

实时荧光定量PCR法鉴别驴乳中的牛乳、羊乳成分

杜兴兰, 董云香, 李淑静*

聊城市检验检测中心, 山东 聊城

收稿日期: 2022年2月14日; 录用日期: 2022年4月11日; 发布日期: 2022年4月20日

摘要

建立了一种实时荧光定量PCR法检测驴乳中牛源性、羊源性的检测方法。将牛乳、羊乳分别以0.05%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%和1.0% (v/v)的比例添加进驴乳中,制成牛乳和驴乳、羊乳和驴乳的混合乳样品。提取DNA后用实时荧光定量PCR仪检测。结果表明:驴乳中掺杂牛乳、羊乳后可鉴别出,检出限分别为0.3%、0.1%。该方法通量大、灵敏度高、特异性好,实现了对驴乳中牛、羊源性成分快速、准确的检测,对保障相关产品市场安全具有重要意义。

关键词

驴乳, 牛乳, 羊乳, 实时荧光定量PCR, 鉴别

Identification of Bovine and Goat Milk Components in Donkey Milk by Real-Time Fluorescence Quantitative PCR

Xinglan Du, Yunxiang Dong, Shujing Li*

Liaocheng Inspection and Testing Center, Liaocheng Shandong

Received: Feb. 14th, 2022; accepted: Apr. 11th, 2022; published: Apr. 20th, 2022

Abstract

A real-time fluorescence quantitative PCR method was established for the determination of bovine and sheep origin in donkey milk. The mixed milk samples of cow milk and donkey milk, goat milk

*通讯作者。

and donkey milk were prepared by adding cow milk and goat milk into donkey milk at the proportions of 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9% and 1.0% (V/V), respectively. DNA was extracted and detected by real-time fluorescence quantitative PCR. The results showed that donkey milk adulterated with cow's milk and goat's milk could be identified and the detection limits were 0.3% and 0.1%, respectively. This method has high throughput, high sensitivity and good specificity, realizing the rapid and accurate determination of bovine and sheep derived components in donkey milk. It had great significance for ensuring the security of related products.

Keywords

Donkey Milk, Cow Milk, Goat Milk, Real-Time Fluorescence Quantitative PCR, Identification

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

随着生活水平不断的提高,人们对乳及乳制品的需求量不断增加,并且对乳及乳制品的需求也逐渐由数量向质量转变,更倾向于追求一些高价值的乳制品。驴乳氨基酸种类齐全,数量充足,比例合理;矿物质和维生素含量丰富,钙磷比 1.7: 1,硒含量是牛乳的 5.16 倍,维生素 C 含量是牛乳的 4.75 倍;乳清蛋白含量比牛乳高 50%。在各种家畜乳中,驴乳的成分和人乳最为接近[1] [2]。由于驴乳产量很少,并且其产量又受到品种、营养状况、环境、饮水、繁殖、健康状况、泌乳阶段、挤乳频率、挤乳方式及是否有幼驴等因素的影响,因此驴乳的价格要远高于牛乳和羊乳。基于此所带来巨大商业前景,一些不法商贩、企业为了获取更多的利益,在驴乳中加入其它物质如牛乳、羊乳、水、豆浆增加乳液体积减少成本。这些掺杂使假行为不但损害了消费者的合法权益,有时还会引起严重的健康问题,例如,牛乳的 α -S1 酪蛋白和 β 乳球蛋白被指控具有过敏性问题。

对于乳品掺假的鉴定技术,目前除了传统的感官、化学检测[3]方法以外,最新开展的近红外光谱技术[4] [5]、电子鼻技术[6] [7]、酶联免疫技术[8]、电泳[9] [10]、核磁共振[11]、高效液相-串联质谱技术[12] [13]以及实时荧光 PCR 检测技术等得到越来越多的研究。市场上诸多的乳制品经过了高温高压的处理,这些加工处理可能改变了其结构和稳定性,从而破坏物种特有的蛋白质或抗原决定部位。加之乳品间大部分的主要成分相似,因此这些方法要对市场中加工乳制品做出准确性高的检测还是比较困难。基于上述原因,以核酸为基础的实时荧光 PCR 检测方法凸显了其优势[14]。一些学者运用 PCR 技术已经成功检测出了羊乳中极为少量的牛乳成分[15] [16] [17]。

试验拟向驴乳中模拟掺杂不同体积含量的牛乳、羊乳,提取 DNA,采用实时荧光定量 PCR 法同时对驴乳中掺杂的牛乳、羊乳进行鉴别,建立一种实时荧光定量 PCR 法快速检测驴乳中的牛乳、羊乳成分的检测方法。

2. 材料与方法

2.1. 材料与试剂

材料:驴乳,东阿阿胶股份有限公司提供;牛乳,市售;羊乳,市售。

主要试剂:Dneasy mericon 食物核酸提取试剂盒,凯杰企业管理(上海)有限公司;牛、羊基因组 DNA 检测试剂盒,宝日医生生物技术(北京)有限公司。

2.2. 主要仪器

7500 Fast Real Time System PCR, Applied Biosystems 公司; 微量移液器(10 μ L、20 μ L、100 μ L、200 μ L、1000 μ L), 德国 Eppendorf 公司。

2.3. 方法

2.3.1. 样本制备

驴乳、牛乳、羊乳分别颠倒混匀, 将牛乳、羊乳分别以 0.05%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%和 1.0% (v/v)的比例添加进驴乳中, 制成牛乳和驴乳、羊乳和驴乳的混合乳样品。

2.3.2. 样品中 DNA 的提取

取 2 mL 样品于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 食品溶解缓冲液和 25 μ L 蛋白酶 K 溶解, 混匀, 在 60 $^{\circ}$ C 下恒温培养 30 min, 在冰上冷却至室温, 12,000 r/min 离心 5 min。取 700 μ L 清液至含有 500 μ L 氯仿的 2 mL 微量离心管中, 混匀, 12,000 r/min 离心 15 min。取 350 μ L 上层水相至含有 350 μ L 缓冲液 PB 的 2 mL 微量离心管中, 涡旋混匀。转移到置于 2 mL 收集管中的快速旋转柱中, 12,000 r/min 离心 1 min, 丢弃流经的液体。将 500 μ L 缓冲液 AW2 加入快速旋转柱中, 12,000 r/min 离心 1 min, 并丢弃流经的液体。重复使用收集管, 并在 12,000 r/min 下再次离心 1 min 以干燥膜。将 QIAquick 旋转柱转移至 2 mL 离心管, 并用移液枪将 150 μ L 缓冲液 EB 直接移到 QIAquick 膜上, 室温下孵育 1 min, 12,000 r/min 离心 1 min 以洗脱。每个样品分别做 3 组平行。

2.3.3. 探针标记

探针标记见表 1。

Table 1. Multiplex real-time quantitative PCR probe labeling
表 1. 多重实时荧光定量 PCR 探针标记

	Target	Reporter	Quencher
Probe Mix	Bovine	FAM	Eclipse
	Ovine	ROX	Eclipse
	Internal Control	HEX	Eclipse

2.3.4. PCR 反应体系配置

多重实时荧光定量 PCR 反应体系配置见表 2。

Table 2. Multiplex real-time quantitative PCR reaction system (Total volume 25 μ L)
表 2. 多重实时荧光定量 PCR 反应体系(总体积 25 μ L)

试剂	使用量
2X Premix for Ovine and Bovine	12.5 μ L
Primer Mix for Ovine and Bovine	1 μ L
Probe Mix for Ovine and Bovine	1 μ L
样品 DNA ^{*1}	1 μ L
dH ₂ O	补充至 25 μ L

^{*1}Negative Control 反应时, 用 dH₂O 替代样品 DNA; Positive Control 反应时, 用 Control DNA for Ovine and Bovine 替代样品 DNA。

2.3.5. PCR 反应条件

预变性: 95℃, 10 秒, 循环 1 次; 变性: 95℃, 5 秒, 循环 40 次; 退火: 60℃, 30 秒, 循环 40 次。

2.3.6. 结果判定

Negative Control 实验 FAM、ROX 荧光信号未检出, HEX 荧光信号检出且 Positive Control 实验 FAM、ROX、HEX 荧光信号均检出, 结果正常。实际样品中不管 HEX 荧光信号是否检出, 只要有 FAM 荧光信号检出, 且 C_T 值 ≤ 35 , 则判定为含有牛源性成分; 如果 C_T 值 > 35 , 则视为不含有牛源性成分。只要有 ROX 荧光信号检出, 且 C_T 值 ≤ 35 , 则判定为含有羊源性成分; 如果 C_T 值 > 35 , 则视为不含有羊源性成分。

3. 结果与分析

3.1. 驴乳中掺杂牛乳的实时荧光 PCR 检测结果

表 3 中牛源性成分模拟混合样品的实时荧光 PCR 结果显示, 随着牛乳含量占比的升高, 其 C_T 值逐渐降低, C_T 值介于 21.37~38.25 之间; 当牛乳含量占比(v/v)小于等于 0.3%时, C_T 值 < 35 , 视为未检出牛源性成分。当牛乳含量占比增加至(v/v) 0.8%时, C_T 值明显降低。实验结果表明, 当牛乳以体积分数大于等于 0.3%掺入至驴乳中时, 均能通过实时荧光 PCR 获得阳性检出结果, 说明牛源性成分实时荧光 PCR 体系检测样品的检出限可达到 0.3%。

Table 3. Real-time fluorescence PCR results of simulated mixed samples of bovine origin components

表 3. 牛源性成分模拟混合样品实时荧光 PCR 结果

牛乳占比(v/v)%	C_T 值			C_T 平均值
	1	2	3	
0.05	38.89	37.65	38.21	38.25
0.1	35.77	36.85	36.53	36.38
0.2	35.85	36.86	36.34	36.35
0.3	35.63	36.19	36.02	35.95
0.4	33.62	35.49	34.27	34.46
0.5	34.01	33.58	33.51	33.70
0.6	32.6	32.97	32.76	32.78
0.7	32.81	32.54	32.68	32.68
0.8	21.64	21.92	21.54	21.70
0.9	21.45	21.67	21.69	21.60
1.0	21.38	21.64	21.08	21.37

3.2. 驴乳中掺杂羊乳的实时荧光 PCR 检测结果

表 4 中羊源性成分模拟混合样品的实时荧光 PCR 结果显示, 随着羊乳含量占比的升高, 其 C_T 值逐渐降低, C_T 值介于 21.39~35.60 之间; 当羊乳含量占比(v/v)小于等于 0.1%时, C_T 值 < 35 , 视为未检出羊源性成分。实验结果表明, 当羊乳以体积分数大于等于 0.1%掺入至驴乳中时, 均能通过实时荧光 PCR 获得阳性检出结果, 说明羊源性成分实时荧光 PCR 体系检测样品的检出限可达到 0.1%。

Table 4. Real-time fluorescence PCR results of simulated mixed samples of sheep derived components**表 4.** 羊源性成分模拟混合样品实时荧光 PCR 结果

羊乳占比(v/v)/%	C _T 值			C _T 平均值
	1	2	3	
0.05	36.12	35.01	35.67	35.60
0.1	34.12	35.12	34.86	34.70
0.2	32.13	32.49	33.25	32.62
0.3	30.54	30.47	31.13	30.71
0.4	29.29	30.14	30.08	29.84
0.5	28.61	28.91	29.34	28.95
0.6	27.29	27.09	28.13	27.50
0.7	25.95	26.54	26.82	26.44
0.8	23.04	23.51	23.99	23.51
0.9	22.33	22.57	22.40	22.43
1.0	21.27	21.39	21.50	21.39

4. 结论

本实验采用 PCR 法对驴乳中掺牛乳、羊乳进行了鉴定,混合乳的 C_T 值随掺杂牛乳、羊乳含量的增加而降低,驴乳中掺杂牛乳、羊乳的实时荧光 PCR 检出限分别可达 0.3%、0.1%。此方法能够快速准确的对驴乳中掺假牛乳、羊乳进行鉴别检测,为乳制品掺假检测以及食品安全监管提供了强有力的技术支持,也推动了实时荧光定量 PCR 检测技术在食品特别是乳制品领域中的应用研究。

参考文献

- [1] Salimei, E., Coppola, R., Fantuz, F., *et al.* (2002) Composition and Characteristics of Ass Milk, a San Infant Food. *Proceedings of the 4th Congress: New Findings in Equine Practice*, Campobasso, 11-13 July 2002, 81-88.
- [2] Guo, H.Y., Pang, K., Zhang, X.Y., *et al.* (2007) Composition, Physicochemical Properties, Nitrogen Fraction Distribution, and Aminoacidprofile of Donkey Milk. *Journal of Dairy Science*, **90**, 1635-1643. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-600>
- [3] 李彦明, 董俊梅. 牛奶中几种常见掺假物的鉴别方法[J]. 甘肃畜牧兽医, 2005(1): 42-43.
- [4] 荣菡, 甘露菁. 基于近红外光谱的自组织映射神经网络快速鉴别牛乳与掺假乳[J]. 食品工业, 2019, 40(8): 188-191.
- [5] 李亮. 近红外光谱技术在原料奶掺假快速检测及新鲜度检测中的应用研究[D]: [硕士学位论文]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2010.
- [6] 金嫫, 白丽娟, 彭小雨, 等. 采用电子鼻检测羊奶中的牛奶掺入[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(4): 165-168.
- [7] 贾茹. 电子鼻对羊奶中的蛋白质掺假及多组分混合掺假的识别研究[D]: [硕士学位论文]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2017.
- [8] 任倩然, 张昊, 郭慧媛, 等. 酶联免疫法鉴别乳制品掺假的研究进展[J]. 中国乳业, 2012(123): 46-49.
- [9] 张东送, 庞广昌, 高法国, 等. 毛细管电泳在牛乳中酪蛋白含量测定及掺假检测方面的应用[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(1): 130-132.
- [10] 阿力木·吾布力, 杨洁, 苏力坦·阿巴百克力. SDS-PAGE 电泳在鉴别用牛乳掺伪的新疆特种乳中的应用[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(23): 99-102.
- [11] 赵露. 利用低场核磁共振快速检测法判别牛奶掺假和新鲜度[J]. 食品安全导刊, 2018(10): 93-94.

- [12] 房艳, 于思雨, 高俊海, 等. 超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱法与代谢组学技术分析牛乳与羊乳差异性[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(7): 2075-2083.
- [13] 李刚, 齐磊, 金佰明, 等. 基于超高效液相色谱-四级杆串联飞行时间质谱联用法的牛奶质谱控制和掺假鉴别[J]. 现代预防医学, 2016, 43(23): 4354-4357+4377.
- [14] 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]: [硕士学位论文]. 广州: 华南理工大学, 2016.
- [15] Lopez-Calleja, I., Gonzalez, I., Fajardo, V., *et al.* (2007) Real-Time Taqman PCR for Quantitative Detection of Cows' Milk in Ewes' Milk Mixtures. *International Dairy Journal*, **17**, 729-736. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.09.005>
- [16] Kotowicz, M., Adamczyk, E. and Bania, J. (2007) Application of Aduplex-PCR for Detection of Cows' Milk in Goats' Milk. *Annals of Agricultural & Environmental Medicine*, **14**, 215-218.
- [17] 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.