

技术与方法

PCR-mtDNA 技术鉴别检测不同动物肌肉组织和饲料中鸭源性成分

张娟¹, 宗卉², 张利平³

1 宁夏大学政法学院, 银川 750002

2 深圳检验检疫局, 深圳 518000

3 甘肃农业大学动物科学技术学院, 兰州 730070

摘要: 以鸭肌肉组织 DNA 为模板, 利用 PCR-mtDNA 技术成功克隆出了鸭 mtDNA *COIII* 基因(GenBank Accession No. DQ655706)。对所克隆的序列分析表明, 其序列包括鸭细胞色素 C 氧化酶 III(*COIII*)基因全序列 784 bp, 通过同源性分析可知, 动物的线粒体 DNA *COIII* 基因是相对保守的, 利用此特性设计 PCR-mtDNA 方法鉴别检测鸭源性成分的特异性引物; 以各种动物肌肉组织及饲料 DNA 为模板进行 PCR 扩增、经反复验证筛选出只能扩增出鸭 DNA 的目的片段, 而不能扩增出其他动物 DNA 片段的特异性强、稳定性好的引物 P3、P4; 利用此引物 PCR 扩增鸭 DNA 的特异性片段为 226 bp, 对 PCR 产物进行测序分析可知与已克隆的鸭 mtDNA *COIII* 基因同源性达到 100%, 证明了所筛选引物的准确性。通过对不同含量的 DNA 模板溶液进行 PCR 扩增的方法, 对筛选出的特异性引物 P3、P4 进行灵敏度试验, 结果分析表明灵敏度约为 0.001%, 证明该 PCR 方法具有特异性强、灵敏度高的特点, 完全可作为鉴别不同动物肌肉组织和饲料中鸭源性成分的方法。

关键词: 鸭源性成分, 鉴别检测, 线粒体 DNA, 细胞色素 C 氧化酶 III 基因, 不同动物肌肉组织和饲料, 克隆

PCR-mtDNA for Detecting Components of Duck Origin in Foodstuff and Feedstuff

Juan Zhang¹, Hui Zong², and Liping Zhang³

1 School of Political and Law, Ningxia University, Yinchuan 750002, China

2 Shenzhen Inspection and Quarantine, Shenzhen 518000, China

3 Gansu Agricultural University Faculty of Animal Science and Technology, Lanzhou 730070, China

Abstract: Mitochondrial cytochrome oxidase III(*COIII*) of duck was successfully amplified by PCR-mtDNA with duck muscle DNA as the template (GenBank Accession No. DQ655706). Cloning sequence analysis shows that the 784 bp nucleotides of *COIII* gene were contained. Through homology analysis, we confirmed that the cytochrome oxidase III (*COIII*) was relatively conservative. The method of PCR-mtDNA can be designed to detect the components of duck origin. And then, the method of PCR can be applied to amplify with the muscle DNA of various animal and feedstuff as the template, repeated verification, the primer (P3, P4) with strong specificity and good stability is screened, which can only amplify the sequence of duck. The special sequence contains 226 bp, the amplified product of 226 bp was sequenced and analyzed, it showed 100% homology with duck mtDNA *COIII* gene, which proved the accuracy of the special primer. The test that used different concentration of DNA with P3 and P4 is the sensitive experiment by PCR. The result showed that the primer has much specialty and rather sensitivity. So it is a way to detect the duck origin in the muscle of various animal and feedstuff.

Received: February 28, 2008; **Accepted:** April 15, 2008

Supported by: the Research Project of Shenzhen Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau (No. SY200609110035B).

Corresponding author: Liping Zhang. Tel/Fax: +86-13609303142; E-mail:zhangliping@gsau.edu.cn

深圳出入境检验检疫局科研项目 (No. SY200609110035B)资助。

Keywords: components of duck origin, detect, mtDNA, cytochrome oxidase III(COIII), the muscle of various animal and feedstuff, clone

近年来, 疯牛病、禽流感、羊瘙痒病在世界各地的蔓延和传染给人类的事例, 引起了各国政府和消费者对肉食品、饲料安全性的高度关注。畜禽类肉食品和饲料安全性从根本来讲是动物源性成分的安全性, 目前, 为了确定食物及饲料的真实性, 已经开发了很多对动物源性成分鉴别的方法, 有物理、化学、免疫学和分子生物学等方法, 其中尤以分子生物学方法最为快速、灵敏。在畜禽肉食品及饲料动物源性成分鉴别检测研究中, 目前主要是应用 PCR 技术进行核 DNA 和 mtDNA 分子标记研究^[1]。

目前国内外利用 PCR-mtDNA 分子标记技术对畜禽源性成分鉴别方法做了一些研究工作, 用 PCR-mtDNA 技术美国、意大利对牛源性成分的检测进行了研究^[2], 日本对牛、绵羊、猪、鸡的动物源性成分进行了研究。国外对于用 PCR-mtDNA 分子标记法鉴别禽类动物源性成分除鸡^[3]以外并无其他禽类的研究报道。国内应用 PCR-mtDNA 分子标记对部分畜禽源性成分的鉴别检测也有一些研究。如宗卉、杨宝华等^[1,4,5]对牛、绵羊、猪、鸡、马、驴源性成分进行了研究; 陈颖、吴亚君等人根据 mtDNA 的保守序列对鹿属、马属动物源性成分的鉴别检测进行了研究^[6,7]; 但国内外至今尚未见到对鸭源性成分鉴别检测的研究报道。本研究旨在建立快速、简便、灵敏、特异的不同动物肌肉组织和饲料中鸭源性成分的鉴别检测方法。

1 材料和方法

1.1 实验材料

本试验所用鸡、鸭、鹅、牛、羊、猪、驴、猫、鸽子、兔子、火鸡、鹌鹑、鹧鸪的 DNA 分别从各自的肌肉或肝脏组织中提取(其中鸡、鹅、牛、羊、猪、驴、猫、鸽子、兔子均购自甘肃兰州市场各 1 只, 火鸡、鹌鹑、鹧鸪由深圳检验检疫局提供其肌肉组织。)含鸭源性成分的饲料样品 DNA 由饲料中提取。实验家鸭(家鸭系雁形目鸭亚科河鸭族河鸭属的绿头鸭^[8])购自兰州禽类市场和深圳禽类市场各 3 只, 试验所需试剂均为 TaKaRa 公司产品。

1.2 试验方法

1.2.1 鸭 COIII 基因的克隆

(1)线粒体 DNA 的制备: 活体解剖, 取肌肉或肝脏组织 2 g, 采用一种改进的碱变性法提取线粒体 DNA^[9]。

(2)引物设计与 PCR 扩增: 根据 GenBank 已经公布的潜鸭族(No. AF090337)的全序列及其绿头鸭的 mtDNA 部分序列(L22476、L16770、L22477), 利用 CLUSTAL W1.83 软件^[10]和 BLAST 软件^[11]进行序列比较, 再用 Primer Premier 5.0^[12]设计用于扩增细胞色素 C 氧化酶 III 基因的特异性引物即上游特异引物 P1: 5'-GCCATCCTACTACTCCTCACCA-3'; 下游特异引物 P2: 5'-CCAGATTTTAGAGATTGGAAGTCA-3', 由北京奥科生物工程公司合成。

PCR 扩增的反应体系: DNA 模板 1 μ L, PCR buffer(含 Mg^{2+} 20 mmol/L) 2.5 μ L, dNTP(2.5 mmol/L) 2.0 μ L, 上下游引物(10 pmol/ μ L)各 1 μ L, Taq DNA 聚合酶(2 u/ μ L)0.5 μ L, 加水补足 25 μ L。

PCR 扩增的反应条件: 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 1 min, 60°C 退火 1 min, 72°C 延伸 80 s, 35 个循环, 最后 72°C 延伸 10 min。

(3)目的基因克隆与测序: 回收 PCR 产物后, 在 T4DNA Ligase 作用下使回收产物与质粒 pGEM®-T Vector 连接, 然后转化大肠杆菌 JM109, 蓝白斑筛选后经菌落 PCR 及酶切鉴定, 最后选取 2 个阳性的重组子送上海博亚生物技术有限公司测序。

(4)序列分析: DNA 序列采用 Clustal X 软件进行比对分析。

1.2.2 PCR-mtDNA 鉴别检测鸭源性成分

(1)引物设计与 PCR 扩增: 利用扩增出的细胞色素 C 氧化酶 III 基因, 设计用于鉴别检测鸭源性成分的特异性引物即上游特异引物 P3、下游特异引物 P4, 由北京奥科生物工程公司合成。

PCR 扩增的反应体系: 同上。

PCR 扩增的反应条件: 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 30 s, 72°C 延伸 39 s, 30 个循环, 最后 72°C 延伸 5 min。

(2)引物的特异性验证试验: 利用所设计鉴别检

测鸭源性成分的特异性引物,分别以鸭、含鸭源性成分的饲料、鸡、鹅、火鸡、鸵鸟、鹧鸪、鹌鹑、牛、羊、猪、狗、驴、鸽子、兔子等动物的总DNA为模板,进行PCR扩增,验证引物的特异性。

(3)PCR扩增产物的序列测定:扩增产物由上海生工生物工程有限公司测序,鉴定引物的准确性。

(4)特异性引物灵敏度的分析:将鸭样品通过对不同含量(模板浓度分别为:10%、2%、1%、0.02%、0.01%、0.002%、0.001%)的模板溶液进行PCR扩增,从而对特异性引物的灵敏度进行分析。

2 结果与分析

2.1 鸭线粒体 COIII 基因克隆及序列分析

2.1.1 PCR、菌落PCR、酶切鉴定

利用设计的引物 P1 和 P2 扩增目的 DNA, 获得约 934 bp 的 DNA 片段(图 1), 与预期扩增的片段长度相符。以 P1 和 P2 为特异引物, 从琼脂糖平板上的菌落中选取单克隆菌落 1、2 进行菌落 PCR。结果表明菌落 1、2 中均有目的片段插入(图 2)。提取重组质粒 DNA, 用 *Sph* I 和 *Sal* I 进行双酶切鉴定, 表明在 pGEM®-T Vector 中已成功插入目的片段(图 3)。

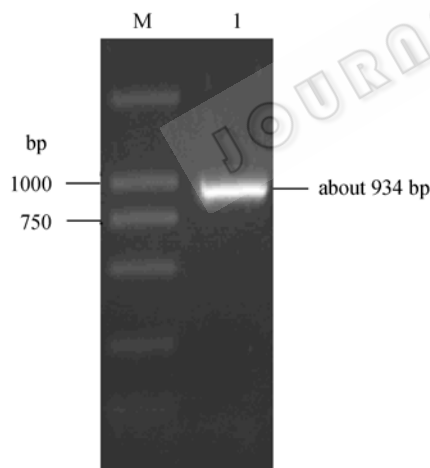


图 1 PCR 产物电泳图

Fig. 1 The COIII PCR products

M: DL-2000 markers; 1, 2: the PCR products

2.1.2 测序与序列分析

(1)家鸭 COIII 基因的序列分析

序列分析表明, 所克隆的片段长为 934 bp, 其中包括 COIII 基因全长 784 bp, 含一个起始密码子(ATG)和一个不完全终止密码子(T)以及 3'端下游的

ATPase6 基因和 5'端上游的 tRNA-Gly 基因。克隆的基因序列登录号为 DQ655706。

(2)家鸭线粒体 COIII 与 7 种禽类 COIII 的核苷酸序列和氨基酸序列比较

由表 1 可见家鸭线粒体 COIII 基因的序列及其推导的氨基酸序列与 GenBank 数据库已发表的 2 个目的 7 种禽类的 COIII 核苷酸和氨基酸序列比较, 结果显示具有良好的序列相似性。氨基酸序列的同源性也显示相似的结果。

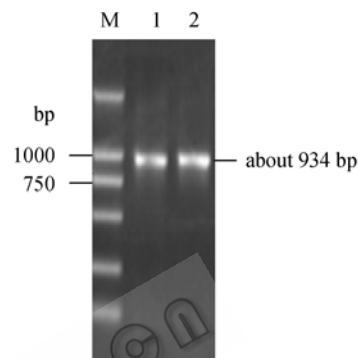


图 2 阳性克隆的菌体 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of the positive clones by PCR

M: DL-2000 markers; 1, 2: PCR products of positive clones

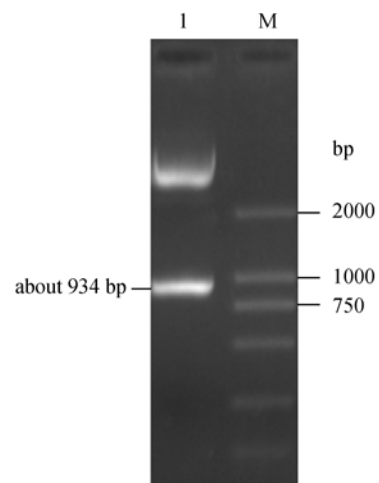


图 3 重组质粒的 DNA 酶切鉴定

Fig. 3 Enzyme analysis for the recombinant

M: DL-2000 markers; 1: the recombinant digested by *Sph* I and *Sal* I

2.2 PCR-mtDNA 鉴别检测鸭源性成分

2.2.1 鸭 PCR 扩增

利用设计的引物 P3 和 P4 以鸭、含鸭源性成分的饲料为模板进行 PCR 扩增从图 4 可以看出, 扩增出约 226 bp 左右的 DNA 片段, 与预期扩增的片段长度相符。

表 1 家鸭与其他 7 种禽类 COIII 序列及推测的氨基酸序列同源性比较
Table 1 Comparison of homology(%) among COIII from poultry mtDNA

GenBank accession No.	Scientific name	Ratio of (A+T) (%)	Nucleotide homology (%)	Amino acid homology (%)
DQ655706	<i>Anas platyrhynchos</i>	48.53		
AF090337	<i>Aythya americana</i>	50.00	90.6	97.7
NC007011	<i>Branta canadensis</i>	50.26	89.0	95.8
DQ083161	<i>Cygnus columbianus</i>	50.89	88.6	95.8
AF363031	<i>Anser albifrons</i>	49.62	88.6	95.8
NC007237	<i>Gallus bankiva</i>	50.51	84.6	91.3
NC_004575	<i>Coturnix chinensis</i>	54.33	82.5	91.7
NC_007227	<i>Alectura lathamii</i>	49.11	83.8	93.2

2.2.2 鸭特异性引物的验证

利用设计的特异性引物 P3、P4 分别对鸭、含鸭源性成分的饲料、鸡、鹅、火鸡、鸵鸟、鹌鹑、鹁鹑、牛、羊、猪、狗、驴、鸽子、兔子的肌肉组织 DNA 进行 PCR 扩增,结果除鸭及含鸭源性成分的饲料外均未扩增出特异性条带(图 5),由此可以初步推断引物 P3、P4 为鉴别检测鸭源性成分的特异性引物(只能扩增出鸭、含鸭源性成分的饲料)。

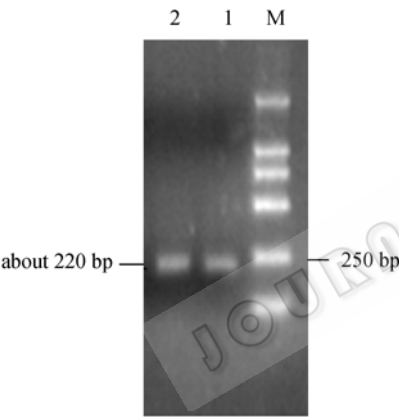


图 4 PCR 产物电泳图
Fig. 4 PCR products

M: DL-2000 markers; 1: the PCR products with duck muscle DNA;
2: the PCR products with duck DNA extract feedstuff

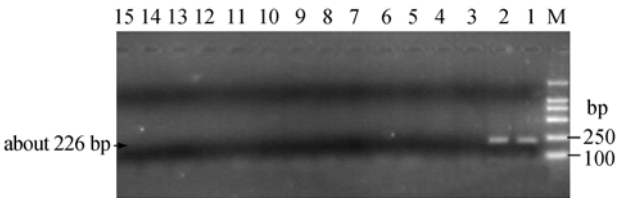


图 5 鸭特异性基因片段的 PCR 检测电泳图
Fig. 5 Electrophoretic profile of PCR products specially amplified from duck mtDNA

M: marker DL2000; 1: duck DNA; 2: the duck DNA extract feedstuff; 3: chicken DNA; 4: goose DNA; 5: turkey DNA; 6: ostrich DNA; 7: partridges DNA; 8: quail DNA; 9: cattle DNA; 10: sheep DNA; 11: pig DNA; 12: dog DNA; 13: pigeon DNA; 14: rabbit DNA; 15: donkey DNA

2.2.3 鸭 PCR 产物测序

将鸭 PCR 扩增产物进行纯化后送测序公司测序。经测序分析表明:PCR 特异性扩增产物的测序结果与克隆的鸭线粒体 DNA COIII 基因序列完全一致,这进一步证明本试验所设计的 PCR-mtDNA 鉴别检测鸭源性成分特异性引物特异强,准确度高。

2.2.4 特异性 PCR 检测的灵敏度验证

将鸭基因组 DNA 样品通过对 10%、2%、1%、0.02%、0.01%、0.002%、0.001% 的模板溶液进行 PCR 扩增,从 10%至 0.001% 的稀释度都能扩增出目的片段,亮度逐渐变暗,当含量达到 0.001% 时扩增出的条带较暗,稍有些模糊,说明能够检测出的最低含量约为 0.001%(图 6)。

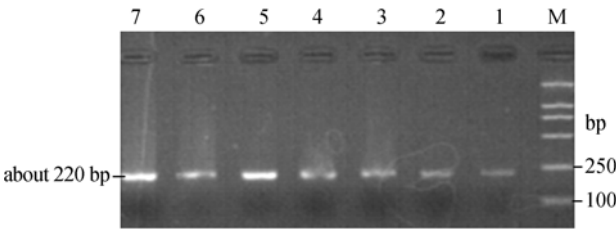


图 6 PCR 方法的灵敏度实验
Fig. 6 Sensitive experiment of PCR
M: marker DL2000; 1: 0.001% (the content of duck DNA);
2: 0.002%; 3: 0.01%; 4: 0.02%; 5: 1%; 6: 2%; 7: 10%

3 讨论

3.1 鸭 mtDNA 细胞色素 C 氧化酶 III(COIII)基因克隆的分析

本试验以家鸭为材料,通过提取 mtDNA 克隆了家鸭 mtDNA 部分片段,测序结果表明该片段包括 ATPase6 基因 3'端部分序列(1~102 bp)、COIII 基因全序列(102~885 bp)及 tRNA-Gly 基因 5'端部分序列

(886~934 bp)共 934 bp。序列分析表明: ATPase6 的终止子 TAA 与 COIII 的 ATG 的 A 相重叠, 终止密码子为不完全终止子, 仅有一个 T, 与 tRNA-Gly 共用一个 A。

3.2 PCR-mtDNA 鉴别检测鸭源性成分的分析

在动物源性成分鉴定方面, PCR 方法以其简便快速、灵敏度高、操作简单、节省费用、对检测样品的要求低(几乎所有的样本都可以作为 PCR 的材料, 它只要求样本中有完整的靶序列核酸)等特点逐渐成为质检部门检测的主要方法。应用上述试验建立的 PCR 方法, 可将鸭源性成分方便快捷地鉴定出来。肉骨粉、饲料等中由于加工工艺等原因, 均需要经过高温处理, 其中的 DNA 会受到影响, Ebbehøj 等^[13,14]证实, 当肉加热到 100°C 时锐减到 1100 bp 左右, 而加热到 120°C 时锐减至 600 bp 以下。若所扩增的目的片段太大则难以有效扩增, 所扩增的目的片段越大, 越难以扩增出来。因此, 选择所要扩增的目的片段应尽量短。本试验所建立的方法具有特异性强和灵敏度高等特点, 适用于一般试验室, 可以作为鉴别源性成分、肉骨粉种类的常规方法。

REFERENCES

- [1] Yang BH, Zong H, Lin QY, *et al.* Molecular approach for identification of bovine and ovine derived materials from animals derived feedstuffs. *Chin J Anim Sci*, 2002, **38**(1): 3-5.
杨宝华, 宗卉, 林庆燕, 等. 用分子生物学方法鉴别检测动物源性饲料中的牛羊源性成分. 中国畜牧杂志, 2002, **38**(1): 3-5.
- [2] Tartaglia M, Esaulle E, Pestalozza S, *et al.* Detection of bovine mitochondrial DNA in ruminant feeds: A molecular approach to test for the presence of bovine-derived materials. *J Food Prot*, 1998, **61**: 513-518.
- [3] Hopwod AJ, Faribrother KS, Lockley AK, *et al.* An actin gene-related polymerase chain reaction (PCR) test for identification of chicken in meat mixtures. *Meat Sci*, 1999, **53**: 227-231.
- [4] Yang BH, Zong H. Determination of animal-derived materials with conserved mitochondrial sequence in feedstuffs. *Feed Res*, 2002, **5**: 1-3.
杨宝华, 宗卉. 根据线粒体基因的特异性鉴别检测饲料中的动物源性成分. 科学试验与研究, 2002, **5**: 1-3.
- [5] Zong H, Zeng SL, Ling QY, *et al.* Molecular biology techniques for identification of horse and donkey materials in feedstuff. *China Herbiv*, 2005, **25**(5): 3-6.
宗卉, 曾少灵, 林庆燕, 等. 饲料中马、驴源性成分分子生物学检测技. 中国草食动物, 2005, **25**(5): 3-6.
- [6] Chen Y, Wu YJ, Xu BL, *et al.* Species specific PCR for identification of horse and donkey materials in feedstuff. *China Biotechnol*, 2004, **24**(5): 78-83.
陈颖, 吴亚君, 徐宝梁, 等. 食品及饲料中马属动物源性成分的 PCR 检测研究. 中国生物工程杂志, 2004, **24**(5): 78-83.
- [7] Chen Y, Wu YJ, Xu BL, *et al.* Detection of bovine, sheep and goat materials in import animal products by PCR assay. *Sci Technol Food Ind*, 2004, **25**(8): 144-146.
陈颖, 吴亚君, 徐宝梁, 等. 进出口动物源性产品中牛羊成分的检测方法. 食品工业科技, 2004, **25**(8): 144-146.
- [8] Zheng ZX, Zhang YS, Tang ZZ, *et al.* Fauna Editorial Committee Academia Sinica. Beijing: Science Press, 1979.
郑作新, 张荫荪, 唐詹珠, 等. 中国动物志. 北京: 科学出版社, 1979.
- [9] Wang W, Shi LM. An improved method for isolation of a animal mitochondrial DNA. *Zool Res*, 1993, **14** (2): 197-198.
王文, 施立明. 一种改进的动物线粒体 DNA 提取方法. 动物学研究, 1993, **14** (2): 197-198.
- [10] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res*, 1994, **22**: 4673-4680.
- [11] Altschul SF, Gish W, Miller W, *et al.* Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 1990, **215**: 403-410.
- [12] Singh VK, Mangalam AK, Dwivedi S, *et al.* Primer Premier: program for design of degenerate primers from a protein sequence. *Bio Tech*, 1998, **24**: 318-319.
- [13] Ebbehøj EF, Thomsen PD. Species differentiation of heated meat products by DNA hybridization. *Meat Sci*, 1990, **3**: 221-234.
- [14] Ebbehøj EF, Thomsen PD. Differentiation of closely related species by DNA hybridization. *Meat Sci*, 1991, **31**: 359-366.