

技术与方法

扩增内标在沙门氏菌 PCR 检测方法中的应用*

刘 斌 史贤明**

(上海交通大学食品科学与工程系陆伯勋食品安全研究中心 上海 201101)

摘要: 在 PCR 反应体系中添加了一条人工构建的扩增内标片段, 以指示沙门氏菌 PCR 快速检测中出现的假阴性。对 9 株沙门氏菌和 15 株非沙门氏菌进行 PCR 检测, 结果显示所有沙门氏菌都能扩增到一条 *invA* 基因中的 374bp 特异性片段, 而模板来源于非沙门氏菌时则只能扩增到一条 513bp 扩增内标片段。灵敏度试验显示, 该 PCR 检测体系对猪霍乱沙门氏菌纯 DNA 模板的检测灵敏度为 $12.8 \text{ fg}/\mu\text{L}$, 如果将增菌时间确定为 8h, 则该检测体系对人工染菌牛乳中沙门氏菌的检测灵敏度可以达到起始浓度为 $8 \text{ cfu}/25\text{mL}$ 。采用上述方法检测了 80 份污染严重的样品, 证实此方法可以有效地排除假阴性, 提高检测准确率。

关键词: 扩增内标, PCR 检测, 沙门氏菌

中图分类号: TS207.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 02-0156-06

Application of Internal Amplification Control in the PCR Detection Method for Food-borne *Salmonella**

LIU Bin SHI Xian-Ming**

(Dept. of Food Science & Technology and Food Safety Center,
Shanghai JiaoTong University, Shanghai 201101)

Abstract: An internal amplification control, which could be co-amplified with the *invA* target gene of *Salmonella* in the PCR system, was constructed in order to indicate possible PCR inhibitors derived from food samples. Specificity of this PCR system was tested with 9 *Salmonella* strains and 15 non-*Salmonella* strains, and the results showed that there was a 374 bp amplicon resulted from all *Salmonella* strains, while only a 513 bp IAC amplicon appeared after the amplification for all non-*Salmonella* strains. The detection sensitivity of this PCR system was $12.8 \text{ fg}/\mu\text{L}$ for purified target DNA, and the detection limit for artificially inoculated milks was $8 \text{ cfu}/25\text{g}$ if they were enriched for 8h in buffered peptone water. *Salmonella* in 80 samples of seriously contaminated milks was detected by the PCR method developed in this study, and the experiments demonstrated that it could successfully eliminate false-negative results.

Key words: Internal amplification control, PCR detection, *Salmonella*

沙门氏菌是食源性致病菌中一个重要属, 由其引起的食物中毒占世界食物中毒病例的第一或第二位^[1-3]。沙门氏菌主要是通过食品 (特别是动物性食品) 传播、感染人体。因此, 沙门氏菌检测是食品安全与质量检测的一项重要指标。但是目前法定的沙门氏菌检测方法仍采用传统培养方法, 操作繁琐、耗时, 需 4~5d, 已不能满足食品

* 美国农业部国际合作项目 (No. USDA58-3148-4-106)

国家“十五”奶业重大专项课题 (No. 2002BA518A-06)

** 通讯作者 Tel: 021-64783841; E-mail: xmshi@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2005-05-11, 修稿日期: 2005-05-28

生产和国际贸易发展的需要。基于聚合酶链式反应（PCR）的检测方法灵敏、特异、快速，已广泛应用于沙门氏菌的检测。

近年来的应用实践表明，沙门氏菌 PCR 检测方法也存在一些不足，因此它在大多数国家还不是法定的检测方法。例如食品和培养基中存在的抑制剂可影响 PCR 反应，使检测结果呈假阴性^[4,5]。虽然 PCR 检测技术不断地得到改进，可是还没有有效的方法消除抑制剂对 PCR 检测的影响。因而一些学者开始认识到在 PCR 反应体系放置指示假阴性的扩增内标（internal amplification control, IAC）是必要的^[6,7]。但是在目前已建立的 PCR 检测方法中，却很少有人切实加以应用。本研究通过添加一条人工构建的 IAC 片段来显示假阴性的发生，从而提高 PCR 检测的准确率。

1 材料与方法

1.1 菌株

标准菌株购于中国科学院微生物研究所，其余为本实验室保存菌株，见表 1。

表 1 菌株及 PCR 检测结果

菌株名称	学名	菌株数	PCR 检测结果
甲型副伤寒沙门氏菌	<i>Salmonella paratyphi</i> A	1	+
猪霍乱沙门氏菌 AS1. 1190	<i>Salmonella choleraesuis</i> AS1. 1190	1	+
伤寒沙门氏菌 CMCC50098	<i>Salmonella typhi</i> CMCC50098	1	+
伤寒沙门氏菌	<i>Salmonella typhi</i>	2	+
肠炎沙门氏菌	<i>Salmonella enteritidis</i>	2	+
鼠伤寒沙门氏菌	<i>Salmonella typhimurium</i>	1	+
阿伯丁沙门氏菌	<i>Salmonella aberdeen</i>	1	+
副溶血弧菌 ATCC17802	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC17802	1	-
单核增生李斯特菌	<i>Listeria monocytogenes</i>	2	-
志贺氏菌	<i>Shigella</i>	1	-
大肠杆菌	<i>Escherichia coli</i>	3	-
金黄色葡萄球菌 ATCC6538	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538	1	-
金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	2	-
小肠结肠炎耶尔森氏菌	<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	-
绿脓杆菌	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	-
最小弧菌	<i>Vibrio mimicus</i>	1	-
福氏痢疾杆菌	<i>Shigella flexneri</i>	1	-
大肠杆菌 O157: H7	<i>Escherichia coli</i> O157: H7	1	-

注：+ 阳性结果，- 阴性结果

1.2 引物合成

根据文献 [8] 的分析，沙门氏菌属不同菌株的 *invA* 基因 DNA 序列的同源性很高，因此选择 *invA* 基因中特异性较强的序列，设计了一对沙门氏菌特异性目标引物。目标引物序列为：svaL, 5' -GCTCTTTCGTCTGGCATT-3'; svaR, 5' -CGGCAATAGCGT-CACCTT-3'。

1.3 扩增内标的构建

首先选择一段与 *invA* 基因同源性较低、来源于沙门氏菌 *stn* 基因的 DNA 序列，设

计了一对内标引物: sinL, 5' - TGGGCATCCTGACTGACCAG-3' 和 sinR, 5' - CGACGAACCAGCGAAACAAA-3'。经 PCR 扩增得到一段 476bp 的产物, 然后用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(天为时代)将这段扩增产物回收纯化, 插入到载体 pMD 18-T (大连宝生)中, 再转化到大肠杆菌。采用选择性平板筛选到转化子, 用 SDS 碱裂解法提取转化子中的质粒 DNA。然后, 在内标引物 sinL 和 sinR 的 5' 末端分别连接目标引物 svaL 和 svaR, 形成一对约 40bp 的长引物。接着, 用这对长引物对质粒 DNA 扩增后便得到 513bp 的 IAC 片段^[9]。最后纯化 IAC 片段并测定浓度, 参照文献 [6] 的方法计算其拷贝数。

1.4 样品的采集

食品样品见表 2, 所有样品均购自上海的食品市场。

1.5 沙门氏菌的培养及 DNA 的提取

从 BPW 平板上挑取猪霍乱沙门氏菌的单菌落, 接入 50mL BPW 液体培养基中, 在 37℃ 培养 6h。取 1mL 菌液加入 1.5mL 离心管中, 12,000r/min 离心 5min。弃去上清液后, 用无菌水洗涤菌体, 加入 480μL 含有溶菌酶 (10μg/mL) 的 TE 缓冲液, 37℃ 水浴 1h。再加入 10% 的 SDS 53μL、1% 的 NaCl 87μL 及 1% 的 CTAB 69μL, 68℃ 水浴 15min, 用酚: 氯仿抽提法纯 DNA 后, 用乙醇沉淀, 加无菌水溶解即为 PCR 模板 DNA 溶液。

1.6 人工污染样品的制备

猪霍乱沙门氏菌经过 6h 的纯培养之后, 用生理盐水作 10 倍系列稀释, 并取 1mL 稀释度为 10^{-7} 的菌液作平板计数, 计算沙门氏菌纯培养的起始浓度。再取 4 份无菌牛乳样品, 每份 25mL, 分别加入 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 个稀释度的猪霍乱沙门氏菌菌悬液各 1mL, 然后根据沙门氏菌的起始浓度分别计算每份样品的接菌量。

1.7 人工污染样品的增菌及样品中沙门氏菌 DNA 的提取

将上述 4 份人工污染的样品 (25mL) 添加到 225mL BPW 液体培养基中。在 37℃ 的摇床 (150r/min) 中增菌, 并且分别在增菌 8h 和 12h 后各取样 1 次。每份样品取样 1mL, 放入 1.5mL 离心管中, 3,000r/min 离心 10min, 沉淀培养物中的食品残渣。取上清液, 在 12,000r/min 离心 5min, 收集沙门氏菌菌体。倒去上清液后, 用无菌双蒸水重新悬浮菌体, 离心洗涤 3 次。然后加入 100μL 无菌超纯水, 在沸水浴中煮 10min。从沸水浴中取出后, 立即在 -20℃ 放置 30min。在 37℃ 解冻后, 12,000r/min 离心 5min, 上清液为 PCR 模板 DNA 溶液。

1.8 PCR 扩增

25μL 反应体系含 10 × PCR 缓冲液 2.5μL, 25mmol/L 的 Mg^{2+} 1.5μL, 2.5mmol/L 的 dNTP 1μL, 10μmol/L 的引物各 1μL, 模板 5μL, 含 IAC 片段溶液 1μL, 2.5U/μL 的 TaqDNA 聚合酶 (天为时代) 0.3μL。PCR 循环参数: 在 94℃ 预变性 3min, 接着作 35 个循环, 每个循环的程序包括 94℃ 变性 30s, 56℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 30s, 循环结束后在 72℃ 延伸 10min。再用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳观察结果。

2 结果

2.1 扩增内标及沙门氏菌纯培养总 DNA 的定量测定

纯化的 IAC 片段和沙门氏菌纯培养的总 DNA, 经 DU-800 紫外分光光度计 (Beckman Coulter) 测量, 其含量分别为 11.4ng/μL 和 64.0ng/μL。根据文献 [6] 中的计算

公式可以得到 $1\mu\text{L}$ IAC 片段的拷贝数为 2.2×10^{10} 。

2.2 灵敏度评价

2.2.1 模板 DNA 检测的灵敏度：将猪霍乱沙门氏菌总 DNA 溶液用无菌水进行梯度稀释，从 $64.0 \sim 6.4\text{ng}/\mu\text{L}$ DNA 溶液中分别取 $5\mu\text{L}$ 加入 PCR 反应体系，使每个 PCR 反应体系 ($25\mu\text{L}$) 分别含 DNA 为： $12.8\text{ng}/\mu\text{L}$ 、 $1.28\text{ng}/\mu\text{L}$ 、 $128\text{pg}/\mu\text{L}$ 、 $12.8\text{pg}/\mu\text{L}$ 、 $1.28\text{pg}/\mu\text{L}$ 、 $128\text{fg}/\mu\text{L}$ 、 $12.8\text{fg}/\mu\text{L}$ 、 $1.28\text{fg}/\mu\text{L}$ 。如图 1 所示，本文建立的 PCR 方法检测沙门氏菌 DNA 的灵敏度为 $12.8\text{fg}/\mu\text{L}$ 。

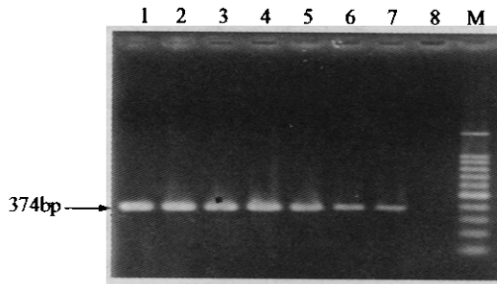


图 1 未添加 IAC 时猪霍乱沙门氏菌检测的灵敏度

1~8 PCR 反应中模板 DNA 量依次为 $12.8\text{ng}/\mu\text{L}$ 、 $1.28\text{ng}/\mu\text{L}$ 、 $128\text{pg}/\mu\text{L}$ 、 $12.8\text{pg}/\mu\text{L}$ 、 $1.28\text{pg}/\mu\text{L}$ 、 $128\text{fg}/\mu\text{L}$ 、 $12.8\text{fg}/\mu\text{L}$ 、 $1.28\text{fg}/\mu\text{L}$ ，M 100bp ladder marker

纯化的 IAC 片段先用无菌水稀释成 660 拷贝/ μL ， 440 拷贝/ μL ， 220 拷贝/ μL 和 110 拷贝/ μL ，分别加入到上述的 PCR 检测体系中，研究 IAC 片段对灵敏度的影响。当 IAC 片段的添加量为 660 拷贝或 440 拷贝时，检测灵敏度仅为 $128\text{fg}/\mu\text{L}$ ；当添加量为 110 拷贝时，扩增产物的荧光强度较弱，达不到指示假阴性结果的目的。当添加量为 220 拷贝时，其灵敏度仍然为 $12.8\text{fg}/\mu\text{L}$ (图 2)，对 PCR 检测体系的灵敏度几乎没有影响，因此，在本研究建立的 PCR 检测体系中采用 220 拷贝的 IAC 片段。

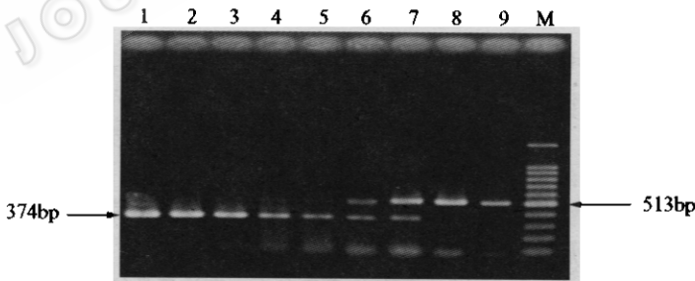


图 2 添加 IAC 为 220 拷贝时猪霍乱沙门氏菌检测的灵敏度

1~8 PCR 反应中模板 DNA 量分别为 $12.8\text{ng}/\mu\text{L}$ 、 $1.28\text{ng}/\mu\text{L}$ 、 $128\text{pg}/\mu\text{L}$ 、 $12.8\text{pg}/\mu\text{L}$ 、 $1.28\text{pg}/\mu\text{L}$ 、 $128\text{fg}/\mu\text{L}$ 、 $12.8\text{fg}/\mu\text{L}$ 、 $1.28\text{fg}/\mu\text{L}$ ，9 阴性对照 (dH_2O)，M 100bp ladder marker

2.2.2 人工污染食品样品的检测灵敏度：在无菌牛乳中人为接种猪霍乱沙门氏菌，起始菌液浓度为 $8.3 \times 10^8 \text{cfu}/\text{mL}$ ，按照方法 1.6 稀释，分别接入 4 份无菌牛乳样品 (25mL) 中，接菌量分别为 8cfu ， 80cfu ， $8 \times 10^2 \text{cfu}$ ， $8 \times 10^3 \text{cfu}$ 。按照方法 1.7 增菌后进行 PCR 检测，同时，以沙门氏菌纯培养的基因组 DNA 为阳性对照，以无菌水为阴性对照。由图 3 可以看出，增菌培养时间为 8h 和 12h 时，污染的牛乳样品均扩增出目标序列特异条带；而阴性对照没有扩增出目标序列特异条带，只有 IAC 片段的扩增带。这说明建立的检测体系经 8h 增菌后，就可以从起始菌量为 $8\text{cfu}/25\text{mL}$ 的样品中检测到

沙门氏菌。

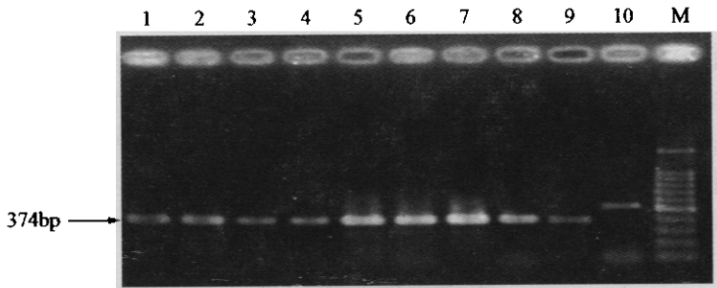


图3 人工污染猪霍乱沙门氏菌的牛乳样品增菌培养 8h 和 12h 后的 PCR 检测结果

1~4 增菌 8h 接菌量依次为 8×10^3 cfu/25g、 8×10^2 cfu/25g、80cfu/25g、8cfu/25g, 5~8 增菌 12h 接菌量依次为 8×10^3 cfu/25g、 8×10^2 cfu/25g、80cfu/25g、8cfu/25g, 9 阳性对照, 10 阴性对照, M 100bp ladder marker

2.3 特异性评价

采用本研究建立的 PCR 检测体系对表 1 中的 9 株常见沙门氏菌和 15 株非沙门氏细菌分别进行扩增检测, 发现以沙门氏菌基因组 DNA 为模板皆能扩增出 374bp 的目标序列特异产物, 而以非沙门氏菌基因组 DNA 为模板时只能扩增出 513bp 的 IAC 片段 (表 1)。

2.4 准确率评价

采集 80 份人为污染严重的牛乳样品, 每份取 25mL, 移入 225mL 的 BPW 液体培养基中, 37℃ 增菌 8h。按照方法 1.7 提取沙门氏菌 DNA, 不加 IAC, 进行 PCR 检测, 检测结果中有 77 份为阳性, 3 份阴性。而用同样的模板 DNA 并加有 IAC 进行 PCR 检测时, 对应的 3 份阴性样品显示为假阴性 (没有目标序列和扩增内标的扩增产物)。出现假阴性的样品经过重新纯化 DNA 后, 再次进行检测, 假阴性样品均显示为阳性结果。这说明从这 3 份假阴性样品中提取得到的模板 DNA 溶液中存在干扰因子, 本研究建立的检测体系在进行大量样品检测时确实能够指示假阴性, 有助于提高检测的准确率。

2.5 不同食品对沙门氏菌 PCR 检测方法的影响

采集 6 种食品样品, 每种样品每份取 25g 或 25mL, 加入到 225mLBPW 液体培养基中, 在无菌条件下均浆, 然后再加入稀释度为 10^{-7} 的沙门氏菌菌悬液 1mL (每份样品的起始染菌量约为 8cfu/25g 或 25mL), 在 37℃ 下增菌 8h。按照方法 1.7 提取 DNA 进行 PCR 检测, 均有特异扩增带出现, 采集的食品样品及检测结果见表 2。这说明此方法能够排除食品成分的干扰, 适合于多类食品的沙门氏菌检测。

表 2 用于沙门氏菌检测的食品及其人工污染后的检测结果

食品	数量	阳性结果	阴性结果
鲜牛乳	10	10	0
袋装牛乳	5	5	0
火腿肠	10	10	0
鸡蛋	10	10	0
黄瓜	2	2	0
西红柿	2	2	0

3 讨论

本文根据沙门氏菌 *stn* 基因的一段特异 DNA 序列而构建了 IAC 片段, 其目的是为

了指示并校正假阴性结果。IAC 片段的序列与 *invA* 基因的同源性非常低 (<10%), 两者不会通过互补链的结合而交联在一起, 因此不会影响扩增反应。IAC 片段的两端分别连接于有目标引物 *svaL* 和 *svaR* 的序列, 因此 IAC 片段可与模板 DNA 同时扩增。在反应体系中若目标序列的浓度较低或不存在时, 应该有 IAC 片段的扩增产物。但是, 当 PCR 反应没有产生任何扩增产物时, 说明反应受到抑制, 产生了假阴性, 需要重新提取 DNA 进行 PCR 反应。

由于 IAC 片段与目标序列在同一 PCR 反应中, 检测引物也相同, 二者之间会存在竞争, 从图 2 可以观察到, 在 PCR 反应体系中 IAC 片段的拷贝数是固定的, 当目标 DNA 含量从 12.8ng/ μ L 依次降低时, 目标 DNA 的扩增产物逐渐减少, 而 IAC 片段的扩增则会逐渐增多 (泳道 4, 5, 6 在试验中曾观察到微弱的 IAC 片段的扩增带), 直至目标 DNA 含量降至 1.28fg/ μ L 时, 图中就只有 IAC 片段的扩增产物了。当然, 如果 PCR 检测体系含有的 IAC 片段的拷贝数增加时, IAC 片段的扩增产物就会增多, 随之 PCR 检测的灵敏度就会降低。因此, 选择适宜浓度的 IAC 片段添加到 PCR 检测体系是至关重要的。在本研究建立的 PCR 检测体系中, IAC 片段为 220 拷贝时, 几乎不会降低检测的灵敏度 (12.8fg/ μ L), 而且比卢强等人报道的检测灵敏度 10pg/PCR (200fg/ μ L) 要高许多。准确率评价试验也说明, 我们建立的检测体系可以借助 IAC 片段指示由于不定因素导致的假阴性结果, 并通过校正措施来得到正确的结论。

由图 3 检测结果可知, 只需增菌 8h 就可以达到 8cfu/25g 的灵敏度, 这与曹泽虹、Ferretti 及 Syed 等人的报道相符^[2,10,11]。食品中的沙门氏菌部分以“亚致死”状态存在, 增菌培养是必要的, 这样还可以提高灵敏度。一般增菌培养时间定为 6~12h^[10,12], 沙门氏菌经过 6~8h 的培养, 就可以达到 10^8 cfu/mL 以上, 可以满足大多 PCR 检测方法灵敏度 ($10^2 \sim 10^6$ cfu/mL) 的要求。本文研究结果还显示, 增菌培养需要 8h, 其他检测步骤最多需要 4h, 因此, 从增菌培养到确定检测结果在 12h 内就可以完成。

本研究的结果表明, 在 PCR 体系中添加适宜浓度的 IAC 片段在不降低检测灵敏度的情况下可以应用于多类食品的检测, 而且在大量样品检测时可以有效的排除假阴性, 有助于提高 PCR 检测的准确率。

参考文献

- [1] Manzano M, Cocolin L, Astori G, *et al.* Molecular and Cellular Probes, 1998, 12: 227~234.
- [2] Riyaz-Ul-Hassan S, Verma V, Qazi G N. Molecular and Cellular Probes, 2004, 18: 333~339.
- [3] 黄金林, 焦新安, 文其乙, 等. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20 (4): 321~327.
- [4] 李莉, 蒋作明. 食品科技, 2002, 4: 60~62.
- [5] 卢强, 陈贵连, 林万明. 中国兽医学报, 1994, 14 (3): 251~256.
- [6] Malorny B, Hoorfar J, Bunge C, *et al.* Applied and Environmental Microbiology, 2003, 1: 290~296.
- [7] Malorny B, Hoorfar J, Hugas M, *et al.* International Journal of Food Microbiology, 2003, 89: 241~249.
- [8] 陈金顶, 索青利, 廖明, 等. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20 (10): 868~871.
- [9] Sachadyn P, Kur J. Molecular and Cellular Probes, 1998, 12: 259~262.
- [10] 曹泽虹, 李勇. 微生物学通报, 2001, 28 (4): 73~76.
- [11] Ferretti R, Mannazzu I, Cocolin L, *et al.* Applied and Environmental Microbiology, 2001, 2: 977~978.
- [12] Agarwal A, Makker A, Goel S K. Molecular and Cellular Probes, 2002, 16: 243~250.