

肉类掺假的分子生物学检测

石盼盼, 李旭, 魏法山, 谢文佳

(河南省产品质量监督检验院, 河南 郑州 450002)

摘要: 针对 GeneBank 中公布的牛羊猪鸡鸭线粒体细胞色素氧化酶亚基基因的特异性序列设计引物, 建立了肉样的 5 种常见牛羊猪鸡鸭动物源性成分检测的 PCR 电泳法体系。采用大连宝生物的猪源牛源羊源鸡源性成分检测试剂盒和广州迪奥生物的鸭源性成分检测试剂盒, 利用实时荧光 PCR 检测体系对河南省范围内几个大型超市的 118 批次牛肉样品的 5 种即猪牛羊鸡鸭动物源性成分进行了检测。结果显示: 牛源性成分检出 117 批次检出率 99.15%, 猪源性成分检出 10 批次检出率 8.47%, 鸡源性成分检出 7 批次检出率 5.93%, 鸭源性成分检出 1 批次检出率 0.85%, 没有检出羊源性成分, 其中熟肉制品掺杂其他源性成分的比例较高。与配料表对比掺假使假样品共 9 批次, 总掺假率为 7.63%。

关键词: 肉类掺假; PCR; 实时荧光 PCR; 检测

中图分类号: TS 251 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2017)07-0773-05

Molecular Biological Detection for Adulterated Meat

SHI Panpan, LI Xu, WEI Fashan, XIE Wenjia

(Institute of Products Quality Supervision and Inspection in Henan Province, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: This article established PCR examination system for five bovine, ovine, porcine, chicken, duck-derived materials of meat. Five animal-derived materials of 118 batches beef samples at several big supermarkets in Henan Province were detected by using TAKARA and Deaou real-time PCR detection kit, And result showed that 117 batch samples had bovine-derived material for 99.15%, 10 batch samples had porcine-derived material for 8.47%, 7batch samples had chicken-derived material for 5.93%, just 1batch sample had duck-derived material for 99.15% and no sample had ovine-derived material, The adulteration ratio of done meat products is higher. There are 9 batches of adulteration with the ratio of 7.63%.

Keywords: meat adulteration, PCR, real-time PCR, detection

肉类掺假是食品安全面临的难题。鉴别肉及其制品是否掺假已成为食品安全检测和监管机构迫切需要解决的问题, 利用基因检测技术鉴别动物源性成分可迅速准确地鉴定产品中是否含有其他

肉类成分^[1-9]。作者依托河南省质检院食品中心分子生物学实验室平台, 在长期从事肉制品动物源性成分检验的基础上, 针对标准检验方法^[10]中实时荧光 PCR 技术灵敏度高易出现假阳性的缺陷, 设计引物

收稿日期: 2015-08-14

作者简介: 石盼盼(1987—), 女, 河南洛阳人, 助理工程师, 主要从事食品检验研究。E-mail: 523150920@qq.com

引用本文: 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, 36(07): 773-777.

摸索实验条件,最终建立了肉及肉制品中动物源性成分检测的普通 PCR 电泳法检测体系,在实际检测中可以作为标准检验方法的补充,进一步保障检验结果的准确性^[14]。

作者检测了河南省范围内大型超市 118 批次牛肉样品的猪牛羊鸡鸭动物源性成分,并细分产品种类了解不同牛肉产品动物源性成分检出情况,通过与配料表对比了解产品的掺假情况,验证了试剂盒的有效性,为相关检验工作提供技术支持。进一步统计的生鲜牛肉,酱牛肉,熟牛肉干制品,速冻调理牛肉制品 4 种不同种类产品的动物源性成分检出情况,使消费者对不同种类牛肉产品的成分及掺假情况有了更深一步的了解。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

试剂盒特异性和灵敏度检测实验用到的生鲜牛肉,羊肉,猪肉,鸡肉,鸭肉为作者所在实验室保存,其他生鲜牛肉及酱牛肉,熟牛肉干制品,速冻调制牛羊肉制品均购自河南省沃尔玛,家乐福,丹尼斯等各大超市。溴化乙锭,牛源,猪源,羊源,鸡源性成分实时荧光 PCR 检测试剂盒:宝生物(大连)生物工程有限公司产品;鸭源性成分实时荧光 PCR 检测试剂盒:自广州迪奥生物公司产品;牛羊猪鸡鸭源性成分普通 PCR 引物:宝生物合成。

1.2 主要仪器设备

Milli-Q 超纯水系统:美国密理博公司产品;HFsafe 生物安全柜:上海力申科学仪器有限公司产品;LightCycle480 荧光 PCR 仪:罗氏诊断产品有限公司产品;Colibri Titertek Berthold 超微量分光光度计:上海科瑞生物科技有限公司产品;水平电泳仪及制胶板、凝胶成像系统:美国 BIO-RAD 公司产品;移液器、普通 PCR 仪,小型离心机:美国 Eppendorf 公司产品。

1.3 PCR 反应条件

普通 PCR 扩增程序为:94 ℃,10 min;(94 ℃,30 s;55 ℃,30 s;72 ℃,1 min) x40;72 ℃,5 min,4 ℃保存。

荧光定量 PCR 扩增程序为:95 ℃,10 sec;(95 ℃,5 s;60 ℃,30 s;) x45;50 ℃,2 min。

1.4 测定方法

1.4.1 DNA 提取 酚氯仿抽提法:多点取样(对于

加工肉制品需用水浸泡去盐后再取样),用解剖剪剪碎后,取适量样品放入研钵中液氮冷冻研磨至粉末状,称取 50 mg 研磨物至 1.5 mL 离心管中,加入 700 μL DNA 提取裂解液,置 65 ℃水浴 3 h,期间不时震荡混匀;12 000 r/min 离心 5 min,转移上清至新的 1.5 mL 离心管中,加入等体积苯酚氯仿与异戊醇(25:24:1)的混合溶液,充分混匀后,12 000 r/min 离心 5 min;取上清,加入 1/10 体积的 3 mol/L 醋酸钠溶液,混匀后加入 2 倍体积预冷的无水乙醇,-20 ℃静置 1~3 h,12 000 r/min 离心 5 min 弃去上清;加体积分数 70%乙醇溶液洗涤 1~2 次,超净台内室温下晾干后,加 50 μL TE 缓冲液,最终获得 $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 在 1.8~2.0 之间的 DNA 溶液。

1.4.2 PCR 扩增

1)引物 检测所用引物具体序列见表 1。

表 1 猪牛羊鸡鸭源性成分普通 PCR 检测引物列表

Table 1 Primers of bovine, ovine, porcine, chicken, duck five Animal-derived materials by PCR

引物、探针名称	序列	工作浓度/(μmol/L)	扩增长度/bp
Porcine FP	CGACAAAGCAACCCTCACAC	10	71
Porcine RP	TGCGAGGGCGGTAATGAT	10	
Bovine FP	CTCCTCGGAGACCCAGATAA C	10	79
Bovine RP	AGAAGTATCACTCGGGTTTG	10	
Ovine FP	CAGCCCTCGCCATAGTTCAC	10	98
Ovine RP	AGGGTGGAAAGGGAATTTTAT CTG	10	
Chicken FP	CGACAACCCAACCCTTACC	10	89
Chicken RP	AGGAAGGTGAGGTGGATGA TA	10	
Duck FP	GGCCACACAAATCCTCACAG	10	85
Duck RP	TGTGTTGGCTACTGAGGAGA AA	10	

2)普通 PCR 扩增 分别提取牛肉,羊肉,猪肉,鸡肉,鸭肉样品的 DNA,用牛源性引物扩增牛肉样品 DNA,羊猪鸡鸭源性引物分别扩增羊猪鸡鸭肉样品 DNA。25 μL 扩增体系为:DDW 9.5 μL,2×PCR Master Mix 12.5 μL,primer For (10 μmol/L) 1 μL, primer Rev(10 μmol/L) 1 μL,模板 DNA(50~100 ng/μL) 1 μL。PCR 扩增程序为:94 ℃,10 min;(94 ℃,

30 s;55 ℃,30 s;72 ℃,1 min) x40;72 ℃,5 min,4 ℃保存。PCR 扩增产物用质量分数 1.5%的琼脂糖凝胶,水平电泳仪 150 V 电泳 40 min 分离扩增产物,凝胶成像系统观察结果。

3)实时荧光 PCR 扩增 按 1.3.1 方法提取牛肉 DNA,依照试剂盒说明书进行实时荧光 PCR 扩增。25 μL PCR 扩增体系:DDW 9.5 μL,2×Premix 12.5 μL,Primer Mix 1 μL,Probe Mix 1 μL,样品 DNA(50 ng/μL 左右) 1 μL。扩增程序为:95 ℃,10 s;(95 ℃,5 s;60 ℃,30 s;) x45;50 ℃,2 min。扩增结束后用 LightCycle480 软件分析 CT 值和扩增曲线,结合标准和试剂盒说明书判断扩增结果。

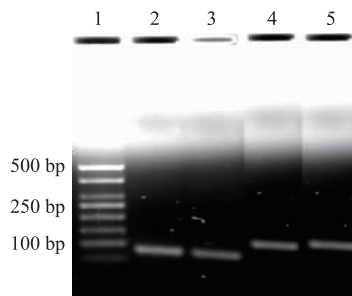
2 结果与讨论

2.1 PCR 电泳法检测牛羊猪鸡鸭肉动物源性成分结果

依 1.3.1 方法提取各样品的 DNA,提取的牛肉,羊肉,鸡肉,猪肉,鸭肉样品的 DNA 总质量浓度分别为:100、113、107、105、108 ng/μL;调整使 PCR 模板浓度达到 50~100 ng/μL,依照 1.3.2.2 分别用对应引物进行 PCR 扩增。结果显示,用牛源性引物可以扩增出牛肉样品约 79 bp 的条带,羊源性引物可以扩增出羊肉样品约 98 bp 的条带,与目的条带大小一致(如图 1 所示)。同样如图 2 所示,用猪源性引物可以扩增出猪肉样品约 71 bp 的条带,鸡源性引物可以扩增出鸡肉样品约 89 bp 的条带,鸭源性引物可以扩增出鸭肉样品约 85 bp 的条带,与目的条带大小一致。电泳条带清晰单一,此结果说明构建的 PCR 方法体系可用于鉴定猪牛羊鸡鸭肉各自的动物源性成分。

2.2 牛源性成分实时荧光 PCR 检测试剂盒特异性和灵敏度检测结果

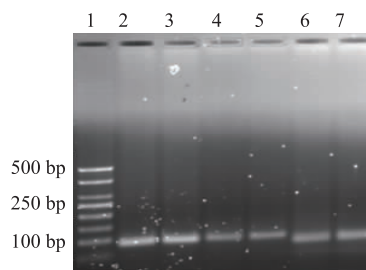
2.2.1 牛源性成分检测试剂盒特异性检测结果 提取的牛肉,羊肉,鸡肉,猪肉,鸭肉样品的 DNA 总质量浓度分别为:140、113、107、105、108 ng/μL;用 TE 缓冲液稀释至相同且合适的质量浓度,分别以 5 种 DNA 为模板,按照牛源性检测试剂盒说明书进行实时荧光 PCR 扩增,结果如图 3 所示,只有以牛肉 DNA 为模板时才能发生特异性扩增,而其他样品 DNA 没有扩增。这说明牛源性检测试剂盒用来检测牛肉 DNA 特异性良好,没有交叉反应。



1:DNA Ladder;2,3 牛肉样品 PCR 扩增结果;4,5 羊肉样品 PCR 扩增结果

图 1 牛羊源性 DNA PCR 扩增结果

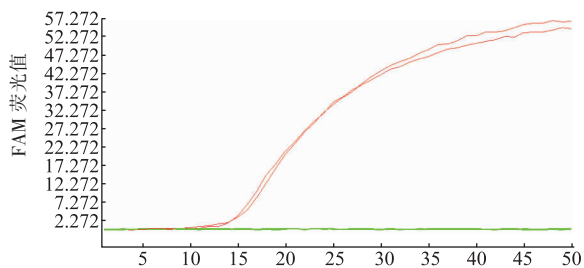
Fig. 1 PCR result of bovine and ovine-derived materials



1:DNA Ladder;2,3 猪肉样品 PCR 扩增结果;4,5 鸡肉样品 PCR 扩增结果;6,7 鸭肉样品 PCR 扩增结果

图 2 猪鸡鸭源性 DNA PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR result of porcine, chicken, duck-derived materials



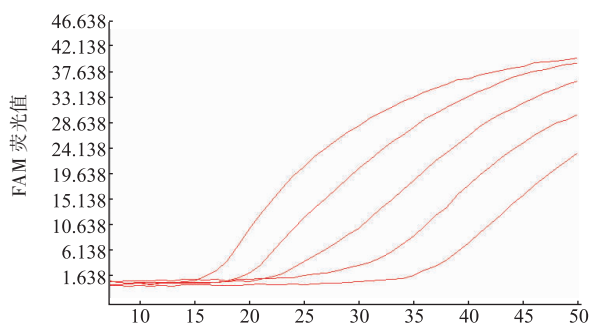
说明:红色线为牛肉样品扩增曲线,绿色线为猪羊鸡鸭扩增情况

图 3 牛源性检测试剂盒特异性试验结果

Fig. 3 Specificity result of real time PCR Bovine DNA detection kit

2.2.2 牛源性成分检测试剂盒灵敏度检测结果 提取牛肉样品 DNA,用 TE 稀释,使牛肉 DNA 分别呈 100,10,1,0.1,0.01 ng/μL 浓度梯度,用牛源性试剂盒检测牛肉样品各梯度 DNA,实时荧光 PCR 结果如图 4,从左至右依次是 100,10,1,0.1,0.01 ng/μL 牛肉样品 DNA 的扩增曲线,CT 值依次为

16.37, 19.33, 22.25, 29.32, 36.49。根据试剂盒的判定原则,当 DNA 质量浓度为 0.01 ng/ μ L 时 CT 值大于 35,为阴性结果,所以此结果表明牛源性试剂盒可以检测低至 0.1 ng/ μ L 质量浓度的目标 DNA。用同样方法检测羊猪鸡鸭源性试剂盒,结果显示检测最低质量浓度也可达到 0.1 ng/ μ L。



从左至右依次是浓度为 100,10,1,0.1,0.01 ng/ μ L 的牛肉 DNA 实时荧光 PCR 扩增曲线

图 4 牛源性检测试剂盒灵敏度试验结果

Fig. 4 Sensitivity result of real time PCR Bovine DNA detection kit

2.3 牛肉样品 5 种牛羊猪鸡鸭动物源性成分检验结果

检测了河南省大型超市的 118 批次牛肉样品的猪牛羊鸡鸭 5 种动物源性成分。牛源性成分检出 117 份,检出率为 99.15%;猪源性成分检出 10 份,检出率为 8.47%;鸡源性成分检出 7 份,检出率为 5.93%;鸭源性成分检出 1 份,检出率为 0.85%;羊源性成分检出 0 批次。

118 批次样品分为 4 类,分别统计各类产品的

动物源性成分检出情况,并与样品配料表对比,了解掺假情况,统计结果如表 2 所示:生鲜牛肉 18 批次,全部仅检出牛源性成分检出率为 100%。酱牛肉 50 批次,47 批次仅检出牛源性成分,2 批次同时检出牛源和鸡源成分另有 1 批次样品仅检出猪源性成分,牛源鸡源猪源的检出率分别为 98%,6%和 2%;同时检出牛源鸡源的 2 批次样品因无法排除配料中添加的鸡精对检出鸡源性的影响,判定为合格品,仅检出猪源成分的 1 批次样品配料标注为牛肉,判定为不合格品。熟肉干制品共 38 批次,27 批次仅检出牛源性成分,3 批次同时检出牛源鸡源性成分,8 批次同时检出牛源猪源性成分,牛源鸡源猪源的检出率分别为 100%,7.89 和 21.05%;检出牛源猪源的 8 批次样品配料中没有猪肉成分,判断为掺假品。速冻调制肉制品 12 批次,9 批次仅检出牛源性成分,其中 1 批次牛肉丸同时检出牛源猪源鸡源鸭源;另 2 批次为复合牛肉片同时检出牛源和猪源,牛源鸡源猪源的检出率分别为 100%,7.89 和 21.05%;样品检出情况与配料标注一致,故全部为合格品。

3 结语

鉴于实时荧光 PCR 其灵敏度极高,在实际检验中有时无法排除因包装运输及检测过程中污染出现的假阳性结果^[12],作者建立了常见肉类动物源性成分检测的普通 PCR 电泳法,可以实现对牛羊猪鸡鸭肉样品的种属鉴定,在实际检验中可作为实时荧光 PCR 法的补充,使得样品的检验更严谨。同时验

表 2 4 类牛肉样品检测情况汇总表

Table 2 Testing summary table of four kinds of samples

样品类型	样品批次	检出成分	标示成分	检出批次	不符合率/%	总体不符合率/%
生鲜牛肉	18	牛源	牛肉	0	0	
		牛源	牛肉	46		
酱牛肉	50	牛源鸡源	牛肉鸡肉	3	2(1/50)	
		源猪源	牛肉	1		
		牛源	牛肉	27		7.63
熟牛肉干制品	38	牛源鸡源	牛肉鸡精	3	21.05(8/38)	
		牛源猪源	牛肉	8		
		牛源	牛肉	9		
速冻调制肉制品	12	牛源鸡源	牛肉鸡精	2	0	
		牛源猪源鸡源鸭源	牛猪鸡鸭肉	1		

证了 TAKARA 牛源性成分实时荧光 PCR 检测试剂盒检测样品的特异性和灵敏度,方法有效,结果良好。

总而言之,大型超市的牛肉产品掺杂猪肉鸡肉情况比较严重,主要是加工牛肉制品,其中熟肉干制品是牛肉掺假的重灾区。监管部门可做专项监管整治,对于消费者,在选购时最好挑选正规场所大品牌的牛肉产品,并且看清配料表。

本次 118 批次牛肉样品中每种牛肉产品批次不等,样本量太小如速冻调制共 12 批次,导致结论可能不具有普遍意义。另外采用实时荧光 PCR 检测

方法灵敏度高,当产品为了增加口感添加极少量其他动物源性成分如非清真食品的酱牛肉,卤汁中可能含有少量鸡源或猪源成分,牛肉干表面添加鸡精鸡粉,这些会导致牛肉样品中检出猪源鸡源成分,难以判断是否是掺假样品,食品标签管理需要进一步完善。如果可以找到合适的物种基因组中特异性单拷贝基因,以之为靶基因,通过荧光定量 PCR 技术实现对样品各种动物源性成分的基因水平定量检测,对肉品的掺假情况把控会更加的精准^[13-15]。

参考文献:

- [1] LI Zongmeng, ZHAO Liangjuan, WANG Yongfang, et al. The development of molecular biology detecting techniques for meat and meat products[J]. **Journal of Food Safety & Quality**, 2015(2):340-344. (in Chinese)
- [2] MIGUEL A Rodríguez, TERESA García, ISABEL González, et al. TaqMan real-time PCR for the detection and quantitation of pork in meat mixtures[J]. **Meat Science**, 2005(1).
- [3] MA Yanjun. Application of Cyt b gene in species Identification of meat products[J]. **Food Science and Technology**, 2015(6). (in Chinese)
- [4] ALI M E, HASHIM U, KASHIF M, et al. Development of swine-specific DNA markers for biosensor-based halal authentication [J]. **Gene Mol Res**, 2012, 11(2):1762-1772.
- [5] KARABASANA VAR N S, SINGH S P, KUMAR D, et al. Detection of pork adulteration by highly-specific PCR assay of mitochondrial D-loop[J]. **Food Chemistry**, 2014.
- [6] SU Weiyi, LI Xinnan, YU Lei, et al. Detection of beef adulteration by Multiplex real-time PCR [J]. **Food Industry**, 2015 (2). (in Chinese)
- [7] BOTERO M T, DALMASSO I A, NUCERA D, et al. Development of a PCR assay for the detection of animal tissues in ruminant feeds[J]. **Journal of food Protection**, 2003, 66(12):2307-2312.
- [8] CAMMA C, DOMENICO M D, MONACO F. Development and validation of fast Real-Time PCR assay for species identification in raw and cooked meat mixtures[J]. **Food Control**, 2012.
- [9] ZHANG Chunlai, MARK R Fowler, NIGEL W Scott, et al. A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses[J]. **Food Control**, 2006(9).
- [10] SB/T10923-2012, 肉及肉制品中动物源性成分的测定 实时荧光 PCR 法[S].
- [11] ZHONG An, CAI Zhen, WANG Yi. Comparison of the sensitivity of RT-PCR and general PCR in detecting pathogenic microorganisms. *Hainan Med.* 201(13):1956-1958
- [12] FREZZA D, FAVARO M, VACCARI G, et al. A competitive polymerase chain reaction-based approach for the identification and semiquantification of mitochondrial DNA in differently heat-treated bovine meat and bone meat[J]. **Journal of Food Protection**, 2003, 66:103-109.
- [13] CHIAPPINI B, BRAMBILLA G, AGRIMI U, et al. Real-time polymerase chain reaction approach for quantitation of ruminant-specific DNA to indicate a correlation between DNA amount and meat and bone meal heat treatments[J]. **J AOAC Int**, 2005, 88(5):1399-1403.
- [14] RENE Koppel, JUG Ruf, FRANZISKA Zimmerli, et al. Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from duck, goose, chicken, turkey and pork[J]. **Eur Food Res Technol**, 2013, 236:1093-1098.
- [15] MOHD HAZIM Mohd Yusop, SHUHAIMI Mustafa, YAAKOB B, et al. Detection of raw pork targeting porcine-specific mitochondrial cytochrome B gene by molecular beacon probe real-time polymerase chain reaction [J]. **Food Anal Methods**, 2012, 5(3):422-429.