

实验技术与方法

九种核酸提取裂解剂对PCR扩增效率影响研究

刘娜,王亚萍,王学硕,崔生辉
(中国食品药品检定研究院,北京 100050)

摘要:目的 探究6种化学试剂型和3种酶型菌体裂解剂在聚合酶链式反应(PCR)扩增体系中的最大允许浓度和不同浓度IGEPAL CA-630裂解不同种属菌株的差异。方法 配制6种化学试剂型(IGEPAL CA-630、CTAB、SDS、EDTA、异硫氰酸胍和NaOH)和3种酶型(溶菌酶、溶葡萄球菌酶和蛋白酶K)及多个不同稀释度的裂解液,添加于荧光定量PCR体系中,分析比较Ct值差异。用IGEPAL CA-630溶液(浓度为1%和0.1%,TE为溶剂)、TE和去离子水分别裂解嗜热链球菌、金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌,经荧光定量PCR扩增,比较Ct值的差异。结果 在PCR体系中,IGEPAL CA-630、CTAB、SDS、EDTA、异硫氰酸胍和NaOH的最大允许终浓度分别为0.800‰、0.256‰、0.0128‰、0.8 mmol/L、0.0128 mol/L和0.64 mmol/L,溶菌酶、溶葡萄球菌酶和蛋白酶K的最大允许浓度分别为0.512、1.28和0.512 μg/mL。IGEPAL CA-630裂解嗜热链球菌和金黄色葡萄球菌实验中,TE溶液、0.1%和1% IGEPAL CA-630的Ct值依次减小,TE溶液和去离子水的Ct值没有明显差异;去离子水、TE溶液、0.1%和1% IGEPAL CA-630裂解大肠埃希菌的Ct值均没有明显差异。结论 通过探究,明确了上述9种常见裂解剂不影响PCR扩增的最大浓度,且适当提高IGEPAL CA-630浓度可以增强提取革兰氏阳性菌DNA作用。

关键词:聚合酶链式反应;裂解剂;化学试剂型;酶型;种属

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2023)06-0843-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2023.06.007

Study on the effect of nine nucleic acid extraction lysing reagents on PCR amplification efficiency

LIU Na, WANG Yaping, WANG Xueshuo, CUI Shenghui

(National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective To explore the maximum allowable concentration of six chemical reagents and three enzyme lysates in a polymerase chain reaction (PCR) amplification system and the differences of IGEPAL CA-630 cleaving different species. **Methods** Prepare different kinds of working solutions, including six chemical reagents (IGEPAL CA-630, CTAB, SDS, EDTA, guanidine isothiocyanate, and NaOH) and three enzymes (lysozyme, lysostaphin, and protease K) with different concentrations. Add the working solutions to the fluorescent quantitative PCR system and then analyze the differences in Ct values. *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli* were lysed with IGEPAL CA-630 solutions (1% and 0.1% with TE buffer), TE buffer and deionized water, respectively, and the differences in PCR results were analyzed. **Results** In the PCR system, the maximum allowable final concentrations of IGEPAL CA-630, CTAB, SDS, EDTA, guanidine isothiocyanate, and NaOH were 0.800‰, 0.256‰, 0.0128‰, 0.8 mmol/L, 0.0128 mol/L, and 0.64 mmol/L respectively. The maximum allowable concentrations of lysozyme, lysostaphin, and protease K were 0.512, 1.28, and 0.512 μg/mL. In the lysing of *S. thermophilus* and *S. aureus* with IGEPAL CA-630, the Ct values of TE solution, 0.1% and 1% IGEPAL CA-630 decreased successively, with no significant difference between the TE solution and deionized water. There was no significant difference in Ct values of *E. coli* treated with deionized water, TE solution, 0.1% and 1% IGEPAL CA-630. **Conclusion** This study established the maximum allowable concentration of the above nine components in the PCR amplification solution. Additionally, it was found that increasing the concentration of IGEPAL CA-630 could enhance DNA extraction from gram-positive bacteria.

Key words: Polymerase chain reaction; lysing reagent; chemical trial dosage form; enzymatic; species

收稿日期:2022-09-06

基金项目:中国食品药品检定研究院中青年基金(2020C3)

作者简介:刘娜 女 助理研究员 研究方向为食品安全监测 E-mail:xinyiliuna@163.com

通信作者:崔生辉 男 研究员 研究方向为食品安全检测 E-mail:cuishenghui@aliyun.com

聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)是一种体外扩增特定核酸片段的分子生物学技术,具有灵敏度高、操作简便、检测效率高^[1]和容易实现高通量^[2-4]等特点。因此,PCR在微生物学和细胞生物学等多个基础现代生命科学领域^[5-6]是必不可少的检测手段,同时也在食品安全^[7]、生态保护^[8]、临床诊断^[9-11]等多个领域中的应用越来越广泛。现在已经发展的PCR包括普通PCR、荧光定量PCR^[12-14]和数字PCR技术等^[15-16],无论哪种PCR技术都离不开有效的核酸模板制备方法,无论是RNA还是DNA模板一般都是由裂解剂裂解细胞制备而成^[17],因此在保证模板链完整的同时,还需要确保裂解剂不会干扰PCR扩增过程^[18-19]。

目前,用于裂解细胞提取核酸的裂解剂主要有化学试剂型和酶型两类,前者主要包括液体形态的IGEPAL CA-630、十六烷基三甲基溴化铵(Cetyltriethylammonium bromide, CTAB)、固体形态的十二烷基硫酸钠(Sodium dodecyl sulfate, SDS)、乙二胺四乙酸(Ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)、异硫氰酸胍、氢氧化钠(NaOH)。酶型裂解剂主要有溶菌酶、溶葡萄球菌酶和蛋白酶K。无论化学型还是酶型裂解剂,都是裂解菌体提取核酸用于后续PCR扩增等实验,因此需要在裂解剂发挥作用的同时不能干扰后续PCR过程。对于常规样本,实验室按照推荐方法或经验使用可以达到研究目的。

表1 裂解剂最大允许终浓度研究用引物和探针

Table 1 Primers and probes for maximum allowable concentrations of lysing reagents research

种属	基因名称和序列(5'-3')
嗜热链球菌 ^[28]	<i>pdh</i> -F: ATTCCGATGTCTGCTATG
	<i>pdh</i> -R: GTAACGGTGTTCCTCTTT
	<i>pdh</i> -Probe: FAM-TGGTGCAGTCAAGTATGAGTGCCT-BHQ1
黄色葡萄球菌 ^[29]	<i>nuc</i> -F: AAAGCGATTGATGGTGATACGGTT
	<i>nuc</i> -R: TGCTTTGTTTCAGGTGTATCAACCA
	<i>nuc</i> -Probe: FAM-ATGTACAAAGGTCAACCAATGACATTYAGAT-BHQ1
大肠埃希菌	16Sr-F: CCTCTTGCCATCGGATGTG
	16Sr-R: GGCTGGTCATCTCTCAGACC
	16Sr-Probe: CY5-GTGGGTAACGGCTCACCTAGCCGAC-BHQ3

1.2 主要仪器与试剂

电子天平(瑞士梅特勒公司);离心机、Thermo1389生物安全柜(美国赛默飞公司);基因扩增仪(定量)(美国伯乐公司)。

PCR扩增试剂[宝生物工程(大连)有限公司];IGEPAL CA-630和异硫氰酸胍(美国默克公司);SDS、NaOH(中国医药集团有限公司);2% CTAB(中国索莱宝生物科技有限公司);EDTA(美国赛默飞公司);蛋白酶K(20 mg/mL)(中国天根生化科技(北京)有限公司);溶菌酶(中国上海翊圣生物科技

有限公司);溶葡萄球菌酶(源叶生物有限公司);所有试剂均在有效期内使用。

但是对于稀缺等非常规样本时,需要尽可能提高核酸提取效率,而增大裂解剂浓度是一种方法,但还需要保证不影响后续实验过程,因此需要明确裂解剂在PCR体系中的浓度上限。在上述9种裂解剂中,市售的IGEPAL CA-630、CTAB等裂解剂虽然生产厂家已经有明确的安全浓度范围,但在产品使用说明中仅提供推荐使用浓度;SDS和EDTA是《分子克隆》中核酸提取试剂,也并未对安全使用浓度做出说明。

本研究通过多个浓度探索上述9种裂解剂在PCR体系中的最大允许终浓度,明确裂解剂安全使用上限,期望为提高稀缺样本核酸提取效率提供方法支持,为今后PCR检测技术更好的发展奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与引物

细胞壁组分不仅是影响裂解剂效率的因素之一,而且是细菌区分为革兰氏阳性菌和阴性菌的关键原因,在革兰氏阳性菌中还有易于成链或成团的嗜热链球菌类。为全面探究裂解剂,本研究选择以嗜热链球菌CMCC(B)32483和金黄色葡萄球菌CMCC(B)26003为革兰氏阳性菌代表,以大肠埃希氏菌CMCC(B)44102为阴性菌代表,均来自于中国医学细菌保藏管理中心。

有限公司);溶葡萄球菌酶(源叶生物有限公司);所有试剂均在有效期内使用。

1.3 试剂配制

液体IGEPAL CA-630、2% CTAB用去离子水依次5倍稀释至15 625倍。固体的SDS、EDTA、异硫氰酸胍和NaOH需要称量并溶解于去离子水,分别制备成10%的SDS溶液、0.25 mol/L的EDTA溶液(调pH至8.0)4 mol/L的异硫氰酸胍溶液和0.2 mol/L的NaOH溶液,用去离子水依次5倍稀释至15 625倍。

称量溶菌酶、溶葡萄球菌酶和蛋白酶K并用去离

子水配制成 20、10 和 20 mg/mL 的溶液储存液,用去离子水依次 5 倍稀释至 15 625 倍。

1.4 模板制备

探究 9 种裂解剂在 PCR 体系中的最大允许终浓度时,模板为由 Qiagen DNA 提取试剂盒(DNeasy Blood & Tissue Kit)提取的嗜热链球菌基因组 DNA。

用 TE 溶液溶解 IGEPAL CA-630 制备成 1% 和 0.1% 溶液,挑取嗜热链球菌、金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌二代新鲜培养物适量分别溶解于上述 IGEPAL CA-630 溶液、TE 溶液和去离子水中,经 99 °C 煮沸 10 min 和 13 800×g 离心 10 min 后,获取上清液作为进一步研究 IGEPAL CA-630 用模板。

1.5 PCR 体系配制和扩增

依照表 2 配制 PCR 体系,其中阳性对照和阴性对照的裂解剂为去离子水,阴性对照体系中的模板为去离子水。在不同浓度 IGEPAL CA-630 裂解不

表 2 PCR 扩增体系成分表

试剂名称	体积/ μL
模板	2
引物(10 nmol/ μL)	上下游各 0.5
探针(10 nmol/ μL)	0.5
DNTP mix	0.5
10x Buffer	2.5
Taq 酶	0.2
去离子水	16.3
裂解剂	2
总计	25

表 3 以嗜热链球菌 DNA 模板 PCR 反应体系中九种裂解剂的最大允许浓度结果

Table 3 The results of the maximum allowable concentrations of nine lysing agents in the PCR reaction system with *Streptococcus thermophilus* DNA template

裂解剂名称	原始浓度	不影响 PCR 稀释倍数*	裂解剂终浓度	Ct 均值(n=3)
IGEPAL CA-630	1%	原液	0.800‰	19.91
CTAB	2%	125	0.256‰	20.62
SDS	10%	625	0.012 8‰	20.26
EDTA	0.25 mol/L	25	0.8 $\mu\text{mol/L}$	21.02
异硫氰酸胍	4 mol/L	25	0.012 8 mol/L	20.76
NaOH	0.2 mol/L	25	0.64 $\mu\text{mol/L}$	20.05
溶菌酶	2 mg/mL	312.5	0.512 $\mu\text{g/mL}$	20.12
溶葡萄球菌酶	25 $\mu\text{g/mL}$	1.6	1.28 $\mu\text{g/mL}$	20.75
蛋白酶 K	2 mg/mL	312.5	0.512 $\mu\text{g/mL}$	20.28
阳性对照	—	—	—	20.34

注:* PCR 体系为 25 μL ,裂解剂添加量为 2 μL

2.2 IGEPAL CA-630 裂解不同种属菌株结果

1% 和 0.1% 的 IGEPAL CA-630 溶液、TE 溶液和去离子水分别裂解嗜热链球菌、金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌制备的模板,其 PCR 结果见表 4。在嗜热链球菌组中以对照组 Ct 值较低的去离子水组为参照,两个实验组 Ct 值分别降低了 8.9% 和 3.4%,可以看出 1% 实验组 Ct 值降低幅度更大。对照组中的 TE 溶液和去离子水则没有明显差别。金黄色葡萄球菌组中,以对照组 Ct 值较低的 TE 组

同种属菌体试验中,则不需要添加裂解剂。

每个样品设置两个平行,扩增条件为 5 min 95 °C,30 s 95 °C(变性)、30 s 58 °C(退火)、40 循环。

1.6 荧光定量 PCR 扩增差异判定规则

计算每个样品的 Ct 均值,以阳性对照为参考,规定偏差<5% 为没有差异,偏差>5% 为有差异。

2 结果

2.1 9 种裂解剂不影响 PCR 扩增最大浓度结果

在以嗜热链球菌基因组 DNA 为模板的 PCR 扩增体系中,6 种化学试剂型和 3 种酶型裂解剂不影响 PCR 扩增最大浓度结果见表 3。当裂解剂组 Ct 值与阳性对照 Ct 值相差小于 1.17(5%)时为没有差异。两种液体化学试剂中,IGEPAL CA-630 一般使用浓度为 0.1%,在实验中添加 2 μL 时,即终浓度为 0.800‰,未见其对 PCR 的干扰;CTAB 作为分子生物学 DNA 提取常用裂解剂,其推荐裂解浓度为 2%,从结果中可以看出在 125 倍及更高倍数稀释后,其 Ct 值与阳性对照没有差异,即最大允许浓度为 0.256‰。4 种固体化学试剂中,SDS、EDTA、异硫氰酸胍和 NaOH,最大允许终浓度分别为 0.012 8‰、0.8 $\mu\text{mol/L}$ 、0.012 8 mol/L 和 0.64 $\mu\text{mol/L}$ 。

3 种酶型裂解剂中,溶菌酶、溶葡萄球菌酶和蛋白酶 K 在 PCR 反应体系中最大允许终浓度分别为 0.512、1.28 和 0.512 $\mu\text{g/mL}$ 。

为参照,两个实验组 Ct 值分别降低了 8.1% 和 3.9%,可以看出 1% 实验组 Ct 值降低幅度更大。大肠埃希菌组中,实验组 Ct 值和对照组差异介于 -1.0% 和 1.0% 之间,差异值低于嗜热链球菌和金黄色葡萄球菌组,提示该组对照组和实验组提取核酸效率没有明显区别。对于荧光定量 PCR 实验,Ct 值越大,模板浓度越低,因此对于本研究中的嗜热链球菌和金黄色葡萄球菌,1% IGEPAL CA-630 提取核酸效率最高。

表4 不同浓度 IGEPAL CA-630 制备不同种菌模板的 PCR 结果

Table 4 PCR results of different templates prepared by different concentrations of IGEPAL CA-630

菌株种属	不同 IGEPAL CA-630 浓度裂解菌体对应的 Ct 均值(n=3)		对照组 Ct 均值(n=3)		实验组比对照组 Ct 值
	1%	0.1%	TE 溶液	去离子水	差异值(%)
嗜热链球菌	21.16	22.43	23.45	23.22	8.9, 3.5
金黄色葡萄球菌	21.13	22.10	22.98	23.12	8.1, 3.8
大肠埃希氏菌	20.45	20.87	20.66	20.28	1.0, -1.0

注:选择与实验组 Ct 值更近的对照组 Ct 值为参考值,计算实验组和对照组 Ct 值差异

3 讨论

化学试剂型裂解剂 IGEPAL CA-630 属于醚类非离子表面活性剂,能增强细胞膜通透性^[30-31],适用于膜蛋白复合物的增溶、分离和纯化,一般作为 Nonidet P-40(因属于危险化学品而退市)的替代品而使用,推荐使用浓度为 0.1%^[32]。在研究中发现,IGEPAL CA-630 在裂解革兰氏阳性菌和阴性菌时存在差异。当不同浓度的 IGEPAL CA-630 溶液裂解嗜热链球菌、金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌时,发现随着 IGEPAL CA-630 浓度的提高,革兰氏阳性菌的裂解程度在提高,表现为 Ct 值减小,这说明在一定范围内,IGEPAL CA-630 的裂解能力随着浓度的提高而增强;而革兰氏阴性菌的裂解程度没有变化,因此 Ct 值也没有明显变化。这可能与细胞壁组成的差异有关,嗜热链球菌和金黄色葡萄球菌属于革兰氏阳性菌,细胞壁含有多层肽聚糖以及肽交联桥,细胞壁厚且坚韧^[33-34];大肠杆菌为典型的革兰氏阴性菌,细胞壁中的肽聚糖成分较少,容易被破坏^[35]。依据实验结果和细胞壁组成特点,低浓度 IGEPAL CA-630 足以使革兰氏阴性菌裂解充分,革兰氏阳性菌并没有充分裂解,需要提高 IGEPAL CA-630 浓度才能裂解充分。因此在实际研究中,不能将 IGEPAL CA-630 的推荐使用浓度作为唯一使用浓度,要根据菌株种属特性,选择合适的浓度裂解菌体提高核酸提取效率。

在去离子水和 TE 溶液溶解核酸模板的比较试验中,证实了 TE 溶液并不影响 PCR 扩增过程。在实验室中,DNA 模板一般会保存于去离子水或 TE 溶液中,水作为核酸溶剂时,长时间保存或者反复冻融会破坏核酸的结构,而核酸一级结构的完整性是 PCR 扩增实验的基础。TE 溶液相较去离子水,组成成分较为复杂,一般为 10 mmol/L Tris-HCl 和 1 mmol/L EDTA (pH=8.0),核酸在 Tris-HCl 维持的弱碱性环境中稳定存在,EDTA 可以整合二价金属离子,从而抑制 DNA 酶的作用,因此对于需要长时间保存的核酸,TE 溶液是最佳溶剂。然而有些实验室考虑到 TE 溶液会影响 PCR 扩增,选择用水溶解核酸。本研究结果显示,无论是革兰氏阳性菌还是阴性菌,TE 溶液和去离子水溶解的核酸模板,经

PCR 扩增后的 Ct 值没有明显差异,即证明了 TE 溶液不会干扰 PCR 扩增过程。这与 PCR 扩增体系的组成成分有关,其中,缓冲溶液是维持 Taq 酶活性的关键条件,常包含 KCl/NH₄Cl、Tris-HCl、Mg²⁺等成分。与 TE 成分相比,Tris-HCl 为相同成分,暂且可以不考虑其影响;EDTA 理论上可以整合 Mg²⁺等离子,而实验结果表明并没有影响 PCR 扩增结果,这可能与 EDTA 终浓度过低,其整合的 Mg²⁺等离子不足以影响 Taq 酶活性有关。因此,少量的 TE 溶液加至 PCR 扩增体系中不会影响 PCR 扩增,实验室可以依据实验条件或目的选择用去离子水或 TE 溶液溶解核酸模板。

实验室应根据不同目的和试验要求,结合本研究的安全使用浓度范围,选择合适的裂解剂裂解细胞提取核酸。IGEPAL CA-630 的作用原理和适用对象已经介绍。CTAB 具有从低离子强度溶液中沉淀核酸与酸性多聚糖的特性^[20],可用于植物组织、动物组织、真菌和细菌中 DNA 的提取,且提取的 DNA 浓度高^[21-22]。SDS 和 EDTA 是《分子克隆》中用于核酸提取的试剂,SDS 可降解细胞壁细胞膜等成分^[20, 23],EDTA 通过与 Mg²⁺等二价金属离子结合抑制核酸酶,从而保证核酸的稳定性和完整性^[24]。异硫氰酸胍是在 RNA 提取中发挥重要作用,通过抑制 RNA 酶等保证 RNA 的完整性^[25]。NaOH 是常见的强碱试剂,可以快速破坏细胞结构。溶菌酶是一种能水解细菌中黏多糖的碱性酶,破坏细胞壁利于核酸的提取^[26]。葡萄球菌类细胞壁中,聚甘氨酸交联键可以耐受溶菌酶,而溶葡萄球菌酶能裂解聚甘氨酸交联键,从而利于葡萄球菌类核酸提取。蛋白酶 K 则通过酶解与核酸结合的蛋白质在核酸提取中发挥作用^[27]。在上述 9 种裂解剂中,酶型相较化学型比较贵,但并不代表酶型裂解细胞提取核酸的效率优于化学型,实验室还有依据样品特性在安全浓度上限选择最佳裂解剂。

本研究通过实验,确定了常见的 6 种化学试剂型和 3 种酶型裂解剂在 PCR 反应体系中的最大允许终浓度,为安全浓度上限提供了数据支撑。实验室可以结合具体的样品,确定合适的裂解剂种类和浓度来有效提取核酸。尤其是稀缺样品,可以在安

全浓度上限下,适当提高裂解剂浓度来提高核酸提取效率,避免样品、时间和相关试剂的浪费,达到提高检验技术水平的目的。

参考文献

- [1] SCHREMSE V, ANTONIEWICZ L, TSCHACHLER E, et al. Polymerase chain reaction for the diagnosis of herpesvirus infections in dermatology[J]. Wiener Klinische Wochenschrift, 2020, 132(1-2): 35-41.
- [2] THIRUMALAPURA N R, FERIA W, HUE E, et al. Evaluation of a high-throughput nucleic acid extraction method for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in bovine fecal samples by PCR[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2021, 33(2): 375-378.
- [3] ZHAN Y X, ZHANG J, YAO S, et al. High-throughput two-dimensional polymerase chain reaction technology[J]. Analytical Chemistry, 2020, 92(1): 674-682.
- [4] CHATURANTABUT S, KITKUMTORN N, MUTIRANGURA A, et al. Identification of pathogens causing invasive fungal rhinosinusitis in surgical biopsies using polymerase chain reaction[J]. The Journal of Laryngology and Otology, 2020, 134(7): 632-635.
- [5] ÖSTERDAHL M F, LEE K A, LOCHLAINN M N, et al. Detecting SARS-CoV-2 at point of care: Preliminary data comparing loop-mediated isothermal amplification (LAMP) to polymerase chain reaction (PCR)[J]. BMC Infectious Diseases, 2020, 20(1): 783.
- [6] CHANG J T, CHEN Y C, CHOU Y C, et al. Quantitative detection of residual porcine host cell DNA by real-time PCR[J]. Biologicals, 2014, 42(2): 74-78.
- [7] WANG Z Y, LI T T, YU W J, et al. Determination of content of camel milk in adulterated milk samples by normalized real-time polymerase chain reaction system based on single-copy nuclear genes[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020, 100(8): 3465-3470.
- [8] SOGA K, NAKAMURA K, ISHIGAKI T, et al. Development of a novel method for specific detection of genetically modified Atlantic salmon, AquAdvantage, using real-time polymerase chain reaction[J]. Food Chemistry, 2020, 305: 125426.
- [9] WANG C X, HUANG Z D, FANG X Y, et al. Comparison of broad-range polymerase chain reaction and metagenomic next-generation sequencing for the diagnosis of prosthetic joint infection[J]. International Journal of Infectious Diseases, 2020, 95: 8-12.
- [10] MITRA S, NAYAK M K, MAJUMDAR A, et al. Development and evaluation of a multiplex conventional reverse-transcription polymerase chain reaction assay for detection of common viral pathogens causing acute gastroenteritis[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2020, 97(4): 115061.
- [11] KWACK W G, LIM Y J, KWON K H, et al. Outcomes and clinical relevance of stool multiplex bacterial polymerase chain reaction in patients with acute diarrhea: Single center experience[J]. The Korean Journal of Internal Medicine, 2020, 35(2): 300-309.
- [12] LI M X, CHEN Y, CHEN Z P, et al. An assumption-free quantitative polymerase chain reaction method with internal standard[J]. Talanta, 2020, 220: 121405.
- [13] MAY M L A, TOZER S, DAY R, et al. Polymerase chain reaction for human *Parechovirus* on blood samples improves detection of clinical infections in infants[J]. Molecular Biology Reports, 2020, 47(1): 715-720.
- [14] DITOMMASO S, GIACOMUZZI M, MEMOLI G, et al. Reduction of turnaround time for non-tuberculous *Mycobacteria* detection in heater-cooler units by propidium monoazide-real-time polymerase chain reaction[J]. Journal of Hospital Infection, 2020, 104(3): 365-373.
- [15] MAHENDRAN P, LIEW J W K, AMIR A, et al. Droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) for the detection of *Plasmodium knowlesi* and *Plasmodium vivax* [J]. Malaria Journal, 2020, 19(1): 241.
- [16] CAMPRUBÍ D, GOMILA A, GRIJOTA-CAMINO M D, et al. Infectiousness of patients with smear-negative pulmonary tuberculosis, assessed by Real-time Polymerase Chain Reaction, Xpert[®]MTB/RIF [J]. The Journal of Infection, 2020, 80(3): 298-300.
- [17] ZHAO X L, LI Y, DUAN Y K, et al. A simple methodology for RNA isolation from bacteria by integration of formamide extraction and chitosan-modified silica purification[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2021, 413(26): 6469-6477.
- [18] OBINO D, VASSALLI M, FRANCESCHI A, et al. An overview on microfluidic systems for nucleic acids extraction from human raw samples[J]. Sensors (Basel, Switzerland), 2021, 21(9): 3058.
- [19] LINKE R B, ZEKI S, MAYER R, et al. Identifying inorganic turbidity in water samples as potential loss factor during nucleic acid extraction: Implications for molecular fecal pollution diagnostics and source tracking[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 660566.
- [20] 徐建堂, 祁建民, 方平平, 等. CTAB法提取红麻总DNA技术优化与ISSR和SRAP扩增效果[J]. 中国麻业科学, 2007, 29(4): 179-183.
- XU J T, QI J M, FANG P P, et al. Optimized CTAB protocol for extracting genomic DNA from kenaf and improved PCR amplifications of ISSR and SRAP [J]. Plant Fiber Sciences in China, 2007, 29(4): 179-183.
- [21] VARGAS F, ESCATELL G, SALAS E. Polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Mycoplasma hyopneumoniae*, responsible of enzootic pneumonia in pigs [J]. Journal of Animal and Veterinary Advances, 2011, 10(23): 3065-3068.
- [22] 胥振国, 蔡玉华, 袁星, 等. 直接用于PCR反应的芽胞杆菌基因组DNA抽提改良方法的建立[J]. 中国生物制品学杂志, 2012, 25(5): 630-632.
- XU Z G, CAI Y H, YUAN X, et al. Development of an improved method for extraction of genomic DNA from *Bacillus*, used for PCR directly [J]. Chinese Journal of Biologicals, 2012, 25(5): 630-632.
- [23] 侯泽菁, 常迺滔. 用改良SDS法提取适于PCR扩增的小麦基因组DNA [J]. 江苏农业科学, 2014, 42(5): 49-51.
- HOU Z J, CHANG N T. Extraction of wheat genomic DNA suitable for PCR amplification by improved SDS method [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2014, 42(5): 49-51.

- [24] RAGGAMR B, WAGNERJ, BOZICM, et al. Detection and quantitation of Epstein-Barr virus (EBV) DNA in EDTA whole blood samples using automated sample preparation and real time PCR[J]. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2010, 48(3): 413-418.
- [25] 李志能, 黄文俊, 张佳琪, 等. 异硫氰酸胍法快速提取二球悬铃木组织总RNA的研究[J]. *武汉植物学研究*, 2007(3): 266-269.
- LI Z N, HUANG W J, ZHANG J Q, et al. Guanidine Thiocyanate Method of Total RNA Isolation in *Platanus acerifolia* [J]. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 2007, 25(3): 266-269.
- [26] 杨信怡. 重组溶葡萄球菌酶抗菌药效学及耐药机制研究[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2005.
- YANG X Y. Antibacterial pharmacodynamics of recombinant lysostaphin and mechanism of induced lysostaphin-resistance in *S. aureus*[D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2005.
- [27] 王念, 巫丽娟, 周易, 等. 蛋白酶K预处理在SARS-CoV-2核酸提取中的应用探讨[J]. *国际检验医学杂志*, 2021, 42(1): 30-33.
- WANG N, WU L J, ZHOU Y, et al. Application of protease K pretreatment in nucleic acid extraction of SARS-COV-2 [J]. *International Journal of Laboratory Medicine*, 2021, 42(1): 30-33.
- [28] 刘文俊. 嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌产酸、风味特性及其功能基因分型和表达研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2014.
- LIU W J. Characteristics of acid and flavor-producing streptococcus thermophilus and *Lactobacillus bulgaricus*, as well as their functional gene typing and expression [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2014.
- [29] WANG H Y, KIM S, KIM J, et al. Multiplex real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant staphylococci directly from positive blood cultures [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2014, 52(6): 1911-1920.
- [30] TAMANO K, MIURA A, KOIKE H, et al. High-efficiency extracellular release of free fatty acids from *Aspergillus oryzae* using non-ionic surfactants[J]. *Journal of Biotechnology*, 2017, 248: 9-14.
- [31] VIET-PHUONG LE A, HUANG D X, BLICK T, et al. An optimised direct Lysis method for gene expression studies on low cell numbers[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 12859.
- [32] JØRGENSEN R L, PEDERSEN M S, CHAUHAN A S, et al. An in-well direct Lysis method for rapid detection of SARS-CoV-2 by real time RT-PCR in eSwab specimens [J]. *Journal of Virological Methods*, 2021, 289: 114062.
- [33] 张钊瑞. 乳酸菌肽聚糖的功能特性及其对鲜切苹果品质的影响[D]. 泰安: 山东农业大学, 2020.
- ZHANG Z R. Functional properties of lactic acid bacteria peptidoglycan and its effect on the quality of fresh-cut apples [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2020.
- [34] SUTTON J A F, CARNELL O T, LAFAGE L, et al. *Staphylococcus aureus* cell wall structure and dynamics during host-pathogen interaction[J]. *PLoS Pathogens*, 2021, 17(3): e1009468.
- [35] 周德庆. 微生物学[M]. 深圳: 高等教育出版社, 2020: 19-39
- ZHOU D Q. *Microbiology* [M]. Shenzhen: Higher Education Press, 2020: 19-39.