

# 利用 *hutC* 基因对洋葱伯克霍尔德菌群种水平的鉴定探讨

余萌<sup>1</sup>, 王似锦<sup>1</sup>, 张迅迪<sup>1,2</sup>, 马仕洪<sup>1\*</sup>

1 中国食品药品检定研究院, 北京

2 中国药科大学, 江苏 南京

余萌, 王似锦, 张迅迪, 马仕洪. 利用 *hutC* 基因对洋葱伯克霍尔德菌群种水平的鉴定探讨[J]. 微生物学报, 2025, 65(12): 5339-5351.

YU Meng, WANG Sijin, ZHANG Xundi, MA Shihong. Species-level identification of *Burkholderia cepacia* complex through *hutC* sequence analysis[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(12): 5339-5351.

**摘要:** 【目的】探讨利用 *hutC* 基因对洋葱伯克霍尔德菌群(*Burkholderia cepacia* complex, Bcc)进行种水平鉴定的可行性。【方法】对 *hutC* 基因序列及其编码蛋白的氨基酸序列进行比对和系统发育分析, 从理论上评估用于 Bcc 种水平鉴定的可行性。针对 Bcc 的 *hutC* 基因设计该基因扩增引物, 以标准菌株为模板扩增 Bcc 代表菌种的 *hutC* 基因, 将测序结果与 NCBI 序列进行比对和系统发育分析以验证前述理论假设。此外, 对 *hutC* 基因序列进行单核苷酸多态性分析, 查找 Bcc 种水平的特征条码。【结果】*hutC* 基因在 Bcc 和非 Bcc 菌种间相对保守。采用所设计的引物和扩增条件可扩增出 12 株 Bcc 标准菌株长度为 692 bp 的 *hutC* 基因序列。除 1 株分类学有误的菌株外, 其余 11 株的比对结果均与保藏中心一致。对 *hutC* 基因的系统发育分析结果表明, 不同 Bcc 菌种能够以较高的自展值聚类。由 12 个核苷酸组成的 *hutC* 基因特征条码可快速区分不同的 Bcc 菌种。【结论】*hutC* 基因可作为 Bcc 鉴定的新型看家基因靶点, 用于 Bcc 菌群和菌种水平的准确鉴定。

**关键词:** 洋葱伯克霍尔德菌群; *hutC* 基因; 看家基因; 微生物鉴定

资助项目: 中国食品药品检定研究院化学药品检定所重点实验室项目(2025HYZX04)

This work was supported by the NIFDC Key Laboratory of Chemical Drug Analysis Project (2025HYZX04).

\*Corresponding author. E-mail: mash@nifdc.org.cn

Received: 2025-04-29; Accepted: 2025-06-12; Published online: 2025-06-27

## Species-level identification of *Burkholderia cepacia* complex through *hutC* sequence analysis

YU Meng<sup>1</sup>, WANG Sijin<sup>1</sup>, ZHANG Xundi<sup>1,2</sup>, MA Shihong<sup>1\*</sup>

1 National Institutes for Food and Drug Control, Beijing, China

2 China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu, China

**Abstract: [Objective]** To explore the application of *hutC* sequence analysis in the identification of *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) at the species level. **[Methods]** We compared the sequences of *hutC* and the amino acid sequences of the encoded proteins and conducted phylogenetic analysis to theoretically assess the feasibility of using *hutC* for species-level identification of Bcc. Primers targeting the *hutC* of Bcc were designed, and the amplification conditions were optimized. With those of standard strains as templates, the *hutC* sequences of representative Bcc species were amplified. The sequencing results were compared with NCBI sequences for phylogenetic analysis to validate the theoretical hypothesis. Additionally, single nucleotide polymorphism analysis of *hutC* sequences was performed to identify species-level characteristic barcodes of Bcc. **[Results]** The *hutC* gene was relatively conserved between Bcc and non-Bcc. With the designed primers and amplification conditions, a 692 bp fragment of *hutC* was successfully amplified from 12 Bcc standard strains. Except for one strain with taxonomic errors, the remaining 11 strains had the comparison results consistent with those from the culture collection centers. The phylogenetic analysis based on *hutC* showed that different Bcc species could be clustered with high bootstrap values. A 12 nucleotide characteristic barcode of *hutC* was identified, which can rapidly distinguish different species of Bcc. **[Conclusion]** The gene *hutC* can serve as a new housekeeping gene target for accurate identification of Bcc at the complex and species levels.

**Keywords:** *Burkholderia cepacia* complex; *hutC*; housekeeping gene; microbial identification

洋葱伯克霍尔德菌群(*Burkholderia cepacia* complex, Bcc)隶属于伯克霍尔德菌属(*Burkholderia*),由若干表型近似但基因型存在差异的菌种组成,其代表菌种为洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*)。*B.cepacia*于1950年首次在腐烂的洋葱根茎中被发现,最初被命名为洋葱假单胞菌(*Pseudomonas cepacia*)<sup>[1]</sup>。1992年,Yabuuchi等<sup>[2]</sup>通过多相分类学方法依据16S rRNA基因序列、DNA-DNA杂交同源性等将假单胞菌属rRNA杂交II组定义为伯克霍尔德菌属。1997年,Vandamme等对128株伯克霍尔德菌属菌株进行了系统的表型和基因型

分析<sup>[3]</sup>,这些被鉴定为“*B.cepacia*”的若干菌株通过DNA-DNA杂交又进一步被划分为至少5个不同的基因型亚群(genotypic subgroups)。同年5月,在洋葱伯克霍尔德菌国际工作组第3次会议(third meeting of the international *Burkholderia cepacia* working group, May 10 to 11, 1997, Victoria, British Columbia, Canada)上提议将上述表型特征近似的基因型亚群命名为Bcc,并针对其分类学特点采用“基因型(genomovar)”对不同亚群进行命名,至此,Bcc被分为5个基因型,分别是基因型I(对应种名:*B.cepacia*)、基因型II(*B.multivorans*)、基因型

III (*B. cenocepacia*)、基因型 IV (*B. stabilis*)、基因型 V (*B. vietnamiensis*)。随着分子生物学分析技术的飞速发展, 基因水平的信息为 Bcc 的准确分类提供了新的依据, 多位点序列分型、全基因组测序等技术在 Bcc 分类学研究中的应用使得 Bcc 家族不断有新的成员加入, 截至 2024 年, 已被分类命名的 Bcc 成员达到了 27 个种<sup>[4-6]</sup>。

Bcc 是环境中广泛存在的人类条件致病菌, 具有寡养、代谢谱广、天然耐药等特点, 易污染药品生产水系统, 且临床治疗难度大<sup>[7-9]</sup>。自 1980 年美国某吸入剂生产企业因去离子水制备系统控制失败导致产品污染 *B. cepacia*, 进而引发数名囊性纤维化(cystic fibrosis, CF)患者死亡事件以来, 该菌一直受到美国食品和药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)的关注<sup>[8]</sup>。近年来, 非无菌水基质药品因存在 Bcc 污染风险而频繁被 FDA 召回<sup>[10-11]</sup>, FDA 已明确将其列为不可接受微生物(objectionable microorganisms, OM)。美国注射剂协会(Parenteral Drug Association, PDA)第 67 号技术报告中指出, 至少满足以下特点之一的微生物即为不可接受微生物: (1) 可在药品中增殖, 改变药品理化性质, 对其功能或疗效产生不利影响; (2) 在药品中的数量、致病性会导致特定给药途径下的用药患者发生感染(<https://www.pda.org/bookstore/product-detail/2456-tr-67-exclusion-of-objectionable-microorganisms>)。美国药典(US Pharmacopeia, USP)42 版第 2 增补本和《中国药典》2025 年版先后收录了基于选择和分离培养的 Bcc 检查法<sup>[12-13]</sup>, 规定了对样品是否污染 Bcc 进行定性判断的检查方法。

按照《中国药典》通则 9204 微生物鉴定指导原则的要求<sup>[14]</sup>, 对于 Bcc 检查结果判断需达到的鉴定水平为菌群, 但在实际应用中当产品发生污染或环境发生严重异常时, 为确定污染源需对检出的 Bcc 菌株进行菌种水平的准确鉴定以便进行溯源分析。然而, 由于 Bcc 在表型、16S rRNA 基因序列等方面具有高度的相似性, 使用传统的生化鉴定、基质辅助激光解析电离

飞行时间质谱技术(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)和 16S rRNA 基因序列分析均无法实现种水平的准确鉴定<sup>[15]</sup>, 通常需要辅助看家基因(housekeeping gene)的序列分析, *recA*、*hisA* 和 *gyrB* 等基因已被用于 Bcc 种水平的鉴定<sup>[16-18]</sup>。

组氨酸利用阻遏物 C (histidine utilization repressor C, HutC)是革兰氏阴性细菌组氨酸代谢中特异性的转录调控因子, 属于 GntR 蛋白家族<sup>[19]</sup>。*hutC* 基因编码的蛋白质, 其 N 端的 DNA 结合结构域较为保守, C 端的效应物结合结构域差异较大<sup>[20]</sup>。这种特性使其在系统发育分析中具有潜在的应用价值, 但目前尚无利用 *hutC* 基因对 Bcc 进行种水平鉴定的报道。本研究对 Bcc 的 *hutC* 基因及其编码蛋白的氨基酸序列进行分析, 探讨其在 Bcc 与非 Bcc 间以及 Bcc 种水平成员间的保守性, 并设计引物进行验证, 探讨利用 *hutC* 基因进行 Bcc 种水平鉴定的可行性, 以便在污染溯源调查时快速准确地确定污染源。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

本研究共使用 12 株 Bcc 标准菌株(表 1), 分别购自美国典型培养物保藏中心(American

表1 本研究所用菌株

Table 1 Strains used in this study

Type strain number	Name
ATCC 25416	<i>B. cepacia</i>
ATCC BAA-245	<i>B. cenocepacia</i>
ATCC BAA-246	<i>B. dolosa</i>
ATCC BAA-247	<i>B. multivorans</i>
CICC 23882	<i>B. contaminans</i>
CMCC(B) 23005	<i>B. cepacia</i>
CMCC(B) 23006	<i>B. cenocepacia</i>
CMCC(B) 23010=CICC 24958	<i>B. aenigmatica</i>
CGMCC 1.2872	<i>B. stabilis</i>
CGMCC 1.2982	<i>B. vietnamiensis</i>
CGMCC 1.10511	<i>B. ambifaria</i>
CGMCC 1.3816	<i>B. pyrrocinia</i>

Type Culture Collection, ATCC)、中国普通微生物菌种保藏管理中心(China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC)、中国工业微生物菌种保藏管理中心(China Center of Industrial Culture Collection, CICC)以及中国医学细菌保藏管理中心(China Center for Medical Bacterial Culture Collection, CMCC)。

## 1.2 主要试剂和仪器

胰酪大豆胨液体培养基(soybean-casein digest broth, TSB), Merck KGaA 公司; 胰酪大豆胨琼脂培养基(soybean-casein digest agar, TSA), BD 医疗公司; 蒸馏水, 英潍捷基(上海)贸易有限公司; IFA 接种液、GENIII 反应板, Biolog 公司; *Ex Taq*<sup>®</sup> DNA Polymerase, 宝日生物技术(北京)有限公司; prepGEM 细菌基因组快速提取试剂盒, MicroGEM 公司; 引物由北京诺赛基因组研究中心有限公司合成。

电子天平, Sartorius 公司; 生物安全柜, NuAire 公司; 生化培养箱、高压灭菌器, Yamato Scientific 公司; 自动微生物鉴定系统, Biolog 公司; 基因扩增仪, Bio-Rad 公司。

## 1.3 菌株培养和基因组提取

将 Bcc 菌株划线接种于 TSA 培养基, 33 °C 培养 18–24 h, 按照 prepGEM 细菌基因组快速提取试剂盒的说明书进行基因组提取。

## 1.4 生化鉴定

按照 Biolog 自动微生物鉴定系统使用说明, 挑取菌落至 IFA 接种液中, 混匀制成规定浓度的菌悬液, 按要求接种至 GENIII 反应板, 置于自动微生物鉴定系统中培养并读取结果。

## 1.5 序列分析

16S rRNA 基因扩增采用引物 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492r (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 反应体系 (50 μL): *Ex Taq*<sup>®</sup> DNA Polymerase (5 U/μL) 0.25 μL, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, 10× PCR buffer 5 μL, dNTP mixture (各 2.5 mmol/L)

4 μL, DNA 模板 1 μL, 余下用 ddH<sub>2</sub>O 补齐。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 4 min; 95 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min 30 s, 共 35 个循环; 72 °C 终延伸 5 min。*recA* 扩增反应体系各组分与 16S rRNA 基因扩增体系相同, 上、下游引物分别为 BCR1 (5'-TGACCGCCGAG AAGAGCAA-3') 和 BCR2 (5'-CTCTTCTTCGTC CATCGCCTC-3')。反应条件: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 32 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。测序扩增产物后, 将序列上传至 NCBI 进行比对。

## 1.6 Bcc 组氨酸利用阻遏物氨基酸序列系统发育分析

以 ATCC 25416 的 HutC 氨基酸序列 (登录号为 WP\_175830369.1) 在 NCBI 中进行 BLASTp 比对, 获取 Bcc 其他成员种的组氨酸利用阻遏物氨基酸 Refseq 序列, 同时从 NCBI 下载非 Bcc 近缘种的组氨酸利用阻遏物蛋白 Refseq 序列。将这些序列置于 MEGA 12 中, 采用 ClustalW 算法进行氨基酸序列比对, 使用 bootstrap 法检验 (检验次数为 1 000), 进化模型选用 Jones-Taylor-Thornton, 构建系统发育最大似然树。

## 1.7 Bcc 菌株 *hutC* 基因序列测定

根据 NCBI 中 Bcc 的 *hutC* 基因 738 bp 全长序列设计扩增引物 (表 2), 扩增片段长度分别为 702 bp (P1、P2) 和 692 bp (P3、P4)。反应体系 (50 μL): *Ex Taq*<sup>®</sup> DNA Polymerase (5 U/μL) 0.25 μL, 上、下游引物各 1 μL (10 μmol/L), 10× PCR buffer 5 μL, dNTP mixture (各 2.5 mmol/L) 4 μL, DNA 模板 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 补齐。用 ATCC 25416 和 ATCC BAA-245 基因组进行反应程序的考察。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 10 s, 退火温度分别为 48.0、48.5、49.3、50.7、52.3、53.6、54.5、55.0 °C, 退火时间 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 终延伸 5 min。使用 1% 琼脂糖凝胶电泳对产物进行

表2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Number	Primers name	Primer sequences (5'→3')*
P1	<i>hutC</i> -F-702	GGCGCCCGGCTTGAA
	<i>hutC</i> -R-702	GCACCGTTCCAGCAGATCAA
P2	<i>hutC</i> -FJ-702	SGCGCCSGGCTTGAA
	<i>hutC</i> -RJ-702	GCRCCGTTCCAGCAGATCAA
P3	<i>hutC</i> -F-692	TTGAAGCGCGAGCCGAG
	<i>hutC</i> -R-692	GCACCGTTCCAGCAGATCAAG
P4	<i>hutC</i> -FJ-692	CTTGAAGCGCGAVCCGAG
	<i>hutC</i> -RJ-692	GCACCGTTCCAGCARATCAAG

\*相对于登录号CP034554.1: 197 165–197 902 bp的反向互补序列。

\*: Relative to the reverse complementary sequence of accession number CP034554.1: 197 165–197 902 bp.

大小和纯度检测。确定退火温度后, 以上述 Bcc 不同菌株的基因组作为扩增模板扩增其 *hutC* 基因, 将扩增产物进行测序后的序列上传至 NCBI 进行比对。

### 1.8 *hutC* 基因核苷酸序列用于 Bcc 种水平鉴定的验证

从 NCBI 下载 Bcc 不同种水平代表菌株的 *hutC* 基因序列, 包括不同种的模式菌株, 与上述标准菌株的 *hutC* 序列一起置于 MEGA 12 中, 采用 ClustalW 算法进行核苷酸序列比对, 使用 bootstrap 法检验(检验次数为 1 000), 进化模型选用 maximum composite likelihood, 构建系统发育树。

表3 实验菌株生化及保守序列鉴定结果

Table 3 Identification results of test strains

Number	Biolog	16S rRNA (similar values, %)	<i>recA</i> (similar values, %)
ATCC 25416	<i>B. pyrrocinia/cepacia</i>	<i>B. cepacia</i> (99.93)	<i>B. cepacia</i> (99.79)
ATCC BAA-245	<i>B. cenocepacia</i>	<i>B. contaminans</i> (99.71)	<i>B. cenocepacia</i> (99.89)
ATCC BAA-246	<i>B. dolosa</i>	<i>B. dolosa</i> (99.86)	<i>B. dolosa</i> (99.79)
ATCC BAA-247	<i>B. multivorans</i>	<i>B. multivorans</i> (100.00)	<i>B. multivorans</i> (99.79)
CICC 23882	<i>B. contaminans</i>	<i>B. lata</i> (99.93)	<i>B. contaminans</i> (99.70)
CMCC(B) 23005	<i>B. pyrrocinia/cepacia</i>	<i>B. territorii</i> (99.79)	<i>B. cepacia</i> (99.80)
CMCC(B) 23006	<i>B. dolosa</i>	<i>B. cepacia</i> (99.72)	<i>B. cenocepacia</i> (100.00)
CMCC(B) 23010	<i>B. ambifaria/cepacia</i>	<i>B. arboris</i> (99.79)	<i>B. lata</i> (98.40)
CGMCC 1.2872	<i>B. stabilis/cepacia</i>	<i>B. pyrrocinia</i> (99.93)	<i>B. stabilis</i> (99.80)
CGMCC 1.2982	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i> (99.86)	<i>B. vietnamiensis</i> (99.70)
CGMCC 1.10511	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>viburni</i>	<i>B. ambifaria</i> (99.86)	<i>B. ambifaria</i> (98.91)
CGMCC 1.3816	<i>B. ambifaria/cepacia</i>	<i>B. ambifaria</i> (99.93)	<i>B. ambifaria</i> (100.00)

在此基础上, 进一步分析 Bcc 不同种的 *hutC* 基因序列, 在 MEGA 12 中找出 27 个种水平成员种内的共识序列(consensus sequence), 随后将这些共识序列进行比对, 获取多态性位点的信息, 从而寻找可用于 Bcc 种水平区分的位点。

## 2 结果与分析

### 2.1 标准菌株的鉴定结果

采用常规细菌鉴定方法对 Bcc 标准菌株进行鉴定(表 3)。*recA* 序列分析基本能将 Bcc 标准菌株准确鉴定至菌种水平, CMCC(B) 23010 的序列比对结果为 *B. lata* (98.40%)。CGMCC 1.3816 的比对结果为 *B. ambifaria*, 与保藏中心给出的 *B. pyrrocinia* 不符, 推测原因可能是保藏中心未能依据分类学变化及时更新菌种名称。Biolog 生化鉴定将 CGMCC 1.10511 鉴定为假单胞菌属, 其他标准菌株仅能鉴定至 Bcc 菌群水平, 其中 ATCC BAA-245、ATCC BAA-246、ATCC BAA-247、CICC 23882、CGMCC 1.2982 可鉴定至种水平。16S rRNA 基因序列分析均能将标准菌株鉴定至 Bcc 菌群水平, 但由于 Bcc 菌种间的 16S rRNA 基因序列相似性较高, 无法准确鉴定至种水平。

## 2.2 对 Bcc 组氨酸利用阻遏物氨基酸序列的系统发育分析

对 Bcc 种成员及其近缘菌种 (*Burkholderia* 中的非 Bcc 种以及 *Paraburkholderia* 种成员代表) 的 HutC 蛋白氨基酸序列进行系统发育分析, 构建最大似然树(图 1)并计算遗传距离。Bcc 种成员间 HutC 蛋白氨基酸序列的一致性为 85.72%–99.54%, 而 Bcc 与非 Bcc HutC 蛋白的氨基酸序列一致性远低于 85.00%。系统发育分

析结果表明, Bcc 种水平成员聚类至同一进化分支的 bootstrap 值较高, 提示 HutC 蛋白在 Bcc 种成员间相对保守, 其编码基因可作为区分 Bcc 与非 Bcc 的靶标。

## 2.3 对 *hutC* 基因扩增引物和扩增条件的考察

使用表 2 中的引物对 P1、P2 对 ATCC 25416 的 *hutC* 基因进行 PCR 扩增, 电泳检测时均可在相应位置获得特异性扩增条带, 确定退

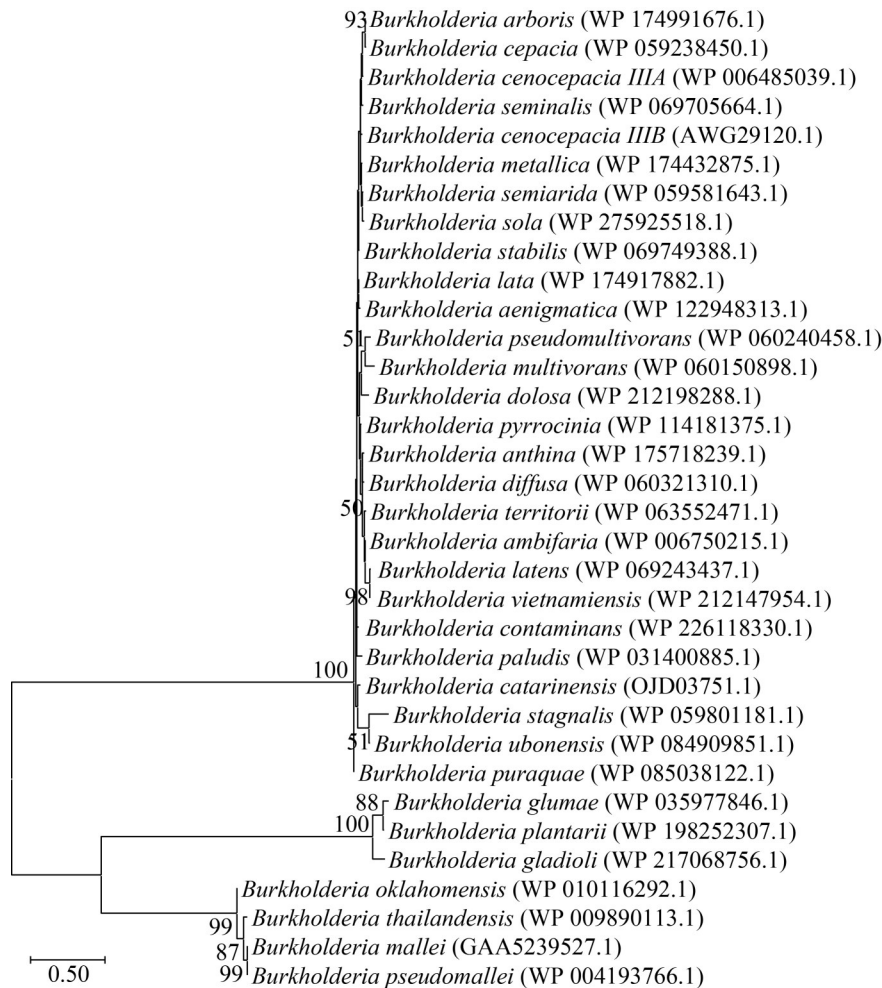


图1 Bcc及其近缘菌种组氨酸利用阻遏物C氨基酸序列系统发育最大似然树。显示自展值大于50%, 每条序列的登记号在括号中显示。

Figure 1 Maximum likelihood phylogenetic tree of the *hutC* histidine utilization repressor amino acid sequences from Bcc and closely related species. Bootstrap values >50% are shown, and the accession number of each sequence is shown in parentheses.

火温度为 54.0 °C。在该退火温度下对表 1 中的试验菌株进行 *hutC* 基因 PCR 扩增, ATCC BAA-245 和 CMCC(B) 23006 无法获得稳定的特异性扩增(数据未展示)。使用引物对 P3、P4 对 ATCC BAA-245 的 *hutC* 基因进行 PCR 扩增, 由电泳检测结果可知(图 2), 引物对 P3 在退火温度为 48.0–55.0 °C 时, 随着温度升高, 除在目标片段大小处有扩增外, 在大于 2 000 bp 处存在一条非特异性扩增条带; 引物对 P4 在退火温度

为 50.7、49.3、48.5、48.0 °C 时, 除在目标片段大小处有扩增外, 在 2 000 bp 和 500 bp 左右存在非特异性扩增, 当退火温度继续升高, 非特异性扩增逐渐减弱, 直至无明显扩增条带。因此, 在后续试验中选择 55.0 °C 作为 *hutC* 基因的 PCR 退火温度。使用引物对 P4, 以表 1 中的 Bcc 菌株作为模板进行 *hutC* 基因扩增, 扩增产物电泳结果如图 3 所示, 各试验菌株在 700 bp 大小附近均呈现特异性扩增。

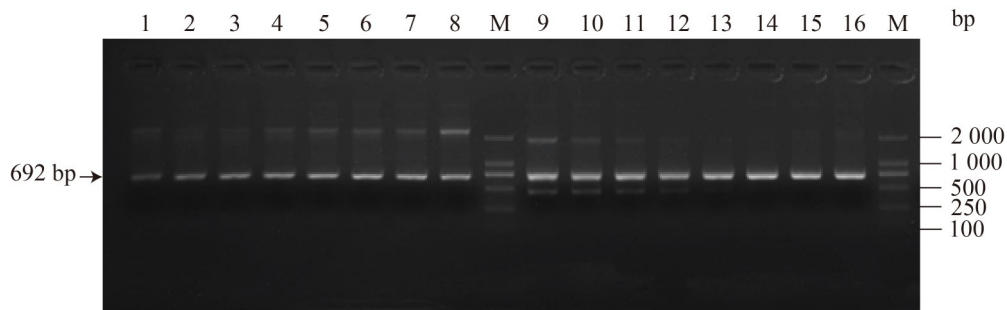


图2 PCR反应退火温度考察。引物对P3对应泳道1–8, 依次为退火温度48.0、48.5、49.3、50.7、52.3、53.6、54.5、55.0 °C; 引物对P4对应泳道9–16, 顺序同泳道1–8; M: DNA marker。

Figure 2 The annealing temperature of PCR reactions was investigated. For primer pair P3, lanes 1–8 corresponded to annealing temperatures of 48.0, 48.5, 49.3, 50.7, 52.3, 53.6, 54.5 and 55.0 °C, respectively. For primer pair P4, samples 9–16 corresponded to the same annealing temperatures as samples 1–8. M represents the DNA marker.

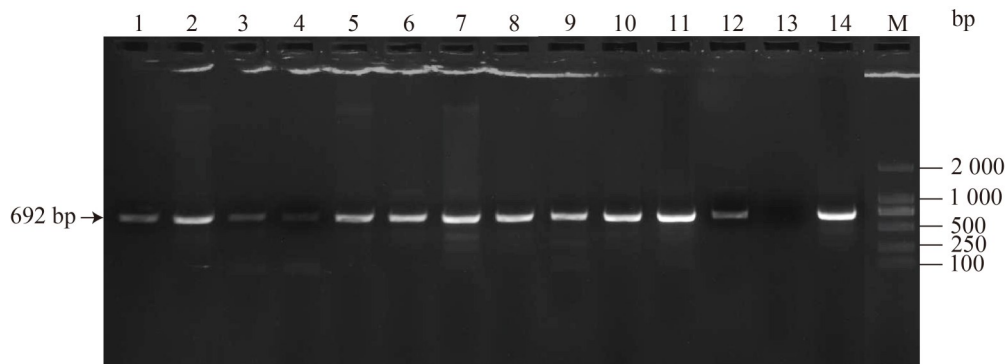


图3 试验菌株*hutC*基因扩增电泳检测结果

Figure 3 PCR amplification and electrophoresis detection results of *hutC* gene in test strains. M represents the marker; Lanes 1–14 corresponded to ATCC 25416, CMCC(B) 23005, CMCC(B) 23006, ATCC BAA-246, ATCC BAA-245, CMCC(B) 23010, CGMCC 1.2982, CGMCC 1.2872, ATCC BAA-247, CGMCC 1.3816, CGMCC 1.10511, CICC 24958, Negative control, and CICC 23882, respectively.

### 2.4 对 *hutC* 基因应用于 Bcc 种水平鉴定的验证

将扩增后的 *hutC* 基因序列在 NCBI 进行比对(表 4), 12 株标准菌株中有 11 株与保藏中心提供的种水平名称一致, 且比对相似度均大于 99.00%, 说明 *hutC* 序列对 Bcc 种水平的鉴定结果准确; CGMCC 1.3816 的比对结果为 *B. ambifaria*, 与 *recA* 鉴定结果一致。

将测序所得试验菌株的 *hutC* 基因序列与 NCBI 中 Bcc 27 个菌种共 80 株菌株的 *hutC* 序列共同构建系统发育邻接树, 每个菌种均选取其模式菌株(type strain), 另根据数据库实际情况选择同种水平的其他非模式菌株(图 4)。通过遗传

表4 试验菌株*hutC*序列比对结果

Table 4 Sequences alignment results of *hutC* gene in test strains

Strain number	<i>hutC</i> (similar values, %)
ATCC 25416	<i>B. cepacia</i> (100.00)
ATCC BAA-245	<i>B. cenocepacia</i> (99.71)
ATCC BAA-246	<i>B. dolosa</i> (100.00)
ATCC BAA-247	<i>B. multivorans</i> (100.00)
CICC 23882	<i>B. contaminans</i> (100.00)
CMCC(B) 23005	<i>B. cepacia</i> (100.00)
CMCC(B) 23006	<i>B. cenocepacia</i> (100.00)
CMCC(B) 23010	<i>B. aenigmatica</i> (99.71)
CGMCC 1.2872	<i>B. stabilis</i> (100.00)
CGMCC 1.2982	<i>B. vietnamiensis</i> (100.00)
CGMCC 1.10511	<i>B. ambifaria</i> (99.57)
CGMCC 1.3816	<i>B. ambifaria</i> (100.00)

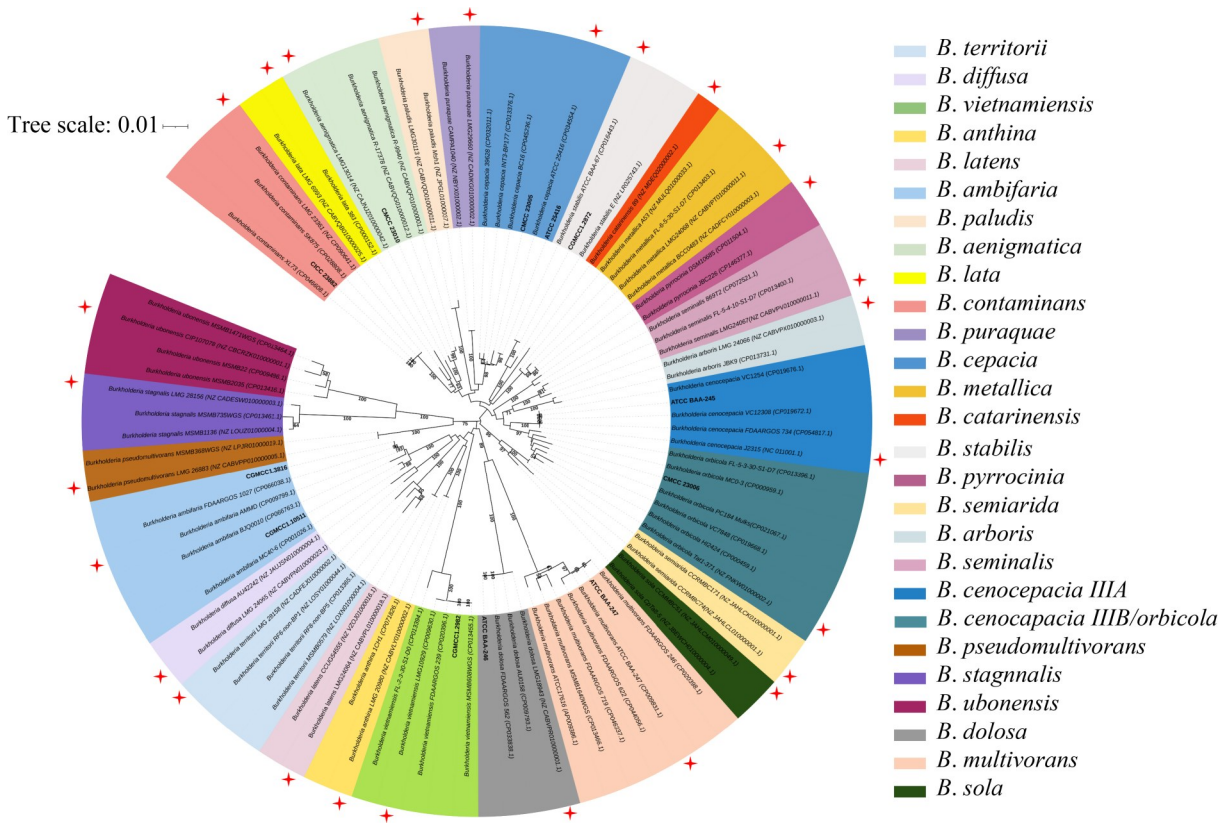


图4 Bcc不同种水平菌株*hutC*序列系统发育树。显示自展值大于50%, 不同颜色代表不同Bcc种水平分类单元, 模式菌株以+标识, 试验菌株以加粗字体显示。

Figure 4 Phylogenetic tree of *hutC* sequences at different Bcc species levels. Bootstrap values above 50% are shown, and different colors represent different Bcc species-level taxa. Type strains are indicated in +, and the tested strains are indicated in bold.

距离计算, 不同 Bcc 种间相似性最大为 97%, 种内相似性为 98%–100%。系统发育树表明, Bcc 同种水平的不同菌株均以较高的自展值 (bootstrap value) 聚类至同一分支, 不同种水平间区分良好。自测获得的 12 株 Bcc 试验标准菌株的 *hutC* 序列也均可聚类至相应的种水平分支中。上述结果表明, *hutC* 基因序列在 Bcc 种内保守性较好, 可应用于 Bcc 的种水平鉴定。当进行溯源分析时, 在完成种水平的鉴定后通过进一步对比污染菌的 *hutC* 基因序列, 如和目标菌的序列不同则可以排除其为污染源; 如和目标菌的序列相同, 虽不能肯定其为污染源, 但为进一步的溯源分析明确了方向。

## 2.5 *hutC* 基因序列中用于 Bcc 种水平鉴定的特征碱基条码

鉴于 *hutC* 基因可作为 Bcc 种水平鉴定的一

个有效看家基因靶点, 通过对 Bcc 种水平菌株 *hutC* 基因的比对可寻找出特征性位点, 实现在不构建系统发育树的情况下识别 Bcc 的不同种。

按照 1.8 节方法检测出 *hutC* 基因的 211 个多态性位点, 对其中具备种水平区分能力的位点进行分析, 最终筛选出 12 个位点, 它们包含在 *hutC* 序列 192 bp 区域内, 分别位于位点 456、459、478、481、482、498、506、523、546、569、579、647 (表 5)。这些位点上的核苷酸组合成一个 12 位的碱基代码, 从而能够区分 27 种 Bcc。表 6 对 Bcc 不同种在这 12 个碱基组成的特征条码中的碱基差异进行了统计, 结果表明 27 个种间的碱基总差异数目为 3 448 个, 每个物种之间的平均错配数为 4.91 (范围在 3.80–7.00), 这表明即便未来会有新的 Bcc 种成员被发现和命名, 这 12 个

表5 *hutC*基因序列中用于Bcc种水平鉴定的特征碱基条码

Table 5 Characteristic base barcode in *hutC* gene sequences for identifying Bcc at the species level

Name of Bcc species	Single nucleotide polymorphism (SNP) sites (relative to the full-length <i>hutC</i> sequence)											
	456	459	478	481	482	498	506	523	546	569	579	647
<i>B. cepacia</i>	C	T	C	G	T	G	A	T	G	G	G	T
<i>B. cenocepacia</i>	C	C	G	G	C	G	A	T	C	G	G	T
<i>B. arboris</i>	C	C	C	G	C	G	T	T	T	C	G	T
<i>B. seminalis</i>	C	C	C	A	C	G	A	T	C	T	G	T
<i>B. pyrrocinia</i>	C	T	C	A	C	G	A	T	C	G	G	T
<i>B. stabilis</i>	M	C	C	A	C	G	T	T	C	G	G	T
<i>B. metallica</i>	C	C	C	A	C	G	A	T	G	G	G	T
<i>B. aenigmatica</i>	C	T	C	G	T	G	A	T	G	G	A	T
<i>B. lata</i>	C	Y	C	G	T	G	A	T	G	G	G	A
<i>B. contaminans</i>	C	C	C	G	T	G	T	T	G	G	G	A
<i>B. purquae</i>	C	C	C	G	T	A	A	G	G	G	G	T
<i>B. paludis</i>	C	T	C	G	T	G	T	G	C	G	C	T
<i>B. pseudomultivorans</i>	G	T	C	A	C	A	T	T	C	T	G	T
<i>B. diffusa</i>	M	A	C	G	C	A	T	T	G	G	G	T
<i>B. territorii</i>	C	A	G	G	T	A	T	T	G	G	G	T
<i>B. ambifaria</i>	C	A	C	G	C	A	T	T	C	G	G	T
<i>B. anthina</i>	G	A	C	A	C	A	T	T	C	G	G	T
<i>B. latens</i>	G	A	C	A	C	A	T	T	G	G	G	T
<i>B. dolosa</i>	C	A	C	G	C	G	A	T	C	G	G	T
<i>B. multivorans</i>	C	M	M	C	A	G	A	G	C	C	G	T
<i>B. vietnamiensis</i>	C	T	G	G	T	A	T	C	C	G	A	T
<i>B. stagnalis</i>	C	C	G	C	A	G	A	T	G	A	G	T
<i>B. ubonensis</i>	G	C	C	R	G	G	A	S	C	A	G	T
<i>B. catarinensis</i>	C	C	C	G	C	G	A	G	G	G	G	T
<i>B. sola</i>	C	T	C	A	C	G	A	C	C	G	G	T
<i>B. semiarida</i>	C	C	C	A	C	G	A	G	C	G	G	T
<i>B. orbicola</i>	C	C	C	A	C	G	A	T	C	G	G	T

Y: T/C; M: A/C; S: G/C; R: A/G.

表6 Bcc各个种之间在特征碱基条码中的差异碱基数目统计

Table 6 Statistics of differential base numbers among Bcc species in the characteristic barcode of *hutC* gene sequence

Number	Name of Bcc species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	总数 Total		
1	<i>B. cepacia</i>	/																													
2	<i>B. cenocepacia</i>	4	/																												
3	<i>B. arboris</i>	4	4	/																											
4	<i>B. seminalis</i>	5	4	4	/																										
5	<i>B. pyrrocinia</i>	3	3	2	2	/																									
6	<i>B. stabilis</i>	5	3	3	2	2	/																								
7	<i>B. metalica</i>	3	3	4	2	2	2	/																							
8	<i>B. aenigmatica</i>	1	5	6	5	4	6	4	/																						
9	<i>B. lata</i>	1	4	5	5	4	5	3	2	/																					
10	<i>B. contaminans</i>	3	5	4	6	6	4	4	4	1	/																				
11	<i>B. purquae</i>	3	5	6	6	6	6	4	4	3	4	/																			
12	<i>B. paludis</i>	4	6	6	7	6	5	7	4	5	5	5	/																		
13	<i>B. pseudomultivorans</i>	7	5	6	3	4	4	6	8	8	8	8	7	/																	
14	<i>B. diffusa</i>	4	5	4	4	5	4	4	5	5	4	4	6	5	/																
15	<i>B. territorii</i>	4	5	6	7	7	6	6	5	5	4	4	6	7	2	/															
16	<i>B. ambifaria</i>	5	4	4	5	4	3	5	6	6	5	5	5	4	1	3	/														
17	<i>B. anthina</i>	7	6	6	5	4	3	5	8	8	7	7	7	2	3	5	3	/													
18	<i>B. latens</i>	6	7	6	6	7	4	4	7	7	6	6	8	3	2	4	3	1	/												
19	<i>B. dolosa</i>	3	2	4	3	2	3	3	4	4	5	5	5	6	3	5	2	4	5	/											
20	<i>B. multivorans</i>	6	5	5	4	5	5	5	7	6	7	5	6	8	7	8	6	7	8	4	/										
21	<i>B. vietnaminans</i>	6	6	8	9	7	7	9	5	7	7	6	4	7	6	4	5	7	8	8	9	/									
22	<i>B. stagnalis</i>	5	4	6	5	6	6	4	6	5	6	6	9	9	7	6	8	9	8	6	4	9	/								
23	<i>B. ubonensis</i>	6	5	6	4	5	5	5	7	6	7	5	6	6	6	8	9	7	6	6	5	3	8	6	/						
24	<i>B. catarinensis</i>	3	3	4	4	4	4	2	4	3	4	2	5	8	4	6	5	7	6	3	4	8	5	4	/						
25	<i>B. sola</i>	4	4	6	3	1	3	3	5	5	7	6	5	5	6	8	5	5	6	3	5	6	7	4	4	/					
26	<i>B. semiarida</i>	5	3	5	2	2	2	2	6	5	6	4	5	6	6	8	5	6	6	3	3	8	6	3	2	2	/				
27	<i>B. orbicola</i>	4	2	4	1	1	1	1	5	4	5	5	6	5	5	7	4	4	5	2	4	8	5	4	3	2	1	/			
总数 Total		111	112	128	113	104	103	102	133	122	134	130	150	155	119	147	118	142	145	102	146	182	163	146	111	120	112	98	3 448		
均值 Average value		4.3	4.3	4.9	4.3	4.0	4.0	3.9	5.1	4.7	5.2	5.0	5.8	6.0	4.6	5.7	4.5	5.5	5.6	3.9	5.6	7.0	6.3	5.6	4.3	4.6	4.3	3.8	4.91		

核苷酸组成的特征条码仍然在较大概率上对 Bcc 有较好的种水平区分效果。

### 3 讨论与结论

目前,《中国药典》和 USP 对 Bcc 的检查结果判断时的鉴定要求均为菌群水平,商品化的鉴定方法如生化法和 MALDI-TOF MS 对于 Bcc 菌种水平的鉴定效果不佳<sup>[21-23]</sup>。虽然通常 16S rRNA 基因序列分析被认为是细菌鉴定的“金标准”,但由于 Bcc 种间 16S rRNA 基因序列的相似性在 98.3%–99.3% 之间<sup>[23]</sup>,16S rRNA 基因序列分析也无法对 Bcc 进行准确的种间区分。目前使用看家基因的序列分析和限制性片段长度多态性分析通常可得到较准确的 Bcc 种水平鉴定结果<sup>[17]</sup>。例如,应用最为广泛的 *recA* 基因,有文献报道其在 Bcc 成员间的相似值为 94.2%–95.6%,而种内的相似值为 98.0%–99.0%<sup>[24]</sup>。然而随着 Bcc 分类的发展,研究者发现部分种的 *recA* 序列相似性较高,仅依靠 *recA* 序列分析获得准确的种水平鉴定存在一定难度<sup>[25]</sup>。

*hutC* 基因于 20 世纪 70 年代首次在肠道细菌中被发现,第一个 *hutC* 基因的完整核苷酸序列是由 Allison 等于 1990 年从恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 中获得<sup>[26]</sup>。目前,对细菌中 *hutC* 基因的研究主要集中在其功能性方面。*hutC* 基因除了调节组氨酸的代谢外,还与细菌毒力、生物膜形成、氮源代谢以及运动性等功能有关<sup>[20,27]</sup>。对伯克霍尔德菌属的分子信标和系统发育研究发现, Bcc 的 *hutC* 基因相对非 Bcc 有 2 个碱基的插入<sup>[28]</sup>,尚未见有利用 *hutC* 基因进行 Bcc 种水平鉴定的研究。本研究首先对 *hutC* 基因的编码蛋白进行了系统发育分析,证明其在 Bcc 菌群与非 Bcc 间相对保守;在此基础上设计了 *hutC* 基因的扩增引物,考察并优化了 PCR 反应条件,以标准菌株为模板,对 12 株 Bcc 菌株的 *hutC* 基因进行了扩增、测序;并将测序结果与从 NCBI 下载的 27 个种的 Bcc 代表菌株的 *hutC* 基因序列进行系统发

育分析,证明 *hutC* 基因对 Bcc 种成员间的区分效果良好,利用 *hutC* 基因可实现对 Bcc 种水平的准确鉴定。在上述工作的基础上,通过对 Bcc *hutC* 基因单核苷酸多态性位点的分析最终选择序列中部靠近 3' 端的 12 个核苷酸位点组成了 Bcc 种水平特征条码,可用于 Bcc 的快速种水平确定。

目前,USP 和《中国药典》收录的 Bcc 检查法在结果判断环节均要求进行菌群水平的确认。通过常规鉴定方法,如 MALDI-TOF MS、16S rRNA 基因序列分析等可以实现此目标。当对生产过程和终产品中污染的 Bcc 进行溯源调查时则需要对污染微生物进行菌种乃至菌株水平的鉴定。应用单一看家基因的序列分析或者联合多基因位点序列分析能够满足相应要求。本研究证明,*hutC* 基因可作为 Bcc 种水平鉴定的新的看家基因靶点,可应用于药品终产品和生产过程中 Bcc 污染溯源时种水平的准确鉴定。

### 作者贡献声明

余萌:数据收集和分析,实验验证,论文撰写;王似锦:论文修改,分析指导;张迅迪:部分实验验证,论文修改;马仕洪:分析指导,论文审阅,项目管理。

### 作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

### 参考文献

- [1] PALLERONI NJ, HOLMES B. *Pseudomonas cepacia* sp. nov., nom. rev. [J]. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 1981, 31(4): 479-481.
- [2] YABUUCHI E, KOSAKO Y, OYAIZU H, YANO I, HOTTA H, HASHIMOTO Y, EZAKI T, ARAKAWA M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. [J]. Microbiology and Immunology, 1992,

- 36(12): 1251-1275.
- [3] VANDAMME P, HOLMES B, VANCANNEYT M, COENYE T, HOSTE B, COOPMAN R, REVETS H, LAUWERS S, GILLIS M, KERSTERS K, GOVAN JR. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov.[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1997, 47(4): 1188-1200.
- [4] JIN Y, ZHOU JL, ZHOU J, HU MD, ZHANG Q, KONG N, REN HG, LIANG L, YUE JJ. Genome-based classification of *Burkholderia cepacia* complex provides new insight into its taxonomic status[J]. *Biology Direct*, 2020, 15(1): 6.
- [5] VELEZ LS, ABURJAILE FF, FARIAS ARG, BAI ADB, OLIVEIRA WJ, SILVA AMF, BENKO-ISEPPON AM, AZEVEDO V, BRENIG B, HAM JH, SOUZA EB, GAMA MAS. *Burkholderia semiarida* sp. nov. and *Burkholderia sola* sp. nov., two novel *B. cepacia* complex species causing onion sour skin[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2023, 46(3): 126415.
- [6] MORALES-RUIZ LM, RODRÍGUEZ-CISNEROS M, KERBER-DÍAZ JC, ROJAS-ROJAS FU, IBARRA JA, ESTRADA-DE LOS SANTOS P. *Burkholderia orbicola* sp. nov., a novel species within the *Burkholderia cepacia* complex[J]. *Archives of Microbiology*, 2022, 204(3): 178.
- [7] MAHENTHIRALINGAM E, URBAN TA, GOLDBERG JB. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(2): 144-156.
- [8] TORBECK L, RACCASI D, GUILFOYLE DE, FRIEDMAN RL, HUSSONG D. *Burkholderia cepacia*: this decision is overdue[J]. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 2011, 65(5): 535-543.
- [9] CHIARINI L, BEVIVINO A, DALMASTRI C, TABACCHIONI S, VISCA P. *Burkholderia cepacia* complex species: health hazards and biotechnological potential[J]. *Trends in Microbiology*, 2006, 14(6): 277-286.
- [10] SUTTON S, JIMENEZ L. A review of reported recalls involving microbiological control 2004 – 2011 with emphasis on FDA considerations of “objectionable organisms” [J]. *American Pharmaceutical Review*, 2012, 15(1): 42-57.
- [11] JIMENEZ L. Microbial diversity in pharmaceutical product recalls and environments[J]. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 2007, 61(5): 383-399.
- [12] USP Convention. <60> Microbiological Examination of Nonsterile Productstests for *Burkholderia Cepaica* Complex[S]. USA: UnitedStates Pharmacopieial Convention, 2021: 6454-6457.
- [13] 国家药典委员会. 中国药典: 四部 1109 洋葱伯克霍尔德菌群检查法[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2025. Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia: General Notices 1109, Test for *Burkholderia cepacia* complex[S]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2025.
- [14] 国家药典委员会. 中国药典: 四部 9204 微生物鉴定指导原则[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020. Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia: General Notices 9204, Guiding Principles for Microbial Identification[S]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020.
- [15] 余萌, 王似锦, 马仕洪. 洋葱伯克霍尔德菌群(Bcc)的分类鉴定研究进展[J]. *中国药事*, 2022, 36(7): 758-771. YU M, WANG SJ, MA SH. Advances in taxonomy and identification of *Burkholderia cepacia* complex[J]. *Chinese Pharmaceutical Affairs*, 2022, 36(7): 758-771 (in Chinese).
- [16] TABACCHIONI S, FERRI L, MANNO G, MENTASTI M, COCCHI P, CAMPANA S, RAVENNI N, TACCETTI G, DALMASTRI C, CHIARINI L, BEVIVINO A, FANI R. Use of the *gyrB* gene to discriminate among species of the *Burkholderia cepacia* complex[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 281(2): 175-182.
- [17] MAHENTHIRALINGAM E, BISCHOF J, BYRNE SK, RADOMSKI C, DAVIES JE, AV-GAY Y, VANDAMME P. DNA-Based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38(9): 3165-3173.
- [18] PAPAEO MC, PERRIN E, MAIDA I, FONDI M, FANI R, VANDAMME P. Identification of species of the *Burkholderia cepacia* complex by sequence analysis of the *hisA* gene[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2010, 59(Pt 10): 1163-1170.
- [19] SUVOROVA IA, KOROSTELEV YD, GELFAND MS. GntR family of bacterial transcription factors and their DNA binding motifs: structure, positioning and co-evolution[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0132618.
- [20] LI YY, SUN WD, WANG Q, YU Y, WAN Y, ZHOU K, GUO R, HAN XG, CHEN ZG, FANG WH, JIANG W. The GntR-like transcriptional regulator HutC involved in motility, biofilm-forming ability, and virulence in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2022, 167: 105546.
- [21] MCMENAMIN JD, ZACCONE TM, COENYE T, VANDAMME P, LIPUMA JJ. Misidentification of *Burkholderia cepacia* in US cystic fibrosis treatment centers[J]. *Chest*, 2000, 117(6): 1661-1665.
- [22] HENRY DA, MAHENTHIRALINGAM E, VANDAMME P, COENYE T, SPEERT DP. Phenotypic methods for determining genomovar status of the *Burkholderia cepacia* complex[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39(3): 1073-1078.

- [23] COENYE T, LIPUMA JJ, HENRY D, HOSTE B, VANDEMEULEBROECKE K, GILLIS M, SPEERT DP, VANDAMME P. *Burkholderia cepacia* genomovar VI, a new member of the *Burkholderia cepacia* complex isolated from cystic fibrosis patients[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 51(Pt 2): 271-279.
- [24] COENYE T, MAHENTHIRALINGAM E, HENRY D, LIPUMA JJ, LAESENS S, GILLIS M, SPEERT DP, VANDAMME P. *Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 51(Pt 4): 1481-1490.
- [25] VANLAERE E, BALDWIN A, GEVERS D, HENRY D, DE BRANDT E, LIPUMA JJ, MAHENTHIRALINGAM E, SPEERT DP, DOWSON C, VANDAMME P. Taxon K, a complex within the *Burkholderia cepacia* complex, comprises at least two novel species, *Burkholderia contaminans* sp. nov. and *Burkholderia lata* sp. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59(Pt 1): 102-111.
- [26] ALLISON SL, PHILLIPS AT. Nucleotide sequence of the gene encoding the repressor for the histidine utilization genes of *Pseudomonas putida*[J]. Journal of Bacteriology, 1990, 172(9): 5470-5476.
- [27] BENDER RA. Regulation of the histidine utilization (hut) system in bacteria[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2012, 76(3): 565-584.
- [28] SAWANA A, ADEOLU M, GUPTA RS. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus *Burkholderia*: proposal for division of this genus into the emended genus *Burkholderia* containing pathogenic organisms and a new genus *Paraburkholderia* gen. nov. harboring environmental species[J]. Frontiers in Genetics, 2014, 5: 429.