

# 进出口动物源性产品中牛羊成分的检测方法

(中国进出口商品检验技术研究所,北京 100025)

陈颖 吴亚君 徐宝梁 王晶 钱增敏 苏宁

**摘要:**加强对进出口动物源性产品,特别是反刍动物源性产品的严格管理是防止疯牛病传播的有效途径。本文详述了饲料、保健品和化妆品等动物源性产品中动物源性成分,特别是牛羊源性成分的检测方法的研究现状,对显微检测、PCR检测、免疫学检测和近红外检测等目前用于检测动物源性成分的主要方法进行了评述,并对进行该项目检测时检测方法的使用原则提出了建议。

**关键词:**动物源性产品,饲料,化妆品,保健品,牛羊成分

**Abstract:**Enforcing the ban on animal products especially ruminant products is considered as an important measure to prevent the spread of bovine spongiform encephalopathy. In this paper, the current analytical methods for detection animal materials especially bovine, sheep and goat materials in feed, cosmetics and functional food are expounded. The principal performance characteristics of currently applied four different approaches i.e. microscopic analysis, polymerase Chain reaction, immunoassay analysis and near infrared spectroscopy are presented and compared and their specific advantages and disadvantages are described. The suggestion for using proper method to detect animal materials has been put forward.

**Key words:**animal products; feedstuff; cosmetics; functional food; bovine and sheep and goat materials

中图分类号:TS207.3 文献标识码:A  
文章编号:1002-0306(2004)08-0144-03

疯牛病(BSE)和痒病已经成为当今世界化妆品和食品卫生安全的重大威胁。

目前,虽然一些国家研究机构声称已经找到抵御疯牛病病毒的方法,但事实上如何控制疯牛病无孔不入的渗透式传播、治疗新型克雅氏症目前仍然是人类无法解决的巨大难题。面对疯牛病的威胁,只有未病先防,及早采取综合性防范措施。

收稿日期:2004-01-07

作者简介:陈颖(1972-),女,博士后,高级工程师,主要从事食品及饮料生物安全检测方面的工作。

基金项目:人事部留学人员重点资助项目。

## 1 进出口动物源性产品中发生 BSE 的潜在危险性

肉骨粉是牲畜屠宰后其毛纤维、皮革、角质、骨骼、脏器等非实用组织经由高温蒸煮后再挥干水分的成品,是极其重要的动物蛋白饲料,在养殖领域使用极为广泛。污染痒病病原的作饲料用的肉骨粉(Meat bone meal, MBM,包括肉粉和骨粉),现在已被确定为是引起 BSE 发生的最初的原因。因此,用肉骨粉类饲料喂反刍动物就有发生 BSE 的危险。

具有美白、祛斑、抗皱、抗衰老作用的化妆品及一些功能性保健品中也大多含有从牛、羊的脑及神经组织、内脏、胎盘和血液中提取的成分。如油脂、蜡类、脂肪酸和脂肪醇等基质材料,动物器官提取物,如胎盘提取物(Placental Extracts),包括胎盘水解液、胎盘球蛋白、胎盘酶和胎盘脂质;血液提取物(Blood Extracts);脑提取物(Brain Extracts);表皮细胞生长因子(Epidermal Growth Factor, EGF);牛脊髓提取物(Bovine spinal cord extract);牛眼晶状体提取物(Bovine eye lens protein extract)等。

因此,开展动物源性产品中牛羊成分的鉴定检测,对防止疯牛病的传播,保证国家的安全和人民的健康,保护我国化妆品、保健食品及饲料工业的发展都具有非常重要的意义。

## 2 进出口动物源性产品中牛羊源性成分的检测

目前,牛羊源性成分鉴别的主要方法有物理、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。

### 2.1 显微组织检测

显微检测方法是欧盟认可的饲料检测方法,主要根据饲料中各种组织的结构特征和细胞特征进行判断,如典型的长骨由有末端的中心骨干组成,该末端通常与其它组织相连,并且包括生长软骨。软骨中的细胞为小空洞,在形状上为球状,软骨中无管道结

构,此外,软骨中还有其它一些组织特异性。由于鱼骨的特殊形状和特有的腔隙、沟纹等组织特征,使其较易与哺乳动物、禽类的骨头分开,但哺乳动物和禽类的骨头则不易区分。目前,显微检测方法能够检测肉粉、骨粉、肉骨粉、血粉、鱼粉和水解、未水解的羽毛粉,但并不能区分其中的动物种类。因此,该方法的进一步发展方向之一是从骨头、肌肉等组织中寻找更多的形态特征,使该方法不但能在脊椎动物层面区分动物,更能从高一级的分类水平区分动物品种。

## 2.2 免疫学检测方法

ELISA 是一种基于可溶性抗原与抗体反应的简便方法,目前已开发研制了几种商业化的检测生肉及中度加工的食品中动物成分的试剂盒。1995年, Hofmann 等采用商业化的 ELISA 试剂盒对饲料样品进行检测后发现,如果肉骨粉先经过了灭菌处理再添加入饲料,则不能检出。但该结果从另一侧面也反映出样品的加工厂家是否严格按照规定( $>120^{\circ}\text{C}$ )对肉骨粉进行了温度处理。Ansileld 第一个采用热稳定蛋白的特殊抗体检测经过严格条件加工的样品,能够检测动物饲料中的哺乳动物和猪的成分。该方法包括两步,首先应用硫酸铵沉淀可溶性蛋白除去明胶,浓缩蛋白,然后应用热稳定性多克隆抗体夹心 ELISA 方法。这种样品纯化/ELISA 方法可以检测加热  $140^{\circ}\text{C}$ 、1.5h 的动物饲料中的小于  $166\text{mg}/\text{kg}$  的牛羊热稳定蛋白。但硫酸铵沉淀使该方法相当繁琐,且该方法不能区分禁止和允许蛋白。最近美国 Neogen 公司开发出了饲料中反刍动物成分检测的免疫层析试纸条,该产品采用单步侧向流动免疫层析法,提取液经过反应区,反应区中含有抗体,可以与加热稳定的反刍动物肌肉蛋白质共轭结合。如果反刍动物副产品存在,被此抗体捕获后,就达到薄膜区,与这个区域里反刍动物肌肉蛋白抗体结合,并使其形成一条明显的线。如果不存在反刍动物副产品,就没有这条线。该方法操作简单,是一种值得推广的方法。综上所述,考虑到它的实用性,免疫学方法可作为一种筛选方法,然后再用更加灵敏特异的方法对 ELISA 检测的阳性样品进行确证。

## 2.3 PCR 检测方法

PCR 技术是应用耐热 DNA 聚合酶特异性地扩增目的片段,扩增的片段可用凝胶电泳、DNA 测序等方法进行分析和鉴别。应用 PCR 技术进行动物成分检测的关键是选择动物种类基因组中的特异基因作为扩增对象。线粒体 DNA、卫星 DNA 等具有拷贝数高,进化过程中保守性强等特点,常被用作动物种类鉴别的基因序列。Tartaglia 等人采用牛线粒体 DNA 中的 tRNA 3' 端、ATPase8 和 ATPase6 的氨基酸片段,设计了特异引物,以检测反刍动物饲料中牛源性

成分,其检测灵敏度可达 0.125%。Chikuni 等人针对绵羊卫星 I DNA 序列设计了特异性引物,该引物在绵羊和山羊中均能扩增出 374bp 的片段,而在其它哺乳动物牛、水牛、梅花鹿、猪、马、兔和鸡中均无此片段,此外,通过内切酶对扩增片段酶切,可区分绵羊和山羊。Lahiff 等建立了检测饲料中绵羊、猪和鸡成分的 PCR 方法,针对反刍动物成分的检测,Tajima 等采用分散重复序列(SINE)设计了牛、绵羊和山羊的扩增引物,该引物对以上 3 种动物成分的检测灵敏度达 0.01%;而 Bellagamba 等人则根据线粒体 12S rRNA 基因序列设计了针对反刍动物的扩增引物,该引物对牛、山羊和绵羊成分的检测灵敏度分别为 0.125%、0.125%和 0.5%。Myers 等根据线粒体 DNA 序列设计了一种所谓的“万能引物”,该引物能同时扩增牛、绵羊、山羊、鹿、赤鹿、马和猪成分。为防止污染,PCR 技术对检测条件和操作人员的要求都较高。由于其工作原理是检测 DNA 分子,因此,对混入饲料,但允许使用的牛奶、血液等来源的牛羊成分无法区分。

## 2.4 近红外光谱检测方法(NIRS)

近红外方法(Near infrared spectroscopic method, NIRS)在饲料工业中广泛地用于饲料的质量控制分析,如对水分、蛋白、脂肪、灰分、糖、淀粉、纤维等的测定。该方法的原理是组成分析样品中的分子在不同电磁波的吸收不同。近红外方法的优点是快捷,使用中不含有害物质,样品用量少,具有良好的可重复信号,最有潜力发展成为“按键式”检测仪器。近红外分析所用的样品量通常为 10~100g,因此在很大程度上可避免假阳性和假阴性结果。Murray 等采用 NIRS 方法检测了含有 3%、6%、9%肉骨粉的 90 种鱼粉,该项结果表明,NIRS 能够区分出来自于两种不同动物的动物蛋白。但该方法的最大缺点是非直接的,因此需要大量具有权威性的标准样品以形成标准或判别模式,即针对不同动物成分、不同组份所建立的光谱库。此外,目前该方法的检测灵敏度仍高于 1%,其检测结果不能单独做为法律证据。

## 3 结语

从联合国粮农组织的声明中可以看出,目前世界上的 BSE 状况纷繁复杂,许多国家情况不明。因此,对进出口动物源性产品实行严格检验是防止疯牛病传播的最有效途径之一。

目前常用的动物源性产品中牛羊成分检测方法有显微检测、PCR 检测、免疫学检测及近红外检测等,它们各有优缺点,采用何种方法进行检验关键在于被检样品的种类及对样品检测的要求,如在需要对哺乳动物成分进行检验时,且样品为非深加工产品时,可采用显微检测或近红外方法,但若要求区分检测哺乳动物种类时,采用 PCR 方法则特异性强且灵敏度高。因此,对动物源性产品的检测应采取“优

势互补”的原则,多种方法相互补充、互相印证,只有这样才能有效防止含有牛、羊源性成分的动物源性产品从疫区进入我国。

#### 参考文献:

- [1] 陈茹,林志雄,刘琳琳.应用PCR等核酸技术检测动物饲料中牛羊组织成分[J].中国兽医科技,2001,31(9):3~8.
- [2] 杨宝华,宗卉,林庆燕,俞火.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[J].中国畜牧杂志,2002,38(1):3~5.
- [3] Ansfield M, Reaney S D, Jackman R. Performance assessment and validation of a sensitive immunoassay for detection of ruminant and porcine heat stable proteins in compound animal feedstuffs[J]. Food Agric Immunol, 2000, 12:285~297.
- [4] Ansfield M, Reaney S D, Jackman R. Production of a sensitive immunoassay for detection of ruminant and porcine proteins, heated to >130°C at 2.7 bar, in compound animal feedstuffs[J]. Food Agric Immunol, 2000, 12: 273~284.
- [5] Bellagamba F, Valfre F, Panseri S, Moretti V M. Polymerase Chain Reaction-Based Analysis To Detect Terrestrial Animal Protein in Fish Meal[J]. Food Protection, 2002, 66(4): 682~685.
- [6] Colgan S, O'Brien L, Maher M, Shilton N, McDonnell K, Ward S. Development of a DNA-based assay for species identification in meat and bone meal[J]. Food Research International 2001, 34:409~414.
- [7] Engling F P, Jorgenson J S, Paradies-Severin I, Hahn H. Evidence of animal meal in feeds[J]. Kraftfutter Feed Magazine, 2000(1):14~17.
- [8] Frezza D, et al. A Competitive Polymerase Chain Reaction -Based Approach for the Identification and Semiquantification of Mitochondrial DNA in Differently Heat-Treated Bovine Meat and Bone Meal[J]. Food Protection, 2003, 66(1):103~109.
- [9] Garrido -Varo A. Current and future applications of NIRS technology in the feed industry[J]. Options Mediter, 1997,26: 87~92.
- [10] Gizzi, G, et al. An overview of tests for animal tissues in feeds applied in response to public health concerns

(上接第 115 页)

#### 参考文献:

- [1] 刘宝家等编.食品加工技术、工艺和配方大全续集 5(中)[M].北京:科学技术文献出版社,1999,10.
- [2] 李慧文等编.牛肉制品 737 例[M].北京:科学技术文献出版社,2002,11.
- [3] 高福成主编.现代食品工程高新技术[M].北京:中国轻工业出版社,2000,5.
- [4] 孔书敬,段善海,等.杀菌方式对软包装酱牛肉品质的影响

- regarding bovine spongiform encephalopathy[J]. Rev Sci Tech Off Int Epiz, 2003,22(1):311~331.
- [11] Kimberlin, RH. Bovine spongiform encephalopathy:an appraisal of the current epidemic in the United Kingdom [J]. Intervirology, 1993,35:208~218.
  - [12] Lahiff S, et al. Species-specific PCR for the identification of ovine, porcine and chicken species in meat and bone meal(MBM)[J]. Molecular Cellular Probes 2001, 15: 27~35.
  - [13] Meyer R, Oesch B, Fatzer R, Zmbrigen A, Vandavelde M. Detection of bovine spongiform encephalopathy specific PrP(Sc) by treatment with heat and guanidine thiocyanate[J]. Virology, 1999, 73: 9386~9392.
  - [14] Momcilovic D, Rasooly A. Detection and analysis of animal materials in food and feed[J]. Food Protection, 2000, 63(11):1602~1609.
  - [15] Murray I, Aucott L S, Pike I H. Use of discriminant analysis on visible and near infrared reflectance spectra to detect adulteration of fish meal with meat-and bone meal[J]. NIRS, 2001(9): 297~311.
  - [16] Myers M, Yancy H F, Farrell D E. Characterization of a Polymerase Chain Reaction -Based Approach for the Simultaneous Detection of Multiple Animal-Derived Materials in Animal Feed[J]. Food Protection, 2003, 66(6): 1085~1089.
  - [17] Tajima K, et al. PCR detection of DNAs of Animal Origin in Feed by Primers Based on Sequences of Short and Long Interspersed Repetitive Elements[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2002, 66(10): 2247~2250.
  - [18] Tartagile M, Saulle E, Pestaliaz 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 Protection, 1998, 61:513~518.
  - [19] Wang RF, Myers MJ, Campbell W, et al. A rapid method for PCR detection of bovine materials in animal feedstuffs[J]. Molecular and Cellular Probes, 2000, 14:1~5.
  - [20] Wells GAHA, Scott AC and Johnson CT. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle[J]. Veterinary Records, 1987, 121:419~420.

[J].肉类工业,2001(12):31~33.

- [5] 徐昆龙,肖蓉编.实用动物性食品卫生检验技术[M].昆明:云南科技出版社,2002,2.
- [6] 苏世彦主编.食品微生物检验手册[M].北京:中国轻工业出版社,1998,10.
- [7] GB4789.26-94.食品卫生国家标准—罐头食品商业无菌的检验[S].
- [8] 刘丽莉,夏延斌,杨协立.提高软包装五香牛肉出品率的研究[J].保鲜与加工,2003(1):15~17.