

16S rRNA 及相关技术用于临床细菌鉴定的研究进展

叶乃芳 综述,王中新[△]审校

(安徽医科大学第一附属医院检验科,安徽合肥 230022)

关键词:16 S rRNA; 细菌鉴定; 综述

DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2015. 04. 037

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)04-0520-03

快速、准确地鉴定细菌是临床微生物学最基本的任务,传统的细菌鉴定方法依赖于直接涂片检查、纯培养,从表型特征方面加以鉴定。该方法繁琐、费时,主要又依赖于专业人员的经验和专业知识。随着核酸技术发展,16S rRNA 序列测定被用于细菌分型鉴定,还可用于发现和描述新的细菌种类,尤其是表型鉴定难于确定的细菌。随着细菌基因组研究的进展,利用分子生物学对细菌进行鉴定已初步应用于临床,包括 16S rRNA、16S-23S rRNA 基因间隔区、肽核酸荧光原位杂交技术(PNA FISH)、基质辅助激光解吸电离飞行质谱法(MALDI-TOF-MS)、随机扩增 DNA 多态性分析(RAPD)、限制性片段长度多态性分析(RFLP)、基因芯片技术。目前国际上的主要发展方向仍然是 16S rRNA 技术,本文对 16S rRNA 及相关技术作一综述。

1 16S rRNA 的分子结构与特点

16S rDNA 基因是细菌染色体上编码 16S rRNA 相对应的 DNA 序列,其可变区与恒定区序列交错排列。恒定区在各种细菌中基本保持不变,而可变区因不同细菌,不同科、种、属而异,且变异程度与细菌的系统发育密切相关。16S rRNA 序列分析技术的基本原理就是利用恒定区序列设计通用引物从微生物标本中扩增出 16S rRNA 的基因片段,通过克隆测序、探针杂交、酶切片段多态性分析等方法获得 16S rRNA 序列信息^[1],再与 16S rRNA 基因数据库中的序列数据或其他数据进行同源对比及分析,从而鉴定标本中可能存在的细菌种类。

2 16S rRNA 技术检测过程

2.1 目的基因的提取 实验室常用的提取细菌 DNA 方法有碱裂解法、十六烷基三甲基溴化胺(CTAB)法、丙酮法、玻璃珠/超声法等。

Millar 等^[2]用商品化试剂及自己改良的方法提取血培养材料中 DNA,包括 Qiagen 公司 QIAmp 试剂盒、罗氏公司 PCR 模板提取试剂盒、Puregene DNA 提取试剂盒、加热法、玻璃珠/超声法和碱裂解法 6 种提取方法,结果得出碱裂解法是最敏感、最简单、最节约成本、产量最高、重复性最好的方法,是唯一能够完全清除血培养瓶中 PCR 抑制剂和内在 DNA 的方法。Hsi 等^[3]通过实验进一步证实碱裂解法是提取血培养瓶中 DNA 最灵敏、最快速的方法。朱飞舟等^[4]分别采用 CTAB 法和丙酮法提取新鲜细菌培养物基因组 DNA。经过比较,两种方法提取的 DNA 均可用作 PCR 的模板,但丙酮法快速、简单、易行,更适于临床应用。

2.2 通用引物 PCR 扩增及条带获取 针对细菌 DNA 保守序列(如 16S rRNA)设计通用引物,通过凝胶电泳和溴化乙锭染色技术对 PCR 扩增产物进行观察分析,观察是否扩增出相

关条带及位置。

2.3 16S rRNA 基因序列同源性比对与结果解释 属于国家生物技术信息中心的核酸数据库有 GenBank([www. ncbi. nlm. nih. gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))、核糖体 II 期工程数据库([http://rdp. cme. msu. edu/html](http://rdp.cme.msu.edu/html))、医学微生物核糖体分化的欧洲数据库 RI-DOM([www. ridom. com](http://www.ridom.com))、小基因 IDNS 数据库([www. smartgene. ch](http://www.smartgene.ch)),另外还有部分商业化数据库,如 Microseq 数据库、16 Spath DB([http://147. 8. 74. 24/16SpathDB](http://147.8.74.24/16SpathDB)),对某些细菌的分类非常有价值^[5-6]。值得一提的是,16 Spath DB 数据库只包含与临床感染有关的细菌序列^[5],即出现于《临床微生物手册》中的细菌。若没有出现种属鉴定结果,可能是未报告过引起人类感染的微生物,所以建议用户用 BLAST 搜出,用户应注意即使某种微生物从未报告过感染人类,可能与某些疾病还是有潜在联系,不容忽视。

通常选 2 个或以上数据库横向比对,参考 16S rRNA 基因序列的同源性比对与结果解释,主要参考美国临床与实验室标准化协会(CLSI)MM18-A 的判定规则^[7]:(1)与某菌种模式菌株相似度大于或等于 99.0%,且与其他种的相似度之差大于 0.8%,则可以报告其属名和种名;(2)与多个菌种的模式菌株相似度大于或等于 99.0%,且相似度之差小于 0.8%,则为“低鉴定度”的鉴定,应报告其属名和所有相似度大于或等于 99.0%细菌的种名;(3)与某属菌细菌的相似度在 97.0%~98.9%范围内,能与其他菌属相区分,则可以报告其属名,并备注“亲缘关系最近的菌种”;(4)与所有菌种的模式菌株相似度小于 97.0%,则报告为可能的新属新种。

3 16S rRNA 相关其他分子生物学技术

3.1 实时荧光定量 PCR 在常规 PCR 基础上添加了荧光染料或荧光探针,利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析。改变了 PCR 定量较差的缺点,对李斯特菌、大肠埃希菌、沙门菌及肠球菌等能进行有效定量检测。傅松维等^[8]用荧光定量 PCR 方法检测沙门菌,通过特异性分析,可有效地排除多种常见食源性致病菌的干扰。8 种沙门菌标准菌株检测均阳性,20 株临床分离菌株除 1 株外,均阳性,检测沙门菌的灵敏度为 220 CFU/mL。但是此方法受检测物成分、增菌培养成分、扩增操作影响,而且仅限于对核酸序列已知的微生物鉴定,不能区分死活细胞^[9]。

3.2 多重 PCR 在同一反应中采用多对引物同时扩增几个不同 DNA 片段。由于每对引物扩增片段长度不同,可用电泳加以鉴别。在同一反应中扩增多个目的基因序列,降低检测成本,提高效率。可以用于检测细菌血症^[10-11]、脑膜炎^[12]、眼内炎^[13]、肠道感染等。罗氏公司多重 PCR 检测系统可以同时

检测 20 种血标本中病原菌^[10-11],最常用于使用过抗菌药物后血培养阴性的患者。细菌性眼内炎少见,常规培养灵敏度 50%~60%,联合常规培养与多重 PCR 灵敏度增加到 70%~80%。因此早期诊断、及时治疗对减缓视力退化很有意义^[13]。

3.3 PCR 限制性片段长度多态性(PCR-RFLP) 将扩增 16S rDNA 片段采用限制性内切酶进行酶切,得到的酶切图谱对细菌进行同源性分析。王蓉美等^[14]在 16S rRNA 基因保守区建立通用引物,对选取的 14 种临床常见病原菌同时进行 PCR 扩增,并根据扩增片段内变异区特点分别选择限制性内切酶 Hae III、Mn II、Alu I、Dde I 和 BstB I 酶切后电泳,建立各细菌菌株特有的酶切图谱,可达到对临床常见病原菌种属进行快速鉴定的目的。

4 16s rRNA 序列分析在微生物鉴定的应用及局限性

16S rRNA 序列分析已成为一种新的细菌鉴定和分类金标准,相对其他表型分类方法的优势在于准确,代表了细菌基因组的结构和内容;具有 PCR 技术的高灵敏性。样品用量少,只需少量细菌即可提供细菌基因组 DNA,除此之外,还有下列特殊应用价值。

4.1 鉴定疑难细菌及罕见菌 Cloud 等^[15]研究了 96 株难以鉴定的非发酵革兰阴性杆菌,传统方法与 16S rRNA 基因测序结果的吻合性为 61.5%,用 16S rRNA 基因测序 88 例(91.7%)可以鉴定到种水平。陈茶等^[16]鉴定 48 株临床来源的罕见菌,72.9%直接鉴定到“种”,22.9%可鉴定到“属”。结合细菌生化反应特征及其他管家基因序列分析结果,则鉴定到种'的细菌可增至 42 株。利用 16S rRNA 基因鉴定不仅能提供正确鉴定结果,选择恰当治疗,还能让了解罕见菌流行病学及它们的致病角色,这是以往很难做到的,比如梭状菌属感染少见,致死率极高,正确鉴定可以帮助选择恰当的治疗方案,了解其流行病学角色^[17]。

4.2 鉴定生长缓慢或者培养条件苛刻的细菌 鉴定某些厌氧菌及分枝杆菌需要十分丰富的经验,常规微生物实验室不能满足。即使是快速生长的分枝杆菌,一些生化反应也至少需要 28 d 才能完成,需要分析分枝杆菌脂肪酸,引进气相色谱等特殊设备及专业知识丰富的实验技术人员。16S rRNA 测序可以节约时间及成本,有些分枝杆菌亚种难以区分,往往需要附加额外基因鉴定如 hsp65 和 rpoB 用于生长快速的分枝杆菌^[18]。

4.3 鉴定新发现的菌种 新菌株生化反应与已知菌株不吻合,使用 16S rRNA 测序,确定系统种系发育史,发现新菌种。在过去 7 年(2001~2007 年)人类标本中发现 215 个新菌种^[6],其中 29 种为新属。大量新种常被发现于口腔及胃肠道,常为分枝杆菌属及诺卡菌属。Zhang 等^[19]使用 16s rRNA 测序技术从福建省一例肺结核患者体内发现新菌种“*Mycobacterium fukienense*”。

4.4 局限性 (1)准确性依赖于数据库的全面性,罕见菌数据库资料不完善,GeneBank 常包含错误的数据,尤其是 1995 年以前的序列,因此在序列比对时尽量选择 1995 年以后的序列为参考^[20]。(2)无国际公认的使用规则及测序结果解释标准,有学者认为没有明确临界值,通用临界值对所有细菌种属判断不大合适。Josefson 等^[20]认为用于种判定的临界值大于 99.0%,理想是 99.5%。使用 16s rRNA 测序鉴定成功率为 62%~92%,取决于细菌种类及用于种属判断的规则。(3)近年来

有研究指出,不同种或同种细菌之间可发生基因水平转移(HGT),并且与 16S rRNA 重组,形成嵌合体^[21]。因此,使用部分 16S rRNA 基因探针或者进行同源性序列分析可能包括了嵌合体结构,导致鉴定结果不准确。(4)由于在 PCR 扩增时可出现碱基错配、基因突变、基因缺失等情况,在一定程度上会影响 16S rRNA 基因序列分析的准确性^[22],通过重复 PCR、增加 16S rRNA 基因扩增片段长度、联合 16S-23S rRNA 基因间区及某些额外单拷贝基因可以进一步提高对细菌的鉴定能力^[19]。相关实验证明测序 groEL、mprA、zmpA 基因,在鉴定伯克霍尔德菌属时尤为重要^[23-24](5)利用 16S rRNA 最大障碍就是设备仪器自动化。当前提取 DNA、PCR 扩增、纯化 PCR 产物、测序等都为手工操作,唯一自动化操作就是把 16s rRNA 序列信息输入数据库软件,会产生序列比对信息,这大大增加了人力、物力的消耗。

5 展 望

随着分子生物学和信息学技术的不断发展,微生物实验诊断的手段也越来越先进,特别是基因诊断技术在临床上的应用也越来越广泛,可以更早、更快速、敏感地诊断细菌感染^[25]。相信在不久的将来,这些细菌鉴定步骤可能实现自动化。

参考文献

- [1] Paolucci M, Landini MP, Sambri V. Conventional and molecular techniques for the early diagnosis of bacteraemia[J]. Int J Antimicrob Agents, 2010, 36(2): S6-16.
- [2] Miller BC, Jiru X, Moore JE, et al. A simple and sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material[J]. J Microbiol Methods, 2000, 42(2): 139-147.
- [3] Hsi SC, Sun JR, Chiueh TS. Evaluation of the alkaline Wash/lysis procedure for the molecular diagnosis of a positive bacterial blood culture in clinical routine practice[J]. J Clin Lab Anal, 2010, 24(3): 139-144.
- [4] 朱飞舟,陈利玉,陈汉春. 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, 38(10): 1035-1041.
- [5] Woo PC, Teng JL, Yeung JM, et al. Automated identification of medically important bacteria by 16S rRNA gene sequencing using a novel comprehensive database, 16SpathDB[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(5): 1799-1809.
- [6] Woo PC, Lau SK, Teng JL, et al. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories[J]. Clin Microbiol Infect, 2008, 14(10): 908-934.
- [7] Clinical and laboratory standards institute. MM18-A Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing: approved guideline[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2008.
- [8] 傅松维,董明国,沈小文. 利用荧光定量聚合酶链反应快速检测沙门菌[J]. 检验医学, 2008, 23(3): 331-332.
- [9] Maurin M. Real-time PCR as a diagnostic tool for bacterial diseases[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2012, 12(7): 731-754.
- [10] Josefson P, Strålin K, Ohlin A, et al. Evaluation of a commercial multiplex PCR test(SeptiFast) in the etiological diagnosis of community-onset bloodstream infections[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2011, 30(9): 1127-1134.
- [11] Bravo D, Blanquer J, Tormo M, et al. Diagnostic accuracy and potential clinical value of the LightCycler SeptiFast assay in the management of bloodstream infections occurring in neutropenic

and critically ill patients[J]. Int J Infect Dis, 2011, 15(5):326-331.

[12] Wang X, Theodore MJ, Mair R, et al. Clinical validation of multiplex Real-Time PCR assays for detection of bacterial meningitis pathogens[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(3):702-708.

[13] Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, et al. Diagnosis of bacterial endophthalmitis by broad-range quantitative PCR[J]. Br J Ophthalmol, 2011, 95(3):345-349.

[14] 王蓉美, 蔡庆, 高和, 等. 采用 PCR 与 RFLP 方法快速诊断细菌感染[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2009, 23(12):1167-1169.

[15] Cloud JL, Harmsen D, Iwen PC, et al. Comparison of traditional phenotypic identification methods with partial 5' 16S rRNA gene sequencing for species-level identification of nonfermenting Gram-negative bacilli[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(4):1442-1444.

[16] 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.

[17] Pett E, Saeed K, Dryden M. Fusobacterium species infections: clinical spectrum and outcomes at a district general hospital[J]. Infection, 2014, 42(2):363-370.

[18] Adékambi T, Berger P, Raoult D, et al. rpoB gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of mycobacterium bolletii sp. nov., mycobacterium phocaicum sp. nov. and mycobacterium aubagnense sp. nov[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2006, 56(1):133-143.

[19] Zhang YY, Li YB, Huang MX, et al. Novel species including mycobacterium fukienense sp. is found from tuberculosis patients in Fujian province, China, using phylogenetic analysis of mycobacterium chelonae/abscessus complex[J]. Biomed Environ Sci, 2013, 26(11):894-901.

[20] Josefson P, Strålin K, Ohlin A, et al. Evaluation of a commercial multiplex PCR test (SeptiFast) in the etiological diagnosis of community-onset bloodstream infections[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2011, 30(9):1127-1134.

[21] Kitahara K, Yasutake Y, Miyazaki K. Mutational robustness of 16S ribosomal RNA, shown by experimental horizontal gene transfer in Escherichia coli[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(47):19220-19225.

[22] Rajendhran J, Gunasekaran P. Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond[J]. Microbiol Res, 2011, 166(2):99-110.

[23] Shinoy M, Dennehy R, Coleman L, et al. Immunoproteomic analysis of proteins expressed by two related pathogens, Burkholderia multivorans and Burkholderia cenocepacia, during human infection[J]. PLoS One, 2013, 8(11):e80796.

[24] Suppiah J, Thimma JS, Cheah SH, et al. Development and evaluation of polymerase chain reaction assay to detect Burkholderia genus and to differentiate the species in clinical specimens[J]. FEMS Microbiol Lett, 2010, 306(1):9-14.

[25] Ecker DJ, Sampath R, Li H, et al. New technology for rapid molecular diagnosis of bloodstream infections[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2010, 10(4):399-415.

(收稿日期:2014-11-26)

• 综 述 •

内皮细胞微粒的研究进展

李 贤 综述, 王德明[△] 审校

(南华大学第二附属医院麻醉科, 湖南衡阳 421001)

关键词: 内皮细胞微粒; 心血管疾病; 糖尿病; 肺部疾病

DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2015. 04. 038

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)04-0522-03

血管内皮细胞是衬覆于血管内壁的单层扁平细胞,在保持血管内膜的完整性和维持血管的正常功能方面有着重要的作用。内皮细胞微粒(EMPs)是内皮细胞激活或凋亡时从其表面释放的直径小于1 μm的微囊泡,具有内皮细胞的某些抗原特性,可有效反映内皮细胞的结构和功能状态。研究表明,EMPs不仅是内皮功能紊乱的新的标志物,并被认为是炎症、血管损伤、内皮功能障碍和血栓形成中发挥着重要的生物学作用^[1]。在患有心血管疾病、糖尿病、肺部疾病等疾病的患者血液中EMPs水平都有增加。本文就EMPs可能的形成机制、检测方法及其与疾病的相互作用做一综述。

1 EMPs 的形成机制

细胞膜磷脂酰丝氨酸(PS)的暴露和连续不断的微粒脱落是一个普遍存在的过程,它不断清除衰老的细胞并维持组织和机体的平衡。微粒的脱落是所有真核生物受刺激或凋亡时的一个原始应激反应^[2]。相同细胞起源的微粒或许会由不同的蛋白质和磷脂组成。用TNF-α刺激脐静脉内皮细胞后,第一

次记录了EMP的增殖。然而,除了TNF-α,其他的炎症因子、细菌的脂多糖、活性氧、酰溶酶原激活抑制剂、凝血酶、喜树碱、C-反应蛋白、尿毒素也能刺激体内的EMP增加^[3]。当然,微粒的形成过程是十分复杂的,其具体机制目前尚不明确。

1.1 细胞活化 正常细胞膜的磷脂双分子层是由外层的磷脂酰胆碱和鞘磷脂与内层的磷脂酰乙醇胺和PS组成^[4]。这种磷脂分布的不对称性是由氨基磷脂转移酶、ATP依赖性氨基磷脂特异性移位酶和磷脂爬行酶的跨膜平衡来维持的。当细胞受到刺激时,细胞内的Ca²⁺会增加,ATP依赖性氨基磷脂特异性移位酶和磷脂爬行酶活性增加,氨基磷脂转移酶活性降低,导致细胞膜的不对称性消失,PS暴露在细胞膜的表面,细胞膜出芽形成微粒。然而,并不是PS暴露在细胞膜的表面就会有微粒的脱落,它还受细胞内Ca²⁺浓度的调节。已经被证实细胞骨架的重组在微粒的释放中起重要的作用。细胞受刺激会出芽形成微粒,并且不同的刺激形成不同的微粒^[5]。

1.2 细胞凋亡 凋亡是活体内个别细胞的程序性死亡,是细

作者简介:李贤,女,医师,主要从事临床生物化学相关研究。 △ 通讯作者,E-mail:471474637@qq.com。