

微小隐孢子虫卵囊 DNA 提取及用于 PCR 检测

沈玉娟, 曹建平*, 卢潍媛, 李小红, 刘海鹏, 徐徐信, 周晓农, 汤林华, 刘述先

【摘要】 目的 采用 3 种方法提取微小隐孢子虫卵囊 DNA, 并用于 PCR 检测以进行比较。方法 微小隐孢子虫卵囊经多次冻融加热破壁后, 采用螯合树脂 (Chelex-100)、酚/氯仿和基因组 DNA 纯化系统试剂盒 3 种方法提取微小隐孢子虫卵囊 DNA, 并根据微小隐孢子虫基因序列 (LI6996) 设计一对寡核苷酸引物, 分别对 3 种方法制备模板进行 PCR 扩增分析。Chelex-100 提取的 DNA 也用于观察 PCR 检测的敏感性。结果 3 种方法制备的微小隐孢子虫卵囊模板用于 PCR 检测均获得 1 条 446 bp 条带, Chelex-100 提取的 DNA 用于 PCR 检测的敏感性至少达 0.5 个卵囊。结论 3 种方法提取的微小隐孢子虫卵囊 DNA 均可用于 PCR 检测, Chelex-100 法是一种高效而快速的微量提取 DNA 方法, 适用于对隐孢子虫 DNA 的检测。

【关键词】 微小隐孢子虫; 卵囊; 脱氧核糖核酸; 分离和提纯; 螯合树脂法; 聚合酶链反应

中图分类号: R382.3

文献标识码: A

Preparation of DNA from *Cryptosporidium parvum* Oocysts for PCR Detection

SHEN Yu-juan, CAO Jian-ping*, LU Wei-yuan, LI Xiao-hong, LIU Hai-peng, XU Yu-xin, ZHOU Xiao-nong, TANG Lin-hua, LIU Shu-xian

(National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, WHO Collaborating Center of Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China)

【Abstract】 Objective To establish three methods of DNA extraction from *Cryptosporidium parvum* oocysts and test by PCR.

Methods After three freeze-thaw cycles, three kinds of templates were extracted from the oocysts by Chelex-100, phenol/chloroform or genomic DNA purification system kit, and used for PCR detection. According to the sequence of a *C. parvum* gene (LI6996), a pair of primers was designed and synthesized, and used for PCR. The sensitivity of the template by Chelex-100 method was also tested by PCR. **Results** One 446 bp PCR product was observed by agarose gel electrophoresis for all three kinds of templates. The PCR sensitivity by Chelex-100 extracted DNA reached for detection of a specimen containing only 1/2 oocyst. **Conclusion** The three kinds of extraction can all be served as templates for PCR detection of *C. parvum* oocysts, while Chelex-100 method is simpler, quicker and more reliable for DNA extraction of the parasite.

【Key words】 *Cryptosporidium parvum*; Oocysts; DNA; Isolation and purification; Chelex-100 method; PCR

Supported by the National Tenth Five-year Plan Project (No. 2003BA712A03-06)

* Corresponding author, E-mail: caojp@yahoo.com

隐孢子虫 (*Cryptosporidium*, CPS) 为小肠上皮细胞内寄生原虫, 可引起隐孢子虫病 (cryptosporidiosis), 是人类和幼畜严重腹泻的重要病原, 列为全球最常见的 6 种腹泻病之一, 并被列入新发传染病^[1]。随着对该病的认识和重视, 近年来病例报道迅速增多, 全球每年约有 5 000 万 5 岁以下的儿童感染, 主要发生在发展中国家。由于隐孢子虫常可污染水源而造成暴发流行, 成为重要的公共卫生问题^[2]。因此, 对隐孢子虫卵囊的检测和监测尤为重要。本研究

采用 3 种方法提取隐孢子虫卵囊 DNA, 并用 PCR 方法进行检测。

材料与方法

1 材料来源

微小隐孢子虫卵囊来自江苏省徐州市铜山县棠张镇腹泻儿童调查病例, 经改良抗酸染色法检查确诊微小隐孢子虫感染 18 例, 经碘液染色和铁苏木素染色检查确诊蓝氏贾第鞭毛虫感染 6 例, 结肠内阿米巴 (包囊) 感染 1 例。微小隐孢子虫卵囊, 从感染者粪便中分离获得。计数卵囊, 分装于 1.5 ml 离心管中, 分别置于液氮 2 min、94 ℃ 2 min, 反复冻融 3 次, 破坏卵囊壁, 用于以下模板提取。同法收集蓝氏贾第鞭毛虫及结肠内阿米巴包囊, 用于抽提 DNA 作为 PCR 对照。

基金项目: 国家“十五”科技攻关 (No. 2003BA712A03-06)

作者单位: 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心, 卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室, 上海 200025

* 通讯作者, E-mail: caojp@yahoo.com

2 主要试剂

螯合树脂 Chelex-100 (美国 Bio-Rad 公司), Taq DNA 聚合酶 (美国 Promega 公司), dNTPs (美国 Amersham 公司), 基因组 DNA 纯化系统 (上海华美生物工程公司), DNA marker (上海申能博彩生物科技有限公司)。

3 提取 DNA

3.1 Chelex-100 法 于上述冻融和加热处理的破壁卵囊中, 加 5% Chelex-100 溶液 500 μ l 振荡混匀, 56 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 震荡 15~30 s, 100 $^{\circ}$ C 8 min, 再震荡 15~30 s, 10 000 \times g 离心 5 min, 取上清于 -20 $^{\circ}$ C 保存, 用于 PCR 的模板。蓝氏贾第鞭毛虫和结肠内阿米巴包囊按上述方法抽提 DNA, 作为 PCR 对照。

3.2 酚/氯仿法提取 DNA 在隐孢子虫卵囊悬液中加入 10 倍体积裂解液 (100 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 乙二胺四乙酸 (EDTA), 20 mmol/L Tris-HCl pH7.5, 2% 十二烷基磺酸钠 (SDS), 反复冻融 3 次 (液氮中 5 min、23 $^{\circ}$ C 2 min)。加入蛋白酶 K (2 mg/ml), 56 $^{\circ}$ C 水浴 2 h, 用等体积的酚-氯仿-异戊醇 (25:24:1) 抽提 2 次, 吸取水相, 加入 1/10 体积的乙酸钠 (3 mmol/L, pH 5.2) 和 2 倍体积的冷无水乙醇混匀, -20 $^{\circ}$ C 1 h 或过夜, 12 000 \times g 离心 10 min, 弃上清, 抽干, 溶于 TE 缓冲液 (pH7.4) 中, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

3.3 基因组 DNA 试剂盒提取 DNA 参照试剂盒操作步骤略加改良。加核裂解液 300 μ l 于上述冻融和加热处理破壁卵囊, 混匀, 于 55 $^{\circ}$ C 水浴 30 min。加蛋白质沉淀液 100 μ l, 震荡 15~30 s, 12 000 \times g 离心 1 min; 取上清, 加异丙醇 300 μ l, 混匀, 12 000 \times g 离心 1 min; 弃上清, 70% 乙醇洗涤沉淀, 12 000 \times g 离心 1 min, 弃上清, 抽干, 加入 TE 缓冲液 (pH 7.4) 100 μ l, 65 $^{\circ}$ C 水浴 1 h, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

4 PCR 及其产物电泳分析

根据微小隐孢子虫的 1 个基因序列 (L16996) 设计 1 对引物 (由上海生物工程公司合成), 上游引物: 5'-aacacgggaaactcaccag-3', 下游引物 ... 5'-gtacaaagggcagggacgta-3'。通过试验优化反应条件, PCR 扩增反应体系总体积为 20 μ l, 包括 PCR 缓冲液、1.5 mmol/L MgCl₂、0.2 mmol/L 脱氧核苷三磷酸 (dNTPs)、上下游引物各 0.5 μ mol/L、1 U Taq 酶和样品模板。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。3 种方法提取的模板采

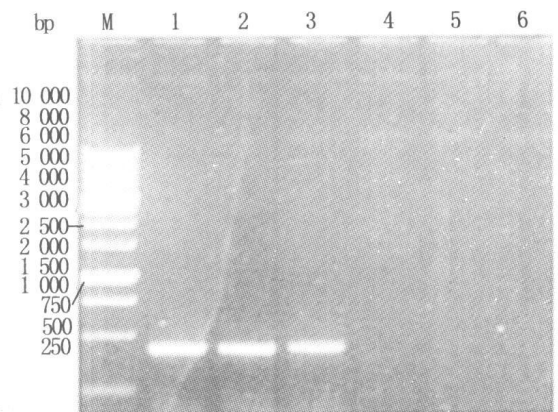
用 PCR 检测比较, 每个反应各取 5 个卵囊模板; Chelex-100 法提取的模板其敏感性观察, 每个反应应用 2 个和 0.5 个卵囊模板。对照模板采用蓝氏贾第鞭毛虫和结肠内阿米巴包囊 DNA, 每个反应模板各取 10 个包囊, 并设立空白对照。PCR 产物采用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

结 果

1 不同方法提取模板的 PCR 扩增分析

Chelex-100 法制备的模板扩增出约 446 bp 的隐孢子虫特异条带, 与酚/氯仿和基因组 DNA 纯化系统试剂盒制备的模板扩增分析结果一致 (图 1), 说明其 PCR 扩增效果与经典方法一致。蓝氏贾第鞭毛虫和结肠内阿米巴包囊 DNA 对照组, 未见相应条带。

Chelex-100 法快速提取 DNA 用于 PCR 检测结果显示与其它 2 种方法同样理想, 具有简单、快捷、灵敏度高的优点。该法提取 DNA 方便简单, 净工作时间小于 1 h, 且仅在一个离心管内进行, 减少污染机会; 基因组试剂盒法耗时大于 1 h, 换 1 次离心管, 有污染的可能; 酚/氯仿法则用时大于 4 h, 且需转换 3 至 4 个离心管, 大大增加了污染的可能性。



M: 1 kb DNA 标志物, 1: 酚/氯仿法提取模板, 2: 基因组 DNA 纯化试剂盒提取模板, 3: Chelex-100 提取模板, 4: 无模板, 5: 蓝氏贾第鞭毛虫包囊 DNA 模板, 6: 结肠内阿米巴包囊 DNA 模板。

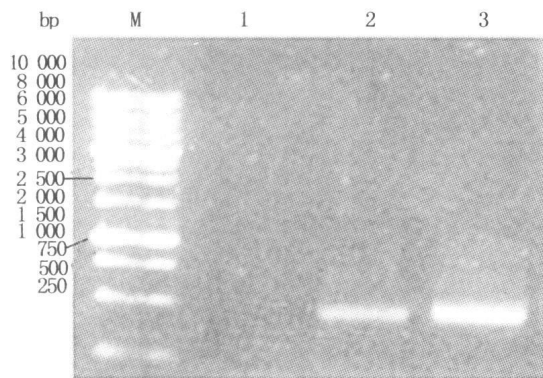
M: 1 kb DNA ladder, 1: Phenol/chloroform extracted template, 2: Genomic DNA purification system template, 3: Chelex-100 treated template, 4: No template, 5: Template of *Giardia lamblia* cysts, 6: Template of *Entamoeba coli* cysts.

图 1 3 种方法提取 DNA 模板 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳分析

Fig 1 Identification of PCR products from different templates of *Cryptosporidium parvum* oocysts

2 Chelex-100 制备模板敏感性结果

采用 Chelex-100 制备的模板进行了敏感性分析, 结果 2 个和 0.5 个卵囊模板经 PCR 扩增, 均获得满意结果, 可见 1 条 446 bp 的特异条带 (图 2)。



M: 1 kb DNA 标志物, 1: 无模板 PCR 产物, 2: 0.5 个卵囊模板 PCR 产物, 3: 2 个卵囊模板 PCR 产物。

M: 1 kb DNA ladder, 1: Negative control, 2: Template from 0.5 oocyst, 3: Template from two oocysts.

图 2 Chelex-100 制备的模板敏感性分析

Fig 2 Analysis of PCR sensitivity of the templates extracted with Chelex-100 method

讨 论

隐孢子虫卵囊形体小, 常规病原检测容易漏检, 但很小剂量即可引起感染, 因而建立灵敏的检测方法十分重要。Laxer 等^[3]和 Webster 等^[4]应用 PCR 检测隐孢子虫, 为建立敏感性高、特异性强的隐孢子虫检测方法开辟了新途径。PCR 可同时批量处理样品, 可用于微量卵囊的检测, 通过选用不同引物可准确鉴定隐孢子虫种属, 可区分卵囊的死活, 是目前该领域研究的热点。本研究采用 3 种方法制备微小隐孢子虫卵囊 DNA 模板, 并根据微小隐孢子虫基因组序列, 选用一对引物, 利用 PCR 特异性扩增该隐孢子虫基因 446 bp。结果 3 种模板均获得满意效果。

虽然 PCR 有许多优点, 但也受一些因素影响, 如样品中的抑制剂能影响敏感性。Chelex-100 是一种弱阳离子螯合树脂, 由苯乙烯与二乙烯苯共聚体组成, 含有成对的亚氨基二乙酸盐离子, 起着螯合基团作用, 对多价金属离子有极强亲和力。在低离子强度及加热条件下, 检材基质中的金属离子可以辅助脱氧核糖核酸酶降解 DNA, 还会抑制 PCR 反应。在提取 DNA

反应体系中加入适量的 Chelex-100, 可以螯合一些在高温、低离子强度下催化 DNA 降解的金属离子, 在提取 DNA 过程中可防止 DNA 的降解。提取过程中煮沸可以裂解细胞核, 释放 DNA, 同时使蛋白质变性成为不溶物, 最后螯合金属离子的 Chelex-100 颗粒和其它非 DNA 成分 (如蛋白质) 可通过离心去除。Chelex-100 颗粒还可结合抑制 PCR 反应的物质, 使 PCR 的敏感性增加。Singer-Sam 等^[5]最先报道了用 Chelex-100 法提取组织培养细胞 DNA。Walsh 等^[6]系统研究了该方法在多种法医生物检材中的应用。而酚/氯仿提取法是广泛应用的经典 DNA 提取方法^[7]。

Chelex-100 法提取 DNA 优点是简单方便, 仅在 1 个管内进行, 减少污染机会等, 缺点是不能浓缩、纯化 DNA 等。酚/氯仿提取法优点是提取 DNA 量多, 可以纯化浓缩 DNA 等, 缺点是使用有机溶剂, 方法繁琐、复杂, 需在多个管内进行, 易丢失 DNA, 检材编号易混乱, 易污染等。基因组 DNA 纯化系统试剂盒也获得较好效果, 但成本高, 步骤和花费的时间也较 Chelex 方法多。本研究采用 Chelex-100 提取的模板经 PCR 检测微小隐孢子虫卵囊, 敏感性较高 (0.5 个卵囊), 具有较好的应用前景。

参 考 文 献

- [1] 沈玉娟, 曹建平. 水源性隐孢子虫的 PCR 检测[J]. 国外医学寄生虫病分册, 2005, 32: 10-13.
- [2] 潘卫庆, 汤林华, 主编. 分子寄生虫学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2004 176-197.
- [3] Laxer MA, Timblin BK, Patel RJ. DNA sequences for the specific detection of *Cryptosporidium parvum* by the polymerase chain reaction[J]. Am J Trop Med Hyg, 1991, 45: 688-694.
- [4] Webster KA, Pow JD, Giles M, et al. Detection of *Cryptosporidium parvum* using a specific polymerase chain reaction[J]. Vet Parasitol, 1993, 50: 35-44.
- [5] Singer-Sam J, Tanguay RI, Riggs AD. Use of Chelex to improve the PCR signal from a small number of cells[J]. Amplification, 1989, 3: 11.
- [6] Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-Based typing from forensic material[J]. Bio Techniques, 1991, 10: 506-513.
- [7] J 萨姆布鲁克, EF 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯, 著. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1998. 16.

(收稿日期: 2005-05-13 编辑: 盛慧锋)