

# 应用微芯片电泳仪 MultiNA 对肉种类掺假鉴定的解决方案



## 1

### 前言

目前，市场上销售假羊肉、假牛肉的事件屡次被曝光，不法分子使用价格低廉的鸡、鸭肉，猪肉和香精等原料制作假羊肉，假牛肉来贩卖，所谓“挂羊头却不卖羊肉”，这严重损害了消费者的切身利益和身体健康。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。

目前我国还没有对肉的种类进行鉴定的国家/行业标准方法。分子生物学—基因检测手段基于不同的物种具有其特异性的基

因序列，可以实现对品种的鉴定。目前基因检测主要有3种方式：普通PCR加电泳法、实时荧光PCR探针法和基因测序法。当检测一种未知肉时，实时荧光PCR探针法需要逐一加入不同肉品种对应探针来确定肉的品种，这样就导致操作繁琐，耗时长，且探针设计也很复杂。而基因测序方法则具有耗时更长、成本昂贵的缺点。因此，目前急需一种操作简单，成本低且快速准确地对肉种类掺假鉴定的方法。

## 2

## 岛津解决方案概述

### 2.1 肉的定性检测

岛津对于掺假肉的品种鉴定采用普通PCR加电泳法：首先对样品进行总DNA提取，利用岛津Ampdirect® Plus试剂盒对肉制品进行处理，无需精制DNA便可快速简便的进行PCR过程，利用精心设计的肉类的特异性引物进行PCR反应，扩增特异性片段DNA，使其含量增加以满足电泳的检测，最后用岛津微芯片电泳仪MultiNA检测PCR扩增产物片段长度，由于不同品种肉具有长度不同的PCR产物，从而实现鉴定。检测未知肉样品时，同时加入多种肉类的对应引物，根据MultiNA检测得到片段的长度，可一次性判断未知样品所含的肉种类，即进行多标签的检测。此方法操作简单，成本低，准确，效率高。

### 2.2 混合肉的定量检测

除了定性检测外，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，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。岛津应用MultiNA开发了混合肉定量检测方法，实验结果显示，混合肉中各肉的目标产物浓度和样品的质量呈大致的线性关系，表明此方法可以进行混合肉中各成分的定量测定。

## 3

## 实验结果和讨论

### 3.1 肉的定性检测

图1是5种单独肉样品（鸡，牛，羊，猪，马）及等量混合制成样品的鉴定结果。鸡肉的217 bp、牛肉的266 bp、羊肉的335 bp、猪肉的365 bp、马肉的445 bp碎片得到明确的分离。3种混合生肉的鉴别限如图2所示。即使是1%的混合样品也可检出，1次分析就可快速鉴别多种肉类。

图1 微芯片电泳MultiNA检测5种肉及其混合肉PCR扩增产物凝胶图以及电泳图

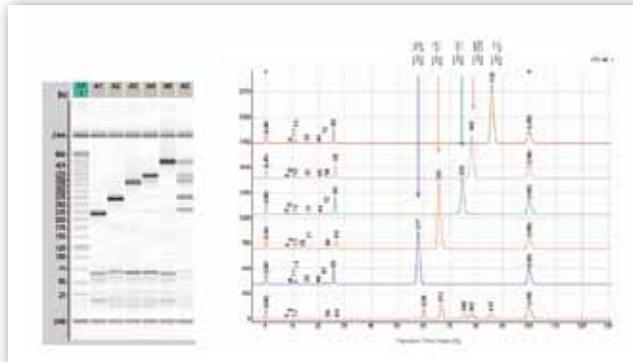
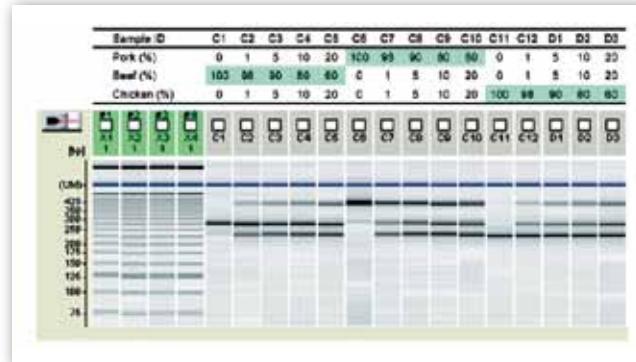


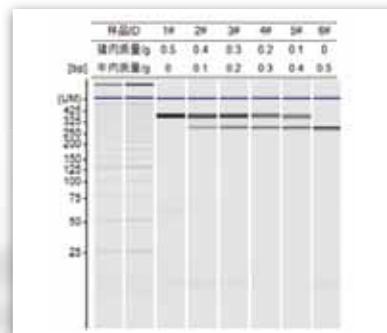
图2 改变混合比的3种肉类的微芯片电泳MultiNA分析结果



### 3.2 混合肉的定量检测

图3是微芯片电泳MultiNA检测不同组成猪肉、牛肉样品的凝胶图。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。

图3 MultiNA检测不同组成猪肉、牛肉的凝胶图



MultiNA

Microchip Electrophoresis System for DNA/RNA Analysis

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 )

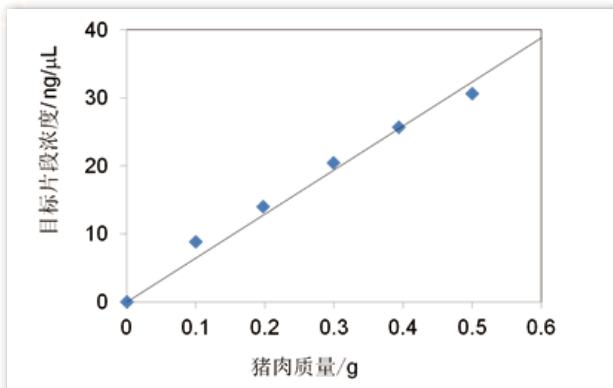


图5 不同含量的牛肉样品PCR扩增出的目标片段浓度对牛肉质量的标准曲线  
( 数据来自两个平行样品平均值 )

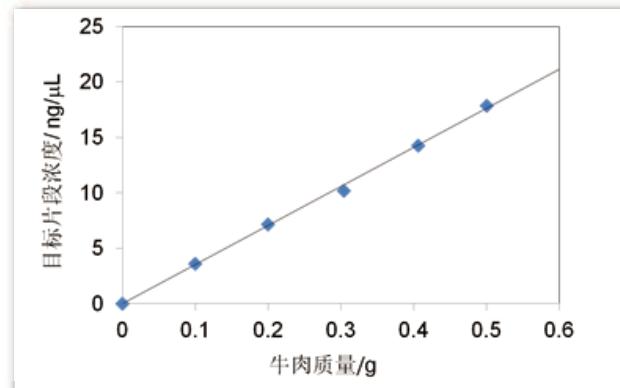


表1 校准曲线参数 ( 线性回归 )

名称	校准曲线	相关系数r
猪肉	$y=64.63x$	0.983

表2 校准曲线参数 ( 线性回归 )

名称	校准曲线	相关系数r2
牛肉	$y=35.19x$	0.998

## 4

### 实验方法

#### 4.1 肉的定性检测

##### 4.1.1 试剂及样品

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

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

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

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

Proteinase K粉末 100 mg ( Sigma ) P6556

Ampdirect® Plus ( For International ) ( WAKO Pure Chem ) 605-21411; ( Shimadzu corp. ) S241-08800-99

IMMOLASETM DNA Polymerase ( Bioline ) BIO-21046

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

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

1×TE Buffer

25 bp DNA Ladder ( Invitrogen ) 10597-011

样品：鸡肉，猪肉，牛肉，羊肉

引物：鸡肉，猪肉，牛肉，羊肉的引物设计如表1所示。

表3 鸡肉，猪肉，牛肉，羊肉的引物设计

引物名称	引物序列
通用反向引物	5' -GACCTCCCAGCCCCATCAAACATC-3'
鸡肉正向引物	5' -GATGAAGAAGAATGAGGCG-3'
牛肉正向引物	5' -GTGTAAGACCCGTAATATAAG-3'
羊肉正向引物	5' -GAATGCTGGCTATTGTCGCA-3'
猪肉正向引物	5' -GATATTTGTCCTCAGGGC-3'

#### 4.1.2 样品處理及PCR反应体系和条件

样品處理及PCR反应体系和条件如图1所示。

#### 4.1.3 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。

#### 4.2 混合肉的定量检测

##### 4.2.1 试剂及样品

试剂：同4.1.1中试剂。

样品：猪肉、牛肉及二者的混合肉，各样品组成及含量见表1。

猪肉、牛肉引物同4.1.1中引物。

##### 4.2.2 样品處理及PCR反应体系和条件

样品處理及PCR反应体系和条件同4.1.2。

##### 4.2.3 MultiNA检测

PCR扩增后，产物进入MultiNA进行测定。实验中选用500 bp的试剂盒进行测定。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。

图6 样品处理及PCR反应体系和条件

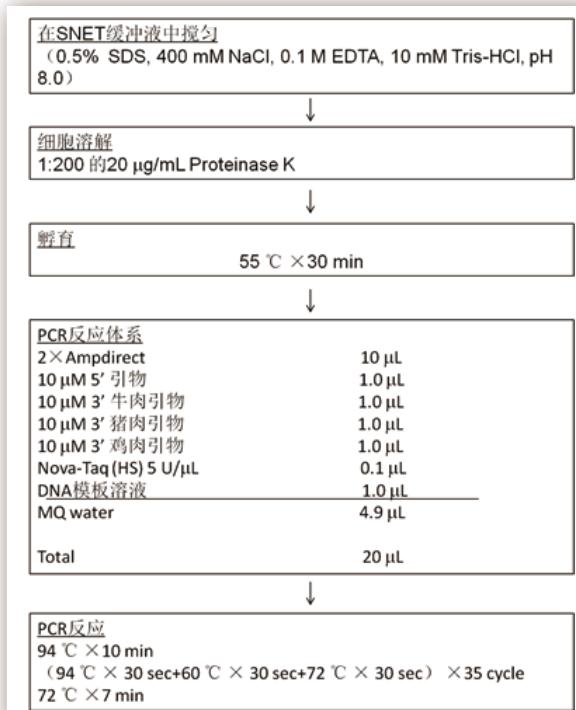


表3 样品组成及含量

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

## 5

### 成本核算

本解决方案的试剂成本核算如表4所示。

表4 成本核算

实验过程	试剂名称	生产公司和货号	0.5 g肉样品分析成本(元)
样品前处理及PCR过程	1 mol/L-Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 1 L	Nacalai Tesque 35435-11	0.17
	0.5 mol/L-EDTA溶液 (pH 8.0) 1 L	Nacalai Tesque 14347-21	0.13
	5 mol/L-NaCl溶液 1 L	Nacalai Tesque 31334-51	0.80
	10%—SDS溶液 100 mL	Nacalai Tesque 30562-51	1.49
	Proteinase K粉末 100 mg	Sigma P6556	12.08
	Ampdirect® Plus	WAKO Pure Chem 605-21411	6
	IMMOLASETM DNA Polymerase	Bioline BIO-21046	0.22
	合 计		20.89
微芯片电泳MultiNA分析	试剂名称	生产公司和货号	每个样品分析成本(元)
	DNA-500 Reagent Kit for MultiNA	( 岛津制作所 ) 292-27910-91	1.25
	SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain	( Invitrogen ) S-11494	0.004
	25 bp DNA Ladder	( Invitrogen ) 10597-011	0.03
	合 计		1.284

本成本核算仅供参考。

**MultiNA**

Microchip Electrophoresis System for DNA/RNA Analysis