

- lar Endocrinology, 2005, 35(2):283-292.
- [9] Moser D, Molitor A, Kumsta R, et al. The glucocorticoid receptor gene exon 1-F promoter is not methylated at the NGFI-A binding site in human hippocampus[J]. World J Biol Psychiatry, 2007, 8(4):262-268.
- [10] Mc Gowan PO, Sasaki A, D'Alessio AC, et al. Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse[J]. Nat Neurosci, 2009, 12(3):342-348.
- [11] Pujols L, Mullol J, Torrego A, et al. Glucocorticoid receptors in human airways [J]. Allergy, 2004, 59(10):1042-1052.
- [12] Turner JD, Alt SR, Cao L, et al. Transcriptional control of the glucocorticoid receptor: CpG islands, epigenetics and more[J]. Biochemical Pharmacology, 2010, 80(12):1860-1868.
- [13] Bird AP, Wolffe AP. Methylation induced repression-belts, braces, and chromatin[J]. Cell, 1999, 99(5):451-454.
- [14] Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, et al. Epigenetic programming by maternal behavior[J]. Nat Neurosci, 2004, 7(8):847-854.
- [15] Szyf M, Meaney MJ. Epigenetics, behaviour, and health[J]. Allergy Asthma Clin Immunol, 2008, 4(1):37-49.
- [16] Alexander U, Moshe S, Peter W, Nathanielsz. Organ and gestational age effects of maternal nutrient restriction on global methylation in fetal baboons[J]. J Med Primatol, 2009, 38(4):219-227.
- [17] Eglen RM, Reisine T. Screening for compounds that modulate epigenetic regulation of the transcriptome; an overview[J]. J Biomol Screen, 2011, 16(10):1137-1152.
- [18] Cheng X, Blumenthal RM. Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective[J]. Structure, 2008, 16(3):341-350.
- [19] Hu YG, Hirasawa R, Hu JL. Regulation of DNA methylation activity through Dnmt3L promoter methylation by Dnmt3 enzymes in embryonic development[J]. Hum Moz Genet, 2008, 17(17):2654-2664.
- [20] Lillycrop KA, Phillips ES, Torrens C, et al. Feeding pregnant rats a protein-restricted diet persistently alters the methylation of specific cytosines in the hepatic PPAR alpha promoter of the offspring[J]. Br J Nutr, 2008, 100(2):278-282.
- [21] Takaya J, Ihara A, Okihana Y, et al. Magnesium deficiency in pregnant rats alters methylation of specific cytosines in the hepatic hydroxysteroid dehydrogenase-2 promoter of the offspring[J]. Epigenetics, 2011, 6(5):573-578.
- [22] Lillycrop KA, Phillips ES, Jackson AA, et al. Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring[J]. J Nutr, 2005, 135(6):1382-1386.
- [23] Lillycrop KA, Slater-Jefferies JL, Hanson MA, et al. Induction of altered epigenetic regulation of the hepatic glucocorticoid receptor in the offspring of rats fed a protein-restricted diet during pregnancy suggests that reduced DNA methyltransferase-1 expression is involved in impaired DNA methylation and changes in histone modifications[J]. Br J Nutr, 2007, 97(6):1064-1073.
- [24] Meaney MJ, Szyf M, Seckl JR. Epigenetic mechanisms of perinatal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal function and health[J]. Trends Mol Med, 2007, 13(7):269-277.
- [25] Dolinoy DC, Weidman JR, Waterland RA, et al. Maternal genistein alters coat color and protects Avy mouse offspring from obesity by modifying the fetal epigenome[J]. Environ Health Perspect, 2006, 114(4):567-572.

(收稿日期:2011-12-10)

细菌分子生物学分型技术进展

陆水英 综述, 陈维贤 审校

(重庆医科大学附属第二医院检验科 400010)

关键词:电泳, 凝胶, 脉冲场; 聚合酶链反应; 分子生物学; 细菌分型技术**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2012.14.024**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2012)14-1716-03

耐药细菌尤其是多耐药、超级耐药细菌的出现,以及由细菌造成的医院感染和暴发流行的发生,不仅严重威胁着人类健康,也造成了医疗资源的浪费,是当今医学界面临的严重挑战。对细菌的正确分型是诊断医院感染、确定暴发流行并采取控制措施的关键。传统的细菌分型方法如细菌的形态特征、染色特征、血清型、噬菌体型等在微生物研究中起了重要作用,但上述方法存在分辨率不高、鉴定时间长等诸多局限。针对这些缺陷,建立有效、快速、灵敏、重复性好、分辨力高的分型方法十分必要。近年来,随着分子生物学技术的迅速发展,特别是聚合酶链反应(PCR)技术的发展,分子生物学技术应用于病原微生物分子分型成为临床诊断研究中的热点^[1]。

1 脉冲场凝胶电泳(PFGE)

PFGE技术是1984年由Schwartz和Cantor发展起来的,该技术采用多个电场交替地开启和关闭,使包埋在琼脂糖凝胶中的DNA分子的电泳方向随电场方向发生相应改变。在凝胶上出现按分子大小排列的条带,通过比较核酸限制性内切酶

图谱,进行细菌的分型。PFGE相较于其他方法有分辨率高、重复性好、结果稳定、易标准化的优点,被誉为细菌分子生物学分型技术的“金标准”^[2]。Palade等^[3]采用噬菌体分型技术和PFGE对流行病学上不具相关性的18株肠道沙门菌进行分型,噬菌体分型技术仅能将其中4株分为DT41、DT86、DT1三型,而以XbaI和BlnI设计染色体进行的PFGE可分出7个型别和8个型别。林一曼等^[4]也证实同种噬菌体分型的肠炎沙门菌用PFGE可以分出更多的型。Knabel等^[5]联合PFGE、MLST及MVLST三种方法证实了1988~2010年在加拿大境内流行的单核增生李斯特菌为同一克隆。随着该方法的应用增多,目前已发展出脉冲场梯度凝胶电泳、正向交变电场凝胶电泳、横向交变电场电泳、电场倒转凝胶电泳、转动凝胶电泳、转动电场电泳、双重脉冲场凝胶电泳、钳位均匀电场电泳等技术。随着该方法的不断优化,该技术已用于肺炎链球菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌、肠球菌及非结核杆菌等多种病原体的分子流行病学调查及分型研究。但该方法操作复杂、耗时长、费

用高、电泳带型易受人为等多种因素的影响,需要专门的设备和较高的技术水平,在临床实际应用中受到一定限制。

2 随机扩增多态性 DNA(RAPD)

RAPD 是 1990 年由 Welsh 和 Willams 建立的一种分子遗传标记技术。该技术以 PCR 为基础,以随机合成的多为 10 bp 大小引物对实验材料基因组进行 PCR 扩增,若引物结合部位的核苷酸序列发生了变化,或扩增范围内碱基出现碱基插入、缺失或重排,扩增产物经电泳分离和染色即可检测出来。

RAPD 所用引物为随机引物,不需要预先知道待扩增的基因组 DNA 序列,理论上讲适用所有物种的基因分析。实验操作简单、快速、费用较低、所需 DNA 样品量较少,样品纯度要求不高,自方法报道以来,越来越多地用于实验室常规分析。Kurlenda 等^[6]用该方法将某院内 234 株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌分为 10 个型别,并发现分型与科室及感染类型无明显相关。Mellifogo 等^[7]用 RAPD 和 PFGE 两种方法对从巴西小鸡分离的鸡败血霉形体进行分子鉴定,认为前者较简单、快速,更适用于分子流行病学研究。RAPD 退火温度较低,重复性较差,若要用此方法在不同范围内进行比较分析,有待进一步系统化和标准化。

3 重复序列聚合酶链反应(Rep-PCR)

重复 DNA 序列是存在于原核生物基因组中的 DNA 片段,主要包括有基因外重复回文序列(REP)、肠杆菌基因间重复一致序列(ERIC)、BOX、GTG5、插入序列(IS)、可变数目串联重复序列(VNTR)等^[8],这些基因序列遗传稳定,在种间仅有拷贝数和位置变化,是菌株分型的理想模板。Rep-PCR 即针对这些重复序列设计引物,对细菌基因组 DNA 进行 PCR 扩增,根据得到的电泳指纹图谱的差异,对细菌进行分型或同源性检测。Rep-PCR、ERIC-PCR 是其中的两个重要技术,现以 ERIC-PCR 为例进行简要介绍。

ERIC 长约 124~127 bp,主要存在于肠道细菌基因,真菌、噬菌体、真核生物中尚未发现该序列。其中心存在高度保守长约 40 bp 的核心序列,定位于基因组内可转录的非编码区域或者与转录有关的区域。ERIC 在基因组中的分布和拷贝具有种属特异性,利用 ERIC 核心的高度保守序列设计引物进行 PCR 扩增,根据扩增产物的电泳条带来区分细菌的株(型)。对含有 ERIC 的细菌,扩增产物大多为基因组中 ERIC 附近的 DNA 片段,一端含有 ERIC,另一端只是随机匹配;对不含 ERIC 的细菌,可能因扩增产物两端与 ERIC 引物相似性较高而被扩增出来,因而该法是一种特殊的随机扩增^[9]。

ERIC-PCR 操作简便,DNA 模板制备较简单,所用仪器设备简单,目前已经广泛应用于大肠埃希菌、沙门菌、李斯特菌、副溶血性弧菌等细菌菌株亲缘关系的确定。Ranjbar 等^[10]用 ERIC-PCR 对临床和环境取样本进行鉴定,确认引起 2008 年爱尔兰某地区霍乱暴发的霍乱弧菌为单一型别,并且经污染的水源传播。Ye 等^[11]曾采用药敏实验、RAPD 及 ERIC-PCR 对金黄色葡萄球菌进行分型比较,ERIC-PCR 分辨指数达 0.984,相对于 RAPD 的 0.949 和药敏实验的 0.826 略高。

4 扩增片段长度多态性(AFLP)

AFLP 技术是由荷兰科学家 Zabeau 和 Peter 所创建,最早用于植物研究,在其基础上进一步用于微生物及动物研究。AFLP 的基本原理是经限制性内切酶酶切的基因组 DNA 与具有同样黏性末端的寡核苷酸双链接头连接成 DNA 模板,用与接头互补的带有选择性碱基的核苷酸序列为引物进行 PCR 扩增,那些两端序列能与选择性碱基配对的限制性酶切片段被扩

增。不同的生物个体之间由于基因组的序列差异,在进行酶切时产生的大小和数量不同的 DNA 片段,经电泳分离后形成不同的电泳图谱,从而区分出检测物之间的亲缘性。

虽然实际工作中 AFLP 仍存在如 DNA 纯度要求高、所用测序仪较贵等问题,但其具有多态性丰富、不需要知道被测微生物的全基因组序列、不受环境影响、无复等位效应,且具有带纹丰富、用样量少、灵敏度高、快速高效等优点。AFLP 已在农业、林业、畜牧业、渔业、医学等生命科学领域中得到广泛应用。Chowdhury 等^[12]曾针对霍乱弧菌进行 AFLP、RFLP 及 PFGE 分型间的比较,发现联合 RFLP 及 AFLP 分辨率高于 PFGE。Ruiting 和 Reeves^[13]利用 AFLP 对 1961~1993 年的 45 株霍乱弧菌进行分析,发现引起 1991 年非洲的霍乱流行的菌株带型与 1989 年的菌株带型一致,证明引起两次霍乱流行的菌株为相同菌株。

5 低频限制性切割位点 PCR(IRS-PCR)

IRS-PCR 是上世纪 90 年代由 Mazurek 等建立的一种细菌基因分型方法,其原理是用两种不同的稀有限制性内切酶对细菌 DNA 进行酶切,然后选择相应的连接体与酶切后的黏性末端连接,再根据连接体设计引物对细菌染色体基因组稀有限制酶切位点和非稀有限制酶切位点之间的片段进行扩增,然后将扩增产物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,根据电泳图谱对细菌进行分型。

IRS-PCR 技术的重复性、准确度与分辨力均较好,方法操作简便、省时、灵活性强,适用于各种研究机构。Ren 等^[14]发现对于溶藻弧菌的分型,IRS-PCR 与 PFGE 重复性一致,但分辨率更高。姜德波等^[15]曾进行医院获得性肺炎鲍曼不动杆菌耐药谱型与 IRS-PCR 基因型关联性研究,发现两者有较高关联性。

6 多位点酶电泳(MLEE)

MLEE 是基于“一个基因一个酶”的观点发展起来的。生物中存在着多种看家基因酶,在生物进化中高度保守。氨基酸序列是由决定该酶的遗传位点上的等位基因直接决定的,通过检测酶蛋白的电泳多态性就可以反映基因位点的多态性。MLEE 技术当有足够的酶参与评价时有较高的分辨率,可提供要求用于群体遗传结构多态性分析的表型和等位基因频率信息,曾一度被称为群体微生物学“分类金标准”^[16]。想要获得较高的分辨率,至少要测评 10 个以上的看家基因酶,且有些氨基酸序列改变在电泳图谱上无法分辨。核苷酸序列中存在着大量的“沉默单位”,蛋白水平上的变化不能完全反映核酸水平的差异,而最大的不足是难以对各个实验室所得的结果进行比较,上诉诸多不足大大限制了该方法的使用。

7 多位点测序(MLST)

为了解决 MLEE 存在的诸多问题,1998 年 Maiden 等提出了 MLST 方法,MLST 基本步骤包括:选定目的基因组的数个看家基因位点,针对各基因位点设计相应 PCR 扩增引物,扩增各目的看家基因片段,扩增产物纯化后测定各位点片段的 DNA 序列,进而给每个等位基因都按发现的先后顺序分配一个等位基因序号,将该菌株所有管家基因的每个等位基因合并在一起组成一个等位基因谱,每个独特的基因型就对应一个序列号(ST)。O'Mahony 等^[17]用该方法对北爱尔兰众多牧场中的弯曲杆菌进行分析,否认了菌株间垂直传播的存在。邓小玲和管大伟^[18]用该方法揭示了广东省 1967~2007 年脑膜炎奈瑟菌的遗传进化关系,同时还首次在广东境内发现了高致病性 ST-11/ET-37 克隆系。有学者应用 MLST 对从 12 家医院

分离的 51 株白色念珠菌进行分析,认为 MLST 较 PFGE 有更高的分辨率^[19]。MLST 高度自动化,所得实验结果确切、清晰,可在各实验室内进行比较,通过互联网的数据分析方法统一和信息共享,从而使全球的分子流行病学数据标准化^[20]。但不足之处在于要预先知道待测微生物的基因组序列,才能推测哪些基因是该物种的看家基因,另外测序的费用和技术要求也相对较高。

目前细菌分型方法多种多样,除上述几种方法之外,还有其他一些用于细菌分型及流行病学调查的方法,如质粒图谱分型、扩增核糖体 DNA 限制性分析(ARDRA)、聚合酶链式反应-单链构象多态性(SSCP)、插入序列(IS)、SPA 基因分析技术(SPA-typing)等。生物芯片技术也逐渐应用病原微生物分型,目前用于病毒的分型检测较多,杨挺和浦洁^[21]采用基因芯片方法对 175 例尖锐湿疣组织标本进行检测,发现 HPV 阳性检出率为 95.4%,各 HPV 类型检出率最高依次为 HPV11、6、16。夏骏和邓菲^[22]用液相芯片技术特异性检测禽流感病毒 H5N1 标本,认为该方法用于 H5N1 亚型最低检出量为 10 pg。一个特定的分型方法可能有较好的分辨率、较好的重复性,但是可能要求的实验技术水平较高、结果的解释复杂、实验费用昂贵等,两种或多种技术的联合使用可能更快速地得到更准确的实验结果。Nath 等^[23]对 113 株肠道沙门菌行 RAPD 和 ERIC-PCR 分型,前者分辨力达 0.897 8,重复性 40%,后者分辨力 0.982 1,重复性 100%,联合两者分辨力可提高到 0.998 1。Vanhee 和 Symoens^[24]用多种方法对 52 株曲霉菌分型,MLEE、RAPD、MSP、SSDP、MLEE 分别分出 16、8、14、9、8 个型别,将上诉方法综合后可产生多达 25 个型别。每个实验室可根据自身条件选择合适的方法,为临床治疗及控制病原菌的传播与扩散提供快速、准确的应对措施。基于病原微生物的表型变化落后于基因的变化,因此传统的分型方法逐渐会被分子分型方法所取代,但是随着基因测序技术的快速发展,DNA 测序分型将有望替代目前已有的各种分型方法^[25]。

参考文献

- [1] Tan SC, Yiap BC. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present[J]. J Biomed Biotechnol, 2009, 57(4): 398.
- [2] Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(6): 1661-1669.
- [3] Palade AM, Usein CR, Ceciu S, et al. Pulsed-field gel electrophoresis associated to phage typing improves the discrimination of epidemiologically unrelated *Salmonella enterica* serovar typhimurium isolates[J]. Roum Arch Microbiol Immunol, 2009, 68(2): 100-105.
- [4] 林一曼, 兰全学, 石晓路, 等. 噬菌体分型技术和脉冲场凝胶电泳技术对肠炎沙门菌分型的比较[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(5): 998-999.
- [5] Knabel SJ, Reimer A, Verghese B, et al. Sequence typing confirms that a predominant *Listeria monocytogenes* clone caused human listeriosis cases and outbreaks in Canada from 1988-2010[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(5): 1748-1751.
- [6] Kurlenda J, Grinholc M, Jasek K, et al. Rapid typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a 7-year experience in a Polish hospital[J]. Med Sci Monit, 2007, 13(6): 13-18.
- [7] Mellifogo E, Buzinhani M, Bui MR, et al. Molecular characterization of MG isolates using RAPD and PFGE isolated from chickens in Brazil[J]. J Vet Med, 2006, B(53): 445-450.
- [8] Mohapatra BR, Mazumder A. Comparative efficacy of five different rep-PCR methods to discriminate *Escherichia coli* populations in aquatic environments[J]. Water Sci Technol, 2008, 58(3): 537-547.
- [9] 孙永艳, 申泉, 李艳琴. 肠杆菌基因间重复共有序列及 ERIC-PCR[J]. 生命的化学, 2004, 24(4): 2882-2891.
- [10] Ranjbar R, Rahbar M, Naqhoni A, et al. Cholera outbreak associated with drinking contaminated well water [J]. Arch Iran Med, 2011, 14(5): 339-340.
- [11] Ye Y, Jiang Q, Wu Q, et al. The characterization and comparison of *Staphylococcus aureus* by antibiotic susceptibility testing, enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction, and random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction[J]. Foodborne Pathog Dis, 2012, 9(2): 168-171.
- [12] Chowdhury N, Asakura M, Neogi SB. Development of simple and rapid PCR-fingerprinting methods for *Vibrio cholerae* on the basis of genetic diversity of the superintegron[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 109(1): 304-312.
- [13] Ruiting L, Reeves PR. Pandemic spread of cholera: genetic diversity and relationships within the seventh pandemic clone of *Vibrio cholerae* determined by amplified fragment length polymorphism [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(1): 172-181.
- [14] Ren C, Hu C, Luo P, et al. Genotyping of *Vibrio alginolyticus* isolates from Daya Bay by infrequent-restriction-site PCR and pulsed-field gel electrophoresis[J]. Molecular and Cellular Probes, 2008, 22(4): 267-271.
- [15] 姜德波, 栾林, 吕锐, 等. HAP 鲍曼不动杆菌耐药谱型与 IRS-PCR 基因型关联性研究[J]. 交通医学, 2009, 23(4): 304-304.
- [16] Boerlin P. Applications of multilocus enzyme electrophoresis in medical microbiology[J]. J Microbiol Methods, 1997, 28(3): 221-231.
- [17] O'Mahony E, Buckley JF, Boltion D, et al. Molecular epidemiology of *Campylobacter* isolates from poultry production units in southern Ireland[J]. PLoS One, 2011, 6(12): e28490.
- [18] 邓小玲, 管大伟. MLST 分型技术应用于脑膜炎奈瑟菌的分子流行病学研究[J]. 华南预防医学, 2008, 34(3): 10-14.
- [19] Chen KW, Chen YC. Multilocus sequence typing for analyses of clonality of *Candida albicans* strains in Taiwan[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(6): 2172-2178.
- [20] Enright MC, Spratt BG. Multilocus Multilocus sequence typing [J]. Trends in Microbiol, 1999, 7(12): 482-487.
- [21] 杨挺, 浦洁. 尖锐湿疣患者人乳头瘤病毒的检测和基因分型[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(1): 97-99.
- [22] 夏骏, 邓菲. 用液相芯片方法检测禽流感病毒 H5N1 亚型的研究[J]. 检验医学, 2009, 24(9): 682-687.
- [23] Nath G, Maurya P, Gulati AK. ERIC PCR and RAPD based fingerprinting of *Salmonella* Typhi strains isolated over a period of two decades[J]. Infect Genet Evol, 2010, 10(4): 530-536.
- [24] Vanhee LM, Symoens F. Comparison of multiple typing methods for *Aspergillus fumigatus*[J]. Clin Microbiol Infect, 2009, 15(7): 843-850.
- [25] 夏季, 邓少丽, 陈鸣. 分子生物学技术应用于病原微生物分子分型的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(11): 1278-1279.

(收稿日期: 2011-10-09)