

УДК 576.8

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ КУЛЬТУР АЦИДОФИЛЬНЫХ ХЕМОЛИТОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

© 2011 г. С. В. Рогатых*, А. А. Докшукина**, Т. С. Хайнасова*, С. В. Мурадов*, И. А. Кофиади**

* Научно-исследовательский геотехнологический центр ДВО РАН, Петропавловск-Камчатский, 683002

** ЗАО «НПФ ДНК-Технология», Москва, 115478

e-mail: kofiadi@mail.ru

Поступила в редакцию 12.05.2010 г.

Проведена оценка эффективности нескольких методов очистки ДНК в отношении представителей накопительных культур сообщества ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов, выделенных из сульфидных руд месторождения Шануч (полуостров Камчатка). Протестированы методики очистки ДНК, использующие различные комбинации физических (нагревание до 65–98°C, перетирание с частицами SiO₂), ферментативных (обработка лизоцимом и протеиназой К) и химических (обработка GuSCN, СТАВ и КОН) воздействий на клетки. Оценку эффективности проводили с помощью ПЦР в реальном времени. Наилучший результат был получен для комбинированной методики, основанной на лизирующей активности GuSCN (лизис при 65°C) с последующей очисткой фенолом и хлороформом.

Ацидофильные хемолитотрофные микроорганизмы являются важным компонентом сообществ, выщелачивающих металлы из сульфидных медно-никелевых руд. Изучение структуры, экологии и филогении сообществ хемолитотрофных микроорганизмов позволяет по-новому взглянуть на некоторые фундаментальные и прикладные аспекты биогеохимии и биотехнологии. Одним из наиболее перспективных подходов к изучению микробиотических сообществ является анализ структуры ДНК микроорганизмов, входящих в их состав. Преимуществом технологий молекулярно-анализа перед классическими микробиологическими методами, основанными на культуральном анализе, является отсутствие искажений, обусловленных недостаточной разрешающей способностью последних [1].

Наиболее привлекательным с точки зрения практики является вопрос определения количественного соотношения различных микроорганизмов в сообществах, обладающих повышенной окислительной активностью. Решение этой задачи открывает новые возможности для создания максимально эффективных сообществ. Одним из наиболее перспективных методов количественного анализа микробиотических сообществ в настоящее время является полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени [2]. Этот метод хорошо зарекомендовал себя в самых различных областях науки в качестве надежного инструмента для специфического количественного анализа нуклеиновых кислот [3].

Достоверность молекулярно-биологических методов, используемых при анализе структуры сообществ микроорганизмов, зависит от качества препарата ДНК и репрезентативности смеси нуклеи-

новых кислот, полученных в результате очистки. Некоторые методы выделения ДНК могут вносить искажение в результат количественного анализа за счет неэффективного лизиса клеток, сорбции ДНК на частичках грунта, наличия в препарате ферментативных и других ингибиторов, а также потери ДНК или нарушения ее структуры. Кроме того, качество препарата оказывает влияние на эффективность анализа, основанного на методах прямого определения нуклеотидной последовательности (секвенирования) и клонирования, широко применяемых при изучении структуры сообществ [4].

Существует несколько способов физического воздействия на клетки с целью последующей очистки содержащихся в них нуклеиновых кислот. К самым распространенным из них относятся обработка ультразвуком, нагревание, перетирание и разрушение клеточной стенки методом замораживания/оттаивания [5–7]. Химические способы разрушения клеток основаны на лизирующей активности некоторых солей и детергентов [5]. И, наконец, к третьему распространенному способу воздействий относятся ферментативные подходы, использующие активность лизоцима и протеиназы К [5, 8]. Следует отметить, что наиболее распространенные методы выделения ДНК практически всегда представляют собой комплексный подход, включающий несколько этапов пробоподготовки [9].

Полученные в ходе очистки препараты ДНК не должны содержать примесей веществ, способных повлиять на эффективность и надежность анализа, основанного на секвенировании и клонировании фрагментов нуклеиновых кислот. Кроме того, получаемая смесь нуклеиновых кислот должна быть репрезентативной и, по возможности, сохранять количественное соотношение копий геномов каж-

дого вида, входящего в состав пробы. Выполнение последнего условия необходимо для проведения точного количественного анализа сообществ.

Цель работы – апробация нескольких способов выделения ДНК и выбор метода наиболее подходящего для анализа накопительных культур сообщества ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов.

МЕТОДИКА

Культуры. Для оценки эффективности полимеразной цепной реакции использовали серии десятикратных разведений чистых культур *Acidithiobacillus thiooxidans* [10], *Acidithiobacillus ferrooxidans* [10], *Sulfobacillus* sp. [11] и *Ferroplasma* sp. [12], любезно предоставленные сотрудниками лаборатории хемолитотрофных микроорганизмов Института микробиологии им. Виноградского РАН.

Анализ эффективности выбранных методик очистки ДНК проводили с использованием накопительных культур автохтонных сообществ ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов, выделенных из сульфидных руд месторождения Шануч (полуостров Камчатка). Предположительно в выделенных автохтонных сообществах содержатся тионовые эубактерии (*Acidithiobacillus thiooxidans*, *A. ferrooxidans*, *A. caldus*), железобактерии (*Leptospirillum ferrooxidans*, *L. thermoferrooxidans*, *L. ferriphillum*), *Alicyclobacillus disulfidooxidans*, *Sulfobacillus acidophilus*, *S. thermosulfidooxidans*, археи (*Ferroplasma acidiphilum*, “*F. acidarmanus*”, *F. cupricumulans*) [13]. Выделение микроорганизмов осуществляли классическими методами, выращивая железоокисляющие бактерии и археи на среде Сильвермана–Люндгрена 9 К [14], а серуокисляющие – на среде того же минерального состава, но с 1% (вес/об.) элементной серы. Накопительные культуры выращивали на среде Сильвермана–Люндгрена 9 К без железа [14]. В сравнении принимали участие 2 типа проб: содержащие микроорганизмы, прикрепленные к частицам грунта и содержащие преимущественно свободные клетки.

Методы выделения ДНК. Для оценки эффективности методов выделения ДНК из смешанных культур, а также для выбора наиболее удобной и универсальной методики, нами были отобраны несколько комбинированных протоколов очистки ДНК, основанных на различных типах воздействия на клетки эубактерий и архей (табл. 1). Были проанализированы методики, основанные на физическом (перетирание клеток с частицами SiO₂), ферментативном (обработка протеиназой К и лизоцимом) и химическом (обработка GuSCN и бромидом цетилтриметиламмония, СТАВ) воздействии на клетки. Кроме того, нами была разработана комбинированная методика, основанная на щелочном лизисе (KOH) в присутствии низкомолекулярного полимера полиэтиленгликоля (ПЭГ-200). ПЭГ добавляли для повышения pH раствора. В присутствии ПЭГ pH при неизменной концентрации KOH возрастает в 10 раз. Объяснить эф-

Таблица 1. Варианты воздействия на клеточную стенку микроорганизмов, используемые в комбинированных методах очистки ДНК

Вариант	Физическое воздействие	Ферментативное воздействие	Химическое воздействие
1	Частицы SiO ₂	–	+SDS
2	Температура	+	–
3	»	–	+GuSCN
4	»	–	+СТАВ
5	»	–	+KOH

фект можно особенностями механизмов взаимодействия ПЭГ и воды. Молекулы ПЭГ, несущие на своей поверхности отрицательный заряд, во-первых, усиливают диссоциацию молекул воды, а, во-вторых, обладают способностью связывать свободные ионы H⁺, увеличивая тем самым концентрацию свободных ионов OH[–] [15].

Ниже приведено описание использованных методик. Для выделения ДНК во всех случаях брали 500 мкл образца (в среднем 0.0015 мг сырой биомассы клеток). Перед этапом лизиса пробы промывали фосфатным буфером (pH 1.8) 2 раза. После каждой промывки клетки и частицы грунта осаждали центрифугированием при 13000 g в течение 10 мин.

1. **Перетирание с частицами SiO₂.** Осадок ресуспендировали в 200 мкл раствора, содержащего 20% ДДС (100 мМ NaCl, 500 мМ трис, pH 8.0, 20% ДДС). К раствору добавляли 20 мкл частиц SiO₂ (5 мг/мл) производства “Sigma-Aldrich” (США) в ТЕ-буфере и перемешивали на вортексе “BioSan” (Латвия) в течение 5–10 мин. После сорбции ДНК частицы осаждали центрифугированием, супернатант удаляли. ДНК элюировали в 100 мкл воды при 60°C [16].

2. **Обработка протеиназой К и лизоцимом.** Осадок ресуспендировали в 500 мкл буфера А (100 мМ NaCl, 100 мМ трис, 1 мМ цитрата натрия, 5 мМ CaCl₂, 25 мМ ЭДТА, pH 8.0. К раствору добавляли 60 мкл лизоцима (100 мг/мл) “Fermentas” (Литва) и инкубировали при 37°C в течение 40 мин. Добавляли 10 мкл 20%-ного ДДС, 60 мкл протеиназы К (20 мг/мл) “Fermentas”, инкубировали при 50°C в течение 30 мин [17].

3. **Обработка GuSCN.** Осадок ресуспендировали в 500 мкл лизирующего буфера (5.25 М GuSCN, 50 мМ трис, pH 6.4, 20 мМ ЭДТА, 1.3%-ный тритон), инкубировали в течение 30 мин при 65°C [18].

4. **Обработка СТАВ.** Осадок ресуспендировали в 500 мкл лизирующего буфера (0.2 М трис-HCl pH 8.0, 0.05 М ЭДТА, 2 М NaCl, 2%-ный СТАВ) инкубировали в течение 30 мин при 65°C.

5. **Обработка KOH в присутствии ПЭГ.** Осадок ресуспендировали в 500 мкл лизирующего буфера (10% ПЭГ-200, 20 мМ KOH), инкубировали 10 мин при 98°C.

После этапа лизиса проводили очистку от ингибиторов с помощью стандартной методики фенол-

хлороформной экстракции [19]. После преципитации ДНК растворяли в 50 мкл ТЕ-буфера (10 мМ трис-НСl рН 8.6, 1 мМ ЭДТА).

Создание универсальных праймеров. Важным условием настоящего исследования было получение препарата ДНК, содержащего фрагменты нуклеиновых кислот всех или, по крайней мере, основных представителей ацидофильных хемолитотрофных сообществ. Для этой цели нами были созданы пары универсальных праймеров, позволяющих с высокой эффективностью амплифицировать фрагменты гена 16S рРНК большинства эубактерий и архей. Для подбора универсальных праймеров использовали базу данных GenBank и алгоритм Blast сервера NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). В общей сложности было проанализировано 5000 последовательностей. На основании анализа было отобрано несколько участков, обладающих высокой степенью сходства. В случае с единичными вырожденными нуклеотидами использовали эквимольную смесь праймеров полностью комплементарных каждому из вариантов последовательности. Ни один из праймеров не содержал более одного вырожденного нуклеотида. Последовательности 7 праймеров, дающих в парных комбинациях 8 ПЦР-продуктов различной длины (рис. 1) приведены в табл. 2.

Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени. Для оценки эффективности методов очистки ДНК использовали полимеразную цепную реакцию в реальном времени. На сегодняшний день это единственный метод, позволяющий осуществлять прямой количественный анализ нуклеиновых кислот. При проведении ПЦР использовали пары универсальных праймеров, позволяющих амплифицировать суммарную ДНК в пробе. ПЦР проводили по следующей программе: 94°C – 10 с, 70°C – 20 с, 72°C – 10 с в течение 40 циклов с измерением флуоресценции при 70°C на приборе ДТ-96 (ЗАО “НПФ ДНК-Технология”, Россия). Для контроля воспроизводимости результатов ПЦР все образцы тестировали дважды. Использовали полимеразу HS Taq (ЗАО “Евроген”, Россия). Визуализацию накопления продукта реакции осуществляли с помощью интеркалирующего красителя SYBR Green (“Sigma-Aldrich”, США). Данная модификация метода обладает преимуществом перед методиками, использующими линейные зонды (типа taqman) или молекулярные маячки (molecular beacons) – она позволяет избежать отклонений в термодинамике реакции, вызванных вводом дополнительных олигонуклеотидов [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эффективность ПЦР. Сохранение исходного соотношения копий геномов микроорганизмов разных видов (исходного соотношения нуклеиновых кислот разных типов), представляет собой наиболее сложную задачу. Нарушение этого соотношения может повлиять на результат дальнейших исследований. Прямых способов проведения

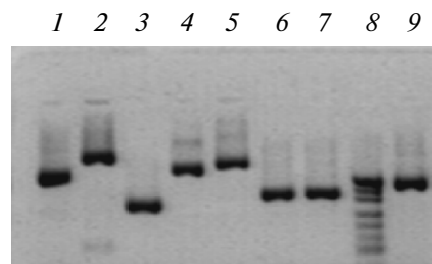


Рис. 1. Электрофореграмма ПЦР-продуктов, полученных при амплификации фрагмента гена 16S рРНК, с использованием парных комбинаций разработанных праймеров: 1 – upr1-d + upr2-g (562 п.н.), 2 – upr1-d + upr3-g (898 п.н.), 3 – bac2-d + upr2-g (293 п.н.), 4 – bac2-d + upr4-g (630 п.н.), 5 – bac2-d + 1427-g (724 п.н.), 6 – upr2-d + upr3-g (358 п.н.), 7 – upr2-d + upr4-g (363 п.н.), 9 – upr2-d + 1427-g (457 п.н.), 8 – маркер.

такой оценки не существует. Однако если используемые в реакции праймеры амплифицируют фрагменты ДНК различных видов с одинаковой эффективностью, можно говорить о том, что смесь нуклеиновых кислот, получаемая в ходе реакции, будет содержать фрагменты, специфичные для основных представителей анализируемого сообщества, и при этом исходное соотношение нуклеиновых кислот различных групп микроорганизмов будет сохраняться. Поэтому одной из наших задач стало создание универсальной пары праймеров, обеспечивающей одинаковую эффективность ПЦР при амплификации гена 16S рРНК бактерий и архей. Универсальность разработанных праймеров и эффективность ПЦР проверяли на чистых культурах основных представителей ацидофильных хемолитотрофных сообществ: *A. thiooxidans*, *A. ferrooxidans*, *Sulfobacillus* sp. и *Ferroplasma* sp. Эффективность определяли методом серийных десятикратных разведений [3]. Зная кратность разведений и пороговый цикл *Ct* (первый цикл, на котором сигнал накопления специфического продукта достоверно превышает уровень шумов) можно построить стандартную прямую (график зависимости порогового цикла от исходной концентрации матрицы), по углу наклона которой можно оценить эффективность ПЦР. Расчет эффективности ПЦР проводили с помощью программы ДТ-96 v. 7.3.

Таблица 2. Последовательности праймеров, использованных в работе

Праймер	Последовательность праймера
upr1-d	GTGCCAGCHGCCGCGGTA
upr2-d	TGCATGGCYGTCGTCAGCTCGT
upr2-g	ACGAGCTGACGACRCCATGCA
upr3-g	TGACGGGCGGTGTGTRCAAGG
upr4-g	TGGTTTGACGSGCGGTGTGT
bac2-d	ATTAGATACCCBGGTAGTCC
1427-g	TACCTTGTTACGACTTMACCC

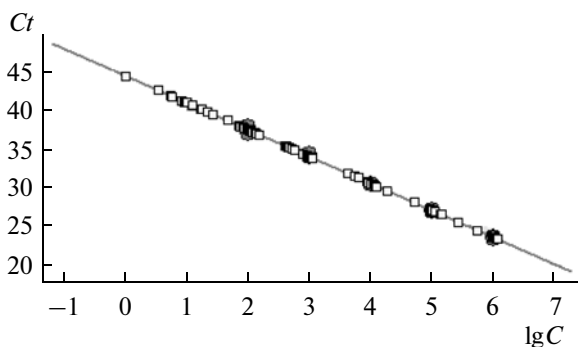


Рис. 2. Стандартная прямая, построенная по результатам ПЦР в реальном времени. Использована серия десятикратных разведений чистых культур *A. thiooxidans*, *A. ferrooxidans*, *Sulfobacillus* sp. и *Ferroplasma* sp. По оси ординат отложены значения пороговых циклов (C_t); по оси абсцисс логарифм ($\lg C$) концентрации ДНК (копий геномов на реакцию). Эффективность ПЦР – 93%, среднее квадратичное отклонение – $\sigma = 0.23$, достоверность аппроксимации $R^2 = 0.9978$.

(ЗАО “НПФ ДНК-Технология”, Россия). На рис. 2 приведен пример определения эффективности ПЦР путем построения стандартной прямой. В сравнении принимали участие 8 пар праймеров (табл. 2). Наилучший результат был получен для пары праймеров *urp2-d/urp3-g*. Они позволяют детектировать ДНК всех исследованных микроорганизмов с эффективностью $\geq 93\%$.

Анализ эффективности выбранных методов выделения ДНК. На сегодняшний день не существует общепринятой методологии очистки нуклеиновых кислот из смешанных культур микроорганизмов. Однако для решения задач, связанных с количественным анализом микробиотических сообществ, вопрос качества препарата нуклеиновых кислот является принципиальным. Так, например, недостаточная очистка от ингибиторов (гуминовых кислот или ионов железа, содержащихся в средах для выращивания железокисляющих бактерий) оказывает влияние на эффективность работы Taq-полимеразы и приводит к искажению результатов количественной ПЦР [20, 21]. Кроме того, смешанные сообщества могут содержать микроорганизмы из различных таксономических групп, обладающих различной устойчивостью к механическому, химическому или ферментативному воздействию. Так, например, из-за особенностей строения клеточной стенки, грам– клетки разрушаются легче, чем грам+, что приводит к изменению исходного соотношения различных типов нуклеиновых кислот и, как следствие, к некорректным результатам количественного анализа. Выбранные нами методы продемонстрировали значительные отличия в эффективности выделения нуклеиновых кислот из накопительных культур. Это может объясняться и различной эффективностью очистки от ингибиторов и комплексным составом исследованных образцов. По данным микроскопического анализа к основным видам сообществ месторождения Шануч относятся как грам+ (*Sulfobacillus* sp.) так и грам– (*Acidithiobacillus* sp.) бактерии, а также археи (*Ferroplasma* sp.), лишенные клеточной стенки. Наилучший результат получен для методики, основанной на лизирующей активности GuSCN (рис. 3а). Специфический сигнал в отрицательном контроле ПЦР объясняется недостаточной очисткой препарата Taq-полимеразы от остатков нуклеиновых кислот *E. coli*, используемых при производстве фермента. Сходный по эффективности результат

получен для методики, основанной на лизирующей активности GuSCN (рис. 3а). Специфический сигнал в отрицательном контроле ПЦР объясняется недостаточной очисткой препарата Taq-полимеразы от остатков нуклеиновых кислот *E. coli*, используемых при производстве фермента. Сходный по эффективности результат

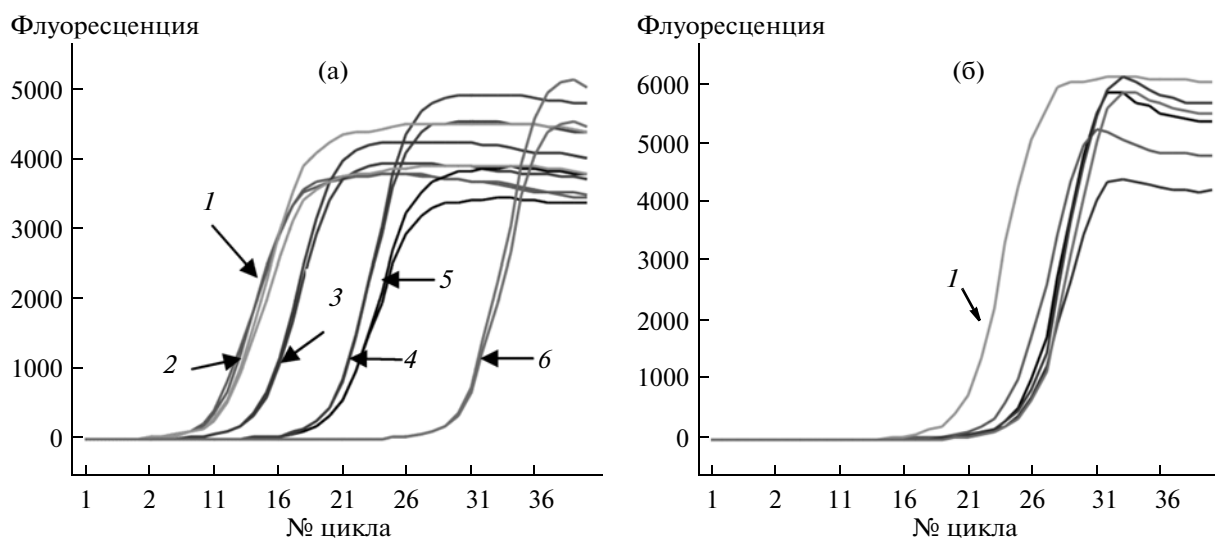


Рис. 3. Сравнение эффективности методик очистки ДНК по результатам ПЦР в реальном времени. а – сравнение всех методик: 1 – лизис GuSCN, 2 – ферментативный лизис, 3 – лизис КОН в присутствии ПЭГ-200, 4 – лизис СТАВ, 5 – перетирание с частицами SiO_2 , 6 – отрицательный контроль ПЦР. б – сравнение результатов ПЦР в реальном времени для контролей выделения всех методик и отрицательного контроля ПЦР; 1 – контроль выделения для методики с использованием протеиназы К и лизоцима (ферментативный лизис).

был получен для ферментативной методики, однако в данном случае на результат количественной ПЦР оказали влияние остатки бактериальных нуклеиновых кислот, содержащиеся в реагентах, использованных при выделении ДНК (рис. 3б). Недостаточная степень очистки ферментов от нуклеиновых кислот приводит к значительным искажениям результатов количественного анализа. Нами показана низкая эффективность методик основанных на лизирующей активности СТАВ и на физическом воздействии на клетки с помощью частиц SiO₂. Для методики, основанной на лизирующей активности КОН, в присутствии ПЭГ-200 получен средний результат, однако ее принципиальным недостатком является низкая степень очистки препарата ДНК от ингибиторов, в частности ионов железа, содержащихся в некоторых культуральных средах. В то же время этот метод показал лучший результат для проб, содержащих микроорганизмы, не окисляющие железо. Значимых отличий в эффективности лизиса между пробами, содержащими свободные и прикрепленные клетки, обнаружено не было.

Полученные результаты позволяют рекомендовать методику, основанную на лизирующей активности GuSCN (лизис при 65°C) с последующей очисткой фенолом и хлороформом, при проведении молекулярного анализа структуры сообществ ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ammann R., Ludwig W., Schleifer K.H. // Microbiol. Rev. 1995. V. 59. P. 143–169.
2. Zammit C.M., Mutch L.A., Watling H.R., Watkin E.L.J. // Hydrometallurgy. 2008. V. 94. № 1–4. P. 185–189.
3. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю., Семенов П.А., Савилова А.М., Кофиади И.А., Абрамов Д.Д. // ПЦР “в реальном времени”. М.: БИНОМ, 2009. 215 с.
4. Schneegurt M.A., Dore S.Y., Kulpa C.F.Jr. // Curr. Issues Mol. Biol. 2003. V. 5. № 1. P. 1–8.
5. Bruce K.D., Horns W.D., Hobman J.L., Osborn A.M., Strike P., Ritchie D.A. // Appl. Environ. Microbiol. 1992. V. 58. P. 3413–3416.
6. Picard C., Ponsonnet C., Paget E., Nesme X., Simonet P. // Appl. Environ. Microbiol. 1992. V. 58. P. 2717–2722.
7. Erb R.W., Wagner-Dubler I. // Appl. Environ. Microbiol. 1993. V. 59. P. 4065–4073.
8. Zhou J., Bruns M.A., Tiedje J.M. // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. P. 316–322.
9. Miller D.N., Bryant J.E., Madsen E.L., Ghiorse W.C. // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. P. 4715–4724.
10. Kelly D.P., Wood A.P. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2000. V. 50. P. 511–516.
11. Головачева Р.С., Каравайко Г.И. // Микробиология. 1978. Т. 47. № 5. С. 815–822.
12. Golyshina O.V., Pivovarova T.A., Karavaiko G.I., Kondratyeva T.F., Moore E.R., Abraham W.R., Lysndorf H., Timmis K.N., Yakimov M.M., Golyshin P.N. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2000. V. 50. P. 997–1006.
13. Кузякина Т.И., Хайнасова Т.С., Левенец О.О. // Вестник КРАУНЦ. Науки о Земле. 2008. Т. 12. № 2. С. 76–86.
14. Каравайко Г.И., Росси Дж., Агапе А., Грудев С., Аваян З.А. // Биоготехнология металлов. Практическое руководство. М.: Центр международных проектов ГКНТ, 1989. 376 с.
15. Chomczynski P., Rymaszewski M. // BioTechniques. 2006. V. 40. № 4. P. 454–458.
16. Boyle J.S., Lew A.M. // Trends in Genetics. 1995. V. 11. № 1. P. 8.
17. Liu C.-Q., Plumb J., Hendry P. // Biotechnol. Bioeng. 2006. V. 94. № 2. P. 330–336.
18. Патент РФ. 2001. № 2177035.
19. Chomczynski P., Sacchi N. // Anal. Biochem. 1987. V. 162. № 1. P. 156–159.
20. Kermekchiev M.B., Kirilova L.I., Vail E.E., Barnes W.M. // Nucleic Acids Res. 2009. V. 37. № 5. P. 40.
21. Yue-li H., Dick W.A., Tuovinen O.H. // Biotechnol. Letters. 2002. V. 24. № 13. P. 1049–1053.

The Use of Real-time PCR Technology to Assess the Effectiveness of Methods of DNA Extraction from Cultures of Acidophilic Chemolithotrophic Microorganisms

S. V. Rogatykh^a, A. A. Dokshukina^b, T. S. Khainasova^a, S. V. Muradov^a, and I. A. Kofiadi^a

^a Research Geotechnological Center, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences,
Petropavlovsk-Kamchatsky, 683002 Russia
e-mail: kofiadi@mail.ru

^b ZAO NPF DNA-Technology, Moscow, 115478 Russia

Received May 12, 2010

Abstract—Comparative evaluation of efficiency of several methods of DNA extraction from storage cultures of acidophilic chemolithotrophic microorganism communities isolated from sulfide ores of Shanuch ore deposit (Kamchatka peninsula) was conducted. DNA extraction methods in various combinations of physical (heating to 65–98°C, grinding with SiO₂ particles), enzymatic (treatment with lysozyme and proteinase K), and chemical (GuSCN, СТАВ and КОН) treatments were tested. The evaluation of efficiency was performed using Real-time PCR. The best result was obtained for the combined method based on GuSCN lysis activity (lysis at 65°C) followed by purification with phenol and chloroform.