

• 论 著 •

引物标记技术在耐甲氧西林金黄色葡萄球菌检测中的应用

梁有才¹, 聂署萍², 吴润香², 范菲楠², 陆学东^{2△}

(1. 广东医科大学研究生学院, 广东湛江 524000; 2. 中山大学附属第八医院检验医学部, 广东深圳 518033)

摘要:目的 在 GeXP 系统中应用 CY5 标记的特异引物代替通用引物, 建立一种检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的方法。方法 设计 mecA 与 nuc 基因引物, 经聚合酶链反应(PCR)扩增琼脂糖电泳验证引物特异性并优化 PCR 反应条件。用荧光染料 CY5 标记单条引物(单独标记上游或下游引物)。以提取的 MRSA、甲氧西林耐药凝固酶阴性葡萄球菌(MRCNS)、甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(MSSA)核酸为模板液, 采用已标记引物进行单重及多重 PCR, 产物经琼脂糖电泳与 GeXP 毛细管电泳分析, 验证应用效果。再通过采用混合标记引物的 GeXP 系统检测 100 株 MRSA, 分析其应用效果。结果 单标记下游引物的 GeXP-PCR 的杂质扩增峰较少。经 GeXP 系统检测分析的 MRSA、MRCNS、MSSA 均出现目的特征峰, 能明确辨别其含有大小不同的基因片段, 结果与琼脂糖电泳一致; 经 GeXP 系统分析的 100 株 MRSA 均含有 nuc 与 mecA 片段, 与 VITEK II Compact 检测结果相符。结论 单独标记下游引物应用于 GeXP 检测 MRSA 的方法可行。

关键词:标记; 特异引物; GeXP 系统; 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.05.010 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2017)05-0624-04

Application of primer labeling technique in detection of MRSA

LIANG Youcai¹, NIE Shuping², WU Runxiang², FAN Feinan², LU Xuedong^{2△}

(1. Department of Graduate School, Guangdong Medical University, Zhanjiang, Guangdong 524000, China; 2. Department of Laboratory Medicine, Eighth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Shenzhen, Guangdong 518033, China)

Abstract: Objective To establish a method for detecting MRSA by using CY5-labelled specific primer to replace universal primer in GeXP system. **Methods** The mecA and nuc gene primers were designed. The primer specificity was verified by PCR amplification and agarose gel electrophoresis. The PCR reaction condition was optimized. Single primers were marked by fluorescent dye CY5 (labeling the forward primer or reverse primer alone). The extracted MRSA, MRCNS and MSSA nucleic acid served as the template solution. The labeled primers were adopted for conducting the single PCR and multiple PCR. The PCR products were analyzed by the agarose gel electrophoresis and GeXP capillary electrophoresis for verifying the application effect. Then 100 strains of MRSA were detected by the GeXP system using the labelled primers and their application effects were analyzed. **Results** The GeXP-PCR impurity amplification peaks in single labeled reverse primers were less. The target specific amplification peaks appeared in MRSA, MRCNS and MSSA detected and analyzed by the GeXP system, which containing different sizes of gene fragments was clearly distinguished, the results were consistent with the agarose gel electrophoresis; 100 strains of MRSA contained the nuc and mec A fragments by the GeXP system analysis, which conformed to the results of VITEK II Compact detection. **Conclusion** Applying singly labeling reverse primer in GeXP system for detecting MRSA is feasible.

Key words: label; peculiar primer; GeXP system; MRSA

耐药基因检测技术由于具有可快速预测细菌潜在耐药等优点, 其应用推广已成为临床细菌耐药研究的热点。多重基因表达遗传信息分析系统(GeXP)在多重基因的检测上, 相比聚合酶链反应(PCR)与基因芯片技术有较大优势, 但其在细菌耐药基因的检测方面比较少见。目前报道的 GeXP 基因片段分析的基本原理是基于贝克曼公司推荐的通用引物 PCR 扩增法。与之不同, 本文是采用荧光染料直接标记的特异引物, 建立了耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的 GeXP 检测方法。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 118 株葡萄球菌来自中山大学附属第八医院微生物实验室菌种库, 其经 VITEK II Compact 鉴定为 106 株 MRSA, 6 株甲氧西林耐药凝固酶阴性葡萄球菌(MRCNS), 6 株甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(MSSA)。所有菌株由住院或门诊患者各类体液标本分离培养所得。VITEK II Compact 细菌鉴定系统定期参加国家、省临检中心的室间质评与室内

质控。

1.2 仪器与试剂 PCR Master Mix(2×)(Fermentas 公司), EasyPure Bacteria Genomic DNA kit(北京全式金生物技术有限公司), Marker I(北京全式金生物技术有限公司), PTC-2000 梯度 PCR 循环仪(美国 MJ Research 公司), GenomeLab™ GeXP system CEQ 8800(美国 Beckman 公司), GenomeLab™ DNA Size Standard Kit-400(SS-400, 美国 Beckman 公司), GenomeLab™ Separation Buffer(美国 Beckman 公司), GenomeLab™ Separation GEL-LPAI(美国 Beckman 公司), Samples Loading Solution(SLS, 美国 Beckman 公司), VITEK II Compact 全自动微生物鉴定仪(法国梅里埃公司)。

1.3 方法

1.3.1 临床菌株的准备 取住院与门诊部就诊患者体液标本进行细菌分离培养, 挑取经 VITEK II Compact 鉴定为 MRSA 的单菌落, MRCNS 的单菌落, MSSA 的单菌落, -80℃ 储存待用。

1.3.2 细菌基因组核酸模板液制备 将待用菌株接种至血琼脂平板,置 37 ℃ 二氧化碳培养箱培养过夜,挑取数个单菌落至 1 mL 双蒸水调成混悬菌液。使用核酸提取试剂盒(EasyPure Bacteria Genomic DNA kit),按照说明书提取核酸。

1.3.3 引物合成与标记 根据金黄色葡萄球菌保守区基因序列,利用 Primer5.0 软件设计甲氧西林耐药基因(*mecA*)与金黄色葡萄球菌共有基因片段(*nuc*)的引物。将上游或下游引物 5'端标记荧光染料 CY5,合成和标记由上海辉睿生物科技有限公司完成。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

引物	序列(5'~3')	产物长度(bp)
<i>mecA</i> -F	TGGTATGTGGAAGTTAGATTGGGAT	152
<i>mecA</i> -R	CTAATCTCATATGTGTTCTGTATTGGC	152
<i>nuc</i> -F	GCGATTGATGGTGATACGGTT	280
<i>nuc</i> -R	AGCCAAGCCTTGACGAACATAAAGC	280
<i>mecA</i> -F-CY5	CY5-TGGTATGTGGAAGTTAGATTGGGAT	—
<i>mecA</i> -R-CY5	CY5-CTAATCTCATATGTGTTCTGTATTGGC	—
<i>nuc</i> -R-CY5	CY5-AGCCAAGCCTTGACGAACATAAAGC	—

注:—表示无数据。

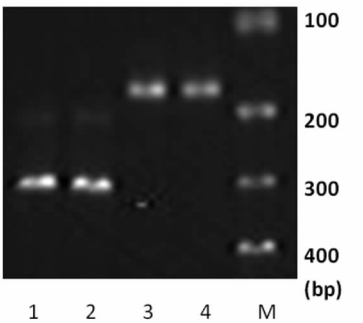
1.3.4 单对引物 PCR 特异性验证及双对引物 PCR 反应条件的建立 根据 PCR Master Mix(2×)说明书推荐的反应体系与反应程序初步建立的反应体系为 PCR Mix 12.5 μL, Forward Primer(10 μmol/L)0.1 μL, Reverse Primer(10 μmol/L)0.1 μL, DNA 模板液 2.5 μL, 补水至总体积达 25.0 μL。反应程序第一步 94 ℃ 5 min;第二步 94 ℃ 1 min, 55 ℃ 45 s, 72 ℃ 1 min, 40 个循环;第三步 72 ℃ 10 min。产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析。先验证单对引物特异性,再混合双对引物,根据电泳条带亮度调整引物用量比。混合引物中的 *mecA*-F、*mecA*-R、*nuc*-F、*nuc*-R 原始比例为 1:1:1:1,经调整后其比例为 1.5:1.5:1:1。

1.3.5 单条标记引物应用效果的比较 给 *mecA* 引物 5'端标记荧光染料 CY-5,并分为 3 组:A 组为 *mecA*-F-CY5 与 *mecA*-R-CY5,B 组为 *mecA*-F-CY5 与 *mecA*-R,C 组为 *mecA*-F 与 *mecA*-R-CY5。3 组引物置于 3 个不同体系行 PCR 扩增 MRSA 的基因组核酸。用 28.7 μL 的 SLS 混合 0.3 μL 的 SS-400 后,分别加入 1.0 μL 3 组引物所对应的 PCR 产物,经 GeXP 毛细管电泳分析,比较所得峰图质量,评价单条标记引物(仅标记上游或下游引物)的应用效果。

1.3.6 带标记的混合引物的 GeXP-PCR 应用验证 (1)使用荧光染料 CY-5 标记 *nuc* 下游引物 5'端,并制作单条标记引物的混合液(Primer Mix),组成比例为 *mecA*-F:*mecA*-R-CY5:*nuc*-F:*nuc*-R-CY5=1.5:1.5:1:1。(2)应用 Primer Mix 进行 PCR 扩增 18 株葡萄球菌基因组核酸,分别是 6 株 MRSA,6 株 MRCNS,6 株 MSSA。产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳以及经 GeXP 毛细管电泳分析。根据电泳图调整引物混合比。最终反应条件为 PCR Mix 12.5 μL, Primer Mix 0.5 μL(含有 *mecA*-F、*mecA*-R-CY5、*nuc*-F、*nuc*-R-CY5 比例为 1.5:1.5:1:1),DNA 模板液 2.5 μL,补水至总体积达 25.0 μL。反应程序第一步 94 ℃ 5 min;第二步 94 ℃ 1 min, 55 ℃ 45 s, 72 ℃ 1 min, 40 个循环;第三步 72 ℃ 10 min。(3)应用 Primer Mix 的 GeXP 系统检测分析 100 株 MRSA 基因组核酸(无重复菌株)。

2 结 果

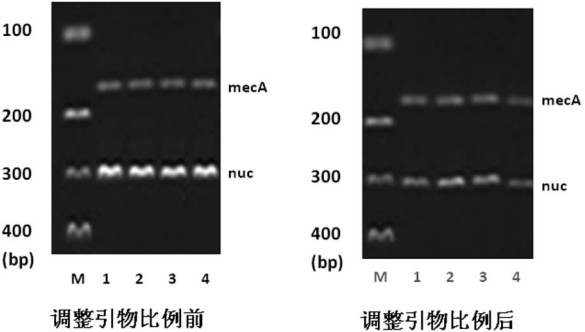
2.1 琼脂糖凝胶电泳结果 单对引物 PCR 扩增 MRSA 的基因组核酸,经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,*mecA* 片段的特异条带(152 bp)、*nuc* 片段的特异条带(280 bp),与引物设计目的片段相符。见图 1。



注:M 为标准分子量 DNA;1~2 为 *nuc*(280 bp);3~4 为 *mecA*(152 bp)。

图 1 *nuc* 与 *mecA* 片段琼脂糖电泳特异条带

双对引物 PCR 扩增 MRSA 的基因组核酸,*mecA* 片段的扩增被抑制,琼脂糖电泳特异条带亮度相对弱,在调整两引物比例后,*mecA* 与 *nuc* 目的条带亮度基本相同,见图 2。调整后引物如下,*mecA*-F、*mecA*-R、*nuc*-F、*nuc*-R 比例为 1.5:1.5:1:1。



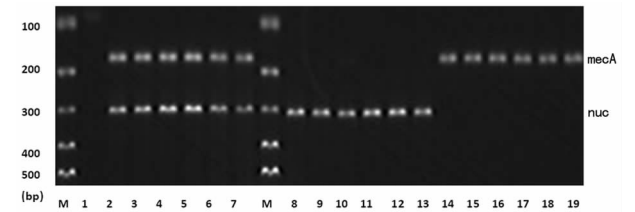
注:M 为标准分子量 DNA;1~4 为 MRSA 的 DNA 扩增条带, *mecA* 为 152 bp, *nuc* 为 280 bp。

图 2 引物比例在调整前后 *mecA* 与 *nuc* 片段电泳条带亮度对比

应用 Primer Mix 进行 PCR 扩增 18 株葡萄球菌基因组核酸,琼脂糖电泳可见 MRSA 有 *mecA* 与 *nuc* 片段对应的两个特异条带,MRCNS 只有 *mecA* 片段的特异条带,MSSA 只有 *nuc* 片段的特异条带。见图 3。

2.2 GeXP 系统检测结果 A、B、C 3 组引物对应的扩增产物经 GeXP 毛细管电泳分析,皆出现特异峰,大小分别为 A 组 155 bp 与 157 bp,B 组 155 bp 与 156 bp,C 组 157 bp;对比 3 组

的信号强度低于 50 000 的杂质扩增峰,C 组最少,可见 C 组是 PCR 扩增最佳引物组合。



注:M 为标准分子量 DNA;1 为阴性对照;2~7 为 MRSA;8~13 为 MSSA;14~19 为 MRCNS。

图 3 18 株葡萄球菌的基因组核酸 PCR 产物琼脂糖电泳图

应用 Primer Mix 行 PCR 扩增 18 株葡萄球菌基因组核酸,其产物经 GeXP 毛细管电泳结果与琼脂糖电泳一致:MRSA 基因组 PCR 产物经 GeXP 系统分析可见 mecA(158 bp)与 nuc(283 bp)的特征峰(双峰),MRCNS 仅见到 mecA 的特征峰(单峰),MSSA 仅见到 nuc 的特征峰(单峰),见图 4~6。另外,100 株 MRSA 的 PCR 扩增产物经 GeXP 系统分析,皆可见 mecA 与 nuc 对应的特征峰(双峰)。

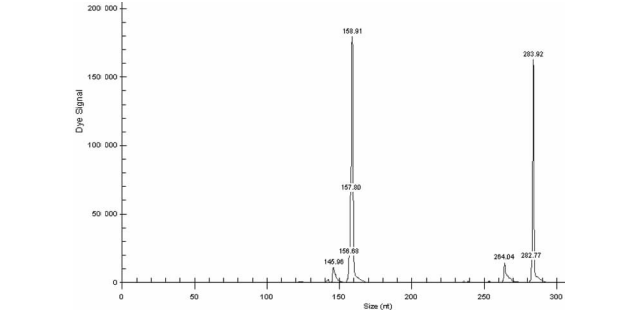


图 4 MRSA 经 GeXP 系统分析的样图

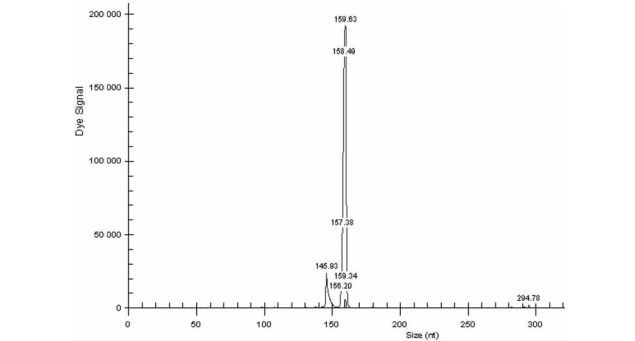


图 5 MRCNS 经 GeXP 系统分析的样图

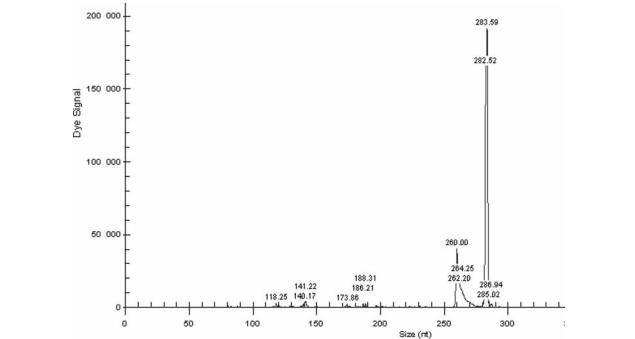


图 6 MSSA 经 GeXP 系统分析的样图

3 讨 论

近年来我国 MRSA 检出率呈逐年上升之势,是引起院内

与社区爆发感染的重要原因之一。MRSA 对甲氧西林耐药的机制主要由青霉素结合蛋白 PBP2a 介导,PBP2a 的编码基因是 mecA,所以 mecA 是 MRSA 的主要耐药基因;而实际上 MSSA 也可能携带 mecA 基因,携带 mecA 基因的菌株可能因为暂时未表达 PBP2a 蛋白而对甲氧西林敏感。故美国临床和实验室标准协会推荐从表现型和基因型两个方面确认甲氧西林耐药,以确保结果准确可靠^[1-2]。本实验中经 GeXP 系统分析检测 106 株 MRSA(事先经 VITEK II Compact 鉴定的结果),全部携带 mecA 基因。可见本院的 MRSA 菌株携带 mecA 基因达 100%,而对甲氧西林敏感的 MSSA 是否携带 mecA 基因,尚需进一步研究分析。

GeXP-PCR 技术多采用荧光标记的通用引物和特异嵌合引物相结合。首先由正反向嵌合引物特异序列结合靶模板启动 PCR 反应,待扩增出适量通用引物互补序列后,通用引物与互补序列结合,继续扩增出带标记的 DNA 片段。PCR 产物经 GeXP 毛细管电泳分离,由仪器探测荧光信号绘成峰图,分析峰图的信号强度与片段大小可判断目标片段的含量及基因类型。GeXP 系统具有高灵敏、高通量,易标准化等诸多优点。其最少可在 5~50 ng 的 RNA 单样中同时检测分析 30 个基因;可区分差别 5 bp 以上的基因片段,解决了琼脂糖电泳难以区分 100 bp 以下基因片段的难题^[3]。目前,GeXP 系统在临床上的应用主要是在致病基因诊断与微生物病原体检测方面^[4-8],其对临床细菌耐药基因检测尚在方法建立阶段^[9-10],较少应用于临床。

与上述相关参考文献不同,本实验未采用通用引物和特异嵌合引物,而是用荧光染料 CY5 直接标记特异引物。在标记引物前笔者事先经 PCR 琼脂糖电泳验证了引物特异性,根据电泳特异条带亮度强弱比对初步调试好双对引物 PCR 反应条件。在标记引物后,经 GeXP 系统测试发现,应用单独标记上游或者下游的引物进行 GeXP-PCR 与应用同时标记上下游的引物相比,所产生的特征峰一致;单独标记下游引物比单独标记上游引物的杂质扩增峰较少。标记单条引物自然比同时标记上下游引物节约成本,综合考虑,单独标记下游引物为最佳选择。

本实验中携带 nuc 片段的是金黄色葡萄球菌,携带 mecA 基因的是甲氧西林耐药菌株,被检出同时携带这两种基因片段的菌株可视为 MRSA。双对引物 PCR 扩增的 18 株葡萄球菌包括 MRSA、MRCNS、MSSA,经 GeXP 毛细管电泳分析可见明显特征峰,与琼脂糖电泳结果一致,与 VITEK II Compact 检测结果相符。根据特征峰大小可直观辨别这 3 种不同菌株。说明仪器分辨率高,抗干扰能力强,不易导致交叉污染。根据系统本身特性,通常基线值<5 000,且纵坐标×50%(峰面积)在 10 000~<120 000 即表明系统运行稳定且检测结果可信^[8]。本实验检测的 116 株葡萄球菌 DNA 的扩增峰信号强度均在 100 000 以上,特征峰与杂峰区别显著,与 VITEK II Compact 检测结果相符,说明仪器运行稳定,实验重复性好。值得指出的是,特征峰对应片段的大小:mecA 在 158 bp 左右,nuc 在 283 bp 左右;特征峰有 2~3 个数值,同一靶基因片段的检测峰值不固定而是在区间内波动;根据该系统特性,待检片段实际长度与理论长度误差在 3~6 bp 的范围,属于毛细管电泳分离过程中正常产生的片段大小漂移现象。另外,两引物在未标记之前扩增的目的片段应分别为 152 bp 和 280 bp,但考虑到标记后的引物加上了染料本身的长度,其扩增出的片段大小增加了。本实验 GeXP 系统检测的峰值分(下转第 629 页)

且当患者存在疼痛应激时,以上指标将出现异常升高,同时与患者疼痛程度呈正比。MYO、IMA 及 TAC 为机体氧化受损的重要评价指标,卵巢功能是反映整个手术对患者周围组织影响的程度,因此,监测患者卵巢功能可反映手术安全性^[12]。从本研究结果可知,采用腹腔镜下子宫肌瘤剔除术可减少对患者卵巢功能的影响,同时患者术后各项指标恢复较快,说明该手术方式尽管对患者卵巢功能有一定影响,但却是短暂性的。采用腹腔镜下子宫肌瘤剔除术对患者疼痛及氧化受损指标的影响较小,患者术后恢复较快,对患者影响较小。

综上所述,临床采用腹腔镜下子宫肌瘤剔除术治疗子宫肌瘤,对患者机体影响较小,具有较高安全性。本研究仍存在不足之处:研究样本数量小且研究时间短,同时未对患者术后性生活等指标进行研究,所以未得出更为准确的数据,尚需进一步深入研究。但本研究具有其一定优势,尤其是对目前临床报道较少的疼痛指标、氧化损伤指标等进行研究,可为后续前瞻性研究提供参考。

参考文献

[1] 贾祖卫. 子宫动脉阻断术联合垂体后叶素在腹腔镜下子宫肌瘤剔除术中的作用[J]. 中国妇幼保健, 2013, 28(16):2630-2631.

[2] 吕芳,方和金,万淑梅,等. 腹腔镜下子宫动脉上行支血流阻断辅助子宫肌瘤剔除术对卵巢功能的影响[J]. 山西医药杂志, 2016, 45(8):919-921.

[3] 赖秀芳. 子宫肌瘤不同手术方法治疗对患者卵巢功能和性功能的影响观察[J]. 河北医学, 2014, 20(6):969-972.

(上接第 626 页)

别为 158 bp 左右和 283 bp 左右,这与理论预测相符,说明检测方法可行^[3,8]。

综上所述,本实验建立的采用荧光染料 CY5 直接标记下游引物代替通用引物经 GeXP 系统检测 MRSA 的方法可行,与使用通用引物相比较,其 PCR 反应直接简单,省去制作通用引物及嵌合引物的麻烦,节约成本,适合临床进行细菌多重耐药基因的检测。

参考文献

[1] Rasheed MU, Ahmed Z. Phenotypic methods of greater accuracy to detect the mecA gene product for the recognition of MRSA in resource constraint setting[J]. Asian Pacific J Trop Med, 2010, 3(9):741-744.

[2] Sturenburg E. Rapid detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus directly from clinical samples: methods, effectiveness and cost consideration [J]. Ger Med Sci, 2009, 1(2):7-11.

[3] 胡凌,林星宇,王印,等. GeXP 多重基因表达分析系统研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2016, 48(1):128-131.

[4] Rai AJ, Kamath RM, Gerald W, et al. Analytical validation of the GeXP analyzer and multiplexed gene-expression profiling[J]. Anal Bioanal Chem, 2009, 393(5):1505-1511.

[5] Huang MY, Chen HC, Yang IP, et al. Tumorigenesis and tumor progression related gene expression profiles in

[4] 周华. 腹腔镜子宫肌瘤剔除术中子宫动脉阻断对卵巢功能及妊娠的影响[J]. 广西医学, 2014, 36(3):332-334.

[5] 闫冬丽. 腹腔镜下子宫动脉上行支阻断术辅助腹腔镜子宫肌瘤剔除术对患者卵巢功能和性功能的影响[J]. 临床和实验医学杂志, 2016, 15(1):66-69.

[6] 金凤斌,任波,谭凤美,等. 醋酸亮丙瑞林联合腹腔镜下子宫肌瘤剔除术治疗巨大子宫肌瘤 63 例临床研究[J]. 中国妇幼保健, 2015, 30(1):154-156.

[7] 李海燕,周晓燕. 腹腔镜在子宫肌瘤剔除术中的价值探讨[J]. 中华全科医学, 2014, 12(10):1629-1630.

[8] 高香丽,沈金凤. 三种不同术式对子宫肌瘤患者卵巢储备功能、妊娠结局的影响比较[J]. 中国妇幼健康研究, 2016, 27(3):361-363.

[9] 袁华,赵绍杰,龚华,等. 腹腔镜下次全子宫与全子宫切除、肌瘤剔除术对子宫肌瘤患者卵巢储备功能的影响[J]. 中华全科医师杂志, 2015, 14(5):377-380.

[10] 龚敏. 腹腔镜下子宫肌瘤剔除术治疗子宫肌瘤临床疗效观察[J]. 河北医学, 2013, 19(5):690-692.

[11] 董晶. 腹腔镜下子宫肌瘤剔除术对患者卵巢功能及创伤相关血清指标的影响[J]. 海南医学院学报, 2014, 20(8):1103-1104, 1107.

[12] 徐莉,李丹,郭凤军,等. 腹腔镜下子宫肌瘤剔除术与开腹手术的 150 例临床分析[J]. 中国妇幼保健, 2014, 29(18):3011-3013.

(收稿日期:2016-08-23 修回日期:2016-11-15)

colorectal cancer[J]. Cancer Biomark, 2013, 13(4):269-279.

[6] Yang MJ, Luo L, Nie K, et al. Genotyping of 11 human papillomaviruses by multiplex PCR with a GeXP analyzer[J]. J Medical Virol, 2012, 84(6):957-963.

[7] Drew JE, Mayer CD, Farquharson AJ, et al. Custom design of a GeXP multiplexed assay used to assess expression profiles of inflammatory gene targets in normal colon, polyp, and tumor tissue[J]. J Mol Diagn, 2011, 2(13):233-242.

[8] 周丽芳,保志军,缪应新,等. 多重基因分析系统检测幽门螺杆菌的初步研究[J]. 检验医学, 2014, 29(4):350-356.

[9] Ting C, Jun A, Shun Z, et al. Detection of the common resistance genes in Gram-negative bacteria using gene chip technology[J]. Indian J Med Microbiol, 2013, 31(2):142-147.

[10] Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, et al. Evaluation of a DNA microarray for the rapid detection of extended-spectrum-lactamases (TEM, SHV and CTX-M), plasmid-mediated cephalosporinases (CMY-2-like, DHA, Fox, A CC-1, ACT/MIR and CMY-1-like/MOX) and carbapenem-ases (KPC, OXA-48, VIM, IMP and NDM) [J]. J Antimicrob Chemother, 2012, 67(8):1865-1869.

(收稿日期:2016-09-02 修回日期:2016-11-23)