

肠炎沙门氏菌 gDNA 标准物质的研究

柯璐^{1,2}, 黄晓蓉^{*1,2}, 林杰^{1,2}, 戴晓丽^{1,2}, 曾维扬^{1,2}, 张温玲^{1,2}

(1. 福建出入境检验检疫局, 福建 福州 350001; 2. 福建省检验检疫技术研究重点实验室, 福建 福州 350001)

摘要: 作者对制备肠炎沙门氏菌核酸标准物质(gDNA)进行初探,共制备 200 支样品,每支约含有肠炎沙门氏菌 gDNA 1 μg。方差分析结果显示, F 值为 0.835 7,小于 $F_{0.05}(14,30)=1.68$,表明在 95%显著性水平时,样品的 gDNA 含量均匀;稳定性试验表明样品在-20 ℃下保存 12 个月,gDNA 含量维持在 1 μg/支,0.8 g/dL 的琼脂糖凝胶电泳的目标条带清晰,以 *invA* 基因为引物的 PCR 反应产物电泳条带清晰,样品均具有较好的稳定性。

关键词: 肠炎沙门氏菌;核酸;标准物质

中图分类号: Q93-331 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2015)08-0891-05

Study on the Reference Materials of *Salmonella enteritidis* Nucleic Acid

KE Lu^{1,2}, HUANG Xiaorong^{*1,2}, LIN Jie^{1,2}, DAI Xiaoli^{1,2}, ZENG Weiyang^{1,2}, ZHANG Wenling^{1,2}

(1. Fujian Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Fuzhou 350001; Fujian Provincial Key Laboratory of Inspection and Quarantine Technology Research, Fuzhou 350001)

Abstract: The preparation of nucleic acid reference materials of *Salmonella Enteritidis*(gDNA) was carried out in this study. A total of 200 samples were prepared, each of them contained 1 μg of *Salmonella Enteritidis* gDNA. Variance analysis results showed that F value was 0.835 7 < $F_{0.05}(14,30) = 1.68$, indicating that gDNA content was evenly in the 95% significance level. Stability tests showed that gDNA content of the samples was maintained at 1 μg/support after stored for 12 months at the temperature of -20 ℃. The goal electrophoresis band of 0.8 g/dL agarose gel and the electrophoresis bands of PCR reaction product by using the *invA* gene as primers were clear revealed that the property of samples were stable.

Keywords: *Salmonella enteritidis*, gDNA, reference materials

福建省曾因微生物污染遭遇国际贸易壁垒的抵制而使得出口商家损失巨大。20 世纪 90 年代以来,以核酸为基础的基因诊断技术发展迅速,并在食品微生物领域逐渐成为出入境口岸检验检疫中快速检测方法之一。由于国内在快速检测方面没有统一的标准,各试剂盒采用的标准也各有不同,使

得结果相差甚大,给进出口产品检验检疫带来很大的误差^[1]。要解决检测的标准化问题以及提高检测的有效性,需要一个统一的标准物质。在国际上,生物成分的 gDNA 标准物质,大部分都是针对人类及一些真核生物,而关于细菌的基因组标物却比较少,目前欧盟执委会联合研究中心标准与测量研究

收稿日期: 2014-04-21

基金项目: 福建省科学技术厅社会发展重点项目(2011Y0002)。

* 通信作者: 黄晓蓉(1958—),江苏南通人,主任技师,主要从事微生物生理及生物化学方面的研究。E-mail: hxrwz@163.com

院(IRMM)有研制细菌基因组 DNA 的标准物质^[2],在国内却很少有报道。肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*, SE)是引起食物中毒的常见致病菌,在公共卫生学上具有重要意义,严重影响养殖业的发展和人类健康^[3],作者对肠炎沙门氏菌 gDNA 标准物质进行研究制备,为 gDNA 标物的研制提供可行的技术路线。

1 材料与方法

1.1 菌源及引物

肠炎沙门氏菌 *Salmonella enteritidis* (ATCC13076): 购自上海汉尼公司; 引物 invA (286bp): 由北京赛百盛基因技术有限公司合成; invA-1: 5'-GTGA AATT TACG CCAC GTTC GGGC AA-3'; invA-2: 5'-TCAT CGCA CCGT CAAA GGAA CC-3'

1.2 主要仪器及耗材

多功能酶标仪: Molecular Devices 公司 SpectraMax M5; 核酸蛋白仪: Eppendorf 公司 Biophotometer; 全自动变焦凝胶成像系统: 美国 KODAK 公司 GL212Pro; 电泳仪、水平电泳槽系统: 美国 BIO-RAD 公司, Powerpac 通用型, SUBCELL-GT; 冷冻干燥机: 美国 LABCONC 公司, FreeZone[®] Triad[™] 2.5L; 冻存管: 京中生柏奥生物科技有限公司, 0.5 mL。

1.3 主要试剂

缓冲蛋白胨: 北京陆桥公司; Puregene Yeast/Bact.Kit B 试剂盒: QIAGEN 公司; 通用型 DNA 纯化回收试剂盒: 北京天根生化科技有限公司; λ DNA: Promega 公司产品; λ DNA/Hind III + EcoR I Marker: 上海英骏生物技术有限公司; 2 $\times$ Taq PCR MasterMix: 自北京天根生化科技有限公司; 100 bp DNA Ladder Marker: 北京天根生化科技有限公司; Picogreen 荧光染料等。

2 SE gDNA 标准物质制备方法

2.1 高浓度 gDNA 提取

核酸标准物质的质量关键在于基因组必须具有较好的完整性,且 $A_{260/280}$ 在 1.70~1.90^[4]。经比较, QIAGEN 公司生产的 Puregene Yeast/Bact.Kit B for Purification of Archive-quality DNA from Gram-Positive Bacteria Culture Medium 试剂盒提取过程相

对简便快捷,且基因组质量优良。取新鲜培养菌液(菌浓度达到 $0.5 \times 10^9 \sim 1.5 \times 10^9$ cells),按试剂盒步骤进行提取。

2.2 gDNA 浓度测定

利用 pH 8.0 TE 溶液按 200:1 比例对 Picogreen 染料原液进行稀释,充分混合后避光保存待用。将 1 μ L DNA 样品与 99 μ L pH 8.0 TE 溶液混合,50 $^{\circ}$ C 孵育 5 min,每个待测样品做两个平行,孵育后样品与 100 μ L Picogreen 工作试剂混合。同时,选用浓度为 2 μ g/mL 的 λ DNA 作为外标物,选取 6 个体积控制点,与 pH 8.0 TE 溶液及 100 μ L Picogreen 工作试剂混合,最终稀释度见表 1。混合液快速点入 96 Well corning 黑色荧光板中,避光孵育 5 min,于多功能酶标仪上检测。

表 1 标准曲线制备设计

Table 1 Protocol for preparing standard curve

序号	2 μ g/mL DNA 原液体积/ μ L	pH 8.0 TE 缓冲液/ μ L	PicoGreen 试剂/ μ L	终质量浓度/(ng/mL)
1	100	0	100	1 000
2	50	50	100	500
3	25	75	100	250
4	12.5	87.5	100	125
5	5	95	100	50
6	0	100	100	0

2.3 gDNA 的核酸电泳及特征性验证

2.3.1 核酸电泳 取 7 μ L 的 gDNA 与 6 $\times$ Loading Buffer 混合,1.0 g/dL 的琼脂糖凝胶电泳,设计 10 个平行,98 V 下电泳约 80 min,EB 染色 30 min,利用全自动变焦凝胶成像系统观察条带。

2.3.2 invA 基因扩增 以 invA (286 bp) 为引物进行 PCR 反应,10 管平行实验,每管 25.0 μ L 反应体系,详见表 2。

表 2 PCR-25 反应体系

Table 2 PCR-25 reaction system

体系	用量/ μ L
2 $\times$ Taq PCR MasterMix	12.5
primer1: invA-1	0.6
primer2: invA-2	0.6
ddH ₂ O	10.3 μ L (补足 25.0 μ L)
模板 gDNA	1 μ L

PCR 扩增反应热力学循环参数为:95 $^{\circ}$ C、5 min 预变性,95 $^{\circ}$ C、30 s 变性,64 $^{\circ}$ C、30 s 退火,72 $^{\circ}$ C、30

s 延伸,共 35 个循环,25 ℃保温。

分别取 10 μL PCR 产物进行 2.0 g/dL 琼脂糖凝胶电泳,200 V 下跑胶约 20 min,EB 染色 30 min,利用全自动变焦凝胶成像系统观察条带。

2.2.3 PCR 产物的纯化回收、测序 按照 Universal DNA Purification Kit 步骤对 PCR 反应产物进行纯化。取纯化产物 1 mL 于离心管中,盖口封膜后送至上海生工进行克隆测序。将测序获得的基因序列进行在线 BLAST,分析比对结果是否存在差异,以此

作为 gDNA 标准物质的特征标志。

2.3 制备 gDNA 标准物质

2.3.1 冷冻干燥程序的选择 制备的 gDNA 标准物质进行冷冻干燥后密封保存。针对冷冻干燥过程中对结果影响较大的两个因素水平进行实验设计,以冻干后 gDNA 质量浓度为指标,选择适合的冷冻干燥程序,每个水平设置 6 个重复,主要分析因素及水平见表 3。

表 3 冷冻干燥影响因素及水平设计

Table 3 Influence factor and level design of Freeze drying

因素	降温速率/ (℃/h)	gDNA 体积/μL	初始质量浓度/ (μg/mL)	预冻时间/h	隔板控温-40 ℃ 运行时间/h	隔板控温 4 ℃ 运行时间/h
水平 1	0.50	100 μL	20	5	5	3
水平 2					7	5
水平 3					10	7

2.3.2 gDNA 的分装 将 gDNA 溶液用 pH 8.0 TE 溶液稀释后分装于冻存管,100 μL/支,于-70 ℃预冻 5 h 后,置于冷冻干燥机按 2.3.1 程序冻干。

2.3.4 冻干样品的均匀性验证及定值

1) 样品 gDNA 含量(μg)测定:抽取 15 支冻干样品,加 100 μL、pH 8.0 TE 溶液,室温下溶解 2 min,于涡旋振荡仪上低速涡旋 20 s,置于 50 ℃干浴锅中溶解 5 min,每支样品设置 3 个平行,样品最终质量浓度 c_z (μg/μL) 取平均值计,gDNA 样品质量(μg)=100 μL $\times c_z$ 。参照 CNAS-GL03:2006《能力验证样品均匀性和稳定性评价指南》要求,采用 t 检验法进行验证。

2) 不确定度评估 测量不确定度主要由 The Picofluor™ 荧光计的测量中产生,评估方法如下:抽取样本数为 $n=10$,每个样本进行平行 3 次的测量,标准不确定度 $U=S_x/n^{1/2}$ 。

$$\text{公式中: } S_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2}{n(n-1)}} \quad \bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

2.3.5 对冻干样品进行特征性验证及稳定性追踪 对抽取的 10 份样品同时进行以 invA 为引物的 PCR 扩增。模拟-20、4、25、60 ℃ 4 个保存温度,对 gDNA 标准物质分组保存。在不同时间段,每个保存温度各抽取 3 份样品,以 gDNA 浓度、核酸电泳及特征性扩增为指标,进行稳定性追踪^[5-7]。

3 结果与讨论

3.1 gDNA 质量浓度及特征性检测

将提取的 gDNA 混合,混合后质量浓度为 96 μg/mL, $A_{260}/A_{280}=1.87$ 。将 gDNA 溶液分装于 17 支 1.5 mL 离心管中,1 mL/支,于-20 ℃保存待用。

由图 1—2 可知,9 条 gDNA 溶液电泳条带清晰,条带均在 20 kb 左右。PCR 反应产物电泳条带清晰,无明显杂带,与阳性对照条带位置一致。由图 3 可知,将测序的结果以 FASTA 的格式上传至 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> 进行 nucleotide blast,数据库选择 nucleotide collection(nr/nt)。测序峰图结果显示其信号强,无明显干扰,清晰可见。进行 nucleotide blast,结果为 Identities=100%。

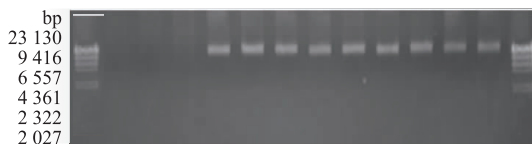


图 1 gDNA 核酸电泳图

Fig. 1 gDNA nucleic acid electrophoresis

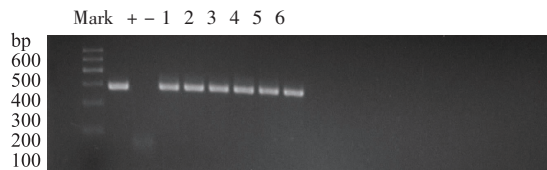


图 2 gDNA PCR 反应产物电泳图

Fig. 2 GDNA PCR reaction product electrophoresis

Salmonella enterica invasion protein(invA) gene, partial cds
Sequence ID:gb|U43272.1|SEU43272 Length:1950 Number of Matches:1

Range 1:269 to 554 GenBank		Graphics	▼Next Match
Score	Expect	Identities	Gaps
529 bits(286)	6e-147	286/286(100%)	0/286(0%)

Query 2 GTGAAATATCGCCACGTTCCGGCAATTCGTATATGGGATAGCTGGCGGTGGTTTG 61
Sbjct 269 GTGAAATATCGCCACGTTCCGGCAATTCGTATATGGGATAGCTGGCGGTGGTTTG 328

Query 62 TTGCTCTCTTATGTCACCGTGGTTCAGTTATCGTATATACCAAGGTTTCAGAACCGG 121
Sbjct 329 TTGCTCTCTTATGTCACCGTGGTTCAGTTATCGTATATACCAAGGTTTCAGAACCGG 388

Query 122 TCGCCGAAGTCGCGGCCGATTTTCTCTGGATGGTATGCCCGTAAACAGATGATTTG 181
Sbjct 389 TCGCCGAAGTCGCGGCCGATTTTCTCTGGATGGTATGCCCGTAAACAGATGATTTG 448

Query 182 ATGCCGATTTGAAGGCCGGTATTTATGATCGGATGCTGCGCGCAAGCGGACGCTAC 241
Sbjct 449 ATGCCGATTTGAAGGCCGGTATTTATGATCGGATGCTGCGCGCAAGCGGACGCTAC 508

Query 242 TGGAAAGGGAAGCAGCTTTACGGTTCCTTTGACGGTGGCATGAA 287
Sbjct 509 TGGAAAGGGAAGCAGCTTTACGGTTCCTTTGACGGTGGCATGAA 554

图 3 测序比对结果

Fig. 3 Sequence alignment result

3.2 冷冻干燥因素结果及分析

由表 4 可知,当程序设定为隔板控温-40℃运行 7 h,隔板控温 4℃运行 5 h 时,gDNA 冻干后质量浓度最高。将 gDNA 溶液稀释至 15 μg/mL 后按照冻干程序进行冷冻干燥,冻干后样品用 Parafilm 封口膜封闭瓶盖。

表 4 冷冻干燥试验结果

Table 4 Experiment results of Freeze drying

序号	隔板控温-40℃运行时间	隔板控温 4℃运行时间	初始质量浓度/(μg/mL)	冻干后质量浓度/(μg/mL)
1	1	1	20	12
2	1	2		13
3	1	3		12
4	2	1		15
5	2	2		17
6	2	3		13
7	3	1		15
8	3	2		14
9	3	3		15

3.3 样品的浓度及均匀性结果

抽取的 15 支样品,利用荧光值法分别测定 3 次,cz= 11 μg/mL,均匀性结果见表 5。

表 5 方差分析结果

Table 5 Results of variance analysis

差异源	SS	df	MS	F	F _{0.05} (14,30)
组间	0.018 511	14	0.001 322	0.835 7	1.68
组内	0.047 467	30	0.001 582		

参考文献:

[1] 王根荣,陆慧. 标准物质及其管理[J]. 化学计量分析,2004,13(6):59-62.
WANG Genrong,LU Hui. Reference material and its administration[J]. Chemical Analysis and Meterage,2004,13(6):59-62.

F 值=0.835 7,小于 F_{0.05}(14,30)= 1.68,这表明在 0.05 显著性水平时,样品中的 gDNA 含量是均匀的。

3.4 研制方法的不确定度分析与评估

经计算,单次测量结果试验的标准差:S=3.529,则 U=0.6442。因此,当检验结果以 3 次测量值的平均值表示时,其值区间分布于(11±0.644 2) μg/mL 之间,这个取值区间适合于任何一次测量。

3.5 标准物质的稳定性追踪

3.5.1 样品质量浓度稳定性追踪 4 种保存温度下标准物质 gDNA 质量浓度与 t=0 的 gDNA 质量浓度对比,统计结果见表 6。

表 6 稳定性结果

Table 6 Stability test results

保存时间	-20℃	4℃	25℃	60℃
1 周	0.410	0.418	0.151	<0.01
3 周	0.446	0.142	0.021<0.05	<0.01
2 月	0.643	0.052	<0.01	<0.01
6 月	0.538	0.031<0.05	<0.01	<0.01
12 月	0.540	0.018<0.05	<0.01	<0.01

由表 6 可见,样品在-20℃下保存 12 个月标准物质质量浓度稳定,在 4℃下保存半年后,gDNA 开始降解。而在 25℃及 60℃下存储,gDNA 样品降解快,不稳定。

3.5.2 琼脂糖凝胶电泳结果 每个保存温度抽取 3 支样品进行核酸电泳,同时进行 PCR 产物电泳。结果表明,在-20、4、25℃下保存 12 个月,gDNA 电泳条带清晰,无明显杂带。PCR 产物电泳结果显示,在-20、4、25℃下保存 12 个月均能扩增出 invA。而保存温度为 60℃时,虽 invA 特征基因能被扩增出,但 gDNA 电泳结果无条带。

4 结 语

本研究制备的肠炎沙门氏菌 gDNA 标物共 200 支,具备一定的稳定性和均匀性,给核酸标准物质的制备及验证方法提供了有效的依据,并建立起适用于标准物质的定值的方法及不确定度的评估方案,作为制备成果适用性的理论依据。

- (in Chinese)
- [2] 张洁. 生物标准物质的制备、发展及管理[J]. 中国生物制药学杂志, 2007, 20(6): 630-632.
ZHANG Jie. The preparation, development and management of biological reference materials [J]. **Chinese Journal of Biologicals**, 2007, 20(6): 630-632. (in Chinese)
- [3] 叶朗光, 邓树轩. 肠炎沙门氏菌研究进展[J]. 畜牧与饲料科学, 2011, 32(2): 121-122.
YE Langguang, DENG Shuxuan. The research progress of salmonella enteritidis [J]. **Animal Husbandry and Feed Science**, 2011, 32(2): 121-122. (in Chinese)
- [4] 张丽, 杨莲茹, 吴绍强. 核酸提取方法的研究进展[J]. 中国动物检疫, 2011, 28(12): 75-78.
ZHANG Li, YANG Lianru, WU Shaoqiang. The research progress of nucleic acid extraction method [J]. **China Animal Health Inspection**, 2011, 28(12): 75-78. (in Chinese)
- [5] 韩永志. 标准物质不确定度的给定与评定[J]. 地质实验室, 1995(3): 162-163.
HAN Yongzhi. Given and evaluation of reference materials uncertainty [J]. **Geological Laboratory**, 1995(3): 162-163. (in Chinese)
- [6] 阚莹, 张正东. 标准物质均匀性检验统计量F的判断[J]. 中国计量, 2010(4): 78-79.
HAN Ying, ZHANG Zhengdong. The statistic F judgment of reference materials homogeneity test [J]. **China Metrology**, 2010(4): 78-79. (in Chinese)
- [7] 韩永志. 标准物质的稳定性监测及评价[J]. 化学分析计量, 2001, 10(4): 37-79.
HAN Yongzhi. The stability of the reference materials monitoring and evaluation [J]. **Chemical Analysis and Meterage**, 2001, 10(4): 37-79. (in Chinese)

科技信息

菲律宾发布有关食品辐射加工实施规程

2015年6月22日, 菲律宾发布《国家标准最终草案: 有关食品辐射加工实施规程》, 该规程为利益相关人士提供有关辐射加工卫生与植物卫生方面的指南。该规程覆盖所有经伽马射线、X射线或加速电子处理, 以控制食源性病原体、降低微生物含量、控制检疫性有害生物、抑制根作物萌芽及延长货架期的加工食品。

[信息来源] 国家质量监督检验检疫总局. 菲律宾发布有关食品辐射加工实施规程 [EB/OL]. (2015-7-2). http://jckspaqj.aqsiq.gov.cn/wxsts/gwbz/201506/t20150630_443759.htm

加拿大允许燕麦产品使用“无谷蛋白”声明

2015年6月19日, 据香港贸发局网站消息, 加拿大政府已经发布一项销售授权, 允许特制燕麦和含燕麦的食品使用“无谷蛋白”声明。

尽管正常农业作业会造成少量谷蛋白存在于燕麦中, 但加拿大相关机构指出, 最新的证据表明, 燕麦能够安全地被多数身患腹腔疾病的人士所食用, 只要其生产、加工能避免来自其它谷类谷蛋白的交叉污染。

[信息来源] 食品伙伴网. 加拿大允许燕麦产品使用“无谷蛋白”声明 [EB/OL]. (2015-6-26). <http://news.foodmate.net/2015/06/315887.html>