

terriophage DMS3 and host CRISPR region inhibits group behaviors of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. J Bacteriol, 2009, 191(1): 210-219.

[14] O' May C, Tufenkji N. The swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* is blocked by cranberry proanthocyanidins and other tannin-containing materials[J]. Appl Environ Microbiol, 2011, 77(9): 3061-3067.

[15] Murray TS, Ledizet M, Kazmierczak BI. Swarming motility, secretion of type 3 effectors and biofilm formation phenotypes exhibited within a large cohort of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates[J]. J Med Microbiol, 2010, 59(5): 511-520.

[16] Yeung AT, Bains M, Hancock RE. The sensor kinase CbrA is a global regulator that modulates metabolism, virulence, and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. J Bacteriol, 2011, 193(4): 918-931.

[17] Wilhelm S, Gdynia A, Tielen P, et al. The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolipid production, cell motility, and biofilm formation[J]. J Bacteriol, 2007, 189(18): 6695-6703.

[18] 魏志华, 徐元宏. 铜绿假单胞菌生物被膜耐药机制的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(5): 469-471.

[19] Lai S, Tremblay J, Déziel E. Swarming motility: a multicellular behaviour conferring antimicrobial resistance[J]. Environ Microbiol, 2009, 11(1): 126-136.

[20] Yeung AT, Torfs EC, Jamshidi F, et al. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is controlled by a broad spectrum of transcriptional regulators, including MetR[J]. J Bacteriol, 2009, 191(18): 5392-5602.

[21] Wang WB, Chen IC, Jiang SS, et al. Role of RppA in the regulation of polymyxin B susceptibility, swarming, and virulence factor expression in *Proteus mirabilis*[J]. Infect Immun, 2008, 76(5): 2051-2062.

[22] Jiang SS, Lin TY, Wang WB, et al. Characterization of UDP-glucose dehydrogenase and UDP-glucose pyrophosphorylase mutants of *Proteus mirabilis*: defectiveness in polymyxin B resistance, swarming, and virulence [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(5): 2000-2009.

[23] Bala A, Kumar R, Harjai K. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* by azithromycin and its effectiveness in urinary tract infections[J]. J Med Microbiol, 2011, 60(Pt 3): 300-306.

[24] Gode-Potratz CJ, Chodur DM, McCarter LL. Calcium and iron regulate swarming and type III secretion in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. J Bacteriol, 2010, 192(22): 6025-6038.

(收稿日期: 2011-05-15)

• 综 述 •

PCR-HRM 技术在微生物鉴定中的应用

于静波 综述, 孟冬娅[△], 薛文成 审校
(沈阳军区总医院检验科, 辽宁沈阳 110840)

关键词: 聚合酶链反应; 高分辨熔解曲线; 微生物; 应用
DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.17.033 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-4130(2011)17-1988-02

目前, 在微生物检验中, 分子生物学技术的应用逐渐增多^[1-6], 高分辨熔解曲线 (high resolution melting, HRM) 技术就是其中的一种^[7], 其分析原理是在标准 PCR 试剂的基础上再加入可与双链 DNA 结合的饱和性荧光染料, 扩增结束后即开始运行 HRM 程序, 将 PCR 产物自低到高 (60~95 ℃) 逐步升温, 每次升温 0.02~0.1 ℃, 此过程双链 DNA 解链, 荧光染料脱落, 不再产生荧光信号。以温度为横坐标, 荧光强度变化率为纵坐标作图, 即可得出对应于特定双链 DNA 的特征曲线。本文从以下两种策略就 HRM 在微生物鉴定、分型及细菌的耐药性基因分析等方面的研究进展综述如下。

1 设计通用引物, 对比特异性熔解曲线与标准株曲线 (或者数据库), 对细菌进行鉴定

Samuel 等^[8]于 2009 年针对 16S rRNA 基因序列 3 个高变区 (V1、V3 和 V6) 设计通用引物, 对 58 种共 100 株细菌进行了 PCR-HRM 分析。每组中不同的曲线用惟一的字母代码标识, 同一可变区内相似的曲线使用相同的字母代码。结果显示同一可变区内的不同菌种有相似的曲线, 但是当 3 个可变区编码串联组合分析时, 可将受检的 58 种共 100 株细菌准确鉴别, 包括靶基因中只有单个核苷酸差异的炭疽芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌。随后的验证试验中, 作者随机抽取了 40 个关节液和脑脊液临床样本, 与常规培养鉴定的符合率为 100%。该作者于 2010 年将该技术应用于血培养检测^[9], 除 6/52 混合感染或

所建立的数据库中不存在的菌株, 其余菌株均被准确鉴定到种水平。

2 设计针对某菌属 (种) 特异性序列引物, 在 PCR-HRM 分析中又分以下两种方法

2.1 与已建立的标准曲线对比进而鉴定菌种或分型 Castellan 等^[10]于 2010 年设计针对鸟结核杆菌 MAP1506 基因的特异性引物, 采用熔解曲线标准化比值方法, 准确地区分了 30 例已知序列的鸟结核杆菌类结核亚种的 I 型、II 型、III 型。此次实验中, 作者利用标准化比值成功消除因温度变化导致荧光强度背景差异所引起的曲线漂移。Stephens 等^[11]利用该技术分析 *spaX* 基因重复序列的高度多态性, 对 MRSA 进行分型, 准确区分了 44 例 MRSA 中的 20 种基因型, 有两种基因型仅 1 bp 碱基差异, 该方法未能将其区分。利用此策略的还有 Richardson 等^[12]对化脓性链球菌进行的多位点序列分型, Jonas 等^[13]对布氏杆菌的 8 个种进行鉴定。

Steer 等^[14]用 RT-PCR-HRM 法对 12 种血清型的鸡腺病毒六位体基因的 3 个基因片段进行检测, 与限制性核酸内切酶法的结果进行对比, 仅 301~890 bp 区间的产物能准确地将 12 种血清型区分开。Ghorashi 等^[15]通过该方法检测传染性黏液囊病毒病的 VP2 基因的高度可变区, 认为该方法可用于病毒筛查、分型和发现突变株。

2.2 将扩增产物与非标记探针 (标准株基因片段) 混合, 通过

[△] 通讯作者, E-mail: mengdongya@hotmail.com。

HRM 分析 DNA 杂化双链的存在 Lin 等^[16]设计针对流感病毒特异性引物,扩增 M 基因。将分离株与参考株(H1N1 或 H5N1)PCR 产物混合杂交后进行 HRM 分析,检测是否存在杂化双链以区分流感病毒亚种。用 21 株临床分离株对该方法进行验证,结果与病毒 HA 基因特异性引物进行的 RT-PCR 完全相符,HRM 方法还准确鉴别了 4 株临床分离的突变株。Pietzka 和 Indra^[17]在 2008 年利用该方法对 *ropB* 基因中的利福平耐药决定区进行检测,结果与鉴定利福平耐药性“金标准”结果完全相符。同时,作者探讨了不同 DNA 提取方法对该方法的影响,与 van der stoep 和 van Paridon^[18]2009 年提出的结论一致。Hoek 等^[19]也做了类似的实验。

HRM 优点已被认可,但实际应用中还有局限性:(1)灵敏度,理论上该方法可检出一个碱基变异^[16],但也有文献报道 HRM 不能区分仅一个碱基的变异^[11]。(2)该方法检测片段长度范围在 50~1 000 bp,但最佳片段长度和熔解决定区的数量存在争议^[20-23]。(3)DNA 扩增缓冲液及扩增产物浓度、解链时温度漂移等均可能影响熔解曲线形态^[24]。(4)当 GC 含量较少时,该方法的分析能力较差^[17]。(5)HRM 分析不适合细菌混合感染^[5]。

综上所述,“方法 1”采用的引物和方法有良好的应用前景,需进一步优化不同可变区通用引物组合。对于病毒、真菌等非细菌致病微生物的 PCR-HRM 分析,目前研究重点是筛选通用引物。“方法 2”是选择相对特异的引物,主要应用于特定的种属内菌种鉴定。

参考文献

- [1] 孙菲,万向阳,季芳.革兰氏阴性菌耐药基因检测芯片的研制及应用[J].国际检验医学杂志,2010,30(11):1207-1208.
- [2] 杨挺,浦洁,谢平,等.基因芯片对尖锐湿疣患者人乳头瘤病毒的检测和基因分型[J].国际检验医学杂志,2010,32(1):97-98.
- [3] Zhou S,Wei S,Ke L,et al. PCR-DGGE as a supplemental method verifying dominance of culturable microorganisms from activated sludge[J]. J Microbiol Biotechnol,2010,20(11):1592-1596.
- [4] 杜艳,单斌,黄东,等.多重 PCR 检测万古霉素耐药的肠球菌[J].临床检验杂志,2009,27(2):84-86.
- [5] Luis GC,Pacheco RR,Castro TL,et al. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples[J]. J Med Microbiol,2007,19(10):480-486.
- [6] 闫中强.多重 PCR 方法检测鲍曼不动杆菌基因型[J].临床检验杂志,2008,26(6):422.
- [7] Wittwer CT,Red GH,Gundry CN,et al. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen[J]. Clin Chem,2003,49(6):853-860.
- [8] Samuel,Ramachandran P,Ramachandran R,et al. Rapid identification of biothreat and other clinically relevant bacterial species by use of universal PCR coupled with high-resolution melting analysis[J]. J Clin Microbiol,2009,47(7):2252-2255.
- [9] Won H,Rothman R,Ramachandran P,et al. Rapid identification of bacterial pathogens in positive blood culture bottles by use of a broad-based PCR assay coupled with high-resolution melt analysis[J]. J Clin Microbiol,2010,48(9):3410-3413.
- [10] Castellanos E,Aranaz A,Buck JD. Rapid identification and differentiation of *mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*

- types by use of real-time PCR and high-resolution melt analysis of the MAP1506 locus[J]. J Clin Microbiol,2010,48(4):1474-1477.
- [11] Stephens AJ,Inman-Bamber J,Giffard PM,et al. High-resolution melting analysis of the *spa* repeat region of *Staphylococcus aureus* [J]. Clin Chem,2008,54(2):432-436.
- [12] Richardson LJ,Tong SY,Towers RJ,et al. Preliminary validation of a novel high resolution melt-based typing method based on the multilocus sequence typing scheme of *Streptococcus pyogenes*[J]. Clin Microbiol Infect,2011,17(9):1426-1434.
- [13] Jonas M,Winchell,Bernard J,et al. Rapid identification and discrimination of *brucella* isolates by use of real-time PCR and high-resolution melt analysis[J]. J Clin Microbiol,2010,48(3):697-702.
- [14] Steer PA,Kirkpatrick NC,O'Rourke D,et al. Classification of fowl adenovirus serotypes by use of high-resolution melting-curve analysis of the hexon gene region[J]. J Clin Microbiol,2009,47(2):311-321.
- [15] Ghorashi SA,O'Rourke D,Ignjatovic J,et al. Differentiation of infectious bursal disease virus strains using real-time RT-PCR and high resolution melt curve analysis[J]. J Virol Methods,2011,171(1):264-271.
- [16] Lin JH,Tseng CP,Chen YJ,et al. Rapid differentiation of influenza A virus subtypes and genetic screening for virus variants by high-resolution melting analysis [J]. J Clin Microbiol,2008,46(3):1090-1097.
- [17] Pietzka AT,Indra A. Rapid identification of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates by *rpoB* gene scanning using high-resolution melting curve PCR analysis [J]. J Antimicrob Chemothera,2009,63(4):1121-1127.
- [18] van der Stoep N,van Paridon CDM. Diagnostic guidelines for high resolution melting curve analysis:an interlaboratory validation of BRCA1 mutation scanning using the 96-well LightScanner[J]. Hum Mutat,2009,30(6):899-909.
- [19] Hoek KG,Gey van Pittius NC,Moolman-Smook H,et al. Fluorometric assay for testing rifampin susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* complex[J]. J Clin Microbiol,2008,46(4):1369-1373.
- [20] Reed GH,Wittwer CT. Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis [J]. Clin Chem,2004,50(10):1748-1754.
- [21] Tindall EA,Petersen DC,Woodbridge P,et al. Assessing high resolution melt curve analysis for accurate detection of gene variants in complex DNA fragments[J]. Hum Mutat,2009,30(6):876-883.
- [22] Rouleau E,Lefol C,Bourdon V,et al. Quantitative PCR high-resolution melting (qPCR-HRM) curve analysis,a new approach to screen simultaneously point mutations and large rearrangements: application to MLH1 germline mutations in Lynch syndrome[J]. Hum Mutat,2009,30(6):867-875.
- [23] Dobrowolski SF,Gray J,Miller T,et al. Identifying sequence variants in the human mitochondrial genome using high resolution melting profiling[J]. Hum Mutat,2009,30(12):891-898.
- [24] Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis:advancements and imitations [J]. Hum Mutat,2009,30(6):857-859.