

采用通用引物 PCR 配合 SSCP 及 RFLP 技术快速检测常见病原菌

罗雯 万雅各 彭宣宪 王三英

【摘要】目的 建立一种快速检测病原菌的方法以利于临床诊断。方法 选取 10 种具有代表性的病原菌,采用通用引物 PCR (UPPCR) 对其 16S rRNA 基因进行扩增,并对 PCR 产物进行限制性酶切片段长度多态性分析 (RFLP) 和单链构象多态性分析 (SSCP)。结果 RFLP 电泳图谱呈现多态性,但半数菌的图谱两两相同或相似;SSCP 电泳图谱各异,可以相互区分。结论 UPPCR-SSCP 技术能快速简便地检测病原菌。

【关键词】病原菌;聚合酶链反应;限制性酶切片段长度多态性;单链构象多态性

Rapid identification of pathogens using UPPCR with SSCP and RFLP analysis LUO Wen, WAN Yage, PENG Xuanxian, et al. The School of Life Sciences, The Key Laboratory of Education Ministry for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, P. R. China

Corresponding author: PENG Xuanxian, E-mail: wangpeng@xmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To establish a method for the identification of pathogens for fast diagnosis. **Methods** By universal primer polymerase chain reaction (UPPCR), the 16S ribosomal RNA genes of ten representative pathogens were amplified. Then the PCR products were analyzed by single strand configuration polymorphism (SSCP) and restrict fragment length polymorphism (RFLP). **Results** RFLP map expressed polymorphism, but there were either the same or similar figures between two or among three pathogens in half of test strains. However, there were significantly different bands in all of the pathogens by SSCP. **Conclusion** UPPCR-SSCP analysis can rapidly and conveniently identify bacterial pathogens.

【Subject words】 Pathogens; PCR; RFLP; SSCP

细菌性疾病长期以来危害着人类健康,而有效治疗细菌性感染的首要前提就是快速地对病原菌作出准确诊断。但是,检测病原菌的常规方法所需时间较长,往往延误临床正确的诊断和治疗,对生长缓慢或难以培养的病原菌则更加困难。随着分子生物学技术应用于临床,人们已能用快速敏感的 PCR 检测病原菌^[1,2]。常规 PCR 技术必需采用针对特定病原菌的特异性引物,由于临床病原菌往往不明,需用多种不同引物和扩增程序进行 PCR 扩增才可能奏效,故亦难实现快速诊断。本研究采用细菌共有的 16S rRNA 基因的保守区引物,对 10 种病原菌同时进行 PCR 扩增,随后对 PCR 产物进行 RFLP 和 SSCP 分析,建立了通用引物 (universal primer) PCR-RFLP (UP-

PCR-RFLP) 和通用引物-SSCP (UPPCR-SSCP) 技术,旨在达到快速鉴别病原菌的目的。

材料与方法

菌种:金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、乙型溶血性链球菌 (*-Hemolytic streptococcus*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、副溶血性弧菌 (*Vibrio parahemolyticus*)、普通变形杆菌 (*Proteus vulgaris*)、大肠埃希菌 (*Escherichia coli*)、痢疾志贺菌 (*Shigella dysenteriae*)、宋内志贺菌 (*Shigella sonnei*)、福氏志贺菌 (*Shigella flexneri*)、鲍氏志贺菌 (*Shigella boydii*)。除金黄色葡萄球菌、乙型溶血性链球菌、普通变形杆菌和大肠埃希菌为本实验室保存菌种外,其它菌种均购自江西省卫生防疫站。

引物:引物设计参考文献 [3] 进行,由 Sangon 公司合成,经鉴定为电泳纯。引物序列:5'-AAACTCAAAGGAATTGACGG,5'-GACGGCCGGTGTGTACAA。

细菌培养:采用普通肉汤培养基。培养基成分为 1% 蛋白胨,0.5% 牛肉膏,0.5% NaCl,0.2%

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (39770585); IFS 基金资助项目 (A/2338-2)

作者单位:361005 厦门大学生命科学院,细胞生物学和肿瘤细胞工程教育部重点实验室(彭宣宪,王三英);南昌大学生物科学与食品工程学院[罗雯(研究生)];南昌大学医院(万雅各)

通信作者:彭宣宪(E-mail: wangpeng@xmu.edu.cn)

KH₂PO₄ pH7.2~7.4, 121 灭菌 20 min, 接种后于 37 摇床培养 18~24 h。

模板制备:采用酚-氯仿抽提法提纯细菌 DNA, 作为模板。简述如下:取 1ml 菌液, 3 500r/min 离心收集菌体, 加入 200μl TE 缓冲液 (pH8.0) 制成菌悬液, 再加入 120μl 10% SDS 轻轻混匀, 置 60 水浴 30 min。随后, 加入等体积酚-氯仿 (1:1), 轻轻混匀, 12 000r/min 离心 10 min 后, 取上清, 加入 0.25 体积无水乙醇和 0.1 体积 5mol/L 醋酸钾, 12 000r/min 离心 10 min, 取上清, 加入 2 体积冰冷的无水乙醇, 于 -20 静置 30 min 后, 12 000r/min 离心 10 min, 去上清, 沉淀用 70% 乙醇洗 2 次, 无水乙醇洗 1 次, 干燥后, 加入适量 TE (pH8.0) 溶解。

PCR 扩增:采用 25μl 体系进行, 10 × buffer 2.5μl, MgCl₂ (25mmol/L) 3μl, 混合 dNTP (各 10mmol/L) 0.5μl, 引物 (74μmol/L) 各 0.085μl, Taq 酶 (5U/μl, MBI 产品) 0.1μl, 模板 1μl, 双蒸水补足体积。PCR 反应程序: 94 预变性 5 min, 然后 94 变性 1 min, 60 复性 1 min, 70 延伸 1 min, 共循环 40 次。

RFLP 分析:取限制性内切酶 Hae (Ferments 产品) 进行实验。采用 20μl 体系: 双蒸水 9μl, 10 × buffer 2μl, Hae 1μl, PCR 产物 8μl, 稍离心混合后于 37 水浴 6 h, 最后进行电泳鉴定。

SSCP 分析:参考文献 [4] 进行。简述如下: 取 15μl PCR 产物, 与等量变性缓冲液 (95% 甲酰胺, 20mmol/L EDTA, 0.05% 溴酚蓝, 0.05% 二甲苯晴 EF) 混匀; 95 热变性 10 min 后, 迅速置冰水浴中不停振荡 15 min, 于预电泳 1h 的 10% 非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳。电泳条件: 1 × TBE, 4, 3mA 1 h, 8mA 4 h。电泳后进行银染, 并制成干胶保存。

结 果

1. 通用引物 PCR (UPPCR) 扩增结果:图 1 示 UPPCR 扩增产物的 2% 琼脂糖电泳结果。从图 1 可见, 采用 UPPCR 可以扩增出 10 种实验菌的目的片段。然而, 难以从片段相对分子质量的大小来鉴别这 10 种产物。

2. RFLP 分析结果:图 2 示 Hae 的酶切结果。从图 2 可见, Hae 能切开 10 种实验菌的 UPPCR 产物, 并呈现出限制性酶切片段多态性现象。经分析计算, 各菌的片段数目及大小均与理论数相符。对 10 种病原菌的 RFLP 图谱进行比较, 发现在金黄色葡萄球菌与大肠埃希菌之间以及在宋内志贺菌、福氏志贺菌和鲍氏志贺菌之间难以鉴别。而其余细菌

之间则可作区别。

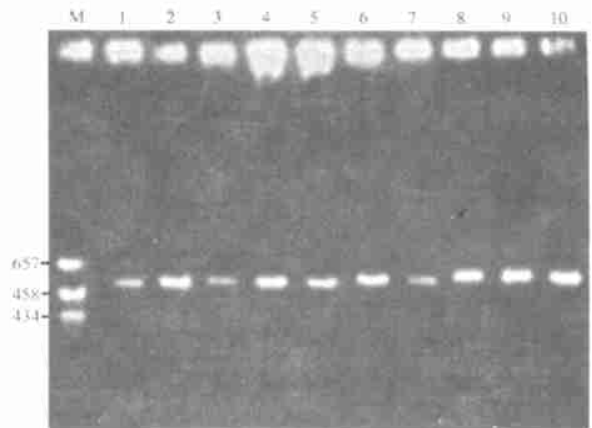


图 1 UPPCR 产物的 2% 琼脂糖电泳结果

Fig 1. Results of PCR amplification with universal primer from bacterial 16S rRNA gene in 2.0% agarose

M: pGEM7Z (+) DNA/HEA markers; 1: *Staphylococcus aureus*; 2: *Hemolytic streptococcus*; 3: *Pseudomonas aeruginosa*; 4: *Vibrio parahemolyticus*; 5: *Proteus vulgaris*; 6: *Escherichia coli*; 7: *Shigella dysenteriae*; 8: *Shigella sonnei*; 9: *Shigella flexneri*; 10: *Shigella boydii*

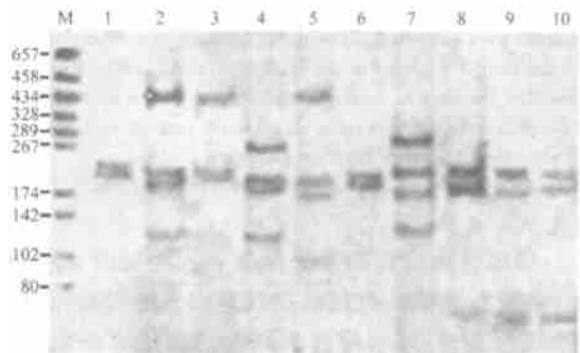


图 2 PCR 产物的 RFLP 分析结果

Fig 2. Restriction mapping and electrophoresis analysis of PCR products

M: pGEM7Z (+) DNA/HEA markers; 1: *Staphylococcus aureus*; 2: *Hemolytic streptococcus*; 3: *Pseudomonas aeruginosa*; 4: *Vibrio parahemolyticus*; 5: *Proteus vulgaris*; 6: *Escherichia coli*; 7: *Shigella dysenteriae*; 8: *Shigella sonnei*; 9: *Shigella flexneri*; 10: *Shigella boydii*

3. SSCP 分析结果:图 3 示 10 种病原菌 PCR 产物的 SSCP 分析结果。从图 3 可见, 10 种病原菌的 SSCP 图谱明显不同, 极易区分。

讨 论

我们采用细菌 16S rRNA 的通用引物, 配合 RFLP 和 SSCP 技术, 建立了检测常见临床病原菌的 UPPCR-RFLP 和 UPPCR-SSCP 技术。由于 16S rRNA 为细菌所共有, 保守性较高, 可以从中选择通用引物, 建立 UPPCR 技术, 用于临床病原菌的检测。UPPCR 较常

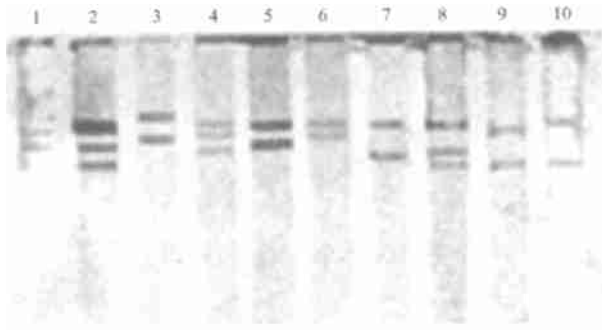


图 3 PCR 产物的 SSCP 分析结果

Fig 3. SSCP analysis of PCR products

1: *Staphylococcus aureus*; 2: *hemolytic streptococcus*; 3: *Pseudomonas aeruginosa*; 4: *Vibrio parahemolyticus*; 5: *Proteus vulgaris*; 6: *Escherichia coli*; 7: *Shigella dysenteriae*; 8: *Shigella sonnei*; 9: *Shigella flexneri*; 10: *Shigella boydii*

规特异性引物 PCR 的优点在于可用同一对引物以相同程序扩增出所有目的菌,但亦存在仅依据其产物的电泳结果尚不可能对检测对象进行鉴别的不足之处。因此,UPPCR 产物需要进一步分析。目前多见采用 16S rDNA PCR 配合序列测定^[5]。虽然序列分析法具有非常特异和准确的长处,但较为费时,特别是费用较高,在临床上难以推广。此外,也有采用逆转录 PCR (RT-PCR) 直接检测 16S rRNA 来检测病原菌的报道^[6,7],此方法较为繁琐,实验条件和技术人员要求较高,亦给临床广泛应用带来困难。因此,筛选一种简便快速、特异敏感的分析方法具有重要意义。

研究报道,采用 16S rRNA 基因 PCR 结合 RFLP 分析来检测 *Abiotrophia adiacens* 和 *Abiotrophia defectiva* 等细菌取得成功^[8]。本研究也曾试图通过对 PCR 产物进行 RFLP 分析来鉴定实验菌,但没有达到目的,这是因为部分菌的酶切片段长度相近,无法通过电泳区分(见图 2)。本文仅涉及 10 种病原菌,而在实际工作中病原菌的种类会更多,因此要找出既能将所有菌的 PCR 产物切开又能使酶切片段相差悬殊的限制性内切酶并不现实。

SSCP 是近年来发展起来的一种简单、快速、经济的分子生物学技术^[9],广泛应用于基因突变分析,可区分由少至一个碱基的改变而导致的构型改变。16S rRNA 基因既有保守区,也有相对变异区,不同种菌的变异区序列必然不同,故可以采用 SSCP 进行分析。本文结果表明,各菌的 SSCP 图谱无论从条带的数目、相对迁移率及条带之间的间距来看,相互间均

存在明显差异,且其差异似与亲缘关系成正比,即亲缘关系越远,差异越明显;反之,越不明显。如志贺菌 4 亚群之间差异较小,而与其它菌差异较大。这可能是由于亲缘关系越近,则 16S rRNA 基因的同源性越大,造成单链的构象越相似。在 SSCP 图谱中出现 2 条或更多的条带都是可能的,因为在一定的电泳条件下,相同序列的 DNA 单链可形成不同的卷曲结构,并在条件固定时达到动态平衡。该实验整个过程只需几小时,且不需昂贵的设备和试剂。总之,UPPCR-SSCP 是简便、快速、特异、敏感地检测病原菌的最佳方法。若能将不同种病原菌的 SSCP 分析图谱存入数据库作为模式图谱,将使临床病原菌的检测变得更为便捷。

参 考 文 献

- 1 Roberts TC, Storch GA. Multiplex PCR for diagnosis of AIDS-related central nervous system lymphoma and toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*, 1997, 35 (1) : 268-269.
- 2 Sabat G, Rose P, Hickey WJ, et al. Selective and sensitive method for PCR amplification of *Escherichia coli* 16S rRNA genes in soil. *Appl Eviron Microbiol*, 2000, 66 (2) : 844-849.
- 3 Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, et al. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl Eviron Microbiol*, 1998, 64 (2) : 795-799.
- 4 彭宣宪, 路丽明, 王三英, 等. HBV DNA/Ig-TCLC 中 HBV 基因变异的 PCR-SSCP 分析. 厦门市科学技术协会编: 厦门市科学技术协会第二届青年学术年会暨中国科协第三届青年学术年会卫星会议. 厦门: 厦门大学出版社, 1998, 94-98.
- 5 Tiveljung A, Borch K, Jonasson J, et al. Identification of *Helicobacter* in gastric biopsies by PCR based on 16S rDNA sequences: a matter of little significance for the prediction of *H. pylori*-associated gastritis. *J Med Microbiol*, 1998, 47 (8) : 695-704.
- 6 Jou NT, Yoshimori RB, Mason GR, et al. Single-tube, nested, reverse transcriptase PCR for detection of viable *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 1997, 35 (5) : 1161-1165.
- 7 Engstrand L, Nguyen AM, Graham DY, et al. Reverse transcription and polymerase chain reaction amplification of rRNA for detection of *Helicobacter species*. *J Clin Microbiol*, 1992, 30 (9) : 2295-2301.
- 8 Ohara-nemoto Y, Tajika S, Sasaki M. Identification of *Abiotrophia adiacens* and *Abiotrophia defectiva* by 16S rRNA gene PCR and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol*, 1997, 35 (10) : 2458-2463.
- 9 赵永忠. PCR-LIS-SSCP 快速分析非缺失型 -地中海贫血点突变. *中华医学遗传学杂志*, 1999, 16 (2) : 113-115.

(收稿日期: 2000-09-07)