DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250915002
引用格式: 刘晋玎, 霍雨美, 高妞, 等. 手持式实时荧光定量聚合酶链式反应仪现场快速检测肉类样本猪、鸡、鸭源性成分[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(1): 25–34.
LIU JD, HUO YM, GAO N, *et al*. Rapid detection of pork, chicken and duck-derived components in meat samples by handheld quantitative real-time polymerase chain reaction [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(1): 25–34. (in Chinese with English abstract).

手持式实时荧光定量聚合酶链式反应仪现场快速检测肉类样本猪、鸡、鸭源性成分

刘晋玎[1,2,3], 霍雨美[1,2,3], 高　妞[1,2,3], 郭相杰[1,2], 严江伟[1,2,3*]

(1. 山西医科大学法医学院, 晋中　030600; 2. 法医学山西省重点实验室, 晋中　030600;
3. 山西省法医鉴识工程研究中心, 晋中　030600)

摘　要: 目的　建立适用于手持式实时荧光定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)仪肉类成分检测方法, 实现肉源性成分现场快速检测。**方法**　本研究以猪、鸡、鸭源性成分为研究对象, 探索肉类样本前处理工具、裂解液成分、裂解液浓度、裂解液添加量等对所提 DNA 的影响, 构建肉类样本快速预处理方法; 筛选特异性引物和探针, 利用手持式实时荧光定量 PCR 一体机进行特异性、灵敏度、检出限验证, 绘制扩增标准曲线; 对真实单一肉类样品和混合样品进行检测。**结果**　建立的肉类样本快速预处理方法 5 min 完成操作, 提取 DNA 耗时 10 min, 提取的 DNA 满足后续实验; 猪、鸡、鸭检测体系均具有良好的特异性; 对猪、鸡、鸭源性 DNA 成分的检出限分别为 0.010、0.001、0.001 ng/μL; 所建立的标准曲线线性关系良好, 猪肉 DNA 扩增标准曲线: Y=–3.956X+38.803, r^2=0.9956; 鸡肉 DNA 扩增标准曲线: Y=–3.499X+40.491, r^2=0.9909; 鸭肉 DNA 扩增标准曲线: Y=–3.961X+39.192, r^2=0.9962; 对 28 份肉类样本检测, 成功率为 100%。**结论**　本研究建立的方法可用于在手持式实时荧光定量 PCR 一体机上对猪、鸡、鸭肉类样本的快速、准确检测, 为肉类食品的市场监管和相关执法提供有力的技术保障。

关键词: 快速预处理; 手持式实时荧光定量聚合酶链式反应; 猪、鸡、鸭源性成分; 快速检测; 食品真实性; 现场检测

Rapid detection of pork, chicken and duck-derived components in meat samples by handheld quantitative real-time polymerase chain reaction

LIU Jin-Ding[1,2,3], HUO Yu-Mei[1,2,3], GAO Niu[1,2,3], GUO Xiang-Jie[1,2], YAN Jiang-Wei[1,2,3*]

(1. *School of Forensic Medicine*, *Shanxi Medical University*, *Jinzhong* 030600, *China*; 2. *Shanxi Key Laboratory of Forensic Medicine*, *Jinzhong* 030600, *China*; 3. *Shanxi Province Engineering Research Center of Forensic Identification*, *Jinzhong* 030600, *China*)

收稿日期: 2025-09-15
基金项目: 国家重点研发计划项目(2021YFC2401005)
第一作者: 刘晋玎(1991—), 女, 博士, 讲师, 主要研究方向为食品药品环境犯罪的检测鉴定。E-mail: liujinding1991@outlook.com
***通信作者:** 严江伟(1974—), 男, 博士, 教授, 主要研究方向为食品药品环境犯罪的检测鉴定。E-mail: yanjw@sxmu.edu.cn

ABSTRACT: Objective To develop a meat component detection method based on handheld quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) for rapid on-site identification of meat sources. **Methods** This study focused on the pork, chicken and duck-derived components, explored the influence of the single factors of meat sample pretreatment tools, lysate composition, lysate concentration and lysate addition amount on the extracted DNA, and constructed a rapid pretreatment method for meat samples; screened specific primers and probes, used the handheld quantitative teal-time PCR instrument to verify specificity, sensitivity and limit of detection, and drew amplification standard curves; and detected the real single and mixed meat samples. **Results** The established rapid pretreatment method for meat samples could be completed within 5 min, the DNA extraction took 10 min, and the extracted DNA could meet the requirements of subsequent experiments. The detection methods exhibited high specificity for pork, chicken and duck samples. The limits of detection of pork, chicken and duck-derived DNA components were 0.010, 0.001 and 0.001 ng/μL. The standard curve showed a sound linear relationship. The amplification standard curve of pig DNA was: Y=−3.956X+38.803, r^2=0.9956. The amplification standard curve of chicken DNA was: Y=−3.499X+40.491, r^2=0.9909. The amplification standard curve of duck DNA was: Y=−3.961X+39.192, r^2=0.9962. The method was successfully applied to detect 28 meat samples with a 100% success rate. **Conclusion** These results indicate that the rapid meat sample pretreatment method established in this experiment can be used for the rapid and accurate detection of pork, chicken and duck meat on a handheld quantitative real-time PCR all-in-one machine. This approach provides robust technical support for monitoring and controlling meat adulteration at the retail or market level.

KEY WORDS: rapid pretreatment; handheld quantitative real-time polymerase chain reaction; pork, chicken and duck-derived components; rapid detection; food authenticity; on-site detection

0 引 言

随着人民生活水平的提高，肉类消费市场发展非常迅速，在世界范围内广受欢迎[1−2]。一些不法商家为了获得巨大利益进行掺假，比如 2013 年的欧洲“马肉事件”[3]，市售的牛肉汉堡中被发现含有未标记的马肉和其他肉类成分；另外，牛肉和羊肉价格昂贵，有些商家也会将猪肉、鸭肉、鸡肉掺入其中以高价进行售卖[4−6]；此行为破坏了消费者利益，易引起宗教冲突，更甚者会影响我国食品企业在国际上的形象[7]。因此，对肉制品进行掺假检测十分重要。

目前检测肉类组织来源的方法有很多，比如基于传统物理学方法、光谱法、免疫学的鉴别方法、基于 DNA 生物学的分析技术[8−10]。由于传统鉴定方法的操作步骤烦琐，依赖实验室专业实验设备完成，无法满足现场快速检测的需求。随着科技的发展，研究者逐渐开始利用恒温扩增技术进行肉类真伪鉴定，包括环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)、重组酶聚合酶等温扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)等，等温扩增技术一般可在 30 min 内获得检测结果，大大缩短检测时间，但这些方法的引物设计比较复杂，对扩增的环境要求较高[11−14]。实时荧光定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)不依赖抗原抗体的特异性反应，可以实现多物种检测，具有特异性高、灵敏度高、检测周期短等优势，逐渐成为肉类组织来源检测鉴定的核心方法[15−17]。北京中科生仪公司开发了一种手持全自动封闭式核酸实时荧光定量 PCR 分析系统(下文简称手持式实时荧光定量 PCR 一体机)(图 1)，可现场快速实现核酸检测(CarryOn P1000Q)，可在 60 min 内完成现场自动化核酸检测，能够实现“样品进，结果出”的快速检测。

本研究选用猪、鸡、鸭肉作为样本，首先建立肉类样本快速预处理方法，再确定猪、鸡、鸭的特异性引物和探针，应用手持式实时荧光定量 PCR 仪进行特异性、灵敏度和检出限实验，构建扩增标准曲线，同时对 28 份市售肉类样品进行该方法的实际应用。为猪、鸡、鸭源性成分的市场监管和相关执法提供有力的技术保障。



图 1 手持式实时荧光定量 PCR 一体机

Fig.1 Handheld quantitative real-time PCR all-in-one machine

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

猪、牛、羊、鸡、鸭、鱼肉类样本均在山西省晋中市榆次区不同便民市场购买；兔[生产许可证：

SCXK(晋)2022-0001]、鼠[生产许可证: SCXK(晋)2024-0004]肌肉样本来源于山西医科大学实验动物中心; 猪肉鸡肉混合样本购自超市; 人的样本取自健康人员的唾液(山西医科大学伦理审查委员会伦理号: 2020GLL031)。

NaOH(浓度 1 mol/L)、琼脂糖(分析纯, 上海麦克林生化科技股份有限公司); 十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、十二烷基三甲基溴化铵(cetyl trimethyl ammonium bromide, CTAB)、异硫氰酸胍(分析纯, 北京索莱宝科技有限公司); 磁珠法核酸提取试剂盒(北京中科生仪有限公司); Air-Dryable™ Direct RNA/DNA qPCR Blood Mix (北京迈迪安生物科技有限公司); TaKaRa Taq Hot Start Version、dNTP、6×Loading Buffer、DL500 DNA Marker(大连宝日医生物技术有限公司); 10×PCR buffer(北京博奥拓达科技有限公司); DNeasy Blood & Tissue 试剂盒(德国 Qiagen 公司); Qubit dsDNA HS Assay 试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 溶剂为超纯水。

1.2　仪器与设备

QuantStudio5 实时荧光定量 PCR 仪、ProFlex PCR 热循环仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); CarryOn P1000Q 手持实时荧光定量 PCR 一体机、微流控芯片(北京中科生仪有限公司); Magic-8 磁力架(青岛科尔德科贸有限公司); X1 离心机(北京基因有限公司); MX-S 涡旋振荡仪(北京大龙仪器有限公司); GelDoc XR+凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3　引物和探针序列筛选

从美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)基因数据库下载不同种属基因序列, 用 clustalW 进行序列比对[18], 选择种内保守且种间变异的区域, 使用 Primer 5.0 软件设计引物和探针。其中内参基因(internal positive control, IPC)的引物和探针及假病毒 DNA 由北京中科生仪有限公司提供, 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成, 探针由湖州河马生物科技有限公司合成; 具体信息见表 1。

1.4　实验方法

1.4.1　样本前处理方法的建立及验证

(1)样本前处理方法的建立

以 20 mg 猪肉样本为例, 构建肉类组织样本的前处理方法。以不同前处理工具、裂解液成分、裂解液浓度、裂解液添加量为单因素[20–22]。前处理工具: 选择剪刀剪取、研磨钵研磨、剪刀剪取+研磨棒研磨 3 种方式。剪刀剪取时将 20 mg 组织放在 1.5 mL 离心管中, 用剪刀直接剪约 60 次, 达到组织破碎状态, 研磨时保证肉组织为肉泥, 裂解液成分选择 500 μL 1 mol/L 的 NaOH。裂解液成分: 肉组织前处理后, 加入 500 μL 1 mol/L NaOH、1% SDS、1% CTAB、1 mol/L 异硫氰酸胍溶液。裂解液浓度: 确定裂解液成分后, 加入 500 μL 不同浓度的裂解液。裂解液添加量: 确定前 3 个因素后, 加入 300 μL、500 μL、1.0 mL、1.2 mL 的裂解液。处理完组织加入裂解液后, 手摇晃 1 min, 静止 30 s, 取 20 μL 上清液, 每次处理 3 次重复, 探究肉类样本最适的快速预处理方法。

(2) DNA 提取和定量

人唾液样本采用 DNeasy Blood & Tissue 试剂盒说明书上步骤提取基因组 DNA。猪肉、牛肉、羊肉、鸡肉、鸭肉、兔肉、鼠肉、鱼肉样本采用磁珠法核酸提取试剂盒提取基因组 DNA。取 1.5 mL 的无菌无酶离心管, 加入

表 1　实验所用的引物、探针信息
Table 1　Information of primers and probes in the experiment

引物名称	引物序列	产物大小/bp	来源
猪 16S rRNA	F: 5'-ACAAATTCACCAACATAATCCCA-3' R: 5'-GATGTAAGCGTGTGCGAGGAG-3' P: 5'-FAM-ACTCCTAGCCCAATACCGGACTAATCTATTGA-BHQ1-3'	133	新设计
脊椎动物 16S rRNA 通用引物	F: 5'-TTACGACCTCGATGTTGGATCA 3' R: 5'-CTCCGGTCTGAACTCAGATCAC-3'	约 105	文献[19]
猪 cytb	F: 5'-TGAATCTGAGGGGGCTTTTCC-3' R: 5'-AGGGTTGTTGGATCCGGTTTC-3' P: 5'-FAM-AAGCAACCCTCACACGATTCTTCGCCTT-BHQ1-3'	138	新设计
鸡 cytb	F: 5'-ATACTACGGCTCCTACCTCTACAAG-3' R: 5'-TAGGGTGTGTCCAATGTAGGGAA-3' P: 5'-FAM-CTCCTCACACTCATAGCCACCGCCT-BHQ1-3'	175	新设计
鸭 cytb	F: 5'-ATGAGGACAAATATCGTTCTGAG-3' R: 5'-GTTAGGGTTGGGTTATCCACTGA-3' P: 5'-FAM-TTACCAACTTATTTTCAGCCCTCCCATACAT-BHQ1-3'	126	新设计
IPC	F: 5'-AGTTGCAGTGTAACCGTCATGTA-3' R: 5'-TCGACGAGACTCTGCTGTTAA-3' P: 5'-CY5-CAGTAATCTGCGTCGCACGTGTGCA-BHQ3-3'	100	北京中科生仪有限公司

10 μL 磁珠、80 μL Lysis-binding 和 20 μL 预处理好的上清液，混匀后涡旋振荡 1 min，静置 30 s；将离心管置于磁力架上，吸附 30 s，待磁珠全部吸附后弃掉上清；取下离心管加入 100 μL Lysis-binding，涡旋振荡 1 min，静置 30 s；将离心管置于磁力架上，吸附 30 s，待磁珠全部吸附后弃掉上清；取下离心管加入 100 μL Wash1，振荡混匀，将离心管置于磁力架上，吸附 30 s，待磁珠全部吸附后弃掉上清；保持磁力吸附状态，沿离心管壁缓慢加入 100 μL Wash2；随后弃掉上清；取下离心管加入 100 μL Elution，振荡混匀，60 ℃孵育 3 min；冷却至室温后，将离心管转移至磁力架上，静置 3 min，吸取上清。

提取的人和肉类样本 DNA 使用 Qubit dsDNA HS Assay Kit 试剂盒进行浓度检测，于–20 ℃冰箱保存备用。

(3)实时荧光定量 PCR 检测

扩增反应体系为：Air-Dryable™ Direct RNA/DNA qPCR Blood Mix 6.25 μL，10 μmol/L 的上下游引物各 1.5 μL，10 μmol/L 的探针 0.5 μL，模板 15 μL，灭菌超纯水 0.25 μL，总体系为 25 μL。扩增条件为：95 ℃预变性 2 min；进入扩增循环，95 ℃变性 5 s，60 ℃退火 20 s，45 个循环。

1.4.2 样本前处理方法在其他种属中的应用

将建立的方法应用于其他肉类，如牛、羊、鸡、鸭、兔、鼠、鱼；使用脊椎动物 16S rRNA 通用引物和 PCR 热循环仪扩增反应体系和程序扩增，PCR 扩增反应体系为：10×PCR buffer 1 μL，dNTP 1 μL，TaKaRa Taq Hot Start Version 0.1 μL，10 μmol/L 的上下游引物各 0.5 μL，模板 6.9 μL，总体系为 10 μL；扩增条件为：95 ℃预变性 3 min，进入 PCR 循环，95 ℃变性 30 s，60 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 45 s，30 个循环，最后 72 ℃延伸 5 min，4 ℃保存。

取扩增产物 5 μL，6×Loading Buffer 1 μL 上样，DL500 DNA Marker 6 μL，2%琼脂糖凝胶电泳，在凝胶成像仪下观察结果。

1.4.3 基于手持式实时荧光定量 PCR 一体机对猪、鸡、鸭进行检测方法的建立及评估

(1)一体化 qPCR 扩增体系和参数

Air-Dryable™ Direct RNA/DNA qPCR Blood Mix 12.5 μL，10 μmol/L 的上下游引物各 2 μL，10 μmol/L 的探针 1 μL，模板 25 μL，内参的正反向引物和探针各 0.2 μL，假病毒 DNA 5 μL (500 拷贝)，灭菌超纯水 1.9 μL，总体系为 50 μL。将配制好的反应混合液全部加入微流控芯片中，用芯片封口膜封住加样孔，确保封口膜完全贴合并上机。扩增条件为：95 ℃预变性 2 min；进入扩增循环，95 ℃变性 5 s，60 ℃退火 20 s，45 个循环。

(2)种属特异性检验

对各种属使用本研究建立的方法进行 DNA 提取，并采用试剂盒定量，使用磁珠法核酸提取试剂盒中的洗脱液对 DNA 进行稀释。以 100 ng 的人、猪、牛、羊、鸡、鸭、兔、鼠、鱼的 DNA 为扩增模板，以无菌水为阴性对照，分别进行猪 cytb、鸡 cytb、鸭 cytb 引物和探针特异性检测。

(3)灵敏度和检出限检验

用洗脱液对 DNA 进行稀释，保证投入的 DNA 模板量分别为 100.000、10.000、1.000、0.100、0.010、0.001 ng，每个模板量 3 次重复。

(4)标准曲线建立

用洗脱液对 DNA 进行稀释，保证投入的 DNA 模板量分别为 100.000、10.000、1.000、0.100、0.010、0.001 ng，以模板 DNA 投入量为横坐标(*X*，ng)，循环阈值(cycle threshold valve，CT)为纵坐标(*Y*)作图，绘制猪、鸡、鸭源性 DNA 扩增标准曲线。

(5)市售肉制品的检测

为验证所建立预处理方法和检测体系在实际肉类样品检测中的应用价值，从当地市场随机购买 28 份肉类样本作为检测对象，包括 5 份生鲜猪肉、6 份生鲜鸡肉、4 份生鲜鸭肉、6 份生鲜牛肉、6 份生鲜羊肉和 1 份真空猪肉鸡肉混合样本。准确称取 3 g 待检样品进行预处理操作，采用现行定性检测标准 NY/T 3309—2018《肉类源性成分鉴定 实时荧光定性 PCR 法》进行检测，检测结果显示为阳性的样品再利用建立的一体化检测方法进行检测，确定是否含有猪、鸡、鸭成分。

1.5 数据处理

利用手持式实时荧光定量 PCR 仪自带分析软件 FTMD (v1.5)，根据测定结果，利用 Excel 2019 软件绘制线性关系曲线，建立线性关系式。所有实验均做 3 个平行重复。

2 结果与分析

2.1 样本前处理方法的建立和实时荧光定量 PCR 检测

2.1.1 猪 DNA 样本 16S rRNA 引物探针特异性验证

猪 DNA 样本的 16S rRNA 引物和探针仅在猪 DNA 中呈现典型的 S 型扩增曲线，其他种属及空白对照均为阴性，表明其引物和探针具有良好的特异性。

2.1.2 不同处理工具、裂解成分、裂解浓度、裂解液添加量分别对 DNA 提取效果的分析

如图 2A 所示，裂解液成分为 500 μL 1 mol/L NaOH 时，研磨钵直接研磨、剪刀剪取+研磨棒研磨、剪刀剪取均能有效提取 DNA 并进行扩增，且剪刀剪取的 CT 值最小；达到组织破碎状态时，剪刀剪取效果最好且时间最短为 35 s，研磨钵研磨为 70 s，剪刀剪取+研磨棒研磨 60 s；最终确定前处理为剪刀剪取。

如图 2B 所示，裂解液添加量均为 500 μL，裂解成分为 CTAB、SDS、NaOH、异硫氰酸胍，在直接剪刀剪取 20 mg 猪肌肉组织且不经过加热裂解的情况下提取的 DNA 均可满

足实时荧光定量 PCR 要求。CTAB 和 SDS 在同等质量分数的浓度下, SDS 效果更好, 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L 异硫氰酸胍的效果不如 1% SDS, 且试剂成本高于 SDS, 综合考虑选 SDS。

从图 2C 可以看出, 随着 SDS 质量浓度的提高, CT 值仅呈现微小幅度的下降, 这说明低质量浓度的 SDS 也能满足基本的样本裂解和扩增要求。但是为了能给复杂多变的实际样本建立足够的性能冗余, 确保 DNA 提取效率与扩增稳定性的最优化, 综合考虑实验成本和扩增稳健性, 最终选择 1.0% SDS。

从图 2D 可以看出, 裂解液添加量与 CT 值呈正相关, 表明增大裂解液的量会稀释 DNA, 降低扩增效率。但是在实际操作过程中, 当裂解液添加量为 300 μL 和 500 μL 时, 肉类样本含有大量脂肪和其他杂质导致裂解完的液体过于黏稠, 不方便吸取, 综合考虑操作便利性和提取效率, 选择 1.0 mL 为最优裂解液添加量。

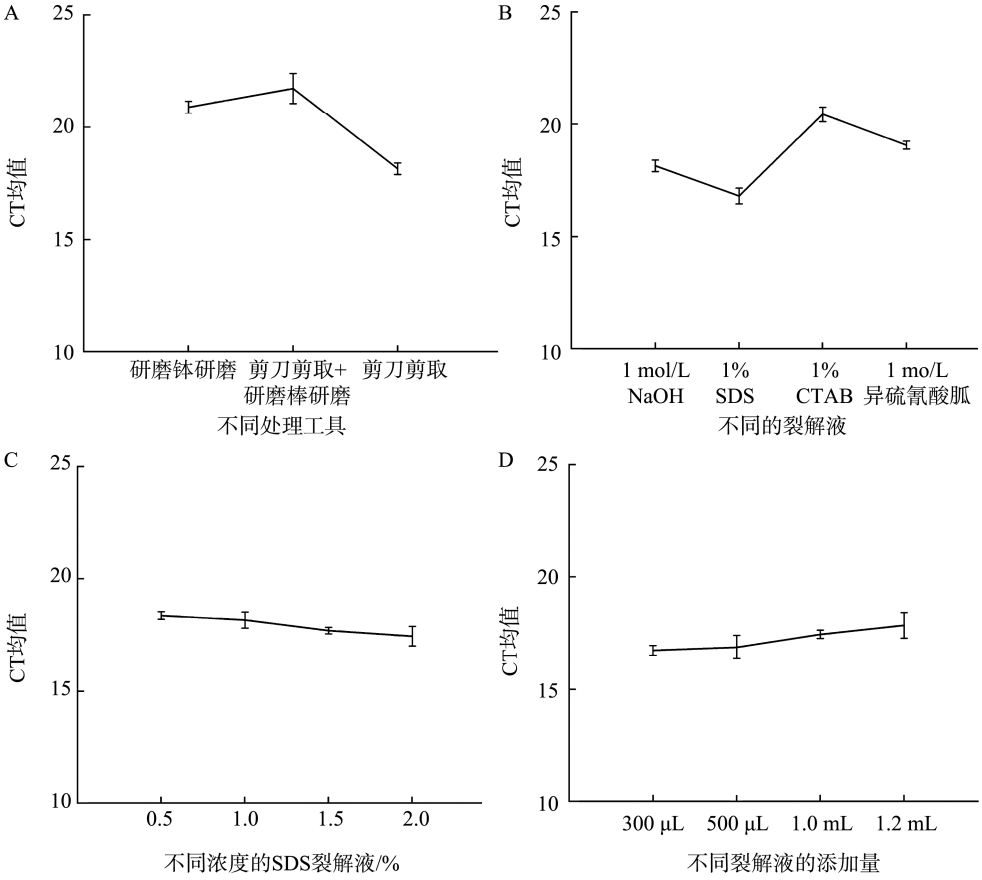


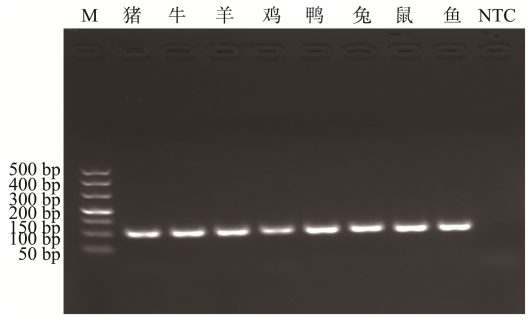
图 2　不同前处理因素对提取效果的影响

Fig.2　Influences of different pretreatment factors on the extraction efficiency

综合以上结果, 本研究选择直接剪刀剪取猪、牛、羊、鸡、鸭、兔、鼠、鱼 20 mg, 加入 EP 管中剪碎, 加入 1.0 mL 裂解液 1.0% SDS 手动摇晃 1 min, 静止 30 s 的方式进行 DNA 提取。

2.2　样本前处理方法在其他种属中的应用和 PCR 检测

采用上述前处理方法提取种属样本, 吸取 20 μL 上清液对进行 DNA 提取, 用脊椎动物 16S rRNA 通用引物进行 PCR 扩增, 2%凝胶电泳图谱见图 3, 显示所有种属条带清晰, 大小在 105 bp 左右, 所建方法良好可应用于其他种属肉类检材。



注: M. Marker; NTC. 空白对照。

图 3　猪、牛、羊、鸡、鸭、兔、鼠、鱼源性成分琼脂糖凝胶电泳图

Fig.3　Agarose gel electrophoresis of pork, beef, mutton, chicken, duck, rabbit, rat and fish samples

2.3 基于手持式实时荧光定量 PCR 一体机对猪、鸡、鸭进行检测

2.3.1 引物和探针的特异性验证

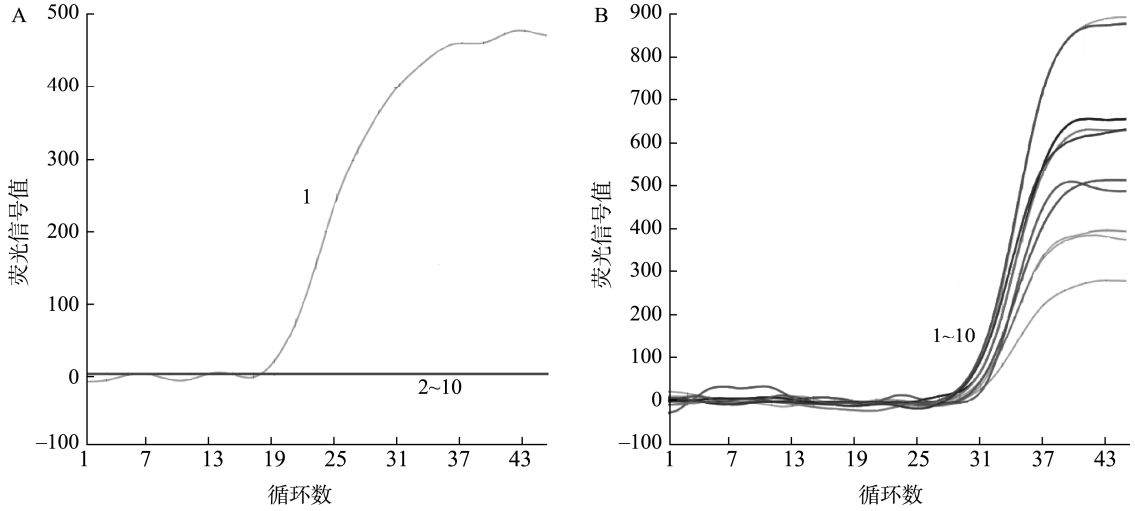
使用 100 ng 的猪、人、牛、羊、鸡、鸭、兔、鼠、鱼的 DNA 为模板, 分别使用表 1 中猪、鸡、鸭的引物和探针进行扩增, 结果如图 4~6 所示, 在目的种属呈阳性, 其余种属样本及空白对照均为阴性, 说明猪 cytb、鸡 cytb、鸭 cytb 的引物和探针具有较好的特异性。

2.3.2 灵敏度及检出限

分别以猪、鸡、鸭 DNA 100.000、10.000、1.000、0.100、0.010、0.001 ng 为扩增模板, 进行灵敏度检测实验。将能稳定检出的 DNA 量用于灵敏度和检出限分析, 其中 0.001 ng 猪 DNA 在扩增时的重复性和稳定性较低, 因此未采用该数据。当猪DNA为0.010 ng时, CT值平均值为36.87±0.47; 鸡DNA为0.001 ng时, CT值平均值为37.03±0.38; 鸭DNA为0.001 ng时, CT值平均值为37.03±0.68; 因此猪、鸡、鸭的最低检出限分别为0.010、0.001、0.001 ng(图 7~9)。

2.3.3 标准曲线

进行定量检测分析时, 需要绘制标准曲线, 按照 1.4.3 中(4)的方法绘制猪、鸡、鸭源性 DNA 扩增的标准曲线。结果如图 10 所示, A 为猪扩增标准曲线: Y=–3.956X+38.803, r^2=0.9956; B 为鸡扩增标准曲线: Y=–3.499X+40.491, r^2=0.9909; C 为鸭扩增标准曲线: Y=–3.961X+39.192, r^2=0.9962, 建立的标准曲线线性关系良好, 可以用于定量检测。



注: 1. 猪源性成分; 2. 鸡源性成分; 3. 鸭源性成分; 4. 牛源性成分; 5. 羊源性成分; 6. 兔源性成分; 7. 鼠源性成分; 8. 鱼源性成分; 9. 人源性成分; 10. 空白对照, 图 5~6 同。

图 4 手持式实时荧光定量 PCR 一体机对猪源性成分特异性测试(A)和内部阳性对照(B)

Fig.4 Specificity test of pork component by handheld fluorescence PCR machine (A) and internal positive control (B)

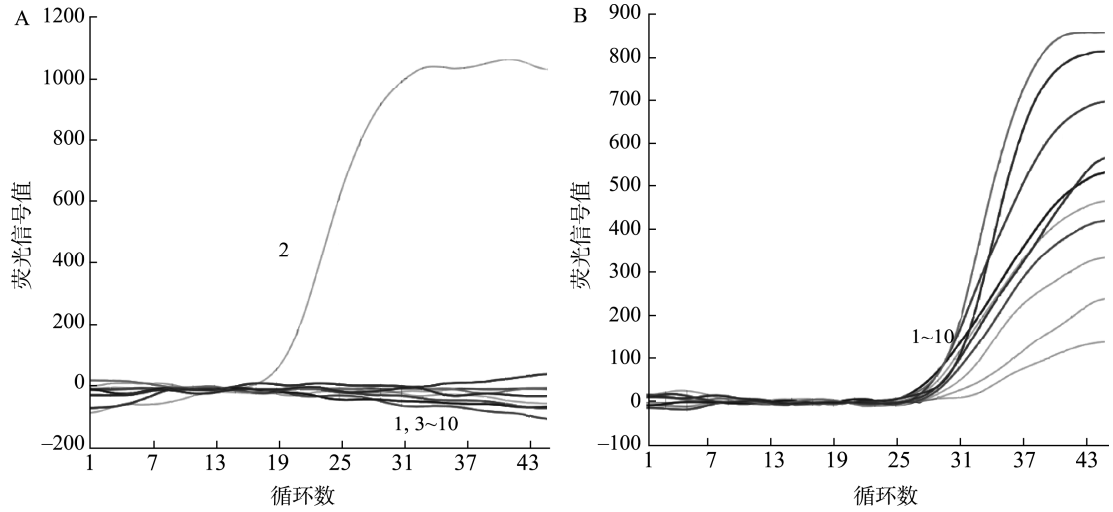


图 5 手持式实时荧光定量 PCR 一体机对鸡源性成分特异性测试(A)和内部阳性对照(B)

Fig.5 Specificity test of chicken component by handheld fluorescence PCR machine (A) and internal positive control (B)

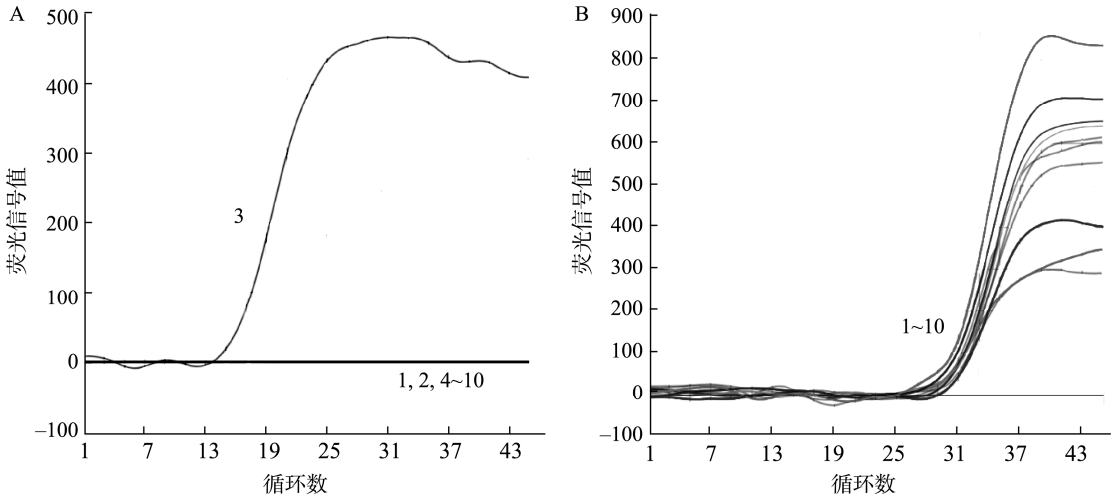
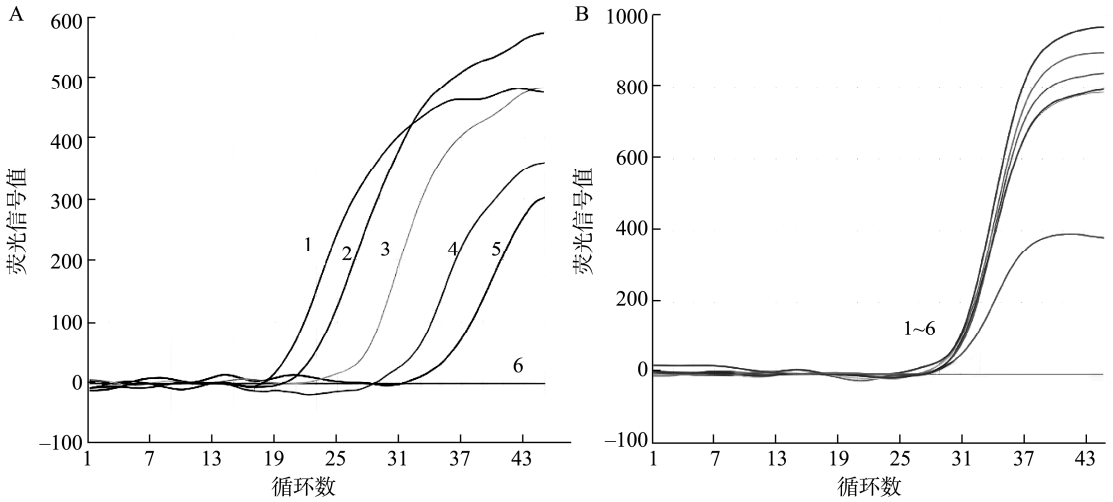


图 6　手持式实时荧光定量 PCR 一体机对鸭源性成分特异性测试(A)和内部阳性对照(B)

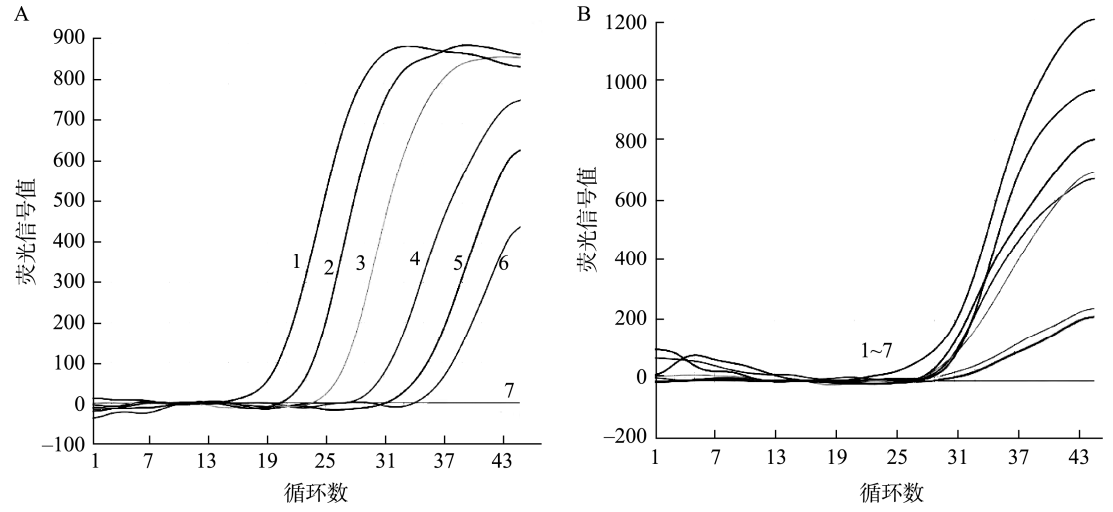
Fig.6　Specificity test of duck component by handheld fluorescence PCR machine (A) and internal positive control (B)



注: 1. 100.000 ng DNA; 2. 10.000 ng DNA; 3. 1.000 ng DNA; 4. 0.100 ng DNA; 5. 0.010 ng DNA; 6. 空白对照。

图 7　猪源性成分检测灵敏度及检出限分析(A)和内部阳性对照(B)

Fig.7　Analysis of sensitivity and limit of detection of pork components (A) and internal positive control (B)



注: 1. 100.000 ng DNA; 2. 10.000 ng DNA; 3. 1.000 ng DNA; 4. 0.100 ng DNA; 5. 0.010 ng DNA; 6. 0.001 ng DNA; 7. 空白对照, 图 9 同。

图 8　鸡源性成分检测灵敏度及检出限分析(A)和内部阳性对照(B)

Fig.8　Analysis of sensitivity and limit of detection of chicken components (A) and internal positive control (B)

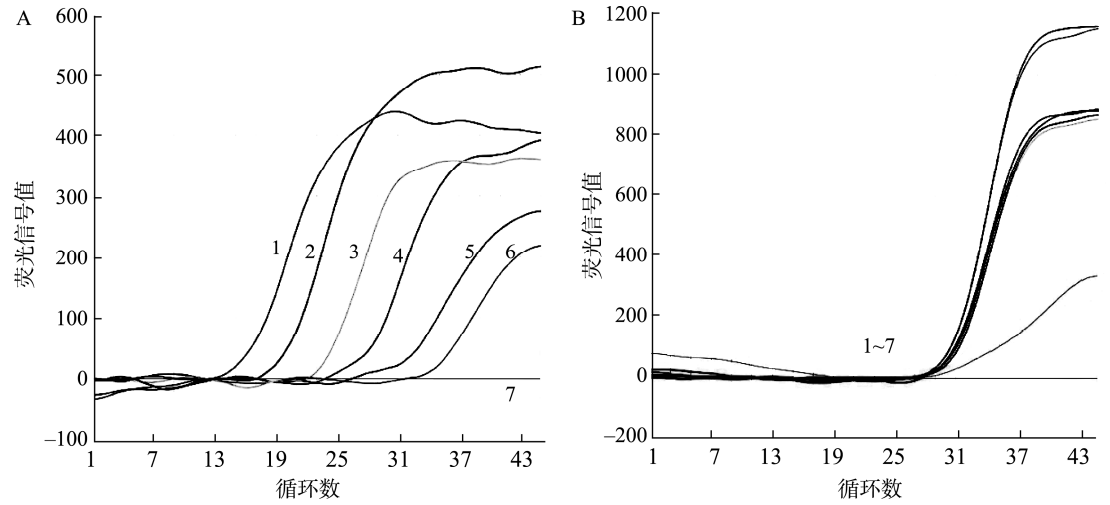


图 9 鸭源性成分检测灵敏度及检出限分析(A)和内部阳性对照(B)

Fig.9 Analysis of sensitivity and limit of detection of duck components (A) and internal positive control (B)

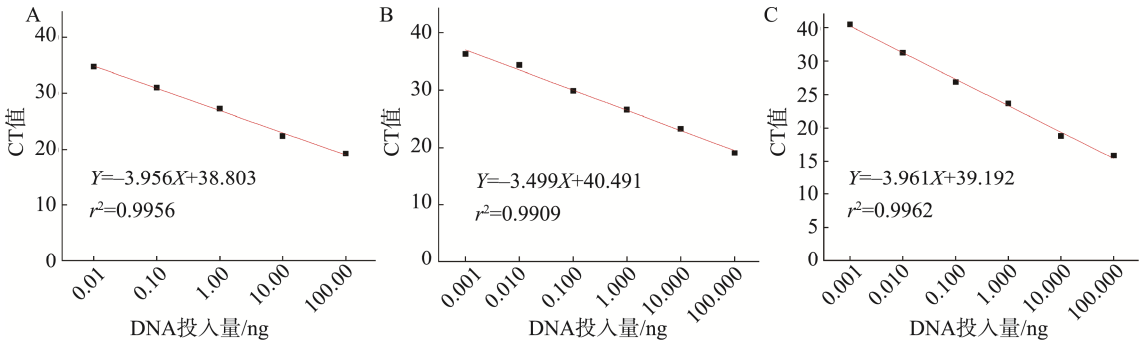


图 10 猪(A)、鸡(B)、鸭(C) DNA 的扩增标准曲线

Fig.10 DNA amplification standard curve of pork (A), chicken (B) and duck (C)

2.3.4 市售肉制品检测

从市场购买的 28 份样本，采用现行定性检测标准的方法进行检测，与购买的肉类种类一致。采用本研究建立的肉类样本快速预处理方法处理样本，按照磁珠法核酸提取试剂盒说明书进行 DNA 提取，然后使用手持式实时荧光定量 PCR 一体机进行扩增。所建立的方法对 28 个样本进行检测，检测结果见表 2 均与实际标签相符，结果准确可靠。

表 2 市售肉制品检测结果

Table 2 Detection results of commercially available meat products

商品种类	数量/份	猪检测体系阳性数/份	鸡检测体系阳性数/份	鸭检测体系阳性数/份	合格率/%
猪肉	5	5	0	0	100
鸡肉	6	0	6	0	100
鸭肉	4	0	0	4	100
牛肉	6	0	0	0	100
羊肉	6	0	0	0	100
猪肉鸡肉混合样本	1	1	1	0	100

3 讨论与结论

近些年来，肉类掺假问题非常突出，破坏了消费者的利益，引起宗教矛盾[23]。目前，我国最常采用的方法是实时荧光 PCR[24]，已经出台了相关的国家标准和行业标准，比如 GB/T 38164—2019《常见畜禽动物源性成分检测方法 实时荧光 PCR 法》、GB/T 25165—2010《明胶中牛、羊、猪源性成分的定性检测方法 实时荧光 PCR 法》、NY/T 3309—2018，但现行检测方法通常涉及核酸提取、PCR 反应体系配制和扩增反应等多个独立步骤，且需在不同实验分区中由专业人员操作，一个完整的检测流程耗时约 2~3 h，对实验场地、设备及人员专业性要求较高，限制了其现场快速检测的应用。为

解决这一问题, 本研究开发了基于一体化便携设备的检测方法。与传统方法相比较, 检测设备仅重约 1 kg、内搭载电池可持续供电 3.5 h, 实验操作流程简化, 总检测时间缩短至 1 h 以内, 降低对操作人员的技术依赖, 且具备体积小、重量轻、便于携带等特点, 适用于各类现场条件下的快速检测任务。

在进行实时荧光定量 PCR 检测前, 首先需要对样本进行预处理, 预处理结束后进行 DNA 提取。检材预处理方法如液氮冷冻研磨和匀浆法不适合在现场使用, 且液氮容易使实验人员冻伤; DNA 提取方法如有机法使用化学试剂多、实验步骤复杂、DNA 损失较大、部分试剂对人体有害、实验过程依赖恒温水浴锅、离心机等大型设备, 严重限制了动物源性成分在现场的快速检测[25]。本研究在样本预处理时采用 1.0% SDS 裂解液效果较好, 可在 5 min 内完成操作; 预处理后采用磁珠法提取 DNA, 提取一个样本的时间总共约为 15 min, 需要的设备仅为磁力架和涡旋振荡仪。与传统样本前处理方法相比, 此方法不需要液氮冷冻进行研磨仅剪刀剪取; 无需苯酚、氯仿等毒性大的有机溶剂; 也无需水浴加热裂解; 在一定程度上保护了实验人员的安全, 节约了时间, 减少现场检测所带实验器材, 可在常温环境下进行操作过程[26]。前处理步骤简单, 耗时短, 有利于在现场或者是实验条件受限的环境中的进行 DNA 提取。经此方法进行样本前处理, 所得 DNA 的质量完全满足实时荧光定量 PCR 仪的检测。

采用本研究的预处理和检测方法, 猪的最低检出限为 0.010 ng, 鸡和鸭源性成分的最低检出限均为 0.001 ng。周藏等[27]建立的多重实时荧光定量 PCR 体系对猪、鸡、鸭的检测灵敏度为 0.010、0.010、0.001 ng; 而在本研究中, 猪和鸭的检测灵敏度与之持平, 鸡的灵敏度有所提高。使用本研究建立的猪、鸡、鸭的检测方法在检测猪、鸡、鸭肉来源实际样本时, 检出率为 100%, 展示了良好的特异性和应用潜力。

微流控芯片 PCR 技术利用微流控器件热质量较小和比表面积较高的特点实现快速传热, 使得微流控芯片上的扩增时间大大缩短[28–30], 本研究的一体机扩增时间仅需约 25 min 左右, 较常规的实时荧光定量 PCR 扩增的 1~1.5 h 缩短了 50%以上。另外, 芯片为全封闭设计, 一步加样后整个检测过程不再开盖, 减少了污染的风险。但本研究中一体机的扩增总体积 50 μL, 体积过大, 导致试剂与模板的消耗量较高; 此外, 现有体系尚未实现多靶标检测, 难以满足多种肉类样本的同时检测需求。未来本研究将从两个方向进行推进: 第一, 致力于优化扩增体系, 缩减试剂与模板用量, 并构建猪、鸡和鸭的多重检测体系, 以显著缩短检测时间、降低检测成本; 第二, 着力于检测范围的拓展, 将检测对象逐步延伸至牛、羊等其他肉源性成分, 提升该技术平台的应用广度。

本研究针对 3 种常见肉源性成分的现场快速检测, 建立了剪刀剪取结合裂解液裂解的预处理方法, 操作简便, 耗时较短; 使用手持式实时荧光定量 PCR 一体机体积小, 携带方便, 适合现场快速检测; 依托手持式实时荧光定量 PCR 一体机, 建立了猪、鸡和鸭源性成分的核酸扩增体系, 灵敏度高、特异性良好, 能够应用于猪、鸡和鸭源性的检测。整体方法操作简便、检测周期短, 可广泛应用于市场监督、食品安全检测等领域, 为食品监管部门对肉类掺假提供有力技术支持。

参考文献

[1] BOHME K, CALO-MATA P, BARROS-VELAZQUEZ J, *et al*. Review of recent DNA-based methods for main food-authentication topics [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(14): 3854–3864.

[2] LI X, ZANG M, LI D, *et al*. Meat food fraud risk in Chinese markets 2012—2021 [J]. NPJ Science of Food, 2023, 7(1): 12.

[3] 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.
DU P. The “Horsemeat Scandal” and the EU’s meat product safety supervision system [J]. World Agriculture, 2015(4): 82–86, 168.

[4] MUALIM M, LATIF H, PISESTYANI H, *et al*. Analysis of species adulteration in beef sausage using real-time polymerase chain reaction in Makassar, Indonesia [J]. Vet World, 2024, 17(10): 2355–2364.

[5] HE C, BAI L, CHEN Y, *et al*. Detection and quantification of adulterated beef and mutton products by multiplex droplet digital PCR [J]. Foods, 2022, 11(19): 3034.

[6] CHEUBONG C, SUNAYAMA H, TAKANO E, *et al*. A rapid abiotic/biotic hybrid sandwich detection for trace pork adulteration in halal meat extract [J]. Nanoscale, 2023, 15(37): 15171–15178.

[7] 李宗梦, 赵良娟, 赵宏, 等. 肉及肉制品动物源性成分鉴别技术研究进展[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(18): 122–127.
LI ZM, ZHAO LJ, ZHAO H, *et al*. Research progress in identification techniques of animal ingredient in meat and meat products [J]. Food Research and Development, 2014, 35(18): 122–127.

[8] 余卉茹, 纪艺, 彭城, 等. 肉类掺假检测技术研究进展[J]. 生物技术进展, 2022, 12(2): 213–221.
YU HR, JI Y, PENG C, *et al*. Research progress on detection technology of meat adulteration [J]. Current Biotechnology, 2022, 12(2): 213–221.

[9] 路宇轩, 翟睿, 吴帆, 等. 肉类掺假检测方法及研究进展[J]. 计量学报, 2023, 44(6): 1000–1008.
LU YX, ZHAI R, WU F, *et al*. Research progress on detection technology of meat adulteration [J]. Acta Metrologica Sinica, 2023, 44(6): 1000–1008.

[10] LEON-ECAY S, INSAUSTI K, LOPEZ-MAESTRESALAS A, *et al*. Non-destructive spectroscopy-based technologies for meat and meat product discrimination-A review [J]. Meat Science, 2025, 228: 109893.

[11] 曹婷婷, 袁毅, 王晶, 等. 双拖尾重组聚合酶恒温扩增技术结合核酸杂交侧流条快速检测牛肉中的鸡、鸭、猪源性成分[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(15): 119–128.
CAO TT, YUAN Y, WANG J, *et al*. Nucleic acid hybridization-lateral flow strip combined with double tailed recombinase polymerase amplification for rapid detection of chicken, duck and pig adulteration in beef [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2023, 14(15): 119–128.

[12] CAO Y, ZHENG K, JIANG J, *et al*. A novel method to detect meat adulteration by recombinase polymerase amplification and SYBR green I [J]. Food Chemistry, 2018, 266: 73–78.

[13] LIN L, ZHENG Y, HUANG H, *et al*. A visual method to detect meat adulteration by recombinase polymerase amplification combined with lateral flow dipstick [J]. Food Chemistry, 2021, 354: 129526.

[14] XIAO B, ZHAO R, WANG N, *et al*. Integrating microneedle DNA extraction to hand-held microfluidic colorimetric LAMP chip system for meat adulteration detection [J]. Food Chemistry, 2023, 411: 135508.

[15] RODRIGUEZ MA, GARCIA T, GONZALEZ 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.

[16] ABITAYEVA G, ABEEV A. Development of a real-time PCR protocol for the detection of chicken DNA in meat products [J]. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2024, 54(8): 1068–1078.

[17] 彭媛媛, 武煊, 陶晓奇. 实时荧光 PCR 技术定量检测肉类掺假的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(15): 279–287.
PENG YY, WU X, TAO XQ. Quantitative detection of meat adulteration by real-time fluorescent PCR [J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(15): 279–287.

[18] HUNG JH, WENG Z. Sequence alignment and homology search with BLAST and Clustalw [Z]. Cold Spring Harbor Protocols, 2016.

[19] KEI-TANIGUCHI TA, KEN WATANABE, YOSHINORI OGAWA, *et al*. A vertebrate-specific qPCR assay as an endogenous internal control for robust species identification [J]. Forensic Science International: Genetics, 2022, 56: 102628.

[20] 肖兴玉, 张永哲, 张凯华, 等. 基于磁珠法的肉制品 DNA 快速提取方法研究[J]. 食品安全导刊, 2022(17): 65–67.
XIAO XY, ZHANG YZ, ZHANG KH, *et al*. Research on rapid DNA extraction method of meat products based on magnetic bead method [J]. China Food Safety Magazine, 2022(17): 65–67.

[21] 程浩, 查勇, 高丹丹, 等. 不同动物肌肉组织中 DNA 提取方法研究[J]. 西北民族大学学报(自然科学版), 2020, 41(2): 73–79.
CHENG H, ZHA Y, GAO DD, *et al*. Study on methods of DNA extraction from different muscle tissuees in animal [J]. Journal of Northeast Minzu University (Natural Science), 2020, 41(2): 73–79.

[22] 李婷婷, 张桂兰, 王之莹, 等. 快速提取肉类基因组 DNA 的裂解液的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(17): 4755–4758.
LI TT, ZHANG GL, WANG ZY, *et al*. Study on rapid extraction lysate of meat genomic DNA [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2018, 9(17): 4755–4758.

[23] CUI W, JIN X, GUO Y, *et al*. Development and validation of a novel five-dye short tandem repeat panel for forensic identification of 11 species [J]. Frontiers in Genetics, 2020, 11: 1005.

[24] 许文娟, 赵晗, 孔彩霞, 等. 肉及肉制品掺假鉴别技术研究进展[J]. 肉类工业, 2021(7): 44–49.
XV WJ, ZHAO H, KONG CX, *et al*. Research progress on adulterant identification technology of meat and meat products [J]. Meat Industry, 2021(7): 44–49.

[25] 赵金艳, 刘榜, 王文君, 等. 一种适于 PCR 扩增的快速提取猪基因组 DNA 的碱裂解法[J]. 华中农业大学学报, 2017, 36(4): 90–94.
ZHAO JY, LIU B, WANG WJ, *et al*. A rapid alkaline lysis method of extraction pig genomic DNA for PCR amplification [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2017, 36(4): 90–94.

[26] 李婷婷, 张桂兰, 赵杰, 等. 肉及肉制品掺假鉴别技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(2): 409–415.
LI TT, ZHANG GL, ZHAO J, *et al*. Research progress on identification techniques for meat and meat products adulteration [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2018, 9(2): 409–415.

[27] 周藏, 孙晓霞, 王金凤, 等. 同时检测速冻食品中鸡、鸭、猪和牛源性成分实时荧光聚合酶链式反应方法的建立及应用[J]. 肉类研究, 2022, 36(8): 29–34.
ZHOU C, SUN XX, WANG JF, *et al*. Development and application of a real-time polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of chicken-, duck-, swine- and bovine-derived ingredients in quick-frozen food [J]. Meat Research, 2022, 36(8): 29–34.

[28] 崔莉煊, 张宁, 程智, 等. 基于微流控芯片的核酸检测技术研究进展[J]. 分析测试学报, 2024, 43(12): 2008–2020.
CUI LX, ZHANG N, CHENG Z, *et al*. Research progress of nucleic acid detection technology based on microfluidic chip [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2024, 43(12): 2008–2020.

[29] 杨飞. 微流控实时荧光定量RT-PCR和实时荧光定量RT-PCR检测两种出血热病毒的比较[J]. 中华卫生杀虫药械, 2022, 28(1): 64–67.
YANG F. A comparison between microfluidic real-time fluorescence quantitative RT-PCR and real-time fluorescence quantitative RT-PCR in detection on two hemorrhage fever viruses [J]. Chinese Journal of Hygienic Insecticides & Equipments, 2022, 28(1): 64–67.

[30] WANG S, LIU Y, LI Y, *et al*. Rapid, multiplex and automated detection of bacteria and fungi in endophthalmitis via a microfluidic real-time PCR system [J]. Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection, 2024, 14(1): 64.

(责任编辑: 蔡世佳 安香玉)