

文章编号:1000-8551(2020)12-2762-07

# 干制羊肉基因组 DNA 不同提取方法的比较

陈传君<sup>1</sup> 金鹭<sup>1</sup> 林华<sup>2</sup> 胡滨<sup>1,\*</sup> 韩国全<sup>1</sup> 陈世界<sup>2</sup> 张婧<sup>2</sup> 安徽<sup>2</sup><sup>(1</sup>四川农业大学食品学院,四川雅安 625000;<sup>2</sup>成都海关,四川成都 610000)

**摘要:**为了研究干制加工羊肉基因组 DNA 的最佳提取方法,本试验采用传统酚-氯仿法、磁珠法、改良 CTAB 法、离心柱法分别提取干制处理后的羊肉基因组 DNA,并对 4 种方法提取的羊肉基因组 DNA 浓度、纯度、完整性以及提取所需时间、PCR 扩增效果等进行比较。结果表明,采用磁珠法提取 DNA 的效果更好,DNA 浓度为  $118.87 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,  $A_{260}/A_{280}$  值为 1.89,而且此方法具有提取时间短、效率高、污染小等特点。本研究结果为干制加工羊肉基因组 DNA 的大批量提取和检测提供了参考依据。

**关键词:**干制羊肉;DNA 提取方法;磁珠法;凝胶电泳;实时荧光定量 PCR

DOI:10.11869/j.issn.100-8551.2020.12.2762

肉及肉制品是人类饮食中重要的优质蛋白质来源。羊肉因具有肉质细嫩、味道鲜美,富含人体所必需氨基酸、维生素和微量元素而备受消费者青睐,历来被当做秋冬御寒和进补的重要食品之一<sup>[1-2]</sup>。同时,羊肉产品没有文化和宗教的禁忌,更易被广大消费者所接受<sup>[3]</sup>。也正因羊肉的这些优点及其所具有的商业价值,利用鸭肉、猪肉、貂肉、老鼠肉制造假羊肉的现象屡见,假羊肉的泛滥不仅干扰了市场秩序,还严重损害了养殖户和消费者的利益<sup>[4-5]</sup>。因此,对羊肉中其他肉类的快速检测研究具有重要的意义。目前,针对肉种鉴定的方法主要有电子鼻法<sup>[6]</sup>、红外光谱法<sup>[7]</sup>、酶联免疫吸附法<sup>[8-10]</sup>、聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)法等,其中实时荧光定量 PCR 法的应用最广泛<sup>[11]</sup>。DNA 的提取效果对于采用 PCR 检测显得尤为重要。目前动物源性 DNA 提取方法主要有酚抽提法、异丙醇沉淀法、Tris-EDTA 法、改良十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyl trimethyl ammonium bromide, CTAB)法、chelex-100 法、盐析法、异硫氰酸胍(GuSCN)法等<sup>[12-13]</sup>。但大多数 PCR 法是基于不同物种鲜肉样品的掺假研究,针对热加工后肉样定量掺假研究的报道较少。而多数掺假羊肉制品往往已经加工为成品,经历了烹调过程,导致 DNA 断裂并遭到破坏,在一定程度上影响了提取基因组 DNA 的纯度和浓

度<sup>[14-15]</sup>。PCR 法检测的关键在于快速、简洁地提取 DNA,而筛选出合适的干制羊肉基因组 DNA 的提取方法才能够保证羊肉真伪鉴别的准确性和灵敏度。因此,本试验将新鲜羊肉进行高温干制处理后,采用传统酚-氯仿法、动物组织基因组磁珠法提取试剂盒(磁珠法)、DNeasy © mericon Food Kit 试剂盒(改良 CTAB 法)以及 DNeasy © Blood & Tissue Kit 试剂盒(离心柱)提取干制羊肉基因组 DNA,通过比较分析 4 种方法提取的羊肉基因组 DNA 浓度、纯度、完整性以及提取所需时间、PCR 扩增效果等,探求一种适合于干制羊肉基因组 DNA 的提取方法,旨在获得稳定、高质量的 DNA,使产品的进一步分析检测更加便捷。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

1.1.1 试验材料 羊肉由成都海关检验检疫技术中心提供,-70℃保存;动物组织基因组磁珠法提取试剂盒,由食品安全检测四川省重点实验室自制[组织裂解液;磁珠悬浮液:磁珠浓度  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,液态介质为异丙醇;洗涤液(pH 值 7.0): $800 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化锂, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)缓冲液, $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠,70%乙

收稿日期:2019-06-25 接受日期:2019-09-16

基金项目:国家质量监督检验检疫总局科技计划项目(2017IK019)

作者简介:陈传君,男,主要从事食品质量与安全的研究。E-mail:jnlu1992@foxmail.com

\* 通讯作者:胡滨,男,副教授,主要从事食品质量与安全的研究。E-mail:hubin2555@sina.com

醇;漂洗液:70%乙醇;制备时间:2017年10月];DNeasy<sup>®</sup> mericon<sup>®</sup> Food Kit 试剂盒、Neasy<sup>®</sup> Blood & Tissue Kit 试剂盒,德国 QIAGEN 公司;Tris-饱和酚,索莱宝(北京)生物科技有限公司;蛋白酶 K (20 mg·mL<sup>-1</sup>),郑州拓样生物有限公司;Premix Ex Taq (Probe qPCR)预混液,北京 TaKaRa 公司;组织裂解液 [1 mol·L<sup>-1</sup>三(羟甲基)氨基甲烷-盐酸、0.5 mol·L<sup>-1</sup>乙二胺四乙酸、10%十二烷基硫酸钠、2 mol·L<sup>-1</sup>氯化钠]、氯仿-异戊醇(24:1,v/v)、0.1 mol·L<sup>-1</sup>醋酸钠溶液均为自配试剂。

1.1.2 主要仪器与设备 ND-1000 Nano Drop 核酸蛋白测定仪、CFX96 Real-time PCR 仪、小型水平电泳槽、ChemiDoc MP 多功能凝胶成像系统,美国 Bio-Rad 公司;MagMax Express 自动化核酸提取仪、高速冷冻离心机 X3R,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;Eppendorf Thermomixer F 恒温金属浴,德国 Eppendorf 公司;FastPrep-245G 匀浆仪,美国 MP Biomedicals 生物医学公司。

## 1.2 样品的制备

取新鲜羊肉样品的肌肉组织,用绞肉机绞碎后于烘箱中烘干至恒重,烘干温度 100℃,每 2 h 取出放入干燥皿冷却,0.5 h 后称重并记录一次,直到前后 2 次称重差值不超过 2 mg 即达到恒重。将烘干样品研磨至粉末状,室温条件下保存于干燥皿中用于 DNA 的提取。

## 1.3 干制羊肉基因组 DNA 提取

1.3.1 传统酚-氯仿法 参考《分子克隆实验指南》(第三版)<sup>[16]</sup>的方法,采用蛋白酶 K 和苯酚从哺乳动物细胞中提取 DNA,将提取的 DNA 于-20℃保存。

### 1.3.2 磁珠法

1.3.2.1 自制磁珠法提取 DNA 准确称取 100 mg 干制羊肉粉末于 2 mL EP 管中,加入 500 μL PBS 缓冲液,匀浆。然后吸取 200 μL(相当于 25 mg 样品)匀浆于 2 mL EP 管中,再加入 200 μL 组织裂解液和 20 μL 蛋白酶 K 于 56℃ 条件下恒温孵育 1 h,消化完全后取出,期间每隔 10 min 震荡一次。后续操作严格按照动物组织基因组磁珠法提取试剂盒操作手册进行,具体操作步骤如下:将经过恒温孵育的样品加入 300 μL 异丙醇涡旋混匀,同时设置阴性对照(未添加肉粉末组);室温孵育 10 min(期间每隔 3 min 振荡混匀一次)后加入 20 μL 磁珠悬浮液,将离心管放置于磁力架上静置 30 s,小心去除液体;将离心管从磁力架上取下,加入 500 μL 洗涤液,并震荡混匀;将离心管放置于磁力架上静置 30 s,小心去除液体;将离心管从磁力架上

取下,加入 500 μL 漂洗液,并震荡混匀;将离心管放置于磁力架上静置 30 s,小心去除液体;重复上述洗涤步骤一次,尽量将液体去除干净;将离心管放置于磁力架上室温晾干 10 min 后,将离心管从磁力架上取下,加入 100 μL ddH<sub>2</sub>O,涡旋混匀,室温孵育 10 min;将离心管放置于磁力架上静置 30 s,小心将核酸液转移到新的 1.5 mL EP 管中,-20℃保存或者立即使用。

1.3.2.2 自制磁珠法提取试剂盒的性能评价 1) 重复性。取同一批干制羊肉粉末,由同一试验人员按照自制磁珠法提取试剂盒操作说明提取羊肉基因组 DNA,重复 6 次,每次 3 个平行。用核酸蛋白测定仪测定并计算每份样品 DNA 的浓度及纯度值。按照相对标准差(relative standard deviation, RSD)不大于 5.0%,判定检测方法的重复性。

2) 稳定性。将试剂盒从 2~8℃ 条件下取出置于 25℃ 复温后,提取同一批干制羊肉的基因组 DNA,使试剂盒反复复温 10 次、20 次,将每一次提取的 DNA 进行实时荧光定量 PCR 扩增,计算 RSD 值。

3) 有效期。将试剂盒于 2~8℃ 条件下保存 1 年,期间每隔一个月用试剂盒提取同一批干制羊肉的基因组 DNA,测定提取 DNA 的纯度及浓度。

1.3.3 改良 CTAB 法 准确称取 100 mg 干制羊肉粉末于 2 mL EP 管中,加入 800 μL PBS 缓冲液,充分匀浆。然后吸取 200 μL 匀浆,严格按照 DNeasy<sup>®</sup> mericon<sup>®</sup> Food Kit 试剂盒操作手册提取 DNA,将提取的 DNA 置于-20℃保存。

1.3.4 离心柱法 准确称取 100 mg 干制羊肉粉末于 2 mL EP 管中,加入 800 μL PBS 缓冲液,充分匀浆。然后吸取 200 μL 匀浆,严格按照 DNeasy<sup>®</sup> Blood & Tissue Kit 说明书提取 DNA,将提取的 DNA 置于-20℃保存。

## 1.4 DNA 指标测定

每份 DNA 样品取 3 μL,用相应缓冲液作为空白对照,采用核酸蛋白仪测定基因组 DNA 的浓度 (ng·μL<sup>-1</sup>) 及纯度 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 值,用于评价基因组 DNA 的质量。每份样品重复测定 3 次,每次 3 个平行。

## 1.5 实时荧光定量 PCR 扩增效果检测

1.5.1 引物探针的设计 参考任君安<sup>[17]</sup>的方法,选定羊的生长激素因子 GH(序列号为 NC-000077)作为目的基因,根据 NCBI 中公布的不同物种间各基因序列,进行序列比对,选取羊特异性较好的区域运用引物设计软件 Primer Express 3.0 设计一对特异性引物及一条 Taqman 探针,设计时充分考虑引物设计的要求。

1.5.2 实时荧光定量 PCR 反应条件 为验证不同方

法提取的 DNA 在 qPCR 中的实际扩增情况,分别将 4 种方法提取的基因组 DNA 稀释至  $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  作为扩增模板,使用 CFX96 Real-time PCR 仪进行扩增,PCR

反应参照优化后体系及程序进行扩增。具体反应程序见表 1,反应体系见表 2。

表 1 实时荧光定量 PCR 扩增反应程序

Table 1 Real-time fluorescence quantitative PCR reaction procedure

物种 Species	引物探针名称 Primer probe name	预变性 Predenaturation	循环 Circulate	变性 Denaturation	退火 Annealing
羊 Sheep	羊 GH-F/GH-R/GH-P	95℃ 5 min	45	95℃ 15 s	60℃ 30 s

表 2 实时荧光定量 PCR 扩增反应体系

Table 2 Real-time fluorescence quantitative PCR reaction system

试剂名称 Name of reagent	体积 Volume/ $\mu\text{L}$	终浓度 Final concentration /( $\text{pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )
Premix Ex Taq <sup>TM</sup> (2X)	12.5	1
羊-F( $10 \text{ pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) sheep-F( $10 \text{ pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	1	0.4
羊-R( $10 \text{ pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) sheep-R( $10 \text{ pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	1	0.4
TaqMan 探针( $10 \text{ pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) TaqMan probe( $10 \text{ pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	1	0.4
DNA 模板 DNA template	2	—
ddH <sub>2</sub> O	7.5	—
总体积 Total volume	25	—

## 1.6 琼脂糖凝胶电泳检测

取不同方法提取的 DNA 样品各  $5 \mu\text{L}$ ,采用 1%琼脂糖进行凝胶电泳,采用 TAE 缓冲液,100 V 恒压电泳 30 min,在 ChemiDoc MP 多功能凝胶成像系统中成像,观察并记录结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 核酸蛋白仪测定 4 种方法提取的 DNA 比较

由表 3 可知,传统酚-氯仿法、磁珠法和离心柱法提取的羊肉基因组 DNA 的  $A_{260}/A_{280}$  平均值均大于 1.80,说明提取的 DNA 纯度均较好。传统酚-氯仿法的  $A_{260}/A_{280}$  值  $>1.90$ ,可能有少许 RNA 污染。改良 CTAB 法所得 DNA 浓度平均值最低,且该方法的  $A_{260}/A_{280}$  值远低于 1.80,表明该方法提量最低,且提取的 DNA 存在较多的杂质。

表 3 不同提取方法基因组 DNA 的质量参数

Table 3 The quality parameters of different extraction methods about genomic DNA

方法 Method	$A_{260}/A_{280}$ 值 $A_{260}/A_{280}$ value	DNA 浓度 DNA concentration /( $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )
传统酚-氯仿法 Conventional phenol-chloroform extraction method	1.95±0.05	148.61±21.95
磁珠法 Magnetic beads method	1.89±0.05	118.87±10.43
改良 CTAB 法 Modified CTAB method	1.48±0.18	19.41±3.69
离心柱法 Centrifugal column method	1.89±0.03	73.41±18.31

### 2.2 引物探针的设计

通过 NCBI 中公布的不同物种间基因序列的比对,选取了羊特异性较好的区域,运用引物设计软件 Primer Express 3.0 设计了一对羊特异性引物和一条探针(表 4)。

表 4 羊的特异性引物探针

Table 4 Specific primers/probes for sheep

名称 Name	引物/探针序列 Primer/probe sequence
羊 GH-F Sheep GH-F	GAATCCGCACCCCTCCA
羊 GH-R Sheep GH-R	ACTCCCCTGACCACATCCT
羊 GH-P Sheep GH-P	CCACTGAGTCTCAGTCCCTCCAT

### 2.3 实时荧光定量 PCR 扩增效果比较

由图 1 可知,4 种方法提取的羊基因组 DNA 均有 PCR 扩增曲线,但扩增效果有明显差异。仅从 Ct 值大小可知,4 种方法提取羊基因组 DNA 的 PCR 扩增效率为磁珠法  $>$  传统酚-氯仿法  $>$  离心柱法  $>$  改良 CTAB 法,从核酸蛋白仪测定的结果来看,磁珠法与传统酚-氯

仿法所得 DNA 浓度相差不大,但磁珠法的扩增效率更好,说明传统酚-氯仿提取的 DNA 中存在抑制 PCR 扩增的物质。而离心柱法和改良 CTAB 法因 DNA 质量浓度相对较低,导致其扩增效率较其他 2 种方法更低。

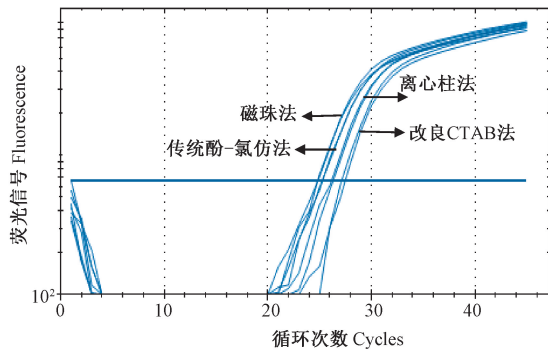
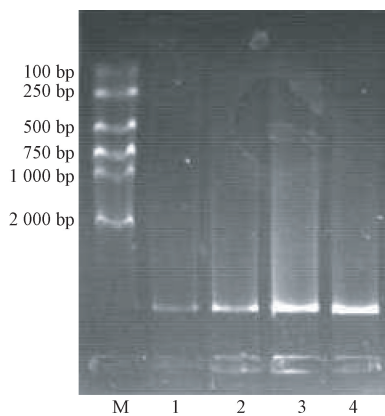


图 1 4 种方法提取 DNA 样品的实时荧光定量 PCR 扩增图  
Fig.1 Real-time fluorescence quantitative PCR amplification of DNA samples extracted by four extraction methods

## 2.4 羊基因组 DNA 凝胶电泳检测结果

由图 2 可知,4 种方法提取的羊基因组 DNA 电泳条带的大小一致,说明 4 种方法提取的 DNA 都是完整的、全面且无降解的。泳道 3、4 的条带较 1、2 条带更加明亮、清晰,泳道 1(改良 CTAB 柱法)的条带最弱,说明传统酚-氯仿法和磁珠法提取的基因组 DNA 浓度比离心柱法和改良 CTAB 法高。而泳道 3 有轻微拖尾现象,这是由于传统酚-氯仿法提取 DNA 过程中未加入 RNA 酶,还有少许 RNA 未去除完全,造成了轻微



注: M: 2 000 bp marker; 1: 改良 CTAB 法; 2: 离心柱法; 3: 传统酚-氯仿法; 4: 磁珠法。

Note: M: 2 000 bp marker. 1: Modified CTAB method. 2: Centrifugal column method. 3: Conventional phenol-chloroform extraction method. 4: Magnetic beads method.

图 2 4 种方法提取的 DNA 琼脂糖凝胶电泳图  
Fig.2 Agarose gel electrophoresis of DNA extracted by four methods

拖尾的现象。

## 2.5 自制磁珠法提取试剂盒的性能评价

2.5.1 重复性验证结果 由表 5 可知,重复性验证结果中  $A_{260}/A_{280}$  值的 RSD 为 0.50%, DNA 浓度的 RSD 为 3.34%,表明试剂盒的重复性较好,符合提取试剂盒标准。

表 5 自制磁珠法提取试剂盒重复性验证  
Table 5 Repeatability verification of self-made magnetic bead extraction kit

编号 Number	$A_{260}/A_{280}$ 值 $A_{260}/A_{280}$ value	DNA 浓度 DNA concentration ( $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )
1	$1.90 \pm 0.02$	$116.65 \pm 2.11$
2	$1.88 \pm 0.05$	$125.33 \pm 9.66$
3	$1.89 \pm 0.05$	$126.07 \pm 10.36$
4	$1.89 \pm 0.03$	$119.54 \pm 5.69$
5	$1.91 \pm 0.05$	$117.34 \pm 5.88$
6	$1.90 \pm 0.03$	$119.21 \pm 8.49$
平均值 Average value	1.90	120.69
标准差 Standard deviation	0.01	4.03
相对标准差 RSD/%	0.50	3.34

2.5.2 稳定性检测结果 由表 6 可知,试剂盒经反复复温 10、20 次后仍能提取动物基因组 DNA,利用实时荧光定量 PCR 定量,试验结果显示多次提取样本的 Ct 值基本一致,表明试剂盒具有良好的稳定性。

表 6 自制磁珠法 DNA 提取试剂盒稳定性验证  
Table 6 Stability verification of self-made magnetic bead DNA extraction kit

复温次数 Number of freeze-thaw cycles	平行平均 Ct 值 Parallel average Ct value
0	23.78
10	22.91
20	23.02
平均值 Average value	23.24
标准差 Standard deviation	0.47
相对标准差 RSD/%	2.04

2.5.3 有效性检测结果 由表 7 可知,12 个月中 12 次提取结果的 RSD 均较小, $A_{260}/A_{280}$  值和 DNA 浓度检测结果的 RSD 分别为 0.74% 和 4.99%,说明该试剂盒



在 2~8℃ 保存条件下,检测结果准确可靠,至少可保存 1 年。

表 7 自制磁珠法 DNA 提取试剂盒有效性验证  
Table 7 Validation of self-made magnetic bead  
DNA extraction kit

编号 Number	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> 值 A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub> value	DNA 浓度 DNA concentration (ng·μL <sup>-1</sup> )
1	1.88	126.52
2	1.91	113.22
3	1.90	121.50
4	1.91	110.79
5	1.89	126.01
6	1.90	111.41
7	1.88	118.96
8	1.87	120.27
9	1.88	122.65
10	1.88	109.31
11	1.90	115.34
12	1.89	119.89
平均值 Average value	1.89	117.99
标准差 Standard deviation	0.01	5.89
相对标准差 RSD/%	0.74	4.99

### 3 讨论

随着分子生物学的发展,应用 PCR 技术在 DNA 水平上对肉类及肉制品进行掺假检验备受关注。DNA 的提取是利用 PCR 技术鉴定肉类及肉制品是否掺假的第一步,DNA 模板的纯度和完整性与后续试验成功与否密切相关<sup>[18]</sup>。对于肉制品来说,加工过程易造成基因组 DNA 的降解,影响提取基因组 DNA 的质量,导致检测结果不稳定<sup>[19]</sup>。Pascoal 等<sup>[20]</sup>证实经加热和超压处理后,牛肉的 DNA 发生了一定程度的降解。Aslan 等<sup>[21]</sup>通过提取生牛排和煮熟牛排的 DNA 发现,将牛肉高温烹调会导致肉质量下降,DNA 的碎片小于 800 bp。因此,筛选适宜的 DNA 提取方法极为重要。

由于不同的 DNA 提取方法对肉制品的提取效果有所不同,本研究通过实时荧光定量 PCR 扩增效果和凝胶电泳对 4 种不同方法提取干制羊肉基因组 DNA 效果进行比较,发现不同提取方法得到的 DNA 浓度、纯度均存在较明显的差异。改良 CTAB 法和离心柱法

提取的 DNA 浓度和纯度较其他 2 种方法更低,传统酚-氯仿法和磁珠法提取 DNA 的效果更好。杨成等<sup>[22]</sup>采用改良 NaCl 法、十二烷基苯磺酸钠法、CTAB 法和 Tiangen 试剂盒法提取猪肉、牛肉、羊肉的 DNA,结果发现 CTAB 法提取的 DNA 浓度与纯度均低于其他 3 种方法,这可能与 CTAB 法提取时样品受到小分子物质污染有关,这与本研究结果较为一致。Chapela 等<sup>[23]</sup>采用 CTAB 法从同一金枪鱼品种的 4 种不同品牌罐头中提取 DNA,结果表明 CTAB 法提取的 DNA 浓度与纯度均相对较低。曾国权等<sup>[24]</sup>采用离心柱法提取牛肉干中牛基因组 DNA 时证实,该方法操作简单快速,提取的 DNA 质量较高,易进行 PCR 扩增,但离心柱法提取得到的 DNA 质量相对较低,这与本研究结果也较相似。

传统酚-氯仿法作为经典的 DNA 提取方法,提取的 DNA 质量能够满足分子生物学试验的基本要求,但耗时较长。而且酚和氯仿均有一定的挥发毒性,长期使用会对使用者和环境造成危害<sup>[25]</sup>。Arslan 等<sup>[26]</sup>将牛肉经过高温烹调处理后,采用酚-氯仿法提取 DNA,用 PCR 扩增出 271 bp 的 DNA 片段,但试验时间达到 10 h 以上。何建文等<sup>[27]</sup>在提取牦牛肉产品中基因组 DNA 时发现,酚-氯仿抽提法所提 DNA 的纯度和含量适中,蛋白含量较低,但缺点是试验时间较长。磁珠法通过把 DNA 分离技术和富集技术有机结合在一起,经过简单洗脱即可得到纯度较高的靶物质 DNA,其操作步骤少、自动化程度高、耗时短,目前已被广泛应用于 DNA 的提取<sup>[28]</sup>。曾国权等<sup>[24]</sup>采用磁珠法提取牛肉干中牛基因组 DNA 时证实,磁珠法提取不需要加入苯酚等有毒试剂,无乙醇沉淀等步骤,且不需要离心操作,整个过程仅需 1.5 h,操作简单快捷,这与本研究结果较一致。石盼盼等<sup>[29]</sup>采用 OMEGA 磁珠组织 DNA 提取试剂盒提取熟制牛肉干的 DNA,发现提取 DNA 的纯度较高,耗时较短。沈丽等<sup>[30]</sup>比较了磁珠核酸提取法与商品化核酸提取试剂盒提取肉制品 DNA,证明磁珠核酸提取法具有快速方便、灵敏、安全及可实现自动化等优点。本试验中,自制磁珠法提取试剂盒对仪器和人员操作要求低,而且配制试剂盒所用试剂均为常规试剂,较易取得,相较于另外 2 种商品试剂盒成本较低。目前,QIAGEN 的 DNeasy © mericon © Food Kit 试剂盒提取成本约 32 元/次,DNeasy © Blood & Tissue Kit 试剂盒提取成本约 29.6 元/次,而实验室自制试剂盒仅需要约 7.8 元/次,市面上国产的商品化磁珠法 DNA 提取试剂盒提取成本普遍大于 10 元/次,进口试剂盒更昂贵。因此,本试验自制磁珠法提取试剂盒具

有一定的应用前景。

## 4 结论

从提取 DNA 的纯度、浓度、扩增效果以及试验所消耗时间、成本等方面综合考虑,本研究认为,磁珠法具有较好的稳定性和重复性,更适宜于加工羊肉基因组 DNA 的大规模提取与检测。

### 参考文献:

- [ 1 ] Maria F, Luis G. Consumer preference, behavior and perception about meat and meat products: An overview [ J ]. *Meat Science*, 2014, 98(3): 361-371
- [ 2 ] 张志超, 段子渊, 张新华, 蒙静. 羊肉肉质风味研究进展 [ J ]. *肉类研究*, 2018, 32(10): 61-65
- [ 3 ] 赵张哈, 张英杰. 羊肉特殊风味及脱膻技术研究 [ C ] // 中国畜牧兽医学会养羊学分会, 2018 年全国养羊生产与学术研讨会论文集. 石家庄: 中国畜牧兽医学会养羊学分会, 2018: 235-237
- [ 4 ] 刘达玉, 肖龙泉, 杜茜, 张崑, 王卫. 假羊肉泛滥危害及其防治对策 [ J ]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(3): 677-680
- [ 5 ] 刘达玉, 肖龙泉, 王卫, 李翔, 张崑. 羊肉鉴别技术的研究进展及其分析比较 [ J ]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(1): 181-186
- [ 6 ] 李璐. 电子鼻结合 GC-MS 对羊肉掺假鸭肉快速检测 [ D ]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016
- [ 7 ] Gao F, Zhou S, Han L, Yang Z L, Liu X. A novel FT-IR spectroscopic method based on lipid characteristics for qualitative and quantitative analysis of animal-derived feedstuff adulterated with ruminant ingredients [ J ]. *Food Chemistry*, 2017, 237: 342-349
- [ 8 ] 马科锋, 王红青, 贾彦博, 励炯, 林伟杰, 姜荷. 基于蛋白质组学的食品鉴别技术研究进展 [ J ]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(14): 3686-3692
- [ 9 ] Naveena B M, Jagadeesh D S, Babu A J, Rao T M, Kamuni V, Vaithyanathan S, Kulkarni V V, Rapole S. Offgel electrophoresis and tandem mass spectrometry approach compared with DNA-based PCR method for authentication of meat species from raw and cooked ground meat mixtures containing cattle meat, water buffalo meat and sheep meat [ J ]. *Food Chemistry*, 2017, 233: 311-320
- [ 10 ] Wang G J, Zhou G Y, Ren H W, Xu Y, Yang Y, Guo L H, Liu N. Peptide biomarkers identified by LC-MS in processed meats of five animal species [ J ]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2018, 73: 47-54
- [ 11 ] Ali M E, Razzak M A, Hamid S B A, Rahman M M, Amin M A, Rashid N R A, Asing. Multiplex PCR assay for the detection of five meat species forbidden in Islamic foods [ J ]. *Food Chemistry*, 2015, 177: 214-224
- [ 12 ] Shaikh A N, Sangale D, Tiknaik A, Prakash B. Authentication of origin of meat species processed under various Indian culinary procedures using DNA barcoding [ J ]. *Food Control*, 2018, 90: 259-265
- [ 13 ] Hellberg R S, Hernandez B C, Hernandez E L. Identification of meat and poultry species in food products using DNA barcoding [ J ]. *Food Control*, 2017, 80: 23-28
- [ 14 ] Zhao J, Zhang T, Liu Y F, Wang X Y, Zhang L, Ku T, Quek S Y. Qualitative and quantitative assessment of DNA quality of frozen beef based on DNA yield, gel electrophoresis and PCR amplification and their correlations to beef quality [ J ]. *Food Chemistry*, 2018, 260: 160-165
- [ 15 ] Yalçınkaya B, Yumbul E, Yalçınkay B, Akgöz M. Comparison of DNA extraction methods for meat analysis [ J ]. *Food Chemistry*, 2017, 221: 1253-1257
- [ 16 ] Sambrook J, Russell D. 分子克隆实验指南 (第三版) [ M ]. 黄培唐, 译. 北京: 科学出版社, 2005: 128-137
- [ 17 ] 任君安. 羊肉及其制品中掺假动物源性成分数字 PCR 技术精准定量研究 [ D ]. 北京: 中国农业大学, 2017
- [ 18 ] Zhao J, Zhang T, Liu Y F, Wang X Y, Zhang L, Ku T, Quek S Y. Qualitative and quantitative assessment of DNA quality of frozen beef based on DNA yield, gel electrophoresis and PCR amplification and their correlations to beef quality [ J ]. *Food Chemistry*, 2018, 260: 160-165
- [ 19 ] 黄娅琳. 高温烹饪对动物肌肉组织 DNA 降解的影响 [ J ]. *四川动物*, 2012, 31(2): 222-225
- [ 20 ] Pascoal A, Prado M, Calo P, Cepeda A, Barros-Velázquez J. Detection of bovine DNA in raw and heat-processed foodstuffs, commercial foods and specific risk materials by a novel specific polymerase chain reaction method [ J ]. *European Food Research and Technology*, 2005, 220(3/4): 444-450
- [ 21 ] Aslan O, Hamill R M, Sweeney T, Reardon W, Mullen A M. Integrity of nuclear genomic deoxyribonucleic acid in cooked meat: Implications for food traceability [ J ]. *Journal of Animal Science*, 2009, 87(1): 57-61
- [ 22 ] 杨成, 李晶, 徐悦, 郭露露, 沈晓芳. 利用 4 种方法对猪肉、牛肉、羊肉 DNA 进行提取比较 [ J ]. *食品工程*, 2018(3): 51-53, 61
- [ 23 ] Chapela M J, Sotelo C G, Pérez-Martín R I, Pardo M Á, Pérez-Villareal B, Gilardi P, Riese J. Comparison of DNA extraction methods from muscle of canned tuna for species identification [ J ]. *Food Control*, 2007, 18(10): 1211-1215
- [ 24 ] 曾国权, 王德莲, 陈汉金, 陈景亮. 牛肉干中牛基因组 DNA 提取方法的比较研究 [ J ]. *生物技术世界*, 2014(2): 58-60
- [ 25 ] Yalçınkaya B, Yumbul E, Mozioglu E, Akgöz M. Comparison of DNA extraction methods for meat analysis [ J ]. *Food Chemistry*, 2017, 221: 1253-1257
- [ 26 ] Arslan A, İlhak O I, Calicioglu M. Effect of method of cooking on identification of heat processed beef using polymerase chain reaction (PCR) technique [ J ]. *Meat Science*, 2006, 77(2): 326-330
- [ 27 ] 何建文, 韩建林, 罗玉柱. 利用不同方法从深加工牦牛肉产品中提取基因组 DNA 效果的比较 [ J ]. *生物技术通报*, 2010, 26(10): 162-167
- [ 28 ] Yoon J G, Kang J S, Hwang S Y, Song J, Jeong S H. Magnetic bead-based nucleic acid purification kit: Clinical application and performance evaluation in stool specimens [ J ]. *Journal of*

- Microbiological Methods, 2016, 124: 62-68
- [29] 石盼盼, 魏法山, 冯波. 4种方法提取牛肉干DNA的效果比较[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(7): 2920-2925
- [30] 沈丽, 贺平丽, 冯涛, 田凯. 基于磁珠核酸提取法的动物源性成分检测研究[J]. 中国畜牧杂志, 2012, 48(21): 71-74

## Comparative Study on Different Extraction Methods of Genomic DNA From Dried Mutton

CHEN Chuanjun<sup>1</sup> JIN Lu<sup>1</sup> LIN Hua<sup>2</sup> HU Bin<sup>1,\*</sup> HAN Guoquan<sup>1</sup> CHEN Shijie<sup>2</sup> ZHANG Jing<sup>2</sup> AN Wei<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>College of Food, Sichuan Agriculture University, Ya'an, Sichuan 625000; <sup>2</sup>Chengdu Customs, Chengdu, Sichuan 610000)

**Abstract:** To study the optimal extraction method of extracting genomic DNA from dried mutton, conventional phenol-chloroform extraction method, magnetic beads method, modified CTAB method and centrifugal column method were used to extract the genomic DNA from dried mutton, respectively. The concentration, purity, integrity, extraction time and PCR amplification effect of mutton genomic DNA extracted by the four methods were compared. The results showed that the extraction effect of DNA by magnetic bead method was better than other methods with DNA concentration of 118.87 ng·μL<sup>-1</sup> and A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> value of 1.89. This method also had several advantages such as short extraction time, high efficiency and less pollution. Our study provides scientific guidance for mass extraction and detection of genomic DNA from dried mutton in practical.

**Keywords:** dried mutton, extraction method of DNA, magnetic beads method, gel electrophoresis, real-time fluorescent quantitative PCR