



基于 SNP 标记的肉类溯源技术

张小波^{1,2}, 何 慧², 吴 潇¹, 朱连龙¹, 唐雪明^{1,*}

(1.上海市农业科学院生物技术研究所, 上海 201106; 2.华中农业大学食品科学技术学院, 湖北 武汉 430070)

摘 要: 本文阐述了建立肉类溯源系统对我国食品安全和国际贸易的重要性, 并对溯源管理、食品溯源系统进行概述。重点讲述各种 DNA 标记技术的原理、利弊, 以及在肉制品溯源标记应用的比较、SNP 位点的检测方法等。最后指出了我国肉类溯源技术研究的方向和趋势。

关键词: 肉类安全; DNA 溯源; SNP(single nucleotide polymorphisms)检测

A Review of Meat Traceability Technology Based on SNP Markers

ZHANG Xiao-bo^{1,2}, HE Hui², WU Xiao¹, ZHU Lian-long¹, TANG Xue-ming^{1,*}

(1. Institute of Biotechnology Research, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China;

2. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: This article describes the importance of establishing meat traceability system for food safety and international trade, and summarizes the management of food traceability system. We also highlight the principles of various DNA markers and their pros and cons, compare the applications of meat traceability markers and introduce SNP detection methods. Finally development trends and research directions of meat traceability technology in China are presented.

Key words: meat safety; DNA traceability; SNP detection

中图分类号: TS207.7

文献标识码: A

文章编号: 1001-8123(2011)05-0040-06

肉类食品因味道鲜美且营养价值丰富而广受消费者的喜爱, 随着世界人口不断增长, 消费者对肉品的需求量也不断增加, 世界肉类生产总量一直是呈现持续增长的趋势。2004 年世界肉类产量为 25750 万吨, 较 1961 年的产量 7144 万吨增加了 18606 万吨, 增长 260%, 年均增长 3.04%^[1]。我国是肉类生产大国, 但出口份额却很小, 这是由于我国猪肉质量安全控制水平较低, 猪肉产品品质不符合发达国家进口标准。近日, 媒体报道了我国著名肉制品企业“双汇”品牌猪肉在猪的饲养过程中使用违禁的瘦肉精, 使消费者产生极大恐慌。随着生活水平的不断提高和保健意识的逐渐增强, 肉类安全问题已受到越来越多的关注和重视, 媒体呼吁政府部门和企业应尽快建立肉类市场的可追溯管理系统。除了瘦肉精等违规添加剂外, 影响肉类安全还有其他因素, 如养殖环境受到有害物质的污染致使在猪肉中蓄积, 动物生长过程感染致病性微生物, 兽药残留在体

内, 在动物屠宰、加工运输过程中受到病原性微生物如沙门氏菌和大肠杆菌的污染等。

肉产品的流通需经过养殖、屠宰、运输、加工及销售等不同环节, 在产品流通的各个环节都可能潜藏着食品安全隐患。建立肉产品全程的可追溯监控体系——肉类溯源管理体系, 可以有效控制肉产品的质量安全。溯源管理就是从产品逆向找到供体个体, 即通过追溯污染源的方式, 在食品安全事件中果断采取措施, 尽可能缩小污染传播的范围, 最大限度地降低风险和损失^[2]。目前世界上有很多国家已经积极发展肉类食品的溯源管理模式, 试图从源头上控制并消除食品安全隐患^[3], 并制定相应的法律法规制度来规定肉类溯源管理是控制肉类食品安全的必要前提^[4-5]。如日本在 2001 年就已经对牛肉生产进行溯源管理^[6-7], 欧盟的管理法规强制要求自 2005 年 1 月 1 日起在其地区销售的所有肉都必须具备可追溯性^[6-8], 加拿大、澳大利亚等国家也都相继建立肉类

收稿日期: 2011-05-11

基金项目: 国家“863”计划项目(2008AA100804); 上海市自然科学基金项目(09ZR1428000);

上海市启明星计划项目(10QA1406000); 上海市科委创新平台建设项目(10DZ2294103);

上海市国际合作项目(10410703500)

作者简介: 张小波(1985—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品安全。E-mail: zhangxiaobo1212@126.com

* 通信作者: 唐雪明(1970—), 男, 研究员, 博士, 研究方向为食品安全。E-mail: xueming70@gmail.com



溯源管理系统^[6,9]。我国肉类食品溯源管理尚在起步阶段,肉的生产许可只需三个证明和一个目标,远远不能满足食品安全控制要求。随着我国社会生产力的发展,以及人们对肉的质量安全水平要求的提高,建立肉类溯源系统将成为必要的趋势。

肉类溯源的管理系统分为3个子系统,包括动物个体标识系统、信息采集系统和中央管理平台。整个溯源过程产品物流与信息流应保持同步和一致,在产品供应链的各个环节每个参与者应记录产品相关信息;通过一系列技术方法对动物或动物产品保持一个可靠的识别^[10],并将信息延续到下一个环节;最终,所有信息积累到一起,在中央数据库进行保存,形成动物个体的历史档案。在此过程中如果个体标识出现错误标识,则会导致产品信息的丢失和混乱,而标识系统是不允许产生任何错误和漏洞的,因此标识方法是建立溯源管理系统最为关键的环节,也是整个系统所有技术中最困难的技术。近年来,随着科学技术的发展,已经逐渐产生了多种跟踪识别方法,标识技术的好坏可影响到溯源系统追溯的准确性。标识法应具备唯一性、安全性和永久性;在产品流通的整个周期都应保持其可识别状态;标识信息和数据应易读取,最好标记方法本身不对产品主体有较大影响。

目前能够用于肉类溯源识别的方法大致分为3类——物理方法(标签技术)、化学方法(同位素溯源)和生物技术(虹膜识别和DNA标记)。其中标签溯源、同位素及虹膜识别技术我国都开始有研究,但这些标记在应用过程中都会遇到一个致命的问题,在屠宰阶段,一旦肉块拆分,追溯将被中断,而中断的追溯链再次进行连接时,容易产生欺骗或错误。目前DNA标记是近几年国外新兴的一种用于大型牲畜的标记手段,但在国内却未见报道。标记本身是基于动物生命个体DNA序列的差异,不对动物自身造成影响,DNA标记就像一个嵌入生物体内的隐形标签,永远不会丢失。

1 DNA溯源技术

DNA溯源技术是通过建立个体DNA指纹图谱的方法实现的。过去,DNA指纹鉴定常常用于人类法医及亲子鉴定中,如今DNA标记也用于肉制品的溯源标识^[11]。当肉制品发生污染或被检出疾病时,对其进行DNA标记识别可以快速地追溯到它的原产地^[12]。

DNA决定了生命个体的物种、品种、品系等。即便是同一个品种或品系的动物个体之间,DNA序列也存在差异,即每个生命个体的DNA序列都是唯一的。针对同一生命个体而言,其体内的DNA在生命活动的生、老、病、死都不会发生改变,并且不同组织或器官的DNA序列都基本完全相同,无论是整个动物胴

体还是被分割的肉块,只要能够提取出较高质量的基因组DNA,便能对样品进行标记和检测,从而能够追溯到肉的个体来源。有研究显示,肉类食品在80℃高温下烹调后还可以提取出高分子质量DNA^[13],由此可知,DNA标记能够完成肉的从生产到餐桌的全程溯源。自20世纪80年代始,逐渐出现了数十种DNA标记方法,其中较为常见的有以下几类^[14-15]。

1.1 限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)

RFLP是最早应用的分子标记技术^[16],它反映了DNA分子不同酶切位点的分布情况。其原理是DNA序列的微小变化能够引起内切酶位点的产生或消失,限制性内切酶对不同个体处理后所产生的片段长度不同,通过凝胶电泳分子筛后可产生不同的条带,与克隆的DNA探针进行Southern杂交和放射自显影后可获得能够反映出个体特性的RFLP图谱。RFLP标记不受标记位点数目的限制,共显性好,结果很稳定,适合用于构建遗传连锁图谱。但是操作过程需构建DNA探针,步骤较为繁琐,不利于自动化操作;RFLP检测周期长、费用高,需接触放射性物质,不安全。

1.2 酶切扩增多态性(cleaved amplified polymorphism sequences, CAPS)

CAPS是将PCR技术与RFLP相结合的一种标记方法。通过设计引物,对基因组中某个基因或片段进行PCR扩增,扩增产物再通过RFLP分析,从而得到多态性信息。此法操作简单,所显示的是特异性片段的限制性长度变异的信息,精确性较高,且省去了探针和显影的步骤,成本相对较低。目前,CAPS常常用于动物的遗传育种标记。

1.3 扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphisms, AFLP)

AFLP是由1992年荷兰科学家Zabeau和Vos所创造^[17],其原理是将RFLP和RAPD相结合,用内切酶切割基因组DNA获得不同长度的片段,用特定的接头使这些DNA片段的两端连接,形成一个带接头的特异片段,通过接头序列和PCR引物3'末端的识别进行PCR扩增,最后通过聚丙烯酰胺电泳使这些特异的限制性片段分离。

AFLP结合了RFLP和RAPD两种技术的优点,使标记方法既具有RFLP的可靠性,又具有RAPD的灵敏性。此方法操作简单、成本较低、省去了制备探针和分子杂交的过程、多态信息含量丰富,是目前一种有效的分子标记。AFLP是第一代分子标记,在基因定位、连锁图谱的构建等方面应用较多。

1.4 简单重复序列(simple sequence repeats, SSR)

SSR是第二代分子标记,它是由于真核生物基因组中存在大量的重复序列而产生的标记。有些重复序列较



长, 大概由 15~65bp 组成的重复单元, 这种标记成为小卫星标记法, 而由 1~6bp 所组成的较小重复序列称为简单重复序列或微卫星 DNA(microsatellite DNA), 又称简短重复序列(short tandem repeat polymorphism, STRP)^[16], 最为常见的是(CA)ⁿ 和(TG)ⁿ 重复。多态性是来源于串联数目的不同或重复次数的不同。在技术上对微卫星进行分离和鉴定并不难, 通过设计特异性引物并进行 PCR 扩增。由于串联数目不同所扩增片段序列长短则不同, 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳可进行检测。基因组 DNA 所含丰富的微卫星多态性信息, 有研究显示, 在哺乳动物中每个基因中几乎都至少含有一个微卫星标记, 而在整个基因组中微卫星的平均拷贝数为 5~10 万个左右^[18], 微卫星标记常常用于基因作图、定向克隆、亲子鉴定、构建遗传图谱等等, 是较为常见的有效分子标记方法。

1.5 单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)

SSR 是第三代分子标记技术, 它是指基因组上的单个核苷酸发生变异而引起的多态性, 包括单个碱基的缺失和插入, 而更为常见的是单个核苷酸的替换形式^[19-20]。它又包括转换和颠换两种, 其比例大概为 2:1。SNP 是二等位基因多态, 也叫做双等位基因标记(biallelic marker), 有时也会有 3 个和 4 个等位基因多态性存在, 但这很罕见。由于二等位多态性是非此即彼的选择, 往往只分析 + / - 即可, 有利于进行基因分型和自动化筛选^[21]。SNP 分布十分广泛, 几乎在所有的已知或未知基因附近都能找到一系列的标记位点^[22-23], 在人体中, 每一千个碱基当中就会发生一个 SNP^[24], 而在其他的哺乳类动物的基因组中也很可能含有两到三百万个 SNP。Heaton 等^[25]从事用于动物识别的 SNP 标记的筛选和使用工作, 他们在牛的测试中发现每 96bp 中就检测到一个 SNP。

SNP 标记信息量丰富, 具有遗传稳定性, 并且适合高通量生产。SNPs 已经成为一种应用于商业诊断和亲子鉴定的重要的标记类型, 目前已经建立了产量精确自动化的分型系统技术。

2 DNA 溯源标记在肉类中的应用

2.1 肉类溯源的常用 DNA 标记方法

用于肉类 DNA 溯源标记应具备多态性高、分布广、能稳定遗传, 对 DNA 质量要求不高且操作简便等特点。目前 AFLP、SSR 和 SNP 标记都在 DNA 溯源中得到使用^[26], 例如 Massino 等^[27]验证了 AFLP 标记技术可对鸡肉产品(鸡肉、鸡蛋、鸡胚)等进行追溯, Maldini 等^[28]使用 AFLP 标记对 32 种海鱼及海产品进行追溯, Nakamura 等^[29]使用 25 个微卫星标记对日本爱知县农业研究中心 4 个家系的名古屋鸡进行分析和检测, 他们最终

找到了 5 个微卫星标记可以有效鉴别纯种名古屋鸡, 而 Ricardo 等^[30]利用微卫星标记成功地对牛肉产品进行追溯。Jalving 等^[31]从事鸡的溯源标记工作, 他们从数据库选出 5332 个候选 SNP 标记, 最后筛选获得 24 个可通过 BglII 酶切识别的 SNP 位点, 并检测了这组 SNP 溯源标记的有效性, Orrùa 等^[32]筛选出 18 个位于不同基因中含丰富信息的 SNP, 根据这 18 个 SNP 组建的 DNA 指纹图谱, 成功的对 528 头牛进行溯源。

2.2 几种常用于 DNA 溯源方法的比较

AFLP 标记是第一代分子标记法, 具有较丰富的多态性、遗传稳定性强且灵敏度高的特点, 但是这种方法对 DNA 模板的质量及操作人员的技农业水平要求都很高, 统计的时候难度也较大; SSR 标记是第二代分子标记法, 具有高度多态性, 突变率低, 成共显性遗传, 所需 DNA 量较少, 但是基因型的判断较为复杂, 过程繁琐, 不适于自动化分型; SNP 能够稳定遗传, 对 DNA 模板的质量要求不高, 并易于判型而适合高通量自动化检测分型, 是目前来讲用于肉类溯源分子标记最为有效的方法。Rohrer 等^[33]通过实验比较了一组 10 个微卫星的标记和一组 60 个 SNP 的标记, 结果发现 SNP 标记的灵敏度要远远高于微卫星标记。

3 SNP 的检测方法

检测 SNP 的方法有许多, 尤其是最近几年, SNP 的检测技术发展得很快。大致可以分为以下几类:

3.1 基于杂交的检测方法

基于杂交进行检测 SNPs 最早的例子是用等位基因特异性寡核苷酸(allele-specific oligonucleotide, ASO)检测噬菌体的点突变^[34], 这是根据单碱基错配双链的退火温度低于完全正确配对的双链, 因此只要控制在一定的温度, 就能确保后者可以顺利与靶 DNA 杂交, 而错配的探针杂交失败, 通过对放射性同位素标记的探针进行显影检测, 就能够检测到突变位点^[35]。探针杂交法需知待测检基因序列, 才能针对性合成变异的寡核苷酸探针, 杂交条件须严格控制、操作复杂、费用高且容易造成同位素污染。

基于杂交方法的 SNPs 检测还有 DNA 芯片法, 又称基因芯片, 是固相支持介质上进行分子杂交并原位荧光检测的一种高通量检测方法^[36]。在介质表面有序固定大量的基因探针, 形成 DNA 的微阵列^[37], 根据已知的芯片序列而设计探针, 通过优化操作, 探针与基因芯片杂交, 而错配的碱基则不能进行杂交, 因此未杂交的探针信号被洗脱掉, 最后利用激光共聚焦扫描或电荷耦合器件(charge-coupled device, CCD)成像对杂交结果进行检测, 计算机可根据荧光信号的强弱或种类检测出被检序列的碱基类别^[38]。基因芯片技术具有信息量大和



自动化程度高的突出优点,但每个 SNPs 位点都要设计一个芯片,芯片造价十分昂贵。

3.2 基于构象的检测方法

基于构象而产生的检测方法包括许多,包括变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)或温度梯度凝胶电泳(temperature gradient gel electrophoresis, TGGE)、单链构象多态性(single strand conformation polymorphism, SSCP)和变性高效液相色谱方法(denaturing high-performance liquid chromatography, DHPLC)。本文着重介绍 SSCP 和 DHPLC 两种方法。

SSCP 是根据 DNA 序列单个核苷酸发生改变引起 DNA 卷曲结构发生改变,致使有序列差异的 DNA 分子通过非变性凝胶时,由于构象不同,所受到的阻力大小有差异,根据电泳时移动的速度不同进行检测。一般所检测的 DNA 片段不超过 500bp,过长片段会减少单链 DNA 形成发卡结构的几率^[39]。

DHPLC 的核心部件是一个 DNA 分离柱,柱子里面填充带正电荷的化学物质, DNA 是带负电荷的, DNA 在过柱子时会与填充物结合,由于单链 DNA 带电量小于双链 DNA,因此在洗脱的时候总是单链容易被洗脱掉,而双链 DNA 洗脱时间较长。根据 DNA 同源双链与异源双链的解链温度不同,控制温度在异源双链发生变性而同源双链未发生变性时,异源双链 DNA 先变成单链 DNA,因此先被洗脱,最后根据色谱峰的数目鉴定 SNPs。DHPLC 可进行大量样本的 SNPs 检测,自动化程度高,效率高,尤其适合大片段的 DNA 分析。基于构象的检测方法可以对未知 SNPs 进行检测^[40]。

3.3 实时荧光检测技术

RT-PCR 是根据 PCR 过程中和 PCR 过程后所产生的不同的荧光信号,通过检测这种信号的强弱来区分等位基因类型,同时它也基于荧光能量转移原理(fluorescence resonance energy transfer, FRET)。在检测 SNP 位点时,需要设计两条常规引物和一条探针,探针的 3' 端连接猝灭剂基团,而 5' 端连接荧光剂基团,两个基团同时存在于完整的探针中时,猝灭剂基团通过 FRET 的作用,使荧光标记不能发出荧光。若探针与 SNP 位点完全匹配,可以形成 PCR 目的片段,根据 Taqman DNA 聚合酶 5' -3' 端的外切酶活性,将探针 5' 端荧光标记从探针上切下来,探针结构被破坏而释放出荧光信号,由此判断 SNP 变化^[35,41-42]。这种方法也被称为 TaqMan 探针技术,它最大的优点是不需要分离或洗脱等 PCR 后处理过程,因此检测速度快。但是,一个 TaqMan 探针只能对一个 SNP 检测,且容易产生假阳性污染。Van Hoeyveld 等^[43]引进了 DNA 小沟结合探针技术,能够提高 SNP 检测成功率^[44],且可同时检测较为接近的多个 SNP。

Tyagi 等^[45]在 1996 年建立了分子信标技术,分子信标是一个内部部分序列互补配对的 U 型单链寡核苷酸探

针,两端加有荧光剂基团和猝灭剂基团。二者同时存在与探针两端,由于在空间结构上十分接近,因此不会产生荧光;而探针与目标序列完全互补后,二者将被分开,空间距离相隔较远,脱离了 FRET 作用而产生荧光,通过检测荧光的强弱则可检测到 SNP。后来,又发展了多色荧光标记,如 4 种不同颜色的荧光,在同一 PCR 中就可同时检测 4 个 SNP^[46-48]。

3.4 引物延伸法

引物延伸法主要是根据加入不同类型的 dNTP 或者 ddNTP 进行引物的延伸,检测延伸的反应信号可以判断 SNP 类型。主要包括微测序(minisequencing)和焦磷酸测序(pyrosequencing)两种。

微测序又称单碱基引物延伸(single nucleotide primer extension, SnuPE),其原理是先设计一条引物,3' 端位于待测 SNP 位点的上游一个碱基的位置,加入不同荧光标记的 ddNTP,只有与 SNP 互补的 ddNTP 才使得引物继续延伸,通过对延伸中碱基上的荧光进行检测就可以判断出 SNP 的类型^[42]。

焦磷酸测序技术^[49]是一种基于生物发光分析法测定焦磷酸(PPi)的测序技术。在 DNA 聚合酶的作用下,依次加入 4 种 dNTP,若加入的 dNTP 正好与模板碱基互补得以延伸时,会释放 1 个分子的 PPi,磷酸化酶可将 PPi 转化为化学能 ATP,若此时加入荧光素酶,ATP 可使荧光素氧化发光。同时在反应液中加入核苷酸酶使未结合的 dNTP 快速分解。该方法自动化程度高,高通量检测,因此适合大规模的 SNP 检测分析。

寡核苷酸连接分析(oligonucleotide ligation assay, OLA)的原理是通过 PCR 技术扩增出目的片段后,对 PCR 产物进行变性处理,加入两条互补于待测 SNP 位点一侧序列的等位基因特异性探针和另一侧序列的公共探针,通过 DNA 连接酶的作用与单链 DNA 互补的等位基因特异性探针与公共探针产生连接。但若等位基因特异性探针 3' 端存在错配碱基,则不会产生连接。由此可以检测 SNP。

滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)技术^[50]是采用一对等位基因特异性开环(OCP)和两条引物进行 PCR 扩增。在连接酶的作用下,与目标序列完全互补配对的等位基因特异性开环 5' 端与 3' 端发生连接反应,形成闭环的 DNA 序列。闭环 DNA 进行 PCR 扩增,所使用的引物两端分别标有荧光剂和猝灭剂,当它与 OCP 形成双链时,荧光剂与猝灭剂被分开,可检测到荧光信号。

3.5 PCR-RFLP

RFLP 技术是最为经典和常用的技术,其原理是根据限制性内切酶可对 DNA 序列产生特异性酶切反应,当等位基因碱基序列发生改变时可能引起某种内切酶的酶切位点发生改变(产生或者消失),利用内切酶对两个等位基因识别的差异,产生大小不同的切割片段,通



过凝胶电泳对不同长度片段的迁移率不同,来检测核苷酸序列是否发生突变,从而判断出 SNP 类型。为了克服 RFLP 法难以对相隔很近的突变点进行检测这一难题,可在 RFLP 之前先进行 PCR 扩增。

PCR-RFLP 是对包含 SNP 位点的一个 DNA 片段进行特异性扩增,再通过 RFLP 进行 SNP 分析。这种方法操作简便,精确度高。但检测前提是 SNP 位点两侧需要含有限制性内切酶的识别序列,SNP 的存在可以使酶切位点发生改变,否则不能采用此技术。

3.6 其他 SNP 检测方法

基质辅助的激光吸附/离子化飞行时间质谱分析(matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass analyzer, MALDI-TOF MS)是根据引物在延伸反应中所结合的不同碱基质量不同,因此在质谱仪上显示的峰也不同。将碱基修饰后还可提高检测敏感性^[51-52]。此外,还有基于物理技术的毛细管电泳技术(capillary electrophoresis, CE)、原子探针显微镜测序、纳米探针电路检测技术^[53],以及化学错配裂解法(chemical mismatch cleavage, CMC)等。

事实上,SNP 的检测方法还有许多,每种检测手段都有各自的优缺点,且没有一种方法是适用于所有的 SNP 检测。因此,需要根据研究目的不同而正确地选择符合实验的检测方法。

4 基于 SNP 标记的肉类溯源

建立肉类 DNA 溯源系统需要在动物源产地对每个个体进行 DNA 标识,并保留标准样品。通过计算机建立个体 DNA 标识的信息数据库,以便在屠宰、加工和销售等环节都能随时追溯到源产地。建立个体标识系统需要确定一组 SNP 标记位点,确保能够准确识别每个个体。

对数据库中已报道的 SNPs 进行研究和分析,根据 SNPs 多态性和染色体位置进行初步筛选。为节省劳动和成本,应选择高度或中度多态的位点作为候选标记位点,而放弃低度多态的位点;尽量选择位于不同染色体上的 SNPs,防止形成遗传连锁。最后通过实验证明,筛选出变异度高、能够独立遗传且引物效率高的 SNPs 作为最佳溯源标记所使用的 SNPs 组合。

个体 DNA 序列具有唯一性,因此能够准确无误地识别每个个体。而现实中也往往会出现几个样品的标记位点高度一致的情况,如同卵双胞胎两个个体具有相同的基因型,不过这种情况发生的概率很小。一般个体标识在源产地数据库中都应找到唯一与其对应的基因型。如果在数据库中没有找到适合与检测样品匹配的样品,则有可能出了错误,比如基因分型出错。检测时与数据库不匹配还有可能存在另外一种情况,即来自同一个体的不同部位提取的 DNA,其基因型可能不同,即体细胞发生突变,这种情况发生的概率也非常

小^[54]。在所有标准样品中,任何一个样品都应该具有唯一的基因型,如果有两个样品的 SNP 组合都一样,就会出现错误识别,在肉类食品溯源系统中,错误识别率应当控制在一定范围内。Vazquez 建议应控制在 10^{-3} 以下,他曾用微卫星标识法建立了 DNA 指纹图谱对肉牛进行溯源,采用 3 个具有多态性的微卫星标识,错误识别率为千分之一^[55]。而 Cunningham 等^[56]则推荐这种错误识别率应控制在 10^{-5} 以下。一组标记位点的数目一般由标准样品的数目来确定(表 1 是将错误识别率降低到 10^{-5} 下所需标记数目的参考值^[54])。Orrùa 等^[32]筛选出 18 个 SNP 对 528 头牛进行溯源,错误识别率仅为 $1.39 \times 10^{-6} \sim 0.07 \times 10^{-6}$ 。

表 1 错误识别率低于 10^{-5} 时所需标记数目的近似值

Table 1 Approximate number of markers required to reduce the probability that there are no matches to any reference individuals below 10^{-5}

标准样品数量	标记类型	
	四等位基因(微卫星)	二等位基因(SNPs)
1	6	13
10	7	15
100	8	17
1000	9	20
10000	10	22
100000	11	25
1000000	12	27

5 结 语

随着我国人口的增长和人民生活水平的不断提高,消费者对肉类的需求量也不断增加,对于如何进行肉类食品安全有效追溯,及时处理“问题肉”对我国肉市场来讲是一个严峻的考验。肉类 DNA 溯源技术在国外已经兴起,而我国对肉制品的管理还只停留在简单的标签溯源技术,已经远远落后于发达国家。肉类 DNA 溯源技术是源于生物个体的 DNA 遗传图谱,具有唯一性和稳定性,而且不像标签易丢失、损坏,或是人为更换。因此,在我国研究并建立 DNA 指纹图谱数据库,建立肉类食品的 DNA 溯源管理系统对我国肉类品质监管具有重要意义。

参考文献:

- [1] 贾敬敦,王喆. 中国农产品加工发展战略[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 433-434.
- [2] 孟刚. 食用农产品及污染物溯源技术通过鉴定[EB/OL]. (2009-07-03) [2011-04-15]. <http://epaper.xplus.com/papers/zgxfzb/20090703/n46.shtml>.
- [3] SMITH G C, SAUNDERS L. International identification, traceability and verification: the key drivers and the impact on the global food industry[C]. Houston: International Livestock Congress, 2005.
- [4] OZAWA Y, ONG B L, AN S H. Traceback systems used during recent epizootics in Asia[J]. Scientific and Technical Review, 2001, 20(2): 605-613.
- [5] CAPORALE V, GIOVANNINI A, Di FRANCESCO C D, et al. Import-



- tance of the traceability of animals and animal products in epidemiology [J]. Scientific and Technical Review, 2001, 20(2): 372-378.
- [6] 方超, 赵林度. 基于虹膜识别的肉类食品可追溯系统研究[J]. 中国安全科学学报, 2008, 18(7): 11-16.
 - [7] 樊红平, 冯忠泽, 杨玲, 等. 可追溯体系在食品供应链中的应用与探讨[J]. 生态经济, 2007, 23(4): 63-65.
 - [8] AMMENDRUP S, FÜSSEL A E. Legislative requirements for the identification and traceability of farm animals within the European union[J]. Scientific and Technical Review, 2001, 20(2): 437-444.
 - [9] WILSON D W, BEERS P T. Global trade requirements and compliance with world trade organization agreements: the role of tracing animals and animal products[J]. Scientific and Technical Review, 2001, 20(2): 379-384.
 - [10] SHACKELL G H, DODDS K G. DNA-based traceability of meat[M]// FIDEL T. Meat Biotechnology. New York: Springer, 2008.
 - [11] 吴潇, 唐雪明. 肉制品的 DNA 溯源技术[J]. 猪业科学, 2009, 12(3): 105-106.
 - [12] HEATON M P, KEEN J E, CLAWSON M L, et al. Use of bovine single nucleotide polymorphism markers to verify sample tracking in beef processing[J]. Journal of the American Veterinary Medicine Association, 2005, 226(8): 1311-1314.
 - [13] ASLAN Ö, HAMILL R M, SWEENEY T, et al. Integrity of nuclear genomic deoxyribonucleic acid in cooked meat: Implications for food traceability[J]. Journal of Animal Science, 2009, 87(1): 57-61.
 - [14] 闫华超, 高岚, 李桂兰. 分子标记技术的发展及应用[J]. 生物学通报, 2006, 41(2): 17-20.
 - [15] 马克世, 胡炳义. 分子标记的发展及应用[J]. 周口师范学院学报, 2006, 23(2): 81-84.
 - [16] 朱玉贤, 李教. 现代分子生物学[M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2002: 371-376.
 - [17] VELAPPAM N, SONDGRASS J L, HAKOVIRTA J R. Rapid identification of pathogenic bacteria by single-enzyme amplified fragment length polymorphism analysis[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2001, 39(2): 77-83.
 - [18] 吴登俊, 马丁·费尔斯特. 家畜基因组遗传多态标记: 微卫星标记研究进展(上)[J]. 国外畜牧科技, 1999, 26(1): 33-35.
 - [19] 杨昭庆, 洪坤学, 褚嘉佑. 单核苷酸多态性的研究进展[J]. 国外医学: 遗传学分册, 2000, 23(1): 4-8.
 - [20] 张效萌, 韩金祥. 单核苷酸多态性的检测及其在医药领域的应用[J]. 生命的化学, 2001, 21(4): 325-327.
 - [21] 吴昕彦, 张庆华, 陈竺. 单核苷酸多态性研究及应用[J]. 中华医学遗传学杂志, 2000, 17(1): 57-59.
 - [22] 王淑新, 连林生. 单核苷酸多态性作为新一代分子标记的优越性[J]. 中国畜牧兽医, 2008, 35(4): 31-33.
 - [23] The International SNP Map Working Group. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms[J]. Nature, 2001, 409: 928-933.
 - [24] COOPER D N, SMITH B A, COOKE H J. An estimate of unique DNA sequence heterozygosity in the human genome[J]. Human Genetics, 1985, 69(3): 201-205.
 - [25] HEATON M P, HARHAY G P, BENNETT G L, et al. Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in US beef cattle[J]. Mammalian Genome, 2002, 13(5): 272-281.
 - [26] 吴潇, 张小波, 朱连龙, 等. 肉产品分子溯源标记的研究进展[J]. 食品科学, 2010, 31(7): 308-311.
 - [27] MASSINO D M, CHIARA T, BARBARA C, et al. Genetic traceability of chicken breeds[J]. Agriculturae Conspectus Scientificus, 2003, 68(4): 255-259.
 - [28] MALDINI M, NONNIS M, FORTES F, et al. Fish and seafood traceability based on AFLP markers: Elaboration of aspecies database[J]. Aquaculture, 2006, 261(2): 487-494.
 - [29] NAKAMURA A, KINO K, MINEZAWA M, et al. A method for discriminating a Japanese chicken, the nagoya breed, using microsatellite markers[J]. Poultry Science, 2006, 85(12): 2124-2129.
 - [30] RICARDO F D, BORIS S D, RENATO C R, et al. Implementation of amolecular systemfor traceability of beef based onmicrosatellitemarkers [J]. Chilean Journal of Agricultural Research, 2008, 68(4): 342-351.
 - [31] JALVING R, VAN'T R S, Van OOST B A. Chicken single nucleotide polymorphism identification and selection for genetic mapping[J]. Poultry Science, 2004, 83(12): 1925-1931.
 - [32] ORRÚA L, CATILLO G, NAPOLITANO F, et al. Characterization of a SNPs panel for meat traceability in six cattle breeds[J]. Food Control, 2009, 20(9): 856-860.
 - [33] ROHRER G A, FREKING B A, NONNEMAN D. Single nucleotide polymorphisms for pig identification and parentage exclusion[J]. Animal Genetics, 2007, 38(3): 253-258.
 - [34] WALLACE R B, SHAFFER J, MURPHY R F, et al. Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to Φ X 174 DNA: the effect of single base pair mismatch[J]. Nucl Acids Res, 1979, 6(11): 3543-3558.
 - [35] 唐棣, 王志民. SNPs 检测方法研究进展[J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2007, 25(2): 405-410.
 - [36] 仪军玲, 李彩霞, 胡兰. 单核苷酸多态性及其检测方法[J]. 证据科学, 2008, 16(6): 757-764.
 - [37] 杨明星, 高志贤, 王升启. 基因芯片及其应用[J]. 传感器技术, 2002, 21(2): 54-59.
 - [38] WANG D G, FAN Jianbing, SIAO C J, et al. Large-scale identification, mapping and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome[J]. Science, 1998, 280: 1077-1082.
 - [39] 欧阳建华, 柳小春, 施启顺, 等. 单核苷酸多态性及其检测方法[J]. 江西农业大学学报, 2003, 25(6): 920-924.
 - [40] 沈靖, 王润田, 徐希平. 筛查未知SNPs的变性高效液相色谱(DHPLC)技术[J]. 国外医学: 遗传学分册, 2001, 24(6): 341-344.
 - [41] 王晓玲, 马玉珍, 旭日干. 单核苷酸多态性检测技术的研究进展[J]. 生物技术通报, 2006(6): 64-68.
 - [42] 汪维鹏, 倪坤仪, 周国华. 单核苷酸多态性检测方法的研究进展[J]. 遗传, 2006, 28(1): 117-126.
 - [43] Van HONYVELD E, HOUTMEYERS F, MASSONET C, et al. Detection if single nucleotide polymorphisms in the mannose binding lectin gene using minor groove binder DNA probes[J]. J Immunol Methods, 2004, 287(1/2): 227-230.
 - [44] De KOK J B, WIEGERINCK E T, GIESENDORF B A, et al. Rapid genotyping of single nucleotide polymorphisms using novel minor groove binding DNA oligonucleotides (MGB2p robes)[J]. Hum Mutat, 2002, 19(5): 554-559.
 - [45] TYAGI S, KRAMER F R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization[J]. Nat Biotechnol, 1996, 14(3): 303-308.
 - [46] PIATEK A S, TYAGI S, POL A C, et al. Molecular beacon sequence analysis for detecting drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Nat Biotechnol, 1998, 16(4): 359-363.
 - [47] KOSTRIKIS L G, TYAGI S, MHLANGA M M, et al. Spectral genotyping of human alleles[J]. Science, 1998, 279: 1228-1229.
 - [48] TYAGI S, BRATU D P, KRAMER F R. Multicolor molecular beacons for allele discrimination[J]. Nat Biotechnol, 1998, 16(1): 49-53.
 - [49] 周国华, 古卓良, 章杰兵. 生物发光分析法检测 P53 基因上的突变点[J]. 药学报, 2002, 37(1): 41-45.
 - [50] PICKERING J, BAMFORD A, GODBOLE V, et al. Integration of DNA ligation and rolling circle amplification for the homogeneous, endpoint detection of single nucleotide polymorphisms[J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(Suppl 1): 60.
 - [51] CHAMCZYNSKI P, SACCHI N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction[J]. Anal Biochem, 1987, 162(36): 156-159.
 - [52] 陈颖, 王刚, 赵俊霞. 高等植物体内的肌动蛋白[J]. 生物学报, 2003, 38(1): 13-15.
 - [53] 陈冬, 吴登俊. 单核苷酸多态性检测方法的研究进展[J]. 生物技术通报, 2008(2): 93-98.
 - [54] SHACKELL G H, DODDS K G. DNA-based traceability of meat. meat biotechnology[M]. New York: Springer, 2008.
 - [55] VAZQUEZ J F, PEREZ T, URENA F. Practical application of DNA fingerprinting to trace beef[J]. Journal of Food Protection, 2004, 67(5): 972-979.
 - [56] CUNNINGHAM E P, MEGHEN C M. Biological identification systems: genetic markers[J]. Rev Sci Tech, 2001, 20(2): 491-499.