

· 论 著 ·

焦磷酸测序法鉴定临床常见病原菌*

公衍文¹,任绪义²,胡成进¹

(1. 济南军区总医院实验诊断科, 济南 250031; 2. 杭州迪安医学检验中心 310030)

摘要:目的 建立高效的焦磷酸测序鉴定临床常见病原菌的方法。方法 在细菌 16S rRNA 的 V1 及 V3 可变区两端保守序列设计 PCR 扩增通用引物及焦磷酸测序引物, PCR 扩增后焦磷酸测序测定 V1 及 V3 可变区序列, 测序结果与数据库比对判断细菌种属。结果 在 4 h 内完成 96 株细菌的鉴定, 所有菌株鉴定结果与常规鉴定结果一致。结论 焦磷酸测序技术可以用于临床分离菌株的鉴定, 且具有费用相对低廉、高通量、鉴定能力强等优点。

关键词: 细菌; 16S rRNA; 焦磷酸测序

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2010.22.004

中图分类号: R446.5; R378

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)22-3009-02

Identification of clinical common pathogenic by pyrosequencing*

GONG Yan-wen¹, REN Xu-yi², HU Cheng-jin¹

(1. Department of Laboratory Diagnosis, General Hospital of Jinan Military Region, Jinan 250031, China;

2. Hangzhou Di'an Medical Examination Center, Hangzhou 310030, China)

Abstract: Objective To establish a method of identification of clinical common pathogenic bacteria by pyrosequencing. **Methods**

Designing the universal primers for PCR amplification from the both ends of conserved sequences of the V1 and V3 variable regions of the bacterial 16S rRNA, and the pyrosequencing primers for the V1 and V3 variable segment sequence. Sequencing the V1 and V3 variable segment by using pyrosequencing after PCR amplification. Comparing the sequencing results with the NCBI database in order to judge species. **Results** The identification of 96 strains of bacteria was completed in 4 h. The results of identification of bacteria were consistent with the results of all the isolates identified with the VITEK2 compact 60 automatic bacterial identification system. **Conclusion** Pyrosequencing can be used for clinical isolates identification with high specificity, high throughput and low cost.

Key words: bacteria; 16S rRNA; pyrosequencing

病原菌的鉴定一直是临床微生物室工作的难点和重点之一, 传统鉴定方法繁琐、费时、鉴定能力有限、准确率不高。虽然全自动微生物分析系统(AMS)在大型医院已经普及, 但其耗材昂贵, 耗时仍相对较长, 且对生长缓慢菌株鉴定能力不足。将细菌分离培养与 PCR 及杂交探针、基因芯片等技术手段相结合^[1-3], 具有耗时短、重复性好等优点, 但不能得到目标基因序列信息, 准确性和特异性不够高, 且多需要进行电泳或荧光标记的探针(不同种属细菌需要特异的引物或探针), 大大限制了其在临床病原菌鉴定中的广泛应用。

本研究利用细菌 16S rRNA 基因保守区的高度保守性及其 V1、V3 可变区的种间特异性, 阳性克隆菌落经 DNA 裂解、通用引物扩增, 然后用一条通用引物作为测序引物对 PCR 产物进行焦磷酸测序(pyrosequencing), 测序结果与 GenBank 数据库比对来判断菌种, 具有通量高、成本相对低廉、鉴定能力强、特异性好等优点, 现介绍如下。

1 材料与与方法

1.1 菌株来源 选取本实验室保留菌株共 15 种 165 株, 均分离自临床标本, 经 vitek 2 compact 60 全自动微生物分析系统及其配套鉴定卡(法国生物梅里埃公司产品)鉴定, 鉴定百分率(ID%)均大于 95%, 其中部分菌株, 如鲍曼不动杆菌等经手工试验(42℃生长等)和 API 再次确认。涵盖近 5 年本院分离率最高的 15 种细菌, 其中铜绿假单胞菌 20 株, 大肠埃希菌 15

株, 肺炎克雷伯菌 15 株, 鲍曼不动杆菌 15 株, 阴沟肠杆菌 10 株, 嗜麦芽窄食单胞菌 10 株, 弗劳地枸橼酸杆菌 10 株, 奇异变形杆菌 10 株, 金黄色葡萄球菌 15 株, 表皮葡萄球菌 10 株, 腐生葡萄球菌 5 株, 人葡萄球菌 5 株, 粪肠球菌 10 株, 屎肠球菌 10 株, 化脓链球菌 5 株。标准菌株 ATCC 25922(大肠埃希菌)、ATCC 27853(铜绿假单胞菌)、ATCC 25923(金黄色葡萄球菌)、ATCC 29212(粪肠球菌)、ATCC 19615(化脓链球菌)、ATCC 45301(阴沟肠杆菌)、ATCC 49005(奇异变形杆菌)、ATCC 13833(肺炎克雷伯菌)由中国药品生物制品检定所提供。

1.2 DNA 裂解 挑取培养皿中的阳性克隆菌落于 0.5 mL 离心管中, 加入 50 μL TE, 100℃煮沸 10 min 裂解细菌 DNA, 13 000 r/min 离心 10 min, 取上清液备用。

1.3 引物的设计、合成及 16S rDNA 基因扩增 根据 NCBI 基因文库公布的上述菌株 16S rRNA 基因序列, 利用 Primer 5 软件自行设计引物, 由上海英潍捷基生物科技有限公司合成, 引物序列见表 1, 上游引物用生物素标记。除引物外的所有 PCR 试剂均购自美国 Fermentas 公司。PCR 扩增在 S1000 扩增仪(美国伯乐公司)上进行, 采用 50 μL 反应体系, 包括 1× PCR buffer(10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂), 1.5 U Taq DNA 聚合酶, 0.2 mmol/L dNTP, 正反向引物各 0.06 μmol/L 以及 3 μL DNA 模板。反应程序为

* 基金项目: 全军“十一五”面上课题(06MA101)。

94 °C 预变性 3 min, 94 °C 25 s, 42 °C 30 s, 72 °C 20 s, 循环 30 次, 72 °C 延伸 3 min。

表 1 PCR 及测序引物

16S rRNA	引物	序列
V1 反向	正向	b-5'-GAAGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'
	反向	5'-TTACTCACCCGTCGCCACT-3'
	测序	5'-TTACTCACCCGTCGCCACT-3'
V3 正向	正向	5'-GCAACGCGAAGAACCTTACC-3'
	反向	b-5'-ACGACAGCCATGCAGCACCT-3'
	测序	5'-GCAACGCGAAGAACCTTACC-3'

b. 生物素标记。

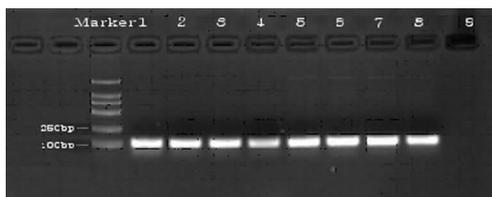
1.4 焦磷酸测序分析 测序采用 Qiagen 公司的 Pyro-Mark ID 遗传分析系统, 委托杭州迪安医学检验中心完成。在 50 μ L PCR 产物中加入 3 μ L 磁珠和 47 μ L (结合) 缓冲液, 室温下震荡混匀 10 min。打开系统真空泵, 将 Prep. Tool 在双蒸水中清洗 30 s, 转移至前述混合物中抓取其中的磁珠, 待磁珠基本抓取完毕后携带有磁珠的 Prep. Tool 分别在 70% 乙醇、变性缓冲液 (0.2 M NaOH) 以及洗涤缓冲液中各清洗 30 s, 再将其移至事先准备好的 PSQ96 孔板正上方 (每孔已加有 5 pmol 相应的测序引物及 44.5 μ L 退火缓冲液), 关掉真空泵后迅速将 Prep. Tool 放入 PSQ96 孔板中, 轻轻摇动使磁珠充分掉落。将 PSQ96 孔板置于 80 °C 烘箱中 2 min, 拿出冷却至室温。测序程序采用 SQA 模式, 即按 ATCG 的碱基排列顺序, 依次循环加入 10 次, 根据软件给出的剂量在试剂仓中加入底物混合物、酶混合物和 4 种 dNTP, 将 PSQ96 孔板和试剂仓放入测序仪中进行测序。

2 结果

2.1 扩增结果 用 2% 琼脂糖电泳鉴定, 在相当于约 100 bp 处均可见 1 条特异目的片段 DNA 条带 (图 1)。

2.2 测序结果 对阳性克隆标本 PCR 扩增产物进行焦磷酸测序, 在 4 h 内完成 96 个临床分离菌株的细菌鉴定 (包括阳性克隆的 DNA 提取、PCR 扩增及焦磷酸测序等, 单纯焦磷酸测序 1 h 内就可完成), 所得序列与 NCBI 中 GenBank 序列比对, 序列完全一致, 绝大多数菌种仅需 V1 区反向测序结果就能完成菌种的鉴定, 只有肺炎克雷伯菌和阴沟肠杆菌 V1 区反向测序序列相同, 须依靠 V3 区正向测序结果来进一步区分。

2.3 比对结果 所有菌株焦磷酸测序鉴定结果与常规鉴定结果符合率为 100%。



1~7 泳道为不同阳性标本; 8、9 泳道分别为金黄色葡萄球菌阳性对照和阴性对照。

图 1 阳性克隆 PCR 扩增结果

3 讨论

特异性序列测定无疑是细菌鉴定、分型的金标准。目前常用的测序法为 Sanger 法, 适合长片段的序列测定, 对仅需 20~30 bp 特异性序列的细菌鉴定来说不太合适, 限制了其在临床

实验室的广泛应用。作为新一代测序技术的焦磷酸测序是短片段 DNA 快速测序技术, 与 Sanger 法相比, 虽然读取序列较短, 但有以下优势: (1) 可以直接测定引物后面的模板序列; (2) 无需制胶电泳, 也无需荧光染色, 操作简便, 成本低, 通量高, 一次最多可检测 96 个样本; (3) 能够对样本快速实时检测, 速度快, 测定数十个 bp 的序列仅需二三十分钟^[3-5]。

由于不同细菌的 16S rRNA 基因既具有高度保守序列, 又具有各自特有的多变序列, 因此 16S rRNA 被认为是细菌种属水平检测的专属基因。本研究利用细菌 16S rRNA 的保守区的高度保守性及其 V1、V3 可变区的种间特异性, 设计了针对所有细菌的共同引物, 经扩增均可见到一条特异的电泳条带, 提示该引物对细菌具有很高的敏感性。PCR 扩增后进行焦磷酸测序, 不同细菌测序片段长度为 22~32 bp。以往虽偶见焦磷酸测序技术用于细菌鉴定的报道^[6-8], 但多是针对某种或某类细菌, 或所选菌种及菌株较少, 且由于测得有效序列较短 (15 bp) 等原因, 导致某些序列极为相似, 菌种难以区分。本实验结果比较理想, 提示焦磷酸测序能够用于分离菌株的鉴定, 且具有高通量、鉴定能力强大等优点, 每株细菌的鉴定成本仅需 12 元。本课题的最终目标是实现 PCR-焦磷酸测序完成各类临床标本中病原菌的直接鉴定, 从根本上解决病原菌分离耗时长等难题, 本试验则是本课题的第一步。

参考文献:

- [1] Barsotti O, Decoret D, Renaud FN. Identification of streptococcus mitis group species by RFLP of the PCR-amplified 16-23S rDNA intergenic spacer[J]. Res Microbiol, 2002, 153: 687.
- [2] 郑桂丽, 翟俊辉, 唐学玺, 等. 16S rDNA 寡核苷酸芯片鉴定致病菌的初步研究[J]. 军事医学科学院院刊, 2005, 29 (1): 13.
- [3] Woo PC, Lau SK, Teng JL, et al. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories[J]. Clin Microbiol Infect, 2008, 14(10): 908.
- [4] Shendure J, Mitra RD, Varma C, et al. Advanced sequencing technologies: methods and goals[J]. Nat Rev Genet, 2004, 5(5): 335.
- [5] Zhao JR, Bai YJ. Pyrosequencing-based approach for rapid detection of rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2005, 51: 135.
- [6] 孟成艳, 金嘉琳, 雷建强, 等. PCR-焦磷酸测序法快速检测和鉴定临床常见病原菌的研究[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(4): 456.
- [7] 李秀娟, 徐保红, 田会方, 等. 基于 PCR 的金黄色葡萄球菌检测方法的建立及应用[J]. 中国人畜共患病学报, 2009, 25(5): 442.
- [8] 杨会勇, 那广水, 朱术会, 等. 利用线性指数 PCR-焦磷酸测序技术快速检测 3 种海洋弧菌[J]. 中国药科大学学报, 2009, 40(5): 460.

(收稿日期: 2010-08-04)