基因膜芯片法检测 7 种药品生产环境微生物的应用

凌 明，蒋彦洁，裘颖儿，应 珂，傅正杨

（金华市食品药品检验检测研究院，金华市中药质量评价与标准研究重点实验室，浙江金华 321000）

摘要：旨在通过基因膜芯片技术开发一种用于药品生产过程中环境微生物的快速检测方法，以提升药品生产质量监管效率。选取蜡样芽孢杆菌、藤黄微球菌、表皮葡萄球菌、沃氏葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌及枯草芽孢杆菌 7 种典型药品生产环境微生物，分别设计特异性引物和探针，采用基因膜芯片结合多重 PCR 技术实现同步核酸检测与结果分析。该方法展现出优异的特异性和稳定性，检测灵敏度达 1.0×10^5 copies/mL，适用于药品生产环境中常见微生物的常规监测。建立的七联检技术具有操作简便、成本低廉及自动化程度高等优势，不仅可为药品生产过程中的质量安全提供实时监控，还能为政府监管部门提供高效的技术支持。

关键词：环境微生物；药品生产；基因膜芯片；多重聚合酶链反应

中图分类号：TQ460.7；Q93-332 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255(2025)11-1453-06

引用：凌 明，蒋彦洁，裘颖儿，等．基因膜芯片法检测 7 种药品生产环境微生物的应用［J］．中国医药工业杂志，2025, **56**(11)：1453-1458．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.11.012

Application of Gene Membrane Chip for Detection of Seven Environmental Microorganisms in Pharmaceutical Production

LING Ming, JIANG Yanjie, QIU Yinger, YING Ke, FU Zhengyang

(*Jinhua Key Lab. for Quality Evaluation and Standardization of Traditional Chinese Medicine, Jinhua Institute for Drug and Food Control, Jinhua 321000*)

ABSTRACT: The study aims to develop a rapid detection method for environmental microorganisms in pharmaceutical production by gene membrane chip technology to improve the efficiency of drug production quality supervision. Seven typical microorganisms of pharmaceutical production environment, including *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* were selected. Specific primers and probes were designed for each microorganism, and synchronous nucleic acid detection and result analysis were achieved by combining gene membrane chip with multiplex PCR technology. The method exhibits excellent specificity and stability, with a detection sensitivity of 1.0×10^5 copies/mL, and is suitable for routine monitoring of common microorganisms in the pharmaceutical production environment. The established seven-in-one inspection technology has advantages of simple operation, low cost and high automation, which can not only provide real-time monitoring for quality safety of drug production process, but also offer efficient technical support for government regulatory departments.

Key Words: environmental microorganism; pharmaceutical production; gene membrane chip; multiplex polymerase chain reaction

药品质量保障的核心环节在于生产过程中环境微生物污染的控制，此类污染不仅直接影响药品的药效评价，更可能威胁使用者的生命健康。尽管各国已通过 GMP 标准和药品召回制度等政策措施加强监管，但药品微生物污染事件仍时有发生[1]。无论欧盟 GMP 无菌附录还是我国新修订的 GMP 无菌药

收稿日期：2025-06-20

作者简介：凌 明，副主任药师，从事药品质量控制研究。

品附录（征求意见稿），都规定不同级别洁净区的微生物应按要求进行鉴定，并评估关键生产区域微生物对产品生产的影响。在我国此次新修订的无菌药品附录中，还强调了使用快速检测方法加速发现微生物污染事件。因此，开发快速、准确的微生物检测技术，既是优化生产过程控制的关键，也是实现污染溯源的必要手段。

分子生物学技术在药品质量控制中的应用已逐步成熟，PCR、DNA 测序等技术在药物研发、中药溯源、生产环境与产品污染微生物监测等领域已得到广泛应用。然而，基因芯片技术在药品质量控制领域的应用仍处于探索阶段，尚未作为独立、常规的检测方法被美国、欧洲等药典收录。值得注意的是，ChP 2025 年版四部已收载基于基因芯片的药物评价技术指导原则，并明确提出以风险评估为基础，完善微生物控制体系的发展方向，为医药新质生产力的提升提供了技术路径。

基因膜芯片技术通过固定在膜介质表面的特异性探针与靶标基因杂交，结合酶 - 底物显色反应，可实现目标基因的高通量快速检测。该技术在食品微生物检测 [2]、动物源性成分鉴定 [3] 及医学病原体检测 [4] 等领域已有广泛应用，但在药品环境微生物检测中尚未见报道，且未被 ChP 收录，具有显著的研究潜力。

本研究首次建立基于基因膜芯片技术的药品环境微生物监测方法，可同时检测蜡样芽孢杆菌（*Bacillus cereus*）、藤黄微球菌（*Micrococcus luteus*）、表皮葡萄球菌（*Staphylococcus epidermidis*）、沃氏葡萄球菌（*Staphylococcus warneri*）、金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）、大肠埃希菌（*Escherichia coli*）及枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）7 种常见污染微生物，以期为药品生产环境监控和质量控制提供新的技术参考。

1　仪器与试药

AB 204S 型分析天平（瑞士梅特勒托利多公司）；CFX96 型荧光定量扩增仪、GelDoc XR+ 型凝胶成像仪（美国 Bio-Rad 公司）；QIAGEN Xpert 型微量分光光度机（德国凯杰公司）；MFS-24 型膜芯片核酸分子杂交仪（四川华汉三创生物科技有限公司）。

细菌基因组提取试剂盒［天根生化科技（北京）有限公司］；膜芯片检测试剂盒（含多重 PCR 扩增试剂）和混合增菌培养基（四川华汉三创生物科技有限公司）；所有 PCR 引物与探针的合成、修饰及纯化均由生工生物工程（上海）股份有限公司完成。

选取 2 批药品样本：玻璃酸钠滴眼液（编号 M1）和益生菌片（编号 M2），5 份环境样本（均源自企业环境菌库）：生物安全柜台面（E1）、均质器（E2）、门把手（E3）、乳胶手套（E4）及洁净工作服（E5）。

试验菌种共 10 株，分别为蜡样芽孢杆菌（CICC 21261）、藤黄微球菌（CICC 10209）、表皮葡萄球菌（CICC 10294）、金黄色葡萄球菌（CICC 10384）、沃氏葡萄球菌（CICC 23992）、大肠埃希菌（CICC 14206）、枯草芽孢杆菌（CICC 10732）、沙门菌（CICC 21513）、阪崎肠杆菌（CICC 21544）及志贺菌（CICC 21535），均由中国工业微生物菌种保藏管理中心提供。

2　方法与结果

2.1　PCR 引物及探针设计

本研究通过文献检索，选取以下特异性基因片段：蜡样芽孢杆菌的 *gyrB* 基因 [5]、藤黄微球菌 23S rRNA 基因 [6]、表皮葡萄球菌 *sesB* 基因 [7]、金黄色葡萄球菌 *nuc* 基因 [8]，以及沃氏葡萄球菌、大肠埃希菌和枯草芽孢杆菌的 16S rRNA 基因 [9]；另采用 16S rRNA 基因保守区作为内参对照。所有基因序列均源自美国国家生物技术信息中心（National Center for Biotechnology Information，NCBI）数据库，引物与探针设计采用 PrimerPlex 2.0 软件与 NCBI BLAST 在线工具协同完成，其中下游引物 5'- 端经生物素（biotin）修饰，探针 5'- 端通过 NH_2C_6 基团标记，具体参数如表 1 所示。

2.2　样品处理与 DNA 提取

依据 ChP 2025 年版四部（2025 年 10 月 1 日起实施）通则 1105 方法，所有药品样本及环境样本均平行制备 2 份，分别用于应用性评价与模拟样本测试。

取所有待检样品及菌株平皿培养物，用接种环分别挑取单菌落，共同接种于含 100 mL 混合增菌培

表 1 引物探针序列信息汇总

Tab.1 Summary of Primer Probe Sequence Information

序号	名称	引物探针信息
1	内参对照	16S-F：ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC 16S-R：biotin-CGTCATCCCCACCTTCCTCC 16S-P：NH2C6-ACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGT
2	蜡样芽孢杆菌	*gyrB*-F：ATTGGTGACACCGATCAAACAG *gyrB*-R：biotin-CCACCTTCATACGTATGGATG *gyrB*-P：NH2C6-CCGGTTGGTATACAAGAAAAAATGGGRCGTC
3	藤黄微球菌	23S-F：GCACGAATGGAGTAACGACTT 23S-R：biotin-CCACACCGAACACCAATACC 23S-P：NH2C6-AACTATAGTAAAGGTCACG
4	大肠埃希菌	Ec16S-F：ACCGCATAACGTCGCAAGA Ec16S-R：biotin-CCGTGTCTCAGTTCCAGTGT Ec16S-P：NH_2C_6-GTCATCCTCTCAGACCAGCTAGGGATCG
5	表皮葡萄球菌	*sesB*-F：GTCAACTCAATACAGCACAATG *sesB*-R：biotin-TCGGTAGCATATCAGATGAACT *sesB*-P：NH_2C_6-CAGAAGATTGAACTTGACCTACGTAGTATG
6	金黄色葡萄球菌	*nuc*-F: GCGATTGATGGTGATACGGTT *nuc*-R: biotin-AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC *nuc*-P: NH2C6-GGTGTAGAGAAATATGGYCCTGAAGCAAGTGCA
7	沃氏葡萄球菌	Sw16S-F：AGGAACACCAGTGGCGAAG Sw16S-R：biotin-GCGGAGTGCTTAATGCGTTA Sw16S-P：NH_2C_6-CTAACACTTAGCACTCATCGTTTAC
8	枯草芽孢杆菌	Bs16S-F：GCTTCGGCTACCACTTACAGA Bs16S-R：biotin-GCGTTGCTCCGTCAGACTT Bs16S-P：NH_2C_6-ATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCT

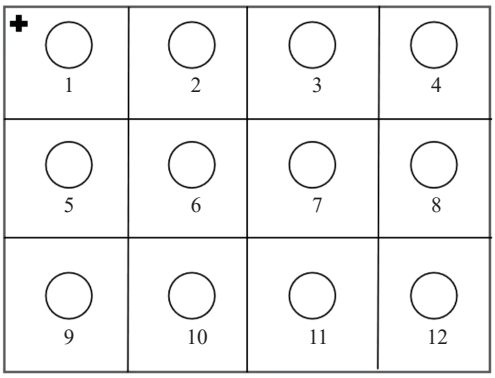
养基（由氯化钠、蛋白胨、酵母浸粉、磷酸二氢钠、磷酸二氢钾及组合促进剂等成分组成，按照文献[10]配制）的 250 mL 摇瓶中，于 35 ℃、150 r/min 恒温振荡培养 12 h，取增菌液 2 mL，转移至灭菌 EP 管中，离心（16 200×*g*）2 min，弃去上清，保留沉淀物用于总核酸提取。基因组 DNA 提取严格按试剂盒说明书操作，提取产物经微量分光光度计检测，质量浓度≥ 10 ng/L 且吸光度比值（A_{260}/A_{280}）为 1.8 ～ 2.0 时，判定为合格，并用于后续试验[11]。

2.3 PCR 扩增

取待测样品总核酸 2 μL 作为模板，依次加入多重 PCR 缓冲液 10 μL、双蒸水 8 μL，构建 20 μL 的多重 PCR 扩增体系。扩增反应程序设置为：95 ℃预变性 2 min；随后进行 40 个循环（95 ℃变性 15 s，55 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 15 s）；最终 72 ℃延伸 5 min，并于 16 ℃保存备用。

2.4 基因膜芯片杂交及结果判读

将多重 PCR 扩增产物于 95 ℃热变性 5 min 后，即刻置冰浴中冷却 10 min，取出放入 MFS-24 基因膜芯片检测工作站进行杂交反应。结果判读依据芯片靶点分布图（图 1）进行：当阳性质控点（positive control，PC）显色且阴性质控点（negative control，NC）无显色时，判定反应体系有效。



1—内参对照；2—蜡样芽孢杆菌；3—藤黄微球菌；4—大肠埃希菌；5—表皮葡萄球菌；6—金黄色葡萄球菌；7—沃氏葡萄球菌；8—空白对照（无探针，预留位置）；9—枯草芽孢杆菌；10—空白对照（无探针，预留位置）；11—PC；12—NC。

图 1 检测靶点分布图

Fig.1 Detect Target Distribution Map

2.5 特异性试验

取 10 种标准菌株样本，按上述试验流程进行测试。结果如图 2 所示，7 种目标微生物样本的内参点及靶点均呈单一显色且无杂点，而其余 3 种菌株样本仅内参点显色且靶点未显色，证明该方法可特异性识别目标微生物，无交叉反应现象。

2.6 灵敏度试验

选用 7 种目标微生物菌株，分别制备浓度为 1.0×10^7 copies/mL 的待测样本，并依次进行 4 个梯度的等比例稀释。按上述试验流程进行测试，结果如图 3 所示。可见，本法的检测灵敏度可达 1.0×10^5 copies/mL。

2.7 稳定性试验

选择 1.0×10^6 copies/mL 的 7 种微生物测试样本，分别提取 DNA 并制备混合样本。所有样本均按上述方法进行试验，每种样本重复检测 3 批次以评估稳定性。结果如图 4 所示。可见，各样本 3 个批次的检测结果相同，靶点显色准确，提示该检测方法具有良好的批间稳定性和检测可靠性。

2.8 应用性评价

选择 7 种实际采集样本，按上述方法进行检测。结果如图 5 所示，7 个样本均未检出目标靶点。另制备 7 组加菌样本：M1+ 藤黄微球菌，M2+ 表皮葡萄球菌，E1+ 金黄色葡萄球菌，E2+ 沃氏葡萄球菌，E3+3 种混菌（藤黄微球菌、金黄色葡萄球菌、沃氏葡萄球菌），E4+ 大肠埃希菌，E5+7 种混菌（蜡样芽孢杆菌、藤黄微球菌、表皮葡萄球菌、沃氏葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌）。按上述方法处理后同法检测（前增菌 12 h+ 分子检测 4 h），结果如图 6 所示。可见，所有加菌样本均可特异性检出对应目标微生物菌株。结果表明，该方法不受样本来源、采样方式及耗材影响，适应真实样本的检测需求。

3 讨论

在全球药品监管领域，微生物控制理念已从最终产品检测升级为覆盖产品生命周期的全过程管理，要求对生产各环节微生物实现全面的识别、风险评估和鉴定[12]。其中，药品生产环境微生物污染因隐蔽性和多样性成为监管重点。传统表型鉴定依赖特定培养条件，操作烦琐、周期漫长，且结果易受主观判断影响[13]；此外，药品成分、营养限制、消毒剂和清洁剂残留等环境因素可能干扰表型特征表达，造成漏检或错检[14]。相比之下，基因膜芯片技术通过直接解析微生物遗传信息，突破环境干扰限制，兼具多靶标同步检测、高灵敏度与特异性优势，为精准监控提供了新范式。

本研究基于基因膜芯片与多重 PCR 技术的融合，实现了蜡样芽孢杆菌、藤黄微球菌等 7 种高风险环境微生物的同步检测。通过特异性引物探针设计及自动化检测步骤，将传统耗时数日的分析周期压缩至 16 h 以内，显著提升了检测效率。该技术不仅具备高通量、高稳定性的特点，更支持企业根据工艺

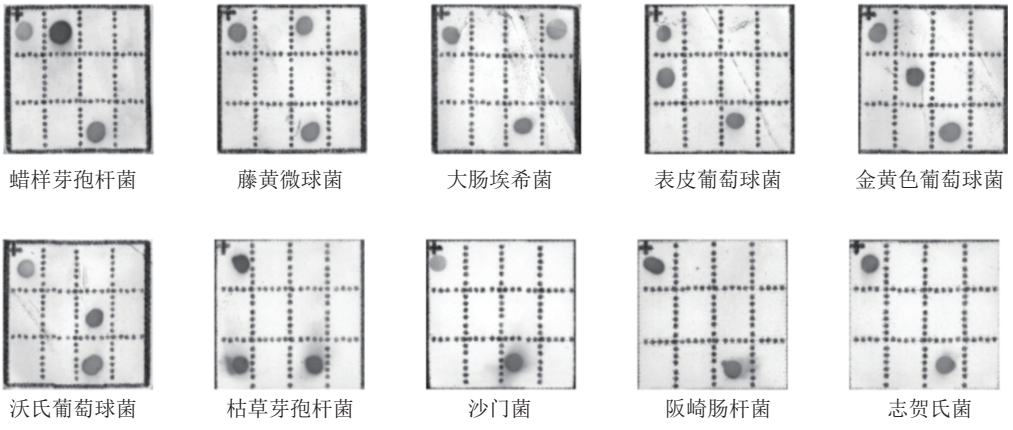


图 2　特异性测试结果

Fig.2　Specificity Test Results

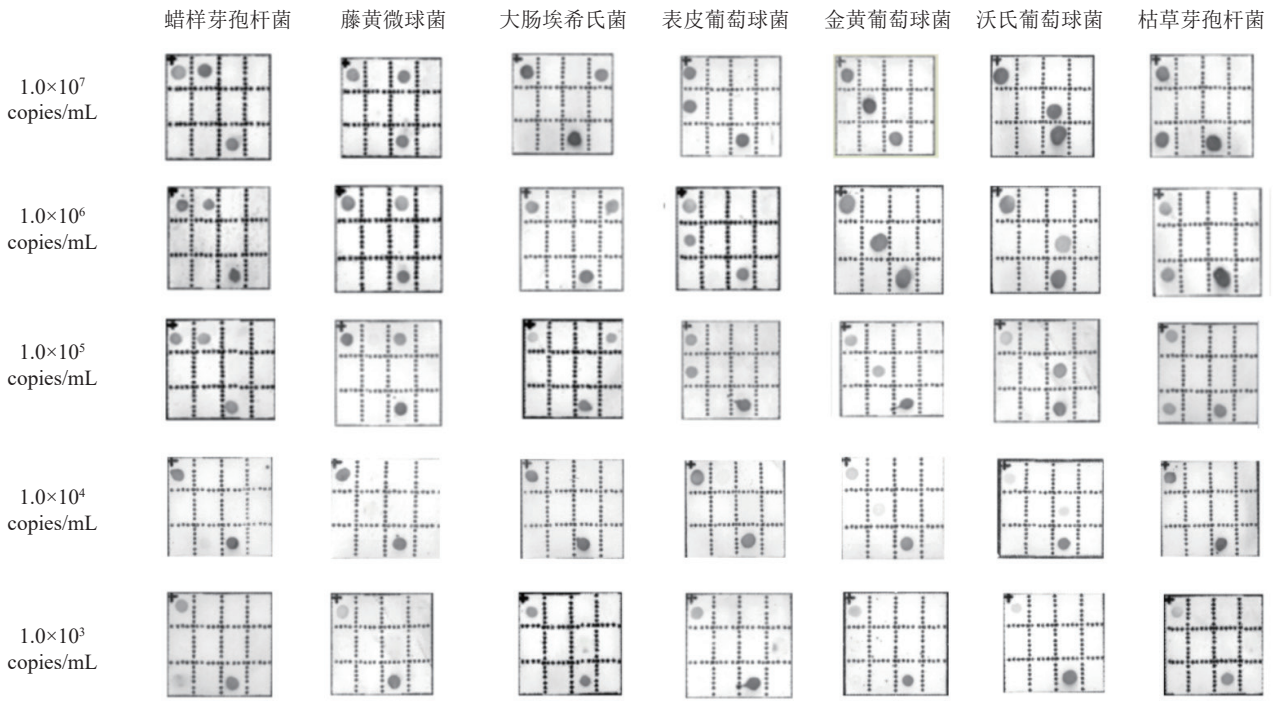


图 3 灵敏度测试结果

Fig.3 Sensitivity Test Results

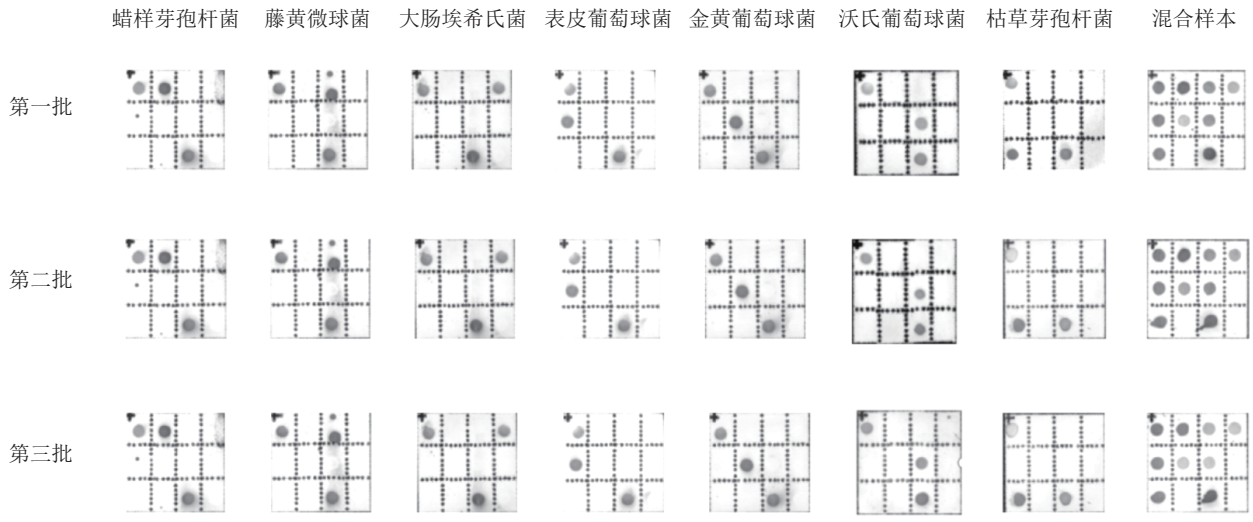


图 4 稳定性测试结果

Fig.4 Stability Test Results

需求、历史监测数据和风险等级，定制靶向性检测芯片，满足个性化管控需求。

综上所述，本研究建立的基因膜芯片技术为药品全生命周期微生物监测提供了高效解决方案，其快速、精准、可定制的特性，在环境表面微生物快速筛查、制药用水系统监测及污染溯源等场景中具有广泛的应用潜力。未来通过灵敏度提升、检测范围拓展及增菌技术优化，该技术有望进一步强化药品生产过程的微生物风险防控能力。

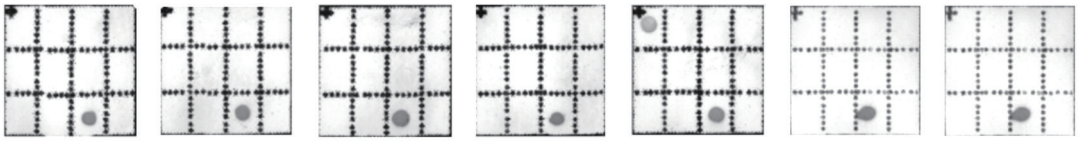
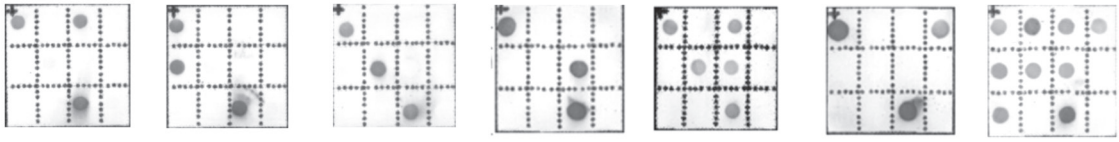


图 5　实际采集样本的测试结果

Fig.5　Test Results of Real Samples



1—M1+ 藤黄微球菌；2—M2+ 表皮葡萄球菌；3—E1+ 金黄色葡萄球菌；4—E2+ 沃氏葡萄球菌；5—E3+3 种混菌；6—E4+ 大肠埃希菌；7—E5+7 种混菌。

图 6　加菌样本的测试结果

Fig.6　Test Results of Contaminated Samples

参考文献：

[1] 王　喆. 某生物药品生产工艺各系统污染菌种库建立[D]. 烟台：烟台大学硕士学位论文，2022.

[2] 杨丹妮，刘旻虹，张晓金，等. PCR-膜芯片技术快速筛查非预包装即食食品中食源性致病菌[J]. 食品安全质量检测学报，2021, **12**(2)：560-568.

[3] 赵睿骁，韩　斐，江明锋，等. PCR-膜芯片技术在牦牛及牛肉制品真假鉴定中的应用[J]. 生物技术通报，2020, **36**(1)：202-208.

[4] GU W, ZHANG P, ZHANG G, *et al*. The importance of HPV in penile cancer in China: A contemporary multicenter study[J]. *Front Oncol*, 2020, **10**: 1521.

[5] LIANG L, WANG P, QU T, *et al*. Detection and quantification of Bacillus cereus and its spores in raw milk by qPCR, and distinguish *Bacillus cereus* from other bacteria of the genus *Bacillus*[J]. *Food Qual Saf*, 2022, **6**(3)：386-395.

[6] 张楠驰，王　利，方　庆. 鱼源藤黄微球菌三重 PCR 检测法的建立及耐药性分析[J]. 食品工业科技，2020, **41**(5)：94-100.

[7] 李　冉，薛　晶，郭文平，等. 环介导等温扩增技术可视化快速检测表皮葡萄球菌方法的建立[J]. 承德医学院学报，2023, **40**(6)：456-460.

[8] GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ M S, CARVAJAL H D, CALLE-ECHEVERRI D A, *et al*. *Staphylococcus species* and its resistance characteristics[J]. *Front Vet Sci*, 2020, **7**: 376.

[9] RAGHAVA, GAJENDRA P S, *et al*. Fingerprint identification method for microbial phylogeny classification and identification based on 16S HRA gene sequence mutations[J]. *Biotechniques*, 2000, **29**(1)：108-116.

[10] 四川华汉三创生物科技有限公司. 一种增菌培养基及其制备方法、增菌培养方法：中国，106047781 B[P]. 2018-05-18.

[11] 杨丹妮，邹雨虹. PCR-反向斑点杂交技术在即食果蔬常见致病微生物快速筛查中的应用[J]. 现代食品，2023, **29**(5)：140-144.

[12] 王淑娟，朱　冉，蒋　波，等. 分子生物学技术在药品微生物鉴定溯源中的应用[J]. 中国药品标准，2023, **24**(6)：579-584.

[13] CENGİZ G, YAPAR E A. Method decision for determining specific microorganisms in pharmaceutical products: an overview[J]. *Univers J Pharm Res*, 2020, **5**(5)：85-91.

[14] CAUDILL M T, BRAYTON K A. The use and limitations of the 16S rRNA sequence for species classification of Anaplasma samples[J]. *Microorganisms*, 2022, **10**(3)：605.