

• 论 著 •

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 DNA 提取方法的改进*

金 姝^{1,2}, 邹玉涵^{1,2}, 闫佩毅^{1,2}, 黄德魁^{2,3}, 张 骥^{1,2,△}

(1. 上海市普陀区人民医院检验科, 上海 200060; 2. 安徽医科大学上海普陀临床学院, 上海 200060; 3. 上海市普陀区人民医院心内科, 上海 200060)

摘要:目的 研究适用于 PCR 法检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的核酸提取方法。方法 MRSA 在不同孵育条件下分别经含溶菌酶、溶葡萄球菌酶或 chelex100R 的裂解液裂解获得 DNA, 用 PCR 法检测目的基因。结果 同时使用溶菌酶、溶葡萄球菌酶、chelex100R 裂解得到的 DNA, 在用 PCR 法检测 mecA 基因时, 获得的循环阈值(Ct 值)明显低于其他组分的裂解液。采用 56 °C 一步法孵育裂解细菌的效果, 与 37、56 °C 二步法比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 但简化了步骤。结论 含溶菌酶、溶葡萄球菌酶、chelex100R 等的裂解液同时与细菌于 56 °C 孵育 30 min 的方法, 是获取 MRSA 细菌 DNA 既便捷又高效的方法, 可以立即用于下一步 PCR, 为 PCR 法快速检测临床 MRSA 感染奠定了基础。

关键词:耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 聚合酶链反应; 脱氧核糖核酸提取

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.03.006

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)03-0303-03

Improvement on DNA extraction method of methicillin resistant Staphylococcus aureus*

Jin Shu^{1,2}, Zou Yuhan^{1,2}, Yan Peiyi^{1,2}, Huang Dekui^{2,3}, Zhang Ji^{1,2,△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Putuo District of People's Hospital, Shanghai 200060, China; 2. Shanghai Putuo Clinical College, Anhui Medical University, Shanghai 200060, China; 3. Department of Cardiology, Putuo District of People's Hospital, Shanghai 200060, China)

Abstract: Objective To study a nucleic acid extraction method suitable for detecting methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) by PCR method. Methods Under different incubation conditions, MRSA was cracked by lysozyme, lysostaphin or chelex100R resin for obtaining DNA, then the target gene was detected by using the PCR method. Results DNA was obtained by simultaneously using lysozyme, lysostaphin and chelex100R resin solution, the obtained Ct value was significantly lower than that of the other components of schizolysis solutions when PCR was used to detect mecA gene of obtained DNA. There was no statistically significant difference between adopting the 56 °C one-step method and the 37 °C and 56 °C two-step method for conducting MRSA schizolysis ($P > 0.05$), but the steps were simplified. Conclusion Incubating MRSA in solution containing lysozyme, lysostaphin, chelex100R resin for 30 min at 56 °C is the convenient and efficient schizolysis method to extract DNA, which can be used immediately for the next step of PCR and lays the foundation for PCR rapid detection of clinical MRSA infection.

Key words: methicillin resistant Staphylococcus aureus; polymerase chain reaction; DNA extraction

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)在临床金黄色葡萄球菌中的分离率已超过 50%, 用分子生物学方法可以在数小时内对 MRSA 进行快速诊断^[1-2], 其灵敏度有赖于标本制备的效果^[3]。现有的酚/氯仿沉淀法、密度梯度离心法、离子交换层析法等步骤繁琐, 不适合用于日常大量标本的检测。为满足临床 MRSA 快速检测的要求, 本研究采用溶菌酶、溶葡萄球菌酶、蛋白酶 K 裂解细菌获取核酸, 同时采用 chelex100 树脂有效去除非核酸有机物, 并通过 PCR 法检测 MRSA 的耐药基因 mecA, 鉴定了一种优良的细菌裂解溶液和方法, 为 PCR 法快速检测 MRSA 奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 三羟甲基氨基甲烷(Tris)、Triton X-100、溶菌酶、溶葡萄球菌酶、蛋白酶 K 等均购自生工生物工程股份有限公司; Na₂-EDTA、弱阳离子螯合树脂(chelex100R)等购自 Sigma 公司; PCR 反应液 Premix Ex TaqTM (2×) 购自罗氏公司; 引物和探针均由上海基康公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细菌混悬液的准备 取临床分离的 MRSA 菌株 R92, 稀释至 2.0 麦氏单位, 浓度约 6×10^8 CFU/mL。每支试管取 0.5 mL (细菌约 3×10^8 CFU), 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清后加入裂解液。

1.2.2 裂解方法 方法 1: 细菌沉淀用 90 μL TEX 裂解液混悬, TEX 裂解液包括 20 mmol/L Tris (pH 8.0)、2 mmol/L Na₂-EDTA、1.0% (v/v) Triton x-100、20 mg/mL 溶菌酶(溶菌酶粉剂最后加入溶液中)。混悬液在 37 °C 孵育 30 min 后, 加入 20 mg/mL 的蛋白酶 K 溶液 10 μL, 56 °C 孵育 30 min 后, 100 °C 加热 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 2 μL 用于 PCR 反应。方法 2: 与方法 1 相似, 但无需 37 °C 孵育 30 min 的步骤。方法 3: 与方法 1 相似, 但裂解缓冲液中加入终浓度 5% (v/v) chelex100。方法 4: 与方法 2 相似, 但裂解缓冲液中加入终浓度 5% (v/v) chelex100。方法 5: 与方法 3 相似, 但裂解缓冲液中再加入 10 μL 1 mg/mL 的溶葡萄球菌酶(终浓度 0.1 mg/mL)。方法 6: 与方法 4 相似, 但裂解缓冲液中再加入 10 μL 1 mg/mL 的溶葡萄球菌酶(终浓度 0.1 mg/mL)。方

* 基金项目: 上海市普陀区卫生系统自主创新科研资助项目(普 KW11103)。 作者简介: 金姝, 女, 副主任检验师, 主要从事医学免疫学及分子检验研究。 △ 通讯作者, E-mail: zhangji196678@aliyun.com。

法 7:将 1.2.1 中的 6×10^8 CFU/mL 细菌混悬液用生理盐水依次 10 倍稀释至 6×10^1 CFU/mL, 每个浓度取 0.4 mL, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清后的细菌沉淀的处理与方法 2 相似, 但是裂解缓冲液中加入 $10 \mu\text{L}$ 1 mg/mL 的溶葡萄球菌酶。方法 8:与方法 7 相似, 但是裂解缓冲液中再加入 5%(v/v) chelex100。方法 9:方法 7 中获得的不同浓度的细菌沉淀, 用上海之江生物有限公司 MRSA 诊断试剂盒中的 DNA 提取试剂处理。

1.2.3 mecA 基因的 PCR 扩增体系 $20 \mu\text{L}$ 的反应体系为: Premix Ex Taq™ ($2 \times$) $10 \mu\text{L}$, $20 \mu\text{mol/L}$ 的上、下游引物各 $0.6 \mu\text{L}$, $20 \mu\text{mol/L}$ 的探针 $0.2 \mu\text{L}$, 模板 $2 \mu\text{L}$ (DNA 浓度为 $50 \sim 200 \text{ ng}$), H_2O $6.6 \mu\text{L}$ 。

1.2.4 mecA 基因的 PCR 扩增条件 $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 2 min, $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 10 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火及 PCR 反应 31 s, 共 40 个循环, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 s。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理及统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 孵育温度及步骤的确定 方法 1、3、5 采用 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 和 $56 \text{ }^\circ\text{C}$ 分别孵育 30 min [二步法, 循环阈值 (Ct) 值分别为 29.87 ± 2.71 、 19.55 ± 1.94 、 16.11 ± 1.44], 方法 2、4、6 采用 $56 \text{ }^\circ\text{C}$ 一次孵育 30 min (一步法, Ct 值分别为 29.30 ± 2.32 、 18.60 ± 1.75 、 15.77 ± 1.29)。按裂解液成分分组, 每组组内的一步法和二步法的结果差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 即方法 1 与 2、3 与 4、5 与 6 无差异。但一步法的 Ct 值普遍低于二步法, 说明细菌在 $56 \text{ }^\circ\text{C}$ 一次孵育 30 min 既简化了操作步骤, 也能获得较好的裂解效果, 细菌裂解液于 $56 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 30 min 能更简便地获取 MRSA 细菌 DNA 用于后续 PCR 检测。

2.2 裂解液组分的确定 方法 3、4 较方法 1、2 中增加了 chelex100, 明显降低了 PCR 反应的 Ct 值, 方法 5、6 在 3、4 基

础上增加溶葡萄球菌酶, PCR 反应的 Ct 值进一步降低。按裂解液分组, 每组组内的一步法和二步法均和另两组的 4 种方法差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。综合方法 1~6 的结果可见, 方法 5 和 6 裂解细菌获得的 DNA 能较早地检测到目的基因, 而方法 6 作为一步法最为简便。在裂解液中增加 chelex100R 和溶葡萄球菌酶获得的 DNA 有利于检测 mecA 基因。

2.3 裂解效果的线性验证 为了验证方法 6 对不同浓度 MRSA 的效果, 将 $3.0 \times 10^3 \sim 3.0 \times 10^7$ CFU 的 MRSA 用方法 6 裂解后, PCR 检测 mecA 基因, 见表 1、图 1 (见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。细菌浓度与检测的 Ct 值有良好的线性关系, $r^2 = 0.9816$ 。说明在细菌数量为 $3.0 \times 10^3 \sim 3.0 \times 10^7$ CFU 时, 方法 6 裂解细菌获得的核酸在 PCR 检测 mecA 基因时有较好的线性结果。

表 1 裂解效果的线性验证结果

细菌绝对数量(CFU)	细菌绝对数量的对数值	Ct 值
3.00×10^7	7.48	18.54
3.00×10^6	6.48	22.73
3.00×10^5	5.48	25.95
3.00×10^4	4.48	29.00
3.00×10^3	3.48	30.82

2.4 验证 chelex100R 树脂对细菌裂解效果的影响 前述方法中发现在含 chelex100R (方法 3、4) 的裂解液中再加入溶葡萄球菌酶 (方法 5、6), 明显降低了 PCR 反应的 Ct 值, 说明了溶葡萄球菌酶的作用。而在含溶葡萄球菌酶 (方法 7) 的裂解液中再加入 chelex100R 树脂 (方法 8) 也能够明显降低 Ct 值, 说明 chelex100R 树脂能增加检测灵敏度。同时方法 8 裂解后的细菌获得的 Ct 值也明显低于方法 9 的商品化试剂盒的裂解方法。见表 2。

表 2 3 种方法裂解 MRSA 后检测 mecA 基因时的 Ct 值 ($\bar{x} \pm s$, CFU)

方法	细菌数量				
	2.4×10^7	2.4×10^6	2.4×10^5	2.4×10^4	2.4×10^3
方法 7	$24.74 \pm 2.16^*$	$30.63 \pm 2.92^*$	$33.57 \pm 3.04^*$	$34.92 \pm 3.11^*$	$36.36 \pm 3.95^*$
方法 8	21.61 ± 2.27	25.37 ± 2.08	27.34 ± 2.13	29.80 ± 2.97	30.03 ± 2.41
方法 9	$24.09 \pm 2.66^*$	27.26 ± 2.37	$29.86 \pm 3.07^*$	$31.93 \pm 3.64^*$	$33.48 \pm 3.35^*$

*: $P < 0.05$, 相同细菌浓度下与方法 8 比较。

3 讨论

金黄色葡萄球菌属革兰阳性菌, 其细胞壁较厚 ($20 \sim 80 \text{ nm}$), 有 $5 \sim 15$ 层肽聚糖, 而革兰阴性菌细胞壁仅 $8 \sim 11 \text{ nm}$, 只有 $1 \sim 2$ 层肽聚糖。获取细菌核酸需要破坏细胞壁、降解蛋白、溶解脂质, 革兰阴性菌仅在 Tris 缓冲液中煮沸加热即可达到裂解细菌获取 DNA 的目的, 而单纯煮沸金黄色葡萄球菌无法破坏其细胞壁, 需要更有效的专一性酶来裂解。采用溶菌酶、溶葡萄球菌酶裂解细菌较煮沸法效果好^[3], 但煮沸裂解法也并没有对核酸进行沉淀及纯化, 溶液中复杂的成分不利于后续直接 PCR 反应。因此分子生物学方法检测 MRSA 的工作基础是基因组 DNA 的提取, 找到核酸提取操作的简便、快捷、价廉和高产的方法。

核酸提取的方法主要有以下几类, 包括煮沸裂解法、酚/氯

仿沉淀法、密度梯度离心法、离子交换层析法、硅膜吸附法和磁珠分离法等^[4]。其中酚/氯仿沉淀法、密度梯度离心法和离子交换层析法费时、繁琐、有机溶剂污染环境, 但核酸纯度高; 磁珠分离法成本高; 硅膜吸附法虽然成本相对低, 但步骤仍繁琐, 不适用于日常大量的检测。本研究在于快速获取适合于 PCR 反应的 MRSA DNA, 而且标本制备过程简单, 仅需加入裂解液后孵育、离心, 上清即可用于 PCR, 避免了繁琐的反复加液、离心、吸弃上清、洗涤等步骤, 最大程度地保留了所有细菌中的核酸。

本研究首次尝试了将溶菌酶、溶葡萄球菌酶、蛋白酶 K 和 chelex100R 树脂共同使用, 破坏细胞壁、降解蛋白、螯合溶液中的非核酸有机物和阳离子同时进行。有研究报道 chelex100R 树脂提取的 DNA 纯度和完整性虽不如有机 (下转第 307 页)

穿刺活检来完成,不利于病情的长期监测;并且在癌症早期,调控肝癌细胞增殖的相关基因也不会出现明显变化。相比穿刺活检,血清学指标检测的优势在于创伤小、可重复,并且在癌症发生的早期便会出现改变。如上所述,肝癌患者血清中 GP73、TK1、DKK1 水平异常升高。那么,上述血清学指标能否反映肝癌细胞的增殖能力及疾病的恶性程度呢?为了验证这一点,本研究对血清学指标与凋亡调节基因的相关性进行了分析,结果显示血清中 GP73、TK1、DKK1 水平与凋亡抑制基因的 mRNA 水平呈正相关;与促凋亡基因 MTS1、Caspase-3、Caspase-8 的 mRNA 水平呈负相关。这就说明血清肿瘤标志物可以反映肿瘤组织中凋亡相关基因的表达情况。

综上所述,原发性肝癌患者血清中 GP73、TK1、DKK1 水平异常升高,且与肿瘤组织中凋亡调节基因的表达存在相关性,是判断原发性肝癌病情的理想指标。

参考文献

[1] 王然,王晓东,李凤焕,等. 高尔基体蛋白 GP73 在肝癌诊断中的临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(13): 1572-1573.
 [2] 王强,谢跃文,夏洁. 血清 TK1、AFP、CEA 联合检测在原发性肝癌诊断中的临床价值[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(9): 1101-1102.
 [3] Jia Z, Wang L, Liu C, et al. Evaluation of α -fetoprotein-L3 and Golgi protein 73 detection in diagnosis of hepatocellular carcinoma [J]. Contemp Oncol (Pozn), 2014, 18(3): 192-196.
 [4] Faria M, Halquist MS, Kindt E, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantification of thymidine kinase activity in human serum by monitoring the conversion of 3'-deoxy-3'-fluorothymidine to 3'-deoxy-3'-fluorothymidine mono-

phosphate[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2012, 907(907): 13-20.
 [5] Huang Y, Yang X, Zhao F, et al. Overexpression of dickkopf-1 predicts poor prognosis for patients with hepatocellular carcinoma after orthotopic liver transplantation by promoting Cancer metastasis and recurrence[J]. Med Oncol, 2014, 31(7): 966.
 [6] 喻宏,贾晓敏,张灿,等. PLK1、CCL18 在原发性肝癌中的表达及其与临床病理的关系[J]. 中国现代医学杂志, 2013, 23(34): 48-52.
 [7] Mok WC, Wasser S, Tan T, et al. Polo-like kinase 1, a new therapeutic target in hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(27): 3527-3536.
 [8] 何金花,陈顺仪,王莉,等. Survivin, xiap, apollon 和 livin 反义寡核苷酸对人消化系统肿瘤细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中国药理学通报, 2011, 27(3): 367-372.
 [9] 谭湘芳,陈鹤,周俊,等. Livin 和 Caspase-3 在原发性肝癌中的表达及意义[J]. 广东医学, 2013, 34(5): 768-770.
 [10] Luan Z, He Y, He F, et al. Rocaglamide overcomes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in hepatocellular carcinoma cells by attenuating the inhibition of caspase-8 through cellular FLICE-like-inhibitory protein downregulation [J]. Mol Med Rep, 2015, 11(1): 203-211.
 [11] Al-Fatlawi AA, Al-Fatlawi AA, Irshad M, et al. Rice bran phytic acid induced apoptosis through regulation of Bcl-2/Bax and p53 genes in HepG2 human hepatocellular carcinoma cells[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(8): 3731-3736.

(收稿日期: 2015-09-20)

(上接第 304 页)

溶剂提取法,但其在后续扩增目的基因的 PCR 反应中有更好的效果,还避免了繁琐的技术劳动和有毒的有机溶剂^[5]。有研究在提取脑脊液的肺结核分枝杆菌 DNA 时,用含 chelex100 和蛋白酶 K 的缓冲液 56℃ 孵育前,用溶菌酶 37℃ 孵育 1 h 并未改善检测的灵敏度,其最低检测限从 10⁴~10⁵ CFU 细菌反而升至 10⁵~10⁶ CFU 细菌^[6]。因此本文继续研究了当 chelex100R 和蛋白酶 K 与溶菌酶等酶同时应用时的反应条件。

本研究分析显示含溶菌酶、溶葡萄球菌酶、chelex100R 树脂、蛋白酶 K 的裂解液同时与细菌于 56℃ 孵育 30min,是获取 MRSA 细菌 DNA 既便捷又高效的方法^[7],溶葡萄球菌酶和 chelex100R 树脂降低 PCR 反应 Ct 值的效果非常明显,提高了检测能力,该方法可用于细菌定量检测。同时本研究发现以上所有成分 56℃ 一步法裂解的效果最佳,不同于研究者们通常采用的方法,即细菌经溶菌酶和溶葡萄球菌酶 37℃ 孵育后,再用蛋白酶 K 56℃ 孵育^[8]。本研究方法可以立即用于下一步 PCR,如用于日常检测能大大缩短标本处理时间,提高检测效率,为 PCR 法快速检测临床 MRSA 感染奠定了基础。

参考文献

[1] 史小英,陈启容,余新玉,等. ICU 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌快速监测及防控[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(7): 877-879.
 [2] Grisold AJ, Leitner E, Mühlbauer G, et al. Detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus and simultaneous confirmation by automated nucleic acid extraction and real-time PCR[J]. J Clin

Microbiol, 2002, 40(7): 2392-2397.
 [3] 汤一苇,白春学,倪语星,等. 微生物分子诊断学[M]. 北京: 科学出版社, 2013.
 [4] Nagdev KJ, Kashyap RS, Deshpande PS, et al. Determination of polymerase chain reaction efficiency for diagnosis of tuberculous meningitis in chelex100 extracted DNA samples[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2010, 14(8): 1032-1038.
 [5] Zucol F, Ammann RA, Berger C, et al. Real-time quantitative broad-range PCR assay for detection of the 16S rRNA gene followed by sequencing for species identification[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(8): 2750-2759.
 [6] Zhao J, Carmody LA, Kalikin LM, et al. Impact of enhanced Staphylococcus DNA extraction on microbial community measures in cystic fibrosis sputum[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e33127.
 [7] 金姝,朱晴晖,邹玉涵,等. 一种提取耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 DNA 的方法[P]. 中国: ZL201310124795. 2, 2015-01-14.
 [8] López M, Rivera MG, Vietri M, et al. Comparing two protocols of DNA extraction of Trypanosoma cruzi cultured in axenic medium [J]. Rev Peru Med Exp Salud Publica, 2014, 31(2): 222-227.

(收稿日期: 2015-10-28)

