

聚合酶链式反应快速检测畜肉食品中鸭源性成分

史艳宇¹, 刘金华², 王莹¹, 邴炜¹, 华蕾¹, 刘晓晖¹, 王颖¹, 周亮¹, 王潇¹
(1.吉林省产品质量监督检验院, 吉林 长春 130022; 2.吉林出入境检验检疫局, 吉林 长春 130062)

摘要:目的: 建立一种快速、特异、灵敏的鸭源性成分检测方法。方法: 以鸭细胞色素C氧化酶III (COIII) 基因序列为靶位点设计引物, 进行聚合酶链式反应扩增, 建立鸭源性成分检测方法; 以常见畜禽肉, 包括羊肉、牛肉、鸡肉、鹅肉、猪肉、兔肉、马肉、鹿肉等参考动物物种进行特异性检测; 以50 mg/kg羊肉DNA作为稀释液, 对鸭肉DNA进行梯度稀释, 检测灵敏度。结果: 该方法能够有效的对鸭源性成分进行快速检测, 具有较强的特异性, 灵敏度较高 (0.1 µg/kg), 且羊肉成分的存在对鸭肉灵敏度检测没有影响, 可以快速、准确检测畜肉食品中掺杂的鸭源性成分。

关键词: 鸭源性成分; 细胞色素C氧化酶III基因; 聚合酶链式反应; 检测

A Polymerase Chain Reaction Method for Rapid Detection of Duck-Derived Materials in Meat Products

SHI Yan-yu¹, LIU Jin-hua², WANG Ying¹, BING Wei¹, HUA Lei¹, LIU Xiao-hui¹, WANG Ying¹, ZHOU Liang¹, WANG Xiao¹
(1. Jilin Product Quality Supervision Inspection, Changchun 130022, China;
2. Jilin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Changchun 130062, China)

Abstract: This report describes a rapid polymerase chain reaction (PCR) method to detect duck-derived DNA by using primers corresponding to the duck COIII gene. The method was duck specific, free from interference from lumb DNA (50 mg/kg). Its sensitivity was sufficient to detect as low as 0.1 µg/kg duck-derived materials. It can provide a rapid and accurate way to identify duck-derived materials adulteration in meat products without interference of mutton DNA.

Key words: duck-derived materials; cytochrome oxidase III (COIII) gene; polymerase chain reaction (PCR); detection

中图分类号: S853.74

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2014) 08-0163-03

doi:10.7506/spkx1002-6630-201410030

市售牛羊肉及肉制品中, 很多都掺杂鸭肉以冒充牛羊肉进行销售; 为弥补羊肉味不足, 有些不法商家甚至掺入羊肉粉、羊肉精膏等添加剂来粉饰其掺假行为。为了确定畜肉食品的真实性, 已经有很多动物源性成分鉴别的方法, 包括物理、化学、免疫学和分子生物学等方法, 其中尤以分子生物学方法中聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 最为快速且灵敏^[1-16], 其中相关标准也很多, 涵盖牛、羊、猪、狗、鸡、马、驴、鹿、兔、骆驼等动物种类^[17-22], 但尚无对鸭源性成分鉴别检测的相关标准, 满足不了检测需求。

研究中建立的畜肉食品中鸭源性成分鉴别检测方法, 采用主要选择鸭细胞色素C氧化酶III (COIII) DNA作为研究对象, 设计了PCR特异性引物, 建立了PCR技术鉴别检测鸭源性成分的方法, 适用于不同类型的样品检测, 操作简便, 准确可靠, 灵敏度高, 实用性强。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

家鸭 (雁形目鸭亚科河鸭属的绿头鸭^[23])、羊肉、牛肉、鸡肉、鹅肉、猪肉、兔肉、马肉、鹿肉均购于长春市地方市场; 冰冻羊肉卷、肉板、酱鸭脖、酱鸭肠等畜肉加工食品购于长春市超市。

AxyPrep™ DNA提取试剂盒 美国Axygen公司; Ex TaqDNA聚合酶、dNTP (各10 mmol/L)、10×缓冲液、6×Loading buffer、100 bp DNA Ladder Marker、PCR引物合成 宝生物工程 (大连) 有限公司。

1.2 仪器与设备

Microfuge 22R高速冷冻离心机 美国Beckman公司; IKA M20食物研磨器 德国IKA公司; Biometra T gradient-96PCR扩增仪 德国Biometra公司; BioSpecmini DNA/RNA/蛋白分析仪 日本岛津公司; SAVANT PS500A电泳仪 美国Axygen公司; EDAS290凝胶成像

收稿日期: 2013-07-10

基金项目: 国家质检总局科技计划项目 (2012QK169)

作者简介: 史艳宇 (1977—), 女, 高级工程师, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: shiyanyu219@163.com

系统 美国柯达公司; HH-S恒温水浴锅 上海博珍仪器设备制造厂。

1.3 方法

1.3.1 样品前处理

取500 mg固体样品加入50 mL离心管, 加入约2倍体积的双蒸水, 充分混匀, 12 000 r/min离心5 min并弃去上清液, 重复1次, 必要时用三氯甲烷清洗样品1次。酱汁等悬乳油或浊状的液体食品样品可以通过添加电解质(无机酸、碱、盐类)等物理方式破坏胶体稳定性再分离、浓缩。取500 mg样品加入2 mL离心管, 12 000 r/min离心5 min并弃去上清液, 再次加入500 mg样品, 12 000 r/min离心5 min并弃去上清液, 必要时用三氯甲烷清洗样品1次。

1.3.2 DNA提取

按试剂盒说明书提取DNA, 并用DNA分析仪检测其纯度及浓度。

十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyltrimethylammoniumbromide, CTAB)法提取DNA: 取200 mg研磨成粉状的样品于1.5 mL离心管中, 加入600 μ L CTAB、15 μ L蛋白酶K、65 $^{\circ}$ C温育30 min; 加入500 μ L酚-氯仿-异戊醇(25:24:1, V/V)混合液剧烈振荡, 12 000 r/min离心15 min; 吸取上清液加入等体积异丙醇, 剧烈振荡后12 000 r/min离心10 min, 弃上清液; 用70%乙醇洗涤2~3次, 弃上清液; 用200 μ L TE缓冲液溶解; 加等体积氯仿-异戊醇(24:1, V/V)重复上述步骤纯化DNA。用DNA分析仪检测其纯度及浓度。

1.3.3 引物设计

在GenBank中检索到的1个潜鸭族基因全序列(accession AF090337)、其绿头鸭的mtDNA部分序列(accession L22476、L16770、L22477)及家鸭线粒体COIII基因序列(accession DQ655706)。用Lasergene软件中的MegAlign对基因序列进行序列同源性比较分析, 根据基因序列中同源性较高部分用Primer Express 3.0设计引物。在GeneBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)中, 经BLAST软件对相似序列搜索后, 筛选出一套最优且与常见畜禽肉无交叉反应的引物。正向引物: 5'-CATCTATCCTGCTAGCCGCC-3', 反向引物: 5'-GGCTTGAGTGGAAGAATGCC-3', 扩增片段201 bp。

1.3.4 反应体系和反应条件

反应体系(共25 μ L): 10 \times Ex Taq Buffer (Mg^{2+} plus) 2.5 μ L, dNTP s Mixture (各10 mmol/L) 0.5 μ L, 上下游引物(10 μ mol/L)各1 μ L, Ex Taq (5 U/ μ L) 0.2 μ L, 模板DNA 2 μ L, 补水至25 μ L。

反应条件: 94 $^{\circ}$ C预变性5 min; 94 $^{\circ}$ C变性30s, 58 $^{\circ}$ C退火30s, 72 $^{\circ}$ C延伸30s, 共35个循环; 最后72 $^{\circ}$ C延伸10min。

1.3.5 特异性实验

分别用羊肉、牛肉、鸡肉、鹅肉、猪肉、兔肉、马肉、鹿肉等对引物进行特异性实验。

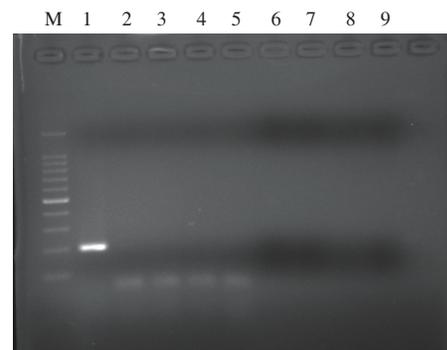
1.3.6 灵敏度实验

用羊肉DNA(50 mg/kg)溶液对鸭肉DNA进行10倍梯度稀释, 使羊肉DNA中分别含有100、10、1 mg/kg和100、10、1、0.1 μ g/kg的鸭肉DNA, 进行PCR扩增, 观察该方法灵敏度及羊肉成分的存在对鸭肉检测灵敏度的影响。

2 结果与分析

2.1 引物特异性

在优化好的PCR反应体系和反应条件下, 以羊肉、牛肉、鸡肉、鹅肉、猪肉、兔肉、马肉、鹿肉等DNA为特异性实验对照进行PCR检测。电泳结果显示, 仅有家鸭被扩增出条带, 而其他对照以及空白对照均未扩增出条带(图1)。

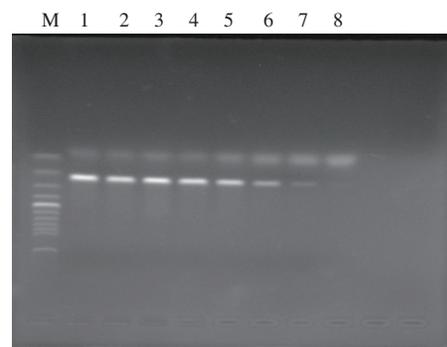


M.100 bp DNA Marker; 1.家鸭; 2.鸡; 3.鹅; 4.羊; 5.牛; 6.兔; 7.马; 8.鹿; 9.空白对照。

图1 PCR特异性检测结果

Fig.1 Specificity of the PCR method

2.2 灵敏度



M. 100 bp DNA Marker; 1. 100 mg/kg; 2. 10 mg/kg; 3. 1 mg/kg; 4. 100 μ g/kg; 5. 10 μ g/kg; 6. 1 μ g/kg; 7. 0.1 μ g/kg; 8. 阴性对照。

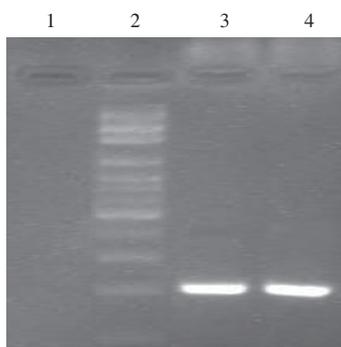
图2 PCR灵敏度检测结果

Fig.2 Sensitivity of the PCR method

对用羊肉DNA溶液稀释的各质量浓度鸭肉DNA进行PCR检测,结果显示,设计的引物对鸭肉的检测灵敏度可达到0.1 μg/kg。同时,高质量浓度羊肉DNA的存在并不影响鸭肉的检测灵敏度(图2)。

2.3 市售羊肉卷和肉板中鸭源性成分的检测

应用特异引物对2份市售的羊肉卷及肉板(经证明已掺入鸭肉)进行PCR检测,结果表明该方法能有效检测出试样中掺入的鸭源性成分(图3)。



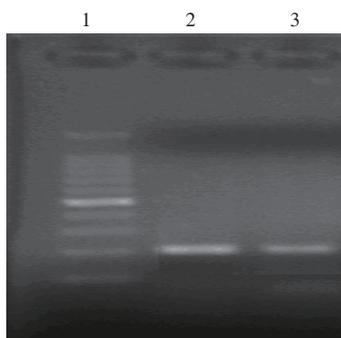
1.阴性对照; 2. 100 bp DNA Ladder Marker; 3.羊肉卷; 4.肉板。

图3 检测样品中的鸭源性成分

Fig.3 Qualitative detection of duck-derived materials in commercial meat products

2.4 市售加工肉制品中鸭源性成分的检测

加工肉制品由于需要经过高温处理或添加盐类等调料制品,这些处理方式对DNA的提取效果均有影响。应用特异性引物对市售的鸭脖、鸭肠制品进行PCR检测,结果表明样品通过洗涤方式去除样品中的盐、糖和色素后,经PCR扩增仍能够检测出鸭源性成分(图4)。



1. 100 bp DNA Ladder Marker; 2.鸭肠; 3.鸭脖。

图4 检测加工制品中的鸭源性成分

Fig.4 Qualitative detection of duck-derived materials in processed meat products

3 结论

本研究根据鸭COIII基因序列设计特异性引物,成功建立了鸭源性成分的PCR检测方法,填补了鸭源性成分检测方法及标准的空白。

在本研究中,对所设计引物进行特异性预测及实际检验,结果表明所用引物与常见畜禽物种间无同源性,引物具有较高的特异性。另外,采用50 mg/kg羊肉DNA溶液对鸭肉DNA进行稀释,结果表明高质量浓度羊肉DNA的存在不影响鸭肉检测的灵敏度(0.1 μg/kg),能够满足实际检测需要。另外,肉制品经加工等工序后,DNA会受到影响,特别是加热时DNA片段会变短,因此要求引物扩增的目的片段较短^[24-25]。本研究中设计的引物所扩增的目的片段为201 bp,适于加工的肉制品中鸭源性成分的检测。本研究中所采用方法可应用于肉制品掺假诊断、食品生产环节污染监控及食品监督部门检测等各个领域,为检测食品中掺假、造假提供技术支持,同时为食品安全工作顺利开展打下良好技术基础。

参考文献:

- [1] TARTAGLIA M, SAULLE E, PESTALOZZA S, et al. Detection of bovine mitochondrial DNA in ruminant feeds. A molecular approach to test for the presence of bovine-derived materials[J]. Journal of Food Protection, 1998, 61(5): 513-518.
- [2] HOPWOOD A J, FAIRBROTHER K S, LOCKLEY A K, et al. An actin gene-related polymerase chain reaction (PCR) test for identification of chicken in meat mixtures[J]. Meat Science, 1999, 53(4): 227-231.
- [3] 张慧霞, 张利平, 吴建平, 等. 鸭源性成分PCR检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2008, 38(4): 346-349.
- [4] 张慧霞, 吴建平, 宗卉, 等. 应用PCR技术检测禽类源性成分[J]. 中国畜牧杂志, 2008, 44(11): 46-48.
- [5] 汪燕玲, 宗卉, 阮周曦, 等. 鸭源性成分PCR检测方法的建立[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(24): 11432-11434.
- [6] 张慧霞, 宗卉, 吴建平, 等. 应用SYBR Green I 实时荧光PCR溶解曲线检测鸭源性成分[J]. 中国畜牧杂志, 2010, 46(17): 70-72.
- [7] 曹际娟, 卢行安, 秦成, 等. 实时荧光PCR技术检测肉骨粉中牛羊源性成分的方法[J]. 生物技术通讯, 2002, 13(2): 158-160.
- [8] 赵冉, 蔡振鸿, 陈永锋, 等. 动物产品及饲料中牛源和羊源性成分三重荧光PCR检测方法的建立[J]. 畜牧与兽医, 2012, 44(7): 18-22.
- [9] 于凤芹, 王金玲, 庞杰, 等. 实时荧光PCR法检测饲料中鸭源性成分[J]. 中国动物检疫, 2009, 26(5): 57-58.
- [10] 宗卉, 曾少灵, 林庆燕, 等. 饲料中马、驴源性成分分子生物学检测[J]. 中国草食动物, 2005, 25(5): 3-6.
- [11] 段宏安, 张睿, 李金华, 等. 食品及饲料中动物源性成分种类的鉴别方法[J]. 中国兽医杂志, 2002, 38(12): 42-44.
- [12] 杨宝华, 宗卉, 林庆燕, 等. 用分子生物学方法鉴别检测动物源性饲料中的牛羊源性成分[J]. 中国畜牧杂志, 2002, 38(1): 3-5.
- [13] BOTTERO M T, DALMASSO I A, NUCERA D, et al. Development of a PCR assay for the detection of animal tissue in ruminant feeds[J]. Journal Food Protection, 2003, 66(12): 2307-2312.
- [14] 张娟, 宗卉, 张利平, 等. PCR-mtDNA技术鉴别检测不同动物肌肉组织和饲料中鸭源性成分[J]. 生物工程学报, 2008, 24(10): 1832-1836.
- [15] 王静, 宗卉, 刘丑生, 等. 鹧鸪线粒体CO II、ATPase8和3个tRNA基因序列分析及物种鉴别研究[J]. 中国畜牧兽医, 2008, 35(4): 52-55.
- [16] 张驰, 邱皓璞, 张筠, 等. 荧光定量PCR检测肉制品中鸭源性成分[J]. 食品科学, 2013, 34(18): 154-157.
- [17] 国家质量监督检验检疫总局. SN/T 2557—2010 畜肉食品中牛成分定性检测方法: 实时荧光PCR法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [18] 国家质量监督检验检疫总局. GB/T 21101—2007 动物源性饲料中猪源性成分定性检测方法: PCR方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [19] 国家质量监督检验检疫总局. GB/T 21106—2007 动物源性饲料中鹿源性成分定性检测方法: PCR方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [20] 国家质量监督检验检疫总局. GB/T 21104—2007 动物源性饲料中反刍动物源性成分(牛、羊、鹿)定性检测方法: PCR方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [21] 国家质量监督检验检疫总局. GB/T 21105—2007 动物源性饲料中狗源性成分定性检测方法: PCR方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [22] 国家质量监督检验检疫总局. SN/T 2051—2008 食品、化妆品和饲料中牛羊猪源性成分检测方法: 实时PCR法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [23] 郑作新, 张荫荪, 唐詹珠, 等. 中国动物志: 鸟纲: 第二卷: 雁形目[M]. 北京: 科学出版社, 1979: 73-74.
- [24] EBBEHOJ E F, THOMSEN P D. Species differentiation of heated meat products by DNA hybridization[J]. Meat Science, 1990, 30(3): 221-234.
- [25] EBBEHOJ E F, THOMSEN P D. Differentiation of closely related species by DNA hybridization[J]. Meat Science, 1991, 30(4): 359-366.