

健康鸡源肺炎克雷伯菌检测到质粒介导喹诺酮 耐药 qnrA 基因

岳磊, 陈雪影, 庄娜, 廖晓萍, 何家欣, 时伟, 李树娟, 刘雅红
(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:通过 PCR 技术检测 195 株健康动物肠杆菌中 qnrA 基因的流行情况;琼脂稀释法对 qnrA 阳性菌株进行 8 种抗菌药物的药物敏感性试验;质粒接合转移试验研究 qnrA 的可转移性;Southern 杂交对 qnrA 基因进行定位;PCR 检测 qnrA 阳性菌中 I 类整合酶 intI 基因的携带情况. 结果表明,195 株肠杆菌中检出 1 株 qnrA 阳性的肺炎克雷伯菌 *Klebsiella pneumoniae* GDKA1,经 Blast 鉴定为 qnrA1. 药物敏感性试验表明 GDKA1 对磺胺甲恶唑、氨苄西林、大观霉素、氯霉素、四环素耐药,对环丙沙星(MIC = 0.019 mg · L⁻¹),头孢噻吩(MIC = 0.047 mg · L⁻¹)表现敏感,对萘啶酸(MIC = 12 mg · L⁻¹)表现为部分敏感. 接合试验表明 qnrA1 位于可转移的质粒上,且可以通过接合试验水平传播. 接合子 T_{GDKA1}对喹诺酮类药物的敏感性比大肠埃希菌 *Escherichia coli* J53 Az^R 稍高,但远低于 GDKA1. Southern 杂交进一步证实了 qnrA1 基因位于质粒上. T_{GDKA1}的质粒扩增出 intI1,表明 qnrA1 阳性菌株携带 I 类整合子. 可见,qnrA1 基因已在健康鸡源肺炎克雷伯菌中出现且同时携带 I 类整合子位于质粒上,整合子灵活多样的存在方式和传播方式为 qnrA 基因的传播提供了便利条件,整合子可能携带 qnrA 基因通过食物链传播给人,因此健康动物共生菌携带 qnrA1 基因值得注意.

关键词:健康动物;肺炎克雷伯菌;qnrA1 基因;整合子
中图分类号:S852 文献标志码:A 文章编号:1001-411X(2012)02-0259-05

Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinant qnrA Gene in *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Health Chickens

YUE Lei, CHEN Xue-ying, ZHUANG Na, LIAO Xiao-ping,
HE Jia-xin, SHI Wei, LI Shu-juan, LIU Ya-hong
(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract:All of the 195 clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from chickens were screened for the qnrA by PCR. Susceptibility of qnrA-producing to 8 antimicrobial agents was determined by agar disc diffusion method. Conjugation experiment was performed by using *Escherichia coli* J53 Az^R as the recipient strain. Southern hybridization was done with plasmid DNA and genetic DNA. IntI I was screened from the qnrA positive strains. The results showed that a qnrA1 gene was identified in a *Klebsiella pneumoniae* GDKA1. GDKA1 showed resistance to sulfamethoxazole, ampicillin, spectinomycin, chloramphenicol, and tetracycline, susceptible to ciprofloxacin (MIC = 0.019 mg · L⁻¹) and cefotaxime (MIC = 0.047 mg · L⁻¹) and intermediate to nalidixic acid (MIC = 12 mg · L⁻¹). A transconjugant was selected during the conjugation experiment and hybridization with qnrA1-specific probes revealed that the qnrA1 gene was located in plasmid DNA. Tranconjugant T_{GDKA1} showed a little higher quinolone MIC than *E. coli* J53 Az^R but not as high as GDKA1. IntI1 was detected in qnrA gene positive strain. In conclusion, qnrA1 gene in *K.*

收稿日期:2011-07-14
作者简介:岳磊(1981—),男,博士;通信作者:刘雅红(1966—),女,教授,博士,E-mail:gale@scau.edu.cn
基金项目:国家自然科学基金—广东省政府自然科学基金联合基金重点项目(U0631006);广东省自然科学基金创新团队项目(5200638);教育部创新团队项目(IRT0723);第 45 批中国博士后科学基金面上资助项目(20090450875).

pneumoniae isolated from health chicken might be transmitted together with class I integron to people through food chain. The presence of *qnrA1* gene in health animal commensal bacteria should be noticed.

Key words: healthy animal; *Klebsiella pneumoniae*; *qnrA* gene; integron

随着喹诺酮类抗菌药的广泛应用,细菌对该类药物的耐药日趋严重. 通常细菌对喹诺酮类耐药主要由染色体上靶位(DNA 旋转酶及拓扑异构酶 IV)突变或者是主动外排机制^[1-2]所致. 近年来人们陆续发现了各种质粒介导喹诺酮耐药(Plasmid mediated quinolone resistance, PMQR)机制:*qnr* (*qnrA*、*qnrB*、*qnrS*、*qnrC*、*qnrD*), *aac* (6')-Ib-cr, *qepA*^[3]和 *oqx-AB*^[4-5]. 有关 PMQR 在人类医学临床分离肠杆菌的流行情况,在美国^[4-5]、中国^[6-7]、法国^[8]、德国^[9]、韩国^[10]和土耳其^[11]等许多国家均有报道. 但兽医临床 PMQR 的流行报道相对较少,尤其是 *qnrA* 基因. 与人类医学临床所不同的是,动物源 *qnrA* 基因的检出率相对较低^[12]. 我国兽医临床 PMQR 的流行调查工作开展较早^[13-14],但在健康动物 PMQR 的流行情况报道较少. 特别是还没有肠道常在肺炎克雷伯菌 *Klebsiella pneumoniae* 中 *qnrA* 基因的报道. 本研究拟采用 PCR 检测健康动物源肠杆菌中 *qnrA* 基因的携带情况,采用临床与试验标准协会(CLSI)所推荐的琼脂稀释法^[15]对 *qnrA* 基因阳性菌株进行 8 种抗菌药物的药物敏感性试验,并通过质粒的接合转移试验研究 *qnrA* 的可转移性. 采用 Southern 杂交试验对 *qnrA* 基因进行定位. 通过 PCR 扩增测序 *qnrA* 基因阳性菌株的 I 类整合酶,进一步深入研究 *qnrA* 基因的传播.

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

分离自广东健康鸡直肠拭子的 195 株肠杆菌(每只鸡分离 1 株). 大肠埃希菌 *Escherichia coli* J53 Az^R(对叠氮化合物耐药,由复旦大学附属华山医院王明贵教授馈赠)作为接合试验的受体菌. *E. coli* DH5 α 感受态细胞用于 PCR 产物的克隆转化. 细菌培养条件为 LB 营养肉汤或 MH 琼脂培养基,37 ℃ 培养. 8 种抗菌药物购自杭州天河微生物试剂有限公司,药物含量分别为:萘啶酸(Nalidixic acid, NAL)90%,环丙沙星(Ciprofloxacin, CIP)90%,磺胺甲恶唑(Sulfamethoxazole, SMZ)99.8%,氨苄西林(Ampicillin, AMP)90%,头孢噻肟(Cefotaxime, CTX)90%,大观霉素(Spectinomycin, SC)90%,氯霉素(Chloramphenicol, CHL)90%,四环素(Tetracycline, TET)

93%. 质粒 DNA 中等量抽提试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒均为德国 QIAGEN 公司产品. 限制性内切酶、*rTaq* 酶、*LA Taq* 酶、pMD19-T 载体连接试剂盒以及细菌基因组 DNA 小量纯化试剂盒均为 TaKaRa 公司产品. Southern 杂交用 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 试剂盒由美国 Roche 公司出品. 特异性引物合成与 DNA 测序均由上海英俊公司完成.

1.2 方法

1.2.1 *qnrA* 基因的 PCR 检测及测序 用煮沸法提取 DNA 模版,针对 *qnrA* 基因的特异性引物见表 1. PCR 扩增程序为:94 ℃ 5 min;94 ℃ 1 min;50 ℃ 45 s, 72 ℃ 45 s, 32 个循环;终延伸 72 ℃ 5 min. 产物经 QIAquick 回收试剂盒纯化后,与 pMD19-T 载体连接,转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞. 送英俊公司测序.

表 1 PCR 引物序列
Tab. 1 Primers for PCR

目的基因	引物序列(5'→3')	目的片段/bp	参考文献
<i>qnrA</i>	ACGCCAGGATTGAGTGACAGC	602	[4]
	CTATGACTCCCAAGGGTTCCAGC		
<i>intI1</i>	AACAAACGATGCTCGCCTTCCA	314	[15]
	CCAACCGAACAGGCTTATGTCCACT		

1.2.2 药物敏感性测定 采用临床与试验标准协会(CLSI)所推荐的琼脂板稀释法进行.

1.2.3 接合转移试验 以大肠埃希菌 J53 Az^R 作为受体菌. 将孵育至对数生长期的供体菌和受体菌在 LB 肉汤中按体积比 1:4 的比例混合均匀,37 ℃ 孵育 4 h 后,接种于含叠氮化合物(100 mg/L)及磺胺甲恶唑(200 mg/L)的胰化大豆琼脂(TSA)平皿. 37 ℃ 培养过夜,挑取外白里红的疑似接合子,PCR 扩增测序鉴定.

1.2.4 质粒、染色体 DNA 提取和 Southern 杂交 采用 Qiagen Plasmid Midi Kit 和细菌基因组 DNA 小量纯化试剂盒提取 *qnrA* 阳性菌 GDKA1 及其接合子 T_{GDKA1} 的质粒和染色体 DNA. 按照美国 Roche 公司 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 试剂盒使用说明书对 GDKA1 及 T_{GDKA1} 的质粒和染色体 DNA 进行 Southern 杂交试验.

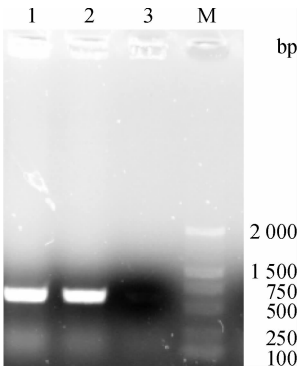
1.2.5 I 类整合酶 *intI* 基因的 PCR 检测及测序
以接合子质粒为模板,针对 *intI* 基因的特异性引物见表 1. PCR 扩增程序为:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s;57 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s,32 个循环;终延伸 72 ℃ 5 min. 产物经回收、TA 克隆后测序.

1.2.6 PCR 扩增产物的序列分析 利用 NCBI(National Center for Biotechnology Information)推荐的 Blast 程序在 GenBank™中对目的基因序列进行同源检索分析.

2 结果与分析

2.1 qnrA 基因的 PCR 检测及测序

195 株动物源肠杆菌中,检测到 1 株(0.51%) *qnrA* 基因阳性肺炎克雷伯菌 GDKA1,所检测到的 *qnrA* 基因经 Blast 分析证实为 *qnrA1* 基因. PCR 产物电泳结果见图 1.



1:阳性对照;2:菌 GDKA1;3:阴性对照;M:DNA marker DL2000.

图1 qnrA 基因 PCR 结果

Fig.1 PCR products of qnrA gene

2.2 药物最小抑菌质量浓度(MIC)测定

GDKA1 对磺胺甲恶唑、氨苄西林、大观霉素、氯霉素和四环素耐药,对环丙沙星(MIC =0.019 mg · L⁻¹)、头孢噻肟(MIC =0.047 mg · L⁻¹)表现敏感,对萘啶酸(MIC =12 mg · L⁻¹)表现为部分敏感(表 2).

表 2 GDKA1 与接合子 T_{GDKA1} 的 MIC¹⁾

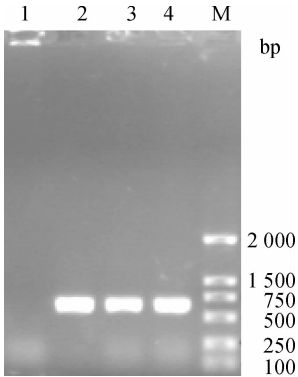
Tab.2 MICs of GDKA1 and T_{GDKA1}

菌株	MIC/(mg · L ⁻¹)							
	CIP	NAL	SMZ	AMP	CTX	SC	CHL	TET
GDKA1	0.019	12	>1 024	>256	0.047	32	96	64
T _{GDKA1}	0.0194	8	>1 024	>256	0.047	32	3	64
J53 Az ^R	0.008	4	16	8	0.08	8	3	1

1) CIP:环丙沙星;NAL:萘啶酸;SMZ:磺胺甲恶唑;AMP:氨苄西林;CTX:头孢噻肟;SC:大观霉素;CHL:氯霉素;TET:四环素.

2.3 接合转移试验

接合子 T_{GDKA1} 经 PCR 检测为 *qnrA* 基因阳性,PCR 产物电泳结果见图 2. 与供体菌比较,T_{GDKA1} 对喹诺酮类药物的 MIC 值均有明显下降,但比大肠埃希菌 J53 Az^R 稍高(表 2).



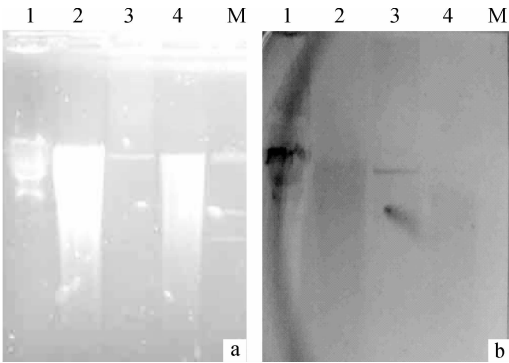
1:阴性对照;2:阳性对照;3、4:接合子 PCR 产物;M: DNA marker DL2000.

图2 接合子 T_{GDKA1} qnrA 基因 PCR 结果

Fig.2 PCR products of T_{GDKA1} qnrA gene

2.4 提取质粒、染色体 DNA 和 Southern 杂交

提取 GDKA1 和 T_{GDKA1} 的质粒,发现 GDKA1 携带 3 个大小不一的质粒,而其接合子 T_{GDKA1} 只携带 1 个与 GDKA1 最大质粒 23 kb 一致的质粒. GDKA1 和 T_{GDKA1} 的染色体 DNA 都为一条约 23 kb 的条带. GDKA1 和 T_{GDKA1} 质粒、染色体 DNA 电泳及 Southern 杂交结果表明,质粒 DNA 有明显的条带,而染色体 DNA 无明显条带(图 3).



a:电泳图;b:杂交图;1:GDKA1 质粒;2:GDKA1 染色体 DNA;3:T_{GDKA1} 质粒;4:T_{GDKA1} 染色体 DNA;M:DNA Hind III marker.

图3 GDKA1 和 T_{GDKA1} 质粒与染色体 DNA 的电泳与杂交图

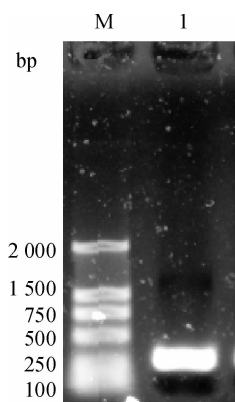
Fig.3 Plasmid DNA,genetic DNA and southern blotting of GDKA1 and T_{GDKA1}

2.5 I 类整合酶 *intI* 基因的 PCR 检测及测序

接合子的质粒扩增出 314 bp 片段(图 4),测序结果为 *intI1*.

2.6 核酸序列登录号

QnrA1 基因序列已在美国核酸数据库 GenBank 成功登录(GenBank 登录号为 EU722351).



M: DNA marker DL2000; I: T_{GDKA} 质粒的 PCR 产物.

图4 intI1 基因 PCR 产物电泳图

Fig. 4 intI1 PCR product

3 讨论与结论

自1998年Martinez-Martinez等^[16]在一肺炎克雷伯氏菌临床分离株中发现质粒介导的喹诺酮类耐药基因 *qnrA* 后,该基因在大肠埃希菌、产酸克雷伯菌 *Klebsiella oxytoca*、沙门氏菌 *Salmonella* spp.、阴沟肠杆菌 *Enterobacter cloacae*、产气肠杆菌 *Enterobacter aerogenes*、奇异变形杆菌 *Proteus mirabilis* 中均有发现^[6,8,17-21]. 很多国家及地区对该酶的流行病学进行了研究,其检出率在各地不同菌种及不同耐药水平的细菌中,从<1%~>20%不等^[22].

本研究在195株健康动物源肠杆菌中只发现了1株 *qnrA1* 基因携带株,结果 *qnrA* 的检出率为0.51%,检出率很低. 但上述有关 *qnrA* 基因流行情况的报道中,所筛查的细菌多为临床分离菌且是临床分离株中耐第3代头孢菌素或产ESBL的菌株,故检出率相对健康动物高很多. 本研究也在国内报道了携带 *qnrA* 基因的动物源肺炎克雷伯菌.

接合转移试验结果表明,*qnrA1* 基因位于可转移质粒上,并且可以随质粒在不同细菌之间水平转移. 也有研究表明,携带 *qnrA* 基因的质粒可以在体外从供体菌转移到受体菌,这从某种程度上促进了喹诺酮类耐药的传播^[23]. Southern杂交结果也证实了 *qnrA1* 基因位于质粒上.

含 *qnrA* 基因的临床株 GDKA1 的喹诺酮类耐药水平比其相应的结合子高倍. 表明 GDKA1 可能同时存在 DNA 旋转酶和拓扑异构酶 IV 基因的变异,这些变异在耐药的大肠埃希菌临床株中常见,同时也可能存在主动外排机制. 研究表明, *qnrA* 基因常位于 I 类整合子的 3'保守区域. 整合子是一种可移动的基因原件,通过对耐药基因(基因盒)的捕获而携带多种耐药基因,整合子灵活多样的存在方式和传播方式为 *qnrA* 基因的传播提供了便利条件^[6,8]. 本研究 *qnrA* 基因阳性的菌株也同时检测到 I 类整合酶,

证实了整合子的存在. 因此本研究中的 *qnrA* 基因可能在整合子的协助下通过食物链传播给人. 具体的传播方式有待进一步的研究.

综上所述,本研究在195株健康动物肠杆菌中只检出1株 *qnrA* 基因阳性的肺炎克雷伯菌. 虽然这一比例很低,但由于此类基因具有质粒携带的特点,且同时携带 I 类整合子,可以通过克隆或水平转移耐药基因^[24]. 因此动物源耐药基因可能通过食物链或其他接触途径转移到人源正常的肠道寄生菌^[25]. 在健康动物源细菌接合质粒上的 *qnrA1* 基因使得质粒介导喹诺酮类耐药基因在喹诺酮类耐药迅速传播方面值得注意.

参考文献:

- [1] NIKAIDO H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2003, 67(4): 593-656.
- [2] POOLE K. Efflux-mediated antimicrobial resistance[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2005, 56(1): 20-51.
- [3] STRAHILEVITZ J, JACOBY G A, HOOPER D C, et al. Plasmid mediated quinolone resistance: a multifaceted threat[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2009, 22(4): 664-689.
- [4] WANG Ming-gui, SAHM D F, JACOBY G A, et al. Emerging plasmid-mediated quinolone resistance associated with the *qnr* gene in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in the United States[J]. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 2004, 48(4): 1295-1299.
- [5] ROBICSEK A, SAHM D F, STRAHILEVITZ J, et al. Broader distribution of Plasmid-mediated quinolone resistance in the United States[J]. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 2005, 49(7): 3001-3003.
- [6] WANG Ming-gui, TRAN J H, JACOBY G A, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai China[J]. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 2003, 47(7): 2242-2248.
- [7] 李涛, 熊自忠, 沈继录, 等. 大肠埃希菌与克雷伯菌属细菌 *qnr* 基因的检测[J]. 检验医学杂志, 2005, 25: 112-114.
- [8] MAMMERI H, LOO M V D, POIREL L, et al. Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe[J]. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 2005, 49(1): 71-76.
- [9] JONAS D, BIEHLER K, HARTUNG D, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance in isolates obtained in German intensive care units[J]. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 2005, 49(2): 773-775.
- [10] JEONG J, YOON H J, KIM E S, et al. Detection of *qnr* in clinical isolates of *Escherichia coli* from Korea[J]. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 2005, 49(6): 2522-2524.
- [11] NAZIC H, POIREL L, NORDMANN P. Further identification of plasmid mediated quinolone resistance determinant

- in *Enterobacteriaceae* in Turkey[J]. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*,2005,49(5):2146-2147.
- [12] YUE Lei, JIANG Hong-xia, LIAO Xiao-ping, et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in poultry and swine clinical isolates of *Escherichia coli* [J]. *Veterinary Microbiology*,2008,132(3/4):414-420.
- [13] MA Jun-ying, ZENG Zhen-ling, CHEN Zhang-liu, et al. High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, and *qepA* among ceftiofur-resistant *Enterobacteriaceae isolates* from companion and food-producing animals[J]. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*,2009,53(2):519-524.
- [14] HUANG Si-yang, DAI Lei, XIA Li-ning, et al. Increased prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in chicken *Escherichia coli* isolates from 2001 to 2007 [J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2009, 6(10):1203-1209.
- [15] Clinical, Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests for bacteria isolated from animals: Approved standard [M]. 3rd ed. Wayne,PA: Clinical, Laboratory Standards Institute,2008.
- [16] MARTÍNEZ-MARTÍNEZ L, PASCUAL A, JACOBY G A. Quinolone resistance from a transferable plasmid[J]. *Lancet*,1998,351(9105):797-799.
- [17] POIREL L, VILLA L, BERTINI A, et al. Expanded-spectrum β -actamase and plasmid-mediated quinolone resistance[J]. *Emerg Infect Dis*,2007,13(5):803-805.
- [18] POIREL L, LEVIANDIER C, NORDMANN P. Prevalence and genetic analysis of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA and QnrS in *Enterobacteriaceae* isolates from a French university hospital[J]. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*,2006,50(12):3992-3997.
- [19] CHEUNG T K, CHU Y W, CHU M Y, et al. Plasmid-mediated resistance to ciprofloxacin and cefotaxime in clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in Hong Kong[J]. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*,2005,56(3):586-589.
- [20] CHU Y W, CHEUNG T K, NG T K, et al. Quinolone resistance determinant qnrA3 in clinical isolates of *Salmonella* in 2000 – 2005 in Hong Kong[J]. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*,2006,58(4):904-905.
- [21] CAMBAU E, LASCOLS C, SOUGAKOFF W, et al. Occurrence of qnrA-positive clinical isolates in French teaching hospitals during 2002-2005[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2006,12(10):1013-1020.
- [22] BASS L, LIEBERT C A, LEE M, et al. Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in avian *Escherichia coli* [J]. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*,1999,43(12):2925-2929.
- [23] CORKILL J, ANSON J, HART C. High prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnrA in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* from blood cultures in Liverpool, UK [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*,2005,56(6):1115-1117.
- [24] SALYERS A A, GUPTA A, WANG Y. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes [J]. *Trends in Microbiology*,2004,12(9):412-416.
- [25] SALYERS A, SHOEMAKER N B. Reservoirs of antibiotic resistance genes[J]. *Animal Biotechnology*,2006,17(2):137-146.

【责任编辑 李晓卉】

(上接第258页)

参考文献:

- [1] TIAN Ke-gong, YU Xiu-ling, ZHAO Tie-zhu, et al. Emergence of fatal PRRSV variants; Unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark[J]. *PloS ONE*,2007,2(6):526-535.
- [2] WENSVOORT G, DE KLUYVER E P, LUIJTZE E A, et al. Antigenic comparison of Lelystad virus and swine infertility and respiratory syndrome virus[J]. *J Vet Diagn Invest*,1992,4(2):134-138.
- [3] GAO Zhi-qiang, GUO Xin, YANG Han-chun, et al. Genomic characterization of two Chinese isolates of Porcine respiratory and reproductive syndrome virus[J]. *Arch Virol*, 2004,149(7):1341-1351.
- [4] PIRZADEH B, DEA S. Immune response in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of porcine reproductive and respiratory[J]. *J Gen Virol*,1998,79(5):989-999.
- [5] NELSEN C J, MURTAUGH M P, FAABERG K S. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: Divergent evolution on two continents [J]. *Virol*,1999,73(1):270-280.
- [6] LI Hua, YANG Han-chun. Infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus suppresses the antibody response to classical swine fever virus vaccination[J]. *Vet Microbiol*,2003,95(4):295-301.
- [7] KWON B, ANSARI I H, OSORIO F A, et al. Infectious clone-derived viruses from virulent and vaccine strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus mimic biological properties of their parental viruses in a pregnant sow model[J]. *Vaccine*,2006,24(49-50):7071-7080.
- [8] 吴海涛,胡云龙,陈松,等. 重组蛋白在中国仓鼠卵巢细胞中高效表达的影响因素[J]. *中国生物工程杂志*, 2004(8):1-5.
- [9] 徐艳,李鹏,张蕴惠,等. 重组质粒 pcDNA3/sil-IR(I) 在哺乳动物细胞中的表达[J]. *华西口腔医学杂志*,2003(12):467-470.

【责任编辑 柴焰】