

## 实验技术与方法

## 肉制品中牛源性成分芯片数字 PCR 定量检测方法的建立

邓迎春,郭旭光,苏利霞,陶健

(河南省食品和盐业检验技术研究院 国家市场监管重点实验室(食品安全快速检测与智慧监管技术),  
河南 郑州 450003)

**摘要:**目的 为了对肉制品中牛肉源性成分进行准确定量,本文采用数字 PCR(dPCR)技术对牛肉的线粒体 *Cytb* 基因进行定量检测,根据基因拷贝数建立了肉制品中牛肉源性成分 PCR 的定量检测方法。方法 参照标准设计的牛源性特异性引物、探针,猪源性特异性引物、探针,鸭源性特异性引物、探针以及动物源性成分通用引物、探针,建立了双重数字 PCR 体系。结果 在一定范围内生鲜牛肉质量与 DNA 含量、DNA 含量与 DNA 拷贝数之间均呈现明显的线性关系,并以 DNA 含量为中间值计算出 DNA 拷贝数(C)与生鲜牛肉质量之间的换算公式: $M_{\text{牛}}=0.0209C+0.676$ 。应用建立的 dPCR 方法对构建的肉样模型进行检测,结果显示牛肉定量检测值与实际质量基本一致,且受外源物种的干扰小。运用该方法对抽取的 10 份市售牛肉样品检测,同时通过特异/通用引物扩增的拷贝数之比(%)辅助判断肉制品中是否存在非牛源性的其他动物源性成分掺假,检测出部分样品不符合标签规定。结论 该方法可实现对牛源性成分的量化检测,能够作为区分故意添加和无意污染的依据,为执法监管部门提供有力的技术保障。

**关键词:**牛源性成分;芯片数字 PCR;肉制品;拷贝数;定量检测

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2024)05-0533-08

DOI:10.13590/j.cjfh.2024.05.004

## Quantitative detection methods of bovine-derived ingredients in meat product by chip digital PCR

DENG Yingchun, GUO Xuguang, SU Lixia, TAO Jian

(He'nan Food and Salt Industry Inspection Technology Research Institute Key Laboratory of Food Safety  
Quick Testing and Smart Supervision Technology for State Market Regulation, He'nan  
Zhengzhou 450003, China)

**Abstract: Objective** In order to accurately quantify the proportion of bovine-derived ingredients in meat products, the Mitochondrial *Cytb* gene of bovine for quantitatively detection of bovine ingredients by the digital PCR (Dpccr) technology was developed in this paper. **Methods** This duplex digital PCR was developed and optimized by designing bovine-derived specific, duck-derived specific, porcine-derived specific and animal-derived universal primers and probes according to standards. **Results** Good linear relationships between the raw beef meat weight and DNA content and between the DNA content and DNA copy number. By using the dPCR method, we found good linear relationships between the raw meat weight and DNA content and between the bovine-derived DNA content and DNA copy number. Using the DNA content as an intermediate value, we established the following formulae for calculating the weight of the original raw beef meat from the specific DNA copy number:  $M_{\text{beef}}=0.0209C+0.676$ . The mixed samples of known bovine quality were tested, and the results showed that the method can accurately quantify bovine-derived ingredients, which has little interference by foreign species. Using this method to test 10 samples of the bovine-derived products on the market, by using the ratio of universal and specific amplified copy number, it could determine whether other animal-derived components were present in the beef meat product. It was found that the content of some samples was not up to standard. **Conclusion** This method can realize the quantitative detection of bovine origin components, which can be used as a basis to distinguish intentional addition from unintentional pollution and provide a strong technical guarantee for law enforcement and supervision departments.

**Key words:** Bovine-derived ingredients; chip digital PCR; meat products; copy number; quantitative detection

收稿日期:2023-05-06

基金项目:河南省市场局科技项目(2022sj21);河南省科技计划项目(222102410011)

作者简介:邓迎春 女 高级工程师 研究方向为食品检验 E-mail:dengyingchun@126.com

通信作者:陶健 男 正高级工程师 研究方向为食品检验 E-mail:369694930@qq.com

据调查,目前市场上牛羊肉及肉制品的掺假现象层出不穷,掺假手段五花八门<sup>[1-2]</sup>,如将鸭肉、猪肉等低价肉掺入牛羊肉等高价肉中;速冻调理肉制品中标签标识与品种不符,各成分占比不吻合;甚至用口感和观感像肉的非肉成分如淀粉、大豆蛋白等制作劣质肉丸;以及加工过程中添加香精等掺假行为欺诈消费者以牟取暴利。因此,对食品中原料肉进行掺假、掺杂检验显得十分必要,亟须建立准确可靠的检测方法来维护广大消费者切身利益,维护社会市场秩序。

近年来,食品检验机构在检测肉类掺假时一般采用第二代 PCR 技术——实时荧光 PCR 技术,该技术通过在扩增过程中实时采集反应体系的荧光信号,利用扩增曲线的循环阈值(CT)可准确地对肉源成分进行定性,但在定量方面却有着很大的局限性。由于实时荧光 PCR 技术在定量时完全依赖于标准曲线的线性关系,只能对一定范围内低含量的样本实行相对定量,且定量的准确性易受到样品的扩增效率或样品基质抑制等因素的影响,无法实现对掺假样品的绝对定量,尤其是当多种肉类成分同时检出时,无法准确定量出各自的占比<sup>[3-7]</sup>。

数字 PCR 技术作为第三代 PCR 技术,与实时荧光 PCR 技术相比,可以实现单分子层面上的绝对定量,数字 PCR 技术主要包括微孔板数字 PCR 法、微流控芯片数字 PCR 法和微滴数字 PCR 法<sup>[8-13]</sup>。微流控芯片数字 PCR 法是在有限稀释模式下,将反应液通过微流控等技术均匀导入芯片上的 2 万个独立的反应仓或通孔中进行 PCR 反应,根据泊松分布和荧光信号阳性的反应单元占总反应单元的比例来计算目标核酸序列拷贝数<sup>[14]</sup>。由于目的序列被分配到多个反应仓中,显著降低了体系间的影响以及背景序列和抑制因素对反应的干扰,扩增基质效应大大减小,可以解决目前食品检测机构在实际样本检测中只能定性,无法精准定量的问题。本

文将牛肉及其制品作为研究对象,利用微流控芯片数字 PCR 技术,建立牛肉及其制品的定量检测方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 肉及其制品

鸡、鸭、鹅、牛、羊、猪、马、驴等肉源为本实验室冻存组织标本;牛肉干、牛肉丸、牛肉卷(片)、牛肉松、牛肉火腿制品等为本机构抽检样品。

### 1.2 主要仪器与试剂

高通量实时荧光定量 PCR 仪(QuantStudio 7 Flex)、数字 PCR 仪(QuantStudio Absolute Q Digital PCR System)(美国 Thermo Fisher 公司);台式高速冷冻离心机(4-16KS,美国 sigma 公司);超微量核酸蛋白分析仪(美国 PULTON 公司);生物安全柜(新加坡艺思高科技有限公司);恒温混匀仪(珠海黑马医学仪器有限公司)。

动物组织基因组 DNA 提取试剂盒(T004S2021 0509,广州迪奥生物科技有限公司),5×AbQ master mix 混合液、微滴反应芯片、微滴发生盖、dPCR 机油(美国 Thermo Fisher 公司),2×TaqMan Fast qPCR Master Mix、牛源引物和探针、猪源引物和探针、鸭源引物和探针、内参照真核生物 18S rRNA 引物和探针(生工生物工程(上海)股份有限公司合成)。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 牛、猪、鸭源性成分引物和探针设计

采用 Taqman 探针法,参照标准 SB/T 10923—2012《肉及肉制品中动物源性成分的测定 实时荧光 PCR 法》<sup>[15]</sup>,以 GenBank 上公布的牛、猪、鸭线粒体上 *Cytb* 基因序列为模板,设计并合成各自的特异性引物及探针,对特定的基因序列进行扩增,真核生物 18S rRNA 内参照检测用引物(对)序列参照标准 SN/T1204—2016<sup>[16]</sup>,所有引物探针均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,序列见表 1。

表 1 引物探针序列表

Table 1 Sequences of primers and probes

畜禽种类	引物探针序列(5'→3')	扩增片段大小/bp
牛	FP: CTCCTCGGAGACCCAGATAAC	79
	RP: AGAAGTATCACTCGGGTTTG	
	Probe: VIC - CCAGCCAATCCACTCAACACACCC -NFQ	
猪	FP: CGACAAAGCAACCCTCACAC	71
	RP: TGCGAGGGCGGTAATGAT	
	Probe: TAMRA - CTTGCGCTTCCACTTTATCCTGCCATTC-NFQ	
鸭	FP: GGCCACACAAATCCTCACAG	85
	RP: TGTGTTGGCTACTGAGGAGAAA	
	Probe: FAM - CCTACTGGCTATGCACTACACCGCAGAC-NFQ	
18S rRNA	FP: CCTGAGAAACGGATACCA	65
	RP: CGTGTACAGATTGGGTAAT	
	Probe: FAM - TGCCGCGCTGCTGCCTTCCT-NFQ	

### 1.3.2 样品前处理及DNA提取

准确称取新鲜待测样品,于液氮罐中速冻,取出后快速用研钵粉碎研磨成粉,加入消化液消化过夜,加入裂解液,按照试剂盒说明书进行样品处理、核酸提取,不同肉类分开处理,防止样品间交叉污染。运用核酸蛋白分析仪对提取的DNA进行测定,保证OD260/OD280在1.8~2.0之间,浓度在10~100 ng/ $\mu$ L之间,将其稀释至适宜的浓度用于数字PCR扩增。

### 1.3.3 牛、猪、鸭源性成分实时荧光qPCR方法的建立

以提取的牛肉、猪肉、鸭肉基因组DNA为模板,分别用对应的引物和探针进行扩增,同时扩增真核生物内参照引物和探针,设置2个平行,总反应体系为25  $\mu$ L,各成分比例如下:2 $\times$ TaqMan Fast qPCR Master Mix 10  $\mu$ L,上游引物(10  $\mu$ mol/L)、下游引物(10  $\mu$ mol/L)、探针(10  $\mu$ mol/L)各1  $\mu$ L, DNA模板(10~100  $\mu$ g/ $\mu$ L)5  $\mu$ L,用ddH<sub>2</sub>O补充至25  $\mu$ L。反应程序:95  $^{\circ}$ C预变性10 min,95  $^{\circ}$ C变性15 s,60  $^{\circ}$ C退火及延伸60 s,40个循环。扩增分别选择VIC通道、TAMRA通道、FAM通道并在退火步骤检测荧光信号。

### 1.3.4 牛、猪、鸭源性成分dPCR方法的建立

以提取的牛肉、猪肉、鸭肉基因组DNA为模板,采用设计的相对应的引物和探针建立dPCR方法。反应体系为10  $\mu$ L:5 $\times$ AbQ master mix混合液2  $\mu$ L,上游引物(10  $\mu$ mol/L)和下游引物(10  $\mu$ mol/L)各0.9  $\mu$ L、探针(10  $\mu$ mol/L)0.5  $\mu$ L、DNA模板2  $\mu$ L(0.01~0.1 ng/ $\mu$ L)、补水至10  $\mu$ L。将配制好的反应体系取9  $\mu$ L倾斜45 $^{\circ}$ 上样至芯片中,加15  $\mu$ L dPCR机油密封,盖上微滴发生盖放入仪器中进行扩增。dPCR反应条件:96  $^{\circ}$ C预变性10 min;96  $^{\circ}$ C变性15 s,62  $^{\circ}$ C退火及延伸60 s,50个循环;分别选择VIC通道、TAMRA通道、FAM通道检测,收集微滴信号,读取阳性微滴数和阴性微滴数进行分析。

#### 1.3.4.1 DNA上机浓度的优化

鉴于数字PCR的高灵敏性,以核酸蛋白分析仪所测定的100 ng/ $\mu$ L牛DNA为初始浓度进行系列稀释,分别进行10、1 000、10 000、100 000倍稀释后,摸索最适宜dPCR检测的核酸浓度范围。

#### 1.3.4.2 dPCR退火温度优化

为考察扩增退火温度对读取拷贝数定量结果的影响,采用不同的退火温度进行试验,以优化dPCR反应。以2 ng/ $\mu$ L牛DNA为模板,PCR反应条件:96  $^{\circ}$ C预变性10 min;96  $^{\circ}$ C变性15 s退火、延伸于不同的退火温度58  $^{\circ}$ C、60  $^{\circ}$ C、62  $^{\circ}$ C、64  $^{\circ}$ C,1 min,

共50个循环;升降温速率为1  $^{\circ}$ C/s。

### 1.3.5 双重dPCR反应体系的建立

以提取模拟样本或实际样本DNA为模板,采用牛源性引物、探针和动物源性通用型引物、探针同时扩增,双重dPCR反应体系构成及配比参照1.3.4所述方法,引物探针浓度均为10  $\mu$ mol/L,总反应体系为10  $\mu$ L。按照1.3.4所述方法进行扩增,收集VIC信号和FAM信号进行分析。

### 1.3.6 牛肉质量与拷贝数换算公式的确定

#### 1.3.6.1 肉样质量与DNA含量的关系

为考察牛肉质量与DNA含量之间的相关性,分别称量10个质量梯度的牛肉质量依次为5、10、15、20、25、30、35、40、45、50 mg,同一浓度平行称量3份,动物组织DNA提取试剂盒提取基因组DNA后,运用核酸蛋白分析仪测定每个牛肉样品基因组DNA的浓度,每个梯度3个重复,分别计算其平均值,使用Excel拟合肉样质量与DNA含量的关系,绘制DNA浓度与拷贝数浓度之间的标准曲线。

#### 1.3.6.2 DNA含量与拷贝数的关系

为摸索DNA含量与DNA拷贝数之间的关系,鉴于数字PCR高灵敏性,在dPCR检测最高核酸质量浓度范围内,需要将提取的牛肉DNA进行1:10 000倍稀释(梯度稀释),对1.3.4.1中10个DNA质量浓度梯度进行检测和分析,每个体系的有效独立反应仓应至少应高于20 000个,以满足泊松统计的需求,记录有效的拷贝数浓度(C),分析DNA含量与拷贝数之间的关系,每个梯度重复3次,绘制DNA含量与DNA拷贝数之间的标准曲线。

#### 1.3.6.3 拷贝数相对含量的计算

通过同时采集双通道拷贝数比值计算样品中牛源性成分在动物源性成分中的拷贝数相对含量,公式如下:拷贝数相对含量/%=特异性引物扩增拷贝数/通用性引物扩增拷贝数 $\times$ 100%。

### 1.3.7 dPCR定量方法的抗干扰及适用性实验

#### 1.3.7.1 dPCR的抗干扰实验

为验证所建dPCR方法对外源性物种的抗干扰性,分别对已知牛源性成分含量的模拟混合肉样进行检测。分别称量不同质量的牛肉与猪肉制成9个质量分数(5%~95%)的混合样品,同时选取鸡肉、鸭肉、鹅肉、羊肉、驴肉、马肉6种肉样与牛肉按照1:1的质量比制成两两混合样品的二重dPCR模拟体系,以及构造牛肉、猪肉和鸭肉按照2:2:1、1:2:3多肉样混合的dPCR模拟体系,构建总质量均为50 mg。按1.3.2的方法提取混合肉样DNA,进行1:10 000倍稀释后,取2  $\mu$ L进行dPCR扩增检

测,样品测定设置3个平行取平均值,将DNA拷贝数值代入肉样质量与拷贝数关系式中计算肉样质量。

### 1.3.7.2 实际样品的检测

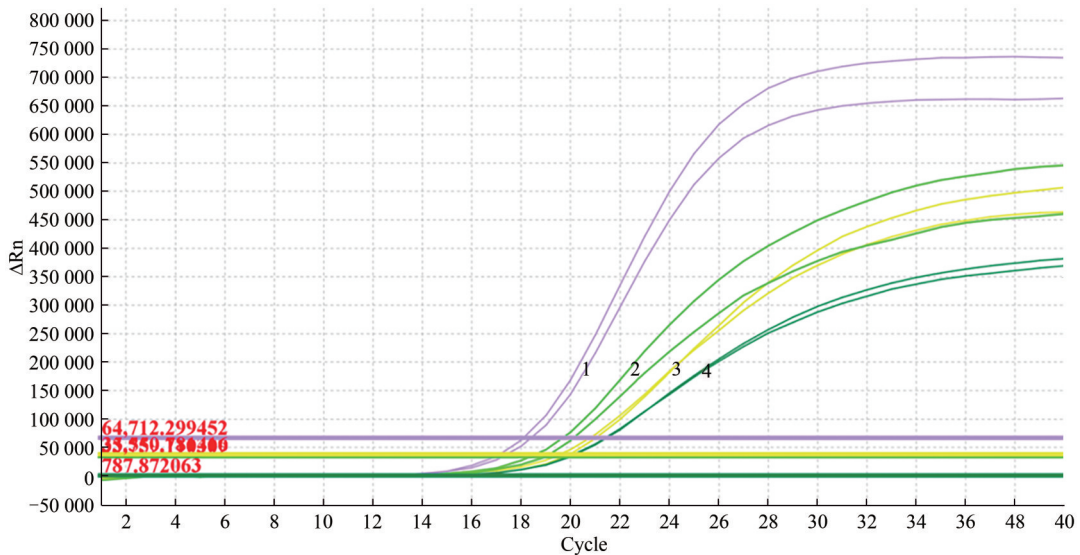
实测样品主要来自市、县药品监督管理局及公安机关抽检的样品,部分为网抽样品,样品类型主要包括肥牛卷、牛肉丸、牛排等速冻调理肉制品,用组织匀浆机匀浆成粉末状后称取质量50 mg按1.3.2方法提取混合肉样DNA,先按照1.3.3方法用实时荧光PCR进行定性检测,再经过1:10 000倍稀释后,取2 μL DNA进行dPCR检测,用建立的dPCR方法对肉制品中牛源的质量

进行测定。通过扩增双通道中特异性引物与通用性引物的扩增拷贝数之比,得到的拷贝数相对含量,进一步验证所建方法的准确性和实际应用能力。

## 2 结果

### 2.1 牛、猪、鸭源性成分及18S rRNA实时荧光PCR方法的建立

分别以牛、猪、鸭DNA作为模板,采用各自特异性引物和探针,同时将动物通用性引物和探针进行扩增,结果见图1,牛、猪、鸭及18S rRNA均有很好的“S”形扩增曲线。



注:1为牛源性成分;2为18S rRNA;3为猪源性成分;4为鸭源性成分

图1 肉源成分实时荧光定量PCR扩增曲线

Figure 1 The amplification curves of the meat ingredients in the Real-Time fluorescence quantitative PCR

### 2.2 dPCR扩增条件优化

#### 2.2.1 DNA上机浓度的优化

当对所提取的100 ng/μL牛DNA样本进行1:10、1:1 000、1:10 000、1:100 000倍稀释后,结果见图2,显示1:10稀释由于浓度太高不能有效地区分阴性和阳性反应仓点数,1:1 000阳性反应仓点数过于密集,而进行1:100 000倍稀释后阳性反应仓点数又过于稀疏,相比之下将样本进行1:10 000稀释时阴性和阳性反应仓点数分配均匀,能取得良好的结果,因此1:10 000为最佳稀释度。

#### 2.2.2 dPCR退火温度优化

当退火温度分别为58℃、60℃、62℃、64℃时,检测结果如图3所示,所有退火温度均能有效区分阴性和阳性反应仓点数,但当温度在62℃时,处于阴性和阳性中间地带的点数最少,因此选择62℃作为最佳退火温度。

### 2.3 牛肉质量与拷贝数换算公式的确定

#### 2.3.1 肉样质量与DNA含量的关系

结果显示牛肉质量范围为5~50 mg时,牛肉的质量与其所测定的DNA含量之间有明显的线性关系: $y=5.0213x-2.160$ 。其中 $x$ 代表牛肉的质量/mg; $y$ 代表所测得的DNA含量/(ng/μL),结果见图4。

#### 2.3.2 DNA含量与拷贝数的关系

结果显示核酸的浓度在0.0069~0.0512 ng/μL范围内与拷贝数呈明显的线性相关性,即 $y=9538.8x-11.792$ ,其中 $x$ 代表所加模板DNA总量/ $10^{-3}$  ng; $y$ 代表所测得的DNA拷贝数/(conc. cp/μL),当牛肉质量低于5 mg时,DNA含量与DNA拷贝数之间无明显的线性关系,故将该方法的定量限确定为5 mg,结果见图5。

#### 2.3.3 肉样质量与拷贝数换算公式的确定

根据牛肉质量与所提取DNA含量之间的线性关系式 $y=5.0213x-2.160$ ,以及DNA含量与所测定

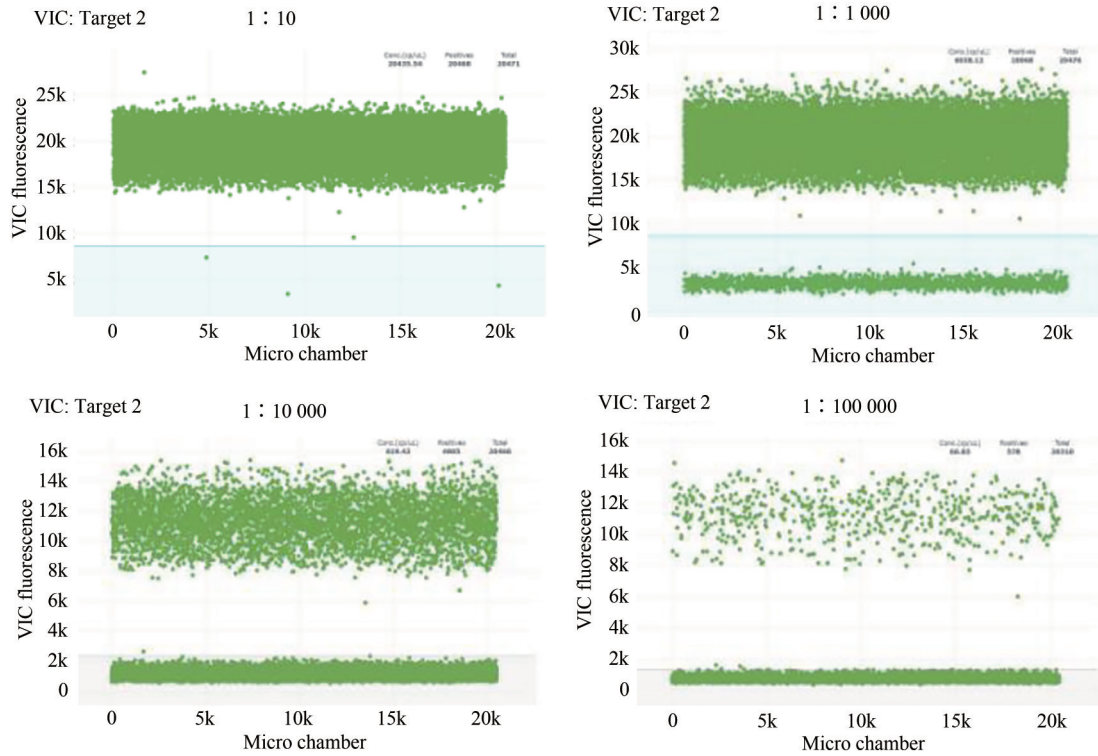


图2 不同DNA稀释浓度下双重数字PCR拷贝数散点图

Figure 2 Scatter plot of dPCR copies at different DNA dilution concentration

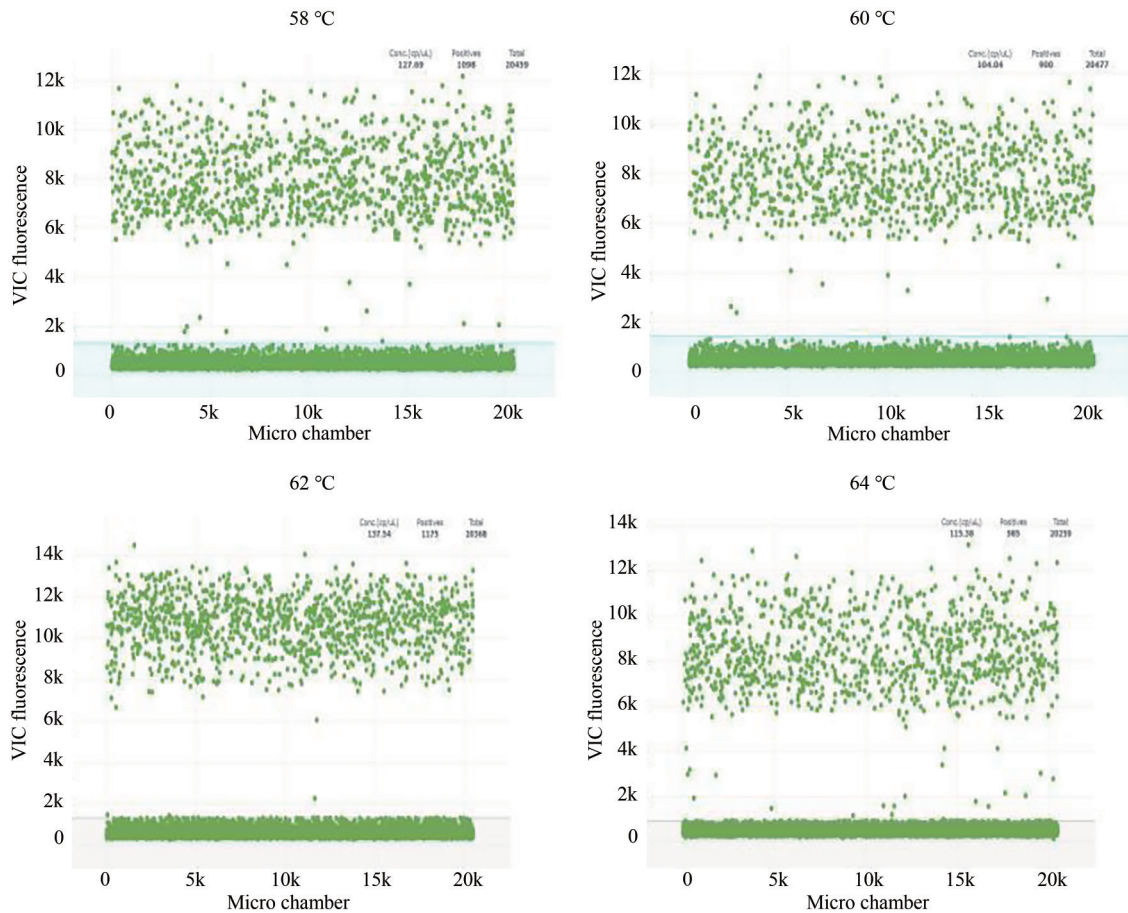


图3 不同退火温度下双重数字PCR拷贝数散点图

Figure 3 Scatter plot of dPCR copies at different annealing temperatures

DNA 拷贝数之间的线性关系式  $y=9\ 538.8x-11.792$ , 选择 DNA 含量作为中间值,计算肉样的质量与拷贝

数之间的关系,最终推导出公式  $M=0.020\ 9C+0.676$ , 其中 C 代表每微升的 DNA 拷贝数( $\text{conc. cp}/\mu\text{L}$ ); M

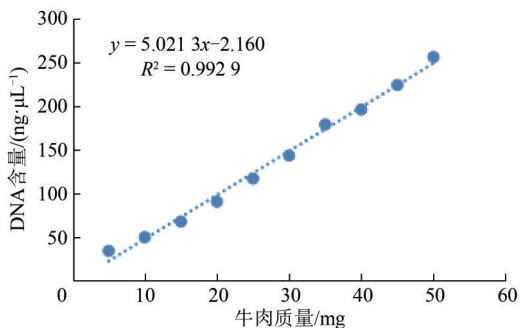


图4 牛肉的质量与DNA含量的关系

Figure 4 Linear relationship between meat quantity and nucleic acid content of beef

代表肉样的质量/mg,通过此方程式来达到通过测定DNA拷贝数来计算原始肉样质量的目的。

#### 2.4 dPCR定量方法的抗干扰及适用性实验

##### 2.4.1 dPCR的抗干扰实验

结果显示牛肉与猪肉混合样品中,当牛肉掺杂量在10%~30%时,拷贝数相对含量与实际含量偏差较大,但随着牛肉含量的上升,差距逐渐缩小并趋于稳定。当牛肉与其他肉类同比例混合时,除牛

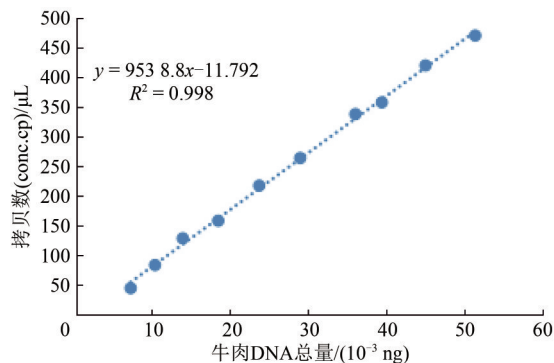


图5 牛肉DNA含量与DNA拷贝数的关系

Figure 5 Linear relationship between nucleic acid content and DNA copy number of beef

肉与马肉各拷贝数相对含量与实际含量偏差较大外,其余样品与实际含量基本一致(表2),表明所建立的dPCR方法具有一定的抗干扰能力。但当牛肉、猪肉、鸭肉3种肉源混合时,牛源拷贝数相对含量明显低于理论值,可能是由于提取到的可参与通用性引物扩增的核酸含量高于牛肉的核酸含量,从而导致通用引物的拷贝数相对提升较多。

表2 已知的混合成分及比例肉样的dPCR定量分析

Table 2 Results of quantification of samples with known concentration

混合的非牛源性物种	非牛源性成分质量/mg	牛肉质量/mg	牛源拷贝数/(conc.cp/μL)	牛肉定量检测值/mg	定量检测值相对偏差/%
猪	45	5	66.95	5.30	6.0
猪	40	10	105.87	9.35	-6.5
猪	35	15	167.84	15.80	5.3
猪	30	20	203.54	19.51	-2.5
猪	25	25	251.32	25.87	-2.1
猪	20	30	311.17	30.70	2.3
猪	15	35	361.23	35.91	2.6
猪	10	40	392.98	39.21	-2.0
猪	5	45	455.26	45.69	1.5
鸡	25	25	260.75	25.46	1.8
鸭	25	25	260.23	25.40	1.6
鹅	25	25	253.38	24.69	-1.2
马	25	25	263.49	25.74	3.0
驴	25	25	251.76	24.52	-1.9
样1(猪、鸭)	30	20	179.29	16.99	-15.1
样2(猪、鸭)	40	10	74.81	6.12	-38.8

##### 2.4.2 实际样品的检测

利用本研究建立的双重dPCR方法,对于成分复杂、肉种多样的市售肉及肉制品进行定量鉴定,qPCR定性检测结果、dPCR定量检测结果以及通过扩增双通道中特异性引物与通用性引物的扩增拷贝数之比,得到的拷贝数相对含量见表3。排除超市加工环节或者样品流通中的无意污染造成的误差,发现2批牛肉丸和1批肥牛卷存在掺假现象,其余样品均基本符合产品标注。

### 3 讨论

在数字PCR技术的应用中,国内学者进行了积

极的探索,如熊苏玥等<sup>[17]</sup>、苗丽等<sup>[18-19]</sup>、张秀平等<sup>[20]</sup>采用建立标准曲线法,通过肉制品质量、核酸含量以及核酸含量与基因拷贝数关系式的两步转换,将样本基因拷贝数换算为肉制品质量,该方法有良好的准确性;任君安等<sup>[21]</sup>、刘立兵等<sup>[22]</sup>通过计算单位质量不同肉源之间基因拷贝数之比这一固定值,无须两步转换即可计算相对质量占比,该方法简单易操作,具有很好的借鉴性。

本文所建立的检测体系主要着眼于市售牛肉及牛肉制品,通过芯片数字PCR分析了鲜牛肉的质量与拷贝数的关系,发现牛肉质量与DNA含量、DNA含量与DNA拷贝数之间均具有明显的线性关

表3 市售肉样品的dPCR定量分析

Table 3 Results of quantification of samples from local supermarket

序号	样品名称	牛肉	猪肉	鸭肉	牛源拷贝数/(conc.ep/ $\mu$ L)	18S rRNA 拷贝	检测牛肉总	检测牛肉拷贝数	产品标注成分
						数/(conc.ep/ $\mu$ L)	占比/%	相对含量/%	
1	牛肉丸1	检出	检出	检出	130.26	455.58	23.77	28.6	牛肉、猪肉、鸭肉
2	牛肉丸2	检出	检出	未检出	140.20	461.76	25.84	30.4	牛肉及配料
3	牛肉丸3	检出	未检出	未检出	416.24	438.66	83.26	94.9	牛肉及配料
4	肥牛卷1	检出	未检出	未检出	488.72	498.71	98.33	98.0	仅牛肉
5	肥牛卷2	检出	检出	未检出	280.40	492.42	55.00	56.9	仅牛肉
6	肥牛卷3	检出	未检出	未检出	464.28	472.93	93.25	97.3	仅牛肉
7	肥牛卷4	检出	未检出	未检出	451.88	484.27	90.67	93.3	仅牛肉
8	牛排1	检出	未检出	未检出	485.61	489.20	97.69	99.3	仅牛肉
9	牛排2	检出	未检出	未检出	470.94	482.11	94.64	97.7	仅牛肉
10	牛排3	检出	未检出	未检出	475.64	480.20	95.61	99.1	仅牛肉

系,从而建立了生鲜牛肉质量与DNA拷贝数之间的换算公式,并通过模拟样本及实际样本验证了该方法的可行性。

但在实际运用过程中发现,当牛肉与鸡肉、鸭肉及猪肉等不同物种混合时,不同原料肉在相同的样品质量下,其DNA拷贝数之比并不能完全对应其组分的质量比,可能是由于不同种属的肉源肌肉细胞数乃至DNA提取效率不相同所导致。另外,相同种属的肉源样品DNA也受其他各种因素的影响,如牛的性别、年龄、部位及加工过程所采用的加工工艺、配料(增稠剂、防腐剂等)等,都会导致DNA得率存在差异,该结论与熊苏玥等<sup>[17]</sup>、杨华等<sup>[23]</sup>、纪艺等<sup>[24]</sup>的研究结果一致。同时,实际加工过程中的部分牛肉制品可能含有淀粉、大豆蛋白、香辛料、添加剂等成分,这些成分的存在可能会导致18S rRNA拷贝数增多,从而会对最终的定量结果产生影响。因此,目前还不能通过对样品中不同肉源性成分的DNA拷贝数比来绝对定量出其组分的具体质量比,数字PCR检测方法仍存在对部分多重掺假肉不能精准定量的不足之处,需进一步地研究和探索。

## 参考文献

- [1] 金萍,丁洪流,李培,等. 2013年苏州地区肉及其制品掺假情况调查. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(2): 168-172.  
JIN P, DING H L, LI P, et al. Analysis of meat products adulterated in Suzhou area in 2013[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2014, 26(2): 168-172.
- [2] 唐穗平,张燕,黄景辉. 广东省牛羊肉及其制品中掺杂掺假情况的调查分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(5): 1882-1886.  
TANG S P, ZHANG Y, HUANG J H. Analysis of beef and lamp products adulteration in Guangdong Province [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2016, 7(5): 1882-1886.
- [3] 胡馨予,黄朱梁,汤海凤,等. 基于PCR技术的肉类成分溯源鉴定方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(11): 3385-3390.

HU X Y, HUANG Z L, TANG H F, et al. Research progress in species identification methods of meat ingredients based on PCR technology[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(11): 3385-3390.

- [4] KANG T S, TANAKA T. Comparison of quantitative methods based on SYBR Green real-time qPCR to estimate pork meat adulteration in processed beef products [J]. Food Chemistry, 2018, 269: 549-558.[LinkOut]
- [5] 彭媛媛,武焯,陶晓奇. 实时荧光PCR技术定量检测肉类掺假的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(15): 279-287.  
PENG Y Y, WU X, TAO X Q. Quantitative detection of meat adulteration by real-time fluorescent PCR [J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(15): 279-287.
- [6] 王金斌,李文,白蓝,等. 基于核酸分子学方法的肉类成分鉴别技术研究进展[J]. 食品科学, 2017, 38(11): 318-327.  
WANG J B, LI W, BAI L, et al. A review of current DNA-based methodologies for meat authentication [J]. Food Science, 2017, 38(11): 318-327.
- [7] 陈益春,牛海力,孔保华. 实时荧光定量PCR技术在肉及肉制品中的应用[J]. 食品工业科技, 2017, 38(17): 324-328.  
CHEN Y C, NIU H L, KONG B H. Application of quantitative real-time PCR in meat and meat products [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(17): 324-328.
- [8] 付莎莉,王利刚,张婧,等. PCR技术在动物源性成分检测中的应用[J]. 肉类工业, 2021, 10: 49-54.  
FU S L, WANG L G, ZHANG J, et al. Application of PCR in detection of animal-derived ingredients [J]. Meat Industry, 2021, 10: 49-54.
- [9] 张宜文,赵海波,吴红,等. 数字PCR在食品安全检测中的应用研究进展[J]. 分析测试学报, 2020, 39(5): 672-680.  
ZHANG Y W, ZHAO H B, WU H, et al. Progress on application of digital PCR in food safety detection [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2020, 39(5): 672-680.
- [10] LOU Y, CHEN C, LONG X, et al. Detection and quantification of chimeric antigen receptor transgene copy number by droplet digital PCR versus real-time PCR [J]. The Journal of Molecular Diagnostics, 2020, 22(5): 699-707.
- [11] LIANG Y J, GAO D W, DONG J, et al. A quantitative detection of mung bean in chestnut paste using duplex digital PCR [J]. Current Research in Food Science, 2022, 5: 34-40.
- [12] 朱扬,刘永峰,魏燕超,等. 牛肉及其中式加工品中猪肉成分定性、定量检测方法研究[J]. 中国农业科学, 2018, 51

- (22): 4352-4363.  
ZHU Y, LIU Y F, WEI Y C, et al. Qualitative and quantitative detection methods of pork in beef and its Chinese processing products[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2018, 51(22): 4352-4363.
- [13] 刘艳, 王鸣秋, 李诗瑶, 等. 基于实时荧光定量PCR和数字PCR的肉制品中牛源性成分检测[J]. *现代食品科技*, 2019, 35(7): 254-260.  
LIU Y, WANG M Q, LI S Y, et al. Detection of bovine components in meat products based on real-time fluorescence quantitative PCR and digital PCR[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2019, 35(7): 254-260.
- [14] 李慧调, 潘建章, 方群. 数字PCR技术的发展及应用[J]. *化学进展*, 2020, 32(5): 581-593.  
LI H D, PAN J Z, FANG Q. Development and application of digital PCR technology[J]. *Progress in Chemistry*, 2020, 32(5): 581-593.
- [15] 中华人民共和国商务部. 肉及肉制品中动物源性成分的测定 实时荧光PCR法: SB/T 10923—2012[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013.  
Ministry of Commerce of the People's Republic of China. Identification of animal derived materials in meat and meat products Real-time PCR method: SB/T 10923—2012[S]. Beijing: Standards Press of China, 2013.
- [16] 国家质量监督检验检疫总局. 植物及其加工产品中转基因成分实时荧光PCR定性检验方法: SN/T 1204—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.  
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Protocol of the real-time PCR method for detecting genetically modified plants and their derived products [S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.
- [17] 熊苏玥, 李家鹏, 李金春, 等. 一种基于双重ddPCR的肉制品中牛源性成分的定量分析方法[J]. *食品科学*, 2022, 43(24): 318-324.  
XIONG S Y, LI J P, LI J C, et al. Quantification of bovine-derived ingredients in meat products by duplex droplet digital polymerase chain reaction [J]. *Food Science*, 2022, 43(24): 318-324.
- [18] 苗丽, 张秀平, 陈静, 等. 微滴数字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.  
MIAO L, ZHANG X P, CHEN J, et al. Quantitative analysis of bovine and *Porcine* ingredients in meat products by droplet digital PCR[J]. *Food Science*, 2016, 37(8): 187-191.
- [19] 苗丽, 张秀平, 陈静, 等. 肉制品中羊源性成分微滴数字PCR法定量检测方法的研究[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(4): 73-76.  
MIAO L, ZHANG X P, CHEN J, et al. Development of quantitative analysis of ovine products by droplet digital PCR [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(4): 73-76.
- [20] 张秀平, 苗丽, 黄世英, 等. 食品中鸭源性成分的微滴数字PCR定量检测方法的建立[J]. *中国兽医杂志*, 2020, 56(6): 29-34.  
ZHANG X P, MIAO L, HUANG S Y, et al. Development of quantitative analysis of duck-derived ingredients by droplet digital PCR[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2020, 56(6): 29-34.
- [21] 任君安, 邓婷婷, 黄文胜, 等. 微滴式数字聚合酶链式反应精准定量检测羊肉中掺杂猪肉[J]. *食品科学*, 2017, 38(2): 311-316.  
REN J A, DENG T T, HUANG W S, et al. A precise quantitative assay for measuring pork incorporated into mutton products by droplet digital PCR[J]. *Food Science*, 2017, 38(2): 311-316.
- [22] 刘立兵, 石蕊寒, 项佳林, 等. 应用微滴式数字聚合酶链式反应定量检测牛肉制品中的猪源性成分[J]. *肉类研究*, 2018, 32(9): 29-34.  
LIU L B, SHI R H, XIANG J L, et al. Quantitative analysis of pork in adulterated beef products by droplet digital polymerase chain reaction [J]. *Meat Research*, 2018, 32(9): 29-34.
- [23] 杨华, 汪小福, 肖英平, 等. 牛肉及其制品中掺入鸡肉、鸭肉和猪肉的多重数字PCR快速检测方法研究[J]. *浙江农业学报*, 2017, 29(6): 994-1000.  
YANG H, WANG X F, XIAO Y P, et al. Rapid detection of chicken, duck and pork blending in beef products by multiple digital PCR [J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2017, 29(6): 994-1000.
- [24] 纪艺, 徐晓丽, 姜媛媛, 等. 基于数字PCR的不同品种鸭组织中线粒体与核DNA拷贝数差异研究[J]. *生物技术通报*, 2020, 5: 86-91.  
JI Y, XU X L, JIANG Y Y, et al. Copy number variations of mitochondrial DNA and genomic DNA from different tissues of duck based on digital PCR [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2020, 5: 86-91.