

文章编号: 1000-7423(2009)-04-0365-03

【综述】

# 隐孢子虫卵囊 DNA 纯化方法的研究进展

吴亮<sup>1</sup>, 章秋霞<sup>1</sup>, 李婷婷<sup>1</sup>, 陈盛霞<sup>1\*</sup>, 曹建平<sup>2</sup>

【摘要】 PCR 技术不仅可检测极微量的隐孢子虫, 而且具有高度特异性, 在隐孢子虫检测中发挥重要作用。PCR 检测中, 隐孢子虫卵囊模板 DNA 的制备尤为重要, 需对卵囊进行分离纯化和裂解后才能提取纯化 DNA。本文综述目前常用的卵囊分离纯化、裂解和 DNA 提取纯化的方法。

【关键词】 隐孢子虫; 卵囊; DNA; 纯化

中图分类号: R382.9 文献标识码: A

## DNA Purification Methods of *Cryptosporidium* Oocysts

WU Liang<sup>1</sup>, ZHANG Qiu-xia<sup>1</sup>, LI Ting-ting<sup>1</sup>, CHEN Sheng-xia<sup>1\*</sup>, CAO Jian-ping<sup>2</sup>

(1 School of Medical Science and Laboratory Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;

2 National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Key Laboratory of Parasite and Vector Biology, MOH, Shanghai 200025, China)

【Abstract】 PCR technique can especially detect trace amount of *Cryptosporidium* oocysts. The preparation of template DNA is important for PCR detection. Before DNA purification, the oocysts should be purified and splitted. This paper summarizes the ordinary purification and splitting methods for *Cryptosporidium* oocysts.

【Key words】 *Cryptosporidium*; Oocyst; DNA; Purification

Supported by the Natural Resource Platform Project from Ministry of Science and Technology (No. 2005 DKA21104) and a project of the Key Laboratory of Parasite and Vector Biology, MOH (No. WSBKFKT200701)

\* Corresponding author, E-mail: chensxia@163.com

隐孢子虫(*Cryptosporidium* spp.)是一种世界范围内危害严重的人畜都能感染的寄生虫, 广泛寄生于人、家畜、鸟和某些爬行动物体内, 引起长期反复腹泻<sup>[1]</sup>。卵囊是隐孢子虫的主要致病阶段, 30 个隐孢子虫卵囊即可使人致病<sup>[2]</sup>, 卵囊在该虫流行病学和病原学检测中起着十分重要的作用。由于卵囊具有坚固的囊壁, 可抵抗恶劣的外界环境而长期存活, 从而造成隐孢子虫病的广泛流行<sup>[3]</sup>。近年来的多起隐孢子虫病暴发事件均由被卵囊污染的饮用水或食品所致, 因此建立和完善隐孢子虫卵囊检测技术显得尤为重要<sup>[4]</sup>。PCR 法是一种极有发展前景的检测技术, 但对模板 DNA 的质量要求很高, 因此, 本文综述一套完整的卵囊提纯、囊壁裂解和基因组 DNA 提取纯化的方法。

基金项目: 科技部自然资源平台项目 (No. 2005 DKA21104), 卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室开放课题 (No. WSBKFKT 200701)

作者单位: 1 江苏大学基础医学与医学技术学院, 镇江 212013;  
2 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室, 上海 200025

\* 通讯作者, E-mail: chensxia@163.com

### 1 隐孢子虫卵囊分离纯化

目前粪便中隐孢子虫卵囊的提纯主要根据卵囊与其他杂质的密度差异, 离心法分离卵囊。使用较多的分离介质有: 饱和 NaCl 溶液、饱和 ZnSO<sub>4</sub> 溶液、Sheather's 蔗糖溶液、甲醛-乙醚溶液、不连续蔗糖密度梯度溶液、Percoll 密度梯度溶液和氯化铯 (CsCl) 溶液等。离心的方法主要是差速离心法(即浮聚法)和密度梯度离心法两种。差速离心法较简单, 所需离心速度不高, 但分离效果远低于密度梯度离心法, 只适用于卵囊的初步分离。密度梯度离心法的操作较复杂, 但能得到近乎纯净的卵囊, 可用于体外培养和虫体特殊蛋白分析等研究<sup>[5]</sup>。

1.1 差速离心法(浮聚法) 浮聚法操作简单快速, 可用于粪便中隐孢子虫卵囊的初步分离纯化, 在要求不高时其纯化产物可直接提取 DNA。通常使用的浮聚介质有饱和 NaCl 溶液、饱和蔗糖溶液和饱和 ZnSO<sub>4</sub> 溶液等, 国内研究者多使用饱和蔗糖溶液, 国外研究者多采用饱和 ZnSO<sub>4</sub> 溶液。浮聚法常规操作: 粪便悬液通过 60 目筛除去较大杂质, 滤液 2 000×g 离心 10 min 后弃上清。于沉淀中加入浮聚介质, 2 000×g 离心 10

min, 取最上层溶液用双蒸水或 PBS 洗涤 2 次后用于后续实验。3 种浮聚介质中以饱和 ZnSO<sub>4</sub> 溶液纯化效果最好, 效率最高<sup>[6]</sup>。饱和蔗糖溶液也有较高的纯化效率, 但该溶液黏稠, 限制了杂质与卵囊的分离, 影响卵囊的纯度<sup>[7]</sup>。饱和 NaCl 溶液效果最差, 纯化后的卵囊仍有大量杂质, 同时该溶液会造成卵囊的破裂, 降低卵囊最终回收率<sup>[6]</sup>。

1.2 密度梯度离心法 密度梯度离心法操作较复杂, 且需超速离心机等实验设备, 但使用该方法可获得更为纯净的卵囊, 可用于卵囊蛋白的分析和隐孢子虫体外培养等研究<sup>[8]</sup>。常用的离心介质有蔗糖、Percoll 密度梯度溶液和 CsCl 溶液等。胡景辉等<sup>[9]</sup>以蔗糖密度梯度离心法纯化鼠隐孢子虫卵囊, 回收率为 72%, 杂质含量极少, 可直接用于体外培养。蔗糖梯度离心法操作简单, 无需超速离心机等设备, 且蔗糖价廉, 适于大量虫体纯化。Percoll 和 CsCl 溶液密度梯度离心法操作较复杂, 需超速离心机, 因而限制了其使用。Truong 等<sup>[5]</sup>以 Percoll 和 CsCl 溶液密度梯度离心法纯化微小隐孢子虫卵囊, 获得纯度极高的卵囊悬液, 可用于体外培养和虫体特殊蛋白的研究, 但两种方法的回收率偏低, 仅 10% 左右。

## 2 卵囊的裂解

隐孢子虫卵囊具有坚固的囊壁, 常规基因组 DNA 提纯方法并不能有效地裂解囊壁。因此提纯前需用一些物理或化学方法裂解囊壁, 释放虫体核酸, 再以常规方法提纯虫体基因组 DNA。通常将物理和化学裂解法联合使用, 以达最佳效果<sup>[10]</sup>。

2.1 物理裂解法 常用物理裂解法有煮沸法、冻融法、声裂法等。煮沸法操作最简单, 但单纯使用该方法并不能有效裂解囊壁, 同时长时间煮沸也会造成 DNA 链断裂, 影响模板质量<sup>[11]</sup>。冻融法较超声裂解法简便易行, 低温范围可从 -20~-196 °C 间任意选择, 对设备要求不高。冻融操作时, 重复次数并非越多越好, Laberge 等<sup>[12]</sup>认为冻融操作只需 3 个循环即可获得良好效果, 增加循环数不仅浪费时间且卵囊的裂解效果并无显著提高。超声裂解法是使用超声波震碎隐孢子虫囊壁, 需超声破碎仪等专业设备。该法耗时较少, Anceno 等<sup>[3]</sup>认为每次超声持续时间 10 s, 连续 6 次 (超声破碎仪功率 130 W) 即可获得理想的裂解效果。但如进一步增加超声次数虽可提高裂解效果, 但是随之产生的高温会使 DNA 链断裂, 影响模板质量。使用超声裂解法的最大缺陷是由于互用超声探头极易造成标本间的污染引起假阳性, 在处理大量标本时应注意。

2.2 化学裂解法 化学裂解法常用蛋白酶 K (proteinase K)<sup>[13]</sup>、异硫氰酸胍 (guanidinium thiocyanate) 和曲拉通 X-100 (Triton X-100)<sup>[10]</sup> 等强蛋白变性剂裂解囊壁, 使卵囊内 DNA 释放出来。3 种常用的裂解剂中以蛋白酶 K 的效果最差, 异硫氰酸胍效果最好。但绝大多数化学裂解剂对囊壁的裂解效果并不理想, 且耗时较长<sup>[14]</sup>。通常将化学裂解法与其他物理裂解法联合使用, 可以使裂解效果明显提高<sup>[15]</sup>。

## 3 基因组 DNA 的提取纯化

卵囊裂解后的上清中含有大量基因组 DNA, 但同时也含多糖、酚和胍类物质会抑制 PCR 反应, 需用各种方法除去杂质, 纯化 DNA。目前纯化 DNA 的方法很多, 如酚-氯仿抽提法、试剂盒法和螯合树脂法 (Chelex-100 法或 PVP-360 法) 等。酚-氯仿抽提法需手工操作, 成本低廉, 但操作复杂, 所提纯的 DNA 中仍含蛋白等其他杂质。国内外很多公司生产 DNA 纯化试剂盒, 其中美国 Promega 公司和德国 Qiagen 公司的基因组 DNA 提取试剂盒具有极佳的纯化效果, 为大多数研究者所采用。卵囊裂解后通过试剂盒中的 DNA 制备管可除去绝大部分蛋白等杂质, 获得纯净的 DNA。但试剂盒价格较高, 操作较复杂, 处理大量标本耗时较多。螯合树脂法操作简单, 整个提取过程只在一个管内完成, 避免污染, 适合大量标本的处理<sup>[16]</sup>, 但螯合树脂法获得的 DNA 在 4 °C 易降解, 应尽快检测或在 -20 °C 及更低温度下保存。

## 4 结语

隐孢子虫卵囊的检测存在较大困难, 粪便中的大量杂质 (如腐殖酸) 会严重干扰后续 PCR 检测<sup>[17]</sup>, 而水源中卵囊的含量极少, 在地表水中密度约 0.5~5 000 个/100L<sup>[18]</sup>, 生活污水中的密度约 10~10<sup>4</sup> 个/L<sup>[19]</sup>, 因此需浓集和纯化标本中的卵囊后再检测。美国环境总署推荐的 IMS 法 (immunomagnetic separation), 检测过程复杂, 卵囊损失量大, 同时需昂贵的荧光检测设备, 并且仍无法区分隐孢子虫与其他肠道病原体等诸多不足<sup>[4]</sup>。PCR 法具有快速、敏感和特异等诸多优点, 是一种极具发展前景的检测技术, 随着卵囊浓集纯化、囊壁裂解和 DNA 提取纯化方法的完善, 该法将在隐孢子虫检测中发挥越来越重要的作用。

## 参 考 文 献

- [1] Xiao L, Sulaiman IM, Ryan UM, *et al.* Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health[J]. *Int J Parasitol*, 2002, 32(14): 1773-1785.
- [2] DuPont HL, Chappell CL, Sterling CR, *et al.* The infectivity of

- Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers [J]. N Engl J Med, 1995, 332(13): 855-859.
- [3] Anceno AJ, Katayama H, Houpt ER, et al. IMS-free DNA extraction for the PCR-based quantification of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in surface and waste water[J]. Int J Environ Health Res, 2007, 17(4): 297-310.
- [4] Fontaine M, Guillot E. An immunomagnetic separation-real-time PCR method for quantification of *Cryptosporidium parvum* in water samples[J]. J Microbiol Method, 2003, 54(1): 29-36.
- [5] Truong Q, Ferrari BC. Quantitative and qualitative comparisons of *Cryptosporidium* faecal purification procedures for the isolation of oocysts suitable for proteomic analysis[J]. Int J Parasitol, 2006, 36(7): 811-819.
- [6] Jiang JS, Jing P. The effect of different solution for the *Cryptosporidium* oocysts purification[J]. Chin J Vet Sci Tech, 1992, 22(12): 32-33. (in Chinese)  
(蒋金书, 金平. 不同溶液对隐孢子虫卵囊的漂浮效果[J]. 中国兽医科技, 1992, 22(12): 32-33.)
- [7] Wang Y, Zhang SF, Zhang QK, et al. The comparative assay for the separation and purification of *Cryptosporidium* oocysts[J]. Heilongjiang J Anim Sci Vet Med, 2003, (8): 9-11. (in Chinese)  
(王妍, 张守发, 张乾坤, 等. 牛隐孢子虫卵囊分离和纯化方法的比较试验[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2003, (8): 9-11.)
- [8] Guo BP, Lian DR. The comparative study on the separation of *Cryptosporidium* oocysts[J]. Chin J Zoonoses, 1997, 13(1): 34-35. (in Chinese)  
(郭步平, 连德润. 隐孢子虫卵囊分离纯化方法的比较研究[J]. 中国人兽共患病杂志, 1997, 13(1): 34-35.)
- [9] Hu JH, Jiang JS. Purification of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites[J]. Chin J Vet Med, 1995, 21(4): 3-4. (in Chinese)  
(胡景辉, 蒋金书. 鼠隐孢子虫卵囊及孢子的纯化[J]. 中国兽医杂志, 1995, 21(4): 3-4.)
- [10] Spano F, Putignani L, McLauchlin J, et al. PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin [J]. FEMS Microbiol Lett, 1997, 150(2): 209-217.
- [11] Filkorn R, Wiedenmann A, Botzenhart K. Selective detection of viable *Cryptosporidium* oocysts by PCR[J]. Zentralbl Hyg Umweltmed, 1994, 195(5-6): 489-494.
- [12] Laberge I, Ibrahim A, Barta JR, et al. Detection of *Cryptosporidium parvum* in raw milk by PCR and oligonucleotide probe hybridization[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(9): 3259-3264.
- [13] Balatbat AB, Jordan GW, Tang YJ, et al. Detection of *Cryptosporidium parvum* DNA in human feces by nested PCR[J]. J Clin Microbiol, 1996, 34(7): 1769-1772.
- [14] Laxer MA, Timblin BK, Patel RJ. DNA sequences for the specific detection of *Cryptosporidium parvum* by the polymerase chain reaction[J]. Am J Trop Med Hyg, 1991, 45(6): 688-694.
- [15] Sluter SD, Tzipori S, Widmer G. Parameters affecting polymerase chain reaction detection of waterborne *Cryptosporidium parvum* oocysts[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1997, 48(3): 325-330.
- [16] Shen YJ, Cao JP, Lu WY, et al. Preparation of DNA from *Cryptosporidium parvum* oocysts for PCR detection[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2005, 23(4): 228-230. (in Chinese)  
(沈玉娟, 曹建平, 卢潍媛, 等. 微小隐孢子虫卵囊 DNA 提取及用于 PCR 检测[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23(4): 228-230.)
- [17] Johnson DW, Pieniasek NJ, Rose JB. DNA probe hybridization and PCR detection of *Cryptosporidium* compared to immunofluorescence assay[J]. Wat Sci Tech, 1993, 27(3-4): 77-84.
- [18] Guy RA, Payment P, Krull UJ, et al. Real-time PCR for quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in environmental water samples and sewage[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(9): 5178-5185.
- [19] Robertson LJ, Gjerde B. Effect of sample holding time on recovery of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water samples[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(4): 1724-1725.
- (收稿日期: 2008-10-17 编辑: 衣凤芸)

(上接第 364 页)

## 2 讨论

细粒棘球蚴病多分布于我国西部的牧区和半农半牧区, 以新疆、青海、甘肃、宁夏、西藏、内蒙古和四川等省(自治区)最为严重<sup>[1]</sup>。深圳市地处沿海, 常住居民的细粒棘球蚴病感染尚属首次发现。病例 1 的病理切片见典型棘球蚴, 病例 2 的病理组织由于广泛变性坏死, 未见细粒棘球蚴头节和确切包囊, 符合晚期细粒棘球蚴病的病理变化<sup>[2]</sup>。

本次报告的两例患者原籍分别为广东省和广西区, 均为细粒棘球蚴病的非流行区。广东省 1996 年最早发现的细粒棘球蚴病患者为惠州市居民<sup>[3]</sup>, 1998 年桂林地区也报告了广西省第一例当地居民的细粒棘球蚴病病例<sup>[4]</sup>, 但广东和广西两省(区)至今尚未发现有本地传染源。经流行病学调查, 两例患者均有明确的新疆等流行地区驻留史, 因此最可能的感染途径仍考虑为在流行区接触病犬或被虫卵污染的食物、水源、自然环境和羊毛等畜产品感染所致, 为输入性病例。另外, 两例患者早年均有犬类饲养史, 目前无法查证所饲养犬只的细粒棘球蚴感染状况, 因此也不能完全排除其早年经由自家所养犬只感染细粒棘球蚴的可能。

## 参 考 文 献

- [1] Jiang CP. Today's regional distribution of echinococcosis in China [J]. Chin Med J, 2002, 115(8): 1244-1247. (in Chinese)  
(蒋次鹏. 中国包虫病的分布现状[J]. 中华医学杂志, 2002, 115(8): 1244-1247.)
- [2] Li YZ, Liu J, Zhuang H, et al. Hyperacoustic and pathological analysis for liver echinococcosis[J]. Modern Prev Med, 2008, 35(19): 3869-3871. (in Chinese)  
(李永忠, 刘军, 庄华, 等. 肝囊型包虫病的超声表现及其病理分析[J]. 现代预防医学, 2008, 35(19): 3869-3871.)
- [3] Xu LQ, Yu SH, Xu SH. Distribution and Pathogenic Impact of Human Parasites in China [M]. People's Medical Publishing House, 2000: 806. (in Chinese)  
(许隆祺, 余森海, 徐淑惠. 中国人体寄生虫分布与危害[M]. 人民卫生出版社, 2000: 806.)
- [4] Su JY, Liu FJ, Li AQ, et al. A case of abdominal vertebra and dura-mater of spinal cord echinococcosis [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 1998, 16(4): 311. (in Chinese)  
(苏吉勇, 刘凤军, 李爱琴, 等. 腰椎与椎弓根硬脊膜外细粒棘球蚴病一例[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1998, 16(4): 311.)
- (收稿日期: 2009-03-10 编辑: 高石)