

应用微芯片电泳仪 MultiNA 鉴定羊奶粉中牛奶粉的掺伪

MultiNA-017

摘要：本文应用异硫氰酸胍提取法，从羊奶粉和牛奶粉中提取基因组，使用羊和牛的特异性引物进行 PCR 扩增，应用微芯片电泳仪检测到了相应条带。应用此方法检测羊奶粉和牛奶粉的混合样品，结果显示同时检测到了羊和牛的特异性条带，表明此方法可以实现羊奶粉中牛奶粉掺伪的定性检测。

关键词：微芯片电泳仪 MultiNA 羊奶粉 牛奶粉 掺伪鉴定

近几年无论在资本市场还是消费市场，羊奶粉越来越受青睐，目前，羊奶粉的价格也普遍高于牛奶粉。然而，媒体报道市面上有羊奶粉掺假的情况，打着羊奶的旗号，实际上在奶粉中掺入了牛乳清粉，有欺骗消费者之嫌。更有甚者直接用牛奶粉冒充羊奶粉，严重侵害了消费者的利益。

由于羊奶粉和牛奶粉属于不同的动物源性，应用分子生物学 PCR 和电泳检测手段鉴定羊奶粉中牛的特异性基因，可以鉴定羊奶粉中是否掺有牛奶粉成分。本文应用微芯片电泳仪 MultiNA 开发一种快速简单地检测羊奶粉和牛奶粉的方法，可进行羊奶粉中牛奶粉掺伪的鉴定。

实验部分

1.1 仪器

MCE-202 MultiNA

1.2 试剂和样品

DNA-500 Reagent Kit for MultiNA(Shimadzu, Code: 292-27910-91)

SYBR[®]Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen, Code: S-11494)

1×TE Buffer

25 bp DNA Ladder(Invitrogen, Code: 10597-011)

异硫氰酸胍 GuSCN(Sigma, Code: G9277-100G)

辛基苯氧基聚乙氧乙醇 Triton X-100(Sigma, Code: I8896-50ML)

1 mol/L-Tris-HCl 缓冲液 (nacalai tesque, Code: 35435-11)

Proteinase K 粉末 100 mg(Sigma, Code: P6556)

Ampdirect[®]RPlus(For International)(WAKO pure chem, Code: 604-21469; Shimadzu, Code: S241-08800-99)

IMMOLASE[™] DNA Polymerase(BIOLINE, Code: BIO-21046)

样品：超市购得某品牌羊奶粉和牛奶粉

PCR 引物：根据基因序列，对牛和羊设计特异性 PCR 引物，羊和牛的扩增条带理论片段长度分别为 335 bp 和 266 bp。

1.3 奶粉样品 DNA 的提取

配制奶粉样品的裂解液，包括：5 mol/L 异硫氰酸胍，0.05 mol/L Tris-HCL (pH 6.4)，0.02 mol/L EDTA (pH 8.0)，1.3% Triton X-100。称取 50 mg 样品于 1.5 mL 离心管中，加入 200 μ L TE (pH 8.0)、400 μ L 异硫氰酸胍裂解液和 10 μ L 蛋白酶 K，涡旋 30 S，于 65°C 消化 3 h (期间每隔 30 min 应充分振荡 1 次)。向样品中加入 600 μ L 饱和酚：氯仿：异戊醇 (25: 24: 1)，涡旋 30 S，13000 rpm 离心 10 min；取上清，加入等体积的氯仿：异戊醇 (24: 1)，涡旋 30S，13000 rpm 离心 10 min；取上清，加入等体积的氯仿，涡旋 30S，13000 rpm 离心 10 min，取上清，加入 0.8 倍体积的异丙醇，涡旋 30S，13000 rpm 离心 10 min；取沉淀，加入 500 μ L 70% 乙醇，涡旋 30 S，13000 rpm 离心 10 min。用移液器小心吸出液体，倒扣离心管，使沉淀干燥。向干燥好的沉淀物中加入 100 μ L TE 溶解。

1.4 PCR 反应体系

PCR 反应试剂与反应条件见表 1 和表 2。

表1 PCR反应试剂

	使用量	终浓度
Ampdirect® Plus	10.0 μL	1×
IMMOLASE™ DNA Polymerase	0.1 μL	
PCR Forward Primer (10 μM)	1 μL	0.5 μM
PCR Reverse Primer (10 μM)	1 μL	0.5 μM
DNA 模板	2.0 μL	3-5 ng/μL
dH ₂ O (灭菌蒸馏水)	5.9 μL	
总体积	20.0 μL	

表2 PCR反应参数

作用	时间/s	温度/°C
活化 DNA 活性酶和预变性	600	94
PCR (35 个循环)		
变性	30	94
退火	30	60
延伸	30	72
循环后保持	420	72

1.5 微芯片电泳 MultiNA 检测

PCR 扩增产物进入 MultiNA 进行测定。根据理论产物片段大小，实验中选用 500 bp 的试剂盒进行测定。为了验证测量的准确性，本文同时进行阴性对照实验，阴性对照的反应体系中以纯水代替 DNA 模板。

■ 结果讨论

图 1 是微芯片电泳仪 MultiNA 检测样品的凝胶图，羊奶粉和牛奶粉样品使用相应的特异性引物进行 PCR 扩增，MultiNA 检测出对应的条带，表明从奶粉样品中成功提取到了基因组，且 PCR 过程被顺利实施。图 2 和图 3 是分析纯的羊奶粉和牛奶粉样品的电泳图，MultiNA 结果直接提供条带的尺寸，考虑到检测结果可以有 5% 的误差，得到的条带实际尺寸与理论相一致。图 3 是检测羊奶粉和牛奶粉混合物的电泳图，结果显示羊和牛的特异性条带被同时检测到，这表明微芯片电泳 MultiNA 适合对多重 PCR 产物的检测，可同时鉴定出羊奶粉和牛奶粉，即适用于羊奶粉中牛奶粉掺假的鉴定。

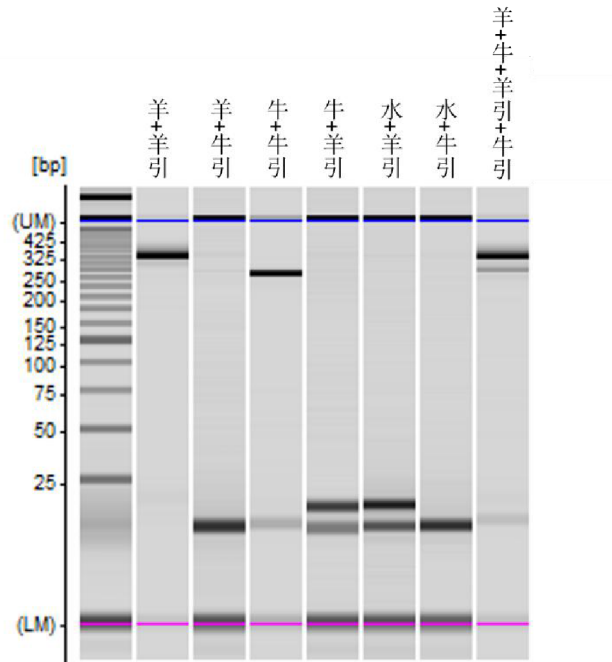


图1 微芯片电泳仪MultiNA检测样品的凝胶图(羊: 羊奶粉样品; 牛: 牛奶粉样品; 羊引: 羊特异性引物; 牛引: 牛特异性引物)

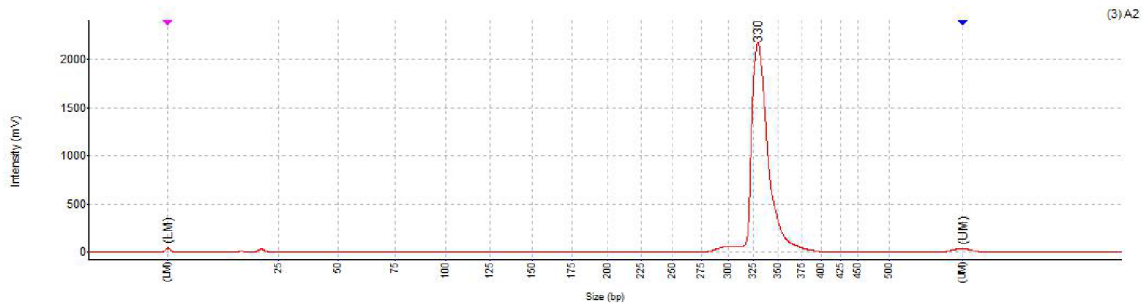


图2 微芯片电泳仪MultiNA检测羊奶粉的电泳图

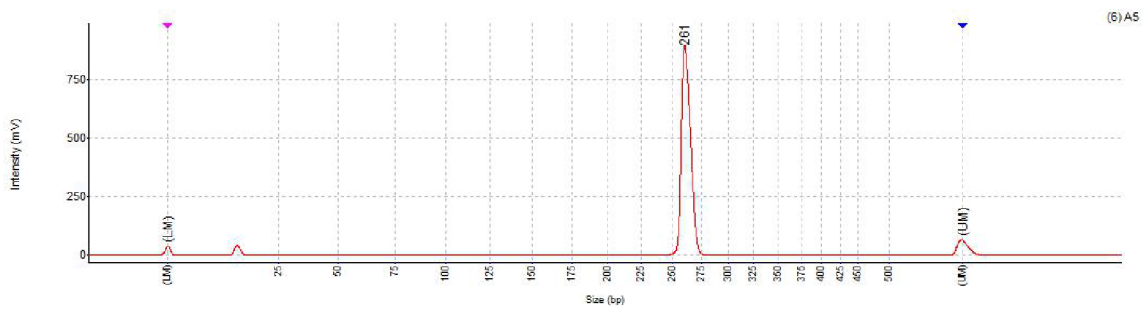


图3 微芯片电泳仪MultiNA检测牛奶粉的电泳图

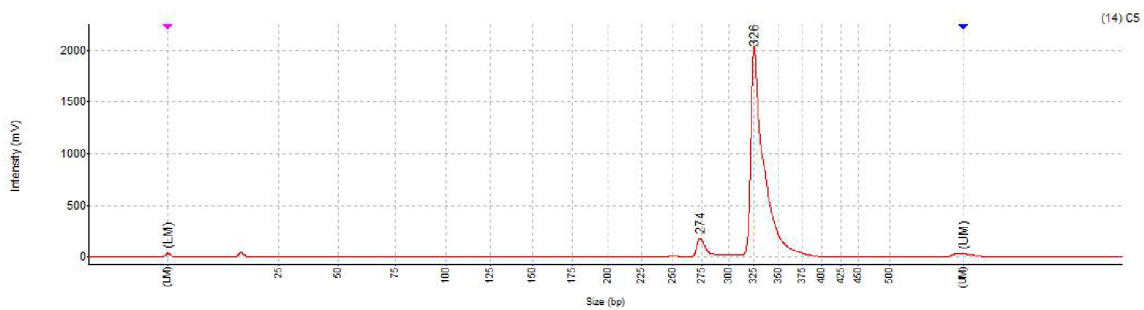


图4 微芯片电泳仪MultiNA检测羊奶粉和牛奶粉混合物的电泳图

■ 结论

本文基于分子生物学技术，应用 PCR 方法和岛津公司微芯片电泳仪 MultiNA 实现了羊奶粉和牛奶粉的定性检测，并建立了同时鉴定这两种奶粉的方法。此方法分析效率高，操作简便，分析成本低，是鉴定羊奶粉中牛奶粉掺伪的有力检测手段。