

双重PCR检测食品中的动物源性成分

毕宇涵, 闫冰, 赵凤, 王明娜, 韩希妍, 吕琦, 姜毓君*

(乳品科学教育部重点实验室, 东北农业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要:建立了一种检测肉制品中动物源性成分的双重 PCR 技术, 针对五种不同动物线粒体 DNA 中所含有的特异性基因分别设计引物, 同时对脊椎动物所共有的保守基因进行引物设计, 并将其作为体系中的内参照。用此技术可同时检测出肉制品中 5 种动物源性成分, 检测灵敏度达到 1%, 能够适应市场化检测的需要。

关键词:双重 PCR, 动物源性成分, 线粒体 DNA, 肉制品

Detection of components of animal origin in food by double PCR

BI Yu-han, YAN Bing, ZHAO Feng, WANG Ming-na, HAN Xi-yan, LV Qi, JIANG Yu-jun*

(Key Lab of Dairy Science, Ministry of Education, College of Food Science and Engineering,
Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: The double PCR was developed for detection of meat products. This research was based on double PCR assay amplification of chondriosome DNA and specific for five genes of meats. Six pairs of primers were designed to amplify five specific genes of five meats and conservative gene of vertebrates. The primers of conservative gene could be used as internal control of double PCR assay. 1% other meat contamination could be detected in heated and unheated meat product.

Key words: double PCR; components of animal origin; mtDNA; meat product

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2009)03-0315-04

随着我国经济的快速发展, 消费者对食品质量与安全性的要求也越来越高。动物种属的鉴定对于商品贸易以及其他诸如野生动物的管理和保护等问题都十分重要, 比如检测清真食品中是否含有猪肉成分, 检测是否用廉价动物冒充较昂贵的动物食品等^[1]。对加工肉制品的质量进行把关, 避免掺假问题以及因某些宗教食品中含有某些禁食的动物成分引起不必要的民族矛盾或宗教纠纷, 有利于维护消费者利益, 避免进出口贸易争端。因此迫切需要对动物性食品成分进行源性鉴定^[2]。目前所采用的常规检测方法如电泳技术、免疫学技术、光谱技术存在许多不足, 如灵敏度低、周期长^[3~5]。由于 DNA 在包括热加工在内的各种加工过程中很稳定^[6], 所以 DNA 可作为鉴定食品中动物物种源性的重要依据^[7]。而广泛采用的 PCR 方法比较简便, 特异性和灵敏度都很高, 国内外已经运用该技术和其他技术结合建立了多种鉴别动物源性成分的方法^[8]。线粒体 DNA (mtDNA) 是大部分哺乳类、鸟类、爬行类、两栖类和

鱼类等脊椎动物所特有的保守基因^[9], 所以我们以 mtDNA 为靶基因, 设计一对引物进行 PCR 扩增, 一方面将其扩增片段作为内对照, 以确认有效地抽提肉制品中的 DNA; 另一方面可以判定是否含有脊椎动物成分来区分动物性和植物性食品^[10]。本研究采用双重 PCR 方法, 分别以猪、牛、羊、马、鸡的特异性基因为靶基因, 分别设计引物, 使其扩增片段与 mtDNA 扩增片段的大小不一致, 建立起基于 mtDNA 内对照并分别与猪、牛、羊、马、鸡的特异性基因同时进行扩增的双重 PCR 检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

猪肉、牛肉、绵羊肉、鸡肉、鸭肉、狗肉、鱼肉、鹿肉、驴肉及其相应制品等 均购自大型超市; 马肉 购自某牧场; Taq 酶 北京天根生化科技有限公司。

DYY-10C 型电泳仪 北京市六一仪器厂;
ABI9700 基因扩增仪 美国 Applied Biosystem 公司;
SYNERGY 去离子水系统 美国 MILLIPORE 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 双重 PCR 引物的合成 参照文献在猪、牛、绵羊、马、鸡线粒体基因上设计一条公用的特异上游引物 SIM, 再根据种属间的差异设计各自的下游引物^[11], 同时根据 Genbank 中线粒体细胞色素 B 基因的一段保守 DNA 序列, 自行设计了一对能够扩增大多数脊椎动物的万能引物 General primer。引物由北

收稿日期: 2008-05-13 * 通讯联系人

作者简介: 毕宇涵 (1983-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物安全与食品生物技术。

基金项目: 黑龙江省科技攻关项目 (GB07B406); 黑龙江省博士后科研启动资助金 (LBH-Q07023); 哈尔滨市青年科技创新人才研究专项资金项目 (2007RFQXN020)。

表1 引物序列及 PCR 扩增产物大小

引物名称	引物序列	扩增产物(bp)
SIM	5'-GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAAA-3'	
Pork	5'-GCTGATAGTAGATTTGTGATACCGTA-3'	398
beef	5'-CTAGAAAAGTGTAAGACCCGTAATATAAG-3'	274
sheep	5'-CTATGAATGCTGTGGCTATTGTGCGCA-3'	331
chicken	5'-AAGATACAGATGAAGAAGAATGAGGCG-3'	227
horse	5'-CTCAGATTCACTCGACGAGGGTAGTA-3'	498
GeneralA	5'-TTCAGCCATAGTTTACATCTCG-3'	162
GeneralB	5'-CAACCCCATCAAACATCTCATC-3'	

京英骏生物技术有限公司合成,各引物终浓度均为 $10\mu\text{mol/L}$ 。引物序列见表1。

1.2.2 样品的制备 根据文献模拟肉肠的加工工艺^[12],将各类样品分别剁碎,选取猪肉样做为主要成分,其余的动物成分以10%、5%、3%、1%的配比加入到主料中,并按文献要求加入适当添加剂如盐、味精、香料、亚硝酸盐等,灌入肠衣,水浴煮沸20min后放入烘箱烘干,以此样品考察本方法的检测灵敏度。

1.2.3 模板提取 取部分样品放入在 -20°C 预冷的研钵中充分研磨至粉末状,然后称50mg样品粉末加入到1.5mL EP管中,向管中加入 $200\mu\text{L}$ TE溶液(pH8.0)及 $400\mu\text{L}$ 裂解液(异硫氰酸胍溶液),旋涡混匀后加入 $600\mu\text{L}$ 酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),剧烈震荡后 14000r/min 离心10min,取上清液,加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1),剧烈震荡后 14000r/min 离心10min,取上清液,加0.8倍体积的异丙醇, 14000r/min 离心10min,弃上清后加入 $1000\mu\text{L}$ 70%乙醇, 10000r/min 离心5min,然后弃去乙醇,干燥后加 $100\mu\text{L}$ TE缓冲液(pH8.0)溶解^[13]。

1.2.4 双重PCR检测方法的建立 分别提取猪肉、牛肉、羊肉、马肉和鸡肉的DNA模板后,与相应的特异性引物和万能引物进行双重PCR扩增。PCR反应体系为 $50\mu\text{L}$, 94°C 变性4min,循环参数设置为: 94°C 30s, 58°C 30s, 72°C 30s,经35个循环之后 72°C 延伸4min。取 $6\mu\text{L}$ 产物,采用浓度为2%的琼脂糖凝胶恒压电泳进行检测,用凝胶成像仪观察结果并记录。

1.2.5 体系特异性及灵敏度考察 利用上述模板提取方法对多种含肉食品进行DNA提取,具体方法是将猪肉作为主料,其它肉样按质量分数10%、5%、3%、1%的梯度进行配比^[14],对混合肉样提取DNA模板,以此混合模板进行PCR扩增实验,分别利用5种特异性引物对各种模板进行PCR扩增实验,然后进行琼脂糖凝胶电泳分析扩增片段大小,检验5对引物的特异性,同时检验体系的灵敏度。

1.2.6 双重PCR检测市售肉制品 采用上述DNA提取方法,分别对市售的近60种肉制品进行DNA提取,然后分别采用特异性引物及万能引物进行双重PCR检测,检测结果通过浓度为2%的琼脂糖凝胶电泳进行确定。

2 结果与分析

2.1 不同肉制品的DNA提取及万能引物的考察

由图1可以看出,加热处理的肉制品中提取的DNA片段存在破碎现象,所以在引物设计过程中我

们特意选择扩增产物为500bp以下的短片段。这样,即使经过高温高压处理,也不会出现因肉中模板DNA被破坏而引起的假阴性结果。6~13泳道显示万能引物对市售常见脊椎动物源性成分均有大小为162bp的阳性扩增条带出现。

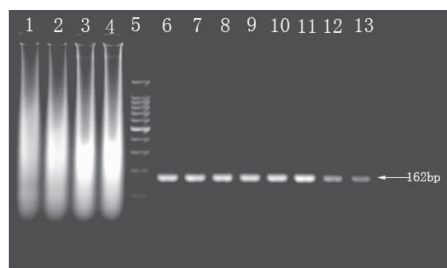


图1 肉制品模板提取及万能引物PCR扩增产物

注:泳道1~4分别为针对加热肉制品DNA的提取电泳图;泳道5为100bp DNA ladder;泳道6~13分别为万能引物针对猪、牛、羊、马、鸡、鸭、鱼、狗肉样模板进行的PCR扩增结果。

2.2 相应特异性引物的考察

为了验证特异性引物是否正确,对猪、牛、羊、鸡和马肉样品进行DNA提取,并对其进行了PCR扩增,对扩增片段大小进行检测,结果与文献[11]报道相一致。图2说明,5对引物针对其特异性模板扩增明显。

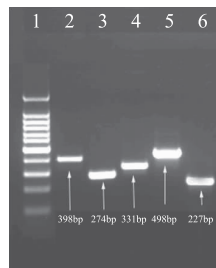


图2 单一肉样PCR检测结果

注:泳道1为100bp DNA ladder;泳道2~6分别为单一猪、牛、羊、马、鸡源成分特异性扩增产物。

为了进一步验证引物的特异性,收集市售常见除猪、牛、羊、鸡和马以外的肉样进行DNA提取,利用已建立的PCR体系分别对其进行扩增实验,发现每种特异性引物对其他肉源成分均无扩增现象(图略),说明引物特异性良好。

2.3 双重PCR检测混合肉样的灵敏度

根据文献采用传统工艺制作肉肠,本实验选取猪源肉样做为主要成分,用漏斗将肉馅灌入肠衣中,其余的动物成分以10%、5%、3%、1%的配比加入到主料中,并按文献要求加入一定配比的淀粉及适当添加剂如盐、味精、香料、亚硝酸盐等,之后提取混合

肉样中的 DNA 作为模板,利用已建立的双重 PCR 体系进行检测。采用此方法分别以牛、羊、马、鸡的最低含量 1% 制作火腿肠,然后进行双重 PCR 检测。结果发现,肉样配比在 10%、5%、3% 的肉制品中有明显阳性条带(图略),从图 3 中可看出,此检测体系对于样品配比在 1% 的肉制品中仍有阳性结果出现,说明此双重 PCR 体系针对肉制品的灵敏度可达到 1%。

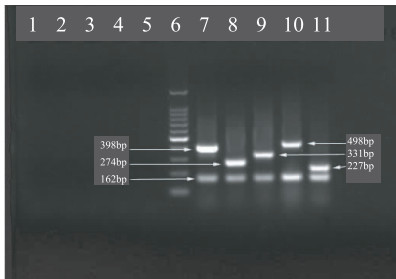


图3 混合肉样双重 PCR 检测结果

注:泳道 1~5 为阴性对照;泳道 6 为 100bp DNA ladder;
泳道 7~11 分别为猪、牛、羊、马、鸡特异性
引物与万能引物混合对混合肉样的检测结果。

2.4 市售肉制品双重 PCR 检测结果

从我国北方市场上随机购买了配料中标示有牛肉、猪肉、鸡肉、鱼肉、鸵鸟肉、驴肉、狗肉、鹿肉等成分的 60 余种肉源食品,进行双重 PCR 检测实验,从图 4、图 5 中可以看出,本实验所建立的检测鉴别方法可用于商业化含有添加剂及其它多种辅料的肉制品检测。

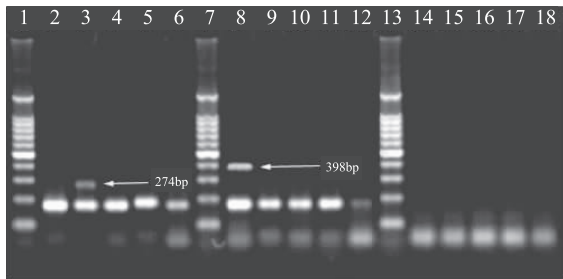


图4 针对市售的红烧鹿肉、驴肉
双重进行 PCR 检测电泳结果

注:泳道 1、13 为 100bp DNA ladder;泳道 2~6 与泳道 8~12 分别为猪、牛、羊、马、鸡特异性引物与万能引物的混合引物对市售鹿、驴肉制品 DNA 进行 PCR 检测的电泳结果;泳道 14~18 为阴性对照组。

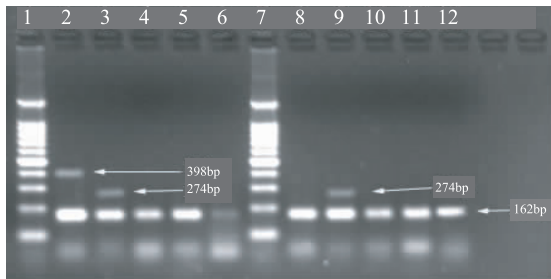


图5 针对市售的兔肉、鸵鸟肉制品
进行双重 PCR 检测电泳结果

注:泳道 1、7 为 100bp DNA ladder;泳道 2~6 与泳道 8~12 分别为猪、牛、羊、马、鸡特异性引物与万能引物的混合引物对市售兔、鸵鸟肉制品 DNA 进行 PCR 检测的电泳结果。

通过对我国北方部分肉制品进行检测,发现大

部分肉制品检测结果值得消费者信赖,本次实验还选取了部分高档鱼肉制品进行检测,未发现有其他源性动物成分。也有部分品牌的肉肠制品中存在掺杂鸡肉源性成分的现象,而在配料中并未提到鸡肉成分。其中,山东某食品厂生产的风味肉制品经检测发现掺有猪、牛源性成分来冒充鸵鸟肉、鹿肉等相对昂贵的肉制品,显然有欺骗消费者的行为。

3 讨论

在实际肉类品种鉴定中,需要从不同制品中提取 DNA,由于目标物掺入量很少会使 DNA 提取相对困难,相关文献中对于动物组织 DNA 的提取一般采用液氮研磨后进行酶消化等^[15],费时费力,而本实验中采用-20℃预冷研钵代替液氮,降低了检测成本和检测时间,使检测鉴别肉制品更加简便,我们从图 1 中可以看出,虽然条带亮度较弱,但扩增结果仍表明,尽管样品经过了比较复杂的加工处理并含有其它多种成分,但建立的双重 PCR 检测方法仍能够取得比较理想的结果,由泳道 1~4 可看出,由于经过高温等加工工艺,使肉制品的 DNA 序列严重断裂,分散成大小不一的片段,但由于本体系中所涉及到的引物均针对不同动物种属间 mtDNA 小片段所设计,每个扩增片段均小于 500bp,所以即使肉样经过多道工艺仍不影响检测效果。

当检测对象中动物源性成分含量很低时,时常无法判定是否因 DNA 的损失而导致阴性结果,如果设立一个内源性基因对照系统便可以从根本上解决“假阴性”的问题。应用上述实验建立的双重 PCR 方法,可将五种肉类(猪、牛、羊、马、鸡)在同一时间方便快捷地鉴定出来。目前有以哺乳动物的保守序列作为内对照的检测鉴别方法,但由于近年来人们追求健康的观念不断加强,多数厂家为迎合消费者口味,开发出了众多鱼肉制品,对于检测来说,以哺乳动物的序列作为内对照就不合适,所以我们使用脊椎动物的保守序列作为内对照。一方面监测 DNA 的提取效率;另一方面可以依据此结果判定检测对象是否含有脊椎动物成分,为进一步的检测工作提供依据。

基于如上考虑,我们选择了 6 对引物,引物 General 可扩增大多数脊椎动物(哺乳类、鸟类、爬行类、两栖类和鱼类)细胞色素 b 基因上一个 162bp 的区段,引物 beef 可扩增位于牛 mtDNA 基因上的一个 274bp 的区段,引物 sheep 可扩增羊 mtDNA 基因上一个 331bp 的区段,引物 horse 可扩增马 mtDNA 基因上一个 498bp 的区段,引物 Pork 可扩增猪 mtDNA 基因上一个 398bp 的区段,引物 chicken 可扩增鸡 mtDNA 基因上一个 227bp 的区段。引物在本研究中均已经过特异性确认^[10]。

在双重 PCR 反应体系中,引物设计至关重要,引物的特异性和退火温度往往比单一 PCR 扩增更为关键。设置双重 PCR 反应体系是一个复杂的问题,必须确保反应中的引物有相近的熔解温度,引物之间不会发生相互作用,扩增产物应该大小相近但又能够通过电泳分开^[16]。在我们的实验中筛选出的引物扩增的产物大小相差 100bp 左右,可通过琼脂糖凝胶

电泳容易地分离开来并观察结果,由此建立了基于内参照的同时检测猪、牛、羊、马、鸡源性成分的双重PCR方法。随着科学的不断发展和各种新技术在动物源性成分检测的应用,未来动物源性检测技术的研究将致力于灵敏度和特异性的提高,为我国的出入境检验检疫和食品安全提供更加强有力的保障。

参考文献:

- [1] 高丹丹,曹郁生,王迎华. PCR技术在食品动物源性检测中的应用[J]. 食品研究与开发,2007,28(1):141~144.
- [2] 王丽媛,叶建荣,李兴民,刘毅,戴瑞彤. PCR技术检测食品与饲料中动物源成分[J]. 食品安全,2006,6(4):33~36.
- [3] 陈颖,吴亚君,徐宝梁,马颖,董萌. 食品及饲料中马属动物源性成分的PCR检测研究[J]. 中国生物工程杂志,2004,24(5):78~83.
- [4] 陈颖,吴亚君,徐宝梁,王晶,钱增敏,苏宁. 进出口动物源性产品中牛羊成分的检测方法[J]. 食品工业科技,2004,25(8):144~146.
- [5] Von Holst C, Honikel KO, Unglaud W, et al. Determination of an appropriate heat treatment of animal waste using the ELISA technique: results of a validation survey[J]. Meat Science, 2000, 54:1~7.
- [6] Jorge H Calvo, et al. Beef- and Bovine- Derived Material Identification in Processed and Unprocessed Food and Feed by

- PCR Amplification[J]. Agric Food Chem, 2002, 50:5262~5264.
- [7] Rodriguez MA, Garcia T, Gonzale I, et al. PCR identification of beef, Sheep, goat and pork in raw and heat-treated meat mixtures[J]. J of Food Protection, 2004, 67:172~177.
 - [8] John J, Dooley, Kelly E, et al. Detection of meat species using Taqman real time PCR Assays[J]. Meat Science, 2004, 68: 431~438.
 - [9] 杨宝华,宗卉. 根据线粒体基因的特异性鉴别检测饲料中的动物源性成分[J]. 饲料研究,2000,15(5):1~3.
 - [10] 宗卉,范万红,温燕辉. 应用多重PCR同时检测牛、羊源性成分[J]. 中国草食动物,2006,26(6):21~23.
 - [11] Matsunaga T, Chikuni K, Tanabe R, et al. A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay[J]. Meat Science, 1999, 51:143~148.
 - [12] 于丽萍. 红肠的加工[J]. 肉类工业,2007(6):19,42.
 - [13] Ali Arslan, O Irfan Ilhak, Mehmet Calicioglu. Effect of method of cooking on identification of heat processed beef using PCR techniques[J]. Meat Science, 2006, 72:326~330.
 - [14] J H Calvo, P Zaragoza, R Osta Technical note: A quick and more sensitive method to identify pork in processed and unprocessed food by PCR amplification of a new specific DNA fragment[J]. Anim Sci, 2001, 79:2108~2112.
 - [15] J Sambrook, D W Russell. 分子克隆实验指南(第三版)[M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.597~611.

(上接第314页)

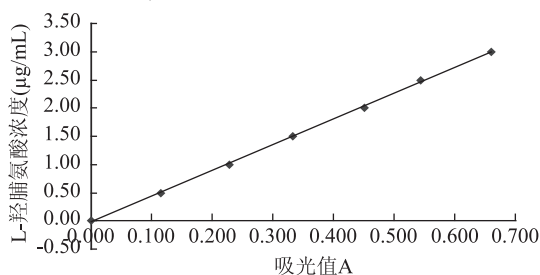


图1 L-羟脯氨酸标准曲线

由表4可以看出,2个奶粉样品分别6次实验结果的重现性好,相对标准偏差RSD分别为0.66%、1.46%。

2.2.3 加标回收率实验 按1.2.4操作,测定L-羟脯氨酸含量,结果见表5,并计算加标回收率,回收率在90.6%~94.1%之间。

表5 加标回收率实验结果

样品	样品中L-羟脯氨酸含量(μg)	标准加入量(μg)	实测量(μg)	回收率(%)
奶粉	4.621	2	6.494	93.7
	4.370	2	6.182	90.6
	4.789	4	8.550	94.0
	4.919	4	8.636	92.9
	4.172	6	9.816	94.1
	4.350	6	9.852	91.7

2.2.4 方法的检出限 将3倍试剂空白的标准偏差(平行测定20次得到)除以标准曲线的斜率,得到方法的检出限为0.002μg/mL。

2.3 模拟掺假实验

按1.2.5操作,测定L-羟脯氨酸含量,结果见表6。

表6 模拟掺假实验结果

水解蛋白掺入量(%)	0	1	2	3	4	5
L-羟脯氨酸含量(μg/g)	37.2	624	1181	1733	2391	2960

由表6可以看出,随着水解蛋白掺入量的增加,L-羟脯氨酸含量有显著升高,说明该方法可以准确地判断出奶粉中是否违规添加水解蛋白。

3 结论

对二甲氨基苯甲醛分光光度法操作简单、准确度高,能用于测定奶粉中L-羟脯氨酸含量,并能准确地判断出奶粉中是否违规添加了水解蛋白。

参考文献:

- [1] Miller EJ, Martin GR, Piez K A. The utilization of lysine in the biosynthesis of elastin crosslinks[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1964, 17:248.
- [2] 冯志民,徐衡,马旺扣. 动物组织中羟脯氨酸测定方法的建立及初步应用[J]. 南京铁道医学院学报,1999,18(3):168~170.
- [3] 关静,叶萍,武继民. 胶原海绵的羟脯氨酸含量测定[J]. 氨基酸和生物资源,2000,22(1):52~54.
- [4] 张俊杰,曾庆孝. 比色法测定鱼鳞中羟脯氨酸的研究[J]. 食品科技,2004(4):83~85.
- [5] 修海霞,徐颖. 胶原鹿骨粉中羟脯氨酸含量测定[J]. 中医药信息,2003,20(1):16.
- [6] 蓝蔚青,王川,李燕. 猪皮中羟脯氨酸含量的测定[J]. 现代食品科技,2006,22(3):81.