

腊肠中的植物成份的 PCR 检测方法研究

覃芳芳¹, 邓鸿铃¹, 郭新东¹, 罗海英¹, 朱思明², 吴玉銮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: 本文建立了应用 PCR 技术鉴别腊肠中植物成分的方法。通过前处理与酚仿抽提 DNA 的方法相结合, 建立了一种快速简便的从腊肠中提取 DNA 的方法, 整个 DNA 提取的过程时间为 2 h 左右, 提取的 DNA 浓度和 A260/A280 均达到了 PCR 的要求。通过 PCR 分析, 发现从腊肠中提取 DNA 完全可以进行 PCR 检测, 并且该方法可定性检测腊肠中的植物成分。

关键词: DNA; PCR; 腊肠; 植物成分; 掺入

中图分类号: TS207.3; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)07-0722-03

Detection of Plant Element in Sausage via PCR Method

QIN Fang-fang¹, DENG Hong-ling¹, GUO Xin-dong¹, LUO Hai-ying¹, 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 article, a rapid and simple method for DNA extraction from sausage was developed and PCR was used in detection of plant element in sausage. The time of DNA extraction via phenol-chloroform extraction of the pretreated sausage was 2 h and the quality and concentration of the achieved DNA met the demand of PCR. The plant element in sausage could be detected qualitatively by this method.

Key words: DNA; PCR; sausage; plant element; 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。

腊肠是中国人民的传统食品。中式腊肠是以猪肉为原料, 通常不添加淀粉、血粉、色素和植物蛋白等。但目前市场上因为猪肉原材料价格上涨, 为了保证腊肠中的蛋白质含量能满足国家标准的要求^[7], 不法生产厂家在腊肠制作过程中掺入植物性蛋白成分, 以次

充好。对于腊肠中掺入的植物成分, 目前尚无相关的检测方法。这里我们通过改善 DNA 的提取方法, 建立了应用 PCR 技术鉴别腊肠中植物成分的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验的原材料为市场购买的 10 份腊肠, 包括了广州腊肠、四川腊肠、南京腊肠和湖南腊肠。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取

取腊肠样品约 200 g, 加少量 TE 缓冲液 (10 mmol Tris-HCl pH 7.0, 1 mmol EDTA pH 8.0), 粉碎搅拌, 取 1 mL 混合液于 2 mL 的 eppendorf 管中, 加入 1 倍体积的异丙醇, 混合均匀室温沉淀 5 min 后于 12500 r/min 室温离心 5 min, 弃上清, 重复操作 2~3 次, 所得的沉淀用于提取 DNA; 或取 0.3~0.5 g 粉碎后的腊肠于 2 mL 的 eppendorf 管中, 直接提取 DNA。加入 400 μ L TE 缓冲液溶解, 加入等体积的苯酚-氯仿-异戊醇混合液 ($V_{\text{苯酚}}:V_{\text{氯仿}}:V_{\text{异戊醇}}=25:24:1$), 摇晃抽提 10 min 后于 12500 r/min 室温离心 10 min, 小心吸取上清液, 加入等体积的氯仿-异戊醇混合液 ($V_{\text{氯仿}}:V_{\text{异戊醇}}=24:1$)

收稿日期: 2008-03-14

基金项目: 广东省科技计划项目 (No. 2007A020300007-5、2007B080501009、2007B080401015)

作者简介: 覃芳芳 (1978-), 女, 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

摇晃抽提 10 min 后, 于 12500 r/min 室温离心 10 min, 小心吸取上清, 加入 1/10 体积的 3 mol/L 的 NaAC(pH 5.2) 和 2~2.5 倍体积预冷的无水乙醇于 -20 °C 沉淀 30 min 后, 于 12000 r/min 4 °C 离心 10 min. 弃上清, 沉淀用 70% 乙醇洗涤, 真空抽干, 溶于 40 μL TE 缓冲液中。

1.2.2 PCR 体系及条件

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

表 1 腊肠制品内源基因和掺入植物成分内源基因的引物

引物序列	PCR 产物大小/bp	基因性质
动物内源基因 正: 5'-GCCATATACTCTCCTTGGTGACA-3' 反: 5'-GTAGGCTTGGGAATAGTACGA-3'	172	线粒体基因
植物内源基因 正: 5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3' 反: 5'-TTCCATTGAGTCTCTGCACCT-3'	180	tRNA ^{Leu}
大豆内源基因 正: 5'-GCCCTCTAGTCCACCCCATCC3' 反: 5'-GCCCATCTGCAAGCCTTTTGTG3'	112	Lectin

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

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)
动物内源基因	94	55	35	72
植物内源基因	94	60	35	72
大豆内源基因	94	60	35	72

2 结果

2.1 DNA 提取结果

将提取得到的 DNA 用 TE 缓冲液 10 倍稀释, 产物用分光光度计检测其含量, 根据其浓度和 A260/A280 比值 (表 3) 可以看到, 所提取的腊肠制品 DNA 的质量浓度平均在 400 ng/μL, A260/A280 值多在 1.8 左右, 最高达到 2.03, 这说明所提取得 DNA

提取的质量较好。

表 3 腊肠样品 DNA 提取结果

样品	DNA 质量浓度/(ng/μL)	A260/A280	样品	DNA 质量浓度/(ng/μL)	A260/A280
1	302	1.84	6	366	1.93
2	516	1.82	7	153	1.87
3	536	2.03	8	379	1.81
4	679	2.01	9	576	1.97
5	309	1.79	10	628	1.79

2.2 PCR 结果

取 100 ng 所提取的 DNA 用作为 PCR 的模版。用动物内源基因引物进行 PCR 扩增, 电泳结果显示在所选的 10 种腊肠均能扩增出 172 bp 的条带 (图 1), 这个结果进一步显示, 该 DNA 提取方法提取得到的 DNA 质量较好。

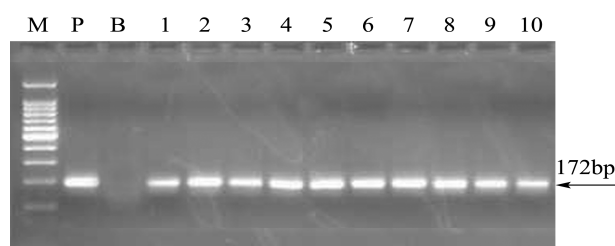


图 1 动物内源基因引物 PCR 检测腊肠制品 DNA 电泳结果

Fig.1 Electrophoretogram of PCR-amplified DNA in sausage using animal endogenous gene

注: M: 100 bp ladder; P: 动物基因组 DNA; B: 植物基因组 DNA; 1-10: 样品 1-10。

为了鉴定腊肠产品中是否含有植物成分, 采用植物内源基因引物进行了 PCR 扩增试验, 电泳结果显示在 4 个样品中扩增得到了 180 bp 条带, 分别是样品 2, 样品 4, 样品 6 和样品 9, 并且样品 2 和样品 9 中扩增的条带较清晰。这个结果显示在这 4 个腊肠样品中含有植物成分 (见图 2)。

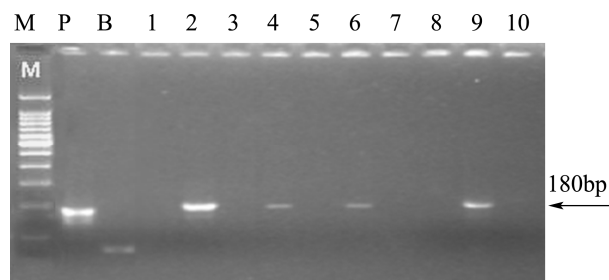


图 2 PCR 检测含腊肠制品中大豆成分电泳结果

Fig.2 Electrophoretogram of PCR-amplified soybean DNA in sausage

注: M: 100 bp ladder; P: 植物基因组 DNA; B: 动物

基因组 DNA; 1-10: 样品 1-10。

对样品中植物成分是否为大豆成分进行 PCR 检测。用大豆特异的内源基因引物对所选的 10 种腊肠样品 DNA 进行 PCR 扩增,电泳结果显示在样品 9 中能扩增出相应的 112 bp 的条带,而在其它 3 个含植物成分样品中未能扩增出相应条带,这个结果说明在这 4 个含植物成分的样品中样品 9 含有大豆成份,而其它三个的植物成分为非大豆植物(见图 3)。

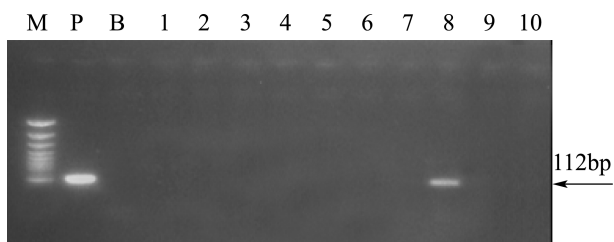


图 3 PCR 检测腊肠样品中的植物成分电泳结果

Fig.3 Electrophoretogram of PCR-amplified plant element DNA in sausage

注: M: 100 bp ladder; P: 大豆 DNA; B: 动物基因 DNA; 1-10: 样品 1-10。

3 讨论

DNA 提取技术一直是 PCR 在食品检测中应用的限制步骤,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^[8-9],在试验中对腊肠 DNA 的提取方法加入了前处理,提取得到的 DNA 产量高且质量好,平均浓度达到了质量浓度 400~600 ng/ μ L, A260/A280 比值平均在 1.8 左右,并通过 PCR 检验证明,这种方法提取腊肠的 DNA 质量高,足以应用于 PCR 检测。

腊肠是中国的传统食品之一,有着悠久的食用历史,腊肠的质量也一直是大众关心的问题。对于腊肠

食品中是否含有其它的植物成分,一直没有一个可靠又灵敏的方法来进行检测。我们尝试采用了分子生物学中的 PCR 技术来鉴别腊肠中是否含有植物成分,经实验证明,该方法操作简单可行,能检测出掺入腊肠中植物成分,同时,对市场上的 10 份腊肠产品进行了检测,检测 4 份样品中含有植物成分,其中的一份含有大豆植物成分。综上所述,本方法将前处理与酚仿抽提 DNA 相结合,建立了一种快速简便的从腊肠中提取 DNA 的方法,采用 PCR 方法来检测腊肠中的植物成分,实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 (4): 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] GB10147-1988,中华人民共和国国家标准[S]:香肠(腊肠)、香肚卫生标准.
- [8] 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
- [9] 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 (4):520-522

(上接第 657 页)

- [5] K.S.Dodgson, et al. Determination of Inorganic Sulphate in Studies on the Enzymic and Non-enzymic Hydrolysis of Carbohydrate and other Sulphate Esters[J], Biochem. J.,1961(78):312
- [6] Julio Ludowieg, Joseph D. Benmaman. Colorimetric differentiation of Hexosamines[J].Analytical Biochemical, 1967, 19:80
- [7] Dische Z. A specific reaction of methylpentose and a spectrophotometric micromethod for their determination. J. Biol. Chem, 1948,175:595
- [8] 张豁中,等.动物活性成分化学(第 1 版)[M],天津:天津科学技术出版社,1995