

不同工艺干扰因素对肉松和肉丸中非洲猪瘟病毒微滴式数字PCR检测结果的影响

郑人浩¹, 邱希斌^{2, 3}, 周 轲⁴

(1. 福建农林大学林学院, 福建 福州 350002;

2. 福建省产品质量检验研究院/国家加工食品质量检验检测中心(福州), 福建 福州 350015;

3. 福建师范大学生命科学学院, 福建 福州 350117;

4. 伯乐生命医学产品(上海)有限公司, 上海 200082)

摘要:目的:探究猪肉松和肉丸加工过程中的工艺添加与高温处理对非洲猪瘟病毒(ASFV)微滴式数字PCR(ddPCR)检测效率的影响,明确主要工艺干扰因素。方法:采用阴性猪肉松和猪肉丸添加 ASFV 重组质粒 pUC19-P72 后设置 0%~10% 梯度的食品添加剂,另取 ASFV 阳性猪肉采用 100℃、120℃、150℃ 温度处理 30 分钟,经研磨、去油预处理后,通过 ddPCR 检测核酸拷贝数变化直观反映影响。结果:油脂干扰最强,酱油次之,白砂糖无显著影响;温度≥120℃时核酸降解显著。结论:油性物质与高温是主要干扰因素,检测深加工肉制品需强化去油前处理。肉丸因加工温度低于肉松仍可检出 ASFV,而肉松因其工艺使得病毒核酸易降解,因此原料检测是关键环节。

关键词:猪肉松;猪肉丸;非洲猪瘟病毒;微滴式数字 PCR;工艺干扰因素

中图分类号:O657.3 文献标识码:A 文章编号:1009-8143(2026)03-0043-05

Doi:10.3969/j.issn.1009-8143.2026.03.09

Influence of different process interference factors on droplet digital PCR detection results of African Swine Fever Virus in pork floss and meatballs

Zheng Ren-hao¹, Qiu Xi-bin^{2, 3}, Zhou Ke⁴

(1. Forestry College, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China;

2. Fujian Provincial Institute of Product Quality Inspection and Research/National Center for Quality Inspection and Testing of Processed Food(Fuzhou), Fuzhou, Fujian 350015, China;

3. College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350117, China;

4. Bio-Rad(shanghai)Co., Ltd., Shanghai 350108, China)

Abstract: Objective: This study investigated the impact of processing additives and high-temperature treatment during the production of pork floss and meatballs on the detection efficiency of African Swine Fever Virus (ASFV) using droplet digital PCR (ddPCR), aiming to identify the main interfering factors. **Methods:** Using negative pork floss and meatball with ASFV recombinant plasmid pUC19-P72, a gradient of food additives ranging from 0% to 10% was applied. Additionally, ASFV-positive pork was treated at temperatures of 100°C, 120°C, and 150°C for 30 minutes. After grinding and oil removal preprocessing, the changes in nucleic acid copy numbers were detected via ddPCR to visually reflect the effects. **Results:** Oil substances had the strongest interference, followed by soy sauce, while white granulated sugar had no significant effect; when temperature reached or exceeded 120°C, nucleic acid degradation was significant. **Conclusions:** Oil substances and high temperature are the main interfering factors. Deep-processed meat products require enhanced oil

收稿日期:2026-01-12

第一作者简介:郑人浩(2004—),男/本科生,研究方向:植物生态和分子生物学。Email:wx3170879773@163.com

1.2 实验方法

1.2.1 加工工艺因素核酸得率干扰评估实验

(1) 食用油及调味品因素干扰试验

取经 qPCR 检测为 ASFV 阴性的猪肉松和猪肉丸样本各 0.03 g, 加入 10 μ L 重组质粒 pUC19—P72, 并分别用不同浓度的食用白砂糖、食用酱油、食用调和油处理, 浓度梯度分别设定为: 0%、2.5%、5%、7.5%、10% 共五个梯度, 每个梯度样本做 3 个重复, 经去油处理后, 上机检测, 数据用差异性统计分析软件 GraphPad Prism 7 作直方图进行评估。

(2) 温度因素干扰试验

取经 qPCR 检测非洲猪瘟阳性猪肉 0.03 g 分别以 100℃、120℃、150℃ 三个温度梯度处理 30 min, 其中 100℃ 用金属孵育器加热 30 min, 120℃ 采用高压灭菌锅处理 30 min, 而 150℃ 采用电子调温万用炉进行油炸。每个温度梯度做 3 个重复, 经去油处理后, 上机检测, 数据用差异性统计分析软件 GraphPad Prism 7 作直方图进行评估。

1.2.2 微滴式 ddPCR 检测

每个样品加入上下游引物 P-F 和 P-R 各 2 μ L、探针 P-P 1 μ L、ddPCR Super mix for Probes (No dUTP) 10 μ L、DNA 模板 2 μ L, 再加 ddH₂O 至 20 μ L 混匀后加样到微滴生成卡的样本孔中, 再加 70 μ L 到生成油孔。上机, 微滴生成仪将 20 μ L 体系混合物生成微滴, 再用热循环仪进行扩增。ddPCR 反应条件为: 95℃ 预变性 10 min, 94℃ 变性 30 s, 54.2℃ 退火 1 min, 40 个循环, 98℃ 微滴固化 10 min 后 4℃ 保存, 各步骤升温速率设置为 2.5℃/sec。PCR 扩增反应结束后利用微滴读取仪读取 DNA 拷贝数。

2 结果与讨论

2.1 食用白砂糖、食用酱油、食用调和油对非洲猪瘟病毒核酸得率的干扰评估

采用研磨、振荡、离心和去油处理后, 用提取试剂盒分别提取加入 5 个梯度的食用白砂糖、食用酱油和食用调和油的猪肉松中非洲猪瘟病毒核酸拷贝浓度, 结果如图 2 所示。结果表明, 食用白砂糖的浓度从 0% 到 10% 都不影响猪肉松中 ASFV 核酸的得率, 其中不加白砂糖时核酸的拷贝浓度为 140 copies/ μ L, 当加入 10% 白砂糖水溶液时核酸的拷贝浓度为 100 copies/ μ L, 基本没有呈现大幅度

的波动。加入食用酱油后 ASFV 核酸拷贝浓度从 0% 时的约 270 copies/ μ L 到加入 10% 浓度时则降低至 60 copies/ μ L, 可以发现随着食用酱油的浓度增加, 猪肉松中获得 ASFV 核酸越来越少, 呈现一定规律的下降。随着食用调和油的浓度由 0% 增加至 10%, ASFV 核酸拷贝浓度呈现明显下降趋势, 即从 140 copies/ μ L 一直减少到 30 copies/ μ L, 可以发现随着食用调和油浓度的增加, 猪肉松中 ASFV 核酸的获得呈现减少趋势。

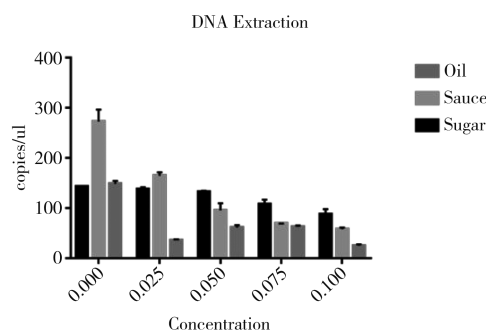


图2 不同浓度食用白砂糖、食用酱油、食用调和油对猪肉松中非洲猪瘟病毒核酸提取效率的影响

Fig.2 The effect of different concentrations of edible white granulated sugar, edible soy sauce and edible blended oil on the extraction efficiency of ASFV nucleic acid from pork floss

采用研磨、振荡、离心和去油处理后, 用提取试剂盒分别提取加入 5 个梯度的食用白砂糖、食用酱油和食用调和油的猪肉丸中非洲猪瘟病毒核酸拷贝浓度的结果, 如图 3 所示。结果表明, 食用白砂糖的浓度从 0% 增加到 10%, 猪肉丸中 ASFV 核酸的拷贝浓度都维持在 20 copies/ μ L 以下且相差不大, 可以发现食用白砂糖的高低对其得率并没有很大的

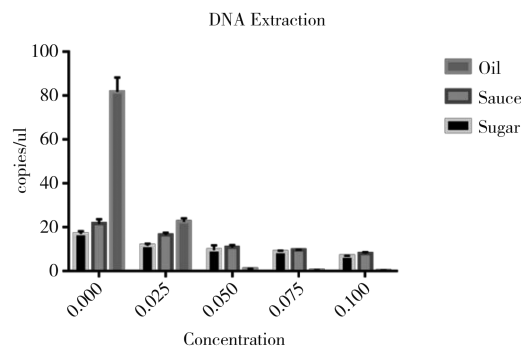


图3 不同浓度食用白砂糖、食用酱油、食用调和油对猪肉丸中非洲猪瘟病毒核酸提取效率的影响

Fig.3 The effect of different concentrations of edible white granulated sugar, edible soy sauce and edible blended oil on the extraction efficiency of ASFV nucleic acid from pork balls

影响,不过相比于猪肉松反倒是减少了不少。当食用酱油的浓度从0%增加到10%时,猪肉丸中ASFV核酸的得率从约20 copies/ μ L降低至10 copies/ μ L左右,可以发现食用酱油对其得率有一定的影响。而食用调和油的影响就更为明显,从0%的约80 copies/ μ L降低至10%的接近0 copies/ μ L,呈现明显的断崖式降低。

2.2 温度对非洲猪瘟病毒核酸得率的干扰评估

采用研磨、振荡、离心和去油处理后,用提取试剂盒提取经过100℃、120℃和150℃处理30 min的阳性猪肉中ASFV核酸,结果分别如图4、图5和图6所示。我们发现当ASFV阳性猪肉经100℃处理后,样本中非洲猪瘟病毒核酸并不会受到过多的影响,反倒是由于100℃的高温处理将蛋白彻底变性而使得DNA释放出来,并获得较高纯度的核酸。而当ASFV阳性猪肉经120℃处理后,ASFV核酸提取浓度降低至4 copies/ μ L。当ASFV阳性猪肉经150℃处理后,即模拟肉松的处理过程时发现,基本已经无法提取到ASFV核酸了。从生物学的角度分析我们也可知道,当温度超过100℃时,DNA彻底变性并开始降解。因此温度过高会将阳性猪肉样本中的ASFV破坏,降低了阳性样本的检出可能性。

3 结论

肉松或称肉绒、肉酥,是将肉除去水分后制成

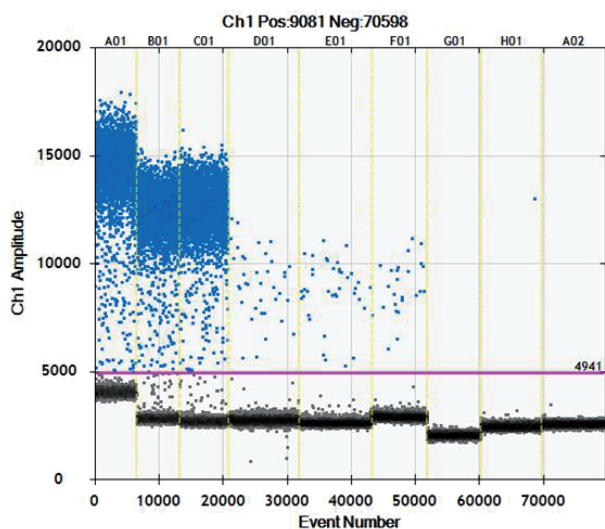


图4 不同处理温度下ASFV阳性猪肉样本数字PCR扩增雨滴图

Fig.4 Raindrop plot of ddPCR amplification of ASFV positive pork samples at different processing temperatures

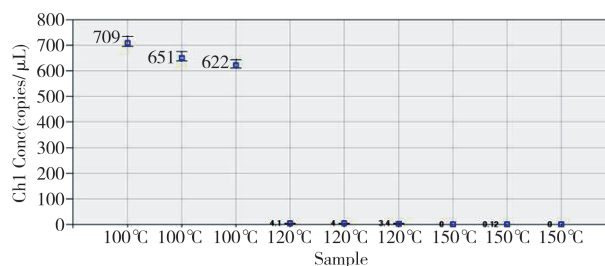


图5 不同处理温度下ASFV阳性猪肉样本数字PCR扩增统计图

Fig.5 Statistical chart of ddPCR amplification of ASFV positive pork samples at different processing temperature

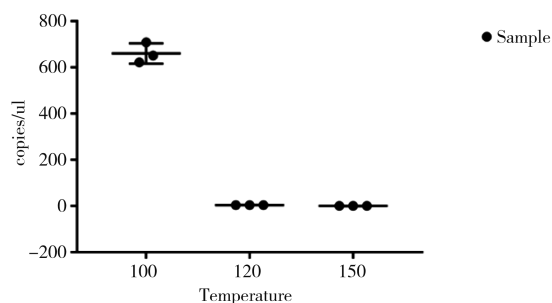


图6 不同处理温度下ASFV阳性猪肉样本数字PCR扩增散点图

Fig.6 Scatter plot of ddPCR amplification of ASFV positive pork samples at different processing temperatures

的粉末,它适宜保存,并便于携带。从蒙古帝国早期,成吉思汗驰骋欧亚作战时的干粮就是肉松和奶粉,马可·波罗就记述有蒙古骑兵曾携带过一种肉松食品。按加工方式的不同猪肉松分为三种:肉粉松、油酥肉松、太仓式肉松,其中产量较大的是肉粉松,其主要加工工艺是用瘦猪肉为主要原料、经煮制、撇油、绞碎、调味、收汤、炒松再用食用油脂和适量面粉炒制成颗粒状的肉制品。猪肉丸的主要用料包括鲜猪肉、葱、酱油、盐、糖、生姜、食用油等。无论是猪肉松还是猪肉丸均有一定量的糖、酱油和食用油的添加,因此我们选择了这三种添加剂作为研究对象。由于猪肉松或猪肉丸的生产工艺较为复杂,有的还有一定的专利或非遗文化,因此在实验室中无法完全复现其生产工艺。此外如果同时增加温度因子开展多因素实验,有可能造成添加剂烧焦或引燃等风险,从而影响实验结果,因此我们分别采用不同的样本开展单因素实验。在添加剂实验中我们选用了有福建特色的福州猪肉松和肉丸为样本,主要考虑了保持成品中其他成分的影响。

研究采用经qPCR检测为ASFV阴性的猪肉松

和猪肉丸,加入ASFV重组质粒pUC19—P72后,作为样本探讨了经不同浓度食用白砂糖、食用酱油和食用调和油处理后ASFV核酸得率的问题。通过结果分析,我们得出了油性物质对ASFV核酸提取的影响最大,而酱油次之,白砂糖则影响最小。因此在深加工肉制品ASFV核酸提取过程中,样本的去油处理十分重要,我们在提取猪肉松和猪肉丸等带油样本时尤其要注意油性物质的去除。由于猪肉松和猪肉丸的加工工艺不同,形态不同,疏密度也不同,不能进行比较。为模拟肉松和猪肉丸加工过程中温度的影响,我们选择经qPCR检测ASFV阳性的猪肉作为样本,讨论经100℃、120℃和150℃分别处理30 min后对ASFV核酸得率影响,发现当处理温度超过100℃后,ASFV核酸得率下降,当温度高达150℃时样本ASFV核酸基本被降解。结合肉丸和肉松的生产过程,即使是使用非洲猪瘟阳性猪肉作为原料,由于猪肉松制作过程中的温度至少会达到150℃,因此制作成成品肉松后检出的可能性较低,当然其传播的可能性也随之降低,肉松制作原料肉的检测成为控制非洲猪瘟的关键。而猪肉丸的制作过程的温度一般为100℃,所以使用非洲猪瘟阳性猪肉作为原料制作的肉丸,其成品具有检出的可能性。要在复杂系数更高的深加工肉制品中检出低浓度的ASFV,如果使用qPCR则需要大体系样本的核酸提取而且结果不一定理想,而ddPCR则可以针对低拷贝浓度的核酸进行绝对定量^[16]。同时,在提取过程中,应针对不同的工艺因素,适当改变前处理方式,并综合评估核酸提取效率的特殊差异性,能够更为精准有效采用ddPCR检测ASFV。

参考文献

- [1] 孙筱弈,李洋,朱紫祥. 非洲猪瘟病毒调控细胞转录和翻译机制研究进展[J]. 中国兽医科学, 2026, 56(02): 241–247.
- [2] Tian C, Liu Y, Di D, et al. Immunogenicity and efficacy of an LNP-mRNA prepared from African Swine Fever Virus K205R1[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2024. 03: 158–162.
- [3] 杨悦. 鉴别非洲猪瘟病毒感染性方法的建立及其应用[D]. 四川农业大学, 2023.
- [4] 宋晟,郭焜鹏,黄燕,等. 非洲猪瘟病毒核酸荧光定量PCR检测方法研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(19): 7646–7650.
- [5] Prince A A M, Samir D, M. K M, et al. Development of a novel sensitive single-tube nested PCR assay for the detection of African swine fever virus[J]. Archives of Virology, 2024, 169(5): 107–107.
- [6] 黄瑾,梁涛波,许恒毅. 数字PCR在生物学检测中应用的研究进展[J]. 生命科学, 2021, 33(02): 255–264.
- [7] 李恩静,王丹,李龙,等. 基于微滴数字PCR技术检测致敏原芒果成分[J]. 食品与机械, 2024, 40(09): 50–55+115.
- [8] 陈佳,张琳琳,王晓茹,等. 基于微滴式数字PCR技术检测树莓制品的定量分析方法[J]. 现代食品, 2024, 30(07): 196–201.
- [9] 孙雪奇,尹玮璐,蒋佳希,等. 三重微滴数字PCR定量检测即食米粉中致病菌方法研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2023, 35(11): 1571–1578.
- [10] 李会杰,董莲华,陈桂芳,等. 食品中椰毒假单胞菌微滴式数字PCR定量检测方法的建立[J]. 生物技术通报, 2023, 39(01): 127–136.
- [11] Huaicheng L, Jianwen Z, Rongchao L, et al. Development of a TaqMan-Probe-Based Multiplex Real-Time PCR for the Simultaneous Detection of African Swine Fever Virus, Porcine Circovirus 2, and Pseudorabies Virus in East China from 2020 to 2022[J]. Veterinary Sciences, 2023, 10(2): 106–106.
- [12] 原霖,董浩,倪建强,等. 非洲猪瘟病毒微滴数字PCR检测方法的建立[J]. 畜牧与兽医, 2019, 51(7): 81–84.
- [13] 郭旭龙,肖璐,宋勇,等. 非洲猪瘟病毒微滴数字PCR(ddPCR)方法的建立及应用[J]. 微生物学通报, 2017, 44(12): 2839–2846.
- [14] Miao F, Zhang J, Li N, et al. Rapid and Sensitive Recombinase Polymerase Amplification Combined With Lateral Flow Strip for Detecting African Swine Fever Virus[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10(2): 45–50.
- [15] 邱立平,邓宗云,尹德明,等. 规模化养猪场非洲猪瘟病毒病防控措施[J]. 农业工程技术, 2025, 45(09): 93–94.
- [16] 李松达,蒋亚君,庞忠宝,等. 野生型非洲猪瘟病毒多重数字PCR方法的建立[J]. 动物医学进展, 2024, 45(04): 32–39.