

肉制品异源基因检测技术研究进展

胡 谦^{1,2}, 陈 颖², 倪 凯³, 葛兆方³, 曾海娟¹, 王淑娟¹, 马 兰¹, 刘 箐^{1,*}

(1.上海理工大学医疗器械与食品学院, 上海 200093; 2.中国检验检疫科学研究院, 北京 100176;

3.徐州绿健乳品饮料有限公司, 江苏 徐州 221006)

摘 要:近年来, 食品掺假逐渐成为消费者关注的重要食品安全问题之一。由于利益的驱使, 在肉制品行业异源肉质掺假现象尤其严重。目前, 用于肉制品异源基因检测的技术包括普通聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术、DNA指纹技术、实时荧光定量PCR技术、微滴式数字PCR技术、DNA条形码技术等。本文综述了肉制品中异源基因检测技术的研究进展, 并对每种方法的优缺点和发展趋势予以讨论。

关键词:肉制品; 异源基因; 检测技术

A Review of Recent Progress in Detection of Heterologous Genes in Meat Products

HU Qian^{1,2}, CHEN Ying², NI Kai³, GE Zhaofang³, ZENG Haijuan¹, WANG Shujuan¹, MA Lan¹, LIU Qing^{1,*}

(1. School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China;

2. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China;

3. Xuzhou Green and Healthy Dairy Drinks Co. Ltd., Xuzhou 221006, China)

Abstract: In recent years, food adulteration has gradually become an important food safety issue of consumer concern. Driven by interests, adulteration with heterogeneous meat is a particularly serious problem in the meat processing industry. The current technologies available for the detection of heterologous genes in meat products include general polymerase chain reaction (PCR), DNA fingerprinting, real-time quantitative PCR, droplet digital PCR and DNA barcoding. This paper reviews recent progress in the development of technologies for the detection of heterologous genes in meat products, and discusses the advantages and disadvantages of each technology as well as future trend.

Keywords: meat products; heterologous gene; detection technology

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201815040

中图分类号: TS207.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2018) 15-0275-08

引文格式:

胡谦, 陈颖, 倪凯, 等. 肉制品异源基因检测技术研究进展[J]. 食品科学, 2018, 39(15): 275-282. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201815040. <http://www.spkx.net.cn>

HU Qian, CHEN Ying, NI Kai, et al. A review of recent progress in detection of heterologous genes in meat products[J]. Food Science, 2018, 39(15): 275-282. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201815040. <http://www.spkx.net.cn>

随着现代食品产业的分工越来越细, 链条越来越长, 食品掺假的问题在各个环节都可能出现。2013年的“欧洲马肉风波”波及16个国家, 起因是商家在牛肉中掺入的马肉中含有对人体有害的苯基丁氮酮 (又名“保泰松”)。消费者一般直接通过标签了解食品的成分, 确定所宣传的高商业价值的物种不被其他较低价值物种部分或完全替代非常重要。误导性标签也可能对健康有

负面影响, 特别是没有说明的潜在过敏原对过敏体质的消费者危害极大。总而言之, 肉类掺假不但使食品产业朝着不健康的方向发展, 还严重打击了消费者对食品产业的信心, 带来了经济损失和对安全问题的担忧。

食品识别的初始方法基于形态特征, 例如风味、颜色、形状和味道。在19世纪, 食品检测方法得到了改善, 人们开始使用分析天平和显微镜识别外来物质^[1]。有

收稿日期: 2017-05-28

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31371776); 上海市科委“科技创新行动计划”长三角科技联合攻关领域项目 (15395810900); 徐州绿健乳品饮料有限公司“乳制品生产体系致病菌快速检测”项目 (3A15308006)

第一作者简介: 胡谦 (1994—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品质量与安全。E-mail: hq_huqian@126.com

*通信作者简介: 刘箐 (1970—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食源性致病菌致病机理、疫苗及快速检测技术。

E-mail: liuq@usst.edu.cn

研究人员开发了基于脂质和蛋白质的检测方法^[2-3],但其存在许多的缺陷,不适用于成分复杂的食品,而且需要昂贵的仪器和复杂的统计分析;同时,脂质和蛋白质容易在加工处理过程中变性,不能满足鉴定需要。与上述方法相比,基于DNA的检测方法优点有:1) DNA比蛋白质的耐热性强,高温处理过的食品中仍能提取出小片段的DNA;2) 不依赖于组织和细胞的类型;3) 不同的基因进化速率不同,可以根据实验目的选择不同的目的基因;4) DNA比蛋白质具有更高的种间多态性,有利于品种鉴定^[4]。目前,用于肉制品检测的基因一般位于线粒体上。线粒体DNA(mtDNA)具有分子结构简单^[5]、严格的母系遗传^[6]、无组织特异性、无重组^[7]、与核基因无共同序列^[8]、进化速率快^[9]、多拷贝^[8]及具有分子钟机制^[10]等优点。mtDNA常用的标记基因主要有细胞色素b(Cyt b)基因、12S rRNA基因、16S rRNA基因、D-loop基因、ND基因、细胞色素C氧化酶亚基I(COI)基因^[11]。具有单拷贝特性的核基因可用于肉制品掺假的定量检测,目前所选择的单拷贝基因包括DNA复制蛋白A基因、生长因子 β -3基因、白细胞介素-2前体基因、 β -肌动蛋白基因、兰诺定受体基因、环状鸟苷酸磷酸二酯酶基因等。综上所述,基于形态特征、蛋白质和脂质的检测方法有非常多的局限性,而基于核酸的检测方法具有适用面广、特异性强等优点。因此,基于核酸分子开发出简单、快捷、准确的肉制品鉴伪技术将成为未来的趋势。

1 普通PCR技术

1.1 常规PCR技术

以核酸为基础的聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术已经成为食品掺假检测的重要手段之一,并得到了广泛的应用。PCR技术的突出优点是特异性强,由于核酸带有生物的遗传信息,针对不同生物设计物种特异性引物,扩增出特定的DNA片段,经琼脂糖凝胶电泳分析扩增出的DNA片段,以鉴定食品的掺假。徐瑗聪等^[12]已经开发了一种针对食品中猪肉、牛肉、绵羊肉掺假检测的试剂盒。Karabasanavar等^[13]针对位于细胞核的5-氨基乙酰丙酸合酶基因设计了一对高度特异性引物,检测限达到10 pg,并且验证该PCR技术适用于60、80、100、121℃下加工30 min的鸡肉制品,对18种动物和6种家禽没有扩增条带,说明该PCR技术具有高度的特异性。DNA比蛋白质和脂质具有更高的热稳定性,因此PCR技术可以用于热加工后肉制品的检测。

PCR技术的另一个优点是灵敏度高,只要有极少量的掺假行为就可以被检测出来。但是,高的检测灵敏度也给PCR技术带来了风险,肉制品在加工或实验时受到外界少量污染也会被检测出来,对实验造成错误判断。

PCR技术还具有对检测样本要求低的特点,因为核酸广泛存在于动物的细胞中,而且每个生物个体的核酸具有唯一性,动物不同组织和器官的DNA序列完全相同。PCR技术的取样非常广泛,在动物的肉、毛发、皮肤甚至是骨头里都有DNA。但是常规PCR技术只能进行定性分析,每次只能鉴定一种成分。

1.2 多重PCR技术

多重PCR技术又称多重引物PCR或复合PCR技术,它是在同一PCR反应体系中加上2对或2对以上引物,对单一样本扩增多个核酸片段的PCR技术。其原理、反应试剂和操作过程与常规PCR基本相同。在1988年,Chamberlain等^[14]利用多重PCR技术分析杜氏肌营养不良症基因座中的几个缺失突变,这是多重PCR技术的首次应用。作为一种多靶点检测技术,多重PCR受到了研究人员的青睐。何玮玲等^[15]基于4种肉类线粒体Cyt b基因差异性位点,采用正向引物共用,反向引物特异,设计了两套各5条引物,对反应条件进行优化,同时比较了几种总DNA提取方法的提取效率和纯度,确定了两种比较好的提取总DNA的方法。最终建立快速鉴定4种肉类的多重PCR方法,相比于现有标准中的常规PCR技术提高了筛选通量。Dai Zhenyu等^[11]基于线粒体COI基因的高杂合区设计7对物种特异性引物,证明这些引物具有高度物种特异性,对于不同的DNA来源没有交叉反应,并用建立的多重PCR技术鉴定了当地4种常见的肉类:猪肉、牛肉、鸡肉和羊肉。

多重PCR并非简单地把多个单一的常规PCR混合,而是要对目的基因进行全面的分析,优化反应体系和反应条件。选择的目基因必须具有高度特异性,根据选择的多个目的基因设计多对引物,扩增出的多个片段还应具有明显的长度差异。多重PCR的成功与否取决于在单组PCR条件下引物与其各自靶标选择性退火的能力,因此需要对多个目的基因进行复杂的引物设计和严格的反应条件优化。因为优化熔融、退火和延伸温度困难,以及需要防止其形成二级结构和引物二聚体,所以引物设计是多重PCR系统开发中最关键的步骤^[16]。

2 DNA指纹技术

2.1 PCR-RAPD技术

随机扩增多态性DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)是以随机合成大量的10 bp左右寡核苷酸单链为引物,提取待测样品的DNA进行PCR扩增,然后用琼脂糖凝胶电泳进行分析。PCR-RAPD技术在DNA序列未知的情况下,可以直接对物种进行分析。然而Fernandez等^[17]的研究表明PCR-RAPD技术是在特异性较低的条件下去进行的,所以其重复性差。Rastogi等^[18]开发

了一种PCR-RAPD技术,根据扩增出的条带数量、亮度和长度进行分析,建立了一种可以鉴别牛、羊、猪、鸡等肉品的技术。Calvo等^[19]开发并评估了一种用于检测猪肉、鸡肉、鸭肉、火鸡肉和鹅肉的PCR-RAPD技术,检测灵敏度达到250 pg。

由于20世纪90年代基因数据库不够完善,PCR-RAPD技术可以作为一种很好的检测肉类掺假的手段。由于该技术操作简单、快速,不依赖基因组遗传信息,扩增片段的多态性反映了基因组DNA的多态性,因此在分子检测中被广泛使用^[20-21]。该技术的缺点有:重复性差、只能局限于定性分析;产生大量的扩增片段;结果分析复杂。但其对于基因序列不了解的物种不失为一种简便、快捷的分子生物技术。随着测序技术的不断完善和成本下降,PCR-RAPD可以结合DNA测序技术在肉制品检测中发挥更大的作用。

2.2 PCR-RFLP技术

限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)的原理是用PCR扩增出特异性的DNA片段,然后将扩增产物用限制性核酸内切酶消化切割成不同大小的片段,最后直接在琼脂糖凝胶电泳上分析切割后的片段^[22]。不同等位基因的限制性内切酶酶切位点分布不同,产生不同长度的DNA片段条带。Girish等^[23]从样品中提取DNA,用线粒体12S rRNA基因通用引物进行PCR扩增,使用限制性内切酶HinfI、Mph1103I、MvaI和Eco47I进行限制性分析,然后基于RFLP鉴定肉类。Muhammed等^[24]利用PCR-RFLP技术比较了不同DNA提取方法对生肉、加工肉的提取效率,使用通用引物扩增9个物种的线粒体Cyt b基因的部分序列。结果表明饱和和盐沉淀法是一种经济、理想的DNA提取方法,利用PCR-RFLP技术产生360 bp的Cyt b基因扩增子可以有效地检测生肉和加工肉的掺假。

PCR-RFLP技术还存在不足之处,比如重复性差、用限制性内切酶酶切时容易受到外界干扰、只适用于单一成分的样品、多成分混合样品会干扰实验结果等。由于有时切割后的片段长度区别不大,Layer等^[25]设计末端RFLP方法,使用荧光标记的引物扩增特定基因,用限制性内切酶消化,并通过毛细管电泳用激光诱导荧光进行分析。相比于琼脂糖凝胶电泳,毛细管电泳具有更加精准的DNA片段检测能力,并且可以容易地区分相似大小的片段。结合毛细管电泳可以大大提高目的DNA检测的特异性,而且方法简便、分型时间短、不需要昂贵的仪器,一般的实验室就可以检测。

2.3 PCR-AFLP技术

扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)是Vos等^[26]提出的DNA指纹技术,是PCR-RAPD和PCR-RFLP技术的巧妙结合。使用

限制性内切酶消化总基因组DNA,将双链核苷酸衔接子连接到DNA片段上用作PCR扩增的引物结合位点,设计特异性引物进行PCR扩增,最后在琼脂糖凝胶上分析DNA片段多态性^[27]。在Vos等提出PCR-AFLP技术后,研究者迅速用于植物物种基因组的研究,其中大部分用于作物物种和具有重要经济价值的植物^[28-30]。在植物病原真菌方面,该技术主要涉及作物生产力和抗病性的研究;在细菌方面涉及菌株和谱系的鉴定,以及系统发育的构建。PCR-AFLP技术在分子生物学研究中有诸多优点,而在动物研究方面,研究者对此技术持保守态度。Huang Changwen等^[31]利用PCR-AFLP技术开发出了鸭的遗传图谱。一共产生了296个多态标记,每个引物对产生7~29个多态性标记。这表明使用AFLP标记的多色荧光检测是高通量的。Sasazaki等^[32]利用PCR-AFLP技术开发了一种可以用于日本黑牛和荷斯坦牛检测的技术。用500个引物组合产生了70 000个条带,每个引物组合平均有140个扩增片段。其中,约7 000个是日本黑牛和荷斯坦牛之间的多态性条带,仅有6个符合要求,误判率仅为1.98%,可以很好地区分这两个牛肉品种,有助于检测牛肉的造假。

PCR-AFLP技术的优点有:高效、快速、稳定、可靠、具有广泛的适用性^[33];可以对成分来源复杂的样品进行分析;可以产生足够多的标记以满足多态性差异小的样品。然而,在研究中会产生大量的酶切片段,找出特异性的片段往往会耗费大量的时间,而如何酶切获得特异性强的片段至关重要。

2.4 PCR-SSCP技术

单链构象多态性(single-strand conformation polymorphism, SSCP)是一种检测短DNA片段序列之间差异性的非常敏感的技术。其原理是基于单链DNA分子在聚丙烯酰胺凝胶中的电泳迁移率,而迁移率又取决于DNA分子的构象,这导致不同序列的DNA不均匀地迁移并呈现出不同的条带^[34]。吴亚君等^[35]采用PCR-毛细管电泳-SSCP技术建立了梅花鹿产品的快速筛查方法,在线粒体Cyt b基因上设计出可以扩增出梅花鹿、白唇鹿等7个鹿种样品的鹿科通用引物,实现了梅花鹿保健品中掺假鹿种成分的大批量快速检测。Tisza等^[36]根据线粒体12S rRNA基因设计引物,野鸡和火鸡样品产生了277 bp扩增子,鸡、珍珠鸡和鹅样品产生了278 bp扩增子,鸭子和番鸭样品分别产生了280 bp和281 bp扩增子,开发了PCR-SSCP和PCR-毛细管电泳-SSCP技术来鉴定7种家禽样品,这两种方法的重复性和灵敏度相接近,检测限达到了0.5% (质量分数,下同)。

SSCP是一种经济、简便、快捷的技术。但影响SSCP稳定性的因素很多,实验过程中须严格控制实验条件,鉴定时要求同时使用标准品以保证实验的准确性。凝胶

浓度和丙烯酰胺与甲叉双丙烯酰胺的比例会影响SSCP的稳定性,在不同的研究中最適浓度不同^[37]。恒定的电泳温度也是SSCP技术必不可少的,温度会影响单链DNA的分子构象,低温有利于维持单链DNA分子构象的稳定性,而高温会破坏DNA的构象^[38]。如果严格优化实验条件,可以鉴别DNA分子的碱基缺失、插入和突变,PCR-SSCP技术完全可以作为检测肉制品掺假分辨率极高的一种技术。

3 qPCR技术

实时荧光定量PCR (real-time quantitative PCR, qPCR) 技术于1993年首先由Higuchi等^[39]提出,从此,PCR技术实现了从定性到定量的飞跃。传统PCR技术只能对最后扩增的产物进行检测,而qPCR技术可以监测整个PCR扩增的过程。qPCR技术的原理是在PCR体系中加入特异性寡核苷酸探针或非特异性DNA荧光染料,在DNA扩增过程中监测荧光信号,制定标准曲线对未知样品进行定量分析^[40-41]。

加入特异性寡核苷酸探针是为了利用探针与目的片段特异性杂交产生的荧光信号,来监测PCR扩增。信号产生基于荧光共振能量迁移原理,即当供体分子的荧光光谱与受体分子激发光谱重叠,供体分子自身荧光强度衰减,受体分子荧光强度增强,典型的是TaqMan探针^[21]。Chisholm等^[42]对雉鸡和鹌鹑的*Cyt b*基因设计了引物和探针,并且优化以实现物种特异性鉴定。Köppel等^[43]用多重qPCR确定牛肉、猪肉、鸡肉和火鸡肉的比例,稀释4个物种的DNA来研究灵敏度。应用这种4重qPCR系统将能够有效地鉴定肉类产品的组成。吴亚君等^[44]以马和驴线粒体*tRNA-Thr*及D-loop区为靶序列,设计合成特异性引物和探针,建立了阿胶中马和驴成分高特异、高灵敏度的qPCR检测方法。

目前研究较为普遍的荧光染料有SYBR Green、SYTO和EvaGreen, 2011年Eischeid^[45]在研究中比较了3种染料对PCR的影响。使用荧光染料具有适用性广、实验成本低的特点。在DNA模板不断变化的情况下,基于染料的检测方法可以有效防止特异性探针结合区域碱基对错配导致的假阳性。大多数qPCR使用的荧光染料是SYBR Green,其具有非常高的信号,但是其会抑制PCR,并且相较于其他化学物质检测范围有限^[46]。所以SYBR Green必须以低浓度使用,从而避免在熔融期间染料再分布对实验造成影响。有研究表明SYTO染料(一种花青染料)最有潜力替代SYBR Green应用于qPCR^[45]。SYTO染料与DNA之间的作用非常复杂,受到静电力、范德华力、疏水作用和空间作用的影响。EvaGreen是另一种DNA染料,已经作为SYBR Green的替代品销售。

EvaGreen比SYBR Green使用浓度更高,能产生更强的荧光信号,同时灵敏度更高、稳定性更强,并且不对PCR有抑制作用。Meira等^[47]利用EvaGreen染料,基于线粒体*Cyt b*基因设计新的特异性引物,开发了对食品中马肉定性和定量检测技术,检测限达0.000 1%。Amaral等^[48]基于18S rRNA基因开发和验证了一种加工肉制品中猪肉定量的EvaGreen qPCR技术,可以对原料和热处理的肉类进行检测和定量分析,检测限和定量限分别高达0.000 1%和0.01%。Köppel等^[49]开发了一种定量多重qPCR方法,可以用于确定火鸡、鸡、鸭、鹅和猪肉样品的DNA和肉类部分比例,对于主要组分测量不确定度为39%;对于次要组成部分,不准确度约为124%。尽管测量不确定度很高,但其还是可以用于检测肉制品的掺假。You Jia等^[50]开发了一种区分鹿和其他家畜的多重qPCR技术,可以测试常见的鹿制品,包括鹿肉、鹿血、鹿茸,经检测这种用于鉴定鹿和其他家畜的高通量qPCR技术是特异性的、敏感的和可靠的。

表1 目前TaqMan qPCR技术在肉制品行业的国标和行标
Table 1 Current national standard and industry standards on TaqMan qPCR for the detection of meat products

标准编号	检测物种	检出限	目的基因	内参基因
SN/T 4418—2016	骆驼	0.01%	<i>Cyt b</i> 基因	生长激素基因
SN/T 4397—2015	牦牛	0.625%	<i>Cyt b</i> 基因	18S rRNA基因
SN/T 3730.1—2013	貂	0.01%	16S rRNA基因、 <i>Cyt b</i> 基因	18S rRNA基因
SN/T 3730.2—2013	狗	10 mg/kg	<i>D-loop</i> 基因	18S rRNA基因
SN/T 3730.3—2013	狐狸	100 mg/kg	<i>CO I</i> 基因	18S rRNA基因
SN/T 3730.4—2013	驴	10 mg/kg	<i>ATPase 6</i> 基因	无
SN/T 3730.5—2013	马	10 mg/kg	<i>ATPase 6</i> 基因	无
SN/T 3730.6—2013	猫	0.01%	<i>CO I</i> 基因	18S rRNA基因
SN/T 3730.7—2013	水牛	1 g/kg	<i>ATPase 8</i> 基因	无
SN/T 3730.8—2013	猪	10 mg/kg	<i>ATPase 8</i> 基因	18S rRNA基因
SN/T 3731.3—2013	鸽子	10 mg/kg	16S rRNA基因	无
SN/T 3731.4—2013	火鸡	0.1 g/kg	12S rRNA基因	无
SN/T 3731.6—2013	鸬鹚	10 mg/kg	<i>CO I</i> 基因	无
SN/T 3589.1—2013	石斑鱼	1%	<i>CO I</i> 基因	18S rRNA基因
SN/T 3589.2—2013	安康鱼	0.01%	<i>CO I</i> 基因	18S rRNA基因
SN/T 3589.3—2013	鲑鱼	100 mg/kg	生长激素基因	无
SN/T 3589.5—2013	黄鱼	0.01%	<i>ND6</i> 基因	18S rRNA基因
SN/T 3589.6—2013	金枪鱼	100 mg/kg	<i>Cyt b</i> 基因	18S rRNA基因
SN/T 3589.7—2013	鳕鱼	1 g/kg	16S rRNA基因	无
SN/T 2980—2011	牛、山羊、绵羊混合成分	无	<i>Cyt b</i> 基因	无
GB/T 25165—2010	牛、羊、猪单体成分	0.1%	生长激素基因、 <i>Cyt b</i> 基因、肌蛋白基因	18S rRNA基因
SN/T 2051—2008	牛、羊、猪单体成分;牛、羊混合成分	0.1%	<i>CO I</i> 基因	无

qPCR技术基于Ct值进行定量分析,Ct值是指反应体系中荧光信号达到所设定的阈值时的循环数。qPCR体系的Ct值与起始拷贝数的对数具有线性关系,起始拷贝数越大,达到设定阈值的循环数就越小,即Ct值就越小^[51],所以说这种定量是相对定量。另外,qPCR技术可以和多

重PCR技术结合,在一个qPCR体系中加入多对引物,提高了检测通量。今后单拷贝的核基因将作为qPCR的主要研究对象,这是因为线粒体基因具有多拷贝的特点,在定量检测中会造成较大误差。Cheng Xin等^[52]针对核基因(猪的 β -肌动蛋白基因、鸡的转化生长因子基因、鸭的T细胞生长因子基因)设计了特异性引物和TaqMan探针,建立了一种多重TaqMan qPCR技术,同时对血凝块样品中猪、鸡和鸭成分进行定性和定量分析,结果显示无交叉反应。TaqMan qPCR技术在我国已经广泛应用于肉制品真伪检测,表1是我国肉的定性检测国标和行标。目前肉制品检测标准还主要集中于定性检测,为了鉴定掺假程度、区别外界污染和人为掺假,定量检测还有待研究。随着肉制品掺假的复杂化,为了更快速地检测多个不同成分,开发高通量的检测技术也将成为未来的研究重点。

4 ddPCR技术

第一代PCR技术通过琼脂糖凝胶电泳进行终点分析以获得定性结果。qPCR技术的出现标志着第二代PCR技术的诞生,其通过使用荧光染料或特异性探针监测扩增的进展来实现定量。在qPCR中,通过Ct值来建立标准曲线获得定量信息,需要外部校准物或内源对照的标准化以估计未知物的浓度,这反过来限制了该技术定量的准确性。逐渐有人意识到,PCR终点和泊松分布的组合可以对核酸浓度进行绝对定量,这种方法被称为数字PCR(digital-PCR, dPCR)技术。目前dPCR技术分为微滴式数字PCR(droplet digital-PCR, ddPCR)技术和芯片式数字PCR(chip digital-PCR, cdPCR)技术,由于肉制品掺假检验主要用的是ddPCR技术,所以这里主要讨论ddPCR技术。在ddPCR中,利用微滴技术把整个体系均匀地分配到大量的微滴中,每个微滴中含有一个或多个或不含目的DNA模板,每个微滴中单独进行PCR扩增,反应结束后逐个对微滴检测荧光信号,最后根据荧光微滴的个数和泊松分布来进行绝对定量^[53]。Scollo等^[54]在实验中比较了qPCR和ddPCR技术的检测浓度和分辨率,结果显示ddPCR技术具有更好的分辨率和较低的极限稀释值。ddPCR线性回归分析显示其准确性与qPCR相近,ddPCR检测的是大量单个的微滴,从而进行定量分析,可以区分少量的外界污染和刻意的造假。但应特别注意避免抑制DNA聚合酶扩增的污染物产生的假阴性结果。

ddPCR技术是对目的DNA的绝对定量,不借用标准曲线,所以目的DNA的选择至关重要。mtDNA具有多拷贝的特点,这使得ddPCR利用mtDNA来定量存在很大的偏差。为了克服这个问题,开发针对单拷贝的基因是ddPCR技术的关键。任君安等^[55]以羊和猪的单拷贝核基因DNA复制蛋白A1(replication protein A1, RPA1)为靶

基因,设计了特异性引物和探针,通过理论推导验证了两种肉基因拷贝数之比的固定值,根据此将羊肉和猪肉的拷贝数转换为相对质量分数,从而绝对定量羊肉和猪肉的比例,猪肉的检测限达到1%。Floren等^[56]开发了一种ddPCR测定靶向核 F_2 基因,对牛肉、马肉和猪肉在加工肉制品中精确量化的方法。运用该方法对14个不同的物种进行了特异性验证,结果显示定量限和检测限分别为0.01%和0.001%。表2总结了国内外关于ddPCR技术在肉制品掺假定量检测方面的研究现状。

表2 国内外ddPCR定量技术研究进展
Table 2 Recent progress of ddPCR in China and abroad

检测物种	目的基因	荧光	定量限	参考文献
绵羊、山羊和鸡	RPA1基因	TaqMan探针	1%	[57]
绵羊、山羊和猪	RPA1基因	TaqMan探针	1%	[55]
羊	催乳素受体基因	TaqMan探针	100 ng	[58]
羊、猪	催乳素受体基因、 β -肌动蛋白基因	TaqMan探针	无	[59]
牛、猪	β -肌动蛋白基因	TaqMan探针	100 ng	[60]
牛、马和猪	F_2 基因、Cyt b基因	TaqMan探针	0.01%	[56]
猪、鸡	β -肌动蛋白基因、转化生长因子基因	TaqMan探针	80、40 ng	[61]

5 DNA条形码技术

当前基于PCR技术检测掺假缺乏标准化和普遍性。2003年,Hebert等^[62]开发出了一种新的DNA检测技术——DNA条形码技术。该技术让DNA检测技术从样品收集到结果分析程序标准化、数据分析计算机化。利用生物体内一段几百个碱基的DNA序列作为条形码进行物种鉴定,就像超市中使用的条形码一样。理想的DNA条形码技术需要具有两个基本特征:高分类学覆盖率,也称普遍性,是指在广泛的物种中具有DNA条形码检测的靶片段;高分辨率确保DNA条形码序列具有高的种间多态性和低的种内变异性。

目前,常用线粒体CO I基因的部分片段,一般以500~700个碱基序列作为动物的条形码区域,原因是其编码的氨基酸序列受到了严格的限制,可以使用通用引物。此外,缺乏内含子、多拷贝、严格的母系遗传使线粒体基因组成为良好的条形码候选者。为管理全球条形码数据推出的生命条形码数据系统(<http://www.barcodinglife.org>)已经公布了550多万条动物DNA条形码,同时创建了3个全球性节点——中央节点、区域节点和国家节点。高玉时等^[63]基于线粒体CO I基因,以13个中国地方鸡种和2个国外引进品种作为研究对象,发现15个鸡种的DNA分类学和形态学分类基本一致,建立的DNA条形码技术可以有效地识别不同鸡种。Nagalakshmi等^[64]从印度不同的地理位置收集了100种海鲜样品,包括新鲜、冷冻、即食和罐装产品,将CO I基因序列与数据库进行比较,对样品进行鉴定。

DNA条形码技术的检测范围更广,结果也更加精确。如果将来给每个物种一个条形码将大大加快物种鉴定的速度。海洋物种极为丰富,从形态上难以区分。迄今为止,对一些生物群体(例如鱼类)的研究很多,但仍然需要大量的工作来对未被研究的群体提供可靠的DNA条形码数据。

6 结 语

随着人们生活水平的提高,消费者对肉制品的需求越来越大。商家为了追求利益,往往会在肉制品中掺入一些廉价肉或者未经检验检疫的肉。以上方法是近些年来基于核酸检测的主要方法。形态学和基于蛋白质水平的检测技术在肉制品掺假、掺杂检测中有非常大的局限性,基于核酸的检测技术特异性强、灵敏度高,且核酸比蛋白质和脂质的热稳定性强。所以,基于核酸的检测方法逐渐成为国内外肉制品掺假检测的研究热点。

常规PCR技术对检测样品要求低,动物组织细胞中均含有核酸,微量的异源DNA都可以检测出来。但是常规PCR只能做定性检测,不能区分异源DNA是故意掺假还是污染导致。多重PCR技术建立在常规PCR技术之上,通过对一个反应体系设计多对引物,可以增加多重PCR检测通量,但是多重PCR技术与常规PCR技术一样不能定量分析,从而不能区分污染。DNA指纹技术建立在DNA序列多态性的基础上,发展出众多技术:RAPD、RFLP、AFLP、SSCP。DNA指纹技术具有多态性高、特异性强、灵敏度高等特点。

早期肉制品检测主要集中在定性检测方面,然而随着掺假形式的多变,为了提高检测的可信度,对肉制品中成分定量分析成为必然趋势。qPCR技术为肉制品检测提供了新的途径,该技术可以监测整个反应过程。目前该技术同样存在一些缺陷:如定量依赖于Ct值和标准曲线;特异性探针价格昂贵;需要开发对PCR扩增没有抑制的荧光染料;选择合适的单拷贝目的基因设计引物困难;对检测机构的设备要求较高;单次检测成本较高;国内定量检测的标准不够完善,还局限于定性检测;容易受到非目的基因和杂质的干扰。ddPCR技术作为第3代PCR技术,可以对样品中的DNA绝对定量,不需借用标准曲线。但是ddPCR技术的检测通量低;灵敏度还有待提升;对实验人员的操作要求更高;目前还没有建立任何的标准。相信随着技术的不断完善,qPCR技术和ddPCR技术将在定量检测领域发挥更好的作用。mtDNA在不同生物、不同组织和细胞中具有多拷贝的特点被广泛应用于肉制品检测,但是这也导致mtDNA不适合于定量分析。在掺假肉制品的定量分析中,重要的是找到

单拷贝合适的内源基因作为定量分析的依据。DNA条形码技术是对扩增出的DNA片段测序,然后与已知物种的DNA进行比对,这种技术相对于其他技术准确性最高。但是仍然需要大量的工作以完善DNA条形码数据库,而种间差异性低的物种不适用于DNA条形码技术。

我国于2011年颁布GB 7718—2011《预包装食品标签通则》,预包装食品的标签上应标示配料表,规定按制造或加工食品时加入量的递减顺序排序,加入量不超过2%的配料除外。法规的实施还需要建立完善的检测标准,这就要求科研人员针对不同物种开发重复性高、特异性强、准确可靠、灵敏度高、标准化的检测技术。

参考文献:

- [1] HAHN H. Animal meal: production and determination in feedstuffs and the origin of bovine spongiform encephalopathy[J]. *Naturwissenschaften*, 1999, 86(2): 62-70. DOI:10.1007/s001140050573.
- [2] ROHMAN A, SISINDARI, 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. DOI:10.1016/j.meatsci.2010.12.007.
- [3] AYAZ Y, AYAZ N D, EROL I. Detection of species in meat and meat products using enzyme-linked immunosorbent assay[J]. *Journal of Muscle Foods*, 2006, 17(2): 214-220. DOI:10.1111/j.1745-4573.2006.00046.x.
- [4] 李文静, 李燕俊. 分子学方法鉴定肉制品种属来源的研究进展[J]. *国外医学(卫生学分册)*, 2009, 36(3): 151-158. DOI:1001-1226(2009)03-0151-08.
- [5] ILHAK I, ARSLAN A. Identification of meat species by polymerase chain reaction (PCR) technique[J]. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 2007, 31(3): 159-163.
- [6] GUHA S, KASHYAP V K. Development of novel heminested PCR assays based on mitochondrial 16S rRNA gene for identification of seven pecora species[J]. *BMC Genetics*, 2005, 6(1): 2469-2480. DOI:10.1186/1471-2156-6-42.
- [7] JAIN K K. Lab-on-a-chip and microarrays: discovery and development[J]. *Pharmacogenomics*, 2003, 4(2): 123-125. DOI:10.1517/phgs.4.2.123.22633.
- [8] PETER C, BRUNENNIWELE C, CAMMANN K, et al. Differentiation of animal species in food by oligonucleotide microarray hybridization[J]. *European Food Research and Technology*, 2004, 219(3): 286-293. DOI:10.1007/s00217-004-0958-6.
- [9] KOCHZIUS M, NÖLTE M, WEBER H, et al. DNA microarrays for identifying fishes[J]. *Marine Biotechnology*, 2008, 10(2): 207-217. DOI:10.1007/s10126-007-9068-3.
- [10] DOOLEY J J, SAGE H D, BROWN H M, et al. Improved fish species identification by use of lab-on-a-chip technology[J]. *Food Control*, 2005, 16(7): 601-607. DOI:10.1016/j.foodcont.2004.06.022.
- [11] DAI Zhenyu, QIAO Jiao, YANG Siran, et al. Species authentication of common meat based on PCR analysis of the mitochondrial *CO I* gene[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 176(6): 1770-1780. DOI:10.1007/s12010-015-1715-y.
- [12] 徐瓊聰, 董凱, 黃昆倫, 等. 猪肉、牛肉和绵羊肉掺伪PCR的检测技术[J]. *农业生物技术学报*, 2013, 21(12): 1504-1508. DOI:10.3969/j.issn.1674-7968.2013.12.013.

- [13] KARABASANAVAR N S, SINGH S P, KUMAR D, et al. Development and application of highly specific PCR for detection of chicken (*Gallus gallus*) meat adulteration[J]. European Food Research and Technology, 2013, 236(1): 129-134. DOI:10.1007/s00217-012-1868-7.
- [14] CHAMBERLAIN J S, GIBBS R A, RANIER J E, et al. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification[J]. Nucleic Acids Research, 1988, 16(23): 11141-11156. DOI:10.1093/nar/16.23.11141.
- [15] 何玮玲, 张驰, 杨静, 等. 食品中4种肉类成分多重PCR的快速鉴别方法[J]. 中国农业科学, 2012, 45(9): 1873-1880. DOI:10.3864/j.issn.0578-1752.2012.09.024.
- [16] ALI M E, RAZZAK M A, HAMID S B A. Multiplex PCR in species authentication: probability and prospects: a review[J]. Food Analytical Methods, 2014, 7(10): 1933-1949. DOI:10.1007/s12161-014-9844-4.
- [17] FERNANDEZ S, COSTA A C, KATSUYAMA Â M, et al. A survey of the inter- and intra- specific RAPD markers of *Eimeria* spp. of the domestic fowl and the development of reliable diagnostic tools[J]. Parasitology Research, 2003, 89(6): 437-445. DOI:10.1007/s00436-002-0785-2.
- [18] RASTOGI G, DHARNE M S, WALUJKAR S, et al. Species identification and authentication of tissues of animal origin using mitochondrial and nuclear markers[J]. Meat Science, 2007, 76(4): 666-674. DOI:10.1016/j.meatsci.2007.02.006.
- [19] CALVO J H, ZARAGOZA P, OSTA R. Random amplified polymorphic DNA fingerprints for identification of species in poultry pâté[J]. Poultry Science, 2001, 80(4): 522-524. DOI:10.1093/ps/80.4.522.
- [20] SCHEIDL T M, YEE M H A, TAMAOKI T. Anomalies in direct pairwise comparisons of RAPD fragments for genetic analysis[J]. Biotechniques, 1995, 19(5): 694-696.
- [21] 李宗梦, 赵良娟, 王永芳, 等. 肉及肉制品分子生物学鉴别技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(2): 405-409.
- [22] GALAL-KHALLAF A, MOHAMMED-GEBA K, OSMAN A G M, et al. SNP-based PCR-RFLP, T-RFLP and FINS methodologies for the identification of commercial fish species in Egypt[J]. Fisheries Research, 2017, 185: 34-42. DOI:10.1016/j.fishres.2016.09.031.
- [23] GIRISH P S, ANJANEYULU A S R, VISWAS K N, et al. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of mitochondrial 12S rRNA gene: a simple method for identification of poultry meat species[J]. Veterinary Research Communications, 2007, 31(4): 447-455. DOI:10.1007/s11259-006-3390-5.
- [24] MUHAMMED M A, BINDU B S C, JINI R, et al. Evaluation of different DNA extraction methods for the detection of adulteration in raw and processed meat through polymerase chain reaction: restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)[J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 52(1): 514-520. DOI:10.1007/s13197-013-1024-9.
- [25] LAYER F, GHEBREMEDHIN B, KÖNIG W, et al. Differentiation of *Staphylococcus* spp. by terminal-restriction fragment length polymorphism analysis of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene[J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 70(3): 542-549. DOI:10.1016/j.mimet.2007.06.015.
- [26] VOS P, HOGERS R, BLEEKER M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23(21): 4407-4414.
- [27] BLEARS M J, GRANDIS S A D, LEE H, et al. Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 1998, 21(3): 99-114. DOI:10.1038/sj.jim.2900537.
- [28] ZHOU Chenping, LI Chunping, LIANG Weiwei, et al. Identification of manganese-toxicity-responsive genes in roots of two citrus species differing in manganese tolerance using cDNA-AFLP[J]. Trees, 2017, 31(3): 813-831. DOI:10.1007/s00468-016-1507-1.
- [29] ARANG A, GASHTI A B. The power of microsatellite markers and AFLPs in revealing the genetic diversity of Hashemi aromatic rice from Iran[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2016, 15(6): 1186-1197. DOI:10.1016/S2095-3119(15)61221-7.
- [30] MASTAN S G, RATHORE M S, GHOSH A. Molecular characterization of genetic and epigenetic divergence in selected *Jatropha curcas* L. germplasm using AFLP and MS-AFLP markers[J]. Plant Gene, 2016, 8: 42-49. DOI:10.1016/j.plgene.2016.10.001.
- [31] HUANG Changwen, CHENG Yushin, ROUVIER R, et al. Duck (*Anas platyrhynchos*) linkage mapping by AFLP fingerprinting[J]. Genetics Selection Evolution, 2009, 41(1): 28-35. DOI:10.1186/1297-9686-41-28.
- [32] SASAZAKI S, ITOH K, ARIMITSU S, et al. Development of breed identification markers derived from AFLP in beef cattle[J]. Meat Science, 2004, 67(2): 275-280. DOI:10.1016/j.meatsci.2003.10.016.
- [33] 高炳森, 潘坤, 田建平, 等. 南药益智AFLP-PCR体系的建立与优化[J]. 生物技术, 2015, 25(3): 251-255. DOI:10.16519/j.cnki.1004-311x.2015.03.052.
- [34] HAYASHI K. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA[J]. PCR Methods and Applications, 1991, 1(1): 34-38.
- [35] 吴亚君, 韩建勋, 王斌, 等. 采用PCR-CE-SSCP技术快速筛查梅花鹿产品的鹿种真伪[J]. 食品科技, 2011, 36(11): 279-283. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2011.11.048.
- [36] TISZA Á, CSIKÓS Á, SIMON Á, et al. Identification of poultry species using polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) and capillary electrophoresis-single strand conformation polymorphism (CE-SSCP) methods[J]. Food Control, 2015, 59: 430-438. DOI:10.1016/j.foodcont.2015.06.006.
- [37] 刚锰, 葛辉, 王洪月, 等. 凝胶浓度对SSCP技术的影响[J]. 河北渔业, 2009, 37(5): 20-22. DOI:10.3969/j.issn.1004-6755.2009.05.006.
- [38] 梅平, 刘双信, 吕灿群. PCR-SSCP灵敏度的影响因素[J]. 皖南医学院学报, 2000, 19(4): 270-272.
- [39] HIGUCHI R, FOCKLER C, DOLLINGER G, et al. Kinetic PCR Analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions[J]. Biotechnology, 1993, 11(9): 1026-1030. DOI:10.1038/nbt0993-1026.
- [40] FAJARDO V, GONZÁLEZ I I, ROJAS M, et al. A review of current PCR-based methodologies for the authentication of meats from game animal species[J]. Trends in Food Science and Technology, 2010, 21(8): 408-421. DOI:10.1016/j.tifs.2010.06.002.
- [41] PEGELS N, GARCÍA T, MARTÍN R, et al. Market analysis of food and feed products for detection of horse DNA by a TaqMan real-time PCR[J]. Food Analytical Methods, 2015, 8(2): 489-498. DOI:10.1007/s12161-014-9914-7.
- [42] CHISHOLM J, SÁNCHEZ A, BROWN J, et al. The development of species-specific real-time PCR assays for the detection of pheasant and quail in food[J]. Food Analytical Methods, 2008, 1(3): 190-194. DOI:10.1007/s12161-008-9026-3.
- [43] KÖPPEL R, RUF J, ZIMMERLI F, et al. Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from beef, pork, chicken and turkey[J]. European Food Research and Technology, 2008, 232(4): 151-155. DOI:10.1007/s00217-008-0837-7.
- [44] 吴亚君, 王斌, 刘鸣畅, 等. 阿胶中马和驴成分的实时荧光PCR检测[J]. 食品科学, 2014, 35(8): 85-88. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201408016.

- [45] EISCHEID A C. SYTO dyes and EvaGreen outperform SYBR Green in real-time PCR[J]. BMC Research Notes, 2011, 4(1): 263-267. DOI:10.1186/1756-0500-4-263.
- [46] GUDNASON H, DUFVA M, BANG D D, et al. Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature[J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35(19): e127. DOI:10.1093/nar/gkm671.
- [47] MEIRA L, COSTA J, VILLA C, et al. EvaGreen real-time PCR to determine horse meat adulteration in processed foods[J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 75: 408-416. DOI:10.1016/j.lwt.2016.08.061.
- [48] 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, 2016, 72: 53-61. DOI:10.1016/j.foodcont.2016.07.029.
- [49] KÖPPEL R, DANIELS M, FELDERER N, et al. Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from duck, goose, chicken, turkey and pork[J]. European Food Research and Technology, 2013, 236(6): 1093-1098. DOI:10.1007/s00217-013-1973-2.
- [50] YOU Jia, HUANG Lirong, ZHUANG Jialin, et al. Species-specific multiplex real-time PCR assay for identification of deer and common domestic animals[J]. Food Science and Biotechnology, 2014, 23(1): 133-139. DOI:10.1007/s10068-014-0018-3.
- [51] 陈旭, 齐凤坤, 康立功, 等. 实时荧光定量PCR技术研究进展及其应用[J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(8): 148-155. DOI:1005-9369(2010)08-0148-08.
- [52] CHENG Xin, HE Weiling, HUANG Feng, et al. Multiplex real-time PCR for the identification and quantification of DNA from duck, pig and chicken in Chinese blood curds[J]. Food Research International, 2014, 60(6): 30-37. DOI:10.1016/j.foodres.2014.01.047.
- [53] 詹成, 燕丽, 王琳, 等. 数字PCR技术的发展和应[J]. 复旦学报(医学版), 2015, 42(6): 786-789. DOI:10.3969/j.issn.162-8467.2015.06.017.
- [54] SCOLLO F, EGEE L A, GENTILE A, et al. Absolute quantification of olive oil DNA by droplet digital-PCR (ddPCR): comparison of isolation and amplification methodologies[J]. Food Chemistry, 2016, 213: 388-394. DOI:10.1016/j.foodchem.2016.06.086.
- [55] 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. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201702049.
- [56] 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, 2014, 173: 1054-1058. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.10.138.
- [57] REN J, DENG T, HUANG W, et al. A digital PCR method for identifying and quantifying adulteration of meat species in raw and processed food[J]. PLoS ONE, 2017, 12(3): e0173567. DOI:10.1371/journal.pone.0173567.
- [58] 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. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2016.04.005.
- [59] 王珊, 李志娟, 苗丽. 微滴式数字PCR与实时荧光PCR检测羊肉制品中羊源和猪源性成分方法的比较[J]. 肉类工业, 2015(7): 38-41. DOI:10.3969/j.issn.1008-5467.2015.07.012.
- [60] 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. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201608033.
- [61] CAI Yicun, LI Xiang, LÜ Rong, et al. Quantitative analysis of pork and chicken products by droplet digital PCR[J]. BioMed Research International, 2014, 2014: 810209. DOI:10.1155/2014/810209.
- [62] HEBERT P D N, RATNASINGHAM S, DEWAARD J R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species[J]. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 2003, 270(Suppl 1): S96-S99. DOI:10.1098/RSBL.2003.0025.
- [63] 高玉时, 唐修君, 屠云洁, 等. 基于线粒体COI基因15个鸡种的DNA编码研究[J]. 中国农业科学, 2011, 44(3): 587-594. DOI:10.3864/j.issn.0578-1752.2011.03.020.
- [64] NAGALAKSHMI K, ANNAM P K, VENKATESHWARLU G, et al. Mislabeling in Indian seafood: an investigation using DNA barcoding[J]. Food Control, 2015, 59: 196-200. DOI:10.1016/j.foodcont.2015.05.018.