

DOI:10.12361/2661-3263-05-10-117658

核桃乳饮品 DNA 快速提取方法研究

黄少康 许越 王霞*

吉林农业科技学院, 中国·吉林 吉林 132101

【摘要】市场上核桃乳饮品掺假现象层出, 急需建立一种快捷、精准的核桃乳饮品真伪鉴别方法。核桃乳饮品 DNA 的快速高效提取是进行分子鉴别的前提和基础。实验分别采用碱裂解法、PBS法和直接煮沸法提取市售不同品牌核桃乳饮品 DNA, 并进行 PCR 扩增, 根据扩增产物的电泳条带筛选最佳 DNA 快速提取方法, 同时分析提取方法的有效性。结果表明, 利用碱裂解法快速提取核桃乳饮品 DNA 的质量较好, 其 PCR 扩增产物电泳条带清晰、明亮, 可用于核桃乳 DNA 快速提取。

【关键词】核桃乳饮品; DNA 快速提取; 碱裂解法; PBS 法; 直接煮沸法; PCR

Study on Rapid DNA Extraction Method of Walnut Milk Drink

Shaokang Huang, Yue Xu, Xia Wang*

Jilin Agriculture Science And Technology College, China Jilin Jilin 132101

[Abstract] Adulteration of walnut milk drinks appears in the market, so it is urgent to establish a quick and accurate method for authenticity identification of walnut milk drinks. Rapid and efficient extraction of DNA from walnut milk drink is the premise and basis for molecular identification. In this experiment, the DNA of different brands of commercially available walnut milk drinks was extracted by alkali cracking method, PBS method and direct boiling method, and PCR amplification was carried out. The optimal DNA rapid extraction method was screened according to the electrophoresis bands of the amplified products, and the effectiveness of the extraction method was analyzed. The results showed that the quality of DNA extracted from walnut milk drink by alkali cracking method was good, and the electrophoresis bands of the PCR products were clear and bright, which could be used for rapid DNA extraction from walnut milk.

[Keywords] Walnut milk drink; Rapid DNA extraction; Alkali cracking process; PBS method; Direct boiling method; PCR

【基金项目】吉林农业科技学院大学生科技创新项目(吉农院合字[2022]第025号)

核桃(*Juglans*)作为“四大干果”之一, 其营养价值非常丰富, 脂质和蛋白质含量高, 符合联合国粮农组织(FAO)和世界卫生组织(WHO)规定的标准, 消化率高达85%, 属于优质植物蛋白, 具有抗衰老、抗癌、预防神经衰退, 强身补脑等作用^[1]。以核桃为原料所制成的核桃乳饮料因其营养丰富等特点为大众喜爱。研究发现, 一些不良商家为谋取私利, 使用廉价原料(花生、大豆等)混用替用核桃原材料, 致使核桃乳饮品市场掺杂使假现象混乱, 严重侵害了消费者的正当权益。同时, 过敏性食源标签制度也要求核桃、花生等主要过敏食源需要在食品中标出。因此, 为了维护广大消费者的健康和权益, 亟需建立一种快捷、准确的核桃乳饮品真伪鉴别方法。

DNA 分子鉴别是从基因水平上进行的一种精准、高效鉴别方法^[2], 该法开展的前提和基础是高质量 DNA 的获得。作为深加工产品, 核桃乳饮品在加工过程中会损失部分原料 DNA, 这无疑增加了 DNA 提取的困难。同时常规 DNA 提取过程复杂, 提取时间冗长, 无法满足核桃乳饮品的高通量现场检测需求。因此探索核桃乳饮品 DNA 的快速提取方法势在必行。

目前, 人们对 DNA 的快速提取研究已经取得了一些成果, 如郭梁等^[3]通过比较 CTAB 法和试剂盒法提取 DNA 的质量, 获得了乳制品较高质量 DNA 的提取方法。李柯^[4]等以花生为材料, 通过简化裂解法步骤, 在短时间内获得高通量 DNA, 大大缩短了 DNA 提取时间, 并成功应用于 PCR 反应。郑琪^[5]等成功运用碱裂解法快速提取中药炒制品的 DNA。目前, 针对核桃乳饮品 DNA 快速提取方面的研究尚无报道, 本研究通过比较碱裂解法、PBS 法和直接煮沸法快速提取核桃乳 DNA 的质量, 寻找核桃乳饮品 DNA 最佳快速提取方法, 为实现核桃乳饮品的快速准确分子鉴别奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料

市售 8 种核桃乳饮品, 分别购自吉林某超市和淘宝网站。

1.1.2 试剂

Taq DNA 聚合酶、dNTPs、琼脂糖等均购自 Takara Bio 公司, PCR 扩增引物为 ITS2、*rbcl*、*psbA-trnH* 和 *matK* 4 个条形码片段的通用引物, 均由上海生工生物工程有限公司合成, 引物序列参照文献^[1]。

1.2 方法

1.2.1 核桃乳饮品预处理

取 1.5 mL 适量核桃乳饮品于无菌离心管中, 向管中加入 1.5 mL 异丙醇, 上下颠倒混匀, 室温静置 5min 后, 12000 r/min 离心 6 min, 弃上清留沉淀, 并重复以上操作 1 遍。

1.2.2 基因组 DNA 快速提取

参照王之莹^[6]操作, 分别采用碱裂解法、PBS 法和直接煮沸法快速提取饮品 DNA。

碱裂解法: 分别向 1.2.1 中离心管中加入 0.25 mL 0.4 mol/L NaOH 裂解液(含 0.1 mol/L EDTA), 将离心管涡旋混匀, 于沸水浴中 5min, 13500 r/min 离心 10min, 取中间清液作为 PCR 反应模板。

PBS 法: 分别向 1.2.1 中离心管中加入 0.25 mL 0.1 mol/L PBS 缓冲液(含 0.1 mol/L Na_2HPO_4 、0.028 mol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.73 mol/L NaCl) 0.25 mL, 将离心管涡旋混匀, 于沸水浴中 5min, 13500 r/min 离心 10min, 取中间清液作为 PCR 反应模板。

直接煮沸法：分别向 1. 2. 1 中离心管中加入 0. 25 mL 无菌水，将离心管涡旋混匀，于沸水浴中 5min，13500 r/min 离心 10min，取中间清液作为 PCR 反应模板。

1. 2. 3 PCR 扩增及电泳检测

以提取的核桃乳饮品 DNA 为模板，采用通用引物 ITS2 进行 PCR 扩增，PCR 扩增体系为 25 uL，包括 2 X Premix Taq 12. 5 uL、上下游引物各 1. 2 uL，DNA 模板 1 uL，去离子水 9. 1 uL。

PCR 反应程序为：94℃ 预变性 5min 后，反应 39 个循环（94℃ 变性 30s，55℃ 退火 30s，72℃ 延伸 45s），最后 72℃ 延伸 10min。PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳，根据电泳条带的清晰度和特异性筛选和确定核桃乳饮品组 DNA 的快速提取技术。实验重复 2 次。

1. 2. 4 提取方法有效性分析

利用上述筛选的最佳基因组 DNA 快速提取方法随机提取 1 种核桃乳 DNA，利用 4 个通用引物（ITS2、rbcL、psbA-trnH 和 matK）对提取的进行 PCR 扩增，扩增体系及反应程序同上，ITS2、rbcL、psbA-trnH 和 matK 通用引物退火温度依次为 55℃、54℃、56℃、46℃。同时对 matK 扩增条带进行回收、测序和序列比对，根据扩增产物条带和序列比对结果，判断提取方法的有效性^[5]。

2 结果与分析

2. 1 DNA 快速提取方法比较

以市售 8 种核桃乳饮品为材料，采用碱裂解法、PBS 法和直接煮沸法快速提取 DNA，并利用 ITS2 通用引物进行 PCR 扩增，根据扩增产物的电泳条带筛选最佳 DNA 快速提取方法。由图 1A 可知，利用碱裂解法提取的 8 种核桃乳饮品 DNA 均有扩增条带，且条带清晰明亮，无拖尾现象；由图 1B 可知，利用 PBS 法提取的样品 4 基因组 DNA 无扩增条带，其余均有扩增条带，条带较碱裂解法偏弱，无拖尾现象；由图 1C 可以看出，利用直接煮沸法提取的样品 1、3、4、6 基因组 DNA 无扩增条带，其余 4 个样品有扩增条带，但整体条带偏弱，说明该法不能破坏所有核桃乳饮品细胞，阻碍了基因组 DNA 释放。

综上，碱裂解法提取核桃乳饮品 DNA 浓度比较高，DNA 质量较好；而 PBS 法和直接煮沸法无法提取所有样品 DNA，不适于核桃乳饮品 DNA 快速提取。

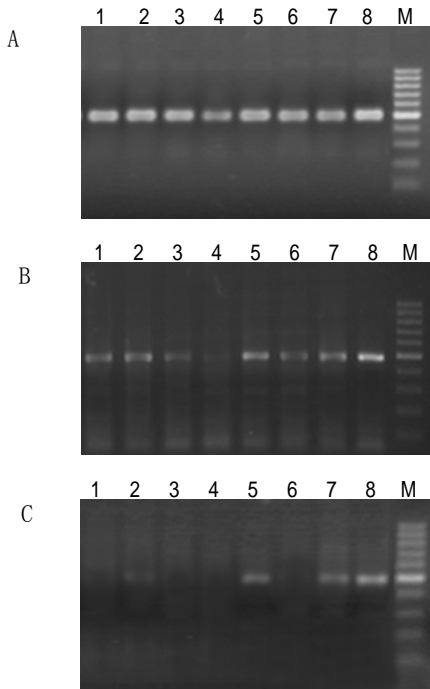


图 1 提取 DNA 扩增产物电泳图

注：M 是 100bp marker，1-8 为不同核桃乳饮品；A：碱裂解法；B：PBS 法；C：直接煮沸法

2. 2 碱裂解法有效性分析

为检验碱裂解法快速提取核桃乳饮品 DNA 的有效性，团队利用 4 个 DNA 条形码通用引物扩增提取的 DNA，扩增产物的凝胶电泳结果如图 4 所示，可以看出，ITS2、rbcL、psbA-trnH 和 matK 4 个通用引物均有扩增产物，扩增产物大小依次约为 500bp、250bp、350bp 和 600bp，且产物电泳条带单一、清晰、明亮，无杂带。

回收 matK 基因片段扩增产物并测序，测序结果与 NCBI 网站中核桃 matK 基因序列比对，结果显示序列同源率为 97. 21%，可见，碱裂解法可用于核桃乳 DNA 快速提取。

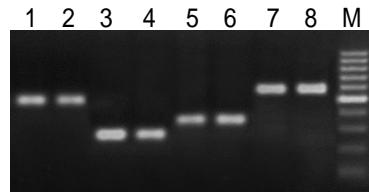


图 4 不同引物扩增产物电泳图

注：1-2 为 ITS2；3-4 为 rbcL；5-6 为 psbA-trnH；7-8 为 matK

3 讨论

作为深加工食品，核桃乳饮品 DNA 破坏比较严重，同时饮品中丰富的蛋白质、脂肪和多糖多酚等的存在也增加了 DNA 提取的困难。因此探寻高效、快速、低成本的核桃乳饮品 DNA 快速提取方法具有重要意义。实验以市售 8 种核桃乳饮品为材料，通过碱裂解法、PBS 法和直接煮沸法快速提取 DNA，并对 ITS2 条形码进行 PCR 扩增，通过分析扩增产物凝胶电泳条带的清晰度和特异性，筛选最佳 DNA 快速提取方法。结果发现，以碱裂解法提取 DNA 为模板进行 PCR 反应，8 个市售样品均有扩增产物，且产物电泳条带清晰明亮，而另外 2 种方法提取的 DNA 在进行 PCR 反应后，仅有部分样品有扩增产物，且条带明显较弱，这可能与 DNA 释放不完全有关。可以推测，碱裂解法提取 DNA 质量更高，结果与王之莹^[6]的研究一致。团队进一步利用 ITS2、rbcL、psbA-trnH 和 matK 4 个常见条形码研究该法提取 DNA 的有效性，并对扩增的 matK 片段进行测序和序列比对，发现利用碱裂解法快速提取 DNA 完全能够满足 PCR 分子检测的需求。该法所需饮品少（1. 5mL），提取过程简单、快速、且成本低，对实现核桃乳饮品的快速、低成本、高通量现场检测具有重要意义。

参考文献：

- [1] 韩晴. DNA 条形码技术对杏仁、核桃饮料掺假鉴别的研究[D]. 河南农业大学, 2016.
- [2] 王金灿, 王春淼, 赵晴, 等. 基于 ITS2 序列的金莲花种子 DNA 条形码鉴定研究[J]. 承德医学院学报, 2019, (04): 52-57.
- [3] 郭梁, 刘国强, 罗建兴, 等. 乳及乳制品中 DNA 提取方法的比较研究[J] 农业与技术, 2021, 41(20): 46-50.
- [4] 李柯, 赵昆昆, 宁龙龙, 等. 花生 DNA 快速提取方法及应用[J]. 山东农业科学, 2019, 51(09): 68-72.
- [5] 郑琪, 蒋超, 黄璐琦, 等. 碱裂解法快速提取中药炒制品 DNA 的研究[J]. 2014, 39(19): 3678-3683.
- [6] 王之莹, 李婷婷, 于文杰, 等. 一种适用于乳制品基因组 DNA 快速提取方法的研究[J]. 2020, 11(1): 134-139.

* 通讯作者：王霞