

肉制品掺假鉴别技术研究进展

张小莉, 魏玲, 李宝明, 程小艳, 李萌, 武会娟*

(北京市理化分析测试中心, 北京 100094)

摘要: 肉制品在食品消费中占很大比例, 近年来, 肉制品掺假问题日益严重, 肉制品掺假鉴别和溯源分析成为研究热点。传统的通过感官及形态的肉类鉴别方法已经不能满足肉类掺假鉴别的需要。随着现代分析仪器和生物技术的发展, 多种蛋白质分析法、DNA分析法和无损检测方法日趋成熟。基于蛋白质的检测方法, 如免疫分析法和色谱分析法均可定量检测, 但不适用于加工肉制品。基于样品特征光谱的无损检测方法操作简单, 检测时间短, 具有独特的优势。基于DNA的检测方法, 特别是荧光定量PCR方法具有检测灵敏度高, 结果重复性好等优势, 将成为未来肉类物种鉴别的发展方向, 具有很好的应用前景。

关键词: 肉类掺假; 定量检测; 溯源分析

Research progress of identification techniques for meat products adulteration

ZHANG Xiao-Li, WEI Ling, LI Bao-Ming, CHENG Xiao-Yan, LI Meng, WU Hui-Juan*

(Beijing Centre for Physical & Chemical Analysis, Beijing 100094, China)

ABSTRACT: As a large proportion of food consumption, meat products play an important role in the day life. In recent years, meat adulteration problem is increasingly serious, and identification and traceability of meat adulteration analysis become a hot topic. Traditional meat sensory and morphological identification methods cannot meet the needs of meat authentication. With the development of modern analytical instrumentation and biotechnology, a variety of protein analysis, DNA analysis and nondestructive testing technology become more sophisticated. Protein-based detection methods, such as immunoassay and chromatography, can detect quantitatively, but not for processed meat. Non-destructive testing method based on the spectral characteristics of the sample is simple, short detection time, has a unique advantage. DNA-based detection methods, especially quantitative PCR detection method has high sensitivity, good reproducibility of the results and other advantages, will become the future direction of the meat species identification, and has good prospects.

KEY WORDS: meat adulteration; quantitative detection; traceable analysis

1 引言

肉制品是人体蛋白质和微量元素的重要来源。我国是肉制品的生产和消费大国, 肉制品在居民食品消费中占有很大比例。目前全球的肉制品的安全状况令人担忧, 比如

欧洲的马肉风波^[1], 我国江苏地区羊肉掺假事件^[2]等, 都暴露了严重的食品安全问题。由于肉制品的品种和价格差异, 不法商贩以低价肉类代替高价肉类出售, 不仅损害了消费者的利益, 而且存在食品安全风险。传统的依靠感官与形态的肉类品质鉴别方法已经无法满足对上述掺假现象

*通讯作者: 武会娟, 副研究员, 主要研究方向为生物技术新方法开发, 及其在食品安全和疾病快速检测方面的应用。E-mail: sunnywhj@126.com

*Corresponding author: WU Hui-Juan, Associate Researcher, Beijing Centre for Physical and Chemical Analysis, No.27, Fengxian Middle Road, Haidian District, Beijing 100089, China. E-mail: sunnywhj@126.com

的控制和监管需要。近年来, 随着现代仪器分析与分子生物学技术的发展, 相继出现了以脂肪、蛋白质、DNA 为检测对象, 结合光谱、色谱、免疫分析和 DNA 分析等现代分析技术的快速灵敏的检测方法, 大大提高了检测的精确性和准确度。本文综述了目前国内外肉制品掺假鉴别技术的研究进展, 分析了各种方法的优、缺点, 为肉制品的市场监管和标准体系的建立提供参考和依据。

2 蛋白质分析方法

蛋白质是肉制品的主要组成成分, 每一物种的特定蛋白质组成和特定蛋白质的三维结构具有一定的保守性和特异性, 非常适于不同物种的鉴别。某些蛋白分子具有组织特异性, 可用于特定组织成分的鉴别。常用的技术包括以蛋白质条带特征为基础电泳分析法、基于抗原-抗体特异性反应的免疫分析法和基于蛋白质或短肽特征组份的色谱分析方法。

2.1 电泳分析法

电泳是在电场作用下将样品中的可溶的蛋白质进行有效分离的常用技术。特定肉制品中的大量蛋白会产生独特的电泳条带, 通过指示蛋白可达到鉴别的目的, 电泳分析法良好的适应性和分辨率确保可用于食品中许多蛋白的鉴别。通常情况下, 由于蛋白质的指纹比较复杂, 所以电泳法不适用于检测含有不同物种的混合样品。常用于肉制品电泳分析方法有: 聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电聚焦、同工酶染色和毛细管电泳 4 种^[3]。

2.1.1 聚丙烯酰胺凝胶电泳

聚丙烯酰胺凝胶电泳是一种分离蛋白质的高效方法, 它能够分离不同物种肉制品中蛋白质的特征谱图。Sotelo 等^[4]利用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)对海产品中鱼类的鉴别进行了详细的研究。Hsieh 等^[5]根据不同品种 SDS-PAGE 图谱的相异性, 对红笛鲷(*Lutianuss campechanus*) 的珍贵品种及替代品和劣质品进行了区别和鉴定。Tanabe 等^[6]对猪、牛和鸡的肌肉进行 SDS-PAGE 分析, 发现不同品种的肌肉呈现的蛋白谱带强度不一致。Skrökki 等^[7]建立了一套定量区分牛肉、猪肉、鹿肉、驯鹿肉和羊肉的电泳检测方法, 通过与标准样品比较能够确定商品化碎肉混合物中牛肉和猪肉的含量。由于样品中的蛋白质含量受到肉制品的新鲜度、加工程度等因素的影响会有所变化, 导致聚丙烯酰胺电泳检测方法缺乏重现性, 从而限制了该方法在肉制品检测中的应用。

2.1.2 等电聚焦法

等电聚焦(iso-electric focusing, IEF)分离蛋白质主要是基于各蛋白质的等电点不同。由于不同动物样品中蛋白质组成存在一定的相似性, 在对未知样品的鉴别中, 通常首先采用 IEF 方法确定物种间的差异。IEF 广泛用于鱼类

鉴别, 也有报道^[8]采用 IEF 分析牛肌球蛋白的热稳定性, 可检测 0.01 mg/mL 牛肌球蛋白。Aristoy 等^[9]应用等电聚焦电泳获得混合碎肉样品的蛋白图谱, 通过多元数据分析也可实现对牛肉、猪肉和火鸡肉的识别。等电聚焦法可用于生肉或加工食品的动物源性成分检测。等电聚焦产生的蛋白质谱图比较复杂, 通常仅适于单一物种的鉴别, 混合样品的鉴定或罕见物种的鉴定一般不采用这种方法。

2.1.3 同工酶染色法

同工酶指具有相同生理活性而分子结构和理化性质不同的酶蛋白分子, 是基因表达的直接产物, 同工酶谱在种属等物种内具有专一性。同工酶在相同物种的相同器官中具有稳定的酶谱特征。先提取蛋白质, 经过后续反应, 在同功酶催化下生成有色化合物, 最后通过同功酶标记物的相对位置就可以判断物种来源。常见的用于物种鉴定的同功酶包括变位酶、酯酶、过氧化物酶、肌氨酸致活酶和乳酸脱氢酶等^[10]。由于酶催化过程需要保持酶活性, 因此对于加工肉制品或未知样品, 不适合采用同工酶染色的方法。

2.1.4 毛细管电泳法

毛细管电泳是一种灵敏的分离技术, 它结合了电泳的原理和色谱分离技术在高压电场作用下, 对样品进行快速分离, 提高分辨率及自动化程度。Simó 等^[11]利用毛细管电泳-质谱技术鉴别了鸡肉和火鸡肉蛋白中的溶菌酶成分。毛细管电泳方法主要针对生牛样品进行种类鉴别。对于混合肉样品或含有蛋白质添加剂的样品, 容易对检测结果产生干扰影响判定, 并且该方法仪器成本较高, 限制了它的使用。

肉制品中蛋白质成分受产地和品种等因素影响会发生变化, 而且在加工食品中蛋白会发生不可逆的变性过程, 容易产生假阳性结果。因此, 肉制品的蛋白质分析方法一般不作为标准制定方法或仲裁鉴定方法, 通常仅作为快速筛查方法使用, 而且需要与其他检测方法相结合确定结论。

2.2 免疫分析法

随着抗体技术的快速发展, 肉类掺假的免疫学检测方法不断出现, 主要有试管沉淀法、琼脂扩散法、对流免疫电泳法、放射免疫法、免疫组化和酶联免疫分析(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)等, 其中 ELISA 方法应用最为广泛。对于加工肉制品, 蛋白会发生变性而使抗原特性发生改变, 在加工食品中只有热稳定性的蛋白标志物才能用于检测^[12]。

Macedo-Silva 等^[13]采用 dot-ELISA 方法通过牛、鸡、猪和马血清蛋白抗原检测同源物种, 对于单一样品和混合样品都具有很好的检测特异性和敏感度, 检测限达到 0.6%。通过制备针对热稳定蛋白的抗体, 利用 ELISA 方法可以测定了生鲜和加工过的肉类和饲料中动物源性成分,

检测限可低至 0.05%^[14]。Chen 等^[15]和 Liu 等^[16]发展了以单克隆抗体建立的 ELISA 方法对猪的热稳定性肌肉蛋白的检测,并且用该方法测定了生鲜和加工过的肉类和饲料中猪肉的含量,在不同来源的肉类混合物中猪肉的检测限为 0.5%~0.05%。免疫分析法的局限性在于抗血清存在交叉反应,而且加工肉制品中抗原的溶解特性和抗原表位都会相应发生变化。

2.3 色谱分析法

色谱分析法是应用最为广泛的分离检测技术。肉中的一些蛋白质、肽类和氨基酸组成因物种来源的不同而存在差异,通过色谱定性、定量分析也能反映肉类掺假情况。Schonherr 等^[17]分别利用动物种间特异性的组氨酸二肽、肌肽、鹅肌肽和鲸肌肽等短肽类物质的分布情况建立用于定性鉴别肉类成分的高效液相色谱技术(high performance liquid chromatography, HPLC),如果样品是纯猪肉、羊肉、鸡肉或牛肉,二肽谱分析技术可准确鉴别其物种来源。Wissiac 等^[18]采用阴离子色谱分离和二极阵列根据 416 nm 处的特征峰图模式对牛、羊或猪肉血红蛋白进行定量鉴定。混合肉样品中含量约 10%成分能够很容易被检测,由于特征峰的共洗脱导致牛肉和羊肉较难区分。Chou 等^[19]采用电化学-高效液相色谱技术(high performance liquid chromatography-electrochemical detection, HPLC-EC)鉴别牛、猪、羊、鹿、马和鸡等物种,检测结果显示很好的变异系数(<6%),物种特异性标志物的保留时间在不同组织和个体间具有很好重复性。

色谱检测对于样品的溶解性有一定要求,加工肉制品的蛋白质结构发生了不可逆的改变,溶解性降低,不再适合色谱检测。由于图谱的复杂化,色谱法检测多物种混合样品和掺假情况有一定的困难。另外,昂贵的检测仪器和复杂的样品制备限制了色谱作为常规的检测手段。

3 红外光谱法

红外光谱因其具有快速,无损检测,实用和无需样品前处理的优点而发展成为一种有前途的方法。红外光谱进行食品的质量控制依赖于样品特征与光谱信号之间的函数关系,使用化学计量方法确定并校正这些函数关系,根据样品的光谱数据对相应成分进行定性和定量分析^[20]。

Mamani-Linares 等^[21]利用可见近红外光谱方法通过分析碎肉的反射光谱对牛肉、驼肉和马肉进行了鉴别。基于不同动物肌肉中脂肪和水含量的不同红外反射光谱可以正确识别和区分不同的牛肉样品^[22]。Morsy 等^[23]利用可见-近红外反射光谱检测新鲜和冷冻牛肉中的掺假,通过建立偏最小二乘回归(partial least squares regression, PLSR)模型,对于新鲜牛肉中掺入猪肉得到 5.39%, 5.12% 和 2.08% 的标准差和 0.96, 0.94 和 0.95 的预测相关系数。

Alamprese 等^[24]借助主成分回归,线性判别分析(linear discriminant analysis, LDA)和偏最小二乘法(partial least squares, PLS)采用紫外可见, NIR 和中红外光谱检测火鸡肉。近红外光谱和中红外光谱与紫外-可见光谱结合可以得到很好的检测结果。借助主成分回归和偏最小二乘法(PLS)近红外光谱能够区分牛肉、羊肉、猪肉和鸡肉,模型的鉴别准确度达到 80%。通过对蛋白质、脂肪、水分和灰分进行多元变量分析,建立基于中红外光谱的聚类分析回归模型,这类模型对样本肉类掺假的识别率可达到 100%^[25]。

红外光谱在评价混合样品时受到限制,此外,较低的精确度和参考方法的主观性也限制了这种方法的广泛应用。近年来,在肉类、鱼类和食用油等的质量控制方面得到广泛的应用相比传统的检测技术,近红外光谱技术检测时间短,不需要样品前处理,显示很好的检测适应性。

4 DNA 分析法

DNA 作为生物的遗传物质,具有一定的热稳定性,在生物体大多数细胞中普遍存在,而且在单一个体的所有组织中序列和结构是非常保守的。PCR 是一种采用体外酶促反应在短时间内对特定 DNA 序列实现指数扩增的实验方法。PCR 方法是一种灵敏、准确、可靠和具有巨大应用前景的实用技术,它可以解决活体动物痕量样品的检测。由于 DNA 分析方法具有较高的检测特异性和敏感度,检测时间短,成本低等独特优势,在肉制品的物种鉴别方面得到广泛的应用。

目前, DNA 分析法主要是通过分析物种的基因组 DNA 或线粒体 DNA 序列差异进行鉴定。线粒体 DNA 相对于基因组 DNA 具有独特的优势。线粒体 DNA 具有较高的进化速率和稳定遗传的特性,每个线粒体中有很多个拷贝的线粒体 DNA 分子,非常适合扩增遗传变异。线粒体的进化速度比核 DNA 快^[26]。线粒体基因组的不同区域具有不同的进化速率,可选择合适区域进行研究^[27]。线粒体 DNA 的热稳定性和高拷贝数有助于 DNA 片段的保存确保有足够的模板进行 PCR 扩增^[28]。

4.1 DNA 杂交

DNA 杂交技术是利用 DNA 碱基互补配对原理,利用标记有荧光素、生物素或放射性同位素等信号分子的特定 DNA 片段(探针)识别其互补序列 DNA 分子的技术,根据信号强弱判断样品成分类别或多少^[29]。Della 等^[30]报道采用点杂交技术鉴别了生鲜肉和加工肉制品中的兔肉、绵羊肉、猪肉、牛和山羊源性成分,实现了半定量检测,检测限为 2.5%。DNA 杂交方法检测敏感度低,操作繁琐、耗时,逐渐被 PCR 方法所取代。

4.2 物种特异性 PCR 方法

物种特异性 PCR 方法相比其他 PCR 分析法是一种简

单、快速、灵敏的物种鉴别方法。然而, 在同一 PCR 反应中鉴定的物种数量是有限的, 可以利用基因组 DNA 或线粒体 DNA 进行物种鉴别, 这种方法对于混合样品的检测非常有优势。Meyer 等^[31]利用猪生长激素基因鉴别新鲜和热加工的牛肉混合样品中的猪源性成分。Herman^[32]通过设计细胞色素 b 基因的物种特异性引物成功地鉴别了食品中鸡肉、火鸡肉、猪肉、牛肉和羊肉成分。Piknova 等^[33]利用细胞色素 b 基因鉴别了牛源性成分。Colgan 等^[34]利用 ATP 酶 6/8 基因鉴别肉骨粉中的牛, 羊, 猪和禽源性成分。Ilhak 等^[35]成功地运用物种特异性 PCR 方法, 分别扩增马, 狗, 猫, 牛, 绵羊, 猪和山羊的相应 439 bp, 322 bp, 274 bp, 271 bp, 225 bp, 212 bp 和 157 bp 片段, 实现在混合肉样品中对上述物种的鉴别, 检出限达 0.1%。Kesman 等^[36]通过设计线粒体 DNA 引物特异性检测加工肉肠中的猪肉、马肉和驴肉成分, 模板 DNA 检出限达到 0.01 ng。在两个物种混合样品中每个物种的检出限都能达到 0.1%, 表明这种方法可用于商品化肉制品的掺假鉴别。

4.3 多重 PCR 分析法

多重 PCR 方法是在同一 PCR 反应中采用多个引物对对多个肉类物种进行同步、精确和快速检测。多个物种鉴别的不同引物对具有共同的正向引物和物种特异性反向引物或者相反。Behrens 等^[37]利用多重 PCR 方法对鸡肉、火鸡肉、牛肉、猪肉、山羊肉、绵羊肉、驴肉和马肉进行了鉴别, 在加热和加工肉制品中的检出限达到 1%。Rea 等^[38]利用多种 PCR 方法在的单一 PCR 反应中鉴别了牛奶和水牛奶酪中的牛和水牛成分, 这个结果表明针对这两个物种具有绝对的特异性和很高的灵敏度(1 pg), 在牛奶和水牛奶酪混合样品中, 浓度低至 1%的成分都能被检测。Wentao 等^[39]报道了通过混合鸡肉、牛肉、羊肉、猪肉和马肉多重引物实现在单一 PCR 反应中对物种特异性 DNA 的鉴别, 检测限达到 0.5 g/kg。多重 PCR 方法简化了 PCR 反复扩增的过程, 提高了检测效率, 具有较高的敏感度和可重复性, 可用于混合肉制品中的筛选和鉴定检测^[40]。Yin 等^[41]报道了利用线粒体 12S rRNA 基因鉴别牦牛肉中的牛肉掺假, 在单一反应体系中加入三条引物, 牛肉 DNA 扩增出 290 bp 和 159 bp 两个片段, 牦牛肉 DNA 仅扩增出 290 bp 片段, 在原料肉和热加工混合肉样品中的检出限为 0.1%。多重 PCR 方法快速、直观, 对于肉制品的质量控制是非常有用的工具。

4.4 PCR-RFLP 方法

PCR-限制性片段长度多态性方法(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)是利用 PCR 将保守 DNA 序列进行扩增, 通过限制性内切酶消化产生物种特异性片段来鉴别遗传变异的检测手段。这种方法方便、快速、灵敏, 可用于多种肉类

品种的鉴别, 在加工肉制品中具有很好的应用前景。Hopwood 等^[42]通过扩增 actin 基因并酶切消化对鸡肉和火鸡肉进行了鉴别, 加工肉制品混合物的检出限为 1%。Myers 等^[43]采用 PCR-RFLP 方法鉴别了牛, 绵羊, 山羊, 鹿和麋鹿。Meyer 等^[44]通过设计细胞色素 b 基因特异性引物经 AluI、RsaI、TaqI 和 HinfI 消化对卤肉, 热加工和发酵肉制品中的猪肉、牛肉、野猪肉、水牛肉、绵羊肉、山羊肉、马肉、鸡肉和火鸡肉检测, 牛肉和猪肉混合样品的检出限为 1%。Murugaiah 等^[45]建立了牛, 猪, 水牛, 鹌鹑, 鸡, 山羊和兔物种的 PCR-RFLP 鉴别方法。首先扩增上述六个物种的细胞色素 b 基因产生 359bp 的片段, 经过 AluI, BsaJI, RsaI, MseI 和 BstUI 酶切消化后根据片段差异进行鉴别。然而, 大多数 RFLP 方法是定性检测, 对于单一成分样品检测效果较好, 混合样品会产生复杂的酶切条带导致无法判断。

4.5 RAPD-PCR 方法

随机扩增多态性 PCR(random PCR amplification of polymorphic DNA, RAPD-PCR)是利用任意随机引物扩增基因组 DNA, 通过产生的特异性和独特的谱图来区分不同肉类。RAPD-PCR 方法具有很强的鉴别能力, 能够在同一 PCR 反应体系中对多个肉类物种进行简单、快速、灵敏的检测。这种方法也适于不同加工程度的肉制品的物种鉴别。Martinez 等^[46]建立了物种特异性 RAPD 印迹法对多个物种进行鉴别, 如牛, 水牛, 猪, 羊, 马, 骡子, 驴, 麋鹿, 驯鹿, 袋鼠和鸵鸟等。Koh 等^[47]利用 RAPD-PCR 技术鉴别了野猪, 猪, 马, 牛, 鹿, 狗, 猫, 兔和袋鼠。Martinez 等^[48]鉴别了海产哺乳动物物种。Arum 等^[49]报道了利用 RAPD-PCR 方法鉴别牛肉、羊肉、猪肉、狗肉、鼠肉、兔肉和鸡肉, 检测限低至 250 pg DNA。随机扩增多态性 DNA 分析利用短的任意 PCR 引物, 产生一系列扩增产物。当存在标准样品作参照时 RAPD 技术具有很强的识别能力, 但 DNA 序列是未知的。

4.6 PCR 测序法

针对物种特异性序列进行 PCR 扩增然后测序鉴定是一种精确的肉类物种鉴别方法。通过 DNA 测序法界定动物的物种依赖于已知的 DNA 数据库。DNA 数据库中包含了许多的序列信息, 如不同动物物种, 品种和遗传变异序列信息等。即使没有参考样本时, 经过 PCR 扩增后, 序列信息与数据库进行比对也能够鉴定样品的物种来源。测序鉴定是最直接有效的分析 PCR 扩增产物的方法, 它通常用于对凝胶电泳或荧光定量 PCR 结果的确证分析。Bottero 等^[50]通过设计线粒体 12S rRNA 基因特异性引物扩增产生 234 bp 和 265 bp, 鉴定热处理的样品中牛肉、猪肉、绵羊肉、山羊肉、马肉、兔肉、鸡肉、鲑鳟鱼和欧洲的沙丁鱼, PCR 产物经测序验证, 检测限达到 0.0625%。

4.7 荧光定量 PCR 方法

荧光 PCR 方法是一种先进的肉制品鉴别定量检测方法。这种方法敏感度非常高,对于含量低于 0.1%的成分也能实现有效检测。目前应用较多的是 Taqman 和 SYBR Green 检测方法, Taqman 检测方法使用杂交探针技术,检测特异性和敏感度更高,可进行多重检测。SYBR Green 检测法只能进行单一物种检测,但是检测成本较低。

Mendoza-Romero 等^[51]建立了一种半定量检测反刍动物 DNA 的荧光定量 PCR 方法,通过扩增反刍动物短的散在核元件 Bov-A2 进行鉴别,牛 DNA 的检测限为 10tg。Aarts 等^[52]采用 SYBR Green 荧光定量 PCR 方法利用物种特异性 Bov-B SINE 引物检测热处理的牛羊肉和肉骨粉中 0.1%的污染成分。Dooley 等^[53]利用 Taqman 荧光定量 PCR 方法检测牛肉、猪肉、羊肉、鸡肉和火鸡肉混合样品,检测敏感度低至 0.1%。Rodriguez 等^[54]建立了快速灵敏地分析线粒体 12S rRNA 基因的 Taqman 荧光定量 PCR 检测方法,对猪源性成分和哺乳动物成分的定量检测线性范围为 0.5%~5%。Lopez-Andreo 等^[55]报道使用 MGB 探针检测牛肉、猪肉、羊肉、鸡肉、火鸡肉和鸵鸟肉 DNA 的荧光定量 PCR 方法,复杂样品的检出限为 0.03~0.80 pg 模板 DNA,该研究进一步分析包含 2~4 个不同物种的混合样品,猪肉、鸡肉或鸵鸟肉的检出限约为 1%,牛肉或羊肉的检出限为 5%。Lopez-Andreo 等^[55]设计了针对牛,羊,猪和鸡线粒体 DNA 的物种特异性探针检测热处理样品中短的物种特异性序列,检测限分别为 0.5 ng, 0.5 ng, 0.01 ng 和 0.05 ng。Zhang 等^[56]采用荧光定量 PCR 技术建立牛肉,牛奶和奶酪中牛 DNA 的定量检测方法。Yumiko 等^[57]通过构建质粒标准分子作为标准样本,建立猪肉、鸡肉和牛肉定量检测方法。荧光定量 PCR 方法由于检测特异性和敏感度较高,操作简单,可实现定量分析,逐渐成为肉制品检测的未来发展趋势。

5 讨论

随着消费者对肉制品品质要求的提高以及对食品组成的关注,正确鉴别肉制品的来源显得尤为重要。传统的物种鉴别检测技术由于可重复性差,操作繁琐,检测敏感度低,受样品加工程度影响等缺点,已经逐渐被以 DNA 为基础的 PCR 检测技术所取代。目前基于荧光定量 PCR 技术的肉类鉴别方法已经能够实现多重定量检测,且检测限达到纳克级,具有良好的应用前景。近年来发展的红外光谱无损检测技术无需样品前处理,检测时间短,具有独特的检测优势。现有的检测技术虽然能够实现定量检测,检测灵敏度也较高。但是,仍然有很大的提升空间,比如检测时间长,通常需要 1~2 d,因此,仍然需要开发快速灵敏的检测技术,在确保检测敏感度和准确性的情况下提高检测效率。

参考文献

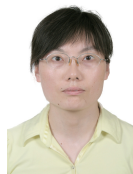
- [1] 徐剑梅. 欧洲马肉冒充牛肉事件席卷英法德等 16 国 [EB/OL]. <http://finance.ifeng.com/news/hqcj/20130213/7665518.shtml>, 2013-02-13.
- Xu JM. European horse posing beef swept Britain, France and other 16 countries in the event. [EB/OL]. <http://finance.ifeng.com/news/hqcj/20130213/7665518.shtml>, 2013-02-13.
- [2] 白羽. 江苏假羊肉案嫌犯自称没用过老鼠肉[EB/OL]. <http://sh.eastday.com/m/20130507/u1a7372866.html>, 2013-05-07.
- Bai Y. Jiangsu fake lamb suspects claiming to have not used the meat of mouse. [EB/OL]. <http://sh.eastday.com/m/20130507/u1a7372866.html>, 2013-05-07.
- [3] Magdalena M, Edward P. Species identification of meat by electrophoretic methods[J]. *Acta Sc Pol Technol Aliment*, 2007, 6(1): 5-16.
- [4] Soltelo CG, Pineiro C, Gallarcho JM, *et al.* Fish species identification in seafood products[J]. *Trends in Food Technol*, 1993, 4: 395-401.
- [5] Hsieh YHP, Chen FC, Nur M. Rapid speis identification of cooked red snapper using isoelectric focusing[J]. *J Food Sci*, 1997, 62: 15-19.
- [6] Tanabe R, Muroya S, Nakajima I, *et al.* Skeletal muscle connecting primary structures as related to animal species and muscle type[J]. *J Food Sci*, 1997, 62: 451-453.
- [7] Skrókki AL, Hormi O. Composition of minced meat part B: A survey of commercial ground meat[J]. *Meat Sci*, 1994, 38(3): 503-509.
- [8] 段宏安, 张睿, 李金华, 等. 食品及饲料中动物性成分种类的鉴别方法[J]. *中国兽医杂志*, 2002, 38(12): 42-45.
- Duan HA, Zhang R, Li JH, *et al.* Detection Methods of Animal derived Materials in food and feed[J]. *Chin Vet J*, 2002, 38(12): 42-45.
- [9] Aristoy MC, Toldra F. Histidine dipeptides HPLC-based test for the detection of mammalian origin proteins in feeds for ruminants[J]. *Meat Sci*, 2004, 67(2): 211-217.
- [10] 刘旭辉, 马贵平, 史喜菊, 等. 商品中动物源性成分检测方法的研究进展[J]. *动物医学进展*, 2007, 28(10): 91-94.
- Liu XH, Ma GP, Shi XJ, *et al.* Advance in the Detection Methods of Commercial Animal derived Materials[J]. *Progr Vet Med*, 2007, 28(10): 91-94.
- [11] Simó CL, Elvira C, González N, *et al.* Capillary electrophoresis-mass spectrometry of basic proteins using a new physically adsorbed polymer coating. Some applications in food analysis[J]. *Electrophoresis*, 2004, 25(13): 2056-2064.
- [12] 马永征, 马冬, 白妮斯, 等. 免疫学检测肉类制品掺假研究进展[J]. *肉类研究*, 2012, 26(9): 26-29.
- Ma YZ, Ma D, Bai DS, *et al.* Recent Advances in Immunological Detection of Meat Adulteration[J]. *Meat Res*, 2012, 26(9): 26-29.
- [13] Macedo-Silva A, Barbosa SFC, Alkmin MGA, *et al.* Hamburger meat identification by dot-ELISA[J]. *Meat Sci*, 2000, 56: 189-192.
- [14] Antonios V, Ioannis S, Arvanitoyannis, *et al.* An updated review of meat authenticity methods and applications[J]. *Food Sci Nutr*, 2013, Oct 2
- [15] Chen FC, Hsieh YH. Detection of pork in heat-processed meat products by monoclonal antibody-based ELISA[J]. *J AOAC Int*, 2000, 83(1): 79-85.
- [16] Liu LH, Chen F C, Dorsey JL, *et al.* Sensitive monoclonal antibody-based sandwich ELISA for the detection of porcine skeletal muscle in meat and feed products[J]. *J Food Sci*, 2006, 71(1): 1-6.
- [17] Schonherr J. Analysis of products of animal origin in feeds by determina-

- tion of carnosine and related dipeptides by high-performance liquid chromatography[J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(7): 1945–1950.
- [18] Wissiack R, de la Calle B, Bordin G, *et al.* Screening test to detect meat adulteration through the determination of hemoglobin by cation exchange chromatography with diode array detection[J]. *Meat Sci*, 2003, 64: 427–432.
- [19] Chou CC, Lin SP, Lee KM, *et al.* Fast differentiation of meats from fifteen animal species by liquid chromatography with electrochemical detection using copper nanoparticle plated electrodes[J]. *J Chromatogr B*, 2007, 846: 230–239.
- [20] Prieto N, Roehe R, Lavin P, *et al.* Application of near infrared reflectance spectroscopy to predict meat and meat products quality: a review[J]. *Meat Sci*, 2009, 83(2): 75–186.
- [21] Mamani-Linares LW, Gallo C, Alomar D. Identification of cattle, llama and horse meat by near infrared reflectance or transreflectance spectroscopy[J]. *Meat Sci*, 2012, 90(2): 378–385.
- [22] Alomar D, Gallo C, Castaneda M, *et al.* Chemical and discriminant analysis of bovine meat by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS)[J]. *Meat Sci*, 2003, 63(4), 441–450.
- [23] Morsy N, Sun DW. Robust linear and non-linear models of NIR spectroscopy for detection and quantification of adulterants in fresh and frozen-thawed minced beef[J]. *Meat Sci*, 2012, 93(2): 292–302.
- [24] Alamprese C, Casale M, Sinelli N, *et al.* Detection of minced beef adulteration by UV-VIS, NIR and MIR spectroscopy[J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2013, 53(1): 225–232.
- [25] Qu JH, Liu D, Cheng JH, *et al.* Applications of near infrared spectroscopy in food safety evaluation and control: a review of recent research advances[J]. *Food Sci Nutr*, 2014, In Press.
- [26] Brown WM, Prager EM, Wang A, *et al.* Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution[J]. *J Mol Evol*, 1982, 18: 225–239.
- [27] Saccone C, Pesole G, Sbsa E. The main regulatory region of mammalian mitochondrial DNA: structure- function model and evolutionary pattern[J]. *J Mol Evol*, 1991, 33: 83–91.
- [28] Girish PS, Anjaneyulu ASR, Viswas KN, *et al.* Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species[J]. *Meat Sci*, 2004, 66(3): 551–556.
- [29] 李家鹏, 乔晓玲, 田寒友, 等. 食品和饲料中动物源性成分检测技术研究进展[J]. *食品科学*, 2011, 32(9): 340–347.
- Li JP, Qiao XL, Tian HY, *et al.* Research Progress of Identification Techniques for Animal-derived Materials in Food and Feed[J]. *Food Sci*, 2011, 32(9): 340–347.
- [30] Della JH, Helen CP, Ian DL. Identification of the species of origin of raw and cooked meat products using oligonucleotide probes[J]. *Food Chem*, 1997, 60(3): 437–442.
- [31] Meyer R, Canadrian U, Luethy J. Detection of pork in heated meat products by the polymerase chain reaction[J]. *J AOAC Int*, 1994, 77(3): 617–622.
- [32] Herman BL. Determination of the animal origin of raw food by species-specific PCR[J]. *J Dairy Res*, 2001, 68(3): 429–436.
- [33] Piknova L, Kuchta T. Detection of the beef component in meat products using polymerase chain reaction[J]. *Bull Potravnarskeho Vyskumu*, 2002, 41(2): 107–111.
- [34] Colgan S, O'Brien L, Maher M, *et al.* Development of a DNA based assay for species identification in meat and bone meal[J]. *Food Res Int*, 2004, 34(5): 409–414.
- [35] Ilhak OI, Arslan A. Identification of Meat Species by Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique[J]. *Turk J Vet Anim Sci*, 2007, 31(3): 159–163.
- [36] Kesmen S, Sahin F, Yetin H. PCR assay for the identification of animal species in cooked meat sausages[J]. *Meat Sci*, 2007, 77: 649–653.
- [37] Behrens M, Unthan M, Bronkmann Y, *et al.* Identification of animal species in heated and complex meat products using specific PCR reactions[J]. *Fleischwirtschaft*, 1999, 79(5): 97–100.
- [38] Rea S, Chikuni K, Branciaro R, S *et al.* Use of duplex polymerase chain reaction (duplex-PCR) technique to identify bovine and water buffalo milk used in making mozzarella cheese[J]. *J Dairy Res*, 2001, 68: 689–698.
- [39] Wentao X, Weibin B, Yunbo L, *et al.* Novel common single primer multiplex polymerase chain reaction (CSP-M-PCR) method for the identification of animal species in minced meat[J]. *J Sci Food Agric*, 2008, 88: 2631–2637.
- [40] Wentao X, Weibin B, Yunbo L, *et al.* Novel common single primer multiplex polymerase chain reaction (CSP-M-PCR) method for the identification of animal species in minced meat[J]. *J Sci Food Agric*, 2008, 88: 2631–2637.
- [41] 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.
- [42] Hopwood AJ, Fairbrother KS, Lockley AK, *et al.* An actin gene-related polymerase chain reaction test for identification of chicken in meat mixtures[J]. *Meat Sci*, 1999, 53(4): 227–231.
- [43] Myers MJ, Yancy HF, Farrell DE. Characterization of a polymerase chain reaction-based approach for the simultaneous detection of multiple animal-derived materials in animal feed[J]. *J Food Prot*, 2003, 66: 1085–1089.
- [44] Meyer R, Hofelein C, Luthy J, *et al.* Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food[J]. *J AOAC Int*, 1995, 78(6): 1542–1551.
- [45] Murugaiah C, Noor ZM, Mastakim M, *et al.* Meat species identification and Halal authentication analysis using mitochondrial DNA[J]. *Meat Sci*, 2009, 83(1): 57–61.
- [46] Martinez I, Malhedenyman I. Species identification of meat products by RAPD analysis[J]. *Food Res Int*, 1988, 31(6/7): 459–466.
- [47] Koh MC, Lim CH, Chua SB, *et al.* Random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints for identification of red meat animal species[J]. *Meat Sci*, 1998, 48(3/4): 275–285.
- [48] Martinez I, Danielsdottir AK. Identification of marine mammal species in food products[J]. *J Sci Food Agric*, 2000, 80(4): 527–533.
- [49] Arun Kumar RR, Kumar BD, Sharma P, *et al.* Identification of species origin of meat and meat products on the DNA basis: a review[J]. *Food Sci Nutr*, 2013, Oct 11
- [50] Bottero MT, Dalmaso IA, Nucera D, *et al.* Development of a PCR assay for the detection of the animal tissue in ruminant feeds[J]. *J Food Prot*, 2003, 66(12): 2307–2312.
- [51] Mendoza-Romero L, Verkaar EL, Savelkoul PH, *et al.* Real-time PCR detection of ruminant DNA[J]. *J Food Prot*, 2004, 67(3):550–554.
- [52] Aarts HJ, Bouwel M, Bumjer JB, *et al.* Detection of bovine meat and bone meal in animal feed at a level of 0.1%[J]. *J AOAC Int*, 2006, 89(6): 1443–1446.
- [53] Dooley JJ, Paine KE, Garrett SD, *et al.* Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays[J]. *Meat Sci*, 2004, 68(3): 431–438.

- [54] Rodriguez MA, Garcia T, Gonzalez I, *et al.* TaqMan realtime PCR for the detection and quantitation of pork in meat mixtures[J]. *Meat Sci*, 2005, 70(1): 113–120.
- [55] Lopez-Andreo M, Lugo L, Garrido-Pertierra A, *et al.* Identification and quantification of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction[J]. *Anal Biochem*, 2005, 339(1): 73–82.
- [56] Zhang CL, Fowler MR, Scott NW, *et al.* A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses[J]. *Food Contr*, 2007, 18: 1149–1158
- [57] Yumiko S, Satoshi K, Takeo Y, *et al.* Quantification of pork, chicken and beef by using a novel reference molecule[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2011, 75(9): 1639–1643.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



张小莉, 副研究员, 主要研究方向:
从事食品安全和物种鉴别方法开发。
E-mail: zhangxiaoli_mail@163.com



武会娟, 副研究员, 主要研究方向:
从事生物技术新方法开发, 及其在食品安全和疾病快速检测方面的应用。
E-mail: sunnywhj@126.com