

PCR 和核酸探针检测猪源沙门氏菌四环素耐药基因 *tetC* 的研究

代 敏^{1,2}, 王红宁^{1*}, 吴 琦¹

(1. 四川农业大学动物科技学院, 雅安 625014; 2. 绵阳师范学院分子生物学与生物制药重点实验室, 绵阳 621000)

摘 要: 对沙门氏菌的四环素耐药性进行了检测, 结果表明, 沙门氏菌对四环素类抗生素产生了广泛的耐药性, 耐药率达 100%, 对其四环素耐药基因 *tetC* 进行了扩增, 结果获得以质粒为模板的特异性产物, 与药敏试验结果阳性符合率 75%, 具有较高的检出率。用光生物素对 PCR 产物进行标记, 制备核酸探针, 采用菌落原位杂交的方法对沙门氏菌进行检测, 结果表明 13 株阳性 3 株阴性, 杂交结果与 PCR 结果阳性符合率为 93.75%, 具有较高的特异性。通过条件的优化, 建立的四环素耐药基因 *tetC* 的 PCR 和核酸探针检测技术, 为四环素耐药性的分子流行病学监测提供了有效的途径。

关键词: 沙门氏菌; 四环素耐药基因; *tetC*; PCR; 核酸探针; 检测

中图分类号: S852.61⁺ 2; Q781

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2005)05-0482-04

由于抗生素的使用, 尤其是不合理使用(如低剂量抗菌促生长剂的长期使用、盲目用药和超剂量使用等), 导致全球耐药性的产生。四环素作为一类广谱抗生素, 因其价格低廉、作用范围广、毒性低等优点, 曾广泛地应用于人医、兽医和植物细菌性感染的防治以及畜禽抗菌促生长剂, 导致许多细菌对四环素类抗菌素表现出很高的耐药性^[1-3]。沙门氏菌能感染人和多种动物, 在生产实践中, 常用抗生素进行防治, 研究表明, 沙门氏菌对四环素类抗生素产生了广泛的耐药性, 大量耐药菌株的存在和流行, 使得本病的发病率和死亡率都不断上升, 一方面制约养殖业的健康发展; 另一方面导致全世界人沙门氏菌感染逐渐上升, 尤其是院内感染和食物中毒不断增多^[4,5]。因此, 开展沙门氏菌的耐药性研究在兽医、食品卫生和公共卫生等方面具有重要的意义。

1 材料及方法

1.1 菌株

自规模化猪场分离的经动物试验和生化试验鉴定的致病性沙门氏菌 16 株, JM109(四川农业大学动物预防医学生物工程实验室保存), 药敏质控菌

ATCC₂₅₉₂₂(购自卫生部药物生物制品鉴定所), 沙门氏菌标准株 C₇₉₋₁₃(购自中国兽药监察所)。

1.2 培养基及常规药品和试剂

四环素、金霉素、土霉素(购自华美生物工程公司北京分公司); photobiotin(购自 Gibco BRL); 普通营养琼脂 SS 琼脂、LB 培养液、甲酰胺、琼脂糖、BSA、Dextran 等。

1.3 分子生物学试剂

溶菌酶、蛋白酶 K 和 RNaseA 购自北方同正公司, Taq Plus I 聚合酶、dNTP 购自上海生物工程公司, pBR322 质粒 DNA(四川大学赠送), BlueGene Nonradioactive Nucleic Acid Detection Sys 购自 Gibco BRL 公司, PCR 产物纯化试剂盒购自赛百盛基因技术有限公司; 鲑鱼精 DNA 和 DL2000 购自天泰生物工程科技有限公司。

1.4 药敏试验

以大肠杆菌 ATCC₂₅₉₂₂ 和沙门氏菌标准株 C₇₉₋₁₃ 作药敏质控菌, 采用琼脂平板稀释法分别测定 16 株猪源致病性沙门氏菌对四环素、土霉素、金霉素的 MIC 值。具体方法参见文献[6]。

1.5 *tetC* 的 PCR 扩增

引物设计: 据文献报道^[7] 及 Genbank 注册的 *tetC* 序列, 用 Primer5.0 软件设计四环素抗性基因 *tetC* 的引物(上海生物工程公司合成)。

上游引物: 5'-CTTGAGAGCCTTCAAC-CCAG-3'

下游引物: 5'-ATGGTTCGTACCTACCT-

收稿日期: 2003-07-15

基金项目: 国家“十五”科技攻关课题(2002BA514A-17-11)

作者简介: 代 敏(1974), 女, 四川达县人, 讲师, 硕士, 主要从事细菌耐药性及微生物学的研究

* 通讯作者: 王红宁, Tel: 0835-2882353; E-mail: whongning@163.com

GCC-3'

模板的制备: 质粒 DNA 和染色体 DNA 的提取参见文献[8, 9]。

反应体系组成: 模板 DNA 1 μ L, 10 μ mol/L 的上下游引物各 2 μ L; 10 \times PCR buffer (含 25 mmol/L MgCl₂) 5 μ L, 4 \times dNTP 混合物 5 μ L, *Taq* 酶 1 μ L (2.5 U/ μ L); 双蒸水 34 μ L, 总体积 50 μ L。

反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。

1.6 *tetC* 的序列分析

分别对低耐药菌株 DY1 和高耐药菌株 SLI-3 的扩增产物进行序列测定(上海生物工程公司完成), 并与 pBR322(GenBank Accession No. J01749) 中 *tetC* 的核苷酸序列进行比较, 用 DNASTar 软件分析同源性。

1.7 pBR322 质粒 DNA 的转化

将 pBR322 质粒 DNA 转化到 JM109 菌株, 选择阳性转化子保存备用。具体方法参见文献[8]。

1.8 *tetC* 探针的制备

用 PCR 产物纯化试剂盒对高耐药沙门氏菌 SLI-3 的 PCR 扩增产物进行纯化, 具体方法参见产品说明书。用光生物素对其进行标记, 制备核酸探针, 具体方法参见文献[10]。

1.9 菌落原位杂交检测沙门氏菌的 *tetC* 基因

以含 pBR322 质粒 DNA 的阳性转化子作阳性对照, 沙门氏菌标准株作阴性对照, 采用菌落原位杂交的方法对临床分离的 16 株猪源致病性沙门氏菌进行检测。具体方法参见文献[9]。

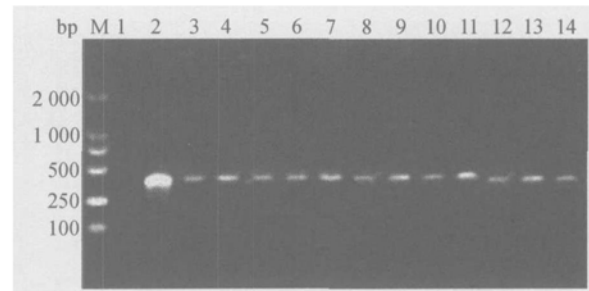
2 结果

2.1 药敏试验

根据美国临床实验室标准委员会(NCCLS) 标准, 判定菌株的耐药性。结果表明, 16 株致病性沙门氏菌对四环素类抗生素表现出普遍耐受性, 耐药率达 100%。其中 MIC 值 > 128 μ g/mL 的高耐药菌株 13 株, 高耐药率 81.25%; MIC 值为 32 μ g/mL 的低耐药菌株 3 株, 低耐药率 18.75%。

2.2 *tetC* 的 PCR 扩增

对 16 株致病性沙门氏菌的 *tetC* 基因进行扩增, 结果 12 株沙门氏菌获得以质粒为模板长约 400 bp 的特异性扩增产物, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果见图 1。



M. DL2000; 1. 阴性对照(有引物无模板); 2. 阳性对照(pBR322); 3. GH1; 4. SLI-3; 5. PJ2-2; 6. SLI-5; 7. SLI-1; 8. SLI-4; 9. SL2-2; 10. MS4; 11. MS6; 12. ZG4-1; 13. ZG3-1; 14. DY1

图 1 沙门氏菌四环素耐药基因 *tetC* 的 PCR 扩增

Fig. 1 Agarose gelelectrophoresis analysis of PCR products

2.3 *tetC* 的核苷酸序列分析

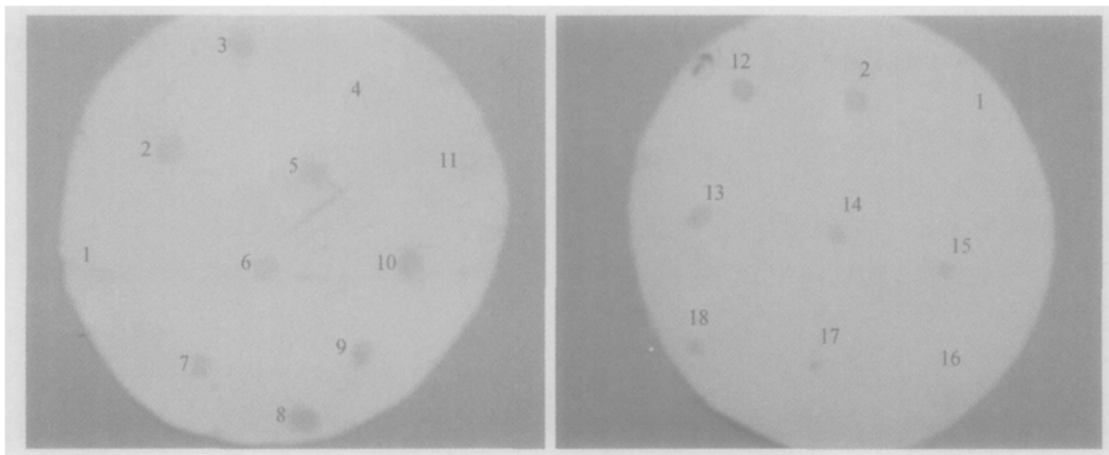
据测序报告, PCR 产物序列中包含了全基因 *tetC* 的一部分, 将菌株 DY1 和 SLI-3 的核苷酸序列进行比较, 并与 pBR322 的四环素耐药基因进行比较, 分析同源性。结果表明, 分离菌株 DY1 和 SLI-3 中 *tetC* 的核苷酸同源率为 97.7%; 菌株 DY1 与质粒 pBR322 中 *tetC* 的核苷酸同源率为 98.7%; 菌株 SLI-3 与质粒 pBR322 中 *tetC* 的核苷酸同源率为 98.4%。

2.4 菌落原位杂交

用光生物素标记的 *tetC* 基因作为核酸探针, 用菌落原位杂交检测了 16 株猪源致病性沙门氏菌, 结果 13 株阳性 3 株阴性(见图 2), 重复试验 3 次, 结果仍如此。

3 讨论

3.1 抗生素的选择性压力是导致细菌耐药性产生的直接原因, 1970 年美国 FDA 进行了动物饲料中抗生素使用的调查, 认为使用亚治疗剂量的抗生素易引起耐药性细菌的形成, 并首次证实动物多种耐药性细菌的产生与抗生素的使用有关^[11]。本研究表明, 在规模化猪场中, 沙门氏菌对四环素类抗生素已产生了严重的耐药性, 耐药率高达 100%, 在分离的 16 株沙门氏菌中, 13 株产生了高水平耐药(81.25%); 低水平耐药 3 株(18.75%)。此外, 从药敏试验结果还可以看出, 沙门氏菌对四环素类抗生素存在交叉耐药性, 对指导临床合理用药具有重要的意义。



1. 阴性对照(C₇₉₋₁₃); 2. 阳性对照(pBR322阳性转化子); 3. ZG3-1; 4. ZG2-3; 5. ZG4-1; 6. MS4; 7. MS6;
8. PJ2-2; 9. DY1; 10. GH1; 11. ZG2-2; 12. SL1-3; 13. SL1-4; 14. SL1-5; 15. SL2-2; 16. ZG2-1;
17. MS8; 18. SL1-1

图2 *tetC* 核酸探针与沙门氏菌的菌落原位杂交

Fig. 2 Analysis of colony hybridization *in situ* with the *tetC* probe

3.2 细菌对四环素耐药的产生常常是由于获得了有关接合质粒或转座子中新的四环素耐药基因 *tet* (又称四环素抗性决定子), *tet* 种类很多, 目前已鉴定出 30 多种, 其中革兰氏阴性菌 32 种, 革兰氏阳性菌 22 种。 *tet* 基因编码 Tet 蛋白, Tet 蛋白主要通过以下 3 种机制介导耐药性: 能量依赖性泵出机制(又称主动转运机制); 通过改变核糖体上有效结合位点使其免受四环素作用的核糖体保护机制; 产生四环素钝化酶机制, 在革兰氏阴性菌中, 四环素耐药的产生主要通过前两种机制, 而 TetC 蛋白主要介导泵出机制^[8]。本研究的结果表明, 猪源致病性沙门氏菌对四环素类抗菌素的耐药性主要由质粒上的四环素耐药基因 *tetC* 介导, 通过编码膜蛋白 TetC 以主动转运的机制产生; 是否还有其它四环素抗性决定子介导, 以及是否与其它耐药机制有关有待进一步研究。

3.3 对 16 株沙门氏菌的 *tetC* 基因进行扩增, 结果表明, 12 株获得以质粒为模板的特异性产物, 大小约 400 bp, 与药敏试验结果阳性符合率为 75%, 具有较高的检出率; 此外, 在本研究中还对四环素耐药基因 *tetA* 进行了扩增, 结果在质粒和染色体上均未获得特异性产物, 表明规模化猪场分离的沙门氏菌的四环素耐药基因以 *tetC* 为主, 且该基因只存在于分离菌株的质粒上, 与 Mendez 等^[12] 报道一致。4 株未扩出 *tetC* 的沙门氏菌可能由其它四环素抗性决定子介导。

3.4 随着分子生物学技术的发展, 核酸探针技术已广泛应用于疾病的诊断、抗药基因来源及发展等方面的研究^[13, 14], 而用核酸探针技术检测沙门氏菌四环素耐药基因在国内尚未见有报道, 本研究用光生物素对临床分离菌株 SL1-3 的 PCR 扩增产物进行标记, 结果标记率高、重复性好, -20℃可保存 8~10 个月以上, 且操作简便、不需特殊的仪器设备、成本明显较其他标记物如地高辛等低。用此探针采用菌落原位杂交的方法对临床分离的 16 株猪源沙门氏菌进行了检测, 结果 13 株阳性, 3 株阴性, 这 3 株阴性菌株可能属于四环素抗性决定子的其他基因组。在本研究中, 用溶菌酶、蛋白酶 K、RNase 等处理杂交膜上残存的菌体蛋白进行了严格的脱蛋白处理, 减少了非特异性反应, 杂交结果与 PCR 检测结果阳性符合率 93.75%, 表明该探针具有较高的特异性。对于杂交阳性而 PCR 结果阴性的菌株 MS8, 认为它可能是假阳性, 因为链酶亲和素不仅可结合到生物素标记的探针上, 而且也可结合到来自临床样品内源性生物素化蛋白及其它糖蛋白类物质, 导致生物素探针出现非特异性着色^[10]。此外, 本研究结果表明, 在耐药性的分子检测方面, 菌落原位杂交具有简便、快速等优点, 可用于四环素耐药性的分子流行病学监测。

3.5 在本研究中, 对 2 株来源和耐药程度各不同的临床分离沙门氏菌的四环素抗性基因 *tetC* 进行了序列测定, 并与 pBR322 的四环素抗性基因 *tetC* 进

行了比较。同源性分析结果表明,对于耐药程度和地方来源各不相同的菌株,同源率为 97.7%~98.7%,与 Lar King 等报道一致^[15]。

参考文献:

- [1] van Den Bogaard A E, London N, Stobberingh E E. Antimicrobial resistance in pig faecal samples from the Netherlands (five abattoirs) and Sweden[J]. J Antimicrob Chemother, 2000, 45(5): 663~ 671.
- [2] 金发祥. 110 株伤寒沙门氏菌药敏结果分析[J]. 河北医学, 1998, 4(2): 68~ 69.
- [3] 王铭杰, 史同瑞, 包靖国, 等. 临床分离病原菌耐药性监测[J]. 中国预防兽医学报, 1999, 21(2): 146~ 147.
- [4] 吴承龙. 细菌 R 质粒在菌群中的转移及细菌耐药性扩散[J]. 中国人兽共患病杂志, 1998, 14(6): 49~ 50.
- [5] Piddock L J, White D G, Gensberg K, et al. Evidence for an efflux pump mediating multiple antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2000, 44(11): 3 118~ 3 121.
- [6] 戴自英. 临床抗菌药理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1985.
- [7] Ng L K, Martin I, Alfa M, et al. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistance genes[J]. Molecular and Cell Probes, 2001, 15(4): 209~ 215.
- [8] 孙树汉. 基因工程原理与方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 2001.
- [9] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 北京: 科学出版社, 1995.
- [10] 富常勤, 周志江, 郑明光. 生物素标记 LT 基因探针检测产肠毒素性大肠杆菌[J]. 兽医大学学报, 1992, 12(3): 217~ 220.
- [11] 徐士新. 国外对抗菌药物耐药性的研究和相关规定[J]. 中国兽药杂志, 2001, 35(5): 51~ 55.
- [12] Mendez B, Jachibana C, Levy S B. Heterogeneity of tetracycline resistance determinants [J]. Plasmids, 1997, 3: 99~ 108.
- [13] 布日额, 王君伟, 吴金花, 等. 用地高辛标记核酸探针检测鹅细小病毒的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2004, 35(1): 102~ 105.
- [14] 杨汉春, 赵 静, 刘金华, 等. 地高辛标记质粒探针监测卡那霉素耐药性的研究[J]. 中国农业科学, 2001, 34(1): 1~ 4.
- [15] Ng L K, Mulvey M R, Martin I, et al. Genetic characterization of antimicrobial resistance in canadian isolates of *Salmonella* serovar *typhimurium* DT 104[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1999, 43(12): 3 018~ 3 021.

Research on Detection of Tetracycline Resistance Gene(*tetC*) of Pathogenic *Salmonella* from Swine by PCR and Nucleic Acid Probe

DAI Min^{1,2}, WANG Hong-ning^{1*}, WU Qi¹

(1. College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China; 2. Key Laboratory for Molecular Biology and Biopharmaceuticals, Mianyang Normal University, Mianyang 621000, China)

Abstract: The detection of tetracyclines-resistance of 16 *Salmonella* isolates showed the resistance rate was 100%. The *tetC* gene of 16 *salmonella* strains was amplified by polymerase chain reaction. 12 strains with this gene were located on plasmids. Compared with the result of the drug-susceptibility tests, the method of PCR showed 75% concordance in positive rate. The probe of *tetC* gene was labelled with photobiotin, and 16 pathogenic *Salmonella* strains from swine were detected by colony hybridization *in situ*. The result indicated that 13 strains were positive, 3 strains were negative. Compared with the result of PCR, the method of the *tetC* probe showed 93.75% concordance in positive rate. In this study, two methods for detecting *tetC* gene were established by using PCR and nucleic acid probe, and they could be applied to the molecular epidemiology surveillance of tetracyclines-resistance.

Key words: *Salmonella*; tetracycline-resistant gene; *tetC*; PCR; nucleic acid probe; detection

* Corresponding author