

PCR-酶切技术快速鉴定军团菌

赵利伟 胡朝晖 陈文聪 顾全 朱庆义*

(广州金域医学检验中心 广东 广州 510330)

摘要: 【目的】建立一种新型的军团菌鉴定方法,并探讨该法在鉴定环境水源和临床标本军团菌菌株中的应用价值。【方法】根据军团菌 16S rRNA 基因保守序列设计引物,以分离培养得到的可疑军团菌菌株作为模板,采用 PCR 法对模板扩增,并用限制性内切酶对 PCR 产物进行酶切分析,建立一种嗜肺军团菌及非嗜肺军团菌的鉴定方法。对 16 株嗜肺军团菌、22 株非嗜肺军团菌及 12 株其他细菌标准菌株进行检测,验证该方法的可靠性,最后用该法检测广州地区分离的 169 株可疑军团菌菌株并进行基因测序。【结果】该 PCR 方法检测嗜肺军团菌及非嗜肺军团菌所有标准菌株均为阳性,非军团菌检测结果均为阴性;进一步的 *Hinf* I 酶切分析可准确的区分嗜肺军团菌标准菌株;广州地区分离的 169 株可疑军团菌菌株经该法检测发现 160 株为军团菌,其中 79 株为嗜肺军团菌,与基因测序检测结果一致。【结论】PCR-酶切技术可快速、特异地检测军团菌及嗜肺军团菌,适用于环境水源和临床标本可疑军团菌菌株的检测。

关键词: 军团菌, 聚合酶链反应, 限制性内切酶

Rapid identification of *Legionella* isolates using PCR combined with restriction endonuclease digestion technology

ZHAO Li-Wei HU Chao-Hui CHEN Wen-Cong GU Quan ZHU Qing-Yi*

(Guangzhou Kingmed Center for Clinical Laboratory, Guangzhou, Guangdong 510330, China)

Abstract: [Objective] To develop a new method based on PCR amplification and restriction

基金项目: 国家标准化委员会资助项目(No. 20081021-T-361); “十一五”国家科技重大专项课题(No. 2008ZX10004-006)

*通讯作者: Tel: 86-20-22283222-616; 信箱: zqy@kingmed.com.cn

收稿日期: 2012-10-12; 接受日期: 2012-12-20

endonuclease digestion of a 557 bp fragment of the 16S rRNA gene for identification of *Legionella* isolates. **[Methods]** The primers were designed according to sequences of 16S rRNA gene of *Legionella*. Pure culture microbial strains were used as templates. The reaction conditions were optimized and the specificity were verified by 16 *L. pneumophila* strains, 22 non-*L. pneumophila* strains and 12 other bacteria strains. One hundred sixty-nine isolates were identified by PCR-enzymatic digestion, and 16S rDNA and *mip* gene sequencing analysis. **[Results]** The results showed that 16 *L. pneumophila* strains, 22 non-*L. pneumophila* strains and 12 other bacteria strains could be correctly identified and differentiated by this scheme. 169 isolates examined by the scheme, 79 *L. pneumophila* strains and 81 non-*L. pneumophila* strains were identified by PCR-enzymatic digestion, and the results were consistent with 16S rDNA and *mip* gene sequencing analysis among them. **[Conclusion]** PCR combined with restriction endonuclease digestion technology is a simple and specific method for rapid identification and differentiation of *L. pneumophila* and non-*L. pneumophila* isolates.

Keywords: *Legionella*, PCR, Restriction endonuclease

军团菌是一种兼性胞内寄生菌,是引起军团菌病的重要病原体。目前已确认军团菌有 57 个种,70 多个血清型,但嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)与人类的疾病关系最为密切,据报道,临床上约 90%的军团菌病是由嗜肺军团菌引起^[1-2]。因此,嗜肺军团菌的快速鉴定显得尤为重要。

近年来,本实验室从环境水样本和临床标本中分离到了大量可疑军团菌,为提高研究效率,需对可疑军团菌菌株进行鉴定。传统的军团菌检测鉴定主要依靠生化实验、血清学反应、脂肪酸成分分析、多重 PCR 检测、RT-PCR 及基因测序等,但生化实验对于大量菌株的分类鉴定繁琐费时、准确性差^[3];血清学检测成本高昂,且易产生交叉反应^[2-3];脂肪酸成分分析操作复杂,且易受细菌生长条件的影响^[4-5];多重 PCR 检测特异性较差^[6];RT-PCR 检测及基因测序分型虽能准确的鉴定军团菌,但对仪器设备要求高,且耗时长、花费高^[7-10]。因此,寻找一种快速、可靠、且成

本低廉的方法鉴定嗜肺军团菌及非嗜肺军团菌是很有必要的。本研究基于我们新发现的一个嗜肺军团菌特异酶切位点,建立一种无需 DNA 抽提的纯菌直接 PCR-酶切技术,可以更为简单、快速、且成本低廉地对嗜肺军团菌进行准确鉴定。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株:根据军团菌在 BCYE 平板上生长,血琼脂平板上不生长的特性,于 2008 年 11 月-2012 年 7 月,从广州市内公园、湖泊、池塘、水库及珠江等地表水源及临床痰标本分离得到纯培养可疑军团菌 169 株,其中 160 株经 16S rDNA 386 bp PCR 检测^[9,11]和生化试验证实为军团菌,其余 9 株为非军团菌。

1.1.2 标准菌株:本研究所用 16 株嗜肺军团菌(包括 15 个不同的血清型)、22 株非嗜肺军团菌及 12 株非军团菌均购自美国模式培养物保藏中心,见表 1。

表 1 本试验所用标准菌株
Table 1 Reference strains used in this study

菌种和血清型 Species and serogroup	ATCC 编号 ATCC No.	557 bp PCR result	酶切结果 Enzymatic digestion result (bp)	菌种和血清型 Species and serogroup	ATCC 编号 ATCC No.	557 bp PCR result	酶切结果 Enzymatic digestion result (bp)
<i>L. pneumophila</i> 1	33152	+	400, 157	<i>L. feeleii</i> 2	35849	+	557
<i>L. pneumophila</i> 1	33153	+	400, 157	<i>L. gormanii</i>	33342	+	557
<i>L. pneumophila</i> 2	33154	+	400, 157	<i>L. hackeliae</i>	35250	+	557
<i>L. pneumophila</i> 3	33155	+	400, 157	<i>L. londiniensis</i>	49505	+	257, 150
<i>L. pneumophila</i> 4	33156	+	400, 157	<i>L. longbeachae</i>	33462	+	557
<i>L. pneumophila</i> 5	33216	+	400, 157	<i>L. oakridgensis</i>	33761	+	557
<i>L. pneumophila</i> 6	33215	+	400, 157	<i>L. parisiensis</i>	35299	+	557
<i>L. pneumophila</i> 7	33823	+	400, 157	<i>L. quinlivanii</i>	43830	+	557
<i>L. pneumophila</i> 8	35096	+	400, 157	<i>L. rubrilucens</i>	35304	+	557
<i>L. pneumophila</i> 9	35289	+	400, 157	<i>L. sainthelensi</i>	35248	+	557
<i>L. pneumophila</i> 10	43283	+	400, 157	<i>L. shakespearei</i>	49655	+	557
<i>L. pneumophila</i> 11	43130	+	400, 157	<i>L. spiritensis</i>	35249	+	557
<i>L. pneumophila</i> 12	43290	+	400, 157	<i>L. wadsworthii</i>	33877	+	557
<i>L. pneumophila</i> 13	43736	+	400, 157	<i>Enterobacter cloacae</i>	13047	-	NT
<i>L. pneumophila</i> 14	43703	+	400, 157	<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	-	NT
<i>L. pneumophila</i> 15	35251	+	400, 157	<i>Escherichia coli</i>	25922	-	NT
<i>L. adelaidensis</i>	49625	+	257, 150	<i>Haemophilus influenzae</i>	10211	-	NT
<i>L. anisa</i>	35292	+	557	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	35657	-	NT
<i>L. bozemanii</i>	33217	+	557	<i>Neisseria meningitides</i>	13090	-	NT
<i>L. busanensis</i>	BAA-518	+	257, 150	<i>Proteus mirabilis</i>	35659	-	NT
<i>L. cherrii</i>	35252	+	557	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	-	NT
<i>L. cincinnatiensis</i>	43753	+	557	<i>Salmonella typhi</i>	14028	-	NT
<i>L. dumoffii</i>	33279	+	557	<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	-	NT
<i>L. erythra</i>	35303	+	557	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	51331	-	NT
<i>L. feeleii</i> 1	35072	+	557	<i>Yersinia enterocolitica</i>	33559	-	NT

注: +: 阳性; -: 阴性; NT: 未做酶切实验。

Note: +: Positive; -: Negative; NT: Not done.

1.1.3 主要试剂和仪器: 2×PCR MasterMix、DNA Marker 购自 TIANGEN; FastDigest *Hinf* I 酶购自 Fermentas (深圳); PCR 仪购自 MJ Research; 电泳仪、凝胶成像仪购自 Bio-Rad; 引物由 Invitrogen 公司合成。

1.2 PCR 反应

1.2.1 PCR 模板的制备: 用灭菌枪头挑取少量标

准菌株及可疑军团菌的菌体直接重悬于 20 μL 的无菌蒸馏水中, 混匀, 作为 PCR 反应的模板备用。

1.2.2 引物设计: 基于我们新发现的酶切位点, 设计一对特异引物 Leg 557F (正向引物)和 Leg 557R (反向引物), 见表 2。

1.2.3 PCR 扩增: PCR 反应体系: PCR Master Mix 12.5 μL, 引物 Leg 557F 和 Leg 557R

表2 引物序列及其与模板 DNA 的互补位置
Table 2 Sequence and position of primers

引物名称 Primer	引物序列 Sequence (5'→3')	位置 Position	扩增长度 Amplicon length (bp)
Leg 557F	CTGACACTGAGGCACGAA	750-768	557
Leg 557R	CGGACTACGACCGACTTT	1 307-1 289	

(10 μmol/L) 各 1 μL, dd H₂O 5.5 μL, 模板 5 μL, 总体积 25 μL。PCR 反应条件: 94 °C 10 min; 94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 35 个循环; 72 °C 5 min。取 5 μL PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳, 观察记录结果。

1.3 酶切分析

取上述 PCR 产物 10 μL 于 PCR 管中, 加入 10×Buffer 2 μL, FastDigest *Hinf* I 酶 1 μL, 用双蒸水补足至 30 μL, 37 °C 水浴 5 min 后, 取 8 μL 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。

1.4 特异性评估

本研究目的是建立一种快速有效检测军团菌及进一步区分嗜肺军团菌的方法, 而 PCR 方法一直具有很高的敏感性。因此, 该方法的特异性显得更为重要。本文通过对 16 株嗜肺军团菌、22 株非嗜肺军团菌及 12 株其他细菌的 ATCC 标准菌株进行 PCR-酶切技术分析, 对该方法进行验证评估。

1.5 基因测序鉴定

通过军团菌 *mip* 基因^[8]和 16S rDNA 386 bp 基因测序^[9,11], 对以上 169 株可疑军团菌菌株的酶切鉴定结果进行验证。所测序列在欧洲军团菌工作组(<http://www.ewgli.org/>) *mip* 基因数据库和 GenBank 核酸序列数据库中进行比对, 获得各菌株鉴定结果。

2 结果与分析

2.1 军团菌 16S rRNA 基因序列分析

通过对嗜肺军团菌、非嗜肺军团菌和非军团

菌的 16S rRNA 基因序列进行分析, 发现在嗜肺军团菌 16S rRNA 基因序列中存在一个特异的酶切位点“GANTC” (1 147-1 151 bp), 而非嗜肺军团菌在此位置不存在该位点, 见图 1。据此我们设计一对军团菌特异引物来扩增含该特异位点的 557 bp 片段, 通过该 PCR 反应可鉴别军团菌与非军团菌; 再通过 *Hinf* I 酶对 PCR 产物酶切, 嗜肺军团菌可被消化为 400 bp 和 157 bp 片段, 而非嗜肺军团菌中的阿德莱德军团菌(*L. adelaidensis*)、釜山军团菌(*L. busanensis*)和伦敦军团菌(*L. londiniensis*)可被消化为约 257 bp 和 150 bp 片段, 其他非嗜肺军团菌不被消化, 仍为 557 bp, 据此可区分嗜肺军团菌和非嗜肺军团菌(见表 1)。

2.2 PCR 扩增条件分析

随机挑选 11 株纯菌以菌体为 PCR 模板, 确定 PCR 反应条件。结果显示: 以纯菌菌体为模板, 使用 1.2.3 的 PCR 反应条件有较好的扩增效果, 扩增产物约 557 bp, 且无明显的引物二聚体等非特异性扩增出现。

2.3 特异性评估

对 16 株嗜肺军团菌、22 株非嗜肺军团菌及 12 株非军团菌进行 PCR-酶切分析检测, 验证该方法的可靠性。结果见表 1, 该 PCR 检测方法对军团菌有很高的特异性(图 2), 酶切技术可有效的对嗜肺军团菌进行鉴定(图 3)。

2.4 PCR-酶切分析

2008 年 11 月-2012 年 7 月, 分离到的 169 株可疑军团菌, 经 16S rDNA 557 bp PCR 扩增后, 通过琼脂糖凝胶电泳观察有 160 株显示军团菌阳

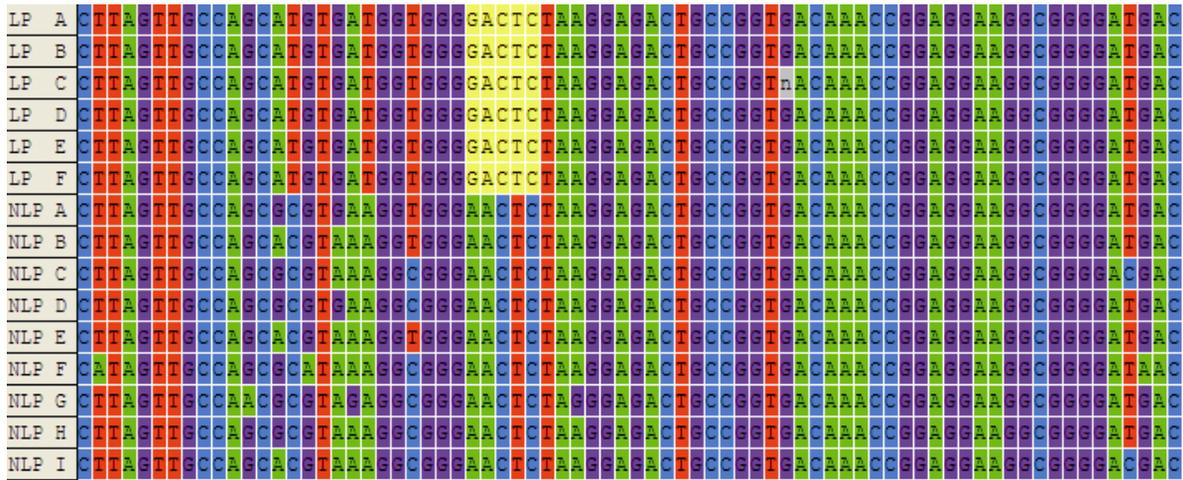


图1 军团菌 16S rRNA 基因序列分析

Fig. 1 Bioinformatic analysis of 16S rRNA genes from genus *Legionella*

注: LP: 嗜肺军团菌; NLP: 非嗜肺军团菌。

Note: LP: *L. pneumophila*; NLP: Non-*L. pneumophila*.

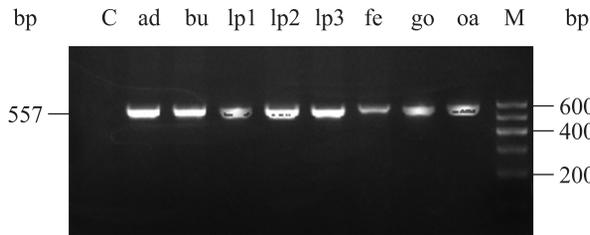


图2 军团菌 16S rDNA 557 bp 基因片段的 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR amplification for the 557-bp fragments of 16S rDNA genes from *Legionella* species

注: M: DNA marker; C: 阴性对照; ad: 阿德莱德军团菌; bu: 釜山军团菌; lp1, lp2, lp3: 分别代表嗜肺军团菌血清 1-3 型; fe: 菲氏军团菌; go: 戈氏军团菌; oa: 橡树岭军团菌。

Note: M: DNA marker; C: Negative control; ad: *L. adelaidensis*; bu: *L. busanensis*; lp1, lp2, and lp3 indicate *L. pneumophila* serogroups 1, 2, and 3, respectively; fe: *L. feeleii*; go: *L. gormanii*; oa: *L. oakridgensis*.

性。酶切分析结果显示: 79 株切成约 400 bp 和 157 bp 2 条带, 其余 81 株仍为 557 bp 条带。说明分离的 160 株军团菌中有 79 株为嗜肺军团菌。进一步基因测序鉴定显示 160 株军团菌中有嗜肺军团菌 79 株; 菲氏军团菌(*L. feeleii*) 36 株; 戈氏军团菌(*L. gormanii*) 27 株; 橡树岭军团菌(*L. oakridgensis*) 13 株; 长滩军团菌(*L. longbeachae*)

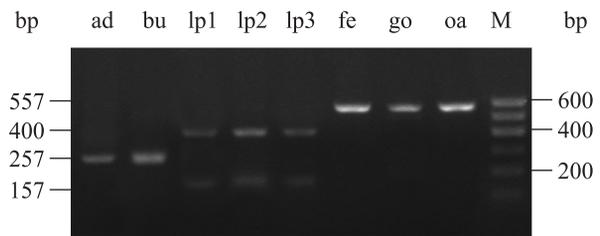


图3 军团菌 16S rDNA 557 bp 基因片段的酶切结果
Fig. 3 *Hinf* I restriction endonuclease digestion results of the 557-bp fragments from *Legionella* species

注: M: DNA marker; ad: 阿德莱德军团菌; bu: 釜山军团菌; lp1, lp2, lp3: 分别代表嗜肺军团菌血清 1-3 型; fe: 菲氏军团菌; go: 戈氏军团菌; oa: 橡树岭军团菌。

Note: M: DNA marker; ad: *L. adelaidensis*; bu: *L. busanensis*; lp1, lp2, and lp3 indicate *L. pneumophila* serogroups 1, 2, and 3, respectively; fe: *L. feeleii*; go: *L. gormanii*; oa: *L. oakridgensis*.

2 株; 海伦山军团菌(*L. sainthelensi*) 1 株; 摩拉维采军团菌(*L. moravica*) 1 株, 此外, 还存在 1 株不能确定种的非嗜肺军团菌。说明 PCR-酶切技术是一种可靠有效的军团菌及嗜肺军团菌鉴定方法。

3 讨论

嗜肺军团菌广泛分布在自然界各种水域环境

中,是引起军团菌病最重要的病原体。目前在欧美等发达国家时有军团菌病流行报道,常引起严重的肺部感染^[2]。随着国内空调系统、供水系统的广泛使用,军团菌病流行和暴发的危险因素也日益增加。分离培养方法一直是军团菌检测的金标准,在过去的研究中,我们已经建立了一套合理的军团菌分离培养方法,近年来也从全国各地分离到 700 多株可疑军团菌。进一步的鉴定主要依靠传统的生化试验、血清学反应、脂肪酸成分分析、多重 PCR 检测、RT-PCR 及基因测序等,但以上方法均存在各种不足。因此,快速有效的鉴定方法,对军团菌病的预防和控制具有十分重要的意义。

军团菌 16S rRNA 基因片段在军团菌属中具有高度的保守性,我们根据生物信息学分析研究,发现在嗜肺军团菌 16S rRNA 基因序列中存在一个特有的酶切位点“GANTC”。据此建立了一种新型的 PCR-酶切技术来鉴定嗜肺军团菌和非嗜肺军团菌,该方法先通过 PCR 扩增军团菌 16S rDNA 中 557 bp 的基因片段来鉴定军团菌及非军团菌。我们通过 169 株可疑军团菌菌株、38 株军团菌标准菌株和 12 株其他非军团菌标准菌株验证该 PCR 反应的特异性,发现该方法可以准确的对军团菌和非军团菌进行鉴别,表明该 PCR 方法检测军团菌具有很好的特异性。而基于仅存在于嗜肺军团菌 16S rDNA 557 bp 基因片段中的特异酶切位点,我们通过一个快速的酶切反应便可将嗜肺军团菌消化为 400 bp 和 157 bp 片段,再利用琼脂糖凝胶电泳便可对嗜肺军团菌进行鉴定。对 95 株嗜肺军团菌(包括 79 株分离株和 16 株标准菌株)和 103 株非嗜肺军团菌(81 株分离株和 22 株标准菌株)的准确鉴定结果说明酶切分析是一种有效、可靠的嗜肺军团菌检测方法。

Zhan 等曾报道过类似的检测方法^[12],与其相比,本研究的方法具有电泳结果更易观察、所用

酶成本更加低廉、反应时间更短等优势。而相比其它的检测方法,该技术对仪器设备要求简单,具备 PCR 高灵敏度的优点,且成本低廉、方便快捷,无须 DNA 抽提便可对环境水样及临床样品中分离的可疑军团菌进行快速检测鉴定,具有很高的实用性,对军团菌流行病学调查和临床快速诊断具有重要的意义。

近年来,我室对全国 14 个省市环境水源中的军团菌分布进行调查,分离培养结果显示我国环境水源中主要存在嗜肺军团菌、橡树岭军团菌、菲氏军团菌、戈氏军团菌、长滩军团菌、海伦山军团菌、杜氏军团菌(*L. dumoffii*)、博兹曼军团菌(*L. bozemanae*)、沃斯利军团菌(*L. worsleiensis*)、摩拉维采军团菌等,根据本研究建立的方法可以准确的对在国内分离的军团菌进行鉴定。另外,在本研究中 160 株军团菌中还存在 1 株不能确定具体种,经 PCR-酶切技术鉴定为非嗜肺军团菌,而 16S rDNA 基因和 *mip* 基因测序鉴定显示该菌为军团菌,但具体种仍需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Golovlev EL. General and molecular ecology of *Legionella*[J]. Mikrobiologiya, 2002, 69(1): 5-12.
- [2] Fields BS, Benson RF, Besser RE. *Legionella* and legionnaires' disease: 25 years of investigation[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2002, 15(3): 506-526.
- [3] Murray PR, Baron EJ, Pfaller M, et al. 临床微生物学手册(Manual of Clinical Microbiology)[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 814-827.
- [4] 屈平华, 尹一兵, 胡朝晖, 等. 环境军团菌的分离培养及鉴定方法探讨[J]. 中华预防医学杂志, 2008, 42(9): 653-657.
- [5] Fang CL, Hu ZH, Zhu QY, et al. Identification of *Legionella* species by the composition of cellular fatty acids[J]. Frontiers of Medicine in China, 2010,

- 4(2): 208–215.
- [6] Stølhaug A, Bergh K. Identification and differentiation of *Legionella pneumophila* and *Legionella* spp. with real-time PCR targeting the 16S rRNA gene and species identification by *mip* sequencing[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(9): 6394–6398.
- [7] Guan W, Xu Y, Chen DL, et al. Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for accurate identification of *Legionella* spp. isolated from municipal fountains in Chengdu, China, based on 16S rRNA, *mip*, and *rpoB* genes[J]. Journal of Microbiology (Seoul, Korea), 2012, 50(1): 127–136.
- [8] Ratcliff RM, Lanser JA, Manning PA, et al. Sequence-based classification scheme for the genus *Legionella* targeting the *mip* gene[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1998, 36(6): 1560–1567.
- [9] Cloud JL, Carroll KC, Pixton P, et al. Detection of *Legionella* species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2000, 38(5): 1709–1712.
- [10] 赵利伟, 朱庆义, 胡朝晖, 等. 实时荧光 PCR 及其在军团菌检测中的应用[J]. 中华临床医师杂志, 2011, 5(17): 13–18.
- [11] 赵利伟, 胡朝晖, 宣瑞红, 等. 聚合酶链反应-酶切分型快速鉴定环境水源军团菌属[J]. 微生物学报, 2010, 50(11): 1532–1536.
- [12] Zhan XY, Li LQ, Hu CH, et al. Two-step scheme for rapid identification and differentiation of *Legionella pneumophila* and non-*Legionella pneumophila* species[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2010, 48(2): 433–439.

科技信息摘录

人类肠道微生物群有多稳定?

研究人员研发出了一种改进了的、用来分析在我们肠道中和平相处的细菌群落的技术,这使得他们能够对这些细菌群落随着时间的推移而呈现的稳定性有所了解。对于为了长期的健康干预而用这些多样的微生物作为标靶而言,定义人类肠道微生物群落的稳定性是至关重要的。然而,科学家们对有关这些微生物株在我们肠道中是多么难以撼动却知之甚少。

现在,Jeremiah J. Faith 及其同事研发出了一种测序方法来准确追踪这些菌株。他们用这种被称作 LEA-seq 的方法对 37 人粪便中的微生物群落进行了采样,他们中有 4 人当时正在参加一个为期 32 周的进食流质饮食的项目,而其余的人则按其喜好进食。Faith 及其同事发现,在采样者中有 60% 的细菌菌株在长达 5 年的时间中仍然保持着稳定。研究人员估计,某些菌株甚至会持续不变几十年。通过评估这些人的微生物株随着时间的推移而改变及那些吃特别饮食而减肥的人的微生物株的改变,研究人员发现,体重减轻对微生物株组成的改变比时间的推移要有更明显的影响。这表明,肠道微生物群的变化可作为宿主健康及功能的标志物。

通过比较相关及不相关个体的全部微生物基因组,研究人员还发现,家庭成员共同拥有某些相同的微生物株,提示我们在很早的时候通过我们的父母而得到的微生物株能够为我们整个一生提供代谢产物。在目前针对微生物组对健康影响的研究继续进行的情况下,由该研究提供的对人类肠道微生物群稳定性的见解可被当做一种参考工具。与此同时,由 Faith 及其同事研发的新型、低误差测序方法可能会让用于个性化疾病预防的常规粪便采样变得更加可行。

——摘自《科学网》2013/7/16

<http://news.sciencenet.cn/htmlnews/2013/7/280025.shtm>