

# 16S rRNA 基因检测在支原体鉴定中的应用

李 淳 综述,朱翠明,吴移谋 审校  
(南华大学病原生物所,湖南衡阳 421001)

关键词:基因,rRNA; 支原体,人型; 分子生物学

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.01.036

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)01-0075-03

支原体是能在无生命的培养基中生长的最小原核细胞型微生物。目前对支原体感染的实验室诊断方法主要是分离培养和血清学检测,但两种方法均存在一定的缺陷。随着对支原体研究的不断深入,人们发现,兼有保守性和变异性于一体的16S rRNA 基因在支原体的鉴定和分类、分型方面有着无可比拟的优势和作用。现就此方面的研究现状作一简要综述。

## 1 16S rRNA 基因的分子特性

16S rRNA 是所有原核生物蛋白质合成必需的核糖体

RNA,它所含信息比 5S rRNA 多且长度适中,又不像 23S rRNA 序列太长而不易检测。16S rRNA 基因具有以下几个特点:(1)16S rRNA 基因几乎存在于所有的原核生物中,并且常作为多基因家族或操纵子存在,其编码基因长度约 1 500 bp,包含大约 50 个功能域,足够用于信息学目的的研究<sup>[1]</sup>。(2)在生物进化过程中,16S rRNA 基因序列变化非常缓慢,在结构与功能上具有高度的保守性,可以用来标志生物的进化距离和亲缘关系,评价生物的遗传多态性和系统发生关系,在细菌分

类学中可作为 1 个科学、可靠的指标<sup>[2]</sup>。(3) 16S rRNA 基因具有高度稳定的保守区和可变区, 可根据保守区设计通用引物, 也可根据可变区设计特异性引物或探针, 用于临床检测。

### 2 16S rRNA 在支原体种系发生和分类中的应用

鉴于 16S rDNA 序列在支原体种系发生分类学中的重大作用, 柔膜体纲委员会推荐使用 16S rDNA 序列来描述任何新型的支原体。最近有研究显示, 扩增 16S rDNA 的变性梯度凝胶电泳以及扩增 16S rDNA 限制分析 (ARDRA) 在辨别支原体种属中的作用较大<sup>[3-4]</sup>。根据 16S rRNA 基因序列, 支原体目可以分成 5 类种系发生单位。无胆甾支原体属和厌氧支原体属被认为是从革兰阳性细菌进化而来的最早的柔膜体纲类细菌。螺旋体属是由早期的无胆甾支原体属分支分裂进化而来, 并且支原体目和尿素支原体被认为含有螺旋体属的祖先。16S rRNA 基因序列对柔膜体纲系统发生和分类中最重要的意义, 就是将不能培养出来的植原体属作为与无胆甾支原体属关系密切的柔膜体纲特殊的单元分化单位。通过 DNA 同源性、16S rRNA 基因的限制性酶分析, 16S rRNA 基因序列描绘了植原体属分化支中的 14 个不同的亚分化支。

### 3 16S rRNA 在支原体临床检测中的应用

将 16S rRNA 基因用于临床标本中支原体的检测, 具有灵敏、快速、不受使用抗生素的影响、与临床诊断吻合度高等优点, 具有良好的应用前景。有学者用肺炎支原体 16S rRNA 基因 V3 区互补的 30 个寡核苷酸探针进行杂交实验, 有效地将其与口腔支原体、唾液支原体和人型支原体区分开。虽然此法检测生殖支原体亦呈阳性, 但根据标本来源不同可鉴别肺炎支原体和生殖支原体。随着分子生物学的发展, 许多实验室已经开始利用 PCR 或套式 PCR 针对不同特异性靶序列进行支原体 DNA 的扩增协助诊断<sup>[5-6]</sup>。PCR 或套式 PCR 扩增检测支原体 16S rRNA 的关键, 是针对不同支原体设计不同的引物。

**3.1 引物设计** (1) 在 16S rRNA 基因的保守区中设计引物: 利用 16S rRNA 基因保守区设计的通用引物, 一次可扩增几乎所有支原体 16S rRNA 基因片段, 克服了传统 PCR 扩增不同支原体需要设计不同引物的缺点, 方便了临床支原体的检测, 引物的设计具体可参考文献<sup>[4]</sup>。(2) 在 16S rRNA 的变异区中设计引物: 根据支原体 16S rRNA 的保守序列中存在支原体属特异性序列, 而其多态序列中存在种特异性序列的特点, 通过对多种支原体的 16S rRNA 序列进行对比分析后, 可以设计出属特异性引物和种特异性引物。见表 1。

表 1 16S rRNA 基因中特异性引物序列

名称	引物序列	位置	靶支原体
属水平的特异序列			
MGSO	5'-TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC-3'	1 029~1 055	支原体属
种水平的特异序列			
PG49	5'-AAG GGA CCT GCA AGG GTT GGT-3'	NL	肺炎支原体
	5'-CTC TAG CCA TTA CCT GCT AA-3'	NL	
	5'-TGA ACG GAA TAT GTT AGC TT-3'	NL	羊肺炎支原体
	5'-GAC TTC ATC CTG CAC TCT GT-3'	NL	
	5'-TGA AAG GCG CTG TAA GGC GC-3'	NL	人型支原体
	5'-GTC TGC AAT CAT TTC CTA AGG CGC-3'	NL	
	5'-GAA GCC TTT CTT CGC TGG AG-3'	NL	发酵支原体
	5'-ACA AAA TCA TTT CCT ATT CTG TC-3'	NL	
	5'-TAA ATG TCG GCT CGA ACG AG-3'	NL	溶脲脲原体
	5'-GCA GTA TCG CTA GAA AGC AAC-3'	NL	
	5'-AGC GTT TGC TTC ACT TTG AA-3'	NL	肺炎支原体
	5'-GGG CAT TTC CTC CCT AAG AT-3'	NL	
	5'-CCT CAA AGC TCC ACT AGA GG-3'	NL	关节炎支原体
	5'-AGC ATT TCC TCA ACT AAG TG-3'	NL	
5'-GAA GCA TAA GAG GTA ACT CC-3'	NL	溶神经支原体	
5'-GTC ATT TCC TAC CCT ATT T-3'	NL		
Mhp 6/30	5'-GAG CCT TCA AGC TTC ACC AAG A-3'	212~233	猪肺炎支原体
	5'-TGT GTT AGT GAC TTT TGC CAC C-3'	839~860	
lambda	5'-TACATGCAAGTCGATCGGAAGTAGC-3'	13 663~13 677	生殖支原体 <sup>[7]</sup>
	5'-AAACTCCAGCCATTGCCTGCTAG-3'	14 266~14 280	
SR/SR	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	1 500	链球菌支原体 <sup>[8]</sup>
	5'-CGGCTACCTGTACGACTT-3'		

**3.2 RT-PCR 扩增特异性靶 RNA 序列或 PCR 和套式 PCR 扩增特异性 DNA 靶序列** 16S rRNA/DNA 基因序列表现为属、种, 甚至株层次上差异, 因而特异性的 RT-PCR/PCR 技术

能特异性地检测出多种支原体, 甚至支原体中特定的株。通过使用敏感度高的套式 PCR 技术, 靶向扩增保守 16S rDNA 基因, 可提高支原体检测的特异性和灵敏度, 关于套式 PCR 引物

的设计具体可参考文献[7]。

**3.3 16S rRNA/DNA 基因的检测方法** (1)琼脂糖凝胶电泳:琼脂糖凝胶电泳是分离 PCR 扩增产物的常规方法。该技术操作简便快速,可以分辨用其他方法(如密度梯度离心法)所无法分离的 DNA 片段。当用低浓度的荧光嵌入染料溴化乙锭(ethidium bromide, EB)染色,在紫外光下至少可以检出 1~10 ng 的 DNA 条带,从而可以确定 DNA 片段在凝胶中的位置并进行物种鉴定。此外,还可以从电泳后的凝胶中回收特定的 DNA 条带,用于以后的克隆技术操作。(2)DNA 测序:在分子生物学研究中, DNA 的序列分析是进一步研究和改造目的基因的基础。目前用于测序的技术主要有 Sanger 等发明的双脱氧链末端终止法和 Maxam、Gilbert 发明的化学降解法。这两种方法在原理上差异很大,但都是根据核苷酸在某一固定的点开始,随机在某一个特定的碱基处终止,产生 A、T、C、G 4 组不同长度的一系列核苷酸,然后在尿素变性的 PAGE 凝胶上电泳检测,从而获得 DNA 序列鉴定支原体的种类。目前 Sanger 测序法得到了广泛的应用。(3)变性梯度凝胶电泳(DGGE)和温度梯度凝胶电泳(TGGE):长度相同的 16S rDNA 序列由于含有的碱基不同,各片段变性时所需要的变性剂浓度和  $T_m$  值也就不同。DGGE 或 TGGE 就是应用这种差异来区分不同的支原体基因序列。这种电泳方法在聚丙烯酰胺中加入甲酰基 DGGE,从正极到负极梯度递加,或是形成温度梯度 TGGE。电泳中的 DNA 到达它的变性温度时,双链部分解开,造成泳动速度发生变化,染色后可以在凝胶上呈现为分开的条带,从而达到分离效果。每个条带代表 1 个特定序列的 16S rDNA 片段。此技术的关键就是引物 GC 夹的设计,目前,用此技术分析支原体 16S rDNA 基因时,其 PCR 扩增所用上游引物普遍使用细菌通用引物扩增 16S rRNA 基因 V3 区,而下游引物则用支原体的特异性引物进行检测<sup>[8]</sup>。DGGE 技术快速简便、分离效果好,可对等长的 PCR 产物进一步的分离,提高了支原体分类鉴定的准确性。(4)DNA 多态性分析:DNA 多态性分析方法有多种,如单链构象多态性分析(SSCP)、末端限制性片段长度多态性分析(T-RFLP)等。通过分析揭示样品种类、数量和种群大小等信息,从而解析样品的结构、功能及动态变化,达到诊断鉴别样品中是否存在支原体的目的。16S rRNA 基因保守区是理想的引物目标识别区,而可变区对微生物种类的鉴别有意义,其变异性导致的 DNA 片段构象很容易被 SSCP 证实。T-RFLP 是对标本中核酸的核糖体序列进行扩增,由于特异的限制性核酸内切酶在核糖体序列位置的不同,可以产生具有不同长度的扩增片段,这些带有各种信息的片段被经典荧光标志,因此可以在 DNA 测序仪上被检测到。(5)核酸(RNA)印迹杂交与基因芯片技术:RNA 印迹杂交又称 Northern 印迹杂交, Northern Blot 是 16S rRNA 基因序列分析最常用的技术之一。Northern Blot 技术的集成化产生了基因芯片技术。DNA 芯片的优点是可快速、准确、高效地显示病原体的遗传信息,已广泛应用于基因序列分析、支原体感染的快速诊断、变异及耐药机制的研究,以及基因分型、分子流行病学调查和抗感染药物的研制等。对多态性和突变检测型基因芯片,采用多色荧光探针杂交技术可以大大提高芯片的准确性、定量及检测范围。(6)扩增性 16S rDNA 限制性酶切片段分析方法(ARDRA)鉴定支原体:ARDRA 是美国最新发展起来的 1 项现代生物技术,此方法简单、普遍且不受菌株是否纯培养物的限制,具有特异性强、效率高的特点,因此可以广泛地用于支原

体的鉴定和系统发育关系的研究。ARDRA 技术的原理是基于 PCR 技术选择性扩增 rDNA 片段,如 16S rDNA,再对 16S rDNA 片段进行限制性酶切片段长度多态性分析(RFLP)。理论上,研究发现扩增性 16S rDNA 限制性酶切片段分析方法可以区分鉴定所有的支原体。

#### 4 结 语

目前,虽然几乎所有的支原体都可以用 16S rRNA 基因分析加以鉴定,但仍然存在许多相关的问题有待解决:(1)由于 16S rRNA 基因具有高度保守性的特点,决定了它在实际应用中易存在污染而造成假阳性的问题。(2)虽然 16S rRNA 基因序列分析在临床或公共卫生方面的支原体鉴定作用很大,但是研究表明 16S rRNA 基因序列并不是完美的,并且不是任何情况都可以应用。对于生长或鉴定有困难的支原体,临床上传统的实验方法鉴别率高于 16S rRNA 基因序列分析。(3)虽然 16S rRNA 基因序列对于支原体的分类鉴定有很大的作用,但是它的物种级别的种系发生能力很低,对于一些属的区分能力也很弱,并且 DNA 亲缘关系的研究必须对这些分类学问题提供绝对的分辨率。不过,16S rRNA 基因的检测在支原体的鉴定和分类中还是很有前景的 1 种快速诊断方法。相信随着医学和分子生物学的发展,这些问题在未来会得到很好的解决。

#### 参考文献

- [1] Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(9): 2761-2764.
- [2] Vicky M, Manuela RC, Pierre P, et al. Massive comparative genomic analysis reveals convergent evolution of specialized bacteria[J]. Biol Direct, 2009, 4(1): 13.
- [3] 雷正瑜. 16S rDNA 序列分析技术在微生物分类鉴定中的应用[J]. 湖北生态工程职业技术学院学报, 2006, 4(1): 4-7.
- [4] Stakenborg T, Vicca J, Butaye P, et al. Evaluation of amplified rDNA restriction analysis(ARDRA) for the identification of Mycoplasma species[J]. BMC Infect Dis, 2005, 5(1): 46.
- [5] Gee JE, Sacchi CT, Glass MB, et al. Use of 16S rRNA gene sequencing for rapid identification and differentiation of Burkholderia pseudomallei and B. mallei[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(10): 4647-4654.
- [6] Drancourt M, Berger P, Raoult D. Systematic 16S rRNA gene sequencing of a typical clinical isolates identified 27 new bacterial species associated with humans[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(5): 2197-2202.
- [7] 糜祖煌, 秦玲. 发酵支原体和穿透支原体双重套式 PCR 检测研究[J]. 中国人兽共患病杂志, 2000, 16(4): 50-52.
- [8] Laura McAuliffe, Ellis RJ, Lawes JR, et al. 16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis; a single generic test for detecting and differentiating Mycoplasma species[J]. J Med Microbiol, 2005, 54(Pt8): 731-739.