

· 论 著 ·

固化 DNA 纳米胶体金探针杂交目视化比色检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 *mecA* 基因的实验研究*

何云燕¹, 黎颖², 夏云^{2△}

(1. 重庆市中山医院检验科 400014; 2. 重庆医科大学附属第一医院检验科 400016)

摘要:目的 建立以纳米金颗粒为载体的 DNA 探针杂交方法,快速、特异地检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)特异性 *mecA* 基因。方法 采用直径为 60nm 的胶体金纳米颗粒与巯基修饰的 2 条 *mecA* 基因寡核苷酸探针共价结合,制备成固化的 DNA 金纳米探针。将金纳米探针与其互补的 *mecA* 基因靶序列在液相中杂交,通过调节 2 条探针的比例和不同的检测方法对杂交反应条件和产物检测进行优化。结果 金纳米探针呈稳定的酒红色,与互补的靶序列 DNA 进行液相杂交后颜色呈现明显的蓝色变化。当 2 条探针不对称加入时颜色变化更明显。采用反向色谱反应盘检测反应产物也可获得满意的效果。产物离心后检测灵敏度可达 2.36 fmol/L。结论 固化纳米胶体金探针杂交技术具有快速简便的特点,有望为 MRSA 的快速检测提供一种新的方法。

关键词:金纳米颗粒;DNA 探针;耐甲氧西林金黄色葡萄球菌;比色法

中图分类号:R378.11;R446.5

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)07-0782-02

Rapid colorimetric detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus mecA* gene by DNA-modified colloid gold nanoparticles probes*

HE Yun-yan¹, LI Ying², XIA Yun^{2△}

(1. Department of Laboratory Medicine, Chongqing Zhongshan Hospital, Chongqing 400014, China; 2. Department of Laboratory Medicine, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To establish the DNA-modified colloid gold nanoparticles probes hybridization method for rapid and specified detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) *mecA* gene. **Methods** DNA modified nanoparticles probes were prepared by using two 5'S modified *mecA* gene oligonucleotide probes bounding with 60nm diameter colloid gold nanoparticles through covalent binding of Au-S. The prepared nanoparticles probes were hybridized with its paired *mecA* gene sequence in liquid-phase. The optical reaction condition was explored by using different concentration of two nanoparticles probes and different methods to detection of hybridization products. **Results** DNA modified gold nanoparticles probes were exhibited the color of wine red. The visible blue color changes of the reaction solution were observed when the DNA-modified colloid gold nanoparticles probes hybridized with its paired target sequence. The more obvious results were obtained by the means of asymmetry adding of two probes to reaction solution. The detection of reaction products by TLC could also acquire satisfactory results. The sensitivity of the method was 2.36 fmol/L if the reaction products were centrifuged and sedimentations were detected by TLC. **Conclusion** The technique of the DNA-modified colloid gold nanoparticles probes hybridization has character of rapid and convenient performing and is potent to be a new method for rapid detection of MRSA.

Key words: gold nanoparticle; DNA probe; methicillin resistant *staphylococcus aureus*; colorimetric

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin resistant *staphylococcus aureus*, MRSA)引起的感染迅速蔓延,目前已成为医院感染的重要病原菌。由于该菌对多种抗生素耐药,故快速诊断对于采用正确的抗生素治疗至关重要。近年来,以纳米技术为代表的快速诊断方法进展迅速,在分子生物学领域的研究和应用已取得可喜的成绩。本文以纳米金颗粒为载体,利用 DNA 探针杂交的原理,快速、特异地检测 MRSA 的 *mecA* 基因,达到快速检测 MRSA 的目的。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 纳米胶体金溶液(颗粒直径 60nm) 由艾康生物技术有限公司提供。配制成 100 mg/L 的溶液,于 2~8 °C 保存。硅胶板或称反向色谱反应盘(reversed-phase thinlayer chromatography plate, TLC)为青岛海洋化工分厂产品。

1.1.2 模拟靶 DNA 的设计与合成 选取 MRSA *mecA* 基因的一段特异性的序列 A'-B'作为模拟靶 DNA,经 BLAST 后确定无同源序列。其序列如下:5'-TGG TGA AGT TGT AAT CTG GAA CTT GTT GAG CAG AGG TTC TTT TTT ATC TTG GGT TAA TTT ATT ATA TTC TTC GTT ACT CAT GCC AT-3'。斜体部分序列为与探针互补的序列。该序列由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.1.3 特异性探针的设计与合成 在 A'-B' 链的 5'和 3'端分别设计其互补的探针序列:A、B,其序列如下:A:5'-ATG GCA TGA GTA ACG AAG AAT A-3'。B:5' TTC CAG ATT ACA ACT TCA CCA-3'。将 A 和 B 探针 5'端进行巯基化修饰,以上巯基化修饰的 A、B 探针由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 方法

* 基金项目:重庆市卫生局科研基金资助项目(07-02-231)。△ 通讯作者,电话:023-89012742;E-mail:xiayun12cn@yahoo.com.cn。

1.2.1 纳米胶体金探针的制备 按参考文献[1]的方法稍加改进,1 OD 的巯基修饰的 A 和 B 探针分别溶解于 100 μL 的去离子水,然后加入 900 μL 60 nm 金纳米溶液中,使 A 探针的终浓度达到 3.7 $\mu\text{mol/L}$,B 探针的终浓度达到 3.61 $\mu\text{mol/L}$,室温放置 16 h,加入 0.3 M NaCl 500 μL 、0.2 M PBS 缓冲液(pH 为 7) 75 μL ,使其终浓度分别为 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、0.01 $\mu\text{mol/L}$,再室温放置 40 h,15 000 r/min 离心 30 min,弃上清液,向油状沉淀中加入 0.1 M NaCl、0.01 $\mu\text{mol/L}$ PBS 重悬红色油状沉淀,15 000 r/min 离心 30 min,弃上清液,再加入 50 μL 1 $\mu\text{mol/L}$ NaCl、0.1 $\mu\text{mol/L}$ PBS 重悬胶体金,使 A、B 纳米胶体金探针的终浓度大约为 200 pmol/L,将制备好的纳米胶体金探针置 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.2 纳米胶体金探针液相杂交实验条件的建立 1 OD 模拟靶序列用 500 μL 去离子水溶解,浓度约为 2.36 $\mu\text{mol/L}$ 。将模拟靶序列与前面制备的 Au 纳米探针 A 和 B 按下述 2 种方法进行杂交。方法 1:依次加入 A 探针 9 μL 、B 探针 9 μL (A/B 为 1:1)、模拟靶序列 2 μL (终浓度为 0.236 $\mu\text{mol/L}$, 6.8 ng/ μL),阴性对照加入无关 DNA 序列(200 bp,终浓度为 0.25 $\mu\text{mol/L}$)使杂交反应体系达到 20 μL ,55 $^{\circ}\text{C}$,杂交 15 min,室温放置 1 h 后,观察结果。方法 2:依次加入 A 探针 6 μL 、B 探针 12 μL (A/B 为 1:2)、模拟靶序列 2 μL (终浓度为 0.236 $\mu\text{mol/L}$, 6.8 ng/ μL),其余同方法 1。

1.2.3 纳米胶体金探针液相杂交产物的检测 方法 1:直接观察,杂交反应完成后将 EP 管置于白色背景下肉眼观察溶液颜色变化。方法 2:杂交反应完成后吸取反应产物 5 μL 滴至硅胶板上观察颜色变化。

1.2.4 杂交反应灵敏度测定 将浓度为 2.36 $\mu\text{mol/L}$ 的模拟靶序列作 1/10、1/50、1/200、1/1 000 稀释,按方法 2 加入反应体系,杂交反应完毕后的反应产物以 12 000 r/min 离心 5 min,吸取管底反应产物 3 μL ,用硅胶板检测。

2 结 果

2.1 纳米胶体金颗粒基因探针的物理特点 纳米胶体金溶液呈酒红色,颗粒直径为 60 nm,与巯基修饰的基因探针结合后呈现紫红色。

2.2 模拟靶序列的检测 将模拟靶序列与制备的纳米胶体金探针 A 和 B 在液相杂交体系中杂交,可见胶体金溶液呈现明显的颜色变化,采用方法 1 加入 A、B 探针时模拟靶序列与之发生杂交反应,溶液呈浅紫色,而采用方法 2 加入 A、B 探针时检测结果呈更为明显的蓝紫色(插页 I 图 1)。产物离心后 2 种方法均能见明显的颗粒沉淀,但采用硅胶板检测时方法 2 的结果颜色变化更明显(插页 I 图 2),表明 A、B 探针不等量加入时更有利于胶体金颗粒的聚集。同时采用硅胶板检测,其结果比采用直接观察更清晰可辨。

2.3 灵敏度测定 将模拟靶 DNA 作系列稀释后杂交反应结果见插页 I 图 3,以 2.36 $\mu\text{mol/L}$ 的模拟靶序列为母液进行倍比稀释,最高稀释度可达 1 000 倍,对应的最低检测限达 2.36 fmol/L,约 5×10^7 个细菌。

3 讨 论

大量研究表明纳米金由于具有独特的生理学特性,以其为基础的检测方法较传统方法(如分子荧光、实时 PCR、ELISA 等)更具有优势^[2]。当在纳米金探针溶液中加入与探针互补的双链多核苷酸时,就会形成由双链多核苷酸相互连接而成的纳米金宏观聚合网络结构^[3]。使体系等离子体共振吸收峰发生较大幅度的红移,这时聚集态的胶体在相对长的波长宽带对光进行吸收和散射从而使颜色转变为紫红色。随着聚集态的逐

渐增大,这种红移会使纳米金颗粒的特征峰值从 520 nm 红移至 600 nm,红移过程也伴随着溶液的颜色由显著的红色到紫红色再向蓝色的转化,由此便可通过肉眼直接对检测结果做出判断或可通过 TLC 进行检测^[4]。

本文以纳米金颗粒为载体将针对 mecA 基因片段的 DNA 探针进行固化,探针制备过程中,高盐状态下胶体金与探针更容易结合,故采用 NaCl、PBS 盐溶液。目前国内外较多采用的纳米金颗粒直径为 $(12 \pm 5) \text{ nm}$ ^[5],而本研究采用了 60 nm 金颗粒可增加对光的吸收,即使只有少量的胶体金颗粒聚集也可以引起明显的红移;同时增加了胶体金的表面积,可固化更多条靶基因的探针,以便最大限度地捕获待检的 DNA 片段,提高反应的灵敏度^[6]。本研究通过固化双探针来提高检测的灵敏度。国外同类方法用 TLC 检测,其检测限为 10 fmol/L^[4],采用本方法进行灵敏度测定表明该法最低检测限可达 2.36 fmol/L,明显低于国外同类方法。

在摸索最佳杂交条件时,研究结果显示提高杂交液的盐浓度有利于杂交反应的进行,故采用了 1 mol/L 的 NaCl 溶液。结果显示探针的浓度对溶液的颜色变化有明显的影响,当 A、B 探针比例为 1:2 时溶液的颜色变化比 1:1 时溶液颜色变化要明显得多。故探针的不等量加入有利于杂交反应进行。

目前,用于检测 MRSA 的方法有多种,分为表型检测和基因检测,表型检测简便易行,但所需时间较长(24~48 h),影响因素较多,对临床抗生素治疗有明显的滞后作用。由于 MRSA 特异性地存在 mecA 基因,直接检测 mecA 基因被认为是 MRSA 检测的金标准^[7]。新近出现的胶乳凝集法操作简单快速^[8],但对于低表达 PBP2a 的菌株检测呈阴性;同时 PBP2a 胶乳凝集法同样存在单克隆抗原抗体反应前滞和后滞现象^[9],实验中须注意抗原抗体反应比例且试剂昂贵,检测成本较高。PCR 检测 mecA 基因具有灵敏度高、特异性高的特点,但该方法实验条件要求较高且因污染易致假阳性,不适合作为常规方法。纳米胶体金探针杂交快速检测 mecA 基因的方法结合了分子杂交的特异性、纳米技术检测的敏感性和简便性等优势,可使整个检测过程大大缩短,杂交反应不需特殊的仪器,可用细菌的基因组 DNA 直接进行检测而不需扩增,操作简便。本研究以 mecA 基因 DNA 序列为检测对象,建立了以液相固化纳米胶体金探针为载体的杂交反应方法并对反应条件进行了优化,反应体系仅需 20 μL ,甚至可以按比例将反应体系降低为 10 μL ,杂交反应和产物检测时间小于 1.5 h,简便快速,为下一步直接用临床分离株进行检测打下了良好的基础。

参考文献:

- [1] Wang YF, Pang DW, Zhang ZL, et al. Visual gene diagnosis of HBV and HCV based on nanoparticle probe amplification and silver staining enhancement[J]. J Medical Virology, 2003, 70(2): 205.
- [2] Thaxton CS, Georganopoulou DG, Mirkin CA, et al. Gold nanoparticle probes for the detection of nucleic acid targets[J]. Clin Chim Acta, 2006, 363(1): 120.
- [3] Mirkin CA, Letsinger RL, Mucic RC, et al. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials[J]. Nature, 1996, 382(6592): 607.
- [4] Elghanian R, Storhoff JJ, Mucic RC, et al. Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold(下转第 786 页)

表 5 各组不同时间 sIL-2R 的变化 ($\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/mL}$)

组别 (n=10)	术前	术后 1 周	术后 3 周	术后 5 周
正常对照组	3.71±0.22	3.73±0.31	3.72±0.26	3.79±0.31
荷瘤对照组	6.44±0.75◆	6.70±1.11◆	7.45±0.88◆	8.19±0.53◆
手术治疗组	6.69±1.13◆	6.23±0.71◆	5.44±0.93◆*	5.03±0.73◆*
冷冻治疗组	6.57±0.74◆	5.57±0.63◆*	4.18±1.05*#	5.62±1.02◆*#

与正常对照组比较,◆: $P<0.05$;与荷瘤对照组比较,* : $P<0.05$;与手术组比较,# : $P<0.05$ 。

3 讨 论

随着冷冻技术的不断改善,以氩氦刀为代表的冷冻消融已成为继手术、放疗、化疗之后的又一重要的恶性肿瘤治疗手段。人们在早期就已经认识到冷冻治疗引起的免疫反应对原发灶和转移灶肿瘤的消退均起着重要作用^[2-3]。

本实验研究结果表明荷瘤大鼠与正常大鼠比较其自身免疫水平处于抑制状态。手术治疗后大鼠免疫功能有一定程度的恢复,但恢复较慢,而且在实验过程中多数指标一直未恢复到正常水平,在各个时间点上的 CD3⁺、CD4⁺ T 细胞,CD4⁺/CD8⁺ T 细胞比值以及外周血液中 sIL-2R 含量与正常对照组比较有明显差异。而冷冻消融治疗对荷瘤大鼠的免疫功能则有比较强的增强效果。冷冻治疗组在治疗后 T 细胞活性及外周血液中 sIL-2R 到第 3 周左右免疫增强效果达到最高,与正常水平相当。尤其引人注意的是,冷冻治疗后 1、3 周各项指标均显著优于相应的手术治疗组,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。与手术治疗组比较,冷冻治疗组的最大不同之处在于将冷冻治疗后坏死的肿瘤细胞原位留置于体内。冷冻治疗组术后免疫功能明显增强的原因可能与此有关,冷冻治疗后的肿瘤细胞可能激活机体的淋巴细胞,促进淋巴细胞增殖,起到了“原位固化瘤苗”(灭活后的肿瘤细胞原位留置于体内)的作用。

冷冻治疗后 5 周 T 细胞分类和外周血液中 sIL-2R 含量同手术治疗组差异无统计学意义,其原因可能与两组荷瘤对照大鼠经手术和冷冻治疗后有不同程度肿瘤复发对结果的影响有关(手术治疗组大鼠复发 3 只,冷冻治疗组大鼠复发 2 只)。也有可能是不明原因所致,但冷冻治疗带来的免疫增强作用可能是有一定限度的,如何促进和维持冷冻治疗的免疫调节作用将是一个值得进一步探讨的问题。

氩氦刀治疗具有减轻肿瘤负荷、减少肿瘤产生的免疫抑制因子、术后应激反应轻、机体免疫抑制小、坏死的原位肿瘤抗原

释放后能够刺激机体免疫功能等外科手术治疗所不具备的优点,在合理选择患者、选择合适肿瘤消融面积、精确定位等条件下,如果与 CIK 过继免疫治疗、树突状疫苗等免疫治疗方法联合应用,将会在中、晚期肿瘤的临床治疗方面开辟新的局面,缓解患者痛苦,提高生活质量,减少肿瘤复发^[4-6]。

参考文献:

[1] 张积仁. 氩氦靶向肿瘤治疗技术[M]. Hong Kong: pioneer Bioscience Publishing Co,2003;124.
[2] Brok MH, Suttmuller RP, Nierkens S, et al. Efficient loading of dendritic cells following cryo and radiofrequency ablation in combination with immune modulation induces anti-tumour immunity[J]. Br J Cancer, 2006, 95(7):896.
[3] Udagawa M, Kudo-Saito C, Hasegawa G, et al. Enhancement of immunologic tumor regression by intratumoral administration of dendritic cells in combination with cryo-ablative tumor pretreatment and Bacillus Calmette-Guerin cell wall skeleton stimulation[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(24):7465.
[4] 彭秋平,汪森明,张积仁,等. 肝癌氩氦刀冷冻免疫的实验与临床研究[J]. 医学研究生报, 2003, 16(2):145.
[5] 施明,王福生,张冰,等. 自体 CIK 细胞治疗肝癌的安全性和有效性评价[J]. 解放军医学杂志, 2004, 29(4):333.
[6] 陈翔,土洪林,李坚,等. 射频消融联合表阿霉素对兔肝 VXZ 肿瘤微血管密度和细胞增殖的影响[J]. 重庆医学, 2005, 34(12):1841.

(收稿日期:2009-08-03 修回日期:2009-09-28)

(上接第 783 页)

nanoparticles[J]. Science, 1997, 277(8):1078.
[5] 张平,习东,宁琴,等. 纳米金标记法在 HIV 检测中的应用[J]. 中国现代医学杂志, 2007, 17(13):1552.
[6] Storhoff JJ, Lucas AD, Garimella V, et al. Homogeneous detection of unamplified genomic DNA sequences based on colorimetric scatter of gold nanoparticle probes[J]. Nat Biotechnol, 2004, 22(7):883.
[7] Velasco D, Tomas M, Cartelle M, et al. Evaluation of different methods for detecting methicillin(oxacillin) resist-

ance in Staphylococcus aureus[J]. J Antimicrob Chemother, 2005, 55(4):379.
[8] 张莉萍,陈维贤,聂红,等. 快速检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌方法的应用评价[J]. 中华医学检验杂志, 2003, 26(2):126.
[9] 张鹏,张文芳,张媛,等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌快速检测方法的比较[J]. 中华医学检验杂志, 2008, 31(3):325.

(收稿日期:2009-08-22 修回日期:2009-09-28)