

环介导恒温扩增法鉴定牛羊肉中的掺杂肉

侯东军,杨红菊,于雷,李颖,王海,姜艳彬*

(中国动物疫病预防控制中心,北京 100125)

摘要:建立了一个鉴定牛羊肉中掺杂动物肉的环介导恒温扩增检测方法。确定了一套可在牛羊肉中特异并灵敏地检测出掺杂肉成分的引物对,以动物细胞色素b基因组为模板可在恒温63℃恒温特异性扩增出猪等基因片段而无其他扩增片段影响。可检测牛肉中0.01%~2%的猪肉成分。经与PCR方法比对,结果表明,该方法可有效用于实际生鲜肉或加工肉制品样本的鉴定。

关键词:环介导恒温扩增,真实性,鉴定

Meat species authenticity identification by loop-mediated isothermal amplification assay in beef and mutton

HOU Dong-jun, YANG Hong-ju, YU Lei, LI Ying, WANG Hai, JIANG Yan-bin*

(China Animal Disease Control Center, Beijing 100125, China)

Abstract: A loop-mediated isothermal amplification (Lamp) method was developed for meat ingredients authenticity identification in beef and mutton. A set of universal primer used for Lamp at 63℃ was chosen to differentiate animal gene encoding cytochrome b with high sensitivity. 0.01%~2% pork could be detected in beef and mutton by the method. Besides, the method could be used to detect animal meats processed or unprocessed.

Key words: LAMP; authenticity; detection

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)22-0060-03

在国内及国际贸易中牛、羊肉中掺杂价格便宜的猪肉,以次充好的欺骗行为屡见不鲜,在清真肉品种掺猪肉以代替牛羊肉更是严重冒犯了广大具有伊斯兰教信仰的消费者,影响民族团结,这些掺假行为极大损害了消费者的利益。20世纪80年代,国外开始对肉的种属鉴定进行研究,采用的方法主要有DNA杂交、免疫扩散和等电点聚焦等。这些方法大都存在着成本高,工作量大,检测对象要求高等缺点^[1-2]。目前,针对掺假行为的检测研究主要基于核酸扩增的PCR方法,检测速度快,灵敏和特异性强,但需要PCR仪才能扩增,这就限制了该技术在条件有限的实验室的应用和推广^[3-4]。环介导恒温扩增技术是一种相对于PCR技术较新的核酸扩增技术,特异性、灵敏度都较高,同时可进行恒温扩增反应,对设备要求低,有时仅用恒温水浴锅就可以完成检测。线粒体中细胞色素b基因高度保守,被广泛应用于动物成分鉴别的引物设计,本研究根据猪、牛等动物细胞色素b的DNA序列设计并最后确定了引物,建立了环介导恒温扩增方法鉴定牛羊肉中掺杂肉的方法,探索了该方法在掺假鉴别行为中的可能性。研究中采用了市场上新出现的等温扩增荧光检测系统,便于更直观的反应扩增反应情况,该系统利用荧光染料不同于另外的浊度法恒温扩增系统。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

猪肉、牛肉、鸡肉、鲤鱼等动物肉样品 购自北京市各大超市;蛋白酶K、RNA酶、dNTP、10×PCR缓冲液(含Mg²⁺)、TaqDNA聚合酶、50bp ladder DNA marker等 均购自北京天根生化科技有限公司;Lamp恒温扩增DNA试剂盒、Lamp恒温扩增荧光检测试剂盒 日本荣研;等温扩增mastermix 英国OPTIGENE。

PCR扩增仪、凝胶成像仪、电泳系统 BIO-RAD;台式离心机 Sigma;等温扩增荧光检测系统 英国OPTIGENE。

1.2 LAMP引物的设计与合成

从GenBank中下载猪、牛、羊、鸡、鱼的细胞色素b DNA序列,然后利用BLAST和CLUSTAL W程序进行序列比对确定特异保守序列,运行引物设计软件Primer Explorer version 3.0 (http://primerexplorer.jp/e/v3_manual/index.html)设计引物序列,用高压灭菌后的超纯水溶解,配制成100μmol/L的储备液。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3 DNA模板的提取

总DNA提取步骤如下:1.5mL离心管中加入约50mg样品,加200μL TE溶(pH8.0),旋涡混匀,加入400μL裂解液,旋涡混匀;加600μL酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),剧烈振荡,12000×g离心10min;取上清液,加入等体积氯仿:异戊醇(24:1),剧烈振荡,12000×g离心10min;取上清液,加入等体积氯仿,剧烈振荡,

收稿日期:2012-06-12 * 通讯联系人

作者简介:侯东军(1975-),男,硕士,研究方向:动物产品质量安全。

表1 Lamp引物信息

Table 1 Primer sequences of Lamp

引物名称	位置(5'→3')	长度(bp)	Tm值(°C)	GC含量(%)	序列(5'→3')
F3	141-159	19	55.17	0.42	AGGCCTGTTCTTAGCAATA
B3	335-355	21	55.79	0.43	GGACTACTCCAATGTTTCATG
FIP		41			ACTCATCCGTAATTTACGTCTCG-TCAGACACAACAACAGCT
BIP		41			CATGCAAACGGAGCATCCAT-ATAGGATCCGTAGTATAGACC

12000×g离心10min;取上清液,加0.8倍体积异丙醇,12000×g离心10min;取沉淀,70%乙醇清洗1次,室温或50℃,20min晾干;加80μL TE (pH8.0)溶解。也可用等效动物基因组提取试剂盒提取基因组DNA。

1.4 Lamp反应

配制25μL Lamp反应体系,其中各成分含量为:反应缓冲液15μL,引物4μL(40pmol引物FIP,40pmol引物BIP,5pmol引物B3,5pmol引物F3),5μL动物基因组DNA,1μL无菌超纯水,1μL Bst聚合酶,1μL荧光试剂,混匀快速离心,63℃恒温扩增50min。用等温扩增荧光检测系统观察反应并记录结果。

1.5 特异性实验

分别提取猪肉、鸡肉、鲤鱼肉、牛肉、山羊肉、绵羊肉中总DNA后,用所设计引物对上述各种DNA成分分别进行Lamp反应,比较引物特异性,从而选择特异性引物。

1.6 灵敏度实验

用研钵研磨制备猪肉、牛肉掺杂样本,分别制备2%、0.5%、0.2%、0.1%、0.05%、0.01%的猪肉的牛肉粉,按照上述方法提取DNA后进行Lamp反应并检测。

1.7 实际样品检测

对从北京各大超市购买销售量较大的加工肉制品分别提取DNA进行Lamp反应,同时与PCR方法^[5-6]进行比对。

2 结果与分析

2.1 特异性实验

用所设计引物对猪肉、鸡肉、鲤鱼肉、牛肉、山羊肉、绵羊肉DNA成分分别进行Lamp反应,比较引物特异性,从而确定一套特异性引物,引物信息见表1。用该引物对这几种动物成分进行Lamp反应,溶解曲线见图1,该引物对鸡肉、鲤鱼肉和猪肉成分均可产生溶解曲线,可扩增出鸡肉、鲤鱼肉和猪肉成分,不能扩增牛肉成分、绵羊成分和山羊成分,说明该引物可用

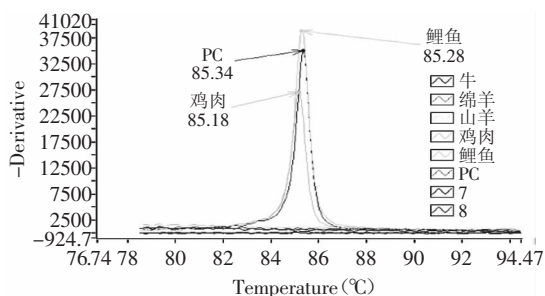


图1 引物特异性溶解曲线

Fig.1 Primer specificity melted curve

注:其中PC表示猪肉,7和8为空白;其他分别为牛肉、绵羊肉、山羊肉、鸡肉和鲤鱼肉,已在图上标注。

于牛、羊肉中鸡肉、鲤鱼肉和猪肉成分的掺杂鉴定。

2.2 灵敏度实验

分别提取含有2%、0.5%、0.2%、0.1%、0.05%、0.01%的猪肉粉的牛肉粉中动物基因组DNA,然后分别进行扩增,Lamp扩增曲线如图2所示,可见随着浓度的降低该扩增曲线同DNA浓度梯度成一定的线性关系,但是随着猪肉成分含量的降低,扩增时间也逐渐增长,当牛肉粉中猪肉粉含量降至0.05%时,扩增时间增长至40min,0.01%时,也有明显的扩增曲线。G1样本无相应扩增曲线,经查实是由于实验失误未加入相应DNA而未发生扩增。

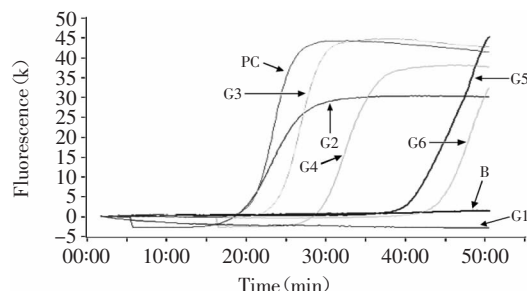


图2 不同浓度猪肉成分扩增曲线

Fig.2 Amplification curve of different pork content

注:G1~G6分别表示2%、0.5%、0.2%、0.1%、0.05%、0.01%的猪肉DNA;B为空白对照,PC为阳性对照。

2.3 实际样本鉴定结果

从超市购买销售比例较大并标明肉类成分的几种肉制品用上述方法提取DNA并进行检测,每个样品都做了一个平行样,并同时用PCR方法进行比对,8个样品的检测结果两种方法一致率100%。结果表明该方法可以用于肉及肉制品中鸡肉、鱼肉、猪肉的掺假鉴别。

表2 市场样本检测比对

Table 2 Detection of samples from market by Lamp and PCR

样本	Lamp	PCR	样本	Lamp	PCR
鸡肉肠	+	C+	鱼罐头	+	F+
盐水方腿1	+	P+	新鲜鸡肉	+	C+
盐水方腿2	+	P+	空白对照	-	-
火腿肠	+	P+	新鲜猪肉(阳性对照)	+	P+

注:“C+”表示扩增出鸡肉成分;“P+”表示扩增出猪肉成分;“F+”表示扩增出鱼成分;“-”表示未扩增出目标条带;“+”表示有阳性扩增。

3 讨论

环介导恒温扩增技术是一种近年来被广泛应用于鉴定病原菌、病毒、寄生虫、真菌以及转基因生物等,与核酸扩增有关的恒温扩增技术。该技术使用4~6个引物,可针对靶标基因的6个不同的区域。扩增温

度可选择60~65℃范围内的某个适宜温度进行恒温扩增,因此,可利用恒温水浴锅进行检测反应,是一种可应用于检测条件有限的国家或区域的技术平台。另外,该技术相对于PCR技术反应速度更快,灵敏度和特异性都很好^[7-9]。肉及肉制品的真实性鉴别可通过基于核酸扩增的PCR技术进行鉴别,因此应该也可以利用环介导恒温扩增技术进行鉴别。本研究针对几种主要肉成分的细胞色素b基因设计了环介导恒温扩增引物,结果发现该反应不扩增牛或羊成分,可扩增猪、鸡、鱼成分,因此可用于鉴别牛或羊成分中猪、鸡、鱼成分的掺假鉴别。溶解曲线中温度小数点后的误差是由于测量导致。本方法可检测牛肉粉中最低0.01%的猪肉粉,说明其灵敏度可满足实际需要。研究中选用了一种含有某种特定荧光染料的环介导恒温扩增试剂盒,并且所利用的便携式等温扩增仪器具有溶解曲线功能和扩增曲线功能,分别用于鉴别引物的特异性和靶基因的扩增情况,便于观察反应规律和分析。日本荣研公司生产的恒温扩增DNA试剂盒基于浊度法原理,可通过在Lamp反应中添加钙黄绿素染料达到在紫外灯下直接观察反应结果的目的,按照该试剂盒的使用说明,我们使用本方法中引物对在恒温水浴63℃下反应50min,在紫外灯下可观察到反应结果。目前,应用环介导恒温扩增技术进行肉的真实鉴别除Minhaz Uddin Ahmed等^[10]有用该技术结合电化学DNA传感器进行肉的鉴别外,没有其他的报道。本研究目前仅对实验室易获取的鸡、猪肉等几种动物成分进行了测试研究,下一步准备扩大样本范围,进一步研究该方法的适用范围。

参考文献

- [1] Andrews C D, Berger R G, Mageau R P, et al. Detection of the beef, sheep, deer and horse meat in cooked meat products by enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Journal of AOAC International, 1992, 75: 572-576.
- [2] Cota-Rivas M, Vallejo-Cordoba B V. Capillary electrophoresis for meat species differentiation [J]. Journal of Capillary Electrophoresis, 1997, 4(4): 195-199.
- [3] Kesmen Z, Sahin F, Yetim H. PCR assay for the identification of animal species in cooked sausages[J]. Meat Science, 2007, 77(4): 649-653.
- [4] Zhang C L, Mark R F, Nigel W S, et al. A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses[J]. Food Control, 2007, 18(9): 1149-1158.
- [5] Benedetto A, Abete M C, Squadrone S. Towards a quantitative application of real-time PCR technique for fish DNA detection in feedstuffs[J]. Food Chemistry, 2011, 126(3): 1436-1442.
- [6] Luo J Q, Wang J Q, Bu D P, et al. Development and Application of a PCR Approach for Detection of Bovis, Sheep, Pig, and Chicken Derived Materials in Feedstuff[J]. Agricultural Sciences in China, 2008, 7(10): 1260-1266.
- [7] Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers [J]. Mol Cell Probes, 2002, 16(3): 223-229.
- [8] Nagamine K, Watanabe K, Ohtsuka K, et al. Loop-mediated isothermal amplification reaction using a nondenatured template [J]. Clin Chem, 2001, 47: 1742-1743.
- [9] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): E63.
- [10] Ahmed M U, Hasan Q, Mosharraf Hossain M, et al. Meat species identification based on the loop-mediated isothermal amplification and electrochemical DNA sensor[J]. Food Control, 2010, 5(21): 593-790.
- [11] Andrews C D, Berger R G, Mageau R P, et al. Detection of the beef, sheep, deer and horse meat in cooked meat products by and BCM to four freshwater organisms[J]. Bull Environ Contam Toxicol, 16: 214-218.
- [12] Traina M E, Fazzi P, Macri C, et al. In vivo studies on possible adverse effects on reproduction of the fungicide methyl thiophanate[J]. Appl Toxicol, 18: 241-248.
- [13] Ogata A, Ando H, Kubo Y, et al. Teratogenicity of thiabendazole in ICR mice[J]. Food Chem Toxicol, 1984, 22: 509-520.
- [14] Mizutani T, Ito K, Nomura H, et al. Nephrotoxicity of thiabendazole in mice depleted of glutathione by treatment with DL-buthionine sulfoximine[J]. Food Chem Toxicol, 1990, 28: 169-177.
- [15] 陈兴权, 赵天生. 2-氨基苯并咪唑的合成[J]. 精细石油化工, 2004(1): 45-46.
- [16] 饶钦雄, 曲明清, 赵晓燕, 等. HPLC法测定常见蔬菜水果中多菌灵、噻菌灵和苯菌灵残留量[J]. 上海农业学报, 2009, 25(4): 85-88.
- [17] 陈莹, 丛佩华, 聂继云, 等. 分散固相萃取-高效液相色谱法测定水果中多菌灵和噻菌灵[J]. 果树学报, 2008, 25(5): 769-773.
- [18] 李海飞, 李静, 徐国锋, 等. 高效液相色谱快速测定水果中的3种苯并咪唑类杀菌剂[J]. 现代农业科技, 2009(1): 114-116.
- [19] 刘晓松, 童张法, 郑玲, 等. 固相萃取-高效液相色谱法同时测定噻菌灵和多菌灵在浓缩菠萝汁中的残留量[J]. 分析科学学报, 2007, 23(3): 311-314.
- [20] Kaushik Banerjee, Dasharathp Oulkar, Shubhangib Patil, et al. ADSULE multiresidue determination and uncertainty analysis of 87 pesticides in mango by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Agric Food Chem, 2009, 57: 4068-4078.
- [21] Cristina Blasco, Guillermina Font, Jordi Manes, et al. Solid-Phase microextraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry to determine postharvest fungicides in fruits [J]. Anal Chem, 2003, 75: 3606-3615.
- [22] Christer Jansson, Tuija Pihlström, Bengt-Göran Österdahl, et al. A new multi-residue method for analysis of pesticide residues in fruit and vegetables using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection[J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1023: 93-104.

(上接第59页)