

郭凤柳,熊蕊,刘晓慧,等. 肉制品中驴源性成分 PCR 方法的建立及应用[J]. 江苏农业科学,2014,42(8):35-38.

肉制品中驴源性成分 PCR 方法的建立及应用

郭凤柳,熊蕊,刘晓慧,赵同欣,王娜,颜红

(保定出入境检验检疫局,河北保定 071051)

摘要:建立了驴源性成分的快速分子检测方法,确立了 1 对驴源性成分的特异性引物 HorseF/HorseR,扩增目的片段的长度是 294 bp,经验证引物对驴源性成分的特异性良好,确立了 PCR 反应的最佳反应体系和最优反应条件。反应体系的检测灵敏度是 13.7 pg/μL。扩增片段经 *Alu* I 酶切分析确认,所得 181、113 bp 片段与分析结果一致。利用该方法对市售样品进行检测,检测结果准确。

关键词:驴源性成分;检测;PCR 反应;肉品贸易;造假检测

中图分类号: S851.34 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)08-0035-04

随着人们生活水平的提高,对肉的要求也越来越高,而目前国内市场上在肉和肉制品的生产与销售中,一些不法商家或个人利用掺杂掺假、以次充好等手段欺骗消费者以牟取暴利的事件屡屡出现。我国食品工业飞速发展,食品掺假方式越来越多,范围越来越广,内容越来越复杂。一些不法商家或个人为了追求自身利益以低价、劣质肉冒充高价、优质肉^[1],如用鸡肉冒充猪肉,用猪肉、鸭肉冒充牛肉、羊肉等造假行为最为常见。这不仅涉及经济、营养价值和食品安全等问题,更直接影响消费者健康。此外,在清真食品中掺杂猪肉等行为还涉及宗教信仰等问题。因此,对食品中原料肉进行掺假、掺杂检验十分必要,其重点就是快速、准确鉴定肉制品品种。

保定驴肉火烧是著名小吃,和“保定三宝”并驾齐驱。驴肉中富含人体必需的氨基酸和脂肪酸,是一种高蛋白、低脂肪

的营养食物。此外,驴肉中矿物元素铁含量高于其他畜禽肉,其食用价值高、营养丰富、味道鲜美,值得大力开发研究和推广^[2]。也是由于上述原因,驴肉在人们日常生活中的需求量越来越大,价格越来越高,致使其掺假问题也越来越普遍,因此肉种类鉴定是食品分析的一个重要方面。PCR 技术是食品中肉类成分鉴别的主流技术,研究对象集中在市场上常见的羊肉、牛肉、猪肉、鸡肉上,目前还没有关于驴源性成分 PCR 检测方法的报道。本研究合成了 1 对用于检测驴源性成分的特异性引物,通过对反应体系的摸索及反应条件的优化,验证了该方法的特异性与灵敏度,建立了鉴定驴源性成分的 PCR 技术,旨在为杜绝食品贸易中的欺骗行为提供检测方法。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

蛋白酶 K、RNA 酶、dNTPs、10 × PCR 缓冲液、MgCl₂、*Taq* DNA 聚合酶、2 000 bp ladder DNA marker、DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒以及血液、细胞、组织基因组 DNA 提取试剂盒等均购自北京天根生化科技有限公司; *Sau*3A I、*Alu* I 限制性内切酶购自宝生物工程有限公司。引物合成及序列测定均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成;其他试剂均为国产分析纯。

收稿日期:2013-11-14

基金项目:河北省出入境检验检疫局自主立项项目(编号:HE2011K019)。

作者简介:郭凤柳(1986—),女,河北辛集人,硕士,助理工程师,主要从事动物检疫研究。Tel:(0312)3110331;E-mail:guofengliu160@126.com。

通信作者:刘晓慧,博士,兽医师,主要从事动物检疫研究。Tel:(0312)3110331;E-mail:dlxh@163.com。

[5]徐淑华. *E. coli* 的 *PrfC* 基因产物对 *OmpA* 前体蛋白翻译后转位的功能[J]. 生物化学杂志,1991,6(7):651-656.

[6]Belaouaj A, Kim K S, Shapiro S D. Degradation of outer membrane protein A in *Escherichia coli* killing by neutrophil elastase [J]. Science, 2000, 289(5482): 1185-1188.

[7]Prasadarao N V, Blom A M, Villoutreix B O, et al. A novel interaction of outer membrane protein A with C4b binding protein mediates serum resistance of *Escherichia coli* K1 [J]. Journal of Immunology, 2002, 169(11): 6352-6360.

[8]Sukumaran S K, Shimada H, Prasadarao N V. Entry and intracellular replication of *Escherichia coli* K1 in macrophages require expression of outer membrane protein A [J]. Infection and Immunity, 2003, 71(10): 5951-5961.

[9]呼锐,佟春玉,崔玉东. 大肠杆菌外膜蛋白 A 在原核表达载体中的克隆表达[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2011, 23(1):

56-59.

[10]Chai T J, Foulds J. Purification of protein A, an outer membrane component missing in *Escherichia coli* K-12 *ompA* mutants [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1977, 493(1): 210-215.

[11]Morona R, Klose M, Henning U. *Escherichia coli* K-12 outer membrane protein (OmpA) as a bacteriophage receptor: analysis of mutant genes expressing altered proteins [J]. Journal of Bacteriology, 1984, 159(2): 570-578.

[12]Pautsch A, Schulz G E. Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain [J]. Nature Structural Biology, 1998, 5(11): 1013-1017.

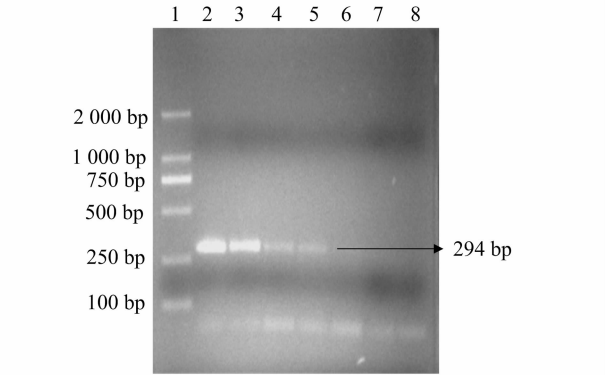
[13]李晓霞,邱玉玉,王海荣. 肠致病性大肠杆菌外膜蛋白免疫保护性研究[J]. 中国免疫学杂志, 2007, 23(5): 394-397.

[14]宋舟,陈伟,张立艳,等. 大肠杆菌外膜蛋白 A 研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(5): 199-202.

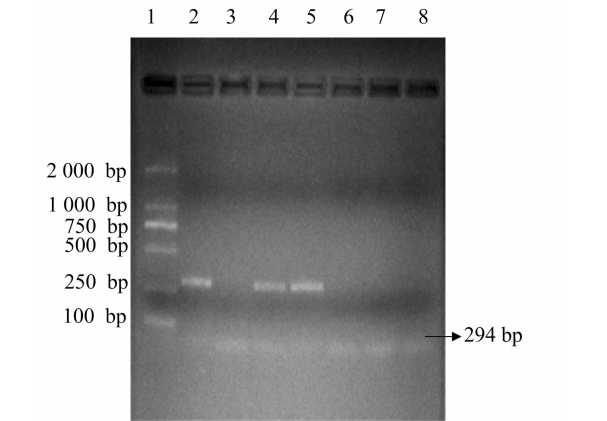
引物对驴肉的基因组 DNA 扩增出了目的条带。如图 5 所示,引物对其他动物的 DNA 没有扩增出条带,但是对羊、狗的基因组也扩增出了相似条带。如图 6 所示,进一步进行酶切验证,结果没有得到正确的酶切结果,表明引物的特异性较高。

Equus asinus.seq	0
Equus hemionus.seq	TTCATCCGAAGACGTCTTACACTCATGAGCTGTCCCTCC	40
目标序列.seq	0
Consensus		
Equus asinus.seq	0
Equus hemionus.seq	CTAGGCCCTAAAAACAGACGCCATCCC'TGGGCGCCTAAATC	80
目标序列.seq	0
Consensus		
Equus asinus.seq	0
Equus hemionus.seq	AGACAACCTCTGTAGCCTCCCGACCAGGTCTTTACTACGG	120
目标序列.seq	0
Consensus		
Equus asinus.seq	0
Equus hemionus.seq	CCAATGCTCAGAGATCTGCGGATCAAACCACAGCTTTATA	160
目标序列.seq	0
Consensus		
Equus asinus.seqAGTTCCACTGAAATACTTTCGAAG	23
Equus hemionus.seq	CCAA'TTGTCTTGAAC'TAGTCCC'ACTGAAACACTTTCGAAG	200
目标序列.seq	0
Consensus		
Equus asinus.seq	63
Equus hemionus.seq	AATGATCTGCATCAATACTATAAAATCACTAAGAAGCTAA	240
目标序列.seq	AATGATCTGCATCAATATTATAAAGTCACTGAGAAGCTAT	0
Consensus		
Equus asinus.seq	103
Equus hemionus.seq	TACAGCGTTAACCTTTTAAAGTTAAAGACTGAGGGTTCAAT	280
目标序列.seq	TACAGCGTTAACCTTTTAAAGTTAAAGACTGAGGGTTCAAC	0
Consensus		
Equus asinus.seq	143
Equus hemionus.seq	CTCCCTCCCTAGTGATA'TGCCACAGTTGGATACATCAACA	319
目标序列.seq	C.CCCTCCCTAGTGATA'TGCCACAGTTGGATACATCAACA	23
ConsensusTGCCACAGTTGGATACATCAACA	
	tgccacagttggatacatcaaca	
Equus asinus.seq	183
Equus hemionus.seq	TGATTTATTAATATCGTCTCAATAATCCTAAC'TCTATTTA	359
目标序列.seq	TGATTTATTAATATCGTCTCAATAATCCTAAC'TCTATTTC	63
Consensus	tgatTTATTAATATCGTCTCAATA tccTAACTctatt a	
Equus asinus.seq	223
Equus hemionus.seq	TTGTATTTC'CAACTAAAAATTTCAAAGCACTCTTATCCAA'T	399
目标序列.seq	TTGTATTTC'CAACTAAAAATTTCAAAGCACTCTTATCCAA'T	103
Consensus	ttgtatt caactaaaaatttcaaagcactcttatccaa	
Equus asinus.seq	263
Equus hemionus.seq	ACACCCAGAAGCT'AAAAACAAC'TAAATAGCTAAAC'CCCTT	439
目标序列.seq	ACACCCAGAAGCAAAAAACAAC'TAAATAGCTAAAC'CCCTT	143
Consensus	acacccagaagc aaaaacaactaaaata ctaaac cct	
Equus asinus.seq	303
Equus hemionus.seq	ACCCCTTGAGAATCAAAATGAACGAAAATCTATTCGCCTC	479
目标序列.seq	ACCCCTTGAGAATCAAAATGAACGAAAATCTATTCGCCTC	183
Consensus	acccttgagaatcaaaatgaacgaaaatctattgcctc	
Equus asinus.seq	343
Equus hemionus.seq	TTT'CGCTACCCCAACAATAATAGGCC'CTTCTATTGTAATC	519
目标序列.seq	TTT'CGCTACCCCAACAATAATAGGCC'CTTCTATTGTAATC	223
Consensus	ttt gctaccccaacaataataggcct cctattgtaat	
Equus asinus.seq	383
Equus hemionus.seq	CTAATCATTTATATTCCCCAGCATCCTATTTCCTTCATCCA	559
目标序列.seq	CTAATCATTTATATTCCCCAGCATCCTATTTCCTTCATCCA	263
Consensus	ctaatacat atattccccagcatcctatt cctcatcca	
Equus asinus.seq	423
Equus hemionus.seq	ACCGACTAATTAACAATCGCTAATCTCAATCCAACAATG	599
目标序列.seq	ACCGACTAATTAACAATCGCTAATCTCAATCCAACAATG	294
Consensus	accgactaat acaaatcg ctaatctcaat	
Equus asinus.seq	463
Equus hemionus.seq	GCTAGTCCAACCTTACATCAAAAACAATAATACCATCCAT	639
目标序列.seq	GCTAATCCAACCTTACATCAAAAACAATAATAGCTATTCAAC	294
Consensus		
Equus asinus.seq	503
Equus hemionus.seq	AACAATAAAGGACAAAACCTGAACCCCTCATACTCATGTGCG	679
目标序列.seq	AACAATAAAGGACAAAACCTGAACCCCTCATACTCATGTGCG	294
Consensus		
Equus asinus.seq	543
Equus hemionus.seq	TAATCCTATTTCATTGGTTCAACAAACTTATTGGGCCTACT	719
目标序列.seq	TGATCCTATTTCATTGGTCAACAAACTTATTAGGCCTACT	294
Consensus	
Equus asinus.seq	583
Equus hemionus.seq	ACCCCACTCATTTACACCAACAACACAAC'TATCAATAAACC	759
目标序列.seq	ACCCCACTCATTTACACCAACAACACAAC'TATCAATAAACC	294
Consensus	
Equus asinus.seq	623
Equus hemionus.seq	CTAGGCATAGCCATCCCCCTGTGAGCAGGAACAGTATTCA	780
目标序列.seq	CTAGGCATAGCCATCCCCCTG.....	294
Consensus		
Equus asinus.seq	659
Equus hemionus.seq	TAGGCTTTTCGTCATAAAACAAAAGCAGCTCTAGCTC	780
目标序列.seq	294
Consensus		

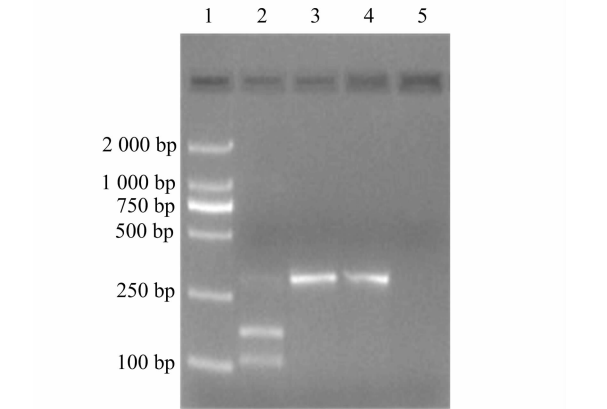
图3 序列比对结果



1—Marker 2000; 2—模板未稀释; 3~8—模板 10^{-6} ~ 10^{-1} 倍梯度稀释
图4 检测体系的灵敏度测定结果



1—Marker 2000; 2—驴肉DNA扩增条带; 3~8—牛肉、羊肉、狗肉、猪肉、兔肉、鸭肉DNA扩增结果
图5 检测体系的特异性扩增结果



1—Marker 2000; 2—阳性对照酶切结果; 3—驴引物对羊DNA扩增产物的酶切结果; 4—驴引物对狗DNA扩增产物的酶切结果; 5—空白对照
图6 对反应体系特异性的酶切验证结果

2.4 应用

对市售驴肉制品进行检测,结果发现市场上的一些掺假现象。由表 1 可见,对一些驴肉小吃(驴肉火烧、驴肉大饼等)取样 10 份,结果有 2 份样品是驴源性阴性;对市售真空袋包装的驴肉制品取样 5 份,结果有 2 份是驴源性阴性。

表 1 市售驴肉制品的驴源性检测

样品	数量 (个)	驴源性阴性 数量(个)	驴源性阴性 比例(%)
现煮驴肉小吃	10	2	20
真空袋包装驴肉制品	5	2	40

3 结论与讨论

肉类检测方法有多种多样,其中 ELISA 技术应用较多,ELISA 技术是将抗原、抗体反应的高度特异性和酶的高效催化作用相结合发展建立的一种免疫分析方法^[3],但是该方法有一定的局限性:首先要有足够的抗体供检测分析;其次肉类食品在加工过程中经过加热、高压、辐射等处理,蛋白遭到破坏,不适合用 ELISA 方法检测。DNA 分子分布广泛、结构稳定,作为遗传信息的载体,分子结构中携带了丰富的种源特异性信息^[4],DNA 检测是目前物种鉴定的最有效手段^[5-8]。DNA 鉴定主要是通过 PCR 反应来实现。目前还没有驴肉检测方法,一般是凭色泽、纹理等简单方法进行辨认,因此需要找到具有说服力的检测方法。本研究使用的 PCR 方法灵敏度高、特异性强、速度快。

肉类产品放置 1、2、9、16 d 后,DNA 片段会由 3 万 bp 降解到 1.6 万 bp。加热到 80 ℃,DNA 片段长度不受影响,而达到 100 ℃则 DNA 长度锐减至 1 100 bp,加热至 120 ℃减至 600 bp 以下。市售驴肉多经过高压处理,因此本研究中选择 294 bp 的短片段,这样即使经过高压处理,肉中模板 DNA 也不被破坏而出现假阴性结果。

引物是根据驴肉线粒体 DNA 设计合成的,因此具有高度的特异性,研究表明,引物对其他动物的基因组 DNA 没有扩增到可以酶切到目的片段的 PCR 产物,因此该检测技术具有高度的特异性。

参考文献:

[1]刘帅帅,李 宏,罗世芝,等. PCR 技术在肉类掺假检验中的应用进展[J]. 食品安全质量检测学报,2011,2(6):280-284.
[2]尤 娟,罗永康,张岩春,等. 驴肉主要营养成分及与其它畜禽肉的分析比较[J]. 肉类研究,2008(7):20-22.
[3]张占军,王富花. 酶联免疫吸附技术及其在食品安全检测中的应用[J]. 食品研究与开发,2011,32(1):157-160.
[4]Fajardo V, Gonzalez I, Rojas M, et al. A review of current PCR - based methodologies for the authentication of meats from game animal species[J]. Trends in Food Science & Technology, 2010, 21(8): 408-421.
[5]王 薇,王利丽,熊莉丽,等. ITS 序列作为 DNA 条形码在虫草鉴定及系统发育关系中的研究与应用[J]. 江苏农业学报,2012,28(3):680-682.
[6]Aida A A, Man Y B, Wong C M, et al. Analysis of raw meats and fats of pigs using polymerase chain reaction for halal authentication[J]. Meat Science, 2005, 69(1): 47-52.
[7]田慧敏,刘铁志. DNA 分子标记技术在红菇分子鉴定中的应用进展[J]. 江苏农业科学,2013,41(4):28-31.
[8]Lockley A K, Bardsley R G. DNA - based methods for food authentication[J]. Trends in Food Science & Technology, 2000, 11(2): 67-77.