DOI:10.12441/spyswjs.20250402001 [文章编号] 1673-1689(2026)03-0111-08

基于 qPCR 技术定量检测掺假骆驼奶的方法研究

张建美

(福建省产品质量检验研究院,福建 福州 350015)

摘要:【目的】为进一步完善骆驼奶行业标准,促进骆驼奶产业的可持续发展,作者基于实时荧光定量 PCR(qPCR)技术建立骆驼奶掺假定量检测方法。**【方法】**采用全自动核酸提取法提取模板 DNA,以骆驼线粒体细胞色素 b 基因(*cytb*)为特异性基因,以哺乳动物 18S rRNA 基因为内参基因,设计特异性引物和内参引物。基于 C_t 比值(骆驼特异性引物 C_t 值/内参引物 C_t 值)与骆驼奶体积分数的线性关系,建立骆驼奶的掺假定量标准曲线。利用建立的标准曲线对含体积分数 35%、55%、75% 骆驼奶的模拟掺假骆驼奶样品进行定量分析,计算回收率、标准差及变异系数(CV)等参数。**【结果】**标准曲线为 $y=-0.325x+1.221\ 5$,相关系数(R^2)为 0.972 3,模拟掺假骆驼奶样品的平均回收率为 100.71%,平均 CV 为 5.29%。**【结论】**作者建立的基于实时荧光定量 PCR 技术的检测方法可实现掺假骆驼奶定量分析,从而判定其是否掺假及掺假比例,为骆驼奶行业的质量控制提供了技术支持。

关键词:骆驼奶;实时荧光定量 PCR;定量检测;掺假

Quantitative Detection Method for Adulteration in Camel Milk Based on qPCR

ZHANG Jianmei

(Fujian Inspection and Research Institute for Product Quality, Fuzhou 350015, China)

Abstract: [**Objective**] To improve the standards and promote the sustainable development of the camel milk industry, the author developed a quantitative detection method for camel milk components in adulterated dairy products based on real-time fluorescent quantitative PCR (qPCR). [**Method**] Template DNA was extracted through an automated nucleic acid extraction method. The mitochondrial cytochrome b gene (*cytb*) of camel was selected as the specific target gene, while the mammalian 18S rRNA gene served as the reference gene. Specific primers and reference primers were designed accordingly. According to the linear relationship between the C_t ratio (C_t value of camel-specific primer/C_t value of reference primer) and the volume fraction of camel milk, a standard curve for quantitative analysis of camel milk adulteration was established. The established standard curve was used for quantitative analysis of simulated adulterated samples containing camel milk at volume fractions of 35%, 55%, and 75%, and parameters such as recovery rate, standard deviation, and coefficient of variation (CV) were calculated. [**Result**] The standard curve was $y=-0.325x+1.221\ 5$, and the correlation coefficient (R^2) was 0.972 3. The average recovery rate of the simulated adulterated samples was 100.71%, and the average CV was 5.29%. [**Conclusion**] Using real-time fluorescent quantitative PCR, the author developed a detection method capable of quantifying adulteration in camel milk. This method not only identifies adulteration but also determines its exact proportion, offering valuable technical support for maintaining quality standards in the camel milk industry.

Keywords: camel milk; real-time fluorescent quantitative PCR; quantitative detection; adulteration

---

基金项目:福建省产品质量检验研究院院级一般项目(KY202222A)。

通信作者:张建美(1990—),女,硕士,主管药师,主要从事食品微生物学及分子生物学检测研究。E-mail:924526521@qq.com

收稿日期:2025-04-02 **修回日期:**2025-05-09

骆驼奶有“沙漠白金”之称，其独特的营养构成与多重健康效益备受推崇。骆驼奶不仅富含优质蛋白质、乳脂及多种维生素（维生素A、维生素B、维生素C、维生素E等）和矿物质（钙、钾、钠等），还含有乳铁蛋白、溶菌酶等活性成分，能增强人体免疫力，改善消化吸收功能[1-2]，且骆驼奶中β-乳球蛋白的缺失，使其成为乳糖不耐受群体的优质替代乳源[3]。此外，骆驼奶还兼具辅助医疗价值，在传统医学中常被用于辅助治疗糖尿病、免疫系统疾病等[4-7]。研究还发现，骆驼奶对非酒精性脂肪肝具有缓解作用，对于肝脏也有保护作用[8-9]。

然而，骆驼奶产业面临双重挑战：一方面，骆驼产奶量低，双峰驼日产奶量约为1.5~2.0 kg（其中约1 kg可供人类利用，其余用于喂养驼羔），单峰驼日产奶量约为3.5 kg，骆驼乳房为反射性泌乳[10]，且骆驼特殊的生存环境限制了骆驼的规模化养殖，导致骆驼奶的供应量严重短缺；另一方面，随着健康消费理念的普及，公众对骆驼奶的认知不断提升，市场需求激增与供给不足的矛盾催生了骆驼奶产品的掺假现象，部分商家通过掺入牛乳、羊乳、水、植物蛋白甚至化学添加剂等方式牟取暴利，这不仅损害了消费者权益，也带来了食品安全隐患。在此背景下，构建精准、高效的骆驼奶掺假检测体系，已成为行业发展的迫切需求。

近年来，针对掺假骆驼奶的鉴别技术涵盖蛋白质、脂肪酸和DNA等多层面检测手段，其中基于DNA遗传信息差异的qPCR技术是最主要、最可靠的方法之一。传统的电泳技术[11-12]、色谱技术[13]、电子鼻技术[14-15]、光谱技术[16-17]等检测技术存在操作复杂、检测成本高、灵敏度和特异性欠佳等缺点，基于高精度热循环仪器的qPCR检测技术[18]具有灵敏度高、特异性强、检测通量大等特性，能快速、灵敏地判定骆驼奶制品的掺假情况。目前关于骆驼乳掺假的定性PCR分析的研究较为常见，但只能检测其掺假物种的种类，而定量PCR不仅可以检测其是否掺假，还可以判断其掺假的比例。此外，依据骆驼奶掺假程度量化处罚对于监管执法具有重要意义。

作者通过引入全自动核酸提取法、筛选合适的特异性引物和反应条件等，在确保检测结果准确和稳定的同时，缩短检测周期，实现对掺假样品中骆驼奶含量的全自动化、快速、精准定量检测。本研究旨在为骆驼奶质量追溯系统的构建提供关键技术支撑，推动骆驼奶市场的规范化建设，保护消费者的合法权益，助力骆驼奶产业的持续、健康发展。

1 材料与方法

1.1 材料

不同产地的骆驼奶：内蒙古自治区巴彦淖尔市乌拉特后旗（标准样品）、内蒙古自治区阿拉善右旗、新疆维吾尔自治区阿克苏市、新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市天山区、新疆维吾尔自治区阿勒泰地区；牛奶：福建省三明市建宁县；山羊奶：福建省厦门市同安区五显镇溪西村大尖里55号；驴奶：青海省祁连县冰沟工业园区；牦牛奶：新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市米东区三道坝镇12号；PCR引物和探针、2×*Taq* PCR Master Mix、2×SYBR Green染料法Mix、6×DNA loading buffer、DNA marker（2 000 bp）、无菌蒸馏水：生工生物工程（上海）股份有限公司；TGuide Smart Universal DNA Kit试剂盒：天根生化科技（北京）有限公司；磷酸盐缓冲液（PBS）：分析纯，北京路桥技术股份有限公司。

1.2 仪器与设备

实时荧光定量PCR仪：CFX96 Real-Time System型，美国Bio-Rad公司；恒温金属浴：DBH 3 S025型，德国IKA公司；TGem Ultra全波长分光光度计：OSE-260-06型，天根生化科技（北京）有限公司；小型高速离心机：LX-40型，德国Eppendorf公司；漩涡混合仪：MS 3 B S25型，德国IKA公司；全自动核酸提取纯化仪：TGuide S32 Pro型，天根生化科技（北京）有限公司；琼脂糖凝胶电泳仪：PowerPac Basic型，美国Bio-Rad公司；凝胶成像系统：Carestream-Gel Logic 212Pro型，美国Carestream公司。

1.3 方法

1.3.1 液态奶DNA提取

采用全自动核酸提取技术提取模板DNA。取400 μL液态奶置于离心管中，以12 000 r/min离心5 min，弃去上清液和乳脂，保留沉淀物。向离心管中加入1 mL PBS，洗涤沉淀物2次，尽可能吸去多余的PBS。再加入300 μL组织消化液GHA，振荡并混匀，直至沉淀完全悬浮。向离心

管中加入20 μL蛋白水解酶K（Proteinase K），充分混匀后离心，然后将样本置于60 ℃的恒温金属浴中孵育2 h，随后离心去除管盖内壁上的水珠。在单样本试剂条的第1孔中加入300 μL消化好的溶液，并将样本试剂条置于全自动核酸提取纯化仪的样本试剂条托架上，将试剂条托架置于仪器孔板底座上，并将磁棒套插入磁棒套架卡槽内。选择DP605-02程序进行提取，提取完成后，从单样本试剂条的第5孔中吸取DNA并保存。

1.3.2　DNA质量浓度和纯度的测定

用TGem Ultra全波长分光光度计测定DNA溶液的质量浓度和纯度，在进行实时荧光PCR扩增试验前，宜将DNA质量浓度稀释至5~50 ng/μL。

1.3.3　特异性引物和内参引物的选择

以骆驼奶线粒体细胞色素b（*cytb*）基因的保守区域设计特异性引物，以哺乳动物18S rRNA基因的保守区域设计内参引物，引物和探针序列由生工生物工程（上海）股份有限公司合成，见表1。

表1　荧光定量PCR的引物和探针序列

Table 1　Primer and probe sequences for qPCR

引物名称	引物/探针序列（5′—3′）	基因来源
内参引物	F：TCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTA	18S rRNA基因
	R：AATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTT	
	P：5′FAM-CCGTTTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAATCGAACC-3′TAMRA	
骆驼奶特异性引物	F：ATTCTTTGCCTTCCACTTCA	*cytb*基因
	R：AGCGTATGCGAATAGGAAAT	
	P：5′FAM-CCTACACGAAACAGGCTCTAATAACCCGAC-3′TAMRA	

1.3.4　实时荧光定量PCR反应

实时荧光定量PCR反应体系总体积为25 μL，包括2×*Taq* PCR Master Mix 12.5 μL、上下游引物（10 μmol/L）各0.5 μL、探针（10 μmol/L）0.5 μL、模板DNA 5.0 μL、无菌蒸馏水6.0 μL。

扩增程序为：95 ℃预变性10 min；95 ℃变性15 s，60 ℃退火延伸1 min，反应进行40个循环。扩增程序结束后，采集荧光信号。检验过程中，设置空白对照，检测污染情况，以无菌蒸馏水为空白对照（NTC）。每个模板DNA重复进行PCR反应3次，空白对照重复进行PCR反应2次。实时荧光定量PCR扩增反应结束后，扩增曲线及样品C_t值由实时荧光定量PCR仪自动生成，根据扩增曲线和C_t值判定结果。C_t值表示各PCR反应管内荧光信号强度达到预先设定的阈值水平时所对应的循环数。

1.3.5　特异性引物和内参引物的验证

分别使用骆驼奶特异性引物和哺乳动物18S rRNA内参引物在上述实时荧光定量PCR反应条件下，扩增5个不同物种的液态奶（骆驼奶、山羊奶、牦牛奶、牛奶、驴奶）DNA样本，对特异性引物和通用性内参引物进行验证，以无菌蒸馏水为NTC。同时扩增不同产地的骆驼奶DNA样本，以验证该特异性引物是否对不同品种的骆驼奶都具有特异性。特异性引物扩增结果判断依据：若C_t值≤35.0，则结果有效；若C_t值>35.0，则结果无效。内参引物扩增结果判断依据：若C_t值≤30.0，则结果有效；若C_t值>30.0，则结果无效。

1.3.6　特异性引物熔解曲线

反应体系总体积为25 μL，其中包括2×SYBR Green染料法Mix 12.5 μL、上下游引物（10 μmol/L）各0.5 μL、探针（10 μmol/L）0.5 μL、模板DNA（标准样品）5.0 μL、无菌蒸馏水6.0 μL。

扩增程序为：95 ℃预变性10 min；95 ℃变性15 s，60 ℃退火延伸1 min，反应进行40个循环；执行熔解曲线程序（由65 ℃升温至95 ℃，升温速率为0.1 ℃/s）。全程采集荧光信号。检验过程中，以无菌蒸馏水作为NTC检测污染情况。重复PCR反应3次，NTC重复PCR反应2次。熔解曲线由实时荧光定量PCR仪自动生成，根据熔解曲线形态判定结果。

1.3.7　琼脂糖凝胶电泳检测

取8 μL骆驼奶（标准样品）DNA特异性扩增产物，与4 μL 6×DNA loading buffer充分混合，进行1 g/dL琼脂糖凝胶电泳（120 V、80 min），在凝胶

成像仪中观察目的条带并拍照。

1.3.8 标准曲线的建立

为了定量检测骆驼奶的掺假比例，将骆驼奶（标准样品）与牛奶按照设置的不同比例混合，制备含有体积分数5%、10%、20%、40%、60%、80%、100%骆驼奶的掺假骆驼奶标准样品，并按上述方法提取模板DNA，利用18S rRNA内参引物和骆驼奶特异性引物分别对其进行实时荧光定量PCR扩增。检测过程中，每个模板DNA重复PCR反应3次，NTC重复PCR反应2次，以C_t比值为纵坐标、骆驼奶体积分数为横坐标，根据两者之间的线性关系，拟合一条标准曲线，根据式（1）计算C_t比值。

$$Y=\frac{C_s}{C_r} \quad (1)$$

式中：

Y——C_t比值；

C_s——骆驼奶特异性引物C_t值；

C_r——内参引物C_t值。

1.3.9 模拟样品的掺假分析

为了验证该方法在实际掺假样品检测中的准确性和适用性，将骆驼奶与牛奶分别按照不同比例混合，制备含体积分数35%、55%、75%骆驼奶的掺假骆驼奶标准样品，进行模拟掺假样品检测试验。每个样品均设置3个平行，用于批次内分析。利用建立的标准曲线，计算混合样品中骆驼奶的体积分数，并与实际掺假率进行比较。通过计算回收率、标准差及变异系数等参数来验证该方法的准确性和稳定性。

1.3.10 数据处理与分析

使用Excel软件对数据进行处理与分析，并绘制标准曲线。

2 结果与讨论

2.1 DNA质量浓度和纯度的测定结果

使用TGem Ultra全波长分光光度计分别测定5种不同物种液态奶样品、5种不同产地骆驼奶样品以及掺假标准样品的DNA质量浓度和纯度。如表2~4所示，A_{260}/A_{280}值为1.60~1.80，A_{260}/A_{230}值为0.60~0.90，DNA质量浓度为50.00~110.00 ng/μL。

A_{260}值代表核酸在最高吸收峰260 nm波长处的吸光度，可用来评测核酸水平。A_{280}值是蛋白质和酚类物质在最高吸收峰280 nm波长处的吸光度，A_{230}值最能反映乙醇、GTC、GuHCl等的水平。A_{260}/A_{280}值反映核酸溶液中酚类物质和蛋白质的去除情况，纯度较高的DNA溶液，该比值在1.8左右。若比值低于1.8，则说明DNA中存在酚类物质或蛋白质（芳香族）。A_{260}/A_{280}值均为1.6~1.8，说明可能存在酚类物质或蛋白质（芳香族）的污染。

表2 5种不同物种液态奶DNA的质量浓度和纯度

Table 2 Mass concentration and purity of DNA in liquid milk from five different species

样品名称	A_{260}/A_{230}值	A_{260}/A_{280}值	DNA质量浓度/（ng/μL）
骆驼奶-1	0.80	1.70	75.22
骆驼奶-2	0.79	1.66	71.55
骆驼奶-3	0.82	1.68	69.74
牦牛奶-1	0.72	1.66	50.24
牦牛奶-2	0.66	1.67	54.12
牦牛奶-3	0.69	1.73	51.92
驴奶-1	0.70	1.66	63.15
驴奶-2	0.66	1.68	58.26
驴奶-3	0.69	1.71	59.31
牛奶-1	0.71	1.65	72.03
牛奶-2	0.73	1.69	69.23
牛奶-3	0.67	1.75	63.20
山羊奶-1	0.78	1.67	63.14
山羊奶-2	0.70	1.68	56.46
山羊奶-3	0.73	1.77	58.67

表3 不同产地骆驼奶DNA的质量浓度和纯度

Table 3 Mass concentration and purity of DNA from camel milk samples of different origins

产地名称	A_{260}/A_{230}值	A_{260}/A_{280}值	DNA质量浓度/（ng/μL）
巴彦淖尔市	0.65	1.63	73.67
阿拉善右旗	0.64	1.67	72.61
阿克苏市	0.71	1.61	109.98
乌鲁木齐市	0.65	1.60	65.12
阿勒泰地区	0.67	1.65	81.95

A_{260}/A_{230}值反映了核酸溶液中污染物质（如碳水化合物、脂类、盐分等）的去除情况，纯净核酸的A_{260}/A_{230}值通常为2.0~2.5。若A_{260}/A_{230}值<2.0，则表明样品溶液中可能含有杂质，如碳水化合物、盐（胍盐）等；若A_{260}/A_{230}值<1.0，则可能是胍盐污染或者蛋白质污染；若A_{260}/A_{280}值>2.0且A_{260}/A_{230}值<1.0，那么污染源可能是胍盐残留；若样品A_{260}/A_{280}值≈1.7，A_{260}/A_{230}值≈0.5，则污染源可能是蛋白质残留。

表4　掺假骆驼奶标准样品DNA的质量浓度和纯度

Table 4　Mass concentration and purity of DNA in the reference samples of adulterated camel milk

骆驼奶体积分数/%	A_{260}/A_{230}值	A_{260}/A_{280}值	DNA质量浓度/（ng/μL）
5	0.76	1.67	58.34
10	0.73	1.66	57.49
20	0.80	1.71	53.17
40	0.69	1.69	59.68
60	0.74	1.75	55.16
80	0.77	1.70	60.04
100	0.83	1.72	61.53

综上，在5种不同物种液态奶、5种不同产地骆驼奶以及掺假骆驼奶标准样品的DNA溶液中，可能存在蛋白质、脂类污染。考虑到液态奶中含有丰富的蛋白质、脂类，这些蛋白质容易与DNA结合形成复合物，而脂肪则会以小油滴的形式存在于提取液中，在提取过程中很难完全去除，且蛋白质、脂类是PCR扩增的抑制剂，因此，需要通过验证确定所提取到的DNA溶液是否符合qPCR的要求。

2.2　内参引物的验证结果

采用哺乳动物18S rRNA内参引物及探针，对5个不同物种的液态奶（骆驼奶、山羊奶、牦牛奶、牛奶、驴奶）模板DNA进行实时荧光定量PCR扩增。如图1所示，5个不同物种液态奶的模板DNA均得到有效扩增，骆驼奶、山羊奶、牦牛奶、牛奶、驴奶的C_t值分别为24.01、17.28、19.95、21.41、23.16，而NTC经过40个循环未产生任何荧光信号，始终保持在基线水平。基线是指反应早期荧光信号稳定、无明显增长的阶段，代表背景的相对荧光强度，用于校正非特异性荧光噪声。结果表明，内参引物对不同物种液态奶均具有通用性，且通过全自动核酸提取法提取得到的模板DNA能够满足实时荧光定量PCR的扩增要求。

2.3　特异性引物的验证结果

采用骆驼奶特异性引物及探针，对5个不同物种的液态奶（骆驼奶、山羊奶、牦牛奶、牛奶、驴奶）模板DNA进行实时荧光定量PCR扩增试验，来验证引物的特异性。如图2所示，只有骆驼奶的模板DNA出现特异性扩增，C_t值为20.67。而其他物种的模板DNA经过40个循环后未出现任何扩增信号，表明该特异性引物对骆驼奶具有高度特异性。

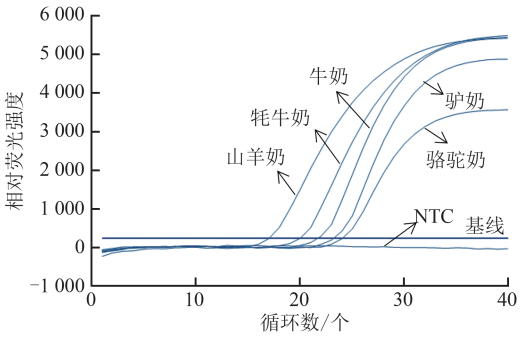


图1　18S rRNA的实时荧光定量PCR扩增曲线

Fig. 1　qPCR amplification curve of 18S rRNA

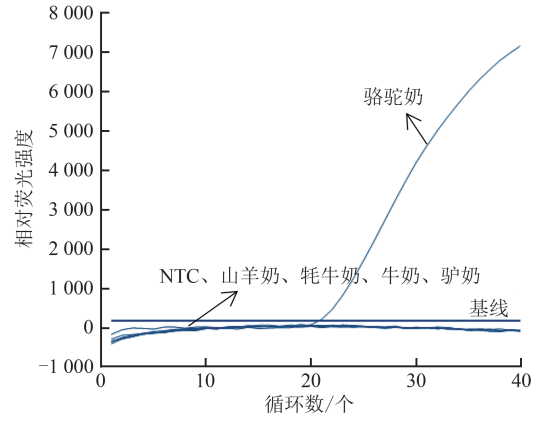


图2　骆驼奶特异性引物及探针的实时荧光定量PCR扩增曲线

Fig. 2　qPCR amplification curve of camel milk-specific primers and probe

骆驼主要分为单峰驼和双峰驼，生活在我国的主要为双峰驼，而双峰驼又分不同的品种，各自生活在不同的区域。内蒙古自治区古巴彦淖尔市乌拉特后旗的骆驼主要是乌拉特后旗戈壁红驼；内蒙古自治区阿拉善右旗的骆驼主要是阿拉善双峰驼；新疆维吾尔自治区阿克苏市的骆驼主要是塔里木双峰驼；新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市的骆驼主要是新疆双峰驼；新疆维吾尔自治区阿勒泰地区的骆驼主要是准噶尔双峰驼。因此，采用骆驼奶特异性引物与探针，对5个不同产地的骆驼奶模板DNA进行实时荧光定量PCR扩增试验，来验证该引物是否对不同品种的骆驼奶均具有特异性。如图3所示，不同产地的骆驼奶模板DNA均出现了特异性扩增，古巴彦淖尔市乌拉特后旗（标准样品）、乌鲁木齐市、阿勒泰地区、阿克苏市以及阿拉善右旗骆驼奶的C_t值分别为21.67、26.84、28.73、22.11、20.77。结果表明，该特异性引物对不同品种的骆驼奶均具有特异性。

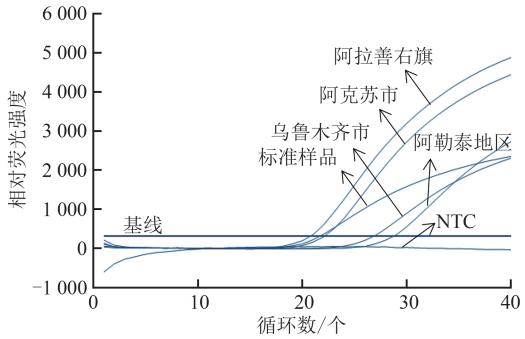


图 3　不同产地的骆驼奶的实时荧光定量 PCR 扩增曲线

Fig. 3　qPCR amplification curves of camel milk samples of different origins

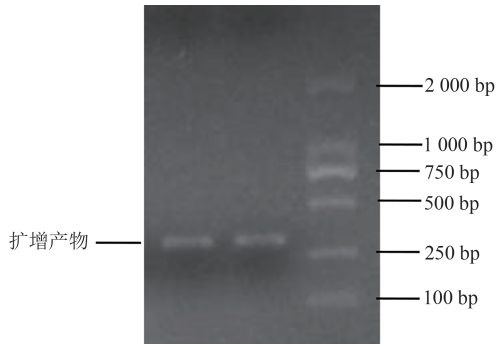


图 5　特异性引物扩增产物的凝胶电泳图

Fig. 5　Gel electrophoresis pattern of specific amplification products

2.4　骆驼奶特异性引物的熔解曲线分析

采用 SYBR Green 荧光染色法，以骆驼奶标准样品 DNA 为模板，进行实时荧光定量 PCR 扩增试验。反应体系经 40 个循环扩增后，执行熔解曲线程序。如图 4 所示，样本熔解曲线呈现单一尖锐峰，主峰对应的熔解温度（T_m）为 82 ℃，即骆驼奶的特征熔解温度为 82 ℃，与预期一致，且 NTC 无扩增信号，表明本次实时荧光定量 PCR 扩增特异性良好，扩增产物单一，无非特异性条带或引物二聚体。

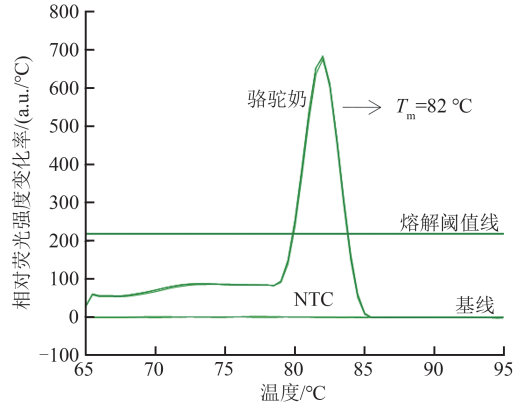


图 4　骆驼奶特异性引物的熔解曲线

Fig. 4　Melting curve of camel milk-specific primers

2.5　琼脂糖凝胶电泳成像分析

以骆驼奶标准样品 DNA 为模板，用特异性引物进行实时荧光定量 PCR 扩增，将扩增产物进行 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳（120 V、80 min），在凝胶成像仪中观察目的条带并拍照。如图 5 所示，特异性扩增产物条带清晰，无拖尾现象，表明通过全自动核酸提取法得到的模板 DNA 质量较好，虽然可能存在蛋白质、脂类污染，但不影响后续试验，能够满足实时荧光定量 PCR 的扩增要求。

2.6　标准曲线的绘制

利用骆驼奶特异性引物，分别对一系列已知体积分数（5%、10%、20%、40%、60%、80%、100%）的掺假骆驼奶标准样品的模板 DNA 进行实时荧光定量 PCR 扩增。如图 6 所示，各掺假骆驼奶标准样品（骆驼奶体积分数分别为 5%、10%、20%、40%、60%、80%、100%）的模板 DNA 经过 40 个循环后均得到有效扩增，C_t 平均值分别为 30.32、29.24、27.88、26.53、24.28、23.40、22.65，均小于 35.00，而 NTC 经过 40 个循环后未出现任何扩增信号，表明结果有效。

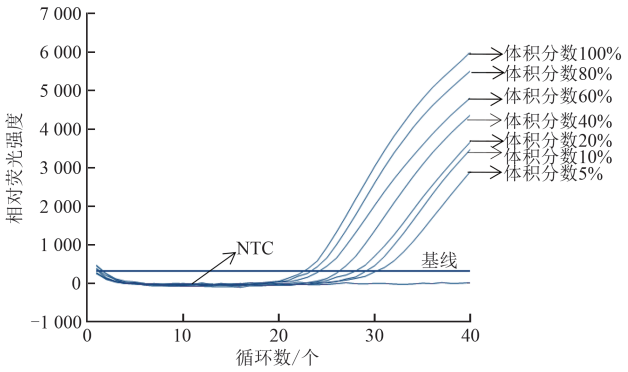


图 6　掺假骆驼奶标准样品的 qPCR 扩增曲线

Fig. 6　qPCR amplification curves of reference samples of adulterated camel milk

以得到的 C_t 比值为纵坐标、掺假标准样品中骆驼奶体积分数为横坐标，建立掺假骆驼奶的定量检测标准曲线。在标准曲线的建立过程中，采用哺乳动物 18S rRNA 内参基因作为参照。内参基因在物种中表达稳定，不受试验条件影响，能够校正试验过程中可能出现的误差（如样本制备、PCR 扩增效率等[19]），确保试验结果的准确性。如图 7 所示，骆

驼奶体积分数为5%~100%时，骆驼奶体积分数与C_t比值之间显示出良好的线性关系，标准曲线方程为$y=-0.325x+1.221\ 5$，相关系数（R^2）为0.972 3。结果表明，两者之间线性关系较好，证实了该方法能够在掺假样品中定量检测出体积分数为5%~100%的骆驼奶，具有较高的准确度。

2.7　模拟骆驼奶样品的掺假分析结果

提取模拟掺假样品（含体积分数35%、55%、75%骆驼奶的样品）的模板DNA，并进行实时荧光定量PCR扩增，根据C_t值，利用已建立的标准曲线计算得出模拟掺假样品中骆驼奶的体积分数，再与实际骆驼奶体积分数进行对比。如表5所示，掺入牛奶的模拟样品的回收率为96.59%~103.27%，平均回收率为100.71%，变异系数（CV）均小于10%，平均CV为5.29%，表明该方法精密度与准确度良好，适用于实际样品的掺假检测。

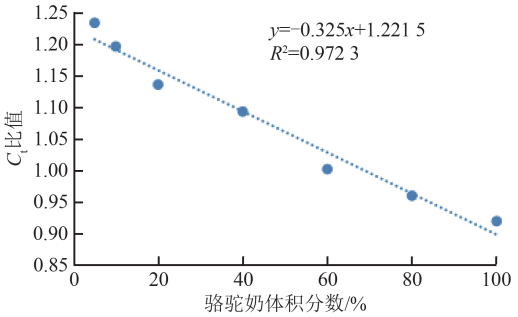


图7　掺假骆驼奶标准样品的定量检测标准曲线

Fig. 7　Standard curve for quantitative detection of reference samples of adulterated camel milk

表5　模拟掺假骆驼奶样品的定量结果

Table 5　Quantitative results of simulated adulteration in camel milk samples

实际体积分数/%	骆驼特异性引物C_t值	内参引物C_t值	C_t比值	测定体积分数/%	标准差	变异系数/%	回收率/%
35	27.25	24.68	1.104 1	36.11	2.81	8.31	96.59
	27.79	25.06	1.108 9	34.63			
	27.26	24.30	1.121 8	30.67			
55	25.44	24.62	1.033 3	57.91	2.27	4.00	103.27
	25.14	24.36	1.032 0	58.30			
	25.79	24.67	1.045 4	54.18			
75	23.96	24.39	0.982 4	73.58	2.73	3.56	102.28
	23.78	24.56	0.968 2	77.93			
	24.13	24.98	0.966 0	78.62			

3　结论

骆驼奶作为新兴的优质乳品资源，凭借其独特的营养成分和药用价值逐渐成为消费市场的新宠。随着消费者对功能性食品需求的提升及“一带一路”共建国家特色农产品的推广，骆驼奶产业迎来了快速发展的机遇。然而，受限于骆驼养殖地域性强、泌乳量低等特性，原料骆驼奶供应长期处于紧缺状态，部分商家通过掺入牛羊乳等低价乳源牟取暴利，严重损害了产品信誉和产业的健康发展。因此亟需开发一种高效、精准的定量检测技术，以实现对骆驼奶真实含量的快速鉴别及掺假程度的科学评估，从而保障产品质量与消费者权益[20]。

作者建立了一种基于实时荧光定量PCR技术的掺假骆驼奶的定量检测方法。以哺乳动物18S rRNA基因为内参基因，使用全自动核酸提取法提取DNA，以减少定量标准曲线建立过程中模板DNA提取率和PCR扩增效率带来的误差，使得检测结果更加准确可靠。结果表明，骆驼奶体积分数与C_t比值呈显著线性相关（R^2=0.972 3）。所建立的标准曲线可在液态奶体系中实现骆驼奶体积分数5%~100%的准确定量分析。骆驼奶体积分数分别为35%、55%、75%的模拟掺假样品验证试验结果表明，该方法的平均回收率达100.71%，变异系数平均值为5.29%，验证了该方法的准确性与重复性。作者建立的基于实时荧光定量PCR的检测方法，能够实现掺假骆驼奶的定量检测，从而判定其是否掺假及掺假比例。

参考文献

[1] 胡定寰，杨伟民，方成，等. 全球及中国骆驼乳制品的经济与市场分析[J]. 中国乳业，2021(8)：40-48.
HU D H，YANG W M，FANG C，et al. Economic and

market analysis of camel dairy products in the world and China[J]. China Dairy,2021(8):40-48.(in Chinese)
[2] 王艳明,妮尕热•阿布都外力,迪娜热尔•迪力达西,等. 驼乳源益生菌对db/db鼠肠道菌群的调节作用[J]. 中国微生态学杂志,2019,31(12):1365-1371.
WANG Y M, ABDUWELI N, DILDASH D, et al. Effects of composite probiotics isolated from fermented camel milk on intestinal microbiota in db/db diabetic mice [J]. Chinese Journal of Microecology, 2019, 31(12): 1365-1371.(in Chinese)
[3] RUBINO M, MAZZA G A, RUBINO S, et al. Camel milk: a possible alternative to infant formulas for patients with allergy to cow milk proteins[J]. Digestive and Liver Disease,2014,46:e116.
[4] ARAB H H, EID A H, GAD A M, et al. Inhibition of oxidative stress and apoptosis by camel milk mitigates cyclosporine-induced nephrotoxicity: targeting Nrf2/HO-1 and AKT/ENOS/NO pathways [J]. Food Science & Nutrition,2021,9(6):3177-3190.
[5] SARIN S K, KUMAR M, ESLAM M, et al. Liver diseases in the Asia-Pacific Region: a lancet gastroenterology & hepatology commission[J]. The Lancet Gastroenterology & Hepatology,2020,5(2):167-228.
[6] SBOUI A, ATIG C, KHABIR A, et al. Camel milk used as an adjuvant therapy to treat type 2 diabetic patients: effects on blood glucose, HbA1c, cholesterol, and TG levels[J]. Journal of Chemistry,2022,2022:5860162.
[7] 王瑞,周克夫,汪建红. 骆驼奶对1型糖尿病小鼠的辅助治疗效果[J]. 厦门大学学报(自然科学版),2015,54(3):331-334.
WANG R, ZHOU K F, WANG J H. Prevention and treatment effect of camel milk on type 1 diabetes mellitus [J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2015,54(3):331-334.(in Chinese)
[8] 郝世奇,李雅菲,吕浩迪,等. 基于脂质组学研究骆驼乳对小鼠非酒精性脂肪肝的缓解作用[J]. 中国食品学报,2024,24(6):128-141.
HAO S Q, LI Y F, LÜ H D, et al. The alleviating mechanism of camel milk on non-alcoholic fatty liver disease in mice based on lipidomics [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology,2024,24(6):128-141.(in Chinese)
[9] 高天,景晓霞,占登,等. 骆驼乳清蛋白对对乙酰氨基酚致小鼠肝损伤的保护作用[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版),2023,44(1):1-6.
GAO T, JING X X, ZHAN D, et al. Protective effect of camel whey protein on liver injury induced by acetaminophen in mice [J]. Journal of Inner Mongolia Agricultural University (Natural Science Edition),2023,44(1):1-6.(in Chinese)
[10] 吉日木图. 骆驼乳现状及未来发展[J]. 畜牧产业,2022(3):45-47.
JI R. Current situation and future development of camel milk [J]. Animal Agriculture, 2022 (3): 45-47.(in Chinese).
[11] 阿力木•吾布力. 新疆特种乳乳间掺伪检测技术的研究[D]. 乌鲁木齐:新疆大学,2017.
[12] TRIMBOLI F, COSTANZO N, LOPREIATO V, et al. Detection of buffalo milk adulteration with cow milk by capillary electrophoresis analysis [J]. Journal of Dairy Science,2019,102(7):5962-5970.
[13] LI L Y, WANG J, LI M J, et al. Detection of the adulteration of camel milk powder with cow milk by ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) [J]. International Dairy Journal,2021,121:105117.
[14] WU X Y, NAQIN, HAO S Q, et al. Electronic nose technology for rapid detection of adulterated camel milk powder [J]. Journal of Camel Practice and Research, 2021,28(2):233-240.
[15] 吴丹丹,其布勒,斯仁达来,等. 电子鼻对驼乳中牛乳掺假的快速检测[J]. 食品工业科技,2021,42(11):263-267.
WU D D, QI B L, SI R D L, et al. Rapid detection of adulteration in camel milk by electronic nose [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(11): 263-267.(in Chinese)
[16] 斯仁达来. 利用低场核磁共振技术快速检测掺假驼乳的研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2016.
[17] NIEUWOUDT M K, HOLROYD S E, MCGOVERIN C M, et al. Raman spectroscopy as an effective screening method for detecting adulteration of milk with small nitrogen-rich molecules and sucrose[J]. Journal of Dairy Science,2016,99(4):2520-2536.
[18] 张娴雅,葛志强. DNA免提取结合qPCR冻干试剂的肉制品掺假鉴定方法[J]. 食品与生物技术学报,2024,43(12):146-153.
ZHANG X Y, GE Z Q. A method for identification of adulteration in meat products by DNA extraction-free qPCR lyophilized reagents[J]. Journal of Food Science and Biotechnology,2024,43(12):146-153.(in Chinese)
[19] 王之莹,李婷婷,于文杰,等. 基于单拷贝核基因的荧光定量PCR技术检测驴奶的含量[J]. 食品工业科技,2020,41(21):261-265.
WANG Z Y, LI T T, YU W J, et al. Quantitative detection of donkey milk adulteration by real-time PCR based on single-copy nuclear genes [J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(21): 261-265.(in Chinese)
[20] 陈爱亮. 基于DNA标记的食品掺假定量分析研究进展[J]. 农产品质量与安全,2022(3):31-35.
CHEN A L. Recent advances of DNA-based quantitative analysis methods for food adulteration[J]. Quality and Safety of Agro-Products,2022(3):31-35.(in Chinese)