

实验技术与方法

食源性致病菌 DNA 快速释放提取试剂的研制

刘艳,王鸣秋,李诗瑶,朱必婷,黄茜,彭青枝

(湖北省食品质量安全监督检验研究院 国家市场监督管理总局重点实验室 动物源性食品中重点化学危害物检测技术,湖北省食品质量安全检测工程技术研究中心,湖北 武汉 430075)

摘要:目的 研制一种食源性致病菌 DNA 快速释放提取试剂并优化其使用方法。方法 采用正交试验法,以 qPCR 扩增 Ct 值为指标,考察曲拉通 X-100(Triton X-100, A)、十二烷基硫酸钠(SDS, B)、乙二胺四乙酸(EDTA, C)和乙基苯基聚乙二醇(NP-40, D)四因素对释放效果的影响,并用实际样品加标后检测判定样品基质对释放效果的影响,对适用过程进行进一步优化。结果 最优试剂组合为 A1B2C2D2,即 Triton X-100 的浓度为 5.5%、SDS 为 0.04%、EDTA 为 2 mmol/L、NP-40 为 2% 时,提取效果最好。结论 该试剂温度适应范围广,能够在一般条件下进行样品处理和核酸提取,耗时短,效率高,使用便捷且生产成本低,具有一定的现场快检应用价值。

关键词:食源性致病菌;核酸释放提取试剂;正交试验

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2023)01-0049-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2023.01.008

Development of rapid extraction reagent for DNA release of foodborne pathogenic bacteria

LIU Yan, WANG Mingqiu, LI Shiyao, ZHU Biting, HUANG Qian, PENG Qingzhi

(Hubei Provincial Engineering and Technology Research Center for Food Quality and Safety Test, Key Laboratory of Detection Technology of Focus Chemical Hazards in Animal-derived Food for State Market Regulation, Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test, Hubei Wuhan 430075, China)

Abstract: Objective To develop a fast DNA release extraction reagent for foodborne pathogenic bacteria and optimize its application. **Methods** Orthogonal test was used to investigate the influence of Triton X-100(A), SDS(B), EDTA(C) and NP-40 (D) on the release effect. The influence of sample matrix on the release effect was determined by testing the actual sample with spiking standard, and the applicable process was further optimized. **Results** The optimal reagent combination was A1B2C2D2, which were Triton X-100 5.5%, SDS 0.04%, EDTA 2 mmol/L and NP-40 2%. **Conclusion** The reagent has a wide range of temperature adaptation with short time and high efficiency, which can be used for sample processing and nucleic acid extraction in poor experimental environment. It is convenient to use with low production cost and has application value for on-site quick inspection.

Key words: Foodborne pathogen; DNA release extraction reagent; orthogonal test

食品安全问题是全球性的重大公共卫生安全问题^[1],大多数是由食源性致病菌导致的^[2]。基于聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)技术进行病原微生物检测,因其相对其他方法具有特异性好、灵敏度高、操作简单快速的优点而得到广泛应用。然而,该技术的选择性和灵敏性等问题需进一步改进^[3-4]。其中,病原微生物核酸提取质量是

下游所有核酸检测的关键,所得核酸质量将直接影响研究或诊断结果。传统的核酸提取方法,包括酸碱裂解法、CTAB法、离心柱膜吸附法、螯合树脂法以及磁珠法等,均需要进行裂解、多次洗涤、洗脱等过程,十分繁琐,不仅耗时长,而且容易交叉污染^[5-8]。其中,酸碱裂解法和 CTAB 法在提取过程中使用有毒有害的有机溶剂,同时还存在核酸质量不佳、操作步骤繁琐、耗时较长等缺陷。相较于其他方法,磁珠法操作更为简便,适用于多种类型样品,并且对样品要求较低。经过修饰的纳米磁珠,能够在高盐、低 pH 的溶液环境中对核酸进行特异性吸附,在外部磁场和洗涤液的作用下将核酸与蛋白质、多糖、脂肪等生物大分子物质分开,再通过改变

收稿日期:2021-12-29

基金项目:湖北省重点研发计划项目(2020BCA091)

作者简介:刘艳 女 高级工程师 研究方向为食品微生物检测

E-mail:297331182@qq.com

通信作者:彭青枝 女 高级工程师 研究方向为食品质量安全检测与管理

E-mail:1415720863@qq.com

溶液的 pH 值将磁珠与核酸进行分离,即可获得高质量的核酸;利用磁珠法进行核酸的提取纯化还能配合自动化核酸提取仪器进行,使得核酸的提取实现自动化和高通量化。但现有的利用磁珠进行核酸提取的方法仍存在较多缺陷。首先,磁珠法提取核酸使用的裂解液中通常含有消化蛋白质的蛋白酶 k,尤其对于全血类样本,必须要加蛋白酶 k 才能保证提取到高质量的核酸,蛋白酶 k 容易残留,提取时间较长,并且提取过程还需加热。其次,现有技术核酸提取操作中,往往将样本的裂解和磁珠与 DNA 的结合分步进行,相应试剂盒往往包括独立分装的裂解液和结合液,不仅使得核酸提取过程复杂,且很大程度上增加了核酸污染的概率,降低检测的准确性^[9-12]。另外,在核酸提取过程中很容易造成核酸的大量丢失,尤其在微量样品的核酸提取过程中核酸的丢失比例更高,甚至导致漏检的发生。当检测样品为 RNA 病毒时,较长的提取过程也容易造成 RNA 的降解^[13-15]。这些因素对核酸检测结果的准确性造成了极大影响。

近年来,越来越多的免提取核酸释放剂被应用于检验检测过程^[16]中,常见的有化学裂解法和酶裂解法等,通过酶或者表面活性剂使得病原菌破壁,内容物被释放出来。核酸免提取试剂的主要成分一般包括表面活性剂(阳离子表面活性剂、阴离子表面活性剂、非离子表面活性剂)、酶保护剂、变性剂、酶稳定剂、镁离子、pH 调节剂等,本研究通过以 qPCR 扩增 Ct 值为指标,考察曲拉通 X-100(Triton X-100)、十二烷基硫酸钠(Sodium dodecyl sulfate, SDS)、乙二胺四乙酸(Ethylene diamine tetraacetic Acid, EDTA)和乙基苯基聚乙二醇(Nonidet P-40, NP-40)四因素对核酸快速释放提取效果的影响,以期得到能较好地应用于现场快速检测的核酸免提取试剂。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

沙门菌标准菌株(*Salmonella typhimurium* CICC 21482)和金黄色葡萄球菌标准菌株(*Staphylococcus aureus* ATCC 6538)均由本实验室保存。

1.2 主要仪器与试剂

5424R 高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司),恒温金属浴(天根生化科技(北京)有限公司),CFX96 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)。

脑心浸液(Brain heart infusion, BHI)肉汤培养基、营养琼脂购自北京陆桥技术股份有限公司; Triton X-100、SDS、螯合树脂 chelex-100、D-海藻糖、NP-40 均购自北京索莱宝科技有限公司; EDTA、

Tris-HCl、NaCl 购自上海沪试化工有限公司; qPCR 预混液购自宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa); 引物探针参照《SN/T 1870—2016 出口食品中食源性致病菌检测方法 实时荧光 PCR 法》中序列由武汉擎科生物合成。

1.3 菌悬液制备

用接种环从培养基斜面(保存在 4 °C 的冰箱)挑取实验菌株至 BHI 肉汤溶液中,37 °C 培养 16~18 h,作为原菌液,12 000 r/min 离心 3 min 后去除上清,加无菌磷酸盐缓冲溶液将菌悬液浓度调至 10⁵ CFU/mL 备用。

1.4 核酸释放提取及扩增

取 1 mL 菌悬液至 1.5 mL 离心管中,12 000 r/min 离心 2 min 后去上清,加入 50 μL 核酸快速释放提取试剂,漩涡混匀后室温放置 5 min,12 000 r/min 离心 2 min,取上清作为模板进行 qPCR 扩增。qPCR 反应体系:2×qPCR 预混液 10 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL,探针(10 μmol/L)0.5 μL, DNA 模板 2.5 μL, ddH₂O 5 μL。PCR 反应程序:95 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 5 s, 60 °C 退火延伸 40 s,同时收集 FAM 荧光,进行 40 个循环。

1.5 核酸快速释放提取剂的优化

1.5.1 核酸快速释放提取剂主要组分浓度的优化

采用同一样本,经含不同浓度的 Triton X-100 [0.1%、0.5%、1%、2%、4%、6%、8%、10% (w/V)]、SDS [0.01%、0.02%、0.04%、0.06%、0.08%、0.1% (w/V)]、EDTA (0.1、0.5、1、2、4、6、8、10 mmol/L) 和 NP-40 [0.1%、0.5%、1%、2%、4%、6%、8%、10% (w/V)] 的核酸快速释放提取剂裂解后,进行 PCR 扩增检测,筛选最佳浓度。

1.5.2 多因素正交试验

根据 Triton X-100、SDS、EDTA 和 NP-40 单个因素筛选的最佳浓度设计四因素三水平的正交试验表格,根据组合的浓度配置核酸快速释放提取试剂后,采用同一样本进行裂解,进行 PCR 扩增,比较各组合之间的差异性,选择最佳组合。正交试验方案如表 1 所示。

1.6 核酸释放提取试剂应用验证

1.6.1 灵敏度验证

将实验菌株进行 10 倍梯度稀释(10²~10⁸ CFU/mL)后经核酸快速释放提取剂裂解,进行 PCR 扩增检测,分析该核酸快速释放提取剂可稳定检测出最低的菌悬液浓度。

1.6.2 线性范围

将实验菌株进行 10 倍梯度稀释(10²~10⁸ CFU/mL)后经核酸快速释放提取剂裂解,进行 PCR 扩增检

表1 正交实验因素水平设计
Table 1 The levels and factors of orthogonal test

试验号	因素			
	Triton X-100/ [%,(w/V)]	SDS/ [%,(w/V)]	EDTA/ (mmol/L)	NP-40/ [%,(w/V)]
1	1(5.5)	1(0.03)	1(1.5)	1(1.5)
2	1(5.5)	2(0.04)	2(2)	2(2)
3	1(5.5)	3(0.05)	3(2.5)	3(2.5)
4	2(6)	1(0.03)	2(2)	3(2.5)
5	2(6)	2(0.04)	3(2.5)	1(1.5)
6	2(6)	3(0.05)	1(1.5)	2(2)
7	3(6.5)	1(0.03)	3(2.5)	2(2)
8	3(6.5)	2(0.04)	1(1.5)	3(2.5)
9	3(6.5)	3(0.05)	2(2)	1(1.5)
10	1(5.5)	1(0.03)	1(1.5)	1(1.5)
11	1(5.5)	2(0.04)	2(2)	2(2)
12	1(5.5)	3(0.05)	3(2.5)	3(2.5)
13	2(6)	1(0.03)	2(2)	3(2.5)
14	2(6)	2(0.04)	3(2.5)	1(1.5)
15	2(6)	3(0.05)	1(1.5)	2(2)
16	3(6.5)	1(0.03)	3(2.5)	2(2)
17	3(6.5)	2(0.04)	1(1.5)	3(2.5)
18	3(6.5)	3(0.05)	2(2)	1(1.5)

测,以菌悬液浓度对数值为横坐标,Ct 值为纵坐标,建立标准曲线,获得回归方程。每个浓度重复检测 3 次。

1.6.3 与同类试剂的比较

分别采用本实验研制的核酸快速释放提取剂

及市售核酸释放试剂检测 32 份疑似或阳性样本,同时用稀释液直接煮沸法作为对照,选用相同的 PCR 扩增条件和体系进行扩增,同一种样本类型在一次 PCR 扩增中完成,减少不同批次间的差异,方便数据分析。检测 Ct≥35 的样本判为阴性,Ct<35 的判为阳性。

1.6.4 试剂的应用

参照现场保障常见的食品类别,将菌悬液加入凉菜、糕点、沙拉等 3 种食品基质中,使得样品中沙门菌和金黄色葡萄球菌的含量为 10³ CFU/g,模拟现场检测过程,每份样品称取 25 g 进行致病菌的检测,共检测 24 份样品,统计检出率。同时进行传统的培养法检测,比较检出率的差异。

1.7 统计学分析

应用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 主要组分的优化

如图 1 所示,单因素试验中,含 6% Triton X-100、0.04% 的 SDS、2 mmol/L EDTA 和 2% NP-40 的核酸快速释放提取剂对同一样本 PCR 扩增检测的 Ct 值最低。

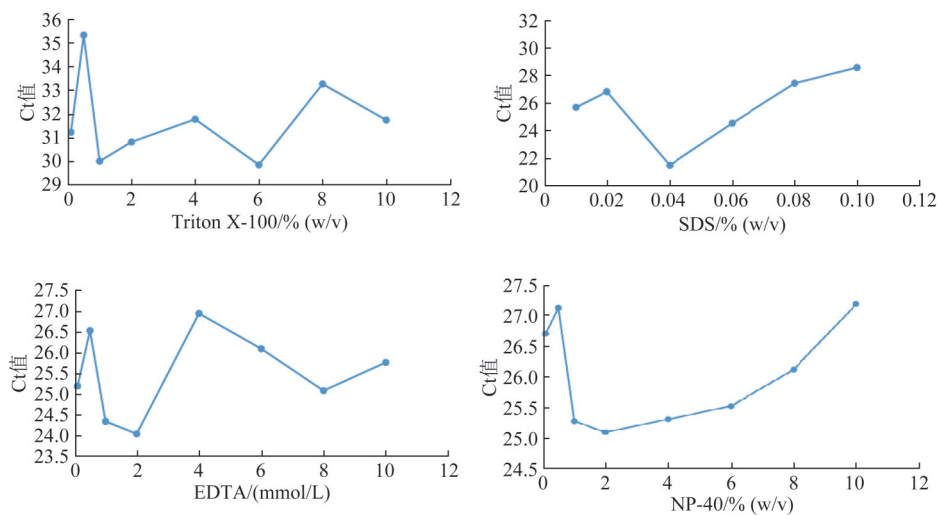


图1 含不同浓度 Triton X-100、SDS、EDTA 和 NP-40 的核酸释放剂的 PCR 扩增的 Ct 值

Figure 1 Ct values of nucleic acid release agents containing various concentrations of Triton X-100, SDS, EDTA and NP-40 for PCR amplification

2.2 多因素正交试验结果

正交试验分析结果见表 2,根据极差 R 值可以看出 4 种试剂对释放效果均有显著影响($P<0.05$),因素主次顺序为 SDS>Triton X-100>EDTA>NP-40,以各因素水平为横坐标,试验指标的平均值为纵坐标,绘制因素与指标趋势图(图 2),可以直观地看出

因素水平的变化趋势,得知最优组合为 A1B2C2D2。

2.3 验证结果

2.3.1 灵敏度

检测结果表明,菌悬液浓度为 10⁴ CFU/mL 时,Ct 值<35,10³~10² CFU/mL 时 Ct 值>38,表明该方法的最低检测限为 10⁴ CFU/mL,见图 3。

表2 实验结果分析

Table 2 Analysis of experimental results

因变量:	主体间效应检验				
	III类平方和	自由度	均方	F	显著性
Ct值源					
修正模型	6.351 ^a	8	0.794	16.006	0.000
截距	12 415.203	1	12 415.203	25 032.053	0.000
Triton X-100	1.088	2	0.544	10.965	0.004
SDS	3.569	2	1.785	35.98	0.000
EDTA	0.957	2	0.478	9.647	0.006
NP-40	0.737	2	0.369	7.432	0.012
误差	0.446	9	0.050		
总计	12 422.000	18			

注:a. R方=0.934(调整后 R方=0.876)

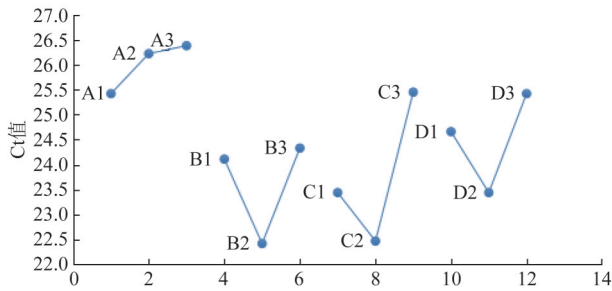


图2 各因素趋势图

Figure 2 Trend chart of various factors

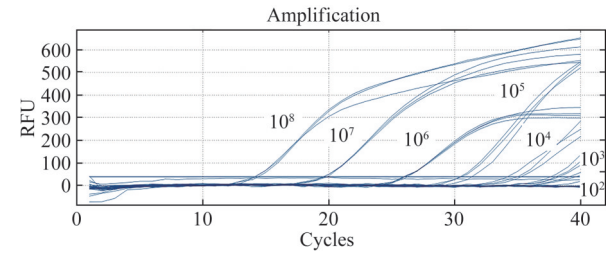


图3 不同浓度菌悬液的PCR扩增曲线

Figure 3 PCR amplification curves of various concentrations of reference

2.3.2 线性范围

参考品标准曲线见图4,回归方程为: $y = -3.3625x + 45.294$, 决定系数 r^2 为 0.9969, 表明菌悬液浓度在 $10^4 \sim 10^8$ CFU/mL 范围内与 Ct 值呈良好线性。

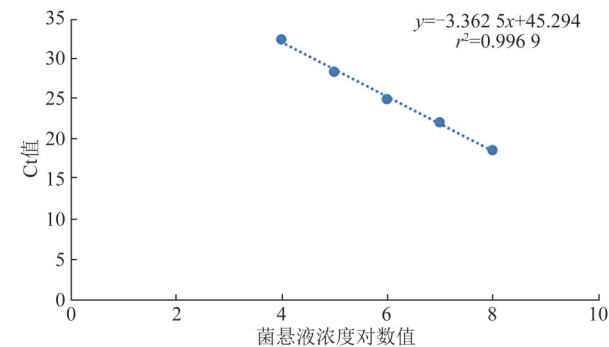


图4 参考品PCR扩增的标准曲线

Figure 4 Standard curve for PCR amplification of reference

2.3.3 与同类试剂比较的结果

如图5,本实验研制的核酸快速释放提取试剂与市售的成品核酸释放剂测试结果的一致性系数为 90.62%。两种试剂均优于直接煮沸后检测,表明本实验研制的核酸快速释放提取试剂可用于样本的核酸检测。

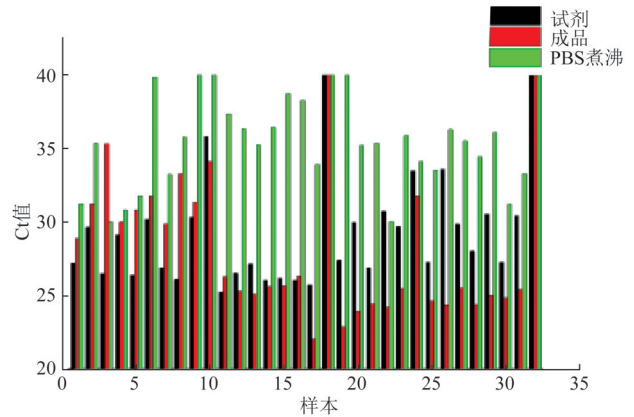


图5 不同方法检测样本的Ct值

Figure 5 Ct values of samples were detected by different methods

2.4 优化后实际样本检测结果

样本检测结果见表3,24份样本通过试剂裂解后检测结果为阳性的有13份,检出率54.2%,检出阳性的样本菌悬液添加量均大于 10^3 CFU/mL,培养

表3 实际样本检测结果

Table 3 Actual sample test results

样品 编号	检测结果		加入菌悬液的浓度/ (CFU/mL)
	试剂裂解后PCR	培养法	
1	+	+	10^5
2	+	+	10^4
3	+	+	10^6
4	+	+	10^5
5	-	-	10
6	-	+	10^2
7	-	+	10^3
8	-	-	10
9	+	+	10^5
10	+	+	10^6
11	+	+	10^7
12	-	-	10
13	+	+	10^5
14	+	+	10^7
15	-	-	10
16	-	-	10
17	+	+	10^6
18	-	-	10
19	+	+	10^6
20	+	+	10^4
21	-	+	10^3
22	+	+	10^5
23	-	+	10^3
24	-	-	10

注:+表示检出,-表示未检出

法检出阳性的有 17 份,检出率 70.8%,应用于实际样品的检测中存在一定的基质干扰,另外由于加入的标准菌株含量有限,没有经过增菌培养的过程,所以存在一定的漏检情况。

3 讨论

本研究研制的核酸快速释放提取试剂中 Triton X-100 终浓度为 5.5%(w/V),SDS 终浓度为 0.04%(w/V),EDTA 终浓度为 2 mmol/L,NaCl 的浓度为 50 mmol/L,海藻糖的浓度为 0.5 mol/L,NP-40 的终浓度为 2%(w/V)。选用较为温和的非离子表面活性剂 Triton X-100、NP-40 和阴离子表面活性剂 SDS 进行细胞膜蛋白的变性,使细胞裂解,染色体离析,释放核酸,同时加入 EDTA,能够螯合金属离子,降低 DNase 和 RNase 的酶活,另一方面,通过海藻糖在 RNA 和 DNA 表面形成保护层,使其能够在溶液中稳定存在。最后通过 Tris-HCl 稳定该试剂的 pH,以确保 RNA 或 DNA 均可稳定保存。通过螯合树脂吸附糖、脂类、金属离子等可能影响下一步分析的杂质。筛选得到的核酸快速释放提取试剂提取效果较好,能够在较差的实验环境中进行样品处理和核酸提取,耗时短,效率高,使用便捷且生产成本低,具有较好的现场快检应用价值。对于食源性致病菌的检出限为 10^4 CFU/mL,在实际应用中辅以增菌培养过程或者目标菌富集过程能达到更好的检测效果。

参考文献

- [1] 许雅欣,宋明翰,高敏,等.我国食品安全满意度调查研究流程、现存问题和改善措施[J].食品安全质量检测学报,2018,9(9):2223-2230.
XU Y X, SONG M H, GAO M, et al. Research process, existing problems and improvement measures of food safety satisfaction survey in China [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2018, 9(9): 2223-2230.
- [2] 冯殿清.食品安全管理与法规监管保障体系的有效性探究[J].现代食品,2019(6):107-109.
FENG D Q. Research on the effectiveness of food safety management and regulatory system[J]. Modern Food, 2019(6): 107-109.
- [3] 王丹丹,刘鸣畅,杨艳歌,等.食源性致病菌快速检测技术研究进展[J].食品科学,2022,43(3):276-285.
WANG D D, LIU M C, YANG Y G, et al. Recent progress in technologies for rapid detection of foodborne pathogens[J]. Food Science, 2022, 43(3): 276-285.
- [4] 胡翀.多重PCR方法快速检测临床常见病原菌方法的建立与应用[D].张家口:河北北方学院,2018.
HU C. Establishment and application of multiple PCR method for rapid detection of common pathogenic bacteria [D]. Zhangjiakou: Hebei North University, 2018.
- [5] 刘洪波,刘晓雷,罗小铭.核酸提取方法进展[J].现代生物医学进展,2011,11(16):3187-3190.
LIU H B, LIU X L, LUO X M. Developments of nucleic acid extraction method [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2011, 11(16): 3187-3190.
- [6] 吴清平,范宏英,张菊梅.食源性致病菌免疫及分子检测新技术研究进展[J].食品科学,2005,26(11):269-273.
WU Q P, FAN H Y, ZHANG J M. Review on immune and new molecular detective techniques for foodborne bacterial pathogens [J]. Food Science, 2005, 26(11): 269-273.
- [7] 李萍,张志斌.乙型肝炎病毒磁珠法核酸提取的临床检验方法学验证[J].医学食疗与健康,2019(17):196-197.
LI P, ZHANG Z B. Validation of clinical test methodology for nucleic acid extraction by magnetic bead method of hepatitis B virus [J]. Medical Diet and Health, 2019(17): 196-197.
- [8] PAN H X, DONG K, RAO L, et al. Quantitative detection of viable but nonculturable state *Escherichia coli* O157: H7 by ddPCR combined with propidium monoazide [J]. Food Control, 2020, 112(C): 107140.
- [9] SHEKAR A, BABU L, RAMLAL S, et al. Selective and concurrent detection of viable *Salmonella* spp., *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* O157: H7, and *Shigella* spp., in low moisture food products by PMA-mPCR assay with internal amplification control [J]. LWT, 2017, 86: 586-593.
- [10] RALSER M, QUERFURTH R, WARNATZ H J, et al. An efficient and economic enhancer mix for PCR [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 347(3): 747-751.
- [11] CHANG C M, CHIU L F, WEI Y H, et al. Integrated three-dimensional system-on-chip for direct quantitative detection of mitochondrial DNA mutation in affected cells [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2013, 48: 6-11.
- [12] OBLATH E A, HENLEY W H, ALARIE J P, et al. A microfluidic chip integrating DNA extraction and real-time PCR for the detection of bacteria in saliva [J]. Lab on a Chip, 2013, 13(7): 1325.
- [13] 刘杰,于成明,陈芳龙,等.提取樱桃中植物病毒RNA方法的建立与优化[J].山东农业大学学报:自然科学版,2021,52(6):922-925.
LIU J, YU C M, CHEN F L, et al. Establishment and optimization of the method extracting the virus RNA from sweet cherry [J]. Journal of Shandong Agricultural University: Natural Science Edition, 2021, 52(6): 922-925.
- [14] 安佳星,伍时华,曾令杰,等.不同方法提取酿酒酵母总RNA的比较[J].中国酿造,2021,40(11):82-86.
AN J X, WU S H, ZENG L J, et al. Comparison of different methods to extract total RNA from *Saccharomyces cerevisiae* [J]. China Brewing, 2021, 40(11): 82-86.
- [15] 冯华炜,闫平平,艾海新,等.食品中甲型肝炎病毒RNA提取方法的比较及应用[J].食品科学,2019,40(6):325-330.
FENG H W, YAN P P, AI H X, et al. Comparison and application of RNA extraction methods for detection of hepatitis A virus in food samples [J]. Food Science, 2019, 40(6): 325-330.
- [16] 张彩虹,林彦星,杨俊兴,等.水疱性口炎病毒免疫提取核酸

荧光定量PCR鉴别检测方法的建立[J]. 动物医学进展, 2018, 39(11): 25-29.
ZHANG C H, LIN Y X, YANG J X, et al. Development of a

real-time PCR assay without RNA extraction for detection and identification of vesicular stomatitis viruses [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2018, 39(11): 25-29.