

实时荧光 PCR 法检测肉制品中猪源性成分

巫 坚, 黄晓韵, 王海华, 陈小聪*

(广西-东盟食品检验检测中心, 南宁 530021)

摘 要: 目的 建立一种高特异性和高灵敏度的有效检测猪源性成分的检测方法。**方法** 以猪雌激素受体基因设计合成一对特异性引物, 采用液氮研磨结合试剂盒抽提的方法提取猪肉中的 DNA, 分别以 300、30、3、0.3、0.03 ng 为模板量进行梯度反应, 基于荧光定量 PCR 技术(SYBR 法)建立检测方法。**结果** 以 Ct 值作为纵坐标, 以 $\lg X$ (X 为 DNA 的量, ng) 的值作为横坐标, 得到标准曲线方法 $Ct=30.473-3.542\lg X$, $r^2=0.9997$; 该方法的检测灵敏度达到 2 pg。**结论** 该猪源性成分检测方法简单快捷、特异性和重复性好、灵敏度高, 可作为市场监督和检测鉴定的可行性方法。

关键词: 猪源性成分; 实时荧光 PCR; 肉类制品

Detection of porcine-derived components in meat products by real-time fluorescence PCR

WU Jian, HUANG Xiao-Yun, WANG Hai-Hua, CHEN Xiao-Cong*

(Guangxi-Asean Food Inspection Center, Nanning 530021, China)

ABSTRACT: Objective To establish a detection method with high specificity and high sensitivity for effectively detecting porcine-derived components. **Methods** A pair of specific primers were designed and synthesized based on porcine estrogen receptor gene. DNA in pork was extracted by liquid nitrogen milling combined with kit extraction. Gradient reaction was performed with 300, 30, 3, 0.3 and 0.03 ng as the template amount, respectively. The detection method was established based on fluorescent quantitative PCR (SYBR method). **Results** Using Ct value as ordinate and $\lg X$ (X as DNA quality, ng) as abscissa, the standard curve method was obtained, $Ct=30.473-3.542\lg X$, $r^2=0.9997$. The detection sensitivity of this method was 2 pg. **Conclusion** The detection method for the porcine-derived components is simple and rapid, good in specificity and repeatability, and high in sensitivity, and can be used as a feasible method for market supervision, detection and identification.

KEY WORDS: porcine-derived ingredients; real-time fluorescent PCR; meat product

0 引 言

自进入 20 世纪, 特别是我国加入世界贸易组织以来, 食品行业始终保持着持续、快速发展的趋势。随着我国社会经济水平的提高, 人们对肉类的需求日益增多, 使我国

在肉类行业中生产和消费量占全球前列水平^[1], 肉制品加工业也是中国的优势产业之一。当前, 肉制品市场上的掺假行为除了掺病、死、注水等畜肉外, 以低价肉或非禽畜肉冒充高价肉的现象比较常见。例如外国的“马肉风波”和近年国内相继报道的肉类掺假事件^[2]。用猪肉、鸭肉伪造

基金项目: 广西科技计划项目(桂科 AB18126084)

Fund: Supported by the Programs for Science and Technology of the Guangxi Province (Guike AB18126084)

*通信作者: 陈小聪, 硕士, 主任技师, 主要研究方向为食品安全及质量控制。E-mail: 330738660@qq.com

*Corresponding author: CHEN Xiao-Cong, Master, Chief Technician, No.9, Qinghu Road, Qingxiu District, Nanning 530021, China. E-mail: 330738660@qq.com

牛羊肉是目前主要的掺假手段。这些掺假行为包含一些潜在风险,比如兽药滥用、动物疫病等,甚至涉及宗教信仰的问题,例如在清真食品中掺进猪肉^[3]。目前,对肉类掺假辨别的方法主要以 2 种方法为基础:蛋白质鉴定和核酸鉴定^[4]。其中以蛋白质为基础的鉴定技术开发得比较早,也运用得比较成熟。20 世纪 80 年代,国外已经开始对肉制品进行掺假研究,主要是在生猪肉和牛肉方面,主要运用的技术有十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳^[5-7]、等电聚焦电泳^[8]和免疫学^[9-13]等方法。但是食品中的肉类经过切碎、混合、蒸煮、熏烤等加工烹调过程后,就失去了原有的形态和质地,最重要的是加工处理也会改变肉类蛋白质的结构和稳定性,从而破坏物种特有的蛋白质和抗原决定部位^[14]。而且,这些方法大都成本高、工作量大、能检测的样品也有限,所以以蛋白质为基础的鉴定技术稳定性、可靠性和可推广性较差,已不能满足当前要求快速、简便和准确的肉类安全检测。随着基于核酸的分子生物学鉴定方法的兴起和发展,由于核酸在肉制品经过加工后依然能够保留一部分,且该方法具有快速简便、灵敏度高、特异性强等特点,成为了肉制品中掺假研究的热点^[15-16]。本研究通过对肉制品提取有效的核酸物质,建立一个高特异性和高灵敏度的分子生物学方法,简单快捷鉴定其中的猪源性成分。该方法可作为市场监督和检测鉴定的可行性方法,有效打击肉制品中的掺假违法行为。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试 剂

液氮(工业级,广西瑞达化工科技有限公司);食品 DNA 抽提试剂盒(德国 QIAGEN 公司);特异性引物(华大基因公司);荧光定量 PCR 试剂盒(北京天根生化有限公司)。

1.1.2 仪 器

HH-4 恒温水浴锅(常州国华公司);BR7047 系列移液枪(德国 BRAD 公司);OSE-260-01 全波长分光光度计(北京天根生化公司);QuantStudio 5 荧光定量 PCR 仪(上海赛默飞世尔公司)。

1.2 肉制品中 DNA 的提取

取样品用液氮在研钵中充分研磨均质,取 200 mg 按

照 DNA 抽提试剂盒提取 DNA,对得到的 DNA 使用全波长分光光度计检测其质量。结果显示,所提取的 DNA 的 A_{260}/A_{280} 比值均在 1.7~2.0 之间时,适宜于进行荧光定量 PCR 扩增。

1.3 特异性引物设计及合成

根据 NCBI 网站上 Genbank 上所公布的猪雌激素受体^[17]基因(EF195768)序列,雌激素受体基因的碱基序列属内高度保守,经查找文献,国内外的猪雌激素受体基因分为 A 和 B 等位基因,而等位基因的碱基序列只有 2 个碱基的突变^[18],可作为猪源性成分通用引物设计模板。用 Vector NTI 软件按照引物设计原则设计特异性引物,并在 NCBI 网站上进行 BLAST,得到特异性较好的引物,并由华大基因公司合成,引物序列见表 1。

1.4 荧光定量 PCR 反应体系与参数

反应体系总体积为 25 μ L: 2 $\times$ Super Real Pre Mix Plus, 12.5 μ L; S1-F(10 μ mol/L)和 S1-R(10 μ mol/L)各 1.5 μ L; 50 $\times$ ROX Reference Dye, 2.5 μ L; DNA 模板(0.015~150 ng/ μ L)2 μ L,其余不足用灭菌超纯水补齐。反应程序参数为: 95 $^{\circ}$ C, 15 min; 95 $^{\circ}$ C, 15 s; 60 $^{\circ}$ C, 30 s; 40 个循环;若添加溶解曲线则默认添加荧光定量 PCR 仪固定溶解曲线程序。

2 结果与分析

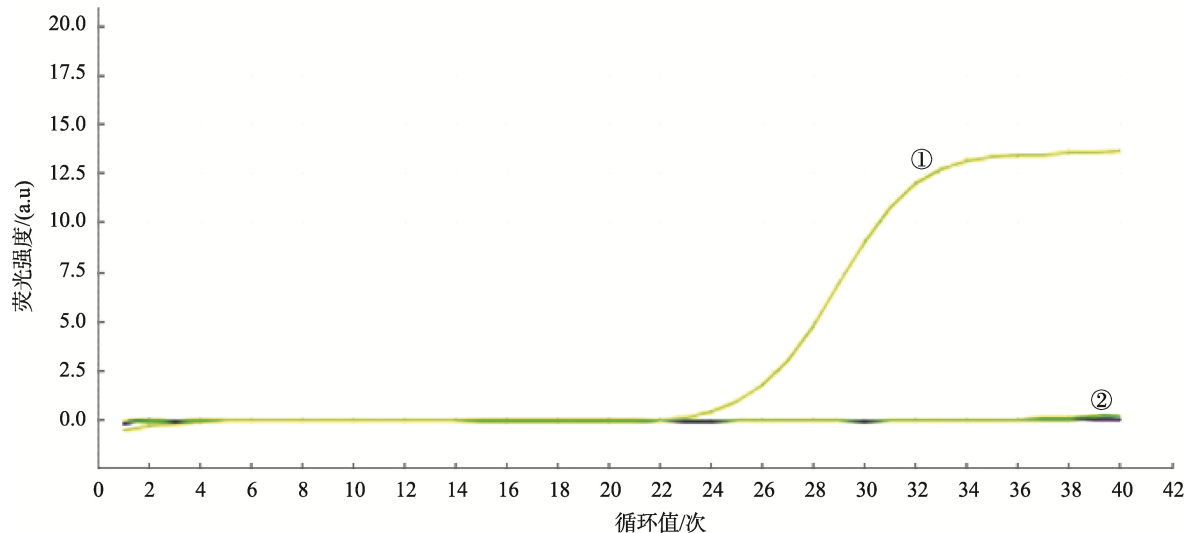
2.1 引物特异性验证实验

按照肉制品中 DNA 的提取方法,分别对猪、牛、羊、鸭、鸡和鱼的 DNA 进行提取,得到的 DNA 经全波长分光光度计测定其质量, A_{260}/A_{280} 比值均在 1.7~2.0 之间,适宜进行荧光定量 PCR 扩增。分别取猪、牛、羊、鸭、鸡和鱼的 DNA 各 100 ng 作为模板,用设计合成的猪特异性引物 S1-F 和 S1-R 进行荧光定量 PCR,验证引物的特异性。

结果显示,图 1 中对猪、牛、羊、鸭、鸡和鱼的 DNA 进行荧光定量 PCR,只有猪的 DNA 有收集到荧光信号,并呈现典型的 S 型扩增曲线,即对其 DNA 进行了有效地扩增,且在 40 Ct 之内,而猪、牛、羊、鸭、鸡和鱼的 DNA 均没有收集到荧光信号,呈现平直的曲线,即无 DNA 扩增,都在 40 Ct 值以上。

表 1 猪特异性引物序列
Table 1 Porcine specific primer sequence

引物名称	目的基因/片段长度/bp	引物序列(5'-3')
猪特异性引物	雌激素受体基因(EF195768)79 bp	S1-F GAGAAATTCTGAGGGGCATCTG
		S1-R CAGCTCCTTCACTCGGGTTG



注: ①猪; ②牛、羊、鸭、鸡、鱼和空白对照。

图 1 引物特异性验证实验扩增曲线

Fig.1 Amplification curve of primer specificity test

为了进一步验证引物对猪 DNA 的特异性扩增, 图 2 中对扩增的猪 DNA 进行了溶解曲线分析, 结果显示只有一个单峰, 没有非特异性扩增, 也说明设计合成的引物特异性好, 可作为建立牛肉制品中猪源性成分荧光定量 PCR 检测方法的引物。

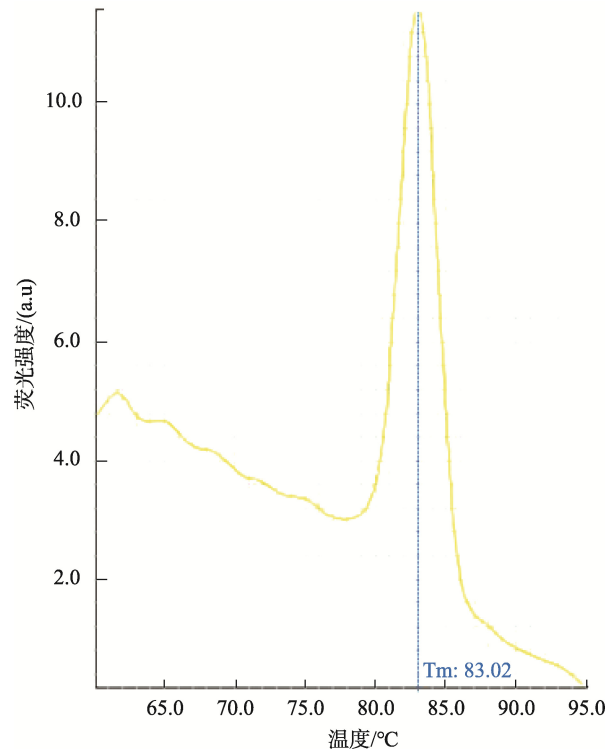


图 2 引物特异性验证实验溶解曲线

Fig.2 Dissolution curve of primer specificity test

2.2 检测重复性和灵敏度实验

按照肉制品中 DNA 的提取方法提取得到猪 DNA, 对其进行 10 倍梯度稀释, 各梯度反应体系中, 模板的量分别为 300、30、3、0.3、0.03 ng, 得到扩增曲线和标准曲线。

图 3 是各梯度模板得到的扩增曲线, 从图中可以看到各梯度均进行了扩增, 且各梯度平行组的曲线重合性好。

为进一步说明实验的重复性, 对实验数据进行了偏差分析, 结果见表 2。

从表 2 可以看到, 标准偏差最大只有 0.24, 说明该方法重复性好, 其中以 Ct 值作为纵坐标, 以 lgX (X 为 DNA 的量, ng) 的值作为横坐标, 每个稀释度 3 份重复, 进行荧光定量 PCR 的标准曲线制作, 得:

$$Ct=30.473-3.542lgX, r^2=0.9997$$

---X 为 DNA 的量, ng。

一般以 40Ct 作为阳性样品检出限, 则本方法理论上可以检测达到 2 pg 级别, 说明灵敏性高。用模板的质量做横坐标, 各梯度平均循环数为纵坐标作图得到图 4 的标准曲线。

2.3 肉制品模拟检测

肉制品的制作工艺中对肉源中的 DNA 影响最大的 2 大因素是高温蒸煮与高温烘烤。因此本研究模拟肉制品的加工过程, 同时模拟肉制品中掺入猪肉的过程, 以牛肉为基底, 按照牛肉:猪肉质量比例分别为: ①0:1, ②1:1, ③4:1, ④9:1, ⑤19:1 制备混合肉。将混合肉都经过 121 °C、45 min 高温高压处理后再置于烘箱 150 °C 烘烤 3 h 后按照 1.2 中的方法提取 DNA 并上机检测。

从图 5 模拟肉制品的加工过程检测结果来看, 模拟掺入各个比例猪肉的混合肉均能够进行良好地扩增, 高温蒸

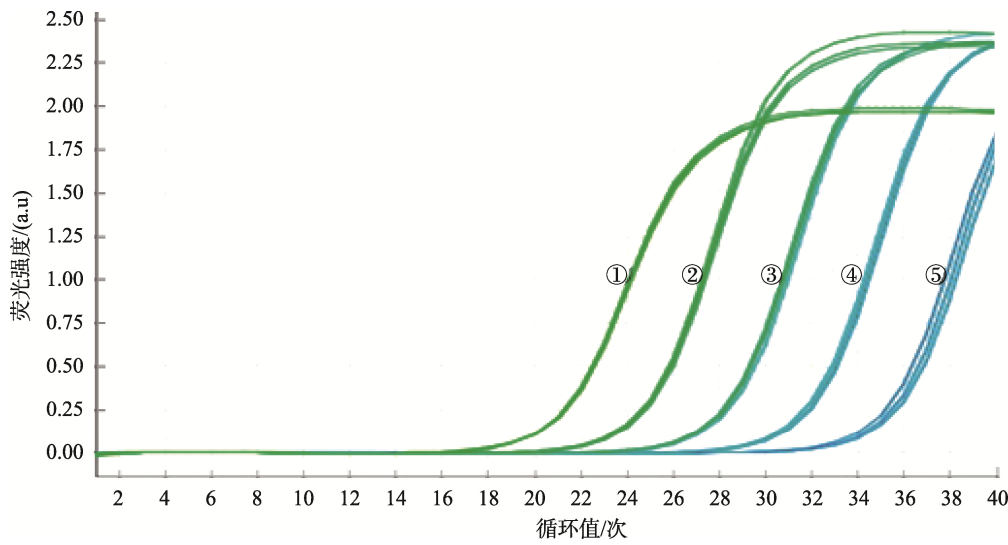
煮以及烘烤过程对肉源的 DNA 质量影响有限, 这可能是因为本身 DNA 虽然有损坏、碎片化, 但是本研究的扩增片段只有 79 bp 长度, 足够得到满足检测的 DNA。

2.4 实际样品检测

从市场销售的预包装肉制品中采购非标示猪源性成

分的样品 15 份, 根据已建立的检测方法进行检测分析。

从图 6 对市场上售卖肉制品的检测结果上看, 15 份样品的扩增曲线平直, 都没有对猪 DNA 的扩增曲线, 即没有检出猪源性成分。表明所采购的 15 份样品都符合标签明示, 并无掺入猪源性成分。



注: 模板量①300 ng; ②30 ng; ③3 ng; ④0.3 ng; ⑤0.03 ng。

图 3 重复性和灵敏度实验扩增曲线

Fig.3 Experimental amplification curves of repeatability and sensitivity

表 2 平行实验数据(n=3)			
Table 2 Parallel experiment data (n=3)			
DNA/ng	Ct	平均 Ct	标准偏差
300	21.82	21.79	0.029
	21.77		
	21.77		
	25.09		
30	25.16	25.16	0.075
	25.24		
	28.69		
	28.60		
3	28.89	28.85	0.140
	32.15		
	32.33		
	32.41		
0.3	36.17	32.30	0.133
	35.95		
	35.94		
	35.69		

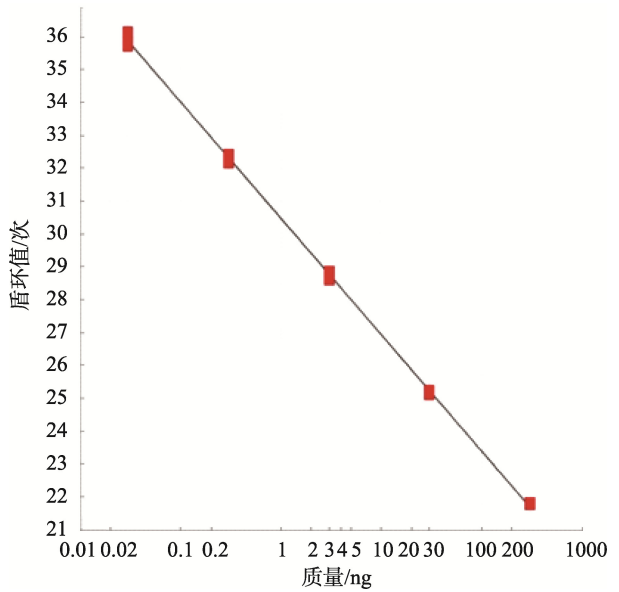
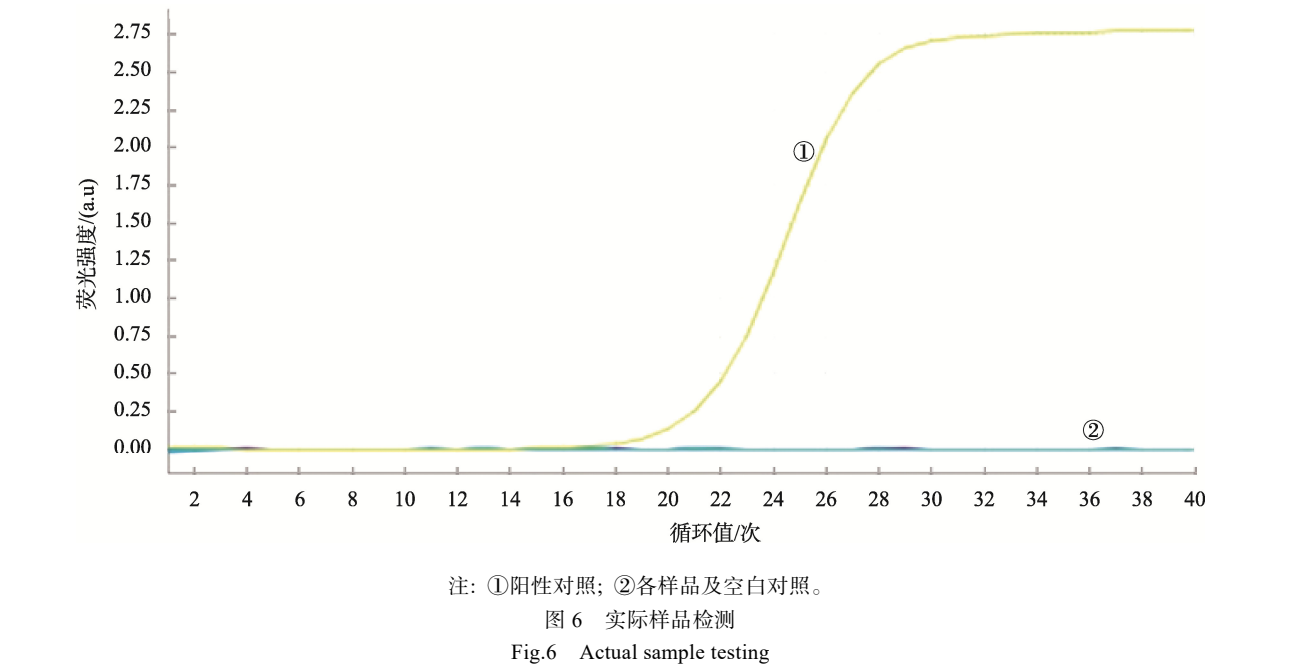
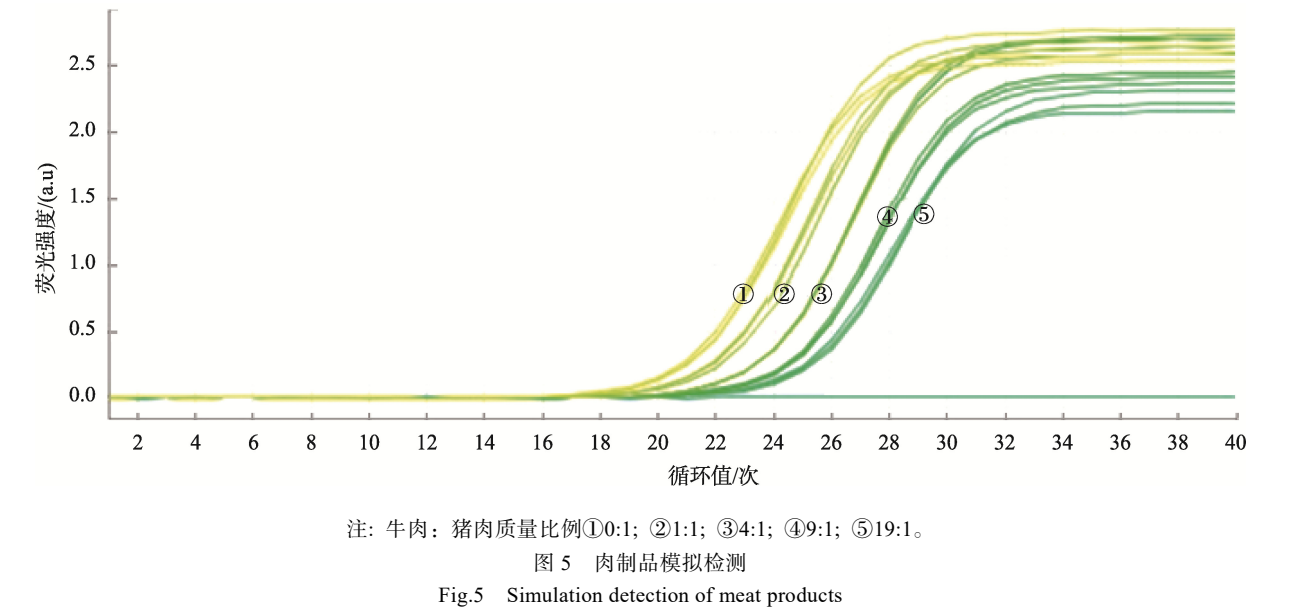


图 4 重复性和灵敏度实验标准曲线

Fig.4 Experimental standard curves of repeatability and sensitivity



3 结论与讨论

以具有物种间特异性的 DNA 物质为基础的鉴别方法得到了快速的发展, 一方面是因为肉类加工业的快速升级, 深加工及复杂的加工工艺导致原有以蛋白质为基础的检测方法无法满足检测需求; 另一方面是以 PCR 技术, 特别是高特异性、高灵敏度、更快速简便的荧光定量 PCR 技术为代表的 DNA 检测技术出现, 使得肉类加工业的产品质量和安全得到进一步的保障。本研究建立了一个从肉类制品中有效提取 DNA, 并能高特异性及高灵敏度地鉴别出其中猪源性成分的方法。虽然比 AL-KAHTANI 等^[16]在灵敏度理论上提高了 7 倍多, 但是该方法只能在定性水平上进

行检测, 而且在如此低的掺入量下毫无经济价值, 或者是由于非故意掺入而造成的, 所以下一步还需对定量的检测方法进行研究, 以便更准确地打击市场上的掺假行为。

参考文献

[1] 周映霞. 我国肉类加工的现状与研究[J]. 肉类研究, 2009, (2): 8–11.
ZHOU YX. The status quo and research of China's meat processing [J]. Meat Res, 2009, (2): 8–11.

[2] 邵长春, 刘光瑞, 田妮娜, 等. 猪·牛·羊源性成分实时等温扩增检测方法的建立[J]. 安徽农业科学, 2019, 47(9): 186–188, 193.
SHAO CC, LIU GR, TIAN NN, et al. Establishment of loop-mediated isothermal amplification detection method for porcine, bovine, and sheep-derived components [J]. Anhui Agric Sci, 2019, 47(9): 186–188,

- 193.
- [3] MAN YBC, AIDA AA, RAHA AR, *et al.* Identification of pork derivatives in food products by species-specific polymerase chain reaction (PCR) for halal verification [J]. *Food Control*, 2007, 18(7): 885–889.
- [4] 刘帅帅, 李宏, 罗世芝, 等. PCR 技术在肉类掺假检验中的应用进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2011, 2(6): 280–284.
- LIU SS, LI H, LUO SZ, *et al.* Progress in meat adulteration identification using PCR method [J]. *J Food Saf Qual*, 2011, 2(6): 280–284.
- [5] TANABE R, MUROYA S, NAKAJIMA I, *et al.* Skeletal muscle connectin primary structures as related to animal species and muscle type [J]. *J Food Sci*, 2010, 62(3): 451–453.
- [6] LAMETSCH R, ROEPSTROFF P, BENDIXEN E. Identification of protein degradation during post-mortem storage of pig meat [J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(20): 5508–5512.
- [7] MONTOWSKA M, POSPIECH E. Species-specific expression of various protein in meat tissue proteomic analysis of raw and cooked meat and meat products made from beef, pork and selected poultry species [J]. *Food Chem*, 2013, 136(3/4): 1461–1469.
- [8] ARISTOY MC, TOLDRA F. Histidine dipeptides HPLC-based test for the detection of mammalian origin proteins in feeds for ruminants [J]. *Meat Sci*, 2004, 67(2): 211–217.
- [9] CHEN FC, HSIEH YH. Detection of pork in heat-processed meat products by monoclonal antibody-based ELISA [J]. *J AOAC Int*, 2000, 83(1): 79.
- [10] 陈辉. 夹心 ELISA 方法检测熟肉中猪肉成分的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.
- CHEN H. Detection of pork components in cooked meat by sandwich ELISA [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2011.
- [11] YAMAMOTO T, KATO M, ENDO K, *et al.* Detection of ruminant meat and bone meal in feeds by sandwich ELISA with monoclonal antibodies [J]. *J Vet Med Sic*, 2016, 77(12): 1605–1609.
- [12] KIM JS, KWON IJ, KIM M, *et al.* Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies highly specific to pork fat protein [J]. *Food Control*, 2017, 79: 80–86.
- [13] MANDLI J, ELFATIMI I, SEDDAOUI N, *et al.* Enzyme immunoassay (ELISA/immunosensor) for a sensitive detection of pork adulteration in meat [J]. *Food Chem*, 2018, 255: 380–389.
- [14] 马永征, 马冬, 白娣斯, 等. 免疫学检测肉类制品掺假研究进展[J]. *肉类研究*, 2012, (9): 26–29.
- MA YZ, MA D, BAI DS, *et al.* Research progress of immunological detection of meat adulteration [J]. *Meat Res*, 2012, (9): 26–29.
- [15] ZENG L, WEN J, FAN S, *et al.* Identification of sea cucumber species in processed food products by PCR-RFLP method [J]. *Food Control*, 2018, 90: 166–171.
- [16] AL-KAHTANI HA, ISMAILEA, AHMED MA. Pork detection in binary meat mixtures and some commercial food products using conventional and real-time PCR techniques [J]. *Food Chem*, 2017, 219: 54–60.
- [17] PIELBERG G, OLSSON C, SYVANEN AC, *et al.* Unexpectedly high allelic diversity at the KIT locus causing dominant white color in the domestic pig [J]. *Genetics*, 2002, 160(1): 305.
- [18] 冉雪琴, 刘金娟, 王嘉福. 贵州地方猪品种雌激素受体基因内含子 1 多态性[J]. *山地农业生物学报*, 2009, (3): 230–234.
- RAN XQ, LIU JJ, WANG JF. Estrogen receptor gene intron 1 polymorphism in Guizhou local pig breeds [J]. *J Mount Agric Biol*, 2009, (3): 230–234.

(责任编辑: 张晓寒)

作者简介



巫 坚, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品检验检测技术。
E-mail: 823561681@qq.com



陈小聪, 硕士, 主任技师, 主要研究方向为食品安全及质量控制。
E-mail: 330738660@qq.com