

# 用 Agilent 2100 芯片生物分析系统测定鱼类的 PCR-RFLP 图谱

应用

食品安全

## 作者

Steve Garrett and John Dooley  
Molecular Biology Group, Dept. of Chemistry and Biochemistry  
Campden & Chorleywood Food Research Association, Chipping  
Campden  
Gloucestershire, GL55 6LD  
UK

## 摘要

本应用报告介绍了安捷伦 2100 芯片生物分析系统在聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析鉴定鱼类中的应用。先对所有脊椎鱼类中存在的 464bp 细胞色素 b 目标序列进行扩增，然后用限制酶水解。在 DNA 500 LabChip® 上对这些片段进行分离，由于准确测定了片段大小，所以能与权威性的种类图谱进行直接比较。与经典的凝胶电泳和 DNA 染色技术进行 PCR-RFLP 片段分析相比，使用芯片生物分析系统具有明显的优势。

## 前言

近年来提供给消费者的鱼产品差别越来越大。从优质的鱼肉到廉价的鱼尾。鱼产品要经过捕获、加工到分销至全球各地的过程，需要确定产品所用鱼类的真实

性和种系。因此，需要一种可靠而简便的种类鉴定方法，以支持标签法的强制性规范（欧盟理事会规则第 104/2000 和 EC 委员会规则第 2065/2001）。

形态学鉴定法是适合整条鱼的种系鉴定方法，但是，一旦进行了加工，鱼种鉴定将变得很困难。蛋白图谱也可以用来进行鱼类鉴定，但这种方法需要和样品一起分析种类参考物质，由于加工过的食品中蛋白质已经变性，分析时可靠性较低。基于 DNA 的方法为鱼类鉴定提供了另一种途径，因为即使对于深度加工的样品，其 DNA 还是可以检测的。

直接测序是最权威的鉴定方法，但是对于怀疑或已知其含有一个以上种类的样品，这种方法操作起来并不容易。因此，发展了其他的技术，用聚合酶链反应 (PCR)，以 DNA 指纹图谱为基础对鱼类进行鉴定。这些方法包括 RAPD（随机扩增多态性 DNA）、SSCP（单链构象多态性）和 PCR-RFLP。

曾有报导 PCR-RFLP 技术用于鲑鱼的鉴定 [1, 2]，包括用限制酶对扩增的细胞色素 b 464bp 进行裂解，产生 DNA 图谱。



Agilent Technologies

本研究的目的是用安捷伦 2100 芯片生物分析系统代替经典的凝胶电泳和染色步骤,对鲑鱼和其它鱼类的鉴定方法进行改进。在 2100 芯片生物分析系统上得到的种类特异性 PCR-RFLP 图谱,以及对各 DNA 片段按大小精确排列和定量,与凝胶电泳方法相比,具有简便、快速、鉴定精确等明显优势。

## 材料与方 法

本研究所用的化学试剂除特别注明外均来自 Sigma-Aldrich 公司,分子生物学级或相当等级。PCR 引物由 MWG-Biotech UK 公司提供。PCR-RFLP 图谱用 DNA500 LabChip 和安捷伦 2100 芯片生物分析仪获得。所有 PCR 反应中所用的 AmpliTaq® Gold DNA 聚合酶来自应用生物系统公司。限制酶来自新英格兰 Biolabs,按厂商说明使用。

## 鱼类样品

具有重要商业价值的鲑鱼和牙鱼样品来自英国、加拿大、阿拉斯加、新西兰、日本的相应水产研究实验室。采用 5 个样品以减少种群中多态性变异的影响。每种鱼的其它样品来自英国当地鱼商和零售店。

## DNA 提取

用改良的 CTAB 方法进行 DNA 提取。将样品 (2 g 湿重) 悬浮于 5 mL CTAB 缓冲液 (2% CTAB, 溴化十六烷基三甲铵, 100 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, pH 8.0) 中,并加入 40  $\mu$ L 蛋白酶 K 溶液 (20 mg/mL)。样品彻底混合,然后 60  $^{\circ}$ C 保温过夜。保温后,将 1 mL 悬液转移至 2.0 mL Eppendorf 管中,冷却至室温 (RT),并于 13000g 离心 10 分钟。取上清液,加入等体积的氯仿。溶液涡旋混合,并于 16000g 离心 15 分钟,然后将上面的水层转移到一个干净的 1.5 mL Eppendorf 管中。加入等体积的异丙醇,使 DNA 在室温下沉淀 30 分钟。16000g 离心 15 分钟使 DNA 聚集,用 70% 乙醇清洗,并在室温下空气干燥 30 分钟。将 DNA 沉积物再悬浮在 100  $\mu$ L SDW [Define] 中,用 Promega 的 Wizard® 纯化树脂按厂家

说明进行纯化。DNA 提取物复溶于 50  $\mu$ L 1 $\times$ TE 缓冲液中 (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1-mM EDTA, pH 8.0)。DNA 的最终浓度 (ng/ $\mu$ L) 用 GeneQuant pro DNA 计算器 (Pharmacia) 测定。

## DNA 扩增

在含 1xAmpliTaq Gold PCR 缓冲液 (应用生物系统公司) 的 20  $\mu$ L 反应溶液中对 DNA 提取物 (50 ng) 进行扩增,设种引物 300 nM (L14735: 5'-AAA AAC CAC CGT TGT TAT TCA ACT A-3' 和 H15149: 5'-GCI CCT CAR AAT GAY ATT TGT CCT CA-3')、200 nM dNTP、5 mM MgCl<sub>2</sub> 和 0.05 U/ $\mu$ L 的 AmpliTaq Gold 酶 (应用生物系统公司),得到 PCR 产物 (来自细胞色素 b 基因的 464bp)。扩增使用 PE9600 仪 (应用生物系统),扩增程序为 94  $^{\circ}$ C 5 分钟 (变性);再按 94  $^{\circ}$ C 40 秒,50  $^{\circ}$ C 80 秒,72  $^{\circ}$ C 80 秒 (扩增) 循环 40 次;72  $^{\circ}$ C 7 秒 (最后延伸)。将未纯化的 PCR 产物 (1  $\mu$ L) 用 2100 芯片生物分析仪进行扩增确认。

## PCR-RFLP 图谱

未经纯化的 PCR 产物 (2.5  $\mu$ L) 用 2 到 5 种酶裂解 3 小时以上 (总体积为 5  $\mu$ L)。65  $^{\circ}$ C 保温 10 分钟终止反应。裂解后的 PCR 产物 (5  $\mu$ L) 在置于 DNA500 LabChip 之前,与 5  $\mu$ L 20 mM EDTA 混合,最终浓度为 10 mM EDTA。按照厂商说明,用 1  $\mu$ L 反应混合物在 2100 芯片生物分析仪上进行分析。

## 结果

### 用 2100 芯片生物分析仪上得到的 PCR-RFLP 图谱进行鱼类鉴定

用鲑鱼对 PCR-RFLP 方法进行了初步评价。

扩增后的 DNA 片段用限制酶裂解后,在 2100 芯片生物分析仪上分离得到种类特异性 PCR-RFLP 图谱。PCR-RFLP 图谱的实例见图 1,这里显示的是鲑鱼和鳟鱼样品用 DdeI 和 HaeIII 酶裂解得到的 PCR-RFLP 图谱。

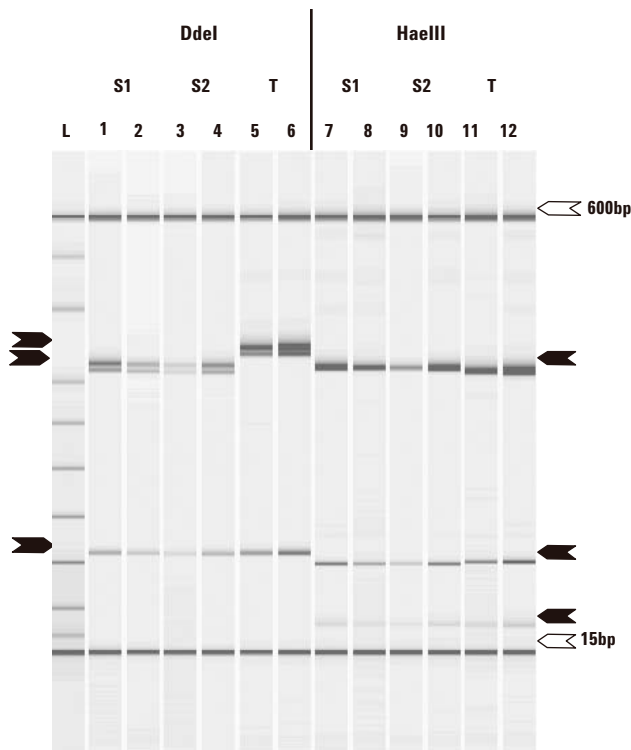


图 1. 鲑鱼和鳟鱼样品用 DdeI 和 HaeIII 酶裂解得到的 PCR-RFLP 图谱。两个鲑鱼 (S1、S2) 和一个鳟鱼 (T) 样品的 DNA 扩增后, 用 DdeI (1-6 道) 或 HaeIII (7-12 道) 酶解, 得到 PCR-RFLP 谱。显示 15-600bp 的分子量标准排列 (L)。每孔中都含有 15bp 和 600bp 的标志物。DNA 片段已注明 (箭头)。

表 1 可见五种酶和四种鲑科鱼类的实测与理论片段。由此可见, 图谱与以前的报道基本一致 [1, 2]。

大于 25bp 的理论 DNA 片段很容易检测, 但是, 一些更小的片段没有检测出来, 因为他们无法与更小的 15bp 标志物分开, 或超出了 LabChip 的检测范围 (25bp-500bp)。某些裂解物中的小 DNA 片段 (25bp-100bp) 以前未见报道 [2]。说明, 这种方法与凝胶电泳法相比谱带的分辨率有所改善。用 DdeI 得到的图谱也显示了这种分辨率的提高, 因为所有四种鱼类都有一个 9bp 的额外片段, 比理论的大片段要小。这是由引物 H15149 产生的另外 DdeI 位点所致。

表 1 显示用 NlaIII 得到的 *O. gorbuscha* 和 *O. mykiss* 图谱只有两个片段, 而理论预测有三个。这是由于两个较大的片段发生了共迁移。对 *O. mykiss* 464bp 扩增产物的序列分析表明, 用 NlaIII 裂解扩增产物应产生 192bp、180bp 和 91bp 三个片段。这些片段分别相当于 Russell 等 (2000) 报导的 210bp、190bp 和 100bp 片段 (见表 1)。从序列数据中可见, 没有证据表明

表 1. 用五种限制酶和四种鲑鱼得到的理论与实际 PCR-RFLP 片段

鱼类	每种酶的理论* (E) 与实测 (O) 片段 (bp)					
		DdeI**	Bsp1286I	HaeIII	NlaIII	Sau3AI
<i>O. nerka</i> (红鲑鱼)	E	360, 130	300, 200	350, 130	310, 180	390, 120
	O	353, 346, 114	289, 172	320, 102, 35 或 421	272, 160	340, 115
<i>O. gorbuscha</i> (粉红鲑鱼)	E	360, 130	U/C***	U/C	210, 190, 100	390, 120
	O	349, 343, 112	464	421	181, 92	338, 115
<i>S. salar</i> (大西洋鲑鱼)	E	350, 130	300, 200	350, 130	U/C	410, 110
	O	321, 312, 110	287, 172	318, 98, 35	438	370, 88
<i>O. mykiss</i> (彩虹鳟鱼)	E	360, 130	300, 200	350, 130	210, 190, 100	U/C
	O	348, 339, 111	279, 174	313, 100, 33	185, 92	451

\*片段大小由 Russell 等报道 (2000)。

\*\* DdeI 图谱中测得的另外片段是由引物 H15149 引入的限制位点所致。

\*\*\*U/C 用酶没有切开。

较小的 180bp 片段包含较高比例的 A 或 G 较重碱基，或较大的 192bp 片段包含较高比例的 C 或 T 较轻碱基，这些因素都可能使对应的分子量集中。计算出的两个片段间分子量差（3277 道尔顿）与碱基数之差相当。由于两个片段的分子量相似，不容易发生共迁移。经常发生两个片段共迁移为一个片段的情况，对种类的鉴定不会造成影响。

总之，用 2100 芯片生物分析仪得到的图谱与预测或以前的报导符合 [1, 2]，从而支持了这种方法可以用于鱼类鉴定的观点。用大西洋鲑鱼和鳟鱼，以及更少量的酶，对这方面的应用做了进一步验证。

### 实验重复性

为了测定整个方法的实验重复性（芯片实验室之间的变异性），用两个鲑鱼和一个鳟鱼样品重复进行 PCR。扩增片段 DdeI 裂解，裂解产物用前保存在 4 °C。用四种条件进行 PCR-RFLP 图谱的分离，不同的 DNA500 LabChip，灌入两批不同的凝胶基质 A 和 B。用新配制的凝胶基质（基质 A）运行两个 LabChip，凝胶基质 A 放置一周后运行第三个 LabChip。第四个 LabChip 和第三个 LabChip 同一天运行，但使用的是

第二批新配制的凝胶基质（基质 B）。表 2 列出了总的变异性（包括不同芯片实验室、PCR 和凝胶基质所产生的差异），在表 2 中显示了四个 LabChip 对 DdeI 酶裂解产物的分析结果。结果显示的是每种鱼类两次重复 PCR 在各 LabChip 上测得的平均片段大小。一个 LabChip 上绝对片段大小差异，即，同一个样品或两个鲑鱼样品之间重复 PCR，小于 2bp，而且只在较大片段 (>300bp) 之间才能测出这种差异。每个片段的绝对大小差异，包括不同 LabChip、PCR 反应和凝胶基质产生的差异，稍大一些；鲑鱼 320bp 片段的差异最大，为 6bp（321bp 到 327bp）。

### 鱼类的鉴定

用从 10 种不同牙鱼类得到的序列数据，从一定范围限制酶得到理论 PCR-RFLP 图谱。对这些理论图谱进一步检查表明，只有三种酶能用于区分所有牙鱼。得到实验图谱，证明用这三种酶可以进行鱼种类鉴定。分析结果见图 2，显示，只用一种酶能通过图谱鉴定 10 种鱼中的 9 种。另外两种要用其它两种酶进行区分。

表 2. 在四种不同 DNA500 LabChip 上分离用 DdeI 裂解的 DNA 所得 PCR-RFLP 片段

预测的条带大小 (bp)	在各 LabChip 测得的片段大小 (bp)				平均	%RSD
	LabChip 1 (新配基质 A)	LabChip 2 (新配基质 A)	LabChip 3 (新配一周基质 A)	LabChip 4 (新配基质 B)		
鲑鱼分析*						
117	111	111	110	111	111	0.34
312	314	316	314	317	315	0.43
320	323	325	323	326	324	0.51
鳟鱼分析						
116	111	111	110	111	111	0.45
339	338	341	338	343	340	0.72
348	347	349	347	352	349	0.61

\*2100 芯片生物分析仪没有检出鲑鱼的预计 27bp 片段。

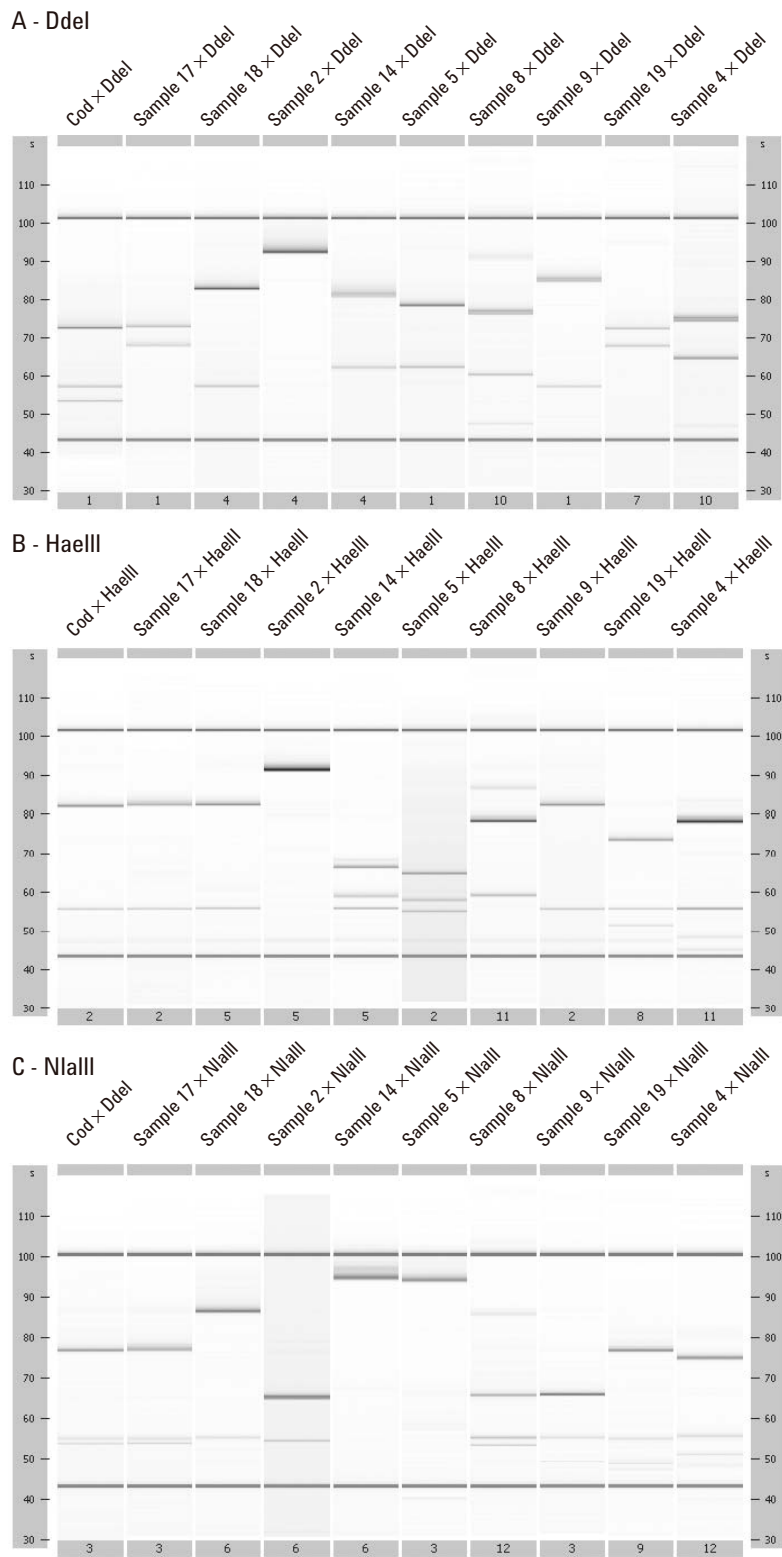


图 2. 本研究所用 10 种牙鱼的 PCR-RFLP 图谱。图谱分别用 Ddel (A)、HaeIII (B)、NlaIII (C) 裂解得到。各样品的数字代表不同的鱼类。

只用这三种酶对九种鲑鱼进行了进一步分析（数据未列出）。再次表明，鲑鱼科鱼类可以用这三种酶进行区分。所有样品的资料列于表 3。

**表 3. 用 Dde I、Hae III 和 NlaIII 这三种酶所 PCR-RFLP 能够区分的鱼类**

通用名 (UK)	拉丁名
大西洋真鳕	<i>Gadus morhua</i>
真鳕	<i>Gadus macrocephalus</i>
绿青鳕	<i>Pollachius virens</i>
大西洋黑线鳕	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>
欧洲鳕鱼	<i>Merluccius merluccius</i>
南非鳕鱼	<i>Merluccius paradoxus</i>
欧洲蝶	<i>Pleuronectes platessa</i>
牙鱼	<i>Merlangus merlangus</i>
阿拉斯加白斑鳕鱼	<i>Theragra chalcogramma</i>
新西兰无须鳕	<i>Macruronus novaezelandiae</i>
大西洋鲑鱼	<i>Salmo salar</i>
红/大马哈鱼	<i>Oncorhynchus nerka</i>
粉/驼背鲑	<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>
帝王鲑	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>
银鲑	<i>Oncorhynchus kisutch</i>
马哈鱼	<i>Oncorhynchus keta</i>
割喉鲑	<i>Oncorhynchus clarki clarki</i>
红点鲑	<i>Salvelinus malma malma</i>
樱桃鲑	<i>Oncorhynchus masou masou</i>

## 讨论

要鉴定事先不了解的样品中的鱼类时，需要有一种通用的方法。所有鱼类都有脊椎动物细胞色素 b 基因，用这一常见区域的 PCR-RFLP 图谱与数据库中的图谱进行比较，是一种通用的方法。

常规的 PCR-RFLP 片段分析包括在大 (30 cm<sup>2</sup>) 而薄 (<2 mm) 的聚丙烯酰胺凝胶上进行凝胶电泳，以分离 PCR-RFLP 图谱。这种方法操作和染色非常困难，而且要使用大型设备和大量溶液。所有这些使这种方法具有一定的危险性，而且很费时间，有时结果的变异性也较大。因此，这种检测方法不适用于要求检测方法快速、耐用的执行与质量控制实验室。

作为另一种选择，2100 芯片生物分析仪将常规毛细管电泳技术与操作简便的芯片形式相结合，可以对各 DNA 片段大小进行精确测定和定量。再结合一块小小的 LabChip, (2 cm<sup>2</sup>), 使这种系统与经典的凝胶分析法相比，在操作的简便性、速度和安全性方面具有明显的优势。从而使 2100 芯片生物分析系统特别适合多个 DNA 小片段的分析，例如 PCR-RFLP 图谱的分析。

用 2100 芯片生物分析系统得到了以前报导过的鲑鱼类 PCR-RFLP 图谱。但 2100 芯片生物分析仪上得到的图谱在片段分辨率和检测方面都有了改进，特别是那些用经典凝胶电泳检测不到的较小片段。与凝胶电泳相比，在 2100 芯片生物分析仪上得到的图谱均一性更好。

用 DdeI、HaeIII 和 NlaIII 三种酶得到的图谱对 19 种商业上重要的鱼类鉴定。下一步将继续增加数据库中鱼类的种类，使其成为研究鱼产品真伪的重要工具。

本方法研究的所有细节，对鱼产品鉴定的应用，以及实验室间研究已于近期发表 [3, 4, 5]。

## 致谢

本工作是英国食品标准局项目 Q01069 中的一部分，作者希望感谢 FSA 对项目的经费支持。

## 参考文献

1. G. L. Hold, V. J. Russell, S. E. Pryde, H. Rehbein, J. Quinteiro, M. Rey-Mendez, *et al.*, (2001), Validation of a PCR-RFLP based method for the identification of salmon species in food products. *European Food Research and Technology*, **212**, 385–389.
2. V. J. Russell, G. L. Hold, S. E. Pryde, H. Rehbein, J. Quinteiro, M. Rey-Mendez, *et al.*, (2000). Use of restriction fragment length polymorphism to distinguish between salmon species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48** (6), 2184–2188.
3. J. J. Dooley, H. D. Sage, H. M. Brown, and S. D. Garrett, Improved fish species identification by use of lab-on-a-chip technology. (2005) *Food Control* **16** (7), 601–607.
4. J. J. Dooley, M. A. Clark, H. D. Sage, H. M. Brown, and S. D. Garrett, (2005). Fish species identification using PCR-RFLP analysis and lab-on-a-chip capillary electrophoresis: application to detect white fish species in food products and an Inter-laboratory study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53** (9), 3348–3357.
5. J. J. Dooley, M. A. Clark, H. D. Sage, H. M. Brown, and S. D. Garrett, (2004) Application of a chip-based capillary electrophoresis system to enable simple PCR-RFLP identification of fish species. FSA Final Report, Q01069

## 如需了解更多信息

如需了解有关我们产品和服务的更多信息，请访问我们的网站 [www.agilent.com/chem/cn](http://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有关损失不承担责任。

本资料中所涉及的信息、说明和指标，如有变更，恕不另行通知。

AmpliQ<sup>®</sup> 是 Roche Molecular Systems 公司的美国注册商标。

LabChip<sup>®</sup> 是 Caliper Technologies 公司的美国注册商标。

Wizard<sup>®</sup> 是 Promega 公司的美国注册商标。

© 安捷伦科技公司，2005

中国印刷

2005 年 5 月 13 日

5989-2982CHCN

