

猪源大肠杆菌氟苯尼考耐药基因 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测试剂盒的研制

余 波,杨 莉,姜玲玲,徐景峨,周思旋,杨粤黔
(贵州省农业科学院 畜牧兽医研究所,贵州 贵阳 550005)

摘要: 根据 GenBank 中猪源大肠杆菌氟苯尼考耐药基因 *floR* 的序列设计 1 对特异性引物,扩增出 *floR* 基因片段,克隆到 pMD-18T 载体上,构建 pMD-18T-*floR* 阳性标准质粒。通过 SYBR Green I 荧光定量 PCR 反应条件的优化、荧光定量 PCR 标准曲线的建立、熔解曲线的分析及敏感性、特异性、重复性试验,建立针对猪源大肠杆菌氟苯尼考耐药基因 *floR* 的荧光定量 PCR 检测方法,并研制出检测试剂盒,同时对从养殖场分离的 156 株大肠杆菌进行耐药表型和耐药基因检测。结果显示,研制的试剂盒灵敏度可达 1.0×10^1 拷贝,重复性好,特异性强,对大肠杆菌磺胺类耐药菌株、 β -内酰胺类耐药菌株、大环内酯类耐药菌株检测均为阴性,熔解曲线分析,扩增产物的熔解温度为 $88.8 \sim 89.2\text{ }^{\circ}\text{C}$,没有引物二聚体和非特异性扩增峰出现,耐药表型与耐药基因检测符合率为 96.7%。表明研制的试剂盒适合于临床样品猪源大肠杆菌氟苯尼考耐药基因的检测。

关键词: 猪源大肠杆菌; 氟苯尼考; *floR* 基因; SYBR Green I 荧光定量 PCR

中图分类号: S855 .1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2017)11-0152-05

A SYBR Green I Real-time Quantitative PCR Kit for Detection of Florfenicol Resistance Gene *floR* of *Escherichia coli* from Swine

YU Bo, YANG Li, JIANG Lingling, XU Jing, ZHOU Sixuan, YANG Yueqian
(Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550005, China)

Abstract: According to the florfenicol resistance gene *floR* of *Escherichia coli* in GenBank, one pair of specific primers was designed for amplifying the specific fragments of *floR* gene. Then *floR* gene was amplified by PCR and cloned into pMD-18T vector, which was used as positive standard plasmid. Through optimization of the reaction conditions, establishment of standard curve, analysis of melting curve and test of sensitivity, specificity and repeatability, a SYBR Green I real-time quantitative PCR was established and diagnostic kit was developed. 156 strains of *Escherichia coli* which were isolated from swine farms were studied on drug resistance phenotype and drug resistance gene. The PCR kit was highly sensitive (1.0×10^1 copies DNA), and had a good reproducibility, specificity. The kit test result was negative for sulfonamides resistant strains, beta lactam resistant strains and macrolide resistant strains of *Escherichia coli* isolated from swine. The melting curve analysis showed that the dissolution temperature of the amplified product was between $88.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $89.2\text{ }^{\circ}\text{C}$, and there were no primer dimers and non-specific amplification peaks. The coincidence rate of drug resistance phenotype and resistance gene was 96.7%. The results showed that the SYBR Green I real-time quantitative PCR kit was suitable for the detection of florfenicol resistance gene *floR* of *Escherichia coli* in clinical samples.

Key words: swine *Escherichia coli*; florfenicol; *floR* gene; SYBR green I real-time quantitative PCR

收稿日期:2017-05-24
基金项目:贵州省农业科技攻关项目(黔科合 NY[2015]3009-2 号);贵州省重大科技专项(黔科合重大专项字[2013]6014 号);贵州省科学技术基金项目(黔科合 LH 字[2014]7694 号)
作者简介:余 波(1981-),男,四川邻水人,副研究员,硕士,主要从事兽医微生物与中兽药研究。E-mail:yubonky@163.com

致病性大肠杆菌是危害养猪业的重要病原菌,广泛存在于世界各地,不仅给养殖业带来巨大经济损失,而且危害人类健康^[1]。目前,治疗大肠杆菌病主要使用抗生素,而抗生素的大量滥用,造成大肠杆菌的耐药菌株逐渐增多^[2-7]。近年来,氟苯尼考作为广谱抗菌药被大量滥用,大肠杆菌对其耐药性日益严重^[8-9]。目前,关于大肠杆菌对氟苯尼考耐药机制的研究主要集中在 *floR* 基因上,该基因能够在多种病原菌间水平转移。因此,掌握 *floR* 基因在大肠杆菌中的散播情况以及大肠杆菌对氟苯尼考的耐药现状具有重要意义,这需要建立快速简便的 *floR* 基因检测方法。为此,通过对 SYBR Green I 荧光定量 PCR 条件的优化,研制大肠杆菌氟苯尼考耐药基因 PCR 检测试剂盒,以期快速准确检测大肠杆菌氟苯尼考耐药基因。

1 材料和方法

1.1 试验材料

菌株:大肠杆菌标准毒株、大肠杆菌氟苯尼考耐药菌株、大肠杆菌磺胺类耐药菌株、大肠杆菌 β -内酰胺类耐药菌株、大肠杆菌大环内酯类耐药菌株以及 2015—2017 年从贵州省贵阳市、大方县、安顺市、瓮安县等规模化生猪养殖场分离鉴定的 156 株大肠杆菌,均由贵州省农业科学院畜牧兽医研究所兽用中草药研究室保存。

主要试剂:2 × Taq PCR Mastermix、Goldview 核酸染料、DL2000、感受态细胞 DH5 α 、pMD-18T 克隆载体、细菌 DNA 快速提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒等均购自天根生化科技(北京)有限公司;SYBR Green I 荧光定量 PCR 酶购自宝生物(大连)工程有限公司;氟苯尼考药敏试纸购自杭州微生物试剂有限公司(批号为 20161122)。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计 根据 GenBank 中 *floR* 基因设计 1 对特异性引物,上游引物:5'-GCTCAACGTGAGTTG-GATCATA-3',下游引物:5'-CACTGCTGCTGATGGC-TCCTTTC-3'。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.2.2 DNA 提取 应用细菌 DNA 快速提取试剂盒提取大肠杆菌标准毒株、大肠杆菌氟苯尼考耐药菌株、大肠杆菌磺胺类耐药菌株、大肠杆菌 β -内酰胺类耐药菌株、大肠杆菌大环内酯类耐药菌株的 DNA,将提取的 DNA 于 -20 ℃ 保存。

1.2.3 pMD-18T-*floR* 阳性标准质粒的构建 利用 1.2.1 中的引物,以大肠杆菌氟苯尼考耐药菌株

DNA 为模板进行 PCR 扩增,反应条件为:94 ℃ 5 min;94 ℃ 1 min,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,30 个循环;最后 72 ℃ 10 min。

将扩增的 PCR 产物与 pMD-18T 克隆载体连接,转化感受态细胞 DH5 α ,重组质粒命名为 pMD-18T-*floR*,同时送上海英骏生物技术有限公司测序。将测序正确的重组质粒进行浓度和纯度测定,作为阳性标准品。

1.2.4 大肠杆菌 *floR* 基因 SYBR Green I 荧光定量 PCR 方法的建立

1.2.4.1 反应条件优化 荧光定量 PCR 反应条件优化包括引物浓度(5 μ mol/L、10 μ mol/L、20 μ mol/L)、退火温度(50 ℃、55 ℃、60 ℃)、ROX Reference Dye 的用量(0.5 μ L、1.0 μ L)。荧光定量 PCR 反应程序为:94 ℃ 10 s;94 ℃ 5 s,退火温度(50 ℃/55 ℃/60 ℃)退火 10 s,72 ℃ 10 s,40 个循环。

1.2.4.2 标准曲线建立 将重组质粒的浓度和纯度进行测定后,计算 DNA 拷贝数,作为阳性标准品进行 10 倍倍比稀释。以优化好的条件进行扩增,每个稀释倍数 3 个重复,以拷贝数为横坐标,以 Ct 值为纵坐标建立标准曲线。

1.2.4.3 熔解曲线分析 在大肠杆菌 *floR* 基因 SYBR Green I 荧光定量 PCR 反应程序完成后,对扩增产物进行熔解曲线分析,分析是否存在引物二聚体或非特异性扩增。

1.2.4.4 敏感性试验 计算重组质粒 DNA 拷贝数,10 倍倍比稀释后分别进行荧光定量 PCR,每个稀释倍数 3 个重复,以确定荧光定量 PCR 敏感性。

1.2.4.5 特异性试验 分别将大肠杆菌氟苯尼考耐药菌株、大肠杆菌磺胺类耐药菌株、大肠杆菌 β -内酰胺类耐药菌株、大肠杆菌大环内酯类耐药菌株 DNA 进行荧光定量 PCR,每个样品 3 个重复,以确定荧光定量 PCR 特异性。

1.2.4.6 重复性试验 应用建立的荧光定量 PCR 方法重复检测大肠杆菌氟苯尼考耐药菌株样品 3 次,以确定建立的荧光定量 PCR 检测方法的稳定性。

1.2.5 大肠杆菌 *floR* 基因检测试剂盒的组装与保存期检测 以建立的荧光定量 PCR 方法所需试剂组装试剂盒,每个试剂盒按检测 20 次样品组装,包括引物、荧光定量 PCR 反应混合液、ROX Reference Dye 核酸染料、阳性对照(大肠杆菌氟苯尼考耐药菌株 DNA)、阴性对照(大肠杆菌标准毒株 DNA)、超纯水。

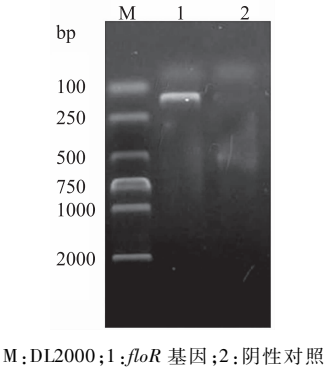
将试剂盒分别保存于 4 ℃ 和 -20 ℃,同时分别保存 3 个月、6 个月、12 个月,对阳性标准品进行检测,观察试剂盒的稳定性。

1.2.6 临床大肠杆菌氟苯尼考耐药表型与耐药基因检测 对从生猪养殖场分离的 156 株致病性大肠杆菌进行液体培养,利用平板计数法进行计数,按传统药敏纸片法检测分离菌株对氟苯尼考的敏感性,测定抑菌圈直径大小,敏感度的判定根据杭州微生物试剂有限公司提供的标准进行。同时提取临床大肠杆菌分离株的 DNA,应用研制的试剂盒对其 *floR* 基因进行检测。

2 结果与分析

2.1 pMD-18T-*floR* 阳性标准品的制备

对大肠杆菌氟苯尼考耐药菌株 DNA 进行 PCR 扩增,扩增出 148 bp 的目的片段,无非特异性扩增(图 1)。将 PCR 产物测序结果与 GenBank 中的 *floR* 基因序列比对,相似度为 98.4%~100%。将扩增的 *floR* 基因片段与 pMD-18T 克隆载体连接,构建重组阳性质粒 pMD-18T-*floR*。



M:DL2000;1:*floR* 基因;2:阴性对照
图 1 *floR* 基因 PCR 扩增结果

2.2 大肠杆菌 *floR* 基因 SYBR Green I 荧光定量 PCR 反应条件的优化

荧光定量 PCR 条件的优化结果为:在 25 μL 反应体系中引物 2 μL (引物浓度 10 $\mu\text{mol/L}$)、Premix Ex

Taq 12.5 μL 、ROX Reference Dye 0.5 μL 、模板 1 μL ,退火温度选择 55 $^{\circ}\text{C}$;在此条件下出现最高的荧光值、最小的 Ct 值,且溶解曲线分析中不出现非特异性扩增峰。

2.3 大肠杆菌 *floR* 基因 SYBR Green I 荧光定量 PCR 反应标准曲线的建立

分别以 1.0×10^4 、 1.0×10^3 、 1.0×10^2 、 1.0×10^1 拷贝 4 种不同含量重组质粒作为模板进行荧光定量 PCR 扩增反应,每个含量重复 3 次,制作荧光定量 PCR 反应标准曲线,得到线性回归方程为 $\text{Ct} = -3.670 \times \lg \text{拷贝数} + 22.59 (R^2 = 0.999)$ (图 2)。

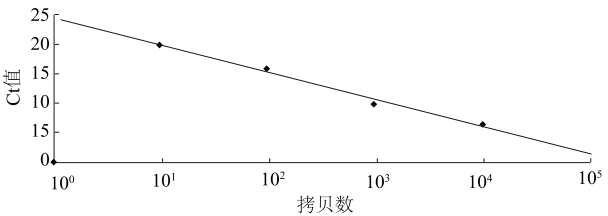


图 2 大肠杆菌 *floR* 基因 SYBR Green I 荧光定量 PCR 标准曲线

2.4 大肠杆菌 *floR* 基因 SYBR Green I 荧光定量 PCR 溶解曲线分析

在大肠杆菌 *floR* 基因 SYBR Green I 荧光定量 PCR 反应结束后,对扩增产物进行溶解曲线分析,扩增产物的溶解温度为 88.8~89.2 $^{\circ}\text{C}$,没有引物二聚体和非特异性扩增出现(图 3)。

2.5 大肠杆菌 *floR* 基因 SYBR Green I 荧光定量 PCR 敏感性试验结果

分别以 1.0×10^5 、 1.0×10^4 、 1.0×10^3 、 1.0×10^2 、 1.0×10^1 、 1.0×10^0 拷贝等 6 种不同含量重组质粒作为模板进行荧光定量 PCR 扩增,每个含量重复 3 次,结果显示,其灵敏度为 1.0×10^1 拷贝(图 4)。

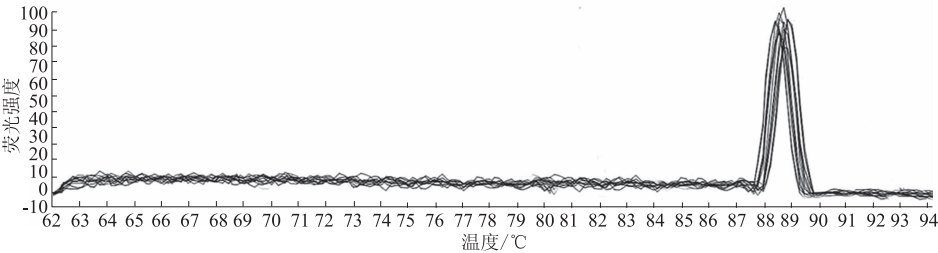


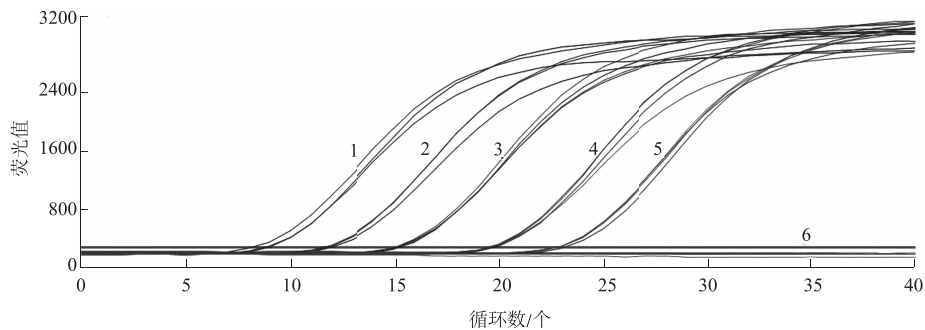
图 3 大肠杆菌 *floR* 基因 SYBR Green I 荧光定量 PCR 溶解曲线

2.6 大肠杆菌 *floR* 基因 SYBR Green I 荧光定量 PCR 特异性试验结果

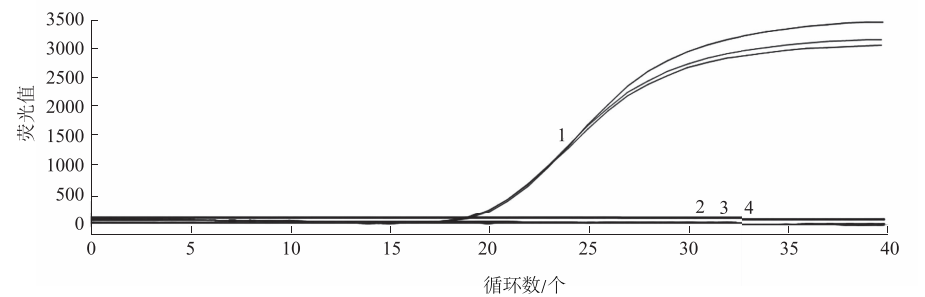
分别以大肠杆菌氟苯尼考耐药菌株、大肠杆菌磺胺类耐药菌株、大肠杆菌 β -内酰胺类耐药菌株、大肠杆菌大环内酯类耐药菌株 DNA 为模板进行荧

光定量 PCR,以确定建立的荧光定量 PCR 检测方法的特异性,结果显示,大肠杆菌氟苯尼考耐药菌株检测结果为阳性,而大肠杆菌磺胺类耐药菌株、大肠杆菌 β -内酰胺类耐药菌株、大肠杆菌大环内酯类耐药菌株 DNA 为阴性(图 5)。可见,建立的荧光定量

PCR 检测方法特异性强。



1~6:重组质粒 DNA 分别为 $1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^0$ 拷贝
图 4 大肠杆菌 *floR* 基因 SYBR Green I 荧光定量 PCR 敏感性试验结果



1:大肠杆菌氟苯尼考耐药菌株;2~4:分别为大肠杆菌磺胺类耐药菌株、大肠杆菌 β -内酰胺类耐药菌株、大肠杆菌大环内酯类耐药菌株
图 5 大肠杆菌 *floR* 基因 SYBR Green I 荧光定量 PCR 特异性试验结果

2.7 大肠杆菌 *floR* 基因 SYBR Green I 荧光定量 PCR 重复性试验结果

应用建立的方法重复检测大肠杆菌 *floR* 基因阳性菌株 3 次,结果显示,扩增曲线重复性较好。

2.8 试剂盒的检测结果

试剂盒组成:特异性引物 40 μ L、荧光定量 PCR 反应混合液 250 μ L、ROX Reference Dye 20 μ L、阴性对照 20 μ L、阳性对照 20 μ L、超纯水 500 μ L。

试剂盒分别保存在 4 $^{\circ}$ C、-20 $^{\circ}$ C,分别于 3 个月、6 个月、12 个月对大肠杆菌 *floR* 基因标准阳性质粒进行检测,试剂盒于 4 $^{\circ}$ C 保存 6 个月、12 个

月后敏感性分别降低 10 倍、1 000 倍;试剂盒于 -20 $^{\circ}$ C 保存 3 个月、6 个月后敏感性未降低,保存 12 个月敏感性降低 10 倍。

2.9 临床大肠杆菌氟苯尼考耐药性与耐药基因检测结果

由表 1 可知,氟苯尼考药敏试验共检测出 88 株耐药表型菌株,试剂盒检测出 85 株 *floR* 基因阳性,而药敏试验检测出对氟苯尼考敏感的 68 株大肠杆菌中,试剂盒检测有 6 株 *floR* 基因阳性,156 株分离大肠杆菌耐药表型和 *floR* 基因检测符合率为 96.7% (88/91)。

表 1 大肠杆菌药物敏感性与 *floR* 基因检测结果

药物敏感性	抑菌圈直径/mm	表型检出数/株	<i>floR</i> 基因检出数/株	符合率/%
耐药	≤ 12	88	85	96.6(85/88)
中度敏感	13~17	22	5	77.3(17/22)
敏感	≥ 18	46	1	97.8(45/46)

3 结论与讨论

氟苯尼考具有抗菌谱广、吸收快等特点,可以广泛用于治疗畜禽养殖中的细菌性疾病,在生猪养殖场中广泛用于治疗仔猪腹泻、猪喘气病、传染性胸膜肺炎等,尤其是作为仔猪腹泻的预防保健药^[10-11]。本研究中,分离的 156 株致病性大肠杆菌有 88 株表

型耐药,耐药率达到 56.4% (88/156)。可见,生猪养殖场中大肠杆菌对氟苯尼考耐药严重,可这能和养殖场使用氟苯尼考作为保健药,以及治疗中大量滥用有关^[12]。

floR 基因作为大肠杆菌的外排泵基因,通过编码外排泵蛋白将体内的氟苯尼考泵出体外,以降低细菌内氟苯尼考的浓度,从而抑制氟苯尼考的抑菌

作用,同时 *floR* 基因是质粒介导的耐药基因,可以在菌株间相互转移,从而造成耐药性广泛传播^[13-15]。本研究根据 GenBank 中猪源大肠杆菌对氟苯尼考耐药的 *floR* 基因序列,建立猪源大肠杆菌氟苯尼考耐药基因荧光定量 PCR 检测方法,灵敏度可达 1.0×10^1 拷贝,与传统的药敏试验检测结果符合率达 96.7% (88/91),表明研制的试剂盒可用于大肠杆菌氟苯尼考耐药基因的检测。本研究中,应用研制的试剂盒检测 88 株表型耐药菌株中,有 85 株 *floR* 基因阳性,这可能与大肠杆菌对氟苯尼考存在其他耐药机制有关^[16]。同时,药敏试验结果为阴性的 68 株大肠杆菌中,试剂盒检测出 6 株 *floR* 基因阳性,其中有 5 株表型为中度敏感,1 株表型为敏感,这可能与耐药基因出现个别碱基变异或缺失引起外排泵功能减弱或丧失有关^[17-18]。

参考文献:

- [1] 马增军,芮萍,逯春香,等. 猪源肠外致病性大肠杆菌的分离与鉴定[J]. 中国人兽共患病学报,2015,31(2):130-134.
- [2] Martinezmedina M, Mora A, Blanco M, et al. Similarity and divergence among adherent-invasive *Escherichia coli* and extraintestinal pathogenic *E. coli* strains[J]. Journal of Clinical Microbiology,2009,47(12):3968-3979.
- [3] 李红丽,詹丽娥,王彩先,等. 山西省猪致病性大肠杆菌血清型调查及耐药性监测[J]. 山西农业科学,2012,40(11):1226-1330.
- [4] 赵凤菊,曹东,李井春,等. 猪源大肠埃希菌超广谱 β -内酰胺酶的检测及其耐药性分析[J]. 河南农业科学,2017,46(2):111-115.
- [5] 孙硕,吕世明,谭艾娟,等. 适应度代价对大肠杆菌药物敏感性恢复的作用[J]. 天津农业科学,2016,22(4):33-35.
- [6] 俱雄,党亚锋,刘祥,等. 大肠杆菌外膜蛋白 OmpC 的生物学信息学分析及表位多肽疫苗的重组预测[J]. 河南农业大学学报,2017,51(1):94-100.
- [7] 李进福,丁海峰,李小申,等. 河南地区猪呼吸道隐性感染大肠杆菌耐药基因检测及分析[J]. 河南农业科学,2017,46(9):144-148.
- [8] 颜友荣,方向红,王琳琳. 苏中地区猪大肠杆菌的耐药性与耐药基因的试验[J]. 中国兽医杂志,2016,52(2):90-92.
- [9] 刘艳红,吕淑霞,李颖,等. 大肠杆菌耐药性及氟苯尼考耐药基因 *floR* 的研究[J]. 中国畜牧杂志,2017,53(1):115-118.
- [10] 崔耀明,林莉,唐桂芬,等. 复方氟苯尼考注射液的临床应用试验[J]. 黑龙江畜牧兽医,2016(14):176-178.
- [11] 文丽,吴泽华,李仕超. 氟苯尼考手性特性及在临床上的应用[J]. 猪业科学,2016,33(8):70-71.
- [12] 冯世文,李军,曾芸,等. 大肠杆菌 O157:H7 对氟苯尼考耐药机制的初步研究[J]. 中国人兽共患病学报,2016,32(3):271-275.
- [13] 王娟. 革兰阳性细菌氟苯尼考耐药机制的研究进展[J]. 中国兽医杂志,2011,47(11):60-62.
- [14] 吴蓓蓓,杜向党. 氟苯尼考耐药菌的构建及大肠杆菌中 *floR* 蛋白定位[J]. 畜牧兽医学报,2008,39(10):1438-1441.
- [15] Blickwede M, Schwarz S. Molecular analysis of florfenicol-resistant *Escherichia coli* isolates from pigs[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy,2004,53(1):58-64.
- [16] 冯世文,曾芸,李军,等. 细菌对氟苯尼考的耐药机制研究[J]. 黑龙江畜牧兽医,2014(3):52-54.
- [17] 郑朝朝,刘聚祥,刘静. 保定地区不同动物源大肠杆菌氟苯尼考耐药基因 *floR* 的同源性分析[J]. 中国兽医科学,2012,42(7):677-680.
- [18] 陈阳阳,薛慧亮,马红霞,等. 氟苯尼考联合多西环素缩小猪源大肠杆菌耐药突变选择窗[J]. 中国兽医学报,2013,33(11):1720-1723.