

# 食品中动物源性成分 PCR 检测法探究

马慧娟 徐慧\* 张维祥 牛鹏飞 黄婷 江苏省理化测试中心, 江苏南京 210042

作者简介: 马慧娟(1988-), 女, (汉族), 中级工程师, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全检测技术开发和研究。

通讯作者\*: 徐慧(1977-), 女, (汉族), 高级工程师, 硕士研究生, 研究方向: 食品质量安全检测技术。

基金项目: 江苏省生产力促进中心青年人才基金项目——食品中牛、羊、猪、鸡、鸭源性成分多重 PCR 快速检测方法的建立(Z2020009)

**摘要:**为了获得动物源性食品中的多重 PCR 检测方法, 试验采用文献中猪、牛、羊和鸡的通用上游引物和相应的下游引物以及鸭的特异性 PCR 引物混合的方法对猪、牛、羊、鸡和鸭提取的 DNA 进行扩增, 对多重 PCR 反应条件以及该检测方法的特异性和检出限进行了研究。试验表明, 当通用上游引物浓度配比为猪: 牛: 羊: 鸡: 鸭(上游引物): 鸭(下游引物)=3:1:1:2:0.7:1:1 时, 猪、牛、羊、鸡和鸭源性成分的检出限分别为 10 pg。

**关键词:** 动物源性食品; PCR; 引物; 检出限和灵敏度

当前, 肉类食品的掺假形式多种多样, 如何对动物源性成分进行鉴别正在成为食品安全领域的研究热点之一<sup>[1]</sup>。动物源性食品鉴别成分的方法有多种, 包括物理法、化学法、免疫学方法和分子生物学等几种方法, 而分子生物学的方法最为快捷, 灵敏度也最高<sup>[2]</sup>。在分子生物学方法中, 聚合酶链反应(PCR)在核酸水平上的分析方法技术因其操作简单、结果可靠而成为动物源性食品鉴定成分的主要方法<sup>[3]</sup>, 该方法包括常规 PCR-凝胶电泳法、荧光定量 PCR 法<sup>[4-10]</sup>等。在实际检测动物源性食品中, 常规 PCR-凝胶电泳法因操作简便、准确度高、反应灵敏、消耗费用低等优点而被广泛应用<sup>[1]</sup>。运用 PCR 方法检测食品中动物源性成分的研究和标准有很多, 多为对单一成分进行鉴定。也有研究运用多重 PCR 法检测食品中的动物源性成分研究, 如: T.Matsunaga 等<sup>[11]</sup>首次通过分析细胞色素 b 研究了牛、山羊、猪、绵羊、鸡和

马肉的四重 PCR, 得出 6 种不同动物肉的检测限为 25 ng gDNA。董焕新等<sup>[12]</sup>参考 T.Matsunaga 的实验结果, 建立了鸡、猪、牛、兔、绵羊、山羊、马和鹿多重 PCR 检测方法, 检测种类五花八门, 检测方法也因人而异。研究基于在实际工作中的检测需求, 探索建立一种可同时鉴别猪、牛、羊、鸡和鸭动物源性成分的多重 PCR 检测方法。

## 1 材料

### 1.1 肉及肉制品

鲜肉(猪肉、牛肉、羊肉、鸭肉、鸡肉)购自南京某大型菜市场, -20℃保存。

### 1.2 试剂

DNA 提取试剂盒 TaKaRa MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver 5.0、10×PCR Buffer (Mg2+ plus)、dNTP Mixture (各 2.5 mM)、TaKaRa



Taq (5U/ $\mu$ L)、琼脂糖 (50 g), 均购于宝生物工程 (大连) 有限公司。

### 1.3 仪器和设备

普通 PCR 仪 (型号为 ABI 2720), 购自美国赛默飞; 电泳仪 (型号为 EPS 300), 购自 Tanon; 高速冷冻离心机 (型号为 ST 16R), 购自美国赛默飞; 凝胶成像仪 (型号为 Universal GenoSens1800), 购自上海勤翔; 超微量分光光度计 (型号为 NanoDrop ND-2000), 购自莫纳生物。

### 1.4 引物

引物参考 T.Matsunaga 的实验结果<sup>[11]</sup>, 鸭的引物序列见标准<sup>[13]</sup>。引物序列、扩增长度和引物来源见表 1。引物的合成由上海生工公司代为合成。

表 1 引物序列及扩增片段长度和来源

Table 1 The primer sequence, amplified fragment length and source

引物名称	引物序列	扩增长度 /bp	引物来源
通用上游引物	5' -GACCTCCCAGC TCCATCAAACATCT CATCT TGATGAAA-3'		Matsunaga 等, 1999
猪 -R	5' -GCTGATAGTAG ATTTGTGATGACCG TA-3'	398	Matsunaga 等, 1999
牛 -R	5' -CTAGAAAAGTG TAAGACCCGTAATA TAAG-3'	274	Matsunaga 等, 1999
羊 -R	5' -CTATGAATGCT GTGGCTATTGTGCG CA-3'	331	Matsunaga 等, 1999
鸡 -R	5' -AAGATACAGAT GAAGAAGAATGAGG CG-3'	227	Matsunaga 等, 1999
鸭 -F	5' -CATCTATCCTG CTAGCCGCC-3'	201	DBS22/018- 2013
鸭 -R	5' -CATCTATCCTG CTAGCCGCC-3'		

## 2 方法

### 2.1 样本 DNA 提取及质量检测

样本 DNA 的提取方法按照 DNA 提取试剂盒的说明书方法步骤进行。样本 DNA 提取后取 DNA 溶液 1 $\mu$ L, 滴加到超微量紫外分光光度计中, 测定 DNA 的质量浓度及纯度。DNA 浓度控制在 50 ~ 100 ng/ $\mu$ L, OD260 nm/OD280 nm 值为 1.8 ~ 2.1。

### 2.2 多重 PCR 检测方法的建立

用猪、牛、羊、鸡和鸭肉样品提取基因组 DNA, 先通过固定 DNA 模板浓度, 用所设计的上游引物和下游引物混合选择合适的引物浓度, 再通过固定上下游引物浓度, 调整体系所用的 DNA 模板浓度, 通过 PCR 扩增建立探索多重 PCR 方法, 经过多次实验, 找寻可同时扩增 5 种动物的最佳引物浓度及混合配比。

PCR 反应体系见表 2: 预混液 7.2 $\mu$ L, 模板 1 $\mu$ L, 混合上游引物 (通用上游引物 + 鸭上游引物) 1.2 $\mu$ L, 混合下游引物 1.7 $\mu$ L, 用 ddH<sub>2</sub>O 补足体系至 25 $\mu$ L。PCR 反应程序为: (1) 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; (2) 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 反应共进行 35 个循环; (3) 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。取多重 PCR 反应循环后的 DNA 溶液 8 $\mu$ L+2 $\mu$ L $\times$  Loading buffer, 上样, 2% 的琼脂糖凝胶电泳, 采用 TBE Buffer 缓冲液, 9V/cm 恒压电泳 35 min, 在凝胶成像系统中观察并记录。

表 2 建立的多重 PCR 反应体系

Table 2 The multiply PCR reaction system

试剂	体积 / $\mu$ L
10 $\times$ PCR Buffer (Mg <sup>2+</sup> plus)	4.7
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	2.5
上游引物 (10 $\mu$ mol/L)	1.2
下游引物 (10 $\mu$ mol/L)	1.7
DNA 模板	1.0
Takara Taq (5 U/ $\mu$ L)	0.2
ddH <sub>2</sub> O	13.7
总体积	25

### 2.3 特异性和检出限

称取相同质量的猪、牛、羊、鸡和鸭的肉样，用混匀器充分搅碎混匀，按 2.1 方法提取 DNA，对混合模板样品进行多重 PCR 扩增，跑电泳进行凝胶成像检验所扩增出来的产物片段的大小，检验所合成引物的特异性。

将猪、牛、羊、鸡和鸭的模板 DNA 进行 10 倍 ~ 1000000 倍系列梯度稀释 (初始浓度为 80 ng/μL)，分别用稀释后的 DNA 进行多重 PCR 扩增，检测猪、牛、羊、鸡和鸭模板 DNA 的最低检出限。

## 3 结果与分析

### 3.1 DNA 质量浓度和纯度的检测结果

按照 2.1 对提取的样品 DNA 进行质量浓度及纯度测定，结果见表 3。

由表 3 看出，用微量核酸蛋白测定分析仪检测提取的样品 DNA 的浓度和纯度，所测 OD<sub>260nm</sub>/OD<sub>280nm</sub> 值在 1.8 ~ 2.1，有的 DNA 浓度提取的较高，需要对所提 DNA 的浓度进行适当稀释，从样品中提取的 DNA 浓度和纯度，均能满足后续 PCR 扩增实验的需求。

表 3 DNA 的质量浓度及纯度

Table 3 The mass concentration and purity of DNA

名称	A260	A280	A260/A280	质量浓度 / (ng/μL)
猪肉	0.215	0.106	2.02	169.9
牛肉	4.449	2.453	1.81	229.9
羊肉	0.345	0.167	2.06	150.7
鸡肉	0.204	0.098	2.08	110.3
鸭肉	0.342	0.187	1.82	196.5

### 3.2 多重 PCR 扩增结果

通过固定退火温度确定最佳引物浓度配比，固定引物浓度配比确定最佳退火温度，通过反复实验不断优化配比，最佳上下游和鸭的上下游引物浓度配比为：通用上游：猪：牛：羊：鸡：鸭（上游引物）：鸭（下游引物）=3:1:1:2:0.7:1:1（引物浓度和量见表 2）、最佳退火

温度为 58℃ 时，扩增效果最好。电泳结果见图 1。

由图 1 可以看出，被检样品猪肉、牛肉、羊肉、鸡肉和鸭肉中均出现特异性目的条带，能一次实验检测出来 5 种动物源性成分，无非特异性扩增。扩增片段大小分为牛 274 bp，羊 331 bp，猪 398 bp，鸡 227 bp，鸭 201 bp，扩增出来的条带区分清楚，引物有良好的特异性。

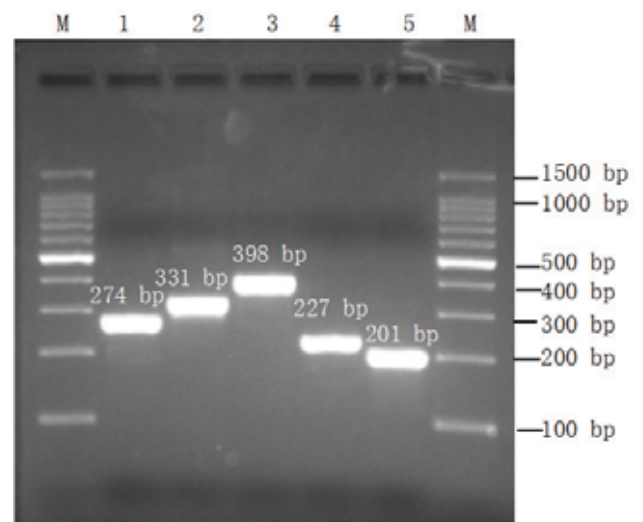


图 1 5 种肉多重 PCR 扩增结果

Fig. 1 The multiplex PCR amplification of 5 kinds of meat  
注: M.100bp DNAladder; 1. 牛肉; 2. 羊肉; 3. 猪肉; 4. 鸡肉; 5. 鸭肉。

### 3.3 特异性和检出限检测结果

分别用猪、牛、羊、鸡、鸭单独的 1 种引物对提取的混合肉样 DNA 进行 PCR 扩增，检测多重 PCR 的特异性，电泳检测结果见图 2。将猪、牛、羊、鸡和鸭的模板 DNA 进行序列梯度稀释 (初始浓度为 80 ng/μL)，分别进行多重 PCR 扩增，猪、牛、羊、鸡和鸭模板 DNA 的最低检出限见图 3 ~ 图 5。

由图 2 可以看出，用混合肉样提取的模板 DNA 用单一引物进行扩增与用单一物种的模板 DNA 用多种引物进行扩增结果一致。每种引物对相应模板扩增出来的条带明亮，扩增结果的特异性清晰，对其他物种均无扩增。

由图 3 ~ 图 5 可见，随着模板的逐级稀释，PCR 扩增



出来的条带亮度逐渐变暗，扩增含量逐渐减少。图3中猪的DNA模板稀释至0.001%仍有扩增出来的清晰条带。图4(1~9)鸭的DNA模板稀释0.0001%、图4(9~18)牛的DNA模板稀释至0.00001%时仍有扩增出来的清晰条带。图5(1~9)鸡的DNA模板稀释至0.00001%、图5(9~18)羊的DNA模板稀释至0.001%时仍有扩增出来的清晰条带。证明该方法的最低检出限为0.001%，检出浓度为 $8 \times 10^{-4} \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。

图2 引物特异性检测结果

Fig. 2 The specific results of primers

注: M.100bp DNAladder; 1. 混合肉样DNA+牛的引物; 2. 混合肉样DNA+羊的引物; 3. 混合肉样DNA+猪的引物; 4. 混合肉样DNA+鸡的引物; 5. 混合肉样DNA+鸭的引物。

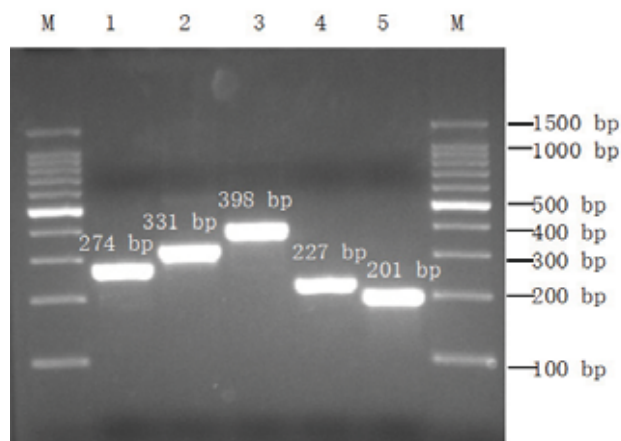


图3 猪 PCR 灵敏度检测结果

Fig. 3 PCR sensitivity of pigs

注: M.100bp DNAladder; 1:100%; 2:10%; 3:1%; 4:0.1%; 5:0.01%; 6:0.001%; 7:0.0001%; 8:0.00001%; 9:0.000001%

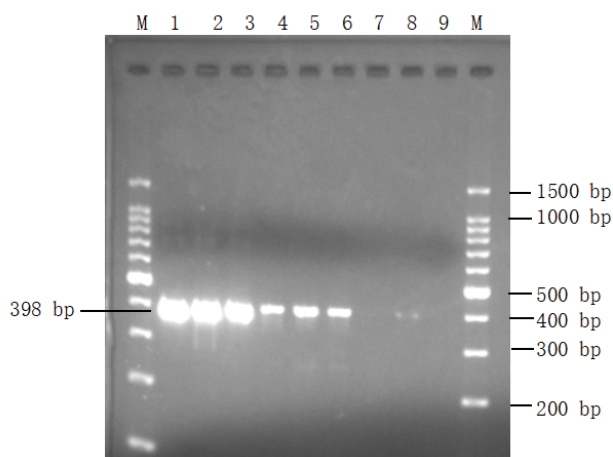


图4 鸭和牛 PCR 灵敏度检测结果

注: M.100bp DNAladder; 其中 1-9 为鸭, 10-18 为牛;

1.100%; 2.10%; 3.1%; 4. 0.1%; 5.0.01%; 6.0.001%; 7.0.0001%; 8.0.00001%; 9.0.000001%; 10.100%; 11.10%; 12.1%; 13.0.1%; 14.0.01%; 15.0.001%; 16. 0.0001%; 17.0.00001%; 18.0.000001%



图5 鸡和羊 PCR 灵敏度检测结果

Fig. 5 PCR sensitivity of chickens and ovines

注: M.100bp DNAladder; 其中 1-9 为鸡, 10-18 为羊;

1.100%; 2.10%; 3.1%; 4.0.1%; 5.0.01%; 6.0.001%; 7.0.0001%; 8.0.00001%; 9.0.000001%; 10.100%; 11.10%; 12.1%; 13.0.1%; 14.0.01%; 15.0.001%; 16.0.0001%; 17.0.00001%; 18.0.000001%



#### 4 结果与讨论

研究参照 T.Matsunaga 等设计的通用上游引物和猪、牛、羊和鸡的下游引物以及通过查阅文献选用鸭的独立上下游引物, 经过大量试验研究, 得出多重 PCR 反应的最佳引物浓度配比为: 通用上游: 猪: 牛: 羊: 鸡: 鸭 (上游引物): 鸭 (下游引物) = 3:1:1:2:0.7:1:1 (引物浓度和量见表 2)、最佳退火温度为 58℃ 时扩增效果最好, 建立了五重 PCR 检测方法, 并确定其特异性和灵敏度。

由于地域性居民饮食的差异和喜好, 江苏地区居民对鸭血的需求量巨大, 而鸭血的营养价值和食用功效在动物血中比较优良, 但鸭的体积相对猪、牛、羊等动物体积较

小,血含量少,不法商贩可能为获取更多利益在鸭血中掺其他动物血或全部用其他动物血来代替。同样,相对于其他动物种类,鸭的“填鸭式”饲养方式使得鸭的饲养成本较小,鸭肉比较便宜,因此猪、牛和羊肉制品中添加鸡或鸭成分的掺假方式也屡见不鲜。因此,猪、牛、羊、鸡和鸭成分在江苏地区的动物源性食品中日常检测鉴定中的比例很大,而本研究建立的多重 PCR 法可满足一次 PCR 反应和一次电泳就能有效鉴别出 5 种动物源性成分,大大地减少了试剂和时间成本,此方法可用作科研机构及食品检测机构对动物源性食品的常规定性检测,对肉制品进行真伪鉴别及掺假成分判断提供技术支撑。■

### 参考文献

- [1] 王金斌,白蓝,李文,等.同步检测动物源性成分的五重 PCR 的条件优化和检出限分析[J].核农学报,2018,32(3):0506—0514.
- [2] 宗卉,范万红,温燕辉.应用多重 PCR 同时检测牛、羊源性成分[J].中国草食动物,2006,26(6):21—23.
- [3] Nicolai Z, Finn K, Anders H. Species determination—Can we detect and quantify meat adulteration[J]. Meat Science, 2009, 83(2): 165—174.
- [4] 李通,尹艳,王海等.聚合酶链式反应快速鉴别 5 种常见肉类[J].食品科学,2013,34(8):249—252.
- [5] 何玮玲,张驰,杨静等.食品中 4 种肉类成分多重 PCR

的快速鉴别方法[J].中国农业科学,2012,45(9):1873—1880.

- [6] 范丽丽,李培,傅春玲等.食品中鸡源性成分实时荧光 PCR 检测方法的建立[J].食品科学,2014,35(2):248—251.
- [7] Calvo H, Zaragoza P, Osta R. Random amplified polymorphic DNA fingerprints for identification of species in poultry pate[J]. Poultry Science, 2001, 80(4):522—524.
- [8] 王敏,刘荻,黄海等. DNA 条形码技术在深圳鱼肉制品鉴定中的应用[J].食品科学,2015,36(20):247—251.
- [9] 苗丽,张秀平,陈静等.数字 PCR 法对肉制品中牛源和猪源成分的定量分析[J].食品科学,2016,37(8):187—191.
- [10] Maede D. A strategy for molecular species detection in meat and meat products by PCR-RFLP and DNA sequencing using mitochondrial and chromosomal genetic sequences[J]. European Food Research and Technology, 2006, 224(2):209—217.
- [11] Matsunaga T, Chikuni K, Tanabe R, et al. A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay[J]. Meat Science, 1999, 51(2):143—148.
- [12] 董焕新,吕二盼,詹磊等.食品中动物源性成分的多重 PCR 快速检测方法[J].食品安全质量检测学报,2018,19(7):4595—4600.
- [13] 吉林省卫生厅. DBS22/018—2013 食品安全国家标准鲜(冻)畜肉中鸭源性成分的定性检测 PCR 方法[S].吉林:吉林标准出版社,2013.

### (接115页)小结

模块化教学是打破传统的依据章节次序安排的教学模式,是对专业课程体系的知识结构和教学次序进行优化,同时结合技能训练进行模块化教学设计。通过借鉴其他课程模块化教学改革成果经验,对《食品生物化学》课程实施模块化教学研究,将教学内容分为“糖类生物化学”“脂类生物化学”“蛋白质生物化学”“核酸生物化学”“酶和维生素”以及“遗传信息传递”六大模块,不仅增强课程知识体系的系统性和连贯性,也提高了学生学习的积极性和主动性,同时培养了学生相应的专业知识运用的能力。《食品生物化学》课程的模块化教学改革对其他课程的建设也具有指导、借鉴和推广意义。■

### 参考文献

- [1] 刘海燕,常桐善.模块化、灵活化、全球化:基于信息技术的大学“学习范式”转型——基于麻省理工学院的案例探讨[J].开放教育研究,2018(3):19—26.
- [2] 葛晋,赵丽娅.论高等职业金融投资人才培养模块化创新教学[J].河北职业教育,2021,5(02):41—44.
- [3] 李海涛.模块化教学条件下课程体系的构建[J].四川职业技术学院学报,2007(02):82—83.
- [4] 戴梓茹,张晨晓.模块化教学的探索与实践——以钦州学院食品科学与工程专业生物化学为例[J].钦州学院学报,2016,31(10):52—55.

