

## · 实验室研究 ·

基于 16S 和 23S rDNA 基因芯片检测和鉴定  
七种临床常见病原菌

邢建明 张颢 张红河 沈翠芬 毕丹 李刚 姚丽惠

**【摘要】** 目的 以细菌 16S rDNA 和 23S rDNA 基因为靶序列建立可检测临床七种常见病原菌寡核苷酸芯片系统。方法 采用双重 PCR 扩增标本中靶细菌 16S 和 23S rDNA 基因片段。构建能同时检测肠出血性大肠埃希菌 O157:H7、副溶血性弧菌、沙门菌、霍乱弧菌、单核细胞增生李斯特菌、空肠弯曲菌和志贺菌的寡核苷酸芯片,并考核芯片的检测特异性、灵敏度和重复性。采用所建立的寡核苷酸芯片检测 81 例腹泻患者粪便样本。结果 双重 PCR 可同时扩增上述七种病原菌的 16S 和 23S rDNA 基因靶序列。所研制的寡核苷酸芯片检测灵敏度可达  $10^3$  cfu/ml,非靶细菌无阳性结果,不同批间和批内芯片的变异系数为 3.89%~5.81%。寡核苷酸芯片检测粪便样本的阳性率为 39.5% (32/81),与常规细菌学检查法检测结果的符合率达到 96.3% (78/81),菌种鉴定结果符合率为 96.8% (31/32)。结论 研究建立的寡核苷酸芯片法在检测七种病原菌时具有简便、快速、准确、高通量等优点,适合于临床样本检测及流行病学现场调查。

**【关键词】** 寡核苷酸芯片;病原菌;检测

**Detection and identification of seven clinical common pathogenic bacteria by oligonucleotide microarray**  
XING Jian-ming\*, ZHANG Su, ZHANG Hong-he, SHEN Cui-fen, BI Dan, LI Gang, YAO Li-hui. Department of Laboratory Medicine, Huzhou Maternity and Child Care Hospital, Huzhou 313000, China

**【Abstract】 Objective** Using 16S rDNA and 23S rDNA genes as the target sequences to develop a system based on oligonucleotide microarray and to detect the seven clinical pathogenic bacteria, commonly seen. **Methods** Double polymerase chain reaction (PCR) was applied to amplify the segments of 16S rDNA and 23S rDNA genes of the target bacteria. An oligonucleotide microarray was constructed to simultaneously detect EHEC O157:H7, *Vibrio parahaemolyticus*, *Saimonella* sp., *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* and *Shigella* sp. Specificity, sensitivity and reproducibility of the microarray during detection were checked. And then microarray was used to detect the microbes in stool specimens of 81 patients with diarrhea and vomiting. **Results** The double PCR method could simultaneously amplify the target sequences of 16S rDNA and 23S rDNA genes of the seven pathogens. The sensitivity of the developed oligonucleotide microarray could reach  $10^3$  cfu/ml but no positive results were presented for non-targeted bacteria. The coefficients of differentiation in one lot or among different lots of the microarray slices were 3.89%-5.81%. The positive detection rate of the stool specimens by oligonucleotide microarray was 39.5% (32/81), with a coincidence of 96.3% (78/81) for the patients and another coincidence of 96.8% (31/32) for bacterial genus or species identification, when comparing to the results by routine bacteriological examinations. **Conclusion** The established assay in this study based on oligonucleotide microarray to detect the seven pathogenic bacteria has many advantages such as convenient, rapid, accurate, stable and high flux, which is suitable for clinical specimen examination and epidemiological field investigation.

**【Key words】** Oligonucleotide microarray; Pathogenic bacteria; Detection

腹泻和呕吐是临床常见的消化道疾病症状,其病因众多;快速、准确地检测和鉴定腹泻患者粪便样本中的病原菌是制定正确治疗方案的重要前提。目

前临床上细菌鉴定仍主要采用基于表型检测的生化反应,仅有极少数细菌采用基因水平的分子生物学鉴定技术<sup>[1]</sup>。基因芯片检测技术具有快速、准确、高通量等优点,已被广泛应用于基因突变、多态性分析、微生物鉴定和疾病基因诊断等领域<sup>[2]</sup>。一些研究者在基因芯片中以病原菌毒力基因为靶序列,虽

作者单位: 313000 湖州市妇幼保健院检验科(邢建明、张颢、毕丹、李刚、姚丽惠);杭州市第一人民医院基因诊断实验室(张红河);湖州市中心医院检验科(沈翠芬)

有较高特异性,但同一种属不同菌株往往存在毒力基因差异,因而毒力基因为靶序列的基因芯片不适用于临床<sup>[3]</sup>。16S rDNA 和 23S rDNA 基因序列在细菌进化过程中相当保守,常被用作细菌种属鉴定的靶基因<sup>[4]</sup>。本研究选取临床常见的病原菌作为检测的靶细菌,初步研究基因芯片技术在致病菌检测方面的应用。建立能检测和鉴定七种临床常见引起腹泻和呕吐病原菌的寡核苷酸芯片技术。

**材料与方 法**

1. 菌株及培养:福氏志贺菌 ATCC51311、宋内志贺菌 ATCC25931、空肠弯曲菌 ATCC33560、单核细胞增生李斯特菌 ATCC7644、霍乱弧菌 ATCC16025/ATCC16026、结肠弯曲菌 ATCC7709、肠出血性大肠埃希菌 O157:H7 ATCC43889、沙门菌 ATCC50835/ATCC50041/ATCC50096/ATCC14028、鼠伤寒沙门菌 ATCC49214、金黄色葡萄球菌 ATCC13565、西尔李斯特菌 ATCC35967、格式李斯特菌 ATCC25401、英诺克李斯特菌 ATCC33090、副溶血性弧菌 ATCC20502/ATCC20506、耶尔森菌 ATCC52215/ATCC52217,均购置中国微生物菌种库。本实验所采用的肠炎沙门菌等临床菌株均经系统的细菌学鉴定。所有菌株均按照常规标准方法进行培养,各种培养基均由法国生物梅里埃公司提供。

2. 细菌基因组 DNA 的提取:按试剂盒说明书操作,采用 UNIQ-10 COLUMN Genomic DNA Minipreps Kit(Sangon)提取各细菌基因组 DNA。

3. 引物和探针的合成:根据相关研究资料<sup>[5-10]</sup>,分别以霍乱弧菌、肠出血性大肠埃希菌 O157:H7、副溶血性弧菌、单核细胞增生李斯特菌、福氏志贺菌、

沙门菌、空肠弯曲菌的 16S rDNA 和 23S rDNA 为靶基因。下游引物 5'端标记生物素,探针 3'端经氨基修饰。根据文献方法<sup>[10]</sup>,选取大肠埃希菌(GenBank accession: X96965)16S rDNA 基因中一段序列作为阳性对照,以引物互补序列合成探针作为标志列,选择与细菌无关的探针作为阴性对照。所有引物和探针均由 TaKaRa 公司合成,引物和探针序列见表 1。

4. 双重 PCR:反应体积 50 μl 内含 1.5 μmol/L Mg<sup>2+</sup>、200 μmol/L dNTPs、2 μmol/L 各基因引物、1.5 U Taq 酶、约 50 ng DNA 模板和 1×PCR 缓冲液。PCR 参数:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s、56℃ 退火 30 s、72℃ 延伸 30 s,35 个循环;72℃ 延伸 5 min。采用溴化乙锭预染的 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

5. 寡核苷酸芯片制备:参照文献方法<sup>[11]</sup>,探针点样液浓度为 50 μmol/L,取 6 μl 置于 384 孔板,采用微阵列自动点样仪 (PixSys 5000, Cartesian Technologies, Irvine, CA) 点于醛基化玻片上,重复 2 次,室温放置至少 20 h。使用前将芯片依次用 0.2% SDS 和双蒸水洗涤,自然晾干。寡核苷酸芯片点样模式图见图 1。

P	1	2	6	N
P	1	2	6	N
标志列	标志列	标志列	标志列	标志列
3	4	5	7	B
3	4	5	7	B

注:1:肠出血性大肠埃希菌 O157:H7; 2:副溶血性弧菌; 3:沙门菌; 4:霍乱弧菌; 5:单核细胞增生李斯特菌; 6:空肠弯曲菌; 7:志贺菌; P:阳性对照; N:阴性对照; B:空白对照

**图 1** 寡核苷酸芯片点样模式图

**表 1** 引物和探针序列

细菌	靶基因探针序列(5'~3')	靶基因	引物序列(5'~3')
肠出血性大肠埃希菌 O157:H7	GCAGTCACCCATAAAAAGAGGCT	23S rDNA	23S rDNA 引物 <sup>a</sup>
副溶血性弧菌	GGTACGCAGTCACAGGACAAAGCC	23S rDNA	F2: ACCGATAGTGAACCAGTACCGTGAG R2: TTAAATGATGGCTGCTTCTAAGCC
沙门菌 <sup>a</sup>	ACAGGCTGTAGCGATTTAGGTTAC	16S rDNA	16S rDNA 引物 <sup>a</sup>
霍乱弧菌	CAGCACAGAGGAACCTGTTCCTGGTGGCGAG	16S rDNA	F1: CGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGC
空肠弯曲菌	CTCCTTTTCTTAGGGAAGAATTCTGACGG TACCTAAGGAAT	16S rDNA	R1: CGCGGCTGCTGGCAGCGAGTTAGCC
福氏志贺菌 <sup>a</sup>	CGAAACAGCAAGCTGCTTC	16S rDNA	
单核细胞增生李斯特菌 <sup>a</sup>	TAGCCGAAACAATATTACAAAAGCG	16S rDNA	
阳性对照	ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGG AGGCAGCAGTAGGGAATATTG	16S rDNA	
阴性对照	ACCTACCGCCGCTGTCTATG		

注:<sup>a</sup> 为自行设计的序列,其他为参考文献的序列

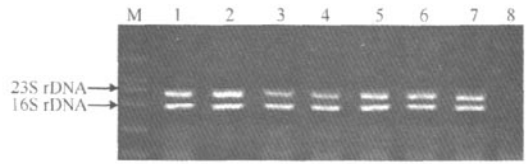
6. 寡核苷酸芯片的鉴定:按 BaiO 芯片杂交试剂盒(上海百傲科技有限公司产品)试剂盒说明书进行寡核苷酸芯片的检测操作,在 55℃ 条件下孵育 1 h,然后用洗涤液清洗 3 次,分别用亲和素标记液和显色液分别加于杂交区,在 55℃ 条件下孵育 30 min,期间用洗涤液清洗 3 次,晾干。采用 BaiO BE 2.0 扫描仪对检测后芯片进行扫描和分析。将肠出血性大肠埃希菌 O157:H7 培养物连续 10 倍稀释后,取 200 μl 进行 DNA 提取和双重 PCR,另取 200 μl 按常规进行菌落计数,重复 3 次,评价该芯片检测系统的灵敏度。从 3 次不同点样批次芯片中分别抽取三张芯片,用于检测肠出血性大肠埃希菌 O157:H7,以了解该芯片检测系统的稳定性和重复性。

7. 临床样本的检测:共收集分别来自湖州市妇幼保健院、湖州市中心医院和杭州市第一人民医院检验科的 81 例腹泻患者的粪便样本。样本中 DNA 提取方法参照文献[10]进行,双重 PCR、寡核苷酸芯片检测过程和条件如前所述。上述腹泻粪便样本进行常规细菌分离培养,采用法国生物梅里埃公司菌种鉴定条对分离的细菌进行鉴定。按照常规操作后,离心取上清作为模板进行基因芯片检测。

结 果

1. PCR 结果:可从患者粪便样本中扩增出预期大小的病原菌目的条带,16S rDNA 和 23S rDNA 基因目的条带大小分别为 500 bp 和 640 bp(图 2)。

2. 寡核苷酸芯片检测特异性:七种病原菌寡核苷酸芯片检测结果见图 3。目的探针有较强的杂交信号,未出现非特异性杂交信号,同时各对照均显示预期杂交结果。



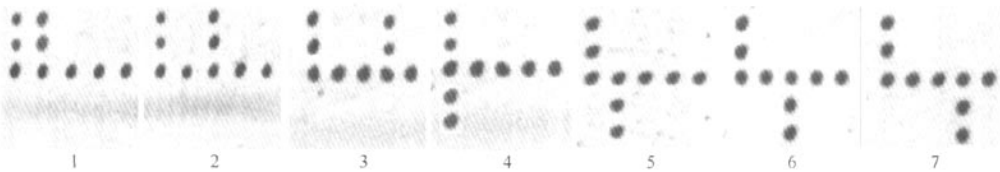
注: M: DNA Marker: DL 2000 (100、250、500、750、1000、2000 bp); 1: 肠出血性大肠埃希菌 O157:H7; 2: 副溶血性弧菌; 3: 沙门菌; 4: 霍乱弧菌; 5: 单核细胞增生李斯特菌; 6: 空肠弯曲菌; 7: 志贺菌; 8: 空白对照

图2 腹泻患者粪便样本中不同细菌 PCR 扩增效果

3. 寡核苷酸芯片的检测敏感性:不同稀释度的肠出血性大肠埃希菌 O157:H7 对应寡核苷酸芯片检测结果见图 4。上述结果表明,所建立的寡核苷酸芯片检测系统灵敏度为 10<sup>3</sup> cfu/ml 细菌。

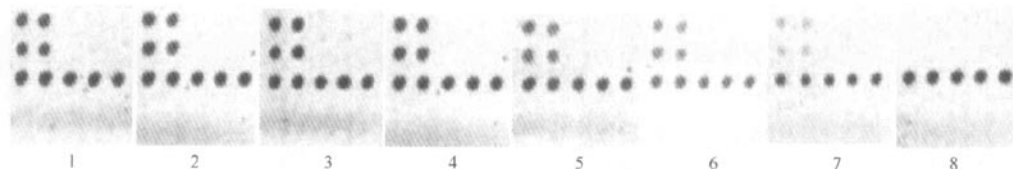
4. 寡核苷酸芯片的检测稳定性和重复性:不同批次芯片对肠出血性大肠埃希菌 O157:H7 检测结果表明,批内变异系数分别为 4.52% 和 3.89%,批间变异系数分别为 5.03% 和 5.81%。

5. 临床样本检测结果:表 2 显示,81 例患者粪便样本中,31 例分离培养出细菌并经生化鉴定为感染七种病原菌,其余分离培养结果阴性。31 例细菌阳性样本经寡核苷酸芯片检测结果 30 例为阳性;细菌分离培养及生化鉴定结果阴性的样本中,也有 2 例检测结果阳性,两种方法细菌检测结果的符合率为 96.3% (78/81)。寡核苷酸芯片与传统细菌分离培养及生化鉴定结果均为阳性的 31 例样本中,1 例寡核苷酸芯片检出志贺菌和沙门菌混合感染,分离培养及生化鉴定仅检出志贺菌,两种方法对菌种鉴定结果符合率为 96.8% (31/32),差异无统计学意义 (P>0.05)。



注:1: 肠出血性大肠埃希菌 O157:H7; 2: 副溶血性弧菌; 3: 空肠弯曲菌; 4: 沙门菌; 5: 霍乱弧菌; 6: 单核细胞增生李斯特菌; 7: 志贺菌

图3 七种肠道病原菌的寡核苷酸芯片检测结果



注:1~8:不同稀释度的肠出血性大肠埃希菌 O157:H7(对应浓度:10<sup>9</sup>~10<sup>2</sup> cfu/ml)寡核苷酸芯片检测结果

图4 不同稀释度肠出血性大肠埃希菌 O157:H7 的寡核苷酸芯片检测结果

表2 腹泻患者粪便样本中细菌检测结果

细菌种类	阳性样本		阴性样本	
	基因芯片检测	细菌学检测	基因芯片检测	细菌学检测
副溶血性弧菌	6	6	0	0
沙门菌	11	11	0	0
霍乱弧菌	1	1	0	0
空肠弯曲菌	0	0	1	0
志贺菌	10	10	0	0
单核细胞增生李斯特菌	1	2	1	0
肠出血性大肠埃希菌O157:H7	1	1	0	0
合计	30	31	2	0

注:基因芯片检测与细菌学检测比较:  $\chi^2 = 0.13, P > 0.05$

讨 论

基因芯片技术以其快速、准确、高通量、自动化等特点,被广泛应用于病原微生物的检测和鉴定<sup>[12-16]</sup>。本研究中选用的两对引物分别来自各靶细菌的 16S 和 23S rDNA 基因,应能检测所有该种、属不同菌株。因此,本研究建立的寡核苷酸芯片检测系统特异性主要取决于探针。检测结果显示,除靶细菌有阳性杂交信号外,其他菌株杂交后均无阳性信号出现,表明所建立的寡核苷酸芯片检测系统有很强的特异性。

基因芯片检测灵敏度主要取决于 PCR 和显色方法。实验结果显示,以肠出血性大肠埃希菌 O157:H7 为靶细菌,以其 16S 和 23S rDNA 基因为靶序列时,采用本次建立的寡核苷酸芯片检测系统可检出  $10^3$  cfu/ml 靶细菌,这与相关文献报道的检测灵敏度相似<sup>[17,18]</sup>。

重复性和稳定性是芯片检测的关键问题,易受探针点样均一性、杂交反应条件、扫描次数等多种因素的影响<sup>[9]</sup>。近年 Affymetrix 和 Genescan 等公司采取原位光刻法直接在芯片上合成探针<sup>[19,20]</sup>,使重复性有所提高。本实验选取肠出血性大肠埃希菌 O157:H7 进行重复性及稳定性实验的结果显示,不同批间和批内寡核苷酸芯片的变异系数(3.89%~5.81%) < 6%,表明该芯片有良好的重复性和稳定性。

81 例患者粪便样本中,通过本研究建立的寡核苷酸芯片检测系统、常规细菌分离培养和生化鉴定法获得的阳性例数分别为 32 和 31 例,两种方法检测结果符合率为 96.3% (78/81)。传统细菌分离培养及生化鉴定结果为阳性的 31 例样本中,寡核苷酸芯片法检出 1 例志贺菌和沙门菌混合感染,而分离培养及生化鉴定仅检出志贺菌,两种方法对菌种鉴定结果符合率为 96.8% (31/32)。然而,寡核苷酸芯片检测系统仅需约 4 h 出结果,细菌分离培养和生化鉴定法常需

3-4 d。寡核苷酸芯片系统检测临床样本具有快速和可靠的特点,对临床疾病诊断和治疗十分有利。

综上所述,较之传统的细菌分离培养及生化鉴定法,本研究中建立的寡核苷酸芯片检测系统在检测七种病原菌时,具有简便、快速、准确、稳定、高通量等优点,适合于临床样本检测及流行病学的现场调查。由于同一属内不同菌种之间 16S 和 23S rDNA 基因之间差别甚小<sup>[21]</sup>,本研究的寡核苷酸芯片对某些细菌仅限于菌属水平检测和鉴定,菌种水平检测和鉴定仍需做大量工作。此外,在此工作基础上,增加可检测细菌属、种数量,也是今后努力的目标之一。

参 考 文 献

- [1] Anthony RM, Brown TJ, French GL. Rapid diagnosis of bacteremia by universal amplification of 23S ribosomal DNA followed by hybridization to an oligonucleotide array. J Clin Microbiol, 2000, 38: 781-788.
- [2] Schemm M. Microarray biochip technology. USA. Eaton Publishing, Natick, MA, 2000: 203-209.
- [3] 金大智,文思远,王升启. 基因芯片技术在检测肠道致病菌方面的应用. 微生物学报, 2006, 46(2): 500-503.
- [4] Warsen AE, Krug MJ, LaFrentz S, et al. Simultaneous discrimination between 15 fish pathogens by using 16S ribosomal DNA PCR and DNA microarrays. Appl Environ Microbiol, 2004, 70: 4216-4221.
- [5] Lin CK, Tsen HY. Use of 16S DNA targeted *Salmonella* in foods. J Appl Bacteriol, 1996, 80: 659-666.
- [6] Lin CK, Tsen HY. Development and evaluation of two novel oligonucleotide probes based on 16S rDNA sequence for the identification of *Salmonella* in foods. J Appl Bacteriol, 1995, 78: 507-520.
- [7] Li X, Ma WL, Zheng WL. Designing oligonucleotide microarray probes for *Bacillus thuringiensis*. Life Sci Res, 2003, 7: 53-57.
- [8] Macario AJL, de Macario EC. Gene probes for bacteria. Academic Press, 1990: 184-205.
- [9] Ma J.R., Jiang ZH. Biochip. Beijing: Chemical Industry Press, 2000: 179-181.
- [10] Jin DZ, Wen SY, Chen SH, et al. DNA microarray assay for simultaneous detection and identification of multiple common intestinal pathogens. Mol Cell Probes, 2006: 337-347.
- [11] Wen SY, Wang H, Sun OJ, et al. Rapid detection of the known SNPs of CYP 2C9 using oligonucleotide microarray. WJG, 2003, 9: 1342-1346.
- [12] Wilson WJ, Strout CL, Desantis TZ, et al. Sequence-specific identification of 18 pathogenic microorganisms using microarray technology. Mol Cell Probes, 2002, 16: 119-127.
- [13] Sasaki Y, Yamamoto K, Amimoto K, et al. Amplification of the 16S-23S rDNA spacer region for rapid detection of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum*. Res Vet Sci, 2001, 71: 227-229.
- [14] Call DR, Borucki M, Loge F. Detection of bacterial pathogens in environmental samples using DNA microarrays. J Microbiol Methods, 2003, 53: 235-243.
- [15] Hong BX, Jiang LF, Hu YS, et al. Application of oligonucleotide array technology for the rapid detection of pathogenic bacteria of foodborne infections. J Microbiol Methods, 2004, 58: 403-411.
- [16] Sergeev N, Distler M, Vargas M, et al. Microarray analysis of *Bacillus cereus* group virulence factors. J Microbiol Methods, 2006, 65: 488-502.
- [17] Call DR, Brockman FJ, Chanler DP. Detecting and genotyping *Escherichia coli* O157:H7 using multiplexed PCR and nucleic acid microarrays. Int J Food Microbiol, 2001, 67: 71-80.
- [18] 胡建宏,于永生,江中良,等. DNA 芯片技术研究进展. 湖北农学院学报, 2002, 22(1): 92-96.
- [19] Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, et al. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. Science, 1991, 251: 767-773.
- [20] Fodor SP, Rava RP, Huang XC, et al. Multiplexed biochemical assays with biological chip. Nature, 1993, 364: 555-556.
- [21] Gibson G. Microarrays in ecology and evolution: a preview. Mol Ecol, 2002, 11: 17-24.

(收稿日期:2007-12-13)  
(本文编辑:尹廉)