

用序列比对设计的茎环结构探针检测金黄色葡萄球菌*

杨旭 肖潇 陈章 李会东 邓乐**

(湖南师范大学生命科学学院 长沙 410081)

摘要 基于金黄色葡萄球菌 16S rRNA 基因序列,采用序列比对设计了一种茎环结构的寡聚核苷酸探针。探针的环序列即为金黄色葡萄球菌 16S rRNA 基因序列的其中一个片段,同其他菌种的 16S rRNA 基因序列误配 2 个以上的核苷酸,因此能高度专一、灵敏的检测金黄色葡萄球菌 16S rRNA。根据分子信标技术和酶联免疫分析的原理,评估一个实验方法,即利用能构象转换的、固定化的茎环结构探针酶联检测靶核酸。由于探针的特异性加强,这个检测系统能有效的排除假阳性即不会出现误配一个核苷酸的情况。采用微量浓度测定分析,最低下限可检测出大约 4ng 的金葡球菌 16S rRNA。这种方法的灵敏度比其他常规检测方法高出了至少一个数量级。

关键词 序列比对,茎环结构探针,16S 核糖体核糖核酸,检测

中图分类号:R378.1+1 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)06-1169-05

Stem-loop Structured Probes Designed by Sequence Comparisons for Detection of *Staphylococcus aureus**

YANG Xu XIAO Xiao CHEN Zhang LI Hui-Dong DENG Le**

(College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081)

Abstract Based on *Staphylococcus aureus* 16S rRNA gene sequences, sequence comparisons have been applied to design a kind of stem-loop structured oligonucleotide probes whose loop sequence mismatched other bacterial strains 16S rRNA gene sequences in more than two positions with high specificity and sensitivity. According to the principle of molecular beacon technology and enzyme linked immunosorbent assay, a method has been evaluated using immobilized stem-loop structured oligonucleotides probe as the conformation switch which is applied to enzymatic detection of nucleic acid targets. As its specificity has been strengthened, the system is able to successfully eliminate false-positive result that is mismatch in an oligonucleotide. Employing a microtiter assay format, 4ng of *S. aureus* 16S rRNA could be detected at least. This approach is more sensitive than other conventional method at least one order of magnitude.

Key words Sequence comparisons, Stem-loop structured probe, 16S rRNA, Detection

金黄色葡萄球菌是目前最难以对付的病原菌之一。金黄色葡萄球菌可以引起小到皮肤感染大到可以致命的严重肺炎、脑膜炎以及骨关节感染、心内膜炎和败血症^[1]。在一般情况下,金黄色葡萄球菌无症状地存在于大约 30% 的人的鼻孔和皮肤上。当一旦它有机会进入到人体内^[2],会引起金黄色葡萄球菌感染或者严重的机体感染如败血症^[3]。尽管常规的微生物检测方法容易鉴定金黄色葡萄球菌,例如凝固酶试验、生化试验、特异性的线性 16S rRNA 基因探针、抗菌素和/或血清型分类法。但是

在某些情况下正确的物种诊断是相当困难的,这是因为至少在一些临床的葡萄球菌物种分离中有广泛的表现特性^[4]。基于分子信标(molecular beacons)的检测方法灵敏、特异、快速,已广泛的应用于细菌的核酸检测^[5,6]。

近年来的应用实践表明,分子信标核酸检测方法存在一些不足。例如分子信标花费高且当分子信标与核酸分子误配一个核苷酸的时候也能够检测出荧光信号,导致假阳性的产生。德国科学家们(Bockisch *et al.*)基于分子信标检测的原理提出了一

* 湖南省教育厅重点资助项目(No.05A034)

** 通讯作者 0731-8872927, E-mail: dengle@hunnu.edu.cn

收稿日期:2006-12-28,修回日期:2007-06-13

种新颖、廉价的酶联构象转换分析系统并在细菌核酸检测中得到了应用^[7]。他们利用亲和标记了的茎环结构的寡聚核苷酸探针来检测靶核酸。这种探针的3'端固定在96孔酶标板上,5'端标记上亲合大分子。当没有靶核酸的时候,亲合分子紧密地靠近在固相支持物的表面而呈现自然状态的发夹结构,由于空间位阻的作用使得酶连接的报告分子不能与亲合分子结合产生信号;当存在靶核酸的时候,探针的环序列与靶核酸完全互补配对使得环被打开,构象发生变化呈现线性结构,暴露在外的亲合分子与报告分子结合产生信号。但是这种方法与分子信标一样在对于存在一个核苷酸误配的时候能检测出信号出现假阳性。本研究在此方法的基础上进行改良,即利用序列比对的方法在目的病原菌16S rRNA高度保守的区域寻找一段序列设计为探针的环序列,这段序列与其它的高度同源菌种的16S rRNA基因序列片段差异两个核苷酸以上,从而避免探针环序列与其他非目的病原菌核酸杂交时出现误配一个核苷酸的情况,克服出现假阳性的问题,极大的提高检测方法的灵敏度和特异性。此外,这个检测系统结合了通过生物信息学方法设计的专一性探针和酶联构象转换分析系统首次应用在金黄色葡萄球菌的16S rRNA检测中。

1 材料与方法

1.1 茎环结构探针的设计与菌株

在NCBI的非冗余核酸数据库中,通过关键词搜索得到金黄色葡萄球菌16S rRNA基因序列

| Strain | Location | 16S rRNA gene sequence | Accession number |
|------------------------|---------------|-----------------------------|------------------|
| <i>S.aureus</i> | 52-69 | CGAACGGA CGAGA AGCTT | L37597.1 |
| <i>S.simiae</i> | 41-58 | CGAACAGATGAGAAGCTT | DQ127902.1 |
| <i>S.sp.11780</i> | 59-76 | CGAACAGACGAGGAGCTT | A8177644.1 |
| <i>S.epidermidis</i> | 51-68 | CGAACAGACGAGGAGCTT | AJ717377.1 |
| <i>BacteriumTe66A</i> | 62-79 | CGAACAGACGAGGAGCTT | AY587794.1 |
| <i>S.caprae</i> | 60-77 | CGAACAGACGAGGAGCTT | AB009935.1 |
| <i>S.croceolyticus</i> | 63-80 | CGAACAGACGAGGAGCTT | AY953148.1 |
| <i>S.haemolyticus</i> | 879901-879918 | CGAACAGACAAGCAGCTT | AF006716.1 |
| <i>S.capitis</i> | 60-77 | CGAACAGACGAGGAGCTT | AB009937.1 |
| <i>S.pasteuri</i> | 54-71 | CGAACAGATAAGGAGCTT | AJ717376.1 |

图1 10种代表性菌株的16S rRNA基因序列队列

其它菌株与金黄色葡萄球菌16S rRNA基因序列不同的地方用灰色指示

1.2 细菌RNA的准备

提取0.5mL处在细胞生长对数期的菌液于离

(L37597),然后根据金黄色葡萄球菌的16S rRNA基因序列通过BlastN程序^[8]在NCBI的BLAST服务器上进行序列比对(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)期望值参数(EXPECT)默认为10。最后10种具有代表性的序列被排列通过ClustalW^[9]和手动编辑如图1所示。在队列中发现金黄色葡萄球菌16S rRNA基因序列中有一段特异性序列(位置:57~64)与其他菌种16S rRNA基因序列差异2个核苷酸以上。因为茎长有6个核苷酸的时候能提供最佳的信噪比,所以茎环结构的探针选择6个核苷酸作为茎序列和18个核苷酸作为环序列。环序列即为一包含有特异性序列的金黄色葡萄16S rRNA基因序列。探针的3'端与5'端分别修饰上生物素和地高辛。

实验中所用到的寡聚核苷酸由上海生工合成,见列表。金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)表皮葡萄球菌(*S. epidermidis*)和白色葡萄球菌(*S. albus*)由中南大学湘雅医学院提供,大肠杆菌(*E. coli*)为本实验室保存菌株。

表1 寡聚核苷酸

| 寡聚核苷酸 | 序列 |
|--------|---|
| 探针 | 地高辛-ggccgt CGAACGGA CGAGA AGCTT acggcc-生物素 |
| 靶核酸 T1 | AAGCTTCTCGTCCGTTCCG |
| 靶核酸 T2 | AAGCTTCTGGTCCGTTCCG |
| 靶核酸 T3 | AAGCTTCTCGACTGTTCCG |

注 探针的小写字母代表茎序列,大写字母为环序列即识别序列。T1与探针的环序列完全互补配对,T2,T3与环序列分别误配1个和2个核苷酸。

心管中4000r/min离心5min。去除上清,加入200μL原生质缓冲液[15mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)],

0.45mol/L 蔗糖, 8mmol/L EDTA (pH 8.0) 和 100 μ L 溶葡萄球菌酶(500 μ g/mL 原液)(Sigma, Deisenhofen, Germany)。混合溶液在冰块上冷却 20min, 然后在 37 $^{\circ}$ C 孵育 5~20min。参考文献 [10], 提取出细菌总 RNA (图 2)。根据文献 [11] 把 RNA 样品片段化, 最后用 5 \times SSC 缓冲液(75mmol/L 柠檬酸钠, pH 7.0 和 750mmol/L 氯化钠)把 RNA 样品稀释至所要分析的浓度。

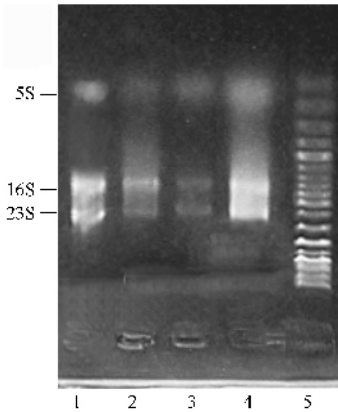


图2 变性凝胶电泳指纹图谱

1 金黄色葡萄球菌 RNA 2 表皮葡萄球菌 RNA,
3 白色葡萄球菌 RNA 4 大肠杆菌 RNA 5 Marker

1.3 在 96 孔酶标板上固定抗生物素蛋白

每孔加入 100 μ L 含有 10mg/L 抗生物素蛋白的碳酸盐缓冲液(50mmol/L, pH 9.5), 在 4 $^{\circ}$ C 孵育。过夜, 弃上清, 每孔加入 200 μ L 的封闭液[PBS, pH 7.4, 3% BSA and 0.05% (V/V) Tween ~ 20] 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。

1.4 固定生物素修饰的茎环结构探针

参考文献 [7], 将生物素修饰的茎环结构探针 (1nmol/L) 固定在 96 孔酶标板的每一个孔表面。

1.5 比色分析

把稀释了的核酸样品加入到包被上探针的酶标板中, 每孔 100 μ L 22 $^{\circ}$ C 孵育 90min。用冰冷的 0.5 \times SSC-Tween [7.5mmol/L 柠檬酸钠, pH 7.0, 75mmol/L NaCl and 0.1% (V/V) Tween-20] 洗涤 3 次, 之后每孔加入 100 μ L 用 0 $^{\circ}$ C 的 5 \times SSC 缓冲液稀释 1000 倍的抗地高辛碱性磷酸酯酶(anti-Dig-Fabfragment-AP), 在 4 $^{\circ}$ C 孵育 10min。再次洗涤 3 次, 加入 100 μ L 的碱性磷酸酯酶显色底物 pNPP (用 10mmol/L Tris, pH 9.5 和 137mmol/L NaCl 稀释至 5mg/mL)。在 405nm 处用 Multiskan Ascent 酶标仪 (Multiskan, Labsystems, Finland) 测定每孔中的吸光值。

2 结果

2.1 孵育时间的影响

因为酶标板的制作材料是聚苯乙烯, 所以蛋白质和酶能吸附在酶标板的表面。抗地高辛碱性磷酸酯酶在酶标板上孵育的时间能影响系统检测结果。在未加入靶核酸的情况下, 用茎环结构探针和抗地高辛碱性磷酸酯酶报告分子研究不同孵育时间对背景的影响, 按照方法 1.5 得到了背景与时间的关系如图 3 所示。随着时间的增加, 吸附在酶标板表面的抗地高辛碱性磷酸酯酶浓度越高, 加入其显色底物 pNPP 后导致背景加强。因此确定 10min 为最佳孵育时间。

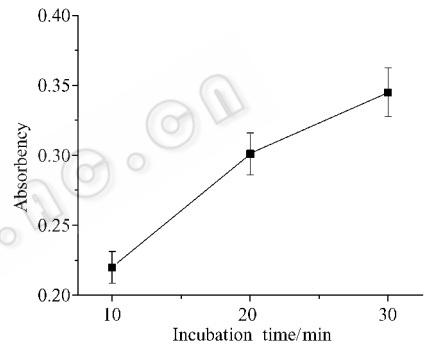


图3 孵育时间对背景吸光值的影响
结果显示均为平均值 \pm 标准差 ($x \pm s$)

2.2 茎环结构探针的特异性

分别在酶标板的每孔加入 T1, T2, T3 (见表) 来评估探针的特异性。图 4 表明与探针误配一个核苷酸 (T2) 能检测出部分信号, 大约占完全互补配对 (T1) 发生信号的 80%, 而误配两个核苷酸 (T3) 未检测出信号。因为探针的环序列设计与金黄色葡萄球菌 16S rRNA 基因序列片段完全互补配对而与其他菌株的 16S rRNA 基因序列差异两个核苷酸以上, 避免与其他菌株的 16S rRNA 误配一个核苷酸的情况出现, 有效的排除了假阳性结果。这暗示了酶联构象转换分析系统和探针能应用到金黄色葡萄球菌 16S rRNA 的鉴定。

2.3 温度的影响

在杂交之前, 用不同温度 (50 $^{\circ}$ C, 70 $^{\circ}$ C 和 95 $^{\circ}$ C) 处理固定化的茎环结构探针来检验探针结构的稳定性。图 5 表明温度处理之后并不能导致信号的极大增强, 这就暗示了固定化的茎环结构探针稳定性加强, 茎端未解链, 在杂交之前一直处于闭合状态。

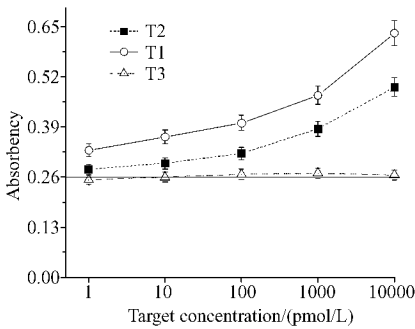


图4 误配的区别

图中的水平线指示未加入靶核酸时的背景,结果显示均为 $x \pm s$

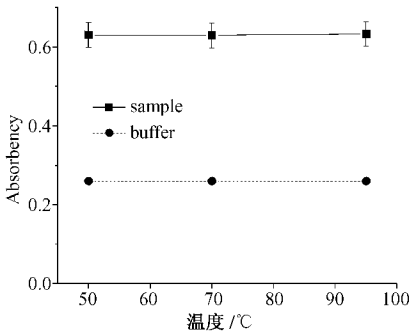


图5 温度的影响

黑方块代表存在 10nmol/L T1 时吸光值,黑圆点代表没有靶核酸 T1 时的背景值,结果显示均为 $x \pm s$

2.4 探针浓度的影响

固定化探针的浓度影响检测系统的背景和检测信号,以不同浓度的探针检测靶核酸 T1(100 nmol/L)测定每孔中的吸光值如图 6A 所示,背景和检测信号随着探针浓度的增加而增加。图 6B 表明信噪比与探针浓度的关系,探针浓度在 1nmol/L 时信噪比达到最大值,而在 10nmol/L 与 100nmol/L 时信噪比急剧下降。这是由于固定化探针浓度过高之后使得空间位阻增加,探针的环结构不能打开导致检测信号降低,所以检测系统选择探针最佳浓度为 1nmol/L。

2.5 检测金黄色葡萄球菌的 16S rRNA

在最佳实验条件下,将已提取的金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、白色葡萄球菌、大肠杆菌 RNA 以相同浓度(0.2 μ g/mL)相同体积 100 μ L 分别加入到已包被上探针的酶标板上杂交,按照方法 1.5 测定吸光值如图 7 所示,发现探针只能和金黄色葡萄球菌的 16S rRNA 杂交后发出信号。在混合样品中鉴定金黄色葡萄球菌的实验,每孔依次加入 30 μ L 相同体积的金黄色葡萄球菌(14.82 μ g/mL)、表皮葡萄球菌(15.57 μ g/mL)、白色葡萄球菌(15.98 μ g/mL)、大肠

杆菌 RNA(14.38 μ g/mL)储备液,比色分析检测出每孔 $x \pm s$ 为 0.494,背景为 0.262。由此可见这个检测系统对于混合样品中鉴定出目的样品可行性。为了评估此方法检测灵敏度,采用不同金黄色葡萄球菌的 RNA 量(2.62ng, 5.14ng, 7.86ng, 10.48ng, 26.2ng, 262ng, 2620ng)用于探针杂交及比色分析如图 8 所示。总 RNA 量 ≥ 10 ng 的时候,可产生检测

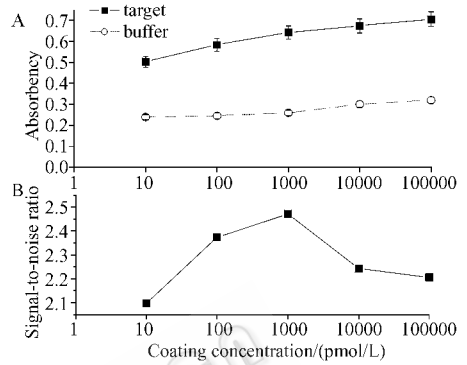


图6 探针浓度对信噪比的影响

A 黑色方块代表存在靶核酸 T1(100nmol/L)时的吸光值,空心圆圈代表没有靶核酸 T1 时的背景值,结果显示均为 $x \pm s$ 。B 信噪比是从 A 中数据计算出。

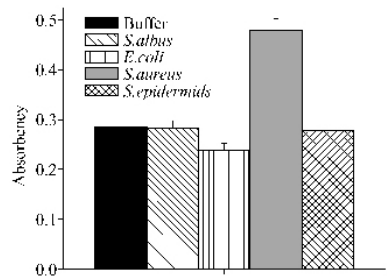


图7 菌株 16S rRNA 的特异性检测

黑色为背景,斑纹条为白色葡萄球菌,竖线条为大肠杆菌,灰色为金黄色葡萄球菌,棋格为表皮葡萄球菌,结果显示均为 $x \pm s$

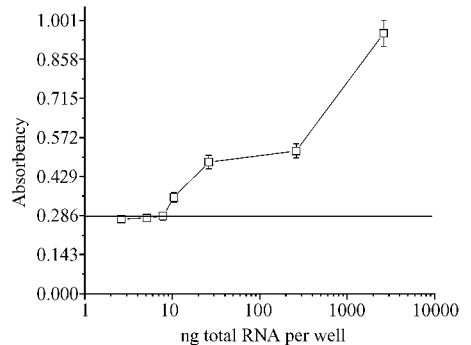


图8 金黄色葡萄球菌 16S rRNA 的检测
水平线指示未加入靶核酸的背景结果,结果显示均为 $x \pm s$

信号。因为10ng的总RNA含有4ng的16S rRNA,推知检测系统最低能检测出大约4ng的16S rRNA。

3 讨论

根据金黄色葡萄球菌16S rRNA基因序列,采用序列比对的方法寻找到一段特异性16S rRNA基因序列片段。这段序列与其他同源性葡萄球菌16S rRNA基因序列片段差异两个核苷酸以上,把它设计成茎环结构探针结合酶联构象转换分析系统特异、灵敏的检测金黄色葡萄球菌16S rRNA,克服出现假阳性的问题。

研究结果表明采用序列比对设计的探针不仅能专一的检测金黄色葡萄球菌,避免与非目的病原菌误配一个核苷酸的情况出现,克服假阳性,而且还能从混合样品中鉴定出金黄色葡萄球菌。同时固定化的探针结构稳定,在杂交之前经高温处理后依然保持其茎环结构,不影响检测结果。在最佳实验条件下,检测系统至少能检测约1pmol/L的靶核酸和约4ng的金黄色葡萄球菌16S rRNA,其灵敏度比电化学DNA传感器^[12]、线性探针、荧光标记的分子信标等检测方法高出了一个数量级,达到亚皮摩尔范围^[13]。因此,在知道靶细菌基因序列前提下,这个通过生物信息学方法设计的专一性探针和酶联构象转换分析系统能代替传统检测技术,甚至能检测含

有变异的靶细菌和应用到单核苷多态性的研究中。

参考文献

- [1] Krimmer V, Merkert H, Frosch M, *et al.* J Clin Microbiol, 1999, **37**: 2667 ~ 2673.
- [2] Lee Y L, Cesario T, Pax A, *et al.* Age Ageing, 1999, **28**: 229 ~ 32.
- [3] Mulligan M E, Murray-Leisure K A, Ribner B S, *et al.* Am J Med, 1993, **94**: 313 ~ 28.
- [4] Proctor R A, Langevelde P, Kristjansson M, *et al.* Clin Infect Dis, 1995, **20**: 95 ~ 102.
- [5] Tyagi S, Kramer F R. Nat Biotechnol, 1996, **14**: 303 ~ 308.
- [6] Goel G, Kumar A, Puniya A K, *et al.* J Appl Microbiol, 2005, **99**: 435 ~ 442.
- [7] Bockisch B, Grunwald T, Spillner E, *et al.* Nucleic Acids Res, 2005, **33**, (11).
- [8] Gotea V, Veeramachaneni V, Makalowski W. Nucleic Acids Res, 2003, **31**(23): 6935 ~ 6941.
- [9] Higgins D. Nucleic Acids Res, 1994, **22**: 4673 ~ 4680.
- [10] J. 萨姆布鲁克. 分子克隆试验指南[M]. 第3版. 北京: 科学出版社, 2003, pp. 522.
- [11] Ausubel FM. Current Protocols in Molecular Biology. Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience J. Wiley NY, 1995, Chapter 3.16.1.
- [12] Fan C, Plaxco K W, Heeger A J. Proc Natl Acad Sci, USA, 2003, **100**: 9134 ~ 9137.
- [13] Gaylord B S, Heeger A J, Bazan G C. Proc Natl Acad Sci, USA, 2002, **99**: 10954 ~ 10957.