

全自动动物源性鉴定系统



背景介绍:

近年来，食品安全问题频发，食品的卫生与安全逐渐成为人们关注的焦点。我们直击国内的“老鼠肉、狐狸肉、水貂肉冒充羊肉”事件、“清真招牌下的猪肉冒充羊肉”、“羊肉卷添加猪肉鸭肉”事件和席卷多国的“马肉风波”以及普遍存在的香肠掺杂掺假等现象.....这些与价格、原料和宗教有关的种种事件，威胁到人们的日常生活和宗教信仰。由此看来，食品安全问题不可小觑，特别是对肉类的鉴别，这需要我们能够有可靠且可行的方法进行检测。现阶段肉类检测方法众多，包括传统方法与现代方法，经典方法与新兴方法。

鉴别肉类的传统方法主要包括视觉、嗅觉、触觉、味觉等。视觉鉴别指通过对动物肉的酮体、肌肉纹理和颜色、脂肪等直接观察判断；嗅觉鉴别指对肉品的气味判断鉴别；触觉鉴别指按压生肉品，感知肉品的脂肪、肌肉的硬度和弹性来判别；味觉鉴别是通过对肉品经加工后的味道来判别。仅仅的感官判别远不能够鉴别肉类的真假，可作为辅助手段应用。

现有技术在 DNA 水平鉴定动物品种的方法主要是基于直接 PCR 或实时 PCR 测定。少数研究者使用 Sanger 测序来直接鉴定动物品种。这些方法都是单一位点（最多 3 重 PCR）的检测，一来无法知道一份样品中除了靶点之外有无其它 DNA（使商家较容易进行掺假而不被发现），二来对于一些未知动物制品的检测无从下手，只能一个一个试，还不能保证检测的完整性。

多重连接探针扩增（multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA）技术于 2002 年由 Schouten 等首先报道，是近几年发展起来的一种针对待检 DNA 序列进行定性和半定量分析的新技术。该技术可以在一次反应中检测多个基因。但之前 MLPA 大多检测人（单一物种）的多个基因，无需考虑检测基因在其它物种的干扰。还没有将该技术用于同时检测多个动物物种的基因。

因此，本领域还需要能够灵敏快速并且方便地同时检测产品中多个动物的基因从而鉴定一个或多个动物物种的方法，以防止商业欺诈并且保护消费者权益。

案例分析:

吃黄焖鸡吃出疑似老鼠头:

2016年12月10日中午，河南开封的丁先生通过美团外卖定了一份黄焖鸡米饭，拿到米饭饭后，吃着吃着，突然觉得有点不对劲。丁先生说：“当时我玩着手机吃着饭，突然感觉到一块特别小的肉，吃在嘴里嚼不动，还有毛发之类的东西，吐出来一看，还有两颗白色的牙齿。”“我第一反应是兔子，但是百度了兔子的构造后，发现不是这种形状，再查询后发现像是老鼠的构造。”



12月14日下午，据河南省产品质量监督检验院检测报告显示，近日丁某举报黄焖鸡米饭吃出“老鼠头”，根据鸡源性成分（SB/T10923-2012）检测确认送检物为鸡肉。河南省产品质量监督检验院于12月14日下午出具了检测报告，检测结果：根据鸡源性成分（SB/T10923-2012）检测确认送检物为鸡肉。



朱明 [广东省深圳市网友]

2016年12月16日 17:44

这个样品是那个吃出有问题的人送过去的，问题是食品药品监督管理局对丁某提供的黄焖鸡进行送检。15日，该局发布检测结果：确认送检物为鸡肉，但是监督检验院说只是检测出样品中含有鸡肉成分...问题来了，为什么不检测一下是否含有老鼠肉成分，或其他成分？

回复 54 (印)

客户需求：多重检测是客户需求

羊肉掺假种类多：猪肉、牛肉、鸡肉、鸭肉、鼠肉、马肉、狗肉、猫肉...

肉制品不明肉类：丸子、香肠、罐头

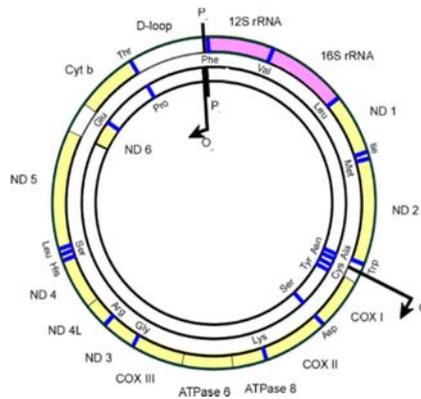
解决方案:

1. 物种选择:

选择了 23 个候选物种，包括：猪、黄牛、水牛、绵羊、山羊、鸡、鸭、猫、狗、大鼠、小鼠、火鸡、鹿、鸽子、骆驼、鸵鸟、兔子、鹅、马、驴、鹌鹑、狐狸、水貂；

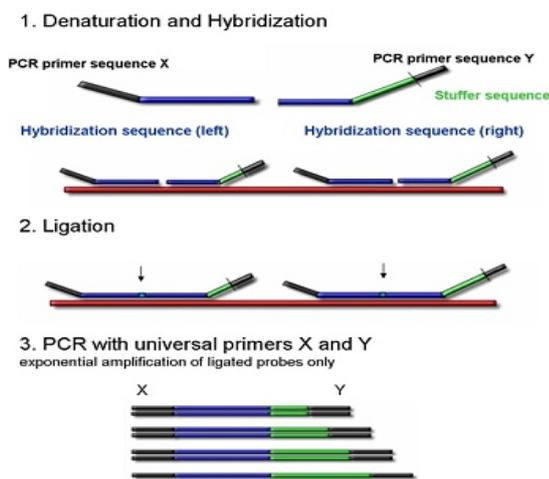
2. 线粒体基因:

线粒体普遍存在于动物细胞当中，相对于基因组，**线粒体基因拷贝数高，易于检出**，并且线粒体的保守区段可以**最大程度的保证探针不受个体变异和品种差异的影响**。如图所示，线粒体编码区编码着大约 37 个基因：



3. 关键技术：**多重连接依赖式探针扩增技术 (Multiplex Ligation dependent Probe Amplification, MLPA)**

MLPA(Multiples ligation-dependent probe amplification)，多重连接依赖探针扩增，是一种在同一反应管内检测多达 50 个核苷酸序列的拷贝数变化的方法。MLPA 可以快速同时鉴定几十个基因的缺失和插入，可用于血液，肿瘤样本的 DNA，mRNA 的表达谱分析。而且，MLPA 方法可用于甲基化分析。MLPA 已经证实是可信而可靠的方法，目前已广泛应用于全世界 900 多个实验室，使用该技术发表的论文已近千篇。



4. 检测平台: SeqStudio 基因分析平台



Applied Biosystems™基因分析仪以可靠性和值得信赖的结果为立足点。作为 Applied Biosystems™毛细管电泳(CE)基因分析仪产品系列的最新成员，SeqStudio 基因分析仪同样基于这一理念，但同时又追求易用、易维护，易于存取和便于分享数据。其先进特性在于将 Sanger 测序和片段分析的可靠性，与远程监控 和云应用便利性结合在一起。

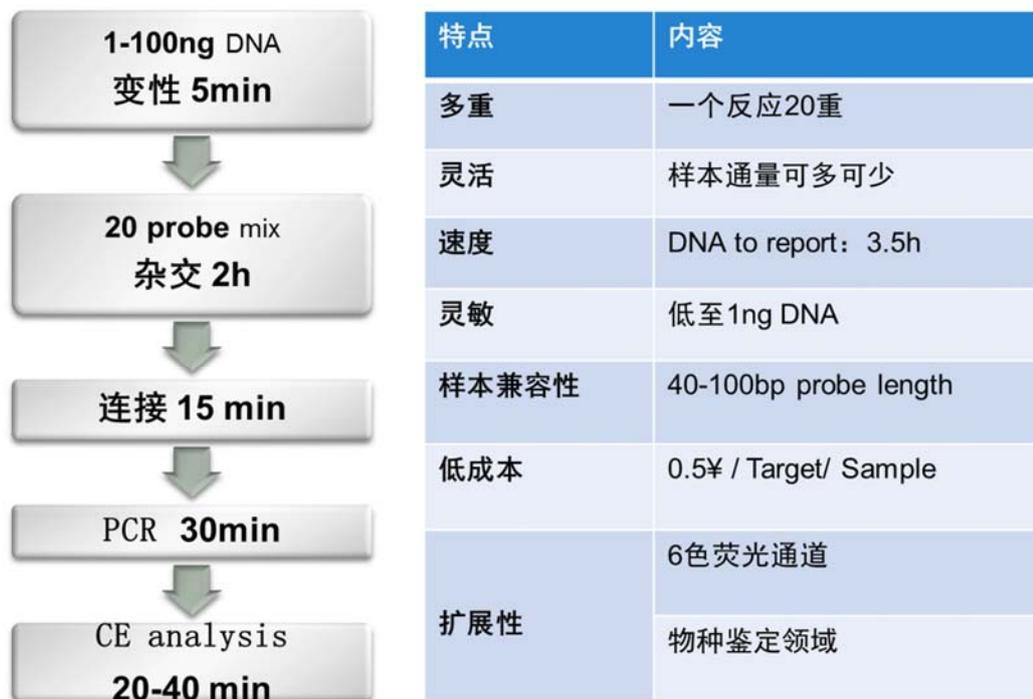
多功能卡夹在最大程度上提升了平台的高效和便利。SeqStudio 基因分析仪采用一种含有毛细管阵列、POP 胶以及阳极缓冲液的多功能卡夹。该卡夹可插拔，并可在仪器上存放达四个月之久。每个卡夹上均含有 SeqStudio 系统所独有的新型聚合物，无需重新配置即可进行 Sanger 测序和片段分析。配备 4 道毛细管可以处理来自 标准 96 孔板或 8 联管的样品。卡夹和阴极缓冲液容器均带有射频识别(RFID)标签，可跟踪二者各自在仪器上加样(卡夹)和存放的时长(阴极缓冲液)。这一特性使科研人员可以利用同一

台仪器，根据需要管理并使用自己的卡夹，进一步提高灵活性。最后，SeqStudio 基因分析仪的维护工作也得到简化。仪器校准工作通过成像和算法工具的先进功能自动化完成。

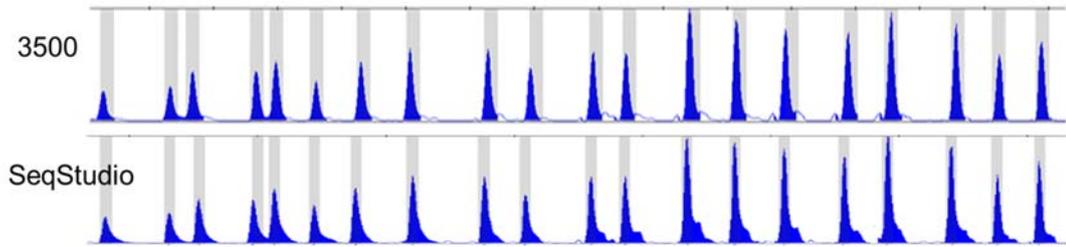
SeqStudio 仪器采用紧凑的外观设计，同时配有机载计算机和一体触摸屏，可以快速、直观、灵活的进行运行设置。运行软件经过专门配置，可在运行不中断的情况下，在同一块板上设置测序和片段分析反应并在仪器上运行。例如，在同一次 CE 运行中，可将基于测序的位点突变筛选检测与基于片段分析的 CNV 检测结合在一起。同时仪器具备无线连接功能。可以通过联机触摸屏，远程计算机和移动设备 APP 操作仪器。只要能上网，就能随时随地地访问运行设置、反应板图、运行条件和分析设置。加样条件、重新加样和重新调整加样次序可在运行期间调整，从而最大限度提高从每块板采集优质数据的能力。采集数据后，基于网页浏览器的应用程序组合包(Sanger Quality Check、Sanger Variant Analysis 和 Next-Generation Confirmation (NGC))可轻松、方便地分析数据。

5. 检测结果:

基于 CE 平台的高效动物源性 20 重检测方案



DNA ladder for 20 animal species

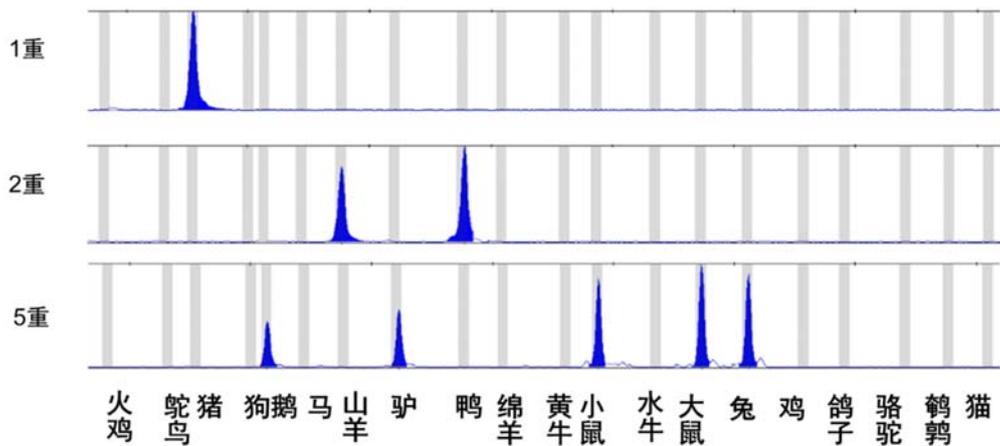


生熟样本皆可检测：

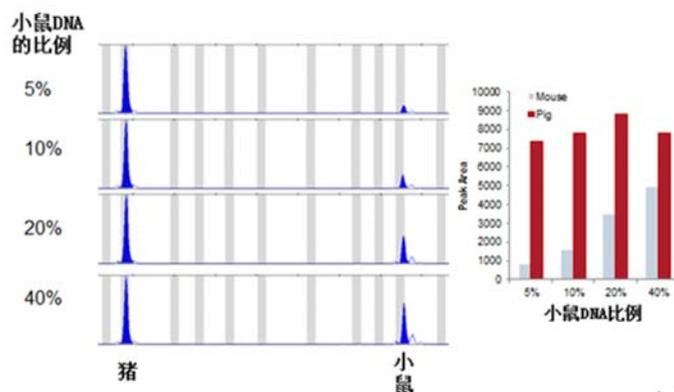
Results Examples

Sample Name	Results	Fraud
大开沙戒香酥鸡	鸡	No
大开沙戒五香牛肉	牛	No
延安西路地铁口烤羊肉串	绵羊	No
友臣肉松	鸡	No
猫罐头-1 (鸡, 牛)	鸡, 猪	Yes
红烧牛肉面料包 (牛肉粒)	黄牛, 鸡	牛肉和鸡精
驴肉火烧	驴	No
呷哺肥牛卷	黄牛	No
呷哺羊肉卷	绵羊	No
海底捞澳洲肥牛	黄牛	No
潮汕手打牛丸	黄牛	No

SeqStudio 可准确检出单一或混合样本：



最低可检测出 5%比例混样



竞争性分析:

技术	多重	价格 (每个样本)	灵活性	检测速度
荧光定量 PCR	1-5	50-100 ¥	1-96 (取决 PCR 仪模块)	2h
IAA	1	50-100 ¥	1-96 (取决 PCR 仪模块)	30min
华汉三创芯片	10	400 ¥	1-48 (8 的倍数)	4h
CE-MLPA	20	30-50 ¥	1-96 (取决 PCR 仪模块)	3h