

應用血清免疫擴散技術及 電聚焦分離肌球蛋白譜鑑別肉品種類

張碧秋

摘 要

在肉類產品中肉種來源之鑑定是食品衛生管制上一項很重要且具挑戰性的工作。本研究係對較具特異性的血清免疫擴散鑑別法及電聚焦分離肌球蛋白鑑別法做探討。

用 Ouchterlony 的雙向擴散法作肉種的鑑別，並探討以不同的溫度、時間處理過的牛肉對此法的反應。此法頗具特異性且經 70°C 加熱處理 45 分鐘的牛肉，仍可用此法鑑別。

電聚焦分離肌球蛋白法是一種可靠而便捷的肉品鑑別方法，能夠鑑別極相近的種間的差異；並以不同比例混合肉類作出之電聚焦分離肌球蛋白譜，用薄層析斑點掃描儀測其分離窄帶的面積，其特殊蛋白質帶的面積與牛肌肉萃取液的量成正比，因此可作定量的依據。

鍵語：雙向擴散法 (Double Diffusion Method)、電聚焦分離肌球蛋白譜 (Myoglobin Electrofocusing Patterns)、聚丙烯醯胺膠板 (Polyacrylamide Gel Plate)、吸附抗血清 (Absorbed Antiserum)。

前 言

從國外進口的冷凍牛肉有摻雜其他肉類蒙混淆費者的事情發生，因此對肉品鑑別方法的探討目前極需要。肉種大約可用理化學和生物學兩類方法來鑑別，如用脂肪酸分析、TBA 值測定、肝醣含量測定及肉蛋白質性質作鑑別的理化學方法；用組織學、免疫學、官能檢查等作鑑別的生物學方法。本研究擬對較具特異性的血清免疫鑑別法^{1,2,3,4,5}及電聚焦分離肌球蛋白鑑別法^{6,7,8}做進一步的探討^{9,10}，期能找出最精確便捷的肉類鑑別法。

材料與方法

一、血清免疫擴散鑑別法—採 Ouchterlony 的雙向擴散法

(一)肉類：購買市售豬、牛、羊、兔的背部里脊肉

置於 - 27°C 冷凍貯存。

(二)試藥：瓊脂 (Bacto agar, Difco)、酚 (Phenol)、三氮化鈉 (Sodium azide)、牛抗血清 (Beef antiserum, Cappel lab., cochr-anville Pa. 19330, division of BCA)、硼酸 (Boric acid)、氯化鈉 (Sodium chloride)。

(三)裝置：冷凍乾燥機 (Freeze-drier)、溫度控制離心機 (Refrigerated centrifuge)、攪拌機 (Blender)、微注射器 (Microsyringe)、震盪器 (Shaker)。

(四)實驗步驟：

1. 抗原之製備⁴：

分別取牛、羊、豬、兔肉 50g 與 150 ml 的生

理食鹽水，用攪拌機在低速下攪拌30分鐘，肉漿在1000 rpm的速度下離心15分鐘，上層液用Whatmann No. 4 濾紙過濾後，貯存不要超過4天。

2. 吸附抗血清之製備⁶：

抗血清先在56°C下加熱30分鐘，再在抗血清內加入小量（約8 mg/ml）會起交叉反應的冷凍乾燥抗原蛋白質（Freeze-dried antigenic protein），用震盪器搖動4小時，置於37°C培養箱內1小時，然後置於4°C冰箱14小時，再用6000 rpm的速度離心除去有交叉作用的抗原抗體複合體之沉澱。

3. 緩衝液之配製⁶：

18.54 g 硼酸溶於0.5 N NaOH 100 ml 中，以此硼酸溶液溶於0.85% 生理食鹽水中，使成0.5% 硼酸食鹽水溶液並調整pH值至8.2。

4. Ouchterlony 雙向擴散法⁶：

以Bacto agar 溶於硼酸緩衝液使成0.85%，再加Sodium azide 0.1%，Phenol 0.25%作抗菌劑，將瓊脂置於20 psi下高溫滅菌10分鐘，然後倒入15×90 mm的培養皿內，冷卻後在瓊脂上切割6個洞，中間的洞直徑8 mm，周圍的五個洞直徑6 mm，底部再用瓊脂封住，在各洞內注入0.1~0.3 ml的各種肌肉萃取液及對照的生理食鹽水，中間的洞內加入牛抗血清0.12~0.2 ml，然後將培養皿置於濕潤的箱內2天，觀察其沉澱帶的形成。再將牛抗血清以起交叉反應的抗原蛋白質吸附過，同樣作上述的免疫擴散試驗，觀察沉澱帶的形成。

5. 經過加熱處理的牛肉之鑑別：

將20份40 g的牛肉各別置於耐熱塑膠袋內，分別在50°C、60°C、70°C、80°C、90°C加熱15、30、45、60分鐘。然後用上述雙向擴散法鑑別，觀察其沉澱帶的形成情形。

二、電聚焦分離肌球蛋白鑑別肉種法：

(一)肉類：購買市售牛、羊、豬、兔的背部里脊肉，貯存於-27°C。

(二)試藥：

1. 聚丙烯醯胺膠板：LKB 1804 ~ 101 Ampholine PAG plate kit (pH3.5~9.5)。

2. 電極溶液：0.1 M NaOH 溶液（陰極），0.1 M H₃PO₄ 溶液（陽極）。

3. 固定溶液：57.5 g Trichloroacetic acid

和17.25 g的Sulphosalicylic acid 用蒸餾水稀釋至500 ml。

4. 脫色溶液：160 ml Acetic acid和500 ml Ethanol 混合，加蒸餾水稀釋至2 l。

5. 染色溶液：0.46 g Coomassie brilliant R-250 溶於400 ml 脫色溶液。

6. 保存溶液：40 ml Glycerol 溶於400 ml 脫色溶液中。

(三)裝置：

1. 電聚焦裝置：LKB 2117 Multiphor。

2. 電源：LKB 2103 Power Supply。

3. 冷卻裝置：2095 Bath & Circulator (Forma Scientific)。

4. 薄層層析斑點掃描儀：High Speed TLC Scanner Cs-920 (Shimadzu)。

(四)實驗步驟：

1. 定性法

(1) 肌肉萃取液之製備同上述免疫擴散法中抗原之製備。

(2) 將上面劃有格子的塑膠片置於冷卻板上，再將PAG膠板置於塑膠片上。

(3) 用小片濾紙(5×10 mm)浸入各種肉萃取液中，約可吸收15 μl 溶液將濾紙依塑膠片上所劃格子置於膠板的長邊上，不一定要排放整齊，可錯開排放。

(4) 接上冷卻裝置維持在5°C，並接通電源，在電功30 W、電壓1500 V、電流40~50 mA的情況下使其分子隨着pH梯度移動，而聚焦在該分子的等電點形成一個窄帶，完全分離的時間約1.5至2小時。

(5) 將膠板置於固定溶液約0.5小時，取出置於脫色溶液中5分鐘，再用染色溶液浸覆2小時左右，最後用脫色溶液洗到分離的蛋白質窄帶呈藍色而膠板背景呈透明為止。

(6) 固定、染色後的膠板可浸於保存溶液內1小時，取出後使乾燥，以透明塑膠覆於膠板上，便可永久保存。

2. 定量法⁷

(1) 另以牛及兔肌肉萃取液作成下列不同的混合液：100%牛肉萃取液，70%牛肉與30%兔肉的混合萃取液，50%牛肉與50%兔肉的混合萃取液，30%牛肉與70%兔肉的混合萃取液，100%

兔肉萃取液。

(2)牛及兔之肌肉混合液用微注射器精確吸取 $15\mu\text{l}$ 置於濾紙上，以1法所述步驟作出電聚焦分離肌球蛋白譜。

(3)用薄層析斑點掃描儀在 580 nm 下掃描肌球蛋白分離譜，積分儀可直接記下各窄帶的面積，供作混合牛肉、兔肉的定量依據。

結果與討論

一、血清免疫擴散鑑別法——Ouchterlony 雙向擴散法

(一)新鮮肉品之鑑別

牛、羊均屬草食性反芻動物，種類較接近，牛抗血清與羊肉萃取液起交叉反應，由圖一可見牛抗血清與牛肉及羊肉肌肉萃取液間均有明顯的白色沉澱帶。若牛抗血清經會起交叉反應的羊抗原蛋白吸附後，則只與牛抗原起白色沉澱帶，如圖二。因此若欲鑑別摻雜混合的其他肉類，可分別用各種動物的吸附抗血清鑑別之。此法非常具特異性，但所費時間較長；因抗血清之製備需考慮效價且須經各種交叉反應之抗原蛋白質的吸附，製備過程複雜費時。本實驗所用抗血清係由國外進口再經吸附處理，雖節省製造抗血清之時間但成本較高。

(二)鑑別經加熱處理之牛肉

牛肉在經過不同溫度及時間加熱後，用免疫擴散法鑑別的結果如表一。本實驗牛肉在 80°C 加熱 30 分鐘時，已無法看到白色沉澱帶，而在 70°C 加熱 45 分鐘的牛肉仍可見到模糊的白色沉澱帶。在西條賴廣等⁸所做的實驗中， 80°C 加熱 30 分鐘的牛

表一 熱處理牛肉以免疫擴散法鑑別的結果

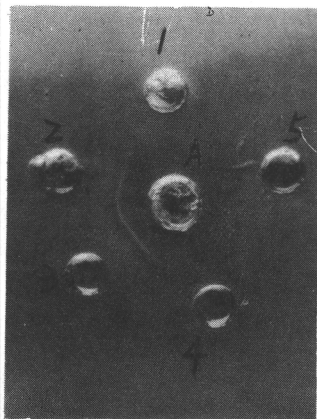
加熱溫度 ($^{\circ}\text{C}$)	加熱時間 (min)			
	15	30	45	60
50	+	+	+	+
60	+	+	+	+
70	+	+	±	—
80	—	—	—	—
90	—	—	—	—

肉仍可用免疫擴散法鑑別出來，此可能因加熱方式及所取肉塊的重量不同所致，由本實驗結果可知加熱過的牛肉只要溫度不超過 70°C 、時間不超過 45 分鐘，均可用此法鑑別，此為 Ouchterlony 雙向擴散法的優點。

三、電聚焦分離肌球蛋白鑑別肉種法

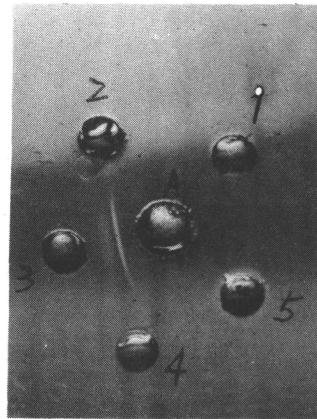
電聚焦法的原理是將樣品放在 Ampholine PAG 膠板上，Ampholine 是許多等電點在 pH 3.5 ~ 9.5 間的多胺基多羧酸 (Polyamine-polycarboxylic acid) 的混合物，電流接通後 Ampholine 形成線狀的 pH 梯度，帶電的分子移向相反電荷的電極，每一個分子隨著 pH 梯度移動逐漸失去電價，到達該分子等電點便停止移動而聚焦成一個窄帶。只要使用相同電極溶液則依據所形成的 pH 梯度，便可確知每種肌球蛋白分子聚焦的位置。

本實驗採用的 PAG 膠板有很多優點：1. 它一次可分析 20 個以上的樣品，所以依不同條件所得到



圖一 未經吸附處理的牛抗血清與肌肉萃取液形成的沉澱帶

A 未經吸附處理的牛抗血清
1. 生理食鹽水
2. 羊肉萃取液
3. 牛肉萃取液
4. 豬肉萃取液
5. 兔肉萃取液



圖二 經吸附處理的牛抗血清與肌肉萃取液形成的沉澱帶

A 經吸附處理的牛抗血清
1. 生理食鹽水
2. 羊肉萃取液
3. 牛肉萃取液
4. 豬肉萃取液
5. 兔肉萃取液

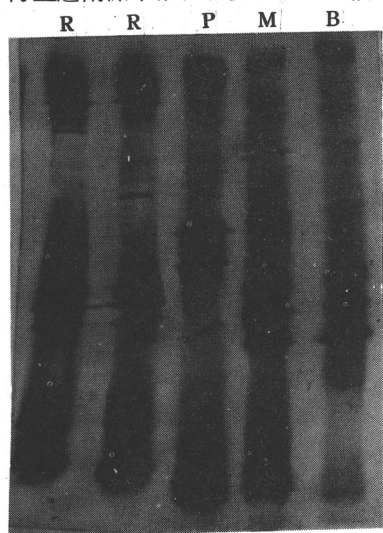
的樣品間的分析比較，或與標準品的比較，可以同時分離鑑定。2. 所有欲比較的樣品是在同一膠體中依相同的時間、溫度、緩衝液及電流下所得到的結果，比較容易解釋其結果。3. 節省分析操作的時間。4. 膠體可以薄至 1 mm，因之用冷却板可以防止熱所引起的窄帶的變形。

(一) 定性法：

將牛、羊、豬、兔肉萃取液用電聚焦法分離出來的肌球蛋白譜如圖三。在接通電源電聚焦開始進行 40 分鐘後，必須將濾紙移去再繼續電聚焦，以免固定、染色後濾紙的痕跡顯出，若仍有濾紙痕跡出現則取出濾紙的時間可斟酌縮短，但濾紙的痕跡與肌球蛋白分離帶很易區分，濾紙的痕跡細而顏色呈深藍，肌球蛋白分離帶則較寬。由圖三所見之每種肌球蛋白分離譜均有明顯差異，但種屬愈接近的肉類其肌球蛋白分離譜愈相似，如牛、羊；但仍有差異可資辨別。電聚焦分離法的解析度很高，甚至有些魚類非常相近的種間也能以此法鑑別⁸。因此比較未知的肉種和已知的各種肉之標準肌球蛋白分離譜，便可鑑別其種類。

(二) 定量法：

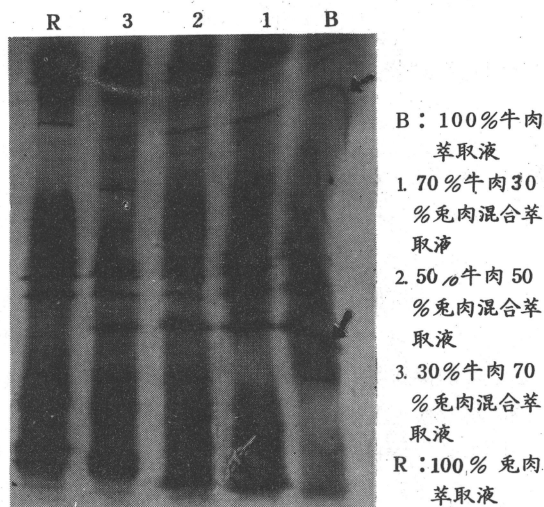
牛、兔肌肉混合萃取液的肌球蛋白分離譜如圖四。圖中箭號所指的距離 31.8 mm 和 68.0 mm 的兩條肌球蛋白窄帶只存在牛肉中，而兔肉中則沒有。色帶的深淺與混合液中牛肉所佔比例呈現相關性。用 TLC Scanner 掃描各肌球蛋白分離譜，測得上述兩條窄帶在各混合液中所佔的面積（如表二



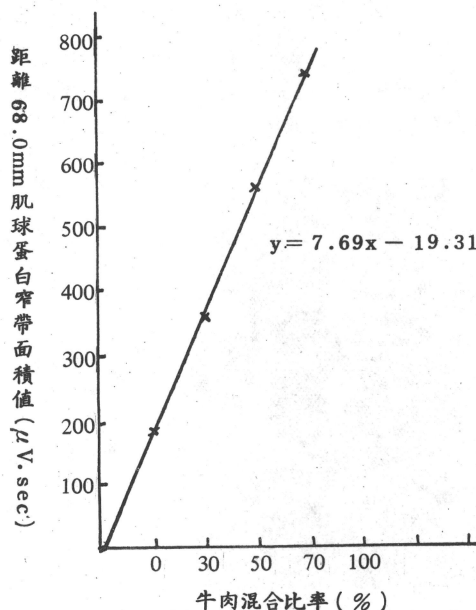
圖三 牛、羊、豬、兔肌肉萃取液之電聚焦分離肌球蛋白譜

表二 薄層層析斑點掃描儀測得之兩個特定肌球蛋白質帶面積值 ($\mu V \cdot sec$)

距離 (mm)	萃取混合液中牛肉所佔比率 (%)				
	100	70	50	30	0
31.8	1610	1330	1310	779	0
68.0	739	549	352	184	0



圖四 各種不同比率牛肉及兔肉萃取混合液之電聚焦肌球蛋白譜



圖五 混合牛肉之標準檢量線

)。距離 31.8mm 的蛋白質窄帶在含 70% 及 50% 牛肉的混合萃取液的肌球蛋白分離譜中，面積無顯著差異，但在 30% 牛肉的混合萃取液則有明顯減少。而距離 68.0 mm 的肌球蛋白窄帶的面積則與其所含牛肉量成正比。以距離 68.0 mm 的肌球蛋白窄帶的面積值對混合液中牛肉所佔比率作圖，結果如圖五。此法可用以定量未知比率牛肉兔肉混合肉中牛肉所佔比率。不過此種定量法較適用於肌球蛋白分離譜差異較大的兩種混合肉之定量。摻雜混合絞肉的定量一直是很多食品科學研究人員研究的方向，目前仍是值得進一步研究的題材。

綜合上述結果，Ouchterlony 雙向擴散法雖具有特异性較高、對加熱過的肉也能鑑別的優點，但抗血清之製備過程複雜費時，欲得實驗結果曠時費日，若購買進口抗血清則成本較高。電聚焦分離肌球蛋白鑑別法的優點是解析度比一般電泳法好，可分離出較多的蛋白質窄帶，能夠鑑別極相近的種，且實驗操作時間較短，因此可說是一種便捷精確的肉種鑑別方法。

謝 誌

本實驗承本局第四組陳組長陸宏及林科長錦英提供數種試藥、裝置及本站蔡主任玉雲的鼓勵和同仁楊福麟技士的協助，使實驗順利完成，謹此誌謝。

參考文獻

1. Karpas, Arthur B., Walter L. Myers and Diego Segre. 1970. Serologic identification of species of origin of sausage meats. *J. of Food Science*. Vol. 35, p. 150-155.
2. Hayden, A. R. 1979. Immunochemical detection of ovine, porcine and equine flesh in beef products with antisera to species myoglobin. *J. of Food Science*. Vol. 44, No. 2, p. 494-500.
3. Fugate, H. Guy, Jr. and Shelton R. Penn. 1971. Immunodiffusion Technique for the Identification of Animal Species. *J. of the A.O.A.C.* Vol. 54, No. 5, p. 1152-1156.
4. Warnecke, M. O. and R. L. Saffle. 1968. Serological Identification of Animal Proteins. *J. of Food Science*. Vol. 33, p. 131-135.
5. 西條賴廣，嵯峨晴也，平田一郎。1974. 肉種鑑別に用いる寒天ゲル内沉澱反應 (Ouchterlony 法) の反應條件の検討。食衛誌 Vol. 15, No. 4 p.308 ~ 312.
6. Department of Food Hygiene, Veterinary College of Norway, Oslo, Norway. 1970. Myoglobin Electrophoretic Patterns in Identification of Meat from Different Animal Species. *J. Agr. Food Chem.* Vol. 18, No. 4, p. 737-739.
7. Matthey, Mary, A. L. Parsons and R. A. Lawrie. 1970. Quantitative Identification of Meat Species after Heating. *J. Fd. Technol.* Vol. 5, p. 41-56.
8. Lundstrom, Ronald C. 1983. Identification of Pacific Rockfish Species by Isoelectric Focusing. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* Vol. 66, No. 4, p. 974-980.
9. 小沢總一郎 矢野幸男 阿部恒夫，茂木一重。1969. 免疫學的方法による食肉の動物種鑑別法。日畜會報 40 (9), p. 357 ~ 362.
10. 小沢總一郎、阿部恒夫、矢野幸男、茂木一重。1971. 免疫學的方法による食肉の動物種鑑別法。日畜會報 43 (7), p. 395~399.

SEROLOGICAL IMMUNODIFFUSION TECHNIQUE AND MYOGLOBIN ELECTROFOCUSING PATTERNS FOR THE IDENTIFICATION OF MEAT SPECIES

PEA-CHEW CHANG

ABSTRACT

Determination of the origin of meat component(s) in meat products is an important and challenging task in food hygiene and food control. In this research, serological immunodiffusion technique and myoglobin electrofocusing patterns were studied for the identification of meat from different animal species.

Ouchterlony's double diffusion method was used to identify several fresh meat species. Beef muscles heated with different heating temperature and time were also investigated. The result showed that the method was quite specific and

could be used to identify beef muscle even after heating at 70°C for 45 minutes.

Myoglobin electrofocusing patterns in identification of meat species is much reliable. It can resolve many more protein bands than do other electrophoretic methods and is able to differentiate even closely related species. The muscle extract mixtures of known ratios were electrofocused and the area of particular protein bands was quantified by TLC scanner. The result showed that this method was useful in both qualitative and quantitative determination.