

谭波, 杨春萍, 刘小玲. 实时荧光定量 PCR 检测肉制品中牛源性成分及其含量 [J]. 福建农业科技, 2023, 54 (10): 06-14.

实时荧光定量 PCR 检测肉制品中牛源性成分及其含量



谭波^{1,2}, 杨春萍³, 刘小玲^{1*}

(1. 广西大学轻工与食品工程学院, 广西南宁 530004; 2. 贵州省检测技术研究应用中心, 贵州贵阳 550014; 3. 贵州省分析测试研究院, 贵州贵阳 550014)

摘要: 建立一种快速、高效、准确且低成本的肉制品中牛源性成分鉴定及量化检测方法。以细胞核单拷贝基因 *bosPDE* 为目的基因, *LcoR* 为内参基因分别合成引物及探针, 优化反应条件, 评价该方法的特异性和灵敏度。采用实时荧光 PCR 相对定量法, 以 ΔCt 值与 $2^{\Delta\Delta Ct}$ 值线性模型分别建立回归曲线, 通过人工模拟混合牛肉样品对方法准确性评估。结果表明: 目的基因 *bosPDE* 引物仅对牛肉 DNA 进行扩增, 具有特异性, 对牛肉 DNA 扩增的灵敏度可达 $0.01 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。以 ΔCt 值与 $2^{\Delta\Delta Ct}$ 值为定量指标的回归曲线分别为 $y = -3.0965x + 8.4797$ ($R^2 = 0.998$)、 $y = 0.7122x + 3.0504$ ($R^2 = 0.9887$)。两个方法检测 35%~90% 牛肉含量的人工模拟混合牛肉样品的回收率为分别为 94.30%~102.52%、98.55%~106.30%。将两种定量方法进行数均处理, 回收率的偏差减少。本研究建立的实时荧光定量 PCR 方法能够准确对肉制品中的牛源性成分进行定性, 并可用于牛肉掺伪制品中的牛肉相对定量分析, 对鉴别肉制品掺假以及量化牛肉制品成分含量具有重要参考价值。

关键词: 肉制品; 牛源性成分; 实时荧光定量 PCR; 相对定量

中图分类号: TS 251.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2301 (2023) 10-0006-09

DOI: 10.13651/j.cnki.fjnykj.2023.10.002

Detection of the Bovine-derived Materials and Their Contents in Meat Products by Real-time Fluorescence Quantitative PCR

TAN Bo^{1,2}, YANG Chun-ping³, LIU Xiao-ling^{1*}

(1. College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004, China;
2. Guizhou Research and Application Center of Detection Technology, Guiyang, Guizhou 550014, China;
3. Guizhou Institute of Analysis and Testing, Guiyang, Guizhou 550014, China)

Abstract: In order to establish a rapid, efficient, accurate and low-cost method for the identification and quantitative detection of the bovine-derived materials in meat products, the primers and probes were synthesized with the single-copy gene of cell nucleus, *bosPDE* as the target gene and *LcoR* as the internal reference gene, to optimize the reaction conditions and evaluate the specificity and sensitivity of the method. By using the relative quantitative method of real-time fluorescence PCR, the regression curves were respectively established with the linear model of ΔCt value and $2^{\Delta\Delta Ct}$ value, and the accuracy of the method was evaluated by simulating artificially the mixed beef samples. The results showed that: the *bosPDE* primer of the target gene only amplified the DNA of beef, which was specific, and

收稿日期: 2023-09-20

作者简介: 谭波, 男, 1991年生, 硕士研究生, 工程师, 主要从事食品加工与安全研究。

* 通信作者: 刘小玲, 女, 1972年生, 博士, 教授, 主要从事食品生物技术研究 (E-mail: 1106133912@qq.com)。

基金项目: 贵州省科技计划项目 (黔科合支撑 [2023] 一般 354)。

the sensitivity of amplification to beef DNA could reach $0.01 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. The regression curves with ΔCt value and $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ value as the quantitative indexes were $y = -3.0965x + 8.4797$ ($R^2 = 0.998$) and $y = 0.7122x + 3.0504$ ($R^2 = 0.9887$), respectively. The recovery rates of the artificial simulated mixed beef samples with 35%–90% beef content detected by the two methods were 94.30%–102.52% and 98.55%–106.30%, respectively. The deviation of recovery rate was reduced when the number-average treatment was carried out on the two quantitative methods. The real-time fluorescence quantitative PCR method established in this study could accurately characterize the bovine-derived materials in meat products, and could be used for the relative quantitative analysis of beef in the beef adulterated products. It had important reference value for identifying the adulteration of meat products and quantifying the concentrations of components in beef products.

Key words: Meat products; Bovine-derived materials; Real-time fluorescence quantitative PCR; Relatively quantitative

近年来,随着全球化经济的高速发展,人们的物质需求逐渐提升,各种肉类食品的流通和交易也越来越频繁,这使得一些不法商家为了牟取暴利,以低价肉替代高价肉,导致肉制品掺假事件频繁发生^[1-3]。其中,由于牛肉营养价值高^[4-5],需求量逐年上涨^[6],其掺假问题比较突出。2013年波及欧盟国家“挂牛头卖马肉”的“马肉风波”事件,对欧盟28个成员国的近7300个样本进行检测,结果有近4.6%的牛肉产品中检出马肉成分,且在被检出的马肉中,又有0.5%含有欧盟禁止使用的动物止疼类药物保泰松^[7]。唐穗平等^[8]对广东省牛羊肉及其制品掺杂掺假情况的调查分析发现,牛肉制品掺假率高达20%。这些食品掺假问题严重影响着食品安全和消费者权益,然而,目前我国对动物源性成分鉴定的现行标准只能进行定性检测,无法完成定量分析^[9],且由于检测灵敏度过高,无法排除生产、贮藏、运输、销售等过程中样品交叉污染或原料带入造成的污染^[10],很难为市场监管提供有力的技术支撑。因此,建立一种准确、快速的牛源性成分量化检测的方法意义重大。聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)是一种基于特异性引物和模板DNA的体外扩增方法^[11],近年来在动植物源性成分检测方面得到了广泛的应用^[9, 12-14]。本研究以牛细胞核单拷贝磷酸二酯酶基因(*bosPDE*)为靶基因,应用实时荧光定量PCR相对定量方法建立肉制品中牛源性成分及含量的检测方法,旨在为市场监管及后续相关标准制定提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜鸡肉、鸭肉、鹅肉、鹌鹑肉、鸽子肉、鸵

鸟肉、猪肉、羊肉、马肉、驴肉、骆驼肉、梅花鹿肉、兔肉、鲑鱼、牛肉、干辣椒、小麦粉购自贵阳市大型农贸市场及网络购物平台;广谱型基因组DNA小量纯化试剂盒(TaKaRa); $6 \times \text{DNA}$ 上样缓冲液、 $2 \times \text{Taq man PCR MasterMix}$ (索莱宝);100 bp DNA Ladder、TS-GelRed 核酸染料、 $1 \times \text{TAE}$ 速溶颗粒、琼脂糖(北京擎科)。

1.2 仪器与设备

冷冻离心机(Centrifuge 5481R), eppendoff; 恒温金属浴(DKT200-4), 杭州米欧仪器有限公司; 迷你离心机(WTL-10K), 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; 超微量分光光度计(Deaou-US200), 广州迪澳生物科技有限公司; 小型板式离心机(PlateSmart), 北京鼎昊源科技有限公司; 梯度PCR仪(SureCycler 8800), Agilent Technologies; 电泳仪(DYY-6C), 北京六一生物科技有限公司; 凝胶成像系统(BIS 910), 北京东胜创新生物科技有限公司; 实时荧光定量PCR仪(7500), Applied biosystems。

1.3 试验方法

1.3.1 引物探针设计 采用Laube等^[15]研究报道的单拷贝细胞核基因*bosPDE*引物及探针为本研究的牛特异性引物和探针,序列为*bosPDE-F*: ACTCCTACCCATCATGCAGAT, *bosPDE-R*: TGTTTTTAAATATTTTCAGCTAAGAAAAA, *bosPDE-probe*: (FAM)-AACATCAGGATTTTT-GCTGCATTTGC-(TAMRA); 采用Wang等^[16]研究报道的单拷贝细胞核基因*LcoR*引物及探针为本研究内参的通用性引物及探针,序列为*LcoR-F*: CCAGCCAGCCCAATAGCACAA, *LcoR-R*: GAG-GTGAGTCTTGGTCAGCCAT, *LcoR-P*: (HEX)-TGCYGAAAGCATCTC-(MGB)。引物及探针均交于

北京擎科生物科技股份有限公司合成。

1.3.2 样品处理 鲜肉: 用无菌剪刀将动物组织表皮去除, 剪取适量中间组织于一次性研磨杯中, 于试管研磨机 $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 研磨 $3 \sim 5 \text{ min}$ 直至组织为匀浆状。干辣椒: 用无菌剪刀将辣椒剪碎至一次性研磨杯中, 于试管研磨机 $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 研磨 $3 \sim 5 \text{ min}$ 直至组织为粉末状。

1.3.3 样品 DNA 提取 取 50 mg 样品与 1.5 mL 离心管, 根据 DNA 提取试剂盒说明书, 使用 MiniBEST 通用基因组 DNA 提取试剂盒提取辣椒及小麦粉 DNA, 使用动物基因组 DNA 提取试剂盒(通用型)提取动物 DNA。最终用 $60 \mu\text{L}$ Tris-EDTA (TE) 缓冲液将提取的样品 DNA 洗脱, 使用超微量分光光度计测定 DNA 纯度及浓度。DNA 的 $\text{OD}_{260 \text{ nm}}/\text{OD}_{280 \text{ nm}}$ 在 $1.8 \sim 2.0$, 可用于 DNA 扩增, 于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

1.3.4 反应条件优化 退火温度优化: 用 TE 缓冲液将牛肉 DNA 浓度稀释至 $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 作为上样模板, 参照 $1.1 \times \text{T3 Super PCR Mix}$ 说明书推荐的 PCR 反应体系及程序, 使用梯度 PCR 仪同时对多个退火温度点的 DNA 模板进行扩增。反应体系为: $1.1 \times \text{T3 Super PCR Mix}$ $21 \mu\text{L}$, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 上游引物 $1 \mu\text{L}$, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 下游引物 $1 \mu\text{L}$, 模板 DNA $2 \mu\text{L}$; *bosPDE* 反应程序为: 98°C , 2 min , [98°C , 10 s , (46.3°C 、 47.8°C 、 50.9°C 、 52.3°C 、 53.7°C 、 54.9°C 、 58.0°C 、 60.0°C) 72°C , 1 min] 35 个循环, 72°C , 2 min , 4°C 保存; *LcoR* 反应程序为: 98°C , 2 min , [98°C , 10 s , (53.2°C 、 54.6°C 、 56.0°C 、 57.2°C 、 59.6°C 、 61.9°C 、 63.2°C 、 65°C) 72°C , 1 min] 35 个循环, 72°C , 2 min , 4°C 保存。用 2% 的琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物, 确认 PCR 反应退火温度。

荧光 PCR 引物、探针浓度优化: 确认 PCR 反应退火温度后, 将引物、探针浓度稀释至 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 后按表 1 反应体系分别进行 PCR 试验, 优化 PCR 引物、探针浓度。

1.3.5 引物特异性验证 分别以鸡肉、鸭肉、鹅肉、鹌鹑肉、鸽子肉、鸵鸟肉、猪肉、羊肉、马肉、驴肉、骆驼肉、梅花鹿肉、兔肉、鲑鱼、牛肉、干辣椒、小麦粉 DNA 为模板, 用 *bosPDE* 引物及探针按照 1.3.4 优化后的反应条件进行实时荧光 PCR 扩增, 验证 *bosPDE* 引物及探针的特异性。

表 1 引物探针浓度优化反应体系

Table 1 Optimized reaction system of the primer probe concentration

$2 \times \text{Taqman PCR MasterMix}$	引物	探针	超纯水
$12.5 \mu\text{L}$	$0.5 \mu\text{L}$		
	$1 \mu\text{L}$		
	$1.5 \mu\text{L}$	$0.5 \mu\text{L}$	
	$2 \mu\text{L}$		
	$2.5 \mu\text{L}$		
	$0.5 \mu\text{L}$		补水至 $25 \mu\text{L}$
	$1 \mu\text{L}$		
	$1.5 \mu\text{L}$	$1 \mu\text{L}$	
	$2 \mu\text{L}$		
	$2.5 \mu\text{L}$		

1.3.6 内参引物通用性验证 分别以鸡肉、鸭肉、鹅肉、鹌鹑肉、鸽子肉、鸵鸟肉、猪肉、羊肉、马肉、驴肉、骆驼肉、梅花鹿肉、兔肉、牛肉 DNA 为模板, 浓度均稀释至 $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 用 *LcoR* 引物及探针按照 1.3.4 优化后的反应条件进行实时荧光 PCR 扩增, 验证内参引物及探针的通用性。

1.3.7 灵敏度试验 将牛肉 DNA 浓度稀释至 $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 然后按 10 倍系列梯度稀释, 即浓度分别为 100 、 10 、 1 、 0.1 、 0.01 、 $0.001 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 用超纯水作为空白对照进行 PCR 试验。

1.3.8 牛源性定量标准曲线建立 精确称取匀浆后牛肉和猪肉, 按质量比混合, 制备牛肉含量分为 1% 、 10% 、 20% 、 40% 、 60% 、 80% 、 100% 的混合样品作为标准品, 提取 DNA, 将浓度均稀释至 $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 进行实时荧光 PCR 反应。以 *LcoR* 作为内参基因, 以牛肉含量为 1% 的样品为对照, 以超纯水为空白对照, 样品和对照设置 2 个平行反应体系, 分别进行目的基因和内参基因扩增, 用 Ct 平均值, 采用相对定量法 ΔCt 值与 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值线性模型分别建立标准曲线。

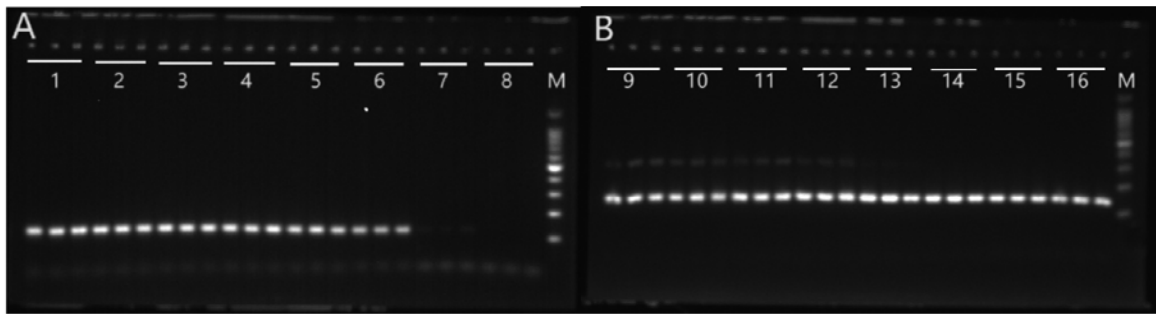
1.3.9 模拟混合样品验证 以牛肉: 猪肉质量百分比为 35% 、 50% 、 65% 、 90% 模拟混合样提取 DNA, 将浓度均稀释至 $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 进行实时荧光 PCR 反应。按 1.3.4 优化后的方法进行扩增, 将 Ct 平均值带入所建立的标准曲线中计算牛肉成分含量, 验证方法的准确性。

2 结果与分析

2.1 反应条件优化

2.1.1 退火温度优化 *bosPDE* 及 *LcoR* 各退火温度点下的 PCR 扩增产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳结果见图 1。*bosPDE* 退火温度在 53.7℃ 以后扩增产

物电泳条带清晰度开始降低，且在 60.0℃ 时无扩增条带；*LcoR* 退火温度在 61.9℃ 后扩增产物电泳条带单一且清晰；为防止非特异扩增及引物二聚体出现，本试验选择 51℃ 和 63℃ 分别作为 *bosPDE* 及 *LcoR* 的 PCR 反应程序退火温度点。



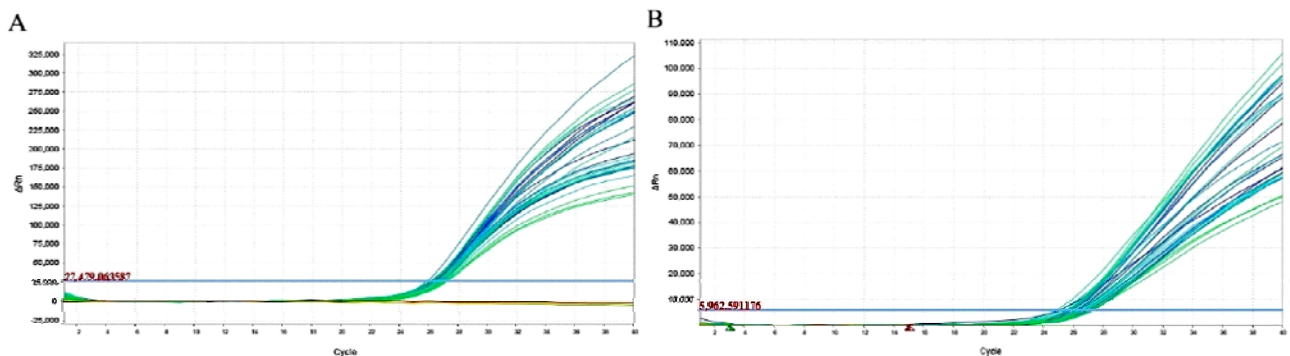
注：A 为 *bosPDE* 各退火温度点下的 PCR 扩增产物凝胶电泳结果，1~8 分别对应退火温度 46.3℃、47.8℃、50.9℃、52.3℃、53.7℃、54.9℃、58.0℃、60.0℃ 的电泳结果；B 为 *LcoR* 各退火温度点下的 PCR 扩增产物凝胶电泳结果，9~16 分别对应退火温度 53.2℃、54.6℃、56.0℃、57.2℃、59.6℃、61.9℃、63.2℃、65℃ 的电泳结果；M 为 100 bp DNA Ladder

图 1 2% 琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 2% agarose gel electrophoresis diagram

2.1.2 荧光 PCR 引物、探针浓度优化 *bosPDE* 及 *LcoR* 引物、探针浓度优化实时荧光定量 PCR 扩增见图 2，Ct 值见表 2。由表 2 可见，*bosPDE* 及 *LcoR* 探针取用量为 0.5 μL 时的 Ct 值均高于探针取用量为 1 μL 时的 Ct 值，即两个靶基因探针取用量在 0.5 μL 时的扩增效果比 1 μL 时的低。且 *bosPDE* 引物取用量在 0.5、1 μL 时，探针取用量

为 0.5 μL 时 Ct 值的离散程度比 1 μL 时的高；*LcoR* 引物取用量 0.5、1、1.5、2 μL 时，探针取用量为 0.5 μL 时 Ct 值的离散程度比 1 μL 时的高。为了试验高效快捷，方便计算，本试验选择引物、探针取用量均为 1 μL 时的浓度为优化后的最适引物、探针浓度。



注：A、B 分别为不同浓度 *bosPDE*、*LcoR* 引物、探针实时荧光定量 PCR 扩增曲线

图 2 实时荧光定量 PCR 扩增曲线

Fig.2 Amplification curve of the real time fluorescence quantitative PCR

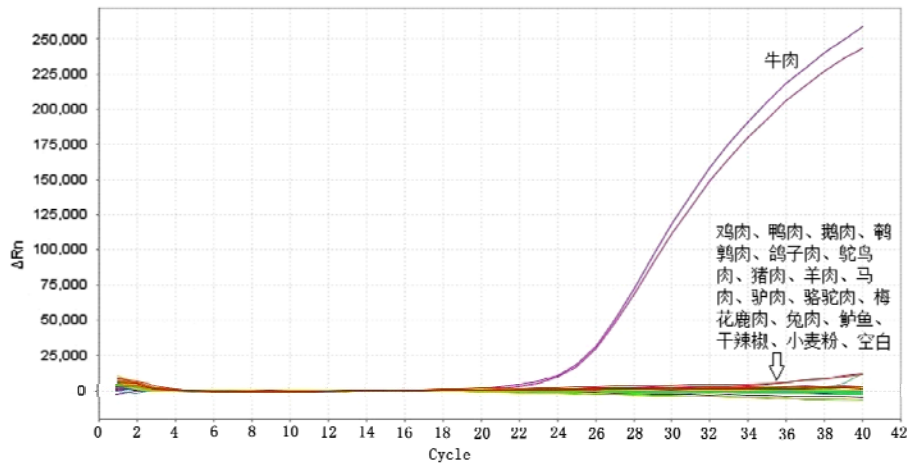
表 2 不同浓度 *bosPDE* 及 *LcoR* 引物、探针实时荧光定量 PCR 扩增 Ct 值Table 2 Real-time fluorescence quantitative PCR amplification of Ct value with different concentrations of *bosPDE* and *LcoR* primers and probes

探针	引物	bosPDE Ct 值			bosPDE Ct 平均值	标准偏差 SD	LcoR Ct 值			LcoR Ct 平均值	标准偏差 SD
		1	2	3			1	2	3		
0.5 μ L	0.5 μ L	27.09	26.55	26.51	26.72	0.324	26.74	26.41	26.2	26.45	0.272
	1 μ L	27.1	26.71	26.3	26.70	0.400	27.05	26.72	26.37	26.71	0.340
	1.5 μ L	27.22	26.99	26.84	27.02	0.191	27.23	26.72	26.69	26.88	0.303
	2 μ L	26.95	26.77	26.76	26.83	0.107	26.48	26.64	27.3	26.81	0.435
	2.5 μ L	26.83	26.72	26.85	26.80	0.070	27.28	27.12	26.96	27.12	0.160
1 μ L	0.5 μ L	26.09	26.27	26.15	26.17	0.092	25.58	25.87	25.88	25.78	0.170
	1 μ L	26.19	26.46	26.35	26.33	0.136	25.54	25.74	25.74	25.67	0.115
	1.5 μ L	26.25	26.66	26.4	26.44	0.207	24.88	25.2	25.02	25.03	0.160
	2 μ L	26.46	26.64	26.15	26.42	0.248	25.73	25.87	25.95	25.85	0.111
	2.5 μ L	26.57	26.85	26.2	26.54	0.326	26.19	25.68	26.15	26.01	0.284

2.2 引物特异性验证

目的基因 *bosPDE* 引物特异性试验结果见图 3, *bosPDE* 引物仅对牛肉 DNA 进行扩增, 对鸡肉、鸭肉、鹅肉、鹌鹑肉、鸽子肉、鸵鸟肉、猪肉、羊肉、马肉、驴肉、骆驼肉、梅花鹿肉、兔肉、牛肉、羊肉、羊

肉、马肉、驴肉、骆驼肉、梅花鹿肉、兔肉、鲑鱼、牛肉、干辣椒、小麦粉 DNA 均无扩增效果, 由此可见, *bosPDE* 引物特异性高, 符合试验要求。

图 3 *bosPDE* 引物对 17 种动植物 DNA 扩增曲线Fig. 3 DNA amplification curves of 17 kinds of animals & plants by *bosPDE* primers

2.3 内参引物通用性验证

内参基因 *LcoR* 引物对鸡肉、鸭肉、鹅肉、鹌鹑肉、鸽子肉、鸵鸟肉、猪肉、羊肉、马肉、驴肉、骆驼肉、梅花鹿肉、兔肉、牛肉 14 种常见畜禽肉 DNA 扩增 Ct 值见表 4。除超纯水外, 14 种常见畜禽肉均有典型扩增曲线, 因此, *LcoR* 可以作为内参基因使用。

2.4 灵敏度试验

为检测 *bosPDE* 引物灵敏度, 将牛肉 DNA 稀释至不同浓度后进行检测, 结果见图 4。当牛肉 DNA 浓度为 $0.01 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 仍可明显看到 PCR 扩增曲线。因此, 本方法检测灵敏度可达 $0.01 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

表 3 *LcoR* 引物对 14 种畜禽肉 DNA 扩增 Ct 值

Table 3 Ct values of DNA amplification of 14 kinds of livestock and poultry meat by *LcoR* primers

样品类别	Ct 值 1	Ct 值 2	Ct 平均值	标准偏差 SD	样品类别	Ct 值 1	Ct 值 2	Ct 平均值	标准偏差 SD
鸡肉	21.89	21.66	21.775	0.16263	马肉	20.57	20.66	20.615	0.06364
鸭肉	21.06	20.49	20.775	0.40305	驴肉	20.17	20.37	20.270	0.14142
鹅肉	21.34	21.53	21.435	0.13435	骆驼肉	20.71	20.82	20.765	0.07778
鹌鹑肉	22.04	22.28	22.160	0.16971	梅花鹿肉	20.28	20.00	20.140	0.19799
鸽子肉	22.19	22.08	22.135	0.07778	兔肉	20.45	20.50	20.475	0.03536
鸵鸟肉	21.86	22.00	21.930	0.09899	牛肉	22.18	22.67	22.425	0.34648
猪肉	21.08	21.32	21.200	0.16971	超纯水	—	—		
羊肉	29.85	28.74	29.295	0.78489					

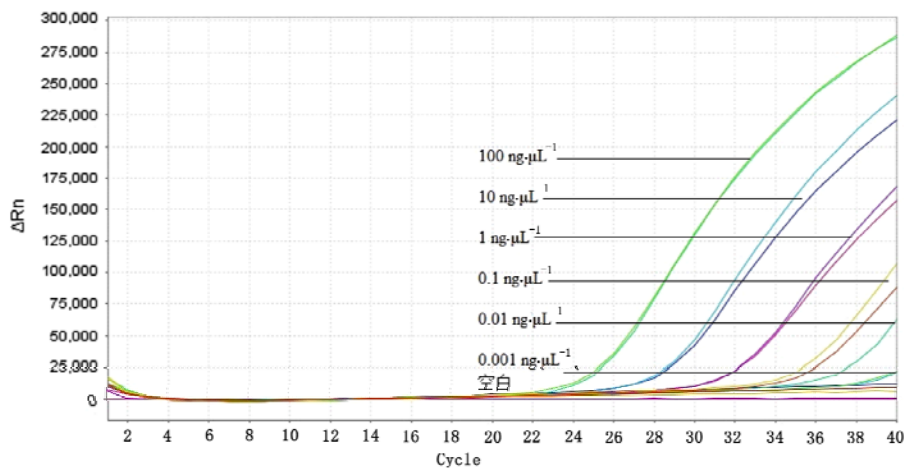


图 4 *bosPDE* 引物对不同浓度牛肉 DNA 的扩增曲线

Fig. 4 Amplification curves of beef DNA with different concentrations by *bosPDE* primers

2.5 牛源性定量标准曲线建立

不同牛肉含量的标准品用 *bosPDE* 及 *LcoR* 引物、探针经荧光定量 PCR 扩增反应后 Ct 值见表 4。以 ΔCt 值 ($\Delta Ct = Ct_{bosPDE} - Ct_{LcoR}$) 为纵坐标，以标准品牛肉含量百分比的对数值为横坐标建立标准曲线见图 5。以 $2^{\Delta\Delta Ct}$ 值 ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{对照} - \Delta Ct$, $\Delta Ct_{对照} =$

$Ct_{bosPDE,1\%牛肉样品} - Ct_{LcoR,1\%牛肉样品}$) 为纵坐标，以标准品牛肉含量百分比为横坐标建立标准曲线见图 6。标准曲线回归公式分别为 $y = -3.0965x + 8.4797$, $R^2 = 0.998$; $y = -0.7122x + 3.0504$, $R^2 = 0.9887$ 。 R^2 均大于 0.980，符合实时荧光定量 PCR 国际化标准—MIQE 指南要求^[17]，均具有良好的线性关系。

表 4 不同牛肉含量的标准品 Ct 值结果

Table 4 Ct value results of the standard samples with different contents of beef

牛肉含量 (%)	<i>bosPDE</i> Ct 值		<i>bosPDE</i> Ct 平均值	标准偏差 SD	<i>LcoR</i> CT 值		<i>LcoR</i> CT 平均值	标准偏差 SD	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{\Delta\Delta Ct}$
	1	2			1	2					
1	32.98	32.98	32.980	0	24.80	24.06	24.43	0.523	8.550	0	1.0
10	29.7	29.48	29.590	0.155	24.25	24.25	24.25	0	5.340	3.210	9.3
20	28.07	28.28	28.175	0.148	23.87	23.75	23.81	0.084	4.365	4.185	18.2
40	27.16	27.16	27.160	0.000	23.84	23.73	23.785	0.077	3.375	5.175	36.1
60	26.11	25.86	25.985	0.176	23.00	22.84	22.92	0.113	3.065	5.485	44.8
80	26.18	26.09	26.135	0.063	23.56	23.54	23.55	0.014	2.585	5.965	62.5
100	25.39	25.26	25.325	0.091	23.11	22.74	22.925	0.261	2.400	6.150	71.0

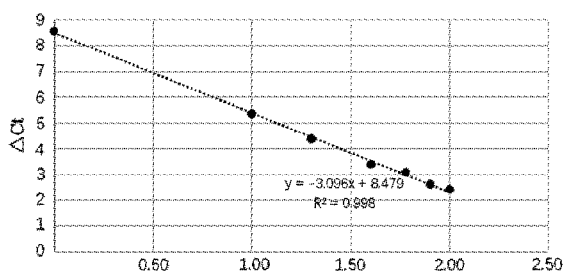
图 5 ΔC_t 值与牛肉含量对数值建立的标准曲线

Fig. 5 Standard curve established by ΔC_t value and the logarithmic value of beef content

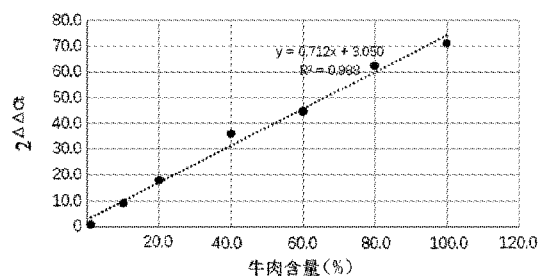
图 6 $2^{\Delta\Delta C_t}$ 值与牛肉含量建立的标准曲线

Fig. 6 Standard curve established by $2^{\Delta\Delta C_t}$ value and beef content

表 5 ΔC_t 值模拟混合肉样检测结果Table 5 Detected results of the mixed meat samples simulated by ΔC_t value

模拟混合牛肉含量 (%)	<i>bosPDE</i> Ct 值		<i>bosPDE</i> Ct 平均值	标准偏差 SD	<i>LcoR</i> CT 值		<i>LcoR</i> CT 平均值	标准偏差 SD	ΔC_t	含量对数值	检测结果	回收率 (%)
	1	2			1	2						
35	27.2	27.14	27.170	0.0424	23.50	23.51	23.505	0.0071	3.665	1.555	35.88	102.52
50	27.04	27.15	27.095	0.0778	23.93	23.78	23.855	0.1061	3.240	1.692	49.22	98.44
65	25.82	25.64	25.730	0.1273	22.94	22.63	22.785	0.2192	2.945	1.787	61.29	94.30
90	25.45	25.49	25.470	0.0283	23.13	22.89	23.010	0.1697	2.460	1.944	87.91	97.68

2.6 模拟混合样品验证

将牛肉质量百分比为 35%、50%、65%、90% 模拟混合样品，经荧光定量 PCR 扩增后平均 Ct 值分别代入基于 ΔC_t 值与 $2^{\Delta\Delta C_t}$ 值建立的标准曲线计算牛肉成分含量，并计算回收率，以验证定量检测结果的准确性，结果见表 5、表 6。基于 ΔC_t 值建立的标准曲线检测的模拟混合牛肉含量的回收率在 94.30%~102.52%，基于 $2^{\Delta\Delta C_t}$ 值建立的标准曲线检测的回收率在 98.55%~106.30%。基于 ΔC_t 值

计算的试验结果总体偏低，基于 $2^{\Delta\Delta C_t}$ 值计算的实验结果总体偏高，取两者平均值后结果见表 7，回收率在 96.42%~104.42%，由图 7 可知，其回收率最接近 100%，即准确度最高。试验表明，取 ΔC_t 值与 $2^{\Delta\Delta C_t}$ 值模型计算结果后的平均值，得出的牛肉成分含量与实际牛肉成分含量准确度得到提高，可为后期相关检测方法及标准的建立提供参考。

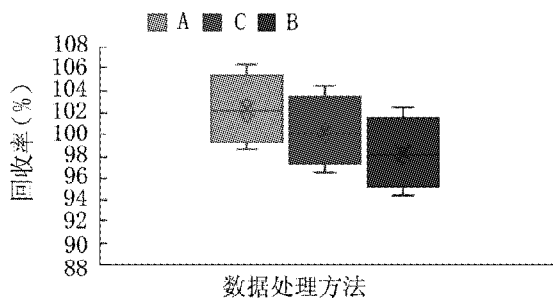
表 6 $2^{\Delta\Delta C_t}$ 值模拟混合肉样检测结果Table 6 Detected results of the mixed meat samples simulated by $2^{\Delta\Delta C_t}$ value

模拟混合牛肉含量 (%)	<i>bosPDE</i> Ct 值		<i>bosPDE</i> Ct 平均值	标准偏差 SD	<i>LcoR</i> CT 值		<i>LcoR</i> CT 平均值	标准偏差 SD	ΔC_t	$\Delta\Delta C_t$	$2^{\Delta\Delta C_t}$	检测结果	回收率 (%)
	1	2			1	2							
35	27.2	27.14	27.17	0.0424	23.50	23.51	23.505	0.0071	3.665	4.885	29.5	37.21	106.30
50	27.04	27.15	27.095	0.0778	23.93	23.78	23.855	0.1061	3.24	5.310	39.7	51.42	102.84
65	25.82	25.64	25.73	0.1273	22.94	22.63	22.785	0.2192	2.945	5.605	48.7	64.06	98.55
90	25.45	25.49	25.47	0.0283	23.13	22.89	23.01	0.1697	2.46	6.090	68.1	91.36	101.52

表 7 ΔCt 值与 $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值线性模型均值处理后的混合肉样检测结果

Table 7 Detected results of the mixed meat samples after the mean processing of linear model with ΔCt value and $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ value

模拟混合牛肉含量(%)	结果平均值	回收率(%)
35	36.55	104.42
50	50.32	100.64
65	62.68	96.42
90	89.63	99.59



注：A 为基于 $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值线性模型结果回收率，B 为基于 ΔCt 值线性模型结果回收率，C 为 A 和 B 结果平均值回收率

图 7 3 种方法结果的回收率比较分析

Fig. 7 Comparative analysis of the recovery rates of the three methods and results

3 讨论与结论

随着肉类掺假案例的暴露，肉类掺假检测技术也随之成了食品安全问题研究的热点，主要研究方法有传统的形态学方法、基于光谱的检测方法、基于蛋白的检测方法和基于核酸的检测方法^[2]。其中，基于核酸的实时荧光定量 PCR 技术灵敏度高、特异性强，在实现肉制品中动物源性成分的定量检测研究中得到广泛应用^[18-19]。目前已报道的实时荧光定量 PCR 技术量化分析方法主要为基于线粒体 DNA^[17,20-21] 和细胞核单拷贝 DNA^[22-23] 两种。然而，由于同一物种在相同组织的不同时期或不同组织间的线粒体 DNA 拷贝数差异显著^[24-25]，不适用于定量分析。核 DNA 的拷贝数因其在不同品种动物组织中具有良好的稳定性^[26]，近年来成为物种源性成分定量检测研究的热点。虽然，目前已报道的动物源性成分定量检测方法层出不穷，但尚无可推广的国家标准方法发布。本研究以牛细胞核单拷贝磷酸二酯酶基因 (*bosPDE*) 特异的细胞核单拷

贝基因为研究对象，通过实时荧光相对定量法 ΔCt 值与 $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值分别建立标准曲线，取两者的平均值，建立了肉制品中牛源性成分及含量的检测方法。研究表明，该方法特异性强、灵敏度高，准确度也均比 ΔCt 值或 $2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值曲线所得结果的准确度高。本研究建立的方法可准确识别出肉制品中是否含有牛肉成分，并可用于牛肉掺入猪肉或污染猪肉后牛肉含量的量化检测，可为肉制品市场监管及相关标准制定提供有力的科学依据。

参考文献：

- [1] 任君安, 黄文胜, 葛毅强, 等. 肉制品真伪鉴别技术研究进展 [J]. 食品科学, 2016, 37 (1): 247-257.
- [2] 纪艺, 陈笑芸, 丁霖, 等. 肉类及肉制品中动物源性成分鉴别方法研究进展 [J]. 生物技术进展, 2020, 10 (6): 711-716.
- [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] 刘敏, 李升升, 张艳, 等. 牛肉掺假鉴别技术研究进展 [J]. 食品工业科技, 2023, 44 (7): 477-489.
- [5] 郭韶珂, 曹梦丽, 王兴东, 等. 甘南牦牛肉品质及营养成分分析 [J]. 中国草食动物科学, 2021, 41 (6): 13-17.
- [6] 曹兵海, 李俊雅, 王之盛, 等. 2022 年度肉牛牦牛产业技术发展报告 [J]. 中国畜牧杂志, 2023, 59 (3): 330-335.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 马炳存, 崔学文, 李琰歆, 等. 基于实时荧光聚合酶链式反应技术定量检测肉制品中动物源性成分研究进展 [J]. 肉类研究, 2021, 35 (7): 44-49.
- [10] AMARAL J S, SANTOS G, OLIVEIRA M B P P, et al. Quantitative detection of pork meat by EvaGreen real-time PCR to assess the authenticity of processed meat products [J]. *Food Control*, 2017, 72: 53-61.
- [11] 郑景生, 吕蓓. PCR 技术及实用方法 [J]. 分子植物育种, 2003 (3): 381-394.
- [12] 陈佳. 樱桃制品中植物源性成分筛查及定量鉴别技术研究 [D]. 保定: 河北农业大学, 2020.
- [13] 孙良广, 黄文婧. 实时荧光 PCR 技术快速检测莲蓉制品中芸豆成分 [J]. 食品科学, 2017, 38 (22): 330-334.
- [14] 潘良文, 宁雪, 王强, 等. 火鸡源性成分实时荧光 PCR 检测方法 ISO 标准研制 [J]. 食品科学, 2023: 1-13. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.ts.20230621.1810.024.html>.
- [15] LAUBE I, ZAGON J, SPIEGELBERG A, et al. Development and design of a 'ready-to-use' reaction plate for a PCR-based simultaneous detection of animal species used in foods [J]. *In-*

- ternational Journal of Food Science & Technology*, 2007, 42 (1): 9–17.
- [16] WANG W, LIU J, ZHANG Q, et al. Multiplex PCR assay for identification and quantification of bovine and equine in minced meats using novel specific nuclear DNA sequences [J]. *Food Control*, 2019, 105: 29–37.
- [17] 史莹莹, 康雨薇, 邵俊锋, 等. 实时荧光定量 PCR 鉴定肉制品中牛源性成分及其含量 [J]. *食品研究与开发*, 2020, 41 (6): 158–163.
- [18] DRUML B, UHLIG S, SIMON K, et al. Real-Time PCR Assay for the Detection and Quantification of Roe Deer to Detect Food Adulteration-Interlaboratory Validation Involving Laboratories in Austria, Germany, and Switzerland [J]. *Foods*, 2021, 10 (11): 2645.
- [19] PLESKACHEVA M, ARTAMONOVA M, LITVINOVA E, et al. Methodology for identification and quantification of chicken meat in food products [J]. *Foods and Raw Materials*, 2020: 98–106.
- [20] CHEN X, LU L, XIONG X, et al. Development of a real-time PCR assay for the identification and quantification of bovine ingredient in processed meat products [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10 (1): 2052. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59010-6>.
- [21] DOLCH K, ANDRÉE S, SCHWÄGELE F. Comparison of Real-Time PCR Quantification Methods in the Identification of Poultry Species in Meat Products [J]. *Foods*, 2020, 9 (8): 1049.
- [22] WANG W, FU M, ZHANG Q, et al. A novel quantitative real-time PCR method for the detection of mammalian and poultry species based on a shared single-copy nuclear DNA sequence [J]. *Food Chemistry*, 2021, 341: 128170.
- [23] 杨瑶, 斯能武, 严钰澳, 等. 实时荧光 PCR 定量检测肉制品中猪源性成分 [J]. *食品工业科技*, 2022, 43 (3): 268–274.
- [24] 王婷. 鸡线粒体 DNA 拷贝数差异研究 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2017.
- [25] FLOREN C, WIEDEMANN I, BRENIG B, et al. Species identification and quantification in meat and meat products using droplet digital PCR (ddPCR) [J]. *Food Chemistry*, 2015, 173: 1054–1058.
- [26] 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, 36 (5): 86–91.

(责任编辑: 林玲娜)