

闫 强,胡亚群,薛 冬,等. 基于绿豆发状根的快速 CRISPR/Cas9 基因编辑方法[J]. 江苏农业科学,2023,51(10):48-53.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.10.006

# 基于绿豆发状根的快速 CRISPR/Cas9 基因编辑方法

闫 强,胡亚群,薛 冬,周琰琰,丁 佩,韦雅雯,袁星星,陈 新

(江苏省农业科学院经济作物研究所/江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室,江苏南京 210014)

**摘要:**由于缺乏有效稳定的遗传转化体系,导致基因编辑技术在绿豆中的应用受到极大限制,也使绿豆基因功能研究受到极大阻碍。因此,建立一套基于发根农杆菌的操作简便、快速且高效的绿豆嵌合植株转化技术,可以为绿豆基因功能研究提供技术支撑。首先在 CRISPR/Cas9 载体骨架中插入 1 个绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 表达框用于阳性发状根的快速筛选,然后将含有靶基基因 gRNA 的 CRISPR/Cas9 质粒导入发根农杆菌 K599。菌液注射侵染绿豆幼苗植株下胚轴,评价 K599 在绿豆中诱导发状根发生及 CRISPR/Cas9 系统在绿豆转基因发状根组织中的效率。结果显示,K599 菌液侵染种植 7 d 的绿豆幼苗植株并在保湿条件下培养 3 周可在侵染点诱导发状根产生,此嵌合植株在切除原生根后可在霍格兰培养液中正常生长且培养 1 周后即可用于后续检测。用 GFP 筛选的结果显示,阳性发状根占比约为  $(57.8 \pm 10.0)\%$ 。随机选择 15 个荧光检测阳性的转基因发状根组织,利用测序检测靶位点的编辑效果,结果显示有 10 个靶位点的序列发生了突变,突变比例达到 67%,其中碱基缺失突变 9 个,碱基转换突变 1 个。由本研究结果可知,利用该方法可以在无菌组织培养的条件下于 4 周内获得目的基因编辑的转基因组织,极大地便利了绿豆分子水平上的功能研究,也为其他尚缺乏稳定遗传转化体系的作物进行基因功能研究提供了参考。

**关键词:**绿豆;CRISPR/Cas9;基因编辑;发状根转化;遗传转化;绿色荧光蛋白

**中图分类号:**S522.01 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2023)10-0048-06

绿豆是我国传统的杂粮作物,其种子含有丰富的易消化蛋白、纤维、维生素 B 和多种矿物微量元素等营养成分,同时还具有清热解毒、消炎杀菌等药理作用,是一种备受消费者喜欢的药食同源类食用豆类作物<sup>[1-2]</sup>。绿豆由于其生育期短(60 ~ 75 d)、抗逆性强及共生固氮的能力,是轮作和救灾备荒的优良作物。近年来,随着我国农业供给侧结构性改革和人民生活水平的不断提高,绿豆在满足人们日益增长的健康多元化饮食的需求及精准扶贫、产业结构调整、乡村振兴中发挥着重要作用。

基于序列特异性核酸酶的基因组编辑技术在过去 10 年内发展迅速,并彻底改变了生命科学研究

的各个领域<sup>[3]</sup>。与早期开发的锌指核酸酶 (ZFNs) 技术和类转录因子效应物核酸酶 (TALENs) 技术相比,规律成簇的间隔短回文重复相关蛋白技术 (CRISPR/Cas9) 利用 1 个向导 RNA (gRNA) 对靶基因位点进行特异性识别,并在 Cas9 蛋白作用下对靶点 DNA 进行切割,断裂的 DNA 双链通过非同源末端连接、同源重组方式进行修饰,在此过程中实现对靶点序列的编辑<sup>[4]</sup>。CRISPR/Cas9 系统由于载体构建简单、编辑效率高等优点,已被作为一种便捷有效的工具而广泛应用,目前在几十种模式植物和作物中的应用均有相关报道<sup>[5-7]</sup>。在豆科植物中,CRISPR/Cas9 系统已经成功用于百脉根、大豆、苜蓿、豇豆的基因编辑<sup>[8-11]</sup>。但在绿豆中,CRISPR/Cas9 介导的基因编辑目前尚没有相关报道。

目前,主流方案是利用农杆菌将包含 CRISPR/Cas9 元件的质粒通过遗传转化的方法导入宿主细胞<sup>[3]</sup>。虽然已有研究发现,用绿豆的初生叶片、下胚轴等作为外植体成功获得了转基因株系,并对侵染条件、培养基激素配方进行了积极探索<sup>[12-14]</sup>,但是这些报道的方法仍存在效率低、可重复性差的问题,绿豆的遗传转化在国内尚没有成功的报道。由此可见,缺乏成熟高效的遗传转化方法是限制

收稿日期:2022-07-13

基金项目:国家重点研发计划(编号:2020YFD1000801、2020YFD1000805);现代农业产业技术体系专项资金(编号:CAR508-G15);江苏特粮特经产业技术体系集成创新中心项目(编号:JATS[2021]423);江苏省种业振兴揭榜挂帅项目(编号:JBGS[2021]004)。

作者简介:闫 强(1986—),男,山东济宁人,博士,助理研究员,主要从事豆类作物抗病育种研究。E-mail:yanqiang@jaas.ac.cn。

通信作者:陈 新,博士,研究员,主要从事豆类作物遗传育种研究。E-mail:cx@jaas.ac.cn。

CRISPR/Cas9 基因编辑技术在绿豆中应用的关键限制因素。

为了建立一套快速便捷的绿豆基因编辑技术体系,本研究拟探索发根农杆菌介导的嵌合植株转化技术在绿豆中的适用性,并对 CRISPR/Cas9 系统在转基因发状根组织中的编辑效率进行评价,从而为绿豆基因功能研究提供技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

苏绿 1 号绿豆种植在装有蛭石和营养土混合物(体积比为 2:1)的小花盆中,浇水后放置在温室中培养,培养条件设置为光—暗周期 16 h—8 h,温度为 26 ℃。种植第 3 天浇水,培养 7 d 待真叶刚刚展开时用于农杆菌侵染。

本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)育苗后移栽到上述同样营养土中,并在相同条件下培养 5~6 周用于外源基因的瞬时表达。试验材料在 2021 年 3—7 月分批播种于江苏省农业科学院植物智能生长室内。

### 1.2 载体构建

利用在线软件 CRISPR (<http://crispor.tefor.net/crispor.py>) 在 *Vradi03g01240* 基因第 1 个外显子区域选择 gRNA。首先将 gRNA 及其反向互补序列分别融合在引物 U6 - gRNA - F、U6 - gRNA - R 的 5'端,并在引物 pSCM - U6 - F、pSCM - U6 - R 的 5'端分别融合质粒 pSC *Nco* I 上游、*Xba* I 下游同源序列。然后以 pGmU6 质粒为模板,用 pSC - U6 - F/U6 - gRNA - R、U6 - gRNA - F/pSC - U6 - R 2 对引物搭配扩增,获得大小分别为 500、200 bp 的片段,最后利用诺维赞多片段重组试剂盒将片段与 *Nco* I、*Xba* I 双酶切线性化的 pSC 质粒重组,获得载体 pSC - gRNA。为便于阳性发状根的筛选,以 pBIN - GFP4 载体为模板,用引物 GFP - F/GFP - R 扩增包含 CaMV35S 启动子、绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)阅读框、终止子的完整表达框,并通过同源重组的方法分别插入 pSC - gRNA 的 *BstE* II 位点处,至此完成载体 pSC - GFP - gRNA、pSC - GFP 的构建,其中 pSC - GFP 作为空载体对照。载体构建过程中所用的引物序列见表 1。

表 1 本研究所用引物

用途	名称	引物序列(5'→3')
载体构建	pSC - U6 - F	gggactttcactggccatggGGAATTGTGAGCGGATAACAATT
	pSC - U6 - R	tggtatcagagccatttagaCCATGAATAGTCTATGACCAAAACT
载体构建	U6 - gRNA - F	gctaaggcttgactccctggGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
	U6 - gRNA - R	ccaggaggtccaageccttagcAATCCATATGTTTTCTGGGAC
载体构建	GFP - F	tgtgttaaatgctgcggtagaccGTCAACATGCTGGAGCAGCAC
	GFP - R	ggggaaattcgagctgggtcaccGTCACTGGATTITGTTTTAGGAAT
PCR 验证	pSC - seq - F	GAGTTAGCTCACTCATTAGGC
	pSC - seq - R	GATAGAGCTACGCTACTATAC
基因编辑检测	Test - F	GGCGTAAAGGGAGTGACT
	Test - R	CTGGAGGCTTAGCAGGAT

### 1.3 绿豆发状根的转化

将质粒 pSC - GFP - gRNA、pSC - GFP 通过冻融法转入发根农杆菌 K599 感受态细胞中,利用引物 pSC - seq - F/R PCR 扩增验证阳性克隆。将阳性克隆在含有 50 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中于 28 ℃、200 r/min 培养 36 h;待菌液浑浊后,吸取 200 μL 菌液均匀涂布在加有卡那霉素的 LB 平板上并在 28 ℃培养箱中过夜培养;第 2 天用涂布棒收集菌体至 10 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 溶液(含有 40 mg/L 乙酰丁香酮)中,并调节  $D_{600\text{ nm}}$  至 0.5~0.6。

绿豆幼苗培养 7 d 时,待真叶完全展开后用于

发根农杆菌侵染。首先用手术刀在子叶节处往下划 1 个长约 1 cm 的伤口,然后用移液器往伤口处滴加适量侵染菌液。将侵染处理完毕的植株放置于用透明塑料布做成的密封罩中,并保持罩内湿度在 90% 以上。每日检查罩内湿度情况直至发状根长出 2~5 cm,从侵染伤口处往下约 1 cm 处用剪刀将植株茎剪断,将剪下的植株放置于霍格兰营养液中继续培养。此时得到的嵌合植株由非转基因的茎、叶片及含有部分转基因发状根组织组成。待根长至 5~7 cm 时,在宏观荧光变倍显微镜下进行荧光筛选,并用镊子小心去除无 GFP 的根,然后将此嵌合

植株放回培养基中继续培养用于后续试验。

#### 1.4 DNA 的提取和编辑位点的序列分析

利用基因组提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]提取转 pSC - GFP - gRNA 质粒发状根组织的基因组。用特异性引物 Test - F/R 扩增包含 gRNA 在内的附近基因组片段,将获得的片段电泳验证后送擎科生物技术有限公司进行测序。获得相应序列后利用 ClustalX 软件进行多序列比对并利用 GeneDoc 进行可视化处理。

#### 1.5 烟草叶片的瞬时表达和荧光观察

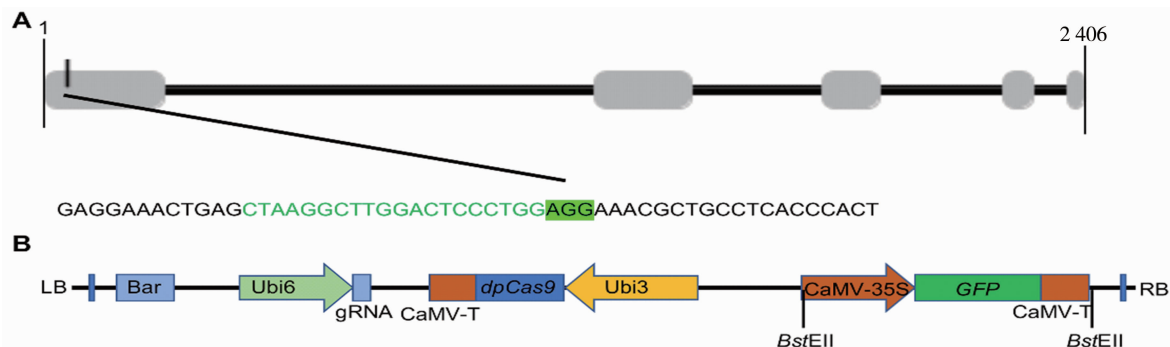
将质粒 pSC - GFP - gRNA、pSC - GFP 通过冻融法转入根癌农杆菌 GV3101 感受态细胞中,经菌落 PCR 验证后在含有 50 mg/L 卡那霉素、30 mg/L 利福平的液体 LB 培养基中于 28 ℃、200 r/min 条件下培养 48 h;在 4 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,用 10 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 溶液(含有 40 mg/L 乙酰丁香酮)

清洗 3 遍后调节  $D_{600\text{ nm}}$  至 0.5 ~ 0.6。用 1 mL 注射器将侵染液注射进烟草叶片中,将处理过的植物放回培养室继续培养 48 h 后用于荧光观察。切取注射区域烟草叶片置于共聚焦显微镜下,在 488 nm 波长激发光下观察荧光并拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 GFP 标记的绿豆基因 CRISPR/Cas9 载体的构建

用在线软件 CRISPR 在 *Vradi03g01240* 基因第 1 个外显子区域 49 ~ 68 个核苷酸处设计 gRNA(图 1 - A),将 gRNA 片段插入载体 pSC - IAA14 上并进一步完成 pSC - GFP - IAA14 载体的构建,此载体由大豆 GmU6 启动子驱动 gRNA 表达,同时含有 1 个由大豆 GmUbi3 启动子驱动的 *dpCas9* 表达框及用于荧光筛选的 CaMV - 35S 驱动的 GFP 表达框(图 1 - B)。



A—绿豆 *Vradi03g01240* 基因结构示意图,灰色方块表示外显子,黑色线条表示内含子,绿色序列表示 gRNA 序列,绿色背景序列表示前间隔序列临近基序(PAM)序列;B—CRISPR/Cas9 载体示意图

图1 CRISPR/Cas9 载体构建示意

为了验证插入 CRISPR 载体中的 GFP 表达框是否能够正常表达,用烟草瞬时表达系统对 GFP 信号进行检测。结果显示,将 pSC - GFP - gRNA、pSC - GFP 在烟草叶片中瞬时表达后,均能够观察到强烈的荧光信号(图 2),说明改造的载体中的 GFP 能够在植物体内正常表达。

### 2.2 绿豆嵌合植株的获得

从图 3 - A 至图 3 - I 可以看出,用含有 pSC - GFP - gRNA 载体的发根农杆菌 K599 在绿豆幼苗子叶节处进行侵染,结果显示,诱导产生了发状根组织。保湿处理 1 周后,侵染点组织变得明显膨大(图 3 - E);保湿处理 2 周后,侵染位点继续膨大并形成瘤状的愈伤组织(图 3 - F);保湿处理 3 周后,侵染点处陆续有发整根形成(图 3 - G);待大部分根长至 2 ~ 5 cm 时,从侵染伤口处往下约 1 cm 处用剪刀将植株茎剪断,剪下的植株置于霍格兰营养液

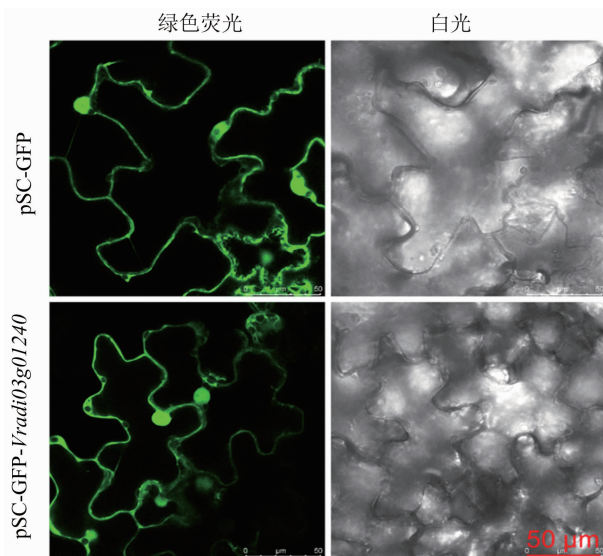


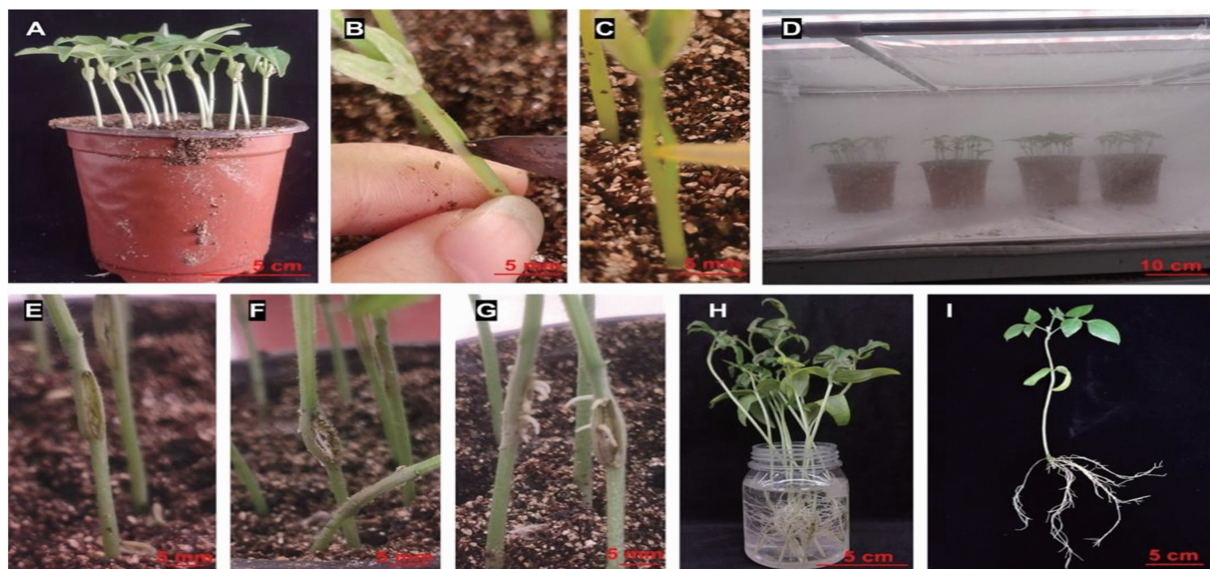
图2 CRISPR/Cas9 载体在烟草叶片中瞬时表达 GFP 的荧光检测结果

中继续培养(图 3 - H)。待根长至 5 ~ 7 cm 时(图



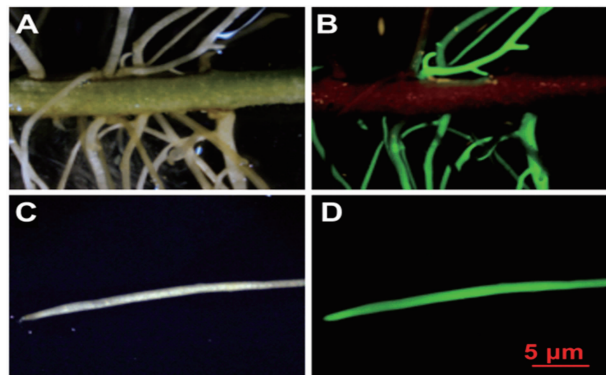
3-I), 在宏观荧光变倍显微镜下进行荧光筛选, 并用镊子小心去除无 GFP 的根(图 4)。经统计, 发出绿色荧光的发状根比例约为  $(57.8 \pm 10.0)\%$ , 然后

将处理完毕的植株放回培养基中继续培养, 进行进一步的检测, 此植株具有野生型的茎、叶器官, 发状根组织为转基因部分。



A—萌发 7 d 的绿豆幼苗; B—手术刀在下胚轴切口; C—在伤口处进行农杆菌感染; D—农杆菌感染后保湿处理; E~G—农杆菌感染 1、2、3 周后感染点愈伤组织形成及发状根发生; H—切除原生根后将植株移到霍格兰营养液中继续培养; I—嵌合植株在培养液中的生长状态

图3 绿豆发状根转化过程



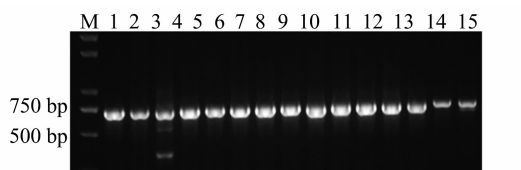
A、B—下胚轴感染点发状根白光和荧光观察结果; C、D—单根阳性发状根白光和荧光观察结果

图4 绿豆发状根荧光观察结果

### 2.3 转基因发状根组织基因编辑效果检测

为了检测获得的嵌合植株发状根组织中 *Vradi03g01240* 基因是否被成功编辑。随机选择 15 个荧光检测阳性的转化 pSC - GFP - gRNA 发状根组织提取基因组 DNA。用特异性引物 Test - F/R 扩增 gRNA 附近序列, 结果显示, 对照和敲除的转基因组织均扩增出了符合预期大小为 706 bp 的条带(图 5)。对条带进行测序的结果显示, 15 个独立的转基因事件中, 有 10 个 gRNA 附近序列发生了突变, 突变比例约为 67% (图 6)。突变类型表现如下: 小片段的碱基缺失 9 个, 占突变总数的 90%; 碱基转换

突变 1 个, 占突变总数的 10%。以上结果表明, 本研究中使用的 CRISPR/Cas9 系统可以对绿豆基因进行有效的编辑, 创制多样性的突变类型。



M—DNA marker; 1~15—转化 pSC-GFP-gRNA 载体荧光筛选阳性发状根样品

图5 CRISPR/Cas9 载体转化的发状根 DNA 的 PCR 检测结果

### 3 讨论与结论

CRISPR/Cas9 基因编辑技术是目前应用广泛的基因编辑技术, 为基因功能研究和作物改良提供了大量突变材料<sup>[15-17]</sup>。本研究在前人基础上, 将应用于大豆基因编辑的遗传转化载体进行了进一步优化<sup>[18]</sup>, 添加了 GFP 筛选标记, 以便后续的阳性转基因材料筛选鉴定。本研究以绿豆 *Vradi03g01240* 基因为目的基因进行基因编辑载体的构建, 通过对荧光筛选过的发状根组织进行测序分析, 发现 CRISPR/Cas9 基因编辑的效率达到 67%, 其中 90% 的靶标基因 gRNA 区域发生了缺失突变。本研究结果充分证明了该 CRISPR/Cas9 系统在绿豆发状根

CTAAGGCTGGACTCCCTGGAGG

野生型 - ACTGAGCTAAGGCTGGACTCCCTGGAGGAAACGCTGCCTCACCC  
 1 - ACTGAGCTAAGGCTGGACTC---GCAGGAAAACCTGCCTCCCC  
 2 - ACTGAGCTAAGGCTGGACTCCCTGGAGGAAACGCTGCCTCACCC  
 3 - ACTGAGCTAAGGCTGGACT---GCAGGAAACCTGCCTCCCC  
 4 - ACTGAGCTAAGGCTGGACTCCCTGGAGGAAACGCTGCCTCACCC  
 5 - ACTGAGCTAAGGCTTGA-----GGAGGAAACGCTGCCTCACCC  
 6 - ACTGAGCTAAGGCTGGACT---GGAGGAAACGCTGCCTCACCC  
 7 - ACTGAGCTAAGGCTGGACTCCCTGGAGGAAACGCTGCCTCACCC  
 8 - ACTGAGCTAAGGCTGGACTCCCTGGAGGAAACGCTGCCTCACCC  
 9 - ACTGAGCTAAGGCTGGACTCCC--GGGACGCCCCCCCCCCCC  
 10 - ACTGAGCTAAGGCTGGACTCCCTGGAGGAAACGCTGCCTCACCC  
 11 - ACTGAGCTAAGGCTGGACT---GGAGGAAACGCTGCCTCACCC  
 12 - ACTGAGCTAAGGCTGGACT---G-----CC  
 13 - ACTGAGCTAAGGCTGGACTCCCTGAAAGAAACCTGCCCACCC  
 14 - ACTGAGCTAAGGCTGGACT---GGAGGAAACGCTGCCTCACCC  
 15 - ACTGAGCTAAGGCTGGACT---GAAGGAAACGCTGCCTCACCC

1~15—转化 pSC-GFP-gRNA 载体阳性发状根样品

图6 CRISPR/Cas9 诱导的绿豆 *Vrtdi03g01240* 基因突变检测结果

系统中的适用性。

基于发根农杆菌介导的根毛转化体系目前已被广泛用于难以转化或尚缺乏有效稳定转化技术手段的植物进行基因功能验证<sup>[19]</sup>。发根农杆菌 K599 介导的发状根转化技术在豆科作物大豆、菜豆、豇豆中都得到了成功的利用<sup>[11,20-21]</sup>。发状根瞬时转化技术能够对候选基因进行快速的功能验证,本系统在 4 周内即可获得用于试验的转基因材料,而且荧光筛选结果表明阳性转基因发状根比例达到 50% 以上。稳定转化虽然具有更加稳定的遗传背景和一致的表型,但往往需要一年甚至更久才能拿到转基因材料,尤其目前绿豆尚缺乏行之有效的稳定转化技术体系。本研究证明了 CRISPR/Cas9 系统能够在绿豆体内进行有效的基因编辑,创制大量的目的基因突变类型,发状根转化技术目前可作为研究绿豆基因功能的一个优异替代方案。本研究的方案能够大大提高绿豆根系发育、根瘤形成、盐碱非生物胁迫以及根部病虫害等相关分子机制研究的速度和质量。

致谢:感谢南京农业大学喻德跃教授惠赠 pGmU6、pSC 基因编辑载体,南京农业大学窦道龙教授惠赠 pBIN-GFP4 载体。

#### 参考文献:

- [1]程须珍. 绿豆生产技术[M]. 北京:北京教育出版社,2016:11-12.
- [2]Keatinge J D H, Easdown W J, Yang R Y, et al. Overcoming chronic malnutrition in a future warming world: the key importance of mungbean and vegetable soybean[J]. Euphytica, 2011, 180(1): 129-141.
- [3]刘耀光,李构思,张雅玲,等. CRISPR/Cas 植物基因组编辑技术研究进展[J]. 华南农业大学学报,2019,40(5):46-57.

- [4]Xie K B, Yang Y N. RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system[J]. Molecular Plant, 2013, 6(6):1975-1983.
- [5]Demirci Y, Zhang B H, Unver T. CRISPR/Cas9: an RNA-guided highly precise synthetic tool for plant genome editing[J]. Journal of Cellular Physiology, 2018, 233(3):1844-1859.
- [6]Shah T, Andleeb T, Lateef S, et al. Genome editing in plants: advancing crop transformation and overview of tools[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2018, 131:12-21.
- [7]张瑞,高彩霞. 基于双碱基编辑系统的植物基因靶向随机突变技术[J]. 植物学报, 2021, 56(1):50-55.
- [8]Li Z S, Liu Z B, Xing A Q, et al. Cas9-guide RNA directed genome editing in soybean[J]. Plant Physiology, 2015, 169(2):960-970.
- [9]Wang L X, Wang L L, Tan Q, et al. Efficient inactivation of symbiotic nitrogen fixation related genes in *Lotus japonicus* using CRISPR-Cas9[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7:1333.
- [10]Ji J, Zhang C Y, Sun Z F, et al. Genome editing in cowpea *Vigna unguiculata* using CRISPR-Cas9[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(10):2471.
- [11]Cañas L A, Beltrán J P. Functional genomics in *Medicago truncatula*[M]. New York:Humana Press, 2018, 1822:161-174.
- [12]Jaiwal P K, Kumari R, Ignacimuthu S, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) - a recalcitrant grain legume[J]. Plant Science, 2001, 161(2):239-247.
- [13]Mahalakshmi L S, Leela T, Kumar S M, et al. Enhanced genetic transformation efficiency of mungbean by use of primary leaf explants[J]. Current Science, 2006, 91(1):93-99.
- [14]Sahoo D P, Kumar S, Mishra S, et al. Enhanced salinity tolerance in transgenic mungbean overexpressing *Arabidopsis* antiporter (*NHX1*) gene[J]. Molecular Breeding, 2016, 36(10):144.
- [15]苏钺凯,邱镜仁,张哈,等. CRISPR/Cas9 系统在植物基因组编辑中技术改进与创新的研究进展[J]. 植物学报, 2019, 54(3):385-395.
- [16]谢先荣,曾栋昌,谭健涛,等. 基于 CRISPR 编辑系统的 DNA 片段删除技术[J]. 植物学报, 2021, 56(1):44-49.
- [17]朱丽珍,王芳,王娅丽,等. 基因编辑技术及 CRISPR/Cas 系统在草地植物开发中的应用[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(20):22-30.
- [18]Du H Y, Zeng X R, Zhao M, et al. Efficient targeted mutagenesis in soybean by TALENs and CRISPR/Cas9[J]. Journal of Biotechnology, 2016, 217:90-97.
- [19]Makhzoum A B, Sharma P, Bernards M A, et al. Hairy roots: an ideal platform for transgenic plant production and other promising applications[M]//Gang D. Phytochemicals, plant growth, and the environment. New York:Springer, 2012:95-142.
- [20]Kereszt A, Li D X, Indrasumunar A, et al. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean to study root biology[J]. Nature Protocols, 2007, 2(4):948-952.
- [21]Estrada-Navarrete G, Alvarado-Affantranger X, Olivares J E, et al. Fast, efficient and reproducible genetic transformation of *Phaseolus* spp. by *Agrobacterium rhizogenes*[J]. Nature Protocols, 2007, 2(7):1819-1824.

方光远,谈福利,张智敏,等. 仔猪腹泻大肠杆菌耐药性和超广谱 $\beta$ -内酰胺酶基因检测分析[J]. 江苏农业科学,2023,51(10):53-57.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.10.007

# 仔猪腹泻大肠杆菌耐药性和超广谱 $\beta$ -内酰胺酶基因检测分析

方光远<sup>1</sup>,谈福利<sup>1</sup>,张智敏<sup>1</sup>,单星月<sup>1</sup>,袁光芬<sup>1</sup>,王喜国<sup>2</sup>,陈俊红<sup>1</sup>,胡志华<sup>1</sup>,蒋加进<sup>1</sup>,戴鼎震<sup>1</sup>

(1.金陵科技学院动物科学与食品工程学院,江苏南京 210038; 2.乾元浩生物股份有限公司南京生物药厂,江苏南京 210012)

**摘要:**为研究 20 日龄左右仔猪腹泻发病机理,检测仔猪腹泻大肠杆菌耐药性和超广谱 $\beta$ -内酰胺酶(ESBLs)基因种类,分析仔猪腹泻大肠杆菌耐药特性,为兽医临床更好地预防控制仔猪腹泻大肠杆菌病提供参考,从腹泻发病仔猪粪便中分离出 34 株致病性仔猪腹泻大肠杆菌,用 10 种头孢类抗生素药敏纸片对其进行药物敏感试验,并设计针对 ESBLs 基因 *TEM*、*SHV*、*CTX-M-1*、*CTX-M-2*、*CTX-M-8*、*CTX-M-9* 的特异性引物,检测 34 株仔猪腹泻大肠杆菌 ESBLs 基因 *TEM*、*SHV*、*CTX-M-1*、*CTX-M-2*、*CTX-M-8*、*CTX-M-9* 存在情况。药敏试验结果表明,34 株仔猪腹泻大肠杆菌对 10 种头孢类抗生素的敏感度不同,其中,对头孢唑啉、头孢噻吩、头孢呋辛的耐药率为 68%、65% 和 56%,敏感率为 29%、15% 和 35%;对头孢哌酮、氨曲南的耐药率为 15%、9%,敏感率为 70%、79%。ESBLs 基因检测结果表明,34 株仔猪腹泻大肠杆菌全部检测到 *TEM* 耐药基因,检出率为 100%;检测到 1 株细菌具有 *CTX-M-9* 耐药基因,检出率为 2.8%。由于该养猪场分离出的仔猪腹泻大肠杆菌对头孢类抗生素普遍耐药,并且全部检测出 ESBLs 的 *TEM* 基因,因此建议对养猪场的头孢类抗生素使用应定期进行耐药性检测 and 合理规范使用。

**关键词:**仔猪腹泻大肠杆菌;耐药性;超广谱 $\beta$ -内酰胺酶基因;检测与分析

**中图分类号:**S852.6 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2023)10-0053-04

大肠杆菌对头孢菌素产生耐药性的主要机理是产生超广谱 $\beta$ -内酰胺酶(extended spectrum  $\beta$ -lactamases, ESBLs)。ESBLs 是通过质粒介导使细菌对第 3、4 代头孢菌素(主要包含头孢曲松、头孢噻肟、头孢他啶和头孢吡肟等)及单环类内酰胺抗生素氨曲南和青霉素类抗生素产生耐药的一组酶<sup>[1-2]</sup>。自从 19 世纪 80 年代欧洲国家发现并报道了第 1 例产 ESBLs 菌株后,目前已发现由质粒介导的 ESBLs 基因亚型 200 多种,其中,TEM (Temoniera)、SHV (Sulphadryl variable) 和 CTX-M (Cefotaxime)基因型非常普遍<sup>[2-3]</sup>。根据基因同源性的差异把 ESBLs 分成三大类:TEM 型、SHV 型、非 TEM 非 SHV 型,其中,TEM 型和 SHV 型占大多数。最近,伴随 CTX-M 型不断增加,且本来属于 2d 亚类 $\beta$ -内酰胺酶 OXA 型中又出现了多种 ESBLs,所

以又把 ESBLs 分类为 TEM 型、SHV 型、CTX-M 型、OXA 型、其他 5 种类型<sup>[4-5]</sup>。ESBLs 最常见的基因型是 TEM,至今已有 168 种,全球广泛分布。目前,我国滥用抗生素现象非常普遍,对超广谱 $\beta$ -内酰胺酶的研究较晚,抗生素产生耐药性的现象比较普遍。本试验通过检测仔猪腹泻大肠杆菌超广谱 $\beta$ -内酰胺酶基因型种类,分析仔猪腹泻大肠杆菌的耐药机理,为兽医临床提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验时间:2021 年 12 月 10 日至 2022 年 4 月 10 日;地点:金陵科技学院动物科学与食品工程学院兽医微生物实验室。

1.1.1 病料 南京某养猪场 34 份仔猪腹泻粪便<sup>[3]</sup>。

1.1.2 菌株 34 份腹泻仔猪粪便进行细菌分离培养获得 34 株细菌,经鉴定均为仔猪腹泻大肠杆菌<sup>[3]</sup>,冻干保存备用。

1.1.3 试剂 琼脂糖、2 × *Taq* PCR mix、DL2000 DNA Marker 等购自南京擎科生物有限公司;普通营养琼脂平板、SS 琼脂平板、普通营养肉汤等自行配制。

收稿日期:2022-06-27

基金项目:江苏省大学生创新训练计划重点项目(编号:202013573017Z);动物药品创新与制备“创客”虚拟班(编号:2017008);江苏省农业科技创新与推广挂县强农富民工程(编号:SJKJ016)。

作者简介:方光远(1965—),男,江苏宿迁人,硕士,副教授,从事兽医微生物学、兽医生物制品学研究。E-mail:fgy@jit.edu.cn。