

DNA 条形码在肉制品掺伪中非定向筛查 技术的研究

钟文涛^{1,2}, 王芳妹^{1,2}, 李白玉¹, 蒋伟¹, 颜亨梅^{2*}

(1. 国家农产品质量监督检验中心, 湖南省产商品质量监督检验研究院, 长沙 410007;

2. 湖南师范大学生命科学院, 长沙 410006)

摘要: **目的** 对基于DNA条形码的肉制品掺伪中非定向筛选技术进行探索。**方法** 以线粒体基因组中COI基因为靶标, 设计猪、牛、羊、马、鸡、鸭、鹅、鼠8种动物源物种间的通用引物和特异性引物, 建立禽畜肉的DNA条形码检测方法。同时应用该技术对50份市售的肉制品进行检测。**结果** 本研究建立了DNA条形码筛选技术, 电泳条带通过基因测序能正确识别猪、牛、羊、马、鸡、鸭、鹅、鼠8种动物源成分, 结合分子克隆技术能实现对混合肉的检测。50份市售肉制品的DNA条形码结果显示, 16份掺杂了除牛羊肉以外的其他禽畜肉。**结论** DNA条形码技术能打破传统标准中PCR法检测目标唯一性的局限, 具有良好的应用前景。**关键词:** DNA条形码; COI基因; 肉制品掺伪; 非定向筛查

Research on the non-directional test in meat adulteration based on DNA barcode

ZHONG Wen-Tao^{1,2}, WANG Fang-Mei^{1,2}, LI Bai-Yu¹, JIANG Wei¹, YAN Heng-Mei^{2*}

(1. *Human Testing Institute of Product and Commodity Supervision, National Supervision & Testing Centre for Agricultural & Sideline Product Quality, Changsha 410007, China*; 2. *College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410006, China*)

ABSTRACT: Objective To research non-directional test method of meat adulteration based on DNA barcode. **Methods** Based on COI gene in mitochondria, universal primers and specific primers of pork, beef, mutton, horsemeat, chicken, duck, goose and rat were designed and DNA barcode method was established. And then 50 meat products bought from markets were detected by this method. **Results** Pork, beef, mutton, horsemeat, chicken, duck, goose and rat meat could be distinguished with each other after sequencing gene of electrophoresis banding in the established DNA barcode method. Combined with molecular cloning technique, mixed meat could be tested by this method. The DNA barcode test results of 50 meat products showed that 16 of them were adulterated with other livestock meat except for beef and mutton. **Conclusion** DNA barcode can break the limitation of which the target of PCR method is unique in traditional standard, and this technology has the extremely broad application prospect.

KEY WORDS: DNA barcode; COI; meat adulteration; non-directional detection

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局科技计划项目(2016QK057)、国家自然科学基金项目(31372159)

Fund: Supported by the State Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of Science and Technology Plan Projects (2016QK057) and the National Natural Science Foundation of China (31372159)

*通讯作者: 颜亨梅, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为生物安全监控。E-mail: yanhm2006@163.com

*Corresponding author: YAN Heng-Mei, Professor, Doctoral Supervisor, College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China. E-mail: yanhm2006@163.com

1 引言

随着生活质量的逐渐提高,人们对肉制品的需求从满足日常摄入到关注其食品安全和品质^[1]。自2000年以来,牛羊肉价格呈持续上涨的趋势,目前市场上牛肉、羊肉的价格普遍是猪肉、鸡肉、鸭肉的2~3倍。禽畜肉间的巨大差价带来巨大的利润空间,使不法商不顾违反《食品安全法》铤而走险,将其他禽畜肉通过牛、羊油浸泡,添加香辛料等方式处理后冒充牛、羊肉进行售卖。国内“挂羊头卖狗肉”的现象屡次被媒体曝光,而2013年在诚信体系比较健全的欧洲也爆发了“马肉风波”。肉制品掺假事件不仅损害了消费者的权益,扰乱了市场秩序,更是对部分民族宗教信仰的亵渎。我国针对肉制品成分鉴定已经颁布了国家标准和行业标准^[2-6],主要采用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)、实时荧光定量PCR(realtime-PCR, RT-PCR)的方法对目标成分进行一对一的定性检测,在食品安全监测中发挥了积极作用,但是面对复杂的掺假市场,这些已有的检测方法在使用过程中略显不足,难以做到多靶标同时检测,检测时间成本和试剂耗材成本较高,而DNA条形码(DNA barcode)技术则可以实现对检测目标物种的无靶标筛选,具有较好的应用前景^[7-9]。

DNA条形码概念一经提出,立刻引起全世界关注,它是以小片段基因(线粒体细胞色素氧化酶I亚基, Cytochrome Oxidase I, COI)作为物种快速鉴定的通用标记,利用DNA序列建立起物种名称和生物实体之间一一对应的关系。DNA条形码有一种潜在的可能性,能够成为地球上已被认知的1千万多种真核生物的有效鉴定方法^[10-13],目前主要应用于对未知物种或表型相似的物种进行分类鉴定,它代表了生物分类学研究的一个新方向,但该技术的应用绝不限于生物分类学领域。国内DNA条形码技术除了在生物分类学的应用外^[14],在消费品检测方面的研究较少^[15]。

本研究通过比对猪、牛、羊、马、鸡、鸭、鹅、鼠8个物种线粒体COI基因序列,设计满足实验要求的通用引物,建立了针对肉制品掺假的DNA条形码检测方法。同时,用该方法对市售的50份肉制品进行动物源成分分析,以期对肉制品真实性的监管提供技术支持。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

基因组DNA提取试剂盒(离心柱式, QIAGEN公司);电泳级琼脂糖(生工生物工程(上海)股份有限公司);2×PCR Master mix、DNA Ladder、琼脂糖DNA纯化试剂盒、TA克隆试剂盒、E.coli HST08感受态细胞、质粒抽提试剂盒(宝

生物工程(大连)有限公司);

引物序列由宝生物工程(大连)有限公司合成;猪肉、牛肉、羊肉、马肉、鸡肉、鸭肉、鹅肉阳性样本由湖南红星冷冻食品有限公司提供,鼠肉阳性样本由湖南师范大学生命科学学院提供。

2.2 仪器与设备

CFX96PCR仪(美国Bio-Rad公司);SmartSpec plus核酸蛋白测定仪、Powerpac universal电泳仪、GelDoc XR+凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司);MiniSpin Plus高速离心机、ThermoMixer C恒温混匀仪(德国Eppendorf公司)。

2.3 核酸提取

样品用液氮研磨粉碎,分别称取100 mg于干净的离心管内。按照QIAGEN基因组DNA提取试剂盒操作说明书小心操作,将纯化后的核酸用100 μL TE溶液洗脱后,用核酸蛋白测定仪测定 OD_{260}/OD_{280} 后,计算DNA的纯度和浓度,于-20℃保存备用。

2.4 引物设计

在GeneBank中搜索猪、牛、羊、马、鸡、鸭、鹅、鼠COI的基因组编码序列,将全序列导入到DNASTAR软件中,通过MegAlign功能分析属间COI基因的同源性,用Primer Premier 6设计适合在不同物种间扩增的通用引物。同时,在COI基因序列内设计各物种特异性引物,用于后续验证试验。所有引物序列、产物大小、GeneBank编号见表1。

2.5 PCR扩增

通用引物PCR反应在20 μL体系中进行:2×PCR Master mix 10 μL、10 μmol/L正反引物各0.5 μL、DNA模板1 μL、无菌水8 μL。

PCR反应条件为:94℃预变性3 min,94℃变性30 s,52℃退火30 s,72℃延伸30 s,循环35次,72℃再延伸5 min。

取5 μL反应产物进行1%的琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像系统分析扩增产物。将琼脂糖凝胶上的电泳条带切下,按照琼脂糖DNA纯化试剂盒说明书进行提取纯化后,送至宝生物工程(大连)有限公司进行基因测序鉴定,测得序列提交GenBank进行BLAST比对。

2.6 质粒制备

将纯化后的DNA与pMD20-T载体进行连接(图1),导入E.coli HST08感受态细胞中,涂布接种于添加了氨苄青霉素、X-Gal的LB琼脂平板上,36℃±1℃培养12 h进行蓝白斑筛选。挑取白色菌株在36℃±1℃培养12 h进行纯化增菌,将菌液离心后按照质粒抽提试剂盒提取质粒。通过特异性引物PCR和EcoR I、HindIII双酶切2种方式对克隆结果进行验证。

表 1 通用引物及特异性引物序列
Table 1 The sequence of universal primer and specific primers

引物名称	引物序列(5'-3')	片段大小(bp)	GeneBank 编号
通用引物	正向引物: CAGACCAAGAGCCTTCAAAGC 反向引物: GGTTTCGATTCCTTCCTTT	1927	/
猪源性	正向引物: ACAGCCGTACTACTTCTACT 反向引物: ATTAGCTAGTACAATGCCCG	510	NC_000845.1
牛源性	正向引物: CTTTATCTACTATTTGATGCTTGGG 反向引物: ATTACGGATCATA CGAACAGA	515	NC_006853.1
羊源性	正向引物: ATACACGGGGCTTACTTCAC 反向引物: CAGAGTATCGTCGTGGTAT	426	NC_005044.2
马源性	正向引物: GCTTTCTAGGCTTCATCGTA 反向引物: TTGGTTGAGTGTGTATCCTG	380	NC_001640.1
鸡源性	正向引物: AATTCGCGCAGAACTAGG 反向引物: GGAGGAAACACCTGCTAAG	361	NC_001323.1
鸭源性	正向引物: CCGTAGGAATAGACGTTGAC 反向引物: TTGAGATCAGGGACCCAATAG	504	NC_009684.1
鹅源性	正向引物: CACCATTTCTCCATCGGC 反向引物: GGCCGGTTCCTCGAAAGTAT	175	NC_011196.1
鼠源性	正向引物: TTCGTTAACC GTTACTCTT 反向引物: TATATCAGGGGCTCCAATCA	273	NC_011638.1

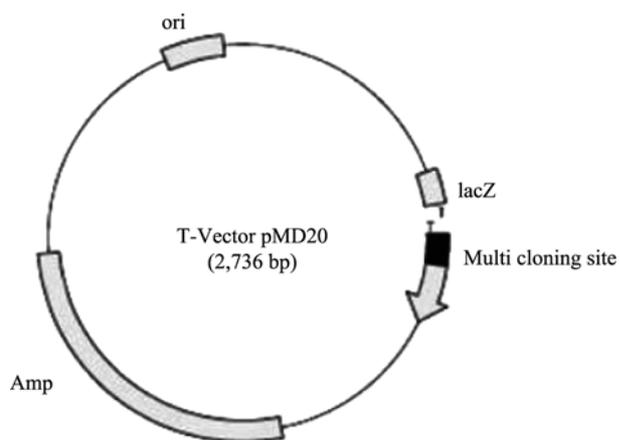


图 1 *pMD20-T* 载体图谱
Fig. 1 Vector map of *pMD20-T*

特异性引物 PCR 反应在 20 μL 体系中进行: 2 \times PCR Master mix 10 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ 正反引物各 0.5 μL 、DNA 模板 1 μL 、无菌水 8 μL 。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 循环 35 次, 72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 5 min。

双酶切反应在 20 μL 体系中进行: EcoR I 1 μL 、HindIII 1 μL 、10 \times M Buffer 2 μL 、DNA 1 μg 、灭菌水补充至 20 μL ，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下水浴反应 1 h。

2.7 市售肉制品掺伪调研检测

从超市、农贸市场、夜宵摊位购买牛羊肉制品 50 份, 进行 DNA 条形码检测。由于市售的肉制品可能掺杂了其他动物源成分, 在使用通用引物对 DNA 扩增、电泳后, 需按照 2.6 所述方法制备质粒, 进一步细化筛选, 每个样品拟挑取 10 个白色菌株送至宝生物工程(大连)有限公司进行基因测序鉴定, 测得序列提交 GenBank 进行 BLAST 比对。

3 结果与分析

3.1 阳性纯肉样品 DNA 条形码电泳及验证

使用通用引物分别对猪、牛、羊、马、鸡、鸭、鹅、鼠纯肉的 DNA 样本进行扩增, 电泳结果如图 2 所示, 所设计的通用引物对 8 种动物的 DNA 均能实现有效扩增, 且未出现干扰杂带。将测序得到的碱基序列导入 BLAST 进行比对, 扩增序列与物种间的同一性均在 99% 以上, 能清晰地对以上 8 种动物源成分进行识别。

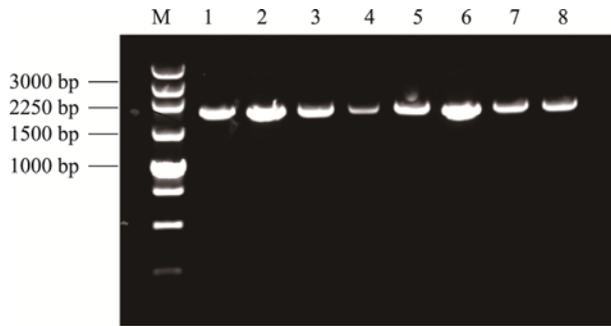


图 2 8 种阳性纯肉样品 DNA 条形码电泳图

Fig. 2 The electrophoretogram of DNA barcodes of 8 kinds of positive samples of pure meat

M. DNA Ladder; 1.猪肉; 2.牛肉; 3.羊肉; 4.马肉; 5.鸡肉; 6.鸭肉; 7.鹅肉; 8.鼠肉

3.2 质粒有效性验证

在波长为 365 nm 的紫外灯下将 8 条 DNA 条形码电泳条带迅速切下后并纯化, 按照 2.6 所述方法进行克隆实验, 通过蓝白斑筛选后提取质粒, 进行后续验证实验。使用表 1 中特异性引物对 8 种条形码质粒一一对应进行 PCR 反应, 结果如图 3 所示, 所得电泳产物与实验设计中产物大小一致。

质粒经过双酶切后, 在 1900 bp 及 2700 bp 左右形成了 2 条带, 分别与克隆片段和载体大小一致, 电泳结果如图 4 所示。

2 个结果从不同的角度证明, DNA 条形码的基因片段已与载体连接, 质粒制备方法可行有效, 可以满足后续测序需求; 同时由于特异性引物设计在通用引物序列范围内, 且能实现有效扩增, 证明通用引物的扩增产物中有能够区别 8 种动物成分的特异性基因片段。综上所述, 使用本实验设计的通用引物对猪、牛、羊、马、鸡、鸭、鹅、鼠 8 种动物 DNA 进行扩增, 制备质粒并结合基因测序技术, 可实现对于肉制品掺伪的非定向筛选, 但对于非上述 8 种动物肉成分是否能够有效鉴定, 还需进一步实验证实。

3.3 市售 50 份样品掺伪检测

采用 2.5、2.6 所述方法对市售的 50 份牛羊猪肉制品进行 DNA 条形码检测, 结果见表 2。

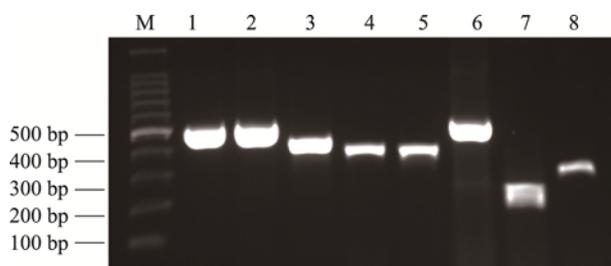


图 3 质粒的特异性引物 PCR 扩增验证

Fig. 3 The PCR amplification test of plasmid by specific primers

M. DNA Ladder; 1.猪肉; 2.牛肉; 3.羊肉; 4.马肉; 5.鸡肉; 6.鸭肉; 7.鹅肉; 8.鼠肉

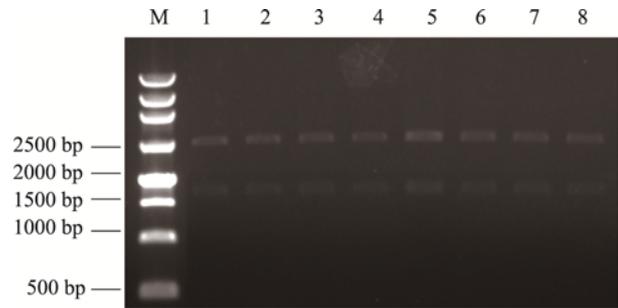


图 4 质粒酶切验证

Fig. 4 Plasmid enzyme validation

M. DNA Ladder; 1.猪肉; 2.牛肉; 3.羊肉; 4.马肉; 5.鸡肉; 6.鸭肉; 7.鹅肉; 8.鼠肉

表 2 市售肉制品鉴定

Table 2 The identification of meat samples in marker

样品	数量	掺假数	掺假率(%)	备注
牛肉干	10	1	10	检出猪肉成分
烤牛肉串	22	8	36.4	检出鸭肉成分
烤羊肉串	14	5	35.7	检出鸭肉成分
牛肉丸	4	2	50	检出马肉、猪肉、鸭肉成分
总计	50	16	32	

从表 2 可以看出, 样品中除了牛、羊肉成分外, 鸭、猪、马肉成分均有检出, 鸡、鹅、鼠肉 3 种成分未检出, 可能由于是鸭、猪、马肉比较容易获得, 成本较低, 肌肉纤维和口感跟牛肉较为接近。

企业生产行为中掺假原材料主要是猪肉、鸭肉、马肉, 掺入的动物源成分复杂(1~3 种); 个体商户(夜宵摊位)生产行为中掺假原材料主要是鸭肉, 掺入动物源成分相对单一。根据检测结果, 牛肉丸的掺假率高达 50%, 其原因可能为: 商家在生产过程中将多种肉泥掺杂在一起, 而产品标签上对除牛肉外的其他肉成分不做标注, 经过加工调味后, 消费者无法以肉眼或口感判断真伪, 商家从中牟取暴利。烤牛肉串、烤羊肉串掺假率分别为 36.4%、35.7%, 同样是由于在烤肉过程中加入大量香辛料, 导致消费者无法对肉质进行识别。

4 讨论

随着食品加工工业的发展, 市售肉制品的种类越来越丰富, 凭感官对肉制品品种进行鉴定的局限性越来越大, 只有通过技术手段进行特征指标的检测才能鉴别, 其中 DNA 检测以最为稳定, 受深加工影响最小, 应用最为广泛^[16,17]。动物源成分的 PCR 鉴定现阶段有检测标准可依, 但随着技术的进步, 现行标准需要向更深检测层次延伸, 检测手段需要升级, 实现从有靶标的检测向无靶标筛选发展, 对检测能力的精准性有了更高要求。而 DNA 条形码技术能打破传统标准中 PCR 法检测目标唯一性的局限, 具有不可替代的优势, 在大众消费领域应用前景良好。

参考文献

- [1] Vandendriessche. Meat products in the past, today and in the future [J]. Meat Sci, 2008, 78(1/2): 104–113.
- [2] GB/T 21103-2007 动物源性饲料中哺乳动物源性成分定性检测方法实时荧光 PCR 方法[S].
GB/T 21103-2007 Identification of mammal derived materials in animal-originated feedstuffs-real time PCR method [S].
- [3] GB/T 20190-2006 饲料中牛羊源性成分的定性检测定性聚合酶链式反应(PCR)法[S].
GB/T 20190-2006 Detection of bovine, sheep and goat-derived material in feed-Qualitative polymerase chain reaction (PCR) method [S].
- [4] GB/T 25165-2010 明胶中牛、羊、猪源性成分的定性检测方法实时荧光 PCR 法[S].
GB/T 25165-2010 Protocol of identification of bovine, caprine, ovine and porcine derived materials in gelatin-Real time PCR method [S].
- [5] SN/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].
SN/T 2051-2008 Detection of bovine, ovine, porcine-derived materials in food, cosmetic and feed -Real time PCR method [S].
- [6] SNT 2727-2010 饲料中禽源性成分检测方法实时荧光 PCR 方法[S].
SNT 2727-2010 Detection of poultry derived materials in feedstuff-Real time fluorescent PCR method [S].
- [7] Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes [J]. Proc Royal Soc B Biol Sci, 2003, 270(1512): 313–321.
- [8] Pedersen ML. DNA barcode profiling: a new platform for the investigation of genome integrity [J]. Genome Biol, 2010, 11(1): 30–35.
- [9] Ron Ammar, Andrew M, Lawrence E. A comparative analysis of DNA barcode microarray feature size [J]. BMC Genomics, 2009, 10(1): 471–477.
- [10] Zahra H, Majid T. Studying genetic variability of pomegranate (*Punica granatum* L.) Based on chloroplast DNA and barcode genes [J]. Mol Biotechnol, 2013, 55(3): 249–259.
- [11] Sungmin K, Hae-Seok E, Hyeyoung K, *et al.* DNA barcode-based molecular identification system for fish species [J]. Mol Cells, 2010, (30): 507–512.
- [12] Paul DN, Sujeevan R, Dewaard JR. Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit 1 divergences among closely related species [J]. Proc Biol Sci, 2003, 270(Suppl 1): 96–99.
- [13] Zeng ZQ, Zhao P, Luo J. Selection of a DNA barcode for nectriaceae from fungal whole-genomes [J]. Sci China Life Sci, 2012, 55(1): 80–88.
- [14] 伏建国, 杨晓军, 钱路. 植物 DNA 条形码技术在出入境检验检疫领域的应用[J]. 植物检疫. 2013, 26(2): 64–69.
Fu JG, Yang XJ, Qian L. Application of plant DNA barcoding in inspection and quarantine [J]. Plant Quarant, 2013, 26(2): 64–69.
- [15] 李新光, 王璐, 赵峰. DNA 条形码技术在鱼肉及其制品鉴别中的应用[J]. 食品科学. 2013, 34(18): 337–342.
Li XG, Wang L, Zhao F. Application of DNA barcoding to identify commercial fish and fish products [J]. Food Sci, 2013, 34(18): 337–342.
- [16] 马英, 鲁亮. DNA 条形码技术[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2012, 23(3): 185–205.
Ma Y, Lu L. DNA barcode technology [J]. Chin J Vector Biol Control, 2012, 23(3): 185–205.
- [17] Doosti A, Ghasemi D. Molecular assay to fraud identification of meat products [J]. J Food Sci Technol, 2014, 51: 148–152.

(责任编辑: 姚 菲)

作者简介

钟文涛, 工程师, 博士研究生, 主要研究方向为食品生物安全。
E-mail: wentao_zhong@qq.com

颜亨梅, 教授, 博士生导师, 享受国务院特殊津贴专家, 主要研究方向为生物安全监控。
E-mail: yanhm2006@163.com