

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

郭燕华, 王德莲, 王强, 聂炎炎, 吴环, 张慧, 陈遂, 杨静, 曾国权,
陈景亮, 郭新东*

(广州质量监督检测研究院, 广州 511447)

摘要: **目的** 建立重组酶介导等温扩增技术快速检测牛肉及牛肉制品中牛源性成分的方法。**方法** 应用重组酶聚合酶等温扩增技术(recombinase polymerase amplification, RPA), 根据牛源性线粒体细胞色素 b(*Cytb*)基因序列设计筛选了一对可用于扩增的引物, 建立基于重组酶介导的等温扩增技术检测方法, 并对该方法进行扩增温度、特异性和灵敏性验证。**结果** 40 °C等温扩增条件下, 所设计的引物的特异性为 100%, 该检测方法的灵敏性可达 0.1 ng/μL。**结论** 本研究成功建立了牛源性肉制品的等温扩增方法, 该方法快速简便, 具有较高的特异性和灵敏性, 适用于市售生鲜肉制品及加工肉制品中牛源性成分的鉴定。

关键词: 等温扩增; 快速检测; 牛肉; 牛源性成分

Determination of bovine ingredient in beef and its derivatives with recombinase polymerase mediated isothermal amplification

GUO Yan-Hua, WANG De-Lian, WANG Qiang, NIE Yan-Yan, WU Huan, ZHANG Hui,
CHEN Sui, YANG Jing, ZENG Guo-Quan, Chen Jing-Liang, GUO Xin-Dong*

(Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, Guangzhou 511447, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for rapid detection of bovine ingredient in beef and its derivatives by recombinase polymerase amplification assay (RPA). **Methods** According to the *Cytb* gene sequence of bovine, a pair of RPA primers was designed and a novel event-specific detection method for beef and its derivatives based on RPA was established. The specificity and sensitivity of this method were respectively performed for validation. **Results** Primers for RPA had good specificity under the condition of 40 °C. This method had a high sensitivity of 0.1 ng/μL. **Conclusion** The RPA method for detection of bovine in meat and meat products is successfully established. This method is rapid, efficient and suitable for the identification of meat and its derivatives from the market.

KEY WORDS: isothermal amplification; rapid detection; beef; bovine ingredient

基金项目: 广东省自然科学基金项目(2016A030310102)、广东省质量技术监督局科技项目(2016CZ11)

Fund: Supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (2016A030310102) and the Scientific and Technological Project of Administration of Quality and Technology Supervision of Guangdong Province (2016CZ11)

*通讯作者: 郭新东, 教授, 主要研究方向为食品营养与安全检测技术。E-mail: gdone@21cn.com

*Corresponding author: GUO Xin-Dong, Professor, Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, No. 1, Zhujiang Road, Guangzhou 511447, China. E-mail: gdone@21cn.com

1 引言

肉类食品是人类动物源性膳食的主要来源,随着人民生活水平的提高,对肉类产品的质量安全问题越来越关注。由于不同肉类品种间的价格差异较大,有些不法分子为了追逐利润,在肉制品的加工销售中使用廉价的猪肉或鸭肉冒充牛肉、羊肉,极大地损害了消费者的合法权益^[1]。肉制品的安全问题不仅涉及经济、营养价值等问题,还涉及进出口问题肉制品的监控,甚至是宗教信仰。1987年始发于英国的疯牛病事件之后,多数国家和地区为了有效控制与管理动物源性成分在食品中的使用,都要求肉及肉制品的食品标签必须明确地标明肉类来源,尤其是敏感性反刍动物源性成分^[2]。

国内外对肉及肉制品的真伪鉴别常用技术有:免疫分析法^[3]、红外光谱法^[4]、色谱法^[5]、电子鼻技术^[6]。但是,这些方法大都对样品要求高,技术操作复杂,且需要贵重的仪器来完成。随着生物学技术的发展,基于DNA序列特异性的分子生物学技术以动物种属间遗传信息的差异作为肉种辨别的检测靶点而广泛应用,其中PCR检测技术是食品中鉴别肉类成分的主要应用技术^[7-10]。PCR技术也存在一定的局限性,反应过程需要在精准的PCR仪完成,反应过程需要数小时,不适宜于缺乏昂贵精密仪器的基层的工作人员操作。重组聚合酶等温扩增技术(recombinase polymerase amplification, RPA)是2006年由英国公司TwistDx Inc研发的一种核酸恒温扩增技术,基于重组聚合酶介导的扩增原理,体外模拟生物体内DNA复制,在恒温条件下即可对目的片段进行扩增^[11-13]。目前基于RPA技术建立的检测方法已经在食品相关领域检测、病原体检测、疾病诊断等多个领域得到越来越广泛的应用^[14-16]。本研究根据基层实验室日常检验和进出口现场检验的条件与需求,以牛源性线粒体色素b(*Cytb*)基因序列为靶基因,设计并筛选RPA检测引物,建立适合于现场检测肉及肉制品中牛源性RPA检测方法。

2 材料与方 法

2.1 材料与仪器

实验用的牛肉、牛肉干、牛肉丸等样品均购自广州大型超市。

基因组DNA提取试剂盒(DNeasy mericon food kit, 德国QIAGEN公司); RPA反应试剂盒(TwistAmp EXO kit, 英国TwistDx公司); DNA Marker(中国GenStar公司); 5xGelRed琼脂糖电泳加样缓冲液(含核酸染料)(中国Generay公司)。以牛源性线粒体基因Cytb基因序列(登录号:KJ193457.1)为模板设计引物,引物序列见表1。所用引物由life公司合成。

NanoDrop 2000(英国Thermo公司); DK-8D电热恒温水槽(上海精宏实验设备有限公司); 离心机(3-30K, 美国Sigma公司)。

2.2 试验方法

2.2.1 基因组DNA提取

先用灭菌剪刀将牛肉干、牛肉粒、牛肉丸等加工的样品剪成2~4 mm见方小块,用1×TE(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH=8.0)浸泡3~6 h,以去除样品表面的调味料及水溶性物质,沥干水分后,将样品匀浆破碎成浆状,然后按照DNeasy mericon food kit试剂盒说明书进行基因组提取。

2.2.2 RPA反应体系及条件

向装有重组酶及聚合酶干粉的反应管中加入25 μL反应缓冲液;上下游引物(10 μmol/L)各2.4 μL以及2 μL模板DNA,用ddH₂O补至总体积为47.5 μL后充分混匀,将2.5 μL 280 mmol/L醋酸镁溶液加到反应管盖内,上下颠倒6~8次混合均匀,瞬时离心后,放置于所需温度的水浴锅中反应20 min。

3 结果与分析

3.1 DNA提取结果

DNA的提取质量直接影响到后续的扩增反应,为了检测实验样本的DNA,使用NanoDrop 2000分析仪测定本研究提取DNA的浓度及纯度(A_{260}/A_{280}),结果见表2。所提取的牛肉、牛肉干等样品的DNA浓度在40~250 ng/μL范围内,生鲜牛肉的DNA浓度明显高于深加工的牛肉制品,究其原因,应该是产品加工过程中会造成DNA的损失。从DNA提取的纯度(A_{260}/A_{280})来看,所有样品的 A_{260}/A_{280} 数值均介于1.75~2.10之间,符合后续扩增的对纯度的要求。

表1 牛源性成分RPA检测引物序列
Table 1 The RPA primer sequences of bovine ingredient

引物名称	序列(5' - 3')	扩增片段长度
Niu-F1	TTAGAGATTGAGAGCCATATACTCTCCTTGGTGACA	300 bp
Niu-R1	TTTGATGTTGGGAATAGTAGCTTGGGAATAGTACGA	

表 2 实验样品 DNA 提取结果
Table 2 Results of DNA extraction from samples

样品编号	样品名称	DNA 浓度(ng/μL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
1	黄牛肉	236	1.83
2	牛肉卷 1	189	1.90
3	牛肉卷 2	192	2.00
4	西冷牛排	137	1.80
5	儿童牛排	150	1.95
6	牛板筋	83	1.79
7	牛肉丸	62	1.72
8	牛肉罐头	45	2.05
9	芝麻牛肉	67	1.83
10	牛肉干(五香)	71	1.87
11	牛肉干(香辣)	64	1.79
12	11 度牙签牛肉	87	1.81
13	牛肉粒	50	1.78
14	手撕风干牛肉	96	1.84
15	美味孜然牛肉	49	1.80
16	牛肉脯	120	1.87

3.2 牛源性成分 RPA 扩增最优扩增温度

配置 6 管 RPA 反应体系, 除了空白反应管外, 其他反应管中每管加入 1 μL 100 ng/μL 的牛肉 DNA, 其他组分完全相同, 设置恒温水浴锅 5 个梯度的扩增反应温度: 25、30、37、40、45 °C, 然后将配置好的反应管分别放在不同温度的水浴锅中进行扩增, 其中空白反应管放置于 37 °C 水浴锅内反应 20 min, 扩增结束后各取 3 μL 扩增产物与 1 μL 5xGelRed 琼脂糖电泳加样缓冲液混匀后进行琼脂糖凝胶电泳, 结果如图 1 所示, 扩增温度在 25~45 °C 范围内均可扩增出牛源性成分特异性目的条带, 扩增温度越高特异性越好, 因此牛源性成分 RPA 引物最优扩增温度为 40 °C。RPA 扩增过程不依赖于精密的 PCR 仪, 不需要进行高温变性、低温退火及适温延伸的循环扩增, 可在 25~45 °C 范围的等温条件下完成反应, 有研究者报道将反应管放在人体腋窝下即可完成扩增过程^[12]。

3.3 牛源性成分 RPA 引物物种特异性检测

以羊肉、猪肉、鸡肉、鸭肉、鹅肉、马肉、驴肉的 DNA 作为模板, 对牛源性成分 RPA 引物的特异性进行验证, 如图 2 所示, 只有牛肉 DNA 扩增出来了目的条带, 而在 7 种不同物种的 DNA 中, 牛源性成分 RPA 引物均未扩增出目的条带, 表明本研究所设计的牛源性 RPA 引物具有良好的物种特异性。

3.4 牛源性成分检测的 RPA 扩增方法的灵敏度测试结果

1 号样品牛肉的 DNA 浓度为 236 ng/μL (A₂₆₀/A₂₈₀=1.83),

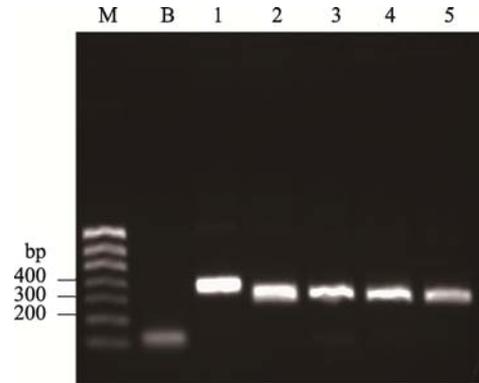


图 1 RPA 引物温度梯度扩增结果

Fig. 1 DNA amplification using RPA primers at incubation temperatures

注: M: DNA 分子量标记; B: 空白对照; 泳道 1~5: 扩增温度分别为 25、30、37、40、45 °C

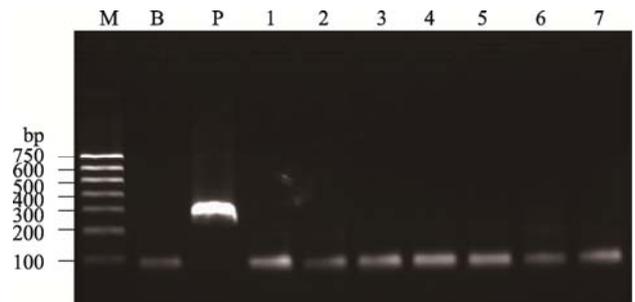


图 2 牛源性 RPA 引物物种特异性扩增结果

Fig. 2 Results of the specificity of bovine RPA primers

注: M: DNA 分子量标记; B: 空白对照; P: 阳性对照; 泳道 1~7 分别为: 羊、猪、鸡、鸭、鹅、马、驴

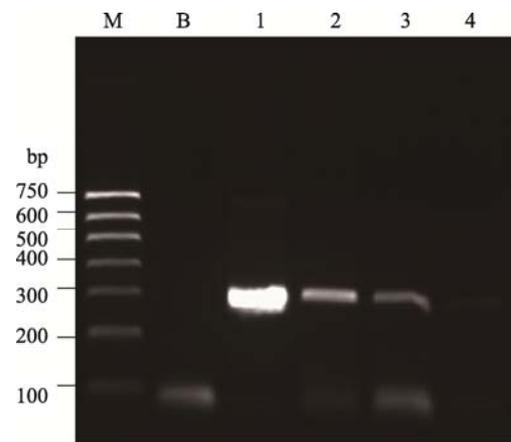


图 3 牛源性成分 DNA 浓度灵敏度 RPA 扩增结果

Fig. 3 Results of the sensitivity of RPA for the detection of bovine ingredient

注: M: DNA 分子量标记; B: 空白对照; 泳道 1~4: 牛肉 DNA 浓度依次为 10、1、0.1、0.01 ng/μL



图 4 样品中牛源性成分的 RPA 扩增结果

Fig. 4 RPA results of the beef-derived products sample

注: M: DNA 分子量标记; B: 空白对照; 泳道 1~16: 牛肉及牛肉制品

将其稀释为 $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$, 然后进行 10 倍梯度的稀释, 共配制 4 个不同的浓度: 10、1、0.1、 $0.01 \text{ ng}/\mu\text{L}$, 然后以其为模板进行 RPA 扩增, 扩增结束后进行电泳检测。扩增图谱表明, RPA 扩增产物的亮度随着 DNA 模板浓度的降低而逐渐下降, 浓度为 $0.1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 以上的牛肉 DNA 都可扩增出清晰的 300 bp 的条带, 这一结果表明, 该检测方法的灵敏度可达到 $0.1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ (图 3), 与普通 PCR 检测方法的灵敏度相当^[8]。

3.6 RPA 技术在牛肉及其制品中牛源性成分检测中的应用

为了检测本研究所建立的 RPA 方法是否适用于市售的各种牛肉制品中牛源性成分的鉴别, 采用本研究所建立的等温扩增方法, 对市面上在售的 16 份牛肉及其制品样品进行鉴定。所有的样品均能扩增出 300 bp 的清晰目的条带(图 4), 这一结果表明 16 份肉制品样品中都包含有牛源性成分。

4 结 论

实验结果表明, 本文所设计的牛源性 RPA 引物只能特异性扩增出以牛肉为模板的目的条带, 而以猪、羊、鸡、鸭、鹅、马、驴肉为模板时均扩增不出来条带, 该引物具有较好的特异性。且来源于市场的 16 份牛肉制品样品均可扩增出来清晰的目的条带(300 bp), 表明该引物可用于牛及其加工产品的牛源性成分检测。同时, 本研究建立的重组酶介导的等温扩增技术的检测极限达到了 $0.1 \text{ ng}/\mu\text{L}$, 本研究建立的实验方法可以摆脱 PCR 精密仪器的束缚, 在 $25\sim 45 \text{ }^\circ\text{C}$ 的水浴锅中即可完成扩增反应, 甚至在脱离实验室的室温条件下都可以进行扩增。该方法具有成本低、易操作、不依赖于大型贵重检测仪器等优点, 适用于实验条件匮乏的基层工作人员, 具有重要的实际意义。

参考文献

- [1] 唐穗平, 张燕, 黄景辉. 广东省牛羊肉及其制品中掺杂掺假情况的调查分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(5): 1882-1886.
Tang SP, Zhang Y, Huang JH. Progress of molecular identification techniques used in meat and meat products [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(5): 1882-1886.
- [2] 李宗梦, 赵良娟, 赵宏, 等. 肉及肉制品动物源性成分鉴别技术研究进展[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(18): 122-127.
Li ZM, Zhao LJ, Zhao H, *et al.* Research progress in identification techniques of animal ingredient in meat and meat products [J]. Food Res Dev, 2014, 35(18): 122-127.
- [3] Macedo-Silva A, Barbosa S, Alkmin M, *et al.* Hamburger meat identification by dot-ELISA [J]. Meat Sci, 2000, 56(2): 189-192.
- [4] Cozzolino D, Murray I. Identification of animal meat muscles by visible and near infrared reflectance spectroscopy [J]. LWT-Food Sci Technol, 2004, 37(4): 447-452.
- [5] Schönherr J. Analysis of products of animal origin in feeds by determination of carnosine and related dipeptides by high-performance liquid chromatography [J]. J Agric Food Chem, 2002, 50(7): 1945-1950.
- [6] Nurjuliana M, Man YC, Hashim DM, *et al.* Rapid identification of pork for halal authentication using the electronic nose and gas chromatography mass spectrometer with headspace analyzer [J]. Meat Sci, 2011, 88(4): 638-644.
- [7] Pfeiffer I, Burger J, Brenig B. Diagnostic polymorphisms in the mitochondrial cytochrome b gene allow discrimination between cattle, sheep, goat, roe buck and deer by PCR-RFLP [J]. BMC Genetics, 2004, 5(1): 30.
- [8] Montiel-Sosa J, Ruiz-Pesini E, Montoya J, *et al.* Direct and highly species-specific detection of pork meat and fat in meat products by PCR amplification of mitochondrial DNA [J]. J Agric Food Chem, 2000, 48(7): 2829-2832.
- [9] 孙晶莹, 孙丽君, 王晓红, 等. 肉制品中牛源性成分多重实时荧光 PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(9): 3756-3760.

- SUN JY, SUN LJ, WANG XH, *et al.* Establishment and application of multiple real-time fluorescent PCR to detect the beef ingredient in meat products [J]. *J Food Saf Qual*, 2016, 7(9): 3756–3760.
- [10] 沙才华, 杨素, 廖秀云, 等. 应用三重 PCR 方法鉴别肉制品中猪和牛源性成分[J]. *畜禽业*, 2011, (12): 52–53.
Sha CH, Yang S, Liao XY, *et al.* Applies triple PCR Simultaneously to Examine the porcine and Bovine Derived Materials [J]. *Livest Poultry Ind*, 2011, (12): 52–53.
- [11] Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, *et al.* DNA detection using recombination proteins [J]. *PLoS Biol*, 2006, 4(7): 1115–1121.
- [12] Crannell ZA, Rohrman B, Richards-Kortum R. Equipment-free incubation of recombinase polymerase amplification reactions using body heat [J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e112146.
- [13] 高威芳, 朱鹏, 黄海龙. 重组酶聚合酶扩增技术: 一种新的核酸扩增策略[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2016, 32(6): 627–634.
Gao WF, Zhu P, Huang HL. Recombinase polymerase amplification: A new DNA /RNA amplification strategy [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*. 2016, 32(6): 627–634.
- [14] Santiagofelipe S, Tortajadagenaro LA, Puchades R, *et al.* Recombinase polymerase and enzyme-linked immunosorbent assay as a DNA amplification-detection strategy for food analysis [J]. *Anal Chim Acta*, 2014, 811(81–87).
- [15] Clarke CM, Connor LO, Carreskinner H, *et al.* Development and performance evaluation of a recombinase polymerase amplification assay for the rapid detection of group B streptococcus [J]. *BMC Microbiol*, 2016, 16(1): 221.
- [16] Eid C, Santiago JG. Assay for *Listeria monocytogenes* cells in whole blood using isotachopheresis and recombinase polymerase amplification [J]. *Analyst*, 2017, 142(1): 48–54.

(责任编辑: 姜姗)

作者简介



郭燕华, 博士, 主要研究方向为食品营养与安全检测技术。

E-mail: gyh9927@163.com



郭新东, 教授, 主要研究方向为食品营养与安全检测技术。

E-mail: gdone@21cn.com