

实验技术与方法

不同热处理方法对鲤鱼 DNA 的影响及不同 DNA 提取方法的比较

雍凌¹, 张文众¹, 刘玉梅^{1,2}, 贾旭东¹, 严卫星¹

(1. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100021;

2. 北京联合大学应用文理学院, 北京 100191)

摘要:目的 研究不同加热方法处理后鲤鱼基因组 DNA 长度和含量的变化, 并对 4 种 DNA 提取方法进行比较。方法 用电磁炉和微波炉将鲤鱼背部肌肉加热煮沸 1、2、3 h 取出, 再分别用酚氯仿法、Wizard® 试剂盒法、磁珠法和离心柱法提取处理前后鲤鱼基因组 DNA, 利用琼脂糖凝胶电泳对处理前后的总 DNA 长度进行比较, 再用实时荧光定量 PCR 法检测所得 DNA 样品中内参基因 β -actin 含量的变化。结果 琼脂糖凝胶电泳结果显示, 处理后 DNA 片段明显降解。生鱼肉提取 β -actin 的量为 1 070 213.39 拷贝/ μ l, 电磁炉处理 1、2、3 h 的浓度分别为 143 309.6、441 350.43 和 256 994.16 拷贝/ μ l, 微波炉处理 1、2、3 h 的浓度分别为 269 121.17、267 371.16 和 134 649.97 拷贝/ μ l。酚氯仿法、Wizard® 试剂盒法、离心柱法和磁珠法提取的平均 DNA 浓度分别为 718 944.93、737 945.64、26 751.22 和 2 934.06 拷贝/ μ l。结论 加热煮沸导致 DNA 降解, 因此加工食品中 DNA 的检测应当选择较短的目标片段。4 种 DNA 提取方法比较, Wizard® 试剂盒法和酚氯仿法提取的 DNA 浓度显著高于离心柱法和磁珠法, 且离心柱法又高于磁珠法。

关键词: 加热时间; 鲤鱼 DNA; DNA 提取方法; 荧光定量聚合酶链反应

中图分类号: Q812; S917 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-8456(2011)03-0245-04

Effects of heating on DNA of carp and the different methods for DNA extraction

Yong Ling, Zhang Wenzhong, Liu Yumei, Jia Xudong, Yan Weixing

(National Institute for Nutrition and Food Safety, China CDC, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of different heating methods on the degradation of carp DNA and to compare different DNA extraction methods. **Methods** The dorsal muscle of carp was boiled for 1, 2 and 3 h by electromagnetic oven or microwave oven. Genomic DNA of carp meat was extracted by four different methods (phenol/chloroform extraction, Wizard® commercial Kit, Mag-Bind DNA Kit and spin column). The length of DNAs before and after heat treatment was compared by agarose gel electrophoresis. The contents of β -actin in tested DNA samples were determined by real-time PCR assays. **Results** The contents of β -actin DNA after heating for 1, 2 and 3 h in electromagnetic oven were 143 309.6, 441 350.43 and 256 994.16 copy/ μ l and those in microwave oven were 269 121.17, 267 371.16 and 134 649.97 copy/ μ l respectively. The contents of raw carp β -actin DNA was 1 070 213.39 copy/ μ l, which were decreased significantly after being heated. However, the contents of β -actin DNA would be no significant change with extended heating time. The contents of DNA extracted by phenol/chloroform or Wizard® commercial Kit (718 944.93 and 737 945.64 copy/ μ l respectively) were higher than that by spin column and Mag-Bind DNA Kit (26 751.22 and 2 934.06 copy/ μ l respectively). **Conclusion** DNA could be degraded by heating for more than 1 h. Therefore, the target fragments of DNA in food selected for DNA detection should be shorter. As for the extraction methods, the contents of DNA extracted by phenol/chloroform and Wizard® commercial Kit were higher than that by spin column and Mag-Bind DNA Kit.

Key words: Heating time; carp DNA; DNA extraction methods; fluorescent quantitative polymerase chain reaction

收稿日期: 2010-10-28

基金项目: 转基因生物检测和监测新技术食品中转基因作物溯源体系研究 (2008ZX08012-005)

作者简介: 雍凌 女 硕士生 研究方向为卫生毒理学 E-mail: yongling1234@139.com

通信作者: 严卫星 男 研究员

转基因鱼的研究发展迅速, 虽然目前唯一商业化的转基因鱼并非用于食用, 但作为增加鱼肉产量的有效方法, 食用转基因鱼的研究在全世界许多实验室广泛进行^[1], 因而检测食品中转基因鱼成分的方法也亟需建立。

目前, 国际上对转基因食品检测技术的研究还

处于初级阶段。其中,聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)等针对DNA的检测方法是判别食品是否含有转基因成分的常规检测方法^[2]。Del Gaudio等^[3]提出了一种PCR预扩增的方法,可以对转基因食品加工后所含有的目的基因进行更精确检测;Kim等^[4]研究的事件特异性DNA微阵列系统,同样是基于加工食品中转基因成分的DNA检测。

本研究探索了不同的热处理方法和时间对鱼肉DNA的影响,并且比较了4种DNA提取方法的效果,旨在完善热处理后鱼肉转基因成分的检测技术,从而为建立检测食品中转基因成分的标准方法提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品

黄河鲤鱼(*Cyprinus carpio*),购自北京市内某超市。

1.2 仪器和试剂

苯酚、氯仿、异戊醇均为分析纯,8-羟基喹啉(纯度99%);Wizard® Genomic DNA Purification Kit,购自美国Promega公司(批号301016);磁珠试剂盒,购自北京博乐通生物科技有限公司(t380301);离心柱法试剂盒,购自LanGang Biotech公司(批号:DP6003);iQTM SYBR Green Supermix,购自美国Bio-Rad公司(批号9207996);低温离心机,酶标仪,PCR仪。

1.3 实验方法

1.3.1 样品处理

将一条鲤鱼的背部肌肉分为3份,1份不加热,另2份分别置于电磁炉和微波炉中加水煮沸。分别称取生鱼肉和煮沸1、2、3h的鱼肉各0.025g进行DNA提取。

1.3.2 DNA提取

以电磁炉处理1h的鱼肉为样本提取DNA。酚氯仿法按照GB/T 19495.3—2004《转基因产品检测核酸提取纯化方法》^[5]中的酚-三氯甲烷-1法操作,Wizard®试剂盒法、磁珠法和离心柱法按照各自的试剂盒说明书操作。

1.3.3 PCR检测

1.3.3.1 引物设计

针对GenBank中鲤鱼的 β -actin序列(基因号M24113.1),运用引物设计软件Primer Premier 5进行设计,扩增产物长度116bp。引物序列见表1。

1.3.3.2 PCR反应

PCR扩增反应的20 μ l反应体系包括iQ™

SYBR Green Supermix 10 μ l,上下游引物各2 μ mol/L,DNA模板1 μ l,用灭菌双蒸水补足体系。PCR反应体系在PCR仪中反应的程序是预变性94 $^{\circ}$ C,30 s,变性94 $^{\circ}$ C,30 s;退火57 $^{\circ}$ C,30 s;延伸72 $^{\circ}$ C,30 s。进行45个循环,最后72 $^{\circ}$ C延伸5 min。

表1 实时荧光定量PCR反应引物的序列

Table 1 Primer sequences for PCR	
引物名称	引物序列(5'—3')
β -actin F	5'GTTACCACTTCACGCCGACT 3'
β -actin R	5'ACCTTCGCCGTTCACGTT 3'

1.4 数据分析

采用SPSS 16.0统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 β -actin 扩增的标准曲线

本实验按照10倍稀释的方法,将生鱼肉提取的DNA样品浓度设为1,将其分别稀释至原浓度的 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} ,每个样品设置3个平行样。利用Rotor-gene 3000软件拟合出浓度的对数与对应的Ct值之间的扩增曲线和标准曲线,见图1。

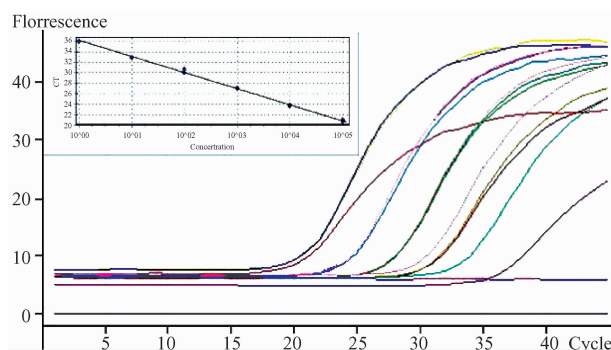


图1 实时荧光定量PCR扩增曲线和标准曲线

Figure 1 Amplification curve and standard curve of real-time PCR

该标准曲线的回归方程为: $y = -3.0477x + 39.111$, $R^2 = 0.9989$ 。其中: x 为标准品DNA浓度的对数值, y 为Ct值, R^2 为确定系数。此外,Rotor-gene 3000计算出的PCR效率达到了111%。通过熔解曲线(图2)可见,扩增的片段为特异性产物。

2.2 加热前后DNA长度的比较

将提取的DNA直接进行琼脂糖凝胶电泳观察,发现未处理的鱼肉DNA多为大片段,长度大于1500bp,而处理后鱼肉DNA片段长度基本上都低于1000bp。

2.3 定量检测样品中 β -actin基因的含量

取微波炉和电磁炉分别处理不同时间的鱼肉

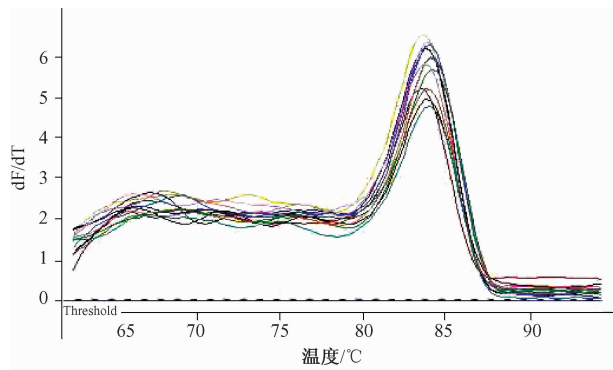


图2 实时荧光定量 PCR 熔解曲线
Figure 2 Melt curve of real-time PCR

样本和未处理的鱼肉样本,采用 Wizard® 试剂盒法提取基因组 DNA,每个样本平行提取 2 次,将所得 DNA 样品进行实时荧光定量 PCR 法检测,每个 DNA 样品平行检测 3 次。由表 2 可见,通过标准曲线计算出来的未处理鱼肉 β -actin 的浓度大于处理后鱼肉 β -actin 的浓度,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);而电磁炉加热和微波炉加热的各组浓度之间,差异并无统计学意义;加热 1、2 和 3 h 后鱼肉

表 2 不同热处理方法和热处理时间后 β -actin DNA 浓度的比较

Table 2 Content of β -actin after heating by different methods ($\times 10^4$)

热处理方法	DNA 拷贝数			
	未处理	1 h	2 h	3 h
电磁炉加热	107.02 \pm 88.51	14.33 \pm 14.66 ^a	44.14 \pm 22.02 ^a	25.70 \pm 15.75 ^a
微波炉加热		26.91 \pm 16.03 ^a	26.74 \pm 22.95 ^a	13.46 \pm 12.10 ^a

注:^a 与未处理鱼肉的 DNA 拷贝数比较, $P < 0.05$ 。

2.4 4 种 DNA 提取方法的比较

采用实时荧光定量 PCR 法检测以上 4 种方法提取的微波炉处理 1 h 的 DNA 样品浓度,每种方法平行提取 2 个样品,每个样品平行检测 3 次。表 3 显示,根据标准曲线计算的 DNA 浓度平均值来看,不同方法提取的 β -actin 浓度从大到小排列依次是:酚氯仿法、Wizard® 试剂盒法、离心柱法和磁珠法;酚氯仿法和 Wizard® 试剂盒法比离心柱法及磁珠

表 3 不同 DNA 提取方法 DNA 拷贝数的比较

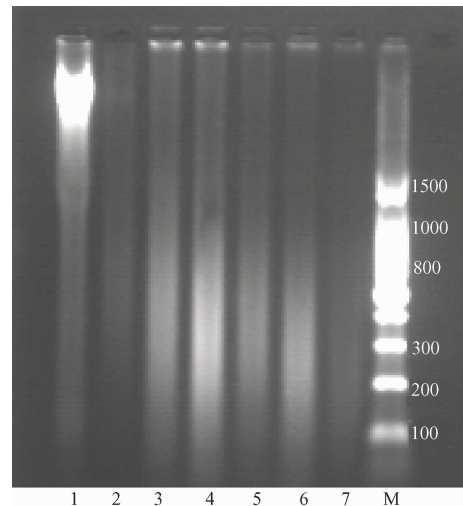
Table 3 The number of DNA copies extracted by different methods ($\times 10^4$)

提取方法	DNA 拷贝数
酚氯仿	71.89 \pm 28.07 ^{ab}
Wizard 试剂盒	73.79 \pm 27.63 ^{ab}
离心柱	2.68 \pm 0.29 ^b
磁珠	0.29 \pm 0.18

注:^a 与离心柱法 DNA 拷贝数比较, $P < 0.05$ 。^b 与磁珠法 DNA 拷贝数比较, $P < 0.05$ 。

法提取的浓度高,而离心柱法提取的浓度又高于磁珠法,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。而酚氯仿法和 Wizard® 试剂盒法提取的浓度之间差异没有

β -actin 的浓度逐渐减少,但数值差异量并无统计学意义。



1:未处理鱼肉 DNA;2-4:电磁炉加热 1、2、3 h 鱼肉 DNA;5-7:微波炉加热 1、2、3 h 鱼肉 DNA;M:Marker

图 3 琼脂糖凝胶电泳图

Figure 3 Picture of agarose gel electrophoresis

显著性。

3 讨论

高温能破坏核酸中的氢键,使之断裂,当加热到 80 ~ 100 °C 时,双螺旋结构即发生解体,两条链分开,形成无规线团,一系列物化性质也随之发生改变,有时可以失去部分或全部生物活性^[6]。

本研究选择了食品加工中常用的加水煮沸的方法、挑选了电磁炉和微波炉两种加热原理不同的烹饪工具对鱼肉样本进行处理,并且对煮鱼时间(一般不超过 1 h)进行了适当的延长,以探索不同的热处理方法和处理时间对鱼肉 DNA 的影响。同时还对酚氯仿法、Wizard® 试剂盒法、磁珠法和离心柱法提取 DNA 的效果进行了比较。

通过琼脂糖凝胶电泳显示,经加热处理,长链 DNA 片段降解为短片段,而检测 100 bp 左右的 DNA 能很好地反映出 DNA 随时间降解的时间-反应关系。同时对电磁炉和微波炉两种处理方法处理后提取的鱼肉 DNA 浓度进行比较后发现,这两种处理方法对鱼肉 DNA 量的影响无统计学意义,提示这两

种处理方法对 DNA 的影响大致相当。

Gawienowski 等^[7]研究表明,经浸泡、湿磨等加工过程能使玉米基因和质粒 DNA 降解,135 ℃加热 2 h 后,DNA 几乎完全降解。Kharazmi 等^[8]认为,浸泡后又经过物理破碎处理而做成的豆奶、豆腐和热加工做成的玉米糊和马铃薯,没有检测出大于 1.1 kb 的 DNA 片段。Alexander 等^[9]推测饲料加工过程中对降解 DNA 起决定作用的可能是高温,且温度必须达到一定高度。Peano 等^[10]研究了豆粉、薄脆饼干和豆腐中的内源大豆凝集素基因(*lectin*)的降解情况,在豆粉中能够检测出 1 626 bp 的该基因片段,薄脆饼干和豆腐中只能分别检测出 391 bp 和 169 bp 的该基因片段。陈颖等^[11]研究发现在豆腐、豆奶和豆粉的加工过程中,其原料中仅能检测到大小为 1 883 bp 的内源 *lectin* 基因片段,经磨浆、煮浆和均质等工艺处理后,*lectin* 基因降解至 1 000 bp 以下,而最终的豆奶、豆粉中 *lectin* 基因片段大小仅为 200 bp。沈立明等^[12]对不同加工条件下转基因大米 s 86 潮霉素标记基因(*hpt*)的稳定性进行了研究,也得出了相近的结论。上述研究均表明,食品的物化加工过程导致了 DNA 的长度减小。

DNA 的提取方法多种多样,目前已有许多相关方法的优化和比较研究。本研究显示,酚氯仿法、Wizard® 试剂盒法、磁珠法和离心柱法这 4 种方法提取的处理后鱼肉 DNA 均可以得到 PCR 检测所需的样品,但各有利弊:酚氯仿法为经典的 DNA 提取方法,不需要昂贵仪器,提取的 DNA 纯度能够满足一般分子生物学的需要,但操作步骤最复杂、耗时长,且苯酚、氯仿等有机溶剂有损操作者健康,易造成环境污染,其他 3 种方法均为试剂盒法,操作相对简单,耗时短,对人体健康影响小;从提取 DNA 的量来看,酚氯仿法和 Wizard® 试剂盒法优于另外两种方法;就提取样本量来说,Wizard® 试剂盒法和离心柱法仅能提取 0.025 ~ 0.04 g 的样本,而酚氯仿法和磁珠法则可根据需要加大样本量。

陈赞等^[13]对酚氯仿法和离心柱法进行了比较,以确定最适提取鱼糜制品 DNA 的方法,结果认为两种提取方法均适用于鱼糜制品基因组 DNA 的提取,但酚氯仿法可处理较多样品,得到 DNA 样品浓度较高,与本实验结果一致。

因此在选择 DNA 提取方法时,若要求高浓度的

DNA 可以选择 Wizard® 试剂盒法和酚氯仿法;需一次性提取大量样品则可选择酚氯仿法和磁珠法;若要操作简单、快速,则选用 Wizard® 试剂盒及离心柱的方法较好;若考虑对操作者健康及环境的影响,可以在 Wizard® 试剂盒法、离心柱法和磁珠法之间进行选择。

参考文献

- [1] MUIR W M. The threats and benefits of GM fish [J]. *Embo Rep*, 2004, 5(7): 654-659.
- [2] MATSUOKA T, KURIBARA H, TAKUBO K, et al. Detection of recombinant DNA segments introduced to genetically modified maize (*Zea mays*) [J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(7): 2100-2109.
- [3] DEL GAUDIO S, CIRILLO A, DI BEMARDO G, et al. A preamplification approach to GMO detection in processed foods [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 396(6): 2135-2142.
- [4] KIM J H, KIM S Y, LEE H, et al. An event-specific DNA microarray to identify genetically modified organisms in processed foods [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(10): 6018-6026.
- [5] 国家技术监督局. GB/T 19495.3—2004 转基因产品检测核酸提取纯化方法[S]. 北京:中国标准出版社,2004.
- [6] 王镜言,朱圣庚,徐长法. 生物化学[M]. 北京:高等教育出版社,2002: 508.
- [7] GAWIENOWSKI M C, ECKHOF S R, PING Y, et al. Fate of maize DNA during steeping, wet-milling, and processing [J]. *Cereal Chem*, 1999, 76(3): 371-374.
- [8] KHARAZMI M, BAUER T, HAMMES W P, et al. Effect of food processing on the fate of DNA with regard to degradation and transformation capability in *Bacillus subtilis* [J]. *Syst Appl Microbiol*, 2003, 26(4): 495-501.
- [9] ALEXANDER T W, SHARMA R, OKINE E K, et al. Impact of feed processing and mixed ruminal culture on the fate of recombinant EPSP synthase and endogenous canola plant DNA [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2002, 214(2): 263-269.
- [10] PEANO C, SAMSON M C, PALMIEFI L, et al. Qualitative and quantitative evaluation of the genomic DNA extracted from GMO and non-GMO foodstuffs with four different extraction methods [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52: 6962-6968.
- [11] 陈颖,王媛,徐宝梁,等. 食品加工工艺对大豆内源基因降解变化规律的影响[J]. *中国粮油学报*, 2005, 20(4): 60-63.
- [12] 沈立明,吴永宁,张建中,等. 不同加工条件下转基因大米潮霉素标记基因(*hpt*)稳定性研究[J]. *卫生研究*, 2006, 35(4): 431-434.
- [13] 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.