计特异引物和探针,建立了定性检测体系。普通 PCR 检测体系以多拷贝基因为靶基因,以达到高效灵敏的目的;实时荧光 PCR 检测体系以其高度的灵敏度及快速无污染性来达到甄别恶意掺假与轻微污染目的。本研究验证所建立体系的可行性,为质检部门打击不法商贩、维护消费者合法利益提供有力的科学依据。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

主要试剂:蛋白酶 K、RNA 酶、dNTPs、 $10 \times$ PCR 缓冲液、 $MgCl_2$ 、Taq DNA 聚合酶、2000 bp ladder DNA marker、血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒、DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒等均购自北京天根生化科技有限公司。

Sau3A I、*Hph I*、*Mnl I*、*Alu I* 限制性内切酶,猪、牛、羊源性成分实时荧光试剂盒均购自宝生物工程有限公司。

引物、探针的合成及序列测定均由上海生工生物工程有限公司完成。

主要仪器:ABI 梯度 PCR 扩增仪、荧光 PCR 扩增仪(爱普拜斯应用生物系统贸易(上海)有限公司北京分公司)、QUANTUM-ST4 型凝胶成像仪(北京五洲东方科技发展有限公司)、电泳系统(伯乐生命医学产品(上海)有限公司)、Sigma 台式离心机(北京北方仪器商贸有限公司)。

1.2 检测方法

1.2.1 普通 PCR 法

研究中根据各动物的线粒体 DNA 分别合成了

猪、牛、羊、狗、驴的 PCR 引物,随后根据这些动物源性阳性样品 DNA 优化反应体系、摸索反应条件,进行扩增,引物对各动物源性 DNA 扩增的目的片段进行纯化,用限制性内切酶进行酶切结合测序技术,验证目的片段的正确与否以及假阳性现象,初步建立了这些哺乳动物的检测方法。

为了提高检测的准确性,对引物的灵敏度以及特异性进行了验证:将上述提取的各动物的 DNA 进行 $10^1 \sim 10^6$ 倍浓度梯度稀释,以此为模板进行扩增,验证引物的灵敏度。

将已制备的其他动物源性的 DNA 作为模板,用各引物分别进行扩增,同时设立阳性及空白对照,电泳检测,验证引物的特异性。

1.2.2 实时荧光 PCR 法

对牛、羊、猪、兔和鸭源性成分开展了荧光定量检测方法建立的工作:

牛、羊、猪检测方法的建立根据购自大连宝生物公司的实时荧光 PCR 检测试剂盒(《Real Time PCR Bovine and Ovine DNA Detection Kit》、《Real Time PCR Porcine DNA Detection Kit》)说明书进行。

对鸭源性的检测根据购自 BioXL 公司的试剂盒《鸭特定基因序列(Duck)核酸扩增检测试剂盒(PCR-荧光探针法)》说明书进行。

对兔源性的检测是本实验室合成的引物及探针,然后对反应体系及反应条件进行摸索,建立检测方法,其中 $25 \mu L$ 的反应体系为 $10 \times$ PCR buffer $9 \mu L$ 、 Mg^{2+} $1.5 \mu L$ 、dNTPs $2 \mu L$ 、兔源性检测引物混合液($10 \mu mol/L$) $1 \mu L$ 、兔源性检测探针混合液($10 \mu mol/L$) $1 \mu L$ 、样品 DNA ($1 \sim 100 ng/\mu L$) $1 \mu L$ 、双蒸水 $9.5 \mu L$ 。反应条件为:预变性 $95^\circ C$ $10 s$ 、 $95^\circ C$ $5 s$ 、 $60^\circ C$ $30 s$ 共 40 个循环。

1.2.3 检测方法的应用

为进一步验证方法的实用性及准确性,对保定各市区进行了样品的随机采集。对各饭店、超市、小作坊的羊肉、驴肉及牛肉等进行随机取样。对采集的样品进行 DNA 提取。其中采集羊肉制品 56 份;现煮驴肉小吃 10 份,真空袋包装驴制品 5 份;牛肉、狗肉、兔肉、猪肉样品较少。

2 结果与分析

已知阳性样品与检测结果一致,具有高度的重复性,因此证明研究中建立的动物源性成分的检测

方法准确可靠。各个引物对源性 DNA 的检测浓度都能达到 $\text{pg}/\mu\text{L}$ 的级别, 有的甚至达到 $\text{fg}/\mu\text{L}$ 的级别, 灵敏度高。

应用建立的 PCR 检测方法对各地采集的样品 DNA 进行检测, 研究人员共采集羊肉制品 56 份, 其中 38 份是在街边烧烤摊及清真市场购买的羊肉串及羊肉卷, 对其进行羊源性成分和猪源性成分的检测, 在羊肉制品的生产小作坊采集 18 份样品, 对其中 11 份进行羊源性成分和鸭源性成分的检测, 其中 7 份做羊源性成分和猪源性成分的检测。结果如表 1 和图 1 所示, 所有样品中有 14 份是只有羊源性成分的检出, 因此掺假比例是 75%。

对超市及现煮驴肉小吃进行随机采样, 其中现煮驴肉小吃 10 份, 驴源性成分全部检出; 真空袋包装驴肉制品 5 份, 其中 1 份是驴源性成分未检出; 对其他源性肉制品进行了少量样品的采集, 其中牛肉制品 5 份, 掺假 1 份, 猪肉制品 3 份, 无掺假, 兔肉和

狗肉制品各有两份掺假, 兔肉制品有 1 份掺假。

表 2 和图 2 对小作坊、小吃摊以及正规超市及饭店购买的肉制品的掺假率进行了统计分析, 从表中可以看出小作坊及小吃摊的掺假率达到了 50% 以上, 正规超市及饭店情况会好些, 因此在大型超市和正规饭店买到的正规厂家生产的肉制品较有保障。

3 讨 论

从上述研究中可以看出肉类掺假问题非常严重, 多发于小企业、小作坊、农贸市场, 因此基层食品监管对检验能力的需求日益强烈。牛羊肉价格坚挺上行, 市场上也是牛羊肉掺假现象严重, 一些不法商家为谋求非法利润而用低价劣质的肉冒充高价优质的肉, 尤以掺杂异种肉的造假行为常见, 如在一些日报网站上报道用鸡肉冒充猪肉, 猪肉冒充牛羊肉等。有的是一些地域问题, 像是驴肉在当地以及全国都是非

表 1 市售羊肉串(卷)检测结果

Table 1 Commercial lamb skewers (volume) test results

样品总数	检测项目	数量	掺假比例 (%)
56	只有羊源性成分样品	14	75
	只有猪源性成分样品	11	
	只有鸭源性成分样品	8	
	既有羊源性成分也有猪源性成分	19	
	既有羊源性成分也有鸭源性成分	4	

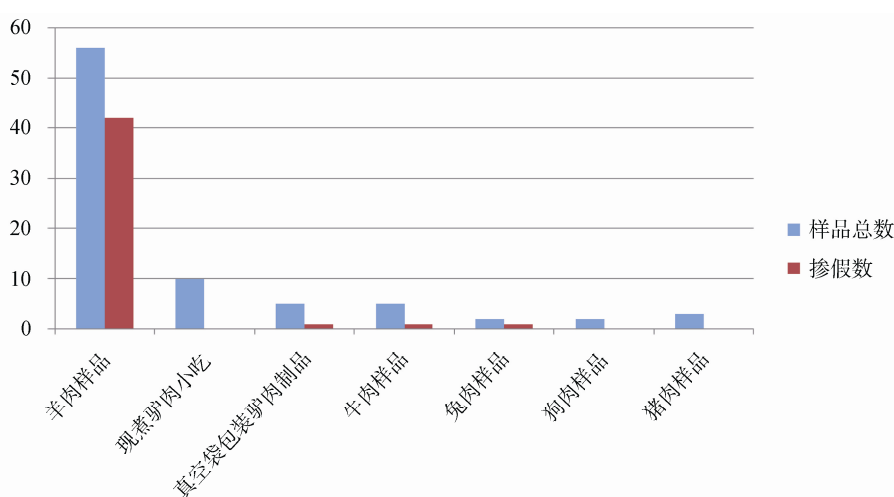


图 1 掺假比例柱形图

Fig. 1 Adulteration percentage column chart

表 2 小作坊、小吃摊、正规超市及饭店肉制品掺假数比较

Table 2 Comparison of relatively adulterated meat among small workshops, food stalls, supermarkets and hotels

样品名称	总数			掺假数		
	小作坊	小吃摊	正规超市及饭店	小作坊	小吃摊	正规超市及饭店
羊	18	27	11	17	21	4
驴	2	8	5	0	0	1
牛	1	3	1	1	0	0
兔	0	1	1	0	1	0
狗	0	1	1	0	0	0
猪	0	2	1	0	0	0
总数	21	42	20	18	22	5

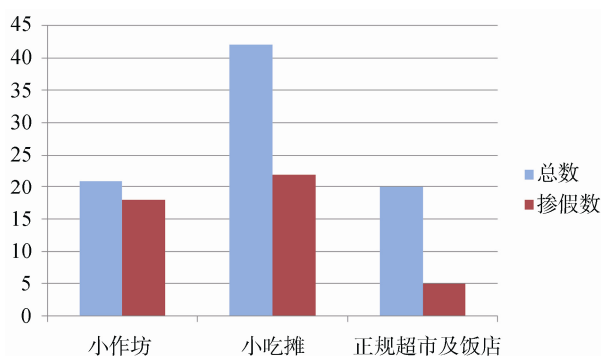


图 2 小作坊、小吃摊、正规超市及饭店肉制品掺假数比较

Fig. 2 Comparison of relatively adulterated meat among small workshops, food stalls, supermarkets and hotels

常受欢迎的, 刚开始可能会供不应求, 或者是肉的价格持续上升, 当黑心生产商看见经济利益后就会掺假, 以次充好。

深圳市监管局在全市范围内组织开展打击肉类掺假专项检查, 在行动中查获一批涉嫌掺假肉类, 并通过 DNA 检测, 在标明“羊肉串”的肉品中, 同时检测到鸭肉、猪肉和鸡肉的 DNA 成分^[4]。现代检测技术飞速发展, 要时刻研究、关注、应用新技术, 这为肉类掺假检验技术的发展提供了广阔的平台。在完善 PCR 等检测技术的同时, 还要确保研发的低成本和高通量的检测。

对肉类掺假检验方法的研究基本确立了以特征性的脂肪、蛋白质、核酸作为靶标物进行肉类掺假检验的基本思路^[5]。根据上述检验思路开展的检验方法

光谱分析^[6]、色谱分析、免疫分析、DNA 分析等现代分析技术大幅提高了检验方法精度和准确度。随着对 DNA 的研究, 发现 DNA 作为遗传信息的载体, 携带了丰富的种源特异性信息, 因此 DNA 分析是目前最有效的物种鉴定手段^[7,8]。2013 年 2 月, 为应对肆虐欧洲多国的马肉风波, 英国食品标准署宣布扩大肉制品掺假检测的调查范围, 以 PCR 方法进行 DNA 的检测。Ali 等用 RT-PCR 反应, 通过将猪的特异性引物结和 TaqMan probe 荧光探针结合检测特征片段, 确定混合肉中是否含有猪肉, 方法的检出限可低至 0.01%^[9]。实时荧光 PCR 技术全程采用的是闭管式检测, 不需 PCR 后处理, 克服了普通 PCR 假阳性问题和交叉污染, 灵敏度高、特异性强, 无需电泳, 简单快速。2011 年李杰等建立了猪肉和牛肉的多重 PCR 鉴定方法, 检出限是牛 DNA 98 fg/ μ L 和猪 DNA 67 fg/ μ L, 检测方法具有高度的敏感度^[10]。本研究以核酸为靶标物, 进行了对 DNA 的研究, 建立的 PCR 检测方法获取 DNA 快速, 检测灵敏度可以达到 pg 或 fg 级别, 适用于大量肉制品的检测。

本研究所建立的检测方法在掺假方面检测还是有一定的局限性, 掺假的具体肉源性成分还需要用各种肉源性成分的检测方法进行检测, 操作相对比较繁琐, 因此还需要建立一种检测方法能够一次性检测到掺假, 并且确定掺假的所有肉源性成分。

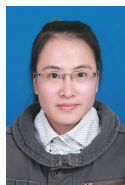
参考文献

- [1] 刘秀梅. 中国城乡居民动物性食物消费研究 [D]. 中国农业大学, 2005.

- Liu XM. Empirical comparison of animal food consumption between Urban and Rural residents in China [D]. China Agricultural University, 2005.
- [2] 李巧玲, 刘景艳. 市场鲜猪肉掺假状况的调查监测[J]. 食品科学, 2004, 25(10): 273–276.
- Li QL, Liu JY. Investigation and detection of adulterated pork from markets [J]. Food Sci, 2004, 25(10): 273–276.
- [3] 韦公远. 市场上常见肉品的鉴别[J]. 肉类研究, 2003, 17(3): 36–43.
- Wei GY. Identification of common meat market [J]. Meat Res, 2003, 17(3): 36–43.
- [4] 深圳羊肉串检出猪肉鸡肉 DNA [J]. 广西质量监督导报, 2013, (5): 8.
- Shenzhen lamb skewers of pork chicken DNA detection [J]. Guangxi Qual Superv Guide Period, 2013, (5): 8.
- [5] 冯永巍, 王琴. 肉类掺假检验技术研究进展[J]. 食品与机械, 2013, 29(4): 237–240.
- Feng YW, Wang Q. Advances on analytical technologies for meat adulteration [J]. Food Mach, 2013, 29(4): 237–240.
- [6] Andrés S, Murray I, Navajas EA, *et al.* Prediction of sensory characteristics of lamb meat samples by near infrared reflectance spectroscopy [J]. Meat Sci, 2007, 76(3): 509–516.
- [7] Aida AA, Che Man YB, Wong CM. *et al.* Analysis of raw meats and fats of pigs using polymerase chain reaction for halal authentication [J]. Meat Sci, 2005, 69(1): 47–52.
- [8] Lockley AK, Bardsley RG. DNA-based methods for food authentication [J]. Trends Food Sci Technol, 2000, 11(2): 67–77.
- [9] Ali ME, Hashim U, Mustafa S, *et al.* Analysis of pork adulteration in commercial meatballs targeting porcine-specific mitochondrial cytochrome b gene by TaqMan probe real-time polymerase chain reaction [J]. Meat Sci, 2012, 91(4): 454–459.
- [10] 李杰, 乔绪稳, 余兴龙, 等. 快速鉴定猪肉和牛肉多重 PCR 方法的建立及初步应用[J]. 湖南畜牧兽医, 2011,(2): 13–15.
- Li J, Qiao XW, Yu XL, *et al.* The establishment of the rapid identification of pork and beef with multiple polymerase chain reaction (PCR) and preliminary application [J]. Hunan J Anim Sci Vet Med, 2011, (2): 13–15.

(责任编辑: 赵静)

作者简介



郭凤柳, 硕士, 助工, 主要研究方向为动物检疫。
E-mail: guofengliu160@126.com



刘晓慧, 博士, 兽医师, 主要研究方向为动物检疫。
E-mail: drlxh@163.com