

基于三重实时荧光聚合酶链反应构建黄牛和牦牛源性成分同步检测方法

木其勒^{1,2}, Bayarmaa Gun-Aajav², 刘国强^{1,3}, 呼日¹,
特格希巴雅尔¹, 牛慧敏¹, 郭梁^{1,3*}

[1. 锡林郭勒职业学院锡林郭勒生物工程研究院, 锡林浩特 026000; 2. Department of Biology, School of Arts and Sciences, National University of Mongolia, Ulaanbaatar 14201; 3. 锡林郭勒盟食品科学与检测实验中心 (锡林郭勒盟农畜产品检验检测中心), 锡林浩特 026000]

摘要: **目的** 建立一种拥有内源质控的三重实时荧光聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)技术, 用以快速鉴定肉和乳中黄牛和牦牛的源性成分。**方法** 首先对黄牛肉、牦牛肉、黄牛奶、牦牛奶等7种动物产品进行特异性检测, 同时通过稀释梯度方法验证此方法的绝对检出限(limit of detection, LOD), 最后通过黄牛和牦牛肉掺假模拟试验确定该方法的相对灵敏度。**结果** 该方法的特异性强, 能特异性地检测到来源于黄牛和牦牛肉和乳的DNA, 稳定扩增的内源质控有效地避免了假阴性结果, 本方法针对黄牛奶的绝对LOD为 $2.5 \times 10^{-3} \sim 5.0 \times 10^{-3}$ ng, 针对牦牛奶的绝对LOD为 $2.5 \times 10^{-3} \sim 5.0 \times 10^{-2}$ ng, 本方法对黄牛肉和牦牛肉混合肉的相对灵敏度可达0.1%牦牛肉。**结论** 所建立的三重实时荧光PCR方法特异性强、灵敏度高, 可实现黄牛和牦牛源性以及内源质控的同步检测, 又能通过内源质控排除实验假阴性结果。

关键词: 三重实时荧光聚合酶链反应; 黄牛; 牦牛; 内源质控; 特异性; 灵敏度

Development of a method for simultaneous detection of cattle and yak-origin ingredients based on triplex real-time fluorescence polymerase chain reaction

MU Qi-Le^{1,2}, BAYARMAA Gun-Aajav², LIU Guo-Qiang^{1,3}, HU Ri¹,
TE Ge-Xi-Ba-Ya-Er¹, NIU Hui-Min¹, GUO Liang^{1,3*}

[1. Xilingol Vocational College, Institute of Bioengineering, Xilinhot 026000, China; 2. Department of Biology, School of Arts and Sciences, National University of Mongolia, Ulaanbaatar 14201, Mongolia; 3. Xilingol Food Science and Testing Experimental Center (Xilingol Agricultural and Animal Products Testing Center), Xilinhot 026000, China]

ABSTRACT: Objective To establish a triplex real-time fluorescence polymerase chain reaction (PCR) technique with endogenous control, and realize the rapid detection of the cattle and yak origin ingredients in meat and milk.

Methods Firstly, the specificity of 7 kinds of animal products, including cattle meat, yak meat, cattle milk and

基金项目: 2022 年内蒙古自治区自然科学基金项目(2022FX14)、锡林郭勒盟博士教学科研项目(XMB202301)、锡林郭勒职业学院科研课题项目(YB-2022-15、YB-2023-26、YB-2023-27)

Fund: Supported by the Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region (2022FX14), the Xilingol Doctoral Teaching and Research Project (XMB202301), and the Xilingol Vocational College Research Project (YB-2022-15, YB-2023-26, YB-2023-27)

***通信作者:** 郭梁, 博士, 研究员, 主要研究方向为动物源性成分检测和转基因成分检测以及微生物资源开发。E-mail: herdman86@163.com

***Corresponding author:** GUO Liang, Ph.D. Professor, Xilingol Vocational College, No.11, Mingantu Road, Xilingol 026000, China. E-mail: herdman86@163.com.

yak milk, etc. was tested. Meanwhile, the absolute limit of detection (LOD) of the method was verified by radiant dilution. Finally, the relative sensitivity of the method was determined by simulated adulteration test of cattle meat and yak meat. **Results** The method was highly specific and could only detect the DNA extracted from meat and milk of cattle and yak. The stable amplification of endogenous control effectively avoided false negative results. The absolute LOD of this method were 2.5×10^{-3} – 5.0×10^{-3} ng for cattle's milk and 2.5×10^{-3} – 5.0×10^{-2} ng for yak's milk. The relative sensitivity of this method for mixed meat of yellow beef and yak could reach 0.1% yak. **Conclusion** The established triplex real-time fluorescence PCR method showed high specificity, high sensitivity, which can realize the simultaneous detection of cattle and yak provenance and endogenous control, and can exclude false negative results through endogenous quality control.

KEY WORDS: triplex real-time polymerase chain reaction; cattle; yak; endogenous control; specificity; sensitivity

0 引言

牦牛是生长在海拔 3000 m 以上, 以我国高原为中心, 毗邻于高山、亚高山地区分布的特有物种^[1]。目前, 全世界牦牛数量约 1753.5 万头, 中国有 1655.6 万头, 是世界上拥有牦牛数量和品种(类群)最多的国家^[2]。牦牛肉质紧实, 脂肪含量低, 牦牛肉的质地、蛋白质和氨基酸含量也都优于黄牛肉, 并富含 40 多种人体所需的营养元素, 是牧区人民主要的营养来源^[3]。牦牛乳中含有 4.9%~5.3% 的蛋白质, 16.9%~17.7% 的矿物质和 5.5%~7.2% 的脂肪, 主要营养物质含量显著高于黄牛乳^[4-5], 且牦牛乳产量小, 故价格偏高^[6-8]。丰富的营养和稀缺的资源导致牦牛肉和牦牛乳在市场中成为紧俏商品。伴随着市场和消费者的青睐, 市场中出现用普通牛肉和牛奶冒充或掺假牦牛肉和牦牛乳的欺诈违法行为。动物产品的冒充或掺假行为亟需稳定可靠的动物源性检验检测方法。目前, 动物源性检验检测方法主要集中在以下两种方法。一种是基于蛋白质进行检测, 涉及到的技术有色谱法^[9]、质谱法^[10]、蛋白质组学法^[8]与酶联免疫分析法^[11-12]等, 这些蛋白质为基础的检测技术非常专一, 但灵敏度较低, 强烈的热处理时稳定性较弱, 另一种是基于 DNA 的聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)的特异性和灵敏度检测动物产品中物种特异的 DNA^[13-18]。DNA 是一种相当稳定的有机分子, 在强烈的加热处理之后仍能保持其稳定性^[19]。TARTAGLIA 等^[20]基于 PCR 检测饲料中牛源性成分, 段庆梓等^[21]也基于 PCR 建立了肉中牦牛源性成分检测方法。但 PCR 方法仍存在一定的局限性, 实时荧光 PCR 的产生, 免去了 PCR 技术后续凝胶电泳步骤, 同时能对整个 PCR 过程进行实时监测, 已成为一种较普及的用于肉制品真伪鉴别的方法^[22-25]。

但上述方法并不能区分牛的种类, 为区分牛的种类, 冀德君等^[26]建立了有关黄牛和牦牛的检测方法, 但依然存在灵敏度不高, 或者覆盖度不高, 即存在不能区分到种内某些品种的情况。因此郭华麟等^[27]、吴姗等^[28]研发了同步检定黄牛、牦牛和水牛源性成分的三重实时荧光 PCR 技术,

但此方法对混合样中含量较低的黄牛肉和牦牛肉的检测存在假阴性的情况, 陈冉越等^[29]研发了同步检定牛、牦牛和水牛源性的六重实时荧光技术水牛、牦牛、黄牛、山羊、驴和鸭的物种成分同步鉴别, 也未设计内源质控。内源质控在实时荧光 PCR 扩增中非常重要, 成功扩增内源质控可以推断 DNA 从样品中成功纯化, 在过程中未被降解, 和 PCR 样品中不含有妨碍成功扩增 DNA 的某些物质^[30]。目前, 基于 PCR 技术的牛源性成分检测主要用于肉及肉制品, 乳中源性检测报道极少, 并且多源性同步检测的方法缺乏灵敏、准确、快速, 并消除假阴性的内源质控。

基于此, 本研究基于具有物种特异性的线粒体细胞色素 c 氧化酶亚基 III (cytochrome c oxidase subunit III, COIII) 基因设计同步鉴定黄牛和牦牛的引物和探针, 并增加内源质控用于监控扩增反应是否发生继而消除假阴性, 拟建立一种包含内源质控的三重实时荧光 PCR 方法, 用以同步鉴定肉和乳中的黄牛和牦牛源性成分, 为有效区分市场上的黄牛和牦牛源性成分提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鲜肉包括驴肉、黄牛肉、牦牛肉、水牛肉、羊肉、猪肉、马肉、山羊肉、鹿肉、鹅肉; 牦牛奶购于网销市场, 均购于中国锡林浩特农贸市场。鲜肉样品被切成小块, 并在-20℃冷冻保存, 防止 DNA 的酶降解。鲜奶在-80℃冷冻保存。

TransStart Probe qPCR SuperMix(北京全式金生物技术有限公司); qPCR 引物、探针合成(北京睿博兴科公司); 磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)、乳化剂(90% Triton-X 100 20 mL、95% 乙醇 125 mL、0.9 g/L NaCl 855 mL)、MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction Kit[宝生物工程(大连)有限公司]。

1.2 仪器与设备

5418R 高速台式离心机(德国 Eppendorf AG 公司);

Nanodrop 2000c 核酸蛋白测定仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 7300plus 实时荧光 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司); AF-06A 粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)。

1.3 方 法

1.3.1 模拟掺假肉类混合物制备

牛肉和牦牛肉按不同质量比例混合, 其中, 黄牛肉质量比为 99.9%、99.0%、90.0%、70.0%、30.0%、10.0%、1.0% 和 0.1% 时, 对应的牦牛肉质量比分别为 0.1%、1.0%、10.0%、30.0%、70.0%、90.0%、99.0% 和 99.9%。为了将来自两个产地的肉类均匀混合, 本研究使用液氮冷冻肉类, 然后在冷冻状态下粉碎机中彻底研磨和混合 4 min。所有样品立即保存在-80℃, 直到进一步分析。

1.3.2 样品 DNA 提取

首先, 取 50 mL 的待测乳样品, 在 4℃ 条件下, 4800 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加入 30 mL PBS 冲洗沉淀, 直至沉淀完全混匀分布于 PBS 中。然后, 在 4℃ 条件下, 4800 r/min 离心 10 min, 加入 30 mL PBS 和 10 mL 乳化剂冲洗沉淀, 直至沉淀完全混匀分布于 PBS 和乳化剂溶液中, 混溶的液体在 40℃ 水浴锅中孵育 10 min。液体在 4℃ 条件下, 4800 r/min 离心 10 min, 保留沉淀。加入 30 mL PBS 冲洗沉淀, 直至沉淀完全混匀分布于 PBS 中。在 4℃ 条件下, 4800 r/min 离心 10 min, 沉淀物保留。沉淀物保留, 根据标准十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)法^[30]提取 DNA。

根据 MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction

Kit 的标准操作程序提取鲜肉和混肉中 DNA。

肉和乳样品, 用核酸蛋白分析仪测定 OD_{260 nm}、OD_{280 nm} 下的 DNA 浓度和纯度。吸光度(A)比 A_{260 nm}: A_{280 nm} 在 1.8~2.0 之间表明提取的 DNA 适合实时荧光定量 PCR 检测。每个样品的标准质量浓度为 100 ng/μL, 用于进一步分析。

将乳样品 DNA 进行连续 10 倍和 2 倍序列梯度稀释, 得到 1.0×10²、1.0×10¹、1.0×10⁰、1.0×10⁻¹、5.0×10⁻²、2.5×10⁻²、1.0×10⁻²、5.0×10⁻³、2.5×10⁻³、1.0×10⁻³、1.0×10⁻⁴、1.0×10⁻⁵ ng/μL 的牛奶和牦牛奶 DNA, 每个稀释度取 2 μL 用作 PCR 反应的模板。

1.3.3 引物和探针合成

通过 DNAMAN 软件对黄牛、牦牛和其他物种的线粒体序列进行比对, 设计引物和探针。本研究使用了特异性引物和探针。利用六氯-6-羧基荧光素(HEX)标记牦牛探针, 荧光报告剂 6-羧基荧光素(FAM)标记黄牛探针, 羧基-x-罗丹明(ROX)标记内源质控探针。引物和探针由北京瑞生物科技有限公司合成和纯化。引物与探针序列如表 1 所示。

1.3.4 实时荧光 PCR 反应体系建立

建立单重和三重实时荧光 PCR 反应体系, 分别使用该体系进行物种特异性检测和黄牛-牦牛-质控的三重实时荧光 PCR 扩增反应, 三重实时荧光 PCR 反应体系见表 2, 单重实时荧光 PCR 反应体系见表 3。实时荧光 PCR 反应在光学 96 孔板进行, 用光学胶膜密封后使用 ABI 7300plus 进行实时荧光 PCR 反应, 使用以下反应程序: 94℃: 30 s, 94℃: 5 s, 60℃: 31 s, 40 个循环(检出限检测为 45 个循环)。

表 1 三重实时荧光 PCR 引物和探针序列
Table 1 Triplex real-time fluorescence PCR primer and probe sequences

引物和探针	长度	序列(5'-3')	片段大小/bp	最终浓度/μmol/L
黄牛左引物	25	CTCATGCTTATCATATAGTAAACCC	135	10
黄牛右引物	25	ATTTGTTGTTAGGCCAATTATTAGC		10
黄牛探针	33	FAM-CTAACCATGTGATTCTACTTTAACTCAATGACC-TAMRA		10
牦牛左引物	25	CTCATGCTTATCACATAGTAAATCC	137	10
牦牛右引物	25	GTTGTTGTTAGGCCAATTATTAAC		10
牦牛探针	33	HEX-TTAGCCATGTGGTTTCATTTAACTCAACAGCT-TAMRA		10
质控探针	25	ROX-AGCCCTTGACC(T/C)CTTAC(A/G)GGAGC-BHQ-2		10

表 2 三重实时荧光 PCR 反应体系(总体积 20 μL)
Table 2 Reaction system of triplex real-time fluorescence PCR (total volume 20 μL)

试剂名称	浓度	使用量/μL
TransStart Probe qPCR SuperMix	10 μmol/L	10
左引物	10 μmol/L	1
右引物	10 μmol/L	1
黄牛探针	10 μmol/L	0.5
牦牛探针	10 μmol/L	0.5
质控探针	10 μmol/L	0.5
模版 DNA	100~120 ng/μL	2
灭菌 ddH ₂ O	-	4.5

注: -表示无此项, 表 3 相同。

表 3 单重实时荧光 PCR 反应体系(总体积 20 μL)
Table 3 Reaction system of single real-time fluorescence PCR (total volume 20 μL)

试剂名称	浓度	使用量/μL
TransStart Probe qPCR SuperMix	10 μmol/L	10
左引物	10 μmol/L	1
右引物	10 μmol/L	1
探针	10 μmol/L	1
模版 DNA	100~120 ng/μL	2
灭菌 ddH ₂ O	-	5

1.3.5 特异性检测及灵敏度评价

采用从牦牛奶、牛奶、牦牛肉、牛肉和其他非目标物种(水牛肉、驴肉、马肉、羊肉、猪肉、鹿肉、山羊肉和鹅肉)中提取的 DNA, 确定三重实时荧光 PCR 检测的特异性。

为了在实验室中模拟乳制品和肉类掺假的做法, 引入独立的肉类混合物, 以确认该技术的认证极限。每个混合 DNA 样本使用 20 个重复, 并用统计分析对鉴定结果进行分析^[31]。

通过测定检出限(limit of detection, LOD)来评价该方法的灵敏度。采用连续 10 倍和 2 倍连续稀释牛奶和牦牛奶 DNA 计算 LOD 值。LOD 定义为在 20 次重复测量中至少有 19 次在 45 个循环内导致荧光信号增加的最低浓度(置信区间: 95%)^[32]。每种稀释使用 20 个重复, 用统计分析确定灵敏度(置信区间: 95%)。

1.3.6 扩增效率

以牛奶和牦牛奶为样本, 在 100 ng/ μ L~10 fg/ μ L 的质量浓度范围内连续稀释 DNA 提取液, 确定三重实时荧光 PCR 扩增效率。扩增效率(E)按照公式(1), 由标准曲线斜率计算。

$$E/\% = (10^{-1/\text{斜率}} - 1) \times 100\% \quad (1)$$

2 结果与分析

2.1 实时荧光 PCR 检测的特异性

黄牛特异性探针用 FAM 标记, 牦牛特异性探针用

HEX 标记, 内源性对照探针用 ROX 标记。其中每批次提取的 DNA 样本, 对照三重实时荧光 PCR 实验结果, 在 40 个循环之内有荧光信号的检出, 且荧光通道出现明显的扩增曲线, 再以 Ct 值为判断依据, 当 Ct 值 ≤ 40 , 说明该源性成分有检出。

使用设计的引物和探针从黄牛和牦牛的奶和肉中识别黄牛和牦牛相应的 DNA。在三重实时荧光 PCR 反应中, 如图 1A、图 1C 所示, 黄牛-FAM 的特异性扩增出现在黄牛肉和黄牛奶中, 而质控-ROX 的扩增表明实时荧光 PCR 反应消除了假阴性结果。同样, 如图 1B、图 1D 所示, 牦牛-HEX 的扩增出现在牦牛肉和牦牛奶中, 而质控-ROX 作为内源对照被扩增。由图 1E、图 1F 所示, 其他非目标物种肉均没有扩增黄牛-FAM 和牦牛-HEX。

10 种肉及 2 种奶的三重实时荧光 PCR 检测样品 Ct 值如表 4 所示, 黄牛肉的 Ct 值为 14.37 ± 0.07 ; 牦牛肉的 Ct 值为 14.14 ± 0.09 , 黄牛奶的 Ct 值分别为 16.23 ± 0.15 , 牦牛奶的 Ct 值为 21.75 ± 0.16 , 其 Ct 值均小于 35, 并与扩增曲线一致。黄牛肉和黄牛奶同步稳定扩增出牛-FAM 的扩增曲线, 牦牛肉和牦牛奶同步稳定扩增出牦牛-HEX 的扩增曲线, 扩增状态及内源质控-ROX 的 Ct 值足以验证三重实时荧光 PCR 技术可有效控制假阴性结果。说明该引物探针特异性强, 适用于乳与肉中黄牛、牦牛源性成分三重实时荧光 PCR 检测。

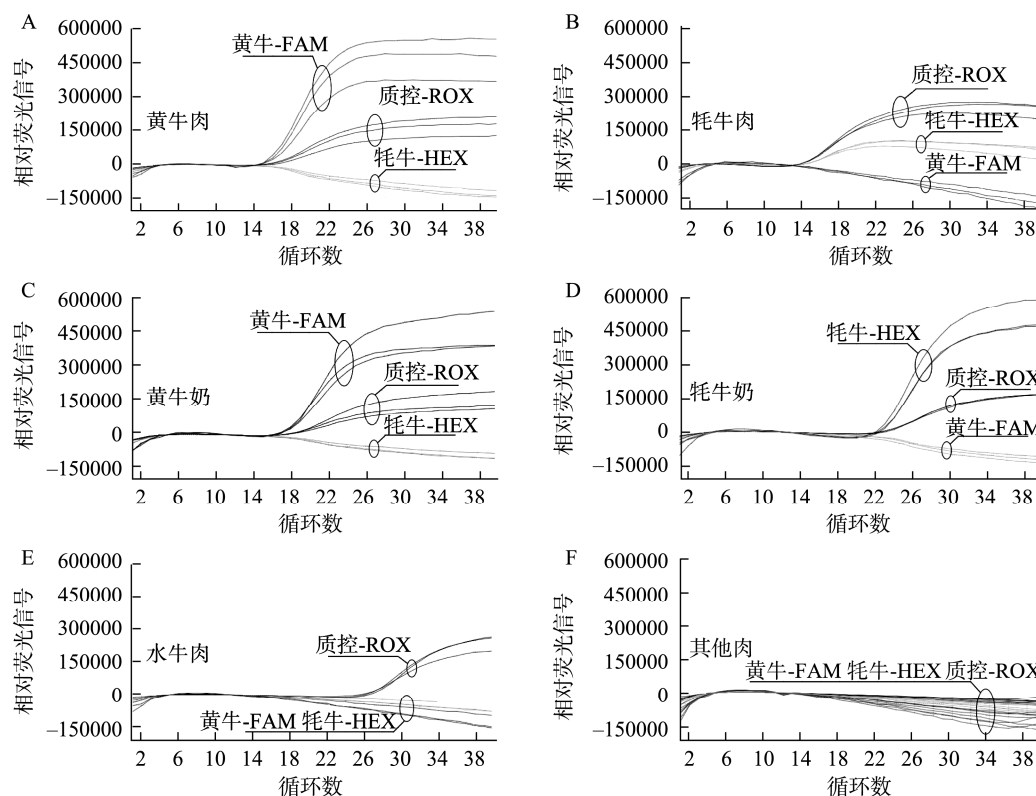


图 1 实时荧光定量 PCR 扩增曲线显示该方法在肉和乳中的特异性

Fig.1 Real-time quantitative PCR amplification curves showed the specificity of the method in meat and milk

表 4 三重实时荧光 PCR 的特异性结果
Table 4 Specific results of triple real-time fluorescence PCR

样品	Ct 值 ^a		
	黄牛-FAM	牦牛-HEX	质控-ROX
黄牛肉	14.37±0.07	-	14.61±0.19
牦牛肉	-	14.14±0.09	13.77±0.07
水牛肉	-	-	25.81±0.47
黄牛奶	16.23±0.15	-	16.64±0.07
牦牛奶	-	21.75±0.16	22.38±0.40
水牛奶	-	-	21.14±0.88
驴肉	-	-	-
马肉	-	-	-
羊肉	-	-	-
猪肉	-	-	-
鹿肉	-	-	-
山羊肉	-	-	-
鹅肉	-	-	-

注: ^a表示平均数±标准偏差; -表示未检出, 下同。

2.2 实时荧光 PCR 检测的灵敏度

用实时荧光 PCR 技术验证黄牛奶和牦牛奶后, 再以 10 倍和 2 倍连续稀释黄牛奶和牦牛奶的 DNA, 测定其灵敏度。每种稀释使用 20 个重复, 用统计分析方法分析灵敏度。如表 5 和图 2 所示, 黄牛奶 1 和黄牛奶 2 中的检测灵敏度分别为 5.0×10^{-3} ng 和 2.5×10^{-3} ng(置信区间: 100%), 牦牛奶 1、牦牛奶 2 中的检测灵敏度分别为 2.5×10^{-3} ng 和 5.0×10^{-2} ng(置信区间: 100%)。Ct 值的 20 个重复结果与上述扩增曲线一致。由表 5 还可以看出, Ct 值随着 DNA 的稀释而增加。因此, LOD 结果说明基于实时荧光 PCR 分析设计的引物和探针针对目标 DNA 的识别是灵敏的, 且较以往的 LOD 低^[33-35]。

为了确定实时荧光 PCR 检测的线性, 建立以黄牛奶和牦牛奶为样本的标准曲线。牛奶的标准曲线斜率、效率和线性拟合系数 r^2 如表 6 和图 3 所示。建立标准曲线时, PCR 扩增效率在 90%~110%之间, 本次实验扩增效率为 95%, 标准曲线 $r^2\geq0.98$, 表明, Ct 值与 DNA 浓度对数之间线性关系良好, 可用于引物和探针的定量检测。

2.3 模拟样品的检出限

实时荧光定量 PCR 检测方法能有效检出动物源性掺假, 在模拟掺假过程中, 采用黄牛-牦牛-内源质控三重实时荧光对黄牛肉和牦牛肉混合肉进行检测。如表 7 所示, 黄牛-牦牛-内源质控三重实时荧光结果显示, 黄牛-FAM 检测到 1.0%的黄牛肉, 牦牛-HEX 检测到 0.1%的牦牛肉(置信区间: 100%)。三重实时荧光 PCR 检测的 Ct 值随着混合物中相应肉类成分的减少而增加。质控-ROX 在所有混合

物中均可扩增。表明三重实时荧光定量 PCR 检测方法在鉴别肉类混合物中极低含量的目标物种方面具有较高的敏感性和特异性。

表 5 牛奶和牦牛奶的检出限结果
Table 5 Results of LOD of cattle milk and yak milk

样品	DNA 量/ng	Ct 值 ^a	阳性检出数量	置信区间/%
黄牛奶 1	1.0×10^1	18.51±0.49	20/20	100
	1.0×10^0	22.73±0.33	20/20	100
	1.0×10^{-1}	27.83±0.40	20/20	100
	1.0×10^{-2}	31.10±0.30	20/20	100
	5.0×10^{-3}	31.64±0.31	20/20	100
	2.5×10^{-3}	-	0/20	0
	1.0×10^{-3}	-	0/20	0
	1.0×10^{-4}	-	0/20	0
	1.0×10^{-5}	-	0/20	0
	1.0×10^1	18.02±0.44	20/20	100
黄牛奶 2	1.0×10^0	22.64±0.35	20/20	100
	1.0×10^{-1}	26.62±0.34	20/20	100
	1.0×10^{-2}	29.31±0.29	20/20	100
	5.0×10^{-3}	30.95±0.23	20/20	100
	2.5×10^{-3}	31.37±0.22	20/20	100
	1.0×10^{-3}	-	0/20	0
	1.0×10^{-4}	-	0/20	0
	1.0×10^{-5}	-	0/20	0
	1.0×10^1	24.59±0.22	20/20	100
	1.0×10^0	28.49±0.26	20/20	100
牦牛奶 1	1.0×10^{-1}	31.99±0.25	20/20	100
	1.0×10^{-2}	35.00±1.30	20/20	100
	5.0×10^{-3}	37.64±0.24	20/20	100
	2.5×10^{-3}	38.68±0.61	20/20	100
	1.0×10^{-3}	39.08±0.17	2/20	10
	1.0×10^{-4}	-	0/20	0
	1.0×10^{-5}	-	0/20	0
	1.0×10^1	26.25±0.53	20/20	100
	1.0×10^0	30.29±0.55	20/20	100
	1.0×10^{-1}	34.30±0.49	20/20	100
牦牛奶 2	5.0×10^{-2}	37.22±1.06	20/20	100
	2.5×10^{-2}	39.25±0.56	2/20	10
	1.0×10^{-2}	-	0/20	0
	1.0×10^{-3}	-	0/20	0
	1.0×10^{-4}	-	0/20	0
	1.0×10^{-5}	-	0/20	0

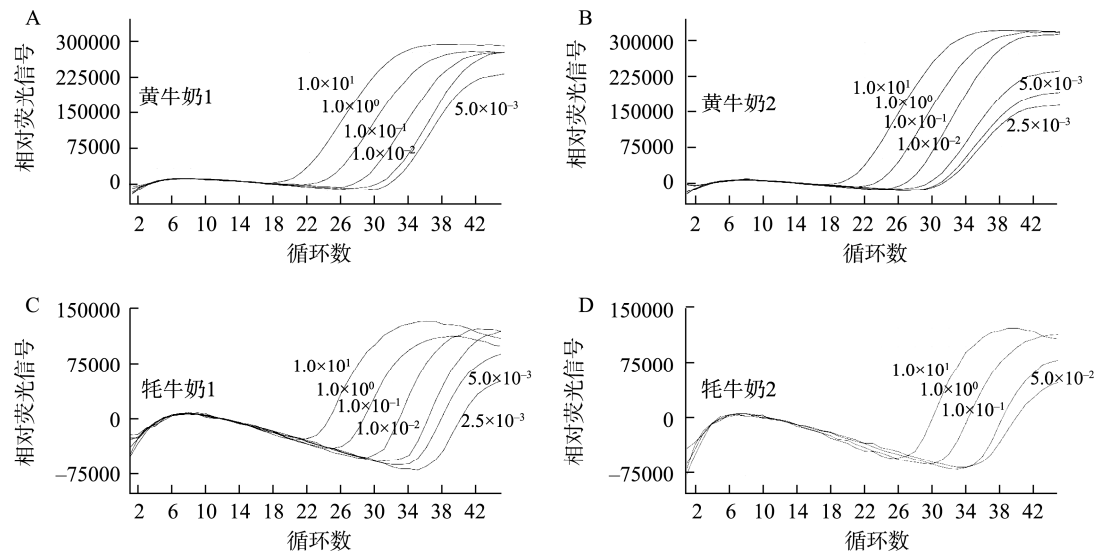


图 2 黄牛奶和牦牛奶检出限的扩增曲线
Fig.2 Amplification curves of detection limits of cattle milk and yak milk

因为超过 10%的掺假牛奶将是非法盈利的, 本研究认为这种技术足以达到 5%。在本研究中, 黄牛特异性探针无法检测出混合物中小于 1.0%的牦牛肉, 而牦牛特异性探针在进行三重实时荧光 PCR 时, 可在混合物中检测出大于 0.1%的牦牛肉(表 7)。将三重实时荧光 PCR 反应的模板浓度调整为 100 ng。1.0%的牦牛奶或黄牛奶含量等于 1 ng 的牦牛或黄牛 DNA。LOD 结果表明, 牦牛特异性探针和黄牛特异性探针能稳定地从奶中检测出 $2.5\times10^{-3}\sim5.0\times10^{-3}$ ng 的黄

表 6 黄牛奶和牦牛奶的标准曲线斜率、效率和拟合系数(r^2)
Table 6 Standard curve slopes, efficiency and fitting coefficient (r^2) for cattle milk and yak milk

样品	r^2	斜率	E/%
黄牛奶 1	0.9936	-4.287	71.11
黄牛奶 2	0.9869	-3.785	83.74
牦牛奶 1	0.9967	-3.472	94.10
牦牛奶 2	0.9940	-3.985	78.21

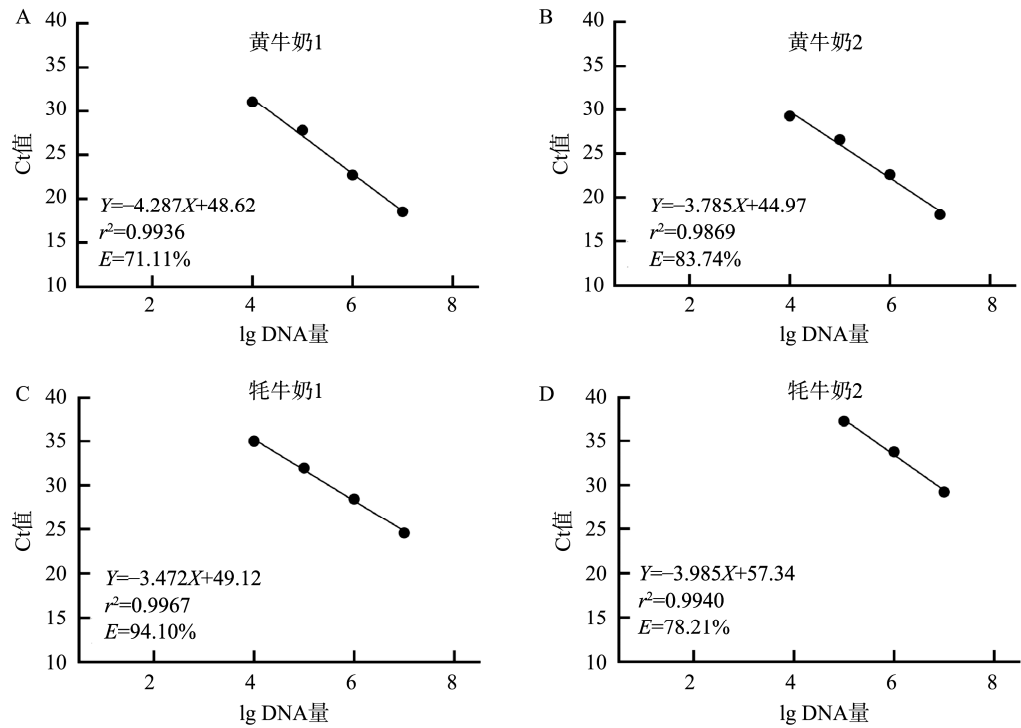


图 3 黄牛奶和牦牛奶的标准曲线
Fig.3 Standard curves of cattle milk and yak milk

表 7 三重实时荧光 PCR 的相对检出限结果
Table 7 Results of relative limits of detection for triple real-time PCR

质量/%		Ct 值 ^a		
黄牛肉	牦牛肉	黄牛-FAM	牦牛-HEX	质控-ROX
99.9	0.1	13.39±0.05	31.95±0.69	13.62±0.03
99.0	1.0	13.52±0.04	26.63±0.21	13.61±0.02
90.0	10.0	13.56±0.04	21.64±0.40	13.70±0.05
70.0	30.0	13.60±0.04	17.80±0.34	13.62±0.03
30.0	70.0	14.09±0.05	14.48±0.17	13.63±0.02
10.0	90.0	16.56±0.37	14.07±0.06	13.64±0.03
1.0	99.0	28.26±0.82	13.94±0.08	13.64±0.02
0.1	99.9	-	13.85±0.08	13.63±0.02

牛 DNA 和 $2.5\times10^{-3}\sim5.0\times10^{-2}$ ng 的牦牛 DNA。然而, 在同时进行的三重实荧光 PCR 检测时, 黄牛特异性探针未能检测到的牦牛奶中 0.1 ng 黄牛奶 DNA。单重实时荧光 PCR 检出限与三重实时荧光 PCR 检出限的极大差异表明, 基于所设计引物和探针的单重实时荧光 PCR 在鉴定牦牛奶和黄牛奶时比三重实时荧光 PCR 更敏感。本研究认为 3 种不同的探针可能会在三重实时荧光 PCR 中争夺 PCR 资源。三重实时荧光 PCR 资源的限制了牦牛和黄牛特异性探针的灵敏度。

3 讨论与结论

本研究基于具有物种特异性的 *COIII* 基因设计了可同步鉴定黄牛和牦牛的引物和探针及消除假阴性的内源质控探针, 并在 3 个探针上分别标记了不同的荧光信号, 在优化三重实时荧光 PCR 的条件下, 实现了同步检测肉和乳中牛和牦牛成分, 通过内源质控有效排除了假阴性结果。利用所研制的引物和探针针对牦牛和黄牛 DNA 的特异性、灵敏度和模拟样品的检出限结果显示, 所建立的方法能有效检测和鉴定等量的黄牛和牦牛的肉和乳的 DNA, 其中, 黄牛肉的检出限比牦牛的低, 这不是由 DNA 浓度决定的, 而是跟肉样品种类有关, 牦牛肉比黄牛肉更瘦, 脂肪含量低, 蛋白质含量高。另外, 在不同种类原乳中体细胞差异非常大, 混乳的比例并不能体现体细胞的比例, 用探针通过检测不同来源的 DNA 比例指示动物产品掺假比例的逻辑基础就不存在。其次, 牦牛乳相比牛奶乳脂含量非常高, 提取的难度大, 尤其在混乳体系中, 高脂会影响最终实验的一致性。最后, 在市场中较难获得牦牛乳, 本研究只能通过藏区购买或者邮寄, 每次买到的牦牛乳的品质差异很大, 有些甚至已经发酵, 严重影响实验一致性, 所以本研究单重实时荧光 PCR 给出黄牛奶和牦牛的检出限, 未能提供三重实时荧光 PCR 黄牛奶和牦牛奶混合奶的检出限结果, 所以本研究最终选择用混肉来检测方法的适用性, 结果显示, 单重实时荧光 PCR 的 LOD 低于三

重实时荧光 PCR, 基于所设计引物和探针的单重实时 PCR 在鉴定黄牛奶和牦牛奶时比三重实时荧光 PCR 更敏感, 这可能是 3 种不同的探针会在三重实时荧光 PCR 中争夺 PCR 资源, 也即三重实时荧光 PCR 资源的限制限制了牦牛和黄牛特异性探针的灵敏度。

本研究对建立的三重实时荧光 PCR 进行重复验证表明, 含有内源质控的三重实时荧光 PCR 方法检测混合样品是可行的, 并能获得更加精确的结果, 是一种特异性强, 灵敏度高, 与单重 PCR 相比, 可以在同一个反应体系中同时分析多个目标, 与杨艳歌等^[36]和任易婕等^[37]多重实时 PCR 相比, 可以通过内源质控有效排除假阴性结果, 操作步骤更加简便, 能够降低试剂用量。综上所述, 所建立的基于内源质控的三重实时荧光 PCR 技术是一种具有特异性高、灵敏高、有效的技术, 可实现牛和牦牛源性以及内源质控的同步检测, 并可区分市场上的黄牛和牦牛源性成分。值得注意的是, 本研究在建立一种基于内源质控的三重 RT-PCR 反应体系后, 可进一步建立基于内源质控四重甚至更多重检测体系。未来将建立完善的多重实时荧光 PCR 方法应用于更多品种的乳与乳制品的掺杂掺假鉴定当中, 除了市面上备受欢迎的婴幼儿乳制品以外, 加工程度更高的不同品种奶酪、初乳粉、营养奶片、奶油等产品都还需要更多的研究, 以获得更大量、更详实的实验数据, 进一步完善源性鉴定手段; 同时本研究方法也可应用于肉制品、深加工产品、保健食品及高档名贵的预包装产品的检测。

参考文献

[1] 李琳, 郭怡婷, 秦鸿楠, 等. 不同海拔牦牛骨骼肌线粒体呼吸链复合酶活性及氧化应激指标的差异分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2023, (11): 121–125, 130.

LI L, GUO YT, QIN HN, et al. Analysis of mitochondrial respiratory chain complex enzyme activity and oxidative stress indexes in skeletal muscle of Yaks at different altitudes [J]. Heilongjiang Anim Husb Vet Sci, 2023, (11): 121–125, 130.

[2] 马志杰. 牦牛父系遗传多样性及起源研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019.

MA ZJ. Genetic diversity and origin of yak sire line [D]. Yangling: Northwest Agriculture & Forestry University, 2019.

[3] 黄振彬, 朱雪俊. 不同气调包装方式对牦牛肉保鲜效果的影响[J]. 中国调味品, 2023, 48(8): 164–167.

HUANG ZB, ZHU XJ. Effect of different modified atmosphere packaging methodson preservation effectof yak meat [J]. China Cond, 2023, 48(8): 164–167.

[4] 陆海霞. 中国奶类消费现状即影响因素研究[J]. 中国乳业, 2009, 18(3): 28–31.

LU HX. Study on the current situation of milk consumption in China [J]. Dairy Ind China, 2009, 18(3): 28–31.

- [5] ZHANG J, YANG M, CAI D, *et al.* Composition, coagulation characteristics, and cheese making capacity of yak milk [J]. *J Dairy Sci*, 2020, 103(2): 1276–1288.
- [6] 中华人民共和国统计局. 中国统计年鉴[M]. 北京: 中国统计出版社, 2020.
- Bureau of Statistics of the People's Republic of China. *China Statistical Yearbook* [M]. Beijing: China Statistics Press, 2020.
- [7] 帕克, 亨莱因, 陈合, 等. 特种乳技术手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009.
- PARKER, HENG LY, CHEN H, *et al.* Technical manual of special milk [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2009.
- [8] 张世瑶, 李莉, 陆东林. 特色乳营养价值研究新进展[J]. *新疆畜牧业*, 2015, (2): 19–22.
- ZHANG SY, LI L, LU DL. Research progress on nutritional efficacy of special milk [J]. *Xinjiang Anim Husb*, 2015, (2): 19–22.
- [9] FERREIRAI M, CACOTE H. Detection and quantification of bovine, ovine and caprine milk percentages in protected denomination of origin cheeses by reversed-phase high-performance liquid chromatography of beta-lactoglobulins [J]. *J Chromatogr*, 2003, 1015: 111–118.
- [10] 冯静, 刘琳, 黄孟军, 等. 基于飞行时间质谱的快速肉类溯源检测方法[C]. 第四届国际食品安全高峰论坛论文集, 2011.
- FENG J, LIU L, HUANG MJ, *et al.* Rapid detection the origin of meat using MALDI-TOF MS [C]. *Proceedings of the 4th International Food Safety Summit Forum*, 2011.
- [11] BENDIXEN E. The use of proteomics in meat science [J]. *Meat Sci*, 2005, 71(1): 138–149.
- [12] RENCOVA E, NECIDOVA I. Identification by ELISA of poultry, horse, kangaroo and rat muscle specific proteins in heat processed products [J]. *Vet Medczech*, 2000, 45(12): 353–356.
- [13] ANGUITA GR, MARTIN T, GARCIA P, *et al.* Hernandez. A competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine milk in ovine and caprine milk and cheese using a monoclonal antibody against bovine beta-casein [J]. *J Food Prot*, 1997, 60: 64–66.
- [14] 赵雯玮, 王珊珊, 朱肖翔, 等. PCR 检测牦牛肉掺伪技术研究现状和进展[J]. *食品安全导刊*, 2021, 329(36): 181–183.
- ZHAO WW, WANG SS, ZHU XX, *et al.* Current status and progress of PCR detection technology for yak meat adulteration [J]. *Chin Food Saf Magaz*, 2021, 329(36): 181–183.
- [15] 罗建兴, 刘国强, 海小, 等. 基于实时荧光 PCR 法定量检测食品中鸡源性成分[J]. *中国动物检疫*, 2020, 37(8): 110–115.
- LUO JX, LIU GQ, HAI X, *et al.* Quantitative detection of chicken components in food by real-time PCR [J]. *China Anim Health Inspect*, 2020, 37(8): 110–115.
- [16] WANG L, ZUO Y, XUE Z, *et al.* A simple and effective PCR assay to detect the origin of meat in food using mitochondrial DNA [J]. *J Consum Prot Food Saf*, 2022, 17: 255–264.
- [17] 其勒木格, 刘国强, 罗建兴, 等. SN/T 2980—2011 在动物源性成分检测中的适用性分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(22): 8484–8490.
- QI LMG, LIU GQ, LUO JX, *et al.* Application of SN/T 2980—2011 in the detection of zoogenic components [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11 (22): 8484–8490.
- [18] LIU GQ, LUO JX, XU WL, *et al.* Improved triplex real-time PCR with endogenous control for synchronous identification of DNA from chicken, duck, and goose meat [J]. *Food Sci Nutr*, 2021, 9(6): 3130–3141.
- [19] GUO L, HAI X, LIU GQ, *et al.* Enhancing the authentication capability of triplex real-time PCR by increasing the primer specificity [J]. *Food Anal Method*, 2022, 15: 2642–2651.
- [20] TARTAGLIA M, SAULLE E, PESTALOZZA S, *et al.* Detection of bovine mitochondrial DNA in ruminant feeds: A molecular approach to test for the presence of bovine-derived materials [J]. *J Food Protect*, 1998, 61(5): 513–518.
- [21] 段庆梓, 尚柯, 张彪, 等. 肉及肉制品中牦牛源性成分的 PCR 鉴别[J]. *食品研究与开发*, 2017, 38(9): 157–160.
- DUAN QZ, SHANG K, ZHANG B, *et al.* PCR identification of yak in meat and meat products [J]. *Food Res Dev*, 2017, 38(9): 157–160.
- [22] PELIN U, HANDAN B, ILKNUR C, *et al.* Meat species identification and Halal authentication using PCR analysis of raw and cooked traditional Turkish foods [J]. *Meat Sci*, 2013, 94(3): 280–284.
- [23] LÓPEZ-ANDREO M, ALDEGUER M, GUILLÉN I, *et al.* Detection and quantification of meat species by qPCR in heat-processed food containing highly fragmented DNA [J]. *Food Chem*, 2012, 134(1): 518–523.
- [24] 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. Detection of duck-derived components in meat products by fluorescence quantitative PCR [J]. *Food Sci*, 2013, 34(18): 154–157.
- [25] KESMEN Z, AYTEN G, MUSTAFA TY, *et al.* TaqMan-based duplex real-time polymerase chain reaction approach for the detection and quantification of donkey and pork adulterations in raw and heat processed meats [J]. *Int J Food Prop*, 2014, 17(3): 629–638.
- [26] 冀德君, 常洪, 常春芳, 等. 中国牛属 4 个物种 *MSTN* 基因的遗传变异研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2008, (6): 701–704.
- JI DJ, CHANG H, CHANG CF, *et al.* Genetic variation of *MSTN* gene in four species of *Bos* in China [J]. *Anim Husb Vet Med*, 2008, (6): 701–704.
- [27] 郭华麟, 明玥, 李轲, 等. 基于实时荧光 PCR 方法的牦牛肉源性成分鉴别[J]. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39(10): 4426–4431.
- GUO HL, MING Y, LI K, *et al.* Bioinformatics analysis of potato nucleoside diphosphate kinase gene (NDPKs) [J]. *Genom Appl Biol*, 2020, 39(10): 4426–4431.
- [28] 吴姗, 张明哲, 方云, 等. 三重 real-time PCR 同步检测黄牛、水牛和牦牛成分[J]. *食品科学*, 2021, 42(20): 280–285.
- WU S, ZHANG MZ, FANG Y, *et al.* Simultaneous detection of cattle-, buffalo- and yak-derived components by triplex quantitative real-time polymerase chain reaction [J]. *Food Sci*, 2021, 42(20): 280–285.

- [29] 陈冉越, 周庆, 王昱, 等. 6 种肉类成分多重 PCR 鉴别方法的建立及应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(19): 6661–6666.
CHEN RY, ZHOU Q, WANG Y, *et al.* Establishment and application of multiple PCR identification method for 6 kinds of meat ingredients [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(19): 6661–6666.
- [30] HAI X, LIU GQ, LUO JX, *et al.* Triplex real-time PCR assay for the authentication of camel-derived dairy and meat products [J]. J Dairy Sci, 2020, 103(11): 9841–9850.
- [31] FINNEY DJ. Probit Analysis. 3rd ed [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1971.
- [32] BUSTIN SA, BENES V, GARSON JA, *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments [J]. Clin Chem, 2009, 55(4): 611–622.
- [33] 范阳阳, 张萃嘉, 刘艳艳, 等. 一种从羊奶中检测牛奶和大豆成分多重实时荧光定量 PCR 方法的建立[J]. 山东农业科学, 2016, 48(6): 118–123.
FAN YY, ZHANG LJ, LIU YY, *et al.* Establishment of a method for detecting cow milk and soybean milk from goat milk by multiplex real-time fluorescent quantitative PCR [J]. Shandong Agric Sci, 2016, 48(6): 118–123.
- [34] GOLINELLI LP, CARVALHO AC, CASAES RS, *et al.* Sensory analysis and species-specific PCR detect bovine milk adulteration of frescal (fresh) goat cheese [J]. J Dairy Sci, 2014, 97(11): 6693–6699.
- [35] ZHANG CL, FOWLER MR, SCOTT NW, *et al.* A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses [J]. Food Control, 2007, 18(9): 1149–1158.
- [36] 杨艳歌, 李莉, 王丹丹, 等. 多重 real-time PCR 技术快速鉴别特种乳中的乳源动物成分[J]. 食品科学, 2021, 42(16): 312–321.
YANG YG, LI L, WANG DD, *et al.* Multiple real-time polymerase chain reaction for identification of animal-derived ingredients in milk products from minor dairy species [J]. Food Sci, 2021, 42(16): 312–321.
- [37] 任易婕, 霍胜楠, 郭颖慧, 等. 乳与乳制品中四种动物源性成分鉴定方法的研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2022, 34(4): 663–667.
REN YJ, HUO SN, GUO YH, *et al.* Identification of four animal derived components in milk and dairy products [J]. Chin J Food Hyg, 2022, 34(4): 663–667.

(责任编辑: 郑 丽 韩晓红)

作者简介



木其勒, 硕士, 助教, 主要研究方向为动物源性成分检测。
E-mail: 402570124@qq.com



郭 梁, 博士, 研究员, 主要研究方向为动物源性成分检测和转基因成分检测以及微生物资源开发。
E-mail: herdman86@163.com