

实时荧光 PCR 法检测食品中梅花鹿成分

齐春萌¹, 杨昕霆², 薛晨玉², 赵琳娜², 侯彩云^{*1}

(1. 中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 北京 100083; 2. 北京市食品安全监控与风险评估中心, 北京 100083)

摘要: 采用实时荧光聚合酶链式反应技术检测食品中梅花鹿成分。通过对梅花鹿基因序列对比分析, 选取种间差异大、种内差异小的线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因序列作为靶序列, 利用 Primer Express、Oligo 和 DNAMAN 等软件设计了梅花鹿特异性的引物和 TaqMan 探针, 并用已知样本对引物和 TaqMan 探针的物种特异性、检测灵敏度进行验证和检测。实验结果表明, 引物和探针对梅花鹿成分检测的特异性良好, 与其他物种 DNA 无非目标扩增, 对梅花鹿 DNA 的扩增效率为 91.68%, 该方法的检测灵敏度达 0.42 pg/反应。

关键词: 物种鉴定; 梅花鹿; 实时荧光聚合酶链式反应; 线粒体 COX1 基因

中图分类号: R 817.93; TS 207 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2016)010—1088—05

Detection for Sika Deer-Origin Ingredients in Foods by Fluorescent Real-Time PCR Method

QI Chunmeng¹, YANG Xinting², XUE Chenyu², ZHAO Linna², HOU Caiyun^{*1}

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. Beijing Municipal Center for Food Safety Monitoring and Risk Assessment, Beijing 100041, China)

Abstract: A method based on fluorescent real-time polymerase chain reaction was developed to detect sika deer-ingredient in food products. By comparative analysis of sika deer gene sequences, sensitive primers and TaqMan probe were designed on a conserved region of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I sequence, using the Primer Express, Oligo and DNAMAN software. Furthermore, the species specificity and detection sensitivity were tested and validated by using standard samples. Results indicated that primers and TaqMan probe have a high sensitivity for sika deer without non-targeted amplification for other species DNA. Sensitivity of detection was confirmed to be 0.42 pg per reaction with a 91.68% amplification efficiency. Real-time PCR method was applied to detect sika deer meat in the market. Compared with the standard method, this method was more rapid, accurate and convenient, which was suitable for fast authentication of sika deer-origin ingredients.

Keywords: species identification, sika deer, fluorescent real-time polymerase chain reaction, mitochondrial COX1 gene

收稿日期: 2015-01-02

基金项目: 北京市科技计划项目(Z131100005613005)。

* 通信作者: 侯彩云(1963—), 女, 北京人, 工学博士, 教授, 主要从事食品科学与加工技术研究。E-mail: cyhou@cau.edu.cn

鹿是我国重要的传统药用经济动物之一,具有极高的药用、观赏和食用价值。现代医学和临床研究表明,鹿制品具有治疗心悸、失眠、健忘、风湿等功效。鹿肉具有较高的营养价值,具备蛋白质、磷脂、维生素含量高,脂肪、胆固醇含量低的特点^[1]。鹿肉味道鲜美,易于消化,是难得的保健肉品。随着人们生活水平的提高,近年来肉鹿养殖业得到了迅速发展,鹿肉逐渐走上了普通百姓的餐桌^[2]。

我国是世界三大鹿肉生产国之一,是世界上驯养梅花鹿最多的国家^[3]。梅花鹿是主要的鹿肉来源,属于国家一级保护野生动物,其饲养、售卖等具有严格的标准。在消费市场上,鹿肉的价格远高于牛、羊肉的售价,这给鹿肉的非法售卖、掺假造假创造了巨大的利润空间。非法售卖、掺假造假的行为,不仅违反了国家法律法规,而且侵害了消费者的切身利益。市场上梅花鹿成分的鉴定对保护梅花鹿,预防、打击、制止不正当行为,规范肉制品市场有着重要意义。

食品中动物源性成分鉴定的方法通常有蛋白质鉴定和分子鉴定两类^[4-5]。蛋白质鉴定以蛋白质的电泳特性、酶活性、免疫活性为基础,因此不适用于蛋白质失活或活性差异小的物种的鉴定^[6]。而核酸具有种间差异大、保守性高、稳定性强的特点,因此以PCR为基础的分子鉴定方法具有特异性好、灵敏度高、适用性广等特点,近年来成为研究的热点^[7]。常用的PCR物种鉴定方法包括物种特异性PCR、PCR测序、实时荧光PCR等。其中实时荧光PCR具有操作简单、自动化程度高、污染小、分析快速等优点,已经在猪、牛、鸡、鸭、火鸡、马等大宗肉制品鉴定上有了广泛的应用研究^[8-18],而在鹿源性成分鉴定方面还鲜有报道。作者通过设计梅花鹿特异性的引物和TaqMan探针,旨在建立肉制品中梅花鹿源性成分的实时荧光PCR鉴定方法,为保护梅花鹿、保障鹿肉制品食用安全、制定相应标准等提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料 梅花鹿肉、马肉、鹌鹑肉、鸽子肉、猫肉、三文鱼肉、水貂肉、兔子肉、鸡肉、绵羊肉、山羊肉、猪肉、狗肉、牛肉、鹅肉、小鼠肉、骆驼肉、鸭肉、大鼠肉等动物材料,均为作者所在实验室自存;20

个市售抽检样品,购自北京市农贸市场;无水乙醇(分析纯),北京化学试剂公司经销;QIAamp DNA Mini Kit提取试剂盒,购自QIAGEN公司;TaqMan实时荧光PCR预混合液(Premix Ex Taq),购自宝生物工程(大连)有限公司;引物、TaqMan探针,由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.1.2 仪器 3K18型冷冻离心机,德国Sigma公司制造;Mili-Q纯水器,美国Milipore公司制造;Biomedical freezer超低温冰箱(-40℃),日本SANYO公司制造;QIA Cube核酸自动提取仪,美国QIA Gene公司制造;ABI Steponeplus实时荧光定量PCR仪,美国Applied Biosystems公司制造;Qubit 2.0 Fluorometer荧光计,美国Life Technologies公司制造。

1.2 实验方法

1.2.1 样本DNA的提取 用QIAGEN DNA Mini Kit提取样本DNA,步骤:

1) 取25 mg样品,切碎置于2.0 mL的离心管中,加入180 μ L Buffer ATL和20 μ L蛋白酶K,混合均匀后56℃裂解30 min至溶液澄清;

2) 短暂离心去除壁上液体,加入200 μ L Buffer AL,混匀后70℃温育10 min;

3) 短暂离心,加入200 μ L无水乙醇后充分混匀,将液体转移至离心柱(置于收集管上),扣上盖子8 000 r/min离心1 min,弃掉滤液,将离心柱置于新的收集管上;

4) 向离心柱中加入500 μ L Buffer AW1,以转速8 000 r/min离心1 min,弃掉滤液,将柱子置于新收集管上;

5) 向离心柱中加入500 μ L Buffer AW2,以转速14 000 r/min离心3 min,弃掉滤液,离心柱室温晾干5 min;

6) 将离心柱置于干净的1.5 mL的收集管上,加入200 μ L Buffer AE,室温静置1 min,6 000 g离心1 min,得到样本DNA溶液。用Qubit 2.0 Fluorometer荧光计(Qubit dsDNA BR Assay Kit试剂盒)测定DNA浓度,并置于-20℃保存备用。

用上述方法分别提取梅花鹿肉、马肉、鹌鹑肉、鸽子肉、猫肉、三文鱼肉、水貂肉、兔子肉、鸡肉、绵羊肉、山羊肉、猪肉、狗肉、牛肉、鹅肉、小鼠肉、骆驼肉、鸭肉、大鼠肉等及市售抽检样品的DNA。

1.2.2 引物和TaqMan探针的设计 根据NCBI基因数据库已注释的梅花鹿(*Cervus nippon*)线粒体

COX1 序列 (Accession Number: NC_006993.1), 用 DNAMAN 软件比对分析梅花鹿和猪、牛、羊、鸡、鸭、小鼠、鹌鹑、鸽子、猫、狗等常见物种和其他亲缘性近的物种的序列, 选择鸵鸟序列中特异性较强的片段作为靶序列, 用 Primer Express 设计扩增片段在 100 bp 左右的引物和 TaqMan 探针。用 DNAMAN 比较探针与梅花鹿、阴性对照序列的结合自由能与退火温度, 选取与梅花鹿 DNA 结合能最小、退火温度最高的 *COX1* 396 引物和探针作后续研究。

1.2.3 样本的测序鉴定 用 CO I 通用引物 LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') 和 HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAA AAAATCA-3')^[19] 扩增样本 DNA, 并对扩增产物进行测序。将测序结果在 NCBI 中 Blast 搜索, 以确定阳性样本及非目标阴性样本的物种。

1.2.4 实时荧光 PCR 反应体系与循环参数 实时荧光 PCR 反应体系为 20 μ L, 包括: Premix buffer (2 $\times$) 10 μ L, 上游引物 (10 μ mol/L) 0.5 μ L, 下游引物 (10 μ mol/L) 0.5 μ L, TaqMan 探针 (10 μ mol/L) 1 μ L, DNA 溶液 1 μ L, 无菌水将体系补充至总体积 20 μ L。实时荧光 PCR 扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 40 个循环。实时记录反应体系的荧光值。

1.2.5 引物和探针特异性的验证 以梅花鹿 DNA 样品为阳性对照, 马、鹌鹑、鸽子、猫、三文鱼、水貂、兔子、鸡、绵羊、山羊、猪、狗、牛、鹅、小鼠、骆驼、鸭、大鼠等非目标物种 DNA 为阴性对照, 以水代替 DNA 模板作为空白对照, 每组做 3 个平行, 进行多次验证。所有 DNA 模板的质量浓度均稀释至 10 ng/ μ L。根据各反应体系的 C_t 值考察引物与探针特异性。

1.2.6 扩增效率与灵敏度的检测 将梅花鹿 DNA 溶液稀释至 1、10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴ ng/ μ L, 每个质量浓度 8 个平行, 设置空白对照进行扩增效率检测实验。根据各梯度的扩增曲线的 C_t 值, 建立 C_t -lg [DNA] 标准曲线。依据扩增效率计算公式

$$E = (-1 + 10^{[-1/s]}) \times 100\% \quad (1)$$

式(1)中, E 为扩增效率, s 为标准曲线斜率。得到 PCR 反应扩增效率。以 C_t 值 35 为判断标准, 通过标准曲线计算出 C_t 值为 35 时的 DNA 质量浓度, 作为该反应体系的检测灵敏度。

2 结果与讨论

2.1 样本的测序鉴定

阳性样本条形码扩增后进行测序, 将序列在 NCBI 进行 Blast 搜索, 结果见图 1。样本序列与 *Cervus nippon* 线粒体 DNA 中序列的相似度大于 99%, 从而确定该阳性样本为梅花鹿肉。阴性样本的条形码鉴定结果表明, 阴性样本与所标物种一致。

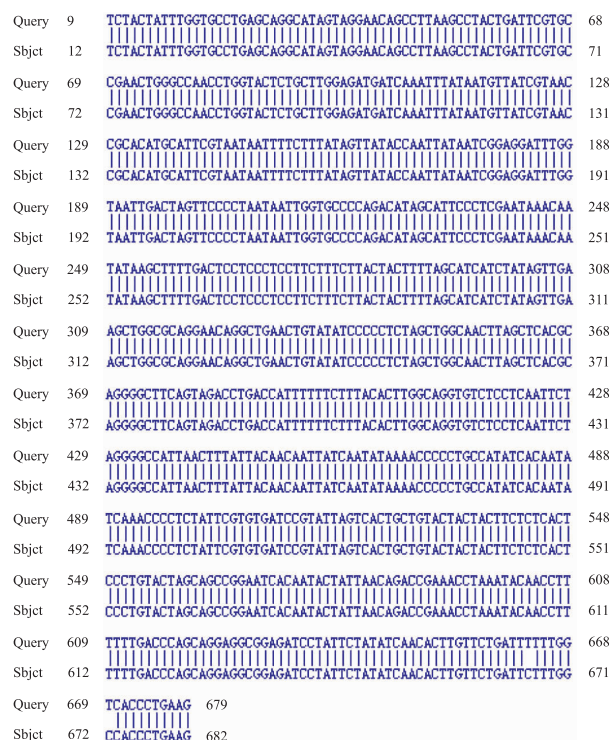


图 1 梅花鹿 DNA 条形码扩增产物在 NCBI 中 Blast 搜索比对结果

Fig. 1 Sequence alignment of sika deer DNA amplification product

2.2 引物和探针的特异性验证

用梅花鹿特异性引物和 TaqMan 探针对鹿和马、鹌鹑、鸽子、猫、三文鱼、水貂、兔子、鸡、绵羊、山羊、猪、狗、牛、鹅、小鼠、骆驼、鸭、大鼠等阴性物种 DNA 进行 PCR 扩增, 结果见图 2。结果表明, 鹿的扩增曲线良好, 阴性物种扩增曲线的 C_t 值均大于 35。此外, 对孢子、三文鱼、虹鳟鱼、鲈鱼、草鱼等其他非目标物种 DNA 的 PCR 实验也未出现明显扩增曲线, 说明梅花鹿 *COX1* 396 引物和 TaqMan 探针的特异性良好。

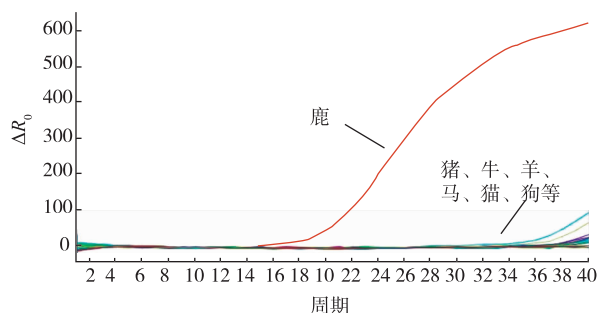
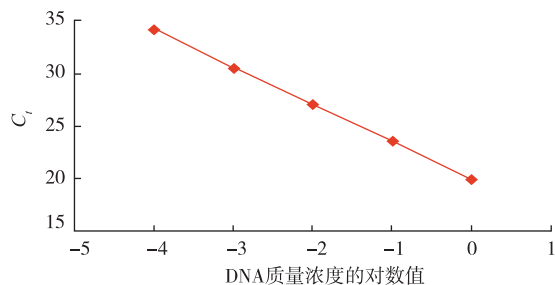


图2 梅花鹿引物探针实时荧光PCR的特异性检测结果
Fig. 2 Specific detection of primers and TaqMan probe for sika deer DNA

2.3 扩增效率与灵敏度测定

按1.2.6中方法进行PCR扩增,将所得 C_t 值进行线性拟合,得到标准曲线,见图3。



以10倍为稀释梯度,梅花鹿DNA初始质量浓度范围为 10^{-4} ~ $1\text{ ng}/\mu\text{L}$ 。

图3 C_t -lg[DNA]标准曲线

Fig. 3 Standard curve showing C_t values in relation to the concentration of initial DNA

$$y = -3.5389x + 20.049, R^2 > 0.9999 \quad (2)$$

线性相关度良好,由斜率 $s = -3.5389$ 得到PCR扩增效率为91.68%。根据此标准曲线,计算得 C_t 值为35时的梅花鹿DNA质量浓度为 $0.42\text{ pg}/\mu\text{L}$,则该实时荧光PCR体系的灵敏度为 $0.42\text{ pg}/\text{反应}$ 。

3 结语

建立了对食品中梅花鹿源性成分的实时荧光PCR检测方法。通过分析线粒体基因序列,以种内保守、种间特异为基本要求,选取了COX1基因序列作为荧光PCR扩增的靶序列,设计了特异性的引物和探针。对大量非目标物种DNA进行扩增检测,结果表明研究所采用的引物与探针仅对梅花鹿DNA特异,降低了其在实际应用中出现非特异性扩增的风险。建立的实时荧光PCR体系的灵敏度为 $0.42\text{ pg}/\text{反应}$,能够对痕量的梅花鹿成分进行检测,同时有利于对加工制品及其他含梅花鹿成分的物质进行检测鉴定。

研究结果表明,鹿COX1 390特异性引物和TaqMan探针对梅花鹿成分鉴定具有特异性好、灵敏度高的特点,该荧光PCR鉴定方法稳定性高、实用性强,可为食品安全检测、打击造假等提供技术支持。通过对市场上梅花鹿肉进行分析检测,与标准方法相比,研究所得方法更快捷、准确、便利,可作为食品中梅花鹿成分的快速检测鉴定方法。

参考文献:

- [1] 季中梅,赵旭彤,赵岩,等. 鹿肉的营养价值与加工研究进展[J]. 肉类研究,2013,27(2):32-36.
JI Zhongmei,ZHAO Xutong,ZHAO Yan,et al. Recent advances in research on nutritional value and processing of venison[J]. *Meat Research*,2013,27(2):32-36.(in Chinese)
- [2] 唐蕊. 中国鹿产业发展现状及策略研究[D]. 长春:吉林大学,2013.
- [3] 姜亦飞,李峰,张世栋,等. 我国梅花鹿产业的发展现状及前景展望[J]. 山东农业科学,2012,44(9):109-111,114.
JIANG Yifei,LI Feng,ZHANG Shidong,et al. The current situation and prospects of deer industry in China [J]. *Shandong Agricultural Sciences*,2012,44(9):109-111,114.(in Chinese)
- [4] CAMMA C,DI Domenico M,MONACO F. Development and validation of fast real-time PCR assays for species identification in raw and cooked meat mixtures[J]. *Food Control*,2012,23(2):400-404.
- [5] DOOLEY J J,PAINE K E,GARRETT S D,et al. Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays [J]. *Meat Science*,2004,68:431-438.
- [6] KESMEN Z,GULLUCE A,SAHIN F,et al. Identification of meat species by TaqMan-based real-time PCR assay [J]. *Meat Science*,2009,82:444-449.
- [7] 李文静,李燕俊. 分子学方法鉴定肉制品种属来源的研究进展[J]. 国外医学(卫生学分册),2009,36(3):151-158.
LI Wenjing,LI Yanjun. A review of molecular methods for the authentication of meats [J]. *Foreign Medical Sciences(Section Hygiene)*,2009,36(3):151-158.(in Chinese)

- [8] TANABE S, HASE M, YANO T, et al. Real-time quantitative PCR detection method for pork, chicken, beef, mutton, and horseflesh in foods[J]. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, 2007, 71(12): 3131-3135.
- [9] JONKER K M, TILBURG J, HAGELE G H, et al. Species identification in meat products using real-time PCR [J]. **Food Additives and Contaminants**, 2008, 25(5): 527-533.
- [10] SAWYER J, WOOD C, SHANAHAN D, et al. Real-time PCR for quantitative meat species testing [J]. **Food Control**, 2003, 14(8): 579-583.
- [11] KOPPLE 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.
- [12] LAUBE I, ZAGON J, BROLL H. Quantitative determination of commercially relevant species in foods by real-time PCR [J]. **International Journal of Food Science and Technology**, 2007, 42(3): 336-341.
- [13] SAWYER J, WOOD C, SHANAHAN D, et al. Real-time PCR for quantitative meat species testing[J]. **Food Control**, 2003, 14(8): 579-583.
- [14] 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.
- [15] RORRIGUEZ M A, GARCIA T, GONZALEZ I, et al. PCR identification of beef, sheep, goat, and pork in raw and heat-treated meat mixtures[J]. **Journal of Food Protection**, 2004, 67(1): 172-177.
- [16] 王颖, 史艳宇, 刘金华, 等. 荧光定量 PCR 方法检测畜肉食品中猪源性成分[J]. 食品安全质量检测学报, 2013(5): 1529-1534. WANG Ying, SHI Yanyu, LIU Jinhua, et al. Detection of porcine-derived materials in meat products by real time PCR method [J]. **Journal of Food Safety and Quality**, 2013(5): 1529-1534. (in Chinese)
- [17] 金萍, 丁洪流, 李培, 等. 实时荧光 PCR 快速筛选食品中鸭源性成分[J]. 食品工业科技, 2013, 34(18): 61-63. JIN Ping, DING Hongliu, LI Pei, et al. Detection for duck-derived ingredients in foods with real-time pcr polymerase chain reaction method[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2013, 34(18): 61-63. (in Chinese)
- [18] CHISHOLM J, CONYERS C, BOOTH C, et al. The detection of horse and donkey using real-time PCR [J]. **Meat Science**, 2005, 70(4): 727-732.
- [19] VRIJENHOEK R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates[J]. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, 1994(3): 294-299.

科 技 信 息

卫计委批准聚(12-羟基硬脂酸)硬脂酸酯等 23 种物质用于食品接触材料及制品

2016 年 5 月 31 日, 国家卫生计生委食品安全标准与监测评估司发布 2016 年第 7 号、关于聚(12-羟基硬脂酸)硬脂酸酯等 23 种食品相关产品新品种的公告。根据《食品安全法》规定, 审评机构组织专家对聚(12-羟基硬脂酸)硬脂酸酯等 23 种食品相关产品新品种的安全性评估材料审查并通过。

在本次公告中规定了对这 23 种物质的使用范围、最大使用量、特定迁移限量(SML)和最大残留量(QM)等要求, 主要有以下要点:

1. 批准聚(12-羟基硬脂酸)硬脂酸酯等 12 种物质用作食品接触材料及制品用添加剂;
2. 扩大氧化镁等 5 种食品接触材料及制品用添加剂的使用范围或使用量;
3. 批准丙烯腈与 1,1-二氯乙烯的聚合物等 6 种物质用作食品接触材料及制品用树脂。

此外, 需要注意的是, 利用 5-降冰片烯-2,3-二羧酸酐、间苯二甲酸与氮杂环十三烷-2-酮和 3,3'-二甲基-4,4'-二氨基二苯基甲烷的聚合物、聚丙烯酰胺、磷酸- α -十三烷基- ω -羟基-聚(氧-1,2-亚乙基)酯几种物质生产的材料和制品在接触或盛装的食品种类方面有严格要求, 而利用氧化镁、丙烯腈与 1,1-二氯乙烯的聚合物、2-甲基-2-丙烯酸甲酯与 1,1-二氯乙烯的聚合物、2-甲基-2-丙烯酸甲酯与 1,1-二氯乙烯和 2-甲基-2-丙烯腈的聚合物、2-甲基-2-丙烯酸与苯乙烯的聚合物几种物质生产的材料和制品需控制与食品的接触温度和接触时间。

[信息来源] WTO 检验检疫信息网. 卫计委批准聚(12-羟基硬脂酸)硬脂酸酯等 23 种物质用于食品接触材料及制品 [EB/OL]. (2016-6-16). <http://www.wtociq.gov.cn/newsinfo>