文章编号:1000-5404(2010)06-0537-04

论著

利用毛细管电泳-单链构象多态性快速鉴定血液感染病原菌的研究

刘春江,黄君富,夏 涵,张晓莉,王 珏,潘 虹,府伟灵 (400038 重庆,第三军医大学西南医院检验科)

[摘要] **目的** 研究毛细管-单链构象多态性(capillary electrophoresis-single strand conformation polymorphism, CE-SSCP)分析技术鉴定血液感染病原菌的可行性,并建立一种快速检测病原菌的新方法。**方法** 选取7种常见血液感染病原菌,在其16S rRNA的保守区设计通用引物,对16S rRNA基因进行扩增,然后将PCR产物进行CE-SSCP分析,依靠CE-SSCP图谱来鉴定病原菌。**结果** 通用引物能够扩增出7种病原菌;CE-SSCP分析后每种菌具有不同出峰时间:大肠杆菌(3999);金黄色葡萄球菌(4082);铜绿假单胞菌(3958);表皮葡萄球菌(4063);肺炎链球菌(4055);肺炎克雷伯菌(3980);粪肠球菌(4166)。**结论** 采用毛细管电泳-单链构象多态性分析技术可简便、快速地鉴定常见血液感染病原菌。

[关键词] 毛细管电泳;单链构象多态性;通用引物;PCR;血液感染
[中图法分类号] R378;R446.5;R515.304 [文献标志码] A

Rapid identification of blood pathogens by capillary electrophoresis-based single strand conformation polymorphism

Liu Chunjiang, Huang Junfu, Xia Han, Zhang Xiaoli, Wang Jue, Pan Hong, Fu Weiling (Department of Laboratory Medicine, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the feasibility of identifying pathogens in blood infection by capillary electrophoresis-based single strand conformation polymorphism (CE-SSCP), and to establish a new method for rapid identification of pathogens. **Methods** A pair of universal primers was designed and synthesized according to the sequences of 16S rRNA of 7 stains of blood pathogens, including *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis*, *S. pneumoniae*, *K. pneumoniae*, and *E. faecalis*. The genomic DNA of above strains was extracted. Then the highly conserved sequences of 7 pathogens were amplified with the universal primers and the extracted DNA as templates. PCR products of 16S rRNA were analyzed by CE-SSCP to discriminate 7 pathogens. **Results** Our designed universal primers amplified the 16S rRNA of 7 stains of blood pathogens. SSCP electrophoresis showed characteristic peak pattern for the different strains with different peak time respectively, *E. coli*: 3 999 ms; *S. aureus*: 4 082 *ms*; *P. aeruginosa*: 3 958 *ms*; *S. epidemidis*: 4 063 *ms*; *S. pneumoniae*: 4 055 ms; *K. pneumoniae*: 3 980 ms; and *E. faecalis*: 4 166 ms. The resulting patterns could be used to differentiate all of the pathogens mentioned above. **Conclusion** Seven pathogens are identified rapidly and conveniently by CE-SSCP.

[**Key words**] capillary electrophoresis; single strand conformation polymorphism; universal primer; blood infection

Supported by the National Science Foundation of China(30672004). Corresponding author: Fu Weiling, E-mail:weilingfu@yahoo.com; Huang Junfu, E-mail: junfuhuang@yahoo.com

血液感染常发生于免疫力低下的群体中,其中毒症状严重,病死率高。传统对于血液感染病原菌的检测方法主要依靠直接培养后的生化鉴定。此方法需要对每种病原菌进行单独培养和鉴定,比较费时、费力。因此,建立一种快速、敏感的诊断方法是很有必要的。在血液感染病原菌中,以金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、表皮葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、粪肠球菌、肺炎链球菌最为常见[1]。在本研究中,我们依靠毛细管电泳-单链构象多态性(capillary electrophoresis- single strand conformation polymorphism, CE-SSCP)

[基金项目] 国家自然科学基金(30672004)
[通信作者] 府伟灵,E-mail:weilingfu@yahoo.com
黄君富,E-mail:junfuhuang@yahoo.com

分析技术,结合细菌16S rRNA基因的PCR扩增技术,对上述7种常见病原菌进行了快速鉴定。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

本研究中所用标准菌株由温州康泰生物科技有限公司提供,共7种病原菌,包括4种革兰阳性球菌和3种革兰阴性杆菌(表1)。

表1 7种常见血液感染病原菌

细菌名称	菌株编号	属性
金黄色葡萄球菌	ATCC25923	G^+
大肠埃希菌	ATCC25922	G^-
铜绿假单胞菌	ATCC27853	G^-
表皮葡萄球菌	ATCC12228	G^+
肺炎克雷伯菌	ATCC700603	G^-
粪肠球菌	ATCC29212	G^+
肺炎链球菌	ATCC49619	G^+

1.2 主要仪器和试剂

VITEK-2全自动微生物鉴定系统(法国梅里埃公司)、PCR扩增仪(ABI GeneAmp PCR system 2700)、BIO-CAPT凝胶成像仪(法国Bio-Profil公司)、FX-DY-252X型电泳仪(上海复星高科技有限公司)、紫外分光光度计(美国Bio-RAD公司)、ABI Prism 3130 genetic analyzer;细菌DNA基因组提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)、ROX500(美国ABI公司);*Taq*聚合酶、荧光标记引物、溴化乙锭、去离子甲酰胺均购自大连宝生物有限公司。软件:ClustalX 1.81、Primer Premier 5.0和Gene Mapper4.0。

1.3 方法

1.3.1 菌株的培养和鉴定 将菌种解冻、复苏后,接种至TH肉汤培养基中,于CO_2孵箱中37 ℃培养24 h,再转种于普通血平板,37 ℃培养20~24 h。挑取培养出的菌落镜检后,用VITEK-2全自动微生物鉴定系统进行鉴定。

1.3.2 细菌基因组的提取 挑取细菌的单菌落,用生理盐水稀释,在比浊仪上调制成0.5麦氏单位,然后按DNA提取试剂盒说明书操作。提取DNA后用紫外分光光度计测定$D(260)/D(280)$的吸光度比值,并进行琼脂糖凝胶电泳。

1.3.3 设计通用引物并标记 分别查询7种血液感染病原菌16S rDNA基因的序列(http://cmr.jcvi.org/tigr-scripts/CMR/CmrHomePage.cgi),利用ClustalX 1.81软件进行多重序列比对,查找7种病原菌的保守区域,然后利用Primer Premier 5.0设计最佳通用引物并进行荧光标记:上游引物FAM-TGGCGGCGTGCCTAATACATG(对应大肠杆菌基因序列37-57);下游引物CCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTC(对应大肠杆菌基因序列326-348)。

1.3.4 PCR扩增及电泳 采用25 μl体系进行,10×buffer 2.5 μl, dNTP (2.5 mmol/L)2.5 μl,Mg^{2+}(25 mmol/L)1.5 μl,*Taq*酶(5 U/μl)0.25 μl,上、下游引物(4 μmol/L)各1 μl,模板1 μl,用灭菌去离子水补足至反应体积并作空白对照。PCR反应程序:94℃预变性5min,然后94 ℃变性40 s,58 ℃45 s,72 ℃40 s,72 ℃5 min,共30个循环。扩增完成后,将PCR产物在含0.5 μg/ml溴化乙锭的1%琼脂糖凝胶上进行电泳。

1.3.5 CE-SSCP分析 将PCR产物用无菌去离子水稀释20倍后,取1 μl加入9 μl去离子甲酰胺和0.5 μl 3 mol/L NaH 0.5 μl ROX 500的内参照品,95 ℃变性5min,迅速置于冰水混合物中10 min。CE-SSCP分析在ABI Prism 3130 genetic analyzer上按操作说明书进行。毛细管规格为47 cm×50 μm,筛分介质为POP7,电泳条件如下:进样电压15.0 Kv,电泳电压13.0 Kv,电泳温度35 ℃。FAM的最大吸收波长为495 nm,最大激发波长为520 nm。信号采集分析由DNA分析软件Gene Mapper自动完成。

2 结果

2.1 细菌DNA提取结果

菌株经形态学观察和生化鉴定显示均符合标准菌株特点。提取基因组DNA经紫外分光光度计测定$D(260)/D(280)$大于1.8,琼脂糖凝胶电泳均显示一明亮条带。

2.2 通用引物的适用性

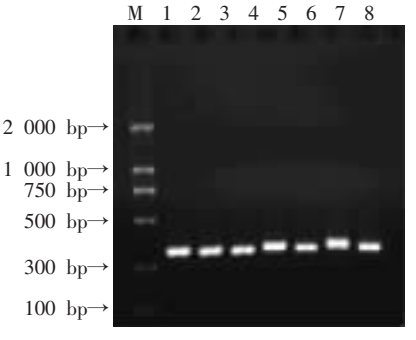
在保守区域设计的通用引物能够扩增7种病原菌,而且G^-菌的扩增效果要优于G^+菌,如图1。

2.3 CE-SSCP中各峰的鉴定

图2为7种菌的CE-SSCP电泳图。每个图中都包含一个主峰和数个很小的杂峰,主峰为每种菌16S rRNA的特异性扩增产物,即每个主峰代表了一种细菌。当使用不同浓度的DNA模版扩增时,各个菌所代表的峰面积有所变化,但各个主峰大致都呈现在同一位置。

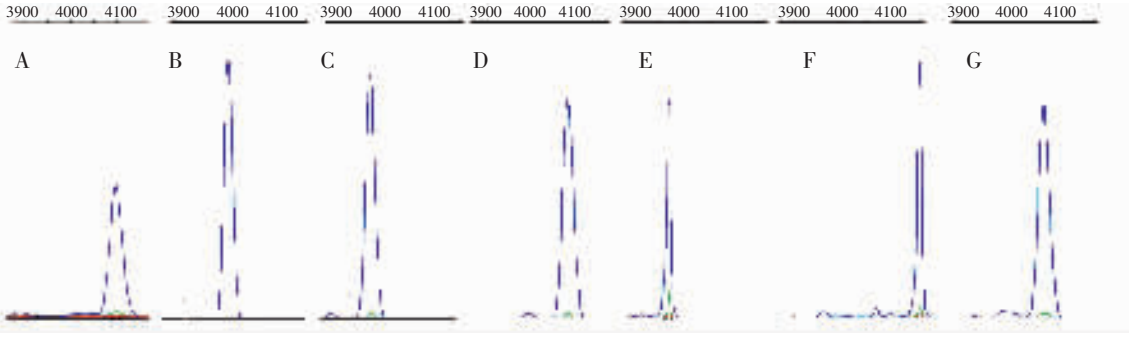
2.4 CE-SSCP中各峰的分离

为鉴定各菌峰位置的特异性,将7种病原菌的16S rRNA的PCR扩增产物混合后,进行CE-SSCP分析,结果如图3。图中呈现了7个特异性峰,分别为肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、肺炎链球菌、表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、粪肠球菌,在混合物种个峰的相对位置与单独分析时的位置是基本一致的。当模板浓度降低时,PCR产物的量减少,相应的峰面积也减小,但是出峰时间所代表的相对位置却不变,这与文献[2]报道相一致。



M:标准,1:金黄色葡萄球菌,2:大肠埃希菌,3:铜绿假单胞菌,4:表皮葡萄球菌,5:肺炎克雷伯菌,6:粪肠球菌7:肺炎链球菌,8:空白对照

图1 通用引物扩增7种病原菌PCR产物的电泳结果



A:金黄色葡萄球菌(4082);B:大肠埃希菌(3999);C:铜绿假单胞菌(3958);D:表皮葡萄球菌(4063);E:肺炎克雷伯菌(3980);F:粪肠球菌(4166);G:肺炎链球菌(4055)

图 2　7 种病原菌的 CE-SSCP 电泳图谱　(横坐标为出峰点,纵坐标为荧光强度)

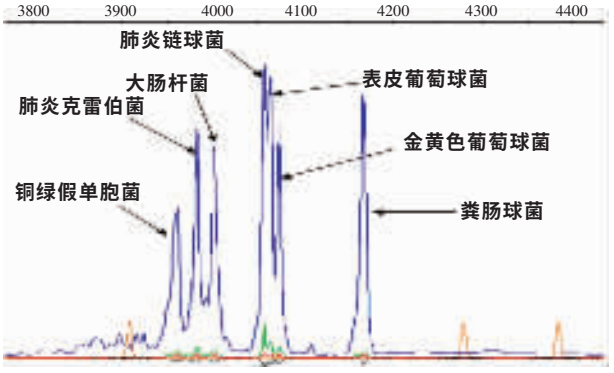


图 3　7 种病原菌扩增产物混合后的电泳图谱
(横坐标为出峰点,纵坐标为荧光强度)

3　讨论

快速、有效地鉴定血液感染病原菌不但有助于菌血症的诊断,而且对指导临床的抗菌治疗,降低患者死亡率有重要意义。本研究中,我们利用自行设计的引物 PCR 扩增 7 种病原菌后,进行 CE-SSCP 分析,能够同时对 7 种病原菌进行鉴定,而克服了传统培养法耗时长和生化鉴定法操作繁琐的缺点。

单链构象多态性分析技术是由 Orita 等[3]建立的,它是指在非变性条件下,DNA 单链可自身折叠成一定的空间构象,这种构象由 DNA 单链碱基决定。相同长度的 DNA 单链,若碱基顺序不同,甚至单个碱基不同,所形成的构象也不同,电泳迁移率也就不同,从而会出现泳动变位,以此可进行鉴别分析。DNA 单链的迁移率除与 DNA 链的长短有关外,更主要的是取决于 DNA 单链所形成的构象。它最初应用于基因的突变分析和基因分型[4],后来也应用于细菌鉴定和 mRNA 的定量[5-6]。尽管此方法应用普遍、成本低廉,但其平板上的电泳时间长,染色步骤复杂,且分辨率有限,尤其对于长片段 DNA,难以达到理想效果。而与毛细管电泳相结合的单链构象多态性分析则克服了以上缺点,它操作简便、分辨率高,而且分析速度快。在本研究中,所扩增的 PCR 产物片段在 306 ~ 330 bp 之间,但只需要数小时就能对上述常见的血液感染病原菌作出快速鉴定,而传统的培养鉴定则需数天。

16S rRNA 存在于所有的原核生物中,具有细菌“活化石”之称。我们对同一种内不同株的 16S rDNA 序列进行比对,显示序列完全一致。Oh 等[7]在研究常见食源性致病菌时,每种菌都选择了多株菌来实验,结果证明同一种菌的不同株之间的 16S rDNA 的 PCR 产物是一致的。因此,实验中我们每种细菌只选择了一种标准菌株作为实验菌株,在不影响实验结果的情况下,大大地减少了工作量。

通用引物是进行 PCR 扩增多种细菌的前提。我们在设计通用引物时,选择序列构成变化较大的前 500 个碱基,这对于 SSCP 分析是至关重要的[8,9]。从琼脂糖凝胶电泳结果可以看出,通用引物能够扩增出 7 种病原菌,但条带基本位于同一位置,而进行 CE-SSCP 分析后,7 种病原菌呈现 7 个不同的波峰,依靠 CE-SSCP 图谱中各个峰的出峰时间的差异即可对每种病原菌进行识别。测序对于突变分析有重要作用,但当样本中同时存在两种序列时却无能为力,同时其检查成本较高,敏感度也并非最好。Holmila 等[10]将 CE-SSCP 方法与变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)、直接测序(direct sequencing)等方法进行了比较,显示 CE-SSCP 有更高的敏感度(突变检出率分别为 94%、88% 和 71%)。这表明,当血液中存在两种以上细菌感染,而测序无法进行鉴定时,应用本研究中的方法可以完成鉴定。因为在本研究中,一次分析能够同时鉴定 7 种病原菌,这与测序相比显得更加便捷。

另外,本方法还有一优点就是其敏感性。在本研究中,我们采用激光诱导荧光检测系统来检测荧光标记的 PCR 产物,具有极高的灵敏度。这对于检查早期少量的细菌感染具有重要意义。

参考文献：

[1] 廖 扬，张晓兵，龚雅利，等. 血培养中病原菌的分布及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志，2005，15(4)：451－453.

[2] Chung J H, Park Y S, Kim J, *et al*. Parallel analysis of antimicrobial activities in microbial community by SSCP based on CE[J]. Electrophoresis, 2007, 28(14): 2416－2423.

[3] Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, *et al*. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction[J]. Genomics, 1989, 5(4): 874－879.

[4] Zhao C, Xu G, Shi X, *et al*. Fluorescent-based single-strand conformation polymorphism/heteroduplex capillary electrophoretic mutation analysis of the P53 gene [J]. Anal Sci, 2004, 20(7): 1001－1005.

[5] Zinger L, Gury J, Alibeu O, *et al*. CE-SSCP and CE-FLA, simple and high-throughput alternatives for fungal diversity studies[J]. J Microbiol Methods, 2008, 72(1): 42－53.

[6] Park Y S, Chu H S, Hwang S H, *et al*. A precise mRNA quantification method using CE-based SSCP[J]. Electrophoresis, 2006, 27(19): 3836－3845.

[7] Oh M H, Park, Y S, Paek S, *et al*. A rapid and sensitive method for detecting foodborne pathogens by capillary electrophoresis-based single-strand conformation polymorphism[J]. Food Control, 2008, 19(11): 1100－1104.

[8] Andersen P S, Jespersgaard C, Vuust J, *et al*. Capillary electrophoresis-based single strand DNA conformation analysis in high-throughput mutation screening[J]. Hum Mutat, 2003, 21(5): 455－465.

[9] Kozlowski P, Krzyzosiak W J. Structural factors determining DNA length limitations in conformation-sensitive mutation detection methods [J]. Electrophoresis, 2005, 26(1): 71－81.

[10] Holmila R, Husgafvel-Pursiainen K. Analysis of TP53 gene mutations in human lung cancer: comparison of capillary electrophoresis single strand conformation polymorphism assay with denaturing gradient gel electrophoresis and direct sequencing[J]. Cancer Detect Prev, 2006, 30(1): 1－6.

（**收稿**：2009-08-19；**修回**：2009-10-20）

（编辑 栾 嘉）

（上接536页）

Plt 7×10^9/L，患者出现发热和鼻出血，给亚胺培南和万古霉素抗炎等治疗、止血、输血小板等处理后好转，第11天WBC 3.91×10^9/L，第14天Plt 20×10^9/L，造血重建完成。第20天，血常规恢复正常。1个月后予以左侧腋窝溃烂愈合部局部放疗50 Gy。2个月后予以干扰素 300×10^4 U皮下注射半年，患者随访至今，病情稳定。

2 讨论

2001年WHO淋巴瘤分类中将原发于鼻腔或鼻腔以外结外器官和部位的、以血管中心病变、血管破坏和坏死为主的NK/T细胞淋巴瘤作为一种独立的病理类型。原发于鼻腔称鼻NK/TCL，少数原发于鼻以外的NK/T细胞淋巴瘤则称鼻型NK/TCL。鼻腔NK/TCL和EB病毒感染密切相关，临床表现为鼻腔肿瘤坏死性改变，中年男性较多见，病变常为局限Ⅰ～Ⅱ期，较少有区域淋巴结或远处转移，对放疗敏感但化疗抗拒，晚期预后差等特点。鼻腔NK/TCL远处转移以皮肤最常见，国内报道占39%[1]。

鼻腔NK/TCL目前尚无成熟或标准的治疗方案。国内外在治疗NK/TCL研究显示：放疗加含左旋门冬酰胺酶联合化疗及AHSCT支持下超大剂量化疗，是鼻NK/TCL常规化放疗失败后的治疗选择。Takenaka等[2,3]尝试了AHSCT治疗NK/TCL，认为这是一种有效的治疗方法。Koizumi等[4]治疗1例52岁伴有皮肤浸润的鼻NK/TCL，采用AHSCT患者无病生存率达36个月以上。Kouzaki等[5]报道1例弥漫浸润的鼻NK/TCL患者接受大剂量化疗后AHSCT获得30个月缓解。刘红等[6]报道AHSCT后，Ⅰ～Ⅱ期患者1年和2年生存率分别为55.6%(5/9例)和44.4%(4/9例)；Ⅲ～Ⅳ期患者3个月至1年内由CR到病情复发，死亡4例，2年生存率为0。而崔秀珍等[7]报道AHSCT后，22例总生存率5年为79.3%，8年为64.1%，Ⅰ～Ⅱ期患者5年生存率90%，Ⅲ～Ⅳ期患者5年生存率70%。本例患者在用局部放疗后出现远处皮肤受侵，用COTD方案联合HD-MTX治疗4个疗程好转，行CE方案加G-CSF动员，以BEAM方案预处理后进行AHSCT，患者获得CR。随访至今，本例患者持续完全缓解22个月以上。我们体会，放、化疗加AHSCT治疗NK/TCL是有效的措施。

参考文献：

[1] 石远凯. 淋巴瘤[M]. 北京：北京大学医学出版社，2007：187－198.

[2] Takenaka K, Shinagawa K, Maeda Y, *et al*. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem cell transplantation is effective for nasal and nasal-type CD56＋ natural killer cell lymphomas [J]. Leuk Lymphoma, 2001, 42(6): 1297－1303.

[3] Au W Y, Lie A K, Liang R, *et al*. Autologous stem cell transplantation for nasal NK/T-cell lymphoma: a progress report on its value[J]. Ann Oncol, 2003, 14(11): 1673－1676.

[4] Koizumi K, Fujimoto K, Haseyama Y, *et al*. Effective high-dose chemotherapy combined with CD34＋-selected peripheral blood stem cell transplantation in a patient with cutaneous involvement of nasal NK/T-cell lymphoma[J]. Eur J Haemtol, 2004, 72(2): 140－144.

[5] Kouzaki H, Kitanishi T, Kitano H, *et al*. Successful treatment of disseminated nasal T-cell lymphoma using high-dose chemotherapy and autologus peripheral blood stem cell transplantation: a case report[J]. Auris Nasua Larynx, 2004, 31(1): 79－83.

[6] 刘红，曾东风，孔佩艳，等. 自体造血干细胞移植治疗结外NK/T细胞淋巴瘤鼻型9例临床分析[J]. 重庆医学，2007，36(17)：1697－1698.

[7] 崔秀珍，王华庆，刘贤明，等. 大剂量化/放疗加自体造血干细胞移植治疗鼻型NK/T细胞淋巴瘤疗效和预后分析[J]. 中华血液学杂志，2007，28(9)：609－611.

（**收稿**：2009-10-22；**修回**：2009-12-28）

（编辑 邓强庭）