

食品中致病菌总 DNA 快速提取方法比较

熊丽莎¹, 程月花¹, 陆利霞^{1,2*}, 游京晶^{1,2}, 熊晓辉^{1,2}

(1. 南京工业大学食品与轻工学院, 江苏南京 210009; 2. 江苏省食品安全快速检测公共技术服务中心, 江苏南京 210009)

摘要 比较近年来国内外传统的和新的或改进的 DNA 提取方法; 物理提取方法(煮沸法、反复冻融法、超声法)、化学提取方法(CTAB 法、chelex-100 法、SDS 法)、酶法及复合提取法的优缺点, 并重点阐述了存在的问题。

关键词 食品; 致病菌; DNA 提取

中图分类号 S182 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)34-13392-03

Comparison of the Rapid DNA Extraction Methods of Pathogenic Bacteria from Food Samples

XIONG Li-sha et al (College of Food Science and Light Industry, Nanjing University of Technology, Nanjing, Jiangsu 210009)

Abstract Several new or improved DNA extraction methods at home and abroad in recent years were summarized, such as physical methods (boiling, ultrasonic methods), chemical methods (Cetyltrimethyl Ammonium Bromide, Resins chelex-100 and SDS methods), enzyme and compound methods of DNA extraction. The advantages and disadvantages of the technique were discussed, the existing problems were elaborated.

Key words Food; Pathogenic bacteria; DNA extraction

在食品致病菌检测技术中, 以致病菌的基因组为检测目标物的方法可保证较高的灵敏性与准确性。聚合酶链式反应(PCR)技术、基因芯片技术等可对多种靶基因同时检测和鉴定, 以其快速、高通量、平行化等其他技术无法比拟的优势, 得到广泛的应用^[1], 而 PCR、基因芯片等检测技术的前提就是模板 DNA 的获取, 直接影响检测结果。因此, 许多学者一直在探索 DNA 的提取方法。目前模板 DNA 提取方法主要包括物理提取(煮沸、冻融、微波、超声、颗粒破碎等)^[2]、化学提取法[十二烷基硫酸钠(SDS)、Trixon、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、螯合树脂、吐温 20 等]、酶法(蛋白酶 K、溶菌酶、植物蛋白酶等)及组合方法等。最常用的 DNA 纯化方法是酚氯仿抽提(Phenol-chloroform extraction)/醇沉淀和介质纯化。酚氯仿抽提具有稳定、可靠、经济等特点, 是去除蛋白质的一种非常有效的方法。介质纯化是利用某些固相介质选择性吸附, 使得 DNA 与蛋白质及其他杂质分离。食品中致病菌 DNA 的提取不仅需要获得一定的量, 保证细胞充分破裂, 同时需要去除食品中蛋白质、多糖、盐等杂质对后续检测反应过程的干扰。长期以来, 样本中 DNA 的提取是一项耗时、繁琐的工作, 影响检测速度。为此, 笔者总结了近年来几种快速、高效的 DNA 提取方法。

1 物理提取方法

1.1 煮沸提取 煮沸法是提取 DNA 比较经典的方法之一, 一般用于 DNA 的手工提取, 分为一步法和两步法。一步法得到的 DNA 还有较多小分子抑制物。两步法是第一步在样本中加入沉淀剂后离心弃上清, 以去除小分子抑制剂并沉淀病毒颗粒; 第二步加入裂解液后煮沸, 以释放 DNA 以及沉淀残留蛋白质等大分子抑制剂, 离心取上清即可得到 DNA。Soumet C 等^[3]用煮沸方法提取 14 个属的革兰阴性菌(大肠

杆菌等)和阳性菌(金黄色葡萄球菌等)的 DNA, 均能成功用于 16S rRNA 基因的 PCR 扩增, 目的片段大小约为 1.5 kb, 并且煮沸时间可以缩短至 5 min 即可提取得到 DNA。张祥等^[4]通过比较常规水煮和改良水煮方法即加入丙酮重悬细菌, 破坏细胞壁的脂质结构, 再结合溶菌酶破壁和蛋白酶 K 消化蛋白, 结果是 2 种方法提取的 DNA 都可以用于 16S rRNA 基因序列 PCR 和种属鉴定多重 PCR, 且效果相同, 但改良方法提取量不如常规水煮方法, 且操作繁琐, 损耗试剂。该实验室采用煮沸法提取金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、副溶血性弧菌的 DNA, 均可以提取, 且对于肉制品中的这 3 类菌也可以提取 DNA。煮沸方法快速、简便、经济, 但提取量少, 难以保证 DNA 充分裂解。

1.2 超声提取 超声破碎通过超声波细胞破碎仪破碎细胞, 使 DNA 释放, 提取的 DNA 片段长度可大于 20 kb。P. Belgrader 等^[5]试验表明, 对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌超声波破碎法破碎率可达 97% 以上, 且所需时间为 30 ~ 50 min。M. T. Taylor 等^[6]研究发现, 采用超声法可对细菌的芽孢具有一定的裂解作用, 从而利于 DNA 提取。但其强度过于激烈, DNA 容易发生断裂。因而超声法较少采用。

物理方法具有经济、简便、快速等优点, 提取过程始终在同一管中进行, 不用转移, 可减少 DNA 的损失及污染的机会, 但提取获得的 DNA 纯度不高。

2 化学提取方法

2.1 CTAB 法 CTAB 是一种阳离子去污剂, 能与核酸形成复合物, 该复合物在高盐(0.7 mol/L 氯化钠)浓度下可溶解并稳定存在, 但在低盐浓度(0.1 ~ 0.5 mol/L 氯化钠)下, CTAB—核酸复合物就因溶解度降低而沉淀, 而大部分的蛋白质及多糖仍溶解于溶液中。通过离心将 CTAB—核酸复合物溶于高盐溶液中, 用异丙醇/无水乙醇沉淀核酸, 即可得到核酸提取物。由于 CTAB 可从含多糖的裂解体系中将核酸沉淀下来, 所以对于含糖量较高的样品可优先选择。

CTAB 法是目前应用最多的 DNA 提取方法^[7-8], 也是多

基金项目 “十二五”农村领域国家科技计划课题(2013BAD19B09); 江苏省科技基础设施建设计划(BM2012026)。

作者简介 熊丽莎(1990-), 女, 江西丰城人, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全检测。* 通讯作者, 副教授, 从事食品安全和微生物方面的研究。

收稿日期 2013-11-05

个国家、行业标准中指定的 DNA 提取方法。但传统的 CTAB 法提取 DNA 操作繁琐、步骤多达 8 步。且多次转移, DNA 损失量大, 已无法满足多数食品样品 DNA 的提取。目前国内有不少改良 CTAB 方法, 从不同程度提高了提取效果。周彤等^[7]从初始取样量、裂解时间、沉淀时间和 RNA 酶作用 4 个方面对肉类样品微生物总 DNA 提取率以及 RT-PCR 结果的影响进行研究。最终确定初始取样量应该小于 0.05 g、裂解时间和沉淀时间均为 0.5 h、不添加 RNA 酶为最佳, 改良后的 CTAB 方法更加快速、准确、规范。Petya Stefanova^[8]等通过对比改良 CTAB 法与 3 种 DNA 商业试剂盒方法提取大豆和肉类微生物 DNA 比较发现, 改良 CTAB 方法提取的 DNA 浓度和纯度最高, 改良 CTAB 法中加大了 CTAB 的浓度至 2%, 在抽提前加入 RNA 酶且温育 10 min, 减少了 DNA 的损失。使得提取的 DNA 浓度从 114.98 ng/mg 上升到 314.47 ng/mg。

CTAB 法目前虽已相对成熟、稳定, 但由于操作繁琐、耗时长, 且酚、氯仿等有机溶剂易造成环境污染等问题, 在使用上受到一定的限制。

2.2 chelex-100 螯合树脂法 Chelex-100 树脂悬液可在低离子强度、碱性 (pH10~11) 及煮沸条件下导致细胞膜破裂、蛋白质变性、DNA 游离, 同时结合许多可能影响下一步分析的其他外源物质, 且 Chelex-100 颗粒可通过离心去除, 不影响需 Mg^{2+} 的 PCR 反应。离心取上清即可得到 DNA 模板。具有经济、简便、高效等优点, 但用该方法提取的仅是 DNA 的粗制品。近年来 Chelex-100 螯合树脂法已被广泛用于食品 DNA 的提取^[9-12]。

钱雪琴等^[11]用 chelex-100 方法对金黄色葡萄球菌浓度低至 10^5 cfu/ml 和大肠杆菌浓度低至 10^6 cfu/ml 提取 DNA, 所得 DNA 可用于 PCR 扩增。Lourdes 等^[13]结合微波破碎方法和常规 chelex-100 法提取不同革兰阳性菌 DNA, 并且加入了蛋白酶 K 和 RNase 酶使得整个提取过程低于 20 min。蛋白酶 K 的作用是在微波过程中的旋转和碰撞中导致细胞破碎, 从而释放出 DNA。Chelex-100 提取方法具有经济、简便、快速、无污染等优点, 特别适用于微量生物样品的处理, 提取过程始终在同一管中进行, 无需转移, 可减少 DNA 的损失及污染的机会, 但产物纯度不高。

2.3 十二烷基磺酸钠 (SDS) 法 作为传统的提取方法, SDS 法被广泛用于动植物 DNA 的提取, 但该方法对于多糖含量高的植物提取效果不佳。Moushumi Paul^[13]等提取生牛奶中大肠杆菌 O157:H7 的 DNA 并用实时定量 PCR 检测其灵敏度, 整个提取检测过程低于 3 h。检测限为 1 cfu/ml。Feng Guangda^[14]等以 14 个属的革兰阴性菌和阳性菌为研究对象, 采用 16S rRNA 基因 PCR 扩增对 4 种细菌 DNA 提取法进行了比较。结果表明, 结合冻融法和 SDS 法既能有效提取 DNA, 又可节省成本和时间, 且减少提取过程中有机废弃物的产生。SDS 法及其改良法都能取得较好的效果且比较经济, 但操作步骤繁琐、试剂种类多且使用了苯酚氯仿等有毒试剂, 而其改良方法只是针对试剂用量, 步骤依旧繁琐, 难以

适合所有食品 DNA 的提取。

3 酶处理方法

该法是在食品样品 DNA 提取过程中, 通过加入适当的溶菌酶或蛋白酶使细胞破裂^[15], 使不需要的物质降解, 以利于 DNA 的分离纯化。如在裂解液中加入蛋白酶 (如蛋白酶 K) 可以降解与核酸结合的蛋白质, 灭活核酸酶 (DNase 和 RNase)。蛋白酶 K 能催化水解多种多肽键, 其在 65 °C 以及有 EDTA、尿素 (1~4 mol/L) 和去污剂 (0.5% SDS 或 1% TritonX-100) 存在时仍保留酶活性, 这有利于提高高分子核酸的提取效率。加入溶菌酶能催化细菌细胞壁的蛋白多糖 N-乙酰葡糖胺和 N-乙酰胞壁酸残基间的 β -(1,4) 键水解。丁小云等^[16]等为了解不同细胞破壁方法对大肠杆菌总 DNA 提取效果的影响, 分别采用 CTAB/溶菌酶/蛋白酶 K 法、溶菌酶/SDS 法、CTAB/SDS 3 种法对大肠杆菌进行破壁提取 DNA, 结果 3 种方法都可以从大肠杆菌中提取到分子量大于 21.2 kb 的 DNA 片段, 1 ml 菌液 DNA 的提取量为 14.3~43.6 μ g。Gordillo R. 等^[17]采用溶菌酶—蛋白酶 K 法提取肉样中大肠杆菌 DNA, 利用双重 PCR 扩增结果判断所得 DNA 样品的质量。结果发现溶菌酶蛋白酶 K 法提取的 DNA 模板检出限为 1.25×10^2 CFU/ml, 该方法提取的基因组 DNA 适用于 PCR 扩增和其他分子生物学研究。

4 其他方法

4.1 试剂盒法 该法主要是通过裂解液将细胞破碎, 细胞破碎后, 使用吸附材料结合方法去除杂质和纯化 DNA, 主要有硅基质材料、阴离子交换树脂和磁珠等。因硅基质材料可特异吸附核酸 DNA, 使用方便、快捷, 不需要使用有毒溶剂如酚、氯仿等, 使得提取基因组像过滤一样简单, 因此硅基质材料成为大规模分离纯化 DNA 的通用方法, 采用硅基质膜吸附的 DNA, 可将 DNA 在低盐高 pH 值条件下洗脱下来。pH 值在 7.0~8.5 之间洗脱效率较高, pH 值低于 7.0 则洗脱效率很低。一般基因组提取试剂盒中的洗脱缓冲液就是 TE (pH 8.0), 既为 DNA 从硅基质膜上洗脱下来提供良好的 pH 环境, 其中的 EDTA 又能保证 DNA 不被 DNase 降解, 同时由于 EDTA 浓度非常低, 对核酸内切酶、DNA 聚合酶的影响非常微弱, 不影响后续试验, 可放心使用。试剂盒方法具有操作简便、结果稳定、高效的特点, 备受研究者的青睐。目前国内已开发了多种商品化的转基因食品 DNA 提取纯化试剂盒^[18-20]。近年来研究了一种磁珠法提取 DNA 试剂盒^[18], 采用纳米、分子生物和医学的综合手段。该试剂盒更为简便、迅速, 转移离心管的次数少, 在 DNA 纯化、微量建库以及 PCR 扩增上效果好。Claassen S 等^[19]用 5 种商业试剂盒提取粪便样品 DNA, 并通过荧光 PCR、T-RLFP 等检测方法, 均取得很好的效果。

4.2 DNA 提取微芯片 随着 PCR 芯片及微机电系统 (MEMS) 发展, DNA 微流芯片、微 DNA 传感器类产品不断开发^[21]。DNA 提取微芯片是将细胞裂解、纯化、扩增及检测在一张微流芯片上完成, 使用体积小、试剂使用量少、样品需要量少及自动化、整体化提高。在微流芯片上采用煮沸、酶法、

CTAB 法均不适用。Lee 等^[22]采用激光射线磁珠体系(LIMBS)对大肠杆菌及金黄色葡萄球菌进行细胞裂解,并用荧光定量 PCR 分析了所提取的 DNA。研究发现,采用激光法可有效杀死试验病原菌,并释放出 DNA,再结合磁珠可有效纯化 DNA。该方法也可采用微流芯片法实现快速提取 DNA,检测致病菌的目的。该法可检测大肠杆菌的浓度为 1×10^4 个/ml。Cichova 等^[23]采用裂解液 1% triton X 结合 5% chelex 树脂进行微流芯片法提取沙门氏菌、粪大肠杆菌及枯草芽孢杆菌 DNA,并采用荧光定量 PCR 分析了所提取的 DNA。发现裂解液 triton X 结合 chelex 树脂可有效裂解细胞,且可以裂解芽孢。该法可检测沙门氏菌的浓度为 1×10^3 CFU/ml。采用该微流芯片可实现 20 min 内快速检测致病菌。

微芯片可以快速完成 DNA 的提取,易于与其他芯片(如 PCR 芯片等)整合,具有很好的发展前景。微芯片法可以使 DNA 的纯度和产量得到提高,而且能够大批量进行提取,但是用于提取 DNA 的成本较高。

5 总结

食品样品中的 DNA 提取方法各不相同,但主要原理都是破裂细胞、去除蛋白质及多糖、纯化 DNA。综上所述,各种提取方法各有优缺点,如何快速、经济有效地从各种食品样本中提取高纯度、高产量的 DNA 已经成为 PCR 等检测技术研究发展的主要问题。不同食品样品的 DNA 结合蛋白或其他杂质的情况各不相同,所含的致病微生物浓度也不一样,因而选用快速有效的提取方法尤为重要。由于样品本身各自的特性,在选择 DNA 提取方法实际工作中,物理方法、化学方法以及酶方法经常联合使用,具体选择哪种或哪几种方法需要根据细胞类型、待分离的核酸以及是否满足后续 PCR 或是其他快速检测方法的试验目的来确定适合的方法。DNA 提取技术中裂解充分,提取快速、经济、简便,使用无毒试剂且能有效去除 PCR 反应抑制剂等,已成为食品 DNA 提取的发展趋势。

参考文献

- [1] BRYANT P A, VENTER D, ROBINS B R, et al. Chips with everything: DNA microarrays in infectious disease[J]. *Lancet Infect Dis*, 2004, 4(2): 100 - 111.
- [2] 萨姆布鲁克, D W 拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2005.
- [3] SOUMET C, ERMEL G, FACH P, et al. Evaluation of different DNA extraction procedures for the detection of Salmonella from chicken products by polymerase chain reaction[J]. *Lett Appl Microbiol*, 1994, 19: 294 - 298.
- [4] 张祥, 李晓博, 谷素美, 等. 不同肠球菌基因组 DNA 提取方法对 PCR 鉴

定的影响[J]. *河南农业大学学报*, 2012, 46(1): 67 - 71.

- [5] BELGRADER P, HANSFORD D, NORTHRUP G T A. A minisonicator to rapidly disrupt bacterial spores for DNA analysis[J]. *Anal Chem*, 1999, 71: 4232 - 4236.
- [6] TAYLOR M T, BELGRADER P, FURMAN B J, et al. Lysing bacterial spores by sonication through a flexible interface in a microfluidics system[J]. *Anal Chem*, 2001, 73: 492 - 496.
- [7] 周彤, 李家鹏, 田寒友, 等. 一种提取肉类总 DNA 的方法——改良 CTAB 法[J]. *肉类研究*, 2011, 25(12): 22 - 24.
- [8] STEFANOVA P, TASEVA M, GEORGIEVA T, et al. A modified ctab method for dna extraction from soybean and meat products[J]. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2013, 27(3): 3803 - 3810.
- [9] BOGAS V, BALSAL F, CARVALHO M, et al. Comparison of four DNA extraction methods for forensic application[J]. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 2011, 3(1): 194 - 195.
- [10] PHILLIPS K, MCCALLUM N, WELCH L. A comparison of methods for forensic DNA extraction: Chelex-100(R) and the QIAGEN DNA Investigator Kit (manual and automated) [J]. *Forensic Science International-Genetics*, 2012, 6(2): 282 - 285.
- [11] 钱雪琴, 张军, 沈芳. Chelex-100 法和碱性裂解法提取细菌 DNA 的比较[J]. *中国卫生检验杂志*, 2008, 18(8): 1565 - 1566.
- [12] REYES-ESCOGIDO L, BALAM-CHI M, RODRÍGUEZ-BUENFIL I, et al. Purification of bacterial genomic DNA in less than 20 min using chelex-100 microwave: examples from strains of lactic acid bacteria isolated from soil samples[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2010, 98(4): 465 - 474.
- [13] PAUL M, VAN HEKKEN D L, BREWSTER J D. Detection and quantitation of *Escherichia coli* O157 in raw milk by direct qPCR[J]. *International Dairy Journal*, 2013, 32(2): 53 - 60.
- [14] GUANG D F, MEI B C, SONG Z Y, et al. A comparative study on bacteria DNA extraction methods used for PCR amplification[J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2013, 34(3): 439 - 442.
- [15] 任晓东, 李一松, 姜毓君. 优化金黄色葡萄球菌基因组 DNA 的提取方法[J]. *东北农业大学学报*, 2009, 40(1): 92 - 96.
- [16] 丁小云, 耿俊丽, 魏成熙. 不同破壁方法对大肠杆菌 DNA 提取的影响[J]. *贵州农业科学*, 2010(4): 149 - 150.
- [17] GORDILLO R, CÓRDOBA J J, ANDRADE M J, et al. Development of PCR assays for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in meat products[J]. *Meat Science*, 2011, 88: 767 - 773.
- [18] 李旭新. 一种采取磁珠法提取病毒 DNA 或 RNA 的试剂盒及其使用方法: 中国, 201310105457.4[P]. 2013.
- [19] CLAASSEN S, DU TOIT E, KABA M, et al. A comparison of the efficiency of five different commercial DNA extraction kits for extraction of DNA from faecal samples[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2013, 94(2): 103 - 110.
- [20] GORDILLO R, RODRÍGUEZ A, MARÍA L, et al. Quantification of viable *Escherichia coli* O157:H7 in meat products by duplex real-time PCR assays[J]. *Meat Science*, 2014, 96(2, Part A): 964 - 970.
- [21] KWAKYE S, GORAL V N, BAEUMNER A J. Electrochemical microfluidic biosensor for nucleic acid detection with integrated minipotentostat[J]. *Biosens Bioelectron*, 2006, 21: 2217 - 2223.
- [22] JEONG-GUN LEE, KWANG HO CHEONG, NAM HUH, et al. Microchip-based one step DNA extraction and real-time PCR in one chamber for rapid pathogen identification[J]. *Lab Chip*, 2006, 6: 886 - 895.
- [23] MARIANNA CÍCHOVÁ I, MILOSLAVA PROKŠOVÁ, LÍVIA TÓTHOVÁ, et al. On-line cell lysis of bacteria and its spores using a microfluidic biochip[J]. *Central European Journal of Biology*, 2012, 7(2): 230 - 240.

(上接第 13391 页)

- [5] BERARDINI N, FEZER R, CONRAD J, et al. Screening of mango (*Mangifera indica* L.) cultivars for their contents of flavonol O- and xanthone C-glycosides, anthocyanins, and pectin [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(5): 1563 - 1570.
- [6] 李琳, 姜新发, 张志斌, 等. 枇杷皮和芒果皮粗提液抗氧化活性研究[J]. *电子科技大学学报*, 2003, 32(6): 168 - 172.
- [7] 向海燕, 刘颖台, 戴开金. 芒果废弃物不同部位乙醇提取物 DPPH 自由基清除能力的研究[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(2): 689 - 691.
- [8] 徐志, 吴莉宇. 芒果皮萃取物在抗食品病原微生物中的应用[J]. *华南热带农业大学学报*, 2002, 8(4): 11 - 14.
- [9] 廖洪利, 苏春丽, 胡小兰, 等. 芒果苷药理研究新进展[J]. *药学实践杂*

志, 2008, 26(3): 161 - 162.

- [10] RODRIGO I, DELGADO R, GARRIDO G. Effects of a *Mangifera indica* L. stem bark extract and mangiferin on radiation-induced DNA damage in human lymphocytes and lymphoblastoid cells[J]. *Cell Proliferation*, 2014, 47(1): 48 - 55.
- [11] 覃丽俭, 吴长兴, 吴莉宇. 芒果皮不同萃取物的抑菌活性初探[J]. *热带农业科学*, 2007, 27(2): 21 - 25.
- [12] 李春美, 田燕, 钟慧臻, 等. 芒果核提取物的抑菌组份研究[J]. *食品工业科技*, 2011, 32(3): 172 - 174, 177.
- [13] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001.
- [14] 尹峰, 胡立宏, 楼凤昌. 罗勒化学成分的研究[J]. *中国天然药物*, 2004, 2(1): 20 - 23.