

· 论 著 ·

一株多重耐药铜绿假单胞菌的双整合子基因结构分析

林瑜

摘要:目的 检测临床多重耐药铜绿假单胞菌的整合子,并进行结构及定位分析。方法 PCR 扩增耐药基因和整合子、电泳回收 DNA 片段并进行序列比对分析。结果 在一株多重耐药铜绿假单胞菌(PAVim2)中检测到双整合子,其中一个为 I 类整合子,一个为 Tn402 样的 I 类整合子,两者基因结构为 5' CS-IntI-sul1-3' CS 和 5' CS-IntI-Vim2-Rh506。结论 双整合子结构的发现为铜绿假单胞菌多重耐药研究有临床意义。

关键词:铜绿假单胞菌;整合子;基因结构

中图分类号:R378.99[†] 文献标识码:A 文章编号:1009-9727(2012)6-673-04

Analysis of gene structure of double integrons from a multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain.
LIN Yu.(Laboratory Department of Xuwen County Maternal and Child Health Care Hospital, Xuwen 524100, Guangdong P. R. China)

Abstract: Objective To detect the integron of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and analyze its structure and location. Methods Drug-resistant gene and integrons were amplified by PCR, DNA fragment was recovered from agar gel electrophoresis and sequence was analyzed. Results Two types of integrons were detected in the strain of multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (named PAVim2), one belonging to the class I integron with the structure 5'CS-IntI-sul1-3'CS, another one was a Tn402-like class I integron with the structure 5'CS-IntI-Vim2-Rh506. Conclusion The identification of a double-integrons multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* is of clinically significant in the research of this bacterium.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; Integron; Gene structure

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, PA) 是临床标本中最多见的条件致病菌,长期住院、大量应用广谱抗生素、应用呼吸机、留置导尿管、中性粒细胞缺乏和免疫抑制状态都是导致感染的危险因素。由 PA 引起的院内感染高达 30% 以上,而呼吸道感染率更高^[1]。PA 对多种抗菌药物天然耐药,可产生超广谱 β 内酰胺酶、碳青霉烯酶等,耐药机制复杂,表现为多重耐药,给临床治疗带来极大困难^[2-3]。传统认为耐药基因通过质粒、转座子水平传递,而抗生素耐药机制的分子特征新进展阐明了整合子基因结构的存在^[4],本研究通过使用金属酶基因和整合酶基因交叉扩增 (PCR) 及 PCR 产物测序,检测临床多重耐药铜绿假单胞菌的整合子,并进行结构分析。

1 材料与方法

1.1 实验菌株 铜绿假单胞菌(命名为:PAVim2)于 2011 年 5 月分离自徐闻县妇幼保健院内科住院患者的痰标本,菌株的种属鉴定采用法国梅里埃 VITEK-2 全自动细菌鉴定仪进行。质控菌为铜绿假单胞菌 ATCC27853 来自卫生部临床检验中心。MH 营养琼脂

购自江门市凯林贸易有限公司;抗生素购自广东省药品检验所。药敏试验参照美国临床实验室标准化委员会(CLSI 2010)操作规程进行。

1.2 PCR 反应体系建立 设计 PCR 反应引物,共设计两对引物,其中整合子引物序列如下:IntI-F 5' - GGGTCAAGGATCTGGATTTCG-3' IntI-R 5' - ACA TGCGTGTAATCATCGTCG-3' ;金属酶基因引物序列如下:Vim2F 5' - AAAGTTATGCCGCACTCACC-3' Vim2R 5' - TGTTATGCCGCATCTGCCT-3' ;另外设计两个引物 3CS5' - AAGCAGACTTGACCTGA-3' , Rh5065' - TTCAGCCGCATAAATGGAG-3' 。

1.3 扩增金属酶基因片段和整合子基因扩增 使用已经设计好的引物 Vim2F 和 Vim2R 作为金属酶基因片段扩增的引物以及使用 Int-F 和 Int-R 作为整合酶基因片段扩增的引物,对 PAVim2 菌株的总 DNA 以及质粒 DNA 进行金属酶基因片段以及整合酶基因片段扩增。反应结束后,取 PCR 产物 1 μ L 使用 10g/L 琼脂糖凝胶进行电泳,以 Goldenview 进行染色,用凝胶成像系统分析条带大小。

作者单位:徐闻县妇幼保健院检验科,广东 徐闻 524100

作者简介:林瑜(1971~),女,广东省徐闻县人,本科,主管检验师,主要从事微生物研究工作

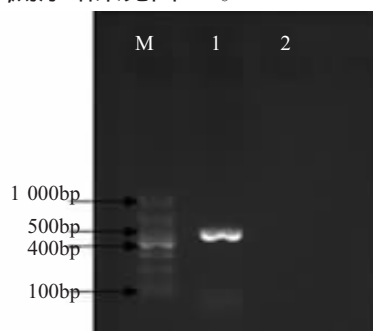
整合子可变区扩增(PCR)材料和方法基本同整合酶基因检测,PCR 反应中的延伸时间随扩增产物片段的长度不同而作调整。增加的引物 Rh506 和 3CS,均位于 I 型整合子可变区(基因盒区)的 3' 保守末端。PCR 反应分别使用引物 Int- R 和 Vim2R,Int- R 和 3CS、Int- R 和 Rh506,Vim2F 和 Rh506 进行不同片段的扩增。其他实验步骤均同金属酶基因检测。

1.4 DNA 测序 上述 PCR 反应产物中用引物 Int- R、3CS 所扩增出来的 PCR 产物,经过电泳分离后得到相预期的基因条带,按照广州东盛生物技术有限公司的胶回收试剂盒说明书对目的基因进行回收,并委托广州市英骏公司测序。序列结果在 GenBank 中用 BLAST 程序进行同源性比对分析。

2 结果

2.1 菌株耐药表型 体外药物敏感试验结果按 CLSI2009 标准进行判断。结果显示 PAVim2 菌株对环丙沙星、米诺环素、阿米卡星、头孢曲松、头孢哌酮一舒巴坦、头孢吡肟、头孢他啶、亚胺培南等多种 β -内酰胺类抗生素耐药。

2.2 金属酶基因和整合酶基因检测 使用引物 Int- F、Int- R 分别对 PAVim2 总 DNA 以及质粒 DNA 作 I 型整合子整合酶基因扩增,由实验结果可见在 PAVim2 总 DNA 中可以扩出目的基因片段,大小约为 484bp。在质粒 DNA 中未能扩出目的基因片段。电泳结果见图 1,测序结果见图 5A。



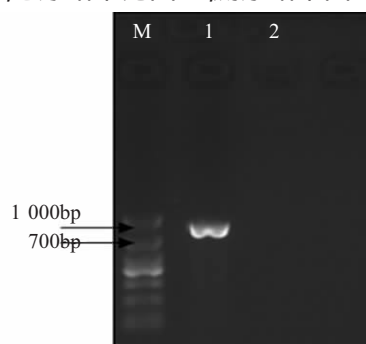
M: TakaRa 公司生产的 DL1 000DNA Maker;
Lane 1: 引物 Primer: IntF+IntR PCR 模板 template: PAVim2 总 DNA;
Lane 2: 引物 Primer: IntF+IntR PCR 模板 template: 质粒 DNA Plasmid DNA

图 1 整合酶 PCR 电泳图

Fig 1 PCR electrophoresis of integrated enzyme

用引物 Vim2F、Vim2R 分别对 PAVim2 总 DNA 以及质粒 DNA 进行金属酶基因扩增,由实验结果可见在 PAVim2 总 DNA 中可以扩出目的基因片段,大小约为 830bp。质粒 DNA 中未扩出目的基因片段。电泳结果见图 2,测序结果见图 5C。

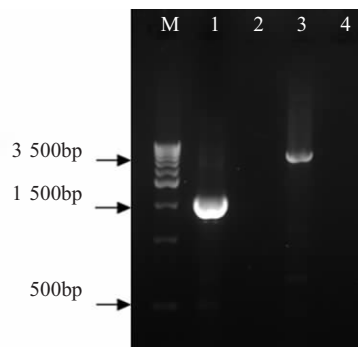
使用引物 Int- R 和 3CS 以及引物 Int- R 和 Rh506 分别对 PAVim2 总 DNA 以及质粒 DNA 进行整合子基因扩增,可见用 PAVim2 总 DNA 进行扩增均扩出相关的基因片段。使用引物 Int- R 和 3CS 扩出的片段大小约为 1400bp;引物 Int- R 和 Rh506 扩出的片段大小约为 3500bp,质粒 DNA 中均未扩出目的基因片段,电泳结果见图 3,测序结果图 5B。



M: TakaRa 公司生产的 DL1 000DNA Maker
Lane1: 引物 Primer: Vim2F+Vim2R PCR 模板 template: PAVim2 总 DNA
Lane2: 引物 Primer: Vim2F+Vim2R PCR 模板 template: 质粒 DNA Plasmid DNA

图 2 金属酶 PCR 电泳图

Fig 2 PCR electrophoresis of metal enzyme



M: 东盛生物有限公司 5000bp maker
Lane 1: 引物 Primer: IntR+3CS, 模板 template: PAVim2 总 DNA
Lane 2: 引物 Primer: IntR+3CS 模板 template: 质粒 DNA Plasmid DNA
Lane 3: 引物 primer: IntR+RH506, 模板 template: PAVim2 总 DNA
Lane 4: 引物 primer: IntR+RH506, 模板 template: 质粒 DNA Plasmid DNA

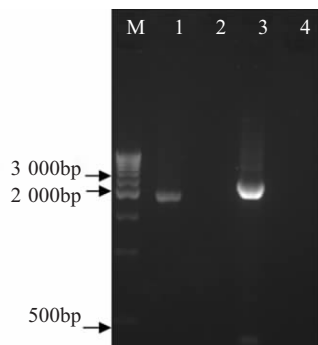
图 3 I 类整合子及 Tn402 样的 I 类整合子电泳图

Fig 3 Electrophoresis of integrin I and integrin Tn402

使用引物 Int- R 和 Vim2R 以及引物 Vim2R 和 Rh506 分别对 PAVim2 总 DNA 以及质粒 DNA 进行整合子基因扩增,由实验结果可见在 PAVim2 总 DNA 中可以扩出目的基因片段,使用引物 Int- R 和 Vim2R 扩出的片段大小约为 2500bp,使用引物 Vim2R 和 Rh506 扩出的片段大小约为 2000bp,质粒 DNA 中均未扩出目的基因片段,电泳结果见图 4。

2.3 整合子结构分析 用 PAVim2 总 DNA 作为 PCR 模板,使用 Int- R 以及 3CS 作为上下游引物扩增

出来的 PCR 产物测序结果进行基因型别确认, 得知该序列与 GenBank 登记号为 AF191564 (全长为 3843bp), 经分析后得出整合子结构如图 6: 用 PAVim2 总 DNA 作为 PCR 模板, 使用 Int- R 以及 Rh506 作为上下游引物扩增出来的 PCR 产物进行基因型别的确认, 得知该整合子已在 GenBank 上注册, 全长为 4449bp, 登记号为 AY943084, 经分析后得出整合子结构见图 7。



M: 东盛生物有限公司 5000bp maker

Lane1 :引物 Primer :VIM2R+RH506 模板 template :PAvim2 总 DNA

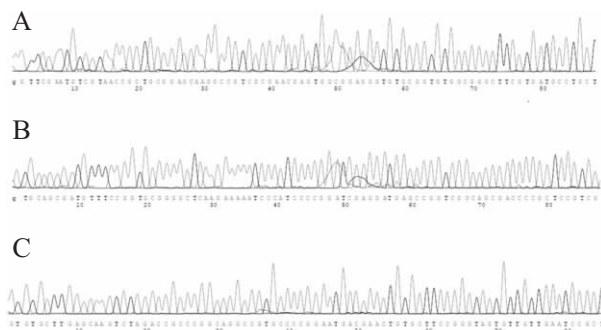
Lane2 :引物 Primer :VIM2R+RH506 模板 template :质粒 DNA Plasmid DNA

Lane3 :引物 Primer :IntR+VIM2R 模板 template :PAvim2 总 DNA

Lane4:引物 Primer :IntR+VIM2R 模板 template :质粒 DNA Plasmid DNA

图 4 整合子可变区电泳图

Fig4 the electrophoresis of the variable region of integron



A. IntI 测序峰型图 A. Peak sequence of IntI

B. 3CS 测序峰型图 B. Peak sequence of 3CS

C. Vim2 测序峰型图 C. Peak sequence of Vim2

图 5 部分测序结果图

Fig 5 Prt of sequencing results

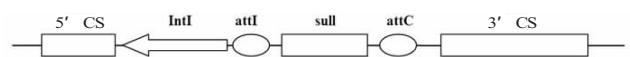


图 6 整合子结构简图 genbank AF191564

Fig 6 Integron structure of genbank AF191564



图 7 整合子结构简图 AY943084

Fig 7 Ingron structure of AY943084

3 讨论

随着临床抗生素的广泛使用, 不断出现细菌对新的抗生素耐药的现象。整合子(integron)由 Stokes 等^[5]于 1989 年首次提出, 具有捕获、切除、重排耐药基因盒的能力。并且能在启动子的控制下表达基因盒的能力。已有证据表明整合子是细菌发生水平基因转移和产生耐药机制的主要结构。

本实验首先通过药敏试验发现 PAVim2 对 IMP 及多种抗生素多重耐药, 进而以 PCR 检测 PAVim2 金属酶和整合子基因, 结果发现 vim2 和 intI 阳性。为分析 vim2 与整合子的关系, 试验进而以引物 Int- R、3CS 扩增 I 类整合子, PCR 获得约 2000bp 的产物, 其测序结果显示为 I 类整合子, 但不含 vim2 基因。于是实验再通过引物 Int- R、vim2R 扩增, 获得 2500bp 左右的条带, 测序结果显示为特异性扩增的产物, 而引物 vim2F、3CS 扩增无结果。说明 vim2 基因在 intI 的下游, 而不在 3CS 的上游; 为了解 vim2 基因所在整合子的下游序列情况, 通过查阅文献, 课题又以 vim2F 为上游引物, Rh506 为下游引物进行扩增, 结果获得 2000bp 左右的条带, 测序显示为特异性扩增产物。同时, 以 Int- R、Rh506 也扩增到 3500bp 左右的目的条带, 以其为模板用 vim2F、vim2R 扩增到 830bp 的目的条带, 说明 vim2 基因确实位于该整合子中。

已知整合子可位于质粒或细菌基因组上, 为了解整合子的定位情况, 进行 PCR 检测碱裂解法提取 PAVim2 菌株质粒的 IntI 和 Vim2 基因, 但结果均显示为阴性。由此可见, 该 PAVim2 菌株的质粒中不含 I 类整合子, 即双整合子均位于该菌株的基因组上。此外, 课题组还对另外 4 株非重复性多重耐药 PA 进行了质粒提取及 PCR 鉴定, 结果发现 intI 都存在于基因组而非质粒上, 这与杨伟青、贾文祥等^[6]报道的 intI 主要存在于质粒的结果不同。

综上, 本课题在一株多重耐药 PA 中检测到 I 类整合子及 Tn402 样的 I 类整合子, 并发现双整合子均位于细菌基因组上。双整合子多重耐药菌株的出现可能具有促进耐药基因水平转移的作用, 从而加大临床治疗难度。

参考文献:

- [1] Xiao Z, Wu J, Zhao LP. Analysis of 1055 drug resisitant bacteria [J]. J Chin Nosocomial Infection, 1998, 8: 117-120. (In Chinese)
- (肖征, 吴坚, 赵丽萍. 对 1055 株病原菌抗生素耐药性的分析[J]. 中华医院感染学杂志, 1998, 8: 117-120.)

- [2] Hou TW, Yin XL, Chen X, et al. Distribution of genotype of extended spectrum beta-lactamases-producing *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Chin J Lab Med 2003, 26(9): 546-548. (In Chinese)
(侯天文, 尹晓琳, 陈兴, 等. 绿脓假单胞菌超广谱 β -内酰胺酶基因型分布[J]. 中华检验医学杂志 2003, 26(9): 546-548.)
- [3] Wang H, Chen MJ. Carbapenemases: A bothering problem in the future[J]. CHIN J Intern Med 2003, 5(42): 354-356. (In Chinese)
(王辉, 陈民钧. 碳青霉烯酶: 未来困扰我们的难题[J]. 中华内科杂志 2003, 5(42): 354-356.)
- [4] Stove CK, Pham QX, Erwin AL, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: an opportunistic pathogen [J]. Nature 2000, 406(6799): 959-964.
- [5] Stokes H W, Hall R M. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons [J]. Mol Microbiol 1989, 3(12): 1669-1683.
- [6] Yang WQ, Jia WX, Yin CF, et al. Explanation and location of *Pseudomonas aeruginosa* category I-related gene [J]. Chin J Antibiotics 2007, 12(32): 12. (In Chinese)
(杨维青, 贾文祥, 殷长甫, 等. 铜绿假单胞菌 I 类整合子相关基因的解析和定位[J]. 中国抗生素杂志 2007, 12(32): 12)

收稿日期 2012-03-30 编辑 吴中菲

(上接第 672 页)

染轮状、杯状和腺病毒^[11]。越南的研究显示 30% 的 HAsV 患儿混合感染了轮状、诺如、札幌和腺病毒^[12]。方肇寅报道的 HAsV 和轮状病毒混合感染率 5.5%~55.3%^[9]。深圳市近年婴幼儿 HAsV 感染数据表明, HAsV 合并其他腹泻病毒的感染占阳性数的 59.38%, HAsV 和 RV 混合感染为主, 占 43.75%^[10]。混合感染的临床症状比单纯 HAsV 感染的要严重, 而且也给原发病因的确定带来了困难。

有研究表明星状病毒 1~8 型毒株的 ORF2 基因分为两个区域, 1~415 位氨基酸为高度保守区, 415 位之后的为高变区^[13]。本实验扩增区域位于 ORF2 基因的第 75~210 位氨基酸, 靠近 5' 端, 为其保守区域。与之前北京的一株星状病毒序列最为相似, 只有 1 个位点的核苷酸变异, 但由于密码子的简并性, 氨基酸并无改变。实验标本来自一位 1 岁儿童腹泻病例, 发病时间是 8 月份, 实验结果表明此病例也是一个混合感染者, 同时感染有腺病毒。这例病例的很多特征与上述文献中的报道类似。今后还将对更多腹泻病例的标本进行 HAsV 检测分析, 获取更多数据, 以便更好的反映出东莞市星状病毒感染流行的特点。

参考文献

- [1] Appleton H, Higgins PG. Viruses and gastroenteritis in infants [J]. Lancet 1975, 1(7919): 1297.
- [2] Guix S, Caballero S, Villena C, et al. Molecular Epidemiology of Astrovirus Infection in Barcelona Spain [J]. J Clin Microbiol 2002, 40(1): 133-139.
- [3] Marshall JA, Bruggink LD, Sturge K, et al. Molecular features of astrovirus associated with a gastroenteritis outbreak in an aged-care centre[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2007, 26(1): 67-71.
- [4] Guix S, Bosch A, Pinto RM. Human astrovirus diagnosis and typing: current and future prospects [J]. Lett Appl Microbiol 2005, 41(2): 103-105.
- [5] Belliot G, Laveran H, Monroe SS. Detection and genetic differentiation of human astroviruses: phylogenetic grouping varies by coding region [J]. Arch Virol 1997, 142(7): 1323-1334.
- [6] Noel JS, Lee TW, Kurtz JB, et al. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing [J]. J Clin Microbiol 1995, 33(4): 797-801.
- [7] Sakamoto T, Negishi H, Wang QH. Molecular epidemiology of astroviruses in Japan from 1995 to 1998 by reverse transcription-polymerase chain reaction with serotype-specific primers (1to8) [J]. J Med Virol 2000, 61(3): 326-331.
- [8] Moser LA, Schultz-Cherry S. Pathogenesis of astrovirus infection[J]. Viral Immunol 2005, 18(1): 4-10.
- [9] Fang ZY, Sun YP, Ye XH, et al. Astrovirus infection among hospitalized children with acute diarrhea in seven regions of China, 1998-2005 [J]. Chin J Epidemiol 2006, 27(8): 673-676. (In Chinese)
(方肇寅, 孙亚萍, 叶新华, 等. 中国七个地区 1998~2005 年急性腹泻住院患儿中星状病毒感染研究 [J]. 中华流行病学杂志, 2006, 27(8): 673-676.)
- [10] Zhang YH, Luo XF, Wang Q, et al. Analysis of astrovirus infection in 413 infants with acute diarrhea in Shenzhen City [J]. China tropical medicine 2011, 11(7): 803-805. (In Chinese)
(张银辉, 罗小芳, 王琼, 等. 深圳地区 413 例急性腹泻婴幼儿星状病毒感染分析[J]. 中国热带医学 2011, 11(7): 803-805.)
- [11] Santos RA, Borges AM, da Costa PS, et al. Astrovirus infection in children living in the central west region of Brazil [J]. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007, 102(2): 209-213.
- [12] Nguyen TA, Hoang L, Pham LD, et al. Identification of human astrovirus infections among children with acute gastroenteritis in the southern part of Vietnam during 2005-2006 [J]. J Med Virol 2008, 80(2): 298-305.
- [13] Zhong JY, Zhu B, Zhou R, et al. Phylogenetic Analysis of the ORF2 Gene of Human Astrovirus[J]. J Mod Clin Med Bioeng 2006, 12(2): 129-131. (In Chinese)
(钟家禹, 朱冰, 周荣, 等. 星状病毒 ORF2 基因的克隆及进化树分析 [J]. 现代临床医学生物工程杂志 2006, 12(2): 129-131.)

收稿日期 2012-06-24 编辑 符式刚