

免疫胶体金法提取环境标本中细菌 DNA 技术*

裴杰萍 何君檀 华朱虹 端青**

(军事医学科学院微生物流行病学研究所 北京 100071)

摘要: 将抗-DNA 单克隆抗体标记在胶体金颗粒上制成免疫胶体金试剂, 提取标本中 DNA, 直接用于 PCR 检测, 从而建立一种简单、快速、高效的免疫胶体金方法提取环境标本中的 DNA。结果表明: 应用免疫胶体金试剂可有效去除环境标本中 PCR 抑制剂, 浓缩模板, 提高 PCR 检测敏感度 3~4 个数量级。操作步骤简单, 无需使用有机溶剂, 避免环境污染, 吸附了 DNA 的免疫胶体金可直接用于 PCR 扩增。研制了免疫胶体金试剂并确定其最佳反应条件, 有效提高 PCR 技术在检测现场环境标本中的敏感性和实用性。

关键词: 单克隆抗-DNA 抗体, DNA 提取, PCR

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 02-0087-04

Extraction of DNA Using Monoclonal Anti-DNA and Colloidal-gold Beads*

PEI Jie-Ping HE Jun TAN Hua ZHU Hong DUAN Qing**

(The Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

Abstract: To developing a simple, rapid and sensitive immunoaffinity method for extracting DNA before amplification by the polymerase chain reaction (PCR). Using monoclonal anti-DNA bound to colloidal-gold beads (which called immunocolloidal-gold) and extracting DNA from the specimen before amplification by PCR. The immunoaffinity method we use is extremely efficient in extracting DNA at low concentration, also, the beads carrying the DNA/anti-DNA complexes can be added directly to a PCR mixture without elution, and the presence of PCR inhibitors in specimens has no effect on amplification. When applied to serial dilution bacteria suspension, the detection of limit can be 10^0 CFU/mL, and the sensitivity of detecting artificial soil sample and milk sample were 10^1 and 10^0 CFU/mL. The immunoaffinity method described here can sever as a sensitive and practicable method for extracting DNA, particularly where samples have low concentrations of DNA or where the material is in poor condition.

Key words: Monoclonal anti-DNA, DNA extracting, PCR

随着 PCR 技术的发展, 已经有许多提取基因组 DNA 的方法。但是要从环境标本如土壤、灰尘和污水中, 快速检测致病微生物, 由于模板量少, 并且含有大量 PCR 抑制剂, 往往使实验的敏感性大大降低。为提高 PCR 实验的敏感性, 许多实验室开始研究提取纯化 DNA 的实验方法, 近年来常见的是以二氧化硅作固相吸附剂提取 DNA, 如玻璃奶法, 硅胶树脂型离心柱法等。利用二氧化硅在高离子强度、低 pH 值条件下吸附 DNA, 用洗涤液洗掉吸附在二氧化硅表面的其它杂质, 再用低离子强度、高 pH 值缓冲

* 国家科技攻关计划课题 (No. 2003BA712A05-03)

国家自然科学基金资助 (No. 30370070)

** 通讯作者 Tel: 010-66948669, E-mail: duang@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2004-10-25, 修回日期: 2004-11-22

液洗脱吸附在二氧化硅表面上的 DNA 分子,用于分子生物学实验。这些方法避免使用酚-氯仿抽提,但需用乙醇沉淀,涉及蛋白酶处理,也比较烦琐。1997年英国科学家^[1]研究了抗-DNA 单克隆抗体与免疫磁珠结合的方法提取 DNA,收到较好的效果。我们利用结合了抗-DNA 单克隆抗体的胶体金颗粒特异性吸附双链 DNA,从样本中提取 DNA。期望通过建立免疫胶体金提取纯化环境标本中细菌 DNA 技术,完善现场标本 PCR 检测实验,提高 PCR 技术在检测现场环境标本中的敏感性和实用性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 氯金酸 (HAuCl₄) 购自上海试剂厂。

1.1.2 抗-DNA 单克隆抗体:本室研制。大肠杆菌 DNA 免疫小鼠后,取小鼠的脾细胞,将其与小鼠骨髓瘤细胞杂交,筛选获得抗-DNA 单克隆抗体 DNA21 株,这株抗体可以与双链 DNA 特异性结合。通过酶联免疫试验 (ELISA) 可以看出抗体可以与 DNA 发生强阳性反应。

1.1.3 玻璃奶:购自博大泰克公司。

1.1.4 离心柱:购自天为时代公司基因组 DNA 提取试剂盒 (离心柱型)。

1.1.5 实验菌株:类鼻疽伯克霍尔德菌 350102 株,本实验室保存。

1.1.6 引物设计与合成:根据 *Burkholderia pseudomallei* ferricuptake regulator gene 设计引物^[2],取其巢式 PCR 一对内引物 Fup2 和 Fdown2,扩增长度 409 bp,由华美公司合成。

1.1.7 PCR 反应体系:天为时代公司 2 × Taq PCR MasterMix。

1.2 方法

1.2.1 胶体金的制备^[3]:采用柠檬酸盐还原法,具体操作方法如下:将 HAuCl₄ 配制成 0.01% 水溶液,取 100 mL 加热至沸,搅动下准确加入 1.6 mL 的 1% 柠檬酸钠 (Na₃C₆H₅O₇ · 2H₂O) 水溶液,液体颜色稳定成葡萄酒红色,即为约 25 nm ~ 30 nm 大小的胶体金颗粒。

1.2.2 胶体金的标记^[3]:调胶体金溶液至 pH8.2,将单抗溶至 1 mg/mL,取 650 μL 加入到 30 mL 的胶体金溶液中,不断搅拌 30 min,然后加入 10% BSA 3 mL 搅拌 30 min,再加入 10% PEG 0.6 mL 搅拌 30 min,于 3,000 r/min 4℃ 离心 10 min,收集上清,将上清于 10,000 r/min 4℃ 离心 25 min,沉淀中加保存液 (四硼酸钠 0.4 g/mL, BSA 1 g/mL, NaN₃ 0.1 g/mL,用 HCl 调 pH 值为 7.4) 30 mL,混匀,9,500 r/min 4℃ 离心 25 min,沉淀加保存液重溶至 3 mL,4℃ 保存备用。

1.2.3 系列稀释菌液和模拟标本的制备:系列稀释菌液,以类鼻疽伯克霍尔德菌为检测样本,比浊法测定其浓度为 5.4×10^{10} 菌/mL。按常规方法将菌液以水进行 10 倍稀释,各取 1 mL 备用。

模拟土壤污染标本,取 0.25 g 土壤,加菌液 100 μL,生理盐水 400 μL,混匀,加 6 mol/L NaI 500 μL。模拟牛奶污染标本,市售纯牛奶 (伊利) 100 μL,加菌液 100 μL,生理盐水 300 μL,混匀,加 6 mol/L NaI 500 μL。

1.2.4 用免疫胶体金法提取 DNA:取系列稀释菌液或模拟标本 1 mL,沸水浴 10 min。然后 12,000 r/min 离心 5 min,收集上清。在上清中加入免疫胶体金 10 μL,混匀,微量振荡器上振动 15 min。9,500 r/min 离心 10 min 或 12,000 r/min 离心 5 min,吸弃上清,用含 3% FCS (小牛血清) 的生理盐水 1 mL 及灭菌纯水各洗 1 次,将沉淀加入 PCR

反应液中, 直接进行扩增。

1.2.5 用玻璃奶法和离心柱法提取 DNA; 实验按试剂盒说明操作。

1.2.6 PCR 反应: PCR 反应液 ($2 \times \text{TaqPCR MasterMix}$) 按试剂盒说明操作。每管反应体系为 $20 \mu\text{L}$, $2 \times \text{TaqPCR}$ 反应液 $10 \mu\text{L}$, 引物各 $0.2 \mu\text{L}$ ($25 \mu\text{mol/L}$), 灭菌纯水 $5.6 \mu\text{L}$, 模板 $4 \mu\text{L}$ 。循环参数为: $94^\circ\text{C} \times 3 \text{ min}$; $94^\circ\text{C} \times 40 \text{ s} \rightarrow 58^\circ\text{C} \times 40 \text{ s} \rightarrow 72^\circ\text{C} \times 40 \text{ s}$ 35 个循环; $72^\circ\text{C} \times 7 \text{ min}$ 。

用琼脂糖凝胶电泳在紫外灯下观察结果。

2 结果

2.1 系列稀释菌液

可发现使用免疫胶体金法可以获得高质量的扩增产物, 免疫胶体金法可以检测到 5.4 个菌/ mL , 比直接扩增 (最低检测到 5.4×10^4 菌/ mL) 敏感性提高 $10,000$ 倍。见图 1。

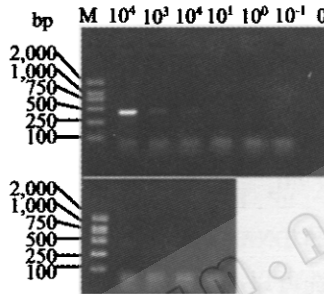


图 1 免疫胶体金法与直接扩增比较

类鼻疽基因 PCR 产物 (409bp) 凝胶电泳结果, 上排用免疫胶体金, 下排为直接扩增, 上排左起第 1 孔为 Maker (DL2000), 第 2 孔到第 8 孔含菌量依次为每毫升 5.4×10^4 , 5.4×10^3 , 5.4×10^2 , 5.4×10^1 , 5.4 , 0.54 , 0 个菌, 下排左起分别于上排对应

2.2 免疫胶体金法与玻璃奶法和离心柱法的比较

可以看出在分别对系列稀释菌液和土壤、牛奶模拟标本的检测中, 应用胶体金法可以达到这两种商品化试剂盒的检测效果。免疫胶体金法最低检测浓度分别为 10^0 菌/ mL 、 10^1 菌/ mL 、 10^0 菌/ mL , 玻璃奶法最低检测浓度分别为 10^1 菌/ mL 、 10^1 菌/ mL 、 10^0 菌/ mL , 离心柱法最低检测浓度分别为 10^0 菌/ mL 、 10^1 菌/ mL 、 10^0 菌/ mL 。免疫胶体金法在 0.25 g/mL 的土壤溶液中最低可以检测到约 50 个菌, 每毫升 10% 的牛奶标本中最低可以检测到几个菌。见图 2。

3 讨论

PCR 检测技术的第一步就是模板 DNA 的制备, 即样本中 DNA 的提取, 这直接影响着 PCR 反应的结果。尤其是标本量很少, 存在 PCR 抑制剂时, DNA 的提取就更加困难。长期以来, 样本中 DNA 的提取和纯化一直是耗时、繁琐的过程。商品化的试剂盒如玻璃奶, 离心柱型基因组 DNA 提取试剂盒的出现, 大大减少了检测时间, 提高了检测的敏感性, 但仍需蛋白酶处理, 乙醇沉淀, 步骤比较烦琐, 不适合现场环境标本应用。

本实验根据抗-DNA 单克隆抗体可以特异性的吸附双链 DNA 的特性, 研制了可以特异性结合 DNA 的免疫胶体金试剂, 并建立了免疫胶体金法提取环境标本中细菌 DNA

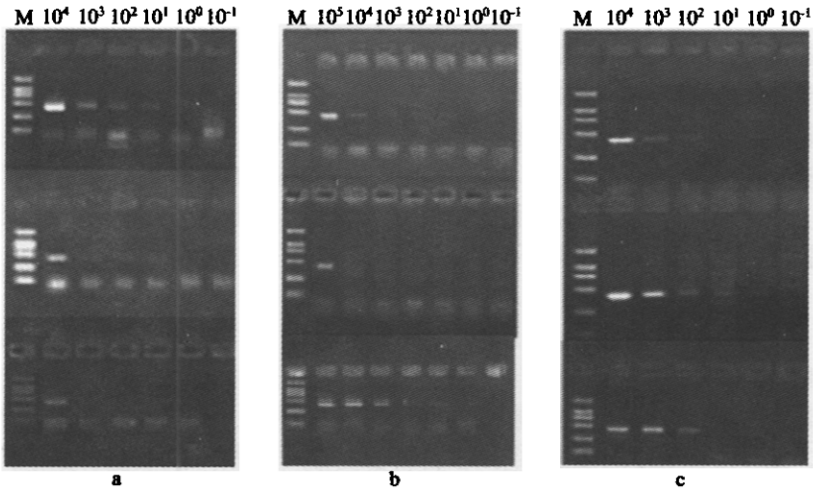


图2 免疫胶体金法与玻璃奶法、离心柱法的比较

类鼻疽基因 PCR 产物 (409bp) 凝胶电泳结果, 上排为免疫胶体金法, 中间为玻璃奶法, 下排为离心柱法 (a) 系列稀释菌液, (b) 土壤样本, (c) 牛奶样本

左起第 1 孔为 Maker (DL2000), 第 2~7 孔 (a, c) 含菌量依次为 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 , 10^{-1} 菌/mL 第 2~8 孔 (b) 含菌量依次为 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 , 10^{-1} 菌/mL

技术。实验表明免疫胶体金可与 DNA 牢固结合, 通过离心可将其富集起来, 用含 3% FCS 的生理盐水及灭菌纯水清洗可以有效去除 PCR 抑制剂。应用该方法可以从每毫升含几个菌的稀释菌液中获得高质量的扩增产物, 并可以在每 0.25 g 土壤中最低检测到 50 个菌, 在每 mL 含 10% 牛奶的样本中最低检测到几个类鼻疽菌, 大大提高了 PCR 的敏感性。与目前常用的商品化的玻璃奶和离心柱 (硅胶树脂膜) 法比较, 效果基本一致。玻璃奶法检测土壤和牛奶标本时, 在模板量少的时候存在许多非特异扩增, 影响结果的观察。离心柱法检测效果较好, 但其步骤比较繁琐并需要蛋白酶 K 处理样本。本实验方法简单, 只需 3 步: 裂解→结合→清洗, 40 min 就可获得 PCR 反应所需 DNA, 结合了 DNA 的免疫胶体金不需洗脱, 可直接用于 PCR 反应。整个过提取过程不需使用有机溶剂, 避免了环境污染。我们还用此方法检测了土拉弗朗西斯菌、鼠疫耶尔森氏菌、马鼻疽伯克霍尔德氏菌、炭疽芽孢杆菌、链球菌等, 都获得了较好的效果。

免疫胶体金溶液在 4℃ 可以存放 1~2 个月, 将其冻干后可于室温长期存放, 因而为该方法广泛应用于核酸提取提供条件。

本方法应用免疫结合的方法, 特异性的吸附 DNA, 可用于不同细菌样品 DNA 的提取, 尤其是在样本含量少、存在大量 PCR 抑制剂时, 更有效的提高了 PCR 技术在检测现场环境标本中的敏感性和实用性。

参考文献

[1] Adrian R C, Keith C, Robert J S. *BioTechniques*, 1997, 22: 1080~1082.
 [2] 宋亚军, 王 津, 张敏丽, 等. 中国人兽共患病杂志, 2001, 17 (2): 35~37.
 [3] 严 杰, 罗海波, 陆德源主编. 现代微生物学实验技术及其应用. 北京: 人民卫生出版社, 1997. 217~224.