

5S及 16S rDNA序列 PCR扩增用于环境军团菌检测^{*}

周世宁¹⁾ 陆勇军¹⁾ 陈维田²⁾ Burnett John²⁾ 邓柏澧²⁾

(1) 中山大学生物化学系, 广州 510275; 2) 香港理工大学)

关键词 5S rRNA基因, 16S rRNA基因, *mip* 基因, 军团菌

分类号 Q 933

军团菌病 (Legionnaires' disease) 是一种严重的空气传播疾病, 在世界各地都常有报道, 是由军团菌 (*Legionella*) 引起, 该菌迄今已鉴定出了 44个种, 其中 18种具致病性, 最常见的导致严重病症的种有嗜肺军团菌 (*L. pneumophila*) 等.

近年已经证明, 军团菌在空调系统的冷却塔水中有十分高的检出率^[1]. 当冷却塔工作时, 冷却水中的细菌极易气雾化, 使邻近的人群感染. 鉴于此, 环境中军团菌的监测问题变得日益重要.

传统的平板培养、生理生化鉴定存在不少问题, 限制了对环境及临床军团菌的准确和及时的检测; 一般的 DNA杂交或 RFLP技术敏感性仍嫌不足.

根据军团菌属 5S rRNA基因和嗜肺军团菌种特异的 *mip* 基因的序列, 合成了专一性的引物, 对环境样品进行 PCR扩增, 结合灵敏的反向点杂交技术, 已成功地进行水样品军团菌的分析. 这方法是将属专一的 5S rRNA基因探针 (5'-GCGCCAATGATAGTGTG-3') 或种专一的 *mip* 基因探针 (5'-CATAGCGTCTTGCATGCCTTTAGCC-3') 固定于尼龙膜上, 对于前者, 设计了 1个负对照, 所用探针只有 1个碱基的差异. 首先用 5'端标记了生物素的 5S rDNA和 *mip* 基因的专一性引物, 分别通过 PCR扩增相应片段, 对于 5S rDNA, PCR引物为: 正向 5'-GGCGACTATAGCGATTTGGAA-3', 反向 5'-GCGATGACCTACTTTCGCATGA-3'; 对于 *mip* 基因, PCR引物为: 正向 5'-GCATTGGTGCCGATTTGG-3', 反向 5'-GCTTTGCCATCAAATCTTTCTGAA-3'. 将 PCR产物与固定于尼龙膜上的探针杂交, 再与辣根过氧化物酶-streptavidin结合, 最后加入酶的底物, 阳性反应则产生蓝色斑点. 应用类似的方法, 对 11个空调系统冷却塔水样品进行了分析, 发现 100%水样品中含有军团菌属细菌, 45%的样品含有嗜肺军团菌.

为验证以上结果的可靠性, 以 16S rDNA作为检测的目标分子, 根据文献合成了 3个军团菌属专一性的引物^[2], 通过半巢式 PCR (seminested PCR) 进行扩增, 得到了与 5S rDNA探针检测一致的结果.

迄今已有的报告几乎都是关于水样品的军团菌检测, 关于空气样品的检测甚少. 将上

* 香港理工大学研究基金资助项目

收稿日期: 1998-10-23 周世宁, 男, 52岁, 教授

述方法改进后,进行了空气样品的检测,在人工气溶胶化的实验中,证明通过用缓冲液收集气体,再检测缓冲液中的军团菌的方法是可行的.接着对 2 个冷却塔系统进行了实地检测,通过在塔顶附近进行约 40 min 的气雾采集,在一定体积的缓冲液中检测到了军团菌,这 2 个冷却系统的冷却水中也同时被证明为军团菌阳性,表明采用上述方法进行空气样品的军团菌分析具有实用性.

虽然采用 5S rRNA 和 *mip* 基因序列探针与 PCR 产物进行反向杂交的方法检测军团菌属和嗜肺军团菌具有良好的效果,但其缺点是杂交条件要求严格,成本高,操作步骤复杂,而 16S rDNA 半巢式 PCR 法则具有简单、快捷、成本低等优点,但该方法目前只能检测到属的水平,我们正在进行种专一性引物设计和应用的研究.

参 考 文 献

- 1 Ng D L K, Kch B B, Tay L, et al. Comparison of polymerase chain reaction and conventional culture for the detection of *Legionella* in cooling tower waters in Singapore. *Let App Microbiol*, 1997, 24 (3): 214~ 216
- 2 Miyamoto H, Yamamoto H, Arima K, et al. Development of a new seminested PCR method for detection of *Legionella* species and its application to surveillance of *Legionellae* in hospital cooling tower water. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63 (7): 2489~ 2494

Detection of *Legionella* spp. in Water and Air by PCR Amplification of rDNA and *mip* Gene

Zhou Shining* Lu Yongjun Chan Daniel W T Burnett John Tang Pak L

Abstract *Legionella* spp. in cooling tower water and air samples were detected by using PCR and reverse dot blot analysis. The sequences used for PCR amplification included 5S rDNA, 16S rDNA and *mip* gene. Seminested PCR method was used for 16S rRNA gene sequence amplification. Eleven cooling tower water samples were analysed, and 100% of the samples was *Legionella* positive and 45% contained *L. pneumophila*. In the experiments of artificial aerosolization of *Legionella* cells, airborne *Legionella* cells were successfully collected and detected. Two air samples collected respectively from sites above two cooling towers were *Legionella* positive. These results indicated that the 5S rRNA gene PCR and probe hybridization method (Perkin-Elmer Enviro Amp *Legionella* Kits) and 16S rRNA gene seminested PCR method can used to detect *Legionella* spp. in water samples as well as in air samples.

Keywords 5S rRNA gene, 16S rRNA gene, *mip* gene, *Legionella*

* School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China