

多重实时荧光 PCR 检测牛、山羊和绵羊源性成分

曾少灵, 秦智锋, 阮周曦, 花群义, 卢体康, 吕建强, 陈书琨, 曹琛福, 张彩虹, 孙洁, 陈兵, 吴绍精

深圳出入境检验检疫局, 深圳 518045

摘要: 根据牛、山羊和绵羊线粒体细胞色素 b 基因序列, 设计特异性引物和以不同荧光素标记的 Taqman 探针。通过对 PCR 反应体系和反应条件的优化筛选, 建立能同时鉴别牛、山羊和绵羊源性成分的多重实时荧光 PCR 方法。采用本文方法与国标 GB/T 20190-2006 方法分别对 17 种不同源性动物 DNA 和 200 份不同来源样品 DNA 进行牛羊源性成分检测, 数据显示两者检测结果符合率达 100%, 特异性相当。与国标方法相比, 本试验方法不需电泳、酶切和测序, 即可在一个 PCR 反应中同时鉴别检测牛、山羊和绵羊 3 种源性成分, 检测效率提高近 3 倍; 灵敏度更高, 比国标方法灵敏 10 倍; 适用性更广, 除了饲料, 还适用于肉品、奶品、生皮和动物油脂等动物产品的牛羊源性成分检测。

关键词: 细胞色素 b 基因, 多重实时荧光 PCR, 牛、山羊和绵羊源性成分

Multiplex fluorescent real-time PCR detection of bovine, goat and sheep derived materials in animal products

Shaoling Zeng, Zhifeng Qin, Zhouxi Ruan, Qunyi Hua, Tikang Lu, Jianqiang Lü, Shukun Chen, Chenfu Cao, Caihong Zhang, Jie Sun, Bing Chen, and Shaojing Wu

Shenzhen Entry-exit Inspection & Quarantine Bureau, Shenzhen 518045, China

Abstract: We designed the specific primers and TaqMan probes targeting cytochrome b genes of mitochondrial DNA from bovine, goat and sheep. We used different fluorescents to label the probes. After optimization of reaction conditions, we set up a multiplex fluorescent real-time PCR method to detect bovine, goat and sheep derived materials, simultaneously. We finished the detection tests of 17 kinds of animal DNA and 200 DNA samples from different sources with the developed method and the National Standard GB/T 20190Y-2006 routine PCR method. The coincidence rate of these two methods was 100%. Without electrophoresis or restriction digestion, the developed method could reduce the test time to one third as routine PCR and identify three kinds of animal derived materials including bovine, goat and sheep in one reaction. The developed method was approximately 10 times more sensitive than routine PCR, and was applicable to identifications of bovine, goat and sheep derived materials in feed stuff, meat, milk, pelt and grease, etc. The study showed that the developed real-time PCR method is a rapid, sensitive and efficacious detection assay for bovine, goat and sheep derived materials in animal products.

Keywords: cytochrome b gene, multiplex fluorescent real-time PCR, bovine, goat and sheep derived materials

Received: May 23, 2008; **Accepted:** November 13, 2008

Supported by: the Technology Project of Shenzhen Entry-exit Inspection & Quarantine Bureau (No. 2006SZK02), the Technology Project of Shenzhen Bureau of Science Technology & Information (No. SY200609110036B).

Corresponding author: Shaoling Zeng. Tel/Fax: +86-755-25588609; E-mail: zengshaoling@gmail.com

深圳出入境检验检疫局科技项目(No. 2006SZK02)和深圳市科技和信息局项目(No. SY200609110036B)资助。

随着国际贸易的飞速发展,防御国际间动物疫病传播的难度在加大。目前,为了防御疯牛病和痒病经饲料传播,检疫部门依据国家标准《饲料中牛羊源性成分的定性检测定性聚合酶链式反应(PCR)法》(GB/T 20190-2006)^[1]对进出口饲料进行牛羊源性成分检测。这是一般 PCR 方法,需对 PCR 产物进行凝胶电泳才能完成整个检测。一旦遇到可疑阳性结果,必须进行酶切鉴定,若要鉴定是山羊还是绵羊源性成分,还必须进行 DNA 测序。

而在生活用品中经常有牛、山羊或绵羊源性的优选性或价格差异等问题存在。例如,一般来说,羊肉比牛肉贵,羊奶比牛奶贵,而源自山羊或绵羊的肉品、奶品、皮张和毛绒纤维均有价格差异。随着改革开放的不断深入,我国牛羊产品的生产和流通已全部放开,在经济利益的驱使下,一些不法分子为牟取暴利,大肆掺杂使假,损害牛羊产品质量,破坏我国牛羊产品资源,也可能对我国出口的牛羊产品在国际市场上的声誉造成损害^[2,3]。要杜绝这些掺杂使假的现象,关键手段是要建立一种能快速准确鉴别牛、山羊和绵羊源性成分的检测方法,为上述产品的质量做本质上的把关,提高执法的科学性和高效性,进一步提高检验检疫通关速度^[4]。另一方面,很多饲料在加工过程中经过多次高温烘焙,其中 DNA 要受到影响而降解为许多仅有几百个碱基的小片段^[5],如果检测目的片段太大,可能在检测中无法发现阳性片段。而受电泳检测有效性的限制,一般 PCR 难以采纳小片段目的产物。因此,基于时效性和准确性上的优势,实时荧光 PCR 技术已经在动物源性成分检测的很多项目上逐步取代了一般 PCR 方法,成为检测动物源性成分最常用的分子生物学方法^[6]。

本研究根据用作动物品种鉴定标志的线粒体基因^[7-12],选取其中细胞色素 b 基因的保守区段,分别设计了针对牛、山羊和绵羊源性成分的引物与探针,分别以 FAM、ROX 和 HEX 荧光素进行标记,牛、山羊和绵羊源性成分的扩增目的片段大小分别为 92 bp、136 bp 和 136 bp,大小仅为国标方法目的片段的 1/2~1/3,成功建立了能同时检测牛、山羊和绵羊源性成分的多重实时荧光 PCR 方法,适用于饲料、肉品、奶品、生皮和动物油脂等动物产品的牛、山羊和绵羊源性成分的鉴定。

1 材料和方法

1.1 样品

DNA 样品来源于 17 种动物:牛肉、猪肉、狗肉、兔肉、鸡肉、鸭肉、鹅肉、鸽子肉、火鸡肉、鸵鸟肉和鱼肉购自深圳超市;山羊肉购自广东深圳和河南安阳两地超市;绵羊肉购自陕西西安和内蒙古呼和浩特两地超市;猫血在深圳一家宠物医院采集;马血、驴血和鹿血在甘肃兰州采集。

此外,200 份不同来源样品:本地收集的各种肉制品 40 份、奶品 10 份,福建、浙江等地的国产饲料 30 份,由美国、加拿大、日本、新加坡、马来西亚、法国、英国、西班牙等多个国家进口的肉骨粉、乳清粉、血粉、羽毛粉和各种饲料添加剂等饲料样品 76 份,动物生皮制品 5 份,进口宠物饲料 20 份,动物骨骼 5 份和进口猪油渣饲料 14 份。

1.2 试剂和仪器

细胞/组织基因组提取试剂盒和动物源性植物饲料基因组 DNA 提取试剂盒均购自广州英韦创津生物科技有限公司,为 TIANGEN 品牌。全血基因组提取试剂盒、Ex Taq DNA 聚合酶及反应缓冲液、dNTP、MgCl₂、DNA 分子量 Marker DL 2000、电泳上样缓冲液等 PCR 生化反应试剂购自宝生物工程(大连)有限公司。引物与探针由上海基康生物科技有限公司负责合成。DNA 测序由宝生物工程(大连)有限公司完成。

ABI 7500 荧光定量 PCR 仪为 ABI 公司产品,T-Gradient PCR 仪为 Biometra 公司产品,5415 R 型高速离心机为 Eppendorf 公司产品,BTS-20.M 凝胶成像仪为 UVITec 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 引物与探针的设计

从 GenBank 上提取包括牛羊在内的种属相关的动物线粒体基因序列,排序分析后选定鉴别序列位置,充分考虑引物与探针之间的二级结构关系,进行 Blaster 分析确保引物与探针的特异性。设计一对引物扩增牛 DNA,一对通用引物扩增山羊和绵羊 DNA,设计 3 条探针分别针对牛、山羊和绵羊,以不同荧光素标记,保证探针退火温度至少比引物高 5°C,各条引物之间或各条探针之间的退火温度相差不超过 2°C。

1.3.2 样品 DNA 的提取

血粉和全血样品依照全血基因组提取试剂盒中的操作说明提取 DNA。肉品、动物源性饲料及饲料添加剂、奶品、生皮、骨骼等样品按照细胞/组织-基因组提取试剂盒中的操作说明提取 DNA。植物性饲料及饲料添加剂按动物源性植物饲料基因组 DNA 提取试剂盒中的操作说明提取 DNA。猪油渣等油脂类样品按文献[13]的方法提取 DNA。

1.3.3 单一荧光 PCR 方法的建立

引物与探针分组配对, 对牛、山羊、绵羊、鹿、马、驴、猪、猫、狗、兔、鱼、鸡、鸭、鹅、鸽子、火鸡和鸵鸟共 17 种不同动物 DNA 进行检测, 验证引物与探针的扩增有效性和特异性, 建立分别检测牛、山羊和绵羊源性成分的单一荧光 PCR 方法。将 DNA 模板分别为牛、山羊和绵羊的荧光 PCR 阳性扩增产物送宝生物(大连)有限公司进行 DNA 克隆测序, 分析比对序列, 确定阳性扩增产物是否为目的源性成分。

1.3.4 引物、探针、dNTP、Mg²⁺浓度、Taq 酶用量和反应条件的优化

分别以牛、山羊和绵羊为研究对象, 反应体系设定为 50 μL , 筛选引物、探针、dNTP 和 Mg²⁺的最佳浓度。引物浓度由 0.25 $\mu\text{mol/L}$ ~0.6 $\mu\text{mol/L}$ 以 0.05 $\mu\text{mol/L}$ 递增, 探针浓度由 0.1 $\mu\text{mol/L}$ ~0.45 $\mu\text{mol/L}$ 以 0.05 $\mu\text{mol/L}$ 递增, dNTP 浓度由 0.075 mmol/L ~0.25 mmol/L 以 0.025 mmol/L 递增, Mg²⁺浓度由 0.75 mmol/L~2.5 mmol/L 以 0.25 mmol/L 递增。Taq 酶用量以单位 U 计算, 由 1 U~5 U 以 0.5 U 递增。每次试验采用等量模板和只设一个变量, 以 Ct 值、荧光增量和平台期等因素为考察依据, 每个成分的浓度筛选重复实验 3 次, 若结果稳定, 可确定为最佳浓度值。根据引物与探针的退火温度, 以优化好的反应体系摸索 PCR 最佳反应条件, 在“95°C 1~12 min; 95°C 15~30 s, 55°C~63°C 35~60 s 35~45 个循环”的范围内反复进行试验, 每次试验采用等量模板, 每个反应条件重复试验 3 次, 以 Ct 值、荧光增量、平台期和耗时等因素为考察依据, 确定最佳反应条件。

1.3.5 单一荧光 PCR 检测方法的相对灵敏度实验

将提取的牛、山羊和绵羊来源的 DNA 模板原液进行梯度稀释, 即 10⁰、10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵,

10⁻⁶、10⁻⁷ 等 8 个梯度, 以 1.3.4 优化好的反应体系和反应条件, 分别进行牛、山羊和绵羊源性成分的荧光 PCR 检测、溶解曲线检测和 PCR 产物电泳检测。然后各取一份使用国标 GB/T 20190Y-2006 方法进行牛羊源性成分的 PCR 检测, 电泳后观察结果。以上每组检测必须重复 5 次, 每个检测设置 2 个平行试验, 只有当每种方法的 5 次重复试验与所有平行试验结果都一致时, 才确定为该方法能检测到的最低模板梯度。此时, 比较 2 种方法能检测到的最低模板梯度, 完成相对灵敏度分析^[14]。

1.3.6 多重实时荧光 PCR 方法的建立

2 对引物和 3 条探针组合起来, 模板采用等比例混合的牛、山羊和绵羊 DNA 原液, 参照方法 1.3.4 对多重实时荧光 PCR 反应体系中的引物、探针、dNTP、Mg²⁺浓度、Taq 酶用量和反应条件进行优化^[15,16], 并完成溶解曲线检测。

1.3.7 多重实时荧光 PCR 方法的特异性和相对灵敏度实验

对 17 种动物 DNA 以及牛、山羊和绵羊 DNA 模板原液的等比例混合样进行多重实时荧光 PCR 检测, 考察检测方法的特异性。依照方法 1.3.5, 分别利用多重实时荧光 PCR 方法和国标 GB/T 20190Y-2006 方法对牛、山羊和绵羊的梯度模板液进行检测, 比较 2 种方法能检测到的最低模板梯度, 完成相对灵敏度分析。

1.3.8 样品检测

分别采用多重实时荧光 PCR 方法和国标 GB/T 20190Y-2006 方法对 200 份不同来源的 DNA 样品进行牛羊源性成分检测, 进一步验证多重荧光 PCR 方法的特异性。在每一个检测试验中采用同管等量的 DNA 模板, 每份 DNA 样品的每种方法检测必须重复 2 次, 每次均设置 2 个平行试验, 只有当每种方法的 2 次重复试验与所有平行试验结果都一致时, 才确定该份 DNA 样品的检测结果, 否则需重新进行检测。最后, 分别比对 2 种方法对每一份 DNA 样品的检测结果是否一致, 计算 2 种方法的检测结果符合率。

2 结果

2.1 单一荧光 PCR 检测方法的建立

设计一对引物 B-F 和 B-R 扩增牛 DNA, 一对通用引物 G-O-F 和 G-O-R 扩增山羊和绵羊 DNA, 各条

引物的退火温度介于 55°C~56°C 之间; 探针 B-probe (牛)以 FAM 标记, G-probe(山羊)以 ROX 标记, O-probe (绵羊)以 HEX 标记, 各条探针的退火温度介于 70°C~72°C 之间; 牛、山羊和绵羊 DNA 扩增的目的片段大小分别为 92 bp、136 bp 和 136 bp。3 种单一荧光 PCR 方法对 17 种不同动物 DNA 的检测结果表明方法的特异性良好, 不存在交叉反应。DNA 测序

结果表明, 荧光 PCR 阳性扩增产物的序列分别与预期序列一致, 分别确定为牛、山羊和绵羊源性成分。

2.2 引物、探针、dNTP、Mg²⁺浓度、Taq 酶用量和反应条件的优化

经筛选分别确定了 3 种单一荧光 PCR 的反应体系(50 μL)和反应条件, 各成分浓度、Taq 酶用量和反应条件见表 1。

表 1 优化后的牛/山羊/绵羊源性成分单一荧光 PCR 反应体系(50 μL)和反应条件

Table 1 The optimized reaction system and program of single fluorescence real-time PCR detection for bovine, goat or sheep-derived materials (50 μL)

Animal derived	Primer (μmol/L)	Probe (μmol/L)	dNTP (mmol/L)	Mg ²⁺ (mmol/L)	Taq enzyme dosage(U)	PCR program
Bovine derived	0.55	0.45	0.175	1.75	3.5	95°C 2 min, 40 cycles of 95°C 15 s and 60°C 35 s
Goat derived	0.45	0.35	0.175	2.25	4.0	95°C 2 min, 40 cycles of 95°C 20 s and 60°C 40 s
Sheep derived	0.45	0.40	0.175	2.25	4.0	95°C 2 min, 40 cycles of 95°C 20 s and 58°C 40 s

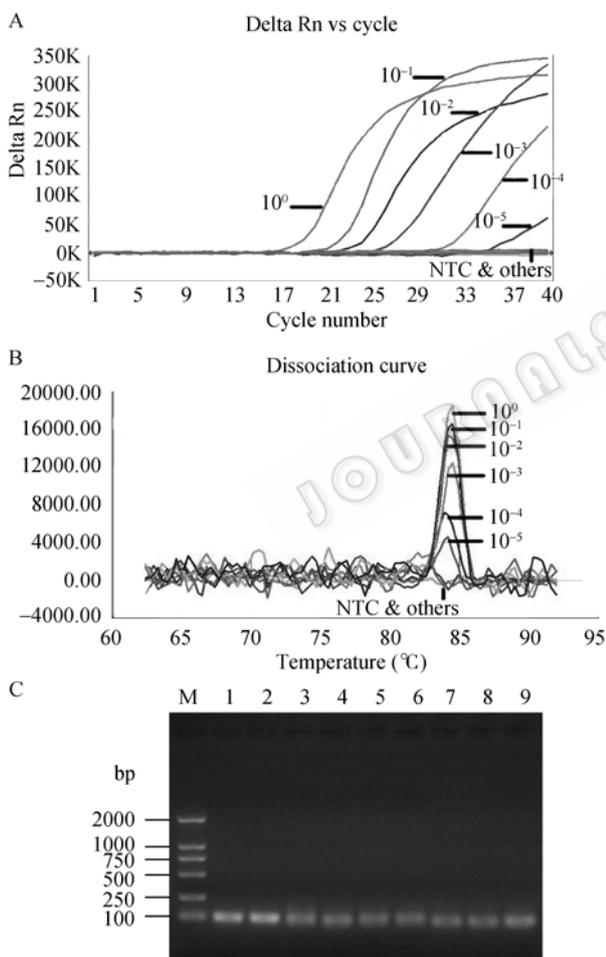


图 1 牛源性成分荧光 PCR(A)、溶解曲线(B)和电泳(C)检测的灵敏度试验结果

Fig. 1 Results of sensitivity tests of fluorescent real-time PCR (A), dissociation (B) and electrophoresis (C) detection for bovine derived materials. M: DL 2000 DNA marker; 1-8: template dilution of 10⁰, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷; 9: negative control (NTC).

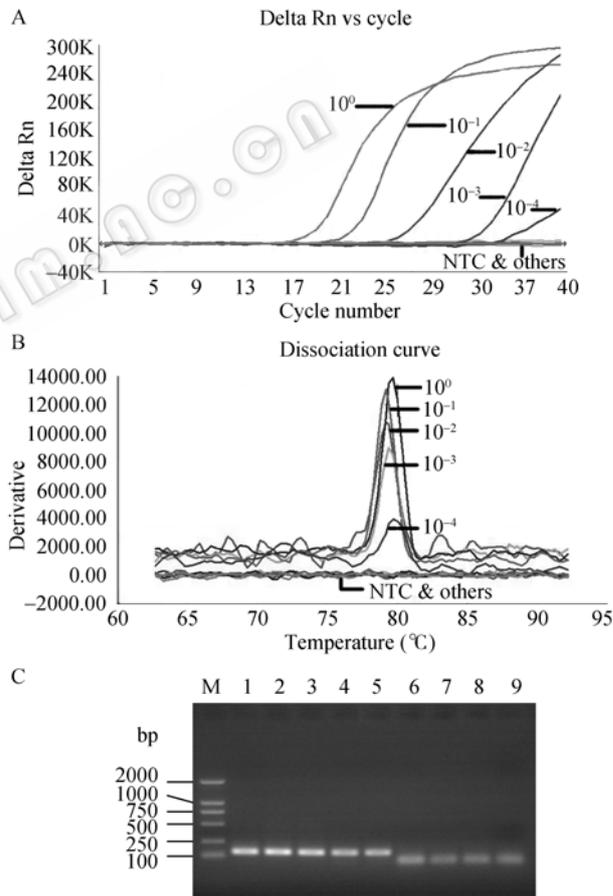


图 2 山羊源性成分荧光 PCR (A)、溶解曲线(B)和电泳(C)检测的灵敏度试验结果

Fig. 2 Results of sensitivity tests of fluorescent real-time PCR (A), dissociation (B) and electrophoresis (C) detection for goat derived materials. M: DL 2000 DNA marker; 1-8: template dilution of 10⁰, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷; 9: NTC.

2.3 单一荧光 PCR 检测方法的相对灵敏度实验

按方法 1.3.5, 经多次试验后, 确定牛、山羊和绵羊源性成分单一荧光 PCR 的最低检测限分别达到 10^{-5} 、 10^{-4} 和 10^{-4} 模板梯度, 荧光 PCR、溶解曲线和 PCR 产物电泳等检测结果分别如图 1 (A、B、C), 图 2 (A、B、C) 和图 3 (A、B、C)。按方法 1.3.5, 经多次试验后, 确定国标 GB/T 20190Y-2006 方法进行牛、羊(山羊和绵羊)源性成分 PCR 的最低检测限分别达到 10^{-4} 、 10^{-3} 和 10^{-3} (图 4~6)。灵敏度比对试验结果表明, 本研究采用的荧光 PCR 方法比国标方法灵敏约 10 倍。

2.4 多重实时荧光 PCR 方法的建立

经筛选优化, 确定 50 μ L 反应体系中各成分的终浓度分别为: $1 \times$ Ex Taq 酶反应缓冲液, dNTP 为 0.25 mmol/L, MgCl₂ 为 2.5 mmol/L, 引物 B-F、B-R、

G-O-F 和 G-O-R 均为 0.4 μ mol/L, 牛探针 B-probe 为 0.3 μ mol/L, 山羊探针 G-probe 为 0.3 μ mol/L, 绵羊探针 Ovi-probe 为 0.2 μ mol/L, Ex Taq 酶 5 U。优化后确定的反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 2 min, 40 个循环的 95 $^{\circ}$ C 15 s 和 58 $^{\circ}$ C 40 s, 总耗时大约 75 min。对 17 种动物 DNA 模板分别进行多重实时荧光 PCR 检测, 能特异性地检测出牛、山羊和绵羊 DNA, 与其他 14 种动物 DNA 无交叉反应 (图 7)。对牛、山羊和绵羊 DNA 原液的等比例混合模板进行多重实时荧光 PCR 检测, 能同时检测出 3 种动物 DNA (图 8)。分别对牛、山羊、绵羊 DNA 和三者 DNA 的等比例混合模板的多重实时荧光 PCR 产物进行溶解曲线检测, 结果显示, 3 种单一 DNA 模板的 PCR 产物的溶解温度很接近, 介于 79.4 $^{\circ}$ C~82.1 $^{\circ}$ C 之间, 混合模板的 PCR 产物的溶解曲线积累显示为一个峰 (图 9)。

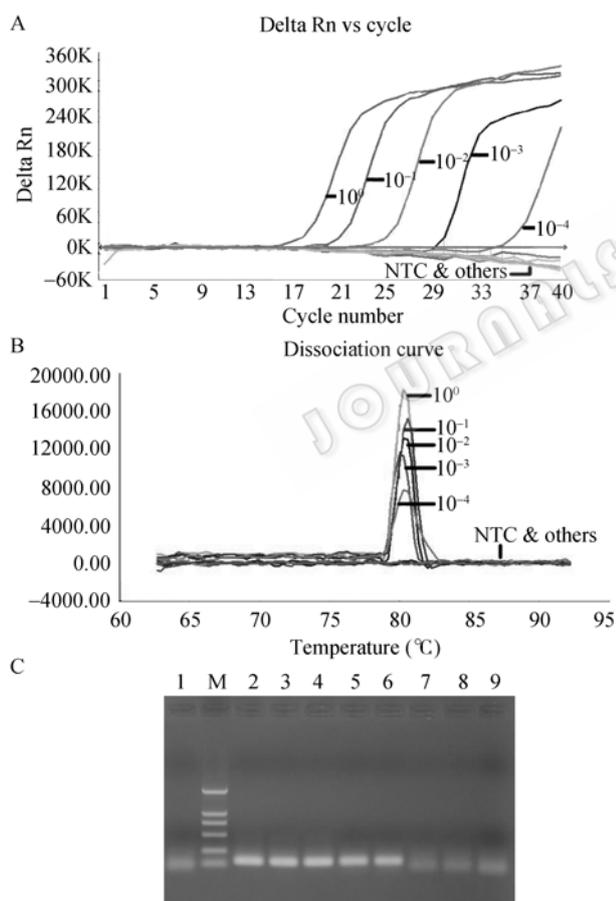


图 3 绵羊源性成分荧光 PCR(A)、溶解曲线(B)和电泳(C)检测的灵敏度试验结果

Fig. 3 Results of sensitivity tests of fluorescent real-time PCR (A), dissociation curve (B) and electrophoresis (C) detection for sheep derived materials. M: DL 2000 DNA marker; 1: NTC; 2-9: template dilution of 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} .

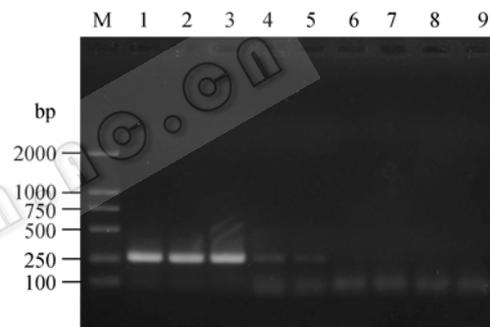


图 4 GB/T 20190Y-2006 牛源性成分 PCR 检测的灵敏度试验结果

Fig. 4 Results of sensitivity tests of GB/T 20190Y-2006 method detection for bovine derived materials. M: DL 2000 DNA Marker; 1-8: template dilution of 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} ; 9: NTC.

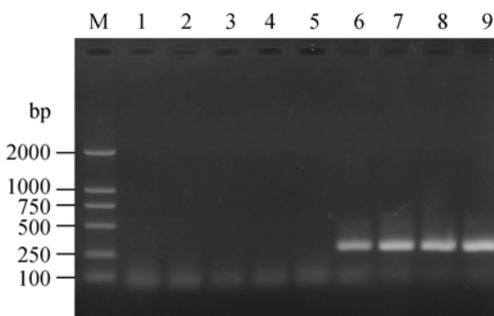


图 5 GB/T 20190Y-2006 羊源性成分 PCR 检测对山羊 DNA 的灵敏度试验结果

Fig. 5 Results of sensitivity tests of GB/T 20190Y-2006 method detection for goat derived materials. M: DL 2000 DNA Marker; 1: NTC; 2-9: template dilution of 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} , 10^0 .

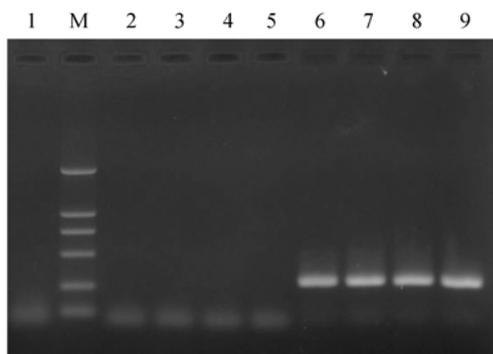


图 6 GB/T 20190Y-2006 羊源性成分 PCR 检测对绵羊 DNA 的灵敏度试验结果

Fig. 6 Results of sensitivity tests of GB/T 20190Y-2006 method detection for sheep derived materials. M: DL 2 000 DNA marker; 1: NTC; 2-9: template dilution of 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} , 10^0 .

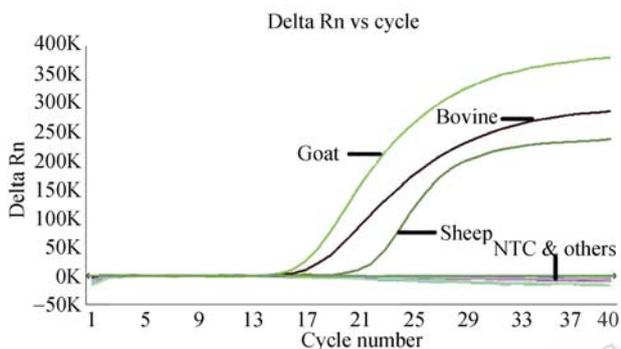


图 7 17 种动物 DNA 的多重实时荧光 PCR 检测结果
Fig. 7 Results of multiplex fluorescent real-time PCR detection for DNA samples from 17 animals.

2.5 多重实时荧光 PCR 方法的相对灵敏度实验

按方法 1.3.5 和 1.3.7, 经多次试验后, 确定多重实时荧光 PCR 方法对牛、山羊和绵羊源性成分的最低检测限分别达到 10^{-5} 、 10^{-4} 和 10^{-4} 模板梯度, 与单一荧光 PCR 检测低限一致, 比国标方法大约灵敏 10 倍。

2.6 样品检测结果

按方法 1.3.8, 分别采用多重实时荧光 PCR 方法和国标方法对本室收集的 200 份不同来源 DNA 样品进行牛羊源性成分检测。检测结果表明, 多重实时荧光 PCR 方法具有良好的特异性, 与国标方法的检测结果符合率为 100%, 未出现假阳性或假阴性结果, 两种方法的检测结果比对见表 2。

3 讨论

当前, 动物源性成分检测受到越来越多的关注, 已广泛应用到饲料、加工食品和皮革等多个领域。

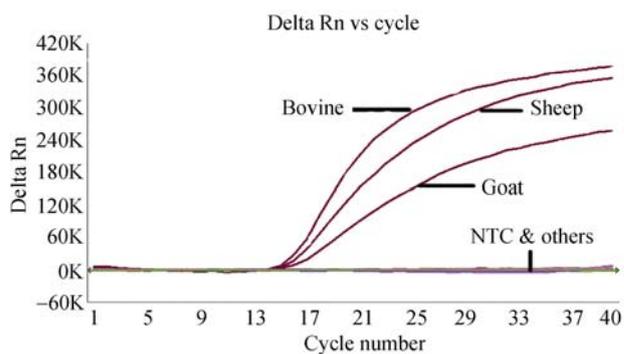


图 8 牛、山羊和绵羊三种 DNA 混合模板液的多重实时荧光 PCR 检测结果

Fig. 8 Results of multiplex fluorescent real-time PCR detection for mix-template of DNA from bovine, goat and sheep.

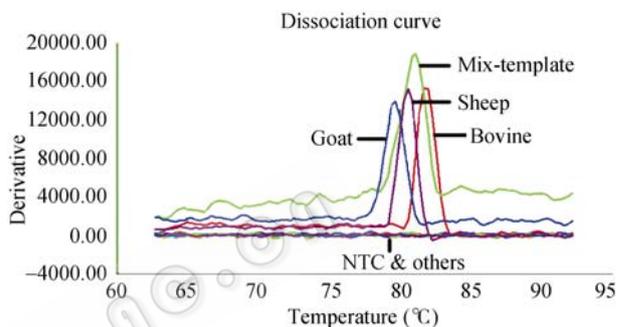


图 9 牛、山羊、绵羊 DNA 和 3 种 DNA 混合模板的多重实时荧光 PCR 产物溶解曲线检测结果

Fig. 9 Results of dissociation test of multiplex fluorescent real-time PCR products from bovine, goat, sheep and their mix-template DNA.

我国检验检疫部门主要对进出口饲料进行牛羊源性成分检测, 目的是防止疯牛病、痒病等动物性疾病通过贸易途径传入我国, 而一些国家甚至还颁布法规禁止在反刍类动物饲料中添加和使用任何动物源性饲料^[17]。但在日常生活中, 其实很多消费者都对一些生活品的动物源性成分表示关心。例如, 目前市场上广泛宣传羊奶比牛奶营养价值高, 特别是孕妇喝羊奶对胎儿发育有良好作用, 市面上纷纷涌现专业供应羊奶的订购点, 还声称采用高新技术去除了羊奶腥味, 口感更好, 不过价格比牛奶要贵 1~2 倍。一些加工肉制品, 如肉干、肉肠和肉丸等, 由于添加了大量香料, 消费者进食时很难分辨是否为某种肉类制品, 而不同肉类制品的价格差异又很大, 如果缺乏相关的检验监管, 不法商人就有鱼目混珠的机会。

利用本研究建立的多重实时荧光 PCR 方法和国

表 2 多重实时荧光 PCR 方法和 GB/T 20190Y-2006 方法的样品检测比对结果

Table 2 Comparison of results detected by multiplex fluorescent real-time PCR and GB/T 20190Y-2006 method

Test method	Kinds of animal source	Feed	Meat	Milk	Pelt	Others	Total	Total
Multiplex fluorescent real-time PCR	Bovine-derived	45	15	9	1	3	73	73
	Goat derived	2	5	0	2	2	11	26
	Sheep derived	10	4	0	1	0	15	
	Negative	49	16	1	1	34	101	101
GB/T 20190Y-2006	Bovine derived	45	15	9	1	3	73	73
	Goat/sheep derived	12	9	0	3	2	26	26
	Negative	49	16	1	1	34	101	101

标 GB/T 20190Y-2006 方法, 对本研究收集的 200 份不同来源样品进行牛羊源性成分检测, 两者的检测结果一致, 没有出现假阳性或假阴性结果, 检测符合率达 100%。其中, 购买的 10 份奶品中有鲜牛奶 3 份、鲜羊奶 3 份、牛奶饮品 2 份和羊奶饮品 2 份, 但检测后发现没有任何一份样品中含有山羊或绵羊源性成分, 其中 9 份样品含牛源性成分, 1 份样品无任何牛或羊源性成分, 检测结果与产品宣传相差甚远, 情况令人担忧。收集的 5 份牛羊生皮样品中, 经检测只有 1 份牛皮和 2 份山羊皮与商品名相符, 1 份商品名为山羊皮的检测结果为绵羊源性, 1 份生皮样品不含任何牛羊源性成分, 是假冒商品。从本地 6 家专营东山羊火锅或烤肉的食店收集山羊肉, 经检测仅有 3 家羊肉为山羊源性, 另外 3 家羊肉均为绵羊源性, 表明某些食店存在以绵羊肉替代山羊肉欺骗消费者的情况。鉴于山羊奶比牛奶贵, 山羊肉比绵羊肉贵, 而羊皮又以山羊皮为好且价格较高, 一些商家经常掺杂使假谋取暴利。通过多重实时荧光 PCR 方法的检测, 可快速有效地鉴别牛、山羊和绵羊源性成分, 杜绝这些不法行为。此外, 对本室自 2003 年至今收集的 106 份进口饲料进行检测, 其中从 12 份牛肉骨粉中检测到 2 份山羊源性成分和 10 份绵羊源性成分, 说明在一些进口牛肉骨粉中还不同程度地掺入了山羊或绵羊组织, 而这些都是疯牛病和痒病传播的高风险物质, 应当引起检疫部门的高度重视。

本研究建立的多重实时荧光 PCR 方法, 通过特异性探针在进行 PCR 过程中检测荧光增量得知检测结果, 能在一个 PCR 反应中同时检测出牛、山羊和绵羊源性成分。对 17 种不同动物 DNA 样品和 200 份不同来源 DNA 样品进行多重实时荧光 PCR 和国

标 GB/T 20190Y-2006 一般 PCR 检测, 实验结果表明, 与国标方法相比, 多重实时荧光 PCR 检测方法具有以下优势: 1) 将 PCR 检测周期从至少 4 h 减少到 1 h 左右, 检测效率提高近 3 倍, 免去了一般 PCR 检测鉴定可疑阳性样品必须进行的酶切、电泳和 DNA 测序等步骤; 2) 除了能特异性鉴定检测出牛羊源性成分, 还能同时区分山羊和绵羊源性成分; 3) 相对灵敏度试验结果表明, 检测灵敏度比国标方法大约高出 10 倍; 4) 实用性更广, 不仅适用于饲料样品的检测, 还适用于肉品、奶品、生皮和动物油脂等多种动物产品的牛、山羊和绵羊源性成分检测, 是防止商家掺假牟利的有效手段。

REFERENCES

- [1] 国家标准 GB/T 20190-2006《饲料中牛羊源性成分的定性检测定性聚合酶链式反应(PCR)法》.
- [2] Li S, Wang JH, Gao JX, *et al.* Detection of cattle and sheep-derived materials in feed products of ruminant feed and animal-derived feed in shaanxi province. *Prog Vet Med*, 2007, **28**(4): 34-38.
李胜, 王建华, 高巨星, 等. 陕西省反刍动物饲料产品和动物源性饲料中牛羊源性成分检测. *动物医学进展*, 2007, **28**(4): 34-38.
- [3] <http://www.xfzj.gov.cn/dispnews.asp?id=1220>.
- [4] http://www.stcity.cn/kpjs/kpjsyryhb/200803/t20080303_9100.htm.
- [5] Ebbehøj EF, Thomsen PD. Species differentiation of heated meat products by DNA hybridization. *Meat Sci*, 1990, **30**(3): 221-234.
- [6] Liu XH, Ma GP, Shi XJ, *et al.* Advance in the detection methods of commercial animal-derived materials. *Prog Vet Med*, 2007, **28**(10): 91-94.
刘旭辉, 马贵平, 史喜菊, 等. 商品中动物源性成分检测方法的研究进展. *动物医学进展*, 2007, **28**(10): 91-94.

- [7] Luo JQ, Wang JQ, Bu DP, *et al.* Development and application of a PCR detection of bovine, sheep, pig and chicken derived materials in feedstuff. *Sci Agric Sin*, 2008, **41**(7): 2112–2119.
罗家琴, 王加启, 卜登攀, 等. 饲料中牛、羊、猪、鸡源性成分的 PCR 检测方法及其应用. 中国农业科学, 2008, **41**(7): 2112–2119.
- [8] Feng XY, Dong HX, Wei XL, *et al.* Test methods for detection of bovine and sheep/goat derived materials in animal-derived feedstuff. *Feed Res*, 2006, **11**: 52–54.
冯秀燕, 董红霞, 魏秀莲, 等. 动物源饲料中牛源和羊源性成分的检测方法. 饲料研究, 2006, **11**: 52–54.
- [9] Wen WG, Cui JX, Zhao XL. Identification of bovine and sheep derived materials in feedstuff by semi-nested PCR. *J Agric Biotechnol*, 2006, **14** (2): 183–186.
闻伟刚, 崔俊霞, 赵秀玲. Semi-nested PCR 检测饲料中牛羊源成分. 农业生物技术学报, 2006, **14** (2): 183–186.
- [10] Cao JJ, Lu XA, Qin C, *et al.* Real-time fluorescence PCR detection of bovine and sheep/goat materials in animal feedstuffs. *Lett Biotechnol*, 2002, **13**(2): 158–161.
曹际娟, 卢行安, 秦成, 等. 实时荧光 PCR 技术检测肉骨粉中牛羊源性成分的方法. 生物技术通讯, 2002, **13**(2): 158–161.
- [11] Lahiff S, Glennon M, O'Brien L, *et al.* Species-specific PCR for the identification of ovine, porcine and chicken species in meat and bone meal (MBM). *Mol Cell Probes*, 2001, **15**(1): 27–35.
- [12] Colgan S, O'Brien L, Maher M, *et al.* Development of a DNA-based assay for species identification in meat and bone meal. *Food Res Int*, 2001, **34**(5): 409–414.
- [13] Shao BY, Zhang TY, Li ZF, *et al.* The DNA extraction and detection of bovine, sheep and goat derived material with PCR in animal oil. *Chin J Vet Sci*, 2006, **26**(3): 300–302.
邵碧英, 张体银, 李志方, 等. 动物油脂中 DNA 的提取及牛、羊源性成分的 PCR 检测. 中国兽医学报, 2006, **26**(3): 300–302.
- [14] Jin LY, Gu X, Cai JH, *et al.* Sensitivity of two methods for detection of bovine and sheep/goat derived materials in feedstuff. *Feed Res*, 2008, **1**: 43–46.
金陵艳, 顾欣, 蔡金华, 等. 2 种 PCR 方法检测饲料中牛和羊源性成分灵敏度. 饲料研究, 2008, **1**: 43–46.
- [15] Peng YZ, Jia H, Zou H, *et al.* Study on the detection of four intestinal bacteria by using quantitative multi-link real-time PCR. *Chin Trop Med*, 2005, **5**(5): 943–947.
彭雁忠, 贾宏, 邹虹, 等. 多联实时荧光 PCR 定量方法检测四种肠道细菌的研究. 中国热带医学, 2005, **5**(5): 943–947.
- [16] Qin ZF, Lü JQ, Xiao XL, *et al.* Development of a multiplex real-time reverse transcriptase PCR assay for simultaneous identification of avian H5, H7 and H9 hemagglutinin subtypes. *Chin J virol*, 2006, **22**(2): 131–136.
秦智锋, 吕建强, 肖性龙, 等. 禽流感 H5、H7、H9 亚型多重实时荧光 RT-PCR 检测方法的建立. 病毒学报, 2006, **22**(2): 131–136.
- [17] 《动物源性饲料安全卫生管理办法》. http://www.askedu.com/cn/info/info_2_arc59859.htm.

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

狂犬病预防控制指南

吴疆 主编 张雪春 卢莉 执行主编

978-7-03-023424-7 ¥25.00 2008年12月出版

内容简介

本书是一本面向广大基层医务人员和普通读者的狂犬病知识基础读物。全书从狂犬病的流行病学、疫苗学、临床医学、预防医学及政策管理等 9 章, 对狂犬病的预防、治疗、管理等进行了分述。本书作者大多是我国从事专业狂犬病预防、临床治疗和疫苗鉴定的权威专家。本书语言简洁明了, 通俗易懂, 不失为一本广大读者日常生活中有价值的工具书。

