

- [21] 邢若葵,温锦锋,王松才,等. 自动固相萃取法(SPE)提取常见安眠镇静药[J]. 刑事技术,2003(3):12-15.
- [22] 周淑光,徐婉. 固相萃取技术在生物样品中微量毒物分析的研究与应用[J]. 中国法医学杂志,1995,10(2):126-128.
- [23] SU J F, CHEN J, CHEN J X, et al. Determination of dicofol residue in eel by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Chromatogr,2010,28(1):84-88.
- [24] 杨旭,汤佳峰,巢文军,等. 基质效应对有机磷农药测定的影响及其解决方法[J]. 分析测试学报,2009,28(12):1368-1372.
- [25] DU J, LV B, ZHU P, et al. Determination of 30 organochlorine pesticides in animal-originated food products using combined purification by gel permeation chromatography and solid-phase extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry [J]. Chromatog,2013,31(8):739-746.
- [26] Lehotay S J, Ae Son K, Kwon H, et al. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables [J]. Chromatogr A, 2010, 1217(6):25-48.

实验技术与方法

鉴别绵羊肉中狐狸源性成分的环介导等温扩增检测方法的建立

刘少宁¹, 陈智², 张志民¹, 曹淑强³, 姚震⁴

- (1. 山东省兽药质量检验所 山东省畜产品质量安全监测与风险评估重点实验室, 山东 济南 250022;
2. 山东省农业科学院 山东省畜禽疫病防治与繁育重点实验室, 山东 济南 250100;
3. 沂水县畜牧局, 山东 沂水 276400; 4. 德州职业技术学院, 山东 德州 253034)

摘要:目的 建立一种能够快速区分出绵羊肉中掺入的狐狸源性成分的环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)检测方法。方法 针对狐狸线粒体 *CoxI* 基因分别设计两条外引物和两条内引物, 优化 LAMP 反应条件后并进行特异性和灵敏性试验, 对绵羊肉中狐狸源性成分进行检测。结果 在 0.2 μmol/L 外引物 (*F3* 和 *B3*)、1.6 μmol/L 内引物 (*FIP* 和 *BIP*)、0.5 mol/L 甜菜碱、0.4 mmol/L dNTP、4 mmol/L MgSO₄ 等参数的优化条件下, 可检测出掺假率为 1.0% 的羊肉制品, 即最低检测浓度为 2 × 10⁻⁴ ng/μl。结论 本文所建立的 LAMP 法特异性强、灵敏度高, 能有效地对绵羊肉中狐狸源性成分进行检测, 可作为羊肉掺假的一种快速检测方法。

关键词: 环介导等温扩增技术; 动物源性成分; 掺假; 羊肉; 狐狸肉; 鉴别; 食品

中图分类号: R155.5; TS251.5+3 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2016)01-0075-04

DOI: 10.13590/j.cjfh.2016.01.017

Development of a LAMP method for the identification of fox-derived ingredients in mutton

LIU Shao-ning, CHEN Zhi, ZHANG Zhi-min, CAO Shu-qiang, YAO Zhen

(Shandong Institute of Veterinary Drug Quality Inspection, Shandong Key Laboratory for Quality Safety Monitoring and Risk Assessment of Animal Products, Shandong Jinan 250022, China)

Abstract: Objective Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method was developed to detect fox-derived ingredients in mutton. **Methods** Four pairs of specific primers (*F3*, *B3*, *FIP*, *BIP*) were designed, respectively. The sensitivity and specificity test were performed after the LAMP assay was optimized. Then the detection of fox-derived ingredients in mutton was carried out. **Results** The optimized condition was 0.2 μmol/L each of *F3* and *B3*, 1.6 μmol/L each of *FIP* and *BIP*, 0.5 mol/L betaine, 0.4 mmol/L dNTP and 4 mmol/L MgSO₄. 1.0% adulterated fox-derived ingredients could be detected specifically. The limit of detection was 2 × 10⁻⁴ ng/μl. **Conclusion** This method is highly specific and sensitive, and could be a very useful tool for mutton adulteration detection

Key words: Loop-mediated isothermal amplification; animal-derived materials; adulteration; mutton; fox; identify; food

收稿日期: 2015-12-01

基金项目: 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金 (BS2014NY009)

作者简介: 刘少宁 女 兽医师 研究方法为兽药及畜禽产品质量监督检验 E-mail: liushaoning-6@163.com

近年来随着市场对羊肉的需求逐渐增加及价格快速上涨,一些不法商贩在利益的驱动下,掺加其他廉价肉造假冒充羊肉。2012年以来,国内曝光了多起以猪肉、鸡肉、鸭肉冒充羊肉的事件。而在一些以皮毛为主的特种经济动物养殖地区,貂肉和狐狸肉的去向成了一个谜,不少人推测其被掺入了羊肉中进入了消费者的餐桌。这种现象不仅会扰乱经济秩序,而且还严重危害人们的身体健康。

目前,用于动物源性成分检测的分子生物学方法主要有基因芯片技术^[1]、常规 PCR^[2-3]、多重 PCR^[4-5]、荧光定量 PCR^[6-7]等,其中荧光定量 PCR 方法由于时效性和准确性两方面的优势,已逐渐取代了普通 PCR 技术,成为检测动物源性成分最常用的方法。但上述诊断方法有的花费时间较长,有的需要借助昂贵的精密仪器设备,都难以在实际生产中普及应用。

本研究根据线粒体细胞色素 C 氧化酶亚单位 I (*CoxI*) 基因上动物种间多态性的差异而进行肉种成分的鉴定。与传统 PCR 相比,该方法操作简便,试验仪器要求较低,在普通恒温水浴锅中反应 40 min 即可完成,而且可以通过在终产物中加入染料的方法直接用肉眼观察结果,能快速准确地鉴定出动物源性成分,具有广阔的应用前景。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样品来源

绵羊肉、猪肉、牛肉、鸡肉、鸭肉、狐狸肉均购自山东省某屠宰厂或动物医院。

1.1.2 主要仪器与试剂

Alphamager EC 型凝胶成像及分析系统(美国 Alpha Innotech)、PCR 仪(PTC-200 型,美国 Bio-RAD)、超微量分光光度计(NanoDrop-2000 型,美国 Thermo Scientific)、台式冷冻离心机、高通量组织破碎仪、电热恒温水浴锅。

Bst DNA 聚合酶(美国 NEB),SYBR GREEN I 核酸染料(北京 Solarbio 公司),DL2000 DNA Marker 购自大连宝生物工程有限公司,甜菜碱(betaine)和硫酸镁($MgSO_4$)等溶液均购自美国 Sigma。

1.2 方 法

1.2.1 引物设计与合成

从 GenBank 数据库中检索获得狐狸(AY598508.1)、牛(NC-006853.1)、猪(NC-012095.1)、山羊(NC-005044.2)和绵羊(NC-001941.1)种属特异性的 *CoxI* 基因序列,用 Lasergene 软件进行比对分析,挑选出合适的序列片

段(序列比对结果见图 1),利用在线软件 Primer Explore Version 4 进行环介导等温扩增(LAMP)引物的设计。引物由上海生工生物工程有限公司合成,引物序列见表 1。

		同源性百分比						
		1	2	3	4	5		
异 源 性	1	■	81.4	80.3	81.2	79.5	1	AY598508.1.seq
	2	21.7	■	90.9	86.5	82.9	2	NC-001941.1.seq
	3	23.3	9.9	■	85.8	82.3	3	NC-005044.2.seq
	4	22.0	15.3	16.4	■	80.9	4	NC-006853.1.seq
	5	24.2	19.6	20.4	22.3	■	5	NC-012095.1.seq
		1	2	3	4	5		

注:1 为狐狸(AY598508.1);2 为绵羊(NC-001941.1);3 为山羊(NC-005044.2);4 为牛(NC-006853.1);5 为猪(NC-012095.1)

图 1 序列比对结果

Figure 1 Sequence alignment results

表 1 检测狐狸源性成分的 LAMP 引物

Table 1 LAMP primers for the detection of fox-derived ingredients

引物	引物序列(5'-3')
F3	TCTCCAGCTATGCTGTGA
B3	GGTGTGATTTAGGGGTGAGC
FIP	AGGGACGAGTTGGCTAAAACGGCTTTATTTTCCTATTTCACGGTA
BIP	CGACTTCCACTACGTACTCTCAGGAGAATAAGGGGAATCACTG

1.2.2 样品前处理

将生鲜羊肉和生鲜狐狸肉按不同质量比例混合制备标准样品,用于确定样品中狐狸源性成分的最低检出限。

1.2.3 组织 DNA 的提取

准确称取 0.1 g 样品于 2 ml 离心管中,匀浆后加入 180 μ l 十二烷基磺酸钠和 20 μ l 蛋白酶 K,50 $^{\circ}$ C 恒温水浴锅中消化 3 h;12 000 r/min 离心 15 min 后取上清液,加入 200 μ l 的酚-氯仿(1:1, V/V),12 000 r/min 离心 15 min 后取上清液,加入 1/10 体积的乙酸钠(pH=5.2)及 200 μ l 的异丙醇,-20 $^{\circ}$ C 沉淀 30 min;12 000 r/min 离心 15 min 后弃上清液,加入 500 μ l 70% 的乙醇溶液,颠倒混匀,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清液;干燥后加 100 μ l 灭菌去离子水溶解,-20 $^{\circ}$ C 保存。用超微量分光光度计测定 DNA 浓度。

1.2.4 LAMP 体系建立

25 μ l 的 LAMP 反应体系中 F3/B3 为 0.2 μ mol/L, FIP/BIP 为 1.6 μ mol/L,dNTP 为 0.4 mmol/L, $MgSO_4$ 为 4 mmol/L,甜菜碱为 0.5 mol/L,*Bst* DNA 聚合酶 1 μ l,10 \times Thermopol buffer 2.5 μ l,模板 2 μ l,加双蒸水(ddH₂O)至 25 μ l。将反应液置于 200 μ l PCR 小管中,混匀,恒温水浴锅中反应 40 min。分别摸索内外引物浓度比和反应温度对检测效果的影响。

内外引物浓度比摸索:参照上述的 LAMP 反应体系,分别将内外引物比配成 6:1、8:1、10:1、12:1,

观察其最佳反应结果。

温度梯度试验:分别观察并记录反应体系在 60、62、64、66 °C 条件下的反应结果。

1.2.5 LAMP 特异性和灵敏性试验

分别以绵羊肉、鸡肉、鸭肉、猪肉、牛肉和狐狸肉作为模板,同时用水作阴性对照,采用已优化的反应体系和反应条件,检验所建立的 LAMP 方法的特异性。

为确定本方法的灵敏度,取绵羊肉和狐狸肉混合标准样品,其中狐狸肉的含量分别为 100%、10%、1%、0.1%。提取组织 DNA 后,用微量分光光度计测出所有样品的组织 DNA 浓度,随后对其进行 LAMP 检测分析。

1.2.6 样品检测

用建立的 LAMP 检测方法对市售的标称 100% 的绵羊肉卷进行狐狸源性成分检测。

2 结果与分析

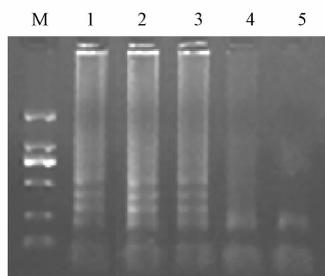
2.1 DNA 模板提取结果

对绵羊肉、猪肉、牛肉、鸡肉、鸭肉、狐狸肉以及按不同比例混合(绵羊肉和狐狸肉)制备的标准样品 DNA 提取结果表明,获得的 DNA 模板 $OD_{260/280}$ 值均在 1.8~2.0 之间,浓度介于 400~600 ng/μl。说明提取方法较为合适,提取的 DNA 纯度较好,浓度较高,适合后续的扩增反应。

2.2 LAMP 试验条件优化结果

2.2.1 内外引物浓度比的优化

试验结果显示,当内、外引物浓度之比为 8:1 时,LAMP 反应条带最亮,扩增最好,见图 2。



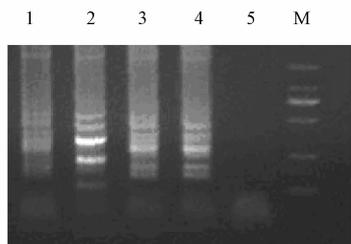
注:M 为 DL2000 bp DNA Marker;1 为 6:1; 2 为 8:1;3 为 10:1;4 为 12:1;5 为阴性对照
图 2 内外引物不同浓度比 LAMP 结果

Figure 2 LAMP results of different concentrations of internal and external primers

2.2.2 温度梯度试验

试验结果显示,在所确立的反应条件下,60~66 °C 水浴后 LAMP 反应出现特异的瀑布状条带,并且可以看出 64 °C 条件下条带最亮,见图 3。

2.3 特异性试验和灵敏度试验结果

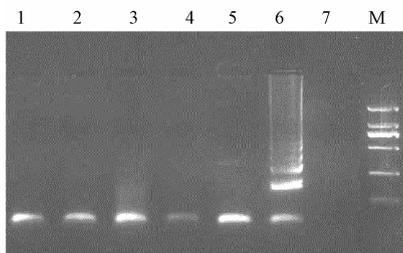


注:M 为 DL2000 bp DNA Marker;1 为 66 °C;2 为 64 °C; 3 为 62 °C;4 为 60 °C;5 为阴性对照

图 3 温度梯度试验结果

Figure 3 Temperature gradient test results

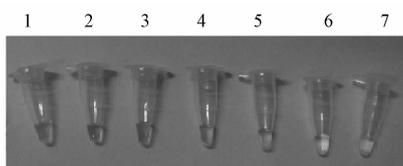
分别以提取的绵羊肉、猪肉、牛肉、鸡肉、鸭肉、狐狸肉的核酸为模板,进行 LAMP 检测,结果显示,以狐狸肉为模板的泳道出现明显的梯状条带,而其他样品均未出现该梯状条带(见图 4),表明该 LAMP 方法能特异地检测狐狸肉,按核酸染料说明书分别加入 1 μl 500 倍稀释的 SYBR GREEN I,仅狐狸肉变为绿色(见图 5)。



注:M 为 DL2000 bp DNA Marker;1 为绵羊肉;2 为猪肉; 3 为牛肉;4 为鸡肉;5 为鸭肉;6 为狐狸肉;7 为阴性对照

图 4 特异性试验电泳结果

Figure 4 Electrophoresis results of specificity test



注:1 为绵羊肉;2 为猪肉;3 为牛肉;4 为鸡肉;5 为鸭肉;6 为狐狸肉; 7 为阴性对照;因杂志为黑白印刷,未能体现实际结果,

实际结果为 6 号样品变为绿色

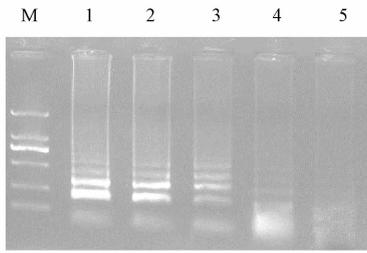
图 5 特异性试验可视化结果

Figure 5 Visualization results of specificity test

以不同质量比的混合肉 DNA 为模板,进行 LAMP 反应。由图 6 可见,LAMP 方法最低可以检测到 1.0% 狐狸源性成分,得知该方法的最低检测浓度为 2×10^{-4} ng/μl。

2.4 样品检测结果

采用本试验建立的方法对市场上销售的 40 份标称 100% 绵羊肉卷样品进行了检测分析。试验结果表明,有 2 份样品检测到了狐狸源性成分,掺假率为 5%。



注: M 为 DL2000 bp DNA Marker; 1 为 100%; 2 为 10%;
3 为 1.0%; 4 为 0.1%; 5 为 阴性对照

图 6 灵敏度试验结果

Figure 6 Sensitivity test results

3 讨论

动物的线粒体 DNA 为双链的闭合环状分子, 常被作为分子标记的靶基因来进行检测^[8]。目前, 研究较多的线粒体 DNA 基因有 18S rRNA、*Cytb*、*CoxI* 和 D-loop 区^[9]。本研究经序列比对后选用具有种间多态性的 *CoxI* 基因作为目的基因设计 LAMP 引物, 以确定羊肉制品中是否含有狐狸源性成分。结果表明, 针对 *CoxI* 基因序列设计的引物具有较好的特异性。

LAMP 检测技术是最近几年发展起来并逐步应用于实践中的新型等温核酸扩增方法^[10], 该技术克服了传统 PCR 技术需要通过反复热循环的缺点, 节约了反应时间; 又无需实时荧光定量 PCR 所需的较高仪器和试剂成本, 更因其具有操作简单、特异性强、结果直观等特点而被认可。

以往的研究结果显示: 猪、鸭源性成分为市售羊肉制品中最为常见的掺假成分^[11], 采用 LAMP 技术对食品中猪、鸭源性成分检测鉴别的研究已有报道^[12]。然而, 对于大家关注的羊肉中可能掺入狐狸等毛皮动物的研究报道较少。本研究建立了鉴别

绵羊肉中狐狸源性成分的 LAMP 检测方法, 可以快速、准确地检测出绵羊肉中最低含量为 1.0% (2×10^{-4} ng/ μ l) 的狐狸源性成分。因此, 建议相关监管部门从源头上加强监管力度, 保障食品安全。

参考文献

- [1] 石丰运, 缪建锟, 张利平, 等. 运用基因芯片技术检测牛、山羊、猪和鸡源性成分[J]. 生物工程学报, 2010, 26(6): 823-829.
- [2] 孙艳华, 张智禹, 牛晋阳, 等. PCR 法快速检测熟肉制品中肉类来源[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(5): 139-142.
- [3] 李林, 徐江涛, 张永强, 等. PCR 方法鉴别肉骨粉中的动物成份种类[J]. 中国动物检疫, 2004, 21(4): 29-31.
- [4] 曾少灵, 秦智锋, 阮周曦, 等. 多重实时荧光 PCR 检测牛、山羊和绵羊源性成分[J]. 生物工程学报, 2009, 25(1): 139-146.
- [5] 冯海永, 韩建林. 羊肉产品中若干动物源性成分的七重 PCR 检测技术应用研究[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(9): 85-90.
- [6] 赵新, 王永, 兰青阔, 等. 荧光定量 PCR 方法鉴别肉制品中羊源性成分[J]. 食品工业科技, 2015, 36(1): 299-302.
- [7] 赵冉, 蔡振鸿, 陈永锋. 动物产品及饲料中牛源和羊源性成分三重荧光 PCR 检测方法的建立[J]. 畜牧与兽医, 2012, 44(7): 18-22.
- [8] Momcilovic D, Rasooly A. Detection and analysis of animal materials in food and feed[J]. J Food Protect, 2000, 63(11): 1602-1609.
- [9] Sevilla R G, Diez A, Norén M, et al. Primers and polymerase chain reaction conditions for DNA barcoding teleost fish based on the mitochondrial cytochrome b and nuclear rhodopsin genes[J]. Mol Ecol Notes, 2007, 7(5): 730-734.
- [10] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucl Acids Res, 2000, 28(12): 63.
- [11] 李楠, 王佳慧, 沈青, 等. 北京地区牛、羊肉片中鸭、鸡、猪源性成分调查[J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(3): 227-232.
- [12] 李向丽, 刘垚, 谭贵良, 等. 基于 LAMP 法快速检测羊肉及其制品中的猪、鸭和羊源性成分[J]. 中国食品卫生杂志, 2015, 27(3): 247-252.

欢迎投稿《中国食品卫生杂志》网址: www.zgspws.com