

研究报告

多黏菌素类抗生素耐药性编码基因检测用质粒标准样品研制

- 陈进¹, 苏秀敏¹, 杨静², 曹彦卫³, 田园园¹, 冯承谦⁴, 赵红阳⁵, 卢行安⁵, 崔生辉⁶, 杨保伟¹
- (1. 西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 杨凌质量技术检测检验所, 陕西 杨凌 712100; 3. 河北省林草花卉质量检验检测中心, 河北 石家庄 050081; 4. 汉中市汉台区市场监督管理局, 过街楼蔬菜批发市场监管所, 陕西 汉中 723000; 5. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100176; 6. 中国食品药品检定研究院, 北京 100500)

摘要:目的 研制适合多黏菌素类抗生素耐药性编码基因检测用质粒 DNA 标准样品。方法 由 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 数据库检索得到 *mcr-1*、*mcr-3*、*mcr-5* 基因参考序列, 构建重组质粒和重组菌株; 将重组菌传代至 15 代检测目标基因的遗传稳定性。提取重组质粒, 真空干燥, 制得标准样品。将标准样品水化、连续 10 倍梯度稀释, 测定聚合酶链式反应 (PCR) 和实时荧光 PCR (RT-qPCR) 扩增目标基因的检出限。随机抽取质粒 DNA 标准样品, 采用 PCR 法和紫外分光光度计法检验样品的均匀性及其在 4 °C、37 °C、-20 °C 的贮存稳定性。**结果** 成功获得多黏菌素类抗生素耐药机制编码基因 *mcr-1*、*mcr-3*、*mcr-5* 基因片段, 重组菌 15 代传代中目的基因遗传稳定。*mcr-1*、*mcr-3*、*mcr-5* 标准样品 PCR 和 RT-qPCR 最低检出限分别为 1.67×10^4 拷贝数/ μL 和 1.67 拷贝数/ μL 、 1.31×10^6 拷贝数/ μL 和 13.1 拷贝数/ μL 、 1.55×10^5 拷贝数/ μL 和 1.55 拷贝数/ μL 。*T* 检验表明, 各基因随机抽取的 12 管标准样品质量间的 *F* 值均小于 $F_{\text{临界值}}$, 且 PCR 均可检出, 均匀性符合要求。标准样品在 4 °C 贮存 90 d、37 °C 贮存 14 d、-20 °C 贮存 360 d, 定性、定量检验结果稳定、无极显著性差异。**结论** 本实验制备的 *mcr-1*、*mcr-3*、*mcr-5* 质粒 DNA 标准样品目的基因遗传稳定, 均匀性和贮存稳定性良好。本研究结果可用于多黏菌素类抗生素耐药机制的快速预测和相关基因检测的质控样品。

关键词: 耐药基因; 质粒 DNA 标准样品; 均匀性; 稳定性

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2022)02-0203-08

DOI: 10.13590/j.cjfh.2022.02.003

Preparation of plasmid DNA reference material for polymyxin antibiotics resistance encoding gene detection

CHEN Jin¹, SU Xiumin¹, YANG Jing², CAO Yanwei³, TIAN Yuanyuan¹,

FENG Chengqian⁴, ZHAO Hongyang⁵, LU Xing'an⁵, CUI Shenghui⁶, YANG Baowei¹

- (1. College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Shaanxi Yangling 712100, China; 2. Yangling Quality and Technical Inspection Institute, Shaanxi Yangling 712100, China; 3. Hebei Forest, Grass and Flower Quality Inspection and Testing Center, Hebei Shijiazhuang 050081, China; 4. Market Supervision and Administration Bureau of Hantai District of Hanzhong, Shaanxi Hanzhong 723000, China; 5. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China; 6. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100500, China)

Abstract: Objective To develop plasmid DNA reference materials that can be used for polymyxin antibiotic resistance encoding genes rapid detection. **Methods** The reference sequence of *mcr-1*, *mcr-3* and *mcr-5* were retrieved from the National Center for Biotechnology Information to construct recombinant plasmids and strains. The recombinant strains were subcultured for 15 generations to detect the genetic stability of the target gene. The recombinant plasmid was extracted and vacuum dried to prepare the standard sample. The limit of detection (LOD) of PCR and RT-qPCR was

收稿日期: 2021-10-19

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项(2017YFC1601400)

作者简介: 陈进 女 在读研究生 研究方向为食品科学 E-mail: cxhchenjin@126.com

通信作者: 杨保伟 男 教授 研究方向为食品科学 E-mail: ybwsheng@nwsuaf.edu.cn

determined after the standard sample was hydrated and continuously diluted with 10-fold gradient, respectively. Multi-tube plasmid DNA standard samples were randomly selected to qualitatively and quantitatively evaluate the uniformity and storage stability at 4 °C, 37 °C and -20 °C by PCR and UV spectrophotometer. **Results** Fragments of *mcr-1*, *mcr-3* and *mcr-5* that encoding polymyxin resistance mechanism were successfully obtained. Target genes in the recombinant strains could stably inherited after subcultured for 15 generations. The LOD of PCR and RT-qPCR of *mcr-1*, *mcr-3* and *mcr-5* standard samples were 1.67×10^4 and 1.67 copies/ μL , 1.31×10^4 and 13.1 copies/ μL , 1.55×10^5 and 1.55 copies/ μL , respectively. The mass *F* values of 12 standard samples randomly selected for each gene were all less than the *F* critical value, each gene could be detected by RT-qPCR and indicating that the uniformity of the samples met the requirements. When standard samples were stored at 4 °C for 90 d, 37 °C for 14 d and -20 °C for 360 d, the qualitative and quantitative test result showed it was stable without significant difference. **Conclusion** In this study, plasmid DNA standard samples that carrying *mcr-1*, *mcr-3* and *mcr-5* were prepared. The target genes could be stably inherited, the standard samples had good uniformity and storage stability, and could be used as a quality control samples for polymyxin antibiotics resistance encoding genes detection and mechanisms prediction.

Key words: Antibiotic resistance gene; plasmid DNA reference material; uniformity; stability

多黏菌素是使用较多的一种抗生素,由多黏类芽孢杆菌产生,能对抗大多数革兰氏阴性菌感染,常应用于临床和畜牧业^[1]。细菌多黏菌素药敏性检测方法主要有微量肉汤稀释法、琼脂稀释法、圆盘扩散法等^[2],这类检测方法周期长,工作量大,甚至会因多黏菌素在琼脂中扩散效果差而导致结果不准确。一些商业测试方法如 E-test、TREK 成本较高^[3]。目前,针对细菌多黏菌素类药敏性检测研究主要基于传统微量肉汤稀释法的改进^[4-5],创建更新型、高效、廉价的多黏菌素药敏性检测方法非常必要。

近年来,核酸计量技术不断发展,为公共卫生紧急事件提供了核酸检测需求和技术准备,实现了病原微生物侵害预防,为民众健康安全建立了重要防线^[6]。如果能在检测过程辅以使用核酸标准物质,即一种生物学反应统一且具有可比性的材料或物质,则可保证检测结果的可靠性^[6]。目前,核酸标准物质研究热点是病毒类检测用标准物质,如新型冠状病毒和禽流感病毒^[7-8],而结合核酸扩增技术检测微生物药敏性的标准物质则非常少见。研制介导某类抗生素耐药机制检测用质粒标准样品能为微生物耐药性及耐药机制编码基因的准确、高效预测提供物质基础。本研究通过构建携带介导多黏菌素类抗生素耐药机制编码基因 *mcr-1*、*mcr-3* 和 *mcr-5* 的重组质粒和菌株,研制多种均匀性和稳定性良好的质粒 DNA 标准样品,以作为聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 定性检验的阳性质控样品,丰富我国核酸标准物质种类,为多黏菌素耐药基因检测和耐药机制快速预测提供物质支撑。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

Plasmid Mini Kit I (100) 质粒提取试剂盒(美国

OMEGA 公司), GelRed 核酸染料(笛医生生物科技有限公司), 0.5×TBE 溶液(广东光华科技股份有限公司)。基因合成、引物合成、重组菌株构建及测序由杨陵天润奥科生物科技有限公司协助完成。

1.2 方法

1.2.1 多黏菌素类抗生素耐药性编码基因重组质粒和菌株构建

从参考文献[9-10]得到多黏菌素耐药性编码基因 *mcr-1*、*mcr-3*、*mcr-5* 扩增用引物序列。由 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 数据库检索得到多条 *mcr-1*、*mcr-3*、*mcr-5* 基因参考序列, BioEdit 比对截取每个基因多条序列中的共同片段, 确定为最终基因序列, 交由杨陵天润奥科生物科技有限公司, 协助构建重组质粒和重组菌株。

1.2.2 重组菌中目标基因遗传稳定性检验

将携带 *mcr-1*、*mcr-3*、*mcr-5* 基因的重组菌连续传代培养 15 代, 挑取每株重组菌的第 1、3、6、9、12、15 代单菌落 2~3 个制成菌悬液, 煮沸法制备 DNA 模板。依据 SN/T 1869—2007《食品中多种致病菌快速检测方法 PCR 法》, 取 2 μL 上清液作为 PCR 模板扩增目标基因, 各基因 PCR 扩增引物序列如表 1 所示。PCR 反应体系为 25 μL , 包括 2×Rapid Taq Master Mix 12.5 μL , ddH₂O 10 μL , F/R 引物(50 ng/mL) 各 1 μL , DNA 模板 0.5 μL 。PCR 产物电泳检测后测序, 将测序结果与原始序列进行 Blast 比对, 检验菌株传代过程目标基因是否丢失及其序列是否发生突变。

1.2.3 重组质粒提取和真空干燥

选择目标基因遗传稳定的重组菌株, 按照 Plasmid Mini Kit I (100 次) 试剂盒操作说明提取质粒 DNA, 使用微量分光光度计检验样品的浓度、 A_{260}/A_{280} 、 A_{260}/A_{230} 比值, 确保质粒 DNA 样品纯度符合

表1 *mcr-1*、*mcr-3*、*mcr-5*基因参考序列信息Table 1 Reference sequence information of *mcr-1*、*mcr-3*、*mcr-5*

基因名称	序列长度/ bp	GenBank 登记号	引物序列 5'-3'	退火温度/ ℃	片段长度/ bp
<i>mcr-1</i>	309	MT890622	CGGTCAGTCCGTTTGTTC CTTGGTCCGTCTGTAGGG	52.5	309
<i>mcr-3</i>	542	MT890623	TTGGCACTGTATTTGCATTT TTAACGAAATTGGCTGGAACA	50	542
<i>mcr-5</i>	1 644	MT890624	TCATTGTGGTTGCCTTTTCTG ATCGGTTGTCTGCATTATC	50	1 644

要求。选择 A_{260}/A_{280} 值 >1.8 且 <2.0 、 A_{260}/A_{230} 值 >2.0 的质粒样品,经真空干燥后得到质粒 DNA 标准样品,储存于 1.5 mL Eppendorf 管中,各制备 200 管, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻保存。

1.2.4 质粒 DNA 标准样品检出限检验

研究同时采用 PCR 和 RT-qPCR 方法确定标准样品的检出限。标准样品使用 20 μL ddH₂O 水化后作为初检样品,连续 10 倍梯度稀释,得到 10^{-10} ~ 10^{-1} 浓度的质粒溶液,测定 PCR 和 RT-qPCR 的检出限。PCR 扩增引物与表 1 相同,Primer Premier 设计 RT-qPCR 扩增用引物见表 2。检出限转换公式如下^[11]:

$$\text{模板拷贝数} = \frac{\text{质粒DNA浓度} \times 10^{-9} \times 6.20 \times 10^{23}}{(\text{载体长度} + \text{目的基因长度}) \times 660}$$

表2 多黏菌素类耐药性编码基因 RT-qPCR 扩增用引物

Table 2 Primers for RT-qPCR amplification for polymyxin resistance encoding genes

基因名称	引物序列 5'-3'	退火温度/℃	片段长度/bp
<i>mcr-1</i>	CGGTCAGTCCGTTTGTTC	60	309
	CTTGGTCCGTCTGTAGGG		
<i>mcr-3</i>	TGGGTTACTATTGCTGGTT	60	198
	ATCTCACGCTGGAGGTTT		
<i>mcr-5</i>	GGGCTGGTTTGTCTGTTCA	60	228
	GCCGCTTCGCTATTGAT		

1.2.5 质粒 DNA 标准样品均匀性检验

根据 GB/T 15000.3—2008《标准样品工作导则(3)标准样品定值的一般原则和统计方法》的要求,检验质粒 DNA 标准样品的均匀性。随机抽取 12 管标准样品,离心、水化后采用 PCR 方法进行定性检验,紫外分光光度计法进行定量检验。DNA 质量 = DNA 浓度 \times ddH₂O 水化体积。样品间均匀性使用 F 检验评价。

1.2.6 质粒 DNA 标准样品短期稳定性检验

随机抽取多管标准样品,1)模拟不加冰常温运输条件。37 $^{\circ}\text{C}$ 贮存 14 d,分别于第 1、3、5、7、9、11、13 天时各取 3 份,使用超微量分光光度计定量检验,并在第 1、7、13 天进行 PCR 定性检验。2)模拟加冰运输或冷藏条件,4 $^{\circ}\text{C}$ 下贮存 90 d,分别于第 1、7、14、21、30、60、90 天时各取 3 份,进行定量检验,并在第 1、7、14、30、60、90 天进行定性检验。

1.2.7 质粒 DNA 标准样品长期稳定性检验

随机抽取多管标准样品,模拟长期冷冻保存条件, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下贮存 360 d,分别于第 30、60、90、120、150、180、300、330、360 天时各取 3 份进行定量检验,并在第 30、60、90、150、300、360 天进行定性检验。

2 结果

2.1 重组质粒与重组菌构建

获得多黏菌素类抗生素耐药性编码基因 *mcr-1*、*mcr-3*、*mcr-5* 基因片段后,上传到 NCBI 数据库,得到 GenBank 登记号(表 1)。以化学合成的方式合成各基因后,将其插入 pUC57 载体构建重组质粒,重组质粒转入大肠杆菌 DH-5 α 得到重组菌。重组菌目标基因扩增、测序和 Blast 在线比对结果如图 1(以 *mcr-3* 为例),扩增片段与目标片段序列相同,无突变。构建的重组质粒与重组菌符合要求。

2.2 重组菌株目标基因遗传稳定性检验

携带 *mcr-1*、*mcr-3*、*mcr-5* 基因的重组菌传代培养至 15 代,各菌株第 1、3、6、9、12、15 代培养物中目的基因 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果如图 2,各特征基因扩增条带明亮,片段大小符合预期,测序结果如图 3(以 *mcr-1* 为例)。表明目的基因在重组菌传代过程可稳定遗传。

2.3 质粒 DNA 标准样品 PCR 和 RT-qPCR 检出限

质粒 DNA 溶液真空干燥后为白色粉末,分装于 1.5 mL 离心管中,每管样品质量约 100 ~ 300 ng。各基因检出限结果如图 4 和图 5 所示。PCR 扩增未出现明显 DNA 条带的质粒 DNA 浓度确定为最低检测浓度,*mcr-1*、*mcr-3*、*mcr-5* 质粒标准样品稀释至 10^7 、 10^4 、 10^6 倍后特征基因 PCR 扩增条带明显变暗,计算得检出限浓度分别为 1.67×10^4 拷贝数/ μL 、 1.31×10^6 拷贝数/ μL 、 1.55×10^5 拷贝数/ μL 。各基因稀释至 10^{10} 、 10^9 、 10^{10} 倍后 RT-qPCR 仍可检出,且扩增 Ct 值和对应 DNA 浓度曲线相关系数 r 均大于 0.99,表明 *mcr-1*、*mcr-3*、*mcr-5* 质粒标准样品适用于 RT-qPCR 检测,计算得检出限浓度分别为 1.67 拷贝数/ μL 、13.1 拷贝数/ μL 、1.55 拷贝数/ μL 。

2.4 质粒 DNA 标准样品的均匀性检验

均匀性定性检验结果如图 6 所示。各基因条带清晰明亮,片段大小一致,与目的基因相符。各目

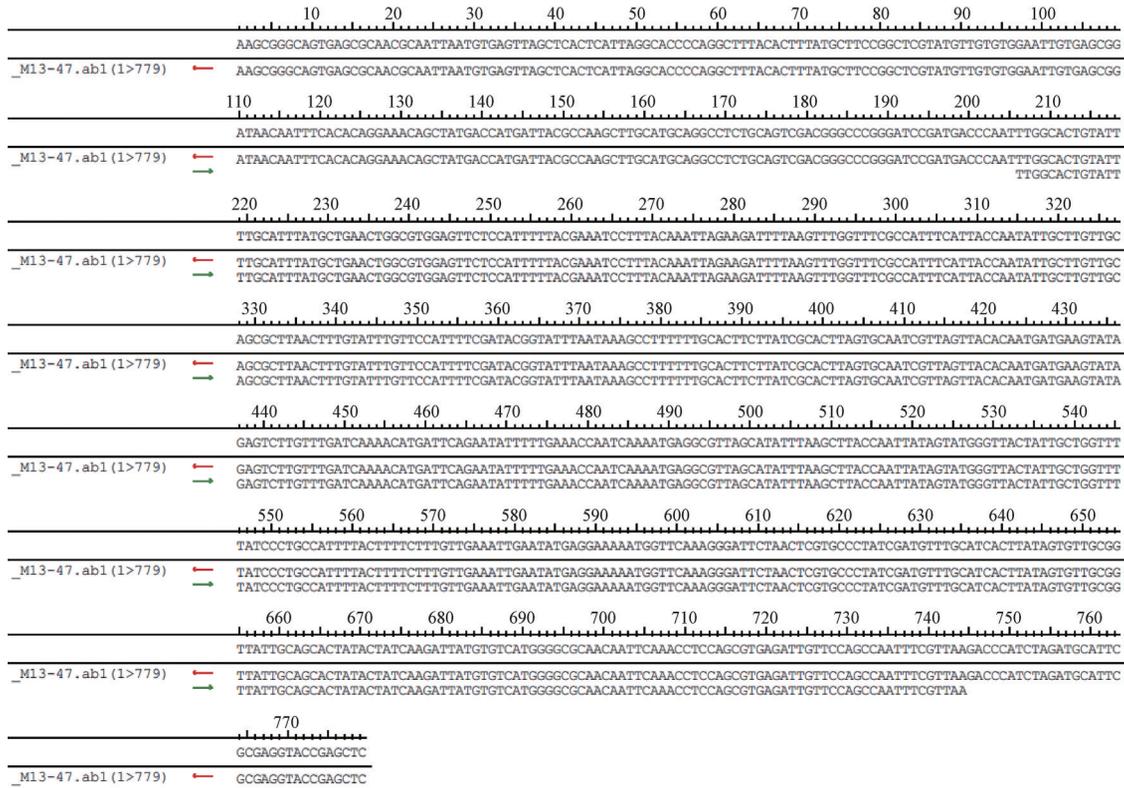
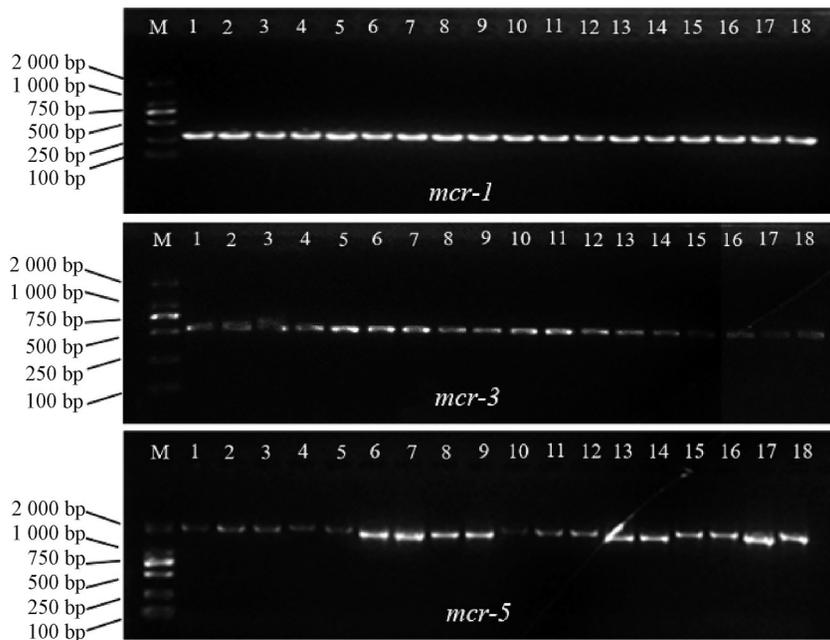


图1 *mcr-3* 扩增片段与目标片段序列比对结果

Figure 1 Results of comparison between *mcr-3* amplified fragment and target fragment



注:M 为 D2000 DNA Marker; 1~3、4~6、7~9、10~12、13~15、16~18 泳道分为第 1、3、6、9、12、15 代重组菌株目的基因 PCR 产物电泳条带

图2 耐药性编码基因遗传稳定性 PCR 检验结果

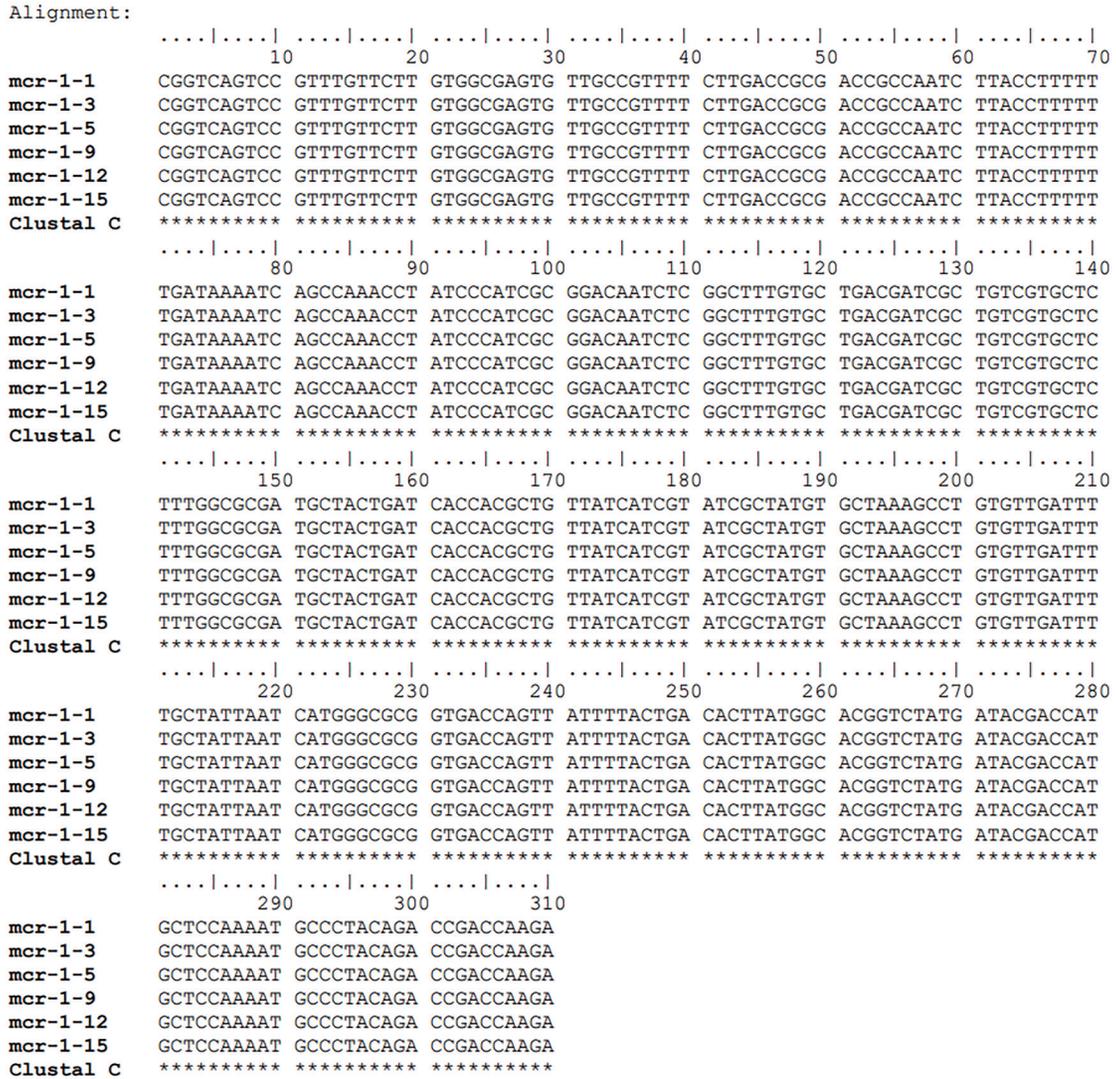
Figure 2 Results of genetic stability of each drug resistance encoding gene

的基因在随机抽取的 12 管标准样品中均被检出。定量检测结果经 *F* 检验可知,随机抽取的标准样品质量间不存在显著性差异($F < F_{\text{临界值}} = 2.72, 95\%CI$, 见表 3)。定性、定量检验结果表明,制备的 *mcr-1*、*mcr-3*、*mcr-5* 定性标准样品均匀性符合要求。

2.5 质粒 DNA 标准样品贮存稳定性检验

2.5.1 短期贮存稳定性

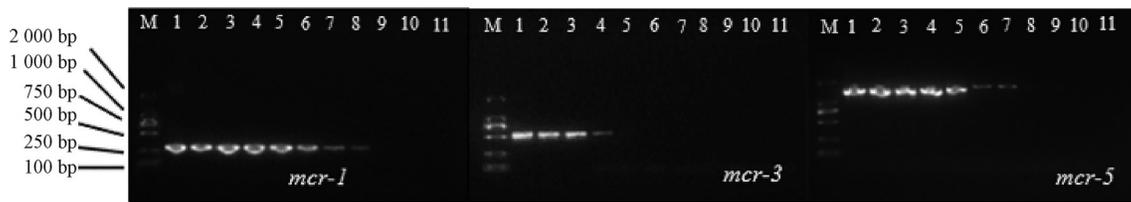
短期贮存时各样品质量检测结果如图 7 所示,PCR 定性检验结果如图 8。结合图 7 和图 8 可知,4 °C 贮存 90 d、37 °C 贮存 14 d,各质粒 DNA 标准物



注:图中“1、3、6、9、12和15”分别表示第1、3、6、9、12和15代培养物,“*”表示相同位点比对结果一致

图3 重组菌株在不同代培养物中 *mcr-I* 扩增产物 DNA 序列比对结果

Figure 3 Comparison of *mcr-I* sequence in different generations subcultured recombinant strains



注:M 为 D2 000 DNA Marker;1~10 泳道分为 10^{-1} ~ 10^{-10} 连续稀释梯度的质粒 PCR 条带

图4 质粒 DNA 标准样品 PCR 检出限

Figure 4 Limit of detection of PCR for plasmid standard sample

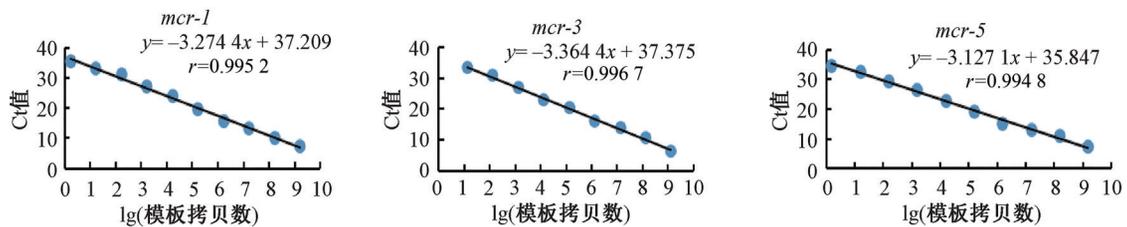


图5 质粒 DNA 标准样品 RT-qPCR 扩增 Ct 值和相应 DNA 浓度曲线

Figure 5 Curve of Ct value of RT-qPCR and corresponding DNA concentration of plasmid standard sample

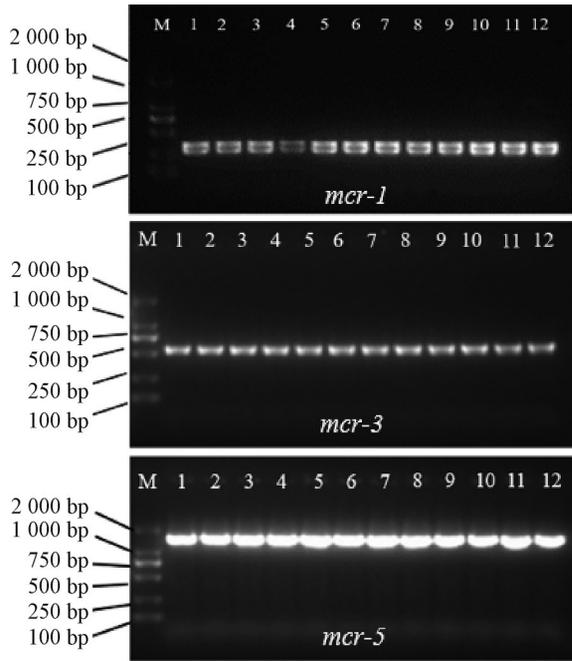


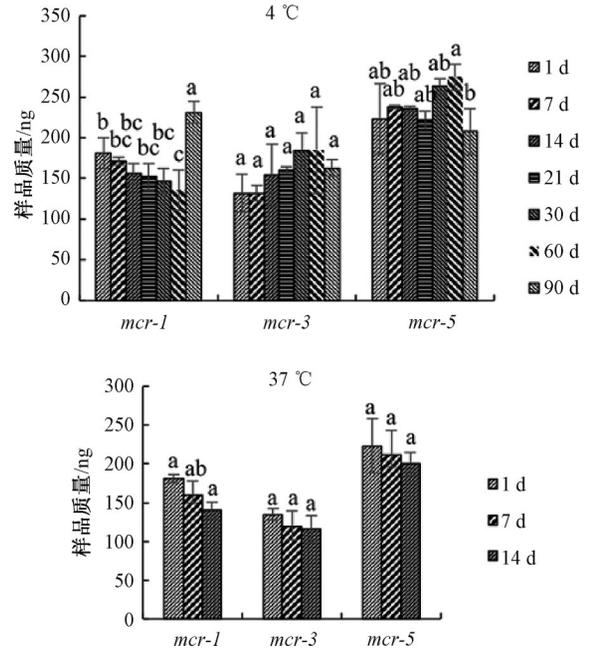
图6 质粒DNA标准样品均匀性PCR检验

Figure 6 PCR detection results of uniformity of plasmid standard sample

表3 质粒DNA标准样品均匀性检验结果

基因	SS(平方和)	Df(自由度)	MS(方差)	F值	F _{临界值}	P值	95%CI
<i>mcr-1</i>	组间	2.06	11.00	0.19	1.40	2.72	0.29
	组内	1.61	12.00	0.13			
<i>mcr-3</i>	组间	9.32	11.00	0.85	2.63	2.72	0.06
	组内	3.87	12.00	0.32			
<i>mcr-5</i>	组间	3.83	11.00	0.35	1.71	2.72	0.18
	组内	2.45	12.00	0.20			

Table 3 The result of uniformity test of each plasmid sample



注:图中相同字母标记的数据间差异无统计学意义($P > 0.05$),不同字母标记的数据间差异有统计学意义($P < 0.05$)

图7 质粒DNA标准样品4 °C和37 °C贮存时质量检测结果
Figure 7 Quality detection of standard plasmid DNA samples stored at 4 °C and 37 °C

质管内质量差异较小,无显著性变化($P > 0.05$); PCR检验条带单一且明亮,表明*mcr-1*、*mcr-3*、*mcr-5*质粒DNA标准样品的短期贮存稳定性良好。

2.5.2 长期贮存稳定性

各样品长期贮存稳定性结果如图9和图10所示。-20 °C贮存12个月,各质粒DNA标准样品质量浓度无显著性变化,各标准样品的长期贮存稳定性良好。

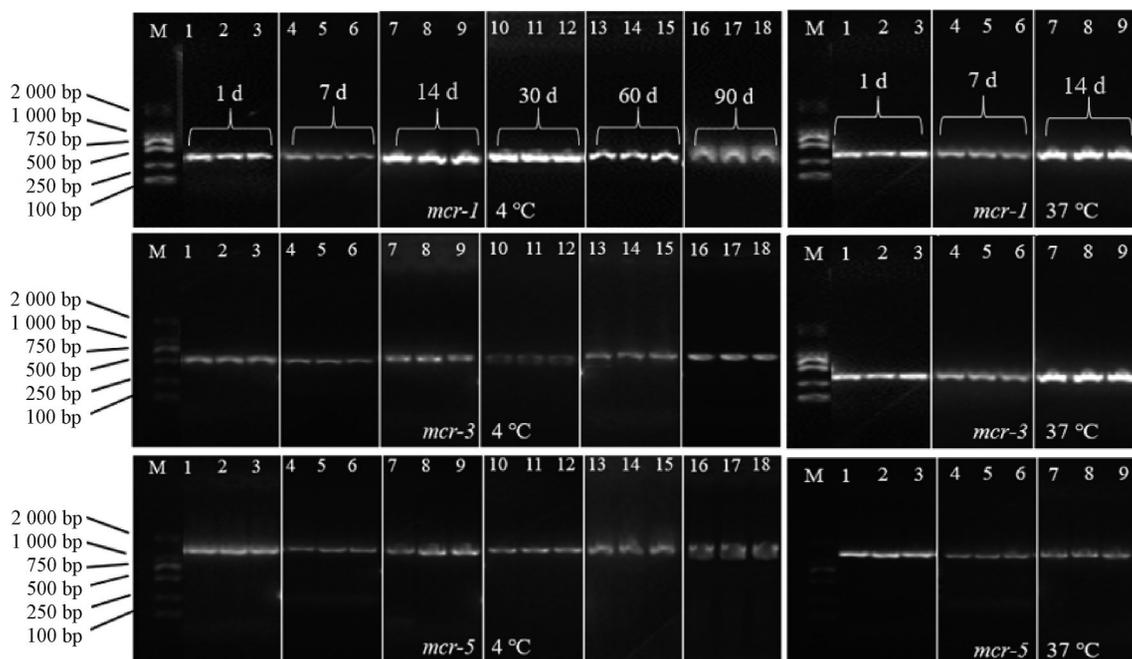
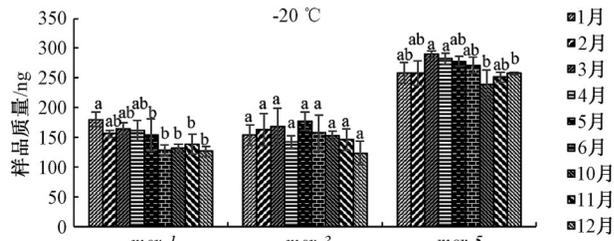


图8 质粒DNA标准样品4 °C和37 °C贮存时PCR定性检测结果

Figure 8 Results of PCR qualitative detection of plasmid DNA standard samples stored at 4 °C and 37 °C



注:图中相同字母标记的数据间差异无统计学意义($P > 0.05$),不同字母标记的数据间差异有统计学意义($P < 0.05$)

图9 质粒DNA标准样品-20 °C贮存时质量检测结果

Figure 9 Quality detection of standard plasmid DNA samples stored at -20 °C

3 讨论

目前,致病菌检测用标准物质研究多数为使用特定的病原菌体(如:阪崎克罗诺杆菌)及其营养基质制成的含菌体冻干粉末^[12],使用时需要活化培养、提取DNA后才能作为检测用阳性对照,需要一定的检测周期。以微生物质粒DNA制得的标准物质有单核细胞增生李斯特菌^[13]和沙门氏菌^[14]等。本研究中,所选的多黏菌素类抗生素耐药性编码基因共同序列来自大肠杆菌、沙门氏菌、肺炎克雷伯氏菌等常见的致病菌,实际应用时经超纯水水化后可直接作为耐药性编码基因检测的质控,可快速检测样品中是否含有该类耐药基因,预测相应的耐药

机制,大大缩短了传统耐药性和耐药机制检测过程微生物培养的周期和时间,也不会向检测方(如:食品生产车间、医院等)引入耐药菌株,避免了耐药性传播带来的生物安全问题。

本研究为确保质粒DNA标准样品来源于质量良好、目标基因可稳定遗传的重组菌株,将成功构建的3种多黏菌素类抗生素耐药性编码基因重组菌株传代培养15代,PCR定性检验和目标基因测序结果表明3种基因在重组菌株15代传代内均能稳定遗传且无突变发生,非常适用于质粒DNA标准样品的制备。实际检测过程中,如果标准样品的浓度较低或低于空白限时,容易产生假阴性,因此需要确定检测限来区分空白限及样品最低可检出浓度或起始量,保证检测结果的合理性和正确性^[15]。本研究中,标准样品经水化、梯度稀释后,使用PCR和RT-qPCR同时检测了3种质粒DNA标准样品的检出限,在实际应用时,适当稀释程度下的标准样品用作质控时检测结果即具有准确性和可靠性。均匀性和稳定性检验是评价制备的标准样品是否合格必不可少的过程,本研究制得的标准样品水化后,每种样品所抽取的质粒DNA管间含量无极显著性差异,均匀性良好;PCR特征基因检测及质量

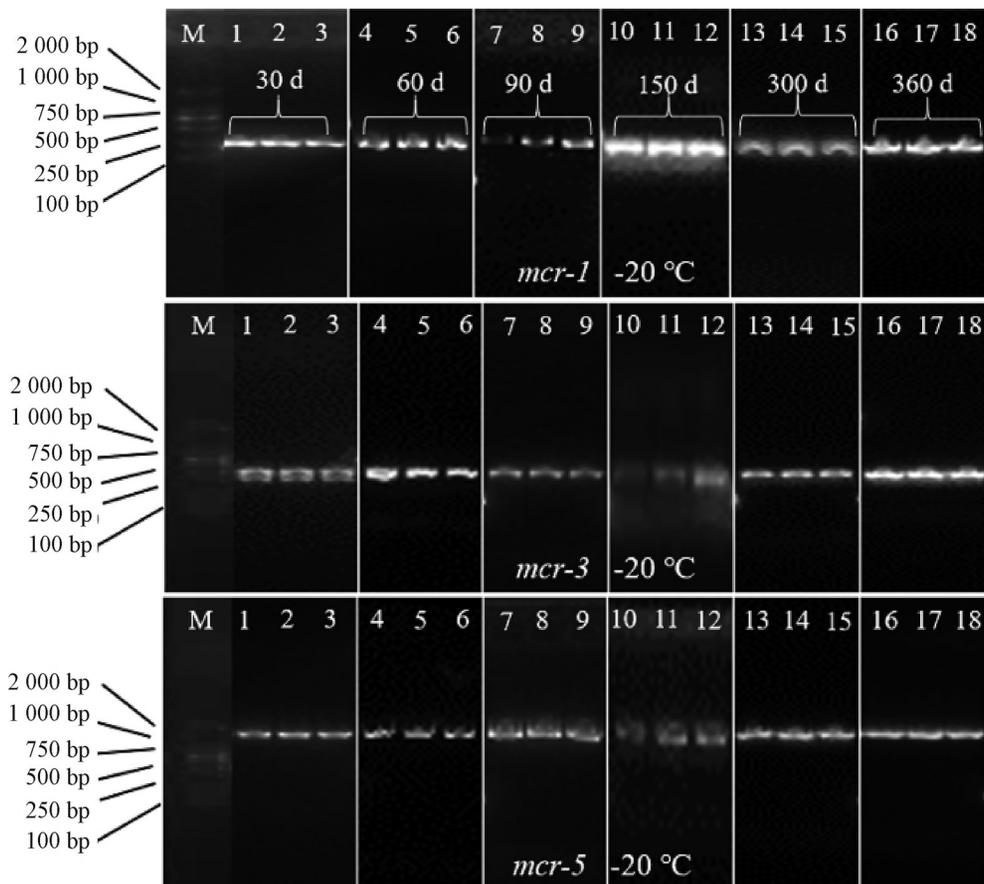


图10 质粒DNA标准样品-20 °C贮存时PCR定性检测结果

Figure 10 Qualitative PCR results of plasmid DNA standard samples stored at -20 °C

检测结果表明,不同贮存条件下贮藏不同时间样品稳定性较好。虽然在4℃和-20℃下 *mcr-1* 和 *mcr-5* 标准样品质量方差分析存在显著差异现象($P < 0.05$),但我们分析这非常可能是人工分装、真空干燥制备样品时质量损失导致。-20℃下长期储存质粒DNA含量有逐渐降低的趋势,其主要原因可能与质粒自然降解有关,但整体含量仍符合质量要求。

综上所述,本研究制备得到3种分别携带多黏菌素类抗生素耐药性编码基因 *mcr-1*、*mcr-3* 和 *mcr-5* 的质粒DNA标准样品,目的基因在重组菌中遗传稳定,标准样品均匀性和贮存稳定性良好。研制得到的质粒DNA标准样品可作为质控样品,用于多黏菌素类抗生素耐药性编码基因检测和耐药机制预测,同时实现具有自主知识产权质粒DNA标准样品在食品耐药微生物标准样品领域的广泛应用。

参考文献

- [1] ALMANGOUR T A, GARCIA E, ZHOU Q, et al. Polymyxins for the treatment of lower respiratory tract infections: Lessons learned from the integration of clinical pharmacokinetic studies and clinical outcomes[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2021, 57(6): 106328.
- [2] BAKTHAVATCHALAM Y D, PRAGASAM A K, BISWAS I, et al. Polymyxin susceptibility testing, interpretative breakpoints and resistance mechanisms: An update[J]. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2018, 12: 124-136.
- [3] POIREL L, LARPIN Y, DOBIAS J, et al. Rapid Polymyxin NP test for the detection of polymyxin resistance mediated by the *mcr-1/mcr-2* genes[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2018, 90(1): 7-10.
- [4] BEHERA B, JENA J, KAR P, et al. Deciphering polymyxin B minimum inhibitory concentration from colistin minimum inhibitory concentration and vice versa: An analysis on 156 carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates [J]. Indian Journal of Medical Microbiology, 2018, 36(4): 587-589.
- [5] LEE W B, FU C Y, CHANG W H, et al. A microfluidic device for antimicrobial susceptibility testing based on a broth dilution method[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2017, 87: 669-678.
- [6] 许丽, 梁文, 刘刚. 核酸计量支撑病原微生物检测[J]. 张江科技评论, 2020, (5): 32-34.
- XU L, LIANG W, LIU G. Hesuan jiliang zhicheng bingyuanweishengwu jiance [J]. Zhangjiang Technology Review, 2020, (5): 32-34.
- [7] 欧阳艳艳, 张永卓, 高颖, 等. 新冠假病毒核糖核酸标准物质的研制和应用[J]. 中国计量, 2020, (11): 87-88.
- OUYANG Y, ZHANG Y Z, GAO Y, et al. Xinguanbingdu hetanghesuan biao zhun wuzhi de yan zhi he ying yong [J]. China Metrology, 2020, (11): 87-88.
- [8] 刘玉良, 王乃迪, 高晓艺, 等. 禽流感病毒核酸检测用定性标准样品的研制[J]. 中国兽医学, 2021, 51(5): 575-580.
- LIU Y L, WANG N D, GAO X Y, et al. Preparation of qualitative reference material for detection of nucleic acid of avian influenza A virus [J]. Chinese Veterinary Science, 2021, 51(5): 575-580
- [9] YIN W, LI H, SHEN Y, et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-3* in *Escherichia coli* [J]. mBio, 2017, 8(3): e00543-17.
- [10] BOROWIAK M, FISCHER J, HAMMERL J A, et al. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2017, 72(12): 3317-3324.
- [11] 夏丹丹, 赵莹莹, 马盼盼, 等. 大肠杆菌DNA定性标准物质的制备及在枸杞子污染检测中的应用[J]. 食品科学, 2020, 41(18): 267-274.
- XIA D D, ZHAO Y Y, MA P P, et al. Preparation of plasmid DNA reference material and its application in rapid detection of Goji Berries (*Lycium barbarum*) contaminated with *Escherichia coli* [J]. Food Science, 2020, 41(18): 267-274.
- [12] 骆海朋, 瞿洪仁, 申静云, 等. 阪崎克罗诺杆菌标准物质研制[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(1): 54-59.
- LUO H P, ZHAI H R, SHEN J Y, et al. Development of microbial reference materials for *Cronobacter sakazakii* [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2019, 10(1): 54-59.
- [13] 蒲泽南, 林晓峰, 袁睿云, 等. 单核细胞增生李斯特菌质粒DNA参考物质的研制[J]. 中国食品卫生杂志, 2021, 33(3): 279-284.
- PU Z N, LIN X F, YUAN M Y, et al. Preparation of plasmid DNA reference material for *Listeria monocytogenes* [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2021, 33(3): 279-284.
- [14] VALLEJO C V, TERE C P, CALDERON M N, et al. Development of a genomic DNA reference material for *Salmonella enteritidis* detection using polymerase chain reaction [J]. Molecular and Cellular Probes, 2021, 55: 101690
- [15] 李达, 王军, 杨忠, 等. 核酸标准物质定值的实验体系研究[J]. 计量学报, 2020, 41(11): 1436-1442.
- LI D, WANG J, YANG Z, et al. Experimental design analysis of developing quantitative nucleic acid reference materials [J]. Acta Metrologica Sinica, 2020, 41(11): 1436-1442.