·论　　著·　　DOI：10.3969/j.issn.1672-9455.2022.11.007

16S rRNA 在常见致病分枝杆菌菌种鉴定中的应用*

纪凌云[1,2]，李马超[2]，蒋　毅[2]，赵秀芹[2]，万康林[2]，王琳琳[3]，刘海灿[2△]

1. 同济大学附属东方医院南院检验科，上海 200120；2. 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所/传染病预防控制国家重点实验室，北京 102206；3. 同济大学附属东方医院门诊护理部，上海 200120

摘　要：目的　通过分析 16S rRNA 在不同分枝杆菌中的异同，探讨测序技术有关的实验和数据处理问题。**方法**　采用 Mega6.0 软件对 34 株非结核分枝杆菌分离株及美国国家生物技术信息中心（NCBI）现有的 55 株常见致病分枝杆菌和 1 株诺卡菌的 16S rRNA 序列进行比对分析，并用 Maximum Likelihood 法构建进化树，最后用 DNASTAR/MegAlign 程序计算种间及种内相似性。**结果**　PCR 扩增后获得长度约为 1 500 bp 的目的片段，与下载获得的 16S rRNA 序列进行比对分析并剪齐后保留 1 248 bp，16S rRNA 可以将常见致病性分枝杆菌分为 18 群，种间相似性为 91.5%～100.0%，种内相似性为 99.0%～100.0%。**结论**　16S rRNA 种内保守性高且具有较好的种特异性，除了龟分枝杆菌和脓肿分枝杆菌、鸟分枝杆菌和胞内分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌和胃分枝杆菌、溃疡分枝杆菌和海鱼分枝杆菌、人型分枝杆菌和牛型分枝杆菌不能分开外，16S rRNA 可将常见致病性分枝杆菌各种分开，可作为一种较好的鉴定分枝杆菌的方法。

关键词：16S rRNA；　分枝杆菌；　鉴定

中图法分类号：R372　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1672-9455(2022)11-1467-05

Application of 16S rRNA in identification of common pathogenic Mycobacteria*

JI Lingyun[1,2], *LI Machao*[2], *JIANG Yi*[2], *ZHAO Xiuqin*[2], *WAN Kanglin*[2], *WANG Linlin*[2], *LIU Haican*[2△]

1. *Department of Clinical Laboratory, Affiliated East Hospital South Yard, Tongji University, Shanghai* 200120, *China*; 2. *National Institute for Communicable Disease Control and Prevention Chinese Center for Disease Control and Prevention/State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, Beijing* 102206, *China*; 3. *Department of Nursing, Affiliated East Hospital, Tongji University, Shanghai* 200120, *China*

Abstract: Objective　To explore the experimental and data processing problems related to sequencing technology by analyzing the similarities and differences of 16S rRNA in different Mycobacteria. **Methods**　The Mega6.0 software was used to conduct the comparative analysis on 16S rRNA sequence in 34 isolated strains of non-tuberculosis Mycobacterium, 55 existing strains of common pathogenic Mycobacteria and 1 strain of Nocardia farcinica in NCBI. The Maximum Likelihood method was used to construct the evolutionary tree, and the DNASTAR/MegAlign program was finally used to calculate the interspecific and intraspecific similarity. **Results**　The 1 500 bp target fragment was obtained after PCR amplification, after cutting to the same length, 1 248 bp was retained, 16S rRNA could divide the common pathogenic Mycobacteria into 18 groups, the range of interspecific similarity was 91.5% to 100.0%, and the range of intraspecific similarity was 99.0% to 100.0%. **Conclusion**　16S rRNA has high intraspecific conservatism and good intraspecific specificity, which can well distinguish various kinds of the common pathogenic Mycobacteria, except for Mycobacteria chelonae and Mycobacteria abscessus, Mycobacteria avium and Mycobacteria intracellular, Mycobacteria kansasii and Mycobacteria gastri, Mycobacteria ulcerans and Mycobacteria marinum, Mycobacteria bovis and Mycobacteria tuberculosis.

Key words: 16S rRNA;　Mycobacteria;　identification

---

*　**基金项目：**上海市公共卫生体系建设三年行动计划（2020－2022 年）（GWV-10.1-XK04）。

作者简介：纪凌云，女，技师，主要从事医学检验研究。　△　**通信作者**，E-mail：liuhaican@icdc.cn。

非结核分枝杆菌（NTM）指除结核分枝杆菌复合群（包括结核分枝杆菌、牛分枝杆菌、非洲分枝杆菌和田鼠分枝杆菌）和麻风分枝杆菌以外的所有其他分枝杆菌属，该菌广泛存在于水、土壤和灰尘等自然环境中，为条件致病菌，至今已发现 150 余种，大约有 50 种能引起人类疾病[1]。目前研究者对已知分枝杆菌的 16S rRNA 基因已经全部测序，通过基因比较分析，发现分枝杆菌 16S rRNA 基因既含有属特异的保守序列，又含有种特异性的高变区。以 16S rRNA 基因为靶基因，采用 PCR 测序方法，通过序列的分析可以鉴定分枝杆菌。本研究结合美国国家生物技术信息中心（NCBI）基因库现有的 55 株常见致病性分枝杆菌 16S rRNA 序列，以及 28 株人源和 6 株牛源 NTM 分离株 16S rRNA 测序结果，探讨 16S rRNA 序列在常见致病性分枝杆菌菌种鉴定中的价值，现报道如下。

1　材料与方法

1.1　菌株来源　收集 2012－2015 年四川人源性 19 株 4 种、2014 年内蒙古牛源性 6 株 2 种、2005－2012 年福建人源性 6 株 2 种、2010 年甘肃人源性 2 株 1 种、2015 年北京人源性 1 株 1 种，共计 34 株 NTM，均为罗氏培养基培养阳性，经噻吩-2-羧酸（TCH）、对硝基苯甲酸（PNB）培养初步鉴定为 NTM，再经多位点序列分析及保守基因 16S、16S-23S rRNA（ITS）、RNA 聚合酶的 β-亚基（rpoB）和热休克蛋白 65（hsp65）等的测序结果与 NCBI 序列库比对鉴定到种，并由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所结核室传代保存。具体信息见表 1。

表 1　临床菌株信息

菌株号	菌株	分离年份（年）	分离地	宿主
ZGCDC2013153	堪萨斯分枝杆菌	2013	四川	人
ZGCDC2014024	堪萨斯分枝杆菌	2014	四川	人
ZGCDC2014095	堪萨斯分枝杆菌	2014	四川	人
ZGCDC2015046	堪萨斯分枝杆菌	2015	四川	人
ZGCDC2015264	堪萨斯分枝杆菌	2015	四川	人
ZGCDC2015252	堪萨斯分枝杆菌	2015	四川	人
ZGCDC2013142	胞内分枝杆菌	2013	四川	人
ZGCDC2014291	胞内分枝杆菌	2014	四川	人
ZGCDC2015011	胞内分枝杆菌	2015	四川	人
ZGCDC2015187	胞内分枝杆菌	2015	四川	人
ZGCDC2015296	胞内分枝杆菌	2015	四川	人
ZGCDC2013192	脓肿分枝杆菌	2013	四川	人
ZGCDC2013319	脓肿分枝杆菌	2013	四川	人

续表 1　临床菌株信息

菌株号	菌株	分离年份（年）	分离地	宿主
ZGCDC2014086	脓肿分枝杆菌	2014	四川	人
ZGCDC2015279	脓肿分枝杆菌	2015	四川	人
ZGCDC2015348	脓肿分枝杆菌	2015	四川	人
ZGCDC2012196	鸟分枝杆菌	2012	四川	人
ZGCDC2014060	鸟分枝杆菌	2014	四川	人
ZGCDC2014135	鸟分枝杆菌	2014	四川	人
HHHTCDC20145S	鸟分枝杆菌	2014	内蒙古	牛
HHHTCDC2014F20	偶发分枝杆菌	2014	内蒙古	牛
HHHTCDC2014F90	偶发分枝杆菌	2014	内蒙古	牛
HHHTCDC2014FJ	偶发分枝杆菌	2014	内蒙古	牛
HHHTCDC2014G46	偶发分枝杆菌	2014	内蒙古	牛
HHHTCDC2015Y28D	偶发分枝杆菌	2014	内蒙古	牛
FJ05522	偶发分枝杆菌	2005	福建	人
FJ05528	偶发分枝杆菌	2005	福建	人
FJ05529	偶发分枝杆菌	2005	福建	人
FJ10095	偶发分枝杆菌	2010	福建	人
FJ12060	偶发分枝杆菌	2012	福建	人
FJ12122	苏尔加分枝杆菌	2012	福建	人
GS10052	龟分枝杆菌	2010	甘肃	人
GS10054	龟分枝杆菌	2010	甘肃	人
BJ15002	瘰疬分枝杆菌	2015	北京	人

1.2　方法

1.2.1　细菌 DNA 制备　采用水煮法提取 DNA，挑取 3～4 周龄新鲜菌落并用生理盐水洗脱菌体，80 ℃灭菌 30 min，离心收集菌体，用 500 μL TE 缓冲液重新悬菌，沸水浴 15 min，12 000 r/min 离心 3 min，取上清液即为模板 DNA，－20 ℃保存备用。

1.2.2　16S rRNA 序列扩增　（1）扩增体系：反应体系总体积 25.0 μL，2× Taq Master Mix 12.5 μL，10 μmol/L 上下游引物各 1.0 μL，双蒸水 8.5 μL，DNA 模板 2.0 μL。为获得 34 株 NTM 的 16S rRNA 基因全序列，采用正向引物 Fd1、反向引物 Rp2 进行扩增，扩增长度约为 1 500 bp，引物由北京天一辉远有限公司合成，引物序列参照文献[2]。正向引物 Fd1：5′-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3′；反向引物 Rp2：5′-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3′。将 PCR 产物送至北京天一辉远有限公司进行双向测序分析。（2）扩增条件为 94 ℃预变性 10 min，94 ℃变性 1 min，58 ℃退火 1 min，72 ℃延伸 1 min，30 个循环，最后 72 ℃延伸 10 min。

1.2.3　16S rRNA 序列下载　从 NCBI 上下载 1 324

bp 以上 23 种 55 株常见致病分枝杆菌及用来建外群的 1 株诺卡菌 16S rRNA 全长序列。

1.2.4 核苷酸序列分析　采用 PCR 扩增电泳的方法验证目的片段并将测得的序列输入 NCBI 数据库，用局部相似性基本查询工具 BLAST 程序进行比对分析，验证是否为所测菌的 16S rDNA 序列。

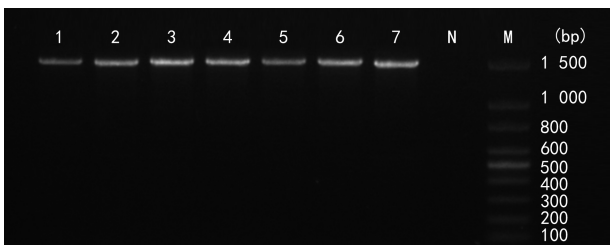
1.2.5 16S rRNA 进化树的建立及序列分析　将拼接好的 34 株 NTM 分离株 16S rRNA 序列和从 NCBI 上下载的 16S rRNA 序列共 90 条，采用 Mega6.0 软件中的 MUSCLE 进行多序列比对，参数保持默认值不变，选择 Maximum Likelihood 法构建进化树，Bootstrap 法生成 1 000 个重复序列组。种间及种内相似性计算使用 DNASTAR/MegAlign 中的 Clustal W 方法完成。

2　结　果

2.1 NTM 分离株 16S rRNA 序列 PCR 扩增电泳结果　34 株 NTM 分离株均可扩增出 1 条约 1 500 bp 的条带，与预期片段大小相符，见图 1。测序结果大小为 1 345～1 362 bp，与 NCBI 数据库进行比对后发现，不同种的 16S rRNA 序列与 NCBI 数据库中现存序列相似性均在 99%以上，可见该片段为本实验所要研究的目的片段。

2.2 分枝杆菌 16S rRNA 序列测定结果

2.2.1 验证目的片段　将所测定的 34 株 NTM 分离株的 16S rRNA 序列用 NCBI 的 BLAST 程序比对分析，结果显示与分枝杆菌的相似性均达 99%，说明扩增片段为目的基因。



注：M 为 DNA 标志物；1～7 为部分 NTM 分离株 16S rRNA 序列 PCR 扩增电泳结果；N 为阴性对照。

图 1　部分 NTM 分离株 16S rRNA 序列 PCR 扩增电泳结果

2.2.2 分枝杆菌 16S rRNA 序列种间、种内相似性分析　将 34 条所测 NTM 16S rRNA 序列和 NCBI 中 55 条常见致病分枝杆菌 16S rRNA 序列导入 DNASTAR/MegAlign 软件采用 Clustal W 方法进行多序列比对，以及种内及种间相似性分析。种内、种间两两比对后统计相似性范围，结果显示，种内相似性为 99.0%～100.0%，其中脓肿分枝杆菌、鸟分枝杆菌、龟分枝杆菌、偶发分枝杆菌、胞内分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、玛尔摩分枝杆菌、海鱼分枝杆菌、瘰疬分枝杆菌、苏尔加分枝杆菌、人型分枝杆菌种内相似性均可高达 100.0%，种内相似性最小值出现在戈登分枝杆菌种内比较中，为 99.0%，提示 16S rRNA 序列的种内保守性很高。分枝杆菌种间相似性为 91.5%～100.0%，其中部分人型分枝杆菌与牛型分枝杆菌、鸟分枝杆菌与胞内分枝杆菌、胃分枝杆菌与堪萨斯分枝杆菌的种间相似性可达 100.0%。其次，海鱼分枝杆菌和溃疡分枝杆菌、玛尔摩分枝杆菌与苏尔加分枝杆菌、脓肿分枝杆菌与龟分枝杆菌表现出较高的种间相似性，均在 99.4%以上（分别为 99.8%、99.8%、99.9%）。蟾分枝杆菌、草分枝杆菌与其他分枝杆菌相比，种间相似性普遍较低，蟾分枝杆菌与其他分枝杆菌比较，相似性为 91.5%～94.9%，其中蟾分枝杆菌与龟分枝杆菌相似性仅为 91.5%。草分枝杆菌与其他分枝杆菌种间相似性为 92.6%～97.2%，其中，草分枝杆菌与蟾分枝杆菌相似性仅为 92.6%，草分枝杆菌与耻垢分枝杆菌种间相似性较高，为 97.2%。这提示通过 16S rRNA 序列难以有效区分同一复合体的不同分枝杆菌亚种，但对于其他分枝杆菌种间能得到较好区分。

2.3 NTM 16S rRNA 系统进化分析结果　以 34 株临床株测序所得的 34 条 16S rRNA 序列和 55 条从 NCBI 下载的常见致病分枝杆菌 16S rRNA 序列，并以诺卡菌作为外群，构建系统进化树，见图 2。除了龟分枝杆菌和脓肿分枝杆菌、鸟分枝杆菌和胞内分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌和胃分枝杆菌、溃疡分枝杆菌和海鱼分枝杆菌、人型分枝杆菌和牛型分枝杆菌不能分开外，使用 16S rRNA 可以很好地将常见致病分枝杆菌各种分开，共分为 18 群。

2.4 NTM 不同种 16S rRNA 碱基变异分析　选取本研究所测 34 株 NTM 临床分离株 16S rRNA 序列和从 NCBI 上下载的所有常见致病性分枝杆菌的 16S rRNA 序列（若分枝杆菌种内相似性为 100%，则合并为 1 株进行分析）共 90 条，采用 Clustal W 分析剪齐后获得的序列大小为 1 248 bp。分析易变区，以 M. abscessus_ATCC19977 作为变异位点的参考序列，分枝杆菌 16S rRNA 整体保守性较高，存在易变区有 7 个，分别在 40～90、306～352、414～487、706～741、871～890、983～1 017、1 136～1 138 碱基位点。具体碱基变异分析见表 2。

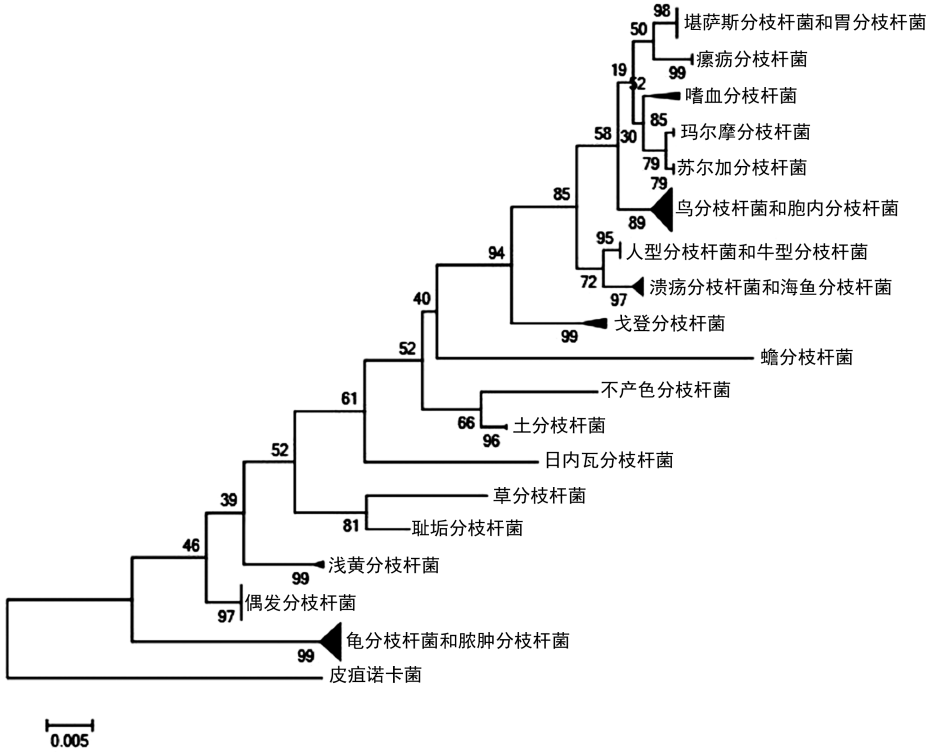


图 2　16S rRNA 聚类结果

表 2　碱基变异分析

菌株	碱基改变位置	碱基改变
蟾蜍分枝杆菌	73～74	GT 插入
	79～80	CG 插入
	517	A→T
	699～700	CT 缺失
	1 014	G→A
	1 231	C→T
人型和牛型分枝杆菌	73～74	GC 插入
	1 150	T→A
日内瓦分枝杆菌	472～474	CAC→GGG
	712	G→A
	833	A→G
	1 049	G→A
瘰疬分枝杆菌	115	T→A
浅黄分枝杆菌	133	C→T
	306	A→G
草分枝杆菌	1 023	T→C
溃疡分枝杆菌	1 112	A→G
不产色分枝杆菌	1 127	G→C
	1 136	T→G
龟和脓肿分枝杆菌	761	C→T
	768	G→A
	1 157	C→T

3　讨　论

基于 16S rRNA 基因的分子生物学检测技术对于 NTM 感染的诊断和进化分析是非常重要的，尤其对于那些不能培养的或者已经被杀死的菌株[3]。16S rRNA 5′端存在 A 区和 B 区，含有针对分枝杆菌的高度变异的核酸序列，使用特异靶基因 16S rRNA 进行序列分析，已经被广泛接受作为鉴定分枝杆菌的“金标准”。A 区序列包含大多数分枝杆菌的种特异序列，通常用作鉴定序列，而后发现的 B 区序列亦为许多菌种共有，也被证实可用于个别菌种鉴定[4-5]。由于 NTM 感染后患者可以具有与结核病相似的临床表现，但在治疗和预防上与结核病有明显不同，不同种的 NTM 对药物的敏感性也不同，因此选择正确和及时的 NTM 鉴定方法对该病患者的治疗和流行病学研究是迫在眉睫的[1,6]。

近年来，基于 16S rRNA 建立的鉴定分枝杆菌的方法有很多，如：基于小段 16S rRNA 高变异区的焦磷酸测序技术，该技术主要用于分枝杆菌种内鉴定，可与 16S rRNA 基因的桑格测序法相比较，据报道，该方法与其他鉴定方法具有较高的符合率[7]。另外基于 16S rRNA 寡核苷酸的基因芯片技术也已经被应用，已在鼻腔、上消化道、肠道样品中检测到分枝杆菌的 DNA[8]。此外，16S rRNA 基因有一段 138 bp 片段的高度可变区，可用于鉴别已知及新型的分枝杆菌，且其鉴定 NTM 快速、准确，鉴定种多达 40 余种，如今已广泛应用于分枝杆菌的鉴定。本次实验中 16S rRNA 目的片段长度约为 1 500 bp，测序所得片段长度在 1 340 bp 以上，比对剪齐后为 1 248 bp，因此覆盖 16S rRNA 的信息较全面。值得注意的是，本实验使用的 34 株 NTM 来自 5 个地域，且不同地域菌种分布有差异，同一菌种分布于同一地域，无法对

NTM 的 16S rRNA 序列进行地域特征的分析。

本研究利用分离株及从 NCBI 数据库中下载的 16S rRNA 序列，系统探讨 16S rRNA 序列在常见致病分枝杆菌菌种鉴定中的应用价值。从系统进化树中可以发现，除了龟分枝杆菌和脓肿分枝杆菌、鸟分枝杆菌和胞内分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌和胃分枝杆菌、溃疡分枝杆菌和海鱼分枝杆菌、人型分枝杆菌和牛型分枝杆菌等几个关系较近的菌种不能分开外，使用全长 16S rRNA 序列可以很好地将 13 种常见致病性分枝杆菌各种分开。通过种间相似性水平分析可以发现，草分枝杆菌、蟾分枝杆菌与其他分枝杆菌差异较大，而部分人型分枝杆菌与牛型分枝杆菌、鸟分枝杆菌与胞内分枝杆菌、胃分枝杆菌与堪萨斯分枝杆菌的种间相似性最高可达 100.0%，其次为脓肿分枝杆菌与龟分枝杆菌(99.9%)、海鱼分枝杆菌和溃疡分枝杆菌(99.8%)、玛尔摩分枝杆菌与苏尔加分枝杆菌(99.8%)。这几种由于相似性极高，很难用 16S rRNA 鉴别开来，这与之前的相关研究结果相符[9]。但是 16S rRNA 可以将偶发分枝杆菌、日内瓦分枝杆菌、浅黄分枝杆菌、戈登分枝杆菌、嗜血分枝杆菌、不产色分枝杆菌、草分枝杆菌、瘰疬分枝杆菌、耻垢分枝杆菌、土分枝杆菌、蟾分枝杆菌很好地鉴别开来，因此可以作为一种较好的鉴定分枝杆菌的方法。而通过种内相似性比较，发现其中脓肿分枝杆菌、鸟分枝杆菌、龟分枝杆菌、偶发分枝杆菌、胞内分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、玛尔摩分枝杆菌、海鱼分枝杆菌、瘰疬分枝杆菌、苏尔加分枝杆菌、人型分枝杆菌种内相似性最高可达 100.0%，可见分枝杆菌 16S rRNA 的种内保守性高。

通过 NTM 不同种 16S rRNA 碱基变异的分析，发现存在点突变、缺失突变、插入突变等变异类型。蟾蜍分枝杆菌的特异碱基变异较多，存在 2 处连续 2 个碱基的插入，3 个单碱基的突变，1 处连续 2 个碱基的缺失。日内瓦分枝杆菌、瘰疬分枝杆菌、浅黄分枝杆菌、草分枝杆菌、溃疡分枝杆菌、不产色分枝杆菌均存在特异的碱基变异。此外，人型分枝杆菌和牛型分枝杆菌、龟分枝杆菌和脓肿分枝杆菌作为复合群分别存在特异的碱基变异。根据分枝杆菌特异的碱基变异，构建荧光定量 PCR 等高灵敏度的分子生物学检测方法，对于分枝杆菌检测及流行病学调查具有重要意义。虽然 PCR 产物直接测序技术存在一定的错配率，但本实验采用双向测序的方法进行测序，且经北京天一辉远有限公司对测序峰图分析并拼接序列，可有效减少错配事件发生。

虽然在鉴定分枝杆菌方面有一个健全的 16S rRNA 库，且每种分枝杆菌有一个特异和稳定的 16S rRNA 序列，但是人们仍不能确定有多少个碱基不同才能区别一个种。据报道，如果 16S rRNA 不同的碱基数小于 5 个，或者它们的差异性小于 1.5%，则可以认为是相同的种[10]。可见 16S rRNA 鉴定方法也存在一定的弊端，基于 hsp65 的限制性片段长度多态性分析(PRA)方法以及 ITS 的序列分析均能将 16S rRNA 不能区分的脓肿分枝杆菌和龟分枝杆菌、胃分枝杆菌和堪萨斯分枝杆菌鉴别开来。因此，联合应用其他分子生物学鉴定方法，会取得更好的效果。

参考文献

[1] KOH W J. Nontuberculous Mycobacteria：overview[J]. Microbiol Spectr，2017，5(1)：653-661.

[2] ADÉKAMBI T，DRANCOURT M. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing Mycobacterium species by 16S rRNA，hsp65，sodA，recA and rpoB gene sequencing[J]. Int J Syst Evol Microbiol，2004，54(6)：2095-2105.

[3] HOZA A S，MFINANGA S G M，RODLOFF A C，et al. Increased isolation of nontuberculous Mycobacteria among TB suspects in Northeastern，Tanzania：public health and diagnostic implications for control programmes[J]. Bmc Res Notes，2016，9(1)：109.

[4] PARK H E，KIM S，SHIM S，et al. 16S and 23S rRNA gene mutation independent multidrug resistance of nontuberculous Mycobacteria isolated from South Korean Soil[J]. Microorganisms，2020，8(8)：1114.

[5] KIM S H，SHIN J H. Identification of nontuberculous Mycobacteria using multilocous sequence analysis of 16S rRNA，hsp65，and rpoB[J]. J Clin Lab Anal，2017，32(1)：e22184.

[6] WU M L，AZIZ D B，DARTOIS V，et al. NTM drug discovery：status，gaps and the way forward[J]. Drug Discov Today，2018，23(8)：1502-1519.

[7] KIM J U，CHA C H，PARK S H. Direct identification of Mycobacteria from liquid media using a triplex real-time PCR coupled with pyrosequencing method[J]. J Microbio Methods，2015，119：83-86.

[8] MACOVEI L，MCCAFFERTY J，CHEN T，et al. The hidden mycobacteriome of the human healthy oral cavity and upper respiratory tract[J]. J Oral Microbiol，2015，7(1)：26094.

[9] REN N，GAO G，SUN Y，et al. MicroRNA signatures from multidrugresistant Mycobacterium tuberculosis[J]. Molec Med Rep，2015，12(5)：651-657.

[10] 刘驰，李家宝，芮俊鹏，等. 16S rRNA 基因在微生物生态学中的应用[J]. 生态学报，2015，35(9)：20.

(收稿日期：2021-09-16　修回日期：2022-01-08)