文章编号:1000-5404(2011)14-1427-05

论著

# 特异引物PCR鉴定类鼻疽伯克霍尔德菌方法的建立和优化

杨小敏[1*],方 瑶[2*],顾 江[2],陈 海[3],王海光[2],毛旭虎[2] (570102 海口,海南医学院附属医院感染病教研室[1];400038 重庆,第三军医大学医学检验系临床微生物及免疫学教研室,国家免疫生物制品工程技术研究中心[2]; 572000 海南 三亚,海南省三亚市人民医院检验科[3])

[**摘要**] **目的** 以16S rRNA编码序列为靶基因,建立特异引物PCR鉴定类鼻疽伯克霍尔德菌方法并优化。**方法** 以类鼻疽伯克霍尔德菌标准菌株K96243的16S rRNA编码序列为靶序列,通过Primer Premier 5软件搜索特异的引物,以该菌为模板,优化特异引物PCR的退火温度、退火时间和反应循环数等条件。得到最优PCR反应条件后,将该方法用于检测临床分离的类鼻疽伯克霍尔德菌菌株和常见细菌感染病原体(大肠杆菌、痢疾志贺菌、伤寒沙门菌、幽门螺旋杆菌、金黄色葡萄球菌、甲型链球菌和乙型链球菌),评价该方法的有效性和特异性。**结果** 共设计3对引物,分别扩增16S rRNA编码序列283~672、760~1 061、771~1 193片段,优化后PCR反应条件为:94 ℃预变性4 min,94 ℃变性40 s,54.5 ℃退火20 s,72 ℃延伸40 s,24个循环,最后延伸1 min;特异性分析发现此方法能将类鼻疽伯克霍尔德菌与其他常见感染病原菌进行有效地鉴别诊断。**结论** 成功建立并优化一种快速鉴定类鼻疽伯克霍尔德菌的方法,通过此方法能有效的从单个菌落中和基因组水平鉴定临床分离的8株类鼻疽伯克霍尔德菌。

[**关键词**] 类鼻疽伯克霍尔德菌;16S rRNA基因;特异引物PCR
[**中图法分类号**] R378.99;R446.5;R446.9 [**文献标志码**] A

# Establishment and optimization of a method to identify *Burkholderia pseudomallei* based on primer-specific polymerase chain reaction

Yang Xiaomin[1*], Fang Yao[2*], Gu Jiang[2], Chen Hai[3], Wang Haiguang[2], Mao Xuhu[2] ([1]Department of Infectious Diseases, Hospital Affiliated with Hainan Medical College, Haikou, Hainan Province, 570102; [2]Department of Clinical Microbiology and Immunology, College of Medical Laboratory Science, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [3]Department of Laboratory Medicine, People's Hospital of Sanya, Sanya, Hainan Province, 572000, China)

[**Abstract**] **Objective** To establish and optimize a method to identify *Burkholderia pseudomallei* based on primer-specific polymerase chain reaction (PCR). **Methods** The whole genome of *Burkholderia pseudomallei* international standard strain K96243 was used as a template to amplify the 16S rRNA encoding gene by PCR using specific primers, and the PCR conditions (annealing temperature, annealing time and cycles) were optimized at the same time. This method was then used to detect *Burkholderia pseudomallei* from other infectious bacteria (*Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella paratyphi*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus group A and Streptococcus group B*), and to identify clinical *Burkholderia pseudomallei* isolates. **Results** Three pairs of primers were selected to amplify fragments 283 – 672, 760 – 1 061 and 771 – 1 193 of 16S rRNA. The optimized PCR conditions were: pre-denaturation at 94 ℃ for 4 min, denaturation at 94 ℃ for 40 s, annealing at 54.5 ℃ for 20 s, and elongation at 72 ℃ for 40 s; there were 24 cycles, with the last elongation time of 1 min. This method was able to rapidly detect *Burkholderia pseudomallei* from other common clinical infectious bacteria and to identify 8 clinical *Burkholderia pseudomallei* isolates at a single colony or whole genome level. **Conclusion** The method to identify *Burkholderia pseudomallei* based on primer-specific PCR is successfully established and optimized, which facilitates efficient diagnosis of *Burkholderia pseudomallei*

[**基金项目**] "重大新药创制"科技重大专项(2008ZXJ09014-007)
*: 同等贡献者
[**通信作者**] 毛旭虎,电话:(023)68752315,E-mail: mxh95xy@mail.tmmu.com.cn

and treatment of diseases associated with *Burkholderia pseudomallei*.

[**Key words**] *Burkholderia pseudomallei*; 16S rRNA encoding gene; primer-specific PCR

Supported by the Major Science and Technology Project of National Significant New Drug Creation (2008ZXJ09014-007). Yang Xiaomin and Fang Yao are the first author who contributed equally to the article. Corresponding author: Mao Xuhu, Tel: 86-23-68752315, E-mail: mxh95xy@mail.tmmu.com.cn

类鼻疽伯克霍尔德菌(*Burkholderia pseudomallei*)是一种重要的人畜共患传染病病原体,主要引起宿主类鼻疽病,其临床表现为脑炎、前列腺及肝脾等内脏的全身多种脏器的脓肿,此外它还能引起难治性肺炎、严重菌血症、败血症等严重并发症,病死率高达90%[1]。该菌感染主要流行于澳大利亚北部、泰国和新加坡等热带地区[2]。就我国而言,广东、广西、海南及附属岛屿是类鼻疽发病的重灾区[3-4],该菌感染已经成为严重的公共卫生问题。

对病原体类鼻疽伯克霍尔德菌快速的诊断是治疗和预防类鼻疽病及并发症的关键。而目前尚无较好的方法用于该菌诊断和鉴别。本研究以类鼻疽伯克霍尔德菌标准菌株K96243的16S rRNA编码序列为靶序列,设计特异的引物,并以该菌为模板,优化特异引物PCR的反应条件。得到最优PCR反应条件后,将该方法用于检测临床常见细菌感染病原体和临床分离的类鼻疽伯克霍尔德菌菌株来评价该方法的有效性和特异性。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要菌种和试剂

类鼻疽伯克霍尔德菌国际标准菌株K96243(NCTC 13392)、8株临床分离株(分离自海口医学院附属医院4株、海口市人民医院1株、三亚市人民医院3株)、大肠杆菌K12(ATCC 29055)、痢疾志贺菌(CMCC 51136)、伤寒沙门菌(CVCC 526)、幽门螺旋杆菌(26695)、金黄色葡萄球菌(ATCC 12600)、甲型链球菌(CMCC 32213)和乙型链球菌(CMCC 32204,本室保存)。pMD18-T vector、PCR premix试剂(大连TaKaRa)、细菌基因组提取试剂盒(北京天根)、引物合成(上海Invitrogen)、血培养瓶(美国BD)、5%羊血平板分离细菌(中国CDC传染病预防控制所)。

### 1.2 方法

1.2.1 PCR引物的设计 从NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov)上查询得到类鼻疽伯克霍尔德菌国际标准菌株K96243的16S rRNA的编码序列,用Premier Primer 5引物设计软件,采用自动搜索功能,设计出最优的引物对。对设计好的引物分别到BLAST网站上进行比对,分析引物的特异性。

1.2.2 PCR反应条件的优化 用细菌基因组提取试剂盒提取类鼻疽伯克霍尔德菌国际标准菌株K96243全基因组作为模板,分别加入引物P1+P2、P3+P4、P5+P6各1 μl,扩增基因片段283~672(F1)、片段760~1 061(F2)和片段771~1 193(F3)。使用PCR Premix *ExTaq*试剂,总体系25 μl(Premix *ExTaq* 12.5 μl、模板1 μl、引物2 μl、$ddH_2O$ 10.5 μl)。分别对PCR反应的退火温度、退火时间、循环数进行优化。退火温度梯度为50.0、51.5、53.0、54.5、56.0、57.5 ℃;退火时间分别为20、30、40、50、60 s;PCR反应循环数分别为12、14、16、18、20、22、24、26、28、30个。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳后用Tanon-1600紫外仪检测。

1.2.3 PCR检测方法特异性 用普通LB培养基培养临床常见细菌感染菌株:大肠杆菌、痢疾志贺菌、伤寒沙门菌、幽门螺旋杆菌、金黄色葡萄球菌、甲型链球菌和乙型链球菌,使用细菌基因组提取试剂盒提取上述细菌的全基因组,以此全基因组为模板,利用1.2.2优化好的PCR反应条件,分别扩增F1、F2、F3片段,检测此方法的特异性。类鼻疽伯克霍尔德菌株K96243全基因组为阳性对照。

1.2.4 PCR方法用于临床分离菌株的检测

1.2.4.1 临床菌株的分离和鉴定 采集8例类鼻疽患者(海口医学院附属医院4例、海口市人民医院1例、三亚市人民医院3例)静脉血20 ml,使用美国BD公司的标准需氧培养瓶进行血培养,然后用5%羊血平板分离单个细菌。细菌的鉴定按照《伯杰氏细菌鉴定手册》进行(第8版)。

1.2.4.2 PCR检测方法鉴定临床菌株 用普通LB培养基培养临床分离得到的类鼻疽伯克霍尔德菌菌株,使用细菌基因组提取试剂盒提取上述细菌的全基因组,分别以此全基因组和单个菌落为模板,利用1.2.2优化好的PCR反应条件,分别扩增F1、F2、F3片段,检测临床分离菌株。类鼻疽伯克霍尔德菌株K96243的全基因组为阳性对照。

## 2 结果

### 2.1 特异引物的选择

以16S rRNA编码基因为靶基因,使用Premier Primer 5引物设计软件的高级搜索功能,限定引物长度2~20 bp,PCR产物100~400 bp,共筛选得到20对引物。根据评分,本实验选择了分数最高的前3对。见表1。

### 2.2 PCR反应条件的优化

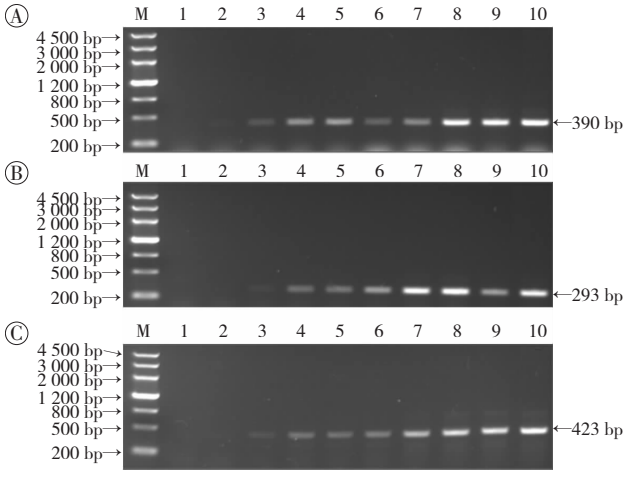
以类鼻疽伯克霍尔德菌国际标准菌株K96243全基因组作为模板,使用引物对P1+P2、P3+P4、P5+P6,分别扩增F1、F2、F3基因片段。采用的PCR反应条件为:预变性94 ℃ 4 min,94 ℃ 变性40 s,退火40 s,72 ℃延伸40 s,30个循环后最终延伸4 min。在所设置的6个退火温度50.0、51.5、53.0、54.5、56.0、57.5 ℃下,类鼻疽伯克霍尔德菌的16S rRNA编码基因

的 3 个片段 F1、F2、F3 都能特异地被扩增出来。选择退火温度为 54.5 ℃,退火时间分别为 20、30、40、50、60 s,片段 F1、F2、F3 也都能特异地被扩增出来,说明退火温度对我们所设计的 PCR 反应无明显影响。

为缩短 PCR 反应的时间,在选择退火温度 54.5 ℃,退火时间 20 s 条件下,PCR 循环数分别为 12、14、16、18、20、22、24、26、28、30 个,结果显示,片段 F1 在 14 个循环后开始出现可见条带,在 26 个循环后条带较为明显(图 1A);而片段 F2 在 16 个循环后才开始出现可见条带,在 24 个循环后条带较为明显(图 1B);片段 F3 与片段 F2 类似,分别在 16 个循环和 24 个循环后出现和变得明显(图 1C)。这些结果说明如果明显观察到特异的 3 个片段,所需要的 PCR 反应循环数仅需要 24 个就已经足够。

**表 1 16S rRNA 编码基因特异引物的设计**

| 引物 | 序列(5′→3′) | $T_m$值(℃) | 得分 | 片段位置 | 片段名称 | 产物大小(bp) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| P1 | CACTGGGACTGAGACACGG | 56.1 | 100 | 283 ~ 672 | F1 | 390 |
| P2 | CTACGCATTTCACTGCTACAC | 53.7 | 100 | | | |
| P3 | GTAGTCCACGCCCTAAACG | 55.6 | 100 | 760 ~ 1 061 | F2 | 293 |
| P4 | AACCCAACATCTCACGACAC | 55.0 | 100 | | | |
| P5 | AGTCCACGCCCTAAACGA | 56.0 | 100 | 771 ~ 1 193 | F3 | 423 |
| P6 | TGTGAAGCCCTACCCATAA | 53.6 | 100 | | | |



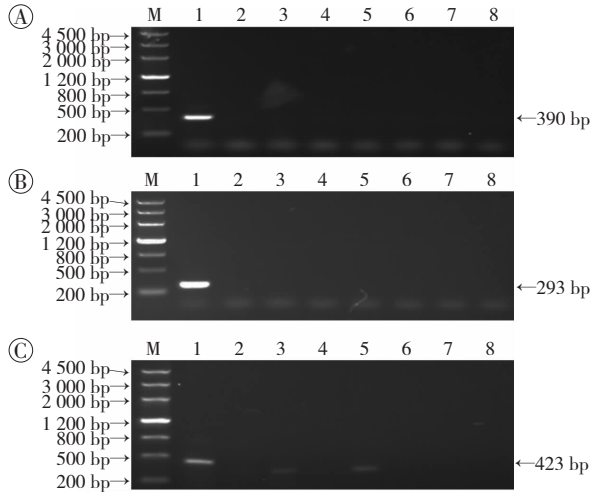

A:F1;B:F2;C:F3

M:DNA 标准;1 ~ 10:PCR 反应循环数分别为 12、14、16、18、20、22、24、26、28、30

**图 1 PCR 反应的循环数优化**

## 2.3 PCR 检测方法的特异性分析

在得到最优 PCR 反应的条件后,我们对该方法的特异性进行分析。利用 1.2.2 优化好的 PCR 反应条件,分别以大肠杆菌、痢疾志贺菌、伤寒沙门菌、幽门螺旋杆菌、金黄色葡萄球菌、甲型链球菌和乙型链球菌全基因组为模板,退火 54.5 ℃ 20 s,反应 24 个循环,分别扩增 F1、F2 和 F3 基因片段,PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。结果如图 2 所示,只有类鼻疽伯克霍尔德菌模板中扩增出了 3 个目的基因片段,在所设计的其他 7 个细菌中均未见这 3 个片段出现,说明此 PCR 检测方法特异性良好。




A:F1;B:F2;C:F3

M:DNA 标准;1:类鼻疽伯克霍尔德菌;2:大肠杆菌;3:痢疾志贺菌;4:伤寒沙门菌;5:幽门螺旋杆菌;6:金黄色葡萄球菌;7:甲型链球菌;8:乙型链球菌

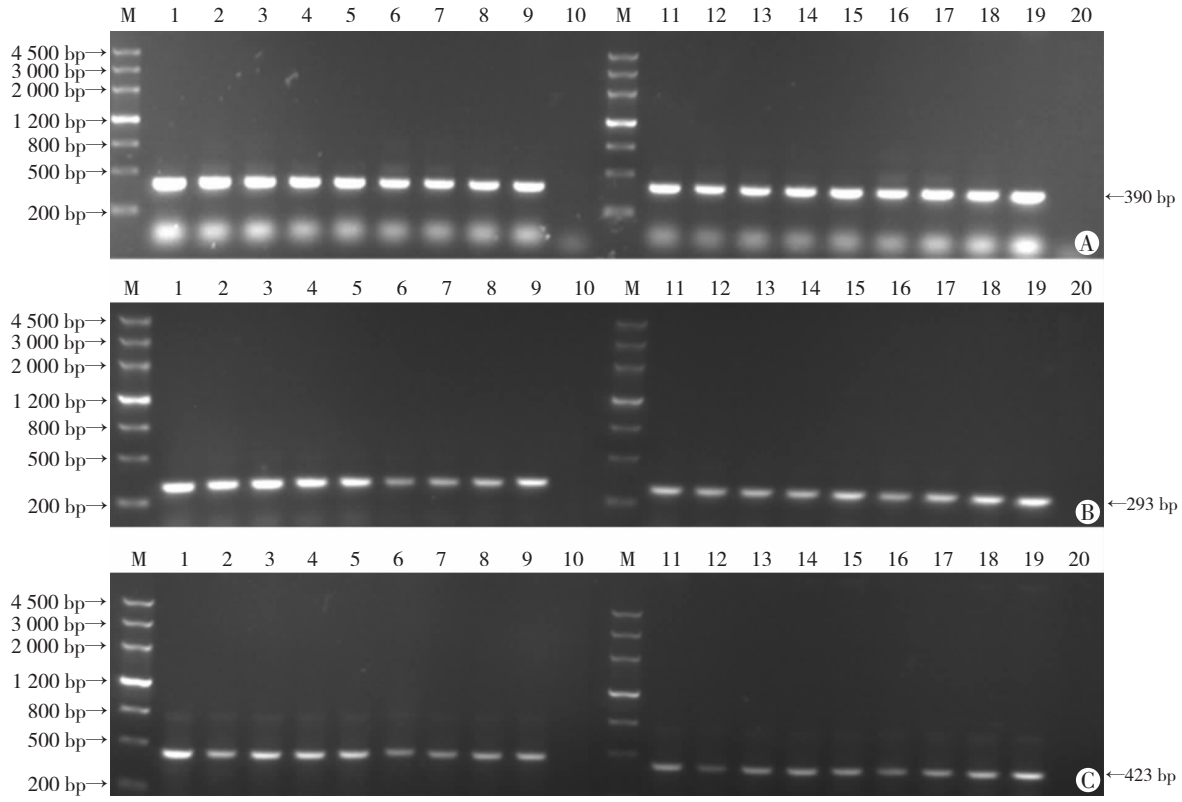
**图 2 PCR 检测方法特异性检测**

## 2.4 PCR 检测方法用于临床分离株的检测

2.4.1 类鼻疽伯克霍尔德菌临床株的分离和鉴定 按照《伯杰氏细菌手册》,我们对从 8 例类鼻疽患者血液中培养出的细菌进行了鉴定。这 8 株细菌革兰染色为阴性,略呈卵圆形杆菌,两端浓染,菌体中间着色较淡,无芽孢、无荚膜、有鞭毛。细菌在羊血平板 35 ℃培养 24 h 后形成细小、光滑、湿润、透明的小菌落,48 h 后菌落逐渐增大,形成不透明银灰色菌落,同时有狭窄的 β 溶血环,72 h 后菌落边缘逐渐出现不规则的皱褶,呈蜂窝状或同心圆状,典型的银灰色光泽的菌落,闻及强烈土霉气味(图 3)。生化特征:氧化酶阳性,不发酵葡萄糖,氧化分解葡萄糖、麦芽糖、木糖、乳糖;还原硝酸盐,分解七叶苷、液化明胶,精氨酸脱氢酶阳性、枸橼酸盐阳性。按照这些结果,结合临床患者资料和《伯杰氏细菌手册》鉴定原则,判定此 8 株细菌为类鼻疽伯克霍尔德菌。



**图 3 类鼻疽伯克霍尔德菌临床分离菌株培养 48 h 典型菌落形态**




A:F1;B:F2;C:F3

M:DNA 标准;1~10:以提取的全基因组为模板;11~20:以单个菌落为模板;1,11:K96243 菌株;2~9、12~19:分别为8株临床分离株;10、20:阴性对照

**图4 PCR检测方法用于检测临床分离的类鼻疽伯克霍尔德菌**

2.4.2 PCR方法用于临床分离类鼻疽伯克霍尔德菌的检测

分别以类鼻疽伯克霍尔德菌的8株临床分株和标准菌株K96243的全基因组和平板上生长的单个菌落为模板,退火54.5 ℃ 20 s,反应24个循环,分别扩增F1、F2和F3基因片段。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测。结果如图4所示,所检测的8株类鼻疽伯克霍尔德菌临床分离株都能扩增出F1、F2和F3基因片段,说PCR检测方法的有效性,同时结果发现直接以平板生长的单个菌落为模板时也能有效地扩增目的片段。

## 3 讨论

类鼻疽伯克霍尔德菌为人兽共患传染病病原体,在东南亚和澳洲等热带和亚热带区域广泛流行[5]。我国海南、广东、广西等南部地区已经出现了众多散发病例,是该菌的主要疫源地[6]。该菌感染引起的疾病临床症状多变,几乎能涉及任何器官(眶、面、中枢神经系统、腮腺、头颈皮下、肺、腹腔、肝、脾、肾、前列腺、骨等)。肺炎是最常见的并发症,治疗不彻底会引发菌血症,多器官损伤和败血症等严重后续并发症,病死率会高达90%。此外该菌已经具有生物战剂的特点(多重耐药、易播散、易获取、感染症状不典型等),严重威胁公共卫生安全。对类鼻疽伯克霍尔德菌快速、有效的鉴定是预防、治疗该菌引起疾病的关键,而目前尚无较好的诊断方法应用于临床。

对类鼻疽伯克霍尔德菌感染的诊断主要集中在血清学和细菌学两个方面。血清学检测常见的方法是使用ELISA方法检测患者血清中特异的抗细菌的抗体,虽然该类方法已经成功用于乙肝病毒、梅毒螺旋体感染的诊断,但在检测类鼻疽伯克霍尔德菌遇到诸多问题。首先,在类鼻疽伯克霍尔德菌感染不能有效刺激宿主产生特异性抗体,限制了改方法的使用[7-8];其次,ELISA检测方法不能有效鉴别诊断类鼻疽伯克霍尔德菌和马鼻疽伯克霍尔德菌及其他假单胞菌属菌感染的差异[9]。有实验者使用荧光标记抗体来改进ELISA技术,虽然检测类鼻疽杆菌感染的特异性有很大提高(>99%),但是敏感性下降十分明显(66%)[10]。

对类鼻疽伯克霍尔德菌的细菌学诊断主要依靠传统的细菌培养和生化方法鉴定。按照《伯杰氏细菌手册》的要求,观察细菌在培养过程中特异的菌落形态、气味、氧化酶实验、动力实验等生化反应特点。该方法的主要缺点是周期长、对鉴定操作人员要求较高、无法普遍推广,此外对类鼻疽伯克霍尔德菌的培养需要在

生物三级安全实验室中进行,大大限制该方法在基层医疗单位中开展。已经有学者通过分子生物学的手段对类鼻疽伯克霍尔德菌进行细菌学的鉴定。这些方法主要包括针对16S rRNA、23S rDNA和Ⅲ型分泌系统的Real-time PCR[11-13]。由于这些方法重复性有限、且需要昂贵的定量PCR设备等问题,使其离临床应用还有一定的距离。

本研究旨在建立一种快速鉴定类鼻疽伯克霍尔德菌的方法。以类鼻疽伯克霍尔德菌标准菌株K96243的16S rRNA编码序列为靶序列,设计了3对特异的引物,通过优化PCR的反应条件,得到最优PCR反应条件为94 ℃预变性4 min,94 ℃变性40 s,54.5 ℃退火20 s,72 ℃延伸40 s,24个循环,最终延伸1 min。将PCR检测方法能有效地将类鼻疽伯克霍尔德菌与临床常见细菌感染病原体(大肠杆菌、痢疾志贺菌、伤寒沙门菌、幽门螺旋杆菌、金黄色葡萄球菌、甲型链球菌和乙型链球菌)鉴别开来。此外,将该方法能有效从单个菌落或细菌基因组中鉴定出临床分离的类鼻疽伯克霍尔德菌菌株。

本研究通过Primer Premier 5软件共搜索到符合条件的引物26条,我们只对其中得分最高的3条进行实验验证,结果发现这3条引物的特异性都比较好,至少能够区分类鼻疽伯克霍尔德菌与其他临床常见的细菌病原体(大肠杆菌、痢疾志贺菌、伤寒沙门菌、幽门螺旋杆菌、金黄色葡萄球菌、甲型链球菌和乙型链球菌)。虽然这3条引物分别用于检测时都具有良好的特异性,单个引物就可以用于类鼻疽伯克霍尔德菌的检测,但是我们的3个引物分布在基因的不同区域,为保证检测的特异性,在不考虑成本的情况下,我们还是推荐将3条引物同时使用,来鉴别类鼻疽伯克霍尔德菌。

与目前的鉴定方法相比,本研究所建立的方法需要的设备更为简单、成本更低,适合更为广泛的推广,本方法只需要普通的PCR仪和凝胶电泳设备,每次检测的消耗也只有基本的PCR反应试剂和引物。此外本方法可以直接针对单个菌落进行鉴定,不需要提取高纯度的全基因组作为模板,大大缩短了整个鉴定过程的时间。此外,经过优化使整个PCR检测反应时间仅为40 min,加上凝胶电泳的时间,1个反应所需不到1 h。当然此方法还存在一定的不足。如该方法还是需要对类鼻疽伯克霍尔德菌进行培养得到单个菌落才能进行检测等。这些不足都将在后续的实验中进行改进和优化。

**志谢** 本研究得到中国疾病预防控制中心微生物流行病研究所张守印副研究员的指导,特此表示感谢

## 参考文献:

[1] Suwannasaen D, Mahawantung J, Chaowagul W, *et al*. Human Immune Responses to *Burkholderia pseudomallei* Characterized by Protein Microarray Analysis[J]. J Infect Dis, 2011, 203 (7): 1002-1011.

[2] Galyov E E, Brett P J, DeShazer D. Molecular insights into *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei pathogenesis*[J]. Annu Rev Microbiol, 2010, 64: 495-517.

[3] 蔡笃运, 施理, 林锋, 等. 类鼻疽伯克霍尔德菌耐药性变迁临床研究[J]. 现代预防医学, 2010, 37(6): 1134-1135, 1138.

[4] 蔡笃运, 贾杰. 104例类鼻疽伯克霍尔德菌感染与耐药性分析[J]. 重庆医学, 2009, 38(18): 2362-2363.

[5] 毛旭虎. 加强类鼻疽的研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(13): 1315-1317.

[6] Li L, He Y W. *Pseudomonas pseudomallei* and *melioidosis* in China [J]. Chin Med J (Engl), 1992, 105(9): 775-779.

[7] Ashdown L R, Johnson R W, Koehler J M, *et al*. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of clinical and subclinical melioidosis[J]. J Infect Dis, 1989, 160(2): 253-260.

[8] Ismail G, Noor-Embi M, Omar O, *et al*. A competitive immunosorbent assay for detection of *Pseudomonas pseudomallei* exotoxin[J]. J Med Microbiol, 1987, 23(4): 353-357.

[9] Rugdech P, Anuntagool N, Sirisinha S. Monoclonal antibodies to *Pseudomonas pseudomallei* and their potential for diagnosis of melioidosis[J]. Am J Trop Med Hyg, 1995, 52(3): 231-235.

[10] Ashdown L R. Demonstration of human antibodies to *Pseudomonas pseudomallei* by indirect fluorescent antibody staining[J]. Pathology, 1981, 13(3): 597-601.

[11] Chantratita N, Wuthiekanun V, Limmathurotsakul D, *et al*. Prospective clinical evaluation of the accuracy of 16S rRNA real-time PCR assay for the diagnosis of melioidosis[J]. Am J Trop Med Hyg, 2007, 77(5): 814-817.

[12] Clarridge J E 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases[J]. Clin Microbiol Rev, 2004, 17(4): 840-862.

[13] Gee J E, Sacchi C T, Glass M B, *et al*. Use of 16S rRNA gene sequencing for rapid identification and differentiation of *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei*[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(10): 4647-4654.

(**收稿**:2011-03-02;**修回**:2011-04-12)

(编辑 邓强庭)