

# PCR 及核酸探针检测耐甲氧西林葡萄球菌 *mecA* 基因的研究

杜沂平, 邹玲, 刘文华, 温建新, 任慧英  
(青岛农业大学动物科技学院, 山东青岛 266109)

**摘要:** 为了解耐甲氧西林葡萄球菌在畜禽间的存在情况, 试验建立针对 *mecA* 基因的 PCR 方法及地高辛标记核酸探针技术, 分别用两种方法对 75 株葡萄球菌分离株进行检测。结果显示, 经 PCR 方法检出 42 株耐甲氧西林葡萄球菌, 占分离株的 56.0%; 经核酸探针方法检出 47 株耐甲氧西林葡萄球菌, 占分离株的 62.7%, 两种方法的总符合率为 93.3%。通过研究证实, 在畜禽的体表及体内能够分离到耐甲氧西林葡萄球菌, 且有较高的分离率, 应该引起兽医工作者的足够重视。

**关键词:** 耐甲氧西林葡萄球菌; *mecA* 基因; PCR; 核酸探针

中图分类号: S852.61+1 文献标识码: A

## Detection of *mecA* Gene of Methicillin-resistant *Staphylococcus* by PCR and Nucleic Acid Probe

Du Yiping, Zou Ling, Liu Wenhua, Wen Jianxin, Ren Huiying

(College of Animal Science and Technology, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109)

**Abstract:** In order to investigate the situation of methicillin-resistant *Staphylococcus* (MRS) in livestock and poultry, the method of PCR and dig-labeled nucleic acid probe to *mecA* gene fragment were established to detect 75 *Staphylococcus* isolates. Forty-two strains of MRS were screened out by PCR, accounting for 56.0%. Forty-seven strains of MRS were screened out by nucleic acid probe method, accounting for 62.7%. The coincidence rate of acid probe method with PCR method was 93.3%. It was verified that MRS could be isolated from livestock and poultry in vivo or in vitro with higher isolation rate. Veterinary researchers should pay more attention to Methicillin-resistant *Staphylococcus*.

**Key words:** methicillin-resistant *Staphylococcus*, *mecA* gene, PCR, nucleic acid probe

葡萄球菌是引起医院感染的一种主要病原菌, 可引起疖、痈、外科切口、创伤等局部化脓性感染和骨髓炎、化脓性关节炎、肺炎、心内膜炎、脑膜炎等, 严重危害人类健康。甲氧西林是一种耐青霉素酶的  $\beta$ -内酰胺类抗生素, 曾有效地控制了对青霉素耐药的金黄色葡萄球菌的感染。上世纪 80 年代后期耐甲氧西林葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus*, MRS)成为全球性的病原微生物, 排在院内感染病原菌的首位<sup>[1-3]</sup>。尽管医学研究领域已对 MRS 进行了大量的研究, 但目前

MRS 尚未引起兽医工作者的重视, 兽医领域对此的研究甚少。*mecA* 基因作为 MRS 的分子标志, 在葡萄球菌属中广泛分布, 目前在葡萄球菌属以外的细菌中尚未检出, 且 *mecA* 基因与葡萄球菌对甲氧西林的耐药性有很好的相关性, 因此 CLSI(Clinical and Laboratory Standards Institute) 将检测 *mecA* 基因作为鉴定 MRS 的金标准<sup>[4,5]</sup>。

PCR 及核酸探针技术是基因检测的常用方法, 准确、可靠, 尤其是核酸探针技术, 具有敏感性高、分辨率

**第一作者简介:** 杜沂平, 女, 1980 年出生, 山东平度人, 硕士, 研究方向为兽医微生物学与免疫学。通信地址: 266109 青岛市城阳区春阳路青岛农业大学动物科技学院, Tel: 0532-88030499, E-mail: duyiping0723@163.com

**通讯作者:** 任慧英, 女, 1968 年出生, 山东莱阳人, 博士, 教授, 研究方向为兽医微生物学与免疫学。通信地址: 266109 青岛市城阳区春阳路青岛农业大学动物科技学院, Tel: 0532-88030499, E-mail: renren0228@sina.com。

收稿日期: 2008-07-21, 修回日期: 2008-08-27。

高、容易判断结果、能在一张膜上检测大量标本的特点。试验试图建立耐药基因 *mecA* 的 PCR 及核酸探针检测技术,对动物源性葡萄球菌分离株进行检测,以了解耐甲氧西林葡萄球菌在畜禽中的携带情况。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

从山东省养殖场及兽医门诊的犬、兔、猪、鸡的体表及发病猪、鸡的化脓灶及内脏中分离并经生化试验鉴定出 75 株葡萄球菌(采集时间为 2007 年 1 月至 2007 年 11 月)。质控菌株 ATCC25923(甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌)购自中国兽医药品监察所。

### 1.2 分子生物学试剂

TaqE (5U/ $\mu$ l)、dNTP Mixture (各 2.5mmol/L)、pMD18-T Vector、纯化回收试剂盒购自 Takara 公司; GoldView 核酸染料购自北京赛百盛基因技术有限公司; DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 购自 Roche(罗氏)公司; NC 膜购自 Pall 公司。

### 1.3 *mecA* 基因的 PCR 扩增

引物设计: 根据 Genbank 中登录号为 AB221123 的 *mecA* 基因全序列,用 Primer5.0 软件设计一对引物(由北京赛百盛基因技术有限公司合成),PCR 产物大小为 225bp。上游引物 P1: 5'-GCAATCGCTAAA-GAACTAAG-3'(20bp); 下游引物 P2: 5'-AATGGGAC-CAACATAACCTA-3'(20bp)。

模板的制备: 按参考文献<sup>[6]</sup>介绍的煮沸法,采用丙酮、溶菌酶及蛋白酶 K 等制备细菌 DNA 模板。

反应体系(25 $\mu$ l): 超纯水 6.0 $\mu$ l, DNA 模板 12.2 $\mu$ l, 10  $\times$ PCR buffer (Mg<sup>2+</sup>Plus)2.5 $\mu$ l, dNTP Mixture (各 2.5mmol/L)2.0 $\mu$ l, 上游引物 P1(25 $\mu$ mol/L)1.0 $\mu$ l, 下游引物 P2(25 $\mu$ mol/L)1.0 $\mu$ l, TaqE(5U/L)0.3 $\mu$ l。

反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1min, 50 $^{\circ}$ C 退火 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

PCR 产物经 1.3% 琼脂糖凝胶电泳,在紫外凝胶成像系统下观察结果。

### 1.4 *mecA* 基因的克隆测序及同源性分析

将 *mecA* 基因的 PCR 扩增产物纯化回收,回收产物与 pMD18-T Vector 进行连接后,转化至 DH5 $\alpha$  感受态细胞中,选择阳性转化子送大连宝生物工程有限公司测序,测序结果用 NCBI 中的 BLAST 进行同源性分析。

### 1.5 葡萄球菌分离株的 PCR 检测

分别提取 75 株葡萄球菌分离株的 DNA 进行 *mecA* 基因的 PCR 扩增,PCR 产物经 1.3% 琼脂糖凝胶电泳,在紫外凝胶成像系统下观察结果。

### 1.6 *mecA* 基因核酸探针的制备

对 *mecA* 基因片段进行纯化回收并测定浓度,用罗氏公司的试剂盒进行地高辛标记制备探针,对该探针进行标记效率、特异性、敏感性检测。

### 1.7 葡萄球菌分离株的核酸探针检测

将 75 株葡萄球菌分离株的模板 DNA 点在 NC 膜上,经烤膜、预杂交、杂交、免疫学检测后,通过斑点的有无判断是否为耐甲氧西林葡萄球菌。

## 2 结果

### 2.1 *mecA* 基因的序列比对

将药敏试验鉴定的耐甲氧西林葡萄球菌阳性菌株进行 *mecA* 基因的 PCR 扩增,将扩增产物克隆测序,测序结果经 NCBI 中的 BLAST 进行搜索,结果该克隆片段与其它耐甲氧西林葡萄球菌 *mecA* 基因的核苷酸同源性达 98%~100%,说明该片段可以用于核酸探针检测。

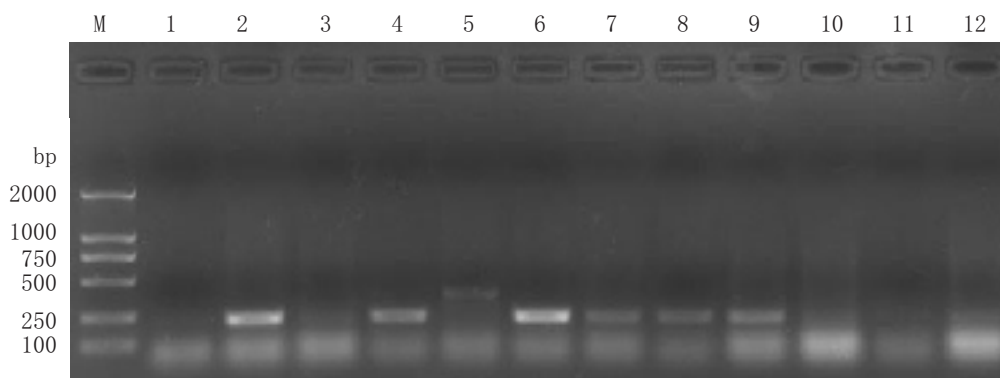


图 1 部分葡萄球菌分离株 *mecA* 基因的 PCR 检测结果

注: M: DL-2000 分子量标准; 1~12: 葡萄球菌分离株。

## 2.2 葡萄球菌分离株的 PCR 检测

将 75 株葡萄球菌的 DNA 进行 *mecA* 基因的 PCR 检测, 结果见图 1。其中有 42 株出现一条带, 大小与预期的 225bp 相符, 阳性率为 56.0%。

## 2.3 探针的敏感性、特异性检测

将葡萄球菌分离株 *mecA* 的模板 DNA 及链球菌、大肠杆菌、沙门氏菌的模板 DNA 点在 NC 膜上, 经烤膜、预杂交、杂交、免疫学检测后, 检测探针的特异性。检测结果表明, 探针链球菌、大肠杆菌、沙门氏菌的检测无阳性杂交信号, 而对同源 DNA 的检测有明显的特异性斑点, 为强阳性, 说明该探针有较高的特异

性。

将 *mecA* 基因片段倍比稀释后, 点在 NC 膜上, 检测探针的敏感性。结果表明, 将 DNA 稀释成 40.5pg/μl 的浓度时仍有肉眼可见的斑点, 即可检测出 40.5pg 的同源 DNA, 说明该探针有较高的敏感性。

## 2.4 葡萄球菌分离株的探针检测

用地高辛标记的 *mecA* 基因片段作为核酸探针, 对 75 株葡萄球菌进行斑点杂交, 结果见图 2。共检出 47 株 MRS, 占 62.7%, 其中 42 株经 PCR 检测为阳性, 5 株经 PCR 检测为阴性, 该方法与 PCR 方法的总符合率为 93.3%。

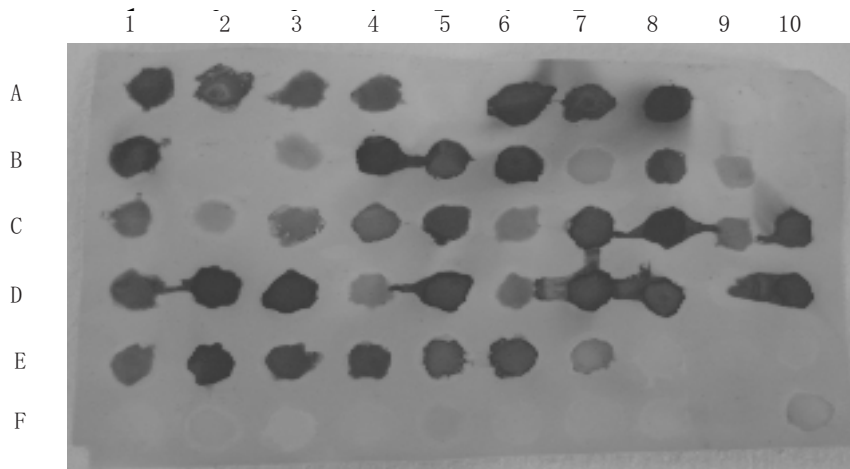


图 2 葡萄球菌分离株的斑点杂交检测结果

B2: 质控菌 ATCC25923; A1~F10(除 B2 外): 葡萄球菌分离株。

## 3 讨论

耐甲氧西林葡萄球菌(MRS)在医学研究领域已经有大量的相关报道, 但在兽医领域中却很少有报道, 吉林大学王教玉等<sup>[7]</sup>报道, 从病猪、鸡的内脏器官中分离出 41 株葡萄球菌中有 48.8% 为 MRS。通过试验发现, 从犬、兔、猪、鸡的体表及发病猪、鸡的化脓灶及内脏中分离的 75 株葡萄球菌中有超过 56.0% 的菌株为 MRS, 说明耐甲氧西林葡萄球菌在畜禽体表及体内普遍存在。试验首次从犬、兔、猪、鸡的体表分离到 MRS, 文献尚未见有报道。由于耐甲氧西林葡萄球菌对多种抗菌药物具有广泛耐药性, 其感染后的治疗问题成为医学临床上的难题, 万古霉素等糖肽类抗菌药物成为治疗 MRS 感染的首选药<sup>[8,9]</sup>。虽然目前国内尚未见耐万古霉素葡萄球菌的分离报道, 但耐甲氧西林葡萄球菌在人和动物的高分离率应引起医学工作者及兽医工作者的足够重视。

应用 PCR 方法对耐药基因进行检测, 不受基因表达条件的影响, 比通过药敏试验进行的表型检测更加

准确, 但容易出现假阴性和假阳性<sup>[10]</sup>。试验发现, PCR 检测为阳性的菌株, 用斑点杂交检测也为阳性。但是, 经 PCR 检测为阴性的某些样品, 经斑点杂交检测却有较强的信号; 经 PCR 检测目的条带模糊的某些样品, 经斑点杂交检测却有很强的信号。这些现象说明, 核酸探针方法比 PCR 更灵敏, 能有效地减少漏检。而且, 核酸探针方法可以在一张膜上检测大量样本, 操作简单、容易判断且不需要 PCR 仪等设备, 适合于临床上大量样本检测。

MRS 具有流行范围广、感染部位多、多重耐药性、临床治疗棘手等特点, 控制动物体耐甲氧西林葡萄球菌具有重要的公共卫生学意义。此研究针对耐甲氧西林葡萄球菌的 *mecA* 耐药基因, 建立了 PCR 及地高辛标记核酸探针的检测方法, 为临床检测耐甲氧西林葡萄球菌的流行奠定了基础。

## 参考文献

- [1] Gould I M. The clinical significance of methicillin-resistant Staphy-

- lococcus aureus. J Hosp Infect, 2005, 61(4):277-282.
- [2] Ana M, Isabel C, Lone A, et al. Prolonged exposure of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* COL strain to increasing concentrations of oxacillin results in a multidrug-resistant phenotype. International Journal of Antimicrobial Agents, 2007, 29:302-305
- [3] S.Ibrahem, S. Salmenlinna, A. M. Kerttula, et al. Comparison of genotypes of methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* in Finland. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2005, 24: 325-328.
- [4] 李晓芳, 范昕建. 甲氧西林金黄色葡萄球菌的耐药基因与耐药性关系. 中国抗生素杂志, 2006, 31(3):140-143.
- [5] Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Seventeenth Informational Supplement (M100-S17)[S]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007, 27(1):38-45.
- [6] Persing D H, Smith T F, Tenover F C, et al. Diagnostic molecular microbiology. Washington DC: American Society for Microbiology, 1993:97-120
- [7] 王教玉, 韩文瑜, 雷连成, 等. 动物源性耐甲氧西林葡萄球菌耐药表型及基因型鉴定. 中国畜牧兽医, 2007, 34(2):89-92.
- [8] 张涛, 马筱玲, 戴媛媛, 等. 万古霉素耐药金黄色葡萄球菌致病性研究. 中国人兽共患病杂志, 2005, 21(11):1003-1006.
- [9] 熊艳. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药现状及检测方法的研究:[学位论文]. 华中科技大学同济医学院, 2006:5-10
- [10] P.U. Krishnan, K. Miles, N. Shetty. Detection of methicillin and mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates using conventional and molecular methods: a descriptive study from a burns unit with high prevalence of MRSA. J Clin Pathol, 2002, 55:745-748.