

检测产超广谱 β -内酰胺酶耐药基因寡核苷酸芯片的研制及应用*

万向阳¹, 孙 菲¹, 季 芳² (1. 湖南省出入境检验检疫局, 长沙 410014;
2. 中南大学湘雅三医院, 湖南长沙 410078)

【摘要】 目的 探讨用寡核苷酸芯片检测革兰阴性杆菌耐产超广谱 β -内酰胺酶抗生素耐药基因的可行性。**方法** 制备了检测产超广谱 β -内酰胺酶革兰阴性杆菌寡核苷酸芯片。应用该寡核苷酸芯片检测 16 例临床革兰阴性杆菌耐药株, 并与测序结果比较。**结果** 提取的 DNA 产物随机引物标记后杂交, 杂交结果差异无统计学意义。其结果与测序结果相符。**结论** 寡核苷酸芯片可以推广应用临床作为耐产超广谱 β -内酰胺酶抗生素快速诊断的一种有效方法。

【关键词】 寡核苷酸芯片; 革兰阴性杆菌; 耐药基因; 产超广谱 β -内酰胺酶

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2010.22.001

中图分类号:R969.4

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2010)22-2433-03

Development and application of oligonucleotide microarray in detecting extended spectrum β -lactamases drug resistance genes WAN Xiang-yang¹, SUN Fei², JI Fang³. 1. Hunan Entry and Exit Inspection Bureau, Hunan 410004, China; 2. The Third Xiangya Hospital of Central South University, Hunan 410078, China

【Abstract】 Objective To explore the feasibility of detecting the extended spectrum β -lactamases drug resistance genes in Gram negative bacteria by means of oligonucleotide microarray. **Methods** Probes were designed and the gene chip was fabricated according to the sequences of the 16 antimicrobial resistance gene cassette published in Genbank. And 16 Gram-negative strains were detected by using DNA microarray for identification drug resistance. Hybridization between probes and genomic DNA and the results were compared with the sequence. **Results** As a result, it is consistent with the one expected before. **Conclusion** This research implies that oligonucleotide microarray can be applied into the quick diagnosis of the extended spectrum β -lactamases drug resistance genes in Gram-negative bacteria

【Key words】 oligonucleotide microarray; Gram-negative bacteria; antimicrobial resistance gene; extend spectrum β -lactamases

近年来,临床上 3 代头孢菌素等超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)类抗生素的广泛使用^[1],使得产 ESBLs 菌株的检出率逐年上升,给临床治疗造成很大困难。传统的药敏试验在获得细菌阳性培养结果后,尚需很长时间。为了更好地控制产 ESBLs 菌的传播,指导临床医生合理使用抗生素,需要一种更快更快捷的检测方法。基因芯片作为最有效和快速检测细菌耐药的方法,具有十分广阔的应用前景。本研究探讨用寡核苷酸芯片检测革兰阴性杆菌耐 ESBLs 耐药基因的可行性,为运用寡核苷酸芯片快速诊断耐产 ESBLs 抗生素的耐药菌提供依据,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 检测耐产 ESBLs 抗生素寡核苷酸芯片的研制

1.1.1 ESBLs 耐药基因靶基因的确定 在中文文献数据库 CNKI(中国知网)和 CMCC(生物医学期刊文献数据库)、英文文献数据库 Pubmed(NLM, NIH, USA)中筛选核心文献,最后从这些文献中提取候选靶基因。

1.1.2 寡核苷酸探针的制备 Pubmed 中下载确定要扩增的靶基因片断,用 Primer Primers5.0、Oligo6.0 等生物学软件在耐药基因的碱基对齐图上 PCR 扩增区域内寻找出所有可能的

探针,从中遴选长度为 60 mer 的最佳芯片探针。结合 Clustalw 同源性分析软件找出特定耐药基因靶基因 DNA 序列的高度保守区,用 DNASTAR-MegAlign 对获得的候选探针进行基因内多重序列比对分析,去除其中存在的重复探针序列。将经过筛选的所有探针,登陆美国生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)的网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>),选择核酸序列的 BLAST,进行数据库类似检索,剔除其中物种特异性差的序列。

本研究中分别针对 blaTEM 耐药基因设计了 34 条寡核苷酸探针,针对 blaSHV 耐药基因设计了 89 条寡核苷酸探针,针对 blaOXA 耐药基因设计了 86 条寡核苷酸探针,针对 blaVEB 耐药基因设计了 94 条寡核苷酸探针,针对 blaVIM 耐药基因设计了 94 条寡核苷酸探针,针对 blaCTX 耐药基因设计了 91 条寡核苷酸探针,针对 blaPSE-耐药基因设计了 90 条寡核苷酸探针,针对 blaIMP-4 耐药基因设计了 76 条寡核苷酸探针。制作探针商业合成订单,委托美国 Agilent Technologies 公司合成。

1.1.3 寡核苷酸芯片的制备 芯片的阵列设计包括定位对照基因、空白对照和耐药基因检测探针。定位对照基因起到定位作用,同时作为阳性对照,用来监控杂交反应的有效性;空白对

* 基金项目:国家质检总局科技计划项目(2008IK203)、湖南省自然科学基金(08JJ3069)、湖南省卫生厅科研基金(B2006-091)、中南大学研究生创新项目(2009ssxt156)。

照用来监控芯片的本底 SNR。

本课题研究的芯片设计的目的是为了同时检测多种耐药基因。因此,在该芯片上,将包含有 ESBLs 耐药基因靶基因的探针,分别以每一个耐药基因的检测探针重复点样 3 次构建一

个亚阵列,在亚阵列末尾在探针数不足以形成一个方针的地方,均以空白代替;然后再将这所有的亚阵列构建为一个大阵列。每个亚阵列之间,分别以一行空白作为间隔。每个大阵列在芯片片基上重复打印 8 次。

表 1 以 blaTEM 基因为例,所设计的探针序列如下

探针名称	探针序列
CUST_1_Pi415921541	TATGCATCTGAATTAACAAATGAAC TTCTTAAAAAAGACGGTAAGGTGCAAGCTAAAAAC
CUST_2_Pi415921541	GAATTAACAAATGAAC TTCTTAAAAAAGACGGTAAGGTGCAAGCTAAAAACTCATTTAGC
CUST_3_Pi415921541	AATGAAC TTCTTAAAAAAGACGGTAAGGTGCAAGCTAAAAACTCATTTAGCGGAGTTAGT
CUST_4_Pi415921541	CTTAAAAAAGACGGTAAGGTGCAAGCTAAAAACTCATTTAGCGGAGTTAGTTATTGGCTA
CUST_5_Pi415921541	GACGGTAAGGTGCAAGCTAAAAACTCATTTAGCGGAGTTAGTTATTGGCTAGTTAAAAAT
CUST_6_Pi415921541	GTGCAAGCTAAAAACTCATTTAGCGGAGTTAGTTATTGGCTAGTTAAAAATAAAATTGAA
CUST_7_Pi415921541	AAAAACTCATTTAGCGGAGTTAGTTATTGGCTAGTTAAAAATAAAATTGAAGTTTTTTAT
CUST_8_Pi415921541	TTTAGCGGAGTTAGTTATTGGCTAGTTAAAAATAAAATTGAAGTTTTTTATCCCGGCCCG
CUST_9_Pi415921541	GTTAGTTATTGGCTAGTTAAAAATAAAATTGAAGTTTTTTATCCCGGCCCGGGGCACACT
CUST_10_Pi415921541	TGGCTAGTTAAAAATAAAATTGAAGTTTTTTATCCCGGCCCGGGGCACACTCAAGATAAC
CUST_11_Pi415921541	AAAAATAAAATTGAAGTTTTTTATCCCGGCCCGGGGCACACTCAAGATAACGTAGTGGTT
CUST_12_Pi415921541	ATTGAAGTTTTTTATCCCGGCCCGGGGCACACTCAAGATAACGTAGTGGTTTGGTTACCT
CUST_13_Pi415921541	TTTTATCCCGGCCCGGGGCACACTCAAGATAACGTAGTGGTTTGGTTACCTGAAAAGAAA
CUST_14_Pi415921541	GGCCCGGGGCACACTCAAGATAACGTAGTGGTTTGGTTACCTGAAAAGAAAATTTTATTC
CUST_15_Pi415921541	CACACTCAAGATAACGTAGTGGTTTGGTTACCTGAAAAGAAAATTTTATTCGGTGTTGT
CUST_16_Pi415921541	GATAACGTAGTGGTTTGGTTACCTGAAAAGAAAATTTTATTCGGTGTTGTTTTGTTAA
CUST_17_Pi415921541	GTGGTTTGGTTACCTGAAAAGAAAATTTTATTCGGTGTTGTTTTGTTAAACCGGACGGT
CUST_18_Pi415921541	TTACCTGAAAAGAAAATTTTATTCGGTGTTGTTTTGTTAAACCGGACGGTCTTGTTAAT
CUST_19_Pi415921541	AAGAAAATTTTATTCGGTGTTGTTTTGTTAAACCGGACGGTCTTGTTAATTTGGGTGAC
CUST_20_Pi415921541	TTATTCGGTGTTGTTTTGTTAAACCGGACGGTCTTGTTAATTTGGGTGACGCAAATTTA
CUST_21_Pi415921541	GGTTGTTTTGTTAAACCGGACGGTCTTGTTAATTTGGGTGACGCAAATTTAGAAAGCTTG
CUST_22_Pi415921541	GTTAAACCGGACGGTCTTGTTAATTTGGGTGACGCAAATTTAGAAAGCTTGCCAAAGTCC
CUST_23_Pi415921541	GACGGTCTTGTTAATTTGGGTGACGCAAATTTAGAAAGCTTGCCAAAGTCCGCCAAAATA
CUST_24_Pi415921541	GGTAATTTGGGTGACGCAAATTTAGAAAGCTTGCCAAAGTCCGCCAAAATATTAATGTCT
CUST_25_Pi415921541	GGTGACGCAAATTTAGAAAGCTTGCCAAAGTCCGCCAAAATATTAATGTCTAAATATGGT
CUST_26_Pi415921541	AATTTAGAAAGCTTGCCAAAGTCCGCCAAAATATTAATGTCTAAATATGGTAAAGCAAAA
CUST_27_Pi415921541	GCTTGCCAAAGTCCGCCAAAATATTAATGTCTAAATATGGTAAAGCAAAACTGGTTGTT
CUST_28_Pi415921541	AAGTCCGCCAAAATATTAATGTCTAAATATGGTAAAGCAAAACTGGTTGTTTCAAGTCAT
CUST_29_Pi415921541	AAAAATTAATGTCTAAATATGGTAAAGCAAAACTGGTTGTTTCAAGTCATAGTGAAATT
CUST_30_Pi415921541	ATGTCTAAATATGGTAAAGCAAAACTGGTTGTTTCAAGTCATAGTGAAATTGGGGACGCA
CUST_31_Pi415921541	TATGGTAAAGCAAAACTGGTTGTTTCAAGTCATAGTGAAATTGGGGACGCATCACTCTTG
CUST_32_Pi415921541	GCAAAACTGGTTGTTTCAAGTCATAGTGAAATTGGGGACGCATCACTCTTGAAACGTACA
CUST_33_Pi415921541	GTTGTTTCAAGTCATAGTGAAATTGGGGACGCATCACTCTTGAAACGTACATGGGAACAG
CUST_34_Pi415921541	AGTCATAGTGAAATTGGGGACGCATCACTCTTGAAACGTACATGGGAACAGGCTGTAAA

1.2 检测耐产 ESBLs 抗生素寡核苷酸芯片的应用

1.2.1 样本的制备 16 株革兰阴性杆菌临床分离株来源于中南大学湘雅三医院,均已通过常规耐药性检测。煮沸法提取细菌基因组 DNA,用超声波打断成 400~500 bp 的低相对分子质量片段,Cy3 随机引物标记。

1.2.2 杂交及清洗 按照 Agilent 杂交试剂盒操作。

1.2.3 芯片扫描 使用安捷伦专用的芯片扫描软件 Agilent scanner 对芯片进行扫描;在芯片扫描过程中,可以运用放大镜头,放大扫描区域,观察扫描图的细节;扫描结束后,点击存盘图标,将获得的扫描图像存盘。

1.2.4 芯片扫描数据的提取与分析 采用 Agilent Technologies 公司专用的数据分析软件对阳性荧光信号值、阴性荧光信号值及空白对照的背景值进行统计分析。分析并提取每一个芯片探针与样品杂交检测的信号强度值,转换为数值数据。在特异性评价的基础上,Agilent scanner 扫描软件通过数据统计,自动确定每条探针的阳性标准。将数值数据以 TXT 文件的形式导出到 Excel 表进行阳性探针数量的分析。

1.2.5 耐药基因特异性扩增片段的克隆与测序 采用非标记引物进行 PCR 扩增。获得的 PCR 产物克隆按 Promega 公司的 PGEM(r)-T Vector System 1 使用说明书操作。重组质粒的测序由上海英俊公司完成。

2 结 果

2.1 探针设计结果 以 ESBLs 类耐药基因 blaTEM、blaSHV、blaOXA、blaVEB、blaVIM、blaCTX、blaPSE、blaIMP-4 为模式靶基因,分别设计了 ESBLs 类耐药基因检测探针,基因芯片检测探针长度都是 60 mer,其他参数如退火稳定 Tm 和 GC%含量等也都是按照设计参数,进行严格控制。

表 2 芯片结果与测序结果相比较(n)

项目 (基因)	芯片结果	测序结果		
		阳性	阴性	总数
blaTEM	阳性	11	0	11
	阴性	0	5	5
	总数	11	5	16
blaSHV	阳性	5	1	6
	阴性	1	9	10
	总数	6	10	16
blaOXA	阳性	2	1	3
	阴性	0	13	13
	总数	2	14	16
blaVEB	阳性	1	0	1
	阴性	1	14	15
	总数	2	15	16
blaVIM	阳性	0	0	0
	阴性	0	16	16
	总数	0	16	16
blaCTX	阳性	10	0	10
	阴性	1	5	6
	总数	11	5	16
blaPSE	阳性	0	1	1
	阴性	0	15	15
	总数	0	16	16
blaIMP-4	阳性	0	2	2
	阴性	0	14	14
	总数	0	16	16

2.2 片打印结果 本研究构建的 ESBLs 类耐药基因检测芯片由 8 个重复的芯片阵列组成,而每个芯片阵列都是针对 ESBLs 类耐药基因检测的探针亚阵列组成。整个芯片阵列点阵规则、均匀、探针点清晰、无融点发生。在打印革兰阴性杆菌耐

药基因检测芯片之前,Agilent Technologies 公司有丰富的操作经验,因此,最终打印的革兰阴性杆菌耐药基因检测芯片阵列,没有发生漏点和间距异常等问题。

2.3 寡核苷酸芯片检测耐 ESBLs 类抗生素菌株

2.3.1 芯片检测结果 用革兰阴性杆菌耐药基因检测芯片共检测了 16 个菌株样品,耐药基因为阳性的样本在相应的探针出现阳性信号,且芯片杂交检测信号强度值计算的阳性探针率均值高,同时,阴性探针和空白对照荧光信号较弱,阳性探针率值较低。

2.3.2 芯片检测结果与测序结果比较 以 blaTEM 基因为例,芯片检测到其中 11 株证实含有该基因,5 株不含此耐药基因,与测序结果相吻合,特异性较高;两种检测方法都未检测到 blaVIM 耐药基因;芯片检测结果显示其中有 1 株临床耐药株中检测到 blaSHV、blaOXA、blaPSE 耐药基因、2 株临床耐药株中检测到 blaIMP-4 耐药基因,而 PCR 测序未发现该基因;经 PCR 测序检测出其中 1 株临床耐药株中含 blaSHV、blaVEB、blaCTX 耐药基因,但芯片检测该基因为阴性。

2.3 重复性验证 分别用本课题研制的革兰阴性杆菌芯片阵列 3 个,同时重复检测该样品 3 次。重复性试验结果表明,在同一杂交条件下,批次内和批次间的芯片都能得到明显的阳性杂交信号,说明制备的芯片具有较好的可重复性。

3 讨 论

通过上述样品的初步验证性检验证实,本课题研制的 ESBLs 类耐药基因检测芯片阵列能清楚、显著地区分不同来源的样品。

基因芯片技术作为病原微生物耐药基因检测和分型的一种平台,其检测和分型的可行性主要依赖于芯片上所固定的靶基因是否能实现这种目的,选择适合于检测基因芯片和分型基因芯片的靶基因成为用基因芯片检测和分型耐药基因的关键^[3]。基因芯片的特异性与靶基因的特异性相关,本试验为了增加基因芯片检测的特异性,避免交叉同源性,笔者针对所有的耐药基因设计 10 个以上的组合探针对于耐药基因进行检测和分型。

本研究中革兰阴性杆菌耐药基因检测芯片上全部探针都由美国 Agilent Technologies 公司合成,该公司使用喷墨技术,将体积非常小的化学物质准确地进行点样,这一技术无需接触载玻片表面,也不会引入表面接触的不均匀性,最终实现样点的一致性及其可重现性。安捷伦微阵列喷墨生产过程由获得专利技术的质量控制(QC)系统进行逐点监测,该系统会追踪样点是如何以及在何处印制的,消除样点丢失及偏离点现象,并提供全方位的 QC 系统标准,100%确保每个微阵列上每个样点的呈现,确保每个微阵列上 95%以上的样点可以充分进行杂交并可图像采集分析。

本课题组研制的基因芯片检测临床样品,芯片检测结果与测序结果仍然存在小的差异。说明本研究所设计的部分探针的特异性表现还不理想,在该芯片的下一轮优化改进时,还需要不断增加检测样品的特异性探针。

芯片重复性试验结果表明,在同一杂交条件下,批次内和批次间的芯片都能得到明显的阳性杂交信号,根据其结果分析,与临床药敏结果一致,但是不管是批次间还是批次内芯片同一探针经点的信噪比(SNR)略有差别,所以目前建立的方法只能用于细菌耐药性的定性检测。

样品制备上,当前多数公司在标记和测定前都要对样本进行一定程度的扩增以便提高检测的灵敏度。(下转第 2438 页)