DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20251118003
引用格式: 赖毅东, 熊珺, 张甜甜, 等. 交叉引物扩增技术快速检测淡水产品中四环素耐药基因 *TetA*[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(8): 136–142.
LAI YD, XIONG J, ZHANG TT, *et al*. Rapid detection of tetracycline resistance gene *TetA* in freshwater products by cross priming amplification technology [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(8): 136–142. (in Chinese with English abstract).

交叉引物扩增技术快速检测淡水产品中四环素耐药基因 *TetA*

赖毅东[1*], 熊　珺[1], 张甜甜[1], 岳　洋[2], 徐振波[2*]
(1. 广东省东莞市质量监督检测中心, 东莞　523808; 2. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广州　510641)

摘　要: 目的　建立一种基于交叉引物扩增(cross primer amplification, CPA)技术的新型现场快速检测四环素耐药基因 *TetA* 的方法。**方法**　通过特异性设计 5 条针对 *TetA* 基因保守区域的引物, 在单一恒温条件(51~60 ℃)下完成靶标核酸的扩增, 整个检测过程可在 45~60 min 完成, 且仅需水浴锅或金属浴等基础加热设备。为验证其性能, 研究对方法的灵敏度、特异性及抗干扰能力进行了系统评价。**结果**　该方法对纯化 *TetA* 基因模板的检出限低至 30.0　fg/μL, 显示出极高的灵敏度。同时, 在与四环素类其他耐药基因(如 *tetB*、*tetM*)及临床常见病原菌基因的对比测试中, 未出现非特异性扩增, 证实了其优异的选择性。此外, 模拟样本检测结果稳定可靠。**结论**　本研究成功建立了一种操作简便、快速、低成本且无需复杂仪器的 *TetA* 基因 CPA 检测新方法。该方法具备的高灵敏度与高特异性, 能够有效满足基层医疗机构、养殖场等场所对四环素耐药基因的现场快速筛查需求, 为实时监测和遏制抗生素耐药基因的传播提供了一项有力的技术工具, 具有重要的实际应用价值。

关键词: 四环素耐药基因; *TetA*; 交叉引物扩增技术; 快速检测; 抗生素耐药

Rapid detection of tetracycline resistance gene *TetA* in freshwater products by cross priming amplification technology

LAI Yi-Dong[1*], XIONG Jun[1], ZHANG Tian-Tian[1], YUE Yang[2], XU Zhen-Bo[2*]
(1. *Dongguan Quality Supervision and Testing Center*, *Dongguan* 523808, *China*;
2. *College of Food Science and Engineering*, *South China University of Technology*, *Guangzhou* 510641, *China*)

ABSTRACT: Objective　To establish a novel method for rapid on-site detection of the tetracycline resistance gene *TetA* by cross priming amplification (CPA) technology. **Methods**　A total of 5 specific primers targeting conserved regions of the *TetA* gene were designed. Amplification was performed under isothermal conditions (optimized at 51–60 ℃), with the entire detection process completed within 45–60 minutes using only basic heating equipment such as a water bath or metal bath. To validate its performance, the method was systematically evaluated for sensitivity, specificity and interference resistance. **Results**　The limit of detection for purified *TetA* gene templates

收稿日期: 2025-11-18
基金项目: 广东省市场监督管理局科技项目(2024CZ29)
第一作者/*通信作者: 赖毅东(1977—), 男, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测研究。E-mail: lyd@gddqt.com
***通信作者:** 徐振波(1982—), 男, 博士, 副教授, 主要研究方向为食源性致病菌。E-mail: zhenbo.xu@hotmail.com

was as low as 30.0 fg/μL, indicating high sensitivity. Furthermore, no nonspecific amplification was observed in comparative tests against other tetracycline resistance genes (*e.g.*, *tetB*, *tetM*) and common clinical pathogenic genes, confirming excellent selectivity. Additionally, simulated sample testing yielded stable and reliable results. **Conclusion** A simple, rapid, low-cost and instrument-free CPA-based method for *TetA* gene detection is successfully developed. With its high sensitivity and specificity, this method can effectively meet the needs for rapid on-site screening of tetracycline resistance genes in primary healthcare institutions and farming environments. It provides a robust technical tool for real-time monitoring and controlling the spread of antibiotic resistance genes, demonstrating significant practical application value.

KEY WORDS: tetracycline resistance gene; *TetA*; cross priming amplification; rapid detection; antibiotic resistance

0　引　言

四环素类抗生素是一种重要的广谱抗生素。根据化学结构差异, 它们可分为四环素、金霉素、土霉素和多西环素 4 种主要类型[1]。四环素类药物通过与细菌核糖体结合并与 30S 核糖体亚基中高度保守的 16S rRNA 相互作用来抑制细菌蛋白质合成[2]。该类药物对多种革兰氏阳性、革兰氏阴性和非典型病原体表现出广谱活性, 导致四环素类药物在最初发现后在人类和动物中得到广泛使用[3]。

抗生素耐药基因可分为内在(来自生产者)或获得性(通过水平基因转移来自其他细菌)抗性, 人类活动施加的选择性压力(包括在诊所、医院和疗养院过度使用抗生素)可能造成耐药基因在环境中传播的增加[4]。人为活动使得耐药微生物和抗菌药物不断排放到水系统中[5], 直接影响环境并改变微生物群落组成。抗生素耐药基因通常位于转座子、共轭质粒或整合子等移动元件上, 在环境微生物群之间的遗传交换中发挥重要作用, 特别是在水生环境中[6]。因此, 河流、溪流、废水和湖泊等水系统被认为是抗生素耐药细菌聚集和传播以及抗生素耐药基因运输和转移的储存库和传播途径之一[7−8]。

TetA 是一种基于外排泵介导的四环素耐药基因, 目前的检测方式最常用的就是聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR), 这种检测方式耗时长, 且基于 PCR 的检测需要精确的变温设备才能实现精确的扩增过程, 限制了其在现场的应用[9−11]。本研究基于交叉引物扩增技术(cross priming amplification, CPA), 拟开发一种新型核酸扩增检测方法, 通过精心设计 5 条特异性引物(包括 2 条交叉引物和 3 条辅助引物), 在恒温条件下(60~65 ℃)实现目标 DNA 序列的高效扩增。基于此技术优势, 本研究拟开发用于快速检测 *TetA* 耐药基因的技术, 为临床耐药基因筛查提供一种高效经济的解决方案。

1　材料与方法

1.1　材料、试剂与仪器

本研究采集了 29 份淡水水产品样本(产品由广东省东莞市质量监督检测中心提供), 包括: 黄骨鱼(3 份)、鲈鱼(4 份)、鲫鱼(3 份)、罗非鱼(2 份)、黄鳝(2 份)、基围虾(2 份)、麻虾(2 份)、花甲(4 份)、沙甲(2 份)、白贝(2 份), 以及泥鳅、草鱼、生鱼等各 1 份。所有样本均由东莞市质量监督检测中心按照标准程序采集并进行初步处理, 确保样本的代表性和处理的一致性。经预处理后, 每份样本取 200 g 作为实验材料, 由华南理工大学研究团队开展后续检测分析工作。

胰蛋白大豆肉汤培养基、技术琼脂粉(广东环凯微生物科技有限公司); Tris-盐酸(Tris-HCl)、Tween 20(分析纯, 上海源叶生物科技有限公司); 50 mg/mL 溶菌酶(生物试剂)、十二烷基硫酸钠、氯化钙、油酸钠(NaOA) (3 mol/L, pH 6.0)(分析纯, 上海麦克林化学试剂有限公司); 20 mg/mL 蛋白酶 K(生物试剂, 北京兰杰柯科技有限公司); 氯化钠(NaCl)(分析纯, 广州化学试剂厂); 10%十六烷基三甲基溴化铵(cetyl trimethyl ammonium bromide, CTAB)(分析纯, 西陇科学股份有限公司); 氯仿、异戊醇(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); Tris 饱和酚[pH 7.7~8.1, 生物试剂, 生工生物工程(上海)股份有限公司]; 无水乙醇(分析纯, 江苏强盛功能化学股份有限公司); 甘油、硫酸镁(分析纯, 天津市大茂化学试剂厂); Gold View(生物染色剂)、Pfu Mix、6×Loading Buffer、DS DNA Marker 2000 分子量标准(生物试剂)(广州东盛生物科技有限公司); Taq Pro Mix、Bst 酶(8000 U, 生物试剂, 广州英赞生物科技有限公司); 琼脂糖(电泳级, 美国 Lonza 公司); 氯霉素钠盐、庆大霉素、四环素、甲氧苄啶(分析纯, 上海碧云天生物技术股份有限公司); 10 mmol/L 脱氧核糖核苷三磷酸(deoxy-ribonucleoside triphosphate, dNTPs)(生物试剂, 上海起发实验试剂有限公司); 氯化钾、硫酸铵(分析纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 甜菜碱(生物试剂, 美国 Sigma 公司); 细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒(广东东盛生物科技有限公司); 乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)(分析纯, 北京兰杰柯科技有限公司)。

THZ-82A 数显气浴恒温摇床振荡器(常州普天仪器制造有限公司); HFsafe-900 生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司); PICO 17 微型离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); A3-50S17R-U 超微量紫外分光光度计(上

海在途生物科技有限公司); 10、100、1000 μL 连续可调微量移液器(广州东盛生物科技有限公司); MX-S 微型漩涡振荡器(美国 SCILOGEX 公司); EDC-810 PCR 扩增仪(东胜国际贸易有限公司); LC-JSY-1 金属浴锅(力辰科技有限公司); GE-100 电泳仪(杭州伯乐生物科技有限公司); GeL Doc EQ 凝胶成像分析仪(美国 BIO-RAD 公司); BS224S 分析天平(感量 0.1 mg, 北京赛多利斯仪器有限公司)。

1.2 涂布平板法筛选菌落

淡水鱼样品处理采取“保留食用部分, 然后混匀”的方式。分离纯化方式是 25 g 淡水鱼样品加到 225 g 生理盐水中均质后, 进行 10 倍系列稀释, 分别得到 10^{-2}、10^{-3}、10^{-4} 和 10^{-5} 的稀释液, 各取 100 μL 涂布于含有 8 μg/mL 四环素的 TSA 平板上, 37 ℃培养 48 h。

1.3 高通量测序与质谱法鉴定菌株

本研究采用高通量测序与质谱分析相结合的方法对分离菌株进行鉴定。其中, 16S rDNA 高通量测序委托广州基迪奥公司完成, 该方法通过提取细菌 DNA、扩增并测定其 16S rRNA 基因序列, 随后与数据库进行比对, 依据序列相似度对菌株进行精确分类鉴定。质谱鉴定则委托广州市红十字会医院完成, 主要采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术, 将少量菌落直接点样于靶板、覆盖基质液, 经仪器检测获取菌体蛋白的质谱指纹图谱, 通过与标准数据库快速匹配, 快速鉴定菌株。

1.4 PCR 检测 *TetA* 基因

使用 DNA 粗提法提取培养后的细菌的 DNA: 取 500 μL 菌液和 160 μL 提取液[20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0); 2 mmol/L EDTA (pH 8.0); 1.2% Triton X-100]到 1.5 mL 离心管中, 100 ℃反应 20 min, 结束后立即冰浴 10 min, 10000 r/min 离心 10 min, 上清即为粗提 DNA。

PCR 反应体系如表 1 所示, 程序如表 2 所示。所使用的引物为 TetA-F: GGCGGTCTTCTTCATCATGC; TetA-R: CGGCAGGCAGAGCAAGTAGA[12]。扩增产物通过 2%琼脂糖凝胶电泳进行检测分析。最终通过凝胶成像系统观察 502 bp 特征条带, 以此判定样品中 *TetA* 基因的存在情况。

1.5 CPA 检测 *TetA* 基因最佳条件的确定

1.5.1 保守序列获取与引物设计

本研究通过生物信息学方法对 Bacterial Antimicrobial Resistance Reference Gene Database 下载的 *TetA* 基因序列进行系统分析。首先建立 *TetA* 基因全序列数据库, 采用 blastn 算法将本研究获得的保守序列与数据库进行比对, 计算其 identity 和 coverage 值以评估序列保守性。进一步利用 MAGE-X 软件对所有 *TetA* 序列进行 Clustalw 多序列比对, 分析不同研究中引物设计所基于的保守序列特征及其差异。

表 1 PCR 反应体系
Table 1 PCR reaction system

试剂	体积/μL
Taq 酶	10.0
TetA-F	0.4
TetA-R	0.4
模板 DNA	1.0
超纯水	8.2

表 2 PCR 反应条件
Table 2 PCR reaction conditions

步骤	温度/℃	时间	循环次数
起始变性	94	3 min	1
变性	94	30 s	30
退火	53	30 s	
延伸	72	30 s	
最终延伸	72	5 min	1

根据交叉引物扩增的反应原理, 使用 Primer Premier 5 软件针对 *TetA* 最保守区域设计引物。引物由广州艾基生物技术有限公司合成。引物均采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)纯化。用 ddH_2O 溶解引物到初始浓度为 100 μmol/L 后于–20 ℃保存。

1.5.2 CPA 反应体系的建立

本研究采用对照实验设计, 以从淡水鱼中分离并经 PCR 验证携带 *TetA* 耐药基因的布氏柠檬酸杆菌 Cbra231203 作为实验组, 同时设立去核酸水作为空白对照组。使用广东东盛生物科技有限公司的细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒提取基因组 DNA。使用 Primer Premier 设计的引物序列(表 3)进行 CPA 反应。

CPA 体系所需试剂的配制如下所示:

(1)浓度均为 10 μmol/L 的剥离引物 4s、5a, 交叉扩增引物 2a1s, 以及特异引物 2a、3a。

(2)配制 2×反应储液。20×反应储液: 含 0.2 mol/L 的氯化钾, 0.2 mol/L 的硫酸铵, 160 mmol/L 的硫酸镁及 2% (*V*:*V*) Tween 20(以上均为终浓度, 用去核酸水配制)。

2×反应储液: 100 μL 20×反应储液, 500 μL 3.2 mol/L 甜菜碱, 280 μL 10 mmol/L dNTPs (each), 27 μL 1.5 mol/L Tris-HCl, 93 μL 去核酸水。

(3)浓度为 8 U/μL 的 Bst DNA 聚合酶(大片段)水溶液。

(4)反应显色剂中钙黄绿素浓度为 3.5 mmol/L, 钙黄绿素的浓度比锰离子的浓度比为 1:2。

CPA 体系配制见表 4。

1.5.3 CPA 反应时间的优化

为优化 CPA 恒温扩增效率, 实验分别设置反应的扩增时间分别为 25、30、35、40、45、50、55、60 min, 反应温度为 63 ℃进行反应。结果通过显色剂颜色变化和琼脂糖凝胶电泳同步鉴定结果, 确定最佳 CPA 反应时间。

表 3　CPA 引物序列
Table 3　CPA primer sequence

引物名称	引物序列
剥离引物 4s	GCCAGACGTGAAACCCAA
剥离引物 5a	TGCACCAACGCATACAGC
交叉引物 2a1s	TGCCATAGTGGGCGGTGATGATTATGCCGGTGCTGC
特异引物 2a	TGCCATAGTGGGCGGTGA
特异引物 3a	CCAGATCGCGCAGGAGGC

表 4　CPA 反应体系
Table 4　CPA reaction system

试剂	体积/μL
2×反应储液	12.5
剥离引物 4s	1.5
剥离引物 5a	1.5
交叉引物 2a1s	2.5
特异引物 2a	1.25
特异引物 3a	1.25
Bst DNA 聚合酶	1.0
DNA 模板	1.0
超纯水	1.5
CPA 显色液	1.0

1.5.4　CPA 反应温度的优化

为探究本研究建立的 CPA 反应体系中的最佳反应温度, 将扩增温度分别设置为 45、48、51、54、57、60、63、66、69、72 ℃, 反应时间为 1 h。结果通过显色剂颜色变化和琼脂糖凝胶电泳同步鉴定结果, 最终确定最佳 CPA 反应温度。

1.6　CPA 检测 *TetA* 基因检出限的确定

为确定针对四环素耐药基因的 CPA 反应体系的检出限, 设计灵敏度实验进行评估。选取淡水鱼中分离的布氏柠檬酸杆菌 Cbra231203 提取基因组 DNA, 浓度使用超微量分光光度计确定, 随后使用无菌生理盐水分别进行 10 倍梯度稀释后进行 CPA 扩增反应确定反应的灵敏度。

实验同时设置了 PCR 反应检测 *TetA*[12]的方法作为对照。PCR 反应体系: Taq PCR mix 12.5 μL, 上下游引物各 0.4 μL、1 μL 的 DNA, 添加去核酸酶水补足体系至 25 μL。PCR 反应体系见表 2。反应结果通过 1.5%的琼脂糖凝胶电泳判断是否扩增成功。

1.7　数据处理

数据处理采用 MEGA-X, Excel 2020 进行整理计算。所有实验均进行 3 次实验, 以确保结果的准确性。

2　结果与分析

2.1　抗生素平板筛菌与鉴定结果

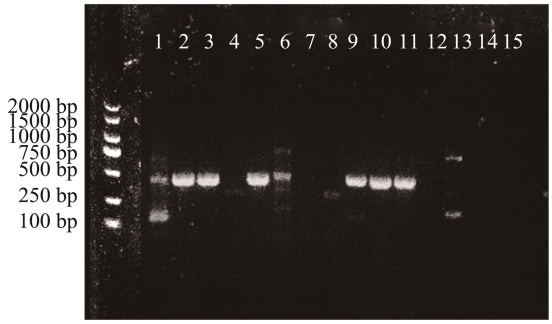
29 个淡水鱼产品共分离出 15 株菌(表 5), 包括布氏柠檬酸杆菌、粘质沙雷菌、温和气单胞菌、中间气单胞菌、栖冷克吕沃尔菌、维氏气单胞菌、杨氏柠檬酸杆菌、肺炎克雷伯菌、弗劳地柠檬酸杆菌、大肠埃希菌、解酪蛋白巨大球菌 11 种菌。这些细菌均属于淡水鱼中的致病菌, 比如粘质沙雷菌易导致医院感染和耐药性败血症, 大肠埃希菌会导致腹泻严重时引发溶血性尿毒综合征, 虽然对淡水鱼生存并未造成很大的影响, 但是对于食品安全来说意义重大[13–18]。

表 5　不同样品分离菌株与 *TetA* 基因 PCR 鉴定结果
Table 5　PCR identification results of isolated strains from different samples and the *TetA* gene

编号	淡水鱼样品	中文名	英文名	菌株编号	是否携带 *TetA*
1	黄骨鱼 2	布氏柠檬酸杆菌	*Citrobacter braakii*	Cbra231202	√
2	黄骨鱼 2	粘质沙雷菌	*Serratia marcescens*	Smar231202	√
3	黄骨鱼 3	布氏柠檬酸杆菌	*Citrobacter braakii*	Cbra231203	√
4	鲈鱼 2	温和气单胞菌	*Aeromonas caviae*	Acav231205	
5	鲈鱼 3	中间气单胞菌	*Aeromonas media*	Amed231206	√
6	鲈鱼 3	栖冷克吕沃尔菌	*Kluyvera cryocrescens*	Kcry231207	√
7	鲫鱼 1	温和气单胞菌	*Aeromonas caviae*	Acav231208	
8	鲫鱼 2	维氏气单胞菌	*Aeromonas veronii*	Aver231209	
9	黄鳝 1	杨氏柠檬酸杆菌	*Citrobacter youngae*	Cyou231212	√
10	基围虾 1	肺炎克雷伯菌	*Klebsiella pneumoniae*	Kpne231214	√
11	基围虾	弗劳地柠檬酸杆菌	*Citrobacter freundii*	Cfre231215	√
12	麻虾 1	大肠埃希菌	*Escherichia coli*	Ecol231216	
13	麻虾 2	解酪蛋白巨大球菌	*Macrococcus caseolyticus*	Mcas231217	
14	花甲 1	解酪蛋白巨大球菌	*Macrococcus caseolyticus*	Mcas231218	
15	花甲 3	粘质沙雷菌	*Serratia marcescens*	Smar231220	

注: 表格中是否携带 *Tet-A* 列中, √代表该样品中分离的菌株携带 *Tet-A* 基因, 无√标识代表不携带此基因。

表 5 汇总了 PCR 扩增结果，其电泳图如图 1 所示。除目标条带外，泳道 1 出现 1 条额外条带，泳道 13 出现 2 条弱条带。经分析，这些均为非特异性扩增产物，其分子大小与预期目标不符，因此在后续分析中不予考虑。



注：图中 1~15 代表 15 株菌的 *Tet-A* 基因验证结果。

图 1 PCR 鉴定 *TetA* 基因结果图

Fig.1 Results chart of PCR identification of *TetA* gene

2.2 保守序列与引物设计

本研究从 Bacterial Antimicrobial Resistance Reference Gene Database 获取 *TetA* (11 条)的编码序列(coding sequence, CDS)序列。经多序列比对软件(multiple alignment using fast Fourier transform, MAFFT)比对分析显示，所得序列片段具有高度保守性。对下载的所有基因序列构建数据库，将提取的保守片段在美国国家生物技术信息中心数据库(National Center for Biotechnology Information, NCBI)中数据库中进行 blast，得到的平均 identity 都大于 99.5%，平均 coverage 都为 100%。可知通过此方法得到的保守序列保守性较好。

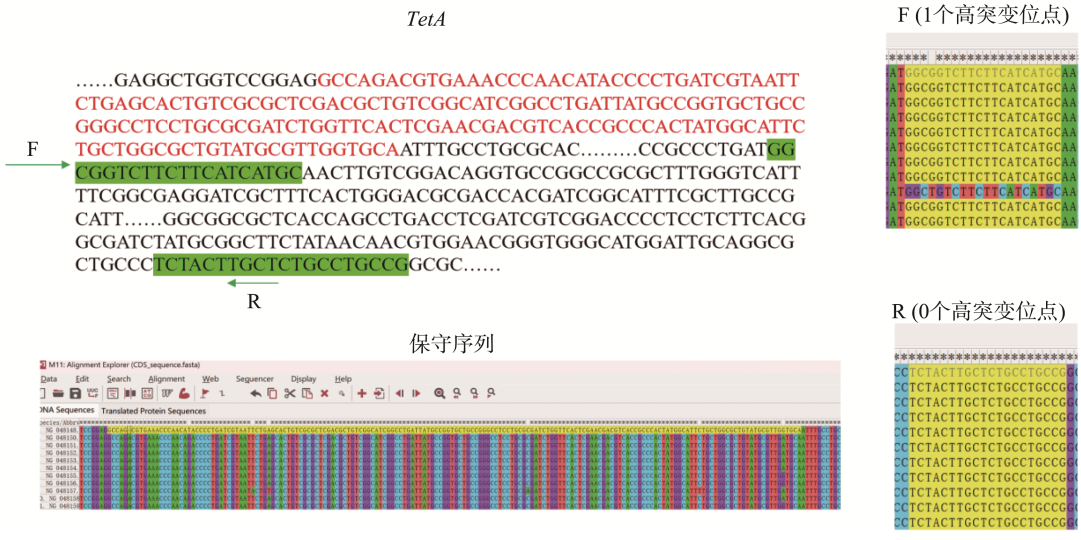
使用 MAGE-X 软件进行多序列比对发现 *TetA* 基因的保守序列无突变点位，这会显著增加检测的准确性。将获取的保守序列与他人所用的检测 *TetA* 基因所用的序列进行比对，参与比对的 *TetA* 基因共涉及 14 条 CDS 序列，来源于 8 个不同菌种，CDS 长度为 1302 bp，保守序列长度为 207 bp，保守序列平均一致性为 99.59%，平均覆盖度为 100%。比对结果如图 2 所示，绿色表示 AMINOV 等[19]使用的 PCR 引物，红色表示本研究挖掘的保守序列。可见 AMINOV 等[19]使用的 PCR 引物中，F 出现了 2 个高突变位点，R 出现了 3 个高突变位点，而本研究挖掘的保守序列无高突变位点，进一步说明了通过本套流程获得的保守序列具有高度保守性，可用于设计无错配引物。

2.3 反应时间和反应温度的优化结果

图 3 中，当反应时间为 45~60 min 时，*TetA* 的 CPA 反应能够进行，且形成明亮的条带，自然光下也能够明显的看出阳性和阴性的颜色差别。图 4，实验数据表明，CPA 反应在 51~66 ℃温度范围内均能有效进行，且扩增效率良好。值得注意的是，当反应温度升至 69 ℃以上时，反应管颜色无显著变化且琼脂糖凝胶电泳未见梯度条带。这一现象证实 *Bst* DNA 聚合酶在高温条件下(>69 ℃)发生不可逆失活，导致核酸扩增反应终止。温度优化实验结果显示，该酶的最适工作温度范围为 51~66 ℃，在此区间内能保持稳定的催化活性。因此 CPA 反应中温度应保持在 51~66 ℃之间且反应时间保持在 45~60 min 内。

2.4 检出限的确定

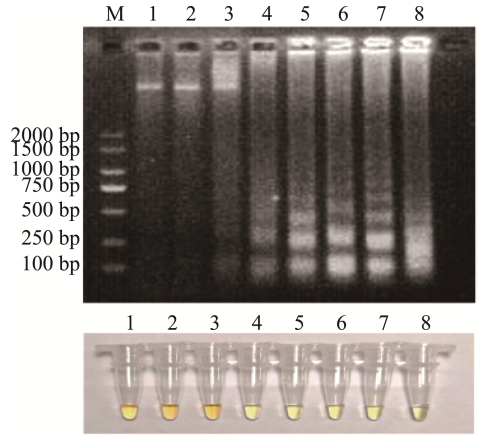
图 5 为检出限的凝胶成像图(A)和显色结果(B)。图 5 结果说明该试剂盒检测 *TetA* 基因方法的检出限为 30 fg/μL。



注：绿色表示 AMINOV 等[19]使用的 PCR 引物，红色表示本研究挖掘的保守序列。

图 2 *TetA* 保守序列在 MEGA 上进行多序列比对的部分结果

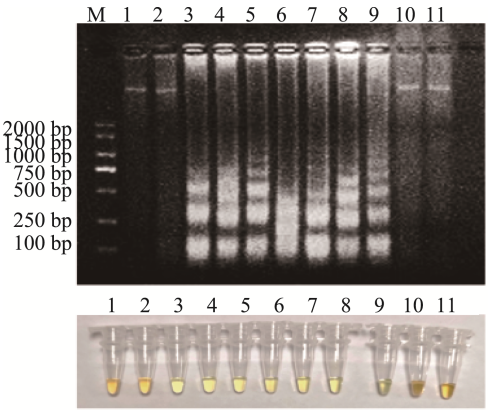
Fig.2 Partial result of multiple sequence alignment of the conserved sequence of *TetA* on MEGA



注: 泳道(反应管)1~8 分别表示 *TetA* 的 CPA 反应在 63 ℃下扩增 25、30、35、40、45、50、55、60 min 的胶图与显色图。

图 3　四环素耐药基因 CPA 反应体系中反应时间的优化结果

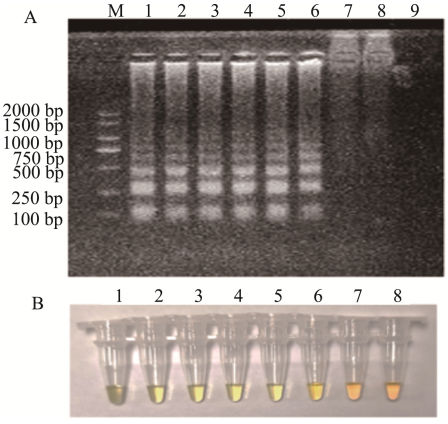
Fig.3　Optimization results of reaction time in the CPA assay system for tetracycline resistance genes



注: 泳道(反应管)1~11 分别表示 *TetA* 的 CPA 反应在 45、48、51、54、57、60、63、66、69、72、75 ℃扩增 1 h 的结果。

图 4　四环素耐药基因 CPA 反应体系中反应温度的优化结果

Fig.4　Optimization results of reaction temperature in the CPA assay system for tetracycline resistance genes



注: 图 A 中 M 为 DS2000 Marker, 1~8 为 DNA 模板的稀释质量浓度, 依次为 30.0 ng/μL、300.0 pg/μL、30.0 pg/μL、3.0 pg/μL、300.0 fg/μL、30.0 fg/μL、3.0 fg/μL、0.3 fg/μL, 9 同样为阴性对照。图 B 中 CPA 显色图 1~8 的含义与胶图相同。

图 5　*TetA* 检出限的凝胶成像图(A)和显色结果(B)

Fig.5　Gel imaging (A) and color development results (B) of the limit of detection of *TetA*

3　讨论与结论

四环素耐药是当前需要解决的一个难题, 检测四环素耐药基因能够及时阻止耐药基因的传播。四环素的耐药机制主要分为核糖体保护蛋白, 四环素特异性外排泵和四环素的酶促失活 3 种机制[20]。*TetA* 属于四环素特异性外排泵, 这种外排蛋白将质子(H^+)交换为四环素分子, 逆浓度梯度将四环素排出细胞外[21]。耐药性的广泛传播, 通常由四环素外排泵介导, 因此检测该基因对于临床治疗非常重要[22]。检测方法的设计未充分考虑靶点的种内保守性, 可能导致部分菌株无法被检测到。在 RPA 检测中, 若引物 3'末端存在多个错配, 会降低扩增效率, 影响检测的特异性[23]。同样, 在实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR)中, 若突变位于引物或探针的结合位点, 检测的灵敏度和特异性可能下降[24]。实验数据显示, 当单链 DNA 序列出现 12%的错配时, 其链交换率下降 50%[25], 进一步表明突变可能导致扩增效率降低甚至出现假阴性结果。副溶血弧菌常用的特异性靶点 *tlh* 和 *toxR* 的引物设计也存在类似问题。TAIWO 等[26]利用 qPCR 对 255 株副溶血弧菌检测特异性靶点 *tlh* 基因, 结果显示有 1 株副溶血弧菌为 *tlh* 基因阴性。进一步全基因组分析表明该菌株确为副溶血弧菌, 但因 *tlh* 引物结合位点存在突变, 导致检测失败。由此可知, 未通过生物信息学分析设计探针的高特异性, 导致反应可能出现漏检现象。本研究提取的保守片段在 NCBI 中数据库中进行 blast, 得到的平均 identity 都大于 99.5%, 平均 coverage 都为 100%。可知通过此方法得到的 *TetA* 引物的保守序列保守性较好。本研究通过对大量 *TetA* 基因序列进行生物信息学分析, 精准锚定了种内高度保守的区域作为扩增靶点。从根本上规避了传统 PCR 方法因引物结合区序列变异而导致的假阴性风险, 实验所验证的 30.0 fg/μL 的检出限, 不仅达到了与 qPCR 相当的灵敏度水平[27], 更意味着该方法能够从极少量的初始核酸样本中捕获到目标信号, 这对于临床或环境样本中低丰度耐药基因的早期筛查至关重要。

总的来说, 本研究利用 CPA 技术独特的交叉引物扩增原理, 建立了一个无需热循环、可在恒温条件下快速完成的检测体系。该体系不仅实现了高灵敏度与高诊断特异性, 更因其操作简便、快速的特点, 为实施现场即时分子诊断奠定了坚实的技术基础[28–30]。当前, 新型检测技术不断涌现。以纳米孔测序为例, 其具备无需扩增即可直接读取序列的能力; 而将这些快速、高灵敏的技术的优势进行系统整合与联合应用, 有望构建出更高效、更便捷的一体化检测体系, 从而进一步推动微生物检测向更精准、更即时、更智能的方向发展[31]。

参考文献

[1] CUI ML, LIN ZX, XIE QF, *et al*. Recent advances in luminescence and

aptamer sensors based analytical determination, adsorptive removal, degradation of the tetracycline antibiotics, an overview and outlook [J]. Food Chemistry, 2023, 412: 135554.

[2] LAPLANTE KL, DHAND A, WRIGHT K, *et al*. Re-establishing the utility of tetracycline-class antibiotics for current challenges with antibiotic resistance [J]. Annals of Medicine, 2022, 54(1): 1686–1700.

[3] AHMED MJ. Adsorption of quinolone, tetracycline, and penicillin antibiotics from aqueous solution using activated carbons: Review [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2017, 50: 1–10.

[4] ZHUANG M, ACHMON Y, CAO Y, *et al*. Distribution of antibiotic resistance genes in the environment [J]. Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987), 2021, 285: 117402.

[5] SÁNCHEZ-BAENA AM, CAICEDO-BEJARANO LD, CHÁVEZ-VIVAS M. Structure of bacterial community with resistance to antibiotics in aquatic environments. A systematic review [J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2021, 18(5): 2348.

[6] SUZUKI S, PRUDEN A, VIRTA M, *et al*. Editorial: Antibiotic resistance in aquatic systems [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 14.

[7] SIVALINGAM P, POTÉ J, PRABAKAR K. Environmental prevalence of carbapenem resistance enterobacteriaceae (CRE) in a tropical ecosystem in india: Human health perspectives and future directives [J]. Pathogens (Basel, Switzerland), 2019, 8(4): 174.

[8] KUSUNUR AB, MOGILIPURI SS, MOTURU D, *et al*. Tetracycline resistance potential of heterotrophic bacteria isolated from freshwater fin-fish aquaculture system [J]. Journal of Applied Microbiology, 2023, 134(4): lxad060.

[9] ROKON-UZ-ZAMAN M, BUSHRA A, POSPO TA, *et al*. Detection of antimicrobial resistance genes in *Lactobacillus* spp. from poultry probiotic products and their horizontal transfer among *Escherichia coli* [J]. Veterinary and Animal Science, 2023, 20: 100292.

[10] SREEJITH S, SHAJAHAN S, PRATHIUSH PR, *et al*. Rapid detection of mobile resistance genes *tetA* and *tetB* from metaplasmid isolated from healthy broiler feces [J]. Microbial Pathogenesis, 2022, 166: 105504.

[11] PINHEIRO LB, COLEMAN VA, HINDSON CM, *et al*. Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification [J]. Analytical Chemistry, 2012, 84(2): 1003–1011.

[12] FERDOUS T, FERDOUSE S, HOSSAIN MS, *et al*. Prevalence of *Escherichia coli* isolated from oropharynx and trachea of clinically sick poultry and antimicrobial resistance pattern of the strains isolated [J]. Biochemistry and Biophysics Reports, 2023, 36: 101555.

[13] AKTER T, RAHMAN MM, TAY ACY, *et al*. Whole-genome sequence of fish-pathogenic enterococcus faecalis strain BFFF11 [J]. Microbiology Resource Announcements, 2020, 9(7): e01447–19.

[14] FELIATRA F, BATUBARA UM, NURULITA Y, *et al*. The potentials of secondary metabolites from *Bacillus cereus* SN7 and *Vagococcus fluvialis* CT21 against fish pathogenic bacteria [J]. Microbial Pathogenesis, 2021, 158: 105062.

[15] COHEN J, ALTAF M, MUSHTAQ M, *et al*. Raoultella planticola infection in Urine [J]. Cureus, 2021, 13(9): e17985.

[16] RAMOS G, VIGODER HC, NASCIMENTO JS. Technological applications of macrococcus caseolyticus and its impact on food safety [J]. Current Microbiology, 2021, 78(1): 11–16.

[17] VALE PF. Providencia rettgeri [Z]. Trends in Microbiology, 2025.

[18] HäNNINEN ML, OIVANEN P, HIRVELÄ-KOSKI V. Aeromonas species in fish, fish-eggs, shrimp and freshwater [J]. International Journal of Food Microbiology, 1997, 34(1): 17–26.

[19] AMINOV RI, GARRIGUES-JEANJEAN N, MACKIE RI. Molecular ecology of tetracycline resistance: Development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(1): 22–32.

[20] GROSSMAN TH. Tetracycline antibiotics and resistance [J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2016, 6(4): a025387.

[21] NGUYEN F, STAROSTA AL, ARENZ S, *et al*. Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms [J]. Biological Chemistry, 2014, 395(5): 559–575.

[22] MøLLER TS, OVERGAARD M, NIELSEN SS, *et al*. Relation between *tetR* and *tetA* expression in tetracycline resistant *Escherichia coli* [J]. BMC Microbiology, 2016, 16: 39.

[23] DAHER RK, STEWART G, BOISSINOT M, *et al*. Influence of sequence mismatches on the specificity of recombinase polymerase amplification technology [J]. Molecular and Cellular Probes, 2015, 29(2): 116–121.

[24] CAO L, XU T, LIU X, *et al*. The impact of accumulated mutations in SARS-CoV-2 variants on the qPCR detection efficiency [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2022, 12: 823306.

[25] PATIL KN, SINGH P, MUNIYAPPA K. DNA binding, coprotease, and strand exchange activities of mycobacterial RecA proteins: Implications for functional diversity among RecA nucleoprotein filaments [J]. Biochemistry, 2011, 50(2): 300–311.

[26] TAIWO M, BAKER AC, POWELL A, *et al*. Comparison of toxR and tlh based PCR assays for *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Food Control, 2017, 77: 116–120.

[27] LIMA A, FRANÇA A, MUZNY CA, *et al*. DNA extraction leads to bias in bacterial quantification by qPCR [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2022, 106(24): 7993–8006.

[28] ZHENG F, LI S, WANG S, *et al*. Cross-priming isothermal amplification combined with nucleic acid test strips for detection of meat species [J]. Analytical Biochemistry, 2020, 597: 113672.

[29] HUANG L, ZUO Z, HU L, *et al*. MultNAT HIV-1 viral load assay: A simple, rapid and sensitive cross-primer amplification assay for detecting the HIV-1 virus in the field [J]. PeerJ, 2025, 13: e19753.

[30] ZHANG H, FENG S, ZHAO Y, *et al*. Detection of *Yersinia enterocolitica* in milk powders by cross-priming amplification combined with immunoblotting analysis [J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 214: 77–82.

[31] 施菊萍, 王翔, 王亚平, 等. 宏基因组纳米孔测序在产气荚膜梭菌食源性疾病调查中的应用研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(22): 27–33.
SHI JP, WANG X, WANG YP, *et al*. Application research of metagenomic nanopore sequencing in the investigation of clostridium perfringens foodborne diseases [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(22): 27–33.

(责任编辑: 蔡世佳 安香玉)