

基于实时荧光 PCR 技术鉴别梅花鹿

高明¹, 王海军², 王准¹, 聂丹丹¹, 刘韬¹, 刘金华^{1*}

(1. 长春海关技术中心, 长春 130062; 2. 吉林省野生动物救护繁育中心, 长春 130117)

摘要: **目的** 建立基于 TaqMan 实时荧光 PCR 技术鉴别梅花鹿的分析方法。**方法** 通过对梅花鹿线粒体 D-loop 基因序列比对分析, 选取梅花鹿 D-loop 基因特异位点作为扩增靶序列, 设计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、灵敏性进行验证。**结果** 该引物和探针对梅花鹿成分检测具有较强的特异性, 与其他物种 DNA 无交叉扩增, 该方法的检测灵敏度为 0.01 ng/ μ L。**结论** 本方法具有较高的特异性和灵敏度, 适用于对肉类以及其他梅花鹿产品的物种的鉴别。

关键词: 物种鉴定; 梅花鹿; 实时荧光 PCR; 线粒体 D-loop 基因

Identification of *Cervus nippon* by fluorescent real-time PCR method

GAO Ming¹, WANG Hai-Jun², WANG Zhun¹, NIE Dan-Dan¹, LIU Tao¹, LIU Jin-Hua^{1*}

(1. Technical Center of Changchun Customs, Changchun 130062, China; 2. Wild Animal Rescue and Breeding Center of Jilin Province, Changchun 130117, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for identification of *Cervus nippon* based on TaqMan real-time fluorescence PCR. **Methods** By comparing and analyzing the D-loop gene sequence of *Cervus nippon* mitochondria, the specific locus of D-loop gene of *Cervus nippon* was selected as the amplification target sequence, and the specific primers and TaqMan probes of *Cervus nippon* were designed. The species specificity and sensitivity of the primers and TaqMan probes were verified with known samples. **Results** The primers and probes showed strong specificity for the detection of *Cervus nippon* and no cross amplification with DNA of other species. The detection sensitivity of this method was 0.01 ng/L. **Conclusion** This method has high specificity and sensitivity, and is suitable for identifying the species of meat and other *Cervus nippon* products.

KEY WORDS: species identification; *Cervus nippon*; real-time PCR; mitochondrial D-loop gene

1 引言

我国是世界上鹿科资源最丰富的国家之一, 根据对鹿科动物进化的研究, 鹿科动物的獐、麂、梅花鹿、马鹿、麋鹿、水鹿和白唇鹿的原产地均在中国^[1]。同时鹿也是人们熟知的一种珍贵的药用动物, 据《本草纲目》记载, 鹿茸、鹿胎、鹿血、鹿肾、鹿筋、鹿心、鹿骨、鹿鞭等均是滋补营养食品亦可入药^[2,3]。鹿的种类虽然较多, 但具有药用价值的主要指梅花鹿和马鹿, 我国历代本草著作及现代

药典都将梅花鹿(*Cervus nippon*)和马鹿(*Cervus. elaphus*)的产品视为正品, 其他鹿种的产品则多作为代用品、习用品或伪品。这其中又以梅花鹿最为珍贵, 价格最高, 如驯鹿、马鹿的鹿茸价格只有梅花鹿鹿茸的一半, 因此导致目前市场上一些以驯鹿、马鹿等低价产品充当高价的梅花鹿产品, 甚至用非鹿源的产品冒充梅花鹿产品, 常见以猪心代替鹿心, 价格与鹿心相差几十倍, 药效的区别也很大^[4]。

鹿的种类甚多, 但有药用价值的主要有梅花鹿和马鹿, 且认为梅花鹿较马鹿质优。目前我国仅有部分地区有

*通讯作者: 刘金华, 博士, 研究员, 主要研究方向为转基因产品及物种资源检测技术的研究。E-mail: liujinhua02@163.com

*Corresponding author: LIU Jin-Hua, Ph.D, Professor, Technical Center of Changchun Customs, Changchun 130062, China. E-mail: liujinhua02@163.com

少量野生梅花鹿,梅花鹿已被列为国家一级保护动物,马鹿列为国家二级保护动物,而药用鹿茸、鹿血、鹿心现主要取自人工饲养的鹿。人工饲养梅花鹿主要集中于吉林、辽宁、河北等地,马鹿主要集中于吉林、黑龙江、内蒙古等地。

目前鹿的品种鉴别主要依靠传统方法,主要包括直观性状鉴定和理化鉴定,很难准确判定鹿产品的真伪^[5]。其中 2007 年颁布的国家标准 GB/T 21106-2007《动物源性饲料中鹿源性成分定性检测方法 PCR 方法》^[6],是用普通 PCR 方法对鹿源性成分进行检测,但不能将梅花鹿与马鹿等其他鹿类区别开来,所用的 PCR 方法需要凝胶电泳过程,根据条带大小判断是否含有鹿类成分,该方法灵敏度低,操作较实时荧光 PCR 方法复杂,容易存在交叉污染现象。本研究以线粒体 D-loop 基因为靶基因,建立一种基于 TaqMan 探针的实时荧光 PCR 技术特异鉴定梅花鹿物种的方法,以为食品及保健品中梅花鹿源性成分的鉴别提供参考。

2 材料与方法

2.1 材料与仪器

2.1.1 材料与试剂

梅花鹿肉、梅花鹿茸、马鹿血、驯鹿角、白臀鹿鹿心、貂血、兔肉、鸡肉、羊肉、猪肉、狗肉、牛肉、狐狸肉、马肉、骆驼骨粉、鸭肉等动物材料均为实验室自存;核酸提取试剂盒(DNeasy Blood & Tissue kit)(德国 QIAGEN 公司);TaqMan 实时荧光 PCR 预混合液(TaqMan Universal Master Mix)(美国 Applied Biosystems 公司);引物、TaqMan 探针(上海捷瑞生物技术有限公司)。

2.1.2 仪器

Heraeus Fresco21 型冷冻离心机(美国 Thermo 公司);Mili-Q 纯水器(美国 Milipore 公司);QIA Cube 核酸自动提取工作站(德国 QIA Gene 公司);ABI Step one plus 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 样本 DNA 的提取

核酸提取试剂盒(DNeasy Blood & Tissue kit)提取样本 DNA,提取过程由 QIA Cube 核酸自动提取工作站自动完成,提取出的 DNA 置于-20℃冰箱保存备用。用上述方法分别提取梅花鹿、马鹿、驯鹿、白臀鹿、水貂、兔、鸡、羊、猪、狗、牛、狐狸、马、骆驼、鸭的样品 DNA。

2.2.2 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 D-loop 基因序列(Accession Number: GU371861),用 DNAMAN 软件比对分析梅花鹿和马鹿、驯鹿、赤鹿、白臀鹿、驼鹿等亲缘性近的物种以及猪、牛、

羊、鸡、鸭、鹅、水貂、马鹿、骆驼、猫、狗等常见物种的序列,选择梅花鹿序列中特异位点较多的片段作为靶序列,用 primer express 软件 3.0.1 设计扩增引物和 TaqMan 探针。引物探针序列如下:

上游引物: 5'-CAATGTGCTATGTACGATAAGC-3';

下游引物: 5'-CGTGATATAACCTTATGTGTTTG-3';

探针: 5'-FAM-ACCATTGTACATGTGTGCCTTAATGCA—BHQ1-3'。

2.2.3 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 μL,包括: Taqman Universal Master Mix(2×) 10 μL,上游引物(10 μmol/L) 1.0 μL,下游引物(10 μmol/L)1.0 μL, TaqMan 探针(10 μmol/L)0.5 μL, DNA 溶液 2 μL, 无菌水将体系补充至总体积 20 μL。实时荧光 PCR 扩增条件为: 50℃ 2min, 95℃ 预变性 10min; 95℃ 变性 15 s, 60℃ 延伸 60 s(采集荧光信号),共 40 个循环。

2.2.4 引物和探针特异性的验证

实验对梅花鹿肉、梅花鹿茸、马鹿血、驯鹿角、白臀鹿鹿心、貂血、羊肉、猪肉、狗肉、牛肉、狐狸肉、马肉、骆驼骨粉、兔肉、鸡肉、鸭肉等物种源性成分 DNA 分别进行特异性验证。根据各反应体系的 *C_t* 值验证引物及探针的特异性。

2.2.5 扩增灵敏度的检测

将梅花鹿 DNA 溶液 10 倍倍比稀释至 10、1、0.1、0.01、0.001 ng/μL,每个反应重复 3 次,以 *C_t* 值≤35 的 DNA 质量浓度,作为该反应体系的检测灵敏度。

3 结果与分析

3.1 引物和探针特异性验证结果

对 2.2.4 中物种样品进行特异性验证,结果显示只有梅花鹿样品能扩增出 S 型曲线,而其他动物源性成分均无扩增曲线,表明该引物探针对于梅花鹿源性成分具有较强的特异性,扩增曲线如图 1 所示。

3.2 引物和探针灵敏性验证结果

将 2.2.5 所述的梅花鹿 DNA 溶液稀释后,扩增曲线如图 2 所示。从扩增曲线可以看出,在 *C_t* 值小于或等于 35,该引物探针的检测浓度为 0.01 ng/μL。

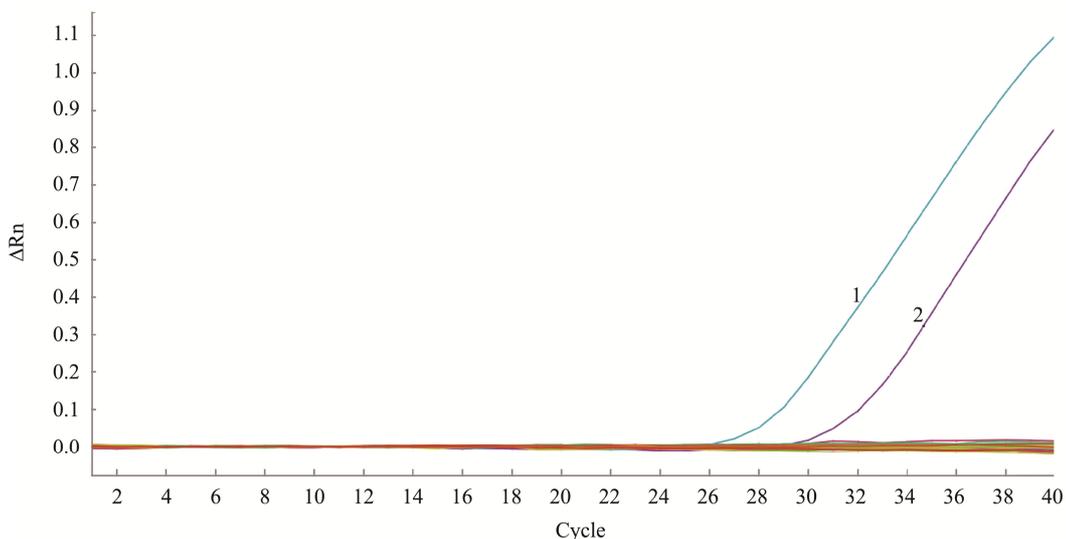
4 结论与讨论

目前市场上常以马鹿茸片充当梅花鹿茸片,以猪、羊、牛的心脏代替梅花鹿的心脏。面对多种多样的掺假形式,为了维护消费者的利益以及良好的市场秩序,国内外许多学者采用了多种手段对鹿产品真伪进行鉴别。常用的方法有性状鉴别、显微鉴别、薄层色谱法鉴别、光谱法鉴

别、紫外光谱法鉴别等^[7]。由于鹿产品中含有的化学成分易受鹿的品种及产地等因素的影响, 成分相对复杂, 而形态结构在加工过程中会有不同程度的改变, 传统方法难以对产品的成分进行准确性检测。

分子生物学检测方法具有反应灵敏, 准确度高,

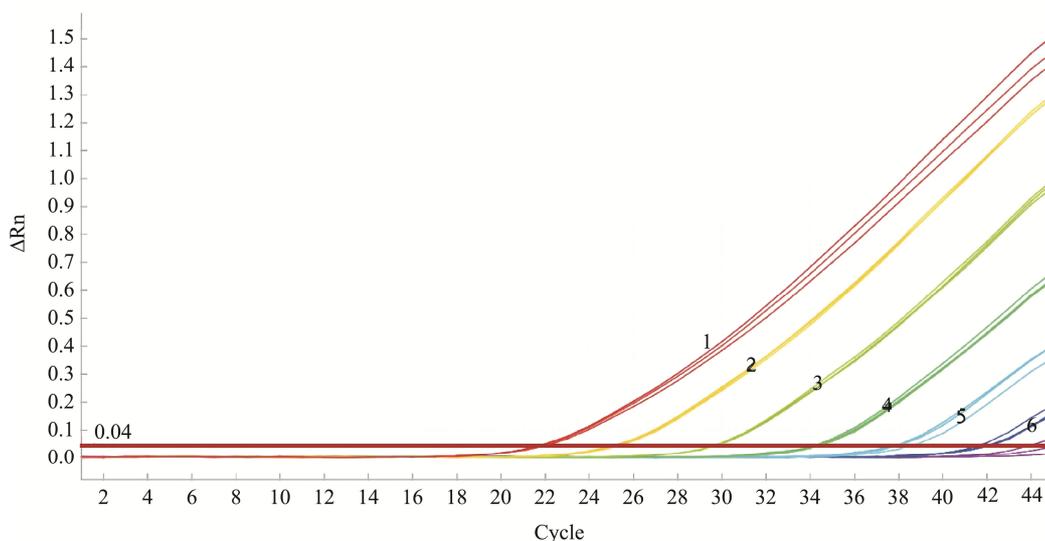
能精确检测到种水平, 给动物源性产品成分的定性分析提供了技术支持^[8-10]。马伊萨兰等^[11]用 *Cytb* 基因通用引物对肉制品中提取的 DNA 进行 PCR 扩增并测序, 将序列与 GenBank 的已知序列对比分析, 从而确定物种的种类。



注: 1.为梅花鹿肉; 2.为梅花鹿茸。

图 1 实时荧光 PCR 对梅花鹿的特异性扩增曲线

Fig.1 Specific amplification curve of *Cervus nippon* by the real-time PCR



注: 1.浓度为 10 ng/μL; 2.浓度为 1 ng/μL; 3.浓度为 0.1 ng/μL; 4.浓度为 0.01 ng/μL; 5.浓度为 0.001 ng/μL; 6.浓度为 0.0001 ng/μL。

图 2 不同 DNA 浓度扩增曲线

Fig.2 Amplification curve of different DNA concentration

此外,限制性内切酶片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)等技术也被用于鹿源性成分的鉴定^[12,13]。如孙景昱等^[14]建立了应用 RFLP 技术鉴别鹿产品真伪,并能够将梅花鹿源成分及马鹿源成分准确区分,为鹿产品的质量控制在提供了有效的技术手段。但基于 RFLP 技术的检测方法相对复杂,对检测人员的技术水平要求较高。

朱云飞等^[15]基于蛋白质检测技术对梅花鹿、马鹿、驯鹿和新西兰赤鹿的鹿茸蛋白进行分析,结果显示梅花鹿和新西兰赤鹿具有不同大小及数量的蛋白条带这为不同品种鹿茸的定性研究提供了依据和基础,但在产品加工过程中蛋白质容易遭到破坏,导致该方法的适用性较差。

本研究建立的基于 Taqman 探针的实时荧光 PCR 鉴别梅花鹿成分的方法具有特异性强、灵敏度高以及操作简单的优势,较上述分子生物学方法无需电泳过程,有效避免了检测实验室内气溶胶的交叉污染,可以应用于梅花鹿物种鉴别及食品及保健品中梅花鹿成分的快速鉴定,该方法对于打击假冒伪劣梅花鹿产品、维护市场秩序和保证消费者权益具有重要意义。

参考文献

- [1] 宋胜利. 中国的鹿科动物[J]. 特种经济动植物, 2008, (1): 10–11.
Song SL. Special economic animals and plants of the deer family in China [J]. 2008, (1): 10–11.
- [2] 张海军, 苏凤艳, 董莹莹, 等. 梅花鹿鹿茸和花马杂交 F1 代鹿茸营养成分比较[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2020, (3): 131–135.
Zhang HH, Su FY, Dong YY, *et al.* Comparison of nutritional components of *Cervus nippon* antler and Horse hybrid Antler in F1 generation [J]. Heilongjiang Anim Husband Veter Sci, 2020, (3): 131–135.
- [3] 刘雪莹, 刘雨霏, 陈昊媛, 等. 梅花鹿鹿茸和马鹿鹿茸中 5 种核苷类成分的含量比较[J]. 中国现代应用药学, 2018, (22): 1675–1679.
Liu XY, Liu YF, Chen HY, *et al.* Comparison of 5 nucleoside components in *Cervus nippon* antler and red deer antler [J]. Chin Mod Appl Pharm, 2018, (22): 1675–1679.
- [4] 翟晶, 左璐雅, 付晶, 等. 双阳梅花鹿鹿肉营养成分分析[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 2017, (1): 128–132.
Zhai J, Zuo LY, Fu J, *et al.* Nutritional composition analysis of deer meat from *Cervus nippon* in Shuangyang [J]. J Inner Mongolia Agric Univ (Nat Sci Ed), 2017, (1): 128–132.
- [5] 李欢霞, 邢秀梅, 杨福合, 等. 鹿产品检测的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2012, (5): 164–169.
Li XX, Xing XM, Yang FH, *et al.* Research progress of deer product detection [J]. China Anim Husband Veter Sci, 2012, (5): 164–169.
- [6] GBT 21106–2007 动物源性饲料中鹿源性成分定性检测方法-PCR 方法[S].
GBT 21106–2007 Quantitative detection method for components of deer in animal-Derived feeds PCR method [S].
- [7] 董世武, 王磊, 周永娜, 等. 鹿产品鉴别的研究进展[J]. 经济动物学报, 2018, (2): 237–244.
Dong SW, Wang L, Zhou YN, *et al.* Progress in the identification of deer products [J]. Chin J Econ Anim, 2018, (2): 237–244.
- [8] 董世武, 王天娇, 张然然, 等. 基于 PCR 技术的鹿源性产品成分分子检测研究进展[J]. 特产研究, 2019, (2): 105–107.
Dong SW, Wang TJ, Zhang RR, *et al.* Progress in molecular detection of components of deer products based on PCR technology [J]. Spec Res, 2019, (2): 105–107.
- [9] 郭鑫, 张旭, 任晓航, 等. HRM 技术在梅花鹿茸及其混伪品药材鉴定中的应用[J]. 时珍国医国药, 2019, (5): 1140–1143.
Guo X, Zhang X, Ren XH, *et al.* Application of HRM technology in the identification of plum blossom antler and its Mixed counterfeits [J]. Lishizhen Med Mate Med Res, 2019, (5): 1140–1143.
- [10] 涂剑锋, 徐佳萍, 王洪亮, 等. 基于线粒体 DNA 控制区序列分析我国马鹿 5 个亚种的遗传分化[J]. 华北农学报, 2018, (6): 79–83.
Tu JF, Xu JP, Wang HL, *et al.* Genetic differentiation of five Chinese red deer subspecies based on mitochondrial DNA control region sequence [J]. Huabei Agron Bull, 2018, (6): 79–83.
- [11] 马伊萨兰, 吕明星, 唐俊妮, 等. 用 Cytb 基因序列分析鉴定肉制品掺假[J]. 中国食品卫生杂志, 2016, 28(1): 48–51.
Ma YSL, Lv MX, Tang JN, *et al.* Identification of adulterated meat products by Cytb gene sequence analysis [J]. Chin J Food Hyg, 2016, 28(1): 48–51.
- [12] 王自强, 吕晶, 邵泓, 等. 利用限制性片段长度多态性技术鉴别梅花鹿骨种属来源的研究[J]. 中国药师, 2017, (5): 813–816.
Wang ZQ, Lu J, Shao H, *et al.* Identification of bone species of *Cervus nippon* by restricted fragment length polymorphism [J]. Chin Pharm, 2017, (5): 813–816.
- [13] 王凤霞, 陈媛媛, 任贵奇, 等. 鹿血的 PCR-RFLP 鉴定研究[J]. 中草药, 2018, 49(8): 1914–1918.
Wang FX, Chen YY, Ren GQ, *et al.* Identification of deer blood by PCR-RFLP [J]. Chin Herbal Med, 2018, 49(8): 1914–1918.
- [14] 孙景昱, 张丽华, 傅桂莲, 等. 聚合酶链式反应偶联单链构象多态性分析(PCR-SSCP)技术用于鹿鞭线粒体 DNA 指纹的研究[J]. 中国药理学杂志, 2014, 49(9): 721–725.
Sun JY, Zhang LH, Fu GL, *et al.* Polymerase chain reaction coupled single strand conformation polymorphism analysis (PCR-SSCP) for the study of mitochondrial DNA fingerprint of deer whip [J]. Chin J Pharm, 2014, 49(9): 721–725.

- [15] 朱云飞, 初正云, 李洪江. SDS-PAGE 凝胶电泳法对不同种鹿茸蛋白质
差异化研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2017, (6): 48-51.
Zhu YF, Chu ZY, LI HJ. Differentiation of antler proteins in different
species by SDS-PAGE gel electrophoresis [J]. J Liaoning Univ Tradit
Chin Med, 2017, (6): 48-51.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介

高 明, 工程师, 主要研究方向为食
品安全及转基因成分检测研究工作。
E-mail: 151981878@qq.com

刘金华, 博士, 研究员, 主要研究方向
为转基因产品及物种资源检测技术的研究。
E-mail: liujinhua02@163.com

食品接触材料专题征稿函

食品接触材料是指用于制造食品包装容器和构成食品包装的材料总称, 包括纸、塑料、金属、玻璃、陶瓷等原材料以及粘合剂, 涂覆材料等各种辅助材料。食品包装是食品的重要组成部分, 具有保护食品不受外来生物、化学和物理因素的影响, 维持食品质量稳定的特点。为了满足各种食品的包装要求, 接触材料必须具备适当的阻隔性、足够的机械强度、化学稳定性、耐高温及光学性能等多种性能。此外, 当接触材料直接与食品接触时, 有些物质会迁移渗透到食品中, 可能导致食品的安全隐患。因此, 食品接触材料的安全问题也显得尤为重要。

鉴于此, 本刊特别策划了“食品接触材料”专题, 由广州海关技术中心 钟怀宁 研究员担任专题主编, 主要围绕食品接触材料的制备、性能(机械性能、阻隔性、化学稳定性、抗菌性及其他性能)、接触材料中有害物质的检测及其向食品中的迁移行为、绿色及智能接触材料的研究与开发等方面或您认为有意义的相关领域展开论述和研究, 综述及研究论文均可。

鉴于您在该领域丰富的研究经历和突出的学术造诣, 学报主编吴永宁技术总师和专题主编钟怀宁 研究员特邀请您为本专题撰写稿件, 综述、研究论文、研究简报均可, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。

本专题计划在 2020 年 11 月正刊出版, 请在 2019 年 10 月 1 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。希望您能够通过各种途径宣传此专题, 并积极为本专题推荐稿件和约稿对象。感谢您的参与和支持!

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com 选择“2020 专题: 食品接触材料”

E-mail: jfoodsq@126.com 备注“2020 专题: 食品接触材料”

《食品安全质量检测学报》编辑部