

铜绿假单胞菌 *oprI* 基因的反向斑点杂交检测法

樊慧珍¹, 黄文杰¹, 梁昆¹, 方怡¹, 马立人², 刘耀清² (¹ 广州军区广州总医院呼吸科, 广东 广州 510010; ² 军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要:目的 建立一种早期快速检测铜绿假单胞菌的方法。方法 根据铜绿假单胞菌特异的 *oprI* 基因设计引物, 聚合酶链反应合成特异探针, 光敏生物素标记细菌 DNA, 应用反向斑点杂交法检测铜绿假单胞菌。结果 所合成的探针具有高度特异性, 能鉴别铜绿假单胞菌, 与其他细菌、病毒、真菌间无交叉反应。该方法能检测出 100 ng 细菌 DNA。结论 反向斑点杂交法具有快速、特异的优点, 对铜绿假单胞菌的早期检测具有重要意义。

关键词: 呼吸道感染 / 诊断; 假单胞菌, 铜绿; *oprI* 基因; 反向斑点杂交 / 方法

中图分类号: R379 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2004)03-0303-03

Detection of *oprI* gene of *Pseudomonas aeruginosa* by reverse dot-blot hybridization

FAN Hui-zhen¹, HUANG Wen-jie¹, LIANG Kun¹, FANG Yi¹, MA Li-ren², LIU Yao-qing²

¹Department of Respiratory Diseases, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Command, Guangzhou 510010, China; ²Institute of Radiology Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

Abstract: Objective To establish a rapid method for detecting *Pseudomonas aeruginosa* at the early stage of infection. **Methods** Specific primers were designed according to *oprI* gene sequence of *Pseudomonas aeruginosa*, and the specific probe was synthesized by PCR. After photosensitive biotin labeling of the bacterial DNA, reverse dot-blot hybridization was used to detect *Pseudomonas aeruginosa*. **Results** The probe synthesized was highly specific to *Pseudomonas aeruginosa* without cross reaction with other bacteria, viruses or fungi. The method was capable of detecting 100 ng bacteria DNA. **Conclusion** Reverse dot-blot hybridization possesses the merits of speediness and specificity in the detection of *Pseudomonas aeruginosa* in the early stage of infection.

Key words: respiratory tract infections/diagnosis; *pseudomonas aeruginosa*; *oprI* gene; dot-blot hybridization/methods

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×Denhardt's (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 MgCl₂、0.05% TritonX-100

1.1.8 底物液 0.1 mol/L Tris、0.1 mol/L NaCl、5 mmol/L MgCl₂(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

收稿日期: 2003-10-02

基金项目: 广东省社会发展攻关基金(2002C30405)

Supported by Key Research and Development Foundation of Guangdong province (2002C30405)

作者简介: 樊慧珍(1975-), 女, 第一军医大学在读硕士研究生, 医师, 助教, E-mail: huizhen2000@163.com

(*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)。

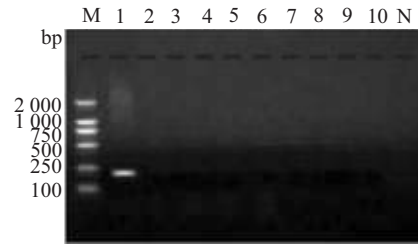


图 1 PCR 扩增产物电泳图

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)。

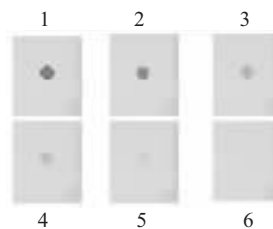


图 2 杂交的敏感性

Fig.2 Sensitivity of the hybridization

1:10 μg DNA; 2:5 μg DNA; 3: 1 μg DNA; 4:500 ng DNA; 5: 100 ng/ μl; 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)。

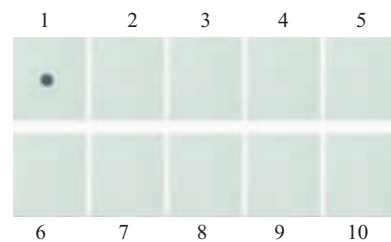


图 3 探针杂交特异性

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 10⁷ 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* PAO1 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,金斯頓,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接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.