

荧光定量PCR检测肉制品中鸭源性成分

张 驰^{1,2}, 邱皓璞², 张 筠³

(1.东南大学 生物电子学国家重点实验室, 江苏 南京 210018;

2.国家农副产品质量监督检验中心, 南京市产品质量监督检验院, 江苏 南京 210028;

3.先声再康江苏药业有限公司, 江苏 南京 210042)

摘 要: 根据鸭线粒体基因组细胞色素 b 基因中的保守序列设计鸭特异性引物和 $TaqMan$ 探针, 建立肉制品中鸭源性成分定性和定量检测的荧光定量PCR技术。结果表明, 引物与探针对于鸭源性成分的特异性良好, 检测灵敏度达到1.78pg/反应, 该方法可对鸭肌肉组织DNA进行准确定量。使用该技术对市售肉制品进行检测, 发现大量使用鸭肉假冒的牛羊肉制品。本研究建立的鸭源性成分荧光定量PCR检测方法, 为肉制品质量控制提供了有效的技术手段。

关键词: 鸭源性成分; 荧光定量聚合酶链式反应; 肉类掺假; 检测方法

A Quantitative Fluorescent PCR Method for Detection of Duck-Derived Ingredients in Meat Products

ZHANG Chi^{1,2}, QIU Hao-pu², ZHANG Yun³

(1. State Key Laboratory of Bioelectronics, Southeast University, Nanjing 210018, China;

2. National Supervision & Testing Centre for Agricultural & Sideline Product Quality, Nanjing Institute of Supervision & Testing on Product Quality, Nanjing 210028, China; 3. Jiangsu Xianshengzaikang Pharmaceutical Ltd., Nanjing 210042, China)

Abstract: Identification of animal species will provide a useful approach for supervision of meat adulteration. Yet in China, little research has been reported on using real-time PCR method to detect duck-derived ingredients in foods. A set of duck-specific primers and $TaqMan$ probe were designed based on the conserved sequences of duck $cyt-b$ gene, and a RT-PCR method was established for qualitative and quantitative detection of duck-derived components in meat products. The primers and probe were highly specific for duck DNA, and the limit of detection was 1.78 pg per reaction. The further quantitative assay revealed that this method was accurate in quantitative determination of DNA from duck skeletal muscle. Finally, commercial meat products were measured, and a number of meat adulterations with duck substituting beef or mutton were detected. In summary, this RT-PCR proved to be a reliable approach in identification of duck ingredients, which could benefit quality control of meat production in China.

Key words: duck ingredients; real-time PCR; meat adulteration; detection method

中图分类号: TS207.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)18-0154-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201318031

肉类掺假是我国食品行业的突出问题之一。据媒体报道, 一些不法企业使用廉价的鸭肉代替价格较高的牛肉、羊肉等肉类生产食品进行销售, 严重损害了消费者的利益^[1]。相比于猪肉, 鸭肉的纹理与牛羊肉更为相似, 因此使得相应的掺假具有更大的隐蔽性。对食品监管部门而言, 建立快速有效的食品中鸭源性成分检验方法, 对此类不法行为的监管十分必要。

以聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术为基础的种属检测技术已是食品中肉类成分鉴别的主流技术。自从Tartaglia等^[2]首先报道了用PCR方法检测饲料中的牛、羊源性成分至今, 大量研究报道了应用PCR及多重PCR技术对食品中不同肉类种属的鉴别方法^[3-9]。近

年来, 荧光定量PCR技术的迅速发展又将种属鉴定技术发展到了新的高度^[10-11]。相比于普通PCR, 荧光定量PCR具备特异性好、检测自动化程度高等优势, 并使得DNA模板的定量检测成为可能^[12-15]。然而, 在鸭源性检测方面, 目前国内仅有张娟等^[16]针对鸭线粒体基因组中的特异性序列, 使用PCR扩增、电泳检测的流程对食品中的鸭源性成分进行检测, 应用荧光定量PCR技术建立的快速、灵敏、准确的食品中鸭源性成分定性、定量检测方法未见有报道。

本研究设计了用于肉制品中鸭源性成分鉴定的 $TaqMan$ 荧光定量PCR引物与探针, 拟建立了鸭源性成分的定性、定量检测方法, 并对大量市售食品样本进行鸭

收稿日期: 2012-08-21

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(2011BAK21B05); 国家质检总局科技计划项目(2010QK178)

作者简介: 张驰(1978—), 男, 高级工程师, 博士, 研究方向为食品生物化学与分子生物学。E-mail: zhangchi@njzj.gov.cn

源性成分的检测, 以期对肉制品质量控制提供一种有效的新途径。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

TIANamp Geromic DNA Kit血液/细胞/组织基因组DNA提取试剂盒(离心柱型) 天根生化科技(北京)有限公司; TaqMan real-time PCR预混液 日本TaKaRa公司; 电泳级琼脂糖 南京生兴生物技术公司; 引物与荧光探针均由南京金斯瑞生物公司合成。

1.2 仪器与设备

7500 Fast Real-Time PCR仪、Viti 96 Well PCR仪 美国ABI公司; 凝胶成像系统 加拿大Bio-Rad公司; 紫外分光光度计 美国Lambda公司。

1.3 方法

1.3.1 样本总DNA的提取

使用离心柱式血液/细胞/组织基因组DNA提取试剂盒提取50mg肉制品中的总DNA。操作过程遵照试剂盒说明书进行。将样品剪碎后于含蛋白酶K的细胞裂解液中消化, 使用吸附柱对总DNA进行吸附、洗涤和洗脱, 得到纯化的样品总DNA溶液。测定其OD_{260nm}数值, 计算DNA质量浓度。

1.3.2 荧光定量PCR引物与TaqMan探针设计

购置市售肉鸭2种、麻鸭1种、野鸭1种, 根据GenBank已发表的鸭(*Anas platyrhynchos*)线粒体基因组序列(HM010684.1)设计用于扩增鸭细胞色素b基因813bp部分序列(61~873)的通用引物, 正向引物序列为5'-ATCAACAACCTCCCTAATCGA-3', 反向引物序列为5'-GATTGACCGCAGGATGGCGTAG-3'。分别提取不同品种鸭肉的总DNA作为模板, 于PCR仪上对目标序列进行扩增。反应体系为20μL, 包含PCR Master Mix(2×)10μL、通用引物(10μmol/L)各1μL、模板(10μg/μL)1μL。反应条件为: 95℃预变性3min; 95℃预性30s、50℃退火30s、72℃延伸1min, 30个循环; 72℃、7min。反应产物全部进行1%琼脂糖凝胶电泳, 使用胶回收试剂盒对813bp处的条带进行回收纯化并测序。

分别将各品种鸭肉的测序结果进行比对, 选择各个品种间完全一致的约700bp序列, 使用ABI Primer Express软件设计TaqMan荧光定量PCR引物和探针。将设计的各组引物所扩增的目标序列分别与牛、猪、绵羊、山羊等常见畜肉以及鸡、鹅、鸽等常见禽肉已发表的细胞色素b同源序列进行比较, 选取目标序列的关键位点(引物近3'端结合位点、探针近5'端结合位点)在鸭和各对照物种间均存在3个以上不同碱基的一组引物与探针作为鸭源性检测的特异性引物和探针(图1)。正向引物D1序列

为5'-GGCCTCCTACTGGCTATGCA-3', 反向引物D2序列为5'-GAGTCAGCCATATTGGACGTTT-3', 探针序列DP为5'-FAM-CACCGCAGACACATCCCTTGCTTTCT-TAMRA-3', 扩增片段大小为90bp。

	D1结合序列	DP结合序列	D2结合序列
鸭	GGCCTCCTACTGGCTATGCACTACACCGCAGACACATCCCTTGCT	GGCCTCCTACTGGCTATGCACTACACCGCAGACACATCCCTTGCT	TTCTCCTCAGTAGCCAACACATGCGGAAACGTCCAATATGGCTGACTC
牛	GGCCTATTCTAGCAATACACTACACATCCGACACAACAACAGCA	GGCCTATTCTAGCAATACACTACACATCCGACACAACAACAGCA	TTCTCCTCTGTTACCCATA.TCTGC CGAGACGTGAACACGGCTGAATC
猪	GGCCTGTTCTTAGCAATACACTACACATCAGACACAACAACAGCT	GGCCTGTTCTTAGCAATACACTACACATCAGACACAACAACAGCT	TTCTCATCAGTTACACACATCTGT CGAGACGTAAATTACGGATGAGTT
绵羊	GGCCTATTCTAGCAATACACTATACACCTGACACAACAACAGCA	GGCCTATTCTAGCAATACACTATACACCTGACACAACAACAGCA	TTCTCCTCTGTAACCCACATCTGCGGAGACGTAAACTATGGCTGAATT
山羊	GGCCTATTCTAGCAATACACTATACACCTGACACAACAACAGCA	GGCCTATTCTAGCAATACACTATACACCTGACACAACAACAGCA	TTTTCCTCTGTAACCTACATTGT CGAGATGTAATATTATGGCTGAATC
鸡	GGCCTACTACTAGCCATGCACTACACAGCAGACACATCCCTAGCC	GGCCTACTACTAGCCATGCACTACACAGCAGACACATCCCTAGCC	TTCTCCTCCGTAGCCACACTTGC CGGAAACGTACAATACGGCTGATC
鹅	GGCCTGCTACTAGCCATACACTACACCGCAGACACTTCACTCGCC	GGCCTGCTACTAGCCATACACTACACCGCAGACACTTCACTCGCC	TTCTCCTCAGTAGCTCACACATGCCGAGACGTCCAGTACGGATGGATC
鸽	GGCTTACTACTCGCCGACATTACACTTGTGACACACCCCTAGCC	GGCTTACTACTCGCCGACATTACACTTGTGACACACCCCTAGCC	TTTTTCATCCGTTGCACACACATGCGGAAACGTACAGTACGGCCGGATC

方框内表示引物D1、D2、探针DP的结合位置; 阴影表示鸭和各对照物种在扩增序列中引物近3'端和探针近5'端的差异位点。

图1 鸭源性检测引物与探针设计

Fig.1 Design of duck-specific primers and probe

1.3.3 引物与探针的特异性

为验证引物与探针对于鸭源性成分的特异性, 将上述2种肉鸭、1种麻鸭与1种野鸭样本的总DNA作为阳性对照, 将牛、猪、绵羊、山羊等常见畜肉以及鸡、鹅、鸽等常见禽肉的总DNA作为阴性对照, 所有DNA模板均使用双蒸水稀释为10μg/mL。荧光定量PCR反应体系为20μL, 包含反应预混液10μL、模板DNA 1μL、引物各1μL、探针1μL、ROX染料0.4μL、灭菌双蒸水5.6μL。使用ABI 7500荧光定量PCR仪进行反应, 反应条件为: 95℃预变性30s; 95℃变性3s、60℃退火+延伸30s, 40个循环。使用ROX染料对荧光数值进行校正。根据各反应体系的Ct值考察引物与探针对于不同DNA模板的特异性。

1.3.4 检测灵敏度与定量检测标准曲线

将提取自肉鸭的DNA 10倍梯度稀释后, 应用本研究设计的鸭源性引物与探针进行荧光定量PCR反应, 以Ct值为35时的模板浓度作为方法的检测限。根据各梯度的扩增曲线, 建立Ct值-模板DNA质量浓度的标准曲线, 用于鸭源性成分的定量检测。

1.3.5 鸭源性成分定量的盲样检测

采用盲样测试的方式, 使用本研究设计的引物与探针针对5份已知质量浓度的不同鸭组织总DNA样本进行鸭源性成分的荧光定量PCR检测。将反应Ct值代入定量标准曲线, 得出模板DNA质量浓度, 并与样本实际质量浓度进行对比, 验证定量方法的准确性。

1.3.6 市售肉制品掺假的检测

购置市售羊肉串32份、预制生牛排5份、预制冷鲜牛柳6份, 提取其总DNA并调整其质量浓度至10μg/mL, 使用荧光定量PCR法测定其鸭源性成分。

2 结果与分析

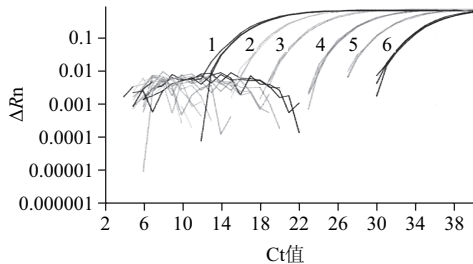
2.1 引物与探针的特异性验证

使用4种不同来源的鸭肉DNA作为阳性对照、4种畜肉和3种禽肉作为阴性对照,验证鸭源性检测引物与探针的特异性。以10ng DNA作为模板进行6次重复实验,4种鸭肉样本均出现显著扩增,6次平行反应的Ct值分别为21.325±0.124(肉鸭1)、21.605±0.086(肉鸭2)、21.477±0.173(肉鸭3)、21.922±0.158(肉鸭4),各阴性对照的反应Ct值均大于40,表明方法针对鸭源性成分的特异性良好。

2.2 检测灵敏度与定量标准曲线

使用10倍梯度稀释的肉鸭肌肉组织总DNA作为模板进行鸭源性成分的荧光定量PCR检测,各梯度反应体系中的模板量(*m*)分别为580、58、5.8、0.58、0.058、0.0058ng。反应的扩增曲线见图2,绝对定量标准曲线方程为 $Ct = -3.6031lgm + 25.09$, $r^2 = 0.998$,扩增效率为89.469%。

鉴于国内外荧光定量PCR检测技术标准均将Ct值为35时的模板量作为方法的检测限,根据本研究的标准曲线,Ct值为35时的模板量为1.78pg,表明方法的定性检测灵敏度达到pg级。



1~6的反应模板量分别为580、58、5.8、0.58、0.058、0.0058ng/反应。

图2 梯度扩增曲线

Fig.2 Amplification plot and standard curve

2.3 盲样的定量检测

利用标准曲线,对5份已知质量浓度的不同鸭组织总DNA进行盲样定量检测。各样品DNA的实际质量浓度和检测结果见表1。鸭肌肉组织的定量结果与实际质量浓度较接近,可用于对鸭肉DNA的准确定量;当对鸭肝、鸭心、鸭肠等鸭内脏组织DNA进行定量时,由于组织细胞中线粒体数量多于肌肉组织,故导致定量检测结果偏大。

表1 不同鸭组织样品的盲样定量检测
Table 1 Blind detection of different duck tissues

样品编号	1	2	3	4	5
样品类别	鸭肉1	鸭肉2	鸭肝	鸭心	鸭肠
实际质量浓度/(ng/μL)	210	39	70	42	12
Ct值	16.832	19.677	17.032	17.872	20.011
检测质量浓度/(ng/μL)	196	32	172	101	26

2.4 市售肉制品的鸭源性检测

使用本研究建立的荧光定量PCR方法对市售样品中鸭源性检测,结果见表2。羊肉串和预制冷鲜牛柳均出现大量鸭源性阳性结果,表明市场上使用鸭肉假冒牛羊肉制品的现象已非常严重。

表2 市售肉制品的鸭源性检测
Table 2 Detection of duck ingredients in meat products

品种	数量	鸭源性阳性数量	鸭源性阳性比例/%
羊肉串	32	12	37.5
预制生牛排	5	0	0
预制冷鲜牛柳	6	4	66.7

3 讨论与结论

自从“假牛肉”事件曝光以来,肉制品掺假已成为公众关注的热点问题。作为对肉类掺假进行监管的有效手段,基于PCR和荧光定量PCR的猪、牛等动物源性检测技术已日益成熟,并逐步进入国内外检测技术标准^[18-19]。然而,由于使用鸭肉假冒牛羊肉违法行为被揭露的时间不长,因此国内目前仍未有使用荧光定量PCR技术进行鸭源性成分定性和定量检测的报道。本研究基于鸭线粒体基因组序列设计特异性引物和荧光探针,建立了肉制品中鸭源性成分检测的TaqMan荧光定量PCR技术。经验证,方法的特异性良好,检测灵敏度达到1.78pg/反应,根据标准曲线可对鸭肉DNA进行定量检测。应用本研究方法对市售羊肉串、预制牛肉片等进行检测,发现大量使用鸭肉进行肉类掺假的行为。

在引物与探针的设计中,引物的近3'端碱基以及探针自5'端至中间位置的碱基是影响方法特异性的关键碱基。一般认为,当模板DNA在上述位置有3个以上的碱基与引物和探针不能匹配时,荧光定量PCR无特异性扩增。本研究选取了鸭线粒体基因组中的一段保守序列设计引物与探针,在上述影响引物与探针特异性的关键结合位点中,其他常见肉类物种与鸭均存在多个差异碱基,从而确保其对于鸭的特异性。实验证实,以常见畜肉和禽肉作为模板均无扩增,表明本研究设计的鸭源性引物与探针特异性良好。

与张娟等^[16]使用PCR扩增、电泳检测的流程对食品中的鸭源性成分的检测方法相比,本研究建立的荧光定量PCR方法在确保特异性的前提下,将检测灵敏度提高了1~2个数量级;同时,利用荧光定量PCR仪的Fast模式可将检测时间缩短至40min,大大优于张娟等方法的3~4h,且不需使用溴化乙锭等有毒试剂,具有快速、灵敏、安全等多方面的优势。

肉类鉴别的靶基因主要包括3类:线粒体基因组DNA、细胞基因组中的重复序列和单拷贝序列^[2]。其

中, 线粒体在细胞中拷贝数多、食品加工过程中不易完全破坏, 以之为靶点的检测方法灵敏度高, 是肉类定性鉴别的首选。然而, Ballin^[19]、何玮玲^[20]等认为不同组织中线粒体数量的区别可能导致定量结果的偏差。本研究对不同基于鸭肌肉组织DNA质量与反应Ct值建立了标准曲线, 对不同鸭组织提取的DNA进行定量。结果表明, 该方法对于未知肌肉组织的定量结果较准确; 对于心脏和肝脏等组织, 由于线粒体数量多于肌肉组织导致定量结果偏大。然而, 对于不同组织的定量结果均在实际值的3倍以内, 因此该定量方法对于检测模板DNA中鸭源性成分的大致含量、从而判断食品中鸭源性成分是主成分还是来自于污染仍然具有一定的实际意义。

参考文献:

- [1] 李家鹏, 乔晓玲, 田寒友, 等. 食品和饲料中动物源性成分检测技术研究进展[J]. 食品科学, 2011, 32(9): 340-347.
- [2] 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.
- [3] YIN R H, BAI W L, WANG J M, et al. Development of an assay for rapid identification of meat from yak and cattle using polymerase chain reaction technique[J]. Meat Science, 2009, 83(1): 38-44.
- [4] FAJARDO V, GONZALEZ I, LOPEZ-CALLEJA I, et al. Identification of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) using polymerase chain reaction targeting specific sequences from the mitochondrial 12S rRNA gene[J]. Meat Science, 2007, 76: 234-240.
- [5] GHOVVATI S, NASSIRI M R, MIRHOSEINI S Z, et al. Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay[J]. Food Control, 2009, 20(8): 696-699.
- [6] MANE B G, MENDIRATTA S K, TIWARI A K. Polymerase chain reaction assay for identification of chicken in meat and meat products[J]. Food Chemistry, 2009, 116(3): 806-810.
- [7] 刘昊, 连春, 王长康, 等. 猪源性成分的PCR检测技术优化研究[J]. 中国农学通报, 2009, 18(1): 1-6.
- [8] 曾少灵, 秦智锋, 阮周曦, 等. 多重实时荧光PCR检测牛、山羊和绵羊源性成分[J]. 生物工程学报, 2009, 25(1): 139-146.
- [9] DI P A, FORTE V T, CONVERSANO M C, et al. Duplex polymerase chain reaction for detection of pork meat in horse meat fresh sausages from Italian retail sources[J]. Food Control, 2005, 16(5): 391-394.
- [10] DOOLEY J J, PAINE K E, GARRETT S D, et al. Detection of meat species using *TagMan* real-time PCR assays[J]. Meat Science, 2004, 68(3): 431-438.
- [11] KESMEN Z, YETIMAN A E, SAHIN F, et al. Detection of chicken and turkey meat in meat mixtures by using real-time PCR assays[J]. Journal of Food Science, 2012, 77(2): 167-173.
- [12] KESMEN Z, GULLUCE A, SAHIN F, et al. Identification of meat species by *TagMan*-based real-time PCR assay[J]. Meat Science, 2009, 82(4): 444-449.
- [13] LOPEZ-ANDREO M, GARRIDO-PERTIERRA A, PUYET A. Evaluation of post-polymerase chain reaction melting temperature analysis for meat species identification in mixed DNA samples[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(21): 7973-7978.
- [14] 李林, 陈继明, 王志亮. Real-time PCR和常规PCR方法快速鉴定肉骨粉中的牛源性成份[J]. 中国预防兽医学报, 2005, 10(1): 50-54.
- [15] 范丽丽, 李培, 丁洪流, 等. 实时荧光PCR技术快速检测食品中的牛源成分[J]. 食品工业科技, 2013, 34(12): 65-67.
- [16] 张娟, 宗卉, 张利平. 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.
- [17] 中国检验检疫科学研究院. 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] 中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局, 宝生物工程(大连)有限公司, 中国检验检疫科学研究院. 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.
- [19] BALLIN N Z, VOGENSEN F K, KARLSSON A H. Species determination: can we detect and quantify meat adulteration?[J]. Meat Science, 2009, 83(2): 165-174.
- [20] 何玮玲, 黄明, 张驰. 食品中肉类成分种属鉴别技术研究进展[J]. 食品科学, 2012, 33(3): 304-307.