

一种快速提取新生隐球菌及其他酵母样真菌 DNA 方法

徐令清, 汪 峰, 刘彩林, 欧国平, 孙明月, 孙自镛[△] (华中科技大学同济医学院附属同济医院
检验科, 武汉 430030)

【摘要】 目的 寻找一种快速提取酵母样真菌 DNA 的方法。**方法** 使用酶溶解法提取新生隐球菌及其他酵母样真菌 DNA, 并对提取的 DNA 通过特异性引物进行 PCR, 所得产物进行酶切验证。**结果** 用此方法提取的新生隐球菌基因组 DNA 浓度为 280~395 ng/ μ L, OD260/OD280 比值为 1.6~1.8, 所提取的 DNA 可用于 PCR 的扩增检测特异性酵母样真菌。**结论** 该方法可以用于提取新生隐球菌及其他酵母样真菌。

【关键词】 新生隐球菌; 酵母样真菌; DNA 提取

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2013.05.009 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)05-0530-02

A fast DNA extraction method of Cryptococcus neoformans and other yeast-like fungi XU Ling-qing, WANG Feng, LIU Cai-lin, OU Guo-ping, SUN Ming-yue, SUN Zi-yong[△] (Department of Laboratory, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430030, China)

【Abstract】 Objective To look for a fast DNA extraction method of Cryptococcus neoformans and other yeast-like fungi. **Methods** The enzyme dissolution method was adopted to extract DNA of Cryptococcus neoformans and other yeast-like fungi. Then the extracted DNA was verified through PCR with specific primers, and confirmed by restriction enzyme digestion. **Results** The concentration of the extracted DNA was 280—395 ng/ μ L and the OD260/OD280 ratio was 1.6—1.8. **Conclusion** This method can be used in extracting DNA of Cryptococcus neoformans and other yeast-like fungi.

【Key words】 Cryptococcus neoformans; yeast-like fungi; DNA extraction

新生隐球菌是一种机会致病菌, 易发于细胞免疫功能受损的人群。其主要传播途径为鸽粪、桉树等含有的隐球菌播散入空气中, 经呼吸道吸入, 主要侵犯中枢神经系统及肺部。随着人们对新生隐球菌分子流行病学和分子生物学的重视, 探讨有效和快速提取其 DNA 已成为必要的课题。根据破壁采用的方式不同, 常用的提取新生隐球菌 DNA 的方法有 3 种: 玻璃珠机械破裂法、酶溶解法和高渗剂破裂法。本文参考酶溶解法对于提取新生隐球菌等酵母样真菌具有快速、高效等优点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 本实验选取酵母菌属新生隐球菌分离自临床标本, 白色念珠菌 ATCC90028、近平滑念珠菌 ATCC22019, 均购自中国微生物菌种保藏中心, 并由本室保存。

1.1.2 主要试剂 SDB 培养基 (OXOID, 英国); 10% 十二烷基磺酸钠 (10% SDS, Sigma 公司); 20 mg/L RNA 酶 (Sigma 公司); 5 mmol/L 醋酸钠 (上海化学试剂公司); 20 mg/mL 蛋白酶 K (Merck, 德国); TE 缓冲液 (pH 8.0); 10 mmol/L Tris·Cl, 1 mmol/L EDTA; TaqDNA 聚合酶 (Fermentas)、dNTP (Fermentas)、Ava I 及 Hind III 酶 (Fermentas)。

1.1.3 主要仪器 PCR 仪和凝胶成像系统均为美国 Bio-Rad 公司产品, 蛋白核酸分析仪 Genequant 1300, 美国安玛西亚公司产品。

1.2 方法

1.2.1 菌株的培养 将待提取 DNA 新生隐球菌及白色念珠菌及近平滑念珠菌接种于沙保罗琼脂培养基 (SDB) 中, 35℃、孵育 12~24 h。

1.2.2 染色体 DNA 的提取 采用蛋白酶 K 消化法^[1]。

1.2.2.1 刮取 2~3 环菌体置于离心管中, 加入双蒸水 1 000

μ L, 洗涤 3 次后, 将收集的菌体, 重悬于 400 μ L 的 TE 中。

1.2.2.2 加入 30 μ L 10% SDS 和 10 μ L 蛋白酶 K 来回轻摇充分混匀, 50~55℃ 孵育 1 h, 加入 200 μ L 冰冷醋酸钠放入 -20℃ 冰箱 20 min, 12 000 r/min 离心 5 min。

1.2.2.3 用等体积的酚和氯仿抽提 1 次, 再用氯仿抽提 1 次。取上清液加 2 倍体积的无水乙醇, 置于 -20℃ 冰箱 20 min, 12 000 r/min 离心 5 min 沉淀 DNA。

1.2.2.4 用 70% 的乙醇洗涤 DNA 沉淀 3 次。在 70℃ 烘箱中干燥 5 min, 用 100 μ L 双蒸水或 TE 溶解 DNA, 加 RNA 酶去除 RNA (加入量按 RNA 酶: TE = 1:50)。

1.2.3 蛋白核酸分析仪检测 DNA 浓度及纯度 取 15 μ L 待测 DNA 溶液于 5 mL 离心管中, 用蒸馏水稀释 50 倍, 混匀; 在蛋白核酸分析仪上分别检测波长 260 nm 和 280 nm 处 OD 值; 其中 DNA 浓度 (μ g/mL) = OD260 $\times$ 50 $\times$ 稀释倍数, DNA 纯度 = OD260/OD280。一般 OD260/OD280 比值在 1.4~1.8 时, DNA 纯度较高, 尤其接近 1.8 最好; 若比值较高, 表明 RNA 没有除干净; 若比值较低, 说明存在蛋白质或酚等杂质较多。

1.2.4 PCR 扩增特异引物 对所提取的新型隐球菌基因组 DNA 进行毒力基因磷脂酶 1 (PLB1) 扩增, 参考文献 [2] 设计引物, PLB1F: TGA GCT TCA GGC GGA GAG AGA GGT TTG G; PLB1R: AGG CTG GGT GGT GTT GTC GTC ACC, 引物 invitrogen 公司合成, 扩增条件: 94℃ 变性 3 min, 94℃ 变性 45 s, 62℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 1 min, 经过 35 个循环后, 72℃ 再延伸 7 min。反应完毕, 取产物 5 μ L 置于 1% 琼脂糖进行凝胶电泳, 在凝胶成像系统上成像。

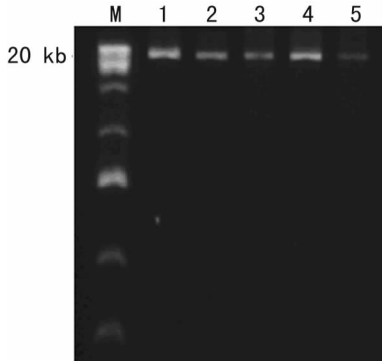
1.2.5 PCR 产物酶切 酶切条件: Ava I 酶 2 μ L, Buffer 3 μ L, PCR 产物 15 μ L, 35℃ 孵育 3 h; Hind III 酶 2 μ L, Buffer 3 μ L, PCR 产物 15 μ L, 37℃ 孵育 3 h; 反应完毕, 取产物 5 μ L 置

[△] 通讯作者, E-mail: zysun@tjh. tjmu. edu. cn.

1%琼脂糖进行凝胶电泳,在凝胶成像系统上成像。

2 结 果

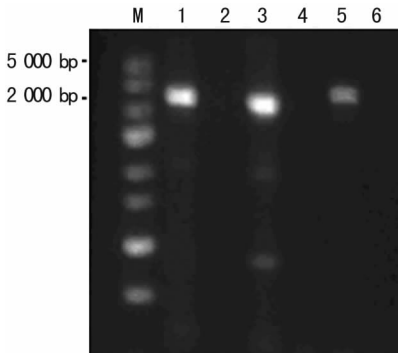
2.1 新生隐球菌、白色念珠菌 ATCC90028 及近平滑念珠菌 ATCC22019 均提取出基因组 DNA,大小约 20 kb(图 1)。提取的 DNA 浓度经检测分别为 280~395 ng/ μ L,OD260/OD280 比值为 1.6~1.8。



注:M 为 Marker;1、2、3 均为新生隐球菌染色体 DNA;4 为白色念珠菌 ATCC90028;5 为近平滑念珠菌 ATCC22019。

图 1 DNA 提取电泳图

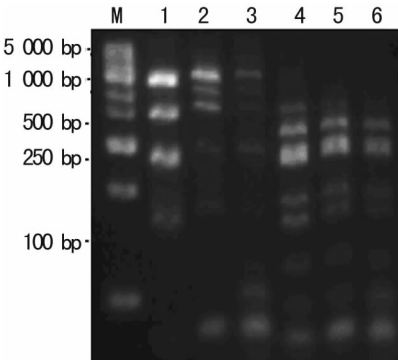
2.2 PCR 扩增结果 应用所提的新生隐球菌 DNA 成功扩增出一特异性基因片段约 1 900 bp(图 2)。而白色念珠菌 ATCC90028 与近平滑念珠菌 ATCC22019 及无菌水均未扩增出特异性片段(图 2)。



注:M 为 Marker;1、3、5 均为新生隐球菌;2 为白色念珠菌 ATCC90028;4 为近平滑念珠菌 ATCC22019;6 为无菌水。

图 2 PCR 扩增电泳图

2.3 酶切结果 PLB1 基因扩增产物经过 2 种不同的酶切,得到 6 种类型的酶切谱型(图 3)。



注:M 为 Marker;1、2、3 均为 HindⅢ酶切谱型;4、5、6 均为 AvaⅠ酶切谱型。

图 3 PLB1 扩增产物酶切谱型电泳图

3 讨 论

酵母样真菌的细胞壁较为坚硬,由很多成分组成,包括几

丁质、葡聚糖、露聚糖等,而且隐球菌属细胞壁外尚有一层较厚的荚膜,所以细胞壁不易充分裂解。参考国内外现有的破壁方法,有玻璃珠法、酶消化法和化学渗透法^[3-4],应用这些方法提取的 DNA 获得率较低,易造成交叉污染,对有荚膜的新生隐球菌破壁效果均不理想。

提取新生隐球菌 DNA 最常用的是酶消化法,这些方法之间差别在于使用不同的破壁酶(如蜗牛酶等)^[4-7]。蜗牛酶价格低廉但不同批号破壁效果不相同,实验中不易控制用量,其他酶破壁效果较好,但价格比较昂贵,因此这些酶消化法不能作为常规提取新生隐球菌 DNA 的试剂^[8]。本文借鉴相关文献进行改良酶消化法,提取的新生隐球菌 DNA 纯度较高,稳定性好,并且提取液中加入一定浓度的蛋白酶 K,能更有效地阻止核酸酶活性,防止 DNA 降解,且蛋白酶 K 价格便宜,容易获得,可以作为实验提取 DNA 的常规试剂。

新生隐球菌是一种机会致病菌,易发于细胞免疫功能受损的人群。其主要传播途径为鸽粪、桉树等含有的隐球菌播散入空气中,经呼吸道吸入,主要侵犯中枢神经系统及肺部。新生隐球菌的毒力因子在致病性方面十分重要,常见的毒力因子有多糖荚膜、黑素、PLB1、甘露醇等。PLB1 在新生隐球菌的生长及在吞噬细胞中的存活、复制等具有重要意义。本实验中新生隐球菌菌株通过 PCR 均扩增出相应的目的片段,而白色念珠菌 ATCC 及近平滑念珠菌 ATCC 均为阴性。PCR 产物通过不同的酶切还可分为不同类型的酶切谱型,可以作为新生隐球菌分子分型的基础。

另外,真菌在生长初期时,破壁相对要容易,等到菌龄老化时,提取 DNA 相对要困难,因此尽量选择菌龄在 12~24 h 内的真菌。在提取 DNA 的过程中要注意:需要保证水浴的足够时间,合适的温度,并不时地振荡使蛋白酶 K 与之充分混匀,以达到最佳的消化效果,破坏细胞壁使 DNA 完全释放到裂解缓冲液中去。但要避免剧烈的振荡以防止 DNA 降解。在 DNA 提取后,记得一定要按比例加入 RNA 酶,以去除 RNA 对于进一步 PCR 扩增的干扰,这一点非常重要。这里所使用的方法也可用于其他酵母样真菌进行基因组 DNA 的提取。

参考文献

- [1] 周小玲,沈微,饶志明,等.一种快速提取真菌染色体 DNA 的方法[J].微生物学通报,2004,31(4):89-92.
- [2] Latouche GN, Huynh M, Sorrell TC, et al. PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the phospholipase B(PLB1) gene for subtyping of *Cryptococcus neoformans* isolates[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(4): 2080-2086.
- [3] Bolano A, Stinchi S, Preziosi R, et al. Rapid methods to extract DNA and RNA from *Cryptococcus neoformans* [J]. FEMS Yeast Res, 2001, 1(3): 221-224.
- [4] Sansinforiano ME, Padilla JA, Hermoso de Mendoza J, et al. Rapid and easy method to extract and preserve DNA from *Cryptococcus neoformans* and other pathogenic yeasts[J]. Mycoses, 1998, 41(5-6): 195-198.
- [5] Chang YC, Kwon-Chung KJ. Isolation, characterization, and localization of a capsule-associated gene, CAP10, of *Cryptococcus neoformans* [J]. J Bacteriol, 1999, 181(18): 5636-5643.
- [6] Chang YC, Penoyer LA, Kwon-Chung KJ. The second capsule gene of *cryptococcus neoformans*, (下转第 533 页)

2.2 糖尿病组间血清 α_1 -MG、Hcy 及 Cys C 的水平比较 血清 α_1 -MG、Hcy 和 Cys C 水平在 C、B 组和 A 组逐渐增高, 各組间比较差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 糖尿病组间血清 α_1 -MG、Hcy 及 Cys C 的水平比较				
组别	<i>n</i>	α_1 -MG(mg/L)	Hcy(μ mol/L)	Cys C(mg/L)
A 组	33	51.8±15.33	26.3±5.98	6.63±3.34
B 组	35	36.9±10.11*	19.8±5.4*	3.89±2.18*
C 组	29	28.7±6.35*	11.3±4.2*	1.32±1.06*

注:与上一个组比较,* $P<0.05$ 。

3 讨 论

α_1 -MG 是淋巴细胞和肝脏产生的一种糖蛋白, 相对分子质量约 33×10^3 。该蛋白产生恒定, 容易透过肾小球滤过膜, 而滤出的绝大部分又被肾小管重吸收, 加之其测定不受 pH 值等因素的影响^[4], 由于肾小管受损时, 重吸收障碍, 可较早反映肾小管的损伤, 因此在肾功能受损早期血 α_1 -MG 就升高, 故在肾脏疾病诊断方面具有重要价值。本研究显示血清 α_1 -MG 在糖尿病组中明显升高, 与健康对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$), 糖尿病肾病组明显高于早期糖尿病肾病组($P<0.05$), 早期糖尿病肾病组明显高于单纯糖尿病组($P<0.05$), α_1 -MG 与病情的发展密切相关。

由 2 型糖尿病患者的代谢异常导致的高浓度 Hcy 血症是动脉粥样硬化和血栓形成等心脑血管病的独立危险因素^[5]。高水平的 Hcy 通过产生超氧化物及过氧化物导致动脉内皮细胞的持续损伤, 引起动脉平滑肌细胞的持续增生, 促进参与血管炎症反应及动脉粥样硬化形成因子的表达和激活, 使已形成的动脉粥样硬化斑块更易受损, 最终阻塞血流通路^[6]。2 型糖尿病患者动脉壁上的脂蛋白更容易被氧化修饰, Hcy 可通过氧化应激系统影响内皮功能, 加重动脉粥样硬化病变, Hcy 还可使血管内皮暴露于糖基化终末产物并与糖基化终末产物有协同作用, 对内皮细胞产生直接的细胞毒作用^[7], 高 Hcy 效应还可表现为血管壁构建和血液凝固系统的多种效应, Hcy 使血小板存活期缩短, 促进血小板凝聚和黏附性, 同时增加凝血因子 V、X 的活性, 抑制组织纤溶酶及抗血栓形成因子Ⅲ、Ⅶ的活性^[8]。Hcy 其他效应还包括损伤性增殖、降低内皮衍生舒张因子的生物利用度、干预多种转录及信号转录, 低密度脂蛋白氧化、减少内皮依赖性的血管舒张。因此, 测定 2 型糖尿病患者血浆 Hcy 对预测患者大血管病变的发生有重要意义。本研究结果显示, 糖尿病组血清 Hcy 水平明显高于健康对照组($P<0.05$), 并且随着肾功能损伤的发展, 血清 Hcy 不断升高($P<0.05$)。

Cys C 为 γ -球蛋白系列组分, 等电点(PI)为 8.0~9.5。它的氨基酸序列在人类大多数组织能稳定表达, 属体内基本微量蛋白之一。人的 Cys C 基因片段位于 20 号染色体上, 通过对

基因片段和启动子的研究, Cys C 是由有核细胞产生的, 其生成速度是稳定的, 不受炎症、胆红素、溶血、三酰甘油等影响, 并与性别、年龄、肌肉量无关。血清 Cys C 浓度非常稳定, 室温下可保持 48 h 不变, 4℃时 1 周不变, -20℃至少 1 个月不变, 在 -80℃至少 6 个月不变^[9]。Cys C 在体内的代谢特点为: 有稳定的生成速度及循环水平, 不受其病理状态的影响; 能自由通过肾小球滤过, 不被肾小球吸收和分泌。这些特点表明它是一项理想的反映肾小球滤过功能的物质。本研究结果显示, 糖尿病组血清 Cys C 水平明显高于健康对照组($P<0.05$), 并且随着肾功能损伤的发展, 血清 Cys C 不断升高($P<0.05$)。

综上所述, DN 患者血清 α_1 -MG、Hcy 和 Cys C 水平明显升高, 并且其与病情的发展其水平不断升高, 血清 α_1 -MG、Hcy 和 Cys C 与糖尿病肾病的发生、发展密切相关, 对糖尿病早期肾病的防治和预后有重要意义。

参考文献

[1] 李岚岚, 涂干卿. 胱抑素 C 在早期糖尿病肾病中的诊断价值[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(4): 453-454.

[2] 彭海, 王象勇. 血清胱抑素 C 和 β_2 -微球蛋白在评价 2 型糖尿病患者早期肾损伤中的临床价值[J]. 青海医药杂志, 2011, 41(2): 55-56.

[3] 王晓薇, 吴美英. 脑利钠肽和同型半胱氨酸检测在糖尿病肾病中的意义[J]. 医学综述, 2010, 16(21): 3306-3308.

[4] Yu H, Yanagisawn Y, Forbes MA, et al. Alpha-1-Microglobulin: an indicator protein for renal tubular function [J]. J Chin Pathol, 1983, 36(2): 153-158.

[5] 王军, 姜建东. 同型半胱氨酸与脑梗死[J]. 神经病学与神经康复学杂志, 2005, 2(3): 172-173.

[6] Guthikonda S, Haynes WG. Homocysteine as a novel risk factor for altherosclerosis[J]. Curr Opin Cardiol, 1999, 14(4): 291-298.

[7] Okada E, Oida K, Tada H, et al. Hyperhomocysteinemia is a risk factor for coronary arterosclerosis in Japanese patient with type 2 diabetes[J]. Diabetes Care, 1999, 22(3): 484-490.

[8] Wood D, Joint European Societies Task Force. Established and emerging cardiovascular risk factors[J]. Am Heart J, 2001, 141(2 Suppl): S49-S57.

[9] Finney H, Newman DJ, Gruber W, et al. Initial evaluation of cystatin C measurement by particle-enhanced immunonephelometry on the Behring nephelometer systems (BNA, BⅡ)[J]. Clin Chem, 1997, 43(6 Pt1): 1016-1022.

(收稿日期: 2012-08-25 修回日期: 2012-12-01)

(上接第 531 页)

CAP64, is essential for virulence[J]. Infect Immun, 1996, 64(6): 1977-1983.

[7] 周万青, 李芳秋, 王立魁, 等. 不同破壁方法提取真菌 DNA 的比较[J]. 临床检验杂志, 2009, 27(3): 212-214.

[8] 郭秀军, 廖万清, 兰和魁, 等. 几种快速提取新生隐球菌 DNA 的方法[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2003, 17(6): 410-411.

(收稿日期: 2012-08-13 修回日期: 2012-11-20)