

自发性腹膜炎常见致病菌 PCR-SSCP 图谱的建立

全敏 李炜 王琦 邢卉春 成军

【摘要】 目的 探讨自发性腹膜炎快速诊断的方法。方法 利用细菌特有 16S rRNA 基因序列片段设计引物,分别通过单引物和双引物扩增标准菌种样品,通过 PCR-SSCP 分析常见致病菌的单链构象差异。结果 建立了基于 16S rRNA 基因序列的自发性腹膜炎 7 种常见致病菌的 PCR-SSCP 图谱。结论 PCR-SSCP 技术可快速检测及鉴定自发性腹膜炎常见致病菌。

【关键词】 聚合酶链反应;单链构象多态性;细菌;自发性腹膜炎

Establishment of PCR-SSCP diagram of the common bacterial species from spontaneous bacterial peritonitis QUAN Min, LI Wei, WANG Qi, XING Hui-chun, CHENG Jun. Beijing Ditan Hospital, Peking University Teaching Hospital, Beijing 100015, China

Corresponding author: XING Hui-chun, Email: huichunxing@126.com

【Abstract】 **Objective** To investigate on the rapid diagnosis method of spontaneous bacterial peritonitis (SBP). **Methods** Primers were designed according to the 16S rRNA gene fragment sequence of bacteria. The DNA templates isolated from the standard strains were amplified using one pair and double pairs primers, then the single strand conformation polymorphism of these bacterial was analyzed by PCR-SSCP. **Results** PCR-SSCP diagram of seven common bacterial species in SBP patients was established successfully. **Conclusions** PCR-SSCP diagram could detect and identify pathogenic bacteria of SBP rapidly and conveniently.

【Key words】 Polymerase chain reaction; Single-strand conformation polymorphism; Bacteria; Spontaneous bacterial peritonitis

自发性细菌性腹膜炎是肝硬化腹水患者常见的并发症之一。研究显示,自发性细菌性腹膜炎致病菌中革兰阴性杆菌占 75%,以大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌为主^[1]。目前诊断 SBP 的金标准是细菌培养,由于其阳性率低,花费时间长,迫切需要开发快速、灵敏的检测方法。PCR-SSCP 技术在多项领域中已有研究,如微生物领域结核分枝杆菌耐药基因的检测^[2]和汉坦病毒基因分型等^[3];目前尚少见应用于诊断 SBP 的研究,为此,本研究应用基于细菌 16S rRNA 的 PCR-SSCP 技术,建立 SBP 常见致病菌 PCR-SSCP 图谱,为进一步探讨该技术在自发性细菌性腹膜炎快速诊断中的价值奠定了基础。

材料与方法

一、材料

1. 标准菌株:标准菌株均来自本院检验科保存

菌株,分别为大肠埃希菌(ATCC25922)、大肠埃希菌(产酶型)、铜绿假单胞菌(ATCC27853)、金黄色葡萄球菌(ATCC25923)、肺炎克雷伯菌(ATCC26114)、粪肠球菌、屎肠球菌和鲍曼不动杆菌。上述菌株的 DNA 均经序列测定,与 GenBank 中相应标准株序列同源性为 98%。

2. 仪器及试剂:PCR 仪(ABI 公司);凝胶成像系统(北京六一仪器厂);Bio-RAD 电泳仪;Go Taq 酶及 DNA marker(大连宝生生物工程有限公司);引物由上海生工生物技术有限公司合成,Wizard 基因组纯化试剂(Promega, USA)。

3. 引物设计:从数据库(GenBank 或 The European Ribosomal RNA Database, <http://rrna.uia.ac.be/ssu/>)中查找致自发性细菌性腹膜炎的常见病原菌如大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、阴沟肠杆菌和变形杆菌等的 16S rRNA 序列,根据恒定区序列设计引物,扩增可变区,同时选用文献中的引物作为参考比较,选取最适合的引物,见表 1^[4-5]。

二、方法

1. 样品 DNA 制备:取过夜培养的菌液 1 ml,按照 Wizard 基因组纯化试剂盒说明书提取细菌 DNA,

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.01.003

基金项目:首都医学发展科研基金(No. 2007-3054)

作者单位:100015 北京,北京大学北京地坛医院教学医院(全敏、邢卉春、成军);北京老年医院(李炜);首都医科大学附属北京地坛医院(邢卉春、王琦、成军);新发突发传染病研究北京市重点实验室(全敏、王琦、成军)

通讯作者:邢卉春,Email:huichunxing@126.com

-20℃条件下保存以备 PCR 扩增用。

表 1 本研究 PCR 所采用的引物序列

可变区	引物(5'→3')	产物大小(bp)
V6	P11P(59-GAGGAAGGTGGGGATGACGT)1173-1192 P13P(59-AGGCCCGGAACGTATTAC)1370-1389	217
V2	ER10(59-GGC GGA CGG GTG AGT AA)103-119 ER11(59-GACTGCTGCTCCCGTAG)341-357	255

2. PCR 扩增:以提取的细菌 DNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 反应体系为 25 μl。PCR 反应参数为:95℃ 5 min,94℃ 1 min,60℃ 1 min,72℃ 30 min,35 个循环。取 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳。

3. SSCP 操作步骤:(1)DNA 样品变性:SSCP 变性缓冲液(98% 去离子甲酰胺,pH8.0 浓度为 10 mmol/L 的 EDTA,0.025% 二甲苯青,0.025% 溴酚蓝)。样品与上样缓冲液等量经 PCR 仪(或沸水浴)95℃ 变性 10 min 后置于冰上,静置 5 min,以免变性产物复性。根据 PCR 产物的大小选择聚丙烯酰胺凝胶。

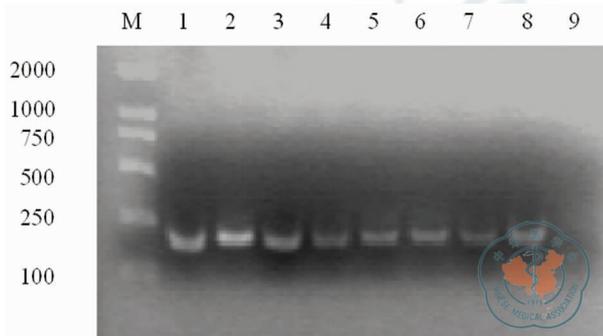
(2)电泳:于冰上或 4℃ 科研室操作,150 V 预电泳 30 min,200 V 高电压电泳 5 min,150 V 恒压电泳 3 min。

(3)银染:染色液(0.2% 的 AgNO₃,1% 冰醋酸、10% 无水乙醇)银染 20 min,蒸馏水漂洗 2 次。显影:显影液(3% 的无水 NaOH,每 200 ml 溶液加 1 ml 甲醛)显色 15 min,凝胶摄像。

结 果

一、标准菌 DNA 样品经 PCR 扩增结果

使用引物 P11P 和 P13P 扩增 7 种常见致病菌 DNA 样品的 PCR 产物,图 1 可见阳性条带(217 bp)。

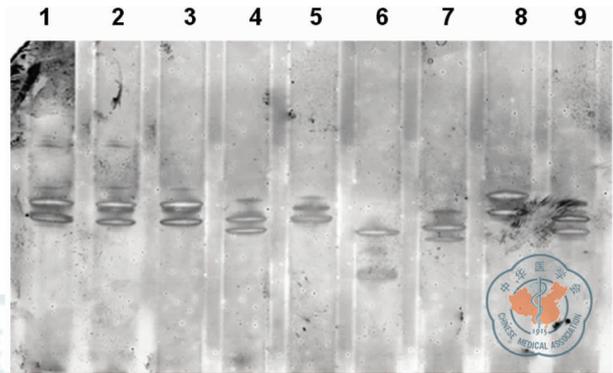


注:EB 染色;M:2000 bp DNA marker;1:大肠埃希菌(ATCC 25922);2:大肠埃希菌(产酶型);3:鲍曼不动杆菌;4:肺炎克雷伯杆菌;5:粪肠球菌;6:尿肠球菌;7:铜绿假单胞菌(ATCC 27853);8:金黄色葡萄球菌(ATCC 25923);9:空白对照

图 1 PCR 扩增 7 种自发性腹膜炎常见感染菌 DNA 产物的琼脂糖凝胶电泳图

二、SBP 常见致病菌 SSCP 分析图谱

将 7 种常见致病菌 PCR 产物变性后经非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离单链,图 2 可见不同菌种得到的单链构象存在差异,从单链的位置和距离可鉴别菌种的不同。可见同一菌种条带的位置和单链距离基本一致,不同菌种各有差异。



注:单引物 P11P, P13P, 银染;1:大肠埃希菌(ATCC 25922);2:大肠埃希菌;3:大肠埃希菌(产酶型);4:鲍曼不动杆菌;5:肺炎克雷伯杆菌;6:粪肠球菌;7:尿肠球菌;8:铜绿假单胞菌(ATCC 27853);9:金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)

图 2 单一引物 PCR 扩增 7 种自发性腹膜炎常见感染菌的 DNA 产物的 SSCP 图

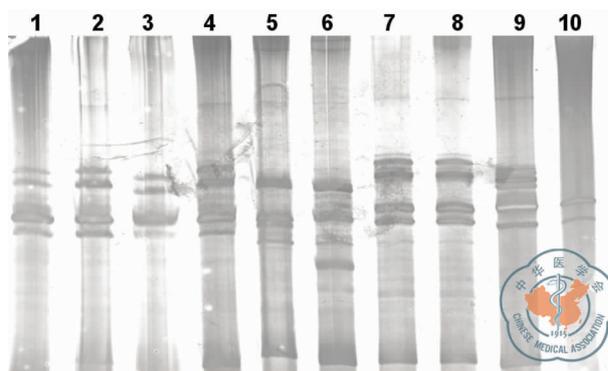
为更好的鉴别常见 SBP 致病菌,本研究应用两对引物(ER10、ER11 与 P11P、P13P)同时扩增标准菌 DNA,产物变性后经非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,与图 2 相比单链条带的数目增加,不同菌种的单链位置和距离均有差异,得到的标准菌图谱更有利于鉴别菌种。可见,双引物扩增产物所得条带数目和距离均有不同,增加了鉴别菌种的灵敏度。

讨 论

随着分子生物学理论和技术的飞速发展,对细菌染色体或染色体外的 RNA/DNA 片段进行分析已成为细菌分类和鉴定的有价值的方法。目前应用较多的是以 16S rRNA 为基础的分子生物学技术。16S rRNA 是细菌核糖体小亚单位中的核糖核酸(ribosomal ribonucleic acid, rRNA),长度约为 1600 bp(每一种原核生物 16S rRNA 基因长度略有差异,如大肠埃希菌为 1541 bp)。16S rRNA 基因序列为 16S rDNA,可变区与恒定区序列相间。根据恒定区设计通用引物进行 PCR 扩增,可判断细菌的存在与否;通过分析扩增产物的序列,可对细菌进行种属鉴定和分类。目前,每一种细菌的 16S rRNA 基因序列几乎全部已完成测定^[6]。

基于 16S rRNA 用于细菌种属鉴定的常用分子生物学技术包括 PCR-限制性片段长度多态性分析 (restriction fragment length polymorphism, RFLP)、PCR-单链构象多态性 (single-strand conformation polymorphism, SSCP); PCR-反向核酸杂交 (nucleic acid hybridization) 及基因芯片等, 尚世强等^[7-8] 采用 PCR-RFLP 及测序技术, 建立检测不同属、不同种细菌的 16S ~ 23S rRNA 基因区间的特异图谱, 对临床上常见的细菌 (如肺炎克雷伯菌和葡萄球菌等) 进行检测, 与常规细菌培养比较阳性率显著增高。但 PCR-RFLP 需预先设计可供鉴别的酶切位点, 故需预先知晓被扩增的核酸序列, 故只能用于已知菌的检测, 且检测菌种有限。与前述的几种方法相比, PCR-SSCP 操作简单、经济快捷、在相同条件下重复性好, 且不需预先知晓待测菌基因序列、不需特殊仪器, 便于临床推广应用。1989 年, PCR-SSCP 作为一种快速、灵敏的筛选点突变和反映基因多态性的方法被提出并推广应用^[9]。此方法主要基于 DNA 单链上碱基及碱基顺序的不同来检测差异性^[10]。近年来该方法已得到了不断完善和发展, 目前已经成为临床上快速检测细菌耐药性突变和环境微生物中研究微生物群落多样性的重要技术手段^[11]。其基本原理是由于碱基的不同导致 DNA 分子构象的差异, 在电泳过程中不同构象的单链迁移率就会出现差异。

本研究采用改良的银染方法对凝胶进行染色, 其机制为 Ag^+ 与核酸上 NH_2 结合后, 在还原剂作用下还原为 Ag , 显示为黑色条带, 通过各样品在凝胶上黑色条带位置的差异可判断样品是否存在差异。SSCP 方法最初是采用放射性同位素进行末端标记, 但该方法污染大, 且操作复杂。目前银染是较普遍的染色方法, 因其操作简单, 费时少, 其检测敏感性与同位素相近, 但无同位素污染, 费用较低, 故本研究采用改良后的银染方法。通过 SSCP 分析图可以看出不同细菌之间的条带数目不一样, 一般变性后会出现两条带。条带的位置和两条带之间的距离是区别不同细菌的关键。为了更精确的区别菌种, 本研究采用双引物扩增细菌 16S rDNA, 进行 SSCP 分析 (图 3), 结果显示 DNA 样品变性后得到更多的单链条带, 更易发现差异, 有利于鉴别菌种。



注: 双引物: ER10、ER11 与 P11P、P13P; 银染; 1: 大肠埃希菌, 2: 大肠埃希菌 (产酶型), 3: 肺炎克雷伯杆菌, 4: 鲍曼不动杆菌, 5: 屎肠球菌, 6: 粪肠球菌, 7~8: 葡萄球菌, 9~10: 铜绿假单胞菌

图 3 双引物 PCR 扩增 7 种自发性腹膜炎常见感染菌的 DNA 产物的 SSCP 图

本研究成功地构建了自发性细菌性腹膜炎常见菌的 PCR-SSCP 图谱, 为进一步探讨该技术在自发性腹膜炎快速诊断中的价值奠定了基础。随着 PCR-SSCP 分析操作系统化, 有望成为检测和鉴定自发性腹膜炎致病菌种的简便、快捷的方法。

参 考 文 献

- 李摇智, 周全胜, 樊和斌, 等. 肝硬化并发自发性腹膜炎腹水病原菌及药物敏感性分析. 现代中西医结合杂志, 2011, 20(3): 289-290.
- 包洪, 于庭, 刘爱忠, 等. PCR-SSCP 方法用于痰标本中结核分枝杆菌耐药基因的检测. 中国实验诊断学, 2007, 11(1): 82-84.
- Li J, Liu YX, Zhao ZT, et al. Genotyping of hantaviruses occurring in Linyi China, by nested RT-PCR combined with single-strand conformation polymorphism analysis. Acta Virologica, 2009, 53(2): 121-124.
- Widjoatmodjo MN, Fluit AC, Verhoef J. Rapid identification of bacteria by PCR-single-strand conformation polymorphism. J Clin Microbiol, 1994, 32(12): 3002-3007.
- Widjoatmodjo MN, Fluit AC, Verhoef J. Molecular identification of bacteria by fluorescence-based PCR-single-strand conformation polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. J Clin Microbiol, 1995, 33(10): 2601-2606.
- Wuyts J, Van de Peer Y, Winkelmans T, et al. The European database on small subunit ribosomal RNA. Nucleic Acids Res, 2002, 30(1): 183-185.
- 尚世强, 董关萍, 付君芬, 等. 细菌 16S-23S rRNA 基因特异 DNA 图谱的分子诊断. 中华儿科杂志, 2003, 41(9): 692-696.
- 张旋, 闫志勇, 王斌, 等. UP-PCR 结合 RFLP 快速检测体液标本中病原菌的初步研究和应用. 首都医药, 2003, 10(22): 49-51.
- Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, et al. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. Genomics, 1989, 5(4): 874-879.
- Guo CY, Xu XF, Wu JY, et al. PCR-SSCP-DNA sequencing method in detecting PTEN gene mutation and its significance in

human gastric cancer. World J Gastroenterol, 2008, 14 (24) :
3804-3811.

(收稿日期:2012-06-23)

(本文编辑:孙荣华)

- 11 顾真庆,冯志新,王占伟,等. PCR-SSCP 技术在微生物检测中的应用. 生物技术通报,2011,27(2):70-73.

全敏,李炜,王琦,等. 自发性腹膜炎常见致病菌 PCR-SSCP 图谱的建立[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版, 2013,7(1):11-14.



中华医学会