

16 S rRNA 序列分析法与传统生化分析法对分枝杆菌分型鉴别的比较研究

叶雅丽 闫李侠 黄至澄 陈保文 王国治

[摘要] 目的 比较 16S rRNA 序列分析法与传统生化分析法鉴别 54 株分枝杆菌模式菌株的异同。方法 采用 PCR 方法扩增 54 株分枝杆菌模式菌株 16S rRNA 序列,通过序列比对构建发育树状谱,计算相似性,并与传统生化分析分型结果进行比较。结果 16S rRNA 序列分析可鉴定出 41 株(41 种)分枝杆菌,其它 6 组(包括 13 株 11 种)的分枝杆菌 16S rRNA 序列两两之间相同无法区别,传统的生化分析方法难以区分鸟分枝杆菌和胞内分枝杆菌、龟分枝杆菌和偶然分枝杆菌,但采用 16S rRNA 很容易区分;16S rRNA 基因无法区分海分枝杆菌与溃疡分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌和胃分枝杆菌,但采用传统生化分型方法很容易区分。结论 在分枝杆菌的分型鉴定方面,分枝杆菌 16S rRNA 基因序列分析与传统分型均十分有效,且两者的联合应用,能够提高鉴定的准确性。

[关键词] 分枝杆菌; 16S rRNA 序列; 鉴别

Comparison between 16S rRNA gene sequence analysis and traditional biochemistry method for identifying Mycobacteria YE Yali, YAN Lixia, HUANG Zhicheng, et al. Department of Laboratory Medicine, Huangyan Hospital of Wenzhou Medical University, Taizhou First People's Hospital, Taizhou 318020, China.

[Abstract] **Objective** To analyze the difference between 16S rRNA sequence analysis and traditional biochemistry method for identifying mycobacteria. **Methods** 16S rRNA sequence analysis was used to analyze the genotype of 54 reference strains of mycobacteria, construct phylogenetic tree and calculate similarity. Its results were compared with those detected by traditional biochemistry method. **Results** All 41 mycobacteria strains (total 41 kinds) could be discriminated for the difference of 16S rRNA except 6 couple of mycobacteria (including 11 kinds and 13 strains) which have the same 16S rRNA sequences between each other. *M. avium* and *M. intracellulare*, *M. chelonae*, *M. chelonae* and *M. fortuitum* were difficult to be identified by traditional biochemistry method but easy to be discriminated by 16S rRNA gene sequence grouping. *M. ulcerans* and *M. marinum*, *M. gastri* and *M. kansasii* could not be identified with 16S rRNA gene sequence analysis but could be discriminated by traditional biochemistry method. **Conclusions** 16S rRNA gene sequence analysis and biochemistry method were accurate and efficient to discriminate Mycobacteria. The combination of the two methods can improve the accuracy of identification.

[Key words] Mycobacteria; 16S rRNA sequence; identify

由于人口流动、感染、病原菌耐药和免疫抑制剂的广泛使用,结核和非结核分枝杆菌病的发病率

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2019.07.005

基金项目:“十二五”国家重大科技专项(2012ZX10004702)

作者单位:318020 浙江台州,温州医科大学附属黄岩医院、台州市第一人民医院检验科(叶雅丽、闫李侠、黄至澄);中国北京中国食品药品检定研究院菌苗室(陈保文、王国治)

通讯作者:闫李侠,Email:lixia059@126.com

在世界范围内有所增高^[1]。分枝杆菌菌种鉴定为流行病学调查、临床诊断和治疗以及预后提供了重要依据。涂片镜检、培养特性和生化反应是诊断分枝杆菌的金标准,但步骤繁琐、耗时过长。rRNA 基因是最常用的细菌系统发育分类和鉴定的靶基因,其中 16S rRNA 基因检测在细菌学和分类学上广泛应用^[2,3]。然而,在分枝杆菌模式菌株的 16S rRNA 基因方面的系统研究报道很少^[4-7]。本次研究采用 16S rRNA 基因序列分析和传统生化分型方法鉴定《伯

杰细菌鉴定手册》中54株分枝杆菌的模式株,并对比结果是否相同,为临床菌株的鉴定提供参考。

1 材料与方法

1.1 研究菌株 本次研究中使用的54株分枝杆菌模式菌株由DSMZ(德国菌种保藏管理中心)引进并存放于中国医学细菌保藏管理中心。

1.2 引物设计 扩增引物与测序引物来源于上海英俊生物公司,上游:5'-CAC ATG CAA GTC GAA CGG AAA GG-3'。下游:5'-GCC CGT ATC GCC CGC ACG CT-3'。

1.3 方法

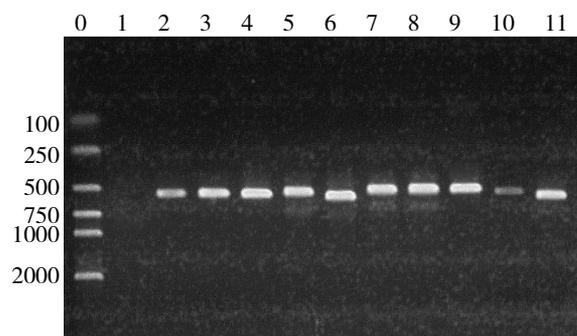
1.3.1 16S rRNA 基因序列分析法 将分枝杆菌模式菌株接种于改良Roche(罗氏)培养基上,并将慢速生长的分枝杆菌在37℃或28℃培养3~4周,快速生长的分枝杆菌培养1周。无菌操作下挑取生长良好的菌落,灭活后用TE Buffer提取模板DNA,并进行PCR扩增,扩增条件为94℃预变性5 min,按变性(94℃ 1 min)、退火(64℃ 1 min)、延伸(72℃ 1 min)的顺序进行30个循环,扩增产物用1%琼脂凝胶电泳验证。DNA的纯化和回收采用日本TAKARA公司的纯化试剂盒(DV805A)。测序外送至上海生工生物公司完成,测序结果采用Clustalx 1.83软件和DNASar的MegAlign软件分析。

1.3.2 传统生化分型法 用改良Roche培养基接种模式菌株并增菌传代。通过细菌的生长特点和生化反应(28℃生长试验、硝基苯甲酸生长试验、细菌生长速度、菌落形态、菌落颜色)区分该菌株是属于结核分枝杆菌复合群还是非结核分枝杆菌。鉴定为结核分枝杆菌复合群的通过进一步生化反应,如噻吩-2-羧酸脲生长试验、硝酸还原试验和烟酸试验等鉴定菌种;鉴定为非结核分枝杆菌的则根据生长速度的快慢进一步确定为快速生长或慢速生长的分枝杆菌。

1.4 统计学方法 对54株分枝杆菌模式菌株的16S rRNA序列件进行比对时使用Clustalx 1.83软件,采用邻位相连法绘制分枝杆菌的聚类分析树状谱,DNASar的MegAlign软件用于计算分枝杆菌菌株之间的相似程度。

2 结果

2.1 成功扩增出54株分枝杆菌的16S rRNA 基因片段,并进行测序,长度为585 bp,与目的DNA片段的长度一致,见图1。



注:0:DNA分子量Marker DL2 000;1:阴性对照;2~11:分枝杆菌DNA。

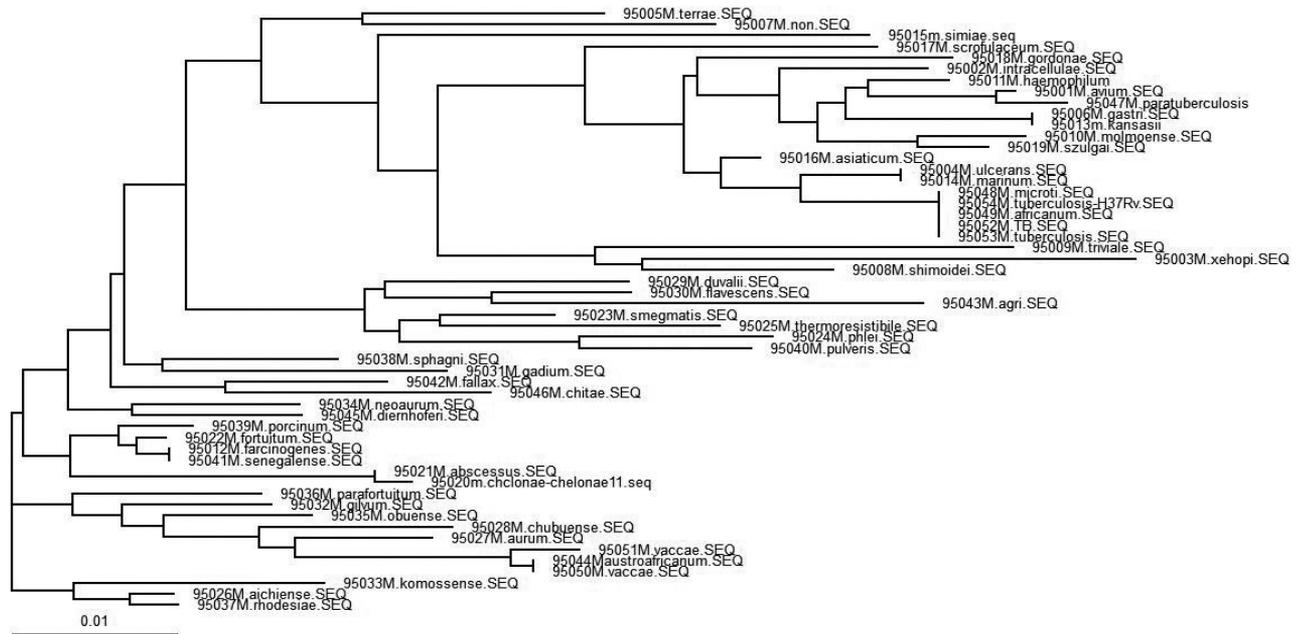
图1 分枝杆菌16S rRNA基因5'端PCR扩增结果

2.2 54株分枝杆菌模式菌株之间16S rRNA 基因序列比对分析见图封二图1和图2~3

由封二图1可见,6组(13株11种)分枝杆菌16S rRNA 基因5'端DNA序列比对完全一致,分别为塞内加尔分枝杆菌(95041)与产鼻疽分枝杆菌(95012);海分枝杆菌(95014)与溃疡分枝杆菌(95004);胃分枝杆菌(95006)与堪萨斯分枝杆菌(95013);脓肿分枝杆菌(95021)与龟分枝杆菌(95020);田鼠分枝杆菌(95048)与非洲分枝杆菌(95049);3株结核分枝杆菌(95052)(95053)(95054)。

由图2可见,41株(41种)分枝杆菌16S rRNA 基因序列存在差异,但6组(13株11种)分枝杆菌16S rRNA 基因的聚类分析结果完全相同,分别为塞内加尔分枝杆菌(95041)与产鼻疽分枝杆菌(95012);海分枝杆菌(95014)与溃疡分枝杆菌(95004);胃分枝杆菌(95006)与堪萨斯分枝杆菌(95013);脓肿分枝杆菌(95021)与龟分枝杆菌(95020);田鼠分枝杆菌(95048)、非洲分枝杆菌(95049)与3株结核分枝杆菌(95052)(95053)(95054)。

由图3可见,大部分分枝杆菌16S rRNA 基因序列在长度及排列上具有高度变异性,16S rRNA 基因可以将它们做明确的鉴别,相似程度是91.7%~99.9%。结果中6组(13株11种)分枝杆菌的16S rRNA 基因序列分别相同且无法鉴别,各组内DNA的相似程度为100%。分枝杆菌模式菌株中亲缘关系比较相近的还包括爱知分枝杆菌和罗德岛分枝杆菌;南非分枝杆菌和母牛结核分枝杆菌;塞内加尔分枝杆菌和猪分枝杆菌、偶然分枝杆菌,这些菌株的相似程度依次是99.7%、99.8%、99.9%。



注:标尺代表 16S rRNA 基因序列差异 0.01(1%)所对应的进化距离。

图2 基于分枝杆菌标准菌株 16S rRNA 基因的聚类分析树状谱

		Percent Identity																													
		96.8	97.8	98.4	97.6	97.1	97.3	96.0	95.8	96.1	95.9	95.9	96.1	96.3	96.2	96.2	96.5	96.5	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.7	96.5	95.7	96.5	96.3	97.1	21	95045M diemhoferi
		97.0	97.5	97.9	97.6	97.5	97.7	96.3	96.0	96.4	96.4	96.4	96.3	96.6	96.6	96.4	96.7	96.7	96.3	96.3	96.3	96.3	96.9	96.9	96.0	96.9	97.2	97.3	22	95042M fallax	
		97.2	97.2	97.5	97.3	97.1	97.4	95.8	95.6	95.9	95.8	95.8	95.9	96.1	96.1	96.0	96.3	96.3	96.0	96.0	96.0	96.0	96.0	96.5	96.4	95.7	96.2	97.0	96.9	23	95046M chitae
		97.2	97.9	98.2	98.0	97.2	97.7	96.4	96.1	96.3	96.2	96.2	96.3	96.5	96.5	96.8	97.0	97.0	96.6	96.6	96.6	96.6	96.6	97.2	96.8	95.9	96.5	96.8	97.1	24	95038M sphagni
		97.2	97.5	98.3	98.2	97.5	97.7	96.7	96.4	96.6	96.6	96.5	96.5	96.5	96.8	96.8	96.7	96.9	96.9	96.8	96.8	96.8	96.8	97.4	97.1	96.0	96.7	96.8	97.5	25	95031M gadium
		94.9	95.1	95.4	94.8	94.6	94.6	92.4	92.0	92.5	92.2	92.2	92.4	92.7	92.7	92.4	92.4	92.4	92.2	92.2	92.2	92.2	92.8	92.8	91.9	92.9	92.9	94.1	26	95030M flavescens	
		4.2	98.1	98.0	97.8	97.2	97.5	95.9	95.3	95.7	95.4	95.4	95.8	96.1	96.2	95.8	95.6	95.6	95.4	95.4	95.4	95.4	95.4	96.0	96.0	94.9	95.9	96.3	95.8	27	95043M agri
		4.7	98.8	98.0	98.2	98.3	96.4	96.1	96.5	96.3	96.3	96.3	96.5	96.6	96.5	96.4	96.4	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.9	96.9	95.1	96.4	96.0	97.1	28	95029M duvalii	
		4.7	2.8	98.8	98.4	98.7	96.4	96.1	96.5	96.3	96.3	96.3	96.5	96.6	96.5	96.4	96.4	96.3	96.3	96.3	96.3	96.3	96.9	96.9	95.5	96.5	96.3	97.5	29	95023M smegmatis	
		4.7	4.3	2.4	98.8	98.5	96.0	95.7	96.1	95.8	95.8	95.9	96.1	96.2	96.1	96.0	96.0	96.0	96.0	96.0	96.0	96.5	96.5	95.6	95.9	96.3	96.8	30	95025M thermoresistibile		
		6.3	4.0	3.8	4.3	98.9	96.3	96.0	96.5	96.3	96.3	96.3	96.6	96.6	96.4	96.4	96.4	96.3	96.3	96.3	96.3	96.9	97.1	95.3	96.3	96.4	97.4	31	95024M phlei		
		5.9	3.8	3.0	3.0	2.2	96.7	96.4	96.8	96.5	96.5	96.6	96.8	96.9	97.0	96.7	96.5	96.5	96.5	96.5	97.2	97.5	95.8	96.8	96.5	97.2	32	95040M pulveris			
		8.0	6.7	7.1	7.7	7.1	6.7	99.4	99.3	99.0	99.0	99.3	99.2	99.4	98.8	99.0	99.0	98.9	98.9	98.9	98.9	99.2	98.4	96.8	98.0	96.4	96.8	33	95010M avium		
		8.5	6.4	6.8	7.4	6.8	6.4	0.4	99.0	98.7	98.7	98.7	98.7	98.9	98.5	98.7	98.7	98.6	98.6	98.6	98.6	98.9	98.1	96.4	97.6	96.1	96.5	34	95047M paratuberculosis		
		8.8	6.5	6.9	7.5	6.9	6.5	1.6	1.3	99.3	99.3	99.4	99.1	99.0	98.7	99.2	99.2	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	98.5	96.8	98.0	96.5	97.0	35	95011M haemophilum	
		9.4	7.1	7.5	8.1	7.1	7.1	2.6	2.2	1.6	100.0	99.2	98.8	98.9	98.6	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	98.9	98.5	96.6	97.7	96.3	97.0	36	95006M gastri		
		9.4	7.1	7.5	8.1	7.1	7.1	2.6	2.2	1.6	0.0	99.2	98.8	98.9	98.6	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	98.9	98.5	96.6	97.7	96.3	97.0	37	95013M kansasii		
		8.4	6.9	7.3	7.9	7.3	6.9	1.8	2.2	1.3	2.2	2.2	99.5	99.0	98.6	99.0	98.9	98.9	98.9	98.9	98.9	98.9	98.2	96.6	97.7	96.2	96.8	38	95010M molmoense		
		7.5	6.5	6.9	7.5	6.5	6.5	1.8	2.2	2.0	2.9	2.9	1.1	99.2	98.5	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	99.2	98.4	96.7	97.8	96.4	97.2	39	95019M szulgai		
		7.1	6.1	6.5	7.1	6.3	6.1	1.6	1.7	2.4	2.9	2.9	2.6	1.8	98.7	98.7	98.7	98.5	98.5	98.5	98.5	99.1	98.7	97.0	97.8	96.3	97.0	40	95002M intracellulae		
		8.0	6.2	6.3	6.9	6.5	5.5	2.8	2.4	2.9	3.3	3.3	3.3	3.1	98.7	98.7	98.7	98.5	98.5	98.5	98.5	99.1	98.2	96.8	98.0	96.5	96.6	41	95018M gordonae		
		8.0	6.7	7.1	7.7	6.9	6.7	2.6	2.2	2.0	2.6	2.6	2.7	3.5	2.9	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	99.4	98.2	96.7	97.8	96.4	96.6	42	95004M ulcerans			
		9.0	6.7	7.1	7.7	6.9	6.7	2.6	2.2	2.0	2.6	2.6	2.7	3.5	2.9	0.0	99.3	99.3	99.3	99.3	99.4	98.2	96.7	97.8	96.4	96.6	43	95014M marinum			
		9.0	6.7	7.1	7.3	6.7	6.7	2.6	2.2	2.0	2.2	2.2	2.4	3.1	3.5	1.5	1.5	100.0	100.0	100.0	100.0	99.3	98.0	96.5	97.7	96.3	96.6	44	95052M TB		
		9.0	6.7	7.1	7.3	6.7	6.7	2.6	2.2	2.0	2.2	2.2	2.4	3.1	3.5	1.5	1.5	0.0	100.0	100.0	100.0	99.3	98.0	96.5	97.7	96.3	96.6	45	95053M tuberculosis		
		9.0	6.7	7.1	7.3	6.7	6.7	2.6	2.2	2.0	2.2	2.2	2.4	3.1	3.5	1.5	1.5	0.0	0.0	100.0	100.0	99.3	98.0	96.5	97.7	96.3	96.6	46	95049M africanum		
		9.0	6.7	7.1	7.3	6.7	6.7	2.6	2.2	2.0	2.2	2.2	2.4	3.1	3.5	1.5	1.5	0.0	0.0	0.0	100.0	99.3	98.0	96.5	97.7	96.3	96.6	47	95054M tuberculosis-H37Rv		
		9.0	6.7	7.1	7.3	6.7	6.7	2.6	2.2	2.0	2.2	2.2	2.4	3.1	3.5	1.5	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	99.3	98.0	96.5	97.7	96.3	96.6	48	95048M microti		
		7.5	5.3	5.7	6.3	5.5	5.3	2.2	1.8	2.4	2.9	2.9	2.8	2.0	2.4	2.0	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	98.5	97.0	98.2	96.7	97.1	49	95016M asiaticum			
		8.1	5.9	6.3	6.9	5.5	4.9	3.7	3.4	3.1	3.3	3.3	4.1	3.3	2.9	3.7	4.1	4.1	4.5	4.5	4.5	4.5	3.3	96.5	97.6	96.6	97.5	50	95017M scrofulaceum		
		10.2	9.2	8.3	8.7	6.6	7.9	7.0	6.9	6.8	7.4	7.4	7.0	6.4	6.6	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	6.2	7.2	98.1	96.5	95.6	51	95003M xehopi			
		8.1	6.1	6.3	7.3	6.5	5.9	4.5	4.3	4.3	5.0	5.0	4.7	4.8	4.1	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	4.8	3.9	4.9	4.2	97.5	96.5	52	95008M shimoidei			
		6.8	7.4	6.8	6.0	6.2	5.6	6.5	6.0	6.0	6.6	6.6	7.0	6.5	6.6	6.4	6.4	6.4	6.4	6.4	6.4	5.6	5.2	5.7	4.0	96.5	53	95009M triviale			
		10.5	6.9	6.3	7.7	5.9	6.5	6.1	5.8	5.3	5.5	5.5	6.1	5.3	5.7	6.3	6.7	6.7	6.3	6.3	6.3	5.3	4.7	8.2	6.5	6.2	54	95015M simiae			
		27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54		

注:Percent Identity为相似性百分比;Divergence为差异性百分比;5位数字编号为菌株号;对应英文为菌株名称。

图3 54株分枝杆菌参考株之间的相似程度/%

2.3 传统生化分型法鉴别结果 传统分型结果中分枝杆菌模式菌株分为结核菌群、I群(光产色)、II群(暗产色)、III群(不产色)、IV群(速生菌群),具体见表1。

3 讨论

通过 16S rRNA 序列分析方法,可以区分非结核分枝杆菌与结核分枝杆菌,并且可以将大多数非结核分枝杆菌鉴定到种的水平,不足是分枝杆菌种间 16S rRNA 基因的多态性较低,并且不能区分部分

亲缘关系密切的种或同一菌种内的不同菌株,这与相关报道的相同^[8,9]。本次研究中有 6 组(11 种)菌株因每组中基因序列的相似程度为 100%,因此难以区别。在传统分型方法中,鸟分枝杆菌和胞内分枝杆菌,龟分枝杆菌和偶然分枝杆菌、结核分枝杆菌复合群,龟分枝杆菌与脓肿分枝杆菌在生化反应和生物学特征方面相似,常常无法区分,其余分枝杆菌可以得到明确鉴别。海分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌属于 I 群光产色;溃疡分枝杆菌、胃分枝杆菌属

于Ⅲ群不产色。但在16S rRNA基因序列法中,溃疡分枝杆菌与海分枝杆菌,堪萨斯分枝杆菌与胃分枝杆菌这两组在生长特征方面却很容易区分,单独一个色素产生实验^[10]即可区别。

表1 分枝杆菌传统生化分型法鉴别实验结果

结核菌群	I群光产色	II群暗产色	III群不产色	IV群速生菌群
结核分枝杆菌	堪萨斯分枝杆菌	瘰疬分枝杆菌	胞内分枝杆菌	偶然分枝杆菌
田鼠分枝杆菌	海分枝杆菌	戈登分枝杆菌	鸟分枝杆菌	龟分枝杆菌
牛结核分枝杆菌	猿猴分枝杆菌	苏加分枝杆菌	蟾蜍分枝杆菌	脓肿分枝杆菌
非洲分枝杆菌	亚洲分枝杆菌		溃疡分枝杆菌	耻垢分枝杆菌
			嗜血分枝杆菌	母牛结核分枝杆菌
			胃分枝杆菌	草分枝杆菌
			土地分枝杆菌	抗热分枝杆菌
			次要分枝杆菌	爱知分枝杆菌
			马尔摩分枝杆菌	金色分枝杆菌
			施氏分枝杆菌	微黄分枝杆菌
			不产色分枝杆菌	加地斯分枝杆菌
				浅黄分枝杆菌
				奥布分枝杆菌
				罗得岛分枝杆菌
				副偶然分枝杆菌

16S rRNA 基因序列分析与传统生化方法相比,传统的分枝杆菌分型方法培养周期长,短则1周,长则超过4周^[10]。培养结果容易受病原菌生长状态、培养基质量、培养时间、培养温度、抗生素使用等多种因素的影响,结果分析容易受生化反应试剂的质量和操作人员的专业水平的影响。而16S rRNA 基因序列分析法不易受细菌生长状态、抗生素使用、标本留取质量等因素的影响,当天可出结果,有利于临床快速诊断。结合分析这两种方法,可以明确地区分54株分枝杆菌的49株(共49种),只有5株(3种)分枝杆菌无法鉴别,即结核分枝杆菌复合群、龟分枝杆菌与脓肿分枝杆菌。总之,在16S rRNA 基因分析中,除结核分枝杆菌复合群外,大多数亲缘关系较近的分枝杆菌属于传统分型中的不同种群,说明16S rRNA 基因分型与传统分型结果之间并没有必然联系,两种方法在一定程度上可以互补。

16S rRNA 基因分析需要一个强大的质控序列数据库作为支持^[11],随着科研工作者的努力和研究的深入,数据库会不断完善,为分枝杆菌的分子鉴定技术提供更高的临床应用性。

参考文献

1 陈保文,都伟欣,杜蓉,等.反相高效液相色谱法和16S rRNA 序列分析法对分枝杆菌分型鉴别的比较研究[J].中国医药生物技术,2012,7(4):263-268.
 2 张婷,付军,王国治,等.探针熔解曲线法快速检测结核分枝杆菌注射类二线药耐药突变[J].中国人兽共患学报,

2015,31(5):412-417.
 3 都伟欣,崔颖杰,卢锦标,等.重组结核分枝杆菌11 kDa 蛋白皮肤试验与体外干扰素 γ 检测方法的比较[J].中国生物制品学杂志,2015,28(11):1183-1186.
 4 陈东科,许宏涛.临床分离快速生长分枝杆菌的鉴定及对抗结核药物的敏感性分析[J].临床检验杂志,2015,33(10):734-736.
 5 侯沪,李爱敏,唐曙明.基因芯片快速分枝杆菌鉴定技术与涂片抗酸染色技术的临床应用比较[J].国际检验医学杂志,2015,36(16):2335-2338.
 6 潘爱珍,吴蓓蓓,柳正卫,等.MPB64免疫胶体金检测法在分枝杆菌菌种鉴定中的应用[J].浙江预防医学,2015,27(7):691-694.
 7 温博海.立克次体的16S rRNA 基因序列分析[J].中国人兽共患病杂志,1999,15(6):18-20.
 8 李国利,庄玉辉,赵铭,等.16S-23S rDNA 内转录间隔区序列寡核苷酸探针鉴定分支杆菌菌种的研究[J].中国防痨杂志,2002,S1:12-16.
 9 Kirschner P, Kiekenbeck M, Meissner D, et al. Genetic heterogeneity within Mycobacterium fortuitum complex species: genotype criteria for identification[J].J Clin Microbiol,1992,30(11):2772-2775.
 10 王甦民.结核菌诊断实验室检验规程[M].中国教育文化出版社,2006.
 11 叶雅丽,闫李侠,黄至澄,等.54株分枝杆菌国际标准株16S-23S rRNA 内转录间隔区序列分析[J].检验医学与临床,2011,8(23):2826-2829.

(收稿日期 2019-01-04)
 (本文编辑 蔡华波)