

沙门菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的多重 PCR 检测*

许一平 成 炜 邵彦春 陈福生**

(华中农业大学食品科技学院 武汉 430070)

摘要: 根据沙门菌 *invA* 基因、大肠杆菌 *phoA* 基因和金黄色葡萄球菌 *nuc* 基因序列, 设计 3 对特异性引物进行多重 PCR 并对反应条件进行优化。结果表明 3 对引物能特异地扩增出 284bp、622bp、484bp 的目的条带; 最佳反应条件为沙门菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的引物浓度分别为 40nmol/L、40nmol/L、80nmol/L, Mg^{2+} 浓度 2.4mmol/L, dNTP 浓度 200 μ mol/L, *Taq* DNA 聚合酶 1.5U, 退火温度 55.0℃ ~ 57.4℃ 之间; 在此条件下多重 PCR 同时检测 DNA 的敏感性分别是 10.2pg、10.2pg、102.0pg, 检测时间 4h。建立的多重 PCR 是一种敏感、特异、准确、快速的方法, 为同时检测食品中沙门菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌奠定了基础。

关键词: 多重 PCR, 沙门菌, 大肠杆菌, 金黄色葡萄球菌

中图分类号: TS202.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 06-0089-06

Detection of *Salmonella* spp., *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by Multiplex PCR*

XU Yi-Ping CHENG Wei SHAO Yan-Chun CHEN Fu-Sheng**

(College of Food Science and Technology, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070)

Abstract: According to DNA sequences of the *invA* gene of *Salmonella* spp., the *phoA* gene of *Escherichia coli* and the *nuc* gene of *Staphylococcus aureus*, three pairs of oligonucleotide primers were designed and synthesized to amplify the special DNA sequences by multiplex PCR. Moreover, the reaction conditions of multiplex PCR were optimized. The results showed the multiplex PCR using the three pairs of primers produced specific amplicons of expected sizes, 284bp for *Salmonella* spp., 622bp for *Escherichia coli*, 484bp for *Staphylococcus aureus*. The optimized reaction conditions followed as the concentration of primer 40nmol/L for *Salmonella* spp., 40nmol/L for *Escherichia coli*, 80nmol/L for *Staphylococcus aureus*, 2.4mmol/L Mg^{2+} , 200 μ mol/L dNTP, 1.5U *Taq* DNA polymerase, anneal temperature from 55.0℃ to 57.4℃. Under the condition, the detection limits for DNA template were 10.2pg, 10.2pg and 102.0pg for *Salmonella* spp., *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, respectively. The whole process could be completed within 4h. The multiplex PCR assay was a specific, sensitive, rapid and reliable method for detecting *Salmonella* spp., *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, which establish important foundation for simultaneous detection for these three bacteria in food.

Key words: Multiplex PCR, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*

食品中污染的病原细菌是引起食源性疾病的主要因素之一, 根据国家食源性疾病监测网的统计资料显示, 近 10 年来, 在我国由微生物引起的食源性疾病事件中, 沙门

* 湖北省科技厅资助项目 (No. 2004AA203B03)

** 通讯作者 Tel: 027-87282927, E-mail: chenfs@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2006-01-06, 修回日期: 2006-03-14

菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌分别占 17.9%、8.9% 和 5.6%，是最常见和最主要的病因物质^[1,2]。沙门氏菌是一类革兰氏阴性杆菌，能引起人的胃肠炎、伤寒、败血症等症状^[3]。金黄色葡萄球菌常存在于肉、奶、蛋类等动物性食品中，部分菌株产生的肠毒素 (enterotoxin) 能引起食物中毒^[4]。大肠杆菌广泛存在于自然界中，是一种条件致病菌，在卫生学上常被作为卫生监督的指示菌^[5]。这 3 种病原细菌常常同时出现在肉制品、牛奶等食品中，因此快速检测它们对有效地控制其传播和预防食物中毒非常重要^[6,7]。

目前对这些病原细菌的检测，主要依靠常规的细菌学培养方法，一般需 4~7d，操作繁琐，费时耗力；有关病原细菌检测的乳胶凝集法、免疫磁珠分离法、酶免疫测定方法、核酸杂交技术和 PCR 技术因其特异性强、敏感性高、操作简单快速而得到广泛应用^[8,9]。但这些方法每次实验通常只能检测一种病原细菌。

多重 PCR (Multiplex PCR) 是在常规 PCR 基础上改进并发展起来的一种新型 DNA 扩增技术，是在同一反应体系中同时加入多对引物扩增多条目的 DNA 片段，采用这一技术可实现多种病原微生物的同时检测^[10~12]。本研究旨在建立一种能同时检测沙门菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的多重 PCR 方法，为其在食品检测中的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株：实验菌株共 7 株，其中沙门菌 (*Salmonella* spp.) HZFS1001，大肠杆菌 (*E. coli*) HZFS2001、HZFS2002，金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) ATCC6538、HZFS3001、HZFS3002 均为本实验室收藏的保存菌株。伤寒沙门菌 (*Salmonella typhimurium*) CMCC50051 由武汉市疾控中心陈智惠赠。所有菌株接种营养琼脂斜面，37℃ 培养 18h，转接 3 次后备用。

1.1.2 试剂：Taq DNA 聚合酶，10 × PCR 缓冲液 (北京鼎国公司)；dNTP (美国 Genview 公司)；DNA Marker DL2000 (大连宝生物工程有限公司)；琼脂糖 (西班牙 Bio-west 公司)；溴化乙锭 (EB)，SDS (Sigma 公司)；Tris base (昆明杰辉生物技术公司)。

1.1.3 仪器：TGradient PCR 仪，核酸蛋白质分析仪 (德国 Whatman Biometra 公司)；DYY-8C 电泳仪 (北京六一仪器厂)；超纯水系统 (美国 Millipore 公司)；GL200 凝胶成像系统 (美国 Eastman Kodak 公司产品)；Centrifuge 5415R 高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司产品)。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成：沙门菌根据 *invA* 基因序列，参照文献 [13] 的引物，扩增片段为 284bp；大肠杆菌和金黄色葡萄球菌分别根据 *phoA* 和 *nuc* 基因序列，采用引物设计软件 Primer 5.0 进行设计。

1.2.2 细菌 DNA 提取：将营养琼脂斜面上的细菌接种于乳糖肉汤 (LB)，37℃ 培养 18h。采用文献 [14] 的酚氯仿法，略做修改。

1.2.3 多重 PCR 反应条件优化：以沙门菌 CMCC50051、大肠杆菌 HZFS2001、金黄色葡萄球菌 ATCC6538 混合 DNA 为模板，对多重 PCR 各反应条件进行优化。初始反应条件 (25μL) 包括 10 × PCR 缓冲液 2.5μL，20mmol/L Mg²⁺ 2.5μL，2.5mmol/L dNTP

2.0 μ L, 2.0 μ mol/L 3 对引物各 1.0 μ L, 2U/ μ L Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L。然后对 PCR 影响较大的退火温度、Mg²⁺ 浓度和引物浓度等进行优化研究。

1.2.4 PCR 产物电泳检测: 取 8 μ L PCR 扩增产物加 2 μ L 溴酚蓝混匀, 以 DNA Marker 作相对分子质量指示, 用 1.0% 琼脂糖凝胶 (含 EB 0.5 μ g/mL) 在 100V 电压下电泳 30min, 置凝胶成像系统中进行结果分析。

1.2.5 多重 PCR 敏感性测定: 测定供试菌株 CMCC50051、HZFS2001、ATCC6538 DNA 浓度, 分别以超纯水 10 倍梯度稀释, 各菌株每个梯度各取 3 μ L 加入 PCR 管中, 使反应体系中均同时含三种菌 DNA 量分别为 10.20ng、1.02ng、102.00pg、10.20pg、1.02pg, 以超纯水作为阴性对照, PCR 后电泳分析结果。

2 结果与分析

2.1 多重 PCR 引物的设计及特异性分析

将经 Primer 5.0 设计的引物通过 Oligo 6.0 和 BLAST 软件进行分析, 获得 3 对特异性引物, 具体结果见表 1。然后分别进行 PCR, 结果供试的 2 株沙门菌均出现 284bp 的扩增条带、2 株大肠杆菌均出现 662bp 的扩增条带、3 株金黄色葡萄球菌均出现 484bp 的扩增条带, 引物间无交叉反应。结果见表 2, PCR 扩增电泳结果见图 1。

表 1 多重 PCR 引物设计

病原菌	引物序列	G + C 含量	Tm	扩增片段长度
沙门菌	正向: TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	54.5%	61.9℃	284bp
	反向: GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGGCAA	50.0%	63.6℃	
大肠杆菌	正向: TACAGGTGACTGCGGGCTTATC	54.5%	61.9℃	622bp
	反向: CTTACCGGGCAATACACTCACTA	47.8%	60.2℃	
金黄色葡萄球菌	正向: CTTTAGCCAAGCCTTGACGAAC	50.0%	60.1℃	484bp
	反向: AAACGGCAATACGCAAAGAGGT	45.5%	58.2℃	

表 2 PCR 引物特异性实验

菌株	引物序列		
	invA	nuc	phoA
<i>Salmonella</i> spp. HZFS1001	+	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> CMCC50051	+	-	-
<i>Escherichia coli</i> HZFS2001	-	-	+
<i>Escherichia coli</i> HZFS2002	-	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538	-	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i> HZFS3001	-	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i> HZFS3002 -	+	-	-

* PCR 阳性结果, ** PCR 阴性结果

2.2 多重 PCR 反应条件优化

为使多重 PCR 体系中各对引物均能得到高效的扩增, 通过预实验确定了对实验结果影响较小的因素 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μ L, dNTP 浓度 200 μ mol/L, Taq DNA 聚合酶 1.5U。在此基础上对反应体系中退火温度、Mg²⁺ 浓度、引物浓度 3 个对实验影响较大的重要参数进行了单因素优化实验。

2.2.1 退火温度对多重 PCR 反应的影响: 根据 PCR 反应退火温度一般应低于 T_m 值 $3^{\circ}\text{C} \sim 5^{\circ}\text{C}$ 的原则^[15], 选择 50.6°C 、 52.6°C 、 55.0°C 、 57.4°C 、 59.7°C 、 60.6°C 6 个温度梯度研究退火温度对多重 PCR 反应的影响, 结果见图 2。由图 2 可知退火温度过低时非特异性片段较多, 条带呈弥散状态; 退火温度过高扩增效率下降, 条带较弱。最佳退火温度在 $55.0^{\circ}\text{C} \sim 57.4^{\circ}\text{C}$ 。

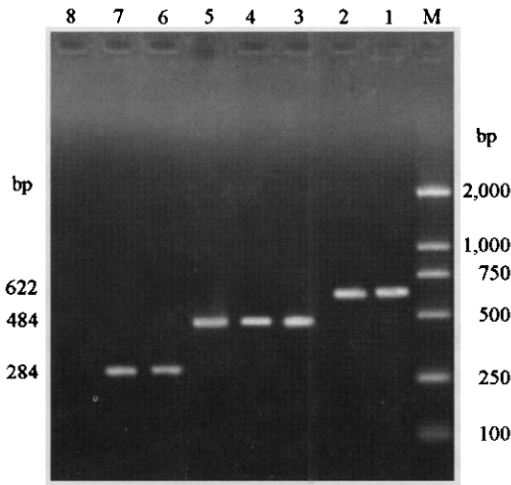


图 1 引物特异性电泳结果

M DNA mark, 1 ~ 7 分别为 *E. coli* HZFS2001、HZFS2002, *Staphylococcus aureus* ATCC6538、HZFS3001、HZFS3001, *Salmonella* spp. HZFS1001、CMCC50051, 8 超纯水

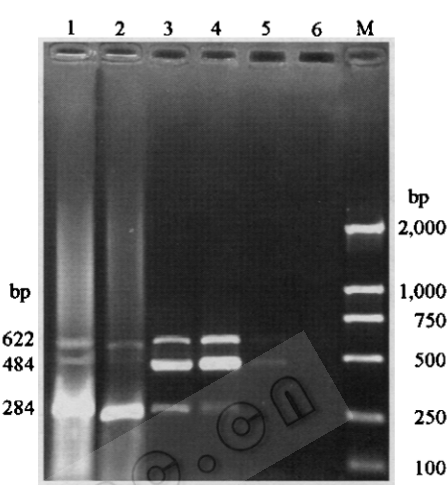


图 2 不同退火温度对多重 PCR 的影响

M DNA mark, 1 ~ 6 分别为 50.6°C 、 52.6°C 、 55.0°C 、 57.4°C 、 59.7°C 、 60.6°C

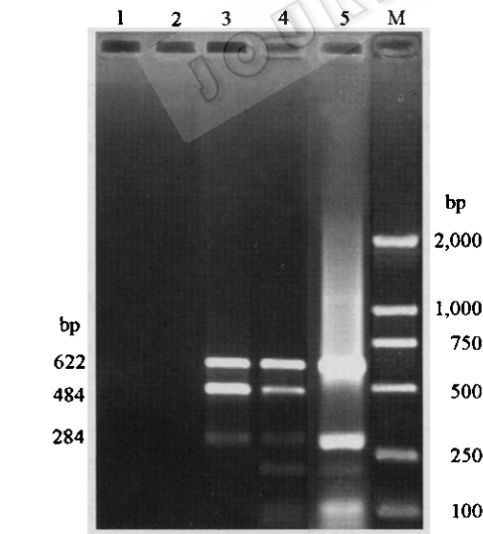


图 3 不同 Mg^{2+} 浓度对多重 PCR 的影响

M DNA mark, 1 ~ 5 分别为 0.8mmol/L 、 1.6mmol/L 、 2.4mmol/L 、 3.2mmol/L 、 4.0mmol/L

2.2.2 Mg^{2+} 浓度对多重 PCR 反应的影响: 在上述最佳退火温度下, 加入不同量的 Mg^{2+} , 以研究 Mg^{2+} 浓度对多重 PCR 反应的影响, 结果见图 3。从图 3 可以看出, 在 Mg^{2+} 浓度为 2.4mmol/L 时可得到均一、稳定、清晰的扩增条带。

2.2.3 引物浓度对多重 PCR 反应的影响: 3 对引物分别选用 5 个浓度梯度 10nmol/L 、 40nmol/L 、 80nmol/L 、 120nmol/L 、 160nmol/L , 首先各加入等量引物, 再根据条带的亮度调整各引物的浓度。电泳结果见图 4, 引物浓度低 (10nmol/L) 时扩增效率低, 条带不整齐且较暗; 随着引物浓度 (80nmol/L 、 120nmol/L 、 160nmol/L) 升高, 虽扩增条带清晰, 但在 100bp 左右的位置出现了弥散亮带, 表明引物过量。在 3 对引物同时为

40nmol/L 时, 金黄色葡萄球菌引物扩增条带较暗, 增加至 80nmol/L 时达到了较好的效果。调整后沙门菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的最佳引物浓度分别为 40nmol/L、40nmol/L、80nmol/L。优化的多重 PCR 反应条件: 10 × PCR 缓冲液 2.5μL, 2.4mmol/L Mg²⁺, 200μmol/L dNTP, 引物浓度为: 沙门菌 40nmol/L、大肠杆菌 40nmol/L、金黄色葡萄球菌 80nmol/L, Taq DNA 聚合酶 1.5U。循环参数为: 94℃ 预变性 7min, 94℃ 变性 30s, 55℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 30s, 共 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 5min。

2.3 多重 PCR 敏感性测定

将供试菌株 DNA 经 10 倍梯度稀释后, 使反应体系均同时含 3 种菌 DNA 浓度为 10.20ng、1.02ng、102.00pg、10.20pg、1.02pg, 以超纯水作为阴性对照。经优化后的多重 PCR 体系扩增后, 电泳照片见图 5。结果表明: 本试验建立的多重 PCR 方法能同时检测到 102.00pg 的沙门菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌 DNA, 沙门菌、大肠杆菌的最低检出限为 10.20pg。

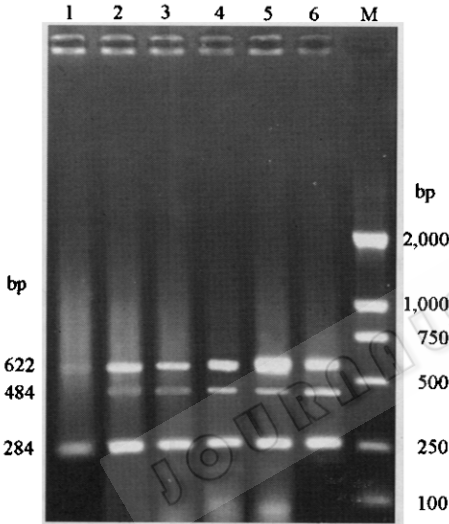


图 4 不同引物浓度对多重 PCR 的影响
M DNA mark, 1 ~ 5 3 对等量引物均分别为 10nmol/L、40nmol/L、80nmol/L、120nmol/L、160nmol/L, 6 优化的引物浓度: *Salmonella* spp. 40nmol/L、*E. coli* 40nmol/L、*Staphylococcus aureus* 80nmol/L

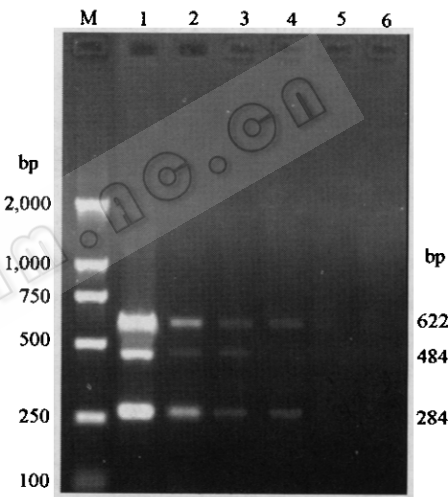


图 5 多重 PCR 敏感性电泳结果
M DNA mark, 1 ~ 5 *CMCC50051*、*ATCC6538*、*HZFS2001* 的 DNA 浓度依次为 10.20ng、1.02ng、102.00pg、10.20pg、1.02pg, 6 超纯水

3 讨论

目前检测食源性病原细菌的方法主要是细菌学培养法, 通常需经富集培养、形态观察、生理生化鉴定等过程, 操作复杂、耗时费力, 而且一次只能检测一种病原细菌。本研究建立的多重 PCR 方法克服以上不足, 可在 4h 左右通过一次实验完成沙门菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的同时检测, 有较好的特异性和敏感性, 比传统的细菌学方法简便经济, 有较大的应用价值。

多重 PCR 反应体系中存在多对引物和多个模板, 相互之间发生作用几率增加。选择的扩增靶序列和非扩增序列有同源性, 引物设计的不合适以及操作过程中靶序列或

扩增产物的交叉污染都容易导致假阳性结果。本研究选用目标菌高度保守的序列,应用软件进行引物设计。沙门菌 *invA* 基因是编码感染上皮细胞表面蛋白的基因,与该菌致病性密切相关,是沙门菌特有的^[13];金黄色葡萄球菌的 *nuc* 基因编码耐热核酸酶,高度保守^[17];大肠杆菌 *phoA* 基因是其持家基因,存在于所有大肠杆菌中^[18]。根据这些保守序列应用软件 Primer 5.0 设计多对引物,通过 Oligo 6.0 和 BLAST 软件进行分析评价确保不同引物对之间没有同源关系,不能形成稳定的引物二聚体,每条引物与其他引物靶序列之间没有同源性或互补性,扩增片段能通过电泳区分开。

多重 PCR 影响因素复杂,反应体系中的各个组分会对扩增结果产生综合效应。Henegariu 等对多重 PCR 中的模板、引物、聚合酶、循环条件、 Mg^{2+} 浓度等各个参数进行了量化研究,提出了一个系统的调整方案^[18]。根据这个方案结合实验经验,本实验选取对扩增效率影响较大的退火温度、 Mg^{2+} 浓度、引物浓度 3 个重要参数进行优化研究,获得了较好的敏感性结果。优化后的反应条件对食品样品中沙门菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌的多重 PCR 检测具有重要价值。

参考文献

- [1] 刘秀梅,陈 艳,王晓英,等. 卫生研究,2004, 6: 725 ~ 727.
- [2] 刘秀英,胡怡秀. 国外医学卫生学分册,2003, 30 (4): 199 ~ 204.
- [3] 刘华伟,郭嵩光,马立农,等. 动物医学进展,2004, 25 (6): 55 ~ 58.
- [4] 向 阳. 中国食品学报,2002, 6 (2): 57 ~ 61.
- [5] 王秀茹. 预防医学微生物学及检验技术. 北京:人民卫生出版社,2002.
- [6] Barbara M L, Tony C B, Grahame W G. The Microbiological Safety and Quality of Food. Gaithersburg, Maryland, USA: Aspen publishers, 2000.
- [7] 苏世彦. 食品微生物检验手册. 北京:中国轻工业出版社,1998.
- [8] 陈福生,高志贤,王建华. 食品安全检测与现代生物技术. 北京:化学工业出版社,2004.
- [9] 陈庆森,冯永强,黄宝华,等. 食品科学,2003, 24 (11): 148 ~ 152.
- [10] 范宏英,吴清平,吴若菁,等. 微生物学通报,2005, 32 (3): 102 ~ 107.
- [11] Malorny B, Tassios P T, Radstrom P, et al. International Journal of Food Microbiology, 2003, 83 (1): 39 ~ 48.
- [12] 杨小娟,吴清平,张菊梅,等. 微生物学通报,2005, 32 (3): 95 ~ 101.
- [13] Rahn K, Grandis D S, Clarke R C, et al. Molecular and Cellular Probes, 1992, 6 (4): 271 ~ 279.
- [14] 夏 涵,府伟灵,陈 鸣,等. 现代预防医学,2005, 32 (3): 571 ~ 573.
- [15] J 萨姆布鲁克, D W 拉塞尔著. 黄培堂等译. 分子克隆实验指南 (第三版). 北京:科学出版社,2002.
- [16] 许业莉,相大鹏,蔡 颖. 检验检疫科学,2003, 13 (6): 52 ~ 54.
- [17] Kim C H, Khant M, Morin D E, et al. Journal of Dairy Science, 2001, 84 (7): 74 ~ 83.
- [18] Kong R Y, Dung W F, Vrijmoed L L, et al. Marine Pollution Bulletin, 1995, 31 (4): 317 ~ 324.
- [19] Henegariu O, Heerema N A, Dlouhy S R, et al. Biology Techniques, 1997, 23 (9): 504 ~ 511.