

基于微滴式数字 PCR 定量牛肉中的鸭源性成分

马小玉, 徐慧丽, 王正亮*, 俞晓平

(中国计量大学生命科学学院 浙江省生物计量及检验检疫技术重点实验室 杭州 310018)

摘要 采用微滴式数字 PCR(ddPCR)技术建立一种牛肉中鸭源性成分的检测方法。以牛和鸭的单拷贝核基因 *ACTB* 为靶基因,合成特异性引物和探针。通过引入一个固定的常数 K (转换系数),直接将 ddPCR 测定的 DNA 拷贝数转换为肉类的质量分数。根据模拟混合样本中已知的肉质量分数和实际测得的 DNA 拷贝数之间的关系,计算和验证 K 值,进而建立牛肉中鸭源性成分的计算公式,并用于牛肉/鸭肉人工模拟混合样本和市售牛肉制品中鸭源性成分的定量检测。结果表明,所建立的 ddPCR 方法能特异性定量检测牛肉中鸭源性成分, K 值为 0.16,定量检测公式为 $M_D/M_B = 0.16 \times Q_D/Q_B$,式中 M_D 和 M_B 分别为鸭肉和牛肉的质量; Q_D 和 Q_B 分别为鸭和牛 *ACTB* 的拷贝数。牛肉中掺杂鸭肉的质量分数在 1%~90% 范围,该函数均具有较好的线性关系, $R^2 > 0.99$ 。该定量方法的检出限(LOD)和定量限(LOQ)分别为 0.1% 和 0.5%。人工模拟混合样本中鸭肉粉质量分数为 20%~80% 时,检测结果绝对误差均 $< 1.0\%$ 。16 份市售牛肉制品样本中,2 份被检出鸭源性成分,含量分别为 44.87% 和 18.21%,与商品标签不符。本研究建立的 ddPCR 方法具有良好的特异性、灵敏性、准确性和适用性,可实现牛肉中鸭源性成分的定量检测,为我国牛肉及其制品质量安全监管提供技术支撑。

关键词 微滴式数字 PCR; 牛肉; 鸭源性成分; 定量检测

文章编号 1009-7848(2024)12-0343-08 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.12.031

随着居民生活水平的提高和中西饮食文化的融合,牛肉在中国肉类消费中所占比例越来越高。由于高额经济利润的诱惑,一些不法商家在牛肉加工和销售过程中掺假、制假,如以价格相对低廉的鸭肉、鸡肉和猪肉冒充高价优质牛肉^[1-3]。这种肉类掺假行为会直接导致消费者经济损失和市场秩序混乱,甚至涉及宗教信仰和社会稳定。为加强牛肉质量安全检测监测,有效保障消费者权益,开发准确可靠的牛肉掺伪检测技术体系至关重要。

目前,肉类掺伪的检测技术主要包括基于蛋白质的免疫学技术、基于代谢物的光谱、色谱、质谱技术和基于核酸的聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术^[4-9]。其中,基于核酸的 PCR 检测技术因具有操作简便快捷、准确度高、成本相对低廉等优点而在动物源性成分定性和定量检测中被广泛应用,且以荧光定量 PCR 检测技术最为突出^[10]。然而,荧光定量 PCR 检测方法需要根据样本特异基因扩增的循环阈值(Cycle thresh-

old, Ct)建立标准曲线,将 DNA 的浓度转换为拷贝数,是一种相对定量的方法,无法满足绝对定量的要求,且该方法受 PCR 扩增的效率影响,在检测准确度方面有所欠缺^[10-13]。微滴式数字 PCR(droplet digital polymerase chain reaction, ddPCR)是近年来兴起的一种能够超灵敏、高精度的定量核酸的新型 PCR 技术,该技术将样品 DNA 通过液滴发生器分割成数万个液滴,经 PCR 扩增后,对每一个微滴荧光信号进行终点检测,根据泊松分布原理精确计算靶标基因的起始拷贝数^[14]。与荧光定量 PCR 相比,ddPCR 技术可在不建立标准曲线的前提下对核酸拷贝数进行绝对定量,且不受 PCR 抑制物及 PCR 扩增效率的影响,目前大量研究证实其在肉类掺假检测方面具有巨大的优势和应用潜力^[15-20]。

基于 ddPCR 技术的肉品掺假定量检测关键在于如何将 DNA 绝对拷贝数准确地转化为肉品的质量分数。由于靶标基因的拷贝数在不同动物物种之间不同,甚至在同一种物种不同组织类型中也存在显著差异,因此导致测得的肉品 DNA 拷贝数通常不能代表真正的质量分数^[21]。目前,在应用 ddPCR 技术定量检测肉品掺假研究中,大多数采用两步转化法,即先后利用肉质量分数与 DNA

收稿日期: 2023-12-10

基金项目: 浙江省重点研发项目(2018C02041);浙江省属高校基本科研业务费专项项目(2022YW82)

第一作者: 马小玉,女,硕士生

通信作者: 王正亮 E-mail: wzl@ejlu.edu.cn

质量浓度、DNA 质量浓度与 DNA 拷贝数之间的线性关系建立两条标准曲线,将 DNA 拷贝数与肉品质量分数进行转换^[22-24]。然而,该方法需要建立两条标准曲线,势必增加检测结果的误差。近年来,有研究者通过添加内参或引入转换常数的方式将 DNA 拷贝数通过一步法转换为肉品质量分数,大大提高了检测结果的准确度^[15,25-26]。如 Yu 等^[26]以火鸡肉作为内参,建立一种毛皮动物源性成分的 ddPCR 检测技术,可实现肉及肉制品中掺伪水貂肉、狐狸肉和貉子肉的精准定量检测。

本研究旨在开发一种定量检测牛肉中鸭源性成分的 ddPCR 技术。以牛和鸭的单拷贝核基因——肌动蛋白基因(β -Actin, ACTB)为靶基因,参考 Ren 等^[19]的方法引入一个固定的常数 K(转换系数),通过一步法将 ddPCR 测定的 DNA 拷贝数直接转换为肉类的质量分数,建立定量检测计算公式,并对方法的特异性、灵敏度、准确性和适用性进行评价,以期为我国牛肉质量安全检测和监测提供技术参考。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料、试剂与amp;仪器

牛肉、鸭肉、猪肉、鸡肉、鹅肉、马肉、羊肉、狗肉、兔肉、驴肉样本保存于本实验室,16 份牛肉制品样本,购自浙江省杭州超市。

DNA 提取试剂盒 DNeasy Blood & Tissue Kit, 德国 Qiagen 公司;2 \times 微滴式数字 PCR 预混液、微滴生成槽、微滴生成油等,美国 Bio-Rad 公司;引物与探针,南京金斯瑞生物科技有限公司。

微滴式数字 PCR 仪 QX200 系统,美国 Bio-Rad 公司;Nanodrop 2000 分光光度计,美国 Ther-

mo Scientific 公司;组织研磨仪,德国 IKA 公司;离心机,德国 Eppendorf 公司;电子分析天平,德国 Sartorius 公司。

1.2 样品制备

称取 500 g 肉样,利用料理机搅碎成肉泥后,置于 65 $^{\circ}$ C 烘箱中烘干 48 h,烘干的肉粉液氮速冻后用组织研磨仪磨成粉状,过 60 目筛后于-20 $^{\circ}$ C 密封保存备用。

以精确度为 0.1 mg 的电子天平准确称量牛肉粉和鸭肉粉样本,制备鸭肉质量分数(鸭肉/牛肉)分别为 0.05%,0.1%,0.2%,0.5%,0.8%,1.0%,5%,10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%和 90%的混合肉样,每份样本总质量为 10 g。另分别称取 10 g 牛肉、鸭肉、猪肉、鸡肉、鹅肉、马肉、羊肉、狗肉、兔肉、驴肉粉末样品以及市售牛肉丸、牛肉卷、牛肉脯、牛肉干、牛肉肠和牛肉粒等牛肉制品粉末样品。

1.3 DNA 提取

取 100 mg 肉粉样品,利用 DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, 德国)试剂盒参照说明书提取样本总 DNA。通过 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性和微量分光光度计 NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific, 美国)检测 DNA 的质量和浓度。检测合格后各样本 DNA 稀释至 50 ng/ μ L,于-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4 引物和探针合成

参考 Köppel 等^[27]和邓珍丹^[28]的方法,分别选取牛和鸭单拷贝核基因-肌动蛋白基因(*ACTB*)作为靶基因,设计特异性引物和探针,并送南京金斯瑞生物技术有限公司合成,引物序列见表 1。

表 1 引物和探针序列

Table 1 Primer and probe sequences used in this study

引物/探针	序列(5'-3')	靶基因	长度
Beef-F	GTAGGTGCACAGTACGTTCTGAAG	<i>ACTB</i>	96 bp
Beef-R	GCCAGACTGGGCACATG		
Beef-P	(HEX)-CGGCACACTCGGCTGTGTTTCCTTGC-(BHQ1)		
Duck-F	TGTTACAGGAAGTTACTCGCCT	<i>ACTB</i>	134 bp
Duck-R	GCGGAAGATACAAAAAGACACT		
Duck-P	(FAM)-TCCTGGTGTAGTTGTAAACGCTTG-(BHQ1)		

1.5 ddPCR 检测体系建立

ddPCR 反应总体积为 20 μL , 包含: 2 \times ddPCR supermix (no dUTP) 10 μL , 上下游引物各 1.8 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), 探针 0.5 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), 模板 DNA 2 μL (50 ng/ μL) 和 ddH₂O 3.9 μL 。将上述反应体系利用微滴生成器进行微滴化, 并转移至 96 孔板中, 封膜进行 PCR 扩增。PCR 反应程序如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火和延伸 60 s, 39 个循环; 98 $^{\circ}\text{C}$ 热失活 10 min, 10 $^{\circ}\text{C}$ 保存。反应结束后, 通过微滴读取仪进行微滴荧光读数。采用 FAM/HEX 双通道荧光采集微滴信号, 读取阴性微滴和阳性微滴数进行分析。

1.6 ddPCR 方法特异性测定

采用 1.5 节所述 ddPCR 检测体系, 分别以牛和鸭 ACTB 基因的引物和探针对牛肉、鸭肉、猪肉、鸡肉、鹅肉、马肉、羊肉、狗肉、兔肉、驴肉等 10 种常见食用肉类的 DNA 进行扩增, 以 ddH₂O 为阴性对照, 检测引物和探针的特异性。

1.7 转换系数 (K) 的确定和验证

ddPCR 技术检测结果以靶标 DNA 的绝对拷贝数形式呈现。因此, 该技术需要将测得的 DNA 拷贝数准确转换为肉的质量。本研究参考 Ren 等^[15]的方法引入一个固定的常数 K (转换系数), 直接将 DNA 拷贝数比例转换为肉质量分数。简单地说, 在鸭肉和牛肉的混合肉样中, 鸭肉和牛肉的质量比例可按以下公式计算:

$$\frac{M_D}{M_B} = \frac{\frac{Q_D}{C_D}}{\frac{Q_B}{C_B}} = \frac{C_B}{C_D} \times \frac{Q_D}{Q_B}$$

式中: M_D 和 M_B 分别为混合样本中鸭肉和牛肉的质量; Q_D 和 Q_B 分别为 ddPCR 检测出的鸭 ACTB 和牛 ACTB 的拷贝数; C_D 和 C_B 分别为单位质量的鸭肉和牛肉中靶标基因的拷贝数。对于某特定肉种, 单位质量的肉中靶标基因 (单拷贝基因) 的拷贝数可以被认为是恒定的。因此, 在一个固定的 ddPCR 检测体系下, C_B/C_D 是一个常数, 指定为转化系数 (K)。因此, 上述公式可以简化为:

$$\frac{M_D}{M_B} = K \times \frac{Q_D}{Q_B}$$

为测出公式中的转换系数 K , 以质量分数分别为 10%, 30%, 50%, 70%, 90% 的混合肉样 DNA

为模板进行 ddPCR 检测, 计算转换系数 K 的平均数和相对标准偏差 (Relative standard deviation, RSD); 使用质量分数分别 20%, 40%, 60% 和 80% 混合肉样进行 ddPCR 检测, 根据测得的 K 值计算混合肉样中鸭肉的质量分数, 并与实际值进行比较分析, 验证 K 值的准确性和稳定性。上述每个样品重复检测 6 次。

1.8 定量线性范围、检测限和定量限测定

运用 ddPCR 检测鸭肉质量分数分别为 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 和 90% 的混合肉样, 利用 1.7 节中计算的 K 值将测得的基因拷贝数转换为肉质量分数, 分析测量值和实际值之间的线性关系, 评估所建 ddPCR 方法的定量线性范围; 利用鸭肉质量分数分别为 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.5%, 0.8%, 1% 和 5% 的混合肉样进行 ddPCR 检测, 确定所建 ddPCR 方法的检测限 (Limit of detection, LOD) 和定量限 (Limit of quantification, LOQ), 计算 RSD, 并以 $RSD \leq 25\%$ 作为有效定量数据的判断依据。上述每个样品重复检测 3 次。

1.9 市售样本检测

利用 ddPCR 方法对市售的 16 份牛肉及其制品中鸭源性成分进行定量检测, 并将检测结果与商品标签中声明的成分含量进行比较, 验证所建立 ddPCR 检测方法的适用性。

2 结果与分析

2.1 引物和探针特异性检测

线粒体 DNA (mtDNA) 是一种广泛用于食品和饲料中动物源性成分检测的 DNA 标记物^[29-31]。然而, 由于 mtDNA 在动物组织和个体间存在拷贝数差异, 基于 mtDNA 的检测方法难以在肉制品掺伪检测时对其中的动物源性成分进行准确定量^[21]。相比于 mtDNA, 单拷贝核 DNA 数量相对稳定, 在开展肉制品掺伪定量检测时具有显著优势。本研究以牛和鸭的单拷贝核基因 ACTB 作为检测靶基因。

以牛、鸭、猪、鸡、鹅、马、羊、狗、兔、驴等 10 种畜禽肉基因组 DNA 为模板, 以 ddH₂O 为空白对照, 进行 ddPCR 检测。由图 1 可知, 空白对照和非靶标肉种中均未出现微滴扩增, 特异性扩增仅针

对靶标肉种,且反应生成的总微滴数均大于10 000个,符合泊松分布的统计要求,表明所设计

的引物及探针具有良好的特异性,能够满足牛肉中鸭源性成分的定量检测需求。

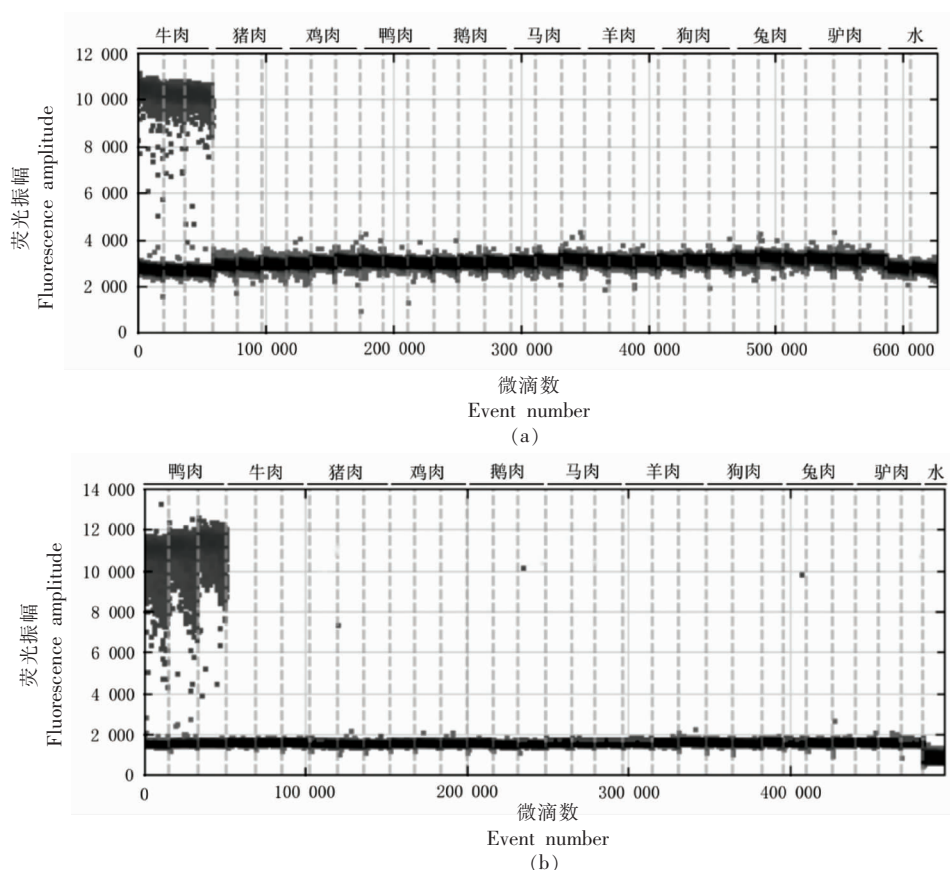


图1 ddPCR方法验证牛(a)和鸭(b) *ACTB* 基因引物和探针的特异性

Fig.1 The specificity of primers and probes targeting beef (a) and duck (b) *ACTB* genes verified by ddPCR assay

2.2 *K*值的计算和验证

以鸭肉质量分数分别10%、30%、50%、70%、90%的混合肉样DNA为模板,通过ddPCR方法分别测定鸭和牛*ACTB*基因拷贝数,并计算*K*值。由

表2可知,*K*值的平均值为0.16,RSD为2.16%。可见,在不同的鸭肉/牛肉质量比下,*K*值相对稳定,可通过*K*值将鸭肉和牛肉的基因拷贝数之比转换为肉的质量分数。

表2 鸭肉质量分数不同的混合肉样中*K*值的测定

Table 2 Determination of *K* value in the meat mixtures with different proportions of duck

鸭肉质量分数/%	鸭基因拷贝数平均值/ (copies/ μ L)	牛基因拷贝数平均值/ (copies/ μ L)	<i>K</i> 值	<i>K</i> 值平均值	RSD/%
10	146.17	209.17	0.16	0.16	2.16
30	360.67	138.75	0.16		
50	110.73	18.57	0.17		
70	339.17	24.10	0.17		
90	503.50	9.02	0.16		

为了进一步验证*K*值的准确性和稳定性,分别对4个已知鸭肉质量分数(20%、40%、60%和

80%)的混合肉样进行ddPCR检测,以计算获得*K*值($K=0.16$)作为固定值计算混合肉样中鸭肉质量

分数。如表 3 所示,检测值与混合肉样中鸭肉质量分数的真实值相比,相对误差范围为 0.01%~1.55%,平均为 0.47%,相对标准偏差均小于 3%,回收率介于 100.01%~105.30%之间。该结果表明,

以计算所得的 K 值测量鸭肉/牛肉混合样本中鸭肉含量具有很好的准确性和稳定性,可应用该值对牛肉中的鸭源性成分进行定量检测,即定量公式为: $M_D/M_B=0.16\times Q_D/Q_B$ 。

表 3 K 值的准确性和稳定性验证 (%)Table 3 Verification of accuracy and stability of the K value (%)

鸭肉质量分数真实值	鸭肉质量分数检测值 (均值 \pm 标准差)	绝对误差	相对误差	RSD	回收率
20	21.06 \pm 0.35	0.06	0.30	1.66	105.30
40	41.01 \pm 1.14	0.01	0.03	2.78	102.53
60	60.93 \pm 0.35	0.93	1.55	0.57	101.55
80	80.01 \pm 0.02	0.01	0.01	0.03	100.01

2.3 定量检测线性范围测定

针对鸭肉质量分数分别 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 和 90% 的混合肉样,运用已建立的 ddPCR 方法和定量公式进行检测和计算,以鸭肉质量分数真实值为横坐标,实际测量值为纵坐标绘制标准曲线,结果如图 2 所示,鸭肉质量分数在 1%~90% 范围内,标准曲线线性关系良好,相关系数(R^2)为 0.9996,适用于定量检测。

2.4 LOD 和 LOQ 测定

针对鸭肉质量分数分别为 0.1%, 0.2%, 0.5%, 0.8%, 1% 和 5% 的混合肉样,运用已建立的 ddPCR 方法和定量公式进行检测和计算(表 3)。结果显示,当混合肉样中鸭肉质量分数在 0.1% 的水平下仍能被稳定检测到,表明所建立的 ddPCR 方法具有较好的灵敏性,其 LOD 为 0.1%;参照国际食品法典委员会标准 CAC/GL 74-2010《检测、鉴定和量化食品中特定基因序列和蛋白质的执行标准和方法确认准则》,回收率介于 70%~120%、RSD \leq

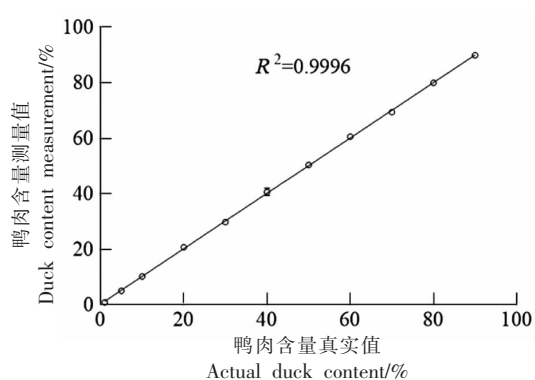


图 2 ddPCR 方法定量检测牛肉中鸭源性成分的线性范围

Fig.2 The linearity range of the ddPCR assays for quantification of duck derivative in beef

25%时认为检测结果可靠^[32]。当混合肉样中鸭肉质量分数在 0.5% 以上水平时,回收率均大于 70%,RSD 均小于 25%,在可接受范围内,表明所建立的 ddPCR 方法的 LOQ 为 0.5%。

表 4 ddPCR 方法的检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 评估 (%)

Table 4 Evaluation of the LOD and LOQ of the ddPCR assays (%)

鸭肉质量分数 真实值	鸭肉质量分数检测值(均 值 \pm 标准差)	绝对误差	相对误差	RSD	回收率
0.05	未检出	—	—	—	—
0.1	0.02 \pm 0.01	-0.98	-980.00	50.00	20.00
0.2	0.16 \pm 0.05	-0.04	-20.00	31.25	80.00
0.5	0.37 \pm 0.08	-0.13	-26.00	21.62	74.00
0.8	0.80 \pm 0.01	-0.00	0.00	1.25	100.00
1	0.99 \pm 0.06	-0.01	-1.00	6.06	99.00
5	5.04 \pm 0.06	0.04	0.80	1.19	100.80

2.5 市售样本检测

以本研究建立的检测方法对 16 份市售牛肉丸、牛肉卷、牛肉脯、牛肉干、牛肉肠和牛肉粒等牛肉制品中鸭源性成分进行定量检测。结果表明,所有样品中均检出牛源性成分,其中 1 份牛肉脯和 1 份牛肉馅中检测到鸭源性成分,含量分别为 44.87% 和 18.21%,且在标签成分表中未明确标明。研究结果表明,本研究建立的 ddPCR 方法适用于对牛肉及其制品中鸭源性成分进行定量检测。

3 结论

本研究建立了一种准确可靠的基于 ddPCR 技术的牛肉中鸭源性成分定量检测方法。以牛和鸭的单拷贝核基因 ACTB 为靶基因合成的引物和探针具有良好的特异性。通过转换系数 K 将 ddPCR 测定的 DNA 拷贝数之比直接转换为肉质质量分数,避免了传统的两步分析法(即先后利用肉质质量分数与 DNA 质量浓度、DNA 质量浓度与 DNA 拷贝数之间的线性关系建立两条标准曲线)带来的结果偏差。根据模拟混合样本中已知的肉质质量分数和 ddPCR 实际测得的 DNA 拷贝数之间的关系,计算获得鸭肉与牛肉之间的 K 值为 0.16。据此建立的牛肉中鸭源性成分的定量检测公式分别为 $M_D/M_B = 0.16 \times Q_D/Q_B$,其在鸭肉质量分数为 1%~90% 范围内均具有较好的线性关系 ($R^2 > 0.99$), LOD 和 LOQ 分别为 0.1% 和 0.5%。模拟混合肉样中鸭肉粉质量分数为 20%、40%、60% 和 80% 时,检测结果绝对误差 $< 1.0\%$, RSD $< 3\%$ 。在 16 份市售牛肉样品中,2 份被检测出鸭源性成分,与商品标签不符,其中一份牛肉脯样本中鸭源性成分含量高达 44.87%,推断属于蓄意掺假。综上可见,本研究建立的基于 ddPCR 技术的牛肉中鸭源性成分定量检测方法具有良好的特异性、灵敏性、准确性和适用性,在牛肉及其制品质量安全市场监管中具有较大的应用潜力。

参 考 文 献

[1] SALEEM A, SAHAR A, PASHA I, et al. Determination of adulteration of chicken meat into minced

表 5 商品牛肉的定量结果

Table 5 Quantification results of commercial beef products

样本编号	样本名称	鸭肉质量分数/%	
		标签注明值	实际检测值
1	牛肉卷	0	0
2	牛肉卷	0	0
3	牛肉卷	0	0
4	牛肉丸	0	0
5	牛肉丸	0	0
6	牛肉脯	0	0
7	牛肉脯	0	44.87 ± 3.85
8	牛肉肠	0	0
9	牛肉肠	0	0
10	牛肉串	0	0
11	牛肉串	0	0
12	牛肉串	0	0
13	牛肉馅	0	18.21 ± 4.17
14	牛肉干	0	0
15	牛肉粒	0	0
16	牛肉粒	0	0

beef mixtures using front face fluorescence spectroscopy coupled with chemometric[J]. Food Science of Animal Resources, 2022, 42(4): 672-688.

- [2] HAN F, HUANG X, AHETO J H, et al. Detection of beef adulterated with pork using a low-cost electronic nose based on colorimetric sensors[J]. Foods, 2020, 9(2): 193.
- [3] WANG Y, WANG B, WANG D. Development of a ladder-shape melting temperature isothermal amplification assay for detection of duck adulteration in beef[J]. Journal of Food Protection, 2022, 85(8): 1203-1209.
- [4] 范梦晨, 韩爱云. 肉类掺假检测技术的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(1): 236-241.
FAN M C, HAN A Y. Research progress on meat adulteration detection technology[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2021, 12(1): 236-241.
- [5] LU B, HAN F, AHETO J H, et al. Artificial bionic taste sensors coupled with chemometrics for rapid detection of beef adulteration[J]. Food Science and Nutrition, 2021, 9(9): 5220-5228.
- [6] PAN X D, CHEN J, CHEN Q, et al. Authentication of pork in meat mixtures using PRM mass

- spectrometry of myosin peptides[J]. *RSC Advances*, 2018, 8(20): 11157–11162.
- [7] STACHNIUK A, SUMARA A, MONTOWSKA M, et al. Peptide markers for distinguishing guinea fowl meat from that of other species using liquid chromatography–mass spectrometry [J]. *Food Chemistry*, 2021, 345: 128810.
- [8] LI Y C, LIU S Y, MENG F B, et al. Comparative review and the recent progress in detection technologies of meat product adulteration[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2020, 19(4): 2256–2296.
- [9] YANG C, ZHONG G, ZHOU S, et al. Detection and characterization of meat adulteration in various types of meat products by using a high–efficiency multiplex polymerase chain reaction technique [J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 9: 979977.
- [10] BOHME K, CALO–MATA P, BARROS–VELAZQUEZ J, et al. Review of recent DNA–based methods for main food–authentication topics[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(14): 3854–3864.
- [11] KANG T S, TANAKA T. Comparison of quantitative methods based on SYBR Green real–time qPCR to estimate pork meat adulteration in processed beef products[J]. *Food Chemistry*, 2018, 269: 549–558.
- [12] LI T T, WANG J S, WANG Z Y, et al. Quantitative determination of mutton adulteration with single–copy nuclear genes by real–time PCR[J]. *Food Chemistry*, 2021, 344: 128622.
- [13] LI T T, JALBANI Y M, ZHANG G L, et al. Detection of goat meat adulteration by real–time PCR based on a reference primer[J]. *Food Chemistry*, 2019, 277: 554–557.
- [14] QUAN P L, SAUZADE M, BROUZES E. dPCR: A Technology Review[J]. *Sensors*, 2018, 18(4): 1271.
- [15] REN J N, DENG T T, HUANG W S, et al. A digital PCR method for identifying and quantifying adulteration of meat species in raw and processed food [J]. *PLoS ONE*, 2017, 12(3): e0173567.
- [16] DECONINCK D, HOSTENS K, TAVERNIERS I, et al. Identification and semi–quantification of Atlantic salmon in processed and mixed seafood products using droplet digital PCR (ddPCR) [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2021, 154: 112329.
- [17] AMPAPORN K, PHASUK Y, DUANGJINDA M. Droplet digital polymerase chain reaction assay for identifying and quantifying pork products[J]. *Animal Science Journal*, 2021, 92(1): e13595.
- [18] SHEHATA H R, LI J P, CHEN S, et al. Droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) assays integrated with an internal control for quantification of bovine, porcine, chicken and turkey species in food and feed[J]. *PLoS One*, 2017, 12(8): 1–17.
- [19] CAO W W, LI Y M, CHEN X, et al. Species identification and quantification of silver pomfret using the droplet digital PCR assay[J]. *Food Chemistry*, 2020, 302: 125331.
- [20] WANG Q, CAI Y C, HE Y P, et al. Droplet digital PCR (ddPCR) method for the detection and quantification of goat and sheep derivatives in commercial meat products[J]. *European Food Research and Technology*, 2018, 244(4): 767–774.
- [21] FLOREN C, WIEDEMANN I, BREINIG B, et al. Species identification and quantification in meat and meat products using droplet digital PCR (ddPCR) [J]. *Food Chemistry*, 2015, 173: 1054–1058.
- [22] CAI Y C, HE Y P, LÜ R, et al. Detection and quantification of beef and pork materials in meat products by duplex droplet digital PCR[J]. *PLoS One*, 2017, 12(8): e0181949.
- [23] NOH E S, PARK Y J, KIM E M, et al. Quantitative analysis of Alaska pollock in seafood products by droplet digital PCR[J]. *Food Chemistry*, 2019, 275: 638–643.
- [24] 刘立兵, 员丽娟, 陈敏娜, 等. 基于微滴式数字聚合酶链式反应技术的肉制品中鸭源性成分的定量检测[J]. *肉类研究*, 2021, 35(3): 30–34.
- LIU L B, YUAN L J, CHEN M N, et al. Quantitative detection of duck–derived ingredients in meat products by droplet digital polymerase chain reaction [J]. *Meat Research*, 2021, 35(3): 30–34.
- [25] XU H, MA X, YE Z, et al. A droplet digital PCR based approach for identification and quantification of porcine and chicken derivatives in beef[J]. *Foods*, 2022, 11(20): 3265.
- [26] YU N, REN J N, HUANG W S, et al. An effective analytical droplet digital PCR approach for identification and quantification of fur–bearing animal meat in raw and processed food[J]. *Food Chemistry*, 2021, 355: 129525.
- [27] KOPPEL R, GANESHAN A, VAN VELSEN F, et

- al. Digital duplex versus real-time PCR for the determination of meat proportions from sausages containing pork and beef[J]. *European Food Research and Technology*, 2019, 245(1): 151-157.
- [28] 邓珍丹. 肉制品中五种动物源性成分的数字PCR检测方法[D]. 郑州: 河南工业大学, 2018.
- DENG Z D. Digital PCR detection method for five animal-derived components in meat products [D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2018.
- [29] HA J, KIM S, LEE J, et al. Identification of pork adulteration in processed meat products using the developed mitochondrial DNA-based primers[J]. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 2017, 37(3): 464-468.
- [30] CHO A R, DONG H J, CHO S. Meat species identification using loop-mediated isothermal amplification assay targeting species-specific mitochondrial DNA[J]. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 2014, 34(6): 799-807.
- [31] LADENBURGER E M, DEHMER M, GRUNBERG R, et al. Highly sensitive matrix-independent quantification of major food allergens peanut and soy by competitive real-time PCR targeting mitochondrial DNA[J]. *Journal of AOAC International*, 2018, 101(1): 170-184.
- [32] CODEX Committee on Methods of Analysis and Sampling. Guidelines on performance criteria and validation of methods for detection, identification and quantification of specific DNA sequences and specific proteins in foods: CAC/GL 7402010 [S]. Rome: Codex Alimentarius-FAO, 2010: 1-22.

Quantification of Duck Derivative in Beef Based on Droplet Digital PCR Technique

Ma Xiaoyu, Xu Huili, Wang Zhengliang*, Yu Xiaoping

(Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biometrology and Inspection and Quarantine, College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018)

Abstract In this study, we developed an accurate and reliable ddPCR-based method for identifying and quantifying duck derivative in beef. Single-copy nuclear gene *ACTB* encoding a β -Actin was selected and used as the target to design specific primers and probes for both beef and duck. In order to transform the ratio of DNA copy number to the mass fraction of targeted meat, a fixed constant (transfer coefficient) was introduced, which was designated as K . Based on the relationship between the known mass fractions in simulated meat mixtures and the actual DNA copy numbers measured by ddPCR, the K value was calculated and validated. A quantitative formula was consequently established and applied for quantifying the content of duck in both the artificial duck/beef-mixed samples and commercial beef products. The results revealed that the established ddPCR method was highly specific for the detection of duck-derivative in beef. The K value was 0.16 and hence the quantitative formula was established as $M_D/M_B=0.16 \times Q_D/Q_B$, where M_D and M_B refer to the mass of duck and beef, respectively. Q_D and Q_B refer to the copy number of the target gene detected in the ddPCR assays, respectively. The linear regression was established within the duck content of 1%-90% with the correlation coefficient (R^2) ≥ 0.99 . The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of the established ddPCR method are 0.1% and 0.5%, respectively. When the artificial mixed samples with the duck content of 20%-80% were detected, the absolute errors were all <1%. Duck derivative was detected in two out of 16 commercial beef products, with the content of 44.87% and 18.21%, respectively, which were inconsistent with statement on the product labels. In summary, the ddPCR method developed in this study demonstrated good specificity, sensitivity, accuracy and applicability for quantifying duck derivative in beef, could provide technical support for the quality and safety inspection of beef and beef products in China.

Keywords droplet digital PCR; beef; duck derivative; quantitative detection