DOI:10.12441/spyswjs.20230423001 [文章编号] 1673-1689(2024)10-0044-10

壳聚糖改性凹凸棒土对食源性致病菌核酸提取效果的影响

王莫凡[1] 彭颖静[2] 李 鹏[3] 成玉梁[1] 于 航[1] 谢云飞[1] 姚卫蓉[1] 郭亚辉[1*]

(1. 江南大学食品学院,江苏 无锡,214122; 2. 苏州海狸生物医学工程有限公司,江苏 苏州,215000;3. 中国矿业大学环境与测绘学院,江苏 徐州,221008)

摘要:利用壳聚糖对凹凸棒土(attapulgite,ATP)进行表面改性,考察改性对ATP吸附性能的影响,并建立基于壳聚糖-ATP的DNA提取方法,以实现食源性致病菌基因组DNA的低成本、高效提取。利用X射线衍射光谱等手段对材料进行表征,并利用吸附动力学模型和吸附等温模型考察改性材料对DNA的吸附机制。以3种食源性致病菌基因组DNA为提取对象,考察提取量、纯度、完整性和提取方法的可靠性。结果表明,准一级动力学模型和Freundlich模型能更好地模拟吸附结果,壳聚糖改性可显著提高ATP的吸附性能,壳聚糖-ATP对DNA饱和吸附量为23.648 μg/mg,提取的基因组DNA完整性好、纯度高,且提取方法的重复性好。

关键词:食源性致病菌;凹凸棒土;核酸提取;改性

Extraction Effect of Chitosan Modified Attapulgite on Nucleic Acid of Foodborne Pathogenic Bacteria

WANG Mofan[1] *PENG Yingjing*[2] *LI Peng*[3] *CHENG Yuliang*[1] *YU Hang*[1] *XIE Yunfei*[1] *YAO Weirong*[1] *GUO Yahui*[1*]

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Suzhou Beaver Biomedical Engineering Co., Ltd., Suzhou 215000, China; 3. School of Environment and Spatial Informatics, China University of Mining and Technology, Xuzhou 221008, China)

Abstract: Surface modification of attapulgite (ATP) using chitosan was conducted to investigate the improvements in the adsorption performance of ATP, and a DNA extraction method based on chitosan-modified ATP was established to achieve low-cost and high-efficiency extraction of genomic DNA from foodborne pathogens. The material was characterized by X-ray diffraction spectroscopy and other techniques, while adsorption kinetics and adsorption isotherm models were used to investigate the adsorption mechanism of modified materials on DNA. Genomic DNA of three foodborne pathogenic bacteria was selected for extraction to investigate the extraction yield, purity, integrity, and stability. The results showed that the experimental data were well-described by the pseudo-first-order kinetic model and Freundlich model. Chitosan modification can significantly improve the adsorption performance of ATP. The saturation adsorption capacity of chitosan-ATP for herring sperm DNA achieved 23.648 μg/mg with high-quality and high-purity, and the chitosan-ATP based extraction method also showed good repeatability.

基金项目:国家“十四五”重点研发计划项目(2022YFF1303305);江苏省自然科学基金项目(BK20210519);中国博士后面上项目(2022M723386);淮安市科技计划项目(HAB202378)。

通信作者:郭亚辉(1988—),男,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事食品安全快速检测方法和食品质量控制研究。E-mail:guoyahui@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2023-04-23 **修回日期:**2023-06-22

Keywords: foodborne pathogenic bacteria; attapulgite; nucleic acid extraction; modification

食源性致病菌的快速、灵敏、低成本检测是防控食源性致病菌污染的关键[1-2]。核酸分析如聚合酶链式反应[3-5]和等温核酸扩增技术[6-8]等，因特异性好、快速、灵敏性高等特点已被广泛应用于食源性致病菌的检测[9]。而核酸提取作为分析检测中的重要环节，其提取效率和效果对后续结果有直接影响[10-11]。目前，商业上常用的固相提取法，如柱提法和磁珠法分别存在操作烦琐和一次性使用成本高的问题。因此，目前急需开发一种低成本、高效的核酸提取材料与方法。

ATP是一种层链状含水富镁硅酸盐[12]，其特殊的晶体通道结构和优异的吸附性能已得到广泛应用[13-17]，且ATP在中国来源广泛、成本低[18]，可以在工业中进行低成本、高效率的批量生产[19]。为了充分发挥ATP的吸附和载体性能，通常需要对ATP进行提纯预处理和改性处理，以优化其物理化学性质[20-22]，如利用酸进行预处理可溶解天然ATP晶体结构中存在的镁盐、钙盐等可溶性杂质[23]。壳聚糖作为一种功能性生物材料，具有良好的生物相容性、生物降解性和较高的核酸吸附能力，但因其在水中难以与其他水溶液分离而存在应用局限性[24]。利用壳聚糖进行改性有望增加ATP表面的功能基团，增大材料对DNA的吸附容量，实现核酸的低成本、高效提取。

利用HCl对ATP进行预处理，采用壳聚糖对ATP进行改性，建立基于壳聚糖-ATP的DNA提取方法。以鱼精DNA为研究对象，考察改性对ATP吸附性能的影响，并利用吸附动力学模型和吸附等温模型考察壳聚糖-ATP对DNA的吸附作用机制。以典型革兰氏阳性菌（金黄色葡萄球菌）和革兰氏阴性菌（大肠杆菌、沙门氏菌）的基因组DNA为提取对象，考察提取的产量、纯度和提取方法的可靠性。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

ATP（过325目筛）：江苏省盱眙欧百特公司；鱼精DNA、三聚磷酸钠（sodium tripolyphosphate，STPP，纯度≥98.0%）、琼脂糖、柱式细菌基因组DNA抽提试剂盒（No. B518255 Ezup）、磁珠法细菌基因组DNA抽提试剂盒（No. B518725）：上海生物工程有限公司；无水乙醇、盐酸（分析纯）：国药集团化学试剂有限公司；冰醋酸（分析纯）、壳聚糖（脱乙酰度≥95%，黏度100~200 mPa·s）：上海阿拉丁试剂有限公司；无水醋酸钠（分析纯）：北京伊诺凯科技有限公司；超纯水使用Milli-Q A10过滤系统纯化；金黄色葡萄球菌ATCC6538、大肠杆菌ATCC25922、沙门氏菌ATCC14028：江南大学食品学院食品安全与质量控制研究中心保藏。

1.2 仪器与设备

加热磁力搅拌器：HWCL-1型，郑州长城科工贸有限公司；振荡恒温金属浴：TUS-200P型，上海一恒科学仪器有限公司；小型高速离心机：SS-5452型，德国Eppendorf公司；全自动化学发光图像分析系统：Tanon 5200型，上海天能生命科学有限公司；超微量分光光度计：K5500型，杭州瑞析科技有限公司；杀菌锅：LS-B50L型，上海医用核子仪器厂；X射线衍射仪（XRD）：D2 PHASER X型，德国布鲁克AXS有限公司；傅里叶变换红外光谱仪（FT-IR）：IS10型，美国Nicolet公司；场发射扫描电子显微镜（SEM）：Quanta 250 FEG型，美国FEI公司；纳米粒度及Zeta电位分析仪：Nano ZS型，英国马尔文公司；比表面积和孔径分析仪（BET）：ASAP2460 BET型，美国麦克默瑞提克仪器有限公司；电子分析天平：AB104-N型，梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司。

1.3 方法

1.3.1 HCl预处理ATP的制备

将10 g ATP粉末添加至100 mL质量分数为10%的HCl溶液中，并在70 ℃恒温水浴中磁力搅拌2 h，将产物离心分离后，利用超纯水洗涤至pH为6.0。将产物置于105 ℃烘箱中干燥12 h，获得HCl预处理的ATP粉末（HCl-ATP）。

1.3.2 壳聚糖改性凹凸棒土的制备

将2 g HCl-ATP和0.2 g壳聚糖添加至300 mL质量分数为1%的HCl溶液中，并在60 ℃恒温水浴中磁力搅拌24 h，逐滴加入1.25 mol/L NaOH直至

中和。将产物置于60 ℃烘箱中干燥，研磨后过325目筛，获得壳聚糖改性ATP粉末（壳聚糖-ATP）。

1.3.3 ATP结构的表征

使用XRD、FT-IR、Zeta电位分析仪、SEM、BET对改性前后的ATP结构进行表征。

1.3.4 DNA吸附试验

1）鱼精DNA的吸附方法：吸附试验采用批量振荡吸附平衡法。将10 μL壳聚糖-ATP悬浮液（30 mg/mL）与50 μL待吸附鱼精DNA溶液、10 μL缓冲溶液和30 μL超纯水混合，以1 000 r/min恒温振荡，随后以8 000 *g*离心3 min。使用超微量分光光度计测量上清液中DNA的质量浓度。DNA吸附量的计算方法见式（1）。

$$Q_e=(C_0-C_e)V_0/W_s \quad (1)$$

式中：

Q_e——吸附剂对DNA的平衡吸附量，μg/mg；

C_e——吸附达到平衡时，上清液中DNA的质量浓度，μg/mL；

C_0——溶液中DNA的初始质量浓度，μg/mL；

V_0——加入DNA溶液的体积，mL；

W_s——吸附剂投加量，mg。

2）壳聚糖-ATP对鱼精DNA的吸附体系优化：考察溶液初始pH为3.0~8.0时对吸附的影响；考察溶液中Na^+浓度为0~600 mmol/L时对吸附的影响；考察溶液中鱼精DNA的初始质量浓度为0~400 μg/mL时对吸附的影响；考察振荡吸附时间为0~60 min时对吸附的影响。

3）吸附动力学模型拟合：采用吸附动力学模型将不同时间下壳聚糖-ATP对DNA的吸附量进行数据拟合，依据R^2判断拟合效果。

准一级动力学模型方程见式（2）。

$$\ln(Q_e-Q_t)=\ln Q_e-K_1t \quad (2)$$

式中：

Q_e——吸附剂对DNA的平衡吸附量，μg/mg；

Q_t——吸附时间为t时，吸附剂对DNA的吸附量，μg/mg；

t——吸附时间，min；

K_1——速率常数，μg/（mg·min）。

准二级动力学模型方程见式（3）。

$$\frac{t}{Q_t}=\frac{1}{K_2Q_e^2}+\frac{t}{Q_e} \quad (3)$$

式中：

Q_e——吸附剂对DNA的平衡吸附量，μg/mg；

Q_t——吸附时间为t时，吸附剂对DNA的吸附量，μg/mg；

t——吸附时间，min；

K_2——速率常数，μg/（mg·min）。

4）等温吸附模型拟合：采用Langmuir和Freundlich等温吸附模型将不同初始DNA质量浓度下壳聚糖-ATP对DNA的吸附量进行数据拟合，依据R^2判断拟合效果。

Langmuir等温吸附模型方程见式（4）。

$$Q_e=\frac{Q_mK_LC_e}{1+K_LC_e} \quad (4)$$

式中：

Q_e——吸附剂对DNA的平衡吸附量，μg/mg；

C_e——吸附达到平衡时，上清液中DNA的质量浓度，μg/mL；

Q_m——吸附剂对DNA的饱和吸附量，μg/mg；

K_L——Langmuir吸附常数。

Freundlich等温吸附模型方程见式（5）。

$$Q_e=K_F\,C_e^{\frac{1}{n}} \quad (5)$$

式中：

Q_e——吸附剂对DNA的平衡吸附量，μg/mg；

C_e——吸附达到平衡时，上清液中DNA的质量浓度，μg/mL；

K_F——Freundlich吸附常数；

n——吸附等温系数。

1.3.5 鱼精DNA的解吸试验

利用质量分数为70%的乙醇洗涤沉淀，经离心晾干后，采用100 μL的洗脱液洗脱DNA，8 000 *g*离心1 min后，使用超微量分光光度计测量上清液中DNA的质量浓度。选取超纯水、TE缓冲液（Tris 10 mmol/L、EDTA 1 mmol/L，pH 8.0）和STPP对DNA进行洗脱，考察不同洗脱剂对改性前后DNA的洗脱效果。改性前后DNA在ATP上的解吸率计算方法见式（6）。

$$E=C_1\times V_1/m\times100\% \quad (6)$$

式中：

E——DNA的解吸率，%；

C_1——洗脱后上清液中DNA的质量浓度，ng/μL；

V_1——加入洗脱液的体积，μL；

m——DNA的吸附量，ng。

1.3.6　致病菌基因组DNA的提取

基于壳聚糖-ATP的核酸提取方法，以3种食源性致病菌基因组DNA为提取对象，评价提取产量、纯度、完整性和提取方法的可靠性。

1）菌体的收集与裂解：取0.5 mL细菌菌液（1×10^8 CFU/mL），参考《柱式细菌基因组DNA抽提试剂盒说明书》进行菌体的收集与裂解。

2）壳聚糖-ATP对食源性致病菌基因组DNA的吸附：将30 μL壳聚糖-ATP悬浮液（30 mg/mL）、400 μL待吸附溶液、70 μL缓冲液混合，并以1 000 r/min恒温振荡10 min，以8 000 g离心3 min。

3）壳聚糖-ATP对基因组DNA的解吸试验：方法同1.3.5。

4）壳聚糖-ATP提取基因组DNA的效果评价：使用超微量核酸定量仪分别测定基因组DNA质量浓度、A_{260}及A_{280}，计算产量和纯度（以A_{260}/A_{280}表征）。采用0.8 g/dL的琼脂糖进行凝胶电泳，检测基因组DNA完整性。

5）核酸提取方法的可靠性测试[25]：在批内差试验中，选择相同批次制备的壳聚糖-ATP，提取同一份食源性致病菌样本基因组DNA，在1 d内做10个平行；在批间差试验中，选择3个不同批次的壳聚糖-ATP，提取同一份食源性致病菌样本基因组DNA，共10个平行。计算核酸提取产量和纯度的平均值、标准差，标准差与平均值的比值即为批内差或批间差。

1.3.7　数据处理

使用Origin 2021进行数据分析和制图。每个样品至少做3个独立试验，数据以平均值±标准偏差显示。使用Dunnett's t检验法进行数据差异显著性分析。

2　结果与讨论

2.1　改性后ATP材料表征

改性前后材料的XRD结果见图1。将改性ATP与凹凸棒土（＃31-0783）、石英（＃85-0798）和白云石（＃36-0426）的XRD图谱进行对比，材料中的主要矿物质组成有凹凸棒土、石英和白云石。经HCl预处理后，白云石的峰型消失，表明HCl使白云石溶解，ATP得到纯化。HCl-ATP经壳聚糖改性后，结构未发生明显改变。

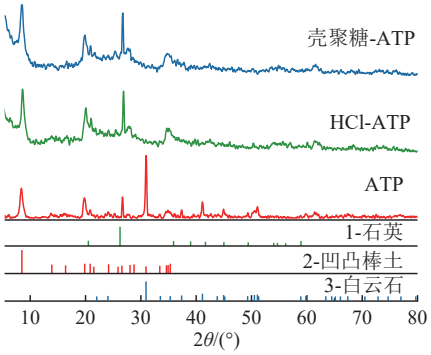


图1　改性前后材料的XRD图谱

Fig. 1　XRD spectra of materials before and after modification

改性前后材料的FT-IR结果见图2。未改性ATP的FT-IR图谱显示，在3 620 cm^{-1}和3 540 cm^{-1}处分别为Mg—OH和Al—OH的伸缩振动峰，3 410 cm^{-1}处为ATP内沸石水的伸缩振动峰；1 645 cm^{-1}处为有吸附水和结晶水的弯曲振动吸收峰；1 030 cm^{-1}处为单链内部四面体层间Si—O的非对称伸缩振动峰；790 cm^{-1}处为Si—O的弯曲振动峰[26]；1 448 cm^{-1}和730 cm^{-1}处为白云石的CO_3^{2-}特征峰。经HCl预处理后，仍然显示出ATP的特征吸收峰，而在1 448 cm^{-1}和730 cm^{-1}处白云石的CO_3^{2-}特征峰均消失，表明材料经HCl预处理后得到纯化，而结构未被破坏，ATP的基本骨架仍然保存完好。经壳聚糖改性后，与HCl-ATP相比，壳聚糖-ATP在3 620、3 540、3 410 cm^{-1}处的峰变弱，但在3 600~3 200 cm^{-1}处的吸附带变宽，这是由于ATP的Si—OH与壳聚糖的—OH和—NH_2之间发生氢键相互作用[27]；2 922 cm^{-1}处的新峰表示脂肪族C—H的拉伸振动，这表明壳聚糖已成功在HCl-ATP上固定[23]。

改性前后材料的Zeta电位结果见图3。在pH为1.0~6.0时，ATP表面均带负电荷。黏土矿物表面由于同构取代而带有负电荷，但表面的边缘断键水解产生的电荷为可变电荷，与pH有关。经HCl预处理和壳聚糖改性后，材料的电负性均发

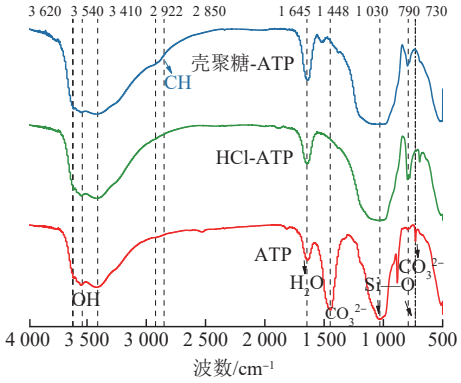


图 2 改性前后材料的 FT-IR 图谱

Fig. 2 FT-IR spectra of materials before and after modification

生改变。HCl 预处理使 ATP 结构中的 Ca^{2+}、Mg^{2+} 溶出，导致 ATP 的负电荷增加，使 HCl-ATP 电负性增加。而与 HCl-ATP 相比，壳聚糖-ATP 的电负性明显降低，这可能是由于壳聚糖的氨基经质子化产生正电基团，导致壳聚糖-ATP 表面负电荷基团减少，使其电荷为零点时，pH 为 6.0。

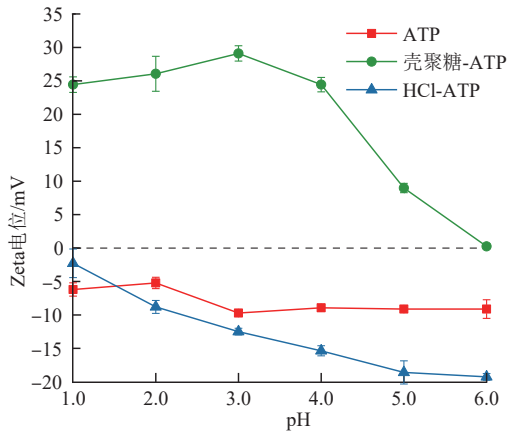


图 3 改性前后材料的 Zeta 电位

Fig. 3 Zeta potential of materials before and after modification

改性前后材料的 SEM 结果见图 4。未改性 ATP 由平均直径为 50 nm，长度为 200~300 nm 的纳米棒相互缠结并聚集而成；经 HCl 预处理后，ATP 晶束解体至疏松，结构间隙增大，ATP 得到纯化，但其基本骨架仍然保存完好；HCl-ATP 经壳聚糖改性后，棒状晶体变得短而粗，且相对平滑。

2.2 吸附性能的条件优化结果

吸附体系的 pH 对 DNA 吸附的影响见图 5。随着 pH 增加，DNA 在壳聚糖-ATP 表面的吸附率逐渐降低，考虑低 pH 下会使 DNA 不稳定，故选取

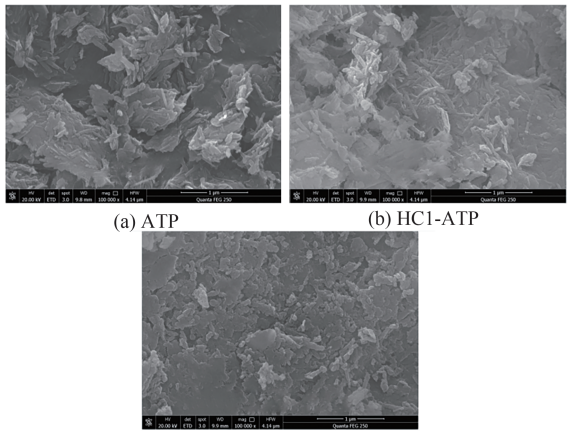


图 4 改性前后材料的 SEM 图

Fig. 4 SEM image of materials before and after modification

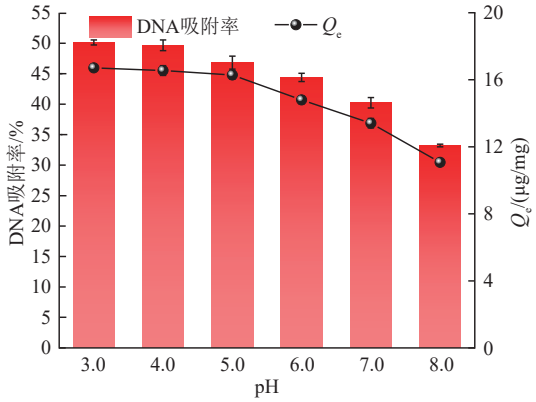


图 5 pH 对 DNA 吸附的影响

Fig. 5 Effect of pH on DNA adsorption

吸附体系的最适 pH 为 5.0。

吸附体系的 Na^+ 浓度对 DNA 吸附的影响见图 6。随着 Na^+ 浓度从 0 增加到 80 mmol/L，壳聚糖-ATP 对 DNA 的吸附率达到最大并保持稳定，

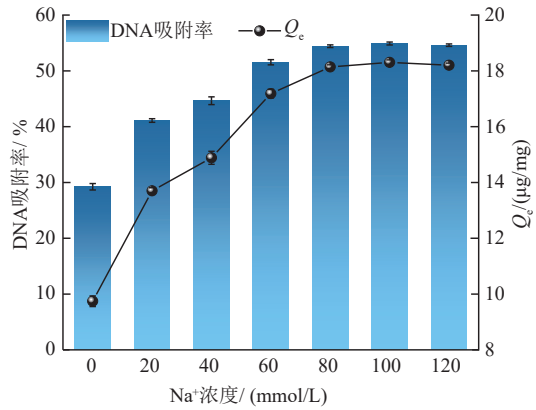


图 6 Na^+ 浓度对 DNA 吸附的影响

Fig. 6 Effect of Na^+ concentration on DNA adsorption

选取吸附体系的最适Na^+浓度为80 mmol/L。

2.3　吸附动力学分析

振荡吸附时间对吸附的影响及吸附动力学拟合曲线如图7所示。在0~60 min，DNA在10 min内被ATP和壳聚糖-ATP迅速吸附，并逐渐趋向平衡，故选择10 min为反应时间。

吸附动力学拟合参数如表1所示。比较两种模型的R^2，确定准一级动力学模型为最佳拟合模型。平衡吸附量的试验值与准一级动力学模型的理论值吻合性较好，拟合得到ATP和壳聚糖-ATP对DNA的饱和吸附量分别为18.897 μg/mg和23.648 μg/mg，表明壳聚糖改性方式使ATP的吸附性能显著提高，且优于已报道的锂改性蒙脱石对DNA的吸附容量（8~10 μg/mg）[28]。

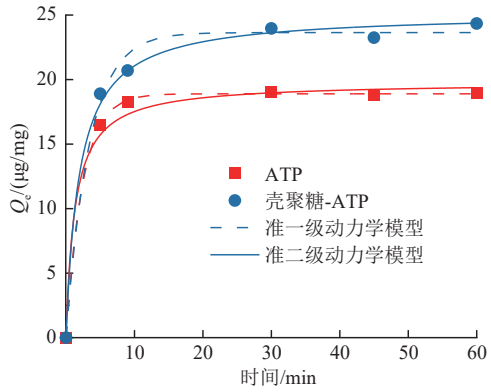


图7　DNA在改性前后ATP上的吸附动力学曲线

Fig. 7　Adsorption kinetics curve of DNA on ATP before and after modification

表1　吸附动力学拟合参数

Table 1　Fitting parameters of adsorption kinetics

吸附剂	准一级动力学模型			准二级动力学模型		
	R^2	K_1/(μg/(mg·min))	Q_m/(μg/mg)	R^2	K_2/(μg/(mg·min))	Q_m/(μg/mg)
ATP	0.999	0.408	18.897	0.945	0.039	19.796
壳聚糖-ATP	0.992	0.294	23.648	0.954	0.020	25.168

2.4　吸附等温线分析

比较2种模型的R^2，确定ATP和壳聚糖-ATP对DNA的吸附等温线均更符合Freundlich模型，且验证表明吸附体系下材料对DNA的吸附不是均匀的单层吸附[29]。如图8所示，与未改性ATP相比，壳聚糖-ATP对DNA的平衡吸附量显著提高。如表2所示，壳聚糖-ATP的饱和吸附量、K_L、K_F和n值更大，显示出更强的吸附能力。

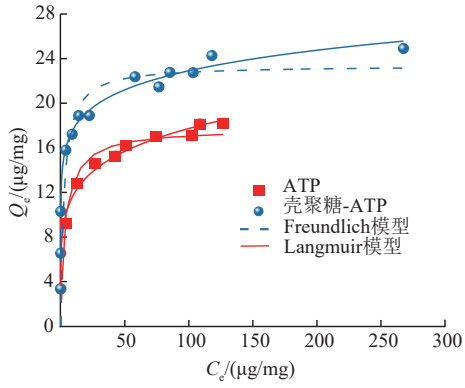


图8　DNA在改性前后ATP上的吸附等温曲线

Fig. 8　Adsorption isotherm curve of DNA on ATP before and after modification

表2　吸附等温线拟合参数

Table 2　Fitting parameters of adsorption isotherm

吸附剂	Langmuir模型			Freundlich模型		
	R^2	K_L	Q_m/(μg/mg)	R^2	K_F	n
ATP	0.906	0.256	17.726	0.990	7.845	5.646
壳聚糖-ATP	0.671	0.375	23.387	0.970	13.695	8.950

2.5　解吸试验结果

超纯水、TE缓冲液和STPP对改性前后ATP上DNA的洗脱效果见图9。STPP对DNA的解吸效果显著优于TE缓冲液和超纯水。

对STPP洗脱剂的浓度优化结果见图10。在15~40 mmol/L时，STPP对ATP和壳聚糖-ATP上的DNA最适解吸浓度均为25 mmol/L，解吸率可达（95.80±0.44）%和（95.77±0.60）%。据报道，包被二氧化硅的磁珠对DNA的解吸率为（93.00±3.10）%，表明与磁珠相比，壳聚糖-ATP上的DNA易解吸[30]。

考察改性前后ATP上DNA的解吸平衡时间如图11所示。以25 mmol/L的STPP为洗脱剂，DNA在1 min内可实现迅速解吸，解吸率达90%

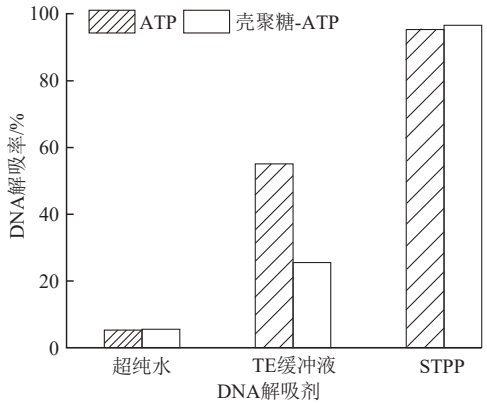


图 9　解吸剂对 DNA 的解吸效果

Fig. 9　Desorption effect of desorption agent on DNA

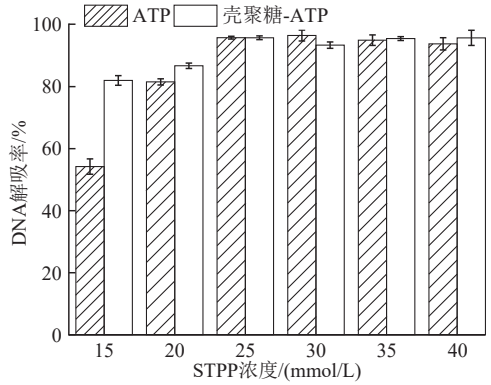


图 10　解吸剂对 DNA 的解吸效果

Fig. 10　Desorption effect of desorption agent on DNA

以上。磁珠上 DNA 的解吸时间通常在 1~10 min[30-32]，表明 ATP 和壳聚糖-ATP 上的 DNA 解吸速度同样较快。

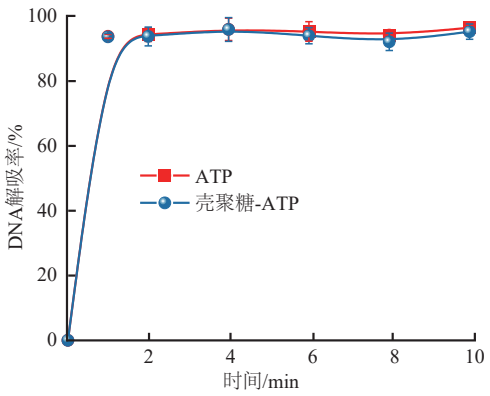
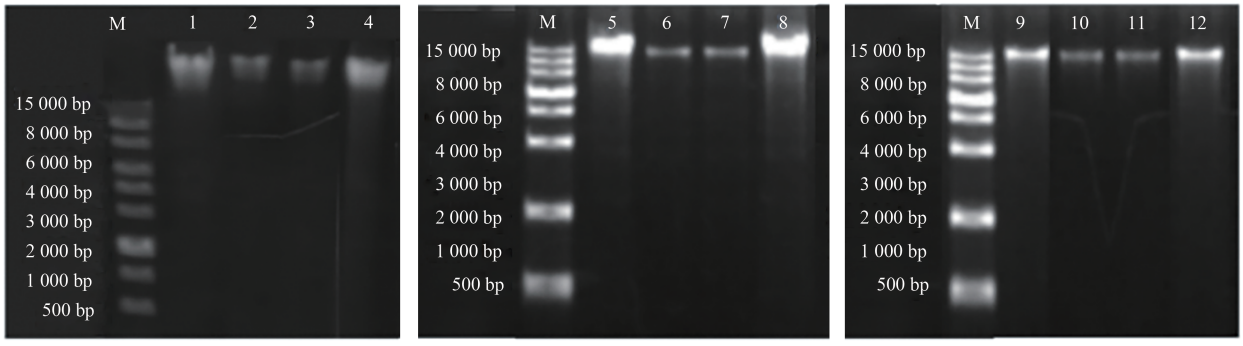


图 11　DNA 解吸平衡时间

Fig. 11　Desorption equilibrium time of DNA

2.6　壳聚糖-ATP 在食源性致病菌核酸提取中的应用

以 3 种食源性致病菌（金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和沙门氏菌）的基因组 DNA 为提取对象，考察壳聚糖-ATP 与 2 种商业试剂盒对细菌样品的 DNA 提取效果。产物电泳结果如图 12 所示，提取得到的金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和沙门氏菌基因组 DNA 长度均大于 15 000 bp，且为单一明亮条带，表明提取的基因组 DNA 均具有较好的完整性。



M—DNA marker; 1—磁珠法; 2—柱提法; 3—ATP法; 4—壳聚糖-ATP。

(a) 金黄色葡萄球菌基因组DNA

M—DNA marker; 5—磁珠法; 6—柱提法; 7—ATP法; 8—壳聚糖-ATP法。

(b) 大肠杆菌基因组DNA

M—DNA marker; 9—磁珠法; 10—柱提法; 11—ATP法; 12—壳聚糖-ATP法。

(c) 沙门氏菌基因组DNA

图 12　基因组 DNA 提取电泳图

Fig. 12　Electrophoretic diagram of genomic DNA extracted

不同方法提取基因组 DNA 的产量和纯度（A_{260}/A_{280}）如表 3 所示，并对基因组 DNA 产量进行差异显著性分析。与柱提法相比，ATP 法提取 3 种食源性致病菌基因组 DNA 的产量无显著性差异（$P>0.05$）；与磁珠法相比，ATP 法提取 3 种食源性致病菌基因组 DNA 的产量均较低。采用壳聚糖-ATP 法提取得到的大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的基因组 DNA 产量分别为

表3　不同方法提取基因组DNA的产量和纯度

Table 3　Yield and purity of genomic DNA extracted by different methods

方法	大肠杆菌		沙门氏菌		金黄色葡萄球菌	
	产量/(μg/mL)	A_{260}/A_{280}	产量/(μg/mL)	A_{260}/A_{280}	产量/(μg/mL)	A_{260}/A_{280}
柱提法	7.86±1.58[a]	1.76±0.06	8.02±0.42[a]	1.76±0.12	5.02±0.59[a]	1.74±0.14
磁珠法	16.81±0.64[b]	1.89±0.12	20.02±0.73[b]	1.80±0.25	19.80±1.65[b]	1.87±0.13
ATP法	7.21±1.12[a]	1.69±0.09	8.72±0.34[a]	1.69±0.05	4.74±0.20[a]	1.69±0.01
壳聚糖-ATP法	17.61±1.58[b]	1.81±0.06	19.18±1.40[b]	1.87±0.05	22.23±0.78[b]	1.86±0.02

注：同一列中不同上标字母表示数据具有显著性差异（P<0.05）。

（17.61±1.58）、（19.18±1.40）、（22.23±0.78）μg/mL，均高于柱提法，且在统计学上具有显著差异（P<0.05）；壳聚糖-ATP法与磁珠法提取的产量相近，无显著性差异（P>0.05）。

此外，ATP法提取3种食源性致病菌基因组DNA的A_{260}/A_{280}为1.69；壳聚糖-ATP法提取3种食源性致病菌基因组DNA的A_{260}/A_{280}为1.81~1.87，表明壳聚糖-ATP法提取的基因组DNA纯度较好。

批内差试验用于排除同一批次壳聚糖-ATP的差异因素；批间差试验则用于评估DNA分离纯化体系和壳聚糖-ATP制备体系的稳定性，排除不同批次壳聚糖-ATP的差异因素。批内差试验所得基因组DNA的产量及纯度（A_{260}/A_{280}）如表4所示，同一批次壳聚糖-ATP提取食源性致病菌基因组DNA产量的CV值为6.98%~9.16%；同一批次纯度的CV值为1.39%~2.72%。综上，壳聚糖-ATP提取基因组DNA的产量及纯度的CV值均小于10%，证明壳聚糖-ATP制备体系和基因组DNA提取纯化体系的重复性良好。

表4　壳聚糖-ATP的批内差试验（n=10）

Table 4　Intra batch difference experiment of chitosan-ATP（n=10）

样本	产量/(μg/mL)	产量CV值/%	A_{260}/A_{280}	纯度CV值/%
大肠杆菌	17.28±1.58	9.16	1.82±0.05	2.72
沙门氏菌	19.98±1.40	6.99	1.86±0.03	1.58
金黄色葡萄球菌	22.19±1.55	6.98	1.86±0.03	1.39

批间差试验所得基因组DNA的产量及纯度（A_{260}/A_{280}）如表5所示，不同批次壳聚糖-ATP提取3种食源性致病菌基因组DNA产量的CV值为7.76%~9.90%，纯度的CV值为1.75%~2.17%。壳聚糖-ATP提取基因组DNA的产量及纯度的CV值均小于10%，证明壳聚糖-ATP制备体系和基因组DNA提取纯化体系的批间差异较小。

表5　壳聚糖-ATP的批间差试验（n=3）

Table 5　Inter batch difference experiment of chitosan-ATP（n=3）

样本	产量/(μg/mL)	产量CV值/%	A_{260}/A_{280}	纯度CV值/%
大肠杆菌	16.49±1.28	7.76	1.81±0.04	2.07
沙门氏菌	18.25±1.61	8.86	1.78±0.03	1.75
金黄色葡萄球菌	21.21±2.10	9.90	1.84±0.04	2.17

3　结论

利用HCl对ATP进行预处理，随后利用壳聚糖进行改性，结果表明壳聚糖可成功修饰在HCl-ATP表面。建立了基于壳聚糖-ATP的DNA提取方法。经吸附动力学分析，准一级动力学模型和Freundlich模型为最佳拟合模型，壳聚糖-ATP对鱼精DNA的饱和吸附量为23.648 μg/mg，且在1 min内可实现迅速解吸。将壳聚糖-ATP应用于金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和沙门氏菌基因组DNA的提取，可获得完整性好、纯度高、产量较高的基因组DNA，且产量及纯度的批内差和批间差的CV值均小于10%，表明壳聚糖-ATP制备体系和基因组DNA提取纯化体系的重复性良好。壳聚糖-ATP可显著提高ATP的吸附性能，基于壳聚糖改性ATP建立的提取方法可实现对细菌样品基因组DNA的高效提取。未来可对菌体的收集和裂解进行系统性优化，并对壳聚糖-ATP开展食品基质样品的基因组DNA提取效果研究。此外，应探究更多的产品形式，加速相关产品的落地和推广。

参考文献

[1] LIAO X Y, ZHANG Y, ZHANG Q Y, et al. Advancing point-of-care microbial pathogens detection by material-functionalized microfluidic systems[J]. Trends in Food Science & Technology, 2023, 135: 115-130.

[2] 吴晨璐,施春雷,周敏,等. 食源性肠球菌荧光定量PCR检测方法的建立与评价[J]. 食品与生物技术学报, 2011,30(5):779-787.
WU C L, SHI C L, ZHOU M, et al. Development and evaluation of a real-time PCR system for *Enterococcus* spp. detection in food samples[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2011, 30(5): 779-787.(in Chinese)

[3] PANCZA B, SZATHMÁRY M, GYURJÁN I, et al. A rapid and efficient DNA isolation method for qPCR-based detection of pathogenic and spoilage bacteria in milk[J]. Food Control, 2021, 130: 108236.

[4] TÓTH I, BAGYINSZKY E, SVÁB D. Multiplex polymerase chain reaction typing scheme based on *Escherichia coli* O157: H7 Sakai prophage (Sp)-associated genes[J]. International Journal of Infectious Diseases, 2022, 120: 68-76.

[5] 徐晓可,吴清平,张菊梅,等. 食品中金黄色葡萄球菌多重PCR检测方法的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2011,30(1):84-89.
XU X K, WU Q P, ZHANG J M, et al. Studies on detection of *Staphylococus aureus* in foods by multiplex PCR[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2011, 30(1): 84-89.(in Chinese)

[6] GIRISH P S, BARBUDDHE S B, KUMARI A, et al. Rapid detection of pork using alkaline lysis- Loop Mediated Isothermal Amplification (AL-LAMP) technique[J]. Food Control, 2020, 110: 107015.

[7] CHEN J H, LIU J H, WU D, et al. CRISPR/Cas precisely regulated DNA-templated silver nanocluster fluorescence sensor for meat adulteration detection[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(44): 14296-14303.

[8] 王建昌,胡连霞,段永生,等. 副溶血性弧菌实时荧光单引物等温扩增方法的建立[J]. 食品与生物技术学报, 2016,35(11):1212-1218.
WANG J C, HU L X, DUAN Y S, et al. Real-time fluorescence single primer isothermal amplification established for the *Vibrio parahaemolyticus* detection[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2016, 35(11): 1212-1218.(in Chinese).

[9] WOLFF N, HENDLING M, SCHROEDER F, et al. Full pathogen characterisation: species identification including the detection of virulence factors and antibiotic resistance genes *via* multiplex DNA-assays[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 6001.

[10] XIA X H, YANG H, CAO J J, et al. Isothermal nucleic acid amplification for food safety analysis[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2022, 153: 116641.

[11] EMAUS M N, VARONA M, EITZMANN D R, et al. Nucleic acid extraction: fundamentals of sample preparation methodologies, current advancements, and future endeavors[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2020, 130: 115985.

[12] LI B, LI L W, ZHANG Q, et al. Attapulgite as natural catalyst for glucose isomerization to fructose in water[J]. Catalysis Communications, 2017, 99: 20-24.

[13] WANG T T, CHEN Y H, MA J F, et al. Attapulgite nanoparticles-modified monolithic column for hydrophilic in-tube solid-phase microextraction of cyromazine and melamine[J]. Analytical Chemistry, 2016, 88(3): 1535-1541.

[14] QUAN G X, SUI F F, WANG M, et al. Mechanochemical modification of biochar-attapulgite nanocomposites for cadmium removal: performance and mechanisms[J]. Biochemical Engineering Journal, 2022, 179: 108332.

[15] DONG L, WANG H, HUANG Y J, et al. Elemental mercury removal from coal-fired flue gas using recyclable magnetic Mn-Fe based attapulgite sorbent[J]. Chemical Engineering Journal, 2021, 407: 127182.

[16] XU C B, QI J, YANG W J, et al. Immobilization of heavy metals in vegetable-growing soils using nano zero-valent iron modified attapulgite clay[J]. Science of the Total Environment, 2019, 686: 476-483.

[17] 张群. 凹凸棒土在食品中的应用研究[J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31(7): 784.
ZHANG Q. Study on application of attapulgite in food[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2012, 31(7): 784.(in Chinese)

[18] YUAN B, YIN X Q, LIU X Q, et al. Enhanced hydrothermal stability and catalytic performance of HKUST-1 by incorporating carboxyl-functionalized attapulgite[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2016, 8(25): 16457-16464.

[19] WANG H, WANG X J, MA J X, et al. Removal of cadmium (II) from aqueous solution: a comparative study of raw attapulgite clay and a reusable waste-struvite/attapulgite obtained from nutrient-rich wastewater[J].

Journal of Hazardous Materials，2017，329：66-76.

[20] GUO X，HE C，SUN X，et al. Adsorption of phenol from aqueous solution by four types of modified attapulgites [J]. International Journal of Environmental Science and Technology，2019，16(2)：793-800.

[21] ZHANG Q H，CHU R，WEI Y Z，et al. A comparative study of Cd(Ⅱ) adsorption on calcined raw attapulgite and calcined aluminium hydroxide-modified attapulgites in aqueous solution[J]. RSC Advances，2022，12(22)：13695-13705.

[22] ZHANG T T，WANG W，ZHAO Y L，et al. Removal of heavy metals and dyes by clay-based adsorbents：from natural clays to 1D and 2D nano-composites[J]. Chemical Engineering Journal，2021，420：127574.

[23] DENG Y H，WU F，LIU B Z，et al. Sorptive removal of β-blocker propranolol from aqueous solution by modified attapulgite：effect factors and sorption mechanisms[J]. Chemical Engineering Journal，2011，174(2/3)：571-578.

[24] DENG Y H，WANG L，HU X B，et al. Highly efficient removal of tannic acid from aqueous solution by chitosan-coated attapulgite[J]. Chemical Engineering Journal，2012，181：300-306.

[25] 国家市场监督管理总局，国家标准化管理委员会. 核酸提取纯化试剂盒质量评价技术规范：GB/T 37875—2019[S]. 北京：中国标准出版社，2019.

[26] 宋功保，刘福生，曹永革，等. 坡缕石的红外光谱研究[J]. 岩石学报，1999，15(3)：469-474.

SONG G B，LIU F S，CAO Y G，et al. Infrared spectrum study of palygorskite[J]. Acta Petrologica Sinica，1999，15(3)：469-474.(in Chinese)

[27] MAGHSOODLOO S H，NOROOZI B，HAGHI A K，et al. Consequence of chitosan treating on the adsorption of humic acid by granular activated carbon[J]. Journal of Hazardous Materials，2011，191(1/2/3)：380-387.

[28] XIE H Y，WAN Z Q，LIU S，et al. Charge-dependent regulation in DNA adsorption on 2D clay minerals[J]. Scientific Reports，2019，9(1)：6808.

[29] AL-GHOUTI M A，DAANA D A. Guidelines for the use and interpretation of adsorption isotherm models：a review[J]. Journal of Hazardous Materials，2020，393：122383.

[30] SUN N，DENG C L，LIU Y，et al. Optimization of influencing factors of nucleic acid adsorption onto silica-coated magnetic particles：application to viral nucleic acid extraction from serum[J]. Journal of Chromatography A，2014，1325：31-39.

[31] YOON J G，KANG J S，HWANG S Y，et al. Magnetic bead-based nucleic acid purification kit：clinical application and performance evaluation in stool specimens[J]. Journal of Microbiological Methods，2016，124：62-68.

[32] JUE E，WITTERS D，ISMAGILOV R F. Two-phase wash to solve the ubiquitous contaminant-carryover problem in commercial nucleic-acid extraction kits[J]. Scientific Reports，2020，10(1)：1940.

（责任编辑：史润东东）