

通用引物 PCR 检测临床常见致病菌的实验研究

王建春^{1,2} 刘 静¹ 黄文红² 张秀岭² 叶林柏¹ 梅国华^{2*}

(武汉大学生命科学院 武汉 430072)¹ (武汉钢铁公司职工医院 武汉 430080)²

摘要: 通用引物可一次性扩增 18 种临床常见致病菌和耐药菌株的 DNA, 扩增片段长度在 220 bp 左右, 18 种特异性探针分别与 18 种标准菌株的 PCR 扩增产物杂交结果显示探针都具有高度特异性; 5 种 37 例经法国梅里埃 API 细菌鉴定系统确定的临床分离菌株进行杂交鉴定, 鉴定结果与分离株一致, 表明设计的探针具有高度特异性及准确性。80 例临床标本分别用法国梅里埃 API 细菌鉴定系统及 PCR 杂交法进行检测, 阳性率分别为 (52.5%) 和 (67.5%), 表明 PCR 结合寡核苷酸杂交法比传统的生物学培养法更为灵敏, 值得推广。

关键词: 通用引物, PCR, 寡核苷酸探针, 致病菌

中图分类号: R446 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 02-0073-05

Universal Primer PCR for Detection of Clinic Bacteria

WANG Jian-Cun^{1,2} LIU Jing¹ HUANG Wen-Hong² ZHANG Xiu-Lin² YE Lin-Bai¹
MEI Guo-Hua^{2*}

(College of Life Science, Wuhan University, Wuhan 430072)¹

(Wuhan Iron and Steel Company, Wuhan 430080)²

Abstract: Universal primers and oligonucleotide probe with genus specific were designed. PCR targeted conserved sequence of bacterial 16S rDNA gene fragment, combined with dot-blot hybridization was used. 18 clinical bacteria and drug-resistant bacterial strains were amplified by PCR, and about 220 bp fragment were produced in the same condition. The probe only hybridized with corresponding PCR products. Results showed that every probe was highly specific. Compare to the bacterial strains of 37 clinical samples of 5 genres. Those were authenticated by identified system of Biomeyieux API bacteria in France with those by this method. The result was the same. Results showed that those probes were highly specific and highly accurate. 80 clinical samples tested by identified system of Biomeyieux API bacteria in France The positive rate was 52.5% but tested by PCR and dot-blot by hybridization technique, the positive rate was 67.5%. The result showed that the samples' positive rate tested by this method was highly than traditional bioetional biolog culture technique. The sensitivity of bacterial samples was 18CFU/ml. This method is highly specific, sensitive, rapid, simple as well as economical and reduces the chances of cross contamination.

Key words: Universal primer, Polymerase chain reaction, Oligonucleotideprobe, Clinical bacteria

细菌性感染的病原学快速、准确诊断一直是实验室检查的一大难点, 传统的病原菌检测方法主要为生物学法, 它是依赖于细菌的形态学、代谢产物、酶活性和表面抗原等表型特征进行细菌分类的, 存在着耗时长、阳性率低等不易克服的缺点, 对生长缓慢或难以培养的病原菌以及耐药菌株的检测则更加困难。近年来, 随着分子生物学和基因诊断技术的不断改进, 给传染性疾病的诊断带来突破性的飞跃, PCR 技术的应用为临床提供了快速、敏感的检测手段, 我们根据细菌 16S rDNA 的特点, 在 16S rDNA

* 通讯作者 Tel: 027-68752372, E-mail: linbaiye@whu.edu.cn

收稿日期: 2004-07-14, 修回日期: 2004-10-22

保守区设计 PCR 引物, 用一对通用引物在适宜的 PCR 反应条件下就可以将所有细菌的相应基因片段全部扩增出来, 同时利用可变区设计地高辛标记的种特异性寡核苷酸探针与扩增产物进行斑点杂交而区分不同细菌, 该法可同时鉴定 18 种细菌以及两类耐药菌株, 达到了快速鉴别、检测病原菌的目的。

1 材料与方法

1.1 标本来源

标准菌株由中国药品生物制品检定所提供 (见表 1)。血液、尿液、痰液、伤口分泌物标本及临床分离菌株由武钢总医院检验科细菌室提供。耐药菌株的筛选和确证试验是根据美国临床实验室标准化委员会 (NCCLS) 的标准, 采用琼脂稀释法测定 MIC^[1], ESBL 表型筛选及确证采用 NCCLS (M100-S10, 2000) 规定的试验方法进行。耐药菌株的基因分型采用 PCR 结合限制性酶切片段长度多态性分析 (RFLP) 进行。

表 1 用于实验的标准菌株

菌种	标准株	菌种	标准株
邻单胞菌	14029	革兰氏阴性厌氧球菌	13272
气单胞菌	10500	阴沟肠杆菌	45301
伤寒沙门菌	50082	粘质沙雷菌	41002, 41003
肺炎克雷伯菌	46114, 46117	凝固酶阴性葡萄球菌	ATCC 12228
大肠杆菌	44113	铜绿假单胞菌	10211
肺炎链球菌	31109, 1110	脑脊髓膜炎双球菌	29018, 9007
粪肠球菌	32219, 2223	普通变形杆菌	49107, 9108
副流感嗜血杆菌	58601	奇异变形杆菌	49106, 9118
流感嗜血杆菌	58545	金黄色葡萄球菌	26112
抗霉素素金黄葡萄球菌	26068	超广谱 β 内酰胺酶大肠埃希菌	35218

1.2 仪器和试剂

HEMAR 480 型基因扩增仪 (珠海黑马公司), 电泳仪 (北京六一仪器厂), 凝胶成像系统为 Kodak 公司产品, 水浴锅, 恒温摇床。DNA 聚合酶 (大连宝生物工程有限公司产品)、DNA 杂交试剂盒为 (美国 Rouche 公司产品), 尼龙膜 (德国杜邦公司产品)。

1.3 引物及寡核苷酸探针设计与合成

查找 18 种临床常见致病菌的 16S rDNA 序列 (见表 2), 将表 2 中列出的所有菌种的 16S rDNA 输入计算机, 用 DNA 序列分析软件进行比对。根据比对结果, 考虑到引物设计的特点, 将保守区做为引物, 可变区做为检测探针, 找出特异性最好的序列分别作为引物及探针。上游引物: 5'AAGACCCATACAGGGCGCGAT 3'; 下游引物: 5'GCCACCGGCAGCCCT 3'; 所设计的探针见表 2。每种探针的 5' 端用地高辛标记, 引物及探针由大连宝生物工程公司合成。

1.4 样品的制备

将各种标本经常规方法处理后, 取 100 μ L 到离心管中, 水浴煮沸 10 min 后, 迅速冰浴。

1.5 PCR 扩增

25 μ L 的 PCR 反应体系中, 含 10 x PCR buffer 2.5 μ L, 2.5 mmol/L dNTP0.5 μ L, 2.5 U Taq 酶, 上下游引物各 50 pmol, 制备的细菌 DNA 模板 5 μ L, 补充无菌蒸馏水至总体积为 25 μ L, 加入液体石蜡 25 μ L 防止蒸发。PCR 循环参数: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,

94℃变性 1 min, 55℃退火 1 min , 72℃延伸 1 min, 共 35 个循环, 然后 94℃变性 1 min, 55℃退火 1 min, 72℃延伸 5 min。

1.6 PCR 产物检测

采用 1% 琼脂糖凝胶电泳, 0.5 × TBE, 5V/cm 电泳 30 min, 溴化乙锭染色, 透射式紫外分析仪对 PCR 产物进行检测。

1.7 PCR 产物的序列测定

将 PCR 扩增产物纯化后进行测序分析。

1.8 寡核苷酸探针针对 PCR 产物的杂交检测

取扩增产物及标记探针经过交联、杂交、洗膜、显色等步骤, 待 DNA 呈深褐色斑点, 本底未显色时用蒸馏水洗膜终止反应。

表 2 试验中使用的菌种及探针

试验菌种	探针序列 (5' →3')
大肠杆菌	5' TCCTGCTTTAACATTATGACG 3'
肺炎克雷伯菌	5' CTGTCAAAGACACCTCTATAC 3'
粪肠球菌	5' TTCAATATTTCTGAAACTTAC 3'
副流感嗜血杆菌	5' AACCTTACTGACCAATGACTC 3'
金黄色葡萄球菌	5' GTAACCTGCGATCTCTCACTC 3'
流感嗜血杆菌	5' GACTAATCAATGATACGACT 3'
脑脊髓膜炎双球菌	5' ATAGTATCTTAGACAAAGTCCAC 3'
普通变形杆菌	5' ATTTGATCGCTCATGCACATA 3'
奇异变形杆菌	5' TCCTAACATTGATAATGCACT 3'
革兰氏阴性厌氧球菌	5' ATAACCCGGGTGCTGACATGG 3'
铜绿假单胞菌	5' TACAGTCGCTGCCTCAGCGCA 3'
阴沟肠杆菌	5' ACGATGGTGTTTCATACAAAGC 3'
粘质沙雷菌	5' CTATTAATACGCTCAAAATGCT 3'
气单胞菌	5' ATACCCAGGGGACGGGAGAC 3'
邻单胞菌	5' TCATACAGTCATATGAGGAC 3'
肺炎克雷伯菌	5' CTCGAATATATGATTCCGTTAT 3'
凝固酶阴性葡萄球菌	5' CGATGCAGCTCGTAATGCCTTG 3'
伤寒沙门菌	5' ATGATA CTC TATCGTAACITTT 3'
超广谱 β 内酰胺酶大肠埃希菌	5' TCGTCATCTATATGAGTACTTT 3'
抗青霉素金黄葡萄球菌	5' GTATGGATTCACTATTGATA 3'

1.9 统计学处理

率比较采用 X² 检验。

2 结果

2.1 引物的通用性试验

用设计的通用引物对 18 种临床常见致病菌标准菌株进行 PCR 扩增, 均获阳性 DNA 条带 (图 1)。结果显示, 与 DNA Markers 相对照, 扩增产物为 220 bp, 与设计相符合。我们用设计的通用引物对单纯疱疹病毒进行 PCR 扩增, 未获阳性条带, 说明设计的引物具有较高的特异性。同时, 用该引物对 13 种 20 株培养阳性的临床分离菌株进行 PCR 扩增, 亦获 220 bp 扩增产物。

2.2 PCR 反应的敏感性试验

将培养处于对数期大肠杆菌标准菌株的菌液进行 10 倍系列稀释, 使菌液浓度最后稀释成 10⁻⁹, 然后将每一稀释度的菌液进行 PCR 扩增反应, 结果发现, 当菌液浓度为

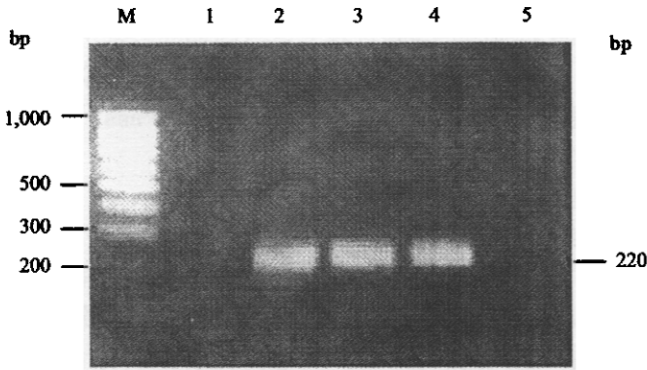


图 1 通用引物扩增细菌 DNA 产物电泳图谱

M DNA marker, 1 阴性对照, 2 大肠杆菌, 3 金黄色葡萄球菌, 4 阴沟杆菌, 5 单纯疱疹病毒对照

18 个/mL 时, 即稀释浓度为 10^{-8} 时, 仍然可以得到目的片段, 该结果证明本方法具有较高的敏感性。

2.3 PCR 产物的序列测定

为了证明所得到的 PCR 产物就是所需要的目的片段, 将 PCR 产物回收纯化后进行测序, 将测序结果与标准菌株的序列进行比较 (序列比较图省略), 结果发现, 测序结果与标准序列完全一致。这表明本方法具有很高的特异性。

2.4 PCR 产物与探针的杂交反应

将 PCR 产物与探针进行杂交反应, 结果见表 3、表 4。

表 3 不同细菌 PCR 产物与同一探针的杂交反应结果

探针	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	绿脓杆菌	阴沟杆菌
大肠杆菌	+	-	-	-
金黄色葡萄球菌	-	+	-	-
绿脓杆菌	-	-	+	-
阴沟杆菌	-	-	-	+

+ 表示杂交反应为阳性, - 表示杂交反应为阴性

表 4 不同细菌探针组合与不同细菌杂交反应结果

细菌探针组合	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌探针	绿脓杆菌探针	阴沟杆菌探针
1 + 2 + 3 + 4	+	+	+	+
2 + 3 + 4	-	+	+	+
3 + 4	-	-	+	+
4	-	-	-	+

1 大肠杆菌探针, 2 金黄色葡萄球菌探针, 3 绿脓杆菌探针, 4 阴沟杆菌探针, + 表示杂交反应为阳性, - 表示杂交反应为阴性

以上结果充分说明, 采用本方法进行杂交实验具有很好的特异性, 完全适合于临床检测。

2.5 临床分离菌株及标本的检测及验证

5 种 37 例经法国梅里埃 API 细菌鉴定系统确定的临床分离菌株用 PCR 杂交法鉴定, 其中大肠埃希菌 8 例, 铜绿假单胞菌 7 例, 肺炎克雷伯菌 9 例, 阴沟杆菌 5 例, 金

黄色葡萄球菌 8 例, 鉴定结果与分离株一致, 表明本法设计的探针具有高度特异性。80 例临床标本 (痰、血液、脓性分泌物及尿液) 分别用法国梅里埃细菌鉴定系统及 PCR 杂交法进行检测, 两者结果比较见表 5。

表 5 80 例临床标本与 PCR 杂交法检测阳性率比较

标本类型	血液	痰液	咽拭	分泌物	尿液	合计
标本例数	10	25	14	20	11	80
生物学方法	2 (20.0%)	14 (56.0%)	9 (64.3%)	13 (65.0%)	4 (36.3%)	42 (52.5%)
PCR 杂交法	3 (30.0%)	18 (72.0%)	11 (78.6%)	16 (80.0%)	6 (54.6%)	54 (67.5%)*

* $P < 0.01$

3 讨论

16S rRNA 在细菌及其他微生物的进化过程中高度保守, 被称为细菌的“分子化石”为所有细菌共有, 同时其保守性又是相对的, 在保守区之间存在着 9 或 10 个变异区 (V_1 、 V_{10}), 不同细菌的科、属、种间都有不同程度的差异, 故 16S rRNA 即可以作为细菌分类的标志, 又可作为临床病原菌检测和鉴定的靶分子^[1,2], 我们利用细菌 16S rRNA 设计的检测方案主要是将引物设计在保守区成为通用引物, 而在中间的可变区选择序列做探针, 这样一对通用引物即可将所有细菌保守区皆扩增出来, 再利用特异性的探针来鉴别, 达到了特异性和广谱性的统一。

我们用设计的通用引物对 18 种临床常见致病菌标准菌株及分离株进行 PCR 扩增, 均获 DNA 条带, 对单纯疱疹病毒进行 PCR 扩增, 未获扩增带, 说明设计的引物具有较高的特异性及良好的通用性。将培养处于对数期大肠杆菌标准菌株的菌液进行 10 倍系列稀释, 当菌液浓度 18 个/mL 时, 即稀释浓度为 10^{-8} 时, 仍然可以得到 PCR 扩增的目的片段, 证明本方法具有较高的灵敏度。同时将 PCR 产物回收纯化后进行测序, 然后与标准菌株的序列进行比较发现, 测序结果与标准序列完全一致; 将不同细菌的 PCR 产物与同一探针以及不同细菌的探针组合与不同细菌分别杂交, 结果显示每一种探针只和其相应的细菌杂交, 试验结果充分说明本方法具有高度的特异性, 完全适合于临床检测。

目前, 多指标的细菌检测方法主要有基因芯片法, 同位素标记的分子杂交法等, 靳连群^[5]法需要标记荧光素及高精度的荧光扫描仪对杂交结果进行检测; 制备芯片也需要芯片点样仪, 这样增加了芯片检测的成本, 不利于临床的推广。而本实验采用通用引物结合 PCR 杂交可一次性检测 18 种细菌及两类耐药菌株, 既达到了芯片检测多指标的特点又无需特殊仪器, 成本低廉, 优越于用放射性同位素标记合成的寡核苷酸探针, 克服了同位素探针固有的缺点以及生物学方法耗时长、阳性率低的缺点, 具有良好的前景, 其操作安全、简便, 快速、灵敏度高、特异性强、重复性好, 省时省力, 易于在临床上推广应用, 具有不可估量的社会效益和经济效益。

参考文献

[1] National Committee for Clinical Laboratory Standard Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing, ninth informational supplement (M100-S9), NCCLS, 1999, Wayne, Pennsylvania.

[2] Olsen G J, Larsen N, Woese C R. *Nucl Acids Res*, 1991, 19 (Suppl): 2017.

[3] de Lencastre H, de Jonge B L, Hattens P R, et al. *J Antimicrob Chemother*, 1994, 33: 7-24.

[4] 李永泰, 魏 瑾. 中国临床, 1993, 9: 97-108.

[5] 靳连群, 李 君, 王升启, 等. 中华微生物和免疫学杂志, 2003, 23 (1): 74-78.