技术方法

文章编号:1000-5404(2006)07-0734-02

应用于PCR及实时荧光定量PCR的细菌DNA提取方法

胡晓红[1],刘 昕[2],黄正根[2],彭惠民[1],袁 科[2],程 英[2],高 云[2] ([1]重庆医科大学细胞生物学及遗传学教研室,重庆 400016;[2]第三军医大学基础医学部分子遗传学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 建立特异灵敏的适应于PCR及实时荧光定量PCR的细菌DNA提取方法。**方法** 于细菌样本离心所得沉淀中加入提取液(25% Chelex-100,0.5% NP40,TE配制,pH=9.0);56 ℃孵育30 min;100 ℃水浴10 min;离心后所得上清即为DNA。电泳、PCR及Real-time PCR扩增评价该方法的特异性及灵敏度。**结果** 本方法所提细菌DNA电泳条带清晰,未见假阳性,$D(260)/D(280)=(1.79\pm0.03)$;PCR及Real-time PCR扩增未见假阳性及假阴性,灵敏度达10^1/ml细菌浓度。**结论** 本研究细菌DNA提取方法特异灵敏,适应于PCR及Real-time PCR。

实时荧光定量PCR(Real-time PCR)技术及一些防污染措施克服了PCR中假阳性的问题,但是作为高灵敏度的扩增技术[1],PCR及Real-time PCR在应用中却仍存在假阴性的问题,究其原因主要是靶序列的获得不够灵敏,DNA未完全暴露[2]。为此我们以细菌为样本,建立了特异灵敏的DNA提取方法,以使PCR及Real-time PCR得到更好的应用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 实验所有细菌菌种为西南医院检验科惠赠,哥伦比亚血平板(庞通公司)培养,挑出单菌落,用双蒸水1:10倍比稀释,取低浓度菌液涂布于血平板,以计数。

1.1.2 主要试剂 Chelex-100(美国Sigma公司),NP40(华美生物公司),*Taq*酶试剂盒(大连宝生物),SYBR Green I(深圳达科为公司)。

1.1.3 主要仪器 台式离心机(TGL-16B,上海安亭科学仪器厂),紫外分光光度计(ND-100,德国NanoDrop),PCR仪(PTC-100,美国MJ),电泳仪(DYY-2C型,北京六一仪器厂),UVP凝胶成像分析仪(GDS-8000,美国),实时荧光定量PCR仪(美国MJ)。

1.2 方法

1.2.1 细菌DNA提取[3,4] 取300 μl培养细菌至1.5 ml离心管,离心12 000 r/min,2 min,弃上清;于沉淀中加入提取液(25% Chelex-100,0.5% NP40,TE配制,pH=9.0);56 ℃孵育30 min;100 ℃水浴10 min;离心12 000 r/min,2 min,取上清,即DNA。

1.2.2 PCR扩增 针对细菌16SrDNA全长,用Primer Premier 5.0设计通用引物[5],上游引物:5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′,下游引物:5′-AAGGAGGTGATCCAGCC-3′(上海博亚生物合成)。目的片段1 500 bp左右。PCR体系为50 μl:1×buffer,*Taq*酶5.0 U,模板2 μl,双蒸水补足50 μl。PCR循环参数,扩增条件:94 ℃预变性5 min,30个循环(94 ℃ 30 s,53 ℃ 30 s,72 ℃ 90 s),72 ℃延伸8 min。电泳:取PCR扩增产物10 μl于2%琼脂糖凝胶电泳,荧光染料SYBR Green I预染,紫外凝胶成像分析仪观察结果。

1.2.3 Real-time PCR扩增 在上述PCR体系中加入SYBR Green I 1.0 μl(双蒸水1:10 000稀释)。Real-time PCR程序:94 ℃预变性5 min,30个循环(94 ℃ 30 s,53 ℃ 30 s,72 ℃ 90 s,读板),72 ℃延伸8 min,融解曲线从45 ℃到100 ℃。

1.2.4 提取方法特异性测定 用本研究方法从12种细菌中抽取36个样本中提取DNA,紫外分光光度仪测定$D(260)/D(280)$,并以所提DNA为模板进行PCR扩增,2%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.5 提取方法灵敏度测定 大肠杆菌1:10倍比稀释后浓度为$10^1\sim10^8$/ml作为样本,双蒸水为空白对照,用本方法提取DNA后PCR扩增,克隆的质粒为PCR阳性对照,扩增产物用2%琼脂糖凝胶电泳;以不同浓度大肠杆菌($10^1\sim10^7$/ml)为样本,双蒸水作空白对照提取DNA,进行Real-time PCR,并以克隆的质粒DNA($10^3\sim10^9$ copy/ml)为Real-time PCR标准品作标准曲线。

2 结果

2.1 特异性

用本研究方法从12种细菌36个样本中提取DNA,紫外分光光度仪测定:$D(260)/D(280)=1.74\sim1.83(1.79\pm0.03)$。取上述所提不同菌种DNA,经PCR扩增,2%琼脂糖凝胶电泳于1 500 bp左右均可见清晰的目的片段(图1)。

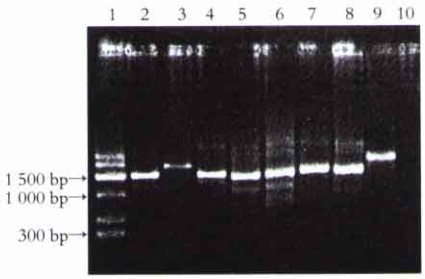
2.2 灵敏度

大肠杆菌1:10倍比稀释后浓度为$10^8\sim10^1$/ml,用本研究方法提取DNA,PCR扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳于1 500 bp左右处可见清晰的目的片段(图2)。

作者简介:胡晓红(1969-),女,江苏省盐城市人,硕士研究生,主管技师,主要从事生物芯片方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68753879

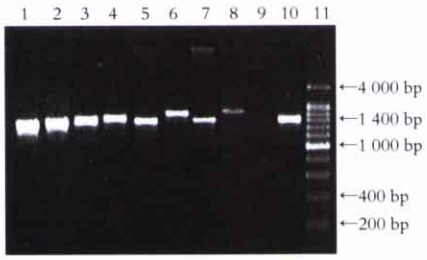
通讯作者:刘 昕,电话:(023)68753934

收稿日期:2005-09-19;修回日期:2005-11-13



1：标准；2：粘质沙雷菌；3：粪产碱杆菌；4：最小弧菌；5：洛菲不动杆菌；6：蜡状芽孢杆菌；7：阴沟肠杆菌；8：蜂房哈夫尼亚菌；9：克隆的质粒阳性对照；10：双蒸水空白对照

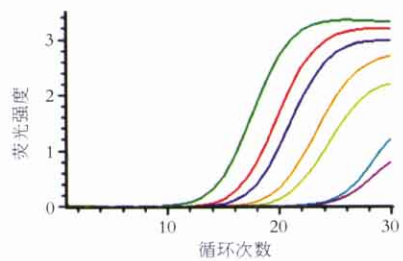
图 1　提取不同细菌 DNA，PCR 扩增产物电泳图



1－8：大肠杆菌浓度分别为 10^8、10^7、10^6、10^5、10^4、10^3、10^2、10^1 个/ml；9：双蒸水空白对照；10：克隆的质粒阳性对照；11：标准

图 2　提取不同浓度大肠杆菌 DNA，PCR 扩增产物电泳图

用本研究方法提取大肠杆菌（$10^1 \sim 10^7$/ml）DNA 经 Real-time PCR，可见随细菌浓度的递减，依次起跳的曲线，循环次数依次递增。空白对照呈近似平坦的直线，位于阈值水平以下，标准品的质粒 DNA（$10^3 \sim 10^9$ copy/ml）浓度对数与 CT 值线性关系，$y = -0.52x - 13.84$，$r^2 = 0.999$（图 3）。



从左至右曲线细菌浓度（个/ml）分别为 10^7、10^6、10^5、10^4、10^3、10^2、10^1；空白对照呈阈值水平以下近似平坦的直线

图 3　提取不同浓度大肠杆菌 DNA，R-T PCR 循环次数与实时荧光强度关系曲线

3　讨论

Chelex-100 是一螯合型的离子交换树脂，由苯乙烯和苯乙二烯组成的聚合物，包含着成对的亚氨二乙酸离子，Chelex 悬液碱性环境和煮沸时可使细胞膜破裂，DNA 从细胞核中释放[3,4]，另外 Chelex-100 可与二价金属离子螯合，从而避免样品中存在的金属离子在高温和低离子强度溶液中作为催化剂使 DNA 降解，保护 DNA[3]，最终避免 PCR 及 Real-time PCR 扩增中因模板的损失而导致假阴性从而降低灵敏度。螯合有金属离子的 Chelex-100 颗粒在离心后沉淀，又易于去除，对需要 Mg^{2+} 的 PCR 及 Real-time PCR 扩增没有损害[6]。

由于不同的蛋白变性剂对 PCR 扩增中 *Taq* 酶的影响不同[7]，依照 New England BioLabs 公司的方法，用非离子型去污剂 0.5% NP40 干扰融合蛋白结合到亲和性树脂上，可提高所提 DNA 纯度；另一方面 NP40 对 *Taq* 酶活性具有保护作用，促进 PCR 反应[7]。

DNA 的提取方法很多，包括酚－仿有机溶剂法、SDS 法等，本研究选取了 Chelex-100 法，整个过程在一管中操作，减少样本损失几率。本法提取细菌 DNA 经电泳鉴定条带清晰，测定 $D(260)/D(280) = (1.79 \pm 0.03)$，纯度较好。本研究的 PCR 通用引物针对 16 SrDNA 全长，目的片段约 1 500 bp，故选取不同细菌用本方法提取 DNA，PCR 扩增均可获得 1 500 bp 左右的目的片段，特异性强，未见假阳性和假阴性；灵敏度高，对于浓度低至 10^1/ml 的细菌提取 DNA，PCR 扩增获得所需目的片段，Real-time PCR 扩增获得的循环次数小于 30。可见本方法所得 DNA 灵敏度达到 10^1/ml 细菌浓度。Real-time PCR 结果显示随细菌浓度的梯度递减，循环次数顺次递增，即所提模板 DNA 浓度与细菌浓度呈平行关系，DNA 得率基本稳定。本研究 DNA 提取方法特异灵敏，且操作简便，值得推广。

关键词：PCR；实时荧光定量 PCR；DNA 提取
中图法分类号：R394-33　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] MACKAY I M. Real-time PCR in the microbiology laboratory[J]. Clin Microbiol Infect, 2004, 10(3): 190－212.

[2] 姚　远，张国富，刘玉英. PCR 污染与对策及假阴性原因[J]. 实用医技杂志，2002，9(4)：276－277.

[3] SWEET D, LORENTE M, VALENZUELA A, *et al.* Increasing DNA extraction yield from saliva stains with a modified Chelex method[J]. Forensic Sci Int, 1996, 83(3): 167－177.

[4] STEIN A, RAOULT D. A simple method amplification of DNA from paraffin-embedded tissues [J]. Nucleic Acids Res, 1992, 20(19): 5237－5238.

[5] EDEN P A, SCHMIDT T M, BLAKEMORE R P, *et al.* Phylogenetic analysis of Aquaspirillum magnetotacticum using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA [J]. Int J Syst Bacteriol, 1991, 41(2): 324－325.

[6] MOHLENHOFF P, MULLER L, GORBUSHINA A A, *et al.* Molecular approach to the characterisation of fungal communities: methods for DNA extraction, PCR amplification and DGGE analysis of painted art objects [J]. FEMS Microbiol Lett, 2001, 195(2): 169－173.

[7] 朱　平. PCR 基因扩增实验操作手册[M]. 北京：中国科学技术出版社，1992：71.

（编辑　陈聪连）