

· 基础研究 ·

16S rRNA 基因序列分析鉴定非典型细菌的实验研究

沈亚娟, 夏云[△]

(重庆医科大学附属第一医院检验科, 重庆 400016)

摘要:目的 建立以 16S rRNA 基因序列分析为基础的细菌鉴定方法, 并初步将其应用于临床常规细菌的鉴定。方法 选择临床微生物实验室不能准确鉴定的细菌, 以 16S rRNA 为靶序列, 在两端保守区设计引物, PCR 反应扩增目的片段, 测序后与数据库中已知细菌的 16S rRNA 序列进行序列比对。结果 13 株菌中, 有 11 株与数据库中的已知 16S rRNA 序列相似性达 99.0% 以上, 成功鉴定到种的水平。结论 16S rRNA 基因序列分析的方法可快速、准确地鉴定不典型菌株, 可作为细菌常规鉴定的补充方法。

关键词: 基因, rRNA; 细菌; 序列分析

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.01.015

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)01-0046-03

Experimental study of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of atypical bacteria

Shen Yajuan, Xia Yun[△]

(Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To establish an approach for bacteria identification based on 16S rRNA gene sequence analysis, and apply it to clinical routine bacteria identification initially. **Methods** Bacteria which can not be accurately identified in clinical microbiological laboratory were selected. 16S rRNA served as target sequence, primers were designed to match the conserved region at both ends and target fragments were amplified by means of PCR reaction. After sequencing, their sequences were compared with 16S rRNA sequence of known bacteria in the database. **Results** Among 13 strains, 11 strains showed sequence similarity of 99.0% with 16S rRNA sequence of known bacteria in the database, and were successfully identified to the species level. **Conclusion** 16S rRNA gene sequence analysis can be applied to identify atypical bacteria quickly and accurately, and serve as a supplementary method of routine bacteria identification.

Key words: genes, rRNA; bacteria; sequence analysis

传统的细菌鉴定方法是对细菌进行纯培养, 然后从形态特征、生化特性及免疫学特性等方面加以鉴定。但该方法繁琐、费时, 且某些细菌的表型特征不典型, 同时还受到抗生素治疗的影响, 导致某些细菌不能准确鉴定。因此, 建立一种简便、准确的细菌鉴定方法具有重要意义。20 世纪 80 年代, 有学者开始对不同细菌的 16S rRNA 序列进行分析, 并初步将其应用到细菌的系统发育研究^[1-2]。随着 PCR 技术及自动化 DNA 测序的开展, 对细菌 16S rRNA 基因序列的分析研究越来越成熟, 并累积了大量不同种属细菌的 16S rRNA 基因序列。通过对这些序列进行比较分析发现, 相同种属细菌的 16S rRNA 序列高度保守, 但是在种间或属间仍有不同之处, 并将其应用到微生物的分类鉴定和系统发育研究^[3]。本课题利用该技术对临床实验室不能准确鉴定的菌株进行鉴定, 以评估该技术在细菌快速鉴定中的应用价值。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源 采用本院临床微生物实验室保存的 7 株标准菌株 ATCC25922 (大肠杆菌), ATCC29213 (金黄色葡萄球菌), ATCC700340 (肺炎克雷伯菌), ATCC27853 (铜绿假单胞菌), ATCC49619 (肺炎链球菌), ATCC49247 (流感嗜血杆菌), ATCC29212 (粪肠球菌) 来评价 16S rRNA 序列分析鉴定细菌的准确性。为了进一步验证 16S rRNA 序列分析对临床细菌的鉴定效能, 从本院临床微生物实验室收集了 8 株经高级全自

动细菌鉴定/药敏系统 (VITEK 2 Compact) 鉴定的已知细菌 (可靠率在 99% 以上), 包括阴沟肠杆菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、粪肠球菌、表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、奇异变形杆菌及鲍曼不动杆菌各 1 株; 另收集了常规方法鉴定 (可靠率较低) 或无法鉴定的细菌 13 株, 所用菌株保存于一 80 ℃ 冰箱。

1.2 提取细菌 DNA 模板的方法

1.2.1 水煮法 将保存的菌株接种到血琼脂平板上, 37 ℃ 培养 18~24 h, 刮取 1~2 个接种环菌苔, 加入 500 μL 双蒸水, 100 ℃ 煮沸 10 min, 离心 10 min (离心半径 8 cm, 12 000 r/min), 上清液即含有所需 DNA 模板。

1.2.2 试剂盒法 采用细菌 DNA 提取试剂盒 (杭州博日科技有限公司) 提取基因组 DNA, 操作步骤按说明书。

1.3 16S rRNA PCR 扩增与测序 PCR 反应的通用引物序列来源于文献^[4], 目的片段长为 750~776 bp (视菌株种类不同而略有差异), 由上海英骏生物技术有限公司合成, 序列如下, BAK11w: 5'-AGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG-3'; BAK2: 5'-GGACTAC(C/T/A)AGGGTATCTAAT-3'。PCR 扩增体系为 50 μL, 引物浓度为 0.4 μmol/μL, Taq 聚合酶浓度为 0.025 U/μL。94 ℃ 预变性 10 min; 94 ℃ 变性 1 min, 48 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 1 min, 循环 40 次; 72 ℃ 再延伸 10 min。阳性产物交由北京六合华大基因科技股份有限公司测序。

1.4 序列分析 测序结果在 GenBank 数据库中进行 16S rRNA 序列比对分析,相似度大于 99% 的细菌判定为同种细菌;相似度介于 95%~99% 判定为同属;相似度在 91%~95% 判定为同科^[1]。

1.5 16S rRNA 鉴定效能分析 (1)用本院微生物室保存的 7 株标准菌株评价采用 16S rRNA 序列分析进行细菌分类鉴定的鉴定效能,其 16S rRNA 序列分析结果与标准菌株完全一致,说明 16S rRNA 序列分析鉴定细菌的可靠率为 100%,可用于临床分离菌株的鉴定;(2)用临床微生物 VITEK 2 Compact 系统鉴定良好的 8 株菌株再次验证 16S rRNA 序列分析的鉴定效能,其 16S rRNA 测序结果与 GenBank 数据库中的数据对比,对比结果与临床鉴定结果完全一致,进一步证实

16S rRNA 序列分析鉴定细菌的准确性,且革兰染色阳性及阴性菌均适用;(3)证实了 16S rRNA 序列分析鉴定细菌的高准确性后,将该技术应用于临床微生物不能准确鉴定的 13 株不典型菌株的分类鉴定,明确病原微生物的种类。

2 结果

2.1 标准菌株的 16S rRNA PCR 鉴定结果 本院临床微生物实验室保存的 7 株标准菌株 16S rRNA PCR 扩增后,均在 750 bp 处得到阳性产物,与预计的片段大小相吻合,其序列与 GenBank 数据库的比对,结果同标准菌株完全一致,其中,金黄色葡萄球菌测序见图 1,说明 16S rRNA 序列分析方法鉴定细菌可靠率达 100%,可用于临床分离菌株的鉴定。

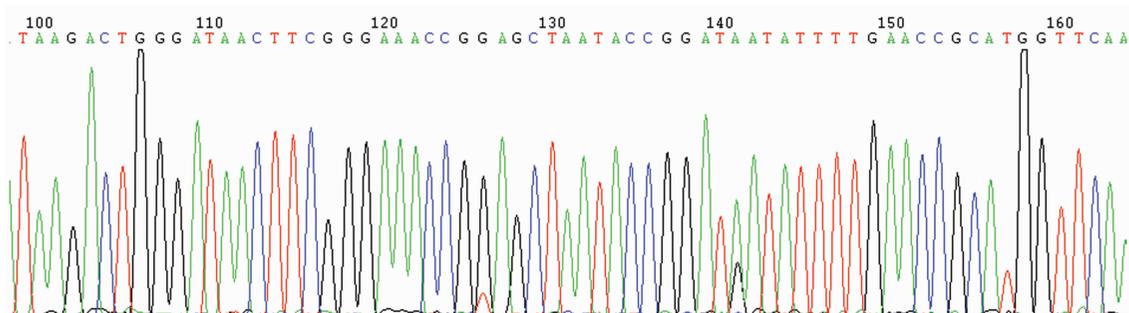


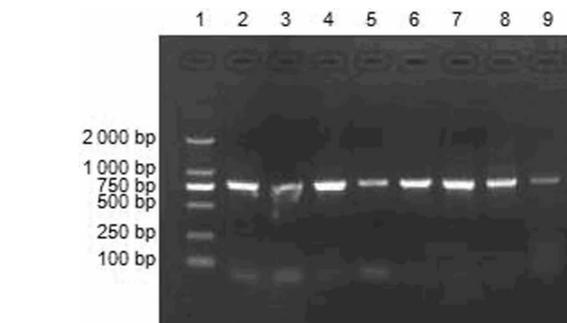
图 1 金黄色葡萄球菌测序图

2.2 已知细菌的 16S rRNA PCR 鉴定结果 分别用上述方法提取细菌 DNA 进行 PCR 扩增后,均在 750 bp 处获得阳性条带,与预计的片段大小相吻合,见图 2。16S rRNA 测序结果与 GenBank 数据库对比,对比结果与实验室鉴定结果完全一致,进一步证实了 16S rRNA 鉴定细菌的准确性。标准菌株及临床已知细菌的 16S rRNA 序列比对结果均完全一致,证实该技术鉴定细菌的可靠率达 100%,且革兰染色阳性及阴性菌均适用,可用于临床不典型细菌的分类鉴定分析。

表 1 16S rRNA 序列分析与 VITEK 2Compact 系统鉴定非典型菌株的结果

编号	标本	16S rRNA 序列分析		VITEK 2Compact 系统	
		细菌种类	可靠率 (%)	细菌种类	可靠率 (%)
1	痰	阴沟肠杆菌	100.0	阿氏肠杆菌	93.0
2	伤口渗出液	Cowanii 肠杆菌	99.7	泛菌属	97.0
3	痰	阿氏肠杆菌	91.3	非脱梭梭杆菌	85.0
4	脑脊液	表皮葡萄球菌	99.9	人葡萄球菌	50.0
5	尿液	鲁氏不动杆菌	95.0	莫拉菌群	50.0
				鲁氏不动杆菌	50.0
6	坏死组织	金黄色葡萄球菌	99.9	金黄色葡萄球菌	90.0
7	痰	土生拉乌尔菌	99.6	产酸克雷伯菌	54.0
				肺炎克雷伯菌	46.0
8	痰	鲍曼不动杆菌	99.9	鲍曼不动杆菌	90.0
9	大便	巴黎链球菌	99.9	缓症/口腔链球菌	34.0
				猪链球菌	33.0
10	角膜溃疡	铅黄肠球菌	100.0	铅黄肠球菌	50.0
				鸚鸡肠球菌	50.0
11	口腔分泌物	副血链球菌	99.4	肺炎链球菌	85.0
12	尿液	Uruburuella suis	99.7	Unidentified	—
13	血液	空肠弯曲菌	99.7	土拉弗朗西斯菌	98.0

—:此项目无数据。



1:Marker DL-2000;2:阴沟肠杆菌;3:铜绿假单胞菌;4:肺炎克雷伯菌;5:粪肠球菌;6:表皮葡萄球菌;7:金黄色葡萄球菌;8:奇异变形杆菌;9:鲍曼不动杆菌。

图 2 PCR 扩增产物电泳图

2.3 13 株 VITEK 2Compact 系统鉴定非典型菌株的 16S rRNA 测序结果 对 13 株采用常规方法鉴定(可靠率较低)或无法鉴定的细菌采用前述 2 种方法提取 DNA 后,进行 16S rRNA PCR 扩增,全部获得阳性目的片段。与 GenBank 数据库比对获得良好的鉴定,其中,11 株(84.6%)鉴定到种,1 株(7.7%)鉴定到属,见表 1。

3 讨论

细菌作为单细胞生物,具有多态性、易变异,导致某些生化

反应不稳定,且受临床抗生素使用的影响,有些菌株仅依靠形态和生化反应难以准确鉴定^[5]。在利用传统方法鉴定细菌时经常遇到一些不能鉴定到种的菌株,而这些菌株对临床诊断或流行病学研究具有重要意义。因此,需要其他方法对其进行准确鉴定。16S rRNA 基因是细菌染色体上与编码 rRNA 相对应的 DNA 序列,存在于所有原核微生物中,但不存在于真核生物及病毒中,在进化过程中高度保守,被称为细菌的“分子化石”,可用于研究不同生物物种间的亲缘关系;同时其保守性又是相对的,在保守区存在着 9~10 个变异区(V1~10),不同的科、属、种间均有不同程度的差异,故又可作为细菌分类鉴定的靶分子^[6]。

本实验对传统方法不能准确鉴定的 13 株细菌进行了分子水平的鉴定,结果显示,有 11 株成功鉴定到种的水平,1 株鉴定到属的水平,大部分菌株均有一些不典型的生化反应,故常规方法鉴定不准确。由此可见,16S rRNA 序列分析的鉴别能力明显高于传统鉴定方法。对于两种鉴定方法结果不一致的菌株采用了第 3 种方法进行复核。1 号样本再次用 ID32E 板条鉴定,结果为阴沟肠杆菌,该菌株的 VITEK 2Compact 系统和 ID32E 板条鉴定结果不一致,可能是由阴沟肠杆菌的脲酶和精氨酸水解实验、侧金盏花醇发酵实验不稳定引起^[7]。Cowarii 肠杆菌的表型特征与水生拉恩菌、成团泛菌、胡萝卜软腐欧文菌相似^[8],本实验中 2 号样本与 Cowarii 肠杆菌的表型特征相符,但仍不能被准确鉴定出来,推测可能的原因是 VITEK 2Compact 系统的革兰阴性细菌鉴定卡不包括 Cowarii 肠杆菌,而将其判定为与其生化反应相近的泛菌属。副血链球菌可产生 β -半乳糖苷酶,可分解乳糖^[9],而本试验中 11 号样本生化反应却与此相反,VITEK 2Compact 系统将其判定为肺炎链球菌,但是奥普拓新实验阴性,反证法证实了该菌是副血链球菌。Uruburuella suis 属于奈瑟菌科,由 Vela 等^[10]在 2005 年首次报道,迄今为止也仅有这一篇报道,故 12 号样本的 16S rRNA 鉴定结果还需进一步验证。本实验中的 13 号菌株自血培养标本分离,生化反应仅吡咯烷基芳胺酶阳性,VITEK 2Compact 系统鉴定为土拉弗朗西斯菌,鉴定结果极不可靠,且临床表现与土拉菌病明显不符^[11]。用 16S rRNA 序列分析方法证实其为空肠弯曲菌,复核显微镜下形体具有典型的弯曲菌形体特征,生化反应也与空肠弯曲菌相同,临床表现也符合弯曲菌感染的特征,而空肠弯曲菌在一般的革兰阴性杆菌鉴定卡上阳性生化反应极少,导致其鉴别能力降低。

本试验结果显示 16S rRNA 序列分析是一种快速、有效的细菌鉴定技术,但仍有一部分细菌不能准确鉴定,如 3 号和 5 号样本,其 16S rRNA 序列与阿氏肠杆菌或鲁氏不动杆菌的相似性仅有 91.3%或 95.0%,仅能鉴定到种或属的水平。可能是因为扩增的目的片段较小,约 750 bp,而 16S rRNA 的碱基数目为 1 540 bp,所包含的遗传信息有待提高;另外 16S rRNA 序列分析本身存在不足,如基因水平转移、基因组内变异、引物特异性不佳等,均可能影响 16S rRNA 序列分析的准确性^[12]。但随着基因组数据库的不断完善,16S rRNA 序列分析的准确性会不断提高,极有可能成为临床常规细菌鉴定的有效方法。

参考文献:

- [1] Fox GE, Magrum LJ, Balch WE, et al. Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977, 74(10): 4537-4541.
- [2] Gupta R, Lanter JM, Woese CR. Sequence of the 16S ribosomal RNA from Halobacterium volcanii, an Archaeobacterium[J]. Science, 1983, 21(4611): 656-659.
- [3] Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990, 87(12): 4576-4579.
- [4] Bosshard PP, Zbinden R, Abels S, et al. 16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE system and the VITEK 2 ID-GNB card for identification of nonfermenting Gram-negative bacteria in the clinical laboratory[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(4): 1359-1366.
- [5] 张守印, 李振军, 张集, 等. 16S rRNA 基因序列分析在非典型菌株鉴定中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(4): 616-617.
- [6] Gray MW, Sankoff D, Cedergren RJ. On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA [J]. Nucleic Acids Res, 1984, 12(14): 5837-5852.
- [7] 储从家, 孔繁林, 管新龙, 等. 62 株阴沟肠杆菌的生化特性和药敏结果[J]. 中国微生态学杂志, 2004, 16(5): 299-300.
- [8] Inoue K, Sugiyama K, Kosako Y, et al. Enterobacter cowarii sp. nov., a new species of the family Enterobacteriaceae[J]. Curr Microbiol, 2000, 41(6): 417-420.
- [9] Willcox MD, Zhu H, Knox KW. Streptococcus australis sp. nov., a novel oral streptococcus[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2001, 51(Pt 4): 1277-1281.
- [10] Vela AI, Collins MD, Lawson PA, et al. Uruburuella suis gen. nov., sp. nov., isolated from clinical specimens of pigs[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2005, 55(Pt 2): 643-647.
- [11] Kaya A, Deveci K, Uysal IO, et al. Tularemia in children: evaluation of clinical, laboratory and therapeutic features of 27 tularemia cases[J]. Turk J Pediatr, 2012, 54(2): 105-112.
- [12] Rajendhran J, Gunasekaran P. Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond[J]. Microbiol Res, 2011, 166(2): 99-110.