

# Chelex 100树脂快速提取动物组织基因组DNA方法的评估

栗冬梅<sup>1</sup>, 梁艳林<sup>1,2</sup>, 宋秀平<sup>1</sup>, 朱彩英<sup>1</sup>, 康央<sup>1,3</sup>

1 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所媒介生物控制室, 传染病预防控制国家重点实验室, 感染性疾病诊治协同创新中心, 北京 102206; 2 山东第一医科大学, 山东 泰安 271016; 3 山东大学生命科学学院, 山东 济南 250100

**摘要:** **目的** 应用基于Chelex 100树脂的6种不同处理方法提取动物组织核酸, 比较6种处理之间及与磁珠法之间的差异, 筛选适用于现场检测、简便快速的动物组织基因组DNA提取方法。**方法** 取适量啮齿动物肝组织, 研磨或剪碎后加入5% Chelex 100树脂悬液, 应用6种不同的裂解与吸附步骤处理该悬液; 经离心或静置处理后收获上清液即为组织基因组DNA, 检测其浓度与纯度; 以此DNA为模板, 应用啮齿动物线粒体细胞色素C氧化酶亚基I (COI) 基因的引物、巴尔通体通用引物和TaqMan探针扩增COI基因片段和巴尔通体的tmRNA基因片段; 比较6种Chelex 100树脂处理方法之间及Chelex 100树脂法与磁珠法提取的基因组DNA浓度、纯度及扩增所得循环值(quantification cycle,  $C_q$ )的差异。**结果** 基于Chelex 100树脂的6种不同处理方法(C1~C6)所获DNA模板浓度在203.93~769.86 ng/ $\mu$ l之间, 比磁珠法提取的DNA模板浓度偏高; Chelex 100树脂法提取的DNA模板吸光度(A)值A260/A280比值在1.25~1.47之间, 磁珠法的A260/A280比值在1.85~1.95之间, C1~C6之间无差别, 但纯度低于磁珠法; 电泳图显示, 相较于磁珠法, Chelex 100树脂法提取的DNA模板没有明确DNA条带, 前者DNA条带明显; COI基因的扩增产物电泳带清晰且长度准确; 对Chelex 100树脂法的DNA模板进行荧光定量PCR扩增, 各样品均可获得正常 $C_q$ 值, 但略高于磁珠法。**结论** 应用Chelex 100树脂法提取动物组织基因组DNA简便、高效, 适用于常规PCR及TaqMan探针荧光定量PCR方法鉴定宿主动物及直接检测动物组织DNA中的病原体。

**关键词:** Chelex 100; 动物组织; 脱氧核糖核酸; 实时荧光定量PCR; 病原体; 即时检验

中图分类号: S443 文献标志码: A 文章编号: 1003-8280(2019)03-0286-06

DOI: 10.11853/j.issn.1003.8280.2019.03.013

## Evaluation of Chelex 100 resin method for rapid extraction of genomic DNA from animal tissues

LI Dong-mei<sup>1</sup>, LIANG Yan-lin<sup>1,2</sup>, SONG Xiu-ping<sup>1</sup>, ZHU Cai-ying<sup>1</sup>, KANG Yang<sup>1,3</sup>

1 State Key Laboratory of Infectious Diseases Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China;

2 Shandong First Medical University; 3 School of Life Sciences, Shandong University

Supported by the National Science and Technology Major Project of China (No. 2017ZX10303404, 2018ZX10712001) and the Project of State Key Laboratory of Infectious Disease Prevention and Control (No. 2018SKLID802)

**Abstract: Objective** To compare Chelex 100 resin method (six different processing procedures) with the commercial automated magnetic bead-based DNA purification method (the standard method for DNA extraction) for the extraction of genomic DNA from animal tissues, and to identify a simple and rapid method for on-site testing of genomic DNA from animal tissue samples. **Methods** An appropriate amount of rodent liver tissue was ground or cut prior to adding 5% Chelex 100 resin suspension. The mixture of homogenized tissue with 5% Chelex 100 resin suspension was treated according to six different processing procedures of lysis and adsorption. After centrifugation or static treatment, the concentration and purity of genomic DNA in supernatant were measured. Using the genomic DNA as the templates, the primers of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene for rodents, the universal primers for *Bartonella* spp. and the TaqMan probe were used to amplify the COI gene fragment and the tmRNA gene fragment of *Bartonella* spp.. The

基金项目: 国家科技重大专项(2017ZX10303404, 2018ZX10712001); 传染病预防控制国家重点实验室项目(2018SKLID802)

作者简介: 栗冬梅, 女, 研究员, 主要从事巴尔通体及相关传染病防治研究, Email: lidongmei@icdc.cn

网络出版时间: 2019-04-23 16:06 网络出版地址: <http://navi.cnki.net/knavi/JournalDetail?pcode=CJFD&pykm=ZMSK>

concentration and purity of genomic DNA and the quantification cycle ( $C_q$ ) value were compared between the six processing procedures based on Chelex 100 resin as well as between the Chelex 100 resin method and the magnetic bead method.

**Results** The concentration of the DNA templates obtained using the six different processing procedures (C1–C6) based on Chelex 100 resin ranged from 203.93 ng/ $\mu$ l to 769.86 ng/ $\mu$ l, which was higher than that obtained using the magnetic bead method. The A260/A280 ratios of DNA templates extracted using the Chelex 100 resin method and the magnetic bead method ranged from 1.25 to 1.47 and 1.85 to 1.95, respectively. There was no difference in A260/A280 ratio between the C1–C6 based on Chelex 100 resin, but the purity of DNA templates extracted using the Chelex 100 resin method was lower than that of DNA templates extracted using the magnetic bead method. The electrophoretograms showed that the bands of the DNA templates extracted using the magnetic bead method were more distinct than those extracted using the Chelex 100 resin method and there was a clear and accurate band for amplification product of the COI gene. The quantitative real-time PCR amplification results showed that the DNA templates obtained using the Chelex 100 resin method had a normal  $C_q$  value, which was slightly higher than that of the DNA templates obtained using the magnetic bead method. **Conclusion** The Chelex 100 resin method for extracting genomic DNA of animal tissues is simple and efficient, which is suitable for conventional PCR and TaqMan fluorescent probe-based quantitative real-time PCR assay to identify host animal species and directly detect pathogens in animal tissue samples.

**Key words:** Chelex 100; Animal tissue; Deoxyribonucleic acid; Quantitative real-time PCR; Pathogen; Point-of-care testing

近年来,人类面临新发突发传染病流行、生物恐怖袭击和外来生物入侵严重威胁。禽流感、埃博拉、登革热和中东呼吸综合征等传染病接踵而至,扩散迅速,引发全球公共卫生危机。从已知到未知病原体,从宿主动物到传播媒介再到易感人群,加强病原微生物流行与变异监测及现场快速检测研究对于传染病预防和控制已势在必行<sup>[1]</sup>。对病原体的现场检测和连续监测,需考虑采用操作简单、成本低、对样品要求低的检测技术,现场检测最好是快速、无设备条件限制的方法。目前较为普及和实用的方法是对生物样品中的靶核酸分子的检测,包括单重或多重 PCR/实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)、各种等温扩增技术<sup>[2]</sup>以及近年来新兴的生物传感器和微流控技术<sup>[3]</sup>。检测病原体的标识性核酸分子,对于生物组织样品的高效处理是前提和基本要求,简便快速、灵敏特异的检测方法首先取决于样品的处理方法。在众多核酸提取方法中,目前应用较多的是硅胶膜法、磁珠法,还有较传统的酚氯仿抽提法和十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)抽提法等,操作均需要温浴、转管、清洗和离心等步骤,所需仪器试剂较多,操作时间一般在 40 min 以上,操作步骤多、耗时长、样品需要量大和交叉污染是上述这些方法的主要问题。为筛选适用于采样现场、大量操作或病原体长期监测所用的核酸提取方法,本研究选择 Chelex 100 树脂作为基本试剂,采用不同处理方法提取动物组织核酸,通过观察核酸浓度、纯度和 PCR/qPCR 扩增结果对这一方法进行评价。Chelex 100 是一种由苯乙烯-二乙烯基苯共聚体组成的化学螯合树脂,包含配对亚氨基二乙酸离子,作为螯合基团能够螯合多价金属离子,在碱性环境下煮沸可裂解细胞释放 DNA,并通

过结合  $Mg^{2+}$  失活脱氧核糖核酸酶(Deoxyribonucleases, DNases),防止 DNA 降解。一般来说,煮沸后的 Chelex 100-DNA 混合物较为稳定,可在 4 °C 保存 3~4 个月<sup>[4]</sup>。Chelex 100 树脂在法医鉴定中应用较多,用于毛发、组织、骨骼、石蜡包埋组织以及血样痕量检材的 DNA 提取,所提模板用于下游的法医 DNA 分型。近年来,也有用于细菌、真菌和昆虫等其他生物 DNA 的提取,所提模板用于病原体检测和物种鉴定等<sup>[5-11]</sup>。

## 1 材料与方法

1.1 主要仪器设备与试剂 CFX96 荧光定量 PCR 仪(BioRad 公司,美国)、SensoQuest Labcycler PCR 仪(圣欧,德国)、全自动核酸提取仪 AU1001(百泰克生物技术有限公司,北京)、超微量分光光度计 NanoDrop 1000(Thermo 公司,美国)、GelDoc XR+全自动凝胶成像系统(BioRad 公司,美国)、G100 高通量组织研磨仪(卡尤迪生物科技有限公司,北京)、MB-102 恒温振荡金属浴(博日科技有限公司,杭州)、旋转混匀器 TR-02U(捷美电子有限公司,苏州)。

Chelex 100 树脂(Cat.1422832, BioRad 公司,美国)、磁珠法组织基因组 DNA 提取试剂盒 AU19014(百泰克生物技术有限公司,北京)、HR qPCR Master Mix(辉睿生物科技有限公司,上海)、2 × TransTaq-T PCR SuperMix(全式金生物技术有限公司,北京)。

1.2 组织样品 选择 6 份巴尔通体感染阳性、野外采集的啮齿动物肝组织样品,作为核酸处理方法的实验样品(表 1)。分离培养和 qPCR 检测结果均为阳性,判断为组织感染巴尔通体。结果判断方法分

表 1 实验用组织样品信息

**Table 1** Information of the tissue samples used in the study

样品编号	宿主动物	组织类型	核酸浓度 <sup>a</sup> (ng/μl)	A260/A280 比值 <sup>a</sup>	循环值
ML44	大绒鼠	肝	178.00	1.88	28.90
ML51	北社鼠	肝	269.59	1.95	24.20
ML70	齐氏姬鼠	肝	390.87	1.89	29.63
ML102	大绒鼠	肝	351.99	1.93	28.91
ML108	北社鼠	肝	125.03	1.85	28.43
ML150	大绒鼠	肝	167.01	1.89	26.42

注:a.为磁珠法提取

别为:应用 *gltA* 引物<sup>[12]</sup> 扩增培养菌落的水煮 DNA 模板,电泳出现 379 bp 条带进行测序验证为巴尔通体培养阳性;应用 qPCR 检测肝组织核酸(磁珠法组织基因组 DNA 提取试剂盒 AU19014 提取),循环值(quantification cycle,  $C_q$ )  $\leq 35.00$  时,判断为肝组织巴尔通体核酸阳性。

表 2 Chelex 100 树脂提取动物组织基因组 DNA 的不同处理方法

**Table 2** The different treatment methods for extracting genomic DNA from animal tissues using Chelex 100 resin

处理方法	操作步骤		
	第 1 步 前处理 <sup>a</sup>	第 2 步 裂解与吸附	第 3 步 核酸收集 <sup>b</sup>
C1	取肝组织加入 1.5 ml 离心管中,加入 5% 的 Chelex 100 树脂悬液 100 μl	向 C1~C3 处理后的离心管中加 2.5 μl (20 mg/ml) 蛋白酶 K, 置于恒温振荡金属浴中 56 °C 孵育 30 min, 再振荡加热 10 min	C1~C3: 12 000 × g 离心 5 min, 取上清液置于新离心管中, 即为 DNA 模板
C2	和 10 余粒陶瓷研磨珠, 置于组织研磨仪中研磨 25 s, 再加入 5% 的 Chelex 100 树脂悬液 100 μl, 混匀	将 C1~C3 处理后的离心管置于恒温振荡金属浴 56 °C 孵育 30 min, 再振荡加热 10 min	
C3		将 C1~C3 处理后离心管置于旋转混匀器中室温下混匀 10 min, 然后置于恒温振荡金属浴中 100 °C 加热 10 min	
C4	取肝组织加入 1.5 ml 离心管中, 用	将 C4~C6 处理后离心管置于沸水中加热 10 min	C4~C6: 短暂离心数秒, 室
C5	灭菌剪刀剪碎组织, 加入 5% 的	将 C4~C6 处理后离心管置于恒温振荡金属浴中 100 °C 加热 10 min	温静置 30 min, 取上清液置
C6	Chelex 100 树脂悬液 200 μl, 混匀	将 C4~C6 处理后离心管置于沸水中加热 10 min, 然后用旋转混匀器室温下混匀 5 min	于新离心管中, 即为 DNA 模板

注:a. Chelex 100 树脂珠易于沉淀, 吸取时应持续混匀, 以确保每个样品管中树脂悬液浓度准确; b. 轻柔吸取上清液, 避免将 Chelex 100 树脂吸出

1.3.3 浓度测定 每份 DNA 模板取 1 μl 用 Nano Drop-1000 微量核酸浓度测定仪测定浓度, 取 4 个平行样浓度和 A260/A280 比值的均值, 与磁珠法提取的 DNA 进行比较。

### 1.3 肝组织基因组 DNA 提取

1.3.1 磁珠法 剪取 -80 °C 冻存的上述 6 份肝组织样品 4~10 mg, 按照试剂盒 AU19014 操作说明, 应用全自动核酸提取仪 AU1001 提取全基因组 DNA, 测定浓度。

1.3.2 Chelex 100 树脂法 用灭菌去离子水配制 5% 的 Chelex 100 悬液, pH 值在 10.0~11.0 之间。吸取 Chelex 100 悬液时, 持续混匀以保证树脂颗粒均匀分布在溶液中, 使用 1 000 μl 枪头, 保证组织裂解时工作液含有 5% 的 Chelex 100 树脂, 离心管内终容量为 200 μl。

剪取 -80 °C 冻存的上述 6 份肝组织样品 4~6 mg/样品 × 24, 分别用 6 种不同的处理方法 (C1~C6) 提取基因组 DNA (表 2), 每种方法做 4 个平行样。举例: 样品 ML44 剪取 24 份组织, 每份 4~6 mg, 每 4 份分别用于 C1~C6。

1.4 引物、探针及扩增参数 表 3 中引物和探针分别用于扩增巴尔通体的 tmRNA 基因片段<sup>[13]</sup> 和啮齿动物线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I (CO I) 的基因片段<sup>[14]</sup>, 由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成。

表 3 实验用引物和探针信息

**Table 3** Information of the primers and TaqMan probes used in the study

引物和探针名称	序列和探针标记(5'~3')	产物大小(bp)	检测靶标
ssrA-F	GCTATGGTAATAAATGGACAATGAAATAA	296	巴尔通体
ssrA-R	GCTTCTGTTGCCAGGTG		
ssrA-T	FAM-ACCCCCTTAAACCTGCGACG-BHQ1		
BatL5310	CCTACTC(A/G)GCCATTTTACCTATG	700~800	啮齿动物
R6036R	ACTTCTGGGTGTCCTAAAGAATCA		

应用 qPCR 方法检测巴尔通体的扩增反应体系为 20 μl, Taq DNA 聚合酶和 dNTP 混合液 (HR qPCR Master Mix) 10 μl, 探针 0.4 μl (终浓度 200 nmol/L), 上、下游引物各 0.8 μl (终浓度 400 nmol/L), 去离子水 5 μl, 样品 DNA 模板 3 μl, 做 3 个平行孔。阳性对照模板为质粒标准品 1 μl。扩增反应参数: 第 1 步,

95 °C 变性 5 min; 第 2 步, 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 45 s, 40 个循环。应用常规 PCR 方法扩增 CO I 基因片段的反应体系为 25 μl, 2 × TransTaq-T PCR Super Mix 加 12.5 μl, 上、下游引物各加 1 μl (10 μmol/L), 样品 DNA 模板加 1 μl, 去离子水补齐。扩增反应参数: 第 1 步, 95 °C 变性 30 s; 第 2 步, 95 °C 变性 30 s,

54 °C退火 30 s, 72 °C延伸 1 min, 35个循环;第3步, 72 °C延伸 3 min。上述扩增使用去离子水作为空白对照反应的模板。

1.5 电泳 配制 1.5%的琼脂糖凝胶, DNA模板和 PCR产物上样量为 1~3 μl, 电压 5 V/cm 运行 40 min。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 24.0 软件进行数据的正态分布 Kolmogorov-Smirnov 检验、方差齐性检验、t 检验和 Friedman M 检验, P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 DNA 模板的浓度和纯度测定结果 用 Chelex 100 树脂 C1~C6 处理方法的样品 ML44、ML51、ML70、ML102、ML108 和 ML150 的 DNA 模板浓度在

154.42~1 057.92 ng/μl 之间, 各样品的平均值在 (203.93 ± 36.27) ~ (769.86 ± 256.41) ng/μl 之间 (表 4), 各样品 DNA 模板浓度的变异系数(CV)值在 6.21%~42.75%之间;磁珠法提取的 DNA 模板浓度分别为 178.00、269.59、390.87、351.99、125.03 和 167.01 ng/μl, 相较 Chelex 100 树脂法提取的 DNA 模板浓度略低, 差异有统计学意义 (t=6.021, P=0.002)。

用 Chelex 100 树脂 C1~C6 处理方法的上述 DNA 模板 A260/A280 比值在 1.25~1.51 之间, 各样品的平均值在 (1.25 ± 0.05) ~ (1.47 ± 0.01) 之间 (表 5), CV 值在 0.73%~3.79%之间;磁珠法提取的 DNA 模板 A260/A280 比值在 1.80~1.95 之间, 与 Chelex 100 树脂法差异有统计学意义 (t=-23.029, P=0.000)。

表 4 动物肝组织 DNA 模板浓度

Table 4 The concentrations of DNA templates from animal liver tissues

样品编号	核酸浓度均值(ng/μl) ± 标准差					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
ML44	262.95 ± 16.32	278.13 ± 53.25	302.38 ± 40.82	232.65 ± 57.82	267.07 ± 41.67	265.05 ± 25.30
ML51	407.69 ± 28.67	412.27 ± 145.39	292.96 ± 51.50	318.45 ± 105.81	356.91 ± 56.48	384.38 ± 37.09
ML70	349.52 ± 46.04	498.46 ± 213.09	346.36 ± 78.17	769.86 ± 256.41	473.98 ± 51.46	489.83 ± 122.03
ML102	408.51 ± 43.16	316.29 ± 75.04	370.52 ± 41.09	534.40 ± 82.97	428.64 ± 150.44	375.80 ± 228.26
ML108	302.34 ± 64.47	318.87 ± 74.56	235.82 ± 54.77	351.22 ± 147.86	402.91 ± 42.00	428.19 ± 63.57
ML150	264.68 ± 60.59	266.45 ± 63.92	203.93 ± 36.27	247.60 ± 95.93	280.03 ± 94.37	382.86 ± 57.61

注: C1~C6. 处理方法

表 5 动物肝组织 DNA 模板的 A260/A280 比值

Table 5 The ratios of A260/A280 for DNA templates from animal liver tissues

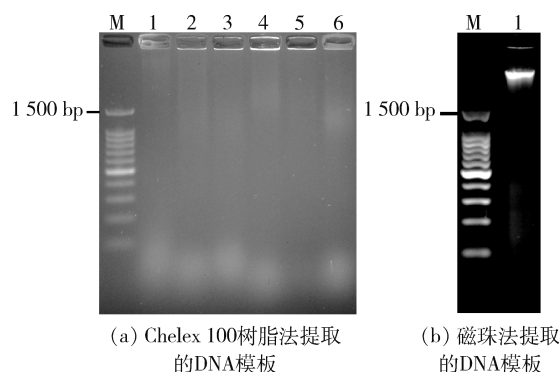
样品编号	A260/A280(均值 ± 标准差)					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
ML44	1.41 ± 0.03	1.37 ± 0.01	1.36 ± 0.03	1.44 ± 0.04	1.41 ± 0.05	1.42 ± 0.02
ML51	1.41 ± 0.01	1.47 ± 0.01	1.46 ± 0.03	1.44 ± 0.02	1.44 ± 0.03	1.46 ± 0.05
ML70	1.42 ± 0.04	1.43 ± 0.03	1.39 ± 0.02	1.41 ± 0.03	1.36 ± 0.02	1.39 ± 0.02
ML102	1.35 ± 0.02	1.34 ± 0.02	1.31 ± 0.02	1.31 ± 0.01	1.31 ± 0.01	1.32 ± 0.02
ML108	1.28 ± 0.02	1.25 ± 0.05	1.31 ± 0.03	1.28 ± 0.02	1.29 ± 0.01	1.27 ± 0.02
ML150	1.29 ± 0.02	1.30 ± 0.02	1.29 ± 0.01	1.27 ± 0.03	1.28 ± 0.02	1.26 ± 0.02

注: C1~C6. 处理方法

2.2 组织 DNA 模板和 PCR 产物电泳 Chelex 100 树脂法提取的 DNA 模板在电泳图中没有明显 DNA 条带, 各泳道可见片状影像;磁珠法提取的 DNA 模板在电泳图中可见 1 条明亮的 DNA 条带 (图 1)。

取样品 ML51 和 ML150 的 C1~C6 处理方法的 CO I 扩增产物电泳, 扩增条带单一、清晰可见, 长度符合目的基因片段, 接近 800 bp, 见图 2。

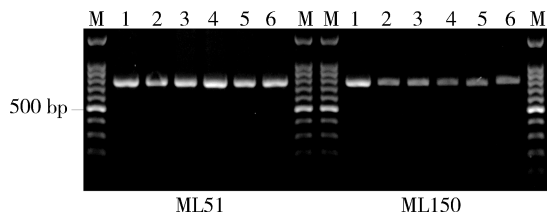
2.3 qPCR 扩增结果 对 Chelex 100 树脂 C1~C6 处理方法的样品 ML44、ML51、ML70、ML102、ML108 和 ML150 的 DNA 模板进行 qPCR 扩增, 各样品均可获得正常 C<sub>q</sub> 值 (表 6)。样品 ML44~ML150 的 C<sub>q</sub> 平均值的极值分别为 (27.94 ± 0.38) ~ (28.86 ±



注: M. Marker; 1~6. C1~C6 处理方法

图 1 DNA 模板琼脂糖电泳结果

Figure 1 The agarose electrophoretograms of DNA templates



注: M.Marker; 1~6.C1~C6处理方法  
**图 2** CO I 扩增产物琼脂糖电泳结果

**Figure 2** The agarose electrophoretogram of PCR products of the COI gene

0.46)、(29.68±0.31)~(31.11±1.27)、(27.36±0.42)~(33.24±0.79)、(31.97±0.58)~(34.16±1.41)、(28.25±0.62)~(31.00±2.81)和(29.45±1.05)~(30.70±0.77), CV 值在 1.37%~7.24% 之间, C1~C6 各处理方法之间差异有统计学意义( $M=106.373, P=0.000$ ), 主要是 C1 和 C2 与其他处理方法之间有差别。磁珠法的 DNA 模板所得  $C_q$  值分别为 28.90、24.20、29.63、28.91、28.43 和 26.42, 略低于 Chelex 100 树脂法, 差异有统计学意义( $t=2.644, P=0.046$ )。

**表 6** qPCR 扩增 Chelex 100 树脂法提取的 DNA 模板结果

**Table 6** The qPCR amplification results of the DNA templates extracted using the Chelex 100 resin method

样品编号	$C_q$ (平均值±标准差)					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
ML44	28.07±0.23	27.94±0.38	28.05±0.40	28.78±0.21	28.86±0.46	28.73±0.43
ML51	28.59±0.31	29.85±0.32	29.68±0.31	31.11±1.27	30.93±0.83	29.93±0.18
ML70	27.36±0.42	29.29±0.79	32.31±1.97	31.78±1.90	33.24±0.79	32.32±0.63
ML102	31.97±0.58	33.08±0.88	33.99±0.64	34.16±1.41	32.77±1.08	33.78±0.98
ML108	28.25±0.62	29.00±1.42	29.38±1.39	29.61±1.52	29.18±1.28	31.00±2.81
ML150	29.45±1.05	29.86±0.40	29.91±0.62	29.91±0.72	30.70±0.77	29.77±0.85

注: a. 为 4 份平行 DNA 样品的 3 个平行扩增反应的总平均值, 剔除异常值(即每份样品的 3 个 qPCR 平行反应值的变异系数  $CV \geq 5\%$ );  $C_q$ : 循环值; C1~C6. 处理方法

### 3 讨论

核酸分子检测方法已广泛应用于传染病病原体检测与监测中, 特别是 qPCR 方法近年来发展迅速、快速普及, 与常规 PCR 联合应用已成为实验室病原体检测的基本手段。虽然核酸扩增依赖于普通/定量 PCR 仪, 但是目前已有可以用于现场检测的便携式仪器, 这为开展现场即时检验 (point-of-care testing, POCT) 提供装备基础。高效的样品前处理是任何检测方法的前提和关键, 简便、省时、省力和经济的核酸提取方法在长期、大规模监测工作中更易于开展实施。Chelex 100 树脂法最早由 Walsh 等<sup>[4]</sup>用于 DNA 提取, 目前已是法医实验室的常规方法, 用于痕量检材的 DNA 提取, 对样品要求较低, 高度腐败、严重污染及暴露在极端恶劣环境中的样品均可应用 Chelex 100 树脂提取出 DNA, 操作简单方便、成本低, 更有利于在野外现场和基层实验室推广使用。

本研究所用 Chelex 100 树脂为生物技术级, 100~200 目, 适用于 DNA 提取。在本研究中, 基于 Chelex 100 树脂采取了 6 种不同处理方法, 区别在于前处理中组织的匀浆方式、裂解和吸附步骤中添加蛋白酶 K 与否及温浴方式和时间、最后核酸收集时是否需要离心。这些不同处理方法在其他研究中多有报道, 特别是在提取不同性质的样品时, 有些研究在裂解时加入蛋白酶 K 等裂解液<sup>[15-17]</sup>、增加纯化步骤<sup>[18]</sup>, 还有与自动化工作站联合使用简化操作方法

等<sup>[19]</sup>, 用以提高提取效果。本研究的这些不同处理对 DNA 模板的浓度及 qPCR 的  $C_q$  值结果虽有差别, 但不影响最终结果判断。Chelex 100 树脂法所提 DNA 模板浓度普遍较磁珠法高, 这与该法“一管式”提取、损失较少有关。A260/A280 在 1.8~1.9 时, DNA 纯度较高, 若 A260/A280 < 1.6, 表明有蛋白等污染, Chelex 100 树脂法所提 DNA 模板该值均 < 1.6。由于该方法没有纯化清洗步骤, 所提 DNA 模板纯度不高在预期内, 溶液中混有少量蛋白, 所以 A260/A280 比值较低。常规 PCR 反应对模板 DNA 纯度要求不高, 少量蛋白或其他杂质只要不抑制 Taq DNA 聚合酶活性即可, 所以本研究中 Chelex 100 树脂法提取的 DNA 模板用于扩增 CO I 基因条带清晰, 产物可用于测序鉴定物种。应用 TaqMan 探针法检测出全部样品中的巴尔通体, 增加蛋白酶 K 处理和 56 °C 温浴会降低  $C_q$  值, Chelex 100 树脂法的  $C_q$  值高于磁珠法, 表明组织中细菌 DNA 的充分释放会影响到检测的灵敏性, 模板纯度会影响 qPCR 检测结果, 对于一些在检测限附近的样品可能会受到限制, 有关这方面影响在做其他组织和病原体时还需具体评估。

既往一些研究已总结出 Chelex 100 树脂提取 DNA 的优势<sup>[16]</sup>, 如步骤少、交叉污染少、检材用量少、可清除 PCR 抑制物和无毒性等。其他优势还有不需要特殊仪器, 有加热设备即可, 如电热炉/电磁炉, 而其他方法最低配置是金属/水浴仪和离心机。该方法费用低廉, 每份样品成本 < 1 元, 其他方法除

传统的酚氯仿法成本较低,市售的各种试剂盒包括磁珠法和硅胶膜法等,均>5元。本研究中Chelex 100树脂提取核酸可以在15 min内完成,样品不需转管,可避免污染,简单快速,适用于常规监测和qPCR。在大规模调查、野外现场工作和长期监测中,综合考虑方法的可持续性、操作实施、设备要求和成本等因素,Chelex 100树脂法具有可行性,相关人员可根据调查和研究目的选择适当的核酸提取方法,以达到最佳效益。最后,提示应用Chelex 100树脂提取DNA时的注意事项:①样品用量不可过多;②树脂悬液配制时注意树脂珠要均匀分布;③要使用新鲜配置的树脂悬液;④吸上清液时不要带过树脂珠;⑤使用保存一段时间的DNA模板应再次离心。

#### 参考文献

- [1] Gao GF. From “A”IV to “Z”IKV: attacks from emerging and re-emerging pathogens[J]. Cell, 2018, 172(6): 1157–1159. DOI: 10.1016/j.cell.2018.02.025.
- [2] 马丽敏. 核酸等温扩增技术研究进展[J]. 浙江预防医学, 2013, 25(1): 24–27. DOI: 10.3969/j.issn.1007-0931.2013.01.007.
- [3] 王瑞丽, 卢晓, 孙中杰, 等. POCT技术在传染病病原检测中的应用[J]. 军事医学, 2016, 40(1): 70–73.
- [4] Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material[J]. Biotechniques, 1991, 10(4): 506–513.
- [5] 马芹, 王元智, 陆涛峰, 等. 棕背鹇性别的快速鉴定[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(1): 96–99, 107.
- [6] 胡晓红, 刘昕, 黄正根, 等. 应用于PCR及实时荧光定量PCR的细菌DNA提取方法[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(7): 734–735. DOI: 10.3321/j.issn:1000-5404.2006.07.036.
- [7] 邹志文, 张素卿, 辛天蓉, 等. 一种改进的Chelex-100法提取单头螨DNA[J]. 南昌大学学报:理科版, 2011, 35(6): 564–567. DOI: 10.3969/j.issn.1006-0464.2011.06.011.
- [8] 王宁, 都佳寅, 张卫军. 4种方法提取口腔致病菌DNA效果的比较[J]. 医学理论与实践, 2018, 31(9): 1253–1256. DOI: 10.19381/j.issn.1001-7585.2018.09.003.
- [9] 柴海云, 张磊, 袁牧歌, 等. 一种简便、快速、高效适合PCR的真菌DNA提取方法[J]. 中国真菌学杂志, 2017, 12(6): 359–361, 367. DOI: 10.3969/j.issn.1673-3827.2017.06.010.
- [10] 赵琳琳, 翟仙敦, 张振, 等. 基于28S rRNA基因序列对洛阳地区嗜尸性蝇类的分子鉴定[J]. 法医学杂志, 2018, 34(2): 114–119. DOI: 10.3969/j.issn.1004-5619.2018.02.002.
- [11] 闫振天, 司风玲, 鲜鹏杰, 等. 基于Chelex-100和蛋白酶K的蚊虫足样本DNA提取技术[J]. 重庆师范大学学报:自然科学版, 2017, 34(5): 26–31.
- [12] Norman AF, Regnery R, Jameson P, et al. Differentiation of *Bartonella*-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene[J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(7): 1797–1803.
- [13] Diaz MH, Bai Y, Malania L, et al. Development of a novel genus-specific real-time PCR assay for detection and differentiation of *Bartonella* species and genotypes[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(5): 1645–1649.
- [14] Robins JH, Hingston M, Matisoo-Smith E, et al. Identifying *Rattus* species using mitochondrial DNA[J]. Mol Ecol Notes, 2007, 7(5): 717–729. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2007.01752.x.
- [15] 陈相波, 陈春, 沈金慧, 等. 利用改良的Chelex方法快速调查田间新蚜虫病霉的流行[J]. 中国生物防治学报, 2014, 30(6): 731–735.
- [16] 欧阳刚, 胡文娟, 姚品芳, 等. PCR-RFLP中Chelex-100制备DNA模板的方法建立及其条件优化[J]. 中南民族大学学报:自然科学版, 2009, 28(1): 38–41. DOI: 10.3969/j.issn.1672-4321.2009.01.010.
- [17] Yang JL, Wang MS, Cheng AC, et al. A simple and rapid method for extracting bacterial DNA from intestinal microflora for ERIC-PCR detection[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(18): 2872–2876. DOI: 10.3748/wjg.14.2872.
- [18] Singh UA, Kumari M, Iyengar S. Method for improving the quality of genomic DNA obtained from minute quantities of tissue and blood samples using Chelex 100 resin[J]. Biol Proced Online, 2018, 20: 12. DOI: 10.1186/s12575-018-0077-6.
- [19] 周如华, 孙溢华, 孙元鹏, 等. 自动化Chelex-100法在接触性检材DNA提取中的应用研究[J]. 刑事技术, 2017, 42(3): 206–208. DOI: 10.16467/j.1008-3650.2017.03.009.

收稿日期: 2019-02-11 (编辑: 陈秀丽)