

文章编号: 1674-5566(2016)06-0814-08

DOI:10.12024/jsou.20160301675

整合子相关元件多重 PCR 检测技术建立及其在弧菌中应用

刘旭^{1,2}, 马立才¹, 赵姝¹, 李健^{1,2}, 王元¹, 房文红¹

(1. 中国水产科学研究院东海水产研究所 农业部海洋与河口渔业资源及生态重点开放实验室, 上海 200090; 2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 为了建立一种能同时检测 1 类整合子、4 类超级整合子和 1 型插入序列共同区的多重 PCR 检测方法, 根据 GenBank 中 1 类整合子整合酶基因 *int1*、4 类超级整合子整合酶基因 *int_{SXT}* 和 1 型插入序列共同区转座酶基因 *ISCR1* 的序列, 应用 PrimerPlex 2.61 设计 3 对特异性引物, 通过改变引物浓度和退火温度对多重 PCR 体系进行了优化。此后, 评价了所建立多重 PCR 体系的特异性和灵敏度, 并应用于 222 株海水养殖源弧菌中 3 种整合子相关元件的检测。结果显示, 设计的 3 对引物能分别单独且特异性地扩增出 569 bp、430 bp 和 651 bp 的目的条带; 当 *int1*、*int_{SXT}* 和 *ISCR1* 3 对引物 (10 pmol/μL) 的体积依次为 0.3 μL、0.6 μL 和 0.6 μL, 退火温度为 50 °C 时, 多重 PCR 体系能特异性地扩增出 3 个条带清晰、区分度良好的目的条带, 方法的灵敏度达到 0.02 ng/μL 弧菌基因组模板 DNA; 利用所建立的方法对 222 株临床分离弧菌进行 3 种整合子元件检测得到的结果与文献报道的单引物检测结果一致。从上述研究结果可以看出, 该多重 PCR 方法能快速准确地检测 *Int1*、*SXT* 和 *ISCR1*, 适用于整合子相关元件流行监测及整合子相关的耐药性研究。

关键词: 多重 PCR; 整合子; SXT; ISCR1; 弧菌

中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

抗生素的发现和ación拯救了数十亿人的生命, 同时也推动了陆生和水生动物养殖业的发展。随着抗菌药物在人类医学临床尤其是在食品动物养殖中的广泛使用, 细菌耐药性问题日趋严重。整合子是介导革兰氏阴性菌抗菌药物耐药产生和迅速传播的重要机制之一^[1]。它是细菌的一种天然的克隆和表达系统, 可在整合酶的催化下介导耐药基因盒的捕获、整合和切除, 造成耐药基因在菌群中迅速传播^[2]。目前, 已报道的耐药相关的整合子包括五类, 其中 1 型整合子在临床菌株中最为常见。整合子携带的耐药基因盒种类多达 130 余种, 涉及到的抗菌药物包括: β-内酰胺类、氨基糖苷类、磺胺类、酰胺醇类、氨基糖苷类、利福霉素类等^[3]。在一些复杂的 1 类整合子 3' 端保守区的下游通常存在有一段长为 2 154 bp、可编码 513 个氨基酸的 DNA 序列,

因此被称为 Orf513, 后来又被命名为 1 型插入序列共同区 (Insertion Sequence Common Region, ISCR1)^[4]。ISCR1 是一种通过“滚环转座”机制转移其相邻耐药基因的可移动遗传元件; 大量的证据表明, ISCR1 与多种抗菌药物耐药基因的传播扩散密切相关, 如氯霉素类、甲氧苄啶类、喹诺酮类、氨基糖苷类耐药基因以及 A 类和 C 类 β 内酰胺酶基因等^[5-6]。4 类整合子即超级整合子 SXT 首次发现于霍乱弧菌, 被认为是指导宿主基因进化的主要因素, 它可携带耐药基因、毒力基因等上百个基因盒, 可使细菌迅速适应环境的变化, 是细菌生存和进化的重要遗传元件^[7]。目前, 上述 3 种整合子相关元件已在国内外多种来源的弧菌中被大量报道, 涉及到耐药基因的种类包括: 酰胺醇耐药基因 (*cat2 floR*)、β-内酰胺耐药基因 (*bla_{PER}*、*bla_{VIM-1}*、*bla_{OXA-10}*)、氨基糖苷类耐药

收稿日期: 2016-03-02 修回日期: 2016-06-26

基金项目: 上海市科技兴农重点攻关项目 (沪农科攻字[2014]第 3-4 号); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (东海水产研究所 L-2015-1602)

作者简介: 刘旭 (1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水生动物细菌耐药性。E-mail: liuxu19890226@163.com

通信作者: 房文红, E-mail: fwenhong@163.com

基因(*aadA1*、*aacA3*、*aadA2*、*aadB*、*strAB*)、四环素类耐药基因(*tetA*)、喹诺酮类耐药基因(*qnrVC*)、利福霉素类耐药基因(*arr*)、甲氧苄啶耐药基因(*dfrA1*、*dfr16*)、磺胺类耐药基因(*sul1*、*sul2*)等^[8-12]。本实验室在开展海水养殖源弧菌耐药性研究的过程中,从江苏、山东、辽宁、福建和海南等地区分离的多种弧菌中检测到了 *Int1*、*SXT*、*ISCR1* 的流行,但未检测到其他类型整合子元件(如 1 和 2 类整合子)的存在。然而,到目前为止还没有一种能同时检测 *Int1*、*SXT*、*ISCR1* 这 3 种元件的方法。

为了建立一种能同时检测 1 类整合子 *Int1*、4 类超级整合子 *SXT*、1 型插入序列共同区 *ISCR1* 的方法,本研究根据 GenBank 中 *int1*、*int_{SXT}* 及 *ISCR1* 的基因序列,利用 PrimerPlex 2.61 设计了 3 对 PCR 引物,建立一种多重 PCR 体系,并通过改变引物浓度、退火温度等对其进行了优化。本研究的成果提供了一种同时检测上述 3 种整合子相关元件的方法,为整合子相关细菌耐药性研究的开展提供了便利。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株来源

阳性对照菌:溶藻弧菌 *V_A-001* 含有 *Int1*、*SXT* 和 *ISCR1*,创伤弧菌 *V_V-311* 含有 *Int1* 和 *ISCR1*,溶藻弧菌 *V_A-352* 含有 *Int1* 和 *SXT*,副溶血弧菌 *V_P-046* 含有 *SXT*、*ISCR1*,均为本实验室从海水养殖中临床分离的菌株,其耐药元件 PCR 产物经测序确认。阴性对照菌:副溶血弧菌 CICC21617、创伤弧菌 CICC10383 和溶藻弧菌 CICC10484 购自中国工业微生物菌种保藏中心。受试弧菌:副溶血弧菌 133 株、哈维氏弧菌 32 株、溶藻弧菌 36 株、创伤弧菌 10 株、霍乱弧菌 7 株和鳗弧菌 4 株,共计 222 株,分离自上海、江苏、福建和海南地区养殖的发病对虾、舌鳎和青蟹等。

1.1.2 主要实验试剂

TCBS 琼脂培养基、胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)购自青岛海博生物技术有限公司;PCR 相关试剂(Premix Ex TaqTM)、克隆载体 pMD18Tvector(含连接酶、Buffer)、DNA Maker DL2000 和胶回收试剂盒购于宝生物工程(大连)有限公司;Wizard[®] 基因组 DNA 纯化试剂盒购于普洛麦格(北京)生

物技术有限公司。

1.1.3 主要实验仪器

恒温培养箱, MIR-254, 日本 Sanyo; 恒温摇床, SHKE5000-8CE, 美国 Thermo; PCR 仪, Mastercycler pro, 德国 Eppendorf; 电泳仪, DYY-7C, 北京六一仪器厂; 凝胶成像仪, G05-7500, 美国 BIO-RAD; 微量移液器, 德国, Eppendorf; 超微量紫外可见分光光度计, ND5000, 北京百泰克。

1.2 细菌培养和 DNA 提取

在无菌操作环境下,将保存于 -80 °C 的甘油菌分区划线于 TCBS 琼脂平板, 28 °C 培养 16 ~ 24 h; 然后,挑取典型弧菌单菌落接种于 2 mL 的 TSB 肉汤(盐度 25)中, 28 °C 摇床中 200 r/min 振荡培养 16 ~ 18 h; 取 1 mL 菌液置于 1.5 mL 离心管中 12 000 r/min 离心 2 min 收集菌体,参照 Wizard[®] 基因组 DNA 纯化试剂盒的操作说明提取基因组 DNA,用作 PCR 模板。

1.3 引物设计与单引物特异性检测

1.3.1 引物的设计与退火温度的优化

根据 GenBank 中 1 类整合子整合酶基因 *int1* (Accession No. KU130396.1)、4 类超级整合子整合酶基因 *int_{SXT}* (Accession No. GQ495075.1) 和 1 型插入序列共同区转座酶基因 *ISCR1* (Accession No. KT725789.1) 的序列,利用多重 PCR 引物设计软件 PrimerPlex 2.61 (PREMIER Biosoft) 设计 1 套(3 对)PCR 引物,交由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表 1)。

之后,在各对引物 TM 值基础之上,分别通过改变 PCR 反应程序中的退火温度值进行梯度扩增(3 次重复试验),以确定各对引物 PCR 反应的最佳退火温度。PCR 反应体系: Premix Ex TaqTM 12.5 μL、上下游引物(10 pmol/L)各 0.5 μL、DNA 模板 0.5 μL,超纯水定容至 25 μL。梯度 PCR 扩增程序: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 40 s, 47 ~ 52.5 °C (即: 47.0 °C、47.5 °C、48.0 °C、48.5 °C、49.0 °C、49.5 °C、50.0 °C、50.5 °C、51.0 °C、51.5 °C、52.0 °C 和 52.5 °C) 退火 35 s, 72 °C 延伸 40 s, 30 个循环; 最后 72 °C 再延伸 10 min, 4 °C 保存。

1.3.2 单引物特异性及灵敏度检测

以第 1.1.1 节中的阳性对照菌和阴性对照菌基因组 DNA 为模板,按照第 1.3.1 节所述的 PCR 反应体系及确定的最佳 PCR 反应程序(退

火温度),使用上述合成的 3 对引物分别进行 PCR 扩增,PCR 产物经 TA 克隆后测序,并将结果与 GenBank 上公布的序列进行比对分析,以检测引物的特异性。

将第 1.1.1 节中的阳性对照菌 V_A -001 基因组 DNA(浓度 700 ng/ μ L)依次梯度稀释为:350、160、80、40、20、10、5、2.5、1.2、0.6、0.3、0.15、

0.08、0.04、0.02、0.01、0.005、0.002、0.001、0.0005、0.0002、0.0001 和 0.00005 ng/ μ L,用作模板 DNA。然后,利用上述 PCR 反应程序对设计的 3 对引物分别进行单独 PCR 扩增,并将 PCR 产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳,以获得所设计各对引物的灵敏度。同时,采用上述方法检测文献中 3 对单引物(表 2)的灵敏度。

表 1 多重 PCR 扩增所用引物序列
Tab.1 Sequences of primers for multi-PCR amplification

基因 genes	引物 primers	序列(5'-3') sequences (5'-3')	T_m 值/ $^{\circ}$ C T_m value	产物长度/bp size of products	GenBank 登录号 accession No.
<i>intI</i>	<i>intI</i> -F	CGAACCGAACAGGCTTAT	49.9	569	KU130396.1
	<i>intI</i> -R	GGATACTTCCGCTCAAGG	49.6		
<i>int_{SXT}</i>	<i>int_{SXT}</i> -F	CTCTACCTACAGCAGGAACG	50.4	430	GQ495075.1
	<i>int_{SXT}</i> -R	TCTCAGTGATTTTGGACTCG	50.7		
<i>ISCR1</i>	<i>ISCR1</i> -F	AGACGATACGCTGACTCA	50.2	651	KT725789.1
	<i>ISCR1</i> -R	AGAATCTGCTCAATGACCTT	49.9		

1.4 多重 PCR 反应体系的建立及优化

1.4.1 多重 PCR 反应体系的建立

以第 1.1.1 节中的阳性对照菌基因组 DNA 为模板,按照第 1.3.1 节中的描述建立 25 μ L 多重 PCR 体系,其中 *intI*、*int_{SXT}* 和 *ISCR1* 的上下游引物(10 pmol/L)体积均为 0.5 μ L。在第 1.3.1 节中所获得的各引物最佳退火温度的基础上,选取适合的多重 PCR 反应退火条件,按照第 1.3.1 节所述的 PCR 程序进行目的基因的扩增。扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳(120 V,40 min)后,利用凝胶成像系统观察结果,依据结果对多重 PCR 反应体系进行优化。

1.4.2 多重 PCR 体系引物体积组合的优化

结合第 1.3.2 节中单引物灵敏度检测结果及第 1.4.1 节中初始多重 PCR 反应体系的检测结果,将退火温度固定为 50 $^{\circ}$ C,然后对 *intI*、*int_{SXT}* 和 *ISCR1* 3 对目的基因引物(10 pmol/L)的体积组合进行优化。在预设的 *intI* (0.3、0.4 和 0.5 μ L)、*int_{SXT}* (0.4、0.5 和 0.6 μ L) 和 *ISCR1* (0.4、0.5 和 0.6 μ L) 体积范围内,进行三因素三水平的全面实验,以确定各引物的最佳体积组合。

1.4.3 退火温度的优化

按照第 1.4.1 节中描述的 PCR 体系和第 1.

4.2 节中得到的各引物最优体积组合,建立 25 μ L 多重 PCR 体系,设定一系列退火温度:47.0、47.5、48.0、48.5、49.0、49.5、50.0、50.5、51.0、51.5、52.0 和 52.5 $^{\circ}$ C,以确定多重 PCR 反应的最佳退火温度。

1.5 多重 PCR 体系的灵敏度检测

以阳性对照菌株溶藻弧菌 V_A -001 的基因组 DNA(浓度为 700 ng/ μ L)为模板,按照第 1.3.2 节中描述的方法对其进行系列的梯度稀释,用作多重 PCR 扩增的模板,以检测经第 1.4 节优化后的多重 PCR 体系的灵敏度(3 次重复实验)。

1.6 多重 PCR 体系的应用

利用所建立多重 PCR 反应体系对临床分离的 222 株弧菌进行 *intI*、*int_{SXT}* 和 *ISCR1* 基因的检测(3 次重复试验),以溶藻弧菌 V_A -001、创伤弧菌 V_V -311、溶藻弧菌 V_A -352、溶藻弧菌 V_A -368、副溶血弧菌 V_P -046 作为阳性对照,副溶血弧菌 CICC21617、创伤弧菌 CICC10484、溶藻弧菌 CICC10484 作为阴性对照,以灭菌去离子水作为 DNA 模板的空白对照。并且,利用文献中报道的 *intI*^[13]、*int_{SXT}*^[14] 和 *ISCR1*^[15] 3 对单引物对 222 株分离株进行检测,并将这 2 种检测方法的结果进行比较分析。

表 2 参考文献引物序列
Tab.2 Sequences of primers from references

基因 genes	序列(5'-3') sequences (5'-3')	产物长度/bp size of products/bp	T _m 值/℃ T _m value/℃	参考文献 references
<i>intI</i>	GTTCGGTCAAGGTTCTGG	890	60.0	[13]
	CGTAGAGACGTCGGAATG		58.2	
<i>int_{SXT}</i>	CTGTGGCCAATCATCAACTC	1034	57.8	[14]
	CGACCGAGATGGGCTAAGTG		61.9	
ISCR1	ATGTCGCTGGCAAGGAACGC	1532	57.8	[15]
	AGACGACTCTGTGATGGATC		61.9	

2 结果

2.1 多重 PCR 引物及最佳退火温度

依据 GenBank 公布的 DNA 序列,利用 PrimerPlex 2.61 设计得到 3 对 PCR 引物,各引物的具体参数详见表 1。在引物软件给出的 T_m 值基础之上,通过调整退火温度的大小进行梯度 PCR 扩增的结果表明,退火温度在 48.5 ~ 51.0 °C 范围时,3 对 PCR 引物均能实现良好的扩增,PCR 产物的电泳条带清晰。基于此,本研究取 50.0 °C 作为多重 PCR 反应的初始退火温度。

2.2 单引物特异性及灵敏度检测结果

以 *intI*、*int_{SXT}* 和 ISCR1 基因设计的 3 对引物能分别特异性地扩增出约 550 bp(菌株 V_A-001、V_V-311 和 V_A-352)、450 bp(菌株 V_A-001、V_A-352 和 V_P-046)和 650 bp(菌株 V_A-001、V_V-311 和 V_P-046)左右的片段。PCR 产物测序的结果与 Genbank 上的序列比较显示,*intI* 的测序结果与 Genbank 中 LN831185.1 序列的相似度为 99% ~ 100%; *int_{SXT}* 的测序结果与 GenBank 中 DQ180349.1 的相似度为 97% ~ 100%; ISCR1 的测序结果与 GenBank 中的 KT725788.1 序列的相似度为 100%。此外,以阴性对照溶藻弧菌 CICC10484、副溶血弧菌 CICC21617 和创伤弧菌 CICC10383 的基因组 DNA 为模板的 PCR 扩增没有得到目的条带。

利用阳性对照株 V_A-001 弧菌基因组不同浓度 DNA (700 ~ 0.000 05 ng/μL) 为模板,电泳结果显示:本实验中设计的 *intI*、*int_{SXT}* 和 ISCR1 基因引物可分别在模板浓度 ≥ 0.005 ng/μL、0.01 ng/μL 和 0.02 ng/μL 的条件下扩增出单一可辨的特异性目的条带,且随着模板浓度的降低,条带亮度也随之依次降低,因此该 3 对引物的灵敏度分别是 0.005 ng/μL、0.01 ng/μL 和 0.02 ng/μL。文献中 *intI*、*int_{SXT}* 和 ISCR1 基因引物的灵敏度检

测结果分别是 0.02 ng/μL、0.02 ng/μL 和 0.02 ng/μL。

2.3 多重 PCR 反应体系的建立与优化

单引物灵敏度检测结果发现,*intI* 基因引物灵敏度高,且当多重 PCR 反应体系中 3 对引物的体积均为 0.5 μL (10 pmol/L) 时,该引物扩增的目的条带的亮度要明显高于 *int_{SXT}* 和 ISCR1 目的条带的亮度。鉴于此,本研究拟通过减少 *intI* 引物体积和/或增加 *int_{SXT}* 和 ISCR1 引物体积的方式来优化该多重 PCR 体系。故而,将 *intI* (0.3 μL、0.4 μL 和 0.5 μL)、*int_{SXT}* (0.4 μL、0.5 μL 和 0.6 μL) 和 ISCR1 (0.4 μL、0.5 μL 和 0.6 μL) 引物体积限定后,进行三因素三水平的全面实验。结果显示,当上述 3 对基因引物的体积组合为:0.3 μL (*intI*)、0.6 μL (*int_{SXT}*) 和 0.6 μL (ISCR1) 时,该反应体系扩增出的 3 条目的条带清晰,亮度均一,区别度较好。

如表 1 所示,利用 PrimerPlex 2.61 设计 6 条 (3 对) PCR 单引物的 T_m 值在 49.6 ~ 50.7 °C 之间。因此,选择在 47.5 ~ 52.5 °C 范围内对多重 PCR 体系的退火温度进行优化。结果显示,在此温度范围内均可特异性地扩增出 3 个目的基因条带,但扩增效率存在一定差异。当退火温度在 47.5 ~ 49 °C 时,*int_{SXT}* 基因的电泳条带相对略弱;而退火温度在 52 °C 及以上时,*intI* 基因的电泳条带相对较弱。最终发现,多重 PCR 体系的退火温度为 50 °C 时,3 对引物扩增效率基本一致,扩增的目的条带清晰,均一性好。

2.4 多重 PCR 体系的灵敏度分析

同时对含有 *intI*、ISCR1 和 SXT 3 种元件的阳性对照株溶藻弧菌 V_A-001 基因组 DNA 做梯度稀释 (700 ng/μL ~ 0.000 05 ng/μL),以测定多重 PCR 体系的敏感性。结果如图 1 所示,随着多重 PCR 体系中加入模板 DNA 浓度的降低,扩增出的条带亮度呈现出逐渐减弱趋势,到 0.02 ng/μL

以下浓度基本已观察不清条带;0.02 ng/ μ L 及以上浓度条带清晰,扩增效果稳定。

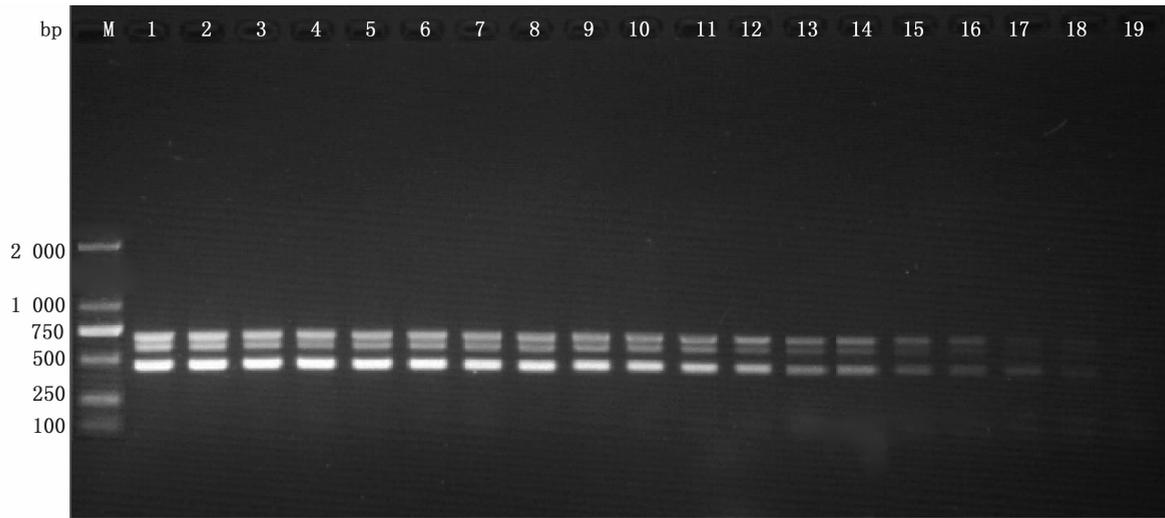


图1 多重 PCR 反应灵敏度检测

Fig.1 Sensitivity tests of the multiplex PCR using V_A -001 DNA

M. DL2000 DNA Marker; 1 - 19. V_A -001 DNA 模板浓度依次为 700、350、160、80、40、20、10、5、2.5、1.2、0.6、0.3、0.15、0.08、0.04、0.02、0.01、0.005 和 0.002 ng/ μ L

M. DL2000 DNA Marker; 1 - 19. the concentrations of V_A -001 DNA templates is 700、350、160、80、40、20、10、5、2.5、1.2、0.6、0.3、0.15、0.08、0.04、0.02、0.01、0.005、0.002 ng/ μ L, respectively

2.5 多重 PCR 检测方法的应用

应用所建立的多重 PCR 体系检测 222 株临床分离弧菌 Int1、SXT 和 ISCR1 的携带情况,3 组平行试验检测结果一致(表 3),图 2 为部分菌株的多重 PCR 电泳图。1 类整合子 Int1 阳性弧菌 24 株,4 类超级整合子 SXT 阳性弧菌 37 株,1 型

插入序列共同区 ISCR1 阳性弧菌 25 株;其中,同时含有 Int1 和 ISCR1 的弧菌有 13 株,同时含有 Int1 和 SXT 的弧菌 4 株,3 种基因同时存在的弧菌仅 1 株。同时,222 株弧菌的多重 PCR 检测结果与利用文献上公布的 *int1*、*int*_{SXT} 和 *ISCR1* 单引物(表 2)PCR 扩增得到的结果相一致。

表 3 222 株临床分离弧菌 3 种整合子相关元件检出结果

Tab.3 The results of three kinds of integron-related elements test in 222 clinical *Vibrio* strains

菌种/数量/株 species/No.	整合子元件/株 integron elements						
	Int1	SXT	ISCR1	Int1 + SXT	Int1 + ISCR1	SXT + ISCR1	Int1 + SXT + ISCR
副溶血弧菌(133) <i>V. parahaemolyticus</i> (133)	6	22	8	0	6	0	0
哈维氏弧菌(32) <i>V. harveyi</i> (32)	5	7	4	1	2	0	0
溶藻弧菌(36) <i>V. alginolyticus</i> (36)	11	4	9	2	4	0	1
创伤弧菌(10) <i>V. vulnificus</i> (10)	1	1	2	0	1	0	0
霍乱弧菌(7) <i>V. cholerae</i> (7)	0	0	2	0	0	0	0
鳗弧菌(4) <i>V. anguillarum</i> (4)	1	3	0	1	0	0	0
合计(222) total (222)	24	37	25	4	13	0	1

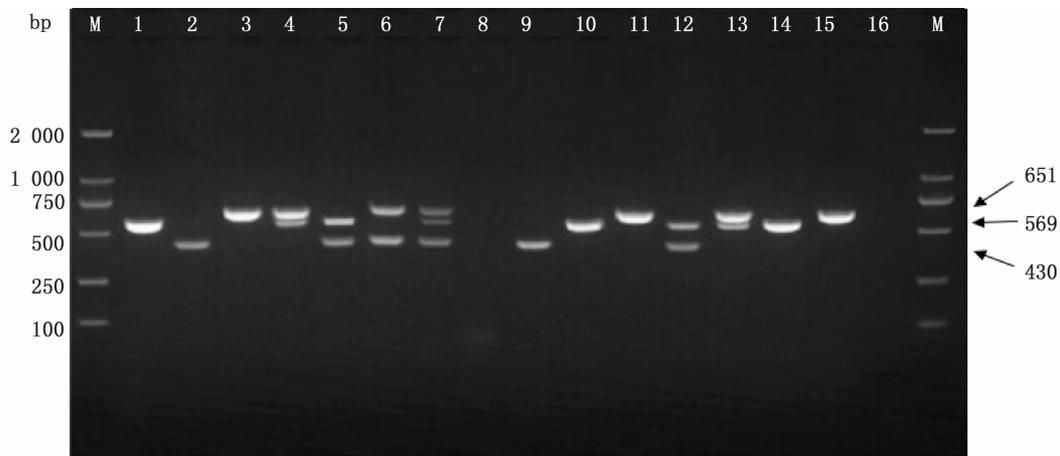


图2 不同 DNA 模板的多重 PCR 扩增电泳图谱

Fig.2 Electrophoresis profile of multiplex PCR amplification against various DNA templates

M. DL2000 DNA Marker; 1. *Int1* (569 bp); 2. *SXT* (430 bp); 3. *ISCR1* (651 bp); 4-7. 阳性对照(依次为: *V_V*-311, *V_A*-352, *V_P*-046 和 *V_A*-001); 8. 阴性对照(溶藻弧菌 CICC10484); 9-15. 临床分离弧菌样品(依次为: *V*-317, *V*-345, *V*-307, *V*-366, *V*-368, *V*-022 和 *V*-013); 16. 空白对照(无菌水)

M. DL2000 DNA Marker; 1. *Int1* (569 bp); 2. *SXT* (430 bp); 3. *ISCR1* (651 bp); 4-7. Positive control (*V_V*-311, *V_A*-352, *V_P*-046 and *V_A*-001, respectively); 8. Negative control (*V. alginolyticus* CICC10484); 9-15. Clinical *Vibrio* isolates (*V*-317, *V*-345, *V*-307, *V*-366, *V*-368, *V*-022 and *V*-013, respectively); 16. Blank control (Sterile water)

3 讨论

整合子在细菌耐药性尤其是多重耐药性的转移扩散中起到了非常重要的作用,是革兰氏阴性菌耐药趋势逐年升高的主要原因之一^[16-17],因此整合子的流行情况可作为评判细菌抗菌药物耐药严重性的指征之一。整合子相关元件也是介导水产养殖源弧菌耐药性传播的一类可移动遗传元件,且以 1 类整合子、4 类超级整合子 *SXT* 和 1 型插入序列共同 *ISCR1* 元件为主,而 2、3 类整合子极少。目前,整合子元件的检测以单对 PCR 引物扩增为主。为了能够实现养殖源弧菌中三类常见整合子相关元件的同时检测,本研究建立了一种多重 PCR 检测方法。与单对引物 PCR 相比,该方法更为省时省力,且能够节约检测成本;与荧光定量 PCR 方法相比,其具备操作相对简单、成本低和不易出现假阳性等优点。因此,整体上来说,本研究针对 3 种整合子相关元件建立的多重 PCR 检测方法,具有操作简便、节省时间和成本等优点,且该方法的检测限能够满足临床检测的要求。

多重 PCR 技术是通过在同一 PCR 反应体系中添加多对引物,对多个靶点序列同时进行扩增的一种分子生物学诊断方法,具有操作简单、节约时间和经济高效等优点。引物的特异性是多

重 PCR 方法的关键。本研究根据 GenBank 中公布的 *int1*、*int_{SXT}* 和 *ISCR1* 基因序列,利用多重 PCR 引物设计软件 PrimerPlex 2.61 设计了 1 套(3 对) PCR 引物。单引物特异性及灵敏度检测实验显示,上述设计的 3 对引物在 DNA 模板浓度分别在 0.005 ng/μL、0.01 ng/μL 和 0.02 ng/μL 及以上时,均能扩增得到预期大小的目的片段,且阴性和空白对照样品没有条带出现。由此说明,利用这些引物能实现对 *int1*、*int_{SXT}* 和 *ISCR1* 基因的特异性扩增检测且敏感性好。基于此,本研究利用这 3 对引物初步建立了同时检测 *Int1*、*SXT* 和 *ISCR1* 元件的多重 PCR 体系。

影响多重 PCR 扩增反应的因素很多,包括: Mg^{2+} 浓度、Taq 酶浓度、dNTP 浓度、引物的浓度与退火温度等^[18]。考虑到实际情况,多数的 PCR 扩增实验使用的是 Mg^{2+} 、Taq 酶和 4 种 dNTP 的预混液。本研究使用的是 Premix Ex Taq™ (TaKaRa, RR902A),故而未对所建立的多重 PCR 体系中 Mg^{2+} 浓度、Taq 酶浓度和 dNTP 浓度进行优化。引物的浓度是 PCR 扩增体系中的关键因素之一,不同的引物在同一 PCR 反应体系中形成竞争关系;在有限量的 Mg^{2+} 、Taq 酶和 dNTP 情况下,引物的浓度与其扩增产物电泳条带的亮度成正相关。此外,PCR 扩增的效率与引物的碱基序列有关,这也就造成了不同引物扩增效率的

差异。本实验结果显示,当多重 PCR 体系中 3 对引物体积相等时,*int1* 引物扩增得到的目的电泳条带亮度明显高于其他两对引物得到的目的条带,表明在该体系中 *int1* 引物竞争能力强,因此扩增效率相对更高;当 *int1*、*int_{SXT}* 和 *ISCR1* 引物体积分别为 0.3 μL 、0.6 μL 和 0.6 μL 时,多重反应体系中各引物之间的竞争能力相互平衡,故扩增得到的三条目的条带亮度清晰一致。此外,退火温度是影响多重 PCR 扩增的另外一个重要因素。本研究在优化出 PCR 反应最优引物体积组合的基础上进一步优化退火温度,当退火温度为 50 $^{\circ}\text{C}$ 时扩增得到目的电泳条带清晰,扩增效率最佳。实验中发现,当退火温度低于 49 $^{\circ}\text{C}$ 时,*int_{SXT}* 目的条带较弱,有微弱的非特异性条带出现;当退火温度高于 52 $^{\circ}\text{C}$ 时,*int1* 的扩增效率降低,条带亮度减弱。灵敏度实验结果显示,本研究建立的多重 PCR 反应体系最低能在 0.02 $\text{ng}/\mu\text{L}$ DNA 浓度时扩增出目的条带,各单引物的检测灵敏度均略高于多重 PCR 的检测灵敏度。在实验室检测中,通过水煮法或利用细菌基因组试剂盒提取的基因组 DNA 模板浓度均可达到 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 以上。本研究对参考文献中所涉及的 3 对引物灵敏度进行了测试,并与本文设计的引物的灵敏度进行了比较,结果发现就单一引物之间比较而言,所设计的引物具有更好的灵敏度,可达 1~2 个数量级的差别;多重 PCR 反应的灵敏度则与文献中各基因单引物的检测灵敏度相当,对阳性菌株的检出结果完全一致。因此,本研究建立的多重 PCR 反应体系的灵敏度完全能满足细菌中 *Int1*、*SXT* 和 *ISCR1* 元件的检测要求。在实际应用过程中发现,利用所建立的多重 PCR 体系对 222 株对虾源分离弧菌 3 次平行试验检测结果与文献公布的单引物 PCR 方法检测结果一致,无假阴性或假阳性出现,说明该多重 PCR 体系重复性好,具有良好的敏感性与特异性。

综上所述,本研究建立了一种可同时检测 3 种整合子相关元件(*Int1*、*SXT* 和 *ISCR1*)的多重 PCR 方法,且扩增得到的目的电泳条带清晰,区分度良好。实际应用结果表明,该方法能够满足在临床分离菌株中实现 3 种整合子相关元件的快速检测要求。

参考文献:

- [1] WU K H, WANG F P, SUN J J, et al. Class I integron gene cassettes in multidrug-resistant Gram-negative bacteria in southern China[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2012, 40(3): 264–267.
- [2] HALL R M, COLLIS C M. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination[J]. *Molecular Microbiology*, 1995, 15(4): 593–600.
- [3] RECCHIA G D, HALL R M. Gene cassettes: a new class of mobile element[J]. *Microbiology*, 1996, 141(12): 3015–3027.
- [4] TOLEMAN M A, BENNETT P M, WALSH T R. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st Century? [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2006, 70(2): 296–316.
- [5] 孙景勇,倪语星. 非 O1、非 O139 型霍乱弧菌中首次发现 PER-1 超广谱 β 内酰胺酶[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2010, 10(5): 338–341.
SUN J Y, NI Y X. First identification and genetic analysis of extended-spectrum β -lactamase PER-1 in a strain of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* [J]. *Chinese Journal of Infection and Chemotherapy*, 2010, 10(5): 338–341.
- [6] 邓玉婷,曾振灵,刘健华,等. 插入序列共同区元件: 细菌中新出现的一种基因捕获系统[J]. *微生物学报*, 2009, 48(8): 987–993.
DENG Y T, ZENG Z L, LIU J H, et al. Insertion sequence common region element: a novel gene-capturing system in bacteria-A review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 48(8): 987–993.
- [7] VAISVILA R, MORGAN R D, POSFAI J, et al. Discovery and distribution of super-integrons among pseudomonads[J]. *Molecular Microbiology*, 2001, 42(3): 587–601.
- [8] JAIN M, KUMAR P, GOEL A K, et al. Class I integrons and SXT elements conferring multidrug resistance in *Vibrio cholerae* O1 strains associated with a recent large cholera outbreak in Orissa, Eastern India[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2008, 32(5): 459–460.
- [9] RAJPARA N, KUTAR B M, SINHA R, et al. Role of integrons, plasmids and SXT elements in multidrug resistance of *Vibrio cholerae* and *Providencia vermicola* obtained from a clinical isolate of diarrhea[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6(57): 1–11.
- [10] KUMAR P, THOMAS S. Presence of *qnrVC3* gene cassette in SXT and class I integrons of *Vibrio cholerae* [J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2011, 37(3): 280–281.
- [11] IWANAGA M, TOMA C, MIYAZATO T, et al. Antibiotic resistance conferred by a class I integron and SXT constin in *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in Laos[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004, 48(7): 2364–2369.

- [12] 姚小娟. 海水养殖源弧菌耐药性检测与整合子分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2014.
YAO X J. Drug resistance detection and integrons analysis of *Vibrios* from mariculture source [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2014.
- [13] XU H, DAVIES J, MIAO V. Molecular characterization of class 3 integrons from *Delftia* spp [J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(17): 389–394.
- [14] RODRIGUEZ-BLANCO A, LEMOS M L, OSORIO C R. Integrating conjugative elements as vectors of antibiotic, mercury, and quaternary ammonium compound resistance in marine aquaculture environments[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2012, 56(5): 2619–2626.
- [15] 陈霞, 袁敏, 李桂喜, 等. 基因捕获元件 *intI* 和 *ISCR1* 在临床菌株中的分布及与细菌耐药性的关系研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2013, 29(7): 646–652.
CHEN X, YUAN M, LI G X, et al. Dissemination of *intI* gene and *ISCR1* and their relations with multi-drug resistance in clinical isolates[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2013, 29(7): 646–652.
- [16] ROWE-MAGNUS D A, GUEROUT A M, MAZEL D. Bacterial resistance evolution by recruitment of super-integron gene cassettes[J]. Molecular Microbiology, 2002, 43(6): 1657–1669.
- [17] 冯洁, 石磊, 肖增璜, 等. 细菌耐药整合子 *intI* 分类的多重 PCR 方法的建立及应用[J]. 中国抗生素杂志, 2005, 30(10): 599–603, 630.
FENG J, SHI L, XIAO Z H, et al. Construction and application of multi-PCR assay to screen antibiotic resistance integrons in bacteria [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2005, 30(10): 599–603, 630.
- [18] 潘孝明. 基于 LM-PCR 预扩增法的建立及其在水产品致病菌检测中的应用[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
PAN X M. Development of a pre-amplification method based on LM-PCR and its applications on detection of pathogens in seafood[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014.

Development of multiplex PCR detection of integron-related elements and its application in *Vibrio* spp.

LIU Xu^{1,2}, MA Licai¹, ZHAO Shu¹, LI Jian^{1,2}, WANG Yuan¹, FANG Wenhong¹

(1. Key and Open Laboratory of Marine and Estuarine Fisheries, Ministry of Agriculture, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Science, Shanghai 200090, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: In order to establish a multi-PCR detection method for the simultaneous detection of class 1 integron (*Int1*), class 4 integron (*SXT*) and insertion sequence common region 1 (*ISCR1*), three pairs of specific primers were designed using PrimerPlex 2.61 based on the gene sequence of *intI*, *int_{SXT}* and *ISCR1* in GenBank. The multiplex PCR system was established and optimized by changing the primer volume and annealing temperature. The specificity and sensitivity of the optimized multiplex PCR were also evaluated, and then the multiplex PCR was applied to the detection of three kinds of integron-related elements in 222 *Vibrio* strains of mariculture source. The results showed that the above primers could amplify three bands of 569 bp, 430 bp and 651 bp specifically. The optimized reaction conditions were as follows: the volume of primers 0.3 μL for *intI*, 0.6 μL for *int_{SXT}*, and 0.6 μL for *ISCR1*, and anneal temperature 50 $^{\circ}\text{C}$. Under the conditions, the detection minimum limit was 0.02 ng/ μL of genome DNA. The results of detection for the above three integron-related elements in 222 *Vibrio* strains, using the optimized multiplex PCR, were the same as that of the control assays. In short, this study provides an effective multiplex PCR method for the simultaneous detection of *intI*, *int_{SXT}* and *ISCR1*, which could be applied to studies on integron-associated antimicrobial resistance.

Key words: multiplex PCR; integron; *SXT*; *ISCR1*; *Vibrio*