

# 膜芯片用于肉制品中动物源性成分检测的研究

范宏伟, 吴鑫, 朱应飞, 王栋\*

(江西省食品检验检测研究院, 南昌 330001)

**摘要:** **目的** 研究膜芯片技术检测肉类及其制品中动物源性成分, 验证该技术的准确性及可行性。**方法** 利用膜芯片检测肉制品中的动物源性成分, 对样品中猪、牦牛、驴及羊源性成分的灵敏度、检出限进行相关实验, 并就实际样品的检测与国家标准进行比较。**结果** 该技术用于动物源性成分检测特异性良好, 4种动物源性检测的灵敏度为0.1 ng, 检出限为0.1%(w:w), 适用的样品种类较广, 实际样品的检测结果与国家标准荧光PCR法一致。**结论** 该技术可作为快速筛选的方法, 为肉制品的动物源性成分鉴定和掺假检测提供理论依据。

**关键词:** 膜芯片技术; 肉制品; 荧光PCR

## Application of film chip for detection of animal-derived components in meat products

FAN Hong-Wei, WU Xin, ZHU Ying-Fei, WANG Dong\*

(Jiangxi Food Inspection Testing Institute, Nanchang 330001, China)

**ABSTRACT: Objective** To investigate the application of film chip technology for detection of animal-derived components in meat and its products, and to verify the accuracy and feasibility of the technology. **Methods** Animal-derived components in meat products were detected by using film chip, the sensitivity and limit of detection (LOD) for components of *Sus scrofa domestica*, *Bos mutus*, *Equus asinus* and *Ovis aries* were tested in samples, and the detection results of actual samples by film chip were compared with those by the national standards. **Results** The technique had good specificity for detection of animal-derived components. The sensitivities of the technology was 0.1 ng and the LODs were 0.1% (w:w) for the 4 kinds of animal-derived components. The technology was applicable to a wide range of samples. The test results of the actual samples by film chip were in accordance with those by national standard of fluorescence PCR method. **Conclusion** This technique can be used as a rapid screening method, which provides theoretical basis for adulteration detection and identification of animal-derived components in meat products.

**KEY WORDS:** film chip technology; meat products; fluorescence PCR

## 1 引言

肉类及其制品一直是深受我国广大消费者喜爱的一

类食品。近年来,我国肉制品行业进入黄金发展时期,成为我国食品工业中发展最快、成长最好的行业之一。目前,我国已成为世界上最大的肉类食品生产大国和消费大国

基金项目: 江西省食品药品监督管理局科研项目(2016SP14)

Fund: Supported by Research Project of Jiangxi Food and Drug Administration (2016SP14)

\*通讯作者: 王栋, 主任中药师, 硕士生导师, 主要研究方向为实验室质量管理、药物分析及食品检验检测。E-mail: hovyfan@qq.com

\*Corresponding author: WANG Dong, Chief Pharmacist, Jiangxi Food Inspection Testing Institute, No.213 Jinggangshandadao, Qingyunpu District, Nanchang 330001, China. E-mail:hovyfan@qq.com

[1]。然而,随着肉类价格差异逐步拉大,有些商家为了利益铤而走险,将低价肉掺入、甚至冒充高价肉,导致市场上肉类掺假现象越来越常见。这种违法行为不仅打击了消费信心,使消费者的利益受到损失,更严重的是包含一些导致食品安全问题的潜在风险,比如兽药滥用、动物疫病等[2]。

目前已有多种利用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)等方法对肉类及其制品进行动物源性成分检测的标准。这些标准使用包括聚合酶链式反应技术、环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)、核酸印迹法(southern 杂交)和基于分子杂交的基因芯片技术等检测方法,对肉类及其制品进行筛查和检测。但是常规的电泳检测结果很难判断,容易出现假阳性和假阴性结果,且由于肉类掺假大多是有意为之,造假的肉品种多种多样,导致利用常规 PCR 方法进行检测的难度及工作量剧增[3],因此亟需一种快速准确筛选肉类及其制品的动物源性成分的方法。

膜芯片技术是一种基于膜如硝酸纤维素膜或尼龙膜等的可视基因芯片技术。将人工合成的碱基序列作为探针固定在硝酸纤维素膜或尼龙膜上,如果待测物中含有与探针碱基互补的序列,当杂交时特定序列会被探针捕获,通过酶-底物显色,从而产生肉眼可辨的信号[4]。Ballin 等[5]总结了大量肉制品成分灵敏度检测的试验结果,其研究表明,基因芯片法、普通 PCR 法、荧光定量 PCR 法等多种检测方法在灵敏度上并没有显著差异,影响灵敏度的主要是因素是目标基因的选择。由于食品中动物源性成分复杂,单一的 PCR 技术存在耗时、效率低等局限性[6],而利用 PCR 结合膜芯片技术可以有效提升检测效率。该技术具有准确、快速、高通量等优点,通过借助相应的显色方法,使其具有直观可视、设备要求低等特点,近年来被广泛应用于食品中致病菌检测、转基因检测等众多食品检测领域。

本研究利用膜芯片技术对市场上的常见肉类及其制品进行动物源性成分筛选检测,并采用国家标准方法对筛选结果进行验证,从而为市场上肉类及其制品的掺假检测提供理论依据。

## 2 材料与方 法

### 2.1 材料与试剂

肉类及肉制品 DNA 提取试剂盒、Premix Ex Taq™ (Probe qPCR)(宝生物工程(大连)有限公司);膜芯片动物源性成份检测试剂盒(包括 MultiplexPCR 试剂盒及酶孵育体系试剂盒(四川华汉三创生物科技有限公司);荧光定量 PCR 引物及探针(生工生物工程(上海)股份有限公司合成);其余化学试剂(西陇科学股份有限公司)。

新鲜猪肉、新鲜牦牛肉、烘干驴肉及新鲜羊肉的阳性样本由四川华汉三创生物科技有限公司提供;其余市售样

品购自南昌生鲜市场及超市(见表 1)。

表 1 试验样品信息表  
Table 1 Information list of test samples

编号	样品名称	样品类型	样品来源
PZ	阳性猪肉	鲜肉	华汉三创
PM	阳性牦牛肉	鲜肉	华汉三创
PL	阳性驴肉	肉干	华汉三创
PY	阳性羊肉	鲜肉	华汉三创
SZ-1	猪肉	鲜肉	生鲜市场
SZ-2	猪肉	肉松	超市
SM-1	牦牛	肉干	超市
SM-2	牦牛	肉干	超市
SL-1	驴肉	酱卤肉	超市
SL-2	驴肉	酱卤肉	超市
SY-1	羊肉	冻鲜肉	超市
SY-2	羊肉	酱卤肉	超市

### 2.2 仪 器

膜芯片杂交仪 MFS-8(四川华汉三创生物科技有限公司);PCR 仪 C1000Touch、荧光定量 PCR 仪 CFX96™ Touch(美国 Bio-rad 生物科技有限公司);高速冷冻离心机 Sorvall ST16R(美国 Thermo Fisher Scientific 有限公司);核酸蛋白测定仪 ScanDrop100(德国 Analytik Jena AG 分析仪器股份公司)

### 2.3 方 法

#### 2.3.1 DNA 提取及浓度测定

取肉类样品 10 g 左右,尽量剪碎混匀后,转移 10 mg 鲜肉、酱卤肉等样品或 5 mg 肉松、肉干样品至 1.5 mL 离心管中,之后提取步骤参照肉类及其制品的基因组 DNA 提取试剂盒说明书。

DNA 浓度和纯度测定:使用核酸蛋白测定仪,对提取的 DNA 样本浓度及纯度进行测定。

#### 2.3.2 膜芯片检测方法

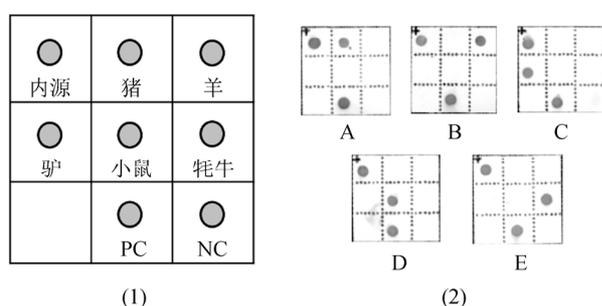
利用多重 PCR(multiplex PCR)以基因组 DNA 为模板进行多重 PCR 扩增,并设置目标肉类的基因组 DNA 作为阳性质控,非目标肉类的基因组 DNA 作为阴性质控,核酸提取空白作为空白质控,以对后续的 PCR 扩增体系、膜芯片杂交反应进行质控。

膜芯片手动杂交过程主要有去活化、杂交、酶联、显色和读取结果几个主要步骤[7]。去活化目的是将没有固定上探针的活性基团封闭,增加特异性。杂交是通过已固定的膜上的探针将待测 PCR 产物中目的基因片段捕获。酶联中使用的是碱性磷酸酶标记的链霉亲和素,而 PCR 产物中

目的基因片段带有生物素标记, 如果 PCR 产物含有目的片段, 通过生物素与亲和素的作用可以将碱性磷酸酶连接到膜上。显色是通过酶与对应底物发生的变色反应来指示膜上是否有碱性磷酸酶, 从而间接指示待测 PCR 产物中是否含有目的基因片段, 判定样品中是否含有转基因成分。

按膜芯片自动杂交仪操作说明书开机, 预热, 之后将包装有膜芯片的杂交盒放入自动杂交仪中开始杂交过程, 依次自动完成去活化、杂交、清洗、酶孵育、显色等步骤。

图 1 为膜芯片检测结果, 可根据检测的阳性结果进行判断是否含有猪、羊、驴、小鼠、牦牛的目的基因片段



(1) 探针在膜芯片表面上的排列; (2) 自动化膜芯片检测仪检测结果(灰色圆点表示该位点阳性结果, 无圆点表示阴性结果, A~E 分别为猪、羊、驴、小鼠、牦牛阳性结果)

图 1 膜芯片检测

Fig. 1 Detection of film chip

### 2.3.3 方法灵敏度及检出限

方法灵敏度检测: 分别取猪肉 PZ、牦牛肉 PM、驴肉 PL、羊肉 PY 阳性样品基因组 DNA 模板, 测定 DNA 浓度后, 按比例稀释加入到 PCR 反应体系, 使得反应体系中包含 0.1 ng 及 1 ng 的目标 DNA 模板, 使用多重 PCR 扩增后, 进行膜芯片自动杂交。

检出限检测: 以鸭肉为本底, 将猪肉、牦牛肉、驴肉和羊肉混入样品, 混合均匀后, 目标肉类最终比例分别为 0.1%、1%及 10%(w:w), 之后使用多重 PCR 扩增后, 进行膜芯片自动杂交。

### 2.3.4 标准方法验证

采用国家标准<sup>[8-11]</sup>荧光定量 PCR 法对猪肉 SZ、牦牛肉 SM、驴肉 SL 和羊肉 SY 样品进行验证, 引物及探针见表 2。

## 3 结果与分析

### 3.1 检出限、灵敏度验证

本研究试验了 0.1 ng 和 1 ng 的 DNA 浓度的灵敏度, 以及掺入比例为 0.1%、1%和 10%的检出限(表 3)。实验结果表明, 该方法的灵敏度为 0.1 ng, 检出限为 0.1%。

陈国培等<sup>[12]</sup>研究了荧光定量 PCR 法检测鸭绒及鹅绒制品动物源性成分, 并分析了该法对 1 pg~100 ng 模板的灵敏度, 结果表明其方法灵敏度为 10 ng, 而本研究使用的膜芯片技术的灵敏度为 0.1 ng, 说明该技术的灵敏度优于荧光定量 PCR 等技术。

表 2 标准方法引物及探针信息

Table 2 Information of primers and probes in standards

目的基因	引物序列(5'-3')
猪 ATP 8 基因	引物 F:TCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTA
	引物 R:AATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTT
	探针 P:FAM-CCGTTTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAATCGAAC-TAMRA
牦牛 Cytb 基因	引物 F:TCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTA
	引物 R:AATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTT
	探针 P:FAM-CCGTTTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAATCGAAC-TAMRA
驴 ATP 6 基因	引物 F:AATAGCTCTAGCCGTACGGCTAACT
	引物 R:CAGGATAATGAATGTAATAAGGGCTG
	探针 P:FAM-TGCCGGACATCTTCTAATCCACCTT-ECLIPSE
羊 Cytb 基因	引物 F:AGAAACATGAAACATCTGGA
	引物 R:ATATGGAATTGCTGAAAGAAG
	山羊探针 P:ROX-TCCTGCTCGCAACAATGGC-MGB
	绵羊探针 P:HEX-TCCTATTTGCGACAATAGC-TAMRA
真核生物 18S RNA 基因	引物 F:TCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTA
	引物 R:AATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTT
	探针 P:FAM-CAACGCATTCATTGACCTTCCAGCTCCAT-TAMRA

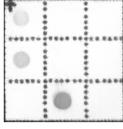
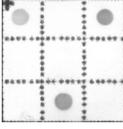
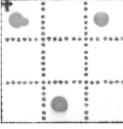
表3 灵敏度及检出限验证结果  
Table 3 Sensitivity and limit of detection (LOD) verification results

样品编号	灵敏度结果		检出限结果(掺入比例, w:w)			结果判定
	0.1 ng	1 ng	0.1%	1%	10%	
PZ						均检出猪源性成分
PM						均检出牦牛源性成分
PL						均检出驴源性成分
PY						均检出羊源性成分

表4 样本检测结果  
Table 4 Results of sample testing

样品编号	DNA 质量测定		试验结果	膜芯片结果判定	国家标准方法验证结果(Ct 值)			
	浓度(ng/uL)	RATIO( $A_{260}/A_{280}$ )			猪源性	牦牛源性	驴源性	羊源性
SZ-1	55	1.831		检出猪源性成分	24.54	>40	>40	>40
SZ-2	132	1.810		检出猪源性成分	19.33	>40	>40	>40
SM-1	63.3	1.902		检出牦牛源性成分	>40	22.91	>40	>40
SM-2	198	1.800		检出牦牛源性成分	>40	15.18	>40	>40
SL-1	70.8	1.754		检出猪、驴源性成分	26.47	>40	23.52	>40

续表 4

样品编号	DNA 质量测定		试验结果	膜芯片结果判定	国家标准方法验证结果(Ct 值)			
	浓度(ng/uL)	RATIO( $A_{260}/A_{280}$ )			猪源性	牦牛源性	驴源性	羊源性
SL-2	37.5	1.880		检出驴源性成分	>40	>40	28.92	>40
SY-1	121	1.833		检出羊源性成分	>40	>40	>40	19.40
SY-2	83	1.942		检出羊源性成分	>40	>40	>40	20.42

López-Andreo 等<sup>[13]</sup>利用荧光定量 PCR 方法检测了猪肉、牛肉互混时的肉类检出限,结果表明,在未处理肉制品中,荧光定量 PCR 对掺入肉类的检出限为 1%。Bai 等<sup>[14]</sup>在使用可视化基因芯片技术研究 11 种致病菌的快速检测时,对基于多重 PCR 联用可视化基因芯片方法的检出限进行了相关研究,结果表明,该方法对致病菌 *Salmonella thompson* 的检出限为 0.4 CFU/g(mL),而常用的荧光 PCR 及普通 PCR 法对致病菌的检出限为  $10^2\sim 10^5$  CFU/g(mL)<sup>[15-17]</sup>。Yun 等<sup>[18]</sup>在利用膜芯片技术检测植物转基因成分时,对膜芯片、荧光定量 PCR 及普通 PCR 的检出限进行了试验研究,其研究表明,膜芯片技术对多个转基因位点的检测检出限均能达到 0.1%,而荧光定量 PCR 和普通 PCR 在部分转基因位点的检出限仅为 1%,与本研究的结果相互印证,说明膜芯片技术的检出限不低于荧光定量 PCR 及普通 PCR。

### 3.2 实际样本检测及标准方法验证结果

共采集了市售样本 8 批,其中标称猪肉、牦牛肉、驴肉及羊肉的样本各 2 批,按照上述膜芯片检测方法进行动物源性成分检测,并采用国家标准荧光定量 PCR 方法进行验证(表 4)。

本次研究中,膜芯片检测方法对 8 批市售样品的检测结果与国家标准方法荧光定量 PCR 法的结果一致。其中有一批样品 SL-1 与其标识肉类成分不符,其标识为驴肉,实际检测含有驴、猪 2 种动物源性成分。

荧光 PCR 与普通 PCR 相比,灵敏度及特异性均较高,因此常用荧光 PCR 探针法进行检测。但在检测动物源性成分时,样品成分较为复杂,荧光 PCR 的荧光信号通道有限,难以满足现有的检测需求。而利用普通 PCR 结合膜芯片技术,可以实现 2 种技术的优势互补,使此种检测技术能达到较高的灵敏度和特异性<sup>[19]</sup>。宋亚培等<sup>[20]</sup>利用 PCR 结合

传统基因芯片技术对 6 种动物源性成分进行了检测,其研究表明,基因芯片检测灵敏度高于常规 PCR 与荧光 PCR,这与本研究的结果相互印证。本研究对生鲜肉、冻鲜肉、肉干、肉松等不同种类的样品进行了相关检测,通过对猪、牦牛、驴和羊的动物源性成分检测方法的初步研究,获得了该方法对动物源性成分检测的参数,为该方法在实际检测中的应用奠定了基础。

## 4 结 论

本研究利用可视化膜芯片技术对猪、牦牛、驴及羊肉及其制品进行了动物源性成分检测,并采用国家标准方法对该结果进行了验证。实验结果表明,该技术适用于动物源性成分检测,灵敏度及检出限均能达到荧光定量 PCR 检测的水平。该技术快速、准确、通量高,可作为快速筛选的方法,为肉类及其制品的动物源性成分鉴定和掺假检测提供技术保障。

### 参考文献

- [1] 焦焯,王维红. 食品安全与消费肉制品篇[J]. 标准生活, 2013(12): 69-81.  
Jiao H, Wang WH. Food safety and consumption and meat products [J]. Standard Life, 2013(12): 69-81.
- [2] 王佳慧,吴爽,李楠,等. 常见肉类中鸭源性成分荧光 PCR 检测方法的建立[J]. 食品安全质量检测学报, 2016,7(2): 823-828.  
Wang JH, Wu S, Li N, et al. Establishment of real-time fluorescence quantitative PCR method for identifying duck ingredients from edible meat [J]. J Food Saf Qual, 2016,7(2): 823-828.
- [3] 冯震,杨美成. 生鲜肉中牛源性和羊源性成分定量检测方法的建立[J]. 食品安全质量检测学报, 2016,7(3): 877-886.  
Feng Z, Yang MC. Establishment of quantitative methods for detecting bovine-derived and ovine-derived materials in fresh meat [J]. J Food Saf Qual, 2016,7(3): 877-886.

- [4] Bai SL, Zhong X, Ma L, *et al.* A simple and reliable assay for detecting specific nucleotide sequences in plants using optical thin - film biosensor chips [J]. *Plant J*, 2007, 49(2): 354–366.
- [5] Ballin NZ, Vogensen FK, Karlsson AH. Species determination—can we detect and quantify meat adulteration? [J]. *Meat Sci*, 2009, 83(2): 165–174.
- [6] 卜登攀, 王加启, 贺云霞, 等. 动物源性饲料检测技术研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2008, 35(2): 54–59.  
Bu DP, Wang JQ, He YX, *et al.* Research progress of animal feed detection technology [J]. *China Anim Husbandry Vet Med*, 2008, 35(2): 54–59.
- [7] GB/T 33807-2017 玉米中转基因成分的测定 基因芯片检测技术[S].  
GB/T 33807-2017 Detection of genetically modified components in maize-Gene chip method [S].
- [8] SN/T 3730.4-2013 食品及饲料中常见畜类品种的鉴定方法第 4 部分: 驴成分检测 实时荧光 PCR 法[S].  
SN/T 3730.4-2013 Identification of domestic animal ingredient in food and feed-Part 4: Detection of donkey ingredient-Real-time PCR method [S].
- [9] SN/T 4397-2015 出口食品中牦牛源性成分的检测方法 实时荧光 PCR 法[S].  
SN/T 4397-2015 Detection of yak (*Bos grunniens*) in food products for export-Real-time PCR method [S].
- [10] SN/T 3730.8-2013 食品及饲料中常见畜类品种的鉴定方法第 8 部分: 猪成分检测 实时荧光 PCR 法[S].  
SN/T 3730.8-2013 Identification of domestic animal ingredient in food and feed-Part 8: Detection of pig ingredient-Real-time PCR method [S].
- [11] SNT 2980-2011 动物产品中牛、山羊和绵羊源性成分三重实时荧光 PCR 检测方法[S].  
SNT 2980-2011 Triple fluorescent real-time PCR detection method for bovine, goat, and sheep derived materials in animal products [S].
- [12] 陈国培, 赖心田, 唐复润, 等. 鸭绒及鹅绒制品实时荧光 PCR 鉴定方法研究[J]. *中国纤检*, 2013(23): 60–62.  
Chen GP, Lai XT, Tang FR, *et al.* Real-time PCR identification of duck and goose downfiber products [J]. *China Fiber Inspect*, 2013(23): 60–62.
- [13] López-Andreo M, Aldeguer M, Guillén I, *et al.* Detection and quantification of meat species by qPCR in heat-processed food containing highly fragmented DNA [J]. *Food Chem*, 2012, 134(1): 518–523.
- [14] Bai S, Zhao J, Zhang Y, *et al.* Rapid and reliable detection of 11 food-borne pathogens using thin-film biosensor chips [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 86(3): 983–990.
- [15] Liu J, Gratz J, Maro A, *et al.* Simultaneous detection of six diarrhea-causing bacterial pathogens with an in-house PCR-luminex assay [J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(1): 98–103.
- [16] Yang YG, Song MK, Park SJ, *et al.* Direct detection of *Shigella flexneri* and *Salmonella typhimurium* in human feces by real-time PCR [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2007, 17(10): 1616–1621.
- [17] Brightwell G, Mowat E, Clemens R, *et al.* Development of a multiplex and real time PCR assay for the specific detection of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* [J]. *J Microbiol Method*, 2007, 68(2): 318–325.
- [18] Yun Z, Peng L, Huo S, *et al.* Auto-microfluidic thin-film chip for genetically modified maize detection [J]. *Food Control*, 2017, 80: 360–365.
- [19] 贺晨, 孙鸿燕, 邵丽筠, 等. 多重 PCR 结合基因芯片技术检测 11 种致病菌方法的建立[J]. *中国实验诊断学*, 2011, 15(4): 587–591.  
He C, Sun HY, Shao LY, *et al.* Multiple PCR combined with gene chip technology to detect the establishment of 11 pathogenic bacteria methods [J]. *Chin J Lab Diagn*, 2011, 15(4): 587–591.
- [20] 朱业培, 王玮, 吕青骥, 等. 基于基因芯片技术检测 6 种动物源性成分[J]. *南京农业大学学报*, 2015, 38(6): 1003–1008.  
Zhu YP, Wang W, Lv QQ, *et al.* Six animal source components were detected based on gene chip technology [J]. *J Nanjing Agric Univ*, 2015, 38(6): 1003–1008.

(责任编辑: 武英华)

## 作者简介



范宏伟, 硕士, 工程师, 主要研究方向为分子生物学与食品微生物学检验。  
E-mail: 278505847@qq.com



王栋, 主任中药师, 硕士生导师, 主要研究方向为实验室质量管理、药物分析及食品检验检测。  
E-mail: hovyfan@qq.com