



### 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 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 30min。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× 萃取液溶解浓缩物，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 μM)	0.8 μL	0.4 μM
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.8 μL	0.4 μM
DNA模板	2.0 μL	16 ng/μL
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 扩增后产物经 BioSpec-Nano 检测浓度后，稀释成 MultiNA 检测所需浓度范围（0.5 ng/μL~50 ng/μL），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，本文同时进行了阳性对照和阴性对照实验。阳性对照的 DNA 模板从大豆和油菜籽组织中提取纯化获得。阴性对照为不加 DNA 模板的体系。

## 结果讨论

图1和图2分别是 MultiNA 测定 Ladder, 大豆阳性对照, 油菜籽阳性对照, 调和油 DNA 扩增产物和阴性对照的凝胶图和电泳图。结果显示大豆阳性对照和油菜籽阳性对照分别得到了清晰的 165 bp 和 127 bp 的条带, 与理论条带 162 bp 和 121 bp 基本相同, 另外, 阴性对照没有得到此区域附近条带, 表明了引物被正确地设计, PCR 程序被成功执行, 并且 MultiNA 能将其检测出。调和油演示实验结果显示调和油中两种成分对应的两个条带被清晰的检测出并能够实现完全分离, 表明了多重 PCR 引物被成功地设计, 两种基因顺利地实现了特异性扩增, MultiNA 检测扩增片段的链长与理论片段长度基本一致, 表明本方法能够准确地对调和油中存在的多种组成实现同时鉴定。

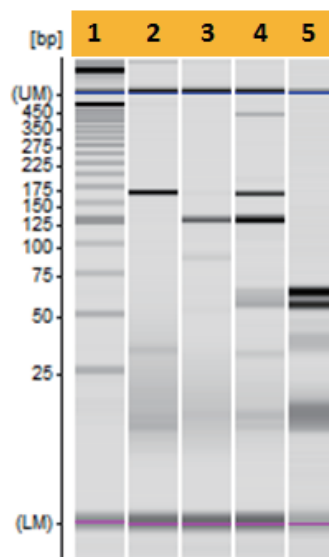


图1 食用调和油分析凝胶结果  
 (1: Ladder, 2: 大豆阳性对照, 3: 油菜籽阳性对照, 4: 调和油样品, 5: 阴性对照)

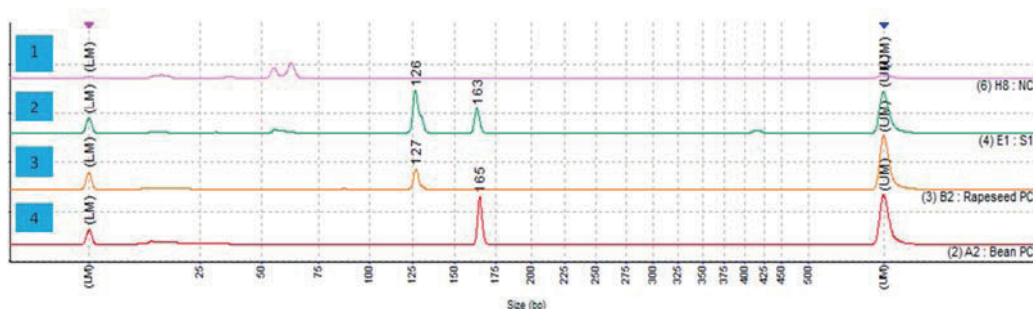


图2 食用调和油分析电泳结果  
 (1: 阴性对照, 2: 调和油样品, 3: 油菜籽阳性对照, 4: 大豆阳性对照)

## 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调和油中多重成分的方法。此方法应用 MultiNA 微芯片电泳仪, 基于多重 PCR 技术, 对调和油中多中成分可以实现同时检测, 可靠性强, 效率高, 操作简便, 是调和油鉴定的有力检测手段。