

## 基于分子信标技术的肉类食品动物源性成分多重筛检方法

承海<sup>1</sup>, 朱洪亮<sup>2</sup>, 姚振明<sup>1</sup>, 毛玲燕<sup>1</sup>, 张胜男<sup>1</sup>, 王慧君<sup>1</sup>, 邢家溧<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>宁波市产品食品质量检验研究院(宁波市纤维检验所) 浙江宁波 315408

<sup>2</sup>嘉兴市食品药品与产品质量检验检测院 浙江嘉兴 330400

**摘要** 建立一种基于通用型分子信标检测及探针熔解曲线分析技术的肉类食品动物源性成分多重筛检方法。通过对猪、牛、羊等 9 种常见食用畜禽动物基因组多序列比对及生物信息学分析,选取线粒体基因组 16s rDNA 中具有特定结构的基因片段作为检测靶序列,设计单一的通用型引物和长链分子信标。以标准基因重组载体及实体样品基因组为检测对象,确定各动物源性成分特征退火温度( $T_m$ ),建立基于实时荧光 PCR 及熔解曲线分析的标准检测方法,并对筛检方法的灵敏度和特异性进行考察。应用所建立检测方法,9 种畜禽动物基因组扩增产物单一,测序结果与参考序列一致。对梯度稀释的猪标准基因重组载体检测发现,终浓度  $10^8\sim 10^1$  copies/ $\mu\text{L}$  模板扩增  $C_t$  值范围为 15~36 个循环(回归系数  $R^2=0.99$ ),熔解峰特征  $T_m$  为  $(68.0\pm 0.1)^\circ\text{C}$ 。对 9 类畜禽肉类标准基因重组载体和实体样品进行独立检测,各类动物源性基因均形成可辨识的特异性熔解峰( $T_m$  分别为猪  $68.0^\circ\text{C}$ 、牛  $64.3^\circ\text{C}$ 、羊  $65.1^\circ\text{C}$ 、驴  $65.8^\circ\text{C}$ 、马  $63.4^\circ\text{C}$ 、驼  $60.6^\circ\text{C}$ 、狗  $61.8^\circ\text{C}$ 、鸡  $52.6^\circ\text{C}$ 、鸭  $56.7^\circ\text{C}$ ),混合样品检测可见独立的种属特征熔解峰或融合形成新熔解峰。基于通用型引物及分子信标的实时荧光 PCR 检测方法具有理想的灵敏度和特异性,可实现对常见畜禽肉类食品源性成分的单管多重鉴定,在肉类食品源性成分筛检方面具有一定的推广应用价值。

**关键词** 分子信标; 肉类食品; 熔解曲线; 鉴定

**文章编号** 1009-7848(2023)06-0378-07 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.06.037

畜禽肉及其制品因风味鲜美、营养丰富,一直以来都是居民日常膳食构成中重要的食品品类之一,故其食品安全对保障消费者健康权益具有重要意义。受疫情及畜牧业产能下滑等因素的综合影响,近年来生鲜畜禽肉价格持续上涨,各类肉制品生产成本显著增高,随之而来的是肉类食品掺杂制假风险相应增高,与之相关的重大食品安全事件近年来在国内外屡有报道<sup>[1-2]</sup>。这种违法制销行为对消费者造成经济损失,同时,来源不明的肉类原料也难以避免地带来了食品安全风险隐患。肉类食品尤其是深加工产品在色、香、味、形及口感等性状方面极为相近,难以用感官鉴定方法直接区分其源性成分。食品源性成分鉴定是对造假行为进行高效靶向监管的基础支撑,也是食品安全检测技术研发的重点和热点。为此,国家市场监

管总局在《假冒伪劣重点领域治理工作方案(2019-2021)》中明确强调,要“加大对食品掺假掺杂、非法添加等检验方法的研制力度,切实筑牢打击假劣食品的技术防线,为遏制食品生产经营潜规则提供技术手段,有效防范系统性风险”。探索高效便捷、灵敏特异的肉类食品源性成分多重鉴定方法,是食品质量安全检测领域持续关注的研究方向。

当前,关于动物源性成分鉴定方法已有诸多报道,主要通过检测具有种属特异性的生物标志物(蛋白质或基因),从而达到鉴定和区分样品种属来源的目的<sup>[3]</sup>。相对于蛋白质检测而言,基因检测以其靶分子具有更好的稳定性、多样性,在同一个体中不存在组织间表达差异性,同时,依靠 PCR 技术对微量靶分子的指数扩增,大幅度提升了检测方法的灵敏度和特异性,因此成为当前动物源性成分鉴定方法中最常用的检测技术。目前我国已颁布实施的食品安全标准中也建立了基于探针杂交技术或测序技术的标准检测方法。然而,值得关注的是,常用的鉴别方法多采用“一对一”检测模式,即针对一种动物种属,设计和使用一套特异

**收稿日期:** 2022-06-07

**基金项目:** 浙江省市场监管局雏鹰计划项目(CY2023322);  
宁波市泛 3315 创新团队项目(2018B-18-C);  
宁波国家高新精英项目(甬高科[2018]63 号)

**第一作者:** 承海,男,博士,工程师

**通信作者:** 邢家溧 E-mail: nbsjy2017@163.com

性引物和探针。为达到多重鉴定目的,往往需进行多次试验或采用多重体系的检测方法,检测体系组成复杂,鉴定成本高。基因芯片检测虽可以达到预期鉴定效果,但是目前还未在食品检验检测领域广泛普及应用。分子信标是基于荧光共振能量转移原理设计的双标签基因检测探针,通过独特的茎-环结构设计,当与靶基因杂交时可通过荧光检测实现对模板的定性鉴定及定量分析<sup>[4]</sup>,具有灵敏度高、特异性好等优点,同时,由于其独特的技术原理,可通过熔解曲线分析区分杂交分子中基因错配情况,因此,也常被应用于基因突变鉴别等分析<sup>[5-6]</sup>。

本研究以畜禽动物基因组极为广泛的多样化和异质性为基础,通过多基因序列比对和筛选,设计和应用 1 对通用引物及 1 根具有兼容“错配”能力的分子信标探针,建立一种基于实时荧光 PCR 技术,适用于常见畜禽食用动物源性成分鉴定的基因检测方法。该方法体系简单、成本低廉、快速高效,为拓展动物食品源性成分鉴定技术,提高食品真伪筛查效能提供技术思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

食品基因组提取试剂盒 (EasyPure Food and Fodder Security Genomic DNA Kit)、克隆载体 (pEASY-T1 Cloning Kit)、质粒提取试剂盒 (EasyPure Plasmid MiniPrep Kit)、探针法 qPCR 检测试剂 (PerfectStart II Probe qPCR SuperMix), 全式金公司 (北京); 高保真聚合酶试剂 (Premix Taq)、探针法 qPCR 检测试剂 (Premix Ex Taq), Takara 公司 (北京); 引物及探针委托上海捷瑞公司合成,测序委托上海桑尼公司完成。

AB ViiATM7 荧光定量 PCR 仪、ProFlex PCR 仪,美国 Thermo Fisher 公司; GelDoc-It 凝胶成像系统,美国 UVP 公司; MaestroNano 微量紫外分光光度计,美国 MaestroGen 公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 样品采集及鉴定 生鲜畜禽肉类标准样品 (包括猪、牛、羊、驴、鸡、鸭) 及其肉制品采购自本地大型商超,马、骆驼、狗标准样品由本实验室长期保存。全部样品采用《常见畜禽动物源性成分检

测方法 实时荧光 PCR 法》(GB/T 38164-2019) 等标准方法进行鉴定,扩增序列经 NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 在线序列比对分析,确定各样品种属来源。

1.2.2 通用引物及分子信标设计 线粒体基因组具有高拷贝数、高异质性、受食品加工工艺影响较小、易于检测等特点,是物种鉴定常选用的靶基因之一<sup>[7]</sup>。根据本研究设计思路,按照目的基因片段两端序列在种属间保守(引物结合区)、中段序列在各种属间高度异质(探针杂交区)的结构需求,应用生物信息学技术筛选在各种属间进化速率适中的靶基因片段序列。各类畜禽肉标准样品经形态学及基因鉴定等方法确定种属来源后,从 Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) 中选择相应种属线粒体参考序列,包括:猪 (*Sus scrofa*) NC012095、牛 (*Bos taurus*) NC006853、山羊 (*Capra hircus*) NC005044、驴 (*Equus asinus*) NC001788、狗 (*Canis lupus familiaris*) NC002008、鸡 (*Gallus gallus*) NC001323、鸭 (*Anas platyrhynchos*) EU755252、马 (*Equus caballus*) NC001640、骆驼 (*Camelus bactrianus*) NC009628。

针对检测靶区两端保守序列,应用 Primer5.0 软件设计相关引物,经 BLAST 比对 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>),择优选择一对适用于各种属靶基因片段扩增及分子信标荧光检测的高特异性通用型引物。既往研究表明,较长环部序列的分子信标对靶基因异质性具有更好的“兼容性”,由于错配核苷酸在种类、数量及位置的差异,可通过杂交分子熔解温度的差异,区分存在异质性的靶基因<sup>[8-9]</sup>。根据各类参考基因序列特点设计分子信标探针,应用 Mfold 程序 (<http://www.unafold.org/mfold/applications/dna-folding-form.php>) 在线分析探针构象,应用 UNAFold 程序 (<http://www.unafold.org/hybrid2.php>) 在线分析探针与靶基因杂交特性并预测杂交分子熔解温度 ( $T_m$ )<sup>[10]</sup>,由此择优选择适用于目标基因鉴定的分子信标。

1.2.3 标准 DNA 载体构建及鉴定 各类畜禽肉标准样品的新鲜肌肉组织经磁珠研磨均质后,取 100 mg 均质样品,采用基于改良 CTAB 裂解法的基因组提取试剂盒提取 DNA,取 1  $\mu$ L 模板基因

组,使用所设计通用引物对和 Premix Taq 高保真扩增体系,采用三步法反应条件扩增目的片段。扩增产物经凝胶电泳分离后,回收 244 bp 目的片段,采用 T-A 克隆法构建重组质粒,转化 Trans-T1 感受态细胞并进行蓝白筛选,挑取蓝色阳性克隆,使用 M13 通用引物对进行 PCR 筛选及测序鉴定。提取成功克隆标准基因片段的重组载体,-20 °C 冻存备用。

**1.2.4 RT-PCR 检测及熔解曲线分析** 以重组载体为模板,使用商品化探针 qPCR 预混体系检测分子信标 MB-P 对各类标准基因的鉴别能力。20 μL 反应体系为:2×qPCR 预混液 10 μL,上、下游通用引物 FP 和 RP 终浓度 0.2 μmol/L,探针 MB-P 浓度 0.1 μmol/L,50×ROX 参比染料 0.2 μL。RT-PCR 及熔解曲线反应条件为:95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 5 s,50 °C 复性 20 s 并检测荧光值、72 °C 延伸 10 s,共 45 个循环。扩增程序结束后进行熔解曲线分析,将反应体系升温至 95 °C 变性 1 min,降温至 40 °C 杂交 5 min,随后以每步 0.2 °C 升温速率缓慢递增至 80 °C,同步采集荧光。应用系统自带程序对荧光变化情况进行分析,绘制熔解曲线,确定探针与各标准基因杂交分子的特征  $T_m$ 。

**1.2.5 灵敏度与特异性分析** 10 倍梯度稀释标准基因载体至浓度为  $10^9 \sim 10^2$  copies/μL,取 1 μL 标准基因稀释液为模板,采用上述建立的反应条件进行检测,分析各模板浓度下荧光定量 PCR 反应的  $C_t$  值及熔解温度,综合考察所建立分子信标

鉴定方法的灵敏度和特异性。

**1.2.6 实样检测** 取生鲜畜禽肉及不同加工工艺生产的肉制品,磁珠研磨均质后采用试剂盒法提取基因组,用灭菌水稀释至 10 ng/μL,应用《常见畜禽动物源性成分检测方法 实时荧光 PCR 法》(GB/T 38164-2019)及本研究所建立检测方法进行鉴定,考察分子信标检测方法对不同种类肉制品的鉴定能力。此外,以猪基因组提取物为基础,按照 1:100、1:10 和 1:1 比例掺入其它动物基因组制成混合基因模板,采用所建立方法进行检测,考察本方法对混合样品的鉴别能力。

**1.2.7 统计学分析** 数据分析采用 SPSS17.0 统计软件。

## 2 结果与分析

### 2.1 引物及探针设计

按照本研究设计思路,靶基因的特定结构是实现通用型分子信标多重鉴定功能的基础。经各种属动物线粒体基因组参考序列比对分析,筛选出 16S rDNA 基因中一段 224 bp 序列为目标序列。以该片段两端保守序列及中段高异质序列为模板,分别设计通用型引物及分子信标(见表 1)。探针经构象分析符合设计要求,与各种属动物参考序列间存在 0~10 个碱基错配,经杂交性状分析,各类杂交产物预测熔解温度( $T_m$ )在 59.1~68.3 °C 区间(见表 2),且任意两者间差值高于 1 °C,理论上满足鉴别需求<sup>[11]</sup>。

表 1 基于 16S rDNA 基因设计的通用引物及分子信标序列设计

Table 1 The sequence of universal primers and molecular beacon probe based on 16s rDNA

名称	序列	扩增长度	位置
上游通用引物 FP	5'-AACCCCGCTGTTTACCAA-3'	224bp	nt1916-1934
下游通用引物 RP	5'-TTTTATTCCCGCTCTTCA-3'		nt2121-2139
探针 MB-P	5'-FAM- <b>CCGCC</b> CACTGTCTCCAAATAAGG ACTTGTATGAATGCCACACGAG <b>GGCGG</b> -Dabcyl-3'	/	nt2033-2077

注:表中引物及探针靶序列位置以参考序列 NC012095(猪源性)为参照;探针序列中黑斜体字符表示探针茎部序列。

### 2.2 标准 DNA 样品构建及检测

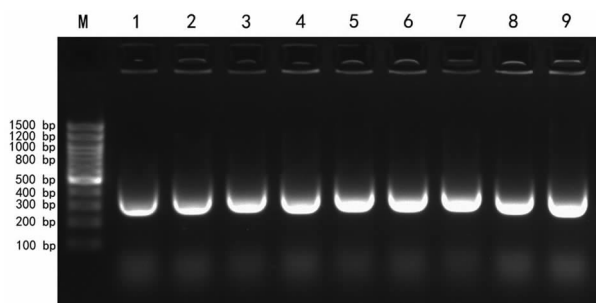
应用通用型引物分别扩增 9 种畜禽动物标准样品基因组,扩增产物采用电泳及测序鉴定,结果可见,扩增产物条带单一,测序结果与参考基因完全一致,表明基于参考序列设计的通用型检测体

系对不同种属来源的基因组均具有良好的特异性,满足样品检测和鉴定的需求。

以 10 ng 克隆入各类动物靶区片段的标准 DNA 重组载体为模板,应用商品化探针型 RT-PCR 检测体系及方法进行检测和鉴定,结果显示,

基于通用型分子信标的 RT-PCR 检测, 各标准 DNA 均形成良好的扩增曲线。熔解曲线分析可见, 各标准 DNA 杂交分子均形成独立的熔解峰

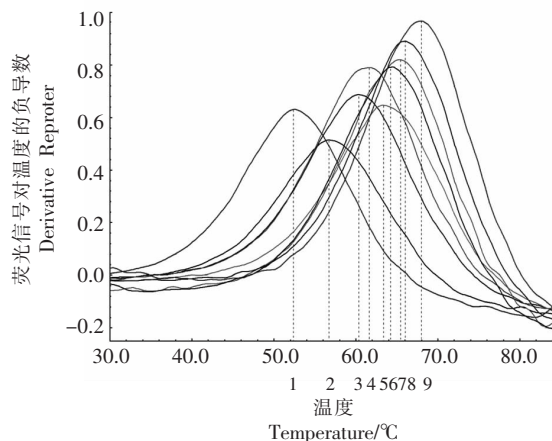
(见图 1), 实测  $T_m$  值虽与预测值存在一定的差异 (见表 2), 但满足普通 RT-PCR 检测仪的分辨能力。



注: 图中各泳道依次为 M.DL1003 Marker; 1.猪源性样品; 2.牛源性样品; 3.羊源性样品; 4.驴源性样品; 5.马源性样品; 6.骆驼源性样品; 7.狗源性样品; 8.鸡源性样品; 9.鸭源性样品。

图 1 畜禽肉样品通用引物扩增产物电泳图

Fig.1 PCR results of animal gene templates with a universal pair of primers



注: 1.鸡源性样品; 2.鸭源性样品; 3.骆驼源性样品; 4.狗源性样品; 5.马源性样品; 6.牛源性样品; 7.羊源性样品; 8.驴源性样品; 9.猪源性样品。

图 2 标准 DNA 模板熔解曲线(B)分析结果

Fig.2 Melting curves in real-time PCR assay applying the molecular plasmid DNA standards from different species of animal samples

表 2 各类源性标准 DNA 模板序列及杂交分子  $T_m$  检测结果

Table 2 Oligonucleotide sequences of molecular plasmid DNA standard and the results of  $T_m$  detection

目标物种	目标序列	预测 $T_m/^\circ\text{C}$	实测 $T_m/^\circ\text{C}$
猪	CAC <b>T</b> TTGTTCTCCAAATAAGGACTTGTATGAATGGCCACACGAGGG	68.7	68.0
牛	CA <b>T</b> TTGTTCTCTAAATAAGGACTTGTATGAATGGCCGACGAGGG	61.0	64.3
羊	CA <b>T</b> TTGTTCTCTAAATAAGGACTTGTATGAACGGCCACACGAGGG	62.4	65.1
驴	CAC <b>T</b> TTGTTCTCTAAATAGGGACTTGTATGAATGGCCACACGAGGG	64.9	65.8
马	CAC <b>T</b> TTGTTCCCTAAATAGGGACTTGTATGAATGGCCACACGAGGG	69.5	63.4
驼	CA <b>T</b> TTGTTCTTTAAATAGGGACTTGTATGAACGGCCACACGAGGG	63.2	60.6
狗	CA <b>T</b> TTGTTCCCTAAATAGGGACTTGTATGAATGGCCACACGAGGG	66.1	61.8
鸡	CAATTGTCC <b>CGT</b> AAAT <b>TG</b> AGACTTGTATGAATGGCTAAACGAGGT	56.9	52.6
鸭	CAATTGTCC <b>CA</b> TAAAT <b>CG</b> AGACTTGTATGAATGGCTAAACGAGGT	60.5	56.7

注: 各目标序列中标识下划线的斜体字符表示为错配碱基。

### 2.3 灵敏度及特异性分析

应用一致的反应条件检测 10 倍梯度稀释的猪标准 DNA 模板, 考察所建立方法的灵敏度及特异性, 结果可见, 在  $10^1 \sim 10^8$  copies/ $\mu\text{L}$  模板浓度下, RT-PCR 反应扩增曲线良好, Ct 值在 15~35 区间, 与模板起始浓度呈良好的线性关系 ( $R^2 =$

0.99), 提示分子信标探针具有良好的检测灵敏度。经熔解曲线分析可见, 随着模板浓度的降低, 熔解峰高逐步下降, 但各浓度模板对应的  $T_m$  值聚集在  $(68.0 \pm 0.1)^\circ\text{C}$ , 表明在不同模板浓度下, 杂交分子熔解温度的检测结果保持良好的稳定性, 由此提示, MB-P 探针熔解曲线分析的精密度能够

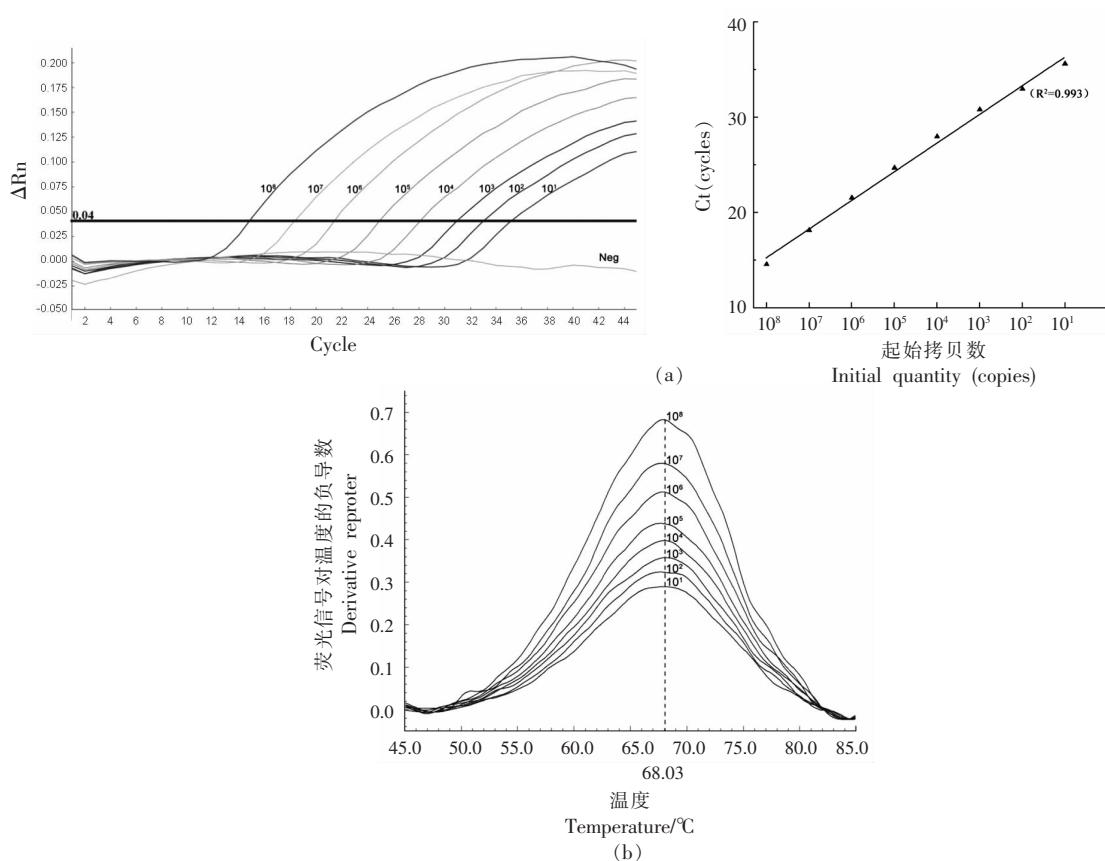


图3 标准DNA梯度稀释模板扩增曲线(a)及熔解曲线(b)分析结果

Fig.3 Amplification curves (a) and melting curves (b) in real-time PCR assay applying the molecular plasmid DNA standards with serial dilutions

保证有效区分各类源性基因  $T_m$  间的差异性。

## 2.4 食品样品检测

食品深度加工工艺可造成食材中DNA的断裂和降解,影响基因检测效能<sup>[2]</sup>。应用所建立反应条件检测生鲜肉及肉制品DNA提取样品,分析结果见图4,可见在相同检测条件下,各类猪肉制品基因样品均有效扩增,所形成熔解峰对应  $T_m$  值不存在显著差异(见图4),表明所建立分子信标方法适用于常见畜禽肉类食品的检测和鉴定。

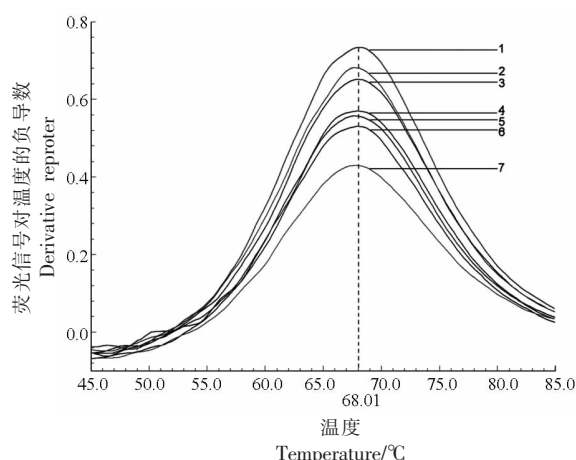
## 2.5 混合样品检测

将猪和鸡两种动物的基因组提取物按比例制成混合样品,经检测可见,两类源性基因模板均形成独立的特征熔解峰,对应的  $T_m$  与其源性基因检测结果相一致。随着鸡源性基因比例的增加,其熔解峰相应增高(见图5)。对特征熔解温度相近的不同源性基因混合样品进行检测,未见各源性基因成分形成独立的熔解峰,而在混合基因特征  $T_m$

间的区域内形成新的融合峰,且融合峰向起始模板浓度占优的源性基因偏移,此结果可能与长链探针高容错能力对混合杂交分子热动力学的综合影响以及检测设备分辨率相关。以上结果表明,应用所建立检测体系可进行肉类食品动物源性成分筛查,通过熔解曲线分析中形成的特征性熔解峰或熔解峰偏移现象,指示样品中可能存在异源性基因,为进一步开展确证鉴定检测提供指征。

## 3 结论

区别于 Taqman 探针,分子信标技术既能够对靶分子进行特异性检测,又能够依靠特殊的结构特点进行熔解曲线分析,实现对突变基因的区分和鉴定。本研究针对常见畜禽动物线粒体基因,设计和构建基于通用型引物和长链分子信标的 RT-PCR 检测方法,通过对不同种属动物靶基因杂交产物特征性  $T_m$  的检测和区分,可实现猪、牛、羊、



注:1.鲜猪肉样品;2.炖煮处理猪肉样品;3.煎烤处理猪肉样品;4.腌腊猪肉制品;5.猪肉火腿肠;6.猪肉松;7.猪血。

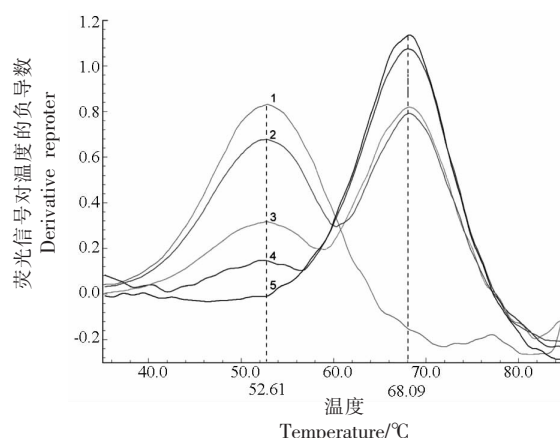
图4 猪肉加工食品溶解曲线分析结果

Fig.4 Melting curves assay applying the genomic DNA isolated from different food products

鸡、鸭等多种常见畜禽肉类食品源性成分的鉴定,并可通过考察受检样品  $T_m$  与参考值之间的偏移情况,为鉴定样品是否存在掺杂提供指示。通用型检测体系的应用,在提供多重检测能力的同时,简化了体系组成,避免了常规多重检测体系中多重引物及探针体系内部的相互干扰,灵敏度高、特异性好,检测成本相对低廉,适用性好,方法可靠,为更好的开展肉类食品掺假问题的筛查鉴别提供了良好的技术支撑。

### 参 考 文 献

- [1] O'MAHONY P J. Finding horse meat in beef products—a global problem[J]. Qjm Monthly Journal of the Association of Physicians, 2013, 106(6): 595–597.
- [2] MEULEN S V D, BOIN G, BOUSOULA I, et al. Fighting food fraud: horsemeat scandal. use of recalls in enforcement throughout the EU[J]. European Food and Feed Law Review, 2015, 10(1): 2–13.
- [3] KUMAR A, KUMAR R R, SHARMA B D, et al. Identification of species origin of meat and meat products on the DNA Basis; A review[J]. Critical Reviews in Food Science & Nutrition, 2015, 55(10): 1340–1351.



注:1.鸡肉样品;2.鸡肉:猪肉混合样品(1:1比例);3.鸡肉:猪肉混合样品(1:10比例);4.鸡肉:猪肉混合样品(1:100比例);5.猪肉样品。

图5 混合畜禽肉样品溶解曲线分析结果

Fig.5 Melting curves assay applying the genomic DNA isolated from mix sample

- [4] WANG K, TANG Z, YANG C J, et al. Molecular engineering of DNA: Molecular beacons[J]. Angewandte Chemie, 2009, 48(5): 856–870.
- [5] ROH S S, SMITH L E, JONG SEOK L, et al. Comparative evaluation of sloppy molecular beacon and dual-labeled probe melting temperature assays to identify mutations in mycobacterium tuberculosis resulting in rifampin, fluoroquinolone and aminoglycoside resistance[J]. Plos One, 2015, 10(5): e0126257.
- [6] WALSER M, BOSSHARD P P. Development and evaluation of a pan-dermatophyte polymerase chain reaction with species-level identification using sloppy molecular beacon probes[J]. British Journal of Dermatology, 2018, 180(6): 1489–1497.
- [7] BOTTERO M T, DALMASSO A. Animal species identification in food products: Evolution of biomolecular methods[J]. Veterinary Journal, 2011, 190(1): 34–38.
- [8] SOUMITESH C, BOLA A, MICHELE B, et al. Rapid universal identification of bacterial pathogens from clinical cultures by using a novel sloppy molecular beacon melting temperature signature technique[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2010, 48(1): 258–267.
- [9] CHAKRAVORTY S, LEE J S, CHO E J, et al. Genotypic susceptibility testing of mycobacterium tuberculosis isolates for amikacin and kanamycin re-

- sistance by use of a rapid sloppy molecular beacon-based assay identifies more cases of low-level drug resistance than phenotypic lowenstein-jensen testing [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2015, 53(1): 43-51.
- [10] MARKHAM N R, ZUKER M. DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33: W577-581.
- [11] HERNÁNDEZ M, RODRÍGUEZ-LÁZARO D, ESTEVE T, et al. Development of melting temperature-based SYBR Green I polymerase chain reaction methods for multiplex genetically modified organism detection[J]. *Analytical Biochemistry*, 2003, 323(2): 164-170.
- [12] 李晶, 杨成. 5种常见加工肉制品的DNA提取方法比较以及猪源性成分检测[J]. *食品工程*, 2019(2): 56-60.
- LI J, YANG C. Comparison of DNA extraction methods in five processed meat products and detection of porcine-derived components[J]. *Food Engineering*, 2019(2): 56-60.

### Multiple Identification Method of Animal Species in Meat Food Based on Molecular Beacon Technology

Cheng Hai<sup>1</sup>, Zhu Hongliang<sup>2</sup>, Yao Zhenming<sup>1</sup>, Mao Lingyan<sup>1</sup>, Zhang Shengnan<sup>1</sup>, Wang Huijun<sup>1</sup>, Xing Jiali<sup>\*</sup>

(<sup>1</sup>Ningbo Academy of Product and Food Quality Inspection (Ningbo Fibre Inspection Institute), Ningbo 315408, Zhejiang

<sup>2</sup>Jiaying Institute for Food, Drug and Product Quality Control, Jiaying 330400, Zhejiang)

**Abstract** To establish a multiple identification method of animal species in meat by using a universal molecular beacon with probe melting curve analysis. Through multi sequence alignment of the genomes of 9 common edible livestock and poultry, the gene fragments with specific structure in the 16S rDNA of the mitochondrial genome were selected as the detection target sequence. A pair of primers and a long-chain molecular beacon for universal detection were designed by the method of bioinformatics analysis. The characteristic annealing temperature ( $T_m$ ) of different animal derived components was determined based on real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) and melting curve analysis, while the sensitivity and specificity of the identification method were investigated. The RT-PCR based on universal primers and molecular beacon was performed on genome samples derived from 9 animal species. The amplified product of each sample was single, and the sequencing result was consistent with its reference sequence. While a dilution range of  $10^8$  to  $10^1$  copies/ $\mu$ L of standard DNA of pork was used as template, the RT-PCR was performed validly with incremental Ct value from 15 to 36 cycles, and the characteristic  $T_m$  was about  $(68.0 \pm 0.1)$  °C steadily by melting curve analysis. The detection result also showed that identifiable specific annealing temperature was obtained for each sample derived from the livestock and poultry meat investigated with  $T_m$  of 68.0 °C for pigs, 64.3 °C for cattles, 65.1 °C for sheep, 65.8 °C for donkeys, 63.4 °C for horses, 60.6 °C for camels, 61.8 °C for dogs, 52.6 °C for chickens and 56.7 °C for ducks. While the mixed genome derived from different animal species was detected, the results could show the independent melting peaks of various species genes or the emergence of a new fusion peak. The RT-PCR detection method based on universal primers and molecular beacon can realize the single-tube multiple identification of common livestock and poultry meat food species with ideal sensitivity and specificity. With high application value, this method could be used in meat adulteration screening.

**Keywords** molecular beacon; meat; melting curve analysis; identification