

# 通过特异 PCR 扩增和 16S rDNA 序列分析检测动弯杆菌

何 亮<sup>1,2</sup> 陈 群<sup>2</sup> 曾忠铭<sup>3</sup> 刘志恒<sup>1</sup> 黄 英<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 中国科学院微生物研究所 北京 100080) (<sup>2</sup> 广东医学院微生物学教研室 湛江 524023)

(<sup>3</sup> 深圳南山医院微生态实验室 深圳 518000)

**摘 要** 细菌性阴道病(Bacterial Vaginosis, BV)是由于细菌过度生长所致阴道微生态非正常改变,从而导致的一类多微生物病(Polymicrobial Diseases)。动弯杆菌(*Mobiluncus* sp.)与 BV 发生有密切关系,但该菌为厌氧菌,营养要求苛刻,很难进行纯培养,国内鲜有研究报道。本文先对 BV 动物模型恒河猴阴道分泌物进行厌氧菌混合培养,抽提混合物染色体 DNA,之后设计了一对动弯杆菌 16S rRNA 基因的特异性引物,用 PCR 的方法扩增出了特异片段。通过对扩增产物进行测序分析,确定检测出的为动弯杆菌,并且与羞怯动弯杆菌极为相似。

**关键词** 混合培养 特异性引物 16S rRNA 基因 动弯杆菌

中图分类号:Q387 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2005)01-0027-04

由于 16S rRNA 基因分子结构上的高度保守性、分布的普遍性及其所含的大量信息,使 16S rRNA 基因成为了一个较为理想的基因分类靶序列。1990 年,Relman 等人首次利用 16S rDNA 的序列构建了种特异性 PCR 引物,通过 PCR 扩增及对扩增片段进行 DNA 序列测定,鉴定了未知特性的细菌<sup>[1,2]</sup>。现已证明该方法在病毒学与细菌学分类鉴定上具有重要价值。

尽管早在 1895 年就有人在阴道分泌物中观察到厌氧、弯曲、有动力、Gram 染色不定的小杆菌,可直到 1913 年才由 Curtis 首次在实验室分离成功。1984 年 Spiegel 和 Roberts 才正式将它命名为动弯杆菌(*Mobiluncus* sp.)。在已建立的细菌分类学中<sup>[3]</sup>,动弯杆菌属属于放线菌目<sup>[4]</sup>,但是对于这一分类结果目前仍然存在争论<sup>[5]</sup>。80 年代,人们发现在细菌性阴道病(Bacterial Vaginosis, BV)患者阴道分泌物中,动弯杆菌的检出率高达 97%<sup>[6]</sup>而在健康妇女阴道分泌物中动弯杆菌检出率却相对低得多,于是人们逐渐认识到动弯杆菌与 BV 有密切关系<sup>[7,8]</sup>。虽然该菌很难培养,但分子生物学的发展为其检测与鉴定提供了可能。

本文报道用动弯杆菌特异引物 PCR 扩增检测 BV 动物模型恒河猴阴道分泌物中的动弯杆菌。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 标本来源** 恒河猴阴道分泌物标本 24 份,来

自中国科学院上海生命科学研究院动物中心。

**1.1.2 主要试剂和培养基**:cDNA、*Taq* DNA 聚合酶和 dNTP 为上海康洁实业有限公司产品;动弯杆菌特异性引物由上海申友生物技术有限责任公司合成;Gram 染液、斯氏肉汤购自生物梅里埃。

**1.1.3 主要仪器**:厌氧培养盒为生物梅里埃产品;HeMa-480 PCR 扩增仪由珠海生物工程公司生产;SCR-300 电泳仪由上海万达生物工程公司制造;TGL-16G 台式高速离心机为上海手术器械厂产品;Tanan 天能凝胶图像处理系统。

### 1.2 BV 的诊断方法

**1.2.1 取样和诊断**:取阴道分泌物标本涂片 Gram 染色镜检,按 Nugent 标准诊断 BV。

Nugent 评分标准<sup>[9]</sup>:根据每个油镜视野细菌数量的多少,分别用 0~4+ 来表示(0,未见细菌;1+,少于一种细菌;2+,1~4 种细菌;3+,5~30 种细菌;4+,30 种以上细菌)。之后,根据表 1,把所得结果换算为积分(0~10 分)。BV 的诊断标准为  $\geq 7$  分;

表 1 阴道分泌物染色涂片积分系统

Table 1 Scoring system (0~10) for Gram stained vaginal smears			
Score	Lactobacillus Morphotypes	Gardnerella and Bacteroides Morphotypes	Curved Gram-Variable Rods
		0	0
1	3+	1+	1+ or 2+
2	2+	2+	3+ or 4+
3	1+	3+	
4	0	4+	

Total score = lactobacilli + *G. vaginalis* and *Bacteroides* sp. + curved rods

\* 通讯作者。Tel/Fax 86-10-62553628 E-mail huangy@im.ac.cn

作者简介:何 亮(1974-)男,云南昆明人,实习研究员,主要从事微生物系统发育学及医学微生物学生态学研究。E-mail lianghe@mail.im.ac.cn

收稿日期:2004-05-19,修回日期:2004-11-02

积分在 4~6 分为临界范围 积分在 0~3 分为正常。

1.2.2 动弯杆菌混合培养 取恒河猴阴道分泌物于斯氏肉汤置厌氧培养盒厌氧培养 48~72h。

### 1.3 PCR 扩增

1.3.1 制备核酸模板 采用煮沸法提取 DNA :取斯氏肉汤培养液 20μL ,12000r/min 离心 2min 弃去上清液 ,加 80μL STE 裂解液 ( 0.1mol/L NaCl , 1mmol/L EDTA ,10mmol/L Tris-HCL )混匀 ;100℃煮沸 5~10min ,10000r/min 离心 2min ,取上清液直接用于 PCR 扩增。

1.3.2PCR 动弯杆菌特异性引物设计如下 :MOB-S :5'-GTTGTGAACTCCTTTTCTCC-3' (  $T_m = 60$  ) ;MOB-AS :5'-CGCAGAAACACAGGATAGCA-3' (  $T_m = 60$  )。由上海申友生物技术有限责任公司合成。

PCR 扩增在严格的条件下进行 :隔离的操作区 ,分装的试剂 ,严格的实验操作 ,一次性吸头的使用及阴性对照的设置 ( 大肠埃希菌 ATCC 25922 )。扩增体系 ( 25μL ) :去离子水 18μL ,10 × PCR 缓冲液 ( 含  $Mg^{2+}$  ) 2.5μL , dNTP ( 25μmol/L ) 0.1μL , MOB-S ( 25μmol/L ) 0.2μL , MOB-AS ( 25μmol/L ) 0.2μL , *Taq* DNA 聚合酶 1μL ( U/μL ) ,DNA 模板 3μL。PCR 扩增条件 94℃ 5min 94℃ 40S 55℃ 40S 72℃ 90S 35 个循环 72℃ 5min。琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

### 1.4 PCR 产物的 DNA 序列测定

PCR 产物由上海生工工程公司测序 ,测序结果在国际生物技术信息中心 ( NCBI ) GenBank 数据库 ( <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> ) 中利用 BLASTN 程序比对。

## 2 结果

### 2.1 阴道分泌物涂片染色镜检

在 24 份标本中 ,Nugent 评分  $\geq 7$  分者共 21 例 ,另 3 例分别为 5 分、5 分和 6 分。对 24 份猴阴道分泌物直接涂片 ,Gram 染色镜检 ,在 18 份标本中检出 Gram 染色阴性或不定、细长、弯曲的杆菌 ( 图 1 箭头所示 ) 均在 Nugent 评分  $\geq 7$  分者中发现。

### 2.2 特异性 PCR 扩增

对 24 份恒河猴阴道分泌物标本分别进行混合厌氧培养、染色体 DNA 抽提及利用动弯杆菌特异性引物的 PCR 扩增 经琼脂糖凝胶电泳结果显示其中 20 份标本在 400bp 附近有特异性扩增条带 ( 电泳图未给出 ,18 份镜检出动弯杆菌的标本均有特异性扩增条带 ) 均为 Nugent 评分  $\geq 7$  分者。随机选择其中 3 份标本再次用混合 DNA 模板进行 PCR 扩增 ,琼脂

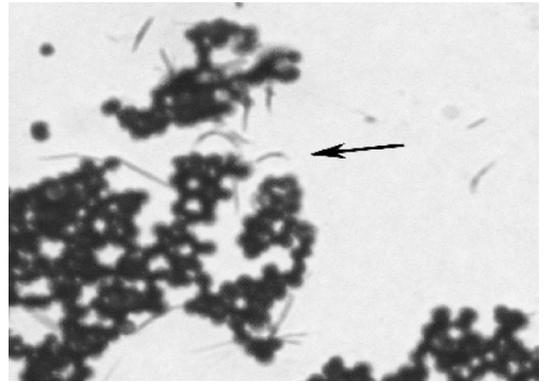


图 1 动弯杆菌 ( 箭头所示 ) 光学显微镜形态 ( 100 × )

Fig.1 Morphology of strain *Mobiluncus* sp. ( pointed by the arrow ) under the light microscopy ( 100 × )

糖凝胶电泳 ,紫外灯下可观察到在 404bp 至 495bp 间一条清晰的条带 ( 图 2 )。

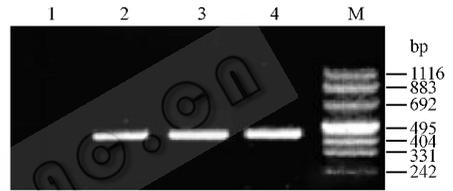


图 2 动弯杆菌特异性引物 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified by using *Mobiluncus*-specified primers.

1. *E. coli* negative control ; 2~4. Sample 1~3 ; M. Marker.

### 2.3 DNA 测序及序列分析

3 份 PCR 产物送上海生工工程公司测序 ,得到良好的测序结果。DNA 序列经过与 GenBank 数据库比对 ( 图 3 ) ,可见它们均与羞怯动弯杆菌 ( *Mobiluncus*

```

QUERY: 1 GTTCCCAAGCCTTAAAGCTGGACTAGCAGGGTATCTAATCTTFTGGCTCCCAAGCGCTT 59
SUBCT: 795 GTTCCCAACGTTTAAAGCTGGACTAGCAGGGTATCTAATCTTFTGGCTCCCAAGCGCTT 734
QUERY: 60 TCGCTCTCAGCGTCAAGTAAACAGCCAGTGAACCTGCTCCGCTATCGGTTGTTCTCTCTGA 119
SUBCT: 733 TCGCTCTCAGCGGTCAGTAAGCGCCAGTGAACCTGCTCCGCTATCGGTTGTTCTCTCTGA 674
QUERY: 120 TATCTGGCGATCCACCGGTACACAGGAATTCAGTCAACCCCTAAGCCACTCAAGCCCG 179
SUBCT: 673 TATCTGGCGATTCACCGGTACACAGGAATTCAGTCAACCCCTAAGCCACTCAAGCCCG 614
QUERY: 180 CCXHTACCACCGCAAAOCCAACAGHTTAAAGCTGCTGCTTCAGCAGACAGCAGCAGCAGC 219
SUBCT: 613 CCXHTACCACCGCAAAOCCAACAGHTTAAAGCTGCTGCTTCAGCAGACAGCAGCAGCAGC 254
QUERY: 240 AACTACGAGCTCTTTAGCCGCAATAAATCCGGACAACGCTCCGCCCTACGTTATACCGC 299
SUBCT: 533 AACTACGAGCTCTTTAGCCGCAATAAATCCGGACAACGCTCCGCCCTACGTTATACCGC 491
QUERY: 300 GGTGGCTGGACGCTAGTATAGCCGGCCGCTTCCTCCCGCTACCAJCAACACACCCAAAAG 359
SUBCT: 495 GGTGGCTGGACGCTAGTATAGCCGGCCGCTTCCTCCCGCTACCAJCAACACACCCAAAAG 434
QUERY: 360 CATGCTTTTCAGCAGGAAAAAGGATTTACAACT391
SUBCT: 433 CATGCTTTTTCAGCAGGAAAAAGGATTTACAACT400

```

图 3 PCR 产物 3 测序结果与羞怯动弯杆菌 CCUG 20071<sup>T</sup> ( AJ318410.1/MMU318410 ) 16S rRNA 基因序列比对结果

Fig.3 Sequence alignment of PCR products NO. 3 with 16S rRNA gene of *Mobiluncus mulieris* CCUG 20071<sup>T</sup>

*mulieris* CCUG 20071<sup>T</sup>) 的 16S rRNA 基因高度相似。菌株 1 与羞怯动弯杆菌 CCUG 20071<sup>T</sup> 16S rRNA 基因位置在 403~792 片段序列相似性达到 100% ;菌株 2 与羞怯动弯杆菌 CCUG 20071<sup>T</sup> 16S rRNA 基因位置在 400~804 片段序列相似性达到 100% ;菌株 3 与羞怯动弯杆菌 CCUG 20071<sup>T</sup> 16S rRNA 基因位置在 400~793 片段序列相似性达到 99.2%。

### 3 讨论

动弯杆菌多分离自细菌性阴道病病人阴道分泌物,也有报道分离自乳腺脓肿液、脐脓肿液、血培养<sup>[10~13]</sup>及早产孕妇胎盘羊膜、绒毛膜羊膜炎患者<sup>[14]</sup>。在恒河猴阴道分泌物中检出该菌,国内还是首次报道。由于该菌很难纯培养,它的检测鉴定多依赖 Gram 染色及形态学特征<sup>[15]</sup>。

国外已有报道使用单克隆或多克隆抗体检测鉴定动弯杆菌(*Mobiluncus*)<sup>[16~19]</sup>。这类方法依赖动弯杆菌的基因表现型,而其基因表现型又受到生长条件的影响。由于动弯杆菌表现型的复杂性,目前利用血清学对其进行分类的方法仍未得到一致认同<sup>[20,21]</sup>。

16S rRNA 编码基因以多拷贝形式存在于所有细菌染色体基因组中,每个细菌约含 5~10 个拷贝,这使得对该基因的检测具有敏感性,其内部结构由可变区和保守区组成。保守区为所有细菌所共有,细菌间无差别;可变区在不同细菌之间存在有不同程度的差异,具有属或种的特异性,16S rRNA 编码基因的这些特点使之成为较理想的细菌基因分类的靶序列,逐渐成为细菌鉴别、分类的金标准。

动弯杆菌 16S rRNA 基因含有 3 个可变区,分别为 V3、V4 及 V9。由于动弯杆菌属于厌氧菌,生长所需营养条件较苛刻,不易进行纯培养,我们根据 Jane 等人的报道<sup>[22]</sup>,用其引物未能扩增出相应 PCR 产物,经与 GenBank 数据库比对发现其正相引物并非动弯杆菌特异性引物,故本试验利用 16S rRNA 基因可变区在不同细菌之间不同程度的差异而具有的属或种的特异性,重新设计了动弯杆菌特异引物,经过与 GenBank 数据库比对,我们发现 MOB-S:5'-GTTGTGAACCTCTTTTCTCC-3' 引物的 21 个碱基与动弯杆菌两个已知种(*Mobiluncus* ssp.) 的吻合率都达到 100% ;而除动弯杆菌属外,不同种属最多与该引物只有 18 个吻合的碱基,而且不同的碱基都出现在 3' 末端;另一条引物 MOB-AS:5'CGCAGAAACACA

GGATAGCA-3' 的 20 个碱基与动弯杆菌(*Mobiluncus* ssp.) 的吻合率也都达到 100% ;除动弯杆菌属外,不同种属最多与该引物吻合的碱基也只有 18 个,而不同的碱基除一例鼠 DNA 序列出现在 5' 端外也都出现在 3' 末端。

根据 Jane RS 与 Lisa FL 的报道,通过 PCR 扩增检测动弯杆菌的方法,灵敏度与特异性要比通过涂片 Gram 染色镜检或动弯杆菌纯培养的方法高。而且与动弯杆菌纯培养的方法相比较,利用 PCR 扩增检测动弯杆菌简便易行,可以在细菌浓度很低的情况下检测出阳性结果。通过实验,我们可以得出以下结论:用混合培养物的 DNA 作模板,利用动弯杆菌特异性引物进行 PCR 扩增,经琼脂糖凝胶电泳分析,可以检测动弯杆菌的存在,结合 DNA 测序分析,则可以进一步确定检测结果并推断所属的种。本实验表明 BV 动物模型恒河猴阴道分泌物中的动弯杆菌为单一的种。该方法避免了对培养条件苛刻的动弯杆菌进行纯培养,又通过特异性引物利用了 PCR 扩增的高度灵敏度与特异性。

BV 是一类多微生物疾病,它的发生主要是因为阴道内某一种或几种菌的过度生长打破了正常状态下以乳杆菌为主要菌群的阴道微生态平衡所致。动弯杆菌与 BV 发生关系密切,国内外陆续都有相关报道,可由于动弯杆菌营养要求苛刻,难于培养,目前相关的研究并不多,对于动弯杆菌是否可以导致 BV 或是否为 BV 的主要致病菌之一,一直没有可信服的结论。本实验结果也显示,通过 Nugent 标准诊断 24 份阴道分泌物标本中 21 份为 BV,另 3 份为临界范围,可通过 Gram 染色光学显微镜检查却只有 18 份标本检出动弯杆菌,通过 PCR 测序检测也只在 20 份标本中检出动弯杆菌,我们并不能就此得出动弯杆菌导致 BV 的结论。由于阴道微环境处于菌群与菌群,菌群与阴道上皮细胞的动态平衡,阴道内菌群的定量对研究 BV 发生提供了一种可行的途径。在即将启动的一项国家“十五”攻关课题中我们将利用实时荧光定量 PCR 方法进一步对 BV 发生进行研究。

致谢 感谢上海第二医科大学的卫蓓文老师、倪培华老师和洪秀华教授在实验中给予的指导与帮助,感谢中国科学院微生物研究所李炜博士的支持与帮助。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Relman D A ,Loutit J S ,Schmidt T M ,et al . Theagent of bacillary angiomatosis . *N Engl J Med* ,1990 **323** :1573 – 1580 .
- [ 2 ] Relman D A ,Schmidt T M ,MacDermott R P ,et al . Identification of the uncultured bacillus of Whipple 's disease . *N Engl J Med* ,1992 , **327** :293 – 301 .
- [ 3 ] Spiegel C A ,Roberts M . *Mobiluncus* gen. nov . , *Mobiluncus curtisii* subsp . *curtisii* sp. nov . , *Mobiluncus curtisii* subsp . *holmesii* subsp . nov . , and *Mobiluncus mulieris* sp. nov . , curved rods from the human vagina . *Int J Syst Bacteriol* ,1984 **34** :177 – 184 .
- [ 4 ] Lassnig C ,Dorsch M ,Wolters J ,et al . Phylogenetic evidence for the relationship between the genera *Mobiluncus* and *Actinomyces* . *FEMS Microbiol Lett* ,1989 **65** ( 1 – 2 ) :17 – 21 .
- [ 5 ] Garlind A , Pahlsson C , Forsum U . Phenotypic complexity in *Mobiluncus* . *APMIS* ,1989 **97** :38 – 42 .
- [ 6 ] Holst E . Reservoir of four organisms associated with bacterial vaginosis suggests lack of sexual transmission . *J Clin Microbiol* , 1990 **28** :2035 – 2039 .
- [ 7 ] Durieux R , Dublanchet A . Les “ Vibrions ” anaerobies des leucorrhées . I : Technique d ' isolement et sensibilité aux antibiotiques . *Med Malad Infect* ,1980 **10** :109 – 115 .
- [ 8 ] Hjelm E ,Hallen A ,Forsum U ,et al . Anaerobic curved rods in vaginitis . *Lancet* ,1981 **ii** :1353 – 1354 .
- [ 9 ] Nugent R P ,Krohn M A , Hiller S L . Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation . *J Clin Microbiol* ,1991 **29** ( 2 ) :297 – 301 .
- [ 10 ] Glupezynski Y ,Labbe M ,Crockaert F ,et al . Isolation of *Mobiluncus* in four cases of extragenital infections in adult women . *Eur J Clin Microbiol* ,1984 **3** :433 – 435 .
- [ 11 ] Weinbten M J ,Perinpanayagan R M ,Malnick H ,et al . *Mobiluncus* spp. pathogenic role in non-puerperal breast abscess . *J Clin Pathol* , 1986 **39** :342 – 343 .
- [ 12 ] Gomez-Garcés J L ,Balas D ,Merino M T ,et al . *Mobiluncus curtisii* bacteremia following septic abortion . *Clin Infect Dis* ,1994 **19** :1166 – 1167 .
- [ 13 ] Edmiston C E ,Krepel C J ,Walker A P . Recovery of *Mobiluncus curtisii* subspecies *holmesii* from missed non-puerperal breast abscess . *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* ,1989 **8** :315 – 316 .
- [ 14 ] Hillier S L ,Martius J ,Kiviat N ,et al . A case-control study of chorioamnionic infection and histologic chorioamnionitis in prematurity . *N Engl J Med* , 1988 , **319** :972 – 978 .
- [ 15 ] Spiegel C A . The genus *Mobiluncus curtisii* . In : Balows A , Truper H G . Prokaryotes . 2<sup>nd</sup> ed . New York :Springer-Verlag ,1992 :906 – 918 .
- [ 16 ] Fohn M J , Lukehart S A , Hillier S L . Production and characterization of monoclonal antibodies to *Mobiluncus* species . *J Clin Microbiol* ,1988 **26** :2598 – 2603 .
- [ 17 ] Moi H ,Schoenknecht F ,Tomqvist E ,et al . A serological study of anaerobic curved rods with rabbit hyperimmune antisera . In : Mardh P A , et al . Bacterial Vaginosis . Sweden : Almqvist and Wiksell International , 1984 :79 – 88 .
- [ 18 ] Pahlson C ,Hallen A ,Forsum U . Curved rods related to *Mobiluncus* phenotypes as defined by monoclonal antibodies . *Acta Path Microbiol Immunol Scand Sect . B* ,1986 **94** :117 – 125 .
- [ 19 ] Roberts M C , Baron E J , Finegold S M ,et al . Antigenic distinctiveness of *Mobiluncus curtisii* and *Mobiluncus mulieris* . *J Clin Microbiol* ,1985 , **21** :891 – 893 .
- [ 20 ] Garlind A , Pahlsson C , Forsum U . Phenotypic complexity in *Mobiluncus* . *APMIS* ,1989 **97** :38 – 42 .
- [ 21 ] Pahlson C ,Mattsson J G ,Larsson P g ,et al . Detection and identification of *Mobiluncus* species by direct filter hybridization with an oligonucleotide probe complementary to rRNA . *APMIS* ,1992 , **100** :655 – 662 .
- [ 22 ] Jane R S ,Lisa F L . Prevalence of *Mobiluncus* spp among women with and without Bacterial Vaginosis as detected by Polymerase . *Chain Reaction Sex Transm Dis* ,2001 April **28** ( 4 ) :195 – 199 .

### Detection of *Mobiluncus* species by special primer amplification and 16S DNA sequence analysis

HE Liang<sup>1,2</sup> CHEN Qun<sup>2</sup> ZENG Zhong-ming<sup>3</sup> LIU Zhi-heng<sup>1</sup> HUANG Ying<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Microbiology ,Chinese Academy of Sciences ,Beijing 100080 , China )

(<sup>2</sup> Department of Microbiology ,Guangdong Medical College ,Zhanjiang 524023 ,China )

(<sup>3</sup> Department of Microecology , Shenzhen Nanshang Hospital ,Shenzhen 518000 ,China )

**Abstract** : Bacterial Vaginosis ( BV ) , a microecological disease led by overgrowth of the vaginal bacteria , is one of the Polymicrobial Diseases . The close relationship between BV and *Mobiluncus* spp . was recognized gradually . But It is difficult to get the pure culture of this anaerobic bacterium because of its rigorous requirement for growth conditions . The vaginal discharge came from the BV animal model-Rhesus monkey was cultured in anaerobic environment . The 16S rRNA gene was amplified and sequenced using mobiluncus-specific primers . *Mobiluncus* spp , closely related to *Mobiluncus mulieris* , were detected by comparing with the 16S rRNA genes in the GenBank .

**Key words** : Mixed culture , Special primer , 16S rRNA gene , *Mobiluncus* species

\* Corresponding author . Tel/Fax 86-10-62553628 ;E-mail huangy@im.ac.cn

Received date : 05-19-2004