

NDM-1 基因 TaqMAN 实时 荧光 PCR 检测方法的建立*

吴兴海¹, 张云霞¹, 姜英辉¹, 邓明俊¹, 孟 怡¹, 雷质文¹, 蒋 丹²

(1 山东出入境检验检疫局 青岛 266002;

2 辽宁出入境检验检疫局技术中心 大连 116000)

摘 要:研究初步建立了 NDM-1 基因的实时荧光 PCR 快速检测鉴定方法。研究根据 NDM-1 序列,设计并合成了 PCR 检测引物(ND-T-F 和 ND-T-R)和探针(ND-T-PROBE),对 NDM-1 质粒 DNA 和其他 11 个标准菌株进行了实时荧光 PCR 检测。结果表明,携有 NDM-1 基因的质粒 DNA 模板都出现了很强的特异信号,而其他对照病菌均未出现特异荧光信号,证明这套引物及探针具有 NDM-1 基因检测的特异性。灵敏度测定结果,此体系可检出 10 fg/ μ L 质粒 DNA 模板。研究表明,TaqMAN 实时荧光 PCR 方法是一种特异、灵敏、快速的 NDM-1 基因检测方法。

关键词:NDM-1;TaqMAN 实时荧光 PCR;检测

中图分类号:S852.69 **文献标识码:**A **国家标准学科分类代码:**330

The study of detection and identification of NDM-1 by TaqMAN realtime PCR

Wu Xinghai¹, Zhang Yunxia¹, Jiang Yinghui¹, Deng Mingjun¹, Meng Yi¹, Lei Zhiwen¹, Jiang Dan²

(1 Shandong Exit-Entry Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China;

2 Liaoning Exit-Entry Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116000, China)

Abstract: NDM-1 was an important gene of superbacteria with broad-spectrum resistance to antibiotic. A TaqMAN realtime PCR method was developed to detect NDM-1 gene. Specific primers and TaqMAN probe were designed based on the gene sequence in GeneBank. The probe used in this assay were shown to be specific for plasmid with NDM-1 and did not react with other 11 standard bacteria strains. This technique was sensitive with the detection limit of 10 fg/ μ L DNA. Real-time fluorescent PCR is a specific, sensitive, rapid and highly effective method for the detection and identification of NDM-1.

Key words: NDM-1; TaqMAN real-time fluorescent PCR; detection

1 引 言

近年来随着分子生物学技术的飞速发展以及生物物理技术的大量应用,新的分子诊断技术也不断涌现。这些新的分子诊断技术如聚合酶

链式反应(PCR)、连接酶链式反应(LCR)、支链 DNA 检测技术(bDNA)、环介导等温核酸扩增技术(LAMP)、基因、蛋白分子杂交捕获、基因芯片技术等,尽管原理各异,耗时不同,但更高的灵敏度、准确性却是它们共同的目标。这些方法分别着眼于不同的检测目的,从高通量、特异性、快速

* 基金项目:山东检验检疫局科技专项:食品中超级细菌耐药基因 NDM-1 基因多重复合痕量检测体系的建立(SK2008-19)

等各个方面,极大地丰富了包括植物病原、动物病原、医学病原在内的病原生物的检测方法,为食品中致病微生物的耐药基因的分子检测的发展提供了更多的选择和更为广阔的空间。实时荧光定量 PCR 技术是在 PCR 反应体系中加入引物和特异性 TaqMan 探针,利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析。该技术在 1996 年首先由美国 Applied Biosystems 公司推出,目前在生命科学领域特别是国内外医学研究、动植物检疫的病原体检测、遗传病的诊断以及转基因产品的检测工作中已得到广泛应用^[16]。

荧光 PCR 技术将 PCR 技术与基因杂交技术相融合,兼具基因的直接扩增检测与杂交检测两种技术的优势,操作步骤简单,自动化程度高,具有检测快速、灵敏的特点,同时全程进行闭管操作,减少了污染机率,降低了检测的假阳性结果几率。为及时监测食品中细菌污染动态,控制食品中超级细菌的传播风险,本研究利用 TaqMan 荧光探针,建立了超级细菌 NDM-1 基因的实时荧光 PCR 快速检测鉴定方法。

2 材料和方法

2.1 材料和试剂

2.1.1 材料

登录美国国家生物信息中心(NCBI)网站,根据大肠杆菌 B10533 菌株 NDM-1 基因部分序列,人工合成该基因片段,将其连入 PMD-T 载体制备 NDM-1 质粒 DNA。研究所用应试菌株具体出处见表 1。

表 1 参试菌株及来源

Table 1 Strains tested and their origins

菌株名称(Latin names of strains)	来源(Resource)
NDM-1 质粒 DNA	参照大肠杆菌 B10533 NDM-1 基因人工合成
溶藻弧菌	ATCC * (17749)
大肠杆菌 1	本室
大肠杆菌 2	本室
金黄色葡萄球菌 1	本室
金黄色葡萄球菌 2	NCB DIP * * (26115)

续表 1

菌株名称(Latin names of strains)	来源(Resource)
金黄色葡萄球菌 3	ATCC 29213
沙门氏菌 1	本室
猪霍乱沙门氏菌	ATCC(10708)
沙门氏菌 2	牛羊肉骨粉分离物
铜绿假单胞菌 1	鱼粉分离物
铜绿假单胞菌 2	ATCC 90277

* :American type culture collection

* * :卫生部药品生物制品检验所

2.1.2 试剂 Taq 酶、dNTP、T 载体购自北京天根公司;DNA Marker、琼脂糖凝胶粉购自 Promega 公司。

2.2 受试菌 DNA 模板的制备

2.2.1 细菌 DNA 的提取

按传统培养方法分别增菌培养表 1 中 11 株试验菌株。分别取各受试菌株的培养液 1 mL,用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(TIANamp Bacteria DNA Kit)提取细菌 DNA,保存于 -20 ℃ 备用。所提取的细菌模板 DNA,用于特异性试验。

2.2.2 NDM-1 基因质粒 DNA 模板的合成和构建

通过美国国家生物信息中心(NCBI)检索平台获得肺炎克雷伯氏菌 ADB65 的 NDM-1 基因序列,人工合成该基因片段(GENESCRIPT—金斯瑞公司)。16 ℃ 下,将合成的 NDM-1 基因在连接酶的作用下和 PMC-T 载体作用 40 min,形成重组质粒

2.2.3 测定 DNA 模板的产量和浓度

将 1.3.1 和 1.3.2 所得模板 DNA,利用核酸蛋白分析仪,测定在波长为 260 nm 和 280 nm 时的吸光度,根据所得的 OD₂₆₀ 值和 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值,得出相应的 DNA 浓度和纯度。

2.3 引物设计与合成

通过美国国家生物信息中心(NCBI)检索平台,搜索 NDM-1 基因不同菌株的所有核酸序列信息,经过特异性线性比对筛选后,确定肺炎克雷伯氏菌 ADB65(GENEBANK:HM853678.1)作为检测目标序列。选用其特异区间序列作为 Ev-erGreen 扩增引物对,利用网站 BLAST 工具中的 Primer Design Tool 对引物的专化性进行验证分

析,从中挑选同时拥有检测特异性和种内通用性的引物。经过筛选后, EverGreen 检测引物 ND-

T-F 和 ND-T-R 具体碱基序列如下:

表 2 引物序列
Table 2 The sequences of primers

序号	引物对	预期扩增片段长度(bp)
1	ND-T-F:GCTGGCGGTGCTGACTCACG	117
	ND-T-R:CCCTCTTGC GGGGCAAGCTG	
	ND-T-probe5'(FAM) - GCGGCGGGGATTGCCACTTA-3'(TAMRA)	

探针采用化学合成标记方法,5'端标记荧光染料为 6'-Carboxyfluorescein (FAM),3'端标记淬灭荧光染料为 Tetramethy-carbo-xyrhodamine(TAMRA)。引物和探针合成由南京金斯瑞公司(GENEsript)生物工程有限公司完成。

2.4 实时荧光 PCR 检测反应

2.4.1 PCR 扩增体系

2 × Buffer 12.5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 2 μL, 2.5 mmol/L dNTP 2 μL, 5 U/μL TaqDNA 聚合酶 0.4 μL, 上、下游引物各 1 μL (10 pmol/μL), 探针 2 μL (10 pmol/μL), DNA 模板 1 μL, 无菌超纯水补充至 25 μL。

2.4.2 PCR 循环参数

94℃预变性 3 min, 94℃变性 40 s; 55℃退火, 40 s, 72℃延伸 1 min, 循环 40 次。

2.4.3 PCR 产物电泳鉴定及测序

配制 1% 琼脂糖凝胶, 放入 TAE 电泳缓冲液的电泳槽中。用 DNA Marker 做分子标记, 在 130 V 条件下电泳 30 min, 置凝胶成像仪进行分析。将含扩增特异片段 PCR 产物送往大连宝生物工程有限公司(TAKARA)测序

2.7 PCR 检测的特异性

将表 1 中的参试菌株以 2.4.2 反应体系进行实时荧光 PCR 扩增。

2.8 PCR 检测的灵敏度

将重组质粒 DNA 以 1 ng/μL DNA 模板溶液按 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 做梯度稀释, 以 2.4.2 反应体系进行 PCR 扩增反应。

3 结 果

3.1 PCR 产物的克隆及鉴定

超级细菌 NDM-1 重组质粒 DNA 克隆片段长度均为 117 bp, 将测序结果与 GENE BANK 中的序列用 BLAST 软件进行同源性分析, 结果表明本试验的克隆片段与发表的 NDM-1 相应片段具有 100% 的同源性, 证明试验结果准确, 所获得片段为目的片段。

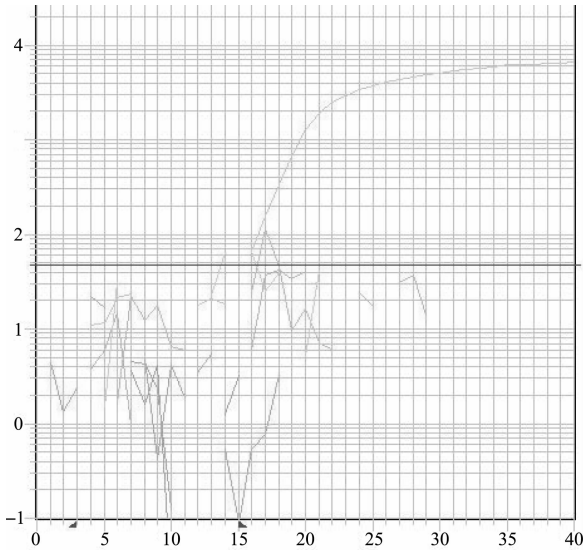


图 1 NDM-1 质粒 DNA 荧光 PCR 特异性扩增图谱
A. NDM-1 质粒 DNA;
B. 表 1 中 2 ~ 12 号菌株

Fig. 1 Specificity of real time PCR fluorescent method
A: NDM-1 positive bacterial strain;
B: Bacteria from 0002 to 0012 in Table 1

3.2 PCR 检测的特异性

利用引物 ND-T-F 和 ND-T-R 及优化的 PCR 条件对供试菌株进行特异性扩增,只有有强的荧光信号增加,表现为阳性扩增,而其他细菌及水对照没有荧光信号增加,表现为阴性(图 1)。说明探针 ND-T-probe 对 NDM-1 基因具有很强的特异性,可以明显地区别 NDM-1 基因与其它细菌菌株。

3.3 PCR 检测的灵敏度

将 NDM-1 阳性菌 100 pg/μL DNA 模板溶液以 10 倍梯度倍比稀释 5 次后,各取 1 μL 直接进行 PCR 检测,结果表明,在浓度为 10 fg/μL 时仍可检测到 PCR 产物杂交荧光信号(图 2)。

4 讨 论

实时荧光 PCR 是在普通 PCR 方法的基础上,加入荧光标记探针,利用荧光信号积累,实时监控整个 PCR 过程,具有更高的准确性和灵敏度,又由于整个过程无需对 PCR 产物进行后期无害化处理,可以有效地解决溴化乙锭的环境污染问题。

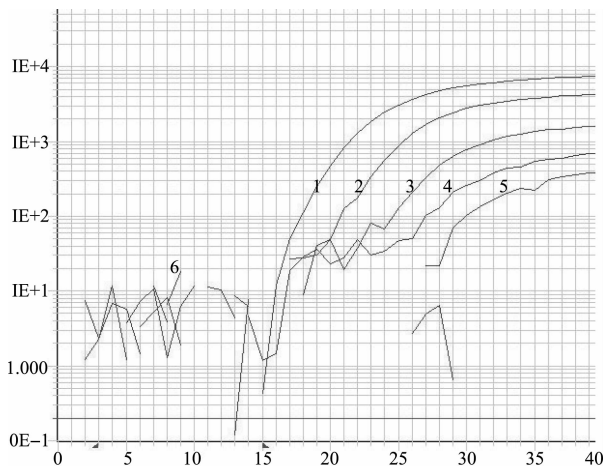


图 2 NDM-1 重组质粒 DNA 灵敏度检测图谱

1. 100pg/μL 模板液; 2. 10 pg/μL 模板液
3. 1 pg/μL 模板液; 4. 100 fg/μL 模板液;
5. 10fg/μL 模板液; 6. 1fg/μL 模板液

Fig. 2 Sensitivity of real time PCR fluorescent method
Curve 1-6: the concentration of DNA is 100 pg/μL, 10 pg/μL, 1 pg/μL, 100 fg/μL, 10 fg/μL, 1 fg/μL

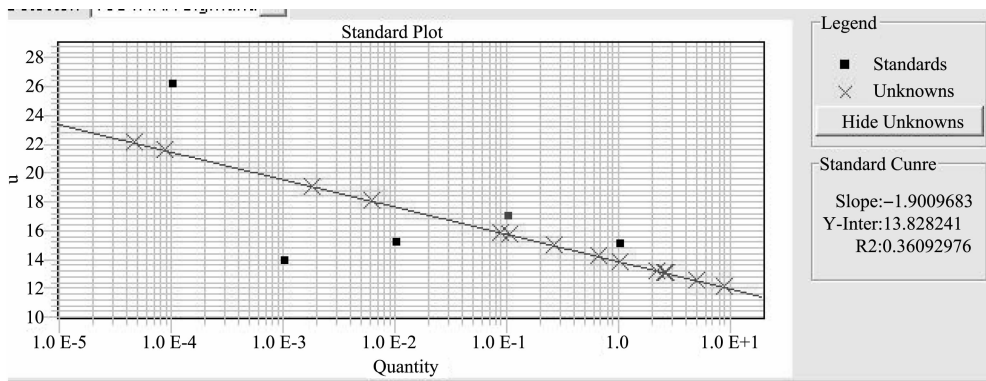


图 3 NDM-1 检测标准曲线

Fig. 3 Stand curve of TaqMAN PCR amplification of NDM-1

实验结果中,供试的 NDM-1 质粒 DNA 和 11 种菌株同时进行检测反应,只有 NDM-1 菌产生阳性图谱,其他菌株检测结果都是阴性,这证明了 TaqMAN 实时荧光 PCR 检测在相关的致病菌中的特异性。NDM-1 基因是具备广谱耐药性的“超级细菌”的重要基因,为不同“超级细菌”菌株所共有^[7-10]。本实验利用 NDM-1 基因及其重组质粒,经过反复实验,成功地建立了三种超级

细菌 NDM-1 质粒 DNA 的 TaqMAN 实时荧光 PCR 快速检测体系,这将为该基因的检测工作及进一步的技术研发起到积极的推动作用。

参考文献

[1] BATTEN C A, VAN R P, OURA A L. Detection of the European field strain of bluetongue virus serotype 6 by real-time RT-PCR[J]. Veterinary Microbiology, 2010, 141(1/2): 186-188.

- [2] KUMAR R, SURENDRAN P K, THAMPURAN N. Rapid quantification of salmonella in seafood using real-time PCR assay [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 20(3) : 569-573.
- [3] WILLEMS H, REINER G. A multiplex real-time PCR for the simultaneous detection and quantitation of *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli* and *Lawsonia intracellularis* in pig faeces [J]. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, 2010, 123 (5/6) : 205-209.
- [4] JOAQUINA M M, RESENDE B, A K CHONG. A Duplex allele-specific amplification PCR to detect SMN1 deletion [J]. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 2009, 13(2) : 205-208.
- [5] LUO Y J, ZHANG G H, XU X Q. Molecular characterization and SYBR green I-based quantitative PCR for duck hepatitis virus type 1 [J]. *Agricultural sciences in China*, 2008, 7(9) : 1140-1146.
- [6] XU S, GREEN M, KINGSLEY L, et al. *Journal of Virological Methods*, 2006, 13(2) : 205-212.
- [7] YONG D, TOLEMAN M A, GISKE C G, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla (NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, 53 (12) : 5046-5054.
- [8] WELTER K. NDM-1; Ein neuer sieg fur mustresistente bakterien [J]. *Chemie in Unserer Zeit*, 2010, 44 (5) : 366-367.
- [9] WOODFORD N, KUMARASAMY K K, TOLEMAN M A, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK; a molecular, biological, and epidemiological study [J]. *The Lancet Infectious Diseases*. 2010, 10(9) : 597-602.
- [10] BUSH K. Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant enterobacteriaceae [J]. *Current Opinion in Microbiology*; 2010, 13 (5) : 558-564.

作者简介



吴兴海, (1977. 6-), 辽宁本溪人, 主要从事病原微生物分子检测研究。

Wu Xinghai, was born in Benxi of Liaoning Province in the year of 1977, mainly engaged in the molecular detection of pathogenic microorganisms.