

3 种动物性食品的分子生物学鉴定方法研究

田金辉¹, 尉婷媛², 周占琴¹, 武彦峰², 武会娟²

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2 北京市理化分析测试中心, 北京 100094)

【摘要】 【目的】建立一种快速、高效、准确的动物源性食品材质的鉴定方法。【方法】采用 PCR 方法扩增猪、羊、牛动物组织 mtDNA 的 CO I 基因, 对 PCR 扩增片段进行测序并构建系统发生树; 以 *Hinf* I 酶为内切酶, 对 3 种样品的 CO I 基因进行聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)分析。【结果】对测序结果进行多重序列比对发现, 猪、羊、牛 CO I 基因的碱基差异为 19.0%~25.9%, 物种内的碱基差异仅为 0.1%~1.6%。猪、羊、牛 CO I 基因 PCR 扩增片段经 *Hinf* I 酶切后的长度依次为 40,411,449 bp; 144,376,381 bp 和 46,377,479 bp, 限制性片段长度具有物种特异性。【结论】CO I 基因的序列及 PCR-RFLP 分析, 可用于猪、牛、羊动物源性食品的材质鉴定。

【关键词】 动物性食品; 材质鉴定; PCR 扩增; CO I 基因

【中图分类号】 TS251.7

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2011)01-0199-04

Identification of molecular biology to identify three kinds of animal flesh

TIAN Jin-hui¹, WEI Ting-yuan², ZHOU Zhan-qin¹, WU Yan-feng², WU hui-juan²

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Beijing Centre for Physical&Chemical Analysis, Beijing 100094, China)

Abstract: 【Objective】 This article aims to establish an effective, rapid and accurate method to identify animal-derived food. 【Method】 CO I mtDNA sequences from pork, mutton and beef were amplified by the polymerase chain reaction (PCR) technique. The PCR products was cleaved by *Hinf* I restriction enzymes. 【Result】 The study resulted in 40,411 and 449 bp (pork); 144,376 and 381 bp (mutton); 46,377 and 479 bp (beef) fragments. A diversity was demonstrated in pork, beef and mutton. Multiple Sequence Alignment result shows that nucleotide difference between swines, ovis aries and bovine's CO I gene is 19.0% to 25.9%, nucleotide difference within species is only 0.1% to 1.6%. 【Conclusion】 The result shows that pork, mutton and beef can be identified by using PCR-RFLP analysis of the CO I gene in animal flesh.

Key words: animal flesh; identification; PCR; CO I gene

动物源性商品广泛分布于食品、药品、保健品、化妆品、饲料、服装等方面, 与人们的生活息息相关。在日常的消费过程中, 消费者经常会遇到一些在动物源性商品中掺杂使假的现象, 甚至在一些明令禁止的商品中添加动物源性成分, 随着大量相关事件的报道, 动物源性商品的成分鉴定成为一个倍受关注的问题。

动物源性成分的检测作为一种重要的识别掺假手段, 迫切需要建立一种快速、准确、标准的鉴定方法。目前, 有关动物源性成分的检测方法包括形态学分类方法、细胞学鉴定方法、生物化学鉴定方法及分子标记技术等。分子标记方法因具有特异性强、灵敏度高且简便快速等优点, 而成为商品中动物源性材质鉴别的有效方法^[1], 并在保健品、饲料、食品

* [收稿日期] 2010-05-13

[基金项目] 北京市科学技术研究院创新团队项目(IG200905N)

[作者简介] 田金辉(1984—), 男, 河北涞源人, 在读硕士, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究。E-mail: tijihu@126.com

[通信作者] 武会娟(1972—), 女, 河南郑州人, 副研究员, 博士, 主要从事生物技术开发与应用研究。

中的鉴定研究中得到广泛应用^[2-5]。

近年来,随着 DNA 测序技术的发展与成熟,在物种鉴定方面已经开始了基因条码研究。CO I 基因由于其合适的进化速率而成为基因条码研究的首选,但目前关于 CO I 基因的研究多集中在昆虫及鱼类上^[6-8],而与人类日常生活息息相关的哺乳类和鸟类的相关研究相对较少。为确定一种能够广泛识别动物源材质的鉴定方法,本研究选择生活中最常见的物种猪、牛、羊等为研究对象,先对其 CO I 基因进行 PCR 扩增和测序分析,再利用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法对扩增片段进行酶切,旨在为动物源性食品材质的鉴定提供技术支持。

1 材料与方 法

1.1 材 料

市售新鲜牛肉、猪肉、羊肉,购自北京超市发、物美、美廉美、家乐福和华联 5 家大型超市;动物组织基因组提取试剂盒及 PCRMix,购自北京全式金生物技术公司;普通 DNA 产物纯化试剂盒,购自北京博迈德科技发展公司;限制性内切酶 *Hinf* I,购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 引物的设计与合成

根据 GenBank 收录的猪(GenBank 号 AF486874、AY334492)、牛(GenBank 号 AY308069、EU177817)、羊(GenBank 号 AF010406、AY858379)CO I 基因序列分别设计引物,送交北京奥科生物技术公司合成。其中猪的上游引物序列为:5'-TACTACTGGCATC-CTCAAT-3',下游引物序列为:5'-TTGCTCAT-GCTTGGTTGAG-3';牛的上游引物序列为:5'-CTACTCCTCGCATCCTCT-3';下游引物序列为:

5'-TTGGCTCATGTATCGTTG-3';羊的上游引物序列为:5'-TACTCCTAGCATCCTCTAT-3',下游引物序列为:5'-GCTCATGTATCATTGAG-3'。

1.3 方 法

1.3.1 猪、牛、羊 DNA 的提取 按试剂盒说明提取动物组织 DNA,每种样品取样 20~25 mg。

1.3.2 CO I 基因的 PCR 扩增 PCR 扩增反应体系为 25 μ L,其中 DNA 模板 2 μ L,正向和反向引物各 1 μ L,PCRMix 12.5 μ L,加 ddH₂O 至 25 μ L。PCR 反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s,34 个循环;最后延伸 8 min。扩增产物经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳并切胶回收后,送北京市理化分析测试中心测序。

1.3.3 CO I 基因的测序及序列分析 测序结果先利用 Primer Primer 5.0 软件进行 *Hinf* I 酶切位点分析,再参考 GenBank 收录的猪、牛、羊 CO I 基因序列(AF486874、AY308069、AF010406),利用 DNASTAR7.1 软件进行多重序列比对及系统发生树的构建。

1.3.4 CO I 基因的 PCR-RFLP 分析 酶切反应体系为 25 μ L:*Hinf* I 酶 1.5 μ L,10 \times Buffer 3 μ L,纯化的 PCR 扩增片段 10 μ L,加 ddH₂O 至 25 μ L,混匀后置于 37 $^{\circ}$ C 水浴中过夜,经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳获取 RFLP 图谱。

2 结果与分析

2.1 CO I 基因的 PCR 扩增、纯化和测序

本试验拟扩增的 DNA 长度为 900~902 bp。猪、牛、羊 mtDNA CO I 基因扩增产物经琼脂糖电泳检测证实,序列大约长 900 bp(图 1)。

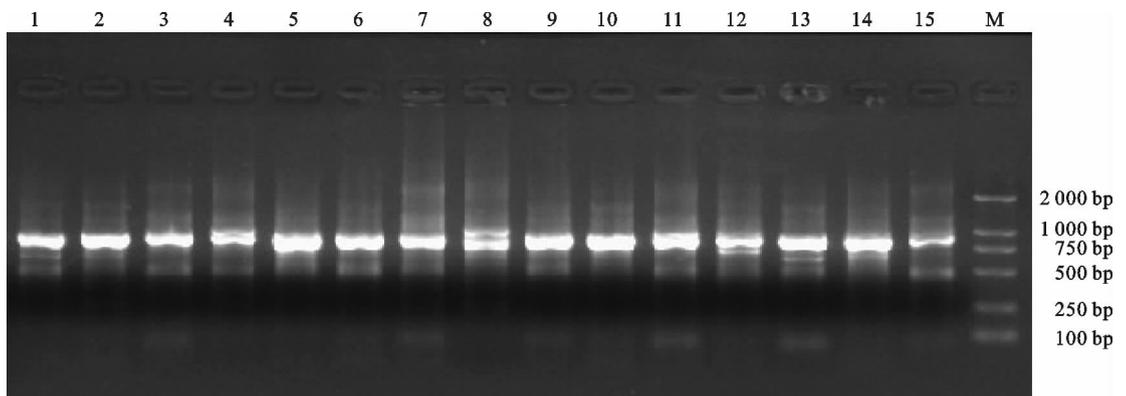


图 1 CO I 基因 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳分析

M. Marker DL2000;1~5. 牛肉;6~10. 羊肉;11~15. 猪肉

Fig. 1 PCR products of CO I gene by agarose electrophoresis

M. Marker DL2000;1-5. Beef;6-10. Mutton;11-15. Pork

DNA 测序结果表明,猪(图 2)、牛、羊 mtDNA CO I 基因的扩增、回收纯化以及测序峰型较好。说

明测序结果准确,可用于后续的序列分析。

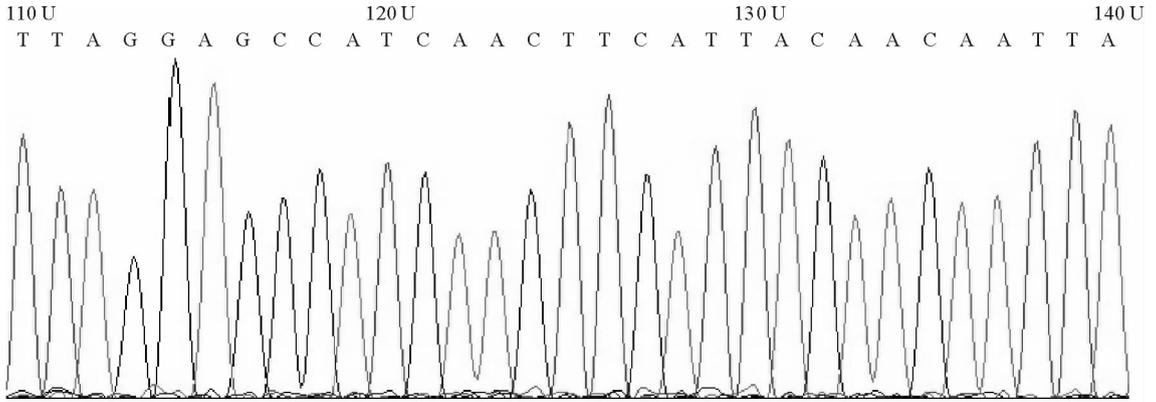


图 2 猪的 DNA 测序图谱

Fig. 2 DNA chromatogram of swine

2.2 序列分析

对测序结果进行多重序列比对,结果(表 1)发现,猪、牛、羊 CO I 基因的碱基差异为 19.0%~

25.9%,物种内的碱基差异仅为 0.1%~1.6%,表明 CO I 基因的碱基差异可以用于猪、牛、羊源性食品的材质鉴定。

表 1 猪、牛、羊 CO I 基因的碱基差异

Table 1 Nucleotide difference between swine,bovine and ovis aries mtDNA CO I sequences

样品	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1		99.3	79.4	80.7	85.2	85.2	85.4	78.6	69.5
2	0.7		78.9	80.3	84.8	84.8	92.4	78.5	69.3
3	25.3	25.9		98.7	81.6	81.6	71.6	74.8	92.5
4	23.8	24.3	1.2		82.8	82.8	73.3	76.0	93.8
5	19.0	19.5	20.6	19.3		100.0	77.2	92.8	76.2
6	19.0	19.5	20.6	19.3	0		77.2	92.8	76.2
7	1.4	1.6	25.7	24.2	20.0	20.0		77.8	75.0
8	20.2	20.4	21.4	20.1	0.9	0.9	21.0		80.0
9	24.9	25.5	1.4	0.1	19.2	19.2	25.3	19.3	

注:1.牛(AY308069),2.牛(EU177817),7.本研究牛样品;3.羊(AF010406),4.羊(AY858379),9.本研究羊样品;5.猪(AF486874),6.猪(AY334492),8.本研究猪样品;右上部分为碱基相同度,左下部分为碱基差异度。

Note:1. Bovine(AY308069),2. Bovine(EU177817),7. Bovine(sample);3. Ovis aries(AF010406),4. Ovis aries(AY858379),9. Ovis aries(sample);5. Swine(AF486874),6. Swine(AY334492),8. Swine(sample);The upper right portion is percent identity,the left-down part is divergence.

系统发生树分析结果(图 3)显示,同一物种能够很好地聚类在一起。

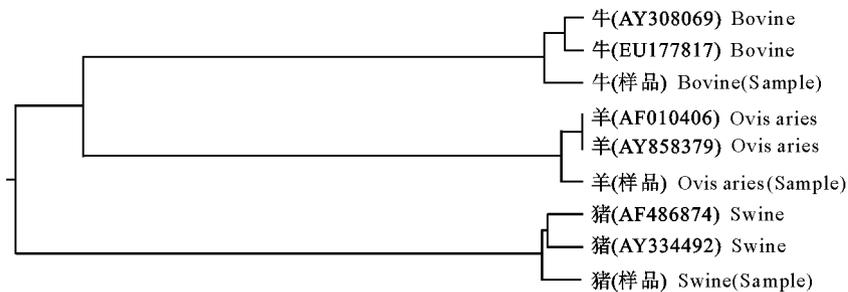


图 3 基于核苷酸序列碱基置换构建的系统发生树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on swine,bovine and ovis aries mtDNA CO I sequences

2.3 酶切鉴定

每个物种选取 5 个常见品种,通过 NCBI 下载

其 CO I 基因序列,经过比对分析,结果显示不同品种猪的限制性内切酶 *Hinf* I 酶切位点均位于目的

序列 411 和 860 bp 处,羊的 *Hinf* I 酶切位点均位于目的序列 376 和 20 bp 处,牛的 *Hinf* I 酶切位点均位于目的序列 377 和 856 bp 处。该结果表明,对于猪、羊、牛 3 个物种的 *CO* I 基因目的片段而言,限制性内切酶 *Hinf* I 的酶切位点无品种内差异。

Primer Primer 5.0 软件分析结果显示,猪、羊、牛 3 个物种的 *CO* I 基因经 *Hinf* I 酶切后均可获得 3 个片段,猪的片段长度分别为 40, 411, 449 bp; 羊分别为 144, 376, 381 bp; 牛分别为 46, 377, 479 bp。

猪、羊、牛 3 个物种 *CO* I 基因的 *Hinf* I 酶切结果见图 4。由图 4 可见,酶切结果与 Primer Primer 5.0 软件分析结果一致,只是猪的 40 bp 和牛的 46 bp 片段条带较弱,羊的 144 bp 片段条带也较弱,且 376 与 381 bp 片段大小相近,无法通过琼脂糖凝胶电泳区分,因此表现为 1 个条带。

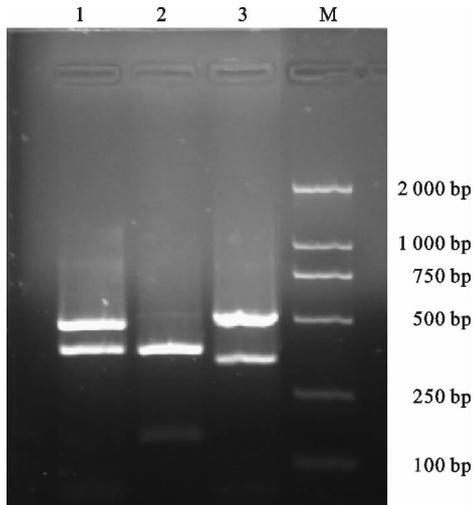


图 4 猪、羊、牛 *CO* I 基因的 PCR-RFLP 分析
M, Marker DL2000; 1, 猪; 2, 羊; 3, 牛

Fig. 4 PCR-RFLP analysis of swine, ovis aries and bovine's *CO* I gene

M, Marker DL2000; 1, Swine; 2, Ovis aries; 3, Bovine

3 讨论

本研究采用试剂盒提取生肉中的 DNA, 步骤相对简单且纯度较高, 便于在实际工作中推广。

CO I 基因位于线粒体 DNA 上, 具有多拷贝、母系遗传、无重组以及结构简单稳定等优点, 而且进化速度适中, 一个较小的基因片段就包含着从种内到种间、属间乃至科间的进化遗传信息, 被认为是解决分类及系统进化问题的可信分子标记之一^[9], 在生物起源进化、物种遗传多样性和亲缘关系鉴定等方

面具有重要意义。目前, 通过构建系统发生树对线粒体 *CO* I 基因进行分析, 已在物种鉴定方面已经得到了应用^[1, 10-11]。随着 DNA 测序技术的成熟与市场化应用, 测序分析已经成为一种经济且适合常规鉴定实验室操作和推广的检测分析手段。

本研究通过对 *CO* I 基因测序发现, 在猪、牛、羊 3 种动物的识别上, *CO* I 基因含有大量的具有物种特征的单核苷酸位点, 能够非常准确地进行鉴定。为进一步提高鉴定的准确性及直观性, 本研究在此基础上又进行了 PCR-RFLP 分析。PCR-RFLP 技术无需 Southern 杂交, 采用电泳分离和图谱分析, 所得结果稳定准确^[12-14]。本研究选取限制性内切酶 *Hinf* I 对扩增的 *CO* I 基因片段进行酶切, 结果表明, 同一物种 *CO* I 基因限制性内切酶 *Hinf* I 的酶切位点具有物种特异性, 能够作为物种的准确标记, 可以酶切得到具有物种特异性的酶切片段, 利用酶切后的片段长度可以对生活中最常食用的猪肉、牛肉、羊肉的动物源性进行准确鉴定。

在本研究基础上, 下一步试验将尽量囊括日常商品中见到的动物物种, 进而建立一种动物源性商品材质的分子生物学标准化鉴定方法。

[参考文献]

- [1] 彭居俐, 王绪祯, 王 丁, 等. 基于线粒体 *CO* I 基因序列的 DNA 条形码在鲤科鲃属鱼类物种鉴定中的应用 [J]. 水生生物学报, 2009, 33(2): 271-276.
Peng J L, Wang X Z, Wang D, et al. Application of DNA barcoding based on the mitochondrial *CO* I gene sequences in classification of culter (Pisces: Cyprinidae) [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2009, 33(2): 271-276. (in Chinese)
- [2] 杨宝华, 宗 卉, 林庆燕, 等. 用分子生物学方法鉴别检测动物源性饲料中的牛羊源性成分 [J]. 中国畜牧杂志, 2002, 38(1): 3-5.
Yang B H, Zong H, Lin Q Y, et al. A molecular approach for identification of bovine and ovine-derived materials from animals-derived feedstuffs [J]. Chinese Journal of Animal Science, 2002, 38(1): 3-5. (in Chinese)
- [3] 高丹丹, 曹郁生, 王迎华. PCR 技术在食品动物源性检测中的应用 [J]. 食品研究与开发, 2007, 28(1): 141-144.
Gao D D, Cao Y S, Wang Y H. Application of PCR technique to detection of the animal origin of food [J]. Food Research and Development, 2007, 28(1): 141-144. (in Chinese)
- [4] 陈 颖, 钱增敏, 徐宝梁, 等. 保健品中牛羊源性成分的 PCR 检测 [J]. 食品科学, 2004, 25(10): 215-218.
Chen Y, Qian Z M, Xu B L, et al. Species-specific PCR for identification of horse and donkey materials in feedstuff [J]. Food Science, 2004, 25(10): 215-218. (in Chinese)