

## • 基础实验研究论著 •

# 16S rRNA 测序鉴定 1 株条件致病性人苍白杆菌<sup>\*</sup>

洪文艳, 李 眇, 刘建伟, 于德宪, 谢晓波, 刘金华, 唐博恒<sup>△</sup>

(广州军区疾病预防控制中心疾病监控科, 广东广州 510507)

**摘要:** 目的 探索一种基于 16S rRNA 基因的细菌快速鉴定方法, 为临床未知病原菌的诊断及治疗提供科学依据。方法 对临床患者的痰标本分离培养纯菌落, 直接以菌液为模板, 以通用引物 PCR 扩增未知菌的 16S rRNA 基因片段, 产物直接测序。将测序结果进行 BLAST 比对, 根据序列同源性鉴定病原细菌。结果 未知病原菌经本实验鉴定为人苍白杆菌, 经 ABI 细菌快速鉴定板条检测, 确认结果一致。结论 该研究简化了临床标本未知病原菌分离培养鉴定的步骤, 建立了一种利用 16S rRNA 基因扩增快速鉴定病原菌的简便方法。

**关键词:** 病原检测; 细菌鉴定; 直接 PCR; 16S rRNA**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.14.002**文献标识码:**A**文章编号:** 1673-4130(2014)14-1819-02

## Identifying 1 strain of conditional pathogenic *Ochrobactrum* by 16S rRNA gene sequencing<sup>\*</sup>

Hong Wenyan, Li Xi, Liu Jianwei, Yu Dexian, Xie Xiaobo, Liu Jinhua, Tang Boheng<sup>△</sup>

(Department of Disease Monitoring and Control, Center of Disease Prevention and Control of Guangzhou Militerary Region, Guangzhou, Guangdong 510507, China)

**Abstract: Objective** To explore a rapid bacterial identifying method based on the 16S rRNA gene sequence analysis technology to provide the scientific basis for the diagnosis and treatment of unknown pathogenic bacteria. **Methods** The pure colonies were isolated and cultured directly from a clinical patient's sputum sample. The colony as a template for PCR amplification with universal primers to amplify 16S rRNA gene fragments of unknown bacteria. The product of PCR was sequenced directly, then the sequence result was compared by using the BLAST of NCBI and the pathogen was identified based on the sequence homology. **Results** 1 strain of unknown pathogen was identified as *ochrobactrum* by this test and confirmed by ABI bacterial rapid identification system. **Conclusion** This study simplifies the isolation and identification procedures of unknown pathogen from the clinical samples and establishes a simple method for the rapid identification of pathogens by using 16S rRNA gene amplification.

**Key words:** pathogen detection; bacterial identification; direct PCR; 16S rRNA

目前, 大部分临床患者病原诊断中对细菌性病原的诊断仍以传统的细菌纯培养加生化反应鉴定为主, 步骤复杂, 操作繁琐, 耗时长, 难以满足临床的快速检验需求。若患者本身合并感染、检查前用药或环境等影响, 传统细菌的鉴定分析方法对临床标本的检测更难以得到满意结果。而基于细菌基因高度保守区域的 16S rRNA 基因的序列比对鉴定技术, 是一种建立在基因文库及生物信息学技术上的较为成熟的细菌快速鉴定方法。该技术经过多年的发展, 已经得到了广泛的应用。本研究即是利用此技术, 从 1 份临床患者的痰标本中分离鉴定出了一株条件致病性人苍白杆菌。

## 1 材料与方法

**1.1 临床标本** 为某发热伴呼吸道症候群患者的痰液标本, 取自广州军区总医院。**1.2 仪器与试剂** 实验所使用仪器设备有美国 PE 公司 480 型 DNA CYCLER 扩增仪、天能 UV2000 凝胶成像分析仪, 生物梅里埃全自动细菌鉴定仪等。培养基为广州环凯公司产品, PCR 反应试剂采用 TAKARA 公司生产的 Ex Taq PCR 试剂。**1.3 标本的细菌分离培养** 痰标本经生理盐水稀释, 取适量接种肉汤培养基, 37 ℃过夜增菌培养, 新鲜菌液接种 LB 平板培养。**1.4 PCR 反应扩增 16S rRNA 基因片段** 挑取平板上的单个菌落, 100 ℃煮沸 10 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 取 2 μL 上清液作为扩增模板。应用 16S rRNA 基因通用引物, 正向引物

的序列为 (27F): 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3', 反向引物的序列为 (1492R): 5'-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3'。建立 30 μL 的 PCR 反应体系: 细菌核酸模板 2 μL, Ex Taq 酶 0.3 μL, ddH<sub>2</sub>O 19.2 μL, 酶缓冲液 3 μL, 正向引物 (10 μmol/L) 1.5 μL, 反向引物 (10 μmol/L) 1.5 μL, d NTP (2.5 mmol/L) 2.5 μL。PCR 反应程序: 95 ℃预变性 5 min 后开始循环: 94 ℃变性 55 s, 55 ℃退火 55 s, 72 ℃延伸 90 s, 30 个循环, 之后 72 ℃延伸 10 min。产物用 1.5% 琼脂糖电泳, 凝胶成像仪分析结果。

**1.5 产物测序比对分析** 上述阳性的 PCR 产物直接送上海生工测序, 选通用引物的正向 27F 引物进行单向测序。测序结果经 Ediseq 及 Clustx 软件分析, 根据序列的峰图去掉首尾信号不佳的易错碱基, 取编辑后序列, 利用 NCBI 的 BLAST 中的 16S rRNA 基因核酸序列比对功能, 进行同源性比对。**1.6 API 的 NP20 细菌鉴定板条检测** 取新鲜 LB 平板上的纯菌落, 用 0.45% 生理盐水稀释至麦氏比浊度为 0.5~0.6, 然后用生物梅里埃全自动细菌鉴定系统分析鉴定。

## 2 结 果

**2.1 PCR 反应结果** PCR 反应产物的电泳分析结果见图 1, 可见扩增出的产物片段大小约为 1 500 bp, 与目标产物 16S rRNA 基因片段的大小一致。**2.2 产物测序比对分析结果** 产物送生工公司单向测序, 结果显示约 1 000 bp 长的基因序列峰形分析后, 取 121~900 bp

\* 基金项目: “艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项传染病监测技术平台项目(2009-ZX10004-205)。 作者简介: 洪文艳, 女, 助理研究员, 主要从事病原生物学研究。 △ 通讯作者, E-mail: lhchhw521@163.com。

之间的 780 bp 序列, 进行 BLAST 比对。结果显示, 所比对的 800 bp 目标片段与人苍白杆菌的 16S rRNA 基因核酸序列完全匹配, 100% 同源。



1:阴性对照;2:待检菌;3:阳性对照(E. coli);4:DL2000 Marker。

图 1 细菌的 16S rRNA 基因扩增产物的凝胶电泳结果

**2.3 梅里埃细菌检测仪器鉴定结果** 用 API 的 NP20 细菌检测板条鉴定, 结果显示与人苍白杆菌的吻合度达 99% 以上, 为极好的鉴定。

### 3 讨 论

临床标本检测技术的研究, 目的是使其操作更加简单、快速、结果更加准确、投入更加低廉, 已求达到更高效更经济的诊治需求。本研究针对未知病原的临床标本检测, 采用了一种尽可能简单的 PCR 检测方法, 以直接煮沸裂解的菌落上清为 PCR 模板, 省略了普遍应用的细菌 DNA 提取步骤。同时应用细菌的 16S rRNA 基因序列鉴定技术, 采用常见的通用引物, 也是目前基于 16S rRNA 基因序列分析法常用的引物序列, 进行简单 PCR, 产物直接测序分析。结果显示, 和梅里埃细菌自动鉴定分析仪检测结果一致, 但明显比后者更为经济易行。说

明本研究方法操作简单, 结果可靠。

当然, 受所检测标本数量的限制, 结果尚待继续研究, 该方法能否基本通用, 即对大多数常见病原菌都能进行准确鉴定, 是未来研究的重点。

### 参考文献

- [1] 常玉梅, 刘海燕. 16S rRNA 基因文库方法在标本感染菌群分析中的应用[J]. 解放军医药杂志, 2013, 25(1): 57-59.
- [2] 陈茶, 屈平华, 顾全, 等. 基于细菌 16S rRNA 基因的 PCR 扩增与测序分析在临床不常见菌鉴定中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(7): 612-619.
- [3] 沈亚娟, 夏云. 16S rRNA 基因序列分析鉴定非典型细菌的实验研究[J]. 重庆医学, 2013, 42(1): 46-48.
- [4] 付晓艳. 分析 16S rRNA 基因部分序列鉴定一株乳酸菌[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2008, 42(3): 265-267.
- [5] 干咏华, 李爱红, 安东善, 等. 6 种常见呼吸道感染细菌 16S rRNA 基因的克隆与鉴定[J]. 中国免疫学杂志, 2007, 23(7): 641-647.
- [6] 王佃鹏, 董玲玲, 张艳芳, 等. 细菌直接 PCR 和双引物策略鉴定 16S rRNA 基因技术的建立[J]. 热带医学杂志, 2012, 12(2): 181-183.
- [7] 金中淦, 葛平, 徐蓉, 等. 16S rRNA、16S~23S rRNA 基因测序分析检测主要血流感染病原菌比较[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2012, 4(3): 181-185.
- [8] 王艳萍. 16S rRNA 基因及 16S~23S rRNA 基因间区在微生物鉴定中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(8): 994-996.
- [9] 朱飞舟, 陈利玉, 陈汉春 M 等. 16S rRNA 基因序列分析法鉴定病原细菌[J]. 中南大学学报: 医学版, 2013, (10): 1035-1041.
- [10] 刘明春, 刘耀川, 赵敬翠, 等. 奶牛子宫内膜炎化脓隐秘杆菌 16S rRNA 基因的鉴定与分析[J]. 中国兽医学报, 2009, 29(3): 343-345.
- [11] 葛淑敏, 钱爱东, 王铁风, 等. 10 株牛源非结核分枝杆菌 16S rRNA 基因序列分析[J]. 中国预防兽医学报, 2010, 32(11): 895-897.
- [12] 程金平, 王亚宾, 刘磊, 等. 应用 16S rRNA 基因序列分析鉴定猪源肠球菌[J]. 江西农业学报, 2008, 20(11): 1-4.

(收稿日期: 2014-01-11)

(上接第 1818 页)

(IFCC)的心肌标志物标准化委员会(CSCM)、美国临床生化学会(NACB)、欧洲心脏病学会以及中华医学会临床检验学分会等组织最近建议在临床工作中将 cTnI 作为急性心肌梗死诊断的“金标准”<sup>[6]</sup>。临床应用发现, cTnI 测定存在标准化问题, 导致同一患者的血标本在不同实验室采用不同厂家的商品化试剂盒, 甚至不同实验室采用同一厂家的试剂盒进行检测, 检测的结果可相差 20~30 倍, 导致不同实验室之间的结果不具有可比性<sup>[3]</sup>。血清中的存在形式绝大部分是 cTnI-TnC 复合物, 而游离的 cTnI 及 cTnI-TnC-TnT 复合物只有很小一部分。血清中 cTnI 的 N-端和 C-端均易被蛋白酶水解, 稳定性差, 而 30~110 间肽段稳定性好, 现在新一代的 cTnI 检测系统多针对此肽段<sup>[7]</sup>。本研究通过选取此片段对比不同的纯化方法, 获取稳定的 rhcTnI, 促进 cTnI 诊断标准化的研究。

本文对两种复性方法进行了初步摸索, 稀释法是小规模包涵体复性最常用的方法, 这种方法操作简单, 但包涵体要在极低的浓度下复性, 复性液用量大, 并且复性后需要对样品进行超滤浓缩, 无法扩大工业化生产; 柱上复性可以通过变性蛋白在层析柱中与层析介质的相互作用抑制蛋白质的聚集, 从而达到提高蛋白质获得率的目的, 同时还能将蛋白质提纯, 并且纯化时间短, 是近期包涵体复性的研究热点<sup>[4-5]</sup>。通过对比, CM-FF 柱上复性要比稀释复性方法纯化 rhcTnI 高效、稳定。

### 参考文献

- [1] Reiffert S, Jaquet K, Helimeyer L, et al. Stepwise subunit interaction changes by mono and bisphosphorylation of cardiac troponin I [J]. Biochemistry, 1998, 37(29): 13516-13525.
- [2] Thygesen K, Alpert JS, White HD, et al. Universal definition of myocardial infarction[J]. Circulation, 2007, 116(22): 2634-2653.
- [3] 韩雪松, 李强, 丛进阳. 心肌肌钙蛋白 I 检测及临床诊断标准化进展[J]. 中华检验医学杂志, 2004, 27(3): 197-200.
- [4] Clark ED. Protein refolding for industrial processes[J]. Curr Opin Biotechnol, 2001, 12(1): 202-207.
- [5] Jungbauer A, et al. Folding and refolding of proteins in chromatographic beds[J]. Curr Opin Biotechnol, 2004, 15(1): 487-494.
- [6] Anderson JL, Adams CD, Antman EM, et al. 2011 ACCF/AHA focused update incorporated into the ACC/AHA 2007 guidelines for the management of patients with unstable angina/non-ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines[J]. Circulation, 2011, 123(4): 426-579.
- [7] Apple FS, Collinson PO. Analytical characteristics of high-sensitivity cardiac troponin assays[J]. Clin Chem, 2012, 58(1): 54-61.

(收稿日期: 2014-01-01)