

一种牛肉检测的荧光实时定量方法研究

马建荣¹, 余永红^{1*}, 何远财¹, 张雅慧², 谭杰峰³, 崔水龙¹, 许锦涛¹

(1. 广东食品药品职业学院, 广东广州 510520; 2. 广东药科大学, 广东广州 511436; 3. 广州奕昕生物科技有限公司, 广东广州 510520)

摘要 [目的] 开发一种用于牛源性成分检测的荧光实时定量检测方法。[方法] 通过序列比对后, 以牛源性线粒体 DNA 中 *cytb* 基因为模板, 设计特异性的引物和探针, 并以不同来源的 DNA 为模板, 分析引物和探针的特异性。对牛源性 DNA 进行梯度稀释后, 分析不同浓度下扩增曲线, 分析检测方法的灵敏度。以牛源性 DNA 稀释液为模板, 进行 10 个平行扩增试验, 分析检测方法的精密度。[结果] 该研究所用的引物和探针对于牛源性 DNA 具有明显的扩增曲线, 而非牛源性(鸡、鸭、猪、人)DNA 模板不进行扩增。灵敏度分析结果显示, 该检测方法对浓度仅为 24.4 pg/ μ L 牛源性 DNA 模板仍进行阳性扩增。精密度分析显示, 10 个平行试验扩增曲线相似, Ct 值的标准差(SD)仅为 0.41, 精密度(CV)也仅为 1.6%。[结论] 该研究开发的牛肉成分检测的荧光实时定量方法特异性高, 仅对牛源性 DNA 发生扩增。同时该方法灵敏度也很好, 检出限为 24.4 pg/ μ L, 精密度也很高, 重复性良好, 适用于市场上肉制品中牛源性成分的检测。

关键词 牛源性成分; 荧光实时定量方法; 引物特异性; 灵敏度; 精密度

中图分类号 TS251.7 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)03-0198-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.03.052



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on a Fluorescence Real-time Quantitative Method for Beef Detection

MA Jian-rong, YU Yong-hong, HE Yuan-cai et al (Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou, Guangdong 510520)

Abstract [Objective] To establish a real-time fluorescence quantitative detection method for the detection of bovine-derived components. [Method] After sequence alignment, specific primers and probe were designed based on the *cytb* gene of bovine mitochondrial DNA, and the specificity of primers and probe was analyzed with different DNA samples. The detection method was also analyzed with gradient dilution samples of bovine DNA. Ten parallel amplification experiments were carried out using bovine DNA dilution as template to analyze the precision of the detection method. [Result] The primers and probes used in this study had obvious amplification curves for bovine-derived DNA, but do not amplify non-bovine-derived (chicken, duck, pig, human) DNA templates. Sensitivity analysis results showed that the detection method still positively amplified bovine-derived DNA templates with a concentration of only 24.4 pg/ μ L. Precision analysis showed that the amplification curves of the 10 parallel experiments were similar, the standard deviation (SD) of the Ct value was only 0.41, and the precision (CV) was only 1.6%. [Conclusion] The fluorescence real-time quantitative method for beef component detection developed by this research has high specificity and only amplifies bovine-derived DNA. At the same time, the sensitivity of the method is very good, the detection limit is 24.4 pg/ μ L, the precision is also high, and the repeatability is good. It is suitable for the detection of bovine-derived components in meat products on the market.

Key words Bovine-derived components; Real-time fluorescence quantitative method; Primer specificity; Sensitivity; Precision

牛肉具有营养价值高、口感佳等特点, 深受消费者喜爱。随着我国经济飞速发展、生活水平提高, 饮食结构日益丰富, 也使得我国牛肉总消费量、人均消费量都逐年稳步提高, 2011—2019 年我国牛肉消费总量从 552 万 t 增长至 883 万 t, 累计增长 59.96%, 年均增长 6.66%^[1]。但与消费需求相比, 我国的牛肉产量明显不足, 牛肉进口量也不断增加, 且牛肉制品的销售价格也不断攀升^[1-2]。

由于牛肉价格偏高, 无良商家以此为“商机”, 将其他价格较低的肉类(如猪肉、鸭肉等)加工制成所谓的“牛肉制品”, 降低成本, 使用错误或伪造的标签蒙骗消费者, 从中牟取暴利^[3]。近年来, 此类“掺杂使假”事件屡有发生, 严重损害消费者权益^[4]。为更好保护消费者利益, 相关部门为各类肉制品的鉴定提供了有效方法, 但随着造假技术和工艺水平的提高, 单纯依赖于感官鉴别和经验判断已经不能满足当前市场监管等方面的需求, 而气相色谱法、液相色谱法、气相色

谱-质谱法(GC-MS)等方法又具有花费时间长、操作过于烦琐以及结果滞后等缺点, 因此开发快速、有效且特异性强的检测方法非常有必要^[5]。

随着分子生物学技术的发展, 以核酸 DNA 为靶标的检测技术被陆续开发出来, 其中聚合酶链式反应(PCR)由于速度快、灵敏度高且简便可靠, 已经发展成为一种成熟的食品掺假检测技术^[6]。同时科技的不断革新产生了众多新的技术, 如多重 PCR^[7-8]、实时 PCR^[9]、LAMP(环介导等温扩增)^[10]、数字 PCR^[11]等, 为肉类鉴定提供了更多的鉴定手段。实时 PCR 包含荧光染料法和荧光探针法 2 种方法, 其中荧光染料法可靠稳定、灵敏度高, 但容易发生非特异性扩增而影响检测结果; 相比之下荧光探针法有更强的特异性, 能快速特异扩增目标序列^[12]。为建立简便、快捷、高效的牛肉检测方法, 该研究开发了一种基于牛源性线粒体细胞色素 b 基因(*cytb*)的荧光探针法实时 PCR 技术^[13]。

1 材料与方法

1.1 引物和探针设计 从 NCBI 网站分别下载牛、猪、鸭和人的线粒体细胞色素 b 基因(*cytb*)序列, 通过比对筛选出牛源性 *cytb* 基因的保守序列, 并利用 Primer Premier 5.0 软件设计出特异性的引物和探针, 并对探针 5'端用 FAM 修饰, 3'端用 BHQ1 修饰。该研究采用的上游引物序列为 5'-GCAATA-

基金项目 广东省大学生“攀登计划”专项资金(pdjh2020b1009); 广州市科技计划项目(202002030422); 广东食品药品职业学院级课题(2019ZR13, 2019ZR17, 2020ZR03)。

作者简介 马建荣(1981—), 女, 河北唐山人, 实验师, 硕士, 从事微生物相关的教学与科研工作。* 通信作者, 讲师, 博士, 从事微生物基础代谢相关研究。

收稿日期 2021-05-21

CACTACACATCC-3', 下游引物序列为 5'-TGAAGCTC-CGTTTGCG-3', 探针序列为 5'-FAM-CTCCTCTGTTAC-CCATATCTGCCG-BHQ1-3'。

1.2 样品 DNA 制备 从市场购买的牛肉、鸭肉、猪肉、鸡肉, 并取内层组织作为样品提取 DNA。人性 DNA 来源于人口腔上皮细胞。不同样品的 DNA 提取过程参照索莱宝公司的动物组织 DNA 提取试剂盒进行。

1.3 反应体系与反应条件 反应总体积为 20 μL , 内含 PCR Mix 12.18 μL , *Taq* 酶 0.32 μL , 模板 DNA 5 μL , 上游引物、下游引物和探针混合物 2.5 μL 。反应条件是 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2.5 min, 93 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 45 个循环。

1.4 特异性试验 分别以 4 种非牛源性(猪、鸡、鸭以及人源)DNA 和牛源性 DNA 为模板, 用“1.3”反应条件和反应体系进行实时定量 PCR 扩增, 根据扩增曲线和反应体系中荧光信号到达设定阈值时所需循环数(Ct 值), 判断引物和探针的特异性。

1.5 灵敏度试验 将牛源性 DNA 样品进行梯度稀释, 终浓度分别为 100.00 ng/ μL 、25.00 ng/ μL 、6.25 ng/ μL 、1.56 ng/ μL 、0.39 ng/ μL 、97.60 pg/ μL 、24.40 pg/ μL , 并将这 7 种稀释液样品分别编号为 D1~D7。以 D1~D7 样品为模板进行实时定量 PCR 扩增, 判断该检测方法的灵敏度。

1.6 精密度试验 选取 D4 样本(浓度为 1.56 ng/ μL)作为精密度试验的模板 DNA, 设置 10 个平行试验并分别编号为 J1~J10, 用“1.3”反应条件和反应体系进行实时定量 PCR 扩增, 根据扩增曲线和 Ct 值, 计算出标准差(SD)、平均值(\bar{X})、精密度(CV)。精密度计算公式为 $CV = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 引物和探针的特异性检测 为验证该研究所用引物和探针的特异性, 以不同来源的 DNA 作为模板, 以“1.3”的反应体系和反应方法进行实时定量扩增, 结果显示(图 1), 针对牛源性线粒体细胞色素 b 基因(*cytb*)设计的引物和探针,

以猪、鸡、鸭、人来源的 DNA 和阴性对照(H₂O)为模板时, 荧光强度差值(ΔR_n)小于 0.05, 说明该反应体系对其他物种来源的模板没有扩增。而当以牛源性 DNA 为模板时, ΔR_n 值超过 3.5, 显示显著性扩增反应。以上结果说明该研究所用的引物和探针具有较高的特异性, 能满足后续试验需求。

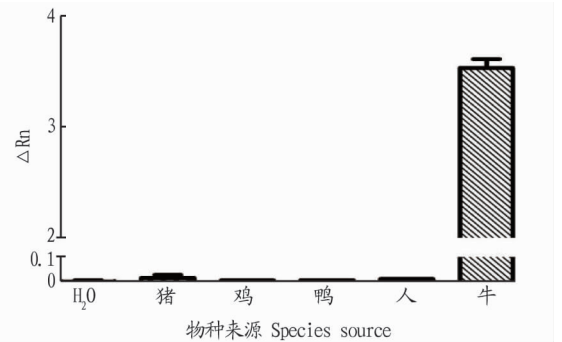


图 1 牛源性引物和探针的特异性检测

Fig. 1 Specific detection of bovine-derived primers and probes

2.2 引物和探针的灵敏性检测 按照“1.5”方法操作, 结果显示(图 2), 100.00 ng/ μL 、25.00 ng/ μL 、6.25 ng/ μL 、1.56 ng/ μL 、0.39 ng/ μL 、97.60 pg/ μL 和 24.40 pg/ μL 这 7 个稀释度的样品均出现典型的扩增曲线, 并且随着稀释度增加, Ct 值逐渐增大, 扩增曲线逐渐右移。样品 D7 中牛源性 DNA 浓度非常低, 虽出现典型的扩增曲线, 但 Ct 值为 32.38, ΔR_n 值也仅为 1.05, 因此当 Ct 值大于 33 时, 可判定为未检出牛源性成分。

2.3 检测方法的精密度分析 按照“1.6”方法操作, 结果显示(图 3), 阴性对照没有发生扩增, 而所有平行试验都发生了阳性扩增, 荧光强度(R_n)约 3.5, 且 Ct 值较为接近。对每个平行扩增试验获得的 Ct 值进行统计分析, 10 个平行试验所得 Ct 值的平均值(\bar{X})为 26.67, 标准差(SD)为 0.41, 平行间的精密度(CV)为 1.6%。以上分析结果表明该研究建立的牛肉检测体系稳定性较高, 具有良好的精密度, 能满足检测需求。

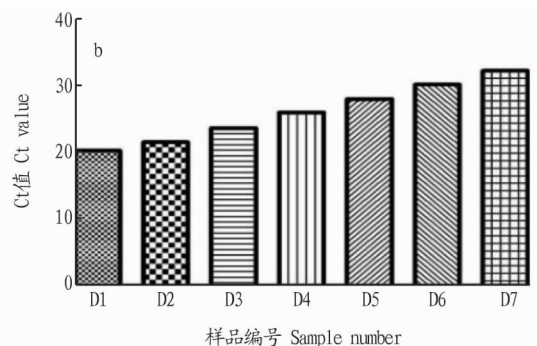
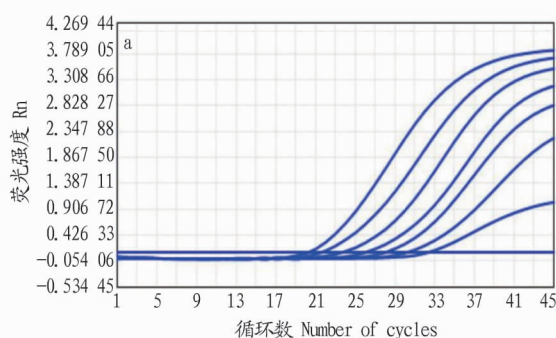


图 2 不同 DNA 浓度时定量扩增曲线(a)和 Ct 值(b)

Fig. 2 Quantitative amplification curve(a) and Ct value(b) at different DNA concentrations

3 结论与讨论

本研究以牛源性线粒体中 *cytb* 基因为靶标, 利用同源性比对后对特异性的位点设计了特异性的引物和探针, 开发了新的荧光定量 PCR 检测方法。首先检测了引物和探

针的特异性, 结果发现该研究所采用的扩增引物和探针对于牛源性 DNA 模板具有非常显著的扩增反应, 而对鸡、鸭、猪和人来源的 DNA 模板无扩增反应, 说明引物和探针的特异性非常高。

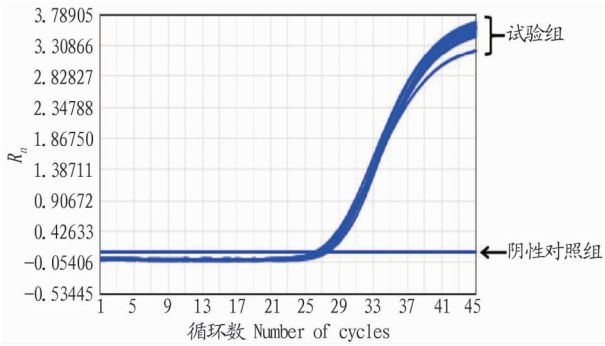


图3 精密度分析定量扩增曲线

Fig. 3 Quantitative amplification curve of precision analysis

进一步分析检测方法的灵敏度,结果显示该方法对牛源性DNA模板的灵敏度很高,最低检测浓度可达到 $24.40 \text{ pg}/\mu\text{L}$,显著低于文献报道的荧光PCR法($0.2 \text{ ng}/\mu\text{L}$)^[14]和多重位点特异性PCR方法($100 \text{ pg}/\mu\text{L}$)^[7]。但海小等^[15]报道的基于Taqman探针的定量PCR方法对水牛源性成分的最低检测限度可达 $10 \text{ fg}/\mu\text{L}$,远低于该研究的检测限度,说明该研究方法在灵敏度方面还需进一步优化提升。

为分析该研究检测方法的重复性和精密度,分析了10个平行试验的重复性,结果发现精密度良好,平行间Ct值标准差仅为0.41,精密度(CV)为1.6%,也说明该检测方法的稳定性良好。

综合分析,该研究的检测方法具有特异性高、灵敏度高、精密度高等优势,适用于市场上肉制品中牛源性成分的检

测,并且该检测操作简单快捷,可进行批量检测,符合当今市场的监测需求,可作为常规检测方法来使用。

参考文献

- [1] 齐皓天,韩啸,龙文军. 如何满足中国日益增长的牛肉需求:扩大生产还是增加进口[J]. 农业经济问题,2020,41(11):87-96.
- [2] 庞博文,王勤志,王俊涛,等. 基于DNA检测的肉制品鉴别技术研究进展[J]. 食品工业科技,2020,41(8):333-340,346.
- [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.
- [4] 杜鹏.“马肉风波”与欧盟肉制品安全监管制度[J]. 世界农业,2015(4):82-86,168.
- [5] 张颖颖,赵文涛,李慧晨,等. 液相色谱串联质谱对掺假牛肉的鉴别及定量研究[J]. 现代食品科技,2017,33(2):230-237.
- [6] 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.
- [7] 李盈诺,王艳双,苑广信,等. 多重位点特异性PCR快速检测牛肉中常见掺假动物源性成分[J]. 食品工业科技,2019,40(24):82-87.
- [8] 张晶鑫,高玉时,樊艳凤,等. 利用PCR技术鉴别畜禽肉中鸭源性成分研究[J]. 安徽农业科学,2015,43(34):202-203,322.
- [9] 潘长宇,安得霞,王戊腾,等. 基于实时荧光PCR定量检测肉制品猪源性成分方法的建立[J]. 基因组学与应用生物学,2017,36(11):4585-4591.
- [10] 何艺梅,刘辉,郑超红,等. LAMP扩增技术在真假肉鉴别中的应用[J]. 中国卫生检验杂志,2018,28(21):2649-2651,2654.
- [11] 王成程. 牛肉源性成分qPCR与ddPCR定量检测技术研究[D]. 雅安:四川农业大学,2019.
- [12] 范梦晨,韩爱云. 肉类掺假检测技术的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报,2021,12(1):236-241.
- [13] 贾南南,李建平,范美霞. 利用PCR法检测熟牛肉的肉源性[J]. 食品安全导刊,2020(13):55-57.
- [14] 杨军辉. 用于牛肉掺杂肉成分检测的荧光PCR方法研究[J]. 中国食物与营养,2020,26(10):10-14.
- [15] 海小,刘国强,罗建兴,等. TaqMan实时荧光PCR检测水牛源性成分[J]. 食品工业,2019,40(11):331-337.

(上接第169页)

穗中上部早开花的强势粒,灌浆快、充实度好、粒重高;着生在穗下部迟开花的弱势粒,灌浆慢、充实度差、粒重低,其强、弱势籽粒灌浆速率的差异在不同栽培条件下表现尤其突出^[11]。该研究证明秸秆还田条件下减肥处理最大灌浆速率和籽粒着生的部位和栽培条件有关,即上部籽粒 \geq 中部籽粒 \geq 下部籽粒,减P \geq 减N \geq 减NPK \geq 减K \geq 常规施肥。

表2 不同减肥处理对水稻产量的影响

Table 2 Effect of different fertilizer reduction treatments on rice yield

处理 Treatment	穗数 Number of ears 个/穴	实粒数 Number of real grains 粒/穗	千粒重 Thousand grain weight g	实收产量 Actual yield kg/hm ²
常规施肥(CK) Conventional fertilization(CK)	22.9 a	93.0 a	20.0 ab	7 588.7 a
①	23.0 a	84.8 abc	20.5 a	7 386.5 c
②	20.1 c	88.1 ab	20.0 ab	7 493.3 ab
③	21.2 ab	84.2 abc	20.5 a	7 557.7 a
④	20.3 c	78.7 d	20.5 a	7 113.2 d

注:同列不同小写字母表示不同处理间差异显著($P < 0.05$)

Note: Different lowercases in the same column stand for significant difference between different treatments at 0.05 level

水稻秸秆还田条件下优化施肥一定程度的减N、减P、减K和减NPK不会造成水稻显著减产,其中有效穗数和穗粒数对最终产量起决定性作用^[12]。该研究证明秸秆还田条件下减P、减K与CK产量无显著差异,每穴穗数和实粒数也无

显著差异。

综上所述,水稻秸秆全量还田条件下可以适当减P或K,但减N或减NPK对产量有一定的影响。

参考文献

- [1] 解文孝,李建国,刘军,等. 不同土壤背景下秸秆全量还田对水稻产量及稻米品质的影响[J]. 中国稻米,2021,27(2):73-76,88.
- [2] 龙胜碧,吴平成,黄万花,等. 水稻秸秆还田化肥减量试验研究[J]. 农业科技通讯,2018(4):127-129,195.
- [3] 戚文辉,黄桂花,农秋连. 水稻秸秆还田减量施钾试验初报[J]. 农业科技通讯,2020(2):82-84.
- [4] 曾研华,范呈根,吴建富,等. 等养分条件下稻草还田替代双季早稻氮钾肥比例的研究[J]. 植物营养与肥料学报,2017,23(3):658-668.
- [5] 徐国伟,谈桂露,王志琴,等. 秸秆还田与实地氮肥管理对直播水稻产量、品质及氮肥利用的影响[J]. 中国农业科学,2009,42(8):2736-2746.
- [6] 董明辉,陈培峰,顾俊荣,等. 麦秸还田和氮肥运筹对超级杂交稻茎鞘物质运转与籽粒灌浆特性的影响[J]. 作物学报,2013,39(4):673-681.
- [7] MOHAPATRA P K, PATEL R, SAHU S K. Time of flowering affects grain quality and spikelet partitioning within the rice panicle[J]. Aust J Plant Physiol, 1993, 20(2): 231-241.
- [8] YANG J C, PENG S B, VISPERAS R M, et al. Grain filling pattern and cytokinin content in the grains and roots of rice plants[J]. Plant Growth Regul, 2000, 30(3): 261-270.
- [9] 朱庆森,曹显祖,骆亦其. 水稻籽粒灌浆的生长分析[J]. 作物学报, 1988, 14(3): 182-193.
- [10] 李旭毅,池忠志,姜心禄,等. 成都平原两熟区籼粳品种籽粒灌浆特性[J]. 中国农业科学,2012,45(16):3256-3264.
- [11] 魏颖娟,赵杨,邹应斌. 不同穗型超级稻品种籽粒灌浆特性[J]. 作物学报,2016,42(10):1516-1529.
- [12] 丁文金,马友华,胡宏祥,等. 秸秆还田与减量施肥对双季稻产量及土壤酶活性的影响[J]. 农业环境与发展,2013,30(4):72-77.