

牛奶中植物成分的 PCR 检测方法研究

覃芳芳, 邓鸿铃, 郭新东, 罗海英, 吴玉奎

(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, 广东 广州 510110)

摘要: 建立了应用 PCR 技术鉴别牛奶饮料中植物成分的方法。将酚仿抽提 DNA 的方法与前处理相结合, 得到了一种快速简便的从牛奶中提取 DNA 的方法, 整个 DNA 提取的过程时间为 2h 左右。分析发现提取的牛奶饮料 DNA 完全可以进行 PCR 检测, 并且该方法可检测到牛奶中掺入的植物成分低至 0.1%。

关键词: DNA; PCR; 牛奶; 植物成分; 掺入

Detection of Plant Ingredient in Milk by PCR Method

QIN Fang-fang, DENG Hong-ling, GUO Xin-dong, LUO Hai-ying, WU Yu-luan

(Guangzhou Product Quality Supervision and Testing Institute, National Centre for Quality Supervision and Testing of Processed Food (Guangzhou), Guangzhou 510110, China)

Abstract: The PCR technology was used in the detection of plant ingredient in milk drink. Combined with pre-operation and phenol-chloroform extraction, a rapid and simple method of DNA extraction from milk drinks was found, and DNA extraction took only two hours. The quality of DNA is sufficient for PCR analysis. Moreover, 0.1% plant ingredient in milk drink can be detected by this method.

Key words: DNA; PCR; milk; plant element; adulteration

中图分类号: TS252.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)06-0234-03

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, 其主要目的是通过热循环, 达到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检测之中, 例如, 用 PCR 技术来检测食品中的转基因成分^[1-4], 还有用 PCR 技术来检测食品中的微生物成分等^[5-8], 其中部分 PCR 检测方法已经作为标准推广于社会。但是 PCR 技术在食品检测的运用过程中也受到一些限制, 主要是因为各种食品经过不同程度的深度加工, 其中所含有的 DNA 成分遭到不同程度的破坏, 并且在生产过程中, 混入不同的添加剂和佐料, 使食品的成分更加复杂。如何提取出高质量的 DNA 成为 PCR 应用于食品检测的一个限制因素。

牛奶是人们常用的一种食品, 因其蛋白含量高, 营养丰富而被人们喜爱, 但是现在市面上牛奶原料紧张, 部分商贩以植物蛋白掺入牛奶中以降低制造成本。对牛奶饮料中植物成分检测的化学方法已经有提及^[9], 但是无法作为一个标准的方法进行推广。本实验通过改善 DNA 的提取方法, 采用 PCR 技术检测牛奶中掺入的植物成分。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

测试样品均从超市购买, 共 13 份, 以纯植物豆乳饮料(百事可乐纯豆乳饮料)作为对照材料。

苯酚、氯仿、异戊醇等试剂均为分析纯。

1.2 仪器

PCR 基因扩增仪、台式高速离心机、电泳仪、电泳槽、凝胶成像系统。

1.3 方法

1.3.1 DNA 提取

取 1ml 牛奶样品于 2ml 的 Eppendorf 管中, 加入 1 倍体积的异丙醇, 混合均匀, 室温沉淀 5min 后, 12500r/min, 室温离心 5min, 弃去上清液, 重复操作一次, 所得的沉淀用于制备提取 DNA。

将沉淀用 400μl TE 缓冲液 (pH7.0 10mmol/L Tris-HCl-pH8.0 1mmol/L EDTA) 溶解, 加入等体积的苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1), 摇晃抽提 10min, 12500r/min, 室温离心 5min, 小心吸取上清液, 加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1)摇晃抽提 10min, 12500r/min 室温离心 10min, 小

收稿日期: 2007-06-18

作者简介: 覃芳芳(1978-), 女, 博士, 研究方向为生物技术在食品检测中的应用。E-mail: ffzhizian@126.com

心吸取上清, 加入 1/10 的 3mol 的 NaAC (pH 5.2) 和 2~2.5 倍体积预冷的无水乙醇, 于 -20℃ 沉淀 30min 后, 12500r/min, 4℃ 离心 10min, 弃去上清液, 用 70% 乙醇洗涤沉淀, 真空抽干, 溶于 40μl TE 缓冲液中, 4℃ 溶解 60min 以上, 使 DNA 溶解充分。

1.3.2 PCR 体系及条件

本实验所用的引物均委托 Invitrogen 生物技术有限公司合成。具体引物信息见表 1。

表 1 牛内源基因和植物内源基因的引物
Table 1 Information of primers of bovine and botanic endogenous gene

基因	引物序列	PCR 产物 大小(bp)	基因性质
牛内源	P1:5'-GCCATATACTCTCCTTGGTGACA-3'		
基因	P2:5'-GTAGGCTTGGGAATAGTACGA-3'	172	线粒体基因
植物内源	P3:5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3'		
基因	P4:5'-TTCCATTGAGTCTCTGCACCT-3'	180	tRNA ^{Leu}

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
Table 2 Reaction conditions of PCR

基因	预变性	循环扩增条件	循环数	延伸
植物内源基因	94℃ 5min	94℃ 30s	35	72℃ 5min
		60℃ 30s		
		72℃ 30s		
		94℃ 30s		
牛内源基因	94℃ 5min	55℃ 30s	35	72℃ 5min
		72℃ 30s		

2 结果与分析

2.1 DNA 提取结果

将提取得到的 DNA 用 TE 缓冲液稀释 10 倍, 产物用分光光度计检测其质量, 根据其浓度和 A_{260}/A_{280} 比值(表 3)可以看到, 所提取的牛奶饮料 DNA 的浓度在 120~628ng/μl, A_{260}/A_{280} 平均值为 1.31, 最高达到 1.67, 这说明所提取得 DNA 提取的质量较好。

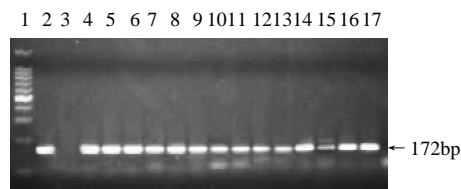
2.2 PCR 结果

取 100ng 所提取的 DNA 作为 PCR 的模版, 用牛内源基因引物进行 PCR 扩增, 电泳结果显示: 在所选的 14 种牛奶饮料中均能扩增出相应得条带, 其中样品 12 的扩增条带略弱于其它样品的扩增条带(图 1)。

同时, 将纯豆乳饮料以不同的比例掺入纯牛奶中(百事可乐纯豆乳饮料掺入到样品 1 中), 提取 DNA 并用植物内源基因引物进行 PCR 扩增。电泳结果如图 2 所

表 3 牛奶饮料样品 DNA 提取结果
Table 3 Results of DNA extraction from milk

序号	样品	DNA 浓度(ng/μl)	A_{260}/A_{280}
1	光明纯牛奶 900ml 装	476	1.67
2	光明纯牛奶 250ml 装	450	1.05
3	维记纯牛奶 236ml 装	146	1.26
4	燕塘纯牛奶 250ml 装	120	1.20
5	燕塘低脂酸牛奶 150ml 装	309	1.32
6	燕塘原味酸牛奶 250ml 装	366	1.34
7	蒙牛纯牛奶 1000ml 装	153	1.20
8	燕塘高钙牛奶 250ml 装	379	1.31
9	风行学生纯牛奶 200ml 装	176	1.27
10	伊利纯牛奶 1000ml 装	628	1.29
11	统一新西兰牧场木瓜牛奶 250ml 装	140	1.34
12	可护儿乳酸菌饮料 250ml 装	136	1.31
13	维它原味豆奶饮料	616	1.47
14	风行纯牛奶	203	1.28
对照	百事可乐纯豆乳饮料	430	1.82



1.100bp ladder; 2.以牛基因组 DNA 为模板的 PCR 结果; 3.以纯豆乳饮料 DNA 为模板的 PCR 结果; 4~17.以样品 1~14 的 DNA 为模板的 PCR 结果。

图 1 牛内源基因引物 PCR 检测牛奶饮料 DNA 电泳结果
Fig.1 PCR analysis of milk DNA with primers P1 and P2



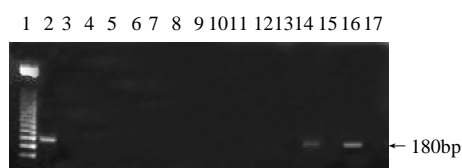
1.50bp ladder; 2.豆乳饮料比例 1:10; 3.豆乳饮料比例 1:20; 4.豆乳饮料比例 1:50; 5.豆乳饮料比例 1:100; 6.豆乳饮料比例 1:200; 7.豆乳饮料比例 1:500; 8.豆乳饮料比例 1:1000; 9.空白对照; 10.纯豆乳饮料 DNA。

图 2 PCR 检测含不同比例植物成分的牛奶电泳结果
Fig.2 PCR analysis of milk DNA containing variety rates plant ingredient with P3 and P4

示, 当豆乳饮料以 1:10~1:1000 的比例(体积)掺入至牛奶中时, 均能通过 PCR 扩增出相应的条带, 其中比例达到 1:1000 时扩增出的条带相对较弱。

最后, 对样品中植物成分进行 PCR 检测。用植物内源基因引物对所选的 14 种牛奶饮料中样品 DNA 进行 PCR 扩增, 电泳结果显示在样品 11 和样品 13 中能扩增出相应的条带, 说明在这两个样品中存在植物成分, 而

其中样品 11 扩增的条带弱于样品 13 扩增的条带, 说明在该样品中的植物成分少于样品 13。



1. 100 bp ladder; 2. 以纯豆乳饮料 DNA 为模板的 PCR 结果; 3. 以牛基因组 DNA 为模板的 PCR 结果; 4~17. 以样品 1~14 DNA 为模板的 PCR 结果。

图3 PCR 检测牛奶样品中的植物成分电泳结果
Fig.3 PCR analysis of milk DNA with primers P3 and P4

3 讨论

牛奶是最受欢迎的食品之一, 有着悠久的饮用历史, 对于牛奶的质量也一直是大众关心的问题。对于牛奶成分的掺假检测方法, 吴茹怡^[9]采用化学方法检测牛奶中的豆质成分和大米淀粉成分等, 但是该方法过于表面, 且灵敏度不够; 皮付伟等^[10]采用近红外的分析方法来检测牛奶的成分, 但是对牛奶中的植物成分检测不能判断。本实验采用分子生物学中的 PCR 技术来鉴别牛奶中是否含有植物成分。实验证明, 该方法操作简单可行, 能检测到牛奶中掺入的植物成分低至 0.1%, 灵敏度高。同时, 本实验对市场上的部分牛奶饮料产品进行了检测, 检测到样品统一新西兰牧场木瓜牛奶和维它原味豆奶饮料中含有植物成分, 这些结果表明该方法适于推广应用。

DNA 提取质量一直是 PCR 技术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, 增加

DNA 的提取难度。曾经有报道^[11]从牛乳中的白细胞中提取牛奶的 DNA, 但是, 该方法需要的样品多, 提取得到的 DNA 不仅浓度低, 且 A_{260}/A_{280} 比值平均值仅为 0.9。本实验采用前处理的方法, 所需的样品仅为 2ml 左右, 提取得到的 DNA 浓度在 120~628ng/ μ l 之间, A_{260}/A_{280} 值平均值为 1.31, 最高达到 1.67。相比牛乳中的白细胞中提取牛奶的 DNA, 这种方法简便, 产量高且质量好。

本实验将酚仿抽提 DNA 的方法与前处理相结合得到了一种从牛奶中提取 DNA 的方法。用该方法提取的牛奶 DNA 浓度高, 质量好, 且简单可行; 另外, 通过实验建立了一种用 PCR 技术来检测牛奶中掺入植物成分的方法。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: 71-74.
- [5] 姜永强, 雷诈荣, 李瑾, 等. 应用 PCR 方法鉴定单核细胞增多性李斯特菌[J]. 中华预防医学杂志, 1998, 32 (1): 19-21.
- [6] 云泓若, 李月琴, 周天鸿. PCR 技术检测金黄色葡萄球菌肠毒素 D 基因[J]. 暨南大学学报: 自然科学版, 1999, 20 (5): 84-87.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 吴茹怡. 牛奶掺假物检验方法研究[J]. 大众科技, 2005(9): 91-92.
- [10] 皮付伟, 王燕岭, 鲁超, 等. CCD 短波近红外光谱仪测定牛奶成分的可行性研究[J]. 现代科学仪器, 2006(4): 34-36.
- [11] 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.