

团 体 标 准

T/AHEPI XXXXX—2020

环境微生物抗生素抗性基因检测 高通量荧光定量 PCR 法

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

安徽省环境保护产业发展促进会 发布

目 次

前言.....	II
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 缩略语.....	2
5 原理.....	2
6 主要试剂.....	3
7 主要设备和仪器.....	3
8 实验方法.....	3
8.1 检测对象.....	3
8.2 样品采集.....	3
8.3 样品保存和运输.....	4
8.4 检测步骤.....	4
8.5 结果分析与计算.....	5
8.6 结果表述.....	6
8.7 不确定度计算.....	6
附录 A（规范性） 抗生素抗性基因列表、分类、对应引物及抗性机制.....	7
附录 B（资料性） 土壤样品采集、保存、运输方法.....	17
附录 C（资料性） 水体样品采集、保存、运输方法.....	18
附录 D（资料性） 样品信息单.....	19
附录 E（资料性） 参考数据库.....	20
参考文献.....	21

前 言

本文件按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由安徽省环境保护产业发展促进会归口。

本文件由安徽微分基因科技有限公司提出。

本文件起草单位： 、 、 、 。

本文件起草人： 、 、 、 。

环境微生物抗生素抗性基因检测 高通量荧光定量 PCR 法

1 范围

本文件规定了人体（动物）环境的口腔、皮肤、生殖道、肠道等及自然环境的空气、水体、土壤、沉积物、海洋、极地等样本中微生物抗生素抗性基因含量的高通量实时荧光PCR定量检测方法。

本文件适用于用高通量荧光定量PCR法进行上述环境微生物检测的机构。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和实验方法

GB 19489-2008 实验室生物安全通用要求

GB/T 19495.2-2004 转基因产品检测实验室技术要求

GB/T 19495.3-2004 转基因产品检测 核酸提取纯化方法

GB/T 19495.5-2004 转基因产品检测核酸定量 PCR检测方法

JJF 1059.1 测量不确定度评定与表示

SN/T 4562 转基因检测实验室测量不确定度评估指南

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

环境 environment

包括人体(动物)环境与自然环境，前者包括但不限于口腔、皮肤、生殖道、肠道等，后者包括但不限于空气、水体、土壤，沉积物、海洋、极地等。

3.2

实时荧光定量 PCR quantitative real-time PCR

在聚合酶链式反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号积累实时监测整个PCR进程，并通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。

3.3

相对定量 relative quantification

相对定量的目的是测定目的基因在两个或多个样本中的含量的相对比例，而不需要知道它们在每个样本中的拷贝数。

3.4

绝对定量 absolute quantification

绝对定量的目的是测定目的基因在样本中的分子数目，即通常所说的基因拷贝数。

3.5

基因拷贝数 gene copy Number

基因拷贝数(copy number)是指某一种基因或某一段特定的DNA序列在单倍体基因组(haploid genome)中出现的数目。

3.6

质粒标准分子 plasmid reference molecule

一种稳定存在的重组质粒分子，其包含了抗生素抗性基因检测的目标序列片段（如筛选基因片段、功能基因片段等），以及原核微生物特异的16S内参基因，用于计算抗生素抗性基因的相对丰度和绝对丰度。

3.7

CT值 cycle threshold

每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数。

3.8

抗生素 antibiotic

在低浓度下有选择地抑制或影响其它种类生物机能的，是微生物生命过程中产生的具有生理活性的次级代谢产物及其衍生物。

3.9

抗生素抗性 antibiotic resistance

通过以下常见的4种方式使抗生素无法发挥作用：

- a. 依靠细胞膜阻止抗生素进入细胞；
- b. 依靠外排泵将抗生素排出；
- c. 对抗生素的作用靶标进行突变，从而阻止抗生素与靶标的结合；
- d. 通过酶修饰或降解使抗生素失活。

3.10

基因 gene

DNA（脱氧核糖核酸）分子上具有遗传信息的特定核苷酸序列的总称，并具有遗传效应，是控制生物性状的基本遗传单位。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

bp——碱基对(base pair)

DNA——脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

PCR——酶链式聚合反应(polymerase chain reaction)

qPCR——实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR)

ARGs——抗生素抗性基因(antibiotics resistance gene)

5 原理

实时荧光定量PCR检测是在PCR反应体系中，加入特异性引物，随着PCR反应的进行，核酸染料不断与PCR产物结合，发出荧光信号，PCR反应产物不断累计，荧光信号强度也等比例增加。每经过一个循环，收集一次荧光强度信号，这样就可以通过荧光强度变化来监测产物量的变化，从而得到一条荧光扩增曲

线。在PCR扩增结束后，增加溶解曲线的步骤，监测扩增产物的特异性情况。符合曲线拟合的扩增才算检出。

每个模板的Ct值与该模板起始拷贝数的对数存在线性关系，起始拷贝数越多，Ct值越小。利用已知起始拷贝数的质粒标准分子可制备标准曲线，其中横坐标代表起始拷贝数的对数，纵坐标代表Ct值。因此，只要获得未知样品的Ct值，即可通过制备的标准曲线计算出该样品的起始拷贝数。

6 主要试剂

除特别说明外，所用试剂均为分析纯或生化试剂，实验用水应符合GB/T 6682中一级水的规格。主要试剂包括：

- a) 适用于口腔、皮肤、生殖道、肠道、空气、水体、土壤，沉积物、海洋、极地等微生物 DNA 提取的试剂盒；
- b) 实时荧光 PCR 预混液：为 Taq DNA 聚合酶（2.5-5U/μL）、1000X SYBR Green 荧光染料、10X PCR 反应缓冲液、50mM MgCl₂、10mM each dNTPs（含 dATP、dTTP、dCTP、dGTP）等混合配制的溶液；
- c) 10 μg/μL 牛血清蛋白；
- d) 0.8%-1.5%琼脂糖；
- e) PCR 产物纯化试剂盒（商用）；
- f) 抗生素抗性基因的引物：根据附录 A 中序列合成的引物，加双蒸水配制成 100 μmol/L 储备液，用于实时荧光 PCR 扩增时用双蒸水稀释至浓度为 10 μmol/L 的工作液。

7 主要设备和仪器

主要设备和仪器包括：

- a) 高通量荧光定量 qPCR 仪；
- b) PCR 仪；
- c) 冷冻离心机；
- d) 微量移液器；
- e) 荧光定量仪；
- f) 电泳仪带水平电泳槽；
- g) 凝胶成像系统；
- h) 恒温孵育器或水浴锅；
- i) 低温保存箱；
- j) 涡旋振荡器；
- k) 紫外分光光度计。

8 实验方法

8.1 检测对象

环境中的微生物。

8.2 样品采集

- 8.2.1 样品采集应经过伦理审查和生物安全评价审查，符合国家法律法规及伦理规范。
- 8.2.2 应根据环境、样品类型等情况选择相应的采样方法以保证样品中微生物群落的代表性和准确性。以粪便样品为例，应即刻采样，减少样品暴露于空气中的时间。其他环境样品（含土壤与水体）采集标准建议，参见附录 B、附录 C。

注：应避免样品被其它物质污染。

8.3 样品保存和运输

宜在干冰条件下运输，并于-80℃保存，不应在没有保护措施（稳定剂）的前提下，室温下放置超过2小时。保存过程中应避免反复冻融。

8.4 检测步骤

8.4.1 样品信息登记与微生物 DNA 提取

- 8.4.1.1 仔细核对样品编号，记录样品信息，检查样品状态，无密封不严导致泄漏或者污染等情况发生，否则该样品不可用于检测，需要重新采样。准确记录信息（参见附录 D），保证样品的可追溯性。
- 8.4.1.2 根据样品类型的不同，选择稳定高度可重复的方法提取样本中的微生物总 DNA，在选择方法时应尽量避免宿主 DNA 对微生物 DNA 的污染。

8.4.2 微生物 DNA 浓度测定及鉴定

- 8.4.2.1 环境微生物样品提取微生物总 DNA 后，依据 GB/T 19495.3-2004 和 GB/T 19495.5-2018 的规定检测 DNA 样品。
- 8.4.2.2 常用荧光定量仪检测 DNA 样品浓度。
- 8.4.2.3 微生物 DNA 的鉴定：根据原核微生物特有的 16S 基因片段设计的引物，对应附录引物表中的 16S 引物，通过实时荧光 PCR 扩增，记录样本用 16S 引物扩增的 Ct 值。
- 8.4.2.4 综合 DNA 样品浓度及 16S 引物扩增的 Ct 指标，按表 1 所示的判定标准划分 DNA 质量等级。

表 1 DNA 样品质量判断标准

样品类型	检测结果		16S Ct 值	判定结论	
微生物 DNA	两次检测要求	$c \geq 10 \text{ ng}/\mu\text{l}$	无降解	$Ct \leq 17$	A 类
	一次检测要求		或轻微降解	$17 < Ct \leq 20$	B 类
	少于一次检测要求的 80%	$c \leq 10 \text{ ng}/\mu\text{l}$	中度降解 或重度降解	$20 < Ct$	C 类
注1：m—总量(total mass)的缩写，此处指DNA总量； 注2：c—浓度(concentration)的缩写，此处指DNA浓度； 注3：A类样品应同时满足总量满足两次上机要求， $c \geq 10.0 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ，16S扩增的 $Ct \leq 17$ ，合格； 注4：B类样品应同时满足一次上机要求， $c \geq 10.0 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ，16S扩增的 $17 < Ct \leq 20$ ，合格； 注5：C类样品应满足少于一次上机要求的80%， $20 < Ct$ ，该样品判为C类，不完全合格。					

8.4.3 实时荧光 PCR 扩增

- 8.4.3.1 实时荧光 PCR 反应体系配制见表 2。每个提取平行重复分别至少 3 次扩增反应（扩增平行重复）。

表 2 实时荧光 PCR 反应体系

名称	储液浓度	终浓度
2×SYBR Green Mix	2×	1×
BSA (牛血清蛋白)	10 μg/μL	1×10 ⁻³ μg/μL
上游引物	10 μmol/L	1 μmol/L
下游引物	10 μmol/L	1 μmol/L
DNA 模板	10ng/μL	2ng/μL
ROX	50×	1×
双蒸水	——	补足至 5 μL

8.4.3.2 实时荧光 PCR 扩增程序：预变性 95℃，10min；{95℃，30s；60℃，30s} 40cycles+溶解曲线。

8.4.3.3 实验对照的设立依据 GB/T 19495.5-2018。

8.4.4 标准曲线制备

标准曲线的制备依据 GB/T 19495.5-2018。

8.5 结果分析与计算

8.5.1 质量控制

8.5.1.1 实验条件

实验应满足下列条件：

- 实验室设施和环境应符合 GB 19489-2008 和 GB/T 19495.2-2004 的规定。
- 实验用水应符合 GB/T 6682 的规定。
- 实验室应按照不同工作内容划分独立区域，并有明显标志。如试剂储备和准备区，样品制备区，扩增区等，各区域间应避免交叉污染。

8.5.1.2 核酸提取

严格按照实验环境规定以及操作标准进行操作，规范填写实验操作单，使用紫外分光光度计确定 DNA 浓度（OD₂₆₀ 值）和纯度（OD₂₆₀/280 比值），核酸提取浓度： $c \geq 10$ ng/μl，核酸提取总量够两次检测要求，DNA 无降解或轻微降解。

8.5.1.3 实时荧光 PCR 扩增

严格按照实验环境规定以及操作标准进行操作，规范填写实验操作单，单次实验不得少于 380 个反应，单个样本单次检测不得少于 96 个基因（从附录 A 基因列表中选择），下机数据以清楚的唯一标识保存于指定文件夹中，检查是否存在假阳性（阴性对照 CT ≤ 31）。细则如下：

- Ct 值：10-31cycles，阴性对照为未检测到 Ct 值，或者与所有样品比较差值不得 < 5；
- 熔解温度 T_m：>80℃；
- 相关系数 R²：>0.990；
- 反应效率 Efficiency：90~110%；
- 绘制标准曲线的模板必须进行至少 5 个数量级（或梯度）的稀释。

8.5.2 检测结果分析

检测结果分析必须用高通量环境微生物抗生素抗性基因检测生物信息分析软件进行标准化的结果分析，绘制图像的标注信息和实验信息包括样本名称、引物名称以及上机模式需一致。输出的标准化结果包括以下：

- 原始数据整理；
- 检出 ARGs 信息统计；
- 检出 ARGs 丰度模式分析；
- Circos 关联性分析。

8.5.3 结果计算

8.5.3.1 微生物 DNA 浓度与拷贝数间的换算，换算关系依据 GB/T 19495.5-2018。

8.5.3.2 微生物 DNA 中抗生素抗性基因拷贝数计算。

8.6 结果表述

8.6.1 定量检测结果表述

8.6.1.1 相对定量

特定样品相对于参考样品（如未处理的对照样品）某个基因表达量的变化， $CT \leq 31$ 即为检出， $CT > 31$ 视为未检出，检出基因根据标准曲线计算出拷贝数。

8.6.1.2 绝对定量(标准曲线法)

基于已知数量对未知数量进行定量，首先创建标准曲线；然后比较未知数量与标准曲线，并通过相对拷贝数间接计算各基因的绝对拷贝数。

目的基因绝对拷贝数 = $16s \text{ rRNA 基因绝对拷贝数} * 2^{-\Delta CT}$

$\Delta CT = CT(\text{gene}) - CT(16s)$

注 1：CT(gene) 和 CT(16s) 来源于同一样本

8.7 不确定度计算

按 JJF 1059.1 和 SN/T 4562 的规定计算。

附录 A

(规范性)

抗生素抗性基因列表、分类、对应引物及抗性机制

表 A.1 抗生素抗性基因列表、分类、对应引物及抗性机制

序号	#Gene Name	Forward Primer	Reverse Primer	class1	Mechanism
1	16S rRNA	GGGTTGCGCTCGTTGC	ATGGYGTGTCGACGCTCGTG		内参基因
2	aac	CCCTGCGTTGTGGCTATGT	TTGGCCACGCCAATCC	Aminoglycoside	antibiotic deactivate
3	aac(6')-I1	GACCGGATTAAGGCCGATG	CTTGCCTTGATATTCAGTTTTATAA CCA	Aminoglycoside	antibiotic deactivate
4	aac(6')-Ib(aka aacA4)-01	GTTTGAGAGGCAAGTACCGTAA	GAATGCCTGGCGTGTGTA	Aminoglycoside	antibiotic deactivate
5	aac(6')-Ib(aka aacA4)-02	CGTCGCCGAGCAACTTG	CGGTACCTTGCTCTCAAACC	Aminoglycoside	antibiotic deactivate
6	aac(6')-Ib(aka aacA4)-03	AGAAGCACGCCGACACTT	GCTCTCCATTCAGCATTGCA	Aminoglycoside	antibiotic deactivate
7	aac(6')-II	CGACCCGACTCCGAACAA	GCACGAATCCTGCCTTCTCA	Aminoglycoside	antibiotic deactivate
8	aac(6')-Iy	GCTTTGCGGATGCCTCAAT	GGAGAACAAAATACCTTCAAGGAAA	Aminoglycoside	antibiotic deactivate
9	aacA/aphD	AGAGCCTTGGGAAGATGAAGTTT	TTGATCCATACCATAGACTATCTCAT CA	Aminoglycoside	antibiotic deactivate
10	aacC	CGTCACTTATTCGATGCCCTTAC	GTCGGGCGCGGCATA	Aminoglycoside	antibiotic deactivate
11	aacC1	GGTCGTGAGTTCGGAGACGTA	GCAAGTCCCAGGTAATCG	Aminoglycoside	antibiotic deactivate
12	aacC2	ACGGCATTCTCGATTGCTTT	CCGAGCTTCACGTAAGCATT	Aminoglycoside	antibiotic deactivate
13	aacC4	CGGCGTGGACACGAT	AGGGAACCTTTGCCATCAACT	Aminoglycoside	antibiotic deactivate
14	aadA-01	GTTGTGCACGACGACATCATT	GGCTCGAAGATACCTGCAAGAA	Aminoglycoside	antibiotic deactivate
15	aadA-02	CGAGATTCTCCGCGTGTA	GCTGCATTCTCCAATTTGC	Aminoglycoside	antibiotic deactivate
16	aadA1	AGCTAAGCGCAACTGCAAT	TGGCTCGAAGATACCTGCAA	Aminoglycoside	antibiotic deactivate
17	aadA-1-01	AAAAGCCGAAGAGAACTTG	CATCTTCCAAAAGATGTGCTGTCT	Aminoglycoside	antibiotic deactivate
18	aadA-1-02	CGGAATTGAAAAACTGATCGAA	ATACCGGCTGTCCGTCATT	Aminoglycoside	antibiotic deactivate
19	aadA2-01	ACGGCTCCGAGTGGAT	GGCCACAGTAACCAACAAATCA	Aminoglycoside	antibiotic deactivate
20	aadA2-02	CTTGTGTCGATGACGACATC	TCGAAGATACCCGAAGAATG	Aminoglycoside	antibiotic deactivate
21	aadA2-03	CAATGACATTCTTGGGGTATC	GACCTACCAAGGCAACGCTATG	Aminoglycoside	antibiotic deactivate
22	aadA5-01	ATCACGATCTTGGGATTTGCT	CTGCGGATGGGCTAGAAAG	Aminoglycoside	antibiotic deactivate
23	aadA5-02	GTTCTTGCTCTTGCTCGCATT	GATGCTCGGACGGCAAAC	Aminoglycoside	antibiotic deactivate
24	aadA9-01	CGCGGAAGCCTATCTTG	CAATCAGCGACCCGAGACT	Aminoglycoside	antibiotic deactivate
25	aadA9-02	GGATGCAGCTTGGATGAA	CCTCTAGCGGCCGAGTATT	Aminoglycoside	antibiotic deactivate
26	aadD	CCGACAACATTCTACCATCCTT	ACCGAAGCGCTCGTCGATA	Aminoglycoside	antibiotic deactivate
27	aadE	TACCTTATGCCCTTGAAGAGT TA	GGAATATGTCCTTTTAATTCTACA ATCT	Aminoglycoside	antibiotic deactivate

表 A.1 抗生素抗性基因列表、分类、对应引物及抗性机制(续)

28	acrA-01	CAACGATCGGACGGGTTTC	TGGCGATGCCACCGTACT	Multidrug	efflux pump
29	acrA-02	GGTCTATCACCTACGCGCTATC	GCGCGCACGAACATAACC	Multidrug	efflux pump
30	acrA-03	CAGACCCGCATCGCATATT	CGACAATTCGCGCTCATG	Multidrug	efflux pump
31	acrA-04	TACTTTGCCGCGCATCTTC	CGTGCGGAACGAACAT	Multidrug	efflux pump
32	acrA-05	CGTGCGGAACGAACA	ACTTTGCCGCGCATCTTC	Multidrug	efflux pump
33	acrB-01	AGTCGGTGTTCGCCGTTAAC	CAAGGAAACGAACGCAATACC	Multidrug	efflux pump
34	acrF	GCGGCCAGGCACAAAA	TACGCTCTCCACGGTTC	Multidrug	efflux pump
35	acrR-01	GCGCTGGAGACAGACAAC	GCCTTGCTGCGAGAACAAA	Multidrug	efflux pump
36	acrR-02	GATGATACCCCTGCTGTGAGA	ACCAAACGAAGCGCAAGAA	Multidrug	efflux pump
37	adeA	CAGTTCGAGCGCTATTCTG	CGCCGTGACCGACCAAT	Multidrug	efflux pump
38	ampC/blaDHA	TGGCCCGAGCAGAAAAGA	CCGTTTTATGCACCCAGGAA	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
39	ampC-01	TGGCGTATCGGGTCAATGT	CTCCACGGGCAGTTGAG	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
40	ampC-02	GCAGCACGCCCGTAA	TGTACCCATGATGCGGCTACT	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
41	ampC-04	TCCGGTGACGCGACAGA	CAGCACGCCGTTGAAAGT	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
42	ampC-05	CTGTTGAGCTGGGTTCTATAAG TAAA	CAGTATCTGGTACCCGGATCGT	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
43	ampC-06	CCGCTCAAGCTGGACCATAC	CCATATCTGCACGTTGGTTT	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
44	ampC-07	CCGCCAGAGCAAGGACTA	GCTCGACTTACCGCGTAAG	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
45	ampC-09	CAGCCGCTGATGAAAAATATG	CAGCGAGCCCACTCGA	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
46	aph	TTTCAGCAAGTGGATCATGTTAA AAT	CCAAGCTGTTCCACTGTTTTTC	Aminoglycoside	antibiotic deactivate
47	aph(2')-Id-01	TGAGCAGTATCATAAGTTGAGTG AAAAG	GACAGAACAATCAATCTCTATGGAAT G	Aminoglycoside	antibiotic deactivate
48	aph(2')-Id-02	TAAGGATATACCGACAGTTTTGG AAA	TTAATCCCTTTCATACCAATCCAT A	Aminoglycoside	antibiotic deactivate
49	aph6ia	CCCATCCCATGTGTAAGGAAA	GCCACCGCTTCTGCTGTAC	Aminoglycoside	antibiotic deactivate
50	aphA1 (aka kanR)	TGAACAAGTCTGGAAGAAATGC A	CCTATTAATTTCCCTCGTCAAAA	Aminoglycoside	antibiotic deactivate
51	bacA-01	CGGCTTCGTGACCTCGTT	ACAATGCGATACCAGGCAAT	Others	antibiotic deactivate
52	bacA-02	TTCACGACACGATTAAGTCATT G	CGGCTCTTCGGCTTCAG	Others	antibiotic deactivate
53	bla1	GCAAGTTGAAGCGAAAGAAAAGA	TACCAGTATCAATCGCATATACACCT AA	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
54	bla-ACC-1	CACACAGCTGATGGCTTATCTAA AA	AATAAACGCGATGGGTTCCA	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
55	blaCMY	CCGCGCGAAATTAAGC	GCCACTGTTTGCCTGTCAGTT	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
56	blaCMY2-01	AAAGCCTCAT GGGTCATAAA	ATAGCTTTGTTGCCAGCATCA	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
57	blaCMY2-02	GCGAGCAGCCTGAAGCA	CGGATGGGCTTGCTCTCTT	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
58	blaCTX-M-01	GGAGGCGTGACGGCTTTT	TTCAGTGCATCCAGACGAA	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate

表 A.1 抗生素抗性基因列表、分类、对应引物及抗性机制(续)

59	blaCTX-M-02	GCCCGGGTGTGAAGA	ATCGGATTATAGTTAACCAGGTCAGATTT	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
60	blaCTX-M-03	CGATACCACCACGCCGTTA	GCATTGCCCAACGTCAGATT	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
61	blaCTX-M-04	CTTGGCGTTGCGCTGAT	CGTTCATCGGCACGGTAGA	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
62	blaCTX-M-05	GCGATAACGTGGCGATGAAT	GTCGAGACGGAACGTTTCGT	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
63	blaCTX-M-06	CACAGTTGGTGACGTGGCTTAA	CTCCGCTGCCGTTTTATC	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
64	blaGES	GCAATGTGCTCAACGTTCAAG	GTGCCTGAGTCAATTCTTCAAAG	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
65	blaIMP-01	AACACGGTTTGGTGGTTCTGTGA	GCGCTCCACAAACCAATTG	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
66	blaIMP-02	AAGGCAGCATTCTCTCATT	GGATAGATCGAGAATTAAGCCACTCT	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
67	bla-L1	CACCGGGTACCAGCTGAAG	GCGAAGCTGCGCTGTAGTC	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
68	blaMOX/blaCMY	CTATGTCAAATGTGCCAAGCA	GGCTTGCTCTTTTCGAATAGC	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
69	blaOCH	GGCGACTTGCCCGTAT	TTTTCTGCTCGGCATGAG	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
70	blaOKP	GCCGCCATCACCATGAG	GGTGACGTGTACCCGATCTG	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
71	blaOXA1/blaOXA30	CGGATGGTTGAAGGGTTATTA T	TCTTGGCTTTTATGCTTGATGTTAA	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
72	blaOXA10-01	CGCAATTATCGGCCTAGAAACT	TTGGCTTCCGTCCTATT	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
73	blaOXA10-02	CGCAATTATCGGCCTAGAAACT	TTGGCTTCCGTCCTATT	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
74	blaOXY	CGTTCAGCGGCAGGTT	GCCGCGATATAAGATTGAGAATT	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
75	blaPAO	CGCCGTACAACCGGTGAT	GAAGTAATGCGGTTCTCTTTCA	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
76	blaPER	TGCTGGTTGCTGTTTTGTGA	CCTGCGCAATGATAGCTTCAT	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
77	blaPSE	TTGTGACCTATCCCTGTAATA GAA	TGCGAAGCACGCATCATC	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
78	blaROB	GCAAAGGCATGACGATTGC	CGCGCTGTGTCGCTAAA	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
79	blaSFO	CCGCCCATCCAGTA	GGCCGCCAAGATGCT	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
80	blaSHV-01	TCCCATGATGAGCACCTTAAA	TTCGTACCCGCATCCA	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
81	blaSHV-02	CTTCCCATGATGAGCACCTT	TCCTGCTGGCGATAGTGGAT	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
82	blaTEM	AGCATCTTACGGATGGCATGA	TCCTCCGATCGTTGTCAGAAGT	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
83	blaTLA	ACACTTTGCCATTGCTGTTATG T	TGCAAATTCGGCAATAATCTTT	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
84	blaVEB	CCCGATGCAAAGCGTTATG	GAAAGATCCCTTTATCTATCTCAGAA CAA	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
85	blaVIM	GCACTTCTCGGAGATTG	CGACGGTGTGCGTACGTT	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
86	blaZ	GGAGATAAAGTAACAAATCCAGT TAGATATGA	TGCTTAATTTCCATTGCGATAAG	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
87	carB	GGAGTGAGGCTGACCGTAGAAG	ATCGCGAAACGCACAAA	MLSB	efflux pump
88	catA1	GGGTGAGTTTACCAGTTTTGAT T	CACCTTGTCGCTTGCATATA	Others	antibiotic deactivate
89	catB3	GCACTCGATGCCTTCCAAA	AGAGCCGATCCAAACGTCAT	Others	antibiotic deactivate
90	catB8	CACTCGACGCTTCCAAAAG	CCGAGCCTATCCAGACATCATT	Others	antibiotic deactivate

表 A.1 抗生素抗性基因列表、分类、对应引物及抗性机制(续)

91	ceoA	ATCAACACGGACCAGGACAAG	GGAAAGTCGGCTCACGATGA	Multidrug	efflux pump
92	cepA	AGTTGCGCAGAACAGTCTCTT	TCGTATCTTGCCCGTCGATAAT	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
93	cfiA	GCAGCGTTGCTGGACACA	GTTCCGGATAAACGTGGTACT	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
94	cfr	GCAAAATTCAGAGCAAGTTACGA A	AAAATGACTCCCAACCTGCTTAT	Others	antibiotic deactivate
95	cfxA	TCATTCTCGTTCAAGTTTCAG A	TGCAGCACCAAGAGGAGATGT	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
96	cInt1-1(class1)	GGCATCCAAGCAGCAAG	AAGCAGACTTGACCTGA	Integron	integrase
97	cmeA	GCAGCAAAAGAAGACCAAA	AGCAGGGTAAGTAAACTAAGTGGA AATCT	Multidrug	efflux pump
98	cmlA1-01	TAGGAAGCATCGGAACGTTGAT	CAGACCGAGCACGACTGTTG	Chloramphenico l	efflux pump
99	cmlA1-02	AGGAAGCATCGGAACGTTGA	ACAGACCGAGCACGACTGTTG	Chloramphenico l	efflux pump
100	cmr	CGGCATCGTCAGTGAATT	CGGTTCCGAAAAAGATGGAA	Multidrug	efflux pump
101	cmx (A)	GCGATCGCCATCCTCTGT	TCGACACGGAGCCTTGGT	Chloramphenico l	efflux pump
102	cphA-01	GCGAGTGCACAAGCTGAT	CGGCCAGTCGCTCTC	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
103	cphA-02	GTGCTGATGGCGAGTTTCTG	GGTGTGGTAGTTGGTGTGATCAC	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
104	dfrA1	GGAATGGCCCTGATATCCA	AGTCTTGCCTCAACCAACAG	Sulfonamide	antibiotic deactivate
105	dfrA12	CCTCTACCGAACCGTCACACA	GCGACAGCGTTGAAACAACCTAC	Sulfonamide	antibiotic deactivate
106	emrD	CTCAGCAGTATGGTGGTAAGCAT T	ACCAGGCCCGAAGAAC	Multidrug	efflux pump
107	ereA	CCTGTGGTACGGAGAATTCATGT	ACCGCATTGCTTTGCTT	MLSB	antibiotic deactivate
108	ereB	GCTTTATTCAGGAGCGGAAT	TTTTAAATGCCACAGCACAGAATC	Others	antibiotic deactivate
109	erm(34)	GCGCGTTGACGACGATTT	TGGTCATACTCGACGGCTAGAAC	MLSB	cellular protection
110	erm(35)	TTGAAAACGATGTTGCATTAAGT CA	TCTATAATCACAACCTAACCACTGAA CGT	MLSB	cellular protection
111	erm(36)	GGCGGACCGACTTGCAT	TCTGCGTTGACGACGGTTAC	MLSB	cellular protection
112	ermA	TTGAGAAGGATTTGCGAAAAG	ATATCCATCTCCACCATTAATAGTAA ACC	MLSB	cellular protection
113	ermA/ermTR	ACATTTTACCAAGGAACCTGTGG AA	GTGGCATGACATAAACCTTCATCA	MLSB	cellular protection
114	ermB	TAAAGGGCATTAAACGACGAAAC T	TTTATACCTCTGTTTGTAGGGAATT GAA	MLSB	cellular protection
115	ermC	TTTGAAATCGGCTCAGGAAA	ATGGTCTATTTCAATGGCAGTTACG	MLSB	cellular protection
116	ermF	CAGCTTTGGTTGAACATTTACGA A	AAATTCCTAAAATCACAACCGACAA	MLSB	cellular protection

表 A.1 抗生素抗性基因列表、分类、对应引物及抗性机制(续)

117	ermJ/ermD	GGACTCGGCAATGGTCAGAA	CCCCGAAACGCAATATAATGTT	MLSB	cellular protection
118	ermK-01	GTTTGATATTGGCATTGTCAGAG AAA	ACCATTGCCGAGTCCACTTT	MLSB	cellular protection
119	ermK-02	GAGCCGCAAGCCCCTTT	GTGTTTCATTTGACGCGGAGTAA	MLSB	cellular protection
120	ermT-01	GTTCACTAGCACTATTTTAAATG ACAGAAGT	GAAGGTGTCTTTTAAATACAATTAA CGA	MLSB	cellular protection
121	ermT-02	GTAATAATCCCTAGAGAATACTTT CATCCA	TGAGTGATATTTTGAAGGGTGTCTT	MLSB	cellular protection
122	ermX	GCTCAGTGGTCCCCATGGT	ATCCCCCGTCAACGTTT	MLSB	cellular protection
123	ermY	TTGTCTTTGAAAGTGAAGCAACA GT	TAACGCTAGAGAACGATTGTATTGA G	MLSB	cellular protection
124	fabK	TTTCAGCTCAGCACTTTGGTCAT	AAGGCATCTTTTCAGCCAGTTC	Others	antibiotic deactivate
125	floR	ATTGTCTTACGGTGTCCGTTA	CCGCGATGTCGTCGAACT	Multidrug	efflux pump
126	foIA	CGAGCAGTTCCTGCCAAAAG	CCCAGTCATCCGGTTCATAATC	Sulfonamide	antibiotic deactivate
127	fosB	TCACTGTAATAATGAAGCATTAA GACCAT	CCATCTGGATCTGTAAGTAAAGAGA TC	Others	antibiotic deactivate
128	fosX	GATTAAGCCATATCACITTAATT GTGAAAG	TCTCCTCCATAATGCAAAATCCA	Others	antibiotic deactivate
129	fox5	GGTTTGCCGCTGCAGTTC	GCGGCCAGGTGACCAA	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
130	imiR	CCGGACTAGAGCTTCTATGAAGC	CCCACGCGGTACTCTGTGAAA	Others	other/unknown
131	intI-1(clinic)	CGAACGAGTGGCGGAGGGTG	TACCCGAGAGCTTGGCACCCA	Integron	integrase
132	IS613	AGGTTCCGACTCAATGAACA	TTCAGCACATACCGCCTTGAT	Transposase	transposase
133	lmrA-01	TCGACGTGACCGTAGTGAACA	CGTGACTACCCAGGTGAGTTGA	MLSB	efflux pump
134	lnuA-01	TGACGCTCAACACTCAAAAA	TTCATGCTTAAGTCCATACGTGAA	MLSB	antibiotic deactivate
135	lnuB-01	TGAACATAATCCCCTCGTTTAAA GAT	TAATTGCCCTGTTTCATCGTAAATAA	MLSB	antibiotic deactivate
136	lnuB-02	AAAGGAGAAGGTGACCAATACTC TGA	GGAGCTACGTCAACAACAGTT	MLSB	antibiotic deactivate
137	lnuC	TGGTCAATATAACAGATGTA AAC CAGATTT	CACCCAGCCACCATCAA	MLSB	antibiotic deactivate
138	marR-01	GCGCGTACTGGTGAAGCTA	TGCCCTGGTCTGTGATGA	Multidrug	efflux pump
139	matA/meI	TAGTAGGCAAGCTCGGTGTTGA	CCTGTGCTATTTTAAAGCCTTGTCT	MLSB	efflux pump
140	mdet11	ATACAGCAGTGGATATTGGTTTA ATTGT	TGCATAAGGTGAATGTTCCATGA	Multidrug	efflux pump
141	mdtA	CCTAACGGGCGTGACTTCA	TTCACCTGTTTCAAGGTGAAA	MLSB	efflux pump
142	mdtE/yhiU	CGTCGGCGCACTCGTT	TCCAGACGTTGTACGGTAACCA	Multidrug	efflux pump
143	mecA	GGTTACGGACAAGGTGAAATACT GAT	TGCTTTTAAATAAGTGAGGTGCGTTA ATA	Beta_Lactamase	cellular protection
144	mefA	CCGTAGCATTGGAACAGCTTTT	AAACGGAGTATAAGAGTGTGCAA	MLSB	efflux pump

表 A.1 抗生素抗性基因列表、分类、对应引物及抗性机制(续)

145	mepA	ATCGGTCGCTCTTCGTTAC	ATAAATAGGATCGAGCTGCTGGAT	Multidrug	efflux pump
146	mexA	AGGACAACGCTATGCAACGAA	CCGGAAAGGGCCGAAAT	Multidrug	efflux pump
147	mexD	TTGCCACTGGCTTTCATGAG	CACTGCGGAGAAGTGTCTGTAGA	Multidrug	efflux pump
148	mexE	GGTCAGCACCGACAAGGTCTAC	AGCTCGAGTACTTGAGGAACAC	Multidrug	efflux pump
149	mexF	CCGCGAGAAGGCCAAGA	TTGAGTTCGGCGGTGATGA	Multidrug	efflux pump
150	mphA-01	CTGACGCGTCCGTGTT	GGTGTGCATGGCGATCT	MLSB	antibiotic deactivate
151	mphA-02	TGATGACCCGTCCATCGA	TTCGCGAGCCCTCTTC	MLSB	antibiotic deactivate
152	mphB	CGCAGCGCTTGATCTGTAG	TTACTGCATCCATACGCTGCTT	MLSB	antibiotic deactivate
153	mphC	CGTTTGAAGTACCGAATTGAAA	GCTGCGGGTTGCTGTGA	MLSB	antibiotic deactivate
154	msrA-01	CTGCTAACACAAGTACGATTCCA AAT	TCAAGTAAAGTTGTCTTACCTACACC ATT	MLSB	efflux pump
155	msrC-01	TCAGACCGGATCGGTTGTC	CCTATTTTTGGAGTCTTCTCTCTAA TGTT	MLSB	efflux pump
156	mtrC-01	GGACGGGAAGATGGTCCAA	CGTAGCGTCCGGTTCGAT	Multidrug	efflux pump
157	mtrC-02	CGGAGTCCATCGACCATTG	ATCGTCGGCAAGGAGAATCA	Multidrug	efflux pump
158	mtrD-02	GGTCGGCAGCTCTTGTC	TGAAGAATTTGCGCACCACTAC	Multidrug	efflux pump
159	mtrD-03	CCGCCAAGCCGATATAGACA	GGCCGGTGGCCAAA	Multidrug	efflux pump
160	ndm-1	ATTAGCCGTCGATTGAT	CATGTCGAGATAGGAAGTG	Beta_Lactamase	antibiotic deactivate
161	nimE	TGCGCCAAGATAGGGCATA	GTCGTGAATTCGGCAGGTTTA	Others	other/unknown
162	nisB	GGGAGAGTTGCCGATGTTGTA	AGCCACTCGTTAAAGGCAAT	Others	other/unknown
163	oleC	CCCGGAGTCGATGTTCGA	GCCGAAGACGTACACGAACAG	MLSB	efflux pump
164	oprD	ATGAAGTGGAGCGCCATTG	GGCCACGGCGAAGTGA	Multidrug	efflux pump
165	oprJ	ACGAGAGTGGCGTCGACAA	AAGGCGATCTCGTTGAGGAA	Multidrug	efflux pump
166	pbp	CCGGTGCCATTGGTTAGA	AAAATAGCCGCCCAAGATT	Beta_Lactamase	cellular protection
167	pbp2x	TTTCATAAGTATCTGGACATGGA AGAA	CCAAAGGAAACTTGCTTGAGATTAG	Beta_Lactamase	cellular protection
168	Pbp5	GGCGAACTTCTAATTAATCCTAT CCA	CGCCGATGACATCTTCTTATCTT	Beta_Lactamase	cellular protection
169	penA	AGACGGTAACGTATAACTTTTTG AAAGA	GCGTGTAGCCGCAATG	Beta_Lactamase	cellular protection
170	pikR1	TCGACATGCGTGACGAGATT	CCGCGAATTAGCCAGAA	MLSB	cellular protection
171	pikR2	TCGTGGCCAGGTGAAGA	TTCCCTTGCCGGTGAA	MLSB	cellular protection
172	pmrA	TTTGCAGGTTTTGTTCCTAATGC	GCAGAGCCTGATTTCTCCTTTG	Multidrug	efflux pump
173	pncA	GCAATCGAGCGGTGTTTC	TTGCCGAGCCAATTCA	Others	other/unknown
174	putitive multidrug	AATTTTGCCGATTATTGCTGAAA	GATTGTCATCATCGTTTATCACCAA	Multidrug	efflux pump
175	qac	CAATAATAACCGAAATAATAGGG ACAAGTT	AATAAGTGTCTTAGTGTGGCCATA G	Multidrug	efflux pump

表 A.1 抗生素抗性基因列表、分类、对应引物及抗性机制(续)

176	qacA	TGGCAATAGGAGCTATGGTGT	AAGGTAACACTATTTTCGGTCCAAT C	Multidrug	efflux pump
177	qacA/qacB	TTTAGGCAGCCTCGCTTCA	CCGAATCCAATAAAAACCCAATAA	Multidrug	efflux pump
178	qacEdelta1-01	TCGCAACATCCGCATTA	ATGGATTTGAGAACAGAGAAAGAAA	Multidrug	efflux pump
179	qacEdelta1-02	CCCCTCCGCCGTTGT	CGACCAGACTGCATAAGCAACA	Multidrug	efflux pump
180	qacH-01	GTGGCAGCTATCGCTGGAT	CCAACGAACGCCACAA	Multidrug	efflux pump
181	qacH-02	CATCGTGTGTGGCAGCTA	TGAACGCCAGAGTCTAGTTTT	Multidrug	efflux pump
182	qnrA	AGGATTTCTACGCCAGGATT	CCGCTTCAATGAAACTGCAA	Others	other/unknown
183	rarD-02	TGACGCATCGCGTATCT	AAATTTCTGTGGCGTGAATC	Multidrug	efflux pump
184	sat4	GAATGGGCAAAGCATAAAAACTT G	CCGATTTGAAACCACAATTATGATA	Others	antibiotic deactivate
185	sdeB	CACTACCGCTCCGCACTTAA	TGAAAAACGGGAAAAGTCCAT	Multidrug	efflux pump
186	spcN-01	AAAAGTTCGATGAAACAGCCTA T	TCCAGTGGTAGTCCCCGAATC	Aminoglycoside	antibiotic deactivate
187	spcN-02	CAGAACTCTCTGAAAAGTTGA TGAA	CGCAGACAGCCGAATC	Aminoglycoside	antibiotic deactivate
188	speA	GCAAGAGGTATTTGCTCAACAAG A	CAGGGTCACCCCTATAAAGAAA	Others	other/unknown
189	str	AATGAGTTTTGGAGTGTCTCAAC GTA	AATCAAAACCCCTATTAAGCCAAT	Aminoglycoside	antibiotic deactivate
190	strA	CCGGTGGCATTGAGAAAA	GTGGCTCAACTGCGAAAAG	Aminoglycoside	antibiotic deactivate
191	strB	GCTCGTGTGAGAACATCT	CAATTCGGTGCCTGGTAGT	Aminoglycoside	antibiotic deactivate
192	sul1	CAGCGCTATGCGCTCAAG	ATCCCCTGCGCTGAGT	Sulfonamide	cellular protection
193	sul2	TCATCTGCCAAACTCGTCGTTA	GTCAAAGAACGCCGAATGT	Sulfonamide	cellular protection
194	sulA/foIP-01	CAGGCTCGTAAATTGATAGCAGA AG	CTTCTCTGCGAATCGCTTT	Sulfonamide	cellular protection
195	sulA/foIP-03	CACGGCTTCGGCTCATGT	TGCCATCTGTGACTAGCTACGT	Sulfonamide	cellular protection
196	tet (32)	CCATTACTCGGACAACGGTAGA	CAATCTCTGTGAGGCAATTAACA	Tetracycline	cellular protection
197	tet (34)	CTTAGCGCAAACAGCAATCAGT	CGGTGATACAGCGCTAAACT	Tetracycline	other/unknown
198	tet (35)	ACCCATGACGTACCTGTAGAGA	CAACCACACTGGTACCAGTT	Tetracycline	other/unknown
199	tet (36)-01	AGAATACTCAGCAGAGGTCAGTT CCT	TGGTAGGTCGATAACCCGAAAAT	Tetracycline	cellular protection
200	tet (36)-02	TGCAGGAAAGACCTCCATTACAG	CTTGTCCACACTCCACGTACTATG	Tetracycline	cellular protection
201	tet (37)	GAGAAGGTTGAAAAGGTGGTGAA	AACCAAGCTGGATCAGTCTCA	Tetracycline	other/unknown
202	tetA-01	GCTGTTTGTTCGCCGAAA	GGTTAAGTTCCTGAAACGCAACT	Tetracycline	efflux pump
203	tetA-02	CTCACCAGCCTGACCTCGAT	CACGTTGTTATAGAAGCCGCATAG	Tetracycline	efflux pump
204	tetB-01	AGTGGCCTTTGGATGCTGTA	AGCCCACTAGCTCCTGTGA	Tetracycline	efflux pump
205	tetB-02	GCCCAGTGTGTTGTTGTCAT	TGAAAGCAAACGCCCTAAATACA	Tetracycline	efflux pump
206	tetC-01	CATATCGCAATACATGCGAAAAA	AAAGCCGCGTAAATAGCAA	Tetracycline	efflux pump

表 A.1 抗生素抗性基因列表、分类、对应引物及抗性机制(续)

207	tetC-02	ACTGGTAAGGTAACGCCATTGT C	ATGCATAAACCCAGCCATTGAGTAAG	Tetracycline	efflux pump
208	tetD-01	TGCCGCGTTTGATTACACA	CACCAGTGATCCCGGAGATAA	Tetracycline	efflux pump
209	tetD-02	TGTCATCGCGCTGGTGATT	CATCCGCTTCCGGGAGAT	Tetracycline	efflux pump
210	tetE	TTGGCGCTGTATGCAATGAT	CGACGACCTATGCGATCTGA	Tetracycline	efflux pump
211	tetG-01	TCAACCATTTGCCGATTCTGA	TGGCCCGGCAATCATG	Tetracycline	efflux pump
212	tetG-02	CATCAGCGCCGGTCTTATG	CCCCATGTAGCCGAACCA	Tetracycline	efflux pump
213	tetH	TTTGGGTATCTTACCAGCATTA A	TTGGCATTATCATCGACAGA	Tetracycline	efflux pump
214	tetJ	GGGTGCCGATTAGATTACCT	TCGTCCAATGTAGAGCATCCATA	Tetracycline	efflux pump
215	tetK	CAGCAGTCATTGGAAAATTATCT GATTATA	CCTTGTAACCTACCAAAAATCAA AATA	Tetracycline	efflux pump
216	tetL-01	AGCCCGATTATTCAAGGAATG	CAAAATGCTTCCCGCTGTCT	Tetracycline	efflux pump
217	tetL-02	ATGGTTGTAGTTGCGCTATAT	ATCGCTGGACCGACTCCTT	Tetracycline	efflux pump
218	tetM-01	CATCATAGACACGCCAGGACATA T	CGCCATCTTTTGCAGAAATCA	Tetracycline	cellular protection
219	tetM-02	TAATATTGGAGTTTAGCTCATG TTGATG	CCCTCTGACGTTCTAAAAGCGTATT AT	Tetracycline	cellular protection
220	tetO-01	ATGTGGATACTACAACGCATGAG ATT	TGCCTCCACATGATATTTTTCTCT	Tetracycline	cellular protection
221	tetPA	AGTTGCAGATGTGTATAGTCGTA AACTATCTATT	TGCTACAAGTACGAAAACAAACTAG AA	Tetracycline	efflux pump
222	tetPB-01	ACACCTGGACACGCTGATTTT	ACCGTCTAGAACCGGAATG	Tetracycline	cellular protection
223	tetPB-02	TGATACACCTGGACACGCTGAT	CGTCCAAAACCGGAATG	Tetracycline	cellular protection
224	tetPB-03	TGGGCGACAGTAGGCTTAGAA	TGACCCTACTGAAACATTAGAAATAT ACCT	Tetracycline	cellular protection
225	tetPB-04	AGTGGTGCAAATACTGAAAAAGT TGT	TTTGTTCTCTGTTTTGGACAGA	Tetracycline	cellular protection
226	tetPB-05	CTGAAGTGGAGCGATCATCC	CCCTCAACGGCAGAAATAACTAA	Tetracycline	cellular protection
227	tetQ	CGCCTCAGAAGTAAGTTCATACA CTAAG	TCGTTTATGCGGATATTATCAGAAT	Tetracycline	cellular protection
228	tetR-02	CGCGATAGACGCTTCGA	TCCTGACAACGAGCCTCCTT	Tetracycline	efflux pump
229	tetR-03	CGCGATGGAGCAAAAGTACAT	AGTGAAAACCTTGTGGCATAAAA	Tetracycline	efflux pump
230	tetS	TTAAGGACAACTTCTGACGAC ATC	TGTCTCCATTGTTCTGGTTCA	Tetracycline	cellular protection
231	tetT	CCATATAGAGGTTCCACCAATC C	TGACCCTATTGGTAGTGGTTCTATTG	Tetracycline	cellular protection
232	tetU-01	GTGGCAAAGCAACGGATTG	TGCGGGCTTGCAAACTATC	Tetracycline	other/unknown
233	tetV	GCGGGAACGACGATGTATATC	CCGCTATCTCAGACCATGAT	Tetracycline	efflux pump

表 A.1 抗生素抗性基因列表、分类、对应引物及抗性机制(续)

234	tetX	AAATTTGTTACCGACACGGAAGT T	CATAGCTGAAAAAATCCAGGACAGTT	Tetracycline	other/unknown
235	tnpA-01	CATCATCGGACGGACAGAATT	GTCCGAGATGTGGGTGTAGAAAAGT	Transposase	transposase
236	tnpA-02	GGGCGGGTCGATTGAAA	GTGGGCGGGATCTGCTT	Transposase	transposase
237	tnpA-03	AATGTATGCGGACGGCTTAA	TCACAAACTGTTTATGGAGTCGTT	Transposase	transposase
238	tnpA-04	CCGATCACGGAAAGCTCAAG	GGCTCGCATGACTTCGAATC	Transposase	transposase
239	tnpA-05	GCCGCATGTCGATTTTATC	GCGGGATCTGCCACTTCTT	Transposase	transposase
240	tnpA-07	GAAACCGATGCTACAATATCCAA TTT	CAGCACCGTTTGCAGTGAAG	Transposase	transposase
241	to1C-01	GGCCGAGAACCTGATGCA	AGACTTACGCAATTCGGGTTA	Multidrug	efflux pump
242	to1C-02	CAGGCAGAGAACCTGATGCA	CGCAATTCGGGTTGCT	Multidrug	efflux pump
243	to1C-03	GCCAGGCAGAGAACCTGATG	CGCAATTCGGGTTGCT	Multidrug	efflux pump
244	Tp614	GGAATCAACGGCATCCAGTT	CATCCATGCGCTTTTGTCTCT	Transposase	transposase
245	ttgA	ACGCCAATGCCAAACGATT	GTCACGGCGCAGCTTGA	Multidrug	efflux pump
246	ttgB	TCGCCCTGGATGTACACCTT	ACCATTGCCGACATCAACAAC	Multidrug	efflux pump
247	vanA	AAAAGGCTCGAAAACGAGTTA T	CGGCCGTTATCTTTAAAAACAT	Vancomycin	cellular protection
248	vanB-01	TTGTCGGCGAAGTGGATCA	AGCCTTTTCCGGCTCGTT	Vancomycin	cellular protection
249	vanB-02	CCGGTCGAGGAACGAAATC	TCCTCTGCAAAAAAGATCAAC	Vancomycin	cellular protection
250	vanC-01	ACAGGGATTGGCTATGAACCAT	TGACTGGCGATGATTTGACTATG	Vancomycin	cellular protection
251	vanC-03	AAATCAATACTATGCCGGGCTTT	CCGACCGCTGCCATCA	Vancomycin	cellular protection
252	vanC1	AGGCGATAGCGGTATTGAA	CAATCGTCAATTGCTCATTCC	Vancomycin	cellular protection
253	vanC2/vanC3	TTTGACTGTCGGTCTTGTA	TCAATCGTTTCAGGCAATGG	Vancomycin	cellular protection
254	vanG	ATTTGAATTGGCAGGTATACAGG TTA	TGATTTGCTTTTCCATACATAATG C	Vancomycin	cellular protection
255	vanHB	GAGGTTCCGAGGCGACAA	CTCTCGGCGCAGTCGTAT	Vancomycin	cellular protection
256	vanHD	GTGGCCGATTATACCGTCATG	CGCAGGTCAATCAGGCAAT	Vancomycin	cellular protection
257	vanRA-01	CCCTTACTCCACCGAGTTTT	TTGTCGCCCCATATCTCAT	Vancomycin	cellular protection
258	vanRA-02	CCACTCGGCCCTTGTCAAT	GCTAACACATTTCCCTTGTTTT	Vancomycin	cellular protection
259	vanRB	GCCTGTGCGGATGACGAA	TTACATAGTCGTGCTCTGCAT	Vancomycin	cellular protection
260	vanRC	TGCGGGAAAACTGAACGA	CCCCCATAACGGTTTTGATTA	Vancomycin	cellular protection
261	vanRC4	AGTGCTTTGGCTTATCTGAAAA	TCCGGCAGCATCACATCTAA	Vancomycin	cellular protection
262	vanRD	TTATAATGGCAAGGATGACTAA AGT	CGTCTACATCCGGAAGCATGA	Vancomycin	cellular protection
263	vanSA	CGCGTCATGCTTTCAAAATTC	TCCGCAGAAAGCTCAATTTGTT	Vancomycin	cellular protection
264	vanSB	GCGCGCAAATGACAAC	TTTGCCATTTTATTCGACTGT	Vancomycin	cellular protection
265	vanSC-02	GCCATCAGCGAGTCTGATGA	CAGCTGGGATCGTTTTCTCTT	Vancomycin	cellular protection
266	vanSE	TGGCCGAAGAAGCAGGAA	CAATAATACTCGTCAAAGGATTCTC A	Vancomycin	cellular protection

表 A.1 抗生素抗性基因列表、分类、对应引物及抗性机制(续)

267	vanTC-01	CACACGCATTTTTCCCATCTAG	CAGCCAACAGATCATCAAAACAA	Vancomycin	cellular protection
268	vanTC-02	ACAGTTGCCGCTGGTGAAG	CGTGGCTGGTCGATCAAAA	Vancomycin	cellular protection
269	vanTE	GTGGTGCCAAGGAAGTTGCT	CGTAGCCACCGCAAAAAAT	Vancomycin	cellular protection
270	vanTG	CGTGTAGCCGTTCCGTTCTT	CGGCATTACAGGTATATCTGAAA	Vancomycin	cellular protection
271	vanWB	CGGACAAAGATACCCCTATAAA G	AAATAGTAAATTGCTCATCTGGCACA T	Vancomycin	cellular protection
272	vanWG	ACATTTTCATTTTGGCAGCTTGT AC	CCGCCATAAGAGCCTACAATCT	Vancomycin	cellular protection
273	vanXA	CGTAAATATGCCACTTGGGATA	TCAAAGCGATTAGCCAACT	Vancomycin	cellular protection
274	vanXB	AGGCACAAAATCGAAGATGCTT	GGGTATGGCTCATCAATCAACTT	Vancomycin	cellular protection
275	vanXD	TAAACCGTGTATTGGGAACGAA	GCGATAGCCGTTCCATAAGA	Vancomycin	cellular protection
276	vanYB	GGCTAAAGCGGAAGCAGAAA	GATATCCACAGCAAGACCAAGCT	Vancomycin	cellular protection
277	vanYD-01	AAGCGGATACCCCTGACTGTCA	ATTGCCGGACGGAAGCA	Vancomycin	cellular protection
278	vanYD-02	CAAACGGAAGAGAGGTCACTTAC A	CGGACGGTAATAGGACTGTTC	Vancomycin	cellular protection
279	vatB-01	GGAAAAAGCAACTCCATCTCTTG A	TCCTGGCATAACAGTAACATTCTGA	MLSB	antibiotic deactivate
280	vatB-02	TTGGGAAAAAGCAACTCCATCT	CAATCCACACATCATTCCAACA	MLSB	antibiotic deactivate
281	vatC-01	CGGAAATTGGGAACGATGTT	GCAATAATAGCCCGTTTCTCA	MLSB	antibiotic deactivate
282	vatC-02	CGATGTTGGATTGGACGAGAT	GCTGCAATAATAGCCCGTTT	MLSB	antibiotic deactivate
283	vatE-01	GGTGCCATTATCGGAGCAAAT	TTGGATTGCCACCGACAAT	MLSB	antibiotic deactivate
284	vatE-02	GACCGTCTACCAGCGTAA	TTGGATTGCCACCGACAAT	MLSB	antibiotic deactivate
285	vgaA-01	CGAGTATTGTGAAAGCAGCTAG TT	CCCGTACCGTTAGAGCCGATA	MLSB	efflux pump
286	vgaA-02	GACGGGTATTGTGAAAGCAA	TTTCTGTACCATTAGATCCGATAAT T	MLSB	efflux pump
287	vgb-01	AGGGAGGGTATCCATGCAGAT	ACCAAATGCGCCCGTTT	MLSB	antibiotic deactivate
288	vgbB-01	CAGCCGATTCTGTCTCTT	TACGATCTCCATTCAATGGGTAAA	MLSB	efflux pump
289	vgbB-02	ATACGAGCTGCCTAATAAAGGAT CTT	TGTGAACCACAGGCATTATCA	MLSB	antibiotic deactivate
290	yceE/mdtG-01	TGGCACAAAATATCTGGCAGTT	TTGTGTGGCGATAAGAGCATTAG	Multidrug	efflux pump
291	yceE/mdtG-02	TTATCTGTTTTCTGCTCACCTTC TTTT	GCGTGGTGACAAAACAGGCTTA	Multidrug	efflux pump
292	yceL/mdtH-01	TCGGGATGGTGGGCAAT	CGATAACCGAGCCGATGTAGA	Multidrug	efflux pump
293	yceL/mdtH-02	CGCGTGAAACCTTAAGTGCTT	AGACGGCTAAACCCATATAGCT	Multidrug	efflux pump
294	yceL/mdtH-03	CTGCCGTTAAATGGATGTATGC	ACTCCAGCGGGCGATAGG	Multidrug	efflux pump
295	yidY/mdtL-01	GCAGTGCATATCGCCTTCTC	CTCCCGCAAACAGCAT	Multidrug	efflux pump
296	yidY/mdtL-02	TGCTGATCGGGATTCTGATG	CAGGCGGACGAACATAAT	Multidrug	efflux pump

附 录 B
(资料性)
土壤样品采集、保存、运输方法

B.1 采集

一般取土壤表层5-10cm处土壤，如果土壤有翻动，应更深处采样，避免空气中微生物污染。采样区内设置至少3个重复采样点，保证所取样本对所在地域的代表性。每个点取样量一致（ $\geq 5\text{g}$ ），去除土样里植物根系或砾石，将重复土样混合均匀，做好标记，装入灭菌封口聚乙烯袋或其他无菌容器。

B.2 保存与运输

采集样品后，应立即置于干冰或 -80°C 保存。若不能即刻转移，可暂存于 4°C 或 4°C 以下环境（如冰盒），30分钟内转移至干冰或 -80°C 保存。干冰条件下运输。

附 录 C
(资料性)
水体样品采集、保存、运输方法

C.1 采集

根据水体不同的浊度，使用无菌器材采集4L-200L不等的水样。采集好的水样需要通过滤膜进行过滤，可选择不同孔径大小的滤膜，如20 μm 、3 μm 、0.8 μm 、0.4 μm 、0.2 μm 、0.1 μm 等孔径滤膜。

浊度较大水样先静置，分离悬浮颗粒，再使用20 μm 孔径滤膜预过滤，然后选择小孔径滤膜进行过滤。浊度较小清凉水样，可选择小孔径滤膜直接过滤。

C.2 保存与运输

样品过滤后的滤膜放置于无菌容器，该无菌容器应立即置于干冰或-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。若不能即刻转移，可暂存于4 $^{\circ}\text{C}$ 或4 $^{\circ}\text{C}$ 以下环境（如冰盒），30分钟内转移至干冰或-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。干冰条件下运输。

附 录 D
(资料性)
样品信息单

样本信息单如表D.1。

表D.1 样本信息单

运输信息*	运输公司: _____ 快递单号: _____ 城市: _____							
	样品寄件人: _____ 样品寄件人联系电话: _____							
	运输状态: <input type="checkbox"/> 干冰 <input type="checkbox"/> 冰袋 <input type="checkbox"/> 常温 <input type="checkbox"/> 其他: _____							
样品联系人*		样品联系人电 话						
样品联系人邮箱*		样品联系人单 位						
有无传染性、 致病性*		<input type="checkbox"/> 无 <input type="checkbox"/> 有 (致病传染性说明: _____) <input type="checkbox"/> 未知						
产品名称*	DNA 产品类型*		子产品类型*					
	备注 (非常规定制化产品): _____							
建库类型*	建库类型*		其他文库类型:					
	备注 (如有特殊要求请说明): _____							
样品信息*	样本类型							
	样本状态: _____							
注意事项*	是否经过 RNase 处理:			备注:				
	为满足建库要求, 样本是否可用 完:			其他:				
详细样本信息								
样品管上名称和信息单名称请务必保持一致, 除名称以外, 请勿将其他信息标记于管盖, 以避免出现可能的识别错误。								
序号	样品名称*	物种*	提取部位	管数	浓度 (ng/ul)	体积 (ul)	相同名称的多管样本 是否合并检测	备注
							请选择...	
							请选择...	

注: 样品的采集及运输需遵守国家相关规定, 需在样品保存管或保存袋上做好清晰标记。

注: “*”栏目为必填项。

附 录 E
(资料性)
参考数据库

E.1 抗生素抗性基因数据库

<http://ardb.cbcb.umd.edu/>

E.2 综合抗生素抗性数据库

<https://card.mcmaster.ca/>

E.3 抗生素抗性基因盒的资源库

<http://rac.aihi.mq.edu.au/rac/>

E.4 抗性基因检测

<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>

E.5 抗生素抗性功能

<http://www.dantaslab.org/resfams/>

参 考 文 献

- [1] Chen Q, An X, Li H, et al. Long-term field application of sewage sludge increases the abundance of antibiotic resistance genes in soil[J]. *Environment International*, 2016, 92-93:1..
- [2] Chen, H.Y., Bai, X.M., Li, Y.Z., Jing, L.J., Chen, R.H., Teng, Y.G., 2019. Source identification of antibiotic resistance genes in a peri-urban river using novel crAssphage marker genes and metagenomic signatures. *Water Res.* 167.
- [3] Chen, S.C., Li, X.M., Sun, G.X., Zhang, Y.J., Su, J.Q., Ye, J., 2015. Heavy metal induced antibiotic resistance in bacterium LSJC7. *Int. J. Mol. Sci.* 16 (10), 23390-23404.
- [4] Corno, G., Yang, Y., Eckert, E.M., Fontaneto, D., Fiorentino, A., Galafassi, S., Zhang, T., Di Cesare, A., 2019. Effluents of wastewater treatment plants promote the rapid stabilization of the antibiotic resistome in receiving freshwater bodies. *Water Res.* 158, 72e81.
- [5] Di Cesare, A., Fontaneto, D., Doppelbauer, J., Corno, G., 2016. Fitness and recovery of bacterial communities and antibiotic resistance genes in urban wastewaters exposed to classical disinfection treatments. *Environ. Sci. Technol.* 50 (18), 10153-10161.
- [6] Xuan Liu, Peng Xiao, Yunyan Guo, Lemian Liu, Jun Yang,
The impacts of different high-throughput profiling approaches on the understanding of bacterial antibiotic resistance genes in a freshwater reservoir, *Science of The Total Environment*, Volume 693, 2019.
- [7] Kai Zhang, Rui Xin, Ze Zhao, Wenpeng Li, Yanan Wang, Qian Wang, Zhiguang Niu, Ying Zhang, Mobile genetic elements are the Major driver of High antibiotic resistance genes abundance in the Upper reaches of huaihe River Basin, *Journal of Hazardous Materials*, Volume 401, 2021.
- [8] Dengmiao Cheng, Yuanwang Liu, Ebrahim Shehata, Yao Feng, Hui Lin, Jianming Xue, Zhaojun Li, In-feed antibiotic use changed the behaviors of oxytetracycline, sulfamerazine, and ciprofloxacin and related antibiotic resistance genes during swine manure composting, *Journal of Hazardous Materials*, Volume 402.
- [9] Rui Zhou, Yijie Wang, Mian Gul Hilal, Qiaoling Yu, Tianshu Feng, Huan Li, Temporal succession of water microbiomes and resistomes during carcass decomposition in a fish model, *Journal of Hazardous Materials*, Volume 403, 2021.
- [10] Xuan Liu, Peng Xiao, Yunyan Guo, Lemian Liu, Jun Yang, The impacts of different high-throughput profiling approaches on the understanding of bacterial antibiotic resistance genes in a freshwater reservoir, *Science of The Total Environment*, Volume 693, 2019.