

Chelex-100 法及酚氯仿法提取阴道毛滴虫 DNA 的比较

谢辉, 王雅静*, 帖超男, 廖琳, 刘佩娜

(四川大学华西基础医学及法医学院寄生虫学教研室, 成都 610041)

摘要: 目的 - 比较 Chelex-100 法和酚氯仿法提取阴道毛滴虫基因组 DNA。方法 - 分别用 Chelex-100 法和酚氯仿法提取阴道毛滴虫基因组 DNA, 用 PCR 法检测 DNA 提取的有效性。结果 - 两种方法提取的 DNA 经 PCR 扩增均有特定的条带。结论 - 两种方法均能提取阴道毛滴虫 DNA。Chelex-100 方法简便、省时, 较适用于分子生物学研究及临床 PCR 扩增使用。

关键词: 阴道毛滴虫; DNA 提取; PCR 扩增

中图分类号: Q959.113.9; Q75 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7083 (2004) 04-0338-03

A Comparative Study of Chelex-100 and Phenol-chloroform Methods for Extracting DNA from *Trichomonas vaginalis*

XIE Hui, WANG Ya-jing, TIE Chao-nan, LIAO Lin, LIU Pei-na

(Department of Parasitology, West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041)

Abstract: Objective To compare Chelex-100 and phenol-chloroform methods for extracting genomic DNA from *T. vaginalis*. **Methods** Two extracting methods were compared with PCR detections. **Result** The result showed that same definite band was amplified by PCR from *T. vaginalis* genomic DNA extracted with two methods. **Conclusion** Two extracting methods were almost at same effective level. Chelex 100 method was practical in molecular biology study and clinical sample amplification by PCR for its simplicity and rapidity.

Key words: *Trichomonas vaginalis*; DNA extracting; PCR amplification

阴道毛滴虫 (*Trichomonas vaginalis*, TV) 是寄生在人体泌尿生殖道的一种常见病原体, 可引起阴道毛滴虫病 (Trichomoniasis)。是威胁人类健康的主要性传播疾病 (sexually transmitted diseases, STDs) 之一^[1]。提取阴道毛滴虫 DNA 是进行 PCR 诊断和进行分子生物学研究的重要基础。目前, 实验室对原虫 DNA 提取主要应用酚氯仿法^[2], 提取步骤比较复杂且耗时, 我们对 Chelex-100 法和酚氯仿法提取阴道毛滴虫基因组 DNA 进行了研究, 并用自行设计的针对滴虫的保守基因 (铁氧化还原蛋白基因 Ferredoxin, Fd) 的一对引物, 进行了 PCR 扩增, 进一步鉴定了提取方法的有效性。关于阴道毛滴虫分子生物学研究国内尚未见相关报道, 而我们对阴道毛滴虫 DNA 的提取方法进行探

索便于国内开展这方面的工作。

1 材料和方法

1.1 虫株

阴道毛滴虫株来自四川大学华西附二院妇产科门诊。

1.2 主要试剂和引物

Chelex-100 (Bio-Rad), DL 2000marker (北京天为), Taq 酶 (上海生工), 蛋白酶 K (上海生工), 其余试剂均为进口及国产分析纯。根据文献^[3]自行设计一对 Fd 基因引物。在上游引物 FER-1 添加了 Hind III 识别序列和保护序列, 下游引物 FER-2 添加了 BamHI 识别序列和保护序列, 以便今后克隆该基因, 引物由上海捷倍思基因公司合

收稿日期: 2004-03-11 修回日期: 2004-07-05

通讯作者: Corresponding author, E-mail: yjwang721@yahoo.com.cn

致谢: 感谢四川大学华西附二院妇产科毕世梁副主任医师协助标本的采集, 感谢华西基础与法医学院物证教研室廖森老师对实验的帮助。

成。引物序列如下:

FER-1 5-ATA AAGCTT ATGCTCTCT-
CAAGTTTGCCG-3

FER-2 5-ATA GGATCC TTAGAGCTC-
GAAAACAGCACC-3

1.3 主要设备

黑马 480 扩增仪, 小型电泳槽 (日本产), 低温离心机 (Backman)。

1.4 TV 的培养

取滴虫性阴道炎患者阴道后穹隆分泌物标本直接接种于加有 12% 的灭活兔血清及青霉素 G 的肝浸汤培养基, 37°C 培养, 对数生长期收获^[4]。

1.5 酚氯仿法提取 DNA

对数生长期收获, 调整虫体的浓度为 1×10^6 / ml (虫量共 10^7), 冰上冷却 10min, 于 4°C 以 3000rpm 离心 5min, 用 PBS 液洗涤两次, 虫体用 1ml Lysis 缓冲液 (15mM 柠檬酸钠, 450mM 氯化钠, 0.2% SDS) 重悬, 并另加入蛋白酶 K 使终浓度为 200 μ g/ml, 65°C 孵育 1h。DNA 用等体积的酚/氯仿提取两次, 2.5 倍体积无水乙醇及 0.1 倍体积乙酸钠沉淀 DNA, 再用 70% 的乙醇洗涤两次, 待乙醇挥发后, 加入 25 μ l TE 溶解 DNA^[5,6]。

1.6 Chelex-100 提取 DNA

取相同虫量 10^7 离心后收集虫体到 1.5ml EP 管中, 加入 200 μ l 5% Chelex-100 和 10 μ l 的 20mg/ml 蛋白酶 K, 振荡混匀, 37°C 孵育 2h, 沸水浴中 8~10min, 冰浴 2min, 室温下 12000rpm 离心 3min, 上清即为用于 PCR 反应的 DNA 样品^[6,7]。

1.7 PCR 扩增鉴定

50 μ l 体系中进行 PCR 扩增, 反应条件为: 94°C 预变性 3min 后进入循环: 94°C 变性 35s, 58°C 退火 35s, 72°C 延伸 35s, 共 35 个循环, 最后一个循环在 72°C 延伸 5min。扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

2 结果

用两种方法提取的 DNA 均能扩增出片段为 324bp 大小的 TV 的 Fd 基因, 而空白对照未扩增出条带 (见图)。

3 讨论

本文用酚氯仿法和 Chelex-100 法分别提取阴道毛滴虫的基因组 DNA, 用 PCR 扩增阴道毛滴虫的保守基因 Fd 基因, 进行鉴定。结果显示, 在琼脂糖电泳上都出现了特定区带, 而且, 同样的虫量, Chelex-100 法扩增出的 DNA 条带更明显, 说

明 Chelex-100 法损失的 DNA 少。

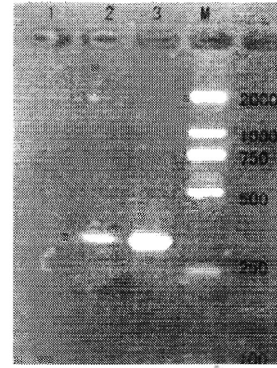


图 用阴道毛滴虫的铁氧化还原蛋白基因的引物 FER-1 及 FER-2, PCR 扩增出的片段 1.0% 琼脂糖凝胶电泳

1. 空白对照, 2. 用酚氯仿法提取 DNA 扩增的结果, 3. 用 Chelex-100 提取 DNA 扩增的结果, M. DNA marker DL2000。

Fig. PCR product of Fd gene of *T. vaginalis* (1.0% agarose gel electrophoresis)

Lane 1: Bblank control. Lane 2: Amplification product of genomic DNA extracted with phenol-chloroform method. Lane 3: Amplification product of genomic DNA extracted with Chelex-100 method. Lane M: DL2000 marker.

经典的酚氯仿法提 DNA 操作十分繁琐、复杂、费时, 但应用范围广, 适合于所有生物检材, 且提取的 DNA 纯度高。Chelex-100 法广泛应用于微量血液、组织块、精斑、骨骼及牙齿等法医物证检材^[8], 近年来国外已有学者将该方法应用于阴道毛滴虫 DNA 的提取^[6,7]。该方法简便快速, 提取过程始终在同一试管中进行, 可减少 DNA 的损失, 由于操作步骤简单, 减少了污染机会。而且 Chelex-100 对高价金属离子有很高的亲和力和螯和作用, 能够抑制核酸酶对 DNA 的消化作用, 防止了 DNA 在煮沸过程中的降解, 同时高温、低离子强度条件下还有催化 DNA 释放的作用, 这样的处理过程既达到了分离提取 DNA 的目的, 同时除去了一些对扩增反应有抑制作用的因子 (如重金属离子), 提高了 PCR 扩增的效率^[8]。

铁氧化还原蛋白是阴道毛滴虫电子传递链的主要成分, 是氢化酶体 (Hydrogenosomal) 的电子供体, 是现在广泛应用的抗滴虫药甲硝唑的作用位点^[9]。我们自行设计 FER-1, FER-2 引物是针对该基因, 进行 PCR 扩增, 用于鉴定 DNA 提取的有效性, 而且该引物有上下游酶切位点, 以便于今后插入表达载体进行表达, 为进一步研究打下基础。

4 参考文献

- [1] Krieger JN, Tam MR, Stevens CE, et al. Diagnosis of trichomoniasis. Comparison of conventional wet-mount ex-

- amination with cytologic studies, cultures, and monoclonal antibody staining of direct specimens [J]. JAMA, 1988, 259 (8): 1223~1227.
- [2] Riley DE, Krieger JN. Rapid and practical DNA isolation from *Trichomonas vaginalis* and other nuclease-rich protozoa. Mol Biochem Parasitol [J]. 1992, 51 (1): 161~163.
- [3] Johnson PJ, d'Oliveira CE, Gorrell TE, et al. Molecular analysis of the hydrogenosomal ferredoxin of the anaerobic protist *Trichomonas vaginalis* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87 (16): 6097~6101.
- [4] 陈佩惠. 人体寄生虫学 (第四版) [J]. 北京: 人民卫生出版社, 1995.
- [5] Rubino S, Muresu R, Rappelli P, et al. Molecular probe for identification of *Trichomonas vaginalis* DNA [J]. J Clin Microbiol, 1991, 29 (4): 702~706.
- [6] Mayta H, Gilman RH, Calderon MM, et al. 18S ribosomal DNA-based PCR for diagnosis of *Trichomonas vaginalis* [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38 (7): 2683~2687.
- [7] Madico G, Quinn TC, Rompalo A, et al. Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection by PCR using vaginal swab samples [J]. J Clin Microbiol, 1998, 36 (11): 3205~3210.
- [8] 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.
- [9] Vidakovic MS, Fraczkiwicz G, Germanas JP. Expression and spectroscopic characterization of the hydrogenosomal [2Fe-2S] ferredoxin from the protozoan *Trichomonas vaginalis* [J]. J Biol Chem, 1996, 271 (25): 14734~14739.