

肉类掺假检测技术研究进展

余卉茹¹, 纪艺², 彭城², 徐晓丽², 汪小福², 孙梅好^{1*}, 陈笑芸^{2*}

1.浙江师范大学化学与生命科学学院, 浙江 金华 321000;

2.浙江省农业科学院农产品质量与安全营养研究所, 杭州 310021

摘要: 肉类掺假现象严重威胁公共卫生安全。快速、准确、可靠的动物源性成分检测技术是有效监管与检测肉类掺假的关键。总结了常见的掺假形式,并对物理技术、光谱技术、免疫学技术、DNA分析等检测方法进行了全面的总结归纳和比较分析,尤其是对当前热门的DNA分析方法,详细阐述了常规PCR、实时荧光定量PCR、数字PCR和等温扩增PCR这4种主要分子检测技术的优缺点和应用情况,旨在为未来动物源性检测技术的发展指明方向。

关键词: 肉类掺假;动物源性成分检测技术;DNA分析方法

DOI:10.19586/j.2095-2341.2021.0103

中图分类号:Q523, TS251.7

文献标志码:A

Research Progress on Detection Technology of Meat Adulteration

YU Huiru¹, JI Yi², PENG Cheng², XU Xiaoli², WANG Xiaofu², SUN Meihao^{1*}, CHEN Xiaoyun^{2*}

1.School of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Zhejiang Jinhua 321000, China;

2.Institute of Agro-Product Safety and Nutrition, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China

Abstract: Meat adulteration has seriously threatened public health security. Fast, accurate and reliable animal-derived component detection technology is the key to effective supervision and detection of meat adulteration. This article summarized the common forms of adulteration, and comprehensively summarized and analyzed various methods such as physical, spectroscopy, immunology, and DNA analysis. Especially for the current popular DNA methods, it elaborated four main molecular detection technologies of conventional PCR, real-time fluorescent quantitative PCR, digital PCR and isothermal amplification PCR, and the advantages, disadvantages and applications of these technologies were discussed. This article was expected to point out the future development direction of animal-derived component detection technology.

Key words: meat adulteration; animal-derived component detection technology; DNA analytical method

食品是人类生存和发展最重要的物质基础,食品安全已成为世界公共卫生关注的焦点。蛋白质是维持人体健康的必需物质,而肉类食品中富含蛋白质和微量元素,故在食品消费中占比较高。近年来,随着社会经济水平的不断提高,肉制食品的需求也不断提高,部分不良商家为获取更多经济效益而在肉类中掺假,严重侵害了消费者的合法权益,也极大地危害了食品安全。因此,亟需相应的检测技术,以确定肉制品中成分的真实

性和准确性,保障食品安全。

随着科学技术的发展,肉类制品的检测水平也逐渐提高。传统的物理方法是通过显微镜观察肉类样品的颗粒形态学构造来区分不同动物组织,该方法检测结果出现假阳性较少,热稳定性能也较为理想,但通过显微镜观测结果受主观因素影响较多,分辨率也无法保证,并且无法有效区分动物种类^[1]。近年来,以蛋白质和核酸为基础的肉类掺假检测技术逐渐兴起,研究表明,利用免疫

收稿日期:2021-06-04; 接受日期:2021-08-05

基金项目:浙江省科技计划项目(2021C02059)。

联系方式:余卉茹 E-mail:yhr_yee@163.com

* 通信作者 孙梅好 E-mail:mhsun@zjnu.cn; 陈笑芸 E-mail:xiaoyunchen_2016@163.com

学方法可以定量地测定出动物源成分^[2-5]。其中微孔板 ELISA 在定量靶标表征上有较高的精确度^[6-7]。Macedo-Silva 等^[8]采用 ELISA 检测法制作抗牛、马、猪、鸡蛋蛋白的抗血清来鉴别汉堡中可能掺入的廉价肉类成分,灵敏度为 0.6%。胡连霞等^[9]研究发现 GNM C7-8 实时荧光 PCR 检测法能够对同时添加 4 类假肉的成分进行检测,且能够实现快速检测。本文分别从传统物理技术、光谱技术、免疫学技术和 DNA 分析技术等角度,分析和阐述肉类和肉类制品中具有的动物源性成分检测方法以及鉴别技术,并对优缺点进行对比分析,旨在为进一步的研究和标准制定提供理论依据。

1 市场上常见的肉类掺假形式

肉类富含蛋白质,营养丰富,味道鲜美,已成为大家餐桌上必不可少的美味,且每年肉类市场需求量较大。在此情况下,部分不良商家为获取更高的经济效益将价格较低的肉类掺杂进高价肉类中出售,这严重影响了肉类市场的流通和消费者的健康^[10]。按照掺假严重性,肉类掺假可分为 3 类^[11]。第 1 类是将低价肉类如鸭肉等加入到牛羊肉中以高价出售,这种掺假方式在生活中最为常见,且牛羊肉制品经常作为火锅食材,通过调味,很大程度上掩盖了牛羊肉原有的味道,使得消费者难以简单地从感官上进行辨别;第 2 种是利用一些如马肉、狐狸肉以及水貂肉等非可食用的肉类进行掺假,这些肉类大多是由生产皮毛的养殖场提供的,在动物饲养过程中往往无节制的使用药物,因此,这类肉制品中存在很大的安全隐患;第 3 种是利用来源不明确的非可食用肉类在牛羊肉中掺假,如流浪猫、流浪狗、老鼠等未经过正规食品安全检测的肉类,此类掺假方式多见于流动商贩,因其无固定场所,无法追踪,而且食用这些肉制品后极易感染疫病,因此,安全隐患极大。

2 传统物理学鉴别方法

传统的肉类掺假鉴别方法是以组织学特性和解剖学为基础,通过肉品自身特征和脂肪特征对其品种进行确定,主要通过色泽、气味和味道等,并对肉类品质的鉴定提供依据^[12]。羊肉和其他肉

类相比更加鲜嫩,并且胆固醇与脂肪含量均低于牛肉和猪肉。此外,镜检法也可用于检测肉制品中的动物源性成分,其是物理鉴别中唯一一个被欧盟官方认可的方法^[13],该方法可对哺乳动物、鱼类、禽类等的肉质进行观察从而区分,但不能鉴别出具体的动物种类。

3 基于光谱法的鉴别方法

不包括蛋白质与核酸在内的其他化合物均属于生物体内的代谢物质,如脂类、糖类大分子和一些小分子的代谢物,但在检测代谢物方面当前仅针对少部分的小分子代谢物,并且它们的分子质量均未超过 2 kD。根据相关研究可知,动物种属的辨别可以借助肉类中氨基酸、酚类和糖类等代谢物含量和构成来实现^[14-16]。目前应用较为广泛的有色谱法、质谱法、光谱分析法等,其中光谱分析法是以原子、分子的光谱学为依据而建立的,其利用各种样品的光谱来分辨物质,同时,对其化学成分含量进行判定。通常用于研究物质的分子结构和组成,是一种在食品饲料动物成分检测鉴别中的有效方法,主要优势为无污染、无损伤、成分检测效率高等^[17]。红外吸收光谱和拉曼光谱自 20 世纪 70 年代就被广泛应用于农产品和有机物的成分鉴定,因此,小分子代谢物内的 C、H、O、N 之间的化学键与官能团的表示均可以采用该方法,从而进行定量和定性检验^[1]。肉糜因为物种和组织特定形态特征不易被识别,成为了一种极易掺假的食品,故 Lemonia-Christina 等^[18]基于光谱技术,利用牛肉、鸡肉、猪肉等不同程度掺假的 120 个样品进行可见光光谱(visible, VIS)、荧光光谱(fluorescence, Fluo)、多光谱图像(multispectral image, MSI)采集,建立并评价了支持向量机分类模型。结果发现,光谱数据在检测和定量肉糜掺假方面具有较大的应用潜力,其中基于 MSI 的模型优于基于其他传感器的模型,其精确度为 87% ~ 100%,基于 Vis 的模型精确度为 57% ~ 97%,而基于 Fluo 的模型精确度较低,但 3 种方法均能检出样品。

3.1 拉曼光谱法

拉曼光谱法是通过物质分子光散射作用下的非破坏指纹成像技术,其可对各种照射光的频率进行散射光谱研究,能够获取分子转动与振动的

相关数据,从而完成分子结构的分析。Fowler等^[19]指出拉曼光谱技术可以对食品中的主要成分含量和结构进行分析,且可定量检测某种成分的含量,因此,可以运用于食品成分检测中。拉曼光谱法具有重复性能好、灵敏度高、操作简单等优点^[20-21]。

3.2 红外光谱法

红外光谱一般分为远红外、中红外和近红外3大区域,该方法主要是针对分子呈现偶极矩变化且振动状态的化合物进行分析,不同红外辐射波长对应的吸收效果也存在差异,可利用光谱图中吸收峰的波长、形状与强度开展物质的研究。一般情况下分子结构特征可以通过吸收谱带长度与红外吸收带波长真实位置来体现,这在未知物质化学基团与分子结构的研究有非常关键的作用和价值^[4];另外,化学基团或者分子构成通常会影响到谱带吸收强度,故其既能够检测物质纯度,也能够完成定量分析。

近年来,红外光谱因效率高、快捷、操作简单等优点,已广泛应用于食用油、蜂蜜、奶制品以及肉制品掺假、鉴别检测等方面。任再琴等^[22]在红外光谱的应用中发现,利用红外光谱法检测食用油并建立相应的校正模型,可以准确的鉴别出某种食用油中是否掺入其他成分。此法也可以有效地应用于检测羊肉是否掺假。方瑶等^[23]将近红外光谱、PLSR偏最小二乘法及MSC多元散射校正算法联合对金鲳鱼鱼肉进行检验,结果表明预测集均方根误差(root mean square error of prediction, RMSEP)为1.845 4,决定系数(decision coefficient, R^2)为0.884 1,即基于以红外光谱法为基础的预测模型检测金鲳鱼肉质精确度较高。

4 基于免疫学的鉴别方法

免疫检测技术可以精确地确定肉类中的动物源性成分,因而被广泛应用于肉类掺假的检测中,常见的检测技术包括试管沉淀法、琼脂凝胶免疫扩散法、放射免疫法、免疫组化、对流免疫电泳法和酶联免疫法^[24],其中应用最广泛的是酶联免疫法(又称ELISA技术),该方法利用酶来检测样品中的抗体或者抗原,具有操作简单、灵敏度高、特异性强等特点^[8,25]。

4.1 环状沉淀法

环状沉淀法是通过抗体和抗原特异性融合产生肉眼可见的沉淀物。李景鹏等^[26]利用环状沉淀法对牛肉中是否掺入马肉进行检测,通过观察发现,可通过已知血清与肉样是否产生沉淀来辨别肉类是否掺假,该方法具有可视、快速、操作简单、特异性好等优势。

4.2 酶联免疫吸附分析法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

ELISA又称酶标法,其是以免疫酶为前提研究而形成的技术^[27]。ELISA技术原理为有效融合待检样品与酶标抗体或者抗原,然后将其吸附于固相抗原或者抗体上,在其表面完成相应反应,液相内游离成分通过洗涤剂完成清洗,然后添加酶底物显色,定性分析依据颜色的深浅来完成;而且被检物质与产物的含量之间存在一定的联系,所以也可以开展定量分析^[28]。Cheng-Hsin等^[29]在1995年的报道中指出,将多克隆抗体对抗血清蛋白的酶联免疫可应用于新鲜肉类的掺假检测中,但不同肉样间可能存在交互反应,因此,可通过多克隆抗体免疫吸附亲和层析减少交互反应。此外,单克隆抗体为捕获抗体(此抗体对肌肉可溶性蛋白具有专一性),制备夹层式酶联免疫用以检测牛肉或猪肉中是否含有鸡肉;或通过将2种不同的单克隆抗体植入乳酸脱氢酶中,以检测牛肉或猪肉中是否含有火鸡肉,该方法灵敏度高,甚至能检测出低含量($\geq 1\%$)的鸡肉或火鸡肉。在Macedo-Silva等^[30]和骆训国等^[31]的研究中也指出,酶联免疫法可以对肉类掺假进行有效检测,不论是单一样品还是混合样品均表现出较好的特异性和灵敏性。

5 基于DNA生物学的分析技术

随着人们生活水平的提高,对食品检测的要求也不断提高,以核酸为基础的DNA生物学检测方法飞速发展。与蛋白质相比,DNA稳定性、灵敏度均更高,即使对于经过热处理的肉制品也可进行DNA检测,从而可有效避免食品加工方式对肉制品的影响^[32],因此,已逐渐成为了动物源性鉴定的主要方式。DNA分析方法是通过对分析线粒体或者核DNA序列差异进行检测。在肉类实际鉴定过程中,PCR应用最为广泛,其可以获得各个

物种特异性的基因片段,并通过实验设计引物并进行扩增而得到所需的片段。

5.1 常规PCR

各物种或个体之间,基因组DNA都有其各自的特点,且不易发生变异,故可利用种属特异性的DNA序列为靶标完成PCR反应,该方式灵敏性较高,已逐渐成为了检测肉类是否掺假的重要方法之一^[33-35]。线粒体DNA是裸露的环状DNA双链分子,基因组通常较小(15~20 kb),并且在动物组织中1个细胞中含有多个线粒体DNA,数量较多,故线粒体DNA被广泛应用于实验研究。陈颖等^[36]和Martín等^[37]分别利用牛、羊线粒体DNA序列(来自tRNA-lys、ATP8和ATP6的部分序列)和线粒体12S rRNA设计了引物和探针,分别对牛肉、羊肉和鸭肉成分进行快速检测,结果表明,牛源性成分的检测限度最小为0.05%,山羊、绵羊源性成分对应的最低检测限依次为0.005%和0.5%,鸭肉的则是0.1%~1.0%。Martin等^[37]还对鸭肉进行了热处理,以探究高温处理后的肉类样品是否能进行掺假检测,结果证明经过处理的样品灵敏度也较高。Soares等^[38]在单一PCR检测的基础上,以线粒体*cytb*和12S rRNA为目标基因开发了1种针对特定物种的双重PCR方法,其灵敏度可达0.1%,重复性也较为理想,为混合肉类的掺假检测提供了良好的方法。René等^[39]、Karola等^[40]和Thitika^[41]建立并研究了多重PCR方法,并在原有灵敏度的基础上提高了检测的效率,可同时检测多个肉样,且Thitika^[41]的实验还证明了该方法对市场销售的样品检测也呈现出较好的效果。

5.2 实时荧光定量PCR

检测扩增产物时,若应用常规PCR技术只能检测终点,实时荧光定量PCR技术是将荧光基团融入到PCR反应系统中,对荧光信号强度进行观测从而观察实验全过程,其中指数增长阶段数据分析最为适用,并且样品DNA含量与 C_t 值(循环数)二者间的关系为线性,因此,样品的定量分析可在完成标准曲线制定后开展^[38,42]。实时荧光定量PCR可分为SYBR Green real-time PCR和TaqMan real-time PCR。SYBR Green real-time PCR荧光染料可以实现以特异性方式插入DNA双链中,并将荧光信号输出,SYBR荧光染料未插入DNA双链中则分子不会出现荧光,对于荧光信号观察

过程中通过荧光信号的强弱程度来确定PCR产物含量。DNA扩增后,该技术可以通过溶解曲线对单碱基突变进行检验^[43]。TaqMan real-time PCR荧光强度改变是通过荧光标记探针的荧光基团解离来实现的。在探针完整的情况下,猝灭基团可以将报告基团的荧光信号吸收;而扩增过程中,探针被酶切,2个基团分离,故产生荧光信号并被接收,最终通过荧光信号的强弱来观测产物的形成。这样的方式主要特点是模板与探针融合和水解使特异性更强,而且不需要进行电泳,简化了流程,可实现单个反应将多种肉类同时进行鉴定的目的。

Wang等^[44]以TaqMan real-time PCR为基础,根据牦牛细胞色素B基因设计特异性引物和探针,并与其他动物物种的DNA进行扩增,结果表明,扩增曲线仅牦牛能够形成,并且与其他物种DNA之间不存在交叉反应,灵敏度可达到0.001%,对牛肉的掺假检测具有重要意义。李亮等^[45]则利用牛线粒体和16S rDNA内参基因进行相应的试验,并通过标准曲线计算出样品中牛的DNA水平和总DNA水平,以此计算出回收率(平均回收率为98.62%)。由于线粒体DNA在不同组织中拷贝数不同,而细胞核DNA具有高度保守性和一致性,且在同一物种的不同细胞中拷贝数基本一致。所以目标基因的设立除了线粒体,还可以是核基因。Li等^[46]利用单拷贝核基因设计引物和探针并运用荧光定量PCR的方法进行了羊肉的掺假检测,由于在之前的研究中发现,若仅应用标准曲线进行定量会存在一定的误差,因此,该试验中引入了1个常数(修正因子)将掺假肉中的DNA浓度转化为目标肉类所占的比例,以此提高肉类掺假检测的准确性。

5.3 数字PCR

实时荧光定量PCR在肉及其制品的检测上可以准确的定性或定量,但也存在较多影响其扩增效率的因素,导致 C_t 值发生变化,进而使标准曲线出现偏差,最终导致实验误差。然而,随着相关检测部门的要求越来越高,实时荧光定量PCR已无法满足实际需求。数字PCR不依靠循环阈值完成定量,而且扩增效率不会被其他因子影响,因此,可实现DNA复制数量的绝对定量,重复性和准确性均较理想。ddPCR一般先完成PCR扩增,然后再研究荧光信号,PCR扩增时稀释待测样品

为单分子后再实验,并在扩增结束后采集各个反应单元的荧光信号,然后利用泊松分布计算所测样品 DNA 的原始含量和大小^[47]。王珊等^[48]建立了羊肉和猪肉源性的数字 PCR 方法,并与 SN/T 2051—2008 标准^[49]下的实时荧光定量 PCR 方法进行比较,结果显示,数字 PCR 的准确性更高。Chen 等^[50]应用数字 PCR 定量检测了羊肉单拷贝基因,结果发现样品质量和 DNA 拷贝数存在线性关系,并将牛肉加入到样品中作为内标,通过线性曲线的绘制,靶基因拷贝数可直接转换为样品质量进行计算,实验发现对于羊肉源性成分为 0.01% 的情况下,对应的结果是 $0.12 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,表明其可以准确定量含量在 5% 以上的羊肉源性成分。Wang 等^[51]基于数字 PCR 技术,建立了一种高精度的肉制品中山羊和绵羊含量的定量分析方法;同时,建立了 DNA 拷贝数的生肉重量计算公式。结果显示山羊和绵羊检测限和定量限分别为 $1 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 和 $5 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

5.4 等温扩增检测技术

重组酶聚合酶扩增技术(recombinant enzyme polymerase amplification, RPA)是利用重组酶和引物形成的蛋白-DNA 复合物在双链 DNA 中找到同源序列,然后发生链交换反应并启动 DNA 合成对模板上的目标区域进行指数级扩增的技术方法。防止肉类掺假,确定肉类和肉制品中的动物来源是关键,传统方法操作存在技能要求较高、仪器昂贵等不足,而且不能提供快速移动现场检测系统检测肉制品中的污染物,因此,仅依靠 RPA 技术不能直观反映出肉类中是否掺假。Lin 等^[52]、Fu 等^[53]和李婷婷^[54]均在 RPA 技术的基础上结合了横向流动试纸,通过试纸的显色功能,肉眼即可观测到实验结果并进行判断,该方法准确性良好且整个实验均能在 30 min 内完成,可明显减少测试时间,为现场快速检测提供了一种更加方便、快捷的检测手段。值得注意的是, Lin 等^[52]还对高温处理后的肉样进行检测以探究不同的烹饪手法是否会对实验结果造成影响,最终测得鸭肉、牛肉、绵羊、鸡肉和猪肉的检测限分别为 10^1 、 10^2 、 10^2 、 10^1 和 $10^1 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)不需要模板的热变性、温度循环、电泳和紫外光观测等步骤,其是一种能够在短时间(一般为 1 h 内),且在恒定温度(通常为

60 ~ 65 °C)下即可进行的核酸扩增技术,具有操作简便、反应快速、结果精确且成本低等优点。朱凯^[55]利用环介导等温扩增技术分别对猪肉、驴肉、兔肉进行检测,通过对实验温度的优化和体系的优化,最终得出猪肉、驴肉、兔肉的实验体系最适温度分别为 57、59、65 °C,最低检出限分别为 1、1、8 pg。整个反应可在 20 min 内完成,操作简单、快速,且能特异性的区分目标肉类。何艺梅等^[56]也通过 LAMP 技术对市场和超市中的牛羊肉进行了检测,结果发现市售牛肉制品掺入的通常为猪肉和鸡肉,而羊肉制品中掺入的通常为猪肉和鸭肉,其为肉类掺假检测提供了可靠的方法。Girish 等^[57]使用碱性裂解(alkaline cleavage, AL)方法提取 DNA,然后用 LAMP 扩增猪的 mt-D 环区。在 121 °C、30 min 热处理肉类样品中获得了可靠的扩增。该方法能够检测 0.1% 混合浓度的牛肉中的猪肉, DNA 检测限为 $0.5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

5.5 DNA 条形码和下一代测序

基于 DNA 的检测方法主要是针对特定靶目标的检测,但在肉类掺假检测过程中,还有很多未知的肉类物种较难识别^[58]。根据此类检测需求发展了一种新型的检测方式,即 DNA 条形码技术^[59-60],指生物体内相对较短的 DNA 片段,这些片段能代表该物种,具有足够多的变异且易扩增。该技术方法常用于生态学研究中的物种鉴定,故也可作为肉类检测的重要检测工具。早期的 DNA 条形码和微条形码技术主要是依赖于动物细胞色素 C 亚基 I (CO I) 基因(约 650 bp)区域标记进行 Sanger DNA 测序^[61-62],随后可在生命数据条形码系统和美国国家生物技术信息中心数据库中进行搜索,从而识别出掺假的肉类物种^[63]。Hanan 等^[64]在实验中结合 DNA 条形码方法和数字 PCR 的方法对香肠中的肉类进行掺假检测。结果显示, DNA 条形码可以有效地检测出香肠中的主要肉类,但在混合肉类中进行定量分析的潜力有限。在现实生活中,多数食品进行了一些中度或高度的加工, DNA 的质量可能受到了严重的影响,而大多数加工样品的降解会阻止长度超过 250 bp 的片段 PCR 扩增^[65]。此外,引物结合位点的降解也可能阻止 CO I 的扩增^[66],因此,从样品中进行全长条形码的 PCR 扩增可能具有挑战性^[65,67]。Xing 等^[68]研究结果表明,52 个动物源性产品中只有 29 个(56%)样品显示全长 CO I 的

PCR 扩增和产物测序成功,随后使用了一套 16S rRNA 通用引物,用于扩增 16S rRNA 基因的短片段,通过 PCR 反应扩增和测序鉴定动物物种,最终所有的 DNA 提取均产生了 PCR 反应产物,在琼脂糖凝胶上可以看到预期大小的单条带。从 52 个样本中共获得了 49 个微条形码序列,成功测序的微条形码的平均长度为 199 ~ 225 bp。44 个样本显示与基因库中物种条目的遗传相似性 $\geq 98\%$,其中,完整的 CO I 条形码结果显示为 1 个物种,而微 DNA 条形码则揭示了 4 个物种,提高了实验的准确性。然而,当肉制品中含有较多种类的掺假成分时,传统的 Sanger 测序会产生多个或重叠的测序峰,从而导致错误的序列信息^[69]。在此情况下,利用下一代测序(next generation sequencing, NGS)技术有望在复杂样品中实现多物种鉴定的方法。下一代 DNA 测序的基本原理是在纳米空洞中配置纳米电极,用电测方法测量 1 个 DNA 的核酸碱基排列。Geoffrey 等^[70]利用 NGS 技术对 4 种不同的肉类混合物进行检测,以评估该方法的准确度、特异性和灵敏度,结果表明,所有测试样品均能够正确检测和识别不同的物种,包括掺入 1% 时的掺杂物种。为提高测试加工样品的适用性,该实验在 20 个牛肉样本中加入 1% 的猪肉和 1% 的驯鹿肉,并在 100 °C 下蒸煮 270 min,以模拟制备膳食的热工业过程。结果发现这些样本中均检测到驯鹿肉,并在 19 个样本中检测到猪肉,最终得出 NGS 工具的灵敏度接近 1%。

5.6 其他核酸检测技术

除上述的检测方法外,还有很多基于核酸的检测技术,如 RAPD 指纹图谱具有物种特异性,使用任意引物针对 DNA 中的多个序列,产生复杂的图谱,允许同时对多个位点进行比较。因此,可以在物种之间检测到高水平的多态性。此外, RAPD-PCR 无需了解所研究物种的 DNA 序列。然而,Arslan 等^[71]指出, RAPD 指纹技术存在一些缺陷,如在含有 50% ~ 55% 杂交物种混合物的产品中,无法识别原始物种。此外, RAPD 分析对严重降解的材料灵敏度较低,如经过高压处理的样品。PCR-SSP 方法则是使用 1 对物种特异性引物扩增 1 个基因片段,然后进行电泳检测。有研究者^[72-73]对单一和多重的 PCR 检测进行了研究,多重 PCR 用其中一种引物瞄准目标基因的保守区

域,引物根据物种的不同而存在差异,因此,许多不同长度的扩增子可被扩增;单一的 PCR 方法可以同时检测多个物种,降低了成本和时间,然而,由于其固有的复杂性、扩增效率低以及对不同长度模板的可变灵敏度,使其不适合用于目标基因的定量。此外, Rahmati 等^[74]发现在单管中使用多个引物可能会导致问题,如错误引物的 PCR 产物或引物-二聚体的形成增加,以及长 DNA 片段的扩增识别;另一方面,虽然单一 PCR 不能在 1 个反应中检测到多个物种,但其被证明敏感度、准确度和稳定性均较高。PCR-RFLP 方法为使用 1 对一致的序列特异性引物对多个物种的 1 个大扩增子进行扩增,然后用 1 个或 1 组限制性内切酶对扩增产物进行酶切,以产生 1 个物种特异性的限制性内切片段模式。该方法在本质上比 SSP 更准确,可以通过鉴别真实产品,进而用于鉴别近缘物种。Doosti 等^[75]在 2014 年用分子分析在牛肉类汉堡中鉴定出了掺假猪肉;同年, Kumar 等^[75]利用 AluI 和 TaqI 酶对 *cyt-b* 基因的 PCR 扩增产物进行酶切,用于肉品鉴定,对 PCR-RFLP 检测的结果重复进行了 10 次验证,结果均一致。

6 展望

食品掺假问题作为全球性的公共问题将会长期存在,但是传统的物理学方法,即依靠感官的形态学鉴别已经不能满足监管与检测要求。目前,探寻一种适用、简便的鉴定方法具有重要意义。近年来,基于光谱、免疫学、核酸的检测方法逐渐应用于食品检测领域,但对于经过深加工处理的肉类,如牛肉干、卤牛肉等检测存在一定的局限,故研究开发可以精确检测加工后样品的方法对市场监管的发展具有重要作用;其次,各种技术的检测方法大多依赖于一些大型进口仪器,仅有规模较大的实验室中配备,增加了现场快速检测的难度。因此,未来仍需开发操作简便、低成本、仪器设备简单便携的方法,以提高现场检测工作的效率。

参考文献

- [1] 任君安,黄文胜,葛毅强,等.肉制品真伪鉴别技术研究进展[J].食品科学,2016,37(1):247-257.
- [2] HOSSNER K L, YEMM R S, SONNENSHEIN S E, et al. Com-

- parison of immunochemical (enzyme-linked immunosorbent assay) and immunohistochemical methods for the detection of central nervous system tissue in meat products[J]. *J. Food Prot.*, 2006, 69(3): 644-650.
- [3] BARAI B K, NAYAK R R, SINGHAL R S, *et al.* Approaches to the detection of meat adulteration[J]. *Trends Food Sci. Tech.*, 1992, 3(92): 69-72.
 - [4] 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.
 - [5] 石盼盼, 李旭, 魏法山, 等. 肉类掺假的分子生物学检测[J]. *食品与生物技术学报*, 2017, 36(7): 773-777.
 - [6] 任秀, 骆海朋, 崔生辉. 酶联免疫吸附法和 DNA 检测法在肉类鉴别中的应用[J]. *中国食品卫生杂志*, 2015(1): 93-98.
 - [7] 王守云, 袁明美, 封聪, 等. 肉类掺假鉴别技术研究进展[J]. *肉类研究*, 2017, 31(4): 56-61.
 - [8] MACEDO-SILVA A, BARBOSA S F C, ALKMIN M G A, *et al.* Hamburger meat identification by dot-ELISA[J]. *Meat Sci.*, 2000, 56: 189-192.
 - [9] 胡连霞, 孙晓霞, 陈启跃, 等. GNM C7-8 实时荧光 PCR 系统对掺假肉制品中多种动物源性成分的同时检测[J]. *食品工业科技*, 2019(14): 240-246.
 - [10] O' MAHONY P J. Finding horse meat in beef products—a global problem[J]. *QJM*, 2013, 106(6): 595-597.
 - [11] 孟楠, 樊振江. 肉及肉制品动物源性成分鉴别技术研究进展[J]. *现代食品*, 2016(22): 82-84.
 - [12] GAZALLI H, MALIK A H, JALAL H, *et al.* Methods of Identification of meat species[J]. *Int. J. Food Nutr. Safety*, 2013, 3(2): 90-110.
 - [13] ZIA Q, ALAWAMI M, MOKHTAR N F K, *et al.* Current analytical methods for porcine identification in meat and meat products[J/OL]. *Food Chem.*, 2020, 324: 126664[2021-12-27]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem>.
 - [14] ELLIS D I, BROADHURST D, CLARKE S J, *et al.* Rapid identification of closely related muscle foods by vibrational spectroscopy and machine learning[J]. *Analyst*, 2005, 130(12): 1648-1654.
 - [15] SOWOINICH K, KRONFELDT H D. Shifted excitation Raman difference spectroscopy at multiple wavelengths for in-situ meat species differentiation[J]. *Appl. Phys. B*, 2012, 108(4): 975-982.
 - [16] ARISTOY M C, TOLDRÁ F. Histidine dipeptides HPLC-based test for the detection of mammalian origin proteins in feeds for ruminants[J]. *Meat Sci.*, 2004, 67(2): 211-217.
 - [17] 朱雨薇. 肉类掺假检测鉴定技术的研究进展[J]. *食品工业*, 2014, 11: 242-248.
 - [18] LEMONIA-CHRISTINA F, ALEXANDRA L, PANAGIOTIS T. Detection of meat adulteration using spectroscopy-based sensors[J/OL]. *Foods*, 2021, 10, 861[2021-12-27]. <https://doi.org/10.3390/foods10040861>.
 - [19] FOWLER S M, SCHMIDT. Raman spectroscopy compared against traditional predictors of shear force in lamb *M. longissimus lumborum*[J]. *Meat Sci.*, 2014, 98(4): 652-656.
 - [20] 赵淑平, 何栩栩, 卢静, 等. 拉曼光谱检测技术应用[J]. *科技经济市场*, 2018(1): 1-2.
 - [21] NIEUWOUDT M K, HOLROYD S E, MCGOVERIN C M, *et al.* Rapid, sensitive, and reproducible screening of liquid milk for adulterants using a portable Raman spectrometer and a simple, optimized sample well[J]. *J. Dairy Sci.*, 2016, 99: 7821-7831.
 - [22] 任再琴, 张荣荣, 邓飞燕. 红外光谱在食品检测中的应用价值探讨[J]. *现代食品*, 2020(23): 193-195.
 - [23] 方瑶, 谢天铎, 郭渭, 等. 基于近红外光谱的金鲷鱼新鲜度快速检测技术[J]. *江苏农业学报*, 2021, 37(1): 213-218.
 - [24] 刘梦恬. 食品中动物源性成分鉴别方法研究新进展[J]. *科技视界*, 2015, 25: 157-158.
 - [25] ASENSIO L, ISABEL G, TERESA G, *et al.* Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)[J]. *Food Control*, 2008, 19(1): 1-8.
 - [26] 李景鹏, 王君伟, 宣世伟, 等. 应用免疫学技术鉴别鲜牛肉和马肉的试验研究[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 1990(8): 7-9.
 - [27] 张占军, 王富花. 酶联免疫吸附技术及其在食品安全检测中的应用[J]. *食品研究与开发*, 2011, 32(1): 157-160.
 - [28] HITCHCOCK C H S, CRIMES A A, WEEKS I, *et al.* Modern techniques and applications in immunoassay[J]. *Anal. Proc.*, 1983(20): 413-418.
 - [29] CHENG-HSIN W, DENISE M S. Lactate dehydrogenase monoclonal antibody immunoassay for detection of turkey meat in beef and pork[J]. *J. Food Sci.*, 1995(2): 253-256.
 - [30] MACEDO-SILVA A, BARBOSA S F, ALKMIN M G, *et al.* Hamburger meat identification by dot-ELISA[J]. *Meat Sci.*, 2000, 56(2): 189-192.
 - [31] 骆训国, 栗绍文, 周蕾蕾, 等. 夹心 ELISA 方法检测生肉混合物中的猪肉成分的研究[J]. *动物医学进展*, 2010, 31(S1): 20-22.
 - [32] WALKER J A, HUGHES D A, ANDERS B A, *et al.* Quantitative intra-short interspersed element PCR for species-specific DNA identification[J]. *Anal. Biochem.*, 2003, 316(2): 259-269.
 - [33] FANG X, ZHANG C. Detection of adulterated murine components in meat products by TaqMan real-time PCR[J]. *Food Chem.*, 2016, 192: 485-490.
 - [34] ERWANTO Y, ROHMAN A, ARSYANTI L, *et al.* Identification of pig DNA in food products using polymerase chain reaction (PCR) for halal authentication—a review[J]. *Int. Food Res. J.*, 2018, 25(4): 1322-1331.
 - [35] KIM M J, KIM H Y. A fast multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of pork, chicken, and beef in commercial processed meat products [J/OL]. *Food Sci. Technol.*, 2019, 114: 108390[2020-11-16]. <https://doi.org/10.1016/j.lwt>.
 - [36] 陈颖, 钱增敏, 徐宝梁, 等. 保健品中牛羊源性成分的 PCR 检测[J]. *食品科学*, 2004, 25(10): 215-218.
 - [37] MARTÍN I, GARCÍA 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 Sci.*, 2007, 76(4): 721-729.
- [38] SOARES S, AMARAL J S, MAFRA I, *et al.*. Quantitative detection of poultry meat adulteration with pork by a duplex PCR assay[J]. *Meat Sci.*, 2010, 85(3): 531-536.
- [39] RENÉKPEL, VELSEN F V, GANESHAN A, *et al.*. Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from chamois, roe, deer, pork and beef[J]. *Eur. Food Res. Tech.*, 2020, 246(5): 1007-1015.
- [40] KAROLA B, PILAR C M, JORGE B V, *et al.*. Review of recent DNA-based methods for main food-authentication topics[J]. *Agric. Food Chem.*, 2019, 67(14): 3854-3864.
- [41] THITIKA K, KUANGTIWA S, PHUVADOL T. Are these food products fraudulent? Rapid and novel triplex-direct PCR meat identification[J/OL]. *forensic Sci. Int-Gen.*, 2013, 4(1): e33-e34 [2022-02-23]. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2013.10.016>.
- [42] PRIMROSE S, WOOLFE M, ROLLINSON S. Food forensics: methods for determining the authenticity of foodstuffs[J]. *Trend. Food Sci. Tec.*, 2010, 21(12): 582-590.
- [43] BALLIN N Z, MADSEN K G. Sex determination in beef by melting curve analysis of PCR amplicons from the amelogenin locus[J]. *Meat Sci.*, 2007, 77(3): 384-348.
- [44] WANG P, HU Y, YANG H, *et al.*. DNA-based authentication method for detection of yak (*Bos grunniens*) in meat products [J]. *J. AOAC Int.*, 2013, 96(1): 142-146.
- [45] 李亮,赵新,刘娜,等. 肉制品中牛源性成分 Taqman 荧光定量 PCR 检测法的建立[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(10), 251-261.
- [46] LI T, WANG J, WANG Z, *et al.*. Quantitative determination of mutton adulteration with single-copy nuclear genes by real-time PCR[J/OL]. *Food Chem.*, 2021, 15: 128622[2021-12-27]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem>.
- [47] 林彩琴,姚波. 数字 PCR 技术进展[J]. *化学进展*, 2012, 24(12): 2415-2423.
- [48] 王珊,李志娟,苗丽. 微滴式数字 PCR 与实时荧光 PCR 检测羊肉制品中羊源和猪源性成分方法的比较[J]. *肉品安全与检测*, 2015, 7: 38-41.
- [49] 国家质量监督检验检疫总局. 食品、化妆品和饲料中牛羊猪源性成分检测方法 实时 PCR 法 .SN/T2051-2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [50] CHEN C J, JIN L, LIN H, *et al.*. Quantification of mutton-derived ingredients in food by droplet digital PCR[J]. *Food Ferment. Ind.*, 2020, 46(6): 229-237.
- [51] WANG Q, CAI Y, HE Y, *et al.*. Droplet digital PCR (ddPCR) method for the detection and quantification of goat and sheep derivatives in commercial meat products[J]. *Eur. Food Res. Technol.*, 2018, 244: 767-774.
- [52] 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/OL]. *Food Chem.*, 2021, 30: 129526[2021-12-27]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem>.
- [53] FU M, ZHANG Q, ZHOU X, *et al.*. Recombinase polymerase amplification based multiplex lateral flow dipstick for fast identification of duck ingredient in adulterated beef[J/OL]. *Animals*, 2020, 10(10): 1765[2021-12-27]. <https://doi.org/10.3390/ani10101765>.
- [54] 李婷婷. 基于 DNA 检测的羊肉掺假鉴别技术研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2019: 5.
- [55] 朱凯. 环介导等温扩增技术在掺假肉检测中的应用[D]. 洛阳: 河南科技大学, 2019: 4.
- [56] 何艺梅, 刘辉, 郑超红, 等. LAMP 扩增技术在真假肉鉴别中的应用[J]. *中国卫生检验杂志*, 2018, 28(12): 2649-2654.
- [57] GIRISH P S, BARBUDDHE S B, KUMARI A, *et al.*. Rapid detection of pork using alkaline lysis- loop mediated isothermal amplification (AL-LAMP) technique[J/OL]. *Food Control*, 110, 107015[2022-01-27]. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont>. 2019. 107015.
- [58] COTTENET G, BLANCPAIN C, CHUAH P F, *et al.*. Evaluation and application of a next generation sequencing approach for meat species identification[J/OL]. *Food Con.*, 2020, 110, 107003[2021-12-27]. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont>. 2019. 107015.
- [59] CAVIN C, COTTENET G, COOPER K M, *et al.*. Meat vulnerabilities to economic food adulteration require new analytical solutions[J]. *Chimia (Aarau)*, 2018, 72: 697-703.
- [60] HEBERT P D, CYWINSKA A, BALL S L. Biological identifications through DNA barcodes[J]. *Proc. Biol. Sci.*, 2003, 270 (1512): 313-321.
- [61] BÖHME K, CALO-MATA P, BARROS-VELÁZQUEZ J, *et al.*. Review of recent DNA-based methods for main food-authentication topics[J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2019, 67(14): 3854-3864.
- [62] XING B, ZHANG Z, SUN R, *et al.*. Mini-DNA barcoding for the identification of commercial fish sold in the markets along the Taiwan Strait[J]. *Food Control*, 2020, 112, 107143.
- [63] NEHAL N, CHOUDHARY B, NAGPURE A, *et al.*. DNA barcoding: a modern age tool for detection of adulteration in food [J]. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2021, 41(5): 767-791.
- [64] HANAN R, SHEHATA A M, NAAUM S C, *et al.*. Re-visiting the occurrence of undeclared species in sausage products sold in Canada[J]. *Food Res. Int.*, 2019, 122: 593-6598.
- [65] SARRI C, STAMATIS C, SARAFIDOU T, *et al.*. A new set of 16S rRNA universal primers for identification of animal species[J]. *Food Control*, 2014, 43: 35-41.
- [66] WALLACE L J, BOILARD S M, EAGLE S H, *et al.*. DNA barcodes for everyday life: routine authentication of natural health products[J]. *Food Res. Int.*, 2012, 49(1): 446-452.
- [67] HAJIBABAEI M, SINGER G A C, HEBERT P D N, *et al.*. DNA barcoding: How it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics[J]. *Trends Genet.*, 2007, 23(4): 167-172.
- [68] XING R R, HU R R, HAN J X, *et al.*. DNA barcoding and mini-barcoding in authenticating processed animal-derived food: a case

- study involving the chinese market[J/OL]. Food Chem., 2020, 309: 125653[2021-12-27]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125653>.
- [69] YANG F, DING F, CHEN H, *et al.* DNA barcoding for the identification and authentication of animal species in traditional medicine[J/OL]. Evid. Based Complement. Alternat. Med., 2018, 2018: 5160254[2021-12-27]. <https://doi.org/10.1155/2018/5160254>.
- [70] Geoffrey C, CARINE B, FONG C, *et al.* Evaluation and application of a next generation sequencing approach for meat species identification[J/OL]. Food Control, 2020,110:107003 <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.107003>.
- [71] ARSLAN A,ILHAK I,CALICIOGLU M,*et al.* Identification of meats using random amplified polymorphic DNA (RAP) technique[J]. J. Muscle Foods, 2005, 16: 37-45.
- [72] ALI M E, RAZZAK M A,HAMID S B A. Multiplex PCR in species authentication: probability and prospects - a Review [J]. Food Anal. Method., 2014, 7: 1933-1949.
- [73] ABBAS D, PAYAM G, DEHKORDI E. Molecular assay to fraud identification of meat products[J]. J. Food Sci. Tech., 2014, 51: 148-152.
- [74] RAHMATI S, JULKAPLI N M, YEHYE W A, *et al.* Identification of meat origin in food products - a review[J]. Food Control, 2016, 68: 379-390.
- [75] DOOSTI A, GHASEMI DEHKORDI P, RAHIMI E. Molecular assay to fraud identification of meat products[J]. J. Food Sci. Tech., 2014, 51(1): 148-152.
- [76] KUMAR D, SINGH S P, KARABASANA VAR N S, *et al.* Authentication of beef, carabeef, chevon, mutton and pork by a PCR-RFLP assay of mitochondrial cytb gene[J]. J. Food Sci. Tech., 2014, 51(11): 3458-3463.