

【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