

杏仁产品杏仁成分的 PCR 检测方法研究

覃芳芳¹, 邓鸿铃¹, 罗海英¹, 郭新东¹, 朱思明², 吴玉奎¹

(1. 广州市产品质量监督检验所, 国家加工食品质量监督检验中心(广州), 广东 广州 510110)

(2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640)

摘要: 建立了应用 PCR 技术鉴别杏仁产品中的杏仁成分的方法。杏仁产品经前处理后, 用酚仿抽提 DNA, 提取时间为 2 h 左右, 提取所得的 DNA 浓度和 A260/A280 均达到了 PCR 的要求。该方法快速简便, 不仅可以检测杏仁产品的 DNA, 且可检测到杏仁产品中 0.1% 的其它植物成分。

关键词: DNA; PCR; 杏仁产品; 掺入

中图分类号: TS207.3; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)06-0603-04

Application of PCR Assays in Detection of Amygdaline Components in Amygdaline Food

QIN Fang-fang¹, DENG Hong-ling¹, LUO Hai-ying¹, GUO Xin-dong¹, ZHU Si-ming², WU Yu-luan¹

(1. Guangzhou Product Quality Supervision and Testing Institute National Centre for Quality Supervision and Testing of Processed Food (Guangzhou), Guangzhou 510110, China)

(2. College of Light Industry and Food Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In this paper, a PCR-based method was developed for detection of amygdaline components in food. The pre-treated samples were extracted by phenol-chloroform for 2 h, and then the achieved DNA extracts from amygdaline foods were amplified by PCR. Results showed that this method was suitable for the detection of amygdaline components.

Key words: DNA; PCR; amygdaline food; adulteration

PCR 是聚合链式反应 (Polymerase Chain Reaction) 的简称, 是分子生物学中广泛运用的一种技术, 其主要是通过热循环, 实现目的基因片段的大量扩增。目前这项技术也越来越多地运用到食品成分鉴别检测之中^[1-6], 部分 PCR 检测方法已经作为检测方法标准。但是 PCR 技术在食品检测中的运用也受到一些限制, 主要是因为各种食品经过不同程度的深度加工, 食品中所含的 DNA 成份遭到不同程度的破坏, 并且在食品的生产过程中, 加入的不同添加剂和佐料, 使食品的成份更加复杂。如何提取出高质量的 DNA 成为了 PCR 运用于食品检测的一个限制因素。

杏仁产品是一种保健食品, 因其蛋白含量高, 含众多对人体有益的微量元素而受到人们喜爱。但是市面上杏仁产品原材料紧缺, 部分商贩将其他成分掺入杏仁产品中以降低制造成本。杏仁产品是真是伪, 如何鉴定, 还未见相关报道。我们通过试验, 建立了杏

仁产品杏仁 DNA 的提取方法, 发现采用 PCR 的方法可以鉴别杏仁产品的成分。

1 材料与方法

1.1 材料

试验样品均购自市场, 包括液态杏仁露、纯杏仁粉和杏仁饼, 对照样品为纯的杏仁 DNA。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取

液态样品: 取 1 mL 样品于 2 mL 的 eppendorf 管中, 加入 1 倍体积的异丙醇, 混合均匀, 室温下沉淀 5 min, 室温下以 12500 rpm 离心 5 min, 弃去上清液, 重复操作一次, 所得的沉淀用于提取 DNA。

固态样品: 将样品粉碎后称取 0.3~0.6 g, 按下列方法提取 DNA。

将处理过的试样用 400 μ L TE 缓冲液 (Tris-HCl, pH 7.0, 10 mmol; EDTA, pH 8.0, 1 mmol) 溶解, 加入等体积的苯酚: 氯仿: 异戊醇 (25:24:1), 振荡抽提 10 min, 室温下以 12500 rpm 离心 10 min, 小心

收稿日期: 2008-02-20

作者简介: 覃芳芳 (1978-), 女, 博士, 研究方向为食品工程及质量检测

通讯作者: 郭新东高级工程师

吸取上清液, 加入等体积的氯仿: 异戊醇 (24:1), 振荡抽提 10 min, 室温下以 12500 rpm 离心 10 min, 小心吸取上清, 加入 1/10 的 3 mol/L 的 NaAC (pH 5.2) 和 2~2.5 倍体积预冷的无水乙醇-20 °C, 沉淀 30 min, 4 °C 下以 12000 rpm 离心 10 min。弃去上清液, 沉淀

用 70% 乙醇洗涤, 真空抽干, 溶于 40 uL TE 缓冲液中。

1.2.2 PCR 体系及条件

本文所用的引物均委托 invitrogen 生物技术有限公司合成。具体引物信息见表 1。

表 1 杏仁制品内源基因和掺入植物成分内源基因的引物

Table 1 Primers of endogenous genes of amygdaline and soybean components

	引物序列	PCR产物大小 (bp)	基因性质
杏仁内源基因	正: 5'-ATCACAATCAGCTGCAGTGC-3'	181	未知
	反: 5'-GGAGGAGGACGAGGATTGAC-3'		
大豆内源基因	正: 5'GCCCTCTAGTCCACCCCATCC3'	180	Lectinu
	反: 5'GCCCATCTGCAAGCCTTTTTGTG3'		

PCR 体系中的缓冲液, 酶和 dNTPs 均购于 TAKARA 生物有限公司。具体反应体系和循环条件见表 2。

表 2 基因检测 PCR 反应条件

Table 2 PCR conditions for gene detection

基因	预变性 (°C/5 min)	循环扩增条件 (°C/30 s)	循环数	延伸 (°C/5 min)
杏仁内源基因	94	94	35	72
		55		
大豆内源基因	94	94	35	72
		60		
		72		

2 结果

2.1 DNA 提取结果

将提取得到的 DNA 用 10 倍 TE 缓冲液稀释, 产物用分光光度计检测其质含量。所提取的杏仁样品中 DNA 的浓度平均为 500 ng/uL, A260/A280 值在 1.8 左右, (具体数据见表 3), 可见所提取的 DNA 质量较好。

表 3 杏仁样品 DNA 提取结果

Table 3 DNA extraction from

样品	DNA浓度 (ng/μL)	A260/A280
液态杏仁露	468	1.79
杏仁粉	497	1.82
杏仁	554	1.86

2.2 PCR 结果

以 100 ng 所提取的 DNA 为 PCR 模版, 用杏仁内源基因引物进行 PCR 扩增, 电泳结果 (见图 1) 显示在所选择的 3 种杏仁样品料中均能扩增出相应的 181 bp 条带。

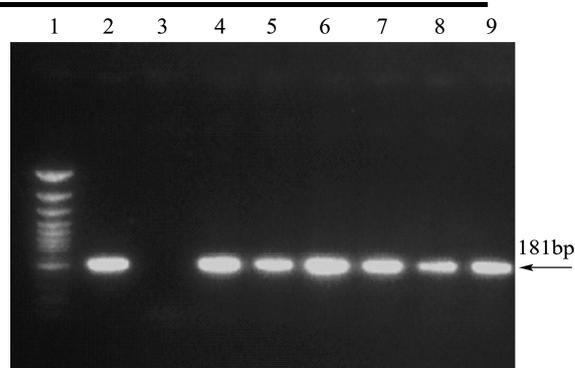


图 1 杏仁内源基因引物 PCR 检测杏仁样品 DNA 电泳结果

Fig.1 PCR detection of amygdaline samples using the primer of almond endogenous gene

注: 1: 100 bp ladder; 2: 杏仁基因组 DNA; 3: 空白对照 (以水为模版); 4-5: 液态杏仁露 DNA; 6-7: 杏仁粉 DNA; 8-9: 杏仁样品 DNA。

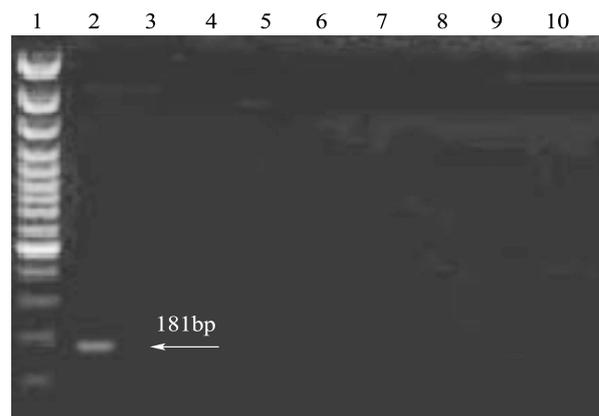


图 2 杏仁 PCR 引物对不同植物的 DNA 样品进行 PCR 试验的电泳结果

Fig.2 PCR detection of other plant samples using the primer of almond endogenous gene

注: 1: 100 bp ladder; 2: 杏仁基因组 DNA; 3: 空白对照 (以水为模版); 4: 水稻 DNA; 5: 小麦 DNA; 6: 玉米 DNA; 7: 大豆 DNA; 8: 番茄 DNA; 9: 马铃薯 DNA; 10: 花生 DNA。

为检测设计的引物的特异性, 采用设计的杏仁 PCR 引物对水稻、小麦、玉米、大豆、番茄、土豆和花生的 DNA 样品进行了 PCR 试验。电泳结果显示(见图 2), 本实验设计的引物只能在杏仁 DNA 中扩增得到相应的条带, 而在水稻、小麦、玉米、大豆、番茄、土豆和花生中都未能扩增得到相应的产物。这个结果表明, 我们设计的 PCR 引物特异性好, 可用于杏仁产品的定性检测。

采用国家标准 GB/T 19495.4-2004 中玉米、大豆、马铃薯和番茄的内源引物对杏仁 DNA 进行了 PCR 试验。试验结果显示(见图 3), 这四种 PCR 引物均不能在杏仁 DNA 中扩增得到相应的扩增条带。

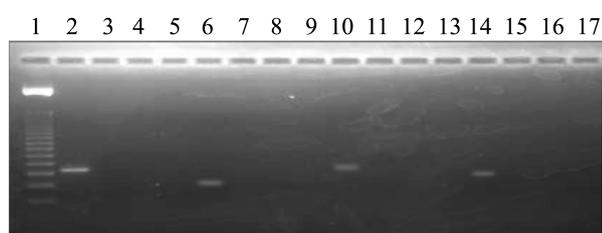


图3 玉米、大豆、马铃薯和番茄的内源引物对杏仁 DNA 进行 PCR 试验的电泳结果

Fig.3 PCR detection of almond gene using the endogenous gene primers of corn, soybean, potato and tomato

注: 1: 100 bp ladder; 2-5: 玉米内源引物; 6-9: 大豆内源引物; 10-13: 马铃薯内源引物; 14-17: 番茄内源引物; 2: 玉米 DNA; 6: 大豆 DNA; 10: 马铃薯 DNA; 14: 番茄 DNA; 3, 7, 11, 15: 空白对照(以水为模版); 4-5, 8-9, 12-13, 16-17: 杏仁 DNA。

同时, 对杏仁成分 PCR 检验方法的灵敏度进行了分析。将大豆乳饮料按不同的比例掺入杏仁露中, 提取 DNA 并用大豆内源基因引物进行 PCR 扩增。电泳结果如图 4 所示。将大豆乳饮料以从 1:10 到 1:1000 的体积比掺入到杏仁露中, 都能通过 PCR 扩增出相应的条带, 其中比例达到 1:1000 时扩增出的条带较弱。

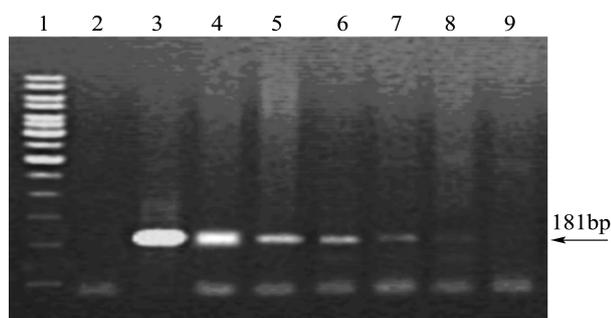


图4 PCR 检测含不同杏仁比例的电泳结果

Fig.4 PCR detection of samples with different almond contents

注: 1: 50 bp ladder; 2: 空白对照(以水为模版); 3: 大

豆乳饮料比例为 1:10; 4: 大豆乳饮料比例为 1:20; 5: 大豆乳饮料比例为 1:100; 6: 大豆乳饮料比例为 1:200; 7: 大豆乳饮料比例为 1:500; 8: 大豆乳饮料比例为 1:1000; 9: 杏仁露 DNA。

3 讨论

杏仁产品是大众喜爱的一种保健食品, 在中国有着悠久的食用记载历史。杏仁产品的质量也是大众所关心的。DNA 提取技术一直是 PCR 在食品检测中应用受限制的环节, 因为在食品加工过程中, 往往会添加各种添加剂或对食品原材料成分进行破坏性的加工。对于食品中 DNA 的提取方法有过不少的研究报道^[7-8], 但是还未有从杏仁食品中提取 DNA 的报道。在这里, 我们采用了分子生物学中的 PCR 技术来鉴别杏仁产品中是否含有其他植物成分。试验证明, 该方法操作简单可行, 灵敏度高, 能检测到杏仁产品中 0.1% 的掺假成分。

在提取杏仁 DNA 前, 对样品进行了处理, 用酚仿抽提所得的 DNA 产量高且质量好, 平均浓度达到了 400~600 ng/uL, A260/A280 比值平均在 1.8 左右。通过 PCR 检验证明, 这种方法提取的杏仁 DNA 质量高, 所得的 DNA 足以运用于 PCR 检测。由此可见, 本文将前处理与酚仿抽提相结合, 建立了一种快速简便的从杏仁产品中提取 DNA 的方法。另外, 采用 PCR 方法来检测杏仁产品中的杏仁成分的鉴别, 试验证明, 该方法灵敏可靠, 适于推广。

参考文献

- [1] 曹际娟, 陈明生, 卢行安, 等. PCR 检测转基因玉米及其粗加工食品[J]. 玉米科学, 2001, 9(2): 87-91
- [2] 陈家华, 潘良文, 沈禹飞, 等. 转基因抗草甘膦油菜籽中草甘膦氧化还原酶基因的检测方法研究[J]. 中国油料作物学报, 2001, 23(2): 63-67
- [3] 覃文, 董洁, 高东微, 等. PCR-Gene Scan 法检测转基因产品[J]. 生物技术, 2001, 11(5): 36-39
- [4] 邓鸿铃, 郭新东, 吴玉玺. 利用 PCR 方法检测转 BT 基因水稻[J]. 现代食品科技, 2007, 23: 71-74
- [5] 李平兰. PCR 技术及其在食品微生物检测中的应用[J]. 食品科学, 1998, 19(7): 3-5
- [6] 张永祥, 辛锡龙. PCR 技术在致病菌检测中的应用[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2003, 26(2): 116-118
- [7] 田雨. 从牛奶中分离 DNA 方法的建立[J]. 乳业科学与技术, 2006, 3: 112-113
- [8] 陈赞, 汪之和. 鱼糜制品中基因组 DNA 提取方法的比较[J]. 湖北农业科学, 2007, 46: 520-522