

PCR检测饲料中牛源组织成分的研究

钟伟军, 陈金顶

(华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要: 为从动物饲料中快速检测所含牛源组织成分以有效防止疯牛病传人, 根据牛线粒体基因核苷酸序列设计1对引物, 应用Chelex法分离饲料中牛源组织成分的DNA. 对分离的DNA进行PCR扩增、基因克隆及核苷酸序列分析, 并建立饲料中牛源组织成分的PCR检测方法. 用建立的PCR方法对羊、猪、鸡、兔和鱼组织基因组DNA进行扩增, 均无特异条带; 将牛组织基因组DNA倍比稀释, 分别对各个稀释度的DNA进行PCR扩增, 结果表明, 该方法对牛组织DNA检测的敏感度可达25.2 pg/ μ L. 用该研究建立的方法对含不同量牛肉粉的鱼粉进行检测, 其最小检测量达0.05% (质量分数), 整个过程约需3 h.

关键词: 饲料; 牛源组织; PCR检测

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1001-411X(2006)03-0085-04

Detection of Bovine-Derived Materials in Feedstuff by PCR Assay

ZHONG Wei-jun, CHEN Jin-ding

(College of Veterinary Medicine, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: In order to prevent from spreading of bovine spongiform encephalopathy in China caused by imported food and animal feeds especially meat and bone meals, it is necessary to prohibit importation of animal feed containing bovine-derived materials and establish method for detection and identification of bovine-derived materials in feedstuff. Feedstuff which contains bovine-derived materials was treated with Chelex-100 and genome DNA was extracted. A 271 bp sequence from bovine specific mitochondrial DNA was amplified. The amplified specific sequence of the bovine mtDNA from bovine-derived materials was demonstrated by cloning and sequencing. This method can detect bovine mtDNA of less than 25.2 pg/ μ L of genome DNA, and less than 0.05% (w) of bovine meat, and the whole process only took 3 h.

Key words: feedstuff; bovine-derived materials; PCR detection

牛海绵状脑病 (bovine spongiform encephalopathy, BSE) 又称疯牛病, 是牛的一种致命性、渐进性的神经系统的疾病, BSE 可以通过食物传染人, 使人患上一种致命的中枢神经紊乱疾病——新型变异型克雅病 (new variant Creutzfeldt-Jakob disease, vCJD)^[1]. 目前认为, 疯牛病的传播是由于给动物饲喂了感染动物的肉骨粉而造成的, 禁止使用含牛肉骨粉的饲料是控制疯牛病传播的重要措施. 欧盟自2001年1月已禁用以牛肉和牛骨粉制成的动物饲料. 2001年3月我国农业部、对外贸易经济合作部和出入境检验检疫局联合下发禁止直接或间接从发生疯牛病的国

家或地区进口动物源性饲料及制品和禁用一切以动物(牛)肉骨粉制成的饲料的通知. 目前有些饲料生产者为了降低饲料成本, 追求暴利, 仍在饲料加工过程中乱加一些除鱼粉之外的动物(牛)肉骨粉, 人为地形成随食物链传播疯牛病和其他疫病的条件, 严重危害畜牧业和人类健康. 为了从源头上预防和控制疯牛病及其他疫病通过饲料、食物链及其他方式传入和传播, 除了要禁止一切动物(牛)肉骨粉混于饲料作为动物的食源之外, 为防止反刍动物肉骨粉混合于其他饲料或这类饲料通过其他方式变相输入我国, 有必要建立快速检测反刍动物组织的可靠技术,

收稿日期: 2006-01-16

作者简介: 钟伟军 (1978-), 男, 硕士研究生; 通讯作者: 陈金顶 (1964-), 男, 教授, 博士, E-mail: jdchen@scau.edu.cn

基金项目: 广东省科技计划项目 (2003B21408)

这对于形成完善的动物性食品安全控制体系与控制畜禽重大疫病的传播,保证畜牧业的可持续发展具有重要意义。目前检测动物组织成分的主要方法有显微镜观察法、ELISA法和PCR方法^[2-3]。由于PCR方法具有快速、灵敏、特异性高的特点,目前,采用PCR方法检测动物组织成分已非常普遍。本研究对动物源性组织DNA分离方法和引物等进行优化,并进行实际检测,建立了一套切实可行的检测饲料中牛源组织成分的方法。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

Chelex-100为北京欣经科生物技术有限公司产品;全血基因组抽提试剂盒为华美生物公司产品;TritonX-100为Sigma生物公司产品;EX-Taq酶、DNA marker DL2000、蛋白酶K和pMD18-T载体为大连宝生物工程有限公司产品;琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒、质粒抽提试剂盒为OMEGA生物公司产品。

牛肉干购自某超市,鱼粉购自某饲料店,各种动物的血液样品包括牛血(黄牛)、绵羊血、山羊血、猪血、鸡血、兔血以及鱼血均采自实验动物。

1.2 PCR引物的设计

参照Tartagile等^[4]发表的序列设计1对引物,所针对的特异性序列是牛线粒体DNA(mtDNA)中D-loop区域内的编码部分tRNA^{lys}、全部ATP酶8亚单位和部分6亚单位的DNA片段,该对引物扩增片段大小约为271 bp,序列分别如下:P1:5'-GC-CATATACTCTCCTTGGTGACA-3',P2:5'-GTAGGCTT-GGGAATAGTACGA-3'。

1.3 样品处理及DNA的制备

牛肉干中DNA的抽提:(1)将少许牛肉干磨成粉末状后称取0.1 g,用0.5 mL灭菌双蒸水稀释,加入0.1 g的Chelex-100后,再加入TritonX-100使其最终质量分数为1.0%,震荡混匀;(2)56℃水浴30 min,震荡混匀;(3)100℃水浴8 min,震荡混匀;(4)12 000 r/min离心5 min。取上清液250 μL,再分别加入灭菌双蒸水250 μL、蛋白酶K(终质量浓度为0.5 mg/mL)、Chelex-100 0.1 g,震荡混匀。重复步骤(2)、(3)与(4),取上清液用作模板DNA。

血液中DNA的抽提:用全血基因组抽提试剂盒从牛血(黄牛)、绵羊血、山羊血、猪血、鸡血、兔血以及鱼血中抽提基因组DNA,方法参照华美生物工程有限公司全血基因组抽提试剂盒说明书进行。

1.4 PCR扩增

PCR反应体系:10×Buffer 2.5 μL, dNTP (10 mmol/L) 2 μL,引物P1、P2 (25 μmol/L) 各

1 μL, EX-Taq酶(5 U/μL) 0.13 μL,模板DNA 2 μL,小牛血清(终体积分数为1%),加灭菌双蒸水至25 μL。PCR扩增条件为:94℃ 3 min;94℃ 45 s;50℃ 45 s;72℃ 1 min;35个循环,最后72℃延伸8 min。反应结束后,取PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 PCR产物的克隆与序列测定

纯化的PCR产物与pMD18-T载体连接后,转化*E. coli* DH5α,涂布含青霉素的琼脂平板,筛选鉴定,重组阳性质粒送上海博亚公司进行序列测定。

1.6 特异性试验

用抽提的牛血、绵羊血、山羊血、猪血、鸡血、兔血以及鱼血DNA作模板,分别进行PCR扩增,同时设阴性对照,PCR体系同1.4。

1.7 敏感性试验

用1.3方法从牛肉干粉中分离的DNA,核酸蛋白仪测得其质量浓度为2.52 μg/μL,灭菌双蒸水分别做10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶与10⁻⁷梯度稀释,然后取各梯度稀释液2 μL用作模板,分别进行PCR扩增。

1.8 模拟样品的检测

将牛肉干研磨成粉末后加入鱼粉中,充分混匀,使牛肉粉的质量分数分别为1.00%、0.50%、0.25%、0.10%、0.05%、0.025%与0.01%,用1.3方法分离DNA,各取2 μL作模板分别进行PCR扩增。

2 结果

2.1 PCR产物的鉴定

PCR扩增结束后,电泳结果显示,以牛源DNA为模板的样品可特异性地扩增出约271 bp的片段,与预期大小相符(图1)。

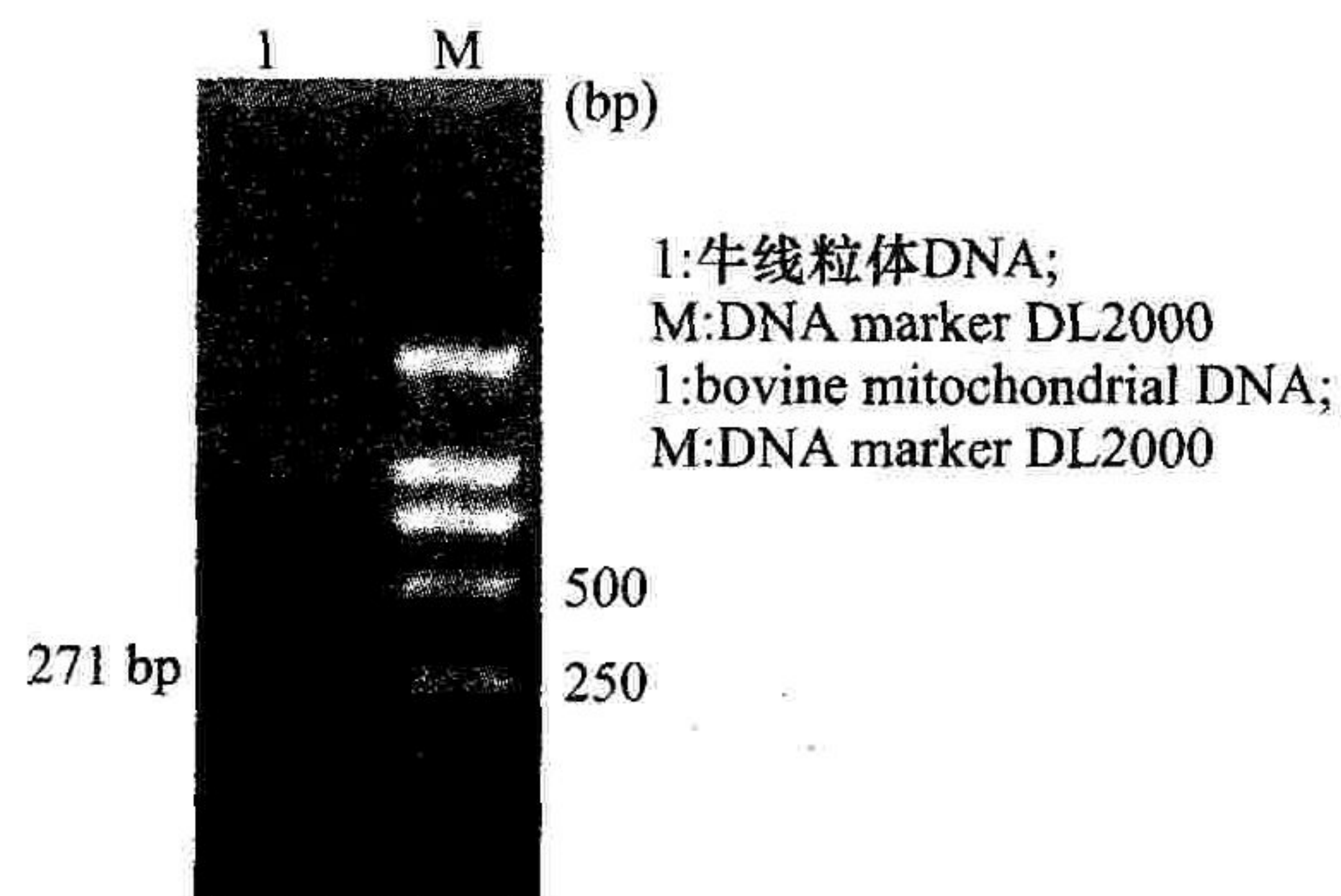


图1 牛源DNA PCR结果

Fig. 1 PCR result of mitochondrial DNA extracted from beef

2.2 质粒PCR鉴定

将挑取的阳性克隆菌进行扩大培养后,抽提质粒,进行PCR鉴定,结果也扩增出与预期大小相符的约271 bp的DNA片段(图2)。

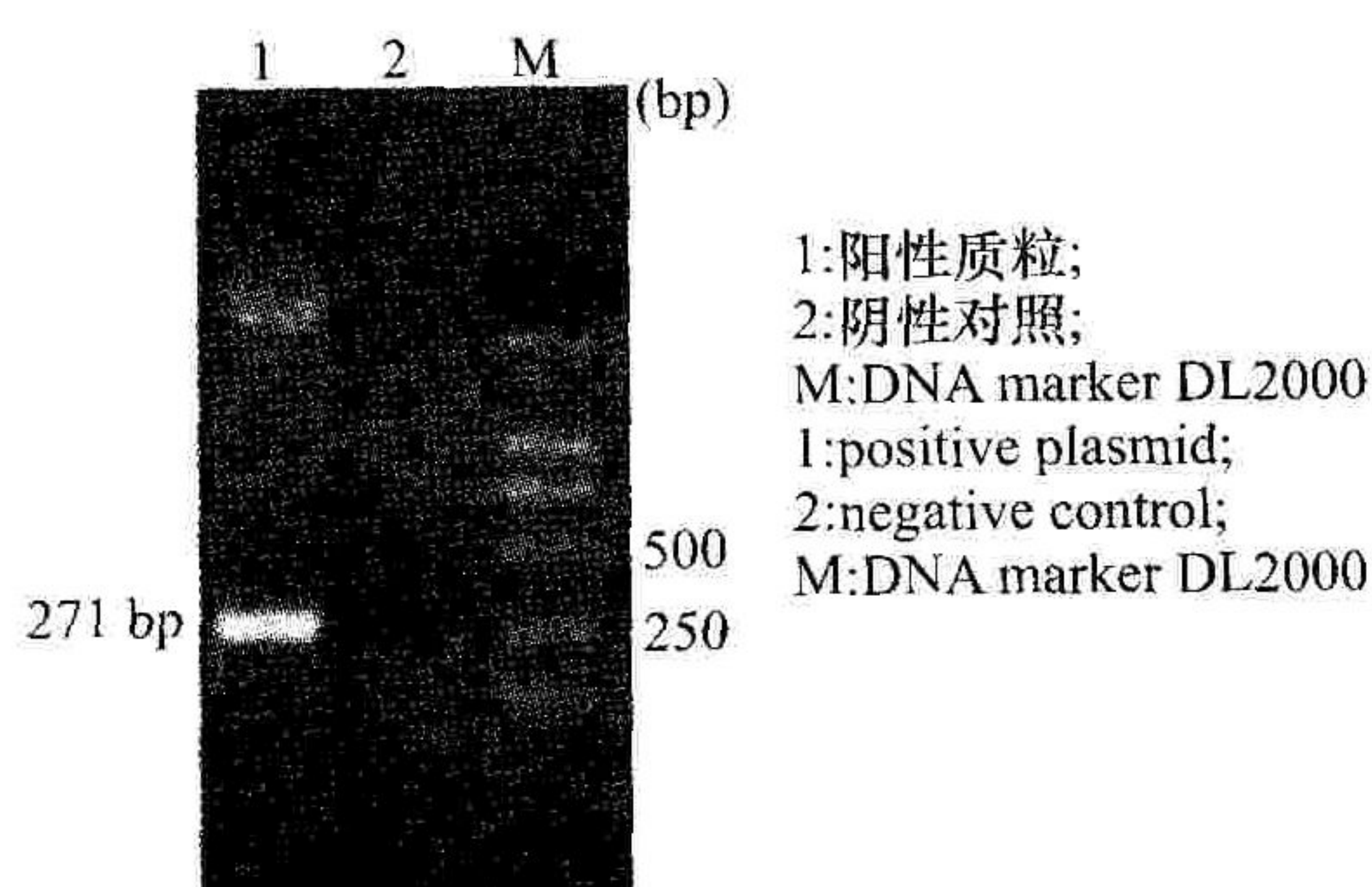


图2 阳性质粒 PCR 结果

Fig. 2 PCR result of positive plasmid

2.3 核苷酸序列鉴定以及分析

测序结果表明,扩增的牛线粒体部分基因的核苷酸序列大小为 271 bp. 该序列与 GenBank 上注册号分别为 AB074967、AF492350 和 AY126697 的牛组织线粒体核苷酸序列进行比较,结果显示,该研究测定的序列与序列号为 AY126697 的牛组织线粒体核苷酸同源性最高,达到 99.6%,与编号为 AB074967 和 AF492350 的牛线粒体核苷酸同源性均为 97.8%.

2.4 特异性试验结果

以牛血分离的 DNA 为模板进行 PCR,扩增出约 271 bp 的片段,而以绵羊血、山羊血、猪血、鸡血、兔血以及鱼血分离的 DNA 为模板 PCR 均未扩增出相应片段(图 3),说明该方法有较高的特异性.

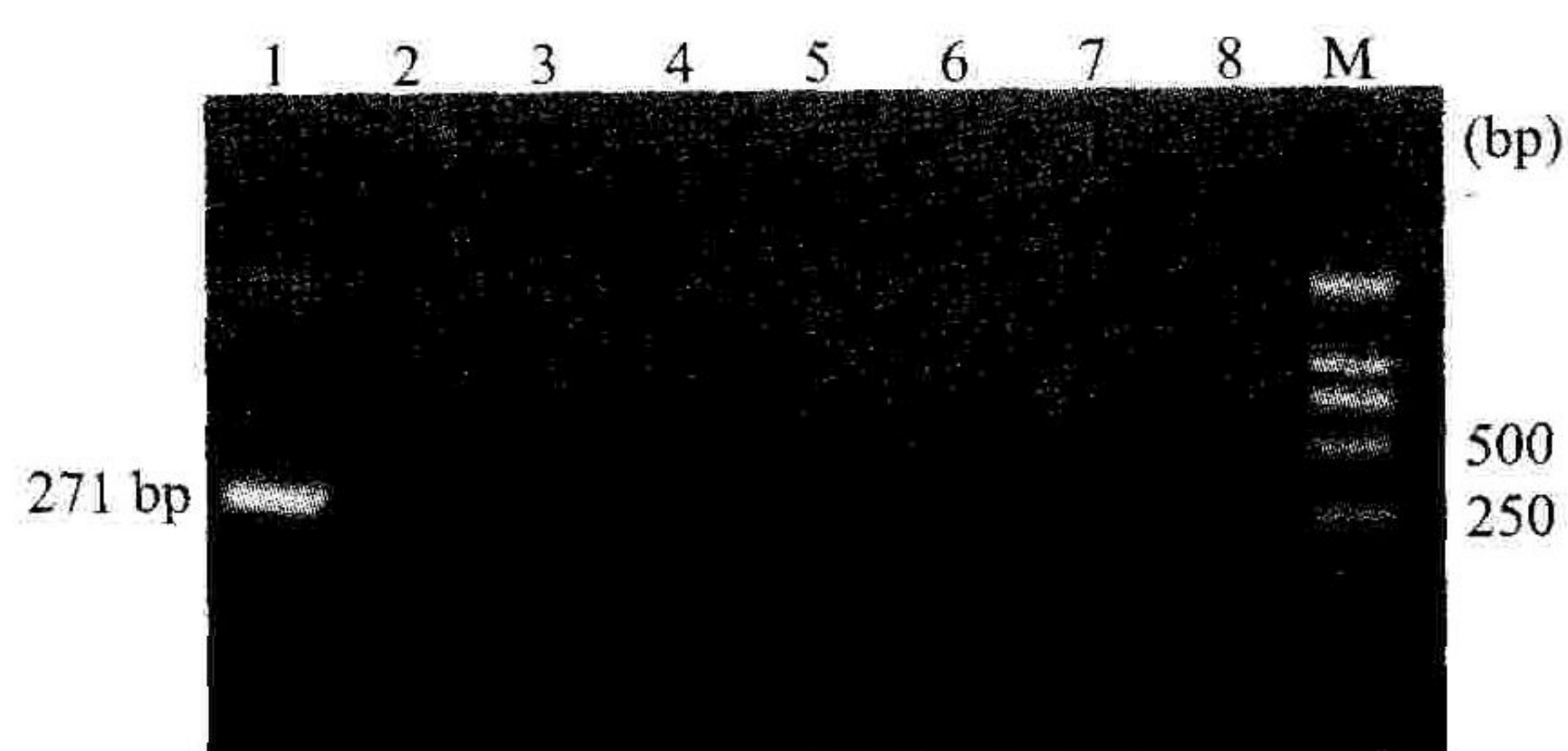


图3 特异性试验结果

Fig. 3 Result of specificity test by PCR

2.5 敏感性试验结果

将质量浓度为 $2.52 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的牛组织 DNA 模板倍比稀释到 10^{-5} 时,仍能扩增出可见的目的片段(图 4)说明该方法的敏感性可达 $25.2 \text{ pg}/\mu\text{L}$.

2.6 模拟样品的检测结果

当鱼粉中牛肉粉质量分数达 0.05% 时,用 Chelex 法处理后分离 DNA,PCR 扩增可见目的条带(图 5),表明该检测方法的最低检测质量分数可达 0.05%.

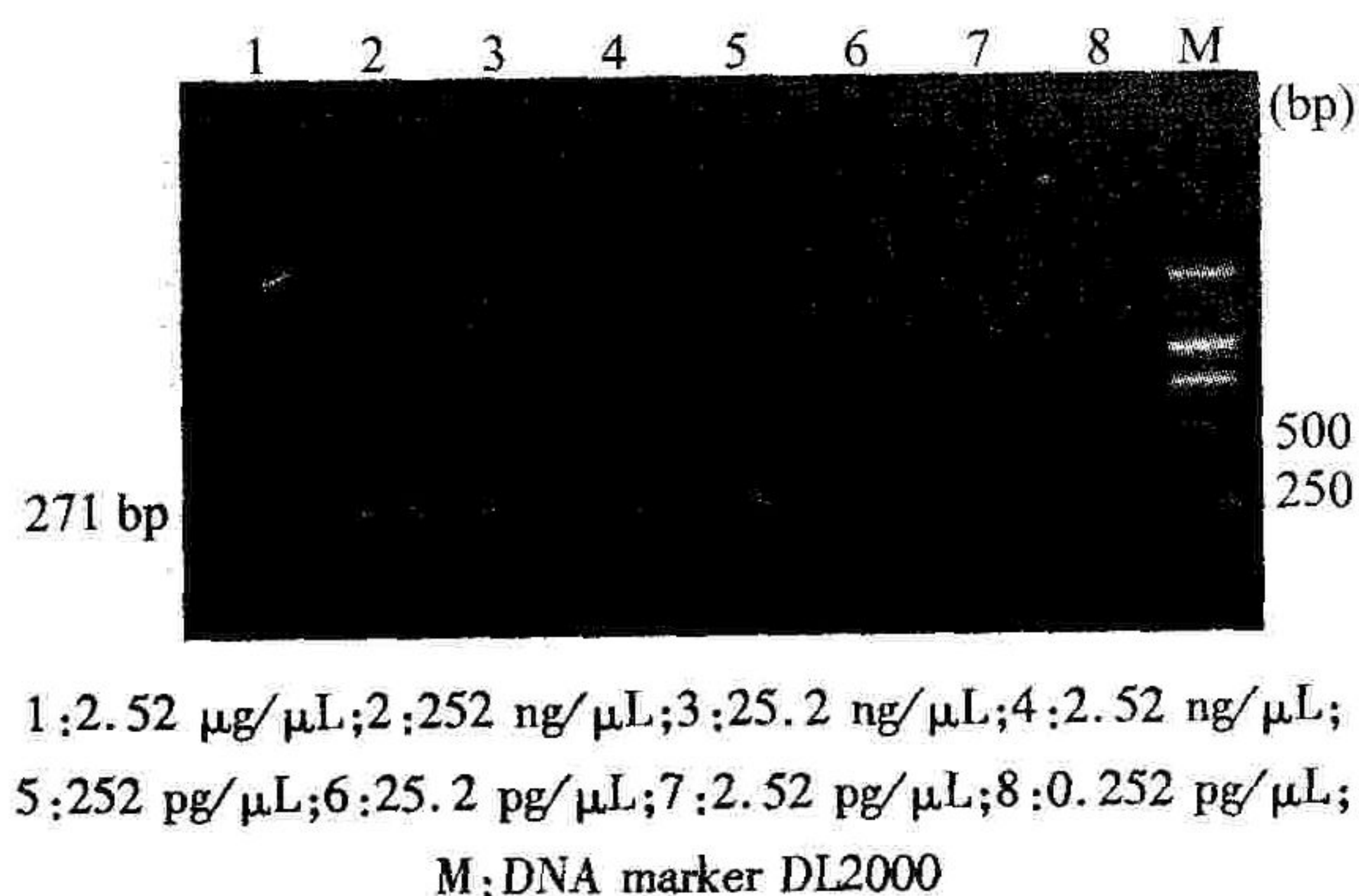


图4 敏感性试验结果

Fig. 4 Result of sensitivity test by PCR

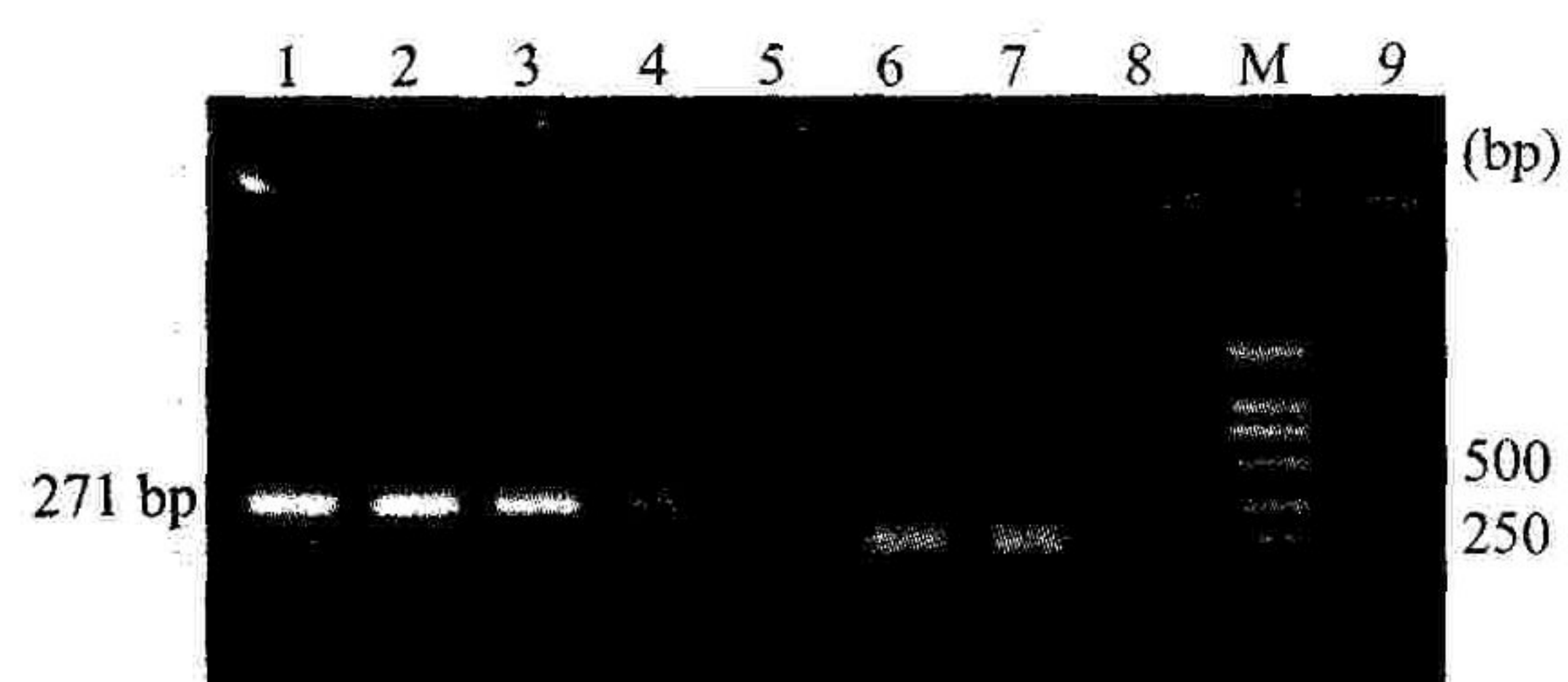


图5 模拟样品检测结果

Fig. 5 Detection results of mock samples

3 讨论

反刍动物(牛、羊等)肉骨粉是传播疯牛病的重要媒介,来自疯牛病疫区的牛、羊组织可能造成疯牛病的传播,给畜牧业造成重大损失. 为防止反刍动物肉骨粉混合于饲料,有必要建立快速检测反刍动物组织的可靠技术. 检测动物组织成分主要使用常规生物学方法与辅免疫学检测方法等. 但由于这些方法检出率低,重复性差,费时费力,越来越不能满足日益发展的需要. 近年来,随着分子生物学研究的深入和发展,动物主要的基因相继被克隆和测序,这为饲料中动物性成分的检测提供了一条新途径. 自从 PCR 技术建立以来,该技术以其敏感性高、特异性强、操作简单、快速而逐渐应用于动物遗传鉴定、动物种别鉴定等方面,这也使饲料中动物性成分的分子快速检测成为可能. 本研究通过反复摸索,建立了一套切实可行的从饲料中检测牛源组织成分的方法,特异性试验和敏感性试验表明,该方法对含不同量牛肉粉的鱼粉进行检测,其最小检测质量分数达 0.05%,整个过程约需 3 h. 该检测方法具有特异、快速的特点,能够满足检测要求,为饲料中动物组织成分的快速检测奠定了基础.

成功的一次 PCR 扩增,需要许多因素的精确控制,其扩增情况不仅受扩增目标序列 DNA 模板的影响,还与引物的特异性、扩增体系等条件有关^[5]。引物与模板 DNA 互补的程度对 PCR 的成功扩增至关重要,由于动物 mtDNA 为核外遗传物质,严格遵循母系遗传,具有无组织特异性、物种之间的基因结构差异大、在组织细胞中具有高拷贝等特点,在动物的系统发育、演化及遗传多样性等研究方面得到了广泛的应用^[6-7]。本研究根据牛线粒体基因核苷酸序列设计了 1 对引物,该对引物能有效、特异地扩增模板 DNA 序列,说明选择此区域设计的引物是可靠的。另外,扩增产物的大小对引物的敏感性也有一定影响,据 Ebbehøj 等^[8]证实,肉骨粉经过高温加工处理,其 DNA 会因此降解成短片段,若扩增片段过长,不利于 PCR 扩增,使 PCR 检测方法的敏感性降低。本研究选择 DNA 扩增跨幅大小为 271 bp,即使饲料经过高温高压加工,肉骨粉中模板 DNA 降解成短片段,亦不至于影响检测而出现假阴性结果。

从动物源性饲料中分离的模板 DNA 质量直接影响 PCR 扩增产物的再现性、特异性和产量。模板 DNA 的质量差,PCR 反应时 *Taq* DNA 聚合酶活性可能受抑制,扩增产物无或不稳定,导致 PCR 扩增失败。目前从动物组织中分离 DNA 的方法主要有 SDS 法、GuSCN 法、CTAB 法、异硫氰酸胍法与 Chelex 法。SDS 法、GuSCN 法、CTAB 法、异硫氰酸胍法通常采用 EDTA 及 SDS 等去污剂溶解细胞成分,用蛋白酶 K、酚、氯仿等有机溶剂祛除残留的蛋白质和细胞膜成分而获得^[9],其操作繁琐费时,存在 DNA 纯度不高等缺点。Chelex-100 是一种螯合树脂,对二价金属离子有螯合作用,可防止 DNA 在高温时被降解;在碱性和煮沸条件下 Chelex-100 能促使 DNA 从细胞核中释放出来,既可保护 DNA 又可减少 PCR 扩增的抑制因素^[10]。本研究采用 Chelex 法从动物源性饲料中分离 DNA 的整个过程在 2 个 EP 管中进行,避免了重复费时的苯酚/氯仿不断抽提所造成 DNA 损失和污染,保证了 PCR 反应的质量。该方法简便有效,可大批量处理标本,避免了苯酚对人体造成的危害。

目前应用 Chelex 法分离肉骨粉中的 DNA,大多数是用 Chelex-100 进行一次分离,将一次性分离的上清液作 PCR 扩增^[11]。笔者在用 Chelex 法分离饲料中动物组织 DNA 过程中发现,仅进行一次分离上清液仍相当浑浊,用其作模板 PCR 扩增常常导致失败。遂在试验中将一次性分离的上清液再次进行分离,结果表明,再次分离的 DNA 纯度提高,PCR 检测的敏感性也大大增加。本研究检测的样品不仅组成成分复杂,且经复杂的加工,但核酸纯化效果仍较好,说明改进的 Chelex 法分离纯化 DNA 技术不仅可

应用于动物肉骨粉等饲料样品的处理,同样适用于其他特定样品中的 DNA 分离,如含有牛羊组织成分的化妆品、食品等。另外,笔者用建立的方法进行样品模拟检测时发现,PCR 结果时常不稳定,遂尝试在 PCR 体系中加入小牛血清,检测结果比较稳定。这可能是小牛血清中的某些成分能消除 PCR 扩增中的抑制因素。

本研究建立的方法对 DNA 最低检测质量浓度可达 25.2 pg/ μ L,检测饲料中动物组织成分的敏感性质量分数达 0.05%,高于国家实验室认可委员会(CNAL)组织水平测试要求的 0.1%,能满足检测的要求,具有一定的实用价值和推广意义。

参考文献:

- [1] WELLS G A, SCOTT A C, JOHNSON C T, et al. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle[J]. *Veterinary Record*, 1987, 121: 419-420.
- [2] CALVO J H, RODELLAR C, ZARAGOZA P, et al. Beef and bovine-derived material identification in processed and unprocessed food and feed by PCR amplification[J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50 (19): 5 262-5 264.
- [3] BOTTERO M T, DALMASSO I A, NUCERA D, et al. Development of a PCR assay for the detection of animal tissues in ruminant feeds[J]. *J Food Prot*, 2003, 66 (12): 2 307-2 312.
- [4] TARTAGLIA M, SAULLE E, PESTALOZZA S, et al. Detection of bovine mitochondrial DNA in ruminant feeds: a molecular approach to test for the presence of bovine derived material[J]. *Journal of Food Protection*, 1998, 61: 513-518.
- [5] JOHN M B, CHRISTIAN M R, PETER M V. Capillary electrophoresis as a tool for optimization of multiplex PCR reactions[J]. *Fresenius J Anal Chem*, 2001, 369: 200-205.
- [6] MICHAELS G S, HAUSWIRTH W W, LAIPIS P J. Mitochondrial DNA copy number in bovine oocytes and somatic cells[J]. *Dev Biol*, 1988, 94: 246-251.
- [7] ROBIN E D, WONG R. Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells[J]. *J Cell Physiol*, 1988, 136: 507-513.
- [8] EBBEHØJ E F, THOMSEN P D. Differentiation of closely related species by DNA hybridization[J]. *Meat Sci*, 1991, 31: 359-366.
- [9] 萨母布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 金冬燕, 黎梦枫, 侯云德, 译. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992: 954-962.
- [10] STEIN A, ROOULT D. A simple method for amplification of DNA from paraffin-embedded tissues[J]. *Nucleic Acids Research*, 1992, 20: 5 237.
- [11] 闻伟刚, 赵秀玲. 进口饲料中牛、羊源成分的 PCR 同时检测方法[J]. *农业生物技术学报*, 2004, 12 (2): 167-169.

【责任编辑 柴 焰】