

• 论 著 •

# PCR 和 HRM 两种方法检测细菌耐药基因 $aac(6')-Ib-cr$ 的比较研究\*

白丽霞, 杨 虹<sup>△</sup>

(北京大学深圳医院检验科, 广东深圳 518036)

**摘 要:**目的 研究聚合酶链反应(PCR)和高分辨熔解技术(HRM)两种方法检测细菌耐药基因氨基糖苷乙酰转移酶的变异基因( $aac(6')-Ib-cr$ )检出率的差异性。方法 采用 PCR 方法检测 299 株临床常见的革兰阴性杆菌的  $aac(6')-Ib$  基因,并以内切酶 BtsCI 酶切消化  $aac(6')-Ib$  的 PCR 阳性产物以确定  $aac(6')-Ib-cr$ ;同时采用 HRM 技术检测以上所有菌株的  $aac(6')-Ib$  和  $aac(6')-Ib-cr$  基因。结果 PCR 和酶切法共检出  $aac(6')-Ib$  基因 29 株,其中有 21 株变异为  $aac(6')-Ib-cr$ ,变异率为 72.4%(21/29)。而且 HRM 技术检测的结果与其完全一致。结论 PCR 和 HRM 两种方法检测细菌耐药基因  $aac(6')-Ib-cr$  的能力相当,可以用更简便的 HRM 技术替代 PCR 和酶切法检测  $aac(6')-Ib-cr$  基因,尤其适用于大量筛检。

**关键词:** 高分辨熔解技术; 基因; 聚合酶链反应; 细菌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.03.011

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)03-0319-03

## Comparison of PCR and HRM for detecting bacterial drug resistance gene $aac(6')-Ib-cr$ \*

BAI Lixia, YANG Hong<sup>△</sup>

(Department of Clinical Laboratory, Shenzhen Hospital of Peking University, Shenzhen, Guangdong 518036, China)

**Abstract:** **Objective** To study the difference of detection rate between PCR and high-resolution melt (HRM) for detecting the bacterial drug resistance gene  $aac(6')-Ib-cr$ . **Methods** The PCR method was adopted to detect the  $aac(6')-Ib$  gene in 299 strains of common Gram-negative bacilli, and the PCR positive products of  $aac(6')-Ib$  were digested with BtsCI. Meanwhile  $aac(6')-Ib$  and  $aac(6')-Ib-cr$  genes in above bacterial strains were detected by adopting the HRM technique. **Results** A total of 29 isolates were identified as  $aac(6')-Ib$  gene, and 21 mutations were  $aac(6')-Ib-cr$ , with a mutation rate of 72.4% (21/29) for PCR and restriction enzyme digestion. And the results of the HRM test were in good agreement with each other. **Conclusion** PCR and HRM are similar for the detection of the bacterial resistance gene  $aac(6')-Ib-cr$ , and  $aac(6')-Ib-cr$  gene could be detected by a simpler HRM technique instead of PCR and enzyme digestion, especially for a large number of screening.

**Key words:** high-resolution melt; gene; polymerase chain reaction; bacteria

高分辨熔解技术(HRM)是一项新的分子生物学检测技术,根据熔解曲线准确区分野生型纯合子、杂合子和突变型纯合子<sup>[1-4]</sup>。国外有学者应用高分辨熔解曲线技术检测细菌的耐药基因<sup>[5]</sup>。研究发现能使氨基糖苷类药物和氟喹诺酮类药物同时失活的氨基糖苷乙酰转移酶的变异基因  $aac(6')-Ib-cr$ ,该基因编码的灭活酶可使环丙沙星及诺氟沙星中的氨基氮发生乙酰化,从而使其抗菌活性下降。研究显示该基因可使细菌对环丙沙星及诺氟沙星的最小抑菌浓度(MIC)上升 4 倍<sup>[6]</sup>。该基因传统的检测方法比较繁琐,采用 PCR 扩增  $aac(6')-Ib$  基因,并以内切酶 BtsCI 酶切消化该基因产物和/或 DNA 测序以确定  $aac(6')-Ib-cr$ 。因此,探索一种更简便的检测技术来筛查临床分离菌株  $aac(6')-Ib-cr$  基因的发生情况,有很大的临床价值。本研究采用 PCR 和 HRM 两种方法同时检测细菌耐药基因  $aac(6')-Ib-cr$ ,并分析其检出率的差异性,以探讨 HRM 技术能否用于大量筛检菌株的  $aac(6')-Ib-cr$  基因。

### 1 材料与与方法

**1.1 菌株来源** 本研究使用的菌株是 2011 年从临床分离的 299 株非重复的临床常见的革兰阴性杆菌,包括 83 株大肠埃希菌、97 株肺炎克雷伯菌、53 株鲍曼不动杆菌和 66 株铜绿假单胞菌。菌株鉴定及其 MIC 值的测定用全自动细菌鉴定及药敏分析仪 MicroScan WalkAway 40 进行细菌鉴定和药敏试验

(MIC 值),并严格按照 CLSI 标准判断药敏结果。药敏质控菌株包括大肠埃希菌 ATCC25922 和铜绿假单胞菌 ATCC27853。

**1.2 仪器与试剂** Eppendorf(德国)生产的 Centrifuge 5417R 台式冷冻离心机; BIO-RAD(美国)公司生产的 C1000TM ThermalCycler PCR 仪; BIO-RAD(美国)生产的 PowerPac Basic PowerPac HC 电泳仪; BIO-RAD(美国)生产的 Gel Doc XR+凝胶成像及分析系统; HRM 分析仪为罗氏 Roche LightCycler 480。培养基为分离培养用的 LB 平板。

### 1.3 方法

**1.3.1 PCR 模板的提取** 煮沸法提取细菌基因组 DNA。将细菌接种于 LB 平板上,35℃ 培养箱培养过夜,次日选单个菌落于 LB 平板分纯培养。第 3 天挑取数个菌落入盛有 180 μL 的双蒸水(ddH<sub>2</sub>O)EP 管中,煮沸 10 min,13 000 r/min 离心 3 min。取上清液即细菌 DNA 模板于 EP 管,在 -20℃ 保存备用。

**1.3.2 基因  $aac(6')-Ib$  的 PCR 筛选及  $aac(6')-Ib-cr$  的确定** 采用 PCR 检测所有菌株的质粒介导耐药基因  $aac(6')-Ib$ ;并以内切酶 BtsCI 酶切消化  $aac(6')-Ib$  的 PCR 阳性产物以确定  $aac(6')-Ib-cr$ 。 $aac(6')-Ib$  引物设计参照文献<sup>[7]</sup>,上游引物 5'-TTG CGA TGC TCT ATG AGT GGC TA-3'和下游引物 5'-

\* 基金项目:广东省深圳市科技计划资助项目(201102017)。

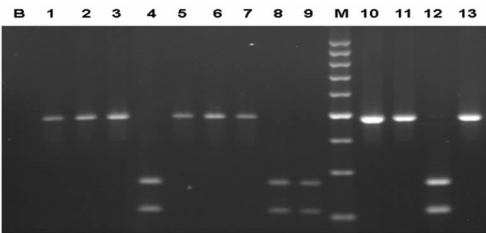
作者简介:白丽霞,女,主管技师,主要从事临床检验研究。△ 通信作者, E-mail: yhkrsy@yeah.net。

CTC GAA TGC CTG GCG TGT TT-3',产物 482 bp。反应条件:94 ℃变性 45 s,55 ℃退火 45 s,72 ℃延伸 45 s,34 个循环。PCR 产物 5 μL 上样,1.5 g/dL 琼脂糖凝胶中电泳 1.0 h,电压 100 V,Gel Red 染色,用凝胶成像系统观察并扫描成像。基因 aac(6')-Ib-cr 确定,用内切酶法从 aac(6')-Ib 的 PCR 阳性产物中检测。用内切酶 BtsCI 对 aac(6')-Ib 阳性 PCR 产物进行酶切消化。由于 aac(6')-Ib-cr 缺乏内切酶 BtsCI 的酶切位点,而野生型具有此酶切位点。将酶切产物进行电泳后,两条带的为 aac(6')-Ib-cr 阴性株即为 aac(6')-Ib;不能被酶切即只有一条带者为 aac(6')-Ib-cr 阳性株<sup>[7]</sup>。随机挑选阳性标本,进行 50 μL 体系 PCR 产物测序,并将测序结果与 Genbank 上已公布的序列进行比对。该实验 HRM 具体操作过程见参考文献<sup>[5]</sup>。将 PCR 和酶切法检测的 aac(6')-Ib-cr 结果和 HRM 分析结果进行一一对应比较,分析检测结果是否完全一致。

2 结 果

2.1 细菌的药敏结果 这些菌株喹诺酮类抗菌药物加替沙星、环丙沙星和左氧氟沙星的敏感率分别为 68.9%、69.6%和 74.9%;其氨基糖苷类抗菌药物庆大霉素、妥布霉素和阿米卡星的敏感率分别为 79.3%、80.6%和 95.7%。

2.2 PCR 和酶切法的检测结果 共检出 aac(6')-Ib 基因 29 株,其中有 21 株变异为 aac(6')-Ib-cr,变异率为 72.4%(21/29);aac(6')-Ib-cr 的总阳性率为 7.0%(21/299)。见图 1。随机抽取的 aac(6')-Ib-cr 阳性株 PCR 扩增产物测序结果,均与 Genbank 公布的序列一致,如 10 号菌株(N10)与编码 EF100892 序列 100%同源,而且也显示了两个突变位点(色氨酸→精氨酸,天冬氨酸→酪氨酸),见图 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。



注:一条带的 aac(6')-Ib-cr 阳性株,两条带的为 aac(6')-Ib 阴性株;M 为 DNA 100bp 标准参照物(由上至下依次为 1 500、1 000、900、800、700、600、500、400、300、200、100 bp);B 为空白对照;1,2,3,5,6,7,10,11,13 为 aac(6')-Ib-cr 阳性的临床分离株;4,8,9,12 为 aac(6')-Ib-cr 阴性的临床分离株。

图 1 采用 BtsCI 酶切 aac(6')-Ib 的 PCR 产物图谱

2.3 HRM 技术检测的结果 共检出 aac(6')-Ib 基因 29 株,其中有 21 株出现突变曲线,8 株未发生变异。

2.4 两种方法的比较结果 HRM 技术检测的 aac(6')-Ib-cr 阳性结果和阴性结果与 PCR 和酶切法的检测结果呈一一对应关系,即完全一致。

3 讨 论

质粒介导的耐药基因可在菌株间进行水平传播,因而其引起的抗菌药物的耐药性引起了广泛重视<sup>[8-9]</sup>;世界上首次发现的能同时使喹诺酮类和氨基糖苷类两种抗菌药物耐药性都提高的 aac(6')-Ib-cr 基因更是受到了关注<sup>[7,10]</sup>。而且研究还发现基因 aac(6')-Ib-cr 主要存在于肠杆菌科细菌,较少甚至未发现存在于非发酵菌株中<sup>[8,11]</sup>。在临床分离的大量的不同种细菌中筛查 aac(6')-Ib-cr 基因具有很大的临床意义和学术价值。

而验证一个基因最准确经典的方法就是 PCR 扩增并对产物进行测序,继而在 Genbank 上比对分析基因序列。但是检测 aac(6')-Ib-cr 基因,在进行 aac(6')-Ib 基因 PCR 扩增后,必须要进行 PCR 产物电泳、染色和成像后,筛检出阳性株,再对 aac(6')-Ib 阳性产物进行内切酶 BtsCI 酶切消化后,又要再次对该酶切消化产物进行电泳、染色和成像从而确定是否为 aac(6')-Ib-cr 基因,整个过程相当耗时耗力;或者对 aac(6')-Ib 阳性产物进行基因测序,再在 Genbank 上进行序列分析是否为 aac(6')-Ib-cr 基因,此过程也挺耗时耗钱。HRM 技术是 2002 年由美国犹他大学和爱德华科技公司合作开发的,该技术是一种用于突变检测和基因分型的新技术,目前该技术成为了一种检测基因突变与基因分型的最新遗传学分析技术<sup>[12-13]</sup>和感染性疾病方面的基因分析技术<sup>[14]</sup>。本研究应用了传统经典的 PCR 和测序方法验证了方便快捷的 HRM 技术对 aac(6')-Ib-cr 基因的检测能力,两者的检测结果呈现一一对应的一致关系。说明了检测 aac(6')-Ib-cr 基因,可以采用灵敏度高、特异性好、高通量、快速简便和成本低的 HRM 技术代替 PCR、酶切和/或测序法。

因此,本研究的结果显示,虽然 PCR 扩增和测序是检测基因突变最常用的方法,但是鉴于其操作步骤多、成本高、不适于大规模突变筛查和流行病学研究等缺点,应极力推荐使用 HRM 技术大量筛检临床分离菌株的 aac(6')-Ib-cr 基因,为后续更进一步深入的研究提供大量的更具研究价值的调查数据信息。

参考文献

[1] 王晶晶,许朝旭,彭红波.应用高分辨溶解曲线分析技术检测 β-地中海贫血基因突变[J].国际检验医学杂志,2015,36(5):650-651.

[2] 张静,刘彦山,赵秀丽,等.高分辨溶解曲线技术在 Wilson 病致病基因突变鉴定中的应用[J].基础医学与临床,2016,36(2):218-221.

[3] 陆林苑,唐海深,李东至.高分辨率溶解曲线分析技术在非缺失型 α-地中海贫血新生儿筛查中的前瞻性应用[J].中国妇幼保健,2013,28(1):156-159.

[4] 魏明,廖灿,李茹,等.高分辨溶解曲线分析技术检测 α-地中海贫血常见三种点突变[J].中华检验医学杂志,2012,35(5):463-465.

[5] Jan M,Bell G,John D,et al. Aac(6')-Ib-cr Genotyping by simultaneous high-resolution melting analyses of an unlabeled probe and full-length amplicon[J]. Antimicrob Agents Chemother,2010,54(1):1378-1380.

[6] Robicsek A,Strahilevitz J,Jacoby GA,et al. Fluoroquinolone modifying enzyme;a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase[J]. Nat Med,2006,12(1):83-88.

[7] Park CH,Robicsek A,Jacoby GA,et al. Prevalence in the United States of aac(6')-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme[J]. Antimicrob Agents Chemother,2006,9(11):3953-3955.

[8] 张雪青,楼丹萍,徐春泉,等.非发酵菌和环丙沙星敏感肠杆菌科细菌中质粒介导喹诺酮类耐药基因的检测[J].疾病监测,2014,29(2):130-135.

[9] 杨虹,王辉,彭黎明,等.中国九家教学医(下转第 323 页)

刺激 B 细胞增殖。化脓性脑膜炎组淋巴细胞亚群分子表达水平与病毒性脑炎组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。病毒性脑炎组患儿外周血中性粒细胞  $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD19^+$  的表达水平低于化脓性脑膜炎组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),提示病毒性感染引起 T 淋巴细胞及 B 淋巴细胞亚群数量与功能减低。也有研究报道 T 淋巴细胞是主导机体免疫功能最主要的免疫细胞之一,在病毒感染时有异常改变,外周血 T 淋巴细胞常降低<sup>[15-16]</sup>。

$CD4^+$  T 淋巴细胞是细胞免疫的主要效应细胞,而  $CD8^+$  T 淋巴细胞在体液免疫中发挥重要的作用<sup>[17]</sup>。本研究显示化脓性脑膜炎组与病毒性脑炎组间体液免疫分子表达水平比较差异有统计学意义( $P<0.05$ ),其中病毒性脑炎组 IgA 较化脓性脑膜炎组低,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),表明病毒性脑炎组患儿体液免疫存在功能障碍,与农少云等<sup>[18]</sup>报道结果一致。化脓性脑膜炎组补体 C3 和 C4 表达水平与病毒性脑炎组和对照组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ ),与刘俊英等<sup>[19]</sup>报道结果一致。免疫功能检测来鉴别脑炎是细菌或病毒感染具有一定临床意义,本研究结果提示脑炎患儿存在着免疫功能下降,这种紊乱可导致脑炎迁延不愈,提示脑炎患儿进行治疗时加用免疫增强剂疗效可能会更好。

参考文献

[1] 王新佳. 小儿脑炎[J]. 中国医刊, 2011, 46(11): 11-14.  
[2] 刘晴肖, 黄志军. 神经节苷脂联合更昔洛韦治疗小儿病毒性脑炎疗效分析[J]. 中国当代医药, 2011, 18(23): 7576.  
[3] 李子恒. 纳洛酮联合更昔洛韦治疗小儿病毒性脑炎临床疗效探讨[J]. 中国医学工程, 2013, 21(1): 137.  
[4] Sejvtr JJ. The evolving epidemiology of viral encephalitis [J]. *Curtopin Neurol*, 2006, 19(4): 350-357.  
[5] Wang T, Rumbaugh JA, Nath A. Viruses and the brain: From inflammation to dementia [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2006, 110(4): 393-407.  
[6] Riancho J, Delgado M, Sedano MJ, et al. Herpes simplex encephalitis: clinical presentation, neurological sequelae and new prognostic factors: ten years of experience [J]. *Neurol Sci*, 2013, 34(10): 1879-1881.  
[7] Hinson VK, Tyor WR. Update of viral encephalitis; In-

flammatory diseases [J]. *Curr Opin Neurol*, 2001, 14(1): 369-374.  
[8] Yoge R, Guzman-cottrill J. Bacterial meningitis in children: critical review of current concepts [J]. *Drugs*, 2005, 22(8): 1097-1112.  
[9] Whitey RJ, Gnann JW. Viral encephalitis: familiar infection - emerging pathogen [J]. *Lancet*, 2002, 359(9305): 507.  
[10] 诸福棠. 实用儿科学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 915-916.  
[11] 胡亚美, 江载芳, 诸福棠. 实用儿科学 [M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 759-769.  
[12] 徐森懋, 黄亚玲. 儿童病毒性脑炎外周血淋巴细胞亚群研究 [J]. *中国医药科学*, 2014, 24(1): 14-17.  
[13] Amadei B, Urbani S, Cazaly A, et al. Activation of natural killer cells during acute infection with hepatitis C virus [J]. *Gastroenterology*, 2010, 138(4): 1536-1545.  
[14] 魏田力, 侯安存, 杭敏. 病毒性肺炎患儿外周血自然杀伤细胞核淋巴细胞亚群变化 [J]. *实用儿科杂志*, 2010, 25(22): 1728-1730.  
[15] Kreijtz JH, Fouchier RA, Rimmelzwaan GF. Immune responses to influenza virus infection. [J]. *Vir Res*, 2011, 162(1/2): 19-30.  
[16] 毛会军, 陈戴红, 张敏, 等. H7N9 禽流感患者外周血 T 淋巴细胞亚群的分析及意义 [J]. *检验医学*, 2013, 28(9): 758-761.  
[17] 张丽, 曾汝良. 某地区吸毒者 HIV 感染状况调查及细胞免疫功能分析 [J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(6): 724-725.  
[18] 农少云, 梁娟英, 杨晓泉, 等. 手足口病患儿外周血 T 淋巴细胞亚群及免疫球蛋白检测的意义 [J]. *检验医学与临床*, 2012, 9(11): 1287-1288.  
[19] 刘俊英, 刘冬青, 南静, 等. 中枢神经系统感染患儿脑脊液和血清 S-100b 蛋白及补体 C3、C4 联合检测的临床意义 [J]. *临床儿科杂志*, 2006, 12(2): 990-992.

(收稿日期: 2016-08-03 修回日期: 2016-10-26)

(上接第 320 页)

院肠杆菌科细菌质粒介导的喹诺酮耐药机制研究 [J]. *中华检验医学杂志*, 2008, 31(9): 969-974.  
[10] 姜梅杰, 包健, 孙树玲. 肺炎克雷伯菌质粒介导的喹诺酮类耐药基因的研究 [J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志 (电子版)*, 2012, 6(6): 74-77.  
[11] 李玉珍, 杨银梅, 汪云霞, 等. 阿米卡星耐药鲍曼不动杆菌  $aac(6')-Ib$  和  $aac(6')-Ib-cr$  基因的研究 [J]. *热带医学杂志*, 2014, 14(3): 293-295.  
[12] 何超, 廖灿. 高分辨溶解曲线分析技术及其在遗传学中的应用 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2012, 20(4): 1-3.  
[13] 张薇, 马云霞, 周永安. 高分辨溶解曲线技术快速检测

Leber 遗传性视神经病变 11778 致病突变位点 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2012, 20(7): 27-28.  
[14] 陈晓晴, 余玲玲, 王慧燕, 等. 高分辨溶解曲线技术检测 HLA-G14bp 插入/缺失突变方法的建立及初步应用 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2014, 20(5): 719-722.

(收稿日期: 2016-09-12 修回日期: 2016-11-02)

