

毛皮 DNA 提取方法的比较研究

杨芳芳, 罗利玲, 周晓芳

(广州纤维产品检测研究院, 广东 广州 510000)

摘要:通过比较两种不同的 DNA 提取方法,发现使用毛发裂解缓冲液处理毛皮样品提取 DNA 的效果更好,可以满足后期 DNA 分析的要求。

关键词:毛皮;DNA 提取;方法

中图分类号:TS111.9

文献标识码:A

文章编号:1673-0356(2017)06-0038-02

随着生活水平的提高,毛皮服饰越来越受到消费者的青睐。除具有美观、舒适、保暖等特点外,也可以突显消费者高贵、典雅的气质。但是毛皮制品的价格相对较高,尤其是不同动物物种来源的产品,价格相差更是悬殊。在利益的驱使下,许多不法分子生产和销售仿制、伪制甚至假冒产品,极大扰乱了市场。与毛皮相关标准有 QB/T 1261-1991^[1] 和 GB/T 16988-1997^[2]。QB/T 1261-1991 标准仅针对毛皮的工业术语进行了解释,但未涉及毛皮种类的鉴别方法。GB/T 16988-1997 标准仅介绍了羊毛和兔毛的显微镜鉴别法,而市面上出现较多的水貂毛皮、貉子毛皮等的鉴别方法没有提及。目前国内毛皮制品材质鉴别方法主要研究方向分为以下 4 种:感官经验鉴别法、显微镜鉴别法、红外光谱鉴别法和 DNA 分析法^[3]。

不同物种之间 DNA 必然存在差异。利用 DNA 分析法主要是对毛皮的 DNA 进行提取然后进行 DNA 序列分析或扩增后分析。无论哪种分析,其前提和难点都是从动物纤维或毛皮上提取 DNA。主要原因是市面上的毛皮制品一般都会经过鞣制、酶软化、浸酸、鞣制、复鞣、水洗、中和、加脂和染整过程^[4]。毛皮上的 DNA 在经过复杂的加工过程后被严重破坏。本文通过比较两种不同的 DNA 提取方法,优化提取步骤,建立一种有效提取毛皮 DNA 的方法。

1 实验部分

1.1 材料和仪器

材料:毛皮样品(裁取 10 cm²,剪去样品表面的毛干,只留下根部约 2~3 mm,将样品剪碎备用)。

试剂:Tris,SDS,蛋白酶 K, tris 饱和酚(东盛生物科技有限公司);EDTA,NaCl,浓盐酸,三氯甲烷,无水乙醇,三水合乙酸钠(广州化学试剂厂);DTT(美国 AndyBio 公司);Triton-X 100(广州艾比利生物科技)。

仪器:CF16RX II 离心机(日本 HITACHI 公司),HB-100 恒温金属浴(杭州博日科技有限公司),M200 PRO 酶标仪(德国 Tecan 公司)。

1.2 实验步骤

1.2.1 配置缓冲溶液

(1)1M Tris-Cl(pH 8.0):称量 121.1 g Tris 置于 1 L 烧杯中,加入约 800 ml 去离子水,充分搅拌溶解,加入浓盐酸调节 pH 值到 8.0。

(2)SNET 缓冲液:20 mmol/L Tris-Cl(pH 8.0),5 mmol/L EDTA(pH 8.0),400 mmol/L NaCl,1% (m/v)SDS 按比例配好后,用 0.45 μm 孔径的硝酸纤维素膜过滤除菌备用。

(3)毛发裂解缓冲液:100 mmol/L Tris-Cl(pH 8.0),1 mmol/L EDTA(pH 8.0),80 mmol/L DTT,1% (m/v)Triton-X 100,0.4 mg/L 蛋白酶 K 按比例配好后,用 0.45 μm 孔径的硝酸纤维素膜过滤除菌备用。

(4)TE 缓冲液:10 mmol/L Tris-Cl(pH 8.0),1 mmol/L EDTA(pH 8.0)和水按比例配好。

1.2.2 毛皮的组织消化分解

方法 1 本法从 Richard Palmiter 和 Ralph Brinster 建立的组织基因组 DNA 提取方法衍生而来。在 SNET 中加蛋白酶 K 制备成裂解缓冲液,将准备好的样品加入到裂解缓冲液中,建议每毫升裂解缓冲液加 50 mg 样品。然后将加好样品的反应管置于 56 °C 孵育 18~24 h^[5]。

方法 2 参考毛发基因的提取方法,在毛发裂解缓冲液中加入准备好的样品,建议每毫升裂解缓冲液加 50 mg 样品,然后将加好样品的反应管置于 56 °C 孵育

收稿日期:2017-03-29;修回日期:2017-04-10

基金项目:广东省质量技术监督局科技项目(2015CZ16)

作者简介:杨芳芳(1987-),女,工程师,硕士研究生,主要从事鞣制皮革/毛皮的分子生物学鉴定技术研究,E-mail:yangfangfang6752@126.com。

18~24 h^[5]。

1.2.3 DNA的抽提和纯化

采用酚氯仿抽提法对DNA进行抽提和纯化。在生物安全柜内,将从步骤1.2.2获得的反应管内的SNET裂解缓冲液或毛发裂解缓冲液吸至一支干净离心管中,然后向管内加入等体积的tris饱和酚,颠倒混匀,注意不要用力震荡。混匀后,12 000 r/min离心25 min。离心后吸上清到一支新离心管内,向管内加入等体积的tris饱和酚,颠倒混匀,注意不要用力震荡。混匀后,12 000 r/min离心25 min。离心完成后,吸上清到一支新离心管内并加入等体积的氯仿,颠倒混匀。混匀后,12 000 r/min离心25 min。离心完成后,吸上清到一支离心管内,加入1/10体积的3 mol/L乙酸钠溶液和2.5倍体积的预冷(-20℃)的无水乙醇。混匀后于-20℃静置3 h。13 000 r/min离心25 min,吸弃上清液,保留沉淀。向管内加入1 ml 75%乙醇,吹洗管壁上的沉淀,13 000 r/min离心10 min,吸弃上清液。晾干或置于50℃干燥,直至无液体残留。向管内加入50 μL TE溶液溶解管壁内的DNA。在酶标仪上测定所提取DNA的浓度和A260/A280比值。

2 结果和分析

A260/A280这个概念是于1945年Warburg和Christian提出的,是蛋白制品被核酸所污染程度的很好指标。现在被广泛用于估计核酸纯度,当 $1.8 \leq A260/A280 < 2.0$ 时DNA纯度较高,可直接用于进一步的DNA分析,并且A260/A280比值越接近这个范围纯度越高。当 $A260/A280 = 1.73$,表示DNA纯度只有30%,对后期的DNA分析,尤其是PCR分析影响较大。如果是要做PCR分析,一般认为 $A260/A280 < 1.7$ 或 $A260/A280 > 2.0$ 是无法满足分析要求的。不同的DNA分析方法对DNA的量及纯度的要求不同,对于纯度达不到后期分析要求的,可以考虑对提取的DNA进行二次纯化。本文研究的两种DNA提取方法对相同种毛皮样品提取的结果见表1。

通过对两种方法进行比较,结果显示按方法1提取的结果有3份样品满足 $1.8 \leq A260/A280 < 2.0$,按方法2提取的结果有6份样品满足 $1.8 \leq A260/A280 < 2.0$;按方法1提取的结果有6份样品是不能满足PCR分析要求的,按方法2提取的结果有1份样品是不能满足PCR分析要求的。本研究中将能够满足PCR分析要求的提取结果判定为DNA提取成功,那

么方法1的成功率为40.0%,方法2的成功率为90.0%。如表1所示,10份样品中,除了7号和9号样品,采用方法1提取的浓度高于采用方法2提取的浓度外,其他8份样品都是采用方法2提取到的样品浓度更高。但是根据7号和9号样品提取的纯度来看,方法2提取的纯度高于方法1,在都能提取到DNA的情况下,要优先选择提取纯度更高的方法2。

表1 DNA浓度和A260/A280比值测试结果

样品 编号	方法1		方法2	
	DNA浓度 /mg·L ⁻¹	A260/A280	DNA浓度 /mg·L ⁻¹	A260/A280
1	2.6	1.18	29.7	1.86
2	66.2	1.94	200.8	1.80
3	23.2	1.62	108.0	1.79
4	124.8	1.89	1065.5	1.88
5	14.8	2.29	62.0	1.88
6	44.5	1.82	125.2	1.84
7	59.8	2.23	53.5	1.77
8	102.9	1.67	110.9	1.99
9	43.2	1.60	27.7	1.68
10	3.5	1.75	39.5	1.70

结合以上分析,方法2的提取效果从浓度和纯度两个方面考虑要优于方法1,这可能是因为毛皮制品接近皮层的毛干部分也有少量DNA^[6],相对于毛皮的皮层部分,毛干受到的破坏较小,而方法2中用到的裂解液可以将毛皮样品上面附着的毛发完全裂解,释放出其中的DNA。根据比较实验初步确定方法2在毛皮制品的DNA提取方面成功率更高。

3 实验验证

为验证方法2的操作性,以及该方法用于不同物种的毛皮DNA提取是否有差异。采用方法2,再对另外20份来源于20个不同物种的毛皮样品进行DNA的提取,有19份样品DNA提取成功,提取成功率为95.0%。加上前面比较试验的10份样品,提取成功率为93.3%。因此方法2基本可以满足对不同物种的毛皮样品DNA的提取。

4 结语

用毛发裂解缓冲液处理毛皮样品,然后利用酚氯仿抽提法提取毛皮DNA,能够获得较高浓度和纯度的毛皮DNA;且提取成功率可达到93.3%,基本可满足研究人员对毛皮制品DNA的进一步分析。本研究建立的毛皮DNA提取方法为DNA分析法鉴定毛皮材质提供研究基础,可供毛皮材质检测人员借鉴参考。

(下转第42页)

优效率,所对应的用户数据及版型对应得分是基于版型绘制步骤得到的,整个最优过程的评定核心在于覆盖率的选定,得分计算类似于2.2中通过模糊逻辑用数字表示含糊的关系变量。由于不同覆盖率下版型自由度也不尽相同,因此可以通过实验和数据比对,计算并判断覆盖率与版型得分之间的关系,从而判定最优效率,并确定出与之对应的人体尺寸数据。

通过计算,判断出服装版型绘制过程中用户数据输入和工艺数据输出之间能够达到的最优效率,从而避免大量繁琐的数据输入工作,更便捷地进行个性化版型定制工作。

4 结语

随着三维扫描技术和三维服装仿真技术的发展,许多研究人员选择构建一套从三维人体测量系统获得人体尺寸信息到服装样板的映射关系,自动生成初始服装样板,然后建立基于三维服装仿真技术的服装样

板合体性评价系统,通过顾客三维人体模型的虚拟试穿,来评价所建立的初始服装样板,同时通过一定的修改机制对原样板进行调整,最终生成个性化的合体服装。在此基础上,优化从人体尺寸信息到初始服装样板过程的数据采集,能够大幅度提高工业生产效率。

参考文献:

[1] 李惠敏. 面向电子化量身定制服装三维人体测量数据库的研究与实现[D]. 上海:东华大学,2005.
 [2] 李晓久,王玉秀,刘 皓. 非接触式人体测量系统中人体体型分类与自动判别[J]. 天津工业大学学报,2007,26(5):34-35.
 [3] 杨 岳,罗意平. CAD/CAM原理与实践[M]. 北京:中国铁道出版社,2002.
 [4] 周 绮. 可持续性服装CAD平台开发与研究:男西服系列[D]. 天津:天津工业大学,2004.
 [5] 胡觉亮,董建明,何 瑛,等. 基于人工神经网络的服装结构设计[J]. 纺织学报,2006,27(2):49-52.

Application of Data Optimization Model on Garment Pattern Customization Technology

HUANG Cai-sen¹, DENG Chun-shan¹, ZHOU Li^{1, 2,*}

(1.College of Textile and Garment, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2.Chongqing Engineering Research Center of Biomaterial Fiber and Modern Textile, Chongqing 400715, China)

Abstract: From the perspective of garment customization, the different research methods of personalized customization technology of garment pattern were summarized. The application mode of the optimizing human dimension data was proposed, and the transposed form of human dimension data with optimal efficiency was applied to personalized clothing model generation process, evaluation criteria was proposed based on data optimization to provide ideas and direction for the application of the optimal efficiency data.

Key words: personalized customization; data optimization; coverage; garment pattern

(上接第39页)

参考文献:

[1] 毛皮工业术语:QB/T 1261-1991[S].
 [2] 特种动物纤维与绵羊毛混合物含量的测定:GB/T 16988-1997[S].
 [3] 钟 蕾,徐峥琦.动物毛皮鉴别方法的研究进展[J].中国纤

检,2012,(7):65-68.
 [4] 朴厚坤,赵 晋,李美荣,等.毛皮加工及质量鉴定[M].北京:金盾出版社,2009.
 [5] 萨姆布鲁克J,拉塞尔D W.分子克隆实验指南[M].黄培堂,译.北京:科学出版社,2002.
 [6] 赵春江,李 宁.一种从毛发中提取DNA的简易方法[J].遗传,2003,25(1):69-70.

Comparative Study of DNA Extraction Methods from Fur

YANG Fang-fang, LUO Li-ling, ZHOU Xiao-fang

(Guangzhou Fiber Product Testing and Research Institute, Guangzhou 510000, China)

Abstract: By comparing two different DNA extraction methods, the effect of extracting DNA by hair pyrolysis buffer was better than the other method, and it could meet the requirements of the later DNA analysis.

Key words: fur; DNA extraction; method