

## 3种制备猪肺炎支原体DNA模板方法的探讨

张旭,武昱孜,白方方,刘茂军,华利忠,邵国青

(江苏省农业科学院兽医研究所/农业部兽用生物制品工程技术重点实验室/  
国家兽用生物制品工程技术研究中心,南京 210014)

**摘要:**为了筛选出一种快速、高效、廉价提取猪肺炎支原体模板DNA的方法,本研究分别对试剂盒法、双蒸水煮法、酚-氯仿法进行比较,从中选出最佳提取方法。结果显示:这3种方法均适合由菌液中提取基因组DNA;水煮法不能由组织中提取出基因组DNA,试剂盒法可由组织中提取出基因组DNA且得到的目的DNA较纯,但每次提取量少;酚-氯仿法能大批量提取组织基因组DNA,但操作繁琐、易污染且稍有杂带。针对不同的模板,选择合适的DNA制备方法,有利于做出准确检测、提高检测效率,为疾病的早期诊断提供保障。

**关键词:**猪肺炎支原体;猪支原体肺炎;基因组DNA;模板制备;PCR检测

中图分类号:S852.62

文献标志码:A

论文编号:2013-1103

### Study of Three Methods for Making DNA Templates of *Mycoplasma hyopneumoniae*

Zhang Xu, Wu Yuzi, Bai Fangfang, Liu Maojun, Hua Lizhong, Shao Guoqing

(Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Animal Diseases Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture/National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing 210014)

**Abstract:** In order to filter out a fast, efficient, inexpensive method to extract the *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA template. In this study we compared Tissue DNA Kit, double distilled boiled method and phenol-chloroform method to choose a best way to extract *Mhp* DNA. The results showed that the three methods were suitable for the extraction of genomic DNA of the bacterium, however, double distilled boiling method could not extract genomic DNA from the tissue, the Tissue DNA Kit could extract out of genomic DNA purely from the tissue, but got a small quantity of DNA each time, phenol-chloroform method could extract large DNA of the tissue, but complicated to operate, vulnerable to pollution, and with a little impurity bands. According to the different templates, select the appropriate DNA preparation method which is beneficial to make the detection accurate, meanwhile improve the detection efficiency, to provide protection for the early disease detection.

**Key words:** *Mycoplasma hyopneumoniae*; Mycoplasmal pneumonia of swine, genomic DNA; template preparation; PCR detection

### 0 引言

猪支原体肺炎(Mycoplasmal Pneumonia of Swine, MPS)又称猪气喘病,是由猪肺炎支原体(*Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mhp*)引起的一种慢性、接触性猪呼吸道传染病,以高发病率和低死亡率为特征<sup>[1]</sup>。*Mhp*是猪呼吸道疾病中最常见的分离病原之一,能破坏呼吸

道黏膜纤毛屏障,引起多病原的继发感染和混合感染,并引发猪呼吸道综合症(Porcine Respiratory Disease Complex, PRDC),给世界养猪业带来巨大的损失<sup>[2]</sup>。

*Mhp*属于原核生物界、软壁菌门、软膜体纲、支原体目、支原体科、支原体属,其大小介于细菌与病毒之间,没有细胞壁,呈高度多形性、进化速度快,是自然界

**基金项目:**江苏省自主创新项目“新型猪支原体肺炎活疫苗研制”(cx(11)4042)。

**第一作者简介:**张旭,男,1985年出生,山东菏泽人,硕士研究生,研究方向:动物疫病诊断研究。E-mail: zhangxu8446@126.com。

**通讯作者:**邵国青,男,1964年出生,江苏建湖人,博士,预防兽医学。通信地址:210014 江苏省南京市玄武区钟灵街50号 江苏省农业科学院兽医研究所, Tel: 025-84391973, E-mail: gqshaonj@163.com。

**收稿日期:**2013-04-17, **修回日期:**2013-08-08。

中能够自行复制的最小原核生物之一<sup>[3]</sup>。

近年来对 *Mhp* 检测方法的研究有了很大进展,一些敏感、特异、快速、准确的检测方法已广泛应用于 *Mhp* 的诊断,如临床诊断(屠宰场监测)、分离培养法、染色电镜观察法、血清学方法、免疫学诊断方法、核酸探针技术、PCR 诊断技术等<sup>[4,5]</sup>。对于 PCR 方法检测 *Mhp*, 模板 DNA 的提取是关键环节之一,而提取模板 DNA 的成功与否,选择 DNA 提取方法至关重要。

Mattsson 等<sup>[6]</sup>采用水煮法提取鼻拭子样本基因组 DNA,运用普通 PCR 技术对 *Mhp*16S rRNA 检测,目的条带为 649 bp,检测浓度底限为 5 CFU/mL; Calsamiglia 等<sup>[7]</sup>采用水煮法提取鼻拭子样本基因组 DNA,运用套式 PCR 检测 *Mhp*16SrRNA,目的条带为 352 bp,检测浓度底限为 80 个细胞。

Stark 等<sup>[8]</sup>采用酚-氯仿法提取过滤空气后的气溶胶模板 DNA,然后对 *Mhp*P1-03-590 重复序列进行套式 PCR 检测,目的条带为 808 bp,检测浓度底限为 1 个细胞/过滤膜; Stakenborg 等<sup>[9]</sup>采用酚氯仿法提取肺组织 DNA,然后对 *Mhp*16SrRNA 进行多重 PCR 检测,目的条带为 1000 bp,最低检测底限为 1 pg/mL。

Cai 等<sup>[10]</sup>应用 Qiagen DNA 提取试剂盒对肺组织进行模板 DNA 的提取,然后对 *Mhp*16SrRNA 进行普通 PCR 检测,目的条带为 645 bp,最低检测底限为 0.18 CFU/g; Strait 等<sup>[11]</sup>应用 Qiagen DNA 试剂盒提取鼻拭子样品 DNA,并对 *Mhp*16S 进行荧光定量 PCR 检测,目的条带为 132 bp,其最低检测底限为 2.5 g/μL; 郭盼盼等<sup>[12]</sup>应用 TIANamp 细菌基因组 DNA 试剂盒提取鼻拭子样品 DNA,并对 *Mhp*16SrRNA 进行 LAMP 检测,目的条带为 581 bp,最低检测底限为 10 个拷贝。到目前为止,还未有研究对不同提取基因组 DNA 方法进行比较,本研究通过应用双蒸水煮法、酚-氯仿法、组织试剂盒法进行 *Mhp* DNA 提取,并应用套式 PCR 对 3 种不同提取基因组 DNA 的扩增结果进行比较,填补不同提取基因组 DNA 方法比较的空缺,以选出提取 *Mhp* DNA 的理想方法。

## 1 试验材料

### 1.1 菌种和样本

*Mhp*168 株、阴阳性肺组织均由江苏省农业科学院兽医研究所制备、保存。

### 1.2 主要试剂和仪器

PCR 反应试剂、DL2000 Maker: TaKaRa; 琼脂糖: Biowest 公司; Gold viewer: 上海赛百盛基因技术有限公司; 天恩泽动物组织 DNAout 试剂盒: 北京天恩泽科技股份有限公司; 其他常规试剂均为分析纯产品。

紫外分光光度计: Eppendorf 公司; DK-8D 型电热恒温水槽: 上海一恒科技有限公司; JS-380 自动凝胶图像分析仪: 上海培清科技公司; 超净工作台: 苏州安泰空气技术有限公司; DY89-II 电动玻璃匀浆仪: 宁波新芝生物科技股份有限公司; SC200 型 PCR 仪: 澳大利亚 Kyratex 公司; HYQ-2121A 涡旋混匀仪: 苏州捷美电子有限公司; DYY-III 电泳槽: 北京六一仪器厂。

## 2 模板 DNA 的制备方法

### 2.1 水煮裂解法制备模板 DNA

将试验菌株按 1:10 的比例接种于 2 mL 的 KM<sub>2</sub> 培养基中,37℃温箱培养,至培养基颜色变为淡黄色,取 1 mL 培养物 12000 r/min 离心 30 min; 弃上清,用 50 μL 高压灭菌的 ddH<sub>2</sub>O 重悬沉淀; 于 100℃水浴 10 min 后立即冰浴中冷却 10 min, 12000 r/min 离心 10 min, 取上清作为 DNA 模板,于 -20℃保存、备用。

### 2.2 酚-氯仿法提取模板 DNA

①取出分装好的肺组织 30 mg,加 600 μL 的蛋白裂解液和 3 μL 20 mg/mL 的蛋白酶 K 及 3 μL 10 mg/mL RNase,旋涡仪上混匀,55℃水浴消化 10 h,期间不断摇动;②加 600 μL 酚-氯仿:异戊醇(25:24:1)旋涡仪上震荡 10 min, 12000 r/min 离心 5 min;③取上清加 200 μL 氯仿抽提, 12000 r/min 离心 5 min;④取上清,加 200 μL 无水乙醇,40 μL 5 M 的醋酸钠,颠倒混匀,放置 20 min, 12000 r/min 离心 5 min, 弃上清;⑤沉淀用 70% 的乙醇洗涤 2 次,于 37℃温箱干燥后,加 50 μL 灭菌水混匀悬浮,所得到的溶液即为模板, -20℃保存、备用。

### 2.3 试剂盒法制备模板 DNA

①将无菌取得的肺组织置于高压过的匀浆杯中,加 65℃预热过的溶液 A 800 μL,匀浆 2 min,然后把匀浆液转移至 1.5 mL 的离心管中;②加 65℃预热过的溶液 B 400 μL 混匀,于 65℃水浴锅中水浴 10 min;③加入 150 μL 的氯仿,旋涡仪上充分混匀, 12000 r/min, 5 min;④将 600 μL 的上清液转移至一新的离心管中;⑤加入 900 μL 的 C 液,充分混匀;⑥分两次上柱 12000 r/min, 1 min, 弃穿透液;⑦加 700 μL 通用洗注液, 12000 r/min, 1 min, 弃穿透液;⑧加 300 μL 通用洗注液, 12000 r/min, 1 min, 弃穿透液;⑨12000 r/min, 空转 1 min, 弃穿透液;⑩将离心吸附柱转移至一新的 1.5 mL 的离心管中,加 50 μL 的通用洗脱液,室温放置 5 min, 12000 r/min, 1 min, 离心所得到的溶液即为模板。 -20℃保存、备用。

### 2.4 PCR 反应体系和条件<sup>[13]</sup>

根据 GenBank 登录的 *Mhp* P36 全基因序列 (AY312243), 利用 Primer Premier 5.0 软件设计合成了

两对特异性引物;经BLAST检索,确认各引物的特异性。引物由南京金斯瑞生物技术有限公司合成,见表1

外套 PCR 反应体系: 10 × buffer 2.5 μL、MgCl<sub>2</sub> (25 mM) 2.0 μL、dNTP(2.5 mM) 2.0 μL、引物 P1 (10 pmol/μL) 0.2 μL、引物 P2(10 pmol/μL) 0.2 μL、

表1 PCR引物

名称	引物序列(5'-3')	产物大小/bp
Forward Primer(P1)	5'-TTAGTGCTCCCGTTATG-3'	621
Reverse Primer(P2)	5'-GAAATCCGTATTCTCCTC-3'	
Forward Primer(P3)	5'-TTACAGCGGAAGACC-3'	427
Reverse Primer(P4)	5'-CGGCGAGAACTGGATA-3'	

Taq酶(5 U/μL)0.2 μL、模板DNA 5.0 μL、ddH<sub>2</sub>O 12.9 μL。外套反应条件:预变性95℃ 5 min;变性94℃ 30 s、退火42℃ 30 s、延伸72℃ 90 s,30个循环;72℃ 10 min。

内套 PCR 反应体系: 10 × buffer 2.5 μL、MgCl<sub>2</sub> (25 mM) 2.0 μL、dNTP(2.5 mM) 2.0 μL、引物 P1 (10 pmol/μL) 0.2 μL、引物 P2(10 pmol/μL) 0.2 μL、Taq酶(5 U/μL) 0.2 μL、模板DNA 1.0 μL、ddH<sub>2</sub>O 16.9 μL。内套反应条件:预变性95℃ 5 min;变性95℃ 30 s、退火51℃ 30 s、延伸72℃ 30 s,18个循环;72℃ 10 min。

3 结果与分析

水煮法、试剂盒法、酚-氯仿法都可以由培养的菌

液中提取出 *Mhp* 基因组 DNA;但通过对3种不同模板提取方法的 R 值和浓度比较发现,水煮法和试剂盒法的 R 值基本一致,低于酚-氯仿法的 R 值,同时其基因组 DNA 的浓度也是呈现酚-氯仿法 > 试剂盒法 > 水煮法;究其原因:可能是由于水煮法中没有用到裂解液,菌体中的基因组 DNA 没能彻底释放,所以其浓度低,而酚-氯仿法由于酚和氯仿的配合使用提高了菌体中的基因组 DNA 彻底释放,其所提取的基因组 DNA 浓度高(表2)。

水煮法、试剂盒法、酚-氯仿法都可以由肺组织中提取出基因组 DNA,但通过对3种不同模板提取方法

表2 菌液中提取DNA样品的比较

菌液	水煮法		试剂盒法		酚-氯仿法	
	R 值	浓度/(μg/mL)	R 值	浓度/(μg/mL)	R 值	浓度/(μg/mL)
1	1.93	24.1	1.97	144.7	2.64	430.5
2	1.71	23.0	1.94	154.2	2.75	486.8
3	1.67	8.8	1.98	180.8	2.51	521.1
平均值	1.77	18.6	1.96	159.9	2.63	479.5

注: R 值为 OD<sub>260</sub> 与 OD<sub>280</sub> 比值。

的 R 值和浓度比较发现,水煮法和试剂盒法的 R 值基本一致,低于酚-氯仿法的 R 值,同时其基因组 DNA 的浓度也是呈现酚-氯仿法 > 试剂盒法 > 水煮法;究其原因:可能是由于水煮法中虽没有用到裂解液,但

组织中的基因组 DNA 的少许释放,也使其浓度升高;而酚-氯仿由于酚和氯仿的配合使用提高了组织中的基因组 DNA 彻底释放,其所提取的基因组 DNA 浓度高(表3)。

表3 肺组织中DNA

组织	水煮法		试剂盒法		酚-氯仿法	
	R 值	浓度/(μg/mL)	R 值	浓度/(μg/mL)	R 值	浓度/(μg/mL)
1	1.89	97.8	1.90	346.4	2.76	710.5
2	1.71	85.1	1.95	223.8	2.62	682.3
3	2.07	103.6	1.88	481.9	2.67	621.7
平均值	1.89	95.5	1.91	350.7	2.68	671.5

注: R 值为 OD<sub>260</sub> 与 OD<sub>280</sub> 比值。

水煮法可以从菌液中提取模板DNA,且不需要昂贵的仪器,但不适合从含菌量低的组织中提取模板DNA;酚-氯仿法适用于从菌液中提取模板DNA,也适

合组织样品,但此方法耗时、繁琐,不适合紧急送检样本;试剂盒法制备模板DNA效果较好,适用于培养物、组织等多种样品,且操作简便,但价格稍高(表4)。

表4 3种制备模板DNA方法的比较

制备模板的方法	耗时/h	是否使用有机溶剂	最低检测限度/(CCU/mL)	价格	操作	扩增效果
水煮法	1	无	10 <sup>4</sup>	便宜	方便	菌液效果理想,组织无扩增
酚氯仿法	13	有	10 <sup>2</sup>	相对便宜	较为繁琐	菌液和组织有少许拖尾
试剂盒法	4	无	10	较贵	繁琐	菌液和组织效果均理想

通过对水煮法、酚氯仿法、试剂盒法这3种DNA制备方法的比较得出:水煮法适合由菌液中提取模板DNA,而不能从组织中提取模板DNA;酚氯仿法和试剂盒法适合提取广泛的临床样本模板DNA,酚氯仿法可应用于大批量的提取组织中的模板DNA,但由于酚氯仿法需要对组织进行消化,耗时长,不适合紧急检样;试剂盒法相对方便,但价格相对较高;所以需根据检测样品的类型选择DNA提取方法,提高检测灵敏度和效率(图1~2)。

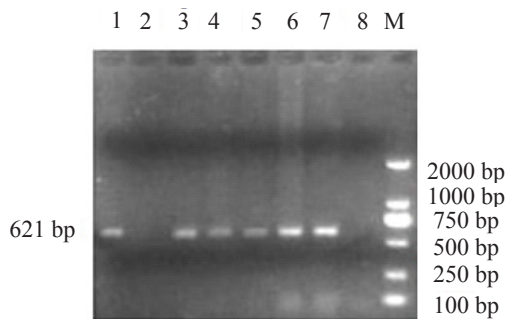
#### 4 结论

本研究运用试剂盒法、双蒸水煮法、酚-氯仿法提取基因组DNA,并用套式PCR对这3种提取方法进行检测、比较。这3种方法均适合从菌液中提取基因组DNA;水煮法不能由组织中提取出基因组DNA,试剂盒法可少量的提取组织中的基因组DNA且得到的目的DNA较纯;酚-氯仿法能大批量提取组织基因组DNA,但操作繁琐,易污染且稍有杂带。针对实际科研需求,对不同的模板选择最佳的DNA提取方法,为准确、快速的检测病原体提供依据。

#### 5 讨论

近年来,国内外研究者对Mhp检测方法进行了广泛研究,采用分子生物技术快速诊断是检测领域的发展趋势<sup>[4]</sup>,尤其以PCR技术发展最快<sup>[5]</sup>,而分子检测的高敏感性与否,关键在于PCR模板制备为前提;不同的组织样品和不同的提取DNA方法对PCR均有不同的抑制作用<sup>[6]</sup>。由于部分样品中本身菌体含量较少及在培养过程中受到杂菌的抑制<sup>[7]</sup>,因此,模板制备方法对PCR检测病原的精确度至关重要。

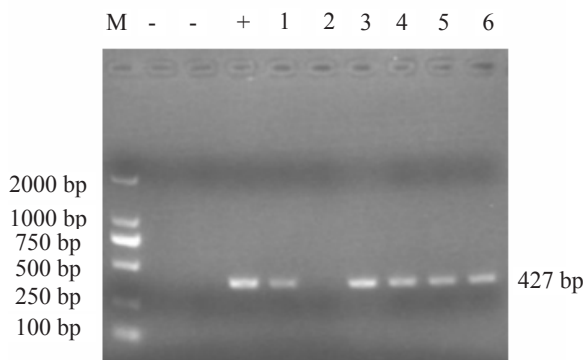
本试验对水煮法、酚-氯仿法、试剂盒法提取DNA进行比较,结果表明:水煮法适合于从菌液提取模板DNA,操作简单,且不需要昂贵的仪器,但不适用于从感染组织中提取模板DNA。通过与Mattsson<sup>[6]</sup>、Calsamiglia<sup>[7]</sup>应用水煮法对所采的鼻拭子样本进行基因组DNA提取后分别通过普通PCR和套式PCR进行检测相比较,本试验应用水煮法没能由组织中提取出模板DNA,但菌液可以,分析其原因:其一可能是Mattsson和Calsamiglia是由鼻拭子中提取模板DNA,鼻拭子采取回来之后,直接用PBS浸泡而由组织中提取基因组DNA不同,组织样品首先需要裂解液的作用;其二,所采用的PCR检测基因也不同,所以检测灵敏度也存在差异,所以结果有少许差异。通过与Stark<sup>[8]</sup>和Stakenborg<sup>[9]</sup>应用酚-氯仿法分别由气溶胶和肺组织中提取基因组DNA相比较,结果一致;酚-氯仿法适用于从含菌量高的大量组织样品中提取模板DNA,同时也



M: DL2000; 1,3,5: 分别为水煮法、试剂盒法、酚-氯仿法提取菌液DNA的外套PCR电泳结果;

2,4,6: 分别为水煮法、试剂盒法、酚氯仿法提取肺组织DNA的外套PCR电泳结果; 7: 阳性对照; 8: 阴性对照

图1 3种制备DNA方法的外套PCR电泳结果



M: DL2000; -, 阴性对照(阴性外套产物为模板); -, 阴性对照(水); +: 阳性对照; 1,3,5: 分别为水煮法、酚-氯仿法、

试剂盒法提取菌液DNA的内套PCR电泳结果; 2,4,6: 分别为水煮法、试剂盒法、酚氯仿法提取肺组织DNA的内套PCR电泳结果

图2 3种制备DNA方法的内套PCR电泳结果

适用于菌液,氯仿和酚的配合使用,加速有机相与液相分层,萃取DNA溶液中的蛋白质类有机物质,保留DNA于水相溶液中,提高了酚-氯法的样本DNA提取浓度,适合微量DNA样品和大批量的临床样本检样,但此方法操作步骤较为复杂,需要多次更换离心管,易发生交叉污染,且匀浆后需55℃水浴10h,不利于紧急送检样本。模板的提取所用的有机溶剂危害操作者健康,同时操作中可能残留的成分会抑制后续的PCR反应<sup>[18]</sup>。通过与Cai<sup>[10]</sup>、Strait<sup>[11]</sup>、郭盼盼<sup>[12]</sup>应用试剂盒法分别由肺组织、鼻拭子中提取基因组DNA相比较,其灵敏度基本一致;试剂盒法制备模板DNA是在蛋白酶裂解方法上做了改进,适用于组织、灌洗液、细胞培养物、菌液等多种样品,操作简便、适用范围广,适合紧急送检样本,避免了苯酚和氯仿对人体的危害,且离心柱式的洗涤效率比传统洗涤效率高。但在操作过程中,柱子有可能被蛋白酶消化不彻底而阻塞,经过适量的蛋白酶充分温育,可以避免类似现象的发生,但试剂盒法提取模板的价格稍高,加大了检测成本。

快速、便捷的模板DNA制备方法,大幅度地提高了检测的敏感度和检测效率,有利于做出准确检测,为疾病的早期诊断提供保障。

### 参考文献

- [1] Thacker E, Leman A D, Straw B E, et al. Diseases of Swine[M]. The Iowa State university Press, Ames, IA,2006:701-717.
- [2] Maes D, Segales J, Meyns T, et al. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs [J].Vet. Microbiol,2008,126: 297-309.
- [3] 闫艳丽,郭宇,张华春.猪肺炎支原体病原性概述[M].大连:第三届猪病防控学术研讨会会议论文集,2008:809-811.
- [4] 张旭.猪肺炎支原体在体内外感染性的研究[D].山西农业大学硕士学位论文,2012.
- [5] 武昱孜,靳蒙蒙,白方方,等.猪肺炎支原体P97 TaqMan-BHQ 荧光定量PCR检测方法的建立及应用[J].中国兽医科学,2012,42(12): 1268-1272.
- [6] Mattsson J G, Bergstrom K, Wallgren P, et al. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nose swabs from pigs by *in vitro* amplification of the 16S rRNA gene[J].Journal of Clinical Microbiology, 1995, 33(4):893-897.
- [7] Calsamiglia M, James E C, Carlos P, et al. Correlation between the presence of enzootic pneumonia lesions and detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchial swabs by PCR[J]. Veterinary Microbiology,2000,76(1):299-303.
- [8] Stark D A, Nicolet J. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by air sampling with a nested PCR assay[J].Applied and Environmental Microbiology,1998,64(2):543-548.
- [9] Stakenborg T, Vicca J, Butaye P, et al. A multiplex PCR to identify porcine mycoplasmas present in broth cultures[J].Veterinary Research Communications,2006,30(3):239-247.
- [10] Cai H Y, van Dreumel T, McEwen B, et al. Application and field validation of a PCR assay for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* from swine lung tissue samples[J].Journal of Veterinary Diagnostic Investigation,2007,19(1):91-95.
- [11] Strait E L, Madsen M L, Minion F C, et al. Real-time PCR assays to address genetic diversity among strains of *Mycoplasma hyopneumoniae*[J].Journal of Clinical Microbiology,2008,46(8): 2491-2498.
- [12] 郭盼盼,黄书林,张跃伟,等.环介导等温扩增技术快速诊断猪肺炎支原体[J].农业生物技术学报,2010,18(4):822-826.
- [13] 逯晓敏,冯志新,刘茂军,等.猪肺炎支原体套式PCR检测方法的建立及应用[J].江苏农业学报,2010,26(1):91-95.
- [14] Liu G M, Su W J, Cai H N, et al. Fluorescence quantitative PCR detection Chinese Journal of of transgenic food based on molecular beacon probe[J].Applied & Environmental Biology,2006,12(2): 273-277.
- [15] Wang N, Ma Y J, Wang Z Z, et al. The application of PCR to the detection of plant diseases [J].ACTA Agriculture Shanghai,2004,20 (4):112-115.
- [16] Oravcova K, Kaclikova E, Krascan icsova K, et al. Detection and quantification of *Listeria monocytogenes* by 5'-nuclease polymerase chain reaction targeting the act gene[J].Letters in Applied Microbiology,2006,42(1):15-18.
- [17] Wery N, Pourcher A M, Stan V, et al. Survival of *Listeria monocytogenes* and *Enterococcus faecium* in. sludge evaluated by real-time PCR and culture methods [J].Letters in Applied Microbiology,2006,43(2):131-136.
- [18] Tranthim F D J, Hansson R C, Norman K W. Headspace/solid-phase microextraction/gas chromatography-mass spectrometry: a screening technique for the recovery and identification of volatile organic compounds in postmortem blood and viscera samples [J].Journal of forensic sciences,2001,46(4): 934-946.