

肺炎链球菌的扩增片段长度多态性快速检测方法的建立和应用

杨锦红 刘 洋 王新林 李方去 陶洪群 李向阳

摘 要 **目的** 建立扩增片段长度多态性(AFLP)快速检测肺炎链球菌。**方法** 针对肺炎链球菌的管家基因 16SrRNA 基因设计特异引物,优化反应条件,建立肺炎链球菌的 AFLP 检测方法。通过对 20 株肺炎链球菌和 15 株非肺炎链球菌进行检测,检验该方法的灵敏度、特异度和实用性。**结果** 活菌计数方法表明建立的 AFLP 方法检测肺炎链球菌的灵敏度为 1.5×10^3 CFU/ml。检测 20 株肺炎链球菌均为阳性,15 株非肺炎链球菌则全部阴性,特异度为 100%。**结论** 建立的 AFLP 方法检测肺炎链球菌灵敏度、特异度高,可用于肺炎链球菌的检测和流行病学调查。

关键词 肺炎链球菌 扩增片段长度多态性 快速检测

Establishment and Application of AFLP Method for Rapid Diagnosis of *Streptococcus Pneumoniae*. Yang Jinhong, Liu Yang, Wang Xinlin, Li Fangqu, Tao Hongqun, Li Xiangyang. Department of Clinical Laboratory, The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325027, China

Abstract Objective To establish a amplified fragment length polymorphism (AFLP) method for rapid diagnosis of *Streptococcus pneumonia*. **Methods** Based on the 16SrRNA nucleic sequence of *streptococcus pneumonia*, a pair of primers was designed for AFLP. The reaction conditions were optimized, and the specificity, sensitivity, and practicability of AFLP were tested using 20 *streptococcus pneumonia* strains and 15 non - *streptococcus pneumonia* strainss in blood. **Results** The results of *streptococcus pneumonia* count showed that AFLP was capable of detecting *streptococcus pneumonia* at a level as low as 1.5×10^3 CFU/ml. All the 20 strains of *streptococcus pneumonia* yielded positive results in AFLP, and the 15 strains of other bacteria all showed negative results, with a detection specificity of 100%. **Conclusion** The established AFLP method has high specificity and sensitivity for detecting *streptococcus pneumonia* and is applicable in field monitoring and epidemiological study of *streptococcus pneumonia*.

Key words *Streptococcus pneumoniae*; Amplified fragment length polymorphism; Rapid diagnosis

肺炎链球菌(*streptococcus pneumoniae*, S. p)在世界范围内仍然是一种重要的病原体,可引起肺炎、脑膜炎、中耳炎、鼻窦炎及菌血症等多种严重疾病^[1,2]。对肺炎链球菌的诊断,目前主要依赖传统方法——培养法进行检测,但是培养法需要对微生物分离、培养和鉴定等检测存在着耗时长、灵敏度低、操作繁琐等缺点,对临床快速诊断,尤其是侵袭性感染的诊断不及时,造成临床治疗上的延误。随着分子生物学技术的发展,肺炎链球菌的快速诊断研究进展迅速,其中有环介导等温核酸扩增技术(LAMP)、PCR 检测核糖体(16SrRNA)、BOX-PCR、荧光定量 PCR、免疫层析

法、DNA 探针杂交等,从基因/基因组的层面对肺炎链球菌进行快速诊断^[3,4]。

材料与方法

1. 菌株来源:2010 年 3~6 月在温州医学院附属第二医院住院患儿送检的呼吸道、血液及脑脊液标本分离的非重复的 20 株肺炎链球菌。质控菌株为肺炎链球菌 ATCC49619。

2. 仪器:Microscan Walkaway-90SI 型全自动细菌鉴定仪(德国西门子公司)、PCR 仪(德国 Eppendorf 公司产品)、电泳仪(美国 BIO. RAD 公司)、凝胶成像系统(北京六一公司)

3. 试剂:PCR 试剂和 DNA Marker I 购于 TaKaRa 大连宝生物公司,引物参照文献设计^[5],由上海生工生物技术有限公司合成。限制性内切酶 *EcoR* I、*Mse* I 购自 Fermentas 公司, DNA 分子质量对照购自 MBI 公司。*EcoR* I 接头、*Mse* I 接头、引物序列列表 1。

4. 菌种鉴定及药敏试验:挑选血平板上脐窝状的可疑菌落分纯,同时做奥普托欣(Optochin)试验,再用 Microscan Walkaway-90SI 型全自动细菌鉴定仪鉴定及药敏试验,判断标准参照 CLSI(2010 版)标准。

基金项目:温州市科技局资助项目(Y20070137)

作者单位:325027 温州医学院附属第二医院检验科(杨锦红、李方去、陶洪群、李向阳);南昌大学第一附属医院检验科(刘洋);温州市龙湾区第一人民医院(王新林)

通讯作者:杨锦红,电子信箱:wzyangjh@126.com

表 1 接头和引物序列

接头和引物	序列
EcoRI 接头	5' - CTCGTAGACTGCGTACC - 3'
	3' - CTGACGCATGGTTAA - 5'
	5' - GACGATGAGTCCTGAC - 3'
MseI 接头	3' - TACTCAGGACTGAT - 5'
	5' - CGGCGTGCCTAATACATGC - 3'
P1	5' - CGGCGTGCCTAATACATGC - 3'
P2	5' - CGTATTACCGCGGCTGCT - 3'

5. AFLP 实验:根据张顺等^[6]报道的方法改进后用于实验。(1)基因组 DNA 的制备:细菌 DNA 的制备:挑 3~5 个菌落调制成 0.5 麦氏点菌液,采取一系列稀释梯度,配制成浓度依次为 1.5×10^8 、 1.5×10^7 、 1.5×10^6 、 1.5×10^5 、 1.5×10^4 、 1.5×10^3 、 1.5×10^2 、 1.5×10 、1.5CFU/ml 的菌液,收集细菌采用 CTAB 法提取肺炎链球菌染色体 DNA 即为扩增检测的模板板,用 1% 琼脂糖电泳检测基因组 DNA,并用紫外分光光度计定量。(2)基因组 DNA 的双酶切:取基因组 DNA 各 2 μ l,内切酶 *EcoR* I 5U、*Mse* I 5U,10 $\times$ Buffer 4 μ l,补水至 40 μ l,先在 37 $^{\circ}$ C 水浴 5h,然后转入 65 $^{\circ}$ C 水浴 2h,用 1% 琼脂糖电泳检测酶切产物。(3)接头的连接反应:取酶切产物 20 μ l,*EcoR* I Adapter、*Mse* I Adapter 各 1 μ l,T 4 DNA 连接酶 0.5 μ l,10 $\times$ Buffer 3 μ l,补水至 30 μ l,22 $^{\circ}$ C,连接过夜。(4)PCR 扩增:PCR 扩增反应体系体积为 25 μ l,上下游引物(20 μ mol/L)各 0.5 μ l,dNTP (100mmol/L) 2 μ l,模板 DNA 3 μ l, MgCl₂ (25mmol/L) 1.5 μ l,10 $\times$ PCR buffer 2.5 μ l, EX Taq 酶 (5U/ μ l) 0.125 μ l, ddH₂O 14.375 μ l,混匀后进行扩增反应。循环参数为:94 $^{\circ}$ C 预变性 4min,然后 94 $^{\circ}$ C 15s $\rightarrow$ 65 $^{\circ}$ C 30s $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 15s 共 40 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。(5)电泳分析:将产物放在 6% 的琼脂凝胶中,150V 电泳 20min 后用凝胶成像仪观察 DNA 条带的分布,产物片段多在 100~600bp 之间呈现出梯状分布,特征性条带明显,具有较强的辨识度。

结 果

1. 特异度试验:检测 20 株肺炎链球菌,结果均阳性(图 1)。15 株非肺炎链球菌均阴性,金黄色葡萄球菌、草绿色链球菌、粪肠球菌、屎肠球菌、大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、变形杆菌、阴沟肠杆菌、宋内志贺菌、伤寒沙门菌、粘质沙雷菌、鲍曼不动杆菌、嗜麦芽窄食

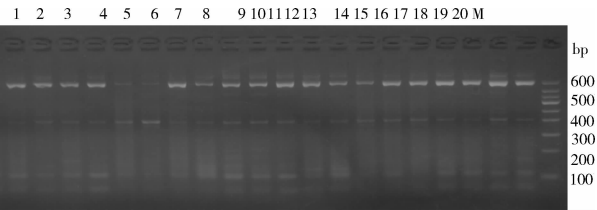


图 1 20 株肺炎链球菌 AFLP 图谱
1~19. 肺炎链球菌临床分离株;20. 肺炎链球菌 ATCC49619, M. Marker

单胞菌、洋葱伯克霍尔德菌及铜绿假单胞菌等多种细菌均为阴性,见图 2。表明 AFLP-PCR 具有良好的特异性。

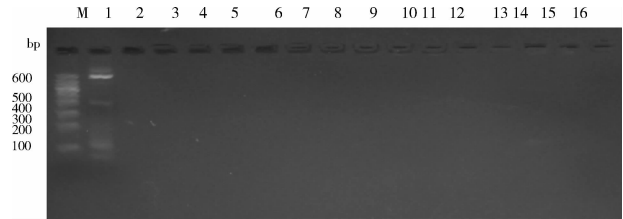


图 2 特异性试验 AFLP 结果

M. Marker, 1. 肺炎链球菌 ATCC49619; 2. 金黄色葡萄球菌; 3. 草绿色链球菌; 4. 屎肠球菌; 5. 粪肠球菌; 6. 大肠杆菌; 7. 肺炎克雷伯菌; 8. 变形杆菌; 9. 阴沟肠杆菌; 10. 宋内志贺菌; 11. 伤寒沙门菌; 12. 黏质沙雷菌; 13. 鲍曼不动杆菌; 14. 嗜麦芽窄食单胞菌; 15. 洋葱伯克霍尔德菌; 16. 铜绿假单胞菌

2. 灵敏度试验:经活菌平板计数,检测细菌原液浓度为 1.5×10^8 CFU/ml,分别进行稀释成为 1.5×10^8 、 1.5×10^7 、 1.5×10^6 、 1.5×10^5 、 1.5×10^4 、 1.5×10^3 、 1.5×10^2 、 1.5×10 、1.5CFU/ml, AFLP-PCR 方法可检测到第 6 个稀释度,最低检测浓度为 1.5×10^3 CFU/ml,见图 3。

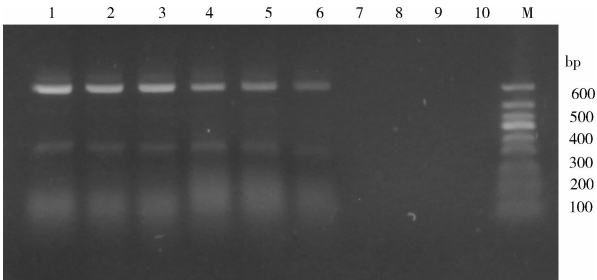


图 3 敏感性 AFLP-PCR 结果

M. Marker; 1~9 分别为 1.5×10^8 、 1.5×10^7 、 1.5×10^6 、 1.5×10^5 、 1.5×10^4 、 1.5×10^3 、 1.5×10^2 、 1.5×10 、1.5CFU/ml, 10 为空白对照

讨 论

传统细菌培养分离生化鉴定方法作为细菌诊断的金标准,检测肺炎链球菌,从微生物分离培养和形态学鉴定到生化分析,做出确诊整个过程约需 2~3 天;而对于肺炎链球菌所致感染,尤其是侵袭性的深部感染,要求快速、方便的特点,该法不能满足要求。近年来,以 PCR 技术为代表的病原核酸检测技术得到不断发展。其中,PCR、荧光定量 PCR 作为快速检测技术得到了一定的应用。然而这些方法虽然可用于快速检测,但因灵敏度和特异度上的差别,加上检

测费用较高,在现场使用有一定的局限性。扩增片段长度多态性快速检测技术是病原核酸检测技术上的长足进步,现已建立起来的 AFLP-PCR 具有高效、快速、简便的优越性,为及时快速检测提供了新方法。

本研究选择了肺炎链球菌的特异基因作为靶序列,设计了两对引物,对基因组 DNA 进行双酶切后链接,优化反应条件,选择适宜的反应液配方,建立了 AFLP 方法检测肺炎链球菌。该方法灵敏度高,最低可检测到 1.5×10^3 CFU/ml,与其他 PCR 快速诊断检测水平相当^[7,8];特异度高,未出现假阴性和假阳性,本研究所用 20 株肺炎链球菌均能检测出来,而 15 株非肺炎链球菌,包括金黄色葡萄球菌、草绿色链球菌等革兰阳性菌,也包括大肠杆菌、铜绿假单胞菌等革兰阴性菌,均未检测出来,表明特异度高,并且电泳图形具有一定的可识别性。

为了及时准确地检测出疑似病例是否为肺炎链球菌感染,需要有灵敏特异的检测方法。提取细菌 DNA 进行肺炎链球菌病原学的鉴定,尤其是与菌落形态与其相似的草绿色链球菌鉴别,是人们一直在寻找的方法。AFLP 简单、快速、敏感性好、特异性高,本研究 AFLP 条带较多,特征性强,分辨率较高,能可靠地检测出肺炎链球菌的同时,还可以分析出亲缘关

系,适合肺炎链球菌的早期诊断,尤其是无菌体液中的侵袭性感染,有着较大的诊断意义。

参考文献

- 1 綦廷娜,王和,陈峥宏.肺炎链球菌 L 型对人淋巴细胞因子分泌刺激作用[J]. 中国公共卫生,2010,26(5):610-611
- 2 Barzilay EJ, Brien KL, Kwok YS, *et al.* Could a single dose of pneumococcal conjugate vaccine in children be effective? Modeling the optimal age of vaccination[J]. Vaccine, 2006, 24(7):904-913
- 3 胡晓彦,桂炳东,王伶,等. BOX-PCR 技术在肺炎链球菌的检测中的应用[J]. 实验与检验医学,2010,28(3):209-211
- 4 樊慧珍,于化鹏,黄文杰,等. DNA 探针杂交快速检测肺炎链球菌和流感嗜血杆菌[J]. 第一军医大学学报,2005,12(10):1503-1505
- 5 Kalpoe JS, Templeton KE, Horrevorts AM, *et al.* Molecular typing of a suspected cluster of nocardia farcinica Infections by use of randomly amplified polymorphic DNA, pulsed-field gel electrophoresis, and amplified fragment length polymorphism analyses[J]. Journal of clinical microbiology, 2007, 45(12):4048-4050
- 6 张顺,蔡挺,陈琳,等. 用 AFLP 分型和分子标记研究鲍曼不动杆菌院内感染传播途径[J]. 现代实用医学,2009,21(1):7-9
- 7 Dijkshoorn L. Typing acinetobacter strains: applications and methods[J]. Acinetobacter Biology and Pathogenesis, 2009, 1(20):85-88
- 8 胡农,蔡挺,张顺,等. 耐药鲍曼不动杆菌扩增片段长度多态性分析指纹图谱数据库的建立[J]. 浙江大学学报:医学版, 2007, 36(6):537-542 (收稿:2011-06-09) (修回:2011-06-23)

两组鲍曼不动杆菌对 Hep-2 细胞黏附及致其凋亡情况的研究

刘彩霞 乔增培 杨锦红 李向阳

摘要 目的 研究全敏感与泛耐药两组鲍曼不动杆菌对 Hep-2 细胞黏附及致其凋亡情况的差异。方法 选取 20 株全敏感和 20 株泛耐药鲍曼不动杆菌,调菌浓度为 3×10^8 CFU/ml,取 0.5 ml 分别加入到 Hep-2 细胞株的单细胞层培养物中,放 5% CO₂ 培养箱分别培养 2、8、12、16 和 20h,分别用于计算 Hep-2 细胞的细胞黏附率和细胞黏附指数,不同时间段细胞凋亡情况的分析。结果 全敏感菌株对 Hep-2 细胞的黏附以分散广泛黏附为主,引起细胞株病变快且形态改变明显;泛耐药菌株对 Hep-2 细胞的黏附以局部黏附为主,易被细胞吞噬,致细胞株病变慢,诱导细胞凋亡时间较全敏感菌株滞后。两组耐药性不同的菌株在对 Hep-2 细胞的平均细胞黏附率上存在显著性差异,但在平均细胞黏附指数上的差异无统计学意义。结论 泛耐药鲍曼不动杆菌对 Hep-2 细胞表现出黏附能力和致细胞病变能力的减弱,或许是自身突变、外膜蛋白缺失及各种耐药基因插入的影响,但具体原因和机制有待进一步研究。

关键词 鲍曼不动杆菌 黏附 凋亡

基金项目:温州市科技局资助项目(Y20110095)

作者单位:325027 温州医学院附属第二医院检验科