

· 基础研究 ·

熔解曲线分析检测大肠埃希菌、嗜麦芽单胞菌方法的构建

陈 弟, 胡大春[△], 邵剑春, 刘德华, 周 玲, 秦海燕

(昆明市临床疾病分子生物学重点实验室/昆明市第一人民医院检验科 650011)

摘要:目的 构建熔解曲线分析法检测大肠埃希菌、嗜麦芽单胞菌。方法 针对大肠埃希菌的 16S rRNA、嗜麦芽单胞菌的促旋酶 B 亚单位(*gyrB*)基因设计种特异性引物。构建熔解曲线分析法,并进行特异性验证。检测不同拷贝浓度稀释液进行敏感性分析。检测临床分离目标菌各 20 株,进行稳定性评价。结果 特异性验证显示,目标检测菌种均有特异性的熔解曲线,熔点温度(*T_m*)值分别为 84.73、82.84 °C。可检测到的拷贝浓度稀释液分别为 3.56×10^3 、 1.21×10^4 copy/mL。稳定性评价的结果显示,*T_m* 值($\bar{x} \pm s$)变化范围窄小,差异有统计学意义。结论 所构建方法具有较好的特异性、敏感性和稳定性。并具有快速、简便、成本低廉的特点,可用于临床样本的检测。

关键词:熔解曲线分析;检测;方法建立

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.03.024

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)03-0271-04

Development the method for detecting *Escherichia coli*, *Stenotrophomonas maltophilia* by melting curve analysis

Chen Di, Hu Dachun[△], Shao Jianchun, Liu Dehua, Zhou Ling, Qin Haiyan

(The Key Clinical Molecular Biology Laboratory of Kunming/The Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Kunming, Kunming, Yunnan 650011, China)

Abstract: Objective The objective is to develop method for detecting *Escherichia coli*, *Stenotrophomonas maltophilia*. **Methods**

The species-specific primers were designed according to the specific target gene of target stains. The melting curve analysis were constructed. The specificity of the method was validated. The solutions with different copies of purified amplification products were analyzed by the method to evaluation its sensitivity. The stability of the method were evaluated with 20 clinical isolated target strains respectively. **Results** The specificity validation of the method showed that the specific melting curves obtained from two species of target strains. *T_m* values of them were 84.73, 82.84 °C respectively. The sensitivity evaluation of the method showed that 3.56×10^3 , 1.21×10^4 copies/mL purified amplification products could be detected respectively for two species of target stains. Stability evaluation of the method displayed that their *T_m* values showed less difference in the same species. **Conclusion** The established method in this study have sufficient specificity, sensitivity and stability, and also rapidly, simply and cheaply for detecting of the target clinical pathogens and would be useful in clinical microbiology laboratory.

Key words: melting curve analysis; detection; method developing

目前,国内外应用分子诊断技术对临床常见病原菌的检测主要有基因芯片技术、实时荧光 PCR、熔解曲线分析法等^[1-5]。其中,芯片技术具有高通量、微型化等特点,但费用昂贵、需要专业的技术人员操作。实时荧光 PCR 灵敏度高且特异性强,但探针设计相对较难、合成费用高。熔解曲线分析法在 PCR 反应体系中加入荧光染料,利用荧光染料的理化特征来指示扩增产物的增加。当荧光染料与 DNA 双链结合时,发出荧光;从 DNA 双链上释放出来时,荧光信号急剧减弱。如果升高温度使 DNA 变性,以温度为横坐标对荧光信号作图,可得到熔解曲线。把 50% DNA 分子发生变性的温度称为熔点温度(melting temperature, *T_m*)。该技术在对病原菌的检测中,主要根据不同病原菌扩增产物长度不同、其 GC 比值不同,熔解曲线不同、*T_m* 值不同^[6-10]。为了满足临床感染性疾病的诊疗需求,作者构建了快速、敏感的熔解曲线分析法检测临床常见的大肠埃希菌、嗜麦芽单胞菌,现报道如下。

1 材料与与方法

1.1 检测菌种与 PCR 扩增靶基因的确定 选取临床常见的大肠埃希菌、嗜麦芽单胞菌^[11-13]作为本研究的检测菌种。分别选取目标检测菌种的 16S rRNA 基因、促旋酶 B 亚单位

(gyrB)基因作为 PCR 扩增的靶基因。

1.2 引物设计 分别对靶基因序列使用 Primer Premier5.0 软件设计,经 BLAST 比对选择特异性较高引物,均由上海生物工程技术有限公司合成。引物特征见表 1。

1.3 研究菌株及来源

1.3.1 标准菌株 本研究选择 ATCC25922 作为大肠埃希菌的标准菌株,由卫生部临床检验中心提供。选择卫生部室间质评活动提供的嗜麦芽单胞菌作为该菌的标准菌株,由本院检验科微生物室提供。

1.3.2 临床分离菌株(目标菌株与非目标菌株) 选取本院临床分离的研究目标菌各 20 株、临床分离其他细菌(非目标菌)18 种(革兰阳性菌 6 种,包括金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、粪肠球菌、屎肠球菌、溶血葡萄球菌、肺炎链球菌等;革兰阴性菌 12 种,包括铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌、阴沟肠杆菌、聚团肠杆菌、黏质沙雷菌黏质亚种、坂崎肠杆菌、普通变形杆菌、流感嗜血杆菌、产气肠杆菌、弗劳地枸橼酸杆菌、产酸克雷伯菌等),用于引物和方法学的特异性及稳定性评价,均由本院检验科微生物室提供。

1.3.3 非细菌性病原体及人源基因组 DNA 选择乙型肝炎

[△] 通讯作者, Tel:15877990167; E-mail: hudach@163.net。

表 1 引物特征

引物	产物片断(bp)	基因名称	GC(%)	退火温度(°C)	序列(5'-3')	基因库序列号
eco-F	426	16S rRNA	52.63	57.56	tag gct tgc tgc ttt gct ga	EU130557
eco-R			45.00	55.75	ggt cct tat tct gcc ggt a	
pma-F	122	gyrB	50.00	57.80	aca cga acg tca tat cag tc	AM743169
pma-R			50.00	57.80	gtc ctt cag cgg aat gat gt	

病毒 DNA、白色念珠菌作为非细菌性病原体,以及人源基因组 DNA 进行方法学的细菌特异性评价。乙型肝炎病毒 DNA、白色念珠菌分别由本院临床疾病分子生物学重点实验室和检验科微生物室提供;人源基因组 DNA 从健康体检者血液白细胞中提取。

1.4 试剂与仪器

1.4.1 试剂 RealMasterMix(SYBR Green-1)、PCR 反应试剂(包括 10×Taq buffer、25 mM 的 MgCl₂、10 mM 的 dNTP)以及 DNA 分子大小 Marker(67~1 118 bp)均为 Fermentas LIFE SCIENCES 产品,普通 DNA 产物纯化试剂盒为北京天根生化科技有限公司产品,细菌核酸的提取方法为煮沸法,DNA 提取液为广州中山达安基因股份有限公司产品。

1.4.2 仪器 实时荧光 PCR 仪:LightCycler1.0, Roche 产品;PCR 扩增仪:MyCycler, 电泳仪:Power PAC 3000,凝胶成像分析系统:Gel Doc 2000 TM,均为 BIO-RAD 产品;核酸蛋白检测仪:Biophotometer,Eppendorf 产品。

1.5 细菌基因组 DNA 的提取与扩增产物的纯化

1.5.1 细菌基因组 DNA 的提取 按无菌要求,用接种环于平板上挑取单个菌落于盛有 1 mL 氯化钠注射用水的 Eppendorf 管中,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,于沉淀物中加入 50 μL 的 DNA 提取液,混匀,煮沸 11 min;冷却后 12 000 r/min 离心 10 min,上清液可直接用于 PCR 扩增。

1.5.2 扩增产物的纯化 对目标菌株进行常规 PCR 扩增,用普通 DNA 产物纯化试剂盒,对扩增产物进行纯化。具体操作步骤按试剂盒说明书进行。用核酸蛋白检测仪检测纯化产物的浓度,A260/280 比值,用于后继的 DNA 测序与敏感度实验。

1.6 引物的特异性验证 对上述引物分别用标准菌株,临床分离菌株、非细菌性病原体以及人源基因组 DNA 进行常规 PCR 扩增,同时设置阳性对照与阴性对照。常规 PCR 反应的总体积为 25 μL,其中 buffer 2.5 μL,25 mM 的 MgCl₂ 2.5 μL,10 mM 的 dNTP 1 μL,10 mM 的上、下游引物各 1 μL,Taq DNA 聚合酶 1 U,模板 DNA 2 μL,双蒸水补足 25 μL。反应条件为 95 °C 预变性 3 min;95 °C 变性 45 s;53 °C 退火 30 s;72 °C 延伸 45 s,30 个循环;然后 72 °C 延伸 5 min。扩增产物取 6 μL 经 2% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,凝胶成像系统观察。

1.7 熔解曲线分析反应体系与反应条件的优化

1.7.1 初步反应体系与反应条件 用大肠埃希菌、嗜麦芽单胞菌 2 种种特异性引物同时进行熔解曲线分析法实验。25 μL 的反应体系,包括 Real Master Mix(SYBR Green 1)11.25 μL,10 mM 的大肠埃希菌、嗜麦芽单胞菌上、下游引物各 1 μL,单目标菌株的模板 DNA 2 μL,双蒸水补足 25 μL。反应条件:95 °C 预变性 10 min;95 °C 变性 15 s;61 °C 退火 30 s;72 °C 延伸 30 s;35 个循环,于 61 °C 30 s 后采集荧光信号,熔解曲线分析条件为 65 °C 10 s,0.5 °C/s 升温至 95 °C 并收集荧光信号。

1.7.2 反应体系与反应条件优化 根据产物及引物二聚体的熔解曲线分析、荧光强度等对退火温度、退火时间、引物浓度、变性时间、循环数、熔解曲线分析的时间进行优化:(1)退火温度优化,从 51~61 °C,每隔 2 °C 设置一个退火温度,并在该阶段采集荧光信号;(2)退火时间优化,从 15~30 s,每隔 5 s 设置退火时间;(3)引物浓度的优化,调整每种引物的浓度,终浓度分别为 100、200、300、400 nM;(4)变性时间优化,比较变性时间 15、20、25、30 s 对扩增效率的影响;(5)扩增循环数优化,比较扩增循环数 35、40、45 个循环对扩增效率的影响;(6)熔解曲线分析中退火温度优化,比较在 65、70、75 °C 下开始收集荧光信号的熔解曲线峰形。

1.8 熔解曲线分析法的特异性分析 用上述优化后的熔解曲线分析法检测标准菌株、临床分离菌株、非细菌性病原体和人源基因组 DNA,同时设置阳性对照与阴性对照,验证所建立方法的特异性。

1.9 熔解曲线分析法的敏感性分析 用核酸蛋白检测仪分别检测纯化好的目标菌株的扩增产物浓度,换算成拷贝数,进行 10^{-N} 倍比稀释,对倍比稀释液进行熔解曲线分析实验。

1.10 熔解曲线分析法对临床分离目标菌株的检测 用构建好的熔解曲线分析法分别检测临床分离目标菌:大肠埃希菌、嗜麦芽单胞菌各 20 株,分析每种菌株 T_m 值、标准差(SD)的变化规律。检测的 T_m 值比较用成组 t 检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 引物的特异性验证 常规 PCR 扩增产物电泳分析显示,每对引物除了对目标菌株有目的特异性条带外,其余的非目标菌株、非细菌性病原体以及人源基因组 DNA 未见扩增条带出现。目标菌株 PCR 扩增产物双向测序结果和所得序列与其标准菌株序列进行比对,结果基本符合。嗜麦芽单胞菌引物扩增产物凝胶电泳结果见图 1。



1:金黄色葡萄球菌;2:表皮葡萄球菌;3:粪肠球菌;4:尿肠球菌;5:肺炎链球菌;6:大肠埃希菌;7:铜绿假单胞菌;8:肺炎克雷伯菌;9:鲍曼不动杆菌;10:阴沟肠杆菌;11:pUC Mix Marker(编号 SM0301);12:聚团肠杆菌;13:坂崎肠杆菌;14:普通变形杆菌;15:流感嗜血杆菌;16:嗜麦芽单胞菌;17:产气肠杆菌;18:弗劳地枸橼酸杆菌;19:产酸克雷伯菌;20:乙型肝炎病毒 DNA;21:白色念珠菌;22:pUC Mix Marker(编号 SM0301);23:人基因组 DNA;24:室内质评菌株(嗜麦芽单胞菌);25:阴性对照。

图 1 嗜麦芽单胞菌引物常规 PCR 扩增不同病原菌的电泳结果

2.2 溶解曲线分析反应条件与反应体系的优化结果 经优化后最佳的反应条件为 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 15 s; 61 °C 退火 30 s; 72 °C 延伸 30 s; 35 个循环, 溶解曲线分析条件为 70 °C 10 s, 0.5 °C/s 升温至 95 °C。最佳的引物浓度为 400 nM。

2.3 溶解曲线分析法特异性分析结果 结果显示, 大肠埃希菌、嗜麦芽单胞菌均有特异性的溶解曲线和熔点峰, 各自的 Tm 值分别为 84.73、82.84 °C。临床分离非目标菌株、非细菌性病原体和人源基因组 DNA 未出现特异性溶解曲线。阴性对照扩增为阴性。结果见图 2~4。

2.4 溶解曲线分析法敏感性分析结果 结果显示, 大肠埃希菌检测到的最低拷贝数为 3.56 × 10³ copy/mL; 嗜麦芽单胞菌为 1.21 × 10⁴ copy/mL。结果见图 5~7。

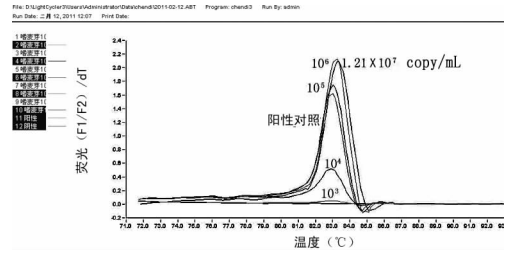


图 7 溶解曲线分析法检测嗜麦芽单胞菌不同浓度拷贝数的熔点峰图

2.5 溶解曲线分析法对临床分离目标菌株检测结果 对临床分离目标菌各 20 株进行检测, 均得到特异性溶解曲线和熔点峰, 其 Tm 值分别为 (84.62 ± 0.513)、(82.56 ± 0.414) °C, Tm 值(±s) 变化范围窄小, 差异有统计学意义 (t = 107.773, P < 0.05)。

3 讨论

在构建病原菌分子诊断技术中, 引物的特异性决定着整个方法的成功与否, 其中, 靶序列的选择是设计引物的关键环节。本研究选取大肠埃希菌的 16S rRNA 基因、嗜麦芽单胞菌的 gyrB 基因作为靶基因设计种特异性引物, 结果显示, 设计出来的引物均能对目标病原菌进行正确鉴定。

为体现方法的快速特性, 本研究把大肠埃希菌、嗜麦芽单胞菌两对引物放在同一 PCR 反应管中同时扩增, 并选择价格低廉、容易推广应用的 SYBR Green 1 荧光染料作为溶解曲线分析法的实现方法。本研究中, 目标菌株的两对引物之间退火温度变化较小; 扩增产物片断大小不一、GC 比值各不相同, 使其 Tm 值有较大的差异, 便于区分目标检测菌种。

由于把两对引物同时进行扩增, 且采用的是 SYBR Green 1 荧光染料, PCR 的反应动力学易受各种因素的影响。因此, 作者对其反应条件与反应体系进行了优化, 尽可能得到最佳的扩增效率。

溶解曲线分析法特异性分析结果显示, 大肠埃希菌、嗜麦芽单胞菌均有特异性的溶解曲线和熔点峰, 各自的 Tm 值分别为 84.73、82.84 °C。因此, 根据各自特异性 Tm 值能对未知样本进行准确判定。临床分离非目标菌株、非细菌性病原体和人源基因组 DNA 均无特异性溶解曲线。

为了评估该方法的敏感性, 作者通过检测纯化扩增产物的不同拷贝数浓度来进行分析。结果显示, 该方法能检测的拷贝数浓度约为 3.0 × 10³ copy/mL。提示所构建的方法具有较好的灵敏度。

溶解曲线分析法分别对临床分离目标菌各 20 株进行检测, 结果显示, 目标菌均得到各自特异性的溶解曲线, 其 Tm 变化范围窄小, 提示所构建的方法具有较好的稳定性。

本研究所构建的方法从样本 DNA 的提取到检测结果的获得, 仅需 2.5 h; 同时, 该方法操作简单、价格低廉。目前, 作者正应用该方法对经初步增菌后的临床样本直接提取核酸进行检测, 以常规微生物鉴定为金标准, 进行方法学的敏感性、重复性和可靠性评价, 待相关实验结果出来后可进一步在临床推

图 2 溶解曲线分析法检测临床分离菌株的扩增曲线图

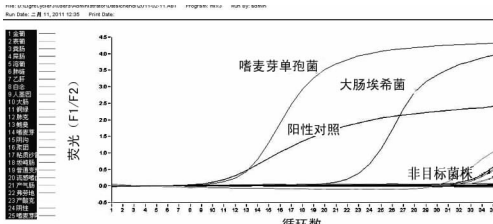


图 3 溶解曲线分析法检测临床分离菌株的溶解曲线图

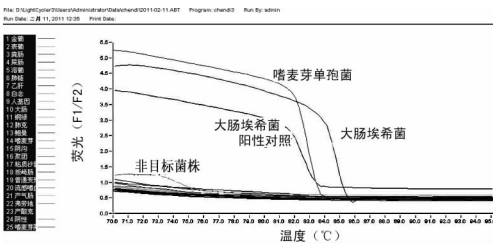


图 4 溶解曲线分析法检测临床分离菌株的熔点峰图

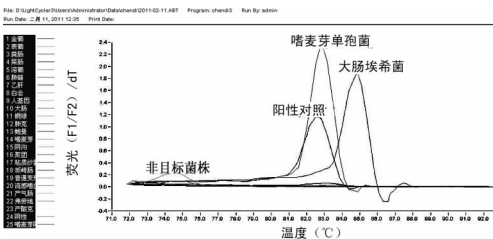


图 5 溶解曲线分析法检测嗜麦芽单胞菌不同浓度拷贝数的扩增曲线图

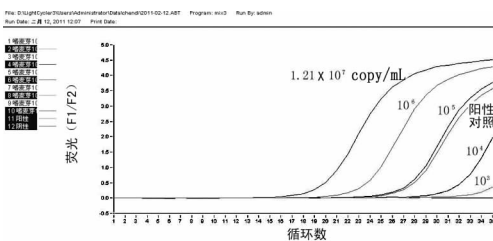
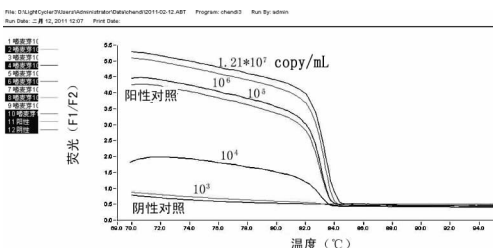


图 6 溶解曲线分析法检测嗜麦芽单胞菌不同浓度拷贝数的溶解曲线图



广应用。

参考文献:

- [1] Hwang BH, Cha HJP. Pattern-mapped multiple detection of 11 pathogenic bacteria using a 16S rDNA-based oligonucleotide microarray [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 106(2):183-192.
- [2] Kodanl M, Yang G, Conklin LM, et al. Application of TaqMan low-density arrays for simultaneous detection of multiple respiratory pathogens [J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(6):2175-2182.
- [3] Haffar M, Gilbride KA. The utility and application of real-time PCR and FISH in the detection of single-copy gene targets in *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* [J]. *Can J Microbiol*, 2010, 56(3):254-262.
- [4] Cha CH, An HK, Kim JU. Detection of vancomycin-resistant enterococci using multiplex real-time PCR assay and melting curve analysis [J]. *Korean J Lab Med*, 2010, 30(2):138-146.
- [5] Schwartz SB, Thurman KA, Mitchell SC, et al. Genotyping of *Mycoplasma pneumoniae* isolates using real-time PCR and high-resolution melt analysis [J]. *Clin microbiol infect*, 2009, 15:756-762.
- [6] Wehrle E, Didier A, Moravek M, et al. Detection of *Bacillus cereus* with enteropathogenic potential by multiplex real-time PCR based on SYBR Green 1 [J]. *Mol Cell Probes*, 2010, 24(3):124-130.
- [7] Kugelman G, Tapsall JW, Goire N, et al. Simple, rapid, and inexpensive detection of *Neisseria gonorrhoeae* resistance mechanisms using heat-denatured isolates and SYBR green-based real-time PCR [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(10):4211-4216.
- [8] Nakamura S, Yanagihara K, Morinaga Y, et al. Melting curve analysis for rapid detection of topoisomerase gene mutations in *Haemophilus influenzae* [J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(3):781-784.
- [9] Cheng JC, Huang CL, Lin CC, et al. Rapid detection and identification of clinically important bacteria by high-resolution melting analysis after broad-range ribosomal RNA real-time PCR [J]. *Clin Chem*, 2006, 52(11):1997-2004.
- [10] Klaschik S, Lehmann LE, Raadts A, et al. Detection and differentiation of in vitro-spiked bacteria by real-time PCR and melting-curve analysis [J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(2):512-517.
- [11] 孙迎娟, 董国英, 丁钰, 等. 医院感染病原菌的分布及耐药性分析 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2007, 17(9):1141-1144.
- [12] Zhu LX, Wang D, Zhang GB, et al. Development of a base stacking hybridization-based microarray method for rapid identification of clinical isolates [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2007, 59(2):149-156.
- [13] Tseng CP, Cheng JC, Tseng CC, et al. Broad-range ribosomal RNA real-time PCR after removal of DNA from reagents: melting profiles for clinically important bacteria [J]. *Clin Chem*, 2003, 49(2):306-309.

(收稿日期:2011-07-20 修回日期:2011-09-15)

(上接第 270 页)

- inhibits hepatocellular carcinoma cells by inducing mitochondria-dependent apoptosis [J]. *Planta Med*, 2010, 76(13):1447-1453.
- [9] Xiao D, Powolny AA, Singh SV. Benzyl isothiocyanate targets mitochondrial respiratory chain to trigger reactive oxygen species-dependent apoptosis in human breast cancer cells [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(14):3015-3017.
- [10] Bagchi-Rakshit S, Mandal L, Pal BC, et al. Involvement of ROS in chlorogenic acid-induced apoptosis of Bcr-Abl+ CML cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 80(11):1662-1675.
- [11] Martín R, Ibeas E, Carvalho-Tavares J, et al. Natural triterpenic diols promote apoptosis in astrocytoma cells through ROS-mediated mitochondrial depolarization and JNK activation [J]. *PLoS One*, 2009, 4(1):59-75.
- [12] Xiao D, Powolny AA, Singh SV. Benzyl isothiocyanate targets mitochondrial respiratory chain to trigger reactive oxygen species-dependent apoptosis in human breast cancer cells [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(44):5962-5965.
- [13] Palapati P, Averill-Bates DA. Mild thermotolerance induced at 40 °C protects HeLa cells against activation of death receptor-mediated apoptosis by hydrogen peroxide [J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 151(4):542-550.
- [14] Lüpertz R, Chovolou Y, Kampkter A, et al. Catalase overexpression impairs TNF-alpha induced NF-kappa B activation and sensitizes MCF-7 cells against TNF-alpha [J]. *J Cell Biochem*, 2008, 103(5):1497-1511.
- [15] Price M, Terlecky SR, Kessel D. A role for hydrogen peroxide in the pro-apoptotic effects of photodynamic therapy [J]. *Photochem Photobiol*, 2009, 85(9):1491-1494.

(收稿日期:2011-07-18 修回日期:2011-07-28)