

基于纳米金粒子的猪源性成分快速比色检测

冯永巍^{1*}, 于丽洪², 杨成²

(1. 无锡市食品安全检验检测中心, 无锡 214122; 2. 江南大学食品学院, 无锡 214122)

摘要: **目的** 开发一种基于纳米金粒子快速比色的猪源性成分快速检测方法。**方法** 选取猪线粒体基因中特异性DNA片段为靶点, 利用互补单链DNA与纳米金粒子偶联为探针, 提取检测目标DNA后在盐溶液中进行检测。**结果** 探针上DNA结合检测目标后, 纳米金粒子失去单链DNA的保护, 发生聚集, 由红色变为蓝色, 实现肉眼可视检测。核酸偶联的最佳用量为0.1 mmol/L的核酸添加30 μL, 方法的检出限为5%。**结论** 这种比色检测可以在不使用复杂仪器的条件下将猪肉与其牛肉类产品区分开来, 方法快捷迅速, 对肉制品掺假的防控具有重要意义。

关键词: 肉类掺假; 纳米金粒子; 比色法; 猪源性成分

Rapid colorimetric detection of pork components based on gold nanoparticles

FENG Yong-Wei^{1*}, YU Li-Hong², YANG Cheng²

(1. Wuxi Food Safety Inspection and Testing Center, Wuxi 214122, China;
2. College of Food Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

ABSTRACT: Objective To develop a rapid detection method for pig-derived components based on fast colorimetric determination of gold nanoparticles. **Methods** A specific DNA fragment of the porcine mitochondrial gene was selected as a target, the complementary single-stranded DNA was coupled with the nano gold particles as a probe, and the target DNA was extracted and detected in a salt solution. **Results** After DNA binding detection on the probe, the gold nanoparticles lost the protection of single-stranded DNA, and they aggregated from red to blue, enabling visual inspection of naked eyes. The optimal amount of nucleic acid coupling was 30 μL for a 0.1 mmol/L nucleic acid, and the limit of detection of the method was 5%. **Conclusion** This colorimetric test can be used to distinguish pork from beef products without using complicated instruments, which is of great significance for prevention and control of adulteration of meat products.

KEY WORDS: meat adulteration; gold nanoparticles; colorimetry; pork ingredients

1 引言

近年来“假牛肉”“假羊肉”“假鸭血”等肉类掺假问题曝光较多, 尤其以猪肉冒充价格较贵的牛肉最为普遍。掺假肉的存在不仅破坏了市场公平, 也是威胁食品安全的重要隐患^[1]。为了有效识别肉类掺假行为, 建立一种高效、准

确掺假鉴别方法十分必要。

从肉制品掺假的实际情况入手, 通过对猪源性成分检测可以鉴别目前市场上大部分的肉类掺假。国内外的研究以猪肉蛋白^[2-6]、猪DNA^[6-11]为检测指标建立了一些猪源性成分的检验方法, 其中以聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术为代表的核酸检测技术应用最为

*通讯作者: 冯永巍, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全。E-mail: 402200023@qq.com

*Corresponding author: FENG Yong-Wei, Senior Engineer, Wuxi Institute of Food Control, Wuxi 214122, China. E-mail: 402200023@qq.com

广泛^[12-16], PCR 法主要是利用动物体内线粒体 DNA 的片段设计引物, 然后进行扩增, 后用琼脂糖凝胶电泳对其进行分离, 实现特异性检测^[17]。该方法可以实现对猪源性肉的高灵敏、快速检测^[18-21], 但是存在检测成本高、需要专业的操作人员等问题, 推广和应用都存在一定的局限性。本研究利用单链 DNA 修饰的金纳米颗粒对猪源性成分中 DNA 的识别作用, 建立对牛肉中掺猪肉的可视化的快速检测方法, 以期在市场上猪肉冒充牛肉的掺假行为提供快速检测手段。

2 材料与方 法

2.1 实验材料

生猪肉和生牛肉均购于无锡本地超市, 熟肉通过生肉煮制 40 min 获得。

2.2 仪器与试剂

MS105DU 分析天平(上海 Mettler Toledo 公司); 微量移液器(美国 Thermo LabSystems 公司); 200R 高速冷冻离心机(德国 Hettich 公司); RET control-visc 电磁搅拌加热器(德国 IKA 公司); UV-2700 紫外可见分光光度计(日本岛津公司); H7000 透射电镜(日本日立公司)。

氯金酸、柠檬酸三钠(分析纯, 美国 Sigma 公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 研究方案

基于纳米金粒子的可视化检测为猪源性成分掺假鉴定提供了一个崭新的技术思路。单链 DNA 会与表面带负电的金纳米粒子发生静电吸附形成保护层, 保持溶液中纳米金粒子的分散性^[22-24], 此时分散状态下的纳米金在溶液中呈现红色; 结合成双链 DNA 时, 纳米金粒子失去静电保护, 由分散状态逐渐转变为聚集状态, 其溶液颜色也会发生由红到蓝的改变。本研究利用上述作用原理, 研发一种猪源性成分裸眼快速比色检测的新方法(原理示意如图 1)。通过在纳米金粒子上修饰选取的猪特异性单链 DNA 片段制备核酸探针, 猪肉中对应的 DNA 链能够与探针发生特异性互补结合, 导致纳米金粒子表面失去 DNA 的保护, 在盐离子作用下反应体系颜色发生变化, 从而实现猪源性成分的特异性检测。

2.3.2 猪源性成分特异性核酸探针的制备

(1) 猪源性成分特异性核酸序列的选择

根据 GenBank 公布的猪线粒体基因的保守序列(GenBank: AF039170.1), 选择了“CAA CTA GAT ACA TCT ACA TGA TTC ATT AC”这一能代表猪种属的特异性序列片段。片段为 29 bp, 长度约 10 nm, 该核酸序列委托生工生物工程(上海)有限公司合成。

(2) 纳米金粒子溶液的制备

取 200 mL 浓度 1 mmol/L 氯化金溶液, 搅拌(100 r/min)

加热至沸腾并持续 2 min, 逐滴加入 3 mL 浓度 1% 柠檬酸三钠溶液, 继续搅拌加热 6 min 直至溶液呈透亮的酒红色。冷却至室温, 装入分子量 12000 的透析袋, 用超纯水透析 2 d, 期间换水 3 次, 得到纳米金粒子溶液。在透射电镜下观察溶液中金颗粒的大小是否均匀一致, 有无椭圆形及多角形金颗粒存在, 并测量金颗粒直径。

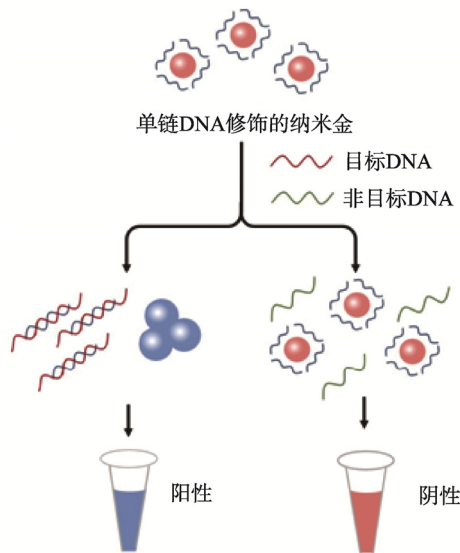


图 1 猪源性成分快速比色检测原理

Fig.1 Schematic of the gold nanoparticles-based colorimetric detection for pork identification

(3) 纳米金粒子核酸探针的偶联

在 8 个 1.5 mL 离心管分别加入 100 μ L 纳米金粒子溶液, 用双蒸水稀释至 1 mL。再分别向各管中加入 5、10、15、20、25、30、35、40 μ L 浓度 0.1 mmol/L 的核酸探针, 混匀后将离心管置于 40 $^{\circ}$ C 水浴中温育 10 min, 再分别加入 100 μ L 浓度 10% 的 NaCl 溶液, 观察各管的颜色变化, 筛选核酸偶联的最佳用量。同时将测定各管在 520 nm 处的 OD 值。

2.4 样品 DNA 提取

准确称取剪碎的熟肉样品 100 mg, 置于 1.5 mL 离心管中, 加入 1 mL 组织裂解液(10 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA), 0.5% SDS, 0.4 mg/mL 蛋白酶 K, 盖上盖子, 将离心管置于沸水中煮 15 min, 将离心管于 5000 r/min 离心 10 min, 吸取上清。将提取的 DNA 样品进行紫外检测, 确认 $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 的数值在 1.8~1.9 左右, 并用超纯水调节 DNA 浓度, 使其 $A_{260\text{nm}}=2.7$, 此时 DNA 浓度约 100 μ g/mL。

2.5 目视检测实施过程及检出限

按照 2.4 的方法提取样品中的 DNA。吸取 30 μ L DNA

样品, 加入到 1 mL 的纳米金粒子核酸探针溶液, 37 °C 温育 5 min, 再向反应体系中 10% NaCl 溶液 100 μ L, 混匀, 静置 3 min, 观察纳米金粒子探针体系的颜色变化。取适量纯的熟牛肉, 分别添加 0%、1%、2%、5%、10%、20% 的熟猪肉, 按照 2.3.2 中(3)的方法进行测试, 观察各个样品反应体系的颜色变化。

3 结果与分析

3.1 纳米金粒子的形貌

本研究采用柠檬酸三钠还原法制备了纳米金粒子溶液, 溶液呈酒红色。溶液透射电镜结果见图 2。如图 2 所示, 在透射电镜下观察到金颗粒的大小基本一致, 分散性比较好, 没有多角形的金颗粒, 也没有聚集现象。通过随机挑选电镜照片上 10 个金颗粒, 测量其平均直径大小在 10 nm 左右。

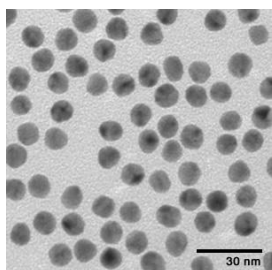


图 2 纳米金粒子的透射电镜图

Fig.2 Transmission electron microscope image of colloidal gold particles

3.2 核酸探针偶联的最佳用量

核酸序列的可视化检测就是利用金纳米粒子的非交联聚集现象, 随着纳米金粒子的分散和聚集状态的变化, 其颜色会发生相应变化, 光学性质也会有相应的改变。在单链 DNA 的存在下, 表面带负电的金纳米粒子与单链 DNA 发生静电吸附, 此时单链 DNA 的磷酸基团骨架暴露在金纳米粒子外侧, 形成保护层, 使得金纳米粒子之间在盐溶液中仍能保持分散性; 单链 DNA 结合成双链 DNA 时, DNA 链上的含氮碱基包在了螺旋结构的内部, 因而无法与金纳米粒子之间发生静电吸附, 无法在金纳米粒子表面形成保护层, 最终在盐溶液中发生聚集。纳米金溶液的颜色发生由红到蓝的变化, 从而实现特征 DNA 片段的可视化检测。

核酸与纳米金粒子偶联的最佳用量结果见表 1。1~4 管, 当体系加入中 NaCl 溶液后, 均呈现出由红变蓝的聚沉现象, 这说明偶联的核酸量较少, 不能稳定纳米金粒子溶液。从第 5 管开始, 体系的颜色保持红色, 说明偶联核酸的量达到或超过了稳定纳米金粒子溶液的最低量。因此最适核酸用量为在此基础上再加上 20% 即为实际核酸用量: $25 \mu\text{L} \times (1+20\%) = 30 \mu\text{L}$ 。

表 1 目测法确定核酸最适用量

Table 1 The most suitable amount of nucleic acid is determined by visual measurement

管号	1	2	3	4	5	6	7	8
DNA 用量/ μ L	5	10	15	20	25	30	35	40
颜色	蓝	蓝	蓝	蓝	红	红	红	红

各管的紫外吸收测定结果见图 3, 1~4 管加入核酸量不足以稳定体系, 加入盐溶液时, 体系的分散性被破坏, 形成了蓝色沉淀, 上清液的吸光度大幅度下降。第 5 管, 即核酸的量 $\geq 25 \mu\text{L}$ 时溶液的吸光度值基本不变, 每个试验重复测定 3 次取平均值, 结果与目测结果一致。

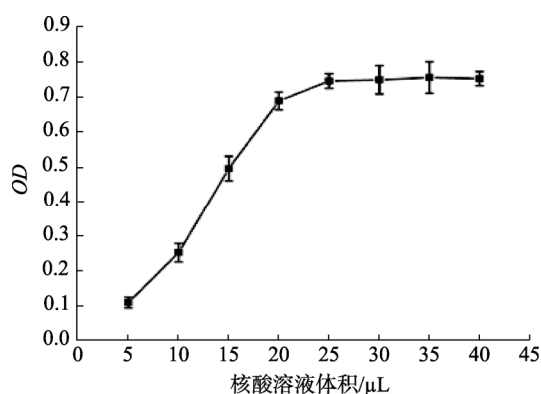


图 3 紫外可见分光光度法确定核酸最适用量($n=3$)

Fig.3 Optimum amount of DNA coupling with colloidal gold particles by ultraviolet visible spectrophotometry ($n=3$)

3.3 实施过程及检出限

样品中含有一定量的猪肉 DNA, 则该 DNA 会与原先吸附在金纳米粒子表面的核酸序列进行特异性结合, 形成双链 DNA, 因此原先的金纳米粒子失去了耐盐能力, 在 NaCl 的存在下, 探针体系颜色变成灰色或有蓝灰色沉淀产生; 如果探针体系的颜色仍是红色, 则说明检测的样品中不含猪肉 DNA 或者其中的猪肉 DNA 含量低于检测域值。检出限测试结果见图 4, 从图中的结果可以看到当样品中含有 5%、10%、20% 的猪肉时, 金纳米粒子出现明显的变色, 肉眼可以很容易判断, 说明该方法可以检测出肉制品掺假中低至 5% 的猪肉掺假。

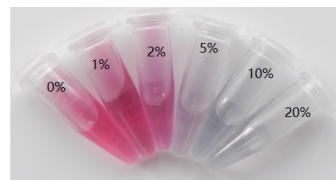


图 4 金纳米颗粒比色法检测猪肉的检出限

Fig.4 Detection limit of the gold nanoparticles-based colorimetric detection for pork identification

4 结 论

本研究合成猪源性成分特异性核酸探针,利用纳米金粒子的显色特性和单链核酸片段对纳米金粒子的保护作用,开发了一种快速鉴定猪源性成分掺假的比色检测方法。该方法裸眼即可判断5%的猪肉成分掺假。但本研究仅采用了煮制的方法制备了熟肉样品,不同的加工方式如腌制、高压、发酵等对DNA的破坏程度不同,因此方法的实际应用还需做进一步的研究。

参考文献

- [1] 古淑青,詹丽娜,赵超敏,等.基于液相色谱-串联质谱法的肉类特征肽段鉴别及掺假测定[J].色谱,2018,36(12):1269-1278.
Gu SQ, Zhan LN, Zhao CM, *et al.* Identification of meat marker peptides and detection of adulteration by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2018, 36(12): 1269-1278.
- [2] Omran GA, Tolba AO, El-Sharkawy ED, *et al.* Species DNA-based identification for detection of processed meat adulteration: Is there a role of human short tandem repeats (STRs)? [J]. *Egypt J Forensic Sci*, 2019, (9): 15-23.
- [3] 施姿鹤, Voglmerir J, 刘丽. 肉及其加工制品的掺假鉴别技术研究进展 [J/OL]. 食品科学. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.ts.20190507.1848.046.html>.
Shi ZH, Voglmerir J, Liu L. Research progress in the application of adulteration identification techniques for meat from different animal sources and meat products [J/OL]. *Food Sci*. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.ts.20190507.1848.046.html>.
- [4] VitKosek, LeošUttl, Monika Jirů, *et al.* Ambient mass spectrometry based on REIMS for the rapid detection of adulteration of minced meats by the use of a range of additives [J]. *Food Control*, 2019, 104: 50-56.
- [5] Rohman A, Erwanto Y, Man YBC. Analysis of pork adulteration in beef meatball using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy [J]. *Meat Sci*, 2011, 88(1): 91-95.
- [6] Barakat H, Elgarhy HAS, Moustafa MMA. Detection of pork adulteration in processed meat by species-specific PCR-QIAxcel procedure based on D-loop and cytb genes [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(23): 9805-16.
- [7] Kamruzzaman M, Sun DW, Elmasry G, *et al.* Fast detection and visualization of minced lamb meat adulteration using NIR hyperspectral imaging and multivariate image analysis [J]. *Talanta*, 2013, 103: 130-136.
- [8] Giaretta N, Di Giuseppe AMA, Lippert M, *et al.* Myoglobin as marker in meat adulteration: A UPLC method for determining the presence of pork meat in raw beef burger [J]. *Food Chem*, 2013, 141(3): 1814-1820.
- [9] Cao YH, Zheng KZ, Jing JF, *et al.* A novel method to detect meat adulteration by recombinase polymerase amplification and SYBR green I [J]. *Food Chem*, 2018, 266: 73-78.
- [10] Sentandreu MA, Fraser PD, Halket J, *et al.* A proteomic-based approach for detection of chicken in meat mixes [J]. *J Proteome Res*, 2004, 9(7): 3374-3383.
- [11] Chen A, Wei C, Chen G, *et al.* Duplex PCR approach for the detection and quantification of donkey, horse and mule in raw and heat-processed meat products [J]. *Int J Food Sci*, 2015, 50(3): 834-839.
- [12] Cheng J H, Chou HT, Lee MS, *et al.* Development of qualitative and quantitative PCR analysis for meat adulteration from RNA samples [J]. *Food Chem*, 2016, 192: 336-342.
- [13] Sonnante G, Montemurro C, Morgese A. DNA microsatellite region for a reliable quantification of soft wheat adulteration in durum wheat-based foodstuffs by real-time PCR [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(21): 10199-10204.
- [14] 胡悦, 刘艳艳, 任金瑞, 等. 牛、羊肉中水貂、猪、鼠混杂成分的多重荧光 PCR 鉴定方法的建立 [J]. *农业生物技术学报*, 2018, (9): 1621-1630.
Hu Y, Liu YY, Ren RJ, *et al.* Establishment of multiplex real-time fluorescence PCR for detection of mink (*Mustela lutreola*), pig (*Sus scrofa*) and rat (*Mus musculus*) derived components in beef and mutton [J]. *J Agric Biotechnol*, 2018, (9): 1621-1630.
- [15] Jia Y, Huang L, Zhuang J, *et al.* Species-specific multiplex real-time PCR assay for identification of deer and common domestic animals [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2014, 23(1): 133-139.
- [16] Yacoub HA, Sadek MA. Identification of fraud (with pig stuffs) in chicken-processed meat through information of mitochondrial cytochrome b [J]. *Mitochondrial DNA Part A*, 2017, 28(6): 855-859.
- [17] 石盼盼, 李旭, 魏法山, 等. 肉类掺假的分子生物学检测 [J]. *食品与生物技术学报*, 2017, (7): 107-111.
Shi PP, Li X, Wei FS, *et al.* Molecular biological detection for adulterated meat [J]. *J Food Sci Biotechnol*, 2017, (7): 107-111.
- [18] Meira L, Costa J, Villa C, *et al.* Eva Green real-time PCR to determine horse meat adulteration in processed foods [J]. *LWT*, 2017, 75: 408-416.
- [19] Soares S, Amaral JS, Mafra I, *et al.* Quantitative detection of poultry meat adulteration with pork by a duplex PCR assay [J]. *Meat Sci*, 2010, 85(3): 531-536.
- [20] Kumari R, Rank DN, Kumar S, *et al.* Real time PCR-An approach to detect meat adulteration [J]. *Buffalo Bulletin*, 2015, 34(1): 124-129.
- [21] Köppel R, Ganeshan A, Weber S, *et al.* Duplex digital PCR for the determination of meat proportions of sausages containing meat from chicken, turkey, horse, cow, pig and sheep [J]. *Eur Food Res Technol*, 2019, 245(4): 853-862.
- [22] Xu J, Shi M, Chen W, *et al.* A gold nanoparticle-based four-color proximity immunoassay for one-step, multiplexed detection of protein biomarkers using ribonuclease H signal amplification [J]. *Chem Commun*, 2018, 54(22): 2719-2722.
- [23] He Z, Yang H. Colorimetric detection of swine-specific DNA for Halal authentication using gold nanoparticles [J]. *Food Control*, 2018, 88: 9-14.
- [24] Ali ME, Hashim U, Mustafa S, *et al.* Nanoparticle sensor for label free detection of swine DNA in mixed biological samples [J]. *Nanotechnology*, 2011, 22(19): 195503.

(责任编辑:王欣)

作者简介



冯永巍, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全。

E-mail: 402200023@qq.com