

痰标本中金黄色葡萄球菌的分离鉴定方法研究*

洪文艳, 刘建伟, 李 曦, 于德宪, 谢晓波, 刘金华, 唐博恒[△] (广州军区疾病预防控制中心疾病监控科, 广州 510000)

【摘要】 目的 探索一种基于 16S rRNA 基因的细菌快速鉴定方法, 为临床标本中未知病原菌的诊断提供新的方法思路。**方法** 对 1 份临床发热伴呼吸道症候群患者的痰标本进行分离培养, 获得 3 种不同的菌落。直接以纯菌落为模板, 以通用引物扩增未知菌的 16S rRNA 基因片段, 产物直接测序后进行基于局部比对算法的搜索工具比对, 根据序列同源性鉴定病原细菌。**结果** 3 种菌落分别为不易致病的表皮葡萄球菌、蝾齿罗特放线菌及致病性的金黄色葡萄球菌, 后者继续用特异性引物扩增检测鉴定, 确认为金黄色葡萄球菌。**结论** 本研究建立了一种利用 16S rRNA 基因扩增快速鉴定临床标本中未知病原菌的简便方法。

【关键词】 病原检测; 细菌鉴定; 直接聚合酶链反应; 16S rRNA

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.20.006 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)20-2813-02

Identify a pathogenic staphylococcus aureus from a sputum specimen HONG Wen-yan, LIU Jian-wei, LI Xi, YU De-xian, XIE Xiao-bo, LIU Jin-hua, TANG Bo-heng[△] (Department of Disease Control, the Center of Disease Prevention and Control of Guangzhou Military Area, Guangzhou, Guangdong 510000, China)

【Abstract】 Objective To explore a rapid bacteria identified method based on the analysis technology of 16S rRNA gene sequence for the diagnosis of the clinical specimens. **Methods** Three kinds of pure colonies were isolated and cultured from the sputum specimen sample from a patient with fever and respiratory syndrome. The colonies were used as templates, universal primers were used to amplify 16S rRNA gene fragments of unknown bacteria, then sequenced the products directly, and compared using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). **Results** A strain of Staphylococcus epidermidis, a strain of Rothia dentocariosa and a strain of Staphylococcus aureus were identified, and the last was confirmed by specific primers. **Conclusion** This study developed a simple method for rapid identification of pathogens from clinical specimens by using 16S rRNA gene amplification.

【Key words】 pathogen detection; bacterial identification; direct Polymerase Chain Reaction; 16S rRNA

16S rRNA 基因是细菌基因组的高度保守区^[1], 16S rRNA 基因序列分析技术就是从微生物标本中获取 16S rRNA 基因片段的序列信息, 再与数据库中的序列进行比较, 分析并确定标本序列在进化树中的位置, 从而鉴定标本可能的微生物种类, 达到病原菌鉴定的目的^[2-3]。该技术是一种建立在基因文库及生物信息学技术上的细菌快速鉴定方法。经过多年的发展, 已得到了广泛的应用。本研究利用 16S rRNA 基因序列分析技术从 1 份临床患者的痰标本中分离鉴定出了 1 株金黄色葡萄球菌。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 临床标本取自某军区医院发热伴呼吸道症候群患者, 患者为 59 岁老年男性, 以受凉后咳嗽、咳痰伴发热、头痛就诊, 之前有自用抗菌药物治疗史, 就诊时体温 38.2℃, 血常规检查中白细胞(WBC) $9.16 \times 10^9/L$ 。对照用的金黄色葡萄球菌菌株为本中心传代保存。

1.2 仪器与试剂 实验使用仪器设备有生物梅里埃全自动细菌鉴定仪、PE(美国)480 型 DNA CYCLER 扩增仪、六一核酸电泳槽、天能 UV2000 凝胶成像仪分析仪等。培养基为广州环凯公司产品。聚合酶链反应(PCR)试剂为 TAKARA 公司生产。16S rRNA 基因通用引物, 正向序列为(27F): 5'-AGA

GTT TGA TCC TGG CTC AG-3', 反向序列为(1492R): 5'-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3'。金黄色葡萄球菌特异性引物, 正向序列: 5'-CGT GCC TAA TAC ATG CAA GTC G-3', 反向序列: 5'-TAC GAT TAC TAG CGA TTC CAG C-3'。

1.3 方法

1.3.1 细菌分离与培养 痰标本经生理盐水稀释, 取适量接种于肉汤培养基, 37℃过夜培养, 培养菌液接种 LB 平板培养。

1.3.2 PCR 扩增 16S rRNA 基因片段 挑取平板上的单个菌落, 100℃煮沸 10 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 取 2 μL 上清液作为扩增模板。应用 16S rRNA 基因通用引物, 建立 30 μL 的 PCR 反应体系: 细菌核酸模板 2 μL, Ex Taq 酶 0.3 μL, ddH₂O 19.2 μL, 酶 buffer 3 μL, 正向及反向引物(10 μmol/L) 各 1.5 μL, 脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)(2.5 mmol/L) 2.5 μL。PCR 反应程序: 95℃预变性 5 min 后开始循环, 94℃变性 55 s, 55℃退火 55 s, 72℃延伸 90 s, 30 个循环, 之后 72℃延伸 10 min。产物用 1.5% 琼脂糖电泳, 凝胶成像仪分析结果^[4]。

1.3.3 产物测序比对分析 阳性 PCR 产物送上海生工直接测序, 选通用引物的正向 27F 引物进行单向测序。Ediseq 软件

* 基金项目: 国家科技重大专项基金项目(2009-ZX10004-205)。

作者简介: 洪文艳, 女, 博士, 助理研究员, 主要从事微生物检测方面研究。△ 通讯作者, E-mail: tangbohen@163.com。

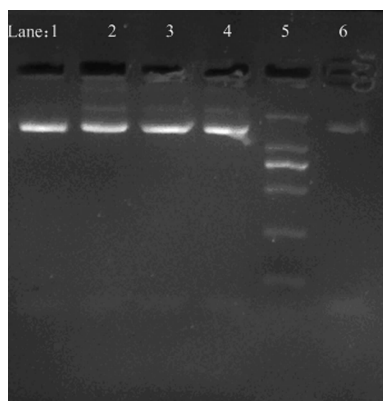
对测序结果进行分析,去掉首尾易错碱基,取编辑后的约 900 个 bp 序列,利用局部比对算法的搜索工具(BLAST)中的 16S rRNA 基因核酸序列比对功能,进行同源性比对,取结果输出中同源性最高的菌群^[5]。

1.3.4 金黄色葡萄球菌特异性 PCR 检测 选取可疑的阳性金黄色葡萄球菌菌落,挑单菌落。建立 30 μ L 的 PCR 反应体系:细菌核酸模板 1.5 μ L,Ex Taq 酶 0.3 μ L,ddH₂O 19.3 μ L,酶 buffer 3 μ L,正向及反向引物(10 μ mol/L)各 1.2 μ L,dNTP (2.5 mmol/L)2.5 μ L。PCR 反应程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后开始循环。94 $^{\circ}$ C 变性 40 s,55 $^{\circ}$ C 退火 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s,35 个循环,之后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。产物用 1.5% 琼脂糖电泳,凝胶成像仪分析结果。

2 结果

2.1 标本培养增菌结果 培养平板上可见明显不同的 3 种菌落,白色大菌落、白色小菌落和少数黄色菌落。

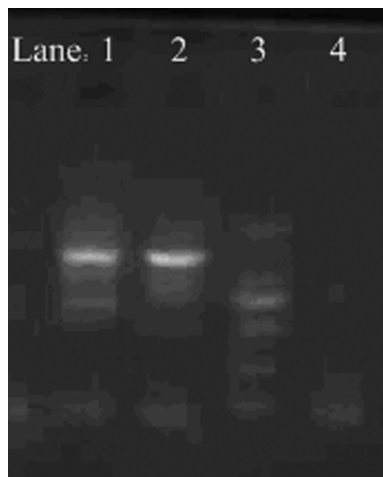
2.2 细菌 16S rRNA 基因扩增结果 以上述 3 种菌落为模板的 16S rRNA 基因扩增产物特异性较好,片段大小约为 1 500 bp,与目的条带大小一致。见图 1。



注:泳道从左至右的模板依次为: Lane 1. 白色小菌落; 2. 黄色菌落; 3. 白色大菌落; 4. 阳性对照(E. coli); 5. DL2000 Marker; 6. 阴性对照 H₂O。

图 1 细菌 16S rRNA 基因扩增产物的凝胶电泳图

2.3 16S rRNA 基因扩增产物测序比对分析结果 白色细小菌落产物的比对结果为非致病性蝾齿罗特放线菌,白色稍大菌落产物比对结果为不易致病的表皮葡萄球菌,黄色菌落产物比对结果为致病性金黄色葡萄球菌。



注:泳道从左至右的模板依次为: Lane 1. 阳性对照(金黄色葡萄球菌); 2. 待测菌落; 3. DL2000 Marker; 4. 阴性对照 H₂O。

图 2 特异性 PCR 产物的凝胶电泳图

2.4 金黄色葡萄球菌特异性 PCR 检测结果 待测可疑金黄色葡萄球菌的 PCR 产物大小与金黄色葡萄球菌阳性对照株的产物大小一致,约为 1 300 bp,与目的条带大小吻合。见图 2。

3 讨论

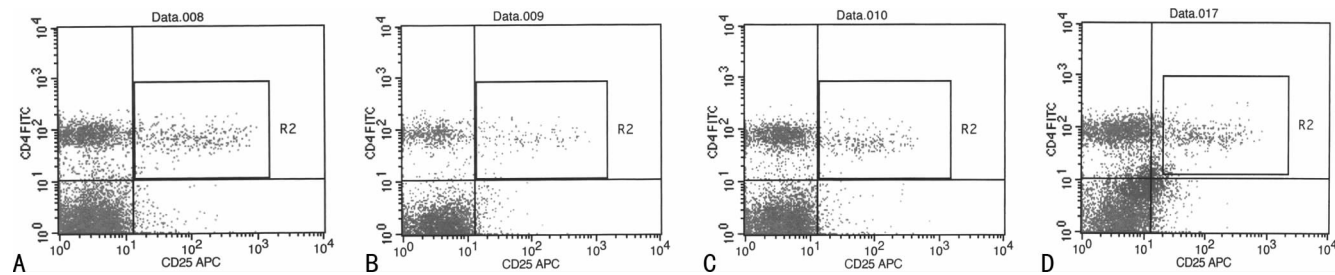
16S rRNA 基因测序在菌株鉴定中有独特优势,弥补了生化鉴定敏感性低、结果不稳定的缺点^[6-7]。随着相关技术的发展,基因测序的准确性不断提高,时间也不断缩短,使 16S rRNA 技术有可能成为细菌鉴定的常规检测方法之一^[8-9]。细菌的 16S rRNA 恒定区序列特别保守,约 1 500 个核苷酸,大小适中,易于扩增并分析。在 16S rRNA 区设计引物,可以方便地得到扩增产物并利用测序技术得到目的序列。且美国国立生物技术信息中心已积累和公布了大量细菌的 16S rRNA 基因序列,测序得到的结果可以做比对分析,得出目的细菌种属及差异等信息。随着生物技术的快速发展,16S rRNA 基因序列测定不仅客观,且比以前更经济、准确和快速,结合核酸序列分析不仅可检测与鉴定已知细菌,也可应用于未知菌种的检测与鉴定,实现快速、微量、准确地对微生物进行检测,更适应于临床应用的需求^[10-12]。

本研究所检测的某咳嗽咳痰伴发热就诊的男性患者痰标本,初次在批量检测过程中并未检出致病性金黄色葡萄球菌,可能是患者在就诊前有自用多种抗菌药物治疗史,且该痰标本混合有大量口腔菌群,使得标本中的金黄色葡萄球菌不易被检出。之后用标本直接反复涂抹接种平板,培养出肉眼可见的 3 种不同菌落,随后采用了细菌 16S rRNA 基因序列鉴定法,从 3 种不同菌落中快速分析出了可疑的致病菌种属。在此基础上再利用具有针对性的特异引物 PCR 检测方法,进行针对性验证,成功鉴定出了标本中的致病菌。

综上所述,16S rRNA 基因序列测定操作相对简单、快速,且投入低廉、结果准确,更符合准确高效且经济易行的临床诊治需求,值得继续研究并推广应用。

参考文献

- [1] 朱诗应,戚中田. 16S rDNA 扩增及测序在细菌鉴定与分类中的应用[J]. 微生物与感染,2013,8(2):104-109.
- [2] 赵建平,周秀岚. 脓液中金黄色葡萄球菌的耐药性监测[J]. 中国医药,2013,8(11):1641-1643.
- [3] 常玉梅,刘海燕. 16S rRNA 基因文库方法在感染标本菌群分析中的应用[J]. 解放军医药杂志,2013,25(1):57-59.
- [4] 付晓艳. 分析 16S rRNA 基因部分序列鉴定一株乳酸菌[J]. 哈尔滨医科大学学报,2008,42(3):265-267.
- [5] 陈茶,屈平华,顾全,等. 基于细菌 16S rRNA 基因的 PCR 扩增与测序分析在临床不常见菌鉴定中的应用[J]. 中华检验医学杂志,2012,35(7):612-619.
- [6] 王佃鹏,董瑞玲,张艳芳,等. 细菌直接 PCR 和双引物策略鉴定 16S rRNA 基因技术的建立[J]. 热带医学杂志,2012,12(2):181-183.
- [7] 金中淦,葛平,徐蓉,等. 16S rRNA、16S-23S rRNA 基因测序分析检测主要血流感染病原菌比较[J]. 分子诊断与治疗杂志,2012,4(3):181-185.
- [8] 程金平,王亚宾,刘磊,等. 应用 16S rRNA 基因序列分析鉴定猪源肠球菌[J]. 江西农业学报,2008,20(11):1-4.
- [9] 朱飞舟,陈利玉,陈汉春. 16S rRNA 基因序列分析法鉴定病原细菌[J]. 中南大学学报:医学版,(下转第 2817 页)



A: 正常对照组; B: CIA 模型组; C: 甲氨蝶呤治疗组; D: MSCs 移植治疗组

图 3 各组 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞表达水平比较

3 讨 论

RA 是以多关节慢性滑膜炎为特征的一种常见自身免疫疾病,发病机制目前尚未完全阐明。研究表明自身反应性 T 细胞与疾病的发生、发展有密切关系,CD4⁺CD25⁺ T 细胞可以调节机体损伤后的免疫反应,而机体内 CD4⁺CD25⁺ T 细胞缺失会导致自身免疫性疾病的发生^[7-8]。越来越多的证据表明 RA 患者中 CD4⁺CD25⁺ T 细胞存在异常。van Amelsfort 等^[5]发现,RA 患者外周血 CD4⁺CD25⁺ T 细胞百分比明显高于健康对照组,而这些细胞的抑制活性却明显下降。Lawson 等^[6]检测活动期和稳定期 RA 患者外周血 CD4⁺CD25⁺ T 细胞百分比,结果发现早期活动性 RA 患者外周血 CD4⁺CD25⁺ T 细胞百分比明显少于健康对照组,而稳定期 RA 患者组与健康对照组比较差异则无统计学意义($P>0.05$),表明 CD4⁺CD25⁺ T 细胞在早期活动性 RA 患者中,其外周血数量是减少的。Cao 等^[7]发现 RA 患者靶器官中高表达 CD4⁺CD25⁺ T 细胞,与外周血 CD4⁺CD25⁺ T 细胞相比明显增高,认为与外周血 CD4⁺CD25⁺ T 细胞转移至受累关节有关。由此看来,上调体内的 CD4⁺CD25⁺ T 细胞百分比可以很好地控制 RA 病情。

本研究结果显示,MSCs 移植组 CD4⁺CD25⁺ T 细胞与正常对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),说明 MSCs 治疗可以在炎症局部阻止骨和软骨的破坏,促进软骨修复。MSCs 移植治疗小鼠 CIA,能显著改善关节肿胀度,明显上调 CD4⁺CD25⁺ T 细胞的表达,并且与甲氨蝶呤治疗组比较,差异亦有统计学意义($P<0.05$)。说明 MSCs 可以通过提高 CD4⁺CD25⁺ T 细胞百分比,控制 RA 病情的发展。

综上所述,MSCs 移植治疗小鼠 CIA,能显著改善关节的肿胀度,明显上调 CD4⁺CD25⁺ T 细胞表达,故 MSCs 可作为一种新的替代细胞来源用于 RA 的移植治疗。

参考文献

[1] Murphy TJ, Choileain NN, Zang Y, et al. CD4⁺CD25⁺ (上接第 2814 页)
2013,20(10):1035-1041.
[10] 刘明春,刘耀川,赵敬翠,等.奶牛子宫内膜炎化脓隐秘杆菌 16S rRNA 基因的鉴定与分析[J].中国兽医学报,2009,29(3):343-345.
[11] 葛淑敏,钱爱东,王铁风.10 株牛源非结核分枝杆菌 16S rRNA 基因序列分析[J].中国预防兽医学报,2010,32

regulatory T cells control innate immune reactivity after in jury [J]. J Imm unol,2005,174(5):2957-2963.
[2] 尹纪伟,赵福涛.间充质干细胞在类风湿关节炎中的研究进展[J].医学综述,2011,3,5(17):644-646.
[3] 徐巍,沈波,陈葆国,等.类风湿性关节炎患者外周血 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞的表达及与疾病活动性的关系[J].浙江检验医学,2009,1(7):22-23
[4] Rizzello V, Liuzzo G, Brugaletta S, et al. Modulation of CD4⁺CD28null T lymphocytes by tumor necrosis factor alpha blockade in Patients with unstable angina[J]. Circulation,2006,113(19):22-27.
[5] van Amelsfort JM, Jacobs KM, Bililisma JW, et al. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid[J]. Arthritis Rheum, 2004,50(9):2775-2785.
[6] Lawson CA, Brown AK, Bejarano V, et al. Early rheumatoid arthritis associatal with a deficit in the CD4⁺CD25 high regulatory T cellspopulation in peripheral blood[J]. Rheumatology(Oxford),2006,45(10):1210-1217.
[7] Cao D, Malmstrom V, Baecher-Allan C, et al. Isolation and functional characterization of regulatory CD25brightCD4⁺ T cells from the targeorgan of patients with rheumatoid arthritis[J]. Eur Immunol,2003,33(1):215-223.
[8] Pittenger F, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineagepotential of adult humanmesenchymal stem cells [J]. Science,1999,284(10):143-147.

(收稿日期:2014-02-12 修回日期:2014-06-17)

(11):895-897.
[12] 王艳萍.16S rRNA 基因及 16S~23S rRNA 基因间区在微生物鉴定中的应用[J].国际检验医学杂志,2013,34(8):994-996.

(收稿日期:2014-02-12 修回日期:2014-05-17)