

食品中马源性成分定性检测能力验证结果与分析

李俊霞*, 朱虹霖, 周浩, 张洪伟, 朱文斌, 杨红, 王利娜

(成都市食品药品检验研究院, 成都 610100)

摘要: 目的 提高实验室对食品中马源性成分定性鉴定的准确性和评估检测人员的专业技术水平, 增强实验室竞争力。**方法** 通过核酸蛋白仪器分析法和单重实时荧光 PCR 法得到样品真核生物 18S rRNA 基因扩增的循环阈值, 进而分析 DNA 的提取质量。再利用标准 SN/T 3730.5-2013《食品及饲料中常见畜类品种的鉴定方法第 5 部分: 马成分检测实时荧光 PCR 法》, 对该标准扩增体系的引物探针浓度进行优化和检出限分析后, 用优化的扩增体系对样品进行检测。再依据标准 SB/T 10923-2012《肉与肉制品中动物源性成分的测定实时荧光 PCR 法》的要求, 对样品进行检测。最后对 2 个标准的检测结果进行比对。**结果** 提取的 DNA 质量符合标准要求。标准 SN/T 3730.5-2013 的引物探针浓度优化后, 能有效扩增阳性样品, 检出限为 0.1%, 能有效检测马源性成分。2 个标准检测 20-M805 和 20-Q719 待测样品, 均未检出马源性成分。**结论** 本次能力验证获得满意评价。DNA 提取质量的评估, 反应体系中引物探针浓度的优化与选择, 不同检测方法结果的相互验证和实验的质量控制都是影响能力验证结果的重要因素。

关键词: 马源性成分; 实时荧光 PCR 法; 定性检测; 能力验证

Validation results and analysis for qualitative detection of horse-derive components in food

LI Jun-Xia*, ZHU Hong-Lin, ZHOU Hao, ZHANG Hong-Wei, ZHU Wen-Bin, YANG Hong, WANG Li-Na

(Chengdu Testing Institute of Food and Drug Control, Chengdu 610100, China)

ABSTRACT: Objective To improve the accuracy of qualitative detection ability of horse-derive components in food and the professional technical level of the detection personnel, and enhance the competitiveness of the laboratory. **Methods** The DNA extraction quality was analyzed by cyclic threshold for amplification of eukaryotic gene 18S rRNA obtained by nucleic acid protein instrumental analysis and simplex real-time fluorescence PCR. After optimizing the primers and probe concentration and analyzing the detection limit of the amplification system in SN/T3730.5-2013 *Identification of domestic animal ingredient in food and feed-Part5: Detection of horse ingredient-Real-time PCR method*, the optimized amplification system was used to detected the samples. The samples were also detected according to the requirements of SB/T 10923-2012 *Identification of animal derived materials in meat and meat products*. Finally, the results of the 2 standards were compared. **Results** The quality of the extracted DNA met the standard requirements. The optimized primer probe concentration of SN/T 3730.5-2013 could effectively amplify positive samples. The detection limit was 0.1%. It can effectively detect horse derived components. The horse derived components were not detected in 20-M805 and 20-Q719 samples by two methods.

*通讯作者: 李俊霞, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: 373727174@qq.com

*Corresponding author: LI Jun-Xia, Master, Senior Engineer, Chengdu Testing Institute of Food and drug Control, No16, Xingmao street, Longquanyi Distrc, Chengdu 610100, China. E-mail: 373727174@qq.com

Conclusion The ability verification is satisfied. Evaluation of DNA extraction quality, optimization and selection of primer and probe concentration in reaction system, mutual verification of results of different detection methods and quality control of experiments are all important factors affecting the results of proficiency test.

KEY WORDS: horse derived materials; real-time fluorescence PCR; qualitative detection; capability verification

1 引言

近年来,肉类掺假问题层出不穷,在国内,一些不法商人将低价猪肉掺入到高价牛羊肉中^[1,2]。在国外,肉类掺假问题也不容乐观。一项关于近千种肉制品的调查结果监测显示,国外加工肉制品中有 20%的产品存在标签标示与实际成分不符的现象^[3]。2013 年欧洲冷冻食品加工和供应商宣布:法国、英国和瑞典,多款冷冻牛肉食品检出马肉成分。2017 年美洲墨西哥在采集的肉制品中也出现 10%的牛肉样品含有马肉成分。由于马匹在饲养过程中可能服用不利于食品安全的药物,如克伦特罗(瘦肉精)而致使食品安全难以保障。因此,加强马源性成分的检测具有重要的社会意义。目前,分子生物检测技术已是国内外各种实验室及机构的动物源性成分鉴定的标准,在准确性、稳定性、重复性方面突显很好的优越性^[4-6]。基于核酸检测发展起来的肉类鉴定技术方法多样化,主要是 PCR 及其衍生技术。根据不同物种基因序列的差异性设计引物,再通过 PCR 反应扩增的特异性片段来检测和判断其物种来源。有直接 PCR 技术,及在此基础上实时荧光 PCR,从单重发展到多重,从定性检测发展到定量检测,不仅可以同时检测几种肉类成分,还可以检测掺假肉类成分含量比例^[7-9]。

中国检验检疫科学研究院测试评价中心是指中国合格评定国家认可委员会认可的能力验证提供者,严格依据标准要求运作能力验证计划,并对参加者的结果进行评价^[10,11]。本实验室于 2020 参加了中国检验检疫科学研究院测试评价中心组织的 ACAS-PT948,食品中牛、羊、猪、马源性成分鉴定能力验证。本次能力验证在检测马源性成分时,选用方法 SN/T 3730.5-2013《食品及饲料中常见畜类品种的鉴定方法第 5 部分:马成分检测实时荧光 PCR 法》^[12]和 SB/T 10923-2012《肉与肉制品中动物源性成分的测定实时荧光 PCR 法》^[13]对样品进行检测和验证。由于 SN/T 3730.5-2013 方法在利用标准检测过程中,标准反应体系中探针引物浓度过低,不能有效扩增阳性 DNA。本研究对该标准扩增体系的引物探针浓度进行优化,并用优化的扩增体系对样品进行检测,以期通过这次能力验证客观地考核本实验室的检测能力及体系管理,从而确定检测实验室的能力和水平,提高其检测能力。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 实验样品

待测样品编号为 20-M805 和 20-Q719,肉糜状样品。重约 10 g,铝箔袋真空包装,由能力验证承办方中国检验检疫科学研究院提供。阳性对照样品在中国检验检疫科学研究院购买。阴性对照为市场购买的兔肉样品。

2.1.2 仪器及试剂

CFX-96 Real time PCR 仪(美国伯乐公司);5424R 高速冷冻离心机(美国赛默飞世尔科技公司);ME204E 电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);501S 恒温水浴锅(上海跃进医疗器械厂);P330 核酸蛋白仪(德国 Implen 公司)。

DNA 提取试剂盒(德国 QIAGEN 公司);18S rRNA 和马共计 3 对引物及相应的 FAM(6-carboxy-fluorescein)荧光探针,按照 SN/T 3730.3-2013《食品及饲料中常见畜类品种的鉴定方法 第 3 部分:狐狸成分检测 实时荧光 PCR 法》^[14]、SN/T 3730.5-2013、SB/T 10923-2012 提供的引物序列信息,由上海生工生物工程股份有限公司合成。

2.2 实验方法

2.2.1 基因组 DNA 的提取和真核生物 18S rRNA 基因的检测

分别取待测样品,对照样品各 25 mg 肉糜置于 2 mL 离心管中,使用 QIAGEN 提取试剂盒提取样品基因组 DNA。使用核酸蛋白仪器对 DNA 的浓度和纯度进行检测,并用实时荧光 PCR 法对样品 18S rRNA 基因进行检测。按照 SN/T 3730.3-2013^[14]中的引物和探针,根据要求设置反应体系为:灭菌蒸馏水 9 μL , 2 \times premix 12.5 μL , 引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL , 探针(10 $\mu\text{mol/L}$)0.5 μL 和 95 ng/ μL 模板 2 μL 。反应混合液在 CFX-96 Real time PCR 仪中进行扩增,反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 40 s, 进行 45 个循环扩增。真核生物 18S rRNA 基因的引物探针见表 1。

2.2.2 标准 SN/T 3730.5-2013 对马源性成分的检测

1) SN/T 3730.5-2013 标准体系检测

按照 SN/T 3730.5-2013 中的引物和探针提取的样品 DNA 进行检测。根据要求设置反应体系为:灭菌蒸馏水 7.5 μL , 2 \times premix 12.5 μL , 引物(10 nmol/L)各 1 μL , 探针(10 nmol/L)1 μL 和 95 ng/ μL 模板 2 μL 。反应混合液在

CFX-96 Real time PCR 仪中进行扩增, 反应条件为: 94 °C 预变性 1 min, 94 °C 变性 34 s, 60 °C 退火延伸 45 s, 60 °C 收集荧光, 进行 40 个循环扩增。引物探针见表 2。

表 1 真核生物 18S rRNA 基因的引物探针序列
Table 1 Primer and probe sequences of eukaryotes 18S rRNA gene

名称	引物/探针 序列(5'→3')
18S rRNA-F(正向引物)	TCT GCC CTA TCA ACT TTC GAT GGTA
18S rRNA-R(反向引物)	AAT TTG CGC GCC TGC TGC CTT CCTT
18S rRNA-P(探针)	FAM-CCG TTT CTC AGG CTC CCT CTC CGG AAT CGA ACC -TAMRA

表 2 马源性基因的引物探针序列(SN/T 3730.5-2013)
Table 2 Primer and probe sequence of Equine gene (SN/T 3730.5-2013)

名称	引物/探针 序列(5'→3')
马-F(正向引物)	TGT AGC CCT AGC CGT GCG GCT AAC
马-R(反向引物)	TAG GAT GAT AAA CGT AAT AAG GGC TG
马-P(探针)	FAM-CGC CGG ACA CCT CCT AAT ACA CCTC-ECLIPSE

2) SN/T 3730.5-2013 反应体系中引物探针浓度的优化
特定的引物探针浓度可在 PCR 反应获得适宜的荧光信号和典型扩增曲线。用 QIAGEN 试剂盒提取的阳性对照马肉 DNA 对加入反应体系的引物探针浓度进行梯度设定筛选: 分别设置为 10、1.0、0.5、0.1 μmol/L。设置反应体系为: 灭菌蒸馏水 7.5 μL, 2×premix 12.5 μL, 引物各 1 μL, 探针 1 μL 和模板 2 μL。反应混合液在 CFX-96 Real time PCR 仪中进行扩增, 反应条件为: 94 °C 预变性 1 min, 94 °C 变性 34 s, 60 °C 退火延伸 45 s, 进行 40 个循环扩增^[12]。

3) 优化反应体系检出限试验

根据引物探针优化后体系情况, 对检出限进行检测。将阳性马肉样品以 1%和 0.1% 2 个水平掺入鸡肉样品中, 充分混匀后, 提取基因组 DNA 作为检测模板使用优化体系对肉样水平检出限检测。

4) 用优化的反应体系对样品进行检测

按照优化的探针引物浓度, 对样品 20-M805 和 20-Q719 的 DNA 进行检测。

2.2.3 标准 SB/T 10923-2012 对马源性成分的检测

待测样品 DNA 按照 SB/T 10923-2012 中的引物和探针, 根据要求设置反应体系为: 灭菌蒸馏水 2.8 μL, 2×premix 10 μL, 引物(900 nmol/L)各 2 μL, 探针(250 nmol/L) 2 μL 和模板 1.2 μL。反应混合液在 CFX-96 Real time PCR 仪中进行扩增, 反应条件为: 50 °C 2 min, 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火延伸 1 min, 60 °C 收集荧光, 进行 40 个循环扩增。使用的引物探针见表 3。

表 3 马源性基因的引物探针序列(SB/T 10923-2012)
Table 3 Primer and probe sequences of Equine gene (SB/T 10923-2012)

名称	引物/探针 序列(5'→3')
马-F(正向引物)	CCA ATG CGT ATT CTGACTCTT AGTG
马-R(反向引物)	CGA TAA TTA CGT ATG GGT GTT CC
马-P(探针)	FAM-CTG ACA CTA ACA TGA ATC GGC GGA CAGC-TAMRA

2.2.4 检验过程质量控制

每一批检测过程设置阳性对照、阴性对照、核酸提取空白对照和 PCR 扩增试剂空白对照。阳性对照使用提取的马肉 DNA 为模板。真核生物 18S rRNA 基因检测的阴性对照中使用苡仁 DNA。马源性成分检测阴性对照使用兔肉 DNA。设置核酸提取空白, 即在核酸提取过程中不加样品的空白管。设置 PCR 扩增试剂空白对照, 即在扩增体系设置的空白对照不加 DNA 模板, 以灭菌水来代替, 用于检测 PCR 污染。每个样品做 2 个复孔的重复实验。根据各标准要求, 对各对照结果进行判定。

3 结果与分析

3.1 DNA 提取的质量评估

QIAGEN DNA 提取试剂盒提取的 DNA 溶液经核酸蛋白分析仪检测纯度和浓度, 均符合扩增条件要求。实验参考 SN/T 3730.3-2013 的真核生物内参照基因 18S rRNA 基因, 18S rRNA 基因在真核生物体或者细胞中稳定表达的基因, 可评估提取的 DNA 提取过程中是否存在片段损失。样品 18S rRNA 满足标准要求 Ct 值<30.0。Ct 值结果为 19.33, 检测过程质量控制设置的阳性对照, 阴性对照及空白对照均满足标准要求。对 DNA 浓度纯度的检测和对 18S rRNA 基因的检测, 双重验证提取的 DNA 满足 PCR 扩增要求。

3.2 标准 SN/T 3730.5-2013 检测结果

3.2.1 SN/T 3730.5-2013 标准体系检测结果

由图 1 可见, 由于标准的引物探针浓度过低, 扩增时荧光信号值过低, 致使反应不完全。扩增结果无阈值线, 阳性对照扩增结果无效。

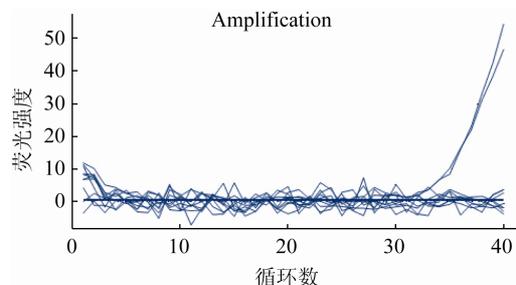


图 1 SN/T 3730.5-2013 标准体系检测结果

Fig.1 Detection results of standard system SN/T 3730.5-2013

3.2.2 反应体系中引物探针浓度的优化

不同浓度的引物探针的反应体系其扩增结果由图 2 可看出, 引物探针浓度 10 $\mu\text{mol/L}$ 阳性对照 DNA 的扩增曲线无平台期。引物探针浓度 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 阳性 DNA 无扩增曲线。引物探针浓度 1 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 扩增曲线都很典型, 综合 Ct 值和扩增曲线的典型性以及平台期荧光值避免过低的原则, 筛选出引物探针加入浓度应为 1 $\mu\text{mol/L}$ 。

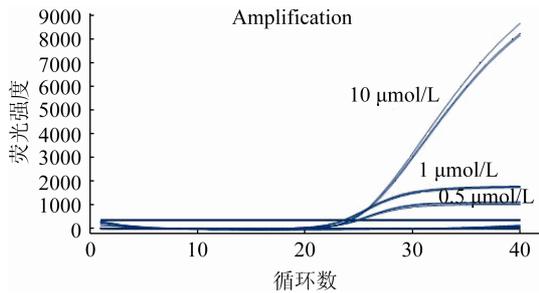


图 2 不同浓度的引物探针检测结果

Fig.2 Detection results of different concentrations of primers and probe

3.2.3 检出限实验

根据标准判定, Ct 值 ≤ 35.0 , 则判定为检品阳性。从图 3 可以看出, 鸡肉中掺入 1% 和 0.1% 2 个水平的马肉, Ct 值均 < 35 , 均能准确判断。由图可见, 反应体系引物探针浓度优化后, 其方法检出限为 0.1%。

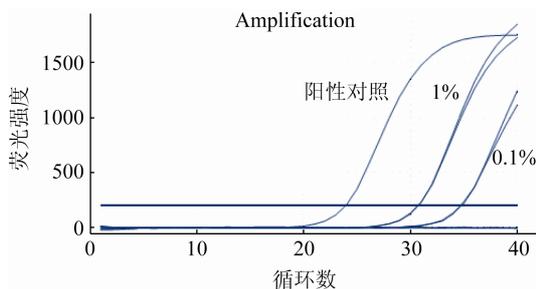


图 3 优化体系的检出限结果

Fig.3 The detection limit results of optimized system

3.2.4 优化的引物探针浓度样品检测结果

按照优化的引物探针浓度, 对样品 20-M805 和 20-Q719 DNA 进行实时荧光 PCR 扩增, 优化反应体系见表 4, 样品检测结果均为阴性。检测过程质量控制设置的阳性对照, 阴性对照及空白对照均满足标准要求。

3.3 标准 SB/T 10923-2012 检测结果

样品 20-M805 和 20-Q719 按照 SB/T 10923-2012 设计的马源性基因的引物和探针进行 PCR 扩增, 检测结果为阴性。检测过程质量控制设置的阳性对照, 阴性对照及空白对照均满足标准要求。

表 4 PCR 反应体系

Table 4 System parameters of PCR reaction	
组分	加样体积/ μL
2 \times premix	12.5
上游引物(1 $\mu\text{mol/L}$)	1.0
下游引物(1 $\mu\text{mol/L}$)	1.0
探针(1 $\mu\text{mol/L}$)	1.0
模板	2.0
水	7.5

4 结论与讨论

根据中国检验检疫科学研究院测试评价中心公布的此次能力验证的结果总结显示, 样品 20-M805 和 20-Q719 能力验证收到了“满意”结果。证明实验室有技术能力进行马源性成分的鉴定, 这对实验室是一个充分的肯定。

在动物 DNA 提取过程中, 在混匀样品与 Buffer 缓冲液时, 为保证样品的充分接触, 应选用涡旋方式混匀, 避免人为操作过程中用力上下颠倒离心管剧烈振荡而导致 DNA 片段断裂而影响后续扩增结果。获取基因组 DNA 后, 为评估提取 DNA 的质量, 除了使用核酸蛋白仪对提取的 DNA 的浓度和纯度进行计算与判断后, 看是否达到标准要求, 也可以通过对样品 18S rRNA 基因扩增的循环阈值进行判断, 确认是否存在 DNA 提取过程中因人为操作不当导致 DNA 过度断裂而影响后续的 PCR 扩增问题。在 PCR 扩增检测时, 每一批检测设置分别为阳性对照、阴性对照、核酸提取空白对照和 PCR 扩增试剂空白对照。以此判断在提取过程和 PCR 反应体系的配制过程是否存在气溶胶污染而导致的结果有误。

在实验方法选择上, 选用 2 种方法对实验结果进行相互验证。在使用标准方法进行实验结果有问题的时候, 除了核对合成的引物探针碱基序列是否有误, 还应对方法中探针引物浓度有敏锐的观察力。对大多数 PCR 反应, 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 是个合适的浓度, 在探针引物的浓度不理想时, 可在 0.3~1.0 $\mu\text{mol/L}$ 之间进行选择, 并确认其检出限^[15]。

通过这次能力验证, 提高了检测人员的检测能力, 对问题的分析和处理能力, 开阔了能力验证者的思路, 促进检测机构检测水平的提高, 增强检测机构的公信力, 提高政府及客户对检测机构的信任度。

参考文献

- [1] 张明, 王冬妍, 杨文奇, 等. 牛羊肉中猪源性成分检测能力验证研究[J]. 食品安全检测学报, 2013, 4(5): 1605-1610.
Zhang M, Wang DY, Yang WQ, et al. Analysis on proficiency test of identification of porcine-derived material in beef and mutton [J]. J Food Saf Qual, 2013, 4(5): 1605-1610.
- [2] 陈雨欣, 朱荣, 石建华. 牛肉粉末中猪源性成分定性检测 FAPAS 能

- 力验证结果与分析[J]. 食品安全检测学报, 2018, 9(20): 5324-5326.
Chen YX, Zhu R, Shi JH. Validation results and analysis of FAPAS capability for qualitative detection of porcine-derive components in beef powder [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(20): 5324-5326.
- [3] He WL, Huang M, Zhang C. Recent technological advances for identification of meat species in food products [J]. Food Sci, 2012, 33(3): 304-307.
- [4] 吕冬梅, 黄原, 文慧, 等. DNA 条形码技术在食品鉴定中的应用[J]. 食品科学, 2015, 36(9): 248-254.
Lv DM, Huang Y, Wen H, *et al.* Application of DNA barcoding in food identification [J]. Food Sci, 2015, 36(9): 248-254.
- [5] 王守云, 袁明美, 封聪, 等. 肉类掺假鉴别技术研究进展[J]. 肉类研究, 2017, (4): 56-61.
Wang SY, Yuan MM, Feng C, *et al.* Advances in meat adulteration identification technology [J]. Meat Res, 2017, (4): 56-61.
- [6] 李宗梦, 赵良娟, 王永芳, 等. 肉及肉制品分子生物学鉴别技术研究进展[J]. 食品安全检测学报, 2015, 6(2): 405-409.
Li ZM, Zhao LJ, Wang YF, *et al.* Advances in molecular biological identification of meat and meat products [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(2): 405-409.
- [7] Kitpipit T, Sittichan K, Thanakiatkrai P. Direct-multiplex PCR assay for meat species identify-cation in food products [J]. Food Chem, 2014, (163): 77-82.
- [8] Kitpipit T, Sittichan K, Thanakiatkrai P. Are there food products fraudulent? Rapid and novel triplex-direct PCR assay for meat identification [J]. Forensic Sci Int: Genet Ser, 2013, (4): 33-34.
- [9] Song KY, Wang HJ, Kim JH. Ultra-fast DNA-based multiplex convection PCR method for meat species identification with possible on-site applications [J]. Food Chem, 2017, (229): 341.
- [10] ISO/IEC 17403-2010 合格评定-能力验证的通用要求[S].
ISO/IEC 17403-2010 Conformity assessment-General requirements for capability verification [S].
- [11] CNAS-RL 02:2018 能力验证规则[S].
CNAS-RL 02:2018 Competency validation rules [S].
- [12] SN/T 3730.5-2013 食品及饲料中常见畜类品种的鉴定方法第 5 部分: 马成分检测实时荧光 PCR 法[S].
SN/T 3730.5-2013 Identification of domestic animal ingredient in food and feed-Part5: Detection of horse ingredient-Real-time PCR method [S].
- [13] SB/T 10923-2012 肉与肉制品中动物源性成分的测定实时荧光 PCR 法[S].
SB/T 10923-2012 Identification of animal derived materials in meat and meat products [S].
- [14] SN/T 3730.3-2013 食品及饲料中常见畜类品种的鉴定方法第 3 部分: 狐狸成分检测实时荧光 PCR 法[S].
SN/T 3730.3-2013 Identification of domestic animal ingredient in food and feed-Part3: Detection of fox ingredient-Real-time PCR method [S].
- [15] 蔡刚, 李闻捷, 沈茜. 实时荧光 PCR 应用中的问题及优化方案[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2003, 24(6): 330-332.
Cai G, Li WJ, Shen Q. Problems and optimization in the application of real-time quantitative PCR [J]. Clin Biochem Lab Med Foreign Count, 2003, 24(6): 330-332.

(责任编辑: 李磅礴)

作者简介



李俊霞, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品微生物检测。
E-mail: 373727174@qq.com