

# 不同核酸提取方法用于多重荧光 PCR 法检测 3 种混合熟肉的比较分析

雷 庆\*, 赵中开

(自贡检验检测院, 自贡 643000)

**摘要: 目的** 探讨多重荧光定量 PCR 法检测不同核酸提取方法以及蒸、煮、烤烹饪方式制作的混合熟肉制品的差异。**方法** 用 3 种不同的提取方法: 抽提法、离心柱法及磁珠法, 提取经过蒸、煮、烤烹饪方式制作的牛、鸡、猪、鸭混合样品的 DNA, 比较不同方法提取 DNA 的质量及多重荧光 PCR 检测提取的 DNA 的效果。**结果** 3 种方法提取 DNA 的浓度及纯度无明显差别, 多重实时荧光 PCR 检测磁珠法提取的混合样品 DNA 的 Ct 值最小, 扩增效果最佳。**结论** 本研究中磁珠法提取熟肉制品 DNA 的检测效果更为理想。

**关键词:** 熟肉; DNA 提取; 多重荧光 PCR

## Comparison and analysis of different nucleic acid extraction methods for detection of 3 kinds of mixed cooked meat by multiple fluorescence PCR

LEI Qing\*, ZHAO Zhong-Kai

(Zigong Inspection and Testing Institute, Zigong 643000, China)

**ABSTRACT: Objective** To investigate the difference of multiple fluorescence quantitative PCR detection results of different nucleic acid extraction methods and steamed, cooked and roasted cooked meat products. **Methods** Three different extraction methods including extraction, centrifugal column and magnetic beads were used to extract DNA from the mixed samples of cattle, chicken, pig and duck prepared by steaming, boiling and baking. The quality of DNA extracted by different methods and the effect of DNA extraction for multiplex PCR detection were compared. **Results** There was no significant difference in the concentration and purity of DNA extracted by the 3 methods. The Ct value of DNA extracted by magnetic bead method was the smallest and the amplification effect was the best. **Conclusion** In this study, the detection effect of DNA extracted from cooked meat products by magnetic beads method is more ideal.

**KEY WORDS:** cooked meat; DNA extraction; multiplex fluorescent PCR

基金项目: 四川省市场监督管理局科技计划项目 2019-2020 年度

Fund: Supported by Science and Technology Plan Project of Sichuan Market Supervision Administration in 2019-2020

\*通信作者: 雷庆, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品药品检测。E-mail: 84411741@qq.com

\*Corresponding author: LEI Qing, Master, Senior Engineer, Zigong Inspection and Testing Institute, Zigong 643000, China. E-mail: 84411741@qq.com

## 0 引言

肉类富含人体生长发育所必需的蛋白质、氨基酸、脂肪、维生素、矿物质及微量元素,对人体的生长发育生理机能调节及维持正常生活活动起着重要作用,其中猪肉、鸡肉、牛肉、羊肉和鸭肉为市场常见销售种类。由于不同肉类品种间存在明显的价格差异,企业和经营单位为了追逐利润,将价格便宜的肉种掺入或替代高价格的肉种加工和销售<sup>[1-3]</sup>。这不仅损失消费者的经济利益,还会由于掺假而带来潜在的食品安全问题,如过敏体质的人群可能因食用掺假的食物而造成过敏损伤<sup>[4-6]</sup>。特别是加工后的熟肉制品,通过肉眼甚至品尝无法辨别是否存在其他肉类成分的非添加。因此,建立一种快速、准确的熟肉鉴别方法十分重要。肉类品种的鉴定方法主要为蛋白质鉴定和核酸鉴定。当肉类经过蒸煮、煎烤等加工后,蛋白质结构被破坏,而经过加工后核酸的序列不发生改变,因此,对肉制品的DNA检测成为可靠的鉴定方法<sup>[7-9]</sup>。ARSLAN等<sup>[10]</sup>研究证明,高温的水烹调肉如烹煮、蒸烤、压力处理等烹饪过的牛肉制品可以提取其线粒体DNA片段,经PCR扩增可以检测出。实时荧光PCR鉴别方法是肉制品动物源性成分检测的主要方法之一,也是目前较为先进的一种分子生物学检验方法,检测灵敏度高,专属性好,具有较高的应用价值<sup>[11-13]</sup>。

为探讨用于实时荧光定量PCR检测的不同核酸提取方法对不同烹饪方式制作的肉制品的实际效果,本研究选取3种核酸提取方法、3种烹饪方式及等比例混合的牛、鸡、猪、鸭肉开展实时荧光PCR检测实验,考察不同提取方法、不同烹饪方法对不同肉类检测结果的影响。同时,采用多重荧光PCR技术,针对混合熟肉制品的核酸提取物采用牛、鸡、猪、鸭的特异性引物和探针在一个反应池中准确鉴定4种肉类种源成分,旨在为经加工的掺假熟肉制品种源快速鉴定提供一种快速、准确的技术方法,为监管部门打击该方面造假提供技术参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验肉类

市购新鲜的牛肉、鸡肉、猪肉、鸭肉,按照等比例搅碎混合后分别采用蒸、煮、烤的烹饪方法自制成混合熟肉制品。

#### 1.1.2 仪器与试剂

H2050R-1 冷冻离心机(湘仪离心机仪器有限公司); JXFSTPRP-32 全自动样品快速研磨仪(上海净信实业发展有限公司); Light Cycler96 荧光定量PCR仪(瑞士罗氏公司); TGem Pro 微量分光光度计[天根生化科技(北京)有限

公司]。

抽提法采用 dBIOZOL 基因组 DNA 提取试剂盒、磁珠法采用 MagaBio plus 组织基因组 DNA 纯化试剂盒、离心柱法采用 Biospin 组织基因组 DNA 提取试剂盒离心柱法基因组 DNA 提取试剂盒和超纯水(Milli-Q 级)(博日科技有限公司); 实时荧光 PCR 试剂 Premix Ex TaqTM[宝生物工程(大连)有限公司]。

#### 1.1.3 引物探针序列

利用 Primer Express 5.0 软件根据牛(GenBank: GU947021.1, 5688-7232)、鸡(GenBank: KF826490.1, 6649-8199)、猪(GenBank: MF183225.1, 5334-6878)、鸭(GenBank: MH744426.1, 5401-6951)的线粒体基因分别自行设计出特异性实时荧光PCR引物和探针,并经北京擎科生物科技有限公司生产和验证。引物和探针序列见表1。

表1 多重实时荧光PCR引物和探针序列  
Table 1 Primer and probe sequences of multiplex real-time fluorescent PCR

| 名称      | 序列(5'—3')                 |
|---------|---------------------------|
| 牛源性引物上游 | GGTGCTTGGGCCCGGTATAGT     |
| 牛源性引物下游 | GGCCTAATTCAGCGCGAAT       |
| 牛源性探针   | HEX-AACAGCTCTAAGCCTTC-MGB |
| 鸡源性引物上游 | CGAAAAGTACTCCAACCCGAATTA  |
| 鸡源性引物下游 | TGGGCAGCCATGAATTCA        |
| 鸡源性探针   | FAM-CTGCCACTAATATCG-MGB   |
| 猪源性引物上游 | GAATAGTGGGCACTGCCTTGA     |
| 猪源性引物下游 | GGGTTCCGGGCTGACCTA        |
| 猪源性探针   | ROX-CTACTAATTCGCGCT-MGB   |
| 鸭源性引物上游 | TCCTAGGCCTGGCAGGAAT       |
| 鸭源性引物下游 | CAGTGTGTAGGCATCAGGGTAGTC  |
| 鸭源性探针   | CY5-CCCCGACGATACTC-MGB    |

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 DNA提取方法及浓度、纯度测定

将混合的牛、鸡、猪、鸭生肉材料通过蒸、煮、烤的方式制成熟肉制品,后分别采用抽提法、离心柱法、磁珠法提取DNA,具体操作步骤按说明书。抽提法主要原理为:首先,生物样本在dBIOZOL中被裂解(匀浆),通过异丙醇的作用使基因组DNA沉淀,后核酸沉淀经过一次乙醇洗涤过程后溶解在洗脱液内。整个过程可以在40min内完成。离心柱法主要原理为:首先,将研磨粉碎的动物组织样品通过FL Buffer和PK Solution的裂解作用,使基因组DNA被释,通过离心,去除大部分杂质,后由于加入的

Binding Buffer 中适当的盐分及 pH 的作用下, DNA 被特异性吸附于 Biospin 膜上。通过洗涤, 可将蛋白质等残留的杂质去除, 最后使用 Elution Buffer 将 DNA 从膜上洗脱下来, 从而获得基因组 DNA。磁珠法主要原理为: 样品中的基因组 DNA 在裂解液和蛋白酶 K 的作用下被释放出来, 通过 RNaseA 消化 RNA; 在结合液的作用下释放的 DNA 特异性结合在磁珠上, 磁珠粒子被磁性材料捕获, 通过 3 次的洗涤过程将污染物除去, 最后在洗脱液的作用下 DNA 从磁珠上被洗脱收集。

将上述 3 种方法提取的 3 种烹饪方式制作的混合 DNA 样品分别用微量紫外分光光度计测量 260 nm 和 280 nm 处的吸光度  $A_{260}$  和  $A_{280}$ , 以  $A_{260}/A_{280}$  的比值确定 DNA 的纯度并计算其浓度。设置 3 次平行, 计算其平均值及相对标准偏差。

### 1.2.2 多重荧光 PCR 反应体系与条件

多重荧光 PCR 反应体系为: Premix Ex Taq(2X)10  $\mu$ L, 4 种物种上游引物各(10  $\mu$ mol/L)0.7  $\mu$ L, 4 种物种下游引物各(10  $\mu$ mol/L)0.7  $\mu$ L, 4 种探针各 0.6  $\mu$ L, DNA 模板 1  $\mu$ L, 超纯无菌水 1  $\mu$ L, 反应总体积为 20  $\mu$ L。反应液配制在冰上完成。反应条件为 95  $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95  $^{\circ}$ C 5 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环, 采集荧光。

### 1.2.3 多重荧光 PCR 检测设计

混合肉制品按 1.2.1 的方法提取 DNA 后采用 1.2.2 所述方法对混合样品进行荧光 PCR 检测。以出现荧光典

型扩增曲线且 Ct 值  $\leq 35$  为阳性反应, 无荧光典型扩增曲线为阴性反应。每个反应设置 3 次平行, 计算阳性反应的平均 Ct 值。

## 2 结果与分析

### 2.1 核酸纯度及浓度检测

将抽提法、离心柱法和磁珠法提取的经蒸、煮、烤的混合牛肉、鸡肉、猪肉、鸭肉制品的 DNA 经微量分光光度计 260 nm 和 280 nm 检测, 结果详见表 2。由表 2 可知, 本研究采用抽提法、离心柱法、磁珠法提取的蒸、煮、烤方式制作的混合肉中牛、鸡、猪、鸭的 DNA 浓度均处于同一数量级, 纯度相差不大,  $A_{260}/A_{280}$  的比值均在 1.7~1.9 范围内, 均能保证后续实时荧光 PCR 实验的要求。

### 2.2 混合样品多重荧光 PCR 检测结果

本研究采用抽提法、离心柱法、磁珠法提取的蒸、煮、烤方式制作的混合肉中牛、鸡、猪、鸭的 DNA 经多重荧光 PCR 检测后均出现典型的 S 型扩增曲线, 且 Ct 值均小于 35, 表明能成功检出牛、鸡、猪、鸭成分, 结果详见表 3。由表 3 可知, 本研究采用磁珠法提取的蒸、煮、烤方式制作的混合肉中牛、鸡、猪、鸭的 Ct 值均小于 20, 说明本研究中磁珠法提取的 DNA 用于实时荧光 PCR 检测的效果最好。

表 2 3 种方法提取的 3 种烹饪方式制作的混合肉类 DNA 的比较( $x \pm s, n=3$ )

Table 2 Comparison of DNA extracted by 3 methods from mixed meat prepared by 3 cooking methods ( $x \pm s, n=3$ )

| 肉类 | 烹饪方式 | 抽提法浓度/(ng/ $\mu$ L) $OD_{260/280}$ |                 | 离心柱法浓度/(ng/ $\mu$ L) $OD_{260/280}$ |                 | 磁珠法浓度/(ng/ $\mu$ L) $OD_{260/280}$ |                 |
|----|------|------------------------------------|-----------------|-------------------------------------|-----------------|------------------------------------|-----------------|
| 牛肉 | 蒸    | 132 $\pm$ 2.6                      | 1.83 $\pm$ 0.11 | 126 $\pm$ 3.8                       | 1.77 $\pm$ 0.12 | 139 $\pm$ 3.9                      | 1.80 $\pm$ 0.08 |
|    | 煮    | 114 $\pm$ 4.6                      | 1.78 $\pm$ 0.12 | 120 $\pm$ 4.8                       | 1.79 $\pm$ 0.10 | 121 $\pm$ 3.4                      | 1.82 $\pm$ 0.12 |
|    | 烤    | 136 $\pm$ 4.5                      | 1.79 $\pm$ 0.09 | 129 $\pm$ 3.7                       | 1.87 $\pm$ 0.14 | 137 $\pm$ 4.1                      | 1.83 $\pm$ 0.11 |
| 鸡肉 | 蒸    | 108 $\pm$ 2.9                      | 1.74 $\pm$ 0.13 | 116 $\pm$ 5.0                       | 1.82 $\pm$ 0.12 | 128 $\pm$ 5.9                      | 1.80 $\pm$ 0.13 |
|    | 煮    | 117 $\pm$ 3.8                      | 1.71 $\pm$ 0.11 | 126 $\pm$ 3.0                       | 1.83 $\pm$ 0.11 | 120 $\pm$ 3.3                      | 1.79 $\pm$ 0.12 |
|    | 烤    | 133 $\pm$ 4.2                      | 1.73 $\pm$ 0.16 | 136 $\pm$ 2.9                       | 1.80 $\pm$ 0.16 | 141 $\pm$ 4.8                      | 1.82 $\pm$ 0.14 |
| 猪肉 | 蒸    | 120 $\pm$ 3.9                      | 1.78 $\pm$ 0.13 | 139 $\pm$ 2.8                       | 1.78 $\pm$ 0.12 | 136 $\pm$ 5.1                      | 1.85 $\pm$ 0.10 |
|    | 煮    | 131 $\pm$ 4.6                      | 1.80 $\pm$ 0.10 | 126 $\pm$ 4.0                       | 1.81 $\pm$ 0.13 | 119 $\pm$ 3.7                      | 1.80 $\pm$ 0.12 |
|    | 烤    | 107 $\pm$ 5.1                      | 1.82 $\pm$ 0.14 | 117 $\pm$ 2.8                       | 1.76 $\pm$ 0.12 | 125 $\pm$ 5.1                      | 1.76 $\pm$ 0.12 |
| 鸭肉 | 蒸    | 108 $\pm$ 3.2                      | 1.85 $\pm$ 0.11 | 128 $\pm$ 3.8                       | 1.77 $\pm$ 0.14 | 114 $\pm$ 3.4                      | 1.88 $\pm$ 0.11 |
|    | 煮    | 121 $\pm$ 3.6                      | 1.79 $\pm$ 0.10 | 113 $\pm$ 2.7                       | 1.84 $\pm$ 0.10 | 107 $\pm$ 3.3                      | 1.81 $\pm$ 0.13 |
|    | 烤    | 119 $\pm$ 5.2                      | 1.74 $\pm$ 0.11 | 130 $\pm$ 3.2                       | 1.81 $\pm$ 0.09 | 121 $\pm$ 3.9                      | 1.84 $\pm$ 0.10 |

表 3 3 种方法提取的 3 种烹饪方式制作的混合肉类 DNA 的多重荧光 PCR 检测结果

Table 3 Three methods of extraction of DNA from mixed meat prepared by 3 cooking methods results of multiplex PCR

| 提取方法 | 烹饪法 | 牛探针信号 | 鸡探针信号 | 猪探针信号 | 鸭探针信号 |
|------|-----|-------|-------|-------|-------|
| 抽提法  | 蒸   | 22.59 | 24.30 | 21.75 | 22.82 |
|      | 煮   | 23.23 | 22.46 | 23.62 | 24.14 |
|      | 烤   | 24.09 | 23.61 | 21.94 | 24.73 |
| 离心柱法 | 蒸   | 22.07 | 24.85 | 21.88 | 25.06 |
|      | 煮   | 23.71 | 22.41 | 23.56 | 24.34 |
|      | 烤   | 21.26 | 23.55 | 21.15 | 22.01 |
| 磁珠法  | 蒸   | 18.63 | 17.89 | 18.77 | 17.39 |
|      | 煮   | 19.21 | 18.54 | 18.02 | 17.39 |
|      | 烤   | 17.58 | 17.99 | 19.23 | 17.39 |

### 3 结论与讨论

本研究中 3 种提取方法均具有对经蒸、煮、烤烹饪方式制作的混合熟肉制品中牛、鸡、猪、鸭肉样品核酸的准确、高效的提取效果, 提取到适用于实时荧光检测的 DNA。采用多重荧光 PCR 技术, 能在一个反应体系中采用 4 种专属引物探针组一次性成功检测出熟肉制品中的牛、鸡、猪、鸭成分, 全过程大约 2 h, 与传统方法比不但节省了检测原料及试剂成本, 且缩短了检测的时间<sup>[14-16]</sup>。3 种方法提取的 DNA 质量经分光光度法检测无显著差异, 但磁珠法提取的熟肉制品 DNA 用于实时荧光 PCR 的检测效果更为理想。分光光度法测量的 DNA 浓度及纯度的效果和荧光检测结果的效果存在差异, 其原因可能由于分光光度法会受到溶液里其他杂质干扰的局限性, 某些时候可能只是一个虚值, 并不能准确反映真实的 DNA 浓度。另外, 磁珠法在本研究中相对其他方法效果更好的原因可能是游离的磁珠与核酸的特异性识别和更高效结合, 这种特性使得提取核酸的纯度更高。本研究提供了经加工制熟后的掺假肉制品的较为可靠的 DNA 提取及快捷检测方法。

#### 参考文献

- [1] 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.
- [2] 陈益春, 牛海力, 孔保华. 实时荧光定量 PCR 技术在肉及肉制品中的应用[J]. 食品工业科技, 2017, 38(17): 324-328.

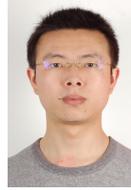
- CHEN YC, NIU HL, KONG BH. Application of quantitative real-time PCR in meat and meat products [J]. Sci Technol Food Ind, 2017, 38(17): 324-328.
- [3] 仝伟建, 任秀. 大体积肉中 DNA 提取方法的优化[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(12): 4966-4970.  
TONG WJ, REN X. Optimization of DNA extraction method from large volume of meat [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(12): 4966-4970.
- [4] 程娟, 申昆玲, 段红梅. 婴幼儿辅食添加与食物过敏关系的研究进展[J]. 中国儿童保健杂志, 2019, 27(7): 737-740, 748.  
CHENG J, SHEN KL, DUAN HM. Research progress on the relationship between infant food supplement and food allergy [J]. Chin J Child Health Care, 2019, 27(7): 737-740, 748.
- [5] 何建文, 韩建林, 罗玉柱, 等. 利用不同方法从深加工牦牛肉产品中提取基因组 DNA 效果的比较[J]. 生物技术通报, 2010, (10): 162-167.  
HE JW, HAN JL, LUO YZ, *et al.* Comparison of quantity and quality of genomic DNAs extracted from highly processed yak meat products using different methods [J]. Biotechnol Bull, 2010, (10): 162-167.
- [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]. 食品安全质量检测学报, 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] 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.
- [8] 石盼盼, 魏法山, 冯波. 4 种方法提取牛肉干 DNA 的效果比较[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(7): 2920-2925.  
SHI PP, WEI FS, FENG B. Evaluation of 4 kinds of DNA extraction methods for beef jerky [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(7): 2920-2925.
- [9] CAMMÀ C, DOMENICO MD, MONACO F. Development and validation of fast real-time PCR assays for species identification in raw and cooked meat mixtures [J]. Food Control, 2012, 23(2): 400-404.
- [10] ARSLAN A, ILHAK OI, CALICIOGLU M. Effect of method of cooking on identification of heat processed beef using polymerase chain reaction (PCR) technique [J]. Meat Sci, 2006, 72(2): 326-330.
- [11] 曲莉, 李潇涵, 王雪松, 等. 7 种肉类线粒体 DNA 的提取及鸭源性成分检测[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(27): 107-110.  
QU L, LI XH, WANG XS, *et al.* Extraction of mitochondrial DNA in seven kinds meat and detection of duck meat composition [J]. Food Res Dev, 2015, 36(27): 107-110.
- [12] 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.
- [13] 罗建兴, 海小, 刘国强, 等. 利用实时荧光定量 PCR 法检测食品中鹌鹑源性成分[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(3): 177-183.  
LUO JX, HAI X, LIU GQ, *et al.* Detection of quail origin in foods by real time quantitative PCR [J]. Food Res Dev, 2019, 40(3): 177-183.
- [14] KESMEN Z, YETIMAN AE, SAHIN F, *et al.* Detection of chicken and

- turkey meat in meat mixtures by using realtime PCR assays [J]. *J Food Sci*, 2012, 77(2): 167–173.
- [15] 马伊萨兰, 吕明星, 唐俊妮, 等. 用 *Cytb* 基因序列分析鉴定肉制品掺假[J]. *中国食品卫生杂志*, 2016, 28(1): 48–51.
- MA YSL, LV MX, TANG JN, *et al.* Identification of adulterated meat products by *Cytb* gene sequence analysis [J]. *Chin J Food Hyg*, 2016, 28(1): 48–51.
- [16] 郭梁, 郭元晟, 钱俊平, 等. 基于 TaqMan 实时荧光 PCR 检测肉制品中羊源性成分[J]. *江苏农业学报*, 2018, 34(4): 938–942.
- GUO L, GUO YS, QIAN JP, *et al.* Identification of sheep-derived materials in meats inferred from TaqMan real-time PCR [J]. *Jiangsu J*

*Agric Sci*, 2018, 34(4): 938–942.

(责任编辑: 王 欣)

### 作者简介



雷 庆, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品药品检测。  
E-mail: 84411741@qq.com