

沙门氏菌 DNA 提取及 PCR 反应条件的优化

邵碧英, 陈 彬, 汤敏英, 吴 谦, 张体银
(福建出入境检验检疫局技术中心, 福建 福州 350001)

摘 要: 分别采用煮沸法和 CTAB/NaCl 法提取沙门氏菌及对照菌株的基因组 DNA, 紫外测定和电泳结果表明 CTAB/NaCl 法提取到的 DNA 的浓度和纯度较煮沸法理想。合成分别扩增沙门氏菌属特异基因 *hut* 基因(495bp)、*hiIA* 基因(490bp)、*invA* 基因(284bp)和 *hns* 基因(152bp)的引物, 对 PCR 反应条件进行了优化。结果表明可同时用于这四种基因检测的 PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5min; 94℃ 变性 40s, 60℃ 退火 40s, 72℃ 延伸 50s, 40 个循环; 72℃ 延伸 5min。

关键词: 沙门氏菌; 基因组 DNA; PCR; 优化

Optimization of DNA Extraction from *Salmonella* and PCR Reaction Condition

SHAO Bi-ying, CHEN Bin, TANG Min-ying, WU Qian, ZHANG Ti-yin
(Fujian Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Fuzhou 350001, China)

Abstract: The genome DNAs of *Salmonella* and some control bacteria were extracted by boiling and CTAB/NaCl method, respectively. The concentration and purity of the DNAs isolated were estimated by spectrophotometric method and gel electrophoresis, and the results showed that the DNAs isolated by CTAB/NaCl method were better. Four pairs of primers were synthesized to amplify *Salmonella* genus special genes such as *hut* gene (495 bp), *hiIA* gene (490 bp), *invA* gene (284 bp) and *hns* gene (152 bp) of *Salmonella*, respectively. The PCR reaction condition was optimized. The optimizing results showed that the PCR reaction condition fitting to amplify simultaneously the four genes of *Salmonella* was 94 °C initial denaturation 5 min; 94 °C denaturation 40 s, 60 °C annealing 40 s, 72 °C extension 50 s, 40 cycles; 72 °C final extension 5 min.

Key words: *Salmonella*; genome DNA; PCR; optimization

中图分类号: Q93-332

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)07-0331-04

沙门氏菌是食物中毒中最常见的致病菌, 在我国占食物中毒的第一位。从食品中检测沙门氏菌, 当前通用的方法分非选择性增菌培养、选择性增菌培养、分离培养和鉴定等步骤, 得到阴性报告最少需 4 d, 阳性报告还要延迟 2~3 d。近年来, 分子生物学方法如聚合酶链式反应(简称 PCR)在沙门氏菌的检测上已得到较好应用^[1-6], 大大缩短了检测时间, 但各报道中所用的 DNA 提取方法、引物、PCR 反应条件各异。本研究在综合他人研究的基础上, 合成多对引物, 对 DNA 提取方法和 PCR 反应条件进行了优化, 以期建立一套适合于提取细菌 DNA 的方法和沙门氏菌多对引物扩增的同一 PCR 反应条件, 为下一步开展沙门氏菌的多重 PCR 检测的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

地衣芽孢杆菌、大肠杆菌、蜡样芽孢杆菌、霍乱弧菌、单增李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌分离株均由本实验室保存; 嗜水气单胞菌由福建省农科院水产研究所惠赠; 两株迟缓爱德华氏菌分别由南京农业大学和福建省淡水水产研究所惠赠; 现均由本单位分子生物学实验室保存; 鼠伤寒沙门氏菌标准菌株 ACCT14028、肠炎沙门氏菌标准菌株 ACCT13076 购自上海汉尼贸易有限公司。

1.2 试剂

λDNA/*Hind* III+*EcoR* I Marker、dNTP 和蛋白酶 K 上海英骏生物技术有限公司; Red Taq™ DNA 聚合酶 北京赛百盛基因技术有限公司; 100bp DNA Marker 厦门泰京生物技术有限公司。

1.3 引物

参考文献[3]合成扩增 *hns* 基因的引物, 参考文献[1]合成扩增 *invA* 基因的引物, 参考文献[4]合成扩增 *hiIA*

收稿日期: 2007-05-15

作者简介: 邵碧英(1973-), 女, 高级工程师, 博士, 主要从事食源性致病菌的分子检测。

表1 引物序列及PCR产物
Table 1 Primer sequences and PCR products

扩增基因	引物名称	引物序列	产物大小(bp)
<i>hns</i> 基因	<i>hns</i> -1	5'-TACCAAAGCTAAACGCGCAGCT-3'	152
	<i>hns</i> -2	5'-TGATCAGGAAATCTTCCAGTTGC-3'	
<i>invA</i> 基因	<i>invA</i> -1	5'-GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGGCAA-3'	248
	<i>invA</i> -2	5'-TCATCGCACCGTCAAAGGAACC-3'	
<i>hilA</i> 基因	<i>hilA</i> -F	5'-CTGCCGCGAGTGTAAAGGATA-3'	490
	<i>hilA</i> -R	5'-CTGTGCGCTTAATCGCATGT-3'	
<i>hut</i> 基因	<i>hut</i> -1	5'-ACTGGCGTTATCCCTTCTCTGCTG-3'	495
	<i>hut</i> -2	5'-ATGTTGTCTGCCCTGGTAAGAGA-3'	

基因的引物,参考文献[5]合成扩增 *hut* 基因的引物,所有引物(表1)由北京赛百盛基因技术有限公司合成。

1.4 基因组DNA提取方法的筛选

各菌培养物分别接种于3ml营养肉汤,37℃振荡培养过夜。沙门氏菌考核样品A、B分别接种于前增殖液中,37℃培养过夜。

煮沸法:取1.5ml细菌培养液和增菌液,12000r/min离心1min;取沉淀,用100μl TE溶液(pH8.0)重复洗两次;12000r/min离心1min,取沉淀,加100μl TE溶液,悬浮,98℃水浴10min,冰上放置5min;12000r/min离心1min,取上清。

细菌小量基因组DNA提取方法参考文献[6],略作修改。取1.5ml细菌培养液和增菌液,12000r/min离心1min;取沉淀,加567μl TE溶液(pH8.0),悬浮,加30μl 10% SDS和3μl蛋白酶K(20mg/ml),混匀,37℃温浴1h;加100μl NaCl(5mol/L),混匀,加80μl CTAB/NaCl溶液(10% CTAB和0.7mol/L NaCl),混匀,65℃温浴10min;加等体积氯仿/异戊醇(体积比为24:1),混匀,12000r/min离心10min;取上清,加等体积酚/氯仿/异戊醇(体积比为25:24:1),混匀,12000r/min离心10min;取上清,加0.6倍体积异丙醇,轻轻混匀,12000r/min离心10min;取沉淀,用70%乙醇清洗两次,干燥,加100μl TE溶液(pH8.0)溶解。

DNA经100倍稀释后,于核酸蛋白分析仪上测定其浓度和纯度。将DNA稀释成100ng/μl,取10μl进行10mg/ml琼脂糖凝胶电泳(98V,50min),溴化乙锭染色后于凝胶成像系统中观察。

1.5 *hut*基因和*invA*基因的PCR初测

PCR反应体系包括:10×PCR缓冲液2.5μl,dNTP 0.5μl,两端引物的终浓度均为0.2μmol/L,模板DNA为100ng,Red Taq™ DNA聚合酶1U,用ddH₂O将体积调整为25μl。

PCR反应条件为:94℃预变性5min;94℃变性40s,54℃退火40s,72℃延伸50min,40个循环;72℃延伸5min。

反应结束后取10μl PCR产物,经浓度为15mg/ml琼

脂糖凝胶电泳检测。

1.6 PCR反应条件的优化及应用

PCR反应体系和PCR产物的检测方法同1.5。PCR反应条件同1.5,退火温度取54~62℃。

取优化后的退火温度,对提取的DNA进行*hut*基因、*hilA*基因、*invA*基因和*hns*基因的PCR检测。

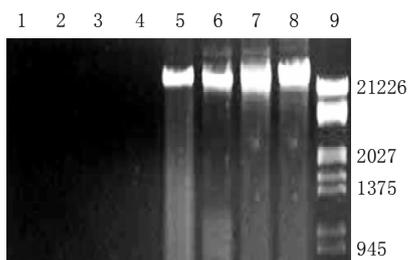
2 结果与分析

2.1 DNA提取方法的筛选结果

以沙门氏菌四个分离株为试验材料,分别用煮沸法和CTAB/NaCl法提取DNA。一般的,优质的DNA的OD₂₆₀/OD₂₈₀值在1.7~2.0,OD₂₆₀/OD₂₃₀的值大于2.0。紫外测定结果如表2所示,CTAB/NaCl法提取的DNA的OD₂₆₀/OD₂₈₀值在1.7~2.0,OD₂₆₀/OD₂₃₀的值大于2.0或接近于2.0,而煮沸法提取的DNA的OD₂₆₀/OD₂₈₀的值大于2.0或接近于2.0,OD₂₆₀/OD₂₃₀的值均小于2.0。CTAB/NaCl法提取的DNA浓度明显高于煮沸法。电泳结果(图1)也表明CTAB/NaCl法提取的DNA均有清晰、明亮的条带,而煮沸法的未见条带。紫外测定和电泳结果均表明CTAB/NaCl法提取的DNA的浓度和纯度明显优于煮沸法。因此选取CTAB/NaCl法作为本试验的DNA提取方法,提取其他12个菌株和两份考核样品的增菌液,电泳结果(图2)显示均有清晰、明亮的条带,表明均已提取到DNA。

表2 两种方法提取的DNA的浓度和纯度
Table 2 Concentration and purity of DNAs extracted by two methods

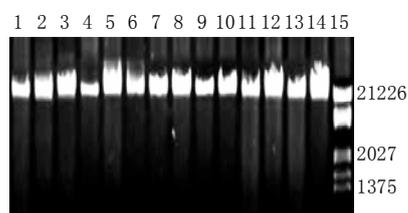
提取方法	沙门氏菌分离株	浓度(ng/μl)	OD _{260nm} /OD _{280nm}	OD _{260nm} /OD _{230nm}
煮沸法	1	253	2.199	1.810
	2	160	2.123	1.677
	3	250	2.007	0.928
	4	256	1.908	1.013
CTAB/NaCl法	1	787	1.906	2.179
	2	1058	1.931	1.957
	3	650	1.842	2.059
	4	546	1.745	1.935



1~4. 煮沸法; 5~8. CTAB/NaCl 法; 1、5. 沙门氏菌分离株 1; 2、6. 沙门氏菌分离株 2; 3、7. 沙门氏菌分离株 3; 4、8. 沙门氏菌分离株 4; 9. λ NA/*Hind* III+*Eco*R I marker。

图1 两种方法提取的 DNA 的电泳结果

Fig.1 Gel electrophoresis result of DNAs extracted by two methods



1. 嗜水气单胞菌; 2. 迟缓爱德华氏菌(南京); 3. 迟缓爱德华氏菌(福建); 4. 地衣芽孢杆菌; 5. 大肠杆菌; 6. 蜡样芽孢杆菌; 7. 霍乱弧菌实验室分离株 1; 8. 霍乱弧菌实验室分离株 2; 9. 单增李斯特氏菌; 10. 金黄色葡萄球菌; 11. 沙门氏菌考核样品 A; 12. 沙门氏菌考核样品 B; 13. 鼠伤寒沙门氏菌标准株; 14. 肠炎沙门氏菌标准株; 15. λ DNA/*Hind* III+*Eco*R I marker。

图2 CTAB/NaCl 法提取其他菌株 DNA 的电泳结果

Fig.2 Gel electrophoresis result of other bacteria DNAs extracted by CTAB/NaCl method

2.2 *hut* 基因和 *invA* 基因的 PCR 初测结果

在参考文献[7]和[8]基础上, 初步确定沙门氏菌的 PCR 扩增条件, 以 *hut* 基因和 *invA* 基因为试验引物, PCR 结果如图 3 所示。*hut* 基因的扩增结果中, 迟缓爱德华氏菌(福建)也扩增到大小正确的、明亮的单一条带, 而 *invA* 基因的扩增结果, 其他非沙门氏菌均扩增到多条非目的条带, 这表明所选取的 PCR 反应条件不适于沙门氏菌的检测, 因此我们对 PCR 反应条件进行了优化。

2.3 PCR 反应条件的优化结果

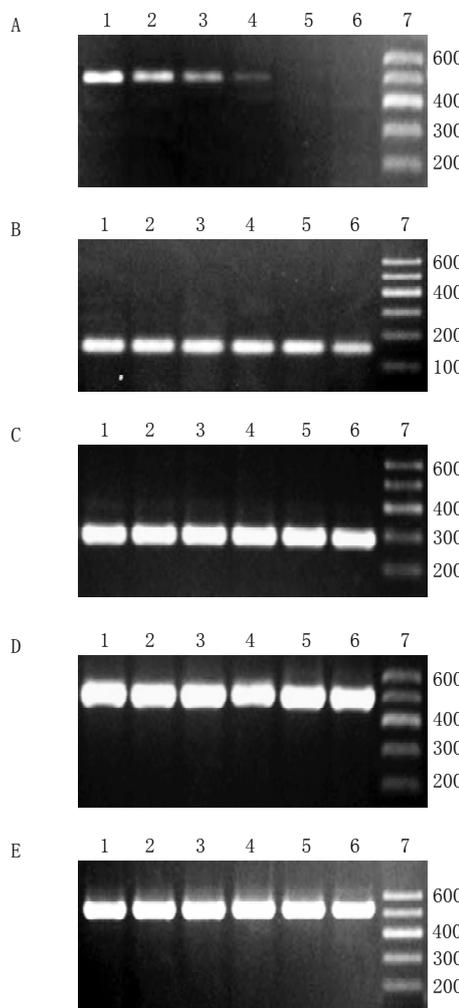
PCR 反应条件中, 最关键的是退火温度, 因此, 我们以迟缓爱德华氏菌(福建)和鼠伤寒沙门氏菌标准株为试验材料, 对扩增 *hut* 基因、*hliA* 基因、*invA* 基因和 *hns* 基因的退火温度进行了优化, 结果如图 4 所示。迟



A. *hut* 基因; B. *invA* 基因; 1. 嗜水气单胞菌; 2. 迟缓爱德华氏菌(南京); 3. 迟缓爱德华氏菌(福建); 4. 地衣芽孢杆菌; 5. 大肠杆菌; 6. 蜡样芽孢杆菌; 7. 霍乱弧菌分离株 1; 8. 霍乱弧菌分离株 2; 9. 单增李斯特氏菌; 10. 金黄色葡萄球菌; 11~14. 4 株沙门氏菌分离株; 15. 沙门氏菌考核样品 A; 16. 沙门氏菌考核样品 B; 17. 空白对照(ddH₂O); 18. 鼠伤寒沙门氏菌标准株; 19. 肠炎沙门氏菌标准株; 20. 100 bp DNA marker。

图3 *hut* 基因和 *invA* 基因的 PCR 检测结果

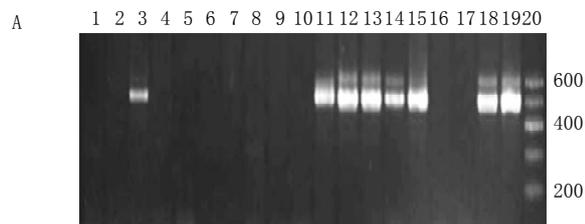
Fig.3 PCR detection results of *hut* gene and *invA* gene



A. 迟缓爱德华氏菌(福建)的 *hut* 基因; B. 鼠伤寒沙门氏菌的 *hns* 基因; C. 鼠伤寒沙门氏菌的 *invA* 基因; D. 鼠伤寒沙门氏菌的 *hliA* 基因; E. 鼠伤寒沙门氏菌的 *hut* 基因; 1~7. 退火温度为 45、47.4、50.3、51.7、53.1、54.6、55.9°C; 8. 100bp DNA marker。

图4 PCR 反应条件的优化结果

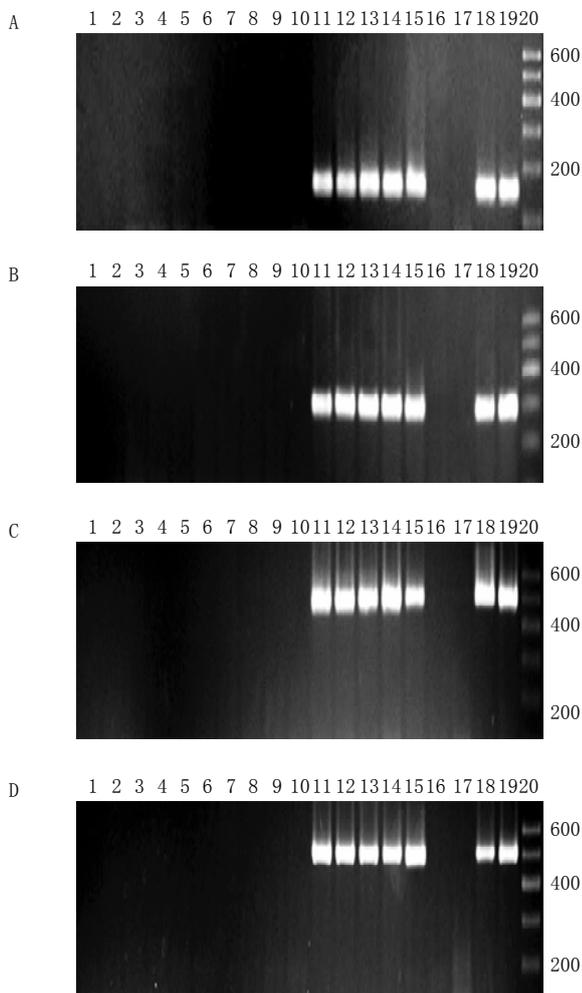
Fig.4 Optimizing results of PCR reaction condition



缓爱德华氏菌(福建)的 *hut* 基因扩增条带随退火温度的升高而逐渐减弱, 60、62℃时无条带产生。鼠伤寒沙门氏菌标准株的四种基因随退火温度的升高, 除 *hns* 基因62℃时产量有所降低外, 其他 PCR 产物的量均无明显的变化, 因此, 选取 60℃作为扩增四种基因的退火温度。

2.4 四种基因的 PCR 检测结果

以选定的 PCR 反应条件对 14 个菌株和两份考核样品进行四种基因的检测, 结果如图 5 所示。每种基因的扩增结果中, 背景清晰、无杂带产生, 考核样品 A、沙门氏菌的实验株和标准株均为明亮、清晰的单一条带,



A. *hns* 基因; B. *invA* 基因; C. *hiIA* 基因; D. *hut* 基因; 1. 嗜水气单胞菌; 2. 迟缓爱德华氏菌(南京); 3. 迟缓爱德华氏菌(福建); 4. 地衣芽孢杆菌; 5. 大肠杆菌; 6. 蜡样芽孢杆菌; 7. 霍乱弧菌分离株 1; 8. 霍乱弧菌分离株 2; 9. 单增李斯特氏菌; 10. 金黄色葡萄球菌; 11~14. 4 株沙门氏菌分离株; 15. 沙门氏菌考核样品 A; 16. 沙门氏菌考核样品 B; 17. 空白对照(ddH₂O); 18. 鼠伤寒沙门氏菌标准株; 19. 肠炎沙门氏菌标准株; 20. 100 bp DNA marker。

图 5 沙门氏菌四种基因的 PCR 检测结果

Fig.5 PCR detecting results of four genes of *Salmonella*

而非沙门氏菌均未扩增到任何条带, 结果很理想。考核样品 B 的四种基因检测结果均为阴性, 表明不含有沙门氏菌。对考核样品 A、B, 我们同时进行了常规检测, 结果与 PCR 检测结果一致。因此, 我们建立的 PCR 反应条件(94℃预变性 5min; 94℃变性 40s, 60℃退火 40s, 72℃延伸 50s, 40 个循环; 72℃延伸 5min)应用于沙门氏菌四种基因的同时检测是可行的。

3 讨论

现有的参考文献中, DNA 提取较多。煮沸法是一种简便的方法, 但提取的 DNA 浓度和纯度不够理想, 会影响 PCR 检测结果, 降低检测灵敏度和准确性, 重复性不好。使用 CTAB/NaCl 法, 虽然所用时间较煮沸法长, 但提取到的 DNA 浓度和纯度较理想, 从而保证 PCR 检测结果的可靠性。在开始多次的试验中, 我们发现, 用煮沸法提取经鉴定是沙门氏菌的 DNA, PCR 结果却为阴性, 而改用 CTAB/NaCl 法提取后才扩增到目的条带。因此, 在实际检测工作中, 我们建议尽量选用 CTAB/NaCl 法提取 DNA, 以避免假阴性结果的出现。

在现有的沙门氏菌 PCR 检测研究报告中, PCR 反应条件不同, 我们在综合多人研究的基础上, 选取了反应条件, 并以 *hut* 基因和 *invA* 基因做了初测, 发现退火温度不够高, 因此, 对退火温度进行了优化。用优化后的 PCR 反应条件进行检测, 结果很理想, 且反应时间较短, 仅需 2h 就可完成。建立的这套反应条件同时适合四种基因的检测, 为下一步开展沙门氏菌的多重 PCR 检测奠定了基础。

参考文献:

- [1] RAHN K, GRANDIS D, CLARKE R C, et al. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*[J]. *Mol Cell Probes*, 1992(6): 271-279.
- [2] 尹荣焕, 尹荣兰, 杨玉英, 等. PCR 技术检测熟肉制品中沙门氏菌的研究[J]. *安徽农业科学*, 2006, 34(2): 222; 226.
- [3] 蒋鲁岩, 陈光哲, 段宏安, 等. 应用 PCR 技术同步检测动物产品中的 4 种致病菌[J]. *检验检疫科学*, 2003, 13(4): 7-9.
- [4] 谢晓红, 韩华忠, 陈悦, 等. 用 PCR 快速检测食物中毒病原菌的方法研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2003, 13(3): 280-282.
- [5] 章新生, 臧富妍. 应用 PCR 技术检测沙门氏菌[J]. *中国兽医学报*, 1999, 19(2): 147-151.
- [6] 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1998: 39.
- [7] 魏麟, 黎晓英. PCR 技术检测饲料中沙门氏菌的应用研究[J]. *中国饲料*, 2005(4): 32-33.
- [8] 张嘉宁, 臧富妍, 顾为望. 沙门氏菌 PCR 诊断试剂盒的研制及初步应用[J]. *中国兽医科技*, 1999, 29(10): 7-9.