

饮用水中 5 种致病菌多重 PCR 技术检测研究*

范宏英^{2,1} 吴清平^{1**} 吴若菁² 寇晓霞^{1,3} 张菊梅¹ 吴慧清¹

(广东省微生物研究所广东省菌种保藏与应用重点实验室 广州 510070)¹

(福建师范大学 福州 350007)² (中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430071)³

摘要: 沙门氏菌 (*Salmonella* sp.)、志贺氏菌 (*Shigella* sp.)、绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、肠出血型大肠杆菌 O157 (*Eterohaemorrhagic* O157) 和副溶血弧菌 (*Vibrio rahnemolyticus*) 是 5 种饮用水中不得检出食源性致病菌, 根据它们的毒素基因、高度保守基因及特异性基因, 设计合成 5 对寡核苷酸引物, 应用 PCR 技术对 10 个属的 30 株细菌进行引物特异性检测。通过对多重 PCR 反应体系、条件进行优化, 显著提高了检测灵敏度。初步应用于水样分析中, 极大的缩短了检测时间、降低了成本。实验结果表明: 5 对寡核苷酸引物都具较高的特异性和专一性, 多重 PCR 检测灵敏度达到 $10^1 \sim 10^2$ cfu, 检测需 5 ~ 6h, 在水样检测的初步应用中得到了均一、稳定、清晰的结果, 可推广应用于环境监测、水源检测、食品卫生监督、商品检验检疫等领域。

关键词: 多重 PCR、食源性致病菌, 检测

中图分类号: TS207.4 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2005) 03-0102-06

Study on Detection of Five-kinds of Pathogenic Bacteria in Drinking Water by Multiplex-PCR*

FAN Hong-Ying^{2,1} WU Qing-Ping^{1**} WU Ruo-Jing² KOU Xiao-Xia^{1,3}
ZHANG Ju-Mei¹ WU Hui-Qing¹

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070)¹

(Fujian Normal University, Fuzhou 350007)²

(Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Science, Wuhan 430071)³

Abstract: The five kinds of food-borne pathogenic bacteria including *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Eterohaemorrhagic* O157 and *Vibrio rahnemolyticus* that couldn't be detected in drinking water. The five pairs of primers were designed and composed according to the toxin genes, high-conservative genes and specific genes of these pathogens. The specificity of individual primer pairs in PCR was evaluated on DNA templates of more than thirty different bacterial isolates from ten species. Through optimizing the system and condition of multiplex-PCR, the detection sensitivity was improved dramatically. Multiplex-PCR analysis was primary performed on several water samples. The method established shortened the detection time and provided a cost-effective way in maximum. The experiment showed the multiplex-PCR using the five pairs of primers produced specific amplicons of expected sizes, the detection limits for the bacterial targets were estimated at $10^1 \sim 10^2$ cfu for one essay. It only took five to six hours to detect a sample, got the single, steady and clear result when the method was applied primarily in the analysis of water samples. The informative supplement to those areas which were environmental inspection, water detection, food sanitation supervision, commodity inspection and detection, etc.

Key words: Multiplex-PCR, Food-borne pathogenic bacteria, Detection

* 广东省重点科技攻关资助项目 (No. 2003C104007)

** 通讯作者 Tel: 020-87688132, E-mail: wuqp@gdas.ac.cn

收稿日期: 2004-10-25, 修回日期: 2004-11-25

食品中存在许多能够引起人类疾病的细菌,快速检测与鉴定致病菌是及时有效地控制与预防致病菌传播的前提。目前对致病菌的检测,主要依赖于常规微生物学方法,一般需 5~7d 时间,比较费时费力;另外应用免疫酶试验、免疫荧光试验、基因探针等方法,其灵敏度相对较低、特异性较差,难以推广^[1,2]。自从 PCR 技术建立,以其敏感度高、特异性强、操作简便、快速而被广泛应用于致病菌的检测,但常规 PCR 一次实验只能针对一种细菌,而食品、水中可能存在众多属、种和型别的致病菌。为此,新近建立的多重 PCR 方法可克服以上不足,为致病菌的检测提供快速、敏感、特异的诊断检测。大量报道多集中于不同组织中一种^[3,4]、两种^[5]或 3 种^[6]致病菌的检测,我国学者严 笠等运用多重 PCR,将大肠杆菌 O157 与其它常见致病性大肠杆菌及沙门氏菌、志贺氏菌相鉴别,取得理想结果^[7]。本文针对食品和水中的多种常见食源性致病菌,选择沙门氏菌 (*Salmonella* sp.)、志贺氏菌 (*Shigella* sp.)、绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、肠出血型大肠杆菌 O157 (*Eterohaemorrhagic* O157) 和副溶血弧菌 (*Vibrio rahaemolyticus*) 5 种饮用水中不得检出的致病菌,通过多重 PCR 检测技术,达到一次性同时快速检测多种食源性致病菌的目的。

1 材料与方法

1.1 菌株

本文研究的细菌菌株资源共 30 株,其中肠出血性大肠杆菌 O157 3 株、副溶血弧菌冻虾分离株,由广东出入境检验检疫局 (GDCIQ) 李志勇博士惠赠;痢疾志贺氏菌 (CMCC51252)、福氏志贺氏菌 (CMCC51572)、宋氏志贺氏菌 (CMCC51592)、甲型副伤寒沙门氏菌 (CMCC50093)、伤寒沙门氏菌 (CMCC50071)、鼠伤寒沙门氏菌 (CMCC50115) 由广东环凯微生物科技有限公司蔡芷荷副研究员保存提供;其余菌株均为广东省微生物研究所 (GIM) 保存株。

1.2 细菌培养和模板制备

1.2.1 细菌培养: 所用菌株均培养于 LB 培养基 (广东环凯微生物科技有限公司生产), 37℃、150r/min 摇床过夜培养,至培养液 OD_{600} 大约为 1.0 时收获菌体。

1.2.2 模板制备: 将待检菌株在 5mL LB 肉汤培养基中过夜,增菌后取 1.5mL 加入离心管中, 8,000r/min 离心 5min, 弃上清,加入 500 μ L 缓冲液 (50mmol/L Tris-HCl, pH=8.0, 1.0 mmol/L EDTA, 0.5% Tween20), 混匀,将菌体悬浮于蒸馏水中煮沸 10min,加入 200 μ g/mL 的蛋白酶 K, 65℃ 保温 40min, 13,000r/min 离心 10min, 收集上清,此即为待扩增的模板,于 4℃ 保存备用。

1.3 PCR 引物制备

根据文献设计^[8~10],同时采用 Primer3.0 软件分析,对原文献引物序列进行修正,合成 5 对引物。其中副溶血弧菌、沙门氏菌、肠出血型大肠杆菌 O157 引物由北京赛百盛公司合成,志贺氏菌、绿脓杆菌引物由上海生工合成。

2 PCR 扩增及 PCR 产物分析

2.1 单重 PCR

2.1.1 单重 PCR 反应体系: 1 \times PCR Buffer, MgCl₂ 2.5 mmol/L, dNTP 0.2 mmol/L (美国 Promega 公司), 各引物 0.4 μ mol/L, Hot star Taq 酶 2.5U (北京天为时代公司), 模

板 5μL, 加水至 50μL。

2.1.2 单重 PCR 反应条件: 通过 PTC-200 梯度扩增仪扩增, 5 种致病菌退火温度不同。反应条件为: 变性 94℃ 5min, 三温循环 94℃ 40s, 63℃ (沙门氏菌)/60℃ (O157、副溶血弧菌)/58℃ (志贺氏菌、绿脓杆菌) 40s, 72℃ 50s, 30 个循环后, 72℃ 延伸 10min。

2.2 多重 PCR

2.2.1 多重 PCR 反应体系: 1 × PCR Buffer, MgCl₂ 3.5 mmol/L, dNTP 0.2 mmol/L (同上), 0.2 μmol/L IpaH、0.2 μmol/L OprL、0.3 μmol/L IpaB、0.3 μmol/L HlyA、0.4 μmol/L Vpara, Hot star Taq 酶 (同上) 2.5U, 模板 5μL, 加水至 50μL。

2.2.2 多重 PCR 反应条件: 结合热启动 PCR 和降落 PCR, 反应条件为: 变性 94℃ 5min, 三温循环 94℃ 1min, 63℃ 1min, 72℃ 100s, 4 个循环后, 退火温度每降低 1℃ 4 个循环, 到退火温度为 58℃ 时, 进行 15 个循环, 共 35 个循环后, 72℃ 延伸 10min。

2.3 PCR 产物检测

1.6% 琼脂糖凝胶电泳, Gold view 染色, 采用凝胶成像分析系统 UV I 观察结果。

2.4 测序

将 PCR 产物进行纯化, 送往上海博亚公司测序。

2.5 多重 PCR 灵敏度测定

将 5 种标准菌株分别培养至对数期, 通过 LB 琼脂平板计数, 将各菌样以 10⁷ cfu/mL 等数量混合后, 用无菌生理盐水以 10⁷ 的最高稀释比进行倍比稀释, 7,000r/min 离心 20min, 采用酚-氯仿法抽提 DNA, 检测其灵敏度。

3 结果与讨论

3.1 单重 PCR

3.1.1 引物设计: 根据 5 种致病菌特异性及毒力靶基因设计 5 对引物, 分别为: 副溶血弧菌特异性区段 (16s ~ 23s rDNA) 基因、侵袭性质粒抗原 H (ipaH)、侵袭性质粒抗原 B (ipaB)、细菌毒力溶血素基因 (hlyA)、绿脓杆菌的一种脂蛋白表达基因 oprL (表 1)。根据 Oligo4.0 和 Primer3.0 软件程序对各引物进行设计和理论分析, 确保引物

表 1 5 种致病菌多重 PCR 引物序列、靶基因扩增大小

菌株	目标基因	引物序列	预期扩增大小	引物位置	接受序列号
志贺氏菌 (<i>Shigella</i> spp.)	质粒侵袭性抗原 H (<i>ipaH</i>)	IpaH-F-CCTTGACCGCCTTTCCGATAC IpaH-R-CAGCCACCTCTGAGACTACTC	611bp	376 ~ 396 965 ~ 986	M76444
绿脓杆菌 (<i>P. aeruginosa</i>)	外膜蛋白基因 I (<i>OprL</i>)	OprL-F-GATGGAATATGCTGAAATTGCGC OprL-R-CTTCTTCAGCTCGACGCCACG	504bp	212 ~ 232 695 ~ 715	Z50191
肠出血性大肠杆菌 O157 (<i>EHEC</i> O157)	溶血素基因 (<i>HlyA</i>)	HlyA-F-CAGTAGGGAAGCGAACAGAG HlyA-R-AAGCTCCGTGTGCCCTGAAGC	366bp	529 ~ 548 872 ~ 894	AF495950
沙门氏菌 (<i>Salmonella</i> spp.)	质粒侵袭性抗原 B (<i>ipaB</i>)	IpaB-F-GGACTTTTTTAAAGCGGCGG IpaB-R-GCCTCTCCACAGCCGTUTGG	315bp	723 ~ 742 1017 ~ 1037	U66877
副溶血弧菌 (<i>V. rhaemolyticus</i>)	16S-23SrDNA IGS (<i>Vpara</i>)	Vpara-F-GCTGACAAAACAAGAAATTTATTGTT Vpara-R-GGAGTTTCCAGTTGATGAAC	175bp	96 ~ 120 251 ~ 270	AF429304

之间无二聚体形成, 并对各引物间的自我互补性、最佳退火温度等做了分析, 同时应用 BLAST 程序, 通过 GenBank, 对各引物及扩增产物同源性比对, 确定扩增产物大小相近但又能够通过电泳分开。

3.1.2 引物的特异性测定: 根据所设计的 5 对特异性 PCR 引物对 30 株常见致病菌 (表 2) 进行 PCR 检测, 利用正交反应多次试验, 阴性、阳性结果见表 2。结果证明引物均为特异性引物, 阳性扩增见图 1。

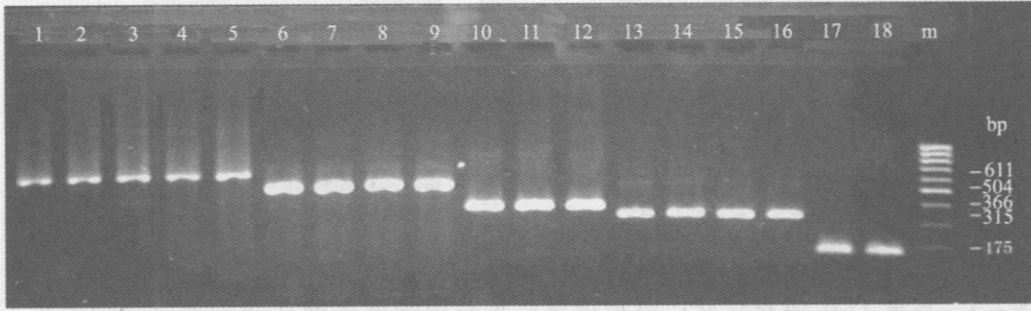


图 1 引物特异性电泳结果

m 100bp Marker, 1 CMCC51252, 2 CMCC51572, 3 CMCC51592, 4 GIM-Shi1, 5 GIM-Shi2, 6 ATCC9027, 7 ATCC15442, 8 CMCC10104, 9 GIM-Ps, 10 ATCC43889, 11 GDCIQ-O157-1, 12 GDCIQ-O157-2, 13 CMCC50093, 14 CMCC50071, 15 CMCC50115, 16 CMCC47001, 17 GIM-Vp, 18 GDCIQ-Vp

表 2 PCR 引物特异性供试菌株

菌株	来源或序列号	lpaH	OprL	HlyA	lpaB	Vpara
放射性土壤杆菌	GIM-Ar	-	-	-	-	-
蜡样芽孢杆菌	GIM-Bc	-	-	-	-	-
枯草芽孢杆菌	GIM-Bs	-	-	-	-	-
普通变形杆菌	GIM-Pv	-	-	-	-	-
粪产碱杆菌	GIM-Af	-	-	-	-	-
绿脓假单胞菌	ATCC9027	-	+	-	-	-
	ATCC15442	-	+	-	-	-
	CMCC10104	-	+	-	-	-
	GIM-Ps	-	+	-	-	-
恶臭假单胞菌	GIM-Pp	-	-	-	-	-
志贺氏菌	CMCC51252	+	-	-	-	-
	CMCC51572	+	-	-	-	-
	CMCC51592	+	-	-	-	-
	GIM-Shi1	+	-	-	-	-
	GIM-Shi2	+	-	-	-	-
沙门氏菌	CMCC50093	-	-	-	+	-
	CMCC50071	-	-	-	+	-
	CMCC50115	-	-	-	+	-
	CMCC47001	-	-	-	+	-
副溶血弧菌	GIM-Vp	-	-	-	-	+
	GDCIQ-Vp	-	-	-	-	+
大肠杆菌	ATCC43889	-	-	+	-	-
	GDCIQ-O157-1	-	-	+	-	-
	GDCIQ-O157-2	-	-	+	-	-
	O26	-	-	-	-	-

续表 2

	ATCC8739	-	-	-	-	-
	ATCC25922	-	-	-	-	-
藤黄八叠球菌	MIG1. 18	-	-	-	-	-
金黄色葡萄球菌	ATCC6538	-	-	-	-	-
肺炎克雷伯氏菌	57	-	-	-	-	-

注：+ PCR 阳性结果，- PCR 阴性结果

3.1.3 PCR 产物测序：PCR 产物经测序，结果通过 GenBank 中 BLAST 比对，同源性分别为：沙门氏菌 98%、志贺氏菌 98%、绿脓杆菌 99%、副溶血弧菌 99%、肠出血型大肠杆菌 O157100%，说明各引物具很强的忠实性、特异性和保守性。

3.2 多重 PCR 的优化

多重 PCR 要求不同引物能在同一反应体系中进行特异性扩增，影响其扩增效果的因素较多，主要有循环参数、反应体积、反应体系、引物间的配对等。因此，针对这些影响因素，通过大量实验，对各参数、条件、体系做了优化。

3.2.1 多重 PCR 体系优化：引物浓度：实验用等浓度的 5 对引物，分别采用了 0.2μmol/L、0.3μmol/L、0.5μmol/L 和 1.0μmol/L，结果均不理想，产物条带模糊、不清晰，并有非特异带，最终确定最优化的引物浓度为 IpaH 0.2μmol/L、OplL 0.2μmol/L、IpaB 0.3μmol/L、HlyA 0.3μmol/L、Vpara 0.4μmol/L。Mg²⁺ 浓度：分别采用了 1.5mmol/L、2.0mmol/L、2.5mmol/L、3.0mmol/L、3.5mmol/L 和 4.0mmol/L，结果显示 3.5mmol/L 为最优 Mg²⁺ 浓度。

3.2.2 多重 PCR 条件的优化：退火温度：当采用单一退火温度进行多重 PCR 时，未得到预期的扩增产物，改用在 5 种菌单一 PCR 条件的基础上，采用降落 PCR，退火温度从 63℃ 到 59℃，每降低 1℃ 4 个循环，退火温度到 58℃ 时进行 15 个循环，操作过程结合热启动 PCR，得到了预期特异性扩增产物。延伸时间：延伸时间以 1min、1.5min、2.0min、2.5min 分别实验，结果发现 1.5min 和 2.0min 均能得到清晰条带，最后定为 100s，可得到均一、稳定的条带。

3.3 多重 PCR 灵敏度确定

利用多重 PCR 进行五种致病菌的灵敏度检测，对各菌以 10⁷cfu 等数量的混合液进行 10 倍梯度稀释，使每种菌的细胞悬浮液浓度为 10⁰ ~ 10⁶cfu。每一稀释度菌液 100ml 7000r/min 离心 20min，灭菌蒸馏水洗 3 次，总 DNA 通过酚-氯仿法抽提，然后以多重 PCR 检测，结果见图 2。5 种致病菌检测灵敏度分别为：肠出血型大肠杆菌 O157 10¹cfu、沙门氏菌 10¹cfu、志贺氏菌 10²cfu、绿脓杆菌 10²cfu、副溶血弧菌 10⁰cfu，通过多个独立实验均得到相似结果。但对这五种菌进行单 PCR 扩增，灵敏度分别为：肠出血型大肠杆菌 O157 3-5cfu、沙门氏菌 10cfu、志贺氏菌 10cfu、绿脓杆菌 10¹cfu、副溶血弧菌 10⁰cfu，因此本实验试图通过增加扩增循环数和热启动酶量来进行对多重 PCR 灵敏度的提高，均未得到理想结果。据美国环保局报道，大多致病菌感染剂量超过 10³cfu 引起疾病发生^[11]，本研究的多重 PCR 检测灵敏度小于致病菌的感染剂量，因此相比较单 PCR 技术，多重 PCR 具备节约时间、降低实验成本、节省劳力等优点。在近年引起众多研究者的重视和青睐，并已初步具备良好的应用前景。

3.4 水样中食源性致病菌的多重 PCR 分析

3.4.1 天然水中加入 5 种致病菌的检测：将 100μL 沙门氏菌、志贺氏菌、绿脓杆菌、

肠出血型大肠杆菌 O157 和副溶血弧菌以 10^6 cfu 等数量混合的菌液加入到 100mL 海水、池塘水、自来水及蒸馏水水样中，经滤膜法浓集，酚-氯仿法抽提 DNA，以 5 对引物进行多重 PCR 检测，结果显示，4 种水样均扩增出相应特异条带（见图 3），其中 1~4 分别为将 5 种菌投入到海水、池塘水、自来水和蒸馏水的条带。

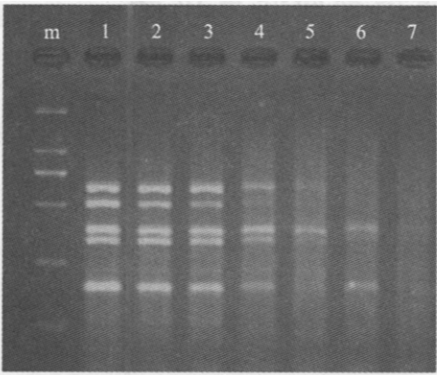


图 2 灵敏度确认电泳结果

m Mark DL2000, 1 10^6 cfu, 2 10^5 cfu, 3 10^4 cfu, 4 10^3 cfu, 5 10^2 cfu, 6 10^1 cfu, 7 10^0 cfu

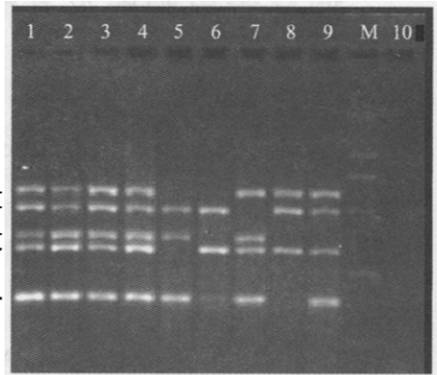


图 3 水样检测电泳结果

M Mark DL2000, 1 海水, 2 池塘水, 3 自来水, 4 蒸馏水, 5、6、7、8 饮用水随机检测, 10 阴性对照

3.4.2 饮用水中随机加入致病菌的检测：将上述 5 种致病菌随机不同组合的投入饮用水中，通过酚-氯仿法抽提 DNA，进行多重 PCR 检测，经优化的最佳引物量进行扩增，结果出现相应的对应条带，见图 3 中的 5~9，阴性对照则未形成任何条带，证明该套技术具有较好的实用价值。

4 结语

传统的检测方法无法对难培养或不可培养的致病菌进行检测，而且特异性不高、灵敏度低、操作烦琐、耗时，还不能实现有效的监测、预防作用。本研究所建立的多重 PCR 技术，能克服以上不足，对水中存在的常见致病菌进行全面、系统、准确的检测与鉴定，且操作简单、快速，具很高的特异性和敏感度，为快速检测与鉴定常见致病菌提供了有效的手段，可以推广应用于环境监测、水源检测，食品卫生监督、商品检验检疫等领域，并为其它不同食源性致病菌检测组合提供技术模式。

参 考 文 献

[1] 左藤静夫. 国外畜牧科技, 1992, 19 (2): 50~51.
[2] 刘 晨. 中国人畜共患病杂志, 1995, 11 (5): 43~46.
[3] Kong R Y C, So C L, Law W F, et al. Mar Pollut Bull, 1999, 38 (12): 1207~1215.
[4] Shangkuan Y H, Show Y S, et al. J Appl Bacteriol, 1995, 79 (3): 264~273.
[5] Way J S, Josephson K L, Pillai S D, et al. Appl Environ Microbiol, 1993, 59 (5): 1473~1479.
[6] Kong R Y C, Dung W F. Mar Pollut Bull, 1995, 31 (4~12): 317~324.
[7] 严 笠, 田小军, 薛燕萍, 等. 中国人畜共患病杂志. 2001, 17 (3): 80~82.
[8] Kong R Y C, So C L, Law W F, et al. Water Research, 2002, 36: 2802~2812.
[9] Daniel D V, Antonio L I M. Journal of Clinical Microbiology, 1997, 35 (6): 1295~1299.
[10] Taylor C M. J Infect, 1995, 30: 189~192.
[11] US E P A. United States Environmental Protection Agency, Washington, 1992.