

## 聚合酶链反应-酶切分型鉴定广州地区环境水源军团菌

赵利伟, 胡朝晖, 宣瑞红, 刘洋敏, 朱庆义\*, 王娟, 詹晓勇

(广州金域医学检验中心, 广州 510330)

**摘要:**【目的】探讨聚合酶链反应-酶切分型在快速鉴定环境水源军团菌方面的应用价值,并了解广州地区环境水源军团菌的分布状况。【方法】对广州地区采集的44份环境水样,作军团菌分离培养,再对分离菌株进行16S rDNA PCR-酶切分型鉴定、16S rDNA 基因测序和 mip 基因测序鉴定。【结果】在广州地区环境水源分离的112株军团菌,经聚合酶链反应-酶切分型鉴定、16S rDNA 基因测序和 mip 基因测序鉴定,检出嗜肺军团菌66株,非嗜肺军团菌46株,其中菲氏军团菌20株,戈氏军团菌17株,橡树岭军团菌7株,长滩军团菌2株。【结论】聚合酶链反应-酶切分型检测环境水源军团菌是一种简便、快速、特异的鉴定方法;在广州地区环境水源中普遍存在军团菌,主要是嗜肺军团菌,其次是菲氏军团菌,戈氏军团菌,橡树岭军团菌和长滩军团菌。

**关键词:** 军团菌;环境水源;聚合酶链反应-酶切分型;基因测序

**中图分类号:** Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 11-1532-05

军团菌是一种兼性胞内寄生菌,在环境水源中分布甚广,是引起人类军团菌病的重要病原体。目前已确认军团菌有50多个种,70多个血清型,接近20个种有临床分离报道,其中嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)与人类的疾病关系最为密切<sup>[1-2]</sup>。自军团菌病暴发以来,已有许多成熟的方法应用于军团菌检测鉴定,但传统的军团菌分离培养法难度大、耗时长;血清学检测与其他细菌之间容易存在交叉反应;生化表型鉴定分辨率低,重复性差<sup>[3-5]</sup>;其它方法如抗原检测<sup>[6]</sup>、脂肪酸成分分析<sup>[5,7]</sup>及分子生物学检测<sup>[8]</sup>等也均存在不足。因此,极需一种简单快速的环境水源军团菌检测鉴定方法。

16S rRNA 为所有细菌共有,是细菌进化过程中最为保守的基因<sup>[9]</sup>。基于16S rRNA 基因分析的分子技术的发展,为复杂环境中军团菌的研究提供了一种新颖、有效的手段<sup>[10]</sup>。大量研究证明<sup>[11-15]</sup>,利

用16S rRNA 基因检测军团菌属和嗜肺军团菌种具有较高的敏感性和特异性。近年来,聚合酶链反应-酶切分型(PCR-酶切分型)方法已广泛应用于微生物的分子分型检测<sup>[16-18]</sup>。该技术通过对微生物特异性基因片段进行PCR-酶切检测,对仪器设备要求简单,并同时具备PCR的高灵敏度等优点,能够为微生物的检测鉴定提供更为客观、可靠及高效的结果。我们根据生物信息学分析研究,已成功建立了PCR-酶切分型鉴定军团菌的方法。本研究通过该方法对在广州地区环境水源中分离的菌株进行分型鉴定,并用16S rDNA 基因测序和 mip 基因测序鉴定法对酶切分型结果进行考证,报道如下。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 水样采集:**2008年11月-2009年1月,在广州市珠江琶洲段、黄埔村珠江支流和池塘、黄埔古

**基金项目:** 国家标准化委员会资助项目(20081021-T-361);“十一五”国家科技重大专项课题(2008ZX10004-005)

\* 通信作者。Tel: +86-20-22283222-616; Fax: +86-20-22283223; E-mail: zqy@kingmed.com.cn

**作者简介:** 赵利伟(1983-),男,山西省原平人,硕士研究生,主要从事分子诊断学研究。E-mail: lwlb@163.com

**收稿日期:** 2010-04-10; **修回日期:** 2010-08-12

港、白云山水库、天河公园和华南植物园内湖泊,共采集水样 44 份,每份 500 mL,置灭菌塑料采样瓶内,记录采样当时水温,pH 值,立即送检。

**1.1.2 标准菌株:**嗜肺军团菌(*L. pneumophila*) ATCC 33152、菲氏军团菌(*L. feeleii*) ATCC 35072、戈氏军团菌(*L. gormanii*) ATCC 33342、橡树岭军团菌(*L. oakridgensis*) ATCC 33761 和长滩军团菌(*L. longbeachae*) ATCC 33462 均购自美国模式培养物保藏中心。

**1.1.3 主要试剂和仪器:**TIANamp 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、2 × PCR Master Mix 酶体系、DNA Marke 2SD 012 均购自北京天根生化科技有限公司;HpyCH4 III 酶购自纽英伦生物技术(北京)有限公司;基因扩增仪 PTC-200 购自美国 MJ Research 公司;电泳仪、凝胶成像仪购自 BIO-RAD 公司。

## 1.2 水样处理及细菌培养

取 200 mL 水样摇匀,用微孔滤器减压抽滤至干,加入 5.0 mL 无菌蒸馏水,用回形针刮下滤膜上的细菌,收集此浓缩菌液至无菌试管中。取 1.0 mL 该浓缩菌液进行酸处理,然后分成两等份,一份不做任何处理,另一份进行热处理,分别取 50 μL 均匀涂布法接种到我室改良 BCYE $\alpha$ -DGVPC 平板<sup>[5]</sup>,倒置平板于 5% CO<sub>2</sub> 孵箱,湿度 80%,36℃ ± 1℃ 孵育。观察菌落生长情况,挑取可疑菌落分别转接到 BCYE $\alpha$  和血琼脂平板上,在 BCYE $\alpha$  平板上生长,血琼脂平板上不生长,可初步判定为军团菌<sup>[3,19]</sup>。

## 1.3 PCR-酶切分型鉴定

**1.3.1 基因组 DNA 提取:**挑取生长 24 - 36 h 的次代纯培养菌落,按照 TIANamp 细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书操作。

**1.3.2 PCR 扩增:**对分离的所有可疑菌株进行 386 bp PCR 扩增,扩增体系、PCR 程序、凝胶电泳等按参考文献[4,20]报道进行。

**1.3.3 酶切分型鉴定:**酶切分型鉴定主要包括:226 bp PCR 扩增、扩增产物纯化、HpyCH4 III 酶切、凝胶电泳、电泳图谱分析等 5 个步骤。具体操作按参考文献[20]进行。

## 1.4 基因测序鉴定

根据参考文献[5,21]的方法,对分离的所有可疑军团菌菌株进行 16S rDNA 386 bp 基因测序和 mip 基因测序鉴定。所测序列经 NCBI Blast 搜索引擎在 GenBank 军团菌核酸序列数据库中进行比对,获得各菌株鉴定结果。

## 2 结果和分析

### 2.1 PCR-酶切分型鉴定

根据军团菌在 BCYE $\alpha$  平板上生长,血琼脂平板上不生长的特性,共分离出 115 株可疑军团菌。经 16S rDNA 386 bp PCR 扩增后,通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳观察有 112 株显示军团菌阳性(图 1)。酶切分型鉴定结果显示:66 株切成约 180 bp 和 46 bp 2 条带,20 株切成约 153 bp 和 73 bp 2 条带,26 株仍为 226 bp 条带,见图 2。说明分离的 112 株军团菌中有 66 株为嗜肺军团菌。

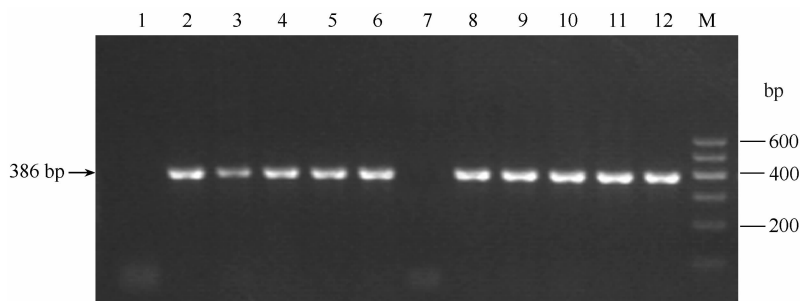


图 1 PCR 扩增军团菌的 16S rDNA 386-bp 基因片段电泳图

Fig.1 PCR amplification for 386-bp fragments of 16S rDNA genes from *legionella* species. Agarose gel electrophoresis of 1.5%. M, 100-bp DNA ladder; 1, 2, 3, 4, 5 and 6 indicate km239, km221, km244, km223, km222 and km228 of the environmental isolates, respectively; 7, Negative control; 8, *L. gormanii*(ATCC 33342); 9, *L. oakridgensis*(ATCC 33761); 10, *L. longbeachae*(ATCC 33462); 11, *L. pneumophila*(ATCC 33152); 12, *L. feeleii*(ATCC 35072).

### 2.2 酶切分型与基因测序鉴定结果比较

16S rDNA 386 bp 基因序列和 mip 基因序列经 NCBI Blast 搜索引擎在 GenBank 军团菌核酸序列数据库中进行比对,结果显示:在 112 株军团菌中有

66 株嗜肺军团菌,20 株菲氏军团菌,17 株戈氏军团菌,7 株橡树岭军团菌,2 株长滩军团菌。比较三种方法对嗜肺军团菌检出率完全一致(表 1),说明酶切分型鉴定嗜肺军团菌具有高度的和特异性。

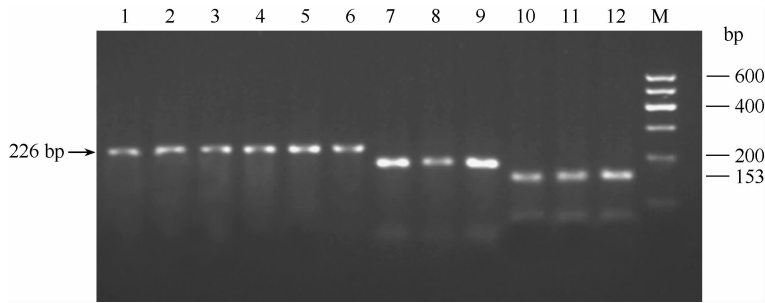


图2 军团菌分离株酶切分型鉴定结果

Fig. 2 *HpyCH4 III* enzymatic digestion analysis of the 226-bp fragments from isolates. Agarose gel electrophoresis of 2%. M, 100-bp DNA ladder; 1, 2, 3, 7, 8, 10 and 11 indicate km221, km244, km223, km222, km225, km228 and km229 of the environmental isolates, respectively; 4, *L. gormanii* (ATCC 33342); 5, *L. oakridgensis* (ATCC 33761); 6, *L. longbeachae* (ATCC 33462); 9, *L. pneumophila* (ATCC 33152); 12, *L. feeleii* (ATCC 35072).

表1 112株军团菌环境水源分离株酶切分型与基因测序鉴定结果比较

Table 1 Comparison of identification results of 112 isolated *Legionella* from environmental water for PCR with enzymatic digestion and sequencing analysis method

Bacterial strains		Enzymatic digestion	16S rDNA gene	Mip gene
Samples No.	Number	results /bp	Sequencing	Sequencing
<i>L. pneumophila</i> (ATCC 33152)	1	<i>L. pneumophila</i> (180,46)	<i>L. pneumophila</i>	<i>L. pneumophila</i>
Km-222,225,226,227,230,231,233,235,236,237,238,240,241,243,245,246,247,248,251,254,255,256,257,258,260,261,262,263,264,266,267,268,270,272,273,274,275,275,280,282,284,285,286,287,294,295,299,302,311,312,317,318,320,321,322,325,326,327,328,329,330,331,332,333,334,335	66	<i>L. pneumophila</i> (180,46)	<i>L. pneumophila</i>	<i>L. pneumophila</i>
<i>L. feeleii</i> (ATCC 35072)	1	Non- <i>L. pneumophila</i> (153,73)	<i>L. feeleii</i>	<i>L. feeleii</i>
Km-228,229,234,271,279,283,289,292,293,290,297,300,301,305,306,307,308,309,310,313	20	Non- <i>L. pneumophila</i> (153,73)	<i>L. feeleii</i>	<i>L. feeleii</i>
<i>L. gormanii</i> (ATCC 33342)	1	Non- <i>L. pneumophila</i> (226)	<i>L. gormanii</i>	<i>L. gormanii</i>
<i>L. oakridgensis</i> (ATCC 33761)	1	Non- <i>L. pneumophila</i> (226)	<i>L. oakridgensis</i>	<i>L. oakridgensis</i>
<i>L. longbeachae</i> (ATCC 33462)	1	Non- <i>L. pneumophila</i> (226)	<i>L. longbeachae</i>	<i>L. longbeachae</i>
Km-221,232,259,265,277,278,281,288,291,296,298,303,304,314,316,319,324	17	Non- <i>L. pneumophila</i> (226)	<i>L. gormanii</i>	<i>L. gormanii</i>
Km-244,249,250,253,269,315,323	7		<i>L. oakridgensis</i>	<i>L. oakridgensis</i>
Km-223,224	2		<i>L. longbeachae</i>	<i>L. longbeachae</i>

### 2.3 广州地区环境水源军团菌分布情况

从广州地区珠江水系、公园湖泊和村中池塘采集的44份水样中有26份水样分离出军团菌,阳性率为59.1%。分离的112株军团菌再经酶切分型鉴定、16S rDNA 386 bp基因测序和mip基因测序鉴定,检出嗜肺军团菌66株;菲氏军团菌20株;戈氏

军团菌17株;橡树岭军团菌7株;长滩军团菌2株,见表2。说明军团菌普遍存在于广州地区环境水源中,以嗜肺军团菌最多(58.9%)。调查结果还表明,在广州地区同一环境水源中存在多种军团菌,且以珠江主流的军团菌最为广泛。

表2 广州地区环境水源军团菌分布情况

Table 2 The distribution of *Legionella* from environmental water system in guangzhou

Sites	Number of samples n	Number of positive n (%)	The type of <i>Legionella</i> (n)					Totals n
			<i>L. pneumophila</i>	<i>L. gormanii</i>	<i>L. longbeachae</i>	<i>L. feeleii</i>	<i>L. oakridgensis</i>	
Mainstream of Zhujiang River	5	5 (100)	26	6	2	6	4	44
Tributaries of Zhujiang River	4	3 (75.0)	3	3	0	0	0	6
Old Port of Huangpu	4	4 (100)	11	2	0	5	1	19
Reservoir of Huangpu	4	2 (50.0)	5	0	0	2	0	7
Park of Tianhe	8	5 (62.5)	2	0	0	7	0	9
Water of Baiyun mountain	9	2 (22.2)	8	6	0	0	2	16
Botanical garden of south China	10	5 (50.0)	11	0	0	0	0	11
Totals n	44	26 (59.1)	66	17	2	20	7	112

### 3 结论和讨论

军团菌普遍存在于天然淡水和人工水域环境中,是引起军团菌病的重要病原体。嗜肺军团菌是其中最常见的一种致病菌<sup>[3,22]</sup>。关于嗜肺军团菌的病原学诊断,目前采用的方法很多,但分离培养法、免疫学方法、PCR 检测均有各种局限性。而基于 16S rRNA 基因测序和 mip 基因测序虽然能直接鉴定军团菌种,但均存在操作复杂、耗时长、花费高等缺点<sup>[15,23]</sup>。因此,一种简单、快速、有效的环境水源军团菌检测方法,对军团菌病的预防和控制具有十分重要的意义。军团菌 16S rRNA 基因片段在军团菌属中具有高度的保守性,本实验室通过对军团菌 16S rDNA 上特定的基因片段进行酶切,实现了对环境水源军团菌的快速鉴定。该方法不需先进的仪器设备即可将军团菌进行分型,对环境水样、中央空调冷却塔水及临床样品中嗜肺军团菌的快速检测具有很高的实用性,对军团菌流行病学调查和临床快速诊断具有重要的意义。

军团菌种可以使用 16S rRNA 基因测序和 mip 基因测序直接鉴定<sup>[15,21,23]</sup>。本研究对环境水样中分离的 112 株军团菌,进行 PCR-酶切分型鉴定,再用 16S rDNA 基因测序和 mip 基因测序鉴定法对酶切分型结果进行考证,结果显示三种方法对嗜肺军团菌检出率完全一致,说明聚合酶链反应-酶切分型检测环境水源军团菌是一种简便、快速、特异的鉴定方法。

军团菌作为引发人类肺炎的重要病原体,主要经呼吸道传染。随着空调系统、供水系统的广泛应用,军团菌病的危险性越来越大,但在目前,军团菌病尚缺乏有效的疫苗,故只能从源头入手,加强对环境水源的监测管理。关于广州地区环境水源军团菌的研究已有很多报道,根据朱庆义(2006)和胡朝晖(2008)研究,广东地区环境水源中普遍存在嗜肺军团菌,且嗜肺军团菌的基因型十分丰富,是引起非典型肺炎的重要病源之一<sup>[4,22]</sup>。另外,据屈平华(2008)报道<sup>[5]</sup>,广州地区环境水源军团菌阳性率约为 61.36%,其中包括嗜肺军团菌、橡树岭军团菌、菲氏军团菌、长滩军团菌及圣海伦军团菌(*L. sainthelensi*),且以嗜肺军团菌居多,与本研究结果基本一致。

### 参考文献

[1] Golovlev EL. General and molecular ecology of *Legionella*. *Mikrobiologiia*, 2002, 69(1):5-12.

- [2] Fields BS, Benson RF, Besser RE. *Legionella* and Legionnaires disease: 25 years of investigation. *Clinical Microbiology Reviews*, 2002, 15(3): 506-526.
- [3] Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. 临床微生物学手册 (*Manual of Clinical Microbiology*), 徐建国, 梁国栋, 刑来君, 范昕建, 冯正, 陈建平, 译. 第一版. 北京:科学出版社, 2005: 814-827.
- [4] 朱庆义, 胡朝晖, 梁耀铭, 潘文刚, 刘元力, 梁卫桥, 王军. 广东地区环境水源和临床标本嗜肺军团菌培养与基因快速鉴定. *中华医院感染学杂志 (Chinese Journal of Epidemiology)*, 2006, 16(1): 19-22.
- [5] 屈平华, 尹一兵, 胡朝晖, 朱庆义, 宋亚军, 杨瑞馥, 刘元力, 李朴. 环境军团菌的分离培养及鉴定方法探讨. *中华预防医学杂志 (Chinese Journal of Preventive Medicine)*, 2008, 42(9): 653-657.
- [6] 张丽霞, 刘凡. 军团菌检测方法概述. *国外医学卫生学分册 (Foreign Medical Science (Section Hygiene))*, 2008, 35(6): 377-381.
- [7] Fang CL, Hu ZH, Zhu QY, Song YJ, Tan YF, Yang RF. Identification of *legionella* species by the composition of cellular fatty acids. *Frontiers of Medicine in China*, 2010, 4(2): 208-215.
- [8] 刘元力, 胡朝晖, 朱庆义. 军团菌分子分型及其流行病学调查中应用. *微生物学杂志 (Journal of Microbiology)*, 2007, 27(4): 83-86.
- [9] 刘文强, 贾玉萍, 赵宏坤. 16S rRNA 在细菌分类鉴定研究中的应用. *动物医学进展 (Progress in Veterinary Medicine)*, 2006, 27(11): 15-18.
- [10] 张彤, 方汉平. 微生物分子生态技术:16S rRNA/DNA 方法. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2003, 32(2): 97-100.
- [11] Cloud JL, Carroll KC, Pixton P, Erali M, Hillyard DR. Detection of *Legionella* species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38(5): 1709-1712.
- [12] Jonas D, Rosenbaum A, Weyrich S, Bhakdi S. Enzyme-linked immunoassay for detection of PCR-amplified DNA of legionellae in bronchoalveolar fluid. *Journal of Clinical Microbiology*, 1995, 33(5): 1247-1252.
- [13] Miyamoto H, Yamamoto H, Arima K, Fujii J, Maruta K, Izu K, Shiomori T, Yoshida S. Development of a new seminested PCR method for detection of *legionella* species and its application to surveillance of legionella in hospital cooling tower water. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(7): 2489-2494.
- [14] Wilson DA, Reischl U, Hall GS, Procop GW. Use of Partial 16S rRNA Gene Sequencing for Identification of *Legionella pneumophila* and Non-pneumophila *Legionella* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, January 2007, 45

- (1): 257-258.
- [15] Zhan XY, Hu ZH, Zhu QY. Research advances of *Legionella* and legionnaires' disease. *Frontiers of Medicine in China*, 2010, 4(2): 166-176.
- [16] 郝旭光, 孙寓姣, 王红旗. PCR-酶切技术在石油烃降解菌筛选鉴定中的应用. *环境工程学报* (*Chinese Journal of Environmental Engineering*), 2010, 4(2): 449-452.
- [17] Scherer S, Stevens D A. Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 1987, 25(4): 675-679.
- [18] 孙南雄, 范晓峰, 杜绍才, 张永祥. 丙型肝炎病毒 Simmonds 基因分型酶切分型研究. *江苏医药* (*Jiangsu Medical Journal*), 1999, 25(7): 481-483.
- [19] Garrity GM. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Springer-Verlag, 2001.
- [20] Zhan XY, Li LQ, Hu ZH, Zhu QY. Two-Step Scheme for Rapid Identification and Differentiation of *Legionella pneumophila* and Non-*Legionella pneumophila* Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010, 48(2): 433-439.
- [21] Ratcliff RM, Lanser JA, Manning PA, Heuzenroeder MW. Sequence-Based Classification Scheme for the Genus *Legionella* Targeting the mip Gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998, 36(6): 1560-1567.
- [22] 胡朝晖, 屈平华, 刘元力, 朱庆义. 广东地区嗜肺军团菌的扩增片段长度多态性分析. *微生物学报* (*Acta Microbiologica Sinica*), 2008, 48(12): 1659-1665.
- [23] Vander ZA, Verbakel H, De JC, Pot R, Bergmans A, Peeters M, Schneeberger P, Schellekens J. Novel PCR-probe assay for detection of and discrimination between *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40(3): 1124-1125.

## Identification of *Legionella* isolates from environmental water by using PCR combined with enzymatic digestion analysis

Liwei Zhao, Chaohui Hu, Ruihong Xuan, Yangmin Liu, Qingyi Zhu\*, Juan Wang, Xiaoyong Zhan

(Guangzhou Kingmed Center for Clinical Laboratory, Guangzhou 510330, China)

**Abstract:** [Objective] To evaluate polymerase chain reaction (PCR) combined with enzymatic digestion for identification of *Legionella*, and investigate status of *Legionella* in environmental water systems in Guangzhou. [Methods] Forty-four water samples collected in Guangzhou were cultivated for *Legionella*, and *Legionella* isolates were identified by PCR-enzymatic digestion, 16S rDNA and mip gene sequencing analysis. [Results] Sixty-six strains of *Legionella pneumophila* and 46 Non-*L. pneumophila* were identified by PCR-enzymatic digestion and sequencing analysis. Forty-six strains of Non-*L. pneumophila* included 20 strains of *L. feelei*, 17 *L. gormanii*, 7 *L. oakridgensis* and 2 *L. longbeachae*. [Conclusion] PCR combined with enzymatic digestion is a simple, rapid, and specific method for the identification of *Legionella*. *L. pneumophila* was distributed widely, followed by *L. feelei*, *L. gormanii*, *L. oakridgensis* and *L. longbeachae*, in environmental water in Guangzhou area.

**Keywords:** *Legionella*; Environmental water; PCR combined with enzymatic digestion; Gene sequencing

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Standardization Committee (20081021-T-361) and by the Ministry of Science and Technology of the P. R. China (2008ZX10004-006)

\* Corresponding author. Tel: +86-20-22283222-616; Fax: +86-20-22283223; E-mail: zqy@kingmed.com.cn

Received: 10 April 2010/Revised: 12 August 2010