

TaqMan 探针法实时荧光定量 PCR 快速检测沙门菌的探讨

郑友限 杨育红 陈培蓉 陈秀恋  
(泉州市卫生防疫站,福建 泉州 362000)

摘 要:为建立一种快速、灵敏、特异的实时荧光定量 PCR 法用于沙门菌的检验,根据 GenBank 上登录的编号为 AE016841 的沙门菌序列,应用生物学软件在 *fimY* 基因的保守区设计引物和 TaqMan 探针,同时应用 BLAST 程序进行网上序列比对,并进行筛选、优化。用鼠伤寒标准菌和 60 份食品样本进行本检测方法的特异性、敏感性和重复性试验,并与常规法和科玛嘉平板分离法做比较。本方法对沙门菌的检测具高度的特异性,检测的灵敏度达  $10^2$  CFU/ml,从增菌至完成检测仅需 24 h 左右,是一种快速检测沙门菌的敏感、特异的新方法。

关键词:聚合酶链反应;荧光;DNA 探针;沙门氏菌属

Rapid Detection of Salmonella by TaqMan-based Real-time PCR Assay

ZHENG You-xian, YANG Yu-hong, CHEN Pei-rong, CHEN Xiu-lian  
(Health and Anti-epidemic station of Quanzhou Municipal, Fujian Quanzhou 362000, China)

**Abstract:** To establish a rapid, sensitive and specific method of TaqMan-based real-time PCR assay for detection of salmonella, based on the gene sequence of salmonella from GenBank (accession no. AE016841), the specific primers and probes were designed in the conserved regions of the *fimY* gene by using the biologic software. The specificity of the sequences were tested by BLAST search in GenBank. This assay was applied to the *S. typhimurium* and 60 food samples to test its specificity, sensitivity and repeatability, compared with those of the regular bacterial culture and the culture on CH ROMager plate. The assay was proved to be highly specific to salmonella, the sensitivity was  $10^2$  CFU/ml, and it only took 24 hours to complete the whole assay. It is concluded that the TaqMan-based real-time PCR assay is a rapid, sensitive and specific method for the detection of salmonella.

**Key word:** Polymerase Chain Reaction; Fluorescence; DNA Probes; Salmonella

沙门菌菌型繁多,分布广泛,是重要的人畜共患病的病原体,也是食源性疾病特别是食物中毒最常见的病原体。目前对沙门菌的检测主要依赖于常规微生物学方法,一般需要 4~5 d 时间,比较费时费力<sup>[1,2]</sup>。免疫酶试验、免疫荧光试验、基因探针等方法检测方法,由于特异性较差而难以推广<sup>[3]</sup>。近年来,用 PCR 技术检测沙门菌得到了迅速发展,产生了多种 PCR 法如常规 PCR、套式 PCR、多重 PCR,比常规法更快速、敏感和简便,但其存在着检测易污染与假阳性率高的缺点<sup>[4]</sup>。最近发展起来的荧光定量 PCR 技术是在 PCR 反应体系中加入荧光基团,借助荧光信号检测 PCR 产物,利用荧光信号的累积来实时监测整个 PCR 进程。不仅克服了传统 PCR 定性检测的不足,而且具有特异性好,灵敏度高,操作简单,自动化程度高等优点<sup>[5]</sup>。本实验利用目前最常用的 TaqMan 探针法建立沙门菌的实时荧光 PCR (Real-time PCR) 检测方法,并对鼠伤寒标准菌的纯

培养及相关食品进行检测,探讨一种新的、快速、敏感、特异的沙门菌检测技术。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与标本对照菌株 鼠伤寒沙门菌 ATCC13311 由福建省疾病预防控制中心细菌科提供,60 份食品样本为本单位 2005 年 6~7 月份“餐桌污染监测”工作采集的市区菜市场样品,其中生肉 30 份、冻鸡爪、鸡翅 10 份、海产品 20 份。

1.1.2 培养基与诊断血清 SC、MM 增菌液、营养琼脂、三糖铁 (TSI) 琼脂、动力半固体、SS、HE、DHL、WS 琼脂均购自杭州天和生物试剂厂,科玛嘉沙门菌显色培养基购自北京陆桥公司,沙门菌诊断血清 (57 种) 购自兰州生物制品所。

1.1.3 主要试剂及仪器 DNA 提取试剂盒,美国 invitrogen 公司生产;opction 2 荧光定量 PCR 仪,美国 MJ 公司;21R 超速冷冻离心机,德国 Backman 公司;细菌鉴定仪,英国 SENSITTIRE 微生物鉴定药敏分析

作者简介:郑友限 男 检验师

系统。

1.2 方法

1.2.1 常规法分离 按国标 GB/T 4789.4—2003 对 60 份食品样本进行沙门菌检测,在分离培养的同时将增菌液划线于科玛嘉沙门菌显色平板,挑可疑菌落(紫色或紫红色)进一步试验,所有分离菌株最后用 SENSITITRE 微生物鉴定分析系统进行生化鉴定。

1.2.2 模板 DNA 的提取 将按 GB/T 4789.4—2003 检测的过夜增菌液 1 ml 加到 1.5 ml Eppendorf 管中,8 000 r/min 离心 5 min,去上清液,用 invitrogen 提取试剂盒提取细菌 DNA,具体方法按说明书操作,鼠伤寒标准菌作为阳性对照经纯培养后制成菌悬液,进行菌落计数后将其稀释至  $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、50 CFU/ml,同时提取 DNA。

1.2.3 引物和探针的设计 选择沙门菌特异性基因 *fimY* (GenBank 上的编号为 AE016841),根据 Beacon Designer 2.0 软件程序进行引物、探针的设计和理论分析,确保引物之间无二聚体或发夹结构形成,产物大小在 100 bp 左右,探针位置尽可能地靠近上游引物, $T_m$  值最好比引物高 10 左右,同时应用 NCBI/BLAST 程序对引物和探针序列在 GenBank、EMBL、DDBJ 等数据库进行检索和比对,并做适当修改以确保引物和探针对沙门菌的特异性,引物和探针由深圳太太基因公司合成和提供,引物和探针序列见表 1。

| 表 1 引物和探针序列           |                                                |           |            |
|-----------------------|------------------------------------------------|-----------|------------|
| 名称                    | 序列                                             | 位置        | $T_m$ 值( ) |
| Primer <i>fimY</i> -1 | CCCCTTTTCAATCCACAAA<br>GAAAT                   | 450 ~ 473 | 57.1       |
| Primer <i>fimY</i> -2 | CCCCTTTTCAATCC<br>ACAAAGAAAT                   | 508 ~ 531 | 58.4       |
| Target probe          | FAM-AAACGTACCGCTGCA<br>TTCCGCTCA-Dark Quencher |           | 66.4       |

1.2.4 实时荧光 PCR 反应体系与反应条件 反应总体积为 25  $\mu$ l,包含 2.5  $\mu$ l 10  $\times$ PCR 缓冲液;2  $\mu$ l 200 mmol/L dNTP;5  $\mu$ l 2.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ ;各 0.5  $\mu$ l 20 mmol/L 的上下游引物;0.25  $\mu$ l 20 mmol/L 的探针;0.5  $\mu$ l (2U) Taq 酶;0.06  $\mu$ l (0.5U) UNG 酶;2  $\mu$ l 模板 DNA;最后用 DEPC 水补至 25  $\mu$ l。在 MJ Option 2 荧光定量 PCR 仪上按下列参数进行反应和检测:37  $^{\circ}$ C,5 min,1 个循环;95  $^{\circ}$ C,3 min,1 个循环;95  $^{\circ}$ C,5 s,60  $^{\circ}$ C,40 s(检测荧光信号),40 个循环。结果判定:检测样本  $C_t$  值小于等于 35.0 时为阳性,大于 35.0 且小于 40.0 时,重复 1 次,如果  $C_t$  值仍小于 40.0,且曲线有明显的对数增长期,可判为阳性,否则判为阴性,检测不到样本  $C_t$  值时判为阴性。

1.2.5 荧光定量 PCR 的特异性、敏感性和重复性试

验 对 60 份食品样本按国标法、荧光定量 PCR 法及科玛嘉显色平板分离法进行沙门菌检测,比较其特异性。对已进行菌落计数的各浓度鼠伤寒标准菌的 DNA 按上述条件同时进行反应和检测,测定本试验检测的敏感性。对于  $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$  CFU/ml 3 个浓度的鼠伤寒标准菌的菌悬液,每个浓度重复 3 次按上述方法和条件提取模板 DNA 并进行荧光定量 PCR 检测,比较定量试验的重复性。

2 结果

2.1 荧光定量 PCR 的特异性 对 60 份食品样本按国标法、荧光定量 PCR 法及科玛嘉显色平板分离法进行沙门菌的检测,结果比较见表 2、表 3,3 种方法的检出率经  $t$  检验分析,差异无显著性( $P > 0.05$ ),表明本法在特异性上与传统的培养分离法上无差别,但检测时间却大大缩短。

| 表 2 60 份食品样本 3 种方法检测沙门菌的比较 |          |             |     |             |            |
|----------------------------|----------|-------------|-----|-------------|------------|
| 样品<br>编号                   | 样品<br>类型 | 检测方法        |     |             | 沙门菌<br>血清型 |
|                            |          | 荧光定量<br>PCR | 国标法 | 科玛嘉<br>平板分离 |            |
| 05QB01                     | 生牛肉      | +           | +   | +           | 德尔卑        |
| 05QB02                     | 生牛肉      | +           | +   | -           | 鸭沙门菌       |
| 05QB04                     | 生牛肉      | +           | +   | +           | 韦太夫雷登      |
| 05QA07                     | 生猪肉      | +           | +   | +           | 鸭沙门菌       |
| 05QD07                     | 鲜鸭心      | +           | +   | +           | 鼠伤寒        |
| 05QB09                     | 猪肉       | +           | +   | +           | 鼠伤寒        |
| 05QB14                     | 猪肉       | +           | +   | +           | 曼哈顿        |

注:检出用“+”,未检出用“-”。

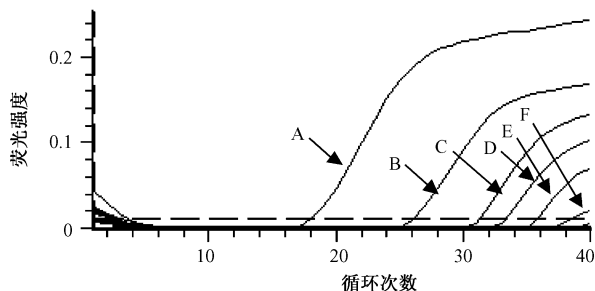
| 表 3 60 份食品样本 3 种不同检测方法阳性率的比较 |     |     |       |
|------------------------------|-----|-----|-------|
| 检测方法                         | 样品数 | 阳性数 | 阳性率 % |
| 荧光定量 PCR                     | 60  | 7   | 11.7  |
| 国标法                          | 60  | 7   | 11.7  |
| 科玛嘉平板分离法                     | 60  | 6   | 10.0  |

注:用 SPSS11.5 软件  $t$  检验分析得  $P = 0.113$

2.2 荧光定量 PCR 的敏感性 各浓度的鼠伤寒沙门菌模板 DNA,用本研究建立的荧光定量 PCR 法进行检测,结果见表 4、图 1。按  $C_t$  值小于等于 35.0 时结果判定为阳性,本法的检测灵敏度可达  $10^2$  CFU/ml。

| 表 4 各浓度鼠伤寒沙门菌荧光定量 PCR 检测的 $C_t$ 值比较 |               |        |        |        |        |       |
|-------------------------------------|---------------|--------|--------|--------|--------|-------|
| $C_t$ 值                             | 荧光定量 PCR 检测结果 |        |        |        |        |       |
|                                     | $10^6$        | $10^5$ | $10^4$ | $10^3$ | $10^2$ | 50    |
|                                     | 17.97         | 26.09  | 31.26  | 33.33  | 35.78  | 38.46 |

2.3 荧光定量 PCR 的重复性 对  $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$  CFU/ml 3 个浓度的鼠伤寒沙门菌中每个浓度的菌悬液,重复 3 次做荧光定量 PCR 检测,并计算  $C_t$  值的标准差来检验本法的重复性,结果见表 5、图 2。

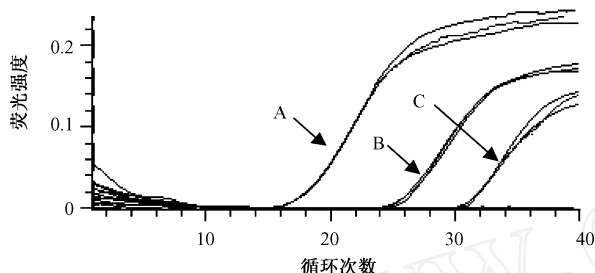


A:10<sup>6</sup> CFU/ml ;B:10<sup>5</sup> CFU/ml ;C:10<sup>4</sup> CFU/ml ;  
D:10<sup>3</sup> CFU/ml ;E:10<sup>2</sup> CFU/ml ;F:50 CFU/ml。

图 1 鼠伤寒沙门菌荧光定量 PCR 敏感性试验扩增曲线图

表 5 荧光定量 PCR 对鼠伤寒沙门菌检测的重复性

| 菌落总数<br>(CFU/ml) | 荧光定量 PCR 检测 $\Delta$ 值 |       |       | 平均值   | 标准差  |
|------------------|------------------------|-------|-------|-------|------|
|                  | 1                      | 2     | 3     |       |      |
| 10 <sup>6</sup>  | 17.89                  | 17.99 | 18.03 | 17.97 | 0.07 |
| 10 <sup>5</sup>  | 26.11                  | 26.00 | 26.16 | 26.09 | 0.08 |
| 10 <sup>4</sup>  | 31.33                  | 31.47 | 30.98 | 31.26 | 0.25 |



A:10<sup>6</sup> CFU/ml ;B:10<sup>5</sup> CFU/ml ;C:10<sup>4</sup> CFU/ml。

图 2 鼠伤寒沙门菌荧光定量 PCR 重复性试验扩增曲线图

### 3 讨论

据美国环保局报道,大多数致病菌感染菌剂量超过 10<sup>3</sup> CFU/ml 就可引起疾病发生<sup>[6]</sup>,本研究的荧光定量 PCR 检测的灵敏度小于致病菌的感染量,而且重复性很好,克服了普通 PCR 难以定量和重复性差的缺点,一般从增菌液就可直接检出沙门菌,甚至增菌液煮沸后直接上机反应也可检出而无需像普通 PCR 要提核酸,而且整个反应和产物分析都是在完全封闭的状态下进行,因而 PCR 产物不污染环境,本实验采用 dUTP 代替 dTTP,并在 PCR 前将样品用 UNG 酶处理,阻止受污染的扩增产物再作为模板,从而保证荧光定量 PCR 检出的阳性结果均来源于

被检样品,减少了假阳性的出现<sup>[7]</sup>。而对于样品中可能存在的 PCR 抑制物而导致的假阴性结果,则需根据被扩增序列设计、制备一定分子量的 DNA 序列作为内标对照和相对应的不同荧光素标记的探针,再以适当的拷贝数加入被测样品中同时进行扩增,这样一个内部扩增控制(internal amplification control, IAC)可以避免假阴性的出现<sup>[8]</sup>,但成本较高。由于本实验无 IAC,故一旦样品中存在 PCR 抑制物就有可能漏检<sup>[9]</sup>。

### 参考文献

- [1] 佐藤静夫. 不容忽视的沙门菌[J]. 国外畜牧科技, 1992,19(2):50-51.
- [2] 刘晨. 鸡群人畜共患沙门菌的预防和免疫[J]. 中国人畜共患病杂志,1995,11(5):43-46.
- [3] 章新生. 应用 PCR 技术检测沙门菌[J]. 中国兽医学报, 1999,19(2):147-151.
- [4] 李莉,蒋作明. PCR 技术在食品沙门菌检测中的应用[J]. 食品科技,2002,4:60-62.
- [5] 黄留玉. PCR 最新技术原理、方法及应用[M]. 北京:化学工业出版社,2004.131-159.
- [6] US E P A. United states environmental protection agency[Z]. Washington,1992.
- [7] Lilly K W Y,Michael G C,Bradley J C,et al. Heminested multiplex reverse Transcription-PCR for detection and differentiation of Norwalk-Like Virus Genogroups 1 and 2 in fecal samples [J]. Jour of Clin Microbio,2001,39(7):2690-2694.
- [8] Burkhard Malorny, Elisa Paccassoni, Patrick Fach, et al. Diagnostic real-time PCR for detection of salmonella in food [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 7046-7052.
- [9] Hoorfar J N, Cook B, Malorny P,et al. Diagnostic PCR: making internal amplification control mandatory[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41:5835.
- [10] Luke T Daum, William J Barnes, James C. Real-time PCR detection of salmonella in suspect foods from a gastroenteritis outbreak in Kerr county, Texas [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2002, 3050-3052.

[收稿日期:2006-03-23]

中图分类号:R15;Q9333;R446.5

文献标识码:B

文章编号:1004-8456(2006)04-0311-03