

郭 梁, 郭元晟, 钱俊平, 等. 基于 *TaqMan* 实时荧光 PCR 检测肉制品中羊源性成分[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(4): 938-942.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2018.04.032

基于 *TaqMan* 实时荧光 PCR 检测肉制品中羊源性成分

郭 梁^{1,2,3}, 郭元晟^{1,2,3}, 钱俊平^{1,2,3}, 海 小^{1,2,3}, 罗建兴^{1,2,3}, 刘国强^{1,2,3},
李春冬^{1,2,3}, 徐伟良^{1,2,3}, 雅 梅^{1,2,3}

(1. 锡林郭勒职业学院, 内蒙古 锡林浩特 026000; 2. 锡林郭勒生物工程研究院, 内蒙古 锡林浩特 026000; 3. 锡林郭勒食品检验检测和风险评估中心, 内蒙古 锡林浩特 026000)

摘要: 随着动物源性产品(农产品、食品和饲料)中掺假造假事件不断增多以及动物源性疾病的传播风险逐渐加大, 作为保障食品安全和维护消费者权益的高效检测手段, 动物源性成分的定性和定量检测技术已成为国内外的研究热点。本研究通过比对分析 8 种动物的线粒体全基因组序列筛选出羊源性成分特异性的引物和探针组合进行基于实时荧光 PCR 技术的羊源性成分鉴定。结果表明, 所研发的羊源性成分检测的引物和探针具有高度的特异性, 同时具有较好的灵敏度(可检测到 1 pg 的 DNA)。羊肉制品中羊源性定量检测试验结果说明, 此方法具有较好的定量检测能力。综上所述, 以此引物和探针为基础的检测方法适用于羊源性食品和农畜产品的动物源性成分检测。

关键词: 羊源性成分; 引物; 探针; 鉴定; *TaqMan*

中图分类号: TS251.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2018)04-0938-05

Identification of sheep-derived materials in meats inferred from *TaqMan* real-time PCR

GUO Liang^{1,2,3}, GUO Yuan-sheng^{1,2,3}, QIAN Jun-ping^{1,2,3}, HAI Xiao^{1,2,3}, LUO Jian-xing^{1,2,3},
LIU Guo-qiang^{1,2,3}, LI Chun-dong^{1,2,3}, XU Wei-liang^{1,2,3}, YA Mei^{1,2,3}

(1. Xilingol Vocational College, Xilinhot 026000, China; 2. Xilin Gol Institute of Bioengineering, Xilinhot 026000, China; 3. Xilin Gol Food Testing and Risk Assessment Center, Xilinhot 026000, China)

Abstract: Due to the increasing of complaints for adulterated foods and feeds and propagation risk of diseases derived from several animals, the qualitative and quantitative detection techniques of animal-derived substances in foods and feeds are significant biotechnical methods to ensure food safety and protect consumer rights. To design the primer and probe with intellectual property which could be used to detect sheep-derived materials by means of *TaqMan* real-time PCR, the

收稿日期: 2017-12-11

基金项目: 内蒙古自治区高等学校科学研究项目 (NJZY18369); 锡林郭勒生物工程研究院重点科研项目 (2016001、2016002)

作者简介: 郭 梁 (1986-), 男, 锡林浩特人, 博士, 助理研究员, 研究方向为利用生物工程技术开发锡林郭勒野生动植物和微生物资源以及实时荧光 PCR 和高通量测序技术 Ion Proton 的应用研究。(Tel) 0479-8112632; (E-mail) herdman86@163.com

complete mitochondrial genome sequences of eight animals were compared. The results showed that the technique based on the primers and probe was specific for species identification and quantification, and had good sensitivity. The results of quantitative detection of sheep-derived material showed that the method had good quantitative detection ability. This biotechnological method based on *TaqMan* real-time PCR was appropriate to identify sheep-derived ma-

terials in farm products and foods.

Key words: sheep-derived material; primer; probe; identification; *TaqMan*

动物源性成分是指动物肉类及其制品。动物源性成分检测是指从农产品、食品以及饲料中检测其含有某一源性成分的技术方法。不同动物源性成分价格的不同驱使一些不法商贩和企业牛、羊、鹿、马、驼等高价肉制品中掺杂猪、鸭、鸡、鹅等低价肉原料,甚至用香精处理低价肉后冒充高价肉。上述这些掺杂造假的行为不仅严重损害了消费者利益,有时还会涉及到民族、宗教问题以及进出口贸易^[1]。农产品、食品以及饲料中动物源性成分的检验检测技术可以有效地检测原料中动物来源,不仅能够有效地保护消费者的合法权益和宗教信仰还能防止来源于某些动物的传染病(牛海绵状脑病、传染性海绵状脑病、疯牛病以及口蹄疫等)的流行。作为羊、牛、马、驼产品(肉和乳)基地的锡林郭勒盟迫切需要研发具有自主知识产权的动物源性成分检测试剂盒。目前,动物源性成分检测技术大部分是建立在对样品中蛋白质和 DNA 的特异性检测和分析的基础上。涉及的技术手段包括酶联免疫(ELISA)、聚合酶链式反应(PCR)、电泳、色谱和质谱等^[2]。其中实时荧光 PCR (Real-time fluorescent polymerase chain reaction, RT-PCR) 以它高通量、高效率、高特异性及高灵敏度等优点在众多技术中脱颖而出。Li-jima 等^[3]建立了通过 18 S rRNA 基因测序技术鉴定食品中动植物源性成分来源的分析方法。Girish 等^[4]建立了通过线粒体 12 S rRNA 基因测序的动物源性成分的鉴定方法。Rodriguez 等^[5]以基于 *TaqMan* 的实时荧光定量 PCR 技术建立起了混合肉样中猪肉成分定性和定量检测的方法。

本研究通过比对羊、牛、猪、马、鸡、鸭、兔、鹅等 8 种动物的线粒体全基因组序列,筛选出羊特异的引物和探针组合进行羊源性成分的定性和定量检测。研发出以此引物和探针为基础的具有高度特异性和灵敏度,适用于羊源性食品和农畜产品检验检测的动物源性成分鉴定方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料与仪器

羊肉购买于锡林浩特市 109 农贸市场,5 个独立样品(1、2、3、4、5)分别来源于 5 家肉店。牛肉、

猪肉、马肉、鸡肉、鸭肉、兔肉、鹅肉采样于锡林浩特市 109 农贸市场和德克隆超市。羊肉干(蒙羊集团生产)购买于德克隆超市。

基因组 DNA 抽提试剂盒和 Probe qPCR Super-Mix 购于北京全式金生物技术有限公司,电泳上样缓冲液和琼脂糖购于宝生物工程(大连)有限公司。

凝胶成像系统和 T100 PCR 扩增仪购于美国 Bio-Rad 公司,2000c Nanodrop 分光光度计购于美国 Thermo Fisher 公司,7300plus 实时荧光 PCR 扩增仪购于美国 ABI 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取与质量评价 利用匀浆器和液氮对 8 种动物的新鲜肉样进行研磨,取出 50 mg 放入离心管中用于后续的 DNA 提取试验,其余-80℃ 储存备用。按照全式金基因组 DNA 抽提试剂盒的提取步骤提取各样品的基因组 DNA。通过 2000c Nanodrop 分光光度计和琼脂糖凝胶电泳测量和评价所提取 DNA 的质量浓度和质量,利用 A260/A280 的吸光度比值评价 DNA 的质量,并将母液稀释至 100 ng/μl 左右(模板浓度)。

1.2.2 引物设计与合成 通过比对羊(KR868678.1、KP981380.1、KP981378.1、KF977846.1、KF938336.1、KF938335.1、KF938332.1、KF938327.1、KF938319.1、KF938317.1)、牛(GU947019.1、GU947020.1、GU947021.1、DQ124405.1、DQ124410.1、DQ124418.1、GU947014.1、GU947015.1、GU947016.1、GU947017.1)、猪(KP126939.1、KX147101.1、KP765603.1、KP294522.1、KX094894.1、KP223728.1、KJ720205.1、KP126954.1、KX147100.1、KC505406.1)、马(HQ439487.1、HQ439456.1、HQ439494.1、HQ439482.1、HQ439486.1、HQ439489.1、HQ439490.1、HQ439492.1、HQ439493.1、HQ439500.1)、鸡(KM433666.1、KP269069.1、KX987152.1、KJ778617.1)、鸭(KJ833587.1、MF069251.1、EU755252.1、MF069248.1)、兔(NC_001913.1、AJ001588.1)、鹅(KU211647.1、KT427463.1)等 8 种动物的线粒体全基因组序列,筛选出羊特异的序列。利用 Primer5 软件对羊特异的序列进行引物和探针的设计,引物和探针名称和序列见表 1。引物和探针由北京睿博兴科生物技术有限公司合成。

表 1 羊源性成分检测的引物及探针序列

Table 1 Primers and probe sequences for the identification of sheep-derived material

引物序列(5'→3')	探针序列(5'-FAM→3'-TAMRA)
LP: AGAAATGGGCTACATT(T/C)TCT	CCCAAGAAAATTTAATACGAAAGCCATT
RP: TTTACTGCTAAATCCTCCTT	

1.2.3 实时荧光 PCR 反应体系 (20 μl) 10 μl Probe qPCR SuperMix, 正向引物 LP 和反向引物 RP 各 1 μl (10 $\mu\text{mol/L}$), 探针 1 μl , 模板 1 μl , 灭菌双蒸水 6 μl 。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 94 s, 40 个循环。

1.2.4 检测灵敏度试验 将羊 DNA (从 1 号羊肉样品中提取) 分别稀释 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 和 10^7 倍 (包括原液共 8 个模板质量浓度梯度) 进行羊源性成分检测灵敏度试验。反应条件同 1.2.3。

1.2.5 数据处理 利用 7300plus 实时荧光 PCR 扩增仪自带分析软件对结果进行扩增曲线和循环阈 (C_t) 的分析。

2 结果与分析

2.1 利用实时荧光 PCR 进行羊源性成分检测

通过所研发的羊特异性引物和探针对 8 种动物的肌肉基因组 DNA (稀释液为模板) 进行实时荧光 PCR (*TaqMan* 探针方法) 检验检测。由图 1 可知在羊肉组织样品中出现典型扩增曲线, 在其他 7 种动物的肌肉组织中均未出现典型扩增曲线。利用实时荧光 PCR 对 8 种动物进行动物源性检测的 C_t 值如表 2 所示, 羊的肌肉组织样品 (5 个羊肉样品, 每个样品 3 个平行试验) 的 C_t 值不为 0 且小于 35, 样品源性符合动物来源。根据国家动物源性检测标准 (中华人民共和国出入境检验检疫行业标准 SN/T2051-2008 食品、化妆品和饲料中牛羊猪源性成分的检测方法) 以及前人的研究结果^[6] 表明, 当样品的 C_t 值不为 0 且小于 35, 并有典型的扩增曲线时, 判断样品具有相应源性。其他 7 种动物 (牛、猪、马、鸡、鸭、兔和鹅) 的肌肉基因组 DNA C_t 值均为 0, 即样品不具有羊源性。以上结果说明以所研发的引物和探针为基础的羊源性成分的鉴定方法可以有效检测出羊肉中的羊源性成分, 在其他动物肌肉组织中没有检出羊源性成分, 即鉴定方法具有较高的特异性。

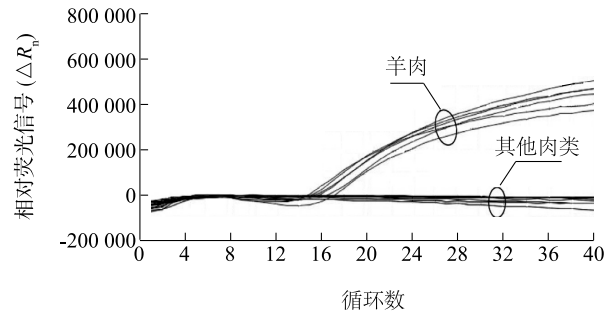


图 1 利用 *TaqMan* PCR 对 8 种动物肌肉组织进行羊源性成分检测

Fig. 1 The identification of sheep-derived materials inferred from *TaqMan* real-time PCR

2.2 利用实时荧光 PCR 检测的灵敏度

将羊的基因组 DNA 分别稀释 10^1 倍、 10^2 倍、 10^3 倍、 10^4 倍、 10^5 倍、 10^6 倍和 10^7 倍 (包括原液共 8 个模板质量浓度梯度) 进行羊源性成分的检测灵敏度试验。由图 2 可知, 原液 (100.000 00 ng)、稀释 10^1 倍 (10.000 00 ng)、稀释 10^2 倍 (1.000 00 ng)、稀释 10^3 倍 (0.100 00 ng)、稀释 10^4 倍 (0.010 00 ng)、稀释 10^5 倍 (0.001 00 ng) 的羊基因组 DNA 样本均出现典型扩增曲线, 而且伴随着稀释倍数的加大扩增曲线向右移动; 稀释 10^6 倍 (0.000 10 ng)、稀释 10^7 倍 (0.000 01 ng) 均未出现典型扩增曲线。利用实时荧光 PCR 对稀释模板进行动物源性检测的 C_t 值如表 3 所示, 原液 (100.000 00 ng)、稀释 10^1 倍 (10.000 00 ng)、稀释 10^2 倍 (1.000 00 ng)、稀释 10^3 倍 (0.100 00 ng)、稀释 10^4 倍 (0.010 00 ng)、稀释 10^5 倍 (0.001 00 ng) 的 C_t 值不为 0 且小于 35, 而且随着模板稀释的进行 C_t 值逐渐变大; 当羊基因组 DNA 稀释至 10^6 和 10^7 倍, C_t 值均为 0。以上结果说明以自主研发的羊特异性引物和探针为基础的羊源性成分鉴定方法可以有效地检测出 0.001 00 ng 的羊 DNA, 检测灵敏度达到 1 pg, 具有较高的检测灵敏度。

表 2 DNA 提取以及实时荧光 PCR 的 Ct 值

Table 2 The evaluation of extraction of DNA and Ct values from eight meats

样品	基因组 DNA 浓度(ng/μl)		A_{260}/A_{280}	Ct 值			
	母液	稀释液		平行试验 1	平行试验 2	平行试验 3	平均值±标准差
羊肉 1	1 044.1	119.3	1.88	16.14	16.97	16.89	16.67±0.46
羊肉 2	905.1	112.3	1.86	15.37	15.02	16.89	15.76±1.00
羊肉 3	945.5	115.3	1.86	13.40	13.28	13.80	13.49±0.27
羊肉 4	540.1	116.4	1.87	15.67	15.00	15.44	15.37±0.34
羊肉 5	1 198.4	127.1	1.85	16.62	15.01	17.22	16.28±1.14
猪肉	158.0	129.1	1.89	0	0	0	0
牛肉	140.0	105.9	1.89	0	0	0	0
马肉	377.4	121.1	1.89	0	0	0	0
鸡肉	255.5	105.9	1.89	0	0	0	0
鸭肉	273.1	122.7	1.90	0	0	0	0
兔肉	301.0	108.4	1.86	0	0	0	0
鹅肉	200.3	102.8	1.85	0	0	0	0

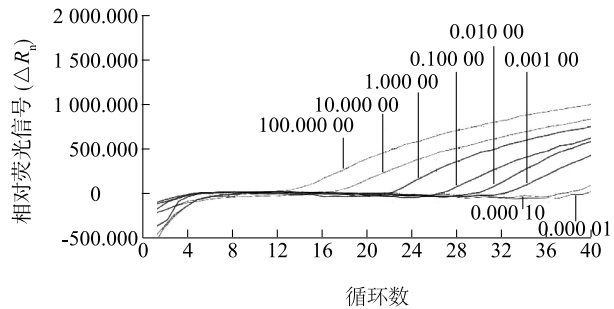


图 2 羊源性成分检测的灵敏度
Fig.2 The limit of detection for sheep-derived material

表 3 以不同稀释倍数羊 DNA 为模板的实时荧光 PCR 的 Ct 值

Table 3 Ct values for different diluted DNA from sheep

基因组 DNA 质量浓度 (ng/μl)	Ct 值			
	平行试验 1	平行试验 2	平行试验 3	平均值± 标准差
100.000 00	17.94	18.47	12.75	16.39±3.16
10.000 00	17.31	17.95	17.51	17.59±0.33
1.000 00	22.21	23.47	22.72	22.80±0.63
0.100 00	27.67	28.16	26.96	27.59±0.60
0.010 00	29.47	29.53	29.68	29.56±0.11
0.001 00	32.51	32.87	31.96	32.45±0.46
0.000 10	0	0	0	0
0.000 01	0	0	0	0

2.3 羊源性成分定量检测

利用羊基因组做标准曲线定量检测肉制品中羊源性成分的含量。将羊 DNA 的 8 个模板质量浓度梯度进行引物和探针的检测,制作羊源性成分定量检测标准曲线(图 3)。通过肉制品的相应源性的 Ct 值和

标准曲线方程可以计算得到肉制品中羊源性成分的定量检测结果。用实时荧光 PCR 检测加工肉制品(羊肉干),通过羊源性成分定量检测标准曲线计算相应的质量浓度值与实际的质量浓度值(50 ng/μl)符合程度较高(表 4)。以上结果说明所研发的羊源性成分检测的引物和探针可以对加工肉制品中的羊源性成分进行鉴定,而且具有定量检测能力。

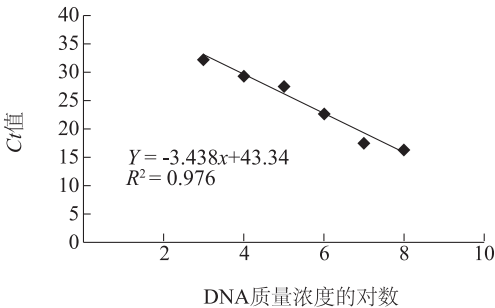


图 3 羊源性定量检测标准曲线
Fig.3 The standard curve for quantitative detection of sheep-derived material

表 4 肉制品中羊源性的定量检测

Table 4 The quantitative detection of sheep-derived material in processed meat

样品	Ct 值	检测的质量浓度(ng/μl)
羊肉干	16.96	46.77
	16.31	72.44
	16.28	74.13
	16.78	53.70
	16.26	75.86

实际的质量浓度为 50 ng/μl。

3 讨论

目前,基于 PCR 技术检测肉制品中的动物源性成分已经成为研究和应用的热点^[7-9]。由于普通 PCR 检测耗时较长,通量较低及存在染料污染等问题,实时荧光 PCR 技术在动物源性成分检测领域的研发为食品监管部门加强食品安全管理,打击肉制品市场上的以廉价肉冒充高价肉的不法现象提供了科学有效的检测方法^[10-11]。在实时荧光 PCR 技术的应用过程中,首先是基于染料法的实时荧光 PCR 技术在动物源性成分检测领域的应用得到广泛的发展^[12-13]。然而,近几年基于 *TaqMan* 探针的方法在动物源性成分检测领域逐渐增多,其技术不仅依赖特异性的引物,还依靠特异性的探针,相对基于染料法的实时荧光 PCR 技术,基于 *TaqMan* 探针的方法特异性更强。本研究通过比对羊、牛、猪、马、鸡、鸭、兔、鹅等 8 种动物的线粒体全基因组序列,筛选出羊源性成分检测的引物和探针。以 8 种动物的肌肉组织基因组 DNA 为模板进行以荧光定量 PCR 为基础的特异性试验,结果表明,所研发的针对羊源性成分检测的引物和探针具有高度的特异性,仅对羊源性成分相关 DNA 模板有典型扩增曲线,对其他动物来源的 DNA 模板无扩增。通过特异的引物和探针的组合特异地鉴定肉类中的羊源性成分,此方法相对普通 PCR 方法具有检测时间短,无需电泳检测,降低开盖气溶胶污染及染料致癌风险^[14-15]。检测灵敏度试验结果表明,以此引物和探针为基础的检测方法可以检测到 1 pg 的来源于羊的 DNA 模板,而且检测的平行度较高。以所研发的引物和探针为基础的羊源性成分检测方法的灵敏度与所报道的基于普通 PCR 和基于染料法的实时荧光 PCR 的灵敏度相当,都可以检测到 pg 级的 DNA 分子^[16-17]。付理文等^[18]利用 *TaqMan* 实时荧光 PCR 技术所研发的猪、牛、羊、鸡、鸭、鹅 6 种动物源性成分的检测方法分别可以检出 0.049 ng、0.048 ng、0.085 ng、0.130 ng、0.162 ng、0.074 ng 的模板 DNA。以上结果说明自主研发的羊特异性引物和探针的检测灵敏度达到 1 pg,具有较高的检测灵敏度。羊肉干中羊源性定量检测结果说明此方法在加工肉制品中具有较好的羊源性检测效果以及具有较好的定量检测能力。

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] 李秀婷,孙宝国,吕跃钢,等. 动物源性食品中药物残留的快速检测技术研究进展[J]. 食品科学,2009,30(19):346-50.
- [3] IJIMA K, SUZUKI K, OZAKI K, et al. DNA analysis for identification of food-associated foreign substances[J]. Journal of Food Quality, 2006, 29(5):531-542.
- [4] GIRISH P S, ANJANEYULU A S R, VISWAS K N, et al. Sequence analysis of mitochondrial 12 S rRNA gene can identify meat species[J]. Meat Science, 2004, 66(3):551-556.
- [5] RODRIGUEZ M A, GARCIA T, GONZALEZ I, et al. *TaqMan* real-time PCR for the detection and quantitation of pork in meat mixtures[J]. Meat Science, 2005, 70(1):113-120.
- [6] 沙才华,汪文辉,黄海超,等. 牛源性成分及定量研究[J]. 中国动物检疫, 2016, 33(12):89-93.
- [7] MANEA B G, MENDIRATTAA S K, TIWARIB A K. Beef specific polymerase chain reaction assay for authentication of meat and meat products[J]. Food Control, 2012, 28(2):246-249.
- [8] DI PINTO A, TERIO V, MARCHETTI P, et al. DNA-based approach for species identification of goat-milk products[J]. Food Chemistry, 2017, 229:93-97.
- [9] SOARES S, AMARAL J S, MAFRA I, et al. Quantitative detection of poultry meat adulteration with pork by a duplex PCR assay[J]. Meat Science, 2010, 85(3):531-536.
- [10] 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.
- [11] KIM M, YOO I, LEE S Y, et al. Quantitative detection of pork in commercial meat products by *TaqMan* real-time PCR assay targeting the mitochondrial D-loop region[J]. Food Chemistry, 2016, 210:102-106.
- [12] AGRIMONTI C, PIRONDINI A, MARMIROLI M, et al. A quadruplex PCR (qPCR) assay for adulteration in dairy products[J]. Food Chemistry, 2015, 187:58-64.
- [13] SAKALAR E, ERGUN S O, AKAR E. A simultaneous analytical method for duplex identification of porcine and horse in the meat products by EvaGreen based real-time PCR[J]. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 2015, 35(3):382-388.
- [14] ZHANG C L, FOWLER M R, SCOTT N W, et al. A *TaqMan* real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses[J]. Food Control, 2007, 18:1149-1158.
- [15] 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.
- [16] 熊蕊,郭凤柳,刘晓慧,等. 肉制品中羊源性成分 PCR 检测方法的建立及其应用[J]. 湖北农业科学, 2014, 53(19):4694-4697.
- [17] 班付国,刘宏伟,高延玲,等. 运用 SYBR Green I 熔解曲线法检测饲料中牛、羊源性成分的研究[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(2):128-131.
- [18] 付理文,张宇,依含,等. *TaqMan* 多重实时荧光 PCR 同步定量检测 6 种动物源性成分方法的建立[J]. 中国生物工程杂志, 2017, 37(9):48-59.

(责任编辑:陈海霞)