

# 鹅源性成分 PCR 检测方法的建立

汪燕玲<sup>1</sup>, 宗卉<sup>2</sup>, 阮周曦<sup>2</sup>, 张利平<sup>1</sup>

(1. 甘肃农业大学动物科学技术学院, 甘肃兰州 730070; 2. 深圳出入境检验检疫局动植物中心, 广州深圳 518010)

**摘要** [目的] 建立一种检测鹅源性成分的 PCR 方法。[方法] 以 15 种动物的 DNA 为模板, 利用鹅的特异性引物进行 PCR 反应, PCR 产物用 1.4% 的琼脂糖凝胶电泳检测并测序, 检测引物的特异性和敏感性。[结果] 通过 PCR 反应从鹅样品中扩增到了 304 bp 的目的片段, 其他物种火鸡、鸭、鹌鹑、鸵鸟、鸽子、鸡、马、牛、羊、猪、狗、猫、鱼和空白对照则无目的片段, 表明该引物的特异性良好。鹅组织 PCR 产物的核苷酸序列与 GenBank 中检索到的相应序列基本符合, 相似性为 98%; PCR 检测方法的检测灵敏度为 0.01%。[结论] 该 PCR 检测方法特异性强、准确性好、灵敏度高、可重复性好, 为明确食品与饲料的成分和来源, 预防禽流感的传播提供了有效的分子生物学检测方法。

**关键词** 鹅; 线粒体 DNA; 动物源性成分; 聚合酶链式反应

**中图分类号** S813.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)24-11432-03

## Establishment of PCR Detections for Goose-derived Components

WANG Yan-ling et al (Institute of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070)

**Abstract** [Objective] The purpose was to establish a PCR method for detecting goose-derived components. [Method] With DNAs from 15 animals as templates, PCR reactions were carried out by using specific primers of goose. The PCR products were detected by 1.4% agarose gel electrophoresis and sequenced to detect the specificity and sensitivity of primers. [Result] The target fragment with length as 304 bp was amplified from goose samples through PCR reaction. There was no target fragment in other species such as turkeys, ducks, quail, ostriches, pigeons, chickens, horses, cattle, sheep, pigs, dogs, donkeys, cats, fish as well as the blank control, indicating that the primers had good specificity. The nucleotide sequences of PCR product from goose tissues were identical with the corresponding sequence retrieved in the Genbank and the similarity was 98%; the detection sensitivity of PCR method was 0.01%. [Conclusion] The PCR detection method had characteristics of strong specificity, good accuracy, high sensitivity and good repeatability, which provided an effective molecular biological detection technique for defining the composition and source of food and feed and preventing the spread of avian influenza.

**Key words** Goose; Mitochondrial DNA; Animal-derived ingredients; Polymerase chain reaction

禽流行性感胃 (Avian Influenza, AI) 简称禽流感, 被国际兽疫局定为 A 类传染病<sup>[1]</sup>, 它是由 A 型流感病毒引起的禽类的烈性传染病。近些年来, 高致病性禽流感病毒在全球范围内频繁暴发<sup>[2]</sup>。从近几年发病的区域看, 东南亚和非洲是禽流感的老疫区和重灾区, 2007 年 26 个国家和地区发生禽流感, 亚洲就占发病总数的 58%<sup>[3-4]</sup>。有数据显示, 2008 年中国就有 4 名禽流感病毒感染者死亡, 因此, 禽流感给人类带来了严峻的挑战, 需要人们积极面对, 采取应急措施去控制其在全球范围内的传播与扩散。禽流感以空气传播为主, 水禽和候鸟也是禽流感病毒的主要宿主和传播者<sup>[5]</sup>。研究表明, 水禽作为禽流感病毒的天然宿主, 禽流感病毒不仅可以长期在其体内寄居, 而且可以通过水禽的迁徙, 经消化道将病毒排出体外污染水域而感染其他鸟类和哺乳动物, 这可能是禽流感病毒长期适应水禽达到进化平衡状态的结果<sup>[6]</sup>。中国是世界上养鹅数量最多, 品种资源最为丰富的国家。针对目前我国畜禽类肉食品和饲料市场贸易中畜禽源性成分检验检疫的迫切需要, 笔者展开了 PCR 技术对检测鹅源性成分的研究, 旨在为鉴别和检测饲料中的鹅源性成分提供一种实用、有效的分子生物学方法<sup>[7]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品。** 试验所用鹅、火鸡、鸭、鹌鹑、鸵鸟、鸽、鸡、马、牛、羊、猪、鹿、兔、狗、鱼肉骨粉样品, 由深圳出入境检验检疫局提供。

**1.1.2 试验仪器和试剂。** 试剂: 选用大连宝生物生物工程有限公司 Taq DNA 聚合酶、dN TP 混合物、10 $\times$ Ex Taq Buffer、MgCl<sub>2</sub>、DL2000 DNA Marke; DNA 快速提取试剂, 购自天根生化科技 (北京) 有限公司。

仪器: PC2000-PCR 反应仪。

**1.1.3 试验用软件。** PCR 引物设计软件为 Primer Premier 5.0 和 DNASTar。

### 1.2 方法

**1.2.1 DNA 提取。** 用天根生化科技 (北京) 有限公司血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒 (离心柱型) 按照试剂盒要求提取。

**1.2.2 PCR 扩增。**

(1) 引物的设计。根据 NCBI 中已经发表的鹅线粒体基因组序列 (登录号为: EU571957。) 线粒体 DNA D-loop 区设计引物, 利用 Primer 5.0 设计经 Blast 比对, 设计了一对鉴别鹅线粒体 DNA D-loop 区的引物, 上游引物 P7, 下游引物 P8, 目的片段 304 bp。引物由上海生工生物有限公司合成。

(2) PCR 反应。PCR 反应条件: 第一次循环前于 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 每一次循环包括: 94 $^{\circ}$ C 变性 50 s, 65 $^{\circ}$ C 复性 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 循环 30 次; 最后一次循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

PCR 扩增的反应体系: DNA 模板 5  $\mu$ l, 10 $\times$ Ex Taq Buffer (Mg<sup>2+</sup> Free) 5  $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 5  $\mu$ l, Taq DNA 聚合酶 0.5  $\mu$ l (5 U/ $\mu$ l), dN TP 混合物 (各 2.5 mmol/L) 3  $\mu$ l, 上游引物 P7 3  $\mu$ l (10 pmol/ $\mu$ l), 下游引物 P8 3  $\mu$ l (10 pmol/ $\mu$ l), 加 DEPC 水补充至 50  $\mu$ l。

(3) PCR 产物的电泳检测。PCR 扩增产物用 14 g/L (1.4%) 琼脂糖凝胶电泳检测 (TAE 缓冲液), 电压 100 V, 电流 110 A, 时间 40 min, 检测有无目的条带。

**基金项目** 深圳出入境检验检疫局资助项目。

**作者简介** 汪燕玲 (1981 - ), 女, 甘肃武山人, 硕士研究生, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖。

**收稿日期** 2009-01-20

(4)产物测序。PCR 扩增后得到的产物经纯化后送去上海生工生物工程有限公司测序。

1.2.3 特异性和敏感性检测。

(1)特异性。利用设计的针对鹅的特异性引物,以所提取的鹅、火鸡、鸭、鹌鹑、鸵鸟、鸽、鸡、马、牛、羊、猪、驴、狗、猫、鱼的 DNA 为模板,进行 PCR 反应,以鉴定其特异性。

(2)敏感性。将研磨成粉末的鹅肉骨粉样品用鱼肉粉末稀释(100 g/100 g)至鹅成分样品含量分别为 100.00、50.00、10.00、1.00、0.10、0.01 g/100 g,提取 DNA,然后进行 PCR 扩增,用以检测该方法的灵敏度<sup>[8]</sup>。

2 结果与分析

2.1 引物的特异性 利用所设计的鹅特异性引物,以所提取的鹅、火鸡、鸭、鹌鹑、鸵鸟、鸽、鸡、马、牛、羊、猪、鹿、兔、狗、鱼肉粉的 DNA 模板多次进行 PCR 反应,对 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳检测结果显示,只有从鹅的 DNA 模板中扩增到大小约为 304 bp 的目的片段(图 1),对其他动物 DNA 无扩增,说明该引物的特异性良好。

2.2 PCR 产物的序列 将引物 P7、P8 扩增的 PCR 产物送去上海生工生物有限公司测序,测序结果如下(符合率为 98%):  
ACCTGCCTCACGGTCTATCCTATATCTCAAGGGTCCCTCG-  
ATGAGACGGTTGGCGTATATGGGGAATCATCCTGACACTG-  
ATGCACCTTGACCACATTCAGTTAATGTCACCTCCACCCT-  
CCGGTTAAATGGGGCTATTGGATGAATGCTCGTTGGACA-  
TAGCACAAAACAACAAATCATTAAAGCGCAACCCCTGCGC-  
TTCACAAACTAAACCAGTAAACTTCACTAATCACCATCTA-  
GTATAAACCTTCACCACCCA。

测序结果对比情况见图 2。

测序结果-Query 1	CCTGCTCACGGTCTATCCTATATCTCAAGGGTCCCTCG-ATGAGACGGTTGGCGTATATGGGGAATCATCCTGACACTG-ATGCACCTTGACCACATTCAGTTAATGTCACCTCCACCCT-CCGGTTAAATGGGGCTATTGGATGAATGCTCGTTGGACA-TAGCACAAAACAACAAATCATTAAAGCGCAACCCCTGCGC-TTCACAAACTAAACCAGTAAACTTCACTAATCACCATCTA-GTATAAACCTTCACCACCCA	50
NBI 序列-Shjet 445	CCTGCTCACGGTCTATCCTATATCTCAAGGGTCCCTCG-ATGAGACGGTTGGCGTATATGGGGAATCATCCTGACACTG-ATGCACCTTGACCACATTCAGTTAATGTCACCTCCACCCT-CCGGTTAAATGGGGCTATTGGATGAATGCTCGTTGGACA-TAGCACAAAACAACAAATCATTAAAGCGCAACCCCTGCGC-TTCACAAACTAAACCAGTAAACTTCACTAATCACCATCTA-GTATAAACCTTCACCACCCA	504
Query 61	GGGAATCATCTGACACTGATGCACCTTGACCACATTCAGTTAATGTCACCTCCACCCT-CCGGTTAAATGGGGCTATTGGATGAATGCTCGTTGGACA-TAGCACAAAACAACAAATCATTAAAGCGCAACCCCTGCGC-TTCACAAACTAAACCAGTAAACTTCACTAATCACCATCTA-GTATAAACCTTCACCACCCA	120
Shjet 585	GGGAATCATCTGACACTGATGCACCTTGACCACATTCAGTTAATGTCACCTCCACCCT-CCGGTTAAATGGGGCTATTGGATGAATGCTCGTTGGACA-TAGCACAAAACAACAAATCATTAAAGCGCAACCCCTGCGC-TTCACAAACTAAACCAGTAAACTTCACTAATCACCATCTA-GTATAAACCTTCACCACCCA	564
Query 121	CCGGTTAAATGGGGCTATTGGATGAATGCTCGTTGGACA-TAGCACAAAACAACAAATCATTAAAGCGCAACCCCTGCGC-TTCACAAACTAAACCAGTAAACTTCACTAATCACCATCTA-GTATAAACCTTCACCACCCA	180
Shjet 565	CCGGTTAAATGGGGCTATTGGATGAATGCTCGTTGGACA-TAGCACAAAACAACAAATCATTAAAGCGCAACCCCTGCGC-TTCACAAACTAAACCAGTAAACTTCACTAATCACCATCTA-GTATAAACCTTCACCACCCA	624
Query 181	TAGGFCAAATCCCTGGCTTCACAACTAAAGCGCAACCCCTGCGC-TTCACAAACTAAACCAGTAAACTTCACTAATCACCATCTA-GTATAAACCTTCACCACCCA	240
Shjet 625	TAGGFCAAATCCCTGGCTTCACAACTAAAGCGCAACCCCTGCGC-TTCACAAACTAAACCAGTAAACTTCACTAATCACCATCTA-GTATAAACCTTCACCACCCA	684
Query 241	TATAAACCTTCACCACCCA	259
Shjet 685	TATAAACCTTCACCACCCA	703

图 2 测序结果对比情况

Fig. 2 Comparison situation of sequence results

原因是:①在所有组织细胞中均含有大量的线粒体<sup>[9]</sup>,可以获得大量的 mtDNA,mtDNA 在不同的物种间具有高度的变异性<sup>[10]</sup>;每个动物细胞中存在许多拷贝的线粒体基因组,在采取相同体积的 DNA 样品进行 PCR 检测时,线粒体基因组的模板数大大高于细胞核基因组的模板数,这就大大提高了 PCR 检测的灵敏度。②mtDNA 主要以编码序列构成,种内的异质基因很少<sup>[11]</sup>。③不同种类的动物线粒体基因组序列虽然高度同源,存在高度保守区域,但也存在一定的变异区域,D-loop 区具有种间的高度多态性和突变性,因此可以选择位于 D-loop 区段内的编码部分,利用该区域可设计特

2.3 引物的敏感性 敏感性试验采用鹅组织肉粉与鱼粉相混合使用的方法,每组 3 个样品,用天根生化科技(北京)有限公司血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)按照试剂盒要求提取 DNA。用提取的 DNA 5 μl 作模板,进行 PCR 扩增,电泳结果见图 3。结果表明,鹅组织含量从 100%~0.01% 都呈阳性,即 PCR 检验检测灵敏度至少可达 0.01%。



注:1 为鹅;2 为火鸡;3 为鸭;4 为鹌鹑;5 为鸽子;6 为鸵鸟;7 为鸡;8 为马;9 为牛;10 为羊;11 为猪;12 为狗;13 为驴;14 为猫;15 为鱼;16 为空白。M 为 marker2000。鹅特异性对比 t=65 ℃。

Note: 1. Goose; 2. Turkey; 3. Duck; 4. Quail; 5. Dove 6. Ostrich; 7. Chicken; 8. Horse; 9. Cattle; 10. Sheep, 11. Pig; 12. Dog; 13. Donkey; 14. Cat; 15. Fish; 16. Blank. M. marker2000. Comparison of goose specific (t=65 ℃).

图 1 鹅源性成分的特异性 PCR 产物电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis products results of goose materials specific

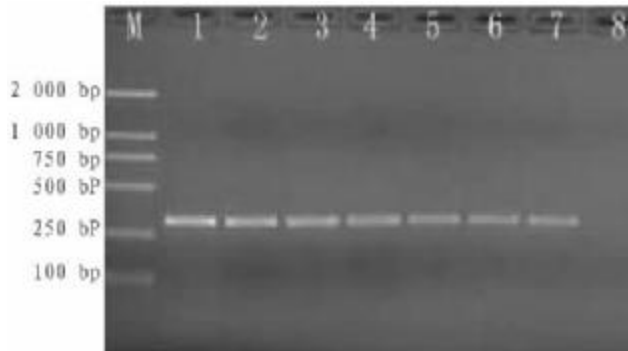
3 结论与讨论

3.1 引物设计的依据 线粒体 DNA 是高等动物唯一的核外遗传物质,是一个比较理想的用于检测的靶基因,其主要

异性引物;有些物种在 Genbank 上没有关于 mtDNA 的全序列的报道,但大部分有 D-loop 区段的序列。

3.2 引物的特异性和灵敏性 一个好的分子生物学检测方法应该具备特异性、灵敏性和稳定性 3 个条件<sup>[12]</sup>,肉骨粉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,经证实,当肉加热到 100 ℃时 DNA 片段长度锐减到 100 bp 左右,而加热到 120 ℃时减至 600 bp 以下<sup>[13-14]</sup>,因此扩增的片段大于 600 bp 则难以扩增出来,出现假阴性结果。该试验选择了 15 种常见动物样品:鹅、火鸡、鸭、鹌鹑、鸽子、鸵鸟、鸡、马、牛、羊、猪、狗、驴、猫、鱼,包括 7 种禽类、7

种哺乳动物以及1种鱼类的样品。根据鹅线粒体DNA序列,筛选出特异性引物,利用该引物用鹅DNA及其他动物的DNA为模板,进行PCR反应,结果只有从含有鹅成分的样品中扩增出304bp特异性目的条带,而没有从其他参照动物的样品及空白对照中扩增出特异性目的条带,这表明所设计的鹅特异性引物具有较好的物种特异性。从灵敏度试验结果来看,该试验PCR检测灵敏度至少可达0.01%,表明该引物有较强的灵敏度,由于DNA具有很高的稳定性,即使当样品经过强度处理形成混合物时仍可鉴别而达到检测目的。



注:数字为鹅DNA含量,1为100%;2为50%;3为10%;4为5%;5为1%;6为0.1%;7为0.01%;8为空白;M为marker2000;灵敏度 $t=65^{\circ}\text{C}$ 。

Note: Numbers stand for DNA content of goose, 1. 100%; 2. 50%; 3. 10%; 4. 5%; 5. 1%; 6. 0. 1%; 7. 0. 01%; 8. Blank; M. marker2000; sensitivity  $t=60^{\circ}\text{C}$ 。

图3 鹅灵敏性PCR产物电泳结果

Fig.3 Electrophoresis products results of goose sensitivity

**3.3 该检测方法的应用前景** 动物源性成分检测是近年来一个非常活跃的研究领域,动物源性饲料是指以动物为原料用作饲料的产品,用于分析食品和饲料中动物源性成分的方法很多,这些方法各有优缺点,但存在的主要问题是当前使用的大部分方法不能区分允许添加的物质和禁止添加的物质,且很多使用的方法都不能进行定量分析。因此,在选择动物源性成分的检测方法时,应考虑实验室的条件和检测需要,选择合适的动物源性成分鉴别方法,在动物源性成分的检测过程中通常检测方法有以下3种:①以组织学为基础的检测技术;②以蛋白质为基础的检测技术;③以DNA为基础的检测技术<sup>[15-16]</sup>,而在日常检测中运用比较普遍和广泛的是以DNA为基础的检测技术。目前,国内动物源性饲料的生产和使用仍然十分混乱,动物源性成分的检测也已经成为一种重要的识别掺假的手段,近几年来,食品安全问题越来越引起人们的重视,生产厂家对食品的掺杂造假现象也成为消费者越来越关注的问题,在饲料生产中由于不同动物的下脚料混合收购和混合加工,很容易掺入禽类组织成分,增加

了动物饲用禽源性饲料而感染禽流感的风险。为了防止高致病性禽流感的传播,有必要对进出口禽类食品和饲料的动物源性成分进行品种鉴定,以确定禽类食品和饲料的成分来源,从而更好地防御禽流感的暴发与传播<sup>[17]</sup>。目前以DNA为基础的PCR鉴别检测方法已广泛运用在牛羊源性成分的检测中,但尚未看到有关对鹅源性成分检测的报道,因此建立一种快速检测鹅源性成分的方法非常重要。该研究成功建立了饲料中鹅源性成分的PCR检测技术,所设计的引物可以专一地从饲料样品的DNA模板中扩增到鹅的mtDNA片段,而不能从其他动物组织样品中扩增出PCR产物,检出限为0.1g/kg;所建立的鹅源性成分的检测方法特异性强、准确性好、灵敏度高、可重复性好,完全适用于进出口食品、饲料源性成分的鉴定工作,为明确食品与饲料的成分和来源,预防禽流感的传播提供了有效的分子生物学检测方法。

#### 参考文献

- [1] 郑作新. 中国经济动物志(鸟类卷)[M]. 北京: 科学出版社, 1963.
- [2] 唐素云, 苏涛, 龙跃生. H5N1亚型禽流感病毒的危害及其防治的研究进展[J]. 湖南科技学院学报, 2006, 27(5): 95-97.
- [3] 李文玉, 林春斌, 徐彬彬. 高致病性禽流感的危害与防控[J]. 江西畜牧兽医杂志, 2007(6): 52-54.
- [4] 赵正阶. 中国鸟类志, 上卷, 非雀形目[M]. 长春: 吉林科学出版社, 2001: 412-414.
- [5] 姚海潮, 曾江勇, 张成福. 浅议禽流感的危害及防控[J]. 西藏科技, 2008(6): 45-47.
- [6] 杨峻, 邵华武, 艾地云, 等. 鹅禽流感免疫程序研究[J]. 湖北农业科学, 2008(4): 449-451.
- [7] 张慧霞, 张利平, 吴建平, 等. 鹅源性成分PCR检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2008, 38(4): 346-349.
- [8] 李峰, 曹波, 叶亦菊, 等. 我国高致病性禽流感流行现状及防治措施[J]. 福建畜牧兽医, 2008, 30(2): 54-56.
- [9] MOMCILOVIC D, RASOOLY A. Detection and analysis of animal materials in food and feed[J]. Journal of Food Protection, 2000, 63: 1602-1609.
- [10] 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 materials[J]. Journal of Food Protection, 1998, 61: 513-518.
- [11] 张慧霞, 吴建平, 宗卉, 等. 应用PCR技术检测禽类源性成分[J]. 中国畜牧杂志, 2008, 44(11): 46-49.
- [12] 张慧霞, 张利平, 吴建平, 等. 应用PCR技术检测鹅源性成分[J]. 中兽医医药杂志, 2008(2): 16-18.
- [13] EBBEHOJ E F, THOMSEN P D. Species differentiation of heated meat products by DNA hybridization[J]. Meat Science, 1990, 30: 221-234.
- [14] EBBEHOJ E F, THOMSEN P D. Differentiation of closely related species by DNA hybridization[J]. Meat Science, 1991, 31: 359-366.
- [15] 张继荣, 雷富民. 我国部分禽流感病毒H5N1之HA序列变异演化分析[J]. 动物学杂志, 2008, 43(6): 10-16.
- [16] SUBBARAO K, KLIMOV A, KATZ J, et al. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness[J]. Science, 1998, 279: 393-396.
- [17] MATROSOVICH M, ZHOU N, KAWAOKA Y, et al. The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens and wild aquatic birds have distinguishable properties[J]. Journal of Virology, 1999, 73(2): 1146-1155.