

基于毛细管凝胶电泳与DNA条形码技术鉴别可食用动物内脏掺假方法的研究

励炯, 吴琼, 江海, 扈明洁, 金朦娜, 闫金花

Identification of Adulterated Animal-derived Ingredients in Edible Animal Viscera Based on Capillary Gel Electrophoresis and DNA Barcoding Techniques

LI Jiong, WU Qiong, JIANG Hai, HU Mingjie, JIN Mengna, and YAN Jinhua

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022090211>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

基于COI序列的DNA微条形码技术鉴别熟肉制品中11种肉掺假的研究

Identification of 11 Adulterated Meat Species in Cooked Meat Products Using DNA Mini-barcoding Methods Based on Cytochrome C Oxidase Subunit I Sequence(COI)

食品工业科技. 2021, 42(2): 99-104 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020040288>

基于DNA条形码技术的海参物种鉴定

Species Identification of Sea Cucumber Products Based on DNA Barcoding

食品工业科技. 2019, 40(10): 145-151,157 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.10.024>

皱纹盘鲍腹足及内脏抗氧化活性研究

Study on Antioxidant Activity of Gastropod and Viscera of Haliotis Discus Hanai

食品工业科技. 2019, 40(19): 280-285 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.19.048>

金鲷鱼内脏酸性蛋白酶的分离纯化及酶学性质研究

Isolation, purification and enzymatic characterization of acid protease from golden pompano viscera

食品工业科技. 2017(02): 210-214 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.02.032>

响应面法优化虎斑乌贼内脏多糖提取工艺及抗氧化活性、吸湿保湿性能研究

Study on extraction optimization of the polysaccharides from *Sepia pharaonis* viscera and its antioxidant activities, moisture-absorption and moisture-retention properties

食品工业科技. 2018, 39(10): 182-189 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.10.034>

金鲷鱼内脏脂肪酶的初步纯化及鱼皮酶法脱脂的工艺优化

Partial purification of lipase from golden pompano viscera and optimization of enzymatic degreasing of tilapia skin

食品工业科技. 2017(20): 98-104 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.20.018>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

励炯, 吴琼, 江海, 等. 基于毛细管凝胶电泳与 DNA 条形码技术鉴别可食用动物内脏掺假方法的研究 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(15): 329–336. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022090211

LI Jiong, WU Qiong, JIANG Hai, et al. Identification of Adulterated Animal-derived Ingredients in Edible Animal Viscera Based on Capillary Gel Electrophoresis and DNA Barcoding Techniques[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(15): 329–336. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022090211

· 分析检测 ·

基于毛细管凝胶电泳与 DNA 条形码技术鉴别可食用动物内脏掺假方法的研究

励 炯, 吴 琼, 江 海, 扈明洁, 金朦娜, 闫金花

(杭州市食品药品检验研究院, 浙江杭州 310017)

摘 要: 建立并优化了使用基于 DNA 条形码技术对可食用内脏制品中包括猪、牛、羊、鸡、鸭、鹅、兔 7 种常见动物源成分进行掺假鉴别的方法。用生理盐水清洗和真空冷冻干燥预处理后的内脏样品, 经 DNA 提取扩增后, 扩增产物经毛细管凝胶电泳分析系统进行确认, 克隆测序结果提交本地数据库 Viscera 进行比对, 同时筛选出适合 7 种动物源内脏 DNA 扩增的通用引物 COI-A, 优化 DNA 模板量和退火温度, 验证考察了 19 个可食用内脏掺假模型的最低掺假比例。7 种动物的 5 类内脏的 PCR 扩增效率均为 100%, 最佳的 DNA 模板量和退火温度为 2 μ L 和 53 $^{\circ}$ C, 掺假成分的最低检出比例为 5%。本方法灵敏度高, 可靠性好, 可作为常见可食用动物内脏掺假的有效检测方法。

关键词: 毛细管凝胶电泳, DNA 条形码, 内脏, 细胞色素 C 氧化酶亚基 I, 掺假

中图分类号: TS251.7

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2023)15-0329-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022090211



本文网刊:

Identification of Adulterated Animal-derived Ingredients in Edible Animal Viscera Based on Capillary Gel Electrophoresis and DNA Barcoding Techniques

LI Jiong, WU Qiong, JIANG Hai, HU Mingjie, JIN Mengna, YAN Jinhua

(Hangzhou Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310017, China)

Abstract: A DNA barcoding method with cytochrome C oxidase subunit I sequence (COI) was developed to identify 7 adulterated animal-derived components (including pig, cattle, sheep, chicken, duck, goose and rabbit) in edible viscera products. Samples were cleaned with physiological saline and pretreated by vacuum freeze drying before DNA extraction and amplification. PCR products were confirmed by capillary gel electrophoresis analysis system, and the cloned sequencing results were submitted to the local database (Viscera) for comparison. The universal primer set COI-A was used for the amplification, and the amount of DNA template and annealing temperature were optimized. Meanwhile, the minimum adulteration percentage of 19 edible viscera adulteration models was validated and examined. Results showed that the 5 viscera sources from 7 animal species can be completely amplified under the above conditions, the optimal DNA template volume and annealing temperature are 2 μ L and 53 $^{\circ}$ C respectively, and the minimum detection percentage of adulterated components was 5%. The method is sensitive and reliable, which can be used for the identification of adulterated 7 animal-derived components in the edible viscera products.

Key words: capillary gel electrophoresis; DNA barcoding; viscera; cytochrome coxidase subunit I; adulteration

食用动物内脏一直是我国几千年饮食文化中重要的一部分, 爆炒鸡心、熘肝尖、红烧鸭肠等等, 很多

可食用内脏是我国各种菜系中的经典之作, 同时, 近年来特别流行的火锅、烧烤及卤味文化, 更是把各种

收稿日期: 2022-09-22

基金项目: 国家市场监督管理总局科技计划项目 (2021MK141)。

作者简介: 励炯 (1983-), 男, 硕士, 副主任技师, 研究方向: 食品科学与安全, E-mail: jokelee2@126.com。

动物内脏的吃法发挥到极致^[1]。动物内脏不仅美味,而且营养丰富^[2],能有效补充人体各种微量元素和维生素等营养元素的需求,防止由于这些营养元素的缺失而导致的各种疾病^[3]。市面上常见的畜禽类内脏食材通常以整个部位进行销售,而猪牛羊畜类动物以及鸡鸭鹅等禽类动物内脏,由于其体型和种属相近的缘故,再加上不法商家会采用香精等对其原有的气味进行掩盖,经过粉碎、烟熏、腌制等深加工处理的可食用内脏,使其原有的感官性状发生改变,普通消费者很难用感官进行判断鉴别^[4-6]。其次,不同来源内脏的价格差异,增加了用低价内脏来替代高价内脏的风险性。

近年来,越来越多基于分子水平的技术研究应用于食品掺假鉴别中,一般包括蛋白分析技术或者基于 DNA 分析^[7-12]。由于基于蛋白的掺假技术存在无法区分相近物种或者深加工食品掺假等问题,基于 DNA 的技术具有较强的特异性和灵敏度,也可以对深加工食品进行鉴别,越来越多的掺假研究集中在基于 DNA 分析的技术方面^[13-15]。

由于缺乏标准化和通用性等问题,大多数基于 DNA 分析的鉴别技术没有得到广泛的应用,局限性较明显,可靠性和专属性不强^[16-17]。DNA 条形码技术(DNA Barcoding)作为一种可靠快速的鉴定手段,越来越多的应用于各种领域的物种的鉴别,其是利用一段相对较短的 DNA 片段,该片段容易扩增且有足够的变异性^[18-20]。很多研究采用线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I(Cytochrome C oxidase Subunit I, COI)基因的 650 bp 左右大小的片段区域来研究可食用动物内脏的掺假,该片段符合 DNA 条形码技术对目标基因需具有足够的特异性和种间足够的多样性的要求,被用于多种动物源食品的掺假鉴别与应用中,也称全片段 DNA 条形码技术(Full-length DNA Barcoding)^[21-22]。毛细管凝胶电泳分析系统是利用高压电场下,由于各 DNA 片段的大小、带电荷数、等电点等性质不同,在凝胶电泳上的迁移速度不一致,各组分依次移动至毛细管输出端附近的光检测器,检测和记录其吸光度,并将各组分以吸收峰的形式动态直观地记录下来,自动分析出各目的片段的碱基数^[23-24]。毛细管凝胶电泳分析技术极大的简化了 PCR 产物的分析步骤,提高了检测效率,其检测分辨率低至 3~5 bp,记录的吸光值使得 PCR 产物的分析更加直观并可以进行量化分析^[25-26]。

目前关于可食用动物内脏的掺假研究有限,未曾有对整个可食用动物内脏掺假风险进行系统性研究和评估,也没有一套完整的掺假鉴别技术来提供相关的技术支持,特别是可食用内脏复杂的基质以及掺假鉴别技术对样品前处理的特殊要求(比如防止漏检和误检),给可食用内脏鉴别带来一定的困难,再加上经济利益驱动,给一些不法商家提供了可乘之机,市售可食用内脏掺假行为层出不穷。本文以常见的

7 种动物源的 5 类可食用内脏为研究对象,首次将毛细管凝胶电泳分析系统与 DNA 条形码技术结合,建立基于 COI 序列的鉴别可食用动物内脏掺假的检测技术,以期能为市售可食用动物内脏的质量监督提供技术支持和保障。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

为了保证研究的动物内脏没有掺假,所用的 5 类可食用动物内脏(包括胃、肠、肝、肾、肺)于屠宰场屠宰整只猪、牛、羊、鸡、鸭、鹅、兔时取样,作为本研究方法学建立与优化的原料;共计 25 批次新鲜动物内脏及其制品。研究所用的实际样品来自杭州市农贸市场及超市,置于-20℃保存。

血液与组织 DNA 提取试剂盒、QIAxcel DNA High Resolution Kit (1200)、QX Alignment Marker 15/600 bp、QX DNA Size Marker 15~1500 bp 均购自德国 Qiagen 公司;即用 PCR 扩增试剂、扩增产物回收试剂盒 购自上海生工公司;T₄ 连接试剂盒、DH5 α 感受态细胞 购自 TaKaRa 公司。

QIAxcel 全自动毛细管凝胶电泳分析系统 购自德国 Qiagen 公司;Veriti 96 孔梯度 PCR 仪 购自美国 ABI 公司;EYELA FDU-1100 真空冷冻干燥器

购自日本东京理化公司;NanoDrop 1000 微量核酸蛋白测定仪、冷冻高速离心机 均购自美国 Thermo 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品预处理 将 7 种动物的 5 类可食用内脏以及 25 批次可食用动物制品分别用刀切成小块或小段后,取 100 g 样品泡于 250 mL 生理盐水中,超声处理 30 min,过滤,去掉滤液,反复处理后直至除去血水,残渣用料理机进行粉碎处理,在-80℃下预冷 4 h 后的样品置真空冷冻干燥箱(温度 $\leq$ -50℃,真空度 $\leq 1\times 10^{-4}$ Pa)处理 24 h,冷冻干燥处理后的样品经粉碎过筛后,室温存放于干燥器中,备用。

1.2.2 DNA 提取与纯化 由于动物内脏基质较复杂,需要一定的 DNA 纯化步骤才可以保证 7 种动物的 5 类内脏的 DNA 的扩增效率,本文在 DNeasy 血液与组织提取试剂盒的操作规程的基础上进行一定的改进,具体操作如下:0.5 g 样品中加入 2 mL ATL 缓冲溶液和 0.2 mL 蛋白酶 K,56℃裂解至溶液澄清。取裂解液 0.25 mL,纯化过程按照试剂盒说明进行操作。最后将纯化的 DNA 用 37℃预热的 AE 缓冲液洗脱 DNA,-20℃储存备用。

1.2.3 COI 基因的扩增 本文最终选用了 Ivanova 等^[27]公开发表的一对引物(COI-A,详细序列见表 1),为了方便 DNA 测序,在每对引物上连接 M13,引物合成由杭州擎科生物技术有限公司提供支持。

本文采用了 25 μ L 的 PCR 扩增体系,每个体系由以下试剂组成:12.5 μ L 即用 PCR 扩增试剂(上海生工公司),9.5 μ L 重蒸水,0.5 μ L 10 μ mol/L 正向引物,

表 1 基因引物序列
Table 1 Primer sequence of genes

引物	上游引物(F-Primer 5'-3')	下游引物(R-Primer 5'-3')
COI-A ^[27]	TGTAAAACGACGGCCAGTCTCAACCAACCACAARGAYATYGG	CAGGAAACAGCTATGACTAGACTTCTGGGTGGCCRAARAAYCA
COI-B ^[26]	TGTAAAACGACGGCCAGTCTCAACCAACCACAAAGACATIGG	CAGGAAACAGCTATGACTAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA
COI-C ^[26]	TGTAAAACGACGGCCAGTCTCAACCAACCAIAAIGALATIGG	CAGGAAACAGCTATGACTAGACTTCTGGGTGICCIAAIAICA

0.5 μL 10 μmol/L 反向引物, 2 μL DNA 模板。DNA 条形码片段扩增程序: 95 ℃ 预变性 2 min; 95 ℃ 变性 1 min, 46 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 30 s(5 个循环); 95 ℃ 变性 1 min, 53 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 30 s(35 个循环); 最后 72 ℃ 延伸 10 min。将扩增片段储存于-20 ℃, 备用。

1.2.4 毛细管凝胶电泳确认 采用 QIAxcel 毛细管凝胶电泳分析系统对 PCR 扩增产物进行确认分析, 对可食用动物内脏的 COI 基因的扩增效率进行初步确认。将 Alignment Marker 校准过并进行平衡的凝胶卡夹置于仪器内, 样品分析盘内分别放入已加入 10 μL DNA size marker 以及动物内脏的扩增产物的小管, 由于本文采用的扩增条件的扩增效率很高, 本文最终将扩增产物用缓冲液稀释至 100 倍后再进行分析, 毛细管凝胶电泳分析时间为 5 min。PCR 扩增产物经 DNA High Resolution Kit (1200)凝胶电泳分离后进行确认分析。确认后的 PCR 产物送公司进行测序(杭州擎科生物技术有限公司), 所得的测序结果经删除两端引物序列, 获得最终的扩增序列。

1.2.5 PCR 产物克隆测序 切胶回收纯化后的 PCR 产物与 pGEM-T 载体连接后, 导入 DH5α 感受态细胞。36 ℃ 培养箱培养 12 h, 经过蓝-白筛选后, 挑取 10 个不同的白色菌落接种到 LB 液体培养基培养过夜(36 ℃, 150 r/min 摇床), 取菌液 1 mL 提取质粒 DNA, 送杭州擎科生物技术有限公司进行测序。

1.2.6 测序结果分析 将经删除两端引物和质粒序列后的测序结果提交本地数据库进行比对, 进行 DNA 序列比对, 便可以得到掺假样品中混有其他不同动物来源的内脏的序列, 从而准确的分析出掺假样品中含有的动物源种类。同时利用美国国家生物信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库对样品的 COI 序列进行鉴定和相似度分析。

2 结果与分析

2.1 掺假样品预处理方法的优化

相对其他生物样本, 动物内脏的基质较为复杂, 一般在 DNA 提取纯化之前, 需要采用一定的预清理方式, 将含有的组织液和血液进行清除^[28-30]。本文将切成小块的动物内脏用生理盐水浸泡并进行超声清洗处理。DNeasy 血液与组织提取试剂盒的说明书的取样方式是采用一次性镊子直接从样品上取一定量的样品, 由于本文是针对掺假样品的研究, 取样的均一性和代表性直接影响最终实验结果。掺混样品

预处理方式的选择会直接决定取样之前样品的均一性, 是影响被取样品的代表性的最重要的因素。一般动物组织的分子生物学实验的预处理方式有 2 种, 即料理机粉碎混匀和液氮研磨法。而现代高科技技术的不断进步, 涌现出很多先进的样品前处理技术和设备, 真空冷冻干燥技术也越来越多的应用于各个领域的前处理技术中。本文采用含 10% 鸡源性成分的鸭肠, 来考察上述三种预处理方式的可靠性, 具体操作如下: 各取 5 组含 10% 鸡源性成分的鸭肠(每组 20 份样品), 分别经三种预处理方式, 前处理和分析参照 1.2 节, 结果用鸡肠检出率来对样品均一性进行分析, 由图 1 可知: 采用真空冷冻干燥法进行预处理的样品检测结果, 与其他两种预处理检测结果有显著性差异($P<0.001$), 鸡源性成分检出率达到 100%, 采用真空冷冻干燥处理后的掺假样品, 由于将样品直接冷冻干燥, 再用粉碎机处理成均一性较好的粉末混合样品, 而其他两种方式处理的样品, 有不同程度的漏

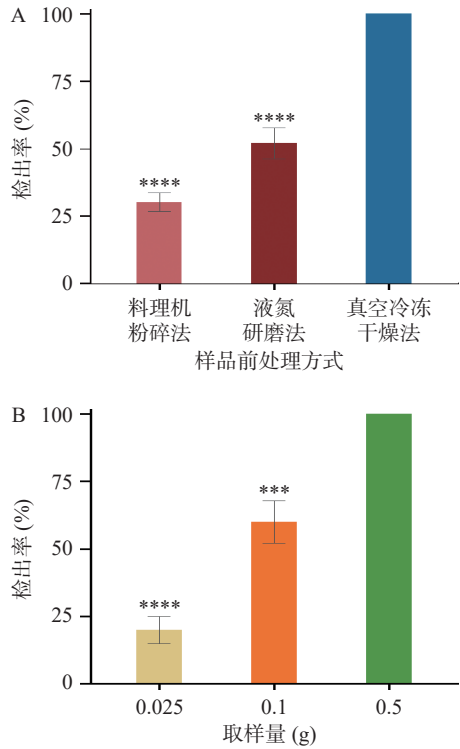


图 1 不同前处理方式(A)和不同取样量(B)对鸭肠掺假模型(含 10% 鸡源性成分)中的掺假成分检出率的影响

Fig.1 Effect of different pretreatment methods (A) and sampling volumes (B) on the detection rate of adulterated ingredients in the duck sausage adulteration model (containing 10% chicken-derived ingredients)

注: ***代表 $P<0.001$; ****代表 $P<0.0001$ 。

检情况发生,所以本文最终选择真空冷冻干燥法对样品进行预处理。

一般生物样品的 DNA 提取与净化均可以完全按照 DNA 提取试剂盒的说明进行操作,比如样品的取样,用一次性镊子取 10~25 mg 即可。由于掺假样品对均一性的要求,取样量太少会影响样品的代表性,从而影响掺假检出情况,造成实验结果误判。本文采用含 10% 鸡源性成分的鸭肠考察动物内脏掺假样品中的最佳取样量,采用 0.025、0.1、0.5 g 三个取样量进行研究,结果发现,当取样量为 0.5 g 时,样品中检出鸡源性成分的比例为 100%,而取样量为 0.025 g 和 0.1 g 时,均有不同程度的漏检情况,所以本文最终采用 0.5 g 的取样量对可食用内脏掺假样品进行 DNA 提取。

2.2 掺假样品 DNA 提取方式的优化

近年来实验室常用的商业化 DNA 提取试剂盒一般有两种类型,即快速提取法和柱模法提取试剂盒,快速提取试剂盒的优点是简单、快、效率高,缺点是没有去杂质步骤,可能会影响 PCR 扩增效率,而柱模法增加了深度纯化 DNA 的步骤,但是提取过程比较耗时^[31-32]。本文采用两种提取试剂盒对 7 种动物的 5 类可食用内脏的 DNA 提取纯化效率进行考察,纯化效率用 A_{260} 和 A_{280} 的比值进行判断判断,如果比值在 1.8~2.0 之间,可以认为该 DNA 比较纯,质量较好^[33],具体数据见图 2。

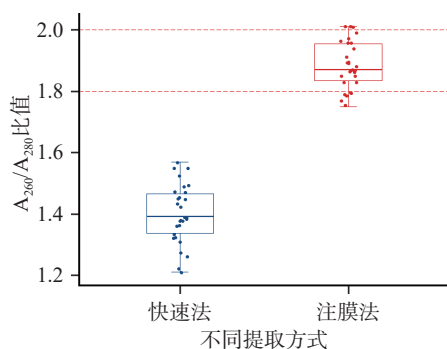


图2 不同 DNA 提取方法对可食用动物内脏 DNA 纯度的总体影响统计

Fig.2 Statistics on the overall effect of different DNA extraction methods on the purity of DNA from edible visceral

从图 2 的统计图中可以看出,柱膜法提取的可食用内脏的 DNA 的 A_{260}/A_{280} 比值要比快速提取法高,纯度较高,质量较好, A_{260} 与 A_{280} 的比值主要集中在 1.8~2.0 之间,而快速提取法提取 DNA 的 A_{260} 与 A_{280} 的比值在 1.2~1.6 之间,纯度较差,所以本文最终采用柱膜法对各种动物源的可食用内脏的 DNA 进行提取净化。

2.3 COI 基因片段的扩增条件优化

影响目标 DNA 片段扩增效率关键因素主要包括引物的选择、扩增体系中 DNA 模板浓度以及扩增程序中的退火温度^[34-35]。DNA 条形码技术的关键也

是选择合适的引物,作为通用引物,在同一个扩增体系和条件下,能有效的扩增出研究的几种物种的目标 DNA 片段。本文选用了三对通用引物 COI-A、COI-B 和 COI-C(具体引物序列详见表 1),分别对 7 种动物源内脏进行扩增效率进行考察,三对引物扩增的目标片段均是线粒体 COI 基因上大小为 658 bp 的片段。7 种动物的 5 类可食用内脏 DNA 经提取纯化并扩增后,扩增产物经 QIAxcel 毛细管凝胶电泳分析系统进行确认分析,结果发现,引物 COI-B 虽然能非常有效的扩增出 7 种动物的 5 类可食用内脏的基因片段,但是鹅的 5 类内脏的扩增效率低,相对于的条带的荧光值较低;引物 COI-C 几乎对所有 7 种动物的 5 类内脏的扩增效率都很低,从条带的荧光值可以判断扩增失败;而引物 COI-A 能全部高效的扩增出 658 bp 的目标片段,所以本文最终采用 COI-A 作为可食用内脏掺混研究的引物(具体见图 3)。

选择了合适的通用引物后,本文继续对扩增体系中的 DNA 模板量及 PCR 扩增程序中的退火温度进行优化。由于毛细管凝胶电泳上的毛细管输出端配置了光检测器,扩增产物条带在每个泳道上吸光度(荧光值)会被检测器记录,并转化为相应的条带信号,所以可以利用毛细管凝胶电泳分析系统记录的各个产物条带的荧光值,对扩增效率进行量化考察。在一定的扩增体系中,DNA 模板的浓度过高或者过低,都会影响扩增效率,从而降低 PCR 扩增产物浓度,影响检测结果的灵敏度和有效性。本文考察了三个体积的 DNA 模板量,分别为 1、2、3 μL ,在同样的扩增条件下进行扩增后,扩增产物经毛细管凝胶电泳分析系统后读取相应的目标条带的荧光值(RFU),结果见图 4。同时,在 PCR 扩增程序中,合适的退火温度是保证扩增效率以及产物特异性的关键因素,退火温度太低,会影响扩增产物的特异性,反之则会大幅度降低扩增效率。本文采用 50、53 以及 57 $^{\circ}\text{C}$,3 个退火温度分别对 7 种动物的 5 类内脏进行扩增效率的考察,扩增产物经毛细管凝胶电泳分析系统后读取相应的目标条带的荧光值(RFU),结果见图 4。

从图 4 可以看出,当 DNA 模板量为 1 μL 和 3 μL 时,7 种动物源的 5 类内脏的凝胶条带的荧光值较模板量 2 μL 时小,而荧光值大小与扩增效率成正比;选择退火温度为 53 $^{\circ}\text{C}$,7 种动物源的 5 类内脏的凝胶条带的荧光值最高。所以本文最终选择 DNA 模板量为 2 μL 、退火温度为 53 $^{\circ}\text{C}$ 的扩增条件作为 7 种动物源的 5 类内脏 DNA 条形码基因的最佳扩增条件。从毛细管凝胶电泳系统中可以看出,7 种动物源的 5 类内脏在 700 bp 左右均有一条较明显的扩增条带(见图 3)。然后将 7 种动物源的 5 类内脏的 PCR 扩增产物送至生物公司进行克隆测序,测序结果见表 2。

2.4 可食用动物内脏掺假模型灵敏度和稳定性检测

本文根据常见的可食用动物内脏的掺假类型,

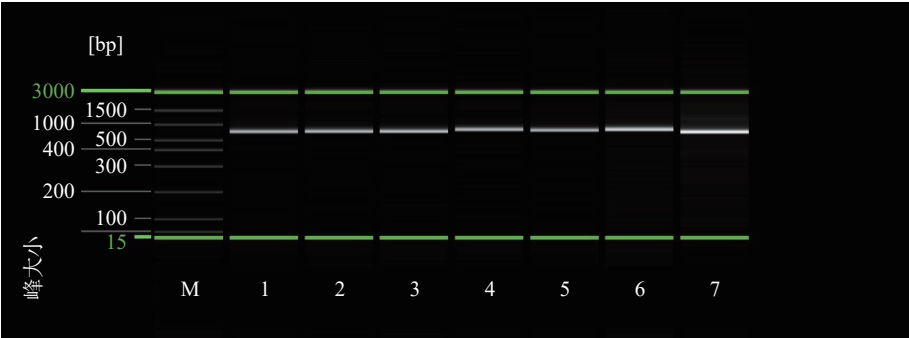


图 3 7 种动物源的可食用内脏(肝)DNA 条形码的 PCR 扩增电泳图

Fig.3 Electrophoresis images of DNA barcoding fragments amplified by PCR from liver of 7 animals
注: M: Marker(15~1500 bp); 1: 猪源性; 2: 牛源性; 3: 羊源性; 4: 鸭源性; 5: 鸡源性; 6: 鹅源性; 7: 兔源性。

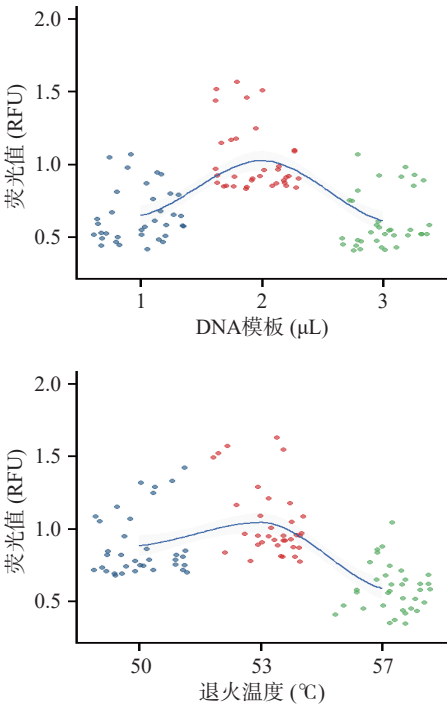


图 4 DNA 模板量与不同退火温度对 7 种动物源的可食用内脏 DNA 条形码的 PCR 扩增效率的影响

Fig.4 Effect of DNA template amount and different annealing temperatures on the PCR amplification efficiency of edible visceral DNA barcodes from seven animal source

表 2 7 种动物源内脏的 DNA 条形码检测结果

Table 2 DNA barcoding results for 7 samples found to contain one species

序号(NO.)	内脏来源	基因相似度	物种匹配结果
1	猪	99%	<i>Sus scrofa</i> (野猪)
2	牛	98%	<i>Bos primigenius</i> (原始牛)
3	羊	99%	<i>Capra hircus</i> (山羊)
4	鸭	98%	<i>Anas platyrhynchos</i> (绿头鸭)
5	鸡	100%	<i>Gallus gallus</i> (普通家鸡)
6	鹅	98%	<i>Anser</i> (鹅属)
7	兔	100%	<i>Oryctolagus cuniculus</i> (家兔)

根据经济价值的高低,对可能存在的掺假模式进行模拟,具体见表 3。

本文根据现有的可食用内脏的市场价格,根据其价格与供给量进行评估可食用内脏的经济价值,分

表 3 可食用内脏掺假模型

Table 3 Animal viscera adulteration model

模型编号	高经济价值内脏	掺假内脏	灵敏度(%)
1	牛肝	猪肝	5
2	羊肝	猪肝	5
3	兔肝	猪肝	5
4	鹅肝	鸭肝	5
5	鹅肝	鸡肝	5
6	牛胃	猪胃	5
7	羊胃	猪胃	5
8	鹅胃	鸡胃	5
9	鹅胃	鸭胃	5
10	牛肠	猪肠	5
11	羊肠	猪肠	5
12	鹅肠	鸡肠	5
13	鹅肠	鸭肠	5
14	牛肾	猪肾	5
15	羊肾	猪肾	5
16	鹅肾	鸡肾	5
17	鹅肾	鸭肾	5
18	牛肺	猪肺	5
19	羊肺	猪肺	5

成高经济价值可食用内脏和低经济价值可食用内脏,根据类型和感官性状等,建立了 19 个可食用内脏掺假模型,对可食用动物内脏中有可能掺假的其他动物源内脏进行掺假灵敏度的考察。结果发现,19 个可食用内脏的掺假模型中的掺假成分检出灵敏度较合理,最低检出比例均能达到 5%,能满足日常的检测要求。同时本文对 19 个掺假模型,分别采用 5%、10%、15% 三个掺假比例,进行稳定性考察。将上述扩增产物置-20℃进行保存,分别在第 1、3、7 d 进行检测,结果保持一致。

2.5 建立基于 BLAST+的 7 种可食用动物内脏的 DNA 条形码本地数据库

基本局域连配检索工具(Basic local alignment search tool, BLAST)是由 NCBI 开发的序列查找和比对工具, BLAST 及其相关数据库是快速进行数据查询匹配的有力工具^[36]。目前 BLAST 本地化工具(BLAST+)及其数据库可以通过自行构建的方法脱

机运行,即通过本地数据库进行查找,而无需连接到美国 NCBI 中央数据库^[37]。本文根据测定的 7 种动物源的可食用动物内脏的 COI 基因序列,构建了常见的可食用内脏掺假的内脏 DNA 条形码本地数据库。将 11 种肉的微条形码片段核酸序列存为单一的 FASTA 格式文件 viscera07,然后使用 BLAST+工具包的 makeblastdb 命令(makeblastdb-in.\viscera07.fasta-dbtype nucl-parse_seqids-out Viscera),对上述序列文件进行数据格式化和索引化,形成可供 BLAST 检索的本地数据库 Viscera。

取本文研究的可食用内脏的掺假模型、实际样品的测序结果,使用本地数据库的 blastn 命令将待检索序列结果对数据库进行检索,结果自动保存于 result.txt 文件。在结果目录下打开 result.txt 文件,根据比对得分(Score)情况进行结果分析。

2.6 可食用内脏制品检测

按照本文建立的方法,对 25 批次可食用内脏制品进行掺假鉴别,将克隆测序结果经建立的可食用动物内脏的 DNA 条形码本地数据库进行 blast 比对分析,结果见表 4。

表 4 实际样品检测结果
Table 4 Actual sample test results

序号 (NO.)	样品名称	DNA条形码 鉴定结果	基因相似 度(%)	判断 结果	实时荧光定 性PCR法结果
1	牛肝a	牛源性成分	98	符合	牛源性成分
2	牛肝b	牛源性成分	98	符合	牛源性成分
3	牛肝c	牛源性成分	98	符合	牛源性成分
4	羊肝a	羊源性成分	99	符合	羊源性成分
5	羊肝b	羊源性成分	99	符合	羊源性成分
6	鹅肝a	鹅源性成分	99	符合	鹅源性成分
7	鹅肝b	鹅源性成分	99	符合	鹅源性成分
8	鹅肝c	鹅源性成分	99	符合	鹅源性成分
9	鹅肝d	鸭源性成分	98	掺假	鸭源性成分
10	鹅肝e	鹅源性成分	99	符合	鹅源性成分
11	牛百叶a	牛源性成分	98	符合	牛源性成分
12	牛百叶b	牛源性成分	98	符合	牛源性成分
13	牛百叶c	牛源性成分	98	符合	牛源性成分
14	牛百叶d	猪源性成分	97	掺假	猪源性成分
15	牛百叶e	牛源性成分	98	符合	牛源性成分
16	牛百叶f	猪源性成分	97	掺假	猪源性成分
17	牛肠a	牛源性成分	98	符合	牛源性成分
18	牛肠b	牛源性成分	98	符合	牛源性成分
19	鹅肠a	鹅源性成分	99	符合	鹅源性成分
20	鹅肠b	鹅源性成分	99	符合	鹅源性成分
21	鹅肠c	鸭源性成分	99	掺假	鸭源性成分
22	鹅肠d	鹅源性成分	99	符合	鹅源性成分
23	牛肺	牛源性成分	98	符合	牛源性成分
24	羊肺a	羊源性成分	99	符合	羊源性成分
25	羊肺b	羊源性成分	99	符合	羊源性成分

本文利用建立的检测和分析方法对 25 批次可食用内脏制品进行掺假鉴别研究,25 批次可食用内脏制品包括 6 批次的牛百叶(牛胃)、5 批次的鹅肝、

4 批次的鹅肠、3 批次的牛肝、2 批次的羊肝、2 批次的牛肠、2 批次的羊肺以及 1 批次的牛肺。所有的样品经预处理、DNA 提取纯化扩增后,在毛细管凝胶色谱分析上 700 bp 左右的位置均有一条较清晰的条带。将扩增产物进行切胶纯化后,进行克隆测序,测序结果经建立的可食用动物内脏的 DNA 条形码本地数据库进行 blast 比对分析。比对结果发现,25 批次的可食用内脏制品检出 2 批次的猪源性成分和 2 批次的鸭源性成分,掺假比例为 16%;其中 6 批次的牛百叶制品中检出 2 批次的猪源性成分,不合格率为 33%;4 批次的鹅肠制品中检出 1 批次的鸭源性成分,不合格率为 25%;5 批次的鹅肝制品中检出 1 批次的鸭源性成分,不合格率为 20%。为了验证本检测方法的可靠性,我们对上述 4 批次的掺假样品参照农业部标准 NY/T 3309-2018《肉类源性成分鉴定 实时荧光定性 PCR 法》进行检测,结果与本方法一致(见表 4)。从上述检测结果可以看出,市售可食用内脏制品中,牛百叶、鹅肠、鹅肝等三类内脏制品比较容易有掺假问题,需要重点关注。

3 结论

本文建立了基于 QIAxcel 毛细管凝胶电泳分析系统结合 DNA 条形码技术对 7 种可食用内脏进行掺假鉴定,优化了样品前处理、DNA 提取和 PCR 扩增条件。扩增产物进行克隆测序所得的 COI 基于序列在建立的可食用动物内脏的 DNA 条形码本地数据库 Viscera 进行 BLAST 比对,进行掺假鉴别。本方法检出灵敏度较合适,适合正常的可食用内脏掺假鉴别,又不会出现误判。传统的基于 DAN 分析的鉴定技术一般使用特异性引物进行扩增,方法的通用性不强,掺假筛选能力一般;而 DNA 条形码技术采用通用型引物,可以一次性检测可食用动物内脏中的 7 种动物源成分,效率高,通用性强。但是本方法也存在一定的缺点,比如 DNA 条形码扩增产物的后续分析和确认需要较昂贵的设备和需要较专业的技术人员,且克隆测序的时间较长,所以今后在动物源成分的掺假鉴定技术研究方向,亟需开发一种耗时短、效率高、特异性强的 DNA 条形码扩增产物确认技术手段。

参考文献

- [1] 王学平. 畜禽产品加工的综合利用发展趋势[J]. 肉类研究, 2008(11): 11-14. [WANG X P. The comprehensive utilization of the livestock and poultry products processing[J]. Meat Research, 2008(11): 11-14.]
- [2] 王晓雄. 吃动物内脏的好与坏[J]. 安全与健康, 2017(12): 51. [WANG X X. The benefits and disadvantages of eating animal viscera[J]. Safety & Health, 2017(12): 51.]
- [3] 张文文, 梅娜娜, 铃莉妍, 等. 驴肝与猪肝、鸡肝和鹅肝之间的营养成分比较[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(16): 4435-4439. [ZHANG W W, MEI N N, QIAN L Y, et al. Comparison of nutrients between donkey liver and pig liver, chicken liver and goose liver[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2018, 9(16): 4435-4439.]

- [4] 李珮斯, 苏永祺, 郭新东, 等. 微波消解-电感耦合等离子体质谱法测定动物内脏中金属元素含量[J]. *安徽农业科学*, 2013, 41(21): 8915–8917. [LI P S, SU Y Q, GUO X D, et al. Content determination of metal elements in animal viscera by microwave digestion-inductively coupled plasma mass spectrometry[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2013, 41(21): 8915–8917.]
- [5] 林竹光, 孙若男, 张莉莉, 等. 气相色谱-质谱法同时测定动物内脏中的 14 种酚酸酯类环境激素残留[J]. *色谱*, 2008(3): 280–284. [LIN Z G, SUN R N, ZHANG L L, et al. Simultaneous determination of 14 phthalate ester residues in animal innards by gas chromatography-mass spectrometry with electron impact ionization[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2008(3): 280–284.]
- [6] 魏法山, 巩阿娜, 谢文佳, 等. 我国畜禽内脏食用安全指标检测分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(9): 3667–3673. [WEI F S, GONG A N, XIE W J, et al. Detection and analysis of edible safety of livestock and poultry viscera in China[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2017, 8(9): 3667–3673.]
- [7] ERBAN T, SHCHERBACHENKO E, TALACKO P, et al. A single honey proteome dataset for identifying adulteration by foreign amylases and mining various protein markers natural to honey[J]. *Journal of Proteomics*, 2021, 239: 104157.
- [8] KRITIKOU A S, AALIZADEH R, DAMALAS D E, et al. MALDI-TOF-MS integrated workflow for food authenticity investigations: An untargeted protein-based approach for rapid detection of PDO feta cheese adulteration[J]. *Food Chemistry*, 2022, 370: 131057.
- [9] MONTOWSKA M, FORNAL E. Absolute quantification of targeted meat and allergenic protein additive peptide markers in meat products[J]. *Food Chemistry*, 2019, 274: 857–864.
- [10] LECRENIER M C, MARIEN A, VEYS P, et al. Inter-laboratory study on the detection of bovine processed animal protein in feed by LC-MS/MS-based proteomics[J]. *Food Control*, 2021, 125: 107944.
- [11] FORNAL E, MONTOWSKA M. Species-specific peptide-based liquid chromatography-mass spectrometry monitoring of three poultry species in processed meat products[J]. *Food Chemistry*, 2019, 285: 489–498.
- [12] HAO X K, FU L L, SHAO L L, et al. Quantification of major milk proteins using ultra-performance liquid chromatography tandem triple quadrupole mass spectrometry and its application in milk authenticity analysis[J]. *Food Control*, 2022, 131: 108455.
- [13] COTTENET G, BLANCPAIN C, CHUAH P F, et al. Evaluation and application of a next generation sequencing approach for meat species identification[J]. *Food Control*, 2020, 110: 107003.
- [14] GALAL-KHALLAF A. Multiplex PCR and 12S rRNA gene sequencing for detection of meat adulteration: A case study in the Egyptian markets[J]. *Gene*, 2021, 764: 145062.
- [15] WANG N, XING R R, ZHOU M Y, et al. Application of DNA barcoding and metabarcoding for species identification in salmon products[J]. *Food Additives & Contaminants*, 2021, 38(5): 754–768.
- [16] CAOBY H, ZHENG K Z, JIANG J F, et al. A novel method to detect meat adulteration by recombinase polymerase amplification and SYBR green I[J]. *Food Chemistry*, 2018, 266: 73–78.
- [17] 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.
- [18] QUINTO C A, TINOCO R, HELLBERG R S. DNA barcoding reveals mislabeling of game meat species on the U. S. commercial market[J]. *Food Control*, 2016, 59: 386–392.
- [19] ZIA Q, ALAWAMI M, MOKHTAR N F, et al. Current analytical methods for porcine identification in meat and meat products[J]. *Food Chemistry*, 2020, 324: 126664.
- [20] XING R R, HU R R, HAN J X, et al. DNA barcoding and mini-barcoding in authenticating processed animal-derived food: A case study involving the Chinese market[J]. *Food Chemistry*, 2020, 309: 125653.
- [21] AHMED N, SANGALE D, TIKNAIK A, et al. Authentication of origin of meat species processed under various Indian culinary procedures using DNA barcoding[J]. *Food Control*, 2018, 90: 259–265.
- [22] KANE D E, HELLBERG R S. Identification of species in ground meat products sold on the U. S. commercial market using DNA-based methods[J]. *Food Control*, 2016, 59: 158–163.
- [23] BARAKAT H, EI-GARHY H A S, MOUSTAFA M M A. Detection of pork adulteration in processed meat by species-specific PCR-QIAxcel procedure based on D-loop and cytb genes[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98: 9805–9816.
- [24] SEN F, UNCU A O, UNCU A T, et al. The trnL (UAA)-trnF (GAA) intergenic spacer is a robust marker of green pea (*Pisum sativum* L.) adulteration in economically valuable pistachio nuts (*Pistacia vera* L.)[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2020, 100(7): 3056–3061.
- [25] ELSAYED M S A E. A first insight into the application of high discriminatory MIRU-VNTR typing using QIAxcel technology for genotyping *Mycobacterium bovis* isolated from the Delta area in Egypt[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2019, 71: 211–214.
- [26] HAJIBABAEI M, SINGER G A C, HEBERT P D N, et al. DNA barcoding: How it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics[J]. *Trends in Genetics*, 2007, 23(4): 167–172.
- [27] IVANOVA N V, DEWAARD J R, HEBERT P D N. An inexpensive automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA[J]. *Molecular Ecology Notes*, 2006, 6: 998–1002.
- [28] RAO M S, CHAKRABORTY G, MURTHY K S. Market drivers and discovering technologies in meat species identification[J]. *Food Analytical Methods*, 2019, 12: 2416–2429.
- [29] KUMAR A, RODRIGUES V, BASKARAN K, et al. DNA barcode based species-specific marker for *Ocimum tenuiflorum* and its applicability in quantification of adulteration in herbal formulations using qPCR[J]. *Journal of Herbal Medicine*, 2020, 23: 100376.
- [30] DAI Z Y, QIAO J, YANG S R, et al. Species authentication of common meat based on PCR analysis of the mitochondrial COI Gene[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 176: 1770–1780.
- [31] LIU W W, TAO J, XUE M, et al. A multiplex PCR method mediated by universal primers for the identification of eight meat ingredients in food products[J]. *European Food Research and Technology*, 2019, 245: 2385–2392.
- [32] DUNHAM-CHEATHAM S M, KLINGLER K B, ESTRADA M V, et al. Using a next-generation sequencing approach to DNA metabarcoding for identification of adulteration and potential sources of mercury in commercial cat and dog foods[J]. *Science of The Total Environment*, 2021, 778: 146102.
- [33] COTTENET G, SONNARD V, BLANCPAIN C, et al. A DNA macro-array to simultaneously identify 32 meat species in food samples[J]. *Food Control*, 2016, 67: 135–143.

- [34] SWETHA V P, SHEEJA T E, SASIKUMAR B. DNA barcoding as an authentication tool for food and agricultural commodities[J]. *Current Trends in Biotechnology & Pharmacy*, 2016, 10(4): 384–402.
- [35] HELLBERG R S, HERNANDEZ B C, HERNANDEZ E L. Identification of meat and poultry species in food products using DNA barcoding[J]. *Food Control*, 2017, 80: 23–28.
- [36] 励炯, 吴琮, 扈明洁, 等. 基于细胞色素 C 氧化酶亚基 I 序列的 DNA 微条形码技术鉴别 11 种生鲜肉制品掺假的研究[J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2021, 47(1): 52–59. [LI J, WU Q, HU M J, et al. Identification of adulteration in 11 fresh meat products by DNA mini-barcoding methods based on cytochrome C oxidase subunit I (CO I) sequence[J]. *Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences)*, 2021, 47(1): 52–59.]
- [37] 部星晨, 姜伟. 三峡库区常见鱼类 DNA 条形码本地 BLAST 数据库的构建和应用[J]. *基因组学与应用生物学*, 2021, 40(5): 1952–1964. [HAO X C, JIANG W. The construction and application of BLAST database of DNA barcode for common fish in the three gorges reservoir[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2021, 40(5): 1952–1964.]