

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.01008

# 基于线粒体 12S rRNA 基因鉴别混合牛肉及制品的牛种来源

陈冬<sup>1</sup>, 柏凡<sup>2</sup>, 周明亮<sup>1</sup>, 张翔宇<sup>1</sup>, 吴登俊<sup>1</sup>

1. 四川农业大学动物科技学院, 雅安 625014;

2. 四川省饲料工作总站, 成都 610041

**摘要:** 线粒体基因组具有种内高度保守性。它的 12S rRNA 基因同时具有抗腐蚀、耐高温的特点, 而被用于饲料、鲜肉及肉制品的来源追踪和物种成分鉴别等研究。利用牦牛、普通牛、水牛作为研究材料, 在牛线粒体 12S rRNA 基因通用引物扩增片段区域发现 3 种特异的酶切位点, 可用于混合鲜牛肉及制品的牛种来源的鉴别。结果显示: 牦牛 12S rRNA 扩增片段被酶切为 203 bp 和 250 bp, 普通牛为 134 bp 和 318 bp, 水牛为 86 bp 和 367 bp, 通过测序验证了特异性位点和酶切的正确性; 对样品经过不同温度(100、120、140、160 和 180)处理均能扩增到目的条带, 但条带从 120 开始变淡。该方法在鲜牛肉及制品的牛种来源鉴别上具有简单、快速、廉价等优点。

**关键词:** 12S rRNA; 酶切; 牛线粒体基因; 内源参照基因

## Differentiation of *Bos grunniens*, *Bos Taurus*, and *Bubalus* from meat products mixture based on mitochondrion 12S rRNA gene

CHEN Dong<sup>1</sup>, BAI Fan<sup>2</sup>, ZHOU Ming-Liang<sup>1</sup>, ZHANG Xiang-Yu<sup>1</sup>, WU Deng-Jun<sup>1</sup>

1. College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China;

2. Sichuan Feedstuff Workstation, Chengdu 610041, China

**Abstract:** Mitochondrial DNA sequence is highly conserved within species. Gene 12S rRNA is able to endure degeneration and high temperature, which allows identification of feedstuff, fresh meat, processed meat, and traceability. In the present study, three unique restriction sites were detected in the fragments of mitochondrial 12S rRNA gene regions amplified with universal primer, which were able to distinguish *Bos grunniens*, *Bos. taurus*, and *Bubalus* in fresh meat and processed meat mixture. The fragment of yak was digested to 134 bp and 318 bp, scalper 134 bp and 318 bp, and buffalo 86 bp and 367 bp. The specific locus and digestion were verified by sequencing analysis. There was no difference between PCR amplification products from various treatments at different temperatures (i.e., 100, 120, 140, 160, and 180). However, the signal was weak at 120 and above. This method is simple, fast and cheap in identification of fresh meat and processed meat.

**Keywords:** 12S rRNA; enzyme cuts; bovine mitochondrial gene; endogenous control gene

收稿日期: 2007-12-07; 修回日期: 2007-12-25

基金项目: 四川省财政厅牦牛鉴定项目[Supported by Financial Bureau in Sihuan Province]

作者简介: 陈冬(1981-), 男, 四川自贡人, 硕士, 专业方向: 动物分子遗传育种。E-mail: 1199cdzy@163.com

通讯作者: 吴登俊(1956-), 男, 四川名山人, 硕士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 动物分子遗传育种。Tel: 0835-2885848; E-mail: wdengjun@sicau.edu.cn

牦牛肉是高原特有无污染的绿色食品,其价格与其他牛肉存在较大差异,市面上出现很多用普通牛肉、水牛肉假冒牦牛肉制品的情况。为了确保消费者的利益和监督牛肉制品产业链,有必要寻找一种简单快速的方法对牛肉制品中牛源性成份进行鉴别。

常规鉴别普遍采用PCR分子标记的方法,基于此的微卫星和SNP的鉴定方法使用最为广泛<sup>[1]</sup>,但其不适用于饲料和加工肉制品。线粒体基因组具有种内高度保守性,线粒体上的12S rRNA基因同时具有抗腐蚀,耐高温的特点<sup>[2]</sup>,在饲料、肉制品鉴别上逐渐被人重视。近几年来,基于12S rRNA基因的鉴定方法不断出现。Sasazaki等<sup>[3]</sup>用PCR-RFLP成功鉴别出肉制品中日本黑牛和日本黑牛与黑白花杂交F<sub>1</sub>代。Girish等<sup>[4,5]</sup>通过序列分析法和PCR-RFLP法,鉴别出了肉制品中普通牛、水牛、绵羊和山羊。Martín等<sup>[6]</sup>通过扩增不同种属各自的特异片段鉴别饲料中牛、绵羊、山羊。Fajardo等<sup>[7]</sup>用同样方法鉴别出肉制品中马鹿、欧洲小鹿、狍。Martín等<sup>[8]</sup>采用多重PCR技术鉴别鸭种属间的肌肉二元混合物。Fajardo等人<sup>[9]</sup>采用实时荧光PCR技术鉴别出马鹿、欧洲小鹿、狍肉制品二元混合物。上述方法中最精确的是对12S rRNA基因进行测序分析,但其成本和时间都耗费较多,对于混合样品测序显得力不从心;特异片段扩增用在不同物种之间的鉴别;多重PCR引物设计复杂,条件不易控制;实时荧光PCR需要寻找适应条件,探针设计染料价格较贵。对线粒体12S rRNA基因进行酶切分析相对于其他鉴别方法被认为是实用、简单、快速的技术<sup>[10]</sup>。值得一提的是Shackell等<sup>[11]</sup>从理论上推断出微卫星可以鉴别最多10种不同牛肉混合物,但其局限于新鲜肉,对于饲料和加工肉制品则无能为力。

本研究用牦牛、普通牛、水牛作为研究材料,对在牛线粒体12S rRNA基因通用引物扩增片段区域发现3种特异的酶切位点进行酶切鉴别牦牛、普通牛、水牛三元混合肉制品,以期从实验中获得一套理想、廉价、快速的方案,从而对牛肉制品中牛源性成份鉴定提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验样本

牦牛样品包括九龙牦牛、天祝白牦牛,分别来自四川省甘孜藏族自治州九龙县、甘肃省天祝藏族

自治县当地屠宰场或市场采集;普通牛样品包括巴山黄牛、云南黄牛、秦川黄牛、安西黄牛、皖南黄牛、三江黄牛、汉源黄牛、黄坡黄牛,分别在四川省宣汉县、云南省马关县、陕西省乾县、甘肃省安西县、安徽省黟县、四川省阿坝藏族羌族自治州汶川县、四川省汉源县、广东省吴川市黄坡镇当地屠宰场或市场采集;水牛样品包括江汉水牛、德昌水牛、云南水牛、安徽水牛,分别在湖北省江陵县、四川省凉山彝族自治州会理县、云南省马关县、安徽省宿松县当地屠宰场或市场采集。每个品种采集肌肉样30个,共420个。

#### 1.1.2 引物和试剂

引物1采用Fajardo等<sup>[9]</sup>设计的通用引物扩增内源参照18S rRNA基因片段;引物2采用Kocher等<sup>[12]</sup>设计的通用引物扩增12S rRNA基因片段。特异性酶切位点在<http://rebase.neb.com>限制性内切酶数据库中获得,并根据每种牛的12S rRNA片段基因进行序列数据、甲基化敏感性、晶体结构等相关分析,确定每种牛的12S rRNA片段基因的特异性酶切位点和相应的内切酶(表1)。所用的引物均由上海英骏生物技术有限公司合成。蛋白酶K、PCR产物纯化试剂盒TaKaRa DNA Fragment Purification Kit Ver.2.0 购自宝生物工程(大连)有限公司,Mastermix 购自博瑞克成都有限公司,内切酶BspH、EcoN、Hpa 均购自NEB公司。引物序列如下:

引物1: F1: 5'-TCTGCCCTATCAACTTTTCGA-GTA-3'; R1: 5'-AATTTGCGCGCCTGCTGCCTTC-T-3'。

引物2: F2: 5'-GCTTCAAACCTGGGATTAGAT-ACCCCACTAT-3'; R2: 5'-TGACTGCAGAGGGT-GACGGGCGGTGTGT-3'。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 加工模拟组

牛肉制品加工中高温是对鉴别结果影响最大的因素。为了寻求在何种温度条件下可获得目的片段,在研究中根据牛肉制品的加工过程设置加工模拟组,对加工过程进行模拟,牦牛、普通牛、水牛新鲜样品各取15个,按照100、120、140、160、180温度梯度加热处理30 min。

#### 1.2.2 混合肉制品制备

新鲜样品牦牛、普通牛、水牛各取1 g充分剪碎混匀;加工模拟组在相同温度处理下的牦牛、黄

表 1 牦牛、普通牛、水牛 12S rRNA 基因片段特异性酶切位点及相应内切酶

Table 1 The specific site and restriction endonucleases of *Bos grunniens*, *Bos taurus* and *Bubalus* in 12S rRNA gene fragment

品种 Breed	酶切位点 Site	限制性内切酶 Restriction endonuclease
牦牛 <i>Bos grunniens</i>	T CATGA	<i>BspH</i>
普通牛 <i>Bos taurus</i>	CCTNN NNNAGG	<i>EcoN</i>
水牛 <i>Bubalus</i>	CC GG	<i>Hpa</i>

注：“N”代表A、C、G、T或者U任意碱基；“ ”代表酶切位点。  
Notes: The letter “N” delegate A, C, G, T or U; The sign “ ” represents the restriction enzyme site.

牛、水牛中各取 1 g 充分剪碎混匀。混合处理后的样品加入 50 毫升已灭菌的磷酸盐缓冲液(PBS: 136 mmol/L NaCl, 1.4 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.09 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 2.6 mmol/L KCl, pH 7.2)用搅拌机搅拌使其微粒均匀分布。

1.2.3 模板 DNA 的提取及纯度测定

新鲜样品DNA提取按照标准的蛋白酶K消化过夜和酚氯仿抽提的方法进行。加工模拟组DNA提取方法参照赵秀玲等<sup>[13]</sup>的Chelex法。用分光光度计测定OD值, 根据OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>判断DNA纯度。

1.2.4 PCR 扩增

PCR采用 10 μL扩增体系, 上、下游引物(10 pmol/μL)各 0.15 μL, Mastermix 2.5 μL, 超纯水(ddH<sub>2</sub>O)1.7 μL, 模板DNA (0.3~6 μg/μL) 0.5 μL。PCR反应条件为 94 预变性 5 min; 94 40 s, 60 50 s, 72 60 s, 35 次循环; 最后再 72 延伸 8 min, 4 保存。用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物, 拍照保存。

1.2.5 12S rRNA PCR 产物酶切

12S rRNA PCR 产物纯化采用 TaKaRa DNA Fragment Purification Kit Ver.2.0 纯化试剂盒。纯化后取 7 μL 依次加入 *BspH*、*EcoN*、*Hpa* 各 0.5 μL, NE buffer4 2.5 μL, 37 温浴 3 h。酶切产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测, 拍照保存。

1.2.6 测序验证

扩增的 12S rRNA 基因片段送往宝生物工程(大连)有限公司进行测序, 验证酶切结果。

1.2.7 灵敏度确定

取 1 g 新鲜样品提取的总 DNA 用已灭菌的磷酸盐

缓冲液(PBS)进行连续 10 倍稀释并混匀, 使其含量达到相当于实际样品含量的 1%, 0.1%, 0.01%, 0.001%。本次研究中 12S rRNA 基因片段将作为后续酶切鉴别, 因此以能扩增 12S rRNA 基因片段同时能够作为后续酶切分析的最低 DNA 模板浓度作为最低灵敏度。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

2.1.1 内源参照基因 18S rDNA 与 12S rRNA 基因片段扩增

引物 1 所扩增的 18S rDNA 片段和预期 137 bp 相符(图 1), 验证了提取 DNA 模板质量的有效性, 可用于进一步的 12S rRNA 基因片段扩增。引物 2 扩增的 12S rRNA 片段和预期 453 bp(普通牛 452 bp)相符(图 2)。两对引物的通用性都很好, 没有非特异性扩增, 可用于后面的酶切鉴别分析。

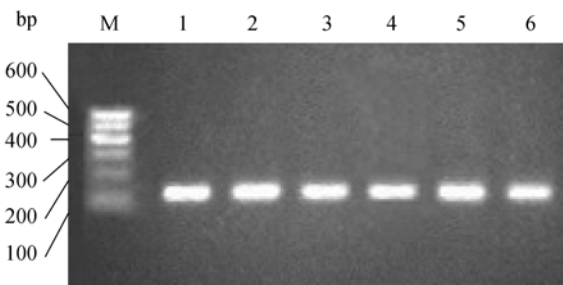


图 1 18S rDNA PCR 扩增电泳图  
M: DNA 分子量标准 ; 1: 牦牛; 2: 普通牛; 3: 水牛; 4: 加工模拟组; 5: 混合新鲜样品; 6: 混合加工模拟样品。

Fig. 1 PCR amplification of 18S rDNA  
M: DNA marker ; 1: *Bos grunniens*; 2: *Bos taurus*; 3: *Bubalus*; 4: Processed meat; 5: Ternary mixture of fresh meat; 6: Ternary mixture of processed meat.

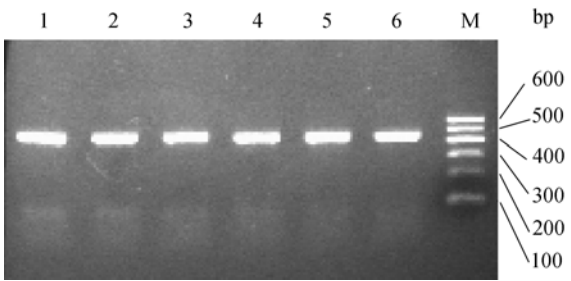


图 2 12S rRNA PCR 扩增电泳图  
M: DNA 分子量标准 ; 1: 牦牛; 2: 普通牛; 3: 水牛; 4: 加工模拟组; 5: 混合新鲜样品; 6: 混合加工模拟样品。

Fig. 2 PCR amplification of 12S rRNA  
M: DNA marker ; 1: *Bos grunniens*; 2: *Bos taurus*; 3: *Bubalus*; 4: Processed meat; 5: Ternary mixture of fresh meat; 6: Ternary mixture of processed meat.

2.1.2 加工模拟组扩增结果

对进行温度梯度处理后的单一样品和混合样品分别用引物 1 和引物 2 扩增 18S rDNA 和 12S rRNA 基因片段, 在单一样品和混合样品中均出现相同结果(图 3): 在所有温度下都扩增出了 12S rRNA 和 18S rDNA 基因片段。但是当温度达到 120 时, 12S rRNA 基因片段开始减淡, 当温度达到 160 时, 难以扩增出 12S rRNA 基因片段, 在此温度下, 18S rRNA 片段开始变淡, 而达到 180 时难以扩增出 18S rDNA 基因片段。12S rRNA 基因片段将作后续酶切分析, 虽然其在 180 时仍能扩增出条带, 但已相当模糊, 不能作后续的酶切鉴别分析。得出在满足酶切鉴定的情况下, 能扩增 12S rRNA 基因片段得最高的温度处理为 160 。

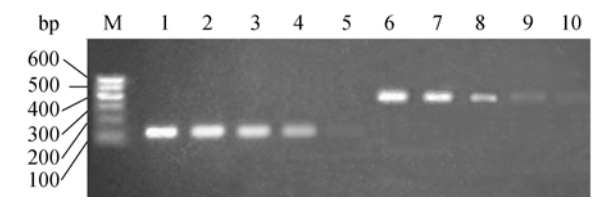


图 3 不同温度处理下 18S rDNA 和 12S rRNA 扩增片段电泳图

M: DNA 分子量标准 ; 1~5: 依次为 100 、 120 、 140 、 160 和 180 处理下 18S rDNA 扩增片段; 6~10: 依次为 100 、 120 、 140 、 160 和 180 处理下 12S rRNA 扩增片段。

Fig. 3 PCR amplification of 18S rDNA and 12S rRNA from the meat treated at different temperatures

M: DNA marker ; 1-5: 18S rDNA-PCR products from the meat processed at 100 , 120 , 140 , 160 , and 180 ; 6-10: 12S rRNA PCR products from the meat processed at 100 , 120 , 140 , 160 , and 180 .

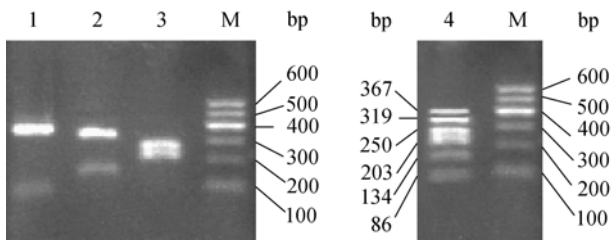


图 4 不同牛 12S rRNA 基因片段 *BspH* I 、*EcoN* I 和 *Hpa* II 酶切后图谱

M: DNA 分子量标准 ; 1: 水牛酶切片段; 2: 普通牛酶切片段; 3: 牦牛酶切片段; 4: 混合酶切片段。

Fig. 4 12S rRNA PCR amplification products digested with *BspH* I , *EcoN* I , and *Hpa* II

M: DNA marker ; 1: Restriction fragment of *Bubalus*; 2: Restriction fragment of *Bos taurus*; 3: Restriction fragment of *Bos grunniens*; 4: Enzyme section breaks of ternary mixture.

2.2 酶切鉴别结果

新鲜样品和加工模拟组的单一样品和混合样品扩增出的 12S rRNA 基因片段经过纯化后同时加入 *BspH* 、*EcoN* 、*Hpa* 3 种内切酶, 经过温浴, 单一酶切和混合酶切均得到和预期一样的结果(图 4), *BspH* 把牦牛样品酶切为 203 bp 和 250 bp, *EcoN* 把普通牛样品酶切为 134 bp 和 318 bp, *Hpa* 把水牛样品酶切为 86 bp 和 367 bp; 在混合样品酶切中同时出现了预期的 6 条带: 从上到下依次为 367 bp、318 bp、250 bp、203 bp、134 bp、86 bp, 没有出现非特异性酶切条带, 表明每种牛的 12S rRNA 基因片段上的酶切位点均具有高度的种内保守性和特异性(表 2)。

2.3 灵敏度确定

采用连续稀释的方法, 模板浓度从 0.001%至亮 1%的稀释度都能扩增出 12S rRNA 基因片段, 度逐渐变暗, 当含量达到 0.001%时扩增出的条带很暗, 比较模糊(图 5)。得出 PCR 能扩增 12S rRNA 基因片段的最低 DNA 模板浓度为 0.001%。在后续酶切分析中发现 DNA 模板浓度在 0.001%时, 牦牛 12S rRNA 基因片段酶切条带几乎不可见, 得出酶切鉴别的最低 DNA 模板浓度要求为 0.01%。

表 2 牦牛、普通牛、水牛 12S rRNA 基因片段酶切结果  
Table 2 Restriction pattern of mitochondrial 12S rRNA gene for *Bos grunniens*, *Bos Taurus* and *Bubalus*

特异性酶 Species enzymes	牦牛 <i>Bos grunniens</i>	普通牛 <i>Bos taurus</i>	水牛 <i>Bubalus</i>
<i>BspH</i>	203 bp+250 bp	—	—
<i>EcoN</i>	—	134 bp+318 bp	—
<i>Hpa</i>	—	—	86 bp+367 bp

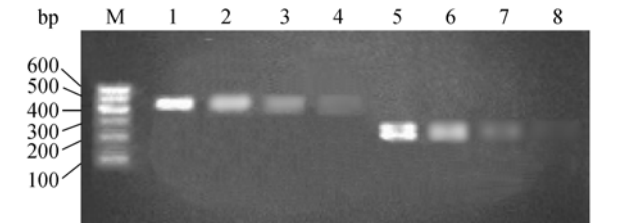


图 5 灵敏度检测结果

M: DNA 分子量标准 ; 1~4: 依次为 DNA 模板浓度为 1%、0.1%、0.01%和 0.001%下 12S rRNA 基因扩增片段; 5~8 依次为 DNA 模板浓度为 1%、0.1%、0.01%和 0.001%下 12S rRNA 基因扩增片段酶切。

Fig. 5 The result of sensibility detection

M: DNA marker ; 1-4: 12S rRNA PCR products form DNA processed at 1%, 0.1%, 0.01%, and 0.001%; 5-8: Enzyme section breaks of 12S rRNA-PCR products form DNA processed at 1%, 0.1%, 0.01%, and 0.001%.

## 2.4 14 个品种 420 个个体研究结果

本次研究中采集 2 个牦牛品种, 8 个普通牛品种, 4 个水牛品种, 共计 420 个样品。所有样品均扩增出 137 bp 的内源参照参基因 18S rDNA 片段; 2 个牦牛品种和 4 个水牛品种 180 个样品均扩增出 453 bp 的 12S rRNA 基因片段, 8 个普通牛品种 240 个样品均扩增出 452 bp 的 12S rRNA 基因片段。经加工模拟处理后结果显示: 所有 420 个样品能扩增 18s rDNA 片段和 12S rRNA 基因片段的最高处理温度分别为 180 和 160 , 未发现有高于此温度的个体。酶切结果显示: 2 个品种的 60 个牦牛样品均被酶切为 203 bp 和 250 bp; 8 个品种的 250 个普通牛样品均被酶切为 134 bp 和 318 bp; 4 个品种的 120 个水牛样品均被酶切为 86 bp 和 367 bp。未发现非特异性酶切。灵敏度检测结果: 所有 420 个样品均得出 PCR 能扩增 12S rRNA 基因片段的最低 DNA 模板浓度为 0.001%。酶切鉴别的最低 DNA 模板浓度要求为 0.01%。未发现能在 DNA 模板浓度小于 0.001% 扩增出 12S rRNA 基因片段和 DNA 模板浓度小于 0.01% 达到酶切鉴别要求的个体。

## 2.5 酶切位点测序验证

基因序列会出现突变, 虽然酶切位点位于高度

保守的 12S rRNA 基因片段上, 但是仍需要用其它方法来进一步对酶切位点进行验证。本次研究采用 DNA 测序的方法来进行进一步对酶切位点进行验证。通过大量的测序表明(表 3): 牦牛的酶切位点为 T CATGA, 酶切片段分别为 203 bp 和 250 bp; 普通牛的酶切位点为 CCTTC TAGAGG, 酶切片段分别为 134 bp 和 318 bp; 水牛的酶切位点为 CC GG, 酶切片段分别为 86 bp 和 367 bp。测序结果同理论预期结果以及酶切鉴别结果完全一致。强有力的证明了上述酶切鉴别结果。

## 3 讨论

### 3.1 基因的选取

线粒体基因组具有种内高度保守性, 在物种鉴别上被广泛应用<sup>[14]</sup>。有研究证明位于线粒体上的 12S rRNA 基因序列在种间呈现适当的变异, 在种内呈现高度保守<sup>[15]</sup>, Zhang 等<sup>[2]</sup>发现在同一样品无论是新鲜肉, 腌肉, 还是经过加工的肉制品, 其 12S rRNA 基因序列上都未发现变化, 证明其具有很强的抗腐蚀性。因此, 12S rRNA 基因适合作为进化分析<sup>[15]</sup>和物种鉴别<sup>[17]</sup>。

表 3 牦牛、普通牛、水牛 12S rRNA 基因片段测序结果及酶切位点

Table 3 The sequence result of the yak, scalper, and buffalo of 12S rRNA and specific site

品种 Breed	12S rRNA 基因片段序列 Sequence of 12S rRNA	酶切位点 Locus
牦牛(453 bp) <i>Bos grunniens</i>	GACCCAACTGGGATTAGATACCCCACTATGCTTAGCCCTAAACACAGATAATTACATAAA CAAAATTATTTGCCAGAGTACTACCAGCAACAGCTTAAACTCAAAGGACTTGGCGGTGC TTTATATCCCTCTAGAGGAGCCTGTTCTGTAATCGATAAACCCCGATAAACCTCACCAATTC TTGCTAATACAGTCTATATACCGCCATCTTCAGCAAACCCTAAAAAGGAAAAAAGTAAGC ACAATCATGATACATAAAAAACGTTAGGTCAAGGTGTAACCTATGAAATGGAAAGAAATGG GCTACATTCTCTACACTAAGAGAATCAATGCACGAAAGTTATTATGAAATTAGTAACCAAA GGAGGATTAGCAGTAACTAAGAGTAGAGTGCTTAGTTGAATTAGGCCATGAAGCACGC ACACACCGCCCGTCACCCTCCTCAAATA	T CATGA
普通牛(452 bp) <i>Bos taurus</i>	GACCCAACTGGGATTAGATACCCCACTATGCTTAGCCCTAAACACAGATAATTACATAAA CAAAATTATTCGCCAGAGTACTACTAGCAACAGCTTAAACTCAAAGGACTTGGCGGTGC TTTATATCCCTCTAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATAAACCCCGATAAACCTCACCAATTC TTGCTAATACAGTCTATATACCGCCATCTTCAGCAAACCCTAAAAAGGAAAAAAGTAAGC GTAATTATGATACATAAAAAACGTTAGGTCAAGGTGTAACCTATGAAATGGGAAGAAATGGG CTACATTCTCTACACCAAGAGAATCAAGCACGAAAGTTATTATGAAACCAATAACCAAAG GAGGATTAGCAGTAACTAAGAATAGAGTGCTTAGTTGAATTAGGCCATGAAGCACGCA CACACCGCCCGTCACCCTCCTCAAATA	CCTTC TAGAGG
水牛(453 bp) <i>Bubalus</i>	GACCCAACTGGGATTAGATACCCCACTATGCTTAGCCCTAAACACAAATAATTATATTAAC AAAATTATTCGCCAGAGTACTACCGGCAATAGCCTAAACTCAAAGGACTTGGCGGTGCT TTATATCCCTCTAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATAAACCCCGATAGACCTCACCAATTCT TGCTAATGCAGTCTATATACCGCCATCTTCAGCAAACCCTAAAAAGGTACAAAAGTAAGCG CAATCACAATGCATAAAAAACGTTAGGTCAAGGTGTAACCTATGAAATGGGAAGAAATGGG CTACATTTTCTACACCAAGAAATACCCAACACGAAAGTTATTATGAAAGTTAATAACCAAAG GAGGATTAGCAGTAACTAAGAATAGAGTGCTTAGTTGAAGTACTAGGCCATGAAGCACGCA CACACCGCCCGTCACCCTCCTCAAGTA	CC GG

注: “ ” 代表酶切位点。

Note: “ ” represents locus.



### 3.2 温度对扩增 12S rRNA 基因片段的影响

线粒体DNA大量存在于组织细胞中,具有较强的抗腐蚀性,即使少量的样品也足以提供可供检测的PCR扩增结果。Fairborth等<sup>[18]</sup>证实PCR具有从高度退化DNA中扩增出短片段的能力。Ebbehøj等<sup>[19,20]</sup>证实,当肉加热到 100 °C 时锐减到 1 100 bp左右,加热到 120 °C 时减至 600 bp以下。本次研究中,从 100 °C、120 °C、140 °C、160 °C、180 °C 不同温度处理 30 min的DNA模板均扩增出 453 bp(普通牛 452 bp)的 12S rRNA基因片段,但是条带从 120 °C 开始变淡,这个结果和Matsunaga等<sup>[21]</sup>对马肉进行相同处理(目的片段 439 bp)得出的结果非常相似。

### 3.3 内源参照基因设立

设置内源参照可以对 DNA 的质量进行有效的评估。在 PCR 反应中,对模板的质量均有很高的要求。当提取的 DNA 中含有 PCR 抑制物或者发生降解,可能会得不到有效扩增。通过检测从样品 DNA 中获得的内源参照可以有效减少已知和未知因素造成的错误,同时能够保证在鉴别中具有很好的重复性。实际应用中,加工方法千差万别,极有可能出现一些不明因素影响 PCR 反应,设置内源参照就显得极其重要。用通用引物扩增所有真核生物常染色体 18S DNA 基因的保守序列(137 bp)作为内源参照起着相似的作用。

### 3.4 检测灵敏度

对 1%含量的DNA模板进行连续稀释,得出扩增 12S rRNA基因片段的DNA模板检测浓度最低为 0.001%,这一点和Lahiff等<sup>[22]</sup>得出的结果相符,但是和Wang<sup>[23]</sup>和潘良文等<sup>[24]</sup>得出的 0.125%和 0.1%有出入,分析认为这可能是对样品进行处理的方法和引物不同的缘故。

### 3.5 非牛源物质的排除

本次研究中采用的 12S rRNA通用引物除了牛以外,还可以扩增包括禽类和昆虫类在内的生物体<sup>[25]</sup>。因此可能出现所采集样品不是牛肉制品,同样扩增出类似的片段造成鉴别失败的可能。Martín等<sup>[26]</sup>通过实验解决了这个问题,采用一对特异引物扩增牛种属线粒体 12S rRNA基因上特有的 84 bp特异片段,并在其他 38 种常见动植物上验证了其特异性。在对可疑肉制品进行鉴定前,应先用这对特异引物进行验证。

本研究所建立的方法具有特异性强和灵敏度高、简便易行、结果可靠的特点,可以作为混合牛肉制品中鉴别牦牛、普通牛、水牛的常规方法。

### 参考文献(References):

- [1] Dalvit C, de Marchi M, Cassandro M. Genetic traceability of livestock products: A review. *Meat Science*, 2007, 77(4): 437–449. [\[DOI\]](#)
- [2] Zhang JB, Hui H, Ze PC, Liang MH. Species identification in salted products of red snappers by semi-nested PCR-RFLP based on the mitochondria 12S rRNA gene sequence. *Food Contr*, 2006, 17(7): 557–563. [\[DOI\]](#)
- [3] Sasazaki S, Itoh K, Arimitsu S, Imada T, Takasuga A, Nagaishi H, Takano S, Mannen H, Tsuji S. Development of breed identification markers derived from AFLP in beef cattle. *Meat Sci*, 2004, 67(2): 275–280. [\[DOI\]](#)
- [4] Girisha PS, Anjaneyulu ASR, Viswas KN, Anand M, Rajkumar N, Shivakumar BM, Sharma Bhaskar. Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species. *Meat Sci*, 2004, 66(3): 551–556. [\[DOI\]](#)
- [5] Girish PS, Anjaneyulu ASR, Viswas KN, Shivakumar BM, Anand M, Patel M, Sharma B. Meat species identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene. *Meat Sci*, 2005, 70(1): 107–112. [\[DOI\]](#)
- [6] Martín I, García T, Fajardo V, López-Calleja I, Hernández PE, González I, Martín R. Species-specific PCR for the identification of ruminant species in feedstuffs. *Meat Sci*, 2007, 75(1): 120–127. [\[DOI\]](#)
- [7] Fajardo V, González I, López-Calleja I, Martín I, Rojas M, Hernández PE, García T, Martín R. Identification of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) using polymerase chain reaction targeting specific sequences from the mitochondrial 12S rRNA gene. *Meat Sci*, 2007, 76(2): 234–240. [\[DOI\]](#)
- [8] Martín I, García T, Fajardo V, López-Calleja I, Rojas M, Hernández PE, González I, Martín R. Mitochondrial markers for the detection of four duck species and the specific identification of Muscovy duck in meat mixtures using the polymerase chain reaction. *Meat Sci*, 2007, 76(4): 721–729. [\[DOI\]](#)
- [9] Fajardo V, González I, Martín I, Rojas M, Hernández PE, García T, Martín R. Real-time PCR for detection and quantification of red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) in meat mixtures. *Meat Sci*, 2007, 80(2): 718–726.
- [10] Partis L, Croan D, Guo Z, Clark R, Coldham T, Murby J. Evaluation of a DNA fingerprinting method for determining the species origin of meats. *Meat Sci*, 2000, 54(4): 369–376. [\[DOI\]](#)
- [11] Shackell GH, Mathias HC, Cave VM, Dodds KG. Evaluation of microsatellites as a potential tool for product trac-

- ing of ground beef mixtures. *Meat Sci*, 2005, 70(2): 337–345. [\[DOI\]](#)
- [12] Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Paabo S, Villablanca FX, Wilson AC. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(16): 6196–6200. [\[DOI\]](#)
- [13] ZHAO Xiu-Ling, WEN Wei-Gang, YU Xu-Ping, HU Qun, HUANG Shao-Tang. The application of chelex-100 method to extract the genomic DNA of the animal derived feedstuff. *J Shanghai Jiaotong Univ (Agri Sci)*, 2004, 22(1): 82–85.  
赵秀玲, 闻伟刚, 余旭平, 胡群, 黄绍棠. Chelex-100 快速提取动物源饲料 DNA 方法的建立. 上海交通大学学报(农业科学版), 2004, 22(1): 82–85.
- [14] Girish PS, Anjaneyulu ASR, Viswas KN, Anand M, Rajkumar N, Shivakumar BM, Bhaskar S. Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species. *Meat Sci*, 2004, 66(3): 551–556. [\[DOI\]](#)
- [15] Munasinghe DHN, Murphy NP, Austin CM. Utility of mitochondrial DNA sequences from four gene regions for systematic studies of Australian freshwater crayfish of the genus *Cherax* (Decapoda: Parastacidae). *J Crustacean Biol*, 2003, 23(2): 402–417. [\[DOI\]](#)
- [16] Bellagamba F, Valfre F, Panseri S, Moretti VM. Polymerase chain reaction-based analysis to detect terrestrial animal protein in fish meal. *J Food Protect*, 2003, 66(4): 682–685.
- [17] Prakash PS, Ghumatkar MS, Nandode SV, Yogesh SK, Shouche. Mitochondrial 12S rRNA sequence analysis in wildlife forensics. *Curr Sci*, 2000, 78(10): 1239–1241.
- [18] Fairbrother KS, Hopwood AJ, Lockley AK, Bardsley RG. The actin multigene family and livestock speciation using the polymerase chain reaction. *Anim Biotechnol*, 1998, 9(2): 89–100.
- [19] Ebbelhøj EF, Thomsen PD. Species differentiation of heated meat products by DNA hybridization. *Meat Sci*, 1991, 30(3): 221–234. [\[DOI\]](#)
- [20] Ebbelhøj EF, Thomsen PD. Differentiation of closely related species by DNA hybridization. *Meat Sci*, 1991, 30(4): 359–366. [\[DOI\]](#)
- [21] Matsunaga T, Chikuni K, Tanabe R, Muroya S, Shibata K, Yamada J, Shinmura Y. A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Sci*, 1999, 51(2): 143–148. [\[DOI\]](#)
- [22] Lahiff S, Glennon M, Lyng J, Smith T, Shilton N, Maher M. Real-time polymerase chain reaction detection of bovine DNA in meat and bone meal samples. *J Food Protect*, 2002, 65(7): 1158–1165.
- [23] Wang RF, Myers MJ, Campbell W, Cao WW, Paine D, Cerniglia CE. A rapid method for PCR detection of bovine materials in animal feedstuffs. *Mol Cell Probes*, 2000, 14(1): 1–5. [\[DOI\]](#)
- [24] PAN Liang-Wen, CHEN Jia-Hua, DING Yan, PAN Ai-Hu, YUAN Zheng, LIANG Wan-Qi, ZHANG Da-Bing. Research on detection of bovine material from imported meat and bone meal. *Biotechnol Bull*, 2001(5): 23–26.  
潘良文, 陈家华, 丁燕, 潘爱虎, 袁政, 梁婉琪, 张大兵. 进口肉骨粉种牛成分检测研究. 生物技术通报, 2001(5): 23–26.
- [25] Prakash PS, Ghumatkar MS, Nandode SV, Yogesh SK, Shouche SK. Mitochondrial 12S rRNA sequence analysis in wild life forensics. *Curr Sci*, 2000, 78(10): 1239–1241.
- [26] Martín I, García T, Fajardo V, López-Calleja I, Hernández PE, González I, Martín R. Species-specific PCR for the identification of ruminant species in feedstuffs. *Meat Sci*, 2007, 75(1): 120–127. [\[DOI\]](#)