

# 16S~23S rDNA 间隔区序列在分枝杆菌 分类鉴定中的应用研究

张灵霞 庄玉辉 何秀云 张晓刚 李国利

(中国人民解放军 309 医院结核病研究室 北京 100091)

**摘 要** 采用聚合酶链反应 (PCR) 技术对分枝杆菌 16S~23S rDNA 间隔区序列进行扩增,其产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 并通过计算机聚类分析,在基因水平上评价其对分枝杆菌分类与鉴定的意义。退火温度 45℃ 时,PCR 扩增的敏感性为 500fg/ $\mu$ L,而 50℃ 时的敏感性为 5pg/ $\mu$ L。已通过对 22 种分枝杆菌和 9 种非分枝杆菌的特异性实验,结果表明,扩增条带多集中在 300~600bp 之间,多数受试快速生长分枝杆菌和非分枝杆菌扩增条带多且分子量较大,缓慢生长分枝杆菌扩增条带相对较少,分子量较小。PAGE 和计算机聚类分析结果显示,分枝杆菌种间条带特异性的相似性系数均小于 70%,且绝大多数菌种间小于 50%。可将被试菌株鉴定到种的水平。PAGE 和聚类分析是分枝杆菌分类鉴定的一种快速、有效的方法。

**关键词** 分枝杆菌,PCR,聚类分析,分类鉴定

中图分类号:Q939 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2000)05-0459-04

已报道的分枝杆菌有一百多种,其中一小部分对人与动物有致病性。非结核分枝杆菌引起的肺部疾病,其临床表现、体征和 X 线影像酷似结核病,但治疗方案不同。因此菌种分类、鉴定对于结核病的诊断、治疗和流行病学调查至关重要。

生物学特性及细胞生化试验一直是菌种鉴定的经典方法,各具特有的优点。但这些方法操作繁杂或敏感性低,或特异性差,而且费时,有其局限性。近年来报道了一些新的检验鉴定技术:1、DNA 探针杂交,一种快速可信的菌种鉴定方法,但只能应用于部分分枝杆菌的鉴定<sup>[1]</sup>。2、枝菌酸的高效液相色谱或者分枝杆菌类脂的薄层层析都能区分大部分分枝杆菌,但需要特殊设备<sup>[2,3]</sup>。3、限制性片段长度多态性(RFLP)分析,这种分析方法只能鉴定部分分枝杆菌。4、对 16S rDNA 基因和 65kd 热休克蛋白基因进行扩增,然后对扩增产物进行酶切分析,比较酶切片段的数目和长度,从而对菌种进行鉴定,但在临床实验室作常规操作比较困难<sup>[4,5]</sup>。

近年来,人们发现不同菌种 16S-23S rDNA 间隔区序列由于所含 tRNA 的数目及大小不同,具有长度与序列上的多态性,而且比 16S rDNA 本身具有更强的高变性,可作为菌种鉴定的一种新方法。作者对这一方法在分枝杆菌鉴定中的应用价值进行了研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌种来源:受试分枝杆菌与非分枝杆菌由中国药品生物制品检定所提供。

作者简介:张灵霞(1972-),女,河南省人,硕士,现在三〇九医院从事分枝杆菌分类鉴定的研究

收稿日期:1999-07-15,修回日期:1999-12-28

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

1.1.2 引物 :PL1 5'-GAAGTCGTAACAAGG ;PL2 5'-CAAGGCATCCACCAT。根据文献报道设计 ,由中国科学院微生物研究所合成。

1.1.3 仪器及设备 :PCR 仪为 PE 公司 Te-1 型 ,电泳槽购自北京六一仪器厂。结核分枝杆菌 PCR 诊断试剂盒由本室提供 ;单双丙烯酰胺分别购自华美生物工程公司和北京邦定生物工程公司。DNA marker 与内切酶购自华美生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增 :参照本室设计的 25μL 扩增体系稍作改进。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳 ,紫外检测。

1.2.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳 :取 5μL 扩增产物加入等体积载样缓冲液混匀 ,加入预电泳 30min 的非变性聚丙烯酰胺凝胶中 ,1×TBE 室温电泳 2.0~2.5h。溴化乙锭染色 20min ,紫外检测 ,拍照。

1.2.3 分子量的计算 :参照文献 [6]。

1.2.4 变异系数的计算 :参照文献 [7]。

2 结果

2.1 16S~23S rDNA 间隔区序列扩增条件的选择

2.1.1 引物 :比较了四种引物浓度 ,发现 1pmol/μL 扩增条带较淡 ,2pmol/μL 扩增结果较为理想 ,3pmol/μL 和 4pmol/μL 均有非特异条带出现。

2.1.2 退火温度 :比较了四种退火温度。结果表明 :45℃ 扩增带很亮 ,50℃ 扩增结果一般 ,55℃ 扩增带很淡 ,60℃ 未见任何扩增条带。

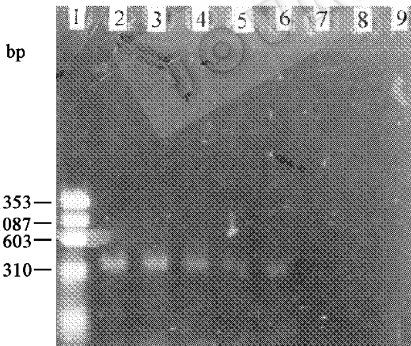


图1 分枝杆菌 16S~23S rDNA 间隔区序列 PCR 扩增敏感性(退火温度 45℃)

Fig.1 The sensitivity of 16S~23S rDNA spacer sequence by PCR amplification(annealing temperature 45℃)

- 1. Marker 2. 5ng/μL ; 3. 500pg/μL ;
- 4. 50pg/μL ; 5. 5pg/μL ; 6. 500fg/μL ;
- 7. 50fg/μL ; 8. 5fg/μL ; 9. 0fg/μL.

2.2 16S~23S rDNA 间隔区序列在不同温度下敏感性

2.2.1 同一菌种不同浓度 DNA 在不同温度下的敏感性 :纯化的结核分枝杆菌 H37Rv 株 DNA 用光密度法测定浓度为 880ng/μL ,用 1×TE 稀释成不同浓度。25μL PCR 扩增体系取稀释 DNA 溶液 3μL。退火温度 45℃ 扩增敏感性为 500fg/μL ,退火温度 50℃ 扩增敏感性为 5pg/μL ,结果见图 1。

2.2.2 不同菌种同一浓度 DNA 不同退火温度下的敏感性 :将 5ng/μL 的 22 种分枝杆菌 9 种非分枝杆菌各取 3μL ,分别于 45℃ 和 50℃ 进行扩增 ,45℃ 条件下 ,均可出现扩增 ,但在 50℃ 时 ,BCG、猿猴分枝杆菌( *M. simiae* )、堪萨斯分枝杆菌、苏加分枝杆菌( *M. szuigai* )、副偶然分枝杆菌( *M. parafortuitum* )、蛙分枝杆菌( *M. ranae* )、蟾蜍分枝杆菌( *M. xenopi* )、龟分枝杆菌龟亚种、次要分枝杆菌( *M. triviale* )、淡黄分枝杆菌、土地分枝杆菌( *M. terrae* )和母牛分枝杆菌( *M. vaccae* )等 12 种分枝杆菌和甲链球菌、卡他球菌( *N.*

*catarrhalis* )没有扩出。

2.3 16S~23S rDNA 间隔区序列扩增特异性

将分枝杆菌 16S~23S rDNA 间隔区序列 PCR 扩增产物进行 PAGE( 图 2 )。由于 PAGE 分辨率高 , 所得条带较琼脂糖凝胶电泳多 , 条带主要集中在 300~600bp 之间 , 大部分迅速生长分枝杆菌和非分枝杆菌扩增条带较多 , 分子量较大。缓慢生长分枝杆菌扩增条带相对较少 , 分子量较小( 表 1 )。

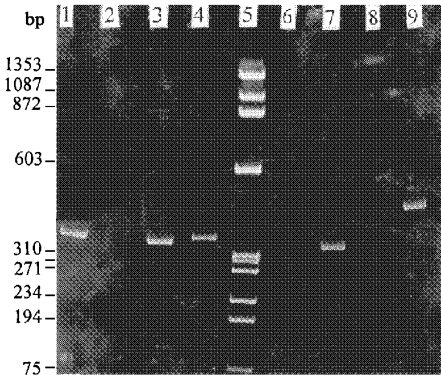


图 2 16S~23S rDNA 间隔区序列扩增特异性

Fig. 2 The specificity of 16S~23S rDNA spacer sequence by PCR amplification  
1. *M. tuberculosis* H37Rv ; 2. *M. bovis* ; 2. BCG ; 4. *M. simiae* ; 5. Marker ;  
6. *M. kansasii* ; 7. *M. marianum* ; 8. *M. intracellulare* ; 9. *M. scrofulaceum* .

表 1 分枝杆菌 16S~23S rDNA 间隔区序列扩增特异性

Table 1 The specificity of 16S~23S rDNA spacer sequence in <i>Mycobacterium</i> by PCR amplification						
Strains	Number of bands		Molecular weight/bp			
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	1	309				
BCG	2	1350	309			
<i>M. intracellulare</i>	2	355	309			
<i>M. scrofulaceum</i>	1	363				
<i>M. simiae</i>	1	302				
<i>M. gastri</i>	4	1318	447	309	302	
<i>M. marianum</i>	4	525	339	324	302	
<i>M. fortuitum</i>	5	1175	776	363	339	324
<i>M. szuigai</i>	6	1318	490	372	339	295
		275				
<i>M. ranae</i>	3	437	372	339		
<i>M. gordonae</i>	9	617	501	447	427	407
		389	347	324	275	
<i>M. xenopi</i>	7	708	501	468	447	417
		324	309			
<i>M. triviale</i>	7	832	603	447	427	417
		398	309			
<i>M. smegmatis</i>	2	501	447			
<i>M. chelonae</i> subsp.	2	603	447			
<i>M. vaccae</i>	5	603	501	447	427	355
<i>M. terrae</i>	6	468	447	427	380	316
		269				
<i>M. parafortuitum</i>	6	692	661	631	537	479
		427				
<i>M. nonchromogenicum</i>	5	617	479	417	407	363
<i>M. phlei</i>	7	1349	871	832	794	617
		603	501			
<i>S. viridans</i>	2	427	271			

续表 1

<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	7	794	691	646	490	427
		380	269			
<i>S. epidermidis</i>	5	537	501	497	417	372
<i>K. pneumoniae</i>	8	1353	933	881	871	759
		523	513	501		
<i>S. aureus</i>	4	933	676	427	380	
<i>E. coli</i>	6	933	708	437	380	288
		257				
<i>N. catarrhalis</i>	3	501	398	380		
<i>S. pneumoniae</i>	2	501	380			
<i>P. aeruginosa</i>	1	389				

Note : Annealing temperature 45℃ .

2.4 PAGE 结果的聚类分析(图3)

将结核分枝杆菌 H37Rv、偶然分枝杆菌、金色葡萄球菌等不同类型菌株的 16S~23S

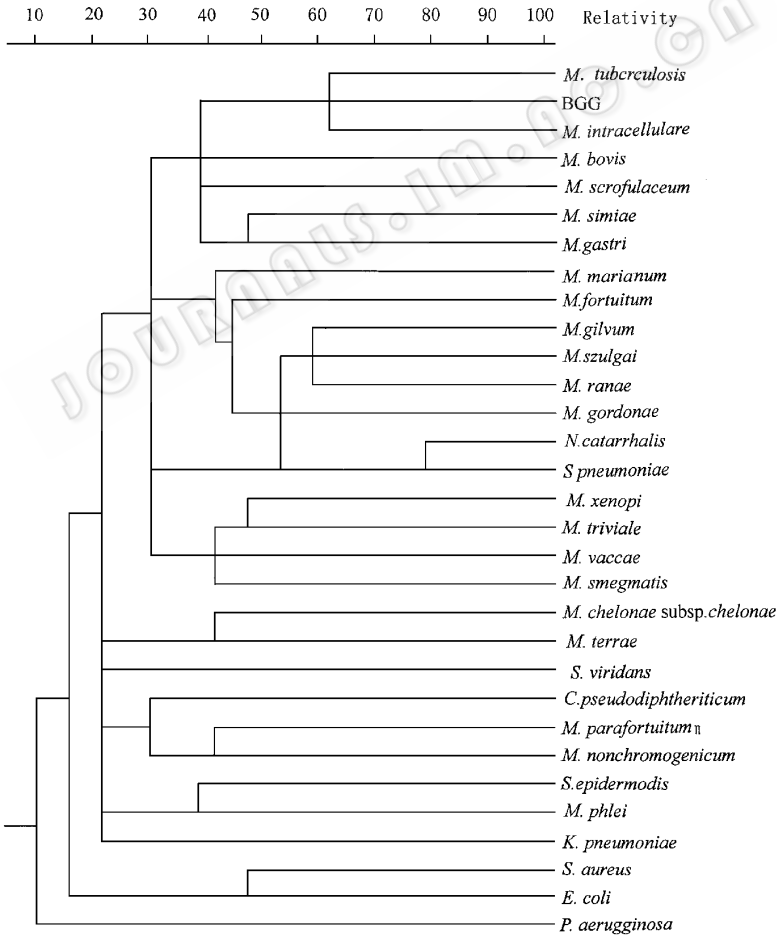


图3 分枝杆菌 16S~23S rDNA 间隔区 PCR 扩增产物指纹图谱分析聚类树状图

Fig.3 The clustering of the products of 16S~23S DNA spacer in *Mycobacterium* by PCR amplification.

rDNA 间隔区序列 PCR 扩增产物 PAGE 重复试验 5 次,分别算出各条带的分子量。挑选出几条主要区带根据公式  $CV = S/X$  计算出变异系数分别为 4%、2%、3%、2%、2%。求出平均变异系数为 2.67%。利用变异系数求出各区带分子量变化范围。利用相似性系数计算公式  $SW = (2 \times W) / (a + b)$ ,用不同的聚类方法对数据进行聚类(图 3)。虽然不同处理方式和聚类方法所得的结果稍有差异,但分枝杆菌菌株间相似性系数均小于 70%,且绝大部分分枝杆菌间相似性系数小于 50%,可鉴定分枝杆菌到种的水平。

### 3 结论

由于 PCR 技术受较多因素的影响,我们在对分枝杆菌 16S~23S rDNA 间隔区序列进行 PCR 扩增时,针对这一序列的特点,对有关实验条件进行比较研究。发现引物浓度  $2\text{pmol}/\mu\text{L}$  扩增效果较好。温度是影响 PCR 敏感性和特异性的重要因素。由于我们所用引物较短,且不是分枝杆菌属所特有,所以希望通过提高退火温度来提高特异性。随着温度的升高,扩增的敏感性明显降低,退火温度  $45^\circ\text{C}$ ,敏感性为  $500\text{fg}/\mu\text{L}$ , $50^\circ\text{C}$  敏感性为  $5\text{pg}/\mu\text{L}$ 。22 种分枝杆菌和 9 种非分枝杆菌在两种退火温度下扩增的结果不同,退火温度  $50^\circ\text{C}$  时扩增阳性率较低,为 53%,而  $45^\circ\text{C}$  情况下则受试细菌全部扩增阳性。

据文献 [7] 报道,缓慢生长分枝杆菌只能扩增出一条条带,分子量在 325~370bp 之间,迅速生长分枝杆菌能扩增出 1~2 条分子量在 420~520bp 之间的片段。从我们的结果来看,总体说来扩增片段分子量集中在 300~600bp,多数被试迅速生长分枝杆菌和非分枝杆菌扩增条带多,分子量较大,缓慢生长分枝杆菌扩增带较少,分子量较少。与国外报道稍有差别,可能与判别标准有关。

同一扩增产物聚丙烯酰胺凝胶电泳所得条带比琼脂糖凝胶电泳多,信息量大。对不同种细菌条带数及每一条带的分子量进行聚类分析,只有 BCG 和结核分枝杆菌 H37Rv 及胞内分枝杆菌之间、耻垢分枝杆菌、牛分枝杆菌和次要分枝杆菌之间、卡他微球菌和肺炎球菌之间相似性系数较高,其他各菌之间的相似性系数均小于 50%,可以鉴定到种。

缓慢生长分枝杆菌的纯培养所需时间长,进行菌种分类所需要的各种常规生化实验有的操作繁杂,或敏感性低、特异性差、耗时长的缺点。DNA 探针杂交只能鉴定部分分枝杆菌,枝菌酸的气相色谱能鉴定 70% 的分枝杆菌。而 16S~23S rDNA 间隔区序列基本上能鉴定被试的分枝杆菌标准株,对分枝杆菌临床分离株的试验表明 [8]:被试的分枝杆菌之间 16S~23S rDNA 间隔区序列大都有区别,而同种分枝杆菌各临床分离株 16S~23S rDNA 间隔区序列扩增片段完全相同,可用于临床分离株的鉴定。这一方法耗时少,敏感性高,是鉴定分枝杆菌的一种快速有效的方法。但其研究还刚刚起步,需要不断的改进、完善操作方法和试验条件,以便为分枝杆菌的分类鉴定提供依据。

### 参 考 文 献

- [1] Kohne D E. *Adv Exp Med Biol*, 1990, **263**: 11~35.
- [2] Bulter W R, Kilburn J O. *J Clin Microbiol*, 1989, **16**: 50~53.
- [3] Bulter W R, Jost K C, Kilburn J O. *J Clin Microbiol*, 1991, **29**: 2468~2472.
- [4] Boris B, Till R, Thomas F, et al. *J Clin Microbiol*, 1990, **28**: 1751~1759.
- [5] Vicent A S, Jeremy L G, Barbara A B, et al. *中国医学微生物学杂志*, 1999, **33**: 49~53. <http://journals.im.ac.cn>

[ 6 ] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T ( 全冬雁等译 ). 分子克隆实验指南 . 北京 : 科学出版社 , 1995 . 305 .  
[ 7 ] Lappayowichit P , Rientnong S , Rientnong D , et al . *Tubercle and Lung disease* , 1996 , 77 : 257 ~ 263 .  
[ 8 ] 张灵霞 , 庄玉辉 , 何秀云 , 等 . 中国防痨杂志 , 1998 , 20 ( 2 ) : 134 ~ 136 .

STUDIES ON APPLICATION FOR CLASSIFICATION AND IDENTIFICATION  
IN MYCOBACTERIUM BY ANALYSIS OF PCR AMPLIFICATION OF  
16S~23S RIBOSOMAL DNA SPACER SEQUENCES

Zhang Lingxia Zhuang Yuhui He Xiuyun Zhang Xiaogang Li Guoli  
( Tuberculosis Research Laboratory , 309 Hospital of PLA , Beijing 100091 )

**Abstract :** The 16S-23S ribosomal DNA spacer sequence of *mycobacterium* were amplified by PCR. The products were visualized by PAGE , and evaluate the possibility for classification and identification of mycobacterium at gene level. The sensitivity of PCR in annealing temperature 45℃ was 500fg/μL , whereas 50℃ was 5pg/μL. The results showed that : the amplified bands ranging from 300 to 600bp , most of rapid-growing *Mycobacterium* and *Non-mycobacterium* tested have more bands and the bands molecular weights were larger than slow-growing *Mycobacterium* . The relativity of mycobacterium < 70 % , most of them < 50 % . This experimental method might be rapid and effective for differentiation of *Mycobacterium* at species level.

**Key words :** *Mycobacterium* , PCR , Clustering , Classification and identification

重 要 声 明

为适应我国信息化建设需要 , 扩大作者学术交流渠道 , 本刊已加入《中国学术期刊( 光盘版 )》和“中国期刊网” 。如作者不同意将文章编入该数据库 , 请在来稿时声明 , 本刊将做适当处理。

从 2000 年开始 , 凡被本刊录用的稿件 , 编辑部将及时发出录用通知 , 对未被录用的稿件 , 将及时函告 , 并说明原因 , 稿件一律不退 , 请作者自留底稿。

《微生物学报》编辑部