

金枪鱼制品中几种 DNA 提取方法的效果比较

许文杰¹, 熊雄¹, 黄曼虹¹, 李壹¹, 操敏¹, 陆利霞¹, 熊晓辉^{1,2}

(1. 南京工业大学食品与轻工学院, 江苏南京 211816)

(2. 江苏省食品安全快速检测公共技术服务中心, 江苏南京 211816)

摘要: 金枪鱼种类繁多, 市场上以次充好、以假乱真的现象时有发生。基于 DNA 的检测技术已经被广泛用于金枪鱼制品品种掺假检测。而 DNA 提取对 DNA 检测技术的运用至关重要。本研究以 28 份深加工金枪鱼产品为样本, 采用 3 种 DNA 提取方法 (SDS 法以及 2 种市售试剂盒) 进行 DNA 提取, 并对 DNA 的质量、得率、PCR 扩增及方法的可操作性等方面进行比较研究。结果表明, 3 种方法均可用于大多数金枪鱼制品的 DNA 提取。与其它 2 种市售试剂盒相比, SDS 法提取的 DNA 得率较低, 但纯度较好, A_{260}/A_{280} 比值为 1.89, 盐残留少, 对实时荧光定量 PCR 的抑制少, 且成本相对价格经济, 满足金枪鱼制品掺假检测的需求。

关键词: 金枪鱼; DNA 提取; PCR 扩增; 品种掺假

文章编号: 1673-9078(2021)07-57-65

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.7.0894

Comparison of Extraction Effect of Several DNA Extraction Methods in Tuna Products

XU Wen-jie¹, XIONG Xiong¹, HUANG Man-hong¹, LI Yi¹, CAO Min¹, LU Li-xia¹, XIONG Xiao-hui^{1,2}

(1. College of Food Science and Light Industry, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, China)

(2. Jiangsu Public Technical Service Center for Rapid Detection of Food Safety, Nanjing 211816, China)

Abstract: There are many types of tuna, shoddy and fake tuna products are found in the market from time to time. DNA-based detection technologies have been widely used in the detection of adulteration of tuna products. DNA extraction is crucial to the application of DNA detection technology. In this study, 28 deep-processed tuna products were used as the experimental samples. Three different DNA extraction methods (SDS method and two commercially available kits) were compared in terms of DNA quality, yield, PCR amplification and method operability. The results showed that all the three methods can be used for DNA extraction from most tuna products. Compared with the other two commercially available kits, the SDS method led to a lower DNA yield with a higher purity and a A_{260} -to- A_{280} ratio (1.89), less salt residue, lower inhibition in real-time fluorescent quantitative PCR and relatively low cost, which meets the demand for adulteration detection of tuna products.

Key words: tuna; DNA extraction; PCR amplification; variety adulteration

引文格式:

许文杰,熊雄,黄曼虹,等.金枪鱼制品中几种 DNA 提取方法的效果比较[J].现代食品科技,2021,37(7):57-65

XU Wen-jie, XIONG Xiong, HUANG Man-hong, et al. Comparison of extraction effect of several DNA extraction methods in tuna products [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(7): 57-65

金枪鱼 (Tuna), 又被称为吞拿鱼、鲔鱼, 属于硬骨鱼纲 (Osteichthyes) 鲈形目 (Pereiformes) 的鲭科 (Scombridae) 鱼类^[1]。肉质鲜美柔嫩, 营养价值高, 尤其是其所含的 DHA (二十二碳六烯酸) 和 EPA (二十碳五烯酸) 等多不饱和脂肪酸, 使得金枪鱼有着“海底黄金”的美称^[2]。

金枪鱼制品加工方式多样, 可冰鲜切片、油浸、

收稿日期: 2020-09-25

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (31701688)

作者简介: 许文杰(1997-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全与检测

通讯作者: 熊雄(1988-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 水产品掺假检测

煎炸、烘烤等。由于加工破坏了外形特征, 使得通过形态学的方法对物种鉴别就变的比较困难。一些不法商贩为谋取更大的利润, 用低价值鱼类替代高价值金枪鱼的现象时有发生。在金枪鱼消费市场中, 除 6 种经济价值比较高的优质金枪鱼外, 另外一些相似的品种, 如巴鲣 (*Euthynnus affinis*)、扁舵鲣 (*Auxis thazard*)、东方狐鲣 (*Sarda orientalis*) 等鱼类也常常用于生产金枪鱼罐头、鱼松等产品^[3,4]。因此, 有效区分和鉴定金枪鱼品种具有重要意义^[5]。

基于 DNA 技术的分子生物学方法具有特异性高、灵敏度强的优势, 在区分和鉴定鱼源性成分中具有重

大意义^[6-9]。常见的鉴定方法有限制性片段长度多态性 (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)^[10]、DNA 条形码 (DNA barcoding)^[11-13]、环介导等温扩增 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP)^[14-16]、实时荧光定量 PCR 技术 (Real-time PCR)^[17-19]。

在检测方法建立初期,提取高质量、高纯度及结构完整的基因组 DNA 是后续试验顺利进行的保障。然而,鱼肉制品在加工过程中经常添加如单宁酸、亚硝酸盐、脂类、酚类等大分子化合物,这些物质会影响 DNA 模板的质量,从而导致 PCR 扩增效率降低^[20]。Xiong X 等^[7]从罐头制品中提取 DNA,发现 DNA 质量较差,PCR 扩增成功率只有 40%,并发现罐头产品中油脂较多抑制了 PCR 扩增效率。Smith 等^[21]发现

随着加热时间的延长,提取的 DNA 的纯度逐渐下降;并且食用油随着储存时间的延长,DNA 提取产物中的抑制剂也越多。María 等^[22]比较了 4 种提取方法对金枪鱼罐头的 DNA 纯度的影响,结果证明不同的提取方法的 A₂₆₀/A₂₈₀ 以及 A₂₆₀/A₂₃₀ 不同。杨珺茹等^[23]从深加工鱼肉制品提取 DNA,发现不同加工方式的鱼肉中 DNA 含量有所差异,且不同提取方法提取同一种样品的纯度存在差异。

基于以上的研究,本文拟采用 SDS 法和 2 种市售试剂盒对金枪鱼制品基因组 DNA 进行提取,并利用 16S rDNA 序列引物对其进行 PCR 扩增,通过比较 DNA 的质量及 PCR 扩增成功率,旨在找到一种较为理想的 DNA 提取方案,以保障后续物种鉴定的顺利进行。

表 1 深加工鱼样品信息及分子鉴定结果

Table 1 Information and molecular identification of fish samples from deep processing

产品编号	标称原料	产地	样品编号	BLAST (98%~100%)	
XWJ1	金枪鱼 (鲔鱼)	台湾	XWJ1-1	<i>Thunnus</i> spp.	
肉松品	金枪鱼	浙江温州	XWJ2-1	<i>Istiophorus platypterus</i>	
			XWJ2-2	<i>Tetrapturus spp Makaira nigricans</i>	
	XWJ3	金枪鱼 (鲔鱼)	台湾	XWJ3-1	<i>Thunnus</i> spp.
	XWJ4	鲔鱼	台湾	XWJ4-1	<i>Thunnus</i> spp.
	XWJ5	黄鳍金枪鱼	浙江宁波	XWJ5-1	<i>Thunnus</i> spp.
	XWJ6	金枪鱼 (鲔鱼)	台湾	XWJ6-1	<i>Thunnus</i> spp.
	XWJ7	金枪鱼	福建漳州	XWJ7-1	<i>Makaira</i> spp.
	XWJ8	金枪鱼	台湾	XWJ8-1	<i>Thunnus</i> spp.
	XWJ9	金枪鱼 (鲔鱼)	台湾	XWJ9-1	<i>Thunnus</i> spp.
罐头制品	金枪鱼	浙江宁波	XWJ20-1	-	
			XWJ20-2	<i>Makaira</i> spp.	
	XWJ21	金枪鱼	辽宁大连	XWJ21-1	-
				XWJ21-2	-
	XWJ22	金枪鱼	广东揭阳	XWJ22-1	-
				XWJ22-1	<i>Makaira</i> spp.
	XWJ23	金枪 (吞拿) 鱼	泰国	XWJ23-1	<i>Makaira</i> spp.
				XWJ23-2	<i>Makaira</i> spp.
	XWJ24	金枪鱼	西班牙	XWJ24-1	<i>Makaira</i> spp.
				XWJ24-2	<i>Makaira</i> spp.
XWJ25	金枪鱼	泰国	XWJ25-1	-	
			XWJ25-2	-	
XWJ26	金枪鱼	中国大陆	XWJ26-1	-	
			XWJ26-2	-	
XWJ27	金枪鱼	韩国	XWJ27-1	-	
			XWJ27-2	-	
XWJ28	长鳍金枪鱼	西班牙	XWJ28-1	-	
			XWJ28-2	-	

注:“-”表示测序失败。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 样品采集

2019年11月至12月,从市场共采集18份预包装金枪鱼产品(表1),包括9份肉松产品(编号为XWJ1-XWJ9)和9份罐装制品(编号为XWJ20-XWJ28)。所有产品抵达实验室后需进行拍照和标记,并记录好产品标签上的信息。当产品包装内有多个独立小包装时,每个小包装需单独取样,总计取样28份(表1),于-18℃保存备用。

1.1.2 试剂

细胞/血液/组织基因组DNA提取试剂盒(Code No. DP304),天根生化科技有限公司;Takara 细胞/血液/组织基因组DNA提取试剂盒(Code No. 9178),宝生物工程(大连)有限公司;琼脂糖凝胶,西班牙Biowest公司;GelRed™核酸染料,美国Biotium公司;引物合成,上海生工生物有限公司;SYBR混合液(with low ROX)、2×Taq PCR Master Mix,上海生工生物有限公司;100 bp DNA Ladder,天根生化科技有限公司;6×Loading Buffer,宝生物工程(大连)有限公司。

1.1.3 仪器与设备

BioPhotometer D30 核酸蛋白测定仪,德国Eppendorf公司;JY-SPFT电泳槽,北京君意东方电泳设备有限公司;Tannon-1600凝胶成像仪,上海天能科技有限公司;GWA-UNI-F40纯水/超纯水器,北京普析通用仪器有限责任公司;MS-100恒温混匀仪,杭州奥盛仪器有限公司;LightCycler® 96实时荧光定量PCR仪,瑞士罗氏集团;全自动医用PCR分析系统(Code No. Gentier 96),西安天隆科技有限公司;台式小型离心机(1-14k),德国Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 DNA提取

SDS法:参照Xiong X等^[24]的提取方法进行适当改进。取样品约100 mg于1.5 mL离心管中,加入100 μL SDS裂解缓冲液[2% (W/V) SDS, 0.1 M NaCl, 0.1 M EDTA, 0.5 M Tris, pH=8.0]、100 μL 磷酸缓冲液(0.3 M NaH₂PO₄, pH=8.0)和20 μL的蛋白酶K(20 mg/μL),并置于恒温混匀仪中60℃温浴50 min。将混合物在室温条件下以14000 r/min离心5 min,取上清液至新的1.5 mL离心管,加入1倍体积乙酸钠溶液(4M CH₃COONa, pH=8.2),混匀后14000 r/min离心5 min。取上清至新的离心管中,加入0.6倍体积异丙醇,混匀后静置10 min,12000 r/min离心10 min弃上清。最后,用70%乙醇和100%无水乙醇分别清洗DNA两次和一次,65℃烘箱烘干后,加入20 μL灭菌超纯水溶解DNA,保存于-20℃。

细胞/血液/组织基因组DNA提取试剂盒(以下简称Tiangen试剂盒):称取100 mg样品,按照试剂盒说明书提取DNA,最后在吸附柱中加入50 μL TE洗脱液洗脱DNA,保存于-20℃。

Takara 细胞/血液/组织基因组DNA提取试剂盒(以下简称Takara试剂盒):取样品约50 mg放入装有0.5 mL Extraction Solution试剂的Microtube中。盖紧Microtube盖,70℃水浴处理10 min,在室温条件下12000 r/min离心10 min,最后用移液枪吸取水层。其中肉松产品吸取200 μL水层体积,罐头产品吸取100 μL,保存于-20℃。

1.2.2 样品DNA质量和浓度测定

采用BioPhotometer D30核酸蛋白测定仪分别测定DNA在230 nm、260 nm和280 nm波长处的吸光值,计算A₂₆₀/A₂₈₀和A₂₆₀/A₂₃₀值,同时测定DNA浓度。

1.3 PCR扩增

1.3.1 普通PCR

表2 通用引物序列及扩增产物大小

Table 2 The sequences and products size of universal primers

区域	引物名称	序列(5'-3')	片段大小	退火温度/℃
	16sar-L	CACGACGTTGTAAAACGACCGCTGTTTATCAAAAACAT	570 bp ^[25]	52
	16sbr-H	GGATAACAATTTACACAGGCCGGTCTGAACTCAGATCACGT		
mtDNA 16S rDNA	FOR16Spc	TGCCCGTGCAGAAGCGG	327 bp ^[26]	53
	REV16Spc	CAACATCGAGGTCGTAAACCC		
	FOR16S-1	GACGAGAAGACCTATGG	242 bp ^[26]	53
	REV16S-2	CTGTTATCCCTAGGGTAACT		

对3种方法提取的DNA进行PCR扩增,由于每种DNA提取方法的取样量不同,为了在同一水平

上比较和评价各提取方法,先对提取的DNA进行稀释。调整后样品DNA浓度均为30 ng/μL。PCR反应

采用 25 μL 体系: 包括 12.5 μL 2 \times Taq PCR Master Mix, 上、下游引物 (10 μM) 各 1 μL (表 2), DNA 模板 1 μL , 加无菌水补足至 25 μL 。PCR 反应程序参考文献^[25,26]。反应结束后, 以 2%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.3.2 荧光定量 PCR

对提取的 DNA 进行稀释, 调整后样品 DNA 浓度均为 30 ng/ μL 。肉松产品采用 327 bp 的目的片段扩增, 罐头产品采用 242 bp 的目的片段扩增。荧光定量 PCR 采用 20 μL 反应体系: SYBR Mixture(With low ROX) 预混液 10 μL , 上、下游引物 (10 μM) 各 1 μL , DNA 模板 1 μL , 无菌水补足至 20 μL 。每个循环结束检测荧光。扩增结束后, 进行溶解曲线分析, 设置 72 $^{\circ}\text{C}$ 为起始温度, 升温至 95 $^{\circ}\text{C}$, 再降温至 65 $^{\circ}\text{C}$ 保持 60 s, 1 s 升温至 97 $^{\circ}\text{C}$ 。反应结束后, 分析扩增曲线, 根据循环阈值 (cycle threshold, CT 值) 判定不同样品处理方式和提取方法对荧光 PCR 扩增的影响, 随后分析溶解曲线, 通过溶解温度(Melting Temperature, TM 值) 的大小区分不同物种。

1.3.3 物种鉴定

以市售产品为材料, 参照 1.3.1 方法进行普通 PCR 扩增, 挑选扩增成功并且条带单一的产物进行双向测序。采用 BioEdit 软件对测序所得的峰图进行校对拼接, 去除正反向引物和低质量的序列后, 提交数据库 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 比对分析, 根据序列相似度比较的结果 (相似度 $\geq 98\%$), 确认各样品的物种类别。

1.4 数据分析

采用 SPSS 24.0 统计学软件分别对 3 种方法提取的 DNA 得率、 A_{260}/A_{280} 和 A_{260}/A_{230} 值进行分析, 由于样品方差不齐, 根据 Kruskal-Wallis K 独立参数求出 p 值, 若 p 值小于 0.05, 说明两组间存在显著性差异, 若 p 值大于 0.05 说明两组间无显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 DNA 的纯度

表 3 三种方法提取的 DNA 纯度

Table 3 DNA purity extracted by three methods

编号	A_{260}/A_{280}				A_{260}/A_{230}			
	Takara 试剂盒	Tiagen 试剂盒	SDS 法	p 值	Takara 试剂盒	Tiagen 试剂盒	SDS 法	p 值
XWJ1	1.14 \pm 0.05	1.98 \pm 0.04	1.91 \pm 0.08	0.019*	0.26 \pm 0.02	1.16 \pm 0.23	0.61 \pm 0.21	0.007**
XWJ2	1.12 \pm 0.09	1.95 \pm 0.05	1.88 \pm 0.15	0.022*	0.29 \pm 0.03	1.05 \pm 0.18	0.60 \pm 0.43	0.048*
XWJ3	1.07 \pm 0.09	1.97 \pm 0.03	1.86 \pm 0.09	0.011*	0.23 \pm 0.02	1.09 \pm 0.17	0.68 \pm 0.31	0.015*
XWJ4	1.08 \pm 0.08	1.94 \pm 0.14	1.72 \pm 0.17	0.012*	0.24 \pm 0.02	0.70 \pm 0.27	0.38 \pm 0.16	0.018*
XWJ5	1.37 \pm 0.06	2.02 \pm 0.04	1.96 \pm 0.16	0.018*	0.27 \pm 0.01	0.95 \pm 0.37	0.84 \pm 0.28	0.022*
XWJ6	1 \pm 0.13	1.88 \pm 0.04	2.06 \pm 0.2	0.007**	0.24 \pm 0.02	1.07 \pm 0.12	1.00 \pm 0.63	0.025*
XWJ7	0.97 \pm 0.06	1.89 \pm 0.03	2.29 \pm 0.34	0.007**	0.25 \pm 0.02	1.00 \pm 0.20	0.95 \pm 0.51	0.018*
XWJ8	0.97 \pm 0.07	1.83 \pm 0.07	1.77 \pm 0.2	0.024*	0.24 \pm 0.03	0.99 \pm 0.11	0.45 \pm 0.01	0.007**
XWJ9	1.08 \pm 0.16	1.9 \pm 0.07	1.87 \pm 0.03	0.021*	0.25 \pm 0.05	1.21 \pm 0.20	0.85 \pm 0.48	0.018*
p 值	0.011*	0.017*	0.027*		n.s.	n.s.	n.s.	
XWJ20	1.17 \pm 0.1	1.77 \pm 0.19	1.77 \pm 0.09	0.023*	0.24 \pm 0.01	0.45 \pm 0.26	0.51 \pm 0.24	n.s.
XWJ21	1.08 \pm 0.18	1.94 \pm 0.08	1.85 \pm 0.12	0.018*	0.23 \pm 0.02	0.61 \pm 0.30	0.50 \pm 0.35	n.s.
XWJ22	1.18 \pm 0.13	1.68 \pm 0.27	1.86 \pm 0.10	0.026*	0.23 \pm 0.01	0.39 \pm 0.25	1.24 \pm 0.34	0.024*
XWJ23	1.27 \pm 0.09	1.83 \pm 0.14	1.87 \pm 0.15	0.025*	0.26 \pm 0.02	0.37 \pm 0.06	1.27 \pm 0.95	n.s.
XWJ24	1.20 \pm 0.1	2 \pm 0.18	2.09 \pm 0.19	0.022*	0.24 \pm 0.01	0.50 \pm 0.30	1.25 \pm 0.76	n.s.
XWJ25	0.87 \pm 0.02	1.78 \pm 0.14	1.84 \pm 0.15	0.020*	0.19 \pm 0.01	0.27 \pm 0.07	0.90 \pm 0.63	0.016*
XWJ26	1.02 \pm 0.11	1.79 \pm 0.12	1.72 \pm 0.38	0.025*	0.23 \pm 0.01	0.33 \pm 0.15	0.59 \pm 0.33	0.047*
XWJ27	1.13 \pm 0.08	1.68 \pm 0.2	1.86 \pm 0.14	0.018*	0.24 \pm 0.02	0.40 \pm 0.18	1.30 \pm 0.70	0.036*
XWJ28	1.09 \pm 0.08	1.83 \pm 0.16	1.91 \pm 0.08	0.019*	0.25 \pm 0.03	0.34 \pm 0.07	0.92 \pm 0.32	0.007**
p 值	0.017*	n.s.	n.s.		0.029*	n.s.	n.s.	

注: 在最后一列和每一行中, 根据 Kruskal-Wallis K 独立参数列出了 p 值, 分别用于同一方法内不同产品的比较以及同一产品内不同方法的比较。**差异极显著 ($p < 0.01$)。*显著不同 ($p < 0.05$)。n.s. = 无明显差异, 下同。

通过分光光度计测定 3 种提取方法的纯度见表 3 和图 1。A₂₆₀/A₂₈₀ 比值表示蛋白质和酚物质的去除情况, 纯度较好的 DNA 比值为 1.8 左右。比值较低说明受到蛋白(芳香族)或酚类物质的污染^[27]。对于肉松样品(XWJ1-XWJ9), Takara 试剂盒的平均比值为 1.08±0.14, 纯度较差, Tiangen 试剂盒和 SDS 法的 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值都在 1.8 左右, 纯度较好。对于罐头样品(XWJ20-XWJ28), Tiangen 试剂盒和 SDS 法的 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值分别为 1.80、1.86。而 Takara 试剂盒的比值为 1.11, 显著低于其他两种; A₂₆₀/A₂₃₀ 比值表示糖类、盐分等的去除情况, 纯度较好的 DNA 溶液比值为 2.0 左右。若比值小于 2.0, 说明样品中碳水化合物(糖类)、或有机溶剂含量较高。Tiangen 试剂盒平均比值为 1.02, SDS 法和 Takara 试剂盒的平均比值分别为 0.7、0.25。表明杂质残留较多, 可能的原因之一是中金枪鱼产品含有大量的油脂较难去除, 与某些盐离子产生吸附。也可能存在未降解的 RNA 在 260 nm 处产生了较高吸收值。

2.2 DNA 的得率

表 4 三种方法提取的 DNA 得率

Table 4 DNA yield extracted by three methods

编号	DNA 得率/ng			
	Takara 试剂盒	Tiangen 试剂盒	SDS 法	p 值
XWJ1	194.61±76.74	19.72±3.54	3.83±2.72	0.007**
XWJ2	297.61±63.07	29.34±4.13	3.55±2.84	0.007**
XWJ3	192.25±44.06	11.93±4.47	2.19±0.99	0.007**
XWJ4	213.66±29.76	9.07±9.12	2.97±0.90	0.012*
XWJ5	329.44±71.07	23.72±7.10	8.88±7.78	0.012*
XWJ6	207.33±29.82	35.10±11.47	3.13±3.25	0.007**
XWJ7	203.82±31.47	20.89±4.12	1.66±1.15	0.007**
XWJ8	177.84±28.49	35.44±4.69	1.41±0.30	0.007**
XWJ9	217.01±73.80	37.64±13.18	4.09±4.12	0.007**
p 值	0.031*	0.001**	n.s.	
XWJ20	113.23±21.58	3.10±2.25	1.77±0.79	0.021*
XWJ21	89.54±16.50	5.18±1.79	2.35±2.01	0.012*
XWJ22	84.87±11.04	1.85±0.94	3.09±2.15	0.021*
XWJ23	111.30±14.81	2.33±0.87	2.30±1.28	0.023*
XWJ24	82.59±3.04	6.48±6.93	3.15±2.39	0.023*
XWJ25	69.50±6.86	3.85±2.90	2.62±1.21	0.024*
XWJ26	101.82±16.69	3.01±1.05	2.04±0.81	0.015*
XWJ27	90.13±16.30	3.90±3.52	2.59±1.77	0.023*
XWJ28	104.03±23.57	2.41±1.15	1.27±0.44	0.012*
p 值	0.013*	n.s.	n.s.	

3 种方法提取的 DNA 得率见表 4 和图 1。其中

Takara 试剂盒所提取出来的 DNA 得率远高于其他两种方法, 对比肉松和罐头制品的 DNA 得率, 肉松品的 DNA 得率普遍高于罐头制品。Tagliavia M 等^[28]发现在 DNA 提取过程中, 采用蛋白酶 K、洗涤剂、树脂和有机萃取的提取步骤, 导致 DNA 得率降低。SDS 法通过蛋白酶 k 去除蛋白质等大分子物质和杂质, Tiangen 试剂盒采用特异性膜吸附 DNA(即膜吸附柱)进行纯化。两种方法提取的 DNA 质量较好, 但 DNA 得率偏低。

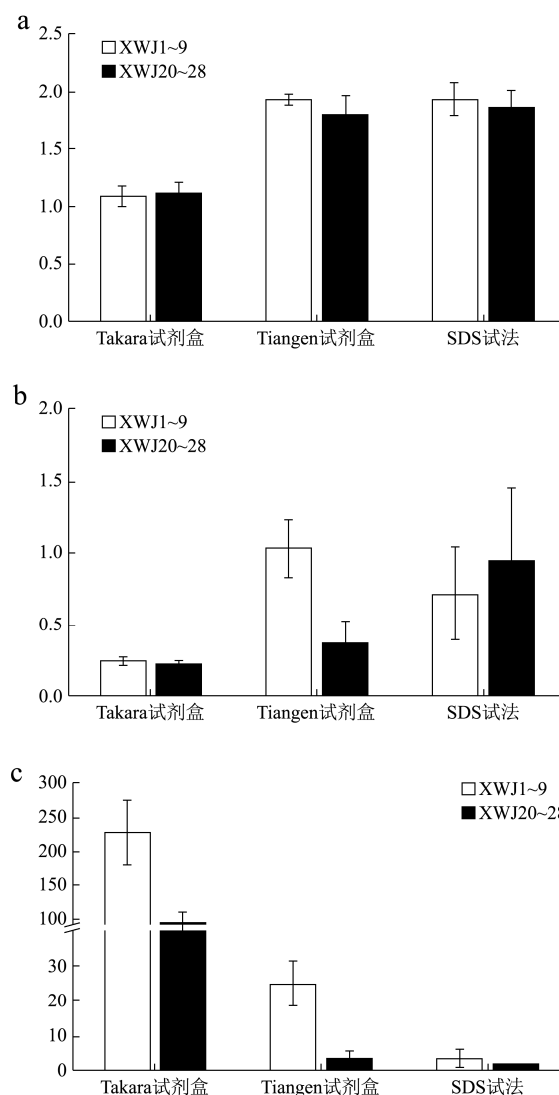


图 1 三种方法提取的 DNA 得率和 DNA 纯度

Fig.1 DNA yield and DNA purity extracted by three methods

注: a: A₂₆₀/A₂₈₀; b: A₂₆₀/A₂₃₀; c: DNA 得率, ng.

2.3 PCR 方法对于 DNA 质量的验证

PCR 扩增对模板 DNA 的质量要求较高, 因此, PCR 扩增成功率成为判定 DNA 质量的重要依据之一。由于金枪鱼产品在加工过程中需经过高温高压处理, 根据相关文献报道^[29], DNA 片段降解严重。为考察 DNA 降解程度, 并保证获取足够数量和质量的 DNA

模板以适用于后续分子生物学研究，以3种方法分别从样品中提取的DNA作为模板，用表2中3对通用引物进行PCR扩增，扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图如图2、3所示。3种方法的阳性对照均可得到明显的电泳条带，空白无条带，但不同提取方法间条带明暗程度差异较大，Tiangen试剂盒，SDS法提取DNA纯度较好，扩增条带较亮。而Takara提取的DNA无清晰条带。

2.4 荧光定量 PCR

表5 三种方法提取的CT值和TM值

Table 5 CT and TM values extracted by the three methods

样品	CT 值			p 值
	Tiagen 试剂盒	SDS 法	Takara 试剂盒	
XWJ1	25.01±0.69	22.97±0.48	20.93±0.2	0.102
XWJ2	20.04±0.21	23.23±1.07	20.64±1.12	0.102
XWJ3	20.11±0.11	23.77±0.06	22.1±0.97	0.102
XWJ4	24.34±0.21	20.97±0.67	22.23±0.12	0.102
XWJ5	21.39±0.29	20.76±0.22	22.11±0.07	0.102
XWJ6	23.15±0.19	25.56±0.82	22.39±0.24	0.102
XWJ7	23.25±1.01	24.23±0.08	23.08±0.87	0.156
XWJ8	22.93±1.08	22.55±0.76	22.87±0.83	0.651
XWJ9	24.22±0.76	21.88±1.14	22.91±0.77	0.156
XWJ20	21.14±0.77	22.58±0.29	25.77±0.25	0.102
XWJ21	20.39±0.1	21.78±0.21	25.77±0.41	0.102
XWJ22	21.39±1.34	23.41±0.06	23.25±0.38	0.180
XWJ23	22.71±0.27	23.17±0.65	23.11±0.29	0.368
XWJ24	22.26±0.43	22.17±0.02	22.36±0.69	0.368
XWJ25	22.77±0.92	23.18±0.03	23.85±0.9	0.325
XWJ26	24.45±1.1	22.25±0.8	24.07±0.14	0.180
XWJ27	21.3±0.73	22.91±0.61	24.44±0.87	0.102
XWJ28	22.61±0.08	23.34±0.49	23.55±0.83	0.180

样品	TM 值			p 值
	Tiagen 试剂盒	SDS 法	Takara 试剂盒	
XWJ1	81.50	82.25±0.35	82.00	0.123
XWJ2	86.25±0.35	84.25±0.35	81.25±0.35	0.180
XWJ3	86.50	81.50	81.50	0.082
XWJ4	86.00	86.00	81.50	0.082
XWJ5	85.75±0.35	86.00	81.50	0.115
XWJ6	85.75±0.35	82.00	81.00	0.089
XWJ7	85.5±0.71	86.00	81.75±0.35	0.123
XWJ8	85.75±0.35	81.25±0.35	81.50	0.123
XWJ9	86.00	81.75±0.35	81±0.71	0.115
XWJ20	87.65±0.49	87.25±0.35	86±0.71	0.156
XWJ21	88.25±0.35	88.26±0.36	86±0.71	0.165
XWJ22	87.75±1.06	88.24±0.16	87.25±0.35	0.465
XWJ23	87.5±0.71	88.25±0.35	87.52±0.02	0.257
XWJ24	86±0.71	88.25±0.35	88.17±0.24	0.325
XWJ25	87.25±0.35	87.75±0.35	87.75±0.35	0.368
XWJ26	87.75±0.35	87.5±0.71	87.75±0.35	0.882
XWJ27	88.25±0.35	87.75±0.35	87.5±0.71	0.333
XWJ28	87±0.71	87.65±0.49	87.75±0.35	0.451

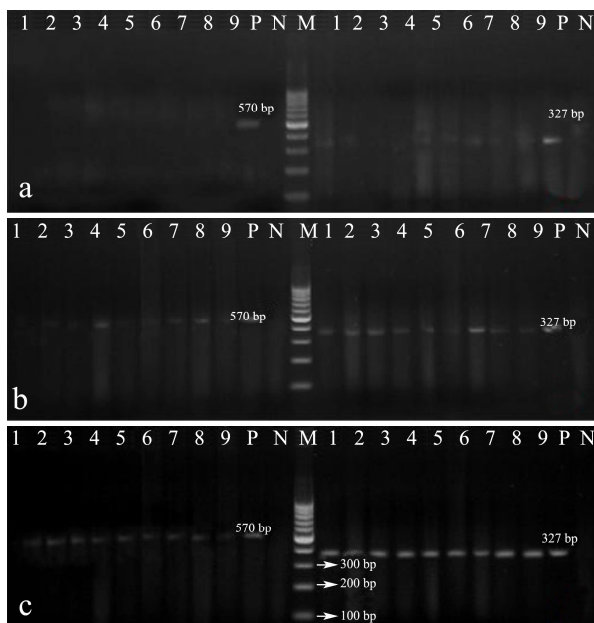


图2 三种提取方法所得肉松样品 PCR 扩增结果

Fig.2 Amplification results PCR three extraction methods

注：a: Takara 试剂盒; b: SDS 法; c: Tiagen 试剂盒; P: 阳性对照; N: 空白对照; M: DL100 分子量标准。图3同。

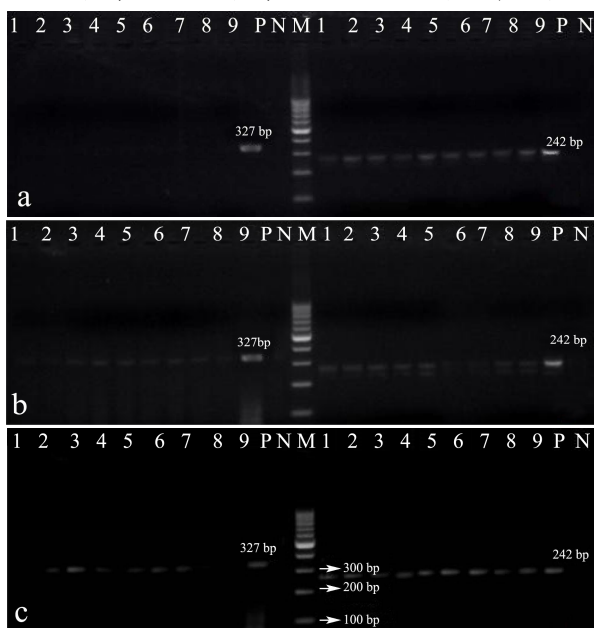


图3 三种提取方法所得罐头样品 PCR 扩增结果

Fig.3 Amplification of canned samples PCR three extraction methods

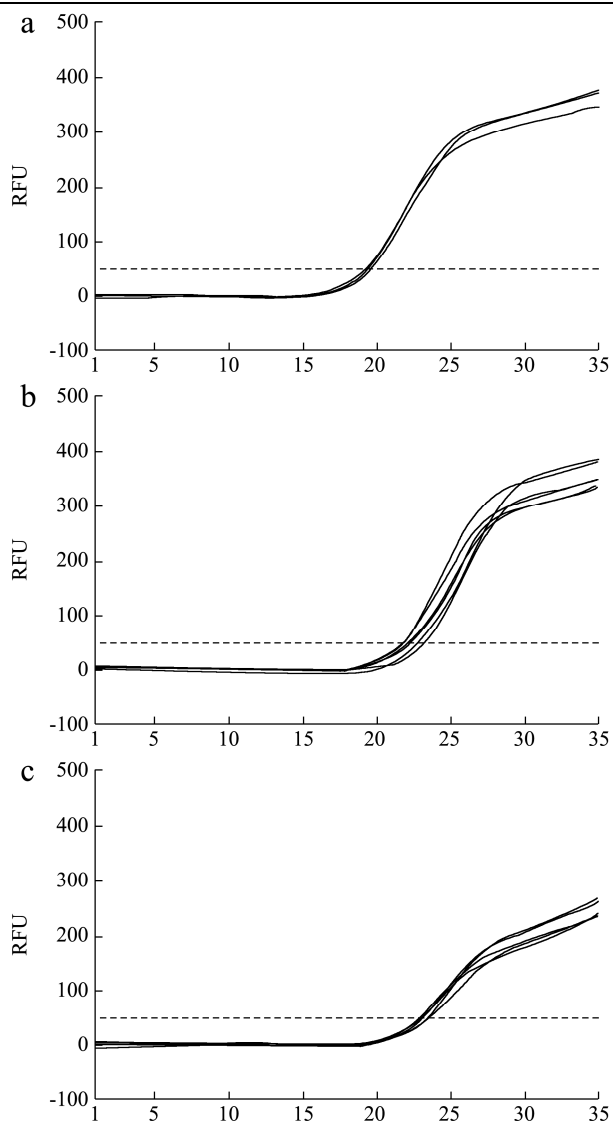


图4 三种提取方法所得肉松样品扩增曲线

Fig.4 Amplification curves of meat pine samples obtained from three extraction methods

注: a: Tiangen 试剂盒; b: SDS 法; c: Takara 试剂盒。

图5同。

为了更好的反映不同提取方法之间的 PCR 扩增效率,本研究选择灵敏度更高的实时荧光定量 PCR。从表 5 可以看出, Tiangen 试剂盒的平均 CT 值为 22.11, SDS 法平均 CT 值为 22.75, Takara 试剂盒平均比值为 24.01。Tiangen 试剂盒和 SDS 法平均 CT 值无显著差异。从扩增曲线看(图 4 和图 5), Tiangen 试剂盒和 SDS 法扩增效果较好,而 Takara 试剂盒荧光强度较低,表明该方法虽然在提取时间上有优势,但提取的 DNA 可能存在某些 PCR 抑制因子,能抑制 PCR 反应。

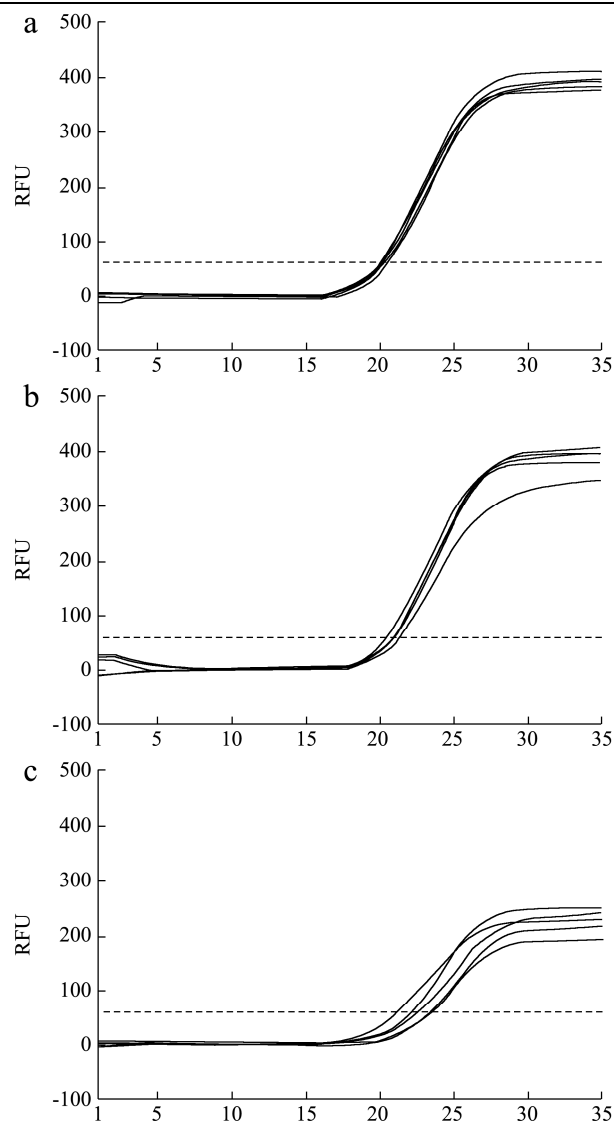


图5 三种提取方法所得罐头样品扩增曲线

Fig.5 Amplification curves of canned samples obtained from three extraction methods

2.5 鉴定结果及分析

市售产品分子鉴定结果见(表 1)。所有市售肉松产品(N=10)其中 XWJ2-1 可在物种水平鉴定,鉴定结果为 *Istiophorus platypterus*。剩余的 9 个产品被鉴定至属水平。对于罐头产品(N=18), XWJ20-2、XWJ22-1、XWJ22-2、XWJ23-1、XWJ23-2、XWJ24-1、XWJ24-2 这些产品被鉴定至属水平。其他罐头产品鉴定结果失败。线粒体 DNA 作为核外遗传物质,具有分子结构简单、严格的母系遗传、无重组、快速进化、多拷贝及稳定等优点。本实验利用线粒体 16S rDNA 对金枪鱼产品的鉴定,但在种水平鉴定成功率较低,

可能的原因有：(1) 数据库中现有的序列数太少，无法准确匹配所有物种；(2) 挑选的片段较保守，无法区分一些亲缘关系较近的物种。

2.6 各种 DNA 提取方法的比较

根据上述 DNA 浓度的测定结果，分光光度计对 A_{260}/A_{280} 和 A_{260}/A_{230} 两个比值的测定结果，以及 PCR 扩增结果对各 DNA 提取方法进行综合分析，同时对提取过程的简易程度等其他因素也进行了分析和总结，各方法的优缺点归纳于见（表 6）。

表 6 三种 DNA 提取方法优缺点比较

方法	优点	缺点
SDS 法	1.价格最低; 2.可用于大多数加工鱼制品的 DNA 提取; 3.去除蛋白质效果较好	DNA 损失量大, 得率相对偏低
Tiangen 试剂盒	1.价格相对便宜; 2.操作简便、步骤简单; 3.去除蛋白质效果较好	DNA 损失量大, 得率相对偏低
TaKaRa 试剂盒	1.操作简便, 耗时短; 2.DNA 损失量少, 得率高;	1.去除大分子物质和 RNA 效果差; 2.去除蛋白质效果差

3 结论

金枪鱼制品中因含有多糖、多酚和色素等化合物，导致 DNA 提取相对困难。本研究通过 DNA 的质量、得率、PCR 扩增成功率，比较了 2 种市售试剂盒和 SDS 法用于金枪鱼制品的 DNA 提取。结果表明，SDS 法成本最低，在试验耗时、DNA 纯度和浓度、盐残留、对荧光定量 PCR 的抑制等方面均较好。可在短时间裂解细胞，加快 DNA 获取效率。针对鱼肉产品易腐败变质和 DNA 降解的特点，加快 DNA 获取效率用于物种鉴定有一定应用价值。

参考文献

- [1] Terio V, Di Pinto P, Decaro N, et al. Identification of tuna species in commercial cans by minor groove binder probe real-time polymerase chain reaction analysis of mitochondrial DNA sequences [J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2010, 24(6): 352-356
- [2] 许丹,朱剑,严忠雍,等.加工方式对金枪鱼鱼糜制品氨基酸组成和营养价值影响研究[J].*中国调味品*,2020,45(11):74-80
XU Dan, ZHU Jian, YAN Zhong-yong, et al. Effects of processing methods on amino acid composition and nutritional value of tuna surimi products [J]. *China Condiment*, 2020, 45(11): 74-80
- [3] Krčmář P, Piskatá Z, Servusová E. Identification of tuna species *Thunnus albacares* and *Katsuwonus pelamis* in canned products by real-time PCR method [J]. *Acta Veterinaria Brno*, 2019, 88(3): 323-328
- [4] Shokralla S, Hellberg R S, Handy S M, et al. A DNA mini-barcoding system for authentication of processed fish products [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5(1)
- [5] Xiong X, Yao L, Ying X, et al. Multiple fish species identified from China's roasted Xue Yu fillet products using DNA and mini-DNA barcoding: Implications on human health and marine sustainability [J]. *Food Control*, 2018, 88: 123-130
- [6] 黄曼虹,熊雄,许文杰,等.大西洋三文鱼和虹鳟鱼双重 PCR 检测方法的建立及应用[J].*现代食品科技*,2020,36(12):274-282
HUANG Man-hong, XIONG Xiong, XU Wen-jie, et al. The establishment and application of double PCR detection method for Atlantic salmon and rainbow trout [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2020, 36(12): 274-282
- [7] Armani A, Tinacci L, Xiong X, et al. Fish species identification in canned pet food by BLAST and forensically informative nucleotide sequencing (FINS) analysis of short fragments of the mitochondrial 16s ribosomal RNA gene (16S rRNA) [J]. *Food Control*, 2015, 50: 821-830
- [8] Armani A, Tinacci L, Xiong X, et al. Development of a simple and cost-effective bead-milling method for DNA extraction from fish muscles [J]. *Food Analytical Methods*, 2014, 7(4): 946-955
- [9] Xiong Xiong, Lisa Guardone, Alice Giusti, et al. DNA barcoding reveals chaotic labeling and misrepresentation of cod (鳕, Xue) products sold on the Chinese market [J]. *Food Control*, 2016, 60: 519-532
- [10] Carrera E, García T, Céspedes A, et al. Identification of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout

- (*Oncorhynchus mykiss*) using PCR-restriction fragment length polymorphism of the p53 gene [J]. *Journal of AOAC International*, 2000, 83(2): 341-346
- [11] Zahn R J, Silva A J, Hellberg R S. Development of a DNA mini-barcoding protocol targeting COI for the identification of elasmobranch species in shark cartilage pills [J]. *Food Control*, 2020, 109: 106918
- [12] Armani A, Guardone L, Castigliengo L, et al. DNA and mini-DNA barcoding for the identification of Porgies species (family Sparidae) of commercial interest on the international market [J]. *Food Control*, 2015, 50: 589-596
- [13] Günther B, Raupach M J, Knebelsberger T. Full-length and mini-length DNA barcoding for the identification of seafood commercially traded in Germany [J]. *Food Control*, 2017, 73: 922-929
- [14] Saull J, Duggan C, Hobbs G, et al. The detection of Atlantic cod (*Gadus morhua*) using loop mediated isothermal amplification in conjunction with a simplified DNA extraction process [J]. *Food Control*, 2016, 59: 306-313
- [15] Wang Y, Feng J, Tian X. Application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid detection of Atlantic cod (*Gadus morhua*), Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) [J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2019: 101420
- [16] Heers T, van Neer A, Becker A, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) as a confirmatory and rapid DNA detection method for grey seal (*Halichoerus grypus*) predation on harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) [J]. *Journal of Sea Research*, 2018, 140: 32-39
- [17] Sultana S, Hossain M A M, Zaidul I S M, et al. Multiplex PCR to discriminate bovine, porcine, and fish DNA in gelatin and confectionery products [J]. *LWT*, 2018, 92: 169-176
- [18] Kim M, Kwon K, Jung Y, et al. A rapid real-time PCR method to differentiate between mottled skate (*Beringraja pulchra*) and other skate and ray species [J]. *Food Chemistry*, 2018, 255: 112-119
- [19] Ahamad M, Ali M E, Hossain M, et al. Multiplex PCR assay discriminates rabbit, rat and squirrel meat in food chain [J]. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2017, 34(12): 2043-2057
- [20] Bernardo G D, Galderisi U, Cipollaro M, et al. Methods to improve the yield and quality of DNA from dried and processed figs [J]. *Biotechnology Progress*, 2010, 21(2): 546-549
- [21] Smith D S, Maxwell P W, De Boer S H. Comparison of several methods for the extraction of DNA from potatoes and potato-derived products [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2005, 53(26): 9848
- [22] Chapela M J, Sotelo C G, Pérez-Martín R I, et al. Comparison of DNA extraction methods from muscle of canned tuna for species identification [J]. *Food Control*, 2007, 18(10): 1211-1215
- [23] 杨珺茹,熊雄,黄曼虹,等.鱼肉DNA提取方法比较及物种鉴定研究[J].现代食品科技,2019,35(6):161-170
YANG Jun-ru, XIONG Xiong, HUANG Man-hong, et al. Study on DNA and species identification of fish meat [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2019, 35(6): 161-170
- [24] X Xiong, Yuan F, Huang M, et al. DNA Barcoding Revealed Mislabeling and Potential Health Concerns with Roasted Fish Products Sold across China [J]. *Journal of Food Protection*, 2019, 82(7): 1200-1209
- [25] Cawthorn D, Steinman H A, Witthuhn R C. Evaluation of the 16S and 12S rRNA genes as universal markers for the identification of commercial fish species in south Africa [J]. *Gene*, 2012, 491(1): 40-48
- [26] Armani A, Tinacci L, Xiong X, et al. Fish species identification in canned pet food by BLAST and forensically informative nucleotide sequencing (FINS) analysis of short fragments of the mitochondrial 16s ribosomal RNA gene (16S rRNA) [J]. *Food Control*, 2015, 50: 821-830
- [27] Aslan O, Hamill R M, Sweeney T, et al. Integrity of nuclear genomic deoxyribonucleic acid in cooked meat: Implications for food traceability [J]. *Journal of Animal Science*, 2009, 1: 57
- [28] Tagliavia M, Nicosia A, Salamone M, et al. Development of a fast DNA extraction method for sea food and marine species identification [J]. *Food Chemistry*, 2016, 203: 375-378
- [29] Peano C, Samson M C, Palmieri L, et al. Qualitative and quantitative evaluation of the genomic DNA extracted from GMO and non-GMO foodstuffs with four different extraction methods [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2004, 52(23): 6962-6968