

# 沙门氏菌的依赖于核酸序列 恒温扩增检测方法的建立\*

雷质文<sup>1</sup>, 姜英辉<sup>1+</sup>, 王妍婷<sup>1</sup>, 赵丽青<sup>1</sup>, 张健<sup>1</sup>, 倪鑫<sup>2</sup>, 王建广<sup>1</sup>, 梁成珠<sup>1</sup>

(1 山东出入境检验检疫局技术中心 青岛 266002; 2 中国海洋大学 青岛 266003)

**摘要:** 采用自行建立和优化的依赖于核酸序列恒温扩增(nucleic acid sequence-based amplification, NASBA)检测体系,对沙门氏菌进行检测。采用沙门氏菌的 invA 基因为目的片段设计特异性引物,建成可快速检测沙门氏菌的 NASBA 检测法,并进行了特异性和灵敏度试验。结果表明:所建立起的 NASBA 检测方法,灵敏度为  $7.1 \times 10^2$  cfu/ml,高于普通 PCR 方法。

**关键词:** 沙门氏菌;检测;依赖于核酸序列恒温扩增

**中图分类号:** R155.5 **文献标识码:** A **国家标准学科分类代码:** 180.6110

## Establishment of the nucleic acid sequence-based amplification method of detecting Salmonella

Lei Zhiwen<sup>1</sup>, Jiang Yinghui<sup>1</sup>, Wang Yanting<sup>1</sup>, Zhao Liqing<sup>1</sup>,  
Zhang Jian<sup>1</sup>, Ni Xin<sup>2</sup>, Wang Jianguang<sup>1</sup>, Liang Chengzhu<sup>1</sup>

(1 Technical center for Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China;

2 Institute of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** A new method, which based on Nucleic Acid Sequence-based Amplification (NASBA) to detect Salmonella of sample, was established. A specific set of primers was synthesized to target the invA gene of Salmonella so as to establish Nucleic Acid Sequence-based Amplification method. Specific and sensitivity were tested. The results shows that the sensitivity of NASBA was  $7.1 \times 10^2$  cfu/ml which was higher than the result of PCR method. Detecting Salmonella with NASBA was more specific and sensitive than PCR method and has lower instrumental requirement.

**Key words:** salmonella; detection; nucleic acid sequence-based amplification

## 1 引言

沙门氏菌(Salmonella)属于肠杆菌科沙门氏菌属,目前已知血清型有2500个以上<sup>[1]</sup>。该菌在自然界分布广泛,几乎可以从所有脊椎动物或昆虫体内分离得到,大部分具有很强的致病性<sup>[2-3]</sup>。

据报道,我国细菌性食物中毒病例中,70%~80%是由沙门氏菌引起的,每年都会有因沙门氏菌的污染造成重大经济损失的报道<sup>[4-5]</sup>。

沙门氏菌检测的主要方法有生理生化鉴定技术、酶联免疫吸附技术和聚合酶链式反应技术(PCR法)等。前两种方法操作繁琐、检验周期长、工作量大,PCR方法虽然快速、灵敏,但需要

\* 基金项目:国家质检总局科研项目(2009IK170)资助项目

+ 通讯作者

昂贵的PCR仪。因此,建立一种快速简捷的沙门氏菌检测方法具有很大的实用价值。

依赖核酸序列恒温扩增(nucleic acid sequence-based amplification, NASBA)技术是一项以核酸序列中RNA为模板的快速恒温扩增技术<sup>[6-7]</sup>,主要用于RNA的检测和测序,具有高度敏感性和特异性。本研究选取沙门氏菌的invA基因作为检测靶基因,自行设计一对特异性引物和一条特异性探针,建立检测沙门氏菌的NAS-

BA检测方法。

## 2 材料与方法

### 2.1 实验菌株

本研究所使用的12株实验菌株(表1)分别购自美国典型菌种保藏中心(ATCC)和中国医学细菌保藏管理中心(CMCC)。

表1 试验用菌株

序号	菌株名称	拉丁名	菌株号	菌株数量
1	鼠伤寒沙门氏菌	Salmonella typhimurium	ATCC 25241	1
2	肠炎沙门氏菌	Salmonella enteritidis	ATCC 13067	1
3	甲型副伤寒沙门氏菌	Salmonella paratyphi-A	ATCC 9150	1
4	鸭沙门氏菌	Salmonella anatis	ATCC 9270	1
5	副溶血性弧菌	Vibrio parahaemolyticus	ATCC 17802	1
6	宋氏志贺氏菌	Shigella sonnei	CMCC(B)51592	1
7	单核细胞增生李斯特氏菌	Listeria monocytogenes	ATCC 7644	1
8	小肠结肠炎耶尔森氏菌	Yersinia enterocolitica	CMCC(B)52207	1
9	大肠埃希氏菌	Escherichia coli	ATCC 25922	1
10	弗氏柠檬酸杆菌	Citrobacter freundii	ATCC4 3864	1
11	产酸克雷伯氏菌	Klebsiella oxytoca	ATCC 43165	1
12	阴沟肠杆菌	Enterobacter cloacae	ATCC 700323	1

### 2.2 引物设计与合成

根据美国国家生物信息中心(NCBI)上已公布的沙门氏菌的invA基因序列(GenBank AC-CESSION:FQ312003),设计一对特异性扩增引物和一条探针。

F:5'-AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGTCCTAACGACGACCCTTCT-3';

R:5'-CATTTCAATGGGAAGCTCTGC-3' 5  
端标记生物素;

T:5'-AAGAAGGGTCGTCGTTAGGAC-3' 3  
端标记FITC。

引物和探针由宝生物工程(大连)有限公司合成。

### 2.3 细菌模板RNA提取

按传统培养方法分别增菌培养表1中的12株试验用菌株。分别取试验菌株的培养液1 mL,

用柱式细菌RNAout提取细菌RNA,并加入适量RNase抑制剂,保存于-20℃备用。

### 2.4 NASBA方法的建立、优化及验证

按照参考文献[8]建立反应体系,并对影响NASBA扩增的因素如反应温度、反应时间、DMSO、dNTPs、NTPs等进行优化。

反应体系为25 μL:反应液I:10×buffer [40 mmol/L Tris-HCl (pH 8.5 @ 25℃), 100 mmol/L KCl, 12 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 5 mmol/L DTT] 2.0 μL, DMSO 2.5 μL, 模板RNA 5 μL, 引物F、R(10 μmol/L)各1 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 0.5 μL, NTPs (2.5 mmol/L) 1.0 μL, 用水补至20 μL。

反应液II:10×buffer [40 mmol/L Tris-HCl (pH 8.5 @ 25℃), 100 mmol/L KCl, 12 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 5 mmol/L DTT] 0.5 μL, BSA(10 mg/ml)

0.25  $\mu\text{L}$ , T7 RNA 聚合酶(50000 U/mL) 0.8  $\mu\text{L}$ , AMV 反转录酶(10000 U/mL) 0.8  $\mu\text{L}$ , RNase 抑制剂(40000 U/mL) 0.5  $\mu\text{L}$ , RNaseH (500 U/mL) 0.4  $\mu\text{L}$ , 用水补至 5  $\mu\text{L}$ 。

反应程序:反应液 I 在 65 $^{\circ}\text{C}$  水浴中孵育 5 min,再迅速放入 41 $^{\circ}\text{C}$  水浴中孵育 5 min,然后把反应液 II 迅速加入反应液 I,小心混匀,置于 41 $^{\circ}\text{C}$  水浴中孵育 90 min。

反应结束后,加入 RNA 保护剂 RNAMaid 1.5  $\mu\text{L}$ ,探针 T(10  $\mu\text{mol/L}$ )1  $\mu\text{L}$ ,混匀,94 $^{\circ}\text{C}$  变性 3 min,52 $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min,用通用型核酸扩增物快速检测板检测产物<sup>[8]</sup>。

按照建立及优化的反应体系和反应条件对 4 株沙门氏菌菌株进行检测,以验证所建方法的可行性。

## 2.5 产物检测

扩增产物利用通用型核酸扩增物快速检测板检测<sup>[9]</sup>。核酸扩增完成后,在反应管中加入探针与扩增产物杂交。把检测板水平放置在操作台上,取杂交产物 10  $\mu\text{L}$  加入检测板的样品孔中,再加入 100  $\mu\text{L}$  缓冲液进行层析,3 min 左右判读结果。



图1 通用型核酸扩增物快速检测板应用示意图

通用型核酸扩增物快速检测板的 C 为质控线,T 为检测线,S 为样品孔。图 1 中检测板 1 为未使用检测板;检测板 2 仅 C 为红色,表示结果

为阴性;检测板 3 中的 C 和 T 均显示为红色,结果为阳性。如果 C 线和 T 线均不显色,说明检测板失效。

## 2.6 特异性实验

用已建立的 NASBA 方法对表 1 所列的 4 株沙门氏菌和其他非沙门氏菌共计 12 株实验菌株模板 RNA 进行 NASBA 扩增,利用通用型核酸扩增物快速检测板检测产物<sup>[8]</sup>,确定特异性。

## 2.7 灵敏度实验

将肠炎沙门氏菌 ATCC 13067 标准菌株进行增菌培养,用 0.85% 生理盐水做成菌悬液,并进行平板计数。同时取初始浓度增菌液 1 mL 提取 RNA,提取的 RNA 用 RNase Free 水做梯度稀释并进行 NASBA 扩增,利用通用型核酸扩增物快速检测板检测产物,确定灵敏度。

## 3 实验结果

### 3.1 NASBA 方法验证

检测结果表明(如图 2 所示),4 株沙门氏菌菌株的 NASBA 扩增产物,采用核酸扩增物快速检测板检测,结果均呈阳性,初步表明本研究所建立的 NASBA 方法可用于沙门氏菌的检测。



注:1:空白对照;2:鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 25241;  
3:肠炎沙门氏菌 ATCC 13067;4:甲型副伤寒沙门氏菌 ATCC 9150;5:鸭沙门氏菌 ATCC 9270。

图2 沙门氏菌的 NASBA 检测结果

### 3.2 特异性实验结果

用 4 株沙门氏菌和 8 株非沙门氏菌的 RNA 来检验反应的特异性。采用通用型核酸扩增物

快速检测板检测,结果如图3所示,4株沙门氏菌阳性菌株经NASBA扩增后,均呈现阳性结果,而非沙门氏菌菌株则呈现阴性反应结果。检测

结果表明该NASBA方法对于沙门氏菌有较好的特异性。



注:1:空白对照;2:鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 25241;3:肠炎沙门氏菌 ATCC 13067;4:甲型副伤寒沙门氏菌 ATCC 9150; 5:鸭沙门氏菌 ATCC 9270;6:副溶血性弧菌 ATCC 17802;7:宋氏志贺氏菌 CMCC(B) 51592; 8:单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC 7644;9:小肠结肠炎耶尔森氏菌 CMCC(B) 52207;10:大肠埃希氏菌 ATCC 25922; 11:弗氏柠檬酸杆菌 ATCC 43864;12:产酸克雷伯氏菌 ATCC 43165;13:阴沟肠杆菌 ATCC 700323。

图3 NASBA 检测沙门氏菌的特异性

### 3.3 灵敏度实验结果

由菌落计数确定沙门氏菌的初始含量,根据梯度稀释,各梯度菌悬液含菌量为  $7.1 \times 10^7$  cfu/ml ~  $7.1 \times 10^0$  cfu/ml 之间。检测结果显示(如图4所

示),至稀释度  $7.1 \times 10^1$  cfu/ml 时没有扩增产物,可以得出NASBA方法的最低检测限为  $7.1 \times 10^2$  cfu/ml。



注:1:空白对照;2: $7.1 \times 10^7$  cfu/ml;3: $7.1 \times 10^6$  cfu/ml;4: $7.1 \times 10^5$  cfu/ml;5: $7.1 \times 10^4$  cfu/ml; 6: $7.1 \times 10^3$  cfu/ml;7: $7.1 \times 10^2$  cfu/ml;8: $7.1 \times 10^1$  cfu/ml;9: $7.1 \times 10^0$  cfu/ml。

图4 NASBA 方法检测不同稀释度肠炎沙门氏菌 ATCC 13067 DNA 的结果

## 4 讨论

1991年,加拿大 Can-gene 公司首先报道NASBA恒温扩增技术<sup>[10]</sup>。NASBA技术是由两个引物介导的、连续均一的特异性体外恒温扩增核苷酸序列的酶促过程。整个反应在恒温

(41℃)条件下进行,无需温度循环,不会受到双链DNA的污染。同时,由于外来双链DNA无T7启动子序列,不可能被扩增,所以NASBA检测方法的特异性得到了极大提高

有研究表明,与沙门氏菌致病性密切相关的侵袭蛋白(invasion protein, invA),主要由 invA, invB, invC, invD 和 invE 等一组基因编码,其中

invA 是沙门氏菌主要的毒力因子<sup>[11]</sup>。本研究选取 invA 基因作为检测靶基因,建立的沙门氏菌的 NASBA 检测方法,具有较好的特异性和较高的检测灵敏度,灵敏度为  $7.1 \times 10^2$  cfu/ml,比传统的 PCR-琼脂糖凝胶电泳检测方法高一个数量级;反应过程仅需普通的恒温设备,1.5 ~ 2h 即可得到理想的结果,检测手段更为简洁。

NASBA 扩增产物的检测主要有酶联凝胶技术、电化学发光技术、分子信标技术等方法<sup>[8]</sup>,上述方法存在操作复杂、需要昂贵仪器等问题,使 NASBA 检测方法的应用受到了限制。NASBA 方法扩增的主要产物为单链 RNA,这就为用探针检测提供了便利,本研究将核酸薄膜层析检测技术<sup>[9]</sup>用于 NASBA 扩增产物的检测,与琼脂糖凝胶电泳检测法相比,不仅缩短检测时间 0.5 ~ 1h,同时避免了操作人员接触 EB 等有毒有害物质和凝胶电泳的辐射环境,保护了操作人员的人身安全。

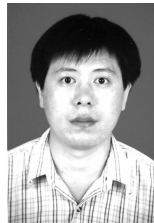
本研究所建立的 NASBA 检测方法适合在细菌快速检测方面应用,在现场快速诊断产品的开发方面具有很大的发展潜力。

### 参考文献

- [1] 贺奋义. 沙门氏菌的研究进展[J]. 中国畜牧兽医,2006,33(11):91-95.
- [2] 李波,洪纬,曲芬. 沙门氏菌肠炎 76 例临床特点及耐药情况[J]. 中国抗生素杂志,2003,28(9):552-554.
- [3] OLSEN S J, BISHOP R, BRENNER F W, et al. The changing epidemiology of Salmonella; Trends in serotypes isolated from humans in the United States, 1987-1997[J]. Journal of Infectious Diseases,2001,183:753-761.

- [4] 吴婷,李玉伟,李凤琴,等. 我国市售婴幼儿乳粉和米粉微生物污染水平研究[J]. 现代预防医学研究,2006,33(7):1065-1067.
- [5] 马呈珠,薛良辉,张红,等. 山东省 286 起沙门氏菌食物中毒分析[J]. 中国食品卫生杂志,2005,17(1):20-22.
- [6] COLLINS R A, KO L S, SO K L. Detection of highly pathogenic and low pathogenic avian influenza subtype H5 (Eurasian lineage) using NASBA[J]. Journal of Virological Methods,2002,103(2):213-225.
- [7] LAU L T, REID S M, KING D P, et al. Detection of foot-and-mouth disease virus by nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) [J]. Veterinary Microbiology,2008,126(1~3):101-110.
- [8] 彭涛. 核酸等温扩增技术及其应用(第一版),北京:科学出版社,2009,22-34.
- [9] 尤其敏,胡林,林源吉,等. 核酸薄膜层析快速检测方法及其试纸条及其用途[P]. 中国,发明专利,200610003429.1,2006.
- [10] Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification[J]. Nature,1991,350(6313):91-92.
- [11] 陈金顶,索青利,廖明,等. 沙门氏菌的 invA 基因序列分析与分子检测[J]. 中国人畜共患病杂志,2004,20(10):868-871.

### 作者简介



雷质文,高级兽医师,食品微生物检测。

E-mail:leizhw@sohu.com