

• 基础实验研究论著 •

反向 PCR 扩增 I 类整合酶基因侧翼序列^{*}

冯 银,袁金玲,伍 勇,漆 涌,陈 体[△]

(中南大学湘雅三医院检验科,湖南长沙 410013)

摘 要:目的 采用反向 PCR 对 I 类整合酶基因侧翼序列进行检测分析。方法 以临床分离的 I 类整合子阳性大肠埃希菌为研究对象,用限制性内切酶 HindⅢ 对基因组 DNA 进行酶切,T4 DNA 连接酶使酶切产物自身环化,设计 I 类整合酶基因反向引物扩增 I 类整合酶基因侧翼序列。结果 临床分离大肠埃希菌中 I 类整合子检出率为 68.1%,反向 PCR 扩增得到 1 800 bp 大小的 I 类整合酶基因侧翼序列。结论 I 类整合子在临床分离大肠埃希菌中广泛存在,反向 PCR 对 I 类整合酶基因侧翼序列检测进一步明确了 I 类整合子的结构,并发现其侧翼序列存在 RNA 聚合酶基因 β 亚基,为 I 类整合子调控基因分析及克隆奠定了研究基础。

关键词:聚合酶链反应; 基因; 整合酶类

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.08.003

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)08-0919-02

Using reverse PCR to analysis flanking DNA regions of class I integrons^{*}

Feng Yin,Yuan Jinling,Wu Yong,Qi Yong,Chen Ti[△]

(Department of Clinical Laboratory,the Third Xiangya Hospital of

Central South University,Changsha,Hunan 410013,China)

Abstract:**Objective** The flanking DNA regions of class 1 integrons were detected using reverse PCR. **Methods** Genomic DNA of Escherichia coli strains from clinic samples were digested by the restriction enzymes Hind Ⅲ. With the help of T4 DNA ligase, the digested fragments will self-ligase. Reverse primers were designed to amplify the 5' and 3' flanking sequences of class I integrase gene. **Results** Study of clinic samples indicated that class I integron was expressed in 68.1% of Escherichia coli strains. 1 800 bp DNA fragment can be obtained from flanking DNA regions of class I integrons by reverse PCR. **Conclusion** Our clinic study indicated that distribution of class I integron in Escherichia coli is prevalent. And we further identified the structure of class I integron, there is RNA polymerase gene β subunits in flanking region of class I integron. Our researches provide support for the gene analysis of the regulation of class I integron and cloning research in the future.

Key words: polymerase chain reaction; genes; integrases

整合子在整合酶的作用下能够识别并俘获或删除移动性基因盒^[1]。近年来整合子系统对细菌耐药形成的作用备受关注^[2-6]。以往对 I 类整合酶阳性菌株的耐药基因盒分析较多^[7-8],而对整合酶基因的表达调控机制研究甚少。一个基因的表达很大程度上是由它的侧翼序列调控的,因此,克隆整合酶基因的侧翼序列对研究整合酶的表达调控就显得尤其重要。本研究以临床分离的 I 类整合子阳性菌株为研究对象,采用反向 PCR 扩增 I 类整合酶基因的侧翼序列。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 2009 年 6~12 月中南大学湘雅三医院住院患者痰、尿和血液等标本中连续分离的不重复大肠埃希菌 72 株。O1 群霍乱弧菌 SK10 为 I 类整合子阳性对照菌,大肠埃希菌 C600 为 I 类整合子阴性对照菌。

1.2 仪器与试剂 Trans Taq PCR 混合物、Trans DNA 标记物、基因组 DNA 提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒(北京全式金生物技术有限公司),限制性内切酶 HindⅢ、T4 DNA 连接酶(Fermentas 公司),VITEK-2 微生物分析仪(法国生物梅里埃公司),基因扩增 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司),电

泳仪(美国 Bio-Rad 公司),Syngene Gene Genius 全自动凝胶成像系统(英国 SYNGENE 公司)。

1.3 引物序列 用于扩增 I 类整合子整合酶基因 intI 1 及侧翼序列的引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。intI 1 引物序列(5'→3') F:GGT CAA GGA TCT GGA TTT CG;R:ACA TGC GTG TAA ATC ATC GTC^[9]。

1.4 I 类整合子检测 以基因组 DNA 提取试剂盒提取临床分离的大肠埃希菌总 DNA,用 I 类整合酶基因 intI 1 上、下游引物进行扩增检测 I 类整合子。PCR 反应体系为 20 μL:2×Trans Taq PCR Supermix 10 μL;上、下游引物各 0.2 μL(20 μmol/L);模板 1.6 μL;双蒸水 8 μL。PCR 扩增 IntI 1 循环参数为:预变性 94 ℃ 5 min;变性 94 ℃ 30 s,退火 62 ℃ 30 s,延伸 72 ℃ 45 s,30 个循环;最后 72 ℃ 延伸 5 min。PCR 扩增产物行 15 g/L 的琼脂糖凝胶电泳观察结果。

1.5 反向 PCR 扩增 I 类整合酶基因侧翼序列

1.5.1 基因组 DNA 限制性酶切 在 50 μL 酶切体系中加入如下组分:基因组 DNA 20 μL,10×Buffer Tango 5 μL,HindⅢ 内切酶 2 μL,双蒸水 23 μL,轻轻混匀后点离数秒置 37 ℃ 温育

^{*} 基金项目:湖南省自然科学基金资助项目(08JJ3069);湖南省科技厅计划资助项目(2010FJ3079)。 作者简介:冯银,女,检验技师,主要从事临床微生物学与检验研究。 [△] 通讯作者,E-mail:chent2000@126.com。

4 h, 80 ℃ 反应 20 min 灭活 HindⅢ 内切酶。

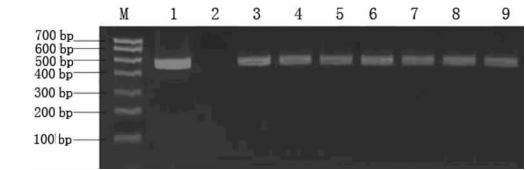
1.5.2 酶切 DNA 自身环化 在 25 μL 反应体系中加入如下组分:酶切 DNA 产物 20 μL, 10×Buffer Tango 2.5 μL, T4 DNA 连接酶 1 μL, 双蒸水 1.5 μL, 轻轻混匀后点离数秒置 PCR 仪 22 ℃ 反应 10 min, 65 ℃ 反应 10 min 灭活 T4 DNA 连接酶。

1.5.3 反向 PCR 反应 根据扩增 I 类整合酶基因 intI 1 的引物设计其反向引物, 引物序列见表 1, 扩增 intI 1 的侧翼序列。在 50 μL 反应体系中加入如下组分:2×Pfu PCR 混合物 25 μL, 上、下游引物各 0.5 μL(20 μmol/L), 环化 DNA 2 μL, 加蒸馏水至总体积 22 μL。PCR 扩增循环参数:预变性 94 ℃ 5 min;变性 94 ℃ 1 min, 退火 56 ℃ 1 min, 延伸 72 ℃ 2 min, 35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 7 min。反向 PCR 扩增产物行 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳观察结果。

1.6 扩增产物纯化及序列分析 将扩增产物用 PCR 产物纯化试剂盒进行纯化, 送 invitrogen(上海)公司测序分析, 测序结果用 DNASTar 软件进行分析, 并在基因库中用 BLAST 工具进行基因同源性比对, 确定 I 类整合酶基因 intI 1 和反向 PCR 产物中基因。

2 结 果

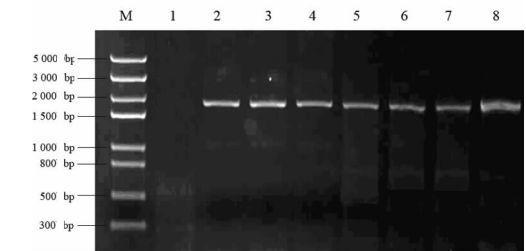
2.1 I 类整合子检测结果 通过对临床分离的 72 株大肠埃希菌 intI 1 扩增, 49 株得到接近 500 bp 的扩增产物, 与预期的 484 bp 大小相符, 如图 1。测序结果在基因库中进行 DNA 序列同源性比对分析, 与已知的 I 类整合酶基因(AJ704863.3)同源性为 99%, 确定为 I 类整合子阳性菌株, 检出率为 68.1%(49/72)。



M:DNA 标记物;1:阳性对照;2:阴性对照;3-9:临床菌株。

图 1 PCR 扩增 intI 1 基因电泳图

2.2 I 类整合酶基因侧翼序列检测结果 对 I 类整合子阳性菌株整合子 5'CS 端 intI 1 的侧翼序列进行检测, 以 intI 1 阴性菌株为阴性对照, 结果 I 类整合子阳性菌株侧翼序列反向 PCR 扩增出 1 800 bp 大小的片段, 如图 2。测序结果在基因库中进行 BLAST 比对分析, 结果显示 1 800 bp 的 DNA 片段上包括 I 类整合酶基因的部分片段, RNA 聚合酶基因 β 亚基部分片段及未知功能基因片段。



M:DNA 标记物;1:intI 1 阴性菌株;2~8:intI 1 阳性菌株。

图 2 反向 PCR 扩增 intI 1 基因侧翼序列电泳图

3 讨 论

本研究临床分离的大肠埃希菌中 I 类整合子的检出率为

68.1%, 国内有 70.9% 的报道, 二者基本一致^[10], 表明 I 类整合子在临床分离大肠埃希菌中广泛存在。

在一个基因的表达过程中, 侧翼序列在一定程度上起到了调控作用, 因而整合酶基因的侧翼序列对整合酶基因的表达也具有一定的调控作用。常规的 PCR 只能扩增两个引物之间的 DNA 序列, 而反向 PCR 设计反向互补引物可扩增已知序列两侧的 DNA 片段。反向 PCR 测序结果显示 1 800 bp 的 DNA 片段上包括 I 类整合酶基因的部分片段、部分 RNA 聚合酶基因 β 亚基及未知基因片段。RNA 聚合酶是以一条 DNA 链或 RNA 为模板催化由核苷-5'-三磷酸合成 RNA 的酶^[11], 含有 α, β, β', δ 等不同的亚基, β 亚基含有核苷三磷酸的结合位点, 是酶和核苷酸底物结合的部位, 但其是否在整合酶基因的表达中发挥作用还有待研究。目前, I 类整合酶基因表达的调控机制尚不十分清楚, 因此, 对 I 类整合酶基因侧翼序列的研究, 不仅使 I 类整合子的结构更加明确, 而且为进一步分析 I 类整合酶基因上游的未知 DNA 片段的结构和功能, 深入了解整合酶基因的表达调控机制奠定了基础。

参考文献

[1] Di Conza JA, Gutkind GO. Integrons: gene collectors[J]. Rev Argent Microbiol, 2010, 42(1): 63-78.

[2] Xu Z, Li L, Shirliff ME, et al. Occurrence and characteristics of class 1 and 2 integrons in Pseudomonas aeruginosa isolates from patients in southern China[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(1): 230-234.

[3] 李彬, 傅蕾, 黄心宏, 等. 整合子与多重耐药大肠埃希菌相关性研究[J]. 中国微生态学杂志, 2010, 22(2): 135-138.

[4] Ramirez MS, Pineiro S, Centron D. Novel insights about class 2 integrons from experimental and genomic epidemiology[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(2): 699-706.

[5] Sajjad A, Holley MP, Labbate M, et al. A preclinical class 1 integron with a complete Tn402-like transposition module[J]. Appl Environ Microbiol, 2011, 77(1): 335-337.

[6] 崔颖鹏, 徐鸿泽, 罗炯, 等. 鲍曼不动杆菌整合子分子型与耐药性的初步研究[J]. 中国微生态学杂志, 2009, 21(6): 524-526.

[7] 单霞, 黄茂, 梅亚宁. 鲍曼不动杆菌耐药性与 I 类整合子关系研究[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2010, 30(1): 82-86.

[8] Krauland M, Harrison L, Paterson D, et al. Novel integron gene cassette arrays identified in a global collection of multi-drug resistant non-typhoidal Salmonella enterica[J]. Curr Microbiol, 2010, 60(3): 217-223.

[9] Mazel D, Dychinco B, Webb VA, et al. Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel aad gene[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(6): 1568-1574.

[10] 凌华志, 徐元宏, 李涛, 等. 739 株革兰阴性杆菌中 I 类整合子的分布及其基因盒结构分析[J]. 临床检验杂志, 2010, 28(4): 312-314.

[11] Campbell EA, Westblade LF, Darst SA. Regulation of bacterial RNA polymerase sigma factor activity: a structural perspective[J]. Curr Opin Microbiol, 2008, 11(2): 121-127.

(收稿日期: 2012-08-09)