

# ETA 基因作为荧光定量 PCR 靶基因设计 TaqMan 探针快速检测铜绿假单胞菌的研究

肖性龙<sup>1,2</sup>, 张经纬<sup>2</sup>, 龚俊<sup>2</sup>, 潘艳萍<sup>2</sup>, 余以刚<sup>1</sup>, 杨晓泉<sup>1</sup>, 吴晖<sup>1</sup>

1 华南理工大学轻工与食品学院, 广州 510640

2 深圳太太基因工程有限公司, 深圳 518057

**摘要:** 铜绿假单胞菌是临床上常见致病菌, 传统的检测方法有各种弊端。本研究对该细菌的 ETA 基因用生物信息学方法加以分析, 选取相对保守且高度特异的 DNA 序列, 设计一对特异性引物和一个 TaqMan 探针, 建立 FQ-PCR (fluorescence quantitative PCR) 检测 PA 的方法。通过对梯度浓度的铜绿假单胞菌基因组 DNA 样品进行 FQ-PCR 检测和对多种细菌的 DNA 进行扩增, 来检测其灵敏度和验证引物和探针的特异性。试验结果表明, 对比现有的检测方法, 以 ETA 基因为靶基因, 基于 TaqMan 探针的快速 FQ-PCR 检测技术有更高的灵敏度和更好的特异性等优点, 具有很好的研究价值和应用前景。

**关键词:** 铜绿假单胞菌, 外毒素 A, 荧光定量 PCR, TaqMan 探针, 检测

## Rapid Detection of *Pseudomonas aeruginosa* by the Fluorescence Quantitative TaqMan PCR Assay Targetting ETA Gene

Xinglong Xiao<sup>1,2</sup>, Jingwei Zhang<sup>2</sup>, Jun Gong<sup>2</sup>, Yanping Pan<sup>2</sup>, Yigang Yu<sup>1</sup>, Xiaoquan Yang<sup>1</sup>, and Hui Wu<sup>1</sup>

1 College of Light Industry & Food, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China

2 Shenzhen Taitai Genomics Inc., Shenzhen 518057, China

**Abstract:** *Pseudomonas aeruginosa* (PA) is one of the most universal pathogens in clinical diagnosis, and conventional detection assay has many disadvantages. In this research, a pair of specific primers and a TaqMan fluorescent probe were designed in the conservative region of ETA gene by the method of bioinformatics analysis, the detection method for PA was successfully developed. Different gradient concentrations of PA DNA and various pathogen DNA were amplified by fluorescence quantitative PCR (FQ-PCR) to confirm the specificity and sensitivity of the developed method. Results showed that the developed detection assay is more sensible and specific by comparison to the conventional FQ-PCR method, and it is valuable for research and application prospects.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, ETA, fluorescence quantitative PCR (FQ-PCR), TaqMan probe, detection

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)又称绿脓杆菌, 属假单胞菌属, 在自然界分布甚广,

**Received:** August 16, 2007; **Accepted:** September 28, 2007

**Supported by:** the National Natural Science Foundation of China (No. 20676042).

**Corresponding author:** Hui Wu. Tel: +86-20-88372853; E-mail: fehwu@scut.edu.cn

国家自然科学基金(No. 20676042)资助。

是最常见的获得性致病菌,在机体免疫力低下时可引起多种疾病,有较高的死亡率<sup>[1,2]</sup>。因此,早期明确诊断有利于控制 PA 感染,降低死亡率。传统的细菌培养检测法需要时间过长,不能满足临床诊断的要求。免疫学检测的实验步骤多、周期长。传统的 PCR 法需要对 PCR 反应进行后处理且不能精确定量<sup>[3]</sup>。以 SYBR Green I 染料建立荧光 PCR 检测方法,因为 SYBR Green I 染料对 DNA 模板没有选择性,特异性不强<sup>[4]</sup>。TaqMan 探针的荧光 PCR 检测具有定量准确、快速、简便、直观的优势,在病原菌检测中得到广泛的应用<sup>[5,6]</sup>。

绿脓杆菌外毒素 A(ETA)是 PA 最具毒性的胞外产物,95%以上临床分离 PA 都会分泌这种毒素<sup>[7]</sup>。ETA 基因高度保守<sup>[8-9]</sup>,可作为 FQ-PCR 检测的目的基因。本研究建立了一种以 ETA 基因为靶基因设计 TaqMan 探针的快速检测 PA 的实时荧光 PCR 检测方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样本及阴性对照样品

PA ATCC27853 和 ATCC15442 各 1 株,分别购于广东省微生物研究所微生物菌种保藏中心和中国普通微生物菌种保藏管理中心。4 株 PA 分离株由深圳市疾病预防控制中心提供。金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、伤寒杆菌(*Salmonellatyphiurium*)、变形杆菌(*Proteus vulgaris*)等 16 株阴性对照菌株分别由广州市疾病预防控制中心和深圳太太基因工程有限公司提供。菌种列表详见表 2。

#### 1.1.2 主要仪器

ABI7500 荧光定量 PCR 仪、Biophotometer 分光光度计(Eppendorf), PTC-100<sup>TM</sup> 自动热循环 PCR 仪(MJ Research), Sigma 低温微量超速离心机。

#### 1.1.3 试剂

DNA 提取试剂盒、胶回收试剂盒购于大连宝生物公司。Taq 酶为 MBI 公司产品。pUCm-T 载体购于上海生物工程有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 ETA 基因特异性分析和引物、探针的设计与合成

在线登陆 GenBank([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), 获

得铜绿假单胞菌 ETA 基因的 DNA 序列: AE004091, AF227419, AF227420, AF227421, AF227422, AF227423, AF227424, CP000438, K01397, NC002516, NC008463, 利用 DNASTar 软件的 MegAlign 模块对上述序列进行同源性分析比较。选出 ETA 基因中相对保守且高度特异的核苷酸片段,将选取的 ETA 保守序列与 GenBank 数据库中所有生物核苷酸序列进行 BLAST 比较分析,证实所选片段的高度特异性。然后采用 Primer Express 2.0 软件设计一对特异性引物和一个 TaqMan 探针,探针的荧光标记选择 FAM 作为报告发光基团, TAMRA 为淬灭基团。上述引物和探针由上海生工生物工程有限公司合成。

#### 1.2.2 细菌的培养和 DNA 模板的制备

将 PA 及其它菌株用营养肉汤培养基(0.3%牛肉膏、1%蛋白胨、0.5%氯化钠、pH 值 7.2)37°C、160 r/min 培养 48 h。细菌增菌后,用 DNA 提取试剂盒提取细菌的基因组 DNA 作为 FQ-PCR 的模板,-20°C 保存。

#### 1.2.3 ETA 标准质粒的构建

用上下游引物对 PA ETA 基因进行 PCR 扩增。扩增体系 25  $\mu$ L, 含 10 $\times$ Taq 缓冲液(MgSO<sub>4</sub> 20 mmol/L) 2.5  $\mu$ L, dNTP mixture 1  $\mu$ L, Pf 及 Pr 引物(30  $\mu$ mol/L) 各 0.12  $\mu$ L, Taq DNA 聚合酶(2.5 u/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L, PA 基因组 DNA (0.5  $\mu$ g) 2  $\mu$ L, 高纯水 18.6  $\mu$ L。扩增条件: 95°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 55°C 退火 40 s, 72°C 延伸 1 min, 30 个循环; 72°C 延伸 5 min。以胶回收试剂盒回收、纯化 ETA 扩增片段,连接至 pUCm-T Vector 上,转化到 *E. coli* JM109 中,用含有 X-Gal、IPTG、Amp 的 LB 琼脂筛选阳性克隆。挑取白色菌落培养增菌,用 PCR 鉴定插入片断,鉴定克隆后提取质粒并测序(上海生物工程有限公司),测序结果与 GenBank 序列比对无误之后,用分光光度计测定 pUCm-T-ETA 浓度与纯度,-20°C 保存。

#### 1.2.4 FQ-PCR 的反应体系和条件的建立和优化

建立 25  $\mu$ L 的 FQ-PCR 反应体系,采用正交实验法对上下游引物浓度、探针浓度、Mg<sup>2+</sup>浓度进行优化, Mg<sup>2+</sup>浓度从 1.5~4 mmol/L 递增,引物浓度从 1~2  $\mu$ mol/L 递增,探针浓度从 0.5~12  $\mu$ mol/L 递增。并对循环条件进行优化。

#### 1.2.5 定量标准曲线的建立

以构建好的 pUCm-T-ETA 作为 PA 标准质粒,建立 FQ-PCR 检测的标准曲线。根据质粒的分子量与

质量浓度, 计算其拷贝数浓度, 计算公式为: 拷贝数 =  $(OD \times 50 \times 10E-6 / (324.5 \times \text{碱基数}) \times (6.02 \times 10^6 + 23)$  [copies/mL], 并将标准质粒 10 倍梯度稀释 4 个梯度, 利用优化好的 FQ-PCR 反应体系检测 4 个反应管的循环阈值, 建立质粒拷贝浓度与 Ct 值对应的对应关系的定量标准曲线。

### 1.2.6 特异性检测

以金黄色葡萄球菌、伤寒杆菌、福式志贺菌、变形杆菌等作为阴性对照, 并用高纯水作为无模板 (no template control, NTC) 对照验证 FQ-PCR 法检测 PA 的特异性。

### 1.2.7 灵敏度检测

将 PA 基因组 DNA 十倍稀释 10 个梯度, 取 2  $\mu$ L 作为模板, 按上述优化好的反应体系与反应条件分别建立 10 管 FQ-PCR 反应体系, 并根据上述标准曲线分别计算出对应的 DNA 基因的拷贝数。

## 2 结果

### 2.1 ETA 特异性片断分析

通过对 GenBank 数据库中所有绿脓杆菌的 ETA 核苷酸序列, 利用 DNASTar 软件的 MegAlign 进行同源性分析, 我们选取 ETA 全长基因(K01397)2096~

2180 bp 这段相对保守且高度特异的核苷酸片段作为 FQ-PCR 扩增的靶序列, 序列如下: 5'-CACCGCCAACTGGAGGAGCGCGGCATATGTGTTTCGTCGGTACCACGGCACCTTCCTCGAAGCGGCGCAAGCATCGTCTTCGGCG-3'。然后与 GenBank 数据库中所有生物核苷酸序列进行 BLAST 比较分析, 证实所选片段均是高度特异的。然后利用 Primer Express 引物探针设计软件设计一对检测绿脓杆菌的引物和一个 TaqMan 探针(见表 1), 上游引物位于 2096~2112 bp, 下游引物位于: 2163~2180 bp, 探针位于 2120~2144 bp。

### 2.2 pUC-18-T 标准质粒的构建

用 PA-pf 和 PA-pr 扩增 pUC-18-T-ETA 质粒, 纯化后测序结果显示, pUCm-T-ETA 所含的 ETA 序列与 GenBank 公布序列(No. K01397)完全一致。

### 2.3 FQ-PCR 体系和循环建立和优化

采用正交实验法对上下游引物浓度、探针浓度、 $Mg^{2+}$  等进行优化, 最终确定最佳反应体系为: 在 25  $\mu$ L 反应体系中, 上下游引物浓度为 0.6  $\mu$ mol/L, 探针浓度为 0.3  $\mu$ mol/L,  $Mg^{2+}$  浓度为 3.75 mmol/L, 0.4 mmol/L dNTPs。荧光定量 PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C、3 min; 95 $^{\circ}$ C、5; 60 $^{\circ}$ C(收集 FAM 荧光)、40; 40 个循环。

表 1 引物和探针的序列

Table 1 Nucleotide sequences of primers and probes for FQ-PCR

Name	Sequences	Length/bp	%GC	Tm/ $^{\circ}$ C
Primer PA-pf	5'-CACCGCCAACTGGAGGA-3'	17	64.7	57.6
Primer PA-pr	5'-CGCCGAAGACGATGCTTT-3'	18	55.6	58.6
Probe PA	FAM-5'-TATGTGTTTCGTCGGCTACCACGGCA-3'-TAMRA	25	56.0	69.7

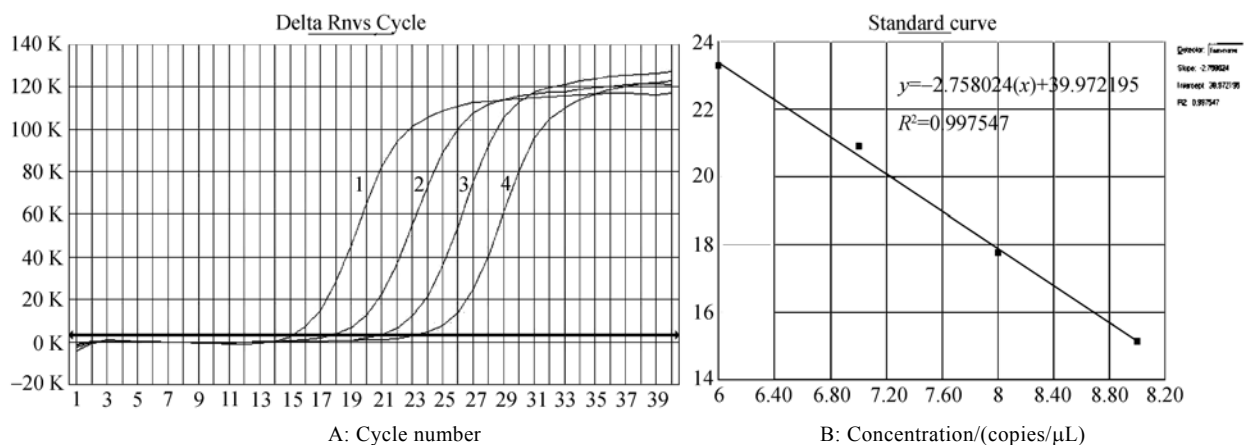


图 1 pUCm-T-ETA 质粒的扩增曲线及标准曲线

Fig. 1 Fluorescence amplification curves (A) and corresponding standard quantitation curve (B) of dilution gradients of recombinant pUCm-T-ETA plasmid detected by the FQ-PCR assay

A: the curves from 1 to 4 represent  $(1.8 \times 10^8 \sim 1.8 \times 10^6)$  copies/ $\mu$ L of pUCm-T-ETA plasmid, respectively; B: the standard curve and related formula

**2.4 FQ-PCR 检测 ETA DNA 标准曲线的建立**

经计算得 pUCm-T-ETA 提取浓度为  $1.8 \times 10^{10}$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ，以梯度稀释至  $1.8 \times 10^8 \sim 1.8 \times 10^5$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的 pUCm-T-ETA 质粒  $2 \mu\text{L}$ ，分别建立四管标准品反应体系，进行 FQ-PCR 检测。根据每管所测得 Ct 值(y)与所含质粒拷贝数浓度(x)之间的对应关系，得到 FQ-PCR 检测 ETA 的标准曲线(见图 1)。循环阈值(Ct 值)和初始拷贝数的对数相关性好，相关系数为 0.997547，初始拷贝数与 Ct 值的关系之间的线性关系表达:  $y = -2.758024(x) + 39.972195$ 。

**2.5 特异性试验**

分别以沙门氏菌、单增李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌等 DNA 作为待检样品，以高纯水为 NTC，进行 PCR 特异性检测。结果表明除两株 PA 标注菌株和 4 株分离株样品呈阳性结果外，其他细菌样品均为阴性(表 2)。

**2.6 灵敏度检测**

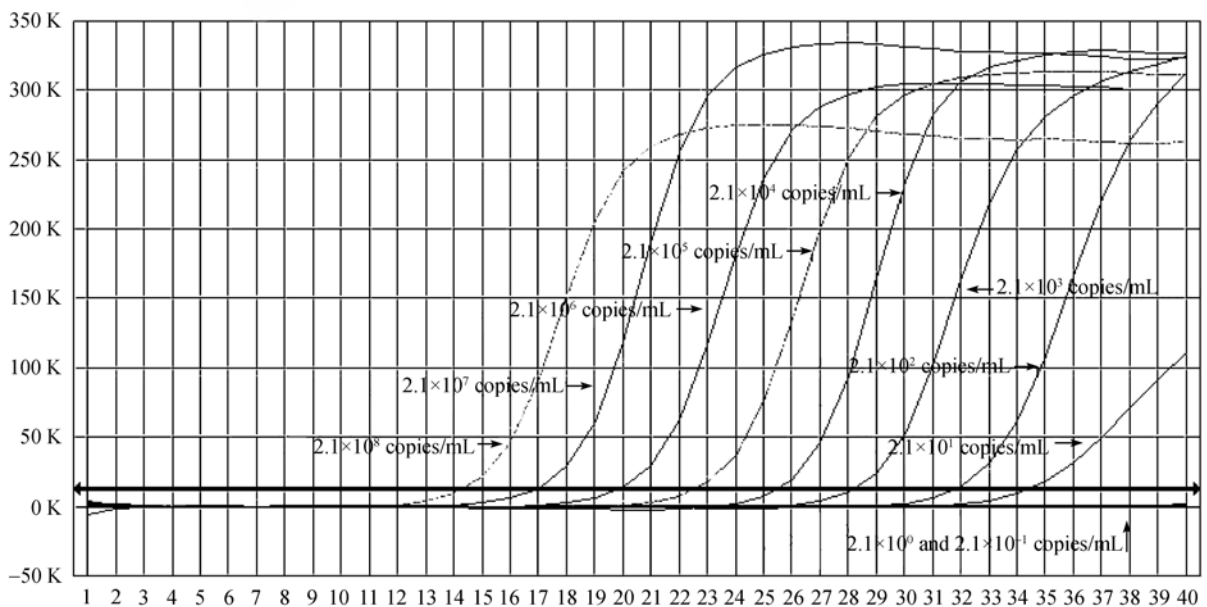
将纯化好的 PA 基因组 DNA 进行 10 倍梯度稀释，各取  $2 \mu\text{L}$  作为模板，按上述优化好的反应体系与反应条件分别建立 10 管 FQ-PCR 反应体系，按上述优化好的反应体系与反应条件建立 10 管 FQ-PCR 反应体系，并根据上述标准曲线分别计算出对应的 DNA 基因的拷贝数。结果显示，检测灵敏度可达  $2.1 \times 10^1 \sim 2.1 \times 10^2$  拷贝/mL(见图 2)。

**表 2 FQ-PCR 特异性检测结果**

**Table 2 Results of FQ-PCR specificity detection**

Microorganissms	<sup>a</sup> Result
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC15422	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> -1	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> -2	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> -3	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> -4	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	-
<i>Escherichia coli</i>	-
<i>Enterobacter Sakazakii</i>	-
<i>Vibrio vulnificus</i>	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Vibrio cholerae</i>	-
<i>Vibrio alginolyticus</i>	-
<i>Salmonella .spp</i>	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-
<i>Shigella</i>	-
<i>K .pneumonia</i>	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-
NTC	-

<sup>a</sup>results of real-time RT-PCR: +, positive result ; -, negative result



**图 2 实时荧光 PCR 检测 PA 的敏感性实验**

**Fig. 2 Sensitivity detection of real-time FQ-PCR assay for PA**

### 3 讨论

目前 PA 的临床分离率已居医院感染监测细菌的首位, 由其引起的医院内感染高达 30% 以上。近年来, 由于广谱抗生素等制剂的广泛应用以及机械通气等侵袭性诊疗操作的大量开展, PA 感染出现增多趋势, 随着耐药菌株的流行, PA 感染导致了较高的死亡率<sup>[10,11]</sup>。因此, PA 快速的定性、定量诊断, 有利于及时、有效地进行临床干预, 继而对控制 PA 感染、降低死亡率具有重要意义。传统的细菌培养检测法需要 2~3 d 的时间, 完全不能满足临床检测的要求。抗原抗体检测灵敏度不高和传统的 PCR 需要进行后处理且不能精确定量, 试剂还存在致癌的危险<sup>[3,12]</sup>。而荧光 PCR 检测具有定量准确、快速、简便、直观的优势在病原菌检测中有广泛的应用。之前有利用 SBYR Green I 建立 FQ-PCR 检测 PA 的报道<sup>[13]</sup>, 但 SBYR Green I 是一种双链 DNA 结核染料, 它也能与非特异性的 PCR 扩增产物结合而产生荧光, 导致假阳结果, 应用范围有限<sup>[4]</sup>。基于 TaqMan 探针的 FQ-PCR, 引物和探针的双重特异性, 保证了检测有极高的灵敏度和特异性<sup>[14]</sup>。

ETA 基因在 PA 中高度保守<sup>[8,9]</sup>, 研究中我们利用生物信息学技术, 对 ETA 基因进行分析, 选取了 ETA 基因中保守片断作为 FQ-PCR 扩增的靶基因, 保证了 ETA 基因对其他生物的高度特异, BLAST 结果显示我们选取的 ETA 基因片断高度保守。在 ETA 基因和引物、探针的高度特异性的三重保证下, 使检测更为准确, 杜绝了假阳性存在的可能, 实验结果显示基于 ETA 基因的 FQ-PCR 检测有很好特异性。通过一系列的灵敏度试验表明, 绿脓杆菌实时荧光 PCR 检测方法的灵敏度达到了  $10^2 \sim 10^3$  拷贝/mL, 每个反应管的检测的拷贝数则达到了个位数, 已经接近 PCR 方法灵敏度的极限, 比以前报道的 PA 的检测方法的<sup>[9,13]</sup>, 我们建立的 PA 检测方法有更高的灵敏度, 适合对 PA 的特异性监测。

### REFERENCES

[1] Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW, et al. Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005, **171**(11): 1209-1223.

[2] Osmon S, Ward S, Fraser VJ, et al. Hospital mortality for patients with bacteremia due to *Staphylococcus aureus* or

*Pseudomonas aeruginosa*. *Chest*, 2004, **125**(2): 607-616.

[3] Yang AP, Huang JL. Comparison of McAb ELISA kit and PCR method used to detect *Salmonella* rapidly. *Husbandry Animal and Veterinary Medicine*, 2003, **35**(12): 21-22.

杨爱萍, 黄金林. 单抗酶联试剂盒与 PCR 方法快速检测沙门氏菌的比较. *畜牧与兽医*, 2003, **35**(12): 21-22.

[4] Wang ZG, Liu JH, Xu BL, et al. Development of SYBR green I real-time PCR assay for detection of *Morbific Bacillus cereus* strains. *Letters in biotechnology*, 2006, **17**(1): 40-42.

王振国, 刘金华, 徐宝梁, 等. 应用实时荧光 PCR 检测致病性蜡样芽孢杆菌. *生物技术通讯*, 2006, **17**(1): 40-42.

[5] Bassler HA, Flood SJA, Livak KL, et al. Use of a fluorogenic probe in a PCR-based assay for the detection of *listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**, 3724-3728.

[6] Lyon WJ. TaqMan PCR for detection of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1 and non-O139 in pure cultures, raw oysters, and synthetic seawater. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 4685-4693.

[7] Iglewski BH, Kabat D. NAD-dependent inhibition of protein synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* toxin A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1975, **72**(6): 2284-2288.

[8] Gray GL, Smith DH, Baldrige JS, et al. Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the exotoxin A structural gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, **81**(9): 2645-2649.

[9] Zhang W, Li W, Zhang WW, et al. The methodological study on rapid identification of *Pseudomonas aeruginosa* based on PCR technique. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2005, **15**(9): 1065-1067.

张伟, 李闻, 张伟尉, 等. 基于 PCR 技术的绿脓杆菌快速检测方法研究. *中国卫生检验杂志*, 2005, **15**(9): 1065-1067.

[10] Rossolini GM, Mantengoli E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect*, 2005, **11**(4): 17-32.

[11] Kolak J, van Saene HK, de la Cal MA, et al. Control of bacterial pneumonia during mechanical ventilation. *Croat Med J*, 2005, **46**(2): 183-196.

[12] Wang Q, Zhang X, Zhang HY. Rapid detection of *Salmonella* in food by PCR technique. *Inspection and Quarantine Science*, 2005, **15**(6): 26-28.

汪琦, 张昕, 张惠媛, 等. 利用 PCR 方法快速检测食品中的沙门氏菌. *检验检疫科学*, 2005, **15**(6): 26-28.

[13] Xue LJ, Wang YZ, Ren H, et al. Rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* by the fluorescence Quantitative PCR assay targetting 16S rDNA. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2006, **22**(5): 789-794.

薛利军, 王勇智, 任浩, 等. 16S rDNA 用作荧光定量 PCR 靶基因快速检测铜绿假单胞菌. *生物工程学报*, 2006, **22**(5): 789-794.

[14] Chen SH, Wang XH, Zhang ML, et al. Fluorescent quantitative PCR with complex probe technique. *Letters in Biotechnology*, 2003, **14**(2): 127-130.

陈苏红, 王小红, 张敏丽, 等. 复合探针荧光定量 PCR 方法的建立. *生物技术通讯*, 2003, **14**(2): 127-130.