

食品安全生物检测技术1

PCR 聚合酶链式反应

- 定义 — 聚合酶链式反应，可以扩增存在于样品中的DNA，扩增存在微量而特殊的DNA序列。反应成分-模板、引物、Taq_DNA聚合酶、dNTP、镁离子。循环参数-变性、退火、延伸、循环次数。特点-高度灵敏性、特异性、操作简便。
- 反应过程 — 高温变性（94℃）-使双链DNA解链为单链；低温退火（55-65℃）-由引物长度和GC含量决定，降低温度可以增加反应灵敏性，增高温度可以减少引物与模板的非特异性结合；适温延伸（70-75℃，72℃）-延伸时间取决于扩增片段长度；循环（25-35）取决于模板DNA的浓度，过多效率降低，错误掺入率增加。
- 引物设计 — 1.序列应位于高度保守区，与非扩增区无同源序列 2.引物长度以15-40bp为宜 3.碱基随机分布，CG含量40-60% 4.引物内部避免形成二级结构 5.两引物间避免有互补序列 6.引物3'端为关键碱基，5'端无严格限制。
- 常见问题 — 1.无扩增产物（模板、buffer、引物设计、反应条件-退火温度偏高+延伸时间过短） 2.非特异性扩增（引物特异性差-重新设计引物/巢式PCR、模板或引物浓度过高、酶量、镁离子浓度、退火温度偏低、循环次数过多） 3.拖尾-产物在凝胶上呈弥散现象（模板不纯、buffer不合适、退火温度偏低、酶量过多、dNTP和镁离子浓度偏高、循环次数过多） 4.假阳性-空白对照出现目的扩增产物-靶序列或扩增产物的交叉污染（操作轻柔，防止将靶序列吸入加样枪内或溅出离心管外；除酶等不耐高温的物质，其余试剂和器材高压消毒，离心管及加样枪头等均一次性使用；各种试剂分装，低温贮存）
- 巢式PCR — 和PCR的区别：是一种变异的聚合酶链式反应，使用两对PCR引物扩增完整的片段。第一对PCR引物扩增片段和普通PCR相似，第二对引物为巢式引物结合在第一次PCR产物内部，使得第二次PCR扩增片段短于第一次扩增，如果第一次扩增产生了错误片段，则第二次能在错误片段上进行引物配对并扩增的概率极低，因此巢式PCR的扩增非常特异。巢式PCR的使用降低了扩增多个靶位点的可能性，因为同多套引物都互补的靶序列很少；其可以增加有限量靶序列的灵敏度，并提高了困难PCR的特异性。
- 多重PCR — 用于检测特定基因序列的存在或缺失：加入多对引物，扩增同一模板的几个区域，如果待检测的基因片段存在，经PCR可以产生扩增区带，如果片段缺失，PCR反应后没有扩增区带出现。用电泳法检测，如果基因的某一区段消失，则相应的电泳图谱上这一区带就会消失。
- 应用 — 1.PCR检测食品中的病原菌（沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、李斯特单增菌）； 2.PCR检测转基因食品（检测出p-35S和3'-NOS片段或Lectin和Actin片段，即可判定为转基因食品）

RFLP 限制性片段长度多态性

- 定义： — DNA顺序中的某个碱基发生了突变，使突变所在部位的DNA序列产生（或缺失）某种限制性内切酶的位点。利用该限制性内切酶消化此DNA时，便会产生与正常不同的限制性片段。同种生物的不同个体会出现不同长度的限制性片段类型，即限制性片段长度多态性
- 原理： — 限制性内切酶酶解样品DNA-产生大量限制性片段-凝胶电泳将DNA片段按照各自的长度分开-为了检测多态性片段-需要将凝胶上的DNA变性-通过Southern转移至硝酸纤维素滤膜或尼龙膜等支持膜上-使DNA单链与支持膜牢固结合-用经同位素或地高辛标记的探针与膜上酶切片段分子杂交，通过放射性自显影显示出杂交带，即检出PFLP。当利用同一种限制性内切酶酶解不同/同一品种的不同个体时，由于目标DNA既有同源性也有变异，因而酶切片段长度就有差异，不同材料显示的杂交带位置也有差异，这种差异就是RFLP。其是由DNA一级结构的变异造成的。
- 多态性： — 1.点的多态性：DNA链中发生单个碱基的突变，且突变导致一个原有酶切位点的丢失或形成一个新的酶切位点 2.系列多态性 （1）由于DNA顺序上发生突变如缺失、重复、插入所致 （2）由于高变区内串联重复顺序的拷贝数不同所产生的，其突出特征是限制性内切酶识别位点本身的碱基没有发生改变，改变的只是它在基因组中的相对位置
- 步骤： — 1.DNA提取 2.酶切 3.电泳 4.转膜 5.杂交 6.数据分析
- 应用： — 1.食品品种鉴定与检测研究（食品中微生物的鉴定与检测-细菌 真核微生物、植物源食品品种鉴别与检测-茶叶、动物源食品品种鉴别与检测-畜禽肉 水产品） 2.检测与食品表型关联的特定基因 （与动物源食品质量相关基因-猪 与植物源食品质量相关基因-大豆）

RAPD 随机扩增多态性DNA

- 原理： — RAPD是一项建立于PCR实验基础上的检测基因组DNA多态性的遗传标记技术。原理：该技术利用大量的、各不相同的，碱基顺序随机排列的寡聚单核苷酸链为引物（约8-10个碱基），以待研究的基因组DNA片段为模板，进行PCR扩增。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分离，可对基因组DNA进行多态性分析。
- RAPD所使用的引物各不相同，但对于任一特定引物，其在基因组DNA序列上有其特定的结合位点，这些结合位点在基因组某些区域内分布如符合PCR扩增反应条件-引物在模板链的两条链上有互补位置+引物3'端相聚在一定长度范围内，就可以扩增出DNA片段。一旦基因组在这些区域发生DNA片段插入、缺失或碱基突变，就可能导致这些特定结合位点的分布发生变化，从而导致扩增产物数量和大小发生改变，表现出多态性。单一引物只能检测基因组特定区域DNA多态性，一系列引物则可使检测区域扩大到整个基因组。所以PAPD可对整个基因组DNA进行多态性检测，也可用于构建基因组指纹图谱。
- 差别： — RAPD起源于PCR，差别主要体现在随机扩增引物上。RAPD随机引物单个加入，不是成对（正、反向引物）加入；随机引物端，一般含10个碱基，因为随机引物短，与常规PCR相比退火温度较低，为35-45℃
- RAPD标记的操作步骤 — 1.模板DNA的制备与调整 2.PCR各组分的混配 3DNA扩增 4.扩增产物的分离检测和记录
- 特点： — 1.不需要DNA探针，设计引物无须知道序列信息； 2.DNA样品需要量少，引物价格便宜，成本低； 3.技术简便，不涉及分子杂交和放射性自显影等技术； 4.显性遗传，不能有效区分杂合子和纯合子； 5.实验重复性差，结果可靠度较低。
- 扩增条件： — 引物：寡聚单核苷酸链。引物扩增方向相对，且距离合适，才能扩增出产物。

AFLP 扩增片段长度多态性

- 特点： — 优点——1. 所需DNA用量少 2.能够获得更高的信息量； 3.实验重复性好，可信度高； 4.样品适用性广，基因组覆盖面大； 5.AFLP标记表现为典型的孟德尔方式遗传 6.AFLP可作为物理图谱和遗传图谱的联系桥梁； 7.AFLP分析不需要预先知道扩增基因组的序列特征等信息。 缺点——1.所需仪器和药品价格昂贵，实验成本较高； 2.操作复杂，对实验员的技术水平要求较高。
- 原理： — AFLP是RFLP和RAPD相结合的一种产物，可在一次单个反应中检测到大量片段。
- 对基因组DNA的酶切片段进行选择性的扩增。基因组DNA经限制性内切酶完全消化后，酶切片段与特定的人工接头相连接作为扩增模板，接头序列和邻近的限制性酶切位点序列作为引物结合位点，再用特定的引物进行PCR扩增。引物的3'端含有1-3个选择性碱基，所以在基因组DNA酶切片段中，只有与引物3'端互补的片段才能被扩增，最后通过聚丙烯酰胺凝胶电泳，多态性即以扩增片段长度的不同被检测出来。
- 引物组成： — 引物由5'端核心序列（CORE）与人工接头互补（5'端的与人工接头互补的核心序列），特异性酶切序列（ENZ）对应于限制性酶切片段的限制性末端（限制性内切酶特定识别序列），3'端选择性碱基的粘性末端（EXT），只有那些在两个酶切末端内侧具有与选择性碱基互补的限制性片段才能被引物识别并扩增。
- 步骤： — 1.预扩增 扩增所用引物3'端有一个选择碱基，通过预扩增对扩增模板进行初步筛选（避免直接扩增造成指纹带型背景拖尾，同时避免引物3'端3个选择碱基误配形成扩增产物） 2.选择性扩增：预扩增产物经稀释后进行选择性扩增，使所需模板量不受限制，所用引物3'端有三个选择碱基的延伸，通过3个选择碱基的变换获得丰富的DNA片段。
- 人工接头：14-18bp，由一个核心序列和一个酶专化序列组成
- 双酶切：多采用稀有切点限制性内切酶和多切点限制性内切酶搭配，产生的DNA片段一般小于500bp，可以被优先扩增。