

• 论 著 •

毛细管直接 PCR 方法快速鉴定 NDM-1 阳性细菌*

周小棉¹, 刘大渔¹, 黄华霖²

(1. 广州医学院附属广州市第一人民医院检验科 510180; 2. 广州医学院检验系 2006 级, 广州 510182)

摘要:目的 建立一种无需核酸提取预处理的毛细管 PCR 方法, 用于新德里金属酰胺酶(NDM-1)阳性细菌的快速鉴定。方法 考察在直接加入细菌培养液条件下, 两种改良型 DNA 聚合酶 Terra 和 MightyAmp DNA 聚合酶对 NDM-1 编码基因的扩增效果。选用其中一种 DNA 聚合酶进行毛细管 PCR, 确定其对于 NDM-1 阳性细菌的检测限。结果 当分别向 25 μ L PCR 反应体系加入 1、3、5、7 μ L 细菌培养液条件下, 两种 DNA 聚合酶均能有效扩增 NDM-1 编码基因序列, Terra DNA 聚合酶效果较好。采用两步法毛细管 PCR 扩增 NDM-1 编码基因, 3 μ L 反应体积条件下, 40 个循环反应在 20 min 内完成。结论 应用改良型 DNA 聚合酶可以免去细菌核酸纯化步骤直接进行 PCR。免核酸提取扩增结合毛细管 PCR 方法可以显著缩短核酸分析时间, 适合于 NDM-1 阳性细菌的快速鉴定。

关键词:聚合酶链反应; 基因; 诊断; 新德里金属酰胺酶**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2011.13.002**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2011)13-1404-03

NDM-1 (+) bacteria screening using capillary PCR and direct PCR amplification method*

Zhou Xiaomian¹, Liu Dayu¹, Huang Hualin²

(1. Department of Clinical Laboratory, Guangzhou First Municipal People's Hospital, Guangzhou 510180, China;

2. Grade 2006, Department of Laboratory Science, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510182, China)

Abstract: **Objective** To develop a DNA extraction-free in-capillary PCR method for the fast identification of bacteria carrying New Delhi Metallo-beta-Lactamase (NDM-1). **Methods** Amplification yields using two DNA polymerases developed for DNA extraction-free PCR were investigated, respectively. The limit-of-detection of this method was also identified. **Results** The two DNA polymerases could amplify directly from culture medium containing bacteria. Coarse bacteria sample could be added up to 30% the reaction volume and showed no inhibitory effect. The NDM-1 encoding gene was analyzed using a two-step capillary PCR method. With 3 μ L reaction volume, an 40-cycle DNA amplification was completed in 20 minutes. **Conclusion** The improved DNA polymerase allows to skip DNA extraction and purification, and go directly to PCR amplification with coarse bacteria sample. The analysis time was greatly shortened using the method combined capillary PCR and direct PCR Amplification. The short analysis time, simplified operation and low sample consumption render the micro-device a potential point-of-care platform for NDM-1 (+) bacteria screening.

Key words: polymerase chain reaction; genes; diagnosis; New Delhi metallo-beta-lactamase

含有“新德里金属酰胺酶”(New Delhi metallo-beta-lactamase, NDM-1)耐药基因的细菌在印度、巴基斯坦地区首先被报道^[1]。这类细菌对多种抗菌剂产生耐药, 并可在细菌中广泛复制和转染, 因而被称为“超级细菌”。基因分析显示, “超级细菌”的多药耐药性状由 NDM-1 编码基因控制^[2]。由于这类细菌的广谱耐药特性, 有必要进行早期快速鉴定, 以为临床治疗提供及时准确的指导信息。传统基于细菌培养和药物敏感性测试方法虽然有效, 但由于花费时间较长, 难以实现快速检测。因此, 临床工作中需要快速有效的 NDM-1 阳性细菌鉴定方法。

微全核酸分析系统的发展为现场快速检测提供了解决方案。微全核酸分析系统主要包括 DNA 纯化、扩增与检测等功能单元。前期报导了多种基于微流控芯片平台的微全核酸分析系统, 这些系统显示出微型化、集成化、低消耗以及分析快速的优势^[3-9]。然而, 这类芯片微全核酸分析系统也面临一些问题, 如加工和使用成本高、控制复杂等。针对这一问题, 近期许

多研究都致力于开发低成本微型化核酸分析系统。使用玻璃^[10-11]和聚四氟乙烯 (polytetrafluoroethylene, PTFE) 材质毛细管^[12]为反应器的振荡流 PCR 装置为低成本微全核酸分析系统的实现带来了希望。振荡流 PCR 装置使用压力发生器或微量注射泵驱动 PCR 液滴在不同恒定温区往复运动, 因温度变化时间缩短所以有利于缩短反应时间^[10-12]。此外, 上述系统使用标准毛细管作为 PCR 反应器, 因而具有成本优势。毛细管振荡流 PCR 系统面临的问题是未能将核酸提取与纯化集成于系统之中, 因而尚不能实现集成化核酸分析。

近期出现的一系列免核酸提取 DNA 扩增试剂为简化核酸分析带来了希望。这些试剂可以跳过核酸纯化, 直接从样本中扩增 DNA。目前, 这类试剂所使用的 DNA 聚合酶主要包括 Phusion Blood DNA Polymerase (New England Biolabs), Terra PCR Direct Polymerase (Clontech) 以及 MightyAmp DNA Polymerase (Takara) 等。这些 DNA 聚合酶的共同特点是经过了基因工程改造而具有极高反应性能, 能够耐受 PCR 抑制剂从

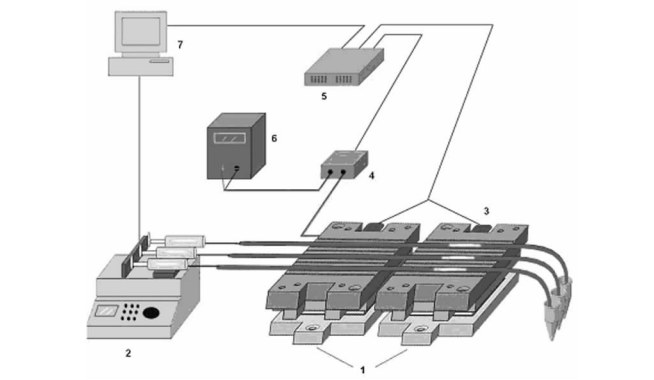
* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30870753); 科技部国际合作项目(2010DFB3380); 广东省自然科学基金资助项目(9151008901000190); 广东省医学科研基金资助项目(A2009518、A2010458); 广州市医药卫生科技重点项目(2009-ZDi-10、2009-ZDi-21); 广州市科信局重大科技专项资助项目(2010U1-E00681)和科技支撑计划资助项目(2010J-E241-1)。

而实现从血液、组织等模板中直接扩增目的片段。Kermekchiev 等^[13]已经成功地利用改造的 DNA 聚合酶(与免核酸提取 DNA 扩增试剂所使用的 DNA 聚合酶具有共同特点)从全血和 DNA 粗提物扩增 DNA。使用免核酸提取 DNA 扩增试剂可以简化操作并缩短分析时间,能够满足快速检测需要。本研究比较两种免核酸提取酶试剂 Terra PCR Direct Polymerase (Clontech) 和 MightyAmp DNA Polymerase (Takara) 直接 PCR 效果,并尝试将免核酸提取 DNA 扩增与毛细管 PCR 结合用于 NDM-1 阳性细菌快速鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 毛细管 PCR 装置 研究所用自行搭建的分析装置有 2 个温度控制模块(图 1),每个模块从上至下的结构分别为聚碳酸酯盖板、带有毛细管嵌合沟槽的加热铝板、加热片顶部固定铝板、Peltier 加热片以及加热片底部固定铝板。加热铝板的尺寸为 55 mm(长)×34 mm(宽)×4 mm(高),其表面有 10 个平行的 1 mm(宽)×1 mm(深)沟槽,间距为 2.5 mm。Peltier 加热片(北京帕尔贴半导体致冷有限公司)固定于上下方铝板之间,其间隙涂有导热硅脂以保证紧密接触和快速温度传导。聚四氟乙烯毛细管(内径 0.6 mm,外径 1 mm,美国 Cole-Palmer 公司)固定于加热铝板沟槽中,顶部安装聚碳酸酯盖板保证其与沟槽表面紧密接触。



1:加热模块;2:多通道微量注射泵;3:PT 100 温度传感器;4:继电器;5:温控器;6:电源;7:计算机。

图 1 基于毛细管的核酸分析系统装置结构示意图

嵌合毛细管的加热铝板与加热片顶部固定铝板之间镶嵌有 PT 100 温度传感器(浙江东阳三星电子厂),用以反馈加热板温度。PT 100 温度传感器与温控器(日本 Yamatake 公司)连接,后者将模拟信号转化为数字信号传输至计算机。计算机控制软件利用 PID 算法根据温度感应反馈信号至温控器,由温控器控制下位继电器是否电流至 Peltier 加热片。控制软件界面显示已经运行和尚未进行的注射泵运行程序,以及各个温度模块的设定与实际温度。毛细管末端与多通道微量注射泵连接,通过设定注射泵运行程序可以控制管中液滴的运动,见图 1。

1.1.2 实验标本 1 株 NDM-1(+)菌株由广州市第一人民医院微生物实验室提供。该菌株是从 2007~2010 年间收集的 70 株耐药肠杆菌(厄它培南 MIC≥2 μg/mL)和 55 株鲍曼不动杆菌(亚胺培南 MIC≥64 μg/mL)中筛选获得。筛选标准包括:(1)Hodge 试验。按照 CLSI 的改良法进行。用大肠埃希菌 ATCC25922 涂布 MH 平板,中间贴厄它培南纸片,接种待检菌的无菌接种环白纸片外缘向平板边缘划线,35℃过夜培

养,厄它培南抑菌圈内出现待检菌矢状生长者为产碳青霉烯酶菌株;(2)EDTA 协同试验。0.5 麦氏单位的待检菌涂布 MH 平板,贴两张亚胺培南纸片,相距其 1.0~1.5 cm,其中 1 张纸片上面滴加 0.5 mol/L EDTA 10 μL。35℃过夜培养,厄它培南加 EDTA 与厄它培南纸片抑菌圈之差大于或等于 5 mm 者为金属酶阳性;(3)NDM-1(+)编码基因检测阳性。细菌密度通过倾注平板法测定,即将细菌悬液梯度稀释后接种于普通琼脂营养平板,摇匀后培养 24 h。挑选一组适宜浓度平板进行菌落技术,估算原始溶液中细菌浓度。

1.1.3 试剂与仪器 Terra PCR Direct Polymerase (Clontech); MightyAmp DNA Polymerase (大连宝生物公司); DL2000 DNA Marker(大连宝生物公司); SYBGreen I 染料(厦门百维信);PCR 引物均由上海生工公司合成,序列为上游:5'-GGC GGA ATG GCT CAT CAC GA-3',以及下游 5'-CGC AAC ACA GCC TGA CTT TC-3',扩增片段长度 286 bp。常规 PCR 使用 MyCycler PCR 仪(美国 Bio-rad)扩增,电泳后使用凝胶成像系统(英国 UVI)观察和拍照。毛细管 PCR 产物使用自制芯片电泳分析仪分析。

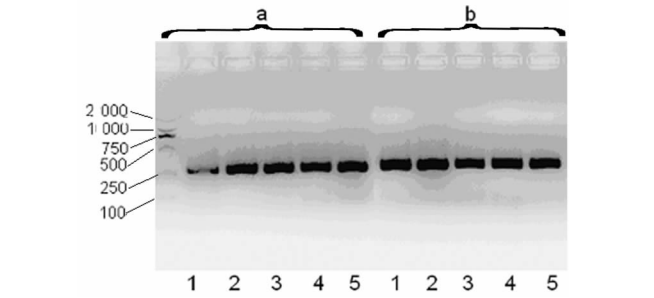
1.2 方法

1.2.1 免核酸提取常规 PCR 首先在常规台式 PCR 中,采用 Terra 和 MightyAmp DNA 聚合酶的反应体系考察免核酸提取 PCR 效果。25 μL PCR 反应体系分别加入 1、3、5、7 μL 细菌培养液。PCR 反应条件为:98℃ 2 min;98℃ 5 s,65℃ 15 s,35 个循环。每次操作中加入阳性对照和阴性对照与样品平行分析。PCR 结束后进行凝胶电泳分析。

1.2.2 免核酸提取毛细管 PCR 毛细管顺序吸入 5 μL 矿物油和 3 μL PCR 反应液。液滴首先运动至 98℃ 温区停留 2 min,继而在 98、65℃ 温区间往返运动 35 个循环。每个循环中液滴在 65℃ 温区暂停 6 s、运动 10 s;98℃ 温区运动 10 s。毛细管 PCR 产物用实验室自制的激光诱导荧光芯片分析仪检测,具体操作见先前报道^[14]。

2 结果

2.1 免核酸提取常规 PCR 效果 凝胶电泳分析显示,在直接加入细菌培养液进行 PCR 条件下,使用 Terra 和 MightyAmp DNA 聚合酶均能进行扩增。反应体系中增加细菌培养液加入量未见明显抑制效应。相比之下,使用 Terra DNA 聚合酶时扩增产量要更高一些。Terra 和 MightyAmp DNA 聚合酶均有较高的延伸速率,当使用两步法热循环反应条件时可以在 1 h 内完成 35 个循环的扩增。

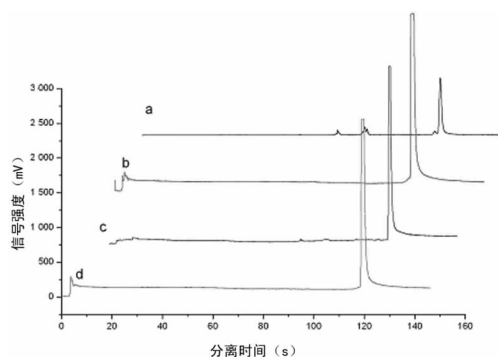


a:使用 MightyAmp DNA 聚合酶;b:使用 Terra DNA 聚合酶。1~5 号样品分别为 25 μL PCR 反应体系分别加入 1、3、5、7 μL 细菌培养液以及 2 μL 提纯 DNA 模板。

图 2 免核酸提取 PCR 产物凝胶电泳分析结果

2.2 免核酸提取毛细管 PCR 效果 在毛细管 PCR 装置上,

40 个循环的扩增在 20 min 内完成。芯片电泳分析显示,在直接加入细菌培养液进行 PCR 条件下,使用 Terra 和 Mighty-Amp DNA 聚合酶均能进行毛细管 PCR 扩增。相比之下,使用 Terra DNA 聚合酶时扩增产量要更高一些。与台式 PCR 相比,毛细管 PCR 扩增产量有所降低。



a:毛细管 PCR,使用 MightyAmp DNA 聚合酶;b:常规 PCR,使用 MightyAmp DNA 聚合酶;c:毛细管 PCR,使用 Terra DNA 聚合酶;d:常规 PCR,使用 Terra DNA 聚合酶。

图 3 毛细管 PCR 与常规 PCR 产物芯片电泳分析结果

2.3 毛细管 PCR 的检测限 经过实验考察选用包含 Terra DNA 聚合酶的试剂用于 NDM-1(+)细菌检测。将定量细菌悬液梯度稀释作为 PCR 模板以考察毛细管 PCR 方法的检测限。结合毛细管 PCR 方法与芯片电泳分析,可以检测到细菌浓度最低限约为每微升 10^1 个细菌。

3 讨 论

临床工作中迫切需要能够快速对 NDM-1 阳性细菌进行鉴定的实验方法。为此,笔者发展了一种基于毛细管 PCR 的 NDM-1 阳性细菌基因鉴定方法。毛细管 PCR 的原理在于通过减小反应体积,缩短反应体系温度变化所需时间。传统台式 PCR 采用静态式反应,即反应体系固定而反应温度循环变化。这种反应方式的弊端在于由于需要对整个温控模块进行加热和制冷,存在显著的温度变化延迟。因而,静态式反应一般需要较长的反应时间。相比之下,毛细管 PCR 使用了流动式反应,即液滴在注射泵驱动下往返于两个恒定温度区。液滴在两个温区的停留时间分别对应变性和退火/延伸。相比较加热模块,微小的 PCR 反应体积非常有利于快速温度变化。由于几乎不存在温度变化延迟效应,毛细管 PCR 反应时间显著缩短。

从前期报导来看,毛细管 PCR 具有分析时间短、试样消耗量低以及便于平行化分析的特点和优势。这种方法面临的问题是未能集成核酸提取,因而尚无法实现集成化分析。本研究使用改良的 DNA 聚合酶由于进行了结构改造,对于反应抑制物的耐受能力得到显著改善。在使用改良 DNA 聚合酶的操作中,可以省略核酸提取操作,将核酸释放与 PCR 集成在毛细管中完成。这种方法不仅简化了实验操作,而且显著缩短了分析时间。使用毛细管 PCR 方法,从样品输入到扩增反应完成在 20 min 内完成。这种分析方法简便快捷,非常适合用于 NDM-1 阳性细菌的快速鉴定。

实验结果显示,使用改良 DNA 聚合酶可以在常规 PCR 和毛细管 PCR 中有效完成扩增反应,而且对于样品加入量具有很好的宽容度。与常规 PCR 相比较,毛细管 PCR 反应时间显著缩短,但扩增产量有所降低。对此的解释是在油包水型液滴反应环境下,油水界面对样品的捕获造成一定反应抑制效应。

本工作发展了一种基于毛细管 PCR 的 NDM-1 阳性细菌

快速鉴定方法。通过使用改良型 DNA 聚合酶,省略了核酸提取步骤,将核酸释放与 PCR 集成在毛细管中完成。实验结果显示,使用免核酸提取 PCR 方法可以在毛细管中有效实现扩增。这种在毛细管中进行的免核酸提取 PCR 方法操作简便、分析快速,适合于 NDM-1 阳性细菌的快速鉴定。

参考文献

- [1] Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study[J]. *Lancet Infect Dis*, 2010(9):597-602.
- [2] Yong D, Toleman MA, Giske CG, 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]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(12):5046-5054.
- [3] Chen L, Manz A, Day PJ. Total nucleic acid analysis integrated on microfluidic devices[J]. *Lab Chip*, 2007, 7(11):1413-1423.
- [4] Liu P, Mathies RA. Integrated microfluidic systems for high-performance genetic analysis[J]. *Trends Biotechnol*, 2009, 27(10):572-581.
- [5] Zhang C, Xing D. Miniaturized PCR chips for nucleic acid amplification and analysis: latest advances and future trends[J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(13):4223-4237.
- [6] Auroux PA, Koc Y, de Mello A, et al. Miniaturised nucleic acid analysis[J]. *Lab Chip*, 2004, 4(6):534-546.
- [7] Zhang C, Xing D, Li Y. Micropumps, microvalves, and micromixers within PCR microfluidic chips: advances and trends[J]. *Biotechnol Adv*, 2007, 25(5):483-514.
- [8] Zhang C, Xu J, Ma W, et al. PCR microfluidic devices for DNA amplification[J]. *Biotechnol Adv*, 2006, 24(3):243-284.
- [9] Liu RH, Yang J, Lenigk R, et al. Self-contained, fully integrated biochip for sample preparation, polymerase chain reaction amplification, and DNA microarray detection[J]. *Anal Chem*, 2004, 76(7):1824-1831.
- [10] Chiou J, Matsudaira P, Sonin A, et al. A closed-cycle capillary polymerase chain reaction machine[J]. *Anal Chem*, 2001, 73(9):2018-2021.
- [11] Chen L, West J, Auroux PA, et al. Ultrasensitive PCR and real-time detection from human genomic samples using a bidirectional flow microreactor[J]. *Anal Chem*, 2007, 79(23):9185-9190.
- [12] Wang HY, Zhang CS, Li YY. Rapid detection of tobacco mosaic virus from crude samples on oscillatory-flow reverse transcription polymerase chain reaction microfluidics[J]. *Chin J Anal Chem*, 2009, 37(9):1286-1290.
- [13] Kermekchiev MB, Kirilova LI, Vail EE, et al. Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples[J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(5):e40.
- [14] Liu D, Zhou X, Zhong R, et al. Analysis of multiplex PCR fragments with PMMA microchip[J]. *Talanta*, 2006, 68(3):616-622.

(收稿日期:2011-04-13)