

肉制品中牛源性成分多重实时荧光 PCR 检测方法的建立及初步应用

孙晶莹¹, 孙丽君¹, 王晓红², 霍雪萍¹, 齐宗利¹, 王 珍¹, 李 元¹, 胡 军^{1*}

(1. 陕西省人民医院中心实验室, 西安 710068; 2. 陕西省食品药品检验所, 西安 710065)

摘要: **目的** 建立肉制品中牛源性成分的荧光 PCR 检测方法。**方法** 根据牛特异性线粒体 DNA 片段, 设计合成两对引物, 以生、熟牛肉及超市牛肉加工品为材料, 建立肉制品中牛源性成分的多重实时荧光 PCR 检测方法, 并用该法与国标法同时对市售的 25 份肉制品同时进行检测, 通过对其他种类的肉源 DNA 进行扩增验证方法的特异性; 对含有不同比例牛肉成分的 DNA 样本进行检测确定检出限。**结果** 该方法可成功检测出肉制品中的牛源性成分。在 25 份肉制品检测中, 与国标法检测结果一致。该法的特异性为 100%, 灵敏度检测线为 1%。**结论** 本研究成功建立牛源性肉制品的检测方法, 该方法快速简便, 且具有较高的特异性和灵敏度, 可用于市售肉制品中牛源性成分的鉴定。

关键词: 多重实时荧光 PCR; 牛源性成分; 肉制品

Establishment and application of multiple real-time fluorescent PCR to detect the beef ingredient in meat products

SUN Jing-Ying¹, SUN Li-Jun¹, WANG Xiao-Hong², HUO Xue-Ping¹, QI Zong-Li¹,
WANG Zhen¹, LI Yuan¹, HU Jun^{1*}

(1. Central Laboratory of Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China; 2. Shaanxi Provincial Institute for Food and Drug Control, Xi'an 710065, China)

ABSTRACT: Objective To establish a multiple real-time fluorescent PCR method for the determination of beef ingredient in meat product. **Methods** Two cattle-specific primers were designed according to the bovine specific mitochondrial DNA fragments, raw, cooked beef and beef processed products were used as materials, multiple real-time fluorescent PCR method was established to detect the beef ingredient in twenty-five beef products, and national standard method was used as positive control. The specificity of the method was verified through the detection of DNA from the meat of other species, and the limit of detection was determined by testing several samples with different proportions of beef. **Results** The results showed that this method could successfully detect the beef ingredient in meat products. Our results were almost the same as the national standard detection methods in detecting 25 meat samples, with detection rate of 100% and detection limitation of 1%. **Conclusion** A multiple real-time fluorescent PCR method is successfully established. This method is simple, rapid and has high specificity

基金项目: 陕西省科技计划项目(2016KTCQ03-04)

Fund: Supported by the Science and Technology Project of Shaanxi Province (2016KTCQ03-04)

*通讯作者: 胡军, 博士, 研究员, 主要研究方向为微生物学、免疫学、肿瘤生物学及食品安全检测。E-mail: 530490203@qq.com

*Corresponding author: HU Jun, Ph.D., Researcher, Central Laboratory of Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China. E-mail: 530490203@qq.com

and sensitivity, which can be applied to identify the beef ingredient in meat products on sales.

KEY WORDS: multiple real-time fluorescent PCR; beef ingredient; meat products

1 引言

肉制品的质量安全问题正日益成为关系国计民生的重大问题,越来越受到关注^[1]。随着人民生活水平的提高、食品质量安全检测技术的不断完善和更新,食品掺杂的手段也在不断提高。据报道,许多不法企业和个人使用廉价的猪肉或鸭肉等肉类原料冒充牛肉、羊肉,将生产的食品进行销售,严重侵犯了消费者的合法权益^[2]。这种食品掺杂方法由于其隐蔽性,经常被不法商贩使用。食品问题不仅涉及经济、营养价值和食品安全等方面,而且涉及宗教信仰,因此,对原料肉进行物种鉴定显得十分必要。

目前,针对动物源性食品鉴定的主要检测方法有:色谱法^[3]、近红外光谱法^[4]、酶联免疫吸附法^[5]、电子鼻技术^[6]和分子生物学方法^[7,8],其中分子生物学方法中多重实时荧光 PCR 检测技术是鉴别食品中肉类成分的主要应用技术。目前,许多检测标准中均使用基于多重实时荧光 PCR 技术的检测方法,多重实时荧光 PCR 技术以 DNA 为模板,设计特异引物,在封闭的体系中进行扩增和实时检测,无需电泳就可以对结果进行分析,而传统的 PCR 产物需要反应完成后进行琼脂糖凝胶电泳,因此多重实时荧光 PCR 避免了传统 PCR 产物的污染和电泳染料 EB 带来的危害,缩短了检测时间,且扩增目的片段较短,尤其适用于加工食品的检测,实时荧光 PCR 技术已经逐步取代了一般的 PCR 方法^[9]。

本研究旨在利用多重实时荧光 PCR 技术建立加工肉制品中牛源性成分的检测方法,通过设计两对引物,利用多重实时荧光 PCR 方法,能检测到所有牛种属的牛源性成分。建立的这个方法能够为快速检测肉制品中的牛源性成分构建技术平台,并作为一种推荐性方法被质检部门推广应用,同时为质检部门打击不法商贩、维护消费者合法权益提供有力的科学依据。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 样品来源

实验用鲜牛肉、熟牛肉、肉干、肉酱、火腿等肉制品购于当地超市。

2.1.2 主要试剂与仪器

Tissue DNA Kit(美国 OMEGA); 蛋白酶 K(北京天根生物科技有限公司); SYBR II (TAKARA); 其余试剂均为分析纯。

荧光 PCR 扩增仪 ABI7500(美国 life 公司)、高速可调离心机 D2012 plus(北京大龙兴创)、NANODROP 2000C 紫外分光光度计(美国 Thermo scientific 公司)、分析天平 100-2(上海

天平仪器厂)、漩涡振荡器 MX-S(北京大龙兴创公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 引物设计与合成

根据 GenBank 中查询的牛源性特异性 DNA 序列,利用 Primer 5.0 软件设计合成两对特异性引物及一对内参引物,并由上海生工生物工程技术有限公司合成,其序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

编号	引物	序列(5'-3')
P1	牛 1-上游	5'-CCCTCTGTTTCGATGATCCGTAA-3'
P2	牛 1-下游	5'-ATTTAGGTTCCGGTCTGTTAATAGC-3'
P3	牛 2-上游	5'-TATCTACTATTTGGTGCTTGG-3'
P4	牛 2-下游	5'-AATGCGTGTGCGGTTACAAC-3'
P5	内参-上游	5'-TCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTA-3'
P6	内参-下游	5'-AATTGCGCGCCTGCTGCCTTCCT-3'

2.2.2 DNA 的提取

按照 Tissue DNA Kit 说明书中的方法对样品中的 DNA 进行提取:取组织约 30 mg,加入 200 μ L 裂解液和 5 μ L 蛋白酶 K,56 $^{\circ}$ C 水浴消化 3 h,离心取上清液,加入 220 μ L BL,70 $^{\circ}$ C 孵育 10 min,加入 220 μ L 无水乙醇,混匀后过柱,用 Wash buffer 清洗柱子,最后加入 200 μ L 洗脱液对样品中的 DNA 进行洗脱。

2.2.3 DNA 含量的测定

取 1 μ L 模板 DNA,使用核酸检测仪 NANODROP 2000C 紫外分光光度计对核酸进行检测,以 A_{260}/A_{280} 比值确认所提取的 DNA 是否满足后续的实验要求。若 A_{260}/A_{280} 比值在 1.8~2.0 之间,则提取的 DNA 模板质量较好,同时对各个样品中的 DNA 模板进行稀释,保证终浓度为 50 ng/ μ L。

2.2.4 样本筛选

采购的肉制品先用国标法(SN/T 2557-2010)检测阳性,筛选的阳性标本利用本研究方法验证。

2.2.5 多重实时荧光 PCR 扩增体系及条件

多重实时荧光 PCR 反应体系的总体积为 20 μ L,牛源性成分检测体系包含 SYBR II 10 μ L、p1、p2、p3 和 p4 各 0.5 μ L、模板 1 μ L 及去离子水 7 μ L;内参检测 PCR 体系包含 SYBR II 10 μ L、p6 0.5 μ L、p7 0.5 μ L、模板 1 μ L 及去离子水 8 μ L。

经过摸索多重实时荧光 PCR 的退火温度将反应条件优化为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,60 $^{\circ}$ C 退火 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,35 个循环,溶解曲线条件:60 $^{\circ}$ C 15 s,90 $^{\circ}$ C 15 s。

表 2 特异性检测
Table 2 Test results of specificity

引物	样本									阴性
	猪	牛	羊	鸡	鸭	鹅	驴	马	鼠	
牛	—	14.59	—	—	—	—	—	—	—	—
内参	16.08	16.80	14.37	16.85	16.61	15.62	15.50	15.38	16.50	—

注: 表中数字为检测 Ct 值, 若 Ct 值 < 30 则判定为含有所检成分, Ct 值 ≥ 30 则判定为不含有所检成分。

2.2.6 引物特异性验证

选取提取得到的不同动物源性的 DNA, 质量浓度为 50 ng/μL, 分别用该方法进行多重实时荧光 PCR 方法检测, 根据各个反应体系 Ct 值(cycle threshold)验证引物对于不同模板 DNA 的特异性。

2.2.7 灵敏度检测

将提取的牛肉 DNA(50 ng/μL)进行稀释, 牛肉的含量依次为 20%、10%、5%、2%、1%(V:V), 6 个稀释度的模板均进行牛源性成分的多重实时荧光 PCR 检测, 获得多重实时荧光 PCR 对牛肉模板的最低检测线。

2.2.8 牛源性多重实时荧光 PCR 方法的应用

利用该方法与国标方法(SN/T 2557-2010)同时对 30 个样本进行检测, 验证方法的准确性。

3 实验结果

3.1 多重实时荧光 PCR 检测结果

(1)结果有效性判定: 阴性对照无荧光信号, 阳性对照有荧光信号, Ct 值小于 30。

(2)DNA 提取有效性判定: 样本内参有荧光信号, Ct 值小于 25。

(3)样本牛源性成分检测结果判定: 在符合 2.2.1 和 2.2.2 的条件下, 样品目的基因体系中有荧光信号, Ct 值小于 30, 表明有牛源性成分检出, Ct ≥ 30 则表明未检出牛源性成分。

3.2 方法特异性

为证明多重实时荧光 PCR 的可靠性, 选取了分别来自猪、牛、羊、鸡、鸭、鹅、驴、马和鼠的 9 种肉制品样本进行检测, 结果如表 2 所示。检测结果显示, 只有牛肉制品样本的结果为阳性, 其余物种的肉制品样本均为阴性, 表明所设计的两对引物能用于多重实时荧光 PCR 对牛源性成分的检测, 同时对其他种属没有干扰, 由此可证明此方法的特异性。

3.3 方法的灵敏度

将提取的牛肉 DNA(50 ng/μL)进行稀释, 牛肉的含量依次为 20%、10%、5%、2%、1% 6 个稀释度的模板均进行牛源性成分的多重实时荧光 PCR 检测, 获得多重实时荧

光 PCR 对牛肉模板的最低检测线, 检测灵敏度可达 1%, 结果如表 3 所示。

表 3 灵敏度检测结果
Table 3 Test results of sensitivity

牛 DNA 含量	引物		判定结果
	牛	内参	
20%	15.89	17.31	+
10%	16.79	17.48	+
5%	17.68	17.96	+
2%	19.89	17.83	+
1%	20.82	17.67	+

注: 表中数字为检测 Ct 值, 若 Ct 值 < 30 则判定为含有所检成分, Ct 值 ≥ 30 则判定为不含有所检成分。

3.4 多重实时荧光 PCR 与国标方法检测比较

利用国标牛源性检测方法和 2.2 中的方法对收集的 25 份牛肉类样本进行检测结果如表 4 所示。从表中可以看出, 利用本研究中的方法对上述 25 份样本进行检测的结果与国标检测结果一致, 证明该方法的阳性检出率为 100%。

表 4 样本的多重荧光 PCR 检测
Table 4 Multiple fluorescence PCR detection of samples

样品名称	国标方法 (SN/T 2557-2010)	多重实时荧光 PCR 方法
牛肚	+	+
牛板筋	+	+
麻辣牛肉	+	+
牛肉粒	+	+
牦牛肉	+	+
牛肉火腿 1	+	+
牛肉火腿 2	+	+
牛肉火腿 3	-	-
菲力牛排	+	+

续表 4

样品名称	国标方法 (SN/T 2557-2010)	多重实时荧光 PCR 方法
西冷牛排	+	+
牛肉酱	+	+
酱牛肉	+	+
腊牛肉	+	+
黄牛肉	+	+
牛肉罐头(牦牛)	+	+
牛肉卷 1	+	+
牛肉卷 2	+	+
牛肉卷 3	+	+
牛肉卷 4	+	+
牛肉卷 5	-	-
精品牛肉 1	+	+
精品牛肉 2	+	+
精品牛肉 3	+	+
精品牛肉 4	+	+
精品牛肉 5	-	-

注: 1. 牛肉卷 1、2、3、4 和精品牛肉 1、2、3、4 分别为不同厂家的样本编号; 2. 表中数值为样本 Ct 值的测定结果, 若 Ct 值 < 30 则判定为含有所检成分, Ct 值 ≥ 30 则判定为不含有所检成分。

4 讨 论

研究结果表明, 当肉被加热到 80 °C 时, 其 DNA 片段长度不会受到影响, 但当温度达到 100 °C 时, 其 DNA 片段长度会锐减至 1100 bp, 至 120 °C 时减至 600 bp 以下^[10,11], 因此肉类的高温加工过程会导致 DNA 片段锐减, 因此, 本试验根据牛线粒体 DNA 的特点选择扩增效果最稳定的引物, 在选择扩增长度上选择了短片段, 即使经过了高压处理的牛肉类加工品, 肉中的模板 DNA 也不至于被破坏而出现假阴性的结果; PCR 时当检测样本中的 DNA 含量很少时, 时常无法确定是否是因为 DNA 的含量而导致的检测阴性, 设计一个内源基因便可解决这种假阴性的问题, 因此我们设计了内参引物, 有效检测了 DNA 的提取效率, 避免假阴性的产生。

本研究建立的多重实时荧光 PCR 方法与国标法同时对市售的 25 种牛肉制品进行检测, 两种方法的检测结果完全符合, 同时建立的多重实时荧光 PCR 方法弥补了普通 PCR 方法的不足, 而且与常规 PCR 相比, 它具有特异性更强、有效解决 PCR 污染问题、自动化程度高等特点, 目前已在动植物基因工程、微生物和医学领域中得到广泛应用,

定性分析可满足市场检测的要求, 同时该方法也为肉制品中各源性成分含量的检测奠定了基础^[12]。为食品监管部门加强食品安全管理、打击肉制品市场上的以廉价肉冒充牛肉的现象提供了强有力的技术支持, 为更好地保证消费者的健康及保护其合法权益奠定了基础^[13]。

5 结 论

利用多重实时荧光 PCR 检测方法能够快速、高效地检测肉制品中的牛源性成分, 检出限可以达到 1%, 能够满足市场上肉制品中牛源性成分检测的需要。本研究所建立的多重实时荧光 PCR 方法检测时间短、操作简便且结果准确可靠, 对市场上产品中动物源性成分的检测有借鉴意义。

参考文献

- [1] 王梅. 肉制品检测技术的应用[J]. 肉类研究, 2009, (7): 50-53.
Wang M. Application of technology in meat food detection [J]. Meat Res, 2009, (7): 50-53.
- [2] 何玮玲, 张驰, 杨静, 等. 食品中 4 种肉类成分多重 PCR 的快速鉴别方法[J]. 中国农业科学, 2012, 45(9): 1873-1880.
He WL, Zhang C, Yang J, et al. A quick multiplex pcr method for the identification of four meat ingredients in food products [J]. Sci Agric Sin, 2012, 45(9): 1873-1880.
- [3] Schonherr J. Analysis of products of animal origin in feeds by determination of carnosine and related dipeptides by high-performance liquid chromatography [J]. Agric Food Chem, 2002, 50(7): 1945-1950.
- [4] 赵红波, 谭红, 史会兵, 等. 近红外光谱技术鉴别猪肉和牛肉的研究[J]. 中国农学通报, 2011, 27(26): 151-155.
Zhao HB, Tan H, Shi HB, et al. Identification of pork and beef by near infrared spectroscopy [J]. Chin Agric Sci Bull, 2011, 27(26): 151-155.
- [5] Kreuz G, Zagon J, Broll H, et al. Immunological detection of osteocalcin in meat and bone meal: a novel heat stable marker for the investigation of illegal feed adulteration [J]. Food Addit Contam A, 2012, 29(5): 716-726.
- [6] Nurjuliana M, Cheman YB, Mathshin D. Rapid identification of pork for halal authentication using the electronicnose and gas chromatography mass spectrometer with headspace analyzer [J]. Meat Sci, 2011, 88(4): 638-644.
- [7] 曾少灵, 秦智锋, 阮周曦, 等. 多重实时荧光 PCR 检测牛、山羊和绵羊源性成分[J]. 生物工程学报, 2009, 25(1): 139-146.
Zeng SL, Qing ZF, Zhou XR, et al. Multiplex fluorescent real-time PCR detection of bovine, goat and sheep derived materials in animal products [J]. Chin J Biotechnol, 2009, 25(1): 139-146.
- [8] 汪琦, 张昕, 赵大贺, 等. 利用 12S rRNA 基因的限制性酶切末端片段长度多态性鉴定动物种类[J]. 食品科学, 2010, 31(2): 214-219.
Wang Q, Zhang X, Zhao DH, et al. Identification of animal species by terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene [J]. Food Sci, 2010, 31(2): 214-219.
- [9] Liu XH, Ma GP, Shi XJ, et al. Advance in the detection methods of commercial animal-derived materials [J]. Prog Vet Med, 2007, 28(10): 91-94.
- [10] Ebbehoj EF, Thomsen PD. Species differentiation of heated meat products

by DNA hybridization [J]. Meat Sci, 1990, 30: 221–234.

[11] Ebbehoj EF, Thomsen PD. Species differentiation of heated meat products by DNA hybridization [J]. Meat Sci, 1991, 31: 359–366.

[12] 孙艳华, 张智禹, 牛晋阳, 等. PCR法快速检测熟肉制品中肉类来源[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(5): 139–142.

Sun YH, Zhang ZY, Niu JY, *et al.* Rapid detecting meat source in cooked meat by PCR method [J]. Food Res Dev, 2010, 31 (5): 139–142.

[13] 巩红霞, 任永宏, 巩强. 用多重 PCR 方法鉴别生羊肉的真假[J]. 中国畜牧兽医, 2006, 33(8): 38–39.

Gong HX, Ren YH, Gong Q. Identification of true or false of raw mutton by multiplex PCR method [J]. Chin Anim Husb Vet Med, 2006, 33(8): 38–39.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



孙晶莹, 助理工程师, 主要研究方向为分子生物学与食品安全检测。
E-mail: sjy0421@126.com



胡军, 博士, 研究员, 主要研究方向为微生物学、免疫学、肿瘤生物学及食品安全检测。
E-mail: 530490203@qq.com