

实时定量 PCR 法对牛肉中鸡源性成份的量化检测

胡智恺, 宋丽萍*, 姜洁, 薛晨玉, 郭淼, 王丹, 赵琳娜

(北京市食品安全监控和风险评估中心生物室, 北京 100041)

摘要: **目的** 实现样品中牛源性成份和鸡源性成份的量化分析。**方法** 通过在基因组单拷贝基因上设计引物, 绘制模板 DNA 扩增标准曲线以及确定牛肉、鸡肉质量与 DNA 浓度的比值常数, 利用实时荧光定量 PCR 技术对四种不同掺混比例的牛鸡瘦肉混合样本中牛源性成份和鸡源性成份所占的质量百分比含量进行分析。**结果** 通过荧光实时定量 PCR 反应的 C_t 值、模板 DNA 扩增标准曲线和质量与 DNA 的比值常数可以计算出样品中所含牛源性成份和鸡源性成份的质量百分比含量, 检测值与理论值之间的绝对误差可控制在 5% 以内, 量化研究结果基本准确。**结论** 对于组织成份单一的样品, 可以通过在基因组单拷贝基因上设计特异性的引物, 利用 PCR 技术实现在质量水平上对食品中动物源性成份的量化分析, 该技术方法的建立可以为肉类掺假监管工作提供有力的技术支持。

关键词: 肉类掺假监管; 量化研究; 实时荧光定量 PCR; 鸡肉; 牛肉

Real-time PCR method for quantitative detection of chicken blending in beef

HU Zhi-Kai, SONG Li-Ping*, JIANG Jie, XUE Chen-Yu, GUO Miao, WANG Dan, ZHAO Lin-Na

(Beijing Municipal Center for Food Safety Monitoring and Risk Assessment, Beijing 100041, China)

ABSTRACT: Objective To quantitatively analyze the beef and chicken in blending samples. **Methods** The primers were designed according to the sequence of the single copy gene. A series of genome DNA were used as standard curve in real-time PCR. The mathematical conversion parameters about the mass of meat and DNA were determined. The weight/weight equivalents of beef and chicken in four blending samples were analyzed using real-time PCR. **Results** The weight/weight equivalents of beef and chicken was determined by calculated using C_t , standard curve and the mathematical conversion parameters about the mass of meat and DNA. The results showed that the absolute error of detection with a tolerance of less than 5%. **Conclusion** Quantitative analyzing of the composition of the animal species in single component sample could be realized using real-time PCR by designing the primer according to the sequence of genome. This research could provide technical support for food safety.

KEY WORDS: meat adulteration; quantitative analysis; real-time PCR; chicken; beef

基金项目: 北京市科委重大专项(食品中植物生长调节剂与物种成分风险多指标同步筛查鉴别和定量技术研究)

Fund: Supported by Key Program for Beijing Municipal Science & Technology Commission (Multi Indicator Synchronous Screening Identification and Quantitative Research on the Plant Growth Regulator and Species Composition of Food)

*通讯作者: 宋丽萍, 博士, 副高级工程师, 主要研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail: slp_0705@sina.com

*Corresponding author: SONG Li-Ping, Senior Engineer, Beijing Municipal Center for Food Safety Monitoring and Risk Assessment, Shixing Street No.64, Shijingshan District, Beijing 100041, China. E-mail: slp_0705@sina.com

1 引言

目前在市场上不同肉类的价格相差很大, 因此有些商贩会故意掺假来牟取利益, 这种行为不但损害了消费者的利益, 而且也干扰了正常市场竞争秩序的建立。通常检测机构会应用荧光实时定量 PCR 检测技术, 通过使用针对不同物种线粒体基因设计获得的特异性引物, 对食品中的动物源性成份进行鉴定^[1-4]。线粒体基因进化速度快, 物种的区分度高, 在科研上宜为物种分类的靶基因^[5-9]。但是, 在食品物种鉴定工作中, 该种检测技术则表现出其特有的局限性。这种局限性主要表现为不同物种细胞中线粒体的拷贝数各不相同, 因此, 以线粒体为靶基因的检测很难定量分析出食品中的动物源性成份的组成比例, 这对于监管执法是相当不利的^[1, 10-13]。因此, 急需研发出一种可以有效判定肉类食品是否掺杂使假的技术手段。

与线粒体基因相比, 一些持家基因属于单拷贝基因, 有利于进行量化分析^[14, 15]。Rene 等^[16]开始探索定量分析食品中的动物源性成份的技术方法, 他们的研究报告指出, 使用根据基因组中单拷贝基因设计的引物进行荧光实时定量 PCR 实验可以在基因水平上对动物源性成份的定量分析。宋丽萍等^[17]根据猪的单拷贝基因 β -actin 和绵羊的单拷贝基因催乳素受体所设计的特异性引物对猪、羊混合的纯瘦肉样本中的动物源性成份进行定量分析, 获得满意结果。

本文为了初步探讨定量分析食品中牛和鸡源性成份组成的可能性, 采用牛瘦肉和鸡瘦肉作为研究样本, 以基因组中单拷贝基因为靶基因设计引物和探针, 通过绘制标准曲线和确定基因质量比系数, 实现对生鲜牛肉中掺有鸡肉的比例进行定量检测。为肉类掺假量化研究的进一步发展提供方法借鉴。

2 材料与方法

2.1 材料与仪器

实验中所用牛肉和鸡肉均为精瘦肉, 购于北京市石景山区的物美超市(西黄村店)。混合肉样制备的比例(牛肉: 鸡肉)为 20%: 80%, 40%: 60%, 60%: 40% 和 80%: 20%。

荧光 PCR 试剂(premix Ex Taq TM)购于 TaKaRa 公司。其他常用试剂均是国产试剂。

3K18 离心机购自美国 Sigma 公司; MyiQ 单色实时定量 PCR 仪购自美国伯乐公司; 核酸测定仪(Eppendorf Biophotometer Plus)购自 Eppendorf 公司。

2.2 实验方法

2.2.1 DNA 提取

将样品用液氮研磨至粉状。加入 CTAB, 65 °C 水浴 30 min, 5000 r/min, 4 °C, 离心 5 min, 取上清液; 加入等体积的酚/氯仿混合物, 剧烈震荡, 12000 r/min, 4 °C, 离心 15 min, 取上清液; 加入等体积的氯仿, 剧烈震荡, 12000 r/min, 4 °C, 离心 10 min, 取上清液; 加入等体积的异丙醇, -20 °C 放置 10 min, 12000 r/min, 4 °C, 离心 10 min, 弃上清液; 加入 75% 的乙醇, 7500 r/min, 4 °C, 离心 5 min, 弃上清液, 晾干沉淀。用 200 μ L 的无核酸水溶解沉淀。并测定 DNA 的浓度。

2.2.2 标准曲线的绘制

分别取 50 ng、100 ng、150 ng、200 ng、250 ng、300 ng 和 350 ng 的牛源性 DNA 和鸡源性 DNA 为模板进行实时荧光 PCR 扩增。以 lg DNA 为横坐标, Ct 值为纵坐标作图, 分别绘制牛源性 DNA 和鸡源性 DNA 的扩增标准曲线。

2.2.3 实时荧光 PCR 扩增

2.2.3.1 引物和探针 所有的引物和探针在赛百盛生物公司合成, 探针的荧光标记为 5'-FAM 和 3'-TAMRA。具体的引物和探针序列见表 1 (表 1 中核酸序列的方向为 5'-3')。

表 1 实验所用的引物和探针列表
Table 1 The sequence of primers and probe

引物/探针名称	工作浓度(pmol)	序列	扩增长度 (bp)
Beef F	10	GTAGGTGCACAGTACGTTCTGAAG	
Beef R	10	GGCCAGACTGGGCACATG	96
Beef Probe	10	CGGCACACTCGGCTGTGTTCCTTGCA	
Chicken F	10	CCAACATGCCTTTAAACCCTCA	
Chicken R	10	GGAAGTGTAGCCTTCTGACTCG	76
Chicken Probe	10	TGCCTTTCCTTCCCCGCCAGTCTC	

注: 表中所有核酸序列均为 5'-3' 方向。

2.2.3.2 实时荧光 PCR 反应体系 反应体系为 20 μL , 其中模版 DNA 2 μL (阴性对照用水代替 DNA 模板), 2 \times Premix Ex Taq 10 μL , 上、下游引物各 0.5 μL (10 pmol/ μL), 探针 1 μL (10 pmol/ μL)。

2.2.3.3 实时荧光 PCR 扩增条件 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$, 5 s; 60 $^{\circ}\text{C}$, 30 s。进行 40 个循环。

2.2.3.4 数据计算方法 在本实验中 $M=d\times\text{DNA}$ (公式 1), 其中 d 为常数, 是不同肉类样品质量与该样品所提出的 DNA 质量数的比值(即 $d=M/\text{DNA}$)。

3 结果与分析

3.1 引物及探针的特异性检测

所有引物均需进行特异性检测以确保进行荧光实时 PCR 检测反应的准确性。分别以羊、牛、猪、鸡、鸭、狗、猫、鼠的 DNA 作为扩增模板, 用 1.2.3 的方法进行荧光实时 PCR 反应。实验结果如表 2 所示, 表 1 中所设计的引物均具有很好的特异性。

3.2 牛肉和鸡肉 DNA 扩增标准曲线的绘制

为了使用荧光实时 PCR 技术检测混合样品中不同动物源性成分的百分比含量, 有必要绘制牛源性和鸡源性 DNA 的扩增标准曲线。按照 1.2.3 的方法进行荧光实时 PCR 扩增反应, 如图 1 所示, 牛源性和鸡源性 DNA 的荧光 PCR 扩增的 C_t 值与 \lg DNA 含量之间呈线性关系, 其函数关系式分别为: 牛源性 $Y=-4.19X+35.39$; 鸡源性 $Y=-3.566X+34.17$ 。其中 Y 为 C_t 值, X 为 Lg DNA 值。

3.3 相同质量的牛肉和鸡肉所提出的 DNA 浓度差异

为使用荧光实时 PCR 技术检测样品中不同动物源性成分的质量百分比, 有必要检测相同质量牛肉

和鸡肉提取的 DNA 浓度差异。分别取 0.1 g 和 0.05 g 牛肉和鸡肉, 按照 1.3.1 的方法提取 DNA, 实验结果如表 3 所示。当质量为 0.1 g 时, $d_{\text{牛}}=M_{\text{牛}}/\text{DNA}_{\text{牛}}=1120$, $d_{\text{鸡}}=M_{\text{鸡}}/\text{DNA}_{\text{鸡}}=170$; 当质量为 0.05 g 时, $d_{\text{牛}}=M_{\text{牛}}/\text{DNA}_{\text{牛}}=1190$, $d_{\text{鸡}}=M_{\text{鸡}}/\text{DNA}_{\text{鸡}}=226$ 。其中不同质量时, d 的差异可能是由于操作误差或者仪器检测误差造成。在本研究中 d 取两次实验的平均值, 即 $d_{\text{牛}}=1155$, $d_{\text{鸡}}=198$ 。

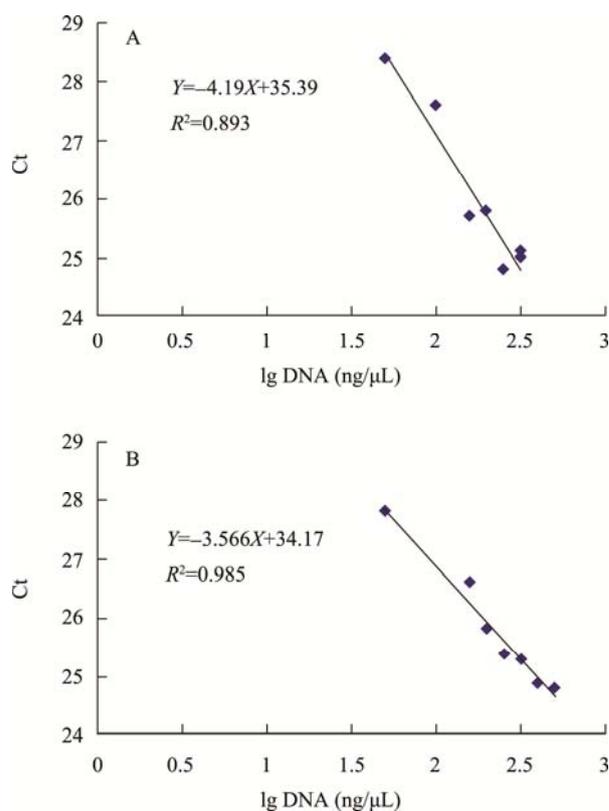


图 1 牛源性 DNA 和鸡源性 DNA 的扩增标准曲线

Fig. 1 The DNA amplification standard curve
注: A 为牛源性扩增标准曲线, B 为鸡源性扩增标准曲线。

表 2 引物与探针的 DNA 扩增特异性验证
Table 2 The DNA amplification results for testing the primers and probe

项目	羊	牛	猪	鸡	鸭	狗	猫	鼠
牛引物及探针(C_t)	N/A	27.01	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
鸡引物及探针(C_t)	N/A	N/A	N/A	27.63	N/A	N/A	N/A	N/A

注: 表中 DNA 浓度为三次实验的平均值。N/A 为 40 个循环的扩增未检测到荧光值

表 3 相同质量牛肉和鸡肉所提 DNA 的浓度
Table 3 The DNA concentration extracted in the same quality of beef and chicken

样品名称	质量(g)	DNA (ng/ μ L)	D (μ L)
牛肉	0.1	88.7	1155
	0.05	41.9	
鸡肉	0.1	580.5	198
	0.05	220.4	

3.4 检测样品中牛肉和鸡肉的所含百分比含量

按照表 4 进行混合肉样的制备。分别按照方法 2.2.1 提取基因组 DNA 作为荧光实时定量 PCR 的模板 DNA。按照方法 2.2.3 进行 PCR 扩增。实验结果见表 4。根据扩增的标准曲线, 计算出样品中所含有的相应物种的 DNA 含量; 根据公式 1 计算样品中相应物种的质量; 再进一步计算出质量百分比。对照检测结果与理论值可以发现, 检测质量百分比数值与理论质量百分比数值之间的绝对误差可以控制在 5% 以内, 量化研究结果基本准确。

4 讨论

本研究通过在基因组单拷贝基因上设计特异性引物和探针, 应用荧光实时定量 PCR 技术初步探索了量化判定食品中动物源性成份的技术方法。对于新鲜的牛瘦肉和鸡瘦肉的混合样本, 应用该技术方法, 可以实现质量水平上的成份百分比含量分析, 实验的绝对误差值可以控制在 5% 之内。本研究的实验结果可以用于监测市场中牛羊肉切片的真伪, 通过定量的检测结果, 为市场监管执法提供有力的技术保障。

此外, 本方法将基因组中单拷贝基因作为检测靶点, 虽然可以实现食品中动物源性成份基因水平的定量分析, 但是对于成份复杂的食品, 很难实现将基因水平的定量分析结果转化成质量水平上的定量分析结果。这主要是由于不同物种、不同组织之间细胞密度不同, 基因含量也不相同。虽然, 科学家们不断尝试利用不同技术方法进行定量分析, 但是目前在质量水平上定量分析食品中动物源性成份的组成仍然属于技术瓶颈, 有待突破。

表 4 混合肉样中牛肉和鸡肉含量的定量检测
Table 4 Measured values of beef and chicken samples

	1		2		3		4	
	牛肉	鸡肉	牛肉	鸡肉	牛肉	鸡肉	牛肉	鸡肉
理论质量(g)	0.02	0.08	0.04	0.06	0.06	0.04	0.08	0.02
理论混合比例(质量百分比%)	20%	80%	40%	60%	60%	40%	80%	20%
DNA (ng)	19.99	371.53	33.11	309.03	44.67	147.91	56.23	89.12
检测质量(g)	0.023	0.074	0.038	0.061	0.052	0.029	0.065	0.018
检测混合比例(质量百分比%)	23.7	76.3	38.3	61.7	64.2	35.8	78.3	22.7

参考文献

- [1] Rodriguez MA, Garcia T, Gonzalez I, *et al.* Quantitation of mule duck in goose foie gras using TaqMan real-time Polymerase Chain Reaction [J]. J Agric Food Chem, 2004. 52(6): 1478-1483.
- [2] 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.
- [3] Chiappini B, Brambilla G, Agrimi U, *et al.* Real-time polymerase chain reaction approach for quantitation of ruminant-specific DNA to indicate a correlation between DNA amount and meat and bone meal heat treatments [J]. J AOAC Int, 2005. 88(5): 1399-1403.
- [4] Wang TH, Chang YL, Peng HH, *et al.* Rapid detection of fetal aneuploidy using proteomics approaches on amniotic fluid supernatant [J]. Prenat Diagn, 2005. 25(7): 559-566.

- [5] Pray-Grant MG, Daniel JA, Schieltz Z, *et al.* Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation [J]. *Nature*, 2005. 433(7024): 434–438.
- [6] Guo J, Guo A. Crossmodal interactions between olfactory and visual learning in *Drosophila* [J]. *Science*, 2005. 309(5732): 307–310.
- [7] Elias M, Hill RI, Willmott KR, *et al.* Limited performance of DNA barcoding in a diverse community of tropical butterflies [J]. *Proc Biol Sci*, 2007. 274(1627): 2881–2889.
- [8] Vences M, Thomas M, Thomas M, *et al.* Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2005. 360(1462): 1859–1868.
- [9] Armstrong KF, Ball SL. DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2005. 360(1462): 1813–1823.
- [10] Robin ED, Wong R. Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells [J]. *J Cell Physiol*, 1988. 136(3): 507–513.
- [11] Brown WM, George M, Wilson AC. Wilson, Rapid evolution of animal mitochondrial DNA [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. 76(4): 1967–1971.
- [12] Thiebot MH. Some evidence for amnesic-like effects of benzodiazepines in animals [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 1985. 9(1): 95–100.
- [13] Bellagamba F, Moretti VM, Comincini S, *et al.* Identification of species in animal feedstuffs by polymerase chain reaction--restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA [J]. *J Agric Food Chem*, 2001. 49(8): 3775–3781.
- [14] Fajardo V, Gonzalez I, Martin I, *et al.* Real-time PCR for detection and quantification of red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) in meat mixtures [J]. *Meat Sci*, 2008. 79(2): 289–298.
- [15] Rodriguez MA, Garcia T, Gonzalez L, *et al.* TaqMan real-time PCR for the detection and quantitation of pork in meat mixtures [J]. *Meat Sci*, 2005. 70(1): 113–120.
- [16] Koppel R, Daniels M, Claudia Brunen-Nieweler. Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from duck, goose, chicken, turkey and pork [J]. *Eur Food Res Technol*, 2013, 236(2): 1093–1098.
- [17] 宋丽萍, 薛晨玉, 路勇, 等. 应用实时荧光 PCR 技术定量检测羊肉中的猪肉成分[J]. *食品科技*, 2014, 39(10): 319–322.
- Song LP, Xue CY, Lu Y, *et al.* Detection and quantification pork in sheep products using real-time PCR [J]. *Food Sci Technol*, 2014, 39(10): 319–322.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



胡智恺, 本科, 主要研究方向为食品安全。

E-mail: 18010289057@163.com



宋丽萍, 副高级工程师, 博士, 主要研究方向为生物化学与分子生物学。

E-mail: slp_0705@sina.com