

· 实验研究 ·

细菌 16S rRNA 基因实时荧光定量及分型方法的建立

舒小莉, 吴亦栋, 尚世强

(浙江大学医学院附属儿童医院中心实验室, 浙江 杭州 310003)

[摘要] **目的** 细菌培养、组织学、免疫学及普通 PCR 方法等在病原菌的检测方面都存在一定的不足, 不能满足临床的需要, 探索快速可靠的败血症和化脓性脑膜炎等细菌性感染疾病诊断的新方法是目前亟待解决的关键问题。**方法** 分析细菌 16S rRNA 基因序列, 在高度保守区自行设计通用引物和探针, 以及革兰阳性和阴性分型探针, 对 12 种标准菌株、23 种临床培养分离株、乙型肝炎病毒、新型隐球菌及白色念珠菌、人基因组 DNA 等进行了荧光定量检测, 分析三种探针检测结果的相关性。**结果** 细菌 16S rRNA 基因荧光定量 PCR 具有较好的敏感性和特异性, 最低能检测到 10 个拷贝的 16S rRNA 基因, 即相当于 2 个细菌, 与病毒、真菌及人基因组 DNA 等无交叉阳性反应; 12 种标准菌株、23 种临床培养分离株均进行三种探针的荧光定量检测; 通用探针均为阳性, 18 株革兰阳性菌株通过革兰阳性探针 (G^+ Probe 探针) 检测为阳性, 17 株革兰阴性菌株通过革兰阴性探针 (G^- Probe 探针) 检测为阳性, 反之均为阴性, 吻合率 100%。**结论** 建立了用通用引物和分型双荧光探针的细菌荧光定量 PCR 定量、分型方法。其检测方便、快速、敏感性和特异性高, 符合率好, 同时进行定量和分型, 在病原菌检测方面具有推广及应用价值。

[中国当代儿科杂志, 2008, 10(6): 732-736]

[关键词] 通用探针; 革兰阳性探针; 革兰阴性探针; 荧光定量; 细菌

[中图分类号] R37 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2008)06-0732-05

Establishment of quantifying and typing analysis of 16S rRNA gene by real-time PCR

SHU Xiao-Li, WU Yi-Dong, SHANG Shi-Qiang. Department of Central Laboratory, Children's Hospital Affiliated to Medical College, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China (Shang S-Q, Email: wyd721@sina.com)

Abstract: Objective To explore a new method of rapid and reliable diagnosis of bacterial infectious diseases such as purulent meningitis and septicemia. **Methods** A pair of universal primers and a set of probes (including universal fluorescence probe, Gram-positive probe and Gram-negative probe) were designed based on the bacterial highly conserved region of 16S rRNA gene. By using the FQ-PCR method, 12 standard strains, 23 clinical cultural isolations and the controls such as HBV, Cryptococcus histolyticus, Blastomyces albicans and human DNA were detected with the three kinds of probes. The correlation among the results of the three kinds of probes detection was analyzed. **Results** The determination of 16S rRNA gene with FQ-PCR was a highly specific and sensitive method and not cross-reactive with human DNA, virus or fungi. The least amount of 10 copies of 16S rRNA gene which corresponded to 2 bacteria could be detected with FQ-PCR. Twelve standard strains and 23 clinical cultural isolations were detected by FQ-PCR with the three kinds of probes mentioned above. All samples presented positive results using the universal probe. The results of 16S rRNA gene detected by the Gram-positive probe were positive to the 18 G^+ strains. The results of 16S rRNA gene detected by the Gram-probe were positive to the 17 G^- strains. **Conclusions** The FQ-PCR technique was established for bacteria quantifying and typing using the universal primer and the double type probes. This method was convenient and rapid in detecting, quantifying and typing bacteria, with a high specificity and sensitivity. [Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10(6): 732-736]

Key words: Universal primer; Gram-positive probe; Gram-negative probe; Fluorescence quantitative polymerase chain reaction; Bacteria

败血症是一种严重的全身感染性疾病, 常危及患儿生命, 早期诊断非常重要。细菌培养、组织学、免疫学方法虽广泛应用于病原菌的检测, 但都存在一定的不足^[1,2]。近年来, 聚合酶链反应 (PCR) 广泛应用于临床诊断, 使得临床细菌感染快速、准确诊断成为可能^[1~3]。运用细菌 16S rRNA 基因保守区设计引物, 进行普通 PCR 的扩增, 通过电泳、限制性酶切、反相杂交等分析扩增产物的方法^[4,5], 都由于存在操作繁琐, 不能实时荧光定量, 没有很好的防止污染方法等问题, 从而未能很好地运用于临床的检

[收稿日期] 2008-04-25; [修回日期] 2008-05-27
[基金项目] 浙江省卫生厅面上项目 2006075A。
[作者简介] 舒小莉, 女, 硕士, 技师。主攻方向: 分子生物学。
[通讯作者] 尚世强, 男, 主任医师, 博士生导师, 浙江大学医学院附属儿童医院中心实验室, 邮编: 310003。

测。我们在细菌 16S rRNA 基因保守区内自行设计一对通用引物和三条探针,分别为通用荧光探针、革兰阳性探针和革兰阴性探针,建立了实时荧光定量 PCR 细菌定量和分型的新方法,对 10 种标准菌属的 12 个标准菌株,以及 17 种临床培养菌属的 23 个临床培养菌株,分别进行了通用探针、革兰阳性探针和革兰阴性探针的荧光定量 PCR 检测,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标准菌株 选择临床引起败血症和化脓性脑膜炎(化脑)的常见细菌 10 种菌属 12 个菌株,其中革兰阳性菌株为 6 株,革兰阴性菌株为 6 株(表 1)。标准菌株由军事医学科学院微生物、流行病学研究室提供。

1.1.2 临床培养菌株 选择临床常见细菌 17 种菌属 23 个菌株,其中革兰阳性菌株为 12 株,革兰阴性菌株为 11 株(表 2)。临床培养菌株由浙江省儿童医院细菌室及感染实验室提供。

表 1 各标准菌株名称及检测结果

菌属	菌种	UnProbe ($C_T \pm S$)	G ⁺ Probe ($C_T \pm S$)	G ⁻ Probe ($C_T \pm S$)
革兰阳性菌				
葡萄球菌属	金黄色葡萄球菌	17.28 ± 0.24	16.97 ± 0.45	40.00 ± 0
	表皮葡萄球菌	20.43 ± 0.58	21.06 ± 0.19	40.00 ± 0
	溶血葡萄球菌	19.62 ± 0.78	20.17 ± 0.97	40.00 ± 0
链球菌属	肺炎链球菌	22.15 ± 0.64	21.87 ± 0.45	40.00 ± 0
芽胞杆菌属	枯草杆菌	15.98 ± 0.34	16.28 ± 1.08	40.00 ± 0
微球菌属	藤黄微球菌	18.26 ± 0.87	19.15 ± 0.67	40.00 ± 0
革兰阴性菌				
埃希菌属	大肠埃希菌	14.24 ± 0.29	40.00 ± 0	14.92 ± 0.18
克雷伯菌属	肺炎克雷伯氏菌	17.85 ± 0.37	40.00 ± 0	17.48 ± 0.58
肠杆菌属	产气肠杆菌	14.95 ± 0.87	40.00 ± 0	16.12 ± 0.72
假单胞菌属	绿脓杆菌	22.75 ± 0.41	40.00 ± 0	22.84 ± 0.72
志贺氏菌	鲍氏志贺氏菌	17.26 ± 0.34	40.00 ± 0	16.87 ± 0.19
沙雷菌属	粘质沙雷菌	21.58 ± 0.53	40.00 ± 0	22.47 ± 0.17

注: C_T 值小于 40 为阳性, C_T 值 40 为阴性;基本准线值:0.02

表 2 各临床培养菌株及检测结果

菌属	菌种	UnProbe ($C_T \pm S$)	G ⁺ Probe ($C_T \pm S$)	G ⁻ Probe ($C_T \pm S$)
革兰阳性菌				
葡萄球菌属	金黄色葡萄球菌	15.68 ± 0.39	15.29 ± 0.67	40.00 ± 0
	表皮葡萄球菌	19.68 ± 0.48	20.19 ± 0.78	40.00 ± 0
	溶血葡萄球菌	20.28 ± 1.12	22.09 ± 0.49	40.00 ± 0
	人葡萄球菌	23.78 ± 0.76	22.45 ± 0.97	40.00 ± 0
	腐生葡萄球菌	23.09 ± 1.08	21.49 ± 0.46	40.00 ± 0
链球菌属	肺炎链球菌	20.42 ± 0.67	20.69 ± 0.81	40.00 ± 0
	溶血性链球菌	23.06 ± 0.26	22.57 ± 0.67	40.00 ± 0
	无乳链球菌	17.59 ± 0.86	17.24 ± 0.28	40.00 ± 0
李斯特菌属	产单核李斯特菌	14.58 ± 0.52	14.88 ± 0.46	40.00 ± 0
棒状杆菌属	类白喉棒状杆菌	16.21 ± 0.92	17.10 ± 0.24	40.00 ± 0
丙酸杆菌属	痤疮丙酸杆菌	19.26 ± 0.67	18.99 ± 0.28	40.00 ± 0
分枝杆菌属	结核杆菌	23.47 ± 0.88	23.16 ± 0.25	40.00 ± 0
革兰阴性菌				
埃希菌属	大肠埃希菌	16.58 ± 0.46	40.00 ± 0	16.02 ± 0.58
克雷伯菌属	肺炎克雷伯氏菌	18.70 ± 0.44	40.00 ± 0	18.17 ± 0.56
肠杆菌属	阴沟肠杆菌	22.06 ± 0.41	40.00 ± 0	22.98 ± 0.24
嗜血杆菌属	流感嗜血杆菌	25.08 ± 0.54	40.00 ± 0	24.86 ± 0.84
奈必菌属	脑膜炎球菌	22.09 ± 0.26	40.00 ± 0	23.17 ± 0.18
拟杆菌属	脆弱拟杆菌	17.26 ± 0.53	40.00 ± 0	18.19 ± 0.34
假单胞菌属	铜绿色假单胞菌	17.24 ± 0.77	40.00 ± 0	16.87 ± 0.58
变形杆菌属	普通变形杆菌	19.58 ± 1.23	40.00 ± 0	20.52 ± 0.64
不动杆菌属	醋酸钙不动杆菌	18.57 ± 0.28	40.00 ± 0	18.29 ± 0.42
枸橼酸杆菌属	费劳地枸橼酸杆菌	21.08 ± 0.68	40.00 ± 0	20.94 ± 0.28
沙门菌属	鼠伤寒沙门菌	23.06 ± 0.40	40.00 ± 0	22.58 ± 0.61

注: C_T 值小于 40 为阳性, C_T 值 40 为阴性;基本准线值:0.02

1.1.3 对照品 乙型肝炎病毒、新型隐球菌及白色念珠菌、人基因组 DNA 等均由浙江省儿童医院细菌室及感染实验室提供。

1.1.4 仪器 PE 5700 荧光定量 PCR 仪,购自美国 ABI 公司。

1.1.5 试剂 Taq 酶、dNTPs 购自 TAKARA 公司,TaqMan 探针由 GENECORE 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 标准菌株及临床培养菌株的 DNA 提取 用无菌棉签分别刮取小量平板上的不同菌株置于各自的 1 mL 无菌水离心管中,各取 50 μ L 菌株液加等量的抽提裂解液 (10 mmol/L Tri-HCl pH 7. 6, 5 mmol/L EDTA,0. 5% SDS,0. 22 μ m 膜过滤处理),置 100℃煮沸 10 min,12 000 r/min 离心 5 min,取 5 μ L 上清作为 PCR 模板。

1.2.2 通用引物、通用探针、革兰阳性探针和革兰阴性探针设计 从 GenBank 中筛选不同临床细菌的 16S rRNA 基因序列,应用 MegAlign 软件分析其基因序列,寻找不同细菌种属间的保守片段,分析生物进化树的规律,根据引物和探针的设计原则,在这些细菌保守区域筛选到一对通用引物和通用探针,并在该引物的扩增的区域内筛到两条能广泛代表革兰阳性菌和革兰阴性菌的特异性保守探针(表 3)^[6]。

表 3 引物和探针的寡核苷酸序列

名称	序列(5'-3')	位置
上游引物 (P690F)	TGTGTAGCGGTGAAATGCG	690-708
下游引物 (P829R)	CATCGTTTACGGCGTGGAC	829-811
通用探针 (UnProbe)	TCTAATCCTGTTTGATCCCCACG	800-778
G ⁺ 探针 (G ⁺ Probe)	AGAGATATGGAGGAACACCA	730-749
G ⁻ 探针 (G ⁻ Probe)	AGAGATCTGGAGGAATACCG	730-749

1.2.3 实时荧光 PCR 反应体系 反应体系 50 μ L,引物和探针浓度分别为 0. 4 μ mol/L 和 0. 2 μ mol/L,dATP, dGTP dCTP dTTP 浓度各为 200 μ mol/L,MgCl₂ 浓度 3. 5 mmol/L,Taq 酶 2. 5 U,模板为 5 μ L,PCR 整个反应液(不包括模板)必须用 0. 22 μ m 膜过滤处理^[7]。荧光定量反应在 ABI 5 700 检测仪进行。PCR 反应程序为: 94℃ 预变性 3 min 后,94℃ 20 s、62℃ 60 s 为一个循环,共循环 40 次。

1.2.4 重组质粒的构建及滴度浓度的稀释 用一对外引物 P527F(5'-CAGCAGCCGCGTAATACG-3')和 P1126R(5'-AGGGTTGCGCTCGTTGC-3')扩增标准的 *S. aureus* 25 723 菌株,PCR 产物为 600 bp,回收 PCR 产物后克隆入 pMD18-T 载体,抽提重组

克隆质粒,用引物 M13R 对重组的阳性克隆进行测序,确定构建质粒的准确性。重组质粒纯化后,于紫外分光光度计上进行定量,根据重组质粒的碱基长度计算其分子质量,根据其分子质量计算其浓度,进而计算出每微升所含的拷贝数,分级 10 倍稀释从 2 $\times 10^9$ 至 2 $\times 10^0$ 拷贝/ μ L,检测荧光定量 PCR 的敏感度。

1.2.5 标准菌株金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌滴度稀释 取标准菌株金黄色葡萄球菌(C_T 17. 28)和大肠埃希菌(C_T 14. 24)的抽提模板用无菌双蒸水分别进行 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ 和 10⁻⁶ 倍 6 个滴度稀释,用通用探针和各自的特异性探针进行荧光定量 PCR。

2 结果

2.1 细菌 16S rRNA 基因荧光定量 PCR 的特异性与敏感性

对 12 种标准菌株、23 种临床培养分离株进行了荧光定量 PCR 的检测,通用探针检测结果均为阳性;其中 18 株革兰阳性菌通过 G⁺ Probe 探针检测结果均为阳性,而用 G⁻ Probe 探针检测均为阴性;17 株革兰阴性菌通过 G⁻ Probe 探针检测均为阳性,而用 G⁺ Probe 探针检测均为阴性(表 1,2)。病毒、真菌及人基因组 DNA 等均无阳性扩增曲线。用重组质粒滴度稀释,可以检测到 10 个拷贝的量,即相当于 2 个细菌量,其 C_T 值(threshold cycle,每个反应管内的荧光信号达到设定的域值时所经历的循环数)为 38. 2。

2.2 三种探针检测标准菌株和临床培养菌株的相关性及分型

对上述 35 株临床上常见的败血症感染菌分别进行了通用探针、革兰阳性探针和革兰阴性探针的同时检测,结果通用探针全部为阳性,且 C_T 值均表现为比较统一的一个范围(15 ~ 23)之间(表 1,2)。在 G⁺ Probe 探针组中,18 株革兰阳性菌株均为阳性,且每个阳性的 C_T 值与 UnProbe 探针检测对应革兰阳性菌的 C_T 值相当,两者的变异系数 CV 均小于 10%(表 4); 17 株革兰阴性菌株通过 G⁺ Probe 探针检测均未有阳性的信号。在 G⁻ Probe 探针组中,17 株革兰阴性菌株均为阳性,且每个阳性 C_T 值与 UnProbe 探针检测对应革兰阴性菌的 C_T 值相当,两者的变异系数 CV 均 < 10%(表 5);同时用 G⁻ Probe 探针检测 18 株革兰阳性菌株均未有阳性的信号。

表 4 UnProbe 探针与 G⁺ Probe 探针检测革兰阳性菌 C_T值相关性比较

革兰阳性菌株	UnProbe (C _T)	G ⁺ Probe (C _T)	标准差 (S)	变异系数 [CV(%)]
金黄色葡萄球菌 ^a	17.28	16.97	0.219	1.28
表皮葡萄球菌 ^a	20.43	21.06	0.445	2.15
溶血葡萄球菌 ^a	19.62	20.17	0.389	1.95
肺炎链球菌 ^a	22.15	21.87	0.198	0.9
枯草杆菌 ^a	15.98	16.28	0.212	1.31
藤黄微球菌 ^a	18.26	19.15	0.629	3.36
金黄色葡萄球菌	15.68	15.29	0.276	1.78
表皮葡萄球菌	19.68	20.19	0.36	1.81
溶血葡萄球菌	20.28	22.09	1.28	6.04
人葡萄球菌	23.78	22.45	0.94	4.07
腐生葡萄球菌	23.09	21.49	1.131	5.08
肺炎链球菌	20.42	20.69	0.19	0.93
溶血性链球菌	23.06	22.57	0.346	1.52
无乳链球菌	17.59	17.24	0.247	1.42
产单核李斯特菌	14.58	14.88	0.212	1.44
类白喉棒状杆菌	16.21	17.1	0.629	3.78
痤疮丙酸杆菌	19.26	18.99	0.191	1
结核杆菌	23.47	23.16	0.219	0.94

a: 为标准菌株

表 5 UnProbe 探针与 G⁻ Probe 探针检测革兰阴性菌 C_T 值相关性比较

革兰阴性菌株	UnProbe (C _T)	G ⁻ Probe (C _T)	标准差 (S)	变异系数 [CV(%)]
大肠埃希菌 ^a	14.24	14.92	0.48	3.3
肺炎克雷伯氏菌 ^a	17.85	17.48	0.262	1.48
产气肠杆菌 ^a	14.95	16.12	0.827	5.33
绿脓杆菌 ^a	22.75	22.84	0.063	0.28
鲍氏志贺氏菌 ^a	17.26	16.87	0.276	1.62
粘质沙雷菌 ^a	21.58	22.47	0.629	2.86
大肠埃希菌	16.58	16.02	0.396	2.43
肺炎克雷伯氏菌	18.7	18.17	0.374	2.03
阴沟肠杆菌	22.06	22.98	0.65	2.89
流感嗜血杆菌	25.08	24.86	0.156	0.62
脑膜炎球菌	22.09	23.17	0.763	3.37
脆弱拟杆菌	17.26	18.19	0.658	3.71
铜绿色假单胞菌	17.24	16.87	0.262	1.53
普通变形杆菌	19.58	20.52	0.665	3.31
醋酸钙不动杆菌	18.57	18.29	0.198	1.07
费劳地枸橼酸杆菌	21.08	20.94	0.099	0.47
鼠伤寒沙门菌	23.06	22.58	0.34	1.49

a: 为标准菌株

2.3 标准菌株金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌滴度稀释定量结果

金葡菌 C_T 17.28 各滴度稀释品用 UnProbe 探针和 G⁺ Probe 探针进行荧光定量 PCR; 大肠杆菌 C_T14.24 各滴度稀释品用 UnProbe 探针和 G⁻ Probe 探针进行荧光定量 PCR(表 6)。在 0.02 处划基本准线,金葡菌 C_T 17.28 各滴度稀释品通过通用和革兰阳性探针定量 PCR,发现稀释的拷贝数和检测的

C_T 值呈负相关,G⁺ Probe 探针能检测到 10⁻⁵ 倍值(C_T 37.86);大肠杆菌 C_T 14.24 各滴度稀释品通过通用和革兰氏阴性探针定量 PCR,发现稀释的拷贝数和检测的 C_T 值也呈负相关,但在 10⁻⁵ 倍和 10⁻⁶ 倍之间数值的跨越有点大。

表 6 组合探针检测两株标准菌株稀释品的结果

组合探针	滴度稀释品的检测 C _T 值					
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
UnProbe 探针 -金葡菌 C _T 17.28	20.12	23.86	27.14	32.28	40	40
G ⁺ Probe 探针 -金葡菌 C _T 17.28	20.58	24.7	27.87	32.34	37.86	40
UnProbe 探针 -大肠杆菌 C _T 14.24	16.86	19.38	23.69	26.82	31.11	40
G ⁻ Probe 探针 -大肠杆菌 C _T 14.24	16.03	19.2	24.01	27.87	31.85	40

3 讨论

16S rRNA 基因是细菌染色体上编码 rRNA 相对应的 DNA 序列。该基因具有以下两大特点:①多拷贝:16S rRNA 编码基因以多拷贝形式存在于所有细菌染色体基因组中,每个细菌约含 5~10 个拷贝,这使得对该基因的检测具有敏感性。②多信息:16S rRNA 编码基因内部结构由可变区和保守区组成。保守区为所有细菌所共有,有“分子化石”之称。可根据保守区设计各种细菌的通用引物,也可根据可变区设计特异引物和探针,用于细菌分型。16S rRNA 编码基因的这些特点使之成为较理想的细菌基因分类的靶序列,逐渐成为细菌鉴别、分类的金标准^[8,10]。

实时荧光定量 PCR 技术具有准确性高、重现性好等特点,已广泛用于基因表达研究,病原体检测等诸多领域^[11~13]。实时荧光定量 PCR 技术的基本原理是,PCR 扩增时在加入一对引物的同时加入一个特异性的荧光探针,该探针为一寡核苷酸,两端分别标记一个报告基因和一个淬灭荧光。当探针完整时,报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收;随着 PCR 的进行,当引物延伸至探针位置时,Taq 酶发挥其 5'-3'外切活性将探针 5'端的荧光分子从探针上切割下来,淬灭分子失去对荧光分子的淬灭作用,从而使荧光分子发出荧光,切割的荧光分子数与 PCR 产物的数量成比例。因此根据 PCR 反应液的荧光强度即可计算出初始模板的数量。在先前的研究中,我们以细菌 16S rRNA 基因为靶序列,设计通用

引物及 TaqMan 探针,建立了细菌 16S rRNA 基因荧光定量 PCR 诊断新生儿败血症方法^[14]。同时也可根据设定的特异性荧光探针用于基因的突变检测和分型分析。我们分析了临床常见菌的 16S rRNA 基因序列,筛选到一对通用引物 P690F、P829R,并且在此基础上设计并筛选通用探针、革兰阳性和革兰阴性探针。用于细菌 DNA 荧光定量的检测和细菌的革兰阴阳性菌的分型。

细菌 16S rRNA 基因荧光定量 PCR 具有很高的特异性和敏感性。35 株标准菌株和临床培养菌株通过通用探针定量 PCR 均为阳性,而病毒、真菌及人基因组 DNA 等均无阳性扩增曲线;用 G^+ Probe 探针检测全部 35 株菌株,其中 18 株革兰阳性菌结果均为阳性,而革兰阴性菌株均为阴性;用 G^- Probe 探针检测全部 35 株菌株,其中 17 株革兰阴性菌结果均为阳性,而革兰阳性菌株均为阴性。特异性革兰阴阳性探针也具有很好的特异性。本研究结果证明本组引物序列和探针对细菌 16S rRNA 基因具有高度特异性。同时我们用构建的重组质粒作为灵敏度检测,发现能检测到 10 拷贝的 16S rRNA 基因 (C_T 38.2)即相当于 2 个细菌的量,具有很高的敏感性。

通用探针和各自的特异性阴阳性分型探针具有很高的相关性。从表 4 和表 5 的分析结果可以看到,18 株革兰阳性菌通过 G^+ Probe 探针和 UnProbe 探针平行检测,发现其检测的 C_T 值相当,两者的变异系数均小于 10%;同样的 17 株革兰阴性菌通过 G^- Probe 探针和 UnProbe 探针同时检测,其两者得 C_T 值也相当,且两者的变异系数均 $<10\%$ 。表明该 16S rRNA 细菌基因荧光定量 PCR 及分型是可靠的,且只要通过做三种探针中的两种探针荧光定量检测,基本可以对细菌进行定量和分型,起到了一举两得效果。我们又对其中的两株标准菌株金葡菌 C_T 17.28 和大肠杆菌 C_T 14.24 分别进行了稀释滴度试验,以检测其与通用探针的相关性和敏感性,结果发现特异性的探针能随着滴度的依次降低其 C_T 值成依次增高,呈负相关性。且各自的量与通用探针的量基本吻合。进一步说明了该定量和分型系统的可靠性和准确性,用革兰阴阳性双探针法是完全能用于细菌的定量和革兰阴阳性分型。

与传统的细菌培养法比较,采用荧光定量 PCR 扩增细菌的方法不仅灵敏度高且检测耗时少,整个过程可在 2~3 h 完成。同时在定量中进行分型,在分型中进行定量,提高了检测的可靠性和准确性。更重要的是此方法不受标本中存在抗菌药物或其他抑菌物质的干扰。因此建立的细菌 16S rRNA 基因

双探针荧光定量 PCR 及分型方法具有快速、特异、灵敏、准确可靠等特点,可望用于临床各种细菌感染性疾病的快速诊断。

[参 考 文 献]

- [1] Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set [J]. *Microbiology*, 2002, 148 (Pt 1):257-266.
- [2] Lieu TA, Schwartz JS, Jaffe DM, Fleisher GR. Strategies for diagnosis and treatment of children at risk for occult bacteremia; clinical effectiveness and cost effectiveness [J]. *J Pediatr*, 1991, 118 (1):21-29.
- [3] Downs SM, McNutt RA, Margolis PA. Management of infants at risk for occult bacteremia; a decision analysis [J]. *J Pediatr*, 1991, 118 (1):11-20.
- [4] 尚世强,洪文澜,俞惠民,孙眉月,滕恣群,金益人. 细菌 DNA 的聚合酶链反应扩增及反相杂交初步分型 [J]. *中华检验医学杂志*, 1998, 21 (5): 281-284.
- [5] Shang S, Chen Z, Yu X. Detection of bacterial DNA by PCR and reverse hybridization in the 16S rRNA gene with particular reference to neonatal septicemia [J]. *Acta Paediatr*, 2001, 90 (2): 179-183.
- [6] Shang S, Chen G, Wu Y, Du L, Zhao Z. Rapid diagnosis of bacterial sepsis with PCR amplification and microarray hybridization in 16S rRNA gene [J]. *Pediatr Res*, 2005, 58 (1):143-148.
- [7] 王荣山,吴亦栋,尚世强,杨祖卿,杜立中. 实时荧光定量 PCR 检测细菌方法的建立及其临床应用 [J]. *中华围产医学杂志*, 2005, 8 (4):242-245.
- [8] McCabe KM, Khan G, Zhang YH, Mason EO, McCabe ER. Amplification of bacterial DNA using highly conserved sequence; Automated analysis and potential or molecular triage of sepsis [J]. *Pediatrics*, 1995, 95 (2):165-169.
- [9] Tsai JC, Teng LJ, Hsueh PR. Direct detection of bacterial pathogens in brain abscesses by polymerase chain reaction amplification and sequencing of partial 16S ribosomal deoxyribonucleic acid fragments [J]. *Neurosurgery*, 2004, 55 (5): 1154-1162.
- [10] Lau SK, Ng KH, Woo PC, Yip KT, Fung AM, Woo GK, et al. Usefulness of the MicroSeq 500 16S rDNA bacterial identification system for identification of anaerobic Gram positive bacilli isolated from blood cultures [J]. *J Clin Pathol*, 2006, 59 (2):219-222.
- [11] Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR [J]. *Genome Res*, 1996, 6 (10):986-994.
- [12] Pas SD, Fries E, De Man RA, Osterhaus AD, Niesters HG. Development of a quantitative real-time detection assay for hepatitis B virus DNA and comparison with two commercial assays [J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38 (8):2897-2901.
- [13] Bièche I, Onody P, Laurendeau I, Olivi M, Vidaud D, Lidereau R, et al. Real-time reverse transcription-PCR assay for future management of ERBB2-based clinical applications [J]. *Clin Chem*, 1999, 45, (8 Pt 1), 45:1148-1156.
- [14] 吴亦栋,尚世强,李建平,杨祖钦,郑之北,杜立中,等. 细菌 16S rRNA 基因荧光定量 PCR 诊断新生儿败血症 [J]. *中华儿科杂志*, 2007, 45 (6):446-449.

(本文编辑:吉耕中)