

新型 p1 基因型肺炎支原体分型方法的建立与应用

闫晓苏^{1,2} 赵飞^{2*} 张建中²

¹ 扬州大学生物科学与技术学院 扬州 225009

² 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所 传染病预防控制国家重点实验室 北京 102206

摘要: 【目的】针对肺炎支原体新型 p1 基因型 (V2c 型) 菌株检测工作的需要, 建立相应 PCR 检测方法并进行评价。【方法】针对新型 V2c 型肺炎支原体菌株 p1 基因变异区域序列设计特异性扩增引物, 建立对 V2c 型肺炎支原体菌株进行 PCR 检测的检测方法并用相关基因测序进行验证。使用所建立的巢式多重 PCR 对北京地区 2008-2011 年分离到的 214 株临床肺炎支原体进行分型分析。【结果】特异引物可有效检测出 V2c 菌株, 在其它型别菌株均无阳性扩增。214 株肺炎支原体临床分离株中 1 型菌株占 90.2% (193/214), V2a 型菌株占 0.9% (2/214), V2c 型菌株占 8.9% (19/214); 未检出 2 型菌株。【结论】针对 V2c 型肺炎支原体所建立的基于 p1 基因的 PCR 检测方法, 能有效区分以往方法无法检测出的新型 V2c 型肺炎支原体菌株, 对开展肺炎支原体流行病学调查和病原分析有重要意义。

关键词: 肺炎支原体, 基因分型, p1 基因, 变异型

中图分类号: Q814 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012)02-0262-06

肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*) 是引起儿童支气管肺炎、原发性非典型性肺炎, 及成人社区获得性肺炎的常见病原体之一^[1-2]。随着研究深入, 肺炎支原体检测技术、分型技术、耐药机理等方面研究在国内外迅速开展。目前肺炎支原体分型的主要方法有 PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism, RFLP)^[3-6]、巢式 PCR (nested-PCR) 扩增^[2,7]、脉冲场凝胶电泳 (pulse-field gel electrophoresis, PFGE)^[4]、随机扩增多态性 DNA 分析 (random amplified polymorphic DNA, RAPD)^[4] 和新近报道的多位点可变数目串联重复分析 (multiple-locus variable-number tandem-repeat

analysis, MLVA)^[8] 等。p1 基因是肺炎支原体研究最广泛的基因, 其大小约 4900 个碱基, 编码产物为 P1 黏附蛋白, 分子质量约为 170 kDa, 含有多个抗原决定簇, 是肺炎支原体黏附宿主的关键蛋白^[9-10]。p1 基因中含有两个重复序列区域: RepMP4 和 RepMP2/3, 这两段重复序列在肺炎支原体基因组上分别有 8 个和 10 个相似但不完全相同的拷贝^[11], 菌株自身或者菌株间重复序列发生同源重组会导致 p1 基因序列变化^[10,12]。p1 基因中 RepMP 区域核酸序列差异是目前肺炎支原体分型的重要依据之一^[12]。依据 p1 基因序列差异, 肺炎支原体分为 1 型和 2 型菌株^[10,13]。随着研究深入, 1999 年, Kenri

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——《传染病检测技术研究——传染病病原体诊断和组合检测技术 (2008ZX10004-002)》; 中国疾病预防控制中心传染病所支原体感染预防控制项目资助

* 通信作者。Tel/Fax: +86-10-58900754; E-mail: zfnversaydie@yahoo.com.cn

作者简介: 闫晓苏 (1990-), 女, 江苏人, 扬州大学在读本科生。

收稿日期: 2011-09-27; 修回日期: 2011-12-09

发现了 p1 基因序列变异的 2 型菌株 MP309 (V2a 型)^[10]; 2001 年, Dorigo-Zetsma 发现了 p1 基因序列变异的 1 型菌株 Mp4817 (V1 型)^[14]; 2006 年, Dumke 发现了 p1 基因序列变异的 2 型菌株 (V2b 型)^[15]。2008 年, Kenri 依据目前已报道的肺炎支原体 p1 基因序列, 建立起一种依赖于 p1 基因序列的巢式多重 PCR 分型方法^[7], 可有效检测 1 型、2 型、Variant 2 型 (V2a 型和 V2b 型) 肺炎支原体菌株, 成为目前最快速有效的肺炎支原体分型技术之一。2009 年, 本实验室通过测序发现新型 p1 基因型 (V2c 型) 肺炎支原体^[19], 其 p1 基因序列区别于以往报道的各种变异型菌株, 使用传统的 PCR-RFLP 方法^[3-6] 和 Kenri 报道的巢式多重 PCR 分型方法^[7] 均无法有效检测该变异型菌株。故本研究在 Kenri 报道的巢式多重 PCR 分型方法的基础上添加了特异性扩增引物, 以期达到检测 V2c 型肺炎支原体变异株的目的。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

核酸提取试剂盒为 QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN), PCR 扩增试剂使用 PrimeSTAR HS DNA Polymerase Kit (TAKARA), 琼脂糖为 Regular Agarose G-40 (BIOWEST) 产品, PCR 扩增使用 Labcycler Triple PCR 仪 (SensoQuest), 离心机为 Centrifuge 5415R 型 (Eppendorf) 离心机, 电泳仪为 JY-SPDT 型电泳仪 (北京君意东方电泳设备有限公司)。

1.2 肺炎支原体分离与检测

对 2008 - 2011 年间收集的 927 例临床呼吸道标本使用肺炎支原体选择性液体培养基 (OXOID 公司) 分离培养, 培养阳性菌株进行分纯培养。每株纯培养菌取 200 μL 液体培养物离心 10 min (12000 × g) 去上清, 沉淀使用 QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) 试剂盒提取核酸。所有菌株提取的核酸使用 real-time PCR 方法^[16] 进行肺炎支原体验证。

1.3 V2c 型菌特异性引物设计和特异性检测

使用 Vector NTI suite 6 软件对 V2c 型肺炎支原体 p1 基因与 NCBI 数据库中 1 型、2 型、V1 型、Variant 2 型菌株 p1 基因序列比对, 在 V2c 型菌株 p1 基因 (GenBank 号: JNO48891) 变异区域 (nt 1368-

1449) 设计特异性扩增引物 Pv2c: 5'-TGTATCAAACCCGGTTTGGGT-3'; 使用外引物 ADH1/ADH2 进行第一次 PCR 扩增, 扩增产物稀释 100 倍作为模板进行巢式 PCR, ADH4F 和 Pv2c 引物对 1 型、2 型、Variant 2 型和 V2c 型菌株检测 (表 1)。反应体系: 5 × PrimeSTAR Buffer 5 μL; dNTP Mixture, 2 μL; 引物各 0.5 μL; PrimeSTAR HS DNA Polymerase 0.25 μL; 模板 DNA 0.5 μL; 灭菌蒸馏水 16.25 μL。反应条件: 98°C, 预变性 2 min; 98°C, 15 s, 58°C, 15 s, 72°C, 1 min, 30 个循环; 72°C 延伸 3 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。

表 1 引物序列

Table 1 Sequence of primers

Primer	Sequence (5'→3')	Reference
ADH1	CTGCCTTGTCCTCAAGTCCACT	[3]
ADH2	AACCTTGTCGGGAAGAGCTG	[3]
ADH3	CGAGTTTGCTGCTAACCAGT	[3]
ADH4	CTTGACTGATACCTGTGCCG	[3]
ADH4F	GACCGCATCAACCACCTTTGCCATTACG	[7]
N1	CCCGGTGGTGAAGTATTTT	[7]
2N2C	TGCCTTGGTACCCGGACTTG	[7]
Pv2c	TGTATCAAACCCGGTTTGGGT	This study
MP2/3-F3	TGCACCAAGCCAACCTCCAG	[7]
R3-1	TGGAATCGGACCCACTTCG	[7]
R3-2	CGACCTGTGTTTGTGCCAC	[7]
R3-2V	CGGTATAGCTAATTTGTAC	[7]

1.4 肺炎支原体临床分离株分型检测

使用 Kenri^[7] 报道的方法对 927 例临床呼吸道标本中分离到的所有肺炎支原体分离株分型: 外引物 ADH1/ADH2 和 ADH3/ADH4 分别进行第一次 PCR 扩增, 扩增产物稀释 100 倍作为模板进行巢式 PCR, 引物 ADH4F、N1、2N2C 用于 RepMP4 区域分型扩增, 引物 Mp2/3-F3、R3-1、R3-2、R3-2V 用于 RepMP2/3 区域分型扩增 (表 1)。使用 PrimeSTAR Kit protocol (TAKARA), 98°C, 预变性 2 min; 98°C, 15 s, 55°C, 15 s, 72°C, 2 min, 30 个循环; 72°C 延伸 3 min。第二次 PCR 产物使用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分型分析。依据电泳结果将 Kenri 分型方法检测到的所有 Variant 2 型肺炎支原体菌株使用 1.2 方法扩增进行再次扩增, 检测 V2c 型肺炎支原体。

1.5 分型方法特异性验证

使用扩增引物 SeqP1-F (5'-ATGCACCAAACCAAAAAAAGTGCCT-3') 和 SeqP1-R (5'-CTAAGCGGTTTTTTTAGGTGTTGC-3')^[19] 对本

研究检测到的所有 V2c 型的临床肺炎支原体菌株进行 p1 基因扩增,扩增产物送华大基因公司测序和拼接,测序结果使用 Vector NTI suite 6 软件进行序列分析。

2 结果

2.1 肺炎支原体分离与检测

927 例临床呼吸道标本分离到肺炎支原体 214 株:其中 2008 年分离 61 株;2009 年 20 株;2010 年 64 株;2011 年 69 株。所有肺炎支原体菌株分纯培养后提取核酸 real-time PCR 检测均为阳性。

2.2 V2c 变异型菌株特异性检测

肺炎支原体核酸经 ADH1/ADH2 外引物进行第一次 PCR 扩增,产物稀释 100 倍后再经 ADH4F/Pv2c 引物巢式扩增,V2c 型菌株可扩增出 1030 bp 目的条带,其余报道的各型菌株均不能扩增出条带。此 PCR 反应有效区分 V2c 型菌株和其他型别菌株(1 型菌株 2 型菌株,Variant 2 型)(图 1)。

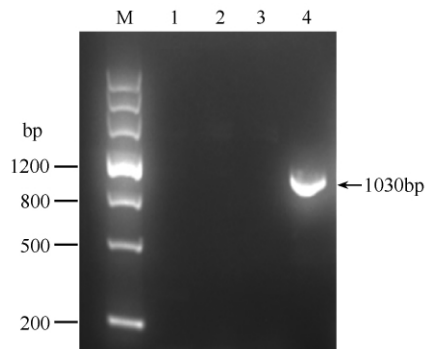


图 1 应用 ADH4F/Pv2c 内引物对各种型别肺炎支原体扩增结果

Fig. 1 PCR products of different genotype *M. pneumoniae* amplified with inner-primer ADH4F and Pv2c. M. DNA Marker III; 1. ATCC 29342 (type 1 strain); 2. ATCC 39505 (type 2 strain); 3. MpP028 (Variant 2a strain); 4. MpP033 (V2c strain).

2.3 菌株分型

214 株肺炎支原体临床分离株使用 Kenri 报道的分型方法,其中 1 型菌株占 90.2% (193/214), Variant 2 型菌株占 9.8% (21/214),未发现 2 型菌株。对检测到的 21 株 Variant 2 型菌株使用方法 1.2 分型后发现,其中 19 株是新型 V2c 型菌株,只

有 2 株为 Variant 2 型菌株。经实验室测序分析,2 株 Variant 2 型菌株属于 V2a 型(表 2 图 2)。

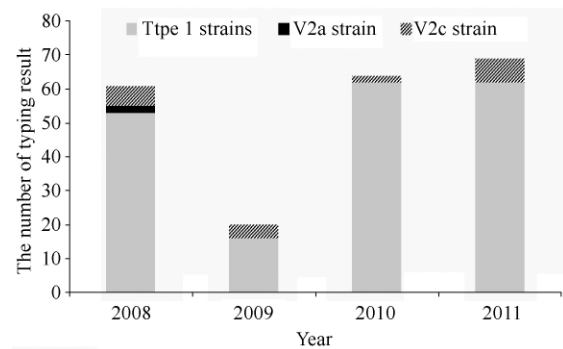


图 2 214 株肺炎支原体临床分离株分型柱状图

Fig. 2 Genotyping of the 214 *M. pneumoniae* isolates from 2008 to 2011.

表 2 214 株肺炎支原体临床分离株分型情况

Table 2 Genotyping of the 214 *M. pneumoniae* isolates from 2008 to 2011

Genotyping	Numbers of year				Total
	2008	2009	2010	2011	
Type 1 strains	53	16	62	62	193
Type 2 strains	0	0	0	0	0
Variant 2a strains	2	0	0	0	2
Variant 2c strains	6	4	2	7	19
Total	61	20	64	69	214

2.4 分型方法特异性鉴定

本研究检测的 19 株 V2c 临床肺炎支原体菌株的 p1 基因测序结果经过 Vector NTI suite 6 软件分析全部为新报道的 V2c 型肺炎支原体菌株。其中 6 株 V2c 型菌株 p1 基因序列已在 NCBI 数据库公布 (GenBank 号:JN048891-JN048896)。

3 讨论

肺炎支原体基因组大小约 816 kb,仅为大肠杆菌的 1/5 左右^[17],生物合成和代谢能力有限,缺乏部分代谢所需要的酶类,其生存所需要的营养主要从外界获得^[17]。但肺炎支原体基因组中大约有 8% 的 RepMP 重复序列^[11],如此高比例的重复序列说明其重要性。由于重复序列间可以发生同源重组,这就使肺炎支原体基因分型变得较为困难。肺炎支原体目前分型方法主要有依赖于 p1 基因的 PCR-RFLP、多重巢式 PCR、基因测序方法 和不依赖

于 p1 基因的 RAPD 和 PFGE 方法, 研究表明几种方法对于相同菌株的分型结果基本一致^[4-7]。但由于分型方法的局限性和肺炎支原体核酸序列同源重组复杂性, 尚未有一种分型技术能够区分所有型别的肺炎支原体。只有通过不断对肺炎支原体基因组学深入研究, 以期发现更多的新型基因型菌株, 完善现有分型方法和建立新分型方法。就目前研究数据来看, 无论是 1 型 2 型还是变异型菌株, 这些临床分离菌均存在致病性^[18], 型别的差异在肺炎支原体致病性上并未体现出差别。可见目前分型技术检测的不同型别肺炎支原体菌株与其致病力并无关联。

Kenri^[7]通过对日本 1976 - 2005 年分离到的肺炎支原体菌株分型研究, 发现每 10 年左右肺炎支原体就会发生一次菌型变化, 这种转换并非突然形成, 而是逐渐转变的。日本在 2003 年后, Variant 2 型菌株逐渐取代了 2 型菌株。由于方法的局限性, 该分型技术无法区分变异区域不在检测引物设计位点的新变异型菌株。本实验室 2009 年发现的 V2c 型肺炎支原体菌株^[19], 其变异区域不在上述分型引物区域, 故该方法无法将 Variant 2 型菌株与 V2c 型菌株区分。使用本研究提供的巢式多重 PCR 方法能有效区分 Variant 2 型和 V2c 型菌株, 有助于对已检测型别的肺炎支原体重新认识。本研究中的 21 株 Variant 2 型菌株使用 Pv2c 引物重新分型, 19 株为 V2c 型变异株, 只有 2 株为真正 Variant 2 型菌株。日本与中国同处东亚地区, 由此可见 Kenri 报道的 18 株 Variant 2 型菌株中有可能存在 V2c 菌株。通过对 2008 年至今分离的到的 214 株肺炎支原体分型发现, 北京地区肺炎支原体以 1 型为主 (90.2%), 其余基本为 V2c 型菌株。依据 Kenri 研究结果, 北京地区肺炎支原体 1 型菌株已经持续 4 年为主要型别, 接下来几年间北京地区流行的肺炎支原体有型别转换的可能, 转型的结果可能会导致肺炎支原体感染的暴发流行^[6-9]。分型监测对当地肺炎支原体暴发有一定的预警作用。

本研究建立了 V2c 型肺炎支原体检测方法, 完善了分型技术, 有利于重新了解目前肺炎支原体型别状况, 对开展肺炎支原体流行病学调查和病原分析有重要意义。通过对 2008 年至今分离的 214 株肺炎支原体分型研究, 表明近几年北京地区肺炎支

原体以 1 型菌株为主, 近期存在别转换进而引起流行的可能。

参考文献

- [1] Ursi D, Ieven M, Van Bever H, Quint W, Niesters HG, Goossens H. Typing of *Mycoplasma pneumoniae* by PCR-mediated DNA fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology*, 1994, 32(11): 2873-2875.
- [2] Kong F, Gordon S, Gilbert GL. Rapid-cycle PCR for detection and typing of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38(11): 4256-4259.
- [3] Sasaki T, Kenri T, Okazaki T, Iseki M, Yamashita R, Shintani M, Sasaki Y, Yayoshi M. Epidemiological study of *Mycoplasma pneumoniae* infections in Japan based on PCR-restriction fragment length polymorphism of the P1 cytoadhesin gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 1996, 34(2): 447-449.
- [4] Cousin-Allery A, Charron A, De Barbeyrac B, Fremy G, Skovjensen J, Renaudin H, Bébéar C. Molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae* strains by PCR-based methods and pulsed-field gel electrophoresis. Application to French and Danish isolates. *Epidemiology and Infection*, 2000, 124: 103-111.
- [5] Dorigo-Zetsma JW, Dankert J, Zaai SA. Genotyping of *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates reveals eight P1 subtypes within two genomic groups. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38(3): 965-970.
- [6] Dumke R, Catrein I, Pirkl E, Herrmann R, Jacobs E. Subtyping of *Mycoplasma pneumoniae* isolates based on extended genome sequencing and on expression profiles. *Journal of Medical Microbiology*, 2003, 292: 513-525.
- [7] Kenri T, Okazaki N, Yamazaki T, Narite M, Izumikawa K, Matsuoka M, Suzuki S, Horino A, Sasaki T. Genotyping analysis of *Mycoplasma pneumoniae* clinical strains in Japan between 1995 and 2005: type shift phenomenon of *M. pneumoniae* clinical strains. *Journal of Medical Microbiology*, 2008, 57(4): 469-475.
- [8] Dégrange S, Cazanave C, Charron A, Renaudin H, Bébéar C, Bébéar CM. Development of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for molecular

- typing of *Mycoplasma pneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009, 47(4): 914-923.
- [9] Jacobs E, Vonski M, Oberle K, Opitz O, Pietsch K. Are outbreaks and sporadic respiratory infections by *Mycoplasma pneumoniae* due to two distinct subtypes? *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 1996, 15(1): 38-44.
- [10] Kenri T, Taniguchi R, Sasaki Y, Okazaki N, Narita M, Izumikawa K, Umetsu M, Sasaki T. Identification of a new variable sequence in the P1 cytoadhesin gene of *Mycoplasma pneumoniae*: Evidence for the generation of antigenic variation by DNA recombination between repetitive sequences. *Infection and Immunity*, 1999, 67(9): 4557-4562.
- [11] Himmelreich R, Hilbert H, Plagens H, Pirkl E, Li BC, Herrmann R. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Research*, 1996, 24(22): 4420-4449.
- [12] Su CJ, Dallo SF, Chaxoya A, Baseman BJ. Possible origin of sequence divergence in the P1 cytoadhesin gene of *Mycoplasma pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 1993, 61(3): 816-822.
- [13] Su CJ, Chavoya A, Dallo SF, Baseman JB. Sequence Divergency of the Cytadhesin Gene of *Mycoplasma pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 1990, 58(8): 2669-2674.
- [14] Dorigo-Zetsma JW, Wilbrink B, Dankert J, Zaaij SA. *Mycoplasma pneumoniae* P1 type 1- and type 2-specific sequences within the P1 cytoadhesin gene of individual strains. *Infection and Immunity*, 2001, 69(9): 5612-5618.
- [15] Dumke R, Luck PC, Noppen C, Schaefer C, Baum H, Marre R, Jacobs E. Culture-independent molecular subtyping of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, 44(7): 2567-2570.
- [16] Winchell JM, Thurman KA, Mitchell SL, Lanier Thacker W, Fields BS. Evaluation of three real-time PCR assays for detection of *Mycoplasma pneumoniae* in an outbreak investigation. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, 46(9): 3116-3118.
- [17] Waites KB, Talkington DF. *Mycoplasma pneumoniae* and Its Role as a Human Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 2004, 17(4): 697-728.
- [18] Cao B, Zhao CJ, Yin YD, Zhao F, Song SF, Bai L, Zhang JZ, Liu YM, Zhang YY, Wang H, Wang C. High prevalence of macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae* isolates from adult and adolescent patients with respiratory tract infection in China. *Clinical Infectious Diseases*, 2010, 51: 189-194.
- [19] Zhao F, Cao B, Li J, Song SF, Tao XX, Yin YD, He LH, Zhang JZ. Sequence analysis of the p1 adhesin gene of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical isolates collected in Beijing in 2008 to 2009. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011, 49: 3000-3003.

Development and application of a new p1-based genotyping method for *Mycoplasma pneumoniae*

Xiaosu Yan^{1 2}, Fei Zhao^{2*}, Jianzhong Zhang²

¹ College of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou University of Jiangsu, Yangzhou 225009, China

² National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, Beijing 102206, China

Abstract: [Objective] To develop a PCR method for detecting the newly reported genotype (variant 2c, V2c) of *Mycoplasma pneumoniae* strains. [Methods] Specific primer was designed for detecting the V2c type based on the variant region of V2c strain p1 gene. A nested multiple PCR method for V2c strain detection was set up and confirmed by related gene sequencing. In total 214 clinical strains isolated from Beijing between 2008 and 2011 were analyzed by this typing method. [Results] Nest multiple PCR typing method is effective to detect the V2c strain. Of the 214 *M. pneumoniae* strains 90.2% (193/214) were type 1, 0.9% (2/214) were variant 2a, and 8.9% (19/214) were V2c. No type 2 was detected. [Conclusion] This typing method is effective to distinguish the V2c strains from other variant *M. pneumoniae* strains, and important for the epidemiological study of *Mycoplasma pneumoniae* infection.

Keywords: *Mycoplasma pneumoniae*, genotyping, p1 gene, variant

(本文责编:王晋芳)

Supported by the "Major Infectious Diseases such as AIDS and Viral Hepatitis Prevention and Control" Technology Major Projects (2008ZX10004-002) and by the *Mycoplasma* Prevention and Control Project of National Institute for Communicable Disease Control and Prevention

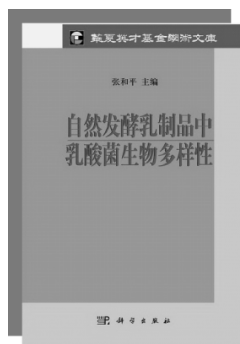
* Corresponding author. Tel/Fax: 86-40-58900754; Email: zfneversaydie@yahoo.com.cn

Received: 27 September 2011/Revised: 9 December 2011

科学出版社新书推介(2011年12月 2012年1月)

自然发酵乳制品中乳酸菌生物多样性

张和平 著; 978-7-03-032916-5/Q · 2814; 定价: 88; 开本: B5



内容简介: 本书的读者对象主要为乳酸菌相关产业、乳品工业、益生菌领域的本科生、研究生及广大科研工作者和研究技术人员。

本书的内容由内蒙古农业大学“乳品生物技术与工程”教育部重点实验室十多年的研究成果和国际上乳酸菌方面最新的研究前沿技术汇编而成。全书以内蒙古农业大学乳酸菌菌种资源库 3388 株乳酸菌的分离、鉴定为基础数据, 结合近几年微生物和分子生物学领域出现的新技术和新方法在乳酸菌研究中的应用, 以新颖的研究思路和方法, 系统阐述了中国少数民族地区自然发酵乳制品(酸马奶、酸牛奶、酸羊奶、酸驼奶、酸牦牛奶等)和其他自然发酵食品(酸粥、酸面团、发酵泡菜等)中乳酸菌的生物多样性。

获取更多图书信息请您关注

<http://books.lifescience.com.cn/>

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书

联系人: 科学出版社科学销售中心 周文宇; 电话: 010-64017301; E-mail: zhouwenyu@mail.sciencep.com

网上订购: <http://shop.sciencepress.cn/>; 卓越网; 当当网

联系我们: 010-64012501; email: lifescience@mail.sciencep.com

更多精彩图书请登陆网站, 欢迎致电索要书目