

沙门氏菌属随机扩增多态性 DNA PCR 条件的优化

栗婉媛¹, 侯家奎², 柳 婷¹, 郭爱玲^{1,*}, 王洪江¹, 谢 跻¹, 马美湖¹

(1. 华中农业大学食品科学技术学院, 湖北 武汉 430070; 2. 许昌职业技术学院, 河南 许昌 461000)

摘 要:目的: 以 5'-CCGAAGCTGC-3' 为引物, 利用随机引物扩增多态性 DNA 技术(random amplified polymorphic DNA, RAPD)对沙门氏菌属的几种菌株进行扩增, 以确定 RAPD 的最终优化条件。方法: 首先选用 25 μ l 体系 PCR 和 50 μ l 体系 PCR 做对比, 以确定进行 RAPD 实验最佳的 PCR 体系。其次进行 PCR 反应体系条件的优化, 对 PCR 复性温度、引物浓度、 Mg^{2+} 浓度进行条件优化。最后对初步确定的优化结果进行不同琼脂糖胶浓度梯度的优化以确定 RAPD 的最终优化条件。结果: RAPD 优化条件为 PCR 复性 32 $^{\circ}C$, 25 mmol/L Mg^{2+} 溶液体积 2.0 μ l, 10 μ mol/L 引物体积 0.2 μ l, 琼脂糖胶浓度 1.0%。结论: 在优化条件下, 以引物 5'-CCGAAGCTGC-3' 对沙门氏菌属的 3 种标准菌株, 9 株食品分离株进行扩增, 得到的电泳条带最多, 且最清晰。

关键词: 沙门氏菌; 地方菌株; 随机扩增多态性 DNA; 优化

Optimization of RAPD PCR Assay for *Salmonella* Detection

SU Wan-yuan¹, HOU Jia-kui², LIU Ting¹, GUO Ai-ling^{1,*}, WANG Hong-jiang¹, XIE Ji¹, MA Mei-hu¹

(1. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China ;

2. Xuchang Vocational Technical College, Xuchang 461000, China)

Abstract: A random amplification of polymorphic DNA (RAPD)-PCR assay was developed for detecting *Salmonella* using a primer of 5'-CCGAAGCTGC-3'. In order to obtain distinctive and reliable results, the optimal PCR reaction conditions (namely PCR system volume, renaturation temperature, primer concentration and Mg^{2+} concentration) and agarose concentration for electrophoresis were investigated. Results showed that the optimal RAPD-PCR reaction was performed in a 25 μ l system containing 2.0 μ l of 25 mmol/L $MgCl_2$ and 0.2 μ l of primer at 32 $^{\circ}C$ and the optimal agarose concentration was 1.0%. Under such conditions, sufficient and clear electrophoresis strips were observed in RAPD-PCR detection of 3 typical *Salmonella* strains and 9 isolated *Salmonella* strains.

Key words: *Salmonella*; local strains; RAPD; optimization

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)20-0320-04

目前法定的沙门氏菌检测方法仍采用传统培养方法, 操作繁琐、耗时, 需 4~5 d^[1], 并且不能得出不同地方的沙门氏菌病是否是同一传染源引起的。所以需要建立一种灵敏、特异、快速的检验方法, 从而能够迅速判断出不同地方的沙门氏菌病是否是同一传染源引起的。目前, 随着科学技术的发展对致病菌的分离鉴定方法越来越适应时代的需要, 这些灵敏度高特异性强快速的方法主要有分子生物学方法、免疫学方法、化学

分类法^[2-3]。本研究的随机扩增多态性 DNA (random amplification polymorphic DNA, RAPD) 就是分子生物学法中的一种方法。

RAPD 是 1990 年美国杜邦公司科学家 Williams 和加利福尼亚生物研究所 Welsh 领导的两个小组几乎同时发展起来的一项新技术^[4]。RAPD 技术建立在 PCR 技术的基础上, 它利用一系列(通常数百个)不同的随机排列碱基序列的寡核苷酸单链(一般为 10 碱基聚合物)为引物,

收稿日期: 2008-10-24

基金项目: 科技部农学教育实验用微生物资源整合项目(2005DKA21208-6; 2006DKA21208-6)

作者简介: 栗婉媛(1982—), 女, 硕士研究生, 研究方向为致病菌。E-mail: suwanyuan@webmail.hzau.edu.cn

* 通讯作者: 郭爱玲(1965—), 女, 副教授, 博士研究生, 研究方向为致病菌检测。E-mail: guoailing@mail.hzau.edu.cn

对所研究基因组 DNA 进行 PCR 扩增。如果引物与模板 DNA 某一片段具有互补的核苷酸序列, 该引物就会结合上去, 在具有 4 种游离脱氧核苷三磷酸(dATP、dGTP、dTTP、dCTP)的情况下, 通过 DNA 聚合酶连接, DNA 链就会从引物的 3'-OH 端开始进行扩增, 合成一段新的互补 DNA 链。这个反应由高温变性(92~94℃)、低温复性(35~55℃)和适温延伸(68~72℃) 3 步组成一个循环, 共进行 35~45 次循环。扩增产物通过聚丙烯酰胺或琼脂糖凝胶电泳分离, 经溴化乙锭(EB) 染色或放射自显影来检测扩增产物 DNA 片段的多态性。由 DNA 片段的多态性构建核基因遗传亲源关系, 进而判断不同地方沙门氏菌病的传染源的亲源关系^[5]。RAPD 具有操作简便、快速、经济等优点, 但是 RAPD 方法某些条件未达到完全优化水平, 因此 RAPD 扩增条件优化是一个棘手的难题。为此本实验就如何快速获得 RAPD 优化条件进行系统研究, 以期建立简便、快速、经济、实用的优化程序与方法。

1 材料与方法

1.1 菌株

甲型副伤寒沙门氏菌 50001(*Salmonella paratyphi* A)、猪霍乱沙门氏菌 50019(*S. choleraesuis*)、伤寒沙门氏菌 50071(*S. typhi*)、鼠伤寒沙门氏菌 ATCC13311(*S. typhimurium*) 中国药品生物制品鉴定所; 其余菌株为武汉市疾病预防控制中心食物来源分离菌株。

1.2 试剂

营养琼脂、营养肉汤 武汉市天益生化有限公司; Taq 酶(5U/ml)、10 × PCR Buffer(加入 Mg^{2+} , 25mmol/L)、10 × PCR Buffer(无 Mg^{2+})、 $MgCl_2$ (25.0mmol/L)、dNTP Mixture(各 2.50mmol/L)、DNA Marker DL2000、6 × loading Buffer TaKaRa 公司; M-8410 矿物油 Sigma 公司; 琼脂糖 BIOWEST 公司。

1.3 仪器与设备

PCR 自动系列分析仪 TaKaRa 公司; 5415R 型离心机 Eppendorf 公司; DYY-8C 型电泳仪 北京市六一仪器厂。

1.4 方法

1.4.1 PCR 体系的选择

本实验选用 25 μ l 体系 PCR 和 50 μ l 体系 PCR 做对比, 以确定进行 RAPD 实验最佳的 PCR 体系。

25 μ l 体系 PCR: Taq 酶(5U/ μ l)0.125 μ l、10 × PCR Buffer(添加 Mg^{2+})2.5 μ l、dNTP Mixture 2 μ l、DNA 上清液 1 μ l、引物(10 μ mol/L)1 μ l、灭菌蒸馏水加至 25 μ l。

50 μ l 体系 PCR: Taq 酶(5U/ μ l)0.25 μ l、10 × PCR Buffer(加入 Mg^{2+})5 μ l、dNTP Mixture 4 μ l、DNA 上清

液 2 μ l、引物(10 μ mol/L) 2 μ l、灭菌蒸馏水加至 50 μ l。

加完混匀后 10000r/min 离心 10s, 加入一滴矿物油, 放入 PCR 仪中, 先 94℃ 预热 3min, 按照 94℃, 1min; 32~36℃, 1min; 72℃, 2min 进行扩增 35 个循环, 72℃ 接着延伸 10min, 最后 4℃ 保存。

1.4.2 引物条件的优化

本实验以 5'-CCGAAGCTGC-3' 为引物, 选取甲型副伤寒沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌 3 株不同菌种按照下表所需优化的 PCR 反应体系的条件进行优化。

表 1 PCR 反应体系所需的优化条件
Table 1 Factors and levels in optimization of PCR reaction conditions

优化条件	优化数值		
复性温度(℃)	32	34	36
引物体积(μ l)	0.2	0.4	0.8
Mg^{2+} 溶液体积(μ l)	1.0	2.0	4.0

2 结果与分析

2.1 25 μ l 体系 PCR 和 50 μ l 体系 PCR

琼脂糖凝胶浓度为 0.1%, 复性温度为 34℃, 点样孔从 1 到 5 的菌种分别为鸭沙门氏菌、甲型副伤寒沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、伊斯沙门氏菌, 按照 1.4.1 节的方法进行 25 μ l 体系 PCR 和 50 μ l 体系 PCR, 所得结果见图 1。

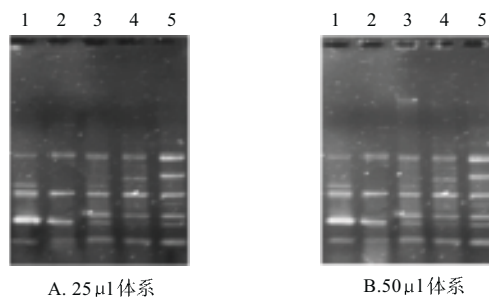


图 1 不同体系的 PCR 产物
Fig. 1 Electrophoretogram of *Salmonella* DNA amplified in a 25 μ l PCR system or in a 50 μ l PCR system

从图 1、2 可知, 25 μ l 体系 PCR 和 50 μ l 体系 PCR 分别所得的产物没有太大的区别, 电泳条带清晰、致密, 均得到了很好的扩增结果。所以后续实验选用了 25 μ l 体系的 PCR。

2.2 引物条件的优化

按照 1.4.2 节方法进行操作, 结果如图 2 所示, 每个图从左到右点样孔的 Mg^{2+} 溶液体积和引物体积分别

为: 1.0 μl 和0.2 μl ; 1.0 μl 和0.4 μl ; 1.0 μl 和0.8 μl ; 2.0 μl 和0.2 μl ; 2.0 μl 和0.4 μl ; 2.0 μl 和0.8 μl ; 4.0 μl 和0.2 μl ; 4.0 μl 和0.4 μl ; 4.0 μl 和0.8 μl 。从图2中可以看出, 对于引物5'-CCGAAGCTGC-3', PCR复性温度为32℃, Mg^{2+} 溶液体积和引物体积分别为: 2.0 μl 和0.2 μl 、2.0 μl 和0.4 μl 、4.0 μl 和0.4 μl 、4.0 μl 和0.8 μl 的情况下, 3种沙门氏菌扩增效果比较好; PCR复性温度为34℃, 在 Mg^{2+} 溶液体积和引物体积分别为: 2.0 μl 和0.2 μl 、4.0 μl 和0.8 μl 的情况下, 3种沙门氏菌扩增效果不太好; PCR复性温度为36℃, 不管 Mg^{2+} 溶液体积和引物体积为多少均没有得到明显的扩增。所以初步确定的优化结果为: PCR复性温度为32℃, Mg^{2+} 溶液体积和引物体积分别为2.0 μl 和0.2 μl 、2.0 μl 和0.4 μl 、4.0 μl 和0.4 μl 、4.0 μl 和0.8 μl 。

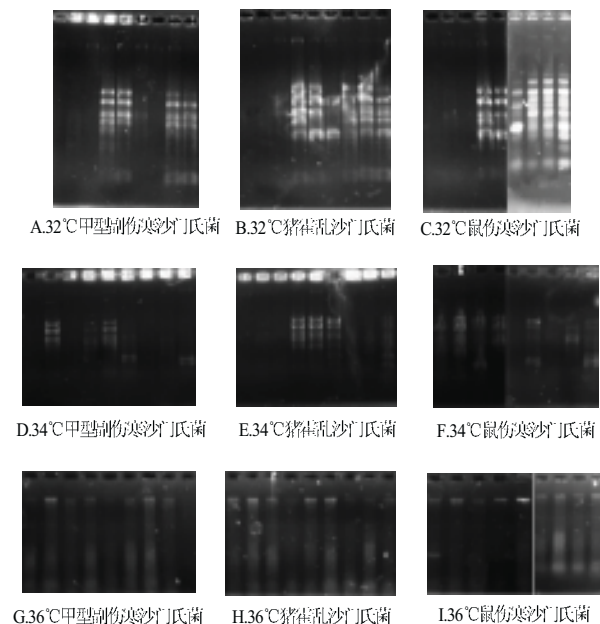


图2 不同温度条件下各菌的优化结果
Fig.2 Electrophoretogram of PCR amplification products of *Salmonella* DNA at different renaturation temperatures

2.3 琼脂糖胶浓度的优化

把上述初步优化条件结果的PCR产物, 进行一系列的琼脂糖胶浓度梯度的优化, 结果如图3所示。

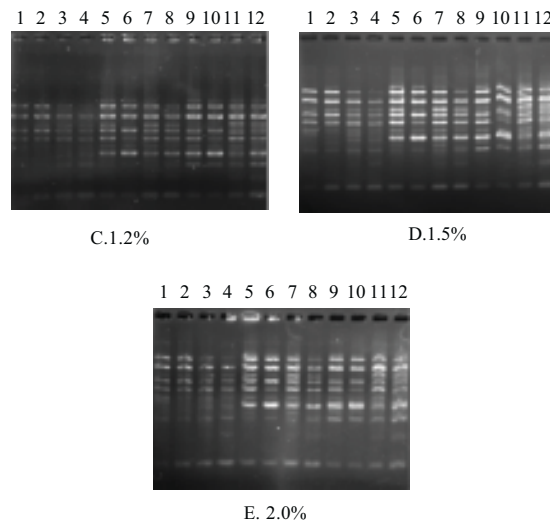
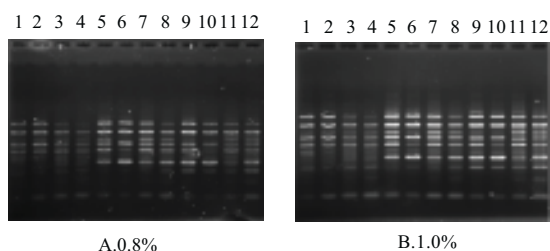


图3 不同浓度琼脂糖胶的电泳结果
Fig.3 Electrophoretogram of PCR amplification products of *Salmonella* DNA at different agarose concentrations

图3中从左到右点样孔的条件如表2所示。

表2 各点样孔RAPD优化条件
Table 2 Optimized RAPD conditions

序号	菌种	PCR 复性 温度(℃)	Mg^{2+} 溶液 体积(μl)	引物体积 (μl)
1	甲型副伤寒沙门氏菌	32	2.0	0.21
2	甲型副伤寒沙门氏菌	32	2.01	0.4
3	甲型副伤寒沙门氏菌	32	4.01	0.4
4	甲型副伤寒沙门氏菌	32	4.0	0.8
5	猪霍乱沙门氏菌	32	2.0	0.2
6	猪霍乱沙门氏菌	32	2.0	0.4
7	猪霍乱沙门氏菌	32	4.0	0.4
8	猪霍乱沙门氏菌	32	4.0	0.8
9	鼠伤寒沙门氏菌	32	2.01	0.2
10	鼠伤寒沙门氏菌	32	2.0	0.4
11	鼠伤寒沙门氏菌	32	4.0	0.4
12	鼠伤寒沙门氏菌	32	4.0	0.8

从整体上看, 比较好的琼脂糖胶浓度应该是0.8%、1.0%、1.2%。当琼脂糖胶浓度达到1.5%时, 扩增的带出现弯曲的几率增大。当琼脂糖胶浓度为2.0%时, 扩增带的分离效果很模糊。

对于琼脂糖胶浓度为0.8%时, 甲型副伤寒沙门氏菌的PCR产物得到的条带最多的为3和4号点样孔, 均为6条带; 猪霍乱沙门氏菌的PCR产物得到的条带最多的为5号点样孔, 为9条带; 鼠伤寒沙门氏菌的PCR产物得到的条带最多的为9号点样孔, 为8条带。

对于琼脂糖胶浓度为1.0%时, 甲型副伤寒沙门氏菌的PCR产物得到的条带最多的为1号点样孔, 为11条带; 猪霍乱沙门氏菌的PCR产物得到的条带最多的为5

号点样孔, 为11条带; 鼠伤寒沙门氏菌的PCR产物得到的条带最多的为9号点样孔, 为9条带, 虽然11和12号条带比较多, 但是拖尾比较严重。

对于琼脂糖胶浓度为1.2%时, 甲型副伤寒沙门氏菌的PCR产物得到的条带最多的为4号点样孔, 为8条带; 猪霍乱沙门氏菌的PCR产物得到的条带最多的为5号点样孔, 为9条带; 鼠伤寒沙门氏菌的PCR产物得到的条带最多的为9号点样孔, 为9条带。

综上所述分析, 只有琼脂糖胶浓度为1.0%时, 3种沙门氏菌扩增的带最多, 且最清晰。并且 Mg^{2+} 浓度和引物浓度的条件是一致的。所以对于引物5'-CCG AAGCTGC-3'的最终优化条件确定为: PCR复性温度32℃, 25mmol/L Mg^{2+} 溶液体积2μl, 10μmol/L引物体积0.2μl, 琼脂糖胶浓度1.0%。

3 讨论

影响RAPD稳定性的因素很多, 大致可分为两大类: 一是PCR反应体系中各种影响因素, 如模板质量、模板浓度、 Mg^{2+} 浓度、dNTP浓度、引物G+C含量、引物浓度、Taq DNA酶用量及其纯度; 二是外部因素, 包括所用PCR仪的性能、循环次数、温度设置、凝胶电泳的类别和胶的质量等。本实验做了25μl和50μl反应体积的比较, 最后发现区别不明显。所以, 为了节约开支, 采用了25μl的反应体积。

Mg^{2+} 是Taq聚合酶的激活剂, 其浓度的变化对结果有重要影响, 可以说是最重要的一个影响因素。 Mg^{2+} 浓度除影响酶活性外, 也影响引物的复性、模板与PCR产物的解链温度、产物的特异性、引物二聚体的形成

等。 Mg^{2+} 浓度过低时, 酶活力显著降低; 过高时会导致非特异扩增产物的积累, 背景模糊。

dNTP是反应中磷酸的主要来源, 一般使用的dNTP的浓度为0.1~0.4mmol/L^[6-7]。由于dNTP能与 Mg^{2+} 结合而影响反应液中游离 Mg^{2+} 的浓度, 因此所需最大激活Taq酶活性的精确 Mg^{2+} 浓度就取决于dNTP浓度。本实验室对 Mg^{2+} 的浓度做梯度比较后, 得出的 $MgCl_2$ 在反应体系中的终浓度为2.0mmol/L。本实验采用的dNTP的浓度为200μmol/L。

Taq酶的用量对反应的结果有很大影响。酶量过大, 特异性减少, 扩增产物的电泳呈弥散状。实验表明, 在25μl反应体系中, 酶的用量在0.5~2U时可以得到可重复的清晰条带, 采用1U的结果较好。

参考文献:

- [1] 阚秋霞, 马增晖. 浅谈沙门氏菌的检测方法[J]. 山东畜牧兽医, 2007(3): 46-47.
- [2] 刘佩红, 屠益平, 徐峰, 等. 沙门氏菌检测技术研究进展[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2005(6): 2-3.
- [3] 吕均, 秦巧玲, 郭爱玲, 等. GC-MS技术在鉴定食源性致病菌研究中的应用[J]. 食品科学, 2008, 29(2): 355-358.
- [4] WILLIAMS J G K, KUBELIK A R, LIVAK K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(22): 6531-6535.
- [5] PARAN L, MICHELMORE R W. Development of reliable PCR-based markers linked to down mildew resistance genes in lettuce[J]. Theor Appl Genet, 1993, 85(8): 985-993.
- [6] 邹继军, 董伟, 张志永, 等. 大豆RAPD影响因素的探讨[J]. 大豆科学, 1998(3): 197-200.
- [7] 李晋海. 水稻幼苗单株DNA的提取及其PCR-RAPD反应体系的建立[J]. 生物技术, 1998, 8(4): 13-16.