

土壤中抗生素抗性基因检测 高通量荧光 定量 PCR 法

High-throughput quantitative PCR method for detection of antibiotic
resistance genes in soil

2024-08-28 发布

2024-09-28 实施

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020 《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由浙江省农产品质量安全学会提出并归口。

本文件起草单位：中国科学院城市环境研究所、武汉工程大学。

本文件主要起草人：苏建强、李欢琴、安新丽、李雅颖、姚槐应。

土壤中抗生素抗性基因检测 高通量荧光定量 PCR 法

1 范围

本文件规定了土壤中抗生素抗性基因检测高通量荧光定量PCR法的方法。
本文件适用于土壤中抗生素抗性基因的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 41689 土壤质量 土壤样品直接提取DNA的方法

NY/T 1121.1 土壤检测第1部分：土壤样品的采集、处理和贮存

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

抗生素抗性基因 antibiotic resistance genes

存在于细菌或其他微生物基因组中的基因，具有降低抗生素效果或完全失效的能力。

3.2

高通量荧光定量 PCR high-throughput quantitative polymerase chain reaction, HT-qPCR

基于微孔芯片进行高通量、纳升级别的实时荧光定量PCR方法。

3.3

可移动遗传元件 mobile genetic elements

在基因组中可扩散或转移的遗传元件，如质粒、噬菌体、整合子、插入序列和整合接合元件等。

3.4

Ct 值 cycle threshold

每个反应体系中荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。

3.5

基因拷贝数 gene copy number

某一种基因或某一段特定的DNA序列在单倍体基因组中出现的数目。

4 原理

基于纳升级微孔芯片，在PCR反应体系中，加入特异性引物，随着PCR反应的进行，核酸染料不断与PCR产物结合，发出荧光信号，PCR反应产物不断累计，荧光信号强度也等比例增加。每经过一个循环，收集一次荧光强度信号，这样就可以通过荧光强度变化来监测产物量的变化，从而得到一条荧光扩增曲线。在PCR扩增结束后，增加溶解曲线的步骤，监测扩增产物的特异性情况。基因的Ct值与基因起始拷贝数的对数存在线性关系。因此，收集未知样品微生物并提取其DNA，经PCR反应获得该样品的Ct值，即可根据建立的标准曲线，用标准质粒内标法计算出该样品的相应抗生素抗性基因的起始拷贝数。

5 设备与材料

5.1 设备

- 5.1.1 高通量荧光定量 PCR 仪。
- 5.1.2 冷冻离心机。
- 5.1.3 涡旋仪。
- 5.1.4 核酸定量仪。
- 5.1.5 荧光成像系统。
- 5.1.6 多样品纳米分配器。

5.2 材料

- 5.2.1 高通量荧光定量芯片。
- 5.2.2 384 方孔板。
- 5.2.3 封板膜。
- 5.2.4 平底 96 孔板。
- 5.2.5 SYBR Green I Master。
- 5.2.6 牛血清白蛋白溶液：50 mg/mL。
- 5.2.7 超纯水。
- 5.2.8 加样槽。
- 5.2.9 抗生素抗性基因引物。
- 5.2.10 次氯酸钠溶液：有效氯终浓度 0.2%。
- 5.2.11 TE 缓冲液：pH 8.0。
- 5.2.12 双链 DNA 超敏检测试剂盒。
- 5.2.13 DNA 纯化试剂盒。
- 5.2.14 DNA 连接试剂盒。
- 5.2.15 质粒提取试剂盒。

6 测定步骤

6.1 土壤样品采集

按照NY/T 1121.1采集土壤样品。

6.2 DNA 提取

按GB/T 41689提取样品中的DNA。样品DNA浓度范围应为 $20 \text{ ng}/\mu\text{L} \sim 40 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ，对浓度大于 $40 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 的样品应用超纯水进行稀释。

6.3 质粒样品的制备

6.3.1 PCR 扩增

对 DNA 样品进行抗生素抗性基因（见附录 A）的 PCR 扩增。

6.3.2 DNA 纯化

用凝胶电泳对 PCR 反应物进行分离，应用荧光成像系统检测扩增的 DNA 片段。应用切胶刀精确切割出目标 DNA 片段。应用 DNA 纯化试剂盒，对回收的 DNA 片段进行纯化处理。

6.3.3 连接载体

应用 DNA 连接试剂盒，将纯化后的 DNA 片段连接到 PMDTM19-T 载体上进行连接反应。

6.3.4 转化培养和 Blast 比对

将连接好的 DNA 载体转化到大肠杆菌中，在含有氨苄西林的培养基中培养。从培养皿中挑选单个菌落进行测序，获得 DNA 序列信息。应用 Blast 软件将测序结果与参考数据库进行比对，确认目标基因的存在和序列的正确性。

6.3.5 质粒提取

应用质粒提取试剂盒，从大肠杆菌中提取质粒 DNA。

6.3.6 质粒浓度测定

宜用双链 DNA 超敏检测试剂盒测定提取的质粒 DNA 的浓度。

6.4 标准曲线的制作

将混合质粒标准液进行梯度稀释，获得不同拷贝数（范围宜为 $10^2 \sim 10^8 \text{ copies}/\mu\text{L}$ ）的标准液。使用这些标准液进行 PCR 反应，以基因拷贝数的对数作为横坐标，Ct 值作为纵坐标作图，并获得标准曲线。制备标准曲线时需设置至少 5 个浓度点，每个浓度应至少做 3 个平行重复。

6.5 实验对照的设立

实验设立以下对照：

- 阳性对照，为质粒标准分子 DNA；
- 阴性对照，相应的无抗生素抗性基因土壤样品 DNA；
- 空白对照，设置两个空白对照，一是提取 DNA 时设置的提取空白对照（以超纯水代替样品），二是 PCR 反应的空白对照（以超纯水代替 DNA 模板）。

6.6 高通量荧光定量 PCR 反应体系的制备

6.6.1 抗生素抗性基因引物和 DNA 样品的分配

使用多样品纳米分配器，按照附录A描述，将抗生素抗性基因引物、DNA样品和阳性克隆质粒分配到纳米芯片上。

6.6.2 PCR 反应液 I 的制备

将911 μL SYBR Green I Master和547 μL 无菌水混合形成PCR反应液I。

6.6.3 引物的加载

在无酶孔板上，为每个孔加载10.9 μL PCR反应液I和2.7 μL 抗生素抗性基因引物，共计120孔。将引物从孔板分样到纳米芯片上。

6.6.4 PCR 反应液 II 的制备

将493 μL SYBR Green I Master、9 μL 灭菌的50 mg/mL牛血清白蛋白溶液和287 μL 无菌水混合，制备成PCR反应液II。

6.6.5 DNA 样品的加载

在无酶孔板上，为每个孔加载15.2 μL PCR反应液II和3.8 μL DNA样品，共计42孔。每个样品应进行3个技术重复。将DNA样品从孔板分样到已加载引物的芯片上。

6.6.6 离心和备用

引物和DNA样品分配完成后，宜用离心机将芯片在3200 rpm下离心5 min。离心完成后，应在芯片上贴膜以备后续使用。

6.7 高通量荧光定量 PCR 程序

6.7.1 PCR 扩增程序

初始预变性步骤：95 $^{\circ}\text{C}$ ，10 min。循环步骤：95 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s，60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸30 s，共40个循环。

6.7.2 熔解曲线分析

程序结束后自动升温，进行熔解曲线分析，检测PCR产物的特异性。

6.8 高通量定量仪器运行操作步骤

6.8.1 多样品纳米分配器操作步骤

6.8.1.1 仪器检查和准备

气瓶气体含量应大于0.3 mpa，曝气水瓶应装满超纯水。更换次氯酸钠溶液（有效氯终浓度0.2%）。保持40 psi压力曝气30 min。

6.8.1.2 仪器喷样

将384引物板和样品板喷到高通量荧光定量芯片上。离心机离心备用。

6.8.2 热循环仪操作步骤

6.8.2.1 仪器检查和准备

气瓶总压力应不低于100 psi，运行时压力维持在120 psi。

6.8.2.2 运行仪器

设置PCR程序和放置芯片。监控压力状态和荧光信号。

6.9 结果计算与表述

6.9.1 质量控制

下述指标有一项不符合者，需重新进行高通量荧光定量PCR扩增：

- 扩增效率应在 80% ~ 120%之间，且阴性对照均无扩增。
- 抗生素抗性基因 3 个技术重复中，至少有 2 个为阳性才判定为有效扩增。
- 标准质粒最低稀释浓度宜为 2 copies/ng DNA，高通量定量过程中，根据质粒最低浓度测定的 Ct 值作为检测的最低检测限，最低定量浓度宜为 20 copies/ng DNA。

6.9.2 定性

定性分析的结果将按以下方式标示：若PCR反应未能检测到目标抗生素抗性基因，则结果记为“未检出”；若PCR反应能够检测到目标基因，并且满足设定的质量控制标准，则结果记为“检出”。

6.9.3 定量

按照创建好的标准曲线，使用标准质粒外标法计算土壤样品中的相应抗生素抗性基因拷贝数，单位为拷贝每纳克（copies/ng）。按照公式（1）进行计算：

$$C = 10^{\frac{Ct-b}{a}} \quad (1)$$

式中：

C ——抗生素抗性基因拷贝数，单位为拷贝每纳克（copies/ng）；

a ——标准曲线方程中的斜率；

b ——标准曲线方程中y轴截距；

Ct ——每个反应体系中荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。

A
附 录 A
(规范性)

土壤中抗生素抗性基因信息

土壤中抗生素抗性基因的种类、引物序列和类别见表A.1。

表 A.1 土壤中抗生素抗性基因的种类、引物序列和抗生素类别

抗性基因种类	正向引物(5' → 3')	反向引物(5' → 3')	抗生素分类
<i>aac(3)II</i>	TGATGGTGCATGCCTCACTT	GACGCGTATCCCATCACAGT	氨基糖苷类
<i>aac(3)VI</i>	AAAACGGCGATTTCACAGAA	GGCATCACCATATCGCTGA	氨基糖苷类
<i>aac(6')I</i>	AGCAACGATTCCGTCACACT	CCCCACCACTCGACGATATG	氨基糖苷类
<i>aadA</i>	CTCACGCAACTGGTCCAGAA	AACAAGCCATGAAAACCGCC	氨基糖苷类
<i>aadE1</i>	TGATGTCGTGGAAGGTTGGG	ACCTCTTTGGACACTTCCCTG	氨基糖苷类
<i>aadE2</i>	TGTCCACCTACCGATGGAT	CTATCCAGGCAGCCGGTTTT	氨基糖苷类
<i>ant(2'')I</i>	TTCTTAGCGGAGATCGGGGA	TCCAGCTGTTACAACGGAC	氨基糖苷类
<i>aph(2'')I_g</i>	CTGCTTTGCAATGGGCTGTT	CTTCCGGAATCAAGGCAGGT	氨基糖苷类
<i>aph(3')I1</i>	AATCCAAGAGCAATAAGGGCA	TGCCCTCGTGAATTCATGT	氨基糖苷类
<i>aph(3')I2</i>	AGAGAGGATGCATCGGAGGA\	CGCACTTCAAGTTTACTCTGCC	氨基糖苷类
<i>aph(3')I3</i>	ATCCCCGGGAAAACAGCATT	CATTCGTGATTGCGCCTGAG	氨基糖苷类
<i>aph(3')III</i>	AGACGGAAAAGCCGAAGAG	TGTCATACCACTTGTCCGCC	氨基糖苷类
<i>aph(3')VII</i>	TGGCTTTGCGAAAATCAACC	CTGCAACTCCACATCTTGCC	氨基糖苷类
<i>aph(6)I1</i>	CGATGTTGCGTTGTTGCAGT	TTTTTGCTCGTCAACCCGAG	氨基糖苷类
<i>aph(6)I2</i>	GCTCGTCGATCTCTGGAGG	ATGTCACTGTGCACGACGAT	氨基糖苷类
<i>rmtF</i>	CGAAGAATCTGCGGGACGTA	CTGTATCGGGCAAAGCTC	氨基糖苷类
<i>rmtG</i>	TACCGCGGGAAAAGGAAAT	CCTGTATTCCGCATCCGTCA	氨基糖苷类
<i>bacA</i>	GGGTTGACAGAATTTGCTCCAG	AGTTGCAGACGCACTTCTTA	杆菌肽类
<i>bla_Z</i>	TCCTAAGGGCAATCTGAACC	ACACTCTTGGCGGTTTCACT	β-内酰胺类
<i>CMY</i>	TTCTCCGGGACAACTTGACG	GCATCTCCAGCCTAATCCC	β-内酰胺类
<i>CTXM</i>	GACTATGGCACCACCAACGA	CCTTAGGTTGAGGCTGGGTG	β-内酰胺类
<i>CTXM15/57</i>	TTGTTAGGAAGTGTGCCGCT	AGCGCTCATCAGCACGATAA	β-内酰胺类

<i>CTXM2</i>	ACCGCCGATAATTCGCAGAT	TGCTTATCGCTCTCGCTCTG	β-内酰胺类
<i>CTXM24/27</i>	AACACGTCAACGGCACAATG	ATGGCGGTATTACAGCGTAGG	β-内酰胺类
<i>GES11</i>	GCCCAGGAGAGAGATTACGC	CTTGACCAGACAGAGGCAACT	β-内酰胺类
<i>IMP4</i>	AGCAGAGCCTTTGCCAGATT	TGTTTAGGAACAACGCCCA	β-内酰胺类
<i>KPC2/4/6</i>	CAGTCGGAGACAAAACCGGA	TCGCTGTGCTTGTATCCTT	β-内酰胺类
<i>mecA</i>	ACCTCTGCTCAACAAGTTCCA	ACGTTGTAACCACCCCAAGA	β-内酰胺类
<i>mecR1</i>	TTAGTGCTCGTCTCCACGTT	ACCGAAGAAGTCGTGCAGA	β-内酰胺类
<i>NDM5/6</i>	GCCCAGCAAATGGAACTGG	CAAACCGTTGGAAGCGACTG	β-内酰胺类
<i>OXA1/4</i>	TATCTACAGCAGCGCCAGTG	TGCGTTGCACACTTTGCTTT	β-内酰胺类
<i>OXA10</i>	AAGAGTTCTCTGCCAAGCC	TGGCTTTCCGTCCCATTGA	β-内酰胺类
<i>OXA72</i>	ACGGACTGGCTAGAGCTAA	TATGTGCAAGGTCATCGGCA	β-内酰胺类
<i>penA</i>	ACGTGTGATTGTGGCGTTG	GGGTGGTGTAGTAGTGGTGC	β-内酰胺类
<i>ROB1</i>	GCAATCCATTGATTCGCGCT	TATTTACCCGCCCGCTTTT	β-内酰胺类
<i>SHV</i>	ATCTCCCTGTTAGCCACCCT	TGCTCATCATGGAAAAGCGT	β-内酰胺类
<i>SHV12</i>	ATCTCCCTGTTAGCCACCCT	CAGCTGGCTTTCGCTTGT	β-内酰胺类
<i>TEM156</i>	TGATAACACTGCGGCAACT	TTCATTCAGCTCCGGTCCC	β-内酰胺类
<i>TEM169/206</i>	GGGAACCGGAGCTGAATGAA	TTGTTGCCGGGAAGCTAGAG	β-内酰胺类
<i>VEB3</i>	CATTCCCGATGCAAAGCGT	TCGGACTCCACGTTTTAGGC	β-内酰胺类
<i>VIM1</i>	TCCACGCACTTTCATGACGA	TGGGAATCTCGTTCCTCT	β-内酰胺类
<i>VIM2</i>	GAAGGACTCTCATCGAGCGG	AGACGTGCGTGACAACCTCAT	β-内酰胺类
<i>cat1</i>	TTGGACAGAATCAAATGCTAGTTT	ACTGTGTTTTTCAGGTATCGGCT	氯霉素类
<i>cat2</i>	ACCAATACCTGAAAACACAGTTCC	TGGTAACCATCACATACCGCA	氯霉素类
<i>cat3</i>	ACTGGTTACAATAGCGACGGA	GGAAACAATTTCCCCGAACCA	氯霉素类
<i>cat4</i>	TTCTTGCCCGCCTGATGAAT	ACCGTAACACGCCACATCTT	氯霉素类
<i>catA1</i>	AATGCGGATTCAGCCTGACC	CCGGAACCTCCGAAACTGAT	氯霉素类
<i>catA2</i>	TTGCCGCTCTCAGTACAGGT	GCCGACTAATAAAGCGTGCAA	氯霉素类
<i>catA3</i>	AGGGAATGTTCCGAAAGCCT	GCCTCAAAGCTTGTCCACG	氯霉素类
<i>catB</i>	CTGTTTCCGACCGTGATGA	GAGTGCGCTTGAGAATGCAG	氯霉素类

<i>cmIA</i>	TCGTTTTATGGGGCGTGTGA	CCACTAGCCACATTGGAGCA	氯霉素类
<i>floR</i>	GACGGTTCGCGACGTTTATG	GAATATCGCCTGCCATCCCA	氯霉素类
<i>mcr1</i>	GGGCCTGCGTATTTAAAGCG	CATAGGCATTGCTGTGCGTC	黏菌素类
<i>fosB</i>	GAGCTTGCAGGCCTATGGAT	TGCCAATATTTAAATTCGCTGTCA	磷霉素类
<i>fusB</i>	GGTTGTAAAGGGTTCTGCAC	TGACCATCCGAATTGGTTTTGA	镰刀菌酸类
<i>ermB1</i>	TGAAAGCCATGCGTCTGACA	GCAACCCTAGTGTTCGGTGA	大环内酯类
<i>ermB2</i>	TTTGTAAAGCCGTGCGTCTG	GCAACCCTAGTGTTCGGTGA	大环内酯类
<i>ermC</i>	TCCAAATGCGTTATCAAATGCGT	TGCGTAATCACTGTTTTAGTCTGT	大环内酯类
<i>ermT</i>	AGATTGGTTCAGGAAAGGTCA	AGGATCTATTTCAATGGCGGT	大环内酯类
<i>lnuA</i>	GATGCCTTCACGCATGGAAC	TGCCACCTTCTGGATTGCT	大环内酯类
<i>lnuB</i>	TGGTGAGCAAACGAAGGTCC	CGTGCATCGATGTCAAGATGG	大环内酯类
<i>mphA</i>	ATTCTCCGTGGTGTGCAT	CTCGCTCCAGTCGATCATCC	大环内酯类
<i>mphB</i>	TTCAGGCACCAAACCTGGATCA	CTGCTAACACCCTGCCTAGC	大环内酯类
<i>msrA</i>	AACAGTTGAAACGGTGGCG	CCACCACTCATACTGTCCGT	大环内酯类
<i>vatE/SatG</i>	CCTGAACTGACTGATTTGCCG	CTCCGATAATGGCACCGTCA	大环内酯类
<i>emrD</i>	GAAGCGTTTATTCGGGCGTC	GTGCTGATGGGGCAGTATT	多重耐药类
<i>mdfA</i>	GTAGGGTATGCCGCGATTCA	TGTAGCCCGAAAAAGGCGAT	多重耐药类
<i>mdtE</i>	AACAGGTTCAAGGCAGTACG	ATACATGCCAGGCAGCAAGT	多重耐药类
<i>mdtG</i>	GCGGATTTATCCCAACGCC	GTAGAGAGCGTCCCTAACGC	多重耐药类
<i>mdtH</i>	CTGGCGGTACAGGTCATGTT	GCGTACATCCATTTACGGC	多重耐药类
<i>mdtL</i>	ACAGGTGTTATTCTGGCGG	ACCTAAGGTCGAGCTGGCTA	多重耐药类
<i>mdtM</i>	CATTAACGTCGTGCGGATT	ATTGAGGTCGTCAACAGCGT	多重耐药类
<i>mepA</i>	TTGGGGACCAATGTTTCT	TACCCAAAGTCGACCAACA	多重耐药类
<i>norA</i>	GAAAGGCAAGGCTTTGCAGG	ACGCACCTGCGATTAAGGA	多重耐药类
<i>EmrB-QacA</i>	GAAATCTCATATGGACGGC	TGCAGTTAAATGCGATGGCG	多重耐药类
<i>ToIC</i>	ACGCTACAACAAGCCGTA	TATAACGCGCATTTGCCAGC	多重耐药类
<i>qnrA</i>	CCTATGCCAATTTGAGCGGC	CAGATCGGCAAAGGTCAGGT	喹诺酮类
<i>qnrB1</i>	AGTCGTGCGATGCTGAAAGA	TGGAATTGCGAAAATCCGCC	喹诺酮类

<i>qnrB10-1</i>	TGTGAGCTGTGGGAAAACCG	TCGCCAGTCGAAAGTCGAAA	喹诺酮类
<i>qnrB10-2</i>	CGATTTTTCAGGTGCCGACC	ATCTTTCAGCATTGCCGGAC	喹诺酮类
<i>qnrB19</i>	GGTGAATTTTAGTCGGCA	CGTTGCGGAAATCTGCCATT	喹诺酮类
<i>qnrB4</i>	CGCGCTAACCTGAAAGATGC	GGCGAATTCGATTCCCAGC	喹诺酮类
<i>qnrB6</i>	GAAAACCGTTGGATGGGTGC	TCGCCAGTCGAAAGTCGAAA	喹诺酮类
<i>qnrS1</i>	TGCACCTTATCCGATCGCA	GCAAGCTGGCATTGTTGGAA	喹诺酮类
<i>qnrS2</i>	CCAACAATGCCAACTTGCGA	AATCACACGCACGGAACCTCT	喹诺酮类
<i>tetA</i>	GTGCCGCCAAATCCTTTCTG	TCGCAACCATAGCGTATCCC	四环素类
<i>tetK</i>	TCTGCTGCATTCCTTCACT	TGAAGGACCTAACCTTCACC	四环素类
<i>tetL</i>	TAGGTGGGCTTTCGTTCA	ACCAGCTTCCTGCTGTTCA	四环素类
<i>tetM</i>	AGCTCATGTTGATGCGGGAA	CGTTGTACCTTTGTCCACGC	四环素类
<i>tetO</i>	CAAAAGGTTGGGCAGCATCC	TTACCGCATCCACTGTTCC	四环素类
<i>tetW1</i>	TGGACGCTTTACGCAACTT	CGACAGCAAAGCGGAAACAA	四环素类
<i>tetW2</i>	ATGTGGCGTGGCTATGAAA	CGTATTGTACACCGGAGCCA	四环素类
<i>dfrA1</i>	CAATGGCTGTTGGTTGGACG	ACGACCGCATACTTTCGGTT	甲氧苄啶类
<i>dfrA12</i>	CCCTGGAAAATTCGGGTGA	GCGACAGCGTTGAAACAACCT	甲氧苄啶类
<i>dfrA14</i>	TGGTTGCGGTCCAGACATAC	CCCACCAGAAGCCACTGATT	甲氧苄啶类
<i>dfrA15</i>	CATGGAGTGCCAAAGGGGAA	AGCCCCCATTGACTCGAAAG	甲氧苄啶类
<i>dfrA17</i>	TGGTCCTGATATCCCGTGGT	TTCCGACAAGGAGCCATTGA	甲氧苄啶类
<i>dfrA25</i>	CAATGGCTTTTGGTAGGGCG	CATGGTCAGTGATCTCGCCT	甲氧苄啶类
<i>dfrA5</i>	TGGCTGAACTACCGATCAC	GTAGAGGCCATGGGCAATGT	甲氧苄啶类
<i>dfrB1</i>	GCCACGTTTGGTATGGGAGA	TCTGTACTGAGCCTGGGTGA	甲氧苄啶类
<i>vanY</i>	CCAAGAAATGGGGCTGAGT	CTTCAGGGGCTCGTTCCATT	万古霉素类
<i>16S rRNA</i>	GGGTTGCGCTCGTTGC	ATGGYTGTGTCAGCTCGTG	16S rRNA 基因