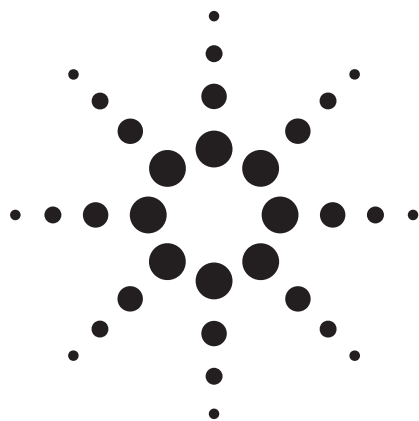




Agilent 2100 生物分析仪用于 Basmati 大米真实性测试应用

食品

作者

Steve Garrett and Marie-Anne Clarke
Molecular Biology Group
Dept. Chemistry & Biochemistry
Campden & Chorleywood Food Research Association
Chipping Campden
Gloucestershire
GL55 6LD
UK

摘要

如何确保食品原料，成分和产品的完整性（保真性）是产品质量和法规所关注的。如果产品信息被证明标记错误，食品供应商和制造商就可能遭受经济和法律制裁。例如，欧盟委员会 1549/04 法规降低了 9 种 basmati 水稻的进口税。安捷伦 2100 生物分析仪和 DNA 1000 分析系统为 basmati 大米产品真实性分析和评价大米产品中的非 basmati 大米的变化水平（含量）提供了另外一种快速、低成本的选择。

前言

食品原料，成分和产品的完整性必须得到确保，这样才能满足相应的质量和法规要求。如果被证明提供了由于采用替代品或者受污染而造成错误标记的原料或者成品，那么食品原料供应商，制造商和零售商都需要负法律责任。

近年来，食品领域中的一个焦点是印度和巴基斯坦出口到英国的 basmati 大米。在欧洲，欧盟委员会法规 1549/04 降低了以下九种 basmati 大米的进口税：Basmati 370, Dehradun (Type 3), Basmati 217, Taraori, Ranbir Basmati, Kernel, Basmati 386, Pusa Basmati, and Super Basmati。其它由印度，巴基斯坦和英国认可的 basmati 大米包括 Basmati 198, Basmati 385, Haryana Basmati, Kasturi, Mahi Suganda 和 Punjab Basmati。2006 年 1 月后由印度，巴基斯坦和英国工业和执法组织制定的条例规定已经开始影响产品的包装和标记，其中规定 Basmati 大米产品中的非 basmati 大米不得超过 7% (见 www.riceassociation.org.uk)。

为了检查 basmati 大米的供应，一种利用 PCR 方法扩增 8 种水稻微卫星序列来鉴别样品 DNA 种类的方法已经建立供英国各方遵从 (www.foodstandards.gov.uk/multimedia/pdfs/fsis4704basmati.pdf)。2003 年，英国食品标准局用该方法对 basmati 大米进行了监察行动，发现 74% 的 basmati 大米中含有大于 7% 的非 basmati 大米。

本文研究了用安捷伦 2100 生物分析仪配以三套引物来区分已被批准和未被批准的 basmati 大米，并用大米混合参照物估算了非 basmati 大米的含量。



Agilent Technologies

实验部分

实验方法

所有 basmati 大米参照品均来自英国食品标准局，通过威尔士大学 (Bangor, UK) 得到。其余 basmati 大米样本是内部收集获得。

使用 PE9600 或 PE2400 PCR 仪 (Applied Biosystems) 进行 PCR 扩增。

DNA 提取

使用 QIAGEN 公司的 DNeasy Plant Mini 试剂盒或 Promega 公司的 Maxwell 16 DNA 自动提取仪从米粉颗粒中提取。

PCR 反应

DNA 提取物用无菌蒸馏水 1:1 稀释成 DNA 模板。PCR 扩增体系为 25 µL: 1x Amplitaq Gold PCR 缓冲液 (Applied Biosystems), 各个引物均为 60 nM, 200 nM dNTPs, 3 mM MgCl₂, 0.05 U/µL 的 Ampli-Taq Gold (Applied Biosystems) 聚合酶和 2 µL DNA 模板。

标记	正向引物
RM201	CTC gTT TAT TAC CTA CAg TAC C
RM212	CCA CTT TCA gCT ACT ACC Ag
RM339	GTA ATC gAT gCT gTg ggA Ag
标记	反向引物
RM201	CTA CCT CCT TTC TAg ACC gAT A
RM212	CAC CCA TTT gTC TCT CAT TAT g
RM339	gAg TCA TgT gAT AgC CgA TAT g

PCR 扩增条件（95 °C 变性 15 分钟；95 °C 1 分钟，60 °C 扩增 1 分钟，进行 50 个循环，循环完成后 72 °C 延伸 10 分钟）。扩增产物通过 Agilent 2100 生物分析仪分离确认。

2100 生物分析仪中的毛细管凝胶电泳

试剂根据产品说明配制。约 500 µL 的凝胶基质（充入 LabChip 的毛细管）根据需要配制或 4 周配制一

表 1. 使用三套微卫星引物分析已经认可的 Basmati 水稻

大米品种		使用引物对得到的微卫星扩增产物大小列表*		
	RM201	RM212	RM339	
法规 1549/04 认可的品种				
Basmati 370	162 (162)	134 (139)	200 (193)	
Dehra Dun (Type 3)	162	134 (139)	200 (195)	
Basmati 217	162	134	200	
Ranbir	162	134	200	
Taraori	162	134 (139)	200 (195)	
Basmati 386	162	134 (138)	200 (195)	
Kernel	162	134	200	
Pusa	162	134 (139)	200 (194)	
Super	162	134 (140)	204 (196)	
英国食品标准局认可的其他品种				
Basmati 198	162	152	200	
Basmati 385	162	152	200	
Kasturi	162	132	166	
Haryana Basmati	162	152	166	
Mahi Sugandha	176	152	166	
Punjab Basmati	162	152	200	
不认可的品种				
Basmati 2000	162	152	204	
Shaheen Basmati	162	152	200	
Sherbati	178 (176)	130 (135)	166 (167)	
Mugad Sugandha	178	132	166	
Pak 386	178	130 (135)	166 (167)	
Superfine	178	132	166	
Pusa Sugandha	162	132	178	
Yamini	162	134	200	

*这来自于 Wales 大学 (Bangor) 开发的 FSA 方法。用 DNA 500 芯片试剂盒在生物分析仪上测定的 DNA 片段的实际大小显示在括号内。生物分析仪测定 DNA 片段的误差约为 5%。阴影部分显示生物分析仪通过三套引物如何对品种进行分类

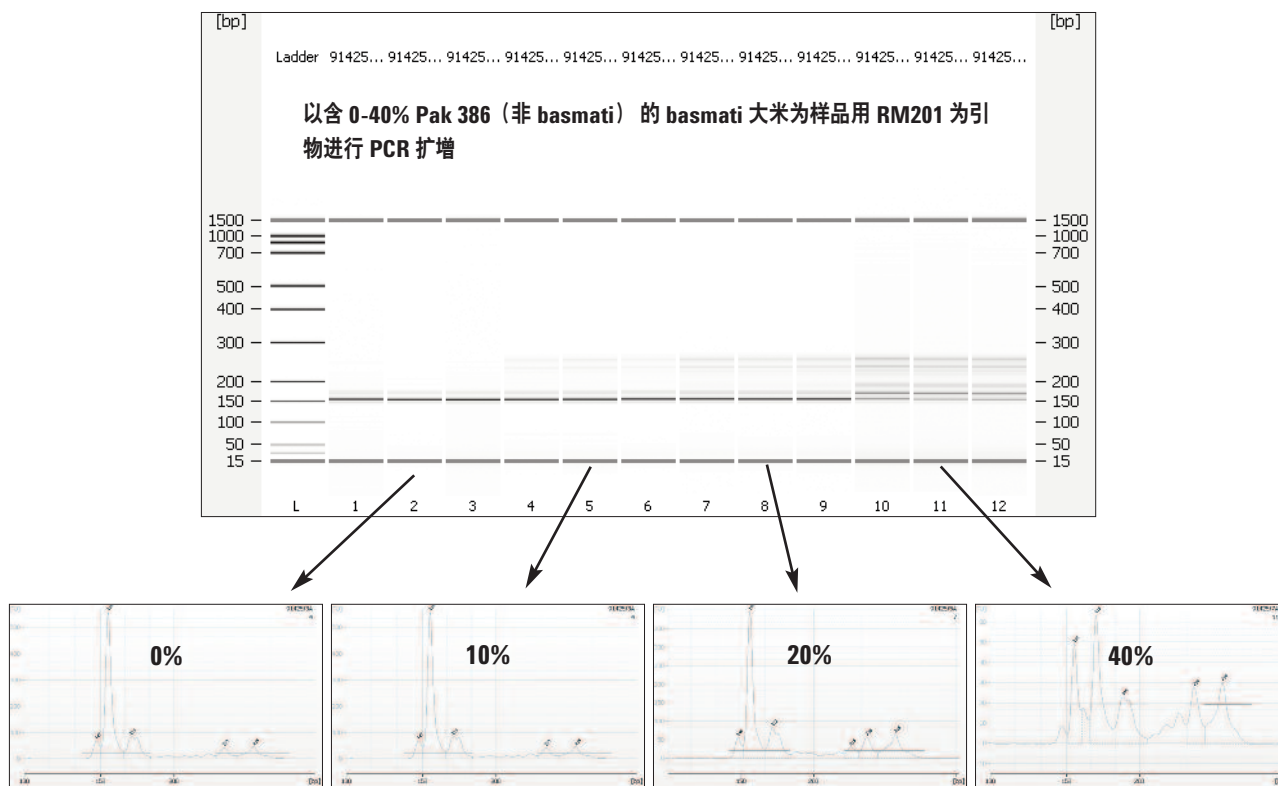
次。所有试剂 4 °C 保存，使用前室温放置 1 小时。PCR 产物 (1 μL) 直接上样到准备好的 DNA 500/ DNA 1000 系列 I 或 DNA 1000 系列 II 芯片上。所有样品根据使用说明在 2100 生物分析仪上分析。

结果与讨论

用三套引物对不同品种扩增的不同大小的 PCR 产物，可在生物分析仪上用 DNA 500 和 DNA 1000 芯片分析。RM212 引物对能产生委员会法规 1549/04 中所

列品种的 139 bp 片段和 FSA 认可的大米品种的 154 bp 片段，从而将 Kasturi 大米和一些非 basmati 大米区分开。其它引物能将他们与 Yamini 大米区分开来，Yamini 大米采用这三种引物进行扩增时可产生与 EC-认证大米品种相似大小的片段。用标准方法很难将 Yamini 大米与认证大米区别。用微卫星引物扩增可将其它 FSA 认证的 basmati 大米与 EC 认证的大米区分开来，但不能与 basmati 386 和 basmati 2000 区分。用微卫星进一步进行 PCR 扩增，扩增产物用生物分析仪分离可提高区分非 basmati 大米的能力。

a) 引物 RM201



b) 引物 RM339

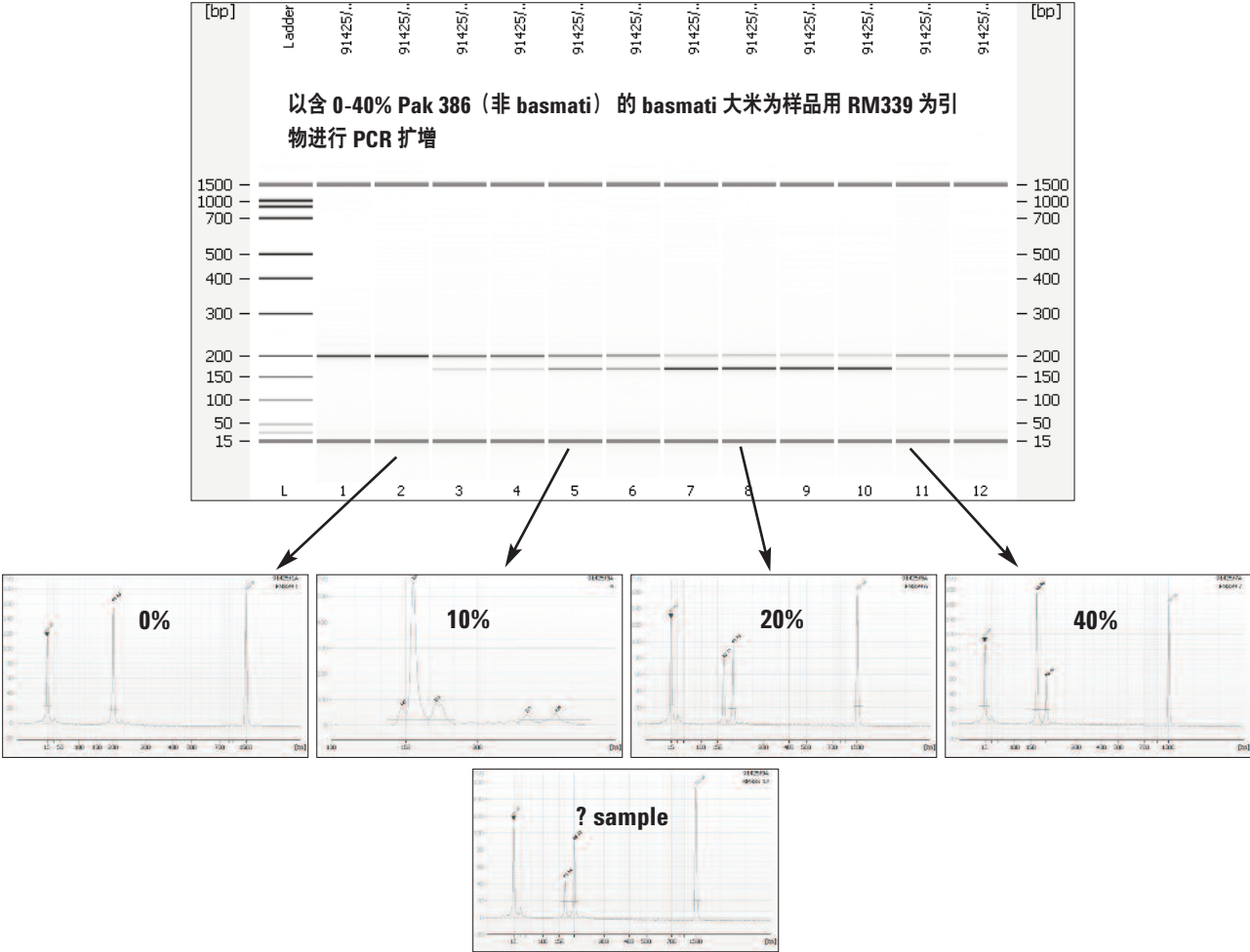


图 1. 用两个微卫星引物分析非 basmati 大米和 basmati 大米混合物。测定未知样品中非 basmati 大米 (Pak386) 的百分含量

表 2. 实验总结

basmati 大米中 的 % Pak 386	引物 RM201 PCR 产物中 156 bp/170 bp (n = 3) 的平均比值	引物 RM339 PCR 产物中 199 bp/169 bp (n = 2) 的平均比值
0	9.6	0
10	3.5	3.1
20	2.7	1.1
40	0.6	0.4
50	0.7	0.3
未知样中含 10–20% Pak 386	3.1	2.1

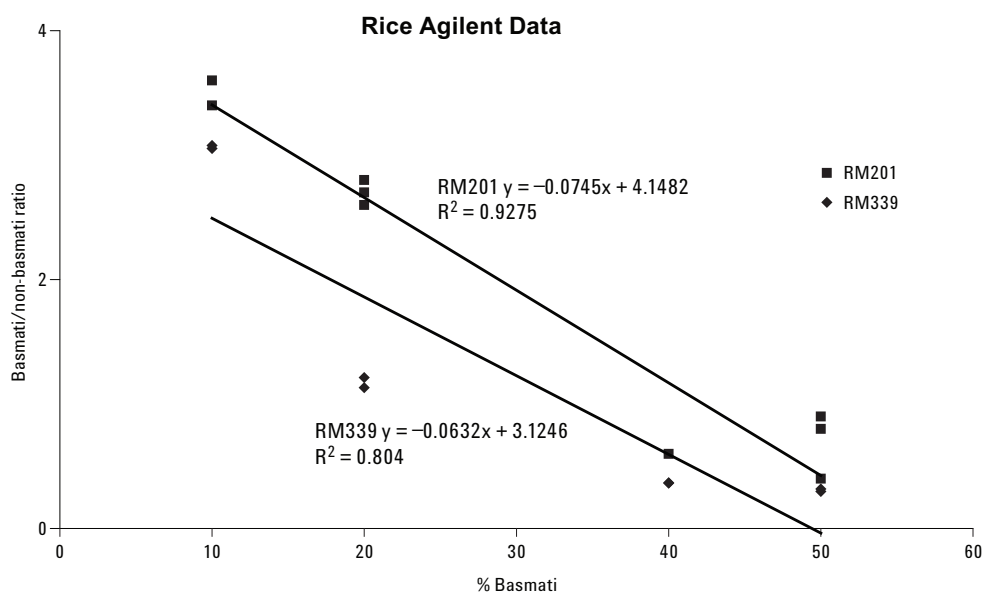


图 2. 以 PCR 产物中 Basmati/non-basmati 比值为纵坐标，% Basmati 为横坐标的标准曲线

用 RM201 引物和 RM339 引物（图 1 和表 2）扩增的产物可进行 PAK 386 basmati 混合物的分离和检测。RM201 引物可从 basmati 大米扩增 170 bp 片段以及从 Pak 386 大米扩增出 156 bp 片段，而 RM339 引物可扩增出 199 bp 和 169 bp 片段。RM281 也可产生其它较大片段的 PCR 产物，这可能是因为在混合物中存在 Pak 386。以 PCR 产物中 Basmati/non-basmati 比值为纵坐标，% Basmati 为横坐标得到的标准曲线如图 2 所示。对未知样进行分析测定，结果表明 basmati 大米中估计含 10-20% 的非 basmati 大米。

结果表明生物分析仪能够用来评估 basmati 大米中非 basmati 大米 (Pak 386) 的水平，这种大米能够产生大小不同于 Pak 386 的微卫星 PCR 产物。

结论

安捷伦 2100 生物分析仪可以作为 basmati 大米产品真实性分析和样品中非 basmati 大米含量测定的快速

和高效另一种选择。有可能通过进一步设计引物，使该生物分析用于识别单个品种。简单的操作方法和自动 DNA 提取加上随后的快速 PCR 分析，用生物分析仪可对印度和巴基斯坦出口的大米进行快速筛选，也可让强制机关对进口产品中未认可的 basmati 大米的微卫星标记进行有效检验。

致谢

特别感谢英国食品标准局的 Mark Woolfe, Wales 大学 (Bangor) 的 John Gorham 和 Katherine Steele 在引物细节和认证的 basmati 大米样品方面提供帮助。

更多信息

欲了解更多有关我们产品和服务信息，请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。

安捷伦对本资料中出现的错误，以及由于提供或使用本资料所造成的相关损失不承担责任。

本资料中涉及的信息、说明和指标，如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技公司, 2007

中国印刷
2007 年 6 月 4 日
5989-6836CHCN



Agilent Technologies