

实时荧光定量 PCR 技术快速检测志贺氏菌

戴陈伟, 童 琳, 武昌俊, 许 勇, 李 舜, 朱倩云, 蔡 标*

(安徽省医学科学研究院, 合肥 230061)

摘 要: 目的 建立实时荧光定量 PCR 法快速检测志贺氏菌。**方法** 提取志贺氏菌基因组为模板扩增 *virA* 基因片段, 将目的片段连接至 pMD19-T 载体得到重组质粒, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 验证所得到的重组质粒, 以紫外分光光度计测量重组质粒吸光度值 A_{260} , 并换算为质粒拷贝数后作梯度稀释得到不同浓度的质粒标准品; 进行荧光定量 PCR 分析并通过特异性、灵敏性实验以验证该方法的可行性。**结果** 重组质粒标准品浓度在 $10^3\sim 10^8$ copies/ μ L 范围内线性关系良好($r^2>0.99$), 实时荧光定量 PCR 检测志贺氏菌时出现良好的扩增曲线, 鼠伤寒沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌均未出现扩增曲线。志贺氏菌的检出限为 100 CFU/mL。

结论 本方法便捷、高效、可靠, 可用于志贺氏菌的快速定性定量检测。

关键词: 志贺氏菌; 实时荧光定量 PCR; 标准曲线; 特异性; 灵敏性

Rapid detection of *Shigella* by real-time fluorescence quantitative PCR

DAI Chen-Wei, TONG Lin, WU Chang-Jun, XU Yong, Li Shun, ZHU Qian-Yun, CAI Biao*

(Anhui Academy of Medical Sciences, Hefei 230061, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for rapid detection of *Shigella* by real-time fluorescent quantitative PCR. **Methods** The *Shigella* genome was extracted as a template to amplify the *virA* gene fragment, and the target fragment was ligated into the pMD19-T vector to obtain a recombinant plasmid, which was transformed into *Escherichia coli* DH5 α competent cells. The obtained recombinant plasmid was verified, and the absorbance value A_{260} of the recombinant plasmid was measured by an ultraviolet spectrophotometer, and it was converted into a plasmid copy number, and then subjected to gradient dilution to obtain plasmid standards of different concentrations. Fluorescence quantitative PCR analysis was performed and the feasibility of the method was verified by specificity and sensitivity experiments. **Results** The concentration of recombinant plasmid standards within the range of $10^3\sim 10^8$ copies/ μ L showed a good linear relationship ($r^2>0.99$). A good amplification curve was observed when real-time PCR was used to detect *Shigella*. No amplification curves were found for *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The detection limit of *Shigella* was 100 CFU/mL. **Conclusion** The method is convenient, efficient and reliable, it can be used for rapid qualitative and quantitative detection of *Shigella*.

KEY WORDS: *Shigella*; real-time fluorescent quantitative PCR; standard curve; specificity; sensitivity

基金项目: 安徽省十三五医疗卫生重点专科建设项目(皖卫科教[2017]30 号)、2018 年度安徽省卫计委科研计划项目(2018YK008)

Fund: Supported by "13th Five-Year Plan" Key Medical and Health Specialty of Anhui (Anhui Health Science and Education [2017] 30), and Health and Family Planning Commission of Anhui Province in 2018 Project (2018YK008)

*通讯作者: 蔡标, 副研究员, 主要研究方向为病原微生物和流行病学。E-mail: caib81@163.com

*Corresponding author: CAI Biao, Associate Professor, The Medical Science Institute of Anhui Province, NO.15, Yonghong Road, Lu yang District, Hefei 230061, China. E-mail: caib81@163.com

1 引言

志贺氏菌, 又称痢疾杆菌, 为革兰氏阴性杆菌, 也是人类细菌性痢疾最常见的病原菌^[1]。志贺氏菌主要通过消化道进行传播, 是重要的食源性致病菌之一^[2], 据调查, 全球每年约有1.6亿人感染志贺氏菌, 大约有110万人死亡, 其中绝大多数是儿童^[3]。志贺氏菌在我国分布广泛, 其中以福氏志贺氏菌和宋内氏志贺氏菌最为常见。2018年, 我国志贺氏菌感染发病率约为百万分之六十五^[4]。志贺氏菌能够污染包括蔬菜、肉类、蛋制品和奶制品在内的很多食物, 它能分泌内、外毒素, 以较低的感染剂量使得疾病得到有效的传播, 可引起腹痛、腹泻、里急后重、结肠水肿和溃疡等症状^[5,6]。常规的国标方法检验志贺氏菌, 在增菌和选择性培养后, 再用生化鉴定和血清学方法进行检测和分型, 往往需要数天的时间来得到检测结果^[7,8]。免疫学方法检测志贺氏菌相对于常规方法, 灵敏度更高, 操作也更简便^[9,10], 但免疫学方法影响因素多, 假阳性率高且不易确定^[11]。而常规的PCR检测方法只能定性分析, 不能准确计算出模板的初始含量。实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time polymerase chain reaction, Real-time PCR)是一种核酸定性定量的试验技术, 通过特殊荧光染料或荧光标记的特异性探针, 对PCR产物进行跟踪标记, 实时监测反应全过程, 在使用标准样品预先绘制标准曲线的前提下, 根据Ct值(threshold cycle, Ct)推断待测样品模板的初始浓度值^[12]。邱杨等^[13]根据志贺氏菌保守基因*ipaH*序列设计特异引物, 采用Real-time PCR技术检测志贺氏菌, 其检测限为133.4 CFU/mL。魏琼等^[14]在建立同时检测志贺氏菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的多重荧光定量PCR快速检测方法时, 以志贺氏菌*virA*基因为检测靶基因之一, 但该方法在检测前需要将目标菌富集培养到约 $10^7 \sim 10^8$ CFU/mL。*virA*基因为志贺氏菌特异的单拷贝基因, 全长1203 bp, 是负责编码侵袭因子的保守基因, 与细菌侵袭细胞和在细胞间扩散有关^[15]。应用*virA*检测志贺氏菌的研究相对较少。因此本研究以*virA*基因215 bp的DNA片段为检测的靶向基因片段, 建立的实时荧光定量PCR检测志贺氏菌, 具有很高的特异性和灵敏性, 且可以精确定量初始志贺氏菌的浓度, 为相关检测单位日常检测工作提供参考。

2 材料与方法

2.1 仪器、试剂与材料

福氏志贺氏菌(BNCC185915)、鼠伤寒沙门氏菌(BNCC 108207)、金黄色葡萄球菌(BNCC 186158)、大肠杆菌(BNCC 185254)(北京北纳创联技术研究院)。

SuperReal PreMix Plus(SYBR Green)染料法实时荧光定量试剂盒、细菌基因组抽提试剂盒、质粒小提试剂盒、

Taq 酶、dNTPs(中国天根生化公司); pMD-19T 载体(日本TaKaRa公司)。

ABI Veriti 温度梯度PCR仪、ABI 7500 实时荧光定量PCR仪(美国应用生物系统(ABI)公司); 岛津 UV-1750 紫外分光光度计(日本岛津公司); 3002 电子分析天平(杭州友恒称重设备有限公司); LS-B50L 电加热式蒸汽灭菌器(江阴滨江医疗设备厂); BCD-181LMC 冰箱(合肥美菱股份有限公司); II级 A 型生物安全柜(蚌埠净化设备厂); SHP-100 生化培养箱(扬州市三发电子有限公司)。

引物: 根据 GenBank 数据库中的志贺氏菌 *virA* 基因的序列, 利用 Primer 5 软件设计特异性引物, 所扩增片段大小为 215 bp。引物序列如下:

vir1: 5'-CTGCATTCTGGCAATCTCTTCACA-3'

vir2: 5'-TGATGAGCTAACTTCGTAAGCCCTCC-3'

实测模拟样品为加入志贺氏菌的灭菌牛奶, 由实验室自制。

2.2 实验方法

2.2.1 目的基因片段的扩增

以福氏志贺氏菌作为实验菌株提取模板 DNA, 应用所设计的引物对其进行 PCR 扩增, 产物经 1.5%(w/v)琼脂糖凝胶电泳, 获得 215 bp 目的扩增片段, 测序验证。

2.2.2 重组质粒的构建

扩增的目的片段连入 pMD-19T 载体。将所得重组质粒 pMD19-T-*virA* 转化 DH5a 大肠杆菌感受态细胞, 为获取高浓度重组质粒, 挑取单克隆菌落, 液体摇菌培养, 以质粒提取试剂盒提取质粒。

2.2.3 志贺氏菌实时荧光定量 PCR 标准曲线的建立

用紫外分光光度计测定重组质粒的 A_{260} 值, 质粒 DNA 为双链 DNA, 故质粒核酸浓度 $\text{g/mL} = (A_{260}) \times \text{稀释倍数} \times 50 \mu\text{L/mL} \times 10^{-3}$, 质粒拷贝数 $\text{copies/mL} = (6.02 \times 10^{23}) \times \text{核酸浓度} / (\text{DNA length} \times 660)$, 按公式计算出原始拷贝数, 然后进行倍比稀释, 取不同稀释度的质粒模板, 依次为 1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 copies/ μL 进行荧光定量 PCR 扩增。实时荧光定量 PCR 的反应体系为: SuperReal PreMix Plus(2 $\times$)12.5 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.75 μL , DNA 模板 2.0 μL , ddH₂O 9 μL , 每个稀释度设 3 次平行试验。反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$, 15 min 预变性, 95 $^{\circ}\text{C}$, 10 s 变性, 60 $^{\circ}\text{C}$ 32 s 退火、延伸, 扩增 40 个循环, 反应结束后, 计算机自动计算, 得到标准品实时 PCR 扩增曲线和以质粒标准品浓度为横坐标, Ct 值为纵坐标的标准曲线。

2.2.4 志贺氏菌实时荧光定量 PCR 实验条件的验证

(1) 特异性实验

在 NCBI 数据库^[16]中利用 Primer-Blast 工具检索验证引物的特异性, 并采用本研究建立的实时荧光定量 PCR 方法对福氏志贺氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌同时进行检测, 确定本研究建立的方法对志贺氏

菌是否有很好的特异性, 是否与其他细菌有交叉反应。

(2) 灵敏性实验

将志贺氏菌用双蒸水 10 倍梯度稀释成 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、10 CFU/mL 的浓度, 提取基因组为模板, 进行实时荧光定量 PCR 扩增, 检测本研究建立方法的灵敏性, 测定其志贺氏菌检出限。

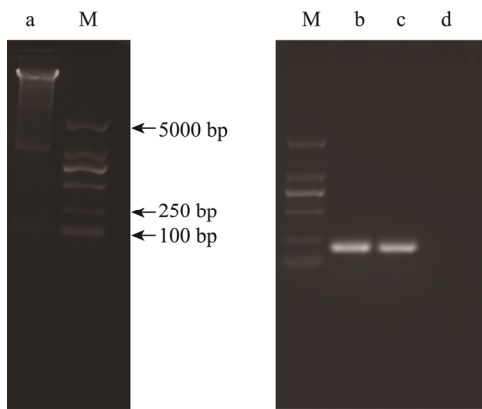
2.3 模拟样品的检测

制备志贺氏菌菌悬液, 测定菌落总数, 分别向灭菌牛奶中加入志贺氏菌菌悬液, 配制含菌量为 1×10^5 CFU/mL 的模拟样品。提取志贺氏菌基因组为模板, 进行实时荧光定量 PCR 扩增。

3 结果与分析

3.1 重组质粒的构建及验证

提取福氏志贺氏菌基因组作为模板 DNA(图 1, 条带 a), 经 PCR 特异性扩增后, 得到长度为 215 bp(图 1, 条带 b)的特异条带, 与实验预期相符。PCR 产物纯化后, 连接入 pMD-19T 载体后, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。挑取单克隆菌落, 液体摇菌培养, 以质粒提取试剂盒提取重组质粒, PCR 验证重组质粒(图 1, 条带 c), 并对重组质粒进行测序, 测序结果显示确有目的基因 *virA* 片段的插入, 重组质粒 pMD19-*virA* 构建成功。



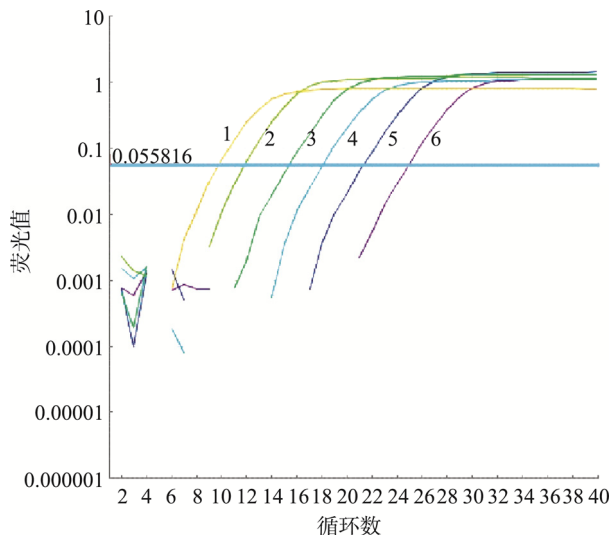
注: M: DL2000 DNA 分子量标准; a: 志贺氏菌基因组; b, c: 目的基因 *virA* 片段; d: 无模板对照。

图 1 志贺氏菌基因组和目的基因片段的扩增
Fig.1 Genome of *Shigella* and amplification of target gene fragments

3.2 标准曲线的建立

通过鉴定的重组质粒 pMD19-*virA*, 用紫外分光光度计测量其 A260 值, 计算出原始拷贝数, 然后梯度稀释成 1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 copies/ μ L 浓度, 加入 25 μ L 反应体系, 于实时荧光定量 PCR 仪上进行

扩增反应, 反应结束后在计算机上自动形成标准曲线, 平行试验重复性良好。重组质粒标准品浓度在 $10^3 \sim 10^8$ 可形成较为理想的扩增曲线(图 2)。以重组质粒标准品梯度稀释拷贝数的对数值为横坐标(X), 以 Ct 值为纵坐标(Y), 绘制实时荧光定量 PCR 的标准曲线(图 3)。荧光阈值取值为 0.055816, 其线性回归方程为 $Y = -3.0086X + 33.397$, 标准曲线斜率为 -3.0086, $r^2 = 0.9949$, 说明荧光定量 PCR 扩增效率较高, 线性关系良好, 符合制备标准曲线的要求。



注: 扩增曲线(copies/ μ L): 1: 1×10^8 , 2: 1×10^7 , 3: 1×10^6 , 4: 1×10^5 , 5: 1×10^4 , 6: 1×10^3 。

图 2 实时荧光定量 PCR 标准品扩增曲线
Fig.2 Amplification curve of real-time fluorescence quantitative PCR for standard plasmid

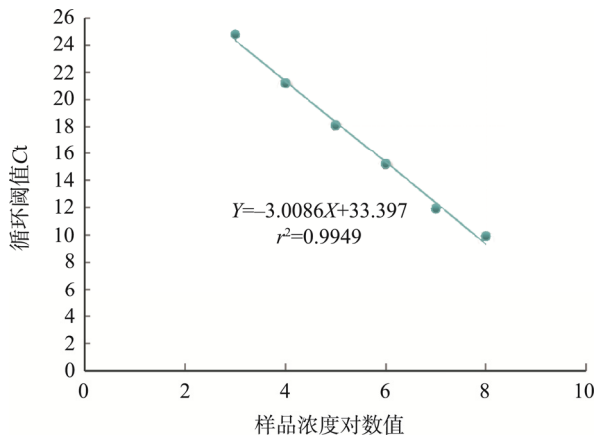


图 3 实时荧光定量 PCR 标准曲线
Fig.3 Standard curve of real-time fluorescence quantitative PCR

3.3 特异性实验结果

Primer-BLAST 结果显示本研究设计的引物对于扩增 *virA* 基因片段是特异的。采用本研究建立的实时荧光定量 PCR 方法同时进行检测福氏志贺氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、金

黄色葡萄球菌和大肠杆菌(图 4), 结果表明: 唯有志贺氏菌实时荧光定量 PCR 出现良好的扩增曲线, 其它 3 种细菌经本研究建立的实时荧光定量 PCR 均未出现扩增曲线, 说明本研究建立的方法对志贺氏菌检测有很好的特异性。

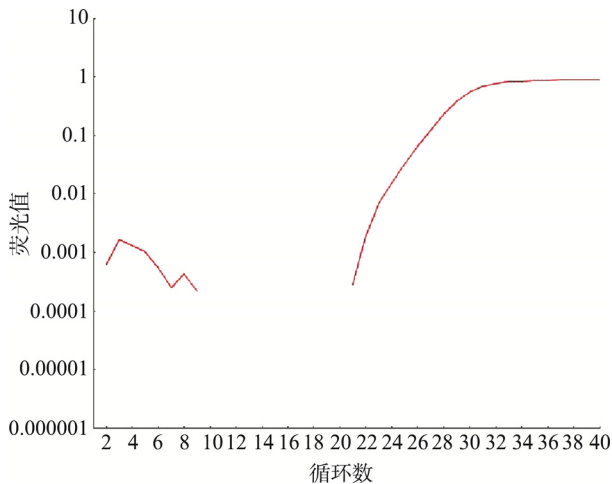
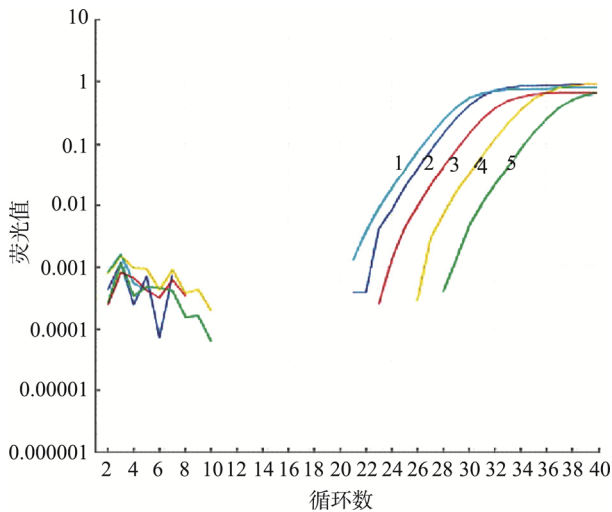


图 4 实时荧光定量 PCR 特异性实验
Fig.4 Specificity experiment of real-time fluorescence quantitative PCR

3.4 灵敏性实验结果

提取 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、10 CFU/mL 浓度的志贺氏菌基因组 DNA 为模板, 进行实时荧光定量 PCR 扩增(图 5), 无模板对照组无扩增曲线产生。结果表明: 本研究建立的实时荧光定量 PCR 方法的志贺氏菌最低检测浓度为 1×10^2 CFU/mL, 检测灵敏度较高。



注: 扩增曲线(CFU/mL): 1: 1×10^6 , 2: 1×10^5 , 3: 1×10^4 , 4: 1×10^3 , 5: 1×10^2 。
图 5 实时荧光定量 PCR 灵敏性实验
Fig.5 Sensitivity experiment of real-time fluorescence quantitative PCR

3.5 模拟样品检测结果

提取含菌量为 1×10^5 CFU/mL(即反应的模板浓度为 1×10^2 copies/ μ L)模拟样品中的志贺氏菌基因组 DNA 为模板, 进行实时荧光定量 PCR 扩增(图 6), 牛奶模拟样品中的志贺氏菌可以检出, 无模板对照组无扩增曲线产生, 模拟样品扩增曲线在实时荧光定量 PCR 第 27 个循环后达到标准曲线绘制时的荧光阈值, 根据线性回归方程, 可反推出模板拷贝数的对数值 x 为 2.126, 与实际含菌量非常接近。结果表明: 本研究建立的实时荧光定量 PCR 方法可以对实际样品中的志贺氏菌进行定量检测。

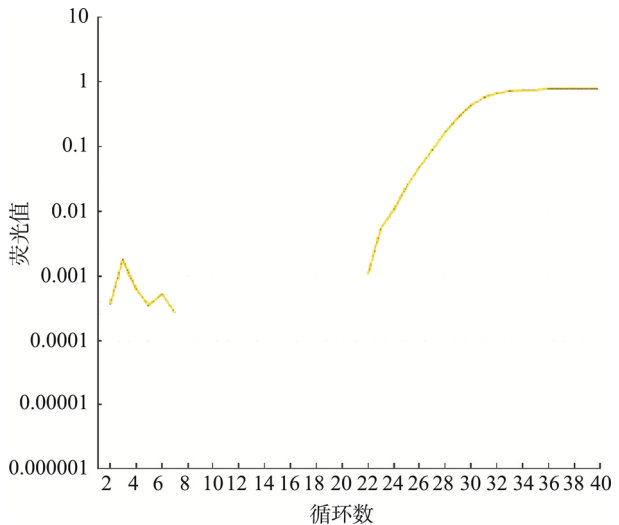


图 6 模拟样品的实时荧光定量 PCR 扩增曲线
Fig.6 Amplification curve of real-time fluorescence quantitative PCR for simulated sample

4 结 论

实时荧光定量 PCR 技术具有时效快、实时监测、假阳性率低、准确度高、对环境无污染和自动化程度高等特点, 该技术的应用在大肠杆菌、沙门氏菌和志贺氏菌等致病菌的诊断中有着广阔的应用前景。本研究制备了重组质粒 pMD19-virA, 以该质粒作为志贺氏菌进行绝对定量检验的标准品, 建立了 SYBR 染料法实时荧光定量 PCR 方法, 并绘制了实时荧光定量 PCR 标准曲线。在实际检测志贺氏菌样品时, 由于 *virA* 为志贺氏菌单拷贝基因, 所以根据标准曲线确定的样品中模板拷贝数即为志贺氏菌个体数目。本研究成功利用 *virA* 基因片段建立了志贺氏菌实时荧光定量 PCR 检测方法, 具有很高的特异性和灵敏性, 只需数小时的时间, 最低可以检测到 100 CFU/mL 的志贺氏菌, 在检测特异性和灵敏性上具有一定的优势。在模拟样品检测中, 该方法可以成功地定量检出牛奶模拟样品中的志贺氏菌, 本研究为食品中志贺氏菌的检测提供了一种便捷、高效、可靠的方法。

参考文献

- [1] Mark A, Sansonetti PJ, Marteyn BS. *Shigella* diversity and changing landscape: Insights for the twenty-first century [J]. Front Cell Inf Microbiol, 2016, 6: 45.
- [2] Davis H, Taylor JP, Perdue JN, et al. A shigellosis outbreak traced to commercially distributed shredded lettuce [J]. Am J Epidemiol, 1988, (6): 1312–1321.
- [3] Golovliovi, Sjostedt A, Mokrievich A, et al. A method for allelic replacement in *Francisella tularensis* [J]. FEMS Microbiol Lett, 2003, 222(2): 273–280.
- [4] 疾病预防控制中心. 2018 年全国法定传染病疫情概况 [EB/OL]. [2019-04-24]. www.nhc.gov.cn/jkj/s3578/201904/050427ff32704a5db64f4ae1f6d57c6c.shtml
Disease Prevention and Control Bureau. Survey of the nationwide epidemic situation of notifiable infectious diseases in 2018 [EB /OL]. [2019-04-24]. www.nhc.gov.cn/jkj/s3578/201904/050427ff32704a5db64f4ae1f6d57c6c.shtml
- [5] Sethuvel DPM, Ragupathi NKD, Anandan S, et al. Update on: *Shigella* new serogroups/serotypes and their antimicrobial resistance [J]. Lett Appl Microbiol, 2017, 64(1):8–18.
- [6] 张传斌, 袁飞, 黄海兰, 等. 食品中志贺氏菌检测方法的研究进展[J]. 食品工业, 2017, (6): 262–266.
Zhang CB, Yuan F, Huang HL, et al. Research progress on detection methods of *Shigella* in foods [J]. Food Ind, 2017, (6): 262–266.
- [7] Muniandy S, Dinshaw IJ, Teh SJ, et al. Graphene-based label-free electrochemical aptasensor for rapid and sensitive detection of foodborne pathogen [J]. Anal Bioanal Chem, 2017, 409(29): 6893–6905.
- [8] GB/T 4789.5-2012 食品安全国家标准 食品微生物学检验 志贺氏菌检验[S].
GB/T 4789.5-2012 National food safety standard-Food microbiology examination-*Shigella* test [S].
- [9] 王怡雯, 张帅, 张红星, 等. 双抗夹心 ELISA 快速检测冷鲜肉中福氏志贺氏菌 2a[J]. 中国食品学报, 2019, 19(2): 235–240.
Wang YW, Zhang S, Zhang HX, et al. Rapid detection of *Shigella flexneri* 2a in cold meat by double-antibody sandwich ELISA [J]. J Chin Instit Food Sci Technol, 2019, 19(2): 235–240.
- [10] Zeinhom MMA, Wang Y, Song Y, et al. A portable smart-phone device for rapid and sensitive detection of *E.coli* O157:H7 in yoghurt and egg [J]. Biosens Bioelectron, 2017, S0956566317305377.
- [11] 赵春阳, 江强世, 刘畅, 等. 沙门氏菌检测方法研究进展[J]. 中国奶牛, 2018, 342(10): 32–36.
Zhao CY, Jiang QS, Liu C, et al. Advances in detection of *Salmonella* [J]. Chin Dairy Catt, 2018, 342(10): 32–36.
- [12] 刘小荣, 张笠, 王勇平. 实时荧光定量 PCR 技术的理论研究及其医学应用[J]. 中国组织工程研究, 2010, 14(2): 329–332.
Liu XR, Zhang L, Wang YP. Theoretical study and medical application of real-time fluorescence quantitative PCR [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2010, 14(2): 329–332.
- [13] 邱杨, 唐丽霞, 赵丽, 等. 志贺氏菌实时荧光 PCR 检测试剂的研制[J]. 现代食品科技, 2008, 24(11): 1151–1154.
Qiu Y, Tang LX, Zhao L, et al. Development of real-time fluorescent PCR reagent for detection of *Shigella* [J]. Mod Food Sci Technol, 2008, 24(11): 1151–1154.
- [14] 魏琼. 沙门氏菌、志贺氏菌和金黄色葡萄球菌多重荧光定量 PCR 快速检测方法的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2011.
Wei Q. Rapid detection of *Salmonella*, *Shigella* and *Staphylococcus aureus* by multiplex fluorescence quantitative PCR [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2011.
- [15] Uchiya K, Tobe T, Komatsu K, et al. Identification of a novel virulence gene, *virA*, on the large plasmid of *Shigella*, involved in invasion and intercellular spreading [J]. Mol Microbiol, 1995, 17(2): 241–250.
- [16] National center for biotechnology information [EB/OL]. [2019-09-03]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



戴陈伟, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为病原微生物学和分子生物学。
E-mail: 87358066@qq.com



蔡 标, 副研究员, 主要研究方向为病原微生物和流行病学。
E-mail: caib81@163.com