

苗 丽,张秀平,王建昌,等. 肉制品中鸡源性成分重组酶介导等温扩增检测方法的建立及应用[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(4): 954-959.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2019.04.029

## 肉制品中鸡源性成分重组酶介导等温扩增检测方法的建立及应用

苗 丽<sup>1</sup>, 张秀平<sup>2</sup>, 王建昌<sup>3</sup>, 王永亮<sup>1</sup>, 程 奇<sup>4</sup>, 徐 超<sup>1</sup>, 张 璐<sup>2</sup>

(1. 郑州海关, 河南 郑州 450003; 2. 河南检验检疫鉴定咨询中心, 河南 郑州 450003; 3. 石家庄海关, 河北 石家庄 050051; 4. 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

**摘要:** 为了快速准确检测出肉制品中的鸡源性成分, 本研究基于鸡线粒体细胞色素 B 基因(*CytB*), 设计特异性引物和 *exo* 探针, 建立了实时荧光重组酶介导等温扩增(RAA)方法, 进行特异性、灵敏性和稳定性分析, 并通过检测市售肉制品对所建立 RAA 方法的准确性和适用性进行分析。结果表明, 该方法可以快速实现对高山鸡肉、乌鸡肉、芦花鸡肉、白羽鸡肉和野鸡肉基因组 DNA 的特异性扩增, 而对猪肉、牛肉、羊肉等的 DNA 均没有扩增, 可稳定检出的鸡源性成分最低质量分数为 0.1%。在 9 份标识有鸡肉成分的市售样品中, 7 份检出鸡源性成分, 有 2 份样品的鸡源性成分检测结果为阴性。本研究建立的实时荧光 RAA 方法操作简单, 反应迅速, 特异性强, 灵敏度高, 为肉制品中鸡源性成分的检测提供了技术保障。

**关键词:** 重组酶介导等温扩增; 细胞色素 B 基因; 鸡源性成分

**中图分类号:** TS207 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2019)04-0954-06

## Establishment and application of real-time recombinase-aided amplification assay to detect chicken-derived ingredients in meat products

MIAO Li<sup>1</sup>, ZHANG Xiu-ping<sup>2</sup>, WANG Jian-chang<sup>3</sup>, WANG Yong-liang<sup>1</sup>, CHENG Qi<sup>4</sup>, XU Chao<sup>1</sup>, ZHANG Lu<sup>2</sup>

(1. Zhengzhou Customs of the People's Republic of China, Zhengzhou 450003, China; 2. Identification Consulting Center of Henan Inspection and Quarantine, Zhengzhou 450003, China; 3. Shijiazhuang Customs of the People's Republic of China, Shijiazhuang 050051, China; 4. Biotechnology Research Institute of the Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract:** In order to detect the *Gallus* ingredient in meat products quickly and accurately, specific primers and *exo* probes were designed based on chicken mitochondrial cytochrome B gene (*CytB*). A recombinase-aided amplification (RAA) real-time fluorescent method was established, and the specificity, sensitivity and stability were analyzed. Furthermore, the accuracy and applicability of RAA method were analyzed by testing meat products sold in the market. The results showed that this method could detect *Gallus* ingredient quickly. No cross-reactions were found in specimens containing pork, beef and mutton. The detection limit was 0.1%. Detection results of commercially available samples showed that two

收稿日期: 2018-12-06

基金项目: 河南省科技攻关项目(172102110202); 河北省科技计划项目(17275507D); 国家质检总局资助项目(2016IK114)

作者简介: 苗 丽(1971-), 女, 河南南阳人, 硕士, 高级兽医师, 主要从事动物检疫及食品微生物学研究。(Tel) 13523505628; (E-mail) ml5628@163.com

samples were negative for chicken-derived ingredients. The established method in this study has strong specificity and high sensitivity, providing a technical guarantee for the detection of chicken-derived ingredients in meat products.

**Key words:** recombinase-aided amplification; cytochrome B gene; chicken-derived ingredients

肉制品掺假是食品质量控制的重要问题<sup>[1]</sup>。一些不法商贩利用掺杂使假、以次充好等手段在牛、羊等高价肉制品中掺杂猪、鸡、鸭等低价肉原料,有些商贩在面粉中加瘦肉精伪造鸡肉制品出售,这些行为侵害了消费者的权益。如果产品出口到国外,更损害中国食品企业的形象,影响出口贸易<sup>[2-3]</sup>。

动植物源性成分的检测涉及到各行各业,最初的检测方法耗时、复杂、单一、准确性低,随着技术的不断突破,现在的检测方法操作方便、准确性高<sup>[4-6]</sup>。重组酶介导等温扩增(RAA)技术是一种新型的体外核酸等温扩增技术<sup>[7-9]</sup>。在恒温(37~39℃)条件下,大肠杆菌的 *recA* 重组酶可与引物 DNA 紧密结合,形成酶和引物的聚合体。当引物在模板 DNA 上搜索到与之完全互补的序列时,在单链 DNA 结合蛋白和 DNA 聚合酶的作用下,打开 DNA 的双链结构,形成新的 DNA 互补链。RAA 技术能够在恒温条件下实现模板 DNA 解链及快速扩增,且专一性好,还可用于实时结果的分析<sup>[10-11]</sup>。RAA 技术不需要高温循环,所以整个反应速度较快,能够实现对靶基因的有效扩增,特别适合大量样品的现场检测。

郭燕华等<sup>[12]</sup>根据牛源性线粒体细胞色素 b 基因序列设计筛选了 1 对可用于扩增的引物,成功建立了牛源性肉制品的等温扩增方法,灵敏性可达 0.1 ng/μl,实现了对市售肉制品中牛源性成分的精准鉴定,该技术为肉源性成分的快速检测提供了新的方法。

本研究拟利用 RAA 技术,设计鸡源性特异性引物和 *exo* 探针,通过恒温扩增收集荧光信号,建立快速鉴定鸡源性成分的实时荧光 RAA 方法,以期为市

场监管提供可靠的检测方法。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

生鲜鸡肉、猪肉、鸭肉、牛肉、羊肉购自郑州农贸市场,狐狸肉、马肉、鼠肉、驴肉、貂肉为本实验室保存的样品。鸡肉制品(腊鸡腿、脆皮鸡、鸡肉火腿、鸡汤料包)购自郑州某大型超市。

### 1.2 试剂

实时荧光 RAA 反应试剂购自众测生物科技有限公司,CTAB 提取缓冲液以及酚:氯仿:异戊醇(25:24:1,体积比)购自索莱宝科技有限公司,异丙醇、无水乙醇购自国药集团化学试剂有限公司,TE(pH8.0)缓冲液购自天根生化科技(北京)有限公司。

### 1.3 仪器与设备

Lightcycle 1.5 荧光定量 PCR 仪(Roche)购自恒久医疗器械有限公司,Sigma 3K30 高速冷冻离心机购自凯维丰科技发展有限公司,GRINDOMIX GM200 组织匀浆机购自莱驰有限公司,DT500 电子天平购自长青仪器厂,Thermo Mixer C 恒温孵育器购自 Eppendorf 公司,BioSpec-nano 微量核酸蛋白仪购自岛津企业管理(中国)有限公司。

### 1.4 方法

1.4.1 RAA 引物和 *exo* 探针的设计 查找 GenBank 中公布的鸡以及非鸡物种的线粒体细胞色素 B 基因(*CytB*)序列,并进行多序列的比对,设计鸡的特异性引物和 *exo* 探针,引物序列如表 1 显示。引物和探针均由上海生物工程技术有限公司合成。

表 1 鸡物种特异性引物和探针

Table 1 Specific primers and probes for chickens

名称	引物序列(5'→3')	扩增片段大小(bp)	目的基因
鸡-F	AYTTCGGCTCCCTAYTAGCAGTMTGCCTCATS	257	<i>CytB</i>
鸡-R	TACTCCTGTRITTCAGGTTTCYTTTRTAKAGG		
鸡-P	ACGCGCCCTCAATTCTTCTCATCTGTATCT[FAM-dT][THF]C[BQH-dT]TCACATCGGACG-C3spacer		

F:上游引物;R:下游引物;P:探针。

1.4.2 样品 DNA 的提取 取 0.2 g 样品至洁净的 1.5 ml 离心管中,加入 1.0 ml ddH<sub>2</sub>O 洗涤 2 次,洗去样品表面的杂质和调味品,若样品不含杂质和调味品,可省略此步骤,尽量剪碎;加入 600 μl CTAB

提取缓冲液,振荡混匀,瞬时离心 10 s,70℃加热 15 min,振荡数秒混匀,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液于一干净的 1.5 ml 离心管中,加入 500 μl 酚:氯仿:异戊醇(25:24:1,体积比),上下颠倒振荡混

匀, 12 000 r/min离心 5 min, 取最上层清液于一新的 1.5 ml 离心管中, 加入 0.7 倍体积的异丙醇, 上下颠倒后振荡混匀 1 min, 12 000 r/min离心 3 min, 去上清液, 留沉淀, 加入 700  $\mu$ l 70% 乙醇, 振荡重悬沉淀, 12 000 r/min离心 1 min, 去上清液, 留沉淀, 打开管盖, 自然干燥 3~5 min, 干燥后加入 50~100  $\mu$ l TE (pH8.0) 缓冲液, 溶解 DNA, -20  $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4.3 实时荧光 RAA 方法的建立 计算好各试剂的使用量(表 2), 加入适当体积的离心管中, 颠倒混匀, 2 000 r/min离心 10 s, 置于恒温荧光检测仪中, 39  $^{\circ}$ C 预热 1 min, 39  $^{\circ}$ C 下等温反应 20 min, 40 个循环。

表 2 实时荧光重组酶介导等温扩增(RAA)反应体系

Table 2 Reaction system of the real-time recombinase-aided amplification (RAA) assay

试剂	体积 ( $\mu$ l)
20% PEG	12.5
正向引物(10 $\mu$ mol/L)	2.0
反向引物(10 $\mu$ mol/L)	2.0
探针(10 $\mu$ mol/L)	0.6
DNA 模板(5 ng/ $\mu$ l)	2.0
MgAc (280 mmol/L)	2.5
实时荧光 RAA 反应试剂	28.4

1.4.4 实时荧光 RAA 方法的特异性分析 分别以不同品种鸡、鸭、黄牛、猪、羊、水牛、牦牛、马、驴、貂、大鼠和狐狸等动物肉提取的 DNA 为模板, 进行荧光 RAA 反应, 以验证所设计引物和探针的特异性。

1.4.5 检测下线的确定 取总质量为 10 g 的肉粉, 在牛肉粉中添加质量百分比为 0.1%、1.0%、10.0% 的高山鸡肉粉, 用研磨机进行混样, 得到梯度质量分数的鸡肉粉样品。称取 200 mg 样品进行 DNA 提取和荧光 RAA 扩增, 每个梯度设置 3 个重复, 根据试验结果确定检测下限。

1.4.6 实时荧光 RAA 方法的灵敏度和重复性分析 在牛肉粉中添加鸡肉粉制成不同质量分数的鸡肉粉样品。分别提取 3 个质量分数(1.00%、0.10%、0.01%)的鸡肉(高山鸡肉、乌鸡肉、芦花鸡肉、白羽鸡肉、野鸡肉), 每个模板进行 20 次扩增反应, 观察阳性扩增效率。同时分析统计鸡样本 3 个质量分数(0.1%、1.0%、10.0%)3 次重复的标准偏差(SD)和

相对标准偏差(RSDr), 对建立的实时荧光 RAA 检测体系进行重复性分析。

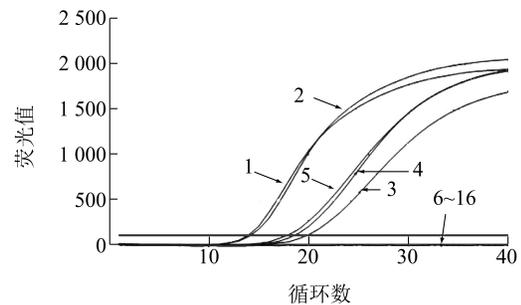
1.4.7 实时荧光 RAA 方法的应用 为检测所建立方法的实际应用效果, 从市场选购的标注含有鸡肉成分的食品, 按照方法 1.4.2 提取 DNA, 并通过所建立的荧光 RAA 方法进行鸡源性成分的检测。

1.4.8 数据处理 所有结果采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 利用 Excel 进行图表编辑, 采用联合国粮农组织(FAO)统一的检测数据评价标准, 即  $RSDr \leq 25\%$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 实时荧光 RAA 方法的特异性检测

结果(图 1)显示, 所建立的实时荧光 RAA 方法对高山鸡肉、乌鸡肉、芦花鸡肉、白羽鸡肉、野鸡肉的 DNA 均有扩增, 而对鸭肉、黄牛肉、猪肉、羊肉、水牛肉、牦牛肉、马肉、驴肉、貂肉、大鼠肉和狐狸肉的 DNA 均没有扩增。表明所建立的鸡源性成分实时荧光 RAA 方法具有良好的特异性。



1: 高山鸡肉; 2: 乌鸡肉; 3: 芦花鸡肉; 4: 白羽鸡肉; 5: 野鸡肉; 6: 鸭肉; 7: 黄牛肉; 8: 猪肉; 9: 羊肉; 10: 水牛肉; 11: 牦牛肉; 12: 马肉; 13: 驴肉; 14: 貂肉; 15: 大鼠肉; 16: 狐狸肉。

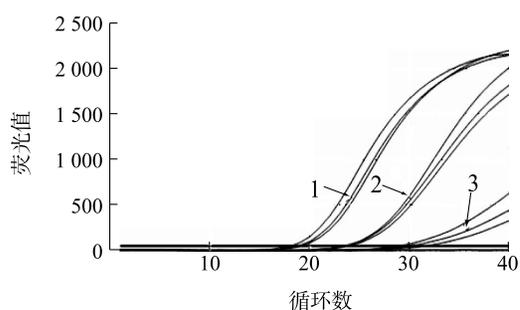
图 1 基于 RAA 方法的不同物种肉源特异性检测结果

Fig.1 Detection results of meat species specificity of different species based on RAA method

### 2.2 实时荧光 RAA 方法灵敏性和检测下线的确定

对高山鸡肉和牛肉样品进行配比, 高山鸡肉质量分数分别为 10.0%、1.0%、0.1%。图 2 显示, 当鸡肉质量分数为 10.0%、1.0%、0.1% 时, 3 次平行测定中均出现 S 型扩增曲线, 平均循环数分别为 18.85、23.65、30.97, 能够检出鸡源性成分。

表 3 显示, 20 次扩增反应中, 当鸡肉质量分数为 0.01% 时, 高山鸡肉、乌鸡肉、芦花鸡肉、白羽鸡



1:鸡肉质量分数为 10.0%;2:鸡肉质量分数为 1.0%;3:鸡肉质量分数为 0.1%。

图 2 基于 RAA 方法的不同质量分数鸡肉的检测限

Fig.2 Detection limit of chicken with different mass fraction based on RAA method

肉、野鸡肉出现阳性扩增曲线次数分别为 3、5、5、4、3。当鸡肉含量为 0.10% 和 1.00% 时,20 次扩增反应中,所有鸡肉样本均得到阳性结果。表明,所建立的实时荧光 RAA 方法可稳定检出鸡源性成分的最低质量分数( $LOD$ )为 0.10%。

表 4 不同质量分数鸡肉 RAA 方法的重复性结果

Table 4 Repeatability results of RAA method for chicken with different mass fraction

物种	鸡肉质量分数 (%)	循环数			平均循环数	标准偏差	相对标准偏差 (%)
		重复 1	重复 2	重复 3			
高山鸡	10.0	18.55	18.32	18.03	18.30	0.26	1.42
	1.0	24.53	24.62	24.78	24.64	0.13	0.51
	0.1	30.25	30.11	30.42	30.26	0.16	0.51
乌鸡	10.0	19.01	19.12	18.95	19.03	0.09	0.45
	1.0	25.25	25.34	24.76	25.12	0.31	1.24
	0.1	30.28	30.51	30.22	30.34	0.15	0.51
芦花鸡	10.0	17.99	18.43	18.12	18.18	0.23	1.24
	1.0	24.55	25.21	24.87	24.88	0.33	1.32
	0.1	30.54	30.42	30.88	30.61	0.24	0.78
白羽鸡	10.0	18.08	18.88	17.87	18.28	0.53	2.91
	1.0	25.25	25.24	25.70	25.40	0.26	1.03
	0.1	31.12	31.62	30.45	31.06	0.59	1.88
野鸡	10.0	17.99	18.63	18.72	18.45	0.40	2.16
	1.0	25.01	24.33	24.66	24.67	0.34	1.38
	0.1	31.02	30.55	30.67	30.75	0.24	0.79

## 2.4 实时荧光 RAA 对实际样品的检测

为了验证该方法在实际样品检测中的可行性,通过所建立的实时荧光 RAA 方法对 9 份不同厂家生产的鸡肉制品进行鸡源性成分检测。

表 3 不同质量分数鸡肉 RAA 方法的灵敏度

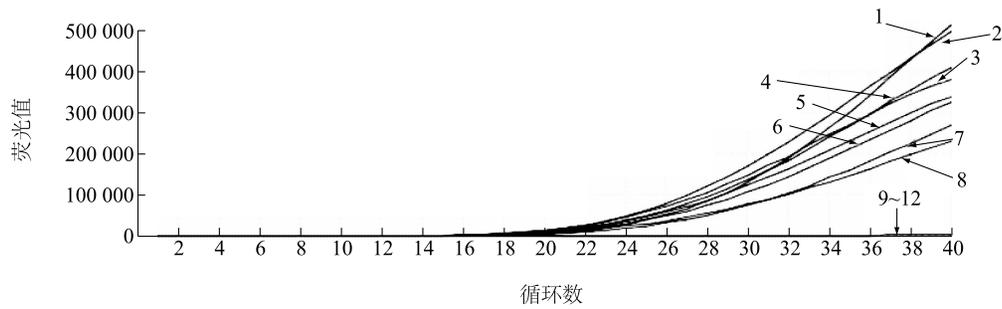
Table 3 Sensitivity results of RAA method for chicken with different mass fraction

物种	不同质量分数鸡肉 20 次扩增反应中阳性扩增次数		
	1.00%	0.10%	0.01%
高山鸡	20	20	3
乌鸡	20	20	5
芦花鸡	20	20	5
白羽鸡	20	20	4
野鸡	20	20	3

## 2.3 实时荧光 RAA 方法重复性结果

对不同种类的鸡源性成分的重复性检测结果进行  $SD$  和  $RSD_r$  分析,结果(表 4)表明,5 种不同品种鸡成分检测的  $SD$  值为 0.09~0.59,  $RSD_r$  值为 0.45%~2.91%,明显小于 25.00%,符合 FAO 标准。说明,建立的鸡源性成分实时荧光 RAA 方法有较好的可重复性。

结果(图 3)表明,腊鸡腿、脆皮鸡、鸡肉火腿均出现了扩增曲线,且循环数在 20 左右时检出鸡源性成分。3 份鸡汤料包中仅有 1 份检出鸡源性成分。



1:高山鸡肉(阳性对照);2~3:腊鸡腿;4~5:脆皮鸡;6~7 鸡肉火腿;8~10:鸡汤料包;11~12:牛肉(阴性对照)。

图3 市售鸡肉制品实时荧光 RAA 检测结果

Fig.3 Detection results of the chicken products from the local supermarket by real-time RAA assay

### 3 讨论

肉制品掺假是食品市场中存在的重要问题,涉及畜牧业的健康发展,消费者权益的保障以及进出口贸易等诸多领域<sup>[13]</sup>。检验检疫部门需加强对市售掺假肉制品的控制和监管,近几年核酸扩增技术的发展给肉类鉴别提供了有效途径<sup>[14-16]</sup>。

实时荧光 RAA 技术是在普通 RAA 的基础上,利用荧光染料在激发光作用下所释放荧光光能的变化来动态反映 RAA 扩增产物量的新技术<sup>[17]</sup>。目前,针对肉类种源的实时荧光 PCR 方法应用较多,而实时荧光 RAA 技术作为一种新型技术,在肉源检测中应用较少。

本研究根据 RAA 引物和 *exo* 探针设计原则,设计了鸡源性成分检测的引物和 *exo* 探针,建立了鸡源性成分检测的实时荧光 RAA 方法,能够稳定检出鸡源性成分的最低质量分数为 0.1%。应用本方法对市售鸡肉制品进行检测,6 份鸡肉制品中均检出了鸡源性成分,3 份鸡汤料包中有 2 份未检出鸡源性成分,鸡汤料包制品中可能存在掺假现象,表明本方法可用于市场中鸡肉制品的快速检测。

实时荧光 PCR 检测时需要摸索反应退火温度,反应程序比较复杂,且反应时间较长。本研究建立的 RAA 方法在 39 °C 下等温反应 20 min,即可实现对靶基因的有效扩增,缩短了反应时间,提高了工作效率。此方法不但可以在实验室应用,还可以现场操作,有利于口岸的快速检测。因此,本研究建立的鸡源性成分实时荧光 RAA 方法,特异性强,灵敏度高,反应快速,实际应用效果好,为那些有快速检测需求的食品安全监管部门,尤其是一线口岸食品监

管部门,提供了有效的技术支撑。

#### 参考文献:

- [1] ALI M E, HASHIM U, KASHIF M, et al. Development of swine-specific DNA markers for biosensor-based halal authentication[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2012, 11(2): 1762-1772.
- [2] KOPPEL R, DANIELS M, FELDERER N, et al. Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from duck, goose, chicken, turkey and pork[J]. *European Food Research and Technology*, 2013, 236(6): 1093-1098.
- [3] 史艳宇,刘金华,吴月丹,等. 荧光定量 PCR 方法检测畜肉食品中鸭源性成分[J]. *食品安全质量检报*, 2013, 4(6): 1859-1864.
- [4] 许如苏,周广彪,魏 霜,等. 锁核酸探针技术快速检测鸭源性成分的试验[J]. *中国兽医杂志*, 2015, 51(9): 91-93.
- [5] FLOREN C, WIEDEMANN I, BRENI G B, et al. Species identification and quantification in meat and meat products using droplet digital PCR (ddPCR) [J]. *Food Chemistry*, 2015, 173: 1054-1058.
- [6] 刘岑杰,刘彦泓,杨 滴,等. 肉制品中鸭源性成分的实时荧光 PCR 检测[J]. *肉类工业*, 2015(1): 51-53.
- [7] GILL P, GHAEMI A. Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review [J]. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 2008, 27(3): 224-243.
- [8] WALKER G T, LITTLE M C, NADEAU J G, et al. Isothermal *in vitro* amplification of DNA by a restriction enzyme/DNA polymerase system [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992, 89(1): 392-396.
- [9] WALKER G T, FRAISER M S, SCHRAM J L, et al. Strand displacement amplification—an isothermal, *in vitro* DNA amplification technique [J]. *Nucleic Acids Research*, 1992, 20(7): 1691-1696.
- [10] 吕 蓓,程海荣,严庆丰,等. 体外核酸快速扩增技术的发展和不断创新[J]. *中国生物工程杂志*, 2011, 31(3): 91-96.
- [11] 吕 蓓,程海荣,严庆丰,等. 用重组酶介导扩增技术快速扩增

- 核酸[J]. 中国科学, 2010, 40(10):983-988.
- [12] 郭燕华,王德莲,王 强,等. 重组酶介导等温扩增技术快速检测牛肉及牛肉制品中的牛源性成分[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(5): 1745-1749.
- [13] KARABASANAVAR N S, SINGH S P, KUMAR D, et al. Detection of pork adulteration by highly-specific PCR assay of mitochondrial D-loop[J]. Food Chemistry, 2014, 145: 530-534.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 苗 丽,张秀平,陈 静,等. 微滴数字 PCR 法定量检测肉制品中羊源性成分的研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(4):73-76.
- [17] 廖 萍,刘茶珍,朱佩云,等. 重组酶介导扩增技术与传统聚合酶链反应技术在甲状腺癌 DNA 甲基化检测中的应用比较[J]. 中国医药, 2013, 8(6): 797-799.

(责任编辑:王 妮)