

反刍动物饲料产品和动物源性饲料产品中 牛羊源成分检测

魏战勇,王学斌,张红英,胡真宏,崔保安
(河南省动物性食品安全重点实验室,郑州 450002)

摘要:利用聚合酶链式反应法(PCR法)对反刍动物饲料产品(预混料、精料补充料、全价配合料等)和动物源性饲料产品(鱼粉、肉粉等)共计350个样品进行了牛羊源成分检测。结果表明,有3个样品检出牛和/或羊源性成分,牛羊源性成分检出率0.86%。其中,反刍动物饲料产品310批次,牛羊源性成分检出率为0.97%;动物源性饲料产品40批次,均未检出牛羊源性成分。

关键词:饲料产品;牛羊源成分;PCR;检测

中图分类号:S852.61 文献标识码:A

Detection of Cattle and Sheep-derived Materials in Feed Products of Ruminant Feed and Animal-derived Feed

Wei Zhanyong, Wang Xuebin, Zhang Hongying, Hu Zhenhong, Cui Baoan
(Henan Key Laboratory for Animal Food Safety, Zhengzhou 450002)

Abstract: The products of ruminant feed including pre-mixed feed, concentrate supplementary material, the full price feed and cattle or sheep-derived feed including fish meal, poultry meat powder, etc from the enterprise in He Nan province were detected by qualitative polymerase chain reaction (PCR). The results showed that the qualified rate was 99.14% in 350 batches of ruminant feed and animal-derived material feed. Among these products, the qualified rate was 99.03% in 310 batches of ruminant feed and the qualified rate was 100% in 36 batches of animal-derived material feed. In the three batches of unqualified products, one batche contains cattle and sheep-derived material .Two batches simply contain cattle-derived materials.

Key words: source ingredients of cattle and sheep, feed products, sampling detection, PCR technology

疯牛病(Mad cow disease)最早在1985年英国的阿什福特农场出现可疑病例^[1],1986年11月研究人员对病牛做了病理组织学检查,发现脑组织产生许多海绵样小孔,定名为牛海绵状脑病(Bovine spongiform encephalopathy, BSE),并确诊此病为牛的一种新病,1987年由Wells等首次报道^[2]。疯牛病的流行给世界养牛业、饲料工业、牛肉及其产品都造成了严重影响和损失,同时此病也严重地威胁着人类的生命和健康。BSE的病原为朊病毒,痒病和疯牛病的共同特征是潜

伏期长,感染后不刺激机体产生免疫反应,尚无法分离病原,因此无法用血清学方法检测抗体,也无法检测活体是否感染^[3]。因此,BSE只能依靠流行病学、临床症状、中枢神经系统病理组织学变化进行诊断,同时辅助以电镜技术、生化技术或免疫细胞化学法等做出综合诊断。世界各国都在寻找快速检测和杀灭BSE病原的方法,但目前尚无治疗和预防的药物。目前,普遍认为疯牛病的大规模暴发,其主要原因是牛食用了含有羊痒病朊病毒的肉骨粉所致。为此,英国自1988年起

第一作者简介:魏战勇,男,1975年出生,河南安阳人,讲师,博士,研究方向为动物疫病检测。通信地址:450002 河南郑州文化路95号河南农业大学牧医工程学院, Tel: 0371-63558519, E-mail: weizhanyong@hotmail.com。

通讯作者:崔保安,男,1948年出生,河南南阳人,教授,学士,研究方向为兽医微生物及免疫学。通信地址:450002 河南郑州文化路95号河南农业大学牧医工程学院, Tel: 0371-63558878, E-mail: cuibao@126.com。

收稿日期:2008-12-05,修回日期:2009-02-04。

就禁止使用反刍动物饲料饲喂牛,随后世界上许多国家和地区都先后颁布了法律、法规以控制动物源性成分的使用。笔者通过对350个反刍动物饲料产品和动物源性饲料产品进行牛羊源成分检测,旨在初步了解反刍动物饲料产品和动物源性饲料产品中牛羊源成分污染情况。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 检测样品 反刍动物饲料产品和动物源性饲料产品共350个。其中,反刍动物饲料产品310批次,动物源性饲料产品40批次。反刍动物饲料产品包括预混料、精料补充料、全价配合饲料;动物源性饲料产品包括鱼粉、肉粉等。

1.1.2 主要试剂与仪器设备 等效DNA提取试剂盒为上海杰美基因医药科技公司产品,Taq DNA聚合酶及10×PCR反应缓冲液为北京新惠泽澳科技公司产品;Marker DL 1 000为宝生物工程(大连)有限公司产品。

牛源性成分检测用引物(对)序列为:

5' -GCCATATACTCTCCTTGGTGACA-3'

5' -GTAGGCTTGGAATAGTACGA-3'

羊源性成分检测用引物(对)序列为:

5' -TATTAGGCCTCCCCCTTGTT-3'

5' -CCCTGCTCATAAGGGAATAGCC-3'

引物溶液:用TE缓冲液分别将上述引物稀释到25 μmol/L。PCR仪为美国MJ Research公司产品;Centrifuge 5415 D型高速低温离心机为Sigma公司产品;UVP型紫外凝胶成像仪为英国GeneGeniu公司产品。

1.2 方法

1.2.1 样品的制备 从350个样品中各取出样品约50 g,经粉碎至其颗粒直径在0.125 mm以下,混合均匀,装入洁净容器内,于4℃避光保存。

1.2.2 模板DNA的抽提 利用组织DNA抽提试剂盒提取样品中的DNA。

1.2.3 PCR检测方法 在200 μl的PCR反应管中依次加入10×PCR反应缓冲液5 μl,浓度为10 mmol/L的4种脱氧核糖核苷酸混合溶液1 μl,上下游引物溶液各1 μl,加入灭菌水使PCR反应体系达到50 μl,每个试样重复两次。同时设置阴性对照、阳性对照和空白对照。阴性对照是指从不含牛或羊成分的饲料中提取的DNA作为PCR反应体系的DNA模板;阳性对照是指将牛或羊成分按0.2%的比例添加在饲料中提取的DNA作为PCR反应体系的模板;空白对照是指用无菌重蒸馏水作为PCR反应体系的DNA模板。利用组织DNA

抽提试剂盒提取样品中的DNA。上述对照PCR反应体系中除模板外其余组分相同^[4-6]。

以4 000 r/min离心10 S后,将PCR管插入PCR仪中95℃预变性1~3 min,进行30次扩增反应循环(95℃恒温30~60 s,56℃恒温30~60 s,72℃恒温30~60 s)。然后72℃延伸5 min,取出PCR反应管,对反应物进行电泳检测。

1.2.4 PCR产物的电泳检测 将适量的琼脂糖加入电泳缓冲液中,加热将其溶解,配制成质量分数为1.5%的琼脂糖溶液,然后按每100 ml琼脂糖溶液中加入5 μl溴化乙锭溶液的比例,加入溴化乙锭,混匀,稍时冷却后,将其倒入电泳板上。在每个泳道中加入5~8 μl的PCR产物,其中一个泳道中加入DNA分子量标记,接通电源,9 V/cm电压,电泳20~30 min。电泳结束后,将琼脂糖凝胶置于凝胶成像仪上成像。结果显示,阳性对照在出现特异性DNA条带,而阴性对照与空白对照未出现特异性DNA条带^[7-9]。

1.2.5 检测结果判定 牛源成分检测 检测 566样品的牛源性检测PCR产物电泳图出现特异性DNA条带,经酶切确认后,判为阳性,即检出牛源成分;羊源成分检测 检测样品的羊源性检测PCR产物电泳图出现特异性DNA条带,经酶切确认后,判为阳性,即检出羊源成分。

2 结果

2.1 样品检测结果与判定

图1~图4为3个阳性样品的检测结果电泳图。由图1,图2可以看出,样品SL28在牛源性检测PCR产物电泳图和羊源性检测PCR产物电泳图的第8,9两条带上均出现特异性DNA条带,表明该样品含有牛源性成分和羊源性成分。

图3、图4表明,样品SL150只在图3中牛源性检测PCR电泳图的第12,13两条带上出现特异的DNA条带,而在图4羊源性检测PCR电泳图上没出现特异性DNA条带,表明该样品只含有牛源性成分,而样品SL154只在图4羊源性检测PCR产物电泳图的4-5条带上出现特异的DNA条带,而在图3牛源性检测PCR电泳图上没出现特异性DNA条带,表明该样品只含有羊源性成分。

2.2 整个饲料产品检测结果

共检测反刍动物饲料产品和动物源性饲料产品350个,有3个样品检出牛和/或羊源性成分,牛羊源性成分检出率0.86%。其中,反刍动物饲料产品310批次,牛羊源性成分检出率为0.97%;动物源性饲料产品40批次,均未检出牛羊源性成分。

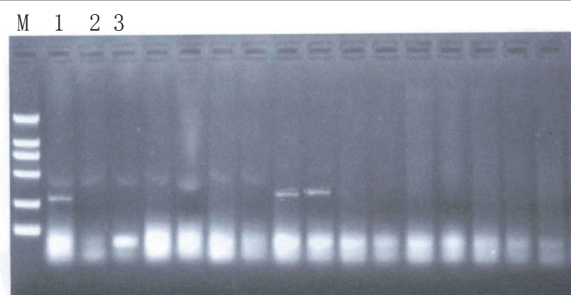


图1 牛源性检测PCR产物电泳图

M.DNA Marker DL2000 1.阳性对照 2.阴性对照
3.空白对照 4.其余为样品,圈内为阳性样品

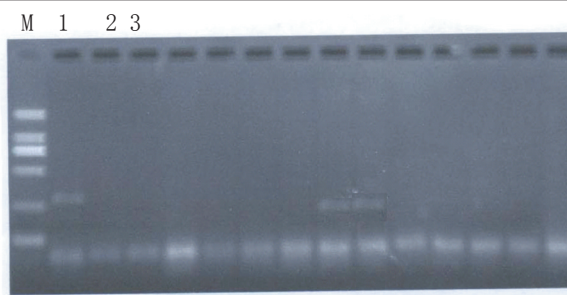


图2 羊源性检测PCR产物电泳图

M.DNA Marker DL2000 1.阳性对照 2.阴性对照
3.空白对照 4.其余为样品,圈内为阳性样品



图3 牛源性检测PCR产物电泳图

M.DNA Marker DL2000 1.阳性对照 2.阴性对照
3.空白对照 4.其余为样品,圈内为阳性样品



图4 羊源性检测PCR产物电泳图

M.DNA Marker DL2000 1.阳性对照 2.阴性对照
3.空白对照 4.其余为样品,圈内为阳性样品

表1 反刍动物饲料产品和动物源性饲料产品中牛羊源性成分检测结果

检测样品		样品数量 /个	检出牛和/或羊源性 成分样品数量/个	检出率 /%
反刍动物饲料产品	精料补充料	55	0	0
	浓缩料	200	3	1.5
	预混合饲料	55	0	0
	小计	310	3	0.97
动物源性饲料产品	国产鱼粉	19	0	0
	进口鱼粉	21	0	0
	小计	40	0	0
总计		350	3	0.86

3 讨论

(1)含牛羊源性成分饲料的使用,一直被认为是疯牛病传播的主要途径,禁止疫区含牛羊源性成分的饲料的生产、流通和使用,成为预防疯牛病感染、流行的重要手段之一^[1]。为了加强对饲料生产企业的监督,杜绝疯牛病的发生,有效提高省内饲料产品的安全性,利用PCR法对反刍动物饲料产品和动物源性饲料产品进行检测。PCR法采用阳性、阴性、空白对照的方法,具有简便、灵敏、准确等优点,有效的提高了饲料检测的工作效率^[6-8]。

(2)此次抽检产品合格率为99.14%,抽检结果说明了此次抽检产品的安全系数较高,特别是鱼粉抽检合

格率为100%。从产品分类抽检结果看,动物源性产品质量较反刍动物饲料产品质量好,预混合复合饲料较浓缩饲料质量好。总之,通过对多种饲料产品的抽查监督促使相关部门的反刍动物饲料产品和动物源性饲料产品的质量逐年不断提高,饲料企业的质量意识也在不断加强,有力的促进了养殖业的健康发展。

此次抽检不合格的3个产品,均为企业生产的浓缩饲料,分析其主要原因可能是有些企业生产管理还存在漏洞。目前,大多数企业生产一批畜禽料后不进行清仓处理,残留的动物源性饲料可能感染下一批反刍动物饲料,而少数企业信息不畅,不知道国家相关法规,甚至有个别企业安全意识差,为降低饲料成本,在

反刍动物饲料产品中违规使用动物源性饲料,给养殖业埋下了隐患。

(3)为了杜绝饲料产品及饲料生产企业中出现的问题,坚决执行国家有关规定,严防牛羊源成分的添加和使用,各行政部门及企业应从以下两个方面入手:首先,继续组织开展反刍动物饲料中牛羊源性成分的检测,在条件允许的前提下,加强监督力度,坚决禁止使用动物源性蛋白饲料饲喂反刍动物。并对产品不合格的企业及时进行通报,并按规定进行严厉处罚,确保反刍动物饲料产品的质量安全。其次,各检测部门应和有关科研院所通力合作,加快反刍动物饲料产品和动物源性饲料产品牛羊源性成分检测方法的行业标准制定工作,规范和提高整个检测部门的检测水平和准确度,切实保障饲料产品的安全性。

参考文献

- [1] 张春扬,赵宏坤.牛海绵状脑病[J].预防兽医学进展,2001,(1):34-36.
- [2] odemer W,KaupF J.Commmnts on present-day spread and epidemiology of BSE and prion diseases[J]. Gesundheitswesen, 2004,66(Suppl):21-25.
- [3] Baron T,Calavas D.Bovine spongiform encephalopathy[J].Pathol Biol(Paris),2005,53(4):229-236.
- [4] 潘文良,陈家华,丁燕等.进口肉骨粉中牛成分检测研究[J].生物技术通报,2001,(5):23-26.
- [5] 中国进出口商品检验技术研究所,中华人民共和国深圳出入境检验检疫局,中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局,等. SN/T 1119-2002.,进口动物源性饲料中牛羊源性成分检测方法 PCR 方法.北京:中国标准出版社,2002:1-6
- [6] 国家饲料质量监督检验中心(北京),中国农业科学院农业资源与农业区划研究所.GB/T20190-2006,饲料中牛羊源性成分的定性检测 定性聚合酶链式反应(PCR)法.北京:中国标准出版社,2006: 1-5
- [7] 张维铭,现代分之生物学实验手册[M].北京:科学出版社, 2003.1-35.
- [8] 韩俊英.荧光定量 PCR 技术及其应用[J].国外医学遗传分册.2000.23-3.
- [9] 闻伟刚,赵秀玲.Semi-nested PCR 检测饲料中牛羊源成分[J].农业生物技术学报, 2004,(14):183-186.