

生鲜牛乳总微生物基因组 DNA 的提取

龙丹丹¹, 张敏爱^{2*}, 王子亮³, 张建军², 杨秀清^{1*}

(1. 山西大学生物技术研究所, 太原 030006; 2. 山西出入境检验检疫局 太原 030024;
3. 中国合格评定国家认可中心, 北京 100062)

摘要:目的 建立高效快速提取生鲜牛乳中总微生物基因组 DNA 的方法。方法 以生鲜牛乳为原料, 采用 SDS-蛋白酶 K 法裂解细胞, 酚氯仿有机抽提去除蛋白和醋酸钾溶液沉淀蛋白, 制备样品中总微生物基因组 DNA。结果 以 NET(Tris·HCl, EDTA, NaCl)作为裂解缓冲液, 蛋白酶 K 消化得到的基因组 DNA 纯度和产量较高, 耗时较短; 缓冲液选择 NCT(NaCl, CaCl₂, Tris·HCl)时, PCR 产物特异性低于前者且产量较低。RNA 酶消化对产品纯度影响不大且会降低产量。用醋酸钾(KAc)沉淀去除蛋白, 操作快速简单, 耗时最短, 但 DNA 产量最低。结论 SDS-蛋白酶 K 法提取的生鲜乳微生物总 DNA 可以作为牛乳样品进一步检测的分子基础。

关键词: 生鲜乳; 基因组 DNA; PCR 扩增法

Extraction of total microbial genomic DNA in raw milk

LONG Dan-Dan¹, ZHANG Min-Ai^{2*}, WANG Zi-Liang³, ZHANG Jian-Jun², YANG Xiu-Qing^{1*}

(1. Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2. Shanxi Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of PRC, Taiyuan 030024, China; 3. National Institute for Public Health and the Environment, Beijing 100062, China)

ABSTRACT: Objective To establish an efficient and rapid method for the genomic DNA extraction of microbe from raw milk. **Methods** Genomic DNA of microbe was prepared after the cell lysis by SDS-proteinase K method and removing protein by phenol-chloroform and potassium acetate. **Results** Genomic DNA of microbe, which was obtained by using of proteinase K and NET(Tris·HCl, EDTA, NaCl) as buffer, showed some advantages of high purity and yield and time saving. Comparatively, the specificity and yield of polymerase chain reaction(PCR) products were lower while choosing NCT (NaCl, CaCl₂, Tris·HCl) as buffer. RNase hardly affected the purity of DNA, but it lowered the yield of DNA. Protein precipitation with potassium acetate may simplify the operation, but the yield of DNA was the lowest among all the methods. **Conclusion** Total microbial genomic DNA in raw milk extracted by SDS-proteinase K method can be used as a molecular basis of further molecular biology detection.

KEY WORDS: raw milk; total genomic DNA; polymerase chain reaction

引言

乳及乳制品富含人体所需的各种营养成分, 是营养全面的理想食品。近年来我国人均乳制品消费快速增长, 乳制品的消费结构也发生了很大变化, 乳粉

的消费逐渐下降, 液态乳消费显著上升, 对原料乳的要求也越来越高^[1]。因此, 检测原料乳中的微生物指标, 对保证其质量, 生产优质乳制品具有重要意义。目前, 传统的检测方法大多是在生鲜乳收购时采用标准平板计数法(standard plate count, SPC)或者显微

基金项目: 国家质检总局科技计划项目(2011HK228)

*通讯作者: 张敏爱, 硕士, 工程师, 研究领域: 食品微生物。E-mail: zmaama2005@163.com。

杨秀清, 博士, 副教授, 研究领域: 红球菌 R04-多氯联苯降解基因的开发和利用。E-mail: xiuqiang@sxu.edu.cn。

镜计数法进行细菌总数的测定,而对致病菌的测定目前仍无法现场进行,需事后用培养法分离。近几十年来,分子遗传学和分子生物学技术的迅速发展,给传统微生物鉴定带来了巨大革新,许多新技术和方法在微生物分类中已得到广泛应用,使微生物分类鉴定从一般表型特征的鉴定,深化到遗传特性的鉴定^[2]。传统的细菌培养方法耗时较长,步骤繁琐,不能快速检测乳及乳制品中的微生物。分子诊断学的发展,尤其是 PCR 技术的诞生能够很好地解决这一问题^[3-4]。国内在这方面已有大量研究,如张伟钦等以 *eae* 致病基因为靶基因,用特异性引物和 Taqman 探针进行实时 PCR 扩增,对生鲜乳中的肠致病性大肠埃希氏菌进行检测^[5]。马兆飞等比较了不同的 DNA 模板制备方法,将快速常规 PCR 与实时 PCR 结合,对阳性培养液及牛乳中的沙门氏菌进行了检验^[6]。胡建华等以 *ipaH* 基因为靶标,采用常规和实时 PCR 对生鲜乳样品中的志贺氏菌进行了检测,灵敏度可达 2 CFU/mL^[7]。

但是,上述研究仅是针对单一微生物的检测技术。近年来,总微生物 DNA 提取及后续宏基因组 PCR 扩增和群落分析技术在细菌生态的研究中发挥了重要作用,这些方法在细菌分类和细菌的功能特性研究中有广阔的应用前景^[8]。从样品中提取总微生物的基因组 DNA,通过基因片段扩增、测序、特异性筛选等分子生物学手段分析 DNA 的种类和相对数量,可以得到样品中微生物的种类组成以及种群数量的比例情况,对于对生鲜乳中微生物进行全面、客观地分析进而为生鲜乳的全面检验检疫和乳牛疾病提前预警,具有重要的意义^[9]。

本文以生鲜乳为原料,采用 SDS-蛋白酶 K 法裂解细胞,酚氯仿有机抽提去除蛋白和 KAc 沉淀蛋白,制备样品中总微生物基因组 DNA。通过对不同反应条件下所得产品进行比较,选择出稳定高效的总 DNA 制备方法,并将提取得到的总 DNA 进行 16SrDNA-PCR 扩增实验,旨在检验生鲜乳中微生物总 DNA 的含量,为样品微生物多样性的研究做准备。

1 材料与方 法

1.1 试剂与材料

生鲜乳取自太原市小店区某牛乳厂,样品取回后,立即于-80℃保存备用。

凝乳酶; NET^[10] (50 mmol/L NaCl, 125 mmol/L EDTA, 50 mmol/L Tris·HCl, pH 8.0); NCT (10 mmol/L NaCl, 1 mmol/L CaCl₂, 50 mmol/L Tris·HCl, pH 8.0); Triton X-100; 十二烷基磺酸钠(SDS); 蛋白酶 K; 醋酸钾(KAc); 质粒提取试剂盒(离心柱型)和 RNA 酶(上海生工生物工程有限公司); 引物(上海生工生物工程有限公司合成)。

1.2 仪器与设备

超净台(DL-CJ-1ND, 东联哈尔滨仪器制造厂); 离心机 (Centrifuge5424, Eppendorf); 恒温水浴锅 (1L-129A, 来亨科贸公司); 电子天平(MP4002, 上海恒平科学仪器有限公司); PCR 仪(ALS1296, Bio-RAD); 高压灭菌锅(SA-300VA, STURDY); 电泳仪(DYY-6C, 北京六一仪器厂); 凝胶成像系统(Bioshine GelX 1520, 上海欧翔科技公司)。

1.3 方 法

1.3.1 样品处理

(1)样品加入裂解液直接进行细胞裂解。

(2)用凝乳酶 37℃消化 30 min, 然后 10000 r/min 离心 10 min, 保留上清用于裂解。

1.3.2 裂解

按裂解条件的不同分为三组, 每组加入 500 μL 样品, 按表 1 加入以下溶液:

表 1 缓冲液的选择
Table 1 The choice of the buffer

	NET/μL	NCT/μL	尿素/μL	Triton X-100/μL
1	90	—	—	10
2	100	—	—	—
3	—	85	5	10

之后, 加入 100 μL 24% SDS(终浓度 3.4%), 80℃水浴 10 min。冰上冷却, 比较不同酶消化条件对实验结果的影响。

1.3.3 酶消化

每种体系均等分为两组, 一组裂解液加入蛋白酶 K(终浓度 325 μg/mL), 55℃水浴 1.5 h, 加入 RNase A(终浓度至 75 μg/mL), 50℃水浴 15 min; 另一组样品仅加入蛋白酶 K, 不加 RNase A, 其余同。

1.3.4 蛋白的去除

酶消化后, 使用酚氯仿抽提和 KAc 沉淀蛋白两种方法去除样品中变性蛋白质。

酚氯仿抽提: (1)酶消化后产物中加入等体积苯

酚-氯仿-异戊醇, 振荡 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 再抽提一次, 之后向上清液中加入等体积的氯仿抽提, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清; (2)加入等体积苯酚, 12 000 r/min 离心 10 min 后取上清加入等体积的氯仿抽提, 12 000 r/min 离心 10 min 后取上清。所得上清液均加入两倍体积的预冷异丙醇, 放置 1 h 后 12 000 r/min 离心 20 min, 取沉淀。所得沉淀加入 75% 的乙醇 50 μ L, 12 000 r/min 离心 5 min, 取沉淀, 重复上述操作一次。37 $^{\circ}$ C 水浴中开盖静置 2 min, 加入 50 μ L TE 于 37 $^{\circ}$ C 溶解 30 min, -20 $^{\circ}$ C 保存。

KAc 沉淀蛋白: 酶消化后产物中加入等体积 3 mol/L KAc 溶液(pH 5.0), 颠倒振荡 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清。将液体转移至离心柱中, 12 000 r/min 离心 1 min, 弃去液体, 离心柱用 75%乙醇分两次洗脱, 用量分别为 700 μ L 和 500 μ L。弃去洗脱液, 空管 12 000 r/min 离心 3 min, 弃去收集管, 向离心柱中加入 50 μ L TE, 将离心柱放入新的 1.5 mL EP 管中, 12 000 r/min 离心 1 min, 弃去柱子, 回收产物-20 $^{\circ}$ C 保存。

1.3.5 PCR 扩增

以 16SrDNA 的 PCR 扩增效果对 DNA 提取方法进行检测。

1.3.5.1 引物

选择细菌 16SrDNA-PCR 扩增的通用引物, 即:

27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

1541R: 5'-AAGGAGGCATCCACCGCA-3'

1.3.5.2 扩增体系

反应体系(50 μ L): DNA 模板, 1 μ L; 10 \times Easy Taq Buffer, 5 μ L; 10 mmol/L 的 dNTPs 2 μ L; 上引物 5 μ L; 下引物 5 μ L; Tag 酶 1 μ L; ddH₂O 31 μ L。

1.3.5.3 PCR 反应条件

预变性 94 $^{\circ}$ C, 5 min; 变性 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 退火 55 $^{\circ}$ C, 30s; 延伸 72 $^{\circ}$ C, 90s; 35 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 保温 10 min。

1.3.6 DNA 检测

基因组 DNA 和 PCR 扩增产物用 0.7% 的琼脂糖凝胶以 100 V 电压电泳 30 min, 溴化乙锭(EB)染色, 用凝胶成像系统观察并照相。

2 结果与分析

2.1 凝乳酶对 DNA 产量的影响

样品经凝乳酶处理后, 其微生物基因组的提取

操作简单, 耗时短, 但所得产量极低, 电泳图显示无特异性基因组条带, 但是以所提的 DNA 作为模板, 能够得到 PCR 产物。

2.2 不同因素对实验结果的影响

2.2.1 裂解缓冲液对 DNA 产量的影响

从图 1 可看出 NET 裂解所得的基因组 DNA 条带比 NCT 裂解得到的基因组 DNA 条带亮, 且使用 NCT 时泳道 5 看不到条带, 说明以 NCT 为缓冲液时提取的 DNA 产量低且效果不稳定。图 1 中条带显示以 NET 作为缓冲液, 同时加入 Triton X-100, DNA 产量最高。

2.2.2 不同酶条件下基因组提取结果

图 1 和图 2 均显示 DNA 条带清晰, 拖尾现象不严重, 说明产品中含杂质较少或者杂质已经降解。图 1 显示以 NET 作为缓冲液, 同时加入 Triton X-100 时, 蛋白酶 K 消化后 RNase 消化 15 min 所得的基因组 DNA 条带较亮, 其余没有明显差异。图 2 显示经 RNase 消化 2 h 的产品条带较暗, RNase 消化 15 min 或不进行 RNA 酶消化时条带没有明显差异。说明样品经过 RNase 消化与否对产品纯度并无明显影响, 而且消化时间较长时, 产品产量降低。

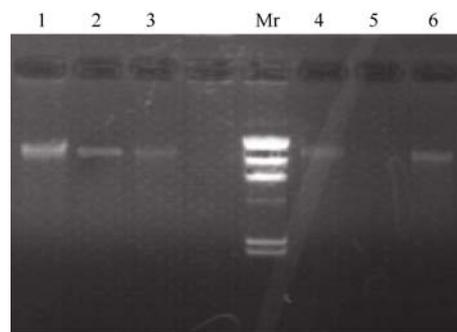


图 1 不同缓冲体系和酶消化条件下生鲜乳微生物总基因组 DNA 的提取效果

Mr: λ DNA /Hind^{III}; 1, 2: 缓冲液为 NET 和 TritonX-100; 3, 4: 缓冲液为 NET; 5, 6: 缓冲液为 NCT, 尿素, TritonX-100; 1, 3, 5: 样品经蛋白酶 K 消化后, RNase 消化 15 min; 2, 4, 6: 样品经 RNase 消化 2 h 后, 蛋白酶 K 消化。

Fig.1 Effects of lysis buffer and RNase composition on the yield of DNA

图 1 所示的实验过程中加入蛋白酶 K 后对体系进行了漩涡振荡, 目的是加强蛋白酶 K 消化作用。图 1 显示 DNA 片段大小仅 9.5 kb 左右, 图 2 显示片段大小为 23 kb。分析认为, 可能是因为振荡导致了基因组 DNA 断裂。

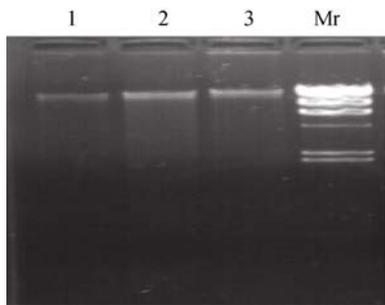


图 2 不同酶条件下生鲜乳中微生物总基因组 DNA 的提取结果

Mr: λ DNA /Hind ; 1: RNase 消化 2 小时后蛋白酶 K 消化; 2: 蛋白酶 K 消化后 RNase 消化 15min; 3: 蛋白酶 K 消化

Fig. 2 Effects of RNase on the yield of DNA

2.2.3 不同的蛋白去除方法对实验结果的影响

2.2.3.1 酚氯仿抽提效果

苯酚抽提效果优于苯酚-氯仿-异戊醇抽提效果。实验发现,使用苯酚抽提离心后可在苯酚相底部清晰看到白色粉末状沉淀,而用苯酚-氯仿-异戊醇则不能看到白色粉末状沉淀。且后者两次抽提后加入预冷的异戊醇时有大量白色粉末状沉淀产生, DNA 不易溶解。电泳图中两种抽提方法所得的基因组 DNA 条带没有明显差异,但苯酚-氯仿-异戊醇抽提后产物的紫外吸收值 $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}} < 1$, 且 PCR 产物电泳显示无特异性条带。分析认为可能因为抽提效果不佳,产品中蛋白质杂质过多。

2.2.3.2 KAc 沉淀蛋白效果

由图 3 可知, KAc 沉淀蛋白所得基因组 DNA 呈

弥散状态,表明产品中基因组 DNA 含量很少,不能用于下一步的研究。

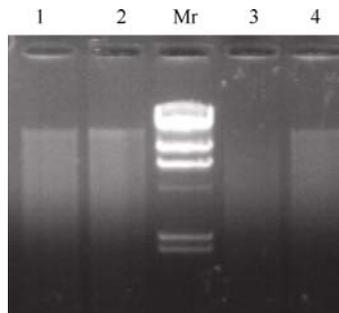


图 3 KAc沉淀蛋白提取基因组DNA结果

Mr: λ DNA / Hind ; 1-4: 经KAc沉淀蛋白所得产品

Fig. 3 PCR results of genome DNA extracted by potassium acetate

2.3 总 DNA 直接用于 PCR 扩增

PCR 扩增过程中以任一大小的基因组 DNA 作为模板,以细菌 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增。从图 4、图 5 可以看出扩增得到的 DNA 片段大小约为 1500 bp,与 16 S rDNA 编码区域的片段长度基本一致,说明以此方法提取的 DNA 可以作为模板进行 PCR 扩增,其产物可以进行测序鉴定。

图 4 显示,基因组 DNA 提取过程中缓冲液为 NET 时,PCR 扩增产物的特异性较好;缓冲液为 NCT 时,PCR 扩增产物的特异性差,电泳显示有多条非特异性条带。

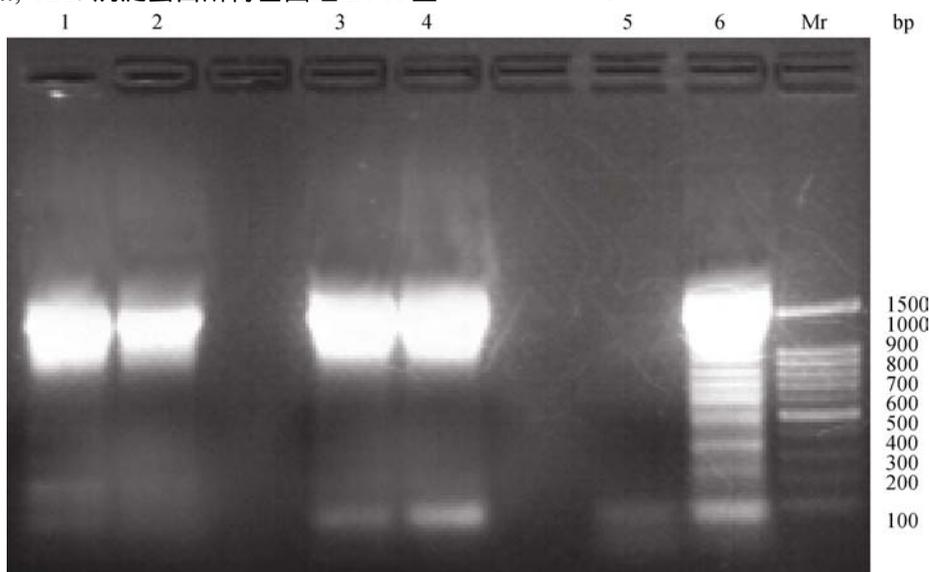


图 4 不同缓冲体系下生鲜乳微生物总基因组 DNA 的 16S rDNA—PCR 产物

Mr: 100bp DNA ladder; 1, 2: 缓冲液为 NET 和 triton X-100; 3, 4: 缓冲液为 NET; 5, 6: 缓冲液为 NCT

Fig. 4 16S rDNA-PCR products of total genomic DNA extracted with different buffer systems from raw milk

由图 5 显示, RNase 消化与否对 PCR 扩增结果无影响, 表明 PCR 过程没有受到 RNA 的干扰, 但扩增产物中非特异条带过多, 说明生鲜乳样品基因组 DNA 的提取只需要经过蛋白酶 K 的消化并非最佳条件。

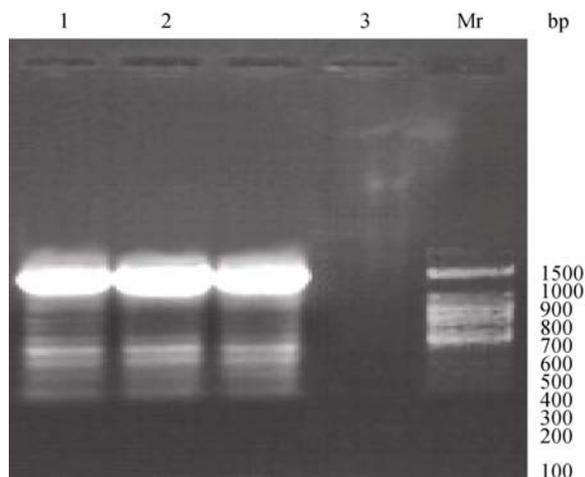


图 5 不同酶条件下总 DNA 的 16S rDNA-PCR 产物
Mr: 100 bp DNA ladder; 1: RNase 消化 2h 后蛋白酶 K 消化; 2: 蛋白酶 K 消化后 RNase 消化 15 min; 3: 蛋白酶 K 消化

Fig. 5 16SrDNA-PCR products of the yield of DNA obtained by different enzyme systems

3 讨论

生鲜牛乳基因组 DNA 提取过程主要受到蛋白质的干扰, 牛乳中蛋白质以酪蛋白为主, 酪蛋白中的 α -酪蛋白相对比例较高。酪蛋白是一种大型、坚硬、致密、极困难消化分解的凝乳, 几乎不溶于水和有机溶剂成为生鲜牛乳中基因组 DNA 提取的主要障碍^[11]。凝乳酶可专一地切割 κ 酪蛋白的 Phe105-Met106 之间的肽键, 从而使酪蛋白变性, 导致牛乳凝集。此处理方法去除了生鲜乳中的蛋白质, 缩短了蛋白质有机抽提的时间, 但 DNA 产量很低, 在凝胶电泳图上显示无特异性基因组条带。可能是凝乳酶作用过程中大量微生物被包在了变性蛋白质中间和蛋白一起被离心沉淀。而且此方法无法保证得到生鲜乳中所有微生物的基因组 DNA, 对样品中微生物的鉴定造成干扰。

若样品不经凝乳酶处理, 蛋白质抽提过程耗时且上清损失较多。因此实验中除文献提供的 NET 外, 还尝试了蛋白酶 K 的最佳缓冲体系 NCT。NCT 中的 Ca^{2+} 目的在于提高蛋白酶 K 的消化效率, 便于有机抽提。EDTA 和 Ca^{2+} 不能共存, 因此 NCT 为缓冲体系中不含有 EDTA。体系内的核酸酶得不到

EDTA 的抑制, 会降解游离 DNA, 总 DNA 的产量减少。而 Triton X-100 作为表面活性剂有助于蛋白质的变性, 使变性蛋白质更容易去除, 减少了反复抽提过程中导致的 DNA 损失。实验过程中只需蛋白酶 K 消化生乳中的蛋白质, 无需 RNA 酶作用, 这是因为细菌的 RNA 具有含量少、半衰期短、容易降解等特点, 细菌细胞壁破裂后, 细胞内的 RNase 以及操作体系中的 RNase 均会降解分离组分中的 RNA^[12]。有机抽提去除蛋白时, 因为酪蛋白未全部变性, 所以蛋白相和上清的分离较困难; 选择醋酸钾溶液沉淀蛋白时, 实验过程中体系 pH 值为 5.0 左右, 不会因 pH 值导致 DNA 降解, 因此可能 KDS 结合并沉淀蛋白质时, 蛋白质与染色体组 DNA 相连, 这样把蛋白质、染色体组 DNA 都沉淀下来, 溶液中大部分为质粒 DNA 或者小片段基因组 DNA。

从电泳图谱可以看出应用 SDS-蛋白酶 K 法可以得到生鲜乳微生物的基因组 DNA, 并且该方法提取的基因组应用于扩增, 获得了较好的扩增条带。说明本文所提供的方法提取的生乳微生物总基因组能够充分满足 PCR 以及其他一些分子生物学实验的要求。应用于乳品行业的细菌总数检测方法很多, 如直接表面荧光过滤器技术、流式细胞计数、还原试验法、点到分析与阻抗分析、ATP 生物发光技术^[13]。这些方法均克服了 SPC 法^[14]的缺陷, 具有灵敏度高, 耗时较短等优点, 但各种方法应用过程中仍各有不足, 且这些方法所需设备昂贵。总基因组 DNA 的提取对下游样品中微生物的检测有重要作用。根据所得的 16SrDNA 测序结果可以设计不同细菌的特异性引物, 对所得的基因组 DNA 进行荧光定量 PCR 可得到具体某微生物 16SrDNA 的拷贝数, 并计算样品中总微生物的含量及该微生物所占的比例^[15-16]。这为生鲜乳微生物指标的快速检测开辟了一条新思路。

参考文献

- [1] 范江平, 王明珠, 毛华明. 原料乳需检测的几项微生物指标[J]. 中国乳业, 2003, (12): 36-37.
- [2] 雷正瑜. 16SrDNA 序列分析技术在微生物分类鉴定中的应用[J]. 湖北生态工程职业技术学院学报, 2006, 4(1): 4-7.
- [3] Wiemer D, Lodersteadt U, von Wulfence H, et al. Real-time multiplex PCR for simultaneous detection of *Campylobacter jejuni*, *Salmonella*, *Shigella* and *Yersinia* species in fecal samples[J]. Int J Med Microbiol, 2011, (301): 577-584.
- [4] 王俊辉, 董淑珍, 付志新, 等. 乳牛隐性乳房炎病原菌的分离

- 鉴定[J]. 动物医学进展, 2010, 31(11): 119-122.
- [5] 张伟钦, 付宇, 周微, 等. Taqman 荧光实时 PCR 快速检测原料乳中 EPEC[J]. 中国乳品工业, 2009, (10): 53-55.
- [6] 马兆飞, 李洁莉, 胡红琴, 等. PCR 和实时 PCR 技术快速检测牛乳样品中的沙门氏菌[J]. 中国食品学报, 2008, 8(5): 132-137.
- [7] 胡建华, 李洁莉, 马兆飞, 等. 牛乳样品中志贺氏菌的快速 PCR 检测技术研究[J]. 食品科学, 2007, 28(8): 433-437.
- [8] Anderson IC, Cairney JW. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques [J]. Environ Microbiol, 2004, 6(8): 769-779.
- [9] Lamontagne MG, Jr Michel FC, Holden PA, *et al.* Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis[J]. J Microbiol Meth, 2002, (49): 255-264.
- [10] Romero C, Lopez-goni I. Improved Method for Purification of Bacterial DNA from Bovine Milk for Detection of Brucella spp. by PCR [J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(8): 3735-3737.
- [11] 张洁, 任砚, 徐桂花, 等. 酶法水解牛乳蛋白技术的研究[J]. 乳业科学与技术, 2010, (3): 112-114.
- [12] 陈星, 潘迎捷, 孙晓红, 等. 细菌总 RNA 提取方法的研究进展[J]. 湖南农业科学, 2010, (5): 9-11.
- [13] 王宁, 刘宁. 流式细胞术快速检测生乳中细菌总数[J]. 食品工业科技, 2007, 29(9): 197-200.
- [14] Mitrecic D, Huzak M, Curlin M, *et al.* An improved method for determination of gene copy numbers in transgenic mice by serial dilution curves obtained by real-time quantitative PCR assay[J]. J Biochem Biophys Methods, 2005, (64): 83-98.
- [15] Gurjar AA, Hegde nv, Love BC, *et al.* Real-time multiplex PCR assay for rapid detection and toxin typing of Clostridium perfringens toxin producing strains in feces of dairy cattle[J]. Mol Cell Probe, 2008, (22): 90-95.
- [16] Varga A, James D. Detection and differentiation of Plum pox virus using real-time multiplex PCR with SYBR Green and melting curve analysis: a rapid method for strain typing[J]. J Virol Methods, 2005, (123): 213-220.

(责任编辑: 赵静)

作者简介



龙丹丹, 在读硕士, 研究领域: 资源微生物。

E-mail: hunlian7940@sina.com



张敏爱, 博士, 副教授, 研究领域: 红球菌 R04-多氯联苯降解基因的开发和利用。

E-mail: zmaama2005@163.com



杨秀清, 博士, 副教授, 研究领域: 红球菌 R04-多氯联苯降解基因的开发和利用。

E-mail: xiuqyang@sxu.edu.cn