

NDM-1 基因 DHPLC 快速检测体系的建立*

吴兴海¹, 张云霞¹, 杨伟克¹, 封立平¹, 房保海¹, 庞国兴¹, 曹际娟², 林黎明¹

(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:NDM-1 基因是一种专属于“超级细菌”的重要特有的耐药基因,在食品潜在污染病原微生物的检测中起着重要的作用。本研究以实现食品中超级细菌的快速检测为目标,初步建立了 NDM-1 基因的 PCR-DHPLC 快速检测鉴定方法,根据 NDM-1 基因序列,设计、合成了 PCR 引物(ND-D-F 和 ND-D-R),并分别对 NDM-1 质粒 DNA 及其他 11 个标准菌株进行了 PCR 扩增和 DHPLC 检测。结果表明,携有 NDM-1 基因的质粒 DNA 经过 PCR-DHPLC 反应扩增出特异性样品吸收峰,而其他对照菌均未出现相应吸收峰,提示本文中设计和应用的 PCR 引物具有 NDM-1 基因检测的特异性;灵敏度测定结果显示,此体系检测下限可达 100 fg/ μ L,提示 PCR-DHPLC 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;PCR-DHPLC;检测

中图分类号:R155.5 文献标识码:A 国家标准学科分类代码:330.47

A rapid assay for detecting NDM-1 by DHPLC

Wu Xinghai¹, Zhang Yunxia¹, Yang Weike¹, Feng Liping¹, Fang Baohai¹,
Pang Guoxing¹, Cao Jijuan², Lin Liming¹

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

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

Abstract: NDM-1 was an important particular gene of superbacteria with broad-spectrum resistance to antibiotic, and make an important role in detecting pathogenic bacteria of food. For the aim at rapidly detect superbacteria in food, the method of detection and identification of NDM-1 by DHPLC was primarily established. A PCR-DHPLC method was developed to detect NDM-1 gene. Specific primers were designed and synthesized based on the gene sequence in GeneBank. The primers used in this assay were shown to be specific for plasmid with NDM-1 which produce special peak and other 11 standard bacteria strains. This technique was sensitive with the detection lower limit of 100 fg/ μ L DNA. PCR-DHPLC is a specific, sensitive, rapid and highly effective method for the detection and identification of NDM-1.

Key words: NDM-1; DHPLC; detection

1 引言

“超级细菌”泛指一类具有广谱抗药性的病

原细菌。最早于 2010 年,在印度和巴基斯坦被发现之后,日本、中国及欧洲、大洋洲等国家和地区也相继出现了种类不同但耐药性相近的“超级细菌”^[1]。此类细菌对目前最广谱、强效的抗生

素亦存在抗药性,导致感染者无法医治,形成无药可医的严重局面。

研究表明^[2-7],多种“超级细菌”体内均存在一种共性基因,名为 NDM-1,是导致超级细菌具备强大耐药性的根源之一。因此开发出一种 NDM-1 基因的快速检测方法,对于食品中“超级细菌”的及时诊断与控制具有重要的意义。本研究利用 PCR 衔接低耗高效的变性高效液相色谱(DHPLC)技术,建立了耐药基因 NDM-1 的新型分子检测技术。

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)
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、EverGreen 染料购自北京天根公司;DNA Marker 购自 Promega 公司;琼脂糖凝胶

粉、三乙胺乙酰盐(TEAA, 色谱纯)购自 Transgenomic 公司;乙腈(色谱纯)购自 Fisher 公司。

DHPLC 缓冲液:缓冲溶液 A 为 0.1 mol/L TEAA + 2.5% 乙腈(PH 7.0);缓冲溶液 B 为 0.1 mol/L TEAA + 25% 乙腈(PH 7.0);缓冲溶液 D 为 75% 乙腈。

2.2 受试菌 DNA 模板的制备

2.2.1 受试菌 DNA 的提取

挑取固体培养基上的单菌落至液体 LB 培养基中,28 °C 振荡过夜,当菌液浓度达到 $10^6 \sim 10^8$ cfu/mL 时,按照商业试剂使用说明书的方法,利用细菌总 DNA 提取试剂盒(DNeasy Bacteria Kits, Tiangen, CA)快速提取所有应试菌株菌悬液的基因组 DNA 后,分别将其悬浮保存于 100 μ L TE 缓冲液中(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)备用。

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“超级细菌”的 NDM-1 基因核酸序列,合成大肠杆菌 B10533(Escherichia coli strain B10533)三种病菌的 NDM-1 基因片段(GENESCRIPT—金斯瑞公司)。16 °C 下,合成的 NDM-1 基因在连接酶的作用下和 PMD-T 载体作用 40 min,形成重组质粒,作为后续 PCR 反应的 DNA 模板。

2.3 引物设计与合成

根据肺炎克雷伯氏菌、肠球菌菌株 ZW031-2、大肠杆菌 B10533 ITS 三种病原菌的 NDM-1 基因序列,在引物对扩增片段区间找出稳定性点突变区,应用引物计算机软件 Primer BLAST 设计其特异 PCR 扩增引物序列(表 2),并完成引物和探针合成(GENEScript 公司)。

表 2 引物序列

Table 2 The sequence of primers

序号	引物对	预期扩增片段长度(bp)
1	ND-D-F: GCAACCGCGCCCAACTTTGG ND-D-R: CCGAGCGACTTGGCCTTGCT;	117

2.4 实时荧光 PCR 检测反应

2.4.1 PCR 扩增体系

2 \times Buffer 12.5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 2 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 2 μ L, 5U/ μ L TaqDNA 聚合酶

0.4 μL , 上、下游引物各 1 μL (10 pmol/ μL), EverGreen 染料 1.25 μL (20 \times), DNA 模板 1 μL , 无菌超纯水补充至 25 μL 。

2.4.2 PCR 循环参数

94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s; 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火, 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 循环 40 次。最后加做溶解曲线 (95 $^{\circ}\text{C}$ 15 sec, 60 $^{\circ}\text{C}$ 15 sec, 95 $^{\circ}\text{C}$, 15 sec)

2.4.3 PCR 产物电泳鉴定及测序

配制 1% 琼脂糖凝胶, 放入 TAE 电泳缓冲液中的电泳槽中。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。将含扩增特异片段的 PCR 产物送往大连宝生物工程有限公司 (TAKARA) 测序

2.5 DHPLC 检测分析条件

色谱柱: PS-DVB&C18 DNASep 色谱柱 (4.6 mm \times 50 mm, 粒度 3 μm), 柱温 50 $^{\circ}\text{C}$;

流动相: 缓冲溶液 A 浓度 50.2%, 缓冲溶液 B 浓度 49.8%, 流速 0.9 mL/min;

检测器: 荧光检测器 (光源: 150 W Xenon 灯; 激发谱带 15 nm; 发射谱带 15.3 nm; 波长 350 nm);

上样量: PCR 产物 5 μL 。

2.6 DHPLC 检测的特异性

将表 1 中的参试菌株以 1.4 反应体系和 1.5 分析条件进行 PCR-DHPLC 检测。

2.7 DHPLC 检测的灵敏度

将 1 ng/ μL 重组质粒 DNA 模板按 1:10 做梯度倍比稀释, 以 1.4 扩增条件及 1.5 反应体系进行 PCR-DHPLC 检测反应。

3 结 果

3.1 PCR 产物的克隆及鉴定

三种超级细菌的 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

3.2 DHPLC 检测的灵敏度

将 100 pg/ μL NDM-1 质粒 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-DHPLC 检测, 结果显示, 在浓度为 100 fg/ μL 时仍可检测到 PCR 产物 (见图 1 ~ 图 5)。

3.3 DHPLC 检测的特异性

利用引物 ND-D-F 和 ND-D-R 及优化的 PCR 条件对受试菌株进行特异性扩增, 只有 NDM-1 基因质粒 DNA 有强的荧光信号吸收曲线增加, 表现为阳性扩增, 而其他细菌及水对照没有荧光信号吸收峰, 表现为阴性 (图 6 ~ 图 16)。说明引物对 ND-D-F 和 ND-D-R 对 NDM-1 基因具有很强的特异性, 可以明显地区别 NDM-1 基因与其他细菌菌株。

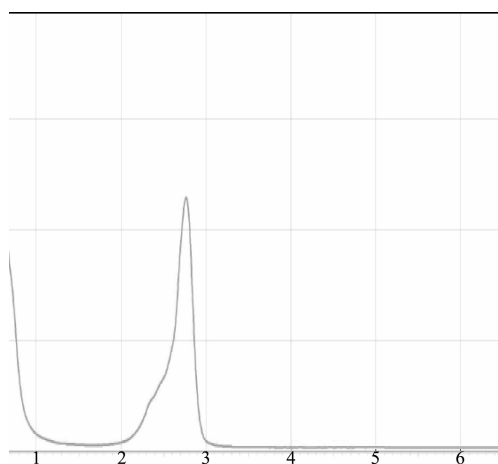


图 1 NDM-1 重组质粒 DNA 灵敏度检测图谱
——100 pg/ μL 模板液

Fig. 1 Detection curve of NDM-1 by DHPLC when the concentration of DNA is 100 pg/ μL

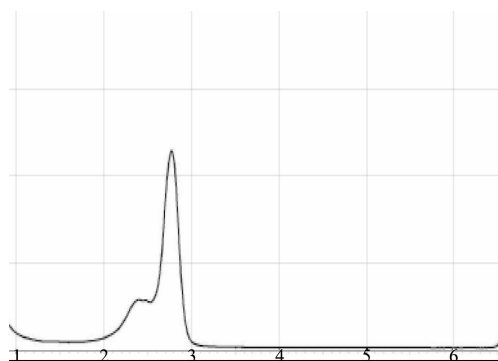


图 2 NDM-1 重组质粒 DNA 灵敏度检测图
——10 pg/ μL 模板液

Fig. 2 Detection curve of NDM-1 by DHPLC when the concentration of DNA is 10 pg/ μL

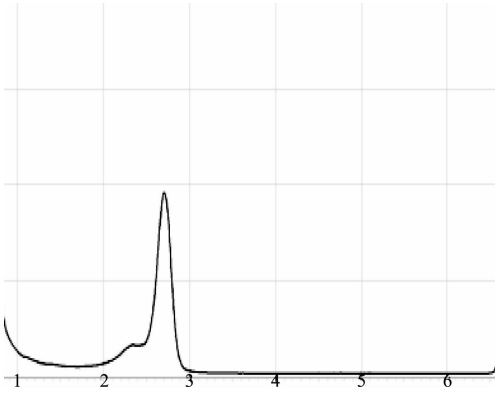


图3 NDM-1 重组质粒 DNA 灵敏度检测图谱
——1 pg/μL 模板液

Fig.3 Detection curve of NDM-1 by DHPLC when the concentration of DNA is 1 pg/μL

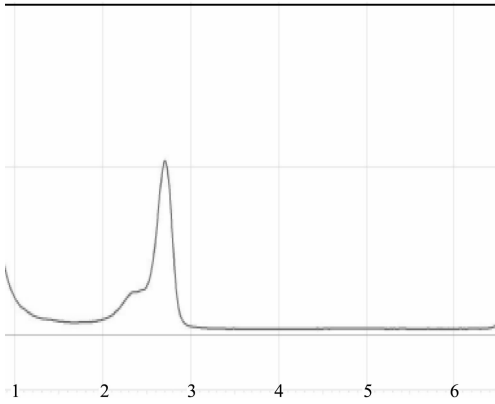


图4 NDM-1 重组质粒 DNA 灵敏度检测图
——100 fg/μL 模板液

Fig.4 Detection curve of NDM-1 by DHPLC when the concentration of DNA is 100 fg/μL



图5 NDM-1 重组质粒 DNA 灵敏度检测图谱
Fig.5 Detection curve of NDM-1 by DHPLC by when the concentration of DNA is 10 fg/μL

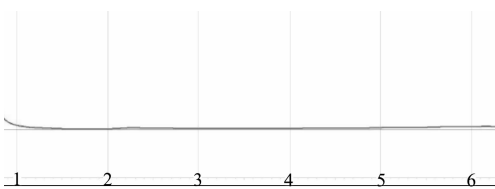


图6 溶藻弧菌 NDM-1 DHPLC 检测图谱
——10 fg/μL 模板液

Fig.6 Detection curve of *Vibrio alginolyticus* by DHPLC

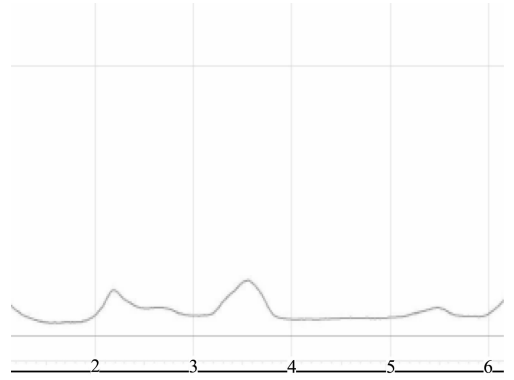


图7 大肠杆菌 1 DHPLC 检测图谱

Fig.7 Detection curve of *Escherichia coli* 1 by DHPLC

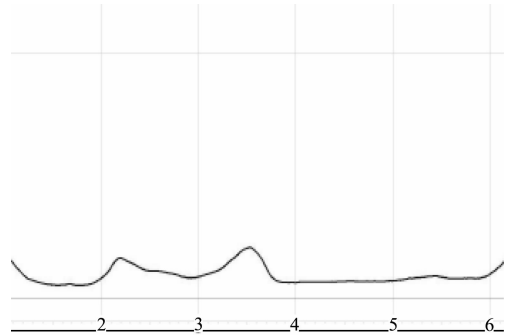


图8 大肠杆菌 2 DHPLC 检测图谱

Fig.8 Detection curve of *Escherichia coli* 2 by DHPLC

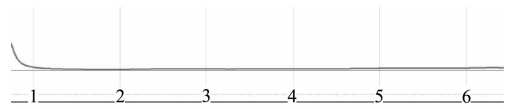


图9 金黄色葡萄球菌 1 DHPLC 检测图谱

Fig.9 Detection curve of *Staphylococcus aureus* 1 by DHPLC

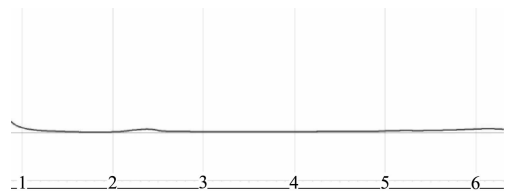


图10 金黄色葡萄球菌 2 DHPLC 检测图谱

Fig.10 Detection curve of *Staphylococcus aureus* 2 by DHPLC



图11 金黄色葡萄球菌 3 DHPLC 检测图谱

Fig.11 Detection curve of *Staphylococcus aureus* 3 by DHPLC

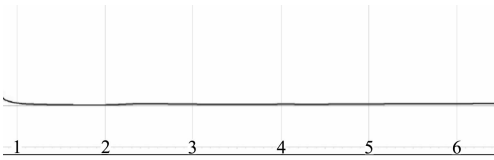


图12 沙门氏菌1 DHPLC 检测图谱

Fig. 12 Detection curve of salmonella 1 by DHPLC

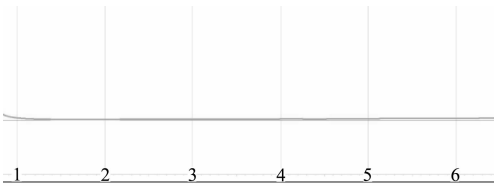


图13 猪霍乱沙门氏菌 DHPLC 检测图谱

Fig. 13 Detection curve of *Salmonella choleraesuis* by DHPLC

图14 沙门氏菌2 DHPLC 检测图谱

Fig. 14 Detection curve of salmonella 2 by DHPLC

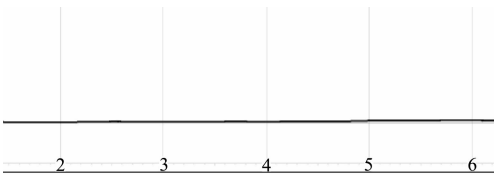


图15 铜绿假单胞菌1 DHPLC 检测图谱

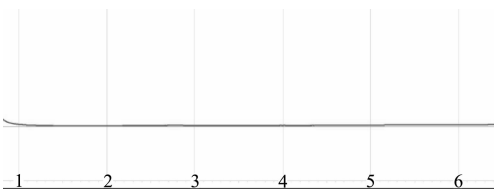
Fig. 15 Detection curve of *Pseudomonas aeruginosa* 1 by DHPLC

图16 铜绿假单胞菌2 DHPLC 检测图谱

Fig. 16 Detection curve of *Pseudomonas aeruginosa* 2 by DHPLC

4 讨 论

变性高效液相色谱(DHPLC)技术主要用于检测基因突变及单核苷酸多态性(SNPs)的筛查,其高通量和接近于基因测序水平的敏感度,使其在医学、食品、刑侦、动物育种、微生物检测等领域得到了大面积的应用^[8-10]。纵观目前常用的核酸检测手段,只有该种检测体系融合了生物学、物理学和化学等几个学科的诸多特点,展现了学科交叉的优势和魅力。

本研究以建立“超级细菌”NDM-1基因快速鉴定方法为目标,利用新型高通量DHPLC方法结合PCR扩增技术,特异性和灵敏度的验证实验结果显示,DHPLC技术具有较高的检测特异性和灵敏度,检测下限可达到fg级,体现了该种检测方法在检测NDM-1基因时具有的特点。研究发现,DHPLC技术在以下几个方面具备了优于其他技术的特性。首先,从检测成本上看,如果除去仪器的购置和日常维护费用,该方法所用试剂耗材均是国产TEAA和乙腈等普通化学试剂,购买渠道广泛,购买费用低廉,适合检测部门常规、高频使用实际。其次,DHPLC检测时间短,从进样到读取峰值乃至完成洗脱等全部流程总计耗时只有几分钟,比普通琼脂糖凝胶电泳检测省时80%,在检测微卫星小片段长度多态性时,相比聚丙烯酰胺凝胶电泳多达数小时的用时,缩短检测周期40~50倍。而其动态实时监测吸收信号的性能可以使检测人员在出现特异性吸收峰时,即可对检测结果做出判断,根据实际需要自行控制检测进程和用时。

参考文献

- [1] SO A, FURLONG M, HEDDINI A. Globalisation and antibiotic resistance-hospitals engaged in medical tourism can turn crisis into opportunity [J]. *BMJ*, 2010, 341(7774): 615-616.
- [2] YONG D, MA T, 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.

- [3] WELTER K. NDM-1; Ein neuer sieg für mustresistente bakterien [J]. *Chemie in Unserer Zeit*, 2010, 44 (5); 366-367.
- [4] WOODFORD N, KUMARASAMY K K, TOLEMAN M, 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.
- [5] BUSH K. Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant enterobacteriaceae [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2010, 13 (5); 558-564.
- [6] HSUEH P R. New Delhi metallo- β -lactamase-1 (NDM-1): an emerging threat among enterobacteriaceae [J]. *Journal of the Formosan Medical Association*, 2010, 109 (10); 685-687.
- [7] GiBB A P, MCCALLUM A K. New Delhi metallo- β -lactamase 1 [J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2010, 10 (11); 751-752.
- [8] LUQUIN N, YU B, RONALD J, et al. DHPLC can be used to detect low-level mutations in amyotrophic lateral sclerosis [C]. *Amyotrophic lateral sclerosis official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases*. 2010, 11 (1/2); 76-82.
- [9] SCHARRER U, SKRZYPCZAK, ZIELINSKA M, et al. A simple method of investigating mutations in CHEK 2 by DHPLC [R]. *A Study of the German Populations of Saxony, Saxony-Anhalt, and Thuringia. Genetics and Cytogenetics*, 2010, 199 (1); 48-52.
- [10] BATTOCHIO A, MOHAMMED S, WINTHROP P, et al. Detection of c-KIT and PDGFRA gene mutations in gastrointestinal stromal tumors: comparison of DHPLC and DNA sequencing methods using a single population-based cohort [J]. *American Journal of Clinical Pathology*, 2010, 133 (1); 149-155.

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.