

## 聚合酶链反应快速鉴定沙门氏菌的研究

文 钧 任保国 李锦瑞

目前沙门氏菌的检验方法,仍沿用传统的细菌培养法,从样品的采集、运送、增菌培养、分离培养、生化鉴定,到最后的血清分型,至少要用 3~5 天的时间,周期长,同时受到培养鉴定中许多因素的影响,阳性率不高。种种情况造成病程延长或漏诊。国外一些学者利用分子生物学技术,克隆出特异性 DNA 分子,经过酶切回收制备成核酸探针,可以检出整个沙门氏菌属的细菌。但是由于探针需要比较复杂的技术和设备,一般基层实验室难以开展。PCR 技术是近几年发展起来的新的生物学技术,用于检测细菌有周期短,特异性强等优点。

本文研究的目的是利用 DNA 扩增技术检测沙门氏菌,以解决周期长、敏感性低等问题,现将实验结果报告如下。

**材料与方**法: 1. 材料: ①实验菌株: 共选 36 株菌,包括: 甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、肠炎沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、都柏林沙门氏菌、斯坦利沙门氏菌、斯特拉斯堡沙门氏菌、俄勒冈沙门氏菌、慕尼黑沙门氏菌、曼哈顿沙门氏菌、弗吉尼亚沙门氏菌、产毒大肠杆菌 (ETEC)、痢疾志贺氏菌 I 型、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、宋内志贺氏菌、嗜水气单胞菌、蜂窝哈夫尼亚氏菌、铜绿假单胞菌、莫根氏菌、邻单胞菌、粘质沙雷氏菌、单增李斯特氏菌、阴沟肠杆菌、肺炎克雷伯氏菌、变形杆菌、霍乱弧菌 (小川)、嗜肺军团菌、空肠弯曲菌、致病大肠杆菌、副溶血弧菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌、肉毒梭菌; ②引物: 由军事医学科学院微生物流行病学研究所提供; ③Taq DNA 聚合酶、dNTP 购自华美生物工程公司; ④Nonidet-P40 为 Fluka 公司产品; ⑤Tween-20 为 Sigma 公司产品。

2. 方法: ①菌液制备: 在灭菌的 Eppendorf 管中加入少量无菌生理盐水,无菌研入少量待测细菌,混匀备用; ②DNA 扩增: 向扩增管中加入 38 $\mu$ l 裂解缓冲液 (含 1 $\times$ PCR 缓冲液, 0.05% NP-40, 0.05% Tween 20), 1 $\mu$ l dNTP (四种终浓度分别为

40 $\mu$ Mol), 4 $\mu$ l 引物 (终浓度分别为 0.2 $\mu$ Mol), 菌液 5 $\mu$ l, 无菌液体石蜡 2 滴。置于 DNA 扩增仪上, 97 $^{\circ}$ C 预扩增 15 分钟, 72 $^{\circ}$ C 条件下加入 1 $\mu$ l/2 $\mu$ l Taq DNA 聚合酶。然后进行循环。循环条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 1 分钟, 55 $^{\circ}$ C 退火 0.5 分钟, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 分钟, 共计 30 个循环。72 $^{\circ}$ C 保持 5 分钟, 以保证双链完整; ③敏感性实验: 先制备 10<sup>5</sup>CFU 细菌菌液, 依次作 5 倍稀释, 共作 8 支, 每个稀释度种两块平板, 接种 0.1ml, 用三角棒匀涂抹, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养。同时每个稀释度作 PCR。

**结果:** 1. 扩增产物经 1.5g% 琼脂糖凝胶 (含 0.5 $\mu$ g/ml 溴化乙锭) 电泳, 80 伏 1 小时, 在紫外分析仪下观察结果, 阳性者有 -300bp 的 DNA 扩增带, 与标准分子对照相符, 阴性对照菌未见任何扩增产物。经 DNA 扩增的 36 株菌中 14 株沙门氏菌为阳性, 其他 22 株对照菌为阴性, 符合率为 100%。

2. 扩增产物分析: 将三只扩增产物移入一只 Eppendorf 管中, 用氯仿抽提一次, 用异丙醇沉淀, 用限制性内切酶 Pst I (40 单位) 切, 37 $^{\circ}$ C 水浴 2 小时。酶切产物用 2.0g% 的琼脂糖凝胶 (含 0.5 $\mu$ g/ml 溴化乙锭) 电泳, 80 伏 1 小时, 在紫外分析仪下观察结果, 有 83bp 和 217bp 的酶切产物, 与引物序列设计相符。

3. 敏感性实验结果: 用本引物扩增检测沙门氏菌, 最低限为 5.5CFU/ml。

**讨论:** 本文用一对分别为 21bp 的寡核苷酸引物扩增沙门氏菌的染色体鞭毛素基因, 由原来细菌学培养法 4 天左右时间, 减少至 5 小时, 同时保持敏感性和特异性高的优点。从 36 株试验株的结果看完全符合原菌种的鉴定。因此, 在今后的防疫工作中, 若能采用 PCR 法对某些肠道传染病的病源性质的确定及早期诊断和相应的治疗, 均有积极的意义, 并为及时采取相应措施, 控制疫情有着重要作用。

(收稿: 1994-12-26 修回: 1995-01-07)

作者单位: 北京市卫生防疫站 100013