

王翔宇,宋玉慧,荆 炜,等. 鸡源大肠杆菌 $Bla_{CTX-M-125}$ 型 *ESBL* 基因的定位及遗传环境[J].江苏农业学报,2017,33(1):141-145.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2017.01.022

鸡源大肠杆菌 $Bla_{CTX-M-125}$ 型 *ESBL* 基因的定位及遗传环境

王翔宇, 宋玉慧, 荆 炜, 朱晓清, 徐 倩, 杜向党
(河南农业大学牧医工程学院,河南 郑州 450003)

摘要: 采用 PCR 扩增、测序分析、接合试验、药敏试验、脉冲场凝胶电泳(PFGE)和 Southern blot 方法,分析了 1 株兽医临床分离大肠杆菌(sd-3)携带的超广谱 β -内酰胺酶(*ESBL*)基因的状况、分型、定位及遗传环境。结果显示,该株大肠杆菌携带 *ESBL* 基因,属于 $bla_{CTX-M-9}$ 亚群的 $bla_{CTX-M-125}$ 亚型,系在大肠杆菌中首次检出;接合试验、PFGE 和 Southern blot 证实该基因位于接合型质粒上; $bla_{CTX-M-125}$ 基因的上、下游分别存在插入序列 *ISEcpI* 和 *IS903*。这表明插入序列和接合型质粒均可在大肠杆菌 $bla_{CTX-M-125}$ 基因的水平转移中发挥重要作用,有必要在肠杆菌科细菌中开展该基因的监视。

关键词: β -内酰胺酶; 大肠杆菌; $bla_{CTX-M-125}$; 接合型质粒

中图分类号: S851.34⁺7.202

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2017)01-0141-05

The location and genetic environment of $bla_{CTX-M-125}$ *ESBL* gene from *Escherichia coli* in chickens

WANG Xiang-yu, SONG Yu-hui, JING Wei, ZHU Xiao-qing, XU Qian, DU Xiang-dang
(College of Animal Husbandry and Veterinary, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450003, China)

Abstract: The presence, types, location and genetic environment of extended-spectrum β -lactamases (*ESBLs*) gene in a *Escherichia coli* strain (sd-3) isolated from veterinary clinic were investigated by PCR amplification, sequencing analysis, conjugation assay, antimicrobial susceptibility test, pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and Southern blot. The results showed the strain carried $bla_{CTX-M-125}$ *ESBLs*, belonging to the $bla_{CTX-M-9}$ subgroup, which was firstly described in *Escherichia coli*. Conjugation, PFGE and Southern blot confirmed that the gene was located on the conjugative plasmid. The upstream and downstream of the $bla_{CTX-M-125}$ was flanked by insertion sequence *ISEcpI* and *IS903*, respectively. This indicated that both insertion sequence and conjugative plasmid had played an important role in the horizontal transfer of the $bla_{CTX-M-125}$ *ESBL* gene. The surveillance of the $bla_{CTX-M-125}$ in enterobacteriaceae bacteria is necessary.

Key words: *ESBLs*; *Escherichia coli*; $bla_{CTX-M-125}$; conjugative plasmid

超广谱 β -内酰胺酶(*ESBL*)是一种丝氨酸蛋白酶,在细菌质粒介导下能水解氧亚氨基 β -内酰胺类

抗生素,并可被 β -内酰胺酶抑制剂(克拉维酸、他唑巴坦和舒巴坦)所抑制,它是导致革兰氏阴性细菌对新型超广谱 β -内酰胺类抗生素耐药的重要因素^[1]。近年来,由于第 3 代头孢菌素和单环 β -内酰胺抗菌药物的开发和广泛使用,许多细菌能产生质粒介导的 *ESBL*,尤其是 Bla_{CTX-M} 基因型已成为许多国家流行的主要类型^[2]。 Bla_{CTX-M} 基因型主要包

收稿日期:2016-03-30

基金项目:河南省高等学校重点科研项目(14A230008)

作者简介:王翔宇(1989-),女,河南开封人,硕士,主要从事细菌耐药性研究。(E-mail)jichushouyi402@163.com

通讯作者:杜向党,(E-mail)xddu@henau.edu.cn

括 6 个亚群,其中 *Bla*_{CTX-M-1} 亚群和 *Bla*_{CTX-M-9} 亚群是世界各地检出率最高的 2 个亚群^[3]。介导的 *ESBL* 基因可以通过质粒、转座子和整合子等移动元件进行转移,进而使耐药基因在不同菌株之间进行水平传播,造成多重耐药细菌发生率大幅提升,对动物疫病防控及人类健康构成了很大威胁。

本试验通过 PCR 扩增、测序分析、接合试验、药敏试验、脉冲场凝胶电泳 (Pulsed field gel electrophoresis, PFGE) 和 Southern blot 等方法,对 1 株兽医临床分离的大肠杆菌 (sd-3) 携带的 *ESBL* 基因的状况、分型、定位及遗传环境进行分析,以期发现 *ESBL* 在耐药菌株中的传播机制,为兽医临床合理使用抗菌药物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株、试剂和药物

鸡源大肠杆菌 sd-3 株,2013 年分离自河南省周口市某鸡场;LB 琼脂和肉汤,购自北京陆桥技术有限责任公司;基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;Premix Taq 酶购自 TaKaRa 公司;DL2000 DNA marker 购自宝生物工程有限公司;头孢噻肟、头孢他啶、四环素、氟苯尼考、环丙沙星购自中国兽医药品监察所和中国生物药品检定

所。

1.2 PCR 扩增及测序分析

模板 DNA 制备:挑取 LB 琼脂板上生长的单菌落接种于 LB 肉汤中,37 ℃ 摇床培养至对数期,使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取细菌 DNA。引物设计:根据文献[4]、[5]及 NCBI (National Center of Biotechnology Information) 中的 β -内酰胺酶基因序列,利用 Oligo 软件设计 *Bla*_{CTX-M} 基因型的通用引物以及常见亚群 *bla*_{CTX-M-1}、*bla*_{CTX-M-9} 基因的引物(表 1)。PCR 反应体系 (50 μ l): 25 μ l Premix Taq 酶,21 μ l 灭菌水,上、下游引物各 1 μ l,模板 DNA 2 μ l,以加入 2 μ l 灭菌水为阴性对照。阳性 PCR 产物送华大基因测序。应用 DNASTAR 软件对序列进行分析,并在 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast> 上进行比对,以确定基因亚型。

1.3 接合试验

大肠杆菌 sd-3 作为供体菌,叠氮钠耐药的大肠杆菌 J53 为受体菌,各取对数生长期的菌液 0.5 ml 接种于 4 ml LB 肉汤中混匀,37 ℃ 200 r/min 培养 12 h。以供体菌、受体菌为对照,在含头孢他啶 (32 μ g/ml) 和叠氮钠 (512 μ g/ml) 的 LB 琼脂平皿上筛选阳性接合子,按方法 1.2 扩增 *bla*_{CTX-M-9} 基因。

表 1 β -内酰胺酶基因引物序列

Table 1 Primer sequence of β -lactamase gene

靶基因	引物名称	引物序列 (5'→3')	片段大小 (bp)	退火温度 (℃)
<i>bla</i> _{CTX-M-u}	M-u-F	ATGTGCAGTACCAGTAAAGT	572	57
	M-u-R	TGGGTRAAGTARGTCACCAGAA		
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	M-1-F	GGTTAAAAATCACTGCGTC	876	58
	M-1-R	TTGCTGACGATTTTAGCCGC		
<i>bla</i> _{CTX-M-9}	M-9-F	ATGGTGACAAAGAGAGTGCA	870	57
	M-9-R	CCCTTCGGCGATGATTCTC		

1.4 药敏试验

用 96 孔板倍比稀释法,测定头孢噻肟、头孢他啶、叠氮钠、四环素、氟苯尼考、环丙沙星对供体菌、受体菌和接合子的最低抑菌浓度 (MIC)。

1.5 S1-脉冲场凝胶电泳 (S1-PFGE) 分析

S1-PFGE 分析参照 PulseNet international 的标准方法^[6]。电泳参数:电压梯度 6 V/cm,脉冲时间

2.16 s 至 63.8 s,14 ℃,0.5×TBE 缓冲液 2 000 ml,电场角度 120°,总时间为 14 h。PFGE 结束后染色、拍照。

1.6 Southern blot 分析

将凝胶依次放入脱嘌呤液、变性液、中和缓冲液中洗胶,之后用 20×SSC 缓冲液将 DNA 转移至 Hybond-N⁺ 尼龙膜上,20 h 转移结束后 120 ℃ 烘烤 30

min;以 *bla*_{CTX-M-9}(870 bp) 为探针,采用 PCR 法用地高辛标记探针,将尼龙膜置于预杂交液中 48 ℃ 2 h,之后加入变性探针 48 ℃ 杂交 16~18 h,杂交结束后,将尼龙膜依次放入洗涤缓冲液、阻断液、抗体液、检测缓冲液中洗涤,最后放入底物显色液中反应过夜,用 50 ml 无菌双蒸水洗膜 5 min 中止反应,拍照

表 2 *bla*_{CTX-M} 基因遗传环境分析引物序列

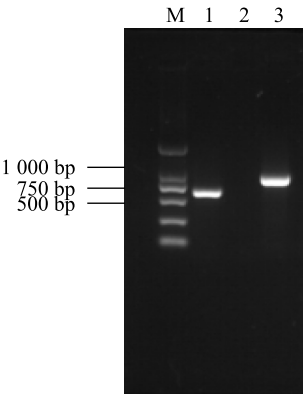
Table 2 Primer sequence of *bla*_{CTX-M} genetic environment analysis

靶位点	引物名称	引物序列 (5'→3')	片段大小 (bp)	退火温度 (℃)
<i>bla</i> _{CTX-M} 上游	ISEcp1-F	TGCTCTGTGGATAACTTGC	1 024	56
	IS26-F	AGCGGTAAATCGTGGACTGA	441	56
	CTX-U-R	TGGGTRAACTARGTCACCAGAA		
	CTX-U-F	ATGTGCAGTACCAGTAAAGT		
<i>bla</i> _{CTX-M} 下游	IS903-R	GTTTAATGACCAGCACAGT	935	56
	ORF477-R	TCGTTTCGTGCTGCTGAATTT	375	55

2 结果与分析

2.1 *bla*_{CTX-M} 基因的检测

分别设计引物 M-u、M-1 和 M-9,对大肠杆菌 sd-3 基因组 DNA 进行扩增,其中引物 M-1 未扩增出目的条带,引物 M-u 和 M-9 扩增获得与预期片段长度相符合(分别为 572 bp 和 870 bp)的特异性条带(图 1)。对引物 M-9 的扩增产物进行测序,测序结果在 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast> 上比对,发现为 *bla*_{CTX-M-125} 基因,系在大肠杆菌中首次检出。



1:引物 M-u; 2:引物 M-1; 3:引物 M-9。

图 1 *bla*_{CTX-M} 基因的 PCR 扩增

Fig.1 PCR amplification of *bla*_{CTX-M} gene

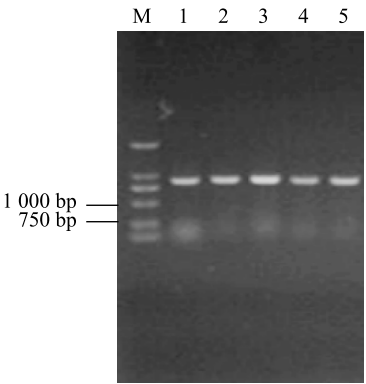
记录。

1.7 *bla*_{CTX-M-125} 基因遗传环境分析

文献[7]、[8]报道,*bla*_{CTX-M} 上游常为插入序列 ISEcp1 和 IS26,下游常为 IS903 和 ORF477。以上述基因序列为依据,设计引物(表 2)。

2.2 大肠杆菌接合子的 *bla*_{CTX-M-9} 基因检测

选取 4 株接合子,提取基因组 DNA 扩增 *bla*_{CTX-M-9} 基因,4 株接合子均为阳性(图 2),说明 *bla*_{CTX-M-9} 基因可以通过接合的方式进行转移。



1:大肠杆菌 sd-3 株; 2~5:接合子 Js-1、Js-2、Js-3、Js-4。

图 2 大肠杆菌接合子 *bla*_{CTX-M-9} 基因的 PCR 扩增

Fig.2 PCR amplification of *bla*_{CTX-M-9} gene of *Escherichia coli* transconjugants

2.3 大肠杆菌接合子的药敏性

对 sd-3、J53 及接合子 Js-1、Js-2、Js-3、Js-4 进行药物敏感性检测,发现野生株和接合子均对头孢类药物表现高水平耐药,此外对四环素、氟苯尼考也表现出较高的耐药性(表 3)。

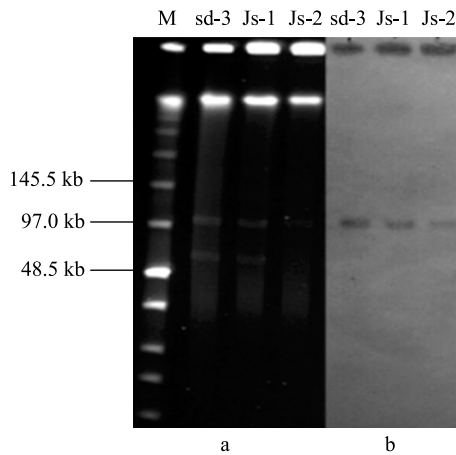
表 3 大肠杆菌接合子对 6 种药物的敏感性

Table 3 Susceptibility of *Escherichia coli* transconjugants to six antimicrobial agents

菌株	头孢他啶 (μg/ml)	头孢噻肟 (μg/ml)	叠氮钠 (μg/ml)	四环素 (μg/ml)	氟苯尼考 (μg/ml)	环丙沙星 (μg/ml)
sd-3	64	>128	128	128	>128	>128
Js-1	32	>128	>1 024	64	>128	8
Js-2	64	>128	1 024	128	>128	4
Js-3	64	128	1 024	64	128	8
Js-4	64	>128	>1 024	64	>128	8
J53	2	4	>1 024	4	8	2

2.4 S1-PFGE 和 Southern blot 结果

野生株 (sd-3) 和 2 株接合子 (Js-1、Js-2) 的 S1-PFGE 结果显示,至少有 1 个质粒通过接合的方式由供体菌转移到受体菌中。以 *bla*_{CTX-M-9} 为探针的 Southern blot 杂交结果表明 *bla*_{CTX-M-9} 基因位于 1 个 97 kb 大小的质粒上 (图 3)。



M: Low-range PFG marker (NEB); sd-3: 野生株; Js-1、Js-2: 接合子。

图 3 大肠杆菌野生株和接合子的 S1-PFGE (a) 及 Southern blot (b) 分析

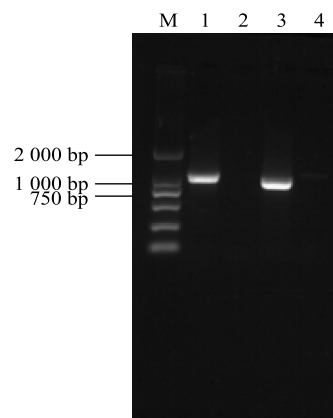
Fig.3 S1-PFGE (a) and Southern blot (b) analysis of wild type and transconjugants of *Escherichia coli*

2.5 *bla*_{CTX-M-125} 基因的遗传环境

分别用 *bla*_{CTX-M} 上游引物 *ISEcpI*、IS26 和下游引物 IS903、ORF477 进行扩增,其中 IS26 和 ORF477 未扩增出阳性条带,ISEcpI 和 IS903 扩增出与目的条带相符 (分别为 1 024 bp 和 935 bp) 的特异性条带 (图 4)。

3 讨论

*bla*_{CTX-M} 基因在猪、牛、禽中均被检测到,是主要



M: Marker; 1: 引物 *ISEcpI*-F; 2: 引物 IS26-F; 3: 引物 IS903-R; 4: 引物 ORF477-R。

图 4 *bla*_{CTX-M-125} 基因侧翼区的 PCR 扩增

Fig.4 PCR amplification of *bla*_{CTX-M-125} flanking region

流行的基因^[9-10],并且 *bla*_{CTX-M-9} 亚群基因是主要流行的亚型^[11]。本研究发现的新型 *bla*_{CTX-M-125} 亚型基因就属于 *bla*_{CTX-M-9} 亚群 (GenBank 登录号 JQ724542.1),系在大肠杆菌中首次检出。

在临床分离的菌株中,*bla*_{CTX-M} 编码基因通常位于 7~160 kb 的质粒上,携带 *bla*_{CTX-M} 的质粒能够在体外通过接合的方式进行转移。每个供体细胞的转移频率在 1×10^{-7} 至 1×10^{-2} 之间。大部分携带 *bla*_{CTX-M} 基因的质粒,同时也携带一些其他耐药基因,例如 *tet*、*qnr*、*aac* (6')-*Ib-cr* 和 *sul*^[12],呈现多重耐药性。2008 年,田勇等^[13]检测的结果表明 95% (19/20) 的大肠杆菌对 4 种或以上的药物耐药,个别菌株可同时耐受 13 种药物。本研究中药敏试验结果表明,野生株 sd-3 及接合子都对三代头孢、四环素、氟苯尼考呈现高度耐药,说明大肠杆菌的多重耐药性已普遍存在。目前,多重耐药的志贺氏菌、阴沟肠杆菌、

变形杆菌和沙门氏菌等革兰氏阴性菌已大量存在于动物和人肠道内,大肠杆菌比其他致病菌更容易接受耐药性质粒,已成为动物和人体内耐药基因的储存库。质粒不仅可以在同一种属细菌间转移,也可以在不同种属间转移,造成耐药性的广泛传播。带有多个耐药基因的质粒传播,导致多重耐药性的日益严重,给临床治疗带来很大的困难。本研究通过接合试验、药敏试验、PFGE 和 Southern blot 分析证实 *bla_{CTX-M-125}* 基因位于接合型质粒上,且该接合型质粒携带有多个耐药基因。

研究 *bla_{CTX-M}* 基因的遗传环境有助于从分子生物学角度对其来源以及基因的表达、转移等有更深刻的了解。在试验中,我们通过定位 PCR 分析了该大肠杆菌所含 *ESBL* 耐药基因的遗传环境。*bla_{CTX-M}* 基因上游存在插入序列 *ISEcp1*,下游存在插入序列 *IS903*。插入序列 *ISEcp1* 属于 *IS1380* 家族,由一个编码转座酶的开放阅读框(ORF)和两端的反向重复序列组成。*ISEcp1* 首次在英国的 1 株大肠杆菌中被发现,位于 *bla_{CMY-4}* 上游(AJ242809)。*ISEcp1* 包含典型的启动子序列-35(TTGAAA)和-10(TACAAT)区,可以促进 *bla_{CTX-M}* 基因高水平表达。*ISEcp1* 是一个重要的遗传因子,与 *bla_{CTX-M}* 基因的传播与扩散有关^[14]。大部分菌株 *bla_{CTX-M}* 基因下游与 *IS903* 相连接。*IS903* 的结构类似 *ISEcp1*,由 2 个域组成,主要涉及与外源 DNA 结合的 C-端结构域和参与催化的 N-端结构域^[15]。插入序列 *IS903* 编码 1 段含有 307 个氨基酸残基的蛋白质,它是耐药基因传播的一个必要因素,使其容易在质粒间、或者质粒和染色体间复制和传播。

综上所述,*Bla_{CTX-M}* 基因广泛、快速的传播所导致的对抗生素耐药,给临床治疗带来巨大挑战。但其传播机制和基因环境还需进一步研究,以发现其传播的分子生物学基础,为发掘潜在的药物靶点,找到有效的控制方法以及合理有效地使用抗生素提供有力依据。

参考文献:

- [1] BRADFORD P A. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat[J]. Clin Microbiol Rev, 2001, 14: 933-951.
- [2] ZHAO W D, YAN P, GUAN H N, et al. Characterization of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase in clinical clones of *Escherichia coli* in Southwest China[J]. J Basic Microbiol, 2014, 54(3): 247-252.
- [3] LIVERMORE D M, CANTON R, GNIADKOWSKI M, et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe[J]. J Antimicrob Chemother, 2007, 59(2): 165-174.
- [4] ECKERT C, GAUTIER V, ARLET G. DNA sequence analysis of the genetic environment of various *bla_{CTX-M}* genes[J]. J Antimicrob Chemother, 2006, 57: 14-23.
- [5] YUAN L, LIU J H, HU G Z, et al. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from chickens in Henan Province, China[J]. J Med Microbiol, 2009, 58: 1449-1453.
- [6] RIBOT E M, FAIR M A, GAUTOM R, et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet[J]. Foodborne Pathog Dis, 2006, 3(1): 59-67.
- [7] LARTIGUE M F, POIREL L, NORDMANN P. Diversity of genetic environment of *bla*(CTX-M) genes[J]. FEMS Microbiol Lett, 2004, 234: 201-207.
- [8] SALADIN M, CAO V T, LAMBERT T, et al. Diversity of CTX-M beta-lactamases and their promoter regions from *Enterobacteriaceae* isolated in three Parisian hospitals[J]. FEMS Microbiol Lett, 2002, 209: 161-168.
- [9] 杜向党,焦显芹,莫娟.鸡猪源大肠杆菌 CTX-M 型 ESBLs 的分子检测[J].华北农学报, 2009, 24(2): 90-93.
- [10] ZHENG H, ZENG Z, CHEN S, et al. Prevalence and characterisation of CTX-M beta-lactamases amongst *Escherichia coli* isolates from healthy food animals in China[J]. Int J Antimicrob Agents, 2012, 39: 305-310.
- [11] KARIM A, POIREL L, NAGARAJAN S, et al. Plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence *ISEcp1*[J]. FEMS Microbiol Lett, 2001, 201: 237-241.
- [12] BONNET R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48: 1-14.
- [13] 田勇,郑雪花,张建军,等.鸡源大肠埃希氏菌多药耐药性的监测与分析[J].中国兽药杂志, 2008, 44(1): 18-19.
- [14] ZONG Z, PARTRIDGE S R, IREDELL J R. *ISEcp1*-mediated transposition and homologous recombination can explain the context of *bla*(CTX-M-62) linked to *qnrB2*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54: 3039-3042.
- [15] TAVAKOLI N P, DEVOST J, DERBYSHIRE K M. Defining functional regions of the *IS903* transposase[J]. J Mol Biol, 1997, 274: 491-504.

(责任编辑:张震林)