不同病原微生物核酸提取方法的对比

陈 涛[1],柴海云[1],刘 彦[2],黄月眉[1],黄 伟[1],张 召[2],林东子[3*]（1.广州南芯医学检验实验有限公司,广东广州 510535；2.广东省人体微生态工程技术研究中心,广东广州 510535；3.佛山市南海区第四人民医院检验科,广东佛山 528211）

摘 要：目的 通过肺泡灌洗液模拟样本,比较不同提取试剂对病原微生物DNA的提取效果。**方法** 选择白念珠菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、大肠埃希菌等代表菌,根据肺泡灌洗液细胞含量,添加特定数量的细胞及不同浓度的混合菌液,模拟临床肺泡样本。采用3种市售核酸提取试剂盒(凯杰、诺唯赞、美基)与自研优化后(南芯自研)的方法进行核酸提取,通过对核酸提取质量及PCR扩增结果对比提取效率。**结果** 南芯自研试剂与3个品牌各样本的A_{260}/A_{280}比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。当菌液浓度≥10^5 CFU/mL时凯杰提取核酸浓度最高,南芯自研次之($P<0.01$)。4个不同样本中,3家品牌试剂处理的4种微生物的Ct值与南芯自研提取试剂比较,差异有统计学意义($P<0.01$或0.05)。当菌液浓度≥10^4 CFU/mL时,南芯自建提取试剂对应的Ct均低于另外3种提取试剂($P<0.01$或0.05)。**结论** 南芯自研核酸提取方法是一种性价比较高的病原微生物核酸提取法。

关键词：病原微生物；核酸提取；实时荧光定量PCR

中图分类号：R 511 **文献标志码：**A **文章编号：**2096-3610（2023）06-0619-05

Comparison of different methods for extracting nucleic acid from pathogenic microorganisms

CHEN Tao[1], CHAI Hai-yun[1], LIU Yan[2], HUANG Yue-mei[1], HUANG Wei[1], ZHANG Zhao[2], LIN Dong-zi[3*] (1.Guangzhou Longsee Medical Laboratory Co., Ltd., Guangzhou 510535, China; 2.Guangdong Human Microecology Engineering Technology Research Center, Guangzhou 510535, China; 3.Department of Laboratory Medicine, the Fourth People's Hospital of Nanhai District, Foshan 528211, China)

Abstract: Objective To compare and analyze the DNA extraction effects of different extraction reagents for pathogenic microorganisms with simulated sample of alveolar lavage fluid. **Methods** Candida albicans, staphylococcus aureus, staphylococcus epidermidis, and escherichia coli were selected as representative bacteria. Clinical alveolar samples were prepared by adding a specific number of cells to a mixed bacterial solution of different concentrations based on the cell content of alveolar lavage fluid. Three commercially available nucleic acid extraction kits (Qiagen, Vazyme and Magen) and self-developed and optimized extraction methods (Longsee) were selected for nucleic acid extraction. The extraction performance was compared in terms of the quality of nucleic acid extraction and PCR amplification. **Results** There was no statistical difference in A_{260}/A_{280} between Longsee reagent and other three brands ($P>0.05$). When the microbial concentration was ≥10^5 CFU/mL, Qiagen had the highest concentration of nucleic acid extracted, followed by Longsee ($P<0.01$). Among the four different kinds of samples, the Ct values of 4 kinds of microorganisms treated by 3 brands of reagents were significantly different from those by Longsee reagent ($P<0.01$ or 0.05). When the microbial concentration was ≥10^4 CFU/mL, the Ct corresponding to Longsee reagent was lower than that of the other three reagents ($P<0.01$ or 0.05). **Conclusion** Longsee self-developed nucleic acid extraction method is a cost-effective nucleic acid extraction method for pathogenic microorganisms.

Key words: pathogenic microorganism; nucleic acid extraction; qPCR

收稿日期：2023-05-11

基金项目：国家自然科学基金青年项目(82003786),广东省科技厅基础与应用基础研究基金(2019A1515110338), 2021年佛山市科技创新团队(青年拔尖人才)(2120001010795)

作者简介：陈 涛(1979–),男,博士,副主任技师, E-mail: eric@longseemed.com

通信作者：林东子(1981–),男,博士,主任技师, E-mail: dongzi_001@163.com

由各类病原微生物引起的疾病统称为感染性疾病，通常是由于其代谢产物所引起的局部或全身性炎症，或者器官功能障碍，具有非常大的危害性[1]。目前，病原微生物检测技术种类非常广泛，除了传统微生物培养检测技术外[2-3]，分子检测技术，如荧光PCR、二代高通量测序等[4-8]也比较成熟。而病原微生物核酸的有效获取是分子检测的基础，也是后续确认病原微生物种类的重要环节之一。影响病原微生物核酸有效获取的因素有很多，其中最重要的影响因素之一为核酸提取过程中由于感染性临床样本种类多且样本构成复杂，较多的蛋白、糖类、脂类等物质会随着核酸一起沉淀，导致核酸提取的总量和纯度难以得到保障。解决病原微生物样本有效提取的问题，可有效提高病原微生物测序准确度，因此获取高纯度、高质量的核酸，对后续病原微生物的分子检测非常重要[9-12]。

市面上流通着各种的病原微生物核酸提取试剂，最为常用的提取方法是磁珠法和离心柱法，这些方法的操作原理类似。据调查显示，目前有不少的品牌自主研发病原微生物核酸提取试剂，但较多采用了离心柱法，该方法需要的样品量较多，所用的耗材也比较多，价格相对昂贵，且其提取需要反复离心，不满足高通量、自动化操作要求[13]。当然，亦有不少的品牌出售的病原微生物核酸提取试剂采用了磁珠法，但为了迎合高通量的要求，多制备成近百人份的预分装板，这在样品起始量不足时易造成试剂浪费。

本研究研发了一种新的核酸提取试剂（南芯自研核酸提取试剂），通过与市售吸附柱法、磁珠法提取试剂的提取效能、操作方便性、使用成本等方面进行综合比较，以验证南芯自研核酸提取试剂的性能及性价比，旨在为病原微生物的核酸提取提供一种更加经济实用的试剂。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及菌种 本实验所用细胞来自广东南芯细胞培养中心；菌种购自广东省微生物菌种保藏中心。

1.1.2 试剂 Qiagen UCP Pathogen Mini Kit（凯杰，50214），FastPure® Host Removal and Miprpbiome DNA Isolation Kit（DC501，诺唯赞），美基核酸提取或纯化试剂盒（R6672B-F-96，美基），南芯自研核酸提取试剂盒（痕量菌群DNA提取试剂盒-I，南芯），Talent荧光定量检测试剂盒SYBR Green（FP209-02，天根生物），引物合成[生工生物工程（上海）股份有限公司]，Qubit dsDNA HS Assay Kit（Q32854，Invitrogen）。

1.2 方法

1.2.1 混合菌悬液 购于广东省微生物菌种保藏中心的菌种，按照相关说明复苏溶解，转接在适当的平板上，在指定条件下培养。确认纯度后，在新鲜培养基上继续扩培，制备菌悬液。初次收集的菌悬液通过麦氏浓度测定，预估浓度为 10^8 CFU/mL。在此基础上，逐步进行10倍稀释，取终浓度为 10^4、10^3、10^2 CFU/mL菌悬液，每个浓度菌悬液取100 μL菌液涂布3块平板，视情况培养24~48 h进行菌落计数，确定原始菌悬液浓度。在此基础上，制备初浓度为 10^7 CFU/mL的混合菌悬液，通过10倍稀释得到4种不同浓度混合菌悬液。

1.2.2 模拟肺泡灌洗液 细胞通过离心（1 000 r/min，5 min）富集，生理盐水悬浮，制得 10^6 个/mL细胞悬液。依次取4 mL 10^7、10^6、10^5、10^4 CFU/mL混合菌悬液，分别加入36 mL上述细胞悬液，制得菌种终浓度依次为 10^6、10^5、10^4、10^3 CFU/mL的模拟样本，依次编号为样本1、样本2、样本3、样本4。

1.2.3 核酸提取 自研方法按照确定流程执行，具体如下：取2.5 mL样本，12 000 r/min离心10 min，弃上清。向沉淀中加入500 μL裂解液VTL，吹打混匀，涡旋震荡15 s，短暂离心后移入Lysing Matrix Tubes中，置研磨仪，59 Hz研磨10 min。研磨结束后，短暂离心，加入35 μL Lysozyme（20 g/L），上下颠倒混匀，短暂离心，37 ℃孵育15 min，短暂离心。加入20 μL Proteinase K（20 g/L）及100 μL SDS，上下颠倒混匀后12 000 r/min离心5 min，取上清液加入与上清液等体积的Buffer VL，涡旋混匀，70 ℃温育10 min后加入与上清液等体积的无水乙醇，上下颠倒混匀，短暂离心。加入80 μL羟基磁珠涡旋混匀，室温孵育5 min。孵育结束后短暂离心，将离心管置于磁力架上，待磁珠吸附完全后，弃管内液体。加入500 μL Buffer VW1，充分涡旋混匀，短暂离心，将离心管置于磁力架上，待磁珠吸附完全后，弃管内液体。加入500 μL Buffer VW2，充分涡旋混匀，短暂离心，将离心管置于磁力架上，待磁珠吸附完全后，弃管内液体后再次进行短暂离心，置于磁力架上，待磁珠吸附完全后，弃残留液体。保持管盖打开，室温晾干管内磁珠（至磁珠表面不反光）。加入35~100 μL无核酸酶水，涡旋混匀，室温孵育5 min。孵育结束后，短暂离心，将离心管置于磁力架上，待磁珠吸附完全后，转移DNA，DNA产物–20 ℃保存。其余核酸提取操作，均按照各自核酸提取试剂盒说明书

进行。

1.2.4 核酸质检　使用紫外分光光度计测定DNA纯度，对应提取试剂洗脱液作为空白对照，每个样本重复测定3次，取平均值，然后根据A_{260}/A_{280}判定核酸纯度。按照Qubit dsDNA HS Assay Kit试剂说明书要求，先绘制标准曲线，使标准曲线控制在9.5~10.5范围内，再进行DNA浓度测定，每个样本重复测定3次，取平均值。

1.2.5 荧光PCR检测　根据各菌种特异性设计合成检测引物，引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。PCR反应体系配制及扩增程序，按照天根扩增试剂说明书进行。10 μL PCR反应体系包括：2×Talent qPCR PreMix 5μL，正反向引物（10 μmol/L）各0.3 μL，RNase-Free ddH_2O 3.4 μL，待测核酸1 μL。当Ct值<35时，相应病原菌判为阳性；Ct值≥35时，判为阴性。PCR扩增条件如下：预变性95 ℃，3 min；PCR反应一个循环：90 ℃ 5 s、60 ℃ 10 s、72 ℃ 15 s，重复40个循环后停止反应。扩增引物序列及片段见表1。

1.3　统计学处理

采用GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析，计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，采用单因素方差分析，以$P<0.05$表示差异有统计学意义。

2　结果

2.1　核酸纯度及浓度

南芯自研试剂与3个品牌各样本的A_{260}/A_{280}比较差异均无统计学意义（$P>0.05$），见表2。当菌液浓度≥10^5 CFU/mL时（样品1和样本2）凯杰提取核酸浓度最高，南芯自研方法次之（$P<0.01$），见表3。

2.2　实时荧光定量PCR检测

4个不同样本中，3家品牌试剂处理的4种微生物的Ct值与南芯自研提取试剂比较差异有统计学意义（$P<0.05$或0.01）。当菌液浓度≥10^4 CFU/mL（样本1、2、3）时南芯自建提取试剂对应的Ct均低于另外3

表1　各微生物检测引物及扩增片段序列

病原微生物	引物名称	序列（5'→3'）	Genbank号	扩增片段长度/bp
大肠埃希菌	引物F	*GCTCGTGTTGTGAAATGTTG*	562	96
	引物R	*TGGCAGTCTCCTTTGAGTTC*		
痢疾志贺氏菌	引物F	*GTAGCGGTGAAATGCGTAG*	622	111
	引物R	*GTATCTAATCCTGTTTGCTCCC*		
金黄色葡萄球菌	引物F	*CAATGGACAATACAAAGGGC*	1 280	81
	引物R	*GCAGACTACAATCCGAACTGAG*		
表皮葡萄球菌	引物F	*CAAATCTTGACATCCTCTGACC*	1 282	108
	引物R	*ACCCAACATCTCACGACAC*		
白念珠菌	引物F	*CCTGTTTGAGCGTCGTTTC*	5 476	90
	引物R	*GCCTTACCACTACCGTCTTTC*		
新型隐球菌	引物F	*CACCTGTGAACTGTTTATGTGC*	5 207	119
	引物R	*CGATGTGGAAGCCAAGAG*		
乙型肝炎病毒核酸血清标准物质	引物F	*TTCTGACTACTGCCTCTCCC*	10 407	87
	引物R	*GGAATCCTGATGTGATGTTCTC*		

表2　4种核酸提取试剂提取DNA A_{260}/A_{280}的比较　（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

品　牌	样本1	样本2	样本3	样本4
南芯自研	1.71±0.98	1.63±0.66	1.73±0.89	1.78±0.73
凯杰	1.86±1.01	1.75±0.92	1.66±0.86	1.69±0.78
诺唯赞	1.84±0.69	1.86±0.71	1.92±1.22	1.79±1.77
美基	1.92±0.68	1.88±0.94	1.69±0.80	1.77±1.48

各品牌比较均$P>0.05$

表3　4种核酸提取试剂提取DNA的浓度　（$\bar{x}\pm s$，μg/L，$n=3$）

品　牌	样本1	样本2	样本3	样本4
南芯自研	37.58±0.31[a]	29.28±0.40[a]	26.73±0.19[a]	21.43±0.21[a]
凯杰	52.83±0.50	53.05±0.21	69.00±0.47	74.83±0.39
诺唯赞	26.88±0.49	27.25±0.31	32.38±0.44	32.63±0.50
美基	22.68±0.36	12.18±0.33	15.63±0.48	19.84±0.30

与凯杰、诺唯赞、美基品牌比较：[a]$P<0.01$

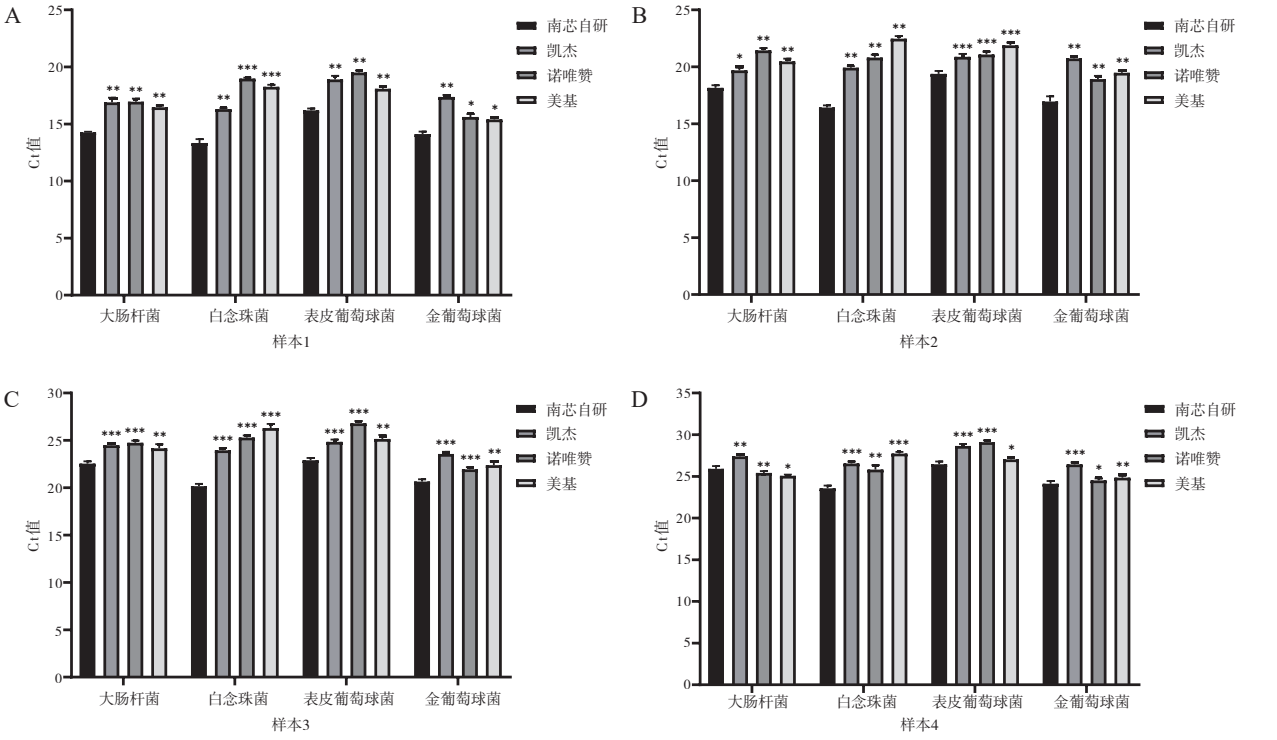
种提取试剂（P<0.01 或 0.05），说明在一定条件下南芯自建方法对微生物的提取效能高于其他 3 种试剂。见图 1。

3 讨论

随着病原微生物种类的增加，以及抗菌药物的不合理使用使得细菌的耐药性持续增加，导致感染性疾病的发病率和死亡率居高不下，严重威胁人类健康。传统检测方法，如微生物培养，检测周期长，部分微生物培养困难，为病原体的及时快速检测带来了一定的挑战。随着分子技术发展，越来越多的方法用于病原微生物检测。病原微生物核酸提取是分子检测的第一个关键步骤，现有提取方法种类比较多，但大部分成本高，或者耗时长，或提取效能不高，对后续病原体分子检测的灵敏度产生显著影响。南芯自研的提取试剂采用磁珠法，其利用纳米磁珠可以特异性的吸附释放在溶液中的核酸，在外加磁场的作用下，将吸附核酸的磁珠从样本溶液中分离出来，后经过洗涤，去除蛋白及离子，最后在晾干的磁珠中加入洗脱液，将吸附的核酸释放出来，得到高纯度核酸。磁珠法提取核酸，更能实现自动化、高通量操作，配合不同规格的自动核酸提取仪可短时间内提取大量的核酸，大大提高了核酸提取的效率[14]，更是配备的少人份、多人份的预分装板，针对性使用预分装板，既可满足样品量大时的高通量提取，也满足样品量少时的痕量检测，同时降低了病原微生物核酸提取成本。

本研究与市面 3 家口碑较好的病原微生物核酸试剂进行提取效能、操作方便性、使用成本等方面进行综合比较，发现采用吸附柱法的核酸试剂可能由于耗材较多的原因，其价格普遍比磁珠法的核酸试剂昂贵；同时发现目前市面上的核酸试剂无论是吸附柱法还是磁珠法提取的核酸纯度相差不大，从侧面也反映了南芯自研的核酸提取试剂的技术可信，技术成熟度能满足市场需求。此外，通过核酸提取浓度的对比发现，当菌液浓度≥10^5 CFU/mL 时南芯自研的核酸提取试剂能够获取的核酸浓度仅稍次于凯杰公司试剂。同时，本研究通过 4 种微生物的荧光PCR检测可以看出，4 个不同样本中，3 家品牌试剂处理的 4 种微生物的Ct值与南芯自研提取试剂相比差异均有统计学意义（P<0.05 或 0.01）。Ct值越高说明基因需要扩增多次才能达到阈值标准，所提取的核酸含量越低。本研究结果显示，当菌液浓度≥10^4 CFU/mL 时南芯自建提取试剂对应的Ct均低于另外 3 种提取试剂（P<0.05 或 0.01），表明南芯自研核酸试剂在一定条件下，其提取效率远胜于凯杰、诺唯赞等多家核酸提取试剂，具有较大的市场优势。同时结合核酸检测成本发现，南芯

（下转第 627 页）



与南芯自研比较：$^{*}P$<0.05，$^{**}P$<0.01，$^{***}P$<0.001

图 1 实时荧光定量PCR检测Ct值

显然是不可能的，在考虑资源与环境等因素的干扰下，logistic模型可能能够更好地预测未来我国人口数。

参考文献：

[1]杨颖 . 数学建模在实践中的应用 [J]. 长春师范学院学报 (自然科学版), 2010, 29(6): 106-108.
[2]刘令，杨力，林源 . 基于指数增长模型的全国人口预测 [J]. 山东工业技术，2014(16): 164.
[3]黄晨 . 基于logistic模型对中国未来人口的预测分析 [J]. 中国新通信，2019, 21(23): 160.
[4]刘亚平，刘云忠 . 美国人口的预测 [J]. 经济研究导刊，2020(3): 175-177.
[5]高梅，康宝生，曹黎侠 . 数学模型在西安市人口预测中的应用 [J]. 西安工业大学学报，2019, 39(4): 373-377.

(上接第 622 页)

自研的核酸检测成本（16.0 元 / 人份）远低于凯杰（32.7 元 / 人份）和诺唯赞（20.0 元 / 人份），说明南芯自研核酸试剂性价比极高；而美基成本（15.0 元 / 人份）虽然最低，但其为 96 人份预分装板，样品起始量不足时易造成试剂浪费。

综上，南芯自研核酸提取试剂，其提取流程简单、操作方便，所提取的核酸纯度与市面凯杰、诺唯赞等 3 家品牌几乎一致，当菌液浓度≥10^5 CFU/mL时核酸提取浓度仅低于凯杰品牌，检测成本则低于凯杰和诺唯赞品牌，提取效能亦远超 3 家核酸提取试剂品牌，综合性价比最高。南芯自研核酸提取试剂不仅可满足临床检测需要，也适用于常规基础实验，值得推广。

参考文献：

[1]RANA J S, KHAN S S, LLOYD-JONES D M, et al. Changes in mortality in top 10 causes of death from 2011 to 2018[J].J Gen Intern Med, 2021, 36(8): 2517- 2518.
[2]ZHU Y G, TANG X D, LU Y T, et al. Contemporary situation of commuunity- acqurired pneumonia in China: A systematic review[J]. J Transl Int Med, 2018, 6(1): 26-31.
[3]SCHLABERG R, CHIU C Y, MILLER S, et al. Validation of metagenomic next-generation sequencing tests for universal pathogen detection[J]. Arch Pathol Lab Med, 2017, 141(6): 776-786.
[4]张淋，洪城，新科，等 . 宏基因组学第二代测序技术对比传统实验室微生物培养在脓毒症病原学诊断中的优势 [J]. 中国急救医学，2022, 42(2): 114-120.
[5]江婷婷，林彦锋 . 人体内微生物游离DNA在病原微生物检测中的应用 [J]. 安徽医科大学学报，2023, 58(2): 327-331.
[6]李俊红 . 病原微生物对人体健康的危害及检测 [J]. 农业开发与装备，2016 (4): 43.
[7]刘瑾，龙运峰，罗勇，等 . 胃液病原微生物核酸检测在早产儿早期感染诊断中的价值 [J]. 邵阳学院学报 (自然科学版), 2022, 19(5): 13-18.
[8]甘明宇，李刚，俞惠，等 . 宏基因组Nanopore测序在儿童呼吸道病原微生物快速检测中的应用价值 [J]. 中国循证儿科杂志，2020, 15(5): 4.
[9]卢运战，程帮照，杨金兵 . 新城疫病毒核酸提取方法的优化与比较 [J]. 畜牧与饲料科学，2017, 38(4): 11-13.
[10]马晓华，柴萨萨，利利，等 . 粪便和组织样本高通量测序前处理方法的评估 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志，2022, 36(1): 103-110.
[11]杨焕蝶，杨金玉，陈相艳，等 . 肠道集聚性大肠杆菌基因组脱氧核糖核酸提取方法比较与改进 [J]. 济南大学学报 (自然科学版), 2021, 35(2): 144-149.
[12]刘燕萍，刘业英，文岚 . 临床检验标本中病原微生物的DNA快速提取方法分析 [J]. 医学信息，2013(24): 85.
[13]王浩，周俊宇，苏锦华 . 三种方法提取猪丹毒杆菌核酸的比较 [J]. 今日畜牧兽医，2019, 35(3): 3.
[14]刘晨曦，姚延禄，周新丽 . 用于磁珠法核酸提取的微流控芯片及自动化平台 [J/OL]. 分析试验室，2023, DOI: 10.13595/j.cnki.issn1000-0720.2022.102402.