

Comparison of Four Methods for Extracting the Genomic DNA of *Staphylococcus aureus*

Zhiqing Zou¹, Min Zhang¹, Xiaoyue Dai¹, Wen Xia¹, Yaling Zhou², Lei He², Jiayu Bai¹, Ye Su¹, Dinesh Kumar Kesavan¹, Liang Wu^{1*}, Qing Yin², Huaxi Xu¹

¹School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang Jiangsu

²Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang Jiangsu

Email: *wl_ujs@163.com

Received: Aug. 9th, 2019; accepted: Aug. 23rd, 2019; published: Aug. 30th, 2019

Abstract

Objective: To compare the effects of four methods, including boiling method, improved alkali cracking method, magnetic bead method and adsorption column method, for extracting the genomic DNA of *S. aureus*, selecting methods with better extraction quality and more suitable for automation, to provide technical support for rapid detection of clinical *S. aureus* infection. **Methods:** 20 clinical strains of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) were isolated and their DNA was extracted by boiling method, improved alkali cracking method, magnetic bead method and adsorption column method. The extraction effects of *spa* gene, *mecA* gene and *femB* gene in *S. aureus* were detected by polymerase chain reaction (PCR). **Results:** In the DNA gene template extracted by magnetic bead method, all samples detected *spa* genes, *mecA* genes and *femB* genes; in the DNA gene template extracted by adsorption column method, all samples detected *spa* genes and *mecA* genes, while 19 samples detected *femB* genes; in the DNA gene template extracted by improved alkali cracking method, all samples detected *spa* genes, and 19 samples detected *mecA* genes and *femB* genes; in the DNA gene template extracted by boiling method, only 7 samples and 8 samples detected *spa* genes, *mecA* genes and none of the samples detected *femB* genes. **Conclusion:** The DNA gene template extracted by improved alkali cracking method, magnetic bead method and adsorption column method can be used for PCR assay, but the direct boiling method is not suitable for clinical *S. aureus* genomic DNA extraction. Magnetic bead method uses the shortest time, which is more suitable for a large number of rapid automatic extraction.

Keywords

Staphylococcus aureus, DNA Extraction, PCR Detection

4种方法提取金黄色葡萄球菌基因DNA效果的比较

*通讯作者。

文章引用: 邹治情, 张敏, 戴晓玥, 夏雯, 周亚玲, 何蕾, 白佳玉, 苏叶, Dinesh Kumar Kesavan, 吴亮, 阴晴, 许化溪. 4种方法提取金黄色葡萄球菌基因DNA效果的比较[J]. 生物医学, 2019, 9(4): 154-161. DOI: 10.12677/hjbm.2019.94023

邹治情¹, 张敏¹, 戴晓玥¹, 夏雯¹, 周亚玲², 何蕾², 白佳玉¹, 苏叶¹,
Dinesh Kumar Kesavan¹, 吴亮^{1*}, 阴晴², 许化溪¹

¹江苏大学医学院, 江苏 镇江

²江苏大学附属医院, 江苏 镇江

Email: *wl_ujs@163.com

收稿日期: 2019年8月9日; 录用日期: 2019年8月23日; 发布日期: 2019年8月30日

摘要

目的: 比较4种方法, 包括煮沸法、改良碱裂解法、磁珠法和吸附柱法提取金黄色葡萄球菌基因DNA效果, 为临床金黄色葡萄球菌感染的快速检测提供技术支撑。方法: 选取20株临床分离耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌, 分别使用煮沸法、改良碱裂解法、磁珠法和吸附柱法提取基因DNA。通过PCR法扩增所提取DNA模板中金黄色葡萄球菌 spa 基因、 $mecA$ 基因和 $femB$ 基因, 以评估4种方法提取效果。结果: 磁珠法制备的模板中, PCR法可以扩增出所有标本的 spa 基因、 $mecA$ 基因和 $femB$ 基因; 吸附柱法制备的模板中, 所有标本均可扩增出 spa 基因和 $mecA$ 基因, 而仅19个标本扩增出 $femB$ 基因; 以改良手工碱裂解法制备的模板, 所有标本均可扩增出 $mecA$ 基因, 19标本可以扩增出 spa 基因和 $femB$ 基因; 煮沸法制备的模板中, PCR法可以分别扩增出7个标本的 spa 基因, 8个标本的 $mecA$ 基因, 所有标本均未扩增出 $femB$ 基因。结论: 改良碱裂解法、吸附柱法和磁珠法提取金黄色葡萄球菌基因组DNA均可以用于PCR扩增, 直接煮沸法提取效果较差, 不适合用于临床金黄色葡萄球菌基因组DNA提取; 磁珠法用时最短, 更适用于大量快速自动化提取。

关键词

金黄色葡萄球菌, DNA提取, PCR检测

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

金黄色葡萄球菌是人类皮肤表面一种常见致病菌[1], 可以引起多种化脓性感染[2], 也是目前最重要的医院内感染性病原体。随着近年来 β -内酰胺类抗生素的广泛应用[3], 临床耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)的分离率迅速上升[4], 并且患者病死率也逐年增加[5]。在MRSA菌感染的治疗中, 早期诊断具有重要意义, 分子生物学技术(如PCR法)是目前最具前景的诊断方法。

金黄色葡萄球菌是革兰阳性菌[6], 具有较厚的细胞壁结构, 主要含有肽聚糖附磷壁酸, 而且90%的金黄色葡萄球菌细胞表面都含有蛋白A, 并与细胞壁中的肽聚糖结合成致密的共价交联结构[7], 增加了提取该菌基因组DNA的难度。现有的金黄色葡萄球菌基因组DNA提取方法包括煮沸法[8]、免疫磁珠法[9]、各种裂解法(包括CTAB裂解、SDS裂解等)[10], 但目前尚缺乏对上述方法提取效果的横向比较研究[11]。

PCR 技术是近 20 年来迅速发展的一种快速检测方法[12], 在医学检验中发挥重要作用, 具有高灵敏性和特异度的优良品质, 还兼具操作简便、成本较低等诸多优势[13]。获得质量合格的模板 DNA 是开展 PCR 检测的先决条件, 本研究比较了现有的 4 种常用金黄色葡萄球菌基因组 DNA 提取方法, 现将结果汇报如下[14]。

2. 材料和方法

2.1. 材料

2.1.1. 菌种来源

本研究中使用的 20 株 MRSA 菌株均来自于江苏大学附属医院检验科微生物室鉴定分离。所有菌株均经 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定仪(法国生物梅里埃公司)鉴定为 MRSA 菌。

2.1.2. 主要试剂

细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自北京天根生物有限公司; 酵母浸出液、胰蛋白酶(英国 OXIOD 公司); 羊血琼脂培养平板、Muller-Hinton 培养基(法国生物梅里埃公司); 溶菌酶(美国 Amersco 公司); 蛋白酶 K 溶液(20 mg/mL)(美国 Merck 公司); 琼脂糖(西班牙进口分装); 2 × Taq Master Mix (Dye Plus)(南京 Vazyme 公司); Tanon™ DNA Maker(上海天能公司); 改良碱裂解法中所需试剂配制包括, 溶液 1(含 25 mol/L Tris·HCl, 10 mmol/L EDTA-Na₂ 和 50 mmol/L 葡萄糖), 经高压灭菌后于 4℃ 保存; 溶液 2 含有 0.2 mol/L NaOH 和 10% (w/v) SDS, 该液现配现用; 溶液 3 含有醋酸钾 150 mg, 冰醋酸 11.5 mL, 以灭菌蒸馏水定容至 100mL, 室温下保存备用。其他试剂均为国产分析纯。

2.1.3. 引物

参考李克诚[15]等报道合成 *spa* 检测引物, 参考黄辉[16]等报道合成 *mecA* 基因和 *femB* 基因(见表 1), 由苏州涨迅生物公司合成。

Table 1. *Staphylococcus aureus spa, mecA and femB* gene amplification primers

表 1. 金黄色葡萄球菌 *spa*、*mecA* 和 *femB* 基因扩增引物

基因	引物序列	产物长度	退火温度
<i>spa</i>	F: 5'-TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC-3' R: 5'-CAGCAGTAGTGCCGTTGCTT-3'	$n \times 70$ bp	55℃
<i>mecA</i>	F: 5'-GGCATTCTGTGTCACAATCG-3' R: 5'-CTGGAAGTTGTTGAGGAGAG-3'	310 bp	57 °C
<i>femB</i>	F: 5'-TTACAGAGTTAACTGTTACC-3' R: 5'-ATACAAATCCAGCACGCTCT-3'	651 bp	51 °C

2.1.4. 主要仪器

电热恒温培养箱(绍兴市苏珀仪器有限公司); 气浴恒温振荡器(江苏科析仪器有限公司); 恒温水浴锅(嘉兴俊思电子有限公司); 梯度 PCR 仪(西安 TIANLONG 科技有限公司); 低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司); 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2.2. 方法

2.2.1. 细菌复苏和培养

所有细菌均先涂布于羊血琼脂平板, 于 37℃ 温箱中培养, 12 h 后挑取单个菌落接种于 3 mL 液体 LB 培养液, 37℃、220 rpm 连续振荡培养 12 h 后, 取上述新鲜饱和菌液 1.5 mL, 以 12,000 r/min 离心 2 min, 弃上清, 收集沉淀用于细菌基因组 DNA 提取。

2.2.2. 磁珠法

向 2.2.1 收集的菌种沉淀中加入 500 μL LBS 溶液, 100 μL 溶菌酶溶液(20 mg/mL)和 20 μL 蛋白酶 K 溶液(20 mg/mL), 充分重悬后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 中温育 30 min, 再转至 56 $^{\circ}\text{C}$ 中温育 10 min, 其间注意颠倒混匀 3 次, 加入 40 μL 混匀的磁珠悬浮溶液, 充分吹打混匀后于 56 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min, 磁性分离 1 min。向样品管加入 600 μL Buffer WS1, 涡旋震荡 30 s, 磁性分离 1 min; 继续向样品管加入 600 μL Buffer WS2, 涡旋震荡 30 s, 磁性分离 1 min; 向样品管加入 600 μL Buffer WS3, 涡旋震荡 30 s, 磁性分离 1 min; 最终向样品管加入 50 μL Buffer ES, 将磁珠悬浮, 65 $^{\circ}\text{C}$ 混匀温浴 5 min 以上, 磁性分离 1 min 后用移液器小心吸取上清转移到另一干净的灭菌离心管, 此即提取的细菌 DNA, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存备用。

2.2.3. 吸附柱法

取 2.2.1 收集的菌种沉淀, 向沉淀中加入 180 μL 溶菌酶溶液(20 mg/mL)于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min, 再向管中加入 20 μL 蛋白酶 K 溶液(20 mg/mL), 混匀后加入 220 μL 缓冲液 GB, 于 70 $^{\circ}\text{C}$ 放置 10 min, 再加 220 μL 无水乙醇沉淀核酸, 将上一步所得溶液和絮状沉淀全部加入一个吸附柱 CB3 中, 以 12,000 r/min 离心 30 s, 倒掉废液; 向吸附柱 CB3 中加入 500 μL 缓冲液 GD, 12,000 r/min 离心 30 s, 倒掉废液, 将吸附柱 CB3 放入收集管中; 向吸附柱 CB3 中加入 600 μL 漂洗液 PW, 12,000 r/min 离心 30 s, 倒掉废液, 吸附柱 CB3 放入收集管中, 重复一次; 将吸附柱 CB3 放回收集管中, 12,000 r/min 离心 2 min, 倒掉废液。将吸附柱 CB3 置于室温放置 10 min, 以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。将吸附柱 CB3 转入一个干净的离心管中, 向吸附膜的中间部位悬空滴加 50 μL 缓冲液 TE, 室温放置 5 min, 12,000 r/min 离心 2 min, 将溶液收集到离心管中, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存备用。

2.2.4. 改良碱裂解法

取 2.2.1 收集的菌种沉淀, 加入 200 μL 溶液 1 充分重悬后加入 20 μL 溶菌酶溶液(20 mg/mL)充分吹打完全重悬后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱孵育过夜, 次日加 20 μL 蛋白酶 K 溶液于 55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min, 后加 300 μL 溶液 2 (现配现用), 上下颠倒 5~10 次, 静置 5 min, 充分混匀, 加入 300 μL 预冷溶液 3, 上下颠倒 5~10 次充分混匀(可见大量白色絮状沉淀), 置冰上 5 min 后 12,000 r/min 离心 10 min, 取上清 600 μL , 加入等体积的酚: 氯仿: 异戊醇, 剧烈震荡 30 s 后 12000 r/min 离心 10 min, 小心吸取上清至一新的 Ep 管内, 加入 0.7 倍体积异丙醇, 颠倒混匀后在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 放置 1~4 h, 12000 r/min 离心 10 min 后弃尽上清, 用 1 mL 70%乙醇洗涤沉淀 2 次, 弃尽上清放置空气中自然晾干, 于白色沉淀中加入 50 μL 灭菌双蒸水, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存备用。

2.2.5. 煮沸法

取 2.2.1 收集的菌种沉淀, 加 200 μL 灭菌双蒸水充分吹打重悬混匀, 于沸水中煮沸 10 min, 以 12,000 r/min 离心 10 min 收集上清液, 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存备用。

2.2.6. PCR 法检测 *spa* 基因、*mecA* 基因和 *femB* 基因

PCR 反应体系中含有 2 \times Taq Master Mix 预混液 12.5 μL , 上下游引物各 0.5 μL , DNA 模板 2 μL , 以灭菌双蒸水补足体系至 25 μL 。反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, *spa* 基因 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min; *mecA* 基因 51 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min; *femB* 基因 57 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 35 个循环, 最终 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 反应结束后, 以 1.2% 琼脂糖电泳检测 PCR 产物。

3. 结果

3.1. *spa* 基因检测结果

如图 1(a)和图 1(b)所示, 以磁珠法和吸附柱法制备的 DNA 模板中 *spa* 基因可以全部被检出; 如图 1(c)

所示, 改良碱裂解法制备的 DNA 模板中可以检出 19 株菌的 *spa* 基因, 仅 1 株菌未检出; 如图 1(d) 所示, 煮沸法制备的 DNA 模板中, 仅检出 7 株菌 *spa* 基因。

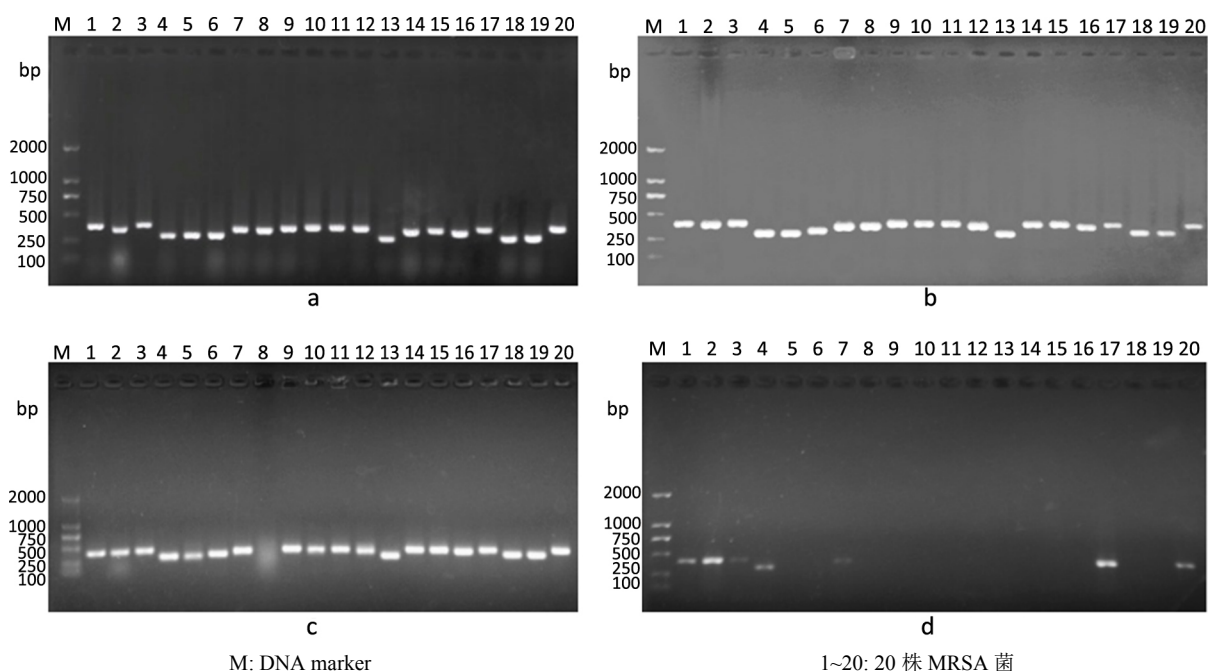


Figure 1. *Staphylococcus aureus spa* gene detection results in DNA templates prepared by four methods; (a) Magnetic bead method; (b) Adsorption column method; (c) Modified alkali lysis; (d) Boiling method

图 1. 4 种方法制备的 DNA 模板中金黄色葡萄球菌 *spa* 基因检测结果; (a) 磁珠法; (b) 吸附柱法; (c) 改良碱裂解法; (d) 煮沸法

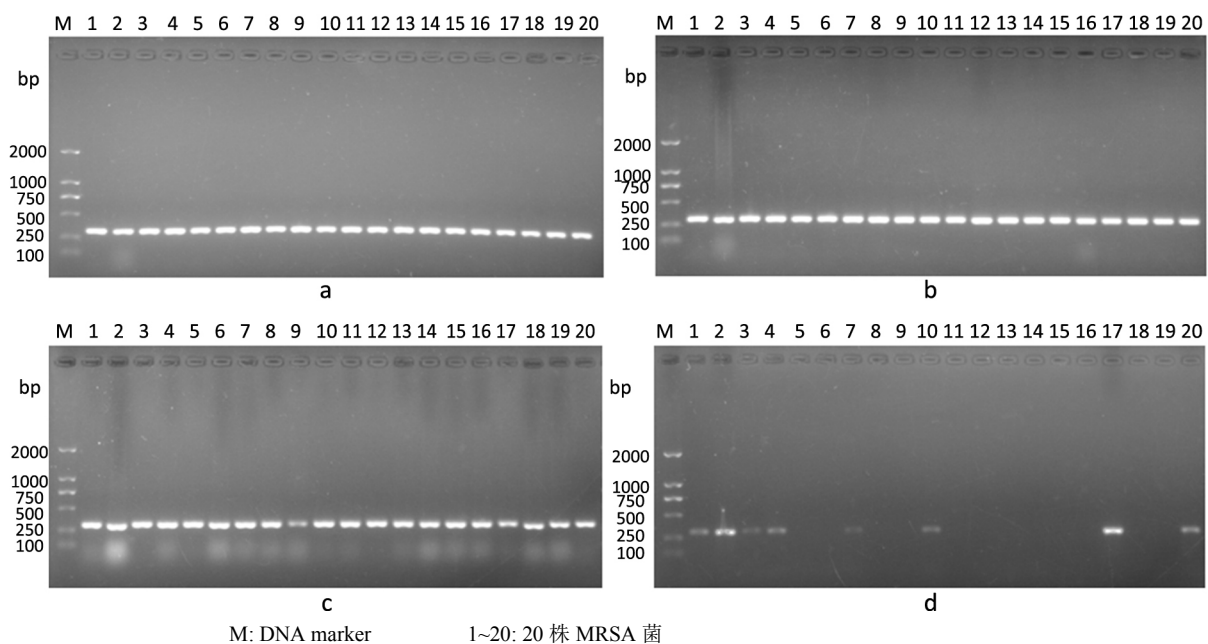


Figure 2. Detection results of *Staphylococcus aureus mecA* gene in DNA template prepared by four methods; (a) Magnetic bead method; (b) Adsorption column method; (c) Modified alkali lysis; (d) Boiling method

图 2. 4 种方法制备的 DNA 模板中金黄色葡萄球菌 *mecA* 基因检测结果; (a) 磁珠法; (b) 吸附柱法; (c) 改良碱裂解法; (d) 煮沸法

3.2. *mecA* 基因检测结果

如图 2(a)~图 2(c)所示, 以磁珠法、吸附柱法和改良碱裂解法制备的 DNA 模板中均可以检出 *mecA* 基因; 如图 2(d)所示, 煮沸法制备的 DNA 模板仅能检出 8 株菌的 *mecA* 基因。

3.3. *femB* 基因检测结果

如图 3(a)所示, 以磁珠法制备的 DNA 模板中均可以检出 *femB* 基因; 如图 3(b)~图 3(c)所示, 以吸附柱法和改良碱裂解法制备的 DNA 模板中有 19 株菌 *femB* 基因均可被检出; 如图 3(d)所示, 以煮沸法制备的 DNA 模板均未扩增出 *femB* 基因。

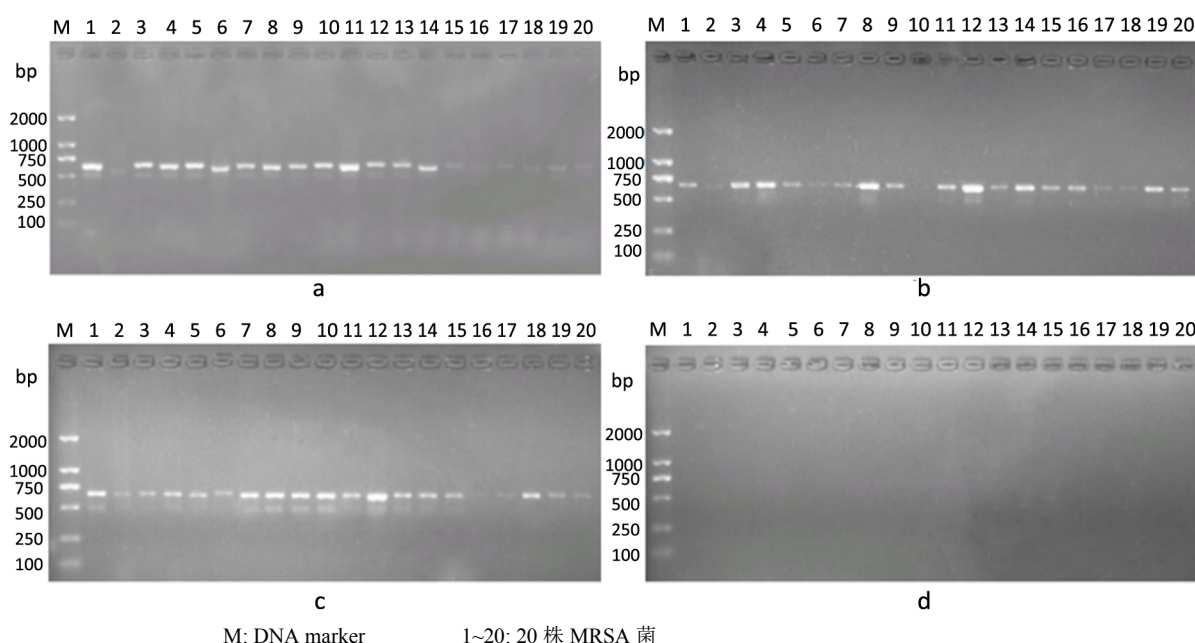


Figure 3. Detection results of *Staphylococcus aureus femB* gene in DNA template prepared by four methods; (a) Magnetic bead method; (b) Adsorption column method; (c) Modified alkali lysis; (d) Boiling method

图 3. 4 种方法制备的 DNA 模板中金黄色葡萄球菌 *femB* 基因检测结果; (a) 磁珠法; (b) 吸附柱法; (c) 改良碱裂解法; (d) 煮沸法

4. 讨论

金黄色葡萄球菌具有坚固的细胞壁, 其基因组 DNA 提取难度远大于其他细菌[17]。本研究比较了目前常用的 4 种基因组 DNA 提取方法效果发现, 磁珠法、吸附柱法和手工碱裂解法均具有较好的提取效果, 而煮沸法提取效果较差。

磁珠法的提取时间是 3 种方法中(磁珠法、吸附柱法和手工碱裂解法)最短的。磁珠法采用包裹有氧化硅的磁性纳米粒子[18], 粒径约为 20 nm, 利用氧化硅在高盐、低 pH 值条件下能吸附生物核酸, 而在低盐、高 pH 值条件下释放核酸的特性, 结合外部磁场实现从生物样本中分离核酸的目的[19]。在外加磁场作用下将负载核酸的磁珠从样品中分离洗脱, 加入适当溶液使核酸脱离磁珠可得到纯化的核酸[20]。磁珠法可以省去离心过滤等费时步骤, 操作简便且不使用氯仿和异丙醇有毒试剂; 磁珠与 DNA 的特异性结合保证了提取质量, 十分适合后续分子生物学研究[21]。目前已有基于磁珠法的基因组 DNA 自动化提取仪, 极大地方便了临床中开展金黄色葡萄球菌的检测工作。

吸附柱法采用特异性结合 DNA 的离心吸附柱和独特的缓冲液系统提取细菌的基因组 DNA [22], 其

硅基质材料为特有新型材料,能够高效专一吸附 DNA,避免蛋白质、酯类以及多糖等生物大分子的污染,提取的基因组 DNA 片段大,纯度高,质量稳定可靠。手工碱裂解法破壁能力强[23],提取 DNA 质量相对煮沸法较好,虽然成本较低但是操作复杂用时过长约需 2 天,并且提取过程需要多种有毒试剂,对操作人员伤害较大并且不利于绿化环保,所提取 DNA 模版虽可用于实验研究,但是程序繁琐复杂无法完成大批量自动化提取。煮沸法虽然操作简便但是提取效果很差,不稳定性极高, DNA 模版质量很低无法用于后续研究,不推荐用于金黄色葡萄球菌的 DNA 提取。综上所述,我们可以根据实际需求选取最合适最恰当的方法。

基金项目

镇江市 2017 年度科技创新资金(重点研发计划 - 社会发展项目) SH2017024;江苏省 2018 年度预防医学科研课题 Y2018108;江苏省博士后科研基金资助项目(1601002C);江苏大学大学生科研立项(18A482)。

参考文献

- [1] Pankratova, G., Hederstedt, L. and Gorton, L. (2019) Extracellular Electron Transfer Features of Gram-Positive Bacteria. *Analytica Chimica Acta*, **1076**, 32-47. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.05.007>
- [2] Tateda, K., Ohno, A., Ishii, Y., et al. (2019) Investigation of the Susceptibility Trends in Japan to Fluoroquinolones and Other Antimicrobial Agents in a Nationwide Collection of Clinical Isolates: A Longitudinal Analysis from 1994 to 2016. *Journal of Infection and Chemotherapy*, **25**, 594-604. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2019.03.008>
- [3] Monciardini, P., Bernasconi, A., Iorio, M., et al. (2019) Antibacterial Aromatic Polyketides Incorporating the Unusual Amino Acid Enduracididine. *Journal of Natural Products*, **82**, 35-44. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00354>
- [4] Gentile, A., Bakir, J., Ensinnck, G., et al. (2018) Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections: Hospitalization and Case Fatality Risk in 10 Pediatric Facilities in Argentina. *Archivos Argentinos de Pediatría*, **116**, E47-E53. <https://doi.org/10.5546/aap.2018.eng.e47>
- [5] Amirsoleimani, A., Brion, G.M., Diene, S.M., et al. (2019) Prevalence and Characterization of *Staphylococcus aureus* in Wastewater Treatment Plants by Whole Genomic Sequencing. *Water Research*, **158**, 193-202. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.04.035>
- [6] Belbekhouche, S., Bousserhine, N., Alphonse, V., et al. (2019) From Beta-Cyclodextrin Polyelectrolyte to Layer-by-Layer Self-Assembly Microcapsules: From Inhibition of Bacterial Growth to Bactericidal Effect. *Food Hydrocolloid*, **95**, 219-227. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.04.037>
- [7] Chauhan, J., Kwasny, S.M., Fletcher, S., et al. (2019) Optimization of a Small-Molecule Lipid II Binder. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **29**, 1849-1853. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.04.046>
- [8] 田小兰, 冯俊丽, 汪艺. 一种快速高效的 DNA 提取方法及其在 qPCR 检测金黄色葡萄球菌中的应用[J]. 食品科技, 2019(2): 344-350.
- [9] Du, M.H., Li, J.W., Zhao, R.X., et al. (2018) Effective Pre-Treatment Technique Based on Immune-Magnetic Separation for Rapid Detection of Trace Levels of Salmonella in Milk. *Food Control*, **91**, 92-99. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.03.032>
- [10] Minarovicova, J., Cabicarova, T., Kaclikova, E., et al. (2018) Culture-Independent Quantification of Pathogenic Bacteria in Spices and Herbs Using Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Food Control*, **83**, 85-89. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.025>
- [11] Ernst, C., Bartel, A., Elferink, J.W., et al. (2019) Improved DNA Extraction and Purification with Magnetic Nanoparticles for the Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Veterinary Microbiology*, **230**, 45-48. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.01.009>
- [12] Umesha, S. and Manukumar, H.M. (2018) Advanced Molecular Diagnostic Techniques for Detection of Food-Borne Pathogens: Current Applications and Future Challenges. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **58**, 84-104. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1126701>
- [13] Li, J., Li, X.L., Shi, X.J., et al. (2019) A Designed Experiment: Polymorphism Analysis of Angiotensin-Converting Enzyme Gene from Human Buccal Epithelial Cells. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, **47**, 168-174. <https://doi.org/10.1002/bmb.21215>
- [14] 刘晔华, 陈锦艳, 江雁, 等. 磁珠法提取金黄色葡萄球菌基因组 DNA 的评价[C]//第七届中国临床微生物学大会暨微生物学与免疫学论坛. 2016: 1.

- [15] 李克诚, 李琼, 夏菲, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 *spa* 基因分型[J]. 疾病监测, 2012, 27(11): 877-880.
- [16] 黄辉, 陈颖, 安如俊, 等. MRSA 中 *mecA* 及 *femB* 基因的检测与耐药相关性[J]. 微生物学杂志, 2009, 29(3): 54-56.
- [17] Nasser, A., Moradi, M., Jazireian, P., et al. (2019) *Staphylococcus aureus* versus Neutrophil: Scrutiny of Ancient Combat. *Microbial Pathogenesis*, **131**, 259-269. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.04.026>
- [18] Zhang, J., Zhu, M.S., Yang, Y.J., et al. (2018) Extraction of Genomic DNA via Superparamagnetic Fe₃O₄ Magnetic Colloidal Nanocrystal Clusters. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, **18**, 8105-8110. <https://doi.org/10.1166/jnn.2018.16399>
- [19] Meng, X.Y., Yang, G.T., Li, F.L., et al. (2017) Sensitive Detection of *Staphylococcus aureus* with Vancomycin-Conjugated Magnetic Beads as Enrichment Carriers Combined with Flow Cytometry. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **9**, 21464-21472. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b05479>
- [20] Zhang, H.L., Huang, F.C., Cai, G.Z., et al. (2018) Rapid and Sensitive Detection of *Escherichia coli* O157:H7 Using Coaxial Channel-Based DNA Extraction and Microfluidic PCR. *Journal of Dairy Science*, **101**, 9736-9746. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14730>
- [21] Luo, J., Yu, J.P., Yang, H., et al. (2018) Parallel Susceptibility Testing of Bacteria through Culture-Quantitative PCR in 96-Well Plates. *International Journal of Infectious Diseases*, **70**, 86-92. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.03.014>
- [22] Wang, J., Shen, H.J., Huang, C., et al. (2017) Highly Efficient and Multidimensional Extraction of Targets from Complex Matrices Using Aptamer-Driven Recognition. *Nano Research*, **10**, 145-156. <https://doi.org/10.1007/s12274-016-1273-9>
- [23] 李佳, 李亚娟, 胡俊菁, 等. 奶牛乳房炎主要致病菌 DNA 不同提取方法的比较[J]. 中国兽医杂志, 2017(2): 40-41.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网首页: <http://cnki.net/>, 点击页面中“外文资源总库 CNKI SCHOLAR”, 跳转至: <http://scholar.cnki.net/new>, 搜索框内直接输入文章标题, 即可查询;
或点击“高级检索”, 下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2161-8976, 即可查询。
2. 通过知网首页 <http://cnki.net/> 顶部“旧版入口”进入知网旧版: <http://www.cnki.net/old/>, 左侧选择“国际文献总库”进入, 搜索框直接输入文章标题, 即可查询。

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: hjbm@hanspub.org