

54 株分枝杆菌国际标准株 16S-23S rRNA 转录间隔区序列分析

闫李侠¹, 黄至澄¹, 段达荣¹, 陈保文², 王国治² (1. 浙江省台州市第一人民医院 318020;
2. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

【摘要】 目的 分析 54 株分枝杆菌国际标准株 16S-23S rRNA 转录间隔区(ITS)序列, 为临床分离株的鉴定提供参考。**方法** 用 16S-23S rRNA ITS 序列分析法对 54 株分枝杆菌国际标准株进行分析, 构建系统发育树, 计算相似性百分比。**结果** 除灰尘与微黄分枝杆菌; 田野与干田分枝杆菌; 抗热与副偶然分枝杆菌, 奥布与母牛结核分枝杆菌; 杜氏与猪分枝杆菌; 金色与东海分枝杆菌, 海与溃疡分枝杆菌、科莫斯分枝杆菌; 2 株结核分枝杆菌与田鼠分枝杆菌、非洲分枝杆菌的 16S-23S rRNA ITS 序列完全相同无法鉴别外, 其他各分枝杆菌菌种间 16S-23S rRNA ITS 序列均不相同, 可以得到很好的鉴别。**结论** 16S-23S rRNA ITS 序列分析是一种很好的鉴定分枝杆菌的方法, 国际标准株 16S-23S rRNA ITS 序列的研究弥补了基因数据库的不足。

【关键词】 分枝杆菌; 16S-23S rRNA 转录间隔区; 国际标准株; 基因数据库

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2011.23.005 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)23-2826-02

Analysis of the genotype of 54 reference strains of Mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences YAN Li-xia¹, HUANG Zhi-cheng¹, DUAN Da-rong¹, CHEN Bao-wen², WANG Guo-zhi² (1. The First People's Hospital of Taizhou City, Zhejiang 318020, China; 2. The National Institute For The Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China)

【Abstract】 Objective To analyze genotype of 54 reference strains of mycobacteria by 16S-23S rRNA Internal Transcription Space (ITS) sequence analysis. **Methods** The genotype of 54 reference strains of mycobacteria were analyzed by 16S-23S rRNA ITS sequence analysis. Then the phylogenetic tree was constructed and calculated similarly. **Results** The sequencing of 16S-23S rRNA ITS of the 54 reference strains of mycobacteria was finished. All the mycobacteria could be discriminated except that *M. flavescens* and *M. pulveris*, *M. agri* and *M. chitae*, *M. thermoresistibile* and *M. parafortuitum*, *M. obuense* and *M. vaccae*, *M. duvalii* and *M. porcinum*, *M. aurum* and *M. sphagni*, *M. ulcerans* and *M. marinum*, *M. komossense*, 2 strains of *M. tuberculosis* and *M. microti*, *M. africanum*. **Conclusion** 16S-23S rRNA ITS sequence analysis is a reliable method to discriminate mycobacteria. The study of the genotype of the 54 reference strains of Mycobacteria is a compensation for the gene database.

【Key words】 mycobacteria; 16S-23S rRNA ITS; international standard bacteria; gene database

16S~23S rRNA 转录间隔区(ITS)序列分析是近年来发展起来的一种基于分子水平上的菌种分类、鉴定方法, 其序列较短且多态性高于 16S rRNA, 能将表型特性极相似、难于鉴别的菌种区别开来^[1], 是非常适合应用于流行病学、诊断学、毒理学与生物学分类方面的研究方法^[2]。但 16S~23S rRNA ITS 序列分析要想成为一种临床检测的常规方法, 还需要一个强大的质控序列数据库^[3-4]; 而目前的数据库还不够完善, 甚至数据库的有些信息是错误的^[5], 这在一定程度上限制了分子鉴定技术的临床应用性。分枝杆菌国际标准株为国内外分枝杆菌研究的标准对照株, 起实验质量控制作用。但到目前为止少见国际标准株 16S~23S rRNA ITS 序列分析的系统研究报告。本研究的目的在于分析 54 株国际标准株 16S~23S rRNA ITS 全序列, 以补充基因数据库中尚未公布的部分分枝杆菌基因, 为实现 16S~23S rRNA ITS 序列分析方法的常规性提供了重要的基础条件。

1 材料与方法

1.1 实验菌株 实验所用国际标准菌株 54 株(共 51 种其中包括 3 株结核分枝杆菌, 2 株母牛结核分枝杆菌)均由 ATCC 引进, 并在中国药品生物制品检定所保存。

1.2 聚合酶链反应(PCR)引物和测序引物 上游引物(位于 16S rRNA 第 1390~1408 位核苷酸): 5'-TTG TAC ACA CCG CCC GTC A-3'; 下游引物(位于 23S rRNA 第 23~44 位核苷酸): 5'-TCT CGA TGC CAA GGC ATC CAC C-3'。上、下游引物之间扩增片段包含完整的 16S-23S rRNA ITS 核苷酸序列。测序引物 5'-GAA GTC GTA ACA AGG-3'。引物均由上海英俊生物工程有限公司合成。

1.3 方法

1.3.1 DNA 制备 将实验菌株接种于改良罗氏培养基斜面上, 慢生长分枝杆菌 37℃ 或 28℃ 培养 2~3 周, 快生长分枝杆菌培养 5~7 d。将培养物混悬于 1 mL 0.9% 生理盐水中, 12 000 r/min 离心 5 min 弃上清液, 加入 200 μL TE 缓冲液, 100℃ 煮沸 15 min, 4℃ 12 000 r/min 离心 20 min, 取含有 DNA 的上清液置于另一灭菌 EP 管中于 -20℃ 保存备用。

1.3.2 PCR 扩增 在 50 μL 反应体系内 PCR 扩增, 10×PCR buffer 5 μL, 上游引物和下游引物终浓度各 0.2 μmol/L, 4×dNTP 终浓度各为 0.2 mmol/L, rTaq DNA 聚合酶 2 U, DNA 模板 10~15 ng, 加双蒸水至 50 μL。扩增条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 1 min, 64℃ 1 min, 72℃ 1 min, 共 30 个循环;

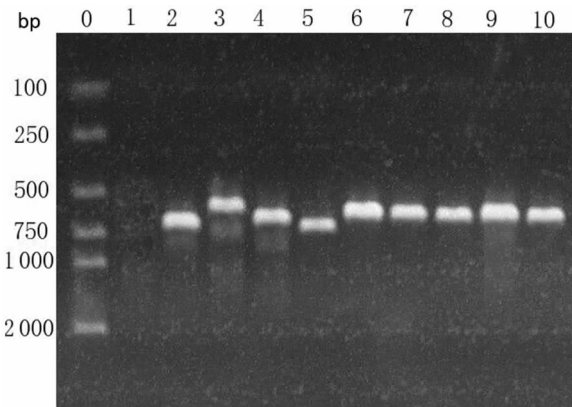
72 ℃延伸 7 min。

1.3.3 DNA 纯化与测序 使用 Takara 公司生产的 DV805A 纯化试剂盒回收纯化目的 DNA,所有 DNA 样品送上海生工生物工程公司做上、下游序列测序,并将双向结果拼接后得到最准确序列。

1.3.4 核苷酸序列分析 对所测定序列用 Clustalx 1.83 软件进行同源性多序列比对,并用邻位相连法(Neighbour Joining, N-J 法)绘制 16S-23S rRNA ITS 序列聚类分析树状谱,使用 DNASTar 的 MegAlign 软件计算相似性百分比。

2 结 果

2.1 54 株分枝杆菌标准株 16S-23S rRNA ITS PCR 扩增 成功完成 54 株分枝杆菌的 16S-23S rRNA ITS PCR 扩增,均得到 300~500 bp 的 DNA 片段,与目的条带大小相符,见图 1。



注:0 为 DNA 分子量质量标准 DL2000;1 为阴性对照;2~10 为分枝杆菌 DNA。

图 1 分枝杆菌 16S-23S rRNA ITS PCR 扩增结果

2.2 54 株分枝杆菌标准株 16S-23S rRNA ITS 序列测定 完成 54 株分枝杆菌 16S-23S rRNA ITS 的上、下游序列测定,得到其双向拼接结果,快生长分枝杆菌为 297~466 bp,慢生长分枝杆菌为 271~382 bp。

2.3 54 株分枝杆菌之间 16S-23S rRNA ITS 序列分析 通过 54 株(共 51 种)分枝杆菌之间同源性序列比对,绘制 16S-23S rRNA ITS 序列聚类分析树状谱,计算株间相似百分比,发现其中 19 株(共 18 种 8 组)分枝杆菌,即灰尘(95030)与微黄分枝杆菌(95040);田野(95043)与千田分枝杆菌(95046);抗热(95025)与副偶然分枝杆菌(95036);奥布(95035)与母牛结核分枝杆菌(95051);杜氏(95029)与猪分枝杆菌(95039);金色(95027)与东海分枝杆菌(95038),海(95014)与溃疡分枝杆菌(95004)、科莫斯分枝杆菌(95033);2 株结核分枝杆菌(95053、95054)与田鼠分枝杆菌(95048)、非洲分枝杆菌(95049) 16S-23S rRNA ITS 序列相互之间完全相同无法鉴别,其他 35 株(共 35 种)分枝杆菌核苷酸序列长度及排列具有较高变异性,16S-23S rRNA ITS 序列相似性百分比为 44.0%~99.6%,快生长分枝杆菌核苷酸序列长度为 297~466 bp,慢生长分枝杆菌为 271~382 bp。在整个 ITS 核苷酸序列内种与种之间仅含两个分枝杆菌属保守片段,均含有变异较大的种特异性序列。

3 讨 论

16S~23S rRNA ITS 序列分析与传统生化方法相比,GC 和高效液相色谱法可以做到快速鉴定,但是两者都需要昂贵的实验仪器,检测结果依赖于分枝杆菌标准的生长状态,容易受

不同温度、不同培养基的影响,结果分析通常比较困难。16S-23S rRNA ITS 分析并不需要标准的生长状态,其更准确、更实用。李国利等^[6]报道 GC 和 HPLC 不能鉴别 *M. triplex* 和 *M. fortuitum*, *M. chelonae* 和 *M. abscessus*, *M. avium* 和 *M. intracellulare*,在本研究中 16S-23S rRNA ITS 序列分析可以将其鉴别。但同时又发现其中 19 株(共 18 种 8 组)分枝杆菌无法鉴别,而以前同类研究中仅发现结核分枝杆菌复合群之间无法鉴别,这可能与以前研究中涵盖的国际标准株数太少有关,要想对 8 组 16S~23S rRNA ITS 基因序列完全相同的分枝杆菌加以鉴别可能还要探索其他更有效的方法。54 株国际标准株 16S-23S rRNA ITS 分析结果表明,该序列分析能将结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌相鉴别,将大部分 NTM 鉴定至种的水平,能将在 16S rRNA 水平上不能鉴别的堪萨斯分枝杆菌与胃分枝杆菌,塞内加尔与产鼻疽分枝杆菌相鉴别,这与李国利等^[7]报道相同。但 16S-23S rRNA ITS 和 16S rRNA 均不能鉴别海与溃疡分枝杆菌,这与李国利等报道的不同。16S~23S rRNA ITS 被认为是最适合、最有潜力设计鉴别分枝杆菌密切相关种探针的靶基因^[8],本研究进一步证实此方法的可靠性和实用性。

16S-23S rRNA ITS 序列分析要想成为一种临床检测的常规方法,还需要一个强大的质控序列数据库;而目前的数据库还不够完善,甚至数据库的有些信息还是错误的。GenBank 中也只能查到个别分枝杆菌标准株的 16S-23S rRNA ITS 序列,这在一定程度上限制了分子鉴定技术的临床应用性。国际标准株为国内外分枝杆菌研究的标准对照株,起实验质量控制作用。但到目前为止少见国际标准株 16S~23S rRNA ITS 序列分析的系统研究报道。本研究为实现 16S-23S rRNA ITS 序列分析方法的常规性提供了重要的基础条件。54 株国际标准株为中国药品生物制品检定所收藏株,本研究对标准株 16S-23S rRNA ITS 序列研究与公布及实现国家医学微生物资料共享试点中分枝杆菌资源共享有一定的参考价值。

参考文献

- [1] Kirschner P, Böttger EC. Species identification of mycobacteria using rDNA sequencing[J]. Methods Mol Biol, 1998, 101: 349-361.
- [2] Kox LF, Jansen HM, Kuijper S, et al. Multiplex PCR assay for immediate identification of the infecting species in patients with mycobacterial disease[J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(6): 1492-1498.
- [3] Turenne CY, Tschetter L, Wolfe J, et al. Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: identifying nontuberculous Mycobacterium species[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(10): 3637-3648.
- [4] Cloud JL, Conville PS, Croft A, et al. Evaluation of partial 16S ribosomal DNA sequencing for identification of nocardia species by using the MicroSeq 500 system with an expanded database[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(2): 578-584.
- [5] Brosius J, Palmer ML, Kennedy PJ, et al. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from Escherichia coli [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1978, 75(10): 4801-4805.
- [6] 李国利, 庄玉辉, 赵铭, 等. 16S-23S rDNA 内转录间隔区序列寡核苷酸探针鉴定分枝杆菌菌种(下转第 2829 页)

2.2 子宫内膜异位症患者血清 IL-2、IL-6、hs-CRP 和 TNF- α 水平进行相关性分析 结果呈明显负相关(r 值分别为 $-0.318\ 4$ 、 $-0.472\ 2$ 、 $-0.513\ 8$, $P < 0.01$)。

3 讨 论

IL-2 是由辅助性 T 淋巴细胞产生的一个十分重要的免疫调节因子,具有促进 T 淋巴细胞增殖的诱导 Lak 细胞,促进 B 淋巴细胞产生抗体,促进 T 淋巴细胞杀伤作用以及增强自然杀伤(NK)细胞活性等作用,国内已见有多篇文献报道^[2-3]。自身免疫性疾病、血液病、肿瘤患者均有明显的血清 IL-2 水平降低。本研究结果表明,子宫内膜异位症患者血清 IL-2 水平显著低于健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$),经中西医结合治疗 3 个月后与健康对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。其降低的机制可能是患者产生 IL-2 能力和对 IL-2 水平的反应性均有不同程度降低之故。

IL-6 是机体内许多细胞产生的一种具有多种生物学活性的刺激因子,为机体复杂的细胞因子网络中的一个重要成员。IL-6 为多种细胞表现的复杂的生物学功能,在正常情况下调节免疫应答,而在病理状态下,其浓度的升高可引起免疫性疾病的损伤。本研究结果表明,子宫内膜异位症患者血清 IL-6 水平显著高于健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$),经治疗 3 个月后则与健康对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。分析其原因可能是患者存在有细胞免疫抑制,T、B 淋巴细胞比例失衡之故。另一原因可能是患者体内巨噬细胞在吞噬或细胞抗原物质时,本身产生一些细胞因子。其中 IL-6 又作用于血管内皮细胞,在正常情况下,可起到抗感染作用,而在病理状态下可导致病理性损伤,促进了疾病的发生与发展^[4]。

CRP 是在人体肝脏合成中一种典型的急性期反应蛋白,在组织损伤、放疗或急性感染后人血液中该蛋白浓度会显著升高,被称为是急性时相反应蛋白^[5-6]。CRP 对外界病原体和伤害细胞具有特异的识别功能,能结合于损伤部位,激活补体系统,消除外界病原体和伤害细胞,加快机体的康复。本研究结果表明,子宫内膜异位症患者血清 hs-CRP 水平显著高于健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$),经治疗 3 个月后则与健康对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。其升高的原因,作者认为是 CRP 可能与脂蛋白结合,由经典途径激活补体系统,产生大量的终末攻击复合物和终末蛋白 C5b-9 造成血管

内皮损伤;CRP 可与单核细胞、粒细胞的 CRP 受体结合,使之浸润、聚集,产生细胞因子,造成血管损伤。是否还有其他因素影响,尚待进一步研究和探讨。

TNF- α 主要由单核-巨噬细胞产生,具有双重的生物学作用^[7],一方面是机体的免疫防护的重要介质,另一方面可参与机体的免疫病理损伤,在一些疾病的发生和发展中起重要的作用。本研究结果表明,子宫内膜异位症患者血清 TNF- α 水平显著高于健康对照组($P < 0.01$),经治疗 3 个月后则与健康对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),其升高的机制作者认为是由于患者机体的防御能力降低,刺激单核细胞产生 TNF- α ,因而造成血中 TNF- α 水平的升高;TNF- α 能加强吞噬作用,引起机体大量而迅速释放超氧化物,因而造成血中 TNF- α 水平的升高,是否还有其他因素参与尚待探讨。

本研究结果还表明,子宫内膜异位症患者血清 IL-2、IL-6、hs-CRP 和 TNF- α 水平呈明显负相关。

总之,作者认为子宫内膜异位症的发生与发展与血清 IL-2、IL-6、hs-CRP 和 TNF- α 水平密切相关,有重要的临床价值。

参考文献

- [1] 彭茜,朱瑾. 子宫内膜异位症与免疫[J]. 中国免疫学杂志,2007,23(5):474-475.
- [2] 高文,刘璐,周云.¹³¹I-17-AAG 治疗 U2 前后 IL-2、IL-4、IL-10 和 IFN- γ 的变化[J]. 放射免疫学杂志,2007,20(4):296-298.
- [3] 任慧芸,王蓓. 肺结核患者血清 IL-2、SiL-2R 和 UEGF 水平变化及临床意义[J]. 放射免疫学杂志,2007,20(3):251-252.
- [4] 张风蕴. 炎性细胞因子[J]. 国外医学:免疫学分册,1992,15(5):261-262.
- [5] 邱阳. 冠心病患者超敏 C 反应蛋白的变化及临床意义[J]. 大连医科大学学报,2003,25(4):281-283.
- [6] 舒建. C-反应蛋白检测的临床应用[J]. 检验医学与临床,2007,4(1):27-28.
- [7] 国冰勇,张小冬. 肿瘤坏死因子在炎症中的作用[J]. 国外医学:生理病理科学与临床分册,1992,5(3):203-204.

(收稿日期:2011-06-01)

(上接第 2827 页)

- 的研究[J]. 中国防痨杂志,2002,24(1):12-16.
- [7] 李国利,庄玉辉,赵铭,等. 16S~23S rDNA 内转录间隔区序列分析及其在分枝杆菌鉴定中的应用价值[J]. 中华结核和呼吸杂志,2002,25(3):166-170.
- [8] Xiong L, Kong F, Yang Y, et al. Use of PCR and reverse

line blot hybridization macroarray based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences for rapid identification of 34 mycobacterium species[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(10):3544-3550.

(收稿日期:2011-09-06)

会 讯

2012 年全国产前和新生儿遗传代谢病筛查技术研讨会暨“丰华杯”优秀论文奖评选活动征文即将开始,请关注本刊网站(www.labmc.con.cn)上的信息。