

• 论 著 •

23S rRNA 通用引物的设计及在气性坏疽快速检测中的应用

蒋栋能,王 左,李 蒙,蒲晓允[△]

(第三军医大学新桥医院检验科,重庆 400037)

摘 要:目的 设计 23S rRNA 通用引物并将其用于气性坏疽快速检测基因芯片。方法 (1)设计 23S rRNA 通用引物,并对气性坏疽的主要致病菌进行聚合酶链反应(PCR)扩增。(2)对外伤感染中常见其他微生物进行检测。(3)测定该通用引物 PCR 的灵敏度。结果 (1)设计出 1 对 23S rRNA 通用引物,该通用引物对气性坏疽主要病原菌都能进行扩增。(2)该通用引物 PCR 对外伤感染中常见非梭菌微生物都不扩增。(3)该通用引物 PCR 的最高灵敏度为 1×10^3 cfu/mL(产气荚膜梭菌)。结论 设计出了 1 对 23S rRNA 通用引物,能够满足气性坏疽快速检测基因芯片的要求。

关键词:气性坏疽; 寡核苷酸序列分析; 23S rRNA; 通用引物
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.08.005 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2011)08-0836-02

Design and application of 23S rRNA general primers in fast detection of gas gangrene

Jiang Dongneng, Wang Zuo, Li Meng, Pu Xiaoyun[△]

(Department of Clinical Laboratory, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract:Objective To design and application of 23S rRNA general primers in the fast gene chip detection of gas gangrene. **Methods** (1)23S rRNA general primers were designed and used to amplify target genes of the main pathogenic bacteria of gas gangrene. (2)Other common microbes in external injury infection were detected. (3)The sensitivity of PCR using designed general primers was analyzed. **Results** (1)A pair of 23S rRNA general primers were designed and target genes of the main pathogenic bacteria of gas gangrene could be amplified by using the designed general primers. (2)Other common microbes in external injury infection could not be detected by using same primers. (3)The highest sensitivity of PCR using designed primers was 1×10^3 cfu/mL(C. perfringens). **Conclusion** A pair of 23S rRNA general primers, designed in this investigation, can be used to construct the gene chip for fast detection of gas gangrene.

Key words:gas gangrene; oligonucleotide sequence analysis; 23S rRNA; general primer

气性坏疽是战伤、创伤、地震伤等的严重并发症,梭状芽孢杆菌是其主要致病菌,包括产气荚膜梭菌、破伤风梭菌等,他们都是厌氧菌。基因芯片检测快速、灵敏、高通量,是气性坏疽检测的重要手段之一,但要求对所有目标细菌都要同步扩增。一般的通用引物对其他非致病菌也要扩增,影响检测的特异性。本研究采用 23S rRNA 基因为靶基因,既保证对气性坏疽主要病原梭菌高效扩增,又尽量避免其他微生物的非特异性扩增,从而从根本上提高检测的效率,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株及来源 标准菌株(产气荚膜梭菌 ATCC 13124、破伤风梭菌 ATCC 19406、艰难梭菌 ATCC 9689、诺维梭菌 ATCC 19402、溶组织梭菌 ATCC 19401、败毒梭菌 ATCC 12464、金黄色葡萄球菌 ATCC 25923、大肠埃希菌 ATCC 25922、铜绿假单胞菌 ATCC 27853、肺炎链球菌 ATCC 49619)均购自上海天呈医流有限公司,其他菌株通过本实验室鉴定得到。

1.2 方法

1.2.1 试剂与仪器 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。细菌 DNA 提取试剂盒、聚合酶链反应(PCR)试剂盒均由天根生化(北京)公司生产。E-Cycler96 型 PCR 扩增仪由美国 Bio-Rad 公司生产;Vitek 2 全自动细菌鉴定及药敏分析系统由法国生物梅里埃公司生产。

1.2.2 通用引物设计 基因序列检索自美国国立生物信息中

心(NCBI);比对软件:DNA USER chs1.0;引物设计软件:Primer Premier 5.0。通过软件比对,筛选出梭菌相对特异的区段,再找寻梭菌共有的序列,然后在共有序列上设计引物。

1.2.3 对梭菌的扩增 选取 8 种梭菌:产气荚膜梭菌、破伤风梭菌、艰难梭菌、诺维梭菌、溶组织梭菌、败毒梭菌、丁酸梭菌、双酶梭菌,按照说明书提取细菌 DNA。PCR 反应:2 μ L DNA 提取模板,PCR 反应液 11.5 μ L,上、下游引物各 1 μ L (5 μ mol/L),反应体积 25 μ L。PCR 扩增条件:94 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ C 10 s,55 $^{\circ}$ C 10 s,72 $^{\circ}$ C 50 s,循环 40 次;72 $^{\circ}$ C 3 min。1%琼脂糖凝胶,80 V 电泳 20 min。

1.2.4 对其他微生物的扩增 4 种外伤感染中的其他细菌:金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、肺炎链球菌;2 种常见病毒:乙型肝炎病毒、巨细胞病毒;产气荚膜梭菌为阳性对照。PCR 操作同 1.2.3。

1.2.5 灵敏度检测 挑取产气荚膜梭菌单个菌落,用生理盐水稀释;倾注培养,计数菌落形成单位(colony forming units, cfu),再用生理盐水将菌液分别稀释为 $1 \times 10 \sim 1 \times 10^7$ cfu/mL 7 个浓度。PCR 操作同 1.2.3。

2 结 果

2.1 通用引物序列(扩增产物长度为 392 bp) P1(上游引物):5'-GGA GCC GAT GAA GGA CGT GAT AAC-3';P2(下游引物):5'-CAC AAG GTT TCA CGT GTC TCG TGC-3'。

2.2 通用引物对梭菌的扩增 该引物对 8 种梭菌都能进行扩

[△] 通讯作者,E-mail:puxiaoyong@yahoo.com。

增,有较好的通用性,见图 1。

2.3 通用引物对其他微生物的扩增 该引物对其他常见非梭菌微生物都不扩增(产气荚膜梭菌为阳性对照),见图 2。

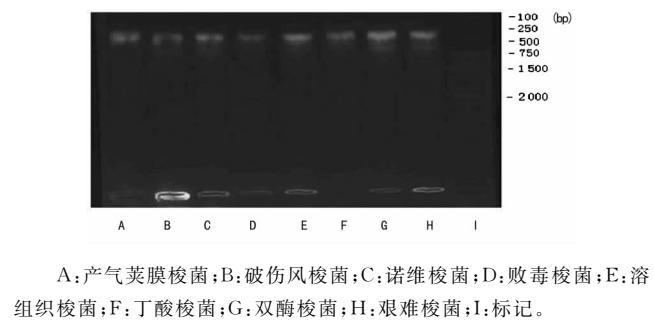


图 1 通用引物对常见梭菌的 PCR 扩增

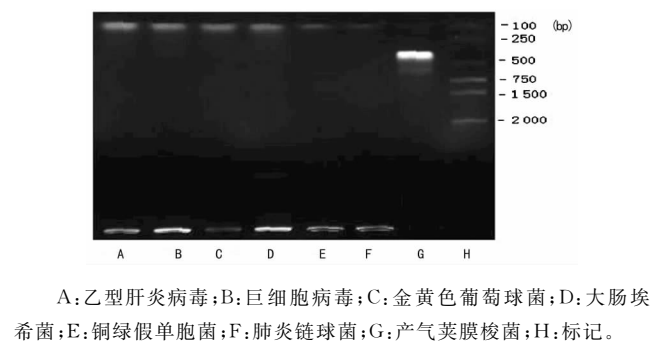


图 2 通用引物对常见非梭菌微生物的 PCR 扩增

2.4 通用引物 PCR 的灵敏度检测 通用引物 PCR 可检测到的产气荚膜梭菌最小载量为 1×10^3 cfu/mL, 灵敏度较高, 见图 3。

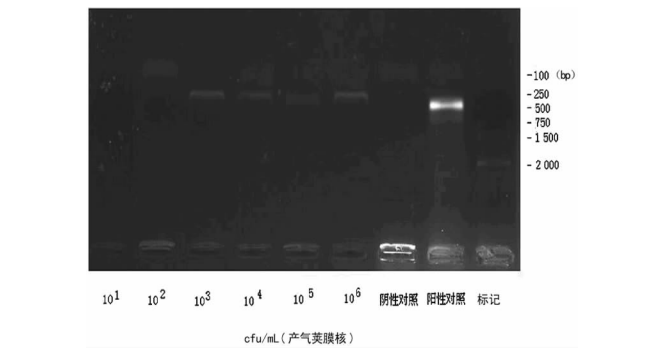


图 3 通用引物的灵敏度检测

3 讨 论

气性坏疽是一种严重的外科感染疾病,在地震伤^[1-2]、车祸伤、建筑工地创伤等情况下多发,也经常与手术、烧伤感染、肿瘤继发感染等相关^[3-4]。引起气性坏疽的病原菌主要为梭状芽孢杆菌(clostridium)^[5],包括产气荚膜梭菌、诺维梭菌、败毒梭菌、溶组织梭菌等。梭状芽孢杆菌在伤口内生长、繁殖,产生外毒素、胶原酶、透明质酸酶、溶纤维酶等,分解组织中糖类和蛋白质,产生大量的气体,从而形成气性坏疽。气性坏疽发生后,大量组织坏死和外毒素吸收,可引起严重的毒血症,导致感染性休克,甚至引起患者死亡^[6]。因此,早期诊断对于气性坏疽的治疗和预后十分重要。

目前,对气性坏疽病原菌的检测方法有直接涂片染色法、厌氧培养鉴定、分子生物学鉴定等^[7]。涂片镜检法灵敏度低,只能作初筛;厌氧培养结合全自动细菌培养鉴定及药敏分析系

统,可以对梭状芽孢杆菌进行鉴定和药敏分析,提高了细菌鉴定的效率和可靠性。但厌氧培养要求高、耗时长,往往错过最佳治疗时机^[8]。基于基因芯片的高通量建立起来的厌氧菌检测方法,利用寡核苷酸探针为检测系统,可以将细菌区分到种,且整个检测过程仅需要 4 h 左右,具有简便、快速、灵敏度高、特异性强等优点^[9]。基因芯片可以一次性对样品大量检测和分析,从而解决了传统核酸杂交操作繁杂、效率低等不足^[10],对一些需特殊培养,如厌氧培养、L 型菌培养等的细菌也能直接检测,有很好的应用前景^[11]。但基因芯片检测要求对所有待测细菌 DNA 都要同步 PCR 扩增,一般通用引物 PCR 可以扩增气性坏疽主要病原菌,但对其他非致病菌也要扩增,势必增加基因芯片的检测难度,产生假阳性结果。

Morris 等^[12]已经利用 16S rRNA 基因设计 PCR 引物,进行厌氧菌检测,其准确度高于其他常规检测方法。23S rRNA 基因信息容量比 16S rRNA 基因大,对种属特别相近的细菌辨别效果更好。细菌 23S rRNA 基因约由 2 900 个核苷酸组成,有高度的保守性,因此被称为细菌的“分子化石”,也是通用引物设计的重要靶基因^[13-14]。因此,本研究以 23S rRNA 基因为靶基因,筛选梭菌属细菌相对特异的序列,尽量排除与其他微生物的交叉。再在校菌属细菌相对特异的序列上选取保守区段。最后,在校菌保守区段设计引物,既保证对气性坏疽主要病原梭菌高效扩增,又尽量避免其他微生物的非特异性扩增,从而从根本上提高检测的特异性。再通过基因芯片上的相应探针杂交,可检测感染由何种梭菌引起,从而实现气性坏疽病原菌的快速检测。

作者首先对导致气性坏疽的 8 种主要梭菌 23S rRNA 基因进行序列分析和 PCR 引物设计,设计出通用引物。PCR 扩增结果显示,该引物对 8 种梭菌都能进行 PCR 扩增,有较好的通用性。同时,根据参考文献^[15]报道,结合本院感染菌群分布情况,选择外科感染中常见的非致病菌及病毒,进行特异性试验。结果显示,通用引物 PCR 对其他常见非梭菌微生物都不发生非特异性扩增,只针对梭菌扩增,抗干扰能力较强。进一步实验显示:该通用引物 PCR 可检测到的产气荚膜梭菌最小载量为 1×10^3 cfu/mL 左右,灵敏度较高。因此,该 23S rRNA 通用引物能针对气性坏疽主要病原菌进行扩增,灵敏度较高,抗干扰能力较强,适用于气性坏疽快速检测基因芯片的前期 DNA 扩增。

参考文献

- [1] 邓可,先迪.汶川大地震气性坏疽伤员救治分析[J].实用医院临床杂志,2010,7(2):72-74.
- [2] 林嘉,何屹,刘祥琴,等.2 065 例地震创伤患者用血特点分析[J].检验医学与临床,2010,7(1):7-8.
- [3] Hanke CA, Hentschel R, Berner R, et al. Clostridium perfringens intestinal gas gangrene in a preterm new born[J]. Eur J Pediatr Surg, 2009, 19(4): 257-259.
- [4] 王左,蒋栋能.厌氧菌内源性感染的临床研究进展[J].检验医学与临床,2010,7(14):1517-1519.
- [5] Blum KS, Wiebking U, Rosenthal H. Spontaneous gas gangrene infection with clostridium septicum[J]. Rofo, 2010, 182(6): 529-531.
- [6] Yang Z, Reilly SD. Clostridium septicum aortitis causing aortic dissection in a 22-year-old man[J]. Tex Heart Inst J, 2009, 36(4): 334-336.

(下转第 840 页)

对粪、尿肠球菌的耐药率均较低,但药物毒性较大^[10],故临床不考虑首选。两种菌对不同药物敏感性有所不同,应根据药敏试验合理选用抗菌剂,减少耐药菌株产生。

肠球菌耐药机制复杂,对多种抗菌剂呈天然耐药和获得性耐药^[1,11-14]。粪、尿肠球菌整体耐药率在 2007~2010 年间均呈上升趋势,不同的是,粪肠球菌耐药率变迁幅度较屎肠球菌显著。值得一提的是,屎肠球菌对部分抗菌剂(如四环素和利奈唑烷)的耐药率呈下降趋势,可能与其自身严重的多重耐药性有关^[11]。屎肠球菌在感染初期已广谱耐药,于是只能使用万古霉素和替考拉宁进行治疗(喹奴普汀/达福普汀当时未进入本院),从而导致该药耐药率逐年升高,其他药物则相对减低,特别是四环素耐药率从 27.3%降至 11.2%,提示治疗屎肠球菌感染时可考虑选用该药。

万古霉素对治疗由革兰阳性菌引起的感染有很好疗效,然而随着其临床应用的增加,VRE 的检出率逐年升高^[1,12]。研究结果显示,本院粪肠球菌 VRE 从 0.0%上升到 13.6%,屎肠球菌 VRE 从 9.1%上升到 28.8%,显著高于 CHINET 监测结果。经调查,本院 2007~2009 年万古霉素用量均居抗菌剂使用前 10 位,提示 VRE 检出率升高可能与万古霉素用量较大有关。对 VRE 所致严重感染目前尚无有效的治疗方法,但对肠球菌所致的一般感染,万古霉素仍不失为控制感染的有效药物^[12-13]。因此,临床医生应合理有效使用万古霉素,减少或避免预防用药,以保持肠球菌对万古霉素的高度敏感性。

参考文献

[1] van den Braak N,Ott A,van Belkum A,et al. Prevalence and determinants of fecal colonization with vancomycin-resistant enterococcus in hospitalized patients in the Netherlands[J]. Infect Control Hosp Epidemiol,2000,21(8):520-524.

[2] 廖国林,刘建,李芳,等. 肠球菌属医院感染分布及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志,2009,19(13):1735-1736.

[3] 黎敏,邱喜辽,王俊霁,等. 4 925 株医院感染细菌分布及耐药性分

析[J]. 重庆医学,2010,39(24):3360-3362.

[4] 杨青,俞云松,倪语星,等. 2007 年中国 CHINET 肠球菌属耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2009,9(3):175-179.

[5] 汪复,朱德妹,胡付品,等. 2008 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2009,9(5):321-329.

[6] 林奇龙,夏邦世,沈忠海,等. 201 株肠球菌属的临床分布及耐药分析[J]. 中华医院感染学杂志,2009,19(7):858-860.

[7] Woodford N. Glycopeptide-resistant enterococci;a decade of experience[J]. Journal Medical Microbiology,1998,47(10):849-862.

[8] Al-Tawfiq JA,Anani AA. Antimicrobial susceptibility pattern of bacterial pathogens causing urinary tract infections in a Saudi Arabian hospital[J]. Chemotherapy,2009,55(2):127-131.

[9] Baudoux P,Lemaire S,Denis O,et al. Activity of quinupristin/dalfopristin against extracellular and intracellular staphylococcus aureus with various resistance phenotypes[J]. J Antimicrob Chemother,2010,65(6):1228-1236.

[10] Attassi K,Hershberger E,Alam R,et al. Thrombocytopenia associated with linezolid therapy[J]. Clinical Pharmacology,2002,34(5):695-698.

[11] Shepard BD,Gilmore MS. Antibiotic-resistant enterococcus; the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance [J]. Microbes Infect,2002,4(2):215-224.

[12] Wang JL,Hsueh PR. Therapeutic options for infections due to vancomycin-resistant enterococci[J]. Expert Opin Pharmacother,2009,10(5):785-796.

[13] Pai MP,Rodvold KA,Schreckenberger PC,et al. Risk factors associated with the development of infection with linezolid- and vancomycin-resistant enterococcus faecium[J]. Clin Infect Dis,2002,35(10):1269-1272.

[14] 王政,刘丁,陈萍,等. 2008 年重庆大坪医院细菌耐药性监测[J]. 重庆医学,2009,38(19):2400-2403.

(收稿日期:2011-01-29)

(上接第 837 页)

[7] 岳华,梁曼丽. 浅谈厌氧菌的鉴定方法[J]. 中外医疗,2010,13:181.

[8] Kennedy CL,Lyras D,Cheung JK,et al. Cross-complementation of clostridium perfringens PLC and clostridium septicum alpha-toxin mutants reveals PLC is sufficient to mediate gas gangrene [J]. Microbes Infect,2009,11(3):413-418.

[9] 陈志. 基因芯片技术的最新进展[J]. 国际检验医学杂志,2006,27(3):249-251.

[10] Moran G,Stokes C,Thewes S,et al. Comparative genomics using candida albicans DNA microarrays reveals absence and divergence of virulence-associated genes in Candida dubliniensis[J]. Microbiology,2004,150(10):3363-3382.

[11] Tang T,Francois N,Glatigny A,et al. Expression ratio evaluation in two-colour microarray experiments is significantly improved by

correcting image misalignment[J]. Bioinformatics,2007,23(20):2686-2691.

[12] Morris AJ,Wilson ML,Mirrett S,et al. Genotypic diversity of anaerobic isolates from blood stream infections[J]. Clin Microbiol,2008,46(5):1596-1601.

[13] 蔡晋,夏季,罗阳,等. 通用引物 PCR 扩增创伤感染细菌 16S-23S rDNA 间区的研究[J]. 中华医院感染学杂志,2009,19(14):1776-1778.

[14] Hunt DE,Klepac-Ceraj V,Acinas SG,et al. Evaluation of 23S rRNA PCR primers for use in phylogenetic studies of bacterial diversity[J]. Appl Environ Microbiol,2006,72(3):2221-2225.

[15] 胡同平,张文兰. 1 164 株临床常见病原菌的分离及细菌耐药性监测[J]. 检验医学与临床,2010,7(3):236-238.

(收稿日期:2010-12-12)