

3 种方法对临床菌血症样本细菌 DNA 提取的比较

赵晓丽, 李晓霞, 刘德华, 任宝军, 邵剑春, 胡大春

(昆明市临床疾病分子生物学重点实验室, 昆明医科大学附属甘美医院检验科, 云南 昆明 650011)

[摘要] **目的** 寻找一种简单、有效的提取临床菌血症样本细菌 DNA 的方法. **方法** 分别用碱液加热裂解法、溶菌酶法和商品 DNA 提取液法提取细菌 DNA, 用临床常见病原菌特异性引物, 进行 PCR 扩增. **结果** (1) 商品 DNA 提取液法提取革兰阴性菌 DNA, 经 PCR 扩增后得到特异性目的片段, 但未扩增出革兰阳性菌的特异性目的片段; (2) 碱液加热裂解法、溶菌酶法提取革兰阴、阳性菌 DNA, 经 PCR 扩增后均得到特异性目的片段, 但碱液加热裂解法比溶菌酶法能扩增到更低浓度的细菌 DNA 目的片段. **结论** 碱液加热裂解法是 3 种方法中最简单有效的细菌 DNA 提取方法, 适用于临床病原菌基因组 DNA 提取.

[关键词] 细菌 DNA; 碱液加热裂解法; 溶菌酶法; 商品 DNA 提取法

[中图分类号] R378.99 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 04-0117-04

Comparison of Three Methods for Extraction of Bacterial DNA from Bacteriemia Blood Samples

ZHAO Xiao-li, LI Xiao-xia, LIU De-hua, REN Bao-jun, SHAO Jian-chun, HU Da-chun

(The key Laboratory of Molecular Biology for Clinical Disease, Dept. of Clinical Laboratory, The Affiliated Ganmei Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650011, China)

[Abstract] **Objective** To find an effective method for extracting bacterial DNA from bacteriemia blood samples. **Methods** Bacterial DNA from bacteriemia blood samples was extracted by three methods including alkali/heat lysis, lysozyme digestion and commercial DNA extraction kit. PCR with the specific primers for common pathogenic bacteria was used to amplify the extracted DNA. **Result** The PCR results showed that the methods of alkali/heat lysis was better than other two methods for extracting DNA from both Gram-negative and Gram-positive bacteria. **Conclusion** Alkali/heat lysis method is the most simple and effective method for extracting DNA from clinical common pathogenic bacteria.

[Key words] DNA; Alkali/heat lysis; Lysozyme digestion; Commercial DNA extraction kit

PCR 方法应用于临床病原菌的检测, 首要难题是临床样本中病原菌 DNA 的制备. 高效、快速的病原菌 DNA 制备方法是 PCR 方法对临床菌血症样本进行病原菌检测的前提, 也是提高 PCR 方法检测病原菌灵敏度的关键^[1]. 细菌基因组 DNA 常见的提取方法有碱裂解法、煮沸法、溶菌酶法等^[2]. 其中, 碱裂解法操作简单、提取 DNA 纯度高, 但需要时间长, 有一定的腐蚀性. 煮沸法时间短、易操作, 但难以提取革兰阳性菌基因组

DNA. 溶菌酶法适用于革兰阳性菌和革兰阴性菌, 但操作繁琐, 成本较高. 碱液加热裂解法可将碱裂解法与煮沸法结合, 在加热煮沸的基础上加入低浓度的 NaOH 溶液, 利用碱破坏革兰阳性菌坚韧细胞壁获得细菌基因组 DNA.

本研究对碱液加热裂解法、溶菌酶法和商品细菌 DNA 专用提取液这 3 种细菌基因组 DNA 提取方法进行了比较研究, 发现碱液加热裂解法提取细菌 DNA 具有耗时少、效率高、易操作等优

[作者简介] 赵晓丽 (1978~), 女, 山西运城市人, 医学硕士, 主治医师, 主要从事临床微生物学与分子生物学研究工作.

[通讯作者] 胡大春. E-mail: hudach@163.co

点, 推荐临床应用.

1 材料与方法

1.1 菌种及来源

菌种来源: 临床分离金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、粪肠球菌、屎肠球菌、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、嗜麦芽窄食单胞菌按《全国临床检验操作规程》进行鉴定后传代培养获得. 标准菌株: 金黄色葡萄球菌 ATCC25923、大肠埃希菌 ATCC25922、铜绿假单胞菌 ATCC27853. 所有菌株均由昆明市第一人民医院检验科微生物室提供.

1.2 主要试剂

PCR 反应试剂、DNA Marker #SM0301、溴酚蓝为 Fermentas 公司产品; 溶菌酶为 Solarbio 公司产品; 琼脂糖为 Santaibio 公司; 氢氧化钠(分析纯)为上海化学试剂总厂产品; TAE 缓冲液为上海创赛科学仪器有限公司产品; DNA 提取液为广州中山达安基因股份有限公司产品; 溴化乙锭为上海前尘生物公司产品; 引物由上海生物工程技术有限公司合成.

1.3 主要仪器

MicroScan Walk Away-40 微生物鉴定药敏系统; Gel Doc 2000TM 凝胶成像分析系统、MyCycler, Bio-RadPCR 扩增仪; Heraeus 低温高速离心机二氧化碳培养箱; Milipore 超纯水机; Power PAC 3000 电泳仪; 电热恒温水浴箱; 漩涡振荡器; 麦氏比浊管; 电子天平等.

1.4 主要试剂的配置

20 mmol/L NaOH 溶液: 0.8 g 氢氧化钠加入 1L 双蒸水, 充分溶解, 高压蒸汽灭菌, 冷却后置 4 °C 冰箱保存.

1.5 方法

1.5.1 浓度梯度菌液的制备 严格按照无菌操作要求, 用接种环从固体培养基上挑取分离的单个菌落, 放入盛有 1 mL 生理盐水的离心管, 用漩涡振荡器混合均匀; 根据麦氏比浊法调整起始浓度为 0.5 个麦氏单位 (1.5×10^8 CFU/mL), 10 倍稀释法系列稀释至 1.5×10^1 CFU/mL.

1.5.2 引物 目的菌株特异性引物中有 8 对为本实验室前期研究中所设计, 肺炎克雷伯菌引用参考文献^[3]提供的 16S-23S rRNA 间隔区引物. 引物特异性在前期研究中已获得确证^[4]. 各引物特征见表 1.

表 1 9 种临床常见病原菌 PCR 扩增种特异性引物特征

Tab. 1 The characteristics of specific primers for PCR of 9 common pathogenic bacteria

引物名称	产物大小	基因	Tm 值	GeneBank 系列号
sau-F	330 bp	nuc	58.04	DQ507382
sau-R			57.31	
sep-F	200 bp	gseA	59.83	AB096695
sep-R			57.12	
efa-F	215 bp	ddl	59.96	AB186053
efa-R			59.93	
efm-F	186 bp	ddl	59.70	FJ767775
efm-R			60.11	
eco-F	426 bp	16S rRNA	60.02	EU130557
eco-R			60.04	
pae-F	191 bp	gyrB	60.40	EF064840
pae-R			60.11	
aba-F	221 bp	16S-23S rRNA	60.82	BCRC10591
aba-R			58.63	
pma-F	122 bp	gyrB	59.97	AM743169
pma-R			60.12	
kpn-F	260 bp	16S-23S rRNA	59.93	DQ399556
kpn-R			59.12	

1.6 病原菌 DNA 的提取方法

1.6.1 碱液加热裂解法 取配置好的菌液 1 mL, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加入 20 mmol/L 的 NaOH 溶液 100 μ L, 混匀, 煮沸 10 min, 置 4 $^{\circ}$ C 冰箱中 30 min; 12 000 r/min 离心 10 min, 上清液用于 PCR 扩增.

1.6.2 溶菌酶法 取配置好的菌液 1 mL, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加入 20 mg/mL 的溶菌酶 40 μ L, 混匀, 置 37 $^{\circ}$ C 电热恒温水箱孵育 30 min; 加入 DNA 提取液 40 μ L, 混匀, 煮沸 10 min, 置 4 $^{\circ}$ C 冰箱中 30 min; 12 000 r/min 离心 10 min, 上清液用于 PCR 扩增.

1.6.3 商品 DNA 提取液法 取配置好的菌液 1 mL, 12000 转离心 10 min, 弃上清, 加入 DNA 提取液 50 μ L, 混匀, 煮沸 10 min, 置 4 $^{\circ}$ C 冰箱中 30 min; 12 000 r/min 离心 10 min, 上清液用于 PCR 扩增.

1.7 PCR 扩增及其产物分析

1.7.1 PCR 反应体系 PCR 反应体系 25 μ L: 10 \times Taq buffer 2.5 μ L, 25 mM 的 MgCl₂ 2.5 μ L, 10 mM 的 dNTP 1 μ L, 20 mM 的上、下游引物各 1 μ L, Taq DNA 聚合酶 1 U, 模板 DNA 2 μ L, 双蒸水补足 25 μ L^[4].

1.7.2 PCR 扩增条件 预变性 95 $^{\circ}$ C 3 min; 变性 95 $^{\circ}$ C 45 s, 退火 53 $^{\circ}$ C 30 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 45 s, 30 个循环; 后延伸 72 $^{\circ}$ C 5 min^[4].

1.7.3 琼脂糖凝胶的制备、电泳以及产物的检测与分析 配制浓度为 2% 的琼脂糖凝胶, 取 6 μ L PCR 扩增产物上样, 100 伏特电压电泳 40 min, 凝胶成像系统观察与分析电泳结果.

2 结果

2.1 3 种方法对不同病原菌基因组 DNA 的提取效果

用碱液加热裂解法、溶菌酶法和商品 DNA 提取液法 3 种方法同时提取标准菌株和 9 种临床分离的目的菌株基因组 DNA, 并进行普通 PCR 扩增. 扩增产物凝胶电泳结果见图 1~3.

商品 DNA 提取液法提取革兰阴性菌 DNA 的样本, 经特异性引物扩增后得到特异性目的片段, 但对革兰阳性菌未得到相应的 PCR 扩增产物. 溶菌酶法和碱液加热裂解法对革兰阳性菌和革兰阴性菌的基因组 DNA 提取效果相同.

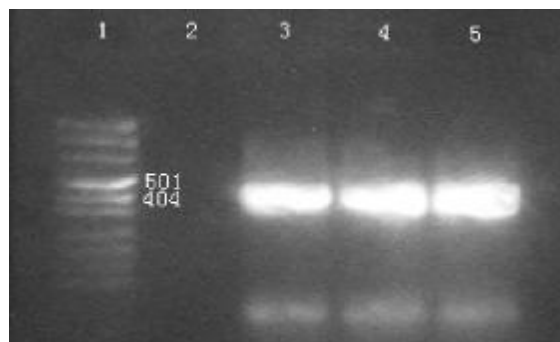


图 1 3 种方法提取大肠埃希菌 DNA 的 PCR 扩增产物 (426 bp) 电泳结果

Fig. 1 The electrophoresis of PCR products from *Escherichia coli* DNA extracted by three methods

1:DNA Marker #SM0301; 2:空白对照; 3:商品 DNA 提取液法提取大肠埃希菌基因组 DNA; 4:溶菌酶法提取大肠埃希菌基因组 DNA; 5:碱液加热裂解法提取大肠埃希菌基因组 DNA.

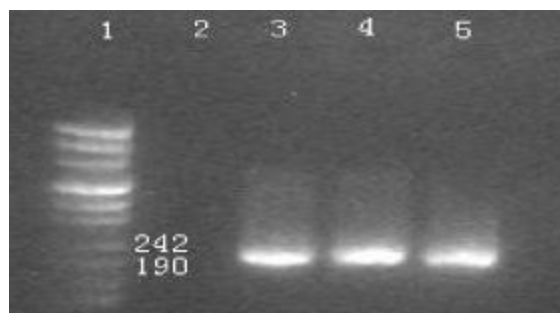


图 2 3 种方法提取鲍曼不动杆菌 DNA 的 PCR 扩增产物 (221 bp) 的电泳结果

Fig. 2 The electrophoresis of PCR products from *Acinetobacter baumannii* DNA extracted by three methods

1:DNA Marker #SM0301; 2:空白对照; 3:商品 DNA 提取液法提取鲍曼不动杆菌基因组 DNA; 4:溶菌酶法提取鲍曼不动杆菌基因组 DNA; 5:碱液加热裂解法提取鲍曼不动杆菌 DNA.

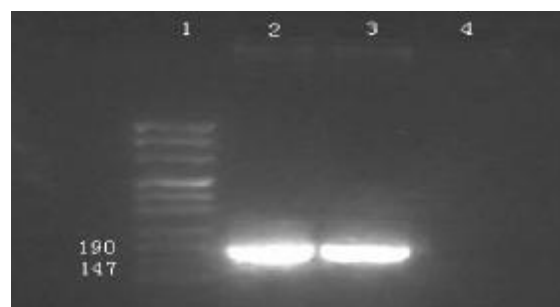


图 3 3 种方法提取屎肠球菌 DNA 的 PCR 扩增产物 (186 bp) 的电泳结果

Fig. 3 The electrophoresis of PCR products from *Enterococcus faecium* DNA extracted by three methods

1:DNA Marker #SM0301; 2:溶菌酶法提取屎肠球菌基因组 DNA; 3:碱液加热裂解法提取屎肠球菌基因组 DNA; 4:商品 DNA 提取液法提取屎肠球菌基因组 DNA.

2.2 碱液加热裂解法和溶菌酶法对革兰阳性菌 DNA 提取的灵敏度

用碱液加热裂解法和溶菌酶法分别对不同浓度菌液进行 DNA 提取, 并进行普通 PCR 扩增验证 DNA 提取效果, 结果如图 4、图 5, 碱液加热裂解法较溶菌酶法能提取到更低浓度菌液中的细菌基因组 DNA。

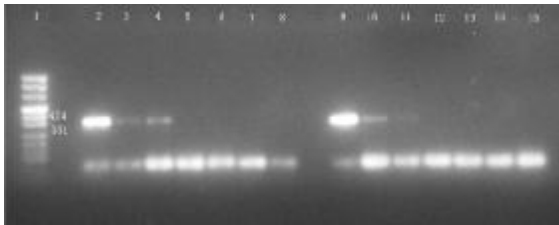


图 4 碱液加热裂解法和溶菌酶法提取不同浓度金黄色葡萄球菌菌液 DNA 的 PCR 扩增产物 (330 bp) 电泳结果

Fig. 4 The electrophoresis of PCR products from *Staphylococcus aureus* DNA extracted by alkali / heat lysis, lysozyme digestion

1:DNA Marker #SM0301; 2~8:碱液加热裂解法提取金黄色葡萄球菌系列稀释的菌液; 9~15:溶菌酶法提取金黄色葡萄球菌系列稀释的菌液; 2 和 9 菌液浓度为 10^7 CFU/mL, 3 和 10 菌液浓度为 10^6 CFU/mL, 4 和 11 菌液浓度为 10^5 CFU/mL, 5 和 12 菌液浓度为 10^4 CFU/mL, 6 和 13 菌液浓度为 10^3 CFU/mL, 7 和 14 菌液浓度为 10^2 CFU/mL, 8 和 15 菌液浓度为 10^1 CFU/mL。



图 5 碱液加热裂解法和溶菌酶法提取不同浓度粪肠球菌 DNA 的 PCR 扩增产物 (215 bp) 电泳结果

Fig. 5 The electrophoresis of PCR products from *Enterococcus faecalis* DNA extracted by alkali / heat lysis, lysozyme digestion

1:DNA Marker #SM0301, 2:空白对照; 3~6:碱液加热裂解法提取不同浓度粪肠球菌 DNA; 7~10:溶菌酶法提取不同浓度粪肠球菌 DNA. 3 和 7 菌液浓度为 10^7 CFU/mL 的, 4 和 8 菌液浓度为 10^6 CFU/mL, 5 和 9 菌液浓度为 10^5 CFU/mL, 6 和 10 菌液浓度为 10^4 CFU/mL。

3 讨论

临床样本含菌量少、标本量有限以及样本中 PCR 反应抑制剂的存在, 阻碍着 PCR 技术在临床感染性疾病病原学诊断中的广泛应用, 因此需要一种高效、快速的提取方法应用于临床样本中细菌 DNA 的提取。

碱液加热裂解法组合碱裂解法和煮沸法, 利用 DNA 在不同温度下变性与复性的特点以及蛋白质在碱性与高温条件下变性沉淀的特性, 通过碱破坏细胞壁提取细菌基因组 DNA^[5]。

本研究比较了碱液加热裂解法、溶菌酶法和商品 DNA 提取液法 3 种方法对病原菌 DNA 的提取效果, 用 PCR 扩增产物凝胶电泳结果进行验证。结果显示, 商品 DNA 提取液法对革兰阳性菌进行 DNA 提取, 经 PCR 扩增未检测到目的扩增产物。碱液加热裂解法和溶菌酶法提取细菌基因组 DNA, 经 PCR 扩增均检测到目的扩增产物, 提示后 2 种方法均不仅适用于革兰阴性菌, 也能用于革兰阳性菌; 但碱液加热裂解法较溶菌酶法能提取到更低浓度菌液中的细菌基因组 DNA, 提示碱液加热裂解法的提取效果优于溶菌酶法; 而且碱液加热裂解法耗时短, 操作简单、成本较低。因此, 在后续研究中, 采用碱液加热裂解法提取菌血症样本中的细菌基因组 DNA。

[参考文献]

- [1] 王华,熊仁平. 简单快速的血中DNA提取纯化法[J]. 第三军医大学学报,2003,25(11):1 020 - 1 021.
- [2] 姚虹,吕治,苏建荣. 不同方法提取阴道加德纳菌细菌基因组DNA 的比较[J]. 中国实验诊断学杂志,2011,1 (15):123 - 125.
- [3] 余道军,童文娟,陈岳明,等. 临床标本细菌基因组 DNA 提取方法探讨[J]. 中国微生物学杂志,2007,19 (6):519 - 523.
- [4] 陈弟. 多重实时荧光PCR检测临床常见病原菌方法的建立[D]. 昆明:昆明医科大学,2010.
- [5] LIU Y,LIU C,ZHENG W,et al. PCR detection of *Klebsiella pneumoniae* in infant formula based on 16S-23S internal transcribed spacer [J]. Int J Food Microbiol, 2008, 125(3):230 - 235.

(2014-02-15 收稿)