

· 基础论著 ·

## 基于 16S rDNAs 的快速检测血液细菌污染的荧光定量 PCR 研究

王永智 薛利军 任浩 赵平 朱诗应 李冕 戚中田

**【摘要】** 目的 探讨快速筛选血液及血液制品中细菌污染的方法。方法 对 20 余种常见致病性细菌的 16S rDNAs 进行多序列比对,设计扩增细菌 16S rDNAs 基因的荧光定量 PCR(FQ-PCR)通用引物。以 12 种致病菌、2 种真菌、1 种支原体、1 种病毒和人基因组 DNA 为模板,验证通用引物检测细菌的特异性。通用引物扩增金黄色葡萄球菌 16S rDNA 靶片段,构建标准质粒 pMDT-Bfr,并建立 FQ-PCR 定量标准曲线。分别以金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌作为革兰阳性和革兰阴性细菌代表菌,以其不同浓度的 DNA 为模板进行 FQ-PCR 反应,检验该方法的敏感性。抽提梯度稀释的金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌模拟血液细菌污染标本的总 DNA 作为 FQ-PCR 反应模板,检验基于 16S rDNAs 的 FQ-PCR 作为血液细菌污染检测方法的敏感性。结果 设计的 FQ-PCR 通用引物有较高的特异性,仅能检测出细菌的 16S rDNAs;用该方法检测革兰阳性和革兰阴性菌,对于浓度在  $10^3$  拷贝/ $\mu\text{l}$  以上的 16S rDNAs 基因都可以准确定量;以该方法检测血液细菌污染模拟标本,灵敏度可达到  $10^5$  CFU/ml。结论 初步建立了以 16S rDNAs 作为 FQ-PCR 靶基因快速检测血液细菌污染的方法。该方法特异性强、灵敏度高、成本低廉,具有很好的研究价值与应用前景。

**【关键词】** 细菌污染;16S rDNAs;荧光定量 PCR

**Rapid FQ-PCR screening for bacterial contamination of blood products based on 16S rDNAs** WANG Yong-zhi\*, XUE Li-jun, REN Hao, ZHAO Ping, ZHU Shi-ying, LI Mian, QI Zhong-tian. \* Department of Microbiology, PLA Key Laboratory of Medical Microbiology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China  
Corresponding author: QI Zhong-tian, Email: qizt@smmu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To establish the rapid screening method for bacterial contamination of blood and related products. **Methods** Multiple sequences of 16S rDNAs from over 20 bacteria were aligned, and the universal primers were designed for fluorescence quantitative PCR (FQ-PCR) assay. Various genomic DNAs from 12 kinds of common pathogenic bacteria, 2 kinds of fungi, 1 kind of mycoplasma, 1 kind of virus

基金项目:军队“十一五”医药卫生科研基金(06Z026,06Z027)

作者单位:200433 上海,第二军医大学微生物学教研室全军医学微生物学重点实验室(王永智、薛利军、任浩、赵平、朱诗应、李冕、戚中田);南京军区南京总医院肿瘤科(薛利军)

通讯作者:戚中田 Email: qizt@smmu.edu.cn

and human genomic DNA were used as templates of routine PCR to confirm the specificity of the universal primers. Genomic DNA of *Staphylococcus aureus* was extracted, and the target 16S rDNA fragment was amplified by PCR with universal primers to construct standard plasmid pMDT-Bfr. The standard quantitation curve was then established by using of the dilution gradients of pMDT-Bfr. To determine the sensitivity of FQ-PCR assay, dilution series of DNAs of *Staphylococcus aureus* and *E. coli* as representative strains for gram-positive and gram-negative bacteria, respectively, were first detected by FQ-PCR with SYBR Green I. To further verify the sensitivity of established FQ-PCR in the screening of bacterial contamination, DNAs extracted from blood samples spiked with series diluted *Staphylococcus aureus* and *E. coli* were used as templates. **Results** The amplified products only have high homology with bacterial 16S rDNAs. The sensitivity of the FQ-PCR assay was  $10^3$  copies/ $\mu\text{l}$  of 16S rDNAs for both gram-positive and gram-negative bacteria. For the blood samples of artificial contamination, bacteria could be detected at concentrations of  $\geq 10^5$  CFU/ml. The above results suggest that FQ-PCR targeting the 16S rDNAs has high specificity and sensitivity. **Conclusions** The FQ-PCR assay targeting 16S rDNAs gene used to detect bacterial contamination of blood exhibits perfect application prospect in the future, because it is rapid, affordable, high sensitive and specific.

**【Key words】** Bacterial contamination; 16S rDNAs; FQ-PCR

血液和血液制品的微生物污染是影响输血安全的重要因素之一。通过输血或注射血制品传播的病原微生物种类很多,其中细菌污染已经越来越引起人们的重视。在美国,输入细菌污染的血液所引起的感染是所有输血致死的第二大死因<sup>[1]</sup>。血液及血制品细菌污染主要因静脉采血不当、献血员菌血症、保存不当等产生<sup>[2]</sup>。全血及红细胞制品的细菌污染通常由革兰阴性嗜冷菌或以枸橼酸为能源的细菌引起,如假单孢菌、大肠埃希菌、无色杆菌、枸橼酸杆菌等。血小板最常见的致病污染菌是葡萄球菌,尤其是表皮葡萄球菌和金黄色葡萄球菌<sup>[3,4]</sup>。目前最常用的检测血液及血制品细菌污染的方法是血培养法,培养的结果一般在 20 h 至 7 d 后才获知,在诊断时效性上存在明显欠缺,还可能因此而降低血液制品的治疗效用。此外,敏感性不高,对于某些难以培养的细菌容易产生假阴性结果<sup>[3]</sup>。

随着分子生物学技术的快速发展,荧光定量 PCR (fluorescence quantitative PCR, FQ-PCR) 技术在病毒、细菌的快速检测方面得到了广泛的应用。对细菌、衣原体和支原体等病原微生物而言,看家基因 16S rDNAs 分布的普遍性及其序列的种内保守性,使其成为微生物快速分类鉴定的理想靶基因<sup>[5,6]</sup>。有研究利用针对细菌 16S rDNAs 基因高度保守区的通用引物,可以进行临床标本中细菌含量测定和细菌感染的初步诊断<sup>[7-9]</sup>。为了寻求能快速、特异性检测血液制品中污染细菌

的方法,本研究通过对数十种致病细菌的 16S rDNAs 序列进行生物信息学分析,设计了细菌 16S rDNAs 通用引物,初步建立了敏感、特异的 FQ-PCR 方法,可用于血液及血液制品中细菌污染的快速筛查。

## 材料与方法

### 一、材料

1. 菌株与培养基:铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)标准株 PA01、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、溶血性葡萄球菌(*Staphylococcus hominis*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、伤寒沙门菌(*Salmonella typhimurium*)、乙型副伤寒沙门菌(*Salmonella paratyphi B*)、炭疽芽胞杆菌(*Bacillus anthracis*)、福氏志贺杆菌(*Shigella flexneri*)、变形杆菌(*Proteus vulgaris*)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)标准株 H37Rv 及大肠埃希菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)等为本室保存;解脲脲原体(*Ureaplasma urealyticum*)、白假丝酵母菌(*Candida albicans*)及克柔氏酵母菌(*Candida krusei*)临床株由上海市第一人民医院实验诊断科李莉主任惠赠。LB 培养基及琼脂平板按《分子克隆实验指南》(第三版)配制,改良罗氏斜面培养基购自上海市临床检验中心,解脲脲原体所用干粉培养基为 LIZVON 产品。

2. 主要试剂:细菌基因组 DNA 提取试剂盒(Bio Basic),质粒小量提取试剂盒、胶回收纯化试剂盒(Qiagen),Taq DNA 聚合酶、dNTP mix、Sau 3AI、pMD18-T 载体与 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup>(TaKaRa)。

3. 主要设备和仪器:Nuair<sup>™</sup>(No. NU-425-400E)生物安全柜;Biophotometer 分光光度计(德国 Eppendorf),PTC-100TM PCR 仪(美国 Bio-Rad),Smart Cycler II 荧光定量 PCR 仪(美国 Cepheid)。

### 二、方法

1. 微生物培养与总 DNA 提取:分别挑取铜绿假单胞菌、SA、伤寒沙门菌、乙型副伤寒沙门菌、福氏志贺菌、变形杆菌、表皮葡萄球菌、溶血葡萄球菌、肺炎链球菌、*E. coli* 及炭疽芽胞杆菌(生物安全柜中操作)的单菌落,接种 LB 肉汤培养基培养过夜。解脲脲原体和真菌分别用解脲脲原体培养基和沙氏培养基培养。结核分枝杆菌以罗氏斜面培养基 37℃ 培养 3 周。培养后的炭疽芽胞杆菌和结核分枝杆菌经高压灭菌后操作。用 Bio Basic 细菌基因组 DNA 提取试剂盒或参照《分子克隆实验指南》方法提取基因组 DNA,分光光度计测定浓度, -20℃ 保存备用。人基因组 DNA、乙型肝炎病毒(HBV) DNA 由本室保存。

2. 引物设计与合成:登录 GenBank 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>),获得包括 *E. coli* (DQ118017)、变形杆菌(J01874、X07652、AJ301683)、白喉棒状杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*, NC\_002935)、破伤风梭菌(*Clostridium tetani*, NC\_004565)、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*, NC\_003366)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*, AAZG01000003、NC\_000907)、肺炎军团菌(*Legionella pneumophila*, NC\_006369、NC\_002942)、牛/人结核分枝杆菌(NC\_000962、NC\_

002945)、脑膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitides*, NC\_003112、NC\_003116)、淋病奈瑟菌(*Neisseria gonorrhoeae*, NC\_002946)、福氏志贺菌(NC\_004337、NC\_004741)、SA(NC\_002951、NC\_002758、BA000033、NC\_002745、BX571856)、表皮葡萄球菌(AJ717377)、肺炎链球菌(X58312)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*, AE003853)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, BA000031)、鼠疫耶尔森菌(*Yersinia pestis*, AE017042、NC\_004088)、铜绿假单胞菌(NC-002516)、布鲁氏菌(*Brucella abortus*, NC\_006932)、土拉弗朗西斯菌(*Francisella tularensis*, NC\_006570)、肠伤寒沙门菌(NC-003198)、鼠伤寒沙门菌(*Salmonella typhimurium*, NC\_003197)、乙型副伤寒沙门菌(U88547)、炭疽芽胞杆菌(AF290552)、蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*, AY425946)及百日咳杆菌(*Bordetella pertussis*, BX470248)等 20 余种细菌的 16S rDNAs 序列。用 MegAlign 软件对各细菌 16S rDNAs 进行多序列比对分析,在高度同源区域设计 FQ-PCR 上下游通用引物 Bf 和 Br,并以 PrimerSelect 软件评估二级结构。引物由北京奥科生物技术有限公司上海分公司合成。

3. 引物的特异性验证:分别以表皮葡萄球菌、SA、溶血性葡萄球菌、肺炎链球菌、结核分枝杆菌、炭疽芽胞杆菌、铜绿假单胞菌、福氏志贺菌、变形杆菌、伤寒沙门菌、乙型副伤寒沙门菌、*E. coli*、HBV、白假丝酵母菌、克柔氏酵母菌和解脲脲原体等 16 种常见致病微生物及人基因组 DNA 作为待测样品模板,取灭菌双蒸水为无模板对照(no template control, NTC),进行常规 PCR 反应,检验细菌通用引物 Bf、Br 检测细菌的特异性。PCR 扩增体系为 25  $\mu$ l,含 10  $\times$  Taq 缓冲液 2.5  $\mu$ l,10 mM dNTP mix 1  $\mu$ l,Bf、Br(10  $\mu$ M)各 0.2  $\mu$ l,Taq DNA 聚合酶 0.5  $\mu$ l,总 DNA 模板 3 ng,灭菌双蒸水补足至 25  $\mu$ l。扩增条件:95 $^{\circ}$ C 变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,50 $^{\circ}$ C 40 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,共 30 个循环;之后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

在加入 DNA 模板前以限制性内切酶 *Sau3AI* 消化 PCR 反应混合物中可能存在的背景 DNA<sup>[10,11]</sup>。每 PCR 反应加入 1 U *Sau3AI*,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,65 $^{\circ}$ C 20 min 灭活酶活性。后续的 PCR 反应按上述体系与条件进行。扩增产物行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析。

4. FQ-PCR 标准质粒构建和标准曲线的绘制:以通用引物 Bf 和 Br 扩增的 SA 16S rDNA 靶片段,胶回收纯化后克隆至 pMD18-T 载体,转化 DH5 $\alpha$  菌。挑取单个菌落培养,提取质粒进行酶切(*EcoR I* + *Hind III*),初步鉴定后送 DNA 测序(上海美季生物技术有限公司),并将测序结果与 GenBank 序列比对。确认无误后以分光光度计测定 pMDT-Bfr 浓度与纯度,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

以 pMDT-Bfr 作为细菌 16S rDNAs 检测的标准质粒,用于建立 FQ-PCR 的标准曲线。根据 pMDT-Bfr 重组质粒的分子量与质量浓度,计算其拷贝数浓度( $2.8 \times 10^{10}$  拷贝/ $\mu$ l),并梯度稀释( $2.8 \times 10^6 \sim 2.8 \times 10^2$  拷贝/ $\mu$ l),利用 Smart Cycler II 荧光定量 PCR 仪检测 5 个反应管的循环阈值(threshold cycle, Ct)。通过 3 次重复实验,建立反应 Ct 值与质粒拷贝数浓度的对数对应关系的定量标准曲线。

5. FQ-PCR 通用引物检测方法的建立:(1)以 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> 建立 20

$\mu\text{l}$  反应体系,含 SYBR Green I 染料预混试剂  $10 \mu\text{l}$ 、Bf、Br ( $10 \mu\text{M}$ ) 各  $0.2 \mu\text{l}$ 、DNA 模板  $1 \mu\text{l}$ 、灭菌双蒸水补足体积至  $20 \mu\text{l}$ 。反应条件:① $95^\circ\text{C}$  变性  $10 \text{ s}$ ;② $95^\circ\text{C}$   $5 \text{ s}$ ,  $55^\circ\text{C}$   $15 \text{ s}$ ,  $72^\circ\text{C}$   $10 \text{ s}$ ,在延伸末采集荧光信号,共 40 循环;③熔解曲线分析, $65^\circ\text{C}$  ~  $95^\circ\text{C}$ 。加入 DNA 模板前同样以限制性内切酶 *Sau* 3AI 消化以消除背景 DNA 的影响;(2) FQ-PCR 的敏感性检测:分别以 SA 和 *E. coli* 作为革兰阳性及革兰阴性细菌的代表菌,将 SA 和 *E. coli* 梯度稀释的基因组 DNA 作为 FQ-PCR 反应模板,取无菌双蒸水为 NTC,按上述反应体系与反应条件,检测 FQ-PCR 方法的敏感性。

6. 模拟细菌污染血液标本的 FQ-PCR 检测:(1) 血液细菌污染模拟标本的制备:分别以 SA 和 *E. coli* 为代表模拟革兰阳性和革兰阴性细菌污染。挑取上述两种细菌单克隆在 LB 液体培养基增菌至  $A_{600} = 0.5$ ,以无菌生理盐水 10 倍系列梯度稀释,每一梯度取  $100 \mu\text{l}$  稀释菌液涂布普通 LB 琼脂平板计算菌落形成单位 (colony forming unit, CFU) 以确定活菌数目。以  $10^7$  CFU/ml 为起点,每一梯度取  $1 \text{ ml}$  菌液  $13\ 000 \text{ r/min}$  离心  $10 \text{ min}$ ,完全弃上清,沉淀以  $1 \text{ ml}$  EDTA 抗凝无菌全血重悬,制成浓度为  $10^7 \sim 10^2$  CFU/ml 的细菌污染模拟血液标本。抗凝全血采自健康志愿者,经常规培养  $72 \text{ h}$  证实无细菌污染;(2) 血液标本中细菌 DNA 提取:上述模拟标本分别加入  $2.5 \text{ ml}$  红细胞裂解液 ( $150 \text{ mmol/L NH}_4\text{Cl}$ ,  $10 \text{ mmol/L KHCO}_3$ ,  $10 \mu\text{mol/L EDTA}$ , pH 8.0),冰浴  $30 \text{ min}$ ,每  $5 \text{ min}$  轻摇混匀。 $13\ 000 \text{ r/min}$  离心  $10 \text{ min}$ ,彻底弃去上清。按基因组 DNA 提取试剂盒说明书抽提沉淀中总 DNA。各梯度洗脱体积均为  $100 \mu\text{l}$ ,取  $1 \mu\text{l}$  为模板用于 FQ-PCR 检测;(3) FQ-PCR 检测、验证及 DNA 抽提效率计算:取上述梯度混合血液标本提取的总 DNA 模板,以无菌血液提取的总 DNA 为阴性对照,FQ-PCR 检验此方法用于检测血液中污染细菌的敏感性,反应体系和条件同前。将 PCR 扩增产物回收纯化,送测序验证扩增产物的特异性。另外根据检测计算出的基因拷贝数和已知的细菌 CFU 数,计算血液中细菌总 DNA 的提取效率。

## 结 果

### 一、细菌 16S rDNAs 通用引物设计及扩增特异性

序列比对分析后,设计通用引物:上游引物 Bf:  $5' \text{-CAAACAGGATTAGAT-ACC-3'}$ ,下游引物 Br:  $5' \text{-TCGAATTAAACCACATGCTC-3'}$ 。通用引物在各细菌 16S rDNAs 基因中的位置及扩增片段的长度见表 1。

对 16 种致病微生物及人类基因组进行常规 PCR 检测,扩增产物以 1.5% 凝胶电泳鉴定,上述所有细菌均扩增出和预期大小一致的单一一条带;白假丝酵母菌、克柔氏酵母菌、解脲脲原体、HBV、人基因组和 NTC 均未见扩增条带(图 1),证明通用引物 Bf、Br 对于细菌检测具有很强的特异性。

### 二、标准质粒 pMDT-Bfr 鉴定及标准曲线的建立

酶切及电泳分析结果表明,重组质粒 pMDT-Bfr 可切出大小为  $187 \text{ bp}$  的目的片段(结果未显示)。DNA 测序结果显示,pMDT-Bfr 质粒所含 SA 16S rDNA 序列

与 GenBank 公布序列完全一致。

以梯度稀释( $2.8 \times 10^6 \sim 2.8 \times 10^2$ ) 拷贝/ $\mu\text{l}$  的 pMDT-Bfr 质粒  $1 \mu\text{l}$  作为模板,进行 FQ-PCR 反应。根据各反应管所测得 Ct 值(x)与所含质粒拷贝数浓度的对数(y)之间的对应关系,得到 FQ-PCR 检测细菌 16S rDNAs 的标准曲线: $y = -0.273x + 12.217 (R^2 = 0.998)$  (图 2)。

表 1 Bf、Br 在不同菌株 16S rDNAs 中的位置及扩增产物的长度

菌株	上游引物位点	下游引物位点	产物长度
<i>Bacillus anthracis</i>	669 ~ 686	836 ~ 855	187
<i>Bacillus cereus</i> strain G9241	795 ~ 812	962 ~ 981	187
<i>Bordetella pertussis</i> Tohama 1	781 ~ 798	946 ~ 965	185
<i>Brucella abortus</i> biovar 1 sm 9-941	718 ~ 735	883 ~ 902	185
<i>Coltsnidium perfringens</i> str 13	755 ~ 772	921 ~ 940	186
<i>Coltsnidium tetani</i> E88	754 ~ 771	919 ~ 938	185
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> NCTC 13129	735 ~ 750	900 ~ 919	185
<i>Escherichia coli</i>	652 ~ 669	818 ~ 837	186
<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> Schu 4	769 ~ 786	938 ~ 957	189
<i>Haemophilus influenzae</i> 86-028NP & Rd KW20	785 ~ 802	949 ~ 968	184
<i>Legionella pneumophila</i> str Lens & Paris	781 ~ 798	948 ~ 967	187
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i> str: Philadelphia 1	785 ~ 802	952 ~ 971	187
<i>Mtuberculosis</i> H37Rv & CDC1551	778 ~ 793	944 ~ 963	186
<i>Mycobacterium bovis</i> AF2122/97	778 ~ 793	944 ~ 963	186
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> FA 1090	787 ~ 804	953 ~ 972	186
<i>Neisseria meningitidis</i> MCS8 & Z2491	787 ~ 804	953 ~ 972	186
<i>Proteus vulgaris</i> (J01874)	784 ~ 801	950 ~ 969	186
<i>Proteus vulgaris</i> (X07652)	1206 ~ 1223	1372 ~ 1391	186
<i>Proteus vulgaris</i> strain CIP103181T	780 ~ 797	946 ~ 965	186
<i>Proteus vulgaris</i> strain DSM 30118	760 ~ 777	926 ~ 945	186
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	780 ~ 797	946 ~ 965	186
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Choleraesuis</i> str. SC-B67 & Ty2	779 ~ 796	945 ~ 964	186
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhi</i> str. CT18	786 ~ 803	952 ~ 971	186
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	776 ~ 793	942 ~ 961	186
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Paratyphi A</i> str ATCC 9150	786 ~ 803	951 ~ 970	185
<i>Salmonella paratyphi B</i>	785 ~ 802	951 ~ 970	186
<i>Shigella flexneri 2a</i> str:2457T & 301	786 ~ 803	952 ~ 971	186
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> MW2 & Mu50 & MRSA252 & COL & N315	794 ~ 811	961 ~ 980	187
<i>Staphylococcus epidermidis</i> isolate CV64	777 ~ 794	944 ~ 963	187
<i>Staphylococcus hominis</i> (X66101)	786 ~ 803	953 ~ 972	187
<i>Staphylococcus hominis</i> (I37601)	766 ~ 783	933 ~ 952	187
<i>Staphylococcus hominis</i> isolate CV21	776 ~ 793	943 ~ 962	187
<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6	773 ~ 790	940 ~ 959	187
<i>Vibrio cholerae</i> O1 biovar <i>eltor</i> str: N16961	779 ~ 796	945 ~ 964	186
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> RIMD 2210633	787 ~ 804	953 ~ 972	186
<i>Yersinia pestis</i> KIM	785 ~ 802	951 ~ 970	186
<i>Yersinia pestis</i> biovar <i>medievalis</i> str:91001	759 ~ 776	925 ~ 944	186

### 三、通用引物 FQ-PCR 检测细菌的敏感性

以重组 pMDT-Bfr 作为标准质粒,分别取梯度稀释至  $1.6 \times 10^2 \sim 1.6 \times 10^{-1}$  pg/ $\mu\text{l}$  的 SA 基因组 DNA 和  $7.3 \times 10^2 \sim 7.3 \times 10^{-1}$  pg/ $\mu\text{l}$  的 *E. coli* 基因组 DNA 各  $1 \mu\text{l}$  作为模板,各建立 4 管 FQ-PCR 反应体系,通过 3 次重复实验检测各管 Ct 值,并根据上述定量标准曲线分别计算出对应的 16S rDNAs 基因拷贝数。由于反

应试剂如 Taq 酶可能存在的痕量背景细菌 DNA<sup>[10]</sup>, 导致 NTC 也检测到荧光信号。在对待测样品进行准确定量的前提下, 以小于 NTC Ct 值 3 个单位的 Ct 值所对应的靶基因浓度为检出限, 即阳性结果的 DNA 浓度应为阴性对照的 10 倍以上。结果如图 3 和表 2 所示, 以 Bf、Br 为通用引物的 FQ-PCR 方法, 对于 SA 和 *E. coli* 的检测灵敏度分别为 1.6 pg/ $\mu$ l SA 基因组 DNA (相当于  $9.2 \times 10^3 \pm 4.9 \times 10^2$  拷贝/ $\mu$ l 16S rDNA 基因)、7.3 pg/ $\mu$ l *E. coli* 基因组 DNA (相当于  $2.5 \times 10^3 \pm 1.5 \times 10^2$  拷贝/ $\mu$ l 16S rDNA 基因)。实验数据表明对于革兰阳性和革兰阴性细菌, 该方法的检测灵敏度均可达到  $10^3$  拷贝/ $\mu$ l 的 16S rDNA 基因。

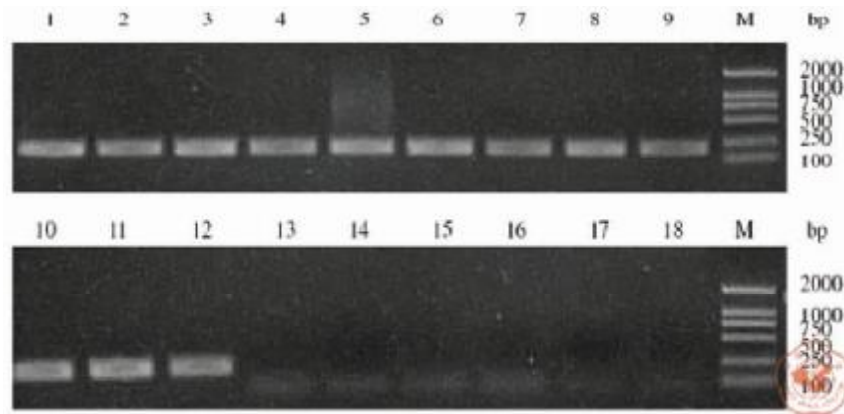


图 1 通用引物 Bf、Br 检测细菌 16S rDNAs 的特异性  
泳道 1~18 总 DNA 样品分别来源于 *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hominis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus anthracis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella enterica*, *Salmonella paratyphi B*, *E. coli*, *Ureaplasma urealyticum*, *Candida albicans*, *C. krusei*, HBV, human genome and NTC。M 代表 DNA 分子量标准(DL2000)。

表 2 FQ-PCR 检测 *E. coli* 和 SA 16S rDNAs 的敏感性实验

样本类型	细菌基因组 DNA 稀释度 (pg/ $\mu$ l)	Ct 值	计算的浓度 (拷贝/ml)
E1	$7.3 \times 10^2$	$20.54 \pm 0.83$	$1.9 \times 10^6 \pm 4.2 \times 10^5$
E2	$7.3 \times 10^1$	$25.49 \pm 1.13$	$9.3 \times 10^4 \pm 8.2 \times 10^3$
E3	$7.3 \times 10^0$	$29.30 \pm 0.98$	$9.2 \times 10^3 \pm 4.9 \times 10^2$
E4	$7.3 \times 10^{-1}$	$35.26 \pm 1.02$	$8.2 \times 10^2 \pm 9.9 \times 10^4$
S1	$1.6 \times 10^2$	$24.73 \pm 0.21$	$2.7 \times 10^5 \pm 2.2 \times 10^4$
S2	$1.6 \times 10^1$	$27.77 \pm 0.86$	$2.3 \times 10^4 \pm 1.5 \times 10^3$
S3	$1.6 \times 10^0$	$31.47 \pm 0.88$	$2.5 \times 10^3 \pm 1.5 \times 10^2$
S4	$1.6 \times 10^{-1}$	$35.23 \pm 1.07$	$4.8 \times 10^2 \pm 3.9 \times 10^2$
NTC		$36.79 \pm 0.13$	ND

注:样本类型与图 3A 和 3B 的一致;计算的浓度代表 3 个独立实验的均数  $\pm$  标准差;ND,未检测到。

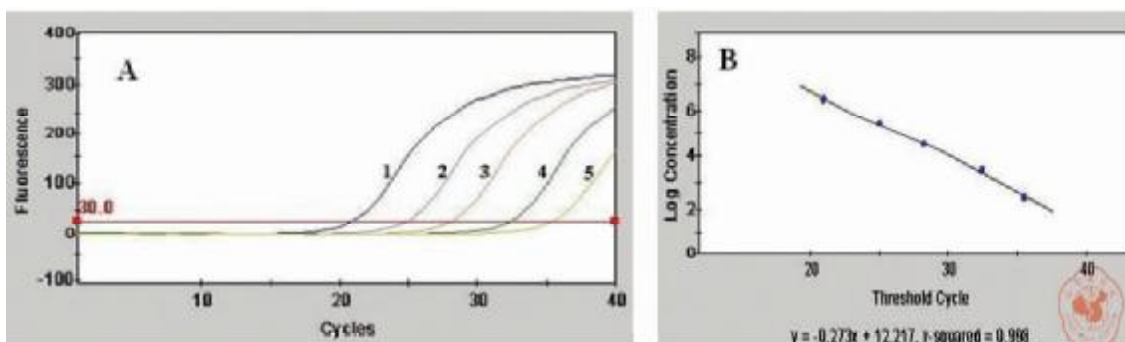


图 2 pMDT-Bfr 质粒的扩增及标准曲线  
A: 曲线 1~5 代表  $2.8 \times 10^6 \sim 2.8 \times 10^2$  拷贝/ $\mu\text{l}$  pMDT-Bfr 质粒; B: 标准曲线

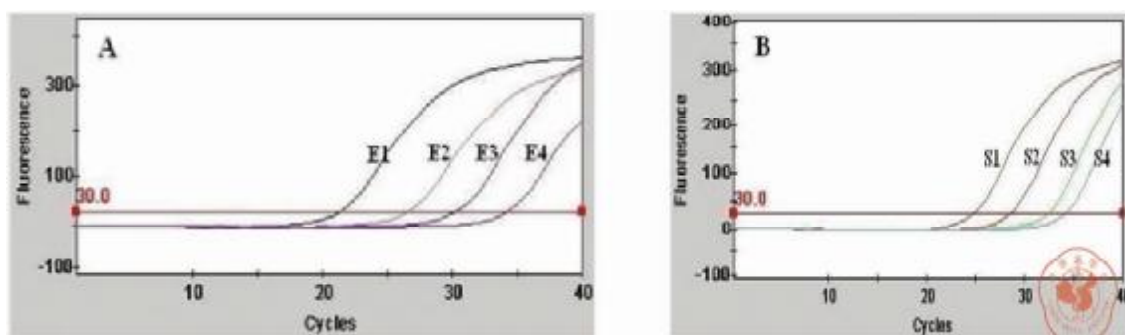


图 3 FQ-PCR 检测 SA 和 *E. coli* 基因组 DNA 的敏感性实验  
A: 大肠埃希菌基因组 DNA 敏感性检测 曲线 E1 到 E4 代表稀释度分别为  $7.3 \times 10^2 \sim 7.3 \times 10^{-1}$   $\text{pg}/\mu\text{l}$  的大肠埃希菌基因组 DNA; B: SA 基因组 DNA 敏感性检测 曲线 S1 到 S4 代表稀释度分别为  $1.6 \times 10^2 \sim 1.6 \times 10^{-1}$   $\text{pg}/\mu\text{l}$  的 SA 基因组 DNA

表 3 FQ-PCR 方法检测不同浓度细菌污染血标本中 *E. coli* 和 SA 16S rDNAs 的 Ct 值

样本类型	$10^7$	$10^6$	$10^5$	$10^4$	$10^3$	$10^2$	NEG
SA	$21.74 \pm 0.20$	$26.17 \pm 0.21$	$30.35 \pm 0.15$	$33.22 \pm 0.77$	$33.29 \pm 0.34$	$33.59 \pm 1.57$	-
<i>E. coli</i>	$23.74 \pm 0.58$	$26.88 \pm 0.31$	$30.54 \pm 1.05$	$33.65 \pm 2.61$	$35.01 \pm 1.88$	$35.85 \pm 1.35$	$34.84 \pm 1.08$

注: a: 所有 Ct 值代表 3 个独立实验的均数  $\pm$  标准差; b: NEG 代表阴性对照

#### 四、FQ-PCR 检测细菌污染血液的敏感性

模拟 SA 和 *E. coli* 污染的系列血液标本浓度分别为  $3.8 \times 10^7 \sim 3.8 \times 10^2$  CFU/ml 和  $1.2 \times 10^7 \sim 1.2 \times 10^2$  CFU/ml。提取各模拟标本总 DNA, 以无菌全血 DNA 为阴性对照, 进行 3 次独立的 FQ-PCR 检测。按准确定量的要求, 以小于阴性对照 Ct 值 3 个单位以上的 Ct 值为阳性结果。如表 3 所示, 模拟 SA 和 *E. coli* 污染血液标本的检出限均为  $10^5$  CFU/ml (SA  $3.8 \times 10^5$  CFU/ml, *E. coli*  $1.2 \times 10^5$  CFU/ml)。熔解曲线显示每组标本阳性结果的熔解峰值 ( $T_m$ ) 均一致 (图 4)。将二组标本阳性结果送测序。测序结果显示阳性结果扩增产物的序列分别与 SA 和 *E. coli* 的 16S rDNAs 靶基因完全一致 (结果未显示)。

### 五、模拟标本中细菌 DNA 提取效率

经过3次重复实验测定靶基因含量,除以每基因组含有的16S rDNAs基因的拷贝数即得到细菌基因组DNA量。计算出的基因组DNA量除以已知细菌CFU数的商即血液标本中细菌总DNA的提取效率。SA全基因组含9个拷贝的16S rDNAs基因<sup>[12]</sup>, *E. coli*含有7个<sup>[13]</sup>,经计算后二菌各浓度梯度的DNA提取效率如表4所示。

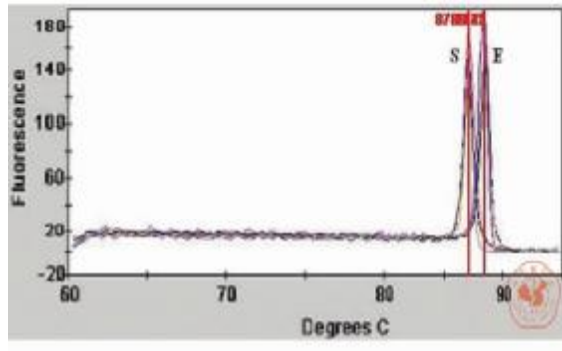


图4 模拟细菌污染血液标本阳性检测结果的熔解曲线

表4 不同浓度细菌污染的血液标本中细菌总DNA提取效率(%)

样本类型	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>
SA	30.67 ± 1.96	15.25 ± 1.25	13.68 ± 4.25
<i>E. coli</i>	26.93 ± 9.41	41.14 ± 3.15	31.73 ± 6.44

## 讨 论

血液细菌污染是关系到输血安全的一个重要问题。尽管采用非常细致缜密的采血技术和保存技术,采自健康献血者的血液中仍有部分受到细菌污染。输注细菌污染的血液或血制品后容易使免疫低下患者发生脓毒症,甚至导致患者死亡。目前,用血前对血液和血液制品进行细菌污染筛查已经受到了越来越多国家和政府的重视<sup>[1]</sup>。筛查的方法应当快速、敏感、特异、成本低并易于操作<sup>[14]</sup>,而现今作为诊断“金标准”的自动细菌培养法难以满足上述要求,难以实现快速诊断。

细菌16S rDNAs是应用分子生物学方法进行微生物快速分类与鉴定的理想靶基因。该基因由可变区和保守区组成,保守区为所有细菌共有<sup>[15]</sup>。通过设计保守区和特异区的引物,可实现细菌的快速分类与鉴定。其中,设计高度保守区的细菌16S rDNAs通用引物是建立FQ-PCR方法检测细菌的关键。本研究在对20余种常见致病性细菌16S rDNAs序列进行比对分析的基础上,在细菌16S rDNAs高度同源区域设计了一对FQ-PCR通用引物Bf和Br。常规PCR电泳结果显示,在使用等量DNA模板的情况下,Bf、Br引物仅对细菌样品扩增出预期片段,而对真菌、支原体、病毒及人基因组均未见扩增,表明Bf和Br引物对细菌有

较强的特异性。由定量标准曲线可见,各梯度模板的浓度对数值与 Ct 值之间有良好的线性关系。基于该标准曲线,本研究以 FQ-PCR 方法检测 SA 和 *E. coli* DNA 样品,其检出限可达  $10^3$  拷贝/ $\mu\text{l}$  的 16S rDNAs 基因,可以满足检测血液中细菌污染的需要。

对于检测血液中的细菌污染而言,血液中细菌总 DNA 的抽提效率是制约检测灵敏度的一个关键因素。一方面,高效的抽提方法能够有效的提高检测灵敏度;另一方面,现在还没有一种抽提方法能够实现以相同的效率提取革兰阳性和革兰阴性细菌 DNA<sup>[16]</sup>。因此,本实验分别以 SA 和 *E. coli* 作为革兰阳性和革兰阴性细菌污染的代表菌,验证了通用引物检测革兰阳性和革兰阴性细菌的敏感性。另外,由于本实验中所使用的细菌总 DNA 抽提试剂盒抽提效率较低,导致检测的敏感性也不高。在今后工作中,如果能够进一步提高血液中革兰阳性和革兰阴性细菌 DNA 提取效率,对于提高检测的灵敏度也将大有裨益。

有研究发现健康人血液中也含有一定量的细菌 16S rDNAs 基因,其来源不明<sup>[17]</sup>,与本实验中血液标本阴性对照也检测到荧光信号( $C_t = 34.84 \pm 1.08$ )结果一致。这对 FQ-PCR 方法检测血液中细菌污染的灵敏度有一定程度的影响,当待测基因浓度高于阴性对照的 10 倍( $C_t$  值小 3 个单位)以上才有准确定量意义,10 倍以内则不能准确定量,因此本实验中定义小于阴性对照  $C_t$  值 3 个单位的  $C_t$  值所对应的浓度为检出限。如果是定性检测,小于阴性对照  $C_t$  值 3 个单位以内的  $C_t$  值也应认为是可疑阳性结果,应重复实验以确认。此外,采用高通量的荧光定量 PCR 仪并进行复管实验在节约检测时间的同时,可以提高检测的准确性。

总之,本研究以 16S rDNAs 为靶基因,采用通用引物进行 FQ-PCR 反应,检测血液标本中污染的细菌特异性强、灵敏度较高,并且具有很好的重复性。成本低廉,便于操作,从提取待检样品 DNA 到完成 FQ-PCR 反应,可在 3 h 左右实现快速鉴定。在本研究建立的 FQ-PCR 方法基础上,如进一步改良标本 DNA 抽提方法,完全可以形成一套有效的献血站和医院输血科应用的血液中细菌污染的快速筛查方法。目前,对血液混合细菌污染的鉴定方法正在进行中。

#### 参 考 文 献

- 1 Hillyer CD, Josephson CD, Blajchman MA, et al. Bacterial contamination of blood components: risks, strategies, and regulation: Joint ASH and AABB educational session in transfusion medicine. *Hematology*, 2003, 2003; 575-589.
- 2 Puckett A, Davison G, Entwistle CC, et al. Post-transfusion septicaemia 1980-1989: importance of donor arm cleansing. *J Clin Pathol*, 1992, 45; 155-157.
- 3 Brecher ME, Means N, Jere CS, et al. Evaluation of an automated culture system for detecting bacterial contamination of platelets: an analysis of 15 contaminating organisms. *Transfusion*, 2001, 41; 477-482.
- 4 Wagner SJ, Friedman LI, Dodd RY. Transfusion-associated bacterial sepsis. *Clin Microbiol Rev*, 1994, 7; 290-302.
- 5 Yang S, Lin S, Kelen GD, et al. Quantitative multiprobe PCR assay for simultaneous detection and identification to species level of bacterial pathogens. *J Clin Microbiol*, 2002, 40; 3449-3454.
- 6 薛利军,王永智,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; 789-

- 794.
- 7 Harris KA, Hartley JC. Development of broad-range 16S rDNA PCR for use in the routine diagnostic clinical microbiology service. *J Med Microbiol*,2003,52:685-691.
  - 8 Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, et al. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*,2002,148:257-266.
  - 9 Warwick S, Wilks M, Hennessy E, et al. Use of quantitative 16S ribosomal DNA detection for diagnosis of central vascular catheter-associated bacterial infection. *J Clin Microbiol*,2004,42:1402-1408.
  - 10 Rand KH, Houck H. Taq polymerase contains bacterial DNA of unknown origin. *Mol Cell Probes*,1990,4:445-450.
  - 11 Mohammadi T, Reesink HW, Vandenbroucke-Grauls CM, et al. Optimization of real-time PCR assay for rapid and sensitive detection of eubacterial 16S ribosomal DNA in platelet concentrates. *J Clin Microbiol*,2003,41:4796-4798.
  - 12 Gurtler V, Stanisich VA. New approaches to typing and identification of bacteria using 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*,1996,142:3-16.
  - 13 Farelly V, Rainley FA, Stackebrandt E. Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl Environ Microbiol*,1995,61:2798-2801.
  - 14 Wagner SJ, Robinette D. Evaluation of an automated microbiologic blood culture device for detection of bacteria in platelet components. *Transfusion*,1998,38:674-679.
  - 15 Bertilsson S, Cavanaugh CM, Polz MF. Sequencing-independent method to generate oligonucleotide probes targeting a variable region in bacterial 16S rRNA by PCR with detachable primers. *Appl Environ Microbiol*,2002,68:6077-6086.
  - 16 Klaschik S, Lehmann LE, Raadts A, et al. Real-time PCR for detection and differentiation of gram-positive and gram-negative bacteria. *J Clin Microbiol*,2002,40:4304-4307.
  - 17 Nikkari S, McLaughlin IJ, Bi W, et al. Does blood of healthy subjects contain bacterial ribosomal DNA. *J Clin Microbiol*,2001,39:1956-1959.

(收稿日期:2007-07-12)

(本文编辑:王丹静)