

白砂糖 DNA 提取方法的比较

齐玲倩,刘秀*,丁梦璇,李静媛,刘远远,尹建军

(中国食品发酵工业研究院,北京 100015)

摘要 为了得到高效的白砂糖 DNA 提取方法,以 5 种白砂糖为研究对象,从前处理方法、裂解液成分及 DNA 纯化方法等方面对传统 CTAB 法进行改良,并比较了 CTAB 法和改良 CTAB 法的提取效果,结果表明:改良 CTAB 法提取的白砂糖 DNA 浓度都在 $2.60 \mu\text{g/mL}$ 以上,纯度在 1.8 左右,且通过实时荧光定量 PCR 能扩增出 18SrDNA 基因的对应荧光信号。因此,改良 CTAB 法能够高效地提取白砂糖的 DNA,可为后续的分子检测奠定基础。

关键词 白砂糖;DNA 提取;改良 CTAB 法;实时荧光定量 PCR(real-time fluorescence quantification PCR, qPCR)

糖是重要的调味品,能增添制品的色泽,增加菜肴的甜味及鲜味,为制作菜肴特别是甜菜品种的主要调味原料。白砂糖是日常生活中最广泛食用的糖,国外几乎所有的食用糖都是白砂糖,国内 90% 以上的食用糖为白砂糖。

白砂糖的广泛消费性,增加了大众对其质量的关注。但如今转基因技术快速发展,并已渗入到白砂糖行业,针对白砂糖的原料——甘蔗和甜菜的产量、含糖量、各种抗性和附加值的转基因研究都已取得重大进展^[1-5]。鉴于转基因食品的安全性还存在争议,同时,包括中国在内的许多国家都规定必须对转基因产品进行标识,因此,白砂糖中转基因检测方法的建立迫在眉睫。

目前,转基因检测主要有 2 种方法:蛋白质(外源基因表达产物)检测法^[6-7]和基因(外源基因)检测法^[8-9]。蛋白质检测法是通过酶联免疫吸附、蛋白质印迹、免疫试纸条等方法检测外源结构基因的表达产物制备成的单克隆或多克隆抗体。基因检测法是通过分子生物学方法直接检测其基因片段,相比于蛋白质检测法,具有特异性高、准确性强、方便快捷、不受组织类别限制等诸多优势,而广泛应用在转基因检测中^[10-11]。然而,高质量 DNA 的提取是白砂糖转基因检测的前提,但是白砂糖中 DNA 含量少,国内外鲜见报道其提取方法,仅有几篇关于从白砂糖的原料——甘蔗、甜菜中提取 DNA 的报道^[12-14]。

本文以 5 种白砂糖为研究对象,拟应用 CTAB 法、改良 CTAB 法提取其 DNA,并比较其浓度、纯度

和实时荧光定量 PCR(real-time fluorescent quantitative PCR,简称 qPCR)扩增效率,以期获得适用于白砂糖的高效 DNA 提取方法,为后续的基因检测提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

白砂糖样品 5 种,分别编号 1、2、3、4、5,均购于北京超市。

1.2 试剂

DNA 提取试剂:CTAB 提取液(20 g/L CTAB、 1.4 mol/L NaCl、 0.1 mol/L Tris-HCl、 0.02 mol/L Na_2EDTA , $\text{pH} = 8$),CTAB 裂解液(20 g/L CTAB、 1.4 mol/L NaCl、 0.1 mol/L Tris-HCl、 0.05 mol/L EDTA、 20 g/L PVP-40, $\text{pH} = 8$),CTAB 沉淀液(5 g/L CTAB, 40 mmol/L NaCl), 1.2 mol/L NaCl 溶液,Tris 饱和酚/三氯甲烷(体积比 25:24),三氯甲烷/异戊醇(体积比 24:1),为本实验室配制。其他试剂或溶剂均为分析纯级或生化纯级。

qPCR 扩增采用的 $2 \times$ Trans Start Probe qPCR Super Mix、Passive Reference Dye I,购于北京全式金生物有限公司;RNaseA($100 \mu\text{g/mL}$),购于天根生化科技有限公司;PCR 扩增引物、探针,由英潍捷基(上海)生物有限公司合成。

1.3 主要仪器与设备

微量移液器,德国 Eppendorf 公司;高压灭菌锅(SX-700),日本 TOMY 公司;精密天平(CPA323S),德国 Sartorius 公司;超纯水仪(Mili-Q Advantage A10),德国默克公司;离心机(5804R 型,5424 型),

第一作者:硕士(刘秀博士为通讯作者)

收稿日期:2015-12-21,改回日期:2016-04-14

德国 Eppendorf 公司;超微量核酸蛋白分析仪 (Biodrop),英国柏点公司;ABI 7900 型实时荧光定量 PCR 扩增仪,美国 Life Technologies 公司。

1.4 DNA 提取方法

1.4.1 CTAB 法

称取样品 10 g 放入有磁力搅拌子的 50 mL 小烧杯中,加灭菌双蒸水 20 mL,40 ℃ 恒温振荡 20 min,使样品和水充分混合均匀,转移至 50 mL 离心管;10 801 r/min 离心 10 min,迅速倒掉上清液,保留沉淀。用 2~4 mL (根据沉淀的量)的去离子水将离心管管壁上的沉淀冲洗下来,转入 2 mL 离心管中,11 884 r/min 离心 10 min,弃上清液,保留沉淀。若溶液体积达 4 mL,应分 2 次转入 2 mL 离心管中,13 018 r/min 离心 15 min,弃上清液保留沉淀。加入 CTAB 提取液 500 μ L 和 2 μ L RNaseA (100 μ g/mL),同时加入终浓度为 2% 的 β -巯基乙醇,混匀;转入 1.5 mL 离心管,65 ℃ 温育 30 min,取出后置冰上 1~2 min,加入等体积 Tris 饱和酚/三氯甲烷 (体积比 25:24),混匀,11 884 r/min 离心 10 min;取上清液,加入等体积三氯甲烷/异戊醇 (体积比 24:1),混匀,11 884 r/min 离心 10 min;取上清液,加入 2 倍体积 CTAB 沉淀液,室温放置 60 min,11 884 r/min 离心 10 min;弃上清液,以 350 μ L 1.2 mol/L NaCl 溶液溶解沉淀,并加入 350 μ L 三氯甲烷/异戊醇,混匀,11 884 r/min 离心 10 min;取上清液,加入 0.6 倍体积异丙醇,室温放置 60 min,混匀;11 063 r/min 离心 5 min 取沉淀,并用 1 mL 体积分数为 70% 乙醇清洗 3 次;倒置晾干后,加入 50 μ L 去离子水, -20 ℃ 保存备用。

1.4.2 改良 CTAB 法

称取 15 g 样品于 50 mL 离心管中,加入 30 mL 去离子水,混匀后 10 000 r/min 离心 5 min,弃去上清,重复操作 4 次,向沉淀中加入 15 mL 去离子水,混匀,10 801 r/min 离心 5 min,弃上清,再向沉淀中加入 4 mL 去离子水,混匀,分 2 次转入 2 mL 离心管中,11 884 r/min 离心 10 min,弃上清,在沉淀中加入 700 μ L CTAB 裂解液,14 μ L β -巯基乙醇,混匀,65 ℃ 温浴 30 min,期间颠倒混匀 2~3 次,取出冷却至室温后,加入 700 μ L 三氯甲烷/异戊醇,涡旋混匀,静置 10 min,10 629 r/min 离心 5 min,取上清,加入 0.6 倍体积 4 ℃ 预冷的异丙醇, -20 ℃ 静置 5 min,10 629 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 1 mL 体积分数 70% 乙醇,倾斜离心管转动数圈,4 ℃,8 679 r/min 离心

1 min,弃上清,加入 2 μ L RNaseA (100 μ g/mL) 37 ℃ 温浴 30 min,冷却至室温后,加入 600 μ L 1.2 mol/L NaCl 溶液,65 ℃ 温浴 10 min,冷却至室温,加入 600 μ L Tris 饱和酚/三氯甲烷,混匀,10 629 r/min 离心 5 min,取上清,加入 0.6 倍体积 4 ℃ 预冷的异丙醇,混匀后,4 ℃ 静置 30 min,4 ℃,10 629 r/min 离心 10 min,弃上清,沉淀用体积分数为 70% 的乙醇洗 2 次,倒置晾干后,加入 50 μ L 去离子水, -20 ℃ 保存备用。

1.5 DNA 提取质量的测定

取 DNA 溶液 1 μ L,用超微量核酸蛋白分析仪 (Biodrop) 测定 CTAB 法、改良 CTAB 法提取的 DNA 在光波 260 nm 和 280 nm 处的紫外吸收值,通过 OD_{260}/OD_{280} 和浓度值判断 DNA 的纯度和浓度,每份样品重复测定 3 次。

用植物通用引物 18SrDNA 基因^[15]对提取的样品 DNA 进行扩增,因白砂糖中 DNA 含量较少,而 qPCR 技术是在 PCR 反应体系中加入荧光基团,通过荧光信号的积累而实现对 PCR 过程的监控,其灵敏度通常为 10~100 拷贝/mL,相对于普通 PCR 法而言,灵敏度更高,故需要采用实时荧光定量 PCR 仪进行扩增,以验证提取的白砂糖 DNA 分子是否适合于 PCR 分析。

引物序列为:

18SrDNA-F: TCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTA;

18SrDNA-R: AATTTGCGCGCTGCTGCCTTCCTT。

探针为: FAM-CCGTTTCTCAGGCTCCCTCTCCGGA-ATCGAACC-TAMRA

qPCR 扩增体系: DNA 模板 5 μ L; 2 \times Trans Start Probe qPCR Super Mix 10 μ L; Passive Reference Dye I 0.4 μ L; 上、下游引物 (10 μ mol/L) 0.4 μ L; 探针 (10 μ mol/L) 0.4 μ L; 用无菌水补至总体积为 20 μ L。扩增反应程序为: 95 ℃ 预变性 30 s, 94 ℃ 变性 5 s, 58 ℃ 退火 15 s, 72 ℃ 延伸 10 s, 共 40 个循环, 反应于 ABI 7900 型荧光定量 PCR 仪上进行, 阈值设置采用默认值, 同时保证阈值不低于阴性对照的最高荧光值, 使阴性对照的 C_t 值大于 40, 每个样品各做 2 个平行管。

2 结果

2.1 白砂糖 DNA 的提取质量

用 CTAB 法、改良 CTAB 法提取 5 种白砂糖 (1、2、3、4、5) 的基因组, 用 Biodrop 超微量核酸蛋白分析仪测定其 DNA 的纯度 (OD_{260}/OD_{280}) 和浓度, 结果

列于表 1。

对于高纯度的 DNA 样品, OD_{260}/OD_{280} 应在 1.7 ~ 1.9 之间。若 OD_{260}/OD_{280} 小于 1.7, 则 DNA 中可能存在蛋白质、酚类等物质的污染; 反之, 则 DNA 样品存在 RNA、小分子核酸等物质。如表 1 所示, 从样品 DNA 提取的效果来看, 相比于 CTAB 法, 改良 CTAB 法提取的白砂糖中 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 均在 1.7 ~ 1.9 之间, DNA 纯度较高, 可以满足分子生物学研究的需要, 这说明改良 CTAB 法适合提取白砂糖中的 DNA。但是该方法提取的白砂糖 DNA 的浓度都较低(低于 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$), 这可能与白砂糖的成分及加工方式有关, 白砂糖中 95% 以上是蔗糖, DNA 含量少, 同时加工过程中的加热、过滤、澄清、浓缩煮晶等步骤也可能对 DNA 造成一定程度的损伤^[16-17]。

表 1 不同方法提取的白砂糖 DNA 的浓度和纯度比较
($\bar{x} \pm SD, n=3$)

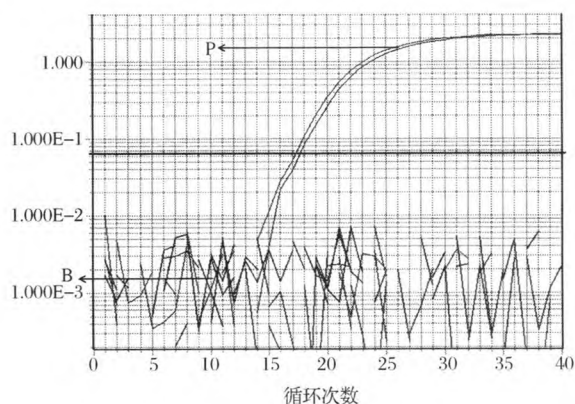
Table 1 Comparison of purity and concentration of DNA extracted from white granulated sugar by different methods($\bar{x} \pm SD, n=3$)

	CTAB 法		改良 CTAB 法	
	OD_{260}/OD_{280}	DNA 浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	OD_{260}/OD_{280}	DNA 浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
1	1.000 ± 0.101	0	1.779 ± 0.000	8.833 ± 0.086
2	1.643 ± 0.293	0	1.881 ± 0.000	5.737 ± 0.145
3	0.643 ± 0.302	0	1.763 ± 0.001	5.797 ± 0.246
4	1.226 ± 0.112	0	1.822 ± 0.002	4.604 ± 0.190
5	0.782 ± 0.220	0	1.875 ± 0.001	2.386 ± 0.231

2.2 白砂糖 DNA 的 qPCR 扩增

目前, 国内白砂糖的原料有 2 种甘蔗和甜菜, 分属于不同的物种, 而市售的白砂糖的产品标签上并没有标明其原料是哪一种, 因此在选择内源基因验证所提取的 DNA 是否能够满足后续 PCR 检测的需要时, 只能选择植物的通用引物。核糖体 DNA 片段在高等植物分子鉴定中应用较为广泛, NG 等^[18] 根据 18SrDNA 上不同长度的片段区域设计引物, 结果表明扩增 2 081 bp 和 2 421 bp 的基因片段能够鉴定鲜榨橙汁和复原橙汁。刘伟红等^[19] 利用 18SrDNA 设计引物对果汁 DNA 进行 PCR 扩增, 以验证提取的 DNA 分子是否适合后续的分子生物学检测。同时, 国家质量监督检验总局出台的植物源食品的相关标准中, 也将 18SrDNA 目的基因作为内源基因对提取的 DNA 分子进行验证^[15, 19-24], 因此 18SrDNA 适合作为内源基因对提取的白砂糖 DNA 进行验证。

为确定提取的白砂糖 DNA 的 qPCR 的扩增效率, 用 18SrDNA 作为目的基因对 2 种方法提取的 5 种白砂糖进行 qPCR 扩增, 扩增结果分别见图 1、图 2。如图 1 所示, 只有阳性对照(甘蔗)基因组对引物扩增出荧光信号, 而 CTAB 法提取的 5 种白砂糖 DNA 则未扩增出荧光信号; 同时, 如图 2 所示, 改良 CTAB 法提取的 5 种白砂糖 DNA 均扩增出相应的荧光信号, 扩增曲线的 Ct 值分别为 29.72、30.86、31.02、31.98、33.46, 说明改良 CTAB 法提取的白砂糖 DNA 可以用于后续的 qPCR 检测研究。



B: 空白对照(无菌超纯水); P: 阳性对照(甘蔗)

图 1 CTAB 法提取的白砂糖基因组 18SrDNA 基因 qPCR 扩增图谱

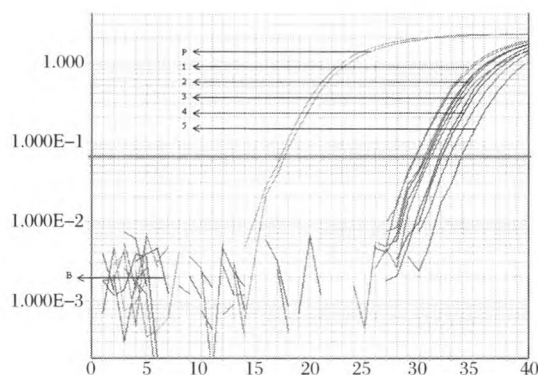
Fig. 1 Amplification profile of qPCR products with 18SrDNA
A gene primer in different white granulated sugar
DNA samples extracted by the CTAB method

3 讨论

中国是全球进口食糖的主要国家之一, 也是世界第三大食糖消费国、第四大食糖生产国^[25-26]。食糖分为 3 种: 白砂糖、红糖和冰糖, 而国内 90% 以上的食糖都是白砂糖, 它是一种天然甜味剂, 是人们日常生活的必需品, 也是饮料、糖果和糕点等含糖食品和制药工业中不可或缺的原料。因此, 加强白砂糖的质量检测, 如转基因成分、蔗糖分、二氧化硫含量、色值检测等显得尤为重要。而作为转基因成分检测重要手段的分子生物学技术, 很大程度上依赖于基因组 DNA 的提取。

本实验采取的改良 CTAB 法, 针对白砂糖中 DNA 含量少的问题, 对传统 CTAB 法进行了以下改进:

前处理方法: 针对 DNA 含量少的问题, 采用多次取样, 重复乳化离心的方法, 多次取样增大了取样量,



1:白砂糖 1 号;2:白砂糖 2 号;3:白砂糖 3 号;4:白砂糖 4 号;
5:白砂糖 5 号;B:空白对照(无菌超纯水);P:阳性对照
(甘蔗)

图 2 改良 CTAB 法提取的白砂糖基因组 18SrDNA 基因
qPCR 扩增图谱

Fig. 2 Amplification profile of qPCR products with 18SrDN
A gene primer in different white granulated sugar DNA
samples extracted by the modified CTAB method

即相对提高了 DNA 的含量,重复乳化离心则最大限度将 DNA 遗留在离心后的沉淀中,同时去除了大部分的可溶性多糖杂质,利于后续操作的进行,提高了 DNA 的提取效率。

裂解液成分:白砂糖为植物样品,针对植物样品中多酚含量多的特点,在 CTAB 裂解液中加入 2% (体积分数)的 PVP,抑制多酚氧化,阻止多酚氧化物与 DNA 的不可逆结合,从而提高 DNA 的质量及 PCR 扩增效率。

DNA 纯化方法:首先在体积分数 70% 乙醇洗后的沉淀中加入 2 μ L RNaseA 温浴,有效去除 DNA 沉淀中的 RNA;其次,对含有 RNaseA 的沉淀进行 Tirs 饱和酚/三氯甲烷抽提、异丙醇沉淀、70% 乙醇洗涤,进一步去除因加入 RNaseA 而造成的蛋白污染。而且,在对含有 RNaseA 的沉淀进行 Tirs 饱和酚/三氯甲烷抽提前,加入 1.2 mol/L NaCl 溶液温浴 10 min,为其抽提提供了一个水相环境,同时也使 DNA 沉淀能够充分溶解在水相中。这对 DNA 的质量及扩增效率起到了进一步的加强作用。

最终建立的白砂糖 DNA 的有效提取方法,提高了 DNA 的提取质量及 PCR 扩增效率,可为今后白砂糖转基因成分检测方法的建立提供参考。

参 考 文 献

[1] 邓智年,魏源文,潘有强,等. 甘蔗抗虫转基因研究进展

[J]. 南方农业学报,2012,43 (10):1 452 - 1 456.

[2] 吴转娣,张敏,刘新龙,等. 甘蔗转基因研究进展[J]. 植物生理学报,2012, 48(6): 537 - 543

[3] 张显勇,杨本鹏,张树珍. 甘蔗转基因研究进展[J]. 分子植物育种,2007, 5(6): 155 - 159

[4] 甘仪梅,张树珍,曾凡云,等. 甘蔗转基因育种研究进展[J]. 生物技术通报,2013(3):1 - 9.

[5] 张舒亚,吕蓉,高琴,等. 转基因甜菜 H7-1 实时荧光 PCR 检测方法[J]. 种子,2012,31(1):53 - 56

[6] BULCKE M V, SCHRIJVER A D, BERNARDI D D, et al. Detection of genetically modified plant products by protein strip testing: an evaluation of real-life samples [J]. European Food Research & Technology, 2007, 225(1):49 - 57.

[7] 吴永彬. 食品中转基因成分的定量检测研究[D]. 广州:南方医科大学,2012.

[8] DINKO MITREČIĆA, MILJENKO HUZZAK, MARIJA ČURLIN, et al. An improved method for determination of gene copy numbers in transgenic mice by serial dilution curves obtained by real time quantitative PCR assay[J]. J Biochem Biophys Methods,2005,64(2): 83 - 98.

[9] DMITRDSSE, DESPNAPK, KYRIAKIG, et al. Advances in molecular techniques for the detection and quantification of genetically modified organisms[J]. Anal Bioanal Chem, 2008,392(3):347 - 354.

[10] 付晓华,张岩,张薇,等. 棉籽油中不同 DNA 提取方法的比较研究[J]. 中国粮油学报,2014, 29 (3):42 - 46.

[11] 任君安,王国兰,程曦,等. 果蔬汁饮料 DNA 提取方法的比较研究[J]. 食品科技,2013,38(2): 42 - 45.

[12] 王继华,李余良,胡建广,等. 一种转基因甘蔗基因组 DNA 的快速提取方法[J]. 甘蔗糖业,2007(6):6 - 7,17.

[13] 王英,邱海燕,高和琼,等. 甘蔗基因组 DNA 提取方法的研究[J]. 中国农学通报,2008,24(12): 44 - 49.

[14] 李建勇,蒙姣荣,陈保善. 从甘蔗种茎茎汁中提取基因组 DNA 的方法[J]. 中国农学通报,2010,26(14):86 - 89

[15] SN/T 3729 - 2013 出口食品及饮料中常见水果品种的鉴定方法 第 8 部分:山楂成分检测 实时荧光 PCR 法[S]. 北京:中国标准出版社,2013.

[16] VIJAYAKUMAR K R, MARTIN A, GOWDA L R, et al. Detection of genetically modified soya and maize: Impact of heat processing[J]. Food Chemistry,2009,117(3): 514 - 521.

[17] SONIA RAMOS-GÓMEZ, MARÍA D. BUSTO, MANUEL PEREZ-MATEOS, et al. Development of a method to re-

- covery and amplification DNA by real-time PCR from commercial vegetable oils[J]. Food Chemistry, 2014, 158 (5): 374–383.
- [18] Chang-Chai Ng, Chen-Chin Chang, I-Chieh Wu, et al. Rapid molecular identification of freshly squeezed and re-constituted orange juice[J]. Int J. Food Sci. Technol, 2006, 41(6): 646–651.
- [19] 刘伟红, 许文涛, 商颖, 等. 果汁 DNA 提取方法比较及柑橘属植物分子生物学检测技术的研究[J]. 中国食品学报, 2012, 12(4): 195–201
- [20] SN/T 3729—2013. 出口食品及饮料中常见水果品种的鉴定方法 第2部分: 杏成分检测 实时荧光 PCR 法[S].
- [21] SN/T 3729—2013. 出口食品及饮料中常见水果品种的鉴定方法 第4部分: 芒果成分检测 实时荧光 PCR 法[S].
- [22] SN/T 3729—2013. 出口食品及饮料中常见水果品种的鉴定方法 第5部分: 木瓜成分检测 实时荧光 PCR 法[S].
- [23] SN/T 3729—2013. 出口食品及饮料中常见水果品种的鉴定方法 第10部分: 香蕉成分检测 实时荧光 PCR 法[S].
- [24] SN2135—2008 蜂蜜中转基因成分检测方法 普通 PCR 方法和实时荧光 PCR 方法[S]. 北京, 中国标准出版社, 2008
- [25] 冯流. 渤海商品交易所白砂糖价格预测研究[D]. 长春: 吉林大学, 2013.
- [26] 刘晓雪, 徐欣. 中国食糖消费状况分析与未来五年前景展望[J]. 农业展望, 2010, 6(2): 28–32.

Comparative study on DNA extraction from white granulated sugar

QI Ling-qian, LIU Xiu*, DING Meng-xuan, LI Jing-yuan, LIU Yuan-yuan, YIN Jian-jun

(China National Research Institute Food & Fermentation Industries, Beijing 100015, China)

ABSTRACT We modified the traditional CTAB method in the ears of pre-treatment methods, lysis buffer composition, DNA purifying to obtain efficient DNA extraction from white granulated sugar. Furthermore, we compared the extraction efficiency of traditional CTAB method and modified CTAB method. As a result, the concentration of isolated genomic DNAs was in more than 2.60 $\mu\text{g/mL}$ and the value of $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ was close to 1.8. Moreover, the isolated genomic DNAs also amplified the corresponding fluorescence signal of endogenous 18SrDNA by real-time fluorescent quantitative PCR. Therefore, the modified CTAB method can efficiently extract the DNA from white sugar and the study provided a foundation for subsequent molecular detection.

Key words white granulated sugar; DNA extraction; the modified CTAB method; real-time fluorescence quantification PCR (qPCR)