

# 微芯片电泳 MultiNA 检测中华鳖蛋白粉中提取的 DNA 扩增产物

## MultiNA-010

**摘要：** 为验证深加工食品中华鳖蛋白粉中是否可以用 DNA 分子标记鉴定，利用改动的试剂盒方法对市售中华鳖蛋白粉进行 DNA 提取，并用细胞色素 b (Cytb) 通用引物进行 PCR 扩增，微芯片电泳 MultiNA 检测扩增产物。实验结果表明深加工蛋白粉中可以得到质量较高的 DNA，与从中华鳖肌肉样品中得到的阳性对照 DNA 相比，结果相似，得到约 450 bp 的产物。本方法为分子标记技术应用于高附加值食品的鉴定提供了技术支持。

**关键词：** 微芯片电泳 MultiNA PCR 中华鳖蛋白粉 DNA 扩增产物检测

中华鳖是高蛋白食品，具有滋补身体增强免疫力的功效，然而直接食用中华鳖，其营养吸收率并不高。相比之下，中华鳖蛋白粉更容易被人体吸收，是具有高附加值的营养食品。然而由于中华鳖原料价格昂贵，不法分子容易对其掺假、造假以牟取非法利益。

分子标记 (molecularmarker) 是一种新的遗传标记方法，它是以 DNA 多态性与性状间的紧密连锁关系为基础的遗传标记。DNA 分子标记是由于缺失、插入、易位、倒位、重排或由于存在长短与排列不一的重复序列等机制而产生的多态性，其本质上是指能反映生物个体或种群间基因组中某种差异特征的 DNA 片段，因此，可以实现物种鉴定的目的。这种 DNA 片段是基因组 DNA 经限制性内切酶切割，或作分子杂交后在电泳胶上或检测得到的。

由于基因组一般很大，无法进行全面的序列分析，需要针对基因组中个别特征基因片段进行研究，选择合适的分子标记片段是一个关键问题。目前的研究对象以

线粒体 DNA 的细胞色素 b 基因 (Cytb) 和核糖体 DNA (rDNA) 为主。线粒体 Cytb 基因具有相对高的种间差异、较低的种内变异以及相当长的变化序列，因而可通过 Cytb 鉴别密切相关的物种。

分子标记技术为中华鳖蛋白粉鉴定提供了新的检测手段，这就需要从蛋白粉中提取合适的 DNA 用于分子标记。然而中华鳖蛋白粉加工工艺精细，所提得的 DNA 结构是否被破坏，最终能否用于 PCR 扩增，即 DNA 分子标记鉴定是否适用中华鳖蛋白粉，是一个需要探讨的课题。为此本文利用改动的试剂盒方法对市售中华鳖蛋白粉进行 DNA 提取，并用通用线粒体细胞色素 b 基因 (Cytb) 引物进行 PCR 扩增，微芯片电泳 MultiNA 检测扩增产物。结果表明蛋白粉中可以提取到线粒体细胞色素 b 基因 (Cytb)，与从中华鳖肌肉样品中得到的阳性对照样品结果相似，即约 450 bp 的产物。本方法为分子标记技术应用于高附加值产品的鉴定提供了技术基础。

## 实验部分

### 1.1 仪器

MCE-202 MultiNA

### 1.2 试剂

TaKaRa MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver.5.0 (宝生物工程(大连)有限公司, 9765)

SYBR<sup>®</sup> Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen, S-11494)

1×TE Buffer

25 bp DNA Ladder (Invitrogen, 10597-011)

DNA-1000 Reagent Kit for MultiNA (岛津公司, P/N 292-27911-91)

样品：市售中华鳖蛋白粉

引物：所用引物为特异性扩增约 450 bp 长的细胞色素 b 基因片段的通用引物对，设计如表 1 所示。

表1 针对细胞色素b (Cytb) 基因设计引物及PCR扩增信息

引物名称	引物序列
L14724	5'-CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG-3'
H15149	5'-AAACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCTCA-3'

### 1.3 分析条件

MultiNA Marker 混合模式: On-chip 混合

#### 1.4 样品中 DNA 的提取与纯化

1.4.1 取 150 mg 中华鳖蛋白粉, 置于 2 mL 离心管中。

1.4.2 加入 180  $\mu$ L 试剂盒中 Buffer GL、20  $\mu$ L Proteinase K 和 10  $\mu$ L 的 RNase A (10 mg/mL), 于 56°C 温水浴 3 小时。

1.4.3 向裂解液中加入 200  $\mu$ L Buffer GB 和 200  $\mu$ L 的 100% 乙醇, 充分吸打混匀。

1.4.4 将 Spin Column 安置于 Collection Tube 上, 溶液移至 Spin Column 中, 12000 rpm 离心 2 分钟, 弃滤液。

1.4.5 将 500  $\mu$ L 的 Buffer WA 加入至 Spin Column 中, 12000 rpm 离心 1 分钟, 弃滤液。

1.4.6 将 700  $\mu$ L 的 Buffer WB 加入至 Spin Column 中, 12000 rpm 离心 1 分钟, 弃滤液。

1.4.7 重复操作步骤 1.4.6。

1.4.8 将 Spin Column 安置于 Collection Tube 上, 12000 rpm 离心 2 分钟。

1.4.9 将 Spin Column 安置于新的 1.5 mL 的离心管上, 在 Spin Column 膜的中央处加入 65°C 150  $\mu$ L 的 TE Buffer, 室温静置 5 分钟。

1.4.10 12000 rpm 离心 3 分钟洗脱 DNA。将离下液重新加入到 Spin Column 膜的中央, 室温静置 5 分钟后, 12000 rpm 离心 3 分钟洗脱 DNA。

1.4.11 利用 BioSpec-nano 测量 DNA 浓度, 调整至 PCR 反应所需浓度范围。

1.4.12 阳性对照品为在市场上购买的中华鳖, 利用上述 DNA 提取试剂盒从中华鳖肌肉中提取 DNA, 调整模板浓度, 用于 PCR 扩增反应。

#### 1.5 PCR 反应体系

PCR 反应试剂与反应条件见表 2 和表 3。

表2 PCR反应试剂

	使用量	终浓度
SYBR <sup>®</sup> Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2 $\times$ )	10.0 $\mu$ L	1 $\times$
PCR Forward Primer (10 $\mu$ M)	0.8 $\mu$ L	0.4 $\mu$ M
PCR Reverse Primer (10 $\mu$ M)	0.8 $\mu$ L	0.4 $\mu$ M
DNA模板	2.0 $\mu$ L	<10ng/ $\mu$ L
dH <sub>2</sub> O (灭菌蒸馏水)	6.4 $\mu$ L	
总体积	20.0 $\mu$ L	

表3 PCR反应参数

作用	时间/s	温度/°C
活化DNA活性酶和预变性	30	95
PCR (45 个循环)		
变性	30	95
退火	30	55
延伸	60	72
循环后保持	180	72

## 1.6 MultiNA 检测

PCR 扩增产物进入 MultiNA 进行测定。根据理论产物片段大小，实验中选用 1000 bp 的试剂盒进行测定。为了验证测量的准确性，本文同时阴性对照实验，阴性对照的反应体系中不加入 DNA 模板。

### 结果讨论

图 1 与图 2 分别是 MultiNA 测量中华鳖肌肉样品和蛋白粉样品中细胞色素 b 基因 PCR 产物的凝胶图和电泳图。实验结果显示中华鳖肌肉中 DNA 经 PCR 扩增，得到明显的约 450 bp 的片段。同时，中华鳖蛋白粉提取扩增出的 DNA 也检测出与阳性对照样品大小相近的片段，表明中华鳖蛋白粉中可以提取并扩增出适合于分子标记的细胞色素基因 b。另外，阴性对照中没有得到相应条带，说明实验过程没有被污染。本实验中提取中华鳖蛋白粉 DNA 时使用宝生物的 DNA 提取试剂盒，但操作方式与试剂盒的说明使用步骤有所不同。首先是样品的取样量，试剂盒中建议取样 10-25 mg，然而按照此取样量，并不能扩增出相应片段。由于蛋白粉加工过程中 DNA 破坏可能比较严重，故实验时加大了取样量，改为 150 mg。此外，两次洗脱 DNA 时，使用了对 DNA 溶解能力强 TE Buffer 进行洗脱，与试剂盒附带的洗脱液相比，得到的 DNA 量更多。同时，增加了离心洗脱时间，使洗脱更彻底。

### 结论

本文成功提取了中华鳖蛋白粉中可用于分子标记的细胞色素 b 基因，并且此基因可用于 PCR 扩增，微芯片电泳 MultiNA 检测出扩增出的特异性条带。本方法把分子标记技术引入到高附加值的产品检测中提供了技术支持。

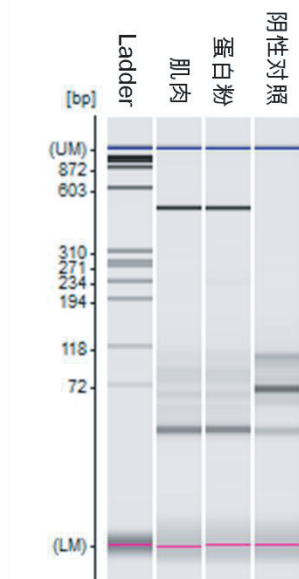


图1 MultiNA检测中华鳖细胞色素b (Cytb) 基因凝胶图

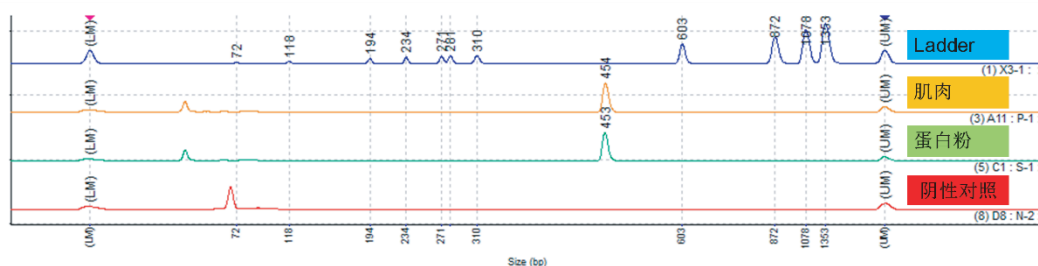


图2 MultiNA检测中华鳖细胞色素b (Cytb) 基因电泳图