

速冻面米制品中金黄色葡萄球菌 DNA 提取方法的比较分析

张易, 宋明辉, 白亚龙, 陈雯瑶, 史贤明, 施春雷

(中美食品安全联合研究中心, 上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240)

摘要: DNA 的提取效率是影响食品中致病菌 PCR 检测的关键因素。因此本研究以速冻面米制品中最易污染的金黄色葡萄球菌为研究对象, 比较了四种 DNA 提取方法 (CTAB 法、离心柱法、氨基化纳米磁珠法、羧基化纳米磁珠法) 的效率和质量, 对提取的 DNA 采用 Real-time PCR 方法进行评价。结果表明, 在三大类速冻面米制品 (肉馅类、素馅类和无馅类) 人工污染金黄色葡萄球菌的样品中, 羧基化纳米磁珠法和氨基化羧基化纳米磁珠法的提取效率显著优于 CTAB 法和离心柱法, 可推荐为速冻面米制品中金黄色葡萄球菌污染快速定量检测的 DNA 提取方法。

关键词: 食品卫生与检验; 金黄色葡萄球菌; Real-time PCR; 速冻面米制品; DNA 提取

中图分类号: R155.5

Comparison on DNA Extraction Methods of *Staphylococcus aureus* from Quick-Frozen Flour and Rice Products

ZHANG Yi, SONG Minghui, BAI Yalong, CHEN Wenyao, SHI Xianming, SHI Chunlei

(MOST-USDA Joint Research Center for Food Safety, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240)

Abstract: DNA extraction is the critical step in the process of detecting pathogens in food by PCR. In this study, we compared four DNA extraction methods of *Staphylococcus aureus* from artificially contaminated quick-frozen flour and rice products. Genomic DNA extraction was performed using the CTAB method, spin column kit method, amino-modified silica-coated magnetic nanoparticles method and carboxyl beads kit method, then the four methods were evaluated by Real-time PCR. The results showed that silica-coated magnetic nanoparticles method and carboxyl beads kit method were significantly more effective than CTAB method and spin column kit method when extracting DNA from three different kinds of quick-frozen flour and rice products. So silica-coated magnetic nanoparticles method and carboxyl beads kit method can be cooperated with Real-time PCR in rapid quantitative detection of *Staphylococcus aureus* in quick-frozen flour and rice products.

Key words: Food hygiene and inspection; *Staphylococcus aureus*; Real-time PCR; quick-frozen flour and rice products; DNA extraction

0 引言

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 是一种重要的食源性致病菌, 由其引起的食物中毒是一个世界性的公共安全问题。金黄色葡萄球菌污染食品后, 在适宜的温度环境下会大量繁殖并产生肠毒素, 从而引起消费者食物中毒^[1]。根据美国疾控中心报道, 每年在美国由金黄色葡萄球菌导致的食物中毒约有 24 万人次, 其中 1000 多人需要住院治疗^[2]。

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金(20120073110052); 国家 863 项目(2012AA101601)

作者简介: 张易 (1991-), 男, 硕士研究生, 食品安全与微生物

通信联系人: 施春雷(1977-), 女, 副高级职称, 食品安全与微生物. E-mail: clshi@sjtu.edu.cn

速冻面米制品（饺子、馄饨、包子、汤圆等速冻预包装食品）是我国居民日常消费的重要食品，然而金黄色葡萄球菌、沙门氏菌等食源性致病菌在速冻食品中屡有检出^[3]，尤其是在速冻水饺中金黄色葡萄球菌的污染率更高，给速冻食品安全带来严重隐患^[4]。我国原有的速冻面米制品的国家标准中金黄色葡萄球菌是不得检出的^[5]，但因为金黄色葡萄球菌广泛存在于自然环境中及人和动物的体表^[6]，在食品加工生产过程中极易造成污染。美国 FDA 相关数据表明，只有当食物中污染的金黄色葡萄球菌数量超过 10^5 CFU/g (mL) 时，产生的肠毒素才能导致人食物中毒，因此美国 FDA 规定金黄色葡萄球菌在食品中是允许限量检出的^[7]。2011 年我国参照国际检测标准并结合本国实际国情，对速冻面米制品的国标进行了修订，金黄色葡萄球菌由不得检出调整为限量检出，生制品和熟制品食物中金葡菌的最大允许检出量分别为 10^4 CFU/g 和 10^3 CFU/g^[8]，这对定量检测速冻面米制品中的金黄色葡萄球菌提出了更高要求。为了更好地保障食品安全，建立高效、快速、准确的金黄色葡萄球菌定量检测技术是非常必要的。

近年来分子生物学检测技术如 PCR、Real-time PCR、LAMP 等越来越多地用于食源性致病菌的检测^[9]。DNA 的提取是利用分子生物学方法进行致病菌检测的关键步骤，直接关系到后续核酸检测的成败，影响其检测速度、灵敏度、特异性等。目前常见的提取金黄色葡萄球菌基因组 DNA 的方法有免疫磁珠法^[10]、CTAB 法^[11]、煮沸法^[12]等，但这些方法一般都需要进行前增菌，使得金黄色葡萄球菌的定量检测无法完成。速冻面米制品基质复杂，其中的蛋白质、多糖、脂肪等成分都会影响 DNA 的提取、抑制 PCR 反应，而常规 DNA 提取方法对于这些杂质去除得不够彻底。本研究将探索在不进行前增菌的情况下，四种 DNA 提取方法对速冻面米制品中金黄色葡萄球菌基因组 DNA 的提取效率和质量，发掘最适合后续 Real-time PCR 定量检测的 DNA 提取方法。

1 材料与方法

1.1 实验菌株和质粒

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 标准菌株 ATCC 13565、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5a，均为本实验室所保藏菌株。

1.2 实验样品

速冻米面制品样品采购自附近超市，包含三大类速冻面米制品，分别为肉馅类样品、素馅类样品和无馅类样品。

1.3 主要试剂和仪器

TIANamp 细菌基因组 DNA 提取试剂盒（上海天根）；AxyPrep 质粒 DNA 小量试剂盒、AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒（吴江康宁）；AllMag 全血基因组 DNA 提取纯化试剂盒（上海奥润）；氨基化纳米磁珠由本实验室制备得；SYBR Premix Ex Taq、pMD-19T 载体、T₄ DNA 连接酶（大连宝生物）；TSB 培养基、LB 培养基（英国 Oxoid）；Baird-Parker 金黄色葡萄球菌选择性培养基、亚硝酸盐卵黄增菌液（北京陆桥）；20 mg/mL 溶菌酶（Lysozyme，美国 Sigma 62970）、5 mg/mL 溶葡萄球菌酶（Lysostaphin，美国 Sigma L7386）配制成混合酶。

Realplex Mastercycler 荧光定量 PCR 仪（德国 Eppendorf），微量台式离心机 5424（德

国 Eppendorf), Thermomixer comfort 恒温混匀器(德国 Eppendorf), NanoDrop 2000 超
80 微量分光光度计(美国 NanoDrop)。

1.4 重组质粒的构建

金黄色葡萄球菌 ATCC 13565 接种于 TSB 液体培养基, 37℃ 摇床过夜培养后提取 DNA,
PCR 扩增 *nuc1* 基因, 引物序列详见表 1, PCR 反应条件为 94℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 30 s、
55℃ 退火 30 s、72℃ 延伸 30 s, 35 个循环后 72℃ 再延伸 5 min。PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂
85 糖凝胶电泳后使用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒回收目的 DNA 片段, 经纯化后连接到
pMD-19T 载体上。20 μL 连接反应体系如下: 10×buffer 1 μL、T₄ DNA 连接酶 0.5 μL、pMD-19T
载体 0.5 μL 以及纯化后的目的 DNA 片段 4 μL, 无菌水补足至 10 μL^[13]。

取上述连接产物 10 μL, 加入到 100 μL 新鲜制备的大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中冰浴
30 min, 42℃ 热激 90 s, 冰浴 2 min, 加入 500 μL LB 液体培养基, 37℃ 振荡培养 45 min,
90 5000×g 离心 5 min 后弃去部分上清, 留约 150 μL 培养液重悬菌体沉淀, 涂布于含 100 μg/mL
氨苄青霉素的 LB 固体培养基上 37℃ 培养 12~16 h 至单菌落出现, 挑取单菌落至含 100 μg/mL
氨苄青霉素的 LB 液体培养基中培养后, 进行重组质粒的 PCR 验证和测序鉴定。

1.5 重组质粒标准曲线的绘制

经 PCR 验证和测序鉴定后正确的重组质粒扩大培养后, 使用 AxyPrep 质粒 DNA 小量
95 试剂盒提取质粒, 使用 NanoDrop 2000 测定并计算质粒拷贝数, 计算公式如下^[14]:

拷贝数 (copies/mL) = $6.02 \times 10^{23} \times \text{DNA 含量 (g/mL)} / [\text{片段大小 (bp)} \times 660 \text{ (Da)}]$ 。

提取的质粒进行 10 倍梯度稀释后, 进行 Real-time PCR 扩增, 反应体系如下: SYBR
Premix Ex Taq 10 μL, RTnuc-F、RTnuc-R 引物 (10 μmol/L) 各 0.3 μL, 重组质粒 DNA 模板
1 μL, 无菌水补足至 20 μL。反应条件为 95℃ 预变性 30 s, 95℃ 变性 10 s、55℃ 退火 40 s,
100 循环 40 次, 在上述条件后还增加 60~95℃ 融解曲线步骤。反应结束后, 以 log₁₀ 质粒拷贝数
为横坐标, 对应的 Ct 值为纵坐标, 绘制重组质粒标准曲线。

表 1 引物序列及其产物大小

Tab.1 Sequences of primers and fragment sizes of products

用途	名称	序列 (5'→3')	产物长度	参考文献
Real-time PCR	RTnuc-F	AAATTACATAAAGAACCTGCGACA	87bp	[15]
	RTnuc-R	GAATGTCATTGGTTGAC TTT GTA		
构建质粒	nuc1-F	AGTATATAGTGCAACTTCAACTAA	448bp	[16]
	nuc1-R	ATCAGCGTTGTCTTCGCTCCAAAT		

1.6 人工污染样品的制备

按照《GB4789.10-2010 金黄色葡萄球菌检验方法》对采集的不同种类的速冻面米制品
样品进行金黄色葡萄球菌定性检验, 筛选出其中的金黄色葡萄球菌阴性样品, 用以制备人工

污染样品。

称取 25 g 金黄色葡萄球菌阴性的速冻面米制品样品置于盛有 225 mL 生理盐水的无菌均质袋中，用拍击式均质器拍打 180 s，制成 1:10 的样品匀液。金黄色葡萄球菌 ATCC 13565 接种到 TSB 液体培养基中，置于 37℃ 摇床培养 10~12 h 至 OD₆₀₀ 为 0.8，对菌液进行 10 倍系列梯度稀释，将 100 μL 菌液加入到 900 μL 样品匀液中制成人工污染样品，未加入菌液的样品匀液作为空白对照。

1.7 四种 DNA 提取方法

1.7.1 CTAB 法

(1) 取 1 mL 人工污染样品于 12000 rpm 下离心 1 min，弃上清后沉淀重悬于 100 μL TE，混匀并充分振荡，加入 50 μL 混合酶后 37℃ 孵育 45 min；

(2) 加入 300 μL TE 和 55 μL 10% SDS，68℃ 水浴 15 min 破碎细胞；加入 87 μL 1% NaCl 和 69 μL 1% CTAB，68℃ 水浴 15 min；

(3) 加入 600 μL 的苯酚：氯仿：异戊醇（25: 24: 1）混合液进行抽提，剧烈震荡混匀后 12000 rpm 离心 10 min，小心地吸取上清液至新的离心管；

(4) 再加入 400 μL 氯仿：异戊醇（24: 1）混合液，再次离心 10 min，吸取上清液至新的离心管；

(5) 加入 800 μL 无水冰乙醇沉淀 30 min，离心 10 min 弃去上清；沉淀中加入 1 mL 70% 乙醇充分洗涤，再次 12000 rpm 离心 10 min，弃上清；风干后加入 100 μL 无菌水溶解。

1.7.2 氨基化纳米磁珠法

(1) 1 mL 人工污染样品于 12000 rpm 下离心 1 min，用 140 μL TE 缓冲液重悬沉淀，加入 40 μL 混合酶 37 °C 作用 30 min 后加入 20 μL 蛋白酶 K（20 μg /μL）56 °C 孵育 30 min；

(2) 100 °C 沸水浴 10min 后立即放入冰盒中冷却 10min，加入 200 μL TE 和 400 μL 苯酚：氯仿：异戊醇（25:24:1）混合液抽提，12000 rpm 离心 10 min 后取上清于新的离心管；

(3) 上清液中加入 30 μL 本实验室制备的氨基化纳米磁珠（1 μg/μL）^[17]充分混匀，60 °C 作用 30min，定期振荡保持纳米磁珠处于悬浮状态；

(4) 磁性分离纳米磁珠后使用 TE 缓冲液洗涤，将吸附了 DNA 的纳米磁珠直接加入到体系中进行 Real-time PCR 反应。

1.7.3 羧基化纳米磁珠法

(1) 1 mL 人工污染样品于 12000 rpm 下离心 1 min，沉淀物用 140 μL TE 缓冲液重悬，加入 40 μL 混合酶 37 °C 作用 30 min 后加入 20 μL 蛋白酶 K（20 μg /μL）56 °C 孵育 30 min；

(2) 按照 AllMag 全血基因组 DNA 提取纯化试剂盒的说明书进行后续步骤。

1.7.4 离心柱法

按照说明书，使用 TIAN amp 试剂盒提取 1 mL 人工污染样品中金黄色葡萄球菌的 DNA。

1.8 DNA 提取效率的评价

使用 NanoDrop 2000 测定 CTAB 法、离心柱法和羧基化纳米磁珠法三种方法提取得到 DNA 的浓度和纯度，并加以比较。

按照 1.2.2 中的体系对以上四种方法提取的 DNA 进行 Real-time PCR 扩增，根据得到的 Ct 值计算提取的 DNA 的拷贝数，每种方法平行三次。

对人工污染样品进行 Baird-Parker 平板计数，用 Real-time PCR 结果与 Baird-Parker 平板计数结果之比计算 DNA 相对提取率。

2 结果

2.1 重组质粒构建

从含氨苄霉素 LB 平板上挑取 8 个白色单菌落接种到 5 mL 的 LB 液体培养基中（氨苄青霉素终浓度 100 $\mu\text{g/mL}$ ）摇床培养后，水煮法提取 DNA 后使用 *nuc1* 引物进行 PCR 验证，结果表明连接有 *nuc1* 基因的 pMD-19T 载体成功转入了大肠杆菌 DH5 α （图 1）。

提取质粒后送交上海美吉生物公司进行测序，得到测序结果后登录 NCBI 网站进行 BLAST 比对分析，比对结果表明插入的序列与金黄色葡萄球菌 *nuc1* 基因（GenBank: EF529593.1）的相似度为 100%，说明插入 *nuc1* 基因的重组质粒构建成功，将该质粒命名为 pMD-*nuc1*。

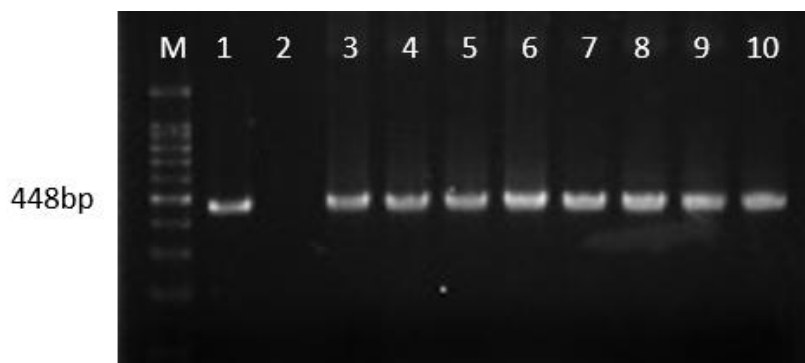


图 1 重组质粒 pMD-*nuc1* 的 PCR 验证结果

Fig. 1 Confirmation of the recombinant plasmid pMD-*nuc1* harboring *nuc1* gene by PCR amplification
M 为 100bp DNA Marker; 1 为阳性对照; 2 为阴性对照; 3~10 为重组质粒

2.2 重组质粒标准曲线的绘制

将提取的重组质粒 DNA 进行 10 倍梯度稀释，采用 Real-time PCR 方法进行扩增。结果显示，重组质粒在 $2.96 \times 10^3 \sim 2.96 \times 10^9$ copies/mL 浓度范围内具有优良的线性关系（ $R^2=0.9999$ ），反应结束后，以 \log_{10} 质粒拷贝数为横坐标，对应的 Ct 值为纵坐标，绘制标准曲线，结果如图 2 所示，回归曲线为 $y = -3.4503x + 41.034$ 。

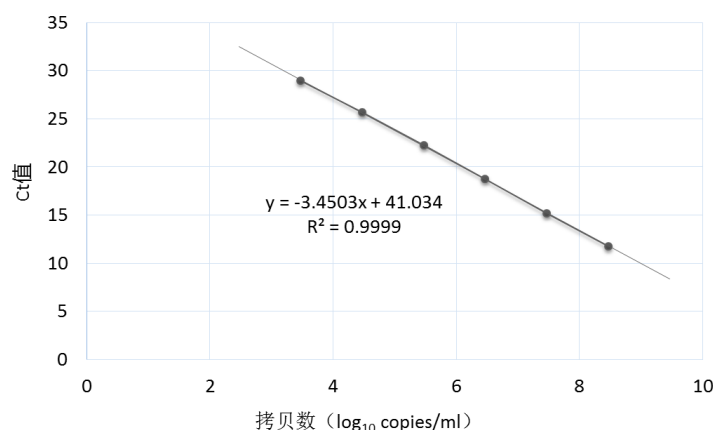


图 2 利用重组质粒 pMD-nuc1 绘制的荧光定量 PCR 核酸定量标准曲线
Fig. 2 Standard curve generated by Real-time PCR amplification with pMD-nuc1

2.3 四种 DNA 提取方法的比较

分别使用离心柱法、羧基化纳米磁珠法、CTAB 法和氨基化纳米磁珠法提取三种不同类别(肉馅类样品、素馅类、无馅类)人工污染速冻面米制品中的金黄色葡萄球菌基因组 DNA。氨基化纳米磁珠是通过氢键和静电作用与 DNA 结合,获得的 DNA 是吸附在纳米磁珠表面的,不能使用分光光度计测定浓度与纯度,但可直接进行 PCR 扩增。故选用 Real-time PCR 方法对四种不同方法提取的 DNA 进行定量测定,一是能够衡量不同方法提取 DNA 的浓度,二是能够验证所提取的 DNA 的纯度是否适宜进行 PCR 扩增。

预实验中,使用羧基化纳米磁珠法和离心柱法对 $10^7 \sim 10^2$ CFU/mL 梯度浓度的人工污染样品进行了 DNA 的提取,提取的 DNA 进行 Real-time PCR 扩增,结果发现羧基化纳米磁珠法在 $10^7 \sim 10^3$ CFU/mL 污染浓度范围内都能得到 Ct 值差异明显的结果;而离心柱法在 10^3 和 10^2 CFU/mL 污染浓度时, Ct 值无法区分开,说明羧基化纳米磁珠的 DNA 提取效率优于离心柱法。根据梯度浓度人工污染样品实验的结果,后续的实验中选择 10^7 和 10^4 CFU/mL 浓度的人工污染样品来比较四种 DNA 提取方法的优劣。

用 NanoDrop 2000 测定 CTAB 法、羧基化纳米磁珠法和离心柱法三种方法从 10^7 CFU/mL 人工污染样品中提取的 DNA 的浓度和 A_{260}/A_{280} 值,结果如表 2 所示。不同方法的多次平行实验表明,CTAB 法提取的 DNA 虽然浓度很高,但 A_{260}/A_{280} 值在 1.45~1.57 之间,而离心柱法得到的 DNA 浓度居中, A_{260}/A_{280} 值为 1.7 左右,说明这两种方法获得的 DNA 含有较多的蛋白质,会影响实际 PCR 的扩增效率;羧基化纳米磁珠法虽然获得的 DNA 浓度不高,但纯度最好。因为不是从纯培养物而是从人工污染样品中提取的金黄色葡萄球菌 DNA,所以根据吸光值 A_{260} 、 A_{280} 得到的 DNA 浓度和纯度仅有参考价值,仍需要用 Real-time PCR 方法进一步确证来比较四种 DNA 提取方法。

表 2 三种方法提取 DNA 的浓度与纯度

Tab. 2 Concentration and purity of DNA extracted by three methods

DNA 提取方法	肉馅类		素馅类		无馅类	
	浓度(ng/μl)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	浓度(ng/μl)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	浓度(ng/μl)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
CTAB 法	154.43±13.17	1.57±0.03	136.23±26.06	1.45±0.04	119.07±11.78	1.48±0.07
羧基化纳米磁珠法	54.40±8.22	2.04±0.04	33.17±5.80	2.07±0.03	22.73±2.11	1.91±0.16
离心柱法	74.80±8.90	1.73±0.03	68.63±6.96	1.66±0.06	34.20±4.36	1.63±0.08

用重组质粒 pMD-nuc1 标准曲线计算 Real-time PCR 获得的 Ct 值对应的 log₁₀ 质粒拷贝数, 除以 BP 平板计数结果计算 DNA 相对提取率, 用 DNA 相对提取率的高低衡量四种方法的优劣, 结果见表 3。可以看出, 无论是在 10⁴ CFU/mL 还是 10⁷ CFU/mL 污染浓度时, 羧基化纳米磁珠法的 DNA 相对提取率都是最高的, 能达到 97.51% 和 106.75%, 氨基化纳米磁珠法次之, 分别为 96.68% 和 99.72%, 但两种纳米磁珠提取方法之间并没有显著性差异 (P>0.05)。虽然根据表 2, CTAB 法和离心柱法提取的 DNA 浓度较高, 但 Real-time PCR 结果反映这两种方法提取的能用于实际 PCR 扩增的 DNA 的量低于羧基化纳米磁珠法和氨基化纳米磁珠法。而在三类不同的速冻面米制品中, 四种方法的相对提取率的趋势是一致的, 从高到低依次为羧基化纳米磁珠法、氨基化纳米磁珠法、离心柱法和 CTAB 法。

表 3 人工污染样品的 Real-time PCR 检测结果

Tab.3 Detection of artificial contaminated samples with Real-time PCR

污染浓度	DNA 提取方法	肉馅类	素馅类	无馅类	BP 平板计数结果 (log ₁₀ CFU/mL)	DNA 相对提	
		Real-time PCR 结果(log ₁₀ CFU/mL)				取率	
10 ⁷ CFU/mL	离心柱法	6.75±0.05	6.88±0.24	7.01 ±0.15	7.62 ±0.15	90.17% ± ^B	
	羧基化纳米磁珠法	7.50±0.06	7.51±0.03	7.31 ±0.04		97.51% ±	
	CTAB 法	6.10±0.23	6.11±0.29	6.55 ±0.26		1.48% ^A	
	氨基化纳米磁珠法	7.42±0.17	7.45±0.10	7.26±0.05		81.96% ±	
						3.37% ^C	
10 ⁴ CFU/mL	离心柱法	4.19±0.16	4.02±0.22	4.05 ±0.20	4.69 ±0.14	96.68% ±	
	羧基化纳米磁珠法	5.09±0.09	5.03±0.06	4.90 ±0.18		1.34% ^A	
	CTAB 法	4.01±0.23	3.59±0.19	3.35 ±0.36		87.14% ±	
	氨基化纳米磁珠法	4.86±0.11	4.49±0.16	4.68±0.19		±1.93% ^b	
						106.75% ±	

A-C, a-c: 显著性检验结果, 同一列不同字母表示显著性差异 (P<0.05, n=3)

3 讨论

PCR 等分子生物学检测技术因其具有特异性强、灵敏度高、检测速度快等特点, 已经被广泛用于食源性致病菌的检测, PCR 检测食品中的致病菌的瓶颈之一是 DNA 的提取, DNA 提取效率以及提取质量严重影响着 PCR 等分子生物学的检测结果。因此, 研究从食品中高效的提取致病菌 DNA 的方法, 消除 PCR 抑制因子对利用 PCR 检测食源性致病菌有重

要的意义。为此,本研究以速冻面米制品中污染的金黄色葡萄球菌为研究对象,对 CTAB 法、离心柱法、氨基化纳米磁珠法和羧基化纳米磁珠法这四种 DNA 提取方法进行了比较。

金黄色葡萄球菌为革兰氏阳性菌,其细胞壁很厚,而且 90% 的金黄色葡萄球菌菌体表面都含有能与肽聚糖形成共价交联结构的蛋白 A^[18],提高了金黄色葡萄球菌的破壁难度。

220 因此本研究参考任晓东等的方法^[19],使用溶菌酶和溶葡萄球菌酶配制的混合酶裂解金黄色葡萄球菌的细胞壁,提高了 DNA 的提取率。

速冻面米制品中基质复杂,含有较多的淀粉、脂肪、蛋白质等杂质,CTAB 法虽然使用苯酚:氯仿:异戊醇抽提了两次,但最终获得的 DNA 中残留的杂质还是很多,离心柱法提取 DNA 时会有较多的淀粉、蛋白质等杂质积聚在滤膜表面,降低了 DNA 的提取效率,

225 Real-time PCR 结果也表明这两种方法不能有效除去速冻面米制品基质中的 PCR 抑制因子,不适合作为直接从食品样品中提取金黄色葡萄球菌基因组 DNA 的提取方法。

纳米磁珠有很高的比表面积^[20],经过表面修饰的纳米磁珠又具有很高的表面活性^[21],能从含有蛋白质、脂类等杂质上清液中大量吸附 DNA,本实验室前期的研究发现适量的氨基化纳米磁珠存在时并不影响 PCR 反应的进行,还能抑制 PCR 中的小片段非特异性扩增^[22],

230 所以建立在纳米磁珠基础上的 DNA 纯化分离方法具有高效、快速、纯度好等优点。本研究的结果也表明,氨基化纳米磁珠法和羧基化纳米磁珠法在人工污染的速冻面米制品中的 DNA 相对提取率更高,且在进行 Real-time PCR 扩增时都能得到重复性良好的结果,可配合 Real-time PCR 对速冻面米制品中污染的金黄色葡萄球菌进行快速定量检测。

从提取时间、提取效率、提取成本等方面综合比较了这四种 DNA 提取方法(表 4),
235 可以看出羧基化纳米磁珠法具有最高的 DNA 相对提取率,所需时间也最短仅需 30 min 左右,操作也十分便捷,但因其是商品化试剂盒,单位提取成本较高;氨基化纳米磁珠法拥有与羧基化纳米磁珠相近的 DNA 提取率,氨基化纳米磁珠由被实验室制备得,成本相对较低,正在将其开发成试剂盒,可望进行商业化生产,适用于大规模样品的检测。

表 4 四种方法的综合比较

240

Tab.4 Comprehensive comparison of four DNA isolation methods

DNA 提取方法	提取时间	单位提取成本	相对提取率
离心柱法	1.5 h	15 元	中等
羧基化纳米磁珠法	1 h	20 元	高
CTAB 法	4 h	5 元	低
氨基化纳米磁珠法	1.5 h	8 元	高

4 结论

本研究对四种 DNA 提取方法进行了比较分析,确定了氨基化纳米磁珠法和羧基化纳米磁珠法在不进行增菌的情况下,可直接从速冻面米制品中提取金黄色葡萄球菌基因组 DNA,有效消除蛋白质等杂质,可在 1.5 h 内完成 DNA 的提取,获得的 DNA 能满足 Real-time PCR 方法定量检测金黄色葡萄球菌的需求,极大地提高了检测速度,可用于速冻面米制品中金黄色葡萄球菌的快速筛查,更有效地对速冻面米制品的食品安全进行风险评估与预警。

245

[参考文献] (References)

- 250 [1] Hein I, Lehner A, Rieck P, et al. Comparison of different approaches to quantify *Staphylococcus aureus* cells by real-time quantitative PCR and application of this technique for examination of cheese [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(7): 3122-3126.
- [2] Scallan E, Hoekstra R M, Angulo F J, et al. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2011, 17(1): 7-15.
- 255 [3] 李秀桂, 吕素玲, 唐振柱, 等. 市售速冻米面制品微生物污染状况调查 [J]. *应用预防医学*, 2007, 13(3): 146-148.
- [4] 李贺楠, 刘爱萍, 陈淑敏. 速冻水饺中金黄色葡萄球菌污染调查及安全性分析 [J]. *中国食品*, 2012 (11): 52-55.
- [5] 中华人民共和国卫生部. GB 19295-2003 食品安全国家标准速冻面米制品 [S]. 2003.
- 260 [6] Le Loir Y, Baron F, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning [J]. *Genetics & Molecular Research*, 2003, 2(1):63-76.
- [7] Hennekinne J A, De Buyser M L, Dragacci S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2011, 36(4):815-836.
- [8] 中华人民共和国卫生部. GB 19295-2011 食品安全国家标准速冻面米制品 [S]. 2011.
- 265 [9] Lazcka O, Del Campo F J, Munoz F X. Pathogen Detection: A perspective of traditional methods and biosensors [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2007, 22(7):1205-1217.
- [10] Kahánková J, Španová A, Pantůček R, et al. Extraction of PCR-ready DNA from *Staphylococcus aureus* bacteriophages using carboxyl functionalized magnetic nonporous microspheres [J]. *Journal of Chromatography B*, 2009, 877(7): 599-602.
- 270 [11] 郭新梅, 康冀川, 张杰. CTAB 法在金黄色葡萄球菌 DNA 提取中的应用 [J]. *山地农业生物学报*, 2006, 24(6): 558-560.
- [12] 唐俊妮, 龙飞, 史贤明, 等. 金黄色葡萄球菌基因组 DNA 提取方法的比较研究 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2008, 18(8): 1467-1469.
- [13] 苏明权, 杨柳, 马越云, 等. 实时荧光定量 PCR 检测金黄色葡萄球菌方法的试验研究 [J]. *国际检验医学杂志*, 2010 (8): 794-796.
- 275 [14] 苏裕心, 高姗, 康琳, 等. 荧光定量 PCR 快速检测金黄色葡萄球菌方法的建立 [J]. *军事医学科学院院刊*, 2010 (1): 25-29.
- [15] Fosheim G E, Nicholson A C, Albrecht V S, et al. Multiplex real-time PCR assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and associated toxin genes [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011, 49(8):3071-3073.
- 280 [16] 李自然. 上海市食源性金黄色葡萄球菌肠毒素基因多样性及分型研究 [D]. 上海交通大学, 2012.
- [17] Bai Y, Song M, Cui Y, et al. A rapid method for the detection of foodborne pathogens by extraction of a trace amount of DNA from raw milk based on amino-modified silica-coated magnetic nanoparticles and polymerase chain reaction [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2013, 787(13):93-101.
- 285 [18] 唐俊妮. 金黄色葡萄球菌耐热核酸酶相关基因的功能与特征分析 [J]. 武汉: 华中农业大学, 生命科学科技学院, 2007.
- [19] 任晓东, 李一松, 姜毓君. 优化金黄色葡萄球菌基因组 DNA 的提取方法 [J]. *东北农业大学学报*, 2009, 40(1): 92-96.
- [20] Saiyed Z M, Parasramka M, Telang S D, et al. Extraction of DNA from agarose gel using magnetic nanoparticles (magnetite or Fe₃O₄) [J]. *Analytical Biochemistry*, 2007, 363(2):288-290.
- 290 [21] Nakagawa T, Tanaka T, Niwa D, et al. Fabrication of amino silane-coated microchip for DNA extraction from whole blood [J]. *Journal of Biotechnology*, 2005, 116(2):105-111.
- [22] Bai Y, Cui Y, Paoli G C, et al. Nanoparticles affect PCR primarily via surface interactions with PCR components: using amino-modified silica-coated magnetic nanoparticles as a main model [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015, doi: 10.1021/am508842v.
- 295