

实验技术与方法

用 *Cytb* 基因序列分析鉴定肉制品掺假

马伊萨兰, 吕明星, 唐俊妮, 陈娟, 张荣, 龙虎

(西南民族大学生命科学与技术学院, 四川 成都 610041)

摘要:目的 采用 *Cytb* 基因进行肉制品真伪鉴定的尝试性探索。方法 随机采集 21 份肉制品样品, 首先采用 CTAB 法方法提取样品 DNA, 基于 *Cytb* 基因的通用引物对 21 份样品 DNA 进行 PCR 扩增, 把扩增产物进行测序, 然后采用 DNAMAN 软件进行序列的比对分析。结果 CTAB 方法适合肉制品的 DNA 提取。10 份牛肉样品中 9 份与标注吻合, 1 份检测出是猪肉; 2 份羊肉样品中 1 份与标注吻合, 1 份检测是猪肉; 2 份猪肉样品中 1 份与标注吻合, 1 份检测是鸡肉; 1 份鸡肉样品与标注吻合; 6 份牦牛肉样品中 2 份与标注吻合, 4 份检测是水牛肉。结论 用 *Cytb* 基因序列分析比对方法适合肉制品的真伪鉴定, 市场上肉制品存在掺假问题。

关键词: 肉制品; 鉴定; PCR; *Cytb* 基因; 测序; 食品; 掺假

中图分类号: R155.5; TS251.5⁺3 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2016)01-0048-04

DOI: 10.13590/j.cjfh.2016.01.011

Meat identification based on *Cytb* gene sequences for the market meat products

MA Yi-sa-lan, LV Ming-xing, TANG Jun-ni, CHEN Juan, ZHANG Rong, LONG Hu

(College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Sichuan Chengdu 610041, China)

Abstract: Objective To explore the identification of the meat and meat products based on *Cytb* gene. **Methods** A total of 21 samples were collected randomly. DNAs were extracted by CTAB method. Conventional PCR technique was applied to amplify *Cytb* genes and the amplified PCR products were sequenced. DNAMAN software was used to align the *Cytb* sequences. **Results** CTAB method was suitable for DNA extraction in meat products. The DNA sequencing and alignment results indicated that 9 beef samples were consistent with the label, and one was pork; one mutton sample was consistent with label, another was detected as pork; one pork sample was consistent with label, and the other was detected as chicken; one chicken sample was consistent with label; 2 yak samples were consistent with label, and four were detected as water buffalo meats. **Conclusion** Sequences alignment method based on *Cytb* gene was suitable for the market meat products identification. Moreover, meat adulteration was very serious.

Key words: Meat products; identification; PCR techniques; *Cytb* gene; sequencing; food; adulteration

肉是人类优质蛋白质和多种营养素的主要来源, 含有多种微量元素和丰富的必须氨基酸^[1]。近年来, 肉的欺诈和掺假行为越来越受到人们的关注^[2]。在“马肉风波”事件发生之前, 国内早已曝光一些不法商家售卖采用化学药物处理的“假鱼翅”、以及采用牛肉膏处理的鸭肉或猪肉冒充牛肉等相关事件。这些不仅涉及到食品掺假欺诈的商业行

为, 而且也涉及到宗教信仰和民族问题^[3]。因此, 基于经济和宗教等方面的考虑, 肉的真伪鉴定具有非常重要的意义^[4]。

目前, 由于经营人员和肉品来源途径广, 食品的掺假方式和范围也越来越复杂。国家已制定了相关法律禁止以次充好和假冒伪劣肉制品在市场上售卖, 由于肉制品的鉴定比较复杂, 这类掺假现象还是屡禁不止。传统依靠肉类感官与形态特征的鉴别方法, 目前已经不能满足对肉品掺假现象的控制和监管需求。随着现代仪器分析和分子生物学技术的迅速发展, 先后出现了以脂肪、蛋白质、DNA 分子为检测对象, 结合免疫分析技术、色谱、光谱、显微技术和 DNA 分析技术等快速灵敏的特点, 提高了检测的精确性和准确度^[5-8]。在所有这些技术中, 分子生物学技术在肉品鉴定中的应用逐渐成为热点。最近几年, 采用 PCR 技术用于肉制品鉴定

收稿日期: 2015-12-01

基金项目: 国家自然科学基金(31371781); 2014 年度教育部回国留学启动项目; 西南民族大学中央高校基本科研业务费专项资金项目(2015NZYQN59); 西南民族大学研究生创新课题(CX2015SZ093)

作者简介: 马伊萨兰 女 硕士生 研究方向为畜产品加工与安全
E-mail: 403884179@qq.com

通信作者: 唐俊妮 女 教授 研究方向为食品安全与食品微生物
E-mail: junneytang@aliyun.com

的研究也越来越广泛,如吕二盼^[9]应用 PCR 技术建立了各种动物源性肉及肉制品鉴别检验方法;刘岑杰等^[10]建立了一种检测肉制品中的鸭源性成分实时荧光 PCR 方法,该方法能够快速有效检测肉制品中的鸭源性成分;范丽丽^[11]建立了一种实时荧光 PCR 技术检测猪、牛、羊、鸡和鸭肉 5 种肉源;何玮玲等^[12]针对食品中 4 种肉类成分建立了一种多重 PCR 快速鉴别方法,用于食品中牛肉、猪肉、羊肉以及鸡肉成分的快速鉴别;Iwobi 等^[13]采用多重实时 PCR 方法定量检测肉糜中的牛肉和猪肉成分;PCR 技术在肉类鉴定中已经得到广泛研究,同时也可以看出,从核酸分子水平上对物种进行鉴定已成为未来的一种趋势和有效手段。

线粒体 DNA 分子 (mitochondrial DNA, mtDNA),被认为是动物体内唯一存在的核外遗传信息载体,其结构简单,一般没有间隔序列,并且属于严格的母系遗传,几乎不发生易位、倒位等畸变和重组^[14]。近年来,通过对 mtDNA 上的细胞色素 b 基因 (*Cytb*) 和控制区的部分序列进行动物的物种鉴定及生物学分类非常广泛^[15]。如尚柯等^[16]根据牛、猪、羊的线粒体 *Cytb* 基因序列,确立一种多重 PCR 检测方法用于对牛肉、猪肉和羊肉的调查。综上,目前以 *Cytb* 基因建立的 PCR 相关方法,只能鉴定出几种设计特异性引物的肉品物种,不适合大规模肉品的检测鉴定。因此,基于 *Cytb* 基因的保守性,本文通过对不同肉制品的 *Cytb* 基因进行扩增,然后将序列进行比对分析,从而达到对多种肉制品进行真伪鉴别的目的,具有更广泛的实际应用价值。该研究思路与方法可为相关检验监管部门提供借鉴,让肉制品安全得到充分保障。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样品来源

从成都地区不同的超市和食品市场采集不同品种的肉及肉制品共计 21 份,采样重点为标注的鸡肉、猪肉、羊肉、牛肉以及牦牛肉等散卖的熟食及成品包装的袋装肉制品。

1.1.2 主要仪器与试剂

凝胶成像系统(美国 Bio-Rad),PCR 仪(美国 Applied Biosystems),NanoDrop2000 分光光度计(美国 MAPADA)。琼脂糖(西班牙 Biowest),液氮,十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)溶液,氯仿-异戊醇(24:1, V/V),10 × PCR Buffer、*Taq* DNA 聚合酶、dNTP Mixture、MgCl₂ 等购自宝生(大连)生物工程

有限公司,6 mol/L 的碘化钾溶液、无水乙醇、75% 酒精溶液、3 mol/L 的醋酸钠溶液均为分析纯,灭菌超纯水。

1.2 方 法

1.2.1 引物合成

通用引物参考文献[17],上游序列为 *Cytb*-F: 5'-CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3',下游序列为 *Cytb*-R: 5'-GCCCTCAGAATGATATTTGTCC TCA-3',引物序列由上海生工合成,引物的理论扩增长度为 359 bp。

1.2.2 样品前处理

将采集的样品进行分类标记,从成品包装中取出一些放入无菌的小烧杯中,加入双蒸水浸泡过夜,去除肉制品表面的调味料,将其分别取出剁碎,并用液氮研磨成细粉,取出放入 EP 管中,每管称取约为 0.4 g 放置冰箱中保存备用。

1.2.3 样品 DNA 提取

肉制品的 DNA 提取方法采用文献[18]报道的方法进行操作。提取的 DNA 溶液经过适当稀释,采用 NanoDrop2000 分光光度计来测定 DNA 分子在溶液中的 $OD_{260/280}$ 比值。

1.2.4 PCR 扩增

PCR 扩增反应体系为:2 μl 10 × PCR buffer(不含 Mg²⁺),1.2 μl dNTP Mixture(每种浓度为 2.5 mmol/L),1.6 μl 25 mmol/L MgCl₂,20 μmol/L 的上下游引物各 0.5 μl,1 μl 样品 DNA 模板,0.2 μl *Taq* DNA 聚合酶(5 U/μl),灭菌超纯水补足 20 μl 体系。

PCR 扩增条件:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 50 s,60 °C 退火 50 s,72 °C 延伸 40 s,共 35 个循环;72 °C 延伸 7 min,最后 4 °C 保存。

PCR 产物琼脂糖电泳检测:配置 1% 琼脂糖凝胶,取 PCR 扩增产物 8 μl 进行上样,电泳条件 80 V,电泳 45 min,凝胶成像系统观察结果。

1.2.5 测序与比对

将 PCR 产物送至上海生工进行测序,测序结果采用 DANMAN(V6)软件进行比对分析。

2 结果与分析

2.1 样品采集结果

本次试验中,在成都、石家庄等地随机采集 21 份肉制品样品,1、2、4、6、7 号为散卖熟食样品,5 号为小摊贩散卖羊肉串样品,其余为超市售卖的不同品牌的成品包装肉制品。样品种类详见表 1,其中,标注的牛肉样品 10 份,猪肉样品 2 份,牦牛肉样品 6 份,鸡肉样品 1 份,羊肉样品 2 份。

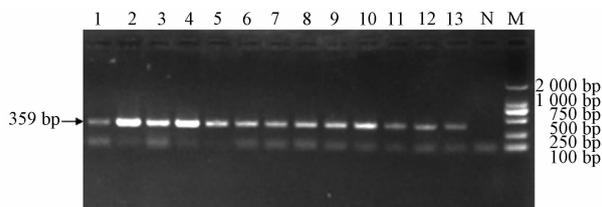
表1 样品采样一览表

Table 1 Samples list

编号	样品名称	生产日期	保质期	采样地点
1	熟食鸡肉	2015/01/26	6天	成都某超市
2	熟食猪肉	2015/01/26	6天	成都某超市
3	猪肉松	2014/10/10	300天	成都某超市
4	熟食羊肉	2015/01/26	6天	成都某超市
5	羊肉串	2015/03/25	2天	成都某校园周边摊贩
6	熟食牛肉	2015/01/26	6天	成都某超市
7	熟食牛肉	2015/01/26	6天	成都某超市
8	牛肉条	2015/01/15	300天	成都某超市
9	牛肉棒	2014/09/22	18个月	成都某超市
10	牛肉棒	2015/01/03	12个月	石家庄某超市
11	牛肉干	2014/10/23	12个月	成都某超市
12	牛肉干	2014/12/12	12个月	成都某超市
13	牛肉片	2014/09/07	12个月	石家庄某超市
14	卤牛肉	2014/10/06	360天	石家庄某超市
15	灯影牛肉	2014/09/10	12个月	成都某校园周边超市
16	手撕牦牛肉	2015/01/13	12个月	成都某超市
17	手撕牦牛肉	2014/04/17	12个月	成都某超市
18	手撕牦牛肉	2014/10/06	12个月	成都某超市
19	牦牛肉	2014/10/20	12个月	成都某校园周边超市
20	手撕牦牛肉	2014/12/10	360天	成都某超市
21	手撕牦牛肉	2014/10/15	12个月	成都某校园周边超市

2.2 样品 PCR 扩增结果

采用 CTAB 法对 21 份样品的 DNA 进行提取,并对提取的 DNA 进行纯度检测, $OD_{260/280}$ 范围在 1.92 ~ 2.12 之间,表明 CTAB 法提取肉制品 DNA 效果理想。采用 *Cytb* 基因的通用引物针对 21 份样品进行 PCR 扩增,部分样品的 *Cytb* 基因扩增结果见图 1。扩增条带大小与理论大小相吻合,约在 359 bp 左右,扩增产物与预期一致。



注:1. 熟食鸡肉;2. 熟食猪肉;3. 熟食羊肉;4. 羊肉串;5. 熟食牛肉;6. 牛肉条;7. 牛肉棒;8. 牛肉干;9. 牛肉片;10. 卤牛肉;11. 灯影牛肉;12. 手撕牦牛肉;13. 牦牛肉;N. 阴性;M. 分子量标准 DL 2000

图1 部分样品 *Cytb* 基因 PCR 扩增产物的电泳图

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products from meat samples' DNA with *Cytb* gene

2.3 样品 *Cytb* 基因测序比对结果

将 21 份样品的 PCR 扩增产物送上海生工进行测序,序列比对采用 DNAMAN 软件进行操作,并与 GenBank 中的已知序列进行分析和比较,构建的 21 份样品基于 *Cytb* 基因的进化树详见图 2。由图 2 的比对分析可以看出,共有 13 份样品分析为水牛肉,它们分别是样品 6,7,8,9,11,12,13,14,15,16,

19,20 和 21;2 份样品为牦牛肉(样品 17 和 18),1 份样品为绵羊肉(样品 4),3 份样品为猪肉(样品 2,5 和 10),2 份样品为鸡肉(样品 1 和 3)。

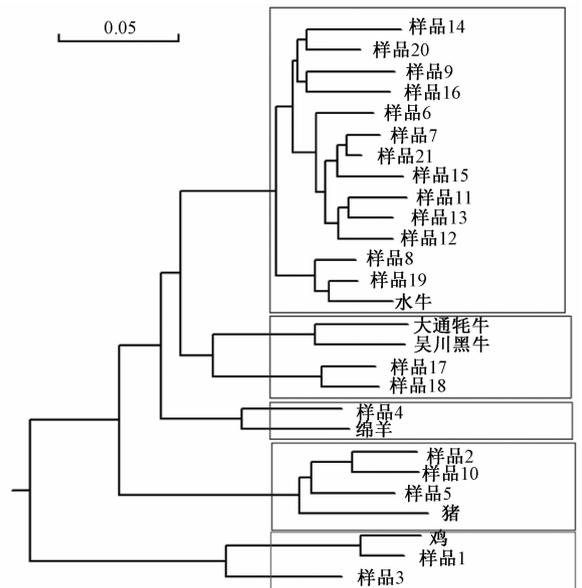


图2 基于 *Cytb* 基因的序列比对结果

Figure 2 Alignment for meat samples based on *Cytb* gene sequence variations

通过以上的分析并与实际标注样品比较发现:10 份牛肉样品中 9 份与标注相吻合;2 份羊肉样品,1 份与标注相吻合;2 份猪肉样品,1 份吻合;1 份鸡肉样品与描述相吻合;6 份牦牛肉样品中,2 份与标注相吻合。5 份熟食样品与测序结果完全吻合;5 号散卖的摊贩羊肉串检测出是猪肉,而加工的成品包装肉制品样品中掺假也比较严重,其中,1 份标注的牛肉检测出是猪肉,1 份标注的猪肉松检测出是鸡肉,特别是牦牛肉样品,6 份样品中 4 份假冒,用水牛肉替代为牦牛肉现象较为普遍。

3 讨论

上文已经提及到基于食品安全、经济和宗教等方面的考虑,对肉的真伪进行鉴定具有非常重要的意义。特别是思考如何建立一些更灵敏和更可靠的检测方法来鉴定动物食品或动物源性加工食品的物种来源非常关键^[19]。因此,近年来关于肉的物种鉴定成为学者们研究的热点。根据文献检索,大多数的研究是基于 *Cytb* 基因建立的 PCR 方法,以及由此延伸的多重 PCR 和荧光实时定量 PCR 方法^[9-10,16,20-21]。这些方法已经应用到猪肉、鸭肉、鸡肉、鹅肉、牛肉、鹿肉、鱼肉等物种的鉴定^[17,22-23]。通过比较这些方法,发现都需要设计针对不同肉品物种的特异性引物而进行操作,在实际检测过程中的适用范围会受到一定的限制,因为样品的背景不清

楚,要不断对待检样品进行筛选和排查。如果针对大规模采样和样品检测,本研究探索的序列比对思路应该更为科学和适用。

本研究中,共采集了 21 份样品,其中 5 份样品专门采集的是不同肉品的熟食,这几种熟食在超市购买时,有些形态完整,可以通过外观进行鉴别,目的是为了对序列比对的准确性进行核对。事实上 5 份熟食样品的比对结果与样品本身也完全吻合。其余样品采集的是深加工的成品肉制品,大部分已经无法根据肉的形态进行判定,采用基于 *Cytb* 基因的序列比对分析,发现市场上售卖的成品包装加工肉制品掺假情况确实存在,并且较为严重。特别是牦牛肉制品,6 份样品中有 4 份是用水牛肉代替。另外,采集的唯一 1 份摊贩售卖的羊肉串检测出来是猪肉代替。本研究的目的是进行肉制品真伪鉴定的一种尝试性探索,因此,在样品采集数量上有一定的局限性,以后建议可加大采样量,数据将更具有代表性。另外,值得一提的是市场上肉制品价格目前比较混乱,如含大豆蛋白的牛肉粒与同重量牛肉干和牦牛肉价格相近,牛肉粒中大豆蛋白的含量占到 7 成左右,肉只占到 3 成左右,还有的样品中同时出现几种不同颜色的肉块。希望本研究结果能引起有关部门重视,以加强对肉制品市场的监控与管理,保证肉制品安全。

本研究针对市场上售卖的熟肉及成品包装的 21 份肉制品样品进行肉品真伪鉴定的探索,采用 CTAB 法提取样品的 DNA 分子,然后基于动物组织的 *Cytb* 基因通用引物对 21 份样品进行 PCR 扩增,并把扩增产物进行测序,采用 DANMAN 软件对序列进行比对,达到了最初设想的通过 *Cytb* 基因序列比对方式对不同肉制品进行鉴别的目的。本研究结果表明由于肉制品经深加工,仅靠感官检验已不能快速准确地检测出肉品真伪,基于保守基因序列的比对分析方法可用于市场上肉制品的真伪鉴定,并且具有一定的优越性。

参考文献

- [1] Doosti A, Dehkordi P G, Rahimi E. Molecular assay to fraud identification of meat products[J]. *J Food Sci Technol*, 2014, 51(1):148-152.
- [2] 高敬,魏迪,张癸荣,等. 常见肉类鉴别技术研究进展[J]. *食品科学*, 2014, 35(11):356-360.
- [3] Arslan A, Ilhak O, Calicioglu M. Effect of method of cooking on identification of heat processed beef using polymerase chain reaction (PCR) technique[J]. *Meat Sci*, 2006, 72(2):326-330.
- [4] Girish P S, Haunshi S, Vaithyanathan S, et al. A rapid method for authentication of Buffalo (*Bubalus bubalis*) meat by alkaline lysis method of DNA extraction and species specific polymerase chain reaction[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2013, 50(1):141-146.
- [5] Singh V P, Neelam S. Meat species specifications to ensure the quality of meat: a review [J]. *International Journal of Meat Science*, 2011, 1(1):15-26.
- [6] Giaretta N, Di Giuseppe A M, Lippert M, et al. Myoglobin as marker in meat adulteration: a UPLC method for determining the presence of pork meat in raw beef burger[J]. *Food Chem*, 2013, 141(3):1814-1820.
- [7] HOU B, MENG X R, ZHANG L Y, et al. Development of a sensitive and specific multiplex PCR method for the simultaneous detection of chicken, duck and goose DNA in meat products[J]. *Meat Sci*, 2015, 101(11):90-94.
- [8] 张小莉,魏玲,李宝明,等. 肉制品掺假鉴别技术研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2014, 5(10):3190-3196.
- [9] 吕二盼. 动物源性食品中各种动物源性肉及肉制品鉴别检验的研究[D]. 河北:河北农业大学, 2012.
- [10] 刘岑杰,刘彦泓,杨滴,等. 肉制品中鸭源性成分的实时荧光 PCR 检测[J]. *肉类工业*, 2015, 405(1):51-53.
- [11] 范丽丽. 实时荧光 PCR 检测食品肉类种源方法研究[D]. 江苏:苏州大学, 2013.
- [12] 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.
- [13] Iwobi A, Sebah D, Kraemer I, et al. A multiplex real-time PCR method for the quantification of beef and pork fractions in minced meat[J]. *Food Chem*, 2015, 169(7):305-313.
- [14] 胡强,郑玉才,金素钰,等. 用通用引物扩增细胞色素 b 基因进行牦牛肉的鉴定[J]. *食品科学*, 2007, 28(11):319-322.
- [15] 杨光,刘海,周开亚,等. 用 mtDNA 序列鉴定一头小布氏鲸标本[J]. *动物学杂志*, 2002, 37(4):35-38.
- [16] 尚柯,段庆梓,张玉,等. 多重 PCR 法用于畜肉源性鉴定的研究[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(8):83-85, 96.
- [17] Erwanto Y, Abidin M Z, Sugiyono E Y, et al. Identification of pork contamination in meatballs of Indonesia local market using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis [J]. *Asian-Australas J Anim Sci*, 2014, 27(10):1487-1492.
- [18] Unseld M, Beyermann B, Brandt P, et al. Identification of the species origin of highly processed meat products by mitochondrial DNA sequences[J]. *PCR Methods Appl*, 1995, 4(4):241-243.
- [19] Rogberg-Muñoz A, Wei S, Ripoli M V, et al. Foreign meat identification by DNA breed assignment for the Chinese market [J]. *Meat Sci*, 2014, 98(4):822-827.
- [20] 王丽媛,叶建荣,李兴民,等. PCR 技术检测食品与饲料中动物源成分[J]. *保鲜与加工*, 2006, 6(4):33-36.
- [21] Safdar M, Junejo Y, Arman K, et al. A highly sensitive and specific tetraplex PCR assay for soybean, poultry, horse and pork species identification in sausages: development and validation [J]. *Meat Sci*, 2014, 98(2):296-300.
- [22] WANG J, LI H, ZHANG L, et al. Histomorphometric characterization of forestomach of yak (*Bos grunniens*) in the Qinghai-Tibetan Plateau [J]. *Int J Morphol*, 2014, 2(3):871-881.
- [23] Kitpipit T, Sittichan K, Thanakiatkrai P. Direct-multiplex PCR assay for meat species identification in food products [J]. *Food Chem*, 2014, 163(4):77-82.