

三种方法提取毛霉菌核酸效能的比较实验研究

潘永圣, 蒲丹, 汪佳婕, 赵云平, 徐宏忍, 白敏凤, 许小靓, 尹利民

(昆明市第一人民医院检验科, 昆明 650011)

摘要: **目的** 比较改良碱裂解法、一步法和磁珠法提取毛霉菌核酸效能的差异, 探索一种用于PCR扩增的快速、高效、简便、经济的毛霉菌核酸提取方法。**方法** 分别用改良碱裂解法、一步法和磁珠法提取黑根毛霉 (*Rhizomucor miehei*, *R. miehei*)、伞枝犁头霉 (*Lichtheimia corymbifera*, *L. corymbifera*) 和卷枝毛霉 (*Mucor circinelloides*, *M. circinelloides*) 3株毛霉菌核酸, 使用Qbit4核酸浓度测定仪测定核酸浓度, 并进行实时荧光定量PCR扩增实验, 比较其扩增后的循环阈值 (*Ct*) 差异和核酸提取效率。**结果** 改良碱裂解法、一步法及磁珠法均能提取 *R. miehei*, *L. corymbifera* 和 *M. circinelloides* 3株毛霉菌核酸, 其中一步法提取所得核酸的浓度最高, 改良碱裂解法次之, 磁珠法最低, 差异具有统计学意义 ($F=38.803$, $2\ 160.759$, 325.175 , 均 $P<0.05$)。改良碱裂解法提取毛霉菌核酸耗时最短 (10.00 ± 1.50 min), 一步法次之 (25.00 ± 1.50 min), 磁珠法最长 (75.00 ± 1.50 min), 差异有统计学意义 ($F=2\ 574.074$, $P<0.01$)。磁珠法提取毛霉菌核酸耗费成本和设备依赖度最高, 其次是一步法次之, 改良碱裂解法最低。改良碱裂解法、一步法及磁珠法提取的3株毛霉菌核酸均能扩增出阳性结果。三种方法提取 *R. miehei* 菌株核酸扩增后 *Ct* 值分别为 18.72 ± 0.18 , 17.42 ± 0.46 和 18.97 ± 0.46 , 差异有统计学意义 ($F=22.375$, $P<0.01$), 其中改良碱裂解法和磁珠法提取的核酸扩增后 *Ct* 值差异无统计学意义 ($t=1.114$, $P>0.05$), 一步法提取的核酸扩增后的 *Ct* 值小于另外两种方法, 差异有统计学意义 ($t=5.852$, 5.277 , 均 $P<0.05$)。提取 *L. corymbifera* 菌株核酸扩增后 *Ct* 值分别为 16.23 ± 0.13 , 21.23 ± 0.25 和 14.53 ± 0.04 , 差异有统计学意义 ($F=2\ 298.548$, $P<0.01$), 其中改良碱裂解法提取的核酸扩增后的 *Ct* 值小于一步法, 差异有统计学意义 ($t=40.031$, $P<0.01$), 磁珠法提取的核酸扩增后的 *Ct* 值小于另外两种方法, 差异有统计学意义 ($t=27.953$, 60.265 , 均 $P<0.05$)。提取 *M. circinelloides* 菌株核酸扩增后 *Ct* 值分别为 16.77 ± 0.28 , 15.38 ± 0.88 和 16.13 ± 0.20 , 差异有统计学意义 ($F=8.152$, $P<0.01$), 其中改良碱裂解法提取的核酸产物扩增后的 *Ct* 值大于另外两种方法, 差异有统计学意义 ($t=3.372$, 4.106 , 均 $P<0.05$), 一步法和磁珠法提取的核酸产物扩增后的 *Ct* 值差异无统计学意义 ($t=1.866$, $P>0.05$)。**结论** 改良碱裂解法、一步法及磁珠法均可成功提取毛霉菌核酸, 其中改良碱裂解法操作简便、耗时最短、耗费成本和设备依赖性最低, 所提取毛霉菌核酸模板能够满足实时荧光定量PCR扩增要求。

关键词: 毛霉菌; 核酸提取; 实时荧光定量PCR

中图分类号: R446.5 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2023) 06-148-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2023.06.027

Comparative Experimental Study on the Efficiency of Three Methods for Extracting *Mucor* Nucleic Acid

PAN Yongsheng, PU Dan, WANG Jiajie, ZHAO Yunping, XU Hongren, BAI Minfeng, XU Xiaoliang, YIN Limin

(Department of Laboratory Medicine, the First People's Hospital of Kunming, Kunming 650011, China)

Abstract: Objective To compare the difference in the extraction efficiency of *Mucor* Nucleic acid by using improved alkaline lysis method, one-step method and magnetic beads method, and to explore a rapid, efficient and economical *Mucor* nucleic acid extraction method for PCR amplification. **Methods** The *Mucor* nucleic acid was extracted from *Rhizomucor miehei* (*R. miehei*), *Lichtheimia corymbifera* (*L. corymbifera*) and *Mucor circinelloides* (*M. circinelloides*) by using improved alkaline lysis method, one-step method and magnetic beads method. The nucleic acid concentration was measured by Qbit4, and fluorescence quantitative PCR was performed to compare the difference of cycle threshold (*Ct*) values after amplification and nucleic acid extraction efficiency. **Results** The nucleic acid was extracted from *R. miehei*, *L. corymbifera* and *M. circinelloides* by improved alkaline lysis method, one-step method and magnetic beads method. Among three methods, one-step method gained the highest nucleic acid concentration, followed by improved alkaline lysis method, while magnetic beads method obtained the lowest

基金项目: 云南省科技厅科技基础研究计划课题项目 (202201AY070001-200); 毛霉菌病多重荧光PCR检测方法建立及临床应用研究; 春城计划高层次创新创业团队专项 (2022SCP002); 5G+分子精准医学大数据平台解锁肝胆胰密码打造云南健康生活目的地。

作者简介: 潘永圣 (1988-), 男, 硕士, 初级技师, 研究方向: 临床生化及分子生物学检验, E-mail: panysh88@126.com。

通讯作者: 尹利民 (1978-), 男, 博士, 主任技师, 研究方向: 临床检验诊断学研究, E-mail: ylmjb@163.com。

concentration, and the differences were statistically significant ($F=38.803$, $2\ 160.759$, 325.175 , all $P<0.05$). The time of *Mucor* nucleic acid extraction was shortest by improved alkaline lysis method (10.00 ± 1.50 min), followed by the one-step method (25.00 ± 1.50 min), and the time of *Mucor* nucleic acid extracted was longest by magnetic beads method (75.00 ± 1.50 min), the difference was statistically significant ($F=2\ 574.074$, $P<0.01$). The cost and equipment dependency of *Mucor* nucleic acid extracted was highest by magnetic beads method, followed by the one-step method, and the cost and equipment dependency of *Mucor* nucleic acid extracted was lowest by improved alkaline lysis method. The *Mucor* nucleic acid extracted by improved alkaline lysis method, one-step method and magnetic beads method could amplify positive results. The C_t values of nucleic acid amplification extracted from *R. miehei* by improved alkaline lysis method, one-step method and magnetic beads method were 18.72 ± 0.18 , 17.42 ± 0.46 and 18.97 ± 0.46 , respectively, and there were significant differences ($F=22.375$, $P<0.01$). Among them, there was no significant difference between C_t value of nucleic acid amplification extracted by improved alkaline lysis method and magnetic beads method ($t=1.114$, $P>0.05$), the C_t value of nucleic acid amplification extracted by one-step method was lower than that by improved alkaline lysis method and magnetic beads method, and there were significant differences ($t=5.852$, 5.277 , all $P<0.05$). The C_t values of nucleic acid amplification extracted from *L. corymbifera* by improved alkaline lysis method, one-step method and magnetic beads method were 16.23 ± 0.13 , 21.23 ± 0.25 and 14.53 ± 0.04 , respectively, and there were significant differences ($F=2\ 298.548$, $P<0.01$). The C_t value of nucleic acid amplification extracted by improved alkaline lysis method was lower than that by one-step method, and there were also significant differences ($t=40.031$, $P<0.01$). The C_t value of nucleic acid amplification extracted by magnetic beads method was lower than that by improved alkaline lysis method and one-step method, and there were also significant differences ($t=27.953$, 60.265 , all $P<0.05$). The C_t values of nucleic acid amplification extracted from *M. circinelloides* by improved alkaline lysis method, one-step method and magnetic beads method were 16.77 ± 0.28 , 15.38 ± 0.88 and 16.13 ± 0.20 , respectively, and the difference was statistically significant ($F=8.152$, $P<0.01$). The C_t value of nucleic acid amplification extracted by improved alkaline lysis method was higher than that by one-step method and magnetic beads method, and the differences were also statistically significant ($t=3.372$, 4.106 , all $P<0.05$). However, there was no significant difference between C_t value of nucleic acid amplification extracted by one-step method and magnetic beads method ($t=1.866$, $P>0.05$). **Conclusion** The improved alkaline lysis method, one-step method and magnetic beads method could be used for *Mucor* nucleic acid extraction, which is sufficient for real-time fluorescence quantitative PCR amplification. Among three method, the improved alkaline lysis method may be easy and simple to perform.

Keywords: *Mucor*; nucleic acid extraction; real-time fluorescence quantitative PCR

毛霉菌是临床上常见侵袭性真菌疾病(毛霉菌病)的病原菌,人类主要通过吸入真菌孢子囊、摄入被污染的食物或皮肤创伤而获得感染^[1]。实体器官或造血干细胞移植患者、血液系统恶性肿瘤患者、未被控制的糖尿病和/或伴有酮症酸中毒患者等免疫功能低下患者毛霉菌感染的发生率较高^[2]。毛霉菌可侵入宿主血管,导致血栓形成和组织坏死,但其感染后无特异性症状、临床表征和影像学表现不明显,进展迅速,具有较高的发病率和病死率^[3]。因此,在该菌感染早期就能快速准确诊断和治疗将有助于降低患者病死率。虽然目前毛霉菌确诊主要依赖于组织病理学和真菌培养,但其周期长、阳性率低、敏感性低等因素,无法满足对其快速准确鉴定的要求^[4]。近年来,聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术凭灵敏度高、特异性强及操作简便迅速等优点在真菌鉴定、分型和耐药性分析中发挥着越来越重要的作用。PCR技术可以早期检测培养物、组织、血液和尿液等不同样本类型中的毛霉菌^[5-7]。提取核酸模板是PCR检测的关键步骤之一,而核酸模板质量是决定PCR法检测结

果灵敏度和可信度的关键因素,因此获得高质量的核酸模板对于开展PCR检测工作十分重要^[8]。回顾近几年研究发现国内关于毛霉菌PCR检测技术和核酸模板提取方法研究的相关报道不多,因此本研究探索改良碱裂解法、一步法及磁珠法提取毛霉菌核酸效能的差异,以及探索一种快速、简便、经济的毛霉菌核酸提取方法,为临床应用PCR技术快速高效检测毛霉菌提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选用米黑根毛霉(*Rhizomucor miehei*, *R. miehei*)、伞枝犁头霉(*Lichtheimia corymbifera*, *L. corymbifera*)和卷枝毛霉(*Mucor circinelloides*, *M. circinelloides*)3株毛霉菌标准菌株为研究对象,以上标准菌株均购自中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC)。本研究已通过昆明市第一人民医院医学伦理委员会审查批准。

1.2 仪器和试剂 主要仪器设备:全自动核酸提取仪(GeneRotex 96,西安天隆科技有限公司),核酸浓度测定仪(Qbit4,赛默飞世尔科技有限公司),实时荧光定量PCR扩增仪(SLAN-96P,上海宏石

医疗科技有限公司)。主要试剂:一步法检测试剂(Lysis buffer for microorganism to direct PCR 9164, Takara Bio 公司);磁珠法检测试剂(西安天隆科技有限公司);马铃薯葡萄糖水、葡萄糖、蛋白胨、酵母提取物和琼脂(昆明鼎国生物科技有限公司);氢氧化钠(NaOH)、Tris-HCl[生工生物工程(上海)股份有限公司];2×PCR预混液[SGExcel GoldStar TaqMan Master, 包含 GoldStar Taq DNA Polymerase, PCR Buffer, dNTPs 和 Mg^{2+} 。生工生物工程(上海)股份有限公司]。

1.3 方法

1.3.1 毛霉菌标准菌株培养和菌液制备:将 *R. miehei* 和 *L. corymbifera* 菌种接种于马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA 培养基)上培养 48h(其中 *R. miehei* 置于 45℃ 下培养, *L. corymbifera* 置于 25℃ 下培养),将 *M. circinelloides* 菌种接种于酵母浸出粉葡萄糖培养基(YPD 培养基)上 25℃ 培养 48h。分别挑取上述培养的菌落,加入已称重的含 3ml 灭菌等渗氯化钠溶液试管中,再次称重调整使每管含毛霉菌 150mg,振荡混匀后均匀分为 15 管(每种毛霉菌每种提取方法各 5 管),每管含毛霉菌约 10mg, 13 000r/min 离心 5min 弃上清液,备用。

1.3.2 改良碱裂解法^[9]:向上述备用菌中加入 80 μ l 的 0.5mol/L NaOH,涡旋振荡混匀 1min,加入 160 μ l 0.1 mol/L Tris-HCl 中和,再次涡旋振荡混匀 1min, 4℃ 13 000r/min 离心 5min,取上清于 -20℃ 保存备用。

1.3.3 一步法:在上述备用菌中加入 50 μ l 样本释放剂,涡旋振荡混匀 1min, 85℃ 热变性 20min, 4℃ 13 000r/min 离心 5min,取上清于 -20℃ 保存备用。

1.3.4 磁珠法:于上述备用菌中加入 180 μ l 溶菌酶溶液和 20 μ l 蛋白酶 K 溶液,涡旋振荡混匀后 50℃ 加热 30min,再加入 200 μ l 菌体消化液,涡旋振荡混匀,将上述液体加入到试剂盒中,上机提取, 40min 后获得核酸提取物。

1.3.5 毛霉菌菌株核酸浓度测定:用 Qbit4 核酸浓度测定仪测定上述不同提取方法提取核酸的浓度,具体操作严格按照操作说明进行。

1.3.6 引物和探针合成:根据 MILLON 等^[7]报道合成 *R. miehei*, *L. corymbifera* 和 *M. circinelloides* 扩增引物和探针:RM-F: 5'-CACCGCCCGTCGCTAC-3',

RM-R: 5'-GTAGTTTGCCATAGTTCGGCTA-3' 和 RM-P: 5'-TTGAATGGCTATAGTGAGCATATGGG AGGCT-3'; LC-F: 5'-CACCGCCCGTCGCTAC-3', LC-R: 5'-GCAAAGCGTTCCGAAGGACA-3' 和 LC-P: 5'-ATGGCACGAGCAAGCATTAGGGACG-3'; MC-F: 5'-CACCGCCCGTCGCTAC-3', MC-R: 5'-CCTAGTTTGCCATAGTTCTCAGCAG-3' 和 MC-P: 5'-CCGATTGAATGGTTATAGTGAGCA TATGGGATC-3'。*R. miehei* 探针的 5' 端以 HEX 报告荧光基团标记, 3' 端以 BHQ1 淬灭基团标记; *L. corymbifera* 探针的 5' 端以 ROX 报告荧光基团标记, 3' 端以 BHQ1 淬灭基团标记; *M. circinelloides* 探针的 5' 端以 CY5 报告荧光基团标记, 3' 端以 BHQ1 淬灭基团标记。以上引物和探针委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3.7 实时荧光定量 PCR 扩增实验:在 PCR 管中依次加入 25 μ l 2×PCR 预混液,各引物和探针 1 μ l(终浓度为 0.2 μ mol/L),核酸模板 5 μ l,以 RNase-Free ddH₂O 补足体系至 50 μ l。PCR 反应条件:95℃ 10min,循环 1 次,95℃ 变性 15s, 60℃ 退火/延伸 60s,循环 40 次。荧光信号收集设在 60℃。*Ct* 值 <38 且曲线呈 S 型判断为阳性。

1.4 统计学分析 采用 SPSS22.0 统计软件进行数据分析,计量资料服从正态分布的采用均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三种提取方法所得核酸浓度和优缺点比较 见表 1。改良碱裂解法、一步法及磁珠法均能提取出 *R. miehei*, *L. corymbifera* 和 *M. circinelloides* 三株毛霉菌核酸,各种方法提取毛霉菌核酸浓度由高到低分别为:一步法 > 改良碱裂解法 > 磁珠法(*P* < 0.05),一步法和改良碱裂解法两种直接裂解法差异有统计学意义(*t* = 4.876, 15.884, 17.213, 均 *P* < 0.05)。改良碱裂解法提取毛霉菌核酸所需时间最短,一步法次之,磁珠法最长,差异有统计学意义(*F* = 2 574.074, *P* < 0.001)。各种方法提取毛霉菌核酸的耗费成本和设备依赖度由高至低依次为:磁珠法 > 一步法 > 改良碱裂解法。

表 1 三种提取方法提取 3 株毛霉菌核酸结果比较($\bar{x} \pm s$, *n* = 5)

类 别	改良碱裂解法	一步法	磁珠法	<i>F</i>	<i>P</i>
耗时间 (min)	10.00 \pm 1.50	25.00 \pm 1.50	75.00 \pm 1.50	2 574.074	< 0.001
<i>R. miehei</i>	0.58 \pm 0.06	1.20 \pm 0.28	0.25 \pm 0.09	38.803	< 0.001
DNA 提取浓度 (ng/ μ l)					
<i>L. corymbifera</i>	5.92 \pm 0.29	8.17 \pm 0.13	0.76 \pm 0.02	2 160.759	< 0.001
<i>M. circinelloides</i>	1.18 \pm 0.16	5.82 \pm 0.58	0.65 \pm 0.10	325.175	< 0.001

2.2 三种提取方法提取毛霉菌核酸产物实时荧光定量 PCR 实验结果 见表 2。三种方法提取毛霉菌核酸产物实时荧光定量 PCR 扩增后均能扩增出阳性结果。对 *R. miehei* 菌株样本, 改良碱裂解法和磁珠法提取的核酸产物扩增后的 *Ct* 值差异无统计学意义 ($t=1.114$, $P=0.298$), 一步法提取的核酸产物扩增后的 *Ct* 值小于另外 2 种方法, 差异有统计学意义 ($t=5.852$, 5.277 , 均 $P<0.05$)。对 *L. corymbifera* 菌株样本, 改良碱裂解法提取的核酸产

表 2 3 种提取方法提取毛霉菌核酸实时荧光定量 PCR 检测法 *Ct* 值比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

标准菌株	改良碱裂解法	一步法	磁珠法	<i>F</i>	<i>P</i>
<i>R. miehei</i>	18.72 \pm 0.18	17.42 \pm 0.46	18.97 \pm 0.46	22.375	< 0.001
<i>L. corymbifera</i>	16.23 \pm 0.13	21.23 \pm 0.25	14.53 \pm 0.04	2 298.548	< 0.001
<i>M. circinelloides</i>	16.77 \pm 0.28	15.38 \pm 0.88	16.13 \pm 0.20	8.152	< 0.006

3 讨论

毛霉菌是继曲霉之后在免疫功能低下的患者如血液系统恶性肿瘤患者、造血干细胞移植和实体器官移植患者中常见的丝状真菌病原体。目前临床上确诊毛霉菌主要通过分离培养和表型鉴定, 但该方法耗时长, 对操作人员专业要求高, 结果判断主观性较强, 不能满足临床上对其快速准确诊断的要求。PCR 检测方法可以早期检测培养物、组织、血液和尿液等不同样本类型中的毛霉菌, 被认为是一种无创的方法^[10]。而核酸提取是 PCR 检测过程中至关重要的一个环节, 提取核酸的质量和效率直接影响 PCR 扩增结果的准确性, 若提取的核酸纯度和浓度较低, 可能导致 PCR 检测出假阴性结果。毛霉菌与其他真菌相似, 具有厚重的细胞壁, 其核酸提取较细菌和人体组织细胞 DNA 的提取难度大。目前常用于真菌核酸提取的方法有 SDS 裂解法、CTAB 法、反复冻融裂解法等, 但都存在操作繁琐、费时费力、提取核酸效率低等缺点^[8, 9]。为此, 本研究采用改良碱裂解法、一步法及磁珠法对不同属的毛霉菌 (*R. miehei*, *L. corymbifera* 和 *M. circinelloides*) 分别提取核酸, 从提取毛霉菌核酸的浓度及 PCR 扩增后 *Ct* 值进行效能比较, 从中筛选出适合临床实验室毛霉菌核酸快速提取的实用方法。

本研究采用改良碱裂解法、一步法及磁珠法提取 *R. miehei*, *L. corymbifera* 和 *M. circinelloides* 3 株毛霉菌, 结果显示三种提取方法均能提取出毛霉菌核酸, 提取的毛霉菌核酸浓度差异有统计学意义 (均 $P<0.05$), 其中磁珠法提取的毛霉菌标准菌株 DNA 浓度低于一步法和改良碱裂解法, 这与不同提取方法的原理有关^[11-12]: ①磁珠法是使用高浓度异硫氰酸胍或十二烷基硫酸钠将细胞破坏, 使核

物扩增后的 *Ct* 值小于一步法, 相差 5.00 ± 0.125 , 差异有统计学意义 ($t=40.031$, $P<0.001$), 磁珠法提取的核酸产物扩增后的 *Ct* 值小于另外 2 种方法, 差异有统计学意义 ($t=27.953$, 60.265 , 均 $P<0.05$)。对 *M. circinelloides* 菌株样本, 改良碱裂解法提取的核酸产物扩增后的 *Ct* 值大于另外 2 种方法, 差异有统计学意义 ($t=3.372$, 4.106 , 均 $P<0.05$), 一步法和磁珠法提取的核酸产物扩增后的 *Ct* 值差异无统计学意义 ($t=1.866$, $P=0.099$)。

酸游离出来, 在高盐低 pH 值的情况下与磁珠表面硅基结合, 经过洗涤、漂洗、吸干, 最后在低盐高 pH 值的环境下将核酸释放出来, 可有效去除 PCR 干扰物, 但存在 DNA 损失。②一步法和改良碱裂解法是直接将样本与裂解液混合, 室温或加热提取核酸的方法, 提取的核酸里不仅有核酸, 还有蛋白质等杂质, 但提取过程中基本不存在 DNA 损失。

为使结果具有可比性, 本研究采用除了核酸提取方法不同外, 其余的核酸模板上样量、PCR 扩增试剂和 PCR 扩增仪均一致, 并同时检测。结果表明 3 种方法提取的 3 株毛霉菌核酸均能扩增出阳性结果, 且提取的不同种毛霉菌核酸产物扩增后 *Ct* 值呈现多样性, 差异有统计学意义 (均 $P<0.01$)。改良碱裂解法提取 *R. miehei* 菌株的核酸产物扩增后 *Ct* 值和磁珠法差异无统计学意义 ($P>0.05$), 提取 *L. corymbifera* 菌株的核酸产物扩增后的 *Ct* 值小于一步法, 差异有统计学意义 ($P<0.01$), 提取 *M. circinelloides* 菌株的核酸产物扩增后的 *Ct* 值虽都大于一步法和磁珠法, 但在进行实时荧光定量 PCR 扩增反应 40 个循环中, 其扩增后结果为强阳性 (*Ct* 值为 17.57 ± 0.26)。本研究还发现, 改良碱裂解法在耗时、耗费成本和设备依赖度等方面均优于一步法和磁珠法。因此对模板核酸的纯度没有严格要求时, 从经济、可操作性角度等方面综合考虑改良碱裂解法提取毛霉菌核酸更实用。由于本实验室进行实验的阳性样本均为标准菌株培养物, 样本类型单一, 样本中是否含有其他干扰核酸提取和抑制 PCR 扩增的物质还不得而知, 所以用患者的不同阳性标本类型进行提取效率的验证值得探索。

综上所述, 改良碱裂解法、一步法及磁珠法均可用于毛霉菌核酸提取, 且提取的毛霉菌标准菌株核酸均能扩增出阳性结果。改良碱裂解法可在短时

间内快速提取毛霉菌核酸,所需成本低,操作简便,所提取的毛霉菌核酸模板的浓度可满足实时荧光定量PCR扩增的要求,因此为了节省时间和成本可应用改良碱裂解法提取毛霉菌核酸。

参考文献:

- [1] 杨政,刘正印. 毛霉菌病的诊断和治疗进展[J]. 中华内科杂志, 2021, 60(11): 1013-1016.
YANG Zheng, LIU Zhengyin. Recent advances in the diagnosis and treatment of mucormycosis[J]. Chinese Journal of Internal Medicine, 2021, 60(11): 1013-1016.
- [2] SHADRIVOVA O V, BURYGINA E V, KLIMKO N N. Molecular diagnostics of mucormycosis in hematological patients: a literature review[J]. Journal of Fungi (Basel, Switzerland), 2019, 5(4): 112.
- [3] WEI Linwei, ZHU Peiqiu, CHEN Xiaoqing, et al. Mucormycosis in mainland China: a systematic review of case reports[J]. Mycopathologia, 2022, 187(1): 1-14.
- [4] SUGAR A M. Mucormycosis[J]. Clinical Infectious Diseases, 1992, 14 (Suppl 1): S126-S129.
- [5] BALDIN C, SOLIMAN S S M, JEON H H, et al. PCR-Based approach targeting Mucorales-Specific gene family for diagnosis of mucormycosis[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2018, 56(10): e00746-18.
- [6] 马梦亭,王凤超. 临床患者血流真菌感染的实验诊断及治疗研究进展[J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(4): 161-164.
MA Mengting, WANG Fengchao. Advances in experimental diagnosis and treatment of blood flow fungal infection in clinical patients[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2019, 34(4): 161-164.
- [7] MILLON L, LAROSA F, LEPILLER Q, et al. Quantitative polymerase chain reaction detection of circulating DNA in serum for early diagnosis of mucormycosis in immunocompromised patients[J]. Clinical Infectious Diseases, 2013, 56(10): e95-101.
- [8] 邹治情,王俊玲,陈思,等. 改良碱裂解法和煮沸法提取金黄色葡萄球菌DNA效果的比较[J]. 江苏大学学报(医学版), 2018, 28(3): 267-270.
ZOU Zhiqing, WANG Junling, CHEN Si, et al. Comparison of improved alkali cracking method and boiling method for extracting DNA of *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of Jiangsu University(Medicine Edition), 2018, 28(3): 267-270.
- [9] 雷果平,王福,杨楸楠,等. 黄曲霉真菌DNA提取方法考察及产毒菌株的鉴别[J]. 现代养生, 2018(8): 75-76.
LEI Guoping, WANG Fu, YANG Qiunan, et al. The DNA extraction of *Apergillus flvus* and preliminary identification of toxigenic strains[J]. Health Care Today, 2018(8): 75-76.
- [10] 许蕊,陈芳艳,赵静雅,等. 毛霉菌病预防与控制研究进展[J]. 中华医院感染学杂志, 2023, 33(13): 2075-2080.
XU Rui, CHEN Fangyan, ZHAO Jingya, et al. Progress of research on prevention and control of mucormycosis[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2023, 33(13): 2075-2080.
- [11] 闻子钰,梁昊,顾一心,等. 细菌核酸提取方法对荧光定量PCR检测差异分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2019, 14(6): 621-624.
WEN Ziyu, LIANG Hao, GU Yixin, et al. Comparison of methods of DNA extraction for real time PCR analysis[J]. Journal of Pathogen Biology, 2019, 14(6): 621-624.
- [12] 何慧,何松哲,陈懿,等. 六种真菌基因组DNA快速提取方法比较[J]. 中华临床感染病杂志, 2015, 8(1): 36-41.
HE Hui, HE Songzhe, CHEN Yi, et al. Comparison of six methods for fungal genomic DNA extraction[J]. Chinese Journal of Clinical Infectious Diseases, 2015, 8(1): 36-41.

收稿日期: 2023-07-16

修回日期: 2023-10-06

(上接第147页)

- [13] SU Xiao, ZHAO Shigang, SONG Yijun. Expression of NLRP3 and AIM2 in inflammasome in peripheral blood in Chinese patients with acute and chronic brucellosis[J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 15123.
- [14] 温占平,杨宏伟,朱悦. 2016-2018年张家口市布鲁菌病流行特征及危险因素分析[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2019, 42(5): 332-335.
WEN Zhanping, YANG Hongwei, ZHU Yue. The epidemiological characteristics and risk factors of brucellosis in Zhangjiakou city, 2016-2018[J]. Chinese Journal of Frontier Health and Quarantine, 2019, 42(5): 332-335.
- [15] MOHAMMADBEIGI A, SAGHAFIPOUR A, HAMTA A, et al. Epidemiological features of brucellosis and factors affecting its treatment failure and relapse in Qom Province, Iran[J]. Ghana Medical Journal, 2021, 55(3): 206-212.
- [16] LIN Zhiqiang, LIN Guoyue, HE Wenwen, et al. IL-6 and INF- γ levels in patients with brucellosis in severe epidemic region, Xinjiang, China[J]. Infectious Diseases of Poverty, 2020, 9(1): 47.
- [17] 赵梦川,李贵霞,李文辉,等. 河北省17例儿童布鲁氏菌病流行特征及临床特征分析[J]. 中国人兽共患学报, 2020, 36(2): 163-168.
ZHAO Mengchuan, LI Guixia, LI Wenhui, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 17 children with brucellosis in Hebei province[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2020, 36(2): 163-168.
- [18] XU Nannan, DONG Xiaomeng, YAO Yongyuan, et al. Improved early detection of focal brucellosis complications with anti-*Brucella* IgG[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2020, 58(10): e00903-e00920.

收稿日期: 2022-12-20

修回日期: 2023-07-04