

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2023.14.003

通用多重不对称 PCR 联合基因芯片实现下呼吸道病原菌及耐药基因快速检测*

刘俊杰¹, 谢海宇¹, 张艳妮¹, 陈桂柳², 何小维¹, 王 羽^{3△}

1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510641; 2. 广州万孚生物技术股份有限公司, 广东广州 510670; 3. 生物岛实验室/广州再生医学与健康广东省实验室, 广东广州 510005

摘要:目的 建立一种基于通用多重不对称聚合酶链反应(PCR)联合基因芯片的下呼吸道病原菌及耐药基因检测方法,同步实现 6 种下呼吸道常见病原菌(大肠埃希菌、鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、卡他莫拉菌)和两种碳青霉烯酶基因(blaKPC、blaVIM)快速检测。方法 针对待检病原菌及耐药基因的保守序列设计特异性引物与探针,并制备相应的基因芯片。优化多重 PCR 的反应体系和杂交参数,分析其特异度、灵敏度,并通过临床标本进行方法应用评价。结果 本研究建立的检测方法特异性强、稳定性好,能在 4 h 内特异性地鉴别单一或多重靶标。检测大肠埃希菌纯培养物的灵敏度为 10^4 copy/mL,鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌及碳青霉烯酶基因(blaKPC、blaVIM)的灵敏度均为 10^3 copy/mL,金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、卡他莫拉菌的灵敏度均为 10^2 copy/mL。与产酸克雷伯菌、黏质沙雷菌、奇异变形杆菌、表皮葡萄球菌、唾液链球菌、流感嗜血杆菌等 6 种病原菌无交叉反应。结论 基于通用多重不对称 PCR 结合基因芯片的下呼吸道病原菌及耐药基因检测方法特异性强、灵敏度高,为快速、灵敏地鉴定下呼吸道病原菌及耐药基因提供了一种有效的检测手段。

关键词:下呼吸道感染; 多重不对称聚合酶链反应; 基因芯片; 快速检测

中图分类号:R446.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2023)14-1994-07

Universal multiplex asymmetric PCR combined with gene chip to achieve rapid detection of lower respiratory tract pathogens and drug resistance genes*

LIU Junjie¹, XIE Haiyu¹, ZHANG Yanni¹, CHEN Guiliu², HE Xiaowei¹, WANG Yu^{3△}

1. College of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510641, China; 2. Guangzhou Wanfu Biotechnology Co., LTD., Guangzhou, Guangdong 510670, China; 3. Bioisland Laboratory/Guangzhou Laboratory of Regenerative Medicine and Health, Guangzhou, Guangdong 510005, China

Abstract: Objective To establish a universal multiplex asymmetric polymerase chain reaction (PCR) combined with gene chip detection method of lower respiratory tract pathogens and drug resistance genes. Simultaneous rapid detection of 6 common pathogens of lower respiratory tract (*Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*) and 2 carbapenemase genes (blaKPC, blaVIM) were realized. **Methods** Specific primers and probes were designed according to the conserved sequences of pathogenic bacteria and drug resistance genes, and the corresponding gene chips were prepared. The reaction system and hybridization parameters of multiplex PCR were optimized, the specificity and sensitivity were analyzed, and the method application was evaluated by clinical samples. **Results** The detection method established in this study had high specificity and good stability, and could specifically identify single or multiple targets within 4 hours. The detection sensitivity of pure culture of *Escherichia coli* was 10^4 copy/mL, and the sensitivity of *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* and carbapenemase gene (blaKPC, blaVIM) were all 10^3 copy/mL. The sensitivity of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* and *Moraxella catarrhalis* was 10^2 copy/mL. There was no cross-reaction with *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus salivarius* and *Haemophilus influenzae*. **Conclusion** The universal multiplex asymmetric PCR combined with gene

* 基金项目:国家自然科学基金项目(82202582);广东省科技计划项目(2021B1212050016)。

作者简介:刘俊杰,男,在读硕士研究生,主要从事病原微生物分子诊断方面的研究。△ 通信作者,E-mail:wang_yu@grmh-gdl.cn。

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?urlId=50.1167.R.20230616.1527.002&uniplatform=NZKPT\(2023-06-19\)](https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?urlId=50.1167.R.20230616.1527.002&uniplatform=NZKPT(2023-06-19))

chip detection method of lower respiratory tract pathogens and drug resistance genes has high specificity and sensitivity, which provides an effective detection method for rapid and sensitive identification of lower respiratory tract pathogens and drug resistance genes.

Key words: lower respiratory tract infection; multiplex asymmetric polymerase chain reaction; gene chip; rapid detection

下呼吸道感染(LRTI)已经成为全球面临的重大公共卫生问题。2016 年全球约有 3.36 亿例 LRTI 患者,导致约 238 万人死亡,是全球第六大致死原因^[1]。由不同病原菌引起的 LRTI 临床表现非常相似,单凭临床症状和病理特征难以鉴别,在病原菌没有得到正确识别的情况下,可能会导致抗菌药物滥用^[2]。同时,耐碳青霉烯酶的革兰阴性杆菌在全球范围内广泛传播,碳青霉烯类抗菌药物的不合理使用是导致革兰阴性杆菌耐药率上升的重要原因^[3]。因此,快速鉴定识别呼吸道感染病原菌及其携带的耐药基因对临床准确诊断和合理用药具有重要意义。用于识别呼吸道病原菌的传统方法包括病原菌分离培养法、涂片镜检法、ELISA 和免疫荧光法等^[4],这些传统方法均存在检测周期长、操作复杂、灵敏度低等不容忽视的问题。近年来,分子检测技术的快速发展在很大程度上弥补了传统培养和免疫分析方法用于呼吸道病原菌检测的不足,大大提高了呼吸道病原菌检测的速度、灵敏度和特异度^[5]。然而,受荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测通道的限制,一次检测不超过 5 种靶标^[6-7],基因芯片结合通用多重不对称 PCR 能够有效解决这一问题。基因芯片技术是依据核酸序列碱基互补配对的原则,将被标记的 PCR 产物与固定在芯片表面的探针进行分子杂交,然后通过采集杂交信号对本进行分析,是一种特异性强、灵敏度高的基因分析方法。通用多重不对称 PCR 是在特异性引物的 5'端连接一段异源通用序列,通过特异性引物介导的第 1 阶段扩增和通用引物介导的第 2 阶段扩增实现对多种靶序列的同步、高灵敏、高特异性扩增,从而较好地解决多重 PCR 中引物相互干扰、扩增效率差等缺点,提高 PCR 的反应重数。因此,基因芯片检测技术与通用多重不对称 PCR 技术联合使用可实现二者优势互补,通用多重不对称 PCR 的扩增作用和基因芯片的多位点杂交技术可以很好地提高检测通量^[8]。本研究建立的基于通用多重不对称 PCR 联合基因芯片技术的 LRTI 病原菌及耐药基因检测方法(下称本方法)可同步检测大肠埃希菌、鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、卡他莫拉菌 6 种常见的下呼吸道病原菌和两种碳青霉烯酶基因(blaKPC 和 blaVIM),可在 4 h 内完成检测并输出结果,可有效助力临床 LRTI 的快速诊断及干预。

1 材料与方法

1.1 标准菌株 选取目标菌株和非目标菌株的标准菌株共 14 株,用于方法的建立及特异度和灵敏度的

评估。肺炎克雷伯菌(ATCC BAA-1902)、大肠埃希菌(ATCC BAA-2452)、金黄色葡萄球菌(ATCC 43300)、肺炎链球菌(ATCC 49619)、鲍曼不动杆菌(GDMCC 1.1336)、卡他莫拉菌(ATCC 25238)、弗氏柠檬酸杆菌(GDMCC 1.1337)、阴沟肠杆菌(GDMCC 1.1338)、产酸克雷伯菌(GDMCC 1.1340)、黏质沙雷菌(ATCC 8100)、奇异变形杆菌(ATCC 35659)、表皮葡萄球菌(ATCC 700566)、唾液链球菌(ATCC 13419)、流感嗜血杆菌(ATCC 49766)均购自广东省微生物种保藏中心。

1.2 仪器与试剂 赛默飞 ABI7500 实时荧光定量 PCR(qPCR)仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)、晶芯 LuxScanTM10K 微阵列芯片扫描仪(北京博奥晶典生物技术有限公司)、晶芯 BioMixerTM II 芯片杂交仪(北京博奥晶典生物技术有限公司)、sciFLEX-ARRAYER S12 非接触式超微量喷点系统(德国 Scienion 公司)、2×Lyo-Ready qPCR Mix(美国 Meridian 公司)、核酸提取及纯化试剂(广州达安基因股份有限公司)、环氧硅烷修饰芯片片基(德国 Schott 公司)、洗液 1[1×柠檬酸钠盐缓冲液(SSC)+0.1%十二烷基硫酸钠(SDS)]、洗液 2(0.1×SSC+0.1%SDS)、杂交缓冲液(美国 Boston BioProducts 公司)。

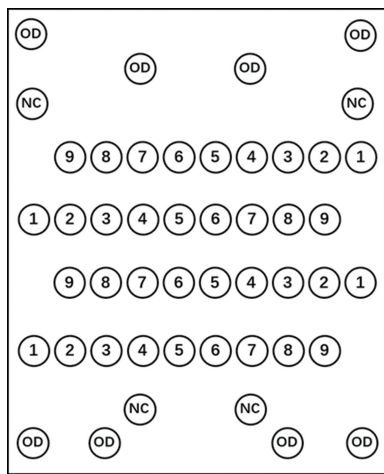
1.3 方法

1.3.1 DNA 提取 标准菌株、肺泡灌洗液和痰液均按照达安基因核酸提取及纯化试剂说明书进行标本核酸提取。

1.3.2 引物探针设计与合成 参考文献[9-14]设计与合成检测肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、大肠埃希菌、卡他莫拉菌的特异性引物。根据 GenBank 中已公布的 mt-DNA、blaK-PC、blaVIM 基因序列,使用 Primer premier 5.0 软件分别设计特异性引物,用于第 1 步 PCR 扩增。在每对特异性引物的 5'端设计一段非同源通用片段。使用 Primer premier 5.0 软件根据不对称 PCR 产物分别设计捕获探针和荧光探针,荧光探针 5'端使用 HEX 标记,捕获探针 5'端氨基化修饰并加 poly(T4)。引物探针序列由上海生工生物工程股份有限公司合成。设计的引物目标片段的序列长度为 100~300 bp,针对各靶基因设计的探针长度为 23 bp 左右。

1.3.3 芯片制备 使用点样缓冲液稀释探针至 40 μmol/L 的终浓度,混匀加入 384 孔板中。在室温和 50%相对湿度的条件下利用芯片点样仪将探针按预设程序在环氧基玻片上进行喷点式点样,点阵排列见

图 1。每个位点的点样量为 670 pL,点样直径为 100 μm,点样间距为 300 μm。将点样完毕的芯片置于敞口盒中,在 22 ℃、70%相对湿度水化过夜。在封闭液中浸泡 5 min,超纯水清洗;使用 0.1%的 SDS 溶液以 50 r/min 摇床清洗 5 min,再次用超纯水清洗后以 1 000 r/min 离心干燥,置于室温避光保存备用。



注:①为质控 DNA;②为碳青霉烯酶基因 blaKPC;③为碳青霉烯酶基因 blaVIM;④为鲍曼不动杆菌;⑤为金黄色葡萄球菌;⑥为肺炎链球菌;⑦为大肠埃希菌;⑧为卡他莫拉菌;⑨为肺炎克雷伯菌;⊙为定位探针;⊖为阴性对照。

图 1 芯片阵列

1.3.4 PCR 扩增 以 DNA 为模板,使用特异性引物进行 PCR 扩增。第 1 步 PCR 体系:2×Lyo-Ready qPCR Mix 25 μL,10 μmol/L 的上、下游特异性引物各 0.5 μL,模板 5 μL,补充 ddH₂O 至 50 μL。反应程序:94 ℃ 120 s;94 ℃ 5 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,10 个循环;94 ℃ 5 s,65 ℃ 30 s,12 个循环,产物 4 ℃ 保存。第 2 步 PCR 体系:2×Lyo-Ready qPCR Mix 25 μL,10 μmol/L 的上游通用引物 5 μL,10 μmol/L 的下游通用引物 0.25 μL,模板 5 μL(第 1 步 PCR 扩增产物),补充 ddH₂O 至 50 μL。反应程序:94 ℃ 120 s;94 ℃ 15 s,55 ℃ 15 s,72 ℃ 15 s,30 个循环,产物 4 ℃ 保存。

1.3.5 通用不对称引物浓度比的优化 通用引物的上、下游引物浓度比是影响通用不对称 PCR 产物杂交效率的关键因素。选择 8 种靶标的混合菌液作为标本进行优化,首先固定下游通用引物浓度为 50 nmol/L,然后设置不同浓度比(1 : 1、5 : 1、10 : 1、20 : 1 和 50 : 1)的上、下游引物进行多重不对称 PCR 和芯片杂交分析。

1.3.6 芯片杂交与信号分析 取 30 μL 扩增产物、80 μL 杂交缓冲液、10 μmol/L 的荧光探针各 1.6 μL,补充 ddH₂O 至 160 μL 混合均匀转移至芯片杂交仪中以 55 ℃、10 r/min 连续避光杂交 70 min。杂交完成后取出芯片,将杂交反应完毕的基因芯片置于玻片架上,分别在洗液 1、2 中清洗 2 次,每次 1 min,离心甩干。使用晶芯 LuxScan™ 10K 微阵列芯片扫描仪

采集荧光信号,设定条件: Cy3 绿色荧光通道,Power: 50%,PMT: 600,分辨率: 5 μm。分析每个样点荧光信号的中值,当某一位点的信号值大于阴性质控探针信号值加 3 倍标准偏差即判定该位点为阳性,每个靶基因设置的 4 个重复位点出现 ≥ 3 个位点为阳性,即可判定该靶标为阳性。按照上述操作,将 8 种靶标的标本核酸等量混匀作为 PCR 模板,进行杂交温度(45、50、55、60 ℃)和杂交时间(30、50、70、90 min)的优化,选择最佳杂交温度和杂交时间。

1.3.7 灵敏度试验 将各目标基因的标准模板调整至 10⁴ copy/mL 进行 10 倍梯度稀释作为模板,按照最优的反应条件进行扩增和杂交,以验证本方法的灵敏度。

1.3.8 标本检测 选取实验室检测无致病菌污染的肺泡灌洗液为基质,分别与不同目标菌液混合,制备人工模拟标本,利用本方法进行检测,验证本方法对多重感染检测的准确性。同时,收集 24 份临床痰液标本使用本方法及分离培养后的 VITEK 2 生化鉴定法、单重 qPCR 进行检测并鉴定,通过比较 3 种方法的最终检测结果,评估临床应用效果。

2 结果

2.1 不同通用引物浓度比对应的荧光信号值 通用引物的浓度比是影响通用不对称 PCR 效率的关键因素。利用通用引物不同浓度比的上、下游引物分别进行多重不对称 PCR 和芯片杂交分析见表 1。当上、下游引物浓度比为 20 : 1 时,杂交信号最强。因此,确定通用多重不对称 PCR 上游通用引物的最佳浓度为 1 000 nmol/L,下游通用引物的最佳浓度为 50 nmol/L。

表 1 不同通用引物浓度比对应的荧光信号值(A. U.)

检测靶标	1 : 1	5 : 1	10 : 1	20 : 1	50 : 1
质控 DNA	129.88	2 340.88	2 147.38	3 175.25	1 705.63
碳青霉烯酶基因 blaKPC	3.50	248.13	527.63	1 039.00	515.63
碳青霉烯酶基因 blaVIM	2.00	2.75	1.50	3.75	2.00
鲍曼不动杆菌	23.00	90.75	129.63	468.75	201.50
金黄色葡萄球菌	60.13	246.13	366.50	663.13	420.63
肺炎链球菌	7.25	33.63	60.63	84.63	87.50
大肠埃希菌	0.25	0.25	0.25	12.00	6.75
卡他莫拉菌	411.38	3 750.00	3 766.25	3 555.25	2 630.63
肺炎克雷伯菌	5.50	85.50	182.75	425.88	485.75

2.2 不同芯片杂交温度对应的荧光信号值 为选择最佳的标本杂交温度,将芯片置于 45、50、55、60 ℃ 条件下杂交 30 min 后进行荧光信号检测见表 2。在相同时间内,55 ℃ 时杂交信号最强。

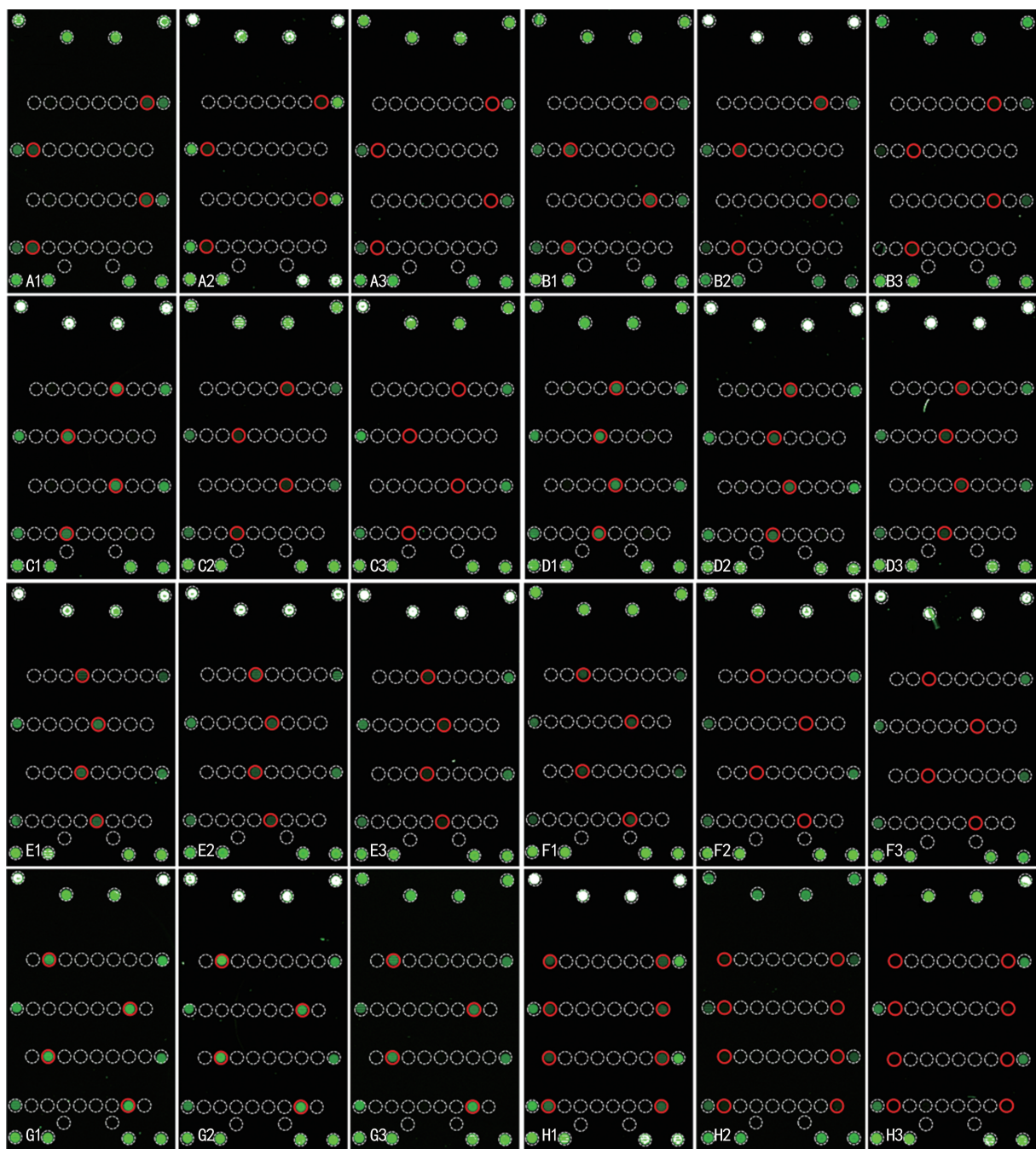
2.3 不同芯片杂交时间对应的荧光信号值 为选择最佳的标本杂交时间,将杂交温度设置为 55 ℃,分析杂交 30、50、70、90 min 的芯片荧光信号强度见表 3。荧光信号的整体强度随杂交时间的延长而增强。在相同温度下,杂交反应时间为 70 min 时荧光信号

最强。

2.4 灵敏度 将各目标菌株的标准菌液进行梯度稀释,按照最优的反应条件进行扩增和杂交见图 2。高浓度菌液的芯片扫描图均有清晰可见的荧光位点,随着菌液浓度降低,荧光强度也明显减弱。最终,本方法检测大肠埃希菌的灵敏度为 10^4 copy/mL,碳青霉烯酶基因 blaKPC、碳青霉烯酶基因 blaVIM、鲍曼不动杆菌和肺炎克雷伯菌的灵敏度均为 10^3 copy/mL,金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌和卡他莫拉菌的灵敏度均为 10^2 copy/mL。

表 2 不同芯片杂交温度对应的荧光信号值(A. U.)

检测靶标	45 °C	50 °C	55 °C	60 °C
质控 DNA	590.00	28 500.00	29 014.75	3 095.38
碳青霉烯酶基因 blaKPC	5.50	2 988.75	5 075.75	27.38
碳青霉烯酶基因 blaVIM	27.25	1 654.88	2 268.88	176.00
鲍曼不动杆菌	1.50	3 363.38	4 864.25	20.00
金黄色葡萄球菌	6.88	2 835.75	4 360.38	3.00
肺炎链球菌	4.13	1 501.75	2 090.88	9.25
大肠埃希菌	0.75	113.50	177.00	1.13
卡他莫拉菌	19.25	12 011.75	21 600.88	510.50
肺炎克雷伯菌	0.50	831.88	1 320.63	7.63



注:A 为碳青霉烯酶基因 blaKPC;B 为碳青霉烯酶基因 blaVIM;C 为鲍曼不动杆菌;D 为金黄色葡萄球菌;E 为肺炎链球菌;F 为大肠埃希菌;G 为卡他莫拉菌;H 为碳青霉烯酶基因 blaKPC+肺炎克雷伯菌;数字 1、2、3 分别表示浓度为 10^4 、 10^3 、 10^2 copy/mL。

图 2 8 种靶标的灵敏度

2.5 特异度 标准菌株加入临床检测无菌的肺泡灌洗液作为模拟标本, 无菌肺泡灌洗液作为阴性标本, 在最佳反应条件下分别对其进行检测, 评价本方法的特异度。图 3A~3H 目标菌株各靶基因对应的探针位点出现的杂交信号清晰可见, 均符合阳性的预期结果。而其他位点均未出现荧光信号, 并且以产酸克雷伯菌、黏质沙雷菌、奇异变形杆菌、表皮葡萄球菌、唾液链球菌、流感嗜血杆菌为干扰菌的模拟标本的检测方法与阴性标本检测结果一致, 靶标位置均无荧光信号检出, 见图 3I。

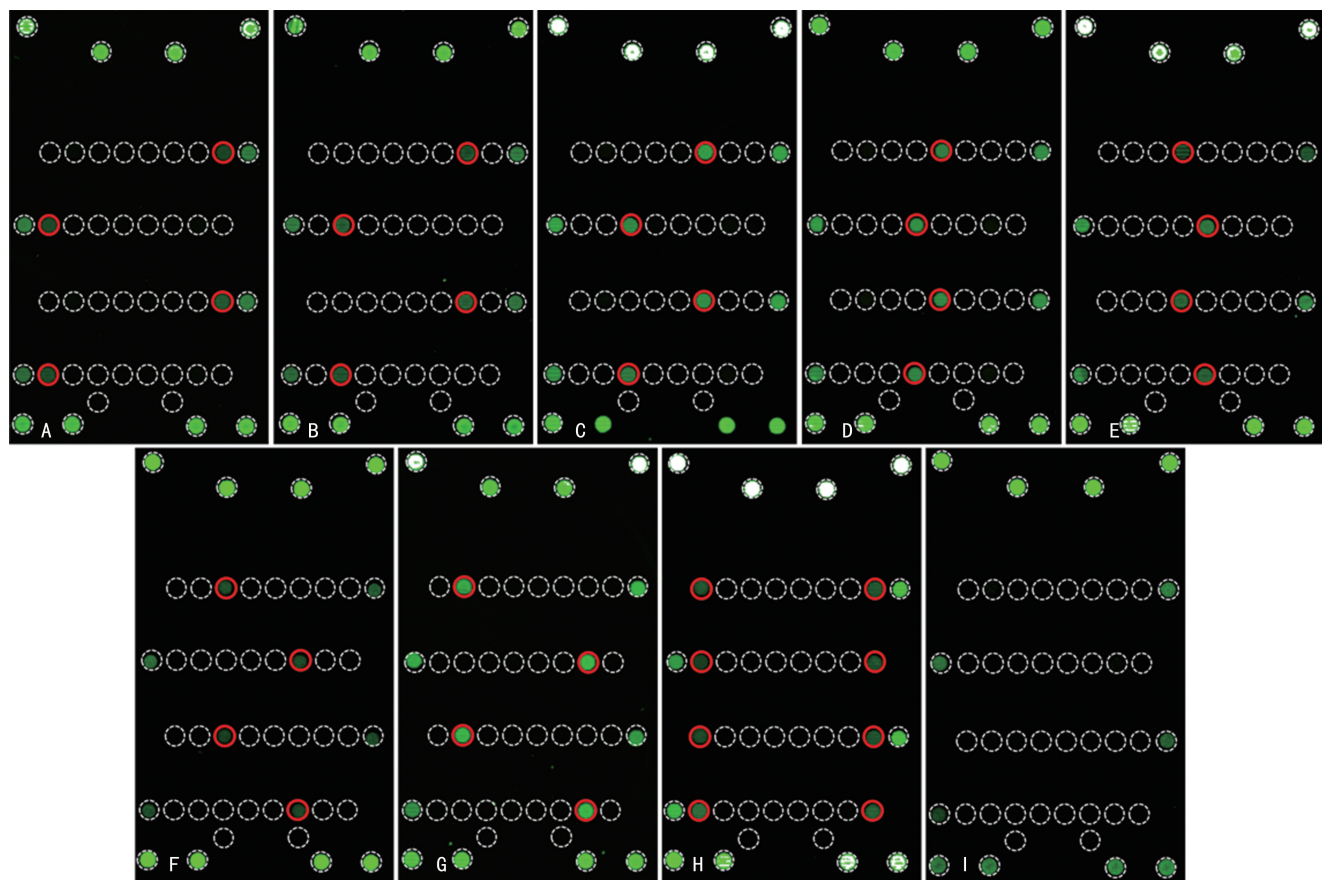
2.6 模拟标本检测结果 将不同菌株组合混匀, 模拟多重细菌感染, 对模拟标本进行检测见图 4。模拟标本检测符合率均可达 100%, 能特异性检出对应的靶标, 说明本方法具有较好的检测分辨力。

2.7 临床痰液标本检测结果 利用本方法对 24 份临床痰液标本进行核酸提取、扩增及芯片杂交, 分析杂交信号见表 4。本方法检出单一病原菌感染 17 份, 多病原菌感染 7 份, 携带耐药基因 5 份, 该检测结果

与单重 qPCR 鉴定结果一致。由于 VITEK 2 生化鉴定法不能进行碳青霉烯类耐药基因鉴定, 且 VITEK 2 生化鉴定法需对标本进行分离培养, 对于混合感染标本的检测易受优势菌株干扰而导致漏检, 故 VITEK 2 生化鉴定法鉴定出单一病原菌感染 22 份, 多病原菌感染 2 份, 与真实结果存在一定误差。

表 3 不同芯片杂交时间对应的荧光信号值 (A. U.)

检测靶标	30 min	50 min	70 min	90 min
质控 DNA	4 975.25	5 129.38	5 664.63	5 351.25
碳青霉烯酶基因 blaKPC	280.63	930.13	1 177.00	1 484.38
碳青霉烯酶基因 blaVIM	154.25	429.25	627.00	873.25
鲍曼不动杆菌	392.25	728.63	1 178.88	1 472.25
金黄色葡萄球菌	704.75	1 287.88	1 897.00	2 434.13
肺炎链球菌	213.75	492.63	772.00	1 028.13
大肠埃希菌	10.63	20.88	30.25	21.50
卡他莫拉菌	1 787.50	4 119.25	5 792.63	5 760.75
肺炎克雷伯菌	159.88	506.25	719.75	1 037.25



注: A 为碳青霉烯酶基因 blaKPC; B 为碳青霉烯酶基因 blaVIM; C 为鲍曼不动杆菌; D 为金黄色葡萄球菌; E 为肺炎链球菌; F 为大肠埃希菌; G 为卡他莫拉菌; H 为碳青霉烯酶基因 blaKPC+肺炎克雷伯菌; I 为阴性标本及干扰菌。

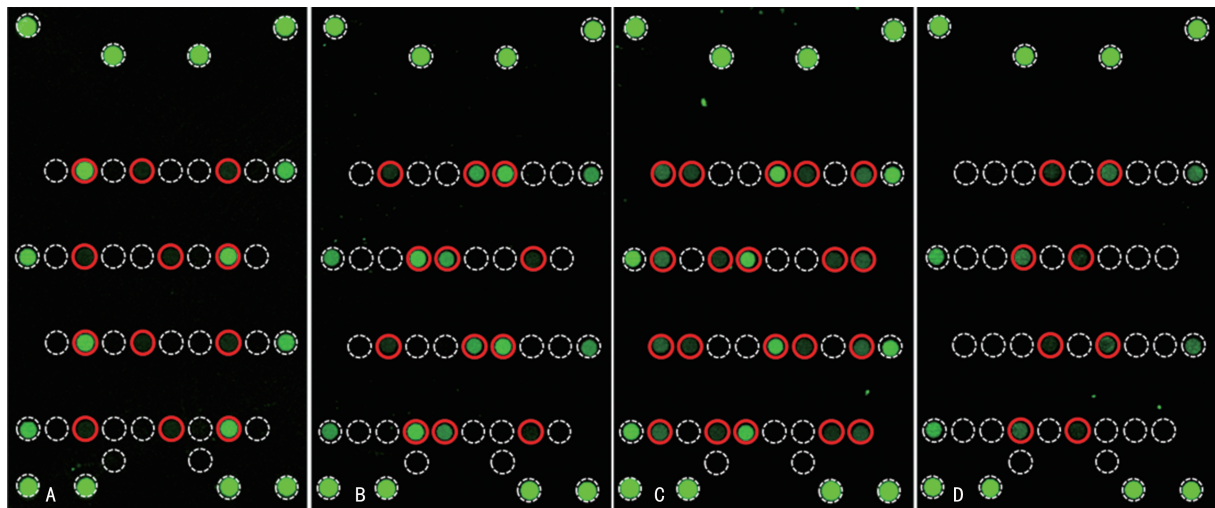
图 3 基因芯片的特异度

表 4 临床痰液标本的检测结果 (n)

检测靶标	本方法	单重 qPCR	VITEK 2 生化鉴定法
鲍曼不动杆菌	7	7	8
金黄色葡萄球菌	2	2	2
肺炎链球菌	2	2	2

续表 4 临床痰液标本的检测结果 (n)

检测靶标	本方法	单重 qPCR	VITEK 2 生化鉴定法
大肠埃希菌	1	1	1
卡他莫拉菌	1	1	1
肺炎克雷伯菌	4	4	8
碳青霉烯酶基因 blaKPC+肺炎克雷伯菌	2	2	0
鲍曼不动杆菌+金黄色葡萄球菌	2	2	1
鲍曼不动杆菌+肺炎克雷伯菌	0	0	1
碳青霉烯酶基因 blaKPC+鲍曼不动杆菌+肺炎克雷伯菌	2	2	0
碳青霉烯酶基因 blaKPC+金黄色葡萄球菌+肺炎克雷伯菌	1	1	0



注: A 为碳青霉烯酶基因 blaVIM+肺炎链球菌+卡他莫拉菌; B 为鲍曼不动杆菌+金黄色葡萄球菌+卡他莫拉菌; C 为碳青霉烯酶基因 blaKPC+鲍曼不动杆菌+金黄色葡萄球菌+卡他莫拉菌+肺炎克雷伯菌; D 为鲍曼不动杆菌+肺炎链球菌。

图 4 模拟标本检测结果

3 讨 论

多重 PCR 可以快速、灵敏地同步扩增多个目标片段,已被越来越多地用于病原菌检测技术研究领域。基因芯片也是一种高通量、快速、准确的分子生物学检测技术。本方法可以在同一个反应中同时检测 6 种下呼吸道常见病原菌和两种碳青霉烯酶基因。

在致病菌检测领域,多重 PCR 和基因芯片的联合应用已有相关报道,有研究建立了一种基于将多重连接酶检测反应及通用不对称 PCR 与通用基因芯片方法联合的检测方法,纯培养物的检测灵敏度为 $10^2 \sim 10^3$ copy/mL^[15],与本方法的灵敏度相当。SONG 等^[16]针对 8 种碳青霉烯酶基因建立了基于多重 PCR 和基因芯片的检测方法,其检测灵敏度最低为 30 copy/ μ L。基于多重 PCR 的基因芯片技术使在一个试管中同时检测多个目的基因成为可能,但通过电泳法根据产物序列大小分离并不能有效鉴定各种片段^[17]。相比之下,本方法耗时更短,并且可以在单次反应中设计更多的待检靶标。

本研究通过多重 PCR 扩增富集目的基因,并利用通用不对称 PCR 扩增大量单链目标片段用于 DNA 杂交,二者结合能够实现多重 PCR 和基因芯片的优势互补,达到较高的灵敏度和特异度。此外,针对每个靶基因设计了特异的荧光探针,在杂交反应中

特异性结合在目标片段的 5' 端。只有当标本中靶基因经两轮 PCR 后的扩增产物与固定在芯片表面的捕获探针和杂交液中的荧光探针同时发生杂交反应时,才能在芯片表面的预设位点检测到荧光信号,这一双重特异性设计保证了本方法的准确性。

此外,目标片段的长度是影响杂交效率的重要因素。有研究表明,短片段较长片段目标序列能产生更高的杂交信号^[18]。因此,本研究设计的引物目标片段的序列长度为 100~300 bp。探针的设计是建立基因芯片检测方法的关键,本研究针对各靶基因设计的探针长度为 23 bp 左右,且具有相近的 DNA 熔解温度,使各靶基因的杂交反应接近最佳反应条件,经过 NCBI BLAST 验证,均具有较强的特异性。此外,有研究表明,DNA 杂交效率与目标序列上捕获探针的位置具有关联,具体表现为目标序列的 5' 伸出端的长度与杂交信号强度呈负相关^[19]。因此,本研究设计的捕获探针与目标序列的结合区域均靠近 5' 端,以提高信号强度。

考虑到下呼吸道病原菌种类繁多且细菌耐药方式并不局限于产碳青霉烯酶,本研究建立的 DNA 微阵列不能涵盖所有的病原菌基因。因此,一些致病菌和耐药基因不在芯片的检测范围内。在后期研究中,可以根据临床需求灵活改变或增加反应体系中的引

物和探针序列,将本方法用于其他靶标的检测。

使用本方法对下呼吸道病原菌进行检测,在预先制备好基因芯片的情况下,经过核酸提取、PCR 扩增、基因芯片分子杂交、芯片扫描等步骤,总检测时间约为 4 h,且具有高灵敏度、高特异度、高准确度的特点,相对于传统的病原菌检测方法更高效、准确。本方法也可搭载于广州万孚 BoxArray 全自动多重核酸检测分析系统上,将核酸提取、扩增、杂交和检测的所有过程集成于卡盒内部,实现标本进结果出的全自动检测过程,为临床诊断提供快速指导,避免药物滥用^[20]。

参考文献

- [1] TROEGER C, BLACKER B, KHALIL I A, et al. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990 – 2016; a systematic analysis for the global burden of disease study 2016[J]. *Lancet Infect Dis*, 2018, 18(11): 1191-1210.
- [2] HUIJSKENS E G, KOOPMANS M, PALMEN F M, et al. The value of signs and symptoms in differentiating between bacterial, viral and mixed aetiology in patients with community-acquired pneumonia [J]. *J Med Microbiol*, 2014, 63(Pt 3): 441-452.
- [3] CANTON R, AKOVA M, CARMELI Y, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2012, 18(5): 413-431.
- [4] 贾雪洋,任红宇,聂旭冬,等.下呼吸道感染病原体检测方法研究进展[J]. *中国人兽共患病学报*, 2019, 35(3): 263-270.
- [5] MCCONNELL M J, PÉREZ-ORDÓÑEZ A, PÉREZ-ROMERO P, et al. Quantitative real-time PCR for detection of acinetobacter baumannii colonization in the hospital environment[J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(4): 1412-1414.
- [6] KAIS M, SPINDLER C, KALIN M, et al. Quantitative detection of Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, and Moraxella catarrhalis in lower respiratory tract samples by real-time PCR[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2006, 55(3): 169-178.
- [7] WANG X, THEODORE M J, MAIR R, et al. Clinical validation of multiplex real-time PCR assays for detection of bacterial meningitis pathogens[J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(3): 702-708.
- [8] KUTATELADZE T, BITSKINASHVILI K, SAPOJNIK-OVA N, et al. Development of multiplex PCR coupled DNA chip technology for assessment of endogenous and exogenous allergens in GM soybean[J]. *Biosensors*, 2021, 11(12): 481-485.
- [9] SUN F, WU D, QIU Z, et al. Development of real-time PCR systems based on SYBR Green for the specific detection and quantification of Klebsiella pneumoniae in infant formula[J]. *Food Control*, 2010, 21(4): 487-491.
- [10] WEISS D, GAWLIK D, HOTZEL H, et al. Fast, economic and simultaneous identification of clinically relevant Gram-negative species with multiplex real-time PCR[J]. *Future Microbiol*, 2019, 14(1): 23-32.
- [11] LI H, XIN H, LI S F. Multiplex PMA-qPCR assay with internal amplification control for simultaneous detection of viable Legionella pneumophila, Salmonella typhimurium, and Staphylococcus aureus in environmental waters [J]. *Environ Sci Technol*, 2015, 49(24): 14249-14256.
- [12] STRÅLIN K, BÄCKMAN A, HOLMBERG H, et al. Design of a multiplex PCR for Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Mycoplasma pneumoniae and Chlamydia pneumoniae to be used on sputum samples[J]. *Apmis*, 2005, 113(2): 99-111.
- [13] MOMTAZ H, DEHKORDI F S, RAHIMI E, et al. Detection of escherichia coli, salmonella species, and vibrio cholerae in tap water and bottled drinking water in isfahan, iran[J]. *BMC Public Health*, 2013, 13: 556.
- [14] HEINIGER N, TROLLER R, MEIER P S, et al. Cold shock response of the UspA1 outer membrane adhesin of Moraxella catarrhalis[J]. *Infect Immun*, 2005, 73(12): 8247-8255.
- [15] 王小强,营思思,韩锐郡,等.多重寡核苷酸连接-聚合酶链式反应-通用基因芯片检测食源性致病菌方法的建立[J]. *卫生研究*, 2017, 46(2): 225-231.
- [16] SONG Y, DOU F, HE S, et al. Laboratory and clinical evaluation of DNA microarray for the detection of carbapenemase genes in gram-negative bacteria from hospitalized patients[J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 8219748.
- [17] JIANG L X, REN H Y, ZHOU H J, et al. Simultaneous detection of 13 key bacterial respiratory pathogens by combination of multiplex PCR and capillary electrophoresis[J]. *Biomed Environ Sci*, 2017, 30(8): 549-561.
- [18] GROVER V, PIERCE M L, HOYT P, et al. Oligonucleotide-based microarray for detection of plant viruses employing sequence-independent amplification of targets[J]. *J Virol Methods*, 2010, 163(1): 57-67.
- [19] PEYTAVI R, TANG L, RAYMOND F R, et al. Correlation between microarray DNA hybridization efficiency and the position of short capture probe on the target nucleic acid[J]. *Biotechniques*, 2005, 39(1): 89-96.
- [20] UZOAMAKA M, NGOZI O, JOHNBULL O S, et al. Bacterial etiology of lower respiratory tract infections and their antimicrobial susceptibility [J]. *Am J Med Sci*, 2017, 354(5): 471-475.