

# 沙门氏菌荧光实时定量 PCR 检测试剂的研制及应用\*

李光伟<sup>1\*\*</sup> 邱 杨<sup>1</sup> 肖性龙<sup>2</sup> 詹少彤<sup>1</sup> 兰 敏<sup>1</sup> 黄 伟<sup>1</sup>

(东莞出入境检验检疫局 东莞 523071) (深圳太太基因工程有限公司 深圳 518057)

**摘要** 荧光实时定量 PCR 技术是近年来广泛应用于沙门氏菌快速检测的现代方法之一,本研究建立了检测沙门氏菌快速、敏感、特异以及准确定量的 FQ-PCR 方法。采用沙门氏菌 *fimY* 基因序列,设计特异引物和探针,通过对 Taq 酶、Mg<sup>2+</sup> 和引物探针浓度等反应体系和条件的优化,然后进行特异性和适用性实验。最优化结果为:Taq 酶用量 2.5U ,Mg<sup>2+</sup> 浓度为  $3.75 \times 10^{-3}$  mol/L,引物浓度为  $0.65 \times 10^{-6}$  mol/L,探针浓度为  $0.30 \times 10^{-6}$  mol/L,循环条件为 step1: 95°C 2min ,step2 95°C 5s ,60°C 40s ,40cycles。结果表明该 FQ-PCR 检测试剂具有快速、简单、灵敏度高、特异性强和适用范围广等优点,可应用于食品卫生监管、商品检验检疫以及临床诊断等领域。

**关键词** 沙门氏菌,荧光实时定量-PCR,检测,研制

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)03-0496-04

## Research and Application on Detection of *Salmonella* sp. by FQ-PCR\*

LI Guang-Wei<sup>1\*\*</sup> QIU Yang<sup>1</sup> XIAO Xing-Long<sup>2</sup> ZHAN Shao-Tong<sup>1</sup> LAN Min<sup>1</sup> HUANG Wei<sup>1</sup>

(Dongguan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dongguan 523071) (Shenzhen Taitai Genomics Inc., Shenzhen 518057)

**Abstract** The FQ-PCR has been introduced for the *Salmonella* spp. detection these years. To develop a FQ-PCR assay to rapid, sensitive, specific and accurate for quantitative detect *Salmonella* spp. A pair of specific primers and probe were designed from the *fimY* gene of *Salmonella* spp. in this research. Through optimizing the Taq enzymes, Mg<sup>2+</sup>, primer concentration and probe concentration system and condition of FQ-PCR, the detection sensitivity was improved dramatically. The results of optimum experiment as following: Taq enzyme 2.5U, Mg<sup>2+</sup> concentration  $3.75 \times 10^{-3}$  mol/L, primer concentration  $0.65 \times 10^{-6}$  mol/L, probe concentration  $0.30 \times 10^{-6}$  mol/L; Cycle condition: step1: 95°C, 2min, step2: 95°C, 5s, 60°C, 40s, 40cycles. Not only is this detection technology more specific, sensitive and efficient, but also the processing is wide application, rapid and simple. This FQ-PCR detection technology, therefore, will be used to detect *Salmonella* spp. for those areas food sanitation supervision, commodity inspection and detection, clinical diagnosis, etc.

**Key words**: *Salmonella* spp., FQ-PCR, Detection, Research

沙门氏菌(*Salmonella*)为革兰氏阴性无芽胞杆菌,在自然界中分布广泛,对营养要求不高,耐胆盐,对外界的抵抗力较强。沙门氏菌是食物中毒中最常见的致病菌,因其引起的食物中毒常列榜首<sup>[1]</sup>,中毒症状有头痛、呕吐、发热、腹泻等现象。目前国内外检测沙门氏菌的方法很多,主要有金标试纸法<sup>[2]</sup>、自动酶联荧光免疫检测系统(VIDAS)筛选法<sup>[3]</sup>、快速酶促反应显色培养基法<sup>[4]</sup>、DNA 探针技术<sup>[5]</sup>和聚合酶链反应(PCR)技术<sup>[6]</sup>。但以上方法都不能同时具备快速、灵敏度高、特异性强、适用范

围广以及操作简单等特点,很难满足当前快速检测要求。荧光实时定量 PCR 技术克服了以上检测方法的缺点,在众多现代检测技术中脱颖而出,成为检测领域中越来越重要的一种快速检测手段。

沙门氏菌的疫情暴发和流行已成为全球性的公共卫生问题。为了有效控制其突发疫情,适应我国进出口食品快速检验,保障人民的生命与健康安全,沙门氏菌 FQ-PCR 快速检测法的建立和试剂盒的研制意义重大。

\* 东莞市科技局科技发展专项基金项目(No.2005D043)

其他作者 周润华<sup>1</sup> 姚小文<sup>1</sup> 冯小军<sup>1</sup> 林 涛<sup>1</sup> 梅艳群<sup>1</sup>

\*\* 通讯作者 Tel: 0769-22802643, E-mail: ciqlgw@126.com

收稿日期 2006-08-16, 修回日期 2006-10-25

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株** :鼠伤寒沙门氏菌(C77-31)、单增李斯特氏杆菌(C53003)、金黄色葡萄球菌(C56001)购自中国兽医药品监察所,沙门氏菌(ATCC9089、ATCC14028)由深圳太太基因工程有限公司惠赠,其它菌株为本实验室所保存。

**1.1.2 主要试剂** :Taq 酶为 MBI 公司产品, DNA 提取液, Tris·Cl, EDTA, SDS, 苯酚、氯仿、异丙醇、Free RNase 等常规试剂(分析纯)。

**1.1.3 主要仪器设备** :ABI7700 荧光定量 PCR 仪、ABI7900HT 荧光定量 PCR 仪、恒温培养箱、MINI-VIDAS 自动分析仪、移液器、低温微量超速离心机。

**1.1.4 样品** :冻禽肉类、水产品类、蛋类、奶制品等,其中部分样品购于农产品市场和超市。

### 1.2 方法

**1.2.1 待检菌株的培养和 DNA 提取** :取待测样本于选择性培养基中 37℃, 150r/min 培养 24h, 取其增菌液 1mL 8000r/min 离心 4min, 尽量吸干上清, 再加入 50 $\mu$ L 核酸溶解液, 振荡混匀后沸水浴 5min, 13000r/min 离心 5min; 上清转移并保存在 -20℃ 备用。

**1.2.2 引物探针设计原理** :采用沙门氏菌 *fimY*<sup>[7]</sup> 基因序列, 利用 Primer Select 软件设计特异引物和探针, 经筛选并进行特异性、灵敏度和适用性检测。

**1.2.3 反应体系优化** : (1) Taq 酶用量(以单位 U 计)从 0.5U ~ 2.5U 以 0.5 单位为梯度递增。将 Mg<sup>2+</sup> 浓度从 1.25 × 10<sup>-3</sup> mol/L ~ 3.75 × 10<sup>-3</sup> mol/L 递增, 将引物浓度从 0.25 × 10<sup>-6</sup> mol/L ~ 1 × 10<sup>-6</sup> mol/L 递增, 探针浓度从 0.125 × 10<sup>-6</sup> mol/L ~ 0.5 × 10<sup>-6</sup> mol/L 递增。以不同浓度的引物和探针配比, 用所提取的核酸进行扩增比较。(2) 循环条件优化, 循环条件 1 : step1 : 95℃, 2min ; step2 : 95℃, 5s ; 60℃, 40s 40cycles。循环条件 2 : step1 : 95℃, 2min ; step2 : 95℃, 5s ; 55℃, 10s ; 72℃, 20s 40cycles ; step3 : 40℃。

**1.2.4 灵敏度实验** :将沙门氏菌标准菌株培养一定时间, 测其 OD 值, 估计其菌数, 然后按 10<sup>-1</sup> ~ 10<sup>-7</sup> 倍数梯度稀释, 再涂板计数, 确定菌密度。每个梯度菌液各取 2 管进行 FQ-PCR 检测与 VIDAS 检测, 对检测结果进行对比。

**1.2.5 特异性和适用性实验** :对沙门氏菌和其他致病菌进行特异性实验, 将沙门氏菌的阳性扩增片段测序, 以确认其是否可以作为阳性对照。共检测样品 1221 份, 同时用国标法验证。

## 2 结果

### 2.1 引物探针组合筛选

设计的多对引物探针组合经实验筛选优化, 获得最佳引物探针组合, 作为本方法中的引物和探针, 它们在沙门氏菌 *fimY* 基因上的结合情况如图 1 所示, 序列见表 1。

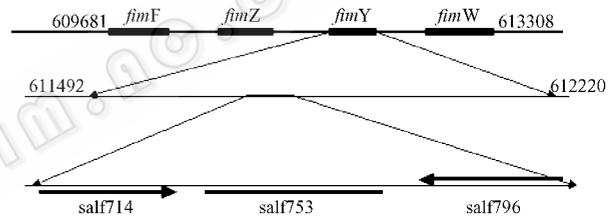


图 1 沙门氏菌引物和探针的设计示意

通过对沙门氏菌上游引物 JHO-left、探针 JHO-pb 和下游引物 JHO-right BLAST 的比对实验, 结果表明以上设计的引物和探针序列是高度保守的, 具有高度特异的扩增效果。

### 2.2 体系优化结果

**2.2.1 Taq 酶的优化** :结果表明, 不同酶用量对 Ct 值的影响很小, Taq 酶用量分别为 0.5U、1U、1.5U、2U 和 2.5U 时, 阳性模板的 Ct 值在 23.16 ~ 23.94 的较狭窄范围内波动, 但 Taq 酶用量在 2.5U 时, 反映体系的荧光增量最高, 故选定 Taq 酶为 2.5U 作为本荧光 PCR 反应中的使用量。以下实验均采用 2.5U Taq 酶进行。

**2.2.2 Mg<sup>2+</sup> 用量优化** :多次实验表明, Mg<sup>2+</sup> 加样量

表 1 沙门氏菌 FQ-PCR 的引物探针序列

名称	代号	序列	长度(mer)	T <sub>m</sub> 值(℃)
上游引物	JHO-left	5'-tcgtcattccattaccctacc-3'	19	58.4
下游引物	JHO-right	5'-aaacgttgaaaaactgagga-3'	21	57.9
探针	JHO-pb	5' FAM-tctgggtgatttctctgatcgca-TAMRA3'	27	68.1

在  $2.5 \times 10^{-3}$  mol/L 以上时对 Ct 值的影响很小,但  $Mg^{2+}$  浓度在  $3.75 \times 10^{-3}$  mol/L 时反映体系的荧光增量最高,故选定  $Mg^{2+}$  浓度  $3.75 \times 10^{-3}$  mol/L 作为本 FQ-PCR 反应中使用的  $Mg^{2+}$  浓度。以下实验均采用该  $Mg^{2+}$  浓度进行。

**2.2.3 引物探针用量优化** 将不同浓度的引物和探针配对,不同浓度的引物、探针对于该阳性模板 Ct 值基本稳定在 22.18 ~ 23.86 内,但引物浓度为  $0.65 \times 10^{-6}$  mol/L、探针浓度为  $0.30 \times 10^{-6}$  mol/L 时的荧光扩增效率较高,效率在 90% ~ 100% 之间,所以选定该浓度引物和探针作为本 FQ-PCR 反应的浓度。以下实验均采用该浓度进行。

**2.2.4 循环条件优化结果:** 实验结果表明采用循环条件 1 的体系无论是 Ct 值还是曲线的扩增效率都比循环条件 2 的体系结果好,故选循环条件 1 作为本实验 FQ-PCR 扩增的循环条件。

**2.3 特异性检测**

用设计的引物和探针检测沙门氏菌阳性菌株,结果表明其扩增效果很好,出现了典型的检测曲线,Ct 值为 22,增幅约为 1100,具有很好的特异性。同时沙门氏菌阳性扩增片段的测序结果与所设计的引物和探针序列完全相符,说明作为阳性对照的菌株符合要求。

对共 8 株(其中 3 株沙门氏菌和 5 株非沙门氏菌属)致病菌进行特异性实验,所有的沙门氏菌菌株检测结果为阳性,而非沙门氏菌菌株检测结果为阴性,表明 FQ-PCR 检测技术具有良好的特异性。

**2.4 灵敏度检测**

取沙门氏菌标准菌株于选择性培养基中培养一定时间,测其 OD 值,估计其菌数,再按  $10^{-1}$  ~  $10^{-7}$  梯度稀释,分别进行 FQ-PCR 与 VIDAS 检测和涂板计数。结果见表 2 和图 3。由表 2 可知,VIDAS 方法在  $10^{-2}$  稀释度时还能检出,到  $10^{-3}$  稀释度甚至浓度更低时便无法检出,而 FQ-PCR 方法一直到

$10^{-6}$  稀释度时还可以检出,检出限在 180cfu/mL 左右。图 2 所显示的扩增曲线也很好地印证了这个结果,可知 FQ-PCR 方法的灵敏度比 VIDAS 方法灵敏度高出四个数量级左右,具有良好的敏感度。

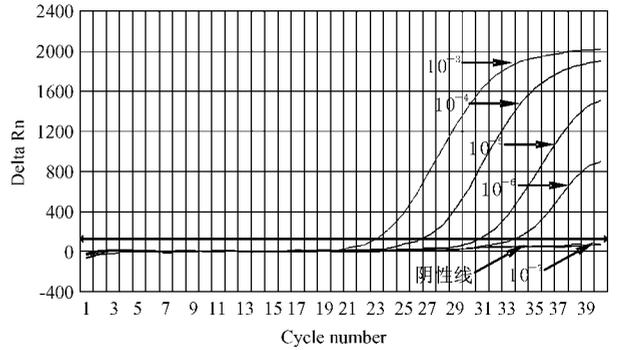


图 2 沙门氏菌模板梯度稀释扩增图

**2.5 适用性检测**

用建立的 FQ-PCR 法和国标法共计检测样品 1221 份,结果见表 3。

表 3 沙门氏菌 FQ-PCR 法和国标法检测结果

样品名称	样品数	FQ-PCR 阳性 (+) 数	检出率 (%)	国标法阳性 (+) 数	检出率 (%)
冻鸡肉	121	4	3.31	4	3.31
冻鸭肉	105	3	2.86	3	2.86
猪肉	99	2	2.02	2	2.02
牛肉丸	95	2	2.11	2	2.11
冻螺肉	80	2	2.50	2	2.50
三文鱼	80	1	1.25	1	1.25
多春鱼	80	2	3.75	2	3.75
香肠	85	3	2.50	3	2.50
火腿	85	1	1.18	1	1.18
蛋类	123	12	9.76	11	9.09
奶制品	118	2	0.85	2	0.85
调味品	70	0	0	0	0
饼干	80	0	0	0	0
合计	1221	34	2.78	33	2.70

由表 3 可知,用 FQ-PCR 方法检出的阳性样本数和检出率分别是 34% 和 2.78%,国标法检出的阳性样本数和检出率分别是 33% 和 2.70%。其结果基本保持一致,准确率达 99.7%,但 FQ-PCR 方法具有快速简便等特点,显示该法具有广泛的适用性。

**3 讨论**

**3.1 引物探针设计原理**

据文献报道用 PCR 法检测沙门氏菌所采用的

表 2 PCR 检测、VIDAS 检测和平板计数结果比较

稀释梯度	PCR 检测	VIDAS 检测	平板计数结果
$10^{-1}$	+ ,Ct = 18.54	+ ,RFV 6983	TNTC
$10^{-2}$	+ ,Ct = 21.23	+ ,RFV 625	TNTC
$10^{-3}$	+ ,Ct = 24.35	-	TNTC
$10^{-4}$	+ ,Ct = 27.83	-	600/580
$10^{-5}$	+ ,Ct = 30.70	-	59/56
$10^{-6}$	+ ,Ct = 34.11	-	8/7
$10^{-7}$	- ,Ct = 40	-	0/0

主要基因有: *agfA*, *fimA*, *iagAB*, *IS200*, *invA*, *iroB*, *mkfA*, *ompC* 以及 *viaB* 等基因。但某些基因存在一些问题,如采用 *IS200* 会产生假阳性,会扩增志贺氏菌等,采用 *invA* 基因还可造成假阴性,漏检 *Salmonella litchfield* 以及 *S. senftenberg* 血清型,而且它还会扩增一些非沙门氏菌,造成假阳性。另外,上述有些基因只适用于检测某些沙门氏菌,而非沙门氏菌属,显然也不应采用。根据沙门氏菌 *fimY* 基因序列与 GenBank 等网络数据库中登录的所有物种核苷酸序列进行比对的结果,以及生物信息学方法证明,该基因在沙门氏菌内高度保守,而相对于其它物种则具有高度特异性。所以采用沙门氏菌 *fimY* 基因序列,利用 ABI primer express 和 DNASTar 中的 Primer Select 软件设计沙门氏菌检测的特异引物和探针。经过大量实验证明 *fimY* 基因序列检测沙门氏菌是切实可行的,实验表明其假阳性率在 0.08% 左右。

### 3.2 方法的灵敏度

通过一系列的灵敏度试验,统计实验数据表明该沙门氏菌 FQ-PCR 检测方法的灵敏度达到了 180cfu/mL 的水平,每个反应管的检测灵敏度则达到了个位数,已经接近 PCR 方法灵敏度的极限。由于整个反应的灵敏度受很多因素影响,待测样本的培养方式、DNA 的提取方法、反应体系中各成分的浓度、反应条件的设置以及仪器本身的检测性能等都能显著影响系统灵敏度,我们的实验基于同样的技术平台和检测仪器,进行大量平行和重复实验的结果证明,该方法的检测灵敏度在 180cfu/mL 左右小幅波动,由于存在人为操作误差,实际上它们之间的差异更小,因此该 FQ-PCR 方法的检测灵敏度高且稳定。

### 3.3 方法的特异性

选取包括大肠杆菌、单增李斯特氏杆菌在内的 5 种常见的食源性致病菌与 3 种沙门氏菌用该检测体系进行荧光 PCR 检测,其特异性实验结果显示,沙门氏菌菌株检测结果为阳性,而非沙门氏菌菌株检测结果均为阴性,说明荧光 PCR 引物 *salF714*、*salR796* 和引物 *salP753* 沙门氏菌的检测特异性为 100%。沙门氏菌 FQ-PCR 检测方法的高度特异性

很好地避免了许多方法在检测过程中出现的错检和漏检现象,因此具有显著的优越性。

### 3.4 方法的适用性

中试实验中,应用研制的该试剂盒共检测实际样本 1221 例,并与国标法和 VIDAS 筛选法做平行对照。结果表明,用 FQ-PCR 方法和国标法检出的阳性样本数和检出率基本保持一致,准确率达 99.7%,其中只有一个样品 FQ-PCR 方法检测为阳性,而国标法检出为阴性,导致这种结果有可能是人为的因素,因为 FQ-PCR 技术是对增菌液用 PCR 仪器直接进行检测,而国标法是对增菌液进行平板分离后,挑出单个菌落再进行生化鉴定,所以有可能是人为的因素没有从增菌液中分离出沙门氏菌,从而导致结果不一致。当然,也有其它方面的原因。

## 4 展望

沙门氏菌 FQ-PCR 检测试剂盒具有以下优点:该试剂盒具有操作方便快捷;特异性强;灵敏度高和操作安全等优点,并且实现了在线式实时监测荧光量变化,使定量更准确可靠。该技术进行全封闭反应,避免了模板的污染隐患,方法可实现单管双检或多检。结果表明已成功研发的试剂盒具有很好的技术优势,应用前景广泛,并在珠海、中山、福州、南京、哈尔滨、长沙、成都等地试用。

### 参考文献

- [1] 吴永宁. 现代食品安全科学, 北京: 化学工业出版社 2003. pp. 336 ~ 337.
- [2] González J M, Jiménez M, Vélez J, et al. Journal of Biological Chemistry 2003, **278**: 37664 ~ 37671.
- [3] Taitt C R, Shubin Y S, Angel R, et al. Applied and Environmental Microbiology 2004, **70**: 152 ~ 158.
- [4] Thoms C J, Bell M, Sojka G, et al. Journal of Clinical Microbiology, 1996, **34**: 792 ~ 797.
- [5] McClelland M, Florea L, Sanderson K, et al. Nucleic Acids Research, 2000, **28**: 4974 ~ 4986.
- [6] 杨小鹏, 吴清平, 张菊梅, 等. 微生物学通报, 2005, **32**(3): 95 ~ 101.
- [7] Yeh K S, Chen T H, Liao C W, et al. International Journal of Food Microbiology 2002, **78**: 227 ~ 234.