

文章编号:1673-1689(2009)02-0276-03

### 3 种抽提隐孢子虫卵囊 DNA 方法的比较

闫东丽<sup>1</sup>, 李晓虹<sup>2</sup>, 叶邦策<sup>1</sup>

(1. 华东理工大学 生物工程学院, 上海 200237; 2. 上海出入境检验检疫局, 上海 200135)

**摘要:** 采用 FTA filter paper、Fast DNA<sup>®</sup> SPIN for Soil Kit、UNIQ-10 柱式基因组抽提试剂盒 3 种方法制备样品 DNA 模板, 根据隐孢子虫 SSU rRNA 设计内外两对引物进行巢式 PCR 扩增。3 种方法检测的灵敏度分别为 1, 10, 100 个/mL。结果表明: FTA filter paper 方法简便、特异性强、灵敏度高。

**关键词:** 隐孢子虫; DNA 抽提; 巢式 PCR

**中图分类号:** Q 789

**文献标识码:** A

### Comparison of Three DNA Template Preparations of *Cryptosporidium oocysts*

YAN Dong-Li<sup>1</sup>, LI Xiao-Hong<sup>2</sup>, YE Bang-Ce<sup>1</sup>

(1. School of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2. Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of the People's Republic of China, Shanghai 200135, China)

**Abstract:** In order to find a more simple, sensitive and specific methods of DNA template preparations from *Cryptosporidium oocysts*, three methods. FTA filter paper, Fast DNA<sup>®</sup> SPIN for Soil Kit, UNIQ-10 kit was compared. All the primers in the Nested PCR protocol were designed according to the small-subunit rRNA genes. The sensitivities of three different methods were 1, 10, 100 oocysts /mL. FTA filter paper has proven to be the more simple, sensitive and specific methods.

**Key words:** *Cryptosporidium*, DNA extraction, nested-PCR

隐孢子虫寄生于人或动物的胃肠道上皮和呼吸道上皮微绒毛上, 会导致人畜共患寄生虫病<sup>[1]</sup>。镜检法操作繁杂、费时费力且灵敏度低。分子生物学检测方法逐渐成熟, PCR 扩增是进行基因克隆和基因表达等分子生物学研究的基础<sup>[2]</sup>, DNA 模板制备是其中一个重要的因素。目前商业化的 DNA 抽提试剂盒如 QIAamp DNA stool minikit, QIAamp DNA minikit 等<sup>[3]</sup>均可抽提隐孢子虫卵囊 DNA。作

者用 FTA filter paper、Fast DNA<sup>®</sup> SPIN for Soil Kit、UNIQ-10 柱式基因组抽提试剂盒制备 DNA, 进行巢式 PCR, 选择最优的检测隐孢子虫的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

贝氏隐孢子虫 (*Cryptosporidium baileyi*) 卵囊

收稿日期: 2008-02-20

基金项目: 上海市科委技术标准专项 (05dz05008)。

\* 通讯作者: 李晓虹 (1965-), 女, 山西太原人, 理学博士, 高级工程师, 主要从事食品微生物检测方面的研究。

Email: lixh@shciq.gov.cn

悬液,中国农业科学院上海兽医研究所何国声教授惠赠,卵囊均保存于 2.5 g/dL 重铬酸钾溶液中,置于 4 °C 冰箱内。

1.2 引物

CryoutL;5'-TTCTAGAGCTAATACATGC G-3'; CryoutR; 5'-CCCCTTCCT TCGAAGC AGGA-3'; CryinL;5'-GGAAGGGTTGTATTTA TTAGATAAAG-3'; CryinR;5'-CTCATA AGG TGCTGAAGGAGTA-3',由上海生工生物工程技术服务有限公司合成<sup>[4-5]</sup>。

1.3 卵囊分离纯化

取 1 mL 卵囊,9 mL Sheater's 蔗糖溶液于 15 mL 离心管中,将 1 mL 蒸馏水沿顶端注入,500 g 离心 20 min,收集顶端水层,血球计数板计数后,浓度稀释为  $1 \times 10^5$  个/mL。

1.4 DNA 抽提

参照 FTA 卡和试剂盒说明书进行操作<sup>[6]</sup>。

1.5 巢式 PCR 扩增

1) 第一轮 PCR 扩增反应体系为:1.4 中制备的 DNA 0  $\mu$ L 或 1  $\mu$ L 作为模板,2 $\times$ Taq PCR Master Mix 50  $\mu$ L;1%BSA 4  $\mu$ L;10  $\mu$ mol/L 引物各 2.5  $\mu$ L;dH<sub>2</sub>O 41  $\mu$ L 或是 40  $\mu$ L。反应条件:94 °C 热启动 4 min;94 °C 变性 1 min,54 °C 退火 45 s,72 °C 复性 1 min,共 35 个循环;72 °C 延伸 8 min。扩增产物长度为 1330 bp。

2) 第二轮 PCR 扩增反应体系为:第一轮 PCR 产物 1  $\mu$ L,2 $\times$ Taq PCR Master Mix 50  $\mu$ L;10  $\mu$ mol/L 引物各 5  $\mu$ L;dH<sub>2</sub>O 39  $\mu$ L;反应条件:94 °C 热启动 4 min;94 °C 变性 1 min,58 °C 退火 45 s,72 °C 复性 1 min,共 35 个循环;72 °C 延伸 8 min。扩增产物长度为 830 bp。

1.6 PCR 产物检测

取第二轮 PCR 产物 10  $\mu$ L,在含有溴化乙锭的 1.5 g/dL 琼脂糖凝胶中电泳,紫外灯拍照。

2 结 果

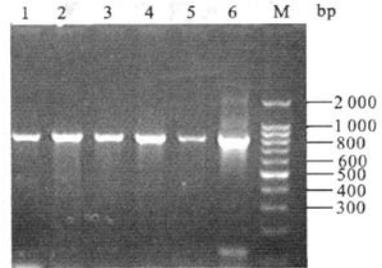
2.1 3 种 DNA 模板制备方法

FTA filter paper、Fast DNA<sup>®</sup> SPIN for Soil Kit、UNIQ-10 柱式临床样品基因组抽提试剂盒抽提的 DNA 为模板,进行巢式 PCR 扩增,结果见图 1。

由图 1 可以看出,3 种方法制备的 DNA 模板 PCR 均可扩增出 830 bp 的条带,说明 3 种方法均可用来抽提隐孢子虫 DNA。

2.2 3 种制备 DNA 模板方法的灵敏度实验

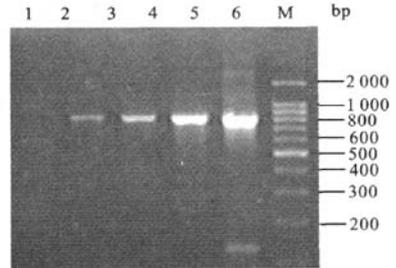
取已知浓度的贝氏隐孢子虫卵囊,稀释为  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^1$  个/mL 4 个稀释度。DNA 抽提时 FTA filter paper 加样 10  $\mu$ L,试剂盒需加样 100  $\mu$ L。然后进行两轮巢式 PCR 扩增,结果见图 2~4。



1,2 为 UNIQ-10 柱式临床样品基因组抽提试剂盒提取的 DNAPCR 产物;3,4 为 Fast DNA<sup>®</sup> SPIN for Soil Kit 提取的 DNAPCR 产物;5,6 为 FTA filter paper 提取的 DNA PCR 产物 M;100 bp DNA Marker

图 1 3 种 DNA 模板制备方法的 PCR 产物电泳图

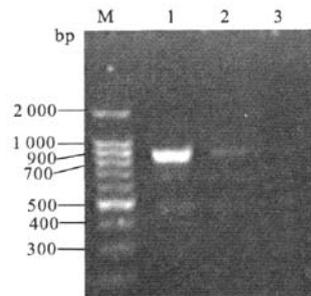
Fig.1 PCR products of three DNA templates



1.  $1.0 \times 10^{-1}$  个/mL 2.  $1.0 \times 10^0$  个/mL 3.  $1.0 \times 10^1$  个/mL 4.  $1.0 \times 10^2$  个/mL 5.  $1.0 \times 10^3$  个/mL M;100 bp Marker

图 2 FTA filter paper 方法的灵敏度

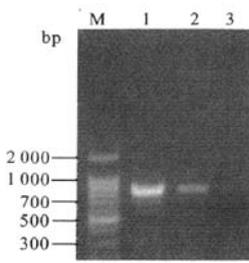
Fig.2 Sensitivity of FTA filter paper method



M;100bp Marker;1.  $1.0 \times 10^2$  个/mL;2.  $1.0 \times 10^1$  个/mL;3.  $1.0 \times 10^0$  个/mL

图 3 Fast DNA<sup>®</sup> SPIN for Soil Kit 方法的灵敏度

Fig.3 Sensitivity of fast DNA<sup>®</sup> SPIN for soil kit method



M: 100 bp Marker; 1.  $1.0 \times 10^3$  个/mL; 2.  $1.0 \times 10^2$  个/mL; 3.  $1.0 \times 10^1$  个/mL.

图4 UNIQ-10柱式临床样品基因组抽提试剂盒方法的灵敏度

Fig. 4 Sensitivity of UNIQ-10 method

由图2~4可以看出,3种方法的灵敏度为1, 10, 100 个/mL。

### 3 结语

本实验中3种DNA抽提方法的巢式PCR结

果表明,该3种方法均适用于隐孢子虫卵囊的抽提,其中利用FTA filter paper方法抽提得到的PCR产物灵敏度较高,可达到个位数<sup>[6]</sup>。Fast DNA<sup>®</sup> SPIN for Soil Kit虽然样品直接提取效果与IMS纯化后的QIAamp DNA minikit效果相似<sup>[3]</sup>,但其价格昂贵,灵敏度较低。UNIQ-10柱式临床样品基因组抽提试剂盒虽然价格便宜,是另两种方法不能与之相比的,其操作过程也不繁杂,但其抽提效率和灵敏度都很低。FTA滤膜经洗脱干燥后,易于保存,常温下可放置10多年,使用非常方便。该操作过程极其简单,从加样到DNA模板干燥整个程序所花费时间至多也不超过3h,其价格也较Fast DNA<sup>®</sup> SPIN for Soil Kit廉价许多。

通过对3种抽提样品中隐孢子虫DNA方法,从操作程序、价格及灵敏度方面的比较认为,FTA filter paper方法操作简便、所用检测时间短且灵敏度高,相对来说也比较经济,是目前较好的检测食品中隐孢子虫的好方法。

### 参考文献(References):

- [1] 张龙现,蒋金书,刘群,等. PCR-RFLP鉴定隐孢子虫种类研究[J]. 畜牧兽医学报,2004,35(5):555-559.  
ZHANG Long-xian, JIANG Jin-shu, LIU Qun, et al. Cryptosporidium species from dairy cow and poultry identified by PCR-restriction fragment length polymorphism[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2004,35(5):555-559. (in Chinese)
- [2] 邵敬伟,吴志香,郭养浩,等. GDHt- $\beta$ 亚基基因的套式PCR扩增及其DNA测序[J]. 食品与生物技术学报,2005,24(5):86-88.  
SHAO Jin-wei, WU Zhi-xiang, GUO Yang-hao, et al. Booster-PCR amplification and sequencing of gene Encoding  $\beta$ -subunit of glycerol dehydratase[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2005,24(5):86-88. (in Chinese)
- [3] Jiang JL, Kerri A, Ajaib S. et al. Development of procedures for direct extraction of *Cryptosporidium* DNA from water concentrates and for relief of PCR inhibitors[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(3):1135-1141.
- [4] Xiao LH, Escalante L, Yang C, et al. Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999,65(4):1578-1583.
- [5] 张龙现,蒋金书,刘群,等.巢式PCR检测隐孢子虫卵囊的研究[J]. 畜牧兽医学报,2003,34(5):509-514.  
ZHANG Long-xian, JIANG Jing-shu, Liu Qun, et al. Study on detection of *Cryptosporidia* oocysts in fecal sample from animal by Nested-PCR[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2003,34(5):509-514. (in Chinese)
- [6] Palmer A. Orlandi, Keith A, et al. Extraction-free, filter-based template preparation for rapid and sensitive PCR detection of pathogenic parasitic protozoa[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000,38(6):2271-2277.

(责任编辑:李春丽)