

## 铜绿假单胞菌oprI基因的反向斑点杂交检测法

铜绿假单胞菌是下呼吸道感染最常见的致病菌之一，临床上主要依靠痰培养诊断，但痰培养所需时间长，结果易受抗生素等多种因素的影响，阳性率较低，达不到早期快速诊断的目的。近年来随着对该细菌基因水平的深入研究和杂交技术的不断发展，铜绿假单胞菌的检测有了新途径。我们利用铜绿假单胞菌特异的oprI基因，建立一种反向斑点杂交检测该细菌的新方法，旨在为铜绿假单胞菌感染的早期快速诊断提供依据。

### 1 材料与amp;方法

#### 1.1 材料

1.1.1 菌株 铜绿假单胞菌、葱头假单胞菌、鼻疽假单胞菌、荧光假单胞菌、大肠埃希菌、流感嗜血杆菌、肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌的标准菌株均购自中国药品生物制品检定所。白色念珠菌、巨细胞病毒为临床分离株，由本院细菌室提供。

1.1.2 酶与试剂 琼脂糖、dNTP、Taq DNA聚合酶、DNA Marker均购自大连宝生物工程有限公司。DNA纯化试剂盒购自美国Promega公司，光敏生物素试剂盒购自军事医学科学院放射医学研究所。

1.1.3 预杂交液 由25%(V/V) 20×SSC(3 mol/L NaCl、0.3 mol/L柠檬酸钠，pH=7.0)、50%二甲基甲酰胺、小牛胸腺DNA0.5 mg/ml、10% 50×Denhartds(1%Ficoll400聚蔗糖、1%聚丙烯吡咯烷酮、1%牛血清白蛋白)、5%1 mol/L PBS、5%硫酸葡聚糖钠组成。

1.1.4 杂交液 预杂交液中加入生物素标记细菌、病毒、真菌DNA。

1.1.5 杂交洗液 2×SSC加入0.1%SDS。

1.1.6 封闭液 3%牛血清白蛋白(BSA)。

1.1.7 酶联缓冲液 0.1 mol/L Tris-HCl(pH 7.5)、1.0 mol/L NaCl、2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、0.05% TritonX-100

1.1.8 底物液 0.1 mol/L Tris、0.1 mol/L NaCl、5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>(pH 9.5)

1.1.9 显色液 底物液中加入5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸(BCIP)7.5 U/ml，氮蓝四唑(NBT)7.5 U/ml。

#### 1.2 方法

1.2.1 PCR引物的设计与合成 参考文献[1]并经Genbank检索后，选取铜绿假单胞菌的外膜脂蛋白I(oprI)基因区内设计引物：上游引物为5'-GGCTGGG AGATTGCTGTTATGG-3'，位于oprI的218-239。下游引物为5'-CAGTCTGCTGAGCTTTCTGAGC-3'，位于oprI的460-439，扩增产物的长度为243 bp。引物由上海生工生物工程公司合成。

1.2.2 DNA的提取 上述标准菌株DNA的提取采用蛋白酶K消化、酚-氯仿抽提法进行[2]。白色念珠菌DNA的提取依照文献[3]进行。巨细胞病毒DNA的提取参照文献[4]进行。

1.2.3 PCR扩增及扩增产物的电泳和纯化

1.2.3.1 PCR扩增及电泳 试管中依次加入Taq DNA聚合酶、10×PCR缓冲液、dNTP、引物、模板DNA、无菌去离子水，混匀后，进行PCR循环：94℃ 30 s、50℃ 30 s、72℃ 1 min，35个循环，最后72℃延伸10 min。取10 μl扩增产物于1.5%琼脂糖凝胶(含EB)中电泳，紫外灯下观察结果。

1.2.3.2 扩增产物的纯化 PCR扩增产物用Wizard PCR DNA纯化试剂盒纯化，紫外灯下将桔红色显色带切割下放入试管中，70℃水浴30 min，加入1 ml裂解液，摇匀，注射器吸取混合液推入DEAE-Sephacel层析柱中，2 ml 80%异丙醇冲洗，层析柱10 000 r/min离心2 min后，加入50 μl蒸馏水，65℃孵育1 h，10 000 r/min离心2 min所得50 μl溶液即为所合成的铜绿假单胞菌特异探针。

1.2.4 生物素标记DNA 上述细菌、病毒、真菌的DNA与长臂光敏生物素按1:2(V:V)混合后，光标记灯照射30 min。等体积仲丁醇萃取2次，弃上层醇相，加入1/10体积3 mol/L醋酸钠和2.5倍体积无水乙醇沉淀，13 000 r/min离心10 min，弃上清，所得粉红色固体即为生物素标记DNA[5]。

1.2.5 反向斑点杂交 将合成的铜绿假单胞菌特异探针100℃水浴5 min、冰浴5 min，点硝酸纤维素膜。将膜置于80℃烤箱中烘烤1 h固定，60℃预杂交30 min，杂交2 h，杂交洗液清洗三遍。37℃时行封闭。酶联时，酶联缓冲液中加入亲和素-碱性磷酸酶(AV-AP)4 U/ml，酶联洗涤液(成分同酶联缓冲液)洗膜三遍，最后将膜加入显色液中显色2~5 min。硝酸膜上出现蓝紫色斑点为阳性，无斑点者为阴性。

## 2 结果

### 2.1 引物的特异性

用合成的铜绿假单胞菌的引物依次扩增上述10种细菌、病毒、真菌DNA，扩增产物电泳，结果显示除铜绿假单胞菌扩增出一条特异的243 bp的DNA带外，其余9种均未见特异性扩增带，表明该对引物具有高度特异性(图1)。

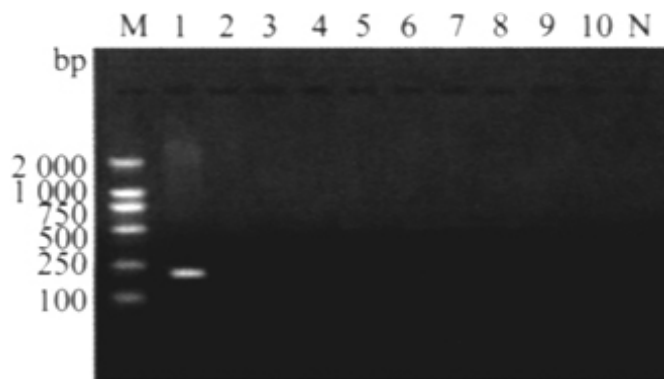


图1 PCR扩增产物电泳图

Fig.1 Electrophoresis of PCR products

M: DNA marker; Lane 1: *Pseudomonas aeruginosa*; Lane 2: *Pseudomonas cepacia*; Lane 3: *Pseudomonas mallei*; Lane 4: *Pseudomonas fluorescens*; Lane 5: *Escherichia coli*; Lane 6: *Haemophilus influenzae*; Lane 7: *Streptococcus pneumoniae*; Lane 8: *Staphylococcus aureus*; Lane 9: *Candida albicans*; Lane 10: *Cytomegalovirus*; Lane N: Negative control

### 2.2 杂交的敏感性

将固定有243 bp DNA探针的硝酸纤维素膜，按上述杂交步骤，依次与倍比稀释的生物素标记铜绿假单胞菌(PA) DNA杂交，结果显示其最低限度可以检测出100 ng的细菌DNA(图2)。

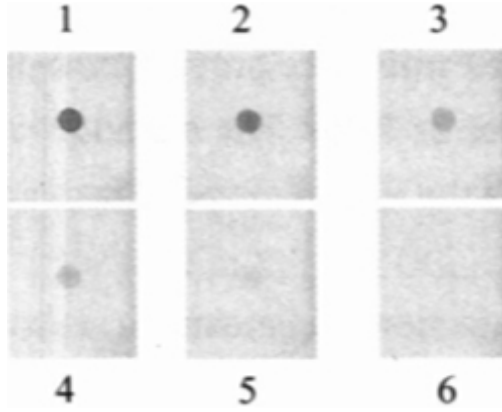


图2杂交的敏感性

Fig.2 Sensitivity of the hybridization

1:10  $\mu$ g DNA; 2:5  $\mu$ g DNA; 3:1  $\mu$ g DNA; 4:500 ng DNA; 5:100 ng/  $\mu$ l; 6:50 ng DNA

### 2.3 杂交的特异性

将固定有铜绿假单胞菌oprI基因的硝酸纤维素膜分别与上述光标细菌、真菌、病毒DNA杂交，结果显示除铜绿假单胞菌杂交点为阳性外，其余均为阴性(图3)。

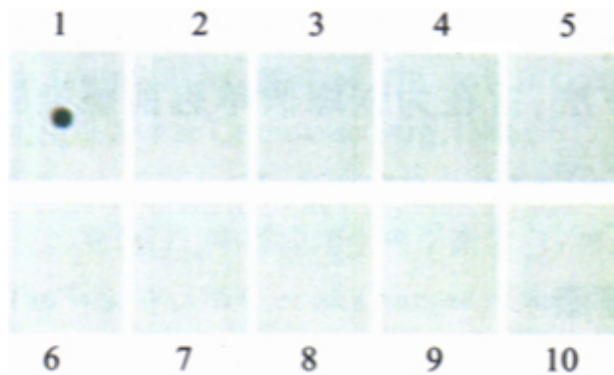


图3探针杂交特异性

Fig.3 specificity of the hybridization

1-10: pseudomonas aeruginosa, pseudomonas cepacia, pseudomonas mallei, pseudomonas fluorescens, Escherichia coli, haemophilus influenzae, streptococcus pneumoniae, staphylococcus aureus, candida albicans, cytomegalovirus

### 2.4 探针纯度

将未纯化的PCR产物与纯化的PCR产物作为探针分别点膜后，按上述步骤杂交，结果显示未纯化探针杂交点颜色浅，本底较深。纯化探针杂交点颜色深，本底浅。

## 3 讨论

铜绿假单胞菌在自然界分布广泛，是院内感染常见的条件致病菌[6]。尤其是随着抗生素、免疫抑制剂、激素的大量使用，近年来其感染率呈上升趋势。据中国医院内病原菌耐药监测网统计，呼吸道标本中最常见的细菌是铜绿假单胞菌(25%) [7]。Osmon等发现[8]，由于铜绿假单胞菌感染所导致的住院死亡率高达30.6%，远远高于金葡菌等其它细菌引起的感染死亡人数。因此它的早期快速诊断尤其重要，但目前临床上常用的痰培养方法所需时间长，假阴性率高，远远不能满足临床工作的需要。

铜绿假单胞菌编码外膜蛋白的oprI基因具有高度保守性[5][9]，利用oprI基因，不仅能检测铜绿假单胞

菌,而且可用于制备其特异的疫苗[10]。目前分子生物学技术如PCR、定量PCR等在临床上有一定的应用,但这种技术目前仍停留在“一次实验只检测一种病原菌”的水平,而且存在假阳性和假阴性的问题[11]。制备病原体的特异探针,通过探针与靶DNA的杂交反应来检测病原体已成为一个新的研究方向。目前常用的探针有寡核苷酸探针、cDNA探针和全基因组探针,全基因组探针由于太长,杂交条件不易控制而限制了其应用[12]。我们没有选用寡核苷酸探针,主要是考虑到在检测基因组DNA方面,寡核苷酸探针并不适用[13]。目前制备cDNA探针主要是先设计特异引物然后通过PCR合成[14],本实验所合成的cDNA探针,与其他细菌、病毒、真菌间无交叉反应,不仅具有属特异性,而且具有种特异性。该方法可检测出100 ng细菌DNA,相当于 $10^7$  CFU/ml细菌,与定量培养结果一致。探针的纯度也很重要,本实验证实纯化的探针杂交结果优于未纯化探针,与文献报道结果一致[15]。点有探针的膜可以预先制备待用,节省后续杂交时间,整个操作在一天之内可以获得检查结果。

通常的反向斑点杂交是将标记好的探针固定在膜上,再与杂交液中的靶DNA杂交,标记物一般与探针结合。本实验采用的虽然也是反向斑点杂交,但生物素标记的是靶DNA,与以往采用的标记探针方法有所不同。它具有简便易行、快速可靠、稳定性和重复性好等优点。该方法的建立,为临床微生物的检测提供了一条新途径,在铜绿假单胞菌感染的早期诊断方面具有一定的应用价值。

#### 参考文献:

- [1] Saint Onge A, Romeyer F, Lebel P, et al. Specificity of the *Pseudomonas aeruginosa* PA01 lipoprotein I gene as a DNA probe and PCR target region within the Pseudomonadaceae[J]. J Gen Microbiol, 1992, 138(Pt4): 733-41.
- [2] 奥斯伯,布伦特,金斯顿,等著.颜子颖,王海林译.精编分子生物学实验指南[M].北京:科学出版社.1998.39.
- [3] 黄媛,牟兆钦,陈建魁,等.PCR结合寡核苷酸探针杂交检测临床常见真菌的实验研究[J].中华微生物学和免疫学杂志.2001,21(3):345-8.  
Huang Y, Mu ZQ, Chen JK, et al. Detection and identification of fungi with clinical significance by PCR combined with oligonucleotide probe hybridization[J]. Chin J Microbiol Immunol, 2001, 21(3): 345-8.
- [4] 尚世强,洪文澜,俞惠民,等.细菌DNA的聚合酶链反应扩增及反相杂交初步分型[J].中华检验医学杂志,1998,21(5):281-4.  
Shang SQ, Hong WL, Yu HM, et al. Amplification of bacterial DNA by polymerase chain reaction(PCR) and typing by reverse hybridization[J]. Chin J Clin Lab Med, 1998, 21(5): 281-4.
- [5] 王卫华,肖红,肖勇,等.长臂光敏基因探针对结核性浆膜腔积液的诊断价值.中华检验医学杂志[J].2001,24(2):79-81.  
Wang WH, Xiao H, Xiao Y, et al. The diagnostic value of improved PCR in pleural offusion tuberculosis[J]. Chin J Clin Lab Med, 2001, 24(2): 79-81.
- [6] 于润江.高龄者难治性细菌性呼吸道感染的对策[J].中华结核和呼吸杂志,2001,24(6):335-8.  
Yu RJ. Measure of intractable bacterial respiratory infection in old man [J]. Chin J Tuberc Respir Dis, 2001, 24(6): 335-8.
- [7] 陈民钧,王辉.中国重症监护病房革兰阴性菌耐药性连续7年监测研究[J].中华医学杂志,2003,83(5):375-80.  
Chen MJ, Wang H. Continuous surveillance of antimicrobial resistance among nosocomial gram-negative bacilli from intensive care units in China[J]. Natl Med J Chin, 2003, 83(5): 375-80.
- [8] Osmon S, Ward S, Fraser VJ, et al. Hospital Mortality for Patients With Bacteremia Due to *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Chest, 2004, 125(2):

[9] Hancock RE, Siehnel R, Martin N. Outer membrane proteins of pseudomonas [J]. Mol Microbiol, 1990, 4(7): 1069-75.

[10] Larbig M, Mansouri E, Freihorst J, et al. Safety and immunogenicity of an intranasal Pseudomonas aeruginosa hybrid outer membrane protein F-I vaccine in human volunteers[J]. Vaccine, 2001, 19(17-19): 2291-7.

[11] Vaughn CP, Elenitoba-Johnson KS. Hybridization-induced dequenching of fluorescein-labeled oligonucleotides: a novel strategy for PCR detection and genotyping [J]. Am J Pathol, 2003, 163(1): 29-35.

[12] 李凌, 马文丽, 毛向明, 等. HIV基因芯片的初步研究[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(8): 724-7.

Li L, Ma WL, Mao XM, et al. Preliminary study of development of gene chips for HIV diagnosis[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(8): 724-7.

[13] 张灵霞, 庄玉辉, 杨华卫, 等. 两种DNA探针杂交检测结核分枝杆菌的研究[J]. 中华检验医学杂志, 2001, 24(2): 106.

[14] 吕梁, 马文丽, 王洪敏, 等. 应用PCR快速制备细小病毒B19诊断芯片探针[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(11): 1121-4.

Lv L, Ma WL, Wang HM, et al. Quick preparations of human parvovirus B19 microarray probes using PCR[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(11): 1121-4.

[15] 张宝, 马文丽, 石嵘, 等. 探针的纯化与否对基因芯片重复利用的影响[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(3): 208-10.

Zhang B, Ma WL, Shi R, et al. Effect of probe purification on the reutilization of gene chip[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(3): 208-10.

#### 参考文献:

[1] Saint Onge A, Romeyer F, Lebel P, et al. Specificity of the Pseudomonas aeruginosa PA01 lipoprotein I gene as a DNA probe and PCR target region within the Pseudomonadaceae[J]. J Gen Microbiol, 1992, 138(Pt4): 733-41.

[2] 奥斯伯, 布伦特, 金斯顿, 等著. 颜子颖, 王海林译. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社. 1998. 39.

[3] 黄媛, 牟兆钦, 陈建魁, 等. PCR结合寡核苷酸探针杂交检测临床常见真菌的实验研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志. 2001, 21(3): 345-8.

Huang Y, Mu ZQ, Chen JK, et al. Detection and identification of fungi with clinical significance by PCR combined with oligonucleotide probe hybridization[J]. Chin J Microbiol Immunol, 2001, 21(3): 345-8.

[4] 尚世强, 洪文澜, 俞惠民, 等. 细菌DNA的聚合酶链反应扩增及反相杂交初步分型[J]. 中华检验医学杂志, 1998, 21(5): 281-4.

Shang SQ, Hong WL, Yu HM, et al. Amplification of bacterial DNA by polymerase chain reaction(PCR) and typing by reverse hybridization[J]. Chin J Clin Lab Med, 1998, 21(5): 281-4.

[5] 王卫华, 肖红, 肖勇, 等. 长臂光敏基因探针对结核性浆膜腔积液的诊断价值. 中华检验医学杂志[J]. 2001, 24(2): 79-81.

Wang WH, Xiao H, Xiao Y, et al. The diagnostic value of improved PCR in pleural

offusion tuberculosis[J]. Chin J Clin Lab Med, 2001, 24(2): 79-81.

[6] 于润江. 高龄者难治性细菌性呼吸道感染的对策[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2001, 24(6): 335-8.

Yu RJ. Measure of intractable bacterial respiratory infection in old man [J]. Chin J Tuberc Respir Dis, 2001, 24(6): 335-8.

[7] 陈民钧, 王 辉. 中国重症监护病房革兰阴性菌耐药性连续7年监测研究[J]. 中华医学杂志, 2003, 83(5): 375-80.

Chen MJ, Wang H. Continuous surveillance of antimicrobial resistance among nosocomial gram-negative bacilli from intensive care units in China[J]. Natl Med J Chin, 2003, 83(5): 375-80.

[8] Osmon S, Ward S, Fraser VJ, et al. Hospital Mortality for Patients With Bacteremia Due to Staphylococcus aureus or Pseudomonas aeruginosa[J]. Chest, 2004, 125(2): 607-16.

[9] Hancock RE, Siehnel R, Martin N. Outer membrane proteins of pseudomonas [J]. Mol Microbiol, 1990, 4(7): 1069-75.

[10] Larbig M, Mansouri E, Freihorst J, et al. Safety and immunogenicity of an intranasal Pseudomonas aeruginosa hybrid outer membrane protein F-I vaccine in human volunteers[J]. Vaccine, 2001, 19(17- 19): 2291-7.

[11] Vaughn CP, Elenitoba-Johnson KS. Hybridization-induced dequenching of fluorescein-labeled oligonucleotides: a novel strategy for PCR detection and genotyping [J]. Am J Pathol, 2003, 163(1): 29-35.

[12] 李 凌, 马文丽, 毛向明, 等. HIV基因芯片的初步研究[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(8): 724-7.

Li L, Ma WL, Mao XM, et al. Preliminary study of development of gene chips for HIV diagnosis[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(8): 724-7.

[13] 张灵霞, 庄玉辉, 杨华卫, 等. 两种DNA探针杂交检测结核分枝杆菌的研究[J]. 中华检验医学杂志, 2001, 24(2): 106.

[14] 吕 梁, 马文丽, 王洪敏, 等. 应用PCR快速制备细小病毒B19诊断芯片探针[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(11): 1121-4.

Lv L, Ma WL, Wang HM, et al. Quick preparations of human parvovirus B19 microarray probes using PCR[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(11): 1121-4.

[15] 张 宝, 马文丽, 石 嵘, 等. 探针的纯化与否对基因芯片重复利用的影响[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(3): 208-10.

Zhang B, Ma WL, Shi R, et al. Effect of probe purification on the reutilization of gene chip[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(3): 208-10.