

PCR 方法快速鉴别食品中肉的种类

黄宇锋, 罗海英, 罗东辉, 冼燕萍, 覃芳芳, 陈意光, 郭新东, 董浩

(广州市质量监督检测研究院 国家加工食品质量监督检验中心(广州) 广州市食品安全检测技术重点实验室 广州市食品安全风险动态监测与预警研究中心, 广东广州 510110)

摘要: 本文针对食品中肉成分种类鉴别开发了一种快速灵敏的 PCR 检测方法, 可检测食品中是否存在猪肉、牛肉、羊肉以及鸡肉等成分。采用微波助提法提取样品中 DNA, 简化了前处理步骤, 可在短时间内完成从多种不同类型肉与肉制品中提取肉成分 DNA。为了评价方法的可靠性与灵敏度, 猪肉以及掺入了不同比例浓度猪肉成分的食品样品采用本方法进行了核酸提取与 PCR 分析。检测结果表明, 方法可检测出低至含有 0.5% 浓度的猪肉成分的混合样品。随机抽取 50 份不同类型的市面食品样品, 检测出 5 份食品含有猪肉成分, 7 份食品中含有牛肉成分, 5 份食品中含有羊肉成分。该样品前处理方法、DNA 提取方法以及 PCR 检测方法可广泛应用于食品中肉成分种类的检测鉴别。

关键词: 微波法; 食品; 肉制品; 检测; 引物

文章编号: 1673-9078(2013)7-1725-1729

Rapid Detection of Meat Species in Food by Polymerase Chain Reaction Technique

HUANG Yu-feng, LUO Hai-ying, LUO Dong-hui, XIAN Yan-ping, QIN Fang-fang, CHEN Yi-guang, GUO Xin-dong, WU Yu-luan

(Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, National Centre for Quality Supervision and Testing of Processed Food (Guangzhou), Guangzhou City Key Laboratory of Detection Technology for Food Safety, Guangzhou City Research Center of Risk Dynamic Detection and Early Warning for Food Safety, Guangzhou 510110, China)

Abstract: In order to detect the ingredients of pork, beef, mutton, chicken in food, a rapid and sensitive polymerase chain reaction (PCR) method was developed for the specie identification of meat ingredients in food. In this method, the DNA in the samples was extracted by microwave irradiation to simplify the pretreatment step and shorten the extraction time of DNA from different kinds of meat and meat products. To evaluate the method, pork and food spiked with different concentrations of pork together with unknown food samples were analyzed by PCR using the new set of porcine specific primers. The detection results showed that the lowest detectable limit (LOD) of pork ingredient by this method was 0.5%. In 50 random samples tested, 5 samples contained pork ingredient and 7 samples contained beef ingredient. Another 5 samples contained mutton ingredient. This method can be widely used in specie identification of meat ingredients in food.

Key words: microwave; food; meat products; detection; primers

俗语有云:“挂羊头, 卖狗肉”, 说明肉与肉制品的掺假售假现象由来已久, 时至今日, 一些唯利是图的生产经营者仍不择手段在食品生产流程中施行掺假, 不法商贩在市场销售中以假乱真, 用低质肉充优质肉从中取利。此外, 随着贸易的全球化, 食品更需要考虑不同国家、不同文化以及不同宗教的饮食习惯,

收稿日期: 2013-03-12

基金项目: 广州市科技计划项目([2011]233-34)

作者简介: 黄宇锋(1979-), 男, 硕士, 工程师, 研究方向为食品安全检测技术

通讯作者: 罗东辉(1982-), 男, 博士, 高级工程师, 研究方向为食品安全及风险预警

并遵循相应规则, 比如说猪肉在伊斯兰教、犹太教以及我国回族居民中的食用禁忌。由此可见, 有效开展食品中肉成分的种类鉴别, 具有重要意义。目前应用于肉与肉制品种类鉴别的方法较多, 主要有形态学鉴别、免疫学鉴别、理化鉴别和分子生物学鉴别等方法, 具体的高新技术分析方法包括 PCR、HPLC、FTIR 法等^[1-8]。

PCR 是聚合酶链式反应的简称, 是分子生物学中广泛运用的一种技术, 主要原理是通过热循环, 达到目的基因片段的大量扩增。目前这项技术越来越广泛地运用于食品来源种类的检测鉴别中。例如, 覃芳芳等运用 PCR 技术检测牛奶和腊肠中的植物成分^[9-10],

陈文炳等运用 PCR 技术检测肉骨粉等产品中的动物源性成分等^[11], 邓鸿铃等运用 PCR 技术检测食品中的转基因成分等^[12]。结合先进的实时荧光定量 PCR 技术, 以 DNA 为基础的检测技术在食品原材料种属鉴定中获得了快速的发展。相关研究表明, 利用物种线粒体 DNA 序列作为扩增靶基因, 通过合成特异性引物, 扩增获得 DNA 片段, 测序以及序列比对等手段可准确鉴别所分析物的物种种属。由于方法具有高度的特异性与敏感性, PCR 技术在物种鉴别方面具有准确性高等优点。

对于常规样品中 DNA 的提取与纯化, 目前已有较多商业化的试剂盒应用于科研以及检测行业中。相关研究表明, 这些试剂盒在 PCR 检测前的 DNA 提取中获得了很好的应用。然而针对大规模的样品筛查检测, 试剂盒方法存在具有成本高, 提取时间长等不足。为了降低研究成本和提高实验速度, 本研究开发了一种快速检测食品中猪肉、牛肉、羊肉及鸡肉成分的 PCR 检测方法。该方法基于各物种不同的线粒体基因序列设计合成专一性的扩增引物, 采用微波法提取样品中的核酸, 根据扩增以及测序结果判断食品中肉成分种类。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

猪肉、牛肉、羊肉、鸡肉以及多种类型食品购自广州市场; Taq DNA 聚合酶, DNA 分子量标记, DL 2000 marker, 购自 Takara, 大连宝生物工程有限公司。

PCR 热循环仪 (MJ Research, PTC-200)、凝胶成像系统 (Bio-Rad, Gel DOX XR)、核酸蛋白分析仪 (Bio-Rad, SmartSpec plus)、微量可调移液器 (Eppendorf)。

1.2 样品处理方法

以加工后的猪肉作为阳性对照, 食品样品主要包括香肠、调味料、巧克力制品以及饼干等。这些样品均有独立的包装, 在取样时为了避免污染, 于取样室分别独立取样, 于粉碎机中粉碎。为了防止污染, 粉碎杯在取完每个样品后需要更换, 粉碎杯在使用后立即清洗、消毒并灭菌。

研磨粉碎均匀后, 取 5 g 样品, 加入 30 mL 预热的裂解缓冲液, 裂解缓冲液配方为 1 mol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L EDTA, 10% (m/V) SDS。将样品与裂解液混合溶液涡旋震荡 15 min, 获得均质的溶液, 置于室温 (25~27 °C) 放置 45 min, 每隔 15 min 涡旋振荡 5 min。将样品置于 4 °C 过夜, 让样品充分裂解。

1.3 微波法提取样品 DNA

过夜消化后, 样品涡旋震荡 3 min, 放置 10 min

让食品颗粒沉降, 吸取上层清液转移至 1.5 mL Eppendorf 管中。为了避免微波加热过程中 Eppendorf 管的变形或破裂, 多个样品管应均匀对称放置于微波台上。并在微波室内放一杯蒸馏水, 防止样品过热。放置好样品后, 微波加热 1~3 min, 经微波处理后的管内液体温度约为 75~80 °C。注意在微波提取过程中, 管子应保持开启状态。微波提取后, 离心, 13000 r/min 离心 5 min。离心直至出现清澈的裂解液上清, 离心后, 转移上清至一新的离心管中, 上清液即为 DNA 模板溶液。

提取的 DNA 溶液的浓度采用核酸蛋白分析仪进行测定, 测定 260 nm 处的吸收值。

1.4 PCR 检测

在设计引物时, 考虑到动物基因组中线粒体 DNA 拷贝数较多且抗腐蚀性较强, 我们设计的引物基于各动物物种的线粒体基因序列。为了准确鉴别食品中所含肉成分的种类, 我们根据猪、牛、羊、鸡各自的线粒体基因序列, 分别设计了种属特异性的引物对提取的食品 DNA 进行 PCR 检测。具体引物信息见表 1, 引物合成于 Invitrogen 公司。

表 1 引物信息以及扩增产物长度

Table 1 Information of primers and the length of PCR products

检测基因	引物序列	扩增产物长度/bp
猪线粒体基因	5'-atgaaacattggagt agtcctactattacc-3'	149
牛线粒体基因	5'-ctacgaggtctgtccgataaagg-3'	271
羊线粒体基因	5'-gtaggcttgggaatagtagca-3'	294
鸡线粒体基因	5'-gggacaccctcccccttaataagca-3'	266

PCR 扩增采用 Taq DNA 聚合酶, 反应体系为 25 μL 体系, 其中 10×PCR buffer 2.5 μL、MgCl₂ 2.5 μL、dNTPs 1.0 μL、上、下游引物各 0.5 μL、Taq 酶 0.3 μL, 模板 DNA 30~50 ng、灭菌双蒸水补足体积至 25 μL。PCR 仪器反应条件为 94 °C 预变性 5 min 后, 按变性 94 °C 30 s、退火依顺序分别为 57/55/54/58 °C 30 s、延伸 72 °C 30 s, 共进行 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min, PCR 产物于 4 °C 保存。

1.5 琼脂糖凝胶电泳

PCR 反应结束后的 PCR 产物于 2% 的琼脂糖凝胶中电泳, 电压 80 V, 分子量标记为 DL 2000 marker。凝胶内含有 0.5 μg/mL 的溴化乙锭, 凝胶成像系统下观

察、拍照。

2 结果与讨论

由于 PCR 方法具有高度的专一性、敏感性且快捷简便, PCR 方法目前已经广泛应用于食品的分析检测中。但是由于食品基质的复杂性,使得 PCR 技术在食品中的应用也受到了一定的限制。一般而言,在食品加工处理过程中, DNA 分子存在不同程度的降解,食品加工辅料如添加剂、防腐剂等的引入也会对 PCR 反应带来一定的干扰。上述各类原因都可能会导致最终结果的不准确性。因此,急需开发更为科学有效的针对不同种类食品的 DNA 提取方法,方法应能基本除去食品中的添加剂、防腐剂等干扰物质成分,尽可能消除食品中干扰成分对后续应用如 PCR 反应的影响。

本文开发的微波法提取食品中的 DNA,由于在高温的作用下,以及处于 pH 6.0~9.0 裂解体系的环境中,可以获得较高产量的 DNA。与常规的煮沸法提取 DNA 相比较,微波提取 DNA 法由于微波辐射的能量很高,可以将样品的沸点提高 25 °C 左右,更高的裂解沸点可以获得更快的 DNA 提取效率。微波处理后,通过高速离心,可以尽量减少食品添加剂等的干扰,获得满足检测要求的质量较高的 DNA。

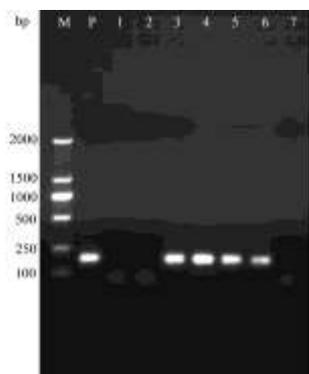


图 1 含不同比例猪肉成分的混合制品中猪线粒体基因片段的扩增结果

Fig.1 The amplification of 149-bp fragment of porcine in different concentrations of porcine inclusion

注:泳道 M: DL2000DNA ladder (Takara); 泳道 P: 阳性对照 (猪肉制品提取的 DNA); 泳道 1: 阴性对照 (不含猪肉成分样品提取的 DNA); 泳道 2: 空白对照 (双蒸水); 泳道 3: 掺杂了 50%猪肉成分的混合样品; 泳道 4: 掺杂了 20%猪肉成分的混合样品; 泳道 5: 掺杂了 5%猪肉成分的混合样品; 泳道 6: 掺杂了 0.5%猪肉成分的混合样品; 7: 掺杂了 0.1%猪肉成分的混合样品

为了检测方法的灵敏性,我们以猪肉成分检测为代表,将猪肉以 50%、20%、5%、0.5%、0.1% (m/m) 的比例均匀混合掺入大豆制品中。将混合样品通过

DNA 提取和 PCR 扩增,电泳结果如见图 1 所示,含 50%、20%、5%、0.5%猪肉比例的大豆制品,采用本研究的检测方法,都可以看到清晰的 149 bp 的条带,证明均能检出猪肉成分,但是 0.1%猪肉比例的大豆制品却没有响应的条带检出。鉴此,我们认为该方法可以检测出低至含有 0.5%浓度的猪肉成分的混合样品,即检出限为 0.5%的掺假比例,同时这个结果也表明,所设计的引物具有较高的敏感性,可以用来专一性的鉴别食品中是否含有猪肉成分。

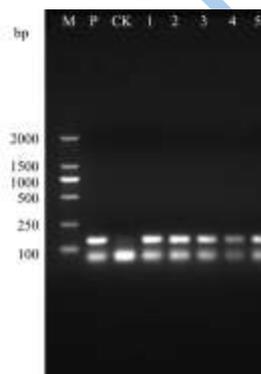


图 2 猪线粒体 149-bp 基因片段的 PCR 扩增结果 (5 份食品中含有猪肉成分)

Fig.2 Amplification of a 149-bp fragment of porcine food samples.

注:泳道 M: DL2000DNA ladder (Takara); 泳道 P: 阳性对照 (猪肉制品提取的 DNA); 泳道 CK: 阴性对照 (不含猪肉成分样品提取的 DNA); 泳道 1~5: 扩增出猪线粒体 149-bp 基因片段的样品。

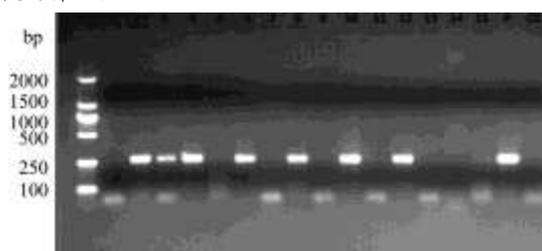


图 3 牛线粒体 271-bp 基因片段的 PCR 扩增结果 (7 份食品中含有牛肉成分)

Fig.3 Amplification of a 271-bp fragment of beef food samples

注:泳道 M: DL2000DNA ladder (Takara); 泳道 P: 阳性对照 (牛肉制品提取的 DNA); 泳道 CK: 阴性对照 (不含牛肉成分样品提取的 DNA); 泳道 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12: 扩增出牛线粒体 271-bp 基因片段样品。

为了验证结果的可靠性以及方法的适用性,我们随机从市场上购买了 50 份不同类型的食品样品进行猪肉、牛肉、羊肉、鸡肉成分的检测工作。检测工作采用本研究方法描述的 DNA 提取方法以及 PCR 检测方法。从电泳结果显示,在 50 份样品中,有 5 份食品中检测出猪肉成分 (见图 2), 7 份食品中检测出牛肉成分 (见

图3), 5份食品中检测出羊肉成分(见图4), 在这些食品中未检测到鸡肉成分(见图5)。



图4 羊线粒体 294-bp 基因片段的 PCR 扩增结果 (5 份食品中含有羊肉成分)

Fig.4 Amplification of a 294-bp fragment of mutton food samples

注: 泳道 M: DL2000DNA ladder (Takara); 泳道 P: 阳性对照 (羊肉制品提取的 DNA); 泳道 CK: 阴性对照 (不含羊肉成分样品提取的 DNA); 泳道 1, 2, 3, 4, 9: 扩增出羊线粒体 294-bp 基因片段的样品。



图5 鸡线粒体 266-bp 基因片段的 PCR 扩增结果 (未检出食品中含有鸡肉成分)

Fig.5 Amplification of a 266-bp fragment of chicken food samples

注: 泳道 M: 100 bp DNA ladder (Takara); 泳道 P: 阳性对照 (鸡肉制品提取的 DNA); 泳道 CK: 阴性对照 (不含鸡肉成分样品提取的 DNA); 其他泳道样品。

从试验结果我们可以得知, 有5份食品检测出149 bp的猪线粒体基因片段, 有7份食品检测出271 bp的牛线粒体基因片段, 有5份食品检测出294 bp的羊线粒体基因片段。通过本研究方法扩增获得扩增片段后, 我们送至测序公司测序, 并与猪、牛、羊各自的基因组序列进行比对, 进一步验证了试验结果的准确性。

结果综合表明, 应用本方法可以特异性的检测食品中的猪肉、牛肉、羊肉及鸡肉成分。

3 结论

3.1 在优化快速、稳定的加工食品中基因检测方法的过程中, 本文开发建立了一整套的食品中肉成分种类

鉴别方法, 从样品制备到PCR反应到电泳检测过程都显示出本方法是稳定而且高效的。本研究方法不仅可以特异性的检测猪肉成分, 还可以检测牛肉、羊肉以及鸡肉成分。猪肉成分的最低检测限可达0.5%, 即在不含有猪肉成分的食品中掺入0.5%的猪肉成分即可被本方法检出。从实际样品检测结果中, 我们得出, 有5份食品检测出猪肉成分, 有7份食品检测出牛肉成分, 有5份食品检测出羊肉成分, 这50份食品中暂未检测到含有鸡肉成分的食品样品。试验证明, 本方法设计的引物具有高度的灵敏性与特异性, DNA提取方法具有高度的可靠性与稳定性, 通过本方法可以实现食品中猪肉、牛肉、羊肉、鸡肉成分的快速精确检测。本文对建立的PCR试验方法进行了敏感性测试, 在多样样品中验证引物与方法的有效性与可靠性。

3.2 本研究开发的快速检测方法可以为样品测试节约大量的时间与消耗, 同时本方法采用的微波加热方法提取样品DNA具有一定的创新性 & 广泛的适用性, 特别适合复杂基质样品肉成分DNA的提取。该方法可以推广应用于不同类型的样品中, 为样品DNA的提取以及食品中肉成分种属鉴别开拓了新的思路。

参考文献

- [1] Calvo J H, Zaragoza P, Osta R. A quick and more sensitive method to identify pork in processed and unprocessed food by PCR amplification of a new specific DNA fragment[J]. J. of American Society of Animal Science, 2001, 79: 2108-2112
- [2] Farouk A A, Mohamed F B, Greiner R, et al. The use of a molecular technique for the detection of porcine ingredients in the Malaysian food market [J]. Saudi Med J., 2006, 27: 447-450
- [3] Knuutinen J, Harjula P. Identification of fish species by reversed-phase high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection [J]. J. Chromatogr., 1998, 705: 11-21
- [4] Lahiffs G M, Lyng J, Smith T, et al. Real-Time polymerase chain reaction detection of bovine DNA in meat and bone meal samples [J]. J. Food Prot., 2002, 65: 1158-1165
- [5] Rastogi G, Dharma M, Bharde A, et al. Species determination and authentication of meat samples by mitochondrial 12SrRNA gene sequence and conformation sensitive gel electrophoresis [J]. Current Science, 2004, 87: 1278-1281
- [6] Shi S R, Cote R J, Wu L, et al. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections based on the antigen retrieval principle: Heating under the influence of pH [J]. The Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2002,

- 50(8): 1005-1011
- [7] Stratil A, Peelman L J, Van Poucke M, et al. A HinfI PCR-RFLP at the porcine leptin (LEP) gene [J]. Anim. Genet, 1997, 28: 371-372
- [8] Zerifi C, Lanie C, Benard G. SDS-PAGE technique for species identification of cooked meat [J]. Fleischwirtschaft, 1991, 71: 1060-1062
- [9] 覃芳芳,邓鸿铃,郭新东,等.牛奶中植物成分的 PCR 检测方法研究[J].食品科学,2008,29(6):234-236
- QIN F F, DENG H L, GUO X D, et al. Detection of Plant Ingredient in Milk by PCR Method [J], Food Science, 2008, 29(6): 234-236
- [10] 覃芳芳,邓鸿铃,郭新东,等.腊肠中的植物成份的 PCR 检测方法研究[J].现代食品科技,2008,24(7):722-724
- QIN F F, DENG H L, GUO X D, et al. Detection of Plant Element in Sausage via PCR Method [J]. Modern Food Science and Technology, 2008, 24(7): 722-724
- [11] 陈文炳,邵碧英,廖宪彪,等.加工食品中若干动物成分的 PCR 检测技术应用研究[J].食品科学,2005,26(8):338-341
- CHEN W B, SHAO B Y, LIAO X B, et al. Application of PCR Detection for Some Animal Components in Processed Food [J]. Food Science, 2005, 26(8): 338-341
- [12] 邓鸿铃,郭新东,吴玉鑫,等.利用PCR方法检测转BT基因水稻[J].现代食品科技,2007,23:71-74
- DENG H L, GUO X D, WU Y L, et al. Detection of BT Transgenic Rice Gene by Polymerase Chain Reaction [J]. Modern Food Science and Technology, 2007, 23: 71-74

欢迎订阅 EI 收录期刊、中文核心期刊 《现代食品科技》

邮发代号：46-349 刊号：ISSN 1673-9078/CN 44-1620

每期定价 15 元，全年 12 期仅 180 元。欢迎食品及相关行业的机构和科学工作者到各地邮局订阅，并踊跃投稿或建立广告宣传和产学研合作关系。

地址：广州五山华南理工大学轻工与食品学院麟鸿楼 508，邮编：510640

电话：020-87112373, 87113352, 87112532

E-mail: xdspkj@vip.sohu.com