

· 论 著 ·

流感嗜血杆菌 16S rRNA 和 p6 基因 PCR 检测结果比较

张莉滢^{1,3}, 陈 林², 吴忠道³

(1. 广东省人民医院病理医学部检验科, 广州 510080; 2. 广东省中医院二沙岛分院检验科, 广州 510105;

3. 中山大学中山医学院病原生物学教研室, 广州 510080)

摘要:目的 比较流感嗜血杆菌(Hi) 16S rRNA 和 p6 基因的 PCR 检测结果的差异。方法 以 Hi 的 16S rRNA 基因及外膜蛋白 p6 基因作为靶基因, 设计特异性引物分别对临床标本分离的 43 株 Hi 进行 PCR 快速检测。结果 34 株 16S rRNA 基因扩增出 538bp 大小 DNA 片段, 检出率为 79%; 43 株 p6 基因均扩增出 296bp 大小 DNA 片段, 检出率为 100%。同时, 其他细菌对照株 16S rRNA 和 p6 基因扩增均未出现假阳性结果。结论 相比于 16S rRNA 基因, p6 基因对 Hi 检测和鉴定更具特异性, 可用于临床对 Hi 感染疾病的快速诊断和流行病学研究。

关键词: 流感嗜血杆菌; PCR; 16S rRNA 基因; p6 基因

中图分类号: R378.41; R446.61

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2009)23-2960-03

Comparison of PCR results of two genes in haemophilus influenzae

ZHANG Li-yan^{1,3}, CHEN Lin², WU Zhong-dao³

(1. Clinical Laboratory of Pathology Medical Science, Guangdong Provincial People's

Hospital, Guangzhou 510080, China; 2. Clinical Laboratory of Ersha Island Branch, Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510105, China; 3. Key Laboratory for Tropical Diseases Control, Ministry of Education, Pre-clinical College, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: **Objective** To compare differences between the results of PCR testing of two genes in haemophilus influenzae (Hi). **Methods** The 16S rRNA and p6 genes were used as targets to identify 43 samples of Hi, which isolated from clinical samples. **Results** Out of 43 strains Hi, 34 were positive by 16S rRNA-PCR and 43 were positive by p6-PCR, the positive rate of detection was 79%, 100% respectively. At the same time, these two genes amplification in other control strains were not false positive. **Conclusion**

In this study we confirmed that p6 gene was one of the more specific gene than 16S rRNA gene for detection and identification of Hi, which can be used rapidly for diagnosing the invasive diseases caused by Hi and epidemiological studies.

Key words: haemophilus influenzae; PCR; 16S rRNA gene; p6 gene

流感嗜血杆菌(haemophilus influenzae, Hi)是引起儿童急性呼吸道感染的常见病原菌,也是小儿化脓性脑膜炎的主要致病菌之一^[1-3]。Hi 主要引起小儿机体化脓性感染,但缺乏独特的临床表现,因而早期、快速的病原学确诊非常重要。细菌学检查方法时间较长,阳性率低;而免疫学检测方法的敏感性及其特异性有限^[4],且不适用于不含荚膜 Hi 的检出^[5]。自 1990 年 Van Ketel 等^[6]首次建立 Hi 的 PCR 检测方法以来,16S rRNA 基因及外膜蛋白 p6 基因都被用作鉴定 Hi(包括有荚膜、无荚膜)的目的基因^[6-7]。本实验用上述两种基因作为靶基因,分别设计特异性引物进行 Hi 的 PCR 检测,比较两种基因对其检测的阳性率,以获得 Hi 的 PCR 快速检测更可靠的靶基因。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要实验设备 ESCO 负压操作台(EQR/GL-12,新加坡)、基因扩增仪(Bio-Rad,美国)、DYY-III-8B 型稳压稳流电泳仪(六一仪器厂,北京)、凝胶成像系统(Gel Image System, Tanon 4100)等。

1.1.2 主要试剂 Hi 的 16SrRNA 及 p6 基因引物由上海生物工程技术有限公司合成, TaqDNA 酶、dNTP 等 PCR 体系为 TaKaRa 公司产品, PCR Marker-DL 2000 为 TaKaRa 公司产品, API NH 鉴定系统为 Bio-Merieux 公司产品。

1.1.3 Hi 标准菌株 ATCC 49247 购自卫生部临床检验

中心。

1.1.4 临床菌株来源 为广州市某医院 2006 年 4~10 月儿童急性呼吸道感染患者(年龄 0.5~6 岁)呼吸道标本。在病原生物学实验室经 37℃、5%~10% CO₂ 培养 24h,由生物梅里埃 API NH 卡鉴定为 Hi,共 43 株。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 取 Hi 细菌 24h 培养物经生理盐水洗涤 2 次后,将细菌混悬于 2mL TE 缓冲溶液中,菌液浓度调成 0.5 麦氏浊度,煮沸 10min,12 000g 离心 5min 后,上清液作为 PCR 检测模板。

1.2.2 引物设计 参照文献[8],根据 Hi 的 16S rRNA 基因与外膜蛋白 p6 基因设计上下引物。扩增 16S rRNA 基因长 538bp 片段,上、下游引物分别为:5'-TCC TAA GAA GAG CTC AGA GAT-3', 5'-TGA TCC AAC CGC AGG TTC C-3'; 扩增 p6 基因长 296bp 片段,上、下游引物分别为:5'-TTG GCG GTT ACT CTG TTG CT-3', 5'-TGC AGG TTT TTC TTC ACC GT-3'。

1.2.3 PCR 扩增 总反应体积 50μL,包括 0.5μL Taq DNA 酶,4μL dNTP,上、下游引物各 1.0μL,5μL 10× buffer(含 Mg²⁺),2.5μL 模板,加无菌双蒸水补至 50μL。以无菌蒸馏水与 Hi ATCC49247 为模板作阴性、阳性对照。PCR 扩增条件为 94℃、预变性 5min;94℃、变性 30s,58℃、退火 30s,72℃、延伸

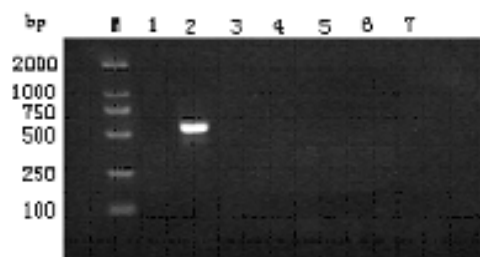
1min,35 个循环;72℃、延伸 7min。PCR 扩增产物用含溴化乙锭(EB 0.5%)的 1%琼脂糖凝胶进行电泳,Marker DL2000 作为分子量标志,凝胶成像系统采集图像。

1.2.4 对照菌株及临床分离株的重复性实验 采用以上 PCR 扩增体系,分别用 Hi ATCC 49247、副流感嗜血杆菌(临床分离株)、金黄色葡萄球菌 ATCC 29213、大肠杆菌 ATCC 25922、铜绿假单胞菌 ATCC 27853、肺炎克雷伯菌(临床分离株)、43 株 Hi 临床分离菌株按上法制备模板进行 16S rRNA 及 p6 基因片段 PCR 扩增。同法制备模板,重复扩增 3 次。

1.3 统计学方法 采用卡方检验。

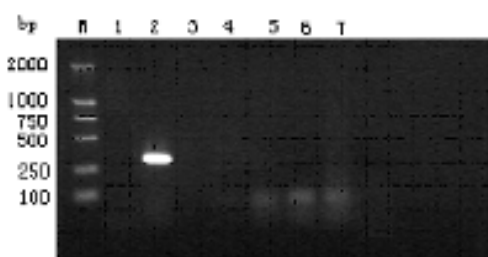
2 结果

2.1 PCR 实验结果 在被检测的 Hi ATCC 49247、副流感嗜血杆菌临床分离株、金黄色葡萄球菌 ATCC 29213、大肠杆菌 ATCC 25922、铜绿假单胞菌 ATCC 27853、肺炎克雷伯菌临床分离株等 6 种呼吸道病原菌中,只有 Hi 可扩增出 538bp 和 296bp 的 DNA 片段,见图 1、2。



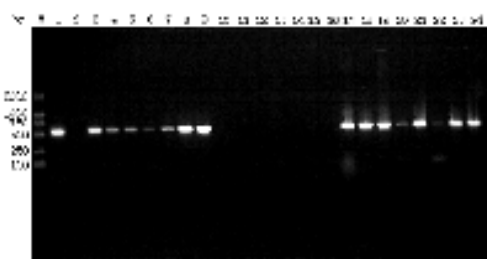
M: DL2000 (TaKaRa); 1~7 泳道分别为阴性对照、Hi-ATCC49247、副流感嗜血杆菌(临床分离株)、金黄色葡萄球菌 ATCC29213、大肠杆菌 ATCC25922、铜绿假单胞菌 ATCC27853、肺炎克雷伯菌(临床分离株)。

图 1 16S rRNA 基因 PCR 检测对照实验



M: DL2000 (TaKaRa); 1~7 泳道分别为阴性对照、Hi-ATCC49247、副流感嗜血杆菌(临床分离株)、金黄色葡萄球菌 ATCC29213、大肠杆菌 ATCC25922、铜绿假单胞菌 ATCC27853、肺炎克雷伯菌(临床分离株)。

图 2 p6 基因 PCR 检测对照实验

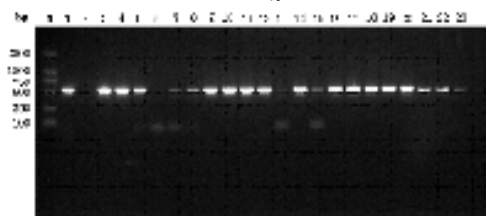


M: DL2000 (TaKaRa); 1、2 泳道为 HiATCC49247、阴性对照;10~16 泳道结果为阴性;4~7、20、22 泳道结果为弱阳性;3、8、9、17~19、21、23、24 泳道结果为强阳性。

图 3 16S rRNA 基因对临床标本分离的 22 株 Hi 的检测结果

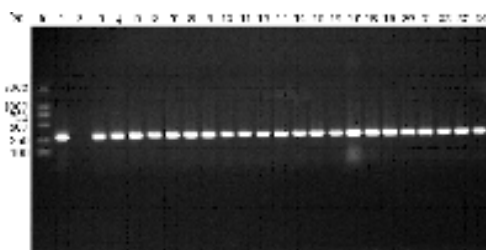
2.2 Hi 16S rRNA 基因扩增结果 在 43 株 Hi 临床分离菌中,有 34 株扩增出大小为 538bp 的目的 DNA 片段,检出率为 79%,重复 3 次检测结果相同,与已知的 Hi(100%)比较差异有统计学意义($\chi^2=5.025, P<0.05$),见图 3、4。

2.3 Hi 外膜蛋白 p6 基因扩增结果 43 株 Hi 临床分离菌全部扩增出大小约 300bp 的产物,与目的片段 296bp 的大小相当,检出率为 100%,重复 3 次检测结果一致。与已知的 Hi (100%)比较差异无统计学意义($\chi^2=0, P>0.05$),见图 5、6。



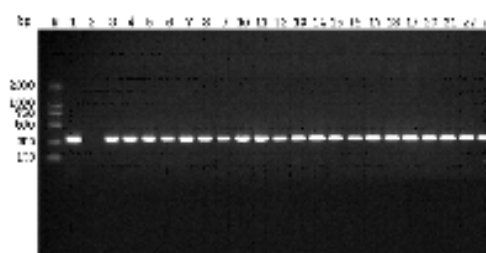
M: DL2000 (TaKaRa); 1、2 泳道为 Hi ATCC49247、阴性对照;6、13 泳道结果为阴性;7、8、15、21~23 泳道结果为弱阳性;3~5、9~12、14、16~20 泳道结果为强阳性。

图 4 16S rRNA 基因对临床标本分离的其余 21 株 Hi 的检测结果



M: DL2000 (TaKaRa); 1、2 泳道为 Hi ATCC49247、阴性对照;3~24 泳道结果均为强阳性。

图 5 p6 基因对临床标本分离的 22 株 Hi 的检测结果



M: DL2000 (TaKaRa); 1、2 泳道为 Hi ATCC49247、阴性对照;3~24 泳道结果均为强阳性。

图 6 p6 基因对临床标本分离的其余 21 株 Hi 的检测结果

3 讨论

急性呼吸道感染是发展中国家严重威胁小儿健康的疾病,是儿科常见病、多发病。Hi 是引起儿童急性呼吸道感染的常见病原,也是小儿化脓性脑膜炎的主要致病菌^[2-3]。对 Hi 快速而准确的检测有利于减少儿童急性呼吸道感染及儿童急性脑膜炎的发病率。长期以来该病原菌的鉴定是对标本进行分离培养,该方法是“金标准”,但分离培养时间较长,且该菌为苛氧菌,培养条件要求相对严格,难以达到快速鉴定,从而延误疾病的诊断和治疗。血清学诊断方法是检测患者血清中相应抗体,而抗体产生需 4~5d,也不能快速检测该细菌;再者血清学实验的固有缺陷使此方法不能检测在生理盐水中自凝和抗原

性弱的菌株。

PCR 自 1985 年问世以来便不断被应用到各种病原微生物,尤其是常规难以培养的微生物检测中。该技术于 1990 年被首次用于 Hi 的鉴定,此方法快速、敏感、特异,为 Hi 的检测提供了广阔的前景。本实验选用 16S rRNA 基因及 p6 基因作为 Hi 快速鉴定的靶基因,结果表明 p6 和 16S rRNA 对 Hi 的检测均具有较高的特异性,但前者的检出率高于后者,这可能与 16S rRNA 的多样性有关。有文献报道 16S rRNA 基因是细菌的“分子化石”,在细菌及其他微生物的进化过程中高度保守,但保守性是相对的,不同细菌的科、属、种间都有不同程度的差异^[9],有研究者基于 16S rRNA 基因的多样性而对 Hi 进行分子流行病学调查及其基因分型^[10],本研究结果证实了 Hi 的 16S rRNA 存在多样性的可能。实验结果显示外膜蛋白 p6 的编码基因的 PCR 检出率为 100%,有文献报道所有的 Hi 均存在外膜蛋白 p6 的编码基因,本实验结果与文献报道一致^[11]。

综上所述,本实验结果提示 p6 基因是对 Hi 快速检测和鉴定的更特异靶基因之一,可用于临床对小儿 Hi 感染疾病的快速诊断和流行病学研究。基于前述的研究结果,可将该 PCR 方法应用于临床标本中 Hi 的直接检测,以此尝试将分子生物学技术应用于苛氧菌的快速鉴定。

参考文献:

- [1] 盛朝凯,刘岚,余道澄,等.住院呼吸道感染患儿嗜血杆菌检出率及耐药性调查[J].重庆医学,2003,32(4):431.
- [2] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Pediatric bacterial meningitis surveillance-African region,2002—2008[J].MMWR Morb Mortal Wkly Rep,2009,58(18):493.
- [3] 郭军,崔振泽,黄燕,等.小儿急性呼吸道感染细菌分布及耐药状况[J].中国当代儿科杂志,2008,10(5):579.
- [4] Marcon MJ,Hamoudi AC,Cannon HJ.Comparative laboratory evaluation of three antigen detection methods for diagnosis of *Haemophilus influenzae* type b disease[J].J Clin Microbiol,1984,19(3):333.
- [5] Malouin F,Bryan LE,Shewciw P,et al. DNA probe technology for rapid detection of *Haemophilus influenzae* in clinical specimens[J].J Clin Microbiol,1988,26(10):2132.
- [6] Van Ketel RJ,De Wever B, Van Alphen L. Detection of *Haemophilus influenzae* in cerebrospinal fluids by polymerase chain reaction DNA amplification[J].J Med Microbiol,1990,33(4):271.
- [7] Bäckman A,Lantz P,Rådström P,et al. Evaluation of an extended diagnostic PCR assay for detection and verification of the common causes of bacterial meningitis in CSF and other biological samples[J].Mol Cell Probes,1999,13:49.
- [8] Stralin K,Bäckman A,Holmberg H,et al. Design of a multiplex PCR for *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* to be used on sputum samples[J].APMIS,2005,113(2):99.
- [9] Olsen GJ,Larsen N,Woese CR. The ribosomal RNA database project[J].Nucleic Acids Res,1991,19(Suppl.):2017.
- [10] Sacchi CT,Alber D,Dull P,et al. High level of sequence diversity in the 16S rRNA genes of *Haemophilus influenzae* isolates is useful for molecular subtyping[J].J Clin Microbiol,2005,43(8):3734.
- [11] Nelson MB,Apicella MA,Murphy TF,et al. Cloning and sequencing of *Haemophilus influenzae* outer membrane protein p6[J].Infect Immun,1988,56(1):128.

(收稿日期:2009-07-12 修回日期:2009-08-15)

(上接第 2959 页)

- Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells[J].Nature Genet,2006,34(20):136.
- [8] Qian C,Wang X,Manzur K,et al. Structural insights of the specificity and catalysis of a viral histone H3 lysine 27 methyltransferase[J].J Mol Biol,2006,359(1):86.
- [9] Ginder GD,Gnanapragasam NM,Mian OY. The role of the epigenetic signal,DNA methylation,in gene regulation during erythroid development,Curr[J].Top Dev Biol,2008,82(7):85.
- [10] 胡华,李彩霞,孙古亚,等.多重引物延伸的方法检测β-地中海贫血[J].重庆医学,2007,36(21):2193.
- [11] Stefania Bottardi,Angélique Aumont, Frank Grosveld, et

- al. Developmental stage-specific epigenetic control of human γ -globin gene expression is potentiated in hematopoietic progenitor cells prior to their transcriptional activation[J].Blood,2003,102(12):3989.
- [12] Stefania Bottardi,Julie Ross,Natacha Pierre-Charles, et al. Lineage-specific activators affect β -globin locus chromatin in multipotent hematopoietic progenitors[J].Blood,2006,25(7):3586.
- [13] Martin C,Zhang Y. The diverse functions of histone lysine methylation[J].Nat Rev,2005,6(11):838.
- [14] Hayashi K,Yoshida K,Matsui Y. A histone H3 methyltransferase controls epigenetic events required for meiotic prophase[J].Nature,2005,438(17):374.

(收稿日期:2009-10-15 修回日期:2009-10-23)