

計畫編號：DOH89-TD-1005

行政院衛生署八十八年下半年及八十九年度

科技研究發展計畫

泌尿道感染菌中 Integron 攜帶之抗藥基因片匣之分析
及抗藥菌株之分子流行病學

研 究 報 告

執行機構：高雄醫學大學微生物學科

計畫主持人：張瑞烽

研究人員：張玲麗、吳文正、張仲羽

執行期間：88年7月1日至89年6月30日

※※本研究報告僅供參考，不代表本署意見※※

目 錄

中文摘要	1
英文摘要	4
前言	6
材料與方法	12
一、實驗菌株之來源與鑑定	12
二、菌株之藥物感受性試驗	12
三、Integron 之偵測 (Detection for the presence of integrons)	14
1. 引子的設計 (primer design)	14
2. 模板 DNA 之製備 (Preparation of template DNA for PCR)	15
3. 聚合酶鏈鎖反應	15
4. 瓊脂醣明膠電泳 (Agarose gel electrophoresis)	16
5. PCR 產物分子量之計算	17
四、Integron 於菌株內存在位置之分析	18
(一) 質體 DNA 之抽取	18
(二) 瓊脂醣明膠電泳	19
(三) 南方雜交分析 (Southern hybridization)	19
1. DNA 的轉印 (Blotting)	19
2. 非輻射性 DNA 探針標記	21
3. 前雜交 (Prehybridization)	22
4. 雜交 (Hybridization)	22
5. 雜交後清洗 (Post-hybridization washes)	23
6. 偵測以 DIG 標記之已雜交探針 (Detection of DIG-labeled, hybridized probe)	23

7.自動放射顯影 (Autoradiography)	25
五、Integron 轉移之分析—接合試驗 (conjugation)	25
六、Integron 攜帶之基因片匣之分析 (Identification of integron-borne gene cassettes)	26
(一) PCR 產物的純化	27
(1)單一 PCR 產物之純化	27
(2)非單一之 PCR 產物純化	28
(二) 核酸自動定序分析	29
1.Cycle Sequencing 及反應產物之純化	30
2.自動定序分析儀之開機與電泳用玻璃之準備	30
3.電泳凝膠的製作	31
4.電泳前預跑 (Pre-run gel)	32
5.電泳前之檢體處理	33
6.電泳及訊息之接收與分析	33
(三) 基因序列之電腦分析	33
七、抗藥基因片匣之抗藥性表現分析	34
(一) 增幅片段之選殖 (Amplicon cloning)	34
1.增幅片段與載體 (vector) 之連接作用 (ligation)	34
2.X-gal plate 之製備	35
3.勝任細胞 (competent cell) 之製備	36
4.重組質體 (recombinant plasmid) 之轉形作用	36
5.轉形菌株之篩選	37
(二) 攜帶增幅片段之轉形菌株抗藥性表現之分析	37
八、攜帶抗藥基因片匣菌株之脈動電泳分析	37

(一) 樣品製備 (Sample preparation)	37
(二) 限制酶的消化與 DNA 的脈動電泳 (Restriction enzyme digestion and PFGE)	39
結果	41
一、Integron 於 <i>E. coli</i> 菌株中之存在情形	41
二、Integron 於菌株內的存在位置	42
三、Integron 所攜帶之基因片匣	42
(一) 基因片匣及 integron conserved segment 特徵之識別	42
(二) 基因片匣之種類	43
(三) 基因片匣之組合排列	44
(四) 基因片匣之出現頻率	45
(五) 新型抗藥基因片匣之發現	46
1.1600 bp 之增幅片段攜帶新型抗藥基因片匣	46
2. <i>dfr17</i> cassette	47
3. <i>aadA4</i> cassette	49
四、Integron 抗藥基因片匣之表現及與菌株抗藥性之相關性	50
(一) 抗藥基因片匣之表現	50
(二) <i>E. coli</i> 菌株之抗藥性	51
五、Integron 之轉移	52
六、攜帶抗藥基因片匣菌株之脈動電泳分析	52
七、Integron 陽性菌株與 integron 陰性菌株抗藥性之比較	54
討論	56
一、Integron 之盛行率	56

二、Integron 攜帶之抗藥基因片匣	57
三、Integron 的轉移與抗藥基因片匣的散佈	62
四、Integron 抗藥基因片匣與菌株抗藥性之相關性	65
五、Integron 存在對菌株抗藥性的影響	67
六、結論	68
參考文獻	70
表	82
圖	87

中文摘要

泌尿道感染雖為一常見的疾病，但卻因經常復發的問題造成病人與醫生的困擾，而由於治療泌尿道感染的抗菌藥物的普遍使用伴隨產生之細菌抗藥性增加的問題更是不容忽視的。為探討泌尿道感染菌中 integron 攜帶之抗藥基因片匣，本研究以聚合酶連鎖反應增幅包含 integron 基因片匣的片段，所分析的 104 株大腸桿菌，有 54 株（佔 52%）可增幅得到 PCR 產物，增幅片段的大小在 1000 bp~3000 bp。增幅片段經純化後，利用核酸直接定序讀得增幅片段之基因序列，再與 GenBank database 內的已知基因進行相似性比對，確定 integron 所帶的基因片匣為何，結果顯示基因片匣在 integron 內呈現不同的數目、種類及組合方式，integron 所攜帶的基因片匣種類，除了一個功能尚未知的 open reading frame，*orfF* 以外，其餘均為抗藥性基因，包括四個 trimethoprim 抗藥基因：*dfrIa*、*dfrV*、*dfr12* 和 *dfr17*；aminoglycosides 類藥物的抗藥性基因（*aadA1a*、*aadA2*、*aadA4* 和 *aadB*）；以及 chloramphenicol 抗藥基因 *cmlA*；erythromycin 抗藥基因 *ereA2* 與 β -lactamase PSE-1 基因 *blaP1*。其中 *dfr17* 和 *aadA4* 是新發現的基因片匣，*dfr17* 為一新型之 trimethoprim 抗藥性 DHFR 基因，與已知的 *dfrVII* 有 91% 的相似性，可歸屬於最常見的 family 1 DHFR 中之一員。至於 *aadA4* 則可對 spectinomycin 和 streptomycin 產生抗藥性，與已知的 *aadA3* 基因有 95% 之

相似性。一個 integron 所攜帶的基因片匣數目為 1~3 個，其中攜帶 *dfr12-orfF-aadA2* 三個基因片匣的 integron 最常見，可在 33 株 *E. coli* 菌株中偵測到（佔 integron 陽性菌株的 61%），而兩個新發現的基因片匣 *dfr17* 和 *aadA4* 則位於同一個 integron 上，此外攜帶不同基因片匣的兩個 integron 可同時存在於單一菌株內。

進一步以基因選殖和感受性試驗可證實 integron 所攜帶之抗藥基因片匣可以讓菌株表現出基因片匣之抗藥性，但抗藥基因片匣尚無法完全涵蓋菌株的抗藥性，表示菌株內尚有其他抗藥機制存在。而質體接合反應顯示 integron 及抗藥基因片匣可隨質體一起轉移，表示 integron 及抗藥基因片匣主要藉質體之水平轉移方式在菌株間散佈，脈動電泳分析也發現攜帶相同抗藥基因片匣的菌株並無基因相關性存在，可見抗藥基因片匣已在不同菌株間散佈了。比較 integron 陽性菌株與 integron 陰性菌株抗藥性結果發現，不論抗藥基因是否位於 integron 內，具有 integron 的菌株呈現多重抗藥性的比例遠高於不具 integron 的菌株，顯示 integron 之存在與菌株多重抗藥性有密切的關係。

綜合本研究的結果可知，integron 及抗藥基因片匣在臨床泌尿道 *E. coli* 菌株中普遍存在，不僅可讓菌株表現出抗藥性，並可藉質體在菌株間散佈，而抗藥基因片匣的種類及其出現頻率則適度反應了常用藥物所給予的篩選

壓力，故可提供藥物使用及抗藥菌株監測之參考，在藥物持續的選擇壓力存在下，攜帶抗藥基因片匣的 integron 可能移至也攜帶抗藥基因的質體或轉位子上，因而使帶有 integron 的菌株呈現較高比例的多重抗藥性。

中文關鍵詞(至少三個)：泌尿道感染細菌、Integron、抗藥基因片匣、分子分型

Abstract

Urinary tract infection (UTI) remains an important health problem and a cause of nosocomial infection. Increasing use of various drugs for the treatment of UTI has resulted in an increase of drug-resistant clinical isolates. In this study, the presence of integrons in *Escherichia coli* urinary isolates was detected using PCR. The results showed that a total of 52% (54/104) of the isolates carried detectable integrons with inserted DNA regions of sizes varying from 1000 bp to 3000 bp. Using DNA sequencing, the genetic content of the integron variable regions was identified. It was found that different integrons contained various numbers, kinds and combinations of gene cassettes within their variable regions. These integrons contained gene cassettes encoding resistance to trimethoprim (*dfrIa*, *dfrV*, *dfr12* and *dfr17*), aminoglycosides (*aadA1a*, *aadA2*, *aadA4* and *aadB*), chloramphenicol (*cmlA*), erythromycin (*ereA2*) and β -lactams (*blaP1*). Two new gene cassettes, *dfr17* and *aadA4*, were found to be inserted in an integron. The *dfr17* cassette encoded trimethoprim resistance and had 91% identity with *dfrVII* dihydrofolate reductase gene. The *aadA4* cassette conferred resistance to spectinomycin and streptomycin and showed 95% identity with *aadA3* gene. An integron carrying three inserted cassettes, *dfr12-orfF-aadA2*, was present in 61% of the isolates (33/54).

The results from resistant gene cassettes cloning and antimicrobial susceptibility tests showed that the resistant gene cassettes were expressed at the phenotypic level. The conjugation experiment revealed that the transfer of integrons and gene cassettes could be plasmid-mediated. Furthermore, isolates carrying identical integrons were found to have genetic backgrounds unrelated by genotyping using the PFGE, suggesting the horizontal integron transfer. In

addition, integron-positive isolates were also more likely to be multi-resistant than integron-negative isolates.

The results from this study indicate that integrons are widespread in clinical urinary *E. coli* isolates. In addition, antibiotic-resistant genes, as the inserted cassettes in integrons, could contribute to the resistance of *E. coli* isolates. The types, combinations and frequency of resistant gene cassettes in integrons may reflect the specific selective pressures to which the isolates were exposed and could provide relevant references to the use of antibiotics and resistance surveillance. Since the imprudent use of antimicrobial agents applies continuous selection pressure, integrons carrying more than one antibiotic-resistant gene cassette may be often associated with other genetic elements containing resistance determinants, such as plasmids and transposons. This makes multiple drug resistance more common in integron-positive isolates.

Keyword: Urinary tract isolates, Integron, Drug-resistant gene cassette, molecular typing

前 言

泌尿道感染是存在已久，且常造成病人及醫生困擾的疾病，隨著抗生素的陸續引進臨床使用後，雖然可以順利地治療泌尿道的感染症，但由於新的抗菌藥物不斷地發明引進，致病菌陸續出現對抗生素的抗藥性也成了不可避免的事實。在台灣由於抗生素使用得極為廣泛，因此各式各樣的抗藥性細菌也不斷的出現，不斷的增加，特別是對多種抗生素具抗性的多重抗藥性細菌更是造成臨床感染控制與疾病治療上相當棘手的難題。因此有關細菌多重抗藥性產生與散播之機轉的研究是極為重要的。

細菌多重抗藥性的產生與廣泛存在，已非單純地菌體染色體突變所導致，而是細菌經由不同的機制獲得新的抗藥基因並在不同的菌種間傳遞抗藥性 [Hall, 1997]。造成抗藥菌株的快速增加和散佈的機轉，較為人熟知的有二，一為帶有抗藥性基因的質體 (plasmid)，另一為轉位子 (transposon)。抗藥性質體 (R factor) 早在 1959 年即在日本被發現 [Akiba *et al.*, 1960; Watanabe, 1963]，1972 年時 Fleming 等人亦從尿液感染菌株中分離出攜帶 trimethoprim 及 sulphonamide 抗藥基因的抗藥性質體 [Fleming *et al.*, 1972]，抗藥性質體可以自行複製，並隨著細菌的分裂過程而將抗藥性傳給子代，此外也可以藉細菌間的接合作用 (conjugation) [Watanabe and Fukasawa, 1961a] 或轉導作用 (transduction) 將抗藥性傳給另一同屬或不

同屬的細菌 [Watanabe and Fukasawa, 1961b; Harada *et al.*, 1963]，導致臨床致病菌株抗藥性增加。另外，轉位子則是一種帶有抗藥基因或其他特性基因的 DNA 片段，由於不能獨立複製，因此須藉嵌入質體，染色體或噬菌體中一起複製，轉位子可在上述三者之間任意跳躍，轉位 (transposition)，亦可進一步藉由質體的接合作用或噬菌體的轉導作用而再傳入另一新菌株 [Saunders, 1975]。此外，亦有具自行轉移 (self-transmissible) 能力的接合性轉位子 (conjugative transposon) 存在於一些革蘭氏陽性細菌染色體上，此種轉位子可藉由菌體間接觸時由原來的菌體上自行轉位到另一菌體上，而在革蘭氏陽性菌間傳遞 [Clewett and Cawron-Burke, 1986]。因此轉位子的存在可加速抗藥基因在菌株間的散佈，且其傳遞過程中也會造成細菌多重抗藥性質體的產生而導致質體多重抗藥性的演變。

近年來，又有第三種與細菌獲得新抗藥基因及抗藥基因散佈有關的機制被提出，此機轉主要牽涉到抗藥基因可經由一特定部位重組作用 (site-specific recombination) 的方式嵌入到一特殊的 DNA 構造中，此構造為 Stokes 和 Hall 於 1989 年時所提出的 integron [Stokes and Hall, 1989]，即是一個可使細菌獲得抗藥基因之 DNA 構造。Integron 基本上是由 5' 端的 conserved segment 及 3' 端的 conserved segment 所組成 (圖 1) [Hall and Vockler, 1987; Stokes and Hall, 1989; Hall and Stokes, 1993; Hall and Collis, 1995]，在 5' 端

conserved segment 中主要包含三個與此種特定部位重組作用及基因表現有關的構造[Hall and Collis, 1995]：(1) 為一段 *int* 基因，可轉譯出 integrase 酵素，(2) 為一個鄰近 *int* 基因且能被 integrase 所認知的重組部位，並可容納外來基因 (incoming gene) 插入，稱為 *attI* site，其主要的保留序列為 GTTRRRY 7 個 base (R 為 purine；Y 為 pyrimidine)，(3) 為一個起動子 (promoter) 負責外來基因的表現。至於 3'端 conserved segment 則攜帶一段 sulfonamine 抗藥基因 *sulI* [Stokes and Hall, 1989]，以及一個可抗四級銨類化合物消毒劑(quaternary ammonium compounds)的基因 *qacE Δ 1* [Paulsen *et al.*, 1993]，還有一功能尚未明瞭的 open reading frame，*orf5*。

至於介於 integron 5'端 conserved segment 與 3' conserved segment 之間則是嵌入 integron 內的外來基因，現在則以基因片匣 (gene cassette) 稱之，基因片匣是由一個 gene coding region 及其 3'端一段與重組作用有關的 59-base element 所組成 [Hall *et al.*, 1991; Collis and Hall, 1992a, b]，目前所發現基因片匣的 gene coding region 所帶的基因以抗藥性基因為最多，且抗藥基因種類相當多，例如多種不同的 aminoglycosides、trimethoprim、chloramphenicol 及 β -lactam 藥物之抗藥基因，因此依基因片匣攜帶之基因的不同，現在已經有 40 種以上不同的基因片匣被發現 [Recchia and Hall, 1995a]。至於基因片匣 3'端的 59-base element，雖然不同抗藥基因所具有

的 59-base element 在基因序列甚至基因長度上都不相同 [Hall *et al.*, 1991]，但在 59-base element 內均具有不完全的 inverted repeat sequence，而且在 59-base element 3'端最後 7 個 base：GTTRRRY，與 integron 5'-conserved segment *attI* site 7 個主要保留核苷酸序列的特徵相同，可能就是抗藥基因以特定部位重組方式進入 integron 的核心部位 (recombination core site)，而 GTT 則是基因重組交換點 (recombination cross-over point) [Hall *et al.*, 1991]，有研究發現重組部位是位於此 GTT 序列的 G 和 T 之間 [Stokes *et al.*, 1997]。此外在 59-base element 5'端則有 7 個 base 的反核心部位 (inverse core site)，其主要保留序列為 RYYAAC [Collis and Hall, 1992b; Recchia and Hall, 1995a]。

因此 integron 所主導的 site-specific recombination 是指在受到 5'端 integrase 的作用下，攜帶抗藥基因和 59-base element 的基因片匣，利用其核心部位重組交換點與 integron 的 *attI* site 發生重組作用而進入到 integron 內 (圖 2) [Collis *et al.*, 1993]。只要在 integrase 驅動下，此種特定部位重組作用不僅可發生在基因片匣的 59-base element 與 integron 的 *attI* site 之間，在攜帶不同抗藥基因的兩個片匣的 59-base element 之間也可能發生 [Martinez and de la Cruz, 1990; Hall *et al.*, 1991; Collis and Hall, 1992a]，因此在 integron 5'端和 3'端的 conserved segment 之間，便可能有單一個或一個

以上的基因嵌入，而構成了 integron 的中心變異區（central variable region）[Hall and Stokes; 1993]，由於基因片匣本身不具有 promoter，所以 integron 可做為一個基因表現載體（expression vector）[Stokes and Hall, 1989; Lévesque *et al.*, 1994; Collis and Hall, 1995]，藉著 integron 5'端 conserved segment 內 promoter 的起動下，傳訊轉譯基因片匣的抗藥性蛋白質，而造成細菌之多重抗藥性。此外，已嵌入 integron 內的基因片匣亦可受 integrase 作用而再度從 integron 移出（excision）（圖 2）[Collis and Hall, 1992a, b]。

由於基因片匣可嵌入或移出 integron，因此被認為是一種 mobile element [Hall and Collis, 1995; Recchia and Hall, 1995a]，integron 則是主導基因片匣之嵌入、移出，甚至重組，並且還可以使嵌入之基因表現其產物。至於基因片匣這種由單一基因和重組部位的特殊組合，也代表了一種有效的裝配基因（packaging genes）的方式 [Recchia and Hall, 1997]。雖然目前對基因片匣產生的來源尚不清楚，但一個抗藥基因若以此種片匣的型式存在，由於具有重組部位加上 integron 共同賦予的移動性，則此抗藥基因散佈的機會將更為增加。加上若 integron 位於細菌的質體或轉位子上，也很容易藉質體和轉位子的轉移而促使抗藥基因在細菌之間傳遞。綜合以上所述，integron 及抗藥基因片匣在細菌多重抗藥性的形成，抗藥基因的變化及散佈上確實是扮演著不容忽視的角色，值得我們去研究探討。

台灣地區抗生素的使用極為普遍，而一些報告及各大醫院的統計資料顯示台灣地區很多臨床致病菌的抗藥性比例相當的高，甚至高出歐美國家甚多[Chang and Hsieh, 1996]，但對於 integron 及抗藥基因片匣尚未有相關的研究報告。因此本研究就泌尿道感染菌分析 integron 所攜帶的抗藥基因片匣；包括基因片匣種類及其表現，以了解有哪些抗藥基因已嵌入臨床泌尿道菌株的 integron 構造內，並探討 integron 及抗藥基因片匣在細菌抗藥性上扮演的角色，這些嵌入之抗藥基因在 integron 存在下，可能造成菌株新抗藥性的產生與散佈，因此對此類藥物的使用、管制及細菌抗藥性的比率便需特別加以注意並監控，以避免因這些藥物的過度使用而造成抗藥菌株的增加及抗藥基因的散佈。此外，本研究進一步探討 integron 及抗藥基因片匣在細菌間的散佈情形，並比較 integron 存在與否對菌株抗藥性的影響，來了解 integron 與細菌多重抗藥性的關係，希望藉此研究對抗藥菌株多重抗藥性形成之機轉、傳遞之途徑有更深入的了解，以期對於臨床藥物使用、抗藥菌株之監控並進而控制抗藥性的擴散能有所助益。

材料與方法

一、實驗菌株之來源與鑑定

自高雄醫學大學附設中和紀念醫院泌尿道感染患者尿液檢體中分離培養出之大腸桿菌(*E. coli*)，隨機抽樣 104 株為本研究之實驗菌株，菌株均以傳統生化學反應鑑定後，即以含 15% glycerol 之 tryptic soy broth (Difco, USA) 保存於-70°C 備用。

二、菌株之藥物感受性試驗

本試驗主要是利用標準瓊脂擴散法(Standardized disc agar diffusion method) [Baur *et al.*, 1966] 來了解菌株對各種抗生素的感受性(susceptibility)。先將菌株在 35°C 恆溫箱內培養 4 小時後，以 McFarland 0.5 單位 BaSO₄ 標準液(0.5 ml 的 0.48 M BaCl₂·2H₂O 與 99.5 ml 的 0.36 N H₂SO₄ 之混合液) 的混濁度作為對照標準，將細菌濃度以無菌的生理食鹽水調整為 1.5×10^8 CFU/ml。利用消毒棉棒浸入細菌懸浮液，在管壁壓乾後，均勻塗佈於 4 mm 厚度的 Mueller Hinton agar (Difco)，待數分鐘使培養基表面乾燥後，將抗生素紙錠貼於培養表面。經過 16 ~ 18 小時 35°C 恆溫培養之後，依照 NCCLS (National committee for Clinical Laboratory Standards) 的標準 [NCCLS, 1993]，以濾紙所形成抑制圈大小，來判定試驗菌株對其所測試的抗生素的感受性程度。使

用抗生素紙錠主要購自 BBL 及 Difco 兩家公司，共有 ampicillin (AM, $10\text{ }\mu\text{g}$)、amikacin (AN, $30\text{ }\mu\text{g}$)、aztreonam (ATM, $30\text{ }\mu\text{g}$)、cefoperazone (CFP, $75\text{ }\mu\text{g}$)、ceftazidime (CAZ, $30\text{ }\mu\text{g}$)、chloramphenicol (C, $30\text{ }\mu\text{g}$)、cefmetazole (CMZ, $30\text{ }\mu\text{g}$)、gentamicin (GM, $10\text{ }\mu\text{g}$)、minocycline (MI, $30\text{ }\mu\text{g}$)、moxalactam (MOX, $30\text{ }\mu\text{g}$)、netilmicin (NET, $30\text{ }\mu\text{g}$)、piperacillin (PIP, $100\text{ }\mu\text{g}$)、streptomycin (S, $10\text{ }\mu\text{g}$)、spectinomycin (SP, $25\text{ }\mu\text{g}$)、trimethoprim (TMP, $5\text{ }\mu\text{g}$)、sulfonamides (G, $250\text{ }\mu\text{g}$)、ampicillin/sulbactam (SAM, $20\text{ }\mu\text{g}$) 等。同時以 *E. coli* ATCC 25922 菌株做對照組來抽驗每一組的包裝，必須符合其所規定的具有一定大小抑制圈的限度 (control zone diameter limits) 方可使用。

若需了解菌株對藥物的最小抑制濃度 (minimal inhibitory concentration, MIC)。則採用瓊脂平板稀釋法 (agar plate dilution method) 來測定 [Koneman *et al.*, 1992]。首先將隔夜培養的測試菌株懸浮液以生理食鹽水調整菌液濃度達 McFarland Standard 0.5 (濃度相當於 1.5×10^8 CFU/ml)。而後利用菌株複種器 (multiple-inoculator replicator) 接種約 $10^4 \sim 10^5$ CFU 的細菌懸浮液到含有不同抗菌藥物濃度的 Mueller-Hinton 平板培養基上。MIC 結果的判讀主要定義為抑制細菌生長的最小藥物濃度。

三、Integron 之偵測 (Detection for the presence of integrons)

本研究主要利用聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction ; PCR) 來偵測菌株是否具有 integron 之構造。此部份之實驗說明如下:

1. 引子的設計 (primer design)

利用 PCR 偵測 integron，主要是以偵測 integron 的 5'-conserved segment 和 3'-conserved segment 之存在為基礎來證實 integron 之存在 [Lévesque *et al.*, 1995]。因此 PCR 中所使用的引子 (primer) 乃根據 integron 此種特殊構造來設計，引子組中一個 primer 位在 integron 5' 端的 conserved segment，另一個 primer 則位於 integron 3' 端的 conserved segment (圖 1)，因此若 PCR 之後有增幅片段出現，則表示有 integron 存在，此外，由於這兩個 primer 的位置都分別靠近 integron 5' 端 conserved segment 和 3' 端 conserved segment 的重組部位 (recombination site)，因此經 PCR 增幅得到的片段就包含了 integron 兩個 conserved segments 間的變異區 (variable region) 的部份，也就是嵌入在 integron 內的基因片匣的部份，所以利用 PCR 不僅可以偵測 integron，同時也可藉 PCR 產物的片段大小來預估 integron 可能含有的基因片匣的數目或大小。本實驗所用的引子組名稱及序列為：位於 5'-conserved segment 上的引子 5'-CS，其序列為 5'-

GGCATCCAAGCAGCAAG-3'；另一個位於 3'-conserved segment 的引子 3'-CS，其序列為 5'-AAGCAGACTTGACCTGA-3'，此對引子組在 Levesque 等人的報告中 [Lévesque *et al.*, 1995]，首先被使用，其後廣泛被許多文獻所沿用 [Sallen *et al.*, 1995; Martinez-Freijo *et al.*, 1998; Tosini *et al.*, 1998; Bass *et al.*, 1999]。

2. 模板 DNA 之製備 (Preparation of template DNA for PCR)

PCR 中所需的菌體 DNA template 是依照 Bass 等人的快速製備方法操作 [Bass *et al.*, 1999]。取 1.5 ml 經過隔夜培養的菌液離心後去除上清液，離心下來的細菌再懸浮於 1.5 ml 無菌蒸餾水中，然後置於沸水中煮沸 10 分鐘使菌體裂解，DNA 即可釋出，再以 12,000 x g 離心 30 分鐘，吸取之上清液內即含有菌體 DNA，貯存於-20°C 備用。

PCR 進行時，將貯存之上清液稀釋 10 倍做為 DNA template。

3. 聚合酶鏈鎖反應

PCR 反應總體積為 20 μ l，反應溶液中各成分的含量為：5'-CS 和 3'-CS 引子組各 0.3 μ M，2 μ l 之 10 倍緩衝液 (10 mM Tris-HCl；pH 8.3，500 mM KCl，15 mM MgCl₂，Takara，Japan)，200 μ M dNTPs 混合液 (deoxynucleotide triphosphates，2.5 mM of each dNTP，Takara)，1 單位的 Taq DNA polymerase (5 units/ μ l，Takara) 及約 100

ng 之細菌 DNA 模板，以無菌二次蒸餾水補至 20 μ l 後，將反應物均勻混合置於溫度循環器中 (GeneAmp 9700 PCR System, Perkin Elmer, USA)。設定執行程式如下: 95°C 加熱 1 分鐘以解開雙股 DNA，然後於 95°C，30 秒使 DNA 變性 (denaturation)，於 55°C，30 秒使引子黏合 (annealing)，72°C，2 分鐘使 DNA 延長 (extension)，共循環 35 次，最後於 72°C，7 分鐘，將未延長完全的反應做完，反應即告完成。程式執行完畢後，PCR 產物再於 1.5% 瓊脂糖明膠 (agarose gel) 內電泳，觀察 PCR 結果。為防止 PCR 過程污染與確定增幅片段，每次的 PCR 進行時，均同時以帶有轉位子 Tn21 的質體 pUB2401 做陽性對照 (Tn21 上具有一個已知的 integron In2) [Hall and Collis, 1995]，另外以質體 ColE1::Tn7 做為陰性對照 [Hall and Collis, 1995]。

為了避免可能有 integron 因變異區長度較長而有 long PCR product 未能於上述 PCR 條件中被偵測出來，本實驗尚利用另一種適合增幅長片段 PCR 產物的 DNA polymerase，*TaKaRa Ex Taq* (TaKaRa) 來輔助使用，將 PCR 程式中 72°C 延伸 DNA 的時間設定為 5~15 分鐘，如此可偵測到長達 20 kb 的 PCR 產物。

4. 瓊脂糖明膠電泳 (Agarose gel electrophoresis)

瓊脂糖明膠用 1×TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA)

配製成 1.5%~2% 的電泳膠片，首先秤取瓊脂糖明膠（Seakem LE agarose, FMC. BioProducts, USA）加入 1×TAE buffer，利用微波爐加熱使瓊脂溶於 1×TAE buffer 內，待冷卻至約 55°C，加入 10 mg/L 之 ethidium bromide（Sigma）使其濃度為 0.5 mg/L，混合均勻後，倒入預先準備好的模盤中，待明膠凝固堅硬後，將梳齒拔除，放入已加有 1×TAE buffer 之小型水平式電泳槽（Mupid-2, Cosmo, Japan）內。待電泳之 PCR 產物加入示蹤劑（tracking dye；50% glycerol, 12.5 M Tris; pH 8.0, 60 mM EDTA, 0.01% bromphenol blue, 0.01% xylene cyanol）混合均勻，以尖端小管吸取注入已製備完成的瓊脂糖明膠平板前端的小孔（well）中，以 100 伏特電泳約 20 分鐘後，將明膠放在紫外線觀察箱（ultraviolet transilluminator; Ultraviolet Product, USA）上觀察，同時以拍立得相機（Polaroid）拍照。

5. PCR 產物分子量之計算

PCR 產物於電泳分析時，同時取已知標準分子量 DNA 片段的核酸標誌（Molecular weight marker, 1 kb ladder, Promega, USA）做對照一併進行電泳，電泳後的明膠以 PHOTO-CAPT Version 97（Vilber Lourmat, France）軟體將影像輸至電腦中，再利用 Bio-Profil 之 Bio-1D V.97 軟體（Vilber Lourmat）中計算分子量的功能，在繪出分子量

標準曲線後，可得到未知的 PCR 產物片段的大小，操作過程均依說明書的指示進行。

四、Integron 於菌株內存在位置之分析

為得知 integron 在菌體內所在的位置是否在質體上，主要利用質體快速抽取及南方雜交來進行分析，實驗敘述如下：

(一) 質體 DNA 之抽取

質體快速抽取法是依照 Kado & Liu 之方法加以修改而成 [Kado and Liu, 1981]。首先將菌體接種於 L broth (tryptone 10 g, sodium chloride 10 g, yeast extract 5 g, 配成 1 升溶液)，於 35 °C 恆溫箱振盪培養隔液，取 1 ml 菌液至 1.5 ml 微量離心管 (ependorf microcentrifuge tube)，離心後去除上清液，將沈澱下來的菌體懸浮於 100 μ l E buffer (40 mM Tris, 2 mM sodium EDTA, 以 glacial acetic acid 調整 pH 至 7.9)，以振盪器 (vortex mixer) 使之均勻混合之後，加入 200 μ l lysing solution (3% SDS, 50 mM Tris, 以 NaOH 調整 pH 至 12.6) 蓋緊離心管，上下顛倒緩慢搖晃使溶液由混濁變為澄清。隨即於 60°C 水浴中加熱 1 小時，然後冷卻至常溫，最後加入 600 μ l 的 phenol/chloroform (1:1, v/v) 混合液，將蓋子蓋緊，上下顛倒

緩慢搖晃，直至溶液均勻混合，於 7000 x g 離心 15 分鐘，使兩層液面分開，此時細胞殘骸、蛋白質及染色體 DNA 聚集於界面層，用微量吸管小心吸取 60 μ l 上清液，加入 15 μ l tracking dye，以便電泳分析。

（二）瓊脂醣明膠電泳

如前述方法配製 0.8% 瓊脂明膠，但不加 ethidium bromide，再將抽取出的質體 DNA 加入 tracking dye，放入瓊脂明膠平板前端小孔中，以 100V 電泳 2~2.5 小時後，明膠以 0.5 mg/L 的 ethidium bromide 染色 20 分鐘，再以自來水退染 5 分鐘，最後將明膠放在 ultraviolet transilluminator 上觀察，以拍立得（Polaroid）相機照相。

（三）南方雜交分析（Southern hybridization）

主要包括下列幾大項步驟：

1. DNA 的轉印（Blotting）

質體 DNA 在經過電泳分析後，藉 ethidium bromide 染色後在 UV transilluminator 觀察並照相，接著便可以進行轉印，將明膠上的質體 DNA 轉印至尼龍膜（nylon membrane）上。轉印方法是利用真空轉印系統（Vacuum blotting system，LKB

2016 Vacugene)，包括一個真空幫浦（vacuum blotting pump）和一個轉印槽（LKB 2016 Vacugene blotting unit）。

首先先剪與待轉印的明膠一般大小的尼龍膜（Boehringer-Mannheim，Germany），用二次蒸餾水浸濕後，再浸泡於 6X SSC 中 15 分鐘，以提高 DNA 的轉印效果。然後將尼龍膜置於轉印槽內的多孔浸透性平板（porous support screen）上，其上覆蓋塑膠膜，但塑膠膜中央需剪一個與尼龍膜大小相若的轉印窗（window），使尼龍膜恰置於塑膠膜轉印窗內，將要轉印的明膠放置於尼龍膜上，並確定明膠上的電泳起始點和電泳後的 DNA 在轉印窗的範圍內，此外尼龍膜-塑膠膜-明膠三者間需緊密接觸而無氣泡存在。再將轉印槽四角的螺旋帽旋緊，轉印槽與幫浦以管子連接，使整個轉印系統呈真空狀態，開啟幫浦，壓力調至 40 cm · H₂O。在明膠上倒入 0.25 N HCl 的去嘌呤溶液（depurination solution），溶液需覆蓋滿明膠表面，作用 5 分鐘後，傾斜轉印槽，用吸管將殘餘溶液吸出丟棄，加入變性溶液（denaturation solution，1.5 M NaCl/0.5 M NaOH），作用 5 分鐘，吸出丟棄，加入中和溶液（neutralising solution，1.0 M Tris/2.0 M NaCl，pH 5.0），

同樣作用 5 分鐘，吸出溶液丟棄，加入 20X SSC 溶液 (3.0 M NaCl/0.3 M sodium citrate-dihydrate, pH 7.0) 轉印 1~1.5 小時，此時需注意隨時補充 SSC 溶液，壓力並持續保持在 40 cm · H₂O。轉印完畢，關掉幫浦，鬆開旋帽，取出尼龍膜，於 ultraviolet transilluminator 下觀察，在尼龍膜上標記出電泳的起始點，將尼龍膜風乾後，以 UV crosslinker (Spectrolinker, Spectronics, XL-1000) 於 120 mj/cm² 能量下照射尼龍膜二次，再以 UV transilluminator 照射 3 分鐘將 DNA 固定於尼龍膜上備用。

2. 非輻射性 DNA 探針標記

本研究中南方雜交法是使用 Boehringer-Mannheim (BM) 的非輻射性 DIG system 來進行 DNA 之標記與偵測 (圖 3)，本實驗使用一個與 integron 之 integrase 基因具特異性的寡核苷酸 (oligonucleotide) 探針，其 DNA 序列為 5'-GCCTCGACTTCGCTGCTGCCC-3' [Schwocho *et al.*, 1995]，探針之標記乃依照 BM 之產品 DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit 使用說明進行。在離心管內加入下列各成分：5X Reaction buffer 4 μ l，CoCl₂ solution 4 μ l，欲標記的

oligonucleotide 100 pmole, digoxigenin-11-ddUTP 1 μ l, terminal transferase 1 μ l, 加無菌水使反應體積為 20 μ l, 混合均勻後置於 37°C 反應 15 分鐘, 然後置於冰上, 加入 1 μ l 200 mM EDTA (pH 8.0) 以中止反應。此標記過程中藉由酵素 terminal transferase 可在每一個 oligonucleotide 的 3' 端加上一個 digoxigenin-11-ddUTP, 因為 ddUTP 使 oligonucleotide 無法進行延長, 其鹼基序列不會改變, 如此可維持 oligonucleotide probe 之特異性, 標記完成之探針貯存於 -20°C 備用。

3. 前雜交 (Prehybridization)

DNA 轉印完成之尼龍膜在進行雜交反應前, 為了避免非特異性雜交發生, 因此將尼龍膜先經過前雜交處理, 以提高雜交反應之特異性。將尼龍膜放進耐熱塑膠袋中, 加入 DIG Easy Hyb 溶液 (BM), 所需溶液量依尼龍膜大小增減, 以每 100 cm² membrane 加入 20 ml DIG Easy Hyb 溶液為原則, 擠出袋內的氣泡後, 以瞬間封口機封口, 在水浴箱中輕微振盪 4~6 小時, 反應的溫度以比 oligonucleotide probe 的 T_m 值約低 5~10°C 下進行。

4. 雜交 (Hybridization)

將製備好的探針 (Dig-labeled oligonucleotide) 加熱煮沸 10 分鐘後，急速冷卻以避免多餘的二級結構，變性後的探針加入到 DIG Easy Hyb 溶液中，溶液量以 2.5 ml/100 cm² membrane 為原則，探針終濃度約為 1-10 pmole/ml，將前雜交後的塑膠袋剪開，倒出前雜交溶液，加入含有探針之 DIG Easy Hyb 溶液，再用瞬間封口機封口，水浴箱中，輕微振盪，作用 16~18 小時，雜交反應的溫度則與前雜交反應時相同。

5. 雜交後清洗 (Post-hybridization washes) :

取出雜交反應後的尼龍膜，2X SSC/0.1% SDS 於雜交反應溫度下洗滌兩次，每次 5 分鐘；再用 0.1X SSC/0.1% SDS 也是於雜交反應溫度下洗兩次，每次 15 分鐘，洗去未結合的探針。

6. 偵測以 DIG 標記之已雜交探針 (Detection of DIG-labeled, hybridized probe)

清洗過的尼龍膜便可以進行探針之偵測，本實驗是利用非輻射性的化學發光偵測法 (chemiluminescent detection) 測定已雜交之探針，依 BM 產品 DIG Luminescent Detection Kit 的使用說明進行，過程中所需的試劑則使用同為 BM 之產品

DIG Wash and Block Buffer Set 中的試劑。步驟如下所述，反應均在室溫下進行：尼龍膜先以 washing buffer (100 mM maleic acid, 150 mM NaCl; pH 7.5; 0.3% (v/v) Tween 20) 潤濕 1~5 分鐘，然後加入適量的 blocking solution [以 100 cm² 之尼龍膜加入 100 ml blocking solution 為原則，blocking solution 原為 10X stock 溶液，使用前需以 1X maleic acid buffer (100 mM maleic acid, 150 mM NaCl; pH 7.5) 稀釋成 1X 溶液] 輕微搖晃作用 30 分鐘，之後將尼龍膜平鋪置入合適的透明塑膠袋內，加入以 blocking solution 稀釋 5000 倍的 anti-DIG-AP (anti-digoxigenin alkaline phosphatase)，封住塑膠袋，於室溫輕微搖晃 30 分鐘。當已標記 digoxigenin-11-ddUTP 的探針與尼龍膜上的核酸進行特異性結合後，探針上的 digoxigenin 便可與 anti-DIG-AP 結合形成抗原，抗體之專一性結合，反應後，以 washing buffer 於室溫下清洗尼龍膜 2 次，每次 15 分鐘，以除去未結合的 anti-DIG-AP。接著以 Detection buffer (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl; pH 9.5) 浸潤 2~5 分鐘，將尼龍膜再次平鋪置入新的塑膠袋，最後加入 ready-to-use 的受質 CSPD (Disodium 3-(4-methoxyspiro{1, 2-dioxetane-3, 2'-

(5'-chloro)tricyclo [3. 3. 1. 1^{3,7}] decan}-4-yl)phenyl phosphate)

於尼龍膜上，使 CSPD 能在 alkaline phosphatase 的去磷酸化作用下，分解並產生發光物質，稱為發光反應 (Luminescence reaction) (圖 4)，在室溫下作用 5 分鐘後，吸出多餘的液體，再於 37°C 放置 5~15 分鐘以增強發光反應，然後即可進行自動放射顯影 (autoradiography)。

7. 自動放射顯影 (Autoradiography)

將尼龍膜封於透明塑膠袋內，固定於 X 光片夾 (X-ray film cassette, Kodak) 於暗房內，將 X 光片 (Kodak, BioMax film) 覆蓋於尼龍膜上，一同壓於片夾內，於室溫感光 15~25 分鐘後，即可以自動沖片機沖片。

五、Integron 轉移之分析—接合試驗 (conjugation)

本實驗利用質體之接合反應探討 integron 藉質體在菌株間轉移的可能性，依據 Lin 及 Chang 的方法加以修改進行接合反應 [Lin and Chang, 1992]。授與菌株 (donor strain) 為 integron 位於質體上的菌株，接受菌株 (recipient strain) 是來自 Dr. B. Rowe (Central Public Health Laboratory, NCTC, London, UK) 之 *E. coli* K12 14R525 (*F^{lac⁺}nal^r*) 或 *E. coli* K12 20R764 (*F^{lac⁺}rif^r*)。當授與菌株對 nalidixic acid 呈抗藥性

時，則接受菌株挑選 *E. coli* K12 20R764，反之，若呈敏感性時，接受菌株挑選 *E. coli* K12 14R525。

先將授與菌株與接受菌株接種在 L Broth，35°C 溫箱隔夜培養，之後再於 35°C 振盪培養箱次培養，使菌液濃度達 3×10^8 CFU/ml，最後取 1 ml 之授與菌株和 9 ml 之接受菌株混合，分別於 35°C 及 28°C 靜置培養 18~24 小時，繼之取適量之接合混合液塗佈於含有 nalidixic acid 或 rifampin 及授與菌株具有的抗藥性藥物的 Mueller Hinton 選擇性培養基上，置 35°C 隔夜培養後，選取接合轉移菌 (transconjugant)。

另外授與菌株及接受菌株分別接種在上述之選擇性培養基內，做為接合反應之對照組。接合後選取得到的接合轉移菌，皆再以前述之聚合酶鏈鎖反應和南方雜交法確定是否有 integron 之存在。

六、Integron 攜帶之基因片匣之分析 (Identification of integron-borne gene cassettes)

前述方法三中以 PCR 所增幅的 integron 片段即已包含了嵌入在 integron 兩個 conserved segments 間的基因片匣的部份，因此取純化過的 PCR 產物進行核酸直接定序 (direct nucleotide sequencing) 讀得增幅片段之基因序列以確定基因片匣種類，再與 GenBank database 內的已知基因做相似性之搜尋比對，即可得知 integron 所攜帶之基因片匣

為何。實驗方法及步驟說明於後：

(一) PCR 產物的純化 (圖 5)

(1) 單一 PCR 產物之純化

若 PCR 結果得到單一之 PCR 產物，則可依照 QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, Germany) 之指示說明，除去 PCR 反應後殘餘的引子、dNTPs、Taq polymerase 及鹽類等反應物。首先在 PCR 產物加入其五倍體積量的 Buffer PB，混合均勻使 Buffer PB 與 PCR 產物結合，將 QIAquick spin column 置於 2 ml 的收集管上，將上述混合液加進 QIAquick spin column 內，於 10,000 x g 轉速下，離心 1 分鐘，此時 DNA 已吸附至 spin column 中的 silica membrane 上，而其餘雜質則因不會結合到 silica membrane 上而通過 column，包含在離心後的液體內，棄去收集管中的液體，QIAquick spin column 置回收集管上，加入 0.75 ml 的 Buffer PE，於 10,000 x g 轉速下，離心 1 分鐘，可去除殘留的鹽類，棄去收集管中的液體後，再於同樣的轉速下離心 1 分鐘，以除去殘餘的 Buffer PE。之後將 QIAquick spin column 置入乾淨的 1.5 ml 之微量離心管中，加入 50 μ l Buffer EB，靜置 1 分鐘後，於

10,000 x g 離心 1 分鐘即可將 DNA 由 silica membrane 內析出以回收產物，純化過的 PCR 產物，利用瓊脂明膠電泳，配合一已知濃度 ($100\ \mu\text{g/ml}$) 的 1000 bp 的 DNA 定量標誌 (DNA Quantitation Standards kit, GenSura Laboratories, USA) 同時進行電泳，藉 PCR 產物片段亮度與 DNA 定量標誌比較，估算純化後產物的濃度。

(2) 非單一之 PCR 產物純化

因為菌體內可能有不只一個 integron 存在，PCR 結果便可能得到一個以上的增幅產物，此時可利用 QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN) 自瓊脂明膠中將 PCR 產物分別純化出來。PCR 產物於 1% 瓊脂明膠電泳後，將明膠置於紫外線觀察箱上，以長波紫外光照射，將欲純化的 PCR 產物分別切下置於離心管內，稱重之後，每 100 mg 的明膠加入 300 μl Buffer QG，置於 50°C 水浴箱作用 10 分鐘直到明膠完全溶解。將 QIAquick spin column 置於 2 ml 收集管上，明膠溶解後的液體加入至 QIAquick spin column 中，以 10,000 x g 離心 1 分鐘，使明膠內的 DNA 片段結合到 column 內的 silica membrane 上，丟棄離心後收集管內的液體，QIAquick spin

column 再放回原收集管上，再加 0.5 ml Buffer QG 到 QIAquick spin column，離心 1 分鐘，此步驟可移除所有之 agarose，離心後的液體再丟棄之，然後加 0.75 ml Buffer PE 到 QIAquick spin column 內，靜置 2~5 分鐘後，離心 1 分鐘，可洗去多餘的鹽類，丟棄離心下來的液體，再將 QIAquick spin column 置回收集管上，再離心 1 分鐘，以去除殘餘的 Buffer PE，將 QIAquick spin column 放在一乾淨的 1.5 ml 離心管上，加入 50 μ l Buffer EB 到 QIAquick spin column 內，離心 1 分鐘，即可回收純化之 PCR 產物，純化後的產物濃度則如上述(1)中的方法估算之。

(二) 核酸自動定序分析

純化後的 PCR 產物便可直接進行 DNA 的定序，核酸之定序乃利用自動定序分析儀 (Autosequencer, ABI PRISM 373, USA) 及 DNA 聚合酶定序試劑組 (Cycle Sequencing Kits with AmpliTaq DNA Polymerase Fluorescent Sequencing, ABI-PRISM, USA)，核酸定序時使用的 sequencing primer，初次先使用 PCR 時的引子 5'-CS 和 3'CS，可分別由 PCR 產物的 5'和 3'端定序，較長的增幅片段之序列若無法僅以這兩個引子完成定序時，則由初步得到的序列中再設計引子把整段 PCR 產物序列完整定

出，以下逐一說明實驗步驟。

1. Cycle Sequencing 及反應產物之純化

本實驗所選用的為 Dye Deoxy Terminator Kits，試劑組中的 Terminator，含有來自 *Thermus aquaticus* 耐熱菌之 DNA polymerase (Taq)，與帶有不同螢光染劑的 dideoxynucleotide phosphate (ddNTP)，以及 deoxynucleotide (dNTP)。取先前製備好之純化 PCR 產物 0.25-0.5 μ g，定序用引子 3.2 pmole 以及 8 μ l dye terminator premix，加入 0.2 ml 微量離心管後，以二次蒸餾水將總體積調整至 20 μ l，再將微量離心管放入 GeneAmp 2400 PCR system (Perkin Elmer) 機器中進行 cycle sequencing，反應條件如下：96°C 10 秒，55°C 5 秒，60°C 4 分，總共進行 25 個循環，反應進行完畢後，將 2 μ l sodium acetate (pH 5.5) 和 60 μ l 純酒精混合，加入 PCR 產物後放置冰上 10 分鐘，以 15,300 x g 於 4°C 下離心 30 分鐘，小心吸取上清液丟棄，加入 250 μ l 的 70% 絕對酒精，以吸管抽吸數次混合均勻，再次離心，吸取上清液丟棄後，在室溫下靜置 5 分鐘使殘餘之酒精揮發後備用。

2. 自動定序分析儀之開機與電泳用玻璃之準備

使用分析儀前須先啟動主機，設定所須之電泳條件（如電泳之瓦特數及電泳時間），所欲收集訊息的時間及分析並儲存資料。電泳條件為固定功率之模式，是為 40 瓦特（40 watts），第一次使用時完成基本設定後，下一次使用則不須再設定，只須檢查無誤即可。進行電泳之玻璃板需以純酒精拭乾淨，接著進行電泳用之玻璃板測試，即測驗二片玻璃是否乾淨，不會發出雜訊干擾訊息之接收，若無雜訊，則可將二片玻璃板中夾入邊條（spacer），並以膠帶封住三邊，平均地夾上鐵夾固定。

3. 電泳凝膠的製作

製備 4.75% polyacrylamide gel 以便進行 DNA 序列之電泳，一片 polyacrylamide gel 大約需要 60 ml 溶液，配製方法如下：2.71 g acrylamide powder（Serva，Germany），0.14 g bis-acrylamide powder（N, N'-Methylene bisacrylamide，Serva），30 g urea（Serva）加上 23 ml 二次蒸餾水，將上述成份充分混合後，將之放置於 50°C 水浴槽中，以促進粉末的溶解，待所有粉末都溶解以後，加入 0.75 g 離子交換樹脂（Biotechnology Grade Mixed Bed Resin，AG 501-X8 Resin

20-50 mesh, Bio-Rad, USA) 進行去離子作用，去離子反應 20 分鐘以後，以濾紙將離子交換樹脂過濾並丟棄，濾液倒入一個新的乾淨燒杯中，再加入 6 ml 10×TBE 電泳緩衝液，最後加入適量二次蒸餾水將總體積校正至 60 ml，本溶液可在 4 °C 冰箱保存一個星期直至灌膠。灌膠前先將此溶液放置於室溫使之回溫，加入 0.03 g APS (ammonia persulfate, Merck, Germany) 及 33.8 μ l TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine, Merck) 並充分混合之。以 50 ml 針筒吸取上述溶液，並小心將之注入兩片玻璃縫中，儘量避免產生氣泡，若有氣泡也要將之除去，待兩片玻璃及 spacers 間的空隙都充滿溶液後，再插入梳齒，灌膠後至少須等候兩個小時，讓 acrylamide 及 bisacrylamide 充分聚合化 (polymerization) 才可進行電泳。拆下黏貼玻璃板之膠帶後，須再測試玻璃板以確保膠片製作過程沒有沾污玻璃板。

4. 電泳前預跑 (Pre-run gel)

將含膠玻片及電泳設備裝置於主機內，置入足量的 1X TBE 於上下槽中，插上電極接頭，蓋上外殼，在主機控制面板中找到 “Pre-run gel” 的指令，開始預跑。預跑條件仍為固

定功率 40 W，液晶面板上可看到電壓約在 1000-1400 伏特，電流約為 18-22 微安培，溫度約 40°C，預跑約 1 小時以內。

5. 電泳前之檢體處理

在預跑結束前，將先前 1. 中沈澱乾燥之 cycle sequencing product 取出，加入 4 μ l 去離子的 formamide loading buffer (5 μ l 去離子 formamide 加 1 μ l 50 mM EDTA，pH 8.0)，以食指輕敲微量離心管使 PCR 產物均勻溶解在 formamide loading buffer 中，將含 PCR 產物之微量離心管放入 90°C 熱水中放置 2 分鐘以便將雙股 DNA 變性成為單股 DNA，取出後迅速放於冰上使雙股 DNA 維持在單股狀，馬上進行 DNA 電泳。

6. 電泳及訊息之接收與分析

將電泳條件調整如下：2500 V、400 mA、40 Watt，進行電泳，當 DNA 進行電泳時，也同時以雷射光激發 DNA 所持有的 Dye terminator，電泳槽內的記錄器也同步收集反射光並記錄之，待電泳結束後再以系統內建立軟體分析並列印 DNA 序列。

(三) 基因序列之電腦分析

為了確知核酸定序所得到的 DNA 序列是何種基因，需進

行基因相似性搜尋，可利用一相似性搜尋程式 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) [Altschul *et al.* 1997] 直接在網路上進行比對。進入美國 National Center for Biotechnology Information 網站，網址為<http://ncbi.nlm.nih.gov>，點選 BLAST 項目後，使用 advanced BLAST search program，輸入欲進行比對之序列後，此程式即可自動搜尋 GenBank，EMBL，DDBJ，PDB 等 database 內所有的基因序列，列出與我們輸入之序列相似的基因，若輸入之序列是 database 內的已知基因，同質性可達 100%，利用電腦網路，可以迅速確認 integron 所攜帶之基因片匣種類。

七、抗藥基因片匣之抗藥性表現分析

為了確認攜帶抗藥基因的片匣其抗藥性的表現情形，本實驗將帶有不同基因片匣的 PCR 增幅片段與載體連接後進行選殖，然後選取帶有增幅片段之轉形菌株分析抗藥性表現情形，實驗步驟如下所述。

(一) 增幅片段之選殖 (Amplicon cloning)

1. 增幅片段與載體 (vector) 之連接作用 (ligation)

本實驗所選用與 PCR 增幅片段進行連接的載體為

pGEM-T Easy Vector (Promega) (圖 6)，此載體已用核酸鑑識酶 *EcoRV* 切開並在兩端均黏合了一個 thymidine (T)，由於 PCR 過程中，Taq DNA polymerase 會在增幅片段的 3'端多加一個 deoxyadenosine (A) [Clark, 1988]，由於 T-A 間的互補關係，因此增幅片段能與 pGEM-T Easy Vector 行有效地連接作用，實驗乃依 pGEM-T Easy Vector System I 的說明進行，在微量離心管中加入下列各反應物：2X Rapid Ligation Buffer，5 μ l pGEM-T Easy Vector (50 ng) 1 μ l，適量的 PCR 產物及 T4 DNA Ligase (3 weiss units/ μ l) 1 μ l，加無菌去離子水使反應總體積為 10 μ l，將各成份混合均勻，置於 4°C 隔夜反應之後，便可進行轉形作用 (transformation)。

2.X-gal plate 之製備

首先將含 1.5% Bacto-agar (Difco) 之 LB 培養液以高溫高壓菌消毒後，放置於 50°C 水浴箱內降溫備用，待降溫完畢，在無菌操作下，每 100 ml 加入事先過濾消毒，避光保存於 -20°C 製備好的 250 ml 2% X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) (Promega)，100 ml 0.1 M IPTG (isopropyl- β -thiogalactopyranoside) (Sigma) 及 200

μ l 50 mg/ml ampicillin (Sigma)，混合均勻後，將培養基分裝於細菌培養皿 (petri dish)，蓋上錫箔紙，置於室溫下使其凝固，最後在 4°C 冰箱內避光保存。

3. 勝任細胞 (competent cell) 之製備

選取 *E. coli* JM101 (*supE thi* Δ (*lac*⁺*proAB*) F' [*traD* 36 *proAB*⁺ *lacI*⁺ *lacZ* Δ M15]) 做為重組 DNA 轉形的宿主。而 JM101 需先處理成勝任細胞 (competent cell)。處理步驟為 [Sambrook *et al.*, 1989] 先將 JM101 在 2 ml L broth 培養 16~18 小時，之後次培養於 40 ml L broth 內，35°C 繼續振盪培養，使細菌生長達對數期 ($OD_{600}=0.5\sim0.6$)，用 1700 x g，4°C 離心 10 分鐘 (Sorvall RT 6000D，Du Pont，USA)，以 15 ml 100 mM CaCl₂ (需經過濾滅菌) 懸浮離心下來的細菌，於冰上放置 30 分鐘後，再次於 1700 x g，4°C 離心 10 分鐘，旋即將離心下來的細菌懸浮於 3 ml 100 mM CaCl₂，即成勝任細胞。

4. 重組質體 (recombinant plasmid) 之轉形作用

將先前經連接反應做好的重組 DNA，加入 200 μ l 的勝任細胞，輕輕拍打使混合後，靜置冰上 30 分鐘，接著於 42°C 搖盪 2 分鐘迅速放入冰上，使反應停止，最後加入 1~2 ml

L Broth 繼續培養 1 小時左右，隨後取適量培液塗佈於含 ampicillin 之 X-gal plate 上，35°C 培養箱隔夜培養。最後挑選單一白色菌落 (colony) 在 X-gal plate 上繼續培養，待進一步分析檢定。

5. 轉形菌株之篩選

挑選白色單一菌落，依前面三所述之 PCR 方法製備轉形菌株之 DNA template，進行聚合酶連鎖反應後，再以瓊脂明膠電泳分析 PCR 產物，以確定含有重組質體之轉形菌株。

(二) 攜帶增幅片段之轉形菌株抗藥性表現之分析

經篩選確定帶有選殖之增幅片段的 *E. coli* JM101 轉形菌株，依前述之藥物感受性試驗測定轉形菌株之抗藥性型式，並與增幅片段上之基因片匣種類對照，即可得知抗藥基因片匣的表現情形。

八、攜帶抗藥基因片匣菌株之脈動電泳分析

脈動電泳分析主要是想了解攜帶 integron 基因片匣之抗藥菌株之 genetic background，分析方法是依照 Maslow 等人的方法加以修改而來 [Maslow *et al.*, 1993]。

(一) 樣品製備 (Sample preparation)

即將細菌與低熔點的瓊脂糖明膠混合，製做成如方塊狀的膠體，直接在膠體內將 DNA 抽取、純化，如此可避免破壞菌體 DNA 的完整性，步驟詳述如下：

- 1.將菌體接種於 5 ml L Broth，於 35°C 振盪培養隔夜，取 1.5 ml 菌液至 15 ml 無菌塑膠試管內，再加入 5 ml 冰的 PIV buffer (10 mM Tris-HCl; pH 7.6, 1 M NaCl)，於 4°C，12,000 x g 離心 10 分鐘，棄上清液，加入 1 ml 冰的 PIV buffer，振盪混勻，置於冰浴中。
- 2.取低熔點瓊脂糖明膠 (low-melting temp, agarose, BRL, USA) 以 PIV buffer 配製成 1.3% (w/v)，於沸水浴中加熱熔融，然後於 50°C 水浴中保溫。
- 3.取 1 ml 步驟 2.的熔融態明膠至步驟 1.的試管內，迅速振盪混勻，立刻以無菌吸管吸取，加至方塊模具 (block mold) 中，然後置於冰浴中 30 分鐘，使明膠固化。
- 4.將步驟 3.的方塊取出，以手術刀切成 5×6×2mm 的小栓塊 (plug) 置於內含 4 ml lysis solution (6 mM Tris-HCl; pH 7.6, 1 M NaCl, 100 mM EDTA; pH 7.6, 0.5% Brij58 (Sigma), 0.2% sodium deoxycholate (Sigma), 0.5% sodium lauroyl

sarcosine (Serva), 20 μ g/ml RNase, 1 mg/ml lysozyme) 的試管中，於 37°C，溫和地振盪隔夜。然後將試管置於冰浴中 15 分鐘以上，以硬化栓塊。小心地以吸管吸走 lysis solution 後，加入 4ml ESP solution (0.5 M EDTA; pH 8.0, 1.0% sodium lauroyl sarcosine, 100 μ g/ml proteinase K), 50°C 水浴中，溫和振盪隔夜。

(二) 限制酶的消化與 DNA 的脈動電泳 (Restriction enzyme digestion and PFGE)

1. 將步驟 (一) 之 4 中的 ESP solution 吸走，以每次 10 ml 的 1X TE buffer (10 mM EDTA; pH 7.6, 0.1 mM Tris-HCl; pH 7.6) 洗四次 (溫和地振盪)，前三次，每次洗 2 小時，最後一次需隔夜。如此，不需要 phenylmethyl sulfonyl fluoride，即可將 proteinase K 去活性。將一個小栓塊置於內含 250 μ l 的限制酶反應溶液 [25 μ l 10X RE buffer, 25 μ l 10X BSA (final conc. 100 μ g/ μ l), 200 μ l 二次蒸餾水] 中，於 4°C 平衡 1 小時後，加入 10 U *Xba*I，溫和地混勻，於 37°C 培養隔夜。移去反應溶液，以 1 ml TE buffer 洗 1 小時。

2. 以 0.5X TBE buffer 來配製 1% 的 Seakem high-melting-temp

agarose (FMC. BioProducts)，固化後，先置於 0.5X TBE buffer 中浸泡隔夜，如此可增加膠體的清晰度及解析度。將步驟 1. 的栓塊，塞入膠體的孔洞內，再以熔融的 low-melting-temp. agarose 填滿空隙，然後以 Pharmacia LKB 2015 Pulsaphor 於 12°C 之 0.5X TBE buffer 中，電壓 200 V，脈動時間為 phase 1：2 秒，2 小時；phase 2：7 秒，4 小時；phase 3：15 秒，10 小時；phase 4：25 秒，4 小時；phase 5：40 秒，4 小時，進行階段式之多相式脈動電泳分離 24 小時。電泳結束後，將膠體取出，置於內含 ethidium bromide (0.5 μ g/ml H₂O) 溶液中，染色 30 分鐘，然後以蒸餾水退染 1 小時，於紫外燈下拍照。電泳的同時，配合已知分子量的 PFGE Marker I， λ -ladder (BM)，以便與分子量未知的限制酶片段做對照。

結 果

一、Integron 於 *E. coli* 菌株中之存在情形

104 株自泌尿道感染患者尿液檢體分離出之 *E. coli* 菌株，以聚合酶鏈鎖反應偵測 integron 的存在情形，結果有 54 株（佔 52%）可增幅得到 PCR 產物，即帶有 integron 構造，由於 PCR 中所使用的引子組分別位於 5'端和 3'端 conserved segments 上近 central variable region 的位置，因此增幅片段的大小與嵌入在 integron 的 variable region 內的 DNA 長度相若，PCR 的結果如表一及圖 7 所示，PCR 所增幅出的產物片段大小介於 1000 bp 至 3000 bp 之間，長度並不一致，此結果即表示嵌入在 integron variable region 內的基因片匣的數目和基因片匣本身的大小有所差異。由表一中所顯示 54 株 *E. coli* 中，有 46 株可增幅出單一的 PCR 產物，表示菌株帶有單一個 integron，另外 8 株則可得到大小不同的兩個增幅片段，顯示菌體內可能具有兩個 integron，分別攜帶不同大小或數目之基因片匣。此外，結果也發現有 33 株 *E. coli* 均能增幅出一段 1900 PCR 產物，表示可能有某一種 integron 佔有比例最高。另外在文獻中曾報告過有一種被命為 In0 的 integron 只具有 conserved segment，但 conserved segment 之間並沒有基因片匣嵌入 [Bissonnette and Roy, 1992]，在本研究的實驗菌株中，若有此種” empty

integron”存在，其增幅片段大小約為 150 bp，但結果並未發現有這類 integron。至於用 *TakaRa Ex Taq* polymerase 偵測結果也未發現有 long PCR product 存在。

二、Integron 於菌株內的存在位置

以 PCR 偵測出帶有 integron 之菌株，萃取其質體 DNA 以瓊脂明膠電泳分析發現菌株所具有的質體數目及其分子量分佈並不一致，進一步以南方雜交反應之結果顯示 integron 是位於細菌的質體之上，且質體分子量雖有所不同，但普遍都在 100 kb 以上（圖 8），這類質體一般可能都是屬於抗藥性質體，且具有轉移性，因此我們要進一步探討 integron 與抗藥性質體的關係，但需要先了解 integron 本身攜帶了那些抗藥基因。

三、Integron 所攜帶之基因片匣

（一）基因片匣及 integron conserved segment 特徵之識別

PCR 增幅片段經純化後進行 DNA 定序分析，然後讀出之基因序列利用電腦網路上的 BLAST 搜尋程式與已知的 database 內的基因做相似性比對，來確定增幅片段上的基因為何。在以引子 5'-CS 所讀出的序列中，可發現有 5'-conserved segment 的部分序列，然後是 *attI* site 最後要進入到基因片匣起始的 7 個

base 的重組核心部位（圖 9），其後便為基因片匣的部分，通常基因的起始譯碼（start codon）都與核心部位相距不遠，這也是片匣的特徵之一。至於以引子 3'-CS 所讀得之互補股序列，可發現包含一小部份 3'-conserved segment 的序列，及基因片匣 59-base element 末端與 3'-conserved segment 交界處的 GTTAGAT 序列，至於 59-base element 的 imperfect inverted repeat 特徵，及其 5'端的 7 個 base 的 inverse core site 也都能找到（圖 10），至於片匣與片匣之間，也有重組核心部位存在（圖 11），由上述之構造特徵，可以確定 PCR 所增幅的是 integron 的片段，而且在 conserved segments 之間的變異區嵌入有基因片匣。

（二）基因片匣之種類

一個 PCR 增幅片段就代表了一個 integron 所攜帶之基因片匣，表二所顯示的為 54 株 integron 陽性的菌株所增幅出的 integron 片段與其相對應的基因片匣，為了便於描述結果，依據單一菌株菌體內 integron 的數目及變異區長度（即增幅片段的數目和大小）將全部的 integron 分為 9 群(group)，其中 Groups 1 和 2 中，因大小相同的片段卻攜帶不同的基因，所以再根據鑑定出的基因種類將 1 和 2 這兩個 Group 再分為 a 和 b 兩個次

群 (subgroup)。基因序列經搜尋比對後發現，嵌入在 integron 變異區內的基因片匣，除了一個是功能未知的 open reading frame *orfF* 以外，其他的都是屬於抗藥性基因，包括 4 個 trimethoprim 抗藥基因：*dfrIa*, *dfrV*, *dfr12* 和 *dfr17*；3 個 streptomycin 和 spectinomycin 抗藥基因：*aadA1a*, *aadA2* 和 *aadA4*；此外還有 gentamicin 抗藥基因 *aadB*；erythromycin 抗藥基因 *ereA2*；以及 *cmlA* 基因（可對 chloramphenicol 產生抗藥性）和 *blaP1* 基因（是一個可產生 β -lactamase PSE-1 的基因，能水解 carbenicillin 產生抗藥性）[Houvinen and Jacoby, 1991]。

（三）基因片匣之組合排列

表二也顯示了一個 integron 具有的基因片匣數目為 1~3 個，以及 integron 上基因片匣的組合排列情形。前述 PCR 結果中，在 33 株 *E. coli* 均可發現的 1900 bp 之增幅片段，帶有三個基因片匣，*dfr12*，*orfF* 和 *aadA2*（Group 3, 6, 8 皆有此 integron），所以攜帶 *dfr12-orfF-aadA2* 的 integron 在 54 株 *E. coli* 所具有的 integron 中所佔比例最高（61%），另外在 Group 2b 和 Group 8 的 1600 bp integron 增幅片段，所攜帶的基因片匣為 *dfr17* 和 *aadA4*，這個 integron 可在 5 株 *E. coli* 菌株中偵測到。

這兩個基因片匣在本實驗中被發現時，database 內並無完全相同的基因存在，所以是兩個新型的抗藥基因片匣，它們的 DNA 序列及與其他已知基因的比較在後面段落會有詳細的說明。另外 PCR 所發現 8 株 *E. coli* 菌體內可偵測到兩個大小不同的 integron 片段，在序列分析後，可確定大小不同的兩個片段分別帶有不同的基因片匣，例如 Group 6 中，具 1000 bp 的增幅片段的 integron 攜帶的基因片匣是 *aadA1a*，具 1900 bp 增幅片段的 integron 則是攜帶 *dfr12-orfF-aadA2* 這三個基因片匣，因此單一菌株體內會有兩個（或更多）攜帶不同基因的 integron 同時存在（Group 6, 7, 8, 9 都是兩個 integron 同時存在於單一菌株內）。此外，Group 7 中的 2100 bp 增幅片段攜帶 *dfrV* 和 *ereA2* 片匣，雖然這兩個片匣並非新發現，但 *dfrV* 和 *ereA2* 片匣組合同位於 integron 則尚未在文獻中報告過，顯示這是一種新的片匣組合方式。

（四）基因片匣之出現頻率

在本研究所發現之 integron 攜帶的基因片匣中，以 streptomycin 和 spectinomycin 的抗藥基因 *aadA*（包括 *aadA1a*，*aadA2* 和 *aadA4*）最為普遍，54 株菌的 integron 至少都帶有一

種 *aadA* 基因，在 13 株 *E. coli* 所具有之 1000 bp 的增幅片段，*aadA* 基因是 integron 攜帶的唯一之基因片匣 (Group 1a, 1b, 6 和 7)，但有 45 株菌所偵測到的其他大小的增幅片段中 (Group 2a~Group 9)，*aadA* 基因則與不同的基因片匣組合 (2100 bp 之增幅片段除外，它所具有的基因片匣是 *dfrV* 和 *ereA2*)，例如 *aadA2* 除了和 *dfr12*, *orfF* 同位於 integron 內，也有 integron 是攜帶 *aadA2* 和 *blaP1* 的片匣組合 (Group 4 和 9)，除了 *aadA* 基因外，另一種也普遍嵌入在 integron 內的基因片匣是 trimethoprim 抗藥基因 *dfr*，4 種不同的 *dfr* 基因 (*dfr1a*, *V*, *12* 和 *17*) 可在 43 株 (佔 80%) *E. coli* 菌株中被發現。

(五) 新型抗藥基因片匣之發現

1. 1600 bp 之增幅片段攜帶新型抗藥基因片匣

表二中 Group 2b 和 8 的 1600 bp integron 增幅片段，經定序分析與基因比對顯示有兩個基因存在，分別屬於 *dfr* 基因與 *aadA* 基因，但 database 內已知的 *dfr* 基因和 *aadA* 基因並未搜尋到完全相同者，表示這兩個基因是新發現的 *dfr* 和 *aadA* 基因，分別命名為 *dfr17* 和 *aadA4*，其構造圖及內核酸鑑識酶圖譜如圖 12 所示。圖 13 為 *dfr17* 與 *aadA4* 的 DNA

序列，可發現基因片匣的辨識特徵存在，如基因兩端有 7 個 base 的重組核心部位 (*dfr17* 5'端為 GTTAGCC，3'端與 *aadA4* 交界處為 GTTAGGC，*aadA4* 3'端之 GTTAGAT 則是與 integron 3' conserved segment 交界之保留序列)，此外靠近基因的 3'端則有 59-base element 存在，所以可確定這兩個基因是以片匣的形式嵌入在 integron 5'和 3' conserved segment 間的變異區內。進一步將此 1600 bp 增幅片段選殖入 pGEM-T Easy 載體，挑選出帶有此增幅片段的轉型菌株對 trimethoprim、spectinomycin 和 streptomycin 具抗藥性，最小抑制濃度分別為 >2048 mg/L 及 128 mg/L 和 64 mg/L，表示 *dfr17* 和 *aadA4* 基因分別對 trimethoprim 及 spectinomycin/streptomycin 產生抗藥性。*dfr17* 和 *aadA4* 的 DNA 序列已登錄於 GenBank database 內，登錄號碼為 AF170088。

2.*dfr17* cassette

此 integron 上的第一個片匣 *dfr17* cassette 長 616 bp (圖 13 中 positions 2 to 617)，包含了一個 471 bp 長的 open reading frame 可轉譯出 157 個胺基酸，以 positions 23 的 TTG 為起始譯碼，雖然 TTG 譯碼對應的胺基酸為 leucine，並非一般典型之起始譯碼 ATG 對應之胺基酸 methionine，但它是整個

dfr17 基因中唯一前面有一段可能為 ribosome binding site 序列的譯碼，這一個可能的 Shine-Dalgarno 序列為 TAAGGGAGT。在文獻報告中也指出，在不同的 DHFR 基因如 *dfrI*、*dfrV* 和 *dfrVIII*，也是以非典型之 GTG 和 TTG 為起始譯碼[Adrian *et al.*, 1998]。至於 *dfr17* cassette 的 59-base element 則有 133 bp (positions 491 to 623)，不同基因片匣所具有的 59-base element 的長度並不一致，有學者將某些 59-base element 依其相關性分成個 Group，其中一個 Group 包含了目前所發現長度最長的三個 59-base element，長度介於 127 bp~134 bp [Recchia and Hall, 1997]，它們分別是 *bla_{IMP}*、*dfrVIII* 和 *qacE* 基因的 59-base element，*dfr17* 的 59-base element 與 *dfrVIII* 134 bp 長的 59-base element 有 87% 的相似性，長度又有 133 bp，因此可將之歸類在這個 Group 的 59-base element 之中。

根據文獻報告，由質體控制而產生具有 trimethoprim 抗藥性的 DHFR 已有十幾種不同型別存在，以胺基酸序列進行 DHFR 的種系分析 (phylogeny analysis) 則將不同型的 DHFR 歸為不同的 family，其中 family 1 包含的 DHFR 型別最多，

在臨床菌株內也最常見 [Huovinen *et al.*, 1995]，屬於 family 1 的 DHFR 之 polypeptide chain 都是 157 個胺基酸，彼此間相似程度有 64%~88%，且都具高程度的 trimethoprim 抗藥性 (MIC>>1000 mg/L)，由 *dfr17* 基因序列所預測的胺基酸序列長度也是 157 個，並且 *dfr17* 也表現出高程度 trimethoprim 抗藥性，此外表三列出 *dfr17* 與屬於 family 1 的已知 DHFR 基因和胺基酸序列的比較，其中與 *dfr17* 相似性最高的是 *dfr* VIII，達 91%，其餘 DHFR 與 *dfr17* 胺基酸的相似性也在 64%~68% 之間，從上述 *dfr17* 的特性可認為，本實驗所發現的 *dfr17* 是 family 1 中另一個新鑑定出來的 DHFR。

3. *aadA4* cassette

位在 *dfr17* 之後的另一個片匣為 *aadA4*，長 895 bp (bases 618 to 1512)，包含一個 789 bp 的 open reading frame，以 ATG 為起始譯碼 (positions 627 to 629)，表四所顯示的是 *aadA4* 基因與其他同具 streptomycin 和 spectinomycin 抗藥性的 *aadA* 基因的比較，*aadA4* 與較普遍存在的 *aadA1a*，*aadA1b* 和 *aadA2* 相似程度並不高，胺基酸相似性分別為 57% 和 56%，與 *aadA3* 則有 95% 的相似性，*aadA4* 的 59-base element 長 57 bp (positions 1462 to 1518)，與 *aadA1* 和 *aadA2* 的 59-base

element 相似性約 70%，*aadA3* cassette 的 3'端因為插入了一個 IS26 序列，使 cassette 序列被截斷所以並無 59-base element [Adrian *et al.*, 2000]，表四中也列出 Sandvang [Sandvang, 1999] 於丹麥所報告的 *aadA5* 基因，雖然 cassette 名稱不同，但與 *aadA4* 的序列完全相同，由於登錄的時間相近，我們在進行 *aadA4* 序列比對時，database 內尚無 *aadA5* 的序列存在，所以將 *aadA4* 視為新報告的基因，目前在 GenBank database 登錄新的基因序列時，基因名稱並未統一，因而可能有基因名稱不同但序列相同或是基因名稱相同但序列不同的情形出現，也許在日後需要加以統一以免造成混淆。由表四的比較可知 *aadA4* 是與發現已久的 *aadA1* 和 *aadA2* 不同的另一個對 streptomycin 和 spectinomycin 具抗性的 *aadA* 基因。

四、Integron 抗藥基因片匣之表現及與菌株抗藥性之相關性

(一) 抗藥基因片匣之表現

包含基因片匣之增幅片段與 pGEM-T Easy 載體連接，經轉形作用挑選出帶有增幅片段之 *E. coli* JM101 轉形菌株，測定轉形菌株的抗藥性發現，轉形菌株所表現之抗藥性與增幅片段所帶的抗藥基因片匣相符，例如前述攜帶 *dfr17* 和 *aadA4* 的 1600

bp 增幅片段可表現 trimethoprim, spectinomycin 和 streptomycin 的抗藥性, 又如具 1900 bp 增幅片段(攜帶 *dfr12*, *orfF* 和 *aadA2*) 的轉形菌株, 也是對 trimethoprim、spectinomycin 和 streptomycin 具抗性, 由此可知抗藥基因片匣在有適當的 promoter 存在時, 就可表現出片匣上基因, 而造成菌株之抗藥性, 54 株 *E. coli* 其 integron 攜帶之基因片匣的抗藥性型式亦列於表二。

(二) *E. coli* 菌株之抗藥性

表二也列出 54 株 integron 陽性菌株對不同藥物之抗藥性, 結果可發現 *E. coli* 菌株都可以表現 integron 上基因片匣之抗藥性, 例如全部的菌株至少都帶有一種 *aadA* 片匣, 所以都對 streptomycin 和 spectinomycin 具抗性, 帶有 *dfr* 基因片匣之菌株, 則對 trimethoprim 具抗藥性, 而 54 株菌皆對 sulfonamide 具抗性, 顯示 integron 與 sulfonamide 抗藥性關係密切。

然而對照表二中基因片匣和 *E. coli* 菌株的抗藥性也可以發現, integron 攜帶之抗藥基因片匣並未完全涵蓋 *E. coli* 菌株之抗藥性, 表二顯示有 39 株及 22 株 *E. coli* 分別對 chloramphenicol 和 gentamicin 具抗藥性, 但只有 1 株菌其 integron 攜帶 chloramphenicol 和 gentamicin 抗藥基因片匣(Group 5 的 integron

具有 *cmlA* 和 *aadB* cassettes)，又對 ampicillin 具抗性的有 40 株，但與 ampicillin 抗藥性相關之 *oxa* 基因片匣則並未發現。此外，僅有少數菌株（2%~7%）對 cefmetazole、cefoperazone、ceftazidime、moxalactam、aztreonam 和 netilmicin 具抗性，對 amikacin 則全部呈現敏感性。

五、Integron 之轉移

由南方雜交反應結果可知 *E. coli* 菌株所帶的 integron 是位於質體上，為進一步了解位於質體上的 integron 是否可藉著質體轉移，我們以帶有 integron 的 *E. coli* 臨床菌株為授與菌株，以 integron 抗藥基因片匣所帶之抗藥性為篩選標記，利用接合反應進行質體轉移，挑選接合轉移菌（transconjugant），抽取其質體，然後以南方雜交和聚合酶連鎖反應分析接合轉移菌之 integron 及其 PCR 增幅片段，結果顯示接合轉移菌獲得之質體有 integron 存在，且帶有與原 *E. coli* 菌株 integron 相同之抗藥基因片匣，表示 integron 及其所攜帶之抗藥基因片匣可藉轉移性質體在菌株間傳遞。

六、攜帶抗藥基因片匣菌株之脈動電泳分析

由前述 integron 攜帶之抗藥基因片匣分析結果，攜帶相同抗藥基因片匣的 integron 可在不同的菌株中被偵測到，例如有 33 株 *E. coli*

之 integron 均攜帶 *dfr12*、*orfF* 和 *aadA2* 片匣，我們更進一步探討具有相同或不同 integron 抗藥基因片匣的 *E. coli* 抗藥菌株間的相關性，以了解位於 integron 之抗藥基因是僅在某一同源或相近的菌株間存在，或是已在無基因關聯性的不同菌株間散佈開來了。在前述南方雜交反應時以瓊脂明膠電泳分析 *E. coli* 質體 DNA 時，雖然菌株的質體數目及分子量分佈並不一致，然而質體畢竟是屬於菌體染色體外的 DNA，在菌株之間有獲得或失去的可能。因此菌株之間相關性的探討主要仍以評估細菌本身 genetic background 的相似程度最為可信，脈動電場膠體電泳分析 (pulsed-field gel electrophoresis; PFGE) 則是普遍被認為菌株鑑別力相當強的分子分型 (molecular typing) 方法 [Olsen *et al.*, 1994]。本實驗中為了使所有試驗菌株的菌體 DNA 經內核酸鑑識酶 (*Xba*I) 切割後的片段在脈動電場膠體電泳分離及染色後能呈現均勻的亮度，以利菌株間酵素切割片段的比對，因此每個大小為 5 mm × 6 mm × 2 mm 的小栓塊 (plug) 內所含的 DNA 量需儘量一致 (約 2 μ g, 2.0×10^8 CFU)。脈動電泳後的結果如圖 14~17 所示，根據 Tenover 等人 [Tenover *et al.*, 1995] 對菌體 DNA 的限制酶切割片段經 PFGE 分離後的判讀方式，認為限制酶片段的差異在 6 條以上，即視為不同的菌株，據此標準可發現，這些帶有 integron 之 *E. coli* 菌株並無明顯之

基因相似性存在，即使是攜帶相同 integron 抗藥基因片匣之菌株，其 genetic background 也並不相同，表示 integron 及抗藥基因片匣已經在不同的菌株間散佈了。

七、Integron 陽性菌株與 integron 陰性菌株抗藥性之比較

為了更進一步探討攜帶 integron 與否對 *E. coli* 菌株抗藥性之間的關係，本實驗也一併測定另外 50 株不具 integron 的菌株的藥物感受性，並與帶有 integron 的菌株做一比較，如表五所顯示，在所選用的 17 種測試藥物中，integron 陽性菌株對其中 10 種藥物抗藥性比率明顯高於 integron 陰性菌株，其中也包括 integron 本身攜帶之抗藥性基因片匣表現的抗藥性，以及其 3'端 conserved segment 所具有的 sulfonamide 抗藥性在內，至於 integron 陽性菌株抗藥性比率較低的一些第三代 β -lactam 藥物，雖然 integron 陰性菌株對這些藥物皆不具抗藥性，但由於樣本數太小，因此並未顯示出明顯的統計學上的差異。

此外，integron 陽性菌株也呈現較顯著的多重抗藥性的趨勢，如圖 18 所示，integron 陽性菌株至少都同時對三種藥物具抗藥性，其中更有高達 69% 的菌株對七種或七種以上的藥物呈現抗藥性，最多可同時對十三種藥物具抗性；反觀 integron 陰性的菌株中，雖也對某些藥物具抗性，但僅有一株（佔 2%）可同時對七種藥物有抗藥性，七種

以上則沒有，而更有 32% 的菌株對所有測試藥物均呈現敏感性，因此由菌株抗藥性的結果可發現，具 integron 的菌株在抗藥性比率和多重抗藥性的呈現上，比不具 integron 的菌株要更為普遍。

討 論

一、Integron 之盛行率

隨著愈來愈多抗藥基因被發現形成基因片匣 (gene cassette) 的型式嵌入在 integron 內，以及實驗證實 integron 主導之特定部位重組作用 (site-specific recombination) 能夠捕獲 (capture) 基因片匣及促使基因片匣的變動 (mobilization) [Collis and Hall, 1992a, b; Collis *et al.*, 1993; Recchia and Hall, 1995a], integron 與抗藥基因片匣在細菌抗藥性的獲得及散佈上所扮演的角色也日益受到重視。本研究發現自臨床尿液檢體所分離之大腸桿菌中，有 52% 的菌株具有 integron 的結構，國外對臨床菌株中 integron 盛行率的調查報告也發現 integron 存在的比率不低，Sallen 等人 [Sallen *et al.*, 1995] 於法國的報告提出有 59%，分屬六個不同的腸內桿菌科菌種具有 integron，Jones 等人 [Jones *et al.*, 1997] 在荷蘭的報告則發現包括 7 個不同的腸內桿菌科菌種的 135 株菌中，有一半以上具有 integron，至於 Martinez-Freijo 等人分析了 [Martinez-Freijo *et al.*, 1998] 自中西歐 9 個國家收集的 163 株分屬 13 個菌種的革蘭氏陰性桿菌，integron 存在頻率也有 43%，這些報告的數據都顯示由臨床患者分離的菌株，integron 存在情形相當普遍，integron 一般較常存在於腸內菌科的菌種及綠膿桿菌內 (*Pseudomonas*

aeruginosa)，但在屬革蘭氏陽性菌之 *Corynebacterium glutamicum* 也發現有 integron 存在 [Nešvera *et al.*, 1998]，一些其他革蘭氏陰性菌菌種如霍亂弧菌 (*Vibrio cholera*) [Dalsgaard *et al.*, 1999]，曲狀桿菌 (*Campylobacter jejuni*) [Gibreel and Sköld, 1998] 也偵測到 integron 存在，可見在人體感染菌中，integron 已是普遍存在。而 Bass 等人 [Bass *et al.*, 1999] 分析自家禽（雞、鵪鶉、火雞）分離之 *E. coli* 也發現高達 63% 的菌株具有 integron，本研究及前述所偵測到的臨床檢體或動物體內的 integron，一般都帶有一個或一個以上的基因片匣。

Rosser 和 Young [Rosser and Young, 1999] 的報告則是篩選由河水中分離出的細菌，integron 存在頻率為 3.6%，遠低於臨床菌株 integron 的比率，且有一半以上的 integron 變異區內不帶有任何基因片匣，乃屬於所謂的"empty integron"。臨床菌株和自然環境中菌株 integron 分離率以及 integron 構造上的差異，原因可能在於藥物篩選壓力的不同，由於臨床醫療和畜牧養殖時，抗生素使用極為常見，在頻繁地藥物使用所給予的篩選壓力就可能造成抗藥基因片匣嵌入 integron 並篩選出具有 integron 的抗藥性細菌。

二．Integron 攜帶之抗藥基因片匣

本研究所分析之 integron，以帶有 *dfr12*、*orfF* 和 *aadA2* 這三個基

因片匣的 integron 最常見，佔了 61%，攜帶這三個基因片匣的 integron 最早是由 Heikkilä 等人在芬蘭一株泌尿道感染之 *E. coli* 中偵測到的，其後 Heikkilä 等人也在分離自芬蘭地區但源自於亞洲的志賀氏桿菌中發現此 integron [Heikkilä *et al.*, 1993]。事實上由於國際間交通之便捷，國際間旅遊往來互動的頻繁，大大提高了抗藥菌株在全球各地散佈的可能性，抗藥基因也可能呈現全球相似性，地域性的差別將逐漸模糊。本研究中所發現的新型抗藥基因片匣 *aadA4*，是存在於泌尿道感染的 *E. coli* 菌株內，而差不多同時在丹麥所發現序列相同的 *aadA5* 基因則是從引起豬隻腹瀉的 *E. coli* 菌株中分離出來 [Sandvang, 1999]，此外，近年來全球各地已有多篇文獻報告均發現由不同國家、不同地區，甚至不同的人或動物細菌宿主分離之多重抗藥性 *Salmonella typhimurium* DT104 菌株，都具有攜帶相同抗藥基因片匣的 integron [Sandvang *et al.*, 1997; Ridley and Threlfall, 1998; Casin *et al.*, 1999; NG *et al.*, 1999; Poirel *et al.*, 1999]。上述發現均顯示抗藥基因可在不同菌種、不同細菌宿主、甚至全世界不同地區散佈，而由於人、動物及環境三者之微生物生態彼此間錯綜、糾結的網路關係，使細菌抗藥性能跨越生態間界限而廣為散佈 [Witt, 1998]，這將使抗藥性菌株的控制益發困難，integron 顯然在抗藥基因的擴散上扮演著重要角色，也值得臨床醫療、畜牧養殖和獸醫界各方重視。

本研究結果發現，54 株 integron-positive 的 *E. coli* 菌株至少都具有一種 *aadA* 片匣（包括 *aadA1a*、*aadA2* 或 *aadA4*），所有的 *aadA* 片匣都是對 streptomycin 和 spectinomycin 具抗藥性，許多文獻均曾報告 *aadA* 片匣是 integron 普遍攜帶的基因片匣 [Recchia and Hall, 1995a; Sallen *et al.*, 1995; Martinez-Freijo *et al.*, 1999; Clark *et al.*, 1999; Sandvang, 1999]。而一個頗值得注意的現象是，雖然 streptomycin 和 spectinomycin 已經很少用於臨床治療，但菌株對 streptomycin 的抗藥性比率仍然很高，並未因藥物篩選壓力不存在後而導致抗藥性消失 [Morell, 1997; Chiew *et al.*, 1998; Bass *et al.*, 1999]。不過正可能因缺乏直接的藥物選擇性壓力，*aadA* 基因並不像一些廣泛使用的藥物如 trimethoprim、 β -lactam 的抗藥基因（*dfr*， β -lactamase 基因）有許多不同的基因型式（type）或基因群（group）存在，但是包括本篇研究在內新發現的 *aadA* 基因，如 *aadA4*、*aadA5* [Sandvang, 1999]，*aadA6* [Naas *et al.*, 1999]，顯示 *aadA* 基因的變異仍然在進行中。由於 streptomycin 仍使用在動物養殖方面 [Liebert *et al.*, 1999]，故其篩選壓力轉移至動物體內寄生菌株，提供 *aadA* 基因產生變異的另一場所，將有可能導致新的 *aadA* 基因首先在動物體內的菌株中被發現，然後再擴散到人體內菌株。加上 *aadA* 基因常嵌入在 integron 內，故 integron 也許可以視為一個保存並攜帶 *aadA* 基因的構造，保留了菌株對

streptomycin 和 spectinomycin 的抗藥性 [Chiew *et al.*, 1998]，甚至幫助 *aadA* 片匣再嵌入不同的 integron 而散佈，使攜帶有 *aadA* 片匣的 integron 在人類和動物分離菌中廣為存在。

另外也有學者以基因片匣嵌入 integron 的演化模式來解釋 *aadA* 片匣存在 integron 的高出現率，認為原始的 integron 並不具有基因片匣，而 *aadA* 則是第一個嵌入 integron 的基因片匣[Bissonnette and Roy, 1992]，之後其他抗藥基因才陸續嵌入 integron。由於實驗已證實當 integron 上已有基因片匣存在時，其他基因片匣要再嵌入 integron 時，雖然特異性嵌入部位有 integron 的 *attI* 和原先 integron 上基因片匣的 59-base element 兩種可能，但嵌入 *attI* 部位的頻率要高於 59-base element [Collis *et al.*, 1993]。本研究的結果發現有的 *aadA* 片匣可以單獨地存在於 integron 內，是 integron 唯一的基因片匣，如 *aadA1a* 和 *aadA2*，但也可以與不同的基因片匣組合同位於 integron 內，然而當 *aadA* 與其他基因片匣同位於 integron 內時，其他基因片匣幾乎都位在 *aadA* 片匣的上游靠近 integron 5'-conserved segment 的位置(即靠近 *attI* 部位)，其他報告也有類似的發現 [Rosser and Young, 1999]，顯示可支持上述的論點。至於本研究中 Group 1a 僅帶 *aadA1a* 片匣的 integron 與 Group 2a 中帶 *dfrIa-aadA1a* 的 integron，或是 Group 1b 中具 *aadA2*

片匣的 *integron* 與 Group 3 中攜帶 *dfr12-orfF-aadA2* 的 *integron* 彼此之間是否確實有這種演化上的相關性，則尚須進一步證實，如再往 *integron* 5'端上游和 3'端下游分析更大段序列上的相似性，以及攜帶 *integron* 的質體相關性，或許能有更深入的了解。此外由於不同基因片匣之間的序列及 59-base element 的差異，也許 *aadA* 基因片匣要比其他基因片匣更穩定地嵌入在 *integron* 上，也可能是 *aadA* 較別的抗藥基因更普遍存在於 *integron* 的原因之一。

本研究中，除了 *aadA* 基因片匣外，另一種也普遍存在的基因片匣是對 trimethoprim 具抗藥性的 *dfr* 基因片匣，有 4 種 *dfr* 基因片匣存在於 43 株 *E. coli* 菌株內（佔 *integron* 陽性菌株的 80%），而 *integron* 陽性的菌株全部都對 sulfonamide 具有抗性，由臨床藥物使用情形觀察，此結果應是屬合理的現象，因為目前臨床上仍普遍使用 trimethoprim 合併 sulfonamide（稱為 co-trimoxazole）治療 *E. coli* 和其他感染性疾病，長期在雙重藥物篩選壓力下，可能導致下列情況：(1) 基因變異持續進行，不同型式的 trimethoprim 抗藥性 DHFR 基因數目一直增加，如本研究發現的 *dfr17* 就是一個新型的 *dfr* 抗藥基因，這些不同的 DHFR 可能具有不同之藥物抑制活性濃度及藥物動力學；(2) trimethoprim 抗藥性 *dfr* 基因形成片匣嵌入帶有 sulfonamide 抗藥基因

的 integron 內 [Huovinen *et al.*, 1995; Adrian *et al.*, 1998; Sandvang, 1999] 並廣為散佈，目前已有多種 *dfr* 基因片匣存在於 integron 內，而其中 *dfrIa* 更被發現由原先存在的轉位子 Tn7 移出，並嵌入 integron 中 [Sundström and Sköld, 1990; Heikkilä *et al.*, 1991; Towner *et al.*, 1994]，本研究之前的研究也發現此種現象 [Chang *et al.*, 1992; Chang *et al.*, 1997]；(3) *dfr* 基因片匣嵌入 integron 都是位在靠近 5'端 conserved segment 的位置，由於距離 promoter 較近，有利於抗藥性的表現 [Collis and Hall, 1995]，因此一般帶有 *dfr* 基因片匣的菌株，通常都具有高程度的 trimethoprim 抗藥性。

三、Integron 的轉移與抗藥基因片匣的散佈

實驗已證實基因片匣的移動主要就是藉 integrase 的活性所驅動之特異部位重組作用，嵌入或移出 integron，除了 integrase 外，*attI* 和 59-base element 也與基因片匣的移動有關 [Collis and Hall, 1992 a, b; Collis *et al.*, 1993]，至於 integron 雖然陸續被發現可存在於不同的質體、轉位子、甚至細菌的染色體上，而被認為具有移動的特性，但截至目前於實驗室尚未證明 integron 自身的轉移性，由於帶有抗藥基因的 integron 已經在許多不同菌屬的細菌體內均被發現，包括 *E. coli*、*Shigella*、*Salmonella*、*Morganella*、*Klebsiella*、*Enterobacter*、*Acinetobacter*

及 *Pseudomonas*，顯示 integron 和基因片匣在菌屬之間傳已經相當普遍，而要達此目的最簡單的方式便是藉由具轉移性的質體進行水平式轉移 (horizontal transfer) 來傳遞 [Hall, 1997]，本篇報告亦發現 integron 是位於細菌質體上，並藉可轉移性質體與抗藥基因片匣一同轉移給別的菌株，也顯示了此種轉移途徑之存在。此外，本篇報告以脈動電泳直接分析菌株本身 genetic background 發現即使是帶有相同 integron 的菌株，菌株之間卻並無基因之相關聯性存在，類似的發現也曾被報告過 [Jones *et al.*, 1997; Martinez-Freijo *et al.*, 1999]，顯然支持 integron 在菌株之間此種水平轉移是極為可能的，而 Martinez-Freijo 等人更認為整段 integron 藉質體或轉位子在同一菌屬或不同菌屬間轉移的頻率要高於單一基因片匣藉 integrase 移動的頻率 (Martinez-Freijo *et al.*, 1999)。至於本研究中是否有攜帶相同 integron 的共同質體 (common plasmid) 或流行質體 (epidemic plasmid) 存在，並且在細菌間傳遞，則有待進一步證實，但由南方雜交結果已初步顯示 integron 所在的質體分子量分佈並不一致，而質體間是否有相關性存在還需要再深入探討。

此外，有學者發現 integron In0，In2 和 In5 本身即是一個不完全轉位子 (defective transposon) [Brown *et al.*, 1996]，因為它們帶有部

份的轉位(transposition)基因，integron 外側還具有 transposon 的 terminal inverted repeat，並且轉位基因與一個已知的轉位子 Tn5053 的轉位基因有很相近的關係 [Kholodii *et al.*, 1995]，雖然這些 integron 因轉位基因不完全而不具有如 transposon 的轉位作用，但學者推測若同一菌株內有相關的完整轉位子同時存在時，可以 *in trans* 的方式提供轉位所需的蛋白質，因此這些本身是不完全轉位子的 integron 仍可能藉此達到移動的目的，若 integron 藉著此種方式轉移到具有活性的轉位子 (active transposon) 或是廣宿主範圍的質體上 (broad-host-range plasmid)，再藉轉位子和質體來移動，更大大增加了 integron 移動的機會。

而基因片匣 integrase 的重組作用，有研究發現竟然可以發生在 59-base element 和另一個非特異性的部位 (non-specific site) 或稱之為 secondary site 之間，而不是已知的特異性的 *attI* site 和 59-base element [Francia *et al.*, 1993 ; Recchia *et al.*, 1994 ; Recchia and Hall, 1995b]，雖然此種重組發生的機率很低，但它可以造成基因片匣嵌入 integron 外的其他地方，顯然增加了基因片匣散佈的可能，並且一旦基因片匣嵌入此類非特異性部位，因為不具有 integron 的重組部位，所以基因片匣無法再度移出，將導致嵌入的部位永久地獲得新的基因 [Recchia and

Hall, 1995a, b]。綜合上述的討論可知，integron 和基因片匣已具有數種傳遞散佈的途徑，並且可跨越菌屬之間的藩籬，例如原本 integron 和抗藥基因片匣多存在於腸內菌和綠膿桿菌中，但現在革蘭氏陽性菌中也發現 integron 的存在 [Nešvera *et al.*, 1998]，而與革蘭氏陰性菌中完全相同的 *aadA* 基因片匣也在 *Enterococcus faecalis* 中偵測到了 [Clark *et al.*, 1999]，這是令人憂心的趨勢，因為腸球菌在革蘭氏陽性菌中抗藥性是最為普遍的，若再獲得新的抗藥基因，不但可能使治療更加棘手，也可能將抗藥性傳給其他致病力較強的葡萄球菌或鏈球菌，因此對於 integron 和抗藥基因片匣的散佈方式實有必要深入了解並且追蹤觀察。

四、Integron 抗藥基因片匣與菌株抗藥性之相關性

經由 PCR 增幅片段之選殖和菌株抗藥性之測定，可證實 integron 攜帶之抗藥基因片匣確實可讓細菌表現出抗藥性，也符合先前學者對 integron 的基本性質的描述——可做為一自然表現之載體表現嵌入其中之抗藥基因，而基因片匣本身雖不具 promoter，但只要嵌入處上游位置有適合的 promoter，便能使基因表現 [Hall and Stokes, 1993; Hall and Collis, 1995; Recchia and Hall, 1995a]。至於 integron 攜帶之抗藥基因片匣並不完全涵蓋細菌本身的抗藥性，可能原因之一為抗藥基因並未

形成片匣的型式，因此不嵌入 integron 內，或是基因片匣嵌入到 integron 變異區以外的其他位置如一些非特異的 secondary site [Recchia *et al.*, 1994; Recchia and Hall, 1995b]，此外，原因尚包括抗藥基因是位在染色體上，或者其他並非 integron 的基因構造如轉位子等也會攜帶抗藥基因，也表示細菌可藉由不同的途徑或機制來表現其對不同藥物的抗藥性。

本實驗也發現大部份的 *E. coli* 菌株對非第一線的 β -lactam 藥物，如第三代 cephalosporins 藥物 cefoperazone、ceftazidime 和 monobactams 藥物 aztreonam 仍呈現敏感性，因此也並未偵測到相關的位於 integron 之抗藥基因片匣，這應該是正常的現象，因為 *E. coli* 在腸內桿菌科的菌種中，本即屬於抗藥性比較不強的細菌，在選用的藥物上也較無需立即使用第三線藥物。但對於抗藥性較強的細菌，最典型的即為綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)，由於經常需合併使用不同的藥物來治療，導致一些可對新一代藥物如 imipenem 和第三代 cephalosporins 產生抗藥性的基因片匣已發現位在 integron 上，並且在綠膿桿菌中被偵測到了，這些基因片匣包括 *bla*_{IMP} [Laraki *et al.*, 1999]、*bla*_{VIM} [Lauretti *et al.*, 1999]、*oxa15* [Danel *et al.*, 1997]、*oxa19* [Mugnier *et al.*, 1998]及 *oxa20* [Naas *et al.*, 1998]等，這些基因片匣則幸而尚未在 *E. coli* 中發

現，因此 integron 所攜帶之抗藥基因片匣的種類及出現頻率可能部份反映了細菌本身的抗藥性情形及經常選用的藥物所給予之篩選壓力。因此對於此類持續有選擇性壓力的藥物的使用及抗藥菌株的監測需要加以注意。由於基因片匣的可移動性與 integron 在菌株間的水平轉移，細菌仍有獲得新抗藥基因的機會，是故如何適當地選擇治療藥物及適度地使用，以減緩對抗新藥的抗藥基因出現的速度及減少出現的頻率，是需要特別注意的課題。

五、Integron 存在對菌株抗藥性的影響

在本研究中比較 integron 陽性與 integron 陰性菌株的抗藥性情形，結果顯示對於 integron 本身即攜帶的抗藥基因片匣的抗藥性，以及其他數種不同藥物的抗藥性，具有 integron 的菌株抗藥性比率都明顯高於 integron 陰性菌株，並且 integron 陽性菌株呈現更顯著的多重抗藥性。Martinez-Freijo 等人 [Martinez-Freijo *et al.*, 1998] 對中歐、西歐分離菌的報告也提及，不論抗藥基因是否位在 integron 上，具有 integron 的菌株對一些 aminoglycoside (如 gentamicin 和 tobramycin)，quinolone 類 (如 ofloxacin, ciprofloxacin) 和 β -lactam (如 piperacillin, ceftazidime) 藥物的抗藥性在統計上要高於不具 integron 的菌株，並且也較具有多重抗藥性，由此可見 integron 與細菌的多重抗藥性實有密切的關係。

integron 除了本身可攜帶不只一種抗藥基因，且多位在也攜帶有抗藥因子的構造如質體和轉位子上，可能導致選擇出其中一種抗藥性時連帶選擇出多種抗藥性，而選出了菌株的多重抗藥性。

六、結論

本篇報告的結果顯示，integron 在臨床泌尿道抗藥菌株中是普遍存在的，integron 所攜帶的抗藥基因片匣種類，組合及出現頻率並不相同，抗藥基因片匣不僅可呈現在菌株抗藥性的表現上，某種程度上也反映了菌株本身抗藥性的情形和來自於常用藥物給予的篩選壓力。同時本研究也發現 integron 是位在細菌的質體上，藉著轉移性質體在菌株間的水平式轉移來傳遞 integron 及抗藥性基因片匣，由脈動電泳分析菌體基因結果顯示 integron 及基因片匣已在不同菌株間散佈。

各種抗菌藥物在大量及毫無限制的使用情況下，使得細菌的抗藥性起了很大的變化，菌株為求抵抗藥物作用，最快速的適應方式便是補充外來的抗藥基因，integron 和抗藥基因片匣的存在，不僅是一個有效的獲取基因的系統，還可以將獲得的基因表現出來，更可以加速基因的擴散。而在藥物選擇性壓力的存在下，integron 和抗藥基因也繼續不斷地在演變，新型的抗藥基因片匣持續增加，基因片匣新的組合方式，甚至對新一代藥物具抗性的基因片匣之發現均可做為佐證。

有學者描繪菌株多重抗藥性形成的一個路徑為：攜帶一個或數個抗藥基因片匣的 integron 存在於也帶有抗藥基因的轉位子上，數個帶有 integron 的轉位子再轉位到抗藥性質體上，此種基因片匣→integron→轉位子→抗藥性質體→質體轉移的方式，可能是多重抗藥性形成與散佈最快速且主要的途徑 [Hall, 1997]。而基因片匣還可嵌入 integron 的特異性重組部位甚至是 integron 外的 secondary site，更增加散佈了可能性，抗藥基因越過菌屬、細菌宿主、生態環境、全球地域上的界限屏障而演化擴散，也是臨床治療、畜牧養殖和農業園藝必須特別注意防範並加以監控的。

學者認為在未來，可能還會有更多的 integron，更多的基因片匣被發現，基因片匣甚至可能不限於抗藥基因。目前 integron 的 integrase 酵素已被純化出來 [Collis *et al.*, 1998]，若能對 integrase 與 integron、基因片匣三者之間的交互作用，還有基因片匣嵌入、移出 integron 的機轉，integrase 的活性、蛋白質特性及其酵素動力學有更深入的認識，或許能找出控制此類重組作用的方法。此外，探究基因片匣來源及形成過程，以阻斷抗藥基因形成片匣型式的途徑，也許可做為未來控制抗藥性散佈的方向。

参 考 文 献

- Adrian PV, du Plessis M, Klugman KP, Amyes SGB (1998). New trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase cassette, *dhfrXV*, inserted in a class 1 integron. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 2221-2224.
- Adrian PV, Thomson CJ, Klugman KP, Amyes SG. (2000). New gene cassettes for trimethoprim resistance, *dhfr13*, and streptomycin-spectinomycin resistance, *aadA4*, inserted on a class 1 integron. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 355-361.
- Akiba T, Koyama K, Ishiki Y, Kimura S, Fukushima T. (1960). On the mechanism of the development of multiple-drug-resistant clones of *Shigella*. *Jap J Microbiol* 4: 219-227.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402.
- Bass L, Liebert CA, Lee MD, Summers AO, White DG, Thayer SG, Maurer JJ. (1999). Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in avian *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 2925-2929.
- Bauer JAW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standard single disc method. *Am J Clin Pathol* 45: 493-496.
- Bissonnette I, Roy PH. (1992). Characterization of In0 of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pVS1, an ancestor of integrons of multiresistance plasmids and transposons of gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 174: 1248-1257.

- Bito A, Susani M. (1994). Revised analysis of *aadA2* gene of plasmid pSa. *Antimicrob agents Chemother* 38: 1172-1175.
- Brown HJ, Stokes HW, Hall RM. (1996). The integrons In0, In2, and In5 are defective transposon derivatives. *J Bacteriol* 178: 4429-37.
- Casin I, Breuil J, Brisabois A, Moury F, Grimont F, Collatz E. (1999). Multidrug-resistant human and animal *Salmonella typhimurium* isolates in France belong predominantly to a DT104 clone with the chromosome- and integron-encoded β -lactamase PSE-1. *J Infect Dis* 179: 1173-1182.
- Chang CY, Chang LL, Chang YH, Lee TM, Li YH, Chang SF. Two new gene cassettes, *dfx17* for trimethoprim resistance and *aadA4* for spectinomycin/streptomycin resistance, inserted in a class 1 integron of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* (in press).
- Chang LL, Chang JC, Chang CY, Chang SF, Wu WJ. (1997). Genetic localization of the type I trimethoprim resistance gene and its dissemination in urinary tract isolates in Taiwan. *Kaohsiung J Med Sci* 13: 525-533.
- Chang LL, Chang SF, Chow TY, Wu WJ, Chang JC. (1992). The distribution of the DHFR genes in trimethoprim-resistant urinary tract isolates from Taiwan. *Epidemiol Infect* 109: 453-462.
- Chang SC, Hsieh WC. (1996). Current status of bacterial antibiotic resistance in Taiwan. *J Infect Dis Soc ROC* 7: 83-88.
- Chiew YF, Yeo SF, Hall LMC, Livermore DM. (1998). Can susceptibility to an antimicrobial be restored by halting its use? The case of streptomycin versus *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* 41: 247-251.
- Clark JM. (1988). Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed

- by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* 16: 9677.
- Clark NC, Olsvik O, Swenson JM, Spiegel CA, Tenover FC. (1999). Detection of a streptomycin/spectinomycin adenyltransferase gene (*aadA*) in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 43: 157-160.
- Clewell DB, Gawron-Burke C. (1986). Conjugative transposons and the dissemination of antibiotic resistance in Streptococci. *Ann Rev Microbiol* 40: 635-659.
- Collis CM, Grammaticopoulos G, Birton J, Stokes HW, Hall RM. (1993). Site-specific insertion of gene cassettes into integrons. *Mol Microbiol* 9: 41-52.
- Collis CM, Hall RM. (1992a). Site-specific deletion and rearrangement of integron insert genes catalyzed by the integron DNA integrase. *J Bacteriol* 174: 1574-1585.
- Collis CM, Hall RM. (1992b). Gene cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles. *Mol Microbiol* 6: 2875-2885.
- Collis CM, Hall RM. (1995). Expression of antibiotic resistance genes in the inserted cassettes of integrons. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 155-162.
- Collis CM, Kim MJ, Stokes HW, Hall RM. (1998). Binding of the purified integron DNA integrase Int11 to integron- and cassette-associated recombination sites. *Mol Microbiol* 29: 477-490.
- Dalsgaard A, Forslund A, Tam AV, Vinh DX, Cam PD. (1999). Cholera in Vietnam: changes in genotypes and emergence of class I integrons containing aminoglycoside resistance gene cassettes in *Vibrio cholerae* O1 strains isolated from 1979 to 1996. *J Clin Microbiol* 37: 734-741.
- Danel F, Hall LM, Gur D, Livermore DM. (1997). OXA-15, an extended-

- spectrum variant of OXA-2 β -lactamase, isolated from a *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 785-790.
- Fleming MP, Datta N, Gruneberg RN. (1972). Trimethoprim resistance determined by R factors. *Br Med J* 1: 726-728.
- Fling ME, Richards C. (1983). The nucleotide sequence of the trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase gene harbored by Tn7. *Nucleic Acids Res* 11: 5147-5158.
- Francia MV, de la Cruz F, Garcia Lobo JM. (1993). Secondary sites for integration mediated by the Tn21 integrase. *Mol Microbiol* 10: 823-828.
- Gibreel M, Sköld O. (1998). High-level resistance to trimethoprim in clinical isolates of *Campylobacter jejuni* by acquisition of foreign genes (*dfr1* and *dfr9*) expressing drug-insensitive dihydrofolate reductases. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 3059-3064.
- Hall RM, Brokkes DE, Stokes HW. (1991). Site-specific insertion of genes into integrons: role of the 59-base element and determination of the recombination cross-over point. *Mol Microbiol* 5: 1941-1959.
- Hall RM, Collis CM. (1995). Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol* 15:593-600.
- Hall RM, Stokes HW. (1993). Integrons: novel DNA elements which capture genes by site-specific recombination. *Genetica* 90: 115-132.
- Hall RM, Vockler C. (1987). The region of the IncN plasmid R46 coding for resistance to β -lactam antibiotics, streptomycin/spectinomycin and sulphonamides is closely related to antibiotic resistance segments found in

- IncW plasmids and in Tn21-like transposons. *Nucleic Acids Res* 15: 7491-7501.
- Hall RM. (1997). Mobile gene cassettes and integrons: moving antibiotic resistance genes in Gram-negative bacteria. In Antibiotic Resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread. Ciba Foundation Symposium 207 (Chadwick, D. J. & Goode, J., Eds) pp. 192-205. John Wiley & Sons, Chichester.
- Harada K, Kameda M, Suzuki M, Mitsuhashi S. (1963). Drug resistance of enteric bacteria. II. Transduction of transmissible drug-resistance R factors with phage Epsilon. *J Bacteriol* 86: 1332-1338.
- Heikkilä E, Skurnik M, Sundström L, Huovinen P. (1993). A novel dihydrofolate reductase cassette inserted in an integron borne on a Tn21-like element. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 1297-1304.
- Heikkilä E, Sundström L, Skurnik M, Huovinen P. (1991). Analysis of genetic localization of the type I trimethoprim resistance gene from *Escherichia coli* isolated in Finland. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 1562-1569.
- Huovinen P, Jacoby GA. (1991). Sequence of the PSE-1 β -lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 2428-2430.
- Huovinen P, Sundström L, Swedberg G, Sköld O. (1995). Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 279-289.
- Jones ME, Peters E, Weersink AM, Fluit A, Verhoef J. (1997). Widespread occurrence of integrons causing multiple antibiotic resistance in bacteria. *Lancet* 349: 1742-1743.
- Kado CI, Liu ST. (1981). Rapid procedure for detection and isolation of large

- and small plasmids. *J Bacteriol* 145: 1365-1373.
- Kholodii GY, Mindlin SZ, Bass IA, Yurieva OV, Minakhina SV, Nikiforov VG. (1995). Four gene, two ends and a *res* region are involved transposition of Tn5053: a paradigm for a novel family of transposons carrying either a *mer* operon or an integron. *Mol Microbiol* 17: 1189-1200.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. (1992). Color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 4th ed. Lippincott, Philadelphia.
- Laraki N, Galleni M, Thamm I, Riccio ML, Amicosante G, Frère JM, Rossolini GM. (1999). Structure of In31, a *bla*_{IMP}-containing *Pseudomonas aeruginosa* integron phyletically related to In5, which carries an unusual array of gene cassettes. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 890-901.
- Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM. (1999). Cloning and characterization of *bla*_{VIM}, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 1584-1590.
- Lévesque C, Brassard S, Lapointe J, Roy PH. (1994). Diversity and relative strength of tandem promoters for the antibiotic-resistance genes of several integrons. *Gene* 142: 49-54.
- Lévesque C, Piché L, Larose C, Roy PH. (1995). PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 185-191.
- Liebert CA, Hall RM, Summers AO. (1999). Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 507-522.

- Lin SR, Chang SF. (1992). Drug resistance and plasmid profile of shigellae in Taiwan. *Epidemiol Infect* 108: 87-97.
- Martinez E, de la Cruz F. (1990). Genetic elements involved in Tn21 site-specific integration, a novel mechanism for the dissemination of antibiotic resistance genes. *EMBO J* 9: 1275-1281.
- Martinez-Freijo P, Fluit AC, Schmitz FJ, Grek VSC, Verhoef J, Jones ME. (1998). Class I integrons in Gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds. *J Antimicrob Chemother* 42: 689-696.
- Martinez-Freijo P, Fluit AC, Schmitz FJ, Verhoef J, Jones ME. (1999). Many class I integrons comprise distinct stable structures occurring in different species of *Enterobacteriaceae* isolated from widespread geographic regions in Europe. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 686-689.
- Maslow JN, Slutsky AM, Arbeit RD. (1993). Application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology, p. 563-572. In DH Persing, TF Smith, FC Tenover, and TJ White (ed.), *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Morell N. (1997). Antibiotic resistance: road of no return. *Science* 278: 575-576.
- Mugnier P, Casin I, Bouthors AT, Collatz E. (1998). Novel OXA-10-derived extended-spectrum β -lactamases selected in vivo or in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 3113-3116.
- Naas T, Poirel L, Nordmann P. (1999). Molecular characterisation of In51, a class 1 integron containing a novel aminoglycoside adenylyltransferase gene

- cassette, *aadA6*, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim Biophys Acta* 1489: 445-451.
- Naas T, Sougakoff W, Casetta A, Nordmann P. (1998). Molecular characterization of OXA-20, a novel class D β -lactamase, and its integron from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 2074-2083.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1993). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. 5th edn. Approved Standard: M2-A5. Villanova, PA, NCCLS.
- Nešvera J, Hochmannová J, Pátek M. (1998). An integron of class 1 is present on the plasmid pCG4 from Gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett* 169: 391-395.
- NG LK, Mulvey MR, Martin I, Peters GA, Johnson W. (1999). Genetic characterization of antimicrobial resistance in Canadian isolates of *Salmonella* serovar Typhimurium DT104. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 3018-3021.
- Olsen JE, Skov MN, Threlfall EJ, Brown DJ. (1994). Clonal lines of *Salmonella enterica* serotype enteritidis documented by IS200-, ribo-, pulsed-field gel electrophoresis and RFLP typing. *J Med Microbiol* 40: 15-22.
- Paulsen IT, Littlejohn TG, Rådström P, Sundström L, Sköld O, Swedberg G, Skurray RA. (1993). The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 761-768.
- Poirel L, Guibert M, Bellais S, Naas T, Nordmann P. (1999). Integron- and

- carbenicillinase-mediated reduced susceptibility to amoxicillin-clavulanic acid in isolates of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 from French patients. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 1098-1104.
- Recchia GD, Hall RM. (1995a). Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology* 141: 3015-3027.
- Recchia GD, Hall RM. (1995b). Plasmid evolution by acquisition of mobile gene cassettes: plasmid pIE723 contains the *aadB* gene cassette precisely inserted at a secondary site in the IncQ plasmid RSF1010. *Mol Microbiol* 15: 179-187.
- Recchia GD, Hall RM. (1997). Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. *Trends Microbiol* 5: 389-394.
- Recchia GD, Stokes HW, Hall RM. (1994). Characterisation of specific and secondary recombination sites recognised by the integron DNA integrase. *Nucleic Acids Res* 22: 2071-2078.
- Ridely A, Threlfall EJ. (1998). Molecular epidemiology of antibiotic resistance genes in multiresistant epidemic *Salmonella typhimurium* DT104. *Microbial Drug Resist* 4: 113-118.
- Rosser SJ, Young HK. (1999). Identification and characterization of class I integrons in bacteria from an aquatic environment. *J Antimicrob Chemother* 44: 11-18.
- Sallen B, Rajoharison A, Desvarenne S, Mabilat C. (1995). Molecular epidemiology of integron-associated antibiotic resistance genes in clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Microbial Drug Resist* 1: 195-202.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). Molecular cloning: A laboratory

- manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sandvang D, Aarestrup FM, Jensen LB. (1997). Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* typhimurium DT104. *FEMS Microbiol Lett* 157: 177-181.
- Sandvang D. (1999). Novel streptomycin and spectinomycin resistance gene as a gene cassette within a class 1 integron isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 3036-3038.
- Saunders JR. (1975). Transposable resistance genes. *Nature* 258: 384.
- Schwocho LR, Schaffner CP, Miller GH, Hare RS, Shaw KJ. (1995). Cloning and characterization of a 3-*N*-aminoglycoside acetyltransferase gene, *aac(3)-Ib*, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 1790-1796.
- Stokes HW, Hall RM. (1989). A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol* 3: 1669-1683.
- Stokes HW, Hall RM. (1992). The integron In1 in plasmid R46 includes two copies of the *oxa2* gene cassette. *Plasmid* 28: 225-234.
- Stokes HW, O'Gorman DB, Recchia GD, Parsekhian M, Hall RM. (1997). Structure and function of 59-base element recombination sites associated with mobile gene cassettes. *Mol Microbiol* 26: 731-745.
- Sundström L, Rådström P, Swedberg G, Sköld O. (1988). Site-specific recombination promotes linkage between trimethoprim and sulfonamide resistance genes. Sequence characterization of *dhfrV* and *sulI* and a recombination active locus of Tn21. *Mol Gen Genet* 213: 191-201.
- Sundström L, Sköld O. (1990). The *dhfrI* trimethoprim resistance gene of Tn7

- can be found at specific sites in other genetic surroundings. *Antimicrob Agents Chemother* 34: 642-650.
- Sundström L, Swedberg G, Sköld O. (1993). Characterization of transposon Tn5086, carrying the site-specifically inserted gene *dhfrVII* mediating trimethoprim resistance. *J Bacteriol* 175: 1796-1805.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33: 2233-2239.
- Tosini F, Visca P, Luzzi I, Dionisi AM, Pezzella C, Petrucca A, Carattoli A. (1998). Class 1 integron-borne multiple-antibiotic resistance carried by IncFI and IncL/M plasmids in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 3053-3058.
- Towner KJ, Brennan A, Zhang Y, Holtham CA, Brough JL, Carter GI. (1994). Genetic structures associated with spread of the type Ia trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase gene amongst *Escherichia coli* strains isolated in the Nottingham area of the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother* 33: 25-32.
- Watanabe T, Fukasawa T. (1961a). Episome-mediated transfer of drug resistance in *Enterobacteriaceae*. I. Transfer of resistance factors by conjugation. *J Bacteriol* 81: 669-678.
- Watanabe T, Fukasawa T. (1961b). Episome-mediated transfer of drug resistance in *Enterobacteriaceae*. III. Transduction of resistance factors. *J Bacteriol* 82: 202-209.
- Watanabe T. (1963). Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria.

Bacteriol Rev 27: 87-115.

Witte W. (1998). Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science* 279: 996-997.

Wylie BA, Koornhof HJ. (1991). Nucleotide sequence of dihydrofolate reductase type VI. *J Med Microbiol* 35: 214-218.

Young H-K, Qumsieh MJ, McIntosh ML. (1994). Nucleotide sequence and genetic analysis of the type Ib trimethoprim-resistant, Tn4132-encoded dihydrofolate reductase. *J Antimicrob Chemother* 34: 715-725.

表一、 Sizes and numbers of amplicons in *E. coli* isolates

from detection of integrons by PCR

One amplicon in a single isolate (n=46)		Two amplicons in a single isolates (n=8)	
Approximate length of amplicons (bp)	No. of isolates	Approximate length of amplicons (bp)	No. of isolates
1000	9	1000 1900	3
1600	6	1000 2100	1
1900	29	1600 1900	1
2000	1	1600 2000	3
3000	1		

表二、PCR 增幅片段與相對應之嵌入 integron 之抗藥基因片匣及基因片匣表現之抗藥性型態與 *E. coli* 菌株之抗藥性

Integron group	Approximate length of amplicons (bp)	Identity and order of gene cassettes inserted in integrons	Resistance phenotype of gene cassettes	No. of isolates	Antibiotic resistance of <i>E. coli</i> isolates (n=54)														
					Su	Sm	Sp	Tp	Ap	Cm	Gm	Mi	Pip	Sam	Cmz	Cfp	Caz	Mox	At
1a	1000	<i>aadA1a</i>	SmSp	7	7	7	7	3	5	6	4	6	3	3					
1b	1000	<i>aadA2</i>	SmSp	2	2	2	2												
2a	1600	<i>dfrIa-aadA1a</i>	TpSmSp	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	1			1		
2b	1600	<i>dfr17-aadA4</i>	TpSmSp	4	4	4	4	4	4	3	3	4	4	1			1		1
3	1900	<i>dfr12-orfF-aadA2</i>	TpSmSp	29	29	29	29	29	20	20	8	16	10	9	1	1	1		
4	2000	<i>blaP1-aadA2</i>	CarSmSp	1	1	1	1		1	1			1						
5	3000	<i>aadB-aadA1a-cmlA</i>	GmSmSpCm	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1					
6	1000	<i>aadA1a</i>	SmSp	3	3	3	3	3	3	2	3	1	2	3	1			1	
	1900	<i>dfr12-orfF-aadA2</i>	TpSmSp																
7	1000	<i>aadA1a</i>	SmSp	1	1	1	1	1	1	1			1	1					
	2100	<i>dfrV-ereA2</i>	TpErm																
8	1600	<i>dfr17-aadA4</i>	TpSmSp	1	1	1	1	1	1	1	1	1		1					
	1900	<i>dfr12-orfF-aadA2</i>	TpSmSp																
9	1600	<i>dfrIa-aadA1a</i>	TpSmSp	3	3	3	3	3	2	2	1	3	2	2		1			
	2000	<i>blaP1-aadA2</i>	CarSmSp																
Total				54	54	54	54	47	40	39	22	34	25	22	2	4	1	2	1

Abbreviations: Ap, ampicillin; Atm, aztreonam; Car, carbenicillin; Caz, ceftazidime; Cfp, cefoperazone; Cm, chloramphenicol; Cmz, cefmetazole; Erm, erythromycin; Gm, gentamicin; Mi, minocycline; Mox, moxalactam; Net, netilmicin; Pip, piperacillin; Sam, ampicillin/sulbactam; Sm, streptomycin; Sp, spectinomycin; Su, sulfonamide; Tp, trimethoprim

表三、*dfr17* 與 family 1 中其他已知的 trimethoprim 抗藥性 DHFR 基因之比較^a

Gene	GenBank accession no.	Origin	% Identity to <i>dfr17</i> (no. identical/total)		Gene coding region position (length; bp)	Cassette position (length; bp)	59-base element (length; bp)	Reference or source
			Gene coding sequence (bp)	Amino acid sequence				
<i>dfrIa</i>	X00926	Tn7	NS ^b	68 (108/157)	236-709 (474)	216-792 (577)	95	Fling and Richards, 1983
<i>dfrIb</i>	Z50804	Tn4132	61 (293/474)	65 (103/157)	235-708 (474)	ND ^c	ND ^c	Young <i>et al.</i> , 1994
<i>dfrV</i>	X12868	pLMO20	61 (290/474)	64 (101/157)	1306-1779 (474)	1287-1854 (568)	87	Sundström <i>et al.</i> , 1988
<i>dfrVI</i>	Z86002	<i>P. mirabilis</i>	NS ^b	65 (103/157)	336-809 (474)	317-861 (545)	64	Wylie and Koornhof, 1991
<i>dfrVII</i>	X58425	Tn5086	91 (432/474)	91 (144/157)	594-1067 (474)	573-1189 (617)	134	Sundström <i>et al.</i> , 1993
<i>dfrXV</i>	Z83311	<i>E. coli</i>	NS ^b	68 (108/157)	357-830 (474)	337-922 (586)	104	Adrian <i>et al.</i> , 1998
<i>dfrXVI</i>	AJ131405	pRAS1	65 (309/474)	67 (105/156)	76-549 (474)	57-644 (588)	117	Sorum
<i>dfr17</i>	AF170088	<i>E. coli</i>	100	100	23-496 (474)	2-617 (616)	133	Chang <i>et al.</i> (This study)

^a Comparisons between known *dfr* genes and *dfr17* were performed using the advanced BLAST search program [Altschul *et al.*, 1997].

^b NS; no significant similarity.

^c ND; no data available.

表四、*aadA4* 與其他 streptomycin/spectinomycin 抗藥性 *aadA* 基因之比較^a

Gene	GenBank accession no.	Origin	% Identity to <i>aadA4</i> (no. identical/total)		Gene coding region position (length; bp)	Cassette position (length; bp)	59-base element (length; bp)	Reference or source
			Gene coding sequence (bp)	Amino acid sequence				
<i>aadA1a</i>	X12870	Tn21	60 (447/745)	57 (149/261)	1299-2090 (792)	1290-2145 (856)	60	Sundström <i>et al.</i> , 1988
<i>aadA1b</i>	M95287	R46	60 (449/745)	57 (149/261)	2324-3115 (792)	2315-3170 (856)	60	Stokes and Hall, 1992
<i>aadA2</i>	X68227	pSa	59 (441/741)	56 (141/250)	166-945 (780)	145-1000 (856)	60	Bito and Susani, 1994
<i>aadA3</i>	Z50802	<i>E. coli</i>	95 (750/789)	95 (249/262)	1306-2094 (789)	ND ^b	ND ^b	Adrian <i>et al.</i> , 2000
<i>aadA4</i>	AF170088	<i>E. coli</i>	100	100	627-1415 (789)	618-1512 (895)	57	Chang <i>et al.</i> (This study)
<i>aadA5</i>	AF137361	<i>E. coli</i>	100	100	64-852 (789)	55-949 (895)	57	Sandvang, 1999
<i>aadA6</i>	AF140629	<i>P. aeruginosa</i>	61 (467/762)	59 (154/261)	61-906 (846)	52-914 (863)	60	Naas <i>et al.</i> , 1999

^a Comparisons between known *aadA* genes and *aadA4* were performed using the advanced BLAST search program [Altschul *et al.*, 1997].

^b ND; no data available. The 3'-end of the *aadA3* cassette was truncated by IS26.

表五、 Integron-positive 與 integron-negative *E. coli* 菌株抗藥性之比較

Antibiotic (Abbreviations)	Integron-positive isolates (n=54)	Integron-negative isolates (n=50)	<i>P</i> value ^a
	% of resistance (No. of isolates)	% of resistance (No. of isolates)	
Sulfonamide (Su)	100 (54)	30 (15)	< 0.01
Streptomycin (Sm)	100 (54)	26 (13)	< 0.01
Spectinomycin (Sp)	100 (54)	10 (5)	< 0.01
Trimethoprim (Tp)	87 (47)	6 (3)	< 0.01
Chloramphenicol (Cm)	72 (39)	12 (6)	< 0.01
Gentamicin (Gm)	41 (22)	0 (0)	< 0.01
Ampicillin (Ap)	74 (40)	36 (18)	< 0.01
Minocycline (Mi)	63 (34)	32 (16)	< 0.01
Piperacillin (Pip)	46 (25)	8 (4)	< 0.01
Ampicillin/Sulbactam (Sam)	41 (22)	10 (5)	< 0.01
Cefmetazole (Cmz)	4 (2)	4 (2)	NS
Cefoperazone (Cfp)	7 (4)	0 (0)	NS
Ceftazidime (Caz)	2 (1)	0 (0)	NS
Moxalactam (Mox)	4 (2)	0 (0)	NS
Aztreonam (Atm)	2 (1)	0 (0)	NS
Netilmicin (Net)	7 (4)	0 (0)	NS
Amikacin (An)	0 (0)	0 (0)	NS

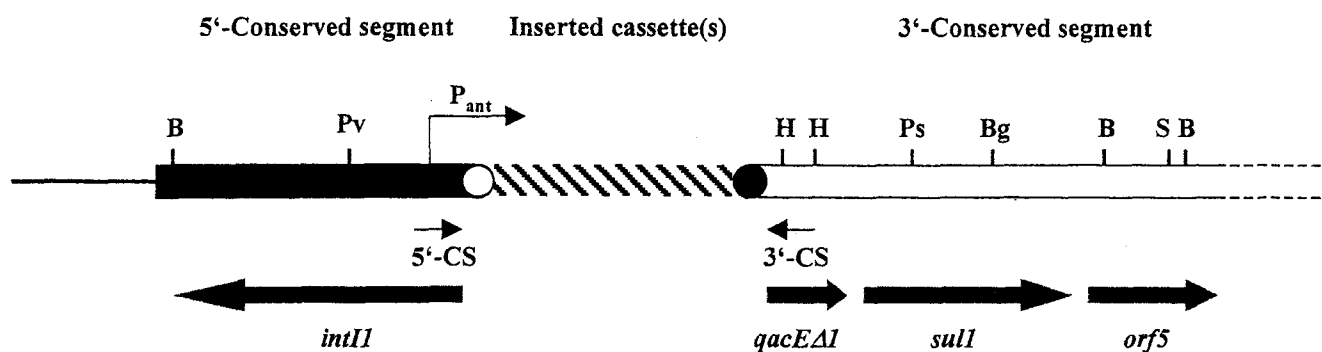


Fig. 1. General structure of integrons [Hall and Stokes, 1993]. The 5' conserved segment is represented by a black box and 3' conserved segment is shown as an open box. The variable region between the conserved segment contains inserted gene cassette(s) and is indicated by a hatch box. The *attI* site is shown as a white circle and the 59-base element associated with the gene cassette as a black circle. Gray arrows represent the genes contained in the conserved segments. The common promoter (P_{ant}) for the expression of the inserted cassette(s) is also shown. Restriction sites are shown only for the conserved segments, and are B, *Bam*HI; Bg, *Bgl*II; H, *Hind*III; Ps, *Pst*I; Pv, *Pvu*II; S, *Sal*I. The 5'CS and 3'-CS are oligonucleotides used as primers for PCR analysis of integrons in this study.

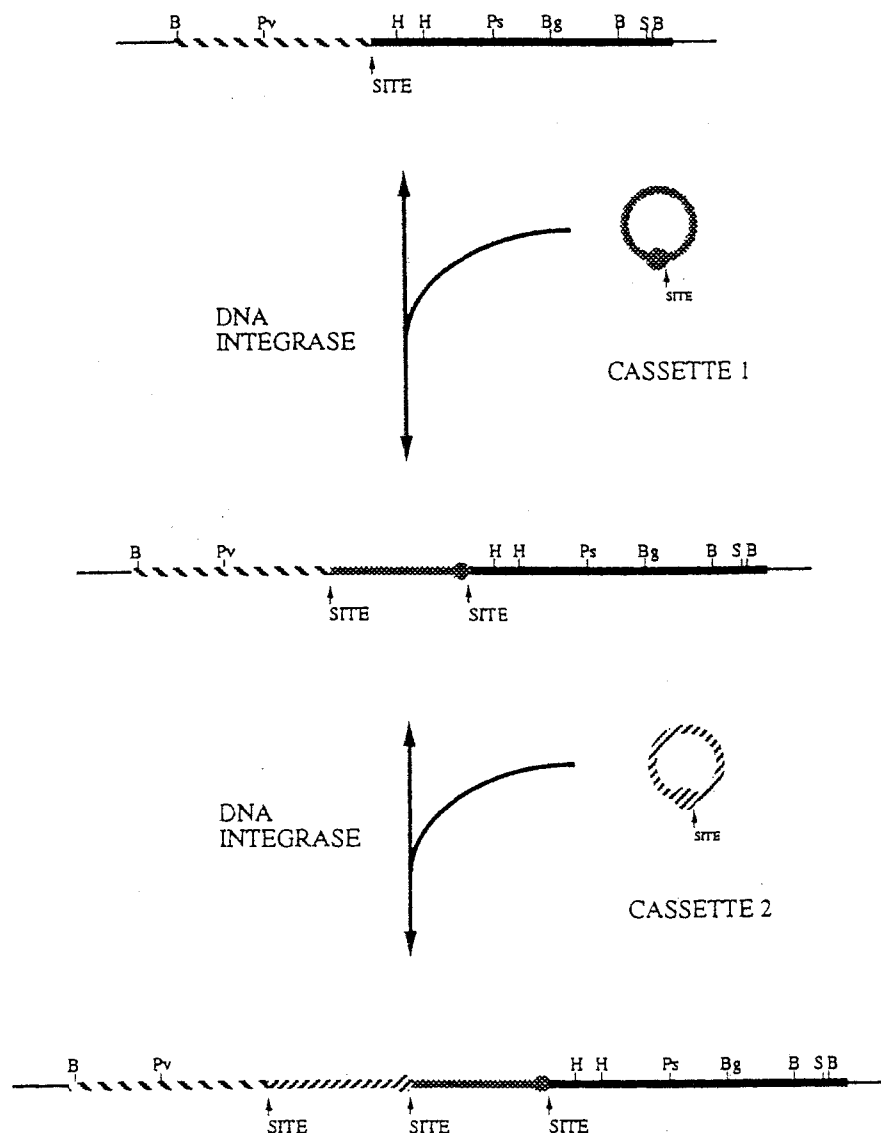


圖 2. Model for the insertion and excision of gene cassettes [Hall and Stokes, 1993].

The 5' conserved segment is shown as a hatched line and the 3' conserved segment is black. Site-specific recombination between two core sites (indicated by arrows) leads to insertion or deletion of a gene cassette. Restriction sites are shown as in Fig. 1.

DIG oligonucleotide 3'-end labeling

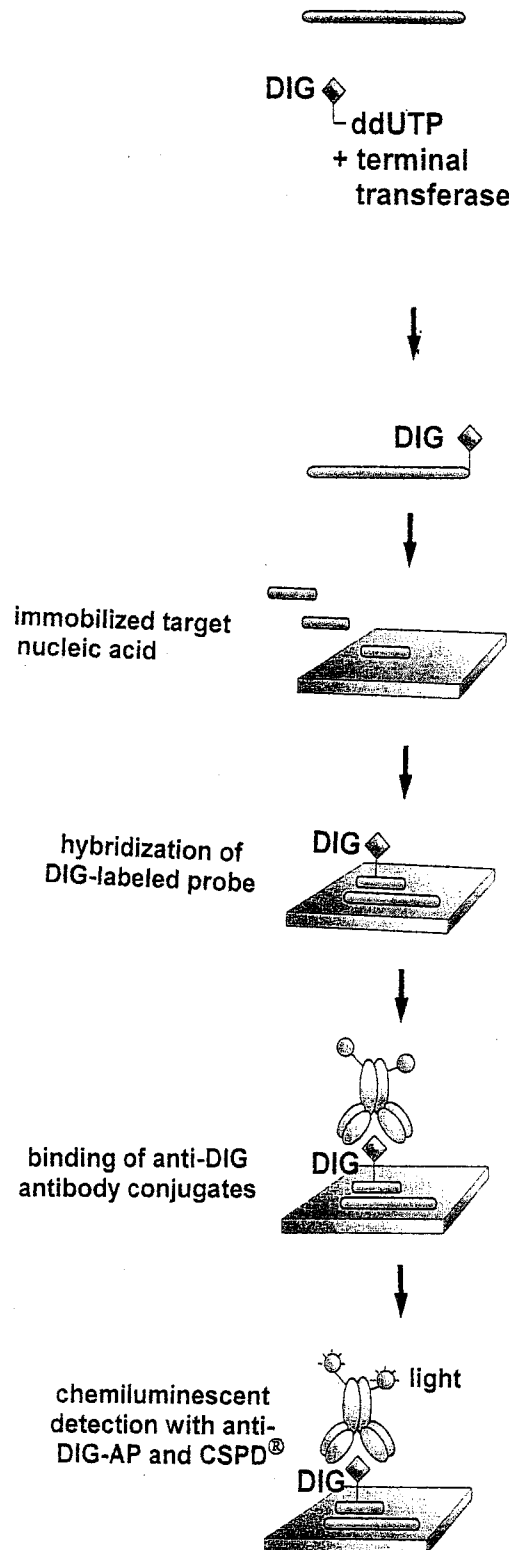


圖 3. 以非輻射性 DIG system 進行 DNA 探針標記與偵測，圖中使用 oligonucleotide 探針，以 DIG-ddUTP 進行 3'-end labeling。

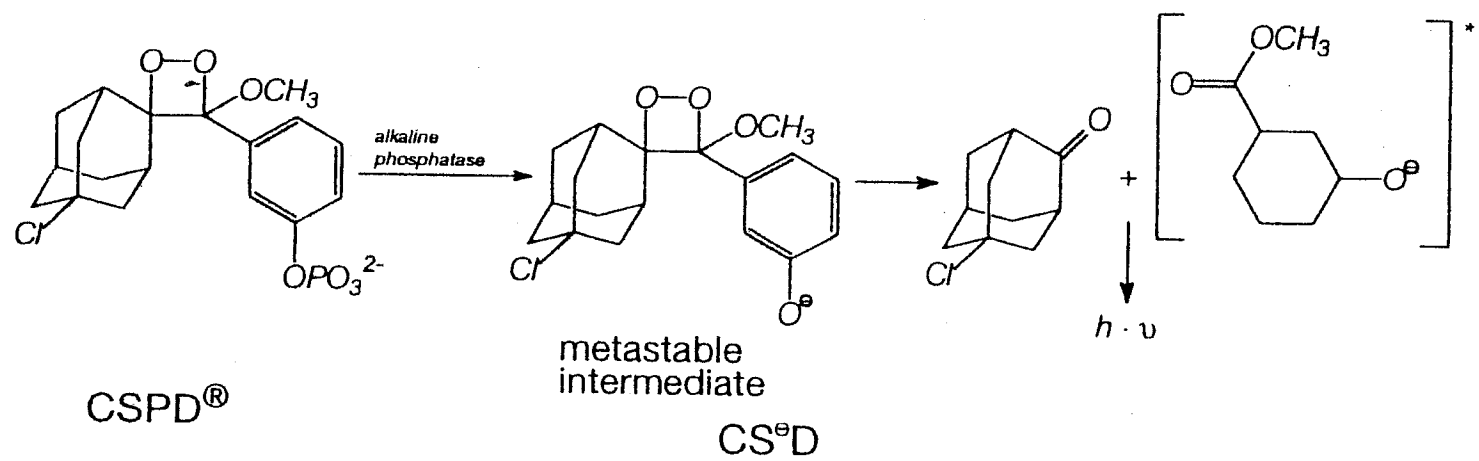
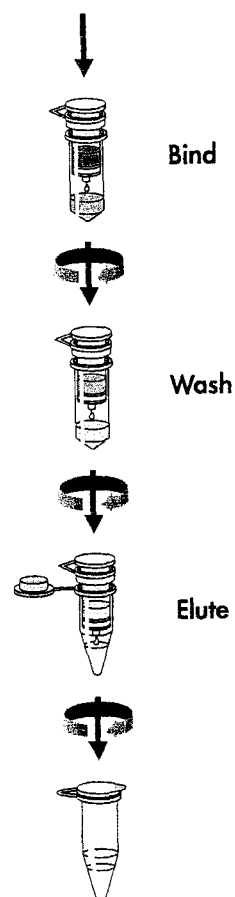


圖 4. CSPD 發光反應

The QIAquick Spin Purification Procedure

PCR reaction
or
Solubilized gel slice



Pure DNA Fragment

圖 5. QIAquick 核酸純化試藥組純化 DNA 片段流程圖

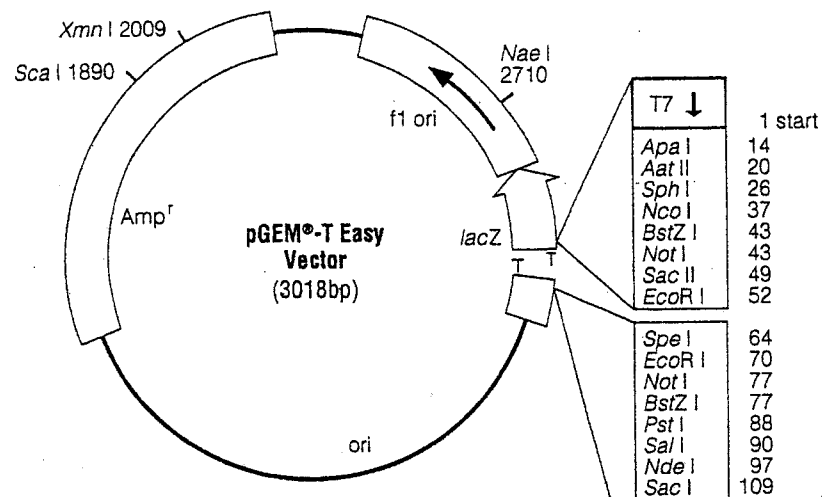


图 6. The pGEM-T Easy Vector circle map.

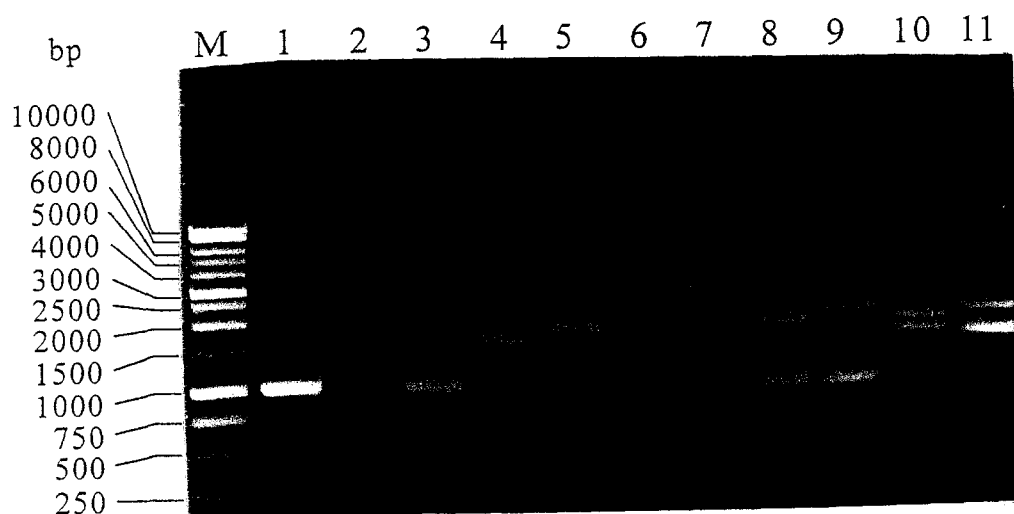


圖 7. 以 PCR 偵測 integron 存在情形之電泳分析圖。以引子組 5'-CS 與 3'-CS 增幅 integron 包含基因片匣的片段，增幅片段以 1.5% 瓊脂醣明膠進行電泳。圖中 M 行為 molecular weight marker (1 kb ladder)；第 1 行是 Tn21 為陽性對照；第 2 行是 ColE1::Tn7 為陰性對照；第 3~11 行為自臨床 *E. coli* 菌株所增幅出之片段，其中第 3 行為 1000 bp 增幅片段；第 4 行為 1600 bp 增幅片段；第 5 行為 1900 bp 增幅片段；第 6 行為 2000 bp 增幅片段；第 7 行為 3000 bp 增幅片段；第 8~11 行為同一菌株內增幅出大小不同的兩個增幅片段，其中第 8 行為 1000 bp 和 1900 bp 之增幅片段；第 9 行為 1000 bp 和 2100 bp 之增幅片段；第 10 行為 1600 bp 和 1900 bp 之增幅片段；第 11 行為 1600 bp 和 2000 bp 之增幅片段。

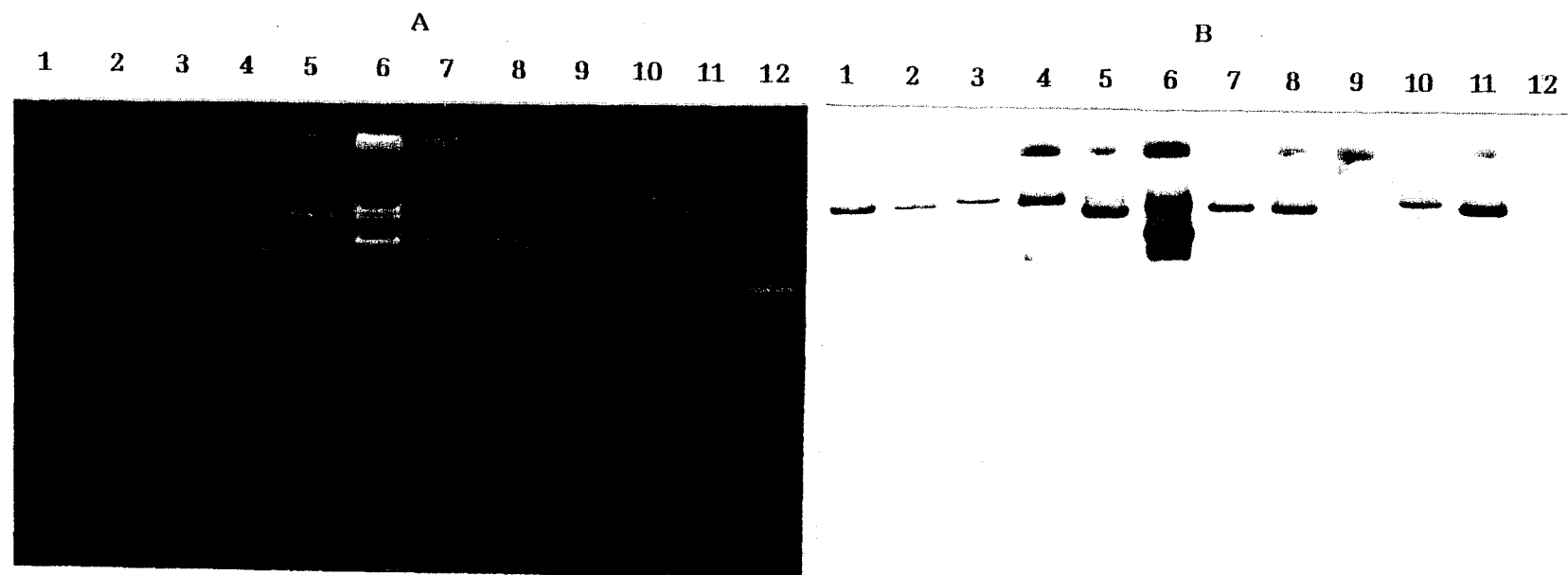


圖 8. 具有 integron 之菌株質體電泳 (A) 以及與 integrase 探針進行南方雜交反應的結果 (B)。第 1~11 行為 *E. coli* 菌株，第 12 行是 ColE1::Tn7 為陰性對照

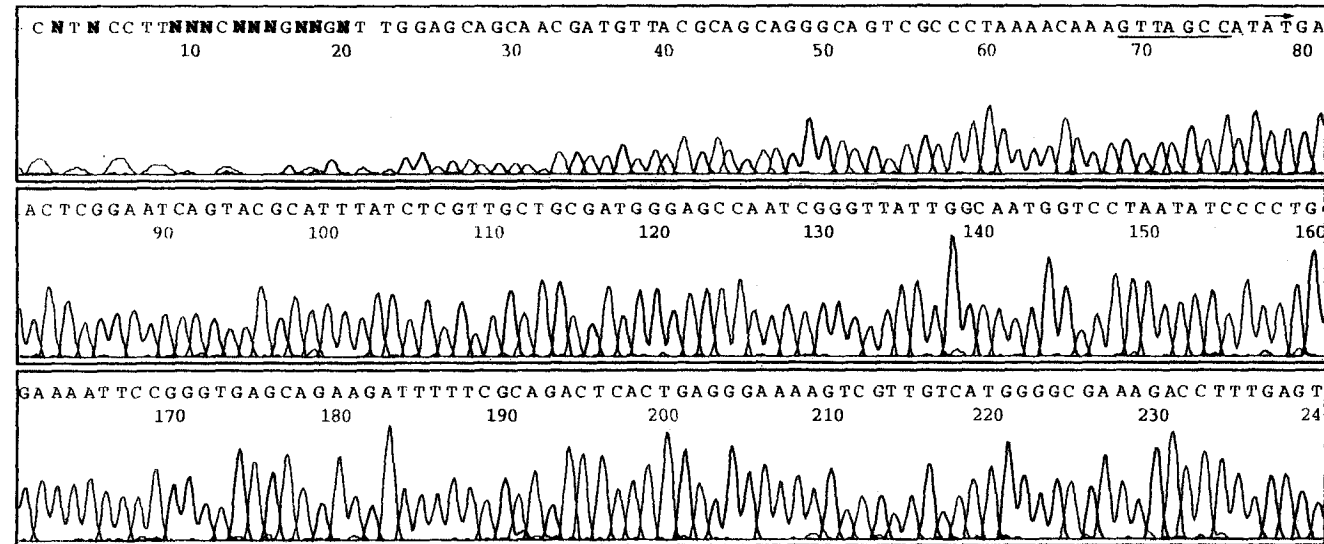


圖 9. 以 5'-CS primer 進行定序所得之序列。圖中底線標示出之 GTTAGCC 為 integron 5'-conserved segment 與基因片匣 *dfr12* 間的 7 個 base 的核心部位，核心部位之前為部分 5'-conserved segment 序列，之後為基因片匣 *dfr12* 之序列，箭頭標示之 ATG 為 *dfr12* 之起始譯碼。

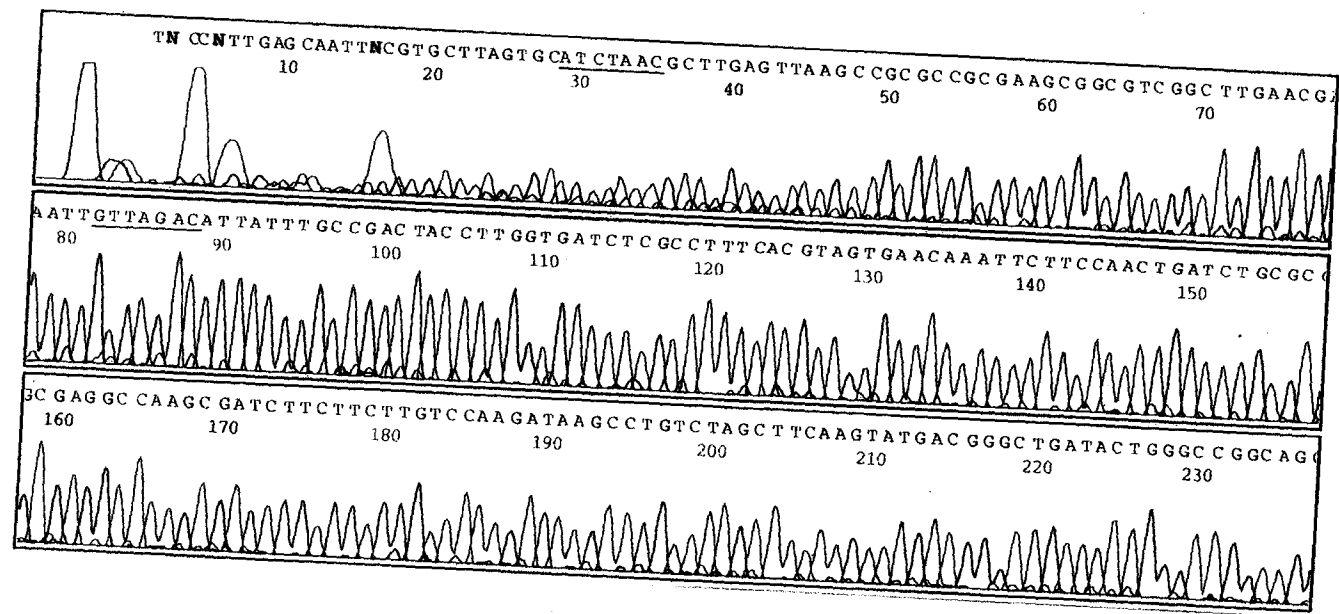


圖 10. 以 3'-CS primer 進行定序所得之序列。圖中底線標示處 bases 29~35 之互補序列為 5'-GTTAGAT-3'，此為基因片匣末端與 integron 3'-conserved segment 間的核心部位，另外 bases 82~88 之互補序列為 5'-GTCTAAC-3'，此為基因片匣 59-base element 5'端的 inverse core site，圖中之基因片匣為 *aadA1a*。

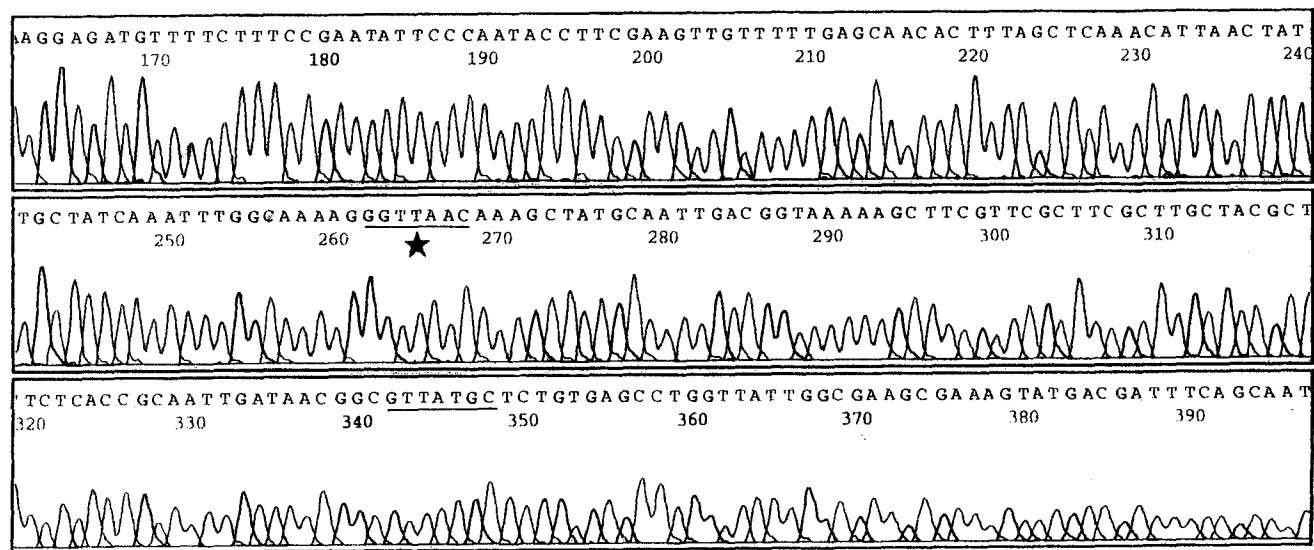


圖 11. 基因片匣 *dfrV* 與 *ereA2* 之序列。圖中底線標示處 bases 262~268 為基因片匣 *dfrV* 之 59-base element 5' 端的 inverse core site, bases 342~348 為 *dfrV* 與 *ereA2* 交界處的核心部位, 星號標示則為 *dfrV* 之終止譯碼 TAA。

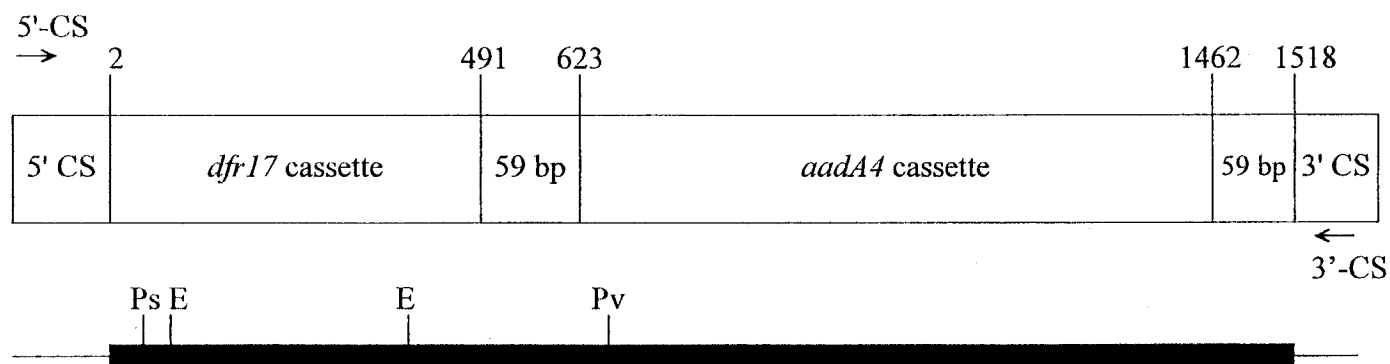


圖 12. Schematic representation of the integron carrying *dfr17* and *aadA4* cassettes. The line below the integron structure represents the amplicon obtained with primers 5'-CS and 3'-CS. The black box region represents the nucleotide sequence shown in Fig. 13 and restriction sites shown are E, *EcoRV*; Ps, *PstI*; Pv, *PvuII*. Numbers above the integron structure correspond to sequence positions in Fig. 13.

圖 13.

→ <i>dfr17</i>	
GTTAGCCATTAAGGGAGTTAAATTGAAAATATCATTGATTTCTGCAGTGTTCAGAAAAATGGCGTAATCGGTAGTGG	75
↑ M K I S L I S A V S E N G V I G S G	18
TCCTGATATCCCGTGGTCAGTAAAAGGTGAGCAACTACTCTTTAAAGCGCTCACATATAATCAATGGCTCCTTGT	150
P D I P W S V K G E Q L L F K A L T Y N Q W L L V	43
CGGAAGAAAAACATTTGACTCTATGGGTGTTCTTCCAAATCGCAAATATGCAGTAGTGTCAAAGAACGGAATTTTC	225
G R K T F D S M G V L P N R K Y A V V S K N G I S	68
AAGCTCAAATGAAAACGTCCTAGTTTTTTCCTTCAATAGAAAATGCTTTGAAAGAGCTATCAAAAGTTACAGATCA	300
S S N E N V L V F P S I E N A L K E L S K V T D H	93
TGTATATGTCTCTGGCGGGGGTCAAATCTATAATAGCCTTATTGAAAAAGCAGATATAATTCATTTGTCTACTGT	375
V Y V S G G G Q I Y N S L I E K A D I I H L S T V	118
TCACGTTGAAGTCGAAGGTGATATCAAATTCCTTATAATGCCTGAGAATTTCAATTTGGTTTTTGAACAGTTTTT	450
H V E V E G D I K F P I M P E N F N L V F E Q F F	143
TATGTCTAATATAAATTATACATACCAGATTTGGAAAAAGGCTAACAAATGCGTTGCAGCACCAGTCGCTTCGCT	525
M S N I N Y T Y Q I W K K G ★	157
59-base element	
CCTTGGACAGCTTTTAAGTCGCGTCTTTGTGGTTTTGCTGCGCAAAAAGTATTCCACAAAGCCGCAACTTAAAAGC	600
→ <i>aadA4</i>	
TGCCGCTGAACCTAACGTTAGGCATCATGGGTGAATTTTTCCCTGCACAAGTTTTCAAGCAGCTGTCCCACGCTC	675
↑ M G E F F P A Q V F K Q L S H A R	17
GCGCGGTGATCGAGCGCCATCTGGCTGCGACACTGGACACAATCCACCTGTTCCGATCTGCGATCGATGGAGGGC	750
A V I E R H L A A T L D T I H L F G S A I D G G L	42
TGAAGCCGGACAGCGACATAGACTTGTCTCGTGACCGTCAGCGCCGCACCTAACGATTCGCTCCGGCAGGCGCTAA	825
K P D S D I D L L V T V S A A P N D S L R Q A L M	67
TGCTCGATTTGCTGAAAGTCTCATCCCGCCAGGCGATGGCGGAACATGGCGACCGCTGGAGCTAACTGTTGTCTG	900
L D L L K V S S P P G D G G T W R P L E L T V V A	92
CTCGAAGCGAAGTAGTGCCTTGGCGCTATCCGGCGCGCGGTGAGCTTCAGTTTCGGTGAGTGGCTCCGCCACGACA	975
R S E V V P W R Y P A R R E L Q F G E W L R H D I	117
TCCTTTCCGGAACGTTTCGAGCCTGCCGTTCTGGATCAGCATCTTGCATTTTGTCTGACCAAGGCGAGGCAACACA	1050
L S G T F E P A V L D H D L A I L L T K A R Q H S	142
GCCTTGGCTTTCTAGGCCCATCCGCAGCCACGTTTTTCGAGCCGGTGCCGAAGGAGCATTTCTCCAAGGCGCTTT	1125
L A L L G P S A A T F F E P V P K E H F S K A L F	167
TCGACACTATTGCCCAGTGAATGCAGAGTCGGATTGGAAGGGTGACGAGCGGAACGTCGTTCTTGCTCTTGCTC	1200
D T I A Q W N A E S D W K G D E R N V V L A L A R	192
GCATTTGGTACAGCGCTTCAACTGGTCTCATTTGCTCCTAAGGACGTTGCTGCCGATGGGTATCGGAGCGTTTGC	1275
I W Y S A S T G L I A P K D V A A A W V S E R L P	217
CTGCCGAGCATCGGCCCTCATCTGCAAGGCACGCGGGCGTACCTGGGTAGCGAGGACGACGACCTAGCAATGC	1350
A E H R P L I C K A R A A Y L G S E D D D L A M R	242
GCGTCGAAGAGACGGCCGCGTTTCGTTTCGATATGCCAAAGCAACGATTGAGAGAATCTTGCCTTGAGCGGCATGTG	1425
V E E T A A F V R Y A K A T I E R I L R ★	262
59-base element	
CGAAAAGTCATCGACCCGCGCCGAGGGCATCTGATGCCTAACCTCGGCGTTCAAGCGGACGGGCTGCGCCCGCCG	1500
CTCAACTATGCGTTAGAT	1518
↑	

■ 13. Nucleotide sequence of the *dfr17* and *aadA4* cassettes (GenBank accession no. AF170088). The start and stop codons for *dfr17* and *aadA4* are indicated by horizontal arrows and by asterisks, respectively. The deduced amino acid sequences are indicated below the corresponding nucleotide sequences. The 59-bp elements are overlined. The conserved 7-bp core sites located at the cassettes boundaries and the 7-bp inverse core sites located at the left end of each 59-bp element are underlined. The cassette boundaries are indicated with vertical arrows.

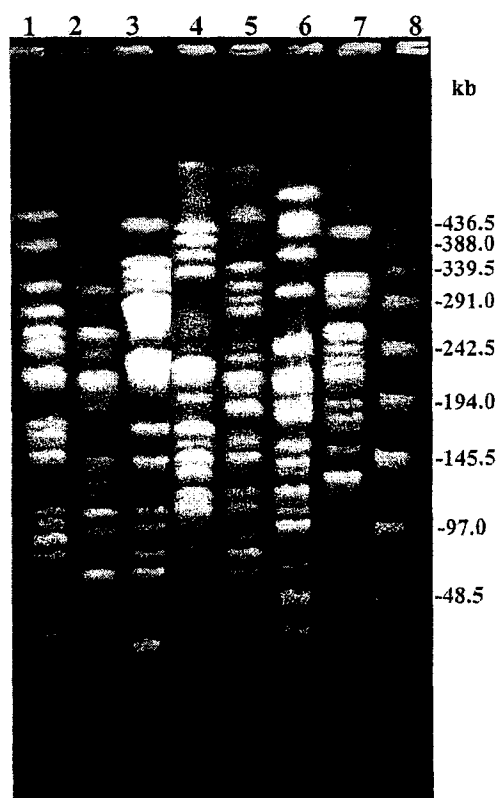


圖 14. 攜帶 integron 之 *E. coli* 菌株以 *Xba*I 切割後之脈動電泳分析圖。圖中第 1~7 行之菌株其 integron 攜帶之基因片匣為 *dfr12-orfF-aadA2*，第 8 行為 PFGE Marker I， λ -ladder。

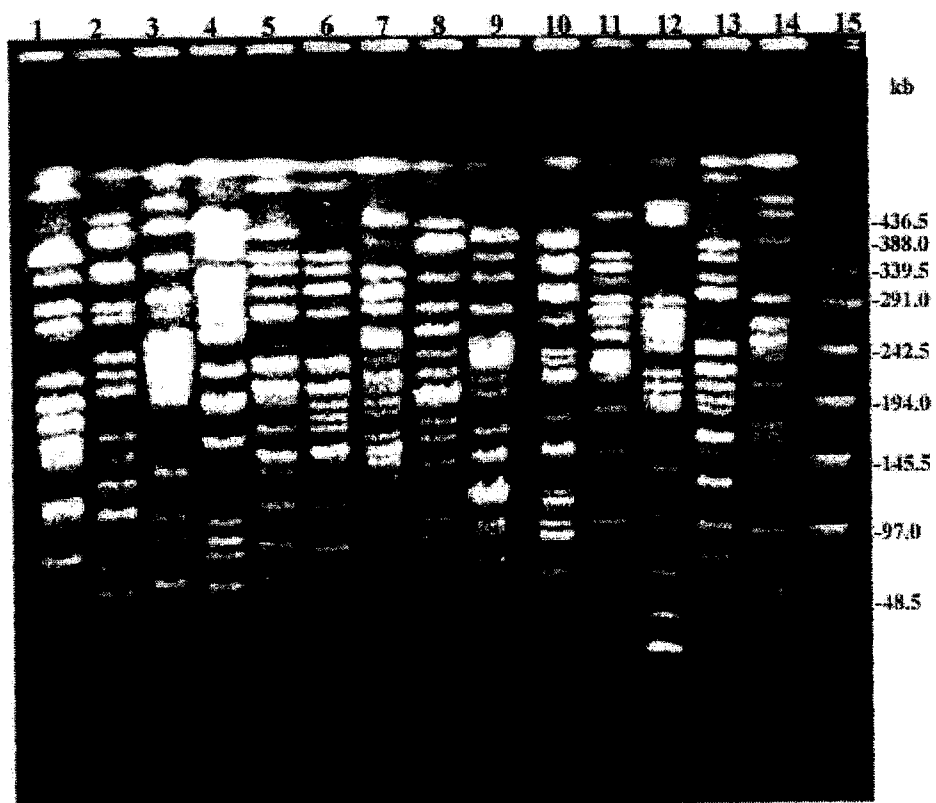


圖 15. 攜帶 integron 之 *E. coli* 菌株以 *Xba*I 切割後之脈動電泳分析圖。圖中第 1~14 行之菌株其 integron 攜帶之基因片匣為 *dfr12-orfF-aadA2*，第 15 行為 PFGE Marker I， λ -ladder。

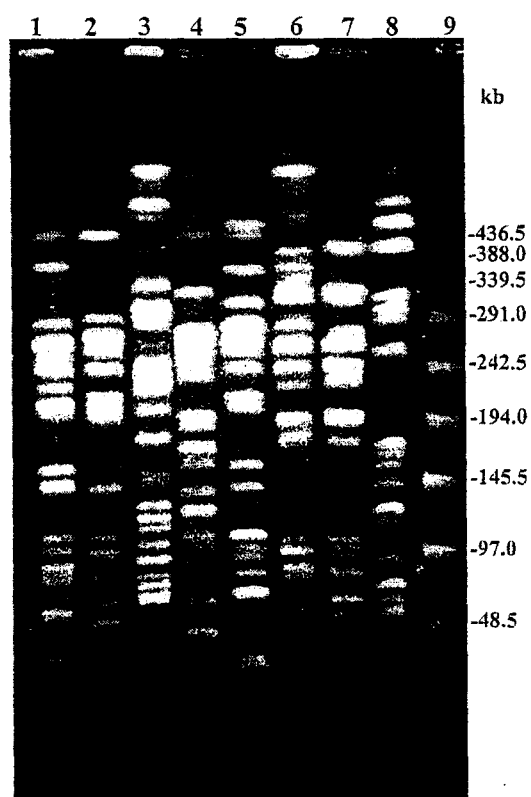


圖 16. 攜帶 integron 之 *E. coli* 菌株以 *Xba*I 切割後之脈動電泳分析圖。圖中第 1~4 行之菌株其 integron 攜帶之基因片匣為 *dfr17-aadA4*，第 5~8 行之菌株其 integron 攜帶之基因片匣為 *dfrIa-aadA1a*，第 9 行為 PFGE Marker I， λ -ladder。

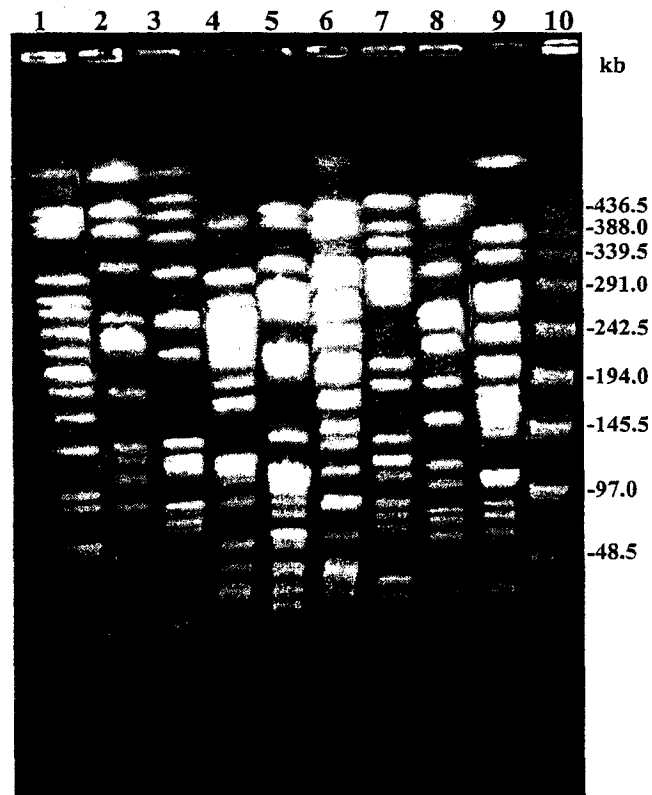


圖 17. 攜帶 integron 之 *E. coli* 菌株以 *Xba*I 切割後之脈動電泳分析圖。圖中之菌株其 integron 攜帶之基因片匣分別為：第 1~5 行為 *aadA1a*，第 6、7 行為 *aadA2*，第 8 行為 *aadB-aadA1a-cmlA*，第 9 行為 *dfrV-ereA2* 和 *aadA1a*，第 10 行為 PFGE Marker I， λ -ladder。

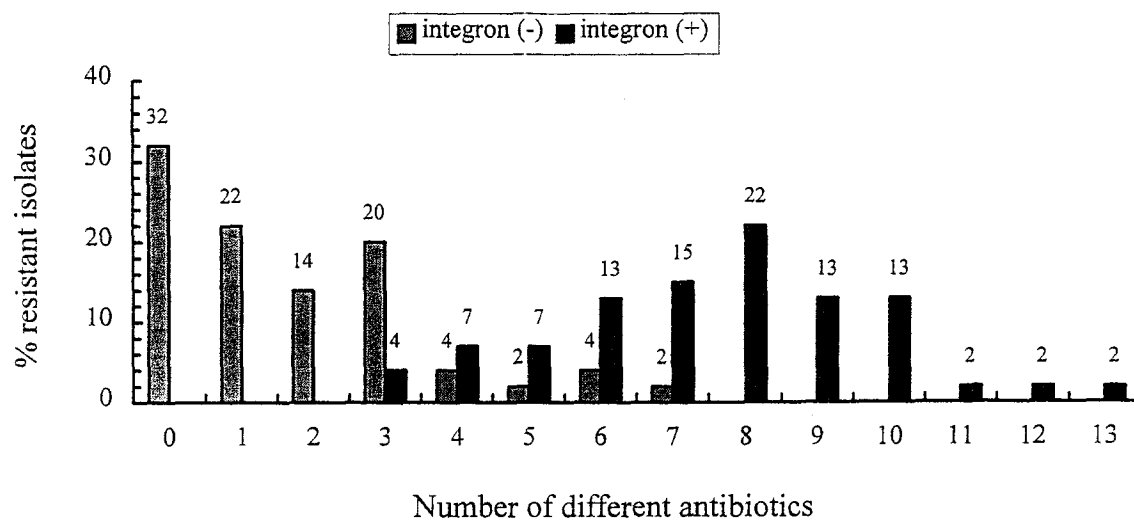


圖 18. Integron-positive 與 integron-negative 菌株對
各種數目的藥物呈現抗藥性的分佈情形