

食品中肉类成分种属鉴别技术研究进展

何玮玲^{1,2}, 黄明², 张驰^{1,*}

(1.南京市产品质量监督检验院, 江苏南京 210028;

2.南京农业大学食品科技学院, 肉品加工与质量控制教育部重点实验室, 江苏南京 210095)

摘要: 肉与肉制品的掺杂、掺假是食品质量控制面临的重要挑战。食品中肉类成分的鉴别与分析技术已逐步形成了分别以蛋白质检测和以核酸检测为基础的方法体系, 其鉴别精度可达属与亚属水平, 检测灵敏度也达到了纳克级。近年来, 食品中肉类成分的定量检测与溯源又成为了本领域中的新研究热点。本文综述食品中肉类成分种属鉴别技术的研究进展, 并重点分析应用荧光定量PCR对食品中肉类成分进行定量分析的现状与前景。

关键词: 肉制品; 掺假; 种属鉴别; 定量

Recent Technological Advances for Identification of Meat Species in Food Products

HE Wei-ling^{1,2}, HUANG Ming², ZHANG Chi^{1,*}

(1.Nanjing Institute of Supervision and Testing on Product Quality, Nanjing 210028, China; 2. Key Laboratory of Meat Processing and Quality Control, Ministry of Education, College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Meat adulteration is one of the worldwide challenges for food quality control. In the last decade, identification technologies for meat species in food products have been mainly focused on specific proteins or DNA sequences. The precision of analysis has been at the genus or subgenus level, and the sensitivity of detection has reached up to the nanogram grade. Recently, more attention has been paid to the quantitative analysis of meat ingredients in foods. In this paper, recent technological advances for the identification of meat species in food products are reviewed. Moreover, some current potential quantitative technologies such as real-time PCR are discussed.

Key words: meat products; adulteration; species identification; quantification

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)03-0304-04

肉制品质量安全是全社会共同关注的热点话题。不法企业使用相对廉价的猪肉、鸡肉等肉类原料, 通过各种手段的深加工, 冒充牛肉、羊肉制品进行销售以谋取不当利益, 这严重侵犯了消费者的合法权益。在我国, 假冒的牛羊肉卷已多次被媒体曝光; 在西方, 一项对近千种肉制品的检测分析表明, 有近20%的产品存在标识与品种不完全相符的现象^[1]。

传统的依靠感官与经验的肉类形态学鉴别手段已远不能满足对上述肉制品掺假现象进行控制与监管的需要。近10多年来, 应用现代仪器分析与分子生物学方法对食品中肉类成分的鉴别技术不断发展, 鉴别精度与检测灵敏度均极大提高, 已逐步形成了分别以蛋白质检测和以核酸检测为基础的方法体系。近年来, 荧光定量PCR(real-time PCR, RTi-PCR)技术的飞速发展又使得

对深加工食品中肉类原料的定量与溯源成为可能。本文将分别综述基于蛋白质检测与核酸检测的食品中肉类成分鉴别技术, 并特别分析应用RTi-PCR对食品中肉类成分定量分析的现状与问题。

1 以蛋白质检测为基础的肉类本质鉴别技术

从20世纪90年代末至今, 大量研究报道了应用免疫学方法对食品中各种动物源性成分的鉴定技术^[2-5], 相应的酶联免疫分析(ELISA)试剂盒与免疫层析试纸条也已面世^[3,6]。在抗体方面, 牛H-钙调蛋白抗体是首先用于检测食品与饲料中牛源性成分的种属特异性抗体, 但由于其对平滑肌以外的组织成分检测灵敏度较低, 因此反刍动物肌钙蛋白等不具组织特异性的特异性蛋白质逐步取代了H-钙调蛋白, 成为了肉类本质鉴别抗体技术开

收稿日期: 2011-03-06

基金项目: 国家质检总局科技计划项目(2010QK178)

作者简介: 何玮玲(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为肉类质量与安全控制。E-mail: 2010108020@njau.edu.cn

*通信作者: 张驰(1978—), 男, 工程师, 博士研究生, 研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail: cavy78@gmail.com

发的理想靶标^[4]。商品化的 ELISA 试剂盒与免疫层析试纸条等免疫学鉴定技术具有检测时间短、操作简便等优势,但同时也存在着特异性较低、受样品基质影响大的局限。另外,肉制品中的特征蛋白质会随着不同加工条件而发生变性,因此需要针对不同变性程度的抗原设计特异性抗体,食品的加工程度极大地影响着免疫检测试剂盒的选择性与灵敏度^[2-3]。目前,尚未有一种商品化的免疫种属鉴定方法通过美国 FDA 或 AOAC 等权威机构的认证^[4-6]。

除免疫学方法外,根据蛋白质分布特征区分动物种属是食品中肉类本质鉴别的另一思路。利用高效液相色谱(HPLC)法检测肉制品提取物中组氨酸二肽、肌肽、鹅肌肽和鲸肌肽的分布特征,可有效地对反刍动物来源的肉制品进行鉴定^[7]。此外,通过十二磺基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、毛细管凝胶电泳(CE)和等电聚焦电泳(IEF)等电泳技术对肉制品提取物中的蛋白质分布特征进行定性、定量分析,从而鉴别肉类的方法也屡见报道^[8-9]。然而,肉制品中蛋白质含量变化范围广、干扰因素多,导致此类技术灵敏度较低、易产生假阳性结果,标准化与推广应用的前景均受到很大局限。

2 以核酸检测为基础对食品中肉类种属的定性检测

DNA 的热稳定性与酸碱稳定性均优于蛋白质,以动物种属间遗传信息的差异作为物种鉴别的检测靶点具有特异性高、方法便捷、不受组织类别限制等诸多优势,已逐渐成为食品中肉类成分鉴别的主流方法^[1]。在目标基因选择方面,线粒体基因组 DNA 序列具有高度的物种特异性,且拷贝数多、在食品加工过程中降解程度低的优点,因此其多态性位点是设计肉类本质鉴定方法的首选靶点;此外,细胞基因组中的重复序列,包括微卫星序列、短散布核元件(SINE)、端粒序列等也是用作物种鉴别的良好靶标;而细胞基因组中的编码序列由于为单一拷贝,食品加工过程中 DNA 部分降解后导致检测灵敏度降低,因此较不宜用于食品中肉类成分的鉴别^[1]。

就技术角度而言, DNA 探针杂交是最早用于食品中肉类成分鉴定的核酸检测方法^[10]。近十多年来,聚合酶链式反应(PCR)技术的迅速发展为物种鉴别开辟的新途径,逐步成为了食品中肉类种属鉴定的核心方法。其基本的实验思路为:根据不同物种细胞或线粒体基因组序列中的特征位点设计物种特异性引物,利用 PCR 反应实现食品中目标基因片段的指数级扩增,继而通过电泳或荧光检测鉴别食品中可能的物种来源。自从 Tartaglia 等^[11]首先报道了用 PCR 方法检测饲料中的牛、羊源性成分至今,大量研究报道了应用 PCR 扩增、电泳检测的流程对食品中多种肉类本质的鉴别方法^[12-14],其鉴定灵

敏度较蛋白质检测及 DNA 杂交提高了 1~2 个数量级,并实现了在同一 PCR 反应体系里加入多对引物同时检测牛、猪、驴、山羊、绵羊、禽类等多种肉类成分的多重 PCR 鉴定^[12-13],相应的方法也已大量通过认证,进入国际、国内的权威检测技术标准。

食品中 DNA 成分复杂,加之 PCR 技术的高灵敏度,使得应用 PCR 扩增方法来鉴定物种具有因非特异性扩增而产生假阳性结果的缺点。此外,对于未知基因序列的物种,也难以应用上述的常规思路设计 PCR 鉴定流程。因此,以 PCR 为基础、应用改良的引物设计策略或新型验证手段的鉴定方法已逐步成为了肉类定性鉴别的新方向。其中,限制性片段长度多态性扩增(PCR-RFLP)与随机扩增多态性 PCR(RAPD-PCR)是两种主要策略:前者将通用引物扩增后的 PCR 产物进行限制性内切酶酶切,通过物种特异性电泳图谱进行定性分析^[15-17],可进行不同种的牛肉等亲缘性较近的物种间的鉴别^[16];后者针对食品中基因序列未知的肉类成分,采用随机引物得到 PCR 产物的指纹图谱,根据指纹图间的差别区分不同的种属^[18]。然而,PCR-RFLP 的缺点是容易受到目标基因序列中酶切位点随机突变的影响,易产生检测结果的不确定性;RAPD-PCR 的重复性较差且受到食品中其他 DNA 成分的严重干扰,因此两者均有不易标准化与广泛应用的劣势。此外,PCR 扩增后的核酸序列分析也是肉制品组分鉴别的有效方法^[19],但其受制于较高的检测成本与繁琐的步骤等缺点,推广的潜力同样有限。值得一提的是, Bai Weibin 等^[20]与 Ahmed 等^[21]分别报道了应用通用引物多重 PCR(CM-P-PCR)与环介导等温扩增(LAMP)对肉制品进行种属鉴别的技术,这些研究通过对 PCR 扩增方案的巧妙构思与设计,在确保 PCR 鉴定高灵敏度的前提下,有效抑制非特异性扩增,减少假阳性检测结果,是应用基因扩增技术进行肉类成分定性检测卓有成效的新思路。

近 5 年来,实时荧光定量 PCR 技术开始应用于食品中的肉类鉴别,并在提升了定性检测准确性的基础上使得定量检测成为可能。RTi-PCR 是利用 PCR 反应体系中荧光信号的变化对产物生成进行实时监测的技术,应用最广泛的 RTi-PCR 技术包括两类:利用双荧光标记探针的荧光基团解离产生荧光强度变化的 TaqMan RTi-PCR,以及利用染料分子插入双链 DNA 产生荧光变化的 SYBR Green RTi-PCR。在定性检测方面, TaqMan RTi-PCR 技术通过 TaqMan 探针与模板的结合与水解,相比于常规 PCR 检测,极大改善了反应特异性,使得同一反应中多种肉类的同时鉴别的可靠性大大提升^[22-23]; SYBR Green RTi-PCR 可生成单个 PCR 循环的溶解曲线,可根据曲线的溶解温度进行种属的定性检测^[24]。总之, RTi-PCR 凭借其特异性好、检测自动化程度高等优势,在肉制品

表1 几种肉类成分检测技术的比较
Table 1 Comparison of several detection technologies for meat ingredients

种类	特点	灵敏度	存在问题	参考文献
以蛋白质检测为基础				
酶联免疫吸附 分析法(ELISA)	主要利用抗原或抗体的固相化及抗原 或抗体的酶标记反应; 检测快速方便	0.05% (熟肉)	特异性低; 需根据蛋白质的变性程度设计特 异性抗体; 无法鉴定到属或亚属水平	[1,3]
免疫层析试纸条 (Immunochromatogr-aphic strip)	待测物通过毛细作用在层析条上移行与膜上试剂接触, 与特异性受体 发生特异性免疫反应; 检测快速方便; 适用大规模样本筛选	0.05% (熟肉)	特异性低; 需根据蛋白质的变性程度设计特 异性抗体; 无法鉴定到属或亚属水平	[2,4]
高效液相色谱法(HPLC)	检测肉制品提取物中多肽的分布特征	0.5%(生肉)	灵敏度较低; 易产生假阳性结果; 无法鉴定到属或亚属水平	[6]
毛细管凝胶电泳(CE)	高压下在毛细管中进行电泳, 快速分离组分	未说明	检测结果的重现性差; 无法鉴定到属或亚属水平	[7]
等电聚焦电泳(IEF)	利用蛋白质两性电介质荷电特征及 等电点的不同对蛋白质进行分离	7.5%(生肉)	分析含有高盐的样品效果较差; 灵敏度低; 无法鉴定到属或亚属水平	[8]
以DNA检测为基础				
DNA探针杂交(DNA hybridization)	标记的DNA探针与样品DNA进行杂交反应	1%(生肉)5%(熟肉)	对交叉感染灵敏度差; 灵敏度低	[10]
PCR技术	利用特异性或通用引物对目标基因进行PCR反应; 可 在同一体系里添加多对引物实现多重PCR检测	0.125% (生肉、熟肉)	对于尚未测定基因组序列的品种不能进行 检测; 容易产生假阳性	[11]
限制性片段长度多态性 扩增(PCR-RFLP)	将通用引物扩增后的PCR产物进行限制性内切酶酶切, 通过物种特异性电泳图谱进行定性分析	1%(生肉、熟肉)	容易受到目标基因序列中酶切位点随机 突变的影响, 易产生检测结果的不确定性	[15-17]
随机扩增多态性 PCR(RAPD-PCR)	对于基因序列未知的样品, 采用随机引物扩增得到PCR 产物的指纹图谱, 根据指纹图谱间的差别区分不同的种属	未说明	灵敏度低; 实验重复性差; 易受其他DNA的干扰	[18]
实时荧光定量 PCR(RT-PCR)	利用PCR反应体系中荧光信号的变化对产物生成进行实时监测; 灵敏度、速度、 精度和自动化水平较高; 实现定量检测; 无需电泳; 有效避免假阳性结果	0.1% (熟肉)	目标基因的选择、降解DNA校正及酶抑制 剂校正三大因素容易造成不准确定量	[22-30]

种属鉴别上具备良好的标准化与应用前景。对于目前较常用的几种肉类成分检测技术, 其特点和存在问题比较见表1。

3 应用 RTi-PCR 对食品中肉类成分的定量与溯源

在 RTi-PCR 反应中, 荧光信号到达设定阈值时所经历的循环数 Ct 与模板拷贝数的对数呈线性关系, 因此 RTi-PCR 是模板 DNA 定量的有效方法。应用 RTi-PCR 技术对食品中肉类成分进行定量研究也屡见报道^[25-29], 无论使用 TaqMan RTi-PCR^[22,27,29]还是 SYBR Green RTi-PCR^[25], 均可通过绘制 Ct 值与模板量的标准曲线对起始目标基因进行定量, 进而结合核酸提取效率等因素推算出样品中特定原料肉的添加量及添加比例。应用 RTi-PCR 不仅可对食品中牛肉、猪肉、羊肉、鸡肉等不同种类的成分进行定量与溯源, 而且可利用 TaqMan 探针 5' 端首个碱基差异实现单碱基突变或缺失的检测, 从而对混合肉类中亲缘关系很近的成分如红鹿、马鹿、獐鹿肉进行区别与定量^[28]。

尽管近年来应用 RTi-PCR 的肉类成分定量技术有了长足发展, 但相关方法的完善与推广仍面临着诸多挑战。首先, 在目标基因选择方面, 线粒体基因组编码序列虽然是肉类定性鉴别的首选, 但不同动物组织中线粒体数量区别较大, 在动物组织种类未知的情况下以之作为定量检测的目标基因, 则可能导致定量结果的偏差, 而现有的部分研究却未考虑这一因素^[22]; 细胞基因组中的重复序列不存在组织差异, 但重复序列间的高同

源性加大了特异性引物与探针设计的难度; 细胞基因组中单拷贝的编码序列在食品加工过程中降解严重, 导致检测灵敏度过低而不适于定量研究。因此, 如何更好地选择高保守性、多拷贝、低降解程度且组织差异小的目标基因设计物种特异性引物和探针, 将是食品中肉类成分 RTi-PCR 定量技术改进面临的首要问题。

其次, 食品加工过程导致细胞内 DNA 大量降解, 使用 RTi-PCR 对模板 DNA 的定量结果必须结合 DNA 的降解程度才能推算出食品中原料肉的用量。经过不同处理过程的熟制食品中 DNA 降解程度可相差 10 倍以上^[27]。针对这个问题, Laube 等^[27]在 RTi-PCR 反应体系中同时加入 *myostatin* 基因特异性引物与探针, 构建二重的 *myostatin* 校正系统。由于 *myostatin* 基因在不同哺乳动物及禽类组织中的表达水平相当, 因此将对 *myostatin* 基因的定量结果与生肉组织中的定量结果相比, 即可计算出基因组 DNA 的降解程度, 从而进一步通过降解程度校正物种特异性扩增的定量结果。

再者, PCR 反应易受到酶抑制剂的影导致定量结果的偏差。加入已知浓度的阳性内参(IPC)构建二重反应体系是校正酶抑制剂影响的有效方法。IPC 往往是人为重组的质粒或线性 DNA 片段, 体系中同时存在扩增 IPC 的引物与探针, 可通过对 IPC 扩增 Ct 值的变化反映 PCR 反应的抑制程度并加以校正^[30]。然而时至今日, 尚未见使用 *myostatin* 与 IPC 系统的三重扩增体系同时校正 DNA 降解与反应抑制的肉类 RTi-PCR 定量研究报道。

此外, DNA 提取效率、食品自身状态、储存时

间、检测仪器性能等因素均会对应用 RTi-PCR 的肉类成分定量产生影响。总之, 尽管现有研究已报道了诸多深加工食品、混合肉制品中肉类成分定量的成功案例, 但相关方法仍处于不断改进、优化与完善之中。

4 结 论

食品中肉类成分的种属鉴定技术是打击肉制品掺假、维护市场秩序的有效保障。通过检测特征蛋白质或其分布的肉类鉴别技术已逐步被更灵敏实用的核酸检测所取代。如今, 荧光定量 PCR 技术的飞速发展肉类成分检测开辟了新的途径, 使得食品中肉类成分定量分析与溯源成为可能。在定量检测中, 通过对反应体系的精巧设计而提升方法的准确性与实用价值将成为相关技术的发展方向与趋势。

参考文献:

- [1] BALLIN N Z, VOGENSEN F K, KARLSSON A H. Species determination: can we detect and quantify meat adulteration?[J]. Meat Science, 2009, 83(2): 165-174.
- [2] KIM S H, HUANG T S, SEYMOUR T A, et al. Development of immunoassay for detection of meat and bone meal in animal feed[J]. Journal of Food Protection, 2005, 68(9): 1860-1865.
- [3] MUIDOON M T, ONISK D V, BROWN M C, et al. Targets and methods for the detection of processed animal proteins in animal feedstuffs [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2004, 39(8): 851-861.
- [4] KIM S H, HUANG T S, SEYMOUR T A, et al. Production of monoclonal antibody for the detection of meat and bone meal in animal feed[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(25): 7580-7585.
- [5] RAO Qinchun, HSIEH Y H P. Evaluation of a commercial lateral flow feed test for rapid detection of beef and sheep content in raw and cooked meats[J]. Meat Science, 2007, 76(3): 489-494.
- [6] MYERS M J, YANCY H F, FARRELL D E, et al. Assessment of two enzyme-linked immunosorbent assay tests marketed for detection of ruminant proteins in finished feed[J]. Journal of Food Protection, 2007, 70(3): 692-699.
- [7] CHOU C C, LIN S P, LEE K M, et al. Fast differentiation of meats from fifteen animal species by liquid chromatography with electrochemical detection using copper nanoparticle plated electrodes[J]. Journal of Chromatography B, 2007, 846(1/2): 230-239.
- [8] VALLEJO-CORDOBA B, RODRIGUE-RAMIREZ R, GONZALEZ-CORDOVA A F. Capillary electrophoresis for bovine and ostrich meat characterisation[J]. Food Chemistry, 2010, 120(1): 304-307.
- [9] DAY L, BROWN H. Detection of mechanically recovered chicken meat using capillary gel electrophoresis[J]. Meat Science, 2001, 58(1): 31-37.
- [10] BUNTIJER J B, LAMINE A, HAAGSMA N, et al. Species identification by oligonucleotide hybridisation: the influence of processing of meat products[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1999, 79(1): 53-57.
- [11] TARTAGLIA M, SAULLE E, PESTALOZZA S, et al. Detection of bovine mitochondrial DNA in ruminant feeds: a molecular approach to test for the presence of bovine-derived materials[J]. Journal of Food Protection, 1998, 61(5): 513-518.
- [12] YIN R H, BAI W L, WANG J M, et al. Development of an assay for rapid identification of meat from yak and cattle using polymerase chain reaction technique[J]. Meat Science, 2009, 83(1): 38-44.
- [13] FAJARDO V, GONZALEZ I, LOPEZ-CALLEJA I, et al. Identification of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) using polymerase chain reaction targeting specific sequences from the mitochondrial 12S rRNA gene[J]. Meat Science, 2007, 76: 234-240.
- [14] GHOVVATI S, NASSIRI M R, MIRHOSEINI S Z, et al. Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay[J]. Food Control, 2009, 20(8): 696-699.
- [15] GIRISH P S, ANJANEYULU A S R, VISWAS K N, et al. Meat species identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene[J]. Meat Science, 2005, 70(1): 107-112.
- [16] MURUGAIAH C, NOOR Z M, MASTAKIM M, et al. Meat species identification and halal authentication analysis using mitochondrial DNA [J]. Meat Science, 2009, 83(1): 57-61.
- [17] MANE B G, MENDIRATTA S K, TIWARI A K. Polymerase chain reaction assay for identification of chicken in meat and meat products[J]. Food Chemistry, 2009, 116(3): 806-810.
- [18] SAEZ R, SANZ Y, TOLDRA F. PCR-based fingerprinting techniques for rapid detection of animal species in meat products[J]. Meat Science, 2004, 66(1): 659-665.
- [19] MARTIN I, GARCIA T, FAJARDO V, et al. Mitochondrial markers for the detection of four duck species and the specific identification of muscovy duck in meat mixtures using the polymerase chain reaction[J]. Meat Science, 2007, 76(4): 721-729.
- [20] BAI Weibin, XU Wentao, HUANG Kunlun, et al. A novel common primer multiplex PCR (CP-M-PCR) method for the simultaneous detection of meat species[J]. Food Control, 2009, 20(4): 366-370.
- [21] AHMED M U, HASAN Q, HOSSAIN M M, et al. Meat species identification based on the loop mediated isothermal amplification and electrochemical DNA sensor[J]. Food Control, 2010, 21(5): 599-605.
- [22] KESMEN Z, GULLUCE A, SAHIN F, et al. Identification of meat species by TaqMan-based real-time PCR assay[J]. Meat Science, 2009, 82(4): 444-449.
- [23] 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.
- [24] LOPEZ-ANDREO M, GARRIDO-PERTIERRA A, PUYET A. Evaluation of post-polymerase chain reaction melting temperature analysis for meat species identification in mixed DNA samples[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(21): 7973-7978.
- [25] BALLIN N Z, MADSE K G. Sex determination in beef by melting curve analysis of PCR amplicons from the amelogenin locus[J]. Meat Science, 2007, 77(3): 384-388.
- [26] MARTIN I, GARCIA T, FAJARDO V, et al. SYBR-green real-time PCR approach for the detection and quantification of pig DNA in feedstuffs [J]. Meat Science, 2009, 82(2): 252-259.
- [27] 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.
- [28] FAJARDO V, GONZALEZ I, MARTIN I, et al. Real-time PCR for detection and quantification of red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) in meat mixtures[J]. Meat Science, 2008, 79(2): 289-298.
- [29] ZHANG Chunlai, FOWLER M R, SCOTT N W, et al. A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses[J]. Food Control, 2007, 18(9): 1149-1158.
- [30] CHIAPPINI B, BRAMBILLA G, AGRIMI U, et al. Real-time polymerase chain reaction approach for quantitation of ruminant-specific DNA to indicate a correlation between DNA amount and meat and bone meal heat treatments[J]. Journal of AOAC International, 2005, 88(5): 1399-1403.