

乳粉中肺炎克雷伯氏菌核酸提取方法比较

傅德江^{通讯作者} 宋帆 韩涛 林碧莲 张芳 张雅薇 福建省产品质量检验研究院 350000

基金项目: 福建省产品质量检验研究院科技项目 (KY201822A)。

作者简介: 通讯作者: 傅德江 (1986.9—), 福建三明, 汉族, 本科, 工程师, 研究方向: 食品微生物检验检测。

摘要: 研究以牛奶中的致病性肺炎克雷伯氏菌作为研究对象, 通过阳性菌株加标提取细菌核酸, 用异硫氰酸胍法、改良 SDS-CTAB 法、高温裂解法和试剂盒法分析比较, 选用紫外分光光度计法和实时荧光 PCR 法对各方法进行系统评估。目的是建立稳定高效的婴幼儿配方奶粉中肺炎克雷伯氏菌核酸 (DNA) 的提取方法。四种方法均能有效从人工污染肺炎克雷伯氏菌的乳粉中提取到肺炎克雷伯氏菌的 DNA, 异硫氰酸胍法提取效率较高, 但费时费力。高温裂解法操作简单、提取时间短, 但 DNA 提取效率较低, 试剂盒法提取的 DNA 效率和产量相对较高、质量稳定、易标准化、方法重现性较好。

关键词: 核酸; 检测; 乳品; 肺炎克雷伯氏菌

肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*, Kpn) 属于革兰阴性杆菌, 是一种重要条件致病菌之一, 近年来, 由肺炎克雷伯氏菌引起的食物中毒越来越多, 据美国疾病预防控制中心报告, 由肺炎克雷伯氏菌引起的食物中毒居第 6 位, 占整个细菌性食物中毒的 8%。我国每年发生的此类中毒事件也较多。肺炎克雷伯氏菌是一种重要的食源性致病菌, 它对乳粉加工业存在着潜在的危害。即使生产符合现行卫生标准, 婴幼儿配方奶粉也不是无菌产品。这就是说, 它有时可能含有引发严重疾病的病原体, 国家食品监督、风险监测及生产乳粉的企业均没有对此菌进行监测。

微生物学培养和生化鉴定虽能进行肺炎克雷伯氏菌的分离鉴定, 但费时费力, 不能快速诊断。随着分子生物学技术的发展, 尤其是 PCR 方法在微生物学检验中得到越来越多的应用, 为细菌的快速鉴定提供了可能, 对于 PCR 方法, DNA 模板的质量是影响其准确性与灵敏度的关键因素之一。研究通过对国内外常用的细菌核酸提取方法进行系统比较评估, 优化婴幼儿配方奶粉中肺炎克雷伯氏菌 DNA 提取方法, 使提取的核酸浓度和纯度均能符合 PCR 扩增的要求, 建立稳定高效的婴幼儿配方奶粉中肺炎克雷伯氏菌核酸的提取方法。

1 试验材料

试验用菌株: 肺炎克雷伯氏菌菌株 CMCC46117, 产酸克雷伯氏菌菌株 ATCC49334, 以上菌种分别购自中国普通微生物菌种保藏管理中心和中国医学细菌保藏管理中心。

试剂: EDTA; 溶菌酶 (10 mg/mL); 蛋白酶 K (20 mg/mL); TE 溶液 [10 mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 1 mmol/L EDTA (pH8.0)]; 碱裂解液 (0.15 mol/L NaOH, 2 mol/L NaCl); 0.5% SDS; 氯仿; 异丙醇; 75% 乙醇; 20% SDS; 5 mol/L NaCl; 细菌 DNA 提取液 (广州生科源生物有限公司), 细菌基因组 DNA 提取试剂盒 [天根生化科技 (北京) 有限公司]; 营养肉汤培养基 (购自北京市陆桥技术有限公司)。

仪器: ABI 7500 荧光 PCR 仪器 (美国 Life Tech 公司); 小型离心机 (Eppendorf); 涡旋混合器 (上海琪特分析仪器有限公司); e 生物安全柜 (美国贝克公司); JJ1000 电子天平 (美国双杰兄弟集团有限公司); SILVER 拍击式均质器 (西班牙 IUL); HVE50 高压灭菌锅 (日本 Hirayama 公司); MDF-U3386S 超低温冰箱 (日本三洋公司); LRH-250F 生化培养箱 (上海一恒科学仪器有限

公司)；BCD-278KACB冰箱(青岛海尔股份有限公司)；移液枪：eppendorf有限公司。

乳粉：乳粉购自当地超市。

2 试验方法

2.1 乳粉人工污染

保藏的肺炎克雷伯氏菌菌株(CMCC46117)，产酸克雷伯氏菌菌株(ATCC49334)用营养肉汤复苏，36℃培养24h+2h，培养后的增菌液后用生理盐水稀释，制作不同浓度的菌稀释液，采用平板涂布法计数各个菌液的最终浓度，在人工污染肺炎克雷伯氏菌前，该乳粉按标准方法检测证实不含有肺炎克雷伯氏菌。将肺炎克雷伯氏菌人工污染到乳粉中，使样品中肺炎克雷伯氏菌达到 $10^1 \sim 10^7$ CFU/mL，取梯度为 10^{-1} ， 10^{-2} ， 10^{-3} ， 10^{-4} ， 10^{-5} ， 10^{-6} 的稀释液1 mL于2 mL离心管中(每梯度做2平行)，12000 r/min离心3 min，弃上清液，用棉签去掉上层漂浮物，取沉淀进行以下四种方法的DNA提取。

2.2 DNA提取

2.2.1 异硫氰胍法

加入200 μL TE、400 μL 异硫氰胍裂解液、5 μL 蛋白酶K、10 μL RNA酶。混匀，56℃温浴2 h以上，期间，每半小时涡旋混匀一次；

加入600 μL 饱和酚：氯仿：异戊醇(25:24:1)，涡旋30s，10000r/min离心10min；

取上清，加入等体积氯仿：异戊醇(24:1)，涡旋30s，10000r/min离心10min；

取上清，加入等体积氯仿，涡旋30s，10000r/min离心10min；

取上清，加入0.8体积异丙醇，涡旋30s，10000r/min离心10min；

取沉淀，加入500 μL 70%乙醇，洗涤一次。退离后吸去残留乙醇；

在DNA浓缩仪中干燥5 min。加入50 μL TE，溶解沉淀；

用核酸蛋白质测定仪测定其浓度，并将DNA样本置于-20℃保存。

2.2.2 改良 SDS-CTAB 法^[4]

加入564 μL TE缓冲液(pH 8.0)重悬菌体加入30 μL 10%SDS和6 μL蛋白酶K，颠倒混合，置于37℃

金属浴中反应1h，使悬液相对清澈；

加入100 μL 5M NaCl和80 μL CATB/NaCl颠倒混匀，65℃金属浴中反应10min；

加入等体积氯仿：异戊醇(24:1)，涡旋30s，10000r/min离心10min；

取上清，加入等体积饱和酚：氯仿：异戊醇(25:24:1)，涡旋30s，10000 r/min离心10min；

取上清，加入等体积氯仿，涡旋30s，10000r/min离心10min；

取上清，加入0.8体积异丙醇，涡旋30s，10000r/min离心10min；

取沉淀，加入500 μL 70%乙醇，洗涤一次。退离后吸去残留乙醇；

在DNA浓缩仪中干燥5min。加入50 μL TE，溶解沉淀；

用核酸蛋白质测定仪测定其浓度，并将DNA样本置于-20℃保存。

2.2.3 高温裂解法^[5]

加入50 μL 细菌DNA提取液，震荡混匀后，100℃孵育10min，快速冷却后离心(>12000 r/min)3min，收集上清液为DNA提取液。用核酸蛋白质测定仪测定其浓度，并将DNA样本置于-20℃保存。

2.2.4 试剂盒法

TIANamp Genomic DNA Kit 血液/细胞/组织基因组DNA提取试剂盒(离心柱型)：

取1ml的样品原液于1.5mL离心管中，12000rpm离心，去上清；

加200 μL 缓冲液GA、20 μL 蛋白酶K，混匀震荡至悬浮，56℃孵育1-3h，简短离心；

加200 μL 缓冲液GB混匀，70℃放置10min，简短离心；

加200 μL 无水乙醇，震荡15s，简短离心；

溶液和絮状物都移入吸附柱CB3中(吸附柱放入收集管中)，12000 rpm离心30s，弃废液，CB3放回；

向CB3中加入500 μL 缓冲液GD，12000rpm离心30s，弃废液，CB3放回；

向CB3中加入600 μL 漂洗液PW，12000rpm，离心30s，弃废液，CB3放回；

向CB3中加入600 μL 漂洗液PW，12000rpm离心

2min, 弃废液, CB3 放回, 置室温数分钟;

CB3 转入干净的离心管, 向膜的中间部位悬空滴加 50 μ L LTE, 室温放置 5-10min, 12000 rpm 离心 2min;

收集液体为 DNA 提取液, 用核酸蛋白质测定仪测定其浓度, 并将 DNA 样本置于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

2.3 DNA 浓度测试

把 14 份 DNA 样品分别用去离子水稀释 100 倍 (在 2 μ L DNA 溶液中加入 198 μ L 去离子水), 涡旋混匀并离心后, 用核酸蛋白质分析仪测定其浓度和 OD₂₆₀ / OD₂₈₀ 值。根据 DNA 得率 (μ g/mL 菌液) = DNA 浓度 (ng/ μ L) \times 洗脱液或定容体积 (μ L) / 菌液体积 (mL) / 1000, 计算得率

2.4 荧光 PCR 扩增

荧光 PCR 反应体系^[1]为: 10 \times PCR Buffer 5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 4 μ L, 10mmol/L dNTPs 1 μ L, 10 μ mol/L 引物上下游各 2 μ L, 探针 1 μ L, 模板 DNA 3 μ L, 5 U/ μ L, Taq DNA 酶 1 μ L, dd H₂O 补足 50 μ L。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10min; 94 $^{\circ}$ C 15s, 60 $^{\circ}$ C 质变性 60s, 45 个循环。

3 结果与分析

3.1 结果

表 1 四种 DNA 提取方法 OD260 / OD280 值

| 菌浓度提取方法 | OD260 / OD280 | | | | | |
|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | 10 ⁷ | 10 ⁶ | 10 ⁵ | 10 ⁴ | 10 ³ | 10 ² |
| 异硫氰胍法 | 1.66 | 1.62 | 1.60 | 1.58 | 1.23 | 1.05 |
| 改良 SDS-CTAB 法 | 1.84 | 1.82 | 1.80 | 1.81 | 1.55 | 1.23 |
| 高温裂解法 | 1.57 | 1.55 | 1.48 | 1.46 | 1.11 | 1.10 |
| 试剂盒法 | 2.05 | 1.98 | 1.96 | 1.91 | 1.76 | 1.51 |

表 2 四种 DNA 提取方法 OD260 / OD230 值

| 稀释度提取方法 | OD260 / OD230 | | | | | |
|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | 10 ⁷ | 10 ⁶ | 10 ⁵ | 10 ⁴ | 10 ³ | 10 ² |
| 异硫氰胍法 | 1.43 | 1.48 | 1.38 | 1.35 | 1.33 | 1.33 |
| 改良 SDS-CTAB 法 | 1.53 | 1.48 | 1.48 | 1.35 | 1.33 | 1.33 |
| 高温裂解法 | 1.33 | 1.28 | 1.28 | 1.25 | 1.23 | 1.13 |
| 试剂盒法 | 1.78 | 1.72 | 1.71 | 1.75 | 1.65 | 1.61 |

表 3 四种提取方法提取所得 DNA 实时荧光 PCR 的 Ct 值

| 稀释度提取方法 | 10 ⁷ | 10 ⁶ | 10 ⁵ | 10 ⁴ | 10 ³ | 10 ² |
|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Ct | Ct | Ct | Ct | Ct | Ct |
| 异硫氰胍法 | 17.23 | 19.56 | 33.85 | ND | ND | ND |
| 改良 SDS-CTAB 法 | 17.59 | 18.73 | 19.44 | 25.32 | ND | ND |
| 高温裂解法 | 16.53 | 21.39 | 23.56 | 24.01 | ND | ND |
| 试剂盒法 | 17.89 | 17.99 | 19.74 | 20.02 | 20.33 | 32.24 |

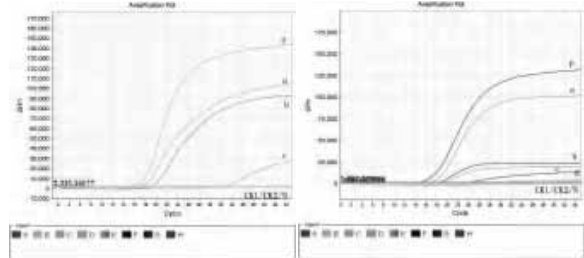


图 1: 异硫氰胍法

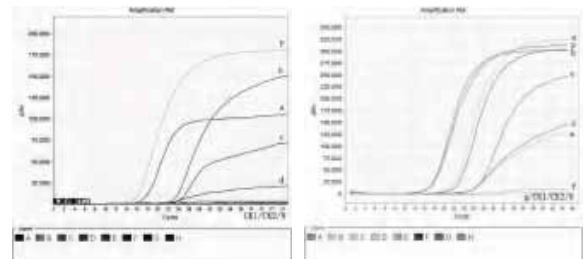


图 2: 改良 SDS-CTAB 法

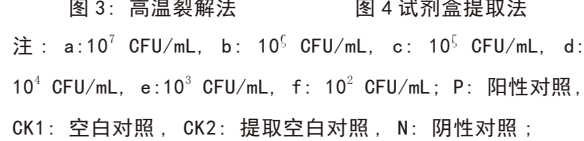


图 3: 高温裂解法

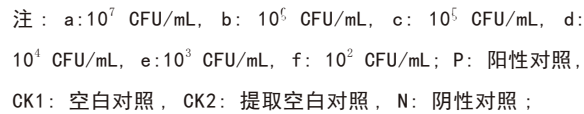


图 4 试剂盒提取法

注: a: 10⁷ CFU/mL, b: 10⁶ CFU/mL, c: 10⁵ CFU/mL, d: 10⁴ CFU/mL, e: 10³ CFU/mL, f: 10² CFU/mL; P: 阳性对照, CK1: 空白对照, CK2: 提取空白对照, N: 阴性对照;

3.2 讨论

4 种 DNA 提取方法的优劣分析

3.2.1 异硫氰胍法

异硫氰胍法结合苯酚-氯仿法中异硫氰胍试剂可以裂解细胞, 并抑制细胞释放出核酸酶, 在该方法中作为实验裂解液使用。苯酚与氯仿是非极性分子, 水是极性分子, 当裂解后的溶液与苯酚-氯仿混合时, 蛋白质分子之间的水分子就被苯酚或氯仿夺去, 使蛋白失去水合状态而变性。经过离心, 变性蛋白质的密度比水的密度更大, 因而与水相分离并沉淀在水相下面, 从而与溶解在水相中的 DNA 分开, 而苯酚与氯仿作为有机溶剂比重更大, 保留在最下层。苯酚的变性作用大, 但苯酚与水相有一定程度的互溶, 大约有 10% ~ 15% 的水溶解在苯酚中, 因而损失了这部分水相中的 DNA, 而氯仿的变性作用不如苯酚效果好, 但氯仿与水不相混溶。所以在抽提过程中, 混合使用苯酚与氯仿一方面可以得到更多纯化的 DNA, 另一方面氯仿可以将残余的苯酚去除, 防止苯酚影响核酸的纯度和浓度, 同时还能使水相和有机相分离。异硫氰胍法提取的 DNA 样本不仅容易受到蛋白质、苯酚残留的污染, 而且在没有中间截留核酸的介质下, 单凭肉眼目测和判断是否有沉淀的情况, 很容易在提取过程中损失

大量的核酸。加上乳粉在加工过程中经过干燥、混合、消毒等步骤，乳粉中的基因片段已被打碎或分散，异硫氰胍法很难富集到大量的小片段 DNA 样本，从而造成提取的 DNA 溶液浓度和纯度都达不到要求的情况。

异硫氰胍结合苯酚-氯仿法中的提取试剂，例如苯酚、氯仿、异戊醇等对人体有毒害作用，提取过程比较烦琐，需要操作人员掌握熟练的实验技巧。

3.2.2 改良 SDS-CTAB 法

改良 SDS-CTAB 法是经典的提取 DNA 的方法，虽然提取效率较高，但费时费力，操作中需要多次离心，步骤烦琐，增加了样品污染的可能性，且提取过程中易造成 DNA 损失。加入酚类物质或 SDS 会严重干扰后续 PCR 反应，且所用试剂有一定毒性，大量使用则有害健康，易造成环境污染，不适合常规使用。改良 SDS-CTAB 法一般需要复杂的裂解液体系，并借助蛋白酶 K 获得高质量的抽提产物，且部分药品及相关酶试剂价格昂贵。

3.2.3 高温裂解法

高温裂解法操作简单、提取时间短，但加热过程中菌体破裂比例极小，且煮沸过程中部分 DNA 降解，致使 DNA 提取效率很低。

3.2.4 试剂盒法

试剂盒法提取的 DNA 效率和产量相对较高、质量稳定、易标准化、方法重现性较好，但试剂盒价格昂贵，使用次数有限，不适用于大量样本的基因组 DNA 提取。不同厂家和生产批次的试剂盒也有差异，分别偏重细胞、病毒、细菌的基因组 DNA 提取，对不同类型的样品效果也不相同。

样本核酸基因组提取试剂盒是目前市面上应用于样品 DNA 提取最广泛的产品。因其耗时少、操作简便以及对人体无毒副作用的优势逐渐代替异硫氰胍等手工配制试剂提取法。基因组提取试剂盒中主要使用与 DNA 特异性结合的吸附柱，吸附裂解后样本中的目的核酸，其材质主要是硅基质材料，吸附核酸的原理主要利用 DNA 在高盐、低 pH 值环境下与硅基质材料相结合，在低盐、高 pH 值环境下与硅基质材料脱离的特征进行 DNA 提取，其机理可能是高浓度盐离子破坏了硅基质水分子结构，形成阳离子桥，使得 DNA 科研特异性吸附到硅基质材料上；而当盐离子被清除后，再水化的硅石破坏了基质和 DNA 之间的吸引力，因而 DNA 从硅基质上被洗脱下来。

4 结论

通过比较四种方法对乳粉中肺炎克雷伯氏菌的 DNA 提取效率和 PCR 扩增效果比较发现，试剂盒法提取的 DNA 效率和产量相对较高，同时在使用提取试剂盒的基础上，对样品前处理过程进行优化和改良：首先增大样本的初始量，采用富集大量提取的方法来提高乳与乳制品中 DNA 的浓度；其次因为乳与乳制品中蛋白质、脂肪含量丰富，在加裂解液之前，先加入无菌双蒸水对乳粉进行溶解，再通过离心将脂肪分层，使用无菌棉签或枪头彻底取出脂肪层，防止 DNA 吸附柱的堵塞；然后将去除脂肪后剩下的上清液和沉淀经过彻底裂解以后，采用分次、等量过柱的方法将收集到的裂解液全部过柱，提高样本 DNA 的最终浓度，而不采用去除脂肪和上清液，只取沉淀的做法；最后在使用试剂盒中的清洗液对吸附柱进行清洗的过程中，加大清洗液和洗脱液的用量和次数，尽可能去除膜上吸附的蛋白质、脂肪等杂质，尽量减少杂质对后续提取过程的干扰。

参考文献

- [1] 李富祥, 廖德芳, 等, 肺炎克雷伯菌 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J], 中国兽医科学, 2014, 44 (12): 1231-1235.
- [2] 秦丽, 周正, 穆燕魁, 等, PCR 检测乳粉中肺炎克雷伯氏菌 [J], 河北师范大学学报, 2011, 3: 192-196.
- [3] 宋帆, 奶粉中 DNA 提取方法的比较 [J], 福建经纺, 2013, 7: 37-40.
- [4] 郭海勇, 于超, 郭伟生, 等, 小鼠胚胎胃肠道细菌基因组 DNA 提取方法比较 [J], 生物技术, 2012, 21(4): 37-40
- [5] 胡晓红, 彭惠民, 刘昕, 等, PCR 及 Real-time PCR 评价细菌 DNA 提取方法 [J], 重庆医科大学学报, 2008, 33(2): 155-158.

