

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.12.04

随机扩增多态性 DNA 技术对绿色气球菌的相关性分析

王羽,董文龙,张喜庆,马红霞,高云航*

(吉林农业大学动物科学技术学院,长春 130118)

[收稿日期] 2017-03-30 [文献标识码]A [文章编号]1002-1280 (2017) 12-0019-05 [中图分类号]S855.1⁺1

[摘要] 随着分子生物学的发展,16S、23S rRNA 以及 16S~23S rRNA 已应用于菌种鉴定。16S~23S rRNA 的基因间隔区相对于前两者有较高的变异性,弥补了 16S 和 23S rRNA 保守性强,分化程度不够的缺点。本研究对 7 株绿色气球菌和两株屎肠球菌扩增 16S~23S rRNA 基因间隔序列。通过随机扩增多态性 DNA 技术分析绿色气球菌 DNA,评价不同菌株间的克隆相关性及其耐药性。

[关键词] 绿色气球菌;16S~23S rRNA;随机扩增多态性 DNA 技术

Drug Resistance Analysis of *Aerococcus viridians* by Random Amplified Polymorphic DNA

WANG Yu, DONG Wen-long, ZHANG Xi-qing, MA Hong-xia, GAO Yun-hang*

(College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Corresponding author: GAO Yun-hang, E-mail: gaoyunhang@163.com

Abstract: With the development of molecular biology, the genes of 16S, 23S and 16S~23S rRNA have been used in strain identification. The gene intergenic spacer (ISR) of 16S~23S rRNA has a higher variability than the former two, which remedies the defects of the strong conservative and the lack of differentiations of 16S and 23S rRNA. In this study, we amplified the ISR of 7 *Aerococcus viridian* strains and 2 *Enterococcus faecium* strains. We analysed the DNA of *Aerococcus viridian* strains and evaluated the clone correlations and resistances of different strains by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD).

Key words: *Aerococcus viridians*; 16S~23S rRNA; RAPD

绿色气球菌属于条件致病菌,广泛分布于自然界。该菌可以在免疫力低下,开放性外伤,静脉置留管及烧伤患者的血液、尿液、脑脊液、伤口组织液等标本中分离出,是重要的机会致病菌^[1]。在细菌进化过程中,rRNA 基因的进化相对保守,被认为是衡量生命进化史最理想的标尺^[2]。由于 16S 和 23S

基因在同一属内的不同菌株间的同源性太高,无法区分某些种系非常接近的种和型,因此必须找到其他种特异性序列^[3]。国外研究已经证实 16S~23S rRNA ISR 序列的进化率要强于 16S rRNA 基因的 10 倍^[4]。因此,16S~23S rRNA ISR 更适合区分不同细菌的特点。1990 年,由 Williams 等基于 PCR

作者简介:王羽,硕士生,从事动物疫病防治研究。

通讯作者:高云航。E-mail:gaoyunhang@163.com

技术之上首次推出了一种简单、灵敏可行的遗传标记技术——随机扩增多态性 DNA^[5]。在随机扩增多态 DNA 中,用任意选择的核苷酸序列的引物扩增基因组 DNA,不同菌株的 RAPD 指纹可以根据 PCR 产物的数量和大小进行比较^[6]。这些扩增的 DNA 片段多态性反映出基因组 DNA 相应区域的多态性。本研究对 7 株绿色气球菌及 2 株屎肠球菌 PCR 扩增 16S~23S rRNA ISR 全序列,并通过随机扩增多态性 DNA 技术分析绿色气球菌 DNA,为评价不同菌株间的克隆相关性及其耐药性提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌种 7 株绿色气球菌及 2 株屎肠球菌由吉林农业大学动物科学技术学院预防兽医学研究室分离保存。

1.2 主要试剂 胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB),

购自青岛高科园海博生物技术有限公司。胎牛血清购自于北京元亨圣马生物技术研究。ExTaq 酶、dNTP、DNA Marker 2000、6×ExBuffer 购自 Takara 公司。胶回收试剂盒购自康宁生命科学(吴江)有限公司,细菌基因组提取试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 DNA 提取及 PCR 扩增 参考 Spaková T 等报道的绿色气球菌的基因间隔区(16S~23S)IGSRev-IGSFor 及多态性 ERIC 1R^[7] 的引物(表 1)。引物序列送上海生工生物工程股份有限公司进行合成。挑取单个菌落接种于 TSB 液体培养基中(含 5% 犊牛血清),置于 37 °C 水平摇床(170 r/min)增菌培养。取 1.6 mL 菌液 12000 r/min 离心,弃上清,按照细菌基因组提取试剂盒说明书提取菌株 DNA。

表 1 引物序列及 PCR 条件

Tab 1 Primer sequences and PCR condition

引物	引物序列	靶基因	PCR 条件 ^a
IGSRev	TACTTAGATGTTTCAGTTCC	intergenic spacer	1
IGSFor	TGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA	region of rDNA	
ERIC 1R	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	fingerprint of whole genome	2

a-1=35x(93oC 60s, 52oC 60s, 72oC 120s); 2=35x(94oC 30s, 40oC 45s, 72oC 45s)。

以提取的 DNA 为模板,对基因间隔区和多态性进行扩增。将基因间隔区 PCR 产物进行胶回收纯化,将纯化的 PCR 产物和 pMD-18T 连接过夜,将连接产物转化到 *E. coli*. DH5 α 感受态细胞,按照试剂盒提取质粒进行验证,并送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

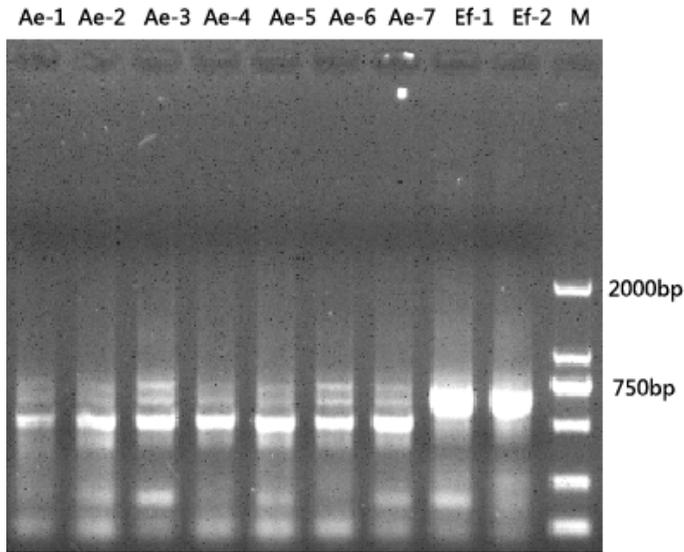
1.4 微量稀释法药敏试验 用 TSB 液体培养基溶解 11 种抗菌药物,并将药物稀释至 2048 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。应用微量稀释在无菌 96 孔培养板对抗菌药物进行二倍梯度稀释,使药液的终浓度由 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至 0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$,共 15 个浓度梯度。将终浓度为 10^6 CFU/mL 菌液加入含有抗菌药物的 96 孔板内,并设置对照,于 37 °C 恒温培养 24 h,进行 3 次重复

性试验。试验结果参考 CLSI 动物源细菌药敏试验标准。

2 结果与分析

2.1 16S-23S rRNA IGS 序列扩增 以 DNA 为模板,扩增绿色气球菌与屎肠球菌 ISR 引物,7 株绿色气球菌均在约 500、600、750 bp 处扩增出 3 条带,两株屎肠球菌均在约 600 bp 处扩增一条带,结果如图 1。

将主条带进行切胶、连接、转化并送往生工生物工程(上海)股份有限公司测序,7 株绿色球菌菌株扩增序列与 GenBank 上已公布的绿色气球菌 16S~23S rRNA 基因间隔区序列(登录号 JN977134.1) 同源性达到 99%,并建立进化树如图 2。

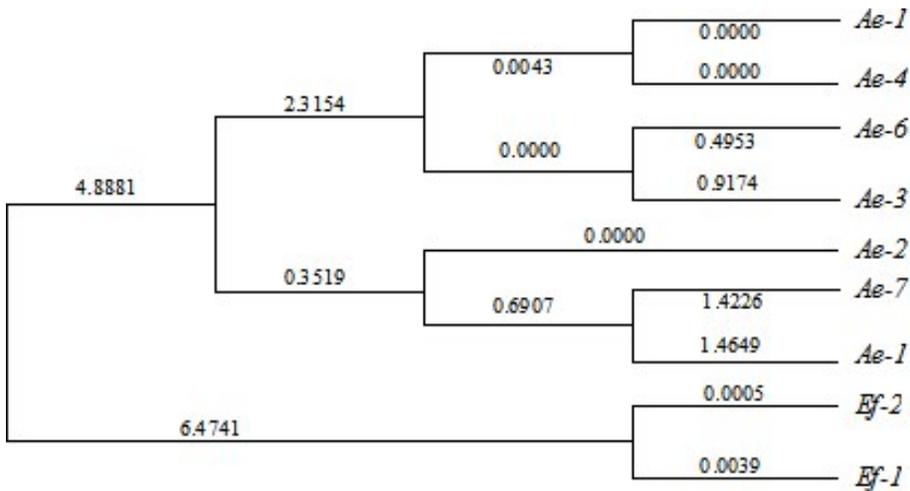


M; DL2 000 DNA Marker; Ae-1-- Ae-7; 绿色气球菌; Ef-1--Ef-2; 屎肠球菌

M; DL2 000 DNA Marker; Ae-1-- Ae-7; *Aerococcus viridians*; Ef-1--Ef-2; *Enterococcus faecium*

图 1 16S~23S rRNA ISR 基因序列 PCR 电泳图

Fig 1 PCR electrophoresis of 16S~23S rRNA ISR gene sequence



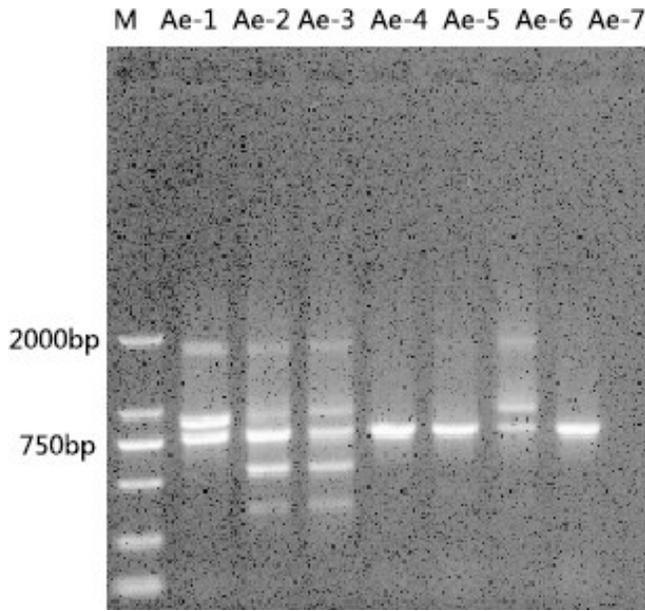
Ae-1--Ae-7; 绿色气球菌; Ef-1, Ef-2; 屎肠球菌

图 2 绿色气球菌与屎肠球菌 16S~23S rRNA ISR 系统进化树

Fig 2 Phylogenetic tree of 16S~23S rRNA ISR of *Aerococcus viridians* and *Enterococcus faecium*

2.2 绿色气球菌多态性序列扩增 绿色气球菌 RAPD 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳 EB 染色结果如图 3。应用引物 ERIC 1R 在 7 株绿色气球菌扩增出 5 个分子量明显不同的特异性片段, 不同菌株扩增

出 3 类 RAPD 指纹。Ae-1 与 Ae-6 有相似的指纹图谱, Ae-2 与 Ae-3 有相似的指纹图谱, Ae-4、Ae-5 与 Ae-7 有相似的指纹图谱, 证明所有分离菌株有限的变异性。



M:DL2 000 DNA Marker; Ae-1--Ae-7:绿色气球菌

M:DL2 000 DNA Marker; Ae-1-- Ae-7; Aerococcus viridians

图 3 绿色气球菌 RAPDA PCR 电泳图

Fig 3 PCR electrophoresis of 16S~23S rRNA ISR gene sequence

2.3 绿色气球菌药物敏感性分析结果 7 株绿色气球菌对 11 种药物的敏感性分析如表 2。Ae-1 与 Ae-6 相同耐药谱。Ae-1 与 Ae-2 有相似的耐药

谱。Ae-3 与 Ae-4 有相同的耐药谱。Ae-4、Ae-5 与 Ae-7 相似的耐药谱。

表 2 绿色气球菌药物敏感性分析结果

Tab 2 The drugs resistance of Aerococcus viridians

药物	Ae-1	Ae-2	Ae-3	Ae-4	Ae-5	Ae-6	Ae-7
强力霉素	R	R	R	R	R	R	R
阿米卡星	S	S	I	I	I	S	I
新霉素	R	R	R	R	R	R	R
卡那霉素	R	R	R	R	R	R	R
克拉霉素	R	R	R	R	R	R	R
氟苯尼考	S	R	S	S	I	S	S
阿莫西林	R	R	I	I	I	R	R
环丙沙星	S	I	S	S	S	S	I
氯霉素	R	R	S	S	R	R	R
阿奇霉素	R	R	R	R	R	R	R
氧氟沙星	S	S	S	S	S	S	S

3 讨论与小结

Matsuda 等利用 16S~23S rRNA 基因的种属特异性引物建立了大肠埃希杆菌,粪肠球菌,金黄色葡萄球菌,产气荚膜梭菌和绿脓假单胞菌的分析曲线,通过检测肠道中的优势菌群,为肠道中共生细菌的检测和定量提供了敏感快速的方法^[8]。近年来,国外已利用 16S~23S rRNA 基因区间用于菌种的鉴定及种系发育研究,如本实验根据参考文献合成 16S 3'末端保守序列同 23S 5'端保守序列通用引物,PCR 扩增 16S~23S rRNA ISR 全序列。16S~23S rRNA ISR 序列比较结果表明 7 株绿色气球菌有较高的同源性,两株屎肠球菌有较高的同源性且单独在一个分支上,表明 16S~23S rRNA ISR 序列在种间及属间具有较高的变异性,可以明显区分绿色气球菌同其他菌株。

1990 年 Williams 等建立随机扩增多态性 DNA 方法^[9],RAPD 分型是一种快速,可重复,高分辨率和经济的方法^[10]。在本研究中,Ae-1 与 Ae-6 有相似指纹又有相同耐药谱,提示它们可能来自同一克隆菌株,但可能发生了变异。Ae-2 与 Ae-3 有相似指纹却表现出不同的耐药谱,说明它们可能来自同一克隆株,但发生了明显的耐药变异。Ae-4、Ae-5 与 Ae-7 有相似的指纹亦有相似的耐药谱,提示它们可能来自同一克隆菌株,但可能发生了耐药变异。Ae-3 与 Ae-4 有相同耐药谱却表现出不同 RAPD 指纹,它们不太可能来自同一克隆株且发生了耐药传播。因此,对菌株耐药谱的 RAPD 分析,可推断其克隆相关性于耐药谱的关系。

参考文献:

[1] 陈东科,孙长贵.实用临床微生物学检验与图谱[M].北京:人民卫生出版社,2011.

Chen D K,Sun C G. Practical examination and Atlas of clinical microbiology[M]. Beijing: People's Health Publishing House,

2011.

[2] 石磊,沈宜,顾大勇,等.奇异变形杆菌、洛菲氏不动杆菌 16s rRNA3'-23s rRNA 5'间序列的克隆及测序[J].重庆医科大学学报,2006,6:783-835.

Shi L,Shen Y,Gu D Y, et al. Cloning and sequencing of the sequence of 16s rRNA3'-23s rRNA5' of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter xylophilus*[J]. J Chongqing Med Univ,2006,6:783-835.

[3] Mendoza M, Meugnier H, Bes M, et al. Identification of *Staphylococcus* species by 16S-23S rDNA intergenic spacer PCR analysis.[J]. INT J SYST BACTERIOL, 1998, 48 Pt 3(3):1049-1055.

[4] Gürtler V, Stanisich V A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region.[J]. Microbiology, 1996, 142 (Pt 1)(142(Pt 1)):3-16.

[5] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.[J]. NUCLEIC ACIDS RES, 1990, 18(22):6531-6535.

[6] Gajic I, Mijac V, Stanojevic M, et al. Typing of macrolide resistant group A streptococci by random amplified polymorphic DNA analysis.[J]. European Review for Medical & Pharmacological Sciences, 2014, 18(19):2960-2965.

[7] Spaková T, Elecko J, Vasil M, et al. Limited genetic diversity of *Aerococcus viridans* strains isolated from clinical and subclinical cases of bovine mastitis in Slovakia.[J]. POL J VET SCI, 2013, 15(2):329-335.

[8] Matsuda K, Tsuji H, Asahara T, et al. Sensitive Quantitative Detection of Commensal Bacteria by rRNA-Targeted Reverse Transcription-PCR[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2007, 73(1):32-39.

[9] Williams J G, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(22):6531-6535.

[10] Nielsen K L, Godfrey P A, Stegger M, et al. Selection of unique *Escherichia coli*, clones by random amplified polymorphic DNA (RAPD): Evaluation by whole genome sequencing[J]. Journal of Microbiological Methods, 2014, 103:101-103.

(编辑:侯向辉)