

# 结合流式细胞仪检测技术的菌体原位 PCR 扩增

吴彩云 蔡俊鹏\* 杨汝德

(华南理工大学食品与生物工程学院 广州 510641)

**摘 要** 建立一套原位 PCR 检测方法,联合流式细胞仪作为检测工具,作为基因水平转移研究中的基因监控手段。通过常规 PCR 反应以确定靶基因的基本扩增参数,细菌菌体经过多聚甲醛 PBS 液固定和溶菌酶处理后进行原位 PCR 扩增,产物洗涤后迅速用流式细胞仪进行荧光检测,并辅以荧光显微镜镜检。扩增样品在荧光显微镜的蓝光激发下发出明亮的黄绿色荧光,与空白对照中的无扩增菌体的自发荧光可明显区分。流式细胞仪检测结果也显示,阴性菌与阳性菌的荧光强度有明显区别。完成了对目标细菌的原位 PCR 扩增,并成功地应用流式细胞仪对原位 PCR 扩增菌体实施了检测。由此表明 isPCR-流式细胞仪检测技术在细菌致病基因原位监控上的应用前景。

**关键词** 原位聚合酶链式反应(isPCR),流式细胞仪,副溶血弧菌(*Vp*),耐热的直接溶血素基因(*tdh*)

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2004)03-0399-03

原位聚合酶链式反应(in situ PCR, 简称为 isPCR)作为一门新兴的检测技术,以其快速、灵敏及其可原位监测的特点而被医学界及生物界的学者们普遍接纳并加以广泛应用。该技术最先用于组织细胞中 DNA 扩增<sup>[1]</sup>,自 1995 年 Hodson 等<sup>[2]</sup>首次将该法用于检测细菌中基因的存在及表达情况后, isPCR 更受到国外微生物学者们的青睐<sup>[3]</sup>,他们还利用流式细胞仪(Flow cytometer, 简称为 FC)可对混合细菌进行检测并分选的特有优点<sup>[4]</sup>,将其作为 isPCR 的后续检测分选工具<sup>[5]</sup>并获得理想结果。但国内目前对于该法在细菌检测中的应用还鲜有报导。本实验室为了进行致病因子在细菌种属间水平转移的研究,运用原位 PCR 对副溶血弧菌耐热的直接溶血素基因(*tdh*)进行扩增并结合流式细胞仪实行检测,为后续的基因监测工作打下技术基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株** 已知携带有耐热的直接溶血素基因(Thermostable direct haemolysin, *tdh*)的副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, *Np*)标准毒力株 Vp25-91 源自上海疾病预防控制中心,由第一军医大学流行病学教研室李志峰硕士惠赠。

**1.1.2 酶和试剂** 溶菌酶、dNTPs 为 Bebeo 公司产品,蛋白酶 K 为 Merk 公司产品, *Taq* DNA 聚合酶、琼脂糖、多聚甲醛及其他试剂为北京鼎国生物技术有限公司产品。

### 1.2 方法

**1.2.1 细菌的培养** 将 Vp25-91 接种于碱性蛋白胨水培养基(北京微生物培养基制造厂)于 30℃ 培养 20~24h,获得处于对数生长期的菌液,用于制备菌体模板。同样条件下振荡培养过夜,获得用于制备 DNA 模板的高浓度菌液。

**1.2.2 菌体处理** 固定:以 1:3 的体积比将菌液与新鲜配制的 4% 多聚甲醛 PBS 液混合,4℃ 下固定 1h,6000r/min 离心 4min 收集菌体。以 1×PBS 洗涤菌体两次,重悬于无水乙醇中置 -20℃ 保存。溶菌酶处理:取低温保存的固定液 100μL (约 10<sup>8</sup> 个菌体),以等体积的 1×PBS 洗涤两次,重悬于含 1mg/mL 溶菌酶的 PBS 中室温消化 15min。1×PBS 洗涤两次,重悬于 20μL 1×PBS 中作为原位扩增模板。

**1.2.3 常规 PCR 引物的设计和合成** 参照文献 [6],并通过 Blast 的同源性分析,在 *tdh* 的下游引物内加入一个混合碱基,由上海基康生物技术有限公司合成。序列如下:L-*tdh*: 5'-GTAAGGTCTCTGACTTTTGGAC-3'; R-*tdh*: 5'-TGAATAG-AAC(G)CTTCATCTTCACC-3' 其中(G)为混合碱基。

isPCR 带荧光素引物的合成和标记:为了能进行 isPCR 的研究,需要在 PCR 引物上标记上相关的荧光素。在常规 PCR 引物的基础上,选取引物 L-*tdh* 作为荧光素的标记对象,选用羧基荧光素(FAM, carboxyfluorescein, Abs/Em = 492/518nm)为标记荧光素,通过化学反应在 L-*tdh* 的 5' 端标记上 FAM。该部分工作由上海基康生物技术有限公司完成。

**1.2.4 常规 PCR 扩增** 采用细菌总 DNA 的小规模快速制备法<sup>[7]</sup>抽提染色体 DNA。扩增体系为 20μL 模板 DNA 2μL, *tdh* 上下游引物各 0.4μmol/L, 4 种 dNTPs 各 0.2mmol/L, *Taq* 酶 2U, Mg<sup>2+</sup> 1.5mmol/L, 10×PCR buffer 2μL, 加 dH<sub>2</sub>O 补足至 20μL。扩增循环在 2400 扩增仪上完成。PCR 参数为 94℃ 2min, 94℃ 15s, 56℃ 20s, 72℃ 20s, 循环 30 次, 72℃ 4min, 4℃ 保存。同时设立不加模板及不加 *Taq* 酶的空白对照各 1 管。

**1.2.5 原位 PCR 扩增** 采用热启动操作在与常规扩增同样的体系中加入 2μL 菌体模板代替 DNA 模板,并以同样的浓

基金项目 国家自然科学基金资助项目(30070591)

\* 通讯作者。E-mail: febjpc@scut.edu.cn

作者简介 吴彩云(1977-)女,广东省云浮市人,硕士研究生,主要从事分子生物学方面的研究。E-mail: wu\_caiyun@sina.com

收稿日期 2003-05-12, 修回日期 2004-01-05

度用经过荧光标记的 L-*tdh* 代替没有标记的上游引物,以同样的循环参数在 2400 扩增仪上完成扩增。同时设立不加荧光引物及不加 *Taq* 酶的空白对照各 1 管。0.2 × PBS 洗涤产物两次,立刻进行检测。

**1.2.6 镜检** 将原位扩增产物涂于干净载玻片上,在荧光显微镜 (OLYMPUS BX-60) 下以 10 × 100 的放大倍数下观察。采用蓝光为激发光,并使用 OLYMPUS PM-30 成像监控仪控制 OLYMPUS PM-C35DX 相机拍照。

**1.2.7 流式细胞仪分析**: 流式细胞仪为 BD 公司的 FACS Calibur 型,使用 530nm ± 30nm 的带通滤片,阈值调整到小于细菌颗粒的数值。

## 2 结果和分析

### 2.1 常规 PCR 和 isPCR 反应条件的确立

在常规 PCR 扩增实验中,通过条件的优化,获得了 269bp 的扩增产物,与测序已知的副溶血弧菌 *tdh* 基因片段的大小一致<sup>[6,8]</sup>。通过实验也获得了 *tdh* 基因扩增的最佳参数,而这些参数也是 isPCR 扩增体系的反应条件。

### 2.2 荧光显微镜检测

荧光显微镜检测发现, FAM 在蓝光激发下发出黄绿色的荧光,而副溶血弧菌自身在蓝光激发下也能产生微弱的绿色自发荧光,但凭两者的荧光强度和猝灭时间的不同可用荧光显微镜或 FC 仪加以检测区分。图 1-A 为蓝光激发视野中的阴性菌(即空白对照中的无 DNA 扩增菌),图 1-B 为阳性菌。阴性菌的荧光黯淡难以分辨,而阳性菌则发出明亮的黄绿色荧光,由此可判断 isPCR 的成功原位扩增。

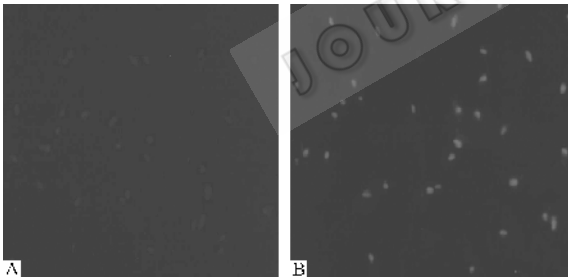


图 1 原位 PCR 产物检测图谱

Fig.1 Photo of *V. parahaemolyticus* cells by the in situ PCR

(A) Photo of *V. parahaemolyticus* cells of the negative control ;

(B) Photo of *V. parahaemolyticus* cells whose *tdh* genes was amplified with FAM labeled primers.

### 2.3 流式细胞仪的检测

图 2 为原位 PCR 产物荧光强度分布频率曲线,相同的峰面积表示收集的菌数相同,而峰的横坐标的明显差别则代表阴性菌(A)和阳性菌(B)的荧光强度有明显区别,由此判断阳性菌内的 *tdh* 基因发生了扩增,带上了引物标记的荧光。

对原位 PCR 产物密度梯度图谱(略)的分析可知它们密度最高的中心圆的横坐标(前像角)基本是一致的,由此说明菌体大小是一样的,体内的基因扩增并不会影响菌体大小,阴性菌和阳性菌经过同样的热循环后大小变化是一致的。

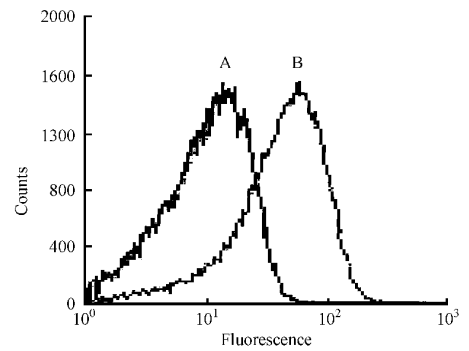


图 2 原位 PCR 产物荧光强度分布频率曲线

Fig.2 Distribution of fluorescence intensity in *V. parahaemolyticus* after isPCR

A. Cells from the Negative control ; B. Cells of the positive results.

纵坐标荧光强度与图 2 中的横坐标是相应的。由此进一步说明经过 isPCR 后,阳性菌内的 *tdh* 基因发生了扩增并带上了引物标记的荧光,从而使它们与阴性菌产生了能被 FC 仪检测到的差别。

菌体损失率较高<sup>[9]</sup>是菌悬液原位 PCR 一直存在且急需解决的问题。由于整个实验过程涉及反复的离心洗涤,使得菌体的损失确实难以避免。另外,扩增循环中的反复升降温过程导致的菌体热裂解及溶菌酶处理时的化学裂解等破坏作用,更是使菌体的数目大量减少。为了获得菌体通透性和回收率之间的最佳平衡,本实验进行了溶菌酶处理条件的优化。结果表明,当酶浓度为 1mg/mL,处理时间为 15min 时,足可以让引物自由进入菌体与靶基因结合而又不至于使菌内物质外流或使菌体胀破。除此之外,在进行 PCR 扩增时,采用了热启动加样方式,并在保证扩增成功的前提下,尽量缩短了循环中各步骤的时间,以使菌体尽量减少在高温中的暴露时间以降低热力学破坏程度。本实验中,菌体模板经过整个实验过程后,所得的回收率为 75%,其中菌体损失最多的两个步骤是溶菌酶处理及扩增热循环,其损失率分别为 10.5% 和 8%。

## 3 结论

本实验以副溶血弧菌为对象,以 *tdh* 基因为靶,在国内率先进行了细菌原位 PCR 扩增及其检测的研究,初步建立了原位检测菌内基因的方法。该法的技术关键是原位扩增模板的前处理,固定步骤使得菌体能承受后续的化学及热力学破坏而保持菌体的完整性,溶菌酶的处理则改善了菌体的通透性而使 PCR 引物等能进入菌体内与靶基因结合,进而发生扩增。isPCR 与流式细胞仪的联合使用,更是解决了微生物研究中检测与分选不能同步进行的难题,为微生物生态学、流行病学等研究提供了一种全新的手段。本实验室将其作为基因水平转移研究方法,是一种创新性尝试,已初步获得成效。诚然,该法在回收率、固定剂选择、背景干扰等方面或多或少还存在问题,尚有待进一步研究改善。

致谢 本实验得到了第一军医大学的俞守义教授、陈清教授和军事医学科学院的曹务春主任、张泮河老师、赵秋敏老师的热心帮助,在此一并向他们致以衷心的感谢!

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Hasse A T , Retzel E F , Staskus K A . Amplification and detection of lentiviral DNA inside cells. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1990 , **7** : 1874 - 1878 .
- [ 2 ] Hodson R E , Dustman W A , Garg R P , *et al.* In situ PCR for visualization of microscale distribution of specific genes and gene products in prokaryotic communities. *Appl Environ Microbiol* , 1995 , **61** : 4074 - 4082 .
- [ 3 ] Hornitzky M A , Berrelheim K A , Djordjevic S P . The detection of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in diagnostic bovine fecal samples using vancomycin-cefixime-cefsulodin blood agar and PCR. *FEMS Microbiol Lett* , 2001 , **198** : 17 - 22 .
- [ 4 ] Porter J , Pickup R . Nucleic acid-based fluorescent probes in microbial ecology : application of flow cytometry. *J Microbiol Meth* , 2000 , **42** : 75 - 79 .
- [ 5 ] Ramaiah Sachidanandham , Karina Yew-Hoong Gin . Flow cytometric detection of  $\beta$ -D-Glucuronidase gene in wild-type bacterial cells using in-situ PCR. *Biotech Bioen* , 2003 , **82** : 127 - 133 .
- [ 6 ] Nishibuchi M , Kaper J B . Nucleotide sequence of the thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus* . *J Bacteriol* , 1985 , **162** : 558 - 564 .
- [ 7 ] 赵 斌 , 何绍江 . 微生物学实验 . 北京 : 科学出版社 , 2002 . 172 - 173 .
- [ 8 ] Asim K Bej , Donald P Patterson , Cynthia W Brasher , *et al.* Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl* , *tdh* and *trh* . *J of Microbiol Methods* , 1999 , **36** : 215 - 225 .
- [ 9 ] Feng C , Binder B , Hodson R E . Flow cytometric detection of specific gene expression in prokaryotic cells using in situ RT-PCR. *FEMS Microbiol Lett* , 2000 , **184** : 291 - 295 .

## In situ PCR and Detection by Flow Cytometer of *tdh*-containing Bacteria *Vibrio parahaemolyticus*

WU Cai-Yun CAI Jun-Peng\* YANG Ru-De

( College of Food Science and Bioengineering , South China University of Technology , Guangzhou 510641 , China )

**Abstract** : To develop a new detection method of toxin gene thermostable direct haemolysin ( *tdh* ) by employing in situ PCR ( isPCR ) technique and in combination with flow cytometry , for the purpose of research in horizontal gene transfer. Parameters employed for isPCR in this study were derived from the conventional PCR test. In setting up the in situ PCR , bacteria *Vibrio parahaemolyticus* were first grew in nutrient medium , and then fixed by paraformaldehyde in PBS buffer. Afterwards , bacteria were further treated with lysozyme to enhance their cell wall permeabilities. The treated bacteria were then subjected to isPCR reactions and rapidly detected by flow cytometry and epifluorescence microscopy. Bacteria *Vibrio parahaemolyticus* carrying *tdh* genes showed bright yellow-green fluorescence under epifluorescence microscope at the excitation of blue light. They could be distinctly differentiated from those cells in the negative controls who displayed very dim auto-emitting fluorescence. Flow cytometry also confirmed the vast differences between the negative cells and the positive ones that had gone through in situ PCR reactions. The results successfully demonstrated the power of isPCR in combination with flow cytometry in the detection of bacterial toxin gene *tdh* in situ. This newly developed technique could be employed to the study of behaviour of bacterial genes , like *tdh* , in a microbial community.

**Key words** : In situ PCR ( isPCR ) , Flow cytometry , *Vibrio parahaemolyticus* , Thermostable direct haemolysin ( *tdh* )