

肉制品中猪源性成分相对定量检测方法研究

李国华^{1*}, 高锦伟², 南丽娟¹, 张建芳³

(1. 延安职业技术学院, 延安 716000; 2. 延安市安塞区中医医院, 延安 717400;
3. 凤翔县城关医院, 延安 721400)

摘要: 目的 建立一种肉制品中猪源性成分的相对定量检测方法。**方法** 针对猪的 ER-beta 基因的 mRNA 序列设计了特异性引物与探针序列, 并对引物和探针的特异性进行了验证。构建重组质粒, 利用质粒拷贝数的 log 值和 Ct 值构建标准曲线。通过标准曲线计算各个样本拷贝数, 将待测样本和标准种源样本的拷贝数进行比较, 确定检测样本的猪源性含量。**结果** 实际掺加量分别为 20%、40%、50%和 60%的混合样品经该方法检测所得掺假量均值为猪体系 24.8%、53.1%、53.1%、61%, 检测结果与其实际含量基本一致。**结论** 该方法基本能实现肉制品中猪源性成分的相对定量检测。

关键词: 肉制品; 猪源性成分; 重组质粒; 相对定量

Study on relative quantitative detection method of porcine-derived components in meat products

LI Guo-Hua^{1*}, GAO Jin-Wei², Nan Li-Juan¹, ZHANG Jian-Fang³

(1. Yan'an Vocational and Technical College, Yan'an 716000, China; 2. Yan'an City Ansai District Chinese Medicine Hospital, Yan'an 717400, China, 3. Fengxiang County Chengguan Hospital, Yan'an 721400, China)

ABSTRACT: Objective To establish a relative quantitative method for the detection of porcine-derived components in meat products. **Methods** Specific primers and probe sequences were designed for porcine ER-beta-based mRNA gene sequence, and the specificity of the primers and probes was verified. A recombinant plasmid was constructed, and a standard curve was constructed by the log value and Ct value of the plasmid copy number. The copy number of each sample was calculated by the standard curve, the copy number of the sample was compared to be tested with the standard provenance sample, and the porcine-derived content of the test sample was determined. **Results** The average adulteration of the mixed samples with actual addition amounts of 20%, 40%, 50% and 60% by the method were 24.8%, 53.1%, 53.1%, 61% of the pig system. The test results were basically the same as their actual content. **Conclusion** This method basically can realize the relative quantitative detection of the porcine-derived components in the meat product.

KEY WORDS: meat products; porcine-derived components; recombinant plasmid; relative quantification

1 引言

食品安全是当今社会的热门议题, 随着人民生活水

平的日益升高, 各种动物源性食品的需求也大大提高^[1], 不法商贩为了谋取更多利润, 开始在肉类产品上做手脚。目前全球范围内的掺假现象呈增长的趋势, 严重侵害了消

*通讯作者: 李国华, 硕士, 主要研究方向为分子检测。E-mail: lghyanan@163.com

*Corresponding author: LI Guo-Hua, Master, Yan'an Vocational and Technical College, Baota District, Yan'an City, Yan'an 716000, China. E-mail: lghyanan@163.com

消费者对食品行业的信任^[2]。针对肉制品的种源鉴别方法有很多, 传统的感官检验与免疫学检测方法只能鉴别生鲜肉的种源, 但肉制品因经热加工等处理导致其外观性状、蛋白质成分及其他免疫原性成分被破坏而难以鉴别^[3,4]。PCR 扩增技术成为近年来食品中肉类种属鉴定的核心方法^[5], 许多研究报道了以 DNA 作为模板, 用 PCR 扩增的方法对肉类种源进行鉴别, 包括传统的普通 PCR 扩增^[6]、多重 PCR^[7]、荧光 PCR^[8]、限制性片段长度多态性分析(restriction fragment length polymorphism, RFLP)^[9]、随机扩增多态性 DNA 分析 (randomly amplified polymorphic DNA, RAPD)^[10]、DNA 测序及基因芯片技术等。基于 PCR 的检测方法现在应用于已知的一些肉制品掺假的检测标准中, 在实际检测应用上获得满意结果^[11,12], 在上述研究工作中, 大多数为定性检测方法, 很少有定量检测, 仅 Laube 等^[13]在对肉制品种源性定量分析基础上对故意掺假与轻微污染的甄别作了初步研究。由于不同种类的肉价格差距较大, 一些厂家、商贩在利益驱使下将价格低的肉冒充昂贵肉种混入加工肉制品中; 同时有些肉质加工品是含多种成分, 但食品名称也仅含有昂贵肉的名称, 而在准确性某食品掺入标签未标注肉源成分时, 为了甄别故意掺假欺骗和轻微污染等行为, 也有必要对加工肉制品掺杂的价格较低廉种源肉进行相对定量检测。

本研究以国内消费量高的猪肉作为研究对象, 设计了特异的引物和探针序列, 建立猪源性成分的相对定量检测方法, 以期对肉类食品的安全监管提供更准确的方法。

2 材料与方 法

2.1 材料、试剂与仪器

检测样本购于延安市内某超市。

质粒提取试剂盒、PCR Master Mix、组织基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生物科技有限公司); 500 bp DNA Ladder、PMD19-T、胶纯化回收试剂盒(宝生物科技有限公司); 胰蛋白胨、酵母粉、NaCl、琼脂糖、氨苄青霉素(陕西昕泰生物科技有限公司)。

BSC-1500IIAZ-X 生物安全柜(济南鑫贝西公司); DP2012 普通离心机(北京大龙公司); 恒温水浴箱(金坛市科普实验仪器); FC204 电子天平(上海恒平电子天平); ABI7500 life 实时荧光 PCR 仪、NANODrop 2000c 紫外分光光度计(美国 Thermo 公司); L1 低温连接仪(珠海黑马公司); ZD-85 震荡摇床(北京中兴公司); 37 °C 恒温培养箱(上海精宏仪器公司); 高压灭菌锅(江阴滨江医疗设备有限公司)

2.2 引物及探针

引物及探针由上海生工负责合成, 引物探针序列如表 1 所示。

表 1 引物探针序列
Table 1 Sequences of primers and probe

物种	引物探针序列(5'-3')
猪	ZF-GCATAGTGCGAAAGCAGAGAAA-
	ZR-TCCTTCACTCGGGTTGTGTGAT-
	ZP-TCCTTCACTCGGGTTGTGTGAT-

注: 探针 5'端报告荧光基团为-FAM, 3'端淬灭基团为-TAMARA。

2.3 实验方法

2.3.1 猪引物和探针序列特异性的验证

选择新鲜无污染的猪肉、牛肉、羊肉、鸡肉、鸭肉、鹅肉、驴肉、马肉、兔肉, 用组织 DNA 提取试剂盒进行 DNA 的提取, 提取完对核酸利用紫外分光光度计进行质量测定, 利用合成的引物探针对提取的 DNA 进行检测, 验证合成的引物和探针的特异性。

2.3.2 PCR 扩增反应体系与反应条件

反应体系的体积为 20 μ L: PCR master mix 10 μ L; 上下游引物及探针均稀释至 10 μ M, 20 μ L 体系各加 1 μ L, 模板 DNA(0.1~70 ng/ μ L) 1 μ L; 其余用灭菌双蒸水补至 20 μ L。

反应条件为: 50 °C 2 min; 94 °C 10 min; 95 °C 20 s, 60 °C 1 min, 40 个循环。

2.3.3 猪肉 DNA 的提取

根据组织 DNA 提取试剂盒进行猪肉 DNA 的提取, DNA 用紫外分光光度计进行质量控制, 控制 PCR 模板的 DNA 浓度为 50 ng/ μ L 左右。

2.3.4 质粒构建

LB 平板的制备: 按照 10 g/L 胰蛋白胨、5 g/L 酵母粉、10 g/L NaCl、15 g/L 琼脂粉比例用单蒸水配制 200 mL LB 培养基, 高压灭菌, 待温度降至 50 °C 时, 加入氨苄青霉素(使用浓度 50 μ g/mL)。以提取的猪肉 DNA 为模板, 以 2.3.2 中的扩增条件和体系扩增其目的基因, 扩增产物用 2% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 阳性的扩增片段胶并用胶回收试剂盒进行片段回收, 以 PMD19-T 作为载体, Solution I 为连接酶, 低温连接仪 16 °C 连接 30 min, 利用大肠杆菌 DH5 α 进行转化, 挑取白色单克隆菌落接种到 3 mL 含有氨苄青霉素(使用浓度为 50 μ g/mL)的 LB 液体培养基中, 37 °C 220 r/min 震荡培养过夜, PCR 鉴定菌液, 鉴定阳性的菌液送上海生工公司测序, 经序列比对正确的菌液进行冻菌保存并质粒提取, 质粒提取按照 TAKARA 的质粒提取试剂盒进行。

2.3.5 相对定量方法研究

将纯品 DNA 和样品 DNA 用目的种源引物探针体系进行检测, 同时检测依次 10 倍稀释度的重组质粒, 得到 Ct 值与质粒拷贝数的 log 值后先计算标准曲线, 通过标准曲线方程算样品的拷贝数, 计算样品 DNA 拷贝数与同批纯样品拷贝数的比值, 以计算的比值来判定检测样品的掺假程度。

2.3.6 模拟加工样品的相对定量检测

(1)将猪肉煮 10 min, 65 °C 烘烤过夜, 用粉碎机分别粉碎为肉沫进行比例混合。猪肉混合比例: 20%、40%、50%、60%, 4 个混合肉样本、纯猪肉各取 50 mg 利用 OMEGA 组织 DNA 提取试剂盒进行组织 DNA 的提取, 用紫外分光光度计进行核酸浓度的检测。

(2)将重组质粒分别进行 10 倍稀释, 得到对应浓度范围的质粒标准品

利用(1)和(2)制备的模板根据 2.3.2 的反应体系和参数进行 PCR。

3 结果与分析

3.1 重组质粒拷贝数的计算

质粒拷贝数=质粒浓度/质粒分子量 $\times 6.02 \times 10^{14}$, 其中质粒浓度为紫外分光光度计测定的质粒浓度($\text{ng}/\mu\text{L}$), 分子量=重组质粒大小 $\times 660$, 重组质粒大小=T 载体大小+目的

基因片段大小, 本研究中所用 TAKARA 公司 PMD19-T 载体长度为 2692 bp, 目的基因的片段 82 bp。计算质粒拷贝数, 将重组质粒标准品进行 10 倍系列稀释制作标准曲线。经过紫外分光光度计测定, 质粒的浓度分别 104 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 计算得质粒拷贝数= 3.4×10^{10} copy/ μL 。

3.2 引物和探针的特异性检测

猪源性引物和探针的特异性实验结果如图 1 所示, 设计的引物和探针只针对猪肉的 DNA 进行了扩增, 对其他种源的 DNA 均没有扩增, 证明设计的引物和探针对其他相近的种源没有交叉, 检测体系特异较强。

3.3 重组质粒灵敏度的测定

根据公式得出重组质粒的拷贝数(每微升)为 3.4×10^{10} , 将重组质粒 10 倍比稀释得 $10^0 \sim 10^9$ 浓度范围样品, 分别利用猪的引物探针体系进行荧光 PCR 扩增, 结果如图 2, 表明所建立重组质粒标准品灵敏性可低至数量级为 10^2 拷贝数。

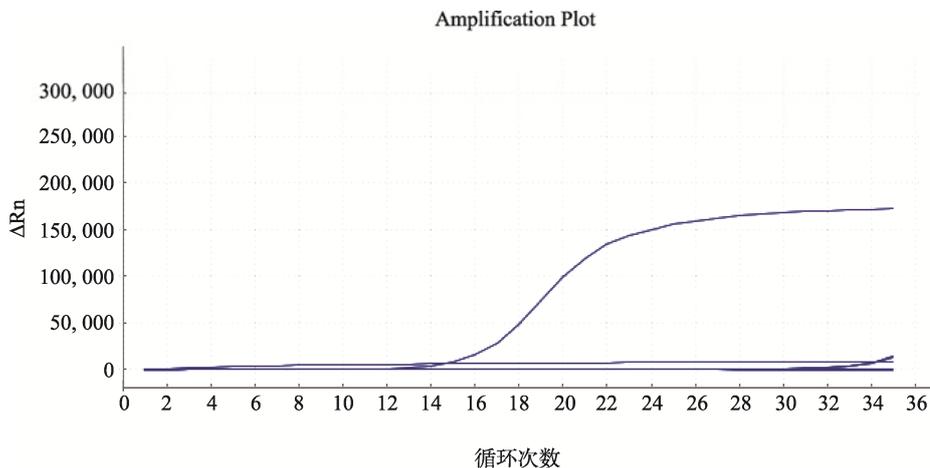
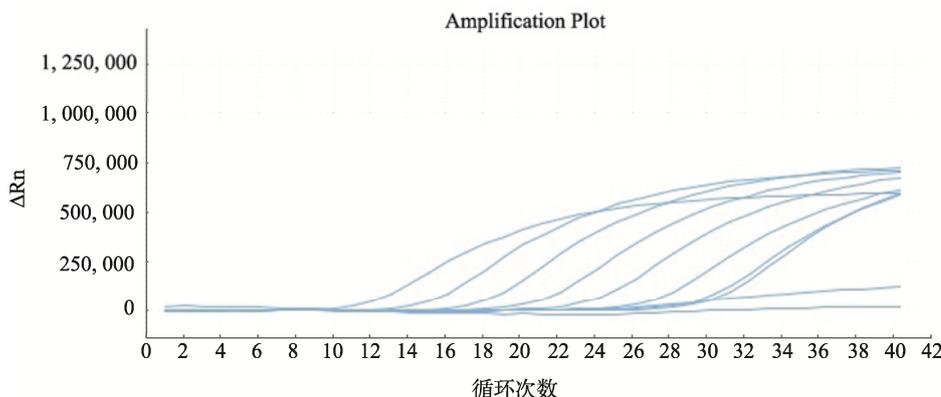


图 1 特异性检测结果
Fig.1 Specificity test results



注: 从左到右依次为 $3.4 \times 10^9 \sim 3.4 \times 10^2$ copy/ μL 。

图 2 质粒灵敏度检测结果
Fig.2 Plasmid sensitivity test results

3.4 模拟加工样品检测相对定量检测结果

3.4.1 标准曲线

根据猪源性质粒拷贝数 \log 值与 Ct 值绘制标准曲线, 计算混合样本中的猪源性成分含量。根据表 2 结果绘制标准曲线, 回归方程为 $Y=-3.1451X+40.539$, $r^2=0.9905$ (其中 X 为 \log 拷贝数, Y 为 Ct 值), 表明该方法线性关系好, 可准确定量。

表 2 荧光 PCR 检测质粒标准品的 Ct 值
Table 2 Ct values of plasmid standards detected by fluorescence PCR

猪质粒拷贝数	3.4×10^9	3.4×10^8	3.4×10^7	3.4×10^6	3.4×10^5	3.4×10^4
Ct 值	11.4	13.59	15.99	20.06	23.36	26.74

表 3 混合样本中猪源性成分的含量计算($n=3$)
Table 3 Calculation of pig derived components in mixed samples ($n=3$)

混合样本	A	B	C	D	E
猪					
体					
系					
Ct 值	24.86±0.10	26.76±0.05	25.74±0.52	25.73±0.33	25.52±0.14
拷贝数	96605	24044	51286	51286	58884
计算猪肉含量	100%	24.8%	53.1%	53.1%	61%
实际猪肉含量	100%	20%	40%	50%	60%

4 结论与讨论

随着国民经济水平的不断提高, 牛、羊肉是消费量增长速度最快的肉类^[4], 尤其是城镇居民牛羊牛肉的消费增长速度已超过猪肉^[15], 本研究选择了消费较多的猪肉作为研究对象, 主要原因是猪肉经常被用来冒充牛羊牛肉以获取更高的利益, 不但损害了消费者的权益, 而且侵犯了我们少数民族的信仰, 对于猪肉掺假, 已经研究了诸多的检测方法, 但是掺假的定量方法研究相对比较少, 经常检出部门只能定性的检测是否掺假, 但掺假量无法确定, 无法区分是蓄意掺假还是加工时的污染, 因此, 对于肉制品中的动物源性成分含量的检测方法显得非常必要。

本研究采用实时荧光 PCR 技术, 选取了单拷贝基因, 由于线粒体及线粒体 DNA 在不同组织部位中的含量不同, 作为目的基因检测影响结果分析的准确性, 因此本研究选择的扩增靶基因是单拷贝基因 ER-beta 基因, 核单拷贝基因其拷贝数为常数, 可有效避免不同目的基因类型和肉制品本身部位来源的影响, 设计短基因片段作为目的基因避免加工处理因素对 PCR 反应的影响。通过构建猪的重组质粒, 利用重组质粒的标准曲线计算检测样品的含量, 同时对模拟混合样本进行了检测, 验证了方法的有效性, 虽然与实际掺假含量稍有差异, 模拟混合样本 C 检测出猪源性成分 53.1%, 但实际含量为 40%, 这种结果的原因可能是制作混合模板时人为的操作引起的误差, 其余的掺入量检

3.4.2 混合样本中猪源性成分的含量

按 3.4.1 中所述定量方法进行混合样本中猪源性成分的含量进行检测, 结果见表 3。结果显示对于不同的混合肉样, 经 SPSS 软件数据处理后, 掺加量分别为 20%、40%、50%和 60%的混合样品经定量体系检测所得掺假量均值为猪体系 24.8%、53.1%、53.1%、61%, 证明建立的相对定量体系可以应用肉制品猪源成分的检测。

测都比较准确。由于本研究主要是根据 Ct 值来相对定量, 因此实际检测时尽量做复孔, 计算复孔的平均值来进行数据处理, 以减少实验误差。

综上所述, 本研究针对猪的线粒体设计了单拷贝基因设计引物探针, 所建立的体系特异性高, 基本能满足定量检测要求。通过构建重组质粒建立了标准曲线, 通过检测计算算得所检测样品中目的肉类拷贝数与标准品比值, 可以定量肉制品中目的种源肉所占比例, 建立的肉制品中猪肉成分的相对定量检测对肉类掺假的相对定量检测技术奠定了基础, 可以为相关执法部门提供参考依据。

参考文献

- [1] 刘秀梅. 中国城乡居民动物性食物消费研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2005.
Liu XM. Empirical comparison of animal food consumption between urban and rural residents in China [D]. Beijing: China Agricultural University, 2005.
- [2] 范冰冰. 肉制品中动物源性成分检测方法研究进展[J]. 新疆畜牧业, 2018, (3): 10-12, 16
Fan BJ. Advances in methods for determination of animal-derived components in meat products [J]. J Xinjiang Anim Husbandr, 2018, (3): 10-12, 16.
- [3] 冯秀燕, 董红霞, 魏秀莲, 等. 动物源性饲料中牛源和羊源性成分的检测方法[J]. 饲料研究, 2006, (11): 52-54.
Feng XX, Dong HX, Wei XL, et al. Methods for the determination of bovine and sheep derived components in animal-derived feed [J]. Feed

- Res, 2006, (11): 52–54.
- [4] 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.
Bo DP, Wang JQ, He YX, *et al.* Detection of the animal origin materials in feedstuff: A review [J]. *China Anim Husbandr Veter Med*, 2008, 35(2): 54–59.
- [5] 杨冬燕, 李浩, 杨永存. 肉制品掺假鉴别与定量检测[J]. 卫生研究, 2016, 45(2): 324–328.
Yang DY, Li H, Yang YC. Identification and quantitative detection of adulterated meat products [J]. *J Hyg Res*, 2016, 45(2): 324–328.
- [6] 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.
- [7] Ghovvati S, Nassiri MR, Mirhoseini SZ, *et al.* Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay [J]. *Food Contr*, 2009, 20(8): 696–699.
- [8] 杨冬燕, 韦梅霞, 杨永存, 等. 多重荧光 PCR 鉴别羊肉掺假[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(2): 555–562.
Yang DY, Wei MX, Yang YC, *et al.* Identification of mutton adulteration by multiplex fluorescent PCR [J]. *J Food Saf Qual*, 2015, 6(2): 555–562.
- [9] Doosti A, Ghasemi DP, Rahimi E. Molecular assay to fraud identification of meat products [J]. *J Food Sci Technol*, 2014, 51(1): 148–152.
- [10] Rastogi C, Dhame MS, Walujkar S, *et al.* Species identification and authentication of tissues of animal origin using mitochondrial and nuclear markers [J]. *Meat Sci*, 2007, (76): 666–674.
- [11] 刘岑杰, 刘彦泓, 杨滴, 等. 肉制品中鸭源性成分的实时荧光 PCR 检测[J]. 肉类工业, 2015, (1): 1, 51–53.
Liu CJ, Liu YH, Yang D, *et al.* Detection of components of duck origin in meat products with real-time PCR method [J]. *Meat Ind*, 2015, (1): 1, 51–53.
- [12] 张驰, 邱皓璞, 张筠. 荧光定量 PCR 检测肉制品中鸭源性成分[J]. 食品科学, 2013, 34(18): 154–157.
Zhang C, Qiu HP, Zhang Y. A quantitative fluorescent PCR method for detection of duck-derived ingredients in meat products [J]. *J Food Sci*, 2013, 34(18): 154–157.
- [13] Laube I, Zagon J, Hermann B. Quantitative determination of commercially relevant species in foods by real-time PCR [J]. *Inter J Food Sci Technol*, 2007, 42(3): 336–341.
- [14] 曹建民, 田露, 张越杰. 我国牛肉消费及其对猪肉价格变化的反应研究[J]. 中国畜牧杂志, 2012, 48(12): 12–15.
Cao JM, Tian L, Zhang YJ. Research on beef consumption and its response to the change of pork price in China [J]. *Chin J Anim Husbandr*, 2012, 48(12): 12–15.
- [15] 王贝贝, 肖海峰. 中国羊肉供需状况及展望[J]. 农业展望, 2012, (10): 19–22.
Wang BB, Xiao HF. Supply and demand situation and prospect of mutton in China [J]. *Agric Outlook*, 2012, (10): 19–22.

(责任编辑: 陈雨薇)

作者简介



李国华, 硕士, 主要研究方向为分子检测诊断。

E-mail: lghyanan@163.com