

阿胶中马和驴成分的实时荧光PCR检测

吴亚君, 王 斌, 刘鸣畅, 韩建勋, 李新实, 陈 颖*
(中国检验检疫科学研究院农产品安全研究中心, 北京 100123)

摘 要: 建立阿胶中马和驴成分高特异、高灵敏的实时荧光聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 检测方法。选择马和驴线粒体基因tRNA-Thr及D-loop区为靶序列, 设计合成特异引物, 通过普通PCR和实时荧光PCR检测, 结果表明, 这两对引物能够准确检测阿胶或动物胶中马和驴成分。

关键词: 阿胶; 马; 驴; 实时荧光PCR

A Real-Time PCR to Detect Horse and Donkey Ingredients in Donkey Hide Glue

WU Ya-jun, WANG Bin, LIU Ming-chang, HAN Jian-xun, LI Xin-shi, CHEN Ying*
(Agro-product Research Center, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100123, China)

Abstract: In this study, we established a highly specific and sensitive real-time polymerase chain reaction (PCR) method to detect horse and donkey components in donkey hide glue. The mitochondrial tRNA-Thr gene of horse and the mitochondrial D-loop region of donkey were selected as target sequences for the designing of specific primers. In conventional and real-time PCR assays, horse and donkey ingredients could be specifically detected using both primer pairs.

Key words: donkey hide glue; horse; donkey; real-time polymerase chain reaction (PCR)

中图分类号: R282.5

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2014) 08-0085-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201408016

阿胶是脊索动物门哺乳纲马科动物驴的皮经煎熬、浓缩而成的干燥胶块^[1-2]。药用历史已有2 000多年。传统的阿胶真伪鉴别方法, 采用外观性状和理化性质等方法, 需要个人经验和专业知识, 而各种杂皮胶的制备工艺与真品相似, 因此其外观性状也相近, 给鉴别带来一定的困难^[3-5]。近10年来DNA检测技术在食品、法医、诊断等领域得到非常广泛的应用。在食品原料的物种鉴定方面, DNA方法能够准确判定混杂样品的生物来源, 而且不受大多数食品加工工艺的干扰^[6]。本研究采用实时荧光聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 法^[7-9]针对马和驴线粒体基因组设计了两对引物和探针, 实验证明, 两对引物具有很好的特异性, 加上特异性探针后, 能够特异和灵敏地检测样品中的马和驴成分。另外, 针对不同DNA提取方法进行比较, 发现不同方法或试剂盒对阿胶样品的适用性有所不同。采用建立的马和驴成分检测方法和标准中针对哺乳动物、牛、猪成分的检测方法^[6,9]对阿胶参考样品和送检样品的检测表明, 建立的方法能够准确检测阿胶中的马和驴成分, 也表明目前存在较普遍的阿胶掺假情况, 主要掺假成分包括猪皮胶、牛皮胶、马皮胶等。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

马血清、驴血清来自山东出入境检验检疫局; 骆驼肉、猪肉、牛肉、貂肉、狗肉、鸡肉、鹿茸、猫肉、豹子肉、鼠肉、兔肉、鸭肉、羊肉、鱼肉、大豆、大米、玉米、黄瓜、胡萝卜为本实验室收集样品。正品阿胶块、未知来源的阿胶样品 (1~6)。

1.1.2 试剂

DNeasy Mericon Food Kit (50) 试剂盒 (货号: 69514) 德国Qiagen公司; Wizard Magnetic DNA Purification System for Food试剂盒 (货号: FF3751) 美国Promega公司; Nucleospin Food试剂盒 (货号: 74094550) 德国MN公司; 十六烷基三甲基溴化铵 (cetyl trimethyl ammonium bromide, CTAB) 提取液 (54.9 mmol/L CTAB、1.4 mol/L NaCl、0.1 mol/L Tris-HCl、0.02 mol/L 乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA), pH 8.0)、CTAB沉淀液 (13.7 mmol/L CTAB、40 mmol/L NaCl)、无水乙醇、PCR预混液 (TaqMan

收稿日期: 2013-07-23

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863计划) 项目 (2011AA100807)

作者简介: 吴亚君 (1975—), 女, 副研究员, 博士, 研究方向为食品物种鉴定技术。E-mail: wuyajuncaiq@163.com

*通信作者: 陈颖 (1972—), 女, 研究员, 博士, 研究方向为食品物种鉴定技术。E-mail: chenyingcaiq@163.com

Gene Expression Master Mix, 货号: 4369016) 美国ABI公司; 蛋白酶K (20 mg/mL, 货号: P6556-100MG) 美国Sigma公司; DNA 1000 LabChip (货号: 5067-1504) 美国Agilent公司; 灭菌水。

1.1.3 仪器与设备

Reriti 96Well Thermal Cycler PCR仪、7500 Real Time PCR System实时荧光PCR仪 美国ABI公司; 2100 Bioanalyzer毛细管芯片电泳仪 美国Agilent公司。

1.2 方法

1.2.1 DNA提取

血清、肌肉、植物样品采用CTAB法^[10-11]: 取1 g样品粉末到50 mL离心管中, 加入5 mL CTAB提取缓冲液和20 μ L蛋白酶K, 涡旋混匀65 $^{\circ}$ C孵育过夜, 将样品管12 000 \times g离心10 min。吸取1 mL上清液到新的2 mL离心管中, 加入700 μ L三氯甲烷振荡混匀, 14 500 \times g离心10 min, 吸取600 μ L上清到新的2 mL离心管中, 加入1 200 μ L CTAB沉淀缓冲液, 混匀室温孵育60 min, 14 500 \times g离心10 min弃去水相, 加入350 μ L 1.2 mol/L NaCl溶液溶解沉淀, 加入350 μ L三氯甲烷振荡混匀, 14 500 \times g离心10 min, 吸取200 μ L上清液到新的1.5 mL离心管中, 加入160 μ L 异丙醇混匀后室温孵育20 min, 14 500 \times g离心10 min, 弃去水相, 加入500 μ L 70%乙醇混合冲洗沉淀, 14 500 \times g离心10 min, 弃去水相室温晾干, 加入100 μ L 0.1 \times TE缓冲液65 $^{\circ}$ C、10 min溶解DNA。

阿胶样品采用试剂盒法, 起始样品量200 mg, DNA溶于100 μ L无菌双蒸水。

1.2.2 常规PCR

PCR反应体系: DNA模板5 μ L; 10 \times PCR反应缓冲液2.5 μ L; dNTPs 2.0 μ L; 上下游引物 (10 pmol/L) 各0.5 μ L; *Taq*酶1 U, 用无菌水补至总体积为25 μ L。

PCR扩增程序: 94 $^{\circ}$ C预变性5 min; 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 60 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸1 min, 35个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸5 min。

1.2.3 毛细管芯片电泳

电泳操作按照DNA 1000 LabChip 试剂盒所提供的说明进行。凝胶-染料混合物的准备: 将试剂盒中DNA Dye Concentrate及DNA Gel Matrix试剂室温放置30 min, 涡旋振荡DNA Dye Concentrate试剂, 取25 μ L DNA Dye Concentrate至DNA Gel Matrix试剂中, 混匀充分后, 用离心过滤器过滤 (1 500 \times g、10 min)。将凝胶-染料混合物注入分离芯片中, 将5 μ L Marker加入各个样品孔中。取上述PCR产物各1 μ L分别加入12个样品孔中, 将1 μ L Ladder加入指定的Ladder孔中, 最后将芯片涡旋混匀后放入毛细管芯片电泳仪中进行自动检测分析。

1.2.4 实时荧光PCR^[6,12-13]

25 μ L PCR体系: 12.5 μ L Master Mix、6.0 μ L

ddH₂O、0.5 μ L 10 μ mol/L引物、0.5 μ L 10 μ mol/L探针、5 μ L模板, 引物探针序列见表1。

PCR程序: 50 $^{\circ}$ C去除RNA 2 min, 95 $^{\circ}$ C预变性10 min, 95 $^{\circ}$ C变性15 s, 60 $^{\circ}$ C退火1 min, 50个循环。

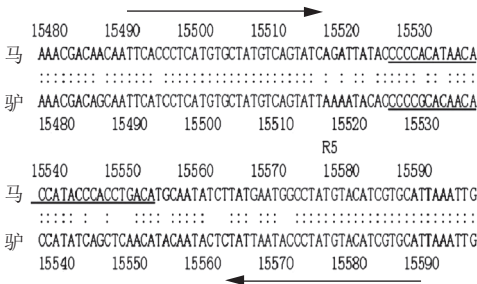
表1 检测用引物和探针

名称	序列	目的基因
马正链引物	5'CACCCTCATGTGCTATGTCAGTA3'	线粒体基因 tRNA-Thr及 D-loop区
马反链引物	5' GCACGATGTACATAGGCCATTC3'	
马探针	5'- (FAM) - TGTCAAGTGGGTATGGTGTATGTGGGG- (TAMRA) -3'	
驴正链引物	5'CATCCTCATGTGCTATGTCAGTA3'	
驴反链引物	5'GCACGATGTACATAGGGTATTA3'	
驴探针	5'- (FAM) - TGTGAGCTGATATGGTGTGTCGGGG- (TAMRA) -3'	

注: 猪、牛、哺乳动物成分检测引物探针参考相关标准。

2 结果与分析

对马和驴线粒体基因组进行序列比对后挑选的靶序列 (NC_001788.1、KC203030.1), 为tRNA-thr和D-loop区, 见图1。马和驴的探针长度为28个碱基, 其中8个为差异碱基。正向引物23个碱基, 其中在5'端有1个差异碱基, 反向引物22个碱基, 靠近3'端有3个差异碱基。

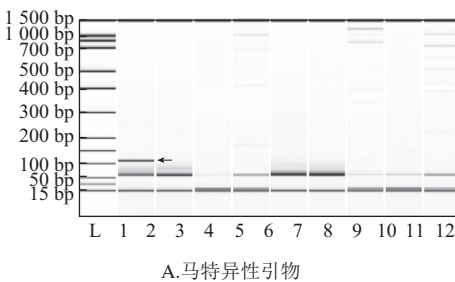


箭头指示正向和反向引物区域, 下划线指示探针区域。

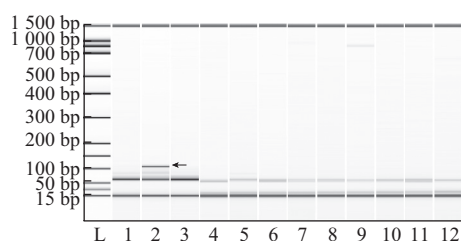
图1 马和驴线粒体靶序列比对结果

Fig.1 Sequence alignment of mitochondrial target genes for horse and donkey

采用常规PCR法对马和驴等11种动物基因组的扩增结果见图2。两对引物对的PCR产物长度108 bp, 与电泳结果一致。马特异性引物仅对马DNA有扩增, 驴特异性引物仅对驴DNA有扩增, 说明两对引物特异性良好。



A. 马特异性引物



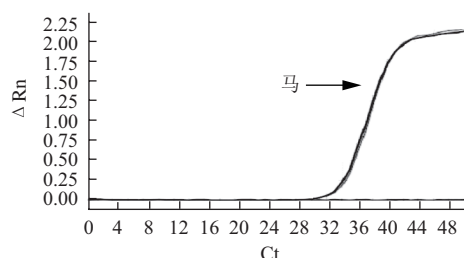
B. 驴特异性引物

L. DNA分子质量Marker (25~1 500 bp); 1~12分别为马、驴、牛、羊、猪、鸡、鸭、鱼、狗、兔、鼠、空白。箭头指示目标条带。

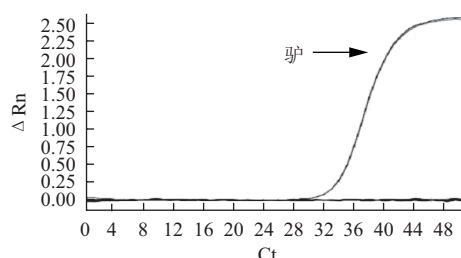
图2 马(A)和驴(B)特异性引物常规PCR产物毛细管芯片电泳结果

Fig.2 Microchip capillary electrophoresis by using horse and donkey specific primers for routine PCR amplification

增加探针后马和驴特异性体系的扩增结果见图3。实验对象包括马和驴等16种动物以及5种植物。其中马特异性体系仅对马DNA样本有扩增, 驴特异性体系仅对驴DNA样本有扩增, 扩增曲线呈典型S型, 所有样本3次平行实验重复良好。说明设计的马和驴特异性实时荧光PCR体系特异性良好。



A. 马特异性体系



B. 驴特异性体系

以箭头分别指示马血清和驴血清样品, 其他样品与空白基线重合。

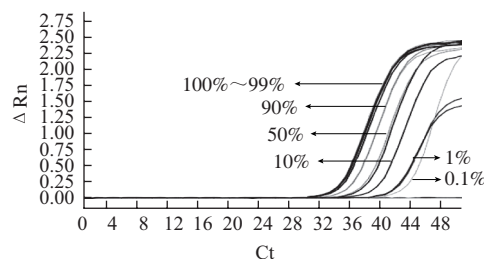
图3 马和驴实时荧光PCR特异性结果

Fig.3 Specificity for horse and donkey ingredients by real-time PCR

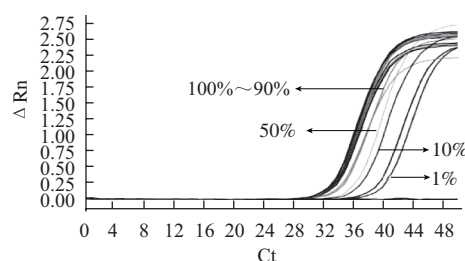
将马和驴DNA质量浓度分别调整至0.1 ng/μL后, 按比例混合, 使马和驴的体积百分比分别为100%、90%、50%、10%、1%、0.1%。混合DNA的实时荧光PCR结果见图4, 马特异性体系的相对灵敏度达到0.1%, 即500 pg模板DNA中检测到0.5 pg马DNA。驴特异性体系的相对灵敏度达到1%, 即500 pg模板DNA中检测到5 pg驴DNA。

为了了解不同DNA提取方法对阿胶的适用性, 分别采用DNeasy Mericon Food Kit (50) 试剂盒、Wizard

Magnetic DNA Purification System for Food试剂盒、Nucleospin Food试剂盒, 以及CTAB法对阿胶进行DNA提取, 每份DNA重复扩增8次, 上述方法的扩增率分别为4/8、2/8、8/8和1/8(结果未示), Nucleospin Food的扩增率明显高于其他方法, 适合阿胶样品的检测。



A. 马特异性体系



B. 驴特异性体系

箭头指示混合样品中马或驴的比例, 其中马特异性体系中的百分比表示DNA混样中马源性DNA的比例, 驴特异性体系表示驴源性DNA的比例。

图4 马和驴特异性体系相对灵敏度

Fig.4 Relative response of horse and donkey specific systems

采用建立的实时荧光PCR体系对正品阿胶及某公司送检的6批阿胶样品的检测, 结果见表2。正品阿胶样品只检出驴成分, 未知来源的6个阿胶样品存在不同程度的掺杂情况, 其中4个样品未检出驴成分。

表2 未知来源阿胶样品检测结果

Table 2 Results obtained by real-time PCR for the detection of unknown donkey glue samples

样品	驴成分	马成分	猪成分	牛成分
正品阿胶	检出 (6/8)	未检出	未检出	未检出
1	未检出	检出 (5/8)	未检出	/
2	未检出	未检出	检出 (1/8)	检出 (5/8)
3	检出 (8/8)	检出 (2/8)	检出 (1/8)	/
4	检出 (8/8)	检出 (2/8)	未检出	/
5	未检出	检出 (4/8)	检出 (5/8)	/
6	未检出	未检出	检出 (5/8)	检出 (1/8)

注: 平行样品中有1个阳性即判定为阳性结果, 其中5/8表示8个平行样品中5个样品为阳性结果, 其余类推。/ 未进行该项检测。

3 讨论与结论

阿胶的传统加工工艺很复杂, 包括晾皮、刮皮、泡皮、镑皮、化皮、打沫、浓缩、凝胶、切胶、晾

胶、擦胶^[1-15]。对阿胶进一步加工成口服液和颗粒冲剂的过程中需要进一步酶解、纯化、干燥等,因此从新鲜的动物皮张到最终的产品需要经过高强度的加工,对DNA的破坏尤为严重。硅胶膜类试剂盒经过许多研究者的验证^[16-17],在深加工食品核酸的提取方面性能很好。其核心是硅树脂,通常为亲水、多孔的硅胶珠,硅胶珠表面包被碱性基团,在酸性条件下可以产生高密度的正电荷,使DNA骨架上带负电荷的磷酸基团高特异性地结合在硅胶珠上,获得的核酸纯度很高,对碎片核酸的富集也很有效,这对于成分复杂的加工食品样品尤为有利。本实验对不同来源阿胶块样品的成功检测说明该类试剂盒的适用性。

此外,由于食品加工过程中高温高压对DNA造成很大破坏,因此检测体系通常选择高拷贝的短序列作为目标物。动物成分检测中线粒体是优先选择的对象,因为拷贝数多(1 000~2 000个/细胞,每个线粒体基因组数百个拷贝),进化适中(能很好地反映物种特征)^[18]。由于马和驴物种非常相近,对其线粒体序列的比对结果显示两者相似度92.4%,因此采用了线粒体全序列比对,寻找适合引物探针设计的差异集中区域的方式,找到了覆盖tRNA-Thr和D-loop区的一段序列,成功设计了满足要求的马特异性引物探针体系和驴特异性引物探针体系。

近年在食品真伪和质量评价领域有许多新型的技术得到应用。瞿海斌等^[3]采用近红外光谱技术对阿胶真品和伪品进行快速区分。近红外等快速无损技术最大的优点是快速和无损,但是由于真品和伪品之间往往缺乏特征性指标,容易对未知样品造成误判,而且加工工艺、原料来源、样品颗粒均一性等也可能影响样品数据,造成聚类的偏差。而且很多伪品在熬制过程中会加入少量阿胶,将对光谱数据造成干扰。DNA检测技术对食品原料物种来源的判别具有唯一性、不受加工和混杂影响等特点,能够准确判定食品真伪。

阿胶作为我国“中药三宝”之一,在我国保健食品市场占据重要地位^[19]。近年来阿胶也开始进入国外市场^[20],例如2006年9月26日首次获准加拿大卫生部的中药产品药品生产质量管理规范证书注册,进入了加拿大的药品市场。在阿胶的质量监管中,对原料的控制尤为重要,虽然目前对阿胶的药理仍在研究中,但上千年的实践已证实驴皮作为阿胶原料所具有的独特效果,同时出于消费者知情权和利益的保护,也应当保证阿胶原料的真实性。对送检样品的检测发现普遍存在的掺杂甚至假冒现象,说明对阿胶原料监管十分必要和紧迫。

本实验针对线粒体tRNA-Thr和D-loop区序列,建立了阿胶中马和驴成分的实时荧光PCR检测方法,此法特异性高、灵敏度高,能准确检测阿胶中的马和驴成分,为市售商品的监管及食品化妆品药品生产企业的原料质控提供快速准确的技术手段。

参考文献:

- [1] 朱建梅. 浅谈阿胶的现代应用[J]. 内蒙古中医药, 2013, 32(5): 50-51.
- [2] 郭健, 孙佳明, 张志颖, 等. 阿胶化学成分及药理作用研究进展[J]. 吉林中医药, 2013, 33(4): 17-73.
- [3] 瞿海斌, 杨海雷, 程翼宇. 近红外漫反射光谱法快速无损鉴别阿胶真伪[J]. 光谱学与光谱分析, 2006, 26(1): 60-62.
- [4] 陈颖, 吴亚君. 基因检测技术在食品物种鉴定中的应用[J]. 色谱, 2011, 29(7): 594-600.
- [5] HIRD H, LLOYD J, GOODIER R, et al. Detection of peanut using real-time polymerase chain reaction[J]. European Food Research and Technology, 2003, 217(3): 265-268.
- [6] SN/T 2557—2011 畜肉食品中牛成分含量检测方法: 荧光定量PCR方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [7] LI Hongwei, XU Haiyue, ZHAO Chunjiang, et al. A PCR amplification method without DNA extraction[J]. Electrophoresis, 2011, 32(3/4): 394-397.
- [8] DEMMEL A, HUPFER C, ILG HAMPE E, et al. Development of a real-time PCR for the detection of lupine DNA (*Lupinus* species) in foods[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(12): 4328-4332.
- [9] GB/T 25165—2010 明胶中牛羊猪源性成分检测方法: 实时荧光PCR法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [10] 刘欣, 祝长青, 王毅谦, 等. 大豆转基因检测中DNA提取方法的比较研究[J]. 食品科学, 2013, 34(4): 199-203.
- [11] 马晓婷, 刘芳, 陈亚丽, 等. 从不同材料中提取马DNA方法的比较研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(26): 12787-12788.
- [12] 敖金霞, 高学军, 仇有文, 等. 实时荧光定量PCR技术在转基因检测中的应用[J]. 东北农业大学学报, 2009, 40(6): 141-144.
- [13] 陈旭, 齐凤坤, 康立功, 等. 实时荧光定量PCR技术研究进展及其应用[J]. 东北农业大学学报, 2010(8): 148-155.
- [14] 赵兴波, 李宁, 吴常信. 动物线粒体核质基因互作研究进展[J]. 遗传, 2001, 23(1): 81-85.
- [15] 崔金玉. 阿胶炮制工艺及质量控制研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2008.
- [16] 李克新. 传统“阿胶”走向世界[J]. 企业文化, 2007(6): 77-78.
- [17] MAFRA I, SILVA S A, MOREIRA E J M O, et al. Comparative study of DNA extraction methods for soybean derived food products[J]. Food Control, 2008, 19(12): 1183-1190.
- [18] WU Yajun, CHEN Ying, WANG Bin, et al. Application of SYBRgreen PCR and 2DGE methods to authenticate edible bird's nest food[J]. Food Research International, 2010, 43(8): 2020-2026.
- [19] 佟艳霞. 浅议中药阿胶的临床应用及药理作用[J]. 中国卫生产业, 2013, 10(3): 178-178.
- [20] 吴长虹, 王若光. 阿胶的历史沿革, 研究现状及相关思考[J]. 湖南中医药大学学报, 2009, 28(6): 77-79.