

利用 PCR 技术鉴别畜禽肉中鸭源性成分研究

张晶鑫, 高玉时*, 樊艳凤, 唐修君, 贾晓旭, 顾荣, 陆俊贤 (中国农业科学院家禽研究所, 江苏扬州 225125)

摘要 [目的] 建立一种快速准确的鸭源性成分检测方法。[方法] 分别以线粒体 16S rRNA 基因和 COI 基因序列为靶位点设计鸭特异性引物, 以常见畜禽肉(羊肉、牛肉、猪肉、兔肉、鸽肉、鹌鹑肉、鸡肉、鸭肉、鹅肉) DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 检测引物的特异性和灵敏度。[结果] 筛选的引物能够有效地对鸭源性成分进行检测, 方便简洁, 灵敏度较高。[结论] 该方法能够快速有效地鉴别畜禽肉中鸭源性成分。

关键词 鸭源性成分; 16S rRNA 基因; COI 基因; PCR; 鉴别

中图分类号 S879.2; TS251.5 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2015)34-202-02

The Identification of Duck Origin Ingredients in Livestock and Poultry Meat by PCR Technique

ZHANG Jing-xin, GAO Yu-shi*, FAN Yan-feng et al (Institute of Poultry, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Yangzhou, Jiangsu 225125)

Abstract [Objective] In order to establish a quick and accurate peculiar method, which could identify the components of duck origin. [Method] 16S rRNA gene and COI gene were used as target sites, the specific primers of duck were designed. The DNA of common livestock and poultry meat including mutton, beef, pork, rabbit meat, pigeon meat, quail meat, chicken, duck and goose were used as template. Through PCR amplification, the specificity and sensitivity of primer were detected. [Result] The selected primer could identify the components of duck origin effectively. The method was convenient and concise, and the sensitivity was high. [Conclusion] This method could detect the duck origin in livestock and poultry meat quickly and effectively.

Key words Components of duck origin; 16S rRNA gene; COI gene; PCR; Identification

近年来, 动物源性食品掺杂掺假等各种食品安全事件频发。在西方, 一项对近千种肉制品的检测分析表明, 有近 20% 的产品存在标识与品种不完全相符的现象^[1]。研究动物源性食品安全检测技术, 对食品动物源性成分进行鉴定, 显得尤为重要。

PCR 技术由于其操作简便、快速高效等特点, 已在国内外肉类掺假研究中得到广泛应用, 并取得创新性成果^[2-4], 目前已成为肉制品品种鉴别最常用的方法之一。动物线粒体基因组 DNA 序列具有高度的物种特异性, 是设计肉类成分定性检测的首选靶点, 包括细胞色素 b (Cyt b) 基因、12S rRNA、16S rRNA、D-Loop 基因等^[5-7]。

笔者选择 16S rRNA 基因和 COI 基因序列为目标基因, 通过基因序列比对, 设计筛选出鸭特异性引物, 以羊肉、牛肉、猪肉、兔肉、鸽肉、鹌鹑肉、鸡肉、鸭肉、鹅肉 9 种动物 DNA 为模板, 建立运用 PCR 技术鉴别畜禽肉中鸭源性成分快速鉴别方法。

1 材料与与方法

1.1 试验材料 以市售合格的牛、羊、猪、兔、鸽、鹌鹑、鸡、鸭及鹅肉为试验素材, 各物种肉样充分搅碎混匀, -20℃ 保存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取。 采用离心柱式组织基因组 DNA 小量抽提试剂盒(北京天根生化科技有限公司)提取 DNA。提取的总 DNA 样品溶于 100 μl 洗脱液 TE 中, 于 -20℃ 保存备用。

1.2.2 引物设计与合成。 根据 GenBank 公布的鸭线粒体 DNA (登录号为 KJ833587) 16S rRNA 基因和 COI 基因序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计筛选特异性引物对, 并送至上海生工生物工程有限公司合成。取适量引物用高压灭菌后的超纯水溶解, 配制成 10 μmol/L 的储备液。引物序列、T_m 值与扩增片段大小见表 1。

表 1 引物序列、T_m 值及 PCR 产物大小

基因	引物序列(5'-3')	T _m //℃	大小//bp
16S rRNA	F: TAGTGGATAAATCTAATCAC	60	222
	R: GGTCTGTTAATAATGTCTCTC		
COI	F: CGACCAAATTTATAACGTG	60	96
	R: CCAATCAGTTGCCGAAC		

1.2.3 PCR 扩增。 20 μl PCR 扩增体系: 2 × Tag Master Mix (南京博尔迪公司) 10 μl, 10 μmol/L 引物各 0.3 μl, 模板 1 μl, ddH₂O 8.4 μl。

反应程序: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 60 s, 共 28 个循环; 最后 72℃ 延伸 4 min。

1.2.4 PCR 产物检测和测序。 PCR 反应完毕后将产物取出, 利用 1.5% 琼脂糖 (Promega 公司) 凝胶电泳检测, 并割胶回收纯化, 交由上海华大公司进行测序, 所有序列采用双向测序, 以便比对核实, 测序结果与 GenBank 上已知序列进行比对。

1.2.5 灵敏度试验。 将鸭肉 DNA 模板按梯度进行稀释, 分别稀释 10 倍、10² 倍、10³ 倍、10⁴ 倍、10⁵ 倍、10⁶ 倍、10⁷ 倍、10⁸ 倍, 观察该方法灵敏度。

2 结果与分析

2.1 线粒体 DNA 16S rRNA 和 COI 基因 PCR 特异性检测 将 PCR 产物测序结果与 GenBank 上已知序列进行比对, 结果显示, 鸭的测序结果与已发表序列 (GenBank 登录号分

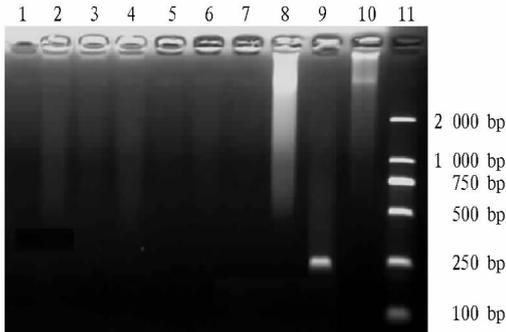
基金项目 扬州市社会发展前瞻性研究项目 (YZ2014188); 国家自然科学基金项目 (31372277)。

作者简介 张晶鑫 (1982-), 男, 江苏金坛人, 助理研究员, 硕士, 从事家禽遗传育种研究。* 通讯作者, 研究员, 博士, 从事家禽遗传育种与质量安全研究。

收稿日期 2015-11-05

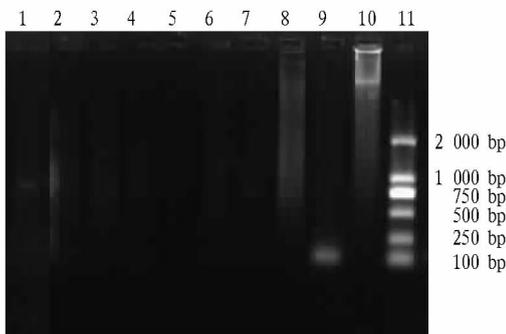
别为 KJ833587.1、KJ833586.1) 的同源性均在 99% 以上, 与预期基本一致, 确定为鸭肉成分。

以羊肉、牛肉、猪肉、兔肉、鸽肉、鹌鹑肉、鸡肉、鸭肉、鹅肉 9 种动物肌肉 DNA 为模板, 分别对所设计筛选的鸭引物进行特异性研究。根据鸭线粒体 16S rRNA 设计的引物, 只有鸭的 DNA 模板能扩增出 222 bp 的目的条带(图 1); 利用鸭线粒体 COI 基因设计的引物, 只有鸭的 DNA 模板能扩增出 96 bp 的目的条带(图 2)。



注: 1. 空白; 2. 羊肉; 3. 牛肉; 4. 猪肉; 5. 兔肉; 6. 鸽肉; 7. 鹌鹑肉; 8. 鸡肉; 9. 鸭肉; 10. 鹅肉; 11. DL 2000 DNA marker。

图 1 16S rRNA 不同动物 PCR 扩增结果



注: 1. 空白; 2. 羊肉; 3. 牛肉; 4. 猪肉; 5. 兔肉; 6. 鸽肉; 7. 鹌鹑肉; 8. 鸡肉; 9. 鸭肉; 10. 鹅肉; 11. DL 2000 DNA marker。

图 2 COI 基因不同动物 PCR 扩增结果

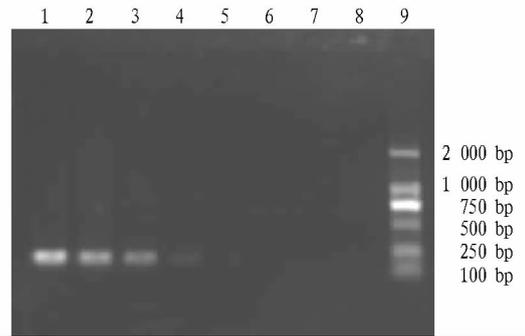
2.2 灵敏度检测 为了确定方法的检测下限, 从 DNA 水平进行试验确认, 将鸭 DNA 模板按梯度稀释, 扩增结果见图 3~4。

经测定鸭 DNA 模板浓度为 198.24 ng/ μ l, 16S rRNA 基因灵敏度可达 1.98 \times 10⁻² ng/ μ l (图 3), COI 基因灵敏度可达 1.98 \times 10⁻¹ ng/ μ l (图 4)。

3 讨论

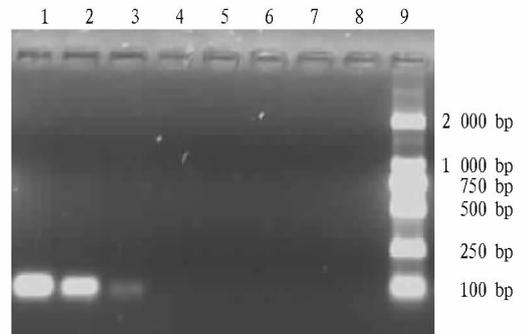
肉与肉制品掺杂、掺假是目前食品质量控制面临的重要挑战。一些不法商家或个人为了追求自身利益以低价劣质的肉冒充高价优质的肉, 严重侵犯了消费者合法权益。对食品中原料肉进行掺假、掺杂检验势在必行, 其重点是快速、准确地鉴定肉品成分来源。

近年来, PCR 技术已逐步成为肉类种属鉴定的核心方法^[8-9]。何玮玲等^[10]基于动物线粒体细胞色素 b 基因的差异性位点, 建立并优化多重 PCR 反应体系, 实现 4 种肉类(猪肉、牛肉、羊肉和鸡肉)的快速鉴别。Soares 等^[11]应用双



注: 1~8 分别为稀释 10、10²、10³、10⁴、10⁵、10⁶、10⁷、10⁸ 倍; 9. DL 2000 DNA marker。

图 3 16S rRNA 基因不同稀释倍数扩增结果



注: 1~8 分别为稀释 10、10²、10³、10⁴、10⁵、10⁶、10⁷、10⁸ 倍; 9. DL 2000 DNA marker。

图 4 COI 基因不同稀释倍数扩增结果

重 PCR 在猪肉中成功检测到禽肉。Ghovvati 等^[12]基于线粒体 12S rRNA 和 16S rRNA 基因应用多重 PCR 技术对反刍动物、家禽和猪进行鉴别。陈冬等^[2]基于牛线粒体 12S rRNA 基因, 设计通用引物, 成功用于混合鲜牛肉及制品中牛种来源鉴别。

该研究主要根据鸭线粒体基因组编码基因 16S rRNA 基因和 COI 基因序列的位点差异设计特异性引物, 进行 PCR 扩增检测, 对包括羊、牛、猪、鸡、兔、鸽、鹌鹑、鸭、鹅 9 种动物在內的畜禽肉进行动物源性鉴别, 经过多次重复试验证明, 所选定的鸭引物对只有在鸭 DNA 模板存在的情况下才会发生 PCR 扩增, 检测灵敏度较高, 16S rRNA 基因灵敏度达 1.98 \times 10⁻² ng/ μ l, COI 基因灵敏度达 1.98 \times 10⁻¹ ng/ μ l, 建立了快速、准确的畜禽肉中鸭源性成分 PCR 鉴别方法。在下一步工作中, 将开展 16S rRNA 和 COI 基因序列荧光定量 PCR 技术, 进一步研发食品中动物源性成分分析方法, 为保障肉类产业健康发展、维护市场秩序提供有效保障。

参考文献

- [1] BALLIN N Z, VOGENSEN F K, KARLSSON A H. Species determination-can we detect and quantify meat adulteration? [J]. Meat science, 2009, 83(2): 165 - 174.
- [2] 陈冬, 柏凡, 周明亮, 等. 基于线粒体 12S rRNA 基因鉴别混合牛肉及制品的牛种来源[J]. 遗传, 2008, 30(8): 1008 - 1014.
- [3] 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.

繁殖和蔓延危害^[6];果实膨大期遇长期阴雨寡照天气,西瓜着色不良,味感甜度低;成熟采收期多阴雨天气,则会影响市场销售,出现卖瓜难和价格跌落。

应对措施:①苗床期遇阴雨寡照灾害,可通过人工补充光照,提高光合作用效率;②抽蔓期阴雨寡照主要通过合理密植,引蔓整枝改善田间的通风透光条件;③开花期阴雨寡照主要采取罩花的方式授粉;④坐果后阴雨寡照主要采取改善田间小气候,摘除畸形果。

4.3 强降雨暴雨、洪涝 当出现暴雨或连续2 d以上大雨或连续5 d以上降水总量 ≥ 100 mm时,西瓜田间容易造成积水^[3],土壤缺氧,不利于根系生长,诱发枯萎病、炭疽病、腐疫病等大量发生^[6],甚至引起瓜蔓死亡;果实成熟遇强降水,容易造成渍害,裂瓜烂果,降低品质。

应对措施:①选择坡地高爽田块种植;②做好开沟排水工作,做到雨停田干;③露地西瓜茎蔓伸长期地面铺茅草或茎秆,让西瓜藤的病虫在茅草或茎秆上,既减轻暴雨冲刷又可防止大风危害;④套袋避雨,在强降雨之前给刚开放的雌花授粉后及时套袋避雨,5~7 d后果实膨大后解开;⑤雨后及时清沟沥水,并及时做好病虫害防治工作。

4.4 高温干旱 西瓜苗期日平均气温25.0℃以上,容易出现高脚苗;开花坐果期日平均气温35℃以上的高温干旱天气持续3~5 d,可造成瓜藤早枯萎及雌花干燥,难以坐果;果实膨大时期遇高温干旱天气灾害可出现高温逼熟品质差,植株早衰枯死,造成减产欠收。

应对措施:①充分利用气候资源,合理安排种植季节,避开高温干旱危害。②根据水源灌溉条件,因地制宜安排早、中、晚熟品种,水源灌溉条件差的沙土宜种植早熟西瓜,可早上市;水源灌溉条件好的壤土或粘壤土可安排中迟熟品种西瓜,可平衡西瓜的上市季节。③科学灌溉,推行喷灌、滴灌等先进水利灌溉技术,减轻高温干旱危害。④用杂草或瓜叶盖

瓜遮阳、垫瓜、翻瓜防止西瓜灼伤。⑤控制棚内温度在35℃以下,遇长时间高温干旱,应结合施肥及时滴灌,补充肥水,防止西瓜早衰减产。

5 结论与讨论

(1)西瓜喜温、喜光、喜干燥、耐热、耐旱、不耐涝,长沙县西瓜成熟期日较差大,5~6月平均气温日较差7.3~7.6℃,7~9月气温日较差8.4~8.5℃,西瓜增重快,产量高,且含糖量高。

(2)长沙县西瓜生产的主要农业气象灾害是低温冷害、阴雨寡照、暴雨强降水和后期的高温干旱,防御措施主要是适时播种、薄膜覆盖、科学管理、合理排灌、及时防治病虫害,做好防灾减灾工作。

(3)充分利用长沙县气候资源,日平均气温稳定通过10℃后,抓住冷尾暖头3月中下旬播种,膜覆盖于3月中下旬~4月上旬播种,露地于4月中旬播种,露地西瓜于6月下旬开始采收上市。

(4)人工增热,提早播种育苗季节,提早西瓜上市期,采用大棚+小棚+地膜3层薄膜覆盖,并配电热线增温设施育苗,3叶期定植,定植后利用薄膜大棚+地膜双层薄膜覆盖,可提高棚内温度,可于2月中旬播种,3月中下旬定植,4月中下旬开花,5月中下旬~6月上中旬采收上市,可获较高的经济效益。

参考文献

- [1] 李胜利. 西瓜甜瓜标准化生产[M]. 郑州:河南科学技术出版社,2012:17-18.
- [2] 蔡俊德. 南方蔬菜栽培技术[M]. 北京:农业出版社,1990:208-209.
- [3] 陈善验. 西瓜农业气象条件研究[G]. 湖南娄底生物科学研究所试验研究成果汇编,2008:57-61.
- [4] 张玉杰,杨占国. 日光温室小型西瓜高效栽培技术[M]. 北京:科学技术文献出版社,2009:14-18.
- [5] 贺中魁. 南方小型西瓜高效栽培[M]. 北京:金盾出版社,2008:10-11.
- [6] 华琼. 西瓜病害的发生防治[J]. 蔬菜,2000(5):50-51.
- [7] GIRISH P S, ANJANEYULU A S R, VISWAS K N, et al. Meat species identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene[J]. Meat science, 2005, 70(1): 107-112.
- [8] GIRISH P S, ANJANEYULU A S R, VISWAS K N, et al. Meat species identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene[J]. Meat science, 2005, 70(1): 107-112.
- [9] 陈文炳,邵碧英,廖宪彪,等. 加工食品中若干动物成分的PCR检测技术应用研究[J]. 食品科学, 2005, 26(8): 338-342.
- [10] 何玮玲,张驰,杨静,等. 食品中4种肉类成分多重PCR的快速鉴别方法[J]. 中国农业科学,2012,45(9):1873-1880.
- [11] SOARES S, AMARAL J S, MAFRA I, et al. Quantitative detection of poultry meat adulteration with pork by a duplex PCR assay[J]. Meat science, 2010, 85(3): 531-536.
- [12] GHOVVATI S, NASSIRI M R, MIRHOSEINI S Z, et al. Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay[J]. Food control, 2009, 20(8): 696-699.

(上接第203页)

- [4] GHOVVATI S, NASSIRI M R, MIRHOSEINI S Z, et al. Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay[J]. Food control, 2009, 20(8): 696-699.
- [5] MURUGAIAH C, NOOR Z M, MASTAKIM M, et al. Meat species identification and Halal authentication analysis using mitochondrial DNA[J]. Meat science, 2009, 83(1): 57-61.
- [6] MANE B G, MENDIRATTA S K, TIWARI A K. Polymerase chain reaction assay for identification of chicken in meat and meat products[J]. Food chemistry, 2009,116(3): 806-810.
- [7] GIRISH P S, ANJANEYULU A S R, VISWAS K N, et al. Meat species identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene[J]. Meat science, 2005, 70(1): 107-112.