

海参营养液 DNA 高效快速提取及 种类鉴定方法

梁君妮¹, 薛长湖^{1,*}, 赵玉然¹, 唐庆娟¹, 许加超¹, 杨文鸽²

(1. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003

2. 宁波大学生命科学与技术学院, 浙江 宁波 315211)

摘 要: 本实验以海参口服液为原料, 采用异丙醇和乙酸钠沉淀的改良方法提取 DNA, 通过 A_{260}/A_{280} 、琼脂糖凝胶电泳和 PCR 检测, 对 DNA 溶液进行定性分析和综合比较。结果表明, 本方法是一种新型的海参营养液 DNA 高效快速提取及种类鉴定的方法, 可用于对海参营养液进行定性检测。

关键词: 海参营养液; DNA 提取; 种类鉴定

An Efficient and Rapid Method for DNA Extraction and Species Identification from Sea
Cucumber Nutrient Solution

LIANG Jun-ni¹, XUE Chang-hu^{1,*}, ZHAO Yu-ran¹, TANG Qing-juan¹, XU Jia-chao¹, YANG Wen-ge²

(1. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Mitochondria DNA of sea cucumber were extracted from the sea cucumber nutrient solution with optimized method. The quantitative and qualitative analyses of DNA solution were performed with the calculation of A_{260}/A_{280} , Agarose gel electrophoresis, and PCR. The results showed that our method of DNA extraction and species identification from the sea cucumber nutrient solution was more efficient and rapid than traditional methods. This study will be helpful for quicker, more economical, and dependable species identification of the sea cucumber.

Key words sea cucumber nutrient solution; DNA extraction; species identification

中图分类号: Q523

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)05-0269-03

海参为棘皮动物门 (*Echinodermata*) 海参纲 (*Holothrioider*) 动物的总称, 根据 Pawson et Fell 的分类系统, 海参纲下设 3 亚纲、6 目和 24 科^[1]。

自古以来, 海参就是保健食品和营养食品。目前, 市场上的海参产品种类繁多, 但其质量问题也令人担忧。由于海参的生活环境不同、食用物质的不同, 所含营养物质存在明显差异^[2], 价格也大相径庭。海参产品中使用的海参种类以及海参的有无是一个重要问题, 采用适当方法对其中的海参进行定性、定量以及种类鉴定, 对规范海参产品加工市场具有重要意义。

单懿等人曾进行干海参 DNA 的提取和纯化研究^[3],

迄今为止, 利用 DNA 提取方法进行海参深加工产品中海参种类鉴定在国内外均未见报道。本实验拟从海参营养液中提取海参的 DNA, 通过 CO I^[4] 引物进行 PCR 扩增, 扩增产物纯化后与 T 载体进行连接, 通过克隆、测序, 最终确认海参有无以及所含海参的种类。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

引物 CO Ief ATAATGATAGGAGG[A/G]TTTGG、CO Ier GCTCGTGT[A/G]TCTAC[A/G]TCCAT 上海生物工程公司; 富硒海参多肽营养液 威海清华紫光科技

收稿日期: 2007-06-11

基金项目: 新世纪优秀人才支持计划项目 (NCET-04-0642); 国家自然科学基金项目 (30471319; 30671632)

作者简介: 梁君妮 (1982-), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产品加工与贮藏。E-mail: sweethabit@sina.com

* 通讯作者: 薛长湖 (1964-), 男, 教授, 博士, 研究方向为水产化学、海洋生物活性物质、海洋生物技术与水产品加工。

E-mail: xuech@mail.ouc.edu.cn

开发有限公司; 鲜刺参 青岛市售。

Wizard Genomic DNA Purification试剂盒 美国 Promega 公司; Taq 酶、dNTPs、PCR 缓冲液、溴化乙锭、DL2000MARKER 大连宝生物工程有限公司; UNIQ-10 柱式 PCR 产物纯化试剂盒、琼脂糖 上海生物工程有限公司。

1.2 DNA 提取

1.2.1 CTAB 法提取 DNA

海参多肽营养液, 经 10000r/min 离心 10 min 预处理, 弃去上清液, 保留沉淀用于 DNA 的抽提; 将 100 mg 经预处理的试样, 在液氮中充分研磨成粉末后加入 400 μ l 冰上预冷的 CTAB 提取缓冲液 I 中(不需研磨的试样直接加入)。加入 500 μ l 65 $^{\circ}$ C 预热的 CTAB 提取缓冲液 II, 1 μ l 2-巯基乙醇, 混匀, 65 $^{\circ}$ C 保温 30~90min, 期间不时轻缓颠倒混匀。待冷却至室温后加入 5 μ l RNase A 贮液, 室温下放置 30min。加入 450 μ l 氯仿+异戊醇, 轻缓颠倒混匀溶液。12000r/min 离心 2min 至分相。将上清液转移至干净的离心管中, 依次加入 600 μ l 异丙醇及 60 μ l 乙酸钠溶液, 轻缓颠倒混匀。12000r/min 离心 10min。弃上清液, 加入 800 μ l 76% 乙醇, 12000r/min 离心 5min, 弃上清液后, 再加入 100 μ l 70% 乙醇洗涤沉淀。12000r/min 离心 5min, 弃上清液。除去残留的乙醇, 待沉淀干燥后, DNA 沉淀溶解于 100 μ l TE 缓冲液中, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.2 异丙醇预处理法

取 10ml 海参营养液, 加入 0.6 倍体积的异丙醇和 0.1 倍体积的乙酸钠, -20 $^{\circ}$ C 沉淀 2h, 12000 \times g 离心 10min, 留沉淀。在沉淀中加入 600 μ l 裂解液[1.5%(W/V)CTAB、1.0mol/L NaCl、15mmol/L EDTA、pH8.0 75mmol/L Tris-HCl], 6 μ l 蛋白酶 K, 55 $^{\circ}$ C 放置 1h, 10000 \times g 离心 2min, 取上清液。在上清液中加入 500 μ l 氯仿, 混合 2min, 10000 \times g 离心 2min, 取上清液。在上清液中加入 2 倍体积的沉淀液[1.0%(W/V)CTAB、10mmol/L EDTA、pH8.0 50mmol/L Tris-HCl], 混合均匀, 静置 1~2h, 12000 \times g 离心 5min。弃上清液, 吸尽残留液, 加入 100 μ l 1.2mmol/L NaCl, 混合均匀, 直至 DNA 完全溶解。加入 6 μ l RNA 酶, 55 $^{\circ}$ C 放置 10min。加入等体积的氯仿, 混合 2min, 10000 \times g 离心 2min。取上清液, 加入 1ml 冰乙醇和 0.1 倍体积的乙酸钠, 混合均匀, -20 $^{\circ}$ C 放置 10min, 中间混匀一次, 12000 \times g 离心 5min, 弃上清液, 吸干残液。沉淀中加入 1ml 70% 乙醇, 12000 \times g 离心 2min, 弃上清液, 吸干残液, 37 $^{\circ}$ C 放置 10min, 加入 30 μ l 水, -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.3 DNA 浓度和纯度检测

用 725 分光光度计测定 A_{260} 、 A_{280} , 1% 琼脂糖凝胶检查纯度和分子量大小。

1.4 PCR 扩增海参 Col 序列

按以下反应条件进行 PCR 扩增: 在 50 μ l 的反应体系中, 包括 1.5mmol/L $MgCl_2$, 2 μ mol/L CO I 引物, 0.2mmol/L dNTP, 1.0 单位 Taq DNA 聚合酶, 5 μ l 10 \times PCR buffer, 2.21 μ g/ml DNA 模板。在 Authorized Thermal Cycler 扩增仪(Eppendorf 公司)上经 94 $^{\circ}$ C 预变性 3min 后经过 35 个循环, 每个循环包括: 94 $^{\circ}$ C 1min, 55 $^{\circ}$ C, 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。

1.5 PCR 产物分子克隆

PCR 产物经电泳纯化后与载体 PMD18-T 进行连接, 转化大肠杆菌 DH-5 α 后, 挑选克隆按照常规的碱裂解法提取质粒, 并通过载体两端的酶切位点对质粒进行酶切鉴定。

1.6 测序和数据处理

将有基因插入的阳性质粒送大连宝生物公司测序, 并对测序结果进行人工核对、矫正。测序后利用 "DNASTAR" 软件进行序列比对。

2 结果与分析

2.1 两种方法提取所得 DNA 的纯度和浓度

应用紫外分光光度计测定所提海参营养液 DNA 的纯度和浓度结果见表 1。

分光光度计测定结果表明异丙醇预处理法提取的

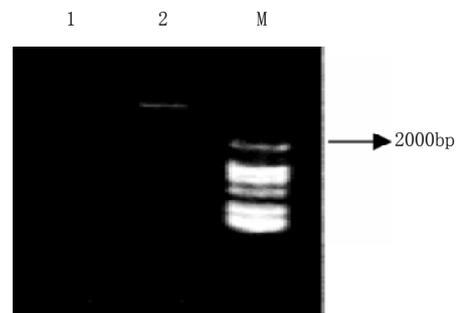
表 1 两种方法提取 DNA 的测定结果
Table 1 Testing results of purified DNA in two ways

提取方法	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}	DNA 浓度 (μ g/ml)
异丙醇				
预处理法	0.221	0.123	1.8	221
CTAB 法	0.185	0.147	1.26	185

DNA 略高于 CTAB 法。

2.2 两种方法提取所得 DNA 的琼脂糖凝胶电泳

将按照 CTAB 法和异丙醇预处理法从海参营养液中

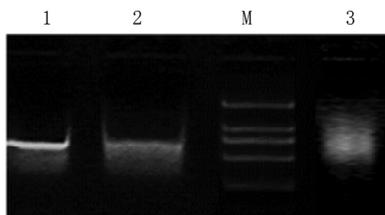


1. CTAB 法提取的 DNA; 2. 异丙醇预处理法提取的 DNA; M. DL 2000。

图 1 两种方法提取 DNA 的琼脂糖电泳图的比较
Fig.1 Gel electrophoresis of purified DNA in two ways

提取的DNA在1.0%的琼脂糖凝胶中电泳进行检测(图1),结果表明,CTAB法电泳无带,说明此方法提取的DNA的量不足,直接电泳无法检验;而异丙醇预处理法提取的DNA,电泳条带清晰,分子量2000以上。

2.3 PCR扩增后的琼脂糖凝胶电泳结果



1. 阳性对照; 2. 异丙醇预处理法提取的DNA; 3. CTAB法提取的DNA; M. DL 2000。

图2 PCR后琼脂糖电泳分析
Fig.2 PCR amplified products of CO I fragment

将两种方法提取的DNA进行PCR扩增,引物为CO Ief/CO Ier,扩增产物在1.0%的琼脂糖凝胶中电泳进行检测(图2)。结果表明,CTAB法提取的DNA PCR扩增后电泳,拖尾非常严重,无法得到清晰条带;而异丙醇预处理法得到一条与预期大小一致的清晰条带,这与Allan Arndt等人^[5]设计的CO I引物的扩增结果相符合。

2.4 酶切结果

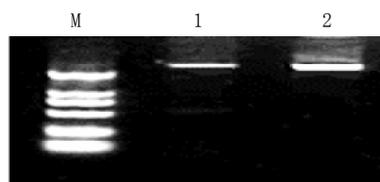
将回收的DNA转化,提取质粒DNA进行酶切,最终得到和扩增后大小一致的条带,如图3,说明克隆成功。并不是每一个克隆都能得到正确的PCR扩增的CO I序列,有时候PCR产物会插到Sma I限制性酶切位点上,而不是pUC18的T位点上^[6]。

2.5 测序结果

海参口服液中提取DNA扩增经测序得到序列如下,经证实的确是海参的CO I序列,与青岛产鲜刺参CO I序列比对发现,序列同源性100%。

所测海参的核苷酸序列:

01	ATAATGATAG	GAGGGTTTGG	TAATGATTAA	TTCCTCTAAT	GATAGGTGCT	CCAGACATGG
61	CTTTCCACG	AATGAAAAA	ATGAGATTTT	GACTAATACC	TCCCTCCTTC	ATTCTTCTTC
121	TTGCCTCTGC	AGGAGTTGAA	AGAGGGGCCG	GAACAGGGTG	AACAATTTAC	CCTCCACTCT
181	CAAGCAATAT	TGCCACGCA	GGAGGATCTG	TTGACCTAGC	TATTTTTTCA	CTACACTTGG
241	CTGGTGCCTC	CTCAATCTA	GCTTCCATAA	AATTCATAAC	CACAATTATT	AAAATGCGGA
301	CTCCGGGGAT	AACTTTTGAT	CGACTTCCCT	TATTCGTGTG	ATCCGTATTT	ATAACTGCTA
361	TTCTTTTACT	TCTGAGCCTT	CCAGTACTAG	CTGGAGCTAT	AACGATGTTA	CTAACGGACC
421	GTAATAATTA	AACAACTTT	TTTGACCCAG	CAGGTGGAGG	AGACCCAATA	TTGTTTCAAC
481	ACTTGTTCTG	ATTCTTCGGA	CACCCAGAAG	TTTATATTTT	AATACTACCT	GGATTTGGTA
541	TGATCTCTCA	CGTTATAGCA	CATTATAGAG	GTAAGCAAGA	ACCCTTCGGT	TATTTAGGTA
601	TGGTGTATGC	CATGGTGGCT	ATAGGGATAC	TAGGATTTCT	TGTTTGGGCC	CACCATATGT
661	TTACTGTTGG	TATGGATGTA	GACACACGAG	C		



1. 所需的酶切片段; 2. 空载质粒酶切片段; M. DL 2000。

图3 酶切后琼脂糖电泳图片
Fig.3 Gel electrophoresis of purified DNA after enzyme cutting

3 结论与讨论

本实验通过异丙醇和乙酸钠沉淀的改良方法从海参营养液中提取海参的DNA, A₂₆₀/A₂₈₀值为1.8, DNA浓度为221 μg/ml, 纯度较好。PCR扩增后, 琼脂糖凝胶电泳检测得到清晰的条带, 确认这种富硒海参营养液中含有海参, 经克隆、测序确认所含海参为青岛刺参。

海参、枸杞等作为海参口服液中主要成分, 本身含有较多的多糖和色素成分, 给DNA提取带来很多干扰。按照NY/T672中CTAB方法提取海参营养液中的DNA, 得到的是黄褐色的絮状沉淀, 不能有效的去除多糖和色素, DNA样品电泳无带, PCR扩增后显示一系列的拖尾带, 因此无法用于分子生物学研究。与常规方法相比, 本实验所建立方法的特点是: 在DNA提取过程中增加了样品的预处理过程, 从而有效的去除海参口服液中的焦糖色素, 减轻后续DNA提取过程的压力; 通过增加三氯甲烷和异戊醇抽提的次数以及溴代十六烷基三甲胺沉淀的时间, 有效的去除蛋白质和多糖等杂质。此方法快速、简便、特异性强, 效率高, 所提取DNA的纯度大大提高, 从而保证了后续PCR扩增的成功率。

海参营养液中枸杞等其他物质的DNA作为杂质DNA对海参线粒体DNA PCR也存在干扰, 影响PCR的灵敏性, 电泳条带出现严重拖尾。将DNA模板稀释后再加入, 减少了杂DNA的影响, 最终电泳得到理想的条带。

海参口服液作为深加工食品, 经过多种生产工序, 已无法得到比较完整的海参基因组 DNA。而由于动物线粒体基因组在遗传上具有自主性, 含量丰富, 并具有一定的遗传保守性, 已广泛作为物种鉴定的分子信标。本研究提取的海参口服液 DNA 可以成功的扩增得到海参 CO I 序列, 通过与青岛产鲜刺参 CO I 序列比对发现, 它们的序列同源率为 100%。这提示针对 CO I 序列的扩增和比对适用于对海参口服液等深度加工食品中原料成分的定性检测。

参考文献:

- [1] 廖玉麟. : 中国动物志(棘皮动物门海参纲) [M]. 北京: 科学出版社, 1997: 161-162.
- [2] 苏秀榕, 娄永将, 常亚青, 等. 海参的营养成分及海参多糖的抗肿瘤活性的研究[J]. 营养学报, 2003, 25(2): 181-182.
- [3] 单懿, 薛长湖, 李兆杰. 干海参线粒体的提取与纯化研究[J]. 食品科学, 2005, 26(10): 111-112.
- [4] SMITH M J, ARNDT A, GORSKI, et al. The phylogeny of echinoderm classes based on mitochondrial gene rearrangements[J]. Mol Evol, 1993, 36: 524-531.
- [5] ALLAN A, CARLOS M, PHILIP L, et al. Molecular phylogeny of eastern pacific sea cucumbers (*Echinodermata: Holothuroidea*) based on mitochondrial DNA sequence[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 1996, 6(3): 425-437.
- [6] MARCHUK D, DRUMM M, SAULINO A, et al. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products[J]. Nucleic Acids Res, 1991, 19:1154-1156.