

## 研究报告

## 乳与乳制品中四种动物源性成分鉴定方法的研究

任易婕<sup>1,2</sup>, 霍胜楠<sup>1,2</sup>, 郭颖慧<sup>1,2</sup>, 翟清燕<sup>1,2</sup>, 孙潇慧<sup>1,2</sup>, 郑世超<sup>1,2</sup>

(1. 山东省食品药品检验研究院, 山东 济南 250101; 2. 山东省特殊医学用途配方食品质量工程技术研究中心, 山东 济南 250101)

**摘要:**目的 针对小众乳与乳制品的掺假的现象, 构建乳与乳制品中动物源性成分检测方法。方法 设计合成了牛、羊、驴、水牛的特异引物探针, 优化乳与乳制品中核酸提取方法, 对设计的荧光 PCR 方法进行了特异性、灵敏度、适用性进行验证。结果 该方法对于常见动物物种具有较强特异性和灵敏度, 牛、羊、驴、水牛的检测灵敏度分别为 0.001、0.01、0.01、0.01 ng。此外, 该方法适用性较强, 在各类乳与乳制品样品中均能检出标识动物源性成分和掺伪动物源性成分。结论 本研究构建的检测方法, 特异性、灵敏度、检出限等指标均能满足日常实验需要, 可为监管与检验提供有力的技术支持。

**关键词:**乳与乳制品; 动物源性成分; 特异性; 适用性

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2022)04-0663-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2022.04.005

## Identification of four animal derived components in milk and dairy products

REN Yijie<sup>1,2</sup>, HUO Shengnan<sup>1,2</sup>, GUO Yinghui<sup>1,2</sup>, ZHAI Qingyan<sup>1,2</sup>,  
SUN Xiaohui<sup>1,2</sup>, ZHENG Shichao<sup>1,2</sup>

(1. Shandong Institute for Food and Drug Control, Shandong Ji'nan 250101, China;

2. Shandong Quality Control Engineering Technology Research Center of Foods for Special Medical Purpose, Shandong Ji'nan 250101, China)

**Abstract: Objective** To detect the adulteration in milk and dairy products, the method for identification of animal derived components in milk and dairy products was constructed. **Methods** The specific primer probes of cattle, sheep, donkey and buffalo were designed and synthesized. The nucleic acid extraction method in milk and dairy products was optimized. The specificity, sensitivity and applicability of the designed fluorescent PCR method were verified. **Results** The method had strong specificity and sensitivity for common animal species. The detection sensitivities of cattle, sheep, donkey and buffalo were 0.001, 0.01, 0.01 and 0.01 ng, respectively. **Conclusion** The specificity, sensitivity, detection limit and other indicators of the constructed method can meet the needs of daily experiments, and provide strong technical support for supervision and testing.

**Key words:** Milk and dairy products; animal derived components; specificity; applicability

乳及乳制品营养丰富, 是一类很重要的食物来源。乳制品中包含人类所全部的必须氨基酸, 可以保证人体正常的营养需要, 促进儿童的成长发育。除常见的牛乳外, 其他物种的乳制品也逐渐进入大众视野, 如羊乳、驴乳、水牛乳、骆驼乳等。这些不同动物源性的乳与乳制品, 由于风味独特, 产品特

点明确, 也越来越受到消费者的青睐<sup>[1]</sup>。不同动物源性的乳产品之间的营养成分差别很大, 如羊奶中所含的维生素 A、烟酸、碳水化合物、磷和氨基酸的含量明显优于牛奶, 其酪蛋白和白蛋白消化率与牛乳相比, 可达 98%<sup>[2]</sup>。羊奶中的短链脂肪酸含量、免疫球蛋白、乳清蛋白含量均优于牛乳, 具有安神补气血的功效<sup>[2]</sup>。驴奶具有很高的食用和药用价值, 其维生素、矿物质、不饱和脂肪酸比例、乳清蛋白等均优于牛乳, 更易被人体消化吸收<sup>[3-4]</sup>。驴奶乳具有调节免疫、对抗肿瘤、增强免疫等作用<sup>[2]</sup>。水牛乳是南方非常重要的乳品来源, 其固形物含量和蛋白含量均高于普通牛乳, 约为普通牛乳的 1.6 倍左右。相关研究表明水牛乳具有抗癌、消炎、抗氧

收稿日期: 2021-12-30

基金项目: 山东省食品药品检验研究院自拟课题 (SDIFDC-KY-2021019)

作者简介: 任易婕 女 工程师 研究方向为食品生物安全检测技术研究 E-mail: 305231234@qq.com

通信作者: 霍胜楠 女 研究员 研究方向为食品生物安全质量管理与检测技术开发 E-mail: huosn@163.com

化等功效<sup>[1,5]</sup>。这些小众乳制品的销售,丰富了消费市场,但其低产量高价值的特性也给不法商贩带来可乘之机,也带来技术与监管的需求。

目前,国内外对乳与乳制品动物源性成分的检测方法包括分子生物学方法、蛋白检测方法,气相色谱-质谱法、电子舌技术、光谱技术等<sup>[6]</sup>。其中,分子生物学方法对乳与乳制品的检测方法包括聚合酶链式反应法(Polymerase chain reaction, PCR法)、实时荧光定量PCR法、利用限制性内切酶片段长度多态性进行鉴定的方法(RFLP法)、环介导等温扩增法(LAMP法)等<sup>[6-8]</sup>。其中荧光PCR具有检测速度较快、反应灵敏的特点,成为很多动物源性成分检测标准中的常用方法,许多研究者采用该方法对牛乳中牛、羊源性成分进行鉴定<sup>[6-14]</sup>。因此,本实验采用实时荧光PCR方法,对常见乳产品中的动物源性成分进行引物探针设计,构建乳与乳制品中牛、羊、驴、水牛成分的检测方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品来源

本实验肉源成分样品及乳粉、液态奶样品均购置于市场和网络。驴生乳样品由山东东阿公司提供。乳清粉样品和其他动物源性成分材料为本实验室储存样本。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

7500 FAST 实时荧光PCR仪(美国ABI公司),

NanoDrop 2000c 生物紫外可见分光光度计(美国Thermo公司),高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司),生物安全柜(美国Nuair公司)等。

TaqMan™ Universal Master Mix II, with UNG (Applied Biosystems公司); DNeasy Mericon 食品DNA提取试剂盒, DNeasy Blood & Tissue 动物组织DNA提取试剂盒(德国Qiagen公司);引物探针由济南博尚公司合成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 DNA的提取

采用DNeasy Mericon食品DNA提取试剂盒对乳与乳制品DNA进行提取,根据样品性质不同,前处理方法分别为:固体样品:取0.2g于50mL离心管中,加入裂解液直接进行提取;液体样品:取10mL样品于50mL离心管中,12000 r/min离心5min后,刮去离心管壁上层乳脂,并吸取去除中间层乳蛋白,留下底层沉淀,加入裂解液直接进行DNA制备。裂解时间延长至3h。提取结束后,通过NanoDrop 2000c仪器检测DNA的浓度及质量<sup>[8]</sup>。同时采用DNeasy Blood & Tissue动物组织DNA提取试剂盒对其他动物源性成分的材料进行DNA的提取。

#### 1.2.2 引物探针的设计合成

对牛、羊、驴、水牛的引物探针进行设计、合成。牛、羊、驴引物引用现行标准<sup>[15-16]</sup>,水牛引物探针自行设计获得。水牛的引物探针选取线粒体COX I基因,利用Primer 5软件进行特异性引物、探针设计。引物探针序列见表1。

表1 牛、羊、驴、水牛引物探针序列信息

Table 1 Primer probe sequences of cattle, sheep, donkey and buffalo

检测物种	引物与探针序列	目的基因
牛	F: 5'-CTCCTCGGAGACCCAGATAAC-3'	细胞色素b基因
	R: 5'-AGAAGTATCACTCGGGTTTG-3'	
	P: 5'-FAM-CCAGCCAATCCACTCAACACACCC-Eclips-3'	
羊	F: 5'-CAGCCCTCGCCATAGTTCAC-3'	细胞色素b基因
	R: 5'-AGGGTGAAGGGAATTTATCTG-3'	
	P: 5'-FAM-TCTTCCTCCACGAAACAGGATCCAACA-Eclips-3'	
驴	F: 5'-AATAGCTCTAGCCGTACGGCTAACT-3'	ATPase 6基因
	R: 5'-CAGGATAATGAATGAATGTAATAAGGGCTG-3'	
	P: 5'-FAM-TGCCGGACATCTTCTAATCCACCTT-Eclips-3'	
水牛	F: 5'-CCCTTTAGCAGTAACTAG-3'	COX I基因
	R: 5'-GATCAAAGAAAGTTGTGTTTAGG-3'	
	P: 5'-FAM-CCACGCAGGAGCCTCGGTAGAT-Eclips-3'	

#### 1.2.3 荧光PCR方法的建立

实时荧光PCR反应体系:反应体系总体积为25 μL, TaqMan™ Universal Master Mix 12.5 μL, 正反向引物(10 μmol/L)各1 μL, 探针(10 μmol/L)1 μL, DNA模板(1~20 ng/μL)5 μL, 用灭菌去离子水补足至总体积25 μL。

实时荧光PCR反应条件为:50℃ 2 min; 95℃

10 min, 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 40个循环, 在延伸时收集荧光。

#### 1.2.4 引物探针特异性验证

采用动物肉源成分DNA作为特异性验证的材料。分别用牛、羊、驴、水牛4种源性成分的引物探针针对牛、水牛、羊、驴、猪、马、骆驼、鸡、鸭、猪、牦牛的基因组DNA进行扩增。

1.2.5 引物探针灵敏度验证

采用动物肉源成分 DNA 作为灵敏度验证的材料。分别将牛、羊、驴、水牛基因组 DNA 进行 10 倍梯度稀释,制备 4 种动物  $10\sim 10^{-3}$  ng 5 个梯度 DNA 样品,并进行荧光 PCR 扩增,每个稀释度设置三个平行。

1.2.6 方法适用性验证

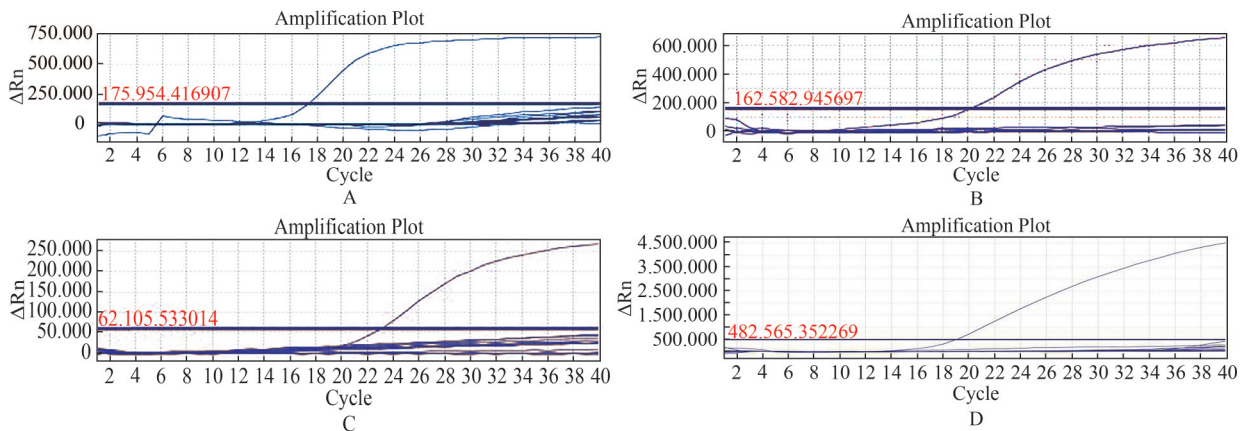
采集 20 份市场样本,样本包括液态乳,乳粉、乳清粉、生乳等样品类型,产品的动物源性成分包含牛、羊、驴、水牛、牦牛、骆驼等。利用建立的 DNA 制

备方法和荧光 PCR 方法,对所采集的样品进行检测。

2 结果

2.1 方法特异性验证

牛、羊、驴、水牛 4 种动物源性成分检测均仅有阳性对照目标成分检出,阴性及空白对照未扩增。验证结果显示,除目标物种外,其余物种 DNA 目标基因均无非特异的扩增曲线产生。结果表明本方法采用的牛、羊、驴、水牛引物探针具有良好的特异性,对目标基因具有良好的扩增。见图 1。



注:A:牛;B:羊;C:驴;D:水牛

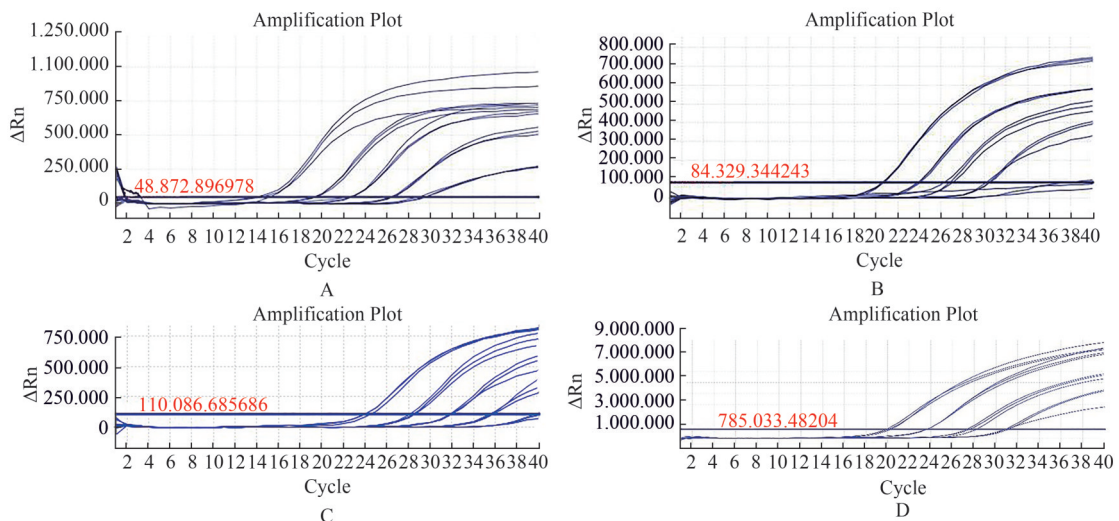
图1 引物探针特异性扩增曲线图

Figure 1 Specific amplification curves of primer probe

2.2 方法灵敏度验证

设定的荧光 PCR 循环数(Ct 值)为 40,当 Ct 值>35 时,判定该物种的动物源性成分未检出。结果如图 2 所示,牛引物探针在 0.001 ng 浓度下扩增 Ct 值约在

30 左右;羊、驴、水牛在 0.01 ng 浓度下扩增 Ct 值分别在 30、35、31 左右,第 5 个稀释浓度扩增曲线均在阈值线以下。验证结果显示牛源性成分的灵敏度为 0.001 ng,羊、驴、水牛源性成分的灵敏度为 0.01 ng。



注:A:牛;B:羊;C:驴;D:水牛

图2 引物探针灵敏度扩增曲线图

Figure 2 Sensitivity amplification curves of primer probe



2.3 方法适用性

荧光 PCR 方法实验结果见表 2。提取试剂盒对各种乳与乳制品均有良好的提取效果,其 DNA 质量可满足后续实验的需要。结果显示,牛奶、驴奶、羊奶、水牛奶这四种液体乳的标识成分和检出成分一致,非目标成分均未检出;在各种动物源性成分乳粉中,有一份羊乳粉样品和一份牦牛乳粉样品、一份骆驼乳粉样品中,标示成分分别仅有羊、牦牛和成分,但三份样品同时检出其他动物源性成分。其中羊乳粉、牦牛乳粉检出牛成分,骆驼乳粉同时检出牛、羊源性成分,表明可能有掺假现象存在。有两份羊乳清粉检出牛源性成分,但 Ct 值在 35 附近,提示产品存在其他源性成分的非恶意带入问题。实验结果表明,上述荧光 PCR 方法具有良好的适用性,可满足乳与乳制品中的牛、羊、驴、水牛成分的鉴定工作。

表 2 市场样本适用性验证结果

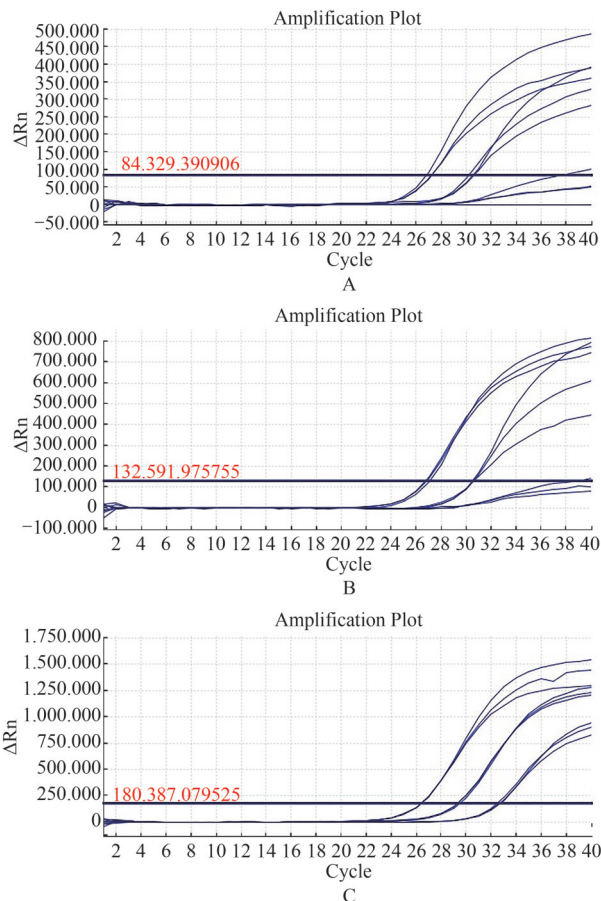
Table 2 Applicability verification results of market samples

编号	样品类型	标识成分	探针类型				结果判定
			牛	羊	驴	水牛	
1	牛奶 1	牛	P	N	N	N	检出牛源性成分
2	牛奶 2	牛	P	N	N	N	检出牛源性成分
3	牛奶 3	牛	P	N	N	N	检出牛源性成分
4	羊奶 1	羊	N	P	N	N	检出羊源性成分
5	羊奶 2	羊	N	P	N	N	检出羊源性成分
6	驴奶	驴	N	N	P	N	检出驴源性成分
7	水牛奶 1	水牛、牛	P	N	N	P	检出水牛、牛源性成分
8	水牛奶 2	水牛	P	N	N	P	检出水牛源性成分
9	牛乳粉 1	牛	P	N	N	N	检出牛源性成分
10	牛乳粉 2	牛	P	N	N	N	检出牛源性成分
11	羊乳粉 1	牛、羊	P	P	N	N	检出牛、羊源性成分
12	羊乳粉 2	羊	P	P	N	N	检出牛、羊源性成分
13	羊乳清粉 1	羊	P	P	N	N	检出牛、羊源性成分
14	羊乳清粉 2	羊	P	P	N	N	检出牛、羊源性成分
15	驴乳粉	驴	N	N	P	N	检出驴源性成分
16	牦牛乳粉 1	牦牛、牛	P	N	N	N	检出牛源性成分
17	牦牛乳粉 2	牦牛	P	N	N	N	检出牛源性成分
18	骆驼乳粉 1	骆驼	P	P	N	N	检出牛、羊源性成分
19	骆驼乳粉 2	骆驼	N	N	N	N	未检出牛、羊源性成分
20	生驴乳 2	驴	N	N	P	N	检出驴源性成分

注:P代表该动物源性成分检出;N代表该动物源性成分未检出

2.4 方法检出限

因为在实际样本中检出非标识成分,因此以液态乳为样本,进行方法检出限实验。分别将只有单一物种检出的羊乳、驴乳、水牛乳,按照目标源性成分 100%、10%、1% 的比例与牛乳混合均匀,进行 DNA 制备及荧光 PCR 实验,进行方法特异性检测,每个实验设置 3 个平行。结果如图 3 所示。羊和驴在 100%、10% 比例下,可检测出目标源性成分,Ct 值分别在 27(100% 比例)和 31(10% 比例)左右;在 1% 比例条件下,无法检测到羊、驴的目标源性成分;水牛在 100%、10%、1% 比例下,可检测



注:A:羊;B:驴;C:水牛

图 3 适用性扩增曲线图

Figure 3 Applicability amplification curves

出目标源性成分,Ct 值分别在 26(100% 比例)和 30(100% 比例)、33(1% 比例)左右。验证结果显示,羊、驴源性成分在液体乳中的检出限为 10%,水牛源性成分在液体乳中的检出限为 1%。

3 结论

随着经济水平的提高,一些小众乳陆续被广大消费者所接受。然而,这些小众乳的产量低,售价高,有不法商贩以低价牛乳成分冒充。因此,需要有相应的检测手段对该现象进行监管。本实验设计了一种适用于乳与乳制品中动物源性成分的检测方法。该方法适用于乳粉、液态乳、生乳的动物源性成分检测,可同时对乳与乳制品进行牛、羊、驴、水牛成分的检测,提高了检测效率。该方法特异性好,对猪、马、骆驼、鸡、鸭、猪、牦牛等物种无交叉反应;灵敏度高,对牛、羊、驴、水牛源性成分的灵敏度分别可达到 0.001、0.01、0.01、0.01 ng,可满足日常检验的需要。对市面上的液态乳、乳粉、生乳样品进行收集、验证实验,实验结果表明该方法具有良好的产品适用性,且对于液体乳的检出限可达到 10%。该方法的建立,可为实验室的日常检验提供方法参考,也

可及政府部门的日常监管提供技术支撑。

## 参考文献

- [1] 范小雪, 韦海涛, 高兴明, 等. 特色乳的功能活性研究进展[J]. 乳业科学与技术, 2021, 44(3): 31-36.  
FAN X X, WEI H T, GAO X M, et al. Advances in understanding the functional activities of the milk of non-bovine mammals[J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2021, 44(3): 31-36.
- [2] 任建存. 我国特色乳制品的营养功效与产业发展[J]. 中国乳业, 2021(8): 34-39.  
REN J C. Nutritional efficacy and industrial development of characteristic dairy products in China [J]. China Dairy, 2021 (8): 34-39.
- [3] MARTINI M, ALTOMONTE I, LICITRA R, et al. Nutritional and nutraceutical quality of donkey milk[J]. Journal of Equine Veterinary Science, 2018, 65: 33-37.
- [4] 曹竑, 王硕, 李明生, 等. 驴乳及其产品开发[C]//第四届(2018)中国驴业发展大会暨第二届国际毛驴产业发展论坛, 2018: 109-113.  
CAO H, WANG S, LI M S, et al. 驴乳及其产品开发[C]//第四届(2018)中国驴业发展大会暨第二届国际毛驴产业发展论坛, 2018: 109-113.
- [5] 张曦予, 李全阳. 广西水牛乳研究与开发现状概述[J]. 乳业科学与技术, 2021, 44(3): 55-59.  
ZHANG X Y, LI Q Y. Overview of research and development of buffalo milk in Guangxi, China[J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2021, 44(3): 55-59.
- [6] 苗金梁, 张九凯, 周正火, 等. 不同乳源动物成分鉴别技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(18): 7314-7323.  
MIAO J L, ZHANG J K, ZHOU Z H, et al. Research progress on identification technology of animal ingredients from different milk sources [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12 (18): 7314-7323.
- [7] 李娟, 丁清龙, 曾晓琮, 等. 实时荧光PCR法与环介导等温扩增法检测食品中动物源性成分的比较[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(12): 2908-2913.  
LI J, DING Q L, ZENG X C, et al. Comparative analysis of real-time PCR and loop-mediated isothermal amplification in determination animal-origin ingredients in food [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2018, 9(12): 2908-2913.
- [8] 杨艳歌, 李莉, 王丹丹, 等. 多重 real-time PCR 技术快速鉴别特种乳中的乳源动物成分[J]. 食品科学, 2021, 42(16): 312-321.  
YANG Y G, LI L, WANG D D, et al. Multiple real-time polymerase chain reaction for identification of animal-derived ingredients in milk products from minor dairy species [J]. Food Science, 2021, 42(16): 312-321.
- [9] 宋宏新, 刘建兰, 徐丹, 等. 羊乳制品中牛乳成分的荧光定量PCR检测方法研究[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(7): 283-287, 299.  
SONG H X, LIU J L, XU D, et al. Identification of bovine milk components in goat dairy products using real-time PCR[J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(7): 283-287, 299.
- [10] 姚卢悦, 李宇. Real-time PCR法检测羊奶粉中羊源性成分[J]. 食品工业, 2015, 36(8): 285-287.  
YAO L Y, LI Y. Identification of sheep milk powder by real-time PCR[J]. The Food Industry, 2015, 36(8): 285-287.
- [11] 刘小艳. 实时荧光PCR技术检测奶制品掺假方法研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2014.  
LIU X Y. Real-time PCR method for the detection of adulteration in dairy products[D]. Suzhou: Soochow University, 2014.
- [12] 陈筱婷. 乳及乳制品真实属性多重实时荧光PCR检测方法研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2016.  
CHEN X T. Research on multiplex PCR detection method of the real property of milk and dairy products[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2016.
- [13] 张艳茹. 羊乳中动物源性成分的实时荧光PCR检测[J]. 食品安全导刊, 2020(6): 91-92.  
ZHANG Y R. Yangru zhong dongwuyuan xing chengfen de shishi yingguan PCR jiance[J]. China Food Safety Magazine, 2020(6): 91-92.
- [14] 蔡扩军, 徐敏, 王梅, 等. 骆驼奶、驴奶中牛乳掺假检出限的测定[J]. 新疆畜牧业, 2020, 35(2): 18-20.  
CAI K J, XU M, WANG M, et al. Luotuoanai lvnai zhong niuru chanjia jianchuxian de ceding[J]. 新疆畜牧业, 2020, 35(2): 18-20.
- [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 materias 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. 食品及饲料中常见畜类品种的鉴定方法 第4部分: 驴成分检测 实时荧光PCR法: SN/T 3730.4—2013[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.  
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Identification of domestic animal ingredient in food and feed. Part 4: detection of donkey ingredient. Real-time PCR method: SN/T 3730.4—2013 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2014.