文章编号:1000-5404(2006)19-2007-02

技术方法

伤寒沙门菌细胞壁缺陷突变株16SrRNA基因的检测与分析

黄 劲[1], 王 和[2] (贵阳医学院:[1]生物化学与分子生物学教研室,[2]微生物学教研室,贵阳 550004)

提 要: 目的 探讨伤寒沙门菌细胞壁缺陷突变株的菌种相关性或亲缘性。**方法** 分离提取伤寒沙门菌细胞壁缺陷突变株及其亲代细菌型的染色体DNA,采用16SrRNA基因引物进行PCR扩增,对扩增的16SrDNA产物进行琼脂糖凝胶电泳和碱基序列测定。**结果** 经PCR扩增后伤寒沙门菌细胞壁缺陷突变株及其亲代细菌型均获得了大小约230 bp的特异性片段,其产物经琼脂糖凝胶电泳可见在230 bp处出现与其亲代细菌型一致的DNA条带,碱基序列测定显示具有同其亲代细菌型一致的核苷酸序列。**结论** 伤寒沙门菌的细胞壁缺陷突变株虽然丧失了常规细菌学可检测的绝大多数表型特征,但检测16SrRNA基因能快速、灵敏地对其进行菌种相关性或亲缘性的分析与鉴定,并且也有利于对各种不能自发返祖的细菌稳定L型进行菌种相关性或亲缘性的分析与鉴定。

造成伤寒长期、反复发生和流行的因素很多,大多数研究者认为伤寒沙门菌在自然界环境中以健康带菌者体内的携带或以细胞壁缺陷细菌的形式广泛潜伏存在,是造成伤寒难以有效控制或消灭的重要因素[1,2]。由于该突变株丧失了同其亲代细菌型一致的形态、代谢活性、表面抗原、致病性等特性以及不能自发返祖,以致采用常规细菌学方法不能对其进行菌种相关性或亲缘性的鉴定[3]。鉴于细菌16SrRNA基因是目前细菌系统分类研究中最有用和最常用的"金标准"[4]。为探讨伤寒沙门菌细胞壁缺陷突变株变异的机制及其同伤寒沙门菌的菌种相关性或亲缘性,本研究采用PCR扩增以及核苷酸序列测定与分析的方法,对伤寒沙门菌的细胞壁缺陷突变株及其亲代细菌型的16SrRNA基因进行了检测和分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 伤寒沙门菌细胞壁缺陷突变株(cell wall-deficient mutants of *Salmonella typhi*, CWDMs),用羧苄青霉素在高渗透压的LEM培养基上诱导伤寒沙门菌形成L型后,接种于非高渗培养基传代培养获得的能够在常规细菌学培养基上传代培养的细胞壁缺陷突变株,传160代保存;亲代细菌型伤寒沙门菌H901(*Salmonella typhi* H901,ST),由贵阳医学院微生物学教研室提供和鉴定。

1.1.2 引物 按文献[5]方法根据伤寒沙门菌的16SrRNA基因保守序列设计,序列分别为:引物1(1 167~1 184):5′-GCATCAGGTCAAGTCATC-3′和引物2(1 351~1 392):5′-CCCGGCTTCGTATTCAC-3′,扩增片段230 bp。北京赛百盛基因技术有限公司合成。

1.1.3 PCR扩增试剂盒 上海生工生物技术有限公司提供,内含*Taq* DNA聚合酶(5 U/μl),10×PCR缓冲液,2 mmol/L dNTP,25 mmol/L $MgCl_2$,已灭菌的ddH_2O。

1.1.4 2%琼脂糖 Electrop级,BBI公司提供,按文献[6]方法配制。

1.2 方法

1.2.1 菌种收集 用无菌生理盐水分别洗脱营养琼脂培养基培养的伤寒沙门菌及CWDMs,在4 ℃条件下以8 000×*g*离心5 min,弃掉上清,用灭菌生理盐水重复洗涤2次,贮于-20 ℃冰箱内备用。

1.2.2 CWDMs及其亲代细菌型的DNA的提取 以酚-氯仿法提取各菌株的染色体DNA。沉淀物置室温风干后,加入TE溶解,4 ℃下瞬间离心,置-20 ℃冰箱贮存备用。

1.2.3 样品DNA定量 将分离提取的CWDMs及其亲代细菌型的DNA置4 ℃下12 000×*g*离心10 min,弃尽乙醇,加入适量pH8.0的TE充分溶解DNA,用TE作25或50倍稀释并调零,于Beckman蛋白-核酸分析仪上以*D*(260)及*D*(280)测定样品DNA含量与纯度。

1.2.4 PCR扩增 分别取10×缓冲液5 μl、2 mmol/L dNTP 5 μl、0.25 μmol/L的引物1和2各1 μl、*Taq*酶1 μl、25 mmol/L $MgCl_2$ 3 μl、模板DNA(20 ng/μl)1 μl、无菌ddH_2O 33 μl(总体积50 μl)于PCR反应管内,以95 ℃预变性5 min,94 ℃变性30 s、55 ℃退火1 min、72 ℃延伸1 min的反应参数共进行30个循环,最后以72 ℃延伸7 min。

1.2.5 扩增产物检查 分别取5 μl PCR扩增产物(1 μl标准+4 μl ddH_2O,作标准分子量参照),加1 μl 6×上样缓冲液,在2%琼脂糖凝胶上(含5 μg/ml EB)以140 V稳压电泳30 min,在凝胶成像仪上观察结果并照相。

1.2.6 PCR产物回收及纯化 按文献[7]方法收集PCR扩增产物,沉淀物置室温风干后,加入TE振荡溶解沉淀,瞬间离心,置-20 ℃冰箱内贮存。

1.2.7 PCR产物克隆测序 使用ABI公司的377型全自动DNA测序仪和BigDye Terminators Cycle sequencing Kit克隆测序。由上海生工测序部完成。

1.2.8 序列分析 去除载体序列后,将所得序列与GenBank中的序列进行Blast分析。

2 结果

2.1 PCR扩增结果

PCR结果显示CWDMs及其亲代细菌型均获得大小约为

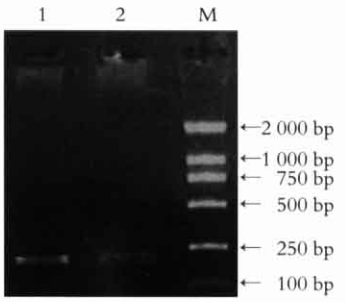
作者简介:黄 劲(1970-),女,重庆市人,硕士,讲师,主要从事细胞壁缺陷细菌变异的分子机制方面的研究。电话:(0851)6908068,E-mail:xinyuehx@163.com

收稿日期:2006-03-09;修回日期:2006-04-19

230 bp 的特异性片段。

2.2 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳

用 1 对引物扩增 CWDMs 及其亲代细菌型后，其产物经琼脂糖凝胶电泳可见在约 230 bp 处出现与其亲代细菌型一致的 DNA 条带，结果表明 CWDMs 及其亲代细菌型的 16SrDNA 序列大小类似。见图 1。



M：DNA 标准；1：伤寒沙门菌；2：CWDMs

图 1　CWDMs 及亲代菌型 PCR 扩增产物凝胶电泳图

2.3 16SrRNA 序列检测

CWDMs 及其亲代细菌型 16SrDNA 克隆测序结果表明，两者具有一致的碱基序列。

2.4 序列分析

通过 Blast 程序与 GenBank 数据库中的已知序列进行比较，结果可见 CWDMs 与 ST 具有一致的序列。表明此段基因进化上的保守性，以及在鉴定 CWDMs 与其亲代细菌型的相关性方面具有较高的灵敏性。

3 讨论

细胞壁是细菌重要的表层结构，对细菌形态、代谢、生长繁殖、致病性等特性的维系或表达具有重要作用。丧失细胞壁的细菌可发生上述相关特性的改变[8,9]。本研究可见 CWDMs 在营养琼脂平板上形成珊瑚红色的圆形凸起、湿润、边缘整齐而不透明的菌落，低倍镜下菌落为圆球形细胞堆积的颗粒样，扫描电镜（×11 000）下为表面光滑的圆球形；不被沙门菌 H 或 O 抗血清凝集等不同与亲代细菌型的特性，以及不能自行返祖。以致采用常规细菌学方法不能对其进行菌种相关性或亲缘性的鉴定，常导致病原学诊断漏诊或误诊甚至延误治疗[3]。

16SrRNA 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，细菌间无差异；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[10]。越来越多的细菌依据 16SrRNA 基因被正确分类或重分类[11]。故本研究用恒定区序列设计引物，将 16SrRNA 基因的序列扩增出来，利用其中可变区序列的差异对 CWDMs 进行分类与鉴定。16SrRNA 基因 PCR 结果显示伤寒沙门菌 CWDMs 及其亲代细菌型均可获得大小约 230 bp 的特异性片段。表明：使用 16SrRNA 基因 PCR 法能迅速、准确检测伤寒沙门菌 CWDMs，为临床诊断提供帮助。测序后，进一步与 GenBank 数据比对，CWDMs 与伤寒沙门菌 16SrRNA 基因位置在 1 166～1 352 片段序列相似性达到 100%，表明了两者在以 16SrRNA 同源性建立起来的细菌进化树中具有相同的进化地位。

检测 16SrRNA 基因有利于临床病原菌的快速诊断以及对 CWDMs 进行菌种相关性或亲缘性的分析与鉴定。较之传统方法具有迅速、灵敏和初步达到鉴定细菌种属的特点，可为临床快速诊断及合理用药提供帮助。有关将此方法应用到对其他不能自发返祖的细菌稳定 L 型菌种的检测与分析中，这是我们下一步研究的工作。

关键词：16SrRNA 基因；伤寒沙门菌；细胞壁缺陷突变株

中图法分类号：R378　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] 王　和，唐七义，徐　英，等. 伤寒杆菌和甲型副伤寒杆菌的稳定 L 型返祖性研究[J]. 贵州医药，1992，16(4)：197－199.

[2] PSVLOVA I B，ZUEV V S. Salmonella typhimurium population in water environment under the influence of temperature[J]. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol，2004，(5)：16－19.

[3] 马　莉，江　滟，易　旭，等. 细菌壁缺陷对沙门菌代谢特性影响[J]. 上海医学检验杂志，2001，16(S)：36－39.

[4] PAPADOPOULOU M，RENTZOS M，NICOLAOU C，*et al*. Cerebral Whipple's disease diagnosed using PCR：the first case reported from Greece[J]. Mol Diagn，2003，7(3－4)：209－211.

[5] 李聪智，谭德明，鲁猛厚，等. 聚合酶链反应检测细菌 16S rRNA 基因[J]. 湖南医科大学学报，1999，24(2)：136－138.

[6] 马洛伊 S R，斯图特 V J，泰勒 R K. 医用细菌遗传学实验指南[M]. 徐建国，译. 北京：科学出版社，2000：318.

[7] 林稚兰，黄秀梨. 现代微生物学与实验技术[M]. 北京：科学出版社，2000：196.

[8] 王　和. 细胞壁缺陷与细菌的演变[J]. 上海医学检验杂志，2001，16(S)：55－57.

[9] INNES C M，ALLAN E J. Induction，growth and antibiotic production of Streptomyces viridifaciens L-form bacteria[J]. J Appl Microbiol，2001，90(3)：301－308.

[10] 何　亮，陈　群，曾忠铭，等. 通过特异 PCR 扩增和 16S rDNA 序列分析检测动弯杆菌[J]. 微生物学报，2005，45(1)：27－30.

[11] HAYASHI H，SAKAMOTO M，KITAHARA M，*et al*. Molecular analysis of fecal microbiota in elderly individuals using 16S rDNA library and T-RFLP[J]. Microbiol Immunol，2003，47(8)：557－570.

（编辑　王小寒）