

奶粉基因组 DNA 不同提取方法的比较

徐伟丽, 马 莺

(哈尔滨工业大学 食品科学与工程学院, 150090 哈尔滨)

摘 要: 为选择适合奶粉材料进行分子标记检测的 DNA 提取方法, 以市售奶粉为材料, 采用 6 种不同的方法提取基因组 DNA, 并比较这 6 种方法的提取效果. 结果表明, 除异丙醇沉淀法和十二烷基硫酸钠法 (SDS 法) 外, 其他 4 种方法提取的基因组 DNA 均适用于聚合酶链式反应 (PCR) 检测. 同时, 结合基因组 DNA 的纯度和质量浓度, 明确奶粉基因组 DNA 提取方法的优劣依次为: 热解法、异硫氰酸胍法、高盐低 pH 法和十六烷基三甲基溴化铵法 (CTAB 法).

关键词: 奶粉; 基因组 DNA; 提取方法; 聚合酶链式反应

中图分类号: TS252.51

文献标志码: A

文章编号: 0367-6234(2012)08-0073-03

Comparison of different extraction methods of genomic DNA from milk powder

XU Wei-li, MA Ying

(School of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, 150090 Harbin, China)

Abstract: There are 6 methods, pyrolysis, high-salt low-pH, isopropyl alcohol, CTAB, SDS or GuSCN, used in the extraction of milk powder genomic DNA for the molecular marker analysis of high quality and sufficient samples. To find out the better method of them, the effects of different methods were compared by detecting the DNA by optical density, agarose gel electrophoresis and polymerase chain reaction (PCR). The results showed that the genomic DNA extracted by all methods except for isopropyl alcohol and SDS method could be used in PCR reaction. Meanwhile, the better DNA concentration and purity could be gained by different methods in the order of pyrolysis, GuSCN, High-salt low-pH, CTAB. These methods are simply to operate, fast to gain results, and suitable for the extraction of total DNA from milk powder.

Key words: milk powder; genomic DNA; extraction method; polymerase chain reaction (PCR)

近年来, 分子生物学技术已成功用于物种鉴别, 其中的聚合酶链式反应 (PCR) 技术更是广泛应用于食品原料物种鉴别、饲料中动物源性成分的鉴别和掺伪检验. 核酸分子是 PCR 技术应用的主要对象, 所以, DNA 的分离与提取是该项技术的重要前提^[1-4]. 反刍动物奶中含有体细胞 (包括白细胞和乳腺上皮细胞). 有研究表明, 这些细胞可以作为 DNA 来源用于 PCR 扩增特定靶序列的

区别动物物种^[5-9]. 目前, 对于植物和动物组织全基因组 DNA 的提取方法已有不少研究和报道^[10-19]. 奶粉不同于一般的植物和动物组织材料, 适宜的提取方法也不同. 能够更有效地提取更高质量的奶粉基因组 DNA 方法的筛选, 是一个需要进一步探讨的问题.

目前关于奶粉中全基因 DNA 的提取国外尚无报道, 国内仅有岳巧云等^[20]采用 Plant DNA Wizard 纯化试剂盒 (Promega 公司) 提取奶粉中的基因组 DNA 用于实时荧光 PCR 法对奶粉中的豆粉进行检测. 此方法具有费用高、费时、对操作技能有较高要求等缺点, 因此, 需要发展简单、快速、成本低的奶粉基因组 DNA 提取方法. 而采用不同

收稿日期: 2011-08-10.

基金项目: 哈尔滨工业大学科研创新基金资助项目 (HIT-NSRIF-2012081); 四川省应用基础研究 (2009JY0101).

作者简介: 徐伟丽 (1977—), 女, 博士, 讲师;

马 莺 (1961—), 女, 教授, 博士生导师.

通信作者: 马 莺, maying@hit.edu.cn.

方法提取奶粉基因组 DNA 的比较研究目前国内尚无报道. 本实验选择热解法、异丙醇沉淀法、CTAB (cetyl-trimethyl-ammonium bromide, 十六烷基三甲基溴化铵) 法、SDS (sodium dodecyl sulphate, 十二烷基硫酸钠) 法和高盐低 pH 值法、异硫氰酸胍法 6 种方法, 以市售奶粉为材料, 进行基因组 DNA 提取, 通过提取效果比较, 探讨适用于奶粉的基因组 DNA 提取方法. 为乳品安全中利用 PCR 技术进行快速检测找到简单、稳定、优质的 DNA 提取方法.

1 实 验

1.1 实验材料

全脂奶粉购于超市, 于阴凉干燥处储存备用. 开封后分装, 于 4 ℃ 保存.

1.2 试剂

Tris Base、EDTANa₂、SDS、CTAB、异硫氰酸胍、Triton X-100、Tris 平衡酚、琼脂糖 G-10、氯仿、异戊醇、异丙醇、乙醇及 PCR 试剂均购于哈尔滨宝泰克生物科技有限公司.

1.3 主要仪器

TGL-16G 型台式离心机、DK-80 型电热恒温水槽、WFZ UV-2100 型紫外可见分光光度计、DYY-10 型 (ECP3000) 三恒电泳仪、TAKARA TP600 PCR 仪、Bio-RAD Universal Hood II 凝胶成像仪和电脑 750 W 微波炉均为本实验室仪器.

1.4 引物

参考文献[21]合成扩增牛 12SrRNA 基因设计特异性引物 cow-1: 5'-CTAGAGGAGCCTGTC-TATAAT-CGATAA-3'; cow-2: 5'-AAATAGGGT-TAGATGCACT-GAATCTAT-3', 扩增产物 344 bp, 引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成.

1.5 DNA 提取方法

热解法、异丙醇沉淀法、CTAB 法、SDS 法、高盐低 pH 法、异硫氰酸胍法的具体步骤见文献[1,3].

1.6 基因组 DNA 纯度和质量浓度检测

参考文献[1, 3]进行检测. 根据 ρ (DNA)/(mg · L⁻¹) = 50 × D (260 nm) × 501 计算 DNA 质量浓度; 根据 D (260 nm)/ D (280 nm) 和 D (260 nm)/ D (230 nm) 判断 DNA 的大致纯度.

1.7 琼脂糖凝胶电泳检测

5 μL 基因组 DNA 与 1 μL 6 × Loading Buffer 混匀, 点样, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳 (100 V, 30 min), 紫外凝胶成像仪观察电泳胶板并拍照.

1.8 基因组 DNA 用于 PCR 扩增的适应性检测

参考文献[1-4]的反应体系和条件. 用

1.7% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物.

2 实验结果

2.1 奶粉基因组 DNA 质量浓度和纯度检测结果

奶粉中基因组 DNA 的提取结果见表 1. 可以看出: DNA 质量浓度最大的为 SDS 法 (495.833 mg/L); 其次为异丙醇沉淀法和热解法, 分别为 302.083 和 231.250 mg/L. 高盐低 pH 法和 CTAB 法提取的 DNA 质量浓度最低, 分别为 31.250 和 29.167 mg/L. 提取得到的 DNA 的 D (260 nm)/ D (280 nm) 范围为 1.65 ~ 1.87, 较为理想; 若偏高, 表明有 RNA 污染; 若偏低, 则表明有蛋白或苯酚污染, 接近 1.80 效果最好^[22-23]. 表中数据也表明 CTAB 法和异丙醇沉淀法提取的基因组 DNA 的纯度较高, 其他 4 种方法均较低. 因此, 也不能排除由于杂质的影响而使 DNA 质量浓度的测量结果偏大的可能.

表 1 奶粉基因组 DNA 的质量浓度和纯度

提取方法	ρ / (mg · L ⁻¹)	D (260 nm) / D (280 nm)	D (260 nm) / D (230 nm)
热解法	231.250	1.047	0.420
异丙醇沉淀法	302.083	1.629	0.233
CTAB 法	29.167	1.273	1.750
SDS 法	495.833	0.561	0.090
高盐低 pH 法	31.250	0.938	0.556
异硫氰酸胍法	139.583	1.000	0.014

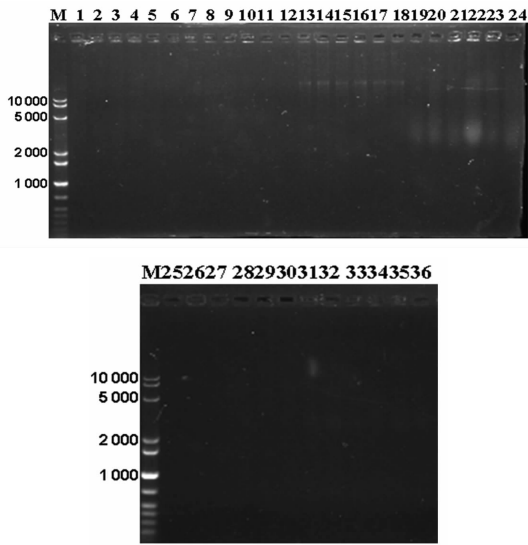
2.2 奶粉基因组 DNA 的琼脂糖电泳检测结果

奶粉基因组 DNA 的质量浓度和纯度进一步采用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 结果见图 1. CTAB 法提取的奶粉基因组 DNA 谱带单一, 无碎片和连片; 重复试验的 DNA 条带迁移率一致, 说明此方法具有较好的稳定性以及此法提取的基因组 DNA 完整性好. 其他 5 种方法提取的基因组 DNA 在凝胶上没有出现谱带, 其可能原因: 一是 DNA 质量浓度较低; 二是没有提取到 DNA.

2.3 PCR 扩增结果

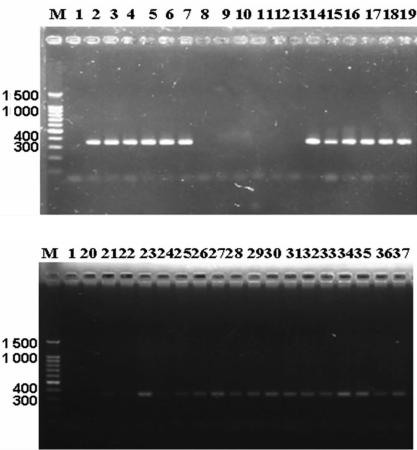
奶粉基因组 DNA 的 PCR 反应结果见图 2. 结果显示, PCR 产物的量不取决于 DNA 的质量浓度, 而是取决于 DNA 的提取方法. 异丙醇沉淀法和 SDS 法提取的 DNA 质量浓度较高, 却不能得到满意的 PCR 扩增产物. 其他 4 种方法提取的基因组 DNA 样品的 PCR 扩增片段大小与预期一致, 且重复性好. 说明这 4 种方法提取的基因组 DNA 可以直接用于牛特异性片段的 PCR 扩增. 因此, 认为这 4 种方法提取的奶粉基因组 DNA 均适用于 PCR 检测. 其中热解法和 CTAB 法特异性条

带更清晰,效果更好.



M: DNA Marker;1~6 为热解法;7~12 为异丙醇沉淀法;13~18 为 CTAB 法;19~24 为 SDS 法;25~30 为高盐低 pH 法;31~36 为异硫氰酸胍法.

图 1 奶粉基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳



M:100 bp DNA Marker(最亮的条带为 500 bp);1 为空白对照(水代替 DNA 模板);2~7 为热解法;8~13 为异丙醇沉淀法;14~19 为 CTAB 法;20~25 为 SDS 法;26~31 为高盐低 pH 法;32~37 为异硫氰酸胍法.

图 2 牛特异性引物扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

3 讨 论

PCR 技术以及建立在 PCR 基础上的分子标记技术,能以微观的视角解释其他技术现在无法解决的问题.但是,由于 PCR 扩增对模板 DNA 的质量要求较高,DNA 质量是影响分子实验结果的关键因素之一^[1-4,18-19].

在提取奶粉基因组 DNA 的过程中要注意:奶粉开封后阴凉干燥处保存,避免杂菌污染和吸湿结块;奶粉在进行去蛋白步骤时,颠倒混匀要充分(保持一段时间),以增加抽提效果;水浴加热时要使管盖高出水面并保持一定的高度,避免 Eppendorf 管炸开,污染样品.

4 结 论

1) 奶粉中的 DNA 含量很少,这 6 种方法获得的提取物中均有蛋白质污染.

2) 热解法、CTAB 法、高盐低 pH 法和异硫氰酸胍法提取的奶粉基因组 DNA 均适用于 PCR 检测.综合考虑基因组 DNA 的纯度和质量浓度,认为这 4 种方法的优劣依次为:热解法、异硫氰酸胍法、高盐低 pH 法和 CTAB 法.

3) 这 4 种奶粉基因组 DNA 提取方法均具有操作简便、省时、利于快速检测等优点.可以根据具体的实验条件和要求选择相应的 DNA 提取方法.

参考文献:

[1] 徐伟丽,马莺,汪家琦,等. 大米基因组 DNA 不同提取方法的比较[J]. 江苏农业科学, 2011 (6):46-49.

[2] 徐伟丽,杜明,王文侠,等. 熟豆浆基因组 DNA 提取方法的优化[J]. 2010 年国际细胞生物学、生物学、生物工程会议, 2010,6:247-251.

[3] 徐伟丽,马莺,杜明,等. 豆粉基因组 DNA 不同提取方法的比较[J]. 中国农学通报, 2011,27(23):119-122.

[4] 徐伟丽,杜明,马莺,等. 生豆浆基因组 DNA 不同提取方法的比较[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(20): 12013-12015, 12017.

[5] LIPKIN E, SHALOM A, KHATIB H, *et al.* Milk as a source of deoxyribonucleic acid and as a substrate for the polymerase chain reaction[J]. J Dairy Sci, 1993, 76(7):2025-2032.

[6] AMILLS M, FRANCINO O, JANSÁ M, *et al.* Isolation of genomic DNA from milk samples by using Chelex resin[J]. J Dairy Res, 1997, 64(2):231-238.

[7] MAUDET C, TABERLET P. Detection of cows' milk in goats' cheeses inferred from mitochondrial DNA polymorphism[J]. J Dairy Res, 2001, 68(2):229-235.

[8] BAI Wenlin, YIN Ronghuan, ZHAO Sujun, *et al.* Rapid detection of bovine milk in yak milk using a polymerase chain reaction technique[J]. J Dairy Sci, 2009, 92(4):1354-1360.

[9] LÓPEZ-CALLEJA I, GONZÁLEZ I, FAJARDO V, *et al.* Rapid detection of cows' milk in sheeps' and goats' milk by a species-specific polymerase chain reaction technique[J]. J Dairy Sci, 2004, 87(9):2839-2845.

[10] OARD J H, DRONAVALLI S. Rapid isolation of rice and maize DNA for analysis by random-primer [J]. Plant Mol Biol Rep, 1992, 10: 234-241.