

· 论 著 ·

多重耐药肺炎链球菌差异 DNA 消减文库的构建及初步筛选

宋 瑱¹, 熊 辉², 李 燕³, 丁显平^{1△}

(四川大学:1. 生命科学学院, 成都 610064; 2. 华西医院检验科, 成都 610041, 3. 成都中医药大学医学技术学院 610041)

摘要:目的 比较肺炎链球菌多重耐药株与敏感株标准参考菌之间的差异基因。方法 使用抑制性消减杂交技术构建多重耐药肺炎链球菌差异 DNA 消减文库, 经斑点杂交筛选阳性克隆后对部分 DNA 片段进行测序和同源分析。结果 成功的构建了肺炎链球菌多重耐药株差异 DNA 消减文库, 经斑点杂交的初步筛选, 有 17 个仅能与多重耐药株 DNA 探针杂交, 而不能与敏感株 DNA 探针杂交。对这 17 个克隆片段测序及基因库检索分析, 发现 2 个未知新序列。结论 从全基因组角度研究肺炎链球菌多重耐药菌株与标准菌株基因组 DNA 分子遗传差异, 为发现、克隆肺炎链球菌多重耐药相关基因提供依据。

关键词:序列分析; 抗药性, 多药; 肺炎链球菌; 抑制消减杂交; 消减文库

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.20.019

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)20-2341-03

Cloning and identifying the differential genes in resistant streptococcus pneumonia

Song Zhen¹, Xiong Hui², Li Yan³, Ding Xianping^{1△}

(1. College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China; 2. Department of Laboratory Medicine, Huaxi Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Medical Technique College, Chengdu University of TCM, 610041, China)

Abstract: Objective To identify the differential genes in multi-drug resistant strain and susceptible strain of *S. pneumoniae*. **Methods** Using suppression subtractive hybridization (SSH) to build DNA subtractive library of multiple drug-resistant *s. pneumoniae*. After screening by spots hybrid, sequencing and homology analysis were used for fragments of partial DNA. **Results** The studies constructed successfully DNA subtractive library of multiple drug-resistant *s. pneumoniae*. By spots hybrid, 17 clones were sequenced, and analyzed. At the same time, two new sequences were found. **Conclusion** From the genome, it revealed that genetic differences are existed between drug-resistant strains and *S. pneumoniae*. This work will provide the basis for discovering and cloning *S. pneumoniae* multiple drug-resistant genes.

Key words: sequence analysis; drug resistance, multiple; streptococcus pneumoniae; suppression subtractive hybridization; DNA library

肺炎链球菌是社区获得性感染的常见疾病如肺炎、中耳炎、脑膜炎、败血病等的主要病原体^[1]。近年来,肺炎链球菌对青霉素和大环内酯类抗菌剂表现出很高的耐药性,并呈现逐年上升的趋势,而且出现对其他抗菌剂(如喹诺酮类抗菌剂等)的多重耐药性^[2-4]。为了探讨肺炎链球菌多耐药的分子机制,本研究以临床分离的肺炎链球菌多耐药菌株和抗生素敏感的标准菌株为研究对象,选用了抑制消减杂交技术从全基因组水平对肺炎链球菌多重耐药机制进行研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株与质粒 肺炎链球菌多重耐药菌株 09062407 分离自四川大学华西医院,多重耐药株 100911 分离自四川省第五人民医院。K-B 法药敏试验结果显示对阿奇霉素、四环素、克林霉素、氯霉素、复方磺胺甲噁唑均耐药。肺炎链球菌标准菌株 ATCC 49619 由四川大学华西医院微生物实验室提供,为上述抗菌剂敏感株。pEASY-T3 线性 TA 质粒购自北京全金公司。

1.1.2 试剂 PCR 选择性细菌基因组消减试剂盒购自 Clon-

tech 公司,地高辛探针标记试剂盒购自 Roche 公司,X-gal、IPTG 购自 Signa 公司。BM 2 000 相对分子质量标准、Hot-Start Taq DNA 聚合酶、三磷酸脱氧核糖核苷(dNTP)、Taq DNA 聚合酶、多功能 DNA 回收试剂盒、柱式质粒 DNA 提取试剂盒均购自博迈德公司。测序在北京博迈德公司进行。实验中所用接头及引物见表 1。

1.2 方 法

1.2.1 抑制性消减杂交构建多重耐药肺炎链球菌差异 DNA 消减文库 采用 PCR 选择性细菌基因组消减试剂盒,原理详见参考文献[5-6]按说明书方法进行。被检菌(tester)为多耐药菌株 09062407,100911 基因组 DNA,参考菌(driver)为标准菌株 ATCC 49619 基因组 DNA。采用 CTAB/NaCl 法提取细菌基因组 DNA。将被检菌基因组 DNA 经 *Ras* I 酶切后分成两份分别连接接头 1、接头 2R,然后分别以两种连接产物为模板,以 23S RNA 引物检查接头连接效率。接头连接后取出 5 μL 连接有接头 1、接头 2R 的样品混合作为未消减对照待用。第 1 轮杂交:接有两种接头的被检菌 DNA 片段分别与酶切后过量的参考菌 DNA 片段在 98 °C 变性 1.5 min、63 °C 杂交

△ 通讯作者, E-mail: Brainding@scu.edu.cn.

1.5 h, 立即进入第 2 轮杂交。两组第 1 轮杂交体系混合后加入过量的变性后参考菌 DNA 片段, 63 °C 杂交过夜。以稀释后第 2 轮杂交产物为模板, 用接头外侧引物 (PCR 引物 1) 进行第 1 次 PCR 扩增。以第 1 次 PCR 稀释后产物为模板用巢式引物 1 和巢式引物 2R 进行第 2 次 PCR 扩增, 同时进行 PCR 产物

消减效率检测。将上一步得到的第 2 次 PCR 产物经柱式 DNA 回收试剂盒回收纯化后, 与 pEASY-T3 线性化 TA 质粒进行连接反应, 连接产物转化 T1 感受态细胞, 通过含 X-gal、异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 的氨苄西林 LB 平板筛选阳性克隆, 建立消减文库。

表 1 接头和引物序列

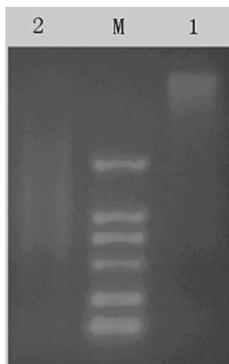
接头及引物	序列
接头 1	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCTGGAGCGCCGCCGGGCAGGT-3' 3'-GGCCCGTCCA-5'
接头 2R	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGCCGAGGT-3' 3'-GCCGGCTCCA-5'
PCR 引物 1	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
巢式引物 1	5'-TCGAGCGCCGCCGGGCAGGT-3'
巢式引物 2R	5'-AGCGTGGTCGCGCCGAGGT-3'
23S 上游引物	5'-CTACCTTAGGACCGTTATAGTTAC-3'
23S 下游引物	5'-GAAGGAACTAGGCAAAATGGTGCC-3'

1.2.2 基因组 DNA 消减文库的初步筛选及鉴定阳性克隆
随机挑选 200 个白色菌落。以巢式引物 1 和巢式引物 2R 进行菌落 PCR 初步鉴定阳性克隆。斑点杂交: 取 *Rsa* I 消化的耐药株和 ATCC 株基因组 DNA, 用地高辛标记试剂盒进行探针标记。然后将被检菌消减文库克隆的质粒 DNA 经变性后点到硝酸纤维膜上, 120 °C 固定 30 min, 进行预杂交和杂交。最后经 NBT/BCIP 检测试剂盒显色。

1.2.3 测序 将斑点杂交鉴定后的 17 个阳性克隆以 M13F, M13R 为引物进行双向测序, 测序结果在 GenBank 中进行 BLAST 检索分析。

2 结 果

2.1 基因组 DNA *Rsa* I 酶切质量分析 将经过 *Rsa* I 酶酶切过后的 10 μL 产物和 5 μL 的未酶切的肺炎链球菌基因组 DNA 进行 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳。未酶切的基因组 DNA 在 5 000 pb 左右, *Rsa* I 酶酶切后的产物带呈弥漫性条带在 200~2 000 pb 左右。酶切效果良好, 可以进行后续实验, 见图 1。

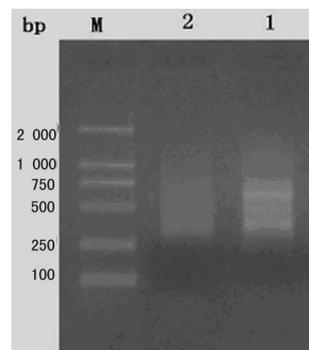


1: 未酶切的基因组 DNA; M: 相对分子质量标准 2 000、1 000、750、500、250、100 bp; 2: *Rsa* I 酶切后的基因组 DNA。

图 1 基因组 DNA 提取及 *Rsa* I 酶切结果

2.2 接头连接效率、消减效率及 PCR 结果 将 *Rsa* I 酶酶切

的被检菌 DNA 分别与接头 1 和接头 2R 连接后, 按试剂盒方法以 23S RNA 引物做 PCR 检查接头连接效率。连有接头与未连接头的 23S RNA 基因的荧光强度相差之比小于 4 倍, 说明连接效率大于 50%, 结果符合要求。连接有接头的被检菌 DNA 与参考菌 DNA 进行两轮消减杂交和两轮 PCR 后得到消减后富集了差异片段的 PCR 产物。电泳结果出现弥散分布带, 大小 300~1 000 bp, 其中有明显富集的条带 (图 2)。消减效率检测分析, 以 23S RNA 管家基因在抑制性消减杂交产物中的丰度为参考, 通过电泳条带的荧光强度检测显示, 消减后的 PCR 产物相对于未消减的 PCR 产物明显减少, 说明消减效率符合要求, 见图 3。



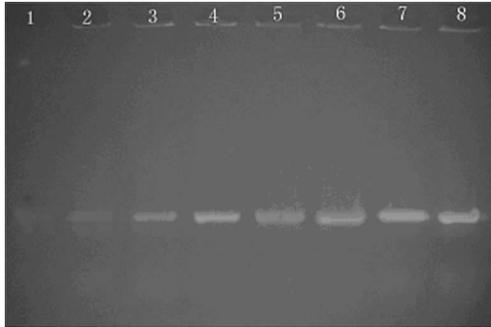
1: 肺炎链球菌多重耐药菌株 09062407 第 2 次 PCR 结果; 2: 多重耐药株 100911 第 2 次 PCR 结果; M: 相对分子质量标准 2 000、1 000、750、500、250、100 bp。

图 2 抑制消减杂交结果

2.3 消减文库构建及初步筛选结果 纯化回收第 2 次 PCR 产物后取 4 μL 和 pEASY-T3 载体 1 μL 连接后转化 T1 感受态细胞, 经蓝白斑筛选的消减文库。直径大于 2 mm 的白色菌落约 1 500 个, 约占蓝白斑总数的 80%。随机挑取 200 个白色克隆, 用巢式引物 1 和巢式引物 2R 进行 PCR 后有 155 个克隆能扩增出大小 300~1 000 bp 的单一片段, 阳性克隆率达

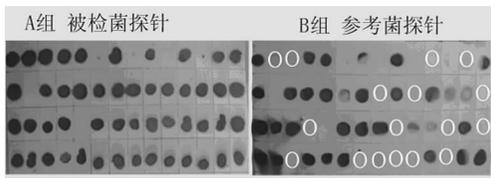
77.5%。

2.4 斑点杂交分析结果 随机挑选的 56 个白色菌落经碱裂解法制备质粒,每个质粒变性后印迹到两张硝酸纤维膜同一位置上。分别与经地高辛标记的 *Rsa* I 酶酶切后的被检菌和参考菌 DNA 探针杂交。结果发现 17 个仅能与被检菌即多重耐药株 DNA 探针杂交,而不能与参考菌即敏感株 DNA 探针杂交,见图 4。



以消减的第 2 轮 PCR 产物(1~4)和未消减的对照(1~4)为模板,用 23S 上下游引物扩增;1,5:18 次循环产物;2,6:23 次循环产物;3,7:28 次循环产物;4,8:33 次循环产物。

图 3 消减效率检测结果



白色圆圈:被检菌即多重耐药菌特有的克隆。

图 4 斑点杂交差异分析结果

2.5 序列分析及初步结果 将上述 17 个阳性克隆菌落送博迈德公司测序部测定其序列,将测得的序列在基因库中进行 BLAST 比对,查找同源序列。其中 2 株未发现其同源或是相匹配的基因,说明可能发现了 2 个和多重耐药相关的新的肺炎链球菌 DNA 片段。

3 讨论

近年来,肺炎链球菌对抗生素的耐药研究主要集中在介导

青霉素耐药的 *pbp* 基因和介导红霉素耐药 *Erm* 基因上。但肺炎链球菌耐药菌株中与多重耐药相关的基因尚不明确。因此,在全基因水平上筛选肺炎链球菌多重耐药相关基因进行研究,有助于探讨肺炎链球菌多重耐药的分子机制;新发现的可能与耐药相关的基因为后续的研究提供实验依据。

抑制消减杂交技术是一种基因差示筛选方法,它将消减杂交与 PCR 结合,可凭表型直接分离基因,目前已成为分离未知新基因的主要方法。此方法通过两次杂交、两次 PCR 后经 TA 克隆建立消减文库可以同时分离上百个差异基因,程序相对简单,不需要特殊的昂贵仪器,操作简便易行^[7]。目前,抑制消减杂交技术主要应用在肿瘤基因差异基因表达谱的筛选。经 Akopyants 等^[5]对抑制消减杂交技术进行改良,用于细菌基因组比较分析,为病原体中未知基因的筛选、细菌致病性和种属进化研究提供了重要的技术手段。

参考文献

[1] 胡福泉. 微生物基因组学[M]. 北京:人民军医出版社,2002:177-185.
 [2] 杨永弘,陆权,邓力,等. 四地儿童肺炎链球菌、流感嗜血杆菌抗生素敏感性监测(2000~2001 年)[J]. 中华儿科杂志,2002,4(8):461-466.
 [3] 张春,陆晓彤. 儿童专科医院临床病原菌分布与抗菌药物耐药分析[J]. 中华医院感染学杂志,2006,16(4):434-437.
 [4] 李家泰,李耘,王进. 中国医院和社区获得性感染革兰阳性球菌耐药性监测研究[J]. 中华医学杂志,2003,83(3):36-52.
 [5] Akopyants NS, Fradkov A, Diatchenko L. PCR-based subtractive hybridization and differences in gene content among strains of helicobacter pylori[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(10):13108-13113.
 [6] Winstanley C. Spot the difference applications of subtractive hybridization to the study of bacterial pathogens[J]. J Med Microbiol, 2002, 51(6):459-467.
 [7] 胡昌华. 抑制差减杂交技术研究进展[J]. 国外医学生理病理科学与临床分册, 2001, 21(1):4-6.

(收稿日期:2011-08-09)

(上接第 2340 页)

[2] 洪小珍,许先国,朱发明,等. 血清学和分子生物学鉴定 Lewis 血型抗体引起的输血反应[J]. 中国实验血液学杂志,2008,16(5):1192-1195.
 [3] 张晨光,王辉. 不规则抗体致同种免疫溶血性疾病与临床研究进展[J]. 中国实验血液学杂志,2010,18(3):825-828.
 [4] 张钦辉. 临床输血学[M]. 上海:上海科学技术出版社,2000:64.
 [5] 王桂英. 输血前开展抗体筛选试验的重要性[J]. 北京医学,2009,31(12):754.
 [6] 池泉,郭永健,田兆嵩. 红细胞血型抗体与输血安全[J]. 中国输血杂志,2008,21(8):649-654.
 [7] Engelfriet CP, Reesink HW. Prevention and diagnosis of delayed haemolytic transfusion reactions[J]. Vox Sang, 2006, 91(4):353-368.

[8] 杨天楹. 临床输血学[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1993:68.
 [9] 王葆昶. 不规则抗体产生原因浅析[J]. 北京医学,2008,30(12):743.
 [10] 林进甲,朱碎永,张瑛,等. 输血前受血者血清抗体筛检及临床价值[J]. 临床检验杂志,2003,21(1):24-26.
 [11] 黎海澜,焦伟,伍焕秀,等. 溶血性输血反应 7 例临床分析[J]. 华夏医学,2007,20(3):534-535.
 [12] 谭轩,曾方,吴建伟,等. 抗体筛选试验在临床输血中的应用[J]. 中国实用医药,2010,5(19):76-77.
 [13] 刘达庄,朱俊,朱自严,等. 免疫性输血反应的调查及预防[J]. 中国输血杂志,2002,15(3):159-161.

(收稿日期:2011-08-09)