

# 超级细菌 NDM-1 基因高通量 微球悬浮芯片检测方法的建立<sup>\*</sup>

张云霞<sup>1</sup>, 郝杰<sup>1</sup>, 吴兴海<sup>2+</sup>, 杨伟克<sup>1</sup>, 梁炜<sup>2</sup>, 陈长法<sup>1</sup>, 曹际娟<sup>3</sup>

(1 青岛出入境检验检疫局 青岛 266002;

2 山东出入境检验检疫局 青岛 266002;

3 辽宁出入境检验检疫局技术中心 大连 116000)

**摘要:**本研究以建立微球体悬浮芯片检测方法为目的,选择三种超级细菌 NDM-1 基因(metallo-beta-lactamase 1 gene)为目的基因,设计并合成标记特异性探针,与荧光编码微球偶联后与细菌 NDM-1 基因的 PCR 产物杂交反应,用微球悬浮芯片检测仪检测荧光信号,建立可快速检测该种基因的微球体悬浮芯片检测方法。特异性和灵敏度检测结果表明:该方法对 NDM-1 基因检测具有特异性,最低检测限可达 10 fg/ $\mu$ L,灵敏度高于普通 PCR 技术,提示微球体悬浮芯片是一种针对 NDM-1 的快速、灵敏、便捷的新型核酸检测技术。

**关键词:** 超级细菌;NDM-1 基因;微球悬浮芯片;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

## Establishment of detecting method of NDM-1 gene by microsphere suspension array

Zhang Yunxia<sup>1</sup>, Hao jie<sup>1</sup>, Wu Xinghai<sup>2+</sup>, Yang Weike<sup>1</sup>, Liang Wei<sup>2</sup>, Chen Changfa<sup>1</sup>, Cao Jijuan<sup>3</sup>

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

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

3 Liao Ning Exit-Entry Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116000, China)

**Abstract:** In this paper, a new method, which based on liquid chip to detect NDM-1 (metallo-beta - lactamase 1 gene) sample was established. A highly specific probe was synthesized and marked by biotin to target the NDM-1, coupled with fluorescent coded microspheres, and then hybridized with the PCR product of NDM-1 gene. Hybridization fluorescence signal was detected through microsphere suspension array (MSA). Specific and sensitivity were tested which were compared with PCR method. The result shows that the sensitivity of MSA was 10 fg/ $\mu$ l of vector DNA, which was higher than the result of PCR method. Detecting NDM-1 with MSA is specific and sensitive method.

**Key words:** super bacteria; metallo-beta-lactamase 1 gene; detection; microsphere suspension array

## 1 引言

微球悬浮芯片检测技术是一个全新的快速高通量检测技术,相对于固相平板芯片,液相反应动力学反应更快速,重复性更好;1~100种灵活多重检测,满足多种检测需求,开发平台可适用于多种检测试剂和软件的开发。此外,该方法避免了PCR、酶联免疫吸附试验(ELISA)等常规方法的不能满足出入境高通量检疫的缺点。研究采用PCR检测方法与微球悬浮芯片检测技术结合,初步建立超级细菌耐药基因微球悬浮芯片快速检测方法,为快速、高通量检测食品中大肠杆菌 B10533 等超级细菌关键耐药基因 NDM-1 提供了技术储备。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

#### 2.1.1 实验菌株

本研究所用 NDM-1 质粒 DNA 和 11 株试验菌株如表 1 所示。标准菌株分别购自美国典型菌种保藏中心(ATCC)和卫生部药品生物制品检验所(NCBDIP);分离菌株源自本实验室分离鉴定所得。

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 1	肺炎克雷伯氏菌 ADB65
NDM-1 质粒 DNA 2	肠球菌菌株 ZW031-2
NDM-1 质粒 DNA 3	大肠杆菌 B10533
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	NCBDIP***(26115)
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 °C 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(*Klebsiella pneumoniae* strain ADB65)、肠球菌菌株 ZW031-2(*Enterococcus faecium* strain ZW031-2)、大肠杆菌 B10533(*Escherichia coli* strain B10533)三种原发超级细菌的 NDM-1 基因序列,根据三种病原菌各自不同的碱基组成,合成三条基因片段(GENESCRIP—金斯瑞公司)。16 °C 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 2.3.1 和 2.3.2 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  $OD_{260}$  值和  $OD_{260}/OD_{280}$  比值,得出相应的 DNA 浓度和纯度。

### 2.3 引物设计与合成

根据肺炎克雷伯氏菌 AD865、肠球菌菌株 ZW031-2、大肠杆菌 B10533ITS 三种病原菌的 NDM-1 基因序列,以序列号为 GENBANK: HM853678.1 的 AD865 NDM-1 基因为设计模板,利用计算机软件 Primer BLAST 设计其寡核苷酸探针, $T_m$  值在 60~62 °C,分别在探针的上下游设计特异性的扩增引物。探针引物的序列如下:

HDA-97-F: CCAGCTTGCCCCGCAAGAGG  
204

HDA-97-R: GCCAAAGTTGGGCGCGGTTG  
300

HDA-97-PROBE: CAGCCTGACTTTTCGCCGC-  
CA 243

引物、探针送 Sigma 公司合成,下游引物的

57 端标记生物素, Probe 的 5'-C6 标记氨基, 探针反向互补序列 RC-Probe 的 5' 端标记生物素。引物用水溶解成 200 mmol/L 贮存母液备用。

## 2.4 PCR 扩增体系的建立

用 NDM-1 基因质粒 PUC18-NDM-1, 按照 PCR Amplification Kit Handbook 推荐的方法建立超级细菌 NDM-1 基因通用 PCR 检测方法。

### 2.4.1 PCR 体系成分

2 × Buffer 12.5 μL, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 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), DNA 模板 1 μL, 无菌超纯水补充至 25 μL。

### 2.4.2 PCR 循环参数

94 °C 预变性 1 min, 94 °C 变性 40 s; 退火温度设为: 55 °C, 时间 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 循环扩增反应 36 次; 最终延伸 10 min。

PCR 产物在 15 g/L 的琼脂糖凝胶上电泳检测。

## 2.5 超级细菌耐药基因微球悬浮芯片检测体系的

### 2.5.1 寡核苷酸探针与微球共价偶联

1) 将微球漩涡混合 20 s 充分分散; 取 3 × 10<sup>6</sup> 个微球 (75 μL), 于 1.5 ml 离心管中 10 000 g 离心 1 min, 去上清;

2) 加入 50 μL 0.1 mol/L 甲基咪唑溶液 (PH 4.5), 漩涡混合, 超声波处理 (30 s-1min);

3) 加入氨基化探针 1.0 nmol, 漩涡混合;

4) 加入 2.5 μL 碳二亚胺溶液 (10 mg 的碳二亚胺粉末加入 1.0 mL 的灭菌纯水, 现用现配) 充分混匀, 室温避光孵育 30 min。

5) 重复 4) 一次。

6) 加入 1.0 mL 0.02% Tween-20, 混匀, 10 000 g 离心 1 min, 弃上清;

7) 加入 1.0 mL 0.1% SDS, 混匀, 10 000 g 离心 1 min, 弃上清;

8) 用 0.1 mol/L 甲基咪唑溶液 (PH 4.5) 100 μL 重悬微球, 2~8 °C 避光保存, 待用。

### 2.5.2 杂交

杂交体系包换 1.5 μL 探针偶联微球, 33 μL 1.5 × TMAC 杂交液, 14.5 μL TE, 2.5 μL RT-PCR 产物。混合均匀后于 98 °C 变性 10 min, 在选定温度下孵育 15 min, 18000 g 离心 2 min 去上

清; 加入 50 μL 用 1 × TMAC 杂交液稀释的 PE 标记的链亲合素 (1:500), 选定温度下孵育 10 min, 18 000 g 离心 2 min 去上清; 加入 50 μL 1 × TMAC 杂交液, 漩涡混合使微球重悬, 上机分析。

杂交温度的优化, 杂交反应时间在 15 min 条件下, 根据探针的 *T<sub>m</sub>* 值, 选 48 °C、50 °C、52 °C、54 °C、56 °C 等 5 个温度梯度为研究对象, 考察不同杂交温度下微球体悬浮芯片的检测效果。

微球悬浮芯片定性比值结果 (1LQRR) 等于样品的校正后的荧光强度中位值 (MFI) 与空白对照 MFI 的平均值 (MFIB) 的比值, 即  $LQRR = MFIS/MFIB$ 。如果  $LQRR > 3$ , 判定为阳性样本; 如果  $2 \leq LQRR \leq 3$ , 则判定为可疑; 如果  $LQRR < 2$ , 则判定为阴性。

## 2.6 芯片快速检测方法灵敏性试验

为确定芯片快速检测方法检测灵敏度, 将抽提的超级细菌的 NDM-1 基因的质粒 DNA 进行 10 倍梯度稀释, 连续稀释至 10<sup>-6</sup>; 将超级细菌的灭活溶液进行 10 倍梯度稀释, 连续稀释至 10<sup>-6</sup>, 抽提 DNA, 进行 PCR 扩增。按所建立的方法, 确定该方法的灵敏度。

## 2.7 芯片快速检测方法特异性试验

分别取 NDM-1 基因的质粒和 11 种对照菌作为模板, 按照 2.2.2 的方法进行这些基因的 PCR 扩增, 将扩增产物与超级细菌基因探针偶联的相应荧光编码微球进行杂交, 检测所建方法的特异性。

## 2.8 普通 PCR 灵敏度检测比对实验

浓度为 6.12 ng/μL DNA 贮存液以 10 倍梯度进行倍比系列稀释后, 分别作为扩增模板, 按照 2.4 的扩增组成体系和反应参数同时进行 PCR 灵敏度检测, 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测产物。将检测灵敏度限值与 PCR 检测灵敏度结果进行比对分析, 参照 PCR 检测结果对微球体悬浮芯片检测灵敏度水平进行评估。

## 3 结果

### 3.1 PCR 检测结果

带有超级细菌 NDM-1 基因的质粒 PCR 检测, 可特异性地扩增出所需要的目的条带, 约 97 bp, 与理论结果相符 (图 1)。

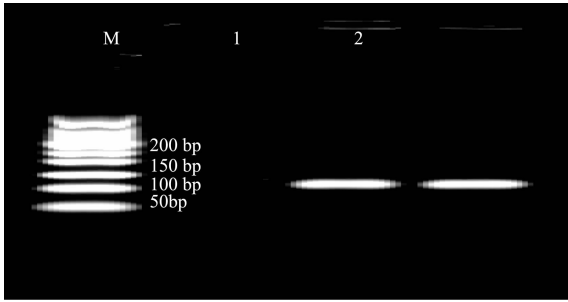


图1 NDM-1 的 PCR 检测结果

M:DNA Marker;1:空白对照;2:NDM-1 质粒 DNA(AD865)

Fig.1 PCR detection for VectorDNA of NDM-1(AD865)

M:DNA Marker;1:Blank control;

2:VectorDNA of NDM-1(AD865)

### 3.2 芯片检测体系的建立

超级细菌探针与相应荧光编码的荧光编码微球偶联后,与相应的 PCR 反应扩增产物直接杂交后显示,各个参与计数的荧光编码微球均  $\geq 20$  个,表明用于计数的荧光编码微球数量有效,所产生的 MFI 值可信;各个荧光编码微球的空白对照 MFI 均  $< 500$ ,表明结果有效,试验可以进行结果判定;PCR 扩增产物的 MFI 明显大于阴性和空白对照的值。探针与相应的 PCR 扩增的阳性产物之间均有特异性的杂交, LQRR 值都  $> 10$ ,表明均为阳性(表 2)。

表 2 NDM-1 基因微球体悬浮芯片检测 MFI 值特异性验证  
Table 2 The specificity MFI test of NDM-1 gene detected by MSA

病原菌	样品荧光值 $MFI_s$	空白对照荧光值 $MFI_b$	荧光比值 LQRR	检测结果
	3362	315	10.67	+
1	3587	346	10.36	+
	3216	295	10.90	+
2	415	302	1.37	-
3	356	345	1.03	-
4	251	298	0.84	-
5	364	328	1.1	-
6	389	320	1.21	-
7	192	353	0.54	-
8	180	210	0.85	-
9	187	220	0.85	-
10	378	326	1.15	-
11	295	367	0.8	-
12	264	318	0.83	-

注:“+”检测结果为阳性

“-”检测结果为阴性

### 2.3 芯片快速检测方法灵敏性试验结果

将抽提的带有超级细菌 NDM-1 基因的质粒定量后以 10 倍梯度稀释,进行超级细菌 NDM-1 基因片段的 PCR 扩增、纯化后进行芯片快速检测。结果表明(表 3),芯片快速检测方法检测超级细菌 NDM-1 基因的检测灵敏度为  $10^{-5}$ , LQRR 值约为 6.77。

### 3.4 芯片快速检测方法特异性试验结果

对含有 NDM-1 基因的质粒 DNA 及对照菌株的 PCR 扩增产物进行有特异性的杂交,超级细菌的 LQRR 值都  $> 10$ ,表明均为阳性,而与对照菌株的 PCR 产物 LQRR 值都  $< 1$ ,而空白对照的值很低,低于 500(表 2),说明建立的芯片检测方法特异性强,方法成立。

表 3 NDM-1 微球体悬浮芯片检测灵敏度 MFI 值验证

Table 3 The sensitivity MFI test of NDM-1 gene detected by MSA

浓度梯度(1 ng/ $\mu$ L)	样品荧光值 MFI <sub>s</sub>	空白对照荧光值 MFI <sub>b</sub>	荧光比值 LQRR	检测结果
$\times 10^{-1}$	3301	301	10.96	+
$\times 10^{-2}$	3206	292	10.92	+
$\times 10^{-3}$	3123	276	11.31	+
$\times 10^{-4}$	2510	231	10.86	+
$\times 10^{-5}$	2148	317	6.77	+
$\times 10^{-6}$	327	353	0.92	-

注：“+”检测结果为阳性

“-”检测结果为阴性

### 3.5 悬浮芯片和 PCR 检测灵敏度的比较

浓度为 1 ng/ $\mu$ L DNA 贮存液以 10 倍梯度进行倍比系列稀释后,分别作为扩增模板,同时进行 PCR 灵敏度检测,电泳结果显示其检测限值为 100 fg/ $\mu$ L。将此检测灵敏度限值与芯片检测灵敏度结果进行比对分析发现,芯片和 PCR 检测的灵敏度相差 10 倍,证明研究所建立的高通量 LAMP 检测体系对 NDM1 基因的灵敏度超出传统 PCR 技术灵敏度 10 倍。

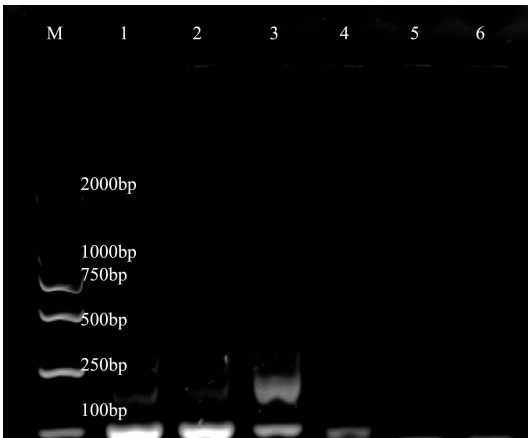


图 2 NDM-1 重组质粒 DNAPCR 检测灵敏度图谱

M: DNA Marker 2000; 1: 100 pg/ $\mu$ L 模板液;  
2: 10 pg/ $\mu$ L 模板液; 3: 1 pg/ $\mu$ L 模板液;  
4: 100 fg/ $\mu$ L 模板液; 5: 10 fg/ $\mu$ L 模板液;  
6: 1 fg/ $\mu$ L 模板液

Fig. 2 The sensitivity test of PCR for NDM-1

M: DNA Marker; 1: 100 pg/ $\mu$ LDNA solution;  
2: 10 pg/ $\mu$ LDNA solution; 3: 1 pg/ $\mu$ LDNA solution;  
4: 100 fg/ $\mu$ LDNA solution; 5: 10 fg/ $\mu$ LDNA solution;  
6: 1 fg/ $\mu$ LDNA solution

## 4 讨 论

NDM-1 基因及其相关耐药基因可以在不同菌体之间转移,这是超级细菌耐药基因所区别于一般耐药细菌的特征之一,建立该基因的新型高通量检测方法对于快速诊断和检测食品中潜在超级细菌具有重要意义。微球体悬浮芯片是一种高通量的新型核酸检测技术,荧光编码微球偶联多个检测探针,可同时多重检测多种目标靶标,具有高通量、快速、高特异性的特点。本文将 PCR 方法与芯片检测方法结合,初步建立了超级细菌 NDM-1 基因微球体悬浮芯片快速高通量检测方法,搭建了超级细菌全新快速高通量检测平台,在具备检测特异性的同时,其检测灵敏度高于普通 PCR。为有效检测食品中潜在病原提供了技术储备,也为其他同类细菌耐药基因的快速高通量检测提供了借鉴和经验。

### 参考文献

- [ 1 ] TRACZ D M, TABOR H, JEROME M, et al. Genetic determinants and polymorphisms specific for human-adapted serovars of *Salmonella enterica* that cause enteric fever[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, 44(6): 2007-2018.
- [ 2 ] LANG J M, SHENNAN M, NJAUW J, et al. A flexible multiplex bead-based assay for detecting germline CDKN2A and CDK4 variants in melanoma-prone kindreds [ J ]. *The Journal of Investigative Dermatology*, 2011, 131(2): 480-486.
- [ 3 ] KONING M N, SCHEGGET J, EEKHOF J A, et

- al. Evaluation of a novel broad-spectrum PCR-multiplex genotyping assay for identification of cutaneous wart-associated human papillomavirus types[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010, 48(5): 1706-1711.
- [4] WASHINGTON C, METZGAR D, Hazbon M H, et al. Multiplexed Luminex xMAP assay for detection and identification of five adenovirus serotypes associated with epidemics of respiratory disease in adults [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010, 48(6): 2217-2222.
- [5] BARCO L, LETTINI A A, DALLA P M, et al. Fluoroquinolone resistance detection in campylobacter coli and campylobacter jejuni by Luminex xMAP technology[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2010, 7(9): 1039-1045.
- [6] KIRA W. NDM-1: ein neuer sieg für multiresistente bakterien[J]. *Chemie in Unserer Zeit*, 2010, 44(5): 366-367.
- [7] 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.
- [8] Alarming  $\beta$ -lactamase-mediated resistance in multi-drug-resistant Enterobacteriaceae[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2010, 13(5): 558-564
- [9] HSUEH P R. New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1 (NDM-1): an emerging threat among Enterobacteriaceae [J]. *Journal of the Formosan Medical Association*, 2010, 109(10): 685-687
- [10] GIBB A P, MCCALLUM A K. New Delhi metallo-beta-lactamase 1 [J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2010, 10(11): 751-752.

### 作者简介



张云霞, (1976. 2-), 山东威海人, 主要从事病原微生物分子检测研究。

**Zhang Yunxia**, born in Benxi of Liaoning province in Feb, 1976, mainly engaged in the molecular detection of pathogenic microorganisms.

通讯作者: 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**, born in Benxi of Liaoning province in July, 1977, mainly engaged in the molecular detection of pathogenic microorganisms.