

改良分子信标-实时 PCR 快速检测 4 种食源性致病菌

邱亚群, 扈庆华, 石晓路, 李迎慧, 林一曼, 江敏

广东省深圳市疾病预防控制中心, 广东 深圳 518020

摘要:目的 建立高效、特异、简便、快速的四重实时荧光 PCR (real-time PCR) 检测体系同时检测沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特菌、大肠杆菌 O157: H7 种常见的主要食源性致病菌。**方法** 从 GenBank 数据库中下载沙门菌侵袭性基因 *ssaR*、金黄色葡萄球菌肠毒素 *nuc* 基因、单增李斯特菌的 *hlyA* 基因、大肠杆菌 O157: H7 的 *rfbE* 基因序列, 设计引物和探针, 利用 HAND 系统和多色探针编码技术, 通过对 PCR 反应的组分和条件进行优化。建立针对肉类食品中 4 种食源性致病菌四重实时荧光 PCR 体系。**结果** 成功建立了检测肉类食品中 4 种食源性致病菌四重实时荧光体系, DNA 和细菌纯培养的最低检测限达到 1-100 fg/PCR 和 1-6.25 CFU/PCR, 特异性均达 98% 以上。**结论** 本文利用 HAND 系统和多色探针编码技术相结合, 构建了针对 4 种食源性致病菌四重实时荧光 PCR 体系。可用于食品中食源性致病菌的快速筛查和食源性疾病爆发的快速诊断。

关键词: 食源性致病菌; 实时荧光 PCR; HAND 系统; 探针编码技术

Rapid detection of four kinds of foodborne pathogens by using modified molecular beacon based on real-time PCR

Yaqun qiu¹, Qinghua Hu¹, Xiaolu Shi¹, Yinhuin Li¹, Yiman Lin¹, Min Jiang¹

¹ Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518020, China

Abstract: Objective To develop a efficient, specific, simple, fast multiplex real-time PCR for the detection of four common foodborne pathogens: *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7. **Methods** A set of primers and probes were designed according to the sequences of *Salmonella* *ssaR*, *Staphylococcus aureus* *nuc*, *Listeria monocytogenes* *hlyA*, *E. coli* O157:H7 *rfbE* gene in Genbank, the four-color real time PCR system was established with HAND system and Multicolor Combinational Probe Coding (MCPC) technology. Then, the components and condition of the PCR assay was optimized. **Results** A multiplex real-time PCR was developed for the detection of four foodborne pathogens in meat food. The lowest detection limit of DNA and pure cultures of bacteria reached 1-100 fg/PCR and 1-6.25 CFU/PCR respectively, and the detection specificity was more than 98%. **Conclusion** The multiplex real-time PCR assays based on HAND system and MCPC technology were developed to simultaneously identify four foodborne pathogens, and could apply to the rapid detection of

基金: 国家自然科学基金 (81071433)

作者简介: 邱亚群 (1969~), 女, 本科, 主任技师, 主要从事微生物学研究, Email-qiuayaqun08@163.com

foodborne pathogens in food and rapid diagnosis of foodborne disease outbreak.

Key words: foodborne pathogens; real-time PCR; rapid diagnosis; HAND system, probe coding

随着经济快速发展, 食品安全问题成为全世界不可忽视的重要公共卫生问题之一, 世界卫生组织 (WHO) 将其看作是一个世界性的挑战^[1, 2]。因人体摄入有毒有害物质而造成的疾病即食源性疾病, 其发病率居各类疾病发病率的前列, 成为威胁人类健康的重要因素。食源性疾病主要表现为感染性和中毒性症状。其中由致病微生物引起的食源性疾病无论是在发达国家还是在发展中国家都是影响食品安全的主要原因^[3, 4]。我国食源性疾病主要表现为细菌性食物中毒, 居各类食物中毒的首位, 高达 40% 左右^[5-7]。引起食源性疾病的常见致病菌主要有沙门菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特菌、肠出血性大肠杆菌 O157:H7、副溶血弧菌、志贺菌、空肠弯曲杆菌等, 上述致病菌主要通过食品、饮用水感染人类, 导致细菌性食物中毒、肠热症、败血症等^[8, 9]。本文选择沙门菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特菌、肠出血性大肠杆菌 O157:H7 4 种常见的致病菌建立四重实时荧光检测体系, 一管能同时检测出这四种致病菌。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 233 株菌株 (43 株菌株购自检定所, 190 株菌株分离自深圳市历年食物中毒或肠道门诊或食品污染物的标本)。

1.1.2 试剂 10×PCR Buffer 缓冲液(Mg²⁺ free)、MgCl₂、dNTP、rTaq DNA 聚合酶均购于大连宝生物有限公司(批号:CK8901AA)引物和探针均由 TAKARA 公司合成。

1.1.3 仪器 ABI7500 荧光 PCR 仪 (美国, ABI 公司), Eppendorf centrifuge 5417R 台式高速冷冻离心机(德国, Eppendorf 公司)。

1.2 方法

1.2.1 特异性靶基因的选取 根据国内外文献报道, 沙门、金葡、单增、O157:H7 分别选取 *ssaR*、*nuc*、*hlyA*、*rfbE* 四个特异性靶基因

1.2.2 检测用引物和探针的设计与合成 从 GenBank 数据库中下载 *nuc* 基因、*ssaR* 基因、*hlyA* 基因、*rfbE* 基因序列各 100 条, 利用 clstal(1.8)软件比对这些序列, 选择出高特异性和高保守的核酸序列区域。然后借助 Primer Premier 5.0、Oligo v6.31、Tm Utility v1.3 以及 google 在线的 DNA Folding 软件进行引物和探针的设计, 每个探针经折叠分析后均只形成

一种预想的茎环结构。将设计的引物和探针组合后放入 GenBank 中进行 blast 比对，以验证设计的引物和探针的特异性。

1.2.3 实时荧光 PCR 体系

1.2.3.1 分子信标熔解曲线 为了解 4 个检测探针的合成质量（是否形成正确的二级发夹结构）和 Tm 值的特征（Tm 值是否在 55 ℃~65 ℃之间），可对 *ssaR* 基因、*nuc* 基因、*hlyA* 基因、*rfbE* 基因的探针进行熔解曲线分析。分子信标熔解曲线的体系为 25 μl 包括：10×PCR Buffer， 3mmol/L Mgcl₂，各个基因的检测探针均为 0.2 μmol/L，将制备的针对 4 个探针的 PCR 反应体系置于 ABI 公司 7500 荧光定量 PCR 仪器中，95 ℃变性 3 min 后，将温度逐渐从 90 ℃降低至 40 ℃（每个循环降低一度），监控每个温度下 4 个反应管的荧光值。

1.2.3.2 引物对和探针组合 为了筛选针对 *ssaR*、*nuc*、*hlyA*、*rfbE* 基因序列的特异性引物组合，利用正交试验原理，从各个基因 4 个引物组中筛选出各自最佳引物组合，并对引物和探针进行验证。参考张建梅文献中^[10]的反应条件和反应程序，反应总体系为 25 μl，内含 5 μl 模板，10×PCR 缓冲液，3 mmol/L MgCl₂，0.2 mmol/LdNTP，1 U Taq 酶，0.2μmol/L 上游引物，0.2 μmol/L 下游引物，0.2 μmol/L 探针。PCR 反应程序为 95 ℃预变性 3 min；94 ℃变性 15 s, 64 ℃退火 1 min（每个循环下降 1 ℃）72 ℃延伸 15 s（共 10 个循环）；94 ℃变性 15 s, 55 ℃退火 20 s, 72 ℃延伸 15 s（共 40 个循环）。使用 ABI 7500 荧光 PCR 仪器在第二个循环周期的退火阶段进行荧光数据采集。

1.2.4 实时荧光 PCR 体系

1.2.4.1 反应程序 反应总体系为 25 μl，内含 5 μl 模板，10×PCR 缓冲液，3 mmol/L MgCl₂，0.2 mmol/LdNTP，1 U rTaq 酶，通用引物含量为 2 μmol/L,4 个基因上下游引物终浓度均为 0.04 μmol/L/0.04 μmol/L，4 个基因探针含量均为 0.2 μmol/L，PCR 反应程序按照表 1 进行设计。

表 1. 四重实时荧光 PCR 反应程序优化组合

优化 编号	预变性	第一个循环周期				第二个循环周期			
		变性	退火	延伸	循环数	变性	退火	延伸	循环数

	℃	min	℃	s	℃	s	℃	s		℃	s	℃	s	℃	s	
1	95	3	95	10	65	20	72	15	10	95	10	55	20	72	15	40
	(1℃↓/循环)															
2	95	3	95	10	58	20	72	15	10	95	10	55	20	72	15	40
3	95	3	95	10	58	20	72	15	5	95	10	55	20	72	15	40
4	95	3	95	10	58	20	72	15	10	95	10	55	30	72	15	40
5	95	3	95	10	58	20	72	15	10	95	10	55	40	72	15	40

1.2.4.2 Mg²⁺浓度 PCR 反应总体系为 25 μl，内含 5 μl 模板，按前面的反应条件和程序,改变加入 PCR 反应管中 Mg²⁺的含量，Mg²⁺浓度设置为 1.0 mmol/L，2.0 mmol/L，3.0 mmol/L，4.0 mmol/L，5.0 mmol/L，6.0 mmol/L 六个水平梯度.

1.2.4.3 加尾引物浓度 选取 4 种食源性致病菌标准菌株基因组 DNA 作为模版，灭菌双蒸水为阴性对照，设计 *ssaR*、*nuc*、*hlyA* 和 *rfbE* 基因加尾上下游引物的浓度均为 0.02 μmol/L/0.02 μmol/L，0.04 μmol/L/0.04 μmol/L，0.06 μmol/L/0.06 μmol/L，0.08 μmol/L/0.08 μmol/L，0.1 μmol/L/0.1 μmol/L 五个水平梯度，PCR 反应条件和程序不变。

1.2.4.4 通用引物浓度 25 μl 的 PCR 反应体系，*ssaR* 和 *rfbE* 基因上游引物/下游引物终浓度选定为 0.04 μmol/L/0.04 μmol/L，*nuc* 和 *hlyA* 基因上游引物/下游引物终浓度选定为 0.06 μmol/L/0.06 μmol/L，通用引物的浓度设置为 0.8 μmol/L，1.2 μmol/L，1.6 μmol/L，2.0 μmol/L，2.4 μmol/L，3.0 μmol/L 六个水平梯度。PCR 反应条件和程序不变。

1.2.4.5 探针浓度 25 μlPCR 反应体系中通用引物终浓度选定为 2.4 μmol/L，设计 *ssaR*、*nuc*、*hlyA* 和 *rfbE* 基因 4 条探针浓度梯度均为 0.10 μmol/L，0.15 μmol/L，0.20 μmol/L，0.25 μmol/L，0.30 μmol/L 五个水平梯度，在已经优化的最佳引物浓度及最佳 Mg²⁺浓度条件下进行 real-time PCR 扩增，从而比较不同探针浓度的扩增曲线以确定各基因的最佳探针浓度。

1.2.4.6 rTaq 酶浓度 以 4 种食源性致病菌抽提的 DNA 做为模板，灭菌双蒸水为空白对照。在固定其它组分的前提下，*ssaR*、*nuc*、*hlyA* 和 *rfbE* 基因探针浓度均选定为 0.25 μmol/L，rTaq 酶的浓度设置为 1.0 U，1.5 U，2.0 U，2.5 U 四个水平浓度，实时 PCR 的反应程序不变，在第二个循环周期的退火阶段检测荧光信号，选择合适的 rTaq 酶浓度。

2 结果

2.1 实时荧光 PCR 体系的初步建立

2.1.1 分子信标熔解曲线的建立 由分子信标的熔解曲线图可以看出，*ssaR*、*nuc*、*hlyA*、*rfbE* 基因的 4 个分子信标探针均形成了倒 S 型的曲线，证实 4 个探针都具备正确的二级发夹结构，且探针的 T_m 值都在 58℃~68℃之间。见图 1。

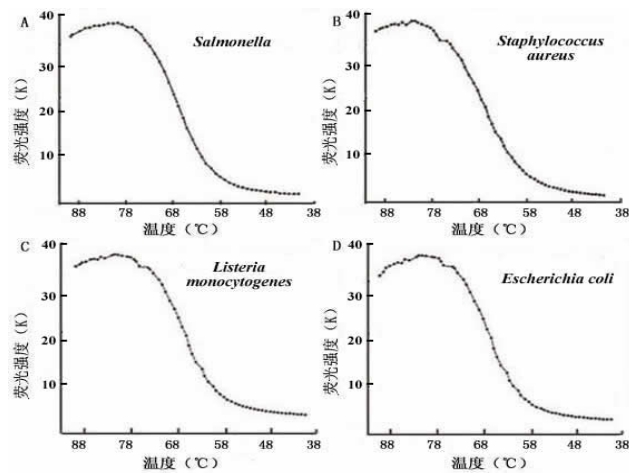


图 1.4 个靶基因的分子信标探针熔解曲线 (K: 10^3)

2.1.2 引物对和探针组合筛选 参考文献中的反应条件和反应程序，最终选取得到 4 对 T_m 值相近为 $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右的引物对和开环温度在 $60\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 之间的 4 条分子信标探针，产物长度控制在 $100\text{ bp}\sim 200\text{ bp}$ 。其中沙门菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌和大肠杆菌 O157:H7 是用单荧光标记。沙门菌探针的 5'端用 CY5 标记，金黄色葡萄球菌探针 5'端用 FAM 标记，单增李斯特菌探针 5'端用 ROX 标记，大肠杆菌 O157:H7 探针 5'端用 HEX 标记。引物和探针均由 TAKARA 公司合成，见表 2。

表 2 4 重实时荧光 PCR 体系实验用引物和探针序列

基因	种类	类型	序列(5'-3')	用量 (pmol)	GeneBank Accession No.	目的片段大小 (bp)
<i>ssaR</i>	Homo-tag		GCAAGCCCTCACGTAGCGAA	60		20
	<i>Salmonella</i>	Sal-f	GAACCTGGCCTGAAGACATAAA	1	CP002614	127
		Sal-r	AGGTCAATAGCCAGAAAGGGA	1		
<i>hlyA</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	Sal-probe	CY5-CCGGCTAACTGACTCACCGTAAATGCCGG-Dabcyl	6.25		
		lm-f	TGCAAGTCCTAAGACGCCA	1.5	HM589603	187
		lm-r	CACTGCATCTCCGTGGTATACTAA	1.5		
<i>nuc</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	lm-probe	ROX-CGCGCTGTATATACTTATCGATTTCATCCGCGC-Dabcyl	6.25		
		Sa-f	GGCAATACGCAAAGAGGTT	1.5	EF529608	124
		Sa-r	CCACTTCTATTTACGCCGTTATC	1.5		
<i>rfbE</i>	<i>E.coli</i> O157:H7	Sa-probe	FAM-CGATGCAGTCTAAGTAGCTCAGCAAATGCATCG-Dabcyl	6.255		
		O157-f	ATTGGCATGACGTTATAGGCTAC	1	JN578668	169
		O157-r	AAATATCAGCAATTTACGTTTTCG	1		
		O157-probe	HEX-CCGCTGTTCTAACTGGGCTAATCCTATAGCAGCGG-Dabcyl	6.25		

2.2 四重实时荧光 PCR 体系的优化

2.2.1 反应程序的优化 PCR 程序经过优化后, 5 种 PCR 扩增程序中, PCR 扩增程序 3 扩增周期短, 用时少, Ct 值小, 扩增的荧光信号强度高, 扩增效率高, 扩增曲线呈现标准的 S 型曲线。因此可确定最佳 PCR 反应程序为 PCR 扩增程序 3, 见图 2。

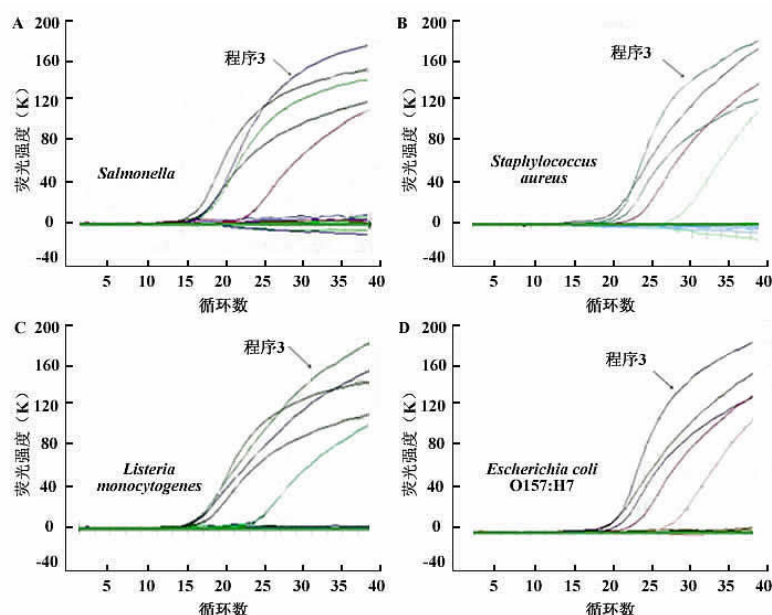


图 2. 实时荧光 PCR 反应程序优化 ($K:10^3$)

2.2.2 Mg^{2+} 浓度的优化 根据四重 PCR 反应体系的扩增曲线选择合适的 Mg^{2+} 浓度, 当 Mg^{2+} 随着浓度梯度增加时, 荧光信号逐渐增强, 直到 Mg^{2+} 浓度达到 3 mmol/L 时, 荧光信号最强。当 Mg^{2+} 浓度大于 3 mmol/L 时荧光信号开始下降, 综合 4 种食源性致病菌的扩增结果可知 Mg^{2+} 最佳浓度为 3 mmol/L。

2.2.3 加尾引物浓度的优化 根据荧光 PCR 扩增结果的 Ct 值、荧光信号强度、扩增曲线的形状进行分析, 沙门菌 *ssaR* 基因的最佳引物浓度是 0.04 $\mu\text{mol/L}$, 金黄色葡萄球菌 *nuc* 基因的最佳引物浓度是 0.06 $\mu\text{mol/L}$, 单核细胞增生李斯特菌 *hlyA* 基因的最佳引物浓度为 0.06 $\mu\text{mol/L}$, 肠出血性大肠杆菌 *rfbE* 基因的最佳浓度是 0.04 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.2.4 通用引物浓度的优化 当通用引物浓度在 2.4 $\mu\text{mol/L}$ 时, 扩增荧光信号最强, Ct 值小, 浓度过低时扩增信号较弱。通用引物浓度 2.4 $\mu\text{mol/L}$ 时, 4 个对象的荧光扩增信号强度和 Ct 值均相当, 因此可确定最佳的通用引物浓度为 2.4 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.2.5 探针浓度的优化 5 个探针浓度梯度中当浓度为 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 时, 4 种食源性致病菌的扩增荧光信号强度高, Ct 值小, 因此可确定检测 4 种食源性致病菌最佳探针浓度均为 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.2.6 rTaq 酶浓度的优化 当 rTaq 酶浓度在 1 U/PCR 时, 4 种食源性致病菌的扩增荧光信号强度高, Ct 值小。当 rTaq 酶浓度过高扩增不甚理想, 因此可确定最佳的 rTaq 酶浓度为 1 U/PCR。

2.3 四重实时荧光 PCR 体系的建立 通过对反应程序、 Mg^{2+} 浓度、加尾引物浓度、通用引

物浓度、探针浓度和 rTaq 酶浓度的优化, 确定检测肉类食品中沙门菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特菌和出血性大肠杆菌 O157:H7 的最优反应体系如下: 25 μ l 反应体系含有 5 μ l 模板, 10 \times PCR 缓冲液, 0.2 mmol/L/dNTP, 1 U rTaq 酶, 通用引物终浓度为 2.4 μ mol/L, *ssaR* 基因和 *rfbE* 基因上游引物/下游引物终浓度均为 0.04 μ mol/L/0.04 μ mol/L, *nuc* 基因和 *hlyA* 基因上游引物/下游引物终浓度均为 0.06 μ mol/L/0.06 μ mol/L, 探针含量均为 0.25 μ mol/L。PCR 反应程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s (共 5 个循环); 94 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s (共 40 个循环), 在第二个循环周期的退火阶段检测荧光信号。

2.4 四重实时荧光 PCR 体系的应用 对深圳市 2003 年-2009 年收集的 2586 份临床标本和 672 份食品标本用传统方法和多重荧光 PCR 方法进行同步检测, 经过 SPSS 软件统计分析, 多重荧光 PCR 方法特异度均在 98% 以上, 灵敏度均为 100%, 与对照菌无交叉荧光信号产生, 并且 4 种食源性致病菌之间的检测互不干扰。且建立的体系 DNA 和细菌纯培养物最低检出限可达到 1 fg/PCR \sim 100 fg/PCR 和 1 cfu/PCR \sim 6.25c fu/PCR

3 讨论

多重实时荧光定量 PCR 是近年发展起来的可以在同一密闭反应体系中应用多对引物和不同荧光标记的探针同时来扩增多个不同目的基因的中通量技术, 具有快速、简便、特异、灵敏、通量高和可定量等一系列优点, 由于其出色的核酸鉴定能力, 已经在病原体检测中得到了广泛应用, 逐渐成为核酸定性或者定量检测的金标准^[1]。但是实时荧光 PCR 技术存在着引物二聚体和通量低等瓶颈问题, 本文针对以上瓶颈, 创新性地将 Homo-Tag Assisted Non-Dimer 系统和多色组合探针编码技术结合起来。

本文构建的多重荧光 PCR 体系可以同时检测 4 种食源性致病菌, 且荧光曲线平滑, 荧光信号值强, 易于观察, 并未出现因某个探针荧光值过强而抑制了其它荧光信号, 从而导致对应的食源性致病菌呈假阴性的现象, 证明本实验所设计的引物和探针较好。同时, 本实验体系具有良好的重复性, 平行管的变异系数都在 5% 以下, 利用方差分析得到 *P* 值都远远小于 0.05。另外, 建立的体系 DNA 和细菌纯培养物最低检出限可达到 1 fg/PCR \sim 100 fg/PCR 和 1 cfu/PCR \sim 6.25c fu/PCR。最后, 对深圳市 2003 年-2009 年收集的 2586 份临床标本和 672 份食品标本用传统方法和多重荧光 PCR 方法进行同步检测, 经过 SPSS 软件统计分析, 多重荧光 PCR 方法特异度均在 98% 以上, 灵敏度均为 100%, 与对照菌无交叉荧光信号产生, 并且 4 种食源性致病菌之间的检测互不干扰。所以本方法具有较广泛的适用性, 可以用于食品污染物监测网中日常食源性致病菌的检测以及细菌性食物中毒的快速检测, 使得检测步骤更为简单, 结果更为可靠。

参考文献:

-
- [1] Christensen D R, Hartman L J, Loveless B M, *et al.* Detection of biological threat agents by real-time PCR: comparison of assay performance on the R.A.P.I.D. the Light Cycler and the Smart Cycler platforms[J]. Clin Chem, 2006, 52(1):141-145.
- [2] Fao/who. Question and Answer, Global forum of Food safety Regulator[Z]. 2002.
- [3] 张丽荣, 林毅雄, 莫韵韶, 等. 食源性致病菌 96 微孔板芯片在一起食物中毒检测中的应用[J]. 实用预防医学, 2013, 20(002): 224-226.
- [4] 吕素玲, 谭冬梅, 李秀桂. 广西食源性单核细胞增生李斯特菌耐药趋势分析[J]. 实用预防医学, 2013, 20(006): 734-735.
- [5] Ltekruse S F, Cohen M L, Swerdlow D L, *et al.* Emerging food bornediseases[J]. Emerg Infect Dis, 1997, 3 (3): 285.
- [6] 冉陆, 张静, 王茂武. 2006 年 1-6 月份全国食物中毒情况分析[J]. 疾病监测, 2006, 21 (6): 331.□
- [7] 蔡炯. 食源性疾病的现状和防制[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15 (9): 1150.□
- [8] 沙丹, 凌霞. 三种食源性致病菌多重 PCR 检测方法的建立和初步应用[J]. 检验医学, 2009, 24(3):177-181.
- [9] 丁建英, 韩剑众. 食品中单增李斯特菌的存在现状及检测方法研究进展[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(12):171-174.
- [10] 杜金伟, 张燕玲. 荧光标记寡核苷酸探针及其应用[J]. 中国生物工程杂志, 2002, 22(4):109-111.
- [11] Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, *et al.* The real-time polymerase chain reaction[J]. Mol Aspects Med, 2006, 27(2/3):95-125.