

鸡源大肠杆菌中 *QRDR* 基因的检测

冯涛, 何纪元, 薛原* (东北林业大学野生动物资源学院, 黑龙江哈尔滨 150040)

摘要 为分析鸡源大肠杆菌对喹诺酮类药物的耐药机制, 使用 PCR 技术从对喹诺酮类药物具有耐药性的大肠杆菌中扩增出喹诺酮耐药决定区 (*QRDR*) 基因。通过对所测序列结果的分析, 得到 DNA 促旋酶和拓扑异构酶 IV 基因 (*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*) 的突变位点及其氨基酸的表达情况。根据基因型研究 *QRDR* 的流行病学情况, 可指导喹诺酮类药物的临床合理用药。

关键词 大肠杆菌; *gyrA* 基因; *gyrB* 基因; *parC* 基因; *parE* 基因

中图分类号 S852.61 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)11-0106-02

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.11.029

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Detection of *QRDR* Gene in *Escherichia coli* from Chicken

FENG Tao, HE Ji-yuan, XUE Yuan (College of Wildlife Resources, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040)

Abstract In order to analyze the drugs resistance mechanism of fluoroquinolone to *Escherichia coli* from chicken, PCR technology was used to amplify determining area (*QRDR*) gene in *E. coli* with drugs resistance of *E. coli*. According to sequencing results of obtained sequences, the mutation sites and amino acid expression of DNA gyrase and topoi-somerase IV genes (*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*) were determined. The study on the epidemic situation of *QRDR* according to the genotype could guide the rational drug use in the clinic.

Key words *Escherichia coli*; *gyrA* gene; *gyrB* gene; *parC* gene; *parE* gene

喹诺酮类药物在兽医临床上的应用有近 30 年的历史, 是一类作用强、抗菌谱广的化学合成抗菌药^[1]。但这类药物的使用频率日益深化, 大肠杆菌对这类药物的影响程度越来越高^[2]。被 *gyrA* 和 *gyrB* 基因编码的 DNA 促旋酶和被 *parC* 和 *parE* 基因编码的拓扑异构酶 IV 是喹诺酮类药物产生耐药机制的主要作用区域^[3]。在大肠杆菌中, *gyrA* 基因所表达的第 67~106 位氨基酸在报道中经常有突变的情况产生, 而这种突变会导致大肠杆菌对喹诺酮类药物耐药或者使该菌株敏感性降低, 即为喹诺酮的耐药决定区^[4]。笔者采用聚合酶链式反应(PCR)分离的大肠杆菌进行了喹诺酮类耐药基因突变的检测, 了解东北地区鸡源大肠杆菌对喹诺酮类抗生素的耐药情况, 以期为指导该类抗菌药物的临床合理应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株。大肠杆菌质控菌株 ATCC25922 由中国兽医药品监察所提供, 试验菌株为采自东北三省不同地区的多个鸡源养殖场 413 株大肠杆菌。

1.1.2 主要仪器和试剂。DNA 片段凝胶回收和质粒小量提取试剂盒(爱思进生物技术有限责任公司); DL2000 DNA Marker 和 *Taq* 酶购自大连宝生物工程有限公司; DYY-6 型电泳仪(北京市六一仪器厂); 凝胶成像分析系统(美国 Alpha Imager2200 公司); YEAR2000 PCR 仪(德国 Biometra 公司)。

1.2 方法

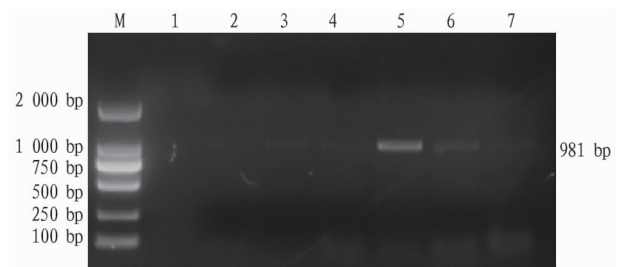
1.2.1 PCR 扩增。参考文献[5-7]得到相应的引物序列,

将序列送至哈尔滨博士生物有限公司合成 *QRDR* 基因的引物序列, 利用合成的引物序列对 413 株大肠杆菌样本进行 PCR 扩增, 并对所扩增得到的 PCR 产物进行电泳验证。

1.2.2 目的片段测序分析。以 *QRDR* 基因 4 种不同引物扩增所得的 PCR 产物扩增样本用胶回收纯化后与 18-T 载体连接, 并转入到感受态细胞 *E. coli* DH5 α 中克隆复制, 将质粒样本送至哈尔滨博仕生物技术有限公司测序部进行序列测定。将返回的核苷酸序列利用 DNASTar 软件分析, 与 GenBank 数据库进行序列比对, 得出其序列的突变位点和特征。

2 结果与分析

2.1 *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* 基因的检测结果 在 413 株鸡源大肠杆菌中, *gyrA* 基因被检出呈阳性的有 107 株, 阳性率为 25.91%; *gyrB* 基因的阳性菌株有 219 株, 检出率为 53.03%; *parC* 基因被检出呈阳性的菌株有 201 株, *parE* 基因被检出呈阳性的菌株有 263 株, 阳性率分别为 48.67% 和 63.68% (图 1~4)。



注: M. DL 2000 Marker; 1. 阴性对照; 2~7. *gyrA* 基因

Note: M. DL 2000 Marker; 1. Negative control; 2~7. *gyrA* gene

图 1 部分 *gyrA* 基因的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification results of partial *gyrA* gene

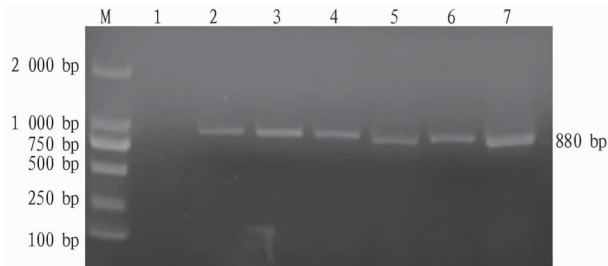
2.2 *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* 基因的氨基酸序列分析结果 菌株的 *gyrA* 基因存在碱基发生突变的现象, 导致 *gyrA* 基因所表达的氨基酸发生取代现象。主要包括 Leu55→Pro、Ser83→Leu、Asp87→Gly、Phe109→Leu 和 Ala136→Val, 其中

基金项目 国家自然科学基金项目(31502119); 黑龙江省博士后科研启动金资助项目(LBH-Q14002)。

作者简介 冯涛(1996—), 女, 河北承德人, 硕士研究生, 研究方向: 细菌耐药性研究。* 通信作者, 副教授, 博士, 硕士生导师, 从事细菌耐药性研究。

收稿日期 2018-12-24

18K、26K、d31 3 株有双位点氨基酸取代的情况出现。15 个菌株中有 7 个菌株都发生 Ser83→Leu 突变, d31 菌株表达为 83 位和 87 位的热点突变同时出现。菌株 f14 和 f53 *gyrB* 基因的碱基有突变发生, 主要表现为 Pro404→Ser、Leu451→Pro 和 Cys410→Tyr。耐药菌株 S44、S49、S67、S82、22K、29K 的 *parC* 基因碱基发生突变如 Ser58→Ile、Gln62→Lys、Val122→Ala、Thr147→Ala 和 Val284→Met, 这些氨基酸的改变也会使大肠杆菌降低其对药物的敏感性。菌株 16R 发生 Gln363→Arg 突变, 导致 *parE* 亚基发生氨基酸取代。

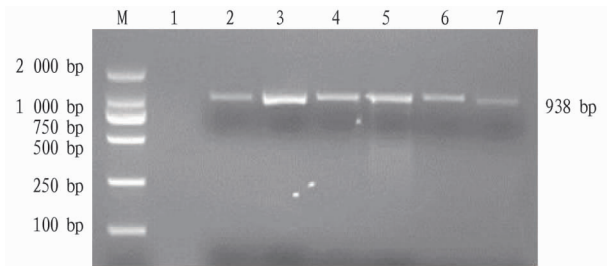


注: M. DL 2000 Marker; 1. 阴性对照; 2~7. *gyrB* 基因

Note: M. DL 2000 Marker; 1. Negative control; 2~7. *gyrB* gene

图 2 部分 *gyrB* 基因的 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR amplification results of partial *gyrB* gene

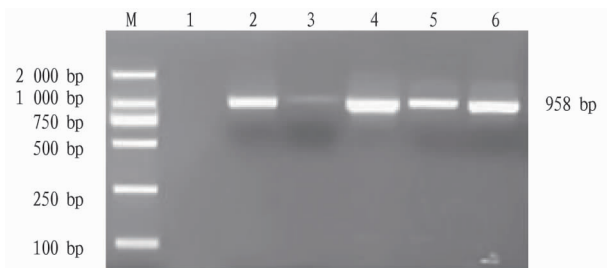


注: M. DL 2000 Marker; 1. 阴性对照; 2~7. *parC* 基因

Note: M. DL 2000 Marker; 1. Negative control; 2~7. *parC* gene

图 3 部分 *parC* 基因的 PCR 扩增结果

Fig. 3 PCR amplification results of *parC* gene



注: M. DL 2000 Marker; 1. 阴性对照; 2~6. *parE* 基因

Note: M. DL 2000 Marker; 1. Negative control; 2~6. *parE* gene

图 4 *parE* 基因的 PCR 扩增结果

Fig. 4 PCR amplification results of *parE* gene

3 讨论

近年来,人类和动物分离的大肠杆菌对喹诺酮类药物耐药的菌株迅速增多^[2]。构成 DNA 促旋酶和拓扑异构酶Ⅳ的氨基酸发生突变,影响了这 2 种酶的表达,导致大肠杆菌对喹诺酮类药物的结合能力发生了变化,从而导致耐药性的产生^[3]。国内外研究表明,喹诺酮类药物的高水平耐药已经成

为一个日益严重的问题^[3]。该研究结果表明,多个基因突变位点在菌株中同时存在,高水平耐药也是由于多个位点的同时突变所产生的,这与刘晓强^[8]的研究结果相似。该试验对 PCR 扩增产物进行测序,并且对测序结果进行比对分析,得到部分基因突变,从而使其表达的氨基酸发生突变。该试验对 4 种喹诺酮类药物进行耐药性研究,发现鸡源大肠杆菌对喹诺酮类药物的耐药性均偏高,说明这些突变的产生提高了细菌的耐药水平。

该研究中鸡源大肠杆菌的 *gyrA* 基因检测出 Ser83→Leu、Asp87→Gly; *gyrB* 基因发生 Pro404→Ser、Cys410→Tyr、Leu451→Pro 突变; *parC* 基因发生 Ser58→Ile、Gln62→Lys、Val122→Ala、Thr147→Ala 和 Val284→Met 突变; *parE* 基因发生 Gln363→Arg 突变。据报道^[1-7], *gyrA* 基因表达的氨基酸易发生突变的最普遍位点为第 81~87 位,表现为发生一个或者几个氨基酸被另一种取代,而大肠杆菌对喹诺酮类药物表现出高度耐药,其主要原因就有第 83 位的丝氨酸经常被亮氨酸所取代。 *gyrB* 基因编码的氨基酸的突变则主要表现在第 426 和第 447 位上,其中第 426 位突变常可呈现为大肠杆菌对喹诺酮类药物均可以有耐药情况产生,而第 447 位突变表现为对萘啶酸的耐药性较为增强^[1]。在近几年分离的大肠杆菌耐药菌株中, *gyrA* 基因热点突变的概率会比 *gyrB* 基因突变的概率大得多^[9]。目前研究表明, *parC* 和 *parE* 基因发生不同位点的突变,会使细菌的耐药水平显著提高。但是,只有当表达促旋酶的基因发生的位点突变会产生对喹诺酮类药物耐药时,才会有 *parC* 和 *parE* 的位点突变产生。以上突变结果中, *gyrA* 的热点突变 Ser83→Leu 和 Asp87→Gly 与任艳娜等^[1]的研究结果相一致。

另外,非特异性耐药机制在较复杂的多重耐药中同样具有十分重要的作用,不仅对喹诺酮类药物的耐药有影响,而且对其他不同种类的抗生素均会产生耐药的情况,但这种耐药机制是否会对大肠杆菌和喹诺酮类药物的耐药水平有影响还需要进一步研究。喹诺酮类药物是一种经过人工设计合成的化学抗生素,若要防止其耐药性的传播范围和频率以及耐药水平的不断增强,可以优先考虑人为改变其药物结构,从而减少 DNA 促旋酶和拓扑异构酶Ⅳ的基因突变对耐药性的影响。

参考文献

- [1] 任艳娜,甄盼盼,李健,等. 喹诺酮类耐药决定区、外排泵负调控基因对大肠杆菌氟喹诺酮高水平耐药分子机制的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(10): 11-16.
- [2] MARCADÉ G, DESCHAMPS C, BOYD A, et al. Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -actamases[J]. J Antimicrob Chemother, 2009, 63(1): 67-71.
- [3] 孟春萍,陈燕杰,吴华,等. 鸭源大肠杆菌对氟喹诺酮类耐药机制的研究[J]. 江西农业学报, 2012, 24(1): 128-130.
- [4] UCHIDA Y, MOCHIMARU T, MOROKUMA Y, et al. Geographic distribution of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* strains in Asia[J]. Int J Antimicrob Agents, 2010, 35(4): 387-391.
- [5] BETITRA Y, TERESA V, MIGUEL V, et al. Determinants of quinolone resistance in *Escherichia coli* causing community-acquired urinary tract infection in Bejaia, Algeria[J]. Asian Pacific journal of tropical medicine, 2014, 7(6): 462-467.

旧羽完成脱落,一般要 14 d 左右,这与文献[20]报道的非洲企鹅的平均换羽期为 16.75 d 基本一致。

表 2 76 号企鹅换羽期的身体特征及行为表现

Table 2 The physical characteristics and behavioral performance of penguin No. 76 in the molting stage

序号 No.	换羽阶段 Molting stages	身体特征 Physical characteristics	行为表现 Behavioral performance
1	换羽前期(脂肪囤积期)	食欲明显上升,体重快速增加	食欲强烈,采食行为明显,采食时异常活跃
2	换羽中期(旧羽脱落期)	背部羽毛开始蓬松,鳍状肢肥厚 背部羽毛蓬松,零星脱落 背部羽毛大面积脱落,腹部羽毛也开始脱落 颈部羽毛开始脱落 全身羽毛基本脱落完 旧羽基本脱落完新羽长出	活动量减少,离群,整个褪毛期不下水游泳,喜欢躲在角落,理羽时间明显增加
3	换羽后期(新羽生长期)	全身短而软的新羽开始生长,体重和食欲逐渐恢复至正常水平	合入大群,采食量逐渐上升,活动量逐渐增加,后期开始下水游泳,直至恢复正常行为 行为表现

换羽前,企鹅食欲旺盛,采食量和体重大幅增加;换羽中期,采食量和体重会急速下降;换羽后期逐渐恢复。整个换羽期,体重和采食量的波动幅度较大,波动曲线基本一致。

根据上述换羽期的时间、体重与采食量、身体特征和行为表现,建议在企鹅圈养管理时要做好以下方面:①加强对其精神状况的观察,并详细记录。②及时进行饲料调整,保证饲料质量。③保证微量元素的摄入。④及时清理褪下的羽毛,防止下水道堵塞和细菌滋生,保持环境干燥。⑤换羽过程中,企鹅的鳍状肢会膨胀,及时放松或去除标志环,以免对其造成压迫,影响血液循环。⑥尊重动物野外生活习性,不强制下水游泳,不强制喂食。⑦因动物换羽期比较敏感,尽量避免运输和其他干扰行为,减少应激。

参考文献

[1] SHANNON L J, CRAWFORD R J M. Management of the African penguin

Spheniscus demersus-insights from modelling[J]. Marine ornithology, 1999, 27(1): 119-128.

[2] 陈云霜,李仲逵,付建义,等. 斑嘴环企鹅的饲养和繁殖[C]//中国鸟类学会,台北市野鸟学会,中国野生动物保护协会. 中国鸟类学研究:第四届海峡两岸鸟类学术研讨会文集. 北京:中国林业出版社,2000:97-99.

[3] 李仲逵,杨天春,陈云霜,等. 斑嘴环企鹅的孵化与育雏[J]. 上海师范大学学报(自然科学版),2004(S1):126-129.

[4] 李仲逵,涂荣秀,杨天春,等. 人工育幼斑嘴环企鹅的代谢率测定及营养评估[J]. 上海师范大学学报(自然科学版),2002(S1):150-154.

[5] 李洪文,刘选珍,吴旭东. 斑嘴环企鹅的人工孵育技术[J]. 经济动物学报,2014,18(3):128-132.

[6] 耿广耀,袁耀华,刘群秀,等. 上海动物园非洲企鹅种群线粒体 DNA 序列分析及遗传管理建议[J]. 野生动物学报,2015,36(2):206-210.

[7] ROEDER A D, RITCHIE P A, LAMBERT D M. New DNA markers for penguins[J]. Conservation genetics, 2002, 3(3): 341-344.

[8] LABUSCHAGNE C, KOTZÉ A, GROBLER J P, et al. The complete sequence of the mitochondrial genome of the African penguin (*Spheniscus demersus*) [J]. Gene, 2014, 534(1): 113-118.

[9] LANBUSCHAGNE C, VAN WYK A M, KOTZÉ A, et al. Isolation and characterization of species-specific microsatellites loci in African penguin (*Spheniscus demersus*) [J]. Conservation genetics resources, 2013, 5(1): 169-171.

[10] COSTANTINI V, GUARICCI A C, LARICCHIUTA P, et al. DNA sexing in Humboldt penguins (*Spheniscus humboldti*) from feather samples [J]. Animal reproduction science, 2008, 106(1/2): 162-167.

[11] JAMIESON I G, GRUEBER C E, WATERS J M, et al. Managing genetic diversity in threatened populations: A New Zealand perspective [J]. New Zealand journal of ecology, 2008, 32(1): 130-137.

[12] 孔繁德,龚艳清,陈信忠. 进境斑嘴环企鹅检出新城疫[J]. 中国动物检疫, 2001, 18(3): 37.

[13] 刘均达,田秀华,张成林. 中国动物园鸟类寄生虫感染现状调查[J]. 野生动物, 2013, 34(1): 50-56.

[14] 陈晓兰,刘佳中. 一例关于企鹅肾衰竭的病例报告[C]//中国动物协会华东地区组委会. 华东地区动物园论文集, 35. 中国动物协会华东地区组委会, 2014: 566-568.

[15] 孟晓彤. 强制换羽与日粮中添加大豆异黄酮对蛋鸡生产性能的影响[D]. 泰安:山东农业大学, 2013.

[16] 陈常秀,唐岭田. 高剂量丙酸锌对蛋鸡换羽和换羽后产蛋性能及鸡蛋品质的影响[J]. 华北农学报, 2007, 22(zl): 214-217.

[17] 陈兴勇,谢珊珊,周丽,等. 皖西白鹅换羽前后基因表达谱差异分析[J]. 畜牧兽医学报, 2013, 44(7): 1030-1036.

[18] 薛海振,王宝维,葛文化,等. 氧化锌法诱导肥肝型种鹅换羽效果的研究[J]. 中国家禽, 2011, 33(22): 15-19.

[19] 金俊,付建义,吴斌. 大群斑嘴环企鹅的饲养与繁殖[C]//中国动物协会华东地区组委会. 华东地区动物园论文集, 32. 中国动物协会华东地区组委会, 2011: 124.

[20] 美国动物园与水族馆(AZA)企鹅鸟类顾问组. 企鹅饲养管理手册[J]. 世界动物园科技信息, 2009(18): 116-117.

(上接第 107 页)

[6] BANSAL S, TANDON V. Contribution of mutations in DNA gyrase and topoisomerase IV genes to ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* clinical isolates [J]. International journal of antimicrobial agents, 2011, 37(3): 253-255.

[7] HABEEB M A, HAQUE A, IVERSEN A, et al. Occurrence of virulence genes, 16S rRNA methylases, and plasmid-mediated quinolone resistance

genes in CTX-M-producing *Escherichia coli* from Pakistan [J]. European journal of clinical microbiology & infectious diseases, 2014, 33(3): 399-409.

[8] 刘晓强. 宠物源大肠杆菌对氟喹诺酮类药物的多药耐药机制研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2012.

[9] FRIEDMAN S M, LU T, DRLICA K. Mutation in the DNA gyrase A gene of *Escherichia coli* that expands the quinolone resistance-determining region [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(8): 2378-2380.