

竞争性 RT-PCR 法及对大肠杆菌 *acrA* 基因 mRNA 表达水平的定量研究

陈爱美^{1,2,3} 陈仪本^{1*}

(¹广东省微生物研究所 广州 510070)

(²中国科学院南海海洋研究所 广州 510301)

(³广东省菌种保藏与应用重点实验室 广州 510070)

摘 要 建立了用于检测大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC25922 的 *acrA* 基因 mRNA 表达水平的定量竞争性 RT-PCR (QC-RT-PCR) 体系。PCR 合成目标片段的突变型片段(321bp)作为内标准模板(Internal standard, IS), 与目标片段一致的片段(389bp)作为目标模板(Target standard, TS), 优化两种模板共扩增体系, 梯度稀释 IS 与等量大肠杆菌 cDNA 样本共扩增, 扫描电泳条带, 软件分析数据。结果表明, 引物设计合适, 以 IS 和 TS 为模板实现共扩增, 产物(321bp 和 389bp)通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳有效分离, 梯度稀释 IS 与 cDNA 共扩增产物出现亮度梯度电泳条带, 获得一元回归曲线 $y = -0.345 + 0.097x$ (相关系数 $r = 0.959$ 标准差 $s = 0.05997$)。该研究成功构建内标准模板, 优化的共扩增 PCR 体系实现了对大肠杆菌 ATCC25922 中 *acrA* 基因 mRNA 表达水平的检测, 具有简便、高效、敏感度高等优点。

关键词: *acrA*; 定量竞争性 RT-PCR; 外排系统

中图分类号: Q78, Q935 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2007)02-0235-05

AcrAB-TolC 是一个三聚体的多药外排泵, 位于大肠杆菌(*Escherichia coli*) 细胞膜上, 由内膜蛋白 AcrB, 外膜蛋白 TolC 和周质融合蛋白 AcrA 三部分构成。该系统的作用底物非常广泛, 包括四环素类、氯霉素类、氟喹诺酮类、 β -内酰胺类、大环内酯类、利福平类、新生霉素、梭链孢酸等抗生素, 溴乙锭、十二烷基磺酸钠、脱氧胆酸, 以及吡啶黄、结晶紫染料等^[1~4]物质。张小林等^[5]通过 RT-PCR 方法研究发现在临床分离大肠杆菌菌株中 *acrAB* 的表达水平明显高于敏感野生株, 李乾学等^[6]采用 Western blot 方法研究发现氟喹诺酮类高耐药临床分离大肠杆菌菌株中 *acrA* 基因过量表达。同时, 近年来有许多研究发现在肠杆菌科的其它几个属中也检测到了与大肠杆菌的这一主动外排系统同源性极高的基因, 在耐药菌株中, 该系统的基因 mRNA 表达水平明显高于敏感野生株^[7~10]。

定量竞争性 PCR (quantitative competitive polymerase chain reaction, QC-PCR) 是根据常规 PCR 发展起来的一种用于核酸定量的 PCR 技术。1990 年, Gilliland 首次将其应用于细胞因子 mRNA 和 DNA 基因体外扩增的定量分析^[11]。与其它研究基

因表达水平的方法相比, 该方法具有实验周期短、使用材料少、灵敏度高、操作简便等优点, 现已广泛用于细胞 DNA、RNA 以及病毒、细菌核酸的定量检测。本实验为研究大肠杆菌中 *acrA* 基因的表达水平奠定基础, 同时对定量竞争性 RT-PCR 这一方法的可靠性及精确性进行了探索和验证。采用该体系可对大肠杆菌中 *acrA* 基因 mRNA 水平进行定量, 进一步研究该基因的表达水平与耐药性之间的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株: 大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC25922 由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器: Taq DNA 聚合酶(鼎国); Triblu(Trizol), 随机引物六聚体(申能博彩); DEPC (AMERSCO); 溶菌 (MBCHEM); dNTPs、DL2000 (TAKARA); M-MLV Reverse、Rnasin (Promega); 琼脂糖 (Biowest); Goldview(赛百盛)。离心机 (SIGMA 1-15K 型 Universal 32R 型); PCR 仪 (BIO-RAD); UVI 凝胶成像与分析系统 (DBT-08 型); 分光光度计 (BEDKMAN DU600 型); 电泳仪 (Amersham Pharmacia

基金项目: 广东省科技攻关项目(2005B32401006); 广东省科学院分析测试基金(SF2005005)

* 通讯作者。Tel: 86-20-37656335; E-mail: cyiben@21cn.com

作者简介: 陈爱美(1982-), 女, 陕西西安人, 硕士研究生, 主要从事微生物抗药性机理研究。E-mail: amchen1982@163.com

收稿日期: 2006-08-22; 接受日期: 2006-10-10; 修回日期: 2006-12-27

Biotech EPS301 型)。

1.1.3 引物设计:根据 GenBank 中 *acrAB* 基因序列,参考张小林等^[5]研究,合成引物 P1(18bp)和 P2(21bp),参考 Celi 等^[12]方法,借助软件 Primer5.0,设计引物 P3P2(39bp),其中 5'端 21 个核苷酸(下划线部分)同 P2。P1 和 P2 用于检测 *acrA* 基因、制备目标模板及建立共扩增体系使用;P1 和 P3P2 用于制备内标准模板。3 条引物序列为 P1:5'-TGTTTGGTTTTCGTGCC-3';P2:5'-GATAATCCCGCTAACTTGAGG-3';P3P2:5'-GATAATCCCGCTAACTTGAGGTTTTCGAC TGTACTACGC-3',由北京赛百盛生物工程公司合成。

1.2 大肠杆菌基因组 DNA 的提取

参照文献^[13]的方法提取大肠杆菌 ATCC25922 基因组 DNA 4℃保存备用。取 2μL 经 1% 琼脂糖凝胶,100V 电压,30min 电泳后,检测基因组 DNA 完整性。

1.3 PCR 检测 *acrA* 基因

PCR 反应采用 20μL 体系:10 × PCR Buffer(含 Mg^{2+}) 2μL;Taq DNA 聚合酶(2.5U/mL) 0.5μL;引物 P1(20μmol/L),引物 P2(20μmol/L),各 0.5μL;dNTP(10mmol/L) 0.5μL;ATCC25922 基因组 DNA,1μL;ddH₂O,补足至 20μL。PCR 反应程序 95℃ 5min;94℃ 30s 56℃ 30s 72℃ 1min,30 个循环 72℃ 10min。产物 5μL 经 1% 琼脂糖凝胶,100V 电压,30min 电泳后拍照检测并送至英骏生物技术有限公司测序,结果借助软件 DNA-MAN Version5.2.2 分析。

1.4 目标模板(TS)和内标准模板(IS)的制备

图 1 为基本原理,按照 1.3 反应体系和程序,PCR 大量扩增获得目标模板(TS)。采用温度梯度 PCR 摸索扩增内标准模板(IS)的退火温度,设计退火温度范围为 55 ~ 65℃,具体为:55℃,55.9℃,56.7℃,57.8℃,59.3℃,61.0℃,62.4℃,63.5℃,64.3℃,65℃。PCR 反应采用 20μL 体系:10 × PCR Buffer(含 Mg^{2+}) 2μL;Taq DNA 聚合酶(2.5U/mL),0.5μL;引物 P1(20μmol/L),引物 P3P2(20μmol/L),各 0.5μL;dNTP(10mmol/L) 0.5μL;ATCC25922 基因组 DNA 3μL;ddH₂O,补足至 20μL。PCR 反应程序:95℃ 5min;94℃ 30s,55 ~ 65℃ 30s,72℃ 1min,30 个循环 72℃ 10min。产物 5μL 经 1.5% 琼脂糖凝胶,100V 电压,30min 电泳后拍照。采用摸索得到的最适退火温度,PCR 大量扩增获得内标准模板(IS)。对大量获得的 TS 和 IS 片段进行凝胶回收,测定 OD_{260} 和 OD_{280} ,无菌水调整至 IS 和 TS 单位浓度拷贝数(copies/μL)相等。

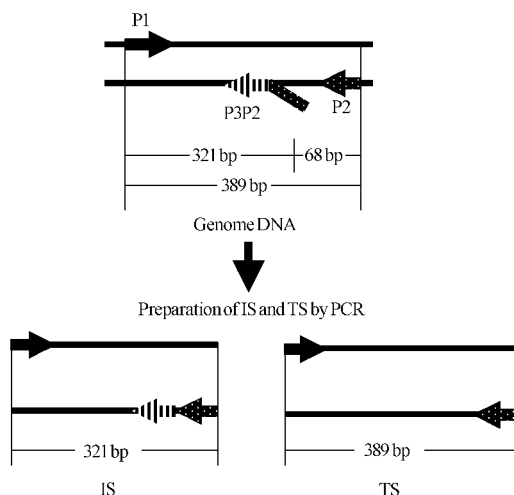


图 1 制备内标准模板(IS)和目标模板(TS)原理示意图

Fig.1 Schematic diagram of preparation of IS and TS.

1.5 内标准模板(IS)和目标模板(TS)共扩增

采用温度梯度 PCR 摸索 IS 和 TS 共扩增退火温度,温度范围为 55 ~ 65℃,具体为:55℃,55.9℃,57.8℃,61.0℃,63.5℃。PCR 反应采用 20μL 体系:10 × PCR Buffer(含 Mg^{2+}) 2μL;Taq DNA 聚合酶(2.5U/mL) 0.5μL;引物 P1(20μmol/L),引物 P2(20μmol/L),各 0.5μL;dNTP(10mmol/L) 0.5μL;IS,TS 各 3μL;ddH₂O,补足至 20μL。PCR 反应程序:95℃ 5min;94℃ 30s,55 ~ 65℃ 30s,72℃ 1min,35 个循环 72℃ 10min。产物 10μL 经 1.5% 琼脂糖凝胶,100V 电压,30min 电泳后拍照。

1.6 大肠杆菌总 RNA 提取及基因组 DNA 的去除

参照 Tribble(Trizol)试剂说明书并根据 G⁻ 细菌特征设计方法,在使用 Tribble 裂解之前用溶菌酶破菌,使 Tribble 的作用效率更高,增加 RNA 得率。为了避免获得的总 RNA 样品中含有痕量的基因组 DNA,影响 mRNA 的定量,所以本实验需要去除总 RNA 样品中痕量的基因组 DNA,方法参照 DNase I(RNase Free)试剂说明书进行。对除去基因组 DNA 的总 RNA 样品稀释后测定 OD_{260} 和 OD_{280} ,计算 RNA 的浓度。对初提及去除基因组 DNA 的总 RNA 样品各取 5μL 经 1% 琼脂糖凝胶,200V 电压,10min 快速电泳后拍照。

1.7 反转录合成 cDNA 第一链

参照 M-MLV Reverse Transcriptase 试剂说明书并稍加改进,将反应温度设定为 42℃并适当延长反应时间。合成的 cDNA 第一链产物稀释后测定 OD_{260} 和 OD_{280} ,计算 cDNA 浓度。

1.8 竞争定量 PCR 体系的建立

① 中国疾病预防控制中心微生物学所期刊室编辑部 对内标准模板(IS)进行 10 倍梯度系列稀释,制

成 1×10^{10} copies/ μL , 1×10^9 copies/ μL , 1×10^8 copies/ μL , 1×10^7 copies/ μL , 1×10^6 copies/ μL , 1×10^5 copies/ μL , 1×10^4 copies/ μL , 1×10^3 copies/ μL 和 1×10^2 copies/ μL 的模板, -20°C 保存备用。将梯度稀释的 IS 分别与等量大肠杆菌 ATCC25922 cDNA 样本加入同一管中进行共扩增。PCR 反应体系: $10 \times$ PCR Buffer(含 Mg^{2+} 离子), $2\mu\text{L}$; *Taq* DNA 聚合酶($2.5\text{U}/\text{mL}$), $0.5\mu\text{L}$; 引物 PI($20\mu\text{mol}/\text{L}$), 引物 P2($20\mu\text{mol}/\text{L}$), 各 $0.5\mu\text{L}$; dNTP($10\text{mmol}/\text{L}$), $0.5\mu\text{L}$; IS(10 倍系列稀释) cDNA, 各 $3\mu\text{L}$; ddH₂O, 补足至 $20\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序同 1.5 并采用 1.5 得到的共扩增的最适退火温度。产物取 $10\mu\text{L}$ 经 1.5% 琼脂糖凝胶, 100V 电压, 30min 电泳后拍照。采用 UVI 凝胶成像与分析系统对电泳条带进行灰度扫描, 获得各个条带灰度值, 所获数据采用软件 SPSS11.5 和 EurveExpert1.3 进行统计学分析。

2 结果

2.1 PCR 检测 *acrA* 基因

PCR 产物片段大小与预期相符为 389bp , 测序结果与 GenBank 所查序列的同源性为 99.23% 。

2.2 温度梯度 PCR 摸索扩增内标准模板(IS)的最适退火温度

PCR 产物电泳结果见图 2。可见片段大小与预期相符为 321bp , 退火温度范围较宽, 在预先设定的 10 个退火温度中只有在 65°C 的条件下扩增得到的条带较弱。为了便于随后共扩增体系的建立, 将 56°C 确定为共扩增反应的退火温度。

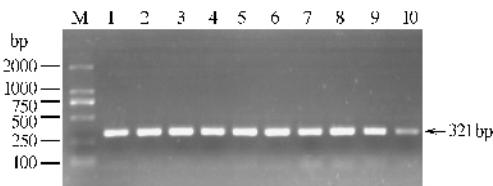


图 2 温度梯度 PCR 摸索制备内标准模板退火温度电泳

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of IS amplified by temperature-gradient-PCR. M :DL2000 ;1 ~ 10 :The annealing temperatures are 55.0°C , 55.9°C , 56.7°C , 57.8°C , 59.3°C , 61.0°C , 62.4°C , 63.5°C , 64.3°C , 65.0°C separately.

2.3 内标准模板(IS)和目标模板(TS)的定量

对 PCR 产物纯化后进行定量, 无菌水稀释, 使内标准模板(IS)和目标模板(TS)的单位浓度拷贝数均为 1×10^{11} copies/ μL , -20°C 保存备用。

2.4 温度梯度 PCR 摸索扩增内标准模板(IS)和目标模板(TS)共扩增的最适退火温度

PCR 产物电泳结果见图 3。两条片段大小均与

预期相符, 分别为 321bp 和 389bp , 二者相差 68bp ; 5 种退火温度均可见产物, 其中 55°C , 55.9°C 和 57.8°C 3 种退火温度得到的产物条带相对较亮; 在共扩增体系中, 两种模板的加入量相等, 图中两个条带的亮度一致。根据以上结果, 将共扩增反应的退火温度定为 56°C 。实验表明引物设计合理, 内标准模板(IS)和目标模板(TS)在同一反应体系中实现了对各个反应成分的竞争, 二者扩增效率一致, 两种产物条带大小相差合适, 在 1.5% 琼脂糖凝胶上可有效分离。由此可见该体系适当, 可用于竞争定量 PCR 反应。

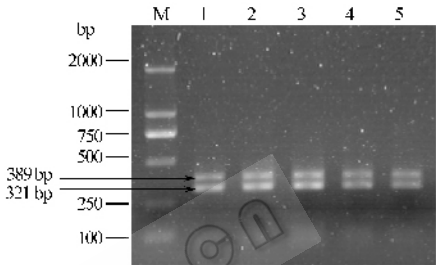


图 3 温度梯度 PCR 摸索内标准模板与目标模板共扩增的退火温度电泳结果

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of co-amplification of IS and TS. M :DL2000 ;1 ~ 5 :the annealing temperatures are 55.0°C , 55.9°C , 57.8°C , 61.0°C , 63.5°C separately.

2.5 大肠杆菌总 RNA 提取

电泳结果见图 4, 初提以及去除基因组 DNA 的总 RNA 样品中 5S、16S 和 23S 这 3 条带清晰可见, A_{260}/A_{280} 均在 1.8 和 2.0 之间, 可以推测 mRNA 未降解且纯度较高, 可用于反转录。

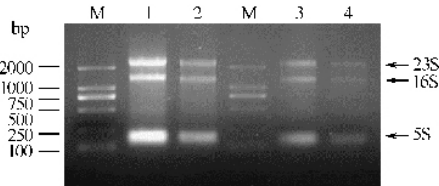


图 4 *E. coli* ATCC25922 菌株的总 RNA 电泳结果

Fig.4 Agarose gel electrophoresis of total RNA of *E. coli* ATCC25922. M :DL2000 ;1, 2 :The originally isolated total RNA of *E. coli* ATCC25922 ;3, 4 :The total RNA of *E. coli* ATCC25922 with genome DNA eliminated.

2.6 竞争定量 RT-PCR 体系的建立

电泳结果见图 5。随着 IS 拷贝数的梯度减少, 以 IS 作为模板的内标准模板产物大小 321bp 的条带亮度明显降低, 而以 cDNA 作为模板的目标产物 389bp 的条带亮度明显增加, 两种模板在同一体系中实现了对引物, dNTP 等反应成分的竞争, 产物条带的亮度与模板量正相关。UVI 凝胶成像与分析系

统对电泳条带进行灰度扫描,得到各个条带的峰面积。结果见表1,条带峰面积的大小与模板的量呈正相关。以lg[内标准模板产物峰面积/目标产物峰面积]为纵坐标,以lg[内标准模板拷贝数]为横坐标,采用软件SPSS11.5和Curve-Expert1.3分别作线性回归分析,得到相同的一元回归方程 $y = -0.345 + 0.097x$,见图6(相关系数 $r = 0.959$,判定系数 $R^2 = 0.920$,标准差 $s = 0.05997$,对相关系数的假设检验 $P = 0.002 < 0.01$;F检验, $F = 45.917 > F_{0.01}$;t检验, $|t| = 6.76 > t_{0.01}$)。分析结果显示lg[内标准模板拷贝数]与lg[内标准模板产物峰面积/目标产物峰面积]之间存在显著的直线回归关系。当[内标准模板产物峰面积/目标产物峰面积]=1,两种模板的加入量相等时,lg[内标准模板产物峰面积/目标产物峰面积]=0,即 $y = 0$,根据公式即可求得 x ,即lg[内标准模板拷贝数]的值,得出内标准模板的拷贝数,由于此时内标准模板与cDNA样本中目标模板量相等,从而得出cDNA样本中目标模板的拷贝数,实现对样本中目标模板的定量。本实验中,当 $y = 0$ 时,lg[内标准模板拷贝数]=3.55,则cDNA样本中目标模板拷贝数等于内标准模板拷贝数为3162,即约为 3×10^3 copies。

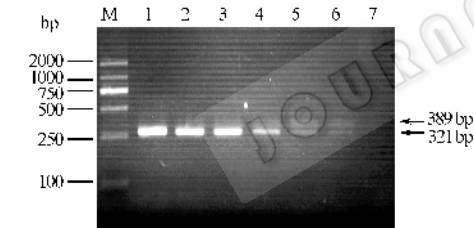


图5 10倍系列稀释内标模板与cDNA共扩增电泳结果

Fig.5 Agarose gel electrophoresis of co-amplification of 10-folded IS and cDNA of *E. coli* ATCC25922. M :DL2000 ;1~6 :The quantities of IS are 3×10^7 , 3×10^6 , 3×10^5 , 3×10^4 , 3×10^3 , 3×10^2 copies separately ;7 : negative control.

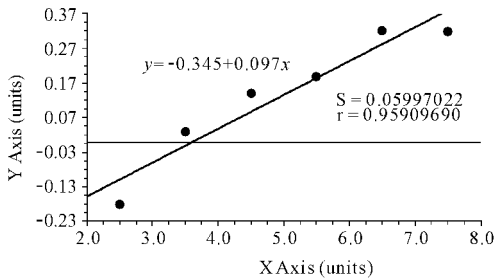


图6 QC-RT-PCR结果的统计学分析

Fig.6 Statistic analysis of quantitative competitive RT-PCR products. x-Axis:lg[IS, copies];y-Axis:lg[band scanning area(321bp)/band scanning area(389bp)].

表1 QC-RT-PCR产物条带密度扫描结果

Sample No.	x-Axis		Bands scanning areas		y-Axis
	IS copies	lg IS copies	321bp (a)	389bp (b)	lg a/b
1	3×10^7	7.4771	1815	867	0.320857532
2	3×10^6	6.4771	1657	790	0.321695417
3	3×10^5	5.4771	1580	1020	0.190056915
4	3×10^4	4.4771	1420	1025	0.141564479
5	3×10^3	3.4771	1106	1027	0.032184683
6	3×10^2	2.4771	790	1184	-0.175724611

3 讨论

目前,采用 Northern blot、RNA 点杂交、RNA 狭线杂交、核酸酶保护实验和原位核酸杂交等方法均可检测细胞内 mRNA 水平,但缺点是起始材料 RNA (mRNA)用量大,灵敏度低,时间周期长。在一般情况下,上述方法至少需要微克级水平的 RNA,而 RT-PCR 法至多才需要几微克 RNA,最少可至 pg 级水平;由于 RT-PCR 可使靶基因产物扩增几百万倍,因此灵敏度高^[11];此外,RT-PCR 实验周期短、所需试剂少等优点也使该方法更广泛的使用。

本实验设计 3 条引物,通过 PCR 合成比目标片段短 68bp 的突变型片段作为内标准模板(IS),再通过 PCR 合成与目标片段相同的片段作为目标模板(TS)。将获得的 IS 和 TS 分别纯化后定量,制备成拷贝数相等的两种模板;IS 和 TS 有共同的引物结合位点,因此可在同一体系中共扩增,通过温度梯度 PCR 摸索获得二者共扩增的最适退火温度,优化体系中各个反应成分的加入量;最后将梯度系列稀释并已知拷贝数的 IS 和目标片段拷贝数未知的 cDNA 样本采用获得的共扩增最适体系进行扩增,随着体系中内标准模板的拷贝数减少,样本 cDNA 中目标片段逐渐得到扩增,当二者的拷贝数在一个数量级时即可进行同等效率的扩增,在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳图上可见亮度一致但大小相差 68bp 的两条带;通过 UVI 凝胶成像与分析系统进行条带灰度扫描,统计学软件分析数据,获得竞争曲线,从而对菌株中 *acrA* 基因 mRNA 表达水平进行定量分析。采用该体系可对临床或食品中分离得到的大肠杆菌耐受菌株中 *acrA* 基因 mRNA 水平进行定量,以便进一步研究该基因 mRNA 的表达水平与大肠杆菌耐药表型之间的关系。

参 考 文 献

[1] 饶 勇,曾振灵,陈权榴,等. 抗生素耐药性的主动外排机制.国外医药抗生素分册,2002 23(3):109-114.
[2] Nikaido H. Multidrug efflux pumps of gram-negative Bacteria .

- [3] Okusu H , Ma D , Nikaido H , *et al.* AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance pheno-type of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. *J Bacteriol* , 1996 , **178** (1) : 306 – 308 .
- [4] Murakami S , Nakashima R , Yamashita E , *et al.* Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* , 2002 , **419** (10) : 587 – 593 .
- [5] 张小林,李家泰. 主动外排系统 *acrAB* 在临床分离大肠杆菌中的分布和表达. 中国临床药理学杂志, 1999 , **15** (3) : 171 – 174 .
- [6] 李乾学,邓旭明,于 录,等. 临床分离大肠杆菌对氟喹诺酮类药物高耐药株 *AcrA* 的过量表达. 畜牧兽医学报, 2005 , **36** (11) : 1232 – 1235 .
- [7] 章建立,姚航平,周建英,等. 主动外排系统 *acrAB* 在临床分离肺炎克雷伯菌中的分布和表达. 中国抗感染化疗杂志, 2001 , **4** (4) : 193 – 197 .
- [8] 杨海燕,段广才,郝园林. 主动外排系统 *acrAB* 在志贺菌中分布和表达. 中国公共卫生, 2005 , **21** (6) : 685 – 687 .
- [9] 余泽波,姚 成,肖永红,等. 伤寒沙门氏菌主动外排多重耐药基因 *acrB* 与表达水平研究. 中国抗生素杂志, 2005 , **30** (8) : 489 – 493 .
- [10] 刘芳萍,佟恒敏. RT-PCR 法定量分析沙门菌中 *acrA* 基因 mRNA 的表达. 毒理学杂志, 2005 , **19** (3) Suppl : 304 .
- [11] 黄留玉,王恒樑,苏国富,等. PCR 最新技术原理、方法及应用. 第一版. 北京: 化学工业出版社, 2005 .
- [12] Celi FS , Zenilman ME , Shuldiner AR. A rapid and versatile method to synthesize internal standards for competitive PCR. *Nucleic Acids Research* , 1993 , **21** (4) : 1047 .
- [13] Ausubel F , Brent R , Kingston RE , *et al.* 精编分子生物学实验指南. 颜子颖,王海林,译. 北京: 科学出版社, 1998 : 39 .

Quantitative competitive RT-PCR and quantitative detection of *Escherichia coli* *acrA*-mRNA

CHEN Ai-mei^{1,2,3} , CHEN Yi-ben^{1,3*}

(¹ Guangdong Institute of Microbiology , Guangzhou 510070 , China)

(² South China Sea Institute of Oceanology , Guangzhou 510301 , China)

(³ Guangdong Province Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application , Guangzhou 510070 , China)

Abstract : A Quantitative detection assay of *acrA*-mRNA of *Escherichia coli* ATCC25922 was developed by Quantitative Competitive RT-PCR. Target Standard (TS) which was same as target-template *acrA* was amplified by PCR with P1 and P2 as primers. Internal Standard (IS) which was shorter 68bp than target-template *acrA* was amplified by temperature-gradient-PCR with P1 and P3P2 as primers , whose annealing temperatures ranged from 55 ~ 65 °C , and the most suitable annealing temperature was acquired at 56 °C . Both TS and IS were largely amplified by PCR as above and extracted to store. Co-amplification with both TS and IS as templates was optimized by temperature-gradient-PCR with P1 and P2 as primers , whose annealing temperatures were ranged from 55 ~ 65 °C , and then the most suitable annealing temperature was also acquired at 56 °C . Then co-amplification optimized as above was did again but with both cDNA of *Escherichia coli* (with target-template *acrA*-cDNA copies unknown) and IS (10-fold serial dilution , and with IS copies known) as templates. The electrophoresis bands were photographed and analysed with UVBand and each band area was acquired , then linear regression analysis was did with SPSS11.5 and CurveExpert1.3 and a competitive curve was drawn as $y = -0.345 + 0.097x$. Results revealed that the two kinds of product electrophoresis bands of co-amplification , whose templates were both 10-fold diluted IS and cDNA , could be distinguished clearly in 1.5% agarose gel because of 68bp discrepancy , and showed lightness dimming gradually with IS copies 10-fold diluting. With the competitive curve , the copies of *acrA*-mRNA in sample could be counted accurately and easily.

Keywords : *acrA* ; quantitative competitive RT-PCR ; efflux pump