

骨胶原蛋白肽粉中 DNA 的提取及猪、羊源性成分的检测

沈晓丽, 闫明俞, 耿文宁, 李海芳*

(新疆维吾尔自治区药品检验研究院, 乌鲁木齐 830054)

摘要: 目的 优化深加工骨胶原蛋白肽粉中 DNA 的提取方法, 鉴定检测其动物源性成分。**方法** 采用 2 种试剂盒法, 并对试剂盒部分步骤进行适度修改后提取骨胶原蛋白肽粉中的基因组 DNA, 分别用猪、羊引物和探针对提取的 DNA 片段进行实时荧光 PCR 扩增检测。**结果** 只有 DNeasy Blood & Tissue Kit 提取试剂盒法提取的 DNA 纯度较好, A_{260}/A_{280} 比值为 1.73, 浓度为 8.2 ng/ μ L, 并且经 18S rDNA 片段的 PCR 扩增结果表明样品中含有哺乳动物 DNA, 且 DNA 中不含抑制 PCR 反应物质。检测结果表明该骨胶原蛋白肽粉中含有猪源性成分。

结论 采用试剂盒法提取深加工骨胶原蛋白肽粉中 DNA 时, 需对部分步骤做修改后才可进行。

关键词: 骨胶原蛋白肽; DNA 提取; 实时荧光 PCR; 源性成分检测

Extraction of DNA from bone collagen peptide powder and detection of pig and sheep derived components

SHEN Xiao-Li, YAN Ming-Yu, GENG Wen-Ning, LI Hai-Fang*

(Xinjiang Uygur Autonomous Region Institute for Drug Control, Urumqi 830054, China)

ABSTRACT: Objective To optimize the method for extracting DNA from deep processed bone collagen peptide powder, and to identify and detect animal-derived components. **Methods** Totally 2 kit methods were used to extract genomic DNA from the collagen peptide powder after some steps of the kit were moderately modified. The extracted DNA fragments were amplified by real-time fluorescence PCR using primers and probes from pigs and sheep respectively. **Results** Only the DNA extracted by the DNeasy Blood & Tissue Kit extraction kit method had good purity. The A_{260}/A_{280} ratio was 1.73 and the concentration was 8.2 ng/ μ L, and the PCR amplification results of the 18S rDNA fragment showed that the sample contained mammalian DNA, and the DNA did not contain a substance that inhibited the PCR reaction. Test results showed that the collagen peptide powder contained pig-derived ingredients. **Conclusion** When the kit method is used to extract DNA from deep-processed collagen peptide powder, some steps need to be modified before proceeding.

KEY WORDS: bone collagen peptide; DNA extraction; real-time fluorescence PCR; source component detection

1 引言

动物骨骼中富含矿物质、蛋白质、氨基酸、骨胶等具

有保健作用的功能物质, 所含蛋白质中, 胶原蛋白占 90% 以上^[1,2], 但胶原蛋白具有特殊的三股螺旋结构, 很难被人体消化吸收, 而胶原蛋白肽是胶原的三股螺旋结构中分子

*通讯作者: 李海芳, 正高级实验师, 主要研究方向为药品检验、药理毒理。E-mail: lhfr@163.com

*Corresponding author: LI Hai-Fang, Professor, Xinjiang Uygur Autonomous Region Institute for Drug Control, NO.518, Xibajiahu Road, New Urban Area, Urumqi 830054, China. E-mail: lhfr@163.com

链被断开形成的小分子蛋白,是一类水溶性较强,蛋白含量高且黏度较低,极易被人体所吸收的物质^[3-5]。研究表明,服用胶原蛋白肽可以改善皮肤松弛、延缓衰老等^[6],并能够促进大鼠股骨的骨折愈合和人成骨细胞I型胶原蛋白基因的表达,从而具有消除关节疼痛的作用^[7]。骨胶原蛋白产品在市场上琳琅满目,因动物来源不同而价格相差较大,较昂贵的有鹿骨胶原、牦牛骨胶原、深海鱼骨胶原等,而猪牛羊为普通家畜,其副产品骨胶廉价,因此市场上常以次充好,换取暴利。近年来,以 DNA 为基础的 PCR 扩增技术被广泛用于鉴定食品中的动物源性成分^[8]。许多研究报道了以 DNA 作为模板,用 PCR 扩增的方法对食品进行源性成分鉴定,包括传统的普通 PCR 扩增^[9]、实时荧光 PCR^[10]、多重 PCR^[11]、限制性片段长度多态性分析(restriction fragment length polymorphism, RFLP)^[12]、随机扩增多态性 DNA 分析(randomly amplified polymorphic DNA, RAPD)^[13]、DNA 测序及膜基因芯片技术^[14]等。

目前对骨胶原蛋白肽的研究较多,但未见动物源性成分检测的相关分析报道。为了甄别产品以次充好,以及故意掺假欺骗消费者,有必要对深加工类动物骨胶原蛋白制品掺杂的价格较低廉动物源性骨胶原进行定性定量检测。本研究以市场上买到的骨胶原蛋白肽粉为材料,其未注明动物来源,从骨胶原蛋白肽粉中提取 DNA 后进行实时荧光 PCR 检测,以确定其是否含有猪羊源性成分,为相关监管单位的日常监测工作提供参考。

2 材料与方法

2.1 供试样品

骨胶原蛋白肽粉,某公司生产的疑似问题产品。

2.2 仪器与试剂

QuantStudio7 Flex 实时荧光 PCR(美国 ABI 公司); 7300 实时荧光 PCR(美国 ABI 公司); Nanodrop 2000 超微量分光光度计(美国 Thermo 公司); XS 205DU 型分析天平(德

国赛多利斯公司); 3K15 型低温高速冷冻离心机(美国 Sigma 公司)。

深加工食品 DNA 提取试剂盒(日本 TakaRa 公司); DNeasy Blood & Tissue Kit 试剂盒(德国 Qiagen 公司); 羊源性成分核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法)(澳东检验检测公司); 引物与探针均由英潍捷基(上海)贸易有限公司提供。

2.3 引物

参照标准 SN/T 3730.8-2013《食品及饲料中常见畜类品种的鉴定方法 第 8 部分:猪成分检测实时荧光 PCR 法》^[15]分别合成扩增 18S rDNA 和猪源性片段的引物及探针。羊源性引物与探针由羊源性成分核酸检测试剂盒提供。

2.4 实验方法

2.4.1 DNA 的提取

参照深加工食品 DNA 提取试剂盒(TakaRa)说明书方法提取,为了使样品裂解完全,将孵育时间由 1 h 延长至 3 h,提取得到样品 S1。完全参照试剂盒说明书提取得到样品 S3。

参照 DNeasy Blood & Tissue Kit 提取试剂盒(QIAGEN)说明书方法提取,部分步骤略做改良。首先将样品按 2:1(V:V)加水制成混悬液,再取混悬液 200 μ L+蛋白酶 K 30 μ L+AL 200 μ L 混合均匀,56 $^{\circ}$ C 过夜,使样品裂解完全。后续提取同说明书,最后洗脱时加入 100 μ L 洗脱液 AE,在室温条件下孵育 1 min,8000 r/min 离心 1 min,收集洗脱液,重复此步操作,即得样品 S2。完全按说明书提取得到样品 S4。

2.4.2 DNA 提取质量分析

分别将 2 种试剂盒提取的 DNA 样品(S1 和 S2)用超微量分光光度计测 A_{260}/A_{280} 比值,并测得 DNA 浓度。

2.4.3 18S rDNA 片段和猪、羊源性成分的 PCR 反应体系

18S rDNA 片段 PCR 反应体系:10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L, dNTPs 2.5 μ L,引物 2 μ L,模板 DNA 3 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μ L,探针 0.5 μ L,加 ddH₂O 至 25 μ L。以已知猪成分的 DNA 作为阳性对照,ddH₂O 作为样品提取的 DNA 为阴性对照,ddH₂O 为空白对照,分别以深加工食品 DNA 提取试剂盒所提取 DNA S1 和 DNeasy Blood & Tissue Kit 提取试剂盒所提取 DNA S2 为样品模板 DNA。

表 1 引物和探针序列
Table 1 Sequences of primers and probe

扩增片段	序列	目的基因
内参照 5'端引物	F: 5'-TCTGCCCTATCA ACTTTCGAT GGTA-3'	
内参照 3'端引物	R: 5'-AAT TTGCGC GCCTGCTGCCTTCCTT-3'	真核生物 18S rDNA 基因
内参照探针	P:5'-FAM-CCGTTTCTCAGGCTCCCTCTCCGAATCGAACC-TAMRA-3'	
猪 5'端引物	F:5'-ATCTACATGATTCATTACAATTAC-3'	
猪 3'端引物	R:5'-CTATGTTTTTGAGTTTTGAGTTCA-3'	猪线粒体 atp8 基因
猪探针	P:5'-FAM-ATCTCAAACACTACTCATACCCA-TAMRA-3'	

猪源性 PCR 反应体系: 参照标准 SN/T 3730.8-2013《食品及饲料中常见畜类品种的鉴定方法 第 8 部分: 猪成分检测实时荧光 PCR 法》^[8], 以已知猪成分的 DNA 作为阳性对照, ddH₂O 为阴性对照。

羊源性 PCR 反应体系: 由羊源性成分核酸检测试剂盒提供反应体系, 试剂盒中提供阳性对照和阴性对照。

2.4.4 18S rDNA 片段和猪、羊源性成分的 PCR 反应条件

18S rDNA 片段 PCR 反应条件: 95 °C 预变性 2 min, ; 45 个循环为 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火/延伸 40 s。

猪源性成分 PCR 反应条件: 参照标准 SN/T 3730.8-2013《食品及饲料中常见畜类品种的鉴定方法 第 8 部分: 猪成分检测实时荧光 PCR 法》^[8]。

羊源性成分 PCR 反应条件: 由羊源性成分核酸检测试剂盒提供反应条件。

3 结果与分析

3.1 DNA 提取质量分析

经核酸蛋白分析仪测定, 经改良的方法所提取骨胶原蛋白肽粉 S1 和 S2 DNA 浓度分别为 2.6 ng/μL 和 8.2 ng/μL, A₂₆₀/A₂₈₀ 比值分别为 1.08 和 1.73, 完全按说明书未改良的方法提取的样品 S3 和 S4 DNA 浓度分别为 1.2 ng/μL 和 2.4 ng/μL, A₂₆₀/A₂₈₀ 比值分别为 1.01 和 1.32。说明只有 S2 样品(DNeasy Blood & Tissue Kit 提取试剂盒改良后提取)DNA 浓度和纯度符合要求, 提取过程中无多肽类和酚类物质污染, 能满足后续实验要求。

3.2 内参照 18s rDNA 基因片段实时荧光检测结果

内参照 18s rDNA 基因片段实时荧光检测结果表明, 阳性对照 Ct=14, 样品 S1 Ct > 40, 样品 S2 Ct=25, 阳性对照和样品 S2 Ct 值均小于 30, 阴性对照 Ct > 40, 空白对照 Ct > 40, 表明该实验有效, 且 S2 PCR 反应曲线为典型的 PCR 扩增曲线, 说明其 DNA 中不含抑制 PCR 反应的物质,

结果与 3.1 相符。后续实验以样品 S2 为模板 DNA, 见图 1。

3.3 猪线粒体 atp8 基因实时荧光检测结果

猪源性实时荧光 PCR 结果显示, 阳性对照 Ct=13, 以样品 S2 为模板做 2 份平行实验, 其中样品 1 Ct=32, 样品 2 Ct=34, 即样品 1 和 2 Ct 值均小于 35, 阴性对照 Ct > 40, 表明该实验有效, 骨胶原蛋白肽粉中检出猪源性成分。见图 2。

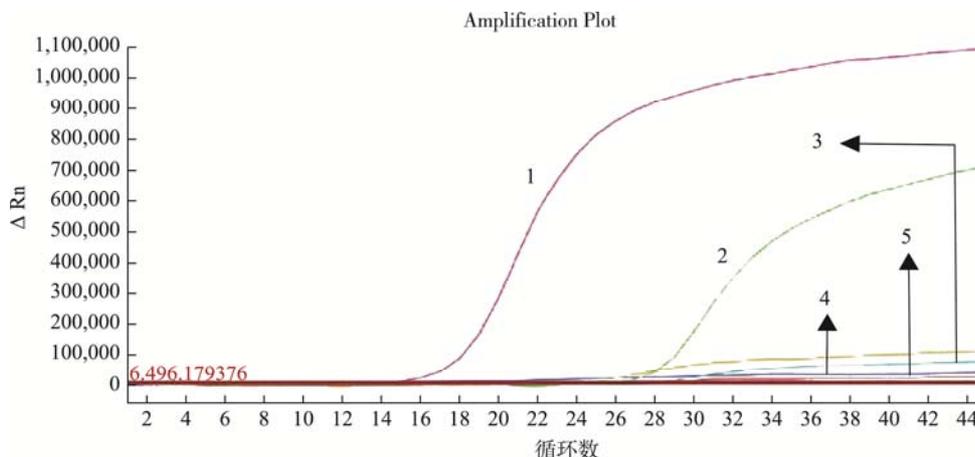
3.4 羊基因实时荧光检测结果

羊源性实时荧光 PCR 结果显示, 阳性对照 Ct=28, 样品 1 Ct=37, 样品 2 Ct > 40, 阴性对照 Ct > 40, 表明该实验有效, 骨胶原蛋白肽粉中未检出羊源性成分。见图 3。

4 结论与讨论

骨胶原中 DNA 含量较低, 且骨胶原蛋白肽粉在深加工过程中经过多道工序处理, 基因组 DNA 破坏严重, 依据试剂盒提取步骤获得 DNA 极低, 故对该提取方法做相应的改进, 可提高 DNA 含量。因此针对深加工骨胶原制品, 选取一种能得到高质量 DNA 的方法, 并能保证其满足后续实验要求, 难度较大。

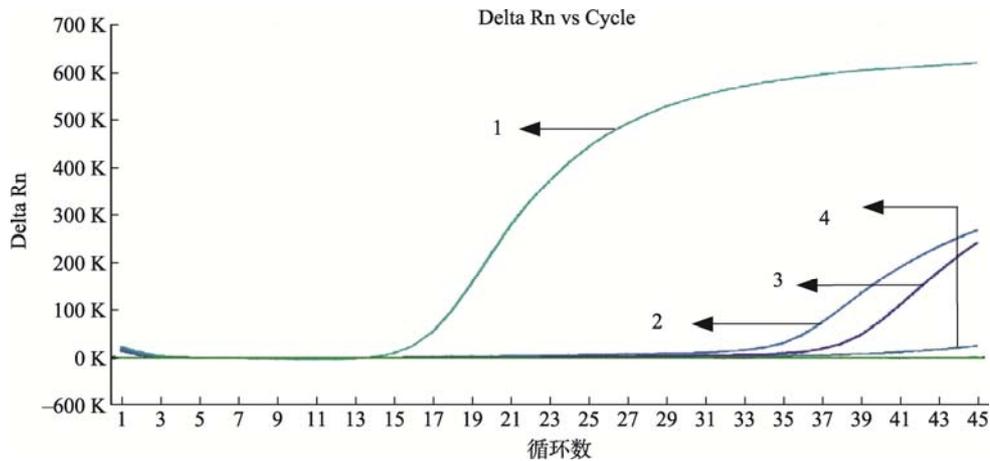
本研究使用 TaKaRa 公司的深加工食品 DNA 提取试剂盒和 QIAGEN 公司组织总 DNA 提取试剂盒分别进行 DNA 提取, 对部分实验步骤做了修改, 但深加工食品 DNA 提取试剂盒仍未得到 DNA 纯度和浓度较满意的结果; 而将 QIAGEN 公司试剂盒样品中先加 ATL、蛋白酶 K、AL 混匀后再进行消化裂解, 增加蛋白酶 K 的量至 30 μL, 为保证 DNA 提取质量, 56 °C 条件下延长孵育时间至过夜以使裂解完全, 这与罗家琴等^[10]的研究一致。通过比较取样品原粉 25 mg、50 mg、样品加水溶解 (2:1、1:1, V:V) 提取 DNA 浓度与纯度, 证明样品加水溶解 (2:1, V:V) 提取效果最好, 本试验经过 TE 100 μL 洗脱 2 次, DNA 浓度由 2.4 ng/μL, 提高到 8.2 ng/μL。



注: 1—阳性对照; 2—S2; 3—S2; 4—阴性对照; 5—空白对照。

图 1 内参照 18S rDNA 基因实时荧光检测结果

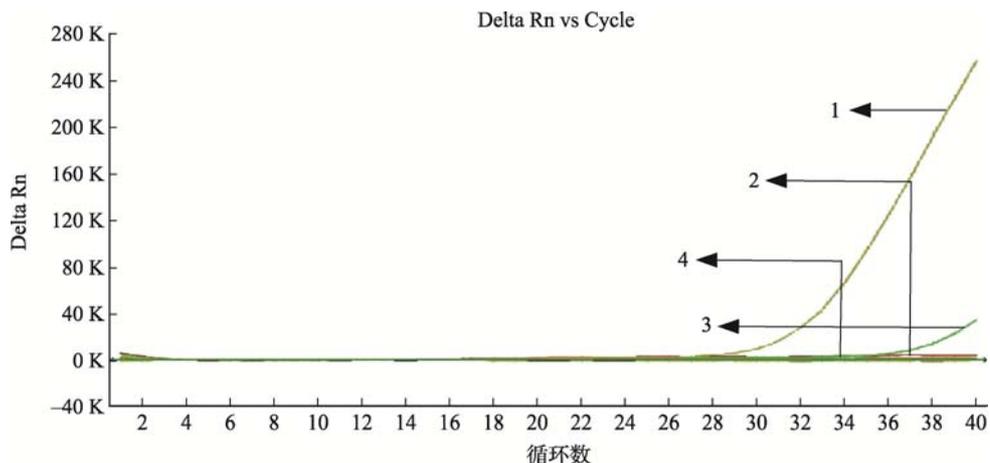
Fig.1 Internal reference 18S rDNA gene real-time fluorescence detection results



注: 1—阳性对照; 2—样品 1; 3—样品 2; 4—阴性对照。

图 2 猪线粒体 atp8 基因实时荧光检测结果

Fig.2 Real-time fluorescence PCR detection of porcine mitochondrial atp8 gene



注: 1—阳性对照; 2—样品 1; 3—样品 2; 4—阴性对照。

图 3 羊源性基因实时荧光检测结果

Fig.3 Real-time fluorescence PCR detection of ovine derived gene

DNA 的质量关系到 PCR 的成败, 所以 DNA 要尽可能纯化, 否则会干扰 PCR 反应, 从而降低检测的灵敏性。根据所提取样本 DNA 的紫外检测结果, 可得到 DNA 浓度, 及 A_{260}/A_{280} 比值可判断 DNA 纯度。根据内参基因的扩增结果, 才可以确定是否提取到 DNA 及 DNA 是否存在对 PCR 反应有抑制作用的物质, 以避免检测结果出现假阴性结果。对提取到的 DNA 进行了真核生物含有的同源序列 18S rDNA 片段的 PCR 检测, 结果为阳性, 再通过猪、羊源性成分的 PCR 检测结果进一步表明所建立的 DNA 提取方法的可行性。

该骨胶原蛋白肽粉包装未注明骨胶原动物来源, 通过猪、羊引物和探针运用实时荧光 PCR 法检测出猪源性成分, 但未检测其它动物源性成分, 后续可以用基因测序分析仪对该蛋白肽粉基因组 DNA 做系统全面检测, 以此能

更加准确可靠检测出其是否还含有其它动物源性成分, 并做出相对定量分析。

参考文献

- [1] 孙蓓, 王龙刚. 畜禽骨的综合利用现状及发展前景[J]. 中国调味品, 2011, 36(4): 1-4.
Sun B, Wang LG. The comprehensive utilization and prospect of fresh bone of animals [J]. Chin Cond, 2011, 36(4): 1-4.
- [2] 刁静静, 孔保华, 陈洪生. 骨蛋白水解物的功能特性及抗氧化性的研究进展[J]. 肉类研究, 2007, (6): 6-29.
Diao JJ, Kong BH, Chen HS. Research progress on functional characteristics and antioxidant activity of bone protein hydrolysate [J]. Meat Res, 2007, (6): 6-29.
- [3] Gomezguillen MC, Gimenez B, Lopezcaballero ME, et al. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review [J]. Food Hydrocoll, 2011, 25(8): 1813-1827.

- [4] Banerjee P, Mehta A, Shanthi C. Investigation into the cyto-protective and wound healing properties of cryptic peptides form bovine Achilles tendon collagen [J]. *Chemico-Biol Interact*, 2014, 211(229): 1–10.
- [5] Toopchamt, Mes JJ, Wichers HJ, *et al.* Bioavailability of angiotensin I-converting enzyme(ACE) inhibitory peptides derived from *Virgibacillus halodenitrificans* SK1-3-7 proteins hydrolyzed tilapia muscle proteins [J]. *Food Chem*, 2017, 220: 190–197.
- [6] Matsumoto H. Clinical effects of fish type I collagen hydrolysate on skin properties [J]. *ITE Lett*, 2006, 7: 386–390.
- [7] Tsuruoka N, Yamato R, Sakai Y, *et al.* Promotion by collagen tripeptide of type I collagen gene expression in human osteoblastic cells and fracture healing of rat femur [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007, 71(11): 2680–2687.
- [8] 李国华, 高锦伟, 南丽娟, 等. 肉制品中猪源性成分相对定量检测方法研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(7): 2054–2058.
Li GH, Gao JW, Nan LJ, *et al.* Study on relative quantitative detection method of porcine-derived components in meat products [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(7): 2054–2058.
- [9] Yin RH, Bai WL, Wang JM, *et al.* Development of an assay for rapid identification of meat from yak and cattle using polymerase chainreaction technique [J]. *Meat Sci*, 2009, 83(1): 38–44.
- [10] 杨冬燕, 韦梅霞, 杨永存, 等. 多重荧光 PCR 鉴别羊肉掺假[J]. *食品安全质量检测学报*, 2015, 6(2): 555–562.
Yang DY, Wei MX, Yang YC, *et al.* Identification of mutton adulteration by multiplex fluorescent PCR [J]. *J Food Saf Qual*, 2015, 6(2): 555–562.
- [11] Ghovvati S, Nassiri MR, Mirhoseini SZ, *et al.* Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay [J]. *Food Contr*, 2009, 20(8): 696–699.
- [12] Doosti A, Ghasemi DP, Rahimi E. Molecular assay to fraud identification of meat products [J]. *J Food Sci Technol*, 2014, 51(1): 148–152.
- [13] Rastogi C, Dhame MS, Walujkar S, *et al.* Species identification and authentication of tissues of animal origin using mitochondrial and nuclear markers [J]. *Meat Sci*, 2007, (76): 666–674.
- [14] 吴鑫, 章志超, 王栋, 等. 基于膜基因芯片技术的肉制品中 5 种动物源性成分的鉴定[J]. *现代预防医学*, 2018: 45(10): 1762–1786.
Wu X, Zhang ZC, Wang D, *et al.* Identification of five kinds of animal-derived ingredients in meat using film gene chips [J]. *Mod Prev Med*, 2018: 45(10): 1762–1786.
- [15] SN/T 3730.8-2013 食品及饲料中常见畜类品种的鉴定方法 第 8 部分: 猪成分检测实时荧光 PCR 法[S].
SN/T 3730.8-2013 Identification of domestic animal ingredient in food and feed-part 8: Detection of pig ingredient-Real-time PCR method [S].
- [16] 罗家琴, 王加启, 卜登攀, 等. 饲料中牛羊猪、鸡源性成分的 PCR 检测方法及其应用[J]. *中国农业科学*, 2008, 41(7): 2112–2119.
Luo JQ, Wang JQ, Bu DP, *et al.* Determination of bovine, sheep, pig and chicken derived components in feed by PCR and its application [J]. *Chin Agric Sci*, 2008, 41(7): 2112–2119.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



沈晓丽, 硕士, 实验师, 主要研究方向为食品药品检验、分子生物学及药理学。
E-mail: 86513757@qq.com

李海芳, 硕士, 正高级实验师, 主要研究方向为药品检验、药理毒理。
E-mail: lhfh@163.com