

基于磁珠核酸提取法的动物源性成分检测研究

沈丽^{1*}, 贺平丽², 冯涛³

(1.北京物资学院物流学院,北京 101149;2.中国农业大学动物营养学国家重点实验室,北京 100193;3.北京百奥科生物技术有限公司,北京 100176)

摘要:实验采用磁珠提取肉制品及饲料中的核酸,并利用常规PCR和实时荧光PCR技术建立鉴定动物源性成分的方法。通过对磁珠核酸提取法与商品化核酸提取试剂盒进行比较,证明磁珠核酸提取法具有方便、快速、

参考文献:

- 2007.
- [1] Cowieson A J, Acamovie T, Bedford M R. The effect of phytic acid and phytase on the digestibility of maize starch for growing chickens[A]. In: Proceedings of the International Poultry Scientific Forum[C]. Atlanta, Georgia. USA The International Poultry Scientific Forum Atlanta, 2004.
- [2] 郭景峰, 徐文进. 挤压膨化玉米的糊化度与乳猪料[J]. 饲料工业, 2006, 27(9): 54-55.
- [3] 胡友军, 周安国, 杨凤, 等. 糊化淀粉对断奶仔猪消化率和血糖水平的影响[J]. 动物营养学报, 2003, 2(15): 33-35.
- [4] 付中华, 薛晓金, 田素芳. 糊化度测定方法[J]. 食品工业, 2004, (3): 27-29.
- [5] 赵凯. 食品淀粉的结构、功能及应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2009.
- [6] 顾正彪. DSC在淀粉研究中的应用[J]. 无锡轻工大学学报, 1996, 15(2): 179-182.
- [7] Jacobson M R, Bemiller J N. Method for determining the rate and extent of accelerated starch retrogradation[J]. Cereal Chemistry, 1998, 75: 22-29.
- [8] 赵思明, 熊善柏, 张声华. 稻米淀粉糊老化过程的流变学和质构特性[J]. 华中农业大学学报, 2002, 21(2): 161-164.
- [9] 孔祥珍, 周惠明, 吴刚. DSC、NMR、X-射线衍射三种技术在研究面包老化中的应用[J]. 食品工业科技, 2003, 24(2): 85-88.
- [10] 熊义强. 饲料淀粉糊化度(熟化度)的测定[J]. 饲料工业, 2000, 21(3): 30-31.
- [11] 叶为标. 淀粉糊化及其检测方法[J]. 粮食与油脂, 2009, (1): 7-10.
- [12] 孙秀萍, 于九皋, 刘延奇. DSC分析方法在淀粉凝胶化研究中的应用[J]. 化学通报, 2003, 66.
- [13] 张本山, 王斌. 淀粉多晶体系中的链链结晶与链水结晶结构研究[J]. 中国粮油学报, 2008, 23(1): 48-50.
- [14] Krueger B R, Knutson C A, Inglett G E, et al. A differential scanning calorimetry study on the effect of annealing on gelatinization behavior of corn starch[J]. J Food Sci, 1987, 52: 715.
- [15] 饶应昌. 饲料加工工艺与设备[M]. 北京: 中国农业出版社, 2007.
- [16] Murray S M, Flickinger E A, Patil A R, et al. In vitro fermentation characteristics of native and Processed cereal grains and Potato starch using ileal chime from dogs[J]. J Anim Sci, 2001, 79: 435-444.
- [17] Perez H, Oliva-teles A. Utilization of Raw and gelatinized starch by European sea bass(Dicentrarchus labrax) juveniles[J]. Aquaculture, 2002, 205: 287-299.
- [18] 周国燕, 胡琦玮, 李红卫, 等. 水分含量对淀粉糊化和老化特性影响的差示扫描量热法研究[J]. 食品科学, 2003, 30(17): 89-92.
- [19] Wolters M G E, Cone J W. Prediction of degradability of starch by gelatinization enthalpy as measured by differential scanning calorimetry[J]. Starch, 1992, 44(1): 14-18.
- [20] 刘亚伟. 淀粉基食品添加剂[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [21] 吴俊, 谢守和. 玉米淀粉的粒度效应对其糊化行为影响研究[J]. 中国粮油学报, 2006, 21(1): 51-54.
- [22] 马成林, 左春怪, 张守勤, 等. 高压对玉米淀粉糊化度影响的研究[J]. 农业工程学报, 1997, 13(1): 172-176.
- [23] 张凯, 李新华, 赵前程, 等. 不同品种玉米淀粉糊化特性比较[J]. 沈阳农业大学学报, 2005, (1): 107-109.
- [24] 赵前程, 吴素文, 李新华, 等. 普通玉米杂交种间淀粉糊化过程中热力学性质的差异研究[J]. 中国粮油学报, 2007, 6(22): 34-37.
- [25] Huber K C, BeMiller J N. Channels of maize and sorghum starch granules[J]. Carbohydrate Polymers, 2000, 41(3): 269-276.
- [26] 黄强, 李琳, 扶雄, 何小维. 酶对淀粉颗粒相变性质的影响[J]. 高分子材料科学与工程, 2009, 25(2): 85-88.
- [27] Cooke D, Gidley M J. Loss of crystalline and molecular order during starch gelatinization: origin of the enthalpic transition[J]. Carbohydrate Research, 1992, 227: 103-112.
- [28] Mechteldis G H. Prediction of degradability of starch by gelatinization enthalpy as measured by differential scanning calorimetry[J]. Starch, 1992, 44(1): 14-18.

灵敏、安全及可实现自动化等优点。将磁珠核酸提取法与实时荧光PCR技术相结合,对猪、牛、羊、鸭、鸡等动物源性成分进行鉴别研究,结果表明:该方法完全适用于动物源性饲料及肉制品中动物源性成份的鉴定工作,为确证肉及肉产品的成份和来源,预防疯牛病的传播及物种的鉴别提供了有效的分子生物学检测方法。

关键词: 动物源性成分;磁珠;PCR

中图分类号: S814.2

文献标识码: B

文章编号: 0258-7033(2012)21-0075-04

疯牛病^[1-2]的出现使得对动物源性种类进行鉴别变得非常有必要。采用聚合酶链式反应(PCR)鉴别食品、肉制品以及饲料中的动物源性成分受到广泛关注。Tartaglia^[3]首次报道了用PCR方法来检测牛、羊源性成分。结果表明PCR方法具有很高的特异性和灵敏性。然而,常规PCR方法对终点数据定量困难,对产物的分析依赖于低通量技术(如琼脂糖凝胶电泳)。为了克服以上缺点,在常规PCR基础上,发展了实时荧光PCR(RT-PCR)技术,在短时间内能够区分微量的不同动物源性成分,可以实现仪器在线式实时高通量检测,因此成为近年来的研究热点^[4]。

由于复杂样品中存在抑制RT-PCR的物质,从样品中提取核酸的前处理步骤对RT-PCR的结果起到关键性作用^[5]。目前,样品中核酸的提取多采用商品化的试剂盒。该提取方法存在提取速度慢,核酸提取不完全等缺陷。磁性纳米材料的发展为核酸的提取提供了新的途径。由于磁珠分离纯化生物分子操作简单,效率高,且具有自动工作站兼容的特性,磁珠被广泛应用于核酸、蛋白质、细胞等的分离^[6-7]。本试验引入磁珠提取肉制品以及饲料中的动物源性DNA片段。然后,运用常规PCR和荧光PCR技术建立起肉制品及饲料中动物源性成分的快速、特异、灵敏的鉴定方法。

1 材料与方 法

1.1 检测样品 植物源性饲料为实验室自配参照样,奶粉来自于商业委托检测样品,已知含有牛源性成分。牛、羊、猪、鸡、鸭肉均购自超市,使用前所有样品都在-20℃密封保存。

1.2 主要试剂 SYBR Green I购自sigma公司;磁珠法DNA提取试剂由北京百奥科生物技术有限公司提供;Marker DL 1 000等其他试剂购自天根生化科技(北京)有限公司。

收稿日期:2012-05-29;修回日期:2012-06-25

资助项目:国家自然科学基金资助项目(20905009);北京市教育委员会科技计划面上项目(SQKM201210037002)

作者简介:沈丽(1978-),女,天津人,副教授,博士

*通讯作者

牛源性成分检测用引物(对)序列:

引物1:5'-GCCATATACTCTCCTTGGTGACA-3'

引物2:5'-CTAGGCTTGGGAATAGTACGA-3'

羊源性成分检测用引物(对)序列:

引物1:5'-TATTAGGCCTCCCCCTTGTT-3'

引物2:5'-CCCTGCTCATAAGGGAATAGCC-3'

猪源性成分检测用引物(对)序列:

引物1:5'-GCCTAAATCTCCCCTCAATGGTA-3'

引物2:5'-ATGAAAGAGGCAAATAGATTTTCG-3'

鸡源性成分检测用引物(对)序列:

引物1:5'-GGGACACCCtCCCCtTAATGACA-3'

引物2:5'-GGAGGGCtGGAAGAAGGAGTG-3'

鸭源性成分检测用引物(对)序列:

引物1:5'-GGAGCACCCtCtATCAGAGAAAGACA-3'

引物2:5'-GTGTGTAGAGCtCAAGATCAATCCC-3'

以上引物在上海生工生物工程技术有限公司合成。引物溶液:用TE缓冲液分别将上述引物稀释到25 μmoL/L。

1.3 仪器设备 PCR仪为美国MJ Research公司产品;Centrifuge 5415 D型高速低温离心机为Sigma公司产品;UVP型紫外凝胶成像仪为英国Gene Geniu 公司产品。

1.4 植物饲料阳性参照样的制备 首先从市场上分别购得约250 g新鲜的牛肉和羊肉,将其冷冻干燥,然后用电动粉碎机粉碎,分别将粉碎后的牛、羊肉粉加入到玉米粉中,充分混匀,使其浓度为0.125%,然后将制备好的阳性参照样放在冰箱中冷冻保持,备用。

1.5 总DNA抽提 利用目前市场上销售的动物源性基因组DNA提取试剂盒进行总DNA抽提,严格按照说明书的操作步骤进行。

利用磁珠法进行动物源性基因组的总DNA抽提,具体步骤如下:

称取5~10 mg研磨的动物源性饲料(30 mg肉松或粉碎后的肉),加入300 μL裂解缓冲液及20 mg/mL的蛋白酶K溶液20 μL混匀,65℃温育30 min,期间混匀样品2~3次。12000 r/min离心2 min得到样品溶液。加入600 μL结合缓冲液,充分混匀。加入40 μL磁珠,轻柔颠倒10 min混匀,静置2 min后磁分离弃去清液。加入

500 μL 洗涤缓冲液I,使磁珠重新悬浮,磁场分离,弃去清液。再加入600 μL 洗涤缓冲液II,同法洗涤磁珠两遍。将离心管置于磁力架上,从离心管的另一侧缓慢加入300 μL 洗涤缓冲液III,30 s后用弃去洗涤液。加入40 μL 洗脱缓冲液,使磁珠重新悬浮,55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴10 min,其间轻轻晃动使DNA洗脱出来。磁分离,清液即为DNA提取液,备用。

1.6 常规PCR扩增 在50 μL 反应体系中加入动物源性样品基因组作为模板,灭菌双蒸水为18 μL ,PCR mix 25 μL ,混合引物2 μL ,DNA模板5 μL 。

标准三步法PCR扩增条件为94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min,然后进入循环反应,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火40 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s,35个循环后,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。

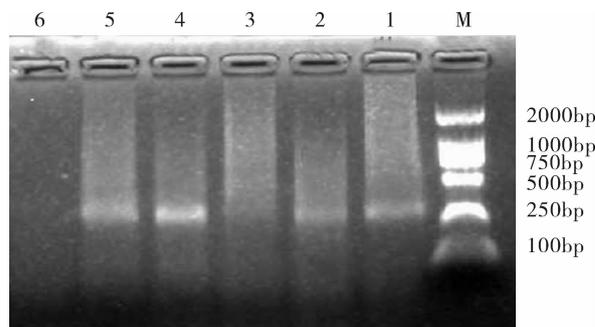
1.7 RT-PCR扩增 在10 μL 反应体系中加入动物源性样品基因组作为模板,灭菌双蒸水为3.75 μL ,SYBR Green I 0.25 μL ,混合引物0.5 μL ,PCR mix 5 μL ,DNA模板0.5 μL 。

PCR扩增条件为94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min,然后进入循环反应,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,57 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s,35个循环后,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸至8 min,读板温度78 $^{\circ}\text{C}$,读板时间0.1 s。

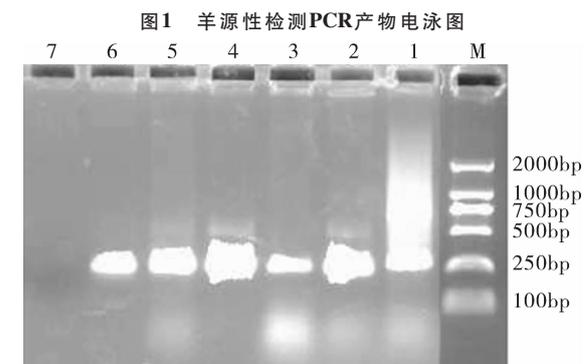
1.8 PCR产物的电泳检测 用电泳缓冲液配制1%琼脂糖凝胶,在胶未凝胶前加入终浓度为0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溴化乙锭,制备胶样。在每个泳道中加入10 μL 的PCR产物,其中一个泳道中加入5 μL DNA Marker,同时做阴性对照。120~150 V电压,电泳30 min。电泳结束后,将琼脂糖凝胶置于凝胶成像仪上成像。

2 结果

2.1 常规PCR鉴定样品中的动物源性成分 利用常规PCR对饲料和肉制品中动物源性成分进行了鉴定。这里以饲料中牛羊源成分的鉴定为例,对实验结果进行分析。如图1所示,泳道1为百奥科配方改进前羊源性玉米饲料的PCR产物,应用磁珠法提取的基因组可以在250 bp处扩增出电泳条带。对百奥科试剂配方做出相应调整,可以看到在改进后的第4、5泳道条带亮度明显增强,而应用市场上销售的某种动物源性植物饲料基因组试剂盒提取的基因组在2号泳道样本得到扩增,3号泳道样本未得到扩增。由图2可知,应用百奥科动物源性植物饲料基因组提取试剂盒提取的植物性和奶粉饲料中的牛源基因组可以在250 bp处扩增出较亮电泳条带,其所用样本量小且所得结果优于市场上销售的该种试剂盒。



注:M:DNA Marker DL2000,2、3:市售基因组试剂盒提取5 mg 样本,1、4、5:磁珠提取法提取5mg样本,6:阴性对照



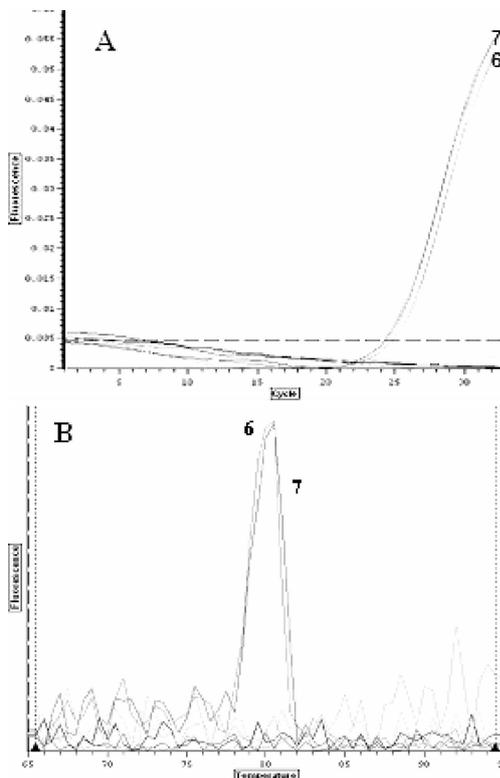
注:M:DNA Marker DL2000,1:市售基因组试剂盒牛源饲料(63 mg 样本)扩增结果,2、3:磁珠法牛源饲料扩增结果(6 mg 样本),4、5:磁珠法奶粉饲料扩增结果(30 mg 样本),6:市售基因组试剂盒奶粉饲料扩增结果(50 mg 样本),7:阴性对照

图2 牛源性检测PCR产物电泳图

2.2 荧光PCR鉴定样品中的动物源性成分 本文利用SYBR Green I实时荧光PCR技术对猪、牛、羊、鸭、鸡源性成分鉴别方法进行研究。以羊阳性样品的结果为例,由图3A可知,羊源性成分的DNA在33循环时检测到荧光信号明显增强,而其它动物源性成分和空白对照均无荧光信号的增长。此外,溶解曲线中的溶解峰也可以反映反应中扩增到的产物。由图3B可知,羊源性成分的DNA在80.5 $^{\circ}\text{C}$ 有明显的溶解峰,而其它动物源性成分和空白对照均无明显的峰。此外,将其它物种提取后的DNA模版进行RT-PCR扩增,结果表明应用SYBR Green I实时荧光PCR技术对猪、牛、鸭、鸡源性成分的检测方法与羊源性检测结果相似,彼此互相不干扰。因此,本文所采用的RT-PCR技术具有很高的特异性。

3 讨论

由实验结果可知,磁珠法提取基因组DNA与市售商品化基因提取试剂盒相比有如下优点:(1)方便:不需要整个过程的超速离心,只需一步简单离心



注:6、7为羊阳性对照,阴性对照为猪、牛、鸡、鸭,空白对照为水

图3 羊阳性样品RT-PCR扩增的浓度曲线(A)和溶解曲线(B)

操作,简单安全;(2)快速:样本裂解后在30~40 min内,只需几个简单的步骤,即可完成一次提取,省时省力;(3)灵敏:与离心柱提取所需至少50 mg样本量相比,本方法只需要5 mg的样本即可完成基因组DNA的提取检测,灵敏度更高;(4)安全:整个过程都是无毒性的物质操作,而无需用到有毒的苯酚氯仿等有机物,安全可靠;(5)可配自动化磁珠提取仪,如在96孔板中纯化DNA,程序开始后,不需任何手工操作,在1小时内完成96个样品的纯化,最大程度的避免了手工操作的误差,使平行性更好。因此,该方法推广可用于大批量样本的高通量、快速DNA提取,用于分析其中的DNA来源。

SYBR Green I是一种不对称腈类荧光素,可以非特异性地嵌合于双链DNA双螺旋结构的小沟中^[8]。在RT-PCR中使用SYBR Green I荧光染料已有较多文献报道^[9-10]。在PCR反应体系中,游离在溶液中的SYBR Green I不发荧光,在PCR聚合过程中,越来越多的SYBR Green I分子结合到新生的双链DNA中,可实时检测到增强的荧光信号,由此可进行扩增产物的定性分析。同时,SYBR Green I可以在反应末尾对扩增产物进行溶解,称为溶解曲线分析。在溶

解曲线分析过程中,基于产物长度和G/C含量的不同,扩增产物会在不同的温度点解链。随着产物的解链可以观察到荧光值的降低并被PCR仪所测量。对溶解曲线进行微分可以计算出溶解峰。溶解峰的大小与反应中扩增产物的含量成正比,因此用溶解曲线数据就可以对扩增产物进行定量检测。

4 结论

本文将磁珠核酸提取法和非探针类RT-PCR技术相结合,建立了一种快速高通量的鉴定动物源性成分的检测方法。该方法特异性强、准确性好、灵敏度高、可重复性好,完全适用于动物源性饲料及肉制品中动物源性成份的鉴定工作,为明确肉及肉产品的成份和来源,预防疯牛病的传播及物种的鉴别提供了有效的分子生物学检测方法。

参考文献:

- [1] Wang R F, Myers M J, Campbell W, et al. A rapid method for PCR detection of bovine materials in animal feedstuffs [J]. *Mol Cell Probe*, 2000, 14: 1-5.
- [2] Brown P, Will R G, Brodley R, et al. Bovine spongiform encephalopathy and variant creutzfeldt-Jakob disease: background, evolution and current concerns [J]. *Emerg Infect Dis*, 2001, 7(1): 6-16.
- [3] Tartaglia M, Saule E, Pestalozza S, et al. Detection of bovinemitochondrial DNA in ruminant feeds: a molecular approach to test for the presence of bovine-derived materials [J]. *J Food Protect*, 1998, 61: 513-518.
- [4] Martín I, García T, Fajardo V, et al. SYBR-Green real-time PCR approach for the detection and quantification of pig DNA in feedstuffs [J]. *Meat Sci*, 2009, 82(2): 252-259.
- [5] Dhumpaa R, Bub M, Handberg K J, et al. Rapid sample preparation for detection and identification of avian influenza virus from chicken faecal samples using magnetic bead microsystem [J]. *J Virol Methods*, 2010, 169(1): 228-231.
- [6] Haukanes B I, Kvam C. Application of magnetic beads in bioassays [J]. *Nat Biotechnol*, 1993, 11: 60-63.
- [7] Nylund L, Heilig HGH J, Salminen S, et al. Semi-automated extraction of microbial DNA from feces for qPCR and phylogenetic microarray analysis [J]. *J Microbiol Methods*, 2010, 83(2): 231-235.
- [8] 邹文, 杨旭, 杨立平, 等. SYBR实时定量聚合酶链反应检测鸭乙型肝炎病毒的研究[J]. *中华肝病杂志*, 2004, 12(7): 444.
- [9] Akiyama H, Sasaki N, Sakata K, et al. Indicated detection of two unapproved transgenic rice lines contaminating vermicelli products [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(15): 5942-5947.
- [10] 欧阳松应, 杨冬, 欧阳红生, 等. 实时荧光定量PCR技术及其应用[J]. *生命的化学*, 2004, 24(1): 74-76.