DOI:10.12441/spyswjs.20220629003 [文章编号] 1673-1689(2024)12-0146-08

DNA免提取结合qPCR冻干试剂的肉制品掺假鉴定方法

张娴雅 葛志强*

(天津大学化工学院,天津 300072)

摘要:【目的】建立肉制品中牛、鸭源性成分的现场快速定量检测方法。**【方法】**将DNA免提取法与荧光定量PCR(qPCR)冻干试剂法相结合,采用DNA免提取法制备qPCR反应模板。通过冻干工艺制备出的预混qPCR试剂,利用便携式qPCR系统对冻干试剂进行扩增。**【结果】**DNA免提取法简化了样品的提取、纯化步骤,该过程可在10 min内完成。DNA免提取法结合qPCR冻干试剂法的检测限可达1 pg/μL,从采样到得出结果只需45 min。预混qPCR冻干试剂可在4 ℃下保存6个月、室温下保存4个月、37 ℃下保存14 d。**【结论】**利用便携式qPCR系统即可对qPCR冻干检测试剂进行扩增,从而实现肉制品掺假的快速鉴别。

关键词:DNA免提取;肉制品掺假;冻干试剂;荧光定量PCR;现场检测

A Method for Identification of Adulteration in Meat Products by DNA Extraction-Free qPCR Lyophilized Reagents

*ZHANG Xianya GE Zhiqiang**

(School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to achieve rapid quantitative detection of beef- and duck-derived ingredients in meat products. [**Method**] The DNA extraction-free method was combined with fluorescent quantitative PCR (qPCR) lyophilized reagents was developed. The DNA extraction-free method was employed to prepare the template for qPCR. The premixed qPCR reagents were prepared by lyophilization. A portable qPCR system was used for amplification with the lyophilized reagents. [**Result**] The DNA extraction-free method with simplified sample extraction and purification steps achieved the detection within 10 min. The method combining the DNA extraction-free DNA method and qPCR lyophilized reagents can produce results within 45 min, with the limit of detection being 1 pg/μL. The premixed qPCR lyophilized reagents can be stored at 4 ℃ for 6 months, at room temperature for 4 months, and at 37 ℃ for 14 d. [**Conclusion**] The qPCR lyophilized reagents are appropriate for a portable qPCR system and can thus achieve rapid identification of adulteration in meat products.

Keywords: DNA extraction-free; adulteration in meat products; lyophilized reagents; fluorescence quantitative PCR; on-site detection

随着人们生活水平的提高,牛、羊肉在日常膳食结构中的消费比例快速增长,有些经营者为谋取高额利润,以价格相对低廉的鸡、鸭肉制品代替牛、羊肉制品[1],这已成为消费者高度关注的食品安全问题。强化肉制品掺假的现场检测工作对食品安全监管部门履行监管职责和保障消费者合法权益具有重要意义[2]。

目前,针对肉制品中动物源性成分的检测技

通信作者:葛志强(1963—),男,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事药物分析及食品安全与检测研究。E-mail:gezhiq@tju.edu.cn

收稿日期:2022-06-29 **修回日期:**2022-08-24

术主要基于DNA或蛋白质的方法[3-6]，尽管蛋白质免疫测定方法操作简便，但其在近缘物种鉴别方面存在局限性[7-8]，特别是蛋白质经过加工后会对其鉴定结果产生影响[9-11]。DNA的热稳定性更好，肉制品经过热处理后仍然能提取出DNA片段[12]，DNA比蛋白质具有更丰富的种间多态性[13]，因此PCR被广泛应用于动物源性成分的鉴别[14-19]。Meira等[20]利用实时定量PCR检测加工食品中的马肉掺假情况；Rodríguez等[21]通过TaqMan实时PCR法检测猪肉。虽然基于DNA的qPCR鉴别技术具有灵敏度高和特异性强等优点，但受所需仪器设备的限制，需要将样品送到专门的实验室进行检测，很难实现样品的现场检测，且检测成本较高。此外，该方法对样品的前处理要求高、过程复杂，肉类中的DNA需要经过裂解、提取和纯化等步骤，且检测时间从采样到得出结果一般需要4 h以上。在不影响检测灵敏度和特异性的基础上，通过简化样品的前处理步骤可缩短检测时长。近年来DNA免提取技术已在医学领域和微生物检测领域受到广泛关注[22-23]。为了实现qPCR检测的现场应用，已有研究者开发了可室温携带的预混qPCR冻干试剂，并在实际应用中取得了较好的结果[24-25]。目前有关DNA免提取与预混qPCR冻干试剂联合应用的研究较少，因此有必要开发操作简便、耗时短、成本低廉且可应用于现场检测的qPCR方法。基于TaqMan探针技术，作者开发了一种肉源性DNA免提取结合qPCR冻干试剂的检测方法，评估了该方法的检测限以及可能的影响因素。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

裂解直扩液、冻干保护剂、磁珠纯化DNA提取试剂盒：天津金歌联合生物科技有限公司；2×TaqMan Fast qPCR Master Mix：生工生物工程（上海）股份有限公司；鸡、兔、牛、山羊、绵羊、鸭、猪基因组DNA：四川华汉三创生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

实时荧光定量PCR仪：LightCycler 480型，罗氏诊断产品（上海）有限公司；便携式qPCR仪：Palm型，普瑞麦迪（北京）实验室技术有限公司；微量核酸蛋白浓度测定仪：NanoDrop One型，赛默飞世尔科技（上海）有限公司；台式离心机：1-14型，美国Sigma公司；掌上离心机：D1008E型，北京大龙兴创实验仪器（北京）股份公司；电子天平：BS124S型，德国赛多利斯公司；冷冻干燥机：Alpha 1-2 LDplus型，德国Christ公司；电热恒温水浴锅：DK-8A型，上海精宏实验设备公司。

1.3 引物和探针的设计与合成

从GeneBank数据库中获取牛线粒体基因序列（MT576844.1）和鸭细胞色素b基因序列（NC_009684.1），根据引物探针设计规则，分别设计了鸭、牛源性成分的上下游引物，在可变区域分别设计了对应的特异性探针。为提高试验结果的准确性，引入了一条人工内标序列，并根据内标序列设计上下游引物与探针。在NCBI上对上述引物和探针序列进行BLAST对比分析，对其特异性进行评估，具体的引物和探针序列见表1。引物探针及内标序列均由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

表1 引物及TaqMan探针序列

Table 1 Sequences of primers and TaqMan probes

样品	名称	引物序列（5′—3′）
牛源性成分	引物P1	TGGAGTAATCCTTCTGCTCACAGT
	引物P2	TGACTGTTGCTCCTCAGAATGATA
	TaqMan探针	ROX-AGCATTTATAGGATACGTCC-BHQ2
鸭源性成分	引物P1	TCAGCCCTCCCATACATC
	引物P2	GGAAGTGAATGGCGAAGA
	TaqMan探针	FAM-AGTGGATAACCCAACCCTAACCCG-BHQ1
内标	引物P1	GTATCATAAACAGTGCCCATCT
	引物P2	AGCATAGTCGGGCTTCCT
	TaqMan探针	CY5-TTCCAGAAACGCCTCCAATACG-BHQ3

1.4 qPCR方法的建立

qPCR扩增体系总体积为20.0 μL，各组分为：qPCR Mix 10.0 μL、10 μmol/L引物1.0 μL、10 μmol/L探针0.5 μL、模板溶液2.0 μL，用ddH_2O将体系补充至20.0 μL，混匀后离心。qPCR扩增条件为：95 ℃预变性2 min，95 ℃变性15 s，58 ℃延伸40 s，反应40个循环，40 ℃冷却30 s，在退火延伸时收集荧光数据。

1.5 扩增样品的处理方法

用针式取样器在生、熟牛肉和鸭肉组织分别提取若干粒圆柱形组织（直径1.0 mm×高1.0 mm），随机分成牛对照组（$C_{牛}$）、鸭对照组（$C_{鸭}$）、牛试验组（$T_{牛}$）和鸭试验组（$T_{鸭}$），根据所用组织颗粒数（1、2、3、4粒）分别标记为：$C_{牛1}$、$C_{牛2}$、$C_{牛3}$、$C_{牛4}$；$C_{鸭1}$、$C_{鸭2}$、$C_{鸭3}$、$C_{鸭4}$；$T_{牛1}$、$T_{牛2}$、$T_{牛3}$、$T_{牛4}$；$T_{鸭1}$、$T_{鸭2}$、$T_{鸭3}$、$T_{鸭4}$。按照磁珠纯化DNA提取试剂盒说明书，提取纯化对照组DNA。洗脱体积为50 μL，用微量核酸蛋白浓度测定仪测定所得DNA的质量浓度和纯度。用DNA免提取法处理试验组样品：将牛肉或鸭肉置于1.5 mL离心管中，加入50 μL裂解直扩液，用配套研磨棒将组织碾碎，于50~60 ℃放置5 min，裂解后的液体直接作为qPCR反应的模板。

1.6 探针的特异性及qPCR的灵敏度检测

为检测牛、鸭及内标引物与探针的特异性，以鸡、兔、猪、绵羊、山羊基因组DNA和提取的鸭、牛基因组DNA以及合成的内标质粒作为qPCR反应模板，在单重qPCR反应体系中对该检测方法进行特异性验证，以无RNA酶水作为阴性对照，每个物种DNA均设置3个平行。具体反应体系为：2×TaqMan Fast qPCR Master Mix 10.0 μL、上下游引物（10 μmol/L）1.0 μL、探针（10 μmol/L）0.5 μL、DNA模板2.0 μL、ddH_2O 6.5 μL。qPCR扩增条件为：95 ℃预变性2 min，95 ℃变性15 s，58 ℃延伸40 s，反应40个循环，40 ℃冷却30 s，在退火延伸时收集荧光数据。

将鸭、牛基因组DNA分别进行10倍稀释，设置其模板质量浓度分别为0.000 1、0.001、0.01、0.1、1、10、100 ng/μL。在反应体系中分别加入2 μL不同质量浓度的基因组DNA作为模板进行扩增，以无RNA酶水作为阴性对照，对所建立的三重qPCR方法进行灵敏度检测。反应体系为：2×TaqMan Fast qPCR Master Mix 10.0 μL、牛上下游引物（10 μmol/L）1.0 μL、鸭上下游引物（10 μmol/L）1.0 μL、内标引物（10 μmol/L）1.0 μL、牛探针（10 μmol/L）0.5 μL、鸭探针（10 μmol/L）0.5 μL、内标探针（10 μmol/L）0.5 μL、DNA模板2.0 μL、ddH_2O 3.5 μL。qPCR扩增条件为：95 ℃预变性2 min，95 ℃变性15 s，58 ℃延伸40 s，反应40个循环，40 ℃冷却30 s，在退火延伸时收集荧光数据。

1.7 qPCR冻干试剂的制备及稳定性检测

在qPCR八连管中预混合qPCR反应体系（不含模板），反应体系中，除了将ddH_2O改成5.5 μL冻干保护剂，其他组成与三重qPCR反应体系相同，反应体系总体积为20 μL。将八连管放入−80 ℃预冷冻24 h，然后进行冷冻干燥。真空冷冻干燥机的冷阱温度为−54 ℃，冷阱压力<13.33 Pa，干燥时间为6 h。对qPCR冻干试剂进行检测，同时以新鲜配制的qPCR试剂和未添加冻干保护剂的冻干qPCR扩增试剂为对照，分析扩增曲线的R_n值和C_t值。

用铝箔袋将qPCR冻干试剂进行真空包装，分别置于4 ℃储存6个月、室温下储存6个月、37 ℃下储存28 d，定期对qPCR冻干试剂进行检测，比较不同温度和储存时间对试剂性能的影响，同时设置未进行冷冻干燥的试剂作为阳性对照。qPCR扩增结束后，分析扩增曲线的R_n值和C_t值。

1.8 qPCR冻干试剂在便携式qPCR仪上的试验

将鸭、牛基因组DNA分别进行10倍稀释，用不同梯度稀释的DNA作为模板，加入qPCR冻干试剂。在实时荧光定量PCR仪和便携式qPCR仪上分别进行荧光PCR扩增，收集荧光信号进行定性检测。qPCR扩增条件为：95 ℃预变性2 min，95 ℃变性15 s，58 ℃延伸40 s，反应40个循环，40 ℃冷却30 s，在退火延伸时收集荧光数据。

1.9 实际样品中鸭源性成分的检测

将市售牛肉丸、牛肉馅、肥牛卷、牛肉松、烤牛肉串、牛肉香肠、猪肉馅、猪肉香肠、酱牛肉、羊肉片等50份不同种类的肉制品，按照1.5的方法进行处理，用所建立的qPCR冻干试剂法和行业标准（SN/T 2727—2010）中的qPCR法分别对鸭源性成分进行检测分析，对qPCR冻干检测试剂的准确性和实用性进行综合评价。

1.10　统计学分析

所有试验在相同条件下设置3个平行，所有收集数据用平均值±标准偏差表示。用SPSS 20.0进行统计学分析，采用方差分析对组间差异进行统计学分析，$P<0.05$代表差异有统计学意义。

2　结果与讨论

2.1　样品量和DNA提取方法对qPCR结果的影响

生物样品的qPCR检测需提取和纯化样品中的DNA，该过程包括裂解、吸附、漂洗和洗脱，一般需要45~70 min。虽然提取得到的DNA的质量浓度和纯度较高，但步骤烦琐、耗时，且对仪器设备的要求较高，因此，该处理过程不适用于现场快速检测。虽然生物样品的简化处理或DNA免提取法简便快速，但可能引入潜在的污染物或抑制物[26-27]。不过，研究表明，这对于一些样品的qPCR检测结果并不会产生明显的影响[28-29]。为了实现qPCR对肉制品的现场快速鉴别，作者分析了DNA免提取法所得样品中DNA的质量浓度和纯度，应用微量核酸蛋白浓度测定仪得到的DNA质量浓度和纯度的结果有误，这可能是由于样品匀浆液中含有较多的细胞内容物（蛋白质、离子等），影响了DNA的测定。经过提取纯化的样品DNA的质量浓度和纯度均达到了较好的水平，DNA质量浓度为2.5~22.4 ng/μL，A_{260}/A_{280}为1.7~1.9。对这些样品进行qPCR扩增试验，结果见表2。试剂盒法的qPCR扩增结果表明，随着样品量的增加，C_t值逐渐减小，4粒生鸭肉、熟鸭肉、生牛肉、熟牛肉样品的C_t值较1粒样品的C_t值分别减少了3.70、3.51、2.20、2.49，C_t值的变化情况与样品中DNA模板量的增加密切相关。DNA免提取法的qPCR扩增结果与试剂盒法的结果相反，随着样品量的增加，C_t值增加，扩增效率逐渐降低，4粒生鸭肉、熟鸭肉、生牛肉、熟牛肉样品的C_t值较1粒样品的C_t值分别增加了7.59、1.71、1.08、0.79，结合内标扩增曲线的结果，推测qPCR扩增受到了较大的抑制，这可能是由于较大样品量的污染物或抑制物相对较多，抑制了qPCR过程。由表2可知，样品量为1粒时，试剂盒法和DNA免提取法的qPCR检测结果没有明显差异。肉源鉴别实际上属于定性分析范畴，无需达到定量检测的精确度要求。DNA免提取法将处理过程缩短在10 min内，且操作简便。

表2　不同样品量及DNA提取方法对qPCR扩增的影响

Table 2　Effects of different sample quantities and DNA extraction method on qPCR amplification

样品成分	样品量	C_t值（试剂盒法）		C_t值（DNA免提取法）	
		肉源性成分	内标	肉源性成分	内标
生鸭肉	1粒	21.78±0.08	15.51±0.02	22.01±0.01	23.51±0.04
	2粒	19.56±0.04	15.46±0.02	23.29±0.04	32.60±0.04
	3粒	18.39±0.01	15.38±0.01	26.94±0.06	—
	4粒	18.08±0.01	15.49±0.02	29.60±0.09	—
熟鸭肉	1粒	18.47±0.06	19.92±0.04	17.46±0.01	20.17±0.01
	2粒	16.52±0.01	19.78±0.01	18.06±0.03	20.54±0.06
	3粒	15.49±0.06	19.66±0.02	18.46±0.05	21.10±0.06
	4粒	14.96±0.04	19.68±0.02	19.17±0.02	21.64±0.01
生牛肉	1粒	21.15±0.08	20.28±0.01	26.69±0.01	22.24±0.01
	2粒	19.93±0.04	20.14±0.05	26.73±0.01	24.10±0.09
	3粒	19.21±0.06	20.41±0.01	26.74±0.04	25.50±0.08
	4粒	18.95±0.06	20.01±0.04	27.77±0.08	—
熟牛肉	1粒	22.72±0.02	14.85±0.02	21.35±0.01	15.68±0.01
	2粒	21.49±0.04	14.81±0.01	22.04±0.06	16.57±0.06
	3粒	21.36±0.02	14.84±0.01	22.12±0.06	17.94±0.06
	4粒	20.23±0.03	14.81±0.01	22.14±0.04	21.49±0.04

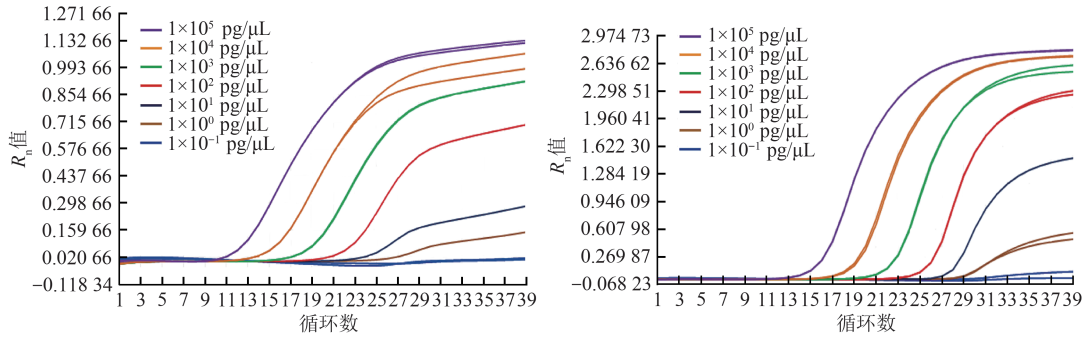
注：“—”表示未检测到。

因此，为了便于现场快速检测，1 粒样品的 DNA 免提取试剂完全可以满足现场 qPCR 检测的要求。

2.2　探针的特异性及 qPCR 的灵敏度分析

用设计的牛、鸭、内标探针分别对牛、鸭、鸡、兔、绵羊、山羊、猪 DNA 及内标进行 qPCR 扩增反应，无 RNA 酶水作为阴性对照，考察探针的特异性。结果表明，牛、鸭和内标探针只能和对应物种的 DNA 和内标序列产生扩增反应，不会与其他物种出现交叉反应，表明所设计的探针具有较好的特异性。

分别以不同质量浓度的牛、鸭基因组 DNA 为 qPCR 模板，无 RNA 酶水作为阴性对照，考察 qPCR 检测方法的灵敏度，扩增结果见图 1，当加入模板量≥1 pg/μL 时，牛源性成分和鸭源性成分的扩增曲线均出现典型的 S 型，C_t 值分别为 30.26 和 30.73，且 C_t 值随着 DNA 质量浓度的增大而逐渐减小。当模板量<1 pg/μL 时，均未出现扩增曲线。表明该检测方法具有较低的检出限，灵敏度较高。



(a) 鸭源性成分扩增曲线　　(b) 牛源性成分扩增曲线

图 1　qPCR 检测方法的灵敏度评价

Fig. 1　Detection sensitivity of qPCR method

2.3　qPCR 冻干试剂的稳定性分析

为了便于携带 qPCR 试剂，减少现场 qPCR 操作过程的准备流程，需要对 qPCR 试剂预混合、分装并冷冻干燥[30]。冷冻干燥包括冷冻和干燥 2 个剧烈变化过程，其过程可能会对 qPCR 体系中的 DNA 聚合酶产生不良影响，导致 *Taq* 酶作用效率降低。因此，在 qPCR 试剂冻干过程中，需添加一定量的冻干保护剂来保护 *Taq* 酶的活性，并减少或避免真空冷冻干燥过程对 *Taq* 酶的影响[31-33]。作者考察了冻干试剂复溶后 qPCR 扩增曲线的 C_t 值、R_n 值和扩增效率，并将其与新鲜配制的 qPCR 试剂扩增曲线进行对比，见图 2。qPCR 冻干试剂的扩增曲线与新鲜配制的 qPCR 试剂的扩增曲线几乎重合，C_t 值较小，两组间无明显差异，且 R_n 值较高、扩增效率高。未添加冻干保护剂时，所得扩增曲线 C_t 值增大，R_n 值较弱，扩增曲线拐点不清楚，扩增效率较低。这可能是由于 *Taq* 酶受冷冻干燥的影响活性降低，导致扩增效率下降。

将避光保存于 4 ℃和室温的 qPCR 冻干试剂分别在 1、2、4、6 个月时进行扩增检测，结果见表 3。每个时间段的扩增曲线与阳性对照扩增曲线的 C_t 值没有明显差异，但室温放置的冻干试剂在 6 个月后的 R_n 值明显下降。这可能与温度对探针荧光强度的影响有关，也可能与扩增效率的下降有关。但是在 4 ℃放置的冻干试剂，其 R_n 值和扩增效率都没有明显改变，表明冻干试剂在 4 ℃条件下保存 6 个月是稳定的。考虑到现场检测的条件，作者考察了冻干试剂在 37 ℃下分别放置 7、14、21、28 d 的稳定性。结果表明，冻干试剂在 37 ℃下放置的 14 d 内，扩增曲线的 C_t 值和 R_n 值与冻干后的初始试剂没有明显差异，但从第 21 天开

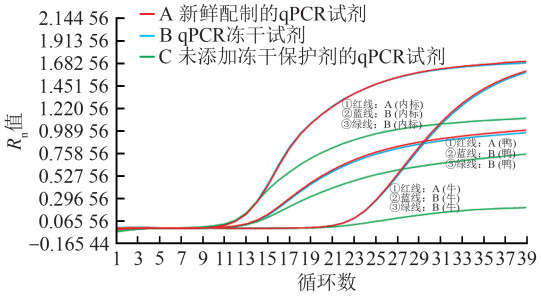


图 2　冻干保护剂对 qPCR 扩增的影响

Fig. 2　Effect of lyophilized protectant on qPCR amplification

表3　不同保存条件对qPCR冻干试剂的影响

Table 3　Effects of different storage conditions on qPCR lyophilized reagents

保存条件		C_t值			R_n值		
		鸭源性成分	牛源性成分	内标	鸭源性成分	牛源性成分	内标
4 ℃	1个月	16.08±0.01	19.58±0.01	19.22±0.02	0.847±0.001	2.335±0.001	0.941±0.003
	2个月	16.09±0.02	19.59±0.03	19.22±0.01	0.846±0.002	2.334±0.004	0.940±0.001
	4个月	16.09±0.02	19.60±0.01	19.23±0.01	0.846±0.003	2.333±0.001	0.939±0.001
	6个月	16.11±0.01	19.61±0.02	19.24±0.01	0.845±0.002	2.331±0.002	0.938±0.002
室温	1个月	16.08±0.01	19.59±0.02	19.22±0.01	0.842±0.004	2.333±0.002	0.940±0.003
	2个月	16.09±0.02	19.60±0.02	19.23±0.02	0.839±0.005	2.332±0.006	0.937±0.002
	4个月	16.10±0.03	19.62±0.03	19.23±0.02	0.837±0.007	2.332±0.005	0.935±0.004
	6个月	16.16±0.05	19.71±0.01	19.29±0.05	0.703±0.011	2.218±0.004	0.921±0.003
37 ℃	7 d	16.08±0.01	19.59±0.02	19.23±0.01	0.839±0.003	2.332±0.004	0.940±0.002
	14 d	16.09±0.01	19.60±0.01	19.25±0.01	0.838±0.009	2.329±0.001	0.937±0.002
	21 d	16.19±0.01	19.68±0.02	19.39±0.02	0.745±0.006	1.961±0.023	0.586±0.005
	28 d	16.49±0.02	19.87±0.04	20.85±0.09	0.558±0.004	1.552±0.006	0.333±0.006
阳性对照		16.08±0.02	19.57±0.01	19.21±0.02	0.848±0.002	2.335±0.001	0.941±0.002

始，其扩增效率明显下降，R_n值明显降低，这可能与*Taq*酶在37 ℃放置时间过长导致扩增效率下降有关。通常情况下，qPCR冻干试剂从冰箱中取出到检测现场的过程不超过12 h，因此37 ℃下放置14 d对扩增效率没有影响，该qPCR冻干试剂的稳定性符合日常检测的需求。

2.4　qPCR冻干试剂的敏感性分析

肉源性成分qPCR冻干检测试剂在便携式qPCR仪和实时荧光定量PCR仪上的敏感性对比结果见表4。2种仪器的检测结果基本一致，无明显差异，表明qPCR冻干试剂也适用于便携式qPCR仪。

2.5　实际样品中鸭源性成分的检测

通过该研究建立的qPCR冻干试剂法和现行标准（SN/T 2727—2010）的方法对50份不同种类的肉制品进行鸭源性成分检测。在qPCR冻干试剂法中，阳性样品的C_t值为20.61~31.24；SN/T 2727—2010的方法中，阳性样品的C_t值为20.67~31.39。其中，在10份样品中检测出鸭源性成分，且牛肉制品中检出鸭源性成分的占比最高，见表5。2种方法的检测结果一致，表明qPCR冻干试剂法能够实现对肉制品中鸭源性成分的快速检测。

表4　qPCR冻干试剂在不同PCR仪中的敏感性对比

Table 4　Comparison of sensitivity of qPCR lyophilized reagents in different PCR instruments

模板质量浓度/（pg/μL）	C_t值（鸭源性成分）		C_t值（牛源性成分）	
	实时荧光定量PCR仪	便携式qPCR仪	实时荧光定量PCR仪	便携式qPCR仪
1×10^5	13.11±0.01	13.13±0.02	15.11±0.02	15.12±0.02
1×10^4	16.27±0.01	16.37±0.03	18.31±0.03	18.43±0.05
1×10^3	19.67±0.05	19.75±0.02	21.83±0.01	21.86±0.04
1×10^2	23.35±0.02	23.41±0.01	25.28±0.03	25.29±0.02
1×10^1	27.11±0.04	27.25±0.02	28.37±0.01	28.37±0.02
1×10^0	33.26±0.03	33.42±0.04	30.29±0.04	30.31±0.02

表5　实际样品中鸭源性成分的检测结果

Table 5　Detection results of duck-derived ingredients in actual samples

编号	样品名称	C_t值	
		qPCR冻干试剂法	SN/T 2727—2010方法
1	牛肉丸	25.72±0.02	25.81±0.05
2	牛肉馅	23.47±0.02	23.49±0.03
3	肥牛卷	28.13±0.03	28.09±0.03
4	牛肉松	23.23±0.02	23.37±0.02
5	烤牛肉串	28.56±0.03	28.61±0.04
6	牛肉香肠	22.35±0.02	22.26±0.03
7	猪肉馅	27.60±0.06	27.64±0.05
8	猪肉香肠	31.24±0.01	31.39±0.03
9	羊肉片	20.61±0.04	20.67±0.05
10	羊肉串	29.66±0.04	29.78±0.06

3　结论

qPCR法在肉源掺假鉴别中是一种可靠灵敏的方法，但是其样品处理过程烦琐耗时，对试剂和

设备条件要求高，难以满足现场快速检测的要求。作者开发的DNA免提取法可以在10 min内完成对肉类样品的处理，且可满足qPCR的要求，所得扩增结果与经提取纯化的样品的扩增结果无明显差异。此外，该研究制备的qPCR冻干试剂在4 ℃避光条件下可放置6个月，且能保持稳定的扩增效率；在37 ℃环境下可稳定存放14 d，为该冻干试剂在现场检测的应用奠定了基础。将DNA免提取与qPCR冻干试剂联合应用于便携式qPCR仪，可实现在现场检测过程中，对肉制品类掺假的快速鉴别。

参考文献

[1] BOTTERO M T，DALMASSO A. Animal species identification in food products：evolution of biomolecular methods[J]. The Veterinary Journal，2011，190(1)：34-38.

[2] REN J N，DENG T T，HUANG W S，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.

[3] LIN C C，FUNG L L，CHAN P K，et al. A rapid low-cost high-density DNA-based multi-detection test for routine inspection of meat species[J]. Meat Science，2014，96(2)：922-929.

[4] FUMIÈRE O，VEYS P，BOIX A，et al. Methods of detection，species identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs[J]. Biotechnology，Agronomy，Society and Environnement，2009，13：59.

[5] MAHAJAN M V，GADEKAR Y P，DIGHE V D，et al. Molecular detection of meat animal species targeting MT 12S rRNA gene[J]. Meat Science，2011，88(1)：23-27.

[6] MASIRI J，BENOIT L，THIENES C，et al. A rapid，semi-quantitative test for detection of raw and cooked horse meat residues[J]. Food Control，2017，76：102-107.

[7] DOOLEY J J，PAINE K E，GARRETT S D，et al. Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays[J]. Meat Science，2004，68(3)：431-438.

[8] FURUTANI S，HAGIHARA Y，NAGAI H. On-site identification of meat species in processed foods by a rapid real-time polymerase chain reaction system[J]. Meat Science，2017，131：56-59.

[9] DINCER B，SPEAROW J L，CASSENS R G，et al. The effects of curing and cooking on the detection of species origin of meat products by competitive and indirect ELISA techniques[J]. Meat Science，1987，20(4)：253-265.

[10] HOSSAIN M A M，ALI M E，HAMID S B A，et al. Tetraplex PCR assay involving double gene-sites discriminates beef and buffalo in Malaysian meat curry and burger products[J]. Food Chemistry，2017，224：97-104.

[11] KUMAR Y，BANSAL S，JAISWAL P. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)：a rapid and sensitive tool for quality assessment of meat products[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety，2017，16(6)：1359-1378.

[12] LAUBE I，ZAGON J，BROLL H. Quantitative determination of commercially relevant species in foods by real-time PCR[J]. International Journal of Food Science & Technology，2007，42(3)：336-341.

[13] SONG K Y，HWANG H J，KIM J H. Ultra-fast DNA-based multiplex convection PCR method for meat species identification with possible on-site applications[J]. Food Chemistry，2017，229：341-346.

[14] CAMMÀ C，DOMENICO M，MONACO F. Development and validation of fast real-time PCR assays for species identification in raw and cooked meat mixtures[J]. Food Control，2012，23(2)：400-404.

[15] DRUMMOND M G，BRASIL B S A F，DALSECCO L S，et al. A versatile real-time PCR method to quantify bovine contamination in buffalo products[J]. Food Control，2013，29(1)：131-137.

[16] NG J，SATKOSKI J，PREMASUTHAN A，et al. A nuclear DNA-based species determination and DNA quantification assay for common poultry species[J]. Journal of Food Science and Technology，2014，51：4060-4065.

[17] SENTANDREU M Á，SENTANDREU E. Authenticity of meat products：tools against fraud[J]. Food Research International，2014，60：19-29.

[18] 吴颖峰，董合磊，刘佳，等. 荧光定量PCR方法检测肉制品中鳄鱼源性成分[J]. 食品与生物技术学报，2020，39(11)：81-87.
WU Y F，DONG H L，LIU J，et al. Detection of crocodile originin meat by fluorescence quantitative PCR[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2020，39(11)：81-87.(in Chinese)

[19] 王玮，吕青骏，朱卢玺，等. 食品中马源性成分的实时荧光PCR检测[J]. 食品与生物技术学报，2015，34(9)：961-964.
WANG W，LYU Q Q，ZHU L X，et al. Detection for horse-derived components in foods by real-time polymerase chain reaction[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2015，34(9)：961-964.(in Chinese)

[20] 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，2017，75：408-416.

[21] RODRÍGUEZ M A，GARCÍA T，GONZÁLEZ I，et al. TaqMan real-time PCR for the detection and quantitation of pork in meat mixtures [J]. Meat Science，2005，70（1）：113-120.

[22] 郭鹏波，章波，王彦红，等. 免提取冻干式百日咳鲍特菌核酸检测方法建立及应用[J]. 实验与检验医学，2021，39（4）：789-791，801.
GUO P B，ZHANG B，WANG Y H，et al. Establishment of freeze-dried and direct amplification Q-PCR method for *B. pertussis* [J]. Experimental and Laboratory Medicine，2021，39（4）：789-791，801.（in Chinese）

[23] SCHELLENBERG J J，ORMOND M，KEYNAN Y. Extraction-free RT-LAMP to detect SARS-CoV-2 is less sensitive but highly specific compared to standard RT-PCR in 101 samples[J]. Journal of Clinical Virology，2021，136：104764.

[24] 谢辉，周蕾，祁芝珍，等. 基于核酸预混室温储运技术的荧光定量PCR快速检测鼠疫耶尔森氏菌[J]. 中国人兽共患病学报，2021，37（9）：783-787.
XIE H，ZHOU L，QI Z Z，et al. *Yersinia pestis* detection through rapid fluorescence quantitative PCR based on a nucleic acid premix，and storage and transportation at room temperature [J]. Chinese Journal of Zoonoses，2021，37（9）：783-787.（in Chinese）

[25] DAS A，SPACKMAN E，SENNE D，et al. Extraction-free RT-LAMP to detect SARS-CoV-2 is less sensitive but highly specific compared to standard RT-PCR in 101 samples[J]. Journal of Clinical Microbiology，2006，44（9）：3065-3073.

[26] DUDLEY D M，NEWMAN C M，WEILER A M，et al. Optimizing direct RT-LAMP to detect transmissible SARS-CoV-2 from primary nasopharyngeal swab samples [J]. PLoS One，2020，15（12）：e0244882.

[27] SCHERMER B，FABRETTI F，DAMAGNEZ M，et al. Rapid SARS-CoV-2 testing in primary material based on a novel multiplex RT-LAMP assay[J]. PLoS One，2020，15（11）：e0238612.

[28] CAPRON A，STEWART D，HRYWKIW K，et al. *In situ* Processing and Efficient Environmental Detection（iSPEED）of tree pests and pathogens using point-of-use real-time PCR[J]. PLoS One，2020，15（4）：e0226863.

[29] ELSLANDE J，OYAERT M，AILLIET S，et al. Longitudinal follow-up of IgG anti-nucleocapsid antibodies in SARS-CoV-2 infected patients up to eight months after infection [J]. Journal of Clinical Virology，2021，136：104765.

[30] XU J S，WANG J，SU X S，et al. Transferable，easy-to-use and room-temperature-storable PCR mixes for microfluidic molecular diagnostics[J]. Talanta，2021，235：122797.

[31] WANG W. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals [J]. International Journal of Pharmaceutics，2000，203（1/2）：1-60.

[32] THAKRAL S，SONJE J，MUNJAL B，et al. Stabilizers and their interaction with formulation components in frozen and freeze-dried protein formulations[J]. Advanced Drug Delivery Reviews，2021，173：1-19.

[33] YANG S Y，WEN W J. Lyophilized ready-to-use mix for the real-time polymerase chain reaction diagnosis [J]. ACS Applied Bio Materials，2021，4（5）：4354-4360.

（责任编辑：闫林红）

中国油脂（月刊）
国内邮发代号 52-129 国外发行代号 M5889
追踪学科发展动态 报道行业最新成果 关注油脂发展热点 共谋行业创新未来
<< 全国中文核心期刊 << 中国科技核心期刊
<< 中国科学引文数据库核心库期刊 << 中国核心学术期刊
<< 中国精品科技期刊 << 中国期刊方阵双效期刊
<< 第二届国家期刊奖百种重点期刊 << 第三届国家期刊奖百种重点期刊
<< 美国EBSCO数据库收录期刊
<< 瑞典DOAJ数据库收录期刊
<< 美国《化学文摘》（CA）收录期刊（千刊表）
<< 俄罗斯《文摘杂志》（AJ）收录期刊
<< 美国《剑桥科学文摘》（CSA）收录期刊
<< 日本科学技术振兴机构数据库(JSA)收录期刊
<< 英国《食品科学与技术文摘》(FSTA)收录期刊
<< 英国《农业与生物科学研究中心文摘》(CABA）收录期刊
主要栏目
专题论述/油脂加工/油脂化学/油脂深加工/油料资源/油脂营养/油脂安全/综合利用/检测分析/应用技术/生物工程等。
欢迎关注官方微信
微信订阅号
各地邮局均可订阅，我社常年办理邮购及逾期补订
A4开本 每本20元 全年240元
国际标准连续出版物号：ISSN 1003-7969 国内统一连续出版物号：CN 61-1099/TS
■银行转账：开户单位：中粮工科（西安）国际工程有限公司
账号：607011580000004188 开户行：西安银行劳动北路支行
地址：陕西省西安市劳动路118 邮编：710082
电话：029-88621360
E-mail：zyzzoil@163.com 网址：www.chinaoils.cn