

β -内酰胺类抗生素耐药编码基因检测用质粒标准样品研制

陈进¹, 甄玉荷¹, 廉鲁昕¹, 牛沁雅¹, 赵红阳², 卢行安², 周巍³, 崔生辉⁴, 杨保伟^{1*}

(1. 西北农林科技大学食品科学与工程学院, 杨凌 712100; 2. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100176;
3. 河北省食品检验研究院, 石家庄 050000; 4. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要: **目的** 研制可作为 β -内酰胺类抗生素耐药编码基因检测质控用标准样品。**方法** 通过检索美国国家生物技术信息中心基因库, 获得 β -内酰胺类抗生素耐药性编码基因 *bla*_{TEM}、*bla*_{PSE}、*bla*_{CTX-M}、*bla*_{CMY} 和 *bla*_{OXA} 的 DNA 序列, 构建耐药基因重组质粒和工程菌。将工程菌传代培养 15 代, 同时使用聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增和 DNA 测序测定确认目标基因的遗传稳定性。大量制备菌悬液, 提取重组质粒, 真空干燥得到质粒标准样品。使用 PCR 和定量逆转录 PCR (quantitative reverse transcription PCR, RT-qPCR) 检测质粒标准样品的最低检出限。使用微量分光光度计测定质粒标准样品的质量, RT-qPCR 测定质粒作为模板扩增时的循环数 (cycle threshold, Ct), 以此评价标准样品的均匀性及贮藏稳定性。**结果** 5 种重组质粒 DNA 可在工程菌中稳定遗传且无突变发生, 5 种质粒 DNA 标准样品均匀性良好。各质粒 DNA 经梯度稀释后, PCR 最低检出限在 $2.33 \times 10^4 \sim 2.25 \times 10^6$ 拷贝数/ μ L 之间, RT-qPCR 最低检出限在 1.93~1850 拷贝数/ μ L 之间。样品在 37 °C 贮存 14 d、4 °C 贮存 3 个月、-20 °C 贮存 12 个月稳定性良好。**结论** 研究制备得到的 β -内酰胺类抗生素耐药编码基因检测用质粒标准样品的目的基因遗传稳定性、标准样品的均匀性和贮存稳定性均良好。

关键词: β -内酰胺类抗生素; 耐药基因; 质粒标准样品

Development of plasmid standard sample for detection of β -lactam antibiotics resistance coding genes

CHEN Jin¹, ZHEN Yu-He¹, LIAN Lu-Xin¹, NIU Qin-Ya¹, ZHAO Hong-Yang², LU Xing-An²,
ZHOU Wei³, CUI Sheng-Hui⁴, YANG Bao-Wei^{1*}

(1. College of Food Science and Engineering, Northwest A & F University, Yangling 712100, China; 2. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China; 3. Hebei Food Inspection and Research Institute, Shijiazhuang 050000, China; 4. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

ABSTRACT: Objective To develop a standard sample which can be used as the quality control for the detection of β -lactam antibiotics resistance coding genes. **Methods** By searching the gene bank of the National Biotechnology Information Center of the United States, the DNA sequences of the drug resistance coding genes *bla*_{TEM}, *bla*_{PSE},

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项(2017YFC1601400)

Fund: Supported by the Key Projects of the 13th Five-Year National Key Research and Development Plan (2017YFC1601400)

*通信作者: 杨保伟, 博士, 教授, 主要研究方向为食品科学。E-mail: ybwsheng@nwsuaf.edu.cn

*Corresponding author: YANG Bao-Wei, Ph.D, Professor, College of Food Science and Engineering, Northwest A & F University, Yangling 712100, China. E-mail: ybwsheng@nwsuaf.edu.cn

*bla*_{CTX-M}, *bla*_{CMY} and *bla*_{OXA} of β -lactam antibiotics were obtained, and the recombinant plasmid and engineering bacteria of drug resistance genes were constructed. The engineered bacteria were subcultured for 15 generations, and the genetic stability of the target gene was confirmed by polymerase chain reaction (PCR) amplification and DNA sequencing. A large amount of bacterial suspensions were prepared, the recombinant plasmids were extracted, and the standard plasmid DNA reference sample was obtained after vacuum drying. The minimum detection limit for the standard plasmid DNA reference sample were determined by PCR and quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR). The ultra-micro spectrophotometer was used to determine the mass of the standard plasmid DNA reference sample, and RT-qPCR was used to determine the cycle threshold (Ct) of plasmid amplification as a template, in order to evaluate the homogeneity and storage stability of the standard samples. **Results** The 5 kinds of recombinant plasmid DNA could be stably inherited in the engineering bacteria without mutation, and the homogeneity of the 5 kinds of plasmid DNA standard samples were good. After gradient dilution of each plasmid DNA, the minimum detection limit of PCR was 2.33×10^4 – 2.25×10^6 copies/ μ L, and the minimum detection limit of RT-qPCR was 1.93–1850 copies/ μ L. The stability of samples stored at 37 °C for 14 d, 4 °C for 3 months and -20 °C for 12 months was good. **Conclusion** The prepared standard plasmid DNA reference sample for detecting the gene encoding β -lactam antibiotic resistance has good genetic stability, uniformity and storage stability of the target gene.

KEY WORDS: β -lactam antibiotics; drug resistance genes; standard plasmid DNA reference sample

0 引言

标准物质作为一种均匀性好、稳定性强的材料或物质,在任何一种微生物检测中使用均可实现精准检测的目标,并保证检测结果的可比性,具有较好发展前景^[1–3]。近年来,我国标准物质研究发展迅速,但食品类标准物质却研究较少^[4–6],而微生物标准物质尤其是核酸标准样品的研究更是少之又少。目前,一些实验室已开展食源性致病微生物标准样品的研制工作,主要以活菌如大肠埃希菌^[7]、金黄色葡萄球菌^[8]、副溶血性弧菌^[9]、鼠伤寒沙门氏菌^[10]、克罗诺杆菌^[11]为原材料制成,同时也有以肠炎沙门氏菌^[12–14]和大肠杆菌^[15]的核酸制备而成的检测用标准物质。但目前为止,关于微生物耐药机制编码基因和耐药基因检测用核酸标准样品的研究几乎为空白。随着基因工程技术的不断发展,质粒重组技术应用日益广泛,如疫苗制备^[16]、转基因食品研发^[17]、人类特有短串联重复序列分型标准物质研制^[18]等,但该技术应用于食品类标准物质研制较少见。本研究通过构建携带 β -内酰胺类抗生素耐药机制编码基因的重组质粒,研制多种满足国家一级标准物质要求的质粒DNA标准样品,以期丰富食源性致病菌耐药性和耐药编码基因检测领域的标准物质基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Luria-Bertani (LB)琼脂、LB肉汤培养基(北京陆桥技术股份有限公司); SOC肉汤培养基(青岛海博生物技术有

限公司); Plasmid Mini Kit I (100)试剂盒(美国OMEGA公司); SYBR Green Pro Taq HS预混型qPCR试剂盒(湖南艾科瑞生物工程有限公司); *pEASY*-Blunt Simple Cloning Kit试剂盒(北京全式金生物技术有限公司); TaKaRa Taq™ (with Mg²⁺ free Buffer)、DL 2000 DNA Marker[宝日医生物技术(北京)有限公司]。

1.2 仪器与设备

BCD-601WPCX 无霜冷藏冷冻箱(合肥美菱股份有限公司); HS-1300-U 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); Hema 9600 基因扩增仪(珠海黑马医学仪器有限公司); LX-200 迷你离心机(海门市其林贝尔仪器制造公司); NanoDrop One 超微量分光光度计[默飞世尔科技(中国)有限公司]; GELDOCXR 凝胶成像系统、GELDOCXR 实时荧光定量PCR仪(美国Bio-Rad公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 β -内酰胺类抗生素耐药机制编码基因重组质粒和菌株构建

通过美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)基因库检索得到 β -内酰胺类抗生素耐药机制的常见基因 *bla*_{TEM}、*bla*_{PSE}、*bla*_{CTX-M}、*bla*_{CMY}、*bla*_{OXA} 序列,再使用 BioEdit 软件对每个基因序列进行比对,获得共同DNA片段。确定各基因具体序列信息后,交由杨凌天润奥科生物科技有限公司合成,并构建携带目标基因的重组质粒和工程菌,重组质粒构建、重组菌株构建及蓝白斑筛选法筛选阳性菌株均使用 *pEASY*-Blunt Simple Cloning Kit 试剂盒完成。重组质粒构建方法:成功合成目的基因片段后,取 1 μ L *pEASY*-Blunt Simple Cloning

Vector 与 0.5~4.0 μL 聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)产物轻轻混合, 室温反应 5 min, 置于冰上获得质粒连接产物, 即为重组质粒。菌株构建方法: 在 50 μL Trans1-T1 感受态细胞中加入连接产物, 轻弹混匀, 冰浴 20~30 min 后, 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴热激 30 s, 立即置于冰上 2 min, 加入 250 μL SOC 肉汤培养基于 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中 200 r/min 摇晃培养 1 h 后蓝白斑筛选白色阳性菌株, 经目标基因 PCR 验证为阳性者为重组菌株。

1.3.2 工程菌中目标基因遗传稳定性检测

将工程菌划线接种于 LB 琼脂培养基, 于(37 $\pm$ 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 下恒温培养 18~24 h, 挑选单菌落连续传代培养至 15 代。使用第 1、3、6、9、12、15 代菌株制备 PCR 模板, 扩增目标基因。制备 PCR 模板时, 使用无菌牙签挑取 2~3 个单菌落, 均匀分散到装有 200 μL 无菌去离子水的 PCR 管中, 100 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min 后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷藏 5 min, 冷藏结束后室温条件下 2000 r/min 离心 3 min, 收集上清液, 即为 PCR 模板。按照 GB 4789.6—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验》中“6.5 部分: PCR 确认试验”方法, 取 0.5 μL PCR 模板, 扩增目标基因。剩余菌落于甘油管中-80 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存。

各基因 PCR 扩增用引物和序列如表 1 所示。PCR 反应体系为 25 μL , 包括 13.15 μL 双蒸水, 上、下游引物各 0.3 μL (50 ng/mL), 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μL , Taq DNA 聚合酶 0.25 μL (5 U/ μL), MgCl_2 1.5 μL (25 mmol/L), 脱氧核糖核苷三磷酸(deoxy-ribonucleoside triphosphate, dNTP)混合物 2 μL (2.5 mmol/L), 5 μL DNA 模板。扩增条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 退火 30 s(退火温度随基因而不同, 见表 1), 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

PCR 产物一部分使用质量体积分数为 1%的琼脂糖凝胶电泳检测, 另一部分保存在低温环境下送至杨凌天润奥科生物科技有限公司进行测序。测序结果通过 NCBI 官网的 Blast 功能在线比对, 验证传代菌株扩增所得的目标基因是否丢失以及序列是否突变。

1.3.3 重组质粒提取和检出限测定

工程菌株活化后, 按照 OMEGA 公司 Plasmid Mini Kit 1 (100)试剂盒说明书操作步骤提取携带目标基因的重组质粒。使用超微量分光光度计测定质粒 DNA 的浓度和纯度, 保证样品质量浓度在 50~60 ng/ μL , 吸收波长(adsorption, A) A_{260}/A_{280} 范围为 1.8~2.0, A_{260}/A_{230} 大于 2.0。取 10 μL 质粒溶液与 90 μL 无菌超纯水在 PCR 管中充分混匀, 得到稀释 10 倍质粒溶液, 重复上述操作, 得到 10^1 ~ 10^{10} 连续 10 倍梯度稀释的质粒溶液。

以不同浓度的质粒溶液作为 DNA 模板, 分别使用 PCR 和定量逆转录 PCR (quantitative reverse transcription PCR, RT-qPCR)检测目标基因。PCR 扩增未出现明显 DNA 条带的质粒 DNA 浓度确定为 PCR 最低检出浓度。将 RT-qPCR 扩增得到的循环数(cycle threshold, Ct)与模板拷贝数对数值建立标准曲线, 满足标准曲线 $r^2>0.99$ 的最大稀释倍数所对应的模板浓度确定为 RT-qPCR 最低检出限, 质粒拷贝数换算公式如公式(1)所示。

$$\text{拷贝数}=\frac{\text{质粒DNA浓度}\times10^{-9}\times6.20\times10^{23}}{(\text{载体长度}+\text{目的基因长度})\times660}$$

(1)

PCR 扩增引物及反应条件与 1.3.2 相同。RT-qPCR 反应体系为 25 μL , 包括 8.5 μL 无菌双蒸水, 12.5 μL 2 $\times$ SYBR Green Pro Taq HS Premix, 上、下游引物各 1 μL (50 ng/mL), 2 μL 质粒 DNA 模板。扩增条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 1 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s 和 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s 和 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 1 个循环。RT-qPCR 扩增用引物使用 Primer Premier 6.0 设计, 见表 2。

1.3.4 质粒 DNA 标准样品的制备

按照 1.3.3 的方法提取工程菌中携带目的基因的质粒, 测定浓度和纯度。选取浓度和纯度符合试验要求的质粒溶液等体积分装入 1.5 mL 离心管中, 由杨凌天润奥科生物科技有限公司协助完成真空干燥。各质粒 DNA 分别制备 200 管。每支离心管中质粒 DNA 质量约为 100~200 ng, 即为标准样品。干燥后的标准样品放入-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

表 1 β -内酰胺类抗生素耐药机制编码基因 PCR 扩增引物
Table 1 PCR amplification primers of gene coding β -lactam antibiotic resistance mechanism

基因名称	引物序列 5'-3'	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$	片段长度/bp	参考文献
<i>bla</i> _{TEM}	ATGAGTATTCAACATTTCCG ACCAATGCTTAATCAGTGAG	50	859	[19]
<i>bla</i> _{CMY}	GACAGCCTCTTTCTCCACA TGGAACGAAGGCTACGTA	55	1015	[20]
<i>bla</i> _{CTX-M}	AAGTGAAAGCGAACCGAATCT ATTGCCCGAGGTGAAGTG	61	309	[21]
<i>bla</i> _{PSE}	AATGGCAATCAGCGCTTCCC GGGGCTTGATGCTCACTCCA	59	587	[22]
<i>bla</i> _{OXA}	ACCAGATTCAACTTTCAA TCTTGGCTTTTATGCTTG	55	590	[23]

表 2 β -内酰胺类抗生素耐药机制编码基因 RT-qPCR 扩增引物
Table 2 RT-qPCR amplification primers of β -lactam antibiotic resistance mechanism coding genes

基因名称	引物序列 5'-3'	退火温度/℃	片段长度/bp
<i>bla</i> _{TEM}	GCGGTATTATCCC GTGTTG CGTCGTTTGGTATGGCTTC	60	295
<i>bla</i> _{CMY}	ACTTGACGCCGAAGCCTAT TCAGCATCTCCCAGCCTAAT	60	179
<i>bla</i> _{CTX-M}	AAGTGAAAGCGAACCGAATCT ATTGCCCGAGGTGAAGTG	60	309
<i>bla</i> _{PSE}	TACTGCGGCAAATATCATCC TGTCGTATCCCTCAAATCACC	60	148
<i>bla</i> _{OXA}	CAAATTCAATTCCTGCGTAA AAACCCTTCAAACCATCC	60	180

1.3.5 质粒 DNA 标准样品的均匀性检验

在制备的标准样品中随机抽取 12 支进行均匀性检验。依据 SN/T 1869—2007《食品中多种致病菌快速检测方法 PCR 法》对质粒 DNA 标准样品进行定性检验,采用紫外分光光度计法进行定量检验。取 20 μ L 无菌超纯水水化样品,使用 Nano Drop 超微量分光光度计测定质粒 DNA 质量,重复 3 次,取平均值。计算公式如公式(2)。

DNA 质量(ng)=DNA 浓度(ng/ μ L) $\times$ ddH₂O 水化体积(μ L) (2)

使用 Minitap 18 对所测质量进行 *F* 检验^[24-25],以此评价样品间的均匀性。

1.3.6 质粒 DNA 标准样品稳定性检验

(1)短期稳定性检验

短期稳定性主要通过模拟标准样品保存和运输环境的温度进行检验,即:将标准样品于 37 $^{\circ}$ C(不加冰常温运输)和 4 $^{\circ}$ C(加冰运输或冷藏)恒温箱中贮藏,定期随机抽样,按照 1.3.3 方法进行 DNA 质量和 RT-qPCR 检验,考察质粒 DNA 标准样品的短期稳定性。抽样频次具体为:37 $^{\circ}$ C 分别于第 1、7、14 d 各抽样 3 份;4 $^{\circ}$ C 分别于第 1、7、14、21、

30、60、90 d 各抽样 3 份进行检验。记录各样品浓度值和 RT-qPCR 的 Ct 值。所有储存温度下抽取的样品平行检测 3 次,取平均值。

(2)长期稳定性检验

DNA 标准样品于-20 $^{\circ}$ C 条件下长期冷冻保存。长期稳定性检验时直接从冷冻样品中随机抽取 3 份样品进行分析,检验方法同短期稳定性检验。抽样频次为第 1、2、3、4、5、6、10、11、12 个月,抽取的样品平行检测 3 次,取平均值。

2 结果与分析

2.1 重组质粒与重组菌构建

成功合成编码 β -内酰胺类抗生素耐药机制的 *bla*_{TEM}、*bla*_{PSE}、*bla*_{CTX-M}、*bla*_{CMY} 和 *bla*_{OXA} 基因,并将其连接到 pUC57 质粒载体,转入大肠杆菌 DH-5 α ,得到重组质粒与重组菌。对重组菌中目标基因扩增、测序和 Blast 在线比对结果表明(以 *bla*_{CTX-M} 为例,见图 1),扩增片段与目标片段序列相同,未发生任何突变,符合基因序列准确性要求。

<i>bla</i> _{CTX-M} .txt	AA	2
<i>bla</i> _{CTX-M} -PUC57-1	GAGCTCGGTACCTCGCGAATGCATCTAGATGACCCAAT AA	40
一致	aa	
<i>bla</i> _{CTX-M} .txt	GTGAAAGCGAACCGAATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAGAT	42
<i>bla</i> _{CTX-M} -PUC57-1	GTGAAAGCGAACCGAATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAGAT	80
一致	gtgaaagcgaaccgaatctgttaaatacagcgagttgagat	
<i>bla</i> _{CTX-M} .txt	CAAAAAATCTGACTTGGTTAACTATAATCCGATTGCGGAA	82
<i>bla</i> _{CTX-M} -PUC57-1	CAAAAAATCTGACTTGGTTAACTATAATCCGATTGCGGAA	120
一致	caaaaaatctgacttggttaaactataatccgattgcgga	
<i>bla</i> _{CTX-M} .txt	AAGCACGTCGATGGGACGATGTCACTGGCTGAGCTTAGCG	122
<i>bla</i> _{CTX-M} -PUC57-1	AAGCACGTCGATGGGACGATGTCACTGGCTGAGCTTAGCG	160
一致	aagcacgtc gat gggac gat gt cact ggct gagct tagcg	
<i>bla</i> _{CTX-M} .txt	CGGCCGCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCGATGAATAA	162
<i>bla</i> _{CTX-M} -PUC57-1	CGGCCGCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCGATGAATAA	200
一致	cggccgc gctacagtacagcgataacgtggcgatgaataa	

图 1 *bla*_{CTX-M} 测序比对结果

Fig.1 Sequence alignment results of *bla*_{CTX-M}

<i>bla</i> _{CTX-M} txt	GCTGATTTCACGTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACCGCG	202
<i>bla</i> _{CTX-M} PUC57-1	GCTGATTTCACGTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACCGCG	240
一致	g c t g a t t t c t c a c g t t g g c g g c c c g g c t a g c g t c a c c g c g	
<i>bla</i> _{CTX-M} txt	TTCGCCCACAGCTGGGAGACGAAACGTTCCGTCTCGACC	242
<i>bla</i> _{CTX-M} PUC57-1	TTCGCCCACAGCTGGGAGACGAAACGTTCCGTCTCGACC	280
一致	t t c g c c c g a c a g c t g g g a g a c g a a a c g t t c c g t c t c g a c c	
<i>bla</i> _{CTX-M} txt	GTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCCGGGCGATCC	282
<i>bla</i> _{CTX-M} PUC57-1	GTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCCGGGCGATCC	320
一致	g t a c c g a g c c g a c g t t a a a c a c c g c c a t t c c g g c g a t c c	
<i>bla</i> _{CTX-M} txt	GCGTGATACCACTTCACCTCGGGCAAT	309
<i>bla</i> _{CTX-M} PUC57-1	GCGTGATACCACTTCACCTCGGGCAATGACCCAAATCGGA	360
一致	g c g t g a t a c c a c t t c a c c t c g g g c a a t	

图 1(续) *bla*_{CTX-M} 测序比对结果
Fig.1 Sequence alignment results of *bla*_{CTX-M}

2.2 菌株中目标基因遗传稳定性检验

重组菌第 1、3、6、9、12、15 代培养物中目的基因 PCR 扩增和测序结果表明, 各目的基因扩增条带清晰、片段大小一致(图 2), 不同代菌株目的基因测序结果与原始序列完全一致(以 *bla*_{CTX-M} 为例, 见图 3)。 β -内酰胺类抗生素耐药性编码基因均能稳定遗传, 无基因丢失和突变现象。

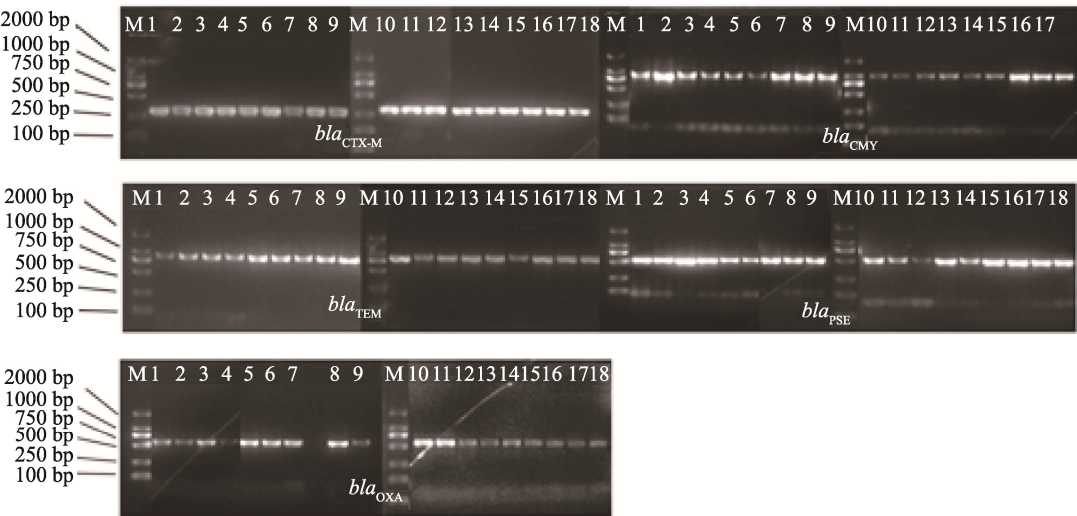
2.3 PCR 和 RT-qPCR 检测灵敏度与检出限

PCR 检测结果表明, *bla*_{TEM}、*bla*_{PSE}、*bla*_{CTX-M}、*bla*_{CMY}、*bla*_{OXA} 可检出最大稀释倍数分别为 10^5 、 10^6 、 10^6 、 10^4 、 10^5 (图 4), 检出限分别为 1.85×10^5 、 2.33×10^4 、 2.33×10^4 、 2.25×10^6 、 1.93×10^5 拷贝数/ μL 。RT-qPCR 扩增结果表明, 目

的 DNA 浓度与其扩增的 Ct 值间相关性极好, 所有回归系数(r^2 值)均大于 0.99(图 5); *bla*_{TEM}、*bla*_{PSE}、*bla*_{CTX-M}、*bla*_{CMY}、*bla*_{OXA} 可检出的最大释倍数分别为 10^7 、 10^9 、 10^8 、 10^8 、 10^{10} , 检出限浓度分别为 1850、23.3、233、225、1.93 拷贝数/ μL 。结果表明, 本研究研制的质粒 DNA 标准样品在稀释一定倍数后仍可使用 PCR 和 RT-qPCR 检出。

2.4 质粒 DNA 标准样品的均匀性检验

随机抽取标准样品, 水化后使用微量分光光度计定量检测质粒的质量, 对结果进行 *F* 检验(表 3)。结果表明各管内质粒 DNA 标准样品的质量 *F* 值均小于 $F_{\text{临界值}}=2.72$, 抽取的各质粒 DNA 标准样品间不存在显著性差异, 均匀性良好。



注: M 为 D2000 DNA Marker; 1~3、4~6、7~9、10~12、13~15、16~18 泳道分为第 1、3、6、9、12、15 代重组菌株目的基因 PCR 产物电泳条带。

图 2 β -内酰胺类抗生素耐药机制编码基因遗传稳定性 PCR 检验结果
Fig.2 Results of PCR assay for genetic stability of genes encoding resistance mechanism of β -lactam antibiotics

($P<0.05$), 如 bla_{TEM} 第 60 d 以及 bla_{PSE} 第 90 d; RT-qPCR 检测所得 Ct 值离散程度小, 无离群值, 表明各标准样品的短期储存稳定性较好。

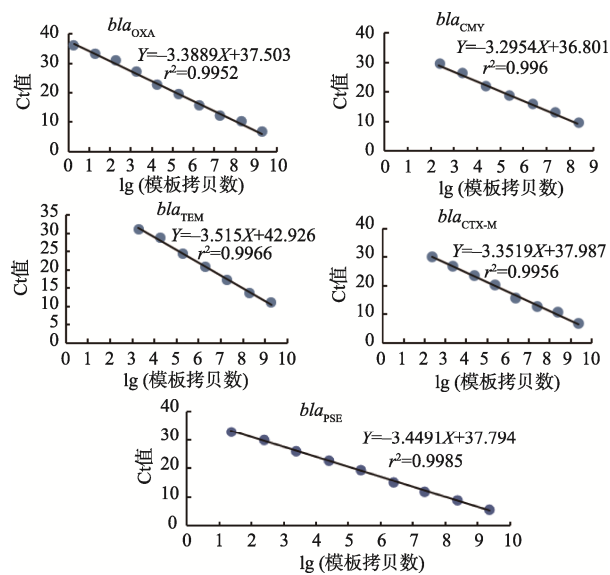


图 5 质粒 DNA 标准样品 RT-qPCR 检测时模板拷贝数和 Ct 值的相关性

Fig.5 Correlation between template copy number and Ct value in RT-qPCR assay of plasmid DNA standard sample

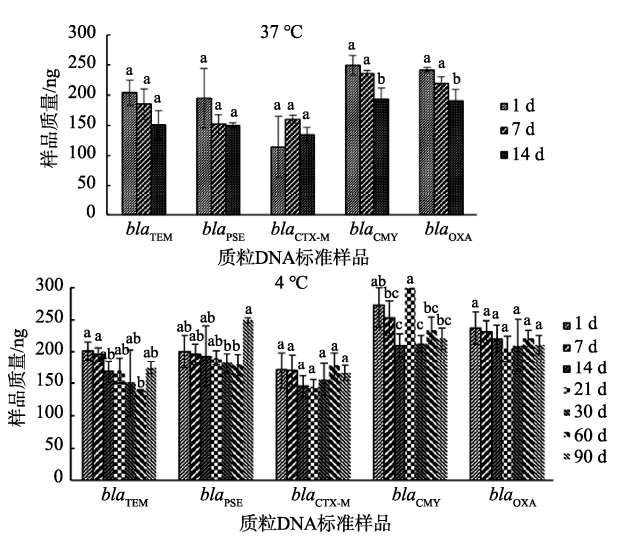
表 3 质粒 DNA 标准样品均匀性检验结果								
Table 3 Uniformity test results of plasmid DNA standard samples								
基因		SS	df	MS	F 值	F 临界值	P 值	置信概率
bla_{TEM}	组间	6.08	11.00	0.55	1.98	2.72	0.13	0.95
	组内	3.35	12.00	0.28				
bla_{PSE}	组间	5.73	11.00	0.52	1.83	2.72	0.16	0.95
	组内	3.14	12.00	0.28				
bla_{CTX-M}	组间	9.32	11.00	0.85	2.63	2.72	0.06	0.95
	组内	3.87	12.00	0.32				
bla_{CMY}	组间	9.10	11.00	0.83	1.86	2.72	0.15	0.95
	组内	5.34	12.00	0.45				
bla_{OXA}	组间	13.32	11.00	1.21	2.42	2.72	0.07	0.95
	组内	6.00	12.00	0.50				

注: SS 表示平方和, df 表示自由度, MS 表示均方差。

2.5.2 长期稳定性

质粒标准样品储存后测得管内质粒 DNA 质量如图 8 所示, RT-qPCR 扩增测得的 Ct 值如图 9 所示。结合图 8、9 可知, -20°C 贮存 12 个月, 各质粒 DNA 标准物质质量差异较小, 只有 bla_{CTX-M} 质粒标准样品第 1 个月与第 12 个月以及 bla_{OXA} 第 2 个月与第 3、12 个月抽样检测存在差异

($P<0.05$), bla_{TEM} 、 bla_{PSE} 、 bla_{OXA} 标准样品质量无显著性变化($P>0.05$); RT-qPCR 检测 Ct 值离散程度小, 无离群值, 表明各标准样品的长期储存稳定性良好。



注: 相同字母标记的数据间无统计学差异($P>0.05$), 不同字母标记的数据间有统计学差异($P<0.05$), 下同。

图 6 质粒 DNA 标准样品 37 和 4 °C 保存时稳定性检测结果
Fig.6 Stability test results of plasmid DNA standard samples stored at 37 and 4 °C

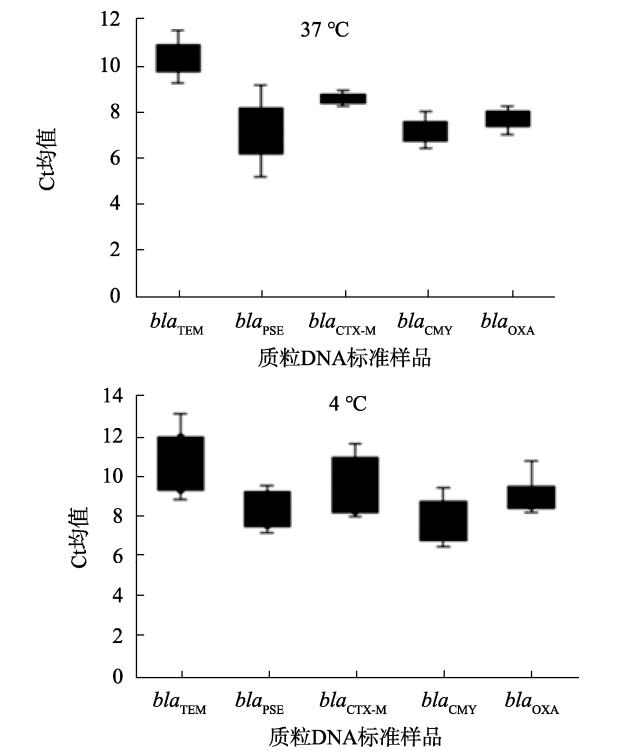


图 7 质粒 DNA 标准样品 37 和 4 °C 保存时 RT-qPCR 检测的 Ct 值
Fig.7 Ct values of RT-qPCR detection for plasmid DNA standard samples stored at 37 and 4 °C

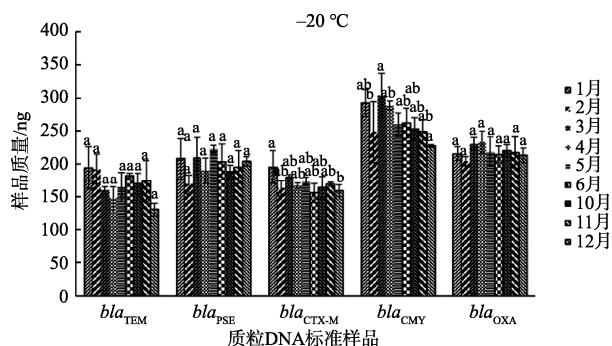


图 8 质粒 DNA 标准样品-20 °C保存时质量检测结果

Fig.8 Quality test results of plasmid DNA standard samples stored at -20 °C

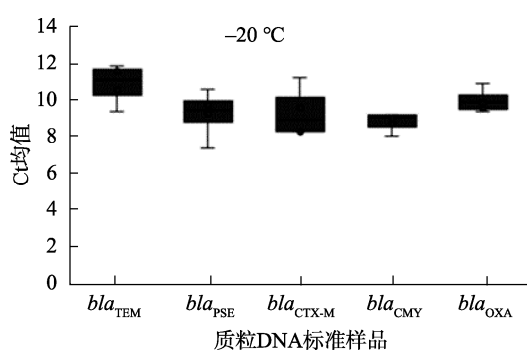


图 9 质粒 DNA 标准样品-20 °C贮存时 RT-qPCR 检测的 Ct 值

Fig.9 Ct value of RT-qPCR detection of plasmid DNA standard samples stored at -20 °C

3 结论与讨论

在多重耐药食源性致病菌日益流行的今天,研究致病菌经常携带的介导某类抗生素耐药编码基因检测用质粒 DNA 标准样品,有利于耐药性食源性微生物的检测和预防。本研究选取的目的基因片段为大肠杆菌、沙门氏菌、肺炎克雷伯氏菌和铜绿假单胞菌等常见食源性致病菌经常携带的耐药基因的共有序列,实际应用时可作为质控,快速了解检测样品中是否含有该类耐药基因。成功构建 5 种 β -内酰胺类抗生素耐药机制编码基因的重组质粒及重组菌株后,将重组菌传代培养至 15 代,发现该 5 种基因在菌株 15 代传代内均能稳定遗传且不发生突变,非常适用于质粒 DNA 标准样品的制备。使用 PCR 和 RT-qPCR 对质粒溶液最低检出限进行检验,发现 2 种检测方法的灵敏度较好,表明研究制备的质粒 DNA 标准样品能够作为耐药机制编码基因 PCR 和 RT-qPCR 检测用阳性质控。

均匀性检验是标准物质研制过程的一个重要测试,用以保证生产的标准物质单位间有相同的性质^[26]。本研究中,随机抽取多管标准样品检测其 DNA 质量, F 检验结果表明各管内各质粒 DNA 标准样品质量之间不存在显著性差异($P>0.05$),均匀性良好。稳定性检验同为标准样品制备

过程中的关键环节之一,是生产和使用实践过程中储存条件参考^[26]。研究模拟了标准样品在 4、37、-20 °C 运输及储藏条件下的稳定性,除 4 °C 下 bla_{CMY} 质粒标准样品质量差异较大外($P<0.05$),其他样品质量含量和 RT-qPCR 扩增的 Ct 值均反映出良好的稳定性。尽管标准样品在真空干燥处理前保证了样品 DNA 浓度在一定的范围,但制备时可能由于人工分装损失等情况,导致质量测量结果处于 100~300 ng 之间,因而有的样品在不同时段测量的数据有一定差异性($P<0.05$)。另外,质粒 DNA 标准样品在贮藏过程中也可能发生自然降解,使质量呈现下降趋势,但总体水平仍然符合标准要求,贮藏稳定性良好。

综上所述,本研究制备得到的 β -内酰胺类抗生素耐药机制编码基因 bla_{TEM} 、 bla_{PSE} 、 bla_{CTX-M} 、 bla_{CMY} 、 bla_{OXA} 质粒 DNA 标准样品,目的基因遗传稳定性、标准样品的均匀性和贮存稳定性良好。研制得到的质粒 DNA 标准样品可为广泛流行的食源性致病菌 β -内酰胺类抗生素耐药编码基因快速检测提供物质参考,进一步提升微生物检测技术的精准和快速化,保障食品安全。

参考文献

- [1] 王巧云. 国际标准物质数据库 COMAR 及有证标准物质[J]. 岩矿测试, 2014, 33(2): 155-167.
- [2] 蔡大川. 浅谈我国标准物质发展趋势[J]. 中国计量, 2014, (2): 79-80.
- [3] JING RR, WANG HM, JU SQ, *et al.* Reference materials for molecular diagnostics: Current achievements and future strategies [J]. Clin Biochem, 2018, 56: 11-17.
- [4] 卢晓华, 汪斌, 郭敬, 等. 2015—2016 国家有证标准物质资源发展分析 [J]. 中国计量, 2017, (3): 82-85.
- [5] 程涛, 田玉平. 食品类标准物质的发展[J]. 中国计量, 2012, (8): 80-81.
- [6] 李秀琴, 逯海, 李红梅, 等. 食品安全化学计量技术与标准物质发展 [J]. 食品安全质量检测学报, 2018, (15): 3891-3896.
- [7] 瞿洪仁, 骆海朋, 李景云, 等. 食品检测用大肠埃希氏菌标准物质的研制[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(17): 6763-6769.
- [8] 李妍, 罗超, 李兰英, 等. 奶粉中金黄色葡萄球菌标准样品的均匀性和

- 稳定性研究[J]. 化学试剂, 2019, 41(2): 177–181.
- LI Y, LUO C, LI LY, *et al.* Study on uniformity and stability of *Staphylococcus aureus* standard samples in milk powder [J]. Chem Reagent, 2019, 41(2): 177–181.
- [9] 林杰, 柯璐, 蔡妮娜, 等. 副溶血性弧菌标准物质制备的研究[J]. 中国饲料, 2020, (9): 38–44.
- LIN J, KE L, CAI NN, *et al.* Study on preparation of reference materials for *Vibrio parahaemolyticus* [J]. China Feed, 2020, (9): 38–44.
- [10] 瞿洪仁, 骆海朋, 李景云, 等. 食品检测用鼠伤寒沙门氏菌标准物质的研制[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(17): 6810–6816.
- QU HR, LUO HP, LI JY, *et al.* Preparation of *Salmonella typhimurium* reference material for food detection [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(17): 6810–6816.
- [11] 任秀, 白继超, 王亚萍, 等. 6 种克罗诺杆菌精准鉴定及标准物质的制备研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(17): 6817–6825.
- REN X, BAI JC, WANG YP, *et al.* Study on accurate identification of 6 kinds of *Cronobacter* spp. and preparation of standard substances [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(17): 6817–6825.
- [12] 柯璐. 含鸡肉基质的肠炎沙门氏菌及其核酸标准物质的研制[D]. 福州: 福建农林大学, 2013.
- KE L. Preparation of *Salmonella enteritidis* containing chicken matrix and its nucleic acid reference material [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2013.
- [13] VALLEJO CV, TERE CP, CALDERON MN, *et al.* Development of a genomic DNA reference material for *Salmonella enteritidis* detection using polymerase chain reaction [J]. Mol Cell Probes, 2020, 55(12): 101690.
- [14] VALLEJO CV, TERE CP, CALDERON MN, *et al.* Development of a genomic DNA reference material for *Salmonella enteritidis* detection using polymerase chain reaction [J]. Mol Cell Probe, 2021, 55: 101690.
- [15] 夏丹丹, 赵莹莹, 马盼盼, 等. 大肠杆菌 DNA 定性标准物质的制备及在枸杞子污染检测中的应用[J]. 食品科学, 2020, (18): 267–274.
- XIA DD, ZHAO YY, MA PP, *et al.* Preparation of *E. coli* DNA qualitative reference material and its application in the detection of *Lycium barbarum* contamination [J]. Food Sci, 2020, (18): 267–274.
- [16] 冯亚亚, 郭晶, 李玉保, 等. 禽流感 DNA 疫苗研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47(11): 3667–3675.
- FENG YY, GUO J, LI YB, *et al.* Research progress of DNA vaccine against avian influenza [J]. Chin J Anim Husband Vet Med, 2020, 47(11): 3667–3675.
- [17] 李飞武, 闫伟, 李葱葱, 等. 一种检测大豆转基因成分的质粒 DNA 标准分子及其应用: 中国, 111560456A[P]. 2020-05-21.
- LI FW, YAN W, LI CC, *et al.* The invention relates to a standard plasmid DNA molecule for detecting soybean transgenic components and its application: CN, 111560456A [P]. 2020-05-21.
- [18] 严安心, 陈静, 刘洪迪, 等. 人 D6S1043-1 型 STR 质粒 DNA 标准物质的研制[J]. 生物技术进展, 2020, 10(6): 630–636.
- YAN ANX, CHEN J, LIU HD, *et al.* Preparation of human D6S1043-1 STR plasmid DNA standard material [J]. Curr Biotechnol, 2020, 10(6): 630–636.
- [19] YIIN A. Antimicrobial resistance and extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) genes in *E. coli* isolated from equine fecal samples in turkey [J]. J Equine Vet Sci, 2021, 101(3): 103461.
- [20] MOFFAT J, CHALMERS G, REID-SMITH R, *et al.* Resistance to extended-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* and other Enterobacterales from Canadian turkeys [J]. PLoS ONE, 2020, 15(9): e0236442.
- [21] KIRATISIN P, APISARNTHANARAK A, LAESRIPA C, *et al.* Molecular characterization and epidemiology of extended-spectrum-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates causing health care-associated infection in Thailand, where the CTX-M family is endemic [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(8): 2818–2824.
- [22] QIAO J, ZHANG Q, ALALI WQ, *et al.* Characterization of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs)-producing *Salmonella* in retail raw chicken carcasses [J]. Int J Food Microbiol, 2017, 248: 72–81.
- [23] YU B, ZHANG Y, YANG L, *et al.* Analysis of antibiotic resistance phenotypes and genes of *Escherichia coli* from healthy swine in Guizhou, China [J]. Onderstepoort J Vet Res, 2021, 88(1): 1–8.
- [24] 李鹏刚, 刘众宣. 标准物质的均匀性检验[J]. 机械工程师, 2010, (8): 32–33.
- LI PG, LIU ZX. Uniformity test of reference materials [J]. Mech Eng, 2010, (8): 32–33.
- [25] 阙莹, 张正东. 标准物质均匀性检验统计量 F 的判断[J]. 中国计量, 2010, (4): 78–79.
- KAN Y, ZHANG ZD. Judgment of homogeneity test statistic F of reference materials [J]. China Metrol, 2010, (4): 78–79.
- [26] MARCHEZI TTB, VIEIRA LV, DE SENA RC, *et al.* Preparation of a reference material for crude oil trace elements: Study of homogeneity and stability [J]. Microchem J, 2020, 155: 104799.

(责任编辑: 张晓寒 于梦娇)

作者简介



陈 进, 硕士研究生, 主要研究方向为食品科学。

E-mail: cxhchenjin@126.com



杨保伟, 博士, 教授, 主要研究方向为食品科学。

E-mail: ybwsheng@nwsuaf.edu.cn