

# 微芯片电泳 MultiNA 结合 PCR 法在食品和 中药材品种鉴定方面的应用 (第二版)

—肉类、奶粉、过敏原、易混中药材及其他—



# 前言

食品不同于一般商品，它是人类健康生存最基本的物质条件，我们每个人每天都离不开食品。民以食为天，食以安为先，食品安全，关乎着每一个人的健康和安全。能否保障食品安全，让人吃得健康、吃得安全，是非常重要的事情。近些年，各种食品安全违法信息不绝于耳，媒体上每曝光一个食品安全问题，都会引起轩然大波。最近，以不同品种的原料来进行食品掺伪掺杂、欺瞒的问题屡被揭露，如不同品种的掺假肉、奶粉掺伪、三高人群理想主食莜面中掺混玉米粉等。因此，监控食品品种的掺假，对于维护食品安全至关重要。

中药对于治疗疾病有很好的效果，近年来中药材品种混淆使用问题屡有发生，有的是名称相似易混，有的是外形相似易混，有的则因价格差故意掺混。由于不同品种中药材药效有差异，中药材品种的掺伪势必会对人们的健康造成影响。另外，2015版《中国药典》中明确规定了一些方剂中药物品种的来源，及易混淆的不同品种中药材的分别收录，如金银花和山银花。为了保证用药安全，准确地鉴定易混中药材的品种非常关键。

“工欲善其事，必先利其器”，食品和中药材品种检测之“器”在于准确、快速和方便使用的技术和方法。对于食品和中药材品种的检测，大多采用感官识别和化学分析仪器测定，如光谱法，高效液相色谱法，质谱法等，对于某些伪产品可以实现准确的鉴别，但是也存在很多问题。由于不同的物种具有其特异性的生物遗传信息-基因，使用分子生物学手段 PCR 方法结合电泳检测手段，通过检测样品的特异性基因信息，可以实现准确鉴定品种的目的。岛津的全自动微芯片电泳仪 MultiNA，即可自动化地检测不同生物品种 PCR 产物的基因检测技术，结合 PCR 方法，已经完成了在食品安全方面多个品种的鉴定，参见之前推出的《微芯片电泳 MultiNA 和 PCR 法在食品安全领域的应用》。在这里，我们继续深入开发在食品和中药品种方面的鉴定方法，推出了《微芯片电泳 MultiNA 结合 PCR 法在食品和中药材品种鉴定方面的应用（第二版）》：食品方面包括肉类品种定性和定量检测、奶粉、莜面、多种食品过敏原、中华鳖蛋白粉、转基因鉴定；中药材方面包括金银花和多种山银花、半夏及其伪品水半夏的鉴别。

真心期待我们的努力能为您的工作提供便利。

岛津企业管理（中国）有限公司

# 目 录

<b>食品品种</b> .....	<b>1</b>
1. 微芯片电泳仪 MultiNA 对 10 类 13 种肉品种的同时鉴定 .....	1
2. 应用微芯片电泳 MultiNA 对混合肉中各肉成分的定量测定 .....	4
3. 应用微芯片电泳仪 MultiNA 鉴定羊奶粉中牛奶粉的掺伪 .....	9
4. 应用微芯片电泳 MultiNA 鉴定莜面中大麦和玉米的掺伪 .....	13
5. 应用微芯片电泳仪 MultiNA 同时鉴定多种食品过敏原 .....	20
6. 微芯片电泳 MultiNA 检测中华鳖蛋白粉中提取的 DNA 扩增产物.....	23
7. 应用 MultiNA 和 PCR 方法定性检测转基因玉米 NK603.....	27
<b>中药材品种</b> .....	<b>30</b>
1. 应用微芯片电泳 MultiNA 鉴定中药材金银花和多种山银花 .....	30
2. 微芯片电泳 MultiNA 对中药材半夏及其伪品水半夏的鉴定 .....	34



SHIMADZU  
Excellence in Science

# 食品品种

## 微芯片电泳仪 MultiNA 对 10 类 13 种肉品种的同时鉴定

**摘要:** 本文针对常见的被掺假肉牛肉、羊肉、鹿肉和驴肉及通常的掺假成份猪肉、禽肉（鸡肉、鸭肉）、犬科肉（狗肉、狐狸肉和貉子肉）、马肉、猫肉、鼠肉等设计特异性 PCR 引物，多重 PCR 扩增后，微芯片电泳 MultiNA 检测扩增产物，结果显示可以同时快速鉴定出 10 类 13 种肉的品种。

**关键词:** MultiNA 多重 PCR 多肉种同时鉴定 猪肉 牛肉 羊肉 鸡肉 鸭肉 马肉 狐狸肉 狗肉 貉子肉 猫肉 鼠肉 鹿肉 驴肉

**数据提供单位:** 中国肉类食品综合研究中心

目前，市场上的肉品种掺假事件被不断地曝光，“挂羊头卖狗肉”已经严重损害了消费者的切身利益和身体健康。相对于传统的视觉、味觉的鉴别方法，分子生物学 PCR 手段对肉品种的鉴定灵敏度高，可靠性强。PCR 检测手段的实现需要先知晓肉的种类，从而根据其特异性基因序列设计 PCR 扩增引物，扩增其特异性基因，电泳检测扩增产物而实现品种鉴定。最近作为掺假成分的肉

的种类越来越多，为了准确地鉴定掺假肉的种类，需要建立多种肉品种的同时鉴定方法，实现未知样本中动物源性成分的快速检测。为此，这里应用多重 PCR 方法，结合岛津微芯片电泳仪 MultiNA 建立了同时检测牛肉、羊肉、猪肉、禽肉（鸡肉、鸭肉）、犬科肉（狗肉、狐狸肉和貉子肉）、马肉、猫肉、鼠肉、鹿肉和驴肉。此方法操作简单，可快速地实现 10 类 13 种肉品种的同时鉴定。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器

微芯片电泳 MCE-202 MultiNA

#### 1.2 试剂和样品

DNA-500 Reagent Kit for MultiNA（岛津制作所，Code: 292-27910-91）；

SYBR<sup>®</sup> Gold Nucleic Acid Gel Stain

（Invitrogen，Code: S-11494）；

1×TE Buffer；

25 bp DNA Ladder（Invitrogen，Code:

10597-011）；

#### 1.3 实验方法

采用核酸提取仪对肉样品的 DNA 进行提纯，纯化后执行多重 PCR 扩增反应，其产物进入微芯片电泳仪 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。

样品：猪肉、牛肉、羊肉、鸡肉、鸭肉、马肉、狐狸肉、狗肉、貉子肉、猫肉、鼠肉、鹿肉和驴肉；

PCR 引物：根据基因序列，对牛、驴、犬科（狗、狐狸、貉子）、鹿、马；猫、猪、鼠、羊、禽（鸡、鸭）设计特异性 PCR 引物。引物分为 2 组，第 1 组包括牛、驴、犬科（狗、狐狸、貉子）、鹿、马的 PCR 引物混合物，第 2 组包括猫、猪、鼠、羊、禽（鸡、鸭）的 PCR 引物混合物。

## 2 结果讨论

图1是MultiNA检测多种肉多重PCR产物的凝胶图，不同种类肉的特异性片段被成功扩增并被MultiNA检测出来。

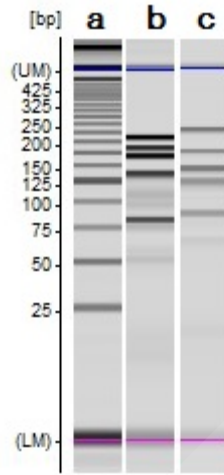


图1 微芯片电泳仪MultiNA检测样品的凝胶图

注：图中a, Ladder标准品；b, 条带由低到高依次为牛肉、驴肉、犬科肉（狗肉、狐狸肉、貉子肉）、鹿肉和马肉；c, 条带由低到高依次为猫肉、猪肉、鼠肉、羊肉和禽肉（鸡肉、鸭肉）。所有引物特异性已被验证。

图2是图1中b泳道的电泳图，检测牛肉、驴肉、犬科肉（狗肉、狐狸肉、貉子肉）、鹿肉和马肉的5重PCR产物。由于MultiNA分辨率高，使得尺寸相差很小的片段也可以被分开，例如犬科肉的167 bp和鹿肉的184bp，这表明微芯片电泳MultiNA适合对多重PCR产物的检测，可同时鉴定出多个肉类的品种。图3是图1中c泳道的电泳图，检测猫肉、猪肉、鼠肉、羊肉和禽肉（鸡肉、鸭肉）的5重PCR产物。

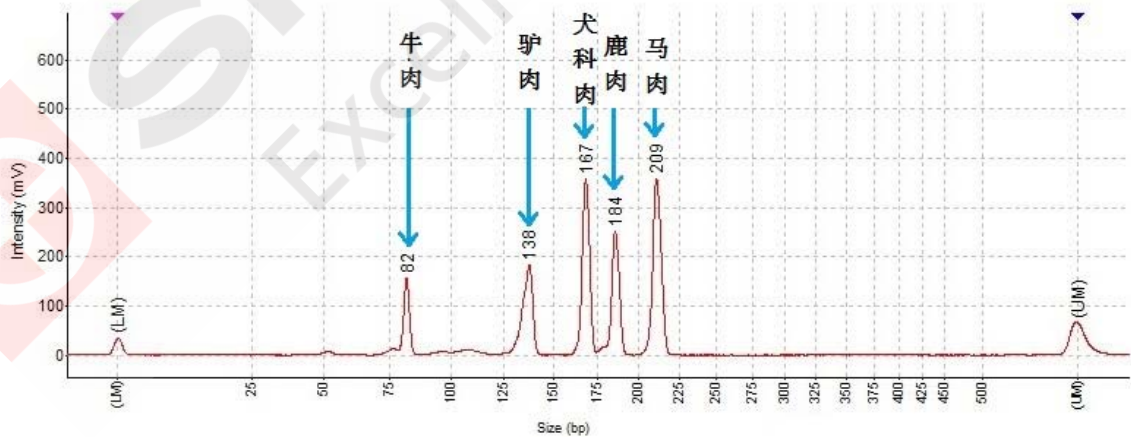


图2 微芯片电泳仪MultiNA检测5种混合肉：牛肉、驴肉、犬科肉（狗肉、狐狸肉、貉子肉）、鹿肉和马肉的电泳图

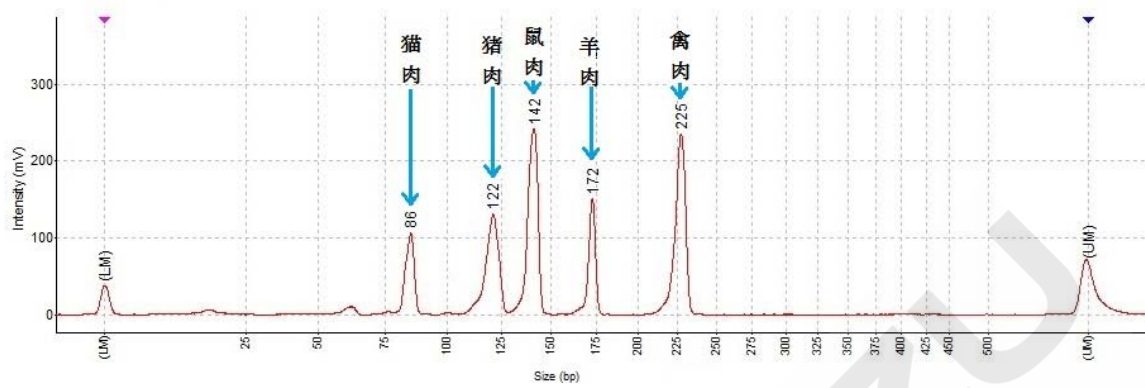


图3 微芯片电泳仪MultiNA检测5种混合肉：猫肉、猪肉、鼠肉、羊肉和禽肉（鸡肉、鸭肉）的电泳图

### 3 结论

本文基于分子生物学技术，采用岛津公司微芯片电泳仪 MultiNA 成功建立了同时对 10 类 13 种肉品种定性检测的方法。此方法分析效率高，操作简便，可实现未知样品的多物种同步鉴定，节省时间和人力成本，是掺假肉类品种鉴定有力的分析方法。

# 应用微芯片电泳 MultiNA 对混合肉中各肉成分的定量测定

**摘要:** 本文利用岛津 Ampdirect®Plus 试剂盒对按照不同比例混合的牛肉和猪肉进行处理, 无需精制 DNA, 可快速简便的进行 PCR 过程, 使用岛津 MultiNA 测定 PCR 产物片段长度和浓度, 实验结果显示在各样品中检测到相应的目标产物, 并且猪肉、牛肉的目标产物浓度和样品的质量呈大致的线性关系, 结果表明本方法可以进行混合肉中各成分的定量检测。

**关键词:** MultiNA PCR 肉类鉴定 猪肉 牛肉 定量检测

日前,“挂羊头卖狗肉”的现象屡次被曝光, 市场上不法分子使用价格低廉的鸡肉、鸭肉、猪肉等原料制作假羊肉、假牛肉来高价贩卖, 严重损害了消费者的切身利益和身体健康。而传统的使用视觉、味觉的鉴别方法不能够准确地对肉类品种进行判断。利用分子生物学方法针对不同的物种具有其特异性的基因序列, 设计PCR扩增引物, 扩增其特异性基因, 电泳检测扩增产物可以实现不同肉品种的定性检测。然而检测部门也常常需要了解掺假的比例, 即定量结果从而来进一步验证定性检测结果; 另外若掺入的其它

肉种未知难于进行定性检测时, 借助含量的测定也可判定是否为纯肉或掺假的比例, 从而作为执法的依据。

MultiNA 作为岛津的微芯片电泳仪器, 不仅可以测定 PCR 目标产物的片段长度, 还可以测定各个片段的浓度, 因此, 应用 MultiNA 进行混合肉定量测定是值得期待的。本文利用岛津 Ampdirect®Plus 试剂盒对按照不同比例混合的牛肉和猪肉进行快速前处理, 执行 PCR 过程后, 使用岛津微芯片电泳 MultiNA 测定 PCR 产物片段长度和浓度, 成功实现了猪肉和牛肉混合肉的定量检测。

## 1 实验原理

对于普通的 PCR 反应来说, 根据其原理, 目的基因 PCR 产物的量与初始模板量有如下的关系:

$$X_n = X_0(1 + E)^n \quad (1),$$

其中  $X_n$  为  $n$  轮 PCR 循环后目的基因 PCR 产物的量;  $n$  为 PCR 循环数;  $X_0$  为目的基因起始模板量;  $E$  为 PCR 反应效率, 取决于反应的温度、引物设计和聚合酶, 若不同样品的 PCR 反应温度、设计的引物和聚合酶相同, 则此项的差异基本可忽略; 由此可见, PCR 产物的量与基因起始模板量呈线性关系。本文以不同比例组成的牛肉和猪肉混合肉作为样品, 采用岛津 Ampdirect®Plus 试剂盒对各个样品进行相同的前处理, 可近似认为提取得到的 DNA 量与肉的质量呈大致线性关系。若依此得到的提取 DNA 作为模板基因进行 PCR, 根据以上的 PCR 原理公式 (1), 可以得到目的基因 PCR 产物的量与肉的质量呈大致线性关系, 从而作为定量的基础。本文中微芯片电泳 MultiNA 测定 PCR 目标片段浓度, 实验结果显示, 混合肉中猪肉、牛肉的目标产物浓度和其样品的质量呈线性关系, 表明此方法可以对肉制品进行定量检测。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器

MCE-202 MultiNA

### 2.2 试剂

1 mol/L-Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 1 L (Nacalai Tesque, Code: 35435-11)

0.5 mol/L-EDTA 溶液 (pH 8.0) 1 L (Nacalai Tesque, Code: 14347-21)

5 mol/L-NaCl 溶液 1 L (Nacalai Tesque, Code: 31334-51)

10%-SDS 溶液 100 mL (Nacalai Tesque, Code: 30562-51)

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

Ampdirect® Plus (For International) (Wako Pure Chem, Code: 604-21469; Shimadzu corp., Code: S241-08800-99)

IMMOLASE™ DNA Polymerase (Bioline, Code: BIO-21046)

DNA-500 Reagent Kit for MultiNA (岛津制作所, 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)

样品: 猪肉、牛肉及二者的混合肉, 各样品组成及含量见表1。

表1 样品组成及含量

序号	牛肉/g	猪肉/g
1	0.50	0
2	0.40	0.10
3	0.30	0.20
4	0.20	0.30
5	0.10	0.40
6	0	0.50

引物: 猪肉、牛肉的引物设计如表2所示。

表2 猪肉、牛肉的引物

检测基因	引物序列		PCR目标长度/ bp
	正向	反向	
牛线粒体DNA的细胞色素 b基因	5'-gtgtaagaccgcgtaataag-3'	5'-gacctcccagcccatcaaacatc-3'	266
猪线粒体DNA的细胞色素 b基因	5'-gatattgtcctcagggc-3'	5'-gacctcccagcccatcaaacatc-3'	365

## 2.3 样品处理及PCR反应体系和条件

样品处理及PCR反应体系和条件如图1所示。

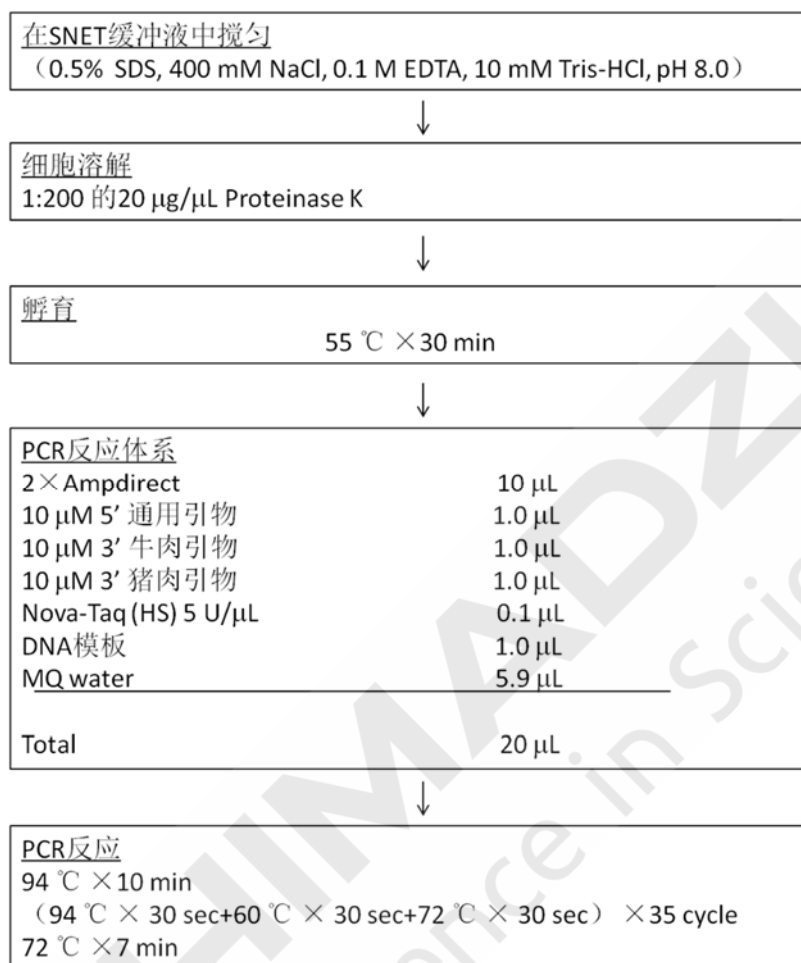


图1 样品处理及PCR反应体系和条件

## 2.4 MultiNA检测

PCR扩增后，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，本文同时进行了阴性对照实验，阴性对照的反应体系中不加入DNA模板。

## 3 结果讨论

图2是微芯片电泳MultiNA检测不同组成猪肉、牛肉样品的凝胶图。图3是MultiNA检测纯牛肉、纯猪肉、牛肉和猪肉混合肉、阴性对照的电泳图。实验结果显示牛肉和猪肉的特异性片段被成功扩增并被MultiNA检测片段大小，考虑到仪器具有5%误差，检测到的片段大小与理论基本相符。表明采用本方法的Ampdirect试剂盒处理样品，可以快速提取核酸，无需精炼即可进行后续的PCR反应。应用MultiNA检测PCR扩增的特异性片段，可以快速简便地实现肉种类鉴定。

另外，以不同含量的猪、牛肉样品PCR扩增出的目标片段浓度对猪、牛肉质量做标准曲线如图4和图5所示。实验结果显示，目标片段浓度和肉的质量大致呈线性关系，与理论相符，这表明应用此方法可以测量混合肉中每种肉的含量。由于市场上掺假肉现象经常发生，定性检验

时，若检验出有其他肉类掺入，本方法可进一步确认掺假的含量；若掺入的其它肉种未知时，根据本方法也可以进行含量的测定，来判定是否为纯肉或掺假的比例。

#### 4 结论

本文采用岛津公司 MCE-202 MultiNA 成功建立了对混合肉的定量测定方法。此方法是一种肉类打假可靠、有力的分析手段，供检测部门参考。

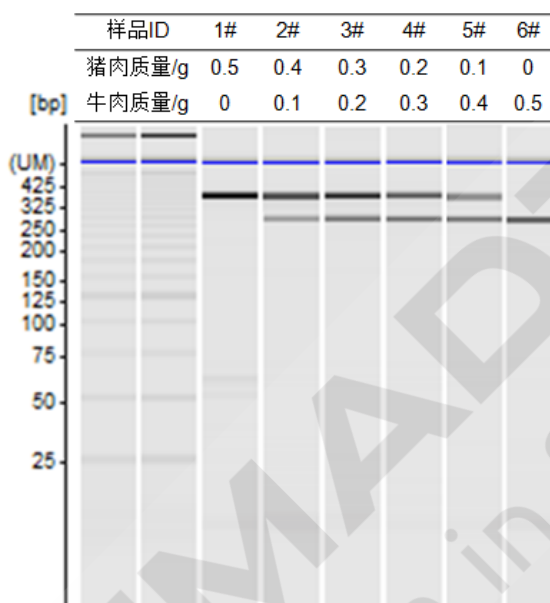


图2 MultiNA检测不同组成猪肉、牛肉的凝胶图

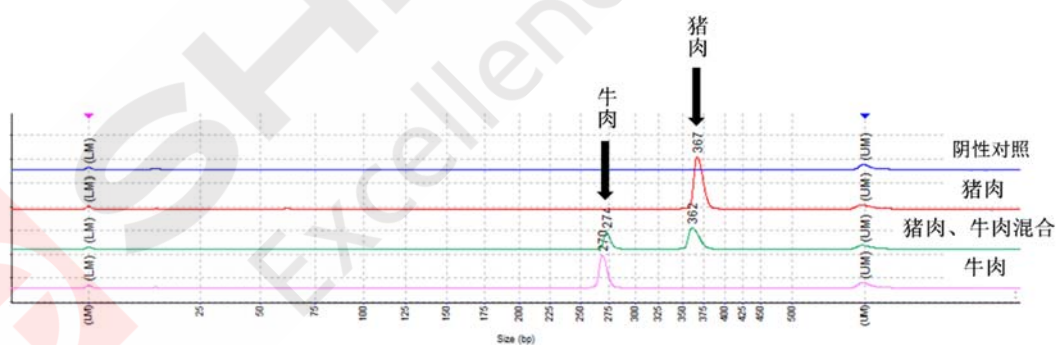


图3 MultiNA检测纯猪肉、牛肉和猪肉混合肉、纯牛肉、阴性对照的电泳图

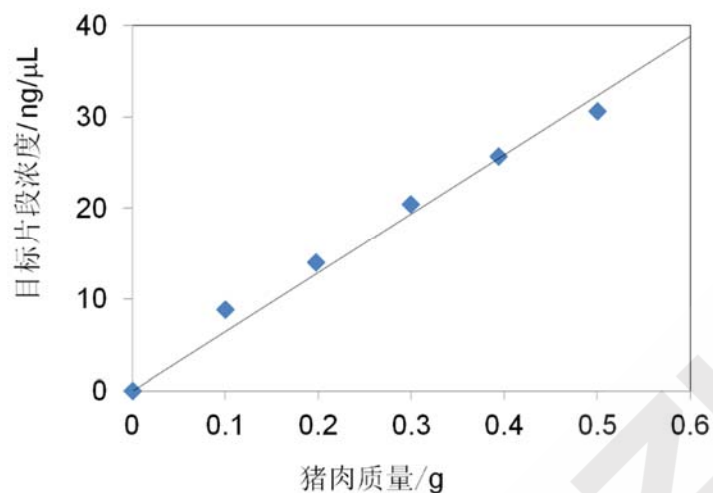


图4 不同含量的猪肉样品PCR扩增出的目标片段浓度对猪肉质量的标准曲线（数据来自两个平行样品平均值）

表3 校准曲线参数（线性回归）

名称	校准曲线	相关系数 r
猪肉	$y=64.63 x$	0.983

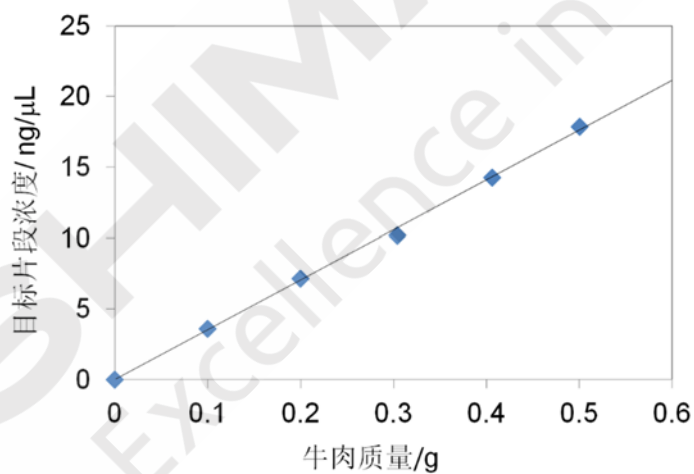


图5 不同含量的牛肉样品PCR扩增出的目标片段浓度对牛肉质量的标准曲线（数据来自两个平行样品平均值）

表4 校准曲线参数（线性回归）

名称	校准曲线	相关系数 $r^2$
牛肉	$y=35.19.x$	0.998

# 应用微芯片电泳仪 MultiNA 鉴定羊奶粉中牛奶粉的掺伪

**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。

## 1 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)

35435-11)

SYBR<sup>®</sup> Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen, Code: S-11494)

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

1×TE Buffer

Ampdirect<sup>®</sup>Plus (For International) (WAKO pure chem, Code: 604-21469; Shimadzu, Code: S241-08800-99)

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

IMMOLASE<sup>™</sup> DNA Polymerase (BIOLINE, Code: BIO-21046)

异硫氰酸胍 GuSCN (Sigma, Code: G9277-100G)

样品: 超市购得某品牌羊奶粉和牛奶粉

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

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 mol/L-Tris-HCl 缓冲液(nacalai tesque, Code: 10597-011)

### 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  $\mu$ L TE (pH 8.0)、400  $\mu$ L异硫氰胍裂解液和10  $\mu$ L蛋白酶K, 涡旋30 S, 于65 $^{\circ}$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ L 70%乙醇, 涡旋30S, 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  $\mu$ 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 $\mu$ L	1 $\times$
IMMOLASE™ DNA Polymerase	0.1 $\mu$ L	
PCR Forward Primer (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L	0.5 $\mu$ M
PCR Reverse Primer (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L	0.5 $\mu$ M
DNA 模板	2.0 $\mu$ L	3-5 ng/ $\mu$ L
dH <sub>2</sub> O (灭菌蒸馏水)	5.9 $\mu$ L	
总体积	20.0 $\mu$ L	

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。

## 2 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。

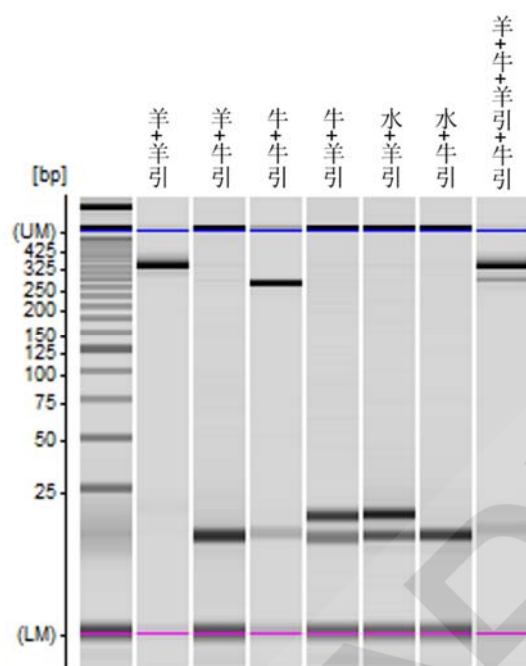


图1 微芯片电泳仪MultiNA检测样品的凝胶图（羊：羊奶粉样品；牛：牛奶粉样品；羊引：羊特异性引物；牛引：牛特异性引物）

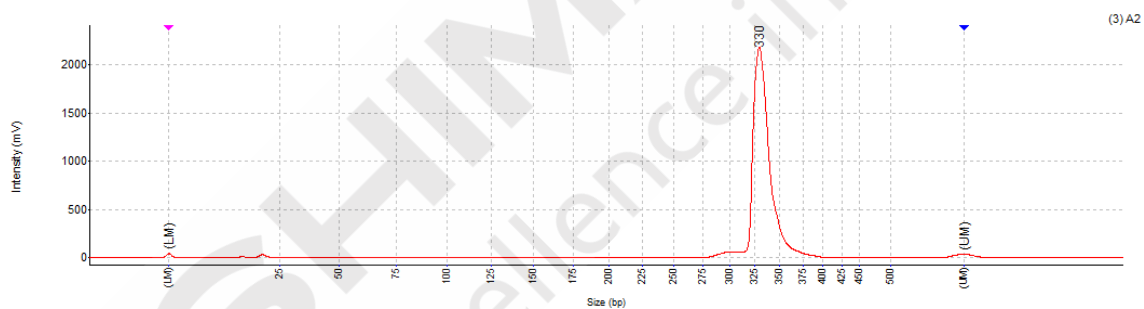


图2 微芯片电泳仪MultiNA检测羊奶粉的电泳图

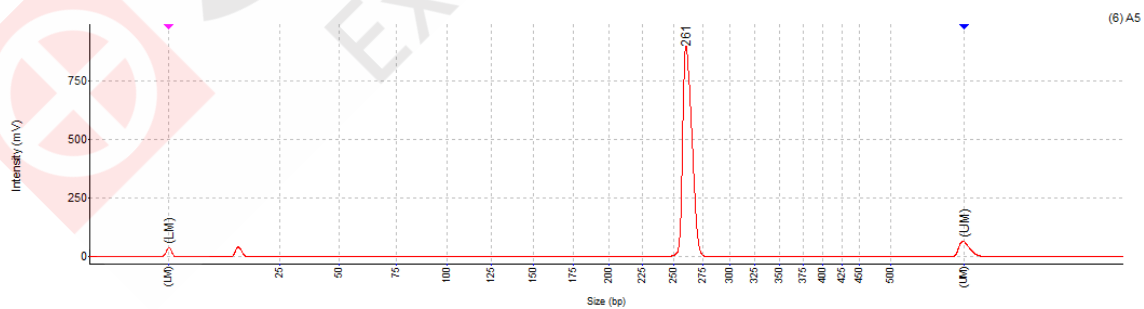


图3 微芯片电泳仪MultiNA检测牛奶粉的电泳图

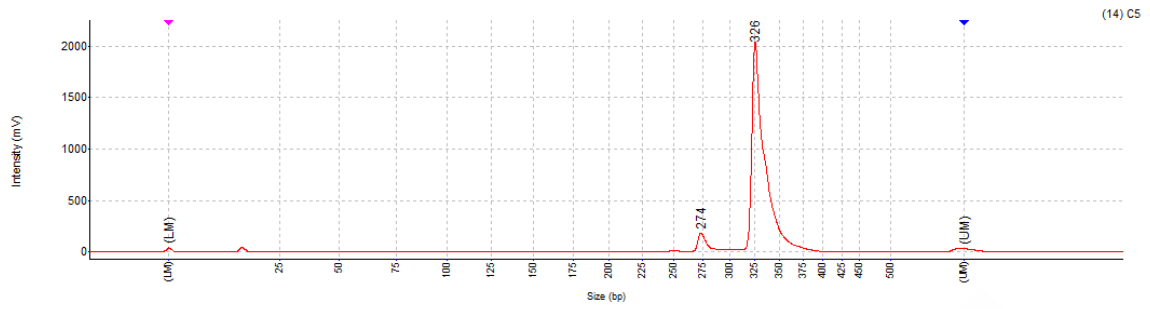


图4 微芯片电泳仪MultiNA检测羊奶粉和牛奶粉混合物的电泳图

### 3 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。



SHIMADZU  
Excellence in Science

# 应用微芯片电泳 MultiNA 鉴定莜面中大麦和玉米的掺伪

**摘要:** 目前, 为了经济利益, 不法分子通常将价格低廉的大麦及玉米掺到莜面中作为莜面进行高价贩卖, 由于莜面含糖量低, 是三高人群的理想食品, 若莜面中掺有大麦和玉米淀粉则严重影响了人们的身体健康和切身利益。本文根据 NCBI 数据库中莜麦、大麦和玉米的特异性基因序列, 开发了莜麦、大麦和玉米的特异性 PCR 引物, 提取得到莜麦、大麦和玉米的基因组, 经 PCR 反应和微芯片电泳仪 MultiNA 检测, 实验结果验证了莜麦、大麦和玉米 PCR 引物的特异性。用改良的试剂盒方法从莜面样品中提取得到了基因组, 分别用莜麦、大麦和玉米的特异性 PCR 引物对莜面样品进行了分析。实验结果表明基于微芯片电泳 MultiNA 开发的方法可实现莜面中大麦和玉米掺伪成分的鉴定。

**关键词:** 微芯片电泳 MultiNA PCR 莜面 大麦 玉米 掺伪鉴定

燕麦(莜麦)是一种古老的农作物, 属于世界禾谷类作物中的八大粮食作物之一, 它主要分布在北半球的温带地区。我国莜麦播种面积 210 万亩, 产量 40 万吨, 主要集中在内蒙古阴山南北地区的呼和浩特市武川县、清水河县, 乌兰察布市的丰镇市、凉城县、卓资县及察哈尔右翼中旗和锡林郭勒盟南部, 河北省张家口市的张北县、尚义县、康保县、崇礼县, 山西大同市的左云县、阳高县等。

莜麦磨成的面粉称莜面。加工时先要将莜麦淘净, 晾干后上锅煸炒。炒熟后再上磨加工成面。民间的吃法颇多, 有搓鱼鱼、推窝窝、卷囤囤、搅拿糕、碾刨渣、炒傀儡等等多种多样的吃法。吃时可按各人的口味不同和季节的不同佐料以羊肉汤、盐菜汤、时令蔬菜等, 再加一些辣椒、蒜蓉, 更觉可口, 深受当地人喜爱, 成为深受消费者喜爱的特

色食品。我国常年消费量在 35 万吨左右。

随着人民生活水平的不断提高, 饮食搭配成为人人关注的事情。莜面是三高人群的理想保健主食, 但是, 目前市场中充斥着添加玉米淀粉和大麦的劣质莜面。原因是玉米淀粉色白无味、价格远远低于莜面, 掺混到莜面中可以提高白度冒充精莜面来获取暴利, 而以廉价的大麦掺混到莜麦中制做莜面很难被消费者察觉更易获利, 让消费者防不胜防。因此, 需要一种高效、可靠的方法进行莜面中大麦和玉米掺伪成分的鉴定。本文根据 NCBI 数据库中莜麦、大麦和玉米的特异性基因序列, 设计了三种作物的特异性 PCR 引物, 经 PCR 反应和微芯片电泳仪 MultiNA 验证了引物的特异性, 并用这三种特异性引物对莜面样品进行了分析。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器

微芯片电泳 MCE-202 MultiNA

### 1.2 试剂

Ampdirect<sup>®</sup> Plus (For International) (WAKO pure chem) 604-21469; (Shimadzu corp.) S241-08800-99

IMMOLASE<sup>™</sup> DNA Polymerase (Bioline) BIO-21046

植物基因提取试剂盒 (北京勤邦生物技术有

限公司) FZ-002

SYBR<sup>®</sup> Gold Nucleic Acid Gel Stain

(Invitrogen, S-11494)

1×TE Buffer

25 bp DNA Ladder (Invitrogen, 10597-011)

DNA-500 Reagent Kit for MultiNA (岛津公司,

P/N 292-27910-91)

样品: 苡麦、苡面、玉米和大麦

PCR引物: 根据NCBI中苡麦、大麦和玉米特

异性基因序列, 设计了苡麦、大麦和玉米的

特异性PCR引物, 苡麦、大麦和玉米的PCR

目标产物理论长度依次为171 bp、108 bp和

190 bp。

### 1.3 样品中DNA的提取与纯化

样品的基因提取和纯化使用的是改良的植物基因提取试剂盒操作方法, 改良之处为开始时取样量为 50 mg, 将试剂盒中方法中抽提液 B: 抽提液 C=1:1 混合换成了抽提液 B: 抽提液 C: 异戊醇=25:24:1, 加入异戊醇的目的是降低表面张力, 从而减少气泡产生。另外, 异戊醇有助于分相, 使离心后的上层含 DNA 的水相、中间的变性蛋白相及下层有机溶剂相维持稳定。另外, 为了使 DNA 能从乙醇中完全沉降下来, 离心速度为由原方法中 12000 rpm 增加到 12500 rpm。

### 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 <sup>®</sup> Plus	10.0 μL	1×
IMMOLASE <sup>™</sup> DNA Polymerase	0.1 μL	
PCR Forward Primer (10 M)	1 μL	0.5 μM
PCR Reverse Primer (10 M)	1 μL	0.5 μM
DNA 模板	2.0 μL	3-5 ng/ L
dH <sub>2</sub> 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。

## 2 结果讨论

图1是验证苜蓿特异性PCR引物实验得到的MultiNA凝胶图，图2-4是相应的MultiNA电泳图。设计苜蓿PCR引物时，目标产物理论条带长度为171 bp，实验结果显示苜蓿DNA模板和苜蓿PCR引物得到的PCR产物目标条带长度为172 bp，考虑到仪器5%的测量误差，实际条带尺寸与理论尺寸基本符合，另外，苜蓿PCR引物对玉米和大麦均无响应，表明了此引物对于苜蓿具有特异性。

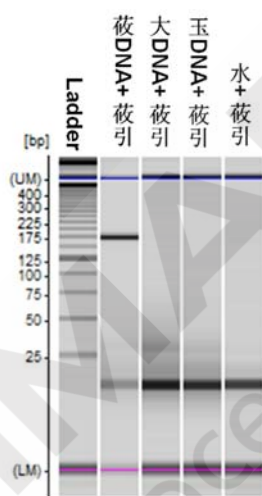


图1 MultiNA验证苜蓿特异性PCR引物的凝胶图（苜：苜蓿；大：大麦；玉：玉米；引：引物）

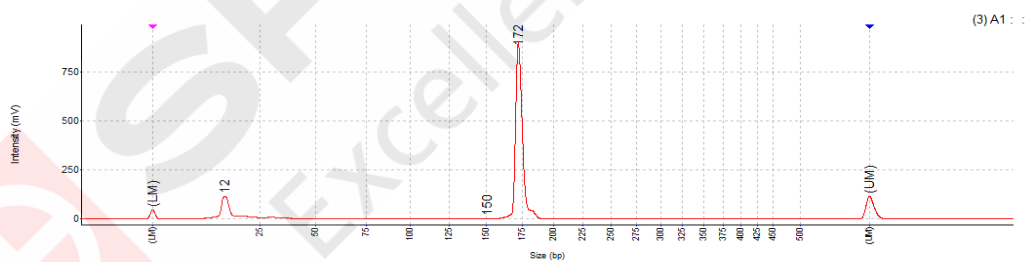


图2 苜蓿DNA和苜蓿引物的PCR产物电泳图

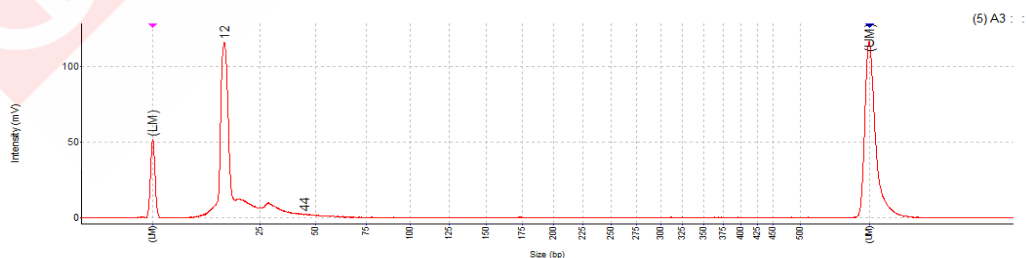


图3 大麦DNA和苜蓿引物的PCR产物电泳图

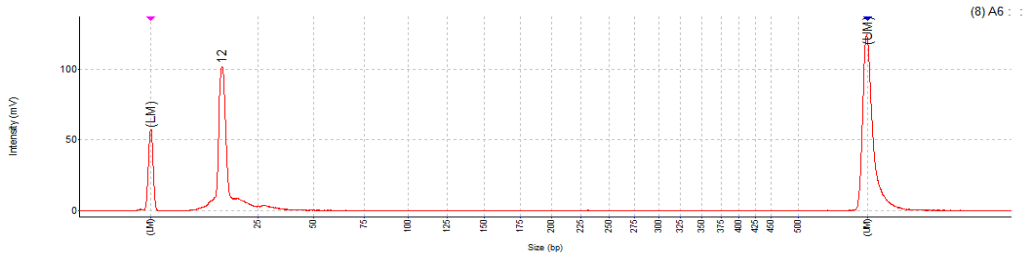


图4 玉米DNA和苜蓿引物的PCR产物电泳图

图5是验证大麦特异性PCR引物时MultiNA得到的凝胶图，图6-8是相应的MultiNA电泳图。设计大麦PCR引物时，目标条带理论长度为108 bp，结果得到大麦DNA模板和大麦引物的PCR产物尺寸为112 bp，与理论尺寸大致相符，且大麦PCR引物对苜蓿和玉米没有扩增出相应条带，验证了大麦引物的特异性。图9是进行验证玉米特异性PCR引物实验室得到的MultiNA凝胶图，图10-12是MultiNA的电泳图。玉米目标条带理论长度为190 bp，同理，实验结果也验证了玉米PCR引物的特异性。

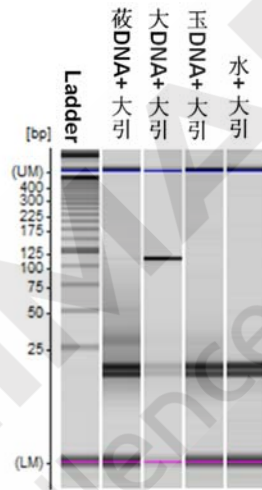


图5 MultiNA验证大麦特异性PCR引物的凝胶图（苜：苜蓿；大：大麦；玉：玉米；引：引物）

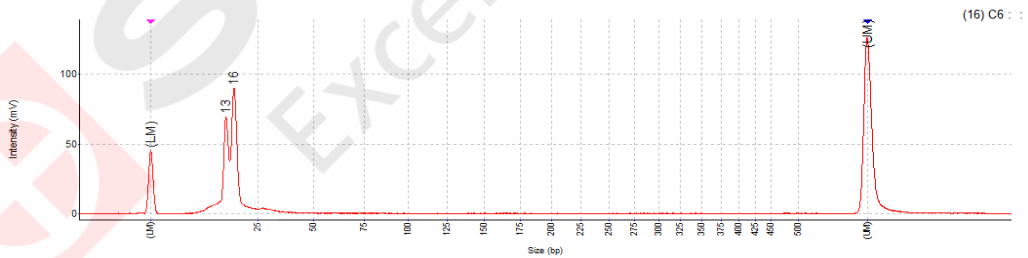


图6 苜蓿DNA和大麦引物的PCR产物电泳图

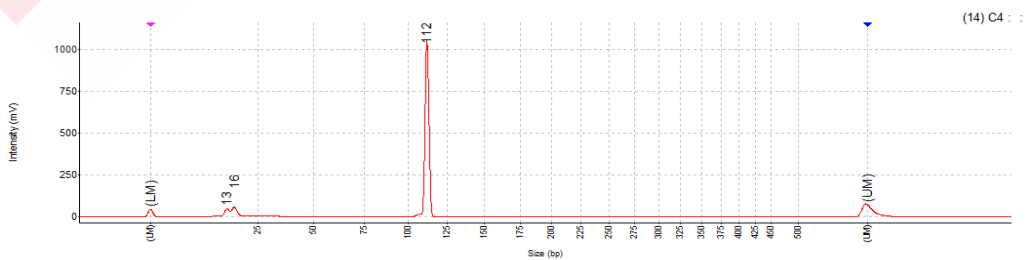


图7 大麦DNA和大麦引物的PCR产物电泳图

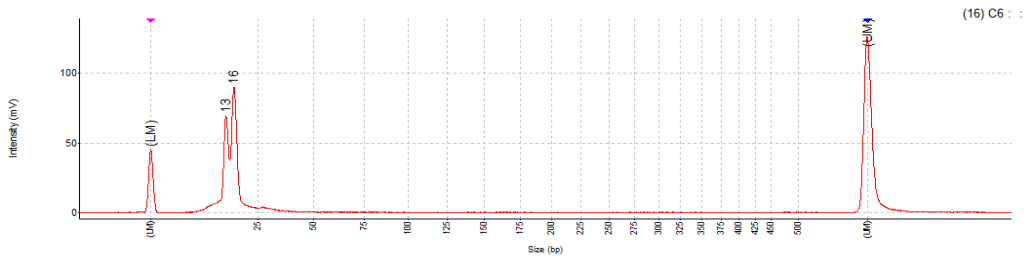


图8 玉米DNA和大麦引物的PCR产物电泳图

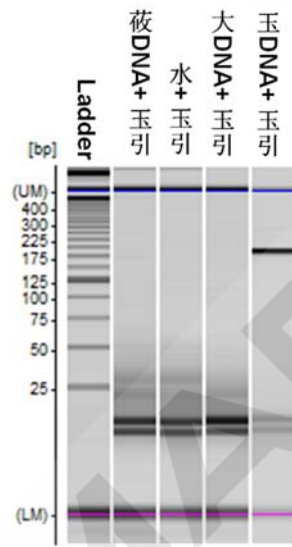


图9 MultiNA验证玉米特异性PCR引物的凝胶图（莜：莜麦；大：大麦；玉：玉米；引：引物）

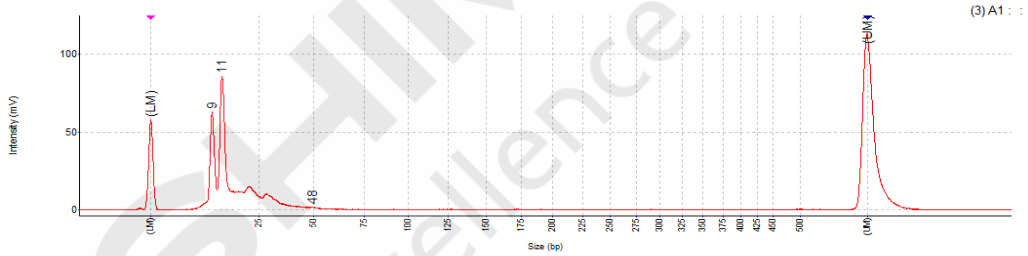


图10 莜麦DNA和玉米引物的PCR产物电泳图

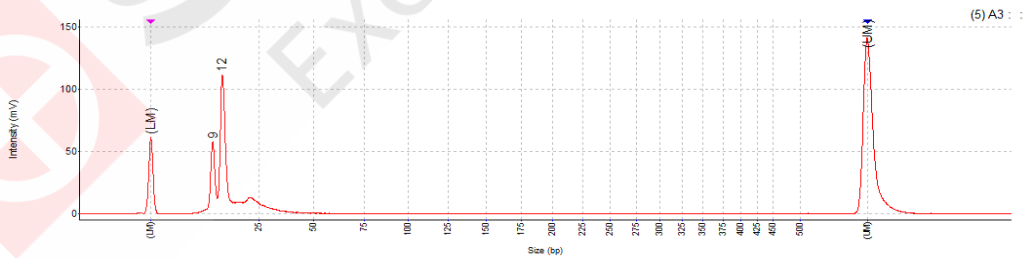


图11 大麦DNA和玉米引物的PCR产物电泳图

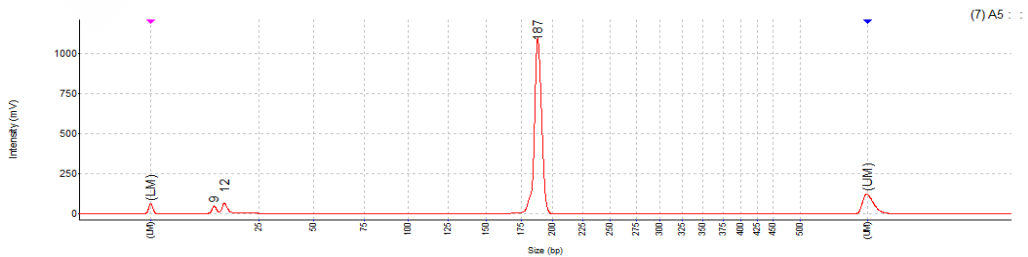


图12 玉米DNA和玉米引物的PCR产物电泳图

另外，为了验证此方法对于混合样品的检测是否有效，这里也进行了多重 PCR 反应，MultiNA 检测多重 PCR 产物结果如图13和图14所示。实验结果显示设计的引物及方法对于混合样品也可以实现鉴定。

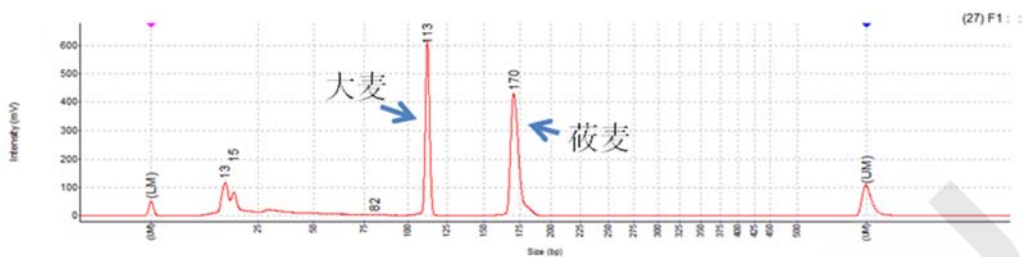


图13 苣麦 DNA、大麦 DNA、苣麦特异性引物和大麦特异性引物 PCR 产物的电泳图

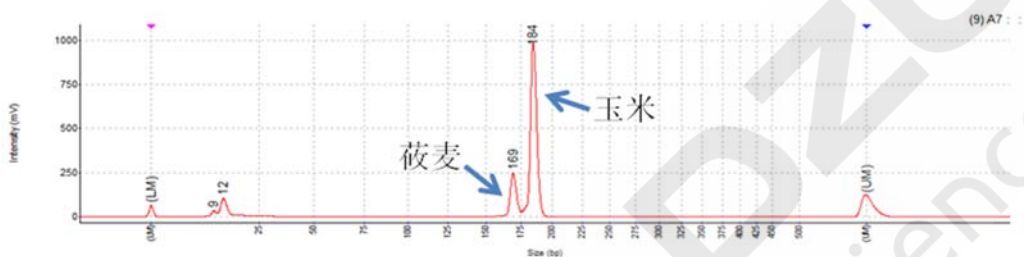


图14 苣麦 DNA、玉米 DNA、苣麦特异性引物和玉米特异性引物 PCR 产物的电泳图

利用改良的试剂盒方法从苣面的样品中提取到了基因组。利用苣麦、大麦和玉米的特异性引物对苣面 DNA 进行检测，结果如图15-17所示。使用苣麦引物时，样品出现特异性条带，证明含有苣面成分。使用大麦引物时，出现轻微的大麦特异性条带，说明苣面中可能掺有少量大麦成分。使用玉米引物时，未出现条带，表明此苣面样品不含有玉米成分。

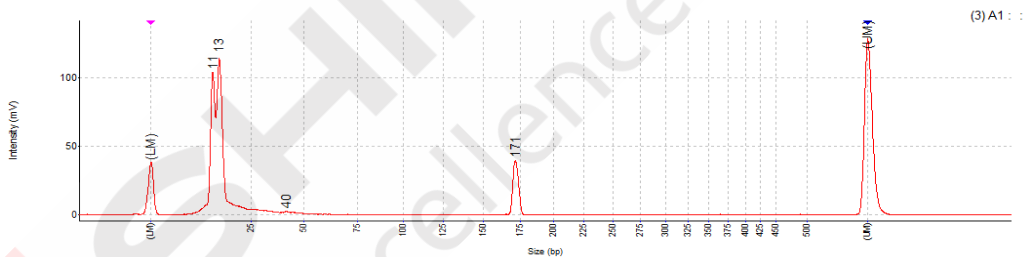


图15 苣面 DNA 和苣麦特异性引物的 PCR 产物电泳图

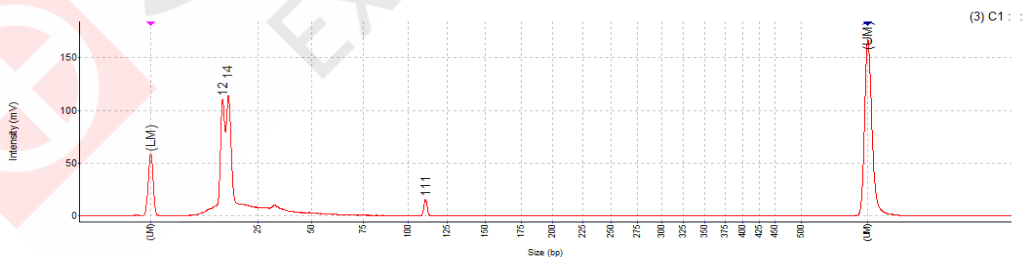


图16 苣面和大麦特异性引物的 PCR 产物电泳图

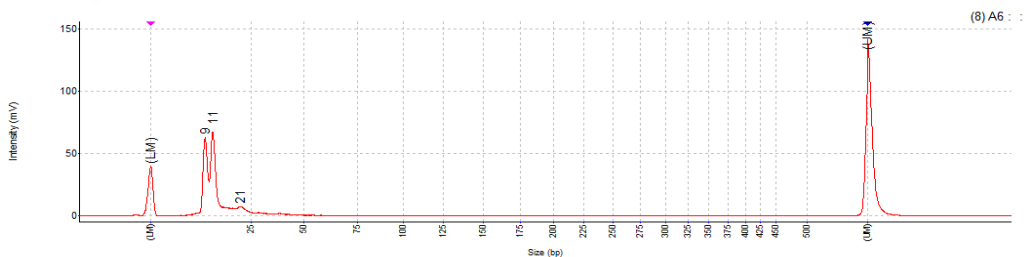


图17 苣面和玉米特异性引物的 PCR 产物电泳图

### 3 结论

本文应用岛津微芯片电泳 MultiNA 成功建立了鉴定莠面中大麦和玉米掺伪成分的方法，本方法操作简单，成本低，分析速度快，可供相关检测机构作为参考。



# 应用微芯片电泳仪 MultiNA 同时鉴定多种食品过敏原

**摘要：**食物过敏原是一类能使机体产生过敏反应的物质。目前食物过敏还没有有效的治疗方法，只能通过避免接触食物过敏原来加以预防。本文根据鱼和虾 16S rRNA，牛和鸡线粒体 DNA 设计特异性引物序列，建立 4 重 PCR 体系，构建了微芯片电泳仪 MultiNA 同时检测 4 种食品过敏原的方法。本方法与实时荧光 PCR 探针法相比，可一次性加入多种过敏原对应的特异性引物，根据片段的尺寸，从而快速鉴定出所含多种过敏原的种类，而实时荧光 PCR 探针法则需要逐一加入探针进行检测，操作繁琐，且探针设计复杂，成本高。

**关键词：**微芯片电泳仪 MultiNA 食品过敏原 同时鉴定 鱼 虾 牛肉 鸡肉

近年来，食物过敏患者日益增多，流行病学研究显示，由食物诱发的过敏反应约占所有过敏反应的 33%。食物过敏已成为了一个备受关注的食品安全问题。一般估计，在美国有 2% 的成人及大约 5% 的婴儿和小孩受食物过敏症所苦；FDA 的新闻稿指出，每年因食物过敏而进急诊室的人数达到了 50,000-125,000，其中约 150 人死亡。据有关资料显示，在英国，1%-2% 的成人和 5%-8% 的儿童患有食物过敏症。目前，食物过敏尚无有效治疗方法，预防食物过敏的唯一有效措施就是避免接触食物过敏原。但是，由于一种食品往往含有几种甚至几十种成分，而这些成分来源的原始形态已发生改变，因消费者误食而导致的过敏事件时有发生。这就

有赖于食品标签标注的准确性，而准确性标注则需可靠和灵敏的致敏原检测方法来作后盾。

岛津对于过敏性食品检测基于 DNA 的检测方法，针对过敏性食品的特异性 DNA 设计 PCR 引物，执行 PCR 反应，岛津微芯片电泳仪 MultiNA 检测 PCR 扩增产物片段长度，根据是否获得预期长度的 DNA 片段来判断所含过敏原的成分。本文以 DNA 为检测目标，选取牛、虾、鱼和鸡 4 种食物样品，建立了多重 PCR 方法，微芯片电泳仪 MultiNA 同时检测 4 种常见食物过敏原的技术。本方法与实时荧光 PCR 探针法相比，可一次性加入多种过敏原对应的特异性引物，根据片段的尺寸，从而快速鉴定出所含多种过敏原的种类。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器

MCE-202 MultiNA

### 1.2 试剂

SYBR<sup>®</sup> Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen, S-11494)

1×TE Buffer

25 bp DNA Ladder (Invitrogen, 10597-011)

DNA-500 Reagent Kit for MultiNA (岛津公司, P/N 292-27911-91)

样品：牛肉、鱼、虾和鸡肉均购于超市

PCR 引物：根据鱼和虾 16S rRNA，牛和鸡线粒体 DNA 设计特异性引物序列。鱼、虾、牛肉和鸡肉的理论扩增片段长度依次是 86 bp，109 bp，271 bp 和 62 bp。

### 1.3 样品中DNA的提取与纯化

样品的前处理和 PCR 体系如图 1 所示。

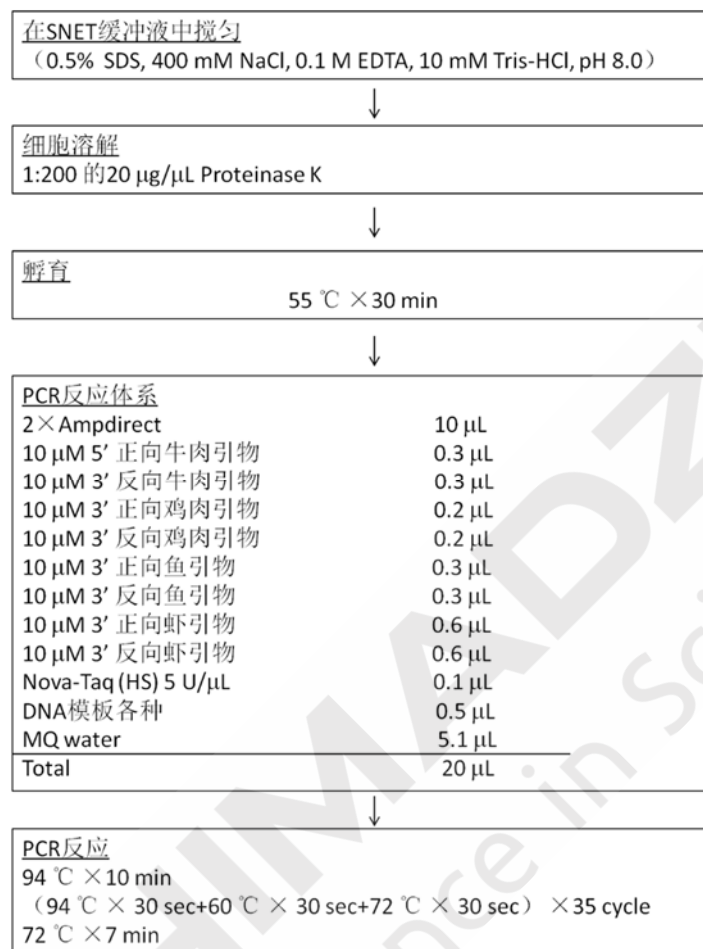


图1 样品前处理和PCR体系

### 1.4 MultiNA检测

PCR反应结束后，产物样品进入MultiNA进行测定。根据产物片段大小，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，本文同时进行了阴性对照实验，阴性对照的反应体系中不加入DNA模板。

## 2 结果讨论

图2为微芯片电泳仪MultiNA检测样品的凝胶图。结果显示单重PCR、2重PCR、3重PCR和4重PCR反应都被成功实施，且MultiNA可以清晰地鉴定这几种PCR产物。阴性对照实验未检测出相应的条带。图3为微芯片电泳仪MultiNA检测样品的电泳图。由电泳图给出的DNA片断的尺寸可知，无论是单重P、2重、3重还是4重PCR反应，MultiNA检测得到的片段尺寸基本一致，这说明方法的可靠性。在实际分析中，使用本方法，可一次性鉴定未知样品中是否含有鱼、虾、牛肉和鸡肉成分，实现多标签鉴定，操作简便，而使用实时荧光PCR探针法时，则需要逐一加入目标探针，操作繁琐，且探针设计较为复杂。

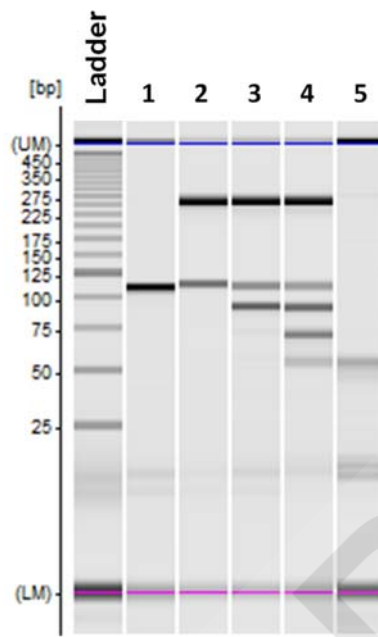


图2 微芯片电泳仪分析样品的凝胶图（1：虾的单重PCR产物；2：虾、牛肉的2重PCR产物；3：虾、牛肉和鱼的3重PCR产物；4：虾、牛肉、鱼和鸡肉的4重PCR产物；5：阴性对照）

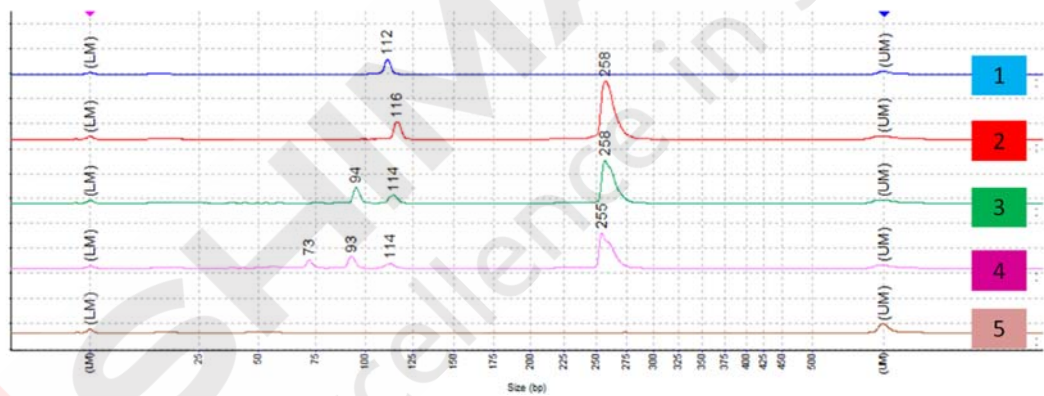


图3 微芯片电泳仪分析样品的凝胶图（1：虾的单重PCR产物；2：虾、牛肉的2重PCR产物；3：虾、牛肉和鱼的3重PCR产物；4：虾、牛肉、鱼和鸡肉的4重PCR产物；5：阴性对照）

### 3 结论

本文应用微芯片电泳 MultiNA 成功同时检测了食品过敏原鱼、虾、鸡肉和牛肉成分。本方法操作简单，分析成本低，可以一次检测多种过敏原成分，可供检测机构参考。

# 微芯片电泳 MultiNA 检测中华鳖蛋白粉中提取的 DNA 扩增产物

**摘要:** 为验证深加工食品中华鳖蛋白粉中是否可以用 DNA 分子标记鉴定, 利用改动的试剂盒方法对市售中华鳖蛋白粉进行 DNA 提取, 并用细胞色素 b (Cyt b) 通用引物进行 PCR 扩增, 微芯片电泳 MultiNA 检测扩增产物。实验结果表明深加工蛋白粉中可以得到质量较高的 DNA, 与从中华鳖肌肉样品中得到的阳性对照 DNA 相比, 结果相似, 得到约 450 bp 的产物。本方法为分子标记技术应用于高附加值食品的鉴定提供了技术支持。

**关键词:** 微芯片电泳 MultiNA PCR 中华鳖蛋白粉 DNA 扩增产物检测

中华鳖是高蛋白食品, 具有滋补身体增强免疫力的功效, 然而直接食用中华鳖, 其营养吸收率并不高。相比之下, 中华鳖蛋白粉更容易被人体吸收, 是具有高附加值的营养食品。然而由于中华鳖原料价格昂贵, 不法分子容易对其掺假、造假以牟取非法利益。

分子标记(molecular marker)是一种新的遗传标记方法, 它是以 DNA 多态性与性状间的紧密连锁关系为基础的遗传标记。DNA 分子标记是由于缺失、插入、易位、倒位、重排或由于存在长短与排列不一的重复序列等机制而产生的多态性, 其本质上是指能反映生物个体或种群间基因组中某种差异特征的 DNA 片段, 因此, 可以实现物种鉴定的目的。这种 DNA 片段是基因组 DNA 经限制性内切酶切割, 或作分子杂交后在电泳胶上或检测得到的。

由于基因组一般很大, 无法进行全面的序列分析, 需要针对基因组中个别特征基因片段进行研究, 选择合适的分子标记片段是一个关键问题。目前的研究对象以线粒体

DNA 的细胞色素 b 基因 (Cyt b) 和核糖体 DNA (rDNA) 为主。线粒体 Cyt b 基因具有相对高的种间差异、较低的种内变异以及相当长的变化序列, 因而可通过 Cyt b 鉴别密切相关的物种。

分子标记技术为中华鳖蛋白粉鉴定提供了新的检测手段, 这就需要从蛋白粉中提取合适的 DNA 用于分子标记。然而中华鳖蛋白粉加工工艺精细, 所提得的 DNA 结构是否被破坏, 最终能否用于 PCR 扩增, 即 DNA 分子标记鉴定是否适用中华鳖蛋白粉, 是一个需要探讨的课题。为此本文利用改动的试剂盒方法对市售中华鳖蛋白粉进行 DNA 提取, 并用通用线粒体细胞色素 b 基因 (Cyt b) 引物进行 PCR 扩增, 微芯片电泳 MultiNA 检测扩增产物。结果表明蛋白粉中可以提取到线粒体细胞色素 b 基因 (Cyt b), 与从中华鳖肌肉样品中得到的阳性对照样品结果相似, 即约 450 bp 的产物。本方法为分子标记技术应用于高附加值产品的鉴定提供了技术基础。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器

MCE-202 MultiNA, GVP-9600 PCR 仪

### 1.2 试剂

TaKaRa MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver.5.0 (宝生物工程 (大连) 有

限公司, 9765)

SYBR® Premix Ex Taq™ II (宝生物工程 (大

连)有限公司, RR820A)  
 SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain  
 (Invitrogen, S-11494)  
 1×TE Buffer  
 25 bp DNA Ladder (Invitrogen, 10597-011)  
 DNA-1000 Reagent Kit for MultiNA (岛津公

司, P/N 292-27911-91)  
 样品: 市售中华鳖蛋白粉  
 引物: 所用引物为特异性扩增约450 bp长的细胞色素b基因片段的通用引物对, 设计如表1所示。

表1 针对细胞色素b (Cyt b) 基因设计引物及PCR扩增信息

引物名称	引物序列
L14724	5'-CGAAGCTTGATATGAAAACCATCGTTG-3'
H15149	5'-AAACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCTCA-3'

### 1.3 分析条件

MultiNA Marker 混合模式: On-chip 混合

### 1.4 样品中DNA的提取与纯化

- 1.4.1 取 150 mg 中华鳖蛋白粉, 置于 2 mL 离心管中。
- 1.4.2 加入 180  $\mu$ L 试剂盒中 Buffer GL、20  $\mu$ L Proteinase K 和 10  $\mu$ L 的 RNase A (10 mg/mL), 于 56°C 温水浴 3 小时。
- 1.4.3 向裂解液中加入 200  $\mu$ L Buffer GB 和 200  $\mu$ L 的 100%乙醇, 充分吸打混匀。
- 1.4.4 将 Spin Column 安置于 Collection Tube 上, 溶液移至 Spin Column 中, 12000 rpm 离心 2 分钟, 弃滤液。
- 1.4.5 将 500  $\mu$ L 的 Buffer WA 加入至 Spin Column 中, 12000 rpm 离心 1 分钟, 弃滤液。
- 1.4.6 将 700  $\mu$ L 的 Buffer WB 加入至 Spin Column 中, 12000 rpm 离心 1 分钟, 弃滤液。
- 1.4.7 重复操作步骤 1.4.6。
- 1.4.8 将 Spin Column 安置于 Collection Tube 上, 12000 rpm 离心 2 分钟。
- 1.4.9 将 Spin Column 安置于新的 1.5 mL 的离心管上, 在 Spin Column 膜的中央处加入 65°C 150  $\mu$ L 的 TE Buffer, 室温静置 5 分钟。
- 1.4.10 12000 rpm 离心 3 分钟洗脱 DNA。将离下液重新加入到 Spin Column 膜的中央, 室温静置 5 分钟后, 12000 rpm 离心 3 分钟洗脱 DNA。
- 1.4.11 利用 BioSpec-nano 测量 DNA 浓度, 调整至 PCR 反应所需浓度范围。
- 1.4.12 阳性对照品为在市场上购买的中华鳖, 利用上述 DNA 提取试剂盒从中华鳖肌肉中提取 DNA, 调整模板浓度, 用于 PCR 扩增反应。

### 1.5 PCR反应体系

PCR反应试剂与反应条件见表2和表3。

表2 PCR反应试剂

	使用量	终浓度
SYBR® Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2×)	10.0 $\mu$ L	1×

PCR Forward Primer (10 M)	0.8 μL	0.4 μM
PCR Reverse Primer (10 M)	0.8 μL	0.4 μM
DNA 模板	2.0 μL	<10 ng/ L
dH <sub>2</sub> O (灭菌蒸馏水)	6.4 μL	
总体积	20.0 μL	

表3 PCR反应参数

作用	时间/s	温度/℃
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扩增产物进入MultiNA进行测定。根据理论产物片段大小，实验中选用1000 bp的试剂盒进行测定。为了验证测量的准确性，本文同时阴性对照实验，阴性对照的反应体系中不加入DNA模板。

## 2 结果讨论

图1与图2分别是MultiNA测量中华鳖肌肉样品和蛋白粉样品中细胞色素b基因PCR产物的凝胶图和电泳图。实验结果显示中华鳖肌肉中DNA经PCR扩增，得到明显的约450 bp的片段。同时，中华鳖蛋白粉提取扩增出的DNA也检测出与阳性对照样品大小相近的片段，表明中华鳖蛋白粉中可以提取并扩增出适合于分子标记的细胞色素基因b。另外，阴性对照中没有得到相应条带，说明实验过程没有被污染。本实验中提取中华鳖蛋白粉DNA时使用宝生物的DNA提取试剂盒，但操作方式与试剂盒的说明使用步骤有所不同。首先是样品的取样量，试剂盒中建议取样10-25mg，然而按照此取样量，并不能扩增出相应片段。由于蛋白粉加工过程中DNA破坏可能比较严重，故实验时加大了取样量，改为150 mg。此外，两次洗脱DNA时，使用了对DNA溶解能力强TE Buffer进行洗脱，与试剂盒附带的洗脱液相比，得到的DNA量更多。同时，增加了离心洗脱时间，使洗脱更彻底。

## 3 结论

本文成功提取了中华鳖蛋白粉中可用于分子标记的细胞色素 b 基因，并且此基因可用于PCR 扩增，微芯片电泳 MultiNA 检测出扩增出的特异性条带。本方法把分子标记技术引入到高附加值的产品检测中提供了技术支持。

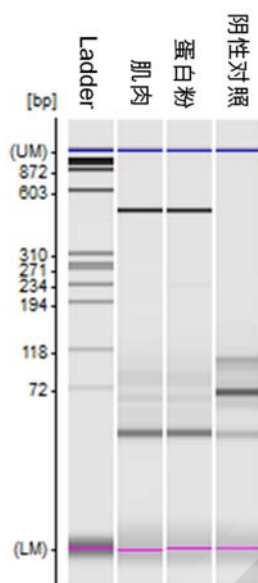


图1 MultiNA检测中华鳖细胞色素b (Cyt b) 基因凝胶图

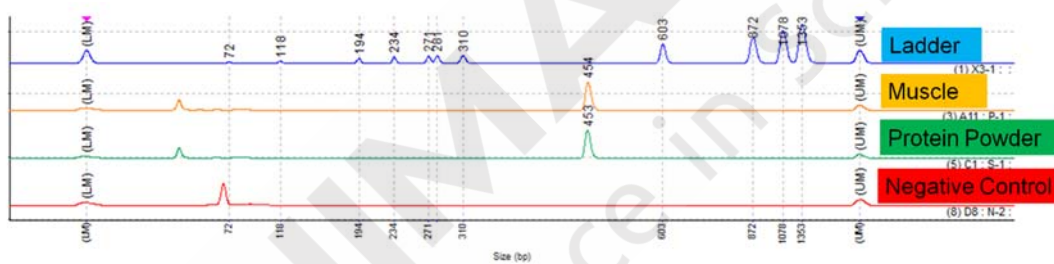


图2 MultiNA检测中华鳖细胞色素b (Cyt b) 基因电泳图

## 应用 MultiNA 和 PCR 方法定性检测转基因玉米 NK603

**摘要:** 利用植物基因组提取试剂盒提取转基因玉米 NK603 标准品的基因组, 以玉米内源 Zein 基因作为内参, 针对 NK603 转基因序列设计特异性引物进行 PCR 扩增, 岛津 MultiNA 微芯片电泳仪检测扩增产物, 结果显示检测到 NK603 成分的扩增条带。本实验表明应用 MultiNA 可以实现对转基因玉米中 NK603 的定性检测。

**关键词:** MultiNA PCR 转基因检测 玉米 NK-603 转基因 定性检测

目前, 许多国家和地区都对转基因作物的环境释放和市场销售采取了较为严格的管理政策。目前, 我国许可进口的转基因玉米品系只有 15 个, 它们是抗农达玉米 NK603, 抗虫耐除草剂玉米 MON88017, 抗虫玉米 MON89034, 抗虫玉米 MIR604, 抗除草剂玉米 GA21, 抗虫耐除草剂玉米 Bt-11×GA21, 抗除草剂玉米 T25, 抗虫玉米 MON810, 抗虫玉米 MON863, 抗虫玉米 TC1507, 抗虫玉米 59122, 抗虫玉米 Bt-11, 抗虫玉米 Bt-176, 耐旱玉米 MON87460, 品种改良玉米 3272。

玉米品系 NK603 是美国孟山都公司研发的抗草铵膦的一种转基因玉米, 商品名为 Roundup Ready 玉米。编码草铵膦耐受基因 (EPSPS) 是从根瘤土壤菌 CP4 品系中提取出来的并使用重组 DNA 技术引入玉米中。

本文根据转基因玉米 NK603 特异性序列设计特异性引物, 对样品进行 PCR 扩增, MultiNA 检测扩增产物。实验结果显示 NK603 特异性扩增条带被 MultiNA 成功检出, 表明本实验方法可以实现定性检测玉米中的 NK603 转基因成分。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器

MCE-202 MultiNA

#### 1.2 试剂

植物基因提取试剂盒 (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)

SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain

(Invitrogen, S-11494)

1×TE Buffer

25 bp DNA Ladder (Invitrogen, 10597-011)

DNA-500 Reagent Kit for MultiNA (岛津公司,  
P/N 292-27910-91)

样品: 欧洲标准物质玉米粉末, 转基因玉米  
NK603 含量 4.91% (ERM-BF415f)

引物: 玉米内源 Zein, 转基因 NK603 的引物设计如表 1 所示。

表 1 针对玉米内源 Zein, 转基因 NK603 设计的引物

检测基因	引物序列	PCR 理论产物大小/bp
玉米内源 Zein	5'-tgaacctatgcatgcagt-3'	190
	5'-ggcaagaccattggtga-3'	
转基因 NK603	5'-tcccgactctcttctcaagca-3'	122

### 1.3 分析条件

MultiNA Marker 混合模式: On-chip 混合

#### 1.4 样品中DNA的提取与纯化

1.4.1 液氮研磨 0.5 g 左右的植物组织, 将粉末转移到 2 mL 离心管中。

1.4.2 加入抽提液 A 0.5 mL, 混匀后 65°C 水浴 1 h。

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

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

1.4.5 沉淀后 4°C、12000 rpm 离心 15 min, 小心倒去上清液。此时 EP 管底部可见白色沉淀物。

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

1.4.7 在晾干后的 EP 管内加入 30 L 溶解液进行沉淀溶解, 沉淀溶解液放置 -20°C 保存。

#### 1.5 PCR反应体系

PCR反应试剂与反应条件见表2和表3。

表2 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 M)	0.8 μL	0.4 μM
PCR Reverse Primer (10 M)	0.8 μL	0.4 μM
DNA 模板	2.0 μL	2 ng/ L
dH <sub>2</sub> O (灭菌蒸馏水)	6.4 μL	
总体积	20.0 μL	

表3 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扩增产物进入MultiNA进行测定。根据产物片段大小, 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, 本文同时进行了阴性对照实验, 阴性对照的反应体系中不加入DNA模

板。

## 2 结果讨论

图1与图2是MultiNA测量转基因玉米NK603的凝胶图和电泳图。从标准样品可检测到玉米内源196 bp的Zein基因，与理论片段190 bp基本一致，可确认DNA提取以及PCR反应已经顺利实施。另外，在NK603转基因玉米标准品种也确认到了转基因NK603的118 bp谱带，虽然PCR产物理论大小为122 bp，考虑到MultiNA使用DNA-500试剂盒分析时，误差为5%，结果合理。而阴性对照未检测出，表明无假阳性检出，检测结果准确。

## 3 结论

本文基于分子生物学技术，采用岛津公司 MCE-202 MultiNA 建立了定性检测转基因玉米 NK603 的方法。此方法对于检测 NK603 品系转基因玉米灵敏度强，操作简便，结果准确，可供检测机构作为参考。MultiNA 的测定结果可获得电泳图和凝胶图，确认峰的有无、尺寸，方便、可靠地判断目的扩增产物。

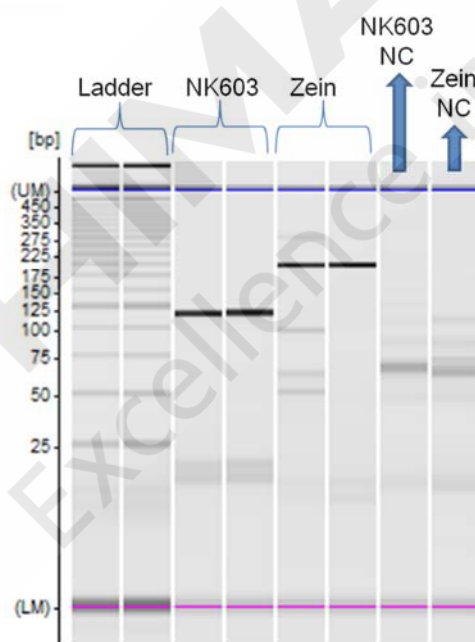


图1 MultiNA检测转基因玉米NK603凝胶图（NC：阴性对照）

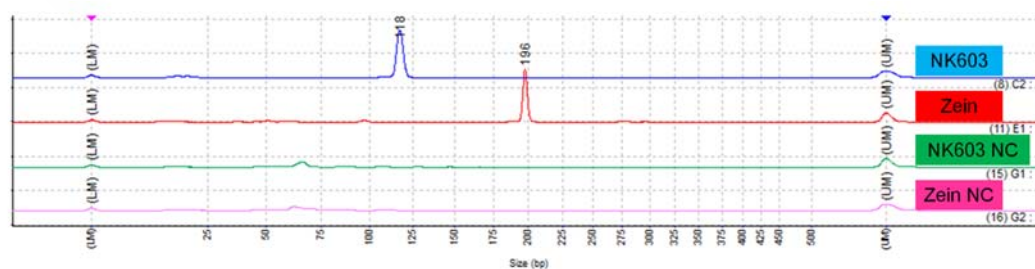


图2 MultiNA检测转基因玉米NK603电泳图（NC：阴性对照）

# 中药材品种

## 应用微芯片电泳 MultiNA 鉴定中药材金银花和多种山银花

**摘要:** 利用改进的基因提取试剂盒方法提取中药材金银花和几种山银花包括红腺忍冬、黄褐毛忍冬和灰毡毛忍冬的基因组, 基于 GenBank 金银花和山银花的基因序列差异, 分别设计金银花和山银花特异性引物, 进行 PCR 扩增, 微芯片电泳仪 MultiNA 检测扩增产物, 实验结果显示 PCR 扩增产物片段长度与预期长度基本一致。另外, 为了验证用于检测山银花的 PCR 引物的特异性, 用山银花引物扩增金银花样品, MultiNA 检测 PCR 产物, 结果未出现特征条带。本实验表明基于微芯片电泳 MultiNA 开发的方法可实现金银花和几种山银花的鉴定。

**关键词:** 微芯片电泳 MultiNA 中药材品种鉴定 金银花 山银花 忍冬 红腺忍冬 黄褐毛忍冬 灰毡毛忍冬

金银花为忍冬科植物忍冬的干燥花蕾或初开的花, 主要活性成分为绿原酸、木樨草苷等黄酮类物质。金银花临床应用非常广泛, 《中国药典》成方和制剂中药中就有 61 个方剂以金银花作为主要的组成成分, 现代药理实验证明其具有抑菌、抗炎、抗病毒、抗氧化、解热、镇痛、调节免疫、保肝、中枢兴奋和神经保护、抗心肌缺血等作用。尽管在 2005 年版《中国药典》中已明确将忍冬作为金银花唯一植物来源, 但之前各版《中国药典》根据临床疗效、地区用药习惯等, 曾先后选定忍冬、红腺忍冬、华南忍冬、水忍冬等为金银花的基原植物。且 2005 年版《中国药典》同时规定红腺忍冬、灰毡毛忍冬和黄褐毛忍冬列为山银花药材基原植物。目前, 金银花和山银花的区分是一个热点话题。

为保证用药安全, 需要准确地鉴定金银花和山银花, 然而两者的形态和化学成分高

度相似, 且传统形态学和化学鉴别常受到人为或环境因素的影响。因此, 需要开发一种快速、准确地进行金银花、山银花的鉴定方法。应用分子生物学手段可以实现品种的鉴定, 其原理是不同物种具有不同的基因序列。本文根据 NCBI GenBank 中金银花和山银花的基因序列差异, 设计两者的特异性 PCR 引物。PCR 过程后, 岛津微芯片电泳 MultiNA 检测 PCR 产物。当检测样品为金银花时, 用金银花特异性引物扩增得到的 PCR 产物检测出相应条带, 尺寸与理论基本一致, 而用山银花特异性引物扩增得到的 PCR 产物未能检测出条带; 对于山银花样品, 本文检测了红腺忍冬、黄褐毛忍冬和灰毡毛忍冬样品, 用山银花特异性引物进行以上样品的 PCR 扩增, MultiNA 检测出相应条带, 且尺寸与预期相符。这表明本文开发的方法可以成功地鉴定金银花和山银花。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器

微芯片电泳 MCE-202 MultiNA

### 1.2 试剂

TaKaRa MiniBEST Plant Genomic DNA

Extraction Kit (宝生物工程有限公司, 9768)

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

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

1×TE Buffer

25 bp DNA Ladder (Invitrogen, 10597-011)

DNA-500 Reagent Kit for MultiNA (岛津公司,

P/N 292-27910-91)

样品: 金银花、山银花样品为红腺忍冬、黄  
褐毛忍冬和灰毡毛忍冬。

PCR引物: 根据文献和NCBI序列, 针对金银  
花和山银花序列差异设计各自对应的特异性  
引物, 金银花的PCR目标产物长度为468 bp,  
山银花的PCR目标产物长度为331 bp。

### 1.3 样品中DNA的提取与纯化

样品的基因提取和纯化基本按照 TaKaRa MiniBEST Plant Genomic DNA 操作方法中富含多糖、  
多酚及油脂植物材料的提取方法进行, 改动之处为开始时取样量为 50 mg, 加入 Buffer HS II 1  
mL, 另外在洗脱 DNA 时, 只用 30 L Elution Buffer 冲洗了 Spin Column 膜, 以获得高浓度的  
DNA。

### 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
SYBR® Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2×)	10.0 μL	1×
PCR Forward Primer (10 M)	0.8 μL	0.4 μM
PCR Reverse Primer (10 M)	0.8 μL	0.4 μM
DNA 模板	2.0 μL	20 ng/ L
dH <sub>2</sub> 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 (35 个循环)		
变性	30	94
退火	30	61
延伸	45	72
循环后保持	420	72

### 1.5 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, 本文同时阴性对照实验, 阴性对照的反应体系中以纯水代替DNA  
模板。

## 2 结果讨论

图1与是微芯片电泳测量金银花和山银花的PCR产物的凝胶图。实验结果显示，金银花+金银花引物的PCR产物及几种山银花+山银花引物的PCR产物都观察到了相应条带，说明基因组被成功的提取出来且PCR过程被顺利执行。另外，金银花+山银花引物未检测出目标条带，验证了用于检测山银花的PCR引物的特异性。阴性对照以纯水代替样品DNA模板，实验没有检测到相关片段，证明无假阳性检出。图2是微芯片电泳MultiNA测量金银花+金银花引物的PCR产物电泳图，实验结果显示基因片段长度为475 bp，与预期的468 bp基本一致。图3、图4和图5分别是红腺忍冬、黄褐毛忍冬和灰毡毛忍冬加入山银花山银花引物的PCR电泳图，实验结果显示基因片段长度分别为342 bp、336 bp和338 bp，由于实验时选用DNA 500试剂盒，仪器具有5%误差，与理论片段长度331 bp相比，结果合理。

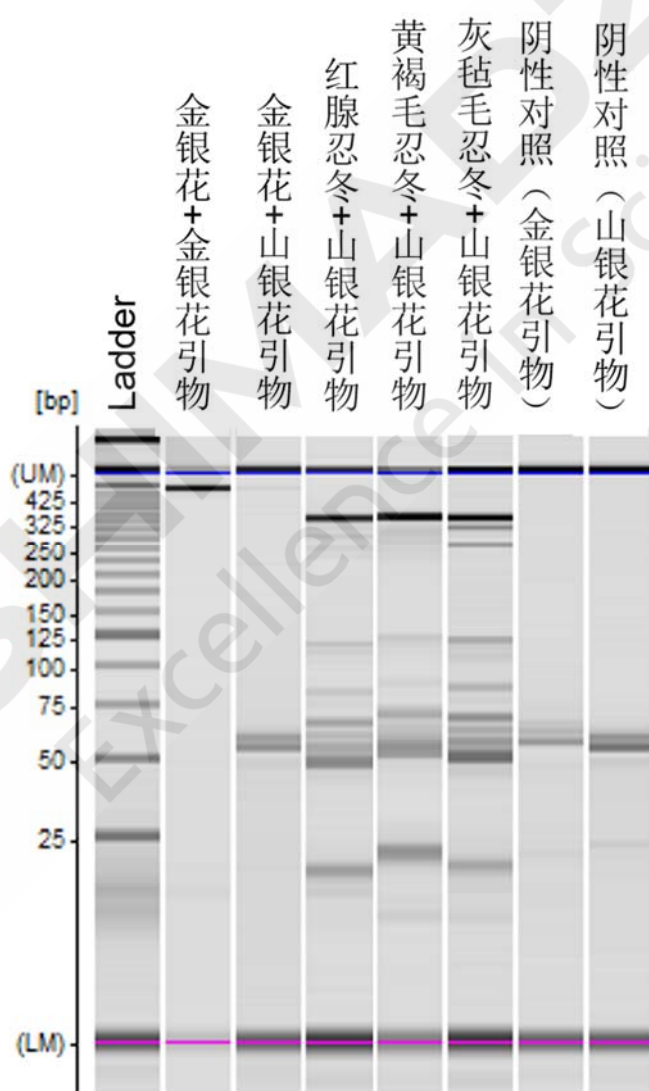


图1 微芯片电泳MultiNA检测金银花引物和山银花引物分别扩增金银花和山银花样品的PCR产物电泳图

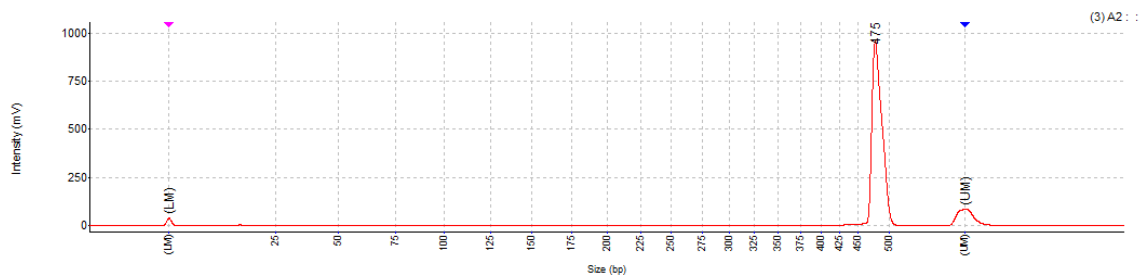


图2 微芯片电泳MultiNA测量金银花+金银花引物的PCR产物电泳图

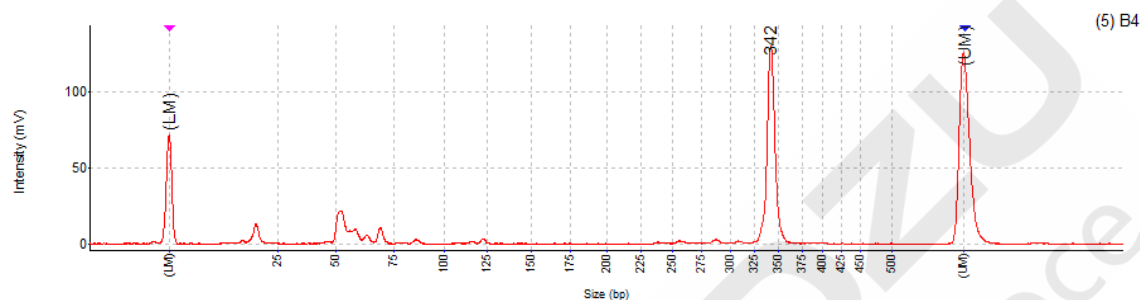


图3 微芯片电泳MultiNA测量红腺忍冬+山银花引物的PCR产物电泳图

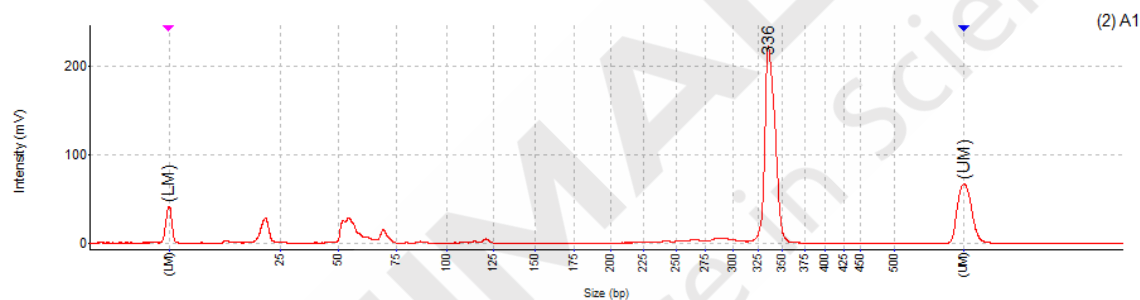


图4 微芯片电泳MultiNA测量黄褐毛忍冬+山银花引物的PCR产物电泳图

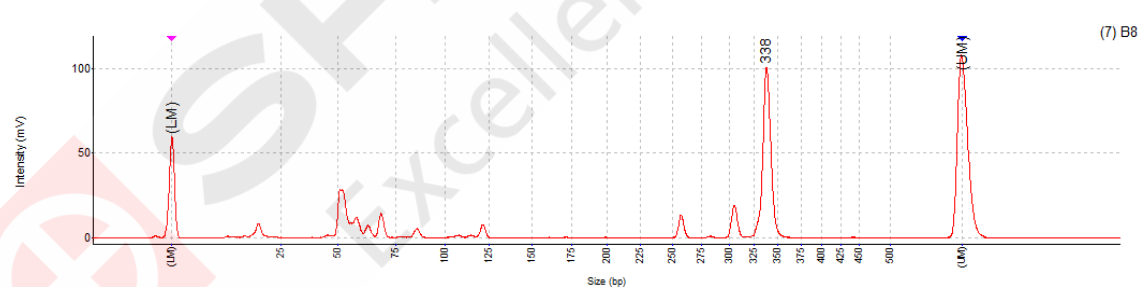


图5 微芯片电泳MultiNA测量灰毡毛忍冬+山银花引物的PCR产物电泳图

### 3 结论

本文应用岛津微芯片电泳 MCE-202 MultiNA 成功建立了鉴定金银花和山银花的方法,本方法特异性强,较传统的以测序仪进行基因测序方法相比,本方法操作简单,成本低,速度快,可供相关检测机构作为参考。

# 微芯片电泳 MultiNA 对中药材半夏及其伪品水半夏的鉴定

**摘要:** 使用基因提取试剂盒方法提取中药材半夏和水半夏的基因组, 基于 GenBank 半夏和水半夏的基因序列差异, 设计了半夏的特异性 PCR 引物, 取半夏和其常见的伪品水半夏进行扩增, 微芯片电泳仪 MultiNA 检测 PCR 产物, 实验结果显示只有半夏样品出现相应的条带, 水半夏样品未出现目标条带。本实验表明基于微芯片电泳 MultiNA 开发的方法可进行中药材半夏及其伪品水半夏的鉴定。

**关键词:** 微芯片电泳 MultiNA PCR 中药材品种鉴定 金银花 山银花

中药材半夏是天南星科植物半夏的块茎, 具有燥湿化痰, 降逆止呕, 消痞散结的功能, 用于痰多咳喘, 痰饮眩悸, 痰厥头痛, 呕吐反胃, 胸脘痞闷, 梅核气等多种病。随着半夏野生资源的减少致使其掺伪现象较为严重, 如市场上常见的混淆品犁头尖属的块茎水半夏, 仅具有燥湿, 化痰的功能, 用于咳嗽痰多, 支气管炎, 其疗效远不如半夏, 但二药常相混不易分辨。两者的基源、性状、功效均不同, 尤其是价格相差很大, 大约是 8: 1, 近来, 市场上大量水半夏冒充半夏。为保证

用药安全, 需要准确地鉴定半夏及其伪品水半夏。本文基于分子生物学手段, 针对半夏和水半夏的特异性基因位点, 设计半夏的特异性 PCR 产物, PCR 过程后, 岛津微芯片电泳 MultiNA 检测 PCR 产物。实验结果显示, 当样品为半夏时, 用半夏特异性引物扩增得到的 PCR 产物检测出相应条带, 尺寸与理论高度相符, 而水半夏样品的 PCR 扩增产物, 未检测出目标条带, 表明开发的方法可以进行半夏及其伪品水半夏的鉴定。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器

微芯片电泳 MCE-202 MultiNA

### 1.2 试剂

TaKaRa MiniBEST Plant Genomic DNA Extraction Kit (宝生物工程有限公司, 9768)  
SYBR® Premix Ex Taq™ II (宝生物工程有限公司, RR820A)  
SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen, S-11494)  
1×TE Buffer

25 bp DNA Ladder (Invitrogen, 10597-011)  
DNA-500 Reagent Kit for MultiNA (岛津公司, P/N 292-27910-91)

样品: 中药材半夏和水半夏

PCR引物: 根据半夏和水半夏的基因序列区别, 设计半夏的特异性引物, 目标产物长度为393 bp。

### 1.3 样品中DNA的提取与纯化

样品的基因提取和纯化基本按照 TaKaRa MiniBEST Plant Genomic DNA 操作方法中富含多糖、多酚及油脂植物材料的提取方法进行。

## 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
SYBR® Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2×)	10.0 μL	1×
PCR Forward Primer (10 M)	0.8 μL	0.4 μM
PCR Reverse Primer (10 M)	0.8 μL	0.4 μM
DNA 模板	2.0 μL	20 ng/ L
dH <sub>2</sub> 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 (35 个循环)		
变性	30	94
退火	30	61
延伸	45	72
循环后保持	420	72

## 1.5 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，本文同时阴性对照实验，阴性对照的反应体系中以纯水代替DNA模板。

## 2 结果讨论

图1与是微芯片电泳MultiNA测量半夏特异性引物分别扩增半夏和水半夏样品的PCR产物凝胶图。实验结果显示，使用半夏特异性引物时，半夏样品PCR产物得到目标条带，尺寸与理论大小相符，半夏常见伪品水半夏未检测到相应条带。以上实验结果表明本方法可以将半夏和其掺伪品水半夏进行鉴别。

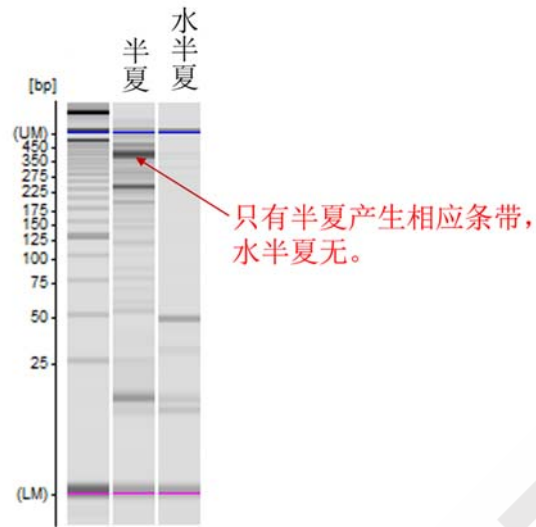


图1 微芯片电泳MultiNA检测半夏引物分别扩增半夏和水半夏样品的PCR产物凝胶图

### 3 结论

本文应用岛津微芯片电泳 MCE-202 MultiNA 建立了鉴定中药材半夏及其常见伪品水半夏的方法，此方法操作鉴定，灵敏度高，分析速度快。



SHIMADZU  
Excellence in Science



本公司三条工厂获得 ISO 认证

JQA-0376

## ⊕ 岛津企业管理 ( 中国 ) 有限公司 / 岛津 ( 香港 ) 有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

### 北京

北京市朝阳区朝外大街 16 号中国人寿大厦 14F  
 邮政编码: 100020  
 电话: (010) 8525-2310/2312  
 传真: (010) 8525-2326/2329

### 上海

上海市徐汇区宜州路180号华鑫天地二期C801栋  
 邮政编码: 200233  
 电话: (021) 3419-3888  
 传真: (021) 3419-3666

### 沈阳

辽宁省沈阳市青年大街167号北方国际传媒中心11F  
 邮政编码: 110016  
 电话: (024) 2325-5577  
 传真: (024) 2383-6378

### 四川

成都市锦江区创意产业商务区三色路38号博瑞创意成都B座12层  
 邮政编码: 610015  
 电话: (028) 8619-8421/8422  
 传真: (028) 8619-8420

### 武汉

武汉市汉口建设大道568号新世界国贸大厦1座41层4116室  
 邮政编码: 430022  
 电话: (027) 8555-7910  
 传真: (027) 8555-7920

### 广州

广州市流花路109号之9达宝广场7楼  
 邮政编码: 510010  
 电话: (020) 8710-8603  
 传真: (020) 8710-8698

### 西安

西安市南二环西段88号老三届世纪星大厦24层G座  
 邮政编码: 710065  
 电话: (029) 8838-6016  
 传真: (029) 8838-6497

### 乌鲁木齐

乌鲁木齐市中山路339号中泉广场14层H座  
 邮政编码: 830000  
 电话: (0991) 230-6271/6272  
 传真: (0991) 230-6273

### 昆明

昆明市青年路 432 号天恒大酒店 908 室  
 邮政编码: 650021  
 电话: (0871) 315-2987  
 传真: (0871) 315-2991

### 南京

南京市鼓楼区汉中路2号金陵饭店亚太商务楼27层B单元  
 邮政编码: 210005  
 电话: (025) 8689-0258  
 传真: (025) 8689-0237

### 重庆

重庆市渝中区青年路 38 号重庆国贸中心 1702 室  
 邮政编码: 400010  
 电话: (023) 6380-6057/6058  
 传真: (023) 6380-6551

### 深圳

深圳市福田区天安数码城天展大厦1楼F2. 6-1C  
 邮政编码: 518042  
 电话: (0755) 8340-2852  
 传真: (0755) 8389-3100

### 河南

郑州市中原路220号裕达国际贸易中心A座20层2011室  
 邮政编码: 450007  
 电话: (0371) 8663-2981  
 传真: (0371) 8663-2982

### 香港

Suite 1028, Ocean Centre, Harbour City,  
 Tsim Sha tsui, Kowloon, Hong-Kong  
 电话: (00852) 2375-4979  
 传真: (00852) 2199-7438

用户服务热线电话: 800-8100439  
 400-6500439

本产品样本所宣传的内容, 以本版本为准  
 样本中的试验数据除注明外为本公司的试验数据

日本总公司工厂已通过ISO质量·环境管理体系的认证

注: 此样本所有信息仅供参考, 如有变动恕不另行通知