

· 实验研究 ·

多重实时 PCR 快速同时检测沙门菌和志贺菌

石晓路 扈庆华 张佳峰 李庆阁 王冰 林一曼 庄志雄 刘小立 张顺祥

【摘要】目的 建立改良分子信标-多重实时 PCR 同时检测沙门菌和志贺菌的快速方法,应用于食源性致病菌的快速诊断。**方法** 根据 GenBank 公布的沙门菌侵袭性基因 *invA* 和 *ssaR* 基因,分别设计一对引物和改良分子信标探针,用同色荧光标记,用于同体系检测沙门菌。志贺菌根据 *ipaH* 基因的保守序列,设计引物和改良分子信标探针,加入沙门菌检测体系中,建立三重实时 PCR-改良分子信标检测体系,应用于同时对沙门菌、志贺菌食物中毒的快速诊断和门诊肠道致病菌的检测。**结果** 改良分子信标-多重实时 PCR 反应体系 DNA 灵敏度为 69~93 fg/ μ l,菌液灵敏度为 32~64 CFU/ml 或 1~2 CFU/PCR 反应体系,无交叉反应。该反应体系同时检测 134 株沙门菌和 67 株志贺菌,均出现特异的荧光信号,两种细菌检测互不干扰。对细菌性食物中毒样本等共 1100 份同时进行沙门菌和志贺菌检测,569 份沙门菌实时 PCR 阳性,其中 551 份沙门菌培养阳性;42 份志贺菌实时 PCR 阳性,其中 41 份志贺菌培养阳性。从样品处理到检测结果仅需时间 2 h 至 1 d。**结论** 改良分子信标-多重实时 PCR 检测体系快速、灵敏度高,特异性强,可用于沙门菌和志贺菌食物中毒的快速诊断,伤寒、痢疾等肠道传染病的初筛及预防医学门诊的健康人群体检,为食源性疾病的分子流行病学调查提供新的检测手段。

【关键词】 沙门菌;志贺菌;多重实时聚合酶链反应;同步检测

Rapid simultaneous detection of *Salmonella* and *Shigella* using modified molecular beacons and real-time PCR SHI Xiao-lu*, HU Qing-hua, ZHANG Jia-feng, LI Qing-ge, WANG Bing, LIN Yi-man, ZHUANG Zhi-xiong, LIU Xiao-li, ZHANG Shun-xiang. *Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518020, China

Corresponding author: HU Qing-hua, Email: huqinghua03@163.com

【Abstract】Objective Dual detection of *Salmonella* and *Shigella* using modified molecular beacons and real-time PCR was developed. The established method was applied to rapid diagnosis of *Salmonella* and *Shigella*' food poisoning, and for routine monitoring programs. **Methods** Two sets of primers were designed based on the core sequence of *invA* gene and *ssaR* gene published on GenBank to detect *Salmonella*, and *ipaH* gene were selected to detect *Shigella*. Three corresponding modified molecular beacons labeled with different fluorophors were designed. The molecular beacons and primer sets were tested against numerous strains from 55 different bacterial species. Then the two assays were combined to establish the dual real-time PCR assay, and were applied to the food poisoning diagnosis and surveillance. **Results** For the modified molecular beacons-based dual real-time PCR assay, the sensitivity achieved was 69-93 fg/ μ l, 32-64 CFU/ml or 1-2 CFU/PCR reaction. There was no cross-reaction with other bacteria served as control. The dual real-time PCR assay was used to detect 134 *Salmonella* strains and 67 *Shigella* strains but no false signals were observed. 1100 food poisoning samples were tested with 569 *Salmonella* and 42 were *Shigella* identified by real time PCR. Among the positive samples, 551 were detected *Salmonella* and 41 were *Shigella* by traditional culture method. The overall test could be finished within 2 hours to one day starting from sample preparation. **Conclusion** The modified molecular beacons-based dual real-time PCR assay was rapid, sensitive, and specific. It could be applied to the rapid diagnosis of *Salmonella* and *Shigella*' food poisoning.

【Key words】 *Salmonella*; *Shigella*; Multiplex real-time polymerase chain reaction; Simultaneous detection

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30300281);广东省卫生厅资助项目(A2003709);深圳市科技局资助项目(200404139)

作者单位:518020 深圳市疾病预防控制中心(石晓路、扈庆华、王冰、林一曼、庄志雄、刘小立、张顺祥);厦门大学生命科学学院(张佳峰、李庆阁)

通讯作者:扈庆华, Email: huqinghua03@163.com

目前沙门菌和志贺菌检验仍以传统培养法为主,操作繁琐,耗时长,且阳性率低。随着分子生物学技术的发展,已采用 PCR 技术应用于细菌的快速诊断。然而传统 PCR 技术易污染,造成检测失败。自 1995 年美国 PE 公司提出实时 PCR 检测原理后,实时 PCR 以其快速、定量、无需后电泳、无交叉污染等突出优点而被广泛采用。1996 年 Tyagi, Kramer^[1]提出的分子信标是一种具有茎环构型的分子探针,用于 PCR 扩增产物均相测定的原理是,在退火阶段,分子信标与生产的靶序列结合发出荧光,在延伸阶段则脱离靶序列而不干扰扩增,随着循环次数的增加,与靶序列结合的分子信标的量亦增加,最终的荧光强度与模板量成正相关。改良分子信标是在分子信标探针基础上提出的一种新型分子探针^[2],以它为基础建立的实时 PCR 技术,可以更好地实现多重实时 PCR 检测多种致病菌。本文采用改良分子信标技术建立沙门菌和志贺菌的多重实时 PCR 方法,和国家标准检测方法进行比较,评价新方法的准确性和灵敏度,用于食源性疾病的快速诊断和肠道门诊的筛查。现将结果报告如下。

材料与与方法

1. 实验用菌株:55 种细菌共 218 株菌株。包括 34 种沙门菌标准菌株、4 种志贺菌标准菌株和 17 种其他肠道致病菌标准株,购自中国药品生物制品检定所(检定所)。100 株沙门菌临床分离株和 63 株志贺菌临床分离株,为深圳市历年食物中毒或肠道门诊中分离(表 1)。

2. 菌株的分离和鉴定:按照中华人民共和国颁布的《食品微生物学》国家检验标准操作。

3. 反应模板的制备:

(1) 菌株 DNA 模板:菌株经 LB 增菌培养过夜后,菌体用 500 μl TE buffer 悬浮,加入终浓度为 50 μg/μl 溶菌酶,37℃ 作用 1 h,然后再加入终浓度为 1% SDS 和 0.2 μg/μl 的蛋白酶 K,55℃ 作用 1 h 后,用酚-氯仿抽提 DNA。

(2) 样品 DNA 模板:①粪便、呕吐物标本:根据粪便和呕吐物量的多少,用 100~200 μl 生理盐水悬浮,煮沸,10 000 r/min 离心 2 min,取 5 μl 上清液即可用于实时 PCR 反应。②食品样品:用 GN 或 SC 增菌 6~8 h 后,取 1 ml 菌液富集,加水 100 μl 煮沸,离心吸取 5 μl 上清液即可用于实时 PCR 反应。

4. 单一细菌改良分子信标检测体系的建立:

表1 实验用菌株

菌株名称及菌号	菌株数	菌株来源
阿伯丁沙门菌 <i>S. aberdeen</i> (50313)	1	检定所
马流产沙门菌 <i>S. abortus-equi</i> (47717)	1	检定所
阿德莱德沙门菌 <i>S. adelaide</i> (50065)	1	检定所
鸭沙门菌 <i>S. anatum</i> (50083)	1	检定所
猪霍乱沙门菌 <i>S. cholerae-suis</i> (47649)	1	检定所
大肠沙门菌 <i>S. coli</i> (50809)	1	检定所
都柏林沙门菌 <i>S. dublin</i> (50042)	1	检定所
肠炎沙门菌 <i>S. enteritidis</i> (50040)	1	检定所
鸡沙门菌 <i>S. gallinarum</i> (50770)	1	检定所
婴儿沙门菌 <i>S. infantis</i> (50341)	1	检定所
爪哇沙门菌 <i>S. javiana</i> (50364)	1	检定所
肯塔基沙门菌 <i>S. kentucky</i> (50794)	1	检定所
利齐菲尔德沙门菌 <i>S. litchfield</i> (50810)	1	检定所
伦敦沙门菌 <i>S. london</i> (50310)	1	检定所
曼彻斯特沙门菌 <i>S. manchester</i> (50380)	1	检定所
曼哈顿沙门菌 <i>S. manhattan</i> (50151)	1	检定所
火鸡沙门菌 <i>S. meleagridis</i> (50329)	1	检定所
明尼苏达沙门菌 <i>S. minnesota</i> (50061)	1	检定所
莫斯科沙门菌 <i>S. moscow</i> (50044)	1	检定所
慕尼黑沙门菌 <i>S. muenchen</i> (50125)	1	检定所
纽波特沙门菌 <i>S. newport</i> (50029)	1	检定所
奥兰堡沙门菌 <i>S. oranienburg</i> (50379)	1	检定所
甲型副伤寒沙门菌 <i>S. paratyphi A</i> (50001)	1	检定所
甲型副伤寒沙门菌无动力变种 <i>S. paratyphi A "O" type</i> (50509)	1	检定所
乙型副伤寒沙门菌 <i>S. paratyphi B</i> (50004)	1	检定所
丙型副伤寒沙门菌 <i>S. paratyphi C</i> (50017)	1	检定所
圣保罗沙门菌 <i>S. saintpau</i> (50339)	1	检定所
圣地亚哥沙门菌 <i>S. sandiego</i> (50009)	1	检定所
仙台沙门菌 <i>S. sendai</i> (50350)	1	检定所
山夫登堡沙门菌 <i>S. senftenberg</i> (50209)	1	检定所
汤卜逊沙门菌 <i>S. thompson</i> (50023)	1	检定所
伤寒沙门菌 <i>S. typhi</i> (47727)	1	检定所
猪伤寒沙门菌 <i>S. typhi-suis</i> (50734)	1	检定所
鼠伤寒沙门菌 <i>S. typhimurium</i> (50013)	1	检定所
蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i> (63301)	1	检定所
弗劳地枸橼酸杆菌 <i>C. freundii</i> (48001)	1	检定所
肉毒梭菌 <i>C. botulinum</i> (64203)	1	检定所
产芽孢梭菌 <i>C. sporogenes</i> (64941)	1	检定所
产气肠杆菌 <i>E. aerogenes</i> (45103)	1	检定所
阴沟肠杆菌 <i>E. cloacae</i> (45301)	1	检定所
大肠埃希菌 <i>E. coli</i> (44104)	1	检定所
单核细胞增生李斯特菌 <i>L. monocytogenes</i> (54001)	1	检定所
奇异变形杆菌 <i>P. mirabilis</i> (49003)	1	检定所
普通变形杆菌 <i>P. vulgaris</i> (49001)	1	检定所
粘质沙雷菌 <i>S. marcescens</i> (41002)	1	检定所
鲍式志贺菌 <i>S. boydii</i> (51265)	1	检定所
痢疾志贺菌 <i>S. dysenteriae</i> (51376)	1	检定所
福氏志贺菌 <i>S. flexneri</i> (51093)	1	检定所
宋内志贺菌 <i>S. sonnei</i> (51081)	1	检定所
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i> (26001)	1	检定所
粪链球菌 <i>Streptococcus</i> (33219)	1	检定所
乙型溶血性链球菌 <i>S. hemolytic-β</i> (32210)	1	检定所
副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i> (20001)	1	检定所
霍乱弧菌 <i>V. cholera</i> (16001)	1	检定所
小肠结肠炎耶尔森菌 <i>Y. enterocolitica</i> (52201)	1	检定所
沙门菌 <i>Salmonella</i>	100	临床分离
志贺菌 <i>Shigella</i>	63	临床分离

(1)引物和探针设计:根据 GenBank 公布的沙门毒力岛 I 的 *invA* 基因和毒力岛 II 的 *ssaR* 基因序列,各设计一对引物和改良分子信标探针,同时用 FAM 标记,用于沙门菌的检测。根据 GenBank 公布志贺菌 *ipaH* 基因片段中的开放阅读框部分序列设计引物和改良分子信标探针,扩增片段为 112 bp。探针用 ROX 标记,用于志贺菌的检测。引物和探针均由上海 Sangon 公司合成。

(2)PCR 反应条件:反应总体积为 25 μ l,内含 5 μ l 模板,2.5 μ l 10 \times PCR 缓冲液,1.5 mmol/L MgCl₂,0.25 mmol/L dNTP,1 U Taq 酶,25 pmol 引物,25 pmol 探针。实时 PCR 反应参数为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,40 个循环中 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s,52 $^{\circ}$ C 退火 25 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s。采用退火阶段检测荧光。

(3)特异性检测:以产气肠杆菌、阴沟肠杆菌、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、变形杆菌等细菌的 DNA 作对照,对沙门菌标准菌株进行 *invA* 和 *ssaR* 改良分子信标实时 PCR 扩增;对志贺菌标准菌株进行 *ipaH* 改良分子信标实时 PCR 扩增。

(4)灵敏度分析:选 1 株鼠伤寒沙门菌标准菌株(S9)作为灵敏度分析的代表株。包括 DNA 灵敏度分析和菌液灵敏度分析。DNA 灵敏度分析:按常规 DNA 提取方法提取模板 DNA。用 Ultraspec2000 紫外可见光蛋白核酸分析仪(Pharmacia 公司)测 DNA 的浓度。然后进行 5 倍梯度稀释,每个稀释度取 1 μ l 用于实时 PCR 反应。菌液灵敏度分析:S9 菌株经肉汤增菌过夜后,进行 10 倍梯度稀释,共做 10 个稀释度,然后依次取 10 个稀释度的 1 ml 菌液经简易处理(见模板提取 2)后,进行实时 PCR 反应。同时相对应的按中华人民共和国颁布的《食品微生物检验标准》做细菌总数计数。

选 1 株福氏志贺菌标准菌株(D1)作为灵敏度分析的代表株。包括 DNA 灵敏度分析和菌液灵敏度分析。其分析方法与沙门菌的灵敏度分析方法相同。

5.多重体系改良分子信标-实时 PCR 的建立:在上述建立的单一检测体系的基础上,优化反应条件,建立起双色多重实时 PCR,反应总体积为 25 μ l,内含 2.5 μ l 10 \times PCR 缓冲液,1.5 mmol/L MgCl₂,0.5 mmol/L dNTP,1 U Taq 酶,25 pmol *invA* 引物,25 pmol *invA* 探针(FAM 标记);25 pmol *ssaR* 引物,25 pmol *ssaR* 探针(FAM 标记);25 pmol *ipaH* 引物,25 pmol *ipaH* 探针(ROX 标记)。扩增和检测条件

同上,退火阶段同时检测荧光 FAM 和 ROX。

6.多重实时 PCR 反应体系的应用:运用于 1100 份样本的检测。包括:452 份食物中毒样本(肛拭子、呕吐物或剩余食品)、328 份伤寒、痢疾标本(肛拭子、粪便等)和 320 份食品从业人员肛拭子。

结 果

1. 沙门菌改良分子信标体系检测:

(1)特异性分析:55 种细菌经改良分子信标体系检测,只有沙门菌有荧光信号,其余细菌均无荧光信号,进一步证明了 *invA* 基因和 *ssaR* 基因共同检测的特异性。

(2)灵敏度结果:DNA 灵敏度为 69 fg/ μ l,菌液灵敏度为 2 CFU/PCR 反应体系,对原始样品而言,菌液灵敏度为 32 CFU/ml。

2. 志贺菌改良分子信标体系的检测:

(1)特异性分析:55 种细菌经改良分子信标体系检测,只有志贺菌有荧光信号,其他细菌无荧光信号。

(2)灵敏度分析:DNA 灵敏度为 93 fg/ μ l,菌液灵敏度为 3 CFU/PCR 反应体系,对原始样品而言,菌液灵敏度为 64 CFU/ml。

3.改良分子信标-多重实时 PCR 检测体系的建立:改良分子信标-多重实时 PCR 反应体系稳定,灵敏度高,特异性强,两种细菌的检测互不干扰,无交叉反应。

4.改良分子信标-多重实时 PCR 检测体系应用:对 1100 份各类样本,用改良分子信标-多重荧光 PCR 法同时检测沙门菌和志贺菌,共检出沙门菌阳性标本 569 份,其中 551 份分离出沙门菌菌株。检出志贺菌阳性标本 42 份,其中 41 份分离出志贺菌菌株。其检测情况见表 2。该检测体系灵敏度高,检出率高于传统分离方法,检测时间仅需 2 h。

表2 改良分子信标-多重实时 PCR 方法的应用

样品来源	样品份数	沙门菌 荧光 PCR 阳性 份数	沙门菌 培养 阳性 份数	志贺菌 荧光 PCR 阳性 份数	志贺菌 培养 阳性 份数
食物中毒样品	452	316	300	3	2
肠道传染病样品	328	250	248	38	38
食品从业人员肛拭	320	3	3	1	1
合 计	1100	569	551	42	41

讨 论

本文在改良分子信标技术的基础上,建立了多重实时 PCR 同时检测两种细菌的方法。结果表明:

①此方法灵敏度高,每毫克或每毫升样品含 32~64 CFU 细菌,即可检出。②特异性强,与对照组 54 种细菌无交叉反应,即类似的肠道致病菌均呈阴性。③操作简单,结果观察直观明了,可一次检测 96 份标本(含阴阳性对照)。④对于食品从业人员肛拭子,可采用 5 人份合并为一管中检测,以提高检测效率。采用水煮法而非酚-氯仿抽提法,快速简便有效,适用于沙门菌和志贺菌食物中毒的快速诊断和大量样品的初筛。⑤检测粪便和呕吐物标本仅需时 2 h,检测食品标本仅需 1 d 时间(包括样品的增菌和前期处理)。在多重实时 PCR 研究的基础上,最终实现多重实时 PCR 同时诊断 10 种食源性致病菌,满足常见细菌性食物中毒快速诊断的要求。

Buysse 等^[3]发现志贺菌侵袭性质粒抗原 H (invasive plasmid, ipaH),同时多拷贝存在于染色体和侵袭性大质粒上,不随传代而丢失,鉴于此,根据志贺菌 *ipaH* 基因的保守序列,设计引物和改良分子信标探针用于志贺菌检测,特异性强,灵敏度高。

Galan 等^[4]克隆并描述了鼠伤寒沙门菌的一组基因(*invA*、*B*、*C*、*D*),是沙门菌毒力岛 I 的重要基因,这组基因决定了沙门菌进入上皮细胞的能力,与沙门菌的致病性密切相关,并在沙门菌中广泛分布,而在非沙门菌中尚未发现,这是目前报道最多的一组靶基因。Rahn 等^[5]在 1992 年率先根据鼠伤寒沙门菌 *invA* 基因设计出一对引物用于沙门菌检测,到目前为止,大多研究者仍沿用 Rahn 所设计的引物^[6]。然而,单纯针对 *invA* 基因设计引物,并不能检测所有的沙门菌,在我们的日常工作中发现,部分山夫登堡沙门菌和利齐菲尔德沙门菌就不存在或者缺失该基因,因此有必要加入另外的属特异性基因进行扩增,才能保证不产生漏检。沙门菌 *ssaR* 基因,是沙门菌毒力岛 II 的重要基因,编码与系统感染有关的分泌蛋白,调控沙门菌在宿主细胞内存活的能力和在吞噬细胞中复制的能力,与系统性疾病如伤寒疾病有关^[7,8]。本研究加入这一基因,可以确保所有的沙门菌均被检出。

改良分子信标探针是为了提高杂交效率,在原来分子信标原理基础上提出的。改良分子信标的突出特点是将分子信标的臂部分也作为靶识别序列,而不仅仅是用于形成发夹结构的无关添加序列。对于同样长度的检测靶序列,改良分子信标比分子信标更短,而且由于臂序列不再悬空,因而与靶序列的结合更趋紧密。已经证明,改良分子信标比分子信

标更易设计且成功率更高,同时对扩增条件要求不严,因此对于多个靶序列的同时检测,改良分子信标的优势更加明显。本文采用改良分子信标的设计思路,在分别建立沙门菌和志贺菌实时 PCR 检测基础上,直接将两体系合并,保留了原来的实验条件,即建立起二者同时检测反应体系,且灵敏度并不比单个检测更低,进一步说明了改良分子信标的优势。

目前国外有采用 TaqMan 技术分别检测志贺菌和沙门菌的文献报道^[9],但主要为单一荧光体系检测一种细菌,未见多重实时 PCR 同时检测多种细菌的文献报道。随着生态环境的变化和抗生素的滥用,许多致病菌引起的临床症状越来越不典型,常常需要同时检测多种细菌才能确定病原。这就对快速诊断技术提出了更高的要求:又快又能同时检测多种病原微生物。实际工作和经验证明,所建立的多重实时 PCR 方法可用于食物中毒的初筛,极少出现漏检,与传统方法相比具有快速灵敏、操作简便等优点,是国标检测方法的有力补充。随着多通道荧光 PCR 仪的不断普及和发展,使得同时检测 4 种或 5 种不同波长的光源成为可能,因此同管检测 4~5 种常见致病菌的多重实时 PCR 技术,是未来发展的趋势。

参 考 文 献

- 1 Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnology*, 1996, 14: 303.
- 2 Li Q, Lang J, Luan G, et al. Molecular beacon-based homogeneous fluorescence PCR assay for the diagnosis of infectious diseases. *Anal Sci*, 2000, 16: 245-248.
- 3 Buysse JM, Hartman AB, Strockbine N, et al. Genetic polymorphism of the *ipaH* multicopy antigen gene in *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Microb Pathog*, 1995, 19: 335-349.
- 4 Galan JE, Curtiss R 3rd. Distribution of the *invA*, *-B*, *-C*, and *-D* genes of *Salmonella typhimurium* among other *Salmonella* serovars: *invA* mutants of *Salmonella typhi* are deficient for entry into mammalian cells. *Infect Immun*, 1991, 59: 2901-2908.
- 5 Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, et al. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and Cellular Probes*, 1992, 6: 271-279.
- 6 Vu DT, Sethabutr O, Von Seidlein L, et al. Detection of *Shigella* by a PCR assay targeting the *ipaH* gene suggests increased prevalence of shigellosis in Nha Trang, Vietnam. *J Clin Microbiol*, 2004, 42: 2031-2035.
- 7 Pfeifer CG, Marcus SL, Steele-Mortimer O, et al. *Salmonella typhimurium* virulence genes are induced upon bacterial invasion into phagocytic and nonphagocytic cells. *Infect Immun*, 1999, 67: 5690-5698.
- 8 Brummell JH, Rosenberger CM, Gotto GT, et al. SifA permits survival and replication of *Salmonella typhimurium* in murine macrophages. *Cell Microbiol*, 2001, 3: 75-84.
- 9 Daum LT, Barns WJ, McAvin JC, et al. Real-time PCR detection of *Salmonella* in suspect foods from a gastroenteritis outbreak in Kerr County, Texas. *J Clin Microbiol*, 2002, 40: 3050-3052.

(收稿日期: 2006-03-06)

(本文编辑: 张林东)