

## B-S3-13

## 铜绿假单胞菌中 c-di-gmp 相关的突变菌株的研究

黄婷<sup>1</sup>, 杨慧<sup>2</sup>, 王浩<sup>1</sup>, 闫军<sup>1</sup>; 指导教师: 黄卫东, 王银

1. 宁夏医科大学 2012 级医学影像学

2 宁夏医科大学 2012 级临床医学

**【立论依据】** 作为一种新型而广泛存在的第二信使, 环鸟苷二磷酸(c-di-GMP)调控细菌的运动性、生物膜合成、细菌毒性、细胞周期等多种生理过程; 而这些功能均与细菌的致病性及耐药性密切相关。在细菌中, 环鸟苷二磷酸的代谢及胞内水平是由两种催化功能相反的酶共同起作用: 鸟苷酸环化酶(diguanylate cyclase, DGCs)将两分子 GTP 转化生成一分子 c-di-GMP; 而环鸟苷二磷酸特异的磷酸二酯酶(phosphodiesterase, PDEs)则将 c-di-GMP 分解为 pGpG, 并最终水解为 GMP。鸟苷酸环化酶具有高度保守的 GGDEF 蛋白结构域, 环鸟苷二磷酸特异的磷酸二酯酶则具有 EAL 结构域或较为少见的 HD-GYP 结构域, 这些蛋白统称为环鸟苷二磷酸代谢蛋白(c-di-GMP metabolizing proteins)。铜绿假单胞菌模式菌株 PAO1 中有多达 38 个含 GGDEF 及 EAL 结构域的蛋白; 然而, 环鸟苷二磷酸是水溶性的小分子化合物; 细胞内却存在如此多的担负环鸟苷二磷酸代谢功能的基因, 这些具有“重叠性”的基因功能及其相互协调的机制完全不清楚。

**【设计思路】** 基因突变将导致表型变化, 由此将表型与基因型相联系, 从而使得对特定基因功能进行分析成为可能。

**【实验内容】** 本研究利用细菌表型分析及 PCR 手段, 比较不同的基因在细菌的生物膜合成及泳动性中的作用。

**【材料】** 以课题组拥有的多个 GGDEF 及 EAL 结构域突变的铜绿假单胞菌突变菌株为主要研究对象。

**【可行性】** (1)已经拥有多个环鸟苷二磷酸代谢相关的突变菌株, 实验材料有所保证; (2)涉及到的实验方法, 例如细菌培养及 PCR, 均较为规范和易于掌握。

**【创新性】** 本项研究中涉及到的多个基因均未见详细的分析、鉴定; 我们将以野生型为对照, 在确定基因型的基础上, 对突变体菌株的表型进行较为精细的分析、比较, 由此为未来进一步的研究工作奠定基础。

**关键词:** 铜绿假单胞菌; 环鸟苷二磷酸; GGDEF 及 EAL 结构域; 基因型; 表型

## B-S3-14

## 博卡病毒 MVC 对 MDCK 细胞的感染能力分析

金彦国<sup>1</sup>, 马鑫<sup>2</sup>, 陈芳明<sup>1</sup>; 指导教师: 孙玉宁, 张茜

1. 宁夏医科大学 2012 级生物技术

2. 宁夏医科大学 2012 级医学影像学

**【立论依据】** 犬亚型博卡病毒 MVC 属于细小病毒家族成员。病毒能够在不同的物种及生物体间发生种属间的感染和疾病传播, 关于博卡病毒在不同物种间的传播和感染方面的报道甚少。实验指导教师在前期研究发现, 博卡病毒 MVC 的感染性克隆载体能够在一些非犬来源的细胞系中进行 DNA 的复制并形成完整具有感染能力的病毒颗粒, 但是 MVC 并不能感染这些细胞系。MVC 能否感染犬来源的 MDCK 细胞系, 其感染能力如何? 这就是我们实验设计的出发点。

**【设计思路】** 用犬来源 WRD 细胞(MVC 的嗜性细胞, 感染的阳性对照)和 MDCK 细胞系作为感染对象, 采用不同感染滴度 MVC 与 2 种细胞孵育, 用免疫荧光技术、RT-PCR 观察细胞中是否有病毒基因表达; 采用 MTT 法观察细胞增殖能力的变化, 依此确认 MVC 对 MDCK 细胞的感染能力。

**【实验内容】** (1) Real-time PCR 技术检测胞中 MVC 病毒基因 mRNA 的表达; WRD 细胞、MDCK 细胞铺 60 mm 培养皿之后与 MVC 病毒孵育 1 h 后, 换培养液并继续培养 24 h, 提取细胞 RNA 并进行 PCR 检测; (2) 免疫荧光技术检测细胞中 MVC 病毒蛋白的表达; 细胞在 6 孔培养板中(底部覆盖载玻片)进行细胞爬片之后, 与 MVC 病毒孵育 1 h 后, 换培养液继续培养 24 h, 通过免疫荧光技术检测 MVC 病毒蛋白的表达; (3) MTT 法观察受感染细胞增殖及活力水平: 细胞铺 96 孔培养皿后与不同 MVC 病毒滴度孵育 1 h 后, 换培养液继续培养 72 h, 通过 MTT 法观察受感染细胞增殖及活力水平。

**【材料】** WRD、MDCK 细胞系、博卡病毒 MVC、靶向病毒蛋白的抗体是实验室的基本储备材料; 需要 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、PCR 引物、荧光二抗、MTT 检测试剂盒及其他常用试剂等均可从生物试剂公司购买或合成; 实验室拥有 PCR 仪、酶标仪、荧光显微镜等实验所需的主要仪器。

**【可行性】** 病毒能够在不同的物种及生物体间进行感染和疾病传播是本实验设计的理论前提; 指导教师前期的研究成果, 为本实验设计提供了充分的、扎实的理论根据和支持。

**【创新性】** 研究博卡病毒 MVC 对非嗜性细胞系 MDCK 的感染能力。实验内容迄今国内未见相关报道, 在国际上亦处前沿研究, 具有创新性。

**关键词:** 博卡病毒 MVC; MDCK 细胞; 感染能力

## B-S3-15

# 青岛地区大肠埃希菌中整合子与耐药性的分析

周宇石, 李梦娇, 郭丽萍, 滕浩波; 指导教师: 于红

青岛大学医学院 2010 级临床医学

**【立论依据】** 大肠埃希菌是临床常见的条件致病菌, 耐药率有逐年上升的趋势。近年研究表明, 整合子在细菌多重耐药性的形成和水平传播中发挥重要作用, 且整合子的分布及其携带的基因盒存在明显的地区差异性。因此, 检测不同地区大肠埃希菌中整合子的分布及耐药基因盒, 对于控制细菌耐药及合理应用抗菌药物具有重要的指导意义。

**【设计思路】** 本研究通过检测青岛地区临床分离的大肠埃希菌中 I 类、II 类及 III 类整合子的分布及携带的耐药基因盒, 分析整合子与耐药表型的关系, 旨在探讨整合子在介导大肠埃希菌耐药中的作用。

**【实验内容】** 琼脂纸片扩散法进行药敏试验; 分别设计针对 I、II、III 类整合子整合酶基因及可变区的 PCR 引物, PCR 检测整合子的整合酶基因, 对整合酶基因阳性菌株进行可变区基因的 PCR 扩增, 回收纯化的 PCR 产物克隆至 T 载体, 将筛选鉴定的重组子送往华大基因公司测序, 测序结果经在线 Blast 及 DNASTAR 软件进行同源性比对分析, 确定整合子携带的耐药基因盒。应用 SPSS 21.0 统计软件分析大肠埃希菌耐药性与整合子的相关性。

**【材料】** 78 株大肠埃希菌分离自青岛市立医疗集团住院患者的各类标本, 细菌 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司, PCR 引物由 Invitrogen 公司合成, pMD18-T 载体购自大连 TaKaRa 公司。

**【可行性】** 前期研究结果表明: 78 株大肠埃希菌对环丙沙星、左氧氟沙星、头孢唑林、头孢呋辛、复方新诺明、氨曲南、头孢曲松及哌拉西林的耐药率均超过 70%; I 类整合子的携带率为 53.89%, 其中 I 类整合子阳性菌株对复方新诺明的耐药率明显高于整合子阴性菌株, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); I 类整合子可变区检测出 3 种不同长度的片段: 2 株 750 bp 片段不携带耐药基因盒, 8 株 1 800 bp 片段携带 dfrA17-aadA5 基因盒, 1 株 1 200 bp 片段为 aadA22 基因盒; I 类整合子阳性菌株中携带耐药基因盒的菌株占 61.90%, 对复方新诺明的耐药率明显高于基因盒阴性菌株 ( $P < 0.01$ )。

**【创新性】** 首次研究青岛地区大肠埃希菌中整合子的分布及其携带的耐药基因盒, 探讨整合子与大肠埃希菌耐药性的关系。

**关键词:** 大肠埃希菌; 整合子; 基因盒; 耐药