

## 技术与方法

泛耐药细菌 NDM-1 基因 Taqman PCR  
快速检测方法的建立\*

杜昕颖\*\* 汪舟佳\*\* 王玉飞 邱少富 袁 静 宋宏彬 孙岩松 陈泽良\*\*\* 黄留玉\*\*\*

(军事医学科学院疾病预防控制中心 北京 100071)

**摘要** 产 NDM-1 (New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase 1, I 型新德里金属  $\beta$ -内酰胺酶) 细菌是新近报道的一种泛耐药细菌, 由于对绝大多数常用抗生素均耐药, 又被称为超级细菌。目的: 建立一种可快速检测泛耐药细菌 NDM-1 基因的 Taqman 探针实时荧光定量 PCR 法。方法: 根据 NDM-1 基因序列, 设计引物和 Taqman 探针, 建立 Taqman 探针实时定量 PCR 检测方法, 对方法的敏感性、重复性和特异性进行了评价, 并对临床模拟标本中的产 NDM-1 细菌进行了检测。结果: 该方法在 9 个浓度 ( $5 \times 10^0 \sim 5 \times 10^8$  拷贝) 梯度范围内呈现很好的线性关系, 检测灵敏度可达 5 个质粒拷贝, 与不含 NDM-1 基因的肠杆菌无交叉反应, 对尿液模拟标本的检出限为 10 CFU, 可快速准确地检出临床样本中分离的 NDM-1 阳性菌株。结论: 建立的 Taqman 探针实时荧光定量 PCR 法具有快速、简单、灵敏度高和特异性强等优点, 可应用于临床上泛耐药细菌 NDM-1 基因的核酸检测。

**关键词** NDM-1 荧光定量 PCR 检测**中图分类号** Q819

2010 年 8 月, Lancet. Inf. Dis 杂志报道<sup>[1]</sup>, 在印度、巴基斯坦和英国发现一些泛耐药的革兰氏阴性细菌, 这些细菌由于含有 NDM-1 基因 (新德里  $\beta$  内酰胺酶 1, New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase 1), 而对多种抗生素耐药, 被称之为“超级细菌”。目前全球已有 170 多人感染了这种超级细菌, 并已蔓延至美国、加拿大、澳大利亚、比利时、荷兰和日本等国。目前研究发现带有 NDM-1 基因的超级细菌主要在住院病人中引起感染, 特别是免疫力低下、正常菌群失调的病人中容易引起感染, 感染部位通常为血液、尿道、肺部和伤口等<sup>[2-4]</sup>。

含有 NDM-1 基因的超级细菌对人类健康的危害目前还不可估计<sup>[5-6]</sup>, 但是, 监测和检测含有该基因的细菌, 并为临床药物治疗提供依据, 对于进一步规范合理

用药, 预防抗生素的滥用和耐药性的产生及广泛传播具有重要意义。为了有效地检测产 NDM-1 细菌, 我们根据 NDM-1 基因序列设计引物和 TaqMan 探针, 建立一种快速、特异、敏感的检测产 NDM-1 细菌的定量 PCR 方法, 并用尿液模拟标本对建立的方法进行评价。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验菌株

大肠埃希菌 ETEC、EAEC、EPEC、EHEC、宋内志贺氏菌、伤寒沙门氏菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌均为本室保存菌株。NDM10918 为本实验室检测出的含有 NDM-1 基因的鲍曼不动杆菌。

### 1.2 仪器与试剂

IQ5 荧光定量 PCR 仪; DYY-12 型电脑三恒多用电泳仪; BIO-RAD 凝胶成像系统; 核酸定量仪等。

rTaq 酶购自宝生物 (大连) 有限公司; dNTPs 购自上海生工生物工程技术有限公司; PCR 产物纯化

收稿日期: 2011-01-11 修回日期: 2011-03-25

\* 传染病重大专项课题 (2009ZX10004-205) 资助项目

\*\* 并列第一作者

\*\*\* 通讯作者, 电子信箱: zeliangchen@yahoo.com; huangliuyuly@163.com

试剂盒及质粒提取试剂盒均购自天根生化科技有限公司;基因组 DNA 提取试剂盒购自 Promega 公司。

### 1.3 引物与 TaqMan 探针的设计与合成

参照 GenBank 收录的 NDM-1 基因全序列 (GeneBank: FN396876), 选择 NDM-1 基因的保守区域, 使用 ArrayDesigner 4 设计引物和探针。共设计了两组上下游引物及荧光探针。DM-1 的上游引物 DM-1-F: GATCCTCAACTGGATCAAG; 下游引物 DM-1-R: TTGGCATAAGTCGCAATC; 探针 DM-1-P: FAM-CCATACCGCCCATCTTGTCC-BHQ1。DM-2 的上游引物 DM-2-F: CTGCCTGATCAAGGACAG; 下游引物 DM-2-R: TGGCTCATCAGATCATG; 探针 DM-2-P: FAM-CCAAGTCGCTCGGCAATCTC。均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

### 1.4 模板的制备

热裂解法制备 DNA 模板: 取 1 ml 菌液于 1.5 ml 离心管中, 12000 r/min 离心 5 min, 弃上清; 将菌体沉淀用 PBS 洗涤 2 次, 重悬于 100  $\mu$ l 无菌超纯水中, 100  $^{\circ}$ C 15 min; 4  $^{\circ}$ C 放置过夜或 -20  $^{\circ}$ C 放置 30 min; 37  $^{\circ}$ C 解冻后, 12000 r/min 离心 5 min, 上清即为所需的细菌 DNA。

### 1.5 质粒标准品的制备

由于在实验初期没有 NDM-1 阳性菌株, 所以根据网上公布的 NDM-1 基因序列, 对序列中引物探针不结合的区域进行了缺失和突变, 使得到的序列只是片段, 并引入终止密码, 使片段不编码功能蛋白, 防止耐药基因的传播。由上海生工生物工程技术服务有限公司合成该 DNA 序列, 将该序列克隆到质粒 pBluescript II SK (+) (购自 TaKaRa 公司) 载体多克隆位点的 Hind III 和 BamHI 酶切位点之间, 得到重组载体 pBlue-NDM-1, 作为阳性对照质粒。使用无菌水对阳性对照质粒进行 10 倍比稀释, 稀释浓度为  $10^0 \sim 10^9$  拷贝/ $\mu$ l。

### 1.6 荧光定量 PCR 反应体系的建立

反应体系为 25  $\mu$ l, 体系组成: 10  $\times$  PCR Buffer 2.5  $\mu$ l, dNTP (10 mmol/L) 1.6  $\mu$ l,  $MgCl_2$  (25 mmol/L) 1.2  $\mu$ l, rTaq 酶 (5U/ $\mu$ l) 0.2  $\mu$ l, 上下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 0.5  $\mu$ l, 探针 (10  $\mu$ mol/L) 0.4  $\mu$ l, 模板 DNA 5  $\mu$ l, 补无菌水至 25  $\mu$ l。用 BIO-RAD IQ5 荧光定量 PCR 仪按如下程序进行扩增: 先防污染 37  $^{\circ}$ C 5 min; 然后预变性 95  $^{\circ}$ C 3 min; 最后扩增 95  $^{\circ}$ C 10 s, 60  $^{\circ}$ C 40 s, 共 40 个循环, 在每个循环的延伸结束时进行荧光信号检测。荧光通道选择 FAM。

### 1.7 荧光定量 PCR 检测方法的敏感性<sup>[7]</sup>

以 5  $\mu$ l 系列稀释的标准品为模板, 进行荧光定量

PCR 扩增, 利用 Excel 分析模板浓度与 Ct 值之间的关系, 以拷贝数的对数为横坐标, Ct 值为纵坐标绘制标准曲线, 得到趋势线和相关系数, 对实时荧光 TaqMan PCR 检测体系的检测敏感性进行评价。

### 1.8 荧光定量 PCR 检测方法的重复性

使用 Ct 值位于标准曲线中间位置的 3 个标准品对建立的反应体系分别进行 5 次重复检测, 对该方法的重复性进行评价。

### 1.9 荧光定量 PCR 检测方法的特异性

由于 NDM-1 基因常见于肠杆菌科细菌或鲍曼不动杆菌中, 我们以 7 种肠杆菌科细菌 (大肠埃希菌 ETEC、EAEC、EPEC、EHEC、宋内志贺氏菌、伤寒沙门氏菌、肺炎克雷伯菌) 以及鲍曼不动杆菌的基因组 DNA 为模板对实时荧光 TaqMan PCR 检测体系的检测特异性进行评价。

### 1.10 模拟尿液标本敏感性试验

由于产 NDM-1 细菌的感染部位通常为血液、尿道、肺部和伤口, 我们对模拟尿液标本的敏感性进行了检测。在 1 ml 的尿液标本中加入 10 倍系列稀释的 pBlue-NDM-1/DH5  $\alpha$  菌液 ( $10^0 \sim 10^5$  CFU/ml), 振荡混匀, 即为制备好的模拟样本。同时取 1 ml 尿液标本作为阴性对照。取模拟尿液标本经 2500 r/min 离心 10 min, 弃上清, 将沉淀物用 1 ml PBS 充分洗涤 2 次后用 Promega 公司的基因组 DNA 提取试剂盒提取细菌基因组 DNA, 以 DNA 作为模板进行实时荧光定量 PCR 检测, 根据扩增结果, 确定模拟尿液标本扩增的敏感性。

### 1.11 NDM-1 阳性菌株的检测

NDM10918 为本实验室检测出的含有 NDM-1 基因的鲍曼不动杆菌。将该阳性菌进行 10 倍系列稀释, 使其浓度为  $10^0 \sim 10^5$  CFU/ml, 煮沸裂解法获得阳性菌的基因组 DNA。以 DNA 作为模板, 利用建立好的荧光定量 PCR 体系进行定量 PCR 检测。

## 2 结果

### 2.1 引物和探针的筛选

以 pBlue-NDM-1 阳性质粒为模板, 分别用两组引物和探针进行扩增, 根据 Ct 值最小和荧光信号增幅最大原则进行筛选。初步筛选显示: 使用 DM-1 组合时, Ct 值为 14.63; 使用 DM-2 组合时, Ct 值为 16.96 (图 1)。因此, 选择 DM-2 作为 NDM-1 基因实时荧光定量 PCR 检测的引物、探针组合。

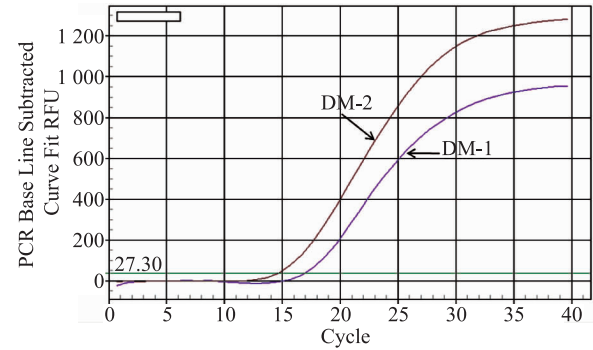


图 1 引物和探针的筛选

Fig. 1 Screening of primers and probe

2.2 反应敏感性

将阳性质粒的浓度稀释到  $10^0 \sim 10^9$  拷贝/ $\mu\text{l}$ ,用质粒稀释物作为模板进行扩增,结果显示,当浓度范围在  $5 \times 10^0 \sim 5 \times 10^8$  拷贝时,扩增曲线呈现 Ct 值随浓度降低而增大的趋势(图 2),表明在这个范围内能够准确定量。根据反应体系中的模板量和扩增的 Ct 值,计算得到标准曲线的公式, $y = -3.1372x + 38.201$ ,相关系数为 0.9963 (图 3),荧光定量 PCR 反应的扩增效率为 102.5%。标准曲线显示,本研究建立的 NDM-1 基因实时荧光 TaqMan PCR 检测方法有 9 个数量级的线性检测范围,最低检出限为 5 拷贝/反应,说明建立的该检测方法具有非常高的灵敏度。

2.3 反应重复性

选取  $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$  拷贝/ $\mu\text{l}$  3 个浓度的质粒标准品,对建立的反应体系分别进行 5 次重复检测,并计算 Ct 值的变异系数 CV%,结果见表 1。从表中可以看出,

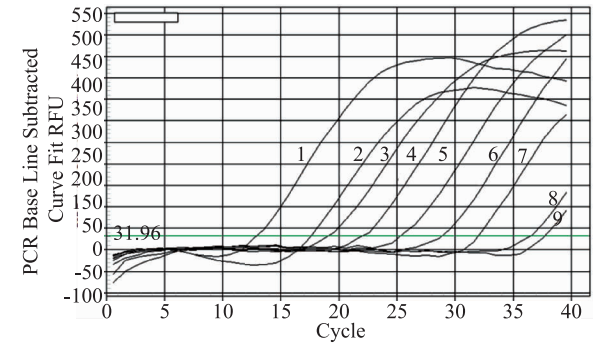


图 2 10 倍系列稀释 pBlue-NDM-1 质粒标准品的实时荧光定量 PCR 扩增曲线

Fig. 2 Amplification plot using 10-fold serial dilutions of plasmid pBlue-NDM-1

Note: Curve 1 to 9 was corresponding to  $10^8 \sim 10^0$  copy/ $\mu\text{l}$

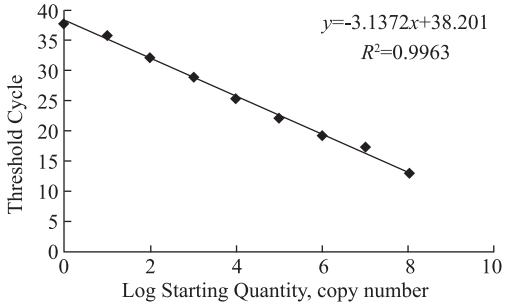


图 3 NDM-1 基因实时定量 PCR 检测的标准曲线

Fig. 3 Quantification standard curve of NDM-1 gene using serial dilutions of plasmid DNA

这 3 个浓度定量 PCR 检测 Ct 值的 CV% 均小于 10%,说明建立的该检测方法具有较好的重复性。

表 1 重复性检测结果  
Table 1 The results of repeatability

质粒浓度 (拷贝/ $\mu\text{l}$ )	荧光定量 PCR 检测 Ct 值					CV%
	1	2	3	4	5	
$10^4$	25.65	25.19	24.87	26.01	25.78	1.812
$10^5$	22.51	22.82	23.31	22.97	23.52	1.7324
$10^6$	19.38	19.89	20.13	20.32	18.99	2.778

2.4 反应特异性

采用荧光定量 PCR 方法对阳性对照质粒、7 种肠杆菌科细菌(大肠埃希菌 ETEC、EAEC、EPEC、EHEC、宋内志贺氏菌、伤寒沙门氏菌、肺炎克雷伯菌)以及鲍曼不动杆菌的基因组 DNA 进行扩增,结果如图 4 所示,仅有阳性质粒扩增后呈现 S 型扩增曲线,其他细菌及阴性对照均没有扩增,说明建立的该检测方法具有非常高的特异性。

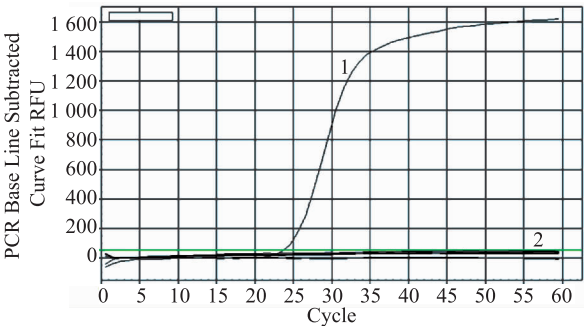


图 4 特异性实验扩增结果

Fig. 4 The results of specifcity detection

1: The Amplification plot of positive plasmid; 2: The Amplification plot of other bacterial and negative control

## 2.5 模拟标本检测

对菌量为  $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$ 、 $10^0$  CFU 的模拟尿液标本及阳性、阴性对照进行定量 PCR 扩增,结果见图 5。从图中可以看出,模拟尿液标本的最低检出限为 10 CFU,说明建立的该检测方法对于模拟标本仍具有非常高的灵敏度。

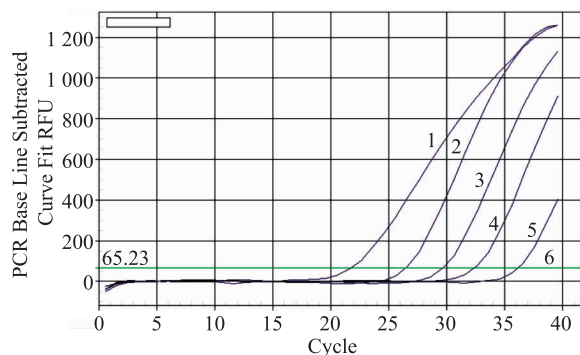


图 5 模拟标本灵敏度实验扩增结果

Fig. 5 The results of simulated urine specimens' sensitivity detection

Note: Curve 1 to 6 was corresponding to  $10^5 \sim 10^0$  CFU per system

## 2.6 临床阳性菌株检测

NDM10918 为本实验室检测出的含有 NDM-1 基因的鲍曼不动杆菌。对菌量为  $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$ 、 $10^0$  CFU 的阳性菌株进行定量 PCR 扩增。实验结果表明阳性菌株的最低检出限为 10 CFU,表明建立的该检测方法可用于临床样本中阳性菌株的检测。

## 3 讨论

NDM-1 全称 New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase 1(I 型新德里金属  $\beta$ -内酰胺酶)。这种酶可分解  $\beta$ -内酰胺环结构,因此可使任何含  $\beta$ -内酰胺环结构的蛋白质失效<sup>[8,9]</sup>。由于目前为止临床最常用的抗生素,包括青霉素与头孢菌素,以及新发展的头霉素类、硫霉素类、单环  $\beta$ -内酰胺类等其他非典型  $\beta$ -内酰胺类抗生素,都含有  $\beta$ -内酰胺环结构,因此携带这种酶的细菌可以使几乎所有临床常用抗生素失效。产 NDM-1 病菌甚至对碳青霉烯类(carbapenems)抗生素也具有耐药性,而碳青霉烯类抗生素通常被认为是紧急治疗抗药性病症的最后方法。NDM-1 基因可在细菌中广泛复制和转染,今后将可能在更多的细菌中播及,因此产 NDM-1 的细菌又被称为“超级细菌”。由于 NDM-1 的基因序列已经

公布,因此,可以建立针对该基因的分子检测方法,从而来确定菌株是否携带 NDM-1 基因,为临床药物治疗提供依据。

实时荧光定量 PCR 技术是一种在 PCR 基础上建立的新技术,它可同时完成扩增和检测,具有快速、敏感、特异等优点<sup>[10]</sup>。本研究以 NDM-1 基因的保守区域为靶标序列,建立了 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测产 NDM-1 细菌的方法。

实时荧光定量 PCR 方法学建立的关键是要有可靠稳定的标准品。由于在实验初期建立定量 PCR 方法时我国尚没有 NDM-1 阳性菌株,所以我们根据网上公布的 NDM-1 基因序列,对序列中引物探针不结合的区域进行了缺失和突变,使得到的序列只是片段,并引入终止密码,使片段不编码功能蛋白,防止耐药基因的传播。合成该 DNA 序列后将该序列克隆到质粒 pBluescript II SK (+) 上,从而得到阳性对照质粒 pBlue-NDM-1。为保证所建立方法的灵敏度,我们设计了两组上下游引物和荧光探针,以阳性质粒为模板进行了定量 PCR 扩增,选取了 Ct 值较小和荧光信号增幅较大的 DM-2 作为 NDM-1 基因实时荧光定量 PCR 检测的引物、探针组合。实验结果表明,我们建立的 Taqman 荧光定量 PCR 方法具有非常高的灵敏度,在 9 个浓度( $5 \times 10^0 \sim 5 \times 10^8$  拷贝)梯度范围内呈现很好的线性关系,检测灵敏度可达 5 个质粒拷贝;对于模拟尿液标本的检出限仍可达 10 CFU。此外,该方法具有良好的重复性和特异性,与不含 NDM-1 基因的肠杆菌及鲍曼不动杆菌无交叉反应。而且该方法可快速准确地检出临床样本中分离的 NDM-1 阳性菌株。实验结果证实建立的 Taqman 荧光定量 PCR 方法能快速、准确地检测出产 NDM-1 细菌,可用于临床样本中泛耐药细菌 NDM-1 基因的核酸检测,诊断细菌中是否含有 NDM-1 耐药基因,对保障人类健康、控制超级细菌传播和人民用药安全意义重大。

## 参考文献

- [1] Kamarasamy K, Toleman M A, Walsh T R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance in India, Pakistan, and the UK: a prospective survey. *Lancet Infect Dis*, 2010, 10(9): 597-602.
- [2] Struelens M J, Monnet D L, Magiorakos A P, et al. New Delhi metallo-beta-lactamase 1-producing *Enterobacteriaceae*: emergence and response in Europe. *Euro Surveill*, 2010, 15 (46): 19716.
- [3] Arya S C, Agarwal N. International travel with acquisition of

- multi-drug resistant Gram negative bacteria containing the New Delhi metallo-beta-lactamase gene, bla (NDM-1). Travel Med Infect Dis, 2011, 9(1): 47-48.
- [4] Mulvey M R, Grant J M, Plewes K, et al. New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. Canada Emerg Infect Dis, 2011, 17(1): 103-106.
- [5] Marra A. NDM-1: a local clone emerges with worldwide aspirations. Future Microbiol, 2011, 6: 137-141.
- [6] Moellering R C Jr. NDM-1—a cause for worldwide concern. N Engl J Med, 2010, 363(25): 2377-2379.
- [7] 杜昕颖,孙宏迪,王玉飞,等. O1 群霍乱弧菌实时荧光定量 PCR 快速检测方法的建立. 生物技术通讯, 2010, 21(5): 686-690.
- Du X Y, Sun H D, Wang Y F, et al. Letters in Biotechnology, 2010, 21(5): 686-690.
- [8] 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. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53: 5046-5054.
- [9] Pillai D R, McGeer A, Low D E. New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1 in *Enterobacteriaceae*: emerging resistance. CMAJ, 2011, 183(1): 59-64.
- [10] Espy M J, Uhl J R, Sloan L M, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. Clin Microbiol Rev, 2006, 19: 165-256.

## Development of a Rapid TaqMan Real-time PCR Assay for Detection of NDM-1

DU Xin-ying WANG Zhou-jia WANG Yu-fei QIU Shao-fu YUAN Jing

SONG Hong-bin SUN Yan-song CHEN Ze-liang HUANG Liu-yu

(Institute of Disease Control and Prevention, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China)

**Abstract** The gene for NDM-1 (New Delhi metallo-beta-lactamase 1) is one member of a large gene family that encodes beta-lactamase enzymes. Bacteria that produce NDM-1 often referred to in the news media as "superbugs" because these bacterial are usually resistant to most antibiotics and infections caused by them are difficult to treat. NDM-1 gene was used for design of PCR primers and Taqman probe. Then a real-time quantitative PCR array for rapid detection of bacteria that produce NDM-1 was developed and its specificity, sensitivity and repeatability were tested. Simulated urine specimens were used to assess the assay. A linear relationship was consistently obtained for input loads of  $5 \times 10^0 \sim 5 \times 10^8$  copies per assay. And the sensitivity of constructed assay method was 5 copies per reaction. No products were observed for strains of *Enterobacteriaceae* and only positive controls showed positive amplifications, indicating that the PCR assay is specific. The detection limit for simulated urine specimens was 10 CFU. These results indicated that the TaqMan real-time PCR assay described here is specific, sensitive and rapid for the detection of bacteria that produce NDM-1, and this assay could be used to detect the clinical specimens.

**Key words** NDM-1 Real time PCR Molecular detection