

应用微芯片电泳 MultiNA 对混合肉中各肉成分的定量测定

MultiNA-013

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 转肉类鉴定 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。

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： $X_n = X_0(1+E)^n$

(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。

实验部分

2.1 仪器

MCE-202 MultiNA

2.2 试剂

1 mol/L-Tris-HCl 缓冲液 (pH8.0) 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'-gtgtaagacccgtaataag-3'	5'-gacctcccagccccatcaaacatc-3'	266
猪线粒体DNA的细胞色素 b基因	5'-gatattgtcctcagggc-3'	5'-gacctcccagccccatcaaacatc-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

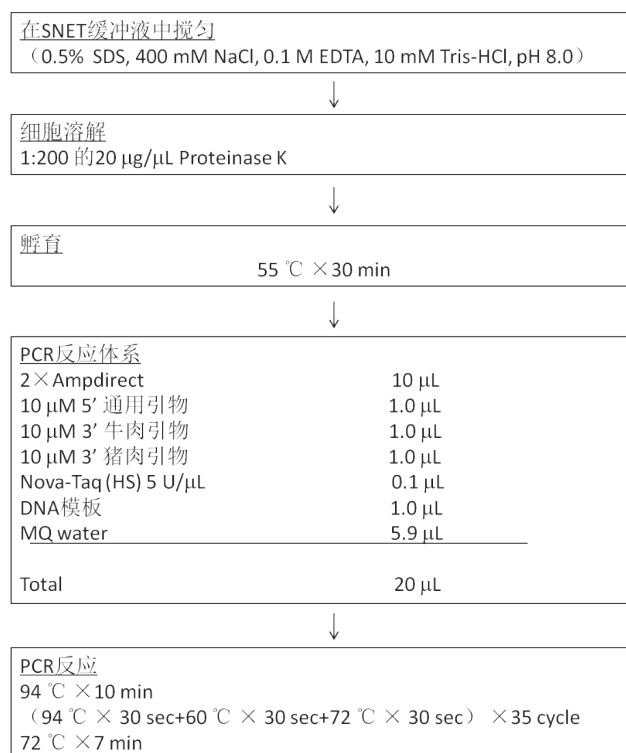


图 1 样品处理及 PCR 反应体系和条件

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。

结果讨论

图 2 是微芯片电泳 MultiNA 检测检测不同组成猪肉、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、阴性对照的凝胶图和电泳图。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。

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。

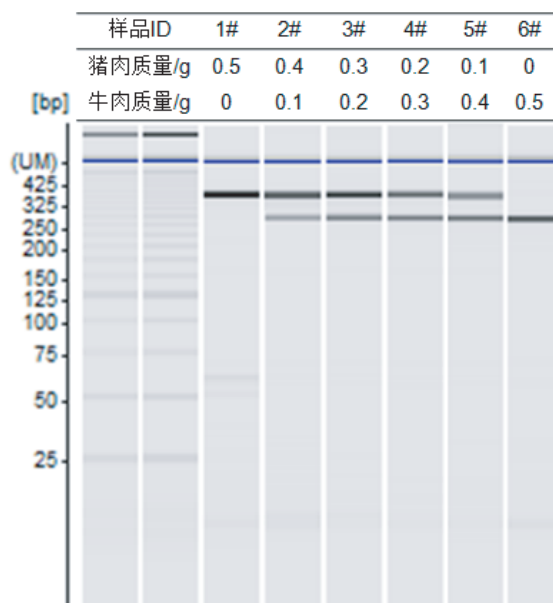


图2 MultiNA检测不同组成猪肉、牛肉的凝胶图

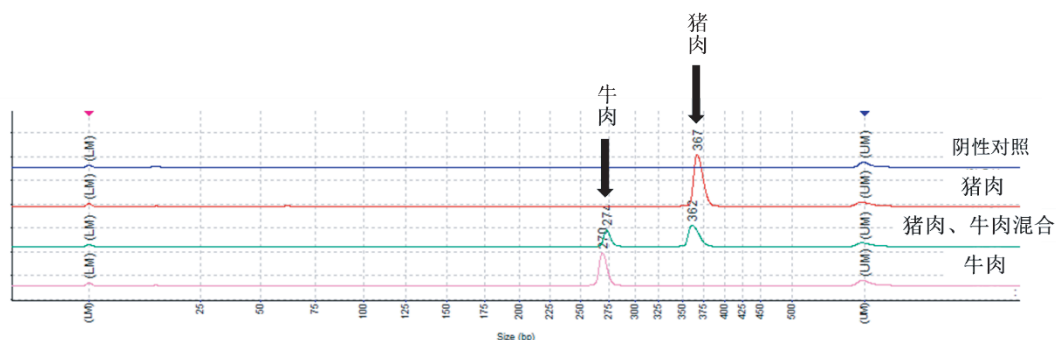


图3 MultiNA检测纯猪肉、牛肉和猪肉混合肉、纯牛肉、阴性对照的电泳图

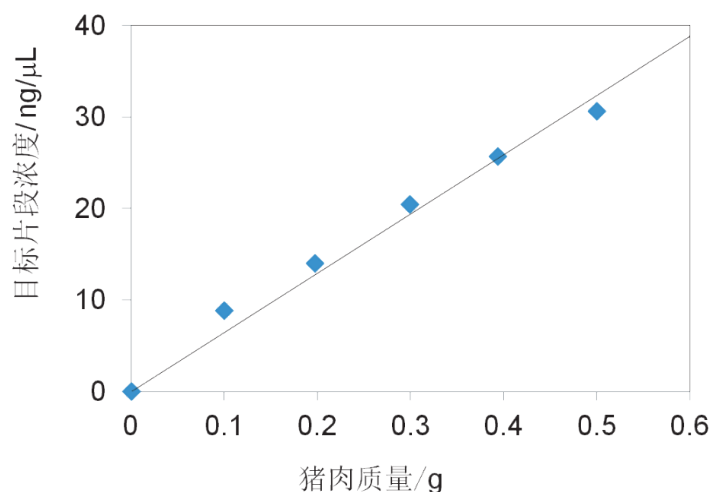


图4 不同含量的猪肉样品PCR扩增出的目标片段浓度对猪肉质量的标准曲线（数据来自两个平行样品平均值）

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

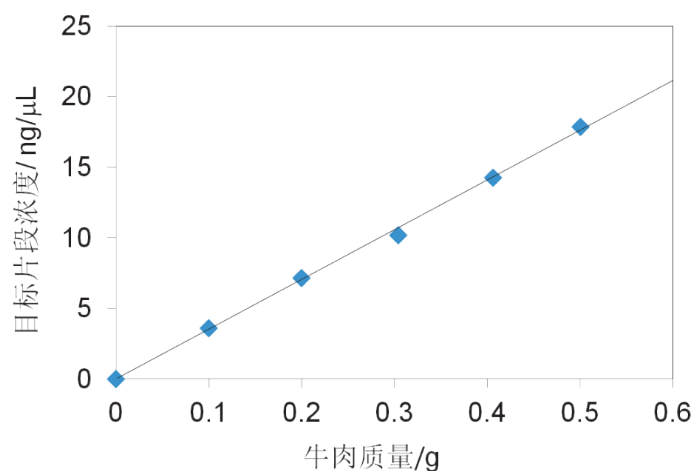


图5 不同含量的牛肉样品PCR扩增出的目标片段浓度对牛肉质量的标准曲线（数据来自两个平行样品平均值）

表3 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