

# 16S rRNA 序列分析法对城市居民区德国小蠊携带致病菌检测研究

唐振强<sup>1,2</sup>, 赵奇<sup>2</sup>, 刘吉起<sup>2</sup>, 郭祥树<sup>2</sup>

1 郑州大学公共卫生学院, 河南 郑州 450003; 2 河南省疾病预防控制中心消毒与病媒生物防制科, 河南 郑州 450016

**摘要:** **目的** 基于 16S rRNA 序列分析法检测河南省城市居民区中德国小蠊携带致病菌情况。**方法** 设计通用的 16S rRNA 基因引物, 对从试虫体表或体内分离出的单菌落进行 PCR 扩增并测序, 再利用 BLAST 序列比对检索系统寻找同源性最高的序列作为鉴定结果。**结果** 分离出福氏志贺菌和伤寒沙门菌 2 种病原菌, 阴沟肠杆菌、柯氏柠檬酸杆菌、大肠埃希菌、沙雷菌和肺炎克雷伯菌 5 种条件致病菌, 以及嗜碱芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌 2 种工程菌。**结论** 河南省城市居民区中德国小蠊携带致病菌的情况不容忽视; 16S rRNA 序列分析法可以作为微生物快速鉴定方法为今后的病媒生物防制工作提供帮助。

**关键词:** 德国小蠊; 致病菌; 16S rRNA

**中图分类号:** R384.9; R378.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-4692(2013)01-0064-03

## Identification of pathogenic bacteria carried by *Blattella germanica* in urban communities by 16S rRNA sequence analysis

TANG Zhen-qiang<sup>1,2</sup>, ZHAO Qi<sup>2</sup>, LIU Ji-qi<sup>2</sup>, GUO Xiang-shu<sup>2</sup>

1 Zhengzhou University, School of Public Health, Zhengzhou 450003, Henan Province, China; 2 Henan Center for Disease Control and Prevention, Zhengzhou 450016, Henan Province, China

**Abstract: Objective** To investigate the pathogenic bacteria carried by *Blattella germanica* in the urban communities of Henan province, China by 16S rRNA sequence analysis. **Methods** A universal primer for 16S rRNA was designed, and the single colonies isolated from the body surfaces or inside the bodies of *B. germanica* samples were treated by PCR amplification with the primer. The amplification products were sequenced and then identified using Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), and the sequences that shared the highest similarity with the amplification products were selected. **Results** The identified pathogens included 2 pathogenic bacteria, *Shigella flexneri* and *Salmonella enteria subsp. enterica*, 5 conditionally pathogenic bacteria, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter koseri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Serratia* sp., and 2 engineering bacteria, *Bacillus halodurans* and *B. amyloliquefaciens*. **Conclusion** In the urban communities of Henan province, *B. germanica* is a pathogen vector, which cannot be neglected; 16S rRNA sequence analysis can be used as a method for rapid identification of pathogens, which is helpful to vector risk assessment.

**Key words:** *Blattella germanica*; Pathogen; 16S rRNA

河南省主要蜚蠊有德国小蠊(*Blattella germanica*)和美洲大蠊(*Periplaneta americana*), 其中又以德国小蠊为绝对优势种, 占全省蜚蠊数的 90% 以上。蜚蠊能够携带多种致病菌, 这些细菌可引起肺炎、脓胸、脑膜炎、心内膜炎以及败血症等, 有的还具有致死性<sup>[1]</sup>。2010 年河南省公共场所病媒生物侵害调查显示德国小蠊的侵害率为 11.97%, 超过全国爱卫会办公室制定的“关于灭鼠、蚊、蝇、蟑螂标准”<sup>[2]</sup>, 然而迄今未见文献报道河南省德国小蠊携带病原菌种类情况。

16S rRNA 基因(rDNA)是目前应用最广的分子生物学检测的靶基因之一, 广泛存在于细菌等原核生物的基因组当中。细菌 16S rRNA 基因序列由保守区

和可变区组成, 两者互相交错排列。保守区序列为所有细菌所共有, 细菌间无差别; 可变区序列则具有属或种的特异性, 且变异程度与细菌的系统发育树密切相关<sup>[3]</sup>。利用 16S rRNA 基因特性进行分子诊断成为判断微生物种类的重要策略, 本研究基于这一策略, 利用 PCR 技术对河南省德国小蠊携带病原菌种类进行了初步调查。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 德国小蠊, 统一使用 500 ml 广口瓶法捕获。瓶内放置诱饵, 晚放晨收, 根据东、西、南、北、中不同方位放置, 采自 2 个省辖市(周口和濮阳市)的城市居民区。培养基, GN 增菌液、7.5% NaCl 肉汤、胆盐乳糖增菌液、LB 液体培养基、SS 分离琼脂、甘露醇高盐琼

**作者简介:** 唐振强(1978-), 男, 硕士, 从事媒介生物学研究。

Email: tangzq@hncdc.com.cn

脂、乙酰胺琼脂、TBX 定位显色平皿、科玛嘉定位显色平皿、生理盐水等,通过河南省疾病预防控制中心药械管理科采购。分子生物学相关试剂:基因组 DNA 小量抽提试剂盒,购自上海生工生物工程有限公司;PCR Master 快速扩增反应体系,购自 Promega 公司。其他试剂仪器由本实验室自备。

## 1.2 方法

**1.2.1 样品的前处理** 每个批次的样本随机挑选 5 只德国小蠊成虫作为研究对象,放在灭菌的研钵中,用 2 ml 生理盐水反复冲洗其表面 5 min,随后各取 0.2 ml 加入 3 ml 不同选择性的增菌液(GN 增菌液、7.5% NaCl 肉汤、胆盐乳糖增菌液、LB 液体培养基)中增菌培养,去掉剩余的生理盐水后,用 75% 乙醇清洗体表 3 次,挥发干后,用剪刀和镊子去掉德国小蠊头部、翅膀和附肢,进行研磨。加入 2 ml 的生理盐水混匀,随后各取 0.2 ml 加入 3 ml 不同选择性的增菌液中增菌培养。

**1.2.2 分离单菌落** 经 37 °C 6~8 h 增菌培养后,取增菌液接种于不同选择性的分离琼脂(SS 分离琼脂、甘露醇高盐琼脂、乙酰胺琼脂、TBX 定位显色平皿、科玛嘉定位显色平皿)。经 37 °C 24 h 培养,挑取 SS 琼脂上白色菌落,甘露醇琼脂上浅粉色菌落,TBX 定位显色平皿上的蓝色菌落,科玛嘉定位显色平皿上白色、紫色、灰蓝色和蓝色菌落,放入相对应的增菌液中扩大培养。乙酰胺琼脂上未长出单菌落。

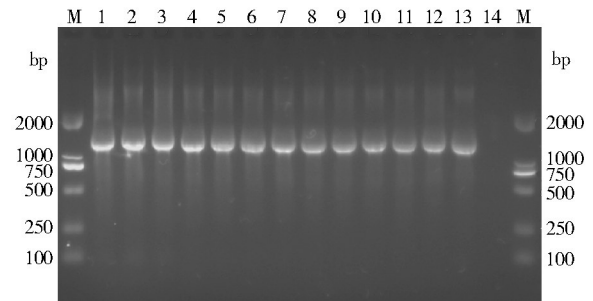
**1.2.3 DNA 提取** 参照试剂盒说明书,使用基因组 DNA 小量抽提试剂盒(离心柱式)进行单菌落的基因组 DNA 提取。

**1.2.4 PCR 和电泳鉴定** PCR 使用 2×PCR Master 进行反应,总体系为 50 μl。上游引物序列为 27F:5' - AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3', 下游引物序列为 1492R:5' -TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T- 3'。PCR 扩增程序:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 1 min,55 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 2 min,35 次循环,最后 72 °C 延伸 7 min,4 °C 保存。扩增结束后,取 10 μl PCR 扩增产物直接上样,加入含 0.5 μg/ml GoldView™ 的 2% 琼脂糖凝胶中,100 V 电泳 25 min,用紫外检测仪观察,并用凝胶成像系统照像。

**1.2.5 测序和 BLAST** 由上海生工生物工程有限公司进行序列测定,序列测定后,用 Vector NTI 软件得到完整序列,再用 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)上的 BLAST 功能进行同源序列搜索对比。

## 2 结果

**2.1 PCR 扩增** 对于分离纯化的细菌菌落,用 27F 和 1492R 引物对能得到有效的扩增,结果如图 1 所示。



注:1~12. 细菌单菌落;13. 阳性对照(福氏志贺菌);14. 阴性对照(双蒸水);M. DNA Marker DL2000 (TaKaRa)。

图 1 PCR 扩增细菌单菌落后产物电泳结果

**2.2 测序与 BLAST 结果** 完成双向测序的样品共 12 份,经 Vector NTI 软件整理得到完整序列后,将序列输入美国 NCBI 网站进行在线 BLAST 比对,取同源性最大的检索结果作为最终确认菌种。12 份样品共鉴定出 9 种细菌,分别为阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)、柯氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter koseri*)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、福氏志贺菌(*Shigella flexneri*)、大肠埃希菌(*Escherichia coli*)、沙雷菌(*Serratia* sp.)、伤寒沙门菌(*Salmonella enteria subsp. enterica*)、嗜碱芽孢杆菌(*Bacillus halodurans*)和解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。鉴定结果详见表 1。

表 1 PCR 产物鉴定结果

样品编号	鉴定结果	与已知序列的同源性(%)
1	阴沟肠杆菌( <i>Enterobacter cloacae</i> )	97
2	柯氏柠檬酸杆菌( <i>Citrobacter koseri</i> )	99
3	肺炎克雷伯菌( <i>Klebsiella pneumoniae</i> )	97
4	柯氏柠檬酸杆菌( <i>Citrobacter koseri</i> )	99
5	福氏志贺菌( <i>Shigella flexneri</i> )	99
6	大肠埃希菌( <i>Escherichia coli</i> )	98
7	福氏志贺菌( <i>Shigella flexneri</i> )	99
8	沙雷菌属( <i>Serratia</i> sp.)	98
9	阴沟肠杆菌( <i>Enterobacter cloacae</i> )	98
10	伤寒沙门菌( <i>Salmonella enteria subsp. enterica</i> )	99
11	嗜碱芽孢杆菌( <i>Bacillus halodurans</i> )	99
12	解淀粉芽孢杆菌( <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> )	98
对照	福氏志贺菌( <i>Shigella flexneri</i> )	100

## 3 讨论

在得到鉴定的 7 种细菌中,福氏志贺菌和伤寒沙门菌是具有高度传染性的肠道致病菌,能够引起痢疾和伤寒等急性肠道传染病。阴沟肠杆菌、柯氏柠檬酸杆菌、大肠埃希菌、沙雷菌和肺炎克雷伯菌是重要的条件致病菌和医源性感染菌,由于近年来滥用抗生素,导致这些条件致病菌的耐药情况严重,给临床治疗带来了新的挑战。嗜碱芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌不属于

致病菌,这些细菌在发酵工程中有所应用。阴沟肠杆菌、柯氏柠檬酸杆菌、大肠埃希菌、沙雷菌和肺炎克雷伯菌等本身是人体中普遍存在的细菌,但因人的个体差异和健康状况,往往能够感染造成各种细菌性疾病,再加之近年来耐药性的发展,这些条件致病菌已经成为常见的医源性感染菌<sup>[4-6]</sup>。

从 20 世纪 60 年代 16S rRNA 基因发现至今,以其作为靶基因的序列分析方法已经日臻成熟,且体现出越来越明显的优势:①16S rRNA 序列分析法能够快速地对微生物进行鉴定,许玉玲等<sup>[7]</sup>的实验证明 16S rRNA PCR 产物直接测序鉴定比克隆产物测序的方法快约 3 d,且鉴定准确性差异无统计学意义;②16S rRNA 序列分析法能够鉴定难于区分的细菌,例如草绿色链球菌有 5 种亚型能够导致心内膜炎,但它们通过表型分析难于区分,应用 16S rRNA 基因序列分析,就能够快速地鉴定出标本中的细菌种类,对临床诊断和预测病情都有重要作用<sup>[8]</sup>;③16S rRNA 序列分析法能够鉴定无法培养或培养阴性的细菌。本研究采用先培养分离、再进行 PCR 扩增和序列分析的方法对德国小蠊携带致病菌的情况进行调查,前期的培养分离步骤可以去除大部分非致病菌的干扰,之后 PCR 通用引物设计在 16S rRNA 基因外显子恒定区的第 27 个和第 1492 个碱基,可以扩增出细菌基因的绝大部分片段,再通过测序和 BLAST 检索,能够快速鉴定到最有可能的物种。这种思路相比于直接利用 PCR 进行大范围

的扩增和测序更加经济,但是由于扩增和测序技术会有一定概率的差错,序列比对的结果也存在同源性相近但分属不同菌种的情况,我们认为对鉴定出来的菌种,仍需进行系统的生化和免疫学分析才能最终确定菌种类。

#### 参考文献

- [1] 马晓光,宋秀平,高博,等. 16S rRNA 序列分析法检测国境口岸截获德国小蠊携带病原菌初探[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2007, 18(6):459-461.
- [2] 刘吉起,张玉勤,赵旭东,等. 河南省公共场所重要病媒生物侵害状况调查[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2010, 21(6): 558-561.
- [3] 罗雯,万雅各. 采用 16S rRNA 基因 PCR 检测病原菌的研究进展[J]. 南昌大学学报, 2000, 3(9):302-306.
- [4] 顾怡明,张杰,俞云松,等. 多重耐药阴沟肠杆菌流行状况及耐药机制的研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2004, 14(12):1321-1324.
- [5] 王震,刘智成,庄建伟,等. 2003—2006 年医院感染大肠埃希菌与肺炎克雷伯菌的临床分布及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2008, 18(4):581-583.
- [6] 杨启文,徐英春,谢秀丽,等. 全国 10 所医院院内与社区感染常见病原菌耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(9): 1133-1138.
- [7] 许玉玲,王建丽,张爱梅,等. 肠道致病菌 16S rRNA 基因的快速检测和鉴定[J]. 现代预防医学, 2011, 38(17):3528-3531.
- [8] 李霞. 16S rRNA 基因序列分析在临床微生物学中的应用[J]. 微生物与感染, 2006, 1(3):184-186.

收稿日期:2012-10-26

(上接第 63 页)

温湿度、对饲养土和饲料进行预处理、及时清除地鳖死亡虫体等。本次样本采集发现,地鳖养殖环境中以伯氏嗜木螨为主。针对该螨的生活特性与地鳖之间的生境关系,以及其变应原性,本实验室正在做进一步研究与验证。此外,通过阳光暴晒饲养土等理化手段,可最大限度降低螨在地鳖养殖中的危害,对控制螨性气传变应原的传播具有重要意义。同时,通过对螨在特殊环境的调查研究,进一步丰富了我国螨类生态学研究内容。

#### 参考文献

- [1] 蒋三俊. 药用地鳖虫种类及其螨害的防治[J]. 特种经济动植物, 2001, 4(4):9.
- [2] 李朝品,武前文. 房舍和储藏物粉螨[M]. 合肥:中国科学技术出版社, 1996:71-291.

- [3] 李朝品. 医学昆虫学[M]. 北京:人民军医出版社, 2006:73-77.
- [4] 李朝品,贺赞,江佳佳,等. 淮南市不同环境中粉螨群落组成和多样性现场调查[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23(6): 460-462.
- [5] 李朝品,陶莉,王慧勇,等. 淮南地区粉螨群落与生境关系研究初报[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2005, 25(12): 955-958.
- [6] 韩宝瑜. 三类典型茶园昆虫和螨类群落组成和动态的差异[J]. 茶叶科学, 2005, 25(4):249-254.
- [7] 苏柱华,林莉,吴洪基,等. 荔枝螨类资源调查及丰富度分析[J]. 广东农业科学, 2006, 3:90-93.
- [8] 吴东辉,张柏,陈鹏. 吉林省中西部平原区土壤螨类群落结构特征[J]. 动物学报, 2005, 51(3):401-412.
- [9] Vichyanond P, Pensrichon R, Kurasirikul S. Progress in the management of childhood asthma[J]. Asia Pac Allergy, 2012, 2(1): 15-25.
- [10] 王慧勇,李朝品. 粉螨危害及防控措施[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2005, 16(5):403-405.

收稿日期:2012-08-27