

饲料中羊源组织成分的 PCR 检测

徐艳芳, 琚春梅, 陈立军, 赵明秋

(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:应用 Chelex-100 快速提取动物基因组 DNA 的方法,并根据羊线粒体基因的核苷酸序列设计 1 对引物,通过对分离的 DNA 进行 PCR 扩增、基因克隆及核苷酸序列分析,实现了对动物源性饲料中羊组织成分的检测.结果显示,该方法对羊组织 DNA 检测的敏感性可达 20.16 pg/ μ L,当肉骨粉样品中含有质量分数为 0.050% 的羊源性成分时仍能检出,整个过程约需 3 h.

关键词:PCR 检测; 饲料; 羊源成分

中图分类号:S816.48

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2009)02-0090-04

Species-Specific PCR Assay for Detection of Ovine-Derived Materials in Feedstuff

XU Yan-fang, JU Chun-mei, CHEN Li-jun, ZHAO Ming-qiu

(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: A method was developed for the detection of ovine-derived materials in imported feedstuff, in which Chelex-100 as matrix for fast extraction of ovine genomic DNA was adopted and a pair of primers designed on the sequence of ovine mitochondrial DNA were used for PCR amplification. The amplified specific fragment of the ovine mtDNA was demonstrated by both cloning and sequencing. This method allows detection of the presence of ovine mtDNA in feedstuffs containing 20.16 pg/ μ L of genome DNA; 0.050% (*w*) of ovine meat, and the whole process takes only 3 h.

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

痒病(Scrapie)是由朊病毒(Virino)或称蛋白侵袭因子(Prion)引起的发生于羊的传染病,其广泛分布于欧洲及北美,亚洲和非洲散发.由于饲料中添加了羊的肉骨粉,将羊瘙痒病的病原传染给牛,使之发生疯牛病^[1],故自 1986 年确诊疯牛病以来,其与羊痒病就一直困扰着畜牧业经济的发展.与此增加了饲料进出口的检疫难度^[2-3].人类误食感染疯牛病或痒病的肉食会导致一种由朊病毒引起的致命的中枢神经紊乱疾病——新型克雅二氏病^[4-5].无论是疯牛病还是克雅氏病都会造成永久性的脑部损伤,使动物或人的脑组织形成海绵状空洞,导致精神错乱、痴呆,最终死亡^[3].为防止该病的蔓延,各国政府纷纷推出相关法规禁止疫区反刍动物蛋白饲料的进口,

反刍动物蛋白饲料的检疫再次被提上检疫日程.经过加工的动物源性饲料(如肉骨粉)一直被认为可能是痒病传播的主要来源^[6],所以禁止羊痒病疫区动物源性饲料的生产和流通也就成为目前最主要的防止疾病流行的手段.动物源性饲料组成上的复杂性,给正确鉴别饲料成分带来了很大困难.目前,饲料中动物源性成分鉴别的主要方法有物理、化学、免疫学和分子生物学方法^[7-8].其中尤以分子生物学方法最为快速、敏感.本研究旨在对动物源性组织 DNA 分离方法和引物等进行优化,建立一种对饲料中羊源性成分快速简便且敏感特异的检测鉴别方法,有效地控制痒病通过疫区含羊源性组织的饲料传入我国.

收稿日期:2008-09-18

作者简介:徐艳芳(1983—),女,硕士研究生;通讯作者:赵明秋(1965—),女,助理研究员, E-mail:zmingqiu@21cn.com

基金项目:广东省科技计划项目(2003B21408)

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; TritonX-100 为 Sigma 生物公司产品; 全血基因组抽提试剂盒为华美生物公司产品; Ex-Taq 酶、DNA Marker DL2000、蛋白酶 K 和 pMD18-T 载体为 Invitrogen 公司产品; 琼脂凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒抽提试剂盒为 Omega 生物公司产品。

生羊肉购于广州市百佳超市, 鱼骨粉购自某饲料店以作动物源性饲料的制备, 各种动物的血液样品包括牛血、羊血、猪血、鸡血、兔血以及鱼血均采自试验动物, 置于冰箱 -20 ℃ 保存备用。

1.2 PCR 引物的设计

引物参照 Tartagile 等^[9]的设计, 根据 GenBank 中发表的线粒体 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 保守序列合成引物: 引物 F: 5'-TTA AAG ACT GAG AGC ATG ATA-3', 引物 R: 5'-ATG AAA GAG GCA AAT AGA TTT TCG-3'。预期扩增片段长度约为 225 bp, 引物由上海博亚公司合成。

1.3 样品处理及 DNA 的制备

样品处理: 将生羊肉置于电炉上烘干, 剪碎, 在研钵中磨成粉状备用。

羊肉 DNA 的抽提: 称取制备好的羊骨粉 0.1 g, 用 0.5 mL 去离子水溶解, 加入 0.1 g 的 Chelex-100, 再加 TritonX-100 使其最终质量分数为 1%, 震荡混匀; 56 ℃ 水浴 30 min, 震荡混匀; 100 ℃ 水浴 8 min, 震荡混匀; 12 000 r/min 离心 5 min; 取上述上清液 250 μL, 加去离子水 250 μL, 加入蛋白酶 K (使最终质量浓度为 0.5 mg/mL), 加 0.1 g Chelex-100, 震荡混匀; 56 ℃ 水浴 30 min, 震荡混匀; 100 ℃ 水浴 8 min, 震荡混匀; 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液即为 DNA 模板。

血液中 DNA 的抽提: 采用全血基因组抽提试剂盒抽提牛血、羊血、猪血、鸡血、兔血以及鱼血的 DNA, 以备分别进行羊引物的特异性试验, 方法参照华美生物公司全血基因组抽提试剂盒的说明书进行。

1.4 PCR 扩增

PCR 反应体系: 10 × Buffer 2.5 μL, dNTP (2.5 mmol/L) 2 μL, 引物 F (25 μmol/L) 1 μL, 引物 R (25 μmol/L) 1 μL, EX-Taq 酶 0.13 μL, 模板 DNA 2 μL, 小牛血清 0.25 μL, 加灭菌双蒸水至 25 μL。PCR 扩增条件为: 94 ℃ 预变性 3 min; 94 ℃ 45 s, 50 ℃ 45 s, 72 ℃ 1 min, 共 35 个循环; 最后 72 ℃ 延

伸 8 min。4 ℃ 保存产物以待进行琼脂凝胶电泳检测鉴定。

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, 转入基因工程菌 *E. coli* DH5α 中, 将菌液均匀涂布于含 100 mg/mL 的 LB 固体培养基, 筛选鉴定重组的阳性质粒送上海博亚公司测序。

1.6 引物的特异性试验

用抽提的牛血、羊血、猪血、鸡血、兔血和鱼血的 DNA 作模板分别进行 PCR 扩增, 同时设空白对照, PCR 体系同 1.4。

1.7 敏感性试验

将 Chelex-100 方法抽提的纯羊肉粉的 DNA 用核酸蛋白仪测得质量浓度为 2 016 μg/mL, 以灭菌双蒸水作 10 倍梯度稀释, 分别稀释成 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶, 取各稀释液 2 μL 作 PCR 反应。

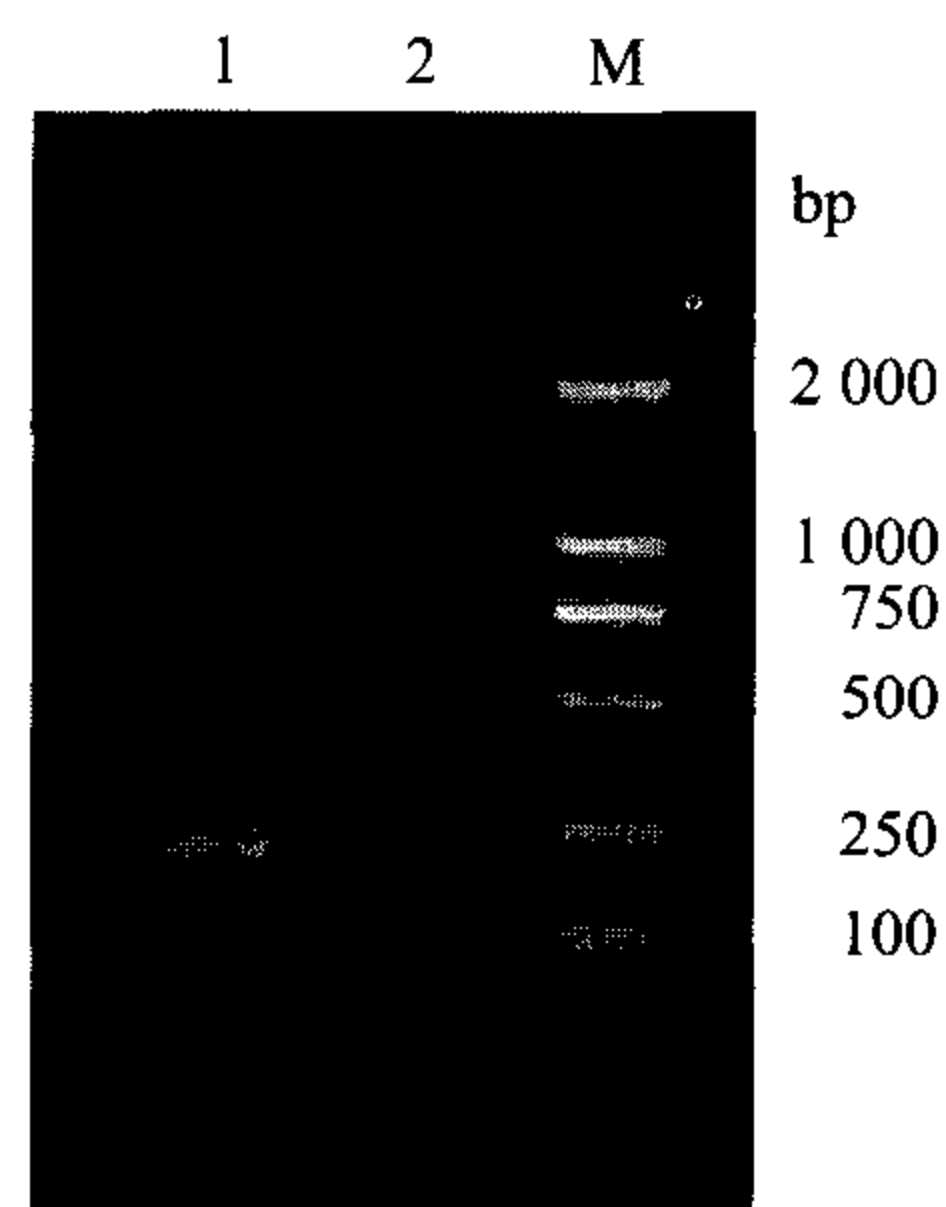
1.8 模拟样品的检测

将羊肉干研磨成粉末后混入鱼骨粉, 使得羊肉的质量分数分别为 1.000%、0.500%、0.250%、0.100%、0.050%、0.025%、0.010%。充分混匀后, 用 Chelex-100 方法抽提出的 DNA 作模板, 各取 2 μL 分别加入 25 μL PCR 体系中扩增。模拟检测中, 为了提高检测的稳定性, 在 PCR 体系中加了小牛血清 0.25 μL。

2 结果

2.1 PCR 产物的鉴定

PCR 产物于 0.01 g/mL 琼脂糖凝胶电泳结果显示, 以羊源 DNA 为模板的样品可特异性地扩增出约 225 bp 的片段, 其大小与理论值相符 (图 1)。



1: 羊线粒体 DNA; 2: 阴性对照; M: DNA Marker DL2000

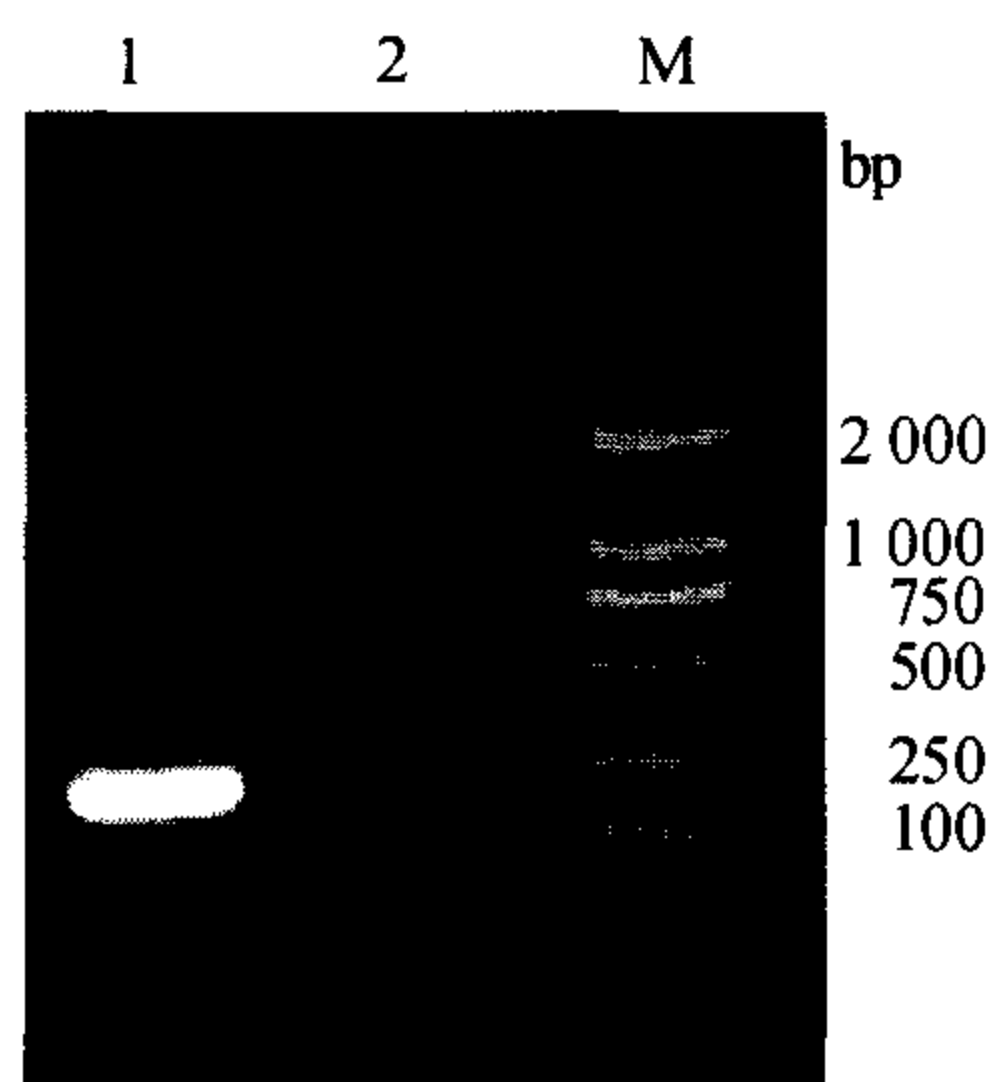
图 1 羊线粒体 DNA 的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR result of mitochondrial DNA extracted from ovine

2.2 质粒 PCR 鉴定

将挑取的阳性克隆菌扩大培养后, 抽提质粒进

行 PCR 鉴定,结果也扩增出与预期大小相符的约 225 bp 的电泳条带(图 2).



1:阳性质粒;2:阴性质粒;M: DNA Marker DL2000

图2 阳性质粒的 PCR 扩增

Fig.2 PCR result of positive plasmid

2.3 核苷酸序列鉴定及分析

将所测定的羊目的基因片断的核苷酸序列与 GenBank 中注册号为 AY858379 的核苷酸序列进行比较,结果表明,羊扩增片断的基因序列与已发表的基因序列的相似性达 98%.

2.4 引物的特异性试验结果

以羊血抽提 DNA 作模板的 PCR 反应,能扩增出 225 bp 的片断,而以其他动物血抽提的 DNA 作模板在含羊引物体系中作 PCR 扩增,均不能扩增出相应片段(图 3). 结果表明,该对羊引物具有高度的特异性,在 PCR 反应体系中只能扩增出羊目的基因片断.



1:羊血 DNA 阳性对照;2:牛血 DNA;3:猪血 DNA;4:鸡血 DNA;5:兔血 DNA;6:鱼血 DNA;7:空白对照;M:DNA Marker DL2000

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

把抽提出的纯羊肉粉的 DNA 倍比稀释后分别作模板进行 PCR 反应以检测反应的敏感性. 从图中 4 可以看出,当 DNA 的稀释度为 10^{-5} 时,还可以看见扩增片段,即此对引物的检测限度达 20.16 pg/ μ L.

2.6 模拟样品的检测结果

为了确定方法的可靠性和稳定性,在不同的时间段用 Chelex-100 方法各抽提了鱼骨粉中按比例混匀羊肉粉的饲料模拟样品的 DNA 做 PCR 扩增. 结果(图 5)可得, Chelex-100 方法抽提肉骨粉中的羊 DNA

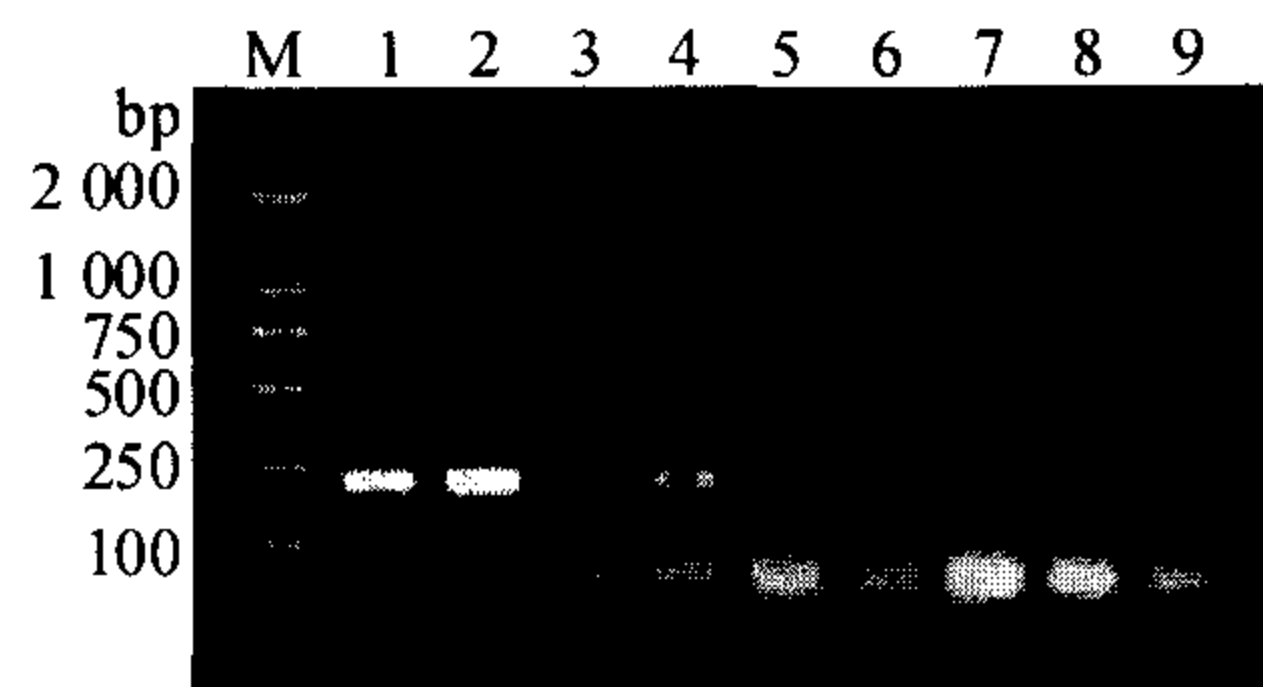
的精确度可达到 0.050% (质量分数),即 1 g 的肉骨粉中即使含有 0.000 5 g 的羊的成分,也能够检测出结果.



1:100 DNA; 2: 10^{-1} DNA; 3: 10^{-2} DNA; 4: 10^{-3} DNA; 5: 10^{-4} DNA; 6: 10^{-5} DNA; 7: 10^{-6} DNA; 8:阴性对照; M:DNA Marker DL2000

图4 敏感性试验结果

Fig.4 Result of sensitivity test by PCR



1~8: 羊肉粉质量分数分别为 100%、1.000%、0.500%、0.250%、0.100%、0.050%、0.025%、0.001%; 9: 阴性对照; M: DNA Marker DL2000

图5 模拟羊鱼肉骨粉样品检测试验

Fig.5 Detection result of mock samples

3 讨论与结论

在进出口贸易中加强对饲料或动物源性深加工食品中牛羊源成分的检测,开发牛羊源成分的 PCR 检测方法,对于防止痒病传入我国是一个强有力的技术支撑. 线粒体 DNA (Mitochondrial DNA, mtDNA) 是高等动物唯一的核外遗传物质,具有以下几个特点:①分子结构简单,相对分子质量小(16.5 kb 左右),基因组中无间隔序列^[10];②无组织特异性,个体不同组织 mtDNA 高度均一;③遗传上具有自主性. 另外 mtDNA 在群体内变异大,近缘物种间解析的灵敏度高. 基于上述特点,利用 mtDNA 提供的信息已广泛应用于研究物种起源及遗传分化、动物种间和种内系统发生关系、群体遗传结构、物种进化事件、饲料成分鉴定等^[11-13]. 本文所设计的引物序列位于线粒体比较保守的区段,哺乳动物间有相当高的特异性,且高等植物中未发现类似的基因结构,也不存在相似的编码同源蛋白基因. Ebbehøj 等^[14]证实,宰后放置 1、2、9、16 d 的肉, DNA 片段 30 000 bp 降解到 16 000 bp,加热到 80 $^{\circ}$ C, DNA 片段长度不受影响,而加热到 100 $^{\circ}$ C 则锐减至 1 100 bp, 120 $^{\circ}$ C 减至 600 bp 以下. 有调查结果显示,虽然各国生产肉骨粉

的工艺有所不同,但均经过高温处理,一般为118~143℃。因此,在选择扩增长度上,我们选择225 bp的片段。这样,即使经过高温高压处理,肉中模板DNA亦不至于被破坏而出现假阴性结果,且检测的敏感性高,达到0.050%。

动物源性饲料成分复杂,含有多种组分,同时经切碎、消解、均质、高温高压脱水、脱脂、与辅料混合及成型等加工步骤已使原料DNA受到不同程度的破坏,其DNA提取是整个试验的关键。本研究所用来从羊组织中抽提DNA的Chelex-100是一种螯合型离子交换树脂,由苯乙烯和苯乙二烯组成的聚合物。Chelex-100悬液在碱性和100℃煮沸条件下可以使细胞膜破裂,DNA从细胞核中释放出来^[15],而且Chelex-100可以与二价金属离子螯合,从而避免样品中存在的金属离子在高温和低离子强度溶液中作为催化剂使DNA降解,还可以结合抑制PCR反应的物质,通过离心得以去除,因此它适用于很多组织DNA的PCR模板的制备。该方法非常简便快速,整个过程约需3 h,且无需接触酚、氯仿等有毒试剂。同时,本文用Chelex-100法所提取的总DNA经核酸蛋白分析仪测定,DNA质量浓度为2 016 μg/μL,其用于动物源性饲料中羊成分检测的最低质量浓度可达20.16 pg/μL,敏感性可达0.050%,高于国家实验室认可委员会(CNAL)组织水平测试要求(精确度为0.1%)。

参考文献:

- [1] BROWN P, WILL R G, BRADLEY R, et al. Bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease: background, evolution, and current concerns [J]. *Emerg Infect Dis*, 2001, 7(1):6-16.
- [2] WELLS G A, SCOTT A C, JOHNSON C T, et al. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle [J]. *Vet Rec*, 1987, 121: 419-420.
- [3] ANDERSON R M, DONNELLY C A, FERGUSON N M, et al. Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle [J]. *Nature*, 1996, 382 (6594): 779-788.
- [4] Anon. Public health issue and clinical and neurological characteristics of the new variant of Creutzfeldt-Jakob disease and animal transmissible spongiform encephalopathies: memorandum from two WHO meetings [J]. *Bull World Health Organ*, 1996, 74: 453-463.
- [5] WILL R G, RONSIDE M, ZEIDLER S N, et al. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK [J]. *Lancet*, 1996, 347: 921-925.
- [6] 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]. *Journal of Food Protection*, 2003, 66(12): 2307-2312.
- [7] VON H C, HONIKEL K O, UNGLAUD W, et al. Determination of an appropriate heat treatment of animal waste using the ELISA technique; results of a validation survey [J]. *Meat Sci*, 2000, 54:1-7.
- [8] UNSELD M, BEYERMAN B, BRAND P, et al. Identification of species origin of highly processed meat products by mitochondrial DNA sequences [J]. *PCR Methods and Application*, 1995, 4:241-243.
- [9] TARTAGLIE 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 (6): 513-518.
- [10] ANDERSON S, BANKIER B G, BRUIJN M H, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome [J]. *Nature*, 1981, 290: 457-465.
- [11] BROWN W M, PRAGER E M, WANG A, et al. Mitochondrial DNA sequence of primates: Tempo and mode of evolution [J]. *J Mol Evol*, 1982, 18: 225-239.
- [12] WALLACE D C. Mitochondrial DNA variation in human evolution, degenerative disease and aging [J]. *Am J Hum Genet*, 1995, 57: 201-223.
- [13] XU X, GULBERG A, AMASON U. The complete mitochondrial DNA (mtDNA) of the donkey and mtDNA comparisons among four closely related mammalian species pairs [J]. *J Mol Evol*, 1996, 43: 438-446.
- [14] EBBEHOJ E F, THOMSEN P D. Species differentiation of hested meat products by DNA hybridization [J]. *Meat Sci*, 1991, 31:359-336.
- [15] STEIN A, ROOULT D. A simple method for amplification of DNA from paraffin embedded tissues [J]. *Nucleic Acids Research*, 1992, 20:5237-5238.

【责任编辑 柴 焰】