

福氏志贺菌血清型单重PCR鉴定方法的建立及应用

张曙霞 王建平 金东 陈道利 刘凯 王艺婷 李振军 徐建国 孙强正

【摘要】 目的 建立基于O抗修饰基因的福氏志贺菌血清型PCR鉴定方法。**方法** 根据福氏志贺菌O抗原合成及修饰特异基因设计引物,以常见的14种福氏志贺菌血清型(包括1a、1b、1c、2a、2b、3a、3b、4a、4b、5a、Y、X、Xv和F6)为标准菌株,建立福氏志贺菌血清型单重PCR鉴定方法;并以痢疾志贺菌、宋内志贺菌、鲍氏志贺菌和腹泻相关的其他菌属菌株验证特异性;应用该方法对106株福氏志贺菌临床分离株进行PCR血清分型。**结果** 建立一种福氏志贺菌血清型单重PCR鉴定方法,通过8个PCR反应,能够鉴定目前已知的15种血清型中的14种(Xv除外)。检测灵敏度在10 pg至1 ng DNA(20 μl反应体系)。对106株福氏志贺菌临床分离株的检测结果显示,PCR分型方法与玻片凝集法具有很高的一致性。**结论** 本研究建立的福氏志贺菌血清型单重PCR鉴定方法具有特异性、灵敏性,可用于临床检测。

【关键词】 福氏志贺菌; O抗修饰基因; 聚合酶链式反应; 血清型

Development of a singleplex PCR assay targeting O-antigen modification genes for molecular serotyping of *Shigella flexneri* ZHANG Shu-xia^{1,2}, WANG Jian-ping², JIN Dong², CHEN Dao-li³, LIU Kai², WANG Yi-ting², LI Zhen-jun², XU Jian-guo², SUN Qiang-zheng². 1 Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; 2 State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Infectious Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention; 3 Ma'anshan Municipality Center for Disease Control and Prevention

Corresponding author: SUN Qiang-zheng, Email: sunqiangzheng@icdc.cn

This work was supported by grants from the Beijing Science and Technology Projects to Excellent Doctoral Dissertation Guiders (No. YB20098450101), State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control of China (No. 2008SKLID106, 2011SKLID203) and Major Projects for Infectious Disease Prevention and Control of Ministry of Science and Technology of China (No. 2008ZX10004-008, 2008ZX10004-009, 2009ZX10004-203).

【Abstract】 Objective To develop a singleplex PCR assay targeting O-antigen modification genes for molecular serotyping of *Shigella* (*S.*) *flexneri*. **Methods** Eight pairs of primer for O-antigen synthesis and modification genes of *S. flexneri* were designed and used for developing an O-antigen modification gene-specific singleplex PCR assay to serotype 14 most common *S. flexneri* serotypes (1a, 1b, 1c, 2a, 2b, 3a, 3b, 4a, 4b, 5a, Y, X, Xv and F6). Bacterial pathogens which causing diarrheal disease were used for specificity detection. 106 *S. flexneri* clinical isolates were serotyped by this method and compared with the slide agglutination method. **Results** An O-antigen modification, gene-specific singleplex PCR was developed. When six singleplex PCR reactions were performed, 14 of the 15 recognized *S. flexneri* serotypes were identified, except for serotype Xv. The detection threshold ranged from 10 pg to 1 ng DNA in a 20 μl reaction system. A high concordance between the singleplex PCR assay and slide agglutination were observed when 106 *S. flexneri* strains of various serotypes were analyzed with an exception that 1 serotype Y strain showed that it was carrying the additional defective *gtr* II genes. **Conclusion** This method showed advantages over the traditional slide agglutination methods, and was promising when under application in the following situations as clinical diagnosis.

【Key words】 *Shigella flexneri*; O-antigen modification genes; Polymerase chain reaction; Serotype

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2012.03.018

基金项目:北京市优秀博士学位论文指导教师科技项目(YB20098450101);传染病预防控制国家重点实验室自主研究重点项目(2008SKLID106、2011SKLID203);传染病预防控制重大专项(2008ZX10004-008、2008ZX10004-009、2009ZX10004-203)

作者单位:030001 太原,山西医科大学寄生虫学教研室(张曙霞);中国疾病预防控制中心传染病预防控制所 传染病预防控制国家重点实验室(张曙霞、王建平、金东、刘凯、王艺婷、李振军、徐建国、孙强正);安徽省马鞍山市疾病预防控制中心(陈道利)

张曙霞、王建平、金东、陈道利、刘凯同为第一作者

通信作者:孙强正, Email: sunqiangzheng@icdc.cn

福氏志贺菌是发展中国家细菌性痢疾的主要病原菌^[1]。根据O抗原的不同,福氏志贺菌分为15个血清型^[2,3]。除6型外,其他血清型的O抗原都具有由四糖重复单位构成的多糖骨架^[4],在骨架的不同糖基上进行糖基或/和乙酰基修饰,导致菌株表面不同的型(如I~V)和群(如3,4;7,8;6)抗原位点的出现,菌株呈现不同的血清型^[5,6]。这种修饰作用是由整合到菌株基因组中的前噬菌体或隐性噬菌体携带的相关基因[*gtrA*、*gtrB*、*gtr*_(1-X)和/或*oac*]介导的糖基化和乙酰化作用完成的^[7]。根据*gtr*_(1-X)和*oac*基因的特异性和惟一性,可将其作为福氏志贺菌血清型的分子标识,建立分子生物学方法鉴定血清型。本研究根据已知的*gtr*_(1-X)、*oac*基因及福氏志贺菌1~5型O抗合成特异基因*wzx*序列设计引物,PCR扩增目前常见的14个血清型(因5b没有标准菌株,本研究没有涉及)菌株中的*gtr*_(1-X)、*oac*和*wzx*基因,并验证特异性,建立福氏志贺菌血清型单重PCR鉴定方法。

材料与方法

1. 菌株、培养条件和鉴定:标准福氏志贺菌菌株购自中国生物制品药品检定所、英国典型培养物国家保藏中心(NCTC)(NCTC4、NCTC9725、NCTC9726)或中国疾病预防控制中心传染病预防控制所传染病预防控制国家重点实验室(本室)保存(2000019、1997020、HN081、301、03HL12、2002110、2003036、2002014、2002017、2000007、51247)。PCR引物特异性检测所用57株腹泻病相关菌株为本室保藏。106株福氏志贺菌为临床分离株,购自NCTC或本室保存;志贺菌在LB琼脂平板上培养。所有福氏志贺菌采用志贺抗血清(日本生研公司)或单克隆抗体(瑞典Reagensia AB公司)进行血清学鉴定,操作按照产品说明书进行。

2. 主要试剂及材料:TaqDNA聚合酶、*Pfu*DNA聚合酶购自日本TaKaRa公司;DNA回收纯化试剂盒为德国Qiagen公司产品;染色体DNA提取试剂盒购自生工生物工程(上海)有限公司;Wide Range DNA Marker(100~6000 bp)为中国宝生物工程(大连)有限公司产品;其他试剂均为分析纯。

3. 引物设计及PCR扩增:根据已经发表的*gtr*I(AF139596)、*gtr*II(AF021347)、*oac*(AF547987)、*gtr*IV(AF288197)、*gtr*V(U82619)、*gtr*X(L0500)、*gtr*Ic(FJ905303)、*wzx*(AE005674)基因序列,采用primer 5.0软件设计引物。选择退火温度相同的引

物(55℃)作为备选引物,以方便PCR扩增同时进行。引物序列见表1,由生工生物工程(上海)有限公司合成。以标准菌株的DNA为模板,PCR分别扩增*gtr*I、*gtr*II、*oac*、*gtr*IV、*gtr*V、*gtr*X 6个基因片段,PCR反应体系和条件:上下游引物各1 μmol/L、dNTP 10 mmol/L、10×buffer 2.0 μl、TaqDNA聚合酶和*Pfu*DNA聚合酶的混合物(1:1)0.2 μl(1 U)、DNA模板1 μl(1 mmol/L),补充蒸馏水至20 μl。PCR条件为:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,退火30 s,72℃延伸60 s,共30个循环;72℃延伸5 min。PCR扩增产物经胶回收纯化后,送生工生物工程(上海)有限公司测序,然后与目的基因序列进行比对,以确定扩增产物的正确性。

表1 福氏志贺菌各基因的引物

基因	序列(5'~3')	扩增片段长度(bp)
<i>gtr</i> I	FR CTGTTAGGTGATGATGGCTTAG	1122
	RR ATTGAACGCCTCCTTGCTATGC	
<i>gtr</i> II	FR TGCGACATTACTTTCTCCCTGAG	1090
	RR TAGTTGCCACCATCCCACCAAAA	
<i>oac</i>	FR CCAGTGGGTCGCCAACCGGATGT	700
	RR CTGTTCCGGCTTTGAAAGTGCTG	
<i>gtr</i> IV	FR ACAGTTCTCACATGATGGCACA	960
	RR AATGCAACAGGAATCCTCACAG	
<i>gtr</i> V	FR AATACGATTCTCCTGGTGCTAAAC	905
	RR TAGGGCATTGCTTGTATCTTTTCAT	
<i>gtr</i> X	FR TACCTTGACCCGTTTCCG	935
	RR TGGCTTAGGCGCATTGAC	
<i>wzx</i>	FR CACTTGTGGGTATGCTGG	782
	RR CCGGCAAACAGATTAGAAA	
<i>gtr</i> Ic	FR AGGGAATGGCATTAGGGATCGG	518
	RR GCTGCAAGTGGTTTTTGTGGA	

4. PCR引物的特异性检测:分别提取56株对照菌株的染色体DNA(宋内志贺菌I相和II相各1株,志贺志贺菌1~12个血清型各1株,鲍氏志贺菌1~18个血清型各1株,肠侵袭性大肠埃希菌、肠致病性大肠埃希菌、肠产毒性大肠埃希菌、尿路致病性大肠埃希菌、单增李斯特菌、霍乱弧菌、猪霍乱沙门氏菌、小肠结肠炎耶尔森菌、伤寒沙门菌、副溶血弧菌、变形杆菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌、嗜水气单胞菌各1株,肠聚集性大肠埃希菌及大肠埃希菌K12各2株,肠出血性大肠埃希菌及副伤寒杆菌各3株),用表1中引物进行PCR扩增,扩增体系及条件同方法3。PCR产物进行凝胶电泳,以判断扩增产物的有无及大小。

5. PCR反应灵敏度检测:灵敏度为每个反应中能检测到的最低DNA质量浓度(ng)表示。测定标

准菌株基因组 DNA A 值, 换算为质量浓度。进行 10 倍系列稀释, 浓度范围为每 20 μl 反应体系 DNA 量 1 pg、10 pg、100 pg、1 ng、10 ng。用表 1 所列出的引物进行 PCR 检测, 扩增体系及扩增条件同方法 3。

6. 福氏志贺菌临床分离株的 PCR 检测: 选取不同血清型的福氏志贺菌临床分离株 106 株, 包括 1a(4 株)、1b(5 株)、2a(8 株)、2b(2 株)、3a(2 株)、3b(1 株)、4a(1 株)、4b(4 株)、5a(1 株)、Y(6 株)、Xv(38 株)、X(29 株)、F6(5 株), 按照方法 3 进行 PCR 扩增, 根据 PCR 扩增结果判断菌株血清型, 并与血清凝集鉴定结果进行比较。

结 果

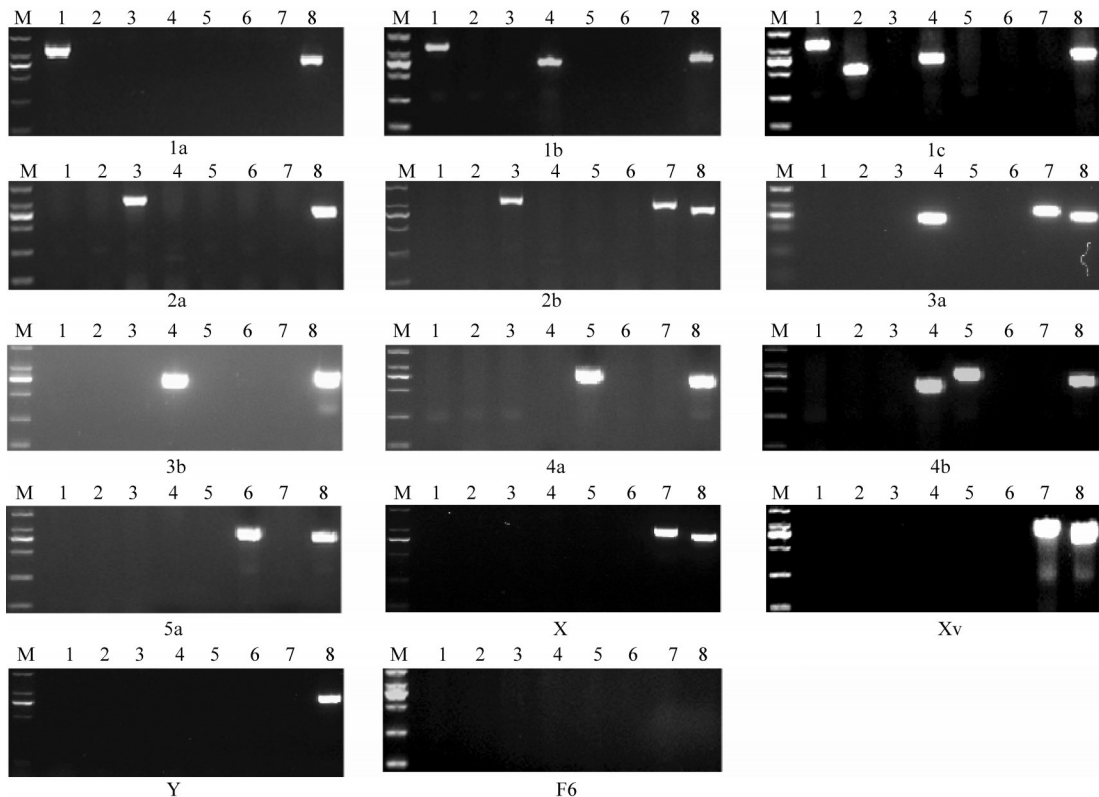
1. 引物选择标准和标准菌株的 PCR 扩增: 引物设计时选择理论 Tm 值一样的引物, 使 8 个 PCR 反应可以在同一条件下进行, 提高时效性。PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, *gtr I*、*gtr II*、*oac*、*gtr IV*、*gtr V*、*gtr X*、*wzx* 和 *gtr I c* 基因扩增产物分别在 1122、1090、700、960、905、935、782 和 518 bp 位置有相应条带, 与预期扩增片段长度相符(图 1); 扩增产物经测序证实为目的片段; 不同血清型菌株具有特异的 PCR 扩增谱, 分别是 1a (*gtr I*、*wzx*), 1b(*gtr I*、*oac*、*wzx*), 1c

(*gtr I*、*gtr I c*、*oac*、*wzx*), 2a(*gtr II*、*wzx*), 2b(*gtr II*、*gtr X*、*wzx*), 3a(*oac*、*gtr X*、*wzx*), 3b(*oac*、*wzx*), 4a(*gtr IV*、*wzx*), 4b(*gtr IV*、*oac*、*wzx*), 5a(*gtr V*、*wzx*), X(*gtr X*、*wzx*), Xv(*gtr X*、*wzx*), Y(*wzx*)。理论上, F6 血清型菌株具有独特的 O 抗合成基因 *wzx*, 而且不含任何 O 抗修饰基因, 因此 8 个基因扩增均阴性。除 Xv 血清型菌株外, 其他血清型菌株血清凝集反应与 PCR 扩增结果一致(图 1)。

2. PCR 特异性检测: 为检测引物特异性, 以 57 株常见腹泻病病原体的 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增。结果显示, 在相同的扩增体系和扩增条件下, 对照菌株 PCR 扩增结果均为阴性, 证明 PCR 引物具有较高特异性。

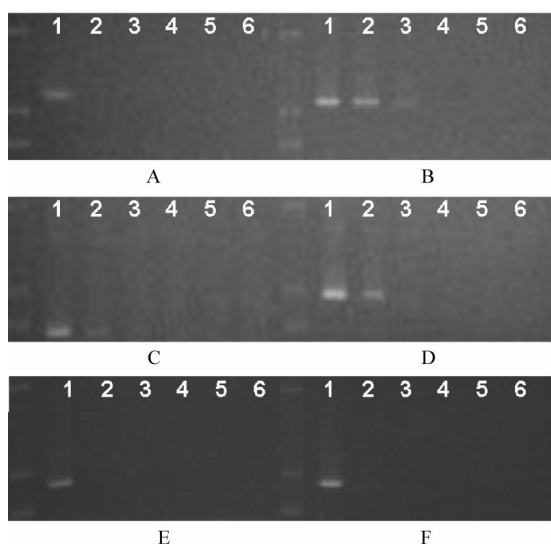
3. PCR 反应灵敏度检测: 为评价常见基因的 PCR 反应灵敏性, 将标准菌株的 DNA 梯度稀释后, 进行 PCR 扩增, 结果 *gtr I*、*gtr V* 基因引物对特异基因检测的最低 DNA 浓度为 10 ng/20 μl; 而 *oac*、*gtr IV* 和 *gtr X* 基因引物对特异基因检测的最低 DNA 浓度为 1 ng/20 μl; *gtr II* 基因引物对最低检测浓度为 100 pg/20 μl(图 2)。

4. 福氏志贺菌临床分离株的 PCR 检测: 106 株福氏志贺菌中, 除了 38 株 Xv 血清型和 1 株 Y 血清型



注: M 为 DNA DL2000 Marker, 从上至下依次为 2000、1000、750、500、250、100 bp; 1~8: *gtr I*、*gtr I c*、*gtr II*、*oac*、*gtr IV*、*gtr V*、*gtr X*、*wzx*

图 1 福氏志贺菌 14 个血清型 O 抗修饰基因 PCR 扩增谱



注: A~F: *gtr*I、*gtr*II、*oac*、*gtr*IV、*gtr*V、*gtr*X基因的扩增产物电泳图;1~6:20 μl扩增体系中DNA模板的量为10 ng、1 ng、100 pg、10 pg、1 pg、0.1 pg

图2 福氏志贺菌PCR反应灵敏度检测结果

菌株外,所有菌株的血清型与PCR扩增谱一致。38株Xv菌株PCR扩增谱与标准菌株2002017一致。1株Y血清型菌株中*gtr*II基因扩增阳性,进一步对扩增产物进行胶回收纯化和测序、比对,结果发现*gtr*II基因序列1197~1282碱基缺失,形成移码突变,导致*gtr*II基因成为假基因。

讨 论

目前,鉴定福氏志贺菌及其他群志贺菌的血清型主要采用免疫动物的抗血清与分离菌株进行玻片凝集反应,根据免疫凝集结果进行判定^[6]。尽管福氏志贺菌血清型诊断系统已经建立^[8],而且多种商业化诊断血清亦广泛应用,但是仍有诸多不足^[9],如样品需要进行预培养和分离单菌落,延长了诊断周期;血清反应受细菌培养条件和生长状态影响;部分血清型间存在交叉反应,导致错误判读;结果判定通过肉眼观察,具有个体主观性。因此,寻找福氏志贺菌血清型的分子标识,发展基于PCR等的分子生物学鉴定方法,对于及时、准确鉴定病原菌血清型具有重要意义。

本研究建立了针对福氏志贺菌O抗修饰特异基因(*gtr*I、*gtr*II、*gtr*IV、*gtr*V、*gtr*X、*oac*、*wzx*和*gtr*Ic)的血清型单重PCR检测体系,在本研究所涉及的福氏志贺菌血清型中,除Xv外,福氏志贺菌各血清型标准菌株的型/群抗原表型与其特异基因*gtr*的PCR扩增结果一致,即血清型与PCR扩增谱吻合。尽管没有5b的标准菌株,但根据5b血清型O抗结构,推测

其应该*gtr*V和*gtr*X基因扩增阳性;本研究根据福氏志贺菌O抗合成基因*wzx*的序列设计特异引物,这样在所有1~5型福氏志贺菌中*wzx*扩增阳性,可以作为内对照。福氏志贺菌中的F6具有区别于1~5型福氏志贺菌的特殊O抗,因此8个基因PCR扩增阴性。本研究建立的福氏志贺菌血清型单重PCR方法具有很好的特异性,对非福氏志贺菌属的腹泻病病原菌进行PCR扩增,结果均为阴性。Xv是近年来在中国流行的福氏血清型,在2001年首次出现,随后4年内取代F2a成为中国优势血清型,其分离率最高达48%^[2]。其与X菌株的区别在于Xv菌株能够与单克隆抗体MASF IV-1发生凝集,而X血清型菌株不发生凝集^[2]。目前决定IV-1抗原的基因还未确定,因此,本方法还不能从X血清型中区分Xv。必要时需要增加血清MASF IV-1单克隆抗体或IV型单价血清进行凝集反应,以区分Xv和X血清型。

对106株不同血清型的福氏志贺菌进行PCR分型发现,除了1株Y血清型菌株外,其他菌株的PCR扩增谱与血清凝集结果一致。在这株Y血清型菌株中,发现了突变的*gtr*II基因,其1197~1282碱基的缺失,导致假基因的形成和功能缺失。

参 考 文 献

- [1] Wang XY, Tao F, Xiao D, et al. Trend and disease burden of bacillary dysentery in China (1991-2000). Bull WHO, 2006, 84 (7):561-568.
- [2] Ye CY, Lan RT, Xia SL, et al. Emergence of a new multidrug-resistant serotype X variant in an epidemic clone of *Shigella flexneri*. J Clin Microbiol, 2010, 48(2):419-426.
- [3] von Seidlein L, Kim DR, Ali M, et al. A multicentre study of *Shigella* diarrhoea in six Asian countries: disease burden, clinical manifestations, and microbiology. PLoS Med, 2006, 3(9):e353.
- [4] Simmons DAR, Romanowska E. Structure and biology of *Shigella flexneri* O antigens. J Med Microbiol, 1987, 23:289-302.
- [5] Carlin NI, Lindberg AA, Bock K, et al. The *Shigella flexneri* O-antigenic polysaccharide chain. Nature of the biological repeating unit. Eur J Biochem, 1984, 139(1):189-194.
- [6] Edwards PR, Ewing WH. Identification of *Enterobacteriaceae*. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1972:126-131.
- [7] Adams MM, Allison GE, Verma NK. Type IV O antigen modification genes in the genome of *Shigella flexneri* NCTC8296. Microbiology, 2001, 147(Pt 4):851-860.
- [8] Ewing WH. Edwards and Ewing's identification of *Enterobacteriaceae*. 4th ed. New York: Elsevier Science Publishing Co., Inc, 1986:135-172.
- [9] Evins GM, Gheesling LL, Tauxe RV. Quality of commercially produced *Shigella* serogrouping and serotyping antisera. J Clin Microbiol, 1988, 26(3):438-442.

(收稿日期:2011-10-21)

(本文编辑:万玉立)