

鸭肉冒充牛羊肉的分子生物学检测

王建昌, 王金凤, 陈瑞春, 田振祥

(河北出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 河北 石家庄 050051)

摘要: 针对送检牛肉和羊肉样品, 设计合成检测动物源性成分的通用引物, 并对 PCR 产物测序后在 NCBI 数据库中进行比对; 根据牛、羊、鸭源性成分检测的相关标准, 合成引物和探针, 进行送检样品中牛、羊和鸭源性成分的实时荧光 PCR 检测。结果表明: 在 7 份送检样品中 4 份检测到鸭源性成分, 2 份检测到牛源性成分, 1 份检测到羊源性成分。实时荧光 PCR 方法灵敏性更高、特异性更强、结果判定更为迅速。

关键词: 鸭源性成分; 通用引物; 实时荧光 PCR

Molecular Biological Detection of Adulteration of Mutton and Beef with Duck

WANG Jian-chang, WANG Jin-feng, CHEN Rui-chun, TIAN Zhen-xiang

(Center of Technology, Hebei Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: A molecular biological method was established to detect mutton and beef samples suspected of being adulterated with duck. Universal primers for the detection of components of animal origin were designed. The PCR amplification products were sequenced before NCBI database searching for sequence alignment. Primers and probes were synthesized according to relevant detection standards for the real-time PCR detection of bovine-origin, sheep-origin and duck-origin components. Of 7 tested samples, 4 contained duck-origin components, 2 contained bovine-origin components, and 1 contained sheep-origin components. This real-time PCR assay was sensitive, specific and rapid.

Key words: duck-origin component; universal primers; real-time PCR

中图分类号: S851

文献标识码: A

文章编号: 1001-8123(2012)06-0020-04

在肉制品市场上个别单位和个人为追求经济利益, 使用低价劣质肉冒充高价优质肉, 尤以掺杂异种肉造假行为最为常见。这不仅仅涉及经济、营养价值和食品安全等问题, 更直接影响着消费者的身体健康, 并涉及宗教信仰等问题。最近在山东、陕西和河南等地陆续出现使用鸭肉冒充牛羊肉的报道, 不法分子将大量鸭肉和少量牛羊脂肪、下脚料混合在一起作为牛羊肉出售, 赚取高额利润。

目前, 对肉种类的鉴别方法主要有: 以显微镜观察为基础的方法, 如通过肉制品的味道、色泽、肉类的纹理等进行肉类来源的判别; 以检测蛋白质为基础的方法, 如电泳法、免疫法、酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、等电聚焦以及层析色谱法和质谱技术; 以检测 DNA 为基础的方法, 如核酸探针杂交、限制性片段长度多态性聚合酶链反应(polymerase chain reaction-fragment length polymorphism, PCR-RFLP)分析、DNA 指纹分析和 PCR 特异扩增。以显微观察为基础的方法, 需要丰富的经验, 并且具有极

大的主观性, 主要用于生鲜肉类的鉴别。在肉制品的加工过程中, 蛋白质容易变性, 基于蛋白质检测方法的敏感性和特异性大大降低, 并且这些方法大都存在着成本高、工作量大、对检测对象要求高等缺点。在基于肉类 DNA 的检测方法中, 杂交探针需要用荧光或放射性物质进行标记; PCR-RFLP 分析法中使用的限制性内切酶对 PCR 产物进行酶切分析有诸多不便; 指纹分析中 DNA 指纹操作难度相对较大, 故这 3 种 DNA 检测的方法在实际检测中都较少应用, 且鉴别方法繁琐, 耗时较长。而基于特异性靶基因扩增的 PCR 方法以其简便、准确、灵敏的特点, 在实际应用中最为广泛。目前我国也建立了一系列基于 PCR 方法的饲料、食品和化妆品中动物源性成分检测和肉类鉴别的国家标准和行业标准^[1-2]。

本研究采用 Bottero 等^[3]报道的动物源性成分检测通用引物进行 PCR 扩增, 并进行测序比对; 同时采用国家标准和行业标准中关于牛羊鸭源性成分的检测方法, 通过普通 PCR 方法和荧光 PCR 方法对送检样品进行牛羊鸭成分分析, 同时对两种方法进行比较。

收稿日期: 2012-05-07

作者简介: 王建昌(1981—), 男, 博士, 主要从事动物及动物产品检验检疫研究。E-mail: jianchangwang1225@126.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

用于阳性对照的牛肉、羊肉和鸭肉 市售；待检样品均来自某客户，共 7 份，分别标示为鲁西黄牛、羔羊 180d、鲁西黄牛、牛肉卷、羔羊 180 卷、鲁西黄牛和德顺祥精品肥牛，样品分别命名为 a、b、c、d、e、f、g。

1.2 仪器与设备

Wizard 基因组 DNA 提取试剂盒(Promega, lot313926); 2 × Taq PCR MasterMix(天根, lotKT201)、DNA Marker(天根); Premix Ex Taq(lotBK201)、BK401 牛羊源性成分检测试剂盒 宝生物工程(大连)有限公司(Takara 公司); 核酸蛋白分析仪 德国 Eppendorf 公司; PCR 仪、AB7500 实时荧光定量 PCR 仪、DNR minibis Pro 凝胶成像系统。

通用引物、实时荧光 PCR 的鸭源性成分检测引物探针，均由 Takara 公司合成，具体信息见表 1。

表 1 实验所用引物探针序列信息

引物名称	引物探针序列	片段大小 /bp	资料来源
通用	F: 5'-AAGACGAGAAGACCCTTGGACTTTA-3'	牛羊 234	Bottero 等 ^[3]
	R: 5'-GATTGCGCTGTTATCCCTAGGGTA-3'	鸭 249	
鸭	F: 5'-AAGCCTTCCTCTAGCTCAGC-3'	80	SN/T 2727—
	R: 5'-AGAAATGCTTTAGTTAAGTC-3'		2010《饲料中禽
	Probe 5'-FAM-CTCAGCGCTTAAACAACGC		源性成分检测方法:
	-TAMRA-3'		实时荧光 PCR 方法》

1.3 方法

1.3.1 样品 DNA 的提取和浓度测定

使用灭菌剪刀在作为阳性对照的牛肉、羊肉、鸭肉和待检样品不同部位取样，置于灭菌研钵中剪碎，加入液氮充分研磨，取样。按照试剂盒说明进行基因组 DNA 提取。将提取的基因组 DNA 做“100 ×”稀释，测定浓度和纯度。

1.3.2 通用引物 PCR 扩增

PCR 扩增体系 50 μL: 2 × Taq PCR Master Mix 25 μL, 上下游引物各 1 μL(10 pmol/μL), 模板 DNA 50~100 ng, 用 ddH₂O 补足体系。

扩增条件: 94℃ 预变性 5min; 94℃ 变性 30s, 55℃ 退火 35s, 72℃ 延伸 45s, 32 个循环; 72℃ 延伸 5min。同时设立空白对照(ddH₂O)。

1.3.3 样品中鸭源性成分检测

按照 SN/T 2727—2010《饲料中禽源性成分检测方法: 实时荧光 PCR 方法》进行。扩增体系 50 μL: 2 × Premix 25 μL, 鸭引物 1 μL(10 pmol/μL), 鸭探针 1 μL

(3 pmol/μL), 模板 DNA(50~100 ng)1 μL, ddH₂O 19 μL。扩增条件: 95℃ 预变性 5min; 95℃ 变性 10s, 58℃ 退火 32s, 40 个循环; 在 58℃ 时收集荧光信号。同时设立空白对照(ddH₂O)、阴性对照(牛羊基因组 DNA)和阳性对照(鸭基因组 DNA)。

1.3.4 样品中牛羊源性成分检测

按照牛羊源性成分检测试剂盒说明进行。扩增体系 25 μL: 2 × Premix 12.5 μL, 牛羊引物混合物 1 μL, 牛羊探针混合物 1 μL, 模板 DNA(50~100 ng)1 μL, ddH₂O 9.5 μL。扩增条件: 95℃ 预变性 10s; 95℃ 变性 5s, 60℃ 退火 34s, 40 个循环; 在 60℃ 时收集荧光信号。同时设立空白对照(ddH₂O)、阴性对照(鸭基因组 DNA)、牛或羊基因组 DNA 对照、阳性对照(试剂盒给出)。

1.3.5 普通 PCR 产物检测

取 PCR 产物 5 μL 使用 2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测，经凝胶成像系统拍照，分析电泳条带大小。将符合预期片段大小的 PCR 产物交由生工生物工程(上海)有限公司测序，并将测序结果在 NCBI 数据库中进行比对。

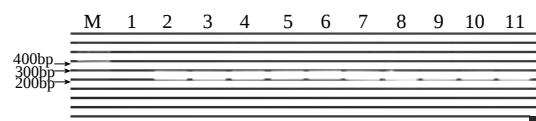
2 结果与分析

2.1 样品基因组 DNA 提取

经核酸蛋白分析仪测定，所提取的样品 DNA 质量浓度在 440~1200 ng/μL 之间，OD_{260nm}/OD_{280nm} 均在 1.6~2.0 之间。将样品 DNA 进行稀释，使其质量浓度为 25~50 ng/μL。

2.2 动物源性成分通用引物 PCR 结果

空白对照没有出现扩增条带，牛羊鸭及样品 DNA 作为模板的 PCR 产物在 200~300 bp 之间出现扩增条带(图 1)。说明提取的基因组 DNA 可以作为模板进行 PCR 扩增。



M. DNA 分子质量标准; 1. ddH₂O; 2. 牛肉; 3. 羊肉; 4. 鸭肉; 5. 样品 a; 6. 样品 b; 7. 样品 c; 8. 样品 d; 9. 样品 e; 10. 样品 f; 11. 样品 g。

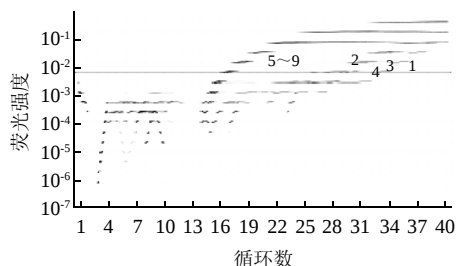
图 1 动物源性成分通用引物 PCR 结果

Fig.1 PCR results obtained with the universal primers for bovine-origin, sheep-origin and duck-origin components

将测序结果在 NCBI 数据中进行比对，结果表明牛肉为牛特异性 DNA 序列；羊肉为羊特异性 DNA 序列；鸭肉为鸭特异性 DNA 序列；样品 a(鲁西黄牛)、b(羔羊 180d)、e(鲁西黄牛)、f(德顺祥精品肥牛)，均为鸭特异性 DNA 序列；样品 c(鲁西黄牛)和 d(牛肉卷)均为牛特异性 DNA 序列；样品 g(羔羊 180 卷)为羊特异性 DNA 序列。

2.3 鸭源性成分检测结果

结果表明,空白对照(ddH₂O)和阴性对照(牛和羊基因组 DNA)均没有出现典型的扩增曲线;阳性对照(鸭基因组 DNA)出现典型的扩增曲线,循环数(Ct)为 16.227;样品 a(鲁西黄牛)、b(羔羊 180d)、e(鲁西黄牛)、f(德顺祥精品肥牛),均出现典型的扩增曲线,Ct 值分别为 16.219、16.953、16.835 和 16.502,确认检出鸭源性成分;样品 c(鲁西黄牛)、d(牛肉卷)和样品 g(羔羊 180 卷)均没有出现典型的扩增曲线或没有扩增曲线,确认未检出鸭源性成分。检测结果见图 2。

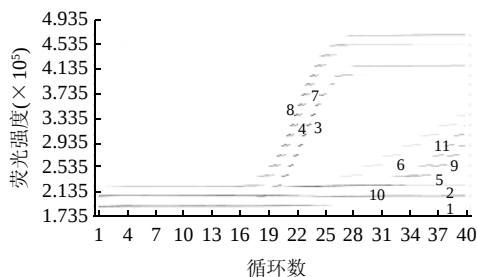


空白对照、样品 g 未出现扩增曲线。阴性对照(牛 DNA 和羊 DNA)出现非典型扩增曲线;阳性对照(鸭 DNA)出现典型扩增曲线;样品 a、b、e、f 均出现典型扩增曲线;样品 c、d 未出现典型扩增曲线。1. DNA; 2. 样品 c; 3. 样品 d; 4. 牛 DNA; 5~9. 鸭 DNA 及样品 a。

图 2 鸭源性成分实时荧光 PCR 检测结果

Fig.2 Real-time PCR detection results of duck-origin components

2.4 牛羊源性成分检测结果



空白对照、阴性对照(鸭 DNA)、样品 a、b、c、d、e、f 未出现典型扩增曲线;样品 g 出现典型扩增曲线。1. ddH₂O; 2. 鸭 DNA; 3. 牛 DNA; 4. 阳性对照; 5. 样品 a; 6. 样品 b; 7. 样品 c; 8. 样品 d; 9. 样品 e; 10. 样品 f; 11. 样品 g。

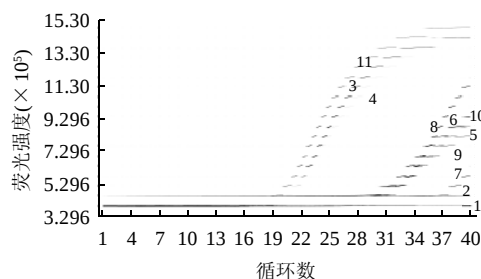
图 3 牛源性成分实时荧光 PCR 检测结果

Fig.3 Real-time PCR detection results of bovine-origin components

牛源性成分实时荧光 PCR 结果表明(图 3),空白对照(ddH₂O)和阴性对照(鸭基因组 DNA)均没有出现典型的扩增曲线,无 Ct 值;阳性对照出现典型的扩增曲线,Ct 值为 20.272;牛 DNA 对照出现典型的扩增曲线,Ct 值为 20.646;样品 c(鲁西黄牛)和 d(牛肉卷)出现典型的扩

增曲线,Ct 值分别为 20.118 和 19.850,确认检出牛源性成分;样品 a(鲁西黄牛)、b(羔羊 180d)、e(鲁西黄牛)、f(德顺祥精品肥牛)和样品 g(羔羊 180 卷)均没有出现典型的扩增曲线,无 Ct 值,确认未检出牛源性成分(图 3)。

羊源性成分实时荧光 PCR 结果(图 4)表明,空白对照(ddH₂O)和阴性对照(鸭基因组 DNA)均没有出现典型的扩增曲线,也没有 Ct 值;阳性对照出现典型的扩增曲线,Ct 值为 24.047;羊 DNA 对照出现典型的扩增曲线,Ct 值为 23.731;样品 g(羔羊 180 卷)出现典型的扩增曲线,Ct 值为 22.671,确认检出羊源性成分;样品 a(鲁西黄牛)、b(羔羊 180d)、e(鲁西黄牛)、f(德顺祥精品肥牛)、样品 c(鲁西黄牛)和 d(牛肉卷)均没有出现典型的扩增曲线,确认未检出羊源性成分。



空白对照、阴性对照(鸭 DNA)、样品 a、b、c、d、e、f 未出现典型扩增曲线;样品 g 出现典型扩增曲线。1. ddH₂O; 2. 鸭 DNA; 3. 羊 DNA; 4. 阳性对照; 5. 样品 a; 6. 样品 b; 7. 样品 c; 8. 样品 d; 9. 样品 e; 10. 样品 f; 11. 样品 g。

图 4 羊源性成分实时荧光 PCR 检测结果

Fig.4 Real-time PCR detection results of sheep-origin components

3 讨论

本实验首先使用动物源性成分 PCR 通用引物验证了所提取样品 DNA 模板的有效性,并对 PCR 产物进行测序,然后在 NCBI 数据库中进行比对;通过实时荧光 PCR 方法对样品中牛、羊和鸭源性成分进行了检测。两种方法得到的结果一致,即样品 a(鲁西黄牛)、b(羔羊 180d)、e(鲁西黄牛)、f(德顺祥精品肥牛)中检出鸭源性成分,未检出牛羊源性成分;样品 c(鲁西黄牛)和 d(牛肉卷)检出牛源性成分,未检出鸭和羊源性成分;样品 g(羔羊 180 卷)中检出羊源性成分,未检出鸭和牛源性成分。综合前期调查、样品外观检测和实验室检测等结果,可以判定送检样品中样品 a(鲁西黄牛)、b(羔羊 180d)、e(鲁西黄牛)、f(德顺祥精品肥牛)使用鸭肉冒充牛羊肉。

以 PCR/RT-PCR 为基础的分子生物学方法成功的基础是高质量核酸(DNA/RNA)的提取。目前国内外许多学



者都建立了基于 PCR 的生鲜肉种类鉴别、加工肉制品中异种肉类鉴别和植物源蛋白检测、转基因成分检测以及饲料中动物源性成分检测方法^[4-7]。在肉类加工过程和饲料生产过程中,都需要高温处理,甚至达到 130℃,在处理过程中基因组 DNA 肯定会受到不同程度的破坏。高质量 DNA 的提取决定 PCR 检测结果的准确性。国内外许多学者对此类样品中基因组 DNA 的提取效果进行比较^[8],认为目前常用的 SDS 法、GuCN 法、Chelex-100 法和 CTAB 法在提取深加工食品 DNA 时都存在一定的缺陷。本实验以 Pormega 公司 DNA 提取试剂盒提取样品 DNA,并通过浓度和纯度测定、运用通用引物进行扩增,结果显示该方法提取 DNA 的质量较好。因此建议在使用 PCR 方法对深加工食品和饲料中动物源性成分进行检测时,使用商品化试剂盒进行 DNA 提取,从而最大可能的保证检测的成功。

基于 PCR 和实时荧光 PCR 方法检测饲料和肉制品中的动物源性成分已经得到了较多的关注和研究^[9-14],目前国内也已经建立一系列检测的国家标准和行业标准。目前应用最广泛的是普通 PCR 方法,该方法操作简单、成本低,但是获得确认结果所需要的时间较长。一般在扩增出预期大小的片段后需要进行测序比对后,才能确认结果,至少需要 3d 时间。实时荧光 PCR 技术显示了巨大优势:该技术多使用一条可与模板互补配对的荧光探针,提高了特异性;自动化仪器收集荧光信号,避免了肉眼判断的主观性,同时提高了灵敏度;分析 PCR 产物的对数期,定量更准确,定量范围可达 10 个数量级;在线式实时监测荧光,结果客观又直观;确认结果需要时间短,一般 1~1.5h 即可。但是实时荧光 PCR 方法成本较高。

结合诸多关于肉类掺假、假冒的报道和文章^[15-16],可以认为国内市场存在较多的异种肉类掺假、以次充好欺骗消费者的行为。国家有关部门应该加大市场监管力度,大力资助肉类鉴定和动物源性成分检测方法的研

发,从而可以提供强有力的技术支持,为更好的保护消费者的利益和进一步落实食品质量安全市场准入制度提供技术。

参考文献:

- [1] SN/T 2727—2010 饲料中禽源性成分检测方法:实时荧光 PCR 方法[S].
- [2] GB/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].
- [3] BOTTERO M T, DALMASSO I A, NUCERA D, et al. Development of a PCR assay for the detection of animal tissues in ruminant feeds[J]. *Journal of Food Protection*, 2003, 66(12): 2307-2312.
- [4] 孙艳华,张智禹,牛晋阳,等. PCR 法快速检测熟肉制品中肉类来源[J]. *食品研究与开发*, 2010, 31(5): 139-142.
- [5] 贺云霞,王加启,王丽,等. 应用 PCR 技术检测饲料中的鱼源性成分[J]. *农业生物技术学报*, 2007, 15(6): 953-957.
- [6] 罗家琴,王加启,卜登攀,等. 饲料中牛、羊、猪、鸡源性成分的 PCR 检测方法及其应用[J]. *中国农业科学*, 2008, 41(7): 2112-2119.
- [7] 高琳,徐幸莲,周光宏. PCR 技术用于食品中原肉物种鉴别的研究进展[J]. *肉类研究*, 2006, 20(10): 19-33.
- [8] 赵秀玲,闻伟刚,余旭平,等. Chelex-100 快速提取动物源饲料 DNA 方法的建立[J]. *上海交通大学学报*, 2004, 22(1): 82-85.
- [9] 孙艳华,张智禹,牛晋阳,等. PCR 法检测肉制品中肉类来源的灵敏度研究[J]. *食品工业*, 2010(3): 93-94.
- [10] 曹黛丽,陈超,宋平,等. 一种简易的猪肉和牛肉分子生物学鉴别方法研究[J]. *中国农学通报*, 2009, 25(18): 110-112.
- [11] 田金辉,李宝明,尉婷媛,等. T-RFLP 快速鉴定生鲜肉中牛羊成分的研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2011, 38(3): 84-86.
- [12] GIRISH P S, ANJANEYULU A S, VISWAS K N, et al. Meat species identification by polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism (PCR- RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene[J]. *Meat Science*, 2005, 70(1): 107-112.
- [13] 冯海勇,韩建林. 羊肉产品中若干动物源性成分的七重 PCR 检测技术应用研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2010, 37(9): 85-90.
- [14] KESMEN Z, GULLUCE A, SAHIN F, et al. Identification of meat species by TaqMan-based real time PCR assay[J]. *Meat Science*, 2009, 82(4): 444-449.
- [15] 侯东军,杨红菊,姜艳彬,等. PCR 鉴定牛羊肉中掺杂猪肉的方法建立[J]. *食品工业科技*, 2009, 30(3): 328-330.
- [16] 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.