

技术与方法

建立多重液相基因芯片方法快速
检测狐狸、水貂成分*陈茹^{1**} 段燕喻¹ 高小博² 刘志玲¹ 阳静¹ 梅明珠¹ 谭鑫³ 骆海燕²

(1 广州海关技术中心 广州 510623 2 国家卫生健康委科学技术研究所 北京 100081)

(3 中山大学生命科学院 广州 510275)

摘要 基于 xMAP 液相芯片新型生物技术平台,分别以狐狸线粒体 DNA D-loop 区序列、水貂线粒体 DNA 细胞色素 b 基因序列为模板设计特异扩增引物和探针,并对探针进行锁核酸修饰,建立了二重 xMAP 液相基因芯片方法,用于快速检测狐狸和水貂源性成分。该法能准确鉴定鉴别狐狸和水貂 DNA,对其他 18 种动物物种 DNA 均呈检测阴性,对狐狸、水貂 DNA 的检测低限分别为 2.8pg/μl、0.9pg/μl,对肉类混样检出限为 0.05% (m/m)。对目标源性 DNA 含量为 1% (V/V) 的 32 份饲料与食品核酸添加样本均呈对应目标检测阳性。结果表明,该方法特异性强、灵敏度高,适用于食品与饲料领域相关原料和产品的质量与安全检验。

关键词 xMAP 液相基因芯片 狐狸成分 水貂成分 锁核酸(LNA)

中图分类号 Q819

食品和饲料中掺杂造假事例在国内外时有发生,危害人类和动物健康,影响相关产业和贸易的健康发展,给食品和饲料的质量与安全监督把关持续带来挑战。近年来,随着我国经济的飞速发展,狐狸、水貂等毛皮动物养殖业规模不断扩大。这些动物的毛皮被用作服装原料,但它们的胴体用途去向不明。据报道,有不法商贩收购毛皮动物肉类,用于掺假到经济价值较高的牛肉、羊肉等肉类中,经加工制成各种食用产品流通到市场。毛皮动物胴体另一可能去向是制成饲用肉骨粉,或掺入到其他动物饲用产品中。国内已有报道在市场流通的绵羊肉卷和饲用动物源性原料产品中检出狐狸源性成分^[1-2]。为防止疯牛病、痒病的传播,中国、美国以及欧盟等多个国家和地区均颁布法规,禁止在反刍动物饲料中使用哺乳类动物原料产品。为保障饲料安全,国内外均规定饲料需清晰标注原料物种成

分,并在生产、流通与使用监管以及进出口把关方面配套实施动物源性成分检测鉴定措施。为加强打击防范食品和饲料产品的制假售假行为,有必要进一步完善动物源性成分检测鉴定技术体系,为加强监管与进出口把关提供技术支撑。

国内外已报道的动物源性成分检测鉴定技术有多种类型,包括镜检技术、光谱光谱分析技术、蛋白质检测分析技术以及核酸检测分析技术等。其中,核酸检测分析技术研发应用最为广泛。DNA 携带物种特异遗传信息,对于高热、高压和化学处理等加工条件耐受性强,使得检测方法较少受到样品类型和保存状态的影响限制。目前,国内外已针对加工食品和饲料中多种动物源性成分的检测鉴定开发了常规 PCR^[3]、实时荧光 PCR^[4]、数字 PCR^[5]、基因芯片^[6]、下一代测序^[7]等多种核酸检测方法。在狐狸、水貂特异成分检测方面,已见报道的方法有常规 PCR^[8-9]、LAMP^[2] 和实时荧光 PCR 方法^[1, 10]。

液相芯片技术由美国 Luminex 生物技术公司开发,

收稿日期:2019-04-09 修回日期:2019-07-04

* 广州市科技计划(201707010487)、原广东出入境检验检疫局科技项目(2018GDK04)资助项目

**通讯作者,电子信箱:gd_chenr@sina.com

是一种具有多指标同步分析 (flexible multi-analyte profiling, xMAP) 功能的新型生物芯片技术平台。xMAP 技术采用直径仅为 5.6 μm 的聚苯乙烯乳胶微球作为基质,反应体系由传统芯片的液相-固相反应转变为接近生物系统内部环境的三维液相反应体系,反应效率显著提高,具有快速、高通量、高灵敏、特异稳定、体系组合灵活等突出优势,被国际业界评价为临床诊断的趋势性技术之一^[11-12]。xMAP 液相芯片技术已被广泛应用于检测人和动植物各种病原体或进行病原分型鉴定^[12]。近年也应用于检测食品中动植物源性成分^[13-14]。锁核酸 (locked nucleic acid, LNA) 是一种核苷酸衍生物,对 DNA 和 RNA 均具有很好的识别能力和强大的亲合力^[15-16]。在寡核苷酸序列中用 LNA 替代少量常规碱基可明显提高寡核苷酸片段的 T_m 值^[17]。国内外研究学者通过对核酸扩增引物或探针序列进行 LNA 修饰,建立了特异高效的检测方法^[18-19],含 LNA 修饰碱基探针的多重荧光 PCR 方法已用于检测动物源性成分^[20]。迄今,还未见采用 xMAP 液相芯片技术或 LNA 修饰碱基技术检测鉴定狐狸或水貂成分的报道。

本研究探索建立快速准确鉴定狐狸和水貂特异成分的多重液相基因芯片方法,并结合 LNA 修饰碱基探针技术,为食品与饲料等相关产品质量安全监督把关提供新型高效检验技术手段。

1 材料与方法

1.1 样品

动物物种样品。本研究收集的北极狐 (*Vulpes lagopus*) 和赤狐 (*Vulpes vulpes*) 肉类样品,分别来自山东和吉林两地的水貂 (*Neovison vison*) 肉类样品,以及其他 15 种陆生动物和 3 种水生动物肉类样品,物种类别包括黄牛、牦牛、水牛、绵羊、山羊、鹿、骆驼、猪、马、驴、兔、犬、鸡、鸭、鹅、鱼 (三文鱼、鳕鱼、草鱼、鲫鱼)、对虾、肉蟹。北极狐、水貂肌肉组织样品分别来自国内毛皮动物养殖场,其余样品购自国内市场。

食品和饲料样品。本研究所用加工食品样品均从国内市场购买,所用配合饲料样品来自国内猪和禽类养殖场;所用饲用鸡肉骨粉、鱼粉、牛羊肉骨粉、猪血浆蛋白粉等进口动物源性原料产品由广东省内海关口岸机构采样送检。

1.2 人工制备肉类混样

以黄牛肌肉组织为基质,以狐狸或水貂肌肉组织样品作为添加物,用万分之一精密度电子分析天平,按

比例准确称取狐狸或水貂肌肉样品,添加到黄牛肌肉组织样品中,分别制备重量比 (m/m) 为 1%、0.1%、0.05% 的狐狸/黄牛或水貂/黄牛肉类混样。1% (m/m) 肉类混样制备:称取 10mg 北极狐或水貂肌肉,添加到 990mg 黄牛肉中,用组织搅拌机充分搅拌均匀;0.1% (m/m) 混样制备:称取 10mg 北极狐或水貂肌肉,添加到 9.9g 黄牛肉中,充分搅拌混匀;0.05% (m/m) 混样制备,称取 25mg 北极狐或水貂肌肉,添加到 50g 黄牛肉中,充分搅拌混匀。制成的肉样置 -20°C 冻存备用。

1.3 主要试剂与设备

热启动 *Taq* 酶 (Promega, 货号 M5008), MES [2-(*N*-morpholino) ethanesulfonic acid, 2-(*N*-吗啡基) 乙磺酸, Sigma 公司, 货号 M2933], 5mol/L TMAC (tetramethylammonium chloride, 氯化四甲基胺, Sigma 公司, 货号 T3411), EDC [1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl carbodiimide hydrochloride)] [(1-乙基-(3-二甲基-丙烷) 氢氯化二酰亚胺, Pierce 公司, 货号 22980)], SAPE (亲和素枣红蛋白, Invitrogen 公司, 货号 S866), 羧基化微球 (carboxylated microspheres, Luminex 公司)。

液相芯片检测仪 (LiquidChip 200 Reader, 购自德国 QIAgen 公司), PCR 扩增仪 (ABI Veriti, 购自美国应用生物系统公司), 控温混匀仪 (Thermomix Comfort, 购自德国 Eppendorf 公司), 台式微量高速冷冻离心机 (Eppendorf 5810R, 购自德国 Eppendorf 公司), NanoDrop ND1000 微量分光光度计 (购自美国 Thermo Fisher 公司), 电子精密分析天平 (Mettler AB 104-L, 购自瑞士梅特勒-托利多公司)。

1.4 核酸提取方法

肉类样品核酸提取采用北京天根公司的组织基因组 DNA 提取试剂盒 (TIANGEN, 货号 DP304), 饲料样品核酸提取采用北京天根公司的饲料基因组 DNA 提取试剂盒 (货号 DP323)。取肉样或饲料样品,按试剂盒提供的程序进行样品预处理及核酸提取纯化操作,经过裂解、消化、柱吸附、洗涤等步骤,最后一步用试剂盒提供的无 DNA 酶纯水 70 μl 洗脱,置 -20°C 冻存备用。

1.5 扩增引物与杂交探针

依据 GenBank 现有动物物种基因序列信息,通过序列同源性分析比对,选择物种特异且种内序列保守的基因作为检测目标。根据序列检索分析结果,狐狸物种特异的扩增引物与杂交探针以狐狸线粒体 DNA D-loop 区序列为模板设计,水貂物种特异的扩增引物与

杂交探针以水貂线粒体 DNA 的细胞色素 b (cytochrome b, cyt b) 基因序列为模板设计。采用 Array Designer 4.0 software、DNAMAN V 7.0 等软件辅助设计扩增引物及杂交探针,并通过 NCBI 网站进行 BLAST 分析,对拟选用的探针,选择物种特异性保守序列中的碱基位点进行锁核酸(LNA)修饰,探针的 T_m 值采用 Exiqon 公司

的 LNA™ Oligo Tm Prediction 软件进行预测。进一步通过检测试验最终选定适合 xMAP 反应体系的引物与探针。本研究所用各条引物与探针序列见表 1。引物与探针委托英潍捷基(上海)贸易公司、上海生工公司进行合成和标记。下游引物 5'端均用生物素(biotin)标记,探针 5'端进行氨基(AmM)C12 标记。

表 1 二重 xMAP 液相基因芯片方法扩增引物与探针

Table 1 Primers and probes used in the duplex xMAP assay

物种	寡核苷酸与序列(5'-3')	扩增产物分子量(bp)
狐狸	上游引物: GTGCATTACTGCTATG	118
	下游引物: biotin-ACGTGCAGTCATGTATG	
	探针: AmM-GACAT(A/G)CTA + TGTTTA + ATCTTACA *	
水貂	上游引物: AACCAAGAACATACTCAC	186
	下游引物: biotin-CTTATCTCTCTTGCCCTT	
	探针: AmM-CAAG + CAA + CTCATCCA *	

* Locked nucleic acid in bold letter in probe sequences

1.6 二重 xMAP 液相基因芯片检测方法的建立

1.6.1 寡核苷酸探针与微球偶联 将狐狸特异探针、水貂特异探针分别偶联到不同编码微球中。操作程序简要如下:按反应用量取出少量微球原液分装到微量离心管中,加入 600 μ l 的 0.1mol/L MES (pH 4.5) 缓冲液,15 000 \times g 离心 10min, 吸弃部分上清,留约 50 μ l, 每管加入 2nmol 氨基标记探针和 10 μ l 新鲜配制的 EDC 溶液(10 μ g/ml);振荡混匀,置摇床,室温低速振荡,避光反应 30min;从摇床取出,每管加入 10 μ l 新鲜配制的 EDC 溶液(10 μ g/ml),振荡混匀,置摇床,室温低速振荡,避光反应 30min;用 0.02% Tween-20 溶液和 0.1% SDS 溶液依次洗涤偶联微球,振荡混匀,15 000 \times g 离心 10min,弃上清;加 100 μ l 1 \times TE (pH 8.0) 缓冲液重悬偶联微球,取少量进行微球计数。偶联了探针的微球可置 4 $^{\circ}$ C 贮存 6 个月以上。

1.6.2 二重不对称扩增反应体系 对二重扩增反应体系中引物、探针用量、扩增反应条件中退火温度、时间、循环数等关键参数进行优化,建立以下反应体系和反应条件:采用 25 μ l 反应体积进行不对称扩增(标记引物与非标记引物用量比为 2:1),每个反应含 20mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、4mmol/L MgCl₂、150mmol/L KCl、3% (V/V) 甘油、dNTP 每种各 0.2mmol/L, Taq 酶 1unit, 上游非标记引物每条 100nmol/L,生物素标记下游引物每条 200nmol/L, DNA 模板 1 μ l,加无核酸酶超纯水补足体积至 25 μ l。扩增循环反应条件如下:95 $^{\circ}$ C, 2min, 1 个循环;95 $^{\circ}$ C 5s, 60 $^{\circ}$ C

6s,进行 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 1min, 1 个循环;4 $^{\circ}$ C 停留。

1.6.3 微球悬浮杂交反应体系 用 1.5 \times TMAC 将偶联微球稀释成工作液,使每 33 μ l 微球工作液中含 2 种编码微球每种各 500 个。把微球工作液分装到 PCR 管中,33 μ l/管。在每个反应管中加入 5 ~ 10 μ l PCR 产物,加 1 \times TE (pH 8.0) 至总体积为 17 μ l;在空白对照管中加入 17 μ l 1 \times TE (pH 8.0);用吸嘴充分混匀,把各反应管放入 PCR 仪,按以下条件进行液相芯片杂交反应:95 $^{\circ}$ C 5min, 60 $^{\circ}$ C 20min。杂交反应结束后,每管加入 100 μ l 1 \times TMAC,用台式离心机 15 000 \times g 离心 4min,吸弃上清;每管加入 100 μ l 1 \times TMAC,振荡混匀,15 000 \times g 离心 4min,吸弃上清;同时,用 1 \times TMAC 将 SAPE 稀释至 5 μ g/ml(1 \times TMAC-SAPE 报告液);在每管微球沉淀中加入 75 μ l 1 \times TMAC-SAPE 报告液,充分混匀,置控温混匀仪,60 $^{\circ}$ C 温育 6min,设振速为 300r/min。反应结束,取反应产物液体,用液相芯片检测仪检测,设读取体积为 60 μ l,微球最低计数设为 50。仪器提供的检测结果数值为 MFI (median fluorescence intensity) 荧光值。

1.6.4 对照设置与结果判定 每次检测均同步设 2 个以上空白对照,即以 PCR 反应所用的无核酸酶超纯水代替 DNA 模板,与待检样品同步进行二重不对称扩增和微球悬浮杂交检测;所测得的 MFI 值平均值作为检测本底值。根据对已知样品和空白对照样品的大量检测试验,设判定标准如下:以本底值的 5 倍值为判定阈值,当被检样品的 MFI 值大于或等于判定阈值则判为阳性。对于 MFI 值小于判定阈值但数值接近的被检

样品,进行重复检测,按以上判定标准进行最终判定。

1.7 特异性检测试验方法

对1.1所述狐狸、水貂肉类样品,以及其他15种陆生动物和3种水生动物肌肉组织样品,按1.4所述进行基因组DNA提取纯化。采用本研究建立的二重xMAP液相基因芯片方法,对上述各物种基因组DNA样品进行检测,用无核酸酶超纯水代替DNA模板为空白对照,根据对各样品所测得的MFI值,按“1.6.4”所述进行结果判定。

1.8 核酸检测灵敏度测试方法

分别提取纯化北极狐、水貂肌肉样品基因组核酸,采用NanoDrop ND1000微量分光光度计测核酸浓度。取每种已知浓度的纯化核酸溶液,用10mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)进行10倍系列梯度稀释,制备系列梯度稀释样品。采用上述二重xMAP液相基因芯片方法对每种模板的系列稀释样品进行检测,对每种模板的每个稀释度均进行3次重复测试,采用10mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)代替DNA模板作为阴性对照,采用无核酸酶超纯水代替DNA模板为空白对照,同步进行检测。检测终点为模板重复测试均呈检测阳性的最高稀释度。

1.9 肉类混样检测敏感性试验方法

按“1.2”分别制备添加量为1%、0.1%、0.05% (m/m)的北极狐/黄牛或水貂/黄牛2组肉类混样,对每组每个添加浓度的肉类混和样均进行4次独立取样,每次均对肉样进行多点取样后合并成约50mg样品,对每个添加浓度的肉样均获得4个独立取样,对4个取样分别进行基因组DNA提取纯化,对纯化DNA样品进行二重xMAP液相基因芯片检测。对作为基质的纯黄牛肉样品也同步进行取样、核酸提取和检测,并采用无核酸酶超纯水代替DNA模板设空白对照检测。

1.10 重复性检测试验方法

按以下方法进行组间(inter-assay)重复性检测试验:用10mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)缓冲液将狐狸、水貂核酸溶液分别稀释至DNA浓度为1ng/μl,对其分别进行8次平行检测(包括二重不对称扩增和二重微球杂交检测),记录每次反应中狐狸、水貂目标成分的MFI检测值,并计算其MFI检测值平均值及组间变异系数(相对标准偏差,coefficient of variation, CV%)。

1.11 模拟阳性食品与饲料样品制备

随机收集不同类型的市售肉类食品30份、国内配合饲料样品20份以及进口动物源性饲料样品15份,分别提取核酸,采用本研究建立的二重xMAP液相基因芯片

方法进行检测。检测结果均呈检测阴性。从中挑选猪肉松、鸡肉松、牛肉干、牛肉丸、牛肉或羊肉类涮肉片等8份含不同原料成分的食品样品,以及饲用鸡肉骨粉、鱼粉、牛羊肉骨粉、猪血浆蛋白粉等8份不同类型的动物源性饲料样品。对每份样品分别进行核酸提取,测DNA溶液浓度,用10mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)缓冲液调配浓度为50ng/μl。同时,制备浓度为50ng/μl的纯化狐狸基因组DNA和水貂基因组DNA,将其按1:100(体积比)比例分别添加到上述16份等同浓度(50ng/μl)的食品和饲料样品DNA溶液中,获得狐狸DNA或水貂DNA含量为1%(V/V)的模拟阳性核酸样品各16份。

2 结果与讨论

2.1 二重xMAP液相基因芯片特异性检测结果

采用本研究所建立的二重xMAP液相基因芯片方法,对“1.1”所列的北极狐、赤狐、水貂,以及其他15种陆生动物和3种水生动物样品的基因组DNA进行检测。结果显示,2种狐狸样品均呈狐狸基因特异强阳性反应,水貂样品均呈水貂基因特异强阳性反应,狐狸和水貂样品之间未出现非特异性交叉反应,其他15种陆生动物和3种水生动物样品均呈典型阴性反应,其MFI检测值与空白对照本底值无明显差异。图1列出了狐狸、水貂以及其他几种常见动物物种基因组DNA的检测数值图,其中鱼DNA样品是由三文鱼、鲑鱼、草鱼和鲫鱼基因组DNA等浓度等量混合后制成的核酸混样。其他未列入图中的非目标动物物种样品对应狐狸基因特异探针(fox-probe)的MFI检测值为6~46,对应水貂基因特异探针(mink-probe)的MFI值为7~76,均接近空白对照本底值。

2.2 二重xMAP液相基因芯片的核酸检测灵敏度

如“1.8”所述,将狐狸、水貂基因组DNA进行系列梯度稀释,取浓度范围在5ng/μl~50fg/μl的两组系列稀释样品,采用二重xMAP液相基因芯片方法分别进行检测,对每个稀释度样品均进行3次重复测试,以3次重复测试反应均呈阳性的最高稀释度为检测终点,其对应的DNA模板浓度即为检测低限(LOD)。检测结果显示,二重xMAP液相芯片方法对狐狸基因组DNA的检测低限为2.8pg/μl,对水貂基因组DNA的检测低限为0.9pg/μl。图2显示该二重液相基因芯片法对狐狸DNA、水貂DNA在敏感性检测终点对应的MFI值平均值及标准偏差(standard deviation),狐狸DNA、水貂DNA在检测终点对应的MFI值相对标准偏差

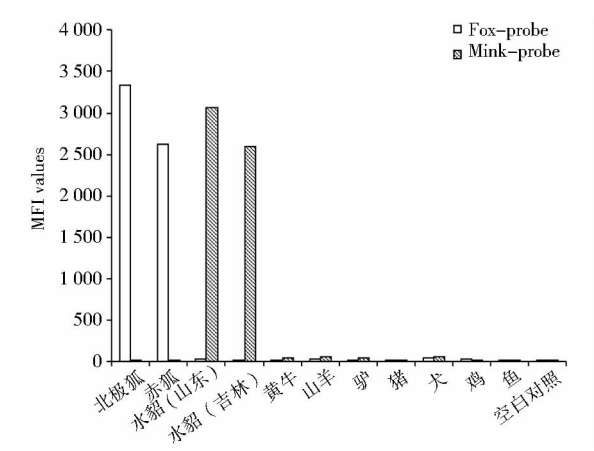


图1 二重 xMAP 液相基因芯片特异性检测结果

Fig.1 Specificity detection results of the duplex xMAP assay

MFI: Median fluorescent intensity

(CV%) 分别为 24%、14%。

2.3 二重 xMAP 液相基因芯片对肉类混样的检测下限

采用二重 xMAP 液相基因芯片方法,对狐狸/黄牛和水貂/黄牛 2 组肉类混样的 3 种添加浓度(1%、0.1%、0.05%,m/m)样品分别进行检测,对每组样品的每种添加浓度混和样按“1.9”所述进行 4 次独立取样、核酸提取和检测。结果显示,狐狸/黄牛混样组的

每种添加浓度所对应的 4 个取样均呈狐狸成分阳性反应;水貂/黄牛混样组的每种添加浓度样品所对应的 4 个取样均呈水貂成分阳性反应。而同时检测的纯黄牛肉样品呈两种目标成分检测阴性。表 2 显示了两组混和样中每个添加浓度所对应的 4 个取样的 MFI 值平均值及其相对标准偏差(CV%)。根据检测结果,本研究所建立的二重 xMAP 液相基因芯片方法对混合肉样中狐狸、水貂成分的检测敏感性均可达 0.05% (m/m) 含量水平。

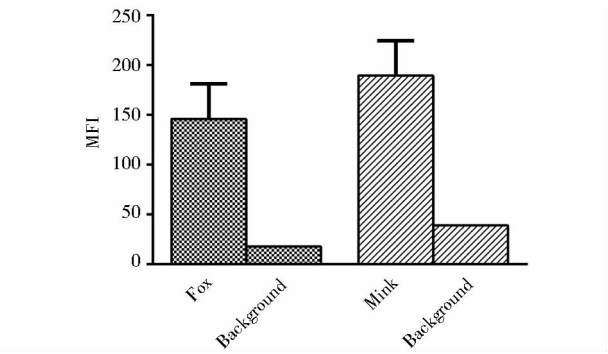


图2 二重 xMAP 液相基因芯片方法敏感性试验检测下限结果

Fig.2 Results of the duplex xMAP assay sensitivity detection at the LOD point

MFI: Median fluorescent intensity

表2 人工制备肉类混样检测结果

检测值		样品				
		1% *	0.1% *	0.05% *	Beef	Blank control
MFI (CV%)	狐狸成分	1 833 (10%)	493 (16%)	192 (12%)	17	16
	水貂成分	2 585 (5%)	880 (14%)	391 (23%)	57	30

* 1% (m/m)、0.1% (m/m)、0.05% (m/m) content of fox or mink meat in beef binary meat samples

2.4 重复性检测试验结果

采用本研究建立的二重 xMAP 液相基因芯片方法,按“1.10”所述,对浓度为 1ng/μl 的狐狸、水貂 DNA 样品进行重复性检测试验。检测结果显示,本研究方法对狐狸成分、水貂成分的 MFI 平均值分别为 1 092、1 450,对应 8 组平行反应的组间检测变异系数分别为 6.4%、4.4%,均小于 10%。

2.5 模拟阳性样品检测

如“1.11”所述,制备狐狸 DNA 或水貂 DNA 含量为 1% (V/V) 的模拟阳性核酸样品各 16 份,采用本研究建立的二重 xMAP 液相基因芯片方法进行检测,用无

核酸酶超纯水代替 DNA 模板设空白对照进行同步检测。结果显示,32 份模拟阳性核酸样品均呈对应添加目标成分阳性反应。详见表 3。

表3 食品与饲料模拟阳性核酸样品检测结果

样品		检测结果 (MFI 值)			
		狐狸成分		水貂成分	
		原样品	模拟阳性样品	原样品	模拟阳性样品
食品	8	14 ~ 35	154 ~ 643	15 ~ 34	353 ~ 624
饲料	8	5 ~ 29	199 ~ 435	8 ~ 27	476 ~ 713
空白对照	3	11 ~ 26	—	7 ~ 33	—

3 讨论

为进一步提高产品中动物源性成分检测效率,本研究基于 xMAP 新型生物芯片技术平台,并结合采用锁核酸修饰碱基探针技术,进行动物源性成分检测新方法开发。xMAP 液相芯片技术的高通量检测优势体现在两方面:一是可同步检测多种目标,二是能够快速自动化检测大批量样品。xMAP 液相芯片技术可在一个反应管中同时检测多达 100 种不同的目标,每份样品的上机检测时间只需几秒^[11];现阶段已有的液相芯片仪可支持连续自动化检测 96 份样品。因此,将 xMAP 技术用于临床筛检大量样品可显著提高检测效率。此外, xMAP 技术在检测时对每种目标的检测值设定取 50 ~ 100 个目标微球的中位值,相当于每个样本重复检测了 50 ~ 100 次并取其平均值,确保检测重复性和稳定性,有利于保障常规大批量检测工作质量。

本研究在 xMAP 液相基因芯片技术平台基础上,结合了 LNA 修饰碱基探针技术,为国内外首创。由于不同动物物种的基因组相互间普遍存在一定程度的同源性,并且现有 GenBank 等数据库中物种基因组信息有限,因此,设计用于检测鉴别物种的特异扩增引物和探针难度较高。采用 LNA 修饰碱基使得可设计序列较短但 T_m 值较高的特异探针,拓宽了设计空间,同时短序列探针可减少序列交叉同源性。由于采用 LNA 修饰碱基使探针具有高 T_m 值,使得检测能采用高温杂交条件,进一步消除由于序列的部分同源性交叉在较低杂交温度易产生的非特异反应,从而确保检测特异性和准确性。本研究在微球悬浮杂交阶段采用了 60℃ 高温杂交条件,通过对不同狐狸、水貂样品以及其他动物源性样品的检测试验,显示所建立的二重 xMAP 液相基因芯片方法特异可靠,能够精准鉴定两种目标物种 DNA,与包括犬等相近物种在内的其他 18 种水生和陆生动物物种无交叉反应。本研究首次建立了鉴别鉴定狐狸、水貂成分的二重 xMAP 液相基因芯片方法,可在 2h 内快速完成对纯化核酸样品的检测。该法对狐狸基因组 DNA 和水貂基因组 DNA 的检测低限小于 3pg/ μ l,略高于已报道的多重荧光 PCR 法检测敏感性水平^[1,9],其对肉类混样的检测低限达到 0.05% (m/m) 微量水平。根据上述验证试验结果,所建立方法能确保准确检出产品中微量的掺假造假或污染目标成分,并具有能快速筛检大批量样品的优势。

在方法重复性和稳定性验证方面,根据国际动物

卫生组织(OIE)发布的核酸检测方法验证指南以及我国发布的相关行业标准,关于核酸检测方法的重复性指标为组间变异系数应小于或等于 30%。在检测重复性方面,通常样品核酸浓度越高,其重复检测结果偏差越小,表现为组间或组内检测变异系数较低。本研究制备较低浓度水平(1ng/ μ l)核酸模板进行重复性试验,结果显示,该法对两种目标基因的组间检测变异系数均小于 10%,说明检测方法稳定,检测重复性好。

由于未能收集到含狐狸、水貂成分的食品和饲料样品,本研究采用人工制备阳性混样的方法,在不同类型的食品 DNA 和饲料 DNA 中添加微量目标 DNA,以模拟检验产品检测效果。通过对狐狸 DNA 或水貂 DNA 含量低至 1% 的模拟阳性核酸样品的检测结果,表明所建立的方法适用于检测各类常见食品和饲料样品,能较好排除加工食品和饲料中各种复杂基质成分的干扰,可准确检出多种基质成分中混有的微量目标成分。

4 结论

本研究运用 xMAP 液相芯片技术原理和锁核酸修饰碱基探针技术,成功建立了同步检测鉴定狐狸和水貂特异成分的二重 xMAP 液相基因芯片新方法,检测快速准确,灵敏度高,稳定性好,并具有高通量筛检样品的优势,适合应用于食品与饲料质量与安全检验相关领域。若配合采用对应的产品前处理与核酸提取技术,该法还可应用于动物毛皮鉴定鉴别等领域。本研究为食品与饲料质量与安全监督监管、进出口检验把关等涉及产品中动物源性成分检测鉴定的各种应用需求提供了高效可靠技术手段。

参考文献

- [1] 刘艳艳,李会荣,胡悦,等. 饲料中狐狸、水貂、貉子和狗源性成分的五重实时荧光 PCR 检测方法的建立. 中国生物工程杂志, 2017, 37(12): 67-76.
Liu Y Y, Li H R, Hu Y, et al. Multiplex fluorescent real-time PCR detection of fox, mink, raccoon and dog derived materials in feedstuff. China Biotechnology, 2017, 37(12): 67-76.
- [2] 刘少宁,陈智,张志民,等. 鉴别绵羊肉中狐狸源性成分的环介导等温扩增检测方法的建立. 中国食品卫生杂志, 2016, 28(1): 75-78.
Liu S N, Chen Z, Zhang Z M, et al. Development of a LAMP method for the identification of fox-derived ingredients in mutton. Chinese Journal of Food Hygiene, 2016, 28(1): 75-78.

- [3] Dalmaso A, Fontanella E, Piatti P, et al. A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. *Molecular and Cellular Probes*, 2004, 18(2): 81-87.
- [4] Cawthraw S, Saunders G C, Martin T C, et al. Real-time PCR detection and identification of prohibited mammalian and avian material in animal feed. *Journal of Food Protection*, 2009, 72(5): 1055-1062.
- [5] Floren C, Wiedemann I, Brenig B, et al. Species identification and quantification in meat and meat products using droplet digital PCR (ddPCR). *Food Chemistry*, 2015, 173: 1054-1058.
- [6] Lin C C, Fung L L, Chan P K, et al. A rapid low-cost high-density DNAbased multi-detection test for routine inspection of meat species. *Meat Science*, 2014, 96(2): 922-929.
- [7] Bertolini F, Ghionda M C, D' alessandro E, et al. A next generation semiconductor based sequencing approach for the identification of meat species in DNA mixtures. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0121701. DOI: 10.1371/journal.pone.0121701.
- [8] 李通, 尹艳, 袁其朋, 等. 运用 PCR 方法鉴别四种犬科动物的研究. *食品工业科技*, 2013, 34(17): 146-149.
- Li T, Yin Y, Yuan Q P, et al. Research and application of PCR method for identification of four Canidae species. *Science and Technology Food Industry*, 2013, 34(17): 146-149.
- [9] 卞如如, 范阳阳, 刘艳艳, 等. 一种驴和马及狐狸源性成分快速检测方法的研究. *中国畜牧杂志*, 2017, 53(1): 100-104.
- Bian R R, Fan Y Y, Liu Y Y, et al. Research of a method for rapid detection of donkey, horse and fox ingredients. *Chinese Journal of Animal Science*, 2017, 53(1): 100-104.
- [10] 贾冰凝, 何微, 岳苑, 等. 实时定量荧光 PCR 法检测食品中狐狸源性成分. *科技创新导报*, 2017, 14(36): 109-111.
- Jia B N, He H, Yue Y, et al. Real-time PCR for detection of fox ingredient in food. *Science and Technology Innovation Herald*, 2017, 14(36): 109-111.
- [11] Dunbar S A. Applications of Luminex xMAP technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection. *Chimica Acta*, 2006, 363(1-2): 71-82.
- [12] Reslova N, Michna V, Kasny M, et al. xMAP technology: applications in detection of pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 55.
- [13] Wu Y, Yang Y, Liu M, et al. A 15-plex/xMAP methods to detect 15 animal ingredients by suspension array system coupled with multifuorescent magnetic beads. *Journal of AOAC International*, 2016, 99(3): 1-10.
- [14] Ponzoni E, Breviario D, Mautino A, et al. A multiplex, bead-based assay for profiling plant-derived components in complex food matrixes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2013, 405(30): 9849-9858.
- [15] 李生茂, 徐祥, 梁华平, 等. 锁核酸研究进展. *生理科学进展*, 2003, 34(4): 319-323.
- Li S M, Xu X, Liang H P, et al. Progress in locked nucleic acid research. *Progress in Physiological Science*, 2003, 34(4): 319-323.
- [16] Vester B, Wenge J. LNA (locked nucleic acid): high affinity targeting of complementary RNA and DNA. *Biochemistry*, 2004, 43(42): 13233-13241.
- [17] Kaur H, Arora A, Wengel J, et al. Thermodynamic, counterion and hydration effects for the incorporation of locked nucleic acid nucleotides into DNA duplexes. *Biochemistry*, 2006, 45(23): 7347-7355.
- [18] Ballantyne K N, van Oorschot R A H, Mitchell R J. Locked nucleic acids in PCR primers increase sensitivity and performance. *Genomics*, 2008, 91(3): 301-305.
- [19] 秦智锋, 刘建利, 卢体康, 等. 基于锁核酸探针的双重荧光实时 RT-PCR 检测方法鉴别新城疫中强毒株与弱毒株. *中国预防兽医学报*, 2012, 34(9): 719-723.
- Qin Z F, Liu J L, Lu T K, et al. Development of duplex locked nucleic acid real-time RT-PCR to differentiate the pathovars of Newcastle disease virus. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2012, 34(9): 719-723.
- [20] 许如苏, 纪玲珍, 黄帅, 等. 应用多重 Taqman -LNA 荧光 PCR 同时检测肉制品中猪鸡鸭源性成分. *中国兽医杂志*, 2017, 53(12): 81-84.
- Xu R S, Ji L Z, Huang S, et al. Development of multiplex Taqman-LNA real-time PCR for detecting pork, chicken and duck-derived ingredients in meat products. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2017, 53(12): 81-84.

Development of a Multiplex Liquidchip Assay for Rapid Identification of Fox and Mink Ingredients

CHEN Ru¹ DUAN Yan-yu¹ GAO Xiao-bo² LIU Zhi-ling¹ YANG Jing¹
MEI Ming-zhu¹ TAN Xin³ LUO Hai-yan²

(1 Technical Center, Guangzhou Customs District People's Republic of China, Guangzhou 510623, China)

(2 National Research Institute for Family Planning, Beijing 100081, China)

(3 School of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract A novel nucleic acid detection method, based on the xMAP (flexible multi-analyte profiling) technology platform, was developed for high-throughput and simultaneous identification of fox and mink ingredients in products of animal origin. A duplex xMAP assay was established, the primers and probes were designed targeting a fox mitochondrial D-loop gene or a mink mitochondrial cytochrome b gene. The probes were incorporated with locked nucleic acids to improve detection efficiency. The assay accurately identified fox and mink DNA, without cross reactions with DNA samples of eighteen nontarget animal species. The LOD on purified fox and mink DNA was evaluated as 2.8 pg/ μ l and 0.9 pg/ μ l, respectively. The detection sensitivity on samples of experimental meat mixtures was demonstrated to be 0.05% (*m/m*). The assay successfully detected 32 mocked positive DNA sample of food and feeds, which each was made by adding fox DNA or mink DNA at 1% (*V/V*) proportion of the same concentration. In conclusion, the duplex xMAP assay provided rapid identification of fox and mink ingredients with high specificity and high sensitivity. The technique is suitable to be applied in food and feeds quality assurance systems and safety inspections.

Key words xMAP technology Fox ingredient Mink ingredient Locked nucleic acid (LNA)