

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2025.01.002

不同 16S rRNA 引物在溺死组织 气单胞菌检测中的性能评估

宁浩冉¹ 代昌海¹ 种法国¹ 王建鑫¹ 王雅莹¹ 胡洋洋¹ 王业全^{1,2} 张磊磊³ 张国安^{1,2}
(¹ 济宁医学院法医学院, ² 济宁市法医学重点实验室, 济宁 272067; ³ 山东省公安厅物证鉴定中心, 济南 250011)

摘要 目的 分析 16S rRNA V3 区引物、V4 区引物和 V3-V4 区引物检测溺死组织中气单胞菌的差异。方法 采用 PCR-扩增子测序方法, 评估 3 种 16S rRNA 引物在 5 例溺死者的 11 个脏器中检测细菌 DNA 的能力, 特别是气单胞菌 DNA 的检测效果。结果 相比于其他 2 个引物, V3 引物在检测细菌分类操作单元 (Operational Taxonomic Unit, OTU) 方面更具优势, 检测到的细菌 OTU 数量更多。测序结果分析表明, V3 引物能够检测更丰富的细菌门 (Phylum) 和科 (Family), 以及更多的气单胞菌。结论 16S rRNA V3 引物在检测溺死脏器中的气单胞菌可能更具优势, 对溺死诊断具有潜在应用价值。

关键词 溺死; 16S rRNA 测序; 气单胞菌

中图分类号: R895 文献标识码: A 文章编号: 1000-9760(2025)02-008-04

Comparison of different 16S rRNA primers for the detection of *Aeromonas* in drowned tissues

NING Haoran¹, DAI Changhai¹, CHONG Faguo¹, WANG Jianxin¹, WANG Yaxuan¹,
HU Yangyang¹, WANG Yequan^{1,2}, ZHANG Leilei³, ZHANG Guoan^{1,2}

(¹ School of Forensic Medicine and Forensic Science, Jining Medical University, Jining 272067, China;

² Jining Key Laboratory of Forensic Medicine, Jining 272067, China;

³ Physical Evidence Identification Center of Shandong Provincial Public Security Bureau, Jinan 250011, China)

Abstract: Objective To analyze the performance of 16S rRNA V3-region primers, V4-region primers and V3-V4-region primers in detecting *Aeromonas* in drowned tissues. **Methods** The performance of three 16S rRNA primers was evaluated using PCR-amplifier sequencing to detect microorganisms, including *Aeromonas*, in the DNA of 11 organs from five drowned individuals. **Results** Compared with the other two primers, the V3 primer detected more bacterial classification Operational Taxonomic Unit (OTU). Sequencing results showed that the V3 primer detected a greater diversity of bacterial phyla and families, as well as most *Aeromonas*. **Conclusion** The V3 16S rRNA primers may be more effective for detecting *Aeromonas* in drowned organs, thus has potential application value in the diagnosis of drowning.

Keywords: Drowning; 16S rRNA sequencing; *Aeromonas*

溺水死亡是全球非自然死亡的常见原因之一。据世界卫生组织统计, 每年约有 23.5 万人死于溺水, 是全球非自然死亡的第五大原因。硅藻检验是

溺死诊断的有效指标之一^[1]。然而, 该方法也存在一些缺陷^[2], 如在非溺死者的肾、肝等器官中也可能检测到少量硅藻, 从而出现假阳性结果^[3-4]。此外, 硅藻识别需要鉴定人员具备一定的经验积累。因此, 溺死鉴定需要其他更灵敏更方便的方法, 作为硅藻检验的补充。

测序技术的发展使得分析整个微生物群落成为可能, 并极大促进了法医微生物学的发展。16S rRNA 存在多个高变区域可用于微生物组学 (V1-

[基金项目] 山东省重点研发计划 (重大科技创新工程) 项目 (2021CXGC011305); 济宁医学院大学生创新创业训练计划项目 (cx2023122z)

[通信作者] 张国安, Email: zga2007@126.com

V9), 在溺死研究中多以检测 V3-V4 区域为主。尽管已有众多研究揭示了基于 16S rRNA 的微生物组学在溺死中的作用, 但关于不同 16S rRNA 高变区域在溺死诊断中的差异性研究仍相对较少。本项目深入研究了不同 16S rRNA 引物对溺死诊断的表现(以检出气单胞菌数量为标准), 旨在筛选出最适合的引物。本研究不仅有助于提高溺死诊断的准确性和效率, 减少误诊和漏诊, 还为法医微生物学的发展提供了新的思路和方法, 有力地推动微生物组学在法医学领域的应用研究。

1 材料和方法

1.1 简要案情

本项目共收集 5 例经硅藻检验诊断为溺死的案例, 均为济宁医学院司法鉴定中心日常受理案件。本研究经济宁医学院伦理委员会审核同意(JNMC-YX-224-074)且均与家属签订知情同意书。5 例案件共有 11 个样本, 均为山东省境内夏季淡水溺死的样本。

1.2 DNA 提取

在尸检过程中, 切取约 1g 组织, 放入 1.5mL 离心管中, 加入 3 颗 2mm 钢珠, 利用高通量组织破碎仪(宁波新芝公司)将组织破碎。随后, 使用 Qiagen DNeasy PowerSoil Pro Kit 提取 DNA, 步骤按照试剂盒说明书进行。

1.3 16S rRNA 扩增、测序及比对

共使用 3 对引物对 16S rRNA 进行 PCR 扩增。其序列及扩增区域见表 1。所有扩增, 产物质控, 二代测序及比对由上海生工生物工程有限公司完成。本项目主要以细菌分类操作单元(Operational Taxonomic Unit, OTU)比较各引物的表现。OTU 是指在微生物群落分析中, 基于序列相似将微生物划分为不同的操作分类单元, 通常用于评估微生物群落的多样性和组成。

表 1 16S rRNA 引物及扩增区域

	上游引物	下游引物
V3 区	341F: CCTACGGGAGGCAGCAG	534R: ATTACCGCGGCTCTGG
V4 区	515F: GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	805R: GACTACHVGGGTATCTAATCC
V3-V4 区	341F: CCTACGGGAGGCAGCAG	805R: GACTACHVGGGTATCTAATCC

2 结果

2.1 不同引物检测到细菌 OTU 数量

在大多数样本中, V4 引物检测到的细菌 OTU

数量最少, 且在 3 个样本中(3-肝, 3-肾, 5-肾), 未能扩增出产物。在 1-肺、1-肾、2-肺等 8 个样本中, V3 引物检测到的细菌 OTU 数量高于 V3-V4 引物(表 2)。但在另外 3 个样本中(3-肝, 3-肾, 5-肾) V3 引物的检测效果不如 V3-V4 引物(表 2)。

表 2 不同引物测序细菌 OTU 数量比较

样本	V3 引物	V4 引物	V3-V4 引物
1-肺	198457	99576	107892
1-肾	151832	81637	140646
2-肺	165576	127992	108753
2-肾	147273	55351	50912
3-肺	158624	56077	57649
3-肝	40064	-	46080
3-肾	57141	-	92922
4-肺	162964	141043	119412
4-肾	128493	54561	119325
5-肺	134663	66579	113783
5-肾	4591	-	7769

注: -代表样本 PCR 未扩增出产物, 未进行测序。

2.2 不同引物检测到的细菌类群

整体上各引物检测到的细菌在门(Phylum)水平上具有一致性: 厚壁菌门占比最多, 其次为变形菌门, 再次为梭杆菌门和拟杆菌门。V3 引物和 V3-V4 引物检测到的细菌组成相似。V3 引物检测到了脱硫菌门和蓝藻门的微生物, 而其他两个引物未检测到(图 1)。

在科(Family)的水平上, 梭状芽孢杆菌科(Clostridiaceae)在各组中均排名第一。肠杆菌科(Enterobacteriaceae)在 V3 和 V3-V4 引物组中均排名第二。此外, 链球菌科(Streptococcaceae), 消化球菌科(Pepfosiropfococcaceae), Wohlfahrtimonadaceae, 乳杆菌科(Lactobaciaceae), 莫根氏科(Morganelaceae)等排名靠前。但在各组中的排名位置存在差异(图 2)。

2.3 不同引物检测到的气单胞菌 OTU 数量

气单胞菌是水中常见微生物, 多个研究强调了气单胞菌在淡水溺死诊断中的重要价值^[5]。V3 引物在每一个样本中都检测到了比其他引物更多的气单胞菌 OTU, 如在样本 1-肾中, V3 引物检测到 343 个气单胞菌 OTU, 远高于 V4 引物的 40 和 V3-V4 引物的 50。并且在 2-肺、2-肾样本中, V4 引物和 V3-V4 引物没有检测到气单胞菌 OTU。这些数据均表明 V3 引物在检测气单胞菌中的优势。见表 3。

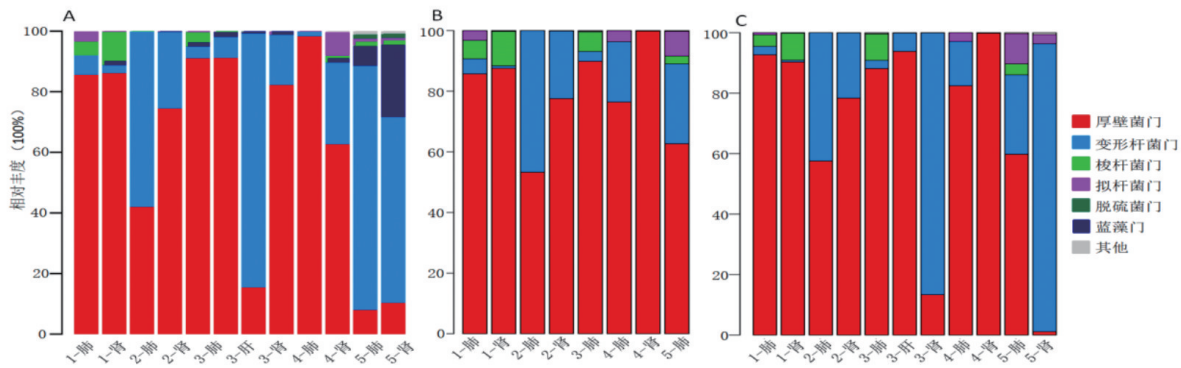


图 1 引物 V3(A), V4(B), V3-V4(C)检测到的细菌在门(Phylum)水平上的组成

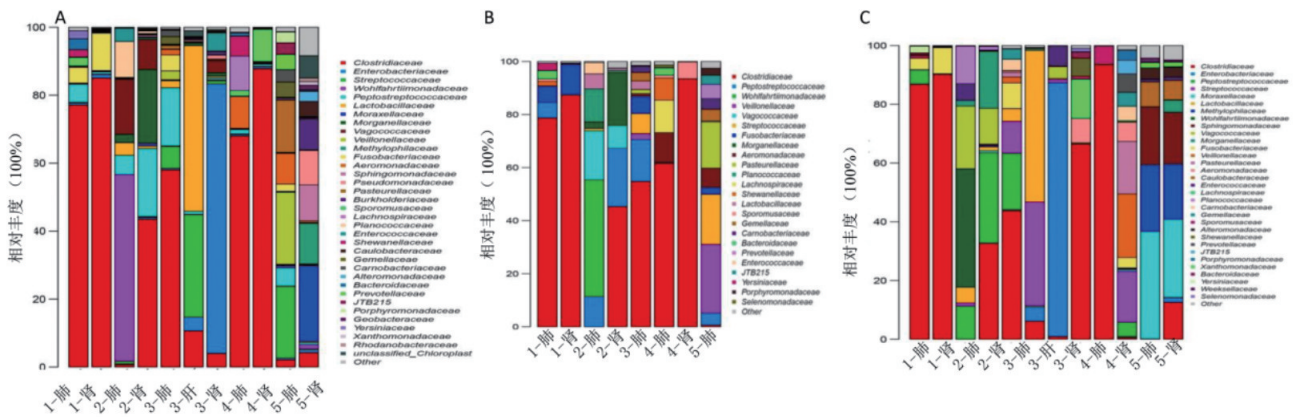


图 2 引物 V3(A), V4(B), V3-V4(C)检测到的细菌在科(Family)水平上的组成

表 3 不同引物检测到气单胞菌的 OTU 数量

样本	V3 引物	V4 引物	V3-V4 引物
1-肺	493	47	11
1-肾	343	40	50
2-肺	125	0	0
2-肾	296	0	0
3-肺	2549	602	307
3-肝	63	-	34
3-肾	192	-	0
4-肺	15357	15873	9159
4-肾	331	9	17
5-肺	12205	4890	6955
5-肾	23	-	2

注: -代表样本 PCR 未扩增出产物,未进行测序。

3 讨论

溺死在大体病理学缺乏特征性体征,诊断困难,尤其在尸体已处于分解状态或死后抛尸入水时^[6]。硅藻检验是现行诊断溺死的重要标准^[1],但存在局限性,如假阳性^[7]、硅藻含量低的水体检测困难,且所用试剂可能对环境与健康造成危害。

因此,溺死鉴定需要更灵敏、方便、健康的方法,作为硅藻检验的补充。

测序技术推动了法医微生物学的发展。Wang 等^[8]利用二代测序分析溺死或死后入水大鼠 3d 的不同部位(包括皮肤、肺、肾、心血)的微生物的 16S rRNA 的 V3-V4 区域,可区分溺死或死后入水大鼠样本。他们还利用 16S rRNA 的 V3-V4 区域,利用生物信息学分析了溺死和死后入水小鼠不同时间肠道、肝、脑微生物组学的变化,发现肠道及浸泡 7d 后的肝脏和肾脏微生物组不能区分溺死和死后入水,但是随机森林法分析所得的回归模型能够预测小鼠淹没在水中的时间,提示了 3 个部位的微生物种群随死亡时间的有规律的变化。

此外,Uchiyama 等^[9]利用 Taqman PCR 方法检测 8 种水生细菌来鉴定溺死并区分淡水溺死和海水溺死。其中包括淡水中的气单胞菌和海水中的弧菌和光杆菌。一个研究团队^[10-12]利用 PCR-毛细管电泳或 Real time PCR 方法构建了复合扩增体系检测水中细菌和硅藻诊断溺死,并与经典的硅藻检

测方法(微波消解-真空抽滤-自动扫描电镜法)比较,发现虽然新方法诊断溺死准确度比硅藻检测方法略低,但可排除非溺死案例并为溺死诊断提供额外证据。气单胞菌被认为是比较有前景的淡水溺死微生物指标^[5]。

本项目研究了微生物组学最常用的 3 个引物即 V3 引物, V4 引物和 V3-V4 引物联合扩增子测序在检测溺死脏器气单胞菌中的能力。结果显示, V3 引物检测能力较好, 在门和科水平上, 检测到更多种类的细菌。这可能与 V3 引物的扩增效率或扩增偏向性有关。微生物组学 16S rRNA 引物设计的目的并不是为了检测某一种细菌, 而是为了检测更多种类的细菌, 因此这些引物均针对 16S rRNA 的保守序列。本研究所用的 PCR-扩增子测序的方法, 对 PCR 扩增产物进行测序和比对, 无疑大大提高了准确性。

本研究利用 3 个不同的 16S rRNA 引物检测了溺死组织, 获得了其微生物组学数据。但如何利用这些数据来诊断溺死同样缺乏标准。本项研究是从微生物组学数据中抽取出来气单胞菌的数据进行溺死诊断的研究。分析数据, 可见气单胞菌 OTU 在不同样本中差别较大。因此一个关键的问题是, 当 OTU 超过多少时可认为是溺死的证据? 这是需要进一步回答的问题。利用微生物组学诊断溺死的另一个策略是利用生物信息学分析整个微生物组学, 从而区分溺死和非溺死。但这个方法也同样处于研究阶段。

综上, 我们通过比较常用的微生物组学 16S rRNA 引物在溺死案例中的表现, 发现 V3 引物能检测到更多的气单胞菌, 是进行溺死诊断的良好候选检测方法, 显示了一定的应用前景。

利益冲突: 所有作者均申明不存在利益冲突。

参考文献:

- [1] Zhou Y, Cao Y, Huang J, et al. Research advances in forensic diatom testing [J]. *Forensic Sci Res*, 2020, 5 (2): 98-105. DOI: 10.1080/20961790.2020.1718901.
- [2] Stephenson L, Van den Heuvel C, Byard RW. The persistent problem of drowning—a difficult diagnosis with inconclusive tests [J]. *J Forensic Leg Med*, 2019, 66: 79-85. DOI: 10.1016/j.jflm.2019.06.003.
- [3] Shen X, Liu Y, Xiao C, et al. Analysis of false-positive results of diatom test in the diagnosis of drowning—would not be an impediment [J]. *Int J Legal Med*, 2019, 133(6): 1819-1824. DOI: 10.1007/s00414-019-02021-4.
- [4] Oliveira M, Amorim A. Microbial forensics; new breakthroughs and future prospects [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(24): 10377-10391. DOI: 10.1007/s00253-018-9414-6.
- [5] García MG, Pérez-Cárceles MD, Osuna E, et al. Impact of the human microbiome in forensic sciences: a systematic review [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2020, 86(22): e01451-20. DOI: 10.1128/AEM.01451-20.
- [6] Piette MH, De Letter EA. Drowning: still a difficult autopsy diagnosis [J]. *Forensic Sci Int*, 2006, 163(1-2): 1-9. DOI: 10.1016/j.forsciint.2004.10.02.
- [7] Marella G, Feola A, Marsella L, et al. Diagnosis of drowning, an everlasting challenge in forensic medicine: review of the literature and proposal of a diagnostic algorithm [J]. *Acta Med*, 2019, 35: 900-919.
- [8] Wang LL, Zhang FY, Dong WW, et al. A novel approach for the forensic diagnosis of drowning by microbiological analysis with next-generation sequencing and unweighted UniFrac-based PCoA [J]. *Int J Legal Med*, 2020, 134(6): 2149-2159. DOI: 10.1007/s00414-020-02358-1.
- [9] Uchiyama T, Kakizaki E, Kozawa S, et al. A new molecular approach to help conclude drowning as a cause of death: simultaneous detection of eight bacterioplankton species using real-time PCR assays with TaqMan probes [J]. *Forensic Sci Int*, 2012, 222(1-3): 11-26. DOI: 10.1016/j.forsciint.2012.04.029.
- [10] 朱晓琳, 徐曲毅, 韩雅莉, 等. 溺死相关浮游生物基因座的复合扩增体系 [J]. *中国法医学杂志*, 2020, 35(1): 20-25. DOI: 10.13618/j.issn.1001-5728.2020.01.004.
- [11] Xiao C, Xu Q, Li H, et al. Development and application of a multiplex PCR system for drowning diagnosis [J]. *Electrophoresis*, 2021, 42(11): 1270-1278. DOI: 10.1002/elps.202000265.
- [12] Yu Z, Xu Q, Xiao C, et al. SYBR Green real-time qPCR method: Diagnose drowning more rapidly and accurately [J]. *Forensic Sci Int*, 2021, 321: 110720. DOI: 10.1016/j.forsciint.2021.110720.

(收稿日期 2024-10-20)

(本文编辑: 石俊强)