

• 论著 •

聚合酶链反应-高分辨率熔解曲线技术在下呼吸道细菌鉴定中的应用

赵焕英¹,薛冰¹,方霄²,陈瑛³,郭伟⁴

1. 首都医科大学医学实验与测试中心,北京 100069; 2. 济宁医学院药学院 2013 级药物制剂技术,日照 276826; 3. 首都医科大学附属友谊医院妇产科,北京 100050; 4. 首都医科大学附属北京天坛医院急诊科,北京 100050

摘要:为探讨聚合酶链反应-高分辨率熔解曲线(PCR-HRM)技术在检测呼吸道菌群中的应用,本研究用支气管镜从慢性阻塞性肺病患者下呼吸道采集分泌液,提取细菌总 DNA,以 16S 通用引物 27F/1492R 扩增 16S rDNA 全长,PCR 产物经电泳、纯化后连接到 pGEMT-Easy 载体上,构建 16S rDNA 克隆文库。然后以 16S rDNA V3 区通用引物 338F/518R 扩增克隆文库,V3 区 PCR-HRM 分析在罗氏 LightCycler 480 实时荧光定量 PCR 系统中进行,采用 HRM 基因扫描软件分析数据。根据不同 HRM 图型,挑选克隆株测序并鉴定菌株。结果显示,PCR-HRM 技术可灵敏区分下呼吸道不同细菌 16S rDNA V3 区,根据 HRM 图谱可极大减少克隆菌株测序样本,提示 PCR-HRM 技术可作为一种快速、高通量、敏感、经济的菌群多样性检测方法。

关键词:聚合酶链反应-高分辨率熔解曲线技术;微生物菌群;16S rDNA 文库;慢性阻塞性肺病;哮喘

Application of polymerase chain reaction-high-resolution melt technology for bacterial identification in samples collected from lower respiratory tract

ZHAO Huan-Ying¹, XUE Bing¹, FANG Xiao², CHEN Ying³, GUO Wei⁴

1. Core Facilities Center, Capital Medical University, Beijing 100069 China; 2. Grade 2013 of Pharmaceutical Preparation Technology, Jining Medical University, Rizhao 276826, China; 3. Department of Obstetrics and Gynecology, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China; 4. Emergency Department, Beijing Tian Tan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

Abstract: To study the role of polymerase chain reaction-high-resolution melt (PCR-HRM) in the detection of mixed bacteria from respiratory tract, the fluid from the lower respiratory tract of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) was collected through bronchoscope. Total DNA was extracted and the full-length 16S rDNA was amplified by PCR with 16S primers 27F/1492R. The PCR products were purified and connected to pGEMT-Easy to build a 16S rDNA clone library. The cloned library was amplified by 338F/518R (16S rDNA-V3 region universal primer). PCR-HRM in V3 region was performed on Roche LightCycler 480 real-time fluorescence quantitative PCR system. The data were analyzed by HRM GeneScan

基金项目:国家自然科学基金(30901598),首都医科大学基础临床科研合作基金(13JL28、14JL29),首都医科大学校基金技术类项目(2014JS08)

通信作者:郭伟

Corresponding author: GUO Wei, E-mail: guowei1010@126.com

analysis software. Strains with different HRM curve were selected for sequencing and strain identification. The results showed that PCR-HRM could be used to distinguish the 16S rDNA-V3 regions from different bacteria of the lower respiratory tract. PCR-HRM technology can be used as a rapid, high-throughput, sensitive and economic detection method for bacterial diversity in clinical samples.

Key words: Polymerase chain reaction-high-resolution melt technology; Microbial flora; 16S rDNA library; Chronic obstructive pulmonary disease; Asthma

近30年来,哮喘、慢性阻塞性肺病等呼吸系统疾病的发病率逐年升高,严重威胁人类健康,成为导致人类疾病死亡的第三大主要原因^[1,2]。最近的研究观点认为,呼吸道微生物可能是慢性阻塞性肺病和哮喘等疾病的重要致病因素^[3]。呼吸道作为人类机体与外界相通的通道,是微生物的栖息地,在维持人类免疫系统功能的健全性和完整性中起重要作用。微生物菌群的迁移和紊乱会导致疾病^[4],因此检测呼吸道微生物菌群与呼吸系统疾病成为研究热点^[5,6]。临幊上在呼吸系统疾病混合细菌感染诊断中,多采用细菌培养方法,但耗时长,检出率低,易出现假阴性^[7]。近年来,分子生物学方法,尤其是16S rDNA聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)联合其他分子生物学技术,如测序、变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)、变性高效液相色谱(denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC)、单链构象多态性(single-strand conformation polymorphism, SSCP)等^[8,9],在快速检测细菌感染方面应用广泛。本研究旨在探讨PCR-高分辨率熔解曲线(high-resolution melt, PCR-HRM)技术在检测微生物中的应用,为快速检测下呼吸道菌群的多样性提供一种新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本 选取5例临床慢性阻塞性肺病患者,分别在治疗前和治疗后经支气管镜检查获取下呼吸道分泌物。根据细菌检测结果,给予相应治疗。

1.1.2 主要试剂和仪器 pGEMT-Easy Vector购自Promega公司,2×TransTag-T PCR SuperMix、核酸胶回收试剂盒购自TransGen Biotech公司,细菌DNA自动提取试剂盒、Lab-Aid820核酸自动提取仪购自致善生物公司,2-Log DNA Ladder(0.1~10 kb)购自NEB公司,LightCycler 480 High

Resolution Melting Master、LightCycler 480定量PCR检测仪购自Roche公司,NanoDrop2000分光光度计购自Thermo Fisher公司,QIAxcel Advanced全自动核酸分析仪购自Qiagen公司。

1.2 方法

1.2.1 样品获取 患者早晨起床刷牙后,用无菌生理盐水300 ml反复漱口。用75%乙醇纱布擦拭患者鼻、唇周围皮肤,雾化吸入支气管扩张剂,并给予2%~4%利多卡因进行表面黏膜麻醉,行支气管镜检查。当支气管镜到达病变部位,向后退约2 cm,镜中的保护性毛刷伸出内套管约3 cm,反复刷取3次,毛刷退回内套管。检查结束后,将支气管镜套管外壁进行75%乙醇消毒、冲洗,避免引入上呼吸道细菌,然后将保护性毛刷伸出内套管,将刷取的下呼吸道分泌物溶解在无菌TE(pH 7.4)缓冲液中。

1.2.2 DNA 提取 镜检缓冲液以14 000 r/min离心5 min,弃上清液,浓缩,在沉淀物中加入0.5 ml TE重新定容。按致善生物公司细菌DNA提取试剂盒说明,在配套Lab-Aid820核酸自动提取仪上设置程序,并按要求将8连管预分装试剂条(包括裂解液、磁珠、洗涤液、DNA洗脱液等)放入仪器指定位置。开启程序,40 min内一次可处理20份样本。提取细菌总DNA,用NanoDrop 2000分光光度计检测浓度和纯度, A_{260}/A_{280} 值为1.6~1.8纳入实验。

1.2.3 细菌 16S rDNA 扩增 以细菌通用引物27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和1492R: 5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'扩增16S rDNA^[10]。本研究所有引物合成和测序工作由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。反应体积为50 μl,上游引物(10 μmol/L)1 μl,下游引物(10 μmol/L)1 μl,2×TransTag-T PCR SuperMix 25 μl,模板DNA 50 ng,补水至50 μl。PCR程序:94 °C预变性5 min;94 °C变性30 s,55 °C退火40 s,72 °C延伸1.5 min,35个循环;最后72 °C延伸

10 min。

1.2.4 下呼吸道菌群 16S rDNA 文库建立 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 切取长度约 1.5 kb 的 16S rDNA 片段, 用胶回收试剂盒纯化后, 连接到 pGEMT-Easy 载体上, 并将载体转化入大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞内, 在含有 X-gal、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG) 和氨苄西林的 LB 平板培养基上 37 °C 培养 14 h, 经蓝白斑筛选, 挑取白色克隆到 LB 液体培养基过夜培养, 再行克隆株细菌 DNA 提取。

1.2.5 菌群多样性的 PCR-HRM 分析 以细菌通用 V3 区引物^[11], 338F: 5'-ACTCCTACGGAG-GCAGCAG-3' 和 518R: 5'-ATTACCGCGGCT-GCTGG-3', 扩增片段长度约 197 bp。PCR 反应体系为: 模板 DNA 20 ng, 上下游引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ l, 2×High Resolution Melting Master Mix 10 μ l, 25 mmol/L MgCl₂ 1.6 μ l, 补水至 20 μ l。PCR 程序: 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 20 s, 此步采集荧光信号, 共 40 个循环。PCR 后 HRM 分析程序: 95 °C 1 min, 40 °C 1 min; 65~95 °C 升温, 升温阶段的采集速度为 0.02 °C/s, 每 1 °C 采集 25 个荧光点; 40 °C 30 s。PCR 和 HRM 分析均在 LightCycler 480 实时荧光 PCR 系统中进行, 采用 HRM 基因扫描分析软件进行数据分析。

1.2.6 挑选不同 HRM 谱型细菌进行测序鉴定

根据 HRM 基因扫描分析图形, 可推测出菌群多样性丰度, 从每一类谱型中挑选 3~6 个克隆株进行测序验证, 用 ClustalW2 多序列比对软件进行 DNA 序列比对, 并对 V3 区序列进行差异敏感性检验。

1.2.7 16S rDNA V3 区 DNA 片段核酸全自动分析

根据 HRM 基因扫描分析结果, 确定细菌组成种类, 并将细菌 V3 区 PCR 产物进行核酸全自动分析。取扩增产物 10 μ l 加入样品排孔内, 分子量标记物 15~600 bp 加入样品孔前排, DNA 分子量标记物 25~500 bp 加入样品排中的一孔。启动仪器后约 10 min 结束实验, 用软件进行分析。

2 结果

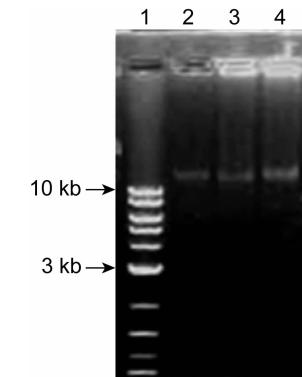
2.1 样本总 DNA 提取结果

支气管镜检下呼吸道分泌物经核酸提取试剂盒

提取总 DNA, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 可观察到 >10 kb 的总 DNA 条带(图 1)。

2.2 16S rDNA PCR 扩增产物

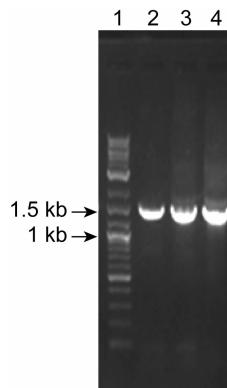
以提取的总 DNA 为模板, 经 27F/1492R 通用引物扩增细菌 16S rDNA 全长, 1% 琼脂糖凝胶电泳可见长度约为 1.5 kb 的预期条带(图 2)。



1, 2-Log DNA Ladder; 2-4, total DNA.

图 1 总 DNA 电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of total DNA



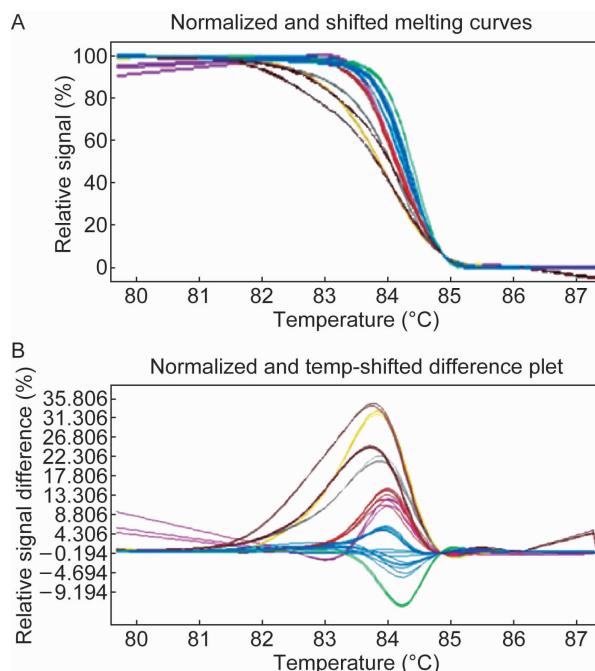
1, 2-Log DNA Ladder; 2-4, 16S rDNA.

图 2 27F/1492R 引物扩增细菌 16S rDNA 全长

Fig. 2 16S rDNA fragments amplified with 27F/1492R

2.3 HRM 分析 16S rDNA 文库细菌多样性

将上述 16S rDNA 纯化回收后, 连接到 pGEMT-Easy 载体中, 转化 DH5 α 感受态细胞, 经平板培养建立样本的细菌 16S rDNA 文库。然后提取单克隆细菌, 提取质粒为模板, 利用细菌 V3 区通用引物 338F/518R, 在饱和荧光染料存在的条件下进行 PCR 扩增, 用 HRM 软件进行分析。如图 3 所示, 熔解曲线经标准和差异显示后, 1 份样本中可检测到 9 种颜色熔解曲线, 一种颜色代表一种细菌, 可判断该呼吸道样本中约有 9 种细菌。



A: Standard melting curve. B: Differential melting curve.

图3 多种细菌V3的熔解曲线

Fig. 3 High-resolution melt curve of bacterial DNA V3 region

2.4 不同 HRM 谱型细菌的测序结果

从 HRM 分析的每种谱型中随机挑选 3~6 个克隆株测序,测序结果与 HOMD 数据库(Human Oral Microbiome Database)和 GenBank 数据库进行基本局部比对搜索工具(Basic Local Alignment Search Tool, BLAST)分析,纳入相似度>99% 的结果。将检测到的 9 种细菌序列用 ClustalW2 多序

列比对软件进行分析,9 种细菌 V3 区差异截图见图 4,红色标注部分是 V3 区通用引物位置。图 5 显示经聚类分析的 9 种细菌相关度结果及鉴定的细菌名称。

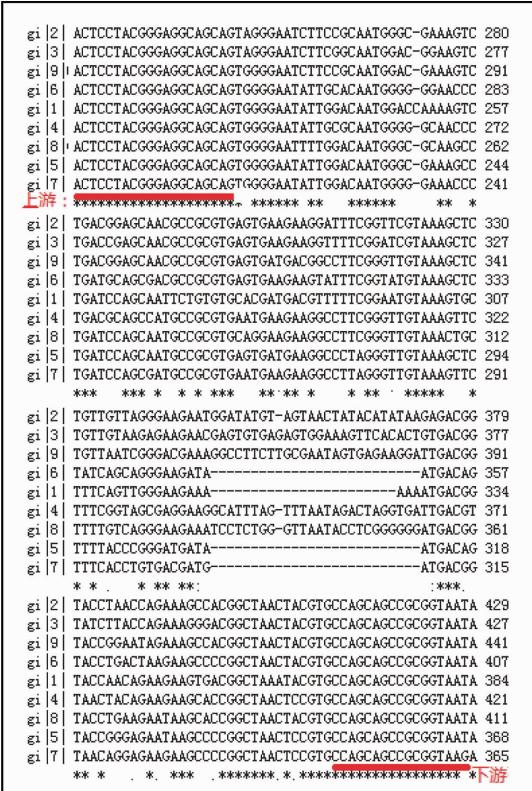


图4 9种细菌V3区DNA序列比对结果

Fig. 4 Alignment results of DNA V3 region of 9 kinds of bacteria

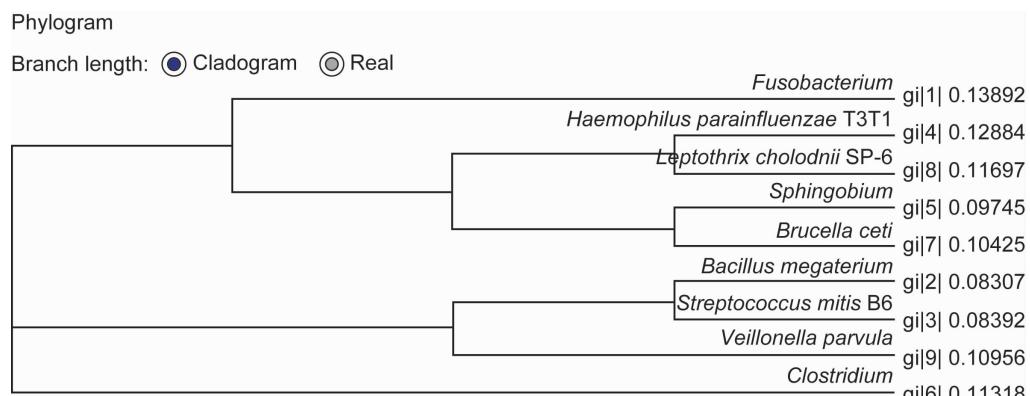


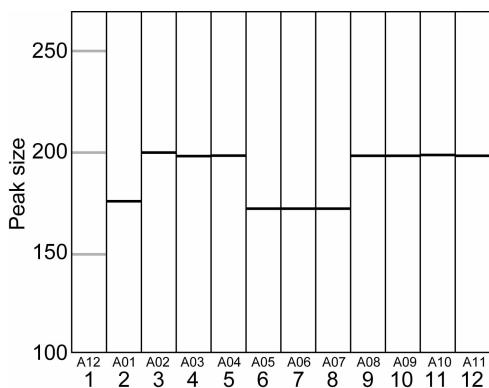
图5 9种细菌系统进化树分析图

Fig. 5 Phylogenetic tree of 9 bacterial systems

2.5 全自动核酸分析仪分析 HRM 的结果

图 6 显示 V3 区扩增产物经全自动核酸分析的电泳谱带结果。图 7 显示条带大小峰图,可见 9 种

细菌对应 9 种峰图颜色及长度差别。QIAxcel Advanced 核酸自动分析仪在 3 min 内能使<0.5 kb DNA 分辨出 3~5 bp 的差别。



1, 25-500 bp DNA marker; 2, strain 1, 177 bp; 3, strain 3, 199 bp; 4, strain 2, 198 bp; 5, strain 4, 198 bp; 6, strain 5, 173 bp; 7, strain 6, 173 bp; 8, strain 7, 173 bp; 9–10, strain 8, 198 bp; 11–12, strain 9, 199 bp.

图 6 全自动核酸分析仪示 9 种细菌 V3 区扩增产物

Fig. 6 Analysis of V3 region amplification products of 9 kinds of bacteria using QIAxcel System

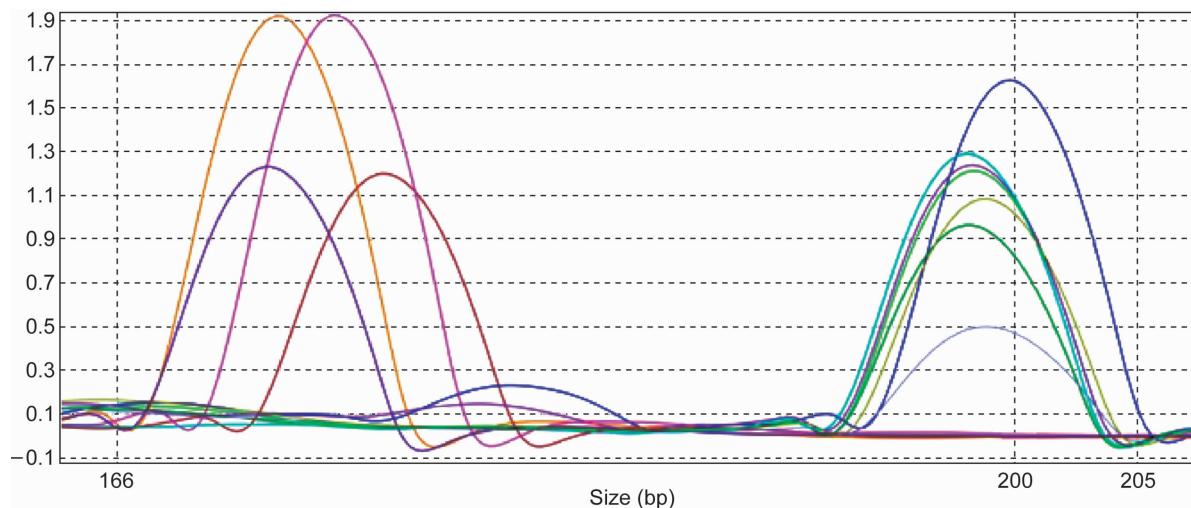


图 7 9 种细菌 V3 区在全自动核酸分析仪上的峰型图谱

Fig. 7 Peak pattern of V3 region of 9 kinds of bacteria on automatic nucleic acid analyzer

3 讨论

HRM 分析是近年来新发展的主要用于单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 及突变检测的技术^[12,13]。该技术在 SYBR Green I 染料法实时 PCR 基础上发展而来。与传统 SYBR Green I 不同, PCR-HRM 技术所用的是饱和染料, 如 LC Green、LC Green Plus、SYTO 9、Eva Green 等, 这类饱和染料与 DNA 双链结合力更强, 对扩增的抑制更低, 对熔解曲线的分辨率更高。在 PCR 后运行 HRM 分析程序时, 双链 DNA 随仪器从 60 °C 至 95 °C 逐步升温而逐渐解链, 此时饱和荧光染料脱落, 不会发生分子重排, 即不再掺入到 DNA 双链内, 从而使荧光信号随温度升高而逐渐减弱。随精密 LightCycler 480 PCR 仪每次升温

0.02 °C/s, 每 1 °C 采集 25 次荧光信号, 可绘制出以荧光强度变化率为纵坐标和以温度为横坐标的特征曲线, 即可得出特定 PCR 产物的特征熔解荧光信号谱型。因细菌 16S rDNA 被认为是生命进化的“分子钟”, 其 DNA 序列具有 10 个恒定区, 恒定区内 DNA 序列为所有细菌共有; 9 个可变区, 可变区内碱基序列随细菌的种属不同而变化丰富, 可变区内 DNA 碱基的差异能揭示物种亲缘关系, 且可变区内 V3 区变化丰富^[14-16]。选取 V3 区两侧恒定碱基序列 338F/518R^[11]作为扩增 V3 区引物, PCR 产物因细菌种属不同其碱基长度、碱基互补排序及 GC 含量会有差别。因此, 不同细菌 V3 区 PCR 产物行 HRM 扫描分析, 会产生独特的熔解曲线形状, 每个菌种的熔解曲线谱型就如同该物种的分子指纹。根据 HRM 的谱型可判断菌群丰度情况, 并可挑选克

隆株测序和鉴定,最终达到对细菌进行种属鉴定。

下呼吸道取样困难,目前临幊上主要通过深部诱导“自然咯痰法”获取痰样来分析下呼吸道细菌,但样本经上呼吸道易造成污染,无法真实反映下呼吸道菌群状态。随着支气管镜技术的发展及患者可接受度的提高,支气管镜刷取液或灌洗液能定点获取下呼吸道细菌样本,并发现在稳定期慢性阻塞性肺病和哮喘患者的下呼吸道均存在细菌定植现象^[17,18],这使得人们对下呼吸道微生态的存在有了新认识。要检测下呼吸道微生态的组成,建立完备的16S rDNA文库很重要。用细菌通用引物27F/1492R扩增16S rDNA全长,并装入克隆载体内组建文库是经典建库模式,也是一代测序检测细菌的通用方法^[10]。文库容量的大小与取样的范围有直接关系,在下呼吸道多点、反复取样会增大库容。本研究从1份样本中检测到9种细菌,与支气管镜检仅在病灶位置单点取样有关,也与检测的文库克隆株数量有关。但病灶部位易检测到的优势菌可能与疾病的发生和发展相关,临幊医师需在治疗过程中考虑到。

以往临幊微生物检测中应用的分子技术通常为PCR-DGGE、PCR-SSCP、PCR-DHPLC、标记性核酸探针杂交技术及PCR联合一代测序等技术。DGGE需配置梯度胶,扩增引物要加高GC含量的GC夹才能在凝胶上区分PCR片段,且常常一条泳带含有2~3种不同PCR产物,灵敏度低^[10];SSCP要求配置聚丙烯酰胺凝胶,且要掌握片段变性和退火温度,条件不易重复;DHPLC要求PCR产物过液相色谱柱来区分,一次检测一个样本,通量低,且液相色谱柱、流动相、洗脱液等步骤繁琐,易堵塞柱子;标记核酸探针技术需放射性标记及系列杂交洗脱处理,周期长;而建立16S rDNA文库的一代测序,则需盲测大量样本,最后一一比对才能知道菌群情况,周期长,成本高。总之,上述方法均未能克服操作复杂、费时、费用高、通量小等缺点,在临幊实践中应用受限。尽管高通量测序是菌群多样性验证的“金标准”,但由于仪器贵、成本高及要求专业大数据分析人员等特点,目前无法在临幊诊断中开展。与以上技术相比,PCR-HRM技术则相对简单、经济。其整个操作是在封闭的384孔板内进行实时PCR,不但减少了交叉污染,而且2 h内一次可检测384个克隆株;实验结束用HRM扫描软件分析熔解曲线,即可知样本中微生态的丰度,又可挑选克隆株测序,最终能明确细菌类别,从而大大降低测序成本。

方法学研究也证实^[19],HRM分析法检测突变的灵敏度可比拟甚至超过当前的一些SNP突变分析技术如DHPLC等,也大大高于测序,很有应用前景。

参考文献

- [1] Vestbo J, Hurd SS, Agustí AG, Jones PW, Vogelmeier C, Anzueto A, Barnes PJ, Fabbri LM, Martinez FJ, Nishimura M, Stockley RA, Sin DD, Rodriguez-Roisin R. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2013, 187(4): 347-365.
- [2] Couzin-Frankel J. Bacteria and asthma: untangling the links [J]. Science, 2010, 330(68): 1168-1169.
- [3] Dickson RP, Martinez FJ, Huffnagle GB. The role of the microbiome in exacerbations of chronic lung diseases [J]. Lancet, 2014, 384(9944): 691-702.
- [4] Beck JM, Young VB, Huffnagle GB. The microbiome of the lung [J]. Transl Res, 2012, 160(4): 258-266.
- [5] Pragman AA, Kim HB, Reilly CS, Wendt C, Isaacson RE. The lung microbiome in moderate and severe chronic obstructive pulmonary disease [J]. PLoS One, 2012, 7(10): e47305.
- [6] Garcia-Nuñez M, Millares L, Pomares X, Ferrari R, Pérez-Brocal V, Gallego M, Espasa M, Moya A, Monsó E. Severity-related changes of bronchial microbiome in chronic obstructive pulmonary disease [J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(12): 4217-4223.
- [7] Keller PM, Rampini SK, Bloomberg GV. Detection of a mixed infection in a culture-negative brain abscess by broad-spectrum bacterial 16S rRNA gene PCR [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(6): 2250-2252.
- [8] Molyneaux PL, Cox MJ, Willis-Owen SA, Mallia P, Russell KE, Russell AM, Murphy E, Johnston SL, Schwartz DA, Wells AU, Cookson WO, Maher TM, Moffatt MF. The role of bacteria in the pathogenesis and progression of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2014, 190(8): 906-913.
- [9] Garzoni C, Brugger SD, Qi W, Wasmer S, Cusini A, Dumont P, Gorgievski-Hrisoh M, Mühlmann K, von Garnier C, Hilty M. Microbial communities in the respiratory tract of patients with interstitial lung disease [J]. Thorax, 2013, 68(12): 1150-1156.
- [10] 赵焕英,尚佳健,张琛,关蕊,杨颖.16S rDNA克隆文库法与PCR-DGGE法在口腔菌群分析中的对比研究[J].山西医科大学学报,2013,44(7):530-534.
- [11] Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA [J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(3): 695-700.

- [12] Maurischat S, Szabo I, Baumann B, Malorny B. Rapid real-time PCR methods to distinguish *Salmonella Enteritidis* wildtype field isolates from vaccine strains Salmovac SE/Gallivac SE and AviPro SALMONELLA VAC E [J]. *J Microbiol Methods*, 2015, 112: 92-98.
- [13] Pomeroy RS, Balamurugan K, Wong H, Duncan G. High-resolution melt analysis of the minisatellite D1S80: a potential forensic screening tool [J]. *Electrophoresis*, 2014, 35(21/22): 3020-3027.
- [14] Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria [J]. *J Microbiol Methods*, 2007, 69(2): 330-339.
- [15] Youssef N, Sheik CS, Krumholz LR, Najar FZ, Roe BA, Elshahed MS. Comparison of species richness estimates obtained using nearly complete fragments and simulated pyrosequencing-generated fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(16): 5227-5236.
- [16] Temmerman R, Scheirlinck I, Huys G, Swings J. Culture-independent analysis of probiotic products by denaturing gradient gel electrophoresis [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(1): 220-226.
- [17] Ege MJ, Mayer M, Normand AC, Genuneit J, Cookson WO, Braun-Fahrlander C, Heederik D, Piarroux R, von Mutius E; GABRIELA Transregio 22 Study Group. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma [J]. *N Engl J Med*, 2011, 364(8): 701-709.
- [18] Beigelman A, Weinstock GM, Bacharier LB. The relationships between environmental bacterial exposure, airway bacterial colonization, and asthma [J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2014, 14(2): 137-142.
- [19] White H, Potts G. Mutation scanning by high resolution melt analysis. Evaluation of Rotor-GeneTM 6000 (Corbett Life Science), HR-1TM and 384 well LightScannerTM (Idaho Technology) [R/OL]. UK: National Genetics Reference Laboratory (Wessex) . http://www.ngrl.org.uk/Wessex/downloads_reports.htm.

(收稿日期:2015-05-15)