

肺炎支原体基因组 DNA 一步法提取 在可视化环介导等温扩增体系中的应用研究*

严春霞, 闻人庆, 陆伟宏, 何国产 (金华职业技术学院, 浙江金华 321007)

摘要:目的 探究建立肺炎支原体(Mp)基因组 DNA 一步提取方法,应用于显色肺炎支原体环介导等温扩增(LAMP)体系,以期研制出高灵敏度和高特异度肺炎支原体的检测方法。方法 分别用5种方法提取肺炎支原体培养液基因组 DNA,并分别从 Mp DNA 的纯度、产量、操作步骤、仪器设备和提取时间方面进行比较;最后将5种方法提取的基因组 DNA 同时应用于已建立的可视化 LAMP 体系检验提取效果;选取2016年1月~3月20例支原体肺炎住院患儿的咽拭子标本,并用改良后的 ROSE 法提取咽拭子标本,并鉴定提取效果。结果 提取纯度上,ROSE 法和其他四种方法进行两两比较,差异均具有统计学意义(P 均 <0.05),即 ROSE 法略好于碱裂解法和煮沸法,但低于 CTAB 法和试剂盒法;产量上,ROSE 法和其他四种方法进行两两比较的结果是:和煮沸法比差异无统计学意义($q=0.95, P>0.05$),和其他三种方法比差异有统计学意义(P 均 <0.05),因此 ROSE 法提取的产量要高于碱裂解法、CTAB 法和试剂盒法;在仪器设备、操作步骤和提取时间上 ROSE 法、碱裂解法和煮沸法优于 CTAB 法和试剂盒法;5种方法提取的 DNA 均能应用于 LAMP 反应,除煮沸法外,其余四种方法结果无明显差异。结论 该研究建立了肺炎支原体一步法基因组 DNA 提取方法,成功应用于显色 Mp LAMP 体系中,真正实现不需要任何贵重仪器即可检测肺炎支原体。

关键词:一步法;DNA 提取;肺炎支原体

中图分类号:R375.2;Q781 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2017)02-082-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2017.02.022

One Step Extraction of *Mycoplasma Pneumoniae* Genomic DNA in Application Research of the Visuable LAMP System

YAN Chun-xia, WEN Ren-qing, LU Wei-hong, HE Guo-chan

(Jinhua College of Profession and Technology, Zhejiang Jinhua 321007, China)

Abstract: Objective The modified rapid one-step extraction (ROSE) method was employed in the *Mycoplasma pneumoniae* (Mp) genomic DNA extraction, in order to establish an easy DNA extraction method, which is used in Mp Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) and suitable for high throughput without any expensive instruments. **Methods** In line with the character of Mp, a one-step Mp acid extraction method was established on the basis of ROSE. The studies had been carried out on comparing the modified ROSE DNA extraction with the classical methods of Boiling, CTAB, Alkali solution and reagent kit in extraction quality, quantity, reagent kinds, operation steps and extraction time. The extracted DNA of the Mp culture solution by these five methods had been used in LAMP to test the extraction efficiency. 20 cases of Throat swab specimens from children with mycoplasma pneumonia were selected from January to March of 2016, and the throat swab specimens were extracted by the improved ROSE method then applied to LAMP detection system. **Results** Purity, comparison of ROSE method and other four methods were $P<0.05$, the difference was statistically significant and ROSE was slightly better than the alkaline lysis method and boiling method, but lower than the CTAB method and kit method; Yield, results were compared with ROSE method and other four methods: there was no significant difference in $q=0.95$ ($P>0.05$) compared with ROSE method and boiling method. The ROSE method was significantly different from the other three methods ($P<0.05$), so the yield of ROSE method was higher than that of alkaline lysis method, CTAB method and kit method. Instrument and equipment, extracting procedure, extracting time and quantity ROSE, Boiling and Alkali solution were obviously better than CTAB and reagent kit. The extracted DNA by these five methods could be used in LAMP reaction, and the results showed no significant difference. **Conclusion** This study established an original one-step DNA genomic extraction method of Mp, which had been successfully applied in the Mp LAMP without any expensive instruments. Offer a groundbreaking method detecting Mp for the hospitals at all levels including the primary medical organizations.

Keywords: one-step extraction; DNA extraction; mycoplasma pneumoniae

肺炎支原体 (*mycoplasma pneumoniae*, Mp) 是儿童和青少年非典型肺炎的首要病原微生物。

* 基金项目:金华市科技计划项目(2014-3-034),浙江省科技计划项目(2017C37085)。

作者简介:严春霞(1977-),女,硕士,主管技师,主要从事病原微生物检测的研究, Tel:13757990496, 0579-82265099。

支原体肺炎一年四季均可暴发流行,以秋冬季为主,学龄前儿童为主要感染人群^[1,2]。Mp感染早期诊断具有较高的临床价值和流行病学意义。

目前Mp检测应用最广泛的方法是检测抗体的ELISA法,但Mp抗体滴度 ≥ 160 才提示患儿急性期感染的可能性较大^[3],不利于支原体肺炎的早期诊断。抗原和核酸检测阳性能忠实代表Mp感染,是可靠的检测靶标,但基于Mp基因密码子具有特殊性,UGA在Mp基因中编码色氨酸,而在大肠埃希菌表达系统中为终止密码子,因此无法获得单克隆抗体^[4],核酸检测成为首选的检测目标。

LAMP^[5]是近年发展起来的核酸检测新技术,在恒温水浴中即可进行,甚至有研究报道通过在LAMP体系中加入指示剂使检测结果可视化^[6],真正实现不需要任何昂贵的检测仪器即可实现基因检测,适合各级医院包括基层卫生组织及现场高通量检测。核酸提取是进行该检测的前提,核酸提取质量对LAMP扩增成功与否有重大影响。

1 材料与方 法

1.1 研究对象 收集2016年1月~3月20例支原体肺炎住院患儿的咽拭子标本,男性10例,女性10例。患儿Mp符合盛湘越^[7]提到的标准:①临床症状和体征表现,如持续高热、频繁咳嗽、胸部闻及湿罗音、哮鸣音、气喘气促等;②胸部X线检测见云雾状、扇状游走性阴影等;③MP的抗药性,曾使用青霉素类抗菌药物3天以上均无效;④实验室检查,血常规检查中见白细胞正常或减少。

1.2 试剂和仪器 菌株来源及试剂:肺炎支原体(ATCC 15531)标准菌株购于中国生物制品检定所;Mp液体培养基购于日水生物有限公司;胎牛血清购于杭州四季青生物公司;其他化学试剂购于Sigma公司。仪器:培养箱、低温离心机、电泳仪、电泳槽、水浴箱和紫外分光光度计等。

1.3 方 法

1.3.1 Mp基因组DNA的提取:Mp标准菌株以含20 ml/dl小牛血清的Mp液体培养基活化,36 \pm 1 $^{\circ}$ C培养24 h后取1.5 ml Mp菌液分装在EP管中,再分别以ROSE法、CTAB法、碱裂解法、煮沸法和试剂盒法提取Mp基因组DNA,Mp菌液取自同一培养批次,每种方法分别提取24次。①煮沸法:取1.5 ml Mp菌液,100 $^{\circ}$ C煮沸10 min,置于4 $^{\circ}$ C保存备用。②碱裂解法:步骤按照石滢等^[8]写的操作,提取的DNA溶液置于4 $^{\circ}$ C保存备用。③CTAB法:本方法按张明月等^[9]的方法进行操作。提取的DNA溶液置于4 $^{\circ}$ C保存备用。④ROSE法:本方法按Steiner等人的方法稍作改进后进行^[9]。实验操作如下:将含1.5 ml Mp菌液的Ep

管中加入1.5 ml 2 \times ROSE提取缓冲液(提取缓冲液为1 g/dl SDS,10 mmol/L Tris,0.3 mol/L EDTA,1 g/dl PVPP,pH8.0),混匀后置于90 $^{\circ}$ C水浴中,不时颠倒混匀。孵育20 min后,置于冰浴中5 min,4 $^{\circ}$ C保存备用。⑤DNA提取试剂盒法:采用OMEGA细菌基因组DNA提取试剂盒,按说明书操作。

1.3.2 各方法提取的Mp基因组DNA纯度分析和产量计算:紫外分光光度计测定DNA的 $A_{260\text{nm}}$ 值和 $A_{280\text{nm}}$ 值,从而计算纯度和产量。

1.3.3 五种提取方法的比较:在消耗时间、需要准备试剂种类、是否需要离心设备、试剂毒性四个方面进行比较。

1.3.4 五种方法提取的Mp基因组DNA应用于显色Mp LAMP检测:先将各方法提取的基因组DNA均稀释至50 μ g/ml。LAMP反应参数如下:引物F3: CACCCTCGGGGCAGTCAG;引物B3: GACCAGCAGGGACAATCAG;引物FIP(F1C-F2): ATGATTACAGGCGGTTCGTTTTGTTTCAGAGCTGGAGTTGGCT;引物BIP(B1C-B2): ACCACACCAAGTTCACGAGCGTTTTTCATTCTTCACCCCGCCC。反应总体积为25.0 μ l,包括2.5 μ l 10 \times Thermopool buffer;4.0 μ l MgSO₄(25 mmol/L);1.0 μ l dNTPs(15 mmol/L);1.0 μ l Bst DNA聚合酶(8U/ μ l);各1.0 μ l F3,B3(5 μ mol/L);各1.0 μ l FIP,BIP(20 μ mol/L);2.0 μ l各方法提取的Mp基因组DNA;ddH₂O补足至25.0 μ l,63 $^{\circ}$ C反应60 min观察各管颜色变化,80 $^{\circ}$ C 5 min终止反应后琼脂糖凝胶电泳检测扩增效果,同时以ddH₂O作为阴性对照。

1.3.5 一步提取法提取咽拭子标本,并应用于LAMP检测体系:选取2016年1月~3月20例支原体肺炎住院患儿的咽拭子标本,放于无菌的Ep管中,加入200 μ l 2 \times ROSE缓冲液,混匀后置于90 $^{\circ}$ C水浴中,不时颠倒混匀。孵育20 min后,置于冰浴中5 min,4 $^{\circ}$ C保存备用。

将提取产物应用于LAMP检测体系,检测参数同1.3.4,咽拭子一步法提取产物不稀释,直接作为模板加入反应体系。同时以ddH₂O作为阴性对照。扩增结束后观察各反应管颜色,并以琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

1.4 统计学分析 采用SPSS16.0统计软件,计数资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,先进行方差分析F检验。如 $P<0.05$,再把ROSE法和其他四组进行两两对比,采用q检验。

2 结 果

2.1 各方法提取的Mp基因组DNA的纯度分析

见表1。用SPSS16.0统计软件先进行方差分析, $F=8.73$ 。每种方法提取的次数均为 $n=24$, 因 F 界值表中无分母自由度 67, 取 $VE=70$, $F_{0.05(4,70)}=2.50$ 。由于 $F > F_{0.05(4,70)}$, 从而 $P < 0.05$, 五组提取 Mp 基因组 DNA 的方法不全相同。然后 ROSE 法和其他四组进行两两对比, 采用 q 检验。通过 q 界值表, 查得四个 q 均 $> q_{0.05}$, 故 $P < 0.05$, ROSE 法和其他四种方法提取的纯度差异均具有统计学意义。因 $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 在 1.8 左右 DNA 纯度较高, 试剂盒法和 CTAB 法纯度较高, ROSE 法略好于碱裂解法和煮沸法。

表1 5种方法提取 Mp 基因组 DNA 纯度比较

方法(组别)	组次	$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}(\bar{x} \pm s)$	q 值
煮沸法	1	1.12±0.05	3.76(3 vs 1)
碱裂解法	2	1.21±0.11	2.92(3 vs 2)
改良后的 ROSE 法	3	1.35±0.09	
CTAB	4	1.76±0.15	5.76(4 vs 3)
试剂盒法	5	1.81±0.22	6.93(5 vs 4)

2.2 各方法提取的 Mp 基因组 DNA 的产量分析

见表2。用SPSS16.0统计软件先进行方差分析, $F=79.48$ 。每种方法提取的次数均为 $n=24$, 因 F 界值表中无分母自由度 67, 取 $VE=70$, $F_{0.05(4,70)}=2.50$ 。由于 $F > F_{0.05(4,70)}$, 从而 $P < 0.05$, 五种方法提取 Mp 基因组 DNA 获得的产量不相同。然后 ROSE 法和其他四组进行两两对比, 采用 q 检验。从表2可见 ROSE 法和煮沸法在产量上最高, 两种方法差异无统计学意义; 而 ROSE 法和其他三种方法比较差异均具有统计学意义, 产量上远比其他三种方法高。

表2 5种方法提取 Mp 基因组 DNA 的产量比较

方法(组别)	组次	产量($\bar{x} \pm s, \mu\text{g}$)	q 值	P 值
煮沸法	1	2 560.47±268.06	0.95(1 vs 2)	>0.05
改良后的 ROSE 法	2	2 456.96±183.79		
碱裂解法	3	336.76±89.34	82.33(2 vs 3)	<0.05
CTAB	4	279.48±73.09	83.25(2 vs 4)	<0.05
试剂盒法	5	279.15±157.32	83.78(2 vs 4)	<0.05

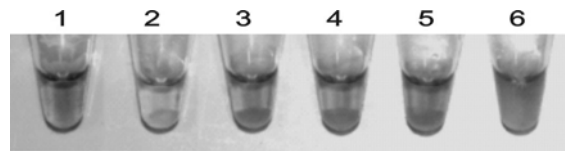
2.3 各提取方法的程序比较 见表3。可知煮沸法、ROSE 法, 碱裂解法在提取时间和实验毒性上优于 CTAB 法和试剂盒法, 而 ROSE 法和煮沸法不需要任何仪器设备, 适合各级医院包括基层医疗组织使用。

2.4 各种方法提取的 Mp 基因组 DNA 应用于 LAMP 检测 见图1, 图2。由图1可知5种方法提取的 Mp 基因组 DNA 均可使 LAMP 反应体系

显色, 呈天蓝色。煮沸法颜色最浅, 其余4种方法的显色结果无明显差异, 阴性对照管仍保持紫色。图2 LAMP 产物电泳图验证了对照管没有扩增条带; 5种方法提取的 Mp 基因组 DNA 均能成功扩增出目的基因, 这与可视化的结果一致, 验证了可视化 Mp LAMP 检测体系的可靠性; 图谱显示扩增效果中 CTAB 和试剂盒法最好, ROSE 法次之, 煮沸法最差。

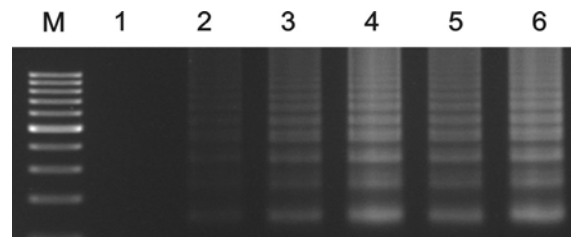
表3 5种提取方法的优劣比较

提取的方法	时间(min)	试剂种类	是否需要低温离心机	是否有毒性
煮沸法	10	0	否	否
碱裂解法	1	3	是	否
CTAB	40	11	是	是
改良后的 ROSE 法	25	4	否	否
试剂盒法	80~140	不确定	是	是



1: DNA 模板; 2~6 为煮沸法, 碱裂解法, CTAB 法, ROSE 法, 试剂盒法。

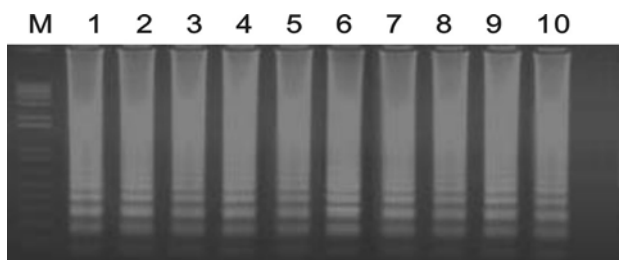
图1 5种方法提取 Mp 基因组 DNA 应用于显色 LAMP 结果



M: D2000 Maker; 1: ddH₂O 模板; 2~6 为煮沸法, 碱裂解法, CTAB 法, ROSE 法, 试剂盒法。

图2 LAMP 反应产物电泳结果

2.5 一步法提取咽拭子标本应用于 LAMP 检测结果 见图3。一步法提取的咽拭子标本均能扩增出梯状条带, 反应管均呈天蓝色, 对照管均为紫色。



M: DL 2 000 Maker; 1~10 均为用一步法提取的部分病人咽拭子标本应用于 LAMP 反应产物的电泳结果。

图3 一步法提取咽拭子标本应用于 LAMP 反应产物的电泳结果

3 讨论 基因检测能准确、快速诊断支原体肺炎, 此类检测均需要进行 DNA 的提取。快速、简易无污染的提取方法能确保核酸扩增的质量, 为保证实验顺利进行奠定基础。LAMP 作为一种操作简便的核酸扩增技术, 在现场工作中具有独特的优势。LAMP 对模板质量要求低, 可以检测直接煮沸的样品^[10,11]、甚至能直接检测未处理的样品, 这些均为一步法基因组 DNA 提取应用于 LAMP 反应提供了理论基础。

目前 Mp 基因组 DNA 的提取方法主要有 CTAB 法、碱裂解法、煮沸法、试剂盒法以及它们的改良方法。这些方法多用到低温离心机, 使得缺乏仪器设备的单位无法开展支原体肺炎的检测, 同时也不适合现场高通量检测。

理想的 DNA 提取方法, 通常要求快速、简易、无污染, 提取的 DNA 能满足特定研究的要求。本研究对 ROSE 法进行了改进, 并与 CTAB 法、碱裂解法、煮沸法、试剂盒法进行全面的比较(表 1~3)。研究表明 5 种方法提取的基因组 DNA 均可作为 LAMP 反应的模板, 并成功扩增出条带。从提取的纯度和扩增效果看, ROSE 法居中, CTAB 法和试剂盒法扩增效果最好, 这个结果基本和穰杰等^[12]研究结果一致, 但这两种方法均费时、使用有毒试剂、需要离心机, 不适合现场及缺乏仪器设备的单位使用; 从产量上看, 一步法和煮沸法最多, 但煮沸法虽简单、快速、扩增效果较其它 4 种方法差; 由于最终用的是咽拭子标本, 采样量少, 如用其他方法提取步骤多、提取过程中损失严重、易对检测结果造成影响, 而 ROSE 法直接在咽拭子标本中加入提取缓冲液, 样本无损失, 适合含菌量少样本提取 DNA, 且整个过程不需要任何仪器设备, 适合大批量提取, 因此是各级医院和现场高通量检测的首选方法。

研究结果表明, 改良后的 ROSE 法与本课题已建立的显色 LAMP 体系联合使用真正实现从提取到扩增不需要任何昂贵仪器设备即可实现支原体肺炎的检测, 适合在各级医院应用推广。

参考文献:

- [1] 胡雨生, 季伟, 杨代秀, 等. 3 738 例肺炎支原体感染的回顾性调查分析[J]. 安徽医学, 2012, 33(6): 699-702.
Hu YS, Ji W, Yang DX, et al. Retrospective investigation and analysis of 3 738 cases of pneumonia mycoplasma infection[J]. Anhui Medical Journal, 2012, 33(6): 699-702.
- [2] 柯莉芹, 王凤美, 李银洁, 等. 儿童肺炎支原体肺炎流行病学特征[J]. 中国当代儿科杂志, 2012, 15(1): 33-36.
Ke LQ, Wang FM, Li YJ, et al. Epidemiological char-

- acteristics of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children[J]. Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2012, 15(1): 33-36.
- [3] 胡洪波, 魏中南, 郭虹, 等. 抗体滴度检测在诊断儿童肺炎支原体急性期感染中的意义[J]. 现代检验医学杂志, 2013, 28(5): 129-131.
Hu HB, Wei ZN, Guo H, et al. Application of detecting *Mycoplasma pneumoniae* antibody titer in acute infection in children[J]. J Mod Lab Med, 2013, 28(5): 129-131.
- [4] 张奇舒, 修冰水, 宋晓国, 等. 密码子优化的肺炎支原体 P1 蛋白在大肠杆菌中的克隆表达[J]. 生物技术通讯, 2012, 23(3): 380-382, 392.
Zhang QS, Xiu BS, Song XG, et al. Cloning and expression of codon-optimized P1 protein gene of *Mycoplasma pneumoniae* in *Escherichia coli*[J]. Letters in Biotechnology, 2012, 23(3): 380-382, 392.
- [5] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): 63-68.
- [6] Goto M, Honda E, Oqura A, et al. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxyl naphthol blue[J]. Biotechniques, 2009, 46(3): 167-172.
- [7] 盛湘越, 几种抗肺炎支原体抗体检测方法临床应用比较[J]. 医学信息, 2013, 26(5): 257.
Sheng XY. Several kinds of resistance of *Mycoplasma pneumoniae* antibody detection methods of clinical application[J]. Medical Information, 2013, 26(5): 257.
- [8] 石滢, 崔岩, 赵莉佩, 等. 球形孢子丝菌 DNA 提取方法的比较[J]. 中国真菌学杂志, 2015, 10(4): 216-219.
Shi Y, Cui Y, Zhao LP, et al. Comparison of DNA extraction methods from *Sporothrix globosa*[J]. Chin J Mycol, 2015, 10(4): 216-219.
- [9] 张明月, 刘晓松, 常建华, 等. 羊肺炎支原体基因组 DNA 几种提取方法的比较[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 2012, 33(3): 9-12.
Zhang MY, Liu XS, Chang JH, et al. Comparison of methods for genomic DNA extraction from *Mycoplasma ovipneumoniae*[J]. Journal of Inner Mongolia Agricultural University (Natural Science Edition), 2012, 33(3): 9-12.
- [10] Tao ZY, Zhou HY, Xia H, et al. Adaptation of a visualized loop-mediated isothermal amplification technique for field detection of *Plasmodium vivax* infection[J]. Parasites & Vectors, 2011, 4(1): 115.
- [11] Sirichaisinthop J, Buates S, Watanabe R, et al. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for malaria diagnosis in field setting[J]. Am J Trop Med Hyg, 2011, 85(4): 594-596.
- [12] 穰杰, 李莉, 唐琼, 等. 第三代测序细菌基因组 DNA 提取方法的比较[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2015, 38(6): 14-20.
Rang J, Li L, Tang Q, et al. Comparative study of bacterial DNA extraction methods for the third generation sequencing technology[J]. Journal of Natural Science of Hunan Normal University, 2015, 38(6): 14-20.