

應用色帶固著電泳法鑑別 鮮肉之摻偽

杜先覺 陳作琳 游祥榮

摘 要

本報告採用精確、簡易、經濟、省時的色帶固著電氣泳動法，對各種屠畜新鮮肉品鑑別真偽以杜絕摻偽事件之發生，進而保護消費者大眾，達到維護國民健康之目的。

各種鑑別方法，年來海內外疊有報告出現，唯費時，不經濟者較多（如免疫沈降法），亦或觀察不易（如電氣泳動法）。本報告特綜合上述各家之長處，改進其缺失，將各泳動譜加以染色，使其易于觀察，而達到快速鑑別之初衷，其中又以纖維凝膠，瓊脂凝膠，分別經 Ponceau S 及 Amido Black 10 B 之染色較適于一般實驗室之用，無毒、安全，泳動譜較易于觀察且可做為永久保存之用。

鍵語：瓊脂凝膠，纖維凝膠，緩衝液，肌肉抽出物，Amido Black 10 B，Ponceau S。

前 言

鑑定肉品之真偽，現今尚無一經濟簡便而又精確詳實之方法可循。雖然 1962 年 Cook 等人曾用葡萄糖澱粉酶（glucoamylase）及葡萄糖氧化酶（glucose oxidase）對肉品中所富含之動物澱粉（glycogen），做定量分量分析以辨別該肉品究屬何品系之動物^{1,2}。

其他尚有六溴烷法（Hexabromide test），亞麻仁酸含量測定法（Linoleic acid content）及氣相色層分析法（Gas Chromatography），然皆太過繁雜及缺乏特異性。1963 年諾貝爾獎得主 John, C. Kendrew 亦發表用 X 射線結晶法（X-ray crystallography）來定肌球蛋白（myoglobin）之構造，從而鑑別肉品系出自何種動物³。然因設備昂貴、鑑別費時，成本龐大等因素而不適於普遍而廣泛之檢定。1960 年 Thompson 等人利用澱粉凝膠電氣泳動法來鑑定肉品，泳動終了不易判定其正確沈降帶。本實驗即針對該項缺失而改正之。1971 年 Mary, 1979 年

Hayden 分別使用抗肉品特異性三種球蛋白及抗肌球蛋白血清行試管凝集反應（Tube precipitation test），雖改進上述各缺失，具有快速、精確之特性，但是此等抗血清之製作如無特殊製備之抗原，是無法達到高力價，精純的抗血清^{1,4,5}。筆者開發之色帶固著電氣泳動法，除改進上述之缺失（如成本龐大，抗血清製作不易，無特異性）且經濟省時最適於一般實驗室之操作。

材料及方法

一、材料：

（一）肉品：選取市售之牛肉、豬肉（冷凍碎豬肉），羊肉及本局日常檢驗所用之兔子，大白鼠經剖檢後，取背最長肌及大腿部之肌肉，留供肌肉抽出物之用。

（二）瓊脂凝膠：Agar Noble, Difco

（三）纖維凝膠：Mylar Supported Cellulosic Electrophoresis Media, Gelman,

（四）緩衝液：李氏 pH7.0 0.05 M phosphate buffer solution，取 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

107.442克溶於 6000 ml 的水中，次取 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 31.202 克溶於 4000 ml 的水中，兩者相混，用 18 N phosphoric acid 或 10 N potassium hydroxide 調節 pH 至 7.0 ± 0.1 。

Gelman Tris-Barbital-Sodium Barbital 取 18 克（即一瓶裝）加蒸餾水 800 ml。

(四)鹽橋：以 Whatman 100 circles，一級之濾紙裁成 $18.5 \text{ cm} \times 18.5 \text{ cm}$ 。

纖維凝膠則直接與緩衝液接觸，而省去濾紙。

(五)電源：425 Voltage 30 分鐘，45 mA 150 分鐘。

(六)恒溫槽：Cooling circulator, Komatus-Yamato, 維持溫度於 20°C 。

(七)玻璃板： $40 \text{ cm} \times 21 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$ ，表面光滑清潔。

(八)鋼框：內徑 $38 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$ 。

(九)染色液：Ponceau S. (Gelman),
Amido Black 10 B. (Merck)
0.6 % (w/v)。

(十)脫色液：醋酸、甲醇。

(十一)pH meter: PH M 62 Standard pH meter, Radiometer Copenhagen。

(十二)Osmotic pressure meter: Fiske OSTTM osmometer U.S. Patent No. 3, 203, 226 Fiske Associates。

二、方法：

(一)肌肉抽出物之製備法：

1. 每種品系之肉品各取 5.0 克放於培養皿剪碎。
2. 加入生理食鹽水 25 ml 充分攪拌混合。(Burrell Shaker)。
3. 裝入離心管中，以 3000 rpm/min 離心 20 分鐘。
4. 抽取中層液（上層為脂肪層，下層為不溶之肌肉碎屑）。

(二)瓊脂凝膠板之製備及電泳程序⁷：

1. 取高級瓊脂以 pH 7.0 的緩衝液泡製成 1.5 % 置於三角瓶中，隔水加熱至沸騰，使之溶解，放冷至 60°C 。
2. 在玻璃板上將鋼框按好，先用少許溶解的瓊脂封固，再將適量之瓊脂凝膠倒入，待冷凝固後，即成一瓊脂凝膠板，移去鋼框，在此瓊脂凝膠板上製作 $1 \times 0.5 \times 0.3 \text{ cm}^3$ 之樣品縫 (well)

數個。

3. 將此製備好的瓊脂凝膠板置於電泳槽上，用滴管將肉品萃取液加入樣品縫中。電泳槽兩邊各注入 1.5 公升的緩衝液 (pH 7.0)，將鹽橋裝好。

4. 在每一片瓊脂凝膠板均取一樣品縫加入適量 Trypan blue (0.125 %)，做為指示劑。

5. 恒溫槽開啓，再將電源開關打開調整電壓或電流。

6. 俟 Trypan blue 泳動 40 公厘時關掉電源，取出瓊脂凝膠板，染色固著，觀察泳動譜^{3, 5}。

(三)纖維凝膠板之泳動程序：

1. 取 100 ml 的 pH 8.8 Tris-Barbital-Sodium Barbital 緩衝液放入一染色槽中。
2. 將一片新鮮纖維凝膠板用鑷子取出，浸入上述含 pH 8.8 緩衝液之槽中，勿傷及凝膠板之纖維糖面，使該緩衝液慢慢滲入凝膠板之纖維糖中，約 10 分鐘。
3. 將檢體放入檢體供應器中 (applicator)。
4. 將 2. 已浸過的纖維凝膠板，用吸附墊將過多之緩衝液吸除後，安放於電泳槽中。
5. 將檢體（肌肉抽出物）經由供應器，打入已安放於電泳槽中之纖維凝膠板中，每按一次供應器約需時 7 秒。
6. 加上電極，打開電源開關，調整電壓至 225 伏特，泳動 30 分鐘，切掉電源⁶。

(四)染色及脫色：

1. Amido Black 10 B 0.6 % (w/v) 染色瓊脂凝膠 5 ~ 10 分鐘（或瓊脂凝膠板微呈暗藍色），以甲醇：醋酸 = 3 : 1 之混合液脫色。直到瓊脂凝膠板上之沈降帶呈暗藍色而瓊脂凝膠呈淡藍色即可用清水沖洗，用濾紙拭取過多之水份後觀察之。

2. 用 Ponceau S 染瓊脂凝膠，方法與 1. 相同，唯脫色用 2 % 醋酸。

3. 以 Ponceau S 染色纖維凝膠 10 分鐘，再以 5 % 醋酸溶液沖洗 15 分鐘。復以 Super Septra Clear 固定 5 分鐘，晾乾纖維凝膠板，送入烤箱中 $80 \sim 90^\circ\text{C}$ ，10 ~ 15 分鐘烘乾，觀察泳動譜⁶。

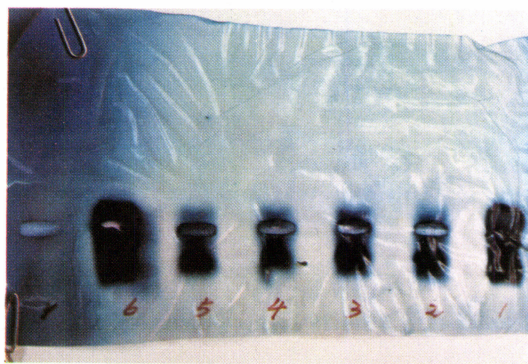
結果與討論

1.5 % 精製瓊脂凝膠板，經 45 mA 150 分鐘

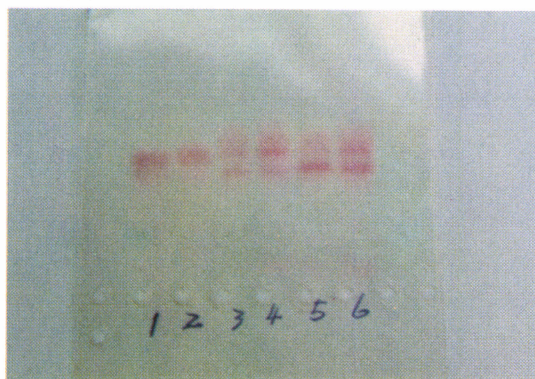
之泳動後，經色帶固著後可見到清晰之色帶（圖一）。唯尚有部份呈現之色帶濃厚而不易分開。

纖維凝膠板泳動終了，經染色固定，脫色、烘乾之後，所呈現之色帶（圖二）較 1.5 % 的精製瓊脂凝膠板清晰分明，且其中不論何種品系之肉品除一色帶帶陽電荷往陰極泳動外，餘往陽極泳動。此和血清泳動後除丙種球蛋白往陽極泳動外，餘均往陰極泳動之現象（圖三）恰好相反。此肌肉抽出物往陽極泳動之色帶各品系之間均有其特異性且易於辨別，圖二之豬肉和檢體（冷凍碎豬肉）之抽出物泳動譜即均具有相同速率之色帶。

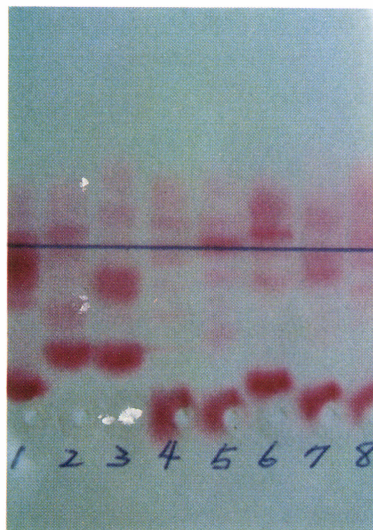
各種肉品之 pH 值，各不相同，亦無顯著之差異可資做為鑑識之依據（表一）。牛、羊之肌肉抽



圖一 Agar Noble 瓊脂凝膠經 4.5 mA, 2 小時泳動後之泳動譜。由右至左依序為犬血清、冷凍碎豬肉抽出物、豬肉抽出物、羊肉抽出物、牛肉抽出物、馬血清、Trypan blue。



圖二 利用纖維凝膠板所泳動之肌肉抽出物泳動譜。(1)小白鼠；(2)大白鼠；(3)冷凍碎豬肉；(4)豬肉；(5)羊肉；(6)牛肉。



圖三 纖維凝膠板所泳動之血清泳動譜。(1)小白鼠；(2)大白鼠；(3)豚鼠；(4)兔；(5)狗；(6)猪；(7)羊；(8)馬。

圖中之藍線為原本 applicator 所做出之樣品縫 (well) 之處。

表一 肉品之 pH 值

兔	羊	牛	猪	檢體	大白鼠
5.88	5.77	5.78	6.27	5.85	6.01

表二 各種來源不同之肌肉抽出物之滲透壓值

	兔	羊	牛	猪	檢體	大白鼠
測定值	-304	-314	-316	-308	-303	-335
	-305	-316	-322	-309	-307	-331
	-300	-311	-319	-311	-314	-328
平均值	-303	-314	-319	-309	-308	-331

出物 pH 值可能因為品系同為反芻獸而很接近。唯亦可能取樣太少不足以代表。

各種肉品之滲透壓之測定值詳見表二。似乎品系接近之動物如牛、羊其滲透壓值較為近似，猪與檢體間之關連性亦成一直線反應。

本實驗中 Agar Noble 所製成之精製瓊脂凝膠板，由於黏性高，妨礙電解質之泳動，易使瓊脂

凝膠因發熱而溶解，甚且將鹽橋燒毀。此時可暫時將泳動槽電源切除以緩衝液沖洗鹽橋而改進之；亦可使用冷却循環器 (cooling circulator) 之裝置來改進。

泳動中瓊脂凝膠板凹凸不平，可能是因為電流太小之故，將電流改正成適當電流即可更正此缺失，而不致於使瓊脂凝膠板斷裂。而使用醋酸纖維凝膠板因為檢體用量少 (僅 $0.25 \mu\text{l}$)，體積小，凝膠為薄板樣散熱容易，具有不易引起發熱，凹凸不平之缺失，且經過處理後可做為永久保存之用²。但是泳動時間過長，亦有發熱之現象可見。

緩衝液由於配方衆多^{3,8,9,10,11,12}，然總以實驗之目的而有所不同。本實驗瓊脂凝膠泳動所用之李氏緩衝液即採取其中所含離子濃度最少，對瓊脂凝膠不易干擾 (如發熱，凝膠斷裂、鹽橋燒毀等) 之優點。其中值得注意的即不論何種凝膠板，在製作凝膠板時瓊脂所用之溶液一定和泳動槽中之緩衝液相同，否則亦見上述之干擾現象。纖維凝膠板由於是成品，故必也使用其所指定之緩衝液為度。

以濾紙做為鹽橋，濾紙使用前先行浸在緩衝液中，以除去濾紙上之雜質。減少泳動中焦耳熱之發生，即減少濾紙燃燒之可能。纖維凝膠板則直接和緩衝液接觸，而無須使用鹽橋。

染色液 Amido Black 10 B 之配方繁雜^{7,8,9,11,13,16}，者等經實驗之結果，其中以 0.6% (w/v) Amido Black 10 B 染色 5~8 分鐘，及以甲醇：醋酸 = 1 : 3 之比例做為脫色液最佳。即最適於瓊脂凝膠板之操作。Ponceau S 對瓊脂凝膠板之染色時間較長，且脫色時間過長 (7~15 分鐘)。但是不論 Amido Black 10 B, 或 Ponceau S 均可能因為過度染色，殘存過多之染料而不易脫去之缺失。脫色液多由醋酸或甲醇組成，當脫色完畢為除去過多之刺激性異味，可使用自來水或蒸餾水沖洗，但是切莫使用生理食鹽水沖洗，否則沈降帶易因而流失之可能⁸。

肌球蛋白 (myoglobin) 之分子量雖僅為血球蛋白 (hemoglobin) 分子量之 $\frac{1}{4}$ ¹⁷，但本實驗中所使用的肌肉抽出物二者均有可能包含於其中，形成一巨分子。且肌球蛋白及血球蛋白均為 α 螺旋蛋白質其螺旋性各為 83% 、 80% ¹⁸，且經 X-射線結晶法證明肌球蛋白由 151 個胺基酸殘餘鏈 (ami-

no acid residue) 組成之 8 個支鏈，且分子至少高達 25,000 reflections¹⁸。而本實驗所用之肌肉抽出物除含有上述二種成份外尚有不少電解質、酵素等，故其分子結構應大於一般血清，由圖二、圖三，更可知血清泳動之速度較肌肉抽出物為快，是故泳動中之肌肉抽出物必須使用低電源，長時間的方式來泳動，否則瓊脂凝膠將因而斷裂，此亦為瓊脂凝膠板使用上之缺失。纖維凝膠板除須遵守低電流 (或低電壓)，長時間之泳動方式外，可不必考慮凝膠板斷裂之問題，此亦為其優點之一。

恒溫冷却循環槽之使用，以維持適當之低溫，而不引起鹽橋燒毀、瓊脂凝膠溶解為度。

pH 值由表一可知豬肉與檢體沒有關連性，而牛羊確很近似，可能因品系相近，同為反芻獸之故。

滲透壓值由表二知牛與羊及豬肉與檢體之間，滲透壓值相近似，且操作方便，今後似乎可依此做為肉品鑑定中之初步篩選步驟之一。為求謹慎本法似宜多方採樣後確定使用與否。

瓊脂凝膠可資運用之種類繁多^{1,4,5,6,7,8,9,10}，本實驗僅採用頗適合一般實驗室使用的價廉，安全之纖維凝膠及 Agar Noble，而不採用 Acrylamide, Polyacrylamide, Bisacrylamide 等雖可永久保存而操作中具有毒性作用之物質。

肉品真偽鑑別法之開發，除了消極的可防止不肖商賈之蒙蔽消費大眾，不使消費者造成經濟上的損失外，尚有保護國民健康不致遭受因吃食此等來路不明，不合屠畜衛生標準之畜產品的損害之積極效用。

本實驗之目的在於找出簡便、實用、經濟、省時，精確之良法，來鑑別肉品之真偽，結果發現利用電氣泳動色帶固著法最符合上述簡便、實用、經濟、省時、精確之原則。

誌 謝

本實驗承蒙鄭局長彰澤之鼓勵，行政院農業發展委員會林本欽博士之指導，及本組同仁之協助始得完成，謹致謝忱。

參考文獻

1. Mary B. Helm, M. O. Warnecke, R. L. Saffle: Gamma globulin isolated from rabbit anti-

- serum for rapid detection of meat adulteration. *Journal of Food Science.*, 36, 998-1000 (1971).
2. 清水祥一，肉ならびにその加工製品，酵素分析法——その原理と應用 115～116 (1977). 講談社サイエンスフィク。
3. John, C. Kendrew: Myoglobin and the structure of proteins, crystallographic analysis and date-processing techniques reveal the molecular architecture. *Science.*, 139, 1259-1266 (1963).
4. A. R. Hayden: Immunochemical detection of ovine, porcine and equine flesh in beef products with antisera to species myoglobin. *Journal of Food Science.*, 44, 494-500, (1979).
5. M. O. Warnecke and R. L. Saffle: Serological identification of animal proteins 1. mode of injection and protein extracts for antibody production. *Journal of Food Science* 33, 131-135 (1968).
6. 李志恒：食品中殘量抗生素分析，華岡農科學報 269～315 (1981)。
7. 電氣泳動實驗法，4版 (1969)，電氣泳動學會，文永堂。
8. 國安主税，寒天ゲル免疫電氣泳動法，家畜衛生に必要な——免疫の概念と術上 (増補) P. 123～129 (1972)。社團法人日本獸醫師會。
9. Gleman Sciences: Super sephaphore (Mylar supported cellulosic electrophoresis media).
10. Pharmacia Fine Chemicals: Polyacrylamide gel electrophoresis laboratory techniques, June 1980-1, Sweden.
11. O. Ouchterlony, L. A. Nilsson: Immuno-diffusion and immunoelectrophoresis. *Experient handbook of immunology* 3rd Ed. 19.1-19.44 (1978).
12. E. Lillehoj, H. Krutzsch, M. D. Poulik: Turkey β_2 -microglobulin-I isolation, properties and aminoacid analysis. *Molecular Immunology.*, 19, 817-827 (1982).
13. Merck Biochemica: Preparation for protein and peptide research, 1963.
14. Erik Lillehoj, M. D. Poulik: Turkey β_2 -microglobulin-II Physiological parameters investigated by radirimmunoassay, *Molecular Immunology.*, 19, 829-837 (1982).
15. Seiichi Homma, Takako Tomura and Masao Fujimaki: Fractionation of nondialyzable melanoidin into components by electrofocusing electrophoresis. *Agric. Biol. Chem.*, 46, 1971-1976 (1982).
16. Atsushi Suzuki and Yoshinobu Nonami: A 34,000 dalton protein located in the Z-disk, *Agric. Biol. Chem.*, 46, 1976-1978 (1982).
17. H. A. Smith, T. C. Jones and R. D. Hunt: *Veterinary pathology* 4th ed. p. 1178 (1974).
18. Eric E. Conn and P. K. Stumpf: *Outlines of biochemistry* 4th ed. PP.102-103 (1976).

USE STAINING FIXATION ELECTROPHORESIS TO IDENTIFY FRESH MEAT ADULTERATION

SHIAN-JYUE DU, TSO-LING CHEN AND SHIANG-RONG YU

ABSTRACT

A major advance in detecting the fresh meat adulteration has been the development of use staining fixation electrophoresis, a simple, precise, rapid and economic method, for the qualitative identification of animal proteins as to species. The skeletal muscle extract, was applied on thin layer

gel electrophoresis, 225 voltage 30min cellulosic strip and 45 mA 150 min agar noble gel, respectively. Then staining fixation by dye amido black 10 B or ponceau S. The method requires a maximum times of only 3~6 hr, in addition, the electrophoregraphy was easy to observed.

Key words: Agar gel, Cellulosic strip, Buffer solution, Skeletal muscle extract, Amido back 10B, Ponceau S.