

基于 MultiNA 对食用玉米油的定性检测

MultiNA-003

摘要: 目前食用油掺假掺杂现象屡见不鲜,这不仅影响着消费者的健康,更影响消费信心,严重侵害了消费者的利益。本文利用 DNA 的分子生物学手段,基于不同物种具有不同的 DNA 序列,针对待鉴定物种的特异性基因设计 PCR 引物,利用 MultiNA 检测 PCR 扩增产物的存在及链长,建立了基于 MultiNA 鉴定食用油品种的方法。将玉米油中提取的特异性基因 PCR 扩增,MultiNA 检测其扩增后产物大小为 196 bp,与玉米基因 PCR 目标产物的大小 190 bp 基本一致。实验结果表明本方法可以实现对食用油的定性检测。

关键词: MultiNA 食用油 定性检测

食用油与米、面等都是老百姓居家过日子的必备食品。为了降低成本和高额利润,有些不法商人用原料成本低的食用油代替成本高的食用油出售,或是在价格高的食用油中大量掺入价格低的食用油。这些行为不仅影响着消费者的健康,更影响消费信心,严重侵害了消费者的利益。运用分子生物学技术进行食用油品种鉴定及掺假检测,具有灵敏度高,可靠性强等优点。其原理是不同物种具有不同的 DNA 序列,针对待鉴定物种的特异性基因设计 PCR 引物,通过检测 PCR 扩增产物的存在与否及链长来实现物质的鉴定。本文建立了基于 MultiNA 鉴定食用油品种的方法。用改动的试剂盒方法从玉米油中提取玉米基因组,针对玉米内源醇溶蛋白基因设计引物,用 GVP-9600 进行 PCR 扩增,MultiNA 检测其扩增后产物尺寸为 196 bp,与引物扩增出的预期产物 190 bp 基本吻合。实验结果表明经本方法的食用油基因提取,PCR 扩增,MultiNA 检测可以实现对食用油品种的鉴定。

实验部分

1.1 仪器

MCE-202 MultiNA, GVP-9600 PCR 仪

1.2 试剂

植物油基因提取试剂盒(北京勤邦生物技术有限公司, FZ-002)

SYBR® Premix Ex Taq™ II (宝生物工程有限公司, RR820A)

引物: 5' -TGAACCCATGCATGCAGT-3'

5' -GGCAAGACCATTGGTGA-3'

(引物由上海生工合成)

MultiNA 分析用 DNA-500 试剂盒 (Shimadzu, 292-27910-91)

SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen, S-11494)

1 × TE Buffer

25 bp DNA Ladder (Invitrogen, 10597-011)

样品: 超市购得食用纯玉米油

1.3 分析条件

MultiNA Marker 混合模式: 芯片上混合

1.4 样品中 DNA 的提取与纯化

1.4.1 将样品油和提取试剂盒中 1 × 萃取液按照 2:1 的比例进行混匀,将混合物置于磁力搅拌器上剧烈搅拌 30 min。将离心后收取的 1 × 萃取液再次加入新的样品油中,重复此步骤,样品油总用量为 4000 mL。

1.4.2 将充分搅拌混匀的混合物进行高速离心(12000 rpm 离心 10 min),离心后除尽上层油相,将水相萃取液放入旋转蒸发仪 65°C 进行干燥浓缩。

1.4.3 用 1 mL 1 × 萃取液溶解冻干物,取其中 0.375 mL 将溶解物放入 1.5 mL 离心管内,加入抽提液 A 0.375 mL,混匀后 65°C 水浴 1 h。

1.4.4 水浴后在管内加入抽提液 B: 抽提液 C=1:1 的混合液 0.75 mL,充分混匀 30 秒后 12000 rpm 离心 5 min。

1.4.5 吸取上层水相到新的 1.5 mL 离心管内,加入 2 倍体积预冷的无水乙醇(4°C)、10% 体积的助沉剂 1 和 1.5 μL 助沉剂 2,充分混匀后于 -20°C 沉淀 1 小时。

1.4.6 沉淀后 12000 rpm 离心 15 min,小心倒去上清液。此时在 EP 管底部可见白色沉淀物。此白色沉淀物即为提取出的 DNA。

1.4.7 加入 1 mL 预冷的洗涤液(4°C),轻弹 EP 管混匀,12000 rpm 离心 5 min 后,弃去上清液,倒扣 EP 管于滤纸上晾干。

1.4.8 在晾干后的 EP 管内加入 30 μL 溶解液进行沉淀溶解,沉淀溶解液放置 -20°C 保存。溶解液进行 65°C 预热以提高溶解效果,沉淀溶解液可直接用于后续 PCR 检测。

1.5 PCR 反应体系

表1 PCR反应试剂

	使用量	终浓度
SYBR® Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2×)	10.0 μL	1×
PCR Forward Primer (10 μM)	0.8 μL	0.4 μM
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.8 μL	0.4 μM
DNA模板	2.0 μL	20 ng/μL
dH ₂ O (灭菌蒸馏水)	6.4 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	30	95
PCR (45个循环)		
变性	30	95
退火	30	55
延伸	60	72
循环后保持	180	72

1.6 MultiNA 检测

PCR 扩增后产物经 BioSpec–Nano 检测浓度后，稀释成 MultiNA 检测所需浓度范围，进入 MultiNA 进行测定。用 MultiNA 实现高准确度的核酸片段长度分析时，首先需要进行 Ladder 分析从而制作标准曲线。当分析未知样品时，只要测得其迁移时间，基于标准曲线便可得知其片段长度。

使用 DNA-500 试剂盒分析其对应 ladder 流程图如图 1 所示。

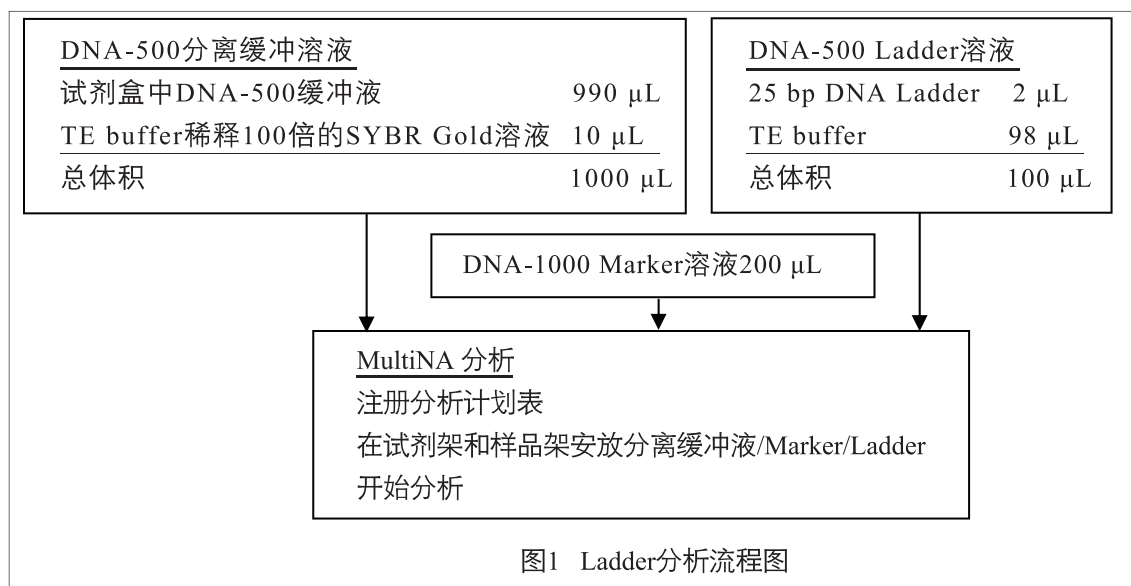


图1 Ladder分析流程图

结果讨论

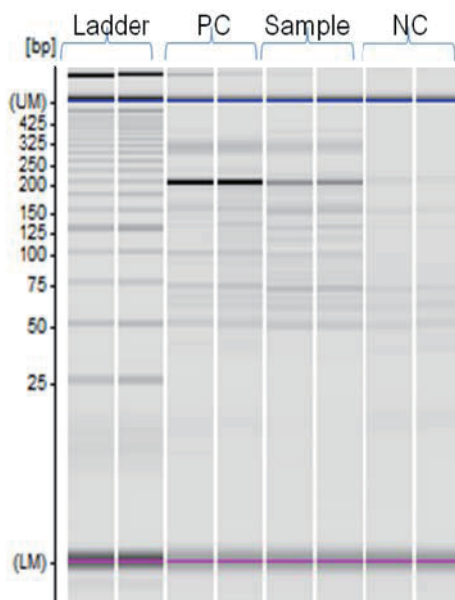


图1 食用玉米油分析凝胶结果（PC：阳性对照；NC：阴性对照）

图2和图3分别是MultiNA测定Ladder，玉米油中提取的DNA扩增后产物，阳性对照（PCR时含有玉米基因模板）及阴性对照（PCR时不含玉米基因模板）的凝胶图和电泳图。阳性对照得到了明显的197 bp的条带，由于PCR目标产物链长190 bp，同时阴性对照没有得到此区域附近相应条带，显示了PCR程序被成功执行。玉米油提取的DNA扩增后产物进入MultiNA分析，结果显示196 bp的条带被检测到，表明此玉米油中含有玉米内源基因。MultiNA检测出的片段长度和PCR目标产物长度略有差异，考虑到仪器具有5%的误差，结果合理。

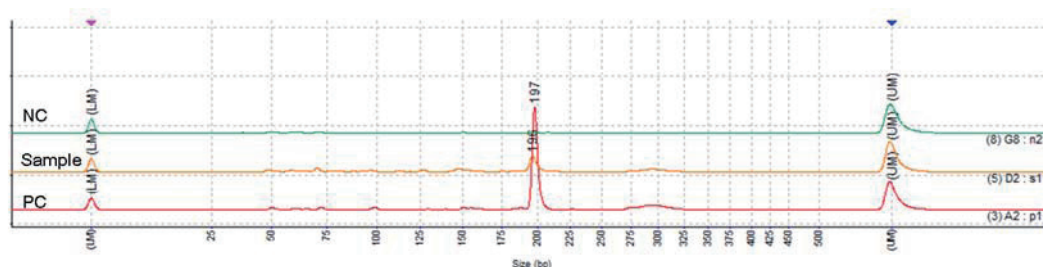


图2 食用玉米油分析电泳结果（PC：阳性对照；NC：阴性对照）

结论

本文基于分子生物学技术，采用岛津公司MCE-202 MultiNA建立了定性检测食用植物油的方法。此方法对于食用油物种的鉴定可靠性强，操作简便，可以被应用于复杂体系的食用油定性及定量测定，让食用油的掺假掺杂现象无处遁形。