

鸡源细菌中5种四环素耐药基因多重PCR检测方法的建立

Establishment of a multiplex PCR system for detection of five tetracycline resistance genes in poultry bacteria

白龙^{1,2} 邵毅^{1,3} 黄柳娟¹ 冯博¹

BAI Long^{1,2} SHAO Yi^{1,3} HUANG Liu-juan¹ FENG Bo¹

周昌艳^{1,3} 索玉娟¹ 白亚龙¹ 林淼¹

ZHOU Chang-yan^{1,3} SUO Yu-juan¹ BAI Ya-long¹ LIN Miao¹

(1. 上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所, 上海 201403; 2. 上海理工大学医疗器械与食品学院, 上海 200093; 3. 上海市设施园艺技术重点实验室, 上海 201403)

(1. Institute for Agri-Food Standards and Testing Technology, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China; 2. School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China; 3. Shanghai Key Laboratory of Protected Horticultural Technology, Shanghai 201403, China)

摘要: 为建立一种同步检测鸡源细菌中5种四环素耐药基因 *tetA*、*tetD*、*tetG*、*tetS* 和 *tetX* 的多重聚合酶链式反应(PCR)方法, 优化了多重PCR体系的引物和 *Taq* DNA聚合酶浓度及退火温度等参数, 并考察了方法的灵敏度、特异性和适用性。建立的多重PCR反应技术的最佳反应体系为: 混合DNA模板 5 μ L, *Taq* 酶 1 μ L, *tetA* 和 *tetX* 的正反向引物各 0.5 μ L, *tetG*、*tetD* 和 *tetS* 的正反向引物各 1.0 μ L, dNTP 4 μ L, MgCl₂ 4 μ L, 10 \times PCR反应缓冲液 5 μ L, 最终用 ddH₂O 补齐至 50 μ L; 反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。该方法的灵敏度为 10² CFU/mL, 且能广谱地检测多种鸡源细菌中的5种四环素耐药基因。与传统的单重PCR方法相比, 该多重PCR技术快速高效、适用性广。

关键词: 鸡源细菌; 四环素耐药基因; 多重聚合酶链式反应; 快速检测

Abstract: In order to establish a multiplex polymerase chain reaction (PCR) method for simultaneous detection of five tetracycline resist-

ance genes including *tetA*, *tetD*, *tetG*, *tetS* and *tetX* in poultry bacteria, the concentrations of primers and *Taq* DNA polymerase, as well as the annealing temperature used in the multiplex PCR system were optimized, then the sensitivity and specificity were examined, and finally, the method was applied for detecting of tetracycline-resistant bacteria isolated from poultry to verify its applicability. The results showed that, the optimized system for the multiplex PCR reaction was: 5 μ L of mixed DNA template, 1 μ L of *Taq* enzyme, 0.5 μ L of forward and reverse primers for *tetA* and *tetX*, and 1.0 μ L for *tetG*, *tetD* and *tetS*. 4 μ L dNTP mixtures, 4 μ L MgCl₂, 5 μ L 10 \times PCR buffer, and finally filled to 50 μ L with double distilled water. The reaction procedures including: predenaturation at 95 $^{\circ}$ C for 5 min, denaturation at 95 $^{\circ}$ C for 30 s, annealing at 55 $^{\circ}$ C for 30 s, extension at 72 $^{\circ}$ C for 1 min, 35 cycles, finally extension 72 $^{\circ}$ C for 10 min. The sensitivity of the method was 10² CFU/mL, moreover, a broad spectrum of poultry bacteria could be detected for the five tetracycline resistance genes by the method. Compared with the traditional single PCR method, the multiplex PCR technique is rapid, efficient and widely applicable.

Keywords: poultry bacteria; antibiotic resistance gene; multiplex polymerase chain reaction; rapid detection

基金项目: 上海市科技兴农重点攻关项目(应用基础类)(编号:沪农科攻字(2014)第7-3-6号); 国家自然科学基金青年科学基金项目(编号:31401599); 上海市青年科技英才扬帆计划项目(编号:14YF1413000)

作者简介: 白龙, 男, 上海理工大学在读硕士研究生。

通信作者: 邵毅(1982—), 女, 上海市农业科学院副研究员, 博士。

E-mail: shao_saas@163.com

收稿日期: 2018-06-27

四环素(tetracycline, tet)作为一种广谱类抗生素, 在禽畜养殖场中被大量使用^[1], 导致病原菌产生耐药性^[2]。研究表明, 中国肉鸡中多种致病菌对四环素类抗生素已经产生了很高的耐药性^[3-5]。因此, 禽源四环素耐药菌的控制迫在眉

睫。大量证据^[6-8]表明,数量庞大的非致病菌可以是耐药基因的供体、受体和中间体,因此,近年来,在全细菌范围内研究抗生素耐药性的污染特征和耐药基因的水平迁移规律,成为揭示耐药性发生机制的新途径^[9]。然而,关于在整个细菌范围内进行耐药基因的筛查研究,现有试验^[10-12]大多基于单重或不多于三重的聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)而展开,工作量非常大。因此,亟需开发耐药基因的快速筛查技术。

细菌对四环素的耐药机理主要分为主动外排蛋白(涉及的耐药基因包括 *tetA*、*tetB*、*tetC*、*tetD*、*tetE*、*tetG*、*tetH*、*tetJ*、*tetK*、*tetL*、*tetV*等)、核糖体保护蛋白(*tetM*、*tetO*、*tetS*、*tetW*、*tetT*)、灭活或钝化四环素酶(*tetX*、*tet34*、*tet37*)^[13]。其中 *tetA*、*tetD*、*tetG*、*tetS* 和 *tetX* 是鸡肉中较多检出的四环素耐药基因^[5],且涉及了3种四环素耐药机制。目前,对这5种四环素耐药菌的多重PCR同时检测技术尚未见报道。因此,本研究在已有的多重PCR技术开发经验^[14-16]基础上,通过优化引物浓度、*Taq* DNA聚合酶浓度和退火温度等因素,建立了同时检测 *tetA*、*tetD*、*tetG*、*tetS* 和 *tetX* 的五重PCR体系,为禽源四环素耐药基因的大规模筛查研究提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

四环素耐药基因 *tetA*、*tetD*、*tetE*、*tetG*、*tetL*、*tetM*、*tetO*、*tetR*、*tetS*、*tetT* 和 *tetX*,以及磺胺耐药基因 *sul1* 和 *sul2* 片段的阳性克隆:本实验室克隆构建并保存^[17];

禽源四环素耐药菌克隆:本实验室筛查、鉴定并保存^[5];

Takara *Ex Taq* 酶:5 U/ μ L,不含 Mg^{2+} ,宝日生物技术(北京)有限公司;

dNTP Mixture:各 2.5 mmol/L,宝日生物技术(北京)有限公司;

$MgCl_2$:25 mmol/L,宝日生物技术(北京)有限公司;

PCR引物(表1):10 μ mol/L,生工生物工程(上海)股份有限公司;

脑心浸液肉汤培养基(Brain heart infusion broth, BHI)、LB培养基和琼脂粉:英国 Oxoid 公司;

GelStain 凝胶电泳染料、2K DNA marker、琼脂糖、6 \times DNA Loading Buffer、50 \times TAE 电泳缓冲液、氨苄西林(Ampicillin, Amp)、双蒸水(dd H₂O):北京全式金生物技术有限公司;

四环素:美国药典级,生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.1.2 主要仪器与设备

PCR仪:T100型,美国 Bio-Rad 公司;

电泳仪:Powerpac Universal型,美国 Bio-Rad 公司;

凝胶成像分析系统:GelDoc XR+Imager型,美国 Bio-Rad 公司;

电泳槽:DYCP-31E型,北京六一生物科技有限公司;

微量移液枪:Research Plus型,德国 Eppendorf 公司;

高速冷冻台式离心机:Centrifuge 5424 R型,德国 Eppendorf 公司;

超净工作台:SW-CJ-2FD型,苏州安泰空气技术有限公司;

摇床:TQ2-312型,上海精宏实验设备有限公司;

电热恒温培养箱:DHG-9203A型,上海精宏实验设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 四环素耐药基因片段阳性克隆 DNA 模板的制备

根据夏乐先等^[21]和刘宗保^[22]的方法修改后制备四环素耐药基因 *tetA*、*tetD*、*tetG*、*tetS* 和 *tetX* 片段阳性克隆的 DNA 模板。菌株用含 100 μ g/mL Amp 的 LB 液体培养基增殖 8 h 后,取 2 mL 菌液,12 000 r/min 离心 3 min,弃去上清液,无菌条件下加入 2 mL 生理盐水,振荡悬浮混合均匀,再用生理盐水依次 10 倍梯度稀释至 $10^{-1} \sim 10^{-8}$,依次取 200 μ L 稀释菌液均匀涂布于固体 LB 培养基上,37 $^{\circ}$ C 过夜培养,菌落计数并计算对应稀释液的活菌数,同时,依次取 2 mL 稀释菌液悬浮 3 min,沸水浴 10 min 后立即冰浴 15 min,即得粗提 DNA, -20 $^{\circ}$ C 保存,作为 PCR 反应的模板。

表 1 四环素耐药基因引物

Table 1 Primers of tetracycline resistance genes used in the study

| 基因名称 | 引物序列(5'-3') | 产物大小/bp | 建议退火温度/ $^{\circ}$ C | 参考文献 |
|-------------|-------------------------|---------|----------------------|------|
| <i>tetA</i> | R: CATAGATCGCCGTGAAGAGG | 210 | 60 | [18] |
| | R: CATAGATCGCCGTGAAGAGG | | | |
| <i>tetD</i> | F: AAACCATTACGGCATTCTGC | 787 | 55 | [18] |
| | R: GACCGGATACCCATCCATC | | | |
| <i>tetG</i> | F: AGCAGGTCGCTGGACACTAT | 623 | 53 | [19] |
| | R: CGCGGTGTTCCTGAAAAC | | | |
| <i>tetS</i> | F: GAACGCCAGAGAGGTATT | 1 050 | 53 | [20] |
| | R: TACCTCCATTTGGACCTCAC | | | |
| <i>tetX</i> | F: CAATAATTGGTGGTGGACCC | 468 | 60 | [18] |
| | R: TTCTTACCTTGGACATCCCG | | | |

1.2.2 多重 PCR 预试验

(1) 单重 PCR 灵敏性试验:以 5 种四环素耐药基因片段阳性克隆的粗提 DNA 为模板,进行单重 PCR 并用琼脂糖凝胶电泳观察结果,结合稀释菌液计数结果,初步确定 5 种耐药基因的单重 PCR 灵敏性。

(2) 多重 PCR 预试验:根据单重 PCR 的灵敏性,对 5 种耐药基因阳性克隆稀释菌液分别选择合适的稀释浓度下的粗提 DNA 模板,等比例混合后作为多重 PCR 的模板,进行多重 PCR 扩增反应。

(3) 反应体系:混合 DNA 模板 5 μ L, *Taq* 酶 0.25 μ L, 每种基因的正向引物和反向引物各 1.0 μ L, dNTP 4 μ L, MgCl₂ 4 μ L, 10 \times PCR 反应缓冲液 5 μ L, 最终用 dd H₂O 补齐至 50 μ L。反应程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 53 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。以去离子水为模板作阴性对照。琼脂糖凝胶电泳观察结果。

1.2.3 多重 PCR 参数优化

(1) 引物浓度的优化:在预试验的基础上,根据各基因 PCR 扩增产物的长度,按照表 2 进行引物浓度优化试验。

(2) *Taq* 酶浓度的优化:在引物浓度优化结果的基础上优化 *Taq* 酶的浓度,在多重 PCR 反应体系中分别添加 0.25 (1.25 U), 0.50 (2.50 U), 1.00 (5.00 U), 1.50 μ L (7.50 U) *Taq* 酶,考察 *Taq* 酶浓度对扩增效果的影响。

(3) 退火温度的优化:依次选取 53, 55, 57, 58 $^{\circ}$ C 作为退火温度,进行多重 PCR 反应体系退火温度的优化试验。

表 2 多重 PCR 体系引物浓度的优化

Table 2 Optimization of concentrations of primers in multi-PCR systems

| 试验组 | PCR 反应体系中各条引物的添加量/ μ L | | | | |
|-----|----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | <i>tetA</i> | <i>tetX</i> | <i>tetG</i> | <i>tetD</i> | <i>tetS</i> |
| 1 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 1.0 |
| 2 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 1.0 | 1.0 |
| 3 | 0.5 | 0.5 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| 4 | 0.5 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| 5 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 |

1.2.4 多重 PCR 的灵敏度和特异性分析 在多重 PCR 参数优化的基础上,对混合 DNA 模板进行 10 倍梯度稀释 (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³),考察多重 PCR 方法的灵敏度。粗提耐药基因 *tetA*、*tetD*、*tetE*、*tetG*、*tetL*、*tetM*、*tetO*、*tetR*、*tetS*、*tetT*、*tetX*、*sul1* 和 *sul2* 片段阳性克隆菌株的 DNA,以优化的反应条件和体系进行 PCR,检测该多重 PCR 方法的特异性。

1.2.5 禽源四环素耐药菌的 5 种耐药基因检测 23 株已鉴定四环素耐药基因携带情况的禽源四环素耐药菌(表 3)在含有 16 μ g/mL 四环素的 BHI 液体培养基活化后粗提 DNA,分别用上述优化后的多重 PCR 体系进行耐药基因的检测,验证方法的实用性。

表 3 用于验证多重 PCR 方法实用性的 23 株禽源四环素菌
Table 3 23 strains of poultry tetracycline resistant bacteria used for verify the utility of multi-PCR system

| 菌株序号 | 携带四环素耐药基因 | 种属 | 革兰氏染色特性 |
|------|---------------------------|----------------------------------|----------------|
| 1 | <i>tetA</i> | <i>Brochothrix thermosphacta</i> | G ⁺ |
| 2 | <i>tetA</i> | <i>Stenotrophomonas sp</i> | G ⁻ |
| 3 | <i>tetA</i> 、 <i>tetS</i> | <i>lactic acid bacterium</i> | G ⁺ |
| 4 | <i>tetA</i> 、 <i>tetD</i> | <i>Sphingobacterium sp</i> | G ⁻ |
| 5 | <i>tetD</i> | <i>Macrococcus caseolyticus</i> | G ⁺ |
| 6 | <i>tetS</i> | <i>Carnobacterium sp</i> | G ⁺ |
| 7 | <i>tetX</i> | <i>Aeromonas sp</i> | G ⁻ |
| 8 | <i>tetA</i> 、 <i>tetD</i> | <i>Kurthia sp</i> | G ⁺ |
| 9 | <i>tetA</i> 、 <i>tetD</i> | <i>Pseudomonas sp</i> | G ⁻ |
| 10 | <i>tetA</i> 、 <i>tetD</i> | <i>Aeromonas sp</i> | G ⁻ |
| 11 | <i>tetA</i> 、 <i>tetD</i> | <i>Brochothrix thermosphacta</i> | G ⁺ |
| 12 | <i>tetS</i> | <i>Macrococcus caseolyticus</i> | G ⁺ |
| 13 | <i>tetX</i> | <i>Staphylococcus sp</i> | G ⁺ |
| 14 | <i>tetS</i> | <i>Acinetobacter sp</i> | G ⁻ |
| 15 | <i>tetA</i> | <i>Pseudomonas sp</i> | G ⁻ |
| 16 | <i>tetS</i> | <i>Carnobacterium sp</i> | G ⁺ |
| 17 | <i>tetS</i> 、 <i>tetX</i> | <i>Myroides marinus</i> | G ⁻ |
| 18 | <i>tetS</i> | <i>Macrococcus caseolyticus</i> | G ⁺ |
| 19 | <i>tetA</i> 、 <i>tetS</i> | <i>Carnobacterium sp</i> | G ⁺ |
| 20 | <i>tetS</i> | <i>Carnobacterium sp</i> | G ⁺ |
| 21 | <i>tetS</i> | <i>Carnobacterium sp</i> | G ⁺ |
| 22 | <i>tetS</i> | <i>Carnobacterium sp</i> | G ⁺ |
| 23 | <i>tetS</i> 、 <i>tetX</i> | <i>Sphingobacterium sp</i> | G ⁻ |

2 结果与分析

2.1 单重 PCR 灵敏性试验结果

用梯度稀释菌液的粗提 DNA 作为模板,对 5 种耐药基因进行单重 PCR 扩增(图 1)。选择比目的条带可见的稀释梯度高 1~2 个梯度的稀释度,即 *tetA* 10⁻⁴、*tetX* 10⁻⁴、*tetG* 10⁻³、*tetD* 10⁻⁴、*tetS* 10⁻⁴,作为多重 PCR 中混合 DNA 的模板稀释度。稀释菌液的平板计数结果表明,*tetA*、*tetX*、*tetG*、*tetD*、*tetS* 阳性克隆菌株悬液原始浓度为 5.1 \times 10⁸, 7.6 \times 10⁸, 4.3 \times 10⁷, 4.5 \times 10⁸, 9.2 \times 10⁸ CFU/mL,再将各被选中的 DNA 模板稀释 5.1, 7.6, 4.3, 4.5, 9.2 倍,制成 10⁴ CFU/mL 的菌液 DNA 粗提物,等比混合后获得用于开发多重 PCR 方法的 DNA 模板。

在多重 PCR 体系中,随着检测基因位点的增多,即引物数量的增加,每条目的基因的扩增效率会受到影响,某种特异性条带优先进行 PCR 反应,而部分条带甚至无法获得扩增^[23]。在本研究中也出现了类似的情况,当多种 DNA 模板和引物混合反应后,部分在单重 PCR 中能够顺利扩增的条带不再呈现目的条带。采取阶梯增加引物的策略,调整新加入的引物浓度直至获得扩增,使得 PCR 体系从一重增加至

五重(图2)。但用该体系和程序对实际细菌样品进行5种耐药基因的筛查时,发现部分基因无法扩增,因此需要优化多重PCR的反应体系及反应程序。

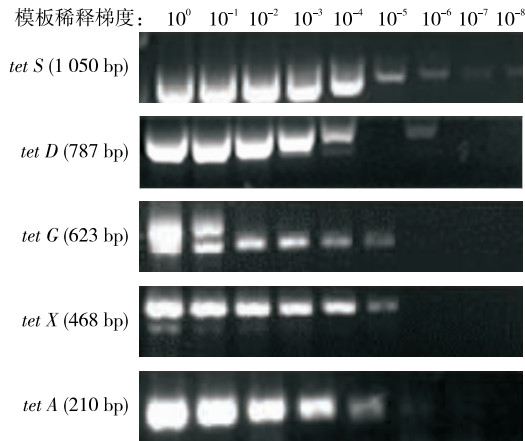
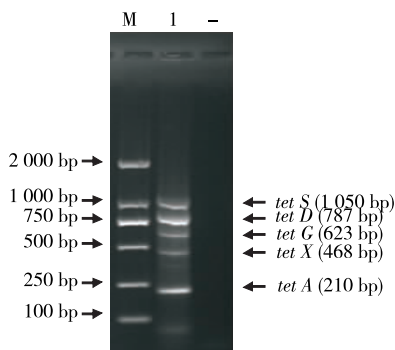


图1 不同稀释度DNA粗提液的单重PCR扩增结果
Figure 1 The amplification of five tet genes in single PCR with diluent templates



M. 2 K Maker 1. 四环素耐药基因五重PCR扩增条带 - . 阴性对照

图2 多重PCR预试验扩增结果

Figure 2 Preliminary amplification of multiple PCR

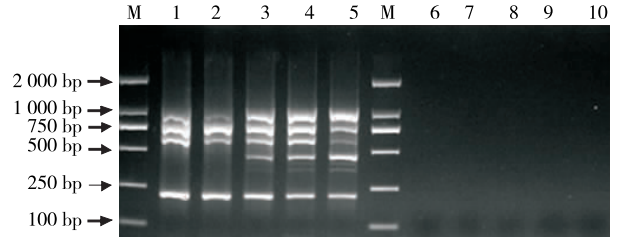
2.2 多重PCR条件优化

2.2.1 引物浓度 当 *tetA*、*tetX*、*tetG*、*tetD* 和 *tetS* 的引物浓度分别为 0.1, 0.1, 0.2, 0.2, 0.2 μmol/L (即 5 对引物的单条引物添加量分别为 0.5, 0.5, 1.0, 1.0, 1.0 μL, 浓度比为 1 : 1 : 2 : 2 : 2, 图 3, 泳道 3) 时, 5 个目的基因的扩增条带亮度相近, 均能得到比较好的扩增且无非特异性条带。

2.2.2 *Taq* 酶浓度 当多重 PCR 体系中的 *Taq* 酶添加量为 1 μL (即 *Taq* 酶的终浓度为 0.1 U/μL) 时, 5 条目的条带最为清晰 (图 4, 泳道 3)。

2.2.3 退火温度 对多重 PCR 反应的退火温度进行优化, 结果表明, 当退火温度高至 58 °C 时 (图 5), 部分条带不再扩增, 因此选择 55 °C 作为多重 PCR 的退火温度。

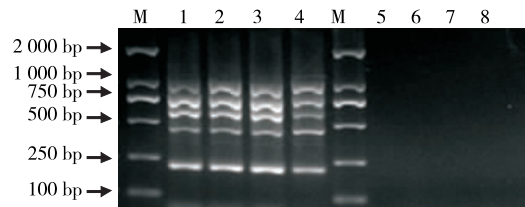
综上, 优化后的多重 PCR 反应体系为: 混合 DNA 模板 5 μL, *Taq* 酶 1 μL, *tetA* 和 *tetX* 的正反向引物各 0.5 μL, *tetG*、*tetD* 和 *tetS* 的正反向引物各 1.0 μL, dNTP 4 μL, MgCl₂ 4 μL, 10×PCR 反应缓冲液 5 μL, 最终用 dd H₂O 补至 50 μL。反应程序为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s,



M. 2 K Maker 1~5. *tetA*、*tetX*、*tetG*、*tetD* 和 *tetS* 的引物浓度比分别为 1 : 1 : 1 : 1 : 2, 1 : 1 : 1 : 1 : 2 : 2, 1 : 1 : 1 : 2 : 2 : 2, 1 : 2 : 2 : 2 : 2, 1 : 2 : 2 : 2 : 4 6~10. 1~5 组的阴性对照

图3 不同浓度的引物进行多重PCR扩增

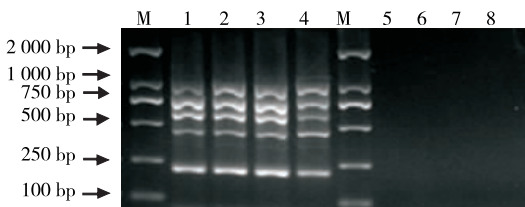
Figure 3 Amplification of multiple PCR using primers with different concentrations



M. 2 K Maker 1~4. *Taq* 酶添加量分别为 0.25, 0.50, 1.00, 1.50 μL 5~8. 1~4 组的阴性对照

图4 多重PCR体系中添加不同体积Taq酶的扩增结果

Figure 4 Amplification of multiple PCR using *Taq* with different concentrations



M. 2 K Maker 1~4. 退火温度分别为 53, 55, 57, 58 °C 5~8. 1~4 组的阴性对照

图5 不同退火温度对多重PCR扩增的影响

Figure 5 Amplification of multiple PCR with different annealing Temperature

55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。

2.3 多重PCR的灵敏度和特异性

为了确定多重PCR体系的灵敏度, 基于优化的PCR扩增条件和反应程序, 将含 10⁴ CFU/g 菌落的粗提DNA混合模板稀释成 10.00%, 1.00%, 0.10% 分别进行扩增。结果表明, 当混合DNA模板被稀释到 0.10% 时, 使用本方法已检测不到 *tetS* 基因, 而 1.00% 的稀释模板仍能扩增出所有 5 条目的条带 (图 6)。因此, 本多重PCR反应的灵敏度为 10² CFU/g。

以 13 种耐药基因的阳性克隆菌株的粗提DNA为模板, 用优化的多重PCR体系进行扩增, 考察体系的特异性。结果表明, 本方法仅可以检测 5 种目的耐药基因, 对不含目的耐药基因的样品无法扩增出条带 (图 7)。因此本多重PCR体系具有较好的特异性。

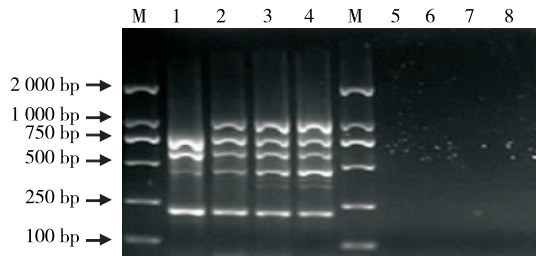
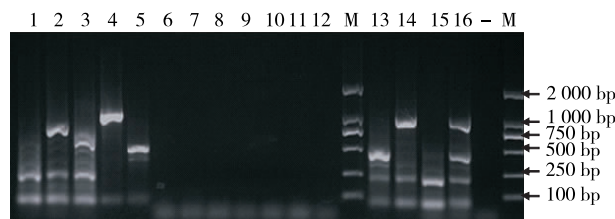


图 6 不同稀释梯度的混合 DNA 模板的多重 PCR 扩增结果
Figure 6 Amplification of multiple PCR using templates with different dilutions

Figure 6 Amplification of multiple PCR using templates with different dilutions



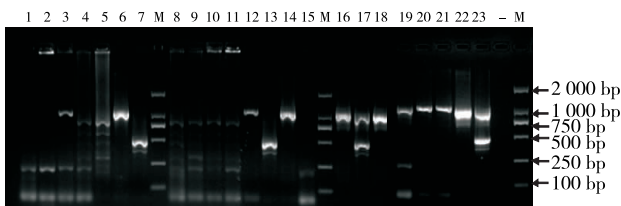
1~16. 分别以 *tetA*、*tetA+tetD*、*tetA+tetG*、*tetS*、*tetX*、*sul1*、*sul2*、*tetE*、*tetM*、*tetT*、*tetO*、*tetR*、*tetA+tetX*、*tetA+tetS*、*tetA+sul1*、*tetA+tetX+tetS* 的阳性克隆菌为模板进行 PCR 扩增的样品
M. 2 K Maker —. 阴性对照

图 7 特异性验证结果

Figure 7 Specificity of the multi-PCR system

2.4 禽源四环素耐药菌的耐药基因检测

用建立的多重 PCR 体系和反应程序检测 23 株本实验室筛查获得并鉴定保存的禽源四环素耐药菌,检测结果与普通单重 PCR 检测结果完全一致(表 3,图 8)。23 株禽源耐药菌属于 11 个种属,包括肉杆菌(*Carnobacterium sp.*)、溶酪大球菌(*Macrococcus caseolyticus*)、鞘氨醇杆菌(*Sphingobacterium sp.*)、气单胞菌(*Aeromonas sp.*)、假单胞菌(*Pseudomonas sp.*)、热死环丝菌(*Brochothrix thermosphacta*)、库特氏菌(*Kurthia sp.*)、寡养单胞菌(*Stenotrophomonas sp.*)、乳酸菌(*lactic acid bacterium*)、海洋类香味菌(*Myroides marinus*)、不动杆菌(*Acinetobacter sp.*)，且既有革兰氏阴性菌又有革兰氏阳性菌。因此,本研究建立的多重 PCR 体系能广泛地应用于禽源细菌的 5 种耐药基因筛查检测。



M. 2 K Maker 1~23. 实验室筛查获得并鉴定的四环素耐药菌菌株 —. 阴性对照

图 8 用多重 PCR 筛查 23 株四环素耐药菌中 5 种四环素耐药基因的存在情况

Figure 8 Screening of five tetracycline resistance genes by multi-PCR system in 23 poultry isolates of tetracycline resistant bacteria

3 结论

本试验通过优化四环素耐药基因引物的浓度、*Taq* DNA 聚合酶浓度和退火温度等因素,建立了可以同时检测 5 种四环素耐药基因 *tetA*、*tetX*、*tetG*、*tetD* 和 *tetS* 的多重 PCR 方法,灵敏度为 10^2 CFU/mL,可用于鸡源革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌中四环素耐药基因的快速筛查。目前已发现 40 多种四环素耐药基因^[1],且在鸡肉产品^[5]和饲养环境^[24-25]中还存在除本研究涉 5 种基因以外的其他多种四环素耐药基因,因此,还需继续开发其他禽源四环素耐药基因的多重 PCR 检测技术,以满足细菌中四环素耐药基因的大规模筛查研究的需求。

参考文献

[1] 严剑芳. 四环素耐药菌和耐药基因在禽畜粪便、堆肥和土壤中的分布[D]. 上海: 华东师范大学, 2015: 10.
 [2] 张正庆, 罗薇, 刘亚刚, 等. 禽源致病性沙门氏菌四环素耐药性基因 *tetC* 的 PCR 扩增及序列分析[J]. 畜禽业, 2006, 33(2): 313-315.
 [3] ZHANG Peng, SHEN Zhang-qi, ZHANG Chun-ping, et al. Surveillance of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* from chicken and swine, China, 2008-2015 [J]. Veterinary Microbiology, 2017, 203(5): 49-55.
 [4] LI Ke-ting, YE Shu-yao, ALALI Q W, et al. Antimicrobial susceptibility, virulence gene and pulsed-field gel electrophoresis profiles of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium recovered from retail raw chickens, China [J]. Food Control, 2017, 72(2, Part A): 36-42.
 [5] 邵毅, 李姝, 黄柳娟, 等. 市售鸡肉中四环素耐药菌污染特征初探[J]. 中国食品学报, 2018, 18(1): 250-256.
 [6] ANDREMONT A. Commensal flora may play key role in spreading antibiotic resistance[J]. Asm News, 2003, 69(2): 601-607.
 [7] LUO Hong-liang, WAN Kai, WANG Hua. High-frequency conjugation system facilitates biofilm formation and pAM 1 transmission by *Lactococcus lactis*[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2005, 71(6): 2 970-2 978.
 [8] 邓瑞, 陈亮. 细菌基因岛研究进展[J]. 重庆医学, 2018, 47(6): 846-848.
 [9] WANG Hua, SCHAFFNER D. Antibiotic resistance: how much do we know and where do we go from here? [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2011, 77(20): 7 093-7 095.
 [10] 张志军, 曹海燕, 刘延媛, 等. 医院感染金黄色葡萄球菌耐药表型与耐药基因研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2015, 25(9): 1 924-1 926.
 [11] 石磊, 周臣清, 闫鹤. 广州市售生猪肉中金黄色葡萄球菌检测及其耐药性研究[J]. 现代食品科技, 2014, 30(4): 255-259.
 [12] 牛建宁, 崔恩慧, 唐攀, 等. 鸡源致病性大肠杆菌对四环素类抗生素耐药性及耐药基因检测[J]. 西北农业学报, 2014, 23(11): 35-39.
 [13] 李晶, 付喜爱, 刘耀, 等. 细菌四环素类药物外排泵的研究新进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2014, 23(12): 48-50.

(下转第 90 页)



图 12 部分采摘试验后的样本

Figure 12 The partial samples after plucking tests

表 2 仿生采摘指采摘失误原因统计

Table 2 Statistics of failure causes of bionic plucking finger

| 失误类型 | 失误数 | 失误原因 |
|-----------------------------|-----|---------------------------------------|
| 一芽一叶不完整 | 4 | 部分新梢叶片的叶展角较大 |
| 错采一芽两叶 | 3 | 部分新梢第一节间距较短(夹爪的指尖有一定的宽度);部分新梢叶片的叶展角较小 |
| 采摘的新梢未能与茎秆发生分离,但新梢的茎秆部分发生夹损 | 12 | 夹爪闭合时发生错位,采摘指机械结构存在一定的加工误差 |

生错位是采摘成功率不高的主要因素。后续研究中,一方面要提高采摘指机械加工精度,减少夹爪闭合时的错位;另一方面,将在采摘指夹爪指尖增加柔性材料,改善指尖与新梢茎的接触状态。

5 结论

通过分析人工采茶时手指的动作要领,并基于在茶园开展的新梢形态及力学特征参数测量试验,本研究提出并设计了模仿人工“提手采”的仿生采摘指。采摘指在气力驱动下,通过定位、夹紧、提拉等动作实现对新梢嫩芽的选择性采摘。基于支链结构运动学分析和遗传算法优化了采摘指结构参数,使得力的传递效率提高了26.6%,室内采摘试验成功率

约为70%。后续研究将进一步提高采摘成功率,并与视觉识别系统集成开展茶园现场试验。

参考文献

- [1] 周智修,段文华,吴海燕,等.我国名优茶发展现状与趋势[J].茶叶科学,2013,33(2):171-178.
- [2] 段学艺,胡华建,忘家伦,等.茶叶3种采摘方式的效益比较[J].贵州农业科学,2011,39(5):79-80.
- [3] 汪建.结合颜色和区域生长的茶叶图像分割算法研究[J].茶叶科学,2011,31(1):72-77.
- [4] 汪建,杜世平.基于颜色和形状的茶叶计算机识别研究[J].茶叶科学,2008,28(6):420-424
- [5] WANG Jian, ZENG Xian-yin, LIU Jian-bing. Three-dimensional modeling of tea-shoots using images and models[J]. Sensors, 2011(11): 3 803-3 815.
- [6] 骆耀平,宋婷婷,文东华,等.茶树新梢节间与展叶角度生长变化及对名优茶机采的影响[J].浙江大学学报:农业与生命科学版,2009,35(4):420-424.
- [7] 张兰兰,董迹芬,唐萌,等.名优茶机采鲜叶分级技术研究[J].浙江大学学报:农业与生命科学版,2012,38(5):593-598.
- [8] 韦佳佳,陈勇,金小俊,等.自然环境下茶树嫩梢识别方法研究[J].茶叶科学,2012,32(5):377-381.
- [9] JIN Xiao-jun, CHEN Yong, ZHANG Hao, et al. High-quality tea flushes detection under natural conditions using computer vision[J]. JDCTA: International Journal of Digital Content Technology and Its Applications, 2012, 6(8): 600-606.
- [10] 张浩,陈勇,汪巍,等.基于主动计算机视觉的茶叶采摘定位技术[J].农业机械学报,2014,45(9):61-78.
- [11] 汤一平,王伟羊,朱威,等.基于机器视觉的茶院识别与采茶机导航方法[J].农业机械学报,2016,47(1):45-50.
- [12] 汤一平,韩旺明,胡安国,等.基于机器视觉的乘用式智能采茶机设计与试验[J].农业机械学报,2016,47(7):15-20.
- [13] 潘志刚.名优绿茶仿生采摘指控制系统研究[D].南京:南京林业大学,2018:39-47.
- [14] 王金斌,白蓝,李文,等.同步检测动物源性成分的五重PCR的条件优化和检出限分析[J].核农学报,2018,32(3):506-514.
- [15] 夏青青.动物源细菌对四环素类药物耐药基因三重PCR检测试剂盒研制[D].成都:四川农业大学,2008:19-53.
- [16] 方志超,刘书超,林雅,等.鸭源致病性大肠杆菌四环素类耐药基因检测[J].中国兽医杂志,2015,51(7):79-81.
- [17] 李姝.市售鸡肉与鸡场中耐药菌污染特征初探[D].上海:上海海洋大学,2017:19-25.
- [18] NG L K, MARTIN I, ALFA M, et al. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes[J]. Molecular and Cellular Probes, 2001, 15(4): 209-215.
- [19] PARK S H, JUN L J, CHO K T, et al. Characterization of *tet(M)* and *tet(G)* genes among tetracycline-resistant *Aeromonas* spp. isolated from imported ornamental fishes[J]. Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2012, 45(3): 238-245.
- [20] LI Xiao-jing, WANG Hua. Tetracycline resistance associated with commensal bacteria from representative ready-to-consume deli and restaurant foods[J]. Journal of Food Protection, 2010, 73(10): 1 841-1 848.
- [21] 夏乐先,孙文娟,沈振,等.煮沸裂解法和试剂盒法提取侵矿菌基因组DNA的比较[J].现代生物医学进展,2014,14(1):31-35.
- [22] 刘宗保.肉食品加工链多重耐药菌及耐药基因分布与传播研究[D].广州:华南理工大学,2015:25.
- [23] 许立奎,潘彬荣,岳高红,等.抗白粉病糯性小麦的多重PCR分子鉴定技术[J].核农学报,2014,28(7):1 203-1 207.
- [24] GAO Min, JIA Rui-zhi, QIU Tian-lei, et al. Size-related bacterial diversity and tetracycline resistance gene abundance in the air of concentrated poultry feeding operations[J]. Environmental Pollution, 2017, 220(Part B): 1 342-1 348.
- [25] ABAIHACHESOO B, KHOSHBAKHT R, SHARIFIVAZDI H, et al. Tetracycline resistance genes in *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolated from poultry carcasses[J]. Jundishapur Journal of Microbiology, 2014, 7(9): e12129.