

# 基于DNA条形码技术常见肉类掺假鉴别技术的研究

田晨曦<sup>1,2</sup>, 周巍<sup>1,2</sup>, 王爽<sup>2</sup>, 王赞<sup>2</sup>, 张翠侠<sup>2</sup>, 李永艳<sup>2</sup>, 张岩<sup>2</sup>, 张志胜<sup>1</sup>

(1. 河北农业大学食品科技学院, 河北保定 071000)

(2. 河北省食品检验研究院, 河北省食品安全重点实验室, 河北石家庄 050091)

**摘要:** 根据市场上常见的肉类掺假情况, 本研究通过提取生鲜牛肉、羊肉、猪肉和鸭肉基因组DNA, 按一定比例进行预混合, 构建牛肉掺猪肉、羊肉掺猪肉、牛肉掺鸭肉和羊肉掺鸭肉4种掺假模型。通过引物 $COI-1$ 和 $COI-2$ 进行PCR扩增和测序比对, 建立基于 $COI$ 基因的动物源性食品的掺假判别方法。根据实验所得纯肉DNA提取率 $T$ 实现DNA水平到肉水平掺假比例的换算。在肉的掺假水平上, 引物 $COI-2$ 检测效果较好, 对牛-猪、羊-猪、牛-鸭和羊-鸭模型掺假物的检出限分别为5%、8%、1%和4%。对采集的28个批次的肉制品进行检测, 结果表明: 28个样品中89%的样品与产品标签标识的成分相符。建立的基于DNA条形码技术的检测方法可作为一种简单、快速、有效的分子鉴定技术, 可以直接应用于研究物源性食品的种类和掺假鉴定。

**关键词:** DNA条形码; 肉; 模型; 掺假

文章编号: 1673-9078(2016)8-295-301

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.8.045

## Techniques for Identifying Common Meat Adulterations Based on DNA Barcoding

TIAN Chen-xi<sup>1,2</sup>, ZHOU Wei<sup>1,2</sup>, WANG Shuang<sup>2</sup>, WANG Zan<sup>2</sup>, ZHANG Cui-Xia<sup>2</sup>, LI Yong-yan<sup>2</sup>, ZHANG Yan<sup>2</sup>, ZHANG Zhi-sheng<sup>1</sup>

(1.College of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, China)

(2.Hebei Food Inspection and Research Institute, Hebei Food Safety Key Laboratory, Shijiazhuang 050071, China)

**Abstract:** According to the cases of common meat adulteration seen in the market, four kinds of adulteration models were built: mixed beef-pork, mutton-pork, beef-duck, and mutton-duck by extracting genomic DNAs from fresh beef, mutton, pork, and duck and premixing them at certain ratios. Through polymerase chain reaction (PCR) and sequence comparison using the universal primers  $COI-1$  and  $COI-2$ , a  $COI$  gene-based method was established to detect adulteration in foods of animal origin. According to the pure meat DNA extraction rate  $T$  obtained from the experiment, the conversion of the adulteration ratio from the DNA level into the meat weight level was achieved. At the meat weight level,  $COI-2$  primers provided a relatively accurate detection, and the detection limits of beef-pork, mutton-pork, beef-duck, and mutton-duck adulteration models were 5%, 8%, 1%, and 4%, respectively. The method was tested on 28 batches of collected meat product samples, and the ingredients of 89% of the identified samples were consistent with those described on the product labels. As a simple, rapid, and effective molecular identification approach, DNA barcoding can be directly applied to determine the animal species present in foods of animal origin and to detect adulteration.

**Key words:** DNA barcoding; meat; model; adulteration

近几年, 在市场肉制品的生产与销售中, 通过掺杂掺假、以次充好等手段欺骗消费者而牟取暴利的事件屡屡出现<sup>[1,2]</sup>, 其中以价格低廉的猪肉或鸭肉掺假牛肉和羊肉的现象突出。对加工食品而言, 物种的原始

收稿日期: 2015-09-24

基金项目: 河北省食药局科技项目 (PT2014003)

作者简介: 田晨曦(1990-), 女, 在读硕士, 研究方向: 农产品加工及贮藏工程

通讯作者: 张岩(1979-), 男, 博士, 正高级工程师, 研究方向: 食品安全;

张志胜(1970-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 畜产品加工原理及技术研究

可识别形态特征消失, 这使得物种的鉴别变得相对困难<sup>[3,4]</sup>。因此, 迫切需要一些灵敏、可靠的检测方法来鉴定动物食品或动物源性加工食品的物种来源。

DNA条形码技术(Barcoding)是近几年兴起的一种分子生物学新技术, 由加拿大动物学家Hebert首次提出。其工作原理就是利用基因组DNA中一段标准的或者被公认的基因片段, 作为分子靶标来进行种级水平的种类鉴定, 类似于超市里识别商品的条形码<sup>[5-7]</sup>。在国外的研究中比较成熟<sup>[8-9]</sup>, 国内对牛、羊、猪、鸭等肉类DNA条形码的研究依然处于初级阶段<sup>[10,11]</sup>, 寻找

有较强特异性和通用性的基因片段作为肉类DNA条形码是迫切需要的。现阶段所采用的肉类掺假的鉴定方法不具备普遍的适用性,只能进行特异性检测,同时为了更好地提高掺假评估的准确性和通用引物的灵敏性,建立人工掺假模型并通过DNA条形码技术进行检测<sup>[12]</sup>。

本研究将牛肉、羊肉、猪肉和鸭肉的阳性DNA按一定比例进行预混合,构建4种肉类的掺假模型,分别取0.1 g、0.05 g和0.025 g的牛肉、羊肉、猪肉和鸭肉提取DNA,并计算DNA提取率T,根据纯肉DNA提取率T实现DNA水平到肉水平掺假比例的换算。利用DNA条形码技术对所建立的模型进行检测,以COI基因为目标片段,通过引物COI-1和COI-2进行PCR扩增和测序比对,建立基于COI基因的动物源性食品的掺假判别的方法。并对市售的肉类产品进行物种鉴定和掺假判定,为DNA条形码技术在动物源性食品鉴别中的应用提供依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

研究所用肉类阳性样本,牛肉、羊肉、猪肉、鸭肉购于大型超市,并利用SN/T 3730、3731标准方法检测(结果略),以确保样本的准确性。

动物基因组DNA提取试剂盒、Premix Taq、Marker、GelRed、琼脂糖购于上海生工公司。

PCR扩增所用通用引物合成和PCR产物测序均由上海生工公司完成。

### 1.2 仪器与设备

Sigma 1-15pk 冷冻离心机,德国Sigma公司;BS-124S 分析天平,北京赛马利斯公司;NanoDrop 2000 微量核算蛋白测定仪,美国Thermo公司;LX-100 手掌型离心机,江苏其林贝尔公司;Powerpac<sup>™</sup>Basic 电泳系统,美国伯乐公司;Bio-rad ChemiDoc<sup>™</sup>Mp 全能型凝胶成像系统,美国伯乐公司;S1000 thermal cycler 基因扩增仪,美国伯乐公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 DNA提取

阳性样本及待测样本基因组DNA均采用组织基因组DNA提取试剂盒进行提取,①称取30 mg肉样品,液氮研磨充分,转入2 mL离心管,简短离心将样品沉入管底。②加入4 μL RNase A (100 mg/mL),震荡15 s,室温静置5 min,以去除体系内的RNA。

③加入20 μL的Proteinase K和200 μL的裂解液GA(可适当增加),56 °C振荡水浴2 h,以充分裂解组织。④加入200 μL缓冲液GB,充分颠倒混匀,70 °C放置10 min,待溶液变清亮。⑤加入200 μL无水乙醇,充分振荡15 s以混匀,全部转入吸附柱,12000 r/min离心1 min。⑥弃收集管废液,加入500 μL缓冲液GD,12000 r/min离心1 min。⑦弃收集管废液,加入600 μL漂洗液PW,12000 r/min离心1 min。重复此步骤,漂洗两次。弃收集管废液,并再次离心以彻底去除漂洗液成分。将离心柱置于超净台数分钟,以彻底晾干漂洗液。⑧将吸附柱转入新离心管中,向吸附膜中间部位悬空滴加70 μL的TE洗脱缓冲液,静置5 min,12000 r/min离心2 min收集DNA。⑨将收集的DNA溶液再次加入吸附柱,静置2 min,12000 r/min离心2 min富集DNA。利用NanoDrop 2000检测提取DNA的纯度和浓度,提取的DNA浓度控制在浓度为40~70 ng/μL,OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>比值控制在1.8~2.1,可用于后续的实验或-20 °C保存待用。

#### 1.3.2 肉类DNA掺假模型设计

根据市场上常见的掺假现象,设计了牛肉掺猪肉、羊肉掺猪肉、牛肉掺鸭肉和羊肉掺鸭肉4种模型。由于试验中小质量的纯肉掺假及掺假工艺无法很好地将两种肉混合均匀模拟实际中制售掺杂肉,造成实验误差较大,所以本实验采用肉类DNA进行掺假。掺假肉(猪肉或鸭肉)DNA与被掺肉(牛肉或羊肉)DNA的掺假比例为1:19、1:9、2:8、3:7、4:6、1:1。

#### 1.3.3 纯肉DNA提取率的计算

相同质量不同种纯肉所提出的DNA质量存在一定的差异,而DNA的掺假比例不一定是纯肉的掺假比例,所以要检测相同质量的牛肉、羊肉、猪肉和鸭肉所提取DNA的质量差异。分别取0.1 g、0.05 g和0.025 g的牛肉、羊肉、猪肉和鸭肉按1.3.1的方法提取DNA,并换算DNA提取率T。根据纯肉的DNA提取率T得到公式:

$$\text{DNA}_{\text{肉1}}/\text{DNA}_{\text{肉2}} = (\text{M}_{\text{肉1}} \times \text{T}_{\text{肉1}})/(\text{M}_{\text{肉2}} \times \text{T}_{\text{肉2}}) = \text{AM}_{\text{肉1}}/\text{M}_{\text{肉2}}$$

注:A为系数,M<sub>肉</sub>为纯肉质量,DNA<sub>肉</sub>为DNA含量。

实现从DNA水平掺假比例到肉水平掺假比例的换算。

#### 1.3.4 PCR扩增

COI序列的通用引物选用本课题组所筛选出的引物COI-1和COI-2,对牛、羊、猪、鸭均具有很好的扩增效率及测序成功率。COI-1上游引物:5'CGAGCAGTAGCACAAACAATC TCAT3',COI-1下游引物:5'GTTGGTCATAGCGAAATCGAGG3';COI-2上游引物:5'TTCTCCAACCACAAAGACATT

GGCAC3', *COI-2* 下游引物: 5'ACGTGGGAGATAA TTCCAAATCCTGG3'。(引物 *COI-1* 来源文章已被现代食品科技录用)。

PCR 反应体系 (50 μL): DNA 模板 5 μL; Premix Taq 25 μL; 正向引物 (10 μmol/L) 2 μL; 反向引物 (10 μmol/L) 2 μL; 以 dd H<sub>2</sub>O 定容到 50 μL。PCR 扩增程序: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 30 s, 54~58 °C 30 s, 72 °C 40 s, 反应 36 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分离, 使用凝胶成像系统分析扩增产物。

### 1.3.5 PCR 产物测序及比对

PCR 产物送上海生工有限公司进行双向测序, 测序引物同于扩增引物。所得的测序结果经拼接并删除两端引物序列, 提交 GenBank 数据库进行 Blast 比对, 同时结合 BOLD 数据库 (<http://www.boldsystems.org>) 对样品的 *COI* 序列进行鉴定和相似度分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 纯肉 DNA 提取率计算及 DNA 水平与肉

水平掺假比例的换算

表 1 相同质量的牛肉、羊肉、猪肉和鸭肉所提出的 DNA 质量  
Table 1 Quality of extracted DNA from beef, lamb, pork, and duck of the same quality

样品名称	肉质量 M/g	DNA 质量 /g	提取率 T/%	平均提取率/%
牛肉	0.1	0.025	0.25	0.25
	0.05	0.013	0.26	
	0.025	0.006	0.24	
羊肉	0.1	0.037	0.37	0.41
	0.05	0.021	0.42	
	0.025	0.011	0.44	
猪肉	0.1	0.024	0.24	0.26
	0.05	0.013	0.26	
	0.025	0.007	0.28	
鸭肉	0.1	0.090	0.91	1.09
	0.05	0.057	1.15	
	0.025	0.030	1.20	

注: 数据为 3 次试验平均所得。

为了计算肉类 DNA 提取率, 分别提取 0.1 g、0.05 g 和 0.025 g 的牛肉、羊肉、猪肉和鸭肉 DNA, 并测量 DNA 浓度, 实验结果如表 1 所示。T(DNA 提取率)=DNA(肉 DNA 含量)/M(肉质量)100%, 设立 3 次平行实验计算平均值, DNA 提取率的差异可能是由于操作误差或者仪器检测误差造成。在本试验中计算可得 DNA 提取率 T<sub>牛</sub>

为 0.25%、T<sub>羊</sub> 为 0.41%、T<sub>猪</sub> 为 0.26%、T<sub>鸭</sub> 为 1.09%, 代入可以得到 DNA 水平与肉水平掺假比例的换算公式:

$$DNA_{牛} / DNA_{猪} = (M_{牛} \times T_{牛}) / (M_{猪} \times T_{猪}) = 0.96M_{牛} / M_{猪} \quad (1)$$

$$DNA_{羊} / DNA_{猪} = (M_{羊} \times T_{羊}) / (M_{猪} \times T_{猪}) = 1.58M_{羊} / M_{猪} \quad (2)$$

$$DNA_{牛} / DNA_{鸭} = (M_{牛} \times T_{牛}) / (M_{鸭} \times T_{鸭}) = 0.23M_{牛} / M_{鸭} \quad (3)$$

$$DNA_{羊} / DNA_{鸭} = (M_{羊} \times T_{羊}) / (M_{鸭} \times T_{鸭}) = 0.38M_{羊} / M_{鸭} \quad (4)$$

根据掺假模型中 DNA 水平的掺假比例, 利用公式 1、2、3 和 4 换算得出掺假模型肉水平的质量百分比, 结果如表 2 所示。

表 2 掺假模型中 DNA 水平和肉水平掺假比例对比

Table 2 Comparison of the ratios of DNA level and meat weight level in adulteration models

序号	DNA 水平		肉水平	
1-1	牛 95%	猪 5%	牛 95%	猪 5%
1-2	牛 90%	猪 10%	牛 90%	猪 10%
1-3	牛 80%	猪 20%	牛 80%	猪 20%
1-4	牛 70%	猪 30%	牛 70%	猪 30%
1-5	牛 60%	猪 40%	牛 60%	猪 40%
1-6	牛 50%	猪 50%	牛 50%	猪 50%
2-1	羊 95%	猪 5%	羊 92%	猪 8%
2-2	羊 90%	猪 10%	羊 85%	猪 15%
2-3	羊 80%	猪 20%	羊 72%	猪 28%
2-4	羊 70%	猪 30%	羊 60%	猪 40%
2-5	羊 60%	猪 40%	羊 51%	猪 49%
2-6	羊 50%	猪 50%	羊 41%	猪 59%
3-1	牛 95%	鸭 5%	牛 99%	鸭 1%
3-2	牛 90%	鸭 10%	牛 97%	鸭 3%
3-3	牛 80%	鸭 20%	牛 95%	鸭 5%
3-4	牛 70%	鸭 30%	牛 91%	鸭 9%
3-5	牛 60%	鸭 40%	牛 87%	鸭 13%
3-6	牛 50%	鸭 50%	牛 81%	鸭 19%
4-1	羊 95%	鸭 5%	羊 98%	鸭 2%
4-2	羊 90%	鸭 10%	羊 96%	鸭 4%
4-3	羊 80%	鸭 20%	羊 91%	鸭 9%
4-4	羊 70%	鸭 30%	羊 86%	鸭 14%
4-5	羊 60%	鸭 40%	羊 80%	鸭 20%
4-6	羊 50%	鸭 50%	羊 72%	鸭 28%

### 2.2 掺假模型 COI 序列的扩增

将上述的掺假模型的 DNA 混合液 (牛-猪、羊-猪、牛-鸭、羊-鸭) 通过引物 *COI-1* 和 *COI-2* 进行 PCR 扩增, 均得到了 500 bp 和 800 bp 左右的单一条带, 其中图 1-1 为引物 *COI-1* 的扩增电泳图, 其中图 1-2 为引物 *COI-2* 的扩增电泳图。

由图 1 掺假模型混合 DNA 的电泳图可知, 掺假

模型的 *COI* 序列可以用通用引物 *COI-1* 和 *COI-2* 扩增出来,说明引物的通用性高,可用于混合 DNA 的 *COI* 序列的扩增。

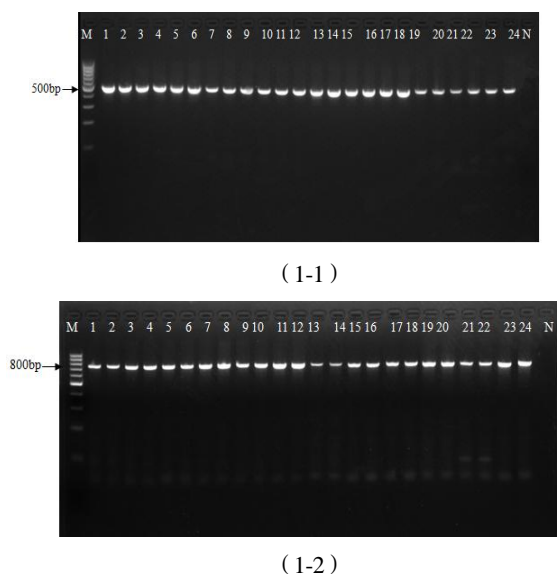


图1 混合 DNA 的基因片段的 PCR 扩增电泳图

Fig.1 Electrophoresis images of gene fragments with mixed DNAs after PCR amplification

注: M, Marker: 1000、900、800、700、600、500、400、300、200、100 bp; 1~6: 牛肉 DNA 掺假猪肉 DNA, 掺假比例为 1:19、1:9、2:8、3:7、4:6、1:1; 7~12: 羊肉 DNA 掺假猪肉 DNA, 掺假比例为 1:19、1:9、2:8、3:7、4:6、1:1; 13~18: 牛肉 DNA 掺假鸭肉 DNA, 掺假比例为 1:19、1:9、2:8、3:7、4:6、1:1; 19~24: 牛肉 DNA 掺假鸭肉 DNA, 掺假比例为 1:19、1:9、2:8、3:7、4:6、1:1; N: 阴性对照。

### 2.3 PCR 产物测序分析

将上述 PCR 扩增产物送生物公司双向测序,测序结果提交 GenBank 进行 Blast 比对分析,同时使用 BOLD 数据库比对分析,结果如表 3、4、5 和 6 所示。

牛肉掺入猪肉的 DNA 扩增产物测序分析结果如表 3 所示,利用引物 *COI-1* 进行扩增,掺入猪肉的 DNA 含量达 40%可测出;利用引物 *COI-2* 进行扩增,猪肉的 DNA 含量达 5%,即猪肉水平上检出限为 5%,检出限较低。

羊肉掺入猪肉的 DNA 扩增产物测序分析结果如表 4 所示,利用引物 *COI-1* 进行扩增,掺入猪肉的 DNA 含量达 10%可测出;利用引物 *COI-2* 进行扩增,猪肉的 DNA 含量达 5%即猪肉水平上检出限为 8%,检出限较低。同时可以看出猪肉 DNA 对于两种引物的竞争性高于羊肉 DNA,因此可以很好地应用于羊肉掺假猪肉的日常检测。

牛肉掺入鸭肉的 DNA 扩增产物测序分析结果如

表 5 所示,利用引物 *COI-1* 进行扩增,鸭肉的 DNA 含量达 50%可测出;利用引物 *COI-2* 进行扩增,鸭肉的 DNA 含量达 5%即鸭肉的含量达 1%可测出,*COI-2* 在鸭肉水平上检出限为 1%,检出限较低。

羊肉掺入鸭肉 DNA 的扩增产物测序分析结果如表 6 所示,利用引物 *COI-1* 进行扩增,鸭肉的 DNA 含量达 50%可测出;利用引物 *COI-2* 进行扩增,鸭肉的 DNA 含量达 10%即鸭肉含量达 4%可测出,与上述结果相似,*COI-2* 在鸭肉水平上检出限较低。

表 3 牛肉掺猪肉测序结果

Table 3 Sequencing results of beef mixed with pork

序号	成分	<i>COI-1</i> 测序结果	<i>COI-2</i> 测序结果
1-1	牛 95% 猪 5%	<i>Bos taurus</i>	<i>Sus scrofa</i>
1-2	牛 90% 猪 10%	<i>Bos taurus</i>	<i>Sus scrofa</i>
1-3	牛 80% 猪 20%	<i>Bos taurus</i>	<i>Sus scrofa</i>
1-4	牛 70% 猪 30%	<i>Bos taurus</i>	<i>Sus scrofa</i>
1-5	牛 60% 猪 40%	<i>Sus scrofa</i>	<i>Sus scrofa</i>
1-6	牛 50% 猪 50%	<i>Sus scrofa</i>	<i>Sus scrofa</i>

注: *Sus scrofa*: 猪; *Bos taurus*: 牛。

表 4 羊肉掺猪肉测序结果

Table 4 Sequencing results of mutton mixed with pork

序号	成分	<i>COI-1</i> 测序结果	<i>COI-2</i> 测序结果
2-1	羊 95% 猪 5%	<i>Ovis aries</i>	<i>Sus scrofa</i>
2-2	羊 90% 猪 10%	<i>Sus scrofa</i>	<i>Sus scrofa</i>
2-3	羊 80% 猪 20%	<i>Sus scrofa</i>	<i>Sus scrofa</i>
2-4	羊 70% 猪 30%	<i>Sus scrofa</i>	<i>Sus scrofa</i>
2-5	羊 60% 猪 40%	<i>Sus scrofa</i>	<i>Sus scrofa</i>
2-6	羊 50% 猪 50%	<i>Sus scrofa</i>	<i>Sus scrofa</i>

注: *Sus scrofa*: 猪; *Ovis aries*: 羊。

经以上分析,该方法通过引物 *COI-1*,在 DNA 水平上对牛-猪、羊-猪、牛-鸭和羊-鸭模型的检出限分别可以达到 40%、10%、50%和 50%,在肉水平上对牛-猪、羊-猪、牛-鸭和羊-鸭模型的检出限分别可以达到 40%、15%、19%和 28%;通过引物 *COI-2*,在 DNA 水平上对牛-猪、羊-猪和牛-鸭模型的检出限可以达到 5%,羊-鸭模型的检出限可以达到 10%,在肉水平上牛-猪、羊-猪、牛-鸭和羊-鸭模型的检出限分别可以达到 5%、8%、1%和 4%。通过对两对引物检测结果的分析,*COI-2* 对于肉制品掺假的检出限较低,更为灵敏,而 *COI-1* 可以对高掺假比例的肉制品进行分析检测,可以减少误判比率。结合两对引物的同时检测,可以建立运用 DNA 条形码技术准确、有效地鉴别 4 种常见动物肉类掺假的方法。

表 5 牛肉掺鸭肉测序结果

Table 5 Sequencing results of beef mixed with duck

序号	成分	COI-1 测序结果	COI-2 测序结果
3-1	牛 95% 鸭 5%	<i>Bos taurus</i>	<i>Anas</i>
3-2	牛 90% 鸭 10%	<i>Bos taurus</i>	<i>Anas</i>
3-3	牛 80% 鸭 20%	<i>Bos taurus</i>	<i>Anas</i>
3-4	牛 70% 鸭 30%	<i>Bos taurus</i>	<i>Anas</i>
3-5	牛 60% 鸭 40%	<i>Bos taurus</i>	<i>Anas</i>
3-6	牛 50% 鸭 50%	<i>Anas</i>	<i>Anas</i>

注: *Anas*: 鸭; *Bos taurus*: 牛。

表 6 羊肉掺鸭肉测序结果

Table 6 Sequencing results of mutton mixed with duck

序号	成分	COI-1 测序结果	COI-2 测序结果
4-1	羊 95% 鸭 5%	<i>Ovis aries</i>	<i>Ovis aries</i>
4-2	羊 90% 鸭 10%	<i>Ovis aries</i>	<i>Anas</i>
4-3	羊 80% 鸭 20%	<i>Ovis aries</i>	<i>Anas</i>
4-4	羊 70% 鸭 30%	<i>Ovis aries</i>	<i>Anas</i>
4-5	羊 60% 鸭 40%	<i>Ovis aries</i>	<i>Anas</i>
4-6	羊 50% 鸭 50%	<i>Anas</i>	<i>Anas</i>

注: *Anas*: 鸭; *Ovis aries*: 羊。

## 2.4 检测方法的应用

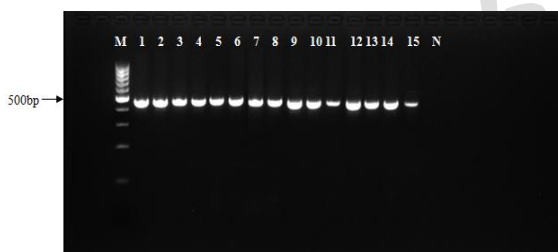


图 2 待测样品基因片段的 PCR 扩增电泳图

Fig.2 Electrophoresis of gene fragments amplified by PCR from test samples

注: M, MarkerI: 1000、900、800、700、600、500、400、300、200、100 bp; 1: 盒装牛肉卷; 2: 盒装牛肉卷; 3: 散装牛肉卷; 4: 散装牛肉卷; 5: 盒装羊肉卷; 6: 盒装羊肉卷; 7: 散装羊肉卷; 8: 散装羊肉卷; 9: 牛肉片; 10: 肥牛肉片; 11: 羊肉片 A; 12: 牛肉粒; 13: 牛肉粒; 14: 羊肉粒; 15: 羊肉粒; N: 阴性对照。

按 1.3.1 的方法, 提取采集的肉卷、肉片、肉丸和火腿肠等肉制品, 共计 28 个批次待测样品的基因组 DNA, 利用筛选的引物 *COI-1* 和 *COI-2* 进行 PCR 扩增, 并利用无菌水作 DNA 模板进行阴性对照, 利用引物 *COI-1* 扩增结果如图 2 和图 3 所示 (*COI-2* 扩增图略)。28 个样品均得到了单一且清晰的条带。21 号

样品为撒尿牛丸, 条带相对较浅可能肉含量比较低。阴性对照组无扩增条带, 证明 PCR 体系未污染。

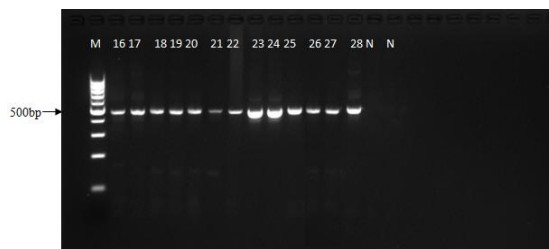


图 3 待测样品基因片段的 PCR 扩增电泳图

Fig.3 Electrophoresis of gene fragments amplified by PCR from test samples

注: M, MarkerI: 1000、900、800、700、600、500、400、300、200、100 bp; 16: 牛肉干; 17: 羊肉串; 18: 肉松; 19: 肉松; 20: 肉松粉; 21: 撒尿牛丸; 22: 撒尿牛丸; 23: 牛肉丸; 24: 牛肉火腿; 25: 火腿肠; 26: 火腿肠; 27: 火腿肠; 28: 火腿肠; N: 阴性对照。

将扩增的 PCR 液送生物公司测序, 测序结果如下表 7 所示。采集的 28 个样品, 经 DNA 条形码技术鉴定, 大多数产品的动物源成分与产品标签符合, 同时也暴露出一定的掺假问题。

其中 3 号样品为散装牛肉卷, 该样品的 PCR 条带清晰, 利用引物 *COI-1* 测序鉴定的结果为牛肉, 而利用引物 *COI-2* 测序鉴定的结果为鸭肉, 由以上建立的牛肉掺假鸭肉的模型可知, 掺假范围在 1%~19% 之间。12 号样品为牛肉粒, 该样品的 PCR 条带清晰, 但测序鉴定的结果未检测出标签上标示的牛肉, 而检出猪肉成分, 由以上建立的牛肉掺假猪肉的模型可知, 猪肉掺假比例大于 40%。21 号样品为撒尿牛丸, 该样品的 PCR 条带清晰, 但测序鉴定的结果未检测出牛肉, 而检出猪肉成分, 由以上建立的牛肉掺假猪肉的模型可知, 利用引物 *COI-1* 进行检测并测序猪肉 DNA 含量达 40% 才可测出, 所以可以初步判定该样品掺入了大量的猪肉成分。

其中 24 号样品牛肉火腿, 标签标识为牛肉和猪肉, 利用引物 *COI-1* 测序鉴定的结果为牛肉, 而利用引物 *COI-2* 测序鉴定的结果为猪肉, 由牛肉掺假猪肉的模型可以判定测序结果与标签相符。

## 3 结论

本研究利用引物 *COI-1* 和 *COI-2*, 对构建的 4 种肉类掺假模型进行 PCR 定性及定量检测, 并对市售 28 批次肉制品进行检测。结论如下:

3.1 实验得到牛肉、羊肉、猪肉和鸭肉 DNA 提取率 T 并依此换算到肉掺假比例。

表7 采样产品物种鉴定结果

Table 7 Identification results of animal species in the collected samples

序号	样品名称	标示成分	COI-1 鉴定结果 (相似率/%)	COI-2 鉴定结果 (相似率/%)	判定结果
1	盒装牛肉卷	牛肉	牛肉 (98%)	牛肉 (99%)	符合
2	盒装牛肉卷	牛肉	牛肉 (98%)	牛肉 (96%)	符合
3	散装牛肉卷	牛肉	<b>牛肉 (98%)</b>	<b>鸭肉 (98%)</b>	<b>掺假</b>
4	散装牛肉卷	牛肉	牛肉 (97%)	牛肉 (96%)	符合
5	盒装羊肉卷	羊肉	羊肉 (99%)	羊肉 (98%)	符合
6	盒装羊肉卷	羊肉	羊肉 (98%)	羊肉 (99%)	符合
7	散装羊肉卷	羊肉	羊肉 (97%)	羊肉 (98%)	符合
8	散装羊肉卷	羊肉	羊肉 (98%)	羊肉 (98%)	符合
9	牛肉片	牛肉	牛肉 (99%)	牛肉 (99%)	符合
10	肥牛肉片	牛肉	牛肉 (97%)	牛肉 (98%)	符合
11	羊肉片	羊肉	羊肉 (99%)	羊肉 (98%)	符合
12	牛肉粒	牛肉	<b>猪肉 (97%)</b>	<b>猪肉 (98%)</b>	<b>掺假</b>
13	牛肉粒	牛肉	牛肉 (98%)	牛肉 (98%)	符合
14	羊肉粒	羊肉	羊肉 (95%)	羊肉 (92%)	符合
15	羊肉粒	羊肉	羊肉 (95%)	羊肉 (92%)	符合
16	牛肉干	牛肉	牛肉 (98%)	牛肉 (98%)	符合
17	羊肉串	羊肉	羊肉 (95%)	羊肉 (93%)	符合
18	肉松	牛肉	牛肉 (97%)	牛肉 (98%)	符合
19	肉松	猪肉	猪肉 (96%)	猪肉 (98%)	符合
20	肉松粉	牛肉	牛肉 (96%)	牛肉 (98%)	符合
21	撒尿牛丸	牛肉	<b>猪肉 (90%)</b>	<b>猪肉 (85%)</b>	<b>掺假</b>
22	撒尿牛丸	牛肉	牛肉 (93%)	牛肉 (94%)	符合
23	牛肉丸	牛肉	牛肉 (97%)	牛肉 (98%)	符合
24	牛肉火腿	牛肉、猪肉	牛肉 (98%)	猪肉 (98%)	符合
25	火腿肠	牛肉	牛肉 (99%)	牛肉 (98%)	符合
26	火腿肠	猪肉	猪肉 (97%)	猪肉 (96%)	符合
27	火腿肠	牛肉	牛肉 (98%)	牛肉 (98%)	符合
28	火腿肠	牛肉、猪肉	牛肉 (97%)	猪肉 (98%)	符合

3.2 结合 *COI-1* 和 *COI-2* 引物, 成功建立对肉类掺假模型的定性检测方法并确定掺假物检出限, 初步进行掺假比例定量推算。

3.3 成功对 28 批次的动物源制品完成检测及判定, 89% 的样品与产品标签标识的成分相符。

3.4 本研究为动物 DNA 条形码技术在肉制品中动物源性成分鉴定方面的后续研究提供了一定理论基础。

#### 参考文献

- [1] Zhang J, Zhang X, Dediu L, et al. Review of the current application of fingerprinting allowing detection of food adulteration and fraud in China [J]. Food Control, 2011, 22(8): 1126-1135
- [2] 田晓静, 王俊, 崔绍庆. 电子鼻快速检测区分羊肉中的掺杂鸡肉[J]. 现代食品科技, 2013, 29(12): 2997-3001  
TIAN Xiao-jing, WANG Jun, CUI Shao-qing. Fast discriminating of chicken adulteration in minced mutton by electronic nose [J] Modern Food Science and Technology, 2013, 29 (12): 2997-3001
- [3] Parchami N F, Tafvizi F, Tajabadi E M, et al. Optimization of multiplex PCR for the identification of animal species using mitochondrial genes in sausages [J]. European Food Research & Technology, 2014, 239(3): 533-541
- [4] 田金辉. 食品中动物源性成分定性鉴定方法研究[D]. 西北农林科技大学, 2011  
TIAN Jin-hui. Studies on qualitative identification methods

- for animal-derived ingredients in foods [D]. North West Agriculture and Forestry University, 2011
- [5] Galimberti A, Mattia F D, Losa A, et al. DNA barcoding as a new tool for food traceability [J]. *Food Research International*, 2013, 50(1): 55-63
- [6] Galimberti A, Mattia F D, Losa A, et al. DNA barcoding as a new tool for food traceability [J]. *Food Research International*, 2013, 50(1): 55-63
- [7] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proceedings of the Royal Society of London-Series B: Biological Sciences*, 2003, 270, 313-322
- [8] Hellberg R S, Kawalek M D, Van K T, et al. Comparison of DNA Extraction and PCR setup methods for use in high-throughput DNA barcoding of fish species [J]. *Food Analytical Methods*, 2014, 10: 1950-1959
- [9] Haye P A, Segovia N I, Vera R, et al. Authentication of commercialized crab-meat in Chile using DNA barcoding [J]. *Food Control*, 2012, 25(1): 239-244
- [10] Luo A R, Zhang A B, Simon YW H, et al. Potential efficiency of mitochondrial genes for animal DNA barcoding: a case study using eutherian mammals [J]. *BMC Genomics*, 2011, 12(84): 1471-1484
- [11] 邱德义, 胡佳, 刘德星, 等. DNA 条形码技术在肉品防欺诈鉴别中的应用 [J]. *肉类研究*, 2013, 27(4): 40-43
- QIU De-yi, HU Jia, LIU De-xing, et al. Application of DNA barcoding in anti-fraud identification of aquatic products [J]. *Meat Research*, 2013, 27 (4): 40-43
- [12] 李通. 基于分子生物学的肉类鉴定方法研究 [D]. 北京化工大学, 2013
- LI Tong. The study of identification methods for meat based on molecular biology [D]. Beijing University of Chemical Technology, 2013