

食用植物油中动物源性成分 PCR 检测方法的建立

赵琳娜, 王丹, 胡凤月, 吴鹏, 韩月贝, 杨红莲

(北京市食品安全监控中心, 北京 100041)

摘要: 本文建立了应用 PCR 技术快速鉴别食用植物油中动物源性成分的方法。以食用植物油中掺入的动物源性基因为靶标, 自行设计 16S rRNA 基因通用引物, 同时选用动物物种特异性引物进行 PCR 扩增, 分别得到相应的目的片段。通过三对 16S rRNA 基因通用引物, 建立了从食用植物油中快速检测是否含有动物源性成分的方法; 利用所选的动物物种特异性引物, 进一步建立了从食用植物油中鉴定猪、牛、羊、鸡、鱼 5 种动物源性成分的方法, 此方法能检测出含有 0.1% (*m/m*) 动物源性成分的植物油。

关键词: 食用植物油; 动物源性成分; 掺入; PCR

文章编号: 1673-9078(2012)5-588-592

Detection of Animal-derived Ingredients in Edible Vegetable Oils by PCR Method

ZHAO Lin-na, WANG Dan, HU Feng-yue, WU Peng, HAN Yue-bei, YANG Hong-lian

(Beijing Municipal Center for Food Safety Monitoring, Beijing 100041, China)

Abstract: In this article, a rapid and simple method of animal-derived ingredients in edible vegetable oils was established. Two pairs of universal primers to animal species and five pairs of specific primers to pig, bovine, sheep, chicken and fish were designed for PCR amplification. The amplicons of universal primers and species-specific primers were used for animal-derived ingredients detection. Sensitivity and specificity of the newly developed method were confirmed with a detection level of 0.1% (*m/m*).

Key words: edible vegetable oils; animal-derived ingredients; adulteration; PCR

近年来, 不法生产企业或人员将加工后的废弃油脂作为食用油非法销售或在食品加工中非法使用的报道越来越多, 引起社会的广泛关注。国家明确规定, 不得将废弃油脂加工后再作为食用油脂使用或者销售。废弃油脂包括餐厨废弃物(通称泔水)经过简单加工提炼出的油和劣质畜禽肉、动物下水等加工提炼后产出的油等等。现行的国家食用油检验标准与检测方法只是对酸价和过氧化值等理化指标的检测, 不能确定食用油中的外源动物成分。而且经过加工后的废弃油脂, 其色泽、气味、滋味等感官指标, 以及酸价和过氧化值等理化指标常接近或完全符合国家《食用植物油卫生标准》(GB2716-2005), 掺混后与正常食用植物油难以区分。

PCR技术主要是通过热循环, 实现对目的基因片段的大量扩增。因其具有快速、灵敏、特异性高等特点, 已被广泛应用于食品成分掺假鉴别检测中^[1-5]。本研究针对废弃油脂在反复回收使用过程中不可避免的混有动物成分, 如: 餐厨废弃物通过食物带入动物成分,

收稿日期: 2012-02-21

作者简介: 赵琳娜(1978-), 女, 高级工程师, 博士研究生, 主要从事生物安全方面的食品检测和研究

用劣质畜禽肉、动物下水等加工提炼的废弃油脂本身就含有动物成分的特点, 以食用植物油中掺入的动物源性基因为靶标, 建立了应用聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)技术鉴别食用植物油中动物源性成分的检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料

猪油、牛油、羊油、鸡油、鱼油、玉米油、花生油、大豆油等常见动植物材料用于动物源性成分的检测。

1.2 标准样品的制备

将猪油、牛油、羊油、鸡油、鱼油用大豆油分别稀释至含量为100%、10%、5%、1%、0.5%、0.1%、0.05%, 以检测单一动物源性成分的灵敏度; 然后将猪油、牛油、羊油、鸡油、鱼油以相同的量混合, 用大豆油稀释, 使混合油脂中每种动物源性成分(猪、牛、羊、鸡、鱼)含量分别为1%和0.1%, 用以检测各种动物源性成分混合后样品的最低限度。

1.3 试剂和仪器

1.3.1 试剂

CTAB、Tris、EDTA、NaCl、三氯甲烷、异丙醇均为国产分析纯; Taq DNA 聚合酶购自 Takara; 100 bp DNA ladder 购自 Tiangen 生物公司; 食品核酸提取试剂盒(磁珠法) 购自海康生命科技有限公司。

1.3.2 仪器

Sigma 3K18 离心机、电热恒温水浴、Bio-RAD MyCycler™ PCR 仪、Bio- RAD 电泳仪、Bio- RAD Gel Doc XR 凝胶成像分析系统。

1.4 DNA提取方法

1.4.1 改良CTAB法

固态油脂于60 °C温浴成液态后, 再进行DNA提取。在用TE萃取油脂过程中, 建议采用较高的温度如37 °C, 使油脂保持液态。

在2 mL离心管中加入400 μL TE缓冲液, 补足油脂至2 mL, 颠倒混匀5 min, 室温下12000 r/min, 离心5 min, 去上层油脂, 再次向同一支离心管中补足新油脂至2 mL, 离心, 去上层油脂, 反复3~5次。取水相用于

提取DNA。

在制样获取约400 μL的水相中, 加入400 μL CTAB 提取液, 涡旋振荡1~3 s, 置于65 °C水浴30 min; 加入等体积24:1三氯甲烷、异戊醇, 轻缓颠倒数次后室温静置5 min; 12000 r/min室温下离心10 min; 转移上清液于一新的1.5 mL离心管中, 加入0.6倍体积预冷的异丙醇, 颠倒混匀后于-20 °C静置1~2 h沉淀DNA; 12000 r/min室温离心10 min, 弃去上清液; 用70%乙醇洗涤沉淀两次。待沉淀干燥后, DNA沉淀溶解于20~50 μL TE 缓冲液或灭菌双蒸水中, 待测或于-20 °C保存备用。

1.4.2 试剂盒法

按照食品核酸提取试剂盒(磁珠法) 操作说明进行。

1.5 PCR 体系及反应条件

本方法所用引物均委托北京赛百盛基因技术有限公司合成。具体引物信息见表1。

表1 食用植物油中掺入动物成分线粒体基因的引物

Table 1 Primers of the mitochondrial gene of animal elements in edible vegetable oil

引物名称	引物序列	片段大小	资料来源
通用1	F:5'-AAGACGAGAAGACCCTTGGACTTTA-3' R:5'-GATTGCGCTGTTATCCCTAGGGTA-3'	234~262	Bottero et al.(2003) ^[6]
通用2	F:5'- ACCGTGCAAAGGTAGCATAATCA-3' R:5'- GCTCCATAGGGTCTTCTCGTCTT-3'	154	自行设计
通用3	F:5'-CCTAGGGATAACAGCGCAATC-3' R:5'-TTAATCGTTGAACAAACGAACC-3'	124	自行设计
牛	F: 5'-GCCATATACTCTCCTTGGTGACA-3' R: 5'-GTAGGCTTGGGAATAGTACGA-3'	271	Tartaglia et al.(1998) ^[7]
猪	F:5'- GCCTAAATCTCCCCTCAATGCTA-3' R:5'- ATGAAAGAGGCAAATAGATTTTCG-3'	212	Lahiff et al.(2001) ^[8]
鱼	F:5'- TAAGAGGGCCGGTAA AACTC - 3 ' R: 5 '- GTGGGGTATCTA ATCCAG - 3 '	224	Dalmasso et al.(2004) ^[9]
羊	F: 5'-ATGCTGTGGCTATTGTC-3' R: 5'-CCTAGGCATTTGCTTAATTTTA-3'	274	Bottero et al.(2003) ^[10]
鸡	F: 5'-GGGACACCCTCCCCCTTAATGACA-3' R: 5'-GGAGGGCTGGAAGAAGGAGTG-3'	266	Lahiff et al.(2001) ^[11]

2 结果与讨论

2.1 通用引物对动物油中动物成分扩增结果

根据动物线粒体16S rRNA基因保守序列, 分别在序列的不同区域自行设计了两对引物, 即通用引物2和通用引物3, 片段大小为154 bp和124 bp, 和文献报道的通用引物1相比, 通用引物2和通用引物3的扩增片段长度缩小了近100 bp。利用通用引物1、通用引物2和通用引物3分别以猪、牛、羊、鸡、鱼DNA为模板进行PCR

扩增, 通用引物1扩增得到234~262 bp大小的目的片段, 其中牛和羊的目的片段均为234 bp, 猪、鸡、鱼的目的片段为238 bp、249 bp、262 bp (图1); 通用引物2扩增得到154 bp大小的目的片段 (图2); 通用引物3扩增得到124 bp大小的目的片段 (图3)。而以大豆油、花生油和玉米油DNA为模板进行PCR扩增, 通用引物1、通用引物2和通用引物3均未扩增到目的片段。结果显示三对通用引物对动物源性成分检测均具有很好的特异性。

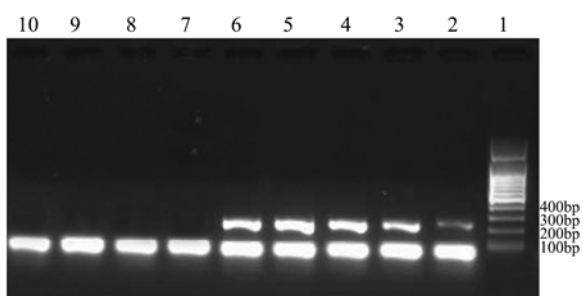


图1 通用引物1检测动物油中单一动物成分PCR扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis patterns of PCR products of animal ingredients in Animal oils with general primer 1

注: 1: 100 bp DNA ladder; 2: 鱼油DNA扩增; 3: 鸡油DNA扩增; 4: 猪油DNA扩增; 5: 牛油DNA扩增; 6: 羊油DNA扩增; 7: 大豆油DNA扩增; 8: 花生油DNA扩增; 9: 玉米油DNA扩增; 10: 空白对照。

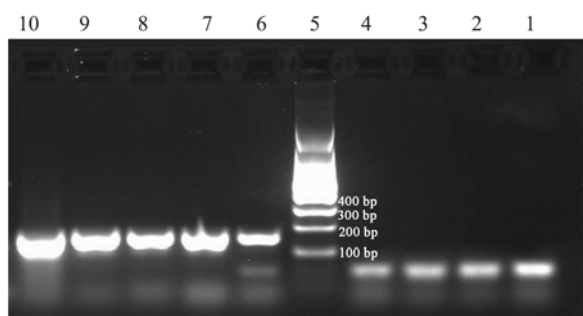


图2 通用引物2检测动物油中单一动物成分PCR扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig.2 Agarose gel electrophoresis patterns of PCR products of animal ingredients in Animal oils with general primer 2

注: 1: 空白对照; 2: 大豆油DNA扩增; 3: 花生油DNA扩增; 4: 玉米油DNA扩增; 5: 100 bp DNA ladder; 6: 鱼油DNA扩增; 7: 鸡油DNA扩增; 8: 猪油DNA扩增; 9: 牛油DNA扩增; 10: 羊油DNA扩增。

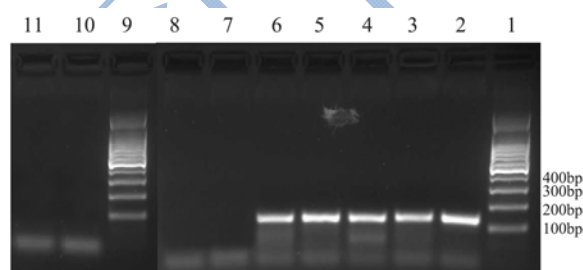


图3 通用引物3检测动物油中单一动物成分PCR扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig.3 Agarose gel electrophoresis patterns of PCR products of animal ingredients in Animal oils with general primer 3

注: 1和9: 100 bp DNA ladder; 2: 鱼油DNA扩增; 3: 鸡油DNA扩增; 4: 猪油DNA扩增; 5: 牛油DNA扩增; 6: 羊油

DNA扩增; 7: 大豆油DNA扩增; 8: 花生油DNA扩增; 10: 玉米油DNA扩增; 11: 空白对照。

2.2 通用引物对植物油中动物源性成分扩增结果

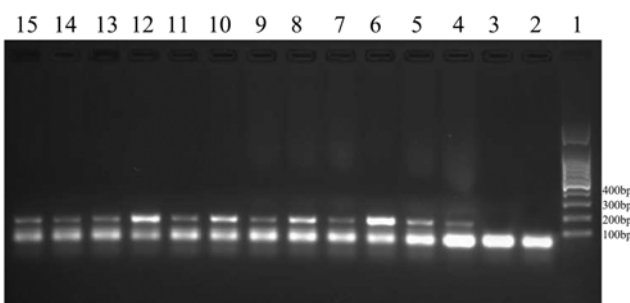


图4 通用引物2检测植物油中动物成分PCR扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig.4 Agarose gel electrophoresis patterns of PCR products of animal ingredient in vegetable oils with general primer 2

注: 1: 100 bp DNA ladder; 2: 空白对照; 3: 100%大豆油; 4: 0.1%鱼油DNA扩增; 5: 1%鱼油DNA扩增; 6: 1%鸡油DNA扩增; 7: 0.1%鸡油DNA扩增; 8: 1%猪油DNA扩增; 9: 0.1%猪油DNA扩增; 10: 1%牛油DNA扩增; 11: 0.1%牛油DNA扩增; 12: 1%羊油DNA扩增; 13: 0.1%羊油DNA扩增; 14: 1%(猪+牛+羊+鸡+鱼)油DNA扩增; 15: 0.1%(猪+牛+羊+鸡+鱼)油DNA扩增。

利用通用引物对分别掺有猪、牛、羊、鸡、鱼1种动物成分的大豆油和同时掺有猪、牛、羊、鸡、鱼5种混合动物成分的大豆油所提取的DNA进行PCR扩增, 均能扩增出相应大小的目的片段。图4为应用通用引物2的PCR扩增结果, 如图所示, 分别掺有1%和0.1%动物油的大豆油DNA均扩增出154 bp大小的目的片段。利用通用引物1、通用引物2和通用引物3对掺有0.05%动物油的大豆油进行PCR扩增, 均未扩增出相应的目的条带(图略)。结果显示通用引物能检测到植物油中0.1% (m/m) 的动物成分。

2.3 动物物种特异性引物对植物油中动物源性成分扩增结果

选择相应的动物物种特异性引物对分别掺有猪、牛、羊、鸡、鱼1种动物成分的大豆油所提取的DNA进行PCR扩增, 扩增结果显示, 含有不同种类动物成分的大豆油均被其对应的动物物种特异性引物扩增出相应大小的目的片段, 其中猪、牛、羊、鸡和鱼的目的片段分别为212 bp、271 bp、274 bp、266 bp和224 bp, 空白对照和含有其他种类动物成分的大豆油均未有目的条带扩出(图5~图9), 结果表明该方法具有较好的特异性和灵敏性, 可检测出含有0.1% (m/m) 动物源性成分的植物油。

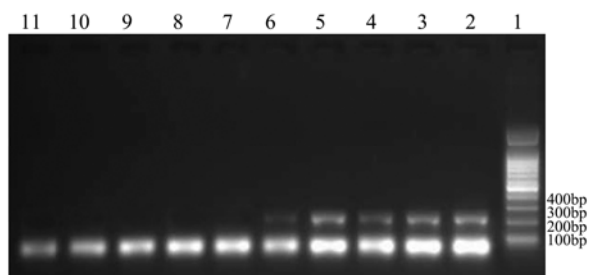


图5 大豆油中猪源成分特异性和灵敏性检测

Fig.5 Specificity and sensitivity analysis of pork-derived ingredient in soybean oil

注: 1: 100 bp DNA ladder; 2: 100%猪油DNA扩增; 3: 10%猪油DNA扩增; 4: 1%猪油DNA扩增; 5: 0.5%猪油DNA扩增; 6: 0.1%猪油DNA扩增; 7: 牛油DNA扩增; 8: 羊油DNA扩增; 9: 鸡油DNA扩增; 10: 鱼油DNA扩增; 11: 空白对照。

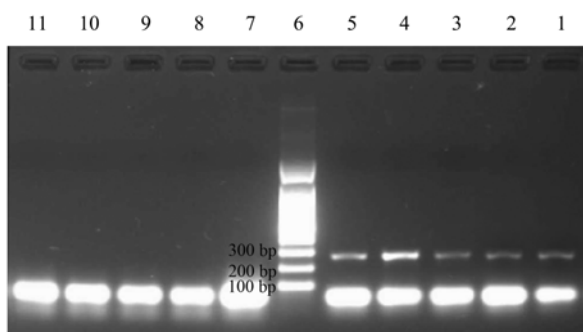


图6 大豆油中牛源成分特异性和灵敏性检测

Fig.6 Specificity and sensitivity analysis of beef derived ingredient in soybean oil

注: 1: 0.1%牛油DNA扩增; 2: 0.5%牛油DNA扩增; 3: 1%牛油DNA扩增; 4: 10%牛油DNA扩增; 5: 100%牛油DNA扩增; 6: 100 bp DNA ladder; 7: 猪油DNA扩增; 8: 羊油DNA扩增; 9: 鸡油DNA扩增; 10: 鱼油DNA扩增; 11: 空白对照。

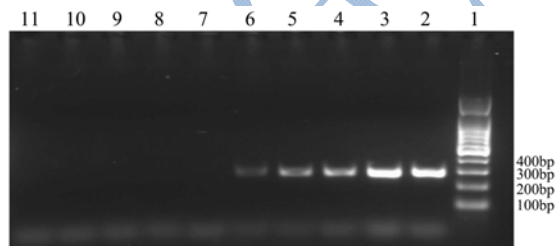


图7 大豆油中羊源成分特异性和灵敏性检测

Fig.7 Specificity and sensitivity analysis of sheep derived ingredient in soybean oil

注: 1: 100 bp DNA ladder; 2: 100%羊油DNA扩增; 3: 10%羊油DNA扩增; 4: 1%羊油DNA扩增; 5: 0.5%羊油DNA扩增; 6: 0.1%羊油DNA扩增; 7: 猪油DNA扩增; 8: 牛油DNA扩增; 9: 鸡油DNA扩增; 10: 鱼油DNA扩增; 11: 空白对照。

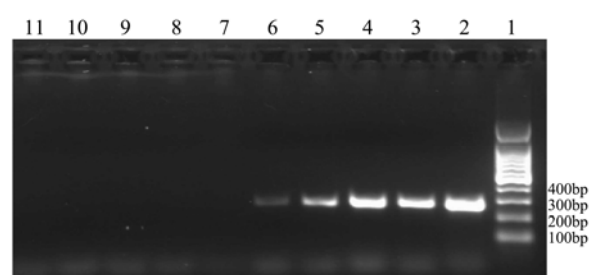


图8 大豆油中鸡源成分特异性和灵敏性检测

Fig.8 Specificity and sensitivity analysis of chicken derived ingredient in soybean oil

注: 1: 100 bp DNA ladder; 2: 100%鸡油DNA扩增; 3: 10%鸡油DNA扩增; 4: 1%鸡油DNA扩增; 5: 0.5%鸡油DNA扩增; 6: 0.1%鸡油DNA扩增; 7: 猪油DNA扩增; 8: 牛油DNA扩增; 9: 羊油DNA扩增; 10: 鱼油DNA扩增; 11: 空白对照

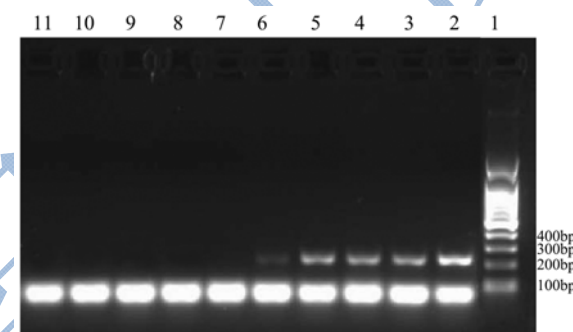


图9 大豆油中鱼源成分特异性和灵敏性检测

Fig.9 Specificity and sensitivity analysis of fish derived ingredient in soybean oil

注: 1: 100 bp DNA ladder; 2: 100%鱼油DNA扩增; 3: 10%鱼油DNA扩增; 4: 1%鱼油DNA扩增; 5: 0.5%鱼油DNA扩增; 6: 0.1%鱼油DNA扩增; 7: 牛油DNA扩增; 8: 羊油DNA扩增; 9: 鸡油DNA扩增; 10: 猪油DNA扩增; 11: 空白对照

2.4 讨论

本研究以动物线粒体 16S rRNA 基因作为目的基因进行 PCR 检测,初步确定植物油中是否含有动物源性成分。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,而且在所有组织细胞中均含有大量的线粒体^[12],因此可以获得大量的线粒体 DNA。在高等植物中没有发现类似结构的基因,在植物线粒体 DNA 中也没有相似的编码同源蛋白的基因。在线粒体 DNA 中,16S rRNA 基因是线粒体基因组中研究较多的基因,既含有保守序列,又含有可变序列,具有较广泛的通用性。本研究结果显示,在猪、牛、羊、鸡、鱼等五种动物油脂和掺有动物油脂的食用植物油中均能检测到 16S rRNA 基因,而纯的食用植物油中均未检测到 16S rRNA 基因,

说明 16S rRNA 基因可以应用于食用植物油中动物源性成分的检测。

食用植物油 PCR 检测面临的最大问题是 DNA 的降解。加工过程中物理、化学因素不可避免的对食用油中的 DNA 产生降解作用,而且不同的加工方式导致食用油中的 DNA 降解程度不同。杨冬燕等^[13]在 11 种以大豆、玉米、菜籽、花生等为原料的精炼食用植物油和 3 种以混合原料为基础的食用调和油中,均未检出 658 bp 的 DNA 片段,5 个样品检出 433 bp 的 DNA 片段,10 个样品检出 150 bp 的 DNA 片段,结果显示精炼食用植物油的 PCR 检测最好选择 200 bp 以下片段作为扩增目标。废弃油脂一般经过加热和脱渣成为粗毛油;再通过加热和脱色成为脱色油;脱色油或再经过高温真空脱臭成为脱臭油。粗毛油以及经过不同程度精炼加工生产的脱色油和脱臭油都是二次油^[14]。考虑到二次油因来源不同、精炼加工程度不同,其中的动物源性成分的 DNA 降解程度不同,而同一基因选择不同长度的目的片段进行扩增,扩增片段长度的增加对假阴性率的提高有明显的影响作用。因此,本研究根据 16S rRNA 基因的保守序列,自行设计两对扩增不同区域的引物,将扩增片段长度从 234~262 bp 缩小到 124 bp 和 154 bp,从而提高检出率,降低由此造成的假阴性率。

用 PCR 方法检测食用油中动物源性成分时,首先要能提取到 DNA。国内在植物油脂 DNA 提取方面已经进行了较深入的研究,摸索出一套较好的植物油脂 DNA 提取方法^[15,16,17]。动物油脂的 DNA 提取方法报道较少,本研究在动物油脂的 DNA 提取方面也得到了理想结果,线粒体 16S rRNA 基因和动物物种特异性基因的 PCR 扩增结果显示本研究建立的动物油脂 DNA 提取方法是可行的。

3 结论

本研究使用通用引物和动物物种特异性引物相结合的检测方法,先用通用引物初步筛查植物油中是否含有动物源性成分,再用动物物种特异性引物确定具体的动物源性成分,可以快速、准确的检测出食用植物油中 0.1% (m/m) 的动物源性成分,对食用植物油中掺伪餐厨废油脂和劣质畜禽肉、动物下水加工提炼油的检测有重要的借鉴意义,可作为食用植物油中动物源性成分检测方法之一。

参考文献

[1] 覃芳芳,邓鸿铃,郭新东,等.腊肠中的植物成份的PCR检测方法

- 法研究[J].现代食品科技,2008,24(7):722-724
- [2] 金永生,朱卫娟,廖祥儒.可可粉中几种外源植物源性成分的 PCR 检测[J].生物技术通报,2008,5:118-121
- [3] 王海艳,陈颖,杨海荣,等.食品过敏原胡桃PCR检测方法研究[J].中国食品学报,2010,10(1):214-218
- [4] 巢强国,杨学明,葛宇,等.PCR法检测食品中大肠杆菌 O157:H7[J].食品科学,2010,31(8):212-215
- [5] 杨冬燕,杨永存,杨小柯,等.物种特异性基因扩增鉴别掺假食用植物油[J].中国卫生检验杂志,2011,21(9):2120-2125
- [6] Bottero M T, Civera T, Nucera T, et al. Design of universal primers for the detection of animal tissues in feedstuff [J]. ProQuest Agriculture Journal, 2003, 27: 667-669
- [7] 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
- [8] 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) [J]. Mol Cell Probes, 2001, 15: 27-35
- [9] Da Im asso A, Fontane lla E, Piatti P, et al. A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs [J]. Molecular and Cellular Probes, 2004, 18: 81- 87
- [10] 覃文,董洁,邓鸿玲,等.PCR法定性检测食用油脂中转基因成分[J].中国油脂,2002,27(2):4-6
- [11] 王亚.食用油 DNA 提取方法及转基因成分检测技术的研究[D].合肥:安徽大学,2007
- [12] Momcilovic D, Rasooly A. Detection and analysis of animal materials in food and feed [J]. Journal of Food Protection. 2000, 63(11): 1602-1609
- [13] 杨冬燕,邓汉超,杨永存,等.精炼食用植物油 PCR 检测技术研究[J].中国卫生检验杂志,2010,20(4):700-702
- [14] 曹文明,薛斌,杨波涛,等.地沟油检测技术的发展与研究[J].粮食科技与经济,2011,36(1):41-44
- [15] Dooley J B, Kelly E P, Stephen D G, et al. Detection of meat species using Taqman real-time PCR assays [J]. Meat Science, 2004, 68: 431-438
- [16] Yancy H F, Mohla A, Farrell D E, et al. Evaluation of a rapid PCR-bases method for the detection of animal material [J]. Journal of Food Protection, 2005, 68: 2651-2655
- [17] 杨冬燕,杨永存,张海龙,等.核酸富集处理对精炼食用植物油 DNA 提取效率的影响[J].中国卫生检验杂志,2009,19(12): 2770-2772