

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.01.004

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2019.01.004

福氏志贺氏菌QRDR基因gyrA, parC及毒力基因ipaH的多重PCR检测

王倩¹, 徐新明¹, 胡蕊¹, 谢常宝¹, 王尹¹, 王鑫², 顾兵¹, 陈莹¹

(1. 徐州医科大学医学技术学院, 江苏 徐州 221004; 2. 南京巨鲨显示科技有限公司, 江苏 南京 210036)

[摘要] 目的: 建立快速检测福氏志贺菌致病性、耐药性的多重PCR方法。方法: 根据福氏志贺菌耐药性基因gyrA, parC及毒力致病性基因ipaH, 分别设计了3对引物, 其PCR扩增产物分别为648, 248和423 bp, 并进行单基因PCR和单管多重PCR扩增特异性和T_m值的优化。结果: 该方法可同时检测福氏志贺菌gyrA, parC及ipaH三种标志性靶基因, 其最优退火温度为57.5 °C。结论: 本方法操作简单, 检测周期短, 能够实现对福氏志贺菌样本的喹诺酮耐药决定区基因、毒力基因的并行快速检测。

[关键词] 多重PCR; 福氏志贺菌; 耐药基因; 致病基因

Multiplex PCR detection of QRDR genes gyrA, parC and virulence gene ipaH of *Shigella flexneri*

WANG Qian¹, XU Xinming¹, HU Rui¹, XIE Changbao¹, WANG Yin¹, WANG Xin², GU Bing¹, CHEN Ying¹

(1. School of Medical Technology, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, China;

2. Nanjing Jusha Display Technology Co., Ltd, Nanjing 210036, China)

Abstract **Objective:** To establish a multiplex PCR method for rapid detection of pathogenicity and drug resistance of *Shigella flexneri*. **Methods:** Three pairs of primers were designed according to the *gyrA*, *parC* and the virulence pathogenicity gene *ipaH* of *Shigella flexneri*, and their PCR amplification products were 648, 248 and 423 bp, respectively, and single gene PCR and single tube were performed. Multiplex PCR amplification specificity and T_m value optimization were optimized. **Results:** The method can parallel detect three target genes of *gyrA*, *parC* and *ipaH* of *Shigella flexneri*, and the optimal annealing temperature is 57.5 °C. **Conclusion:** This method is simple and has a short detection cycle. It can rapidly parallel detect QRDR genes and virulence gene of *Shigella flexneri*.

Keywords multiplex PCR; *Shigella flexneri*; drug resistance gene; pathogenicity gene

收稿日期 (Date of reception): 2018-08-20

通信作者 (Corresponding author): 陈莹, Email: cyylotus@163.com

基金项目 (Foundation item): 国家自然科学基金 (81702103); 江苏省自然科学基金 (BK20170252); 江苏省高校自然科学基金项目 (16KJD320005); 江苏省高校大学生创新创业训练计划 (201610313019Z); 徐州市科技计划项目 (KC16SY15)。This work was supported by the National Natural Science Foundation (81702103), Jiangsu Provincial Natural Science Foundation (BK20170252), Program of Natural Science Foundation of Jiangsu Higher Education Institutions (16KJD320005), Innovation and Entrepreneurship Training Program of Jiangsu College Students (201610313019Z), and Xuzhou Science and Technology Planning Project (KC16SY157), China.

肠道感染性疾病重要病原菌, 流行范围广、传播速度快、感染发病率高, 其耐药发生率也非常高。肝硬化^[1]、炎症性肠道病^[2]、血糖调节^[3]等均与肠道菌群失调有关。研究^[4]表明: 亚非地区志贺菌对环丙沙星的耐药率从1998至2000年的0.6%快速上升到2007至2009年的29.1%, 提示亚非地区志贺菌对氟喹诺酮类抗菌药耐药性上升迅速。目前临床传统检测病原菌及其耐药性的方法繁琐耗时, 而发掘快速有效的检测技术, 对志贺菌致病性及其耐药基因进行检测及分析, 对疾病的早期诊断及指导临床医生及时用药等具有重要意义。

氟喹诺酮是目前成人志贺菌感染治疗常用的药物之一, 随着氟喹诺酮的广泛使用, 氟喹诺酮耐药志贺菌不断出现。研究^[5]表明: 对喹诺酮类药物产生耐药性的病原菌均在喹诺酮耐药决定区(QRDR)发生了碱基突变, 而更严重的耐药则是*gyrA*和*parC*基因多位点的同时突变。由细菌侵入宿主细胞引起的细菌侵袭和细菌诱导炎症反应的能力是志贺氏菌的显著致病特征, 志贺菌侵袭性质粒抗H(invasive plasmid, *ipaH*), 是志贺菌重要的毒力致病性基因, 在细胞内条件下特异性表达^[6]。近年来, 多重PCR(multiplex polymerase chain reaction, mPCR)因其高效灵活等特点成为重要的PCR衍生技术之一, 并得以推广应用^[7]。本研究选取福氏志贺菌(*Shigella flexneri*)QRDR耐药性判断的标志性基因*gyrA*, *parC*及毒力致病基因*ipaH*, 进行喹诺酮耐药决定区基因、毒力基因的多重

PCR并行快速检测, 检测思路将为肠道感染性疾病重要病原菌的分子诊断提供帮助。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

福氏志贺菌氟喹诺酮耐药菌株由徐州医科大学第二附属医院微生物科室提供(菌株编号: SF-29)。采用上海科玛嘉微生物技术有限公司生产的哥伦比亚血琼脂培养基进行培养。

1.1.2 试剂

DNA提取试剂盒、双蒸水和上样缓冲液购自天根生化科技(北京)有限公司; 引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司; PCR混合反应液、标志物购自Takara宝生物工程(大连)有限公司; 琼脂糖、50×缓冲液TAE和Gel Red核酸染液购自徐州微科曼得生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养和基因组DNA的提取

将福氏志贺菌接种于增菌液中进行增菌, 然后接种于血平板培养基上进行纯培养。用细菌DNA提取试剂盒提取细菌的DNA, 分装数管, -20℃保存备用。

1.2.2 引物设计及目的基因的扩增

以志贺菌的耐药性基因*gyrA*, *parC*及致病性基因*ipaH*为研究对象, 根据Genbank中基因序列进行特异性引物的设计(表1)。

表1 多重PCR引物序列

Table 1 Primers of multiplex PCR

基因	引物序列(5'-3')	产物长度/bp
<i>gyrA</i>	上游引物: TACACCGGTCAACAITGAGG	648
	下游引物: TTAATGATGCCCGCGTCGG	
<i>parC</i>	上游引物: GTC TGAAGCTGGGCTGAATGC	248
	下游引物: AGCAGCTCGGAATAITTCGACAA	
<i>ipaH</i>	上游引物: TGGAAAACTCAGTGCCTCT	423
	下游引物: CCAGTCCGTAATTCATCT	

1.2.3 PCR 扩增

1.2.3.1 PCR 扩增体系

PCR混合反应液MIX(10× PCR缓冲液2.5 μL, MgCl₂终浓度1.5 mmol/L, dNTPs终浓度0.2 mmol/L, Taq DNA聚合酶1.0 U)6 μL, 3对引物gyrA, parC, ipaH(终浓度均为1.0 μmol/L)上下游各1 μL, 模板DNA液1 μL, 加无菌双蒸水至总体积25 μL。

1.2.3.2 多重 PCR 退火温度的优化

采用常规PCR反应体系, 根据3种引物的T_m值, 确定3个基因的单基因PCR的退火温度范围为45 °C~67 °C, 并通过单基因PCR确定引物特异性及扩增产物正确性; 通过多基因PCR缩小退火温度范围, 并在该范围内探索最适的三重PCR退火温度。所得到的PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 根据电泳图条带的亮度选择合适的退火温度。

1.2.3.3 PCR 扩增程序

温度优化: 单基因PCR, 预变性94 °C 5 min; 94 °C变性50 s, 45 °C~67 °C退火50 s, 72 °C延伸1 min, 30个循环; 72 °C延伸5 min。每次实验均设阴性对照。PCR产物4 °C保存。多基因PCR, 预变性94 °C 5 min; 94 °C变性50 s, 52 °C~62 °C退火50 s, 72 °C延伸1min, 30个循环; 72 °C延伸5 min。每次实验均设阴性对照。PCR产物置4 °C保存。

三重PCR扩增: 预变性94 °C 5 min; 94 °C变性50 s, 57.5 °C退火50 s, 72 °C延伸1 min, 30个循环; 72 °C延伸5 min。每次实验均设阴性对照。PCR产物置4 °C保存。

1.2.3.4 扩增产物检测

产物用含Gel Red(0.1 μL/mL)的1.5%琼脂糖电泳, 电泳缓冲液1×TAE, 6 V/cm恒压电泳60 min。以标准分子量标志物(1 000 bp)作参照, 在648, 248和423 bp处出现扩增条带者即判相应基因为阳

性, 凝胶成像仪拍照记录结果。

2 结果

2.1 单基因及双基因 PCR

应用3对引物进行福氏志贺菌毒力基因、耐药基因的单基因及双基因PCR检测, 结果显示3种靶基因均为阳性。基因扩增产物的分子量大小: gyrA为648 bp, parC为248 bp, ipaH为423 bp, 与设计预期相同, 未显现明显非特异性条带(图1)。

2.2 三重 PCR 扩增条件的优化

首先对PCR的反应条件进行优化, 主要为退火温度及循环参数优化。在PCR反应中重点优化退火温度, 通过单基因PCR确定引物特异性及扩增产物正确性, 通过多基因PCR缩小退火温度范围, 并在该范围内探索最适三重PCR退火温度。实验结果表明: 退火温度过低时, 条带多且结果不稳定, 温度太高则扩增条带很少, 或出现阴性结果, 因此, 退火温度最终选择57.5 °C。

循环参数优化结果: 预变性94 °C 5 min; 变性94 °C 50 s, 退火57.5 °C 50 s, 延伸72 °C 50 s, 30个循环; 最后延伸72 °C 5 min。

2.3 三重 PCR 检测结果

通过设计3对引物, 分别为gyrA, parC及ipaH, 并依据优化后循环参数进行单管三重PCR, 选取1 000 bp的标志物进行电泳, 最经凝胶成像仪得到三重条带的结果。其中, gyrA条带在648 bp处, parC条带在248 bp处, ipaH条带在423 bp处, 均清晰可见, 达到预期设计(图2)。

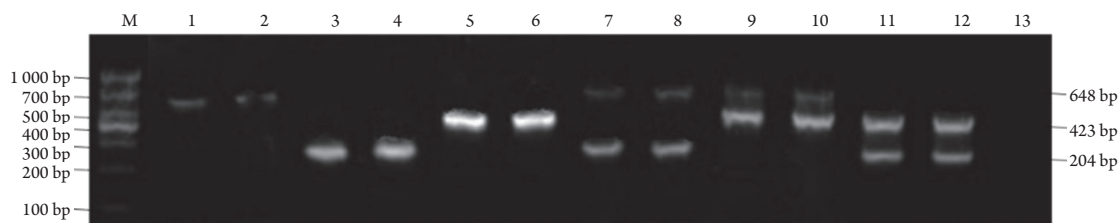


图1 福氏志贺菌单、双重PCR结果

Figure 1 Single and double PCR results of *Shigella flexneri*

1, 2: gyrA单基因PCR; 3, 4: parC单基因PCR; 5, 6: ipaH单基因PCR; 7, 8: gyrA及parC双基因PCR; 9, 10: gyrA及ipaH双基因PCR; 11, 12: parC及ipaH双基因PCR; 13: 阴性对照; M: 分子量标准。

1, 2: Single gene PCR of gyrA; 3, 4: Single gene PCR of parC; 5, 6: Single gene PCR of ipaH; 7, 8: Double gene PCR of gyrA and parC; 9, 10: Double gene PCR of gyrA and ipaH; 11, 12: Double gene PCR of parC and ipaH; 13: Negative control; M: Molecular weight standard.

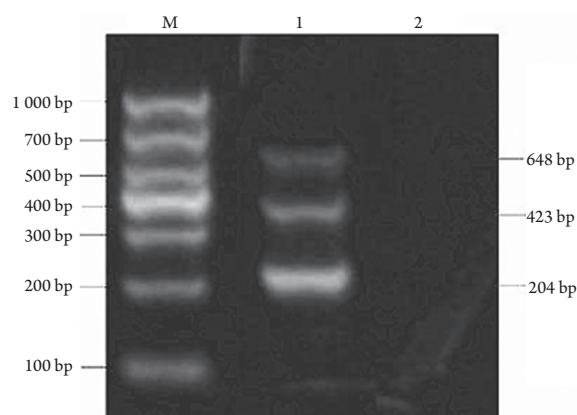


图2 福氏志贺菌三重PCR结果

Figure 2 Triple PCR results of *Shigella flexneri*

1: 福氏志贺菌 *gyrA*, *parC* 和 *ipaH* 基因三重PCR; 2: 阴性对照; M: 分子量标准。

1: Triple PCR of *Shigella flexneri gyrA*, *parC* and *ipaH* genes; 2: Negative control; M: Molecular weight standard.

3 讨论

本研究由志贺菌检测着手, 选出具有代表性的志贺菌耐药基因 *gyrA*, *parC* 及致病基因 *ipaH*, 通过优化实验条件, 对这3个基因进行多重扩增。由于引物之间存在互相抑制、竞争及可能形成引物二聚体等复杂情况, 同时不同引物由于扩增效率、退火温度的差异, 使多重PCR的扩增条件摸索比较费时、费力, 需要通过实验反复调整、优化各个引物浓度及复性条件才能使各基因得到相似的扩增效率和减少非特异性扩增。本实验通过检索大量文献并根据实验情况, 对退火温度及循环参数做出了调整, 最终确定退火温度为57.5 °C, 循环参数为预变性94 °C 5 min; 变性94 °C 50 s, 复性57.5 °C 50 s, 延伸72 °C 50 s, 30个循环; 最后延伸72 °C 5 min。根据本文的研究设计结果, 多重PCR对病原菌进行检测中将特异性的引物混合在一个PCR的反应体系, 各基因成分之间少有相互的交叉影响, 出现的假阳性结果较低。因此, 多重PCR可以通过严密的引物设计使得其检测结果灵敏和可靠。

目前, 临床常选用传统微生物学方法, 通过细菌培养及生化鉴定检测志贺菌, 其检测周期长且操作繁琐, 检测结果常受到环境、人为等多种因素影响, 易造成假阴性。研究^[8]指出: 分子生物学技术的阳性检出率显著高于传统培养法检测阳性率。因此, 高效快速的分子生物学技术有必要

进行推广和发展。多重PCR检测病原菌的主要工作原理是在同一个PCR系统中加入可以对特异性引物能产生多次扩增的DNA片段, 由此实现对2种及以上的病原体DNA进行快速的诊断^[9]。同样基于分子生物学技术发展而成的实时荧光定量PCR, 在临床中也有所运用, 但其运营成本较高, 对操作人员有较高要求, 不适用于大范围普及使用。相较于单基因检测和实时荧光定量PCR, 多重PCR可同时对多种目标基因及病原体进行针对性检测, 降低检测时间和节约检测成本, 使检测具备准确性、实用性和经济性。

综上, 本研究进行了福氏志贺菌 *gyrA*, *parC* 及 *ipaH* 三基因的多重PCR检测, 可同时进行该样本的喹诺酮耐药决定区基因、毒力基因的并行快速检测, 检测思路将为肠道感染性疾病重要病原菌的分子诊断提供帮助。

参考文献

1. Qin N, Yang F, Li A, et al. Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis[J]. *Nature*, 2014, 513(7516): 59-64.
2. Scalfaferrri F, Gerardi V, Lopetuso LR, et al. Gut microbial flora, prebiotics, and probiotics in IBD: their current usage and utility[J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 435268.
3. Bauer PV, Duca FA, Waise TMZ, et al. Metformin alters upper small intestinal microbiota that impact a glucose-SGLT1-sensing glucoregulatory pathway[J]. *Cell Metab*, 2018, 27(1): 101-117.e5.
4. Gu B, Cao Y, Pan S, et al. Comparison of the prevalence and changing resistance to nalidixic acid and ciprofloxacin of *Shigella* between Europe-America and Asia-Africa from 1998 to 2009[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2012, 40(1): 9-17.
5. Azmi IJ, Khajanchi BK, Akter F, et al. Fluoroquinolone resistance mechanisms of *Shigella flexneri* Isolated in Bangladesh[J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e102533.
6. Ashida H, Toyotome T, Nagai T, et al. *Shigella* chromosomal *IpaH* proteins are secreted via the type III secretion system and act as effectors[J]. *Mol Microbiol*, 2007, 63(3): 680-693.
7. Radhika M, Saugata M, Murali HS, et al. A novel multiplex PCR for the simultaneous detection of *Salmonella enterica* and *Shigella* species[J]. *Braz J Microbiol*, 2014, 45(2): 667-676.
8. 陈棋炯, 丁水军, 孙永祥, 等. 实时荧光PCR技术在预防性健康检查沙门菌与志贺菌检测中的应用[J]. *中国卫生检验杂志*, 2015(12): 1937-1940.
9. CHEN Qijiong, DING Shuijun, SUN Yongxiang, et al. Application of

real-time fluorescent PCR in the detection of Salmonella and Shigella in preventive health examination[J]. *Chineses Journal of Health Laboratory Technology*, 2015(12): 1937-1940.

9. Han J. Multiplex PCR in molecular differential diagnosis of microbial infections: methods, utility, and platforms//Advanced techniques in diagnostic microbiology[M]. Boston, MA: Springer, 2013: 627-646.

本文引用: 王倩, 徐新明, 胡蕊, 谢常宝, 王尹, 王鑫, 顾兵, 陈莹. 福氏志贺氏菌QRDR基因gyrA, parC及毒力基因ipaH的多重PCR检测[J]. *临床与病理杂志*, 2019, 39(1): 22-26. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.01.004

Cite this article as: WANG Qian, XU Xinming, HU Rui, XIE Changbao, WANG Yin, WANG Xin, GU Bing, CHEN Ying. Multiplex PCR detection of QRDR genes gyrA, parC and virulence gene ipaH of Shigella flexneri[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2019, 39(1): 22-26. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.01.004