维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)02-0155-04

PCR 及 Real-time PCR 评价细菌 DNA 提取方法

胡晓红[1],彭惠民[1],刘 昕[2],黄正根[2],袁 科[2]

(1. 重庆医科大学基础医学院细胞生物学及遗传学教研室,重庆 400016;2. 第三军医大学分子遗传学教研室,重庆 400038)

【摘 要】目的:比较几种不同的细菌 DNA 提取方法,建立一种适于 PCR 和 Real-time PCR 的细菌 DNA 提取方法。方法:分别用蛋白酶 K 法、碱裂解法、Chelex-100+NP40、Chelex-100+TritonX-100 法和水煮法提取同种浓度大肠杆菌 DNA,测定 $OD_{260/280}$;用不同方法提取不同浓度的大肠杆菌 DNA,进行 PCR 和实时荧光定量 PCR 扩增,比较灵敏度。结果:5 种方法提取细菌 DNA,其中 Chelex-100+ NP40 法纯度($OD_{260/280}$=1.79±0.03)最高,此方法所提取的 DNA 产物进行 PCR 及 Real-time PCR 扩增未见假阳性及假阴性,其灵敏度为 10 个 /ml 细菌浓度。结论:Chelex-100 +NP40 的细菌 DNA 提取方法纯度及灵敏度高,且适应于 PCR 及 Real-time PCR。

【关键词】DNA 提取;PCR;实时荧光定量 PCR

【中国图书分类法分类号】R394-33 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-05-14

Methods of DNA extraction from bacteria for PCR and Real-time PCR

HU Xiao-hong, et al

(*Department of Cell Biology and Genetics, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstrcat】*Objective*: To compare the different DNA extraction methods and establish an efficient and sensitive method of DNA extraction from bacteria for PCR and Real-time PCR. *Methods*: Bacillus coli DNA with the same concentration was extracted by 5 different DNA extraction methods, the Proteinase K method, the alkali-lysis method, the Chelex-100 with NP40 or Triton X-100 and the water-boiling method to determine $OD_{260/280}$. Bacillus coli DNA with different concentrations wewe extracted to be amplified by PCR and Real-time PCR for compariing the sensitivity. *Results*: Among these extraction methods, Chelex-100 + NP40 method was with the best purity and sensitivity and offered a higher $OD_{260/280}$(1.79±0.03). Neither false positive nor false negative was found in PCR and Real-time PCR, The sensitivity was at 10/ml of bacteria concentratio. *Conclusion*: The DNA extraction based on Chelex-100 + NP40 is effective, specific and sensitive, and it accommodate to PCR and Real-time PCR.

【Key words】 DNA extraction; PCR; Real-time PCR

实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)作为灵敏度极高的核酸扩增技术,由于存在可能出现的假阳性和假阴性问题,限制了其广泛应用。虽然各种防污染措施减少或避免了聚合酶链式反应(PCR)中假阳性的问题,但是,PCR 及 Real-time PCR 在应用中出现假阴性的问题,对于微量靶核酸的放大,仍形成很大的限制[1]。究其原因主要是靶核酸序列的获得不够灵敏、不纯,DNA 未完全暴露[2],为此我们比较不同的细菌 DNA 提取方法,旨在选取特异灵敏的方法。

1 材料与方法

作者介绍:胡晓红(1969-),女,硕士,研究方向:分子遗传学。

通讯作者:彭惠民,男,教授,E-mail:penghuimin6@sohu.com。

基金项目:重庆市科委攻关项目(2004-12-1)。

1.1 材料

1.1.1 菌种 大肠杆菌为西南医院检验科惠赠,本实验室培养。

1.1.2 主要试剂 用于提取 DNA 的主要试剂:Chelex-100(Sigma),NP40(华美生物公司),蛋白酶 K(Merck),Triton X-100(Amresco,分装),SDS(Sigma)。用于 PCR 及 Real-time PCR 的试剂:Taq 酶试剂盒 (大连宝生生物),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 提取步骤 方法 A (蛋白酶 K 法):取 300μl 菌液于 1.5ml 离心管中,离心 5 000r/min,5min,弃上

维普资讯 http://www.cqvip.com

清,用 1ml 提取液(10mmol/L Tris-HCl pH7.5,10mmol/L EDTA,100mmol/L NaCl,0.5% SDS,0.3mg/ml 蛋白酶 K)重悬后 56℃放置 3h,等体积苯酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)抽提 2 次,氯仿抽提 1 次后,乙醇沉淀 DNA,70%乙醇洗涤 2 次,空气干燥后溶于 500μl 双蒸水中。方法 B (碱裂解法 [3]):取 300μl 菌液于 1.5ml 离心管中离心,细菌沉淀重悬于 200μl 碱裂解液(0.1mol/L NaOH,2mol/L NaCl,0.5%SDS)中,95℃孵育 15min,酚-仿提取 2 次,乙醇沉淀,重悬于双蒸水中。方法 C(Chelex-100 + NP40 法):取 300μl 培养细菌至 1.5ml 离心管,离心 12 000r/min,2min,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 30min;100℃水浴 10min;12 000r/min 离心 2min,取上清,即 DNA。方法 D(Chelex-100+Triton X-100 法):Chelex-100+NP40 法:取 300μl 培养细菌至 1.5ml 离心管,离心 12 000 r/min,2min,弃上清;于沉淀中加入提取液(25% Chelex-100,0.5% Triton X-100,TE 配制,pH=8.0~9.0);56℃孵育 30min;100℃水浴 10min;12 000r/min 离心 2min,取上清。方法 E(水煮法):取 300μl 菌液于 1.5ml 离心管中,离心 5 000r/min,5min,弃上清,用 1ml 双蒸水重悬后同上离心,500μl 双蒸水再次重悬,煮沸 15min,离心 12 000r/min,5min,取上清,即 DNA。

1.2.2 DNA 的鉴定 1μl DNA 上样,2%琼脂糖凝胶电泳鉴定 DNA 片段大小,紫外分光光度仪测定 $OD_{260/280}$ 鉴定 DNA 纯度。PCR 和实时定量 PCR 鉴定评价灵敏度和特异性。

1.2.3 样本稀释与定量 哥仑比亚血平板(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。再将大肠杆菌 1:10倍比稀释后浓度为 10~10^7 个/ml,用上述不同方法提取 DNA,以备 PCR 及 Real-time PCR 扩增。

1.2.4 PCR 扩增 针对细菌 16SrDNA 全长,用软件 Primer Premier 5.0 设计的通用引物[4],上游引物:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',下游引物:5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'(上海博亚生物公司合成)。目的片段 1 500bp。PCR 体系为 50μl:1 × buffer,Taq 酶 5.0U,模板 2μl,双蒸水补足 50μl。PCR 循环参数及扩增条件:94℃预变性 5min,30 个循环(94℃ 30s,53℃ 30s,72℃ 90s),72℃延伸 8min。取 PCR 扩增产物 10μl 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。

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

2 结 果

2.1 不同方法提取大肠杆菌 DNA,测 OD 值,比较结果

用上述 4 种方法各提取 20 份同样浓度的大肠杆菌 DNA,测 OD 值,结果见表 1。

5 种方法提取的细菌 DNA 方法以 Chelex-100 + NP40 法的纯度最高。

2.2 不同方法提取不同浓度大肠 DNA 后,PCR 扩增结果

大肠杆菌 1:10 倍比稀释后浓度为 10^3~10^5 个/ml,用上述方法提取 DNA,PCR 扩增产物经 2%琼脂糖凝胶电泳于 1 500bp 左右可见特异的目的片段,其中以方法 C(Chelex-100 + NP40 法)的条带最为清晰,而方法 B (水煮法)的结果最差(图 1)。

2.3 不同方法提取不同浓度大肠杆菌 DNA,Real-time PCR 扩增结果

大肠杆菌 1:10 倍比稀释后浓度为 10~10^7 个/ml,用上述方法提取 DNA,Real-timePCR 扩增。仅 Chelex-100 + NP40 组可见随细菌浓度的递减,依次起跳的曲线,$C(_t)$依次递增。质粒 DNA(10^3~10^9 copy/ml) 作为标准品, 其浓度对数与 CT 值线性关系,r^2=0.99(图 2)。

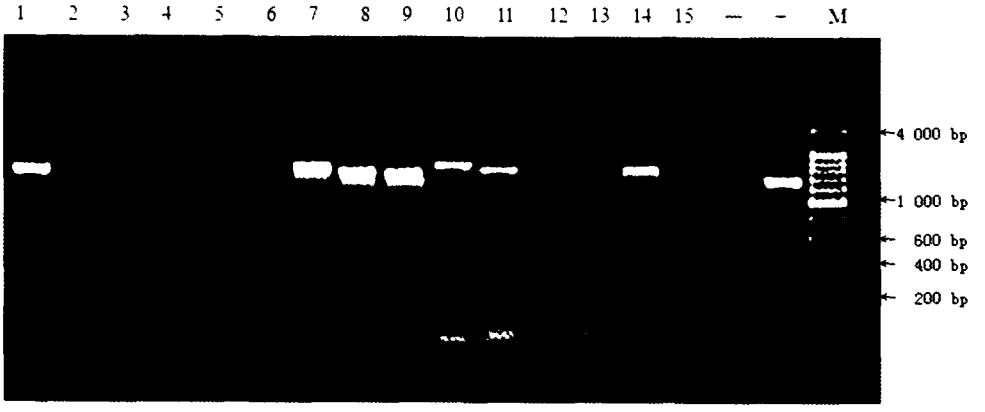
3 讨 论

模板核酸提取制备的纯度和质量,是决定 PCR 成败的关键环节之一,如果核酸提取时样本裂解或 DNA 释放不完全,蛋白质未去除干净、有 PCR 酶抑制剂或有机试剂如酚等残留在所制备的模板 DNA 中等,都可能导致后续的 PCR 反应效率降低、灵敏度减小、甚至 PCR 反应失败,出现假阴性。根据不同的生物材料样本,选择和建立不同的模板核酸提取制备方法,以获得高纯度高质量的模板核酸,是保证 PCR 反应正常进行的先决条件[1]。细菌 DNA 提取方法众多,本文比较了几种经典和常用的核酸提取方法,以期找到一种简易高效、稳定可靠的适用于高灵敏度实时 PCR 的细菌 DNA 提取方法。

表 1 4 种方法提取的细菌 DNA 纯度 $OD_{260/280}$ 比较 $\bar{x} \pm s$(n=20)

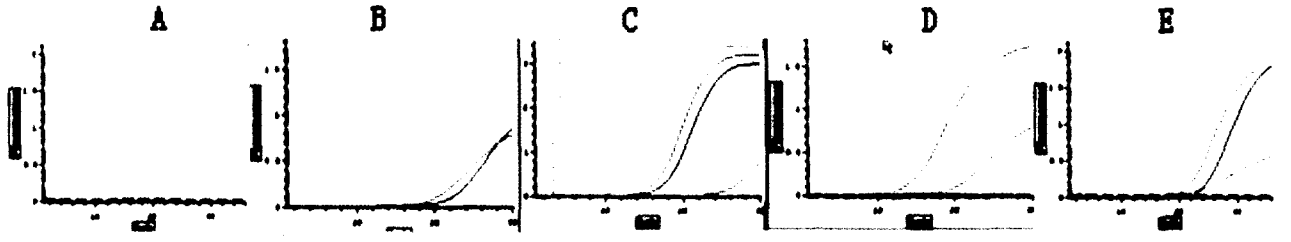
	蛋白酶 K 法	碱裂解法	Chelex-100+NP40	Chelex-100+Tniton	水煮法
$OD_{260/280}$	1.64 ± 0.03	1.55 ± 0.06	1.79 ± 0.03	1.67 ± 0.04	1.62 ± 0.05

维普资讯 http://www.cqvip.com



-.H_2O 空白对照； +.克隆的质粒； M.Marker； 1~3.大肠杆菌浓度(个 /ml)分别为 10^5、10^4、10^3;蛋白酶 K 法提取 DNA； 4~6. 大肠杆菌浓度（个 /ml）分别为 10^5、10^4、10^3; 碱裂解法提取 DNA； 7~9. 大肠杆菌浓度（个 /ml）分别为 10^5、10^4、10^3; Chelex-100+NP40 法提取 DNA； 10~12. 大肠杆菌浓度（个 /ml）分别为 10^5、10^4、10^3;Chelex-100+Triton X-100 法提取 DNA; 13~15.大肠杆菌浓度(个 /ml)分别为 10^5、10^4、10^3;水煮法提取 DNA

图 1 提取不同浓度大肠杆菌 DNA,PCR 扩增产物电泳图



A.蛋白酶 K 法； B.碱裂解法； C.Chelex-100 + NP40； D.Chelex-100+Triton 法； E.水煮法

图 2 用不同方法提取不同浓度大肠杆菌 DNA,Real-timePCR 扩增循环次数与实时荧光强度关系曲线

本文比较了 5 种提取细菌 DNA 的方法，以 Chelex-100+NP40 法所得 DNA 纯度最佳,对 PCR反应的影响最小,其次是 Chelex-100+Triton X-100 法、蛋白酶 K 法和水煮法,而以碱裂解法所得的纯度和效果最差。在所比较的几种方法中:方法 A 为传统的经典的 DNA 纯化方法,反应经 3 个主要环节,即先用 SDS 溶解破坏细胞膜、膜蛋白、解离细胞中的核蛋白,并与蛋白质结合而沉淀,同时用蛋白酶 K 水解消化蛋白质,特别是与 DNA 结合的组蛋白,释放出 DNA;其后再用有机溶剂去除蛋白质和其它细胞组分;最后用乙醇沉淀核酸。优点是样本裂解较充分,蛋白质消化较完全;缺点是蛋白酶 K 较昂贵,提取步骤较多,反应时间较长,核酸容易丢失,且酚和氯仿易造成残留污染。方法 B(碱裂解法)和方法 E(水煮法)优点是简便快速,试剂简单,靠水煮和碱性条件使蛋白质裂解、靶基因游离,水煮法且无需酚和氯仿;缺点是蛋白和样本其它组分裂解消化可能不完全,高温和碱可能使模板核酸损伤和丢失,碱裂解法可有酚和氯仿残留污染,方法稳定性重复性欠佳。对于灵敏度要求高的 Real-time PCR 的应用有一定限制,对于标本量大、灵敏度要求不高的 PCR 反应则不失为简单快截的方法,碱裂解法则更适用于一些难于裂解的细菌如结核杆菌 DNA 的提取[3]。

方法 C 和 D 中使用了 Chelex-100 试剂，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[5,6],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[5],Chelex-100 可结合对 PCR

维普资讯 http://www.cqvip.com

有干扰的成分,形成的沉淀颗粒通过离心即可容易去除,对需要 Mg^{2+} 的 PCR 及 Real-time PCR 扩增没有损害[7],最终避免 PCR 及 Real-time PCR 扩增中因模板的损失或干扰物质的影响而导致的灵敏度降低或假阴性。

由于不同的蛋白变性剂对 PCR 扩增中 Taq 酶的影响不同[8],本文选取不同的去污剂加入 5% Chelex-100 作为提取液提取 DNA,PCR 产物的电泳结果示 0.5%NP40 加入提取液后,所得 DNA 的 PCR 扩增效率最高。依照 New England BioLabs 公司的方法,用非离子型去污剂 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[8]。

本文进一步优化了 Chelex-100 方法的条件,建立了适于 PCR 及 Real-time PCR 细菌 DNA 的提取方法。具体步骤如下:(1)取 300μl 培养细菌于 1.5ml 离心管,离心 12 000r/min,2min。(2)弃上清,于沉淀中加入提取液 (25% Chelex-100,0.5% NP40,TE 配制,pH=8.0~9.0)。(3)56℃孵育 30min。(4)100℃水浴 10min。(5)离心 12 000r/min,2min,取上清,即为DNA。整个过程在 1 管中操作,方法简单,不需酚-氯仿抽提步骤,减少了样本损失机率,其产物用于 PCR 和 Real-time PCR 灵敏度高、特异性强、无假阳性和假阴性。

本优化方法提取细菌 DNA 经电泳鉴定条带清晰,测定 $OD_{260/280}$=1.79±0.03,纯度较好。作为验证 DNA 提取方法的 PCR 扩增产物是细菌核糖体 16S 小亚基(16SrRNA)的基因(16SrDNA),16SrDNA 是编码原核生物核糖体小亚基 rRNA(16SrRNA)的基因,长度约为 1 500pb,具有分子大小适中,突变率小等优点,是细菌分类学研究中最常用、最有用的"分子钟"[9,10]。设计的通用引物针对 16SrDNA 全长,故目的片段 1 500bp 左右,选取不同细菌提取 DNA,PCR 扩增均获得 1 500bp 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 个 /ml 的细菌提取 DNA,PCR 扩增获得所需目的片段,Real-time PCR 扩增 $C_{(t)}$值小于 30。可见本方法所得 DNA 较为高效、灵敏,达到 10 个 /ml 细菌浓度。Real-time PCR 结果显示随细菌浓度的梯度递减,$C_{(t)}$值顺次递增,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。本文 DNA 提取方法特异、高效、灵敏,且操作简便,值得推广。

参 考 文 献

[1] Mackay IM. Real-time PCR in the microgiology laboratory[J]. Clincal Microbiology and Infection,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.

[3] Thierry D,Cave MD,Eisenach KD,et al. Characterization of a Mycobacterium tuberculosis insertion sequence,IS6110,and its application in diagnosis[J]. J Clin Microbiol,1990;28(12):2668-2673.

[4] Eden P A,Schmidt T M,Blakemore R P,et al. Phylogenetic analysis of Aquaspirillum magnetotacticum using polymerase chain reaction-amplified 16SrRNA-specific DNA[J]. Int J Syst Bacteriol,1991;41:324-325.

[5] Sweet D,Lorente M,Valenzuela A,et al. Increasing DNA extraction yield from saliva stains with a modified Chelex method[J]. Forensic Science International,1996;83:167-177.

[6] Stein A,Rooult D. A simple method amplification of DNA from paraffin-embedded tissues[J]. Nucleic Acids Research,1992;20:5237.

[7] Mohlenhoff P,Muller L,Gorgushina AA,et al. Molecular approach to the characterization 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.

[8] 朱 平,主编.PCR 基因扩增实验操作手[M]. 北京:中国科学技术出版社,1992.71.

[9] Chen LL,Wu YM,Yan J,et al. Association between coinfection of Porphyromonas gingivalis,Actinobacillus actinomycetemcomitans and Treponema denticola and periodontal tissue destruction in chronic periodontitis[J]. Chinese Medical Journal,2005;118(11):915-921.

[10] 黄正根,刘 昕. 应用 16SrDNA 检测致病菌的研究进展[J]. 中华检验医学杂志,2005;28(6):663-665.

(责任编辑:冉明会)