

学校编码: 10384  
学 号: 200226062

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_  
UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学  
硕 士 学 位 论 文

实时荧光 PCR 检测肠出血性大肠杆菌  
O 157 和禽流感 H 5 亚型的研究

Development in detection of enterohemorrhagic  
*Escherichia coli* O 157 and H 5 subtype avian  
influenza virus using real-time fluorescence PCR

于 广 福

指导教师姓名: 沈 明 山 教授

陈 亮 教授

专 业 名 称: 细 胞 生 物 学

论文提交日期: 2005 年 10 月 20 日

论文答辩时间: 2005 年 12 月 9 日

学位授予日期: 2005 年 月 日

答辩委员会主席: 王风平 教授

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2005 年 10 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

中文摘要 .....	1
英文摘要 .....	3
第一部分 实时荧光 PCR 检测肠出血性大肠杆菌 O157 的研究 .....	6
1 引言 .....	6
1.1 实时荧光 PCR 应用的荧光探针技术 .....	7
1.1.1 分子信标 .....	7
1.1.2 TaqMan 探针或水解探针 .....	8
1.1.3 杂交探针 .....	9
1.1.4 双链荧光探针 .....	10
1.1.5 荧光标记引物 .....	10
1.1.6 SYBR Green I 荧光染料 .....	11
1.2 实时荧光 PCR 在临床检测上的应用 .....	11
1.3 肠出血性大肠杆菌 O157 的研究 .....	14
2 材料与amp;方法 .....	17
2.1 实验材料 .....	17
2.2 主要试剂 .....	17
2.3 引物和 Y 型荧光探针的设计与合成 .....	18
2.3.1 检测 <i>rfbE</i> 基因的引物和 Y 型荧光探针的设计合成 .....	18
2.3.2 茎、尾长度不同的 Y 型荧光探针的设计合成 .....	18
2.3.3 生物素探针捕获实验设计 .....	19
2.3.4 其他毒力基因的设计合成 .....	20
2.4 主要仪器 .....	20
2.5 常用溶液的配制 .....	21
2.6 实验方法 .....	22
2.6.1 模板准备 .....	22
2.6.2 <i>rfbE</i> 基因的扩增 .....	22
2.6.3 Y 型荧光探针的熔解曲线 .....	23
2.6.4 不同荧光探针的熔解曲线 .....	23
2.6.5 Y 型荧光探针的特异性实验 .....	24
2.6.6 荧光探针的灵敏度实验 .....	25
2.6.7 其它实验 .....	25
2.6.8 电泳检测 .....	26
3 结果 .....	27
3.1 普通 PCR 对 <i>rfbE</i> 基因片段的扩增结果 .....	27
3.2 Y 型荧光探针的反应原理 .....	27
3.3 Y 型荧光探针的熔解曲线 .....	29
3.4 不同荧光探针的熔解曲线 .....	29

3.5 Y 型荧光探针特异性实验结果	30
3.5.1 Y 型荧光探针与合成靶序列的变温反应	30
3.5.2 实时荧光 PCR 反应检测样品的结果	31
3.6 Y 型荧光探针灵敏度实验结果	33
3.7 磁珠捕获实验结果	33
3.8 多重 PCR 反应实验结果	34
4.讨论	37
4.1 Y 型荧光探针的作用原理	37
4.2 Y 型荧光探针的优化	38
4.3 检测肠出血性大肠杆菌 O157 的实时荧光 PCR 体系	39
4.4 磁珠捕获体系和多重 PCR 体系的建立	40
4.5 待解决的问题	41
小 结	42
参考文献	43
第二部分 实时荧光 PCR 检测禽流感 H5 亚型的研究	54
1 引言	54
2 材料与方法	58
2.1 实验材料	58
2.2 主要试剂	58
2.3 主要仪器	58
2.4 引物与荧光探针的设计与合成	58
2.5 常用溶液的配制	59
2.6 实验方法	59
2.6.1 禽流感病毒 RNA 的提取	59
2.6.2 病毒 RNA 的反转录	60
2.6.3 HA 基因的克隆	60
2.6.4 PCR 产物的纯化	61
2.6.5 DNA 连接反应	62
2.6.6 大肠杆菌感受态细胞的制备	62
2.6.7 连接产物转化感受态细胞	62
2.6.8 阳性克隆的筛选	62
2.6.9 Y 型荧光探针的特异性实验	63
2.6.10 反转录—实时荧光 PCR 体系的建立	64
2.6.11 Y 型荧光探针检测病毒 RNA 特异性实验	65
2.6.12 Y 型荧光探针检测病毒 RNA 灵敏度实验	65
3 结果	66
3.1 病毒 RNA 反转录 PCR 扩增的结果	66
3.2 pMD18-HA 质粒的构建	66

---

3.3 Y 型荧光探针的特异性实验 .....	68
3.3.1 与靶序列的变温曲线实验 .....	68
3.3.2 实时荧光 PCR 检测 pMD18-HA 实验 .....	68
3.4 Y 型荧光探针检测病毒 RNA 体系的优化 .....	69
3.5 Y 型荧光探针检测 H5 亚型禽流感病毒 RNA 的特异性实验 .....	74
3.6 Y 型荧光探针检测病毒 RNA 灵敏度的实验 .....	74
4.讨论 .....	76
小 结 .....	79
参考文献 .....	80
附录 .....	85
硕士期间获得奖励 .....	85
硕士期间发表文章 .....	85
致 谢 .....	86

## CONTENTS

<b>Abstract (In Chinese)</b> .....	1
<b>Abstract (In English)</b> .....	3
<b>Part I Development in detection of Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> O157 using real time fluorescence PCR</b> .....	6
<b>1 Introduction</b> .....	6
1.1 Fluorescence probe techniques in real time fluorescence PCR.....	7
1.1.1 Molecular beacon .....	7
1.1.2 TaqMan probe .....	8
1.1.3 Hybridization probe.....	9
1.1.4 Double stranded fluorescence probe .....	10
1.1.5 Fluorescence primer .....	10
1.1.6 SYBR Green I .....	11
1.2 Clinic diagnosis using real time fluorescence PCR.....	11
1.3 Study of Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> O157.....	14
<b>2 Materials and Methods</b> .....	17
2.1 Materials.....	17
2.2 Reagents.....	17
2.3 Design and synthesis of primers and "Y-shape" fluorescence probe.....	18
2.3.1 Detection of <i>rbf E</i> gene .....	18
2.3.2 "Y-shape" fluorescence probe in different structure.....	18
2.3.3 Biotin probe.....	19
2.3.4 Other virulence genes.....	20
2.4 Instruments.....	20
2.5 Solutions.....	21
2.6 Methods.....	22
2.6.1 Preparation of templates.....	22
2.6.2 Amplification of <i>rbf E</i> gene.....	22
2.6.3 Melt curve of "Y-shape" fluorescence probe.....	23
2.6.4 Melt curve of different "Y-shape" fluorescence probe .....	23
2.6.5 Specificity assay .....	24
2.6.6 Sensitivity assay .....	25
2.6.7 Other assay .....	25
2.6.8 Electrophoresis analysis .....	26
<b>3 Results</b> .....	27
3.1 Amplification results of <i>rbf E</i> gene by PCR.....	27

3.2 Principle of "Y-shape" fluorescence probe.....	27
3.3 Melt curve of "Y-shape" fluorescence probe.....	29
3.4 Melt curve of different "Y-shape" fluorescence probe.....	29
3.5 Specificity of "Y-shape" fluorescence probe.....	30
3.5.1 Thermal denaturation profiles of "Y-shape" fluorescence probe and target sequence.....	30
3.5.2 Detection of samples.....	31
3.6 Sensitivity of "Y-shape" fluorescence probe.....	33
3.7 Capture by magnetic beads.....	33
3.8 Multiple PCR detection of virulence genes.....	34
<b>4. Discussion.....</b>	<b>37</b>
4.1 Principle of "Y-shape" fluorescence probe.....	37
4.2 Optimality analysis of "Y-shape" fluorescence probe.....	38
4.3 System for detection of Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> O157 using real time fluorescence PCR.....	39
4.4 System for magnetic beads capture and multiple PCR.....	40
4.5 Farther work.....	41
<b>Brief summary.....</b>	<b>42</b>
<b>References.....</b>	<b>43</b>
<b>Part II Development in detection of H5 subtype avian influenza virus using real time fluorescence PCR.....</b>	<b>54</b>
<b>1 Introduction.....</b>	<b>54</b>
<b>2 Materials and Methods.....</b>	<b>58</b>
2.1 Materials.....	58
2.2 Reagents.....	58
2.3 Instruments.....	58
2.4 Design and synthesis of primers and fluorescence probe.....	58
2.5 Solutions.....	59
2.6 Methods.....	59
2.6.1 RNA extraction.....	59
2.6.2 Reverse transcription of RNA.....	60
2.6.3 Cloning of HA gene.....	60
2.6.4 Purification of PCR products.....	61
2.6.5 Ligation reaction of DNA.....	62
2.6.6 Preparation of competent <i>E.coli</i> .....	62
2.6.7 Transformation of <i>E.coli</i> .....	62

2.6.8 Screening bacterial colonies .....	62
2.6.9 Specificity assay of "Y-shape" fluorescence probe .....	63
2.6.10 System of real time reverse transcriptase PCR.....	64
2.6.11 Specificity assay .....	65
2.6.12 Sensitivity assay .....	65
<b>3 Results</b> .....	<b>66</b>
3.1 Reverse transcriptase PCR assay.....	66
3.2 Construction of Plasmid pMD18-HA .....	66
3.3 Specificity of "Y-shape" fluorescence probe.....	68
3.3.1 Thermal denaturation profiles .....	68
3.3.2 Detction of pMD18-HA .....	69
3.4 Optimality assay of detection system.....	69
3.5 Specificity of detecting H5 avian influenza virus .....	74
3.6 Sensitivity of detecting of RNA .....	74
<b>4. Discussion</b> .....	<b>76</b>
<b>Brief summary</b> .....	<b>79</b>
<b>References</b> .....	<b>80</b>
<b>Appendix</b> .....	<b>85</b>
<b>Acknowledgment</b> .....	<b>86</b>

## 摘 要

实时荧光 PCR 技术具有高灵敏度、高特异性、无需 PCR 反应后处理步骤等优点，近年来被广泛应用于分子生物学研究领域，尤其在临床检验方面，该技术提供了有力的支持。

针对日益完善的实时荧光 PCR 技术和种类越来越多的荧光探针技术，本研究设计了一种新型的荧光探针——等长双链荧光探针，又称 Y 型荧光探针，并围绕该关键技术展开了研究。研究工作主要包括 Y 型荧光探针的设计组合，应用 Y 型荧光探针对常见的病原微生物进行实时定量的检测。

文章分为两部分。在第一部分，首先，我们对不同组合的 Y 型荧光探针进行了筛选、优化，找到最佳的检测探针组成。然后，我们以肠出血性大肠杆菌 O157 为检测目标，以该细菌的 *rbfE* 基因为检测靶序列，从探针的熔解曲线、检测的特异性和灵敏度等几个方面系统的考察了新型 Y 型荧光探针检测细菌 DNA 的效果。通过实验，我们可以特异地从肠出血性大肠杆菌 O157，伤寒沙门氏菌，福氏志贺菌，肠侵袭性大肠杆菌 O4，弗劳地氏枸橼酸杆菌，产毒素大肠杆菌等 16 株常见菌中检测出肠出血性大肠杆菌 O157。另外，以肠出血性大肠杆菌 O157 阳性标准株 10 倍的梯度稀释液作为检测灵敏度的模板，结果可以在  $1.49 \times 10^3$  CFU/mL 浓度下特异地检测出目的菌。

第二部分，应用新型 Y 型荧光探针对禽流感 H5 亚型病毒进行了检测实验。我们选择保守的 HA 基因作为靶序列，系统优化了检测 RNA 病毒的 Y 型荧光探针反应体系和反应条件。结果表明，由 Y 型荧光探针建立的检测体系可以在 1.5 h 左右特异地检测出高致病力的禽流感 H5 亚型。通过对病毒标准株 RNA 的梯度稀释，

可以检测到浓度为  $0.342 \times 10^{-4} \mu\text{g}/\mu\text{L}$  的病毒 RNA。

通过检测细菌 DNA 和病毒 RNA 的实验, 我们所提出的新型 Y 型荧光探针技术, 与其他探针相比, 具备了设计简单, 成本低廉, 实用性好, 特异性强, 灵敏度高等优点。应用于临床检测, 还具有快速, 可靠, 高通量的优点。所建立的检测细菌 DNA 和病毒 RNA 的方法为病原微生物快速、可靠的诊断提供了一个良好的平台。

**关键词:** 实时荧光 PCR 技术; Y 型荧光探针;

肠出血性大肠杆菌 O157; 禽流感 H5 亚型

## ABSTRACT

Recently, real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) has been widely used in the research of molecular biology, especially in clinic diagnosis, because of its high specificity, sensitivity and without any further processing of the samples and opening the test tubes.

This dissertation consists of two parts. The first part is the development of a new fluorescence probe — equal-length double-stranded fluorescence probe, also named “Y-shape” fluorescence probe. Based on the fluorescence probe technique and real-time PCR, we establish a diagnostic assay system, and use it in the detection of *E. coli* O157. The second part, we use the fluorescence probe technique to detect H5 subtype avian influenza virus.

In the first part, we found the best equal-length double-stranded fluorescence probe combination from several different probe combinations after selecting and optimizing. The probe consists of two partially complementary equal-length oligonucleotides, one of which is labeled with a fluorophore and the other is labeled with a quencher. The strand labeled with the fluorophore (fluorescence strand) matches perfectly to the target sequence while the strand labeled with the quencher (quencher strand) is only partly complementary to the strand labeled with the fluorophore. Without the target sequence, both strands will anneal to form a duplex of “Y-shape” structure, which keeps the fluorophore and quencher in close proximity. Therefore, the fluorophore is quenched. After amplification of PCR reaction, the “fluorescent strand” hybridizes perfectly to the target sequence and the

two strands of the probe are separated. Therefore, emission of the reporter dye is released and detected. As it is single-labeled, the probe we used is easier to be designed, synthesized and is cheaper.

The feasibility of this method was tested by diagnosing Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (*E. coli*) O157, using the highly conserved *rfbE* O-antigen synthesis gene as the target. The specificity of the diagnostic method was assessed by comparing test results on 14 different related pathogens including common *E. coli*, enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC), *Salmonella*, *Shigella*, *C.freundii* and *E. coli* O157. All *E. coli* with serotype O157, which expresses *rfbE* gene, were positive in this assay, while all other species without *rfbE* gene expression were negative. The detection limit of the method was determined using 10-fold serial dilutions of an *E. coli* O157 standard sample, and as few as  $1.49 \times 10^3$  CFU/ml could be detected.

In the second part, we used the “Y-shape” fluorescence probe to diagnose the H5 subtype avian influenza virus. Selecting the conserved HA gene as the target, we optimized the reaction systems and the reaction conditions of testing RNA viruses. The result demonstrated that the highly virulent H5 subtype avian influenza virus could be specific tested using the diagnostic assay system. The detection limit of the method was determined using 10-fold serial dilutions of RNA of H5 subtype avian influenza virus standard sample, and as few as  $0.342 \times 10^{-4}$   $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  could be detected.

Comparing to other probes, the new “Y-shape” fluorescence probe technique we developed has the advantages of lower cost and ease of

design, synthesis. Furthermore, this probe is more specific and flexible. When used in clinic pathogen diagnosis, the equal-length double-stranded fluorescence probe technique has proved to be a simple, rapid, specific and sensitive method. With the routine use of the RT-PCR technology, the method will be applied broadly, especially in pathogen diagnosis.

Keywords: Real-time fluorescence polymerase chain reaction;  
“Y-shape” fluorescence probe;  
Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157;  
H5 subtype avian influenza virus;

## 第一部分

# 实时荧光 PCR 检测肠出血性大肠杆菌 O157 的研究

## 1 引言

DNA 双螺旋结构模型和生物中心法则的提出开辟了生命科学的新纪元，分子生物学成为生命科学最具活力的前沿领域。分子生物学新技术在医学领域的不断渗透和应用，对许多疾病的诊断和治疗、对疗效和疾病愈后的判断也进入了分子水平。自从 1985 年 Kary Mullis 发明了聚合酶链式反应以来，PCR 技术已成为分子生物学研究中使用最多、最广泛的手段之一<sup>[1]</sup>，但在 PCR 产物的后处理过程中，由于需要对扩增产物通过凝胶电泳、Southern 杂交或 DNA 序列分析等进行检测分析，就不可避免地涉及到致癌化学试剂的使用、PCR 核酸产物的潜在污染等问题<sup>[2-5]</sup>。实时荧光 PCR 技术对 PCR 产物的检测原理做了很大的改进，可动态实时监测核酸产物的形成，无须后处理过程。该技术最早是由美国 Applied Biosystems 公司在 1996 年推出的，不仅实现了 PCR 从定性到定量的飞跃，而且整个检测过程在完全闭管的条件下进行，无需 PCR 后处理，避免了交叉污染和致癌化学试剂的使用。实时荧光 PCR 仪采用激光器或卤素灯光源进行实时监测，以提供高能、稳定、无干扰的激发荧光，从检测开始到结束，整个过程可全部自动化，完全闭管，而且耗时短、操作方便。实时荧光 PCR 技术不同于其它 PCR 技术之处在于其利用荧光染料在激发光的作用下所释放的荧光光能的变化来动态地直接反映出 PCR 扩增产物量的变化。由于荧光信号变量与扩增产物量成正比，通过足够灵

敏的自动化仪器（如冷光 CDC）对荧光的采集与分析来实现对初始模板的定性和定量<sup>[6-10]</sup>。荧光染料在反应中的引入主要有以下几个途径：直接结合核酸产物（如 SYBR Green I）、荧光标记引物（如 Lux 引物），荧光标记特异性探针等；这些主要途径又可以分为探针介导型的检测和引物介导型的检测两大类。

### 1.1 实时荧光 PCR 应用的荧光探针技术

实时荧光 PCR 所用的荧光探针种类很多，实现的途径也不完全相同，但基本原理都是根据荧光共振能量转移（fluorescence resonance energy transfer, FRET）现象设计的。当一个荧光分子（供体分子）的荧光光谱与另一个荧光分子（受体分子）的激发光谱重叠时，供体荧光分子自身的荧光强度衰减，这种现象即是 FRET。FRET 现象发生程度与供体分子和受体分子的空间距离紧密相关，一般为 7—10 nm 时即可发生 FRET；中心荧光能量转移的效率与两者距离的 6 次方成反比<sup>[11-13]</sup>。

#### 1.1.1 分子信标

分子信标(molecular beacon)技术是 Tyagi 和 Krammer 在 1996 年首次提出的<sup>[13]</sup>。分子信标是基于 FRET 现象设计的一段与特定核酸互补的寡核苷酸探针，一般长约 25 nt，在空间结构上呈茎环结构。分子信标一般包括三部分：环序列，茎杆部分和连接于茎杆两端的荧光分子。环序列长度为 18-20 nt，与靶序列完全互补；茎杆部分长约 5-7 nt，由与靶序列无关的互补序列构成，通常是由 GC 含量较高的核苷酸组成，以提高结合能并减少长度，茎杆部分结合能的选择要与杂交结合能相匹配，环部分的存在使信标分子的杂交特异性明显高于相应的线性探针；茎杆的两端连接两种荧光基团，一端连接报告荧光基团，一般连接在信标分子的 5' 端，

另一端连接淬灭荧光基团。当无靶序列存在时，分子信标呈发夹结构，茎部的荧光分子与淬灭分子非常接近 7-10 nm，荧光分子发出的荧光被淬灭分子吸收并以热的形式散发，此时检测不到荧光信号，即发生了 FRET；当有靶序列存在时，分子信标的环序列与靶序列特异性结合，探针自发进行构型变化，形成的双链体比分子信标的茎环结构更稳定，荧光分子和淬灭分子分开，此时荧光分子发出的荧光不能被淬灭分子吸收，可检测到荧光。分子信标可加入核酸扩增系统中，对核酸扩增过程随时进行监测，同时也可以对扩增产物直接进行定量检测<sup>[13,14]</sup>。影响分子信标构型变化的参数主要有：茎杆长度，茎杆 GC 含量，环序列长度，溶液盐浓度等，尤其是二价阳离子（如  $Mg^{2+}$ ）对形成的杂交茎有较强的稳定作用，在  $Mg^{2+}$  存在条件下，4-12 个核苷酸可形成稳定的杂交茎。环序列长度至少应是臂长的 2 倍，才能保证探针与目的 DNA 杂交及荧光基团与淬灭基团分开，产生荧光信号<sup>[15]</sup>。

### 1.1.2 TaqMan 探针或水解探针

TaqMan 探针技术是在普通 PCR 原有一对特异性引物的基础上，增加了一条特异性的荧光双标记探针。TaqMan 探针是一段 5' 端标记报告荧光基团，3' 端标记淬灭荧光基团的一般长 20-30 nt 的寡核苷酸链。当探针完整时，由于报告基团与淬灭基团在位置上很接近，导致其报告荧光的发射主要由于 FRET 型能量传递而受到抑制。当 PCR 反应进行延伸阶段时，TaqDNA 聚合酶在引物的引导下，沿着模板链合成新链；当链的延伸进行到探针结合部位时，TaqDNA 聚合酶的 5'-3' 核酸外切酶活性将 TaqMan 探针水解成单核苷酸，报告荧光基团和淬灭荧光基团由于水解而互相分离，同时荧光基团从探针上游离出来，随后 TaqDNA 聚合酶使新链继

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库