

快速检测 *NDM-1* 基因的环介导恒温扩增技术的建立与评价

张苑怡^{1,2}, 武娜², 朱宝利², 陈蕾³, 朱玉琢¹

1 吉林大学 遗传学教研室, 长春 130021

2 中国科学院微生物研究所 中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

3 北京蓝谱生物科技有限公司, 北京 100101

摘要: 基于 DNA 环介导恒温扩增技术 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP), 探索建立一种应用于 *NDM-1* 基因 (New Metallo- β -Lactamase-1 Gene, *NDM-1*) 的快速检测方法, 以适应临床实验室等的检测需求。利用 LAMP 技术, 以 *NDM-1* 基因为靶序列, 设计 4 组 LAMP 引物, 并筛选最优引物组, 建立 LAMP 反应体系与条件, 进行灵敏度和特异性实验。结果表明整个检测过程仅需 1 h, 即可通过肉眼直接目测实验结果。在灵敏度试验中, *NDM-1* 基因的最低检测限为 6 拷贝/反应。在特异性实验中, 以 4 株病原菌 (肺炎克雷伯氏菌、大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌) 以及肠道菌群元基因组 DNA、土壤菌群元基因组 DNA 为模板对 *NDM-1* 基因进行检测, 结果显示均没有发生非特异性扩增反应。文中建立的 LAMP 检测方法能够快速检测 *NDM-1* 基因, 且可直接观察到实验结果, 实现了检测结果的可视化。具有操作简单安全、检测灵敏度高、特异性高的特点, 能够满足基层实验室、应急检测或现场监测等方面的使用需求, 具有良好的应用价值。

关键词: *NDM-1* 基因, 环介导恒温扩增技术, 快速检测, β -内酰胺酶, 聚合酶链式反应

Establishment of loop-mediated isothermal amplification technique for rapid detection of *NDM-1* gene

Yuanyi Zhang^{1,2}, Na Wu², Baoli Zhu², Lei Chen³, and Yuzhuo Zhu¹

1 Laboratory of Medical Genetics, Jilin University, Changchun 130021, China

2 CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

3 Beijing Lanpu Biotechnology Co., Ltd, Beijing 100101, China

Abstract: We established a rapid detection method of New Delhi Metallo- β -Lactamase Gene (*NDM-1*) based on Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP). With the application of LAMP, we designed four sets of LAMP primers,

Received: January 25, 2011; **Accepted:** April 22, 2011

Supported by: Key Infectious Diseases Program (No. 2009ZX10601), Knowledge Innovation Project of Chinese Academy of Sciences (Space Science Advanced Research-21).

Corresponding author: Yuzhuo Zhu. Tel: +86-431-85619487; E-mail: yuzhuo001@sina.com

传染病重大专项 (No. 2009ZX10601), 中国科学院知识创新工程项目 (空间科学预先研究项目-21) 资助。

using *NDM-1* gene as the target sequence, and selected the set of optimal primers. Meanwhile, we established optimal reaction systems and conditions to carry out the sensitivity and specificity experiments. The experiment results showed that the whole detection process took only one hour and could be observed visually. In the experiment of sensitivity, *NDM-1* gene had a detection limit of 6 copies in each reaction. In the experiment of specificity, we detected *NDM-1* gene in 4 pathogen strains (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*), and the total DNA from intestinal microbes and the total DNA from soil microbes. We had not detected the amplification reactions. The detection method established could rapidly detect *NDM-1* gene and visualize the experiment result. The method is easy to operate and has high sensitivity and specificity and thus has great application value in basic research laboratories, emergent detection and spot detection.

Keywords: New Delhi Metallo- β -Lactamase Gene (*NDM-1*), Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP), rapid detection, β -Lactamase, PCR

抗生素是由微生物(包括细菌、真菌、放线菌属)或高等动植物在生活过程中所产生的具有抗病原体或其他活性的一类次级代谢产物,能干扰其他生物细胞发育功能的化学物质。抗生素可以通过抑制细菌细胞壁的合成、抑制细菌蛋白质的合成、抑制核酸的复制和转录以及干扰细菌代谢通路等多种药理途径杀灭细菌。由于一种抗生素只能针对一种或几种细菌产生抑制作用,因此医务人员在使用抗生素时,往往在用药剂量及抗生素类型方面具有多种选择,为临床抗生素污染埋下隐患^[1-2]。近年来由于抗生素的不合理使用等多种原因,细菌耐药现象日益严重,大量耐药菌的出现使人们的生命健康又一次面临巨大挑战^[3]。

据 2010 年 8 月 11 日出版的英国 *The Lancet Infectious Diseases* 期刊报道,目前有一种新的耐药基因在一些国家流行,一些西方医学家称其为 *NDM-1* 基因^[4]。同时以 $\text{bla}_{\text{NDM-1}}$ 来命名编码 *NDM-1* 的基因。 $\text{bla}_{\text{NDM-1}}$ 已发现于肺炎克雷伯氏菌的 180 kb 的质粒和大肠埃希氏菌的 140 kb 的质粒上,由 *NDM-1* 基因编码的酶全长 269 个氨基酸,与现有的其他金属- β -内酰胺酶(Metallo- β -Lactamase) 比对,氨基酸序列的一致性不足 33%,且在酶活性位点附近经常伴有独特的氨基酸残基及插入序列,并能与碳青霉烯类抗生素紧密结合^[5]。在 $\text{bla}_{\text{NDM-1}}$ 基因上游的 2 个区域中还存在能够抵抗链霉素、红霉素、氯霉素、利福平等抗生素的基因以及消毒剂和磺胺

药物的多种耐药基因^[6-7]。由于含有 *NDM-1* 基因的质粒既能在菌株之间穿梭传递,又可以在转移中发生重组,且通过携带 *NDM-1* 基因的质粒的传递,还可使对抗生素敏感的细菌获得多重耐药性,大大增加临床抗生素使用的困难^[7]。目前含有 $\text{bla}_{\text{NDM-1}}$ 基因的细菌可以耐受除多粘菌素(Colistin)和氟喹诺酮(Fluoroquinolones)以外的所有抗生素^[8]。因此建立一种快速检测 *NDM-1* 基因的方法以及寻找 *NDM-1* 基因抗生素变得迫在眉睫。本实验的目的即是针对 *NDM-1* 基因,探索建立一种快速检测方法。

LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法是 2000 年由 Notomi 等发明的一种新颖的恒温核酸扩增方法。该方法采用特异地识别靶序列上 6 个区域的 4 条引物(2 条外引物,2 条内引物)及具有链置换活性的 Bst DNA 聚合酶,在 65 °C 左右进行核酸的指数级扩增,其扩增效率可达到 $10^9 \sim 10^{10}$ 个拷贝数量级。整个反应仅需 1 h,在扩增反应中副产物焦磷酸镁沉淀与钙黄绿素结合,产生黄绿色荧光,不需要借助其他仪器便可辨别实验结果。LAMP 技术具有简便、快速、准确、廉价、易检测等特点^[9-12]。目前,国内外尚未见 LAMP 方法检测 *NDM-1* 基因的报道,因此本文针对 *NDM-1* 基因设计特异性引物,快速检测 *NDM-1* 基因。不仅可指导临床合理用药,以免延误病情和增加治疗费用,而且有利于控制其传播,防止爆发流行,这对提高治疗效果和控制医院内感染均有重要意义。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

本研究使用的 4 株试验菌株 (大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯氏菌、肺炎链球菌) 由中国疾病预防控制中心菌种室提供。*NDM-1* 基因模板由中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所杨瑞馥研究员提供, *NDM-1* 基因序列全长 873 bp。肠道菌群元基因组 DNA、土壤菌群元基因组 DNA 为本实验室材料。

1.1.2 主要试剂和仪器

本研究所使用的 LAMP 法 DNA 反应试剂盒与荧光染料钙黄绿素均购自日本荣研化学株式会社; Loopamp 浊度仪购自日本荣研化学株式会社; Loopamp 反应管购自日本荣研化学株式会社; 滤膜枪头购自 Eppendorf 公司及 AXYGEM 公司; 电热恒温水浴锅 (DK-8D) 购自上海森信实验仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 反应体系与反应条件

1) LAMP 反应体系与反应条件: 反应各组分终浓度为: 内引物 FIP 和 BIP 各 1.6 $\mu\text{mol/L}$, 外引物 FOP 和 BOP 各 0.2 $\mu\text{mol/L}$, 环引物 FLP 和 BLP 各 0.8 $\mu\text{mol/L}$, dNTPs 1.4 mmol/L, 甜菜碱 0.8 mol/L, Tris-HCl (pH 8.8) 20 mmol/L, KCl 10 mmol/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 mmol/L, MgSO_4 8 mmol/L, Tween20 0.1%, Bst DNA 聚合酶大片段 8 U, 模板 2 μL , 钙黄绿素 1 μL , 双蒸水定容至 25 μL 。LAMP 反应条件: 将 25 μL 的 LAMP 反应体系迅速置于 65 $^\circ\text{C}$ 水浴锅, 反应 1 h 后, 置于 80 $^\circ\text{C}$ 5min, 终止反应。

2) PCR 反应体系与反应条件: 反应各组分终浓度为: 10 $\mu\text{mol/L}$ 上游引物 (5'-TGGACCGATGACCAGACCG-3') 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 下游引物 (5'-GATCAGGCAGCCACCAAAA-3') 各 1 μL , 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL , 5 U/ μL Ex *Taq* 酶 (TaKaRa) 0.125 μL , 10 \times buffer 2.5 μL , 模板 2 μL , 双蒸水定容至 25 μL

体系。PCR 反应条件: 预变性 94 $^\circ\text{C}$ 5 min; 94 $^\circ\text{C}$ 1 min, 60 $^\circ\text{C}$ 1 min, 72 $^\circ\text{C}$ 1 min 30 s, 30 个循环; 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。

1.3 引物设计、合成与筛选

引物根据 *NDM-1* 基因序列 (GenBank Accession No. FN 396876.1), 利用 PrimerExplorer V4 软件 (日本荣研株式会社) 自行设计 4 组引物 (编号分别为 [1]、[28]、[43]、[75]), 由上海英骏生物技术有限公司合成。将针对 *NDM-1* 基因设计的 4 组引物同时进行 LAMP 扩增, 用 Loopamp 浊度仪同时检测 4 组引物扩增效率, 以筛选最优的一组引物。

1.4 LAMP 扩增产物判断方法

LAMP 反应结束后, 可以用 3 种方法鉴别是否发生了 LAMP 扩增: (A) 可以在反应前向体系中加入 1 μL 钙黄绿素, 反应后观察溶液颜色变化。(B) 可观察反应管中是否有白色焦磷酸镁沉淀。(C) 可直接通过 Loopamp 浊度仪观察。

1.5 灵敏度试验

Nanodrop 测量 *NDM-1* 基因模板浓度 A_{260} 为 2.9 mg/L, 用双蒸馏水进行 10 倍梯度稀释。

1.5.1 LAMP 灵敏度试验

将 *NDM-1* 模板梯度稀释, 选取 2.9×10^{-6} mg/L (6×10^3 拷贝/反应) 到 2.9×10^{-9} mg/L (6 拷贝/反应) 4 个不同梯度为模板, 并用水作空白对照, 肺炎克雷伯氏菌和大肠埃希氏菌作阴性对照, 进行 LAMP 扩增。并同时进行了 3 组平行试验, 检测 120 min。

1.5.2 PCR 灵敏度试验

将 *NDM-1* 模板梯度稀释, 选取 2.9×10^{-1} mg/L (6×10^8 拷贝/反应) 到 2.9×10^{-9} mg/L (6 拷贝/反应) 9 个不同梯度为模板, 并用水作空白对照, 肺炎克雷伯氏菌作阴性对照, 进行 PCR 扩增。

1.6 特异性试验

采用本研究中设计的 LAMP 引物和 PCR 引物, 对 4 株背景明确的菌株 (大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯氏菌、肺炎链球菌) 以及肠道菌群元基因组 DNA、土壤菌群元基因组 DNA 分别进行 LAMP 反应和 PCR 反应, 以验证两种方法的特

异性。

2 结果

2.1 LAMP 引物筛选实验结果

将 invitrogen 公司合成的 4 对引物[1]、[28]、[43]、[75]以 *NDM-1* 为模板同时进行 LAMP 反应, 4 组引物均可以发生 LAMP 反应。观察反应曲线, 其中[1]号引物扩增速率最快, 出峰时间最早, 因此选择[1]号产物组为 *NDM-1* 基因的 LAMP 扩增反应最优引物组。4 组引物 LAMP 反应结果见图 1。[1]号引物序列见表 1。

2.2 LAMP 实验结果的判别方法

以 *NDM-1* 基因模板作为阳性组, 双蒸水作空白对照, 肺炎克雷伯氏菌和大肠埃希氏菌作阴性对照, 同时进行 LAMP 扩增。可以通过以下 3 种方法判断实验结果: 1) 利用荧光显色法结果显示: 阳性组出现了绿色荧光, 空白对照组及阴性对照组仍为浅橙色荧光 (图 2A)。2) 可通过肉眼观察产物颜色变化来判定结果。结果显示: 阳性组出现白色浑浊沉淀物, 空白对照组及阴性对照组仍为无色透明状态 (图 2B)。3) 通过 Loopamp 浊度仪即可判定是否发生 LAMP 扩增。结果显示: 阳性组由于出现了蓝色柱状扩增条带, 而使模块由蓝色改变为红色。空白对照组及阴性对照组由于尚未出现蓝色柱状扩增条带, 模块仍旧显示为蓝色。(图 2C)。以上 3 种检测方法均可用琼脂糖凝胶电泳验证实验结果如下: 阳性组出现 LAMP 扩增特异带型, 空白对照组及阴性对照组未出现 LAMP 扩增条带。3 种观察方法均证

明发生了 LAMP 反应 (图 2)。

2.3 灵敏度试验结果

将选取 (2.9×10^{-6} mg/L 到 2.9×10^{-9} mg/L) 4 个不同梯度的 *NDM-1* 模板, 进行 LAMP 扩增。并同时进行了 3 组平行试验。用 LAMP 浊度仪实时检测 120 min, 由于 LAMP 扩增反应目的条带呈梯状弥散条带, 因此发生 LAMP 扩增反应时, 其泳道呈现梯状目的条带, 而未发生 LAMP 扩增反应, 其泳道为空白。在 3 组 LAMP 灵敏度实验中, 均发生了 LAMP 扩增反应, 其中有两组最低检测灵敏度为 2.9×10^{-9} mg/L (6 拷贝/反应), 与 PCR 方法检测灵敏度 2.9×10^{-6} mg/L (6×10^3 拷贝/反应) 相比提高了

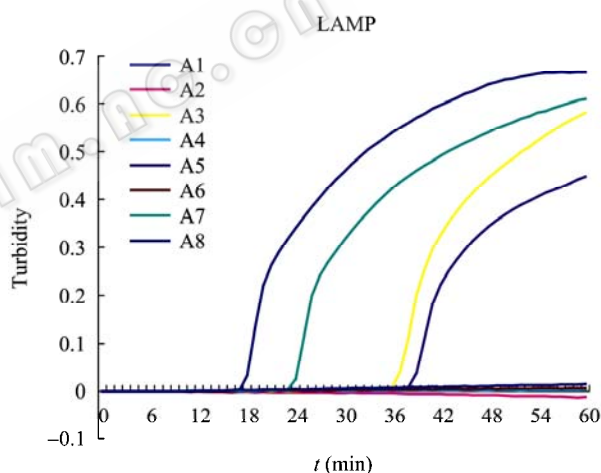


图 1 LAMP 扩增反应引物组筛选实验结果

Fig. 1 Selection of four primer groups with LAMP method. The results of LAMP reaction: as for A1, A3, A5 and A7, LAMP carried out *NDM-1* template DNA with primer [1], [75], [28] and [43], respectively; as for A2, A4, A6 and A8, LAMP carried out in the absence of template DNA with primer [1], [75], [28] and [43], respectively.

表 1 [1]号组 LAMP 引物序列

Table 1 Nucleotide sequences of the primers [1]

Primer name	Primer sequences (5'-3')	Primer length (bp)
FOP	CTCGACATGCCGGTTTC	18
BOP	GCCCATCTTGCTCTGATGC	19
FIP	TATCGACCACCAGCACGCGGGGGCAGTCGCTTCCA	36
BIP	ACCGATGACCAGACCGCCCATGAGTACCACCGCCAG	37
FLP	TCCCTGACGATCAAACCGT	19
BLP	GATCCTCAACTGGATCAAGCAG	22

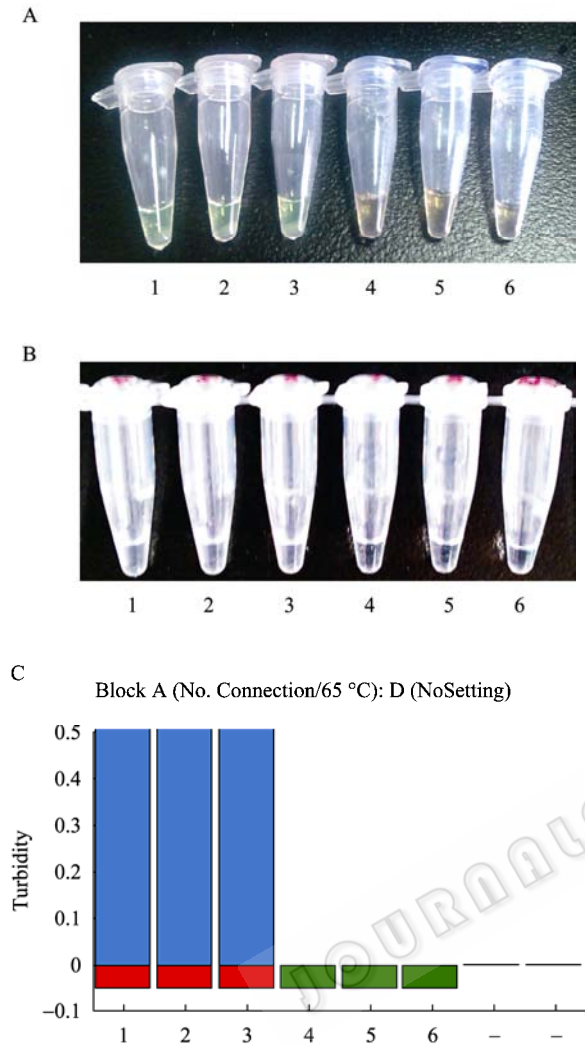


图2 LAMP 扩增产物检测结果

Fig. 2 Detection results of LAMP amplification. (A) Detection results of the LAMP reaction using inspection of the color change in calcein under visible light: tubes 1-3 showed the color change from original orange to bright-green. (B) Detection results of the LAMP reaction using the naked eye detection of the white turbidity as a positive result: tubes 1-3 showed the white turbidity. (C) Detection results of the LAMP reaction using Loopamp turbidimeter: bar 1-3 showed the positive results.

3 个数量级 (图 3)。另外一组最低检测灵敏度为 2.9×10^{-8} mg/L (6×10^1 拷贝/反应), 与 PCR 方法检测灵敏度 2.9×10^{-6} mg/L (6×10^3 拷贝/反应) 相比提高了 2 个数量级 (数据未显示)。

2.4 NDM-1 特异性试验结果

由于 NDM-1 基因是 2008 年发现的新基因, 我

们将此基因 (GenBank Accession No. FN 396876.1) 在 NCBI 中经过 BLAST 比对分析后并未发现与其有同源性很高的序列, 另据文献报道^[5], NDM-1 基因发现于肺炎克雷伯氏菌 *Klebsiella pneumoniae* 05-506 的 180 kb 的质粒和大肠埃希氏菌的 140 kb 的质粒上。因此在特异性实验中, 选择了 4 株背景明确的菌株 (大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯氏菌、肺炎链球菌) 以及肠道菌群元基因组 DNA、土壤菌群元基因组 DNA 分别进行 LAMP 反应和 PCR 反应, 以验证两种方法的特异性。

采用本实验中设计的 [1] 号 LAMP 引物组和 PCR 引物, 分别对 4 株背景明确的菌株及元基因组 DNA 进行扩增, 结果显示均未发生阳性扩增 (图 4), 说明 [1] 号 LAMP 引物组及 PCR 引物均能特异地检测 NDM-1 基因。根据 LAMP 引物设计原则, 如模板序列中 6 个区域中任何一个区域与引物不匹配均不能进行扩增反应。故 LAMP 方法特异性极高。

3 讨论

近年来由于抗生素滥用及抗生素累积的双重因素, 使得细菌中的耐药基因不断积累, 从而产生了多重抗药性^[13]。目前, 携带有 NDM-1 基因的超级细菌正在全球蔓延, 印度、美国、英国、澳大利亚、加拿大、法国、荷兰等多个国家已经出现了疑似病例^[4]。面对“超级细菌”的跨国传播趋势, 寻找一种能够快速、安全的检测 NDM-1 基因的方法成为了人类与细菌这场竞赛的亟待解决的首要问题。

本实验采用 LAMP 技术针对肺炎克雷伯氏菌 *Klebsiella pneumoniae* 05-506 携带的 NDM-1 基因的序列设计了 4 组特异性引物^[5], LAMP 扩增结果显示 4 组引物均可用于检测 NDM-1 耐药基因, 通过进一步的试验筛选, 最终确定了 [1] 号引物组为最优引物。引物的优化及筛选为快速、准确的检测 NDM-1 耐药基因打下坚实的基础。实验结果显示 LAMP 技术相对比传统的 PCR 扩增技术, 在恒温条件下即可发生反应, 摆脱了对于仪器的依赖。反应时间短,

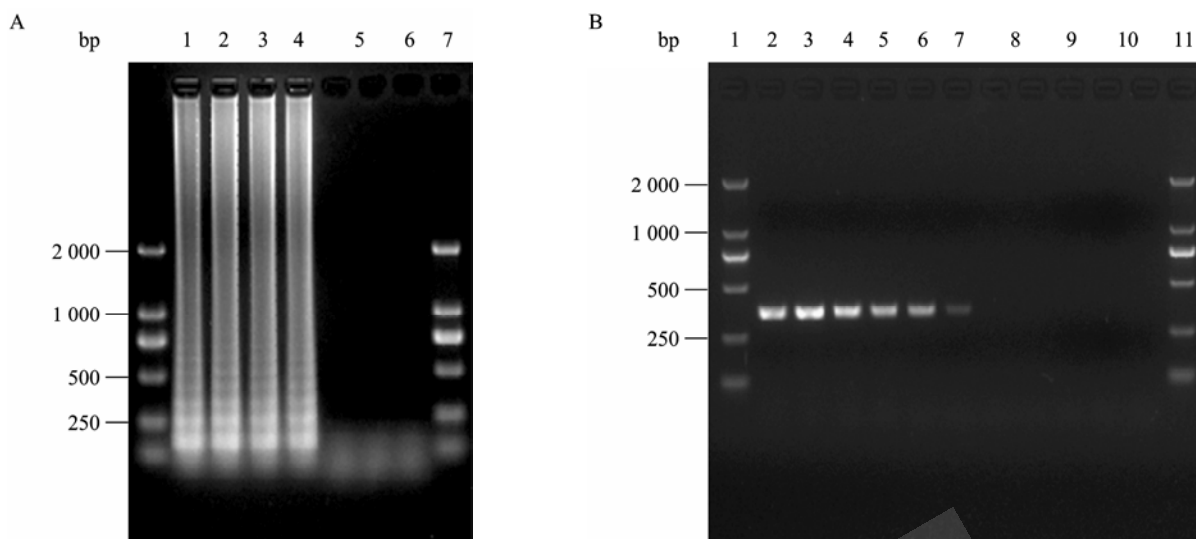


图3 LAMP及PCR灵敏度试验结果

Fig. 3 The sensitivity of *NDM-1* gene shown in LAMP and PCR methods. (A) The sensitivity of *NDM-1* gene shown in LAMP. The first four lanes all have positive results. The other lanes all have negative results. 1: 2.9×10^{-6} mg/L; 2: 2.9×10^{-7} mg/L; 3: 2.9×10^{-8} mg/L; 4: 2.9×10^{-9} mg/L; 5: blank control; 6: negative control: the template with *Klebsiella pneumoniae*; 7: negative control: the template with *Escherichia coli*. (B) The sensitivity of *NDM-1* gene shown in PCR. The first six lanes all have positive results. The other lanes all have negative results. 1: 2.9×10^{-1} mg/L; 2: 2.9×10^{-2} mg/L; 3: 2.9×10^{-3} mg/L; 4: 2.9×10^{-4} mg/L; 5: 2.9×10^{-5} mg/L; 6: 2.9×10^{-6} mg/L; 7: 2.9×10^{-7} mg/L; 8: 2.9×10^{-8} mg/L; 9: 2.9×10^{-9} mg/L; 10: blank control; 11: negative control: the template with *Klebsiella pneumoniae*.

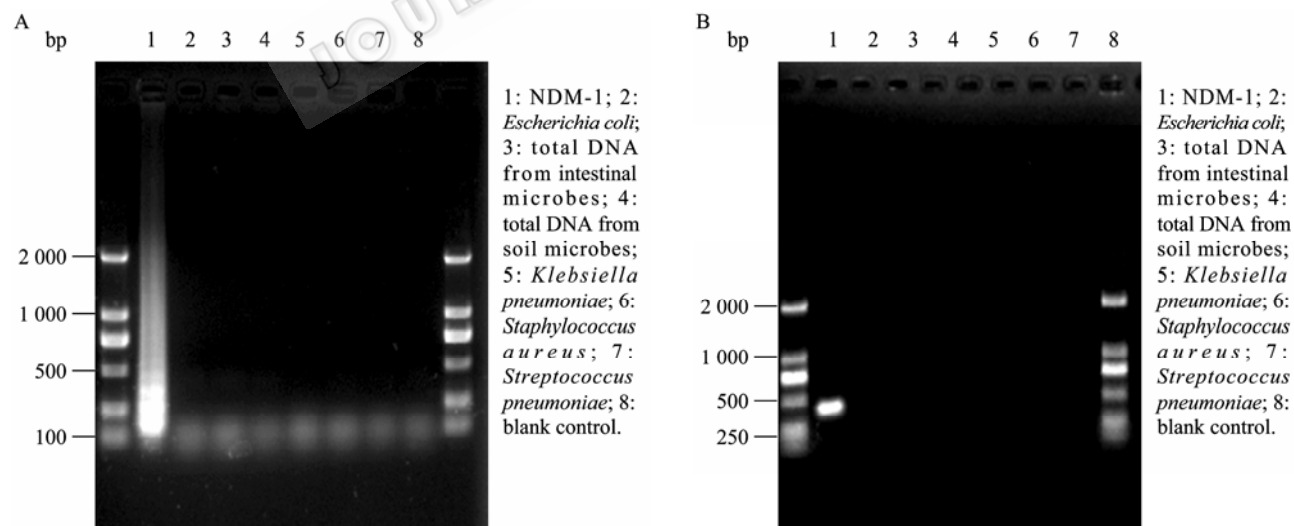


图4 LAMP及PCR特异性试验结果

Fig. 4 The specificity of *NDM-1* gene shown in LAMP and PCR methods. (A) The specificity of *NDM-1* gene shown in LAMP. Lane 1, with *NDM-1* template, was detected of positive result while the rest seven lanes, without *NDM-1* template, was detected of negative result. (B) The specificity of *NDM-1* gene shown in PCR. Lane 1, with *NDM-1* template, was detected of positive result while the rest seven lanes, without *NDM-1* template, was detected of negative result.

在 1 h 内即可完成。LAMP 技术的敏感性与特异性实验结果显示：对于 *NDM-1* 基因的检测，LAMP 扩增敏感性比传统 PCR 扩增技术提高了 3 个数量级，最低检测限为 6 拷贝/反应，且特异性良好。因反应产生了大量的焦磷酸镁沉淀，可直接目测结果、荧光显色分辨或用 Loopamp 浊度仪检测沉淀浊度。本实验方法弥补传统检测方法操作复杂、检测时间长、需要复杂仪器的检测弊端，建立了快速准确的 *NDM-1* 基因检测方法，表明该研究具有重要的应用价值。

LAMP 技术具有许多扩增方法所无法比拟的优点。1) 只需一恒定温度就能进行扩增反应，摆脱了对于仪器的依赖。2) 高特异性：应用 6 个靶基因位点，内引物及外引物在 6 个区域特异性结合方可进行扩增。3) 快速、高效扩增：整个扩增在不到 60 min 即可完成，且产率可达到 0.5 g/L。4) 灵敏度高：最低检测限为 1~10 拷贝。5) 步骤简单：所有试剂在反应前添加，实现一步核酸扩增。6) 鉴定简便：在核酸大量合成时，从 dNTPs 解离出的焦磷酸根离子与反应溶液中的 Mg^{2+} 结合，产生副产物——焦磷酸镁沉淀。只要用肉眼观察或荧光显色就能够判断扩增与否，实现了结果可视化。

因此，环介导恒温扩增技术，在实际应用中表现出灵敏度高、速度快、特异性强、简便等特点。为 *NDM-1* 基因以及其他病原微生物的检测提供了有力的技术支持。作为快速、便洁的检测方法，其广泛应用将大大提高低仪器配置地区的病原微生物检测能力，对病原微生物的早期、准确诊断有着重大意义。

REFERENCES

- [1] Huttner B, Harbarth S. "Antibiotics are not automatic anymore"—the french national campaign to cut antibiotic overuse. *PLoS Med*, 2009, 6(6): e1000080.
- [2] Harbarth S, Samore MH. Antimicrobial resistance determinants and future control. *Emerg Infect Dis*, 2005, 11(6): 794–801.
- [3] Norrby SR, Nord CE, Finch R. Lack of development new antimicrobial drugs: a potential serious threat public health. *Lancet Infect Dis*, 2005, 5(2): 115–119.
- [4] 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. *Lancet Infect Dis*, 2010, 10(9): 597–602.
- [5] 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. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(12): 5046–5054.
- [6] Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, et al. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev*, 2005, 18(2): 306–325.
- [7] Sun MW, Zheng BW, Gao GF, et al. Arms racing between human beings and pathogens: NDM-1 and superbugs. *Chin J Biotech*, 2010, 26(11): 1461–1472.
孙明伟, 郑培文, 高福, 等. 人类与病原菌的军备竞赛: NDM-1 耐药基因与超级细菌. *生物工程学报*, 2010, 26(11): 1461–1472.
- [8] Sharma VK, Guleria R, Mehta V, et al. NDM-1 resistance: fleming's predictions become true. *Int J Appl Biol Pharm Technol*, 2010, 1(3): 1244–1251.
- [9] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12): e63.
- [10] Aryana E, Makvandia M, Farajzadeha A, et al. A novel and more sensitive loop-mediated isothermal amplification assay targeting *IS6110* for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiol Res*, 2010, 165(3): 211–220.
- [11] Mori Y, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J Infect Chemother*, 2009, 15(2): 62–69.
- [12] Boehme CC, Nabeta P, Henostroza G, et al. Operational feasibility of using loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of pulmonary tuberculosis in microscopy centers of developing countries. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(6): 1936–1940.