

灭多威胁迫下罗非鱼精巢 SSH 文库的构建

孟顺龙^{1,2}, 刘涛¹, 宋超¹, 张聪², 裘丽萍¹, 陈家长^{1,2*}, 徐跑^{1,2*} (1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 中国水产科学研究院内陆渔业生态环境和资源重点开放实验室, 江苏无锡 214081; 2. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏无锡 214081)

摘要 [目的]应用抑制性消减杂交(SSH)技术,建立灭多威胁迫下罗非鱼精巢 SSH 正反向文库。[方法]以雄性罗非鱼为试验动物,采用抑制性消减杂交技术构建罗非鱼精巢组织在灭多威胁迫下的正反向 SSH 文库。试验共获得 45 条 EST,成功注释 25 条,其中正向文库 13 条,反向文库 12 条。功能明确基因按功能可分为 5 类,其中催化活性、细胞相关基因表达上调,细胞过程、结构分子活性相关基因表达下调。整合素 $\beta 1$ 表达量上调,丝/苏氨酸蛋白激酶 pim-3、 Ca^{2+} -ATPase、 Na^+ - K^+ -ATPase、核糖体蛋白 L22 表达下调。[结论]研究结果可为揭示灭多威对罗非鱼生殖毒性的分子机制奠定基础。

关键词 灭多威;罗非鱼;抑制性消减杂交;cDNA 文库;精巢

中图分类号 S965.125 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)22-0074-04

Construction of Suppression Subtractive Hybridization Library for Testis of Male Tilapia under the Stress of Methomyl

MENG Shun-long^{1,2}, LIU Tao¹, SONG Chao¹ et al (1. Freshwater Fisheries Research Center of Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Open Laboratory of Inland Fishery Ecological Environment and Resources of Chinese Academy of Fishery Science, Wuxi, Jiangsu 214081; 2. Wuxi Fishery College of Nanjing Agricultural University, Wuxi, Jiangsu 214081)

Abstract [Objective] To construct forward and reserve libraries of suppression subtractive hybridization(SSH) in the testis of male tilapia under the stress of methomyl by using SSH technology. [Method] Using male tilapia as test animal, the forward and reserve libraries of SSH in the testis of tilapia under the stress of methomyl were constructed by using SSH technology. [Result] 45 expressed sequence tags (ESTs) were obtained, and 25 expressed sequence tags were successfully noted, including 13 forward libraries and 12 reserve libraries. The genes with confirmed functions were classified into 5 types. Related genes with catalytic activity and cell were up-regulated, while related genes with structural molecule's activity and biological process were down-regulated. The expression amount of integrin $\beta 1$ was up-regulated, while serine/threonine protein kinase pim-3, Ca^{2+} -ATPase, Na^+ - K^+ -ATPase and ribosomal protein L22 were down-regulated. [Conclusion] The research results could lay the foundation for revealing the molecular mechanism of methomyl's reproductive toxicity to tilapia.

Key words Methomyl; Tilapia; Suppression subtractive hybridization; cDNA library; Testis

灭多威属于氨基甲酸酯类广谱杀虫剂,具有较强的触杀和胃毒作用,无内吸传导作用,是目前使用最广泛的杀虫剂之一。1997 年世界野生动物基金会将灭多威列为雌激素类内分泌干扰物^[1],其对环境的生物毒性表现为破坏动物间的捕食关系,威胁生态系统平衡等^[2]。由于灭多威在水中溶解性强、使用量大,加上工农业生产中的不合理排放,导致在一些水体和食品^[3]中检测到灭多威残留。目前,灭多威由于在环境水体中检出率高和具有内分泌干扰作用等特点而受到广泛关注^[4-6]。

抑制性消减杂交(SSH)是具有选择扩增目的基因功能的差减技术^[7]。丰度不同的序列能够通过该技术将其相对含量最终达成一致,然后运用链内退火时优先于链间的原理,使引物与非目的序列片段两端无法结合配对,抑制非目标序列片段,从而扩增了目的基因。与其他差异基因获得方法相比,该技术具有灵敏度高、假阳性低、特异性强等特点,使其用于筛选和克隆差异表达基因。笔者以雄性罗非鱼为试验动物,采用抑制性消减杂交技术构建了罗非鱼精巢组织在雌激素类农药灭多威胁迫下的正反向 SSH 文库,鉴定罗非

鱼精巢组织在雌激素类农药灭多威胁迫下差异表达基因,旨在为揭示灭多威对罗非鱼生殖毒性的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 以雄性尼罗罗非鱼(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心宜兴养殖基地)作为试验动物,平均体质量为(112.24±9.48)g,平均体长为(17.06±0.91)cm。在容积 300 L(实际水体 200 L)的水族缸中随机放入雄性罗非鱼 30 尾,驯养 4 周。驯养期间,每天 08:00 投喂饲料 1 次,投喂量按罗非鱼体质量的 2% 计算。暗光比为 12 h:12 h。用空气压缩机进行充氧。

1.2 试验用水 试验用水为曝气 7 d 的去氯自来水,水温(25.0±0.5)℃,溶氧量 6.3~7.0 mg/L, pH 为(7.0±0.5),试验用水符合渔业水质标准(GB11607—89)。

1.3 主要试剂和仪器

1.3.1 主要试剂。质量分数大于 97% 的灭多威原药,购自上海焦点生物技术有限公司;Oligotex mRNA 试剂盒、Maxi Plasmid 试剂盒均购自 Qiagen 公司;1 kb DNA Ladder、UltraPure Agarose 购自 Zrbiorise 公司;Taq DNA 聚合酶、10 mmol/L dNTP 购自 TaKaRa 公司;TRIzol Reagent 提取试剂盒购自 Invitrogen 公司;RT Enzyme 购自 ABI 公司;PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒购自 Clonetech 公司。

1.3.2 主要仪器。台式高速冷冻离心机(Eppendorf, Centrifuge 5810R);电转化仪(BTX, ECM630);PCR 仪(Bio-rad, MyCycler);电泳仪(Tanon, HE-120);凝胶成像仪(Tanon, 2500)。

1.4 试验设计 根据前期急性试验结果(灭多威的 96 h

基金项目 中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2015C02XK01);江苏省青年自然科学基金项目(BK20150117);现代农业产业技术体系建设专项(CARS-46)。

作者简介 孟顺龙(1982—),男,安徽颍上人,副研究员,博士,硕士生导师,从事渔业生态环境研究。*通讯作者:陈家长,研究员,硕士,硕士生导师,从事渔业生态环境研究;徐跑,研究员,博士,博士生导师,从事鱼类遗传育种、淡水特色水产品绿色生态养殖、大水面净水渔业研究。

收稿日期 2018-04-22; **修回日期** 2018-04-27

LC₅₀ 为 430 μg/L、在自然水体中灭多威残留量 (0 ~ 97 μg/L)^[8-10] 以及美国水质标准规定灭多威最高限量 (200 μg/L)^[11], 试验采用 5 个浓度梯度: 0、0.2、2.0、20.0、200.0 μg/L。每个浓度梯度设置 3 个平行, 在 300 L 水族缸中配制上述各浓度染毒液 200 L, 每个平行随机放入健康雄性罗非鱼 20 尾。采用半静态水接触染毒法进行试验, 各浓度组水缸每天更换 50% 的水, 并添加药物至原浓度。试验期 48 d, 前 30 d 为灭多威暴露试验阶段, 后 18 d 为清水恢复试验阶段 (无灭多威)。

为测定各试验组灭多威的实际含量, 参照张学健等^[12] 以及张冰等^[13] 的方法进行测定, 灭多威浓度分别为 0、0.2、2.0、20.0、200.0 μg/L 的试验组最初染毒时的灭多威含量分别为 0、0.23、2.12、21.50、182.00 μg/L, 24 h 后各浓度组灭多威含量为 0、0.21、1.92、18.52、179.00 μg/L。24 h 后各浓度组与染毒时的灭多威浓度相差不大。

1.5 样品采集 在染毒的第 30 天对 200 μg/L 灭多威处理组以及对对照组罗非鱼进行样品采集。采样前 24 h, 停止喂食。试验期间, 罗非鱼活跃、健康。采样时, 用 250 mg/L MS-222 麻醉罗非鱼, 对其体长和体重进行测定, 迅速将罗非鱼处死后采集精巢, 置于 RNAlater 保存液中, 最后在 -80 °C 超低温冰箱中贮存备用。

1.6 总 RNA 提取和 mRNA 的分离 取出超低温冰箱中保存的样品, 将其研成粉末。采用 TRIzol Reagent 提取试剂盒提取罗非鱼精巢组织总 RNA, 具体操作按照 TRIzol Reagent 提取试剂盒说明书进行。用乙醇将总 RNA 沉淀后, 溶于 DEPC 处理水中, 检测总 RNA 质量和浓度。样本 mRNA 经 Oligotex mRNA 试剂盒分离并纯化, 具体操作按试剂盒说明书进行。

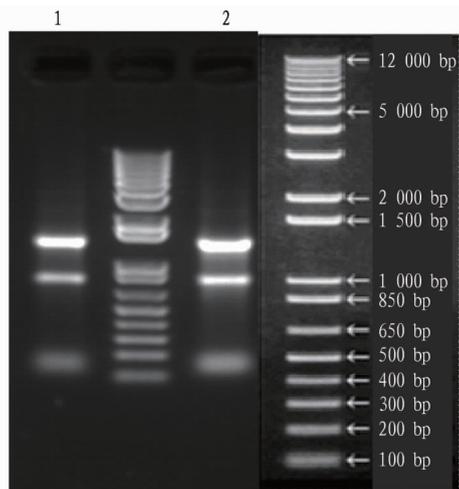
1.7 SSH 文库的构建 SSH 文库的构建采用 PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒, 将纯化的 mRNA 反转录成 cDNA, 加入反转录酶到 cDNA 第一链合成中, 用 *E.coli* 的 DNA 聚合酶 I 进行第二链的合成。以灭多威处理组精巢组织双链 cDNA 和对照组双链 cDNA 互为驱动方或实验方, 分别构建 SSH 正反向文库。将试验方双链 cDNA 分成 2 份, 分别与 Adaptor 1 和 Adaptor 2R 相连接。成功连接后, 将实验方 cDNA 同驱动方 cDNA 一起进行 2 次分子杂交, 杂交产物再进行 2 次特异 PCR。PCR 产物进行 T/A 克隆, 取文库菌液 50 μL, 涂于具有相应抗性的平板上, 37 °C 下培育过夜, 通过菌落 PCR 筛选阳性克隆, 保存菌种。鉴定菌落以 M13 F 和 M13 R 为引物, 采用 PCR 法鉴定阳性克隆。PCR 反应程序如下: 94 °C 4 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min, 反应体系为 20 μL, 4 °C 下保存 PCR 产物。随机挑选 64 个阳性克隆进行测序。

1.8 序列比对 去除 EST 有效序列载体以及接头序列后, 与 GenBank 数据库进行相似性比对, 分析对比序列所具有的功能。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 提取 使用 TRIzol Reagent 试剂盒, 提取灭多威处理组和对照组的罗非鱼精巢组织总 RNA, 并进行 2% 的

琼脂糖凝胶电泳检测。从图 1 可以看出, 18S 和 28S 两条清晰条带均位于 1 000 bp 以上, 无基因组污染, 即提取的 RNA 质量较好。



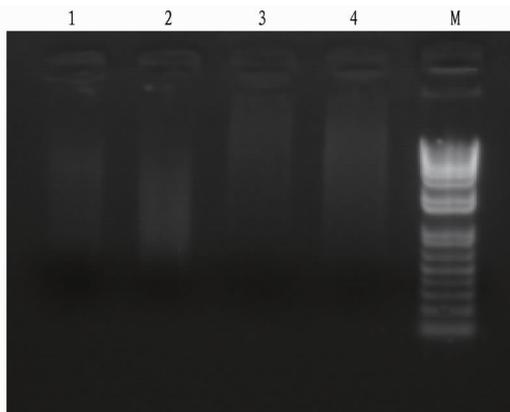
注: 1. 对照组; 2. 200 μg/L 灭多威处理组

Note: 1. Control group; 2. 200 μg/L methomyl treatment group

图 1 总 RNA 的琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig.1 The agarose gel electrophoresis results of total RNA

2.2 双链 cDNA 的合成与酶切 电泳检测罗非鱼双链 cDNA (图 2), 并且将 *Rsa* I 酶切前后的双链 cDNA 条带进行对比, 发现 *Rsa* I 酶切后的片段明显变小, 条带下移, 酶切效果好, 能够满足后续用于构建文库的试验要求。



注: 1. 对照组 *Rsa* I 酶切后双链 cDNA; 2. 灭多威处理组 *Rsa* I 酶切后双链 cDNA; 3. 对照组 *Rsa* I 酶切前双链 cDNA; 4. 灭多威处理组 *Rsa* I 酶切前双链 cDNA; M. DL2000 DNA marker

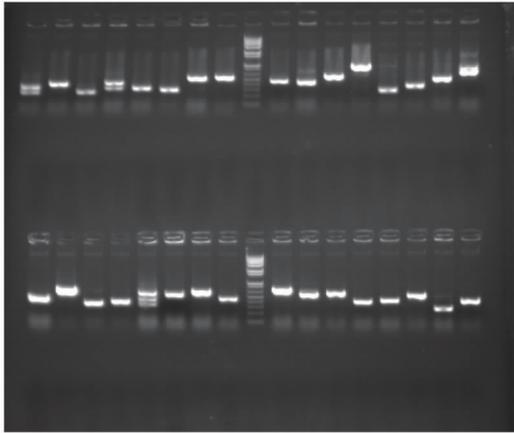
Note: 1. ds cDNA after *Rsa* I enzyme digestion in control group; 2. ds cDNA after *Rsa* I enzyme digestion in methomyl treatment group; 3. ds cDNA before *Rsa* I enzyme digestion in control group; 4. ds cDNA before *Rsa* I enzyme digestion in methomyl treatment group; M. DL2000 DNA marker

图 2 *Rsa* I 酶切前后双链 cDNA 的电泳图谱结果

Fig.2 The electrophoresis results of ds cDNA before and after *Rsa* I enzyme digestion

2.3 差异片段阳性克隆的筛选 将消减杂交后的片段连接到 pMD18T 载体上, 构建了灭多威胁迫下罗非鱼精巢组织正反向消减 cDNA 文库。随机挑取 36 个阳性克隆进行 PCR 筛

选鉴定,对 PCR 产物进行电泳,结果如图 3 所示。由图 3 可



知,重组率大于 95%,载体中的片段长度为 100~500 bp。

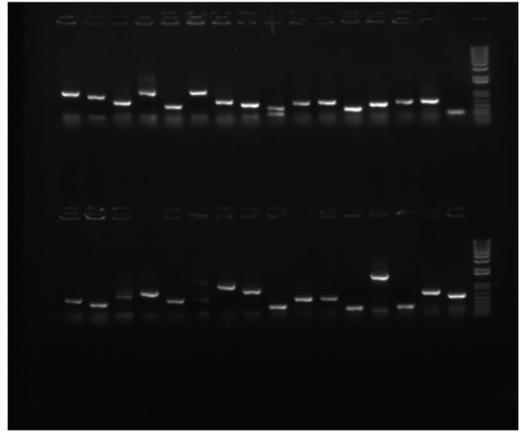


图 3 消减文库 cDNA 片段大小的 PCR 鉴定

Fig.3 PCR identification of cDNA fragment size of SSH library

2.4 阳性克隆测序及分析 随机挑选 64 个阳性克隆进行测序,得到 45 条 EST,将测序成功的序列除去载体和接头序列,最后进行 GenBank 数据库同源比对,对相同序列进行对比和拼接后成功注释得到 25 条基因序列,其中正向文库 13 条,反向文库 12 条。功能确定基因序列结果如表 1 所示。

表 1 功能确定基因序列结果

Table 1 The sequencing results of genes with confirmed functions

序号 No.	功能 Functions	克隆名称 Name of clones	调控作用 Regulatory effect
1	催化活性	17 α -羟化酶/17,20-裂解酶	上调
2	细胞	整合素 β 1	上调
3	细胞过程	Ca ²⁺ -ATPase	下调
4	细胞过程	Na ⁺ -K ⁺ -ATPase	下调
5	生物过程	低密度脂蛋白受体	上调
6	生物过程	丝/苏氨酸蛋白激酶 pim-3、磷脂酶 A2	下调
7	结构分子活性	核糖体蛋白 L22	下调

3 讨论

在该试验雌激素类农药灭多威胁迫下罗非鱼精巢组织 SSH 正向文库中,低密度脂蛋白受体、17 α -羟化酶/17,20-裂解酶表达量上调。低密度脂蛋白受体(LDLR)是细胞表面糖蛋白,它参与了卵巢、睾丸等甾源性组织的脂蛋白代谢过程。低密度脂蛋白经受体 LDLR 途径,摄取胆固醇在细胞内用于类固醇激素合成、细胞增殖等。17 α -羟化酶/17,20-裂解酶是体细胞色素 P450c17 酶,在胆固醇合成途径中控制性类固醇激素的合成^[14]。对鱼类而言,P450c17 酶在精巢中表达较多,而在卵巢中表达较少^[15]。鱼类性类固醇激素睾酮、11-酮基睾酮等则是体内胆固醇的衍生物,它们通过影响生精细胞和支持细胞活性,在精子发生过程中起着重要的调节作用^[16]。灭多威有环境雌激素内分泌干扰作用^[1],可能对罗非鱼类固醇激素的分泌有影响。孟顺龙^[17]研究发现,在高浓度灭多威胁迫下罗非鱼血清睾酮和 11-酮基睾酮含量显著降低。在环境雌激素灭多威胁迫下,精巢组织中低密度脂

蛋白受体蛋白、17 α -羟化酶/17,20-裂解酶表达量上调,可能是因罗非鱼精巢组织脂蛋白代谢或类固醇激素分泌受灭多威的干扰,从而引起机体的反馈机制,使得低密度脂蛋白受体、17 α -羟化酶/17,20-裂解酶表达量上调。

黏附连接主要是将相邻的 2 个细胞通过黏附分子而连接在一起,其中生精细胞则是通过黏附连接与支持细胞相连接。当黏附分子的数量改变或与胞质内的接头蛋白的关系发生改变后,将使得细胞之间的黏附发生改变^[18]。在该试验 SSH 正向文库中,整合素 β 1 表达量上调。整合素 α 6 和整合素 β 1 是生精上皮中 2 个重要的黏附分子,它们可以在支持细胞表面构成异源二聚体^[19],与精细胞表面层黏连蛋白相互作用,参与构成生精上皮的顶面 ES^[20]。因此,精巢组织中整合素 β 1 表达上调,可能是因环境雌激素灭多威对罗非鱼精巢组织黏附性造成影响而引起的反馈机制,使得整合素 β 1 表达上调,以维持精巢组织内部结构的稳定。

在罗非鱼精巢组织 SSH 反向文库中,丝/苏氨酸蛋白激酶 pim-3 表达下调。丝/苏氨酸蛋白激酶 pim-3 具有磷酸化凋亡蛋白 Bad,发送细胞生存信号的生物学作用。线粒体外膜的促凋亡蛋白 Bax 在凋亡蛋白 Bad 的作用下形成同源二聚体,增加线粒体膜通透性,释放细胞色素 Cyt_c,并激活 Caspase,诱发细胞凋亡^[21]。Bad 的活性形式是非磷酸化的,Bad 磷酸化后失去活性,能够抑制细胞凋亡^[22-23]。因此,丝/苏氨酸蛋白激酶 pim-3 表达下调,可能限制凋亡蛋白 Bad 磷酸化。在该试验 SSH 反向文库中,质膜 Ca²⁺-ATPase、Na⁺-K⁺-ATPase 表达下调。在正常情况下,细胞质膜中离子浓度呈现一种动态平衡状态,能够维持细胞结构、正常生理功能。Ca²⁺-AT-Pase、Na⁺-K⁺-ATPase 对细胞内膜结构上 Ca²⁺、Na⁺、K⁺离子稳态具有重要的调节作用,它们在主动运输中具有特定的离子运载功能,以维持组织或器官细胞膜上离子平衡。在灭多威胁迫下,Ca²⁺-ATPase、Na⁺-K⁺-ATPase 表达下调,这可能影响其对罗非鱼精巢组织细胞膜上离子浓度的调节,导致细胞膜上离子浓度的失衡,影响精巢组织细胞的正常生理功能。

在罗非鱼精巢组织 SSH 反向文库中,核糖体蛋白 L22 表达下调。李红艳^[24]发现在果蝇胚胎、幼虫 S2 细胞中敲除 L22 对细胞周期产生影响。孙凯等^[25]发现 L22 表达沉默时细胞周期蛋白 D1 显著降低,相应的细胞增殖受到显著抑制。这说明核糖体蛋白 L22 与细胞增殖周期有密切联系。因此,在灭多威胁迫诱导糖体蛋白 L22 表达下调,可能对精巢组织细胞增殖周期造成影响。另外,还有磷脂酶 A2 差异表达基因下调。磷脂酶 A2 主要水解甘油磷脂,参与磷脂代谢。磷脂酶 A2 表达下调,可能影响精巢组织的磷脂代谢过程。

4 结论

采用抑制消减杂交(SSH)技术,构建了罗非鱼精巢组织在雌激素类农药灭多威胁迫下的正反向 SSH 文库,并获得 8 条功能确定基因序列。对部分重要的差异表达基因的鉴定和分析表明,在环境雌激素灭多威胁迫下,罗非鱼精巢组织脂蛋白代谢或类固醇激素分泌受到干扰,引起机体防御机制,诱导低密度脂蛋白受体相关蛋白、17 α -羟化酶/17,20-裂解酶表达量上调;诱导整合素 β 1 表达量上调,以维持精巢组织内部结构的稳定;丝/苏氨酸蛋白激酶 pim-3 表达下调,可能限制凋亡蛋白 Bad 磷酸化。Ca²⁺-ATPase、Na⁺-K⁺-ATPase、核糖体蛋白 L22 表达下调,细胞膜上离子平衡以及精巢组织细胞增殖可能受到影响。

参考文献

- [1] 郭新彪.环境健康学[M].北京:北京大学医学出版社,2006.
- [2] SUN L,LEE H K.Stability studies of propoxur herbicide in environmental water samples by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization ion-trap mass spectrometry[J].Journal of chromatography,2003,1014(1/2):153-163.
- [3] 何瑞玲,齐景凯,张玉芬,等.通辽地区大米农药残留量调查[J].中国公共卫生管理,2007,23(5):464-466.
- [4] MENG S L, QIU L P, HU G D, et al. Effects of methomyl on steroidogenic gene transcription of the hypothalamic-pituitary-gonad-liver axis in male tilapia[J].Chemosphere,2016,165:152-162.
- [5] MENG S L, QIU L P, HU G D, et al. Responses and recovery pattern of sex steroid hormones in testis of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to sublethal concentration of methomyl[J].Ecotoxicology,2016,25(10):1805-1811.
- [6] MENG S L, QIU L P, HU G D, et al. Effect of methomyl on sex steroid hormone and vitellogenin levels in serum of male tilapia (*Oreochromis niloticus*) and recovery pattern[J].Environmental toxicology,2017,32(7):1869-

1877.

- [7] DIATCHENKO L, LAU Y F C, CAMPBELL A P, et al. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries[J].Pro Natl Acad Sci USA,1996,93(6):6025-6030.
- [8] 王静,刘铮铮,潘荷芳,等.浙江省市级饮用水源地氨基甲酸酯农药的分析、污染特征及健康风险研究[J].环境化学,2010,29(4):623-628.
- [9] VAN SCOY A R, YUE M, DENG X, et al. Environmental fate and toxicology of methomyl[J].Reviews of environmental contamination and toxicology,2013,222:93-109.
- [10] EL-SAEID M H, AL-TURKI A M, AL-WABLE M I, et al. Evaluation of pesticide residues in Saudi Arabia ground water[J].Research journal of environmental sciences,2011,5(2):171-178.
- [11] U.S.EPA.2012 edition of the drinking water standards and health advisories;EPA 822-S-12-001[S].Washington,DC:Office of Water U.S.Environmental Protection Agency,2012.
- [12] 张学健,程永红,李世荣.固相萃取/高效液相色谱法测定生活饮用水中氨基甲酸酯类农药[J].中国卫生检验杂志,2014,24(9):1243-1244,1247.
- [13] 张冰,傅晓钦,徐能斌,等.液相色谱-质谱法测定水中氨基甲酸酯类农药及其代谢物[J].化工环保,2010,30(4):364-367.
- [14] 王子梅,陆召麟,郭爱丽.肾上腺皮质类固醇激素合成过程的研究进展[J].国外医学(内分泌学分册),1997,17(4):167-173.
- [15] YU H S, CHENG H H, GUO Y Q, et al. Alternative splicing and differential expression of P450c17(CYP17) in gonads during sex transformation in the rice field eel[J].Biochemical and biophysical research communication,2003,307(1):165-171.
- [16] BORG B. Androgens in teleost fishes[J].Comparative biochemistry and physiology part C,1994,109(3):219-245.
- [17] 孟顺龙.环境雌激素灭多威对雄罗非鱼下丘脑-垂体-性腺轴和抗氧化防御系统的影响研究[D].南京:南京农业大学,2014.
- [18] CHENG C Y, MRUK D D. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development[J].Physiol Rev,2002,82(4):825-874.
- [19] SALANOVA M, STEFANINI M, DE CURTIS I, et al. Integrin receptor α 6 β 1 is localized at specific sites of cell-to-cell contact in rat seminiferous epithelium[J].Biol Reprod,1995,52(1):79-87.
- [20] LEE N P, CHENG C Y. Ectoplasmic specialization, a testis-specific cell-cell actin-based adherens junction type: Is this a potential target for male contraceptive development? [J].Hum Reprod Update,2004,10(4):349-369.
- [21] HÄCKER G, PASCHEN S A. The rapetuc targets in the mitochondrial apoptotic pathway[J].Expert Opin Ther Targets,2007,11(4):515-526.
- [22] ZHA J P, HARADA H, YANG E, et al. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X_L[J].Cell,1996,87(4):619-628.
- [23] YANG E, ZHA J P, JOCKEL J, et al. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-X_L and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death[J].Cell,1995,80(2):285-291.
- [24] 李红艳.核糖体蛋白 L22 对果蝇发育的影响及机制[J].河北大学学报(自然科学版),2014,34(1):64-69.
- [25] 孙凯,薛鸿,解卫平,等.核糖体蛋白 L22 表达沉默对细胞周期蛋白 D1 表达的影响[J].江苏医药,2015,41(23):2791-2793.

(上接第 70 页)

大肠杆菌的耐药性较为严重,已成为兽医临床用药中的一个严重问题,临床上应避免长期使用同一种药物;细菌的耐药性通过染色体或质粒介导在细菌间传播和扩散^[6-16]。该研究结果为进一步深入研究免源大肠杆菌耐药性机制奠定了基础。

参考文献

- [1] 陆德源.医学微生物学[M].北京:人民卫生出版社,2001:139.
- [2] 翁巧琴,袁新强,翁邵国,等.獭兔腹泻病原的分离、鉴定与药敏试验[J].中国养兔,2008(5):32-34.
- [3] 周庆甫.家兔腹泻成因与防治措施探析[J].山东畜牧兽医,2017,38(5):25-26.
- [4] 马长旺,吴敏秋.引起兔腹泻的原因分析与防治对策[J].当代畜牧,2013(3):28-31.
- [5] 高文玉.幼兔腹泻主要病因分析与综合防治[J].黑龙江畜牧兽医,2012(7):108-110.
- [6] 贺丹丹,黄良宗,陈孝杰,等.不同动物源大肠杆菌的耐药性调查[J].中

国畜牧兽医,2013,40(10):211-215.

- [7] 韩劼.獭兔致病性大肠杆菌的分离鉴定及灭活苗的制备[D].长春:吉林农业大学,2014.
- [8] 李双双,贺志沛,罗俊娜,等.免源大肠杆菌的分离鉴定及药物敏感性检测研究[J].江西农业学报,2013,25(8):70-72.
- [9] 刘保光,李胜利,杨东东,等.河南省免源大肠杆菌氨基糖苷类、四环素类和磺胺类耐药基因检测[J].家畜生态学报,2016,37(7):60-63.
- [10] 李守现.免源大肠杆菌耐药性检测与分析[J].中兽医医药杂志,2017,36(4):47-49.
- [11] 张炳亮,王文文,杨国栋,等.洛阳地区规模化猪场大肠杆菌耐药基因检测及耐药性分析[J].黑龙江畜牧兽医,2018(5):125-128.
- [12] 坤青芳,耿毅,余泽辉,等.免源大肠杆菌对喹诺酮药物耐药性及质粒介导的耐药基因检测[J].中国预防兽医学报,2016,38(12):944-948.
- [13] 坤青芳,耿毅,余泽辉,等.免源产 ESBLs 大肠杆菌耐药性与优势基因型研究[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2018,46(1):15-20,29.
- [14] 叶超群,王晓艺,常维山.泰安一兔养殖场大肠杆菌耐药性的检测[J].山东畜牧兽医,2017,38(6):4-6.
- [15] 石彬,孙艳,泽仁拥忠,等.凉山州不同动物源大肠杆菌耐药性调查[J].黑龙江畜牧兽医,2018(4):115-119.
- [16] 王志宇,王国艳,薛俊龙,等.山西省鸡源性大肠杆菌多重耐药性分析[J].山西农业科学,2018,46(2):272-275.