

PCR鉴定牛羊肉中掺杂猪肉的方法建立

侯东军,杨红菊,姜艳彬,王海

(中国动物疫病预防控制中心,北京 100125)

摘要:建立了一种鉴定牛羊肉中掺杂猪肉的 PCR 检测方法。确定了一对可在牛羊肉中特异并灵敏地检测出所掺杂猪肉成分的引物对,以猪细胞色素 b 基因组为模板,特异性扩增出 130bp 的目的片段,而无其他扩增片段影响。在牛羊肉中分别掺杂 2%、4%、6% 的猪肉,均可灵敏地检测出猪肉成分,无显著性差异;分别经 120℃、10min,120℃、30min,115℃、30min,70℃、16h 处理猪肉,也可灵敏地扩增出特定目的条带,无显著性差异。

关键词:PCR,猪肉,鉴定

Establishment of method for PCR detection of pig components in beef and mutton

HOU Dong-jun, YANG Hong-ju, JIANG Yan-bin, WANG Hai

(China Animal Disease Control Center, Beijing 100125, China)

Abstract: A PCR method to detect porcine DNA in beef and mutton was developed for detecting hidden ingredients in meats or processed meats. A pair of special primer was chosen to amplified 130bp fragment to detect the gene encoding porcine cytochrome b with high sensitivity. The amplified 130bp fragment could be detected in beef and mutton which included 2%, 4%, 6% pork. The method was not markedly influenced by high temperature.

Key words: PCR; pork; detection

中图分类号:TS251.7

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2009)03-0328-03

在国内及国际贸易中,牛、羊肉中掺杂价格便宜的猪肉,以次充好的欺骗行为屡见不鲜,严重损害了消费者的利益。20 世纪 80 年代,国外开始对肉的种属鉴定进行研究,采用的方法主要有 DNA 杂交、免疫扩散和等电点聚焦等。这些方法大都存在着成本高、工作量大、对检测对象要求高等缺点^[1,2]。因此,建立一种能检测生熟肉、快速、灵敏、特异性强的检测方法一直是有待解决的难题。本研究根据猪细胞色素 b 的 DNA 序列,设计并最后确定了 1 对特异引物^[3-5],建立了 PCR 方法鉴定牛羊肉中掺杂生、熟猪肉的方法,为杜绝交易中的欺骗行为提供了快捷可靠的检验方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

各种动物肉样品 采自北京市各超市;不同温度的处理肉 由本实验室加工;蛋白酶 K、RNA 酶、dNTP、10 × PCR 缓冲液(含 Mg^{2+})、TaqDNA 聚合酶、50bp ladder DNA marker 等 均购自北京天根生化科技有限公司。

BIO-RAD PCR 扩增仪, BIO-RAD 凝胶成像仪

及电泳系统, sigma 台式离心机。

1.2 实验方法

1.2.1 PCR 引物的设计与合成 根据猪细胞色素 b DNA 序列,设计并确定 1 对特异猪引物序列,用高压灭菌后的超纯水溶解,配制成 100mol/L 的储备液。引物由上海生工生物工程有限公司合成,引物序列:上游引物序列为 5'-TCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTA-3';下游引物序列为 5'-AATTTGCGCATTGTGCGTCA-3'。

1.2.2 DNA 模板的提取^[2] 总 DNA 提取步骤如下:1.5mL 离心管中加入约 50mg 样品,加 200μL TE 溶解(pH8.0),旋涡混匀;加入 400μL 裂解液,旋涡混匀;加 600μL 酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)混合溶液,剧烈振荡,12000 × g 离心 10min;取上清液,加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1)混合溶液,剧烈振荡,12000 × g 离心 10min;取上清液,加入等体积氯仿,剧烈振荡,12000 × g 离心 10min;取上清液,加 0.8 倍体积异丙醇,12000 × g 离心 10min;取沉淀,用 70% 乙醇清洗 1 次,在室温或 50℃ 下,20min 晾干;加 80μL TE (pH8.0)溶解。也可用等效动物基因组提取试剂盒提取基因组 DNA。

1.2.3 PCR 方法 PCR 反应体系为 50μL,各成分含量为:10 × 缓冲液 5μL,2.5mmol/L 4 × dNTPs 1μL,引物 1μL,引物 E 1μL,模板 10μL,25mmol/L $MgCl_2$ 3μL 无菌超纯水 25μL,2.5μL (2.5u/μL) Taq DNA 聚合酶,混匀后离心,在 PCR 仪上开始循环。循环参数

收稿日期:2008-06-30

作者简介:侯东军(1975-),男,工程师,主要从事动物源性食品安全方面的研究。

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划(2006BAD14B04)。

为:94℃预变性 240s, 然后进行 37 个循环, 每个循环为 94℃变性 30s, 50℃、30s, 72℃、60s, 37 个循环后 72℃保温延伸 5min。取扩增产物 10 μ L, 在 2.5% 琼脂糖凝胶中电泳, 采用 0.5 * TBE 电泳缓冲系统, 5V/cm 恒压电泳, 50bp ladder 作为分子量对照。电泳后, EB 染色, 于凝胶成像仪下观察结果。

1.2.4 特异性、敏感性实验 在干燥箱中经 70℃ 16h 分别干燥猪肉、牛肉和羊肉, 用研钵研磨制备猪肉、牛肉和羊肉粉末, 分别制备含 0.2%、0.4%、0.6% 的猪肉的牛肉及同样猪肉含量的羊肉, 按照上述方法提取 DNA 并电泳检测扩增效果。

1.2.5 不同加热温度对检测效果的影响^[4] 在干燥箱中经 70℃ 16h 干燥猪肉, 在高压灭菌锅中分别经 115℃、30min, 120℃、10min, 120℃、30min 加热处理鲜猪肉, 然后按照上述方法分别提取 DNA 并电泳检测扩增效果。

1.2.6 实际样品检测^[6] 对从市场上购买的销售量较大的肉制品按上述方法进行检测。

2 结果与讨论

2.1 引物对的特异性及敏感性

将含 0.2%、0.4%、0.6% 的猪肉的牛肉及同样猪肉含量的羊肉, 按照上述方法提取 DNA 并电泳检测扩增效果, 结果见图 1, 均能得出 130bp 的目的 DNA 条带, 无非特异性杂带, 说明该引物对能在牛肉或羊肉中特异性地检测出含量高于 0.2% 的猪肉成分。猪肉含量较低的样品 PCR 产物电泳效果相对较差, 这应该是与研磨方法有关, 使用研钵研磨导致样品含量不均一。

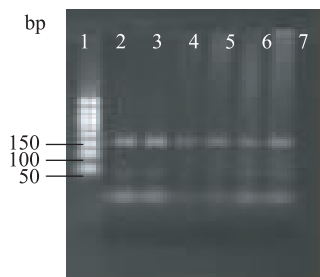


图1 含 0.2%、0.4%、0.6% 猪肉的牛肉或羊肉样品的 DNA 结果

1.50bp ladder; 2. 含 0.2% 猪肉的牛肉; 3. 含 0.2% 猪肉的羊肉; 4. 含 0.4% 猪肉的牛肉; 5. 含 0.4% 猪肉的羊肉; 6. 含 0.6% 猪肉的牛肉; 7. 含 0.6% 猪肉的羊肉。

2.2 不同加热处理程度对扩增效果的影响

将经过不同温度处理的猪肉样品按照上述方法提取 DNA, 并进行 PCR 反应, 电泳结果见图 2, 可见这几种温度处理对 PCR 反应无显著性影响, 说明这种方法可以用于经高温处理过的肉制品的检测。肉制品由于灭菌等工艺的要求, 经常需经过不同温度及时间的高温处理, 从而导致目标片段变小, 影响 PCR 反应效果, 因此所扩增的目的片段越大, 受温度影响越大, 检测结果越差。本方法中所设计引物扩增目的片段为 130bp, 相对较小, 受温度影响很小, 这与图 2 中电泳结果相符。

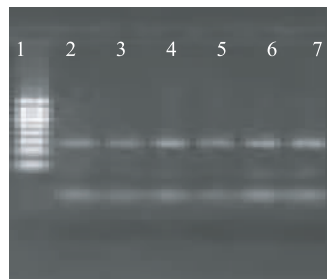


图2 经不同温度及时间加热处理的猪肉的 DNA 结果
1. 50bp ladder; 2. 70℃、16h; 3. 115℃、30min; 4. 120℃、10min; 5. 120℃、20min; 6. 120℃、30min; 7. 100℃、60min。

2.3 实际样品鉴定结果

从超市购买销售比例较大并标明主要成分的几种肉制品, 用上述方法提取 DNA 并进行检测, 每个样品都做了一个平行样, 电泳结果见图 3。取 40 份生猪肉、13 份熟猪肉、10 份猪肉罐头提取 DNA 进行鉴定, 均出现特异性的条带, 正确鉴定率为 100%。

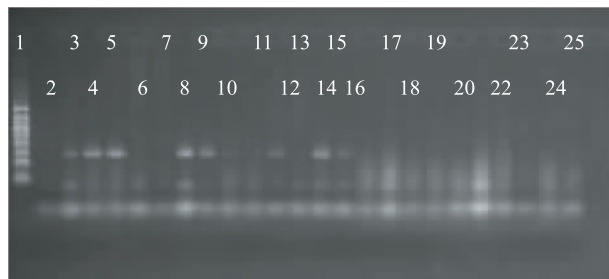


图3 市场上销售的肉制品的 DNA 结果
1. 50bp ladder; 2. “加增牌”三文治; 3. “加增牌”三文治; 4. “双汇牌”盐水方腿; 5. “双汇牌”盐水方腿; 6. 火鸡腿; 7. 火鸡腿; 8. 金双汇; 9. 金双汇; 10. “双汇”鸡肉火腿肠; 11. “双汇”鸡肉火腿肠; 12. “加增牌”火腿肠; 13. “加增牌”火腿肠; 14. “双汇”王中王; 15. “双汇”王中王; 16~25. 植物性或鱼粉饲料。

由图 3 可见, 三文治、盐水方腿、火腿肠等含有猪肉的肉制品均可检出目的条带, 有个别样品平行性不太好, 这与称取 50mg 样品时没有进行样品均质有关。结果说明, 该方法可以用于市场上大部分肉制品中猪肉成分的检测, 其他种类的动物成分及植物成分没发现有非特异性扩增现象。

参考文献:

- [1] 钟伟军, 陈金顶. PCR 检测饲料中牛源组织成分的研究[J]. 华南农业大学学报, 2006, 27(3): 33~36.
- [2] 潘良文, 陈家华, 丁燕, 等. 进口肉骨粉中牛成分检测研究[J]. 生物技术通报, 2001(5): 23~26.
- [3] 杨宝华, 宗卉. 根据线粒体基因的特异性鉴别检测饲料中的动物源性成分[J]. 科学实验与研究, 2002(5): 1~3.
- [4] J H Calvo, P Zaragoza, R Osta. Technical note: A quick and more sensitive method to identify pork in processed and unprocessed food by PCR amplification of a new specific DNA fragment1[J]. J Anim Sci, 2001, 79: 2108~2112.
- [5] Soichi Tanabe, Eiji Muneshige, Kazuhiro Mro, Chikara Sato, Masahiko Sato. PCR method of detecting pork in foods for verifying allergen labeling and for identifying hidden pork ingredients in processed foods [J]. J Biosci Biotechnol Biochem, 2007, 71(7):

高压二氧化碳杀菌技术 及在鲜肉中应用研究进展

史智佳, 李兴民*, 刘毅, 刘萍

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要:传统的热力杀菌技术会对食品中的热敏物质和食品色泽、气味和组织结构产生不利影响。高压二氧化碳(High Pressure Carbon Dioxide, HPCD)杀菌技术作为一种新型的非热力杀菌技术,具有处理条件相对温和、对食品品质破坏小和安全无毒无残留等优点。尽管HPCD杀菌技术受到了广泛的关注并进行了大量研究,但是时至今日仍未得到广泛应用。文章主要对HPCD杀菌技术的杀菌机理、影响因素和在鲜肉杀菌中的研究进展三个方面进行了综述。

关键词:高压二氧化碳(HPCD), 杀菌机理, 影响因素, 鲜肉杀菌

Review of high pressure CO₂ sterilization technique: mechanisms, influencing factors and applies in fresh meat

SHI Zhi-jia, LI Xing-min*, LIU Yi, LIU Ping

(College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agriculture University, Beijing 100083, China)

Abstract: Traditional thermal processing can destroy heat-sensitive nutrients and food product qualities such as flavor, color and texture. The use of high pressure carbon dioxide (HPCD) processing as an alternative cold sterilization technique for food has been widely investigated due to its potential advantages such as sterilize at low temperature, maintains food quality effectively and no-toxin residues. But until now, the HPCD sterilization technique has not yet been broadly used in food industry. This paper presented a review focus on mechanism and effect factors of HPCD sterilization technique, including elaborate on safety and qualities change of fresh meat.

Key words: high pressure carbon dioxide; sterilization mechanism; effect factors; fresh meat sterilization

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2009)03-0330-04

众多研究表明,二氧化碳在一定压力下具有杀菌作用^[1,2]。与传统的热力杀菌技术相比,高压二氧化碳(high pressure carbon dioxide, HPCD)杀菌技术处理温度低,因此对食品中的热敏物质破坏作用小,有利于保持食品原有品质;与超高压杀菌技术(300~600MPa)相比,HPCD杀菌技术处理压力低(一般<20MPa),容易达到并控制压力,因此HPCD杀菌技术日渐成为食品杀菌技术研究的焦点之一。肉品作为人类食物的重要组成部分,其微生物安全向来受到人们的重视,研究表明,HPCD杀菌技术对肉品同样具有很好的杀菌作用^[3~5]。但是,时至今日,该技术在食品领域仍没有得到广泛应用^[6],其主要原因是HPCD的杀菌机理尚不够明确,杀菌作用受限于多种

因素。

1 高压二氧化碳杀菌机理

上世纪80年代末期,几位日本科学家研究高压气体(并着重于CO₂)对生物制品、热敏物质和储藏食品的杀菌作用,HPCD杀菌技术才逐步引起广泛关注。关于HPCD的杀菌机理,研究者们提出了多种假说。尽管论述较为详尽,但是其精确的杀菌机制仍然没有彻底研究清楚。

1.1 导致细胞形态变化

细胞形变是最早出现的解释HPCD杀菌作用的机理假说,但是细胞形变究竟是发生于加压过程还是释压过程存在争议。Fraser和Foster等研究发现,瞬间释压后细菌细胞形态结构发生显著变化,出现了诸如细胞膜褶皱、穿孔和细胞完全破碎的现象,因此,他们推断细胞破碎可能是因为快速释放压力使已经渗透进入细胞内部的CO₂气体迅速膨胀,导致细胞膜穿孔或破碎,进而细胞内容物外泄^[1,2]。但是,

收稿日期:2008-07-07 *通讯联系人

作者简介:史智佳(1982-),男,在读硕士研究生,研究方向:肉品科学。

基金项目:国家“十一五”科技攻关项目(2006BAD05A15)。

1663~1667.

[6] 陈文炳,邵碧英,廖宪彪,等.加工食品中若干动物成

分的PCR检测技术应用研究[J].食品科学,2005,26(8):338~342.