US11 in cells infected with human cytomegalovirus[J]. J Virol Methods, 2001, 96(2): 133-147.

[23] Greijer AE, Adriaanse HM, Dekkers CA, et al. Multiplex real-time NASBA for monitoring expression dynamics of human cytomegalovirus encoded IE1 and pp67 RNA[J]. J Clin Virol, 2002, 24(1/2): 57-66.

[24] Küllerich-Pedersen K, Poulsen CR, Jain T, et al. Polymer based biosensor for rapid electrochemical detection of virus infection of

human cells[J]. Biosens Bioelectron, 2011, 28(1): 386-392.

[25] Chen Q, Bian Z, Chen M, et al. Real-time monitoring of the strand displacement amplification (SDA) of human cytomegalovirus by a new SDA-piezoelectric DNA sensor system[J]. Biosens Bioelectron, 2009, 24(12): 3412-3418.

(收稿日期: 2012-12-18)

• 综 述 •

16S rRNA 基因及 16S~23S rRNA 基因间区在微生物鉴定中的应用

王艳萍 综述, 夏 云[△] 审校

(重庆医科大学附属第一医院检验科, 重庆 400016)

关键词: RNA, 核糖体, 16S; 微生物学; 综述

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.08.038

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)08-0994-03

目前临床上引起感染的病原菌种类繁多, 抗菌药物的不规范使用导致细菌培养阳性率进一步降低^[1]。因此, 传统分类方法的不足随着新型微生物菌株的分离的增多而越来越明显, 亟需一种能快速准确鉴定出微生物种类的新技术以便及时指导抗菌药物的合理使用从而控制临床感染疾病的进展。文章综述了 16S rRNA 及 16S~23S rRNA 基因间区快速鉴定微生物的基本原理、方法、存在的问题及进一步解决方案等。原核生物的 rRNA 有 3 类: 5S rRNA、16S rRNA 和 23S rRNA, 其编码基因(rDNA)长度依次为 120、1 540 及 3 300 个核苷酸。它们位于同一操纵子序列中, 但被一些间隔区所分开, 从 5'~3'端依次是: 16S、间隔区、tRNA、间隔区、23S、间隔区和 5S rRNA^[2], 一个操纵子进行转录后处理成为成熟的 16S、23S 和 5S rRNA。rRNA 结构既具保守性又具高变性, 保守性反映生物物种的亲缘关系, 高变性则揭示生物物种的特征核酸序列, 是属种鉴定的分子基础^[3]。因此, 可以利用保守区设计通用引物扩增细菌的相应靶序列, 再利用可变区的差异鉴别菌种。其中以 16S rRNA 基因及 16S~23S rRNA 基因间区在细菌鉴定中的应用最为成熟及广泛。

1.1 16S rRNA 基因结构特点及序列分析的基本原理 16S rDNA 基因是细菌染色体上编码 16S rRNA 相对应的 DNA 序列, 其可变区与恒定区序列交错排列。恒定区在各种细菌中基本保持不变, 而可变区因不同细菌, 不同科、种、属而异, 且变异程度与细菌的系统发育密切相关。相比之下, 5S rRNA 虽易分析, 但核苷酸少, 没有足够的遗传信息用于分类研究; 而 23S rRNA 含有的核苷酸数几乎是 16S rRNA 的 2 倍, 分析较困难, 故以 16S rRNA 作为研究对象最为理想。16S rRNA 序列分析技术的基本原理就是利用恒定区序列设计通用引物从微生物样本中扩增出 16S rRNA 的基因片段, 通过克隆测序、探针杂交、酶切片段多态性分析或凝胶电泳等方法^[4] 获得 16S rRNA 序列信息, 再与 16S rRNA 基因数据库中的序列数据或其他数据进行同源对比及分析, 从而鉴定样本中可能存在的病原菌种类。

1.2 16S rRNA 基因序列分析的基本方法 目前绝大多数的研究都是先将 16S rRNA 反转录为 16S rDNA 再进行进一步的研究。也可以提取细菌总的 DNA 之后, 利用细菌通用引物对样品总 DNA 中的 16S rRNA 基因进行全长扩增, 再对 PCR

产物进行进一步研究。具体包括: (1) 将 PCR 产物克隆到质粒载体上进行测序, 与 16S rRNA 数据库中的序列进行比较。目前, 大量已知微生物的 DNA 都被测定并输入国际基因数据库, 成为对微生物鉴定分类非常有用的参照系统, 从而可以通过测定某种未知微生物 16S rDNA 序列, 与基因库中已有菌株的 16S rDNA 序列进行同源对比及分析, 即可得出待测菌的菌属类别, 从而达到对其进行快速、有效的鉴定分类的目的^[5]。Bosshard 等^[6] 用 16S rRNA 序列同源性大于等于 95% 至大于等于 99% 定义同属细菌, 用大于等于 99% 定义同种细菌。(2) 通过 16S rRNA 种属特异性的探针与 PCR 产物杂交以获得微生物组成信息, 或利用基因芯片将 DNA 片段制作成探针固定在支持物上, 与荧光标记的待检 DNA 片段杂交, 通过观察荧光信号的位置, 即可确定待检细菌的种类。杨祖钦等^[7] 根据引起化脓性脑膜炎的常见致病菌, 成功地建立了 DNA 芯片, 可对该疾病快速、准确的诊断, 明确病原菌。(3) 对 PCR 产物进行限制性片段长度多态性分析(RFLP), 即使用特异的限制性核酸内切酶作用在扩增的核糖体不同序列位置产生不同长度的片段, 经过凝胶电泳后将大小不同的片段分开, 所检测细菌 DNA 碱基组成不同, 电泳图谱亦不同。通过观察酶切电泳图谱、数值分析, 便可分析样品中微生物组成或不同微生物的种属关系。王蓉美等^[8] 利用 16S rRNA 对 14 种临床常见病原菌同时进行 PCR 扩增, 并根据扩增片段内变异区特点分别选择限制性内切酶 Hae III、Mn II、Alu I、Dde I 和 BstB I 酶切后电泳, 建立了各细菌菌株特有的酶切图谱, 达到了对临床常见病原菌种属进行快速鉴定的目的。(4) 对扩增产物进行变性梯度凝胶电泳、温度梯度凝胶电泳(TGGE)分析, 直接观察其多样性^[9-10]。Goldenberg 等^[11] 还在此基础上建立了变性高效液相色谱(DHPLC)技术, 并成功的分析了大便中菌群的组成, 监测抗菌药物治疗前后肠道菌群的动态变化。

2 16S~23S rRNA 基因间隔区

2.1 16S~23S rRNA 基因间区结构特点及序列分析的基本原理 16S~23S rRNA 区间 ISR 是位于 16S rRNA 基因与 23S rRNA 基因之间的区间序列, 不仅序列长度存在差异, 而且序列中间有 tRNA 的插入、缺失、突变等特征。经研究发现, 大多数革兰阳性菌含有 tRNA^{Aala}、tRNA^{Aile}, 少部分只含 tRNA^{Aglu} 基因。相比而言, 大部分革兰阴性菌不含 tRNA 基因,

少部分只含 tRNA^{Aala} 或 tRNA^{Aile}, 或者两者兼有。另外不同的细菌可能含有不同的 rRNA 操纵子数目。所有这些序列长度差异和 tRNA 基因数目的变异为微生物菌的鉴定分型提供了依据。研究证实 16S~23S rRNA 区间的进化率要高于 16S rRNA 基因 10 倍, 它比 16S rRNA 有更多的变异区。因此, 16S~23S rRNA 基因间区不但可以用于菌种间的鉴别, 还可以用来分辨 16S rRNA 基因不能鉴别的非常接近的菌种和种内菌株, 是 16S rRNA 基因分析很好的补充^[12-13]。金中淦等^[14]利用 16S rRNA、16S~23S rRNA 基因对主要血流感染病原菌进行检测比较后认为在细菌鉴定中, 16S~23S rRNA 可作为比 16S rRNA 基因更好的分子靶标, 可以在 24 h 内将病原菌的种类报告给临床医生。Zhu 等^[15]的研究表明 16S~23S rRNA 基因分析可以将 16S rRNA 序列同源率达 97% 的两株黏质沙雷菌区分开。根据 16S~23S rRNA 基因间区两端被高度保守的 rRNA 所包围的结构特点, 可利用其两端 16S rRNA 及 23S rRNA 保守区设计通用引物作上、下游引物, 特异性扩增特定细菌的 16S~23S rRNA 基因间隔区, 根据片段数目、长度、序列的多态性或测序来鉴别微生物。

2.2 16S~23S rRNA 基因间区序列分析的基本方法 通用引物的选取是 PCR 扩增 16S~23S rRNA 基因间区鉴定细菌的关键所在, 在 16S rRNA 上至少有 4 个保守区域, 区域 2 存在于真细菌、古细菌和真核生物中, 被认为是最保守序列。Gurtler 等^[16]对 18 个属 21 个种的 23S rRNA 的前 520 个碱基进行研究后发现 5 个保守区域, 其中区域 10 最保守, 最适合合作通用引物设计。因此从理论上而言, 16S rRNA 的区域 2 和 23S rRNA 的区域 10 是扩增 16S~23S rRNA 区间的理想引物设计部位。对于 PCR 扩增后的产物, Gonzalez 等^[17]总结的主要方法有依赖序列长度大小的电泳分离技术、特异序列杂交技术、实时定量 PCR 技术、RFLP、DNA 序列测定技术、焦磷酸测序技术、单链构象多态性分析技术 (SSCP)、质谱技术 (MS) 和高压液相色谱技术 (HPLC)。其中最精确的方法当数 DNA 测序技术, 但存在耗时长、费用高等缺点的限制, 无法应用于临床进行常规检测。现最常用方法仍是 PCR、RFLP、SSCP 等技术。在早期采用的方法是 PCR 扩增之后直接电泳, 比较电泳图谱差异进行细菌种属的鉴定; 如果 PCR 产物单一, 可以利用 RFLP 得到不同的酶切片段加以分析或单链构象多态性 (SSCP) 加以区分。而 16S~23S rRNA 基因间区与某些基因 (如 *mecA* 基因、*omp25* 和 *omp31* 基因等) 联合进行细菌鉴定, 与电泳技术相结合或与人工神经网络技术 (ANN) 相结合进行细菌鉴定等均可提高鉴定的灵敏度和特异度^[18]。

3 存在的问题及解决方案

3.1 在检测体系中, 核酸提取是关键的一步, 由于革兰阳性菌与革兰阴性菌细胞壁裂解能力的不同, 因此需选用适当的方法保证提取的样品中包含各种微生物的基因组 DNA, 对难裂解的革兰阳性菌可采用裂解效率高的变溶菌素进行比较实验从而提高所有细菌基因组 DNA 的提取率^[19]。

3.2 当采用 PCR 技术以通用引物对 16S rRNA 基因及 16S~23S rRNA 基因间区进行全长扩增时, 特别是对多种微生物混合样品进行扩增时, 可能出现嵌合产物, 影响结果的分析。Liguori 等^[20]对类鼻疽假单胞菌 16S~23S rRNA 基因间区研究后发现嵌合产物的产生率在不同地区之间也存在差异, 通过重复 PCR、对多个克隆进行序列比较可减少嵌合产物的产生。

3.3 所谓“通用引物”的通用性其实也是相对的, 文献^[21]报道有不能与常用的“通用引物”结合的纳古菌; 因此, 无论采取何种引物, 都不可避免地造成某些细菌的 16S rRNA 基因及

16S~23S rRNA 基因间区不能有效扩增或扩增效率低。通过设计兼并引物或检索多种菌的 16S rRNA、23S rRNA 基因序列, 比对照用作引物的保守区后筛选通用性好的引物可部分弥补这个问题。

3.4 16S rRNA 亦可发生基因组内变异, Wang 等^[22]观察到高温双胞菌的 16S rRNA 基因的差异性达到 6.4%。rRNA 基因在不同细菌内有 1~15 个拷贝不等, 联合单拷贝基因如 GroEL、RNA 聚合酶 β 亚单位 (*rpoB*)、DNA 回旋酶 β 亚单位 (*gyrB*) 及热休克蛋白 *dnaK* 等共同鉴定细菌可避免 16S rRNA 基因组内变异的问题^[23]。

3.5 依靠 16S~23S rRNA 区间鉴定细菌也存在一些局限性, 如某些细菌基因之间没有 ISR; 某些细菌 ISR 序列太长 (大于 1.5 kb), 影响 PCR 的有效扩增; 某些细菌的基因组中含有多个有差别的操纵子; 且 ISR 片段变化的随机性大, 片段长度与序列差异的相对性; 还有些细菌没有与通用引物结合的互补序列。但随着对 16S~23S rRNA 区间实验研究的进一步深入, 其序列数据库将逐渐丰富起来, 结构功能也将会得到全面利用。

4 小 结

综上所述, rRNA 鉴定微生物具有高灵敏度和特异性, 且所需检测时间短, 不依赖于微生物的分离培养, 所以可用于临床上快速、准确鉴定致病微生物, 并且可以检测出未知的新型微生物种类。16S rRNA 由于高度保守及变异性较小, 适合于属内种间的鉴别, 而 16S~23S rRNA 区间由于具有高度变异性及相对保守性, 更适合那些 16S rRNA 无法鉴别而关系非常密切的某些菌种和种内菌株的鉴别, 因此, 这两种检测方法各有所长, 后者是前者的很好补充。但是在实验室检测过程中仍存在某些问题, 但相信随着分子生物学技术的进一步发展以及对 16S rRNA 及 16S~23S rRNA 区间基础和临床研究的不断深入, 许多目前在实验操作中存在的问题一定会得到更好的解决。

参考文献

- [1] 汪峰, 刘彩林, 廖亚龙, 等. 应用 16S rRNA 宽范围聚合酶链反应快速检测临床无菌体液感染[J]. 检验医学, 2011, 26(12): 865-868.
- [2] Volker G, Vilma A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region[J]. J Microbiol, 1996, 142(1): 3.
- [3] 都立辉, 刘芳. 16S rRNA 基因在细菌菌种鉴定中的应用[J]. 乳业科学与技术, 2006(5): 207-209.
- [4] Paolucci M, Landini MP, Sambri V. Conventional and molecular techniques for the early diagnosis of bacteraemia [J]. Int J Antimicrob Agents, 2010, 36(Suppl 2): 6-16.
- [5] Janssen PH. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes[J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(3): 1719-1728.
- [6] Bosshard PP, Abels S, Zbinden R, et al. Ribosomal DNA sequencing for identification of aerobic gram-positive rods in the clinical laboratory (an 18-month evaluation)[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(9): 4134-4140.
- [7] 杨祖钦, 林振浪, 尚世强, 等. 16S rRNA 基因芯片杂交技术快速诊断新生儿化脓性脑膜炎临床研究[J]. 中国实用儿科杂志, 2009, 24(4): 277-280.
- [8] 王蓉美, 蔡庆, 高和, 等. 采用 PCR 与 RFLP 方法快速诊断细菌感染[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2009, 23(12): 1167-1169.
- [9] Mohania D, Nagpal R, Kumar M, et al. Molecular approaches for i-

- dentification and characterization of lactic acid bacteria[J]. J Dig Dis, 2008, 9(4): 190-198.
- [10] 张志明, 孙海英, 李建平. 16S rRNA 在医学微生物鉴定中的应用[J]. 中国医学检验杂志, 2008, 22(6): 170-171.
- [11] Goldenberg O, Herrmann S, Marjoram G, et al. Molecular monitoring of the intestinal flora by denaturing high performance liquid chromatography[J]. J Microbiol Methods, 2007, 68(1): 94-105.
- [12] Li W, Raoult D, Fournier PE. Bacterial strain typing in the genomic era[J]. FEMS Microbiol Rev, 2009, 33(5): 892-916.
- [13] Hoffmann M, Brown EW, Feng PC, et al. PCR-based method for targeting 16S-23S rRNA intergenic spacer regions among *Vibrio* species[J]. BMC Microbiology, 2010, 10(1): 90.
- [14] 金中淦, 葛平, 徐蓉, 等. 16S rRNA, 16S-23S rRNA 基因测序分析检测主要血流感染病原菌比较[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2012, 4(3): 181-185.
- [15] Zhu H, Zhou WY, Xu M, et al. Molecular characterization of *Serratia marcescens* strains by RFLP and sequencing of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer[J]. Lett Appl Microbiol, 2007, 45(2): 174-178.
- [16] Gurtler V, Stanisich VA. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region[J]. Microbiology, 1996, 142(Pt 1): 3-16.
- [17] Gonzalez N, Romero J, Espejo RT. Comprehensive detection of bacterial populations by PCR amplification of the 16S-23S rRNA spacer region[J]. J Microbiol Methods, 2003, 55(1): 91-97.
- [18] 刘春江, 府伟灵, 夏涵, 等. 16S-23S rRNA 基因间区在快速鉴定病原菌中的应用进展[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(7): 685-687.
- [19] 张守印, 郭长青, 李振军, 等. 16S rRNA 基因克隆文库用于菌群分析的效能研究和评价[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(16): 1549-1552.
- [20] Liguori AP, Warrington SD, Ginther JL, et al. Diversity of 16S-23S rDNA internal transcribed spacer (ITS) reveals phylogenetic relationships in *Burkholderia pseudomallei* and its near-neighbors[J]. PLoS One, 2011, 6(12): e29323.
- [21] Huber H, Hohn MJ, Stetter KO, et al. The phylum Nanoarchaeota: present knowledge and future perspectives of a unique form of life[J]. Microbiol Res, 2003, 154(3): 165-171.
- [22] Wang Y, Zhang Z, Ramanan N. The actinomycete *Thermobispora bispora* contains two distinct types of transcriptionally active 16S rRNA genes[J]. J Bacteriol, 1997, 179(10): 3270-3276.
- [23] Rajendran J, Gunasekaran P. Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond[J]. Microbiol Res, 2011, 166(2): 99-110.

(收稿日期: 2012-12-18)

• 综 述 •

成骨细胞在造血微环境中的作用

郝润英¹, 张书霞^{1△}, 贺冠强², 王菊美²

(河北省邯郸市中心医院: 1. 检验科; 2. 血液科, 河北邯郸 056001)

关键词: 造血干细胞; 造血微环境; 成骨细胞

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.08.039

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)08-0996-03

造血干细胞(HSC)具有自我更新能力并且能够发育成各系血细胞。这一过程只有在特定的骨髓微环境中才能完成,早在1978年Sehofield^[1]就提出龕的概念来定义骨髓中适宜HSC生存的特定微环境结构。该假说认为HSC定位于骨髓特定的三维环境内,以维持其自我更新的特点,而一旦离开龕, HSC在基质细胞和各种细胞因子作用下进入增殖和分化状态,分化发育为各种成熟血细胞。随着研究的深入,发现这个龕可以进一步分为“骨龕”和“血管龕”^[2-8],两者在调节HSC方面是有区别的,本文着重讨论作为“骨龕”中重要成分的成骨细胞在造血调控中的重要作用。

研究表明成骨细胞是造血龕中的主体基质细胞,之所以是造血微环境中的重要细胞成分,是因为其能分泌多种造血生长因子,成骨细胞可以分泌IL-1、IL-6、GM-CSF、G-CSF、M-CSF等支持造血的因子,同时成骨细胞也分泌抑制造血细胞增殖的因子,如巨噬细胞抑制蛋白1(MIP-1a), MIP-1a可以抑制造血干、祖细胞的分化以保证有充足的造血干、祖细胞储备^[8]。成骨细胞对造血干、祖细胞调控的前提条件是成骨细胞必须与造血细胞直接接触,当成骨细胞和HSC共培养后,后者也同样能调控成骨细胞,使之分泌许多因子。成骨细胞和HSC之间存在着密切的关系,两者之间可以相互影响。

在HSC龕里面,一方面成骨细胞通过一些黏附因子将

HSC锚定在龕里面,另一方面成骨细胞通过分泌一些细胞因子和基质成分来调控HSC。目前已知许多分子通路都参与了龕的调节,对成骨细胞调控造血发挥很重要的作用。如Notch/Jagged, Ang-1/Tie2, Wnt/ β -catenin, Ca²⁺/钙离子敏感受体(CaR),骨形成蛋白(BMPs),骨桥蛋白(OPN)/ β 1整合素以及SDF-1/CXCR4等。下面对这些调节通路分述如下。

1 Notch/Jagged 通路

Notch基因在无脊椎动物和脊椎动物的多个物种中均有表达,最早在果蝇中发现并被克隆,其编码一相对分子质量约 300×10^3 的单链跨膜蛋白。Notch蛋白是一个结构高度保守的细胞表面受体,又是基因转录的调节因子。Notch蛋白主要包括胞外区、跨膜区和胞内区,它的胞外区由多个表皮生长因子(EGF)样重复序列和3个富含半胱氨酸Notch/Lin-12重复序列组成。它的胞内部分相对较短,包括结合区(RAM),6个CDC10/ankyrin锚蛋白(ANK)重复序列,2个核定位信号(NLS),1个转录激活区(TAD)和1个PEST序列。Notch配体在果蝇中称Delta和Serrate,在线虫中称Lag-2,而在脊椎动物中Serrate的同源分子称Jagged1、Jagged2。Notch配体都是长度很短的跨膜蛋白,胞膜外区含数量不等的EGF样重复序列。N端含有一个富含半胱氨酸的DSL基序,在与Notch的相互作用中起关键作用。Coffman等^[9]发现HSC表面表达