

## 实验技术与方法

## 实时荧光 PCR 法快速检测肉类中貉源性成分

钱云开,王海洋,崔宗岩,高飞,吴曦,肖艳霞,张进杰,曹彦忠

(秦皇岛出入境检验检疫局,河北 秦皇岛 066004)

**摘要:**目的 建立貉源性成分的实时荧光 PCR 快速检测手段。方法 根据貉的线粒体 *Cytb* 基因序列设计引物和探针,通过优化扩增反应体系进行实时荧光 PCR (RT-PCR) 扩增,产物进行快速检测。结果 此方法特异性良好,灵敏度可达到  $10^{-4}$  ng 貉源性 DNA 的量。在混合或纯肉样品以及常见的肉制品中均可检测。结论 本方法可以满足实际工作中肉类掺假检测的要求。

**关键词:**貉; 实时荧光 PCR (RT-PCR); 毛皮动物; 肉类; 掺假; 食品安全; 检测; 鉴定

中图分类号: R155 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2016)05-0602-04

DOI: 10.13590/j.cjfh.2016.05.009

## Development of a real-time PCR method for the raccoon dog meat

QIAN Yun-kai, WANG Hai-yang, CUI Zong-yan, GAO Fei, WU Xi, XIAO Yan-xia,

ZHANG Jin-jie, CAO Yan-zhong

(Qinhuangdao Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Hebei Qinhuangdao 066004, China)

**Abstract: Objective** To establish a *TaqMan*-based real-time PCR approach to determine raccoon dog meat. **Methods** *TaqMan* primers and probe sets were designed by mitochondrial *Cytb* gene of raccoon dog species and PCR system was optimized to achieve real-time PCR and quick detection of products. **Results** This method had good specificity, and the detection limit was  $10^{-4}$  ng DNA of raccoon dog. **Conclusion** This method could well meet the requirements of actual food testing.

**Key words:** Raccoon dog; real-time PCR (RT-PCR); fur-bearing animal; meat; adulteration; food safety; detection; identification

肉类作为人类重要的营养来源,与人们生活和健康息息相关,然而以廉价肉或未经检验检疫的动物肉冒充优质高价肉的行为不仅侵犯了消费者的经济利益,而且也危害了食用者的身体健康,甚至产生社会习惯、宗教信仰问题。

貉 (*Nyctereutes procyonoides*) 是毛皮动物的主要品种之一,目前已形成很大的养殖规模,在获取皮毛之后,动物尸体作为副产物的再利用缺乏监管手段。对于这些未经检验检疫的肉类,需要建立相关检测方法,实现有效监管,以保证消费者的食品安全。

以 DNA 分子特异基因扩增技术鉴定为基础的实时荧光 PCR (real-time PCR, RT-PCR) 具有简单、快速、灵敏度和准确性高的优点,目前已经是肉制品物种源性成分鉴定普遍采用的方法<sup>[1]</sup>。为此,本试验建

立 RT-PCR 快速检测肉制品中貉源性成分的方法。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

## 1.1.1 阳性对照与检测样品

貉(乌苏里亚种)、水貂(黑色标准貂)、狐狸(北极狐)、狗(中华田园犬)、驴(德州驴)肉均通过河北昌黎某养殖基地获得,牛[GBW(E)100197]、山羊(BW4031)、绵羊(BW4029)源性成分标准物质通过中国标准物质信息网购买,鸭(QC-AN-007)、猪(QC-AN-003)、鹌鹑(QC-AN-009)、兔(QC-AN-005)、鹅(QC-AN-008)、马(QC-AN-004)、猫(QC-AN-012)源性成分标准物质通过标准物质网购买,肉制品通过超市和农贸市场购买。

## 1.1.2 主要仪器与试剂

PCR System 7900 基因扩增仪(美国 ABI)、研磨机。

PCR 试剂盒(美国 ABI), CTAB、EDTA、三氯甲烷、异戊醇、异丙醇、乙酸钠、乙醇、Tris 饱和酚均购自北京 Solarbio; CTAB 提取液: 55 mmol/L CTAB, 1 400 mmol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA, 100 mmol/L

收稿日期: 2016-02-24

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局科技计划项目(2015IK228; 2015IK109)

作者简介: 钱云开 男 工程师 研究方向为食品生物安全

E-mail: qyk-1@163.com

Tris,用 10% 盐酸调 pH 至 8.0,121 °C 高压灭菌 20 min,备用;CTAB 沉淀液:13.75 mmol/L CTAB,40 mmol/L NaCl,121 °C 高压灭菌 20 min,备用;TE 缓冲液(Tris、EDTA 缓冲液):10 mmol/L Tris-HCl (pH = 8.0),1 mmol/L EDTA (pH = 8.0);Tris 饱和酚抽提液:Tris 饱和酚-三氯甲烷-异戊醇比例为 25:24:1 (V/V);蛋白酶 K (40 mAnson U/mg, lot# SLBD0562V,美国 Sigma):20 mg/ml;氯化钠水溶液:1 200 mmol/L NaCl,溶于双蒸水中。

## 1.2 方法

### 1.2.1 样品 DNA 的提取

样品经研磨成肉糜或者细粉,需要称重配混合样品的先烘干再研磨成粉后称重。若样品油脂含量高,采用乙醚洗涤 1~2 次后过滤,可有效去除油脂。取 100 mg 放入 2 ml 离心管中,加入 CTAB 提取液 600  $\mu$ l 和蛋白酶 10  $\mu$ l,65 °C 水浴加热 1 h,加入 Tris 饱和酚抽提液 800  $\mu$ l 摇匀,离心取上清加入 1.5 ml 离心管中,加入 2 倍体积的 CTAB 沉淀液,室温静置 1 h,离心弃上清,先加入氯化钠水溶液 400  $\mu$ l 摇匀溶解沉淀,再加入 400  $\mu$ l 三氯甲烷摇匀,离心取上清,加入新的 1.5 ml 离心管中,加入 0.8 倍体积的异丙醇摇匀静置 1 h,离心弃上清,加入 1 000  $\mu$ l 70% 酒精洗涤,离心静置晾干,溶于 100  $\mu$ l 水中。

### 1.2.2 引物设计与反应体系

通过 GenBank 中貉 *Cytb* 基因序列与近源物种犬科动物狗、狐、狼,毛皮动物常见的水貂、狐狸,以及食用肉类常见物种牛、羊、猪、鸡、鸭、兔的 *Cytb* 基因序列进行比对分析,设计一组特异性引物探针,由大连 TaKaRa 公司合成。上游引物 F:5'-TACAGCTGATCTCCTCACGTTAACA-3';下游引物 R:5'-TTGGCCGATGATGATGAAAG-3';探针序列 P:5' (FAM)-AATTGCAGCCAACCGGTGCAAC-3' (TAMRA)。

实时荧光 PCR 反应体系(25  $\mu$ l):12.5  $\mu$ l 2 × RT-PCR Buffer,上、下游引物各 1  $\mu$ l (终浓度 0.2  $\mu$ mol/L),*TaqMan* 探针 P 1  $\mu$ l (终浓度 0.2  $\mu$ mol/L),提取的产品 DNA 模板 2  $\mu$ l,纯水 7.5  $\mu$ l。

PCR 反应程序为:95 °C 预变性 10 min;95 °C 15 s,60 °C 1 min,循环 45 次,仪器设置荧光自动收集。

### 1.2.3 特异性试验

利用所设计检测貉源性成分的特异性引物与探针,分别以貉、水貂、狗、鸡、鸭、猫、猪、鹌鹑、狐、牛、羊、驴、兔、鹅、马动物的 DNA 为模板,以灭菌双蒸水为空白对照模板,进行实时荧光 PCR,验证引

物的特异性。

### 1.2.4 灵敏度试验

用超纯水 10 倍梯度稀释猪肉 DNA,每个反应体系内模板 DNA 的量从 0.000 1 ~ 100 ng,按 1.2.2 进行 RT-PCR 检测。

### 1.2.5 混合纯肉样品的检测

取猪肉样品,按照干重的质量比 1:10 分别与牛肉、羊肉、猪肉、鸡肉、驴肉混合,按照 1.2.1 和 1.2.2 进行 DNA 提取和 RT-PCR 检测。

### 1.2.6 混合肉制品的检测

采用制作肉丸人工模拟肉制品试验<sup>[2]</sup>。样品肉经烘干研磨成粉,按照羊肉 80%,猪肉 10%,其他成分包括木薯淀粉、食用盐、大蒜组合成分占 10% 制作混合肉丸。肉丸分别经①烘箱 200 °C 热处理 30 min<sup>[3]</sup>;②高压灭菌锅 121 °C 处理 30 min<sup>[4]</sup>,按照 1.2.1 和 1.2.2 进行 DNA 提取和 RT-PCR 检测。

为了检测真实肉制品中复杂成分和工艺对检测结果的影响,按照肉制品的主要加工工艺和主要成分<sup>[5]</sup>,取不同厂家的不同主要成分的香肠、肉丸、熏肉等样品,烘干研磨成粉,与猪肉样品按照干重的重量比 1:10 分别混合,按照 1.2.1 和 1.2.2 进行 DNA 提取和 RT-PCR。

## 2 结果

### 2.1 特异性试验结果

检测结果如图 1 所示,1 号样品(貉)出现阳性扩增曲线,其他样品没有貉源性成分 DNA,荧光信号 *Ct* 值与貉相差很多 (> 15) 或无信号检出,空白对照也无信号检出。说明上述引物和探针有良好的特异性。

### 2.2 灵敏度试验结果

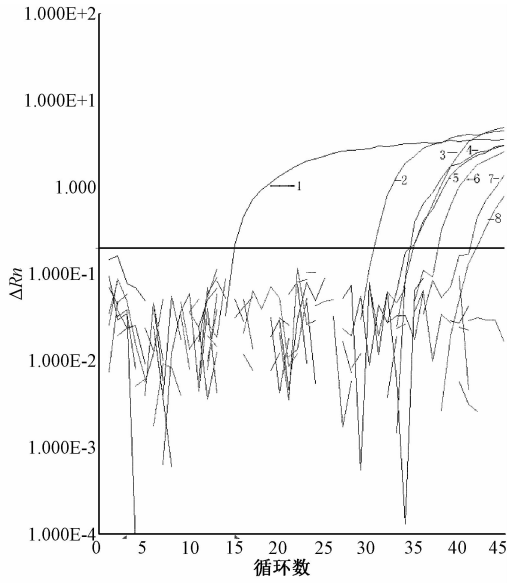
10 倍稀释的模板含量与检测平均 *Ct* 值结果如图 2,相关系数  $r^2 = 0.997$ ,扩增效率 98%,扩增效果达到要求,本方法的检测低限可达  $10^{-4}$  ng 貉源性 DNA 的量。

### 2.3 混合纯肉样品以及肉制品的检测结果

猪肉与常见的食用肉类如牛肉、羊肉、猪肉、鸡肉、驴肉按 10% 混合后,均能检出,不同物种肉组织成分和 DNA 均不影响本方法的检测。

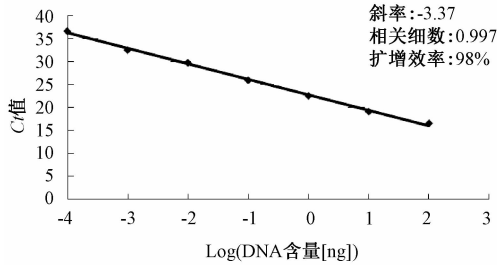
猪肉制作肉丸人工模拟肉制品,经过粉碎、高温烘烤、蒸煮等处理,试验结果均为检出,肉制品的加工处理工艺不影响本方法的检测。

猪肉与常见的肉制品混合试验,猪肉成分均为检出,结果见表 1。常见的肉制品中淀粉、大豆蛋白、油脂、盐和调料以及不同处理工艺如发酵、熏烧等造成的复杂成分均不影响本方法的检测。



注:1. 貉;2. 貂;3. 狗;4. 鸡;5. 鸭;6. 猫;7. 猪;8. 鹌鹑;狐、牛、羊、驴、兔、鹅、马以及空白对照未检测到信号

图1 PCR 特异性扩增曲线  
Figure 1 Specificity of PCR



注:DNA 含量单位为 ng

图2 模板 DNA 含量与 Ct 值的相关线性图  
Figure 2 Relationship between the amount of template DNA in the assay and Ct values

表1 混合纯肉样品以及肉制品的检测结果

Table 1 Results of of the assay in kinds of meat products

肉制品种	主要肉成分	样品数/份	检测结果
腌腊肉	猪	2	检出
酱卤肉	鸡	2	检出
熏烧焙烤肉制品	羊	2	检出
	鸭	2	检出
干肉制品	牛	2	检出
	猪	2	检出
油炸肉制品	鸡	3	检出
	猪	2	检出
肠类肉制品	猪	10	检出
	牛	2	检出
	鸡	2	检出
	鱼	2	检出
火腿肉制品	猪	2	检出
调制肉制品	猪	6	检出
	鸡	2	检出

加没有经济利益和必要,在大比例添加的情况下,检测到猪肉成分的荧光信号会很明显,而且判断经得起推敲。但不同的肉制品,由于主要成分存在差别,可能存在的 PCR 抑制剂等因素,影响 DNA 的含量和扩增效率, Ct 值差异会比较,因此建议在实际检测样品时,对扩增体系须进行质量控制,设置阳性对照、阴性对照、空白对照以及内参基因对照。以猪肉提取的 DNA 为阳性对照,以已知不含有猪源性成分样品提取的 DNA 为阴性对照,以灭菌双蒸水为空白对照,以真核生物 18S rRNA 基因为内参基因<sup>[6]</sup>。样品和对照均设置两个平行的反应体系。一个有效的试验应满足空白对照和阴性对照无荧光对数增长,对应的 Ct 值 > 40; 阳性对照和内参对照有荧光对数增长,且出现典型的扩增曲线,对应的 Ct 值 < 30。在符合以上条件的情况下,被检测样品如果 Ct 值 ≤ 35, 则判定为阳性; 如果 Ct 值 ≥ 40, 则判断为阴性; 在 35 < Ct 值 < 40 时, 需要重复试验, 如果 Ct 值仍然 < 40, 则判定为阳性, 如果 Ct 值仍然 ≥ 40 判断为阴性。

中国是世界上貂、狐、貉最大的养殖国家<sup>[7]</sup>, 目前国内的毛皮动物养殖方式主要为农户家庭养殖为主, 仍然缺乏统一规范的流通监督管理。貉作为毛皮动物的主要品种, 目前我国貉的饲养量有 1 800 万只, 以经济价值较高的乌苏里貉为主, 主要分布在河北、山东、辽宁、吉林、黑龙江和内蒙古等地<sup>[8]</sup>。在毛皮动物养殖不断繁荣的同时, 所带来的副产物处理问题也摆在面前。一只成年的貉体重在 6 ~ 10 kg<sup>[9]</sup>, 据河北省毛皮产业协会统计 2014 年中国貉取皮数量在 1 400 万张左右<sup>[10]</sup>, 由此附带的动物尸体的流向却很少获得关注, 这其中蕴含着巨大的风险。因此, 需要建立一套毛皮动物肉掺假快速检测技术, 以保证食品安全。目前毛皮动物源性成分的鉴定研究报道较少, 无高通量筛选技术手段。毛皮动物基于荧光 PCR 的物种鉴定方法很少, 近两年虽出台了貉和狐狸的检测标准方法<sup>[6, 11]</sup>, 但对于体型大、产肉量高的貉源性成分检测较少报道, 鲜见实时荧光 PCR 的鉴定方法。

PCR 技术因其高效快速、操作简便、特异性强等特点, 已被广泛应用于动物源性成分的检测。实时荧光 PCR 检测具有快速、简便、环保的优点, 近年来获得较广的推广<sup>[12]</sup>。本研究建立的 RT-PCR 方法, 适用于生鲜肉及常见肉制品中貉源性成分的检测, 在食品中动物源性成分的快速检测方面具有良好的应用前景。

参考文献

[ 1 ] 孙艳华, 张智禹, 牛晋阳, 等. PCR 法检测肉制品中肉类来源的灵敏度研究[J]. 食品工业, 2010(3): 93-94.

3 讨论

猪肉属于肉中不应该存在的成分, 而且少量添

- [ 2 ] Rohman A, Sismindari, Erwanto Y, et al. Analysis of pork adulteration in beef meatball using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy[J]. Meat Science, 2011, 88(1):91-95.
- [ 3 ] Kesmen Z, Yetiman A E, Sahin F, et al. Detection of chicken and turkey meat in meat mixtures by using real-time PCR assays[J]. Journal of Food Science, 2012, 77(2):167-173.
- [ 4 ] Karabasanavar 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, 145(4):530-534.
- [ 5 ] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 26604—2011 肉制品分类[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [ 6 ] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T 3730.1—2013 食品及饲料中常见畜类品种的鉴定方法 第1部分: 貂成分检测 实时荧光 PCR 法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
- [ 7 ] 雒霞. 持续推进文明饲养和改善动物福利——中国毛皮动物福利进展情况新闻发布会在京举行[J]. 西部皮革, 2015(10):55.
- [ 8 ] 杨文慧. 貉的饲养管理与疾病防治[J]. 现代畜牧科技, 2015(4):29.
- [ 9 ] 刘志恒. 貉的饲养技术[J]. 农村养殖技术, 2006(1):27.
- [ 10 ] 河北省毛皮产业协会. 中国貂、狐、貉取皮数量权威发布引导毛皮养殖行业科学发展[J]. 特种经济动植物, 2015(9):15.
- [ 11 ] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T 3730.3—2013 食品及饲料中常见畜类品种的鉴定方法 第3部分: 狐狸成分检测 实时荧光 PCR 法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
- [ 12 ] 钱云开, 王海洋, 肖艳霞, 等. 多重 PCR-变性高效液相色谱快速检测单核细胞增生李斯特菌毒力基因方法的建立[J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(2):141-145.

## 实验技术与方法

# 凯氏蒸馏-电子滴定器碘滴定法测定食品中的二氧化硫

毛琏, 王娣, 张兰天, 张雷雷, 张斌, 石伟杰

(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:**目的 利用凯氏蒸馏仪前处理和电子滴定器滴定检测样品中的二氧化硫残留量, 分析食品中二氧化硫残留量的含量水平。方法 对 29 类 1 125 份样品中的二氧化硫残留量进行蒸馏、滴定检测, 进一步研究该方法的检出限、精密度和加标回收率, 并对检测数据进行分析。结果 凯氏蒸馏-电子滴定器碘滴定法的检出限为 0.010 g/kg, RSD 为 2.4% ~ 5.1%, 加标回收率为 87.0% ~ 99.6%, 1 125 份样品中, 20.8% (234/1 125) 检出二氧化硫, 19.1% (215/1 125) 检出但未超二氧化硫最大允许使用量。结论 凯氏蒸馏-电子滴定器碘滴定法快速、准确, 适用于食品中二氧化硫残留量的检测; 个别样品如蜜饯、饼干、粉条、海米中的二氧化硫残留量数据异常, 高于我国最大允许使用量, 存在一定的食品安全隐患。

**关键词:** 二氧化硫; 残留量; 凯氏蒸馏仪; 电子滴定器; 食品; 食品添加剂; 检测

中图分类号: R155 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2016)05-0605-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2016.05.010

## Detection and analysis of the residue of sulphur dioxide in food

MAO Lian, WANG Di, ZHANG Lan-tian, ZHANG Lei-lei, ZHANG Bin, SHI Wei-jie

(Hebei Food Safety Key Laboratory, Hebei Food Inspection and Research Institute, Hebei Shijiazhuang 050091, China)

**Abstract: Objective** Using Kjeldahl distiller pretreatment and electronic titrator titration to determine sulfur dioxide residue in samples, and analyze the content of sulphur dioxide in food. **Methods** According to the distillation and titration of sulfur dioxide residue from 1 125 samples of 29 kinds, detection limit, precision and standard recovery of this method were further studied and test data were analyzed. **Results** The detection limit of Kjeldahl distillation-electronic titration iodine titration method was 0.010 g/kg, with RSD of 2.4% -5.1% and standard recovery of 87.0% -99.6%.

收稿日期: 2016-03-09

基金项目: 河北省科技计划项目 (12275535); 河北省食品药品监督管理局科技计划项目 (PT2014004)

作者简介: 毛琏 女 工程师 研究方向为食品理化分析及食品安全风险监测 E-mail: maolian7104@126.com

通信作者: 王娣 女 工程师 研究方向为食品安全与卫生检验 E-mail: wangdixn@163.com