



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510064434.9

[43] 公开日 2005 年 10 月 26 日

[11] 公开号 CN 1687459A

[22] 申请日 2005.4.15

[21] 申请号 200510064434.9

[71] 申请人 北京博奥生物芯片有限责任公司

地址 102206 北京市昌平区生命科学园路 18 号

共同申请人 清华大学

[72] 发明人 张治位 祝令香 王 璨 杨华卫
张 琼 程 京

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司
代理人 关 畅

权利要求书 5 页 说明书 41 页 附图 3 页

[54] 发明名称 革兰氏阳性细菌种属鉴定与耐药基因检测方法及其专用试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了一种革兰氏阳性细菌种属鉴定与耐药基因检测方法及其专用试剂盒。该试剂盒包括扩增待测革兰氏阳性细菌菌株的种属特异基因及耐药基因的引物对，和检测所述革兰氏阳性菌菌株种属特异基因探针和耐药基因探针。利用该试剂盒进行种属鉴定与耐药基因检测的方法，包括：1) 利用试剂盒中的引物 PCR 扩增待测菌株的种属特异基因及耐药基因；2) 将扩增产物与所述检测革兰氏阳性菌种属特异基因探针和耐药基因探针进行杂交，确定待测菌株的细菌种属及其所含耐药基因。本发明的试剂盒具有集成化程度高、灵敏度高，应用范围广，特异性高，检测结果稳定，可靠性高的特点。

1、革兰氏阳性细菌种属鉴定与耐药基因检测试剂盒，包括扩增待测革兰氏阳性细菌菌株的种属特异基因及耐药基因的引物对，和检测所述革兰氏阳性菌菌株种属特异基因探针和耐药基因探针。

2、根据权利要求1所述的试剂盒，其特征在于：所述待测革兰氏阳性细菌菌株包括葡萄球菌，肠球菌和链球菌。

3、根据权利要求2所述的试剂盒，其特征在于：所述种属特异基因为16S rRNA基因或 *msrC*。

4、根据权利要求3所述的试剂盒，其特征在于：所述耐药基因包括 *blaZ*、*mecA*、*aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*、*pbp-1a*、*pbp-2b*、*pbp-2x*、*aacE*、*varA*、*varB*、*ermA*、*ermB*、*ermC*、*mefA* 和 *msrA*。

5、根据权利要求4所述的试剂盒，其特征在于：所述引物对中的正向引物和反向引物的基因特异性序列长度均为15-50个核苷酸；优选为15-35个核苷酸。

6、根据权利要求5所述的试剂盒，其特征在于：所述试剂盒还包括一条通用引物，所述通用引物大小为15-35个核苷酸，其序列来自与细菌亲缘关系较远的物种的DNA序列，并经序列比对确认为与所有细菌DNA序列均不匹配的无关序列。

7、根据权利要求6所述的试剂盒，其特征在于：所述扩增待测革兰氏阳性细菌菌株的种属特异基因及耐药基因的引物对中的正向引物或反向引物的5'端连接上所述通用引物序列。

8、根据权利要求7所述的试剂盒，其特征在于：所述通用引物的5'端被荧光标记；被连接上所述通用引物序列的正向引物或反向引物的5'端被荧光标记。

9、根据权利要求8所述的试剂盒，其特征在于：所述通用引物具有序列表中序列2的核苷酸序列。

10、根据权利要求9所述的试剂盒，其特征在于：所述扩增待测革兰氏阳性细菌菌株的16S rRNA基因的正向引物具有序列表中序列3的核苷酸序列，所述扩增待测革兰氏阳性细菌菌株的16S rRNA基因的反向引物具有序列表中序列4的核苷酸序列。

11、根据权利要求10所述的试剂盒，其特征在于：所述扩增 *msrC* 的正向引物具有序列表中序列35的核苷酸序列，反向引物具有序列表中序列36的核苷酸序列。

12、根据权利要求 11 所述的试剂盒，其特征在于：所述扩增 *blaZ* 的正向引物具有序列表中序列 7 的核苷酸序列，反向引物具有序列表中序列 8 的核苷酸序列；扩增 *mecA* 的正向引物具有序列表中序列 9 的核苷酸序列，反向引物具有序列表中序列 10 的核苷酸序列；扩增 *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* 的正向引物具有序列表中序列 11 的核苷酸序列，反向引物具有序列表中序列 12 的核苷酸序列；扩增 *pbp-1a* 的正向引物具有序列表中序列 13 的核苷酸序列，反向引物具有序列表中序列 14 的核苷酸序列；扩增 *pbp-2b* 的正向引物具有序列表中序列 15 的核苷酸序列，反向引物具有序列表中序列 16 的核苷酸序列；扩增 *pbp-2x* 的正向引物具有序列表中序列 17 的核苷酸序列，反向引物具有序列表中序列 18 的核苷酸序列；扩增 *aadE* 的正向引物具有序列表中序列 19 的核苷酸序列，反向引物具有序列表中序列 20 的核苷酸序列；扩增 *vanA* 的正向引物具有序列表中序列 21 的核苷酸序列，反向引物具有序列表中序列 22 的核苷酸序列；扩增 *vanB* 的正向引物具有序列表中序列 23 的核苷酸序列，反向引物具有序列表中序列 24 的核苷酸序列；扩增 *ermA* 的正向引物具有序列表中序列 25 的核苷酸序列，反向引物具有序列表中序列 26 的核苷酸序列；扩增 *ermB* 的正向引物具有序列表中序列 27 的核苷酸序列，反向引物具有序列表中序列 28 的核苷酸序列；扩增 *ermC* 的正向引物具有序列表中序列 29 的核苷酸序列，反向引物具有序列表中序列 30 的核苷酸序列；扩增 *mefA* 的正向引物具有序列表中序列 31 的核苷酸序列，反向引物具有序列表中序列 32 的核苷酸序列；扩增 *msrA* 的正向引物具有序列表中序列 33 的核苷酸序列，反向引物具有序列表中序列 34 的核苷酸序列。

13、根据权利要求 12 所述的试剂盒，其特征在于：所述试剂盒还包括扩增待测革兰氏阳性细菌菌株的 23S rRNA 基因的引物对。

14、根据权利要求 13 所述的试剂盒，其特征在于：所述扩增待测革兰氏阳性细菌菌株的 23S rRNA 基因的正向引物具有序列表中序列 5 的核苷酸序列，所述扩增待测革兰氏阳性细菌菌株的 23S rRNA 基因的反向引物具有序列表中序列 6 的核苷酸序列。

15、根据权利要求 1-14 中任一所述的试剂盒，其特征在于：所述探针的大小均为 15-50 个核苷酸。

16、根据权利要求 15 所述的试剂盒，其特征在于：所述探针的 5' 端连接上 10-35 个寡聚 dT；优选连接上 12-25 个寡聚 dT。

17、根据权利要求 16 所述的试剂盒，其特征在于：所述检测革兰氏阳性菌菌株种属特异基因探针为检测革兰氏阳性菌种属特异的 16S rRNA 基因探针或检测 *msrC* 的探针。

18、根据权利要求 17 所述的试剂盒，其特征在于：所述检测革兰氏阳性菌种属特异的 16S rRNA 基因探针包括检测葡萄球菌属，金黄色葡萄球菌，凝固酶阴性葡萄球菌，肠球菌属，粪肠球菌，屎肠球菌和耐久肠球菌和海氏肠球菌，鹌鸡肠球菌和鸟肠球菌和铅黄肠球菌和解糖肠球菌，链球菌属，肺炎链球菌，化脓链球菌和无乳链球菌的 16S rRNA 基因的探针。

19、根据权利要求 18 所述的试剂盒，其特征在于：所述检测葡萄球菌属的 16S rRNA 基因的探针具有序列表中序列 37 的核苷酸序列；所述检测金黄色葡萄球菌的 16S rRNA 基因的探针具有序列表中序列 38 的核苷酸序列；所述检测凝固酶阴性葡萄球菌的 16S rRNA 基因的探针具有序列表中序列 39 的核苷酸序列；所述检测肠球菌属的 16S rRNA 基因的探针具有序列表中序列 40 的核苷酸序列；所述检测粪肠球菌的 16S rRNA 基因的探针具有序列表中序列 41 的核苷酸序列；所述检测屎肠球菌和耐久肠球菌和海氏肠球菌的 16S rRNA 基因的探针具有序列表中序列 42 的核苷酸序列；所述检测鹌鸡肠球菌和鸟肠球菌和铅黄肠球菌和解糖肠球菌的 16S rRNA 基因的探针具有序列表中序列 43 的核苷酸序列；所述检测链球菌属的 16S rRNA 基因的探针具有序列表中序列 44 的核苷酸序列；所述检测肺炎链球菌的 16S rRNA 基因的探针具有序列表中序列 45 的核苷酸序列；所述检测化脓链球菌的 16S rRNA 基因的探针具有序列表中序列 46 的核苷酸序列；所述检测无乳链球菌的 16S rRNA 基因的探针具有序列表中序列 47 的核苷酸序列。

20、根据权利要求 19 所述的试剂盒，其特征在于：所述检测 *msrC* 的探针具有序列表中序列 48 的核苷酸序列。

21、根据权利要求 20 所述的试剂盒，其特征在于：所述试剂盒还包括检测细菌 16S rRNA 基因的通用探针，革兰氏阳性细菌 16S rRNA 基因的通用探针和革兰氏阴性细菌 16S rRNA 基因的通用探针。

22、根据权利要求 21 所述的试剂盒，其特征在于：所述检测细菌 16S rRNA 基因的通用探针具有序列表中序列 63 的核苷酸序列，所述检测革兰氏阳性细菌 16S rRNA 基因的通用探针具有序列表中序列 64 或序列 1 的核苷酸序列，所述检测革兰氏阴性细菌 16S rRNA 基因的通用探针具有序列表中序列 65 的核苷酸序列。

23、根据权利要求 22 所述的试剂盒，其特征在于：所述检测耐药基因探针包括检测 *blaZ*，*mecA*，*aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*，*pbp-1a*，*pbp-2b*，*pbp-2x*，*aadE*，*vanA*，*vanB*，*ermA*，*ermB*，*ermC*，*mefA* 和 *msrA* 的探针。

24、根据权利要求 23 所述的试剂盒，其特征在于：所述检测 *blaZ* 的探针具

有列表中序列 49 的核苷酸序列；所述检测 *mecA* 的探针具有列表中序列 50 的核苷酸序列；所述检测 *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* 的探针具有列表中序列 51 的核苷酸序列；所述检测 *pbp-1a* 的探针具有列表中序列 52 的核苷酸序列；所述检测 *pbp-2b* 的探针具有列表中序列 53 的核苷酸序列；所述检测 *pbp-2x* 的探针具有列表中序列 54 的核苷酸序列；所述检测 *aadE* 的探针具有列表中序列 55 的核苷酸序列；所述检测 *vanA* 的探针具有列表中序列 56 的核苷酸序列；所述检测 *vanB* 的探针具有列表中序列 57 的核苷酸序列；所述检测 *ermA* 的探针具有列表中序列 58 的核苷酸序列；所述检测 *ermB* 的探针具有列表中序列 59 的核苷酸序列；所述检测 *ermC* 的探针具有列表中序列 60 的核苷酸序列；所述检测 *mefA* 的探针具有列表中序列 61 的核苷酸序列；所述检测 *msrA* 的探针具有列表中序列 62 的核苷酸序列。

25、根据权利要求 24 所述的试剂盒，其特征在于：所述试剂盒还包括检测细菌 23S rRNA 基因的通用探针。

26、根据权利要求 25 所述的试剂盒，其特征在于：所述检测细菌 23S rRNA 基因的通用探针具有列表中序列 66 的核苷酸序列。

27、根据权利要求 26 所述的试剂盒，其特征在于：所述试剂盒还包括质控探针和杂交空白对照；所述质控探针包括表面化学质控探针，杂交质控探针和阴性对照探针。

28、根据权利要求 27 所述的试剂盒，其特征在于：所述质控探针的大小均为 15-35 个核苷酸。

29、根据权利要求 28 所述的试剂盒，其特征在于：所述表面化学质控探针具有列表中序列 67 的核苷酸序列，杂交质控探针具有列表中序列 68 的核苷酸序列，阴性对照探针具有列表中序列 69 的核苷酸序列。

30、根据权利要求 29 所述的试剂盒，其特征在于：所述杂交空白对照为含有质量百分浓度为 50% 的二甲基亚砷水溶液。

31、根据权利要求 30 所述的试剂盒，其特征在于：所述探针及杂交空白对照固定于载体上。

32、根据权利要求 31 所述的试剂盒，其特征在于：所述载体为硅片、用各种功能基团修饰的玻片或用各种功能基团衍生的膜。

33、根据权利要求 32 所述的试剂盒，其特征在于：所述载体为带有醛基基团的玻片。

34、根据权利要求 33 所述的试剂盒，其特征在于：所述试剂盒还包括进行 PCR

反应和分子杂交的反应液。

35、根据权利要求 34 所述的试剂盒，其特征在于：所述分子杂交反应液中含有杂交质控报告探针。

36、根据权利要求 35 所述的试剂盒，其特征在于：所述杂交质控报告探针为可以和固定于载体上的所述杂交质控探针进行杂交的核苷酸序列，其 5' 端被荧光标记。

37、根据权利要求 36 所述的试剂盒，其特征在于：所述杂交质控报告探针具有序列表中序列 70 的核苷酸序列。

38、利用权利要求 1-37 中任一权利要求所述的革兰氏阳性细菌种属鉴定与耐药基因检测试剂盒进行革兰氏阳性细菌种属鉴定与耐药基因检测的方法，包括以下步骤：

1) 利用所述试剂盒中的引物 PCR 扩增待测革兰氏阳性细菌菌株的种属特异基因及耐药基因；

2) 将步骤 1) 得到的扩增产物与所述试剂盒中的检测革兰氏阳性菌种属特异基因探针和耐药基因探针进行杂交，确定待测革兰氏阳性细菌菌株的种属及其所含耐药基因。

39、根据权利要求 38 所述的方法，其特征在于：所述 PCR 为多重不对称 PCR。

40、根据权利要求 39 所述的方法，其特征在于：所述 PCR 扩增待测革兰氏阳性细菌菌株种属特异基因及耐药基因的引物对中的两条正反向引物中，5' 端连接上所述通用引物序列的一条引物的浓度是另一条引物的 1-20 倍。

41、根据权利要求 40 所述的方法，其特征在于：所述通用引物的浓度是所述 PCR 扩增待测革兰氏阳性细菌菌株种属特异基因及耐药基因的引物对中的两条正反向引物浓度的 1-50 倍。

42、根据权利要求 41 所述的方法，其特征在于：所述 PCR 扩增温度循环分为两个阶段：第一阶段的每个温度循环由变性、退火和延伸三个步骤组成，包括 10-30 个温度循环；第二阶段的每个温度循环由变性和延伸两个步骤组成，包括 10-30 个温度循环。

43、根据权利要求 42 所述的方法，其特征在于：所述第二阶段的延伸温度为 60-75℃；优选的为 70℃。

革兰氏阳性细菌种属鉴定与耐药基因检测方法及其专用试剂盒

技术领域

本发明涉及革兰氏阳性细菌种属鉴定与耐药基因检测方法及其专用试剂盒。

背景技术

一. 细菌鉴定与耐药性检测的重要意义

细菌是引发大多数感染性疾病的病原体，引起临床细菌性感染的致病菌包括需氧菌与厌氧菌，均分为革兰氏阳性菌和阴性菌两大类，每类又各分为球菌与杆菌。需氧革兰氏阳性球菌与革兰氏阴性杆菌是临床最常见的二类致病菌。革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌由于细胞壁等结构的不同，从而导致药物对其作用机理及其耐药机制也存在显著差异，临床上对这两类细菌的临床用药具有很大差别。

人类感染的细菌谱并非一成不变的。随着时间的推移，引起感染的细菌亦发生着变化。上个世纪，30年代以链球菌占优势。随着40-50年代青霉素和磺胺药物的使用，金黄色葡萄球菌取代了链球菌作为医院感染的主要病原菌。此后应用窄谱的头孢菌素和氨基糖苷类药物，而于70年代又由革兰氏阴性杆菌取代了金黄色葡萄球菌。70年代末期80年代初期广谱头孢类抗菌药物应用、各种导管的使用以及免疫抑制剂的应用，尽管革兰氏阴性杆菌仍占主要地位，又有其他的细菌逐渐成为感染的重要病原菌，如凝固酶阴性葡萄球菌和肠球菌等，而且各种耐药菌发生率越来越高。到目前为止，革兰氏阳性细菌的感染率有逐年增加的趋势，已可占到全部细菌感染的30-40%，其中，凝固酶阴性葡萄球菌、金黄色葡萄球菌和肠球菌可占革兰氏阳性细菌的95%以上。

细菌感染可以发生在人体的几乎任何部位，疾病可以是原发感染，也可以是继发感染，如严重烧伤后的败血症，还有一种在医院获得的感染，称为医院感染或院内感染。临床上通常根据感染性疾病的发生部位来命名相关的感染，但是同一部位的感染可以由不同的病原体引起，其症状与对药物的反应可以不同，例如抗菌药物仅对细菌感染有效，而且同种的抗菌药物对不同种类的细菌有不同的杀灭作用。另外，病原微生物可以是对人体有毒力的病菌，也可以是无（或低）毒性的条件致病菌。因此病原学检查，即细菌鉴定，是治疗细菌感染、合理使用抗菌药物的基础。

感染性疾病的治疗主要依赖抗菌药物。但随着抗菌药物的广泛使用，病原菌对常见抗菌药物的耐药性不断增加，耐药菌感染的治疗已成为一个全球性难题。

抗生素是医院临床中应用最广泛的抗菌药物，在控制、预防和治疗各种感染性疾病中发挥重要作用。然而，自1939年抗生素问世以来，特别是近10年来，细菌耐药率迅速增长，医院内感染时尤其严重。有效治疗手段越来越少，发病率和死亡率增加。

据初步统计，目前抗生素已达200多种，但它们的“寿命”都持续不了多久。几乎每一种抗生素都能被细菌中许多种属抵抗和破坏。例如耐 β -内酰胺类和氨基糖苷类的肠球菌又产生了对万古霉素的耐药性。这种菌株一旦被高危人群感染，就可能无抗生素可选用。金黄色葡萄球菌中90%以上的菌株已产生 β -内酰胺酶，再加上一部分菌株携带可表达的*mecA*基因，这些菌株对所有 β -内酰胺类抗生素都不再敏感，而且还扩大到许多

其他类抗生素。因此万古霉素就成为唯一可治疗用药。在大量使用万古霉素的情况下，有可能出现耐万古霉素的菌株。2002年9月，美国报告了一例由 *vanA* 基因介导的万古霉素耐药金黄色葡萄球菌，引起了全球相关学者和医生的高度关注[Tenover F, Weigel L, Appelbaum P, et al. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. *ANTIMICRO. AGENTS CHEMOTH.* 2004, 48: 275 - 280]。

各种耐药菌的不断出现可造成严重后果，例如，导致手术治疗失败、并发症增多、感染复发、住院时间延长、昂贵抗生素及其它药物的使用量增加等。耐药株还随着国际贸易及旅游业的高速发展而在全球范围蔓延。了解耐药性细菌的出现原因、发生机制，掌握并使用正确的检测方法是及时发现耐药菌株、有效预防和控制耐药性细菌扩散的关键。及时准确地掌握细菌耐药机制，对指导临床合理用药和新的抗菌药物的研制具有重要意义。

直接检测细菌对不同抗生素的敏感性（即耐药表型），是目前实验室进行耐药检测最直接和最常用的方法，但检出率受测定方法、孵育温度、时间、培养基的 pH 及浓度等多种因素的影响较大，因此，必须对其测定方法学进行严格控制，否则难以获得正确结果。

常用的耐药表型检测方法有：（1）纸片扩散法，以测量抑菌环直径来判定敏感、中介或耐药，这种方法受许多因素的影响，如接种菌量、预孵育时间、抗生素含量及扩散力、平皿厚度等。（2）稀释法，可测定某种药物对检测菌的最小抑菌浓度(MIC)。其缺点是耗时，费力。（3）E 试验，是 1988 年由瑞典 AB Biodisk 公司推出，该方法结合稀释法和扩散法的原理和特点，可直接测定药物对待测菌的 MIC。其缺点是价格昂贵，结果如纸片扩散法一样受多种因素影响。（4）仪器化和自动化测定，如 Vitek 系统、MicroScan 系统等。通过检测浊度或荧光指示剂的荧光强度或荧光底物的水解反应判读结果，自动化鉴定仪也具有一定的局限性。首先药物的选择缺乏灵活性，其次是很难检测一些特殊菌的耐药性，尤其是快速药敏板，其可靠性不佳。如一些产诱导酶的菌及延迟表达耐药性的菌在 3-4 小时内难以达到可检测水平。在肠球菌中低耐的 VanB 型也因孵育时间短而会造成漏检。另外，以上药敏检测方法与细菌种属鉴定是分离的过程，因此得到一份含有药敏检测和细菌种属的细菌学报告需要较长的时间。而药敏检测与种属鉴定结合在一起，将会使结果更准确，从而为临床治疗提供更多更有用的信息。

除上述检测耐药表型的方法外，药敏试验还可借助于分子生物学方法检测其耐药基因型。如聚合酶链反应(PCR)检测 *mecA* 基因作为对青霉素有抗药性的金黄葡萄球菌 MRSA (Methicilin-Resistant *Staphylococcus aureus*) 检测的“金标准”，real time PCR 检测 MRSA 等。与常规表型药敏检测方法相比较，分子生物学方法的优点在于快速准确，当 MIC 处于耐药的临界值时，分子生物学方法可为治疗提供有力的依据。但是，常规分子生物学检测指标单一，因而实用性较差。

二. 当前革兰氏阳性菌的主要耐药问题

近年来，需氧革兰氏阳性菌感染在细菌性感染病原菌中所占比例呈增高趋势，主要有耐青霉素肺炎链球菌、耐甲氧西林葡萄球菌、耐万古霉素肠球菌和耐大环内酯类抗生素革兰氏阳性球菌等。

1. 耐甲氧西林葡萄球菌(MRSA)

自 1961 年在英国发现首例 MRSA 以来 [Stewart, G. T., and R. J. Holt. 1963. Evolution of natural resistance to the newer penicillin. Br. Med. J. 1:308 - 311], 其感染率不断上升。在我国, 有的医院报道 MRSA 感染率高达 70% 以上 [周惠平 临床细菌学检验面临的挑战 中华医学检验杂志, 1999, 22:12-14.]。以前认为凝固酶阴性葡萄球菌(CNS)是共栖于人皮肤与粘膜的非致病菌。近年来, 特别是静脉导管等医用植入装置的广泛使用, 使该菌成为具有重要临床意义的医院感染病原菌。约占医院内感染的 9% [Kloos, W. E., and T. L. Bannerman. 1994. Update on clinical significance of coagulase-negative *Staphylococci*. Clin. Microbiol. Rev. 7:117 - 140.]。MRSA 和耐甲氧西林的凝固酶阴性葡萄球菌(MRCNS)正以惊人的速度增长, 对 β -内酰胺类抗生素的耐药性不断增加的葡萄球菌造成的感染已成为日益严重的临床问题[Couto I, Melo-Cristino J, Fernandes ML, et al. Unusually large number of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in a Portuguese hospital. J Clin Microbiol, 1995, 33: 2032-2035.]。葡萄球菌对 β -酰胺类抗生素的耐药主要有 2 方面:

a. 产生 β -内酰胺酶。葡萄球菌对青霉素 G 的耐药主要是由质粒介导的 *blaZ* 基因产生青霉素酶, 从而水解胞外的青霉素, 降低胞内的药物浓度而产生耐药。由于青霉素可诱导细菌产生大量酶, 所以即使使用大剂量青霉素也不能治疗该类产酶菌株所致的感染。

b. 产生与 β -内酰胺类抗生素亲和力极低的青霉素结合蛋白 PBP2a。这是 MRSA 的主要耐药机制, 由染色体上的 *mecA* 基因介导, 该基因编码一种与 β -内酰胺类抗生素亲和力降低的 PBP2a, 从而产生耐药性。青霉素结合蛋白 (penicillin binding proteins, PBPs) 在细菌细胞壁合成中起催化作用。 β -内酰胺类抗生素与细菌细胞壁 PBPs 上的酶位点结合, 从而阻断细菌细胞壁的合成, 抑制细菌的生长。敏感金黄色葡萄球菌有 4 种 PBPs, 即 PBP1、2、3 和 4。 β -内酰胺类抗生素可与 PBP1、2、3 同时结合而发挥最大抗菌效果, 因此 PBP1、2、3 称之为必须 PBPs。除上述 4 种 PBPs, MRSA 可产生出一种额外的 PBP, 称为 PBP2a(PBP2'), 在大多数 β -内酰胺类抗生素的治疗剂量范围内, 必须 PBPs 与药物结合而失活, 但 PBP2a 不与药物结合而保持活性, 继续行使其功能, 从而显示抗药性。*mecA* 位于染色体 DNA 上, 可在转座子作用下插入其他染色体或质粒中, 使耐药性得以传播, 并可通过基因重组获得新的抗药性。

2. 耐青霉素的肺炎链球菌(PRSP)

自 1967 年在澳大利亚首次报道耐青霉素肺炎链球菌 (penicillin-resistant pneumococcus, PRP) [Hamsman D, Bullen MM. A resistant pneumococcus. Lancet. 1967, 2: 264-265.] 以来, 各国均已发现了耐青霉素的肺炎链球菌菌株, 耐药率各不相同, 从 1.3% 至 57.8%, 且儿童的耐药率更高 [Sessegolo J F, Levin ASS, Levy CE, et al. Distribution of serotypes and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated in Brazil from 1988 to 1992. J Clin Microbiol, 1994, 32: 906-911.]。肺炎链球菌是儿童院外感染的主要致病菌, 也是成人尤其是老年人社区感染的首位致病菌 [Musher DM. Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*:

Clinical spectrum, pathogenesis, immunity and treatment. Clin Infect Dis, 1992, 14: 801-809; Marrie TJ. Community-acquired pneumonia. Clin Infect Dis, 1994, 18: 501-515.]. PRP 的出现给治疗带来严峻挑战。近来资料显示, PRP 及多重耐药株在全球持续增加 [Baquero F. Pneumococcal resistance to β -lactam antibiotics: A global geographic overview. Microbial Drug Resistance, 1995, 2: 115]。

肺炎链球菌对青霉素的耐药主要是由于存在 PBP_s 的修饰形式, 特别是作为青霉素靶点的 PBP₂, 这些修饰蛋白对青霉素的亲和性降低, 从而对青霉素产生耐药性。肺炎链球菌产生 6 个 PBP_s, 其编码基因在敏感株中是高度保守的, 但低亲和性的 PBP_{1a}、PBP_{2b} 和 PBP_{2x} 的编码基因 (*pbp-1a*, *pbp-2b*, *pbp-2x*) 中某些区域具有高度变异性。这些变异区来自于其他相关种属, 尤其是从草绿色链球菌转化获得。这些基因可以使 PBP_s 发生改变, 从而与青霉素的亲和力降低。同时发现, 一般对青霉素高度耐药的菌株对头孢菌素、四环素、红霉素、氯霉素、链霉素等 (万古霉素除外) 也可出现交叉耐药, 从而成为多重耐药的肺炎链球菌。

3. 高耐氨基糖苷类和耐万古霉素的肠球菌

肠球菌是人类皮肤、上呼吸道、消化道和泌尿生殖道中的正常菌群, 由于某种原因造成菌群失调时, 可引起上述部位的感染, 甚至作为原发病灶引起尿路感染、化脓性腹部感染、败血症和心内膜炎。肠球菌是目前医院内感染的主要病原菌之一, 常引起免疫功能低下者的感染, 其发生总频率占第二位(12%)。我国细菌耐药性监测中心报告, 全国细菌耐药性监测网(参与单位为 57 家三级甲等医院)2002 年主要临床分离菌中, 粪肠球菌占第 8 位, 屎肠球菌占第 11 位 [马越. 李景云. 张新妹. 张力. 胡昌勤. 金少鸿. 2002 年临床常见细菌耐药性监测. 中华检验医学杂志. 2004. 27(1):38-45]。肠球菌是多重耐药菌并可获得和传递耐药性, 是当今细菌性感染的治疗难题之一。临床常采取联合用药进行治疗。临床分离的肠球菌对抗生素的耐药性越来越严重, 尤其是耐高水平氨基糖苷类抗生素和耐万古霉素肠球菌逐渐增多。从 20 世纪 70 年代首次报道高耐庆大霉素的肠球菌开始, 肠球菌对庆大霉素等氨基糖苷类药物的高水平耐药不断增加, 而且屎肠球菌的耐药率明显高于粪肠球菌 [王清涛, 徐英春, 王辉, 等. 肠球菌耐药现状调查及抗感染用药探讨. 中华医学检验杂志, 1999, 22:154-156.]。其耐药机制如下:

a. 氨基糖苷修饰酶

目前, 在肠球菌中发现的与高耐庆大霉素有关的氨基糖苷修饰酶有 3 种: 双功能酶 6'-O-氨基糖苷乙酰转移酶-2''-N-氨基糖苷磷酸转移酶(AAC(6')-APH(2''))和两种磷酸转移酶 APH(2'')-Id、APH(2'')-Ib。其中双功能酶 AAC(6')-APH(2'')是目前为止发现的最重要的氨基糖苷修饰酶, 肠球菌对庆大霉素的高耐药几乎都由该酶介导。该酶由 *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* 编码, 主要存在于肠球菌、金黄色葡萄球菌等革兰氏阳性菌中, 位于质粒及染色体上 (类似) Tn4001 或 (类似) Tn5281 [Simjee S, Manzoor SE, Fraise AP, et al. Nature of transposon-mediated high-level gentamicin resistance in *Enterococcus faecalis* isolated in the United Kingdom. J Antimicrob Chemother, 2000, 45: 565-575.] 等结构中, 可通过质粒或转座子的转移加速其在细菌间的扩散。腺苷酰转移酶 AAD(6')是另一种重要的氨基糖苷修饰酶, 由 *aacE* 基因编码, 介导对链霉

素的耐药。

b. 万古霉素耐药性

自 1988 年在英国伦敦发现第一株耐万古霉素肠球菌 (vancomycin-resistant enterococcus, VRE) 以来, 糖肽耐药性肠球菌的数量不断增多, 甚至出现了其耐药性向其他细菌转移的严重现象。VRE 耐万古霉素机制的分子生物学研究表明, VRE 对万古霉素的耐药性多数是由位于染色体或质粒上的耐药基因簇引起的。根据对万古霉素和替考拉宁的耐药水平及耐药基因簇的差异, 可将糖肽耐药性肠球菌分为 *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE* 和 *vanG* 等 6 种基因型。VRE 不仅对万古霉素耐药, 而且还对 β -内酰胺类抗生素、氨基糖苷类抗生素有天然的耐药性。万古霉素等糖肽类抗生素与细菌细胞壁上的肽聚糖前体小肽 C 端 D-Ala-D-Ala 特异性结合, 从而抑制转肽反应, 使细菌不能合成细胞壁而死亡。在以上几种 VRE 耐药型中只有 *vanA* 和 *vanB* 型具有重要临床意义。*vanA* 和 *vanB* 型 VRE 不仅具有较高的万古霉素耐药性, 而且其耐药因子可以转移, 是引起感染和流行的主要病原。

4. 革兰氏阳性菌的大环内酯类耐药

大环内酯类-林可霉素类-链阳菌素 B (Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B, MLS_B) 广泛用于葡萄球菌感染的治疗, 其耐药性也在不断增加。主要为 *ermA*, *ermB* 和 *ermC* 基因编码的 23S rRNA 甲基化酶 (erythromycin resistance methylase), 该酶改变 23S rRNA 上大环内酯类、林可霉素类和链阳霉素 B 的结合靶点, 从而导致对大环内酯类、林可霉素类和链阳霉素 B 耐药。核糖体靶位点的改变表现为对大环内酯类、林可霉素类和链阳霉素 B 的交叉耐药 (MLS_B 耐药表型), 是大环内酯类的主要耐药机制, 其中 *ermA* 和 *ermC* 主要存在于葡萄球菌中, 已报道 *ermA* 主要存在于金黄色葡萄球菌中, 而 *ermC* 主要存在于 CNS (凝固酶阴性葡萄球菌) 中 [Jung-A. Lim, Ae-Ran Kwon, Sook-Kyung Kim, Yunsop Chong, Kungwon Lee and Eung-Chil Choi. Prevalence of resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics in Gram-positive cocci isolated in a Korean hospital. JAC. 2004. 49:489-495.]。 *ermB* 主要存在于肠球菌及链球菌中。

大环内酯类耐药的另一个机制是泵出机制, 主要由 *mefA/E* (macrolide efflux) 和 *msrA/B* (macrolide and streptogramin resistance) 基因介导, 这两个泵基因有所不同, *mef* 基因编码的泵只泵出大环内酯类, 而 *msr* 基因编码的泵对大环内酯类和链阳霉素都产生抗性。由 *msrA* 基因介导的大环内酯类耐药在凝固酶阴性葡萄球菌中比较常见 [Ross, J. I., E. A. Eady, J. H. Cove, W. J. Cunliffe, S. Baumberg, and J. C. Wootton. 1990. Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of ATP-binding transport super-gene family. Mol. Microbiol. 4:1207-1214.]。而 *mefA* 基因介导的大环内酯类耐药则在链球菌中比较常见 [Sutcliffe, J., Tait-Kamradt, A. and Wondrack, L. (1996). *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* resistant to macrolides but sensitive to clindamycin: a common resistance pattern mediated by an efflux system. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 40, 1817-24.] [Characterization of a genetic element carrying the macrolide efflux gene *mefA* in *Streptococcus pneumoniae* Antimicrob. Agents Chemother. 44 (9), 2585-2587

(2000)]。

综上所述,临床医学对细菌学检验提出了更迫切的要求。目前从采取标本到给临床以明确的细菌学检验结果(病原学诊断和抗菌药物敏感试验)往往需要3~4天,有的需时更长,这就给临床及时治疗带来了难题。临床细菌学检验要满足临床治疗的迫切要求,就要采取有力的措施,缩短报告时间,增加可靠性并增强临床治疗对细菌检验的依赖性,以取得最佳疗效。

对临床应用而言,细菌鉴定和相应的耐药检测是相辅相成,缺一不可的。临床上对细菌的常规检验手段包括形态学检查,分离培养鉴定和药敏实验等。这些方法操作繁琐、分段进行、耗时很长而准确性差。微生物自动鉴定和药敏系统已开始应用于临床微生物检验,使这一现象在大型医院有所改观,但它完全基于细菌培养的表型鉴定方案,仍然具有内在的缺陷。临床上急需一种快速、准确、简便并且能够同时检测多种不同病原或者同一病原的多项不同指标的检测方法。无疑,基于基因检测的生物芯片技术[Fodor SP, et al. 1991. Science. 251: 767-773],以其分析速度快、可多指标并行检测、所需试剂及样品量少等优势适应了这一需要,为解决这些问题提供了新的科技手段。

已有的一些专利,也利用基因芯片技术进行细菌学检测,但它们具有以下局限性:

1. 只能用于细菌种属鉴定(如李君文等,一种用于同时检测多种细菌的寡核苷酸探针,申请号01120290.4;李君文等,一种检测水中常见致病菌的DNA微阵列,申请号01120291.2;马伟等,基于16S rDNA基因种专一序列的临床常见病原菌诊断的生物芯片,申请号02136567.9)或细菌耐药检测(刘元等,采用基因芯片技术检测耐药基因,申请号01120441.9)。

2. 要求范围广泛,没有针对特殊的种群,实用性较差。

3. 这些专利没有提供一套行之有效的具体的检测方案,因此其可行性较差。如(刘元等,采用基因芯片技术检测耐药基因,申请号01120441.9)。

发明内容

本发明的目的是提供一种革兰氏阳性细菌种属鉴定与耐药基因检测试剂盒。

本发明所提供的革兰氏阳性细菌种属鉴定与耐药基因检测试剂盒,包括扩增待测革兰氏阳性细菌菌株的种属特异基因及耐药基因的引物对,和检测所述革兰氏阳性菌菌株种属特异基因探针和耐药基因探针。

所述革兰氏阳性细菌是指经革兰氏染色鉴定为革兰氏染色阳性的菌株。所述耐药基因是指革兰氏阳性菌的耐药基因。所述引物是指用于进行PCR,特别是多重不对称PCR扩增的核苷酸序列。所述探针是指和上述PCR产物进行杂交的核苷酸序列。

所述待测革兰氏阳性细菌菌株包括葡萄球菌,肠球菌和链球菌。

所述种属特异基因可为16S rRNA基因或*msrC*。

*msrC*为屎肠球菌的种属特异基因。

所述耐药基因包括*blaZ*(葡萄球菌属)、*mecA*(葡萄球菌属)、*aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*(葡萄球菌属及肠球菌属)、*pbp-1a*、*pbp-2b*、*pbp-2x*(肺炎链球菌)、*aacE*(肠球菌属)、*vanA*(肠球菌属)、*vanB*(肠球菌属)、*ermA*(葡萄球菌属)、*ermB*(链球菌属及肠球菌属)、*ermC*(葡萄球菌属)、*mefA*(链球菌属)及*msrA*(葡萄球菌属)等基因。

所述引物对中的正向引物和反向引物的基因特异性序列长度均为 15-50 个核苷酸, 优选为 15-35 个核苷酸。

所述试剂盒还包括一条通用引物, 所述通用引物大小为 15-35 个核苷酸, 其序列来自与细菌亲缘关系较远的物种(如拟南芥等)的 DNA 序列, 并经序列比对确认为与所有细菌 DNA 序列均不匹配的无关序列。可平衡各靶基因的扩增效率, 及促进单链 PCR 产物的生成。

所述扩增待测革兰氏阳性细菌菌株的种属特异基因及耐药基因的引物对中的正向引物或反向引物的 5' 端连接上所述通用引物序列。

为增加标记产物的量, 所述通用引物的 5' 端被荧光标记; 被连接上所述通用引物序列的正向引物或反向引物的 5' 端被荧光标记。

所述通用引物具有序列表中序列 2 的核苷酸序列。

所述扩增待测革兰氏阳性细菌菌株的 16S rRNA 基因的正向引物具有序列表中序列 3 的核苷酸序列, 所述扩增待测革兰氏阳性细菌菌株的 16S rRNA 基因的反向引物具有序列表中序列 4 的核苷酸序列。

所述扩增革兰氏阳性菌菌株种属特异基因引物对还可为扩增 *msrC* 的引物对。所述扩增 *msrC* 的正向引物具有序列表中序列 35 的核苷酸序列, 反向引物具有序列表中序列 36 的核苷酸序列。

所述扩增 *blaZ* 的正向引物具有序列表中序列 7 的核苷酸序列, 反向引物具有序列表中序列 8 的核苷酸序列; 扩增 *mecA* 的正向引物具有序列表中序列 9 的核苷酸序列, 反向引物具有序列表中序列 10 的核苷酸序列; 扩增 *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* 的正向引物具有序列表中序列 11 的核苷酸序列, 反向引物具有序列表中序列 12 的核苷酸序列; 扩增 *pbp-1a* 的正向引物具有序列表中序列 13 的核苷酸序列, 反向引物具有序列表中序列 14 的核苷酸序列; 扩增 *pbp-2b* 的正向引物具有序列表中序列 15 的核苷酸序列, 反向引物具有序列表中序列 16 的核苷酸序列; 扩增 *pbp-2x* 的正向引物具有序列表中序列 17 的核苷酸序列, 反向引物具有序列表中序列 18 的核苷酸序列; 扩增 *aacE* 的正向引物具有序列表中序列 19 的核苷酸序列, 反向引物具有序列表中序列 20 的核苷酸序列; 扩增 *vanA* 的正向引物具有序列表中序列 21 的核苷酸序列, 反向引物具有序列表中序列 22 的核苷酸序列; 扩增 *vanB* 的正向引物具有序列表中序列 23 的核苷酸序列, 反向引物具有序列表中序列 24 的核苷酸序列; 扩增 *ermA* 的正向引物具有序列表中序列 25 的核苷酸序列, 反向引物具有序列表中序列 26 的核苷酸序列; 扩增 *ermB* 的正向引物具有序列表中序列 27 的核苷酸序列, 反向引物具有序列表中序列 28 的核苷酸序列; 扩增 *ermC* 的正向引物具有序列表中序列 29 的核苷酸序列, 反向引物具有序列表中序列 30 的核苷酸序列; 扩增 *mefA* 的正向引物具有序列表中序列 31 的核苷酸序列, 反向引物具有序列表中序列 32 的核苷酸序列; 扩增 *msrA* 的正向引物具有序列表中序列 33 的核苷酸序列, 反向引物具有序列表中序列 34 的核苷酸序列。

所述试剂盒还包括作为内标的扩增待测革兰氏阳性细菌菌株的 23S rRNA 基因的引物对。

所述扩增待测革兰氏阳性细菌菌株的 23S rRNA 基因的正向引物具有序列表中序列 5

的核苷酸序列，所述扩增待测革兰氏阳性细菌菌株的 23S rRNA 基因的反向引物具有序列表中序列 6 的核苷酸序列。

所述探针的大小均为 15-50 个核苷酸。

所述探针的 5' 端连接上 10-35 个寡聚 dT，优选连接上 12-25 个寡聚 dT。

所述检测革兰氏阳性菌菌株种属特异基因探针可为检测革兰氏阳性菌种属特异的 16S rRNA 基因探针或检测 *msrC* 的探针。

所述检测 *msrC* 的探针为检测屎肠球菌的种属特异基因探针。

所述检测革兰氏阳性菌种属特异的 16S rRNA 基因探针包括检测葡萄球菌属，金黄色葡萄球菌，凝固酶阴性葡萄球菌，肠球菌属，粪肠球菌，屎肠球菌和耐久肠球菌和海氏肠球菌，鹌鸡肠球菌和鸟肠球菌和铅黄肠球菌和解糖肠球菌，链球菌属，肺炎链球菌，化脓链球菌和无乳链球菌的 16S rRNA 基因的探针。

所述检测葡萄球菌属的 16S rRNA 基因的探针具有序列表中序列 37 的核苷酸序列；所述检测金黄色葡萄球菌的 16S rRNA 基因的探针具有序列表中序列 38 的核苷酸序列；所述检测凝固酶阴性葡萄球菌的 16S rRNA 基因的探针具有序列表中序列 39 的核苷酸序列；所述检测肠球菌属的 16S rRNA 基因的探针具有序列表中序列 40 的核苷酸序列；所述检测粪肠球菌的 16S rRNA 基因的探针具有序列表中序列 41 的核苷酸序列；所述检测屎肠球菌和耐久肠球菌和海氏肠球菌的 16S rRNA 基因的探针具有序列表中序列 42 的核苷酸序列；所述检测鹌鸡肠球菌和鸟肠球菌和铅黄肠球菌和解糖肠球菌的 16S rRNA 基因的探针具有序列表中序列 43 的核苷酸序列；所述检测链球菌属的 16S rRNA 基因的探针具有序列表中序列 44 的核苷酸序列；所述检测肺炎链球菌的 16S rRNA 基因的探针具有序列表中序列 45 的核苷酸序列；所述检测化脓链球菌的 16S rRNA 基因的探针具有序列表中序列 46 的核苷酸序列；所述检测无乳链球菌的 16S rRNA 基因的探针具有序列表中序列 47 的核苷酸序列。

所述检测 *msrC* 的探针具有序列表中序列 48 的核苷酸序列。

所述试剂盒还包括检测细菌 16S rRNA 基因的通用探针，革兰氏阳性细菌 16S rRNA 基因的通用探针和革兰氏阴性细菌 16S rRNA 基因的通用探针。

所述检测细菌 16S rRNA 基因的通用探针具有序列表中序列 63 的核苷酸序列，所述检测革兰氏阳性细菌 16S rRNA 基因的通用探针具有序列表中序列 64 或序列 1 的核苷酸序列，所述检测革兰氏阴性细菌 16S rRNA 基因的通用探针具有序列表中序列 65 的核苷酸序列。

所述检测耐药基因探针包括检测 *blaZ*，*mecA*，*aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*，*pbp-1a*，*pbp-2b*，*pbp-2x*，*aadE*，*vanA*，*vanB*，*ermA*，*ermB*，*ermC*，*mefA* 和 *msrA* 的探针。

所述检测 *blaZ* 的探针具有序列表中序列 49 的核苷酸序列；所述检测 *mecA* 的探针具有序列表中序列 50 的核苷酸序列；所述检测 *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* 的探针具有序列表中序列 51 的核苷酸序列；所述检测 *pbp-1a* 的探针具有序列表中序列 52 的核苷酸序列；所述检测 *pbp-2b* 的探针具有序列表中序列 53 的核苷酸序列；所述检测 *pbp-2x* 的探针具有序列表中序列 54 的核苷酸序列；所述检测 *aadE* 的探针具有序列表中序列 55 的核苷酸序列；所述检测 *vanA* 的探针具有序列表中序列 56 的核苷酸序列；所述检测 *vanB* 的探针

具有序列表中序列 57 的核苷酸序列；所述检测 *ermA* 的探针具有序列表中序列 58 的核苷酸序列；所述检测 *ermB* 的探针具有序列表中序列 59 的核苷酸序列；所述检测 *ermC* 的探针具有序列表中序列 60 的核苷酸序列；所述检测 *mefA* 的探针具有序列表中序列 61 的核苷酸序列；所述检测 *msrA* 的探针具有序列表中序列 62 的核苷酸序列。

所述试剂盒还包括检测作为内标的细菌 23S rRNA 基因的通用探针。

所述检测细菌 23S rRNA 基因的通用探针具有序列表中序列 66 的核苷酸序列。

所述试剂盒还包括表面化学质控探针，杂交质控探针，阴性对照探针等质控探针，和杂交空白对照。

所述质控探针的大小均为 15-35 个核苷酸。

所述表面化学质控探针具有序列表中序列 67 的核苷酸序列，杂交质控探针具有序列表中序列 68 的核苷酸序列，阴性对照探针具有序列表中序列 69 的核苷酸序列。

所述杂交空白对照为含有质量百分浓度为 50% 的二甲基亚砜 (DMSO) 水溶液。

所述探针及杂交空白对照固定于载体上。

所述载体为硅片、用各种功能基团修饰的玻璃片或用各种功能基团衍生的膜。

所述载体优选为带有醛基基团的玻片。

所述试剂盒还包括进行 PCR 反应和分子杂交的反应液。

所述分子杂交反应液中含有杂交质控报告探针。

所述杂交质控报告探针为可以和固定于载体上的杂交质控探针进行杂交的核苷酸序列，其 5' 端被荧光标记。

所述杂交质控报告探针具有序列表中序列 70 的核苷酸序列。

本发明的第二个目的是提供一种利用上述革兰氏阳性细菌种属鉴定与耐药基因检测试剂盒进行革兰氏阳性细菌种属鉴定与耐药基因检测的方法。

本发明所提供的革兰氏阳性细菌种属鉴定与耐药基因检测方法，包括以下步骤：

1) 利用所述试剂盒中的引物 PCR 扩增待测革兰氏阳性细菌菌株的种属特异基因及耐药基因；

2) 将步骤 1) 得到的扩增产物与所述试剂盒中的检测革兰氏阳性菌种属特异基因探针和耐药基因探针进行杂交，确定待测革兰氏阳性细菌菌株的种属及其所含耐药基因。

所述 PCR 为多重不对称 PCR。

所述 PCR 扩增待测革兰氏阳性细菌菌株的种属特异基因及耐药基因的引物对中的两条正反向引物中，5' 端连接上所述通用引物序列的一条引物的浓度是另一条引物的 1-20 倍。

所述通用引物的浓度是所述 PCR 扩增待测革兰氏阳性细菌菌株的种属特异基因及耐药基因的引物对中的两条正反向引物浓度的 1-50 倍。

所述 PCR 扩增温度循环分为两个阶段：第一阶段的每个温度循环由变性、退火和延伸三个步骤组成，包括 10-30 个温度循环；第二阶段的每个温度循环由变性和延伸两个步骤组成，包括 10-30 个温度循环。

所述第二阶段的延伸温度为 60-75℃，优选为 70℃。

革兰氏染色是非常简便 (<10min) 的临床常规检测，本发明通过染色将阳性菌与阴

性菌快速分开后，再用基因芯片进行检测，本发明针对的是最常见的革兰氏阳性菌及其重要的耐药基因，具有明显的临床针对性和实用价值。此外，本发明将细菌鉴定和耐药检测整合到一起，可同时对常见的革兰氏阳性细菌种属及其重要的耐药基因进行检测。这极大的有利于缩短检测时间和增强临床实用性，对于细菌感染的合理用药及个性化治疗、控制耐药菌株的传播流行等，具有十分重要的意义。

本发明的革兰氏阳性细菌种属鉴定与耐药基因检测方法及其专用试剂盒具有集成化程度高、灵敏度高，应用范围广，特异性高，检测结果稳定，可靠性高的特点。

附图说明

- 图 1 为实施例 1 的探针排布示意图；
- 图 2 为实施例 1 杂交反应的荧光检测结果；
- 图 3 为实施例 2 的探针排布示意图；
- 图 4 为实施例 2 杂交反应的荧光检测结果；
- 图 5 为实施例 3 的探针排布示意图；
- 图 6 为实施例 3 杂交反应的荧光检测结果；

具体实施方式

下述实施例中的方法如无特别说明，均为常规方法。

在本发明的多重不对称 PCR 扩增体系里，DNA 聚合酶、dNTP、 Mg^{2+} 浓度和反应缓冲液等组分与常规 PCR 相同，并可根据不同的反应予以优化。不同之处在于使用的引物：一条基因特异性引物与常规 PCR 相同，而在另一条基因特异引物的 5' 末端加上一段与待扩增靶序列无关的寡核苷酸尾。不同基因特异性引物可加上相同序列尾。反应体系里还可加入一条额外的通用引物，其序列与基因特异性引物的通用无关序列尾完全相同，通用引物的浓度高于基因特异性引物。PCR 扩增温度循环分为两个阶段（参见表 6）：第一阶段同常规 PCR，包括变性、退火和延伸三个步骤，退火温度根据特异基因引物的 T_m 值可相应调整，同样地，延伸时间也可根据扩增片段长度调整。经 10-30 个温度循环后，立即开始第二阶段，10-30 个温度循环。第二阶段温度循环只有变性和延伸两个步骤，延伸反应的温度为 60-75℃。在前 10-30 个温度循环的扩增反应里，由于退火温度与基因特异性引物 T_m 值相当，两条基因特异性引物可进行普通的 PCR 扩增。而在后 10-30 个温度循环，只有加尾的基因特异性引物（较长，其全长的 T_m 值较高）可以退火延伸，从而达到制备单链的目的。通用引物可有以下作用：在前 10-30 个温度循环里，它可以参与第二个循环以后的扩增反应，平衡多重扩增时不同靶的扩增效率；在扩增的全过程里，由于通用引物浓度较高，可与加通用序列的基因特异性引物一起，增加与对应引物的浓度差异，从而进一步有利于不对称扩增和单链生成。可极大地提高杂交的信号。其中，本发明的革兰氏阳性细菌种属鉴定与耐药基因检测试剂盒包括的引物如表 1。

表 1 本发明的革兰氏阳性细菌种属鉴定与耐药基因检测试剂盒包括的引物

靶基因	扩增片段长度 (bp)	引物编号	引物种类	引物序列 (5'-3')	序列号

/	/	PMB-0408047	多重不对称 PCR 通用引物	TAMRA - GGTTTCGGATGTTACAGCGT	2
16S rRNA	约 1500	PMB-0201042	加尾的上游引物	TAMRA - GGTTTCGGATGTTACAGCGTAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	3
		PMB-0201002	不加尾的下游引物	AAGGAGGTGATCCAGCC	4
23S rRNA	231	PMB-0408115	加尾的上游引物	TAMRA - GGTTTCGGATGTTACAGCGTAACGGTCCTAAGGTAGCGAA	5
		PMB-0408116	不加尾的下游引物	GGCTCCTACCTATCCTGTACA	6
<i>msrC</i>	264	PMB-0201076	不加尾的上游引物	GAACATATCCGCAAACAAGG	35
		PMB-0201075	加尾的下游引物	TAMRA - GGTTTCGGATGTTACAGCGTCATCTAACAGCAACACATTACTTG	36
<i>blaZ</i>	259	PMB-0408098	不加尾的上游引物	CAACGTCTAAAAGAACTAGGAGA	7
		PMB-0408060	加尾的下游引物	TAMRA - GGTTTCGGATGTTACAGCGTTAGTCTTTTGGAACACCGTCT	8
<i>mecA</i>	352	PMB-0408007	不加尾的上游引物	GATGGCTATCGTGTCACAATC	9
		PMB-0408061	加尾的下游引物	TAMRA - GGTTTCGGATGTTACAGCGTTGAGTTGAACCTGGTGAAGT	10
<i>aac6</i>	513	PMB-0408017	不加尾的上游引物	AGCCTTGGGAAGATGAAGTT	11
		PMB-0408058	加尾的下游引物	TAMRA - GGTTTCGGATGTTACAGCGTGCCACACTATCATAACCACTAC	12
<i>pbp-1a</i>	309	PMB-0408100	不加尾的上游引物	GTGGTTTTCAATTCCTCGTC	13
		PMB-0408056	加尾的下游引物	TAMRA - GGTTTCGGATGTTACAGCGTCTAAACAAGGTCGGACTCAAC	14
<i>pbp-2b</i>	280	PMB-0408022	不加尾的上游引物	TGCTACATACTGAGCCAACCT	15
		PMB-0408054	加尾的下游引物	TAMRA - GGTTTCGGATGTTACAGCGTATATGGTCCAAACAGCCTTAG	16
<i>pbp-2x</i>	322	PMB-0408011	不加尾的上游引物	TCAGTGCTAAAACAGGGGAA	17
		PMB-0408055	加尾的下游引物	TAMRA - GGTTTCGGATGTTACAGCGTTCATCCCAACGTTACTTGAGT	18
<i>aacE</i>	480	PMB-0408015	不加尾的上游引物	AGCCGGAGGATATGGAATTATT	19
		PMB-0408057	加尾的下游引物	TAMRA - GGTTTCGGATGTTACAGCGTAAAAGTTTCTCCCAAAATCCTC	20
<i>vanA</i>	344	PMB-0408084	不加尾的上游引物	ACCAAATCAGGCTGCAGTA	21
		PMB-0408096	加尾的下游引物	TAMRA - GGTTTCGGATGTTACAGCGTCTAATACGATCAAGCGGTCAAT	22
<i>vanB</i>	413	PMB-0408082	不加尾的上游引物	ACGCTTACCTACCCTGTCT	23

		PMB-0408097	加尾的下游引物	TAMRA - GGTTTCGGATGTTACAGCGTAAGATCAACACGAGCAAGC	24
<i>ermA</i>	452	PMB-0408105	不加尾的上游引物	CCTGTCGGAATTGGTTTTTAG	25
		PMB-0408123	加尾的下游引物	TAMRA - GGTTTCGGATGTTACAGCGTCGGTAAACCCCTCTGAGAATA	26
<i>ermB</i>	431	PMB-0408117	不加尾的上游引物	TAACGACGAAACTGGCTAAAT	27
		PMB-0408125	加尾的下游引物	TAMRA - GGTTTCGGATGTTACAGCGTTGGTATGGCGGGTAAGTTTT	28
<i>ermC</i>	303	PMB-0408107	不加尾的上游引物	AGTAATGCCAATGAGCGTTTT	29
		PMB-0408124	加尾的下游引物	TAMRA - GGTTTCGGATGTTACAGCGTGGTGAATTTGTAACGCA	30
<i>mefA</i>	469	PMB-0408119	不加尾的上游引物	CAGGGCAAGCAGTATCATTAA	31
		PMB-0408126	加尾的下游引物	TAMRA - GGTTTCGGATGTTACAGCGTCAAACGGAGTATAAGAGTGCT	32
<i>msrA</i>	256	PMB-0408128	不加尾的上游引物	TACTTGAAGCTATTTACCACCA	33
		PMB-0408130	加尾的下游引物	TAMRA - GGTTTCGGATGTTACAGCGTAAATTTGTTCTTTCCCACC	34

表 2 本发明的革兰氏阳性细菌种属鉴定与耐药基因检测试剂盒包括的特异探针

探针编号	检测目标	探针序列 (5'-3')	序列号
PBB-0201001	细菌通用	NH2-T12-GCTGCCTCCCGTAGGAGT	63
PBB-0201002	金黄色葡萄球菌	NH2-T12-AGAAGCAAGCTTCTCGTCCG	38
PBB-0201005	链球菌属	NH2-T12-GTTAGCCGTCCTTTCTGG	44
PBB-0201006	无乳链球菌	NH2-T12-ACTAACATGTGTTAATTAATCTTATGC	47
PBB-0201008	化脓链球菌	NH2-T12-TTACTAACATGCGTTAGTCTCTCTTA	46
PBB-0201023	革兰氏阴性细菌	NH2-T12-AGGGCCATGATGACTTGACG	65
PBB-0201024	革兰氏阳性细菌	NH2-T12-GGGCATGATGATTTGACGTC	64
PBB-0201053	葡萄球菌属	NH2-T12-TCCTCCATATCTCTGCGCAT	37
PBB-0201078	肺炎链球菌	NH2-T12-GTGATGCAAGTGACCTT	45
PBB-0201081	粪肠球菌	NH2-T12-CCCTCTGATGGGTAGTT	41
PBB-0201090	表面化学质控(QC)	HEX-TCACTTGCTTCCGTTGAGG-NH2	67
PBB-0201094	肠球菌属	NH2-T12-GTTTCCAAGTGTATCCC	40
PBB-0201101	革兰氏阳性细菌	NH2-T12-AAGGGGCATGATGATTTGACGTC	1
PBB-0201104	屎肠球菌/ 耐久肠球菌/ 海氏肠球菌	NH2-T12-CCTTTCAAATCAAACCATGCG	42
PBB-0201110	鸩鸡肠球菌/ 鸟肠球菌/ 铅黄肠球菌/ 解糖肠球菌	NH2-T12-CGGTGAAAGAAAAAGCGTTCG	43
PBB-0201113	屎肠球菌(<i>msrC</i> 基因)	NH2-T12-GGAATCCTTCTCTCCGAAAGTAAG	48
PBB-0201115	凝固酶阴性葡萄球菌(CNS)	NH2-T12-GGAGCAAGCTCCTTRTCTGTTC	39
PBB-0204631	<i>blaZ</i> 基因	NH2-T12-CTGCTTTCGGTAAGACTTTAAATAAACTT	49
PBB-0204633	<i>mecA</i> 基因	NH2-T12-TATCCACCCTCAAACAGGTGAATT	50

PBB-0204635	<i>pbp-1a</i> 基因	NH2-T12-ACTTGCTCCATATTTTTGTCTGATTCCG	52
PBB-0204637	<i>pbp-2b</i> 基因	NH2-T12-GCAGTACCCAAGCCATATTCCGC	53
PBB-0204639	<i>pbp-2x</i> 基因	NH2-T12-AGTGATGATGTTGGCTGCTGCTATT	54
PBB-0204641	<i>aadE</i> 基因	NH2-T12-GCAATGAATTTTGAATGTAACACCTT	55
PBB-0204643	<i>aac6</i> 基因	NH2-T12-ATTGGAGTAAAGGAATTGGTACAAGAT	51
PBB-0204645	<i>vanA</i> 基因	NH2-T12-GTCTAGCCCGTGTGGATATGT	56
PBB-0204647	<i>vanB</i> 基因	NH2-T12-ACGGTATCTTCCGCATCCATC	57
PBB-0204652	杂交质控(EC)	NH2-T12-CCTCAACGGAAGCAAGTGAT	68
PBB-0204653	杂交质控报告探针(掺入杂交体系中, 与 PBB-0204652 反相互补)	TAMRA - ATCACTTGCTTCCGTTGAGG	70
PBB-0204655	23S rRNA 基因(内标 IC)	NH2-T12-AY*GGGGTCTTTCCGTCCTGT	66
PBB-0204656	<i>tetK</i> 基因(作为阴性对照 NC)	NH2-T12-GTTGCTTCTGGAATGAGTTTGCT	69
PBB-0204661	<i>ermA</i> 基因	NH2-T12-ATAGTAAACCCAAAGCTCGTTGC	58
PBB-0204663	<i>ermC</i> 基因	NH2-T12-TTGAAATTATCGTGATCAACAAGTT	60
PBB-0204665	<i>ermB</i> 基因	NH2-T12-CTTGATATTCACCGAACACTAGG	59
PBB-0204666	<i>mefA</i> 基因	NH2-T12-ATTGGTGTGCTAGTGGATCGTC	61
PBB-0204668	<i>msrA</i> 基因	NH2-T12-GCAAATGGCATACTATCGTCAACT	62

* Y=T 或 C

探针(表2)和PCR产物进行杂交的技术及条件对本领域中的熟练人员是已知的。例如杂交条件如下:中度严谨条件,即在50-60℃,5×SSC杂交1-2小时后,用溶液2×SSC,0.1%SDS,pH8.0进行洗涤,然后用蒸馏水室温洗涤2分钟。作为高度严谨杂交条件,也可能使用更高的温度进行杂交(例如在65-70℃)。

对于高选择性,优选地是使用相对较低的盐浓度和/或较高的温度条件,例如盐浓度从约0.02mol/L到约0.15mol/L,温度从约50℃到约65℃。

在本发明的一个优选实施例中,在检测中使用的是反向杂交技术,即将探针固定在载体上,合适的载体优选地是硅片、用各种功能基团修饰的玻片及用各种功能基团(例如硝基)衍生的膜(例如尼龙膜、硝酸纤维素膜等),最优选地是带有醛基基团的玻片。将来源于样品的经过标记,优选地是荧光标记的扩增PCR产物变性后,与固定在玻片上的探针进行杂交,在该过程中,根据核酸探针的长度、组成及预期杂合子(即标记的PCR产物与探针的结合)的溶解温度来选择温度、离子强度、pH和其他缓冲液条件(杂交参见Wahl, G.M.,等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA.76(1979)3683-3687)。

为了检测待测革兰氏阳性菌株种属及其所含耐药基因,应对靶核酸与探针杂交的杂交信号进行分析例如,典型地,杂交信号通过荧光扫描仪,例如GenePix4000B扫描仪(Axon Instruments, Inc., CA, USA)进行检测,并通过合适软件(例如,Genepix3.0)对杂交信号进行分析。

下面结合实施例进一步阐述本发明。

实施例1、利用本发明的革兰氏阳性细菌种属鉴定与耐药基因检测试剂盒进行葡萄球菌,肠球菌,链球菌种属鉴定及其耐药基因检测

1、检测目标及引物、探针

本试剂盒的检测目标包括:葡萄球菌属的金黄色葡萄球菌、凝固酶阴性葡萄球菌,

肠球菌属的粪肠球菌、屎肠球菌，链球菌属的肺炎链球菌，及其耐药基因 *mecA*、*aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*、*vanA*、*vanB*、*pbp-1a/pbp-2b/pbp-2x*、*ermA*、*ermB*、*ermC*、*mefA* 和 *msrA*。

选用与检测目标相应的引物和探针，如表 3，表 4（详细信息如表 1，表 2）。

表 3 革兰氏阳性细菌鉴定与耐药检测基因芯片试剂盒所用引物（共 31 条）

靶基因	引物编号	靶基因	引物编号	靶基因	引物编号	靶基因	引物编号
(多重不对称通用引物)	PMB-0408047	<i>mecA</i>	PMB-0408007	<i>pbp-2x</i>	PMB-0408011	<i>ermB</i>	PMB-0408117
			PMB-0408061		PMB-0408055		PMB-0408125
16S rRNA	PMB-0201042	<i>aac6</i>	PMB-0408017	<i>vanA</i>	PMB-0408084	<i>ermC</i>	PMB-0408107
	PMB-0201002		PMB-0408058		PMB-0408096		PMB-0408124
23S rRNA	PMB-0408115	<i>pbp-1a</i>	PMB-0408100	<i>vanB</i>	PMB-0408082	<i>mefA</i>	PMB-0408119
	PMB-0408116		PMB-0408056		PMB-0408097		PMB-0408126
<i>msrC</i>	PMB-0201076	<i>pbp-2b</i>	PMB-0408022	<i>ermA</i>	PMB-0408105	<i>msrA</i>	PMB-0408128
	PMB-0201075		PMB-0408054		PMB-0408123		PMB-0408130

表 4 革兰氏阳性细菌鉴定与耐药检测基因芯片试剂盒所用探针（共 27 条）

鉴定探针	探针编号	耐药探针	探针编号	质控探针	探针编号
葡萄球菌属	PBB-0201053	<i>mecA</i>	PBB-0204633	表面化学质控(QC)	PBB-0201090
金黄色葡萄球菌	PBB-0201002	<i>aac6</i>	PBB-0204643	杂交质控(EC)	PBB-0204652
凝固酶阴性葡萄球菌(CNS)	PBB-0201115	<i>vanA</i>	PBB-0204645	23S rRNA 基因(内标 IC)	PBB-0204655
肠球菌属	PBB-0201094	<i>vanB</i>	PBB-0204647	阴性对照(NC)	PBB-0204656
粪肠球菌	PBB-0201081	<i>pbp-1a</i>	PBB-0204635	细菌通用(BU)	PBB-0201001
屎肠球菌(<i>msrC</i> 基因)	PBB-0201113	<i>pbp-2b</i>	PBB-0204637	革兰氏阳性细菌(G+)	PBB-0201024
链球菌属	PBB-0201005	<i>pbp-2x</i>	PBB-0204639	空白对照(BC)	50% DMSO
肺炎链球菌	PBB-0201078	<i>ermA</i>	PBB-0204661		
		<i>ermC</i>	PBB-0204663		
		<i>ermB</i>	PBB-0204665		
		<i>mefA</i>	PBB-0204666		
		<i>msrA</i>	PBB-0204668		

引物和探针均由上海博亚生物技术公司合成。部分引物 5'端的 TAMRA 荧光标记和探针 5'端氨基修饰也由上海博亚生物技术公司完成。

2、革兰氏阳性细菌鉴定与耐药检测基因芯片的制备

1) 带有醛基基团的基质制备

将玻璃基质浸泡于洗液中，室温过夜。用自来水冲洗以洗净玻璃基质上的酸液，蒸馏水冲洗三次，去离子水漂洗一次，再用去离子水冲洗一次。离心甩干玻璃基质，在 110℃ 干燥 15 分钟，彻底干燥玻璃基质。将玻璃基质浸入 1% APTES (异丙胺基-三乙氧基硅烷) 的 95% 乙醇中，在室温下用摇床轻摇 1 小时。用 95% 乙醇清洗处理过的玻璃基质，先冲洗一次，再漂洗一次。将洗净的玻璃基质放入真空干燥箱，抽真空至最大刻度 (-0.08Mpa 到 -0.1Mpa)，关闭通气阀，110℃ 处理 20 分钟。然后将凉至室温的玻璃基质浸泡于 12.5% 的戊二醛溶液 (400ml 12.5% 戊二醛溶液：100ml 50% 的戊二醛，300ml 磷酸盐缓冲液

(1mol/L NaH_2PO_4 30ml, 2.628g NaCl), 调 pH 值到 7.0), 室温下轻摇 4 小时。将玻璃基质从戊二醛溶液中取出, $3\times\text{SSC}$ 漂洗一次, 去离子水冲洗两次, 离心甩干, 室温干燥。

2) 制备表面固定有探针的玻璃基质 (基因芯片)

将表 4 中的探针溶于 50% 的 DMSO 中, 终浓度为 $10\mu\text{mol/L}$ 。采用 Cartesian 的点样仪 (Cartesian Technologies, Inc., CA, USA) 按照图 1 的样式 (10 行 \times 12 列) 点样, 每种探针每次重复点样 4 个点。将点好的玻璃基质在室温中放置过夜以干燥玻璃基质, 然后室温下将玻璃基质在 0.2% 的 SDS 中浸泡两次, 每次 2 分钟, 振动。将玻璃基质用去离子水冲洗两次, 去离子水漂洗一次, 离心甩干。把玻璃基质转移到 NaBH_4 溶液 (1.0g NaBH_4 溶于 300ml $1\times\text{PBS}$ 中, 再加入 100 ml 无水乙醇), 室温摇床轻摇 5 分钟。将玻璃基质用去离子水冲洗一次, 去离子水漂洗两次, 每次 1 分钟, 离心甩干。

3、细菌培养与核酸提取

使用表 5 中的 7 株革兰氏阳性细菌菌株进行试验。其中体外药敏试验结果为根据美国 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) 标准方法所得的实验结果。

表 5 待检测菌株的已知信息

菌株编号	来源	菌种生化鉴定	体外药敏试验结果						
			P ^a	OX	FOX	GM	CM	ER	VAN
26001	中国药品生物制品检定所	金黄色葡萄球菌	40 ^b	30	30	23	24	27	/
TR558	北京同仁医院	金黄色葡萄球菌	6	6	11	10	6	6	/
J175	卫生部北京医院	CNS	6	6	9	12	6	6	/
M9	卫生部北京医院	粪肠球菌	/	/	/	7	/	/	16
YY7b	首都医科大学附属北京友谊医院	屎肠球菌	/	/	/	26	/	/	6
31111	中国药品生物制品检定所	肺炎链球菌	0.06 ^c	/	/	/	0.03	0.03	/
PS53	北京协和医院	肺炎链球菌	4	/	/	/	≥ 4	≥ 4	/

注: ^a 药物: P--青霉素; OX--苯唑西林; FOX--头孢西丁; GM--庆大霉素; CM--克林霉素; ER--红霉素; VAN--万古霉素。

^b 葡萄球菌和肠球菌数据为抑菌圈直径(mm); ^c 链球菌数据为 MIC 值(μg)。

在超净工作台内将细菌划线接种于 MH (Mueller Hinton Agar Medium) 培养基平板以分离单菌落, 将平板在孵箱中倒置, 35°C 孵育 24h。

称取 10mg G1145 型玻璃珠和 40mg G1152 型玻璃珠 (Sigma) 于一无菌 1.5ml 离心管, 向管内加入 $25\mu\text{l}$ $1\times\text{TE}$ 。将镊子在火焰上灭菌并冷却后, 夹取牙签或 tip 头, 从培养细菌的 MH 平板上沾取一单菌落, 在管底的玻璃珠中反复摩擦使菌尽可能完全留在管中, 盖好离心管盖。手持离心管, 在涡旋混合器上 (TDX-1 型, 北京通达) 最大力度持续振荡 5 min。然后将离心管 95°C 水浴 5 min, 置 4°C 备用。

4、核酸扩增

多重不对称 PCR 反应体系的组成如下: $1\times\text{MasterMix}$ (北京天为时代); $1\mu\text{mol/L}$ 的多重不对称 PCR 通用引物 PMB_0408047; 16S rRNA 基因特异引物 PMB-0201042 ($0.5\mu\text{mol/L}$) 和 PMB-0201002 ($0.2\mu\text{mol/L}$); 表 3 中其余 14 对基因特异性引物 (加尾引物 $0.1\mu\text{mol/L}$, 不加尾引物 $0.04\mu\text{mol/L}$); $3\mu\text{l}$ 玻璃珠振荡后的菌液或 $3\mu\text{l}$ 无菌水 (作为空白对照)。反

应的总体积为 25 μl 。

PCR 在 PTC-200 (MJ Research Inc.) 热循环仪上进行, 采用表 6 的多重不对称 PCR 扩增热循环程序。

表 6 多重不对称 PCR 扩增热循环程序

温度 ($^{\circ}\text{C}$)	94	94	59	72	94	70	72	4
时间 (s)	600	1	60	90	1	120	300	-
循环数	1	20			20		1	1
说明	预变性	第一步 PCR 扩增			第二步 PCR 扩增		延伸	终止

5、芯片杂交及信号检测

杂交反应液的配制如表 7 所示。

表 7 杂交反应液

成分	终浓度	加入量 (μl)
10nmol/L PBB_0204653	0.56nmol/L	1.0
20 \times SSC	2 \times	1.8
50 \times Denhardt's	5 \times	1.8
50% 硫酸葡聚糖	10%	3.6
4% SDS	0.4%	1.8
多重不对称 PCR 产物	/	8.0
总计	/	18.0

在杂交盒 (HybriCassettesTM, 北京博奥生物芯片有限责任公司) 内加入 200 μl 蒸馏水, 以防止杂交反应液蒸发, 将表面固定有反应物的玻璃基质及盖片 (SmartCoverTM, 北京博奥生物芯片有限责任公司) 放置于杂交盒中。杂交反应液加热至 95 $^{\circ}\text{C}$ 保持 5 分钟使 PCR 产物充分变性后, 立即置于冰水混合物中冷却。取 13 μl 杂交反应液通过盖片上的小孔加入盖片和玻璃基质之间的空隙中, 盖好杂交盒, 54 $^{\circ}\text{C}$ 杂交 90 分钟。取出芯片, 浸入 2 \times SSC, 0.2% SDS 的溶液中, 室温摇床轻摇 5 分钟。再将芯片用去离子水漂洗两次, 每次 2 分钟, 离心甩干。

芯片荧光信号采用晶芯[®]LuxScanTM-10K/B 激光共聚焦扫描仪及其配套软件 (北京博奥生物芯片有限责任公司) 检测, 检测条件为: 波长 (wavelength), 555nm; PMT, 80%; 功率 (power), 80%。

6、结果分析

芯片杂交结果如图 2 所示。所得结果全部与表 5 中的菌株已知信息相符合:

26001 — 芯片检测为金黄色葡萄球菌, 与已知信息相符合。芯片未检测出目标耐药基因, 而体外药敏试验结果也显示对相应的药物均敏感;

TR558 — 芯片检测为金黄色葡萄球菌, 与已知信息相符合。芯片检测出 *mecA*、*aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*、*ermA*、*ermC* 四种耐药基因, 分析该菌株应为对青霉素、苯唑西林、头孢西丁、庆大霉素等氨基糖苷类、克林霉素等林可霉素类、红霉素等大环内酯类均耐药的 MRSA 菌株, 与体外药敏试验结果相符合;

J175 — 芯片检测为凝固酶阴性葡萄球菌, 与已知信息相符合。芯片检测出 *mecA*、

aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia、*ermC*、*msrA* 四种耐药基因，分析同样为对所有上述 6 种药物均耐药的 MRSCN 菌株，也与体外药敏试验结果相符合；

M9 — 芯片检测为粪肠球菌，与已知信息相符合。芯片检测出 *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* 基因，分析该菌株应对庆大霉素等氨基糖苷类高度耐药，与体外药敏试验结果一致。芯片还检测出 *ermB* 基因，但肠球菌大多对大环内酯类天然耐药，临床上对于肠球菌感染的治疗一般不用大环内酯类药物，因此 *ermB* 基因主要作为链球菌的一个检测指标；而且 NCCLS 也基于此原因，并无对肠球菌检测大环内酯类耐药性的标准方法，因此并未对肠球菌进行大环内酯类的体外药敏试验；

YY7b — 芯片检测为屎肠球菌，与已知信息相符合。芯片检测出 *vanA* 基因，说明该菌株应为较罕见的万古霉素耐药肠球菌(VRE)，体外药敏试验结果也证实了这一点。另外，芯片未检测出 *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* 基因，分析该菌株应对庆大霉素等氨基糖苷类敏感，同样与体外药敏试验结果一致；

31111 — 芯片检测为肺炎链球菌，与已知信息相符合。芯片检测出 *pbp-1a*、*pbp-2b*、*pbp-2x* 等基因的探针阳性，说明这些基因的高变区未发生变异，所以对青霉素类敏感，而体外药敏试验结果也显示对青霉素敏感。另外，芯片未检测出 *ermB* 和 *mefA* 基因，分析该菌株应对大环内酯类敏感，也与体外药敏试验结果一致；

PS53 — 芯片检测为肺炎链球菌，与已知信息相符合。芯片检测 *pbp-1a*、*pbp-2b*、*pbp-2x* 等基因的探针阴性，说明这些基因的高变区发生了变异，所以该菌株应为对青霉素类耐药的 PRSP，而体外药敏试验结果也显示对青霉素耐药。芯片还检测出 *ermB* 和 *mefA* 基因，说明该菌株也应对大环内酯类耐药，仍与体外药敏试验结果相符合。

以上分析可以说明，本方法所得的结果与临床常规方法所得的结果高度吻合。这说明本发明所提供的革兰氏阳性细菌鉴定与耐药检测基因芯片试剂盒，可以特异地鉴定检测目标中常见革兰氏阳性细菌的种属，以及特异地检测出其所含检测目标中的耐药基因。

实施例 2、利用本发明的革兰氏阳性细菌种属鉴定与耐药基因检测试剂盒进行肠球菌鉴定与耐药基因检测

1、检测目标及引物、探针

本试剂盒的检测目标包括：肠球菌属的粪肠球菌、屎肠球菌、屎肠球菌和耐久肠球菌和海氏肠球菌、鹌鸡肠球菌和鸟肠球菌和铅黄肠球菌和解糖肠球菌，及其耐药基因 *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*、*aadE*、*vanA* 和 *vanB*。

选用与检测目标相应的引物和探针，如表 8，表 9（详细信息如表 1，表 2）。

表 8 肠球菌鉴定与耐药检测基因芯片试剂盒所用引物(共 15 条)

靶基因	引物编号	靶基因	引物编号
多重不对称通用	PMB-0408047	<i>aac6</i>	PMB-0408017
			PMB-0408058
16S rRNA	PMB-0201042	<i>aadE</i>	PMB-0408015
	PMB-0201002		PMB-0408057
23S rRNA	PMB-0408115	<i>vanA</i>	PMB-0408084
	PMB-0408116		PMB-0408096

<i>msrC</i>	PMB-0201076	<i>vanB</i>	PMB-0408082
	PMB-0201075		PMB-0408097

表9 肠球菌鉴定与耐药检测基因芯片试剂盒所用探针（共27条）

鉴定探针	探针编号	耐药探针	探针编号	质控探针	探针编号
葡萄球菌属	PBB-0201053	<i>aac6</i>	PBB-0204643	表面化学质控(QC)	PBB-0201090
链球菌属	PBB-0201005	<i>aadE</i>	PBB-0204641	杂交质控(EC)	PBB-0204652
肠球菌属	PBB-0201094	<i>vanA</i>	PBB-0204645	23S rRNA 基因(内标 IC)	PBB-0204655
粪肠球菌	PBB-0201081	<i>vanB</i>	PBB-0204647	阴性对照(NC)	PBB-0204656
屎肠球菌(<i>msrC</i> 基因)	PBB-0201113			细菌通用(BU)	PBB-0201001
屎肠/耐久/海氏肠球菌	PBB-0201104			革兰氏阳性细菌(G+)	PBB-0201101
鸨鸡/乌/铅黄/解糖肠球菌	PBB-0201110			革兰氏阴性细菌(G-)	PBB-0201023
				空白对照(BC)	50% DMSO

引物和探针均由上海博亚生物技术公司合成。部分引物 5'端的 TAMRA 荧光标记和探针 5'端氨基修饰也由上海博亚生物技术公司完成。

2、肠球菌鉴定与耐药检测基因芯片的制备

方法基本同实施例 1。按照图 3 的样式（10 行×8 列）点样（图 3 中 104 表示探针 PBB_0201104，110 表示探针 PBB_0201110）。

3、细菌培养与核酸提取

使用表 10 中的 5 株肠球菌菌株进行试验。其中体外药敏试验结果为根据 NCCLS 标准方法所得的实验结果。

表 10 待检测菌株的已知信息

菌株编号	来源	菌种生化鉴定	体外药敏试验结果(抑菌圈直径)(mm)		
			庆大霉素(GM)	链霉素(S)	万古霉素(VAN)
TR6635	北京同仁医院	粪肠球菌	21	18	21
TR1106	北京同仁医院	屎肠球菌	6	30	24
TR2850	北京同仁医院	鸟肠球菌	22	25	25
R2389	北京协和医院	粪肠球菌	6	6	18
YY7b	首都医科大学 附属北京友谊 医院	屎肠球菌	26	6	6

细菌培养与核酸提取方法同实施例 1。

4、核酸扩增

多重不对称 PCR 反应体系的组成如下：1×MasterMix（北京天为时代）；1 μmol/L 的多重不对称 PCR 通用引物 PMB_0408047；16S rRNA 基因特异性引物 PMB-0201042（0.25 μmol/L）和 PMB-0201002（0.25 μmol/L）；表 8 中其余 6 对基因特异性引物（加尾引物 0.05 μmol/L，不加尾引物 0.05 μmol/L）；1 μl 玻璃珠振荡后的菌液或 1 μl 无菌水（作为空白对照）。反应的总体积为 25 μl。

PCR 在 PTC-200（MJ Research Inc.）热循环仪上进行，采用表 6 的多重不对称 PCR 扩增热循环程序。

5、芯片杂交及信号检测

方法同实施例 1。

6、结果分析

芯片杂交结果如图 4 所示。所得结果全部与表 10 中的菌株已知信息相符合。这说明本发明所提供的革兰氏阳性细菌种属鉴定与耐药基因检测试剂盒，可以特异地鉴定检测目标中肠球菌的种属，以及特异地检测出其所含检测目标中的耐药基因。

实施例 3、利用本发明的革兰氏阳性细菌种属鉴定与耐药基因检测试剂盒进行葡萄球菌种属鉴定与耐药基因检测

1、检测目标及引物、探针

本试剂盒的检测目标包括：葡萄球菌属的金黄色葡萄球菌、凝固酶阴性葡萄球菌，及其耐药基因 *mecA*、*blaZ*、*aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*、*ermA/ermC* 和 *msrA*。

选用与检测目标相应的引物和探针，如表 11，表 12（详细信息如表 1，表 2）。

引物和探针均由上海博亚生物技术公司合成。部分引物 5'端的 TAMRA 荧光标记和探针 5'端氨基修饰也由上海博亚生物技术公司完成。

2、葡萄球菌鉴定与耐药检测基因芯片的制备

方法基本同实施例 1。按照图 5 的样式（10 行×8 列）点样。

表 11 葡萄球菌鉴定与耐药检测基因芯片试剂盒所用引物（共 17 条）

靶基因	引物编号	靶基因	引物编号	靶基因	引物编号
多重不对称通用	PMB-0408047	<i>blaZ</i>	PMB-0408098	<i>msrA</i>	PMB-0408128
			PMB-0408060		PMB-0408130
16S rRNA	PMB-0201042	<i>aac6</i>	PMB-0408017		
	PMB-0201002		PMB-0408058		
23S rRNA	PMB-0408115	<i>ermA</i>	PMB-0408105		
	PMB-0408116		PMB-0408123		
<i>mecA</i>	PMB-0408007	<i>ermC</i>	PMB-0408107		
	PMB-0408061		PMB-0408124		

表 12 葡萄球菌鉴定与耐药检测基因芯片试剂盒所用探针（共 27 条）

鉴定探针	探针编号	耐药探针	探针编号	质控探针	探针编号
葡萄球菌属	PBB-0201053	<i>mecA</i>	PBB-0204633	表面化学质控(QC)	PBB-0201090
金黄色葡萄球菌	PBB-0201002	<i>blaZ</i>	PBB-0204631	杂交质控(EC)	PBB-0204652
凝固酶阴性葡萄球菌(CNS)	PBB-0201115	<i>aac6</i>	PBB-0204643	23S rRNA 基因(内标 IC)	PBB-0204655
肠球菌属	PBB-0201094	<i>ermA</i>	PBB-0204661	阴性对照(NC)	PBB-0204656
链球菌属	PBB-0201005	<i>ermC</i>	PBB-0204663	细菌通用(BU)	PBB-0201001
		<i>msrA</i>	PBB-0204668	革兰氏阳性细菌(G+)	PBB-0201101
				革兰氏阴性细菌(G-)	PBB-0201023
				空白对照(BC)	50% DMSO

3、细菌培养与核酸提取

使用表 13 中的 4 株葡萄球菌菌株进行试验。其中体外药敏试验结果为根据 NCCLS 标准方法所得的实验结果。

表 13 待检测菌株的已知信息

菌株编号	来源	菌种生化鉴定	体外药敏试验结果(抑菌圈直径 mm)					
			青霉素 (P)	苯唑西林 (OX)	头孢西丁 (FOX)	庆大霉素 (GM)	克林霉素 (CM)	红霉素 (ER)
26001	中国药品生物制品检定所	金葡	40	30	30	23	24	27
J121	卫生部北京医院	CNS	16	24	33	20	25	6
TR177	北京同仁医院	金葡	6	6	14	11	6	6
J33	卫生部北京医院	CNS	6	6	6	7	6	6

细菌培养与核酸提取方法同实施例 1。

4、核酸扩增

多重不对称 PCR 反应体系的组成如下：1×MasterMix（北京天为时代）；1 μmol/L 的多重不对称 PCR 通用引物 PMB_0408047；16S rRNA 基因特异性引物 PMB-0201042（0.5 μmol/L）和 PMB-0201002（0.25 μmol/L）；表 11 中其余 7 对基因特异性引物（加尾引物 0.05 μmol/L，不加尾引物 0.05 μmol/L）；1 μl 玻璃珠振荡后的菌液或 1 μl 无菌水（作为空白对照）。反应的总体积为 25 μl。

PCR 在 PTC-200（MJ Research Inc.）热循环仪上进行，采用表 6 的多重不对称 PCR 扩增热循环程序。

5、芯片杂交及信号检测

方法基本同实施例 1。

6、结果分析

芯片杂交结果如图 6 所示。所得结果全部与表 13 中的菌株已知信息相符合。这说明本发明所提供的革兰氏阳性细菌种属鉴定与耐药基因检测试剂盒，可以特异地鉴定检测目标中葡萄球菌的种属，以及特异地检测出其所含检测目标中的耐药基因。

 序列表

<160>70

<210>1

<211>35

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>1

ttttttttt ttaaggggca tgatgatttg acgtc

35

<210>2

<211>20

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>2

ggtttcggat gttacagcgt

20

<210>3

<211>40

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>3

ggtttcggat gttacagcgt agagtttgat cctggctcag

40

<210>4

<211>17

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>4

aaggaggtga tccagcc

17

<210>5

<211>40

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>5

ggtttcggat gttacagcgt aacggtccta aggtagcgaa

40

<210>6

<211>21

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>6

ggctcctacc tatcctgtac a

21

<210>7

<211>23

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>7	
caacgtctaa aagaactagg aga	23
<210>8	
<211>41	
<212>DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223>	
<400>8	
ggtttcggat gttacagcgt tagtcttttg gaacaccgtc t	41
<210>9	
<211>21	
<212>DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223>	
<400>9	
gatggctatc gtgtcacaat c	21
<210>10	
<211>40	
<212>DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223>	
<400>10	
ggtttcggat gttacagcgt tgagttgaac ctggtgaagt	40
<210>11	

<211>20	
<212>DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223>	
<400>11	
agccttggga agatgaagtt	20
<210>12	
<211>42	
<212>DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223>	
<400>12	
ggtttcggat gttacagcgt gccacactat cataaccact ac	42
<210>13	
<211>21	
<212>DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223>	
<400>13	
gtggttttca atttcctcgt c	21
<210>14	
<211>41	
<212>DNA	
<213>人工序列	
<220>	

<223>

<400>14

ggtttcggat gttacagcgt ctaaacaagg tcggactcaa c

41

<210>15

<211>20

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>15

tgctacatac tgagccaact

20

<210>16

<211>41

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>16

ggtttcggat gttacagcgt atatggtcca aacagcctta g

41

<210>17

<211>20

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>17

tcagtgctaa aacaggggaa

20

<210>18

<211>41

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>18

ggtttcggat gttacagcgt tcatcccaac gttacttgag t

41

<210>19

<211>22

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>19

agccggagga tatggaatta tt

22

<210>20

<211>43

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>20

ggtttcggat gttacagcgt aaaagtttct cccacaaatc ctc

43

<210>21

<211>19

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>21

accaaatacag gctgcagta

19

<210>22

<211>42

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>22

ggtttcggat gttacagcgt ctaatacagat caagcggatca at

42

<210>23

<211>19

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>23

acgcttacct accctgtct

19

<210>24

<211>39

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>24

ggtttcggat gttacagcgt aagatcaaca cgagcaagc

39

<210>25
<211>21
<212>DNA
<213>人工序列

<220>
<223>

<400>25
cctgtcggaa ttggttttta g

21

<210>26
<211>41
<212>DNA
<213>人工序列

<220>
<223>

<400>26
ggtttcggat gttacagcgt cggtaaacc ctcctgagaat a

41

<210>27
<211>22
<212>DNA
<213>人工序列

<220>
<223>

<400>27
taacgacgaa actggctaaa at

22

<210>28
<211>40
<212>DNA
<213>人工序列

<220>

<223>

<400>28

ggtttcggat gttacagcgt tggatggcg ggtaagtttt

40

<210>29

<211>21

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>29

agtaatgcca atgagcgttt t

21

<210>30

<211>41

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>30

ggtttcggat gttacagcgt ggtgtaattt cgtaactgcc a

41

<210>31

<211>21

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>31

cagggcaagc agtatcatta a 21

<210>32

<211>41

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>32

ggtttcggat gttacagcgt caaacggagt ataagagtgc t 41

<210>33

<211>22

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>33

tacttgaagc tatttaccac ca 22

<210>34

<211>41

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>34

ggtttcggat gttacagcgt taatttcggt ctttccccac c 41

<210>35

<211>20

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>35

gaacatatcc gcaaacaagg

20

<210>36

<211>44

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>36

ggtttcggat gttacagcgt catctaacag caacacatta cttg

44

<210>37

<211>32

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>37

tttttttttt tttctccat atctctgcgc at

32

<210>38

<211>32

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>38	
tttttttttt ttagaagcaa gcttctcgtc cg	32
<210>39	
<211>34	
<212>DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223>	
<400>39	
tttttttttt ttggagcaag ctccttrtct gttc	34
<210>40	
<211>30	
<212>DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223>	
<400>40	
tttttttttt ttgtttccaa gtgttatccc	30
<210>41	
<211>30	
<212>DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223>	
<400>41	
tttttttttt ttccctctga tgggtaggtt	30
<210>42	
<211>34	

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>42

tttttttttt ttcctttcaa atcaaaacca tgcg

34

<210>43

<211>33

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>43

tttttttttt ttcggtgaaa gaaaaagcgt tcg

33

<210>44

<211>31

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>44

tttttttttt ttgtagccg tccctttctg g

31

<210>45

<211>30

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>45	
tttttttttt ttgtgatgca agtgcacctt	30
<210>46	
<211>38	
<212>DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223>	
<400>46	
tttttttttt ttttactaac atgcgtagt ctctctta	38
<210>47	
<211>39	
<212>DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223>	
<400>47	
tttttttttt ttactaacat gtgtaatta ctcttatgc	39
<210>48	
<211>38	
<212>DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223>	
<400>48	
tttttttttt ttggaatcct tctctctccg aaagtaag	38
<210>49	

<211>41

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>49

tttttttttt ttctgctttc ggtaagactt taaataaact t

41

<210>50

<211>36

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>50

tttttttttt ttatccacc ctcaaacagg tgaatt

36

<210>51

<211>39

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>51

tttttttttt ttattggagt aaaggaattg gtacaagat

39

<210>52

<211>40

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>52

tttttttttt ttacttgctc catatttttt gtctgattcg

40

<210>53

<211>34

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>53

tttttttttt ttgcagtacc caagccatat tcgc

34

<210>54

<211>37

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>54

tttttttttt ttagtgatga tgttggctgc tgctatt

37

<210>55

<211>39

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>55

tttttttttt ttgcaatgaa ttttggaatg taacacctt

39

<210>56
<211>33
<212>DNA
<213>人工序列

<220>
<223>

<400>56
tttttttttt ttgtctagcc cgtgtggata tgt 33

<210>57
<211>33
<212>DNA
<213>人工序列

<220>
<223>

<400>57
tttttttttt ttacggtatc ttccgatcc atc 33

<210>58
<211>35
<212>DNA
<213>人工序列

<220>
<223>

<400>58
tttttttttt ttatagtaaa cccaaagctc gttgc 35

<210>59
<211>36
<212>DNA
<213>人工序列

<220>

<223>

<400>59

tttttttttt ttcttgata ttcaccgaac actagg

36

<210>60

<211>38

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>60

tttttttttt ttttgaaat tatcgtgatc aacaagtt

38

<210>61

<211>34

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>61

tttttttttt ttattggtgt gctagtggat cgtc

34

<210>62

<211>36

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>62

ttttttttt ttgcaaattg catactatcg tcaact	36
<210>63	
<211>30	
<212>DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223>	
<400>63	
ttttttttt ttgctgcctc ccgtaggagt	30
<210>64	
<211>32	
<212>DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223>	
<400>64	
ttttttttt ttgggcatga tgatttgacg tc	32
<210>65	
<211>32	
<212>DNA	
<213>人工序列	
<220>	
<223>	
<400>65	
ttttttttt ttagggccat gatgacttga cg	32
<210>66	
<211>32	
<212>DNA	

<213>人工序列

<220>

<221>misc-feature

<222> (14)

<223>y=t 或 c

<400>66

tttttttttt ttayggggtc tttccgtcct gt

32

<210>67

<211>19

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>67

tcacttgctt ccgttgagg

19

<210>68

<211>32

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>68

tttttttttt ttcctcaacg gaagcaagtg at

32

<210>69

<211>35

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>69

tttttttttt ttgttgcttc tggaatgagt ttgct

35

<210>70

<211>20

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>70

atcacttgct tccgttgagg

20

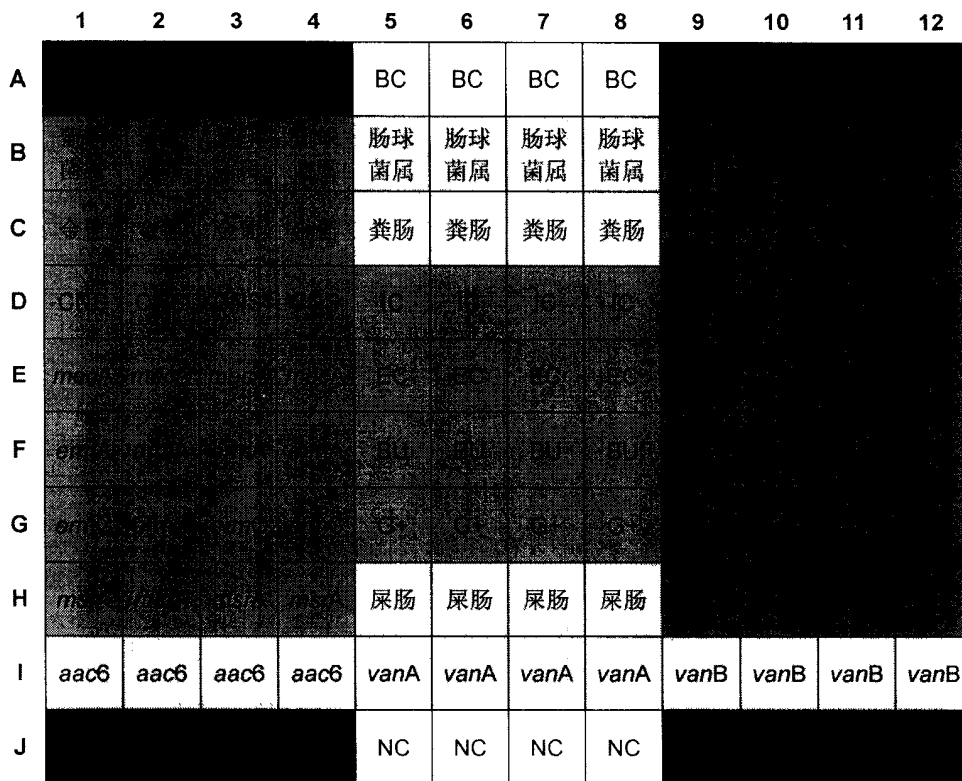


图 1

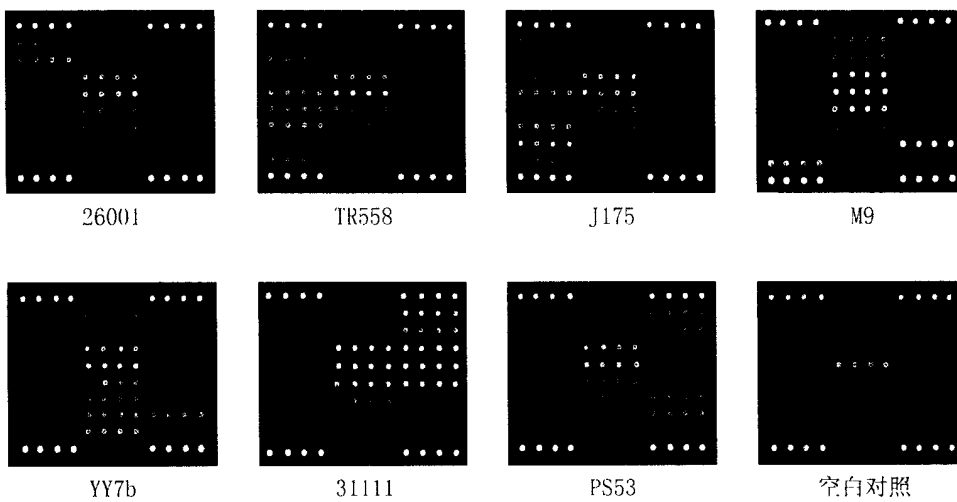


图 2

	1	2	3	4	5	6	7	8
A			NC	NC	BC	BC		
B								
C					肠球 菌属	肠球 菌属	肠球 菌属	肠球 菌属
D	粪肠	粪肠	粪肠	粪肠	屎肠	屎肠	屎肠	屎肠
E	104	104	104	104	110	110	110	110
F								
G	<i>aac6</i>	<i>aac6</i>	<i>aac6</i>	<i>aac6</i>	<i>vanB</i>	<i>vanB</i>	<i>vanB</i>	<i>vanB</i>
H	<i>vanA</i>	<i>vanA</i>	<i>vanA</i>	<i>vanA</i>	<i>aadE</i>	<i>aadE</i>	<i>aadE</i>	<i>aadE</i>
I								
J			BC	BC	NC	NC		

图 3

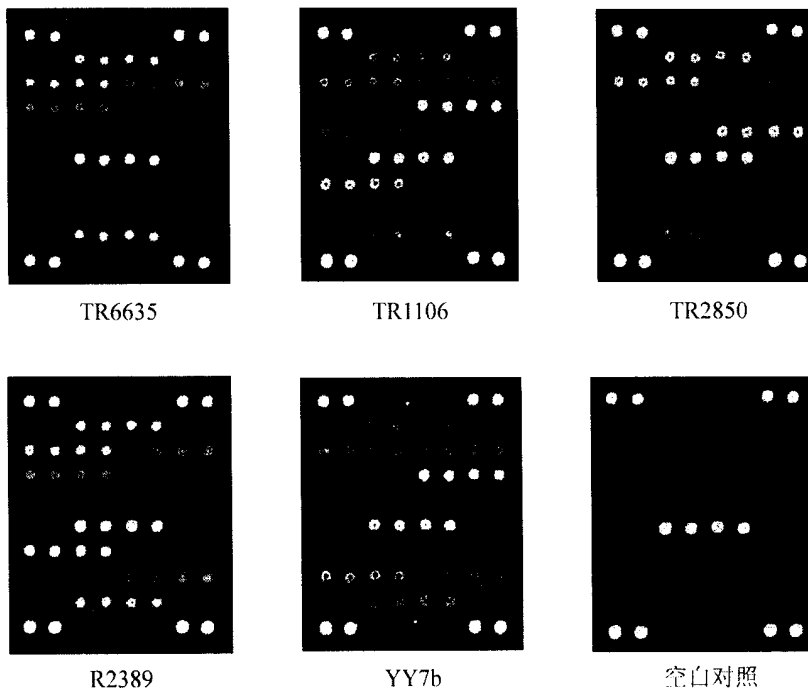


图 4

	1	2	3	4	5	6	7	8
A			NC	NC	BC	BC		
B	G-	G-	BU	BU	BU	BU	G-	G-
C	G+	G+	G-	G-				
D	ONS	ONS				ONS	ONS	ONS
E			EC	EC	EC	EC		
F	<i>ermA</i>	<i>ermA</i>	<i>ermA</i>	<i>ermA</i>	<i>mecA</i>	<i>mecA</i>	<i>mecA</i>	<i>mecA</i>
G	<i>ermC</i>	<i>ermC</i>	<i>ermC</i>	<i>ermC</i>	<i>blaZ</i>	<i>blaZ</i>	<i>blaZ</i>	<i>blaZ</i>
H	<i>msrA</i>	<i>msrA</i>	<i>msrA</i>	<i>msrA</i>	<i>aac6</i>	<i>aac6</i>	<i>aac6</i>	<i>aac6</i>
I	肠球 菌属	肠球 菌属	IC	IC	IC	IC	肠球 菌属	肠球 菌属
J			BC	BC	NC	NC		

图 5

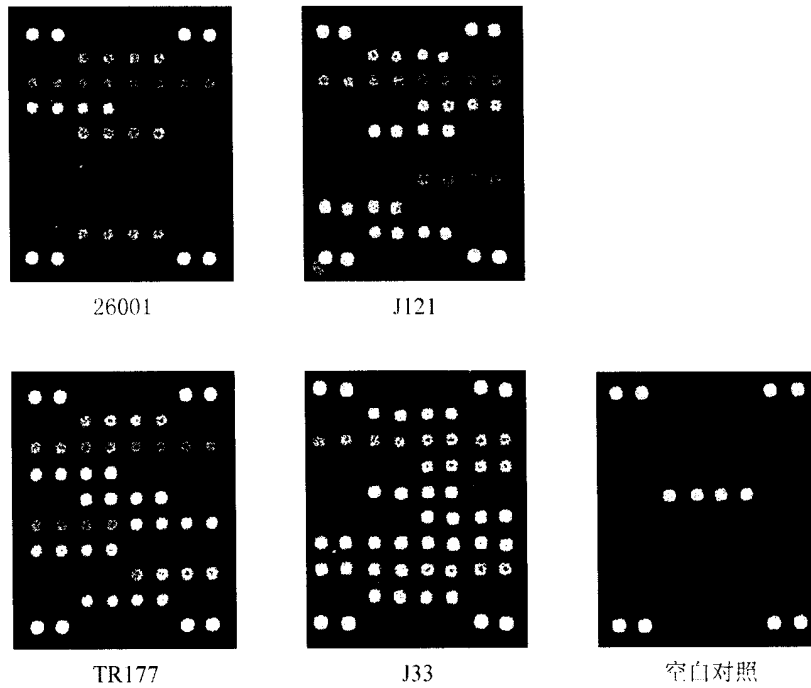


图 6