

# 基于 HDA 的超级细菌耐药基因 NDM-1 检测方法的建立\*

梁 炜<sup>1</sup>, 张京宣<sup>1</sup>, 张云霞<sup>1</sup>, 魏晓棠<sup>1</sup>, 杨伟克<sup>1</sup>, 林黎明<sup>1</sup>, 曹际娟<sup>2</sup>

(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:**本研究以建立解旋酶 DNA 恒温扩增(HDA)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,设计并合成特异性引物,建立和优化了可快速检测该种基因的 HDA 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。提示 HDA 是一种针对 NDM-1 的快速、灵敏、便捷的非 PCR 核酸扩增技术。

**关键词:**超级细菌;NDM-1 基因;检测;解旋酶 DNA 恒温基因扩增

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 the Helicase-dependent isothermal DNA amplification

Liang Wei<sup>1</sup>, Zhang Jingxuan<sup>1</sup>, Zhang Yunxia<sup>1</sup>, Wei Xiaotang<sup>1</sup>,

Yang Weike<sup>1</sup>, Lin Liming<sup>1</sup>, Cao Jijuan<sup>2</sup>

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

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

**Abstract:** In this paper, a new method, which based on Helicase-dependent isothermal DNA amplification (HDA) to detect NDM-1 (metallo-beta-lactamase 1 gene) of sample was established. A highly specific set of primers was synthesized to target the NDM-1 and amplifying temperature, amplifying time were optimized so as to establish Helicase-dependent isothermal DNA amplification method. Specific and sensitivity were tested which were compared with PCR method. The results shows that the sensitivity of HDA was 10 fg/ $\mu$ l of vector DNA which was higher than the result of PCR method. Detecting NDM-1 with HDA is specific and sensitive as well as PCR method and has lower instrumental requirement.

**Key words:** Super bacteria; metallo-beta-lactamase 1 gene; detection; Helicase-dependent isothermal DNA amplification

## 1 引 言

目前,耐药基因的常规分子检测方法包括了

普通 PCR、荧光 PCR 法和 LAMP 等<sup>[1-6]</sup>。普通 PCR 和实时荧光 PCR 检测方法有特异性强,灵敏度高等优势,但需要价格较贵的 PCR 仪,检测成本较高;LAMP 技术是发展较早的恒温扩增技

术,兴起于本世纪初,在以其检测灵敏、肉眼直接观察结果的便捷特点,深受广大检测人员青睐,但同时,由于其对环境场地清洁度、人员操作水平要求严苛,导致了其推广受限。

解旋酶基因恒温扩增(HDA)检测技术的出现解决了上述矛盾。HDA 是一种依赖于解旋酶的非 PCR 的基因体外扩增方法,其原理是利用大肠杆菌 UvrD 解旋酶的解旋功能进行 DNA 双螺旋的解链,再结合 DNA 聚合酶的合成功能,在恒温条件下完成核酸片段的扩增过程<sup>[7]</sup>,具有设计简单、操作简捷、无特殊场地要求的特点,融合 PCR 技术和 LAMP 技术的优势,目前已得到了较为快速的发展。该方法现已应用于一些病原菌的检测,但尚未见应用 HDA 方法检测病原细菌耐药基因的报道。

本文选取 AD865 菌株 NDM-1 基因(登录号 HM853678.1)作为检测靶基因,设计特异性引物,建立快速检测 NDM-1 的 HDA 检测方法,以期为食品中潜在超级细菌等疫害生物的高效、快速检测提供思路。

## 2 材料与方 法

### 2.1 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(NCBIIP);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	NCBIIP***(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)

续表 1

菌株名称(Latin names of strains)	来源(Resource)
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

### 2.2 主要试剂

Bst 聚合酶、MutL 蛋白、大肠杆菌 UvrD 解旋酶、T4 gp32、二硫苏糖醇、小牛血清 BSA 均购自新英格兰公司;Taq 聚合酶、dNTPs、ATP、PCR 反应缓冲液、MgCl<sub>2</sub>、MgAc<sub>2</sub>、氯仿、无水乙醇、异丙醇、巯基乙醇、海藻糖、Tris-HAc 均购自上海生工有限公司;DNA Marker 购自大连 TAKARA 宝生物有限公司;ddH<sub>2</sub>O 由实验室纯水系统制备。引物合成由美国 GENESCRIP(T 金斯瑞生物工程有限公司)完成,纯度级别为分析纯。

### 2.3 受试菌 DNA 模板的制备

#### 2.3.1 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。

#### 2.3.2 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 ℃ 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

#### 2.3.3 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 OD<sub>260</sub> 值和 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值,得出相应的 DNA 浓度和纯度。

## 2.4 解旋酶恒温(HDA)扩增体系

### 2.4.1 HDA 检测引物的设计与分析

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。

1 cttggtcgtc gttggcgggc cgggtcgtgt ggtcgatacc  
gcctggtcgc atgaccgccc

61 gccagatcc tcaactggat caagcaggag atcaactgc  
cggtcgcgt ggcggtggtg

121 actcacgcgc atcaggacaa gatgggcggt atg-  
gacgcgc tgcattcggc ggggattgcg

181 acttatgcca atgcgtgtc gaaccagctt gccccgcaag  
aggggatggt tgcggcgcga

241 cacagcctga ctttcgccgc caatggctgg gtcgaac-  
cag caaccgcgcc caactttggc

301 ccgctcaagg tattttacc cggccccggc cacac-  
cagtg acaatatcac cgttggatc

361 gactgttcg acatcgttt tgggtgctgc ctgateaagg  
acagcaagc caagtcgctc

421 ggcaatctcg gtgatgccga cactgagcac taca

选用其特异区间序列作为 HDA 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,HDA 检测引物 HDA-97-F 和 HDA-97-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	HDA-97-F;CCAGCTTGCCCCGCAAGAGG	204
	HDA-97-R;GCCAAAGTTGGCCCGGTTG	300

### 2.4.2 HDA 体系各组成成份

借鉴 PCR 检测的经验,在保证检测特异性的前提下,HDA 扩增也需要对引物浓度、醋酸镁、Bst 聚合酶、UvrD 解旋酶及 dNTPs 等因素进行优化以提高检测体系的灵敏度。根据 Vincent M 等于 2004 年发表的文献,研究人员对于 HDA

反应体系中各成分的比例、浓度均进行了系统的优化和验证实验,提出了较为理想的体系组成方案。本研究在其基础上,结合扩增片段序列结构及产物长度,设定扩增体系总体积为 50  $\mu\text{L}$ ,体系组成如下:

扩增溶液 A:2  $\mu\text{L}$  模板 DNA,10  $\mu\text{mol/L}$  引物各 2  $\mu\text{L}$ ,用 ddH<sub>2</sub>O 补至 25  $\mu\text{L}$ ;

扩增溶液 B:5  $\mu\text{L}$  海藻糖 (5 mol/L),0.5  $\mu\text{L}$  T4 gp32 (10 mg/ml),2  $\mu\text{L}$  dNTPs (10 mmol/L),2.5  $\mu\text{L}$  Bst polymerase(8000 U/mL),1  $\mu\text{L}$  UvrD helicase (100 mg/L),1.5  $\mu\text{L}$  ATP (100 mmol/L),1  $\mu\text{L}$  MutL 蛋白(600 mg/L),10  $\times$  缓冲液 5  $\mu\text{L}$  [350 mM Tris-HAc (pH 7.5) + 100 mM 二硫苏糖醇 + 1 mg/mL 小牛血清 + 100 mM 醋酸镁],用 ddH<sub>2</sub>O 补至 25  $\mu\text{L}$ 。

### 2.4.3 HDA 反应参数

扩增溶液 A 在 95  $^{\circ}\text{C}$  条件下温浴 5 min,之后在 65  $^{\circ}\text{C}$  条件下,温浴 3 min,将扩增溶液 B 加入扩增溶液 A,二者混匀,于 65  $^{\circ}\text{C}$  恒温扩增 90 min。

反应温度和扩增时间是重要的参数,对于缩短扩增反应周期,提高检测效率具有直接作用,需要进行适当的筛选和优化,以确定最佳反应时间和扩增温度。将扩增用时和温度梯度分别设计为:

恒温扩增时间:45 min、60 min、75 min、90 min、105 min、120 min

扩增温度:60  $^{\circ}\text{C}$ 、62  $^{\circ}\text{C}$ 、64  $^{\circ}\text{C}$ 、66  $^{\circ}\text{C}$ 、68  $^{\circ}\text{C}$ 、70  $^{\circ}\text{C}$

按照建立及优化的反应体系和反应条件对 DNA 模板进行检测,以验证所建方法的可行性。

## 2.5 普通 PCR 扩增条件

PCR 反应体系(50  $\mu\text{L}$ ):2  $\times$  Taq PCR Master-Mix 25  $\mu\text{L}$ 、2 条引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 2  $\mu\text{L}$ 、模板 DNA 2  $\mu\text{L}$ 、ddH<sub>2</sub>O 19  $\mu\text{L}$ 。

PCR 反应程序为:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min,94  $^{\circ}\text{C}$  变性 15 s,51  $^{\circ}\text{C}$  退火 15 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 20 s,进行 35 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min,4  $^{\circ}\text{C}$  保存反应产物。

## 2.6 特异性实验

用已建立的 HDA 方法对表 1 所列的 NDM-1 质粒 DNA 和其他 11 株受试菌株模板 DNA 进行扩增,2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测产物。

## 2.7 灵敏度实验

将 NDM-1 质粒 DNA 100 pg/ $\mu$ L DNA 模板溶液以 10 倍梯度倍比稀释 5 次后,各取 1 $\mu$ L 直接进行 PCR 检测。

## 2.8 HDA 方法与普通 PCR 方法比较

取 2.8 中梯度稀释的各浓度 NDM-1 质粒 DNA 进行普通 PCR 扩增,2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测产物。为增加可比性,两种方法采用相同的反应体积。普通 PCR 的引物与 HDA 方法引物相同。

## 3 实验结果

### 3.1 HDA 扩增有效性验证

电泳鉴定结果表明:在解旋酶的催化作用下,三种重组质粒经过 90 min 的恒温扩增反应,均出现阳性条带,生成 97 bp 的扩增产物,片段长度与预期长度一致。空白水对照并未出现阳性扩增片段,证明扩增体系的有效性,排除了实验污染对结果的干扰。随后的测序结果进一步印证了扩增片段的正确性,测序结果显示该片段的碱基排列顺序分别与 *Klebsiella pneumoniae* strain ADB65、*Enterococcus faecium* strain ZW031-2、*Escherichia coli* strain B10533 NDM-1 基因扩增区间的同源性为 100%。通过以上电泳检测鉴定和基因测序结果可知,三种合成 NDM-1 基因质粒 DNA 模板的 HDA 扩增产物是与预期相符的、正确的,证明了 HDA 扩增体系的有效性和准确性。

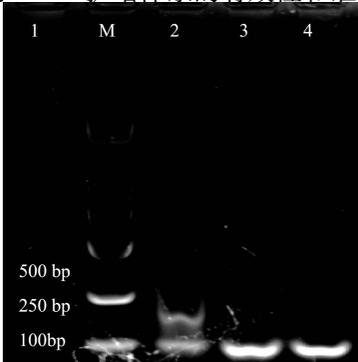


图1 NDM-1 的 HDA 扩增有效性验证

注:M:DNA Marker;1:空白对照;2-4:NDM-1 质粒 DNA;

Fig.1 HDA detection for Vector DNA of NDM-1

Note:M:DNA Marker;1:Blank control;

2-4:VectorDNA of NDM-1;

### 3.2 HDA 检测体系的优化

实验表明,在其他条件相同的情况下,扩增体系在恒温(65 $^{\circ}$ C)扩增时间分别为 60 min、75min、90 min、105 min 和 120 min 均能扩增出相应片段,45 min 时没有扩增产物出现,60 min 较暗,后四者亮度相仿,但 75 min 用时较短可被作为较佳扩增时间。

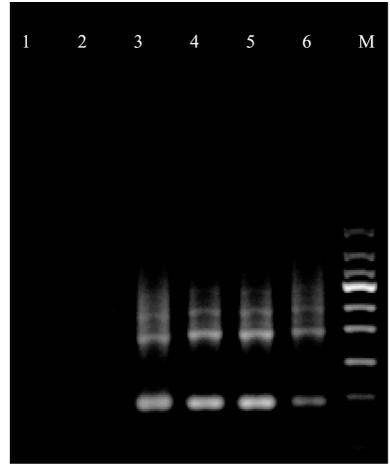


图2 HDA 时间参数优化实验图谱

M. Marker;泳道 1~6:45 min、60 min、75 min、90 min、105 min、120 min

Fig.2 The optimized time of HDA detection system

M. Marker; Lane 1~6:45 min、60 min、75 min、90 min、105 min、120 min

实验表明,在其他条件相同的情况下,扩增体系在同样的时间(75 min)里扩增温度分别为 60 $^{\circ}$ C、62 $^{\circ}$ C、64 $^{\circ}$ C、66 $^{\circ}$ C、68 $^{\circ}$ C、70 $^{\circ}$ C 时均能扩增出相应产物,其中 62 $^{\circ}$ C、64 $^{\circ}$ C、66 $^{\circ}$ C 条带亮度相仿,均可作为检测时扩增温度。

### 3.3 HDA 检测专化性的验证

本研究采用构建的 NDM-1 质粒 DNA 及 11 个已知菌株 DNA 参加交叉反应测试,在同样的引物、反应体系条件下进行扩增,并进行琼脂糖电泳检测,电泳图谱显示,在所有的参试菌株中,只有 NDM-1 质粒 DNA 扩增出长度为 97 bp 的片段条带,其他对照菌株均未形成相同长度的扩增产物,提示实验所用引物对病原微生物耐药基因 NDM-1 检测的特异性,HDA 检测体系具有 NDM-1 基因鉴定特异性。

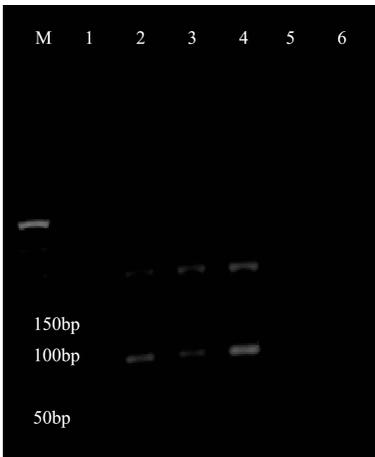


图3 HDA 温度优化实验图谱

M. Marker;泳道 1~6:60 °C、62 °C、64 °C、  
66 °C、68 °C、70 °C

Fig.3 The optimized temperature of HDA detection system

M. Marker;Lane 1~6:60 °C、62 °C、64 °C、  
66 °C、68 °C、70 °C

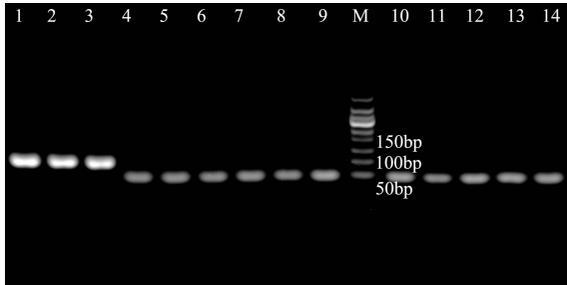


图4 HDA 检测 NDM-1 的特异性

注:M;DNA Marker;1:NDM-1 质粒 DNA1;  
2: NDM-1 质粒 DNA 2; 3: NDM-1 质粒 DNA 3;  
4. 溶藻弧菌; 5: 大肠杆菌 1; 6. 大肠杆菌 2;  
7. 金黄色葡萄球菌 1;8:金黄色葡萄球菌 2;  
9. 金黄色葡萄球菌 3;10. 沙门氏菌 1;  
11: 猪霍乱沙门氏菌; 12. 沙门氏菌 2;  
13. 铜绿假单胞菌 1;14. 铜绿假单胞菌 2

Fig.4 The specificity of HDA detection  
system in detection of NDM-1

Note:M;DNA Marker;1: Plasmid 1 of NDM-1;  
2: Plasmid 2 of NDM-1;3: Plasmid 3 of NDM-1;  
4: *Vibrio alginolyticus*;5: *Escherichia coli* 1;  
6: *Escherichia coli* 2;7: *Staphylococcus aureus* 1;  
8: *Staphylococcus aureus* 2; 9: *Staphylococcus aureus* 3;  
10: *salmonella* 1;11: *Salmonella choleraesuis*;  
12: *salmonella* 2 ;13: *Pseudomonas aeruginosa* 1;  
14: *Pseudomonas aeruginosa* 2

### 3.4 HDA 灵敏度实验

将 100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  NDM-1 质粒 DNA 溶液以 10 倍梯度倍比稀释 5 次,各浓度各取 1  $\mu\text{L}$  直接进行 HDA 检测,电泳结果显示,随着模板浓度的降低,条带逐渐变淡,至 1  $\text{fg}/\mu\text{L}$  时没有扩增产物,可以得出, HDA 方法的最低检测限可达到 10  $\text{fg}/\mu\text{L}$  的水平。

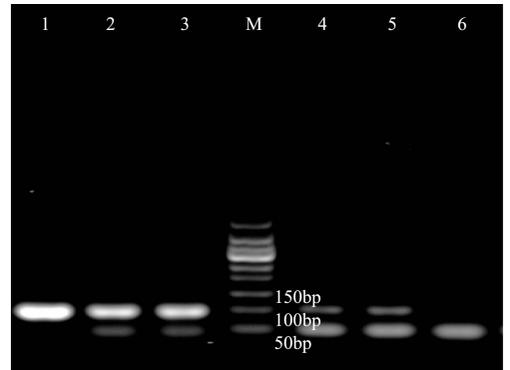


图5 NDM-1 重组质粒 DNAHDA 检测灵敏度图谱

M:DNA Marker;1:100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  模板液;2:10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  模板液;  
3:1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  模板液;4:100  $\text{fg}/\mu\text{L}$  模板液;  
5:10  $\text{fg}/\mu\text{L}$  模板液;6:1  $\text{fg}/\mu\text{L}$  模板液

Fig.5 The sensitivity test of HDA for NDM-1

M:DNA Marker;1:100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  DNA solution;  
2:10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  DNA solution ; 3:1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  DNA solution;  
4:100  $\text{fg}/\mu\text{L}$  DNA solution;5:10  $\text{fg}/\mu\text{L}$  DNA solution;  
6:1  $\text{fg}/\mu\text{L}$  DNA solution

### 3.5 HDA 方法与普通 PCR 方法的比较

由各梯度浓度质粒 PCR 结果显示,普通 PCR 方法的最低检测限达到 100  $\text{fg}/\mu\text{L}$ ,而 HDA 检测限可达到 10  $\text{fg}/\mu\text{L}$ . 由此可以看出,本文所建立的 HDA 方法的灵敏度略高于普通 PCR 方法的灵敏度。

## 4 讨 论

HDA 技术模拟自然界生物体内 DNA 复制的自然过程,在恒温条件下利用解旋酶解开 DNA 双链,最终实现靶序列的指数式增长<sup>[8]</sup>。HDA 技术是由美国 NEB 公司研究人员于 2004 年发明的一种新型核酸恒温扩增技术<sup>[9]</sup>,能在 60~75 min 时间内完成传统 PCR 120 min 时间才能完成的检测,具有快速、简捷、硬件要求低的

特点,近年来被广泛应用于食源性致病菌如沙门氏菌<sup>[10]</sup>、李斯特菌<sup>[11]</sup>、大肠埃希氏菌<sup>[12]</sup>的快速检测技术的开发与应用。NDM-1 是“新德里-金属  $\beta$ -内酰胺酶”基因(Delhi-Metallo-1)的英文缩写,该种基因着生于“超级细菌”体内,能够编码新德里-金属  $\beta$ -内酰胺酶,这种酶对目前大多数抗生素具有广谱的耐药性<sup>[13]</sup>,是“超级细菌”区别于普通耐药细菌的重要的标志性基因之一,建立 NDM-1 基因的快速检测方法将有助于食品中潜在的“超级细菌”的快速诊断和鉴定。

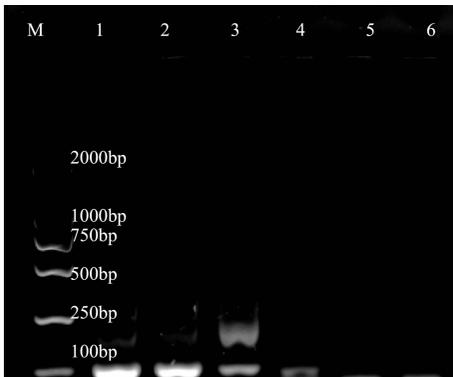


图6 NDM-1 重组质粒 DNAPCR 检测灵敏度图谱

M:DNA Marker;2000;1:100  $\text{pg}/\mu\text{L}$  模板液;

2:10  $\text{pg}/\mu\text{L}$  模板液;3:1  $\text{pg}/\mu\text{L}$  模板液; 4:100  $\text{fg}/\mu\text{L}$  模板液;5:10  $\text{fg}/\mu\text{L}$  模板液;6:1  $\text{fg}/\mu\text{L}$  模板液

Fig.6 The sensitivity test of PCR for NDM-1

M:DNA Marker;1:100  $\text{pg}/\mu\text{LDNA}$  solution;

2:10  $\text{pg}/\mu\text{LDNA}$  solution;3:1  $\text{pg}/\mu\text{LDNA}$  solution;

4:100  $\text{fg}/\mu\text{LDNA}$  solution;5:10  $\text{fg}/\mu\text{LDNA}$  solution;

6:1  $\text{fg}/\mu\text{LDNA}$  solution

本实验通过对 NDM-1 基因的同源性线性比对分析,寻找特异性位点、序列作为扩增检测引物,然后利用 NCBI 数据库引物设计软件对可能的扩增产物进行模拟预测,对不同的引物对的专化性进行验证,直到筛选出专化检测 NDM-1 基因的扩增引物,保证了 HDA 检测的特异性,同时在既往研究者的研究结果基础上,对反应温度、扩增时间等参数进行了梯度测试,建立并优化了 HDA 快速检测体系。灵敏度实验表明,HDA 检测灵敏度与仪器依赖性强、耗时长 PCR 技术等同,适合研究基础较薄弱,硬件设施不齐全,仪器设备配置水平低的基层植物病害实验室诊断检疫使用。

## 参考文献

- [ 1 ] FRADE J P, WARNOCK D W, ARTHINGTON S. Rapid quantification of drug resistance gene expression in *Candida albicans* by reverse transcriptase LightCycler PCR and fluorescent probe hybridization [J]. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004,42(5): 2085-2093.
- [ 2 ] 羊云飞,王红宁,谭雪梅,等.二重 PCR 检测猪、鸡源致病性大肠杆菌、沙门氏菌磺胺类耐药基因(Sul1、Sul2、Sul3)的研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2007,38(10):1088-1092.  
YANG Y F, WANG H N, TAN X M, et al. Detection of sulfonamides-resistant genes of pathogenic *Salmonella* and *E. coli* by duplex PCR[J]. *Acta Veterinaria Et Zootechnica Sinica*, 2007, 38(10): 1088-1092.
- [ 3 ] 王凤玲.多重 PCR 法检测金黄色葡萄球菌耐药基因及致病毒素基因[J]. *中国医药导报*, 2010,7(2):70-71.  
WANG F L. Development of multiplex PCR for the detection of antibiotic-resistant gene and pathogenic genes in *Staphylococcus aureus* [J]. *China Medical Herald*, 2010,7(2):70-71.
- [ 4 ] 代敏,王红宁,吴琦. PCR 和核酸探针检测猪源沙门氏菌四环素耐药基因 tetC 的研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2005,36(5):482-485.  
DAI M, WANG H N, WU Q. Research on detection of tetracycline resistance gene (tetC) of pathogenic *Salmonella* from swine by PCR and nucleic acid probe [J]. *Acta Veterinaria Et Zootechnica Sinica*, 2005,36(5):482-485.
- [ 5 ] 马孟根,王红宁,余勇,等.大肠埃希氏菌和沙门菌氨基糖苷耐药基因 PCR 检测方法的建立[J]. *中国兽医科技*, 2005,35(4):277-283  
MA M G, WANG H N, YU Y, et al. Development of PCR method for detection of aminoglycoside resistance genes of *Escherichia coli* and *Salmonella* [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, 2005,35(4):277-283.
- [ 6 ] 沈俊娅. Real-time PCR 检测肺炎支原体对大环内酯类抗生素耐药基因[J]. *中国预防医学杂志*, 2009,(8):721.  
SHEN J Y. Real-time PCR detection of *Mycoplasma pneumoniae* macrolide antibiotic resistance genes [J]. *Chinese Journal of Preventive Medicine*, 2009,

- (8):721.
- [ 7 ] 鲁雪,李赟,黄健. 核酸扩增新技术[J]. 动物医学进展, 2010,31(3):103-106.  
LU X, LI Y, HUANG J. New technologies of nucleic acid amplification[J]. Progress in Inveterinary Medicine, 2010,31(3):103-106.
- [ 8 ] 刘洵,程天印,常小斌,等. 赖解旋酶恒温基因扩增技术的原理、应用和展望[J]. 长沙大学学报, 2007,21(2):29-31.  
LIU X, CHENG T Y, CHANG X B, et al. Theory, application and outlook of helicase-dependent isothermal DNA amplification[J]. Journal of Changsha University, 2007, 21(2):29-31.
- [ 9 ] VINCENT M, XU Y, KONG H. Helicase-dependent isothermal DNA amplification [J]. EMBO Rep, 2004,5(8):795-800.
- [ 10 ] 刘洵,程天印,王晓君. 应用解旋恒温基因扩增技术检测沙门氏杆菌[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版, 2007,33(4):450-453.  
LIU X, CHENG T Y, WANG X J. Detection of Salmonella with helicase-dependent isothermal DNA amplification[J]. Journal of Hunan Agricultural University: Natural Sciences, 2007,33(4):450-453.
- [ 11 ] 王建广,雷质文,石琰璟,等. 大肠埃希氏菌 O157:H7 的 HDA 检测方法的建立[J]. 安徽农业大学学报, 2011,38(2):1-4.  
WANG J G, LEI ZH W, SHI Y J, et al. Establishment of the HDA method of detecting Escherichia coli O157:H7 [J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2011,38(2):1-4.
- [ 12 ] 王建广,雷质文,石琰璟. 单核细胞增生李斯特氏菌依赖解旋酶 DNA 恒温扩增检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2011(2):130-132.  
WANG J G, LEI ZH W, SHI Y J. Establishment of the Helicase-dependent isothermal DNA amplification method of detecting Listeria monocytogenes[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2011(2):130-132.
- [ 13 ] 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.

#### 作者简介



梁伟,汉,(1979.7-),山东枣庄,主要从事病原微生物分子检测研究。

**Liang Wei**, Han, born in Zaozhuang of Shandong province in 1979.7, Mainly engaged in the molecular detection of pathogenic microorganisms.