

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2024.02.020

陈晨, 史国华, 陈勃旭, 等. 基于 Real-time PCR 法检测乳粉中牛源性成分定量研究[J]. 粮油食品科技, 2024, 32(2): 159-164.

CHEN C, SHI G H, CHEN B X, et al. Quantitative study on the detection of bovine derived components in dairy products based on real time PCR method[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2024, 32(2): 159-164.

基于 Real-time PCR 法检测 乳粉中牛源性成分定量研究

陈晨¹, 史国华¹, 陈勃旭¹, 张瑞¹, 王玉欣¹, 贾文坤², 陈佳³, 周巍¹✉(1. 河北省食品安全重点实验室, 国家市场监管重点实验室(特殊食品监管技术), 特殊食品
安全与健康河北省工程研究中心, 河北省食品检验研究院, 河北 石家庄 050227;

2. 北京市农林科学院, 北京 100097;

3. 石家庄学院 化工学院, 河北 石家庄 050035)

摘要: 基于 Real-time PCR 建立了乳粉中牛源性成分相对定量检测方法, 并对牛的特异性引物与探针进行了特异性、灵敏度和稳定性测试。通过模拟不同浓度牛乳粉与马乳粉混合样本, 根据其 ΔCt 值的函数关系进行线性拟合进而绘制标准曲线, 建立乳粉中牛源性成分的相对定量检测。结果显示, 该方法的最低检测限为 0.000 01 mg/mL, 回收率为 91.11%~119.2%, 组间变异系数 $\leq 0.58\%$ 、组内变异系数 $\leq 1.44\%$ 。说明该方法在特异性与稳定性上适用于乳粉中牛源性成分及含量的掺假检测。

关键词: 牛乳粉; 马乳粉; Real-time PCR; 掺假检测

中图分类号: TS251.7 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2024)02-0159-06

网络首发时间: 2024-03-05 18:23:55

网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/11.3863.TS.20240301.1613.008>

Quantitative Study on the Detection of Bovine Derived Components in Dairy Products Based on Real Time PCR Method

CHEN Chen¹, SHI Guo-hua¹, CHEN Bo-xu¹, ZHANG Rui¹, WANG Yu-xin¹,
JIA Wen-shen², CHEN Jia³, ZHOU Wei¹✉

(1. Hebei Food Safety Key Laboratory, Key Laboratory of Special Food Supervision Technology for State Market Regulation, Hebei Engineering Research Center for Special Food Safety and Health, Hebei Food Inspection and Research Institute, Shijiazhuang, Hebei 050227, China; 2. Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China; 3. College of Chemical Technology, Shijiazhuang University, Shijiazhuang, Hebei 050035, China)

Abstract: This experiment established a relative quantitative detection method for bovine derived components in milk powder based on Real time PCR. The specificity, sensitivity, and stability of cattle-specific primers and probes were tested. By simulating mixed samples of cow's milk powder and horse's milk powder with different concentrations, linear fitting was performed based on the functional

收稿日期: 2023-09-19

基金项目: 河北省市场监督管理局科研计划项目(2022ZD11)

Supported by: Market Supervision Administration Scientific Research Plan Project of Hebei Province (No. 2022ZD11)

作者简介: 陈晨, 女, 1991 年出生, 硕士, 工程师, 研究方向为食品安全。E-mail: 2440013107@qq.com

通讯作者: 周巍, 男, 1983 年出生, 博士, 正高级工程师, 研究方向为食品安全。E-mail: zhouwei0311@aliyun.com

relationship of their ΔCt values, and a standard curve was drawn to establish a relative quantitative detection of bovine derived components in milk powder. The results showed that the minimum detection limit of this method was 0.000 01 mg/mL. The recovery rate was 91.11%~119.2%, with an inter group coefficient of variation of $\leq 0.58\%$ and an intra group coefficient of variation of $\leq 1.44\%$. This method is suitable for detecting the adulteration of bovine derived components and content in milk powder in terms of specificity and stability.

Key words: milk powder; horse milk powder; real time PCR; adulteration detection

乳和乳制品尤其牛乳含有对人体有益的微量元素, 对平衡人体营养方面起着重要作用^[1], 含有的必需氨基酸有助于促进人体新陈代谢^[2]。

牛乳粉中不仅含有人体所需的蛋白质、脂肪、碳水化合物, 还含有生物体遗传信息编码物质(即基因组 DNA), 分子生物学检验是基于生物遗传物质 DNA 与 RNA 建立。其方法主要包括聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction/PCR)、基因克隆、DNA 测序及基因表达测序等。PCR 法是最为常用的一种方法, 它通过体外扩增 DNA 片段, 使得在短时间内扩增得到大量的 DNA 片段, 近而达到检测的目的。目前涉及乳粉掺假检测的方法有液相色谱法^[3]、电泳法^[4]、免疫组学法^[5]和 PCR 法^[6]等。化学分析方法是目前应用最多, 主要用于乳与乳制品生产、销售、运输过程中的现场检测^[7]。但随着分子生物学的发展, 聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction/PCR)在种属成分鉴别、致病菌快速筛查、掺假物质相对定量分析等领域得到广泛应用^[8]。实时荧光 PCR (Real Time-PCR, RT-PCR) 检测技术可以实现针对目标源性物种成分的定性与定量分析, 特异性与灵敏度都相对较高, 目前在食品掺杂使假中应用广泛^[9]。付^[10]开发出了骆驼乳中牛乳与羊乳掺假快速检测试纸条方法。孙^[11]建立了双重实时荧光定量检测掺假驴乳中牛乳源性成分, 最低检出限为 0.5%。沙^[12]应用实时荧光定量检测技术检测肉制品中牛源性成分及定量研究方法。Mininni 等^[13]利用 Real-time PCR 法完成了羊乳酪中牛源性成分的检测。岳巧云等^[14]利用 Real-time PCR 法完成了乳制品中掺入植物源性成分的检测。范阳阳等^[15]建立了针对羊乳中检测牛乳及大豆源的双重实时荧光定量法。广西壮族自治区根据对

比 PCR 检测结果电泳图谱, 出台了《食品安全地方标准 水牛乳及其制品中掺入牛属乳的定性检测 PCR 法》(DBS 45/023—2015), 较好的解决了牛乳中掺假的定性问题^[16]。

本文利用实时荧光定量检测技术, 建立牛乳粉相对定量标准曲线方法, 旨在为乳粉真实性技术研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

牛乳粉、马乳粉、骆驼乳粉、驴乳粉、羊乳粉、鹅肉: 电商平台; 猪肉、鸡肉、鸭肉: 河北省石家庄某大型超市; 狐狸肉、貉子肉、鼠肉: 毒理实验室。深加工食品 DNA 提取试剂盒: 天根(北京)科技有限公司。

1.2 仪器与设备

NANO DROP LITE 紫外分光光度仪: 美国 Thermo 公司; 电子天平 ME204/02: 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; SHA-B 水浴恒温振荡器: 常州润华电器有限公司; Sigma 3K15 离心机: 德国 Sigma 公司; BCD 235STCY: 青岛海尔股份有限公司; LightCycler 480II 实时荧光定量 PCR 仪: 德国罗氏诊断有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 乳粉基因组 DNA 的提取

分别称取 100 mg 5 种乳粉, 7 种动物组织肉末, 按深加工食品 DNA 提取试剂盒进行提取, 其中孵育温度改为 65 °C, 孵育时间为 4 h, 孵育结束后向其中加入 400 uL 三氯甲烷, 其它步骤与试剂盒一致。

1.3.2 引物探针

牛特异性引物选自参考文献沙^[12]。通用引物选用 18S rDNA 作为内参基因。引物序列见表 1。

表 1 特异性引物与通用引物序列
 Table 1 Specific and universal primer sequences

上引物 5'-3'	下引物 5'-3'	探针
牛 GCCATATACTCTCCTTGGTGACA	GTAGGCTTGGGAATAAGTACGA	FAM-CAATCCAGAAGTACACCAAC-TAMRA
18S rDNA TCTGCCCTATCAACTTTCGATGGTA	AATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTT	FAM-CCGTTTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAAT CGAAC-TAMRA

1.3.3 实时荧光 PCR 扩增

实时荧光 PCR 扩增条件为：95 °C 预变性，15 min；95 °C，15 s，60 °C，1 min，40 个循环。扩增体系见表 2。

表 2 实时荧光 PCR 扩增体系
 Table 2 Real time fluorescence PCR amplification system μL

反应体系总体积	μL
Super Real premix	12.5
上引物	0.75
下引物	0.75
探针	0.5
DNA	2
ddH ₂ O	8.5

1.3.4 特异性检测

将本文提取的 12 个物种的基因组 DNA 稀释到统一的浓度，应用牛的特异性引物与 18S rDNA 通用性引物进行荧光定量扩增，无菌双蒸水作为阴性对照。根据扩增结束后的荧光强度来判断特异性与通用性引物的特异性。

1.3.5 灵敏性检测

将提取的牛基因组 DNA 样本进行 10 倍梯度稀释，使其终浓度为 0.01、0.005、0.001、0.000 1、0.000 01、0.000 001、0.000 000 1 mg/mL。以不同浓度梯度的牛基因组 DNA 为目标模板，无菌双蒸水为阴性对照，进行扩增。根据扩增结束后的 Ct 值判断特异性引物的最低检测浓度。

1.3.6 相对定量标准曲线的建立

称取不同质量梯度的牛乳粉与马乳粉的混合样本 100 mg，其中牛乳粉的质量比为 0%、10%、20%、40%、60%、80%、100%。将称取的混合乳粉样本进行提取基因组 DNA 后，统一将其浓度稀释为 0.03 mg/mL，将稀释好的基因组 DNA 进行荧光定量扩增，每个浓度样本设置 3 个重

复，结果以 $\bar{x} \pm S$ 进行表示，进而建立相对定量标准曲线。

1.3.7 相对定量标准曲线准确性验证

仍称取牛乳粉与马乳粉的混合样本 100 mg，其中牛乳粉占比分别为 5%、15%、45%、65%、95%。提取混合样本 DNA 后，根据其基因组 DNA 的含量将其稀释为统一浓度（30 ng/ μL ），进行扩增。将扩增得到的 ΔCt 值带入建立的相对定量标准曲线中，计算牛乳粉的质量百分比及其回收率。设置 3 个重复，取其平均值以验证实验方法的准确性。18S rDNA 作为内参基因，同样本设置 3 个重复。

1.3.8 方法稳定性评估

本文选取了 3 个不同浓度的牛基因组 DNA 样本，分别进行了组间与组内的重复性实验，同样设置 3 个重复，根据检测得到的 Ct 值计算其变异系数，以此来评估检测方法的稳定性。

1.4 数据处理

所有结果采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析，利用 Excel 进行图表编辑。

2 结果与分析

2.1 特异性检测结果

本文分别以牛、羊、猪、鸡、鸭、驴、马、骆驼、鹅、狐狸、貉子、鼠 12 个物种的基因组 DNA 作为模板，对牛的特异性引物与内参引物 18S，进行扩增。由图 1 可知，12 个物种的基因组 DNA 中，只含有牛基因组的 DNA 出现了明显的扩增曲线，其它 11 个物种均未出现扩增曲线，表明牛的特异性引物，符合实验要求，可用于后续实验。由图 2 可知，内参引物 18S 对 12 个物种的基因组 DNA 均有扩增，且 Ct 值起跳位置相对集中，说明 18S 可作为通用性引物使用。

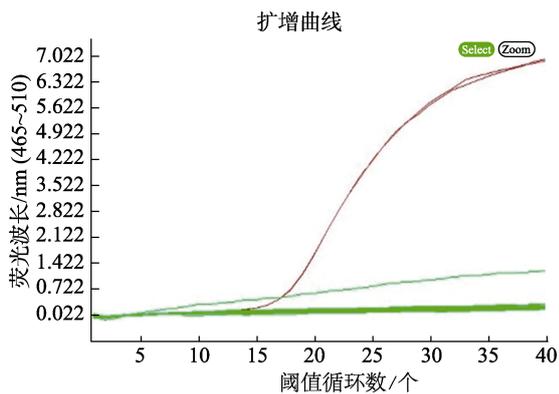


图 1 牛特异性引物验证扩增曲线

Fig.1 Amplification curve of bovine specific primer validation

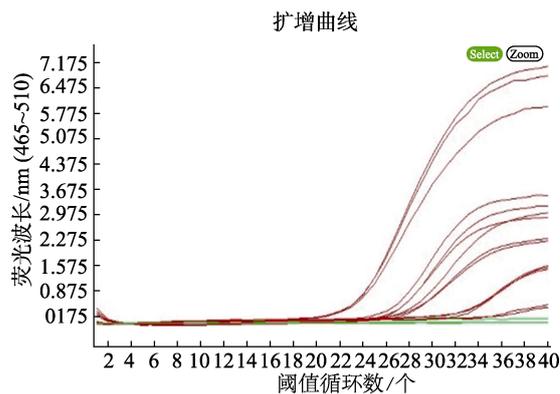


图 3 牛特异性引物灵敏度检测

Fig.3 Sensitivity detection of bovine specific primers

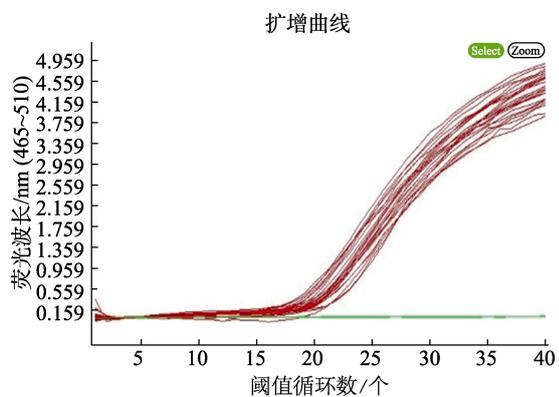


图 2 18S 通用性引物验证扩增曲线

Fig.2 Amplification curve of 18S universal primer validation

表 3 不同比例牛乳粉 Ct 与 Δ Ct 值检测结果

Table 3 Test results of Ct and Δ Ct values of different proportions of milk powder

牛乳粉质量百分比/%	Ct 值		Δ Ct 值
	牛	18S rDNA	
0	35.00	25.04±0.05	9.96±0.05
10	28.45±0.11	24.61±0.02	3.84±0.09
20	27.31±0.07	24.18±0.07	3.13±0.00
40	25.87±0.06	23.38±0.13	2.49±0.07
60	24.68±0.11	22.97±0.16	1.71±0.05
80	23.73±0.05	22.27±0.06	1.46±0.01
100	22.37±0.04	21.52±0.10	0.85±0.07

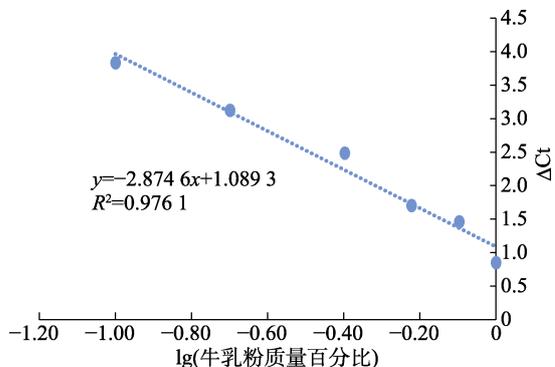


图 4 不同质量百分比牛乳粉标准曲线

Fig.4 Standard curves of milk powder with different mass percentages

2.2 引物灵敏性检测

选取 0.01、0.005、0.001、0.000 1、0.000 01、0.000 001、0.000 000 1 mg/mL 7 个浓度梯度的牛基因组 DNA 作为模板，进行灵敏度扩增检测，结果如图 3 所示，当模板浓度为 0.000 001 mg/mL 时，相对于无菌双蒸水，特异性引物有明显的扩增曲线，当模板浓度为 0.000 000 1 mg/mL 时，无菌双蒸水与特异性引物无明显扩增曲线区别，因此判断该引物的最低检测模板浓度为 0.000 001 mg/mL。

2.3 相对标准曲线的建立

不同比例混合的牛乳粉与马乳粉样本，进行实时荧光定量检测，检测结果如表 3 所示。本文建立牛乳粉相对定量标准曲线，采用牛乳粉质量百分比 log10 值作为横坐标， Δ Ct 值作为纵坐标建立标准曲线，如图 4 所示，线性回归方程为 $y = -2.8746x + 1.0893$ ($R^2 = 0.9761$)。

2.4 相对标准曲线准确性验证

分别以不同牛乳粉质量百分比 5%、15%、45%、65%、95% 的混合样本为模板，进行荧光扩增检测，检测结果如表 4 所示，将检测得到的 Δ Ct 值代入相对定量标准曲线 $y = -2.8746x + 1.0893$ ，计算其牛乳粉质量含量，其回收率在 91.11%~119.2% 之间，实验结果显示符合实践要求，具有实际意义。

表 4 混合乳粉检测结果

Table 4 Test results of mixed milk powder

牛乳粉质量百分比/%	牛 Ct 值	变异系数 (CV) /%	18S rDNA Ct 值	变异系数 (CV) /%	ΔCt 值	牛乳粉质量含量/%	回收率/%
5	29.60±0.05	0.16	24.99±0.02	0.06	4.61±-0.03	5.96	119.20
15	27.87±0.03	0.09	24.62±0.06	0.25	3.24±0.04	17.81	118.73
45	25.78±0.04	0.17	23.58±0.03	0.11	2.20±-0.02	41.00	91.11
65	24.31±0.08	0.34	22.66±0.10	0.43	1.65±0.01	63.82	98.18
95	22.90±0.02	0.09	21.74±0.07	0.32	1.17±0.05	93.99	98.94

2.5 检测方法稳定性评估

为验证本文建立方法的稳定性,选取了三个浓度 DNA,对牛源性引物分别做了组间与组内的

重复性实验。结果如表 5 所示,组间变异系数≤0.59%,组内变异系数≤1.44%。表明该实验方法稳定性良好。

表 5 组内及组间重复性验证结果

Table 5 Results of intra group and inter group repeatability verification

DNA 浓度/(ng/μL)	1	2	3	组内 Ct 值	组间 Ct 值	组内 CV/%	组间 CV/%
10	25.46	25.34	24.86	25.22±0.32		1.26	
	25.31	25.37	25.35	25.34 ±0.03	25.32±0.15	0.12	0.59
	25.45	25.49	25.29	25.41±0.11		0.42	
5	27.74	27.85	27.72	27.77±0.07		0.25	
	27.73	27.71	27.80	27.75 ±0.05	27.73±0.07	0.17	0.25
	27.53	27.64	27.88	27.68±-0.18		0.65	
1	28.88	29.13	29.56	29.19±0.34		1.18	
	29.56	29.78	29.46	29.60±-0.16	29.42±0.13	0.55	0.45
	29.66	28.98	29.76	29.47±0.04		1.44	

3 讨论与结论

本研究利用实时荧光定量技术,以牛的线粒体基因为特异性引物,建立了相对定量检测方法,最低检测限为 0.000 001 mg/mL,其回收率在 91.11%~119.2%之间。选取的乳粉在其自身制作过程中,受到高温喷粉过程的影响,其 DNA 会受到不同程度的损失,因此针对乳粉提取困难,改进了实验方法,主要采用 SDS 法、苯酚-氯仿抽提法、试剂盒法、试剂盒改良法等。通过实验结果的对比,采用深加工食品 DNA 提取试剂盒配合三氯甲烷的提取方法更适合乳粉基因组 DNA 的提取,提取效率高。

食品科技的发展为乳粉真实性检测提供了越来越多的方向,本研究在基因水平对牛乳粉进行定量检测,牛乳粉相对定量标准曲线为 $y=-2.8746x+1.0893$,该方法简化了乳粉真实性检测过程,拓宽了乳粉中动物源性成分的检测应用,为防止乳粉掺假方面提供了一定的参考依据。

参考文献:

- [1] 卢璇,张茜,赵宇轩,等.基于代谢组学技术结合智能感官探究临床乳房炎对牛乳风味和滋味物质影响[J/OL].食品科学,2023. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20230310.1200.020.html>.
- [2] 李文斐,张磊,宋宇轩,等.绵羊、山羊和牛乳的营养成分比较分析[J].食品工业科技,2020,41(24):286-291.
- [3] 赖玉婷,董芷呈,陈挺强,等.基于氨基酸模式的牛奶蛋白掺假分析[J].食品工业科技,2013(6):82-84.
- [4] 张君旗.SDS-PAGE与HPLC检测食品中大豆蛋白的方法研究[D].郑州:河南工业大学,2011.

- ZHANG J Q. Study on the method of detecting soybean protein in food by SDS-PAGE and HPLC[D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2011.
- [5] 李运飞, 付绪梅, 彭泽萍, 等. 蛋白质分析技术在牛乳和人乳鉴别方面的应用[J]. 中国乳品工业, 2011, 39(6): 40-45.
- LI Y F, FU X M, PENG Z P, et al. Application of protein analysis technology in the identification of bovine and human milk[J]. China Dairy Industry, 2011, 39(6): 40-45.
- [6] 陈文炳, 邵碧英, 江树勋, 等. 食品中若干植物源性成分的 PCR 检测[J]. 食品科学, 2006, 27(11): 404-407.
- CHEN W B, SHAO B Y, JIANG S X, et al. PCR detection of several plant-based components in food[J]. Food Science, 2006, 27(11): 404-407.
- [7] 陈筱婷. 乳及乳制品真实属性多重实时荧光 PCR 检测方法研究[D]. 华南理工大学, 2016.
- CHEN X T. Research on the real property multiple real time fluorescence pcr detection method for milk and dairy products[D]. South China University of Technology, 2016.
- [8] KESMEN Z, G ULLUCE A, SAHIN F, et al. Identification of meat species by TaqMan-based real-time PCR assay[J]. Meat Science, 2009, 82(4): 444-449.
- [9] 张弛, 邱皓璞, 张筠. 荧光定量 PCR 检测肉制品中鸭源性成分[J]. 食品科学, 2013, 34(18): 154-157.
- ZHANG C, QIU H P, ZHANG Y. Fluorescence quantitative PCR detection of duck derived components in meat products[J]. Food Science, 2013, 34(18): 154-157.
- [10] 付辉, 于志强, 黄素文, 等. 驼乳中牛乳和羊乳掺假快速检测试纸条的研制[J]. 中国口岸科学技术, 2023, 5(8): 40-47.
- FU H, YU Z Q, HUANG S W et al. Development of a rapid detection strip for adulteration of bovine and sheep milk in camel milk[J]. China Port Science and Technology, 2023, 5(8): 40-47.
- [11] 孙国栋, 李爱丽, 李威, 等. 基于双重聚合酶链式反应技术检测掺假驴乳中的牛乳[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(20): 6511-6517.
- SUN G D, LI A L, LI W, et al. Detection of bovine milk in adulterated donkey milk based on dual polymerase chain reaction technology[J]. Journal of Food Safety and Quality Testing, 2022, 13(20): 6511-6517.
- [12] 沙才华, 汪文辉, 黄海超, 等. Taqman 荧光 PCR 法检测肉制品中牛源性成分及定量研究[J]. 中国动物检疫, 2016, 33(12): 89-93.
- SHA C H, WANG W H, HUANG H C, et al. Detection and quantitative study of bovine derived components in meat products using Taqman fluorescence PCR method[J]. China Animal Quarantine, 2016, 33(12): 89-93.
- [13] MININNI A N, PELIZZARI C, CARDAZZO B, et al. Evaluation of real-time PCR assays for detection and quantification of fraU.D. uLent addition of bovine milk to caprine and ovine milk for cheese manufacture[J]. International Dairy Journal, 2009, 19(10): 617-623.
- [14] 岳巧云, 陈定虎, 伍朝晖, 等. 实时荧光 PCR 在鉴别奶粉中掺入大豆成分的应用研究[J]. 食品科学, 2009(12): 190-193.
- YUE Q Y, CHEN D H, WU C H, et al. Research on the application of real-time fluorescence PCR in identifying soybean ingredients in milk powder[J]. Food Science, 2009(12): 190-193.
- [15] 范阳阳, 张萃嘉, 刘艳艳, 等. 一种从羊奶中检测牛奶和大豆成分多重实时荧光定量 PCR 方法的建立[J]. 山东农业科学, 2016, 48(6): 118-123.
- FAN Y Y, ZHANG L J, LIU Y Y, et al. Establishment of a multiple real-time fluorescence quantitative PCR method for detecting milk and soybean components from sheep milk[J]. Shandong Agricultural Science, 2016, 48(6): 118-123.
- [16] 广西壮族自治区食品安全地方标准 水牛乳及其制品中掺入牛属乳的定性检测 PCR 法: DBS 45/023—2015[S].
- Local Food Safety Standard for Guangxi Zhuang Autonomous Region Qualitative detection of bovine milk and its products by PCR method: DBS 45/023—2015[S]. 
- 备注: 本文的彩色图表可从本刊官网 (<http://lyspkj.ijournal.cn>)、中国知网、万方、维普、超星等数据库下载获取。