基于内参的志贺氏菌实时荧光定量 PCR 快速检测

王建昌， 王金凤， 李 静， 孙晓霞， 陈瑞春 *
（河北省出入境检验检疫局 检验检疫技术中心，河北 石家庄 050051）

摘要：根据 Genbank 已公布的志贺氏菌基因组序列，筛选特异性靶基因 ipaH，设计特异性引物和探针，优化反应体系，并在体系中加入内参(IAC)，通过标记不同荧光基团的 TaqMan 探针来监测 IAC，进而实时监控整个 PCR 反应过程。按照人工污染样品，以评价所建立反应体系的性能。以志贺氏菌基因组 DNA 为模板，最低检测限为 1 pg/uL；以 10 倍梯度稀释的菌液用水煮法提取 DNA 为模板，最低检测限为 9×10^3 CFU/mL；以含有 ipaH 的质粒为模板，最低检测限可以达到 10^3 考贝/uL；建立 ipaH 和 ipaH-IAC 标准曲线，C_t 值与模板拷贝数均呈良好的线性关系（R^2=0.999）；人工污染初始菌量为 20 g 中 10 CFU 的羊肉时，志贺氏菌在增菌 6 h 后即可检出（水洗加试剂盒法）。作者建立的 ipaH-IAC 实时荧光定量 PCR 方法，既能有效检测食品中志贺氏菌，又能实时监测 PCR 反应过程，有效防止"假阴性"的发生，进一步保证了结果的可靠性，有利于实现样品中志贺氏菌实时荧光定量 PCR 检测方法的标准化。

关键词：志贺氏菌；ipaH；实时荧光定量 PCR；内参
中图分类号：R 37　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689(2016)04—0408—11

Establishment of Fluorescence Quantitative PCR Assay in Detection of *Shigella* Based on Internal Reference

WANG Jianchang, *WANG Jinfeng*, *LI Jing*, *SUN Xiaoxia*, *CHEN Ruichun**
(The Technical Center of Hebei Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: According to *Shigella* gene sequences published by Genbank, we selected specific target genes, designed specific primers and probes and optimized the reaction system. An internal amplification control (IAC) was added to reaction system. This IAC was detected by TaqMan probes labeled with different fluorophore. 5~50 CFU/25 g artificially contaminated sample was added to evaluate the performance of reaction system. The assay was could be used reliably for detection of *Shigella* with a sensitivity of 1pg/uL. For the 10 -fold dilutions bacteria DNA extracted by cooking water, the lowest detection limit was 9×10^3 cfu/mL. But for the plasmid with ipaH, the lowest detection limit can reach 10^3 copies /uL. The standard curve of ipaH and ipaH-IAC was established, and the quantification was linear between Ct and template copy number (R^2=0.999). While the initial sample amount of artificially contaminated bacteria was 10 CFU/25 g mutton, the *Shigella* could be

收稿日期：2014-10-20
基金项目：质检公益性行业科研专项(201310126)。
作者简介：王建昌(1981—)，男，山东临朐人，农学博士，兽医师，主要从事食源性微生物、动物疫病病原的分子生物学检测研究。E-mail：18630135980@163.com
* **通信作者**：陈瑞春(1963—)，男，河北承德人，研究员，主要从事食品安全研究。E-mail：crcde@163.com

detected after 6 hours culture. The ipaH-IAC fluorescence quantitative PCR assay was developed. It could not only be applied for detection of *Shigella* in food, but also monitor the PCR reaction system and prevent the false negatives. Therefore, the ipaH-IAC fluorescence quantitative PCR assay further ensures the reliability of the results and is conducive to the realization of standardized quantitative PCR method for *Shigella* in samples.

Keywords: *Shigella*, ipaH, Real Time PCR, IAC

志贺氏菌(*Shigella*)是引起人类细菌性痢疾的主要病原菌，通称痢疾杆菌，为兼性厌氧菌，按照抗原结构和生化反应的不同分为痢疾(A 群)、福氏(B 群)、鲍氏(C 群)和宋内氏(D 群)志贺氏菌。该菌可引起食源性暴发，临床表现通常为带血腹泻，在发达国家志贺氏菌感染主要为 D 群，而在我国流行菌株则以 B 群为主[1-4]。志贺氏菌引起痢疾的传染源主要为病人和带菌者，主要是通过污染了志贺氏菌的食物、饮水等经口感染，具有十分重要的公共卫生学意义[5]。全世界每年志贺氏菌污染食品引起的发病数超过 2 亿，其中死亡人数达 65 万[6]。据报道，在美国志贺氏菌是继 1997 年沙门氏菌和空肠弯曲杆菌之后的引起食源性疾病的主要病因[7]，尤其儿童易引起感染性腹泻[8-9]。

目前志贺氏菌常规检测方法是生化检测方法 GB 4789.5-2012，首先对样品进行增菌，分离培养，通过生化反应、溶血试验以及协同溶血试验对可以菌落进行鉴定分析，如果确定为志贺氏菌则要进行进一步血清型试验。该检验步骤繁琐、耗时长、准确性低，且一次检测的样品数较少。免疫学方法检测相对常规方法具有灵敏度提高，操作简便。钟青萍等[10]建立了双抗夹心 ELISA 法检测志贺氏菌，对 37 ℃、1 h 纯培养的菌液检出限为 10^5 CFU/mL，但 ELISA 由于实验影响因素较多，会引起假阳性，需要其他方法辅助检测。分子检测方法的建立，给致病菌的检测提供了一个快捷、高效、灵敏的检测平台。Kenia[11]建立了以志贺氏菌 ipaH 基因为检测靶点的具有扩增内参的多重 PCR 方法，该检测方法的检测限为 104 CFU/mL。Barletta[12]以志贺氏菌 ipaH、沙门氏菌 invA、空肠弯曲菌 16S rRNA 基因建立多重 RT-PCR 方法，检测限为 10^3 CFU/g，而在临床粪便样品中的检测线为 10^4 CFU/g。上述 PCR 方法多数仅对纯培养的志贺氏菌进行了分析，而未对增菌后的样品提取核酸进行研究评估。在 PCR 检测方法的实际应用中，部分样品基质复杂，存在大量未知的复杂成分，可能会存在影响 PCR 扩增的物质，同时核酸提取过程中残留的物质也可能导致 PCR 扩增的抑制，从而出现“假阴性”结果或定量值较低。

作者所建立的志贺氏菌检测方法是一种基于内参(Internal Amplification Control，IAC)的实时荧光定量 PCR 方法，在反应体系中添加 IAC 以对整个反应过程进行实时监测，从而有效的防止“假阴性”结果的产生，并通过水煮法和商业化试剂盒法对增菌后样品提取核酸进行靶基因检测，均取得了良好的检测结果，同时有效推动了志贺氏菌实时荧光定量 PCR 检测方法的标准化。

1 材 料

1.1 实验用菌株

实验所用菌株见表 1。

1.2 主要试剂和仪器

木糖赖氨酸脱氧胆盐(XLD)琼脂，志贺氏菌增菌肉汤：北京陆桥公司产品；基因组 DNA 提取试剂盒：2×Taq PCR Master Mix，天根生化科技公司产品；Premix Ex Taq，pMD ® 19-T Simple Vector：TaKaRa 公司产品；核酸蛋白分析仪：Eppendorf 公司产品；PCR 仪：TECHNE 公司产品；实时荧光定量 PCR 仪：ABI 公司产品。

1.3 引物和探针的设计

通过查找相关文献[9,13]，选择 ipaH 作为志贺氏菌检测靶基因。从 GeneBank 中下载 ipaH 靶序列，应用 DNAstar 软件对下载的多个靶序列进行比对，查找保守序列。用 Primer Express 3.0 软件设计引物和探针，用 BLAST 工具进行比对，分析其特异性，将探针的 5‘端标记 FAM，3’端标记 Eclipse。引物和探针序列详见表 2。

表 1　实验所用菌株

Table 1　Strains in this study

菌种名称	来源	扩增内参引物探针 PCR 结果	靶基因扩增 PCR 结果
福氏志贺氏菌 *Shigella flexneri*	CICC21678	–	+
宋内氏志贺氏菌 *Shigella sonnei*	CICC21679	–	+
痢疾志贺氏菌 *Shigella flexneri*	CMCC51105	–	+
鲍氏志贺氏菌	CICC21680	–	+
副溶血孤菌 *Vibrio parahaemolyticus*	CICC21617	–	–
O157:H7　*Escherichia coli* O157:H7	CICC21530	–	–
单核细胞增生李斯特氏菌 *Listeria monocytogenes*	ATCC19114	–	–
鼠伤寒沙门氏菌 *Salmonell*	CICC22956	–	–
阪崎肠杆菌 *Enterobacter sakazakii*	ATCC29544	–	–
空肠弯曲杆菌 *Campylobacter jejuni*	ATCC33291	–	–
副溶血弧菌 *Vibrio parahaemolyticus*	CICC21617	–	–
溶血性曼氏杆菌 *Mannheimia haemolytwa*	实验室分离	–	–
地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis*	实验室分离	–	–
绿脓杆菌 *Pseudomonas aeruginosa*	实验室分离	–	–
枯草杆菌 *Bacillus subtilis*	实验室分离	–	–
乙型溶血性链球菌 *Streptococcus hemolytic-β*	CMCC10373	–	–
蜡样芽孢杆菌 *Bacillus cereus*	CICC10468	–	–
肺炎克雷伯 *Klebsiella pneumonia*	实验室分离	–	–
金黄色葡萄球菌 *Staphyloccocus aurous*	ATCC6538	–	–
粪肠球菌 *Enterococcus faecalis*	实验室分离	–	–
溶血曼海姆菌 *Mannheimia haemolytica*	实验室分离	–	–
弗氏柠檬酸杆菌 *Citrobacter freundii*	实验室分离	–	–
阴沟肠杆菌 *Enterobacter cloacae*	实验室分离	–	–

表 2　实验中所用引物探针序列信息

Table 2　Information about the primers and probes

引物名称	引物探针序列	产物大小
ipaH	F:5′- TTCGTGCATGTCTTACCTCTAAGG-3′	
	R:5′- TGCAAGCAGGGAGTACAGGTAAC-3′	
	5′-FAM-ACCTGCGAGCCTTGGCGCTTTC-Eclipse-3′	67
IAC	F:5′- AATGGAGAAAGCCCCTGTGAAG-3′	
	R:5′-TCACGTGAACCTGGAATTTGAC-3′	
	5′-CY5-CACTGCGCATCTAGTCCCGCTGAAC-BHQ3-3′	123

1.4　扩增内参的构建

采用复合引物法[14]构建扩增内参(IAC),选择乳仓鼠肾细胞(BHK-21)的 Nmi 基因作为内参基因,使用 Primer Express 3.0 软件设计扩增内参引物和探针（序列见表 2），将内参探针标记 CY5 荧光基团,在内参引物 5’末端分别连接上 ipaH 检测引物,形成一对内参引物和目标引物的长引物,经长引物扩增后得到扩增内参。内参片段连接载体 pMD19-T,转化感受态细胞,测序验证;提取质粒,测定浓度,-20 ℃保存备用,菌液于甘油中-80 ℃保存。

2　方　法

2.1　志贺氏菌基因组 DNA 的提取

作者研究中志贺氏菌（福氏志贺氏菌

CICC21678,下同)基因组 DNA 的提取分别采用以下 2 种方法进行。

2.1.1 *水煮法* 将 1 mL 菌液转入 1.5 mL Eppendorf 离心管中 5 000~8 000 r/min 离心 5 min,弃上清收集菌体。加入 200 μL 无菌去离子水,振荡混匀,100 ℃水浴 10 min 后,12 000 r/min 离心 10 min,上清作为 DNA 模板在–20 ℃条件下保存备用。

2.1.2 *水洗法加天根提取试剂盒法* 取增菌液样品 1 mL,放入 1.5 mL 离心管中,800 r/min 离心 5 min 或静置 5~10 min,沉淀培养物中的食品残渣。取上清液,在 8 000 r/min 离心 5 min,收集菌体。倒去上清液后,用无菌双蒸水重悬浮菌体,离心洗涤 3 次,然后将沉淀用试剂盒进行 DNA 提取。

2.2 志贺氏菌 ipaH 实时荧光定量 PCR 中引物和探针浓度的优化

以志贺氏菌基因组 DNA 作为模板,取不同浓度的引物和探针组合,以能给出最低 Ct 值和最高荧光强度的组合为最佳组合。反应体系为 25 μL:2× Taq PCR MasterMix 12.5 μL,上下游引物设定终浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8 μmol/L,探针设定终浓度为 0.12、0.16、0.18、0.2 μmol/L ,ROX Ⅱ 0.5 μL,模板 DNA 50~100 ng,用 dd H_2O 补足体系。反应条件:95 ℃ 30 s;95 ℃ 5 s,60 ℃ 35 s,40 个循环。60 ℃时收集荧光。

2.3 志贺氏菌 ipaH 实时荧光定量 PCR 方法的特异性实验

根据 2.2 中确立的最佳引物探针浓度和反应条件,水作为空白对照,提取表 1 中志贺氏菌和其他病原菌的基因组 DNA 进行实时荧光 PCR 扩增,通过观察扩增曲线验证所建立的志贺氏菌实时荧光 PCR 方法的特异性。

2.4 志贺氏菌 ipaH 实时荧光定量 PCR 反应体系中 IAC 探针浓度和添加量的优化

在 2.2 中确定的靶基因最佳引物探针浓度基础上,对反应体系中内参探针浓度进行优化。探针终浓度分别设 0.12、0.14、0.16、0.18 μmol/L,反应体系中包含 10^6 考贝的 IAC,反应条件同前,以能给出最低 Ct 值和最高荧光强度的最小 IAC 探针浓度为最佳浓度。

IAC 添加量过多会抑制靶基因的扩增,需要对 IAC 添加量进行优化。在其他条件已确定的基础上,在反应体系中添加 10^2、10^3、10^4、10^5、10^6 考贝的 IAC,选取能获得 IAC 扩增阳性信号,同时又不影响靶基因扩增的添加量作为 IAC 最佳添加量。

2.5 IAC 对志贺氏菌 ipaH 实时荧光定量 PCR 方法的特异性影响

根据 2.4 中确定的 IAC 最佳探针浓度和添加量,建立加入 IAC 后的志贺氏菌实时荧光定量 PCR(ipaH–IAC)反应体系。对表 1 中菌株提取基因组 DNA,进行实时荧光 PCR 扩增,确定 IAC 添加后所建立的反应体系对志贺氏菌检测的特异性影响。

2.6 ipaH–IAC 实时荧光定量 PCR 方法的灵敏性和定量范围

2.6.1 *灵敏性检测* 将已知浓度的志贺氏菌基因组 DNA 做 10 倍梯度稀释,每个稀释度各取 1 μL 为模板,按照 ipaH–IAC 实时荧光定量 PCR 方法,进行 PCR 扩增,能得到扩增曲线的最低浓度即为该反应体系检测的最高灵敏度。

2.6.2 *定量范围检测* 将志贺氏菌经过夜纯培养后,用灭菌 PBS 作 10 倍梯度稀释,并选择 10^5、10^6、10^7 3 个稀释度进行平板计数,以此计算原始菌落数。每个稀释度各取 1 mL 菌液,用水煮法提取基因组 DNA,用 50 μL 灭菌水溶解 DNA,取 1 μL 为模板,进行 PCR 扩增。

2.7 志贺氏菌实时荧光定量 PCR 检测标准曲线的构建

以志贺氏菌基因组 DNA 为模板,扩增 ipaH 靶基因,凝胶回收,连接到 pMD19–T 载体上,转化 DH5α 感受态细胞,挑取阳性克隆,将菌液送上海生工测序进行鉴定。

将鉴定正确的菌液提取质粒,并测定浓度,计算对应的拷贝数,做 10 倍列稀释,最终至 1 考贝/uL,制成标准模板溶液,分别取 1 μL 作为模板进行 ipaH 和 ipaH–IAC 实时荧光定量 PCR 反应,通过不同 Ct 值和浓度,分别建立标准曲线,最终得到线性方程。分析比较两种方法的检测结果,确认 IAC 对志贺氏菌检测精确度的影响。

2.8 ipaH–IAC 实时荧光定量 PCR 方法重复性和稳定性实验

将志贺氏菌纯培养物按 10 倍梯度稀释,取 4 个稀释度的样本分别作 3 个重复,用以上建立的方法在 ABI7500 进行扩增检测,计算 *Ct* 值的变异系数,评价实验结果的重复性。将试剂配制成试剂盒,考察试剂盒在–20 ℃条件下储存 6 个月后的稳定性。

2.9 ipaH-IAC 实时荧光定量 PCR 方法对志贺氏菌模拟污染样本的检测

将志贺氏菌经过夜纯培养后,用灭菌 PBS 做 10 倍系列稀释，选取 10^5、10^6、10^7 稀释度作平板计数，计算纯培养的初浓度。经稀释后,选取 5~50 CFU 的初始菌量分别添加到 25 g 羊肉样品（已经 GB 4789.5-2012 检测为志贺氏菌阴性）中，再添加到 225 mL 志贺氏菌增菌肉汤中,同时做空白对照(加 1mL 生理盐水)。将上述人工污染样品进行 37 ℃，150 r/min 摇床振荡培养。前增菌后 6、8、10 h,分别取培养液 1mL，采用 2.1 中的 2 种方法进行细菌基因组 DNA 提取,取 3 uL 作为模板进行检测。进行 3 次重复,同时与 GB 4789.5-2012 方法进行比较。

3 结 果

3.1 ipaH 实时荧光定量 PCR 体系中引物、探针浓度优化

选择荧光信号最强,且曲线出现最早的引物探针组合为最佳引物探针浓度。如图 1 所示,确定引物为 0.8 μmol/L，探针为 0.18 μmol/L 时为 ipaH 反应体系最佳浓度。

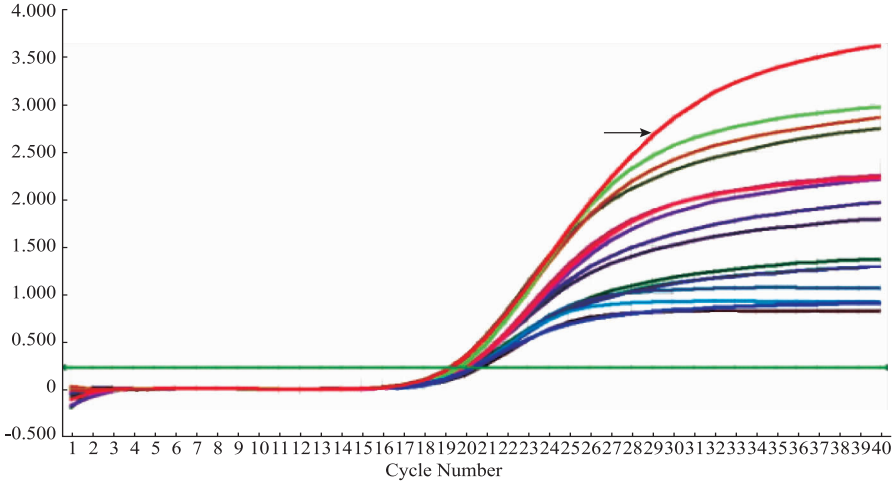


图 1　ipaH 实时荧光定量 PCR 体系中引物探针浓度优化结果

Fig. 1　Primer and probe concentration optimization results of real-time PCR system for ipaH

3.2 ipaH 实时荧光定量 PCR 方法的特异性试验

对志贺氏菌和其它细菌基因组 DNA 进行检测，结果 ipaH 引物探针仅对 4 种志贺氏菌基因组 DNA 为阳性扩增,呈现典型的扩增曲线,对其它菌株均无扩增曲线，显示较好的特异性，结果如图 2 所示。

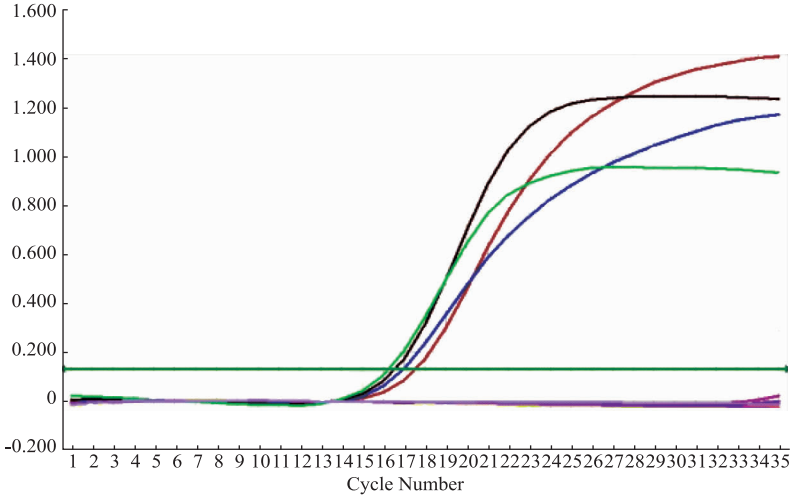


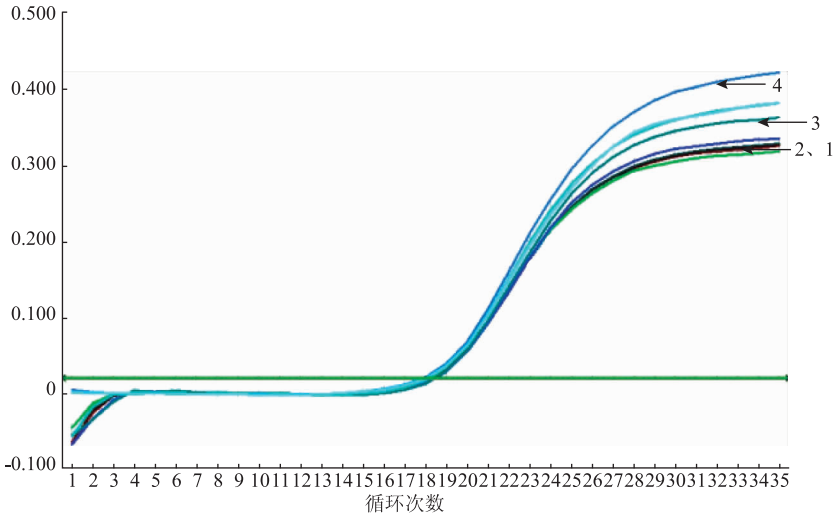
图 2　ipaH 实时荧光定量 PCR 方法特异性试验

Fig. 2　Specific test of real-time PCR for ipaH

3.3 ipaH 实时荧光定量 PCR 反应体系中 IAC 探针浓度和添加量的优化

当 IAC 探针浓度为 0.18 μmol/L 时,荧光信号最强,出现曲线最早,确定为最佳工作浓度(见图3)。

当 IAC 的添加量为 10^5 拷贝时,既能出现明显的 CY5 信号(*Ct* 值小于 25),又不会对 ipaH 的检测有明显影响(见表 3)。最终选择每 25 μL 反应体系添加 10^5 拷贝的 IAC 为最佳添加量,即对 ipaH 靶基因扩增影响最小。



1,0.12 μmol/L;2,0.14 μmol/L;3,0.16 μmol/L;4,0.18 μmol/L

图 3 IAC 探针浓度优化的荧光 PCR 结果

Fig. 3 Fluorescence PCR results of optimization for IAC probe concentration

表 3 不同 IAC 添加量时 ipaH 和 IAC 实时荧光PCR 扩增结果(gyrB Ct 值 \IAC Ct 值)

Table 3 Amplication results of gyrB and gyrB–IAC real–time PCR in adding different IAC

IAC 添加量/拷贝数	ipaH 量/ng		
	10	1	0.1
0	19.22 \undet	22.68 \undet	27.34 \undet
10^2	19.20 \34.91	22.67 \undet	27.39 \34.26
10^3	19.19 \32.62	22.65 \33.06	27.38 \30.68
10^4	19.20 \28.50	22.71 \27.29	27.34 \28.00
10^5	19.21 \24.19	22.68 \24.74	27.28 \25.00
10^6	19.19 \21.22	22.61 \21.73	26.84 \21.94

3.4 ipaH–IAC 实时荧光定量 PCR 特异性结果

如图 4 所示,添加 IAC 后 ipaH 实时荧光定量 PCR 仅对 4 种志贺氏菌为阳性扩增,其余菌株未扩增;同时所有反应中 IAC 均扩增良好。结果说明在反应体系中添加 10^5 拷贝 IAC 对 ipaH 靶基因扩增的特异性以及整个反应体系均没有任何影响,IAC 可以有效地指示假阴性,同时保证结果的可靠性。

3.5 ipaH–IAC 实时荧光定量 PCR 的灵敏性结果

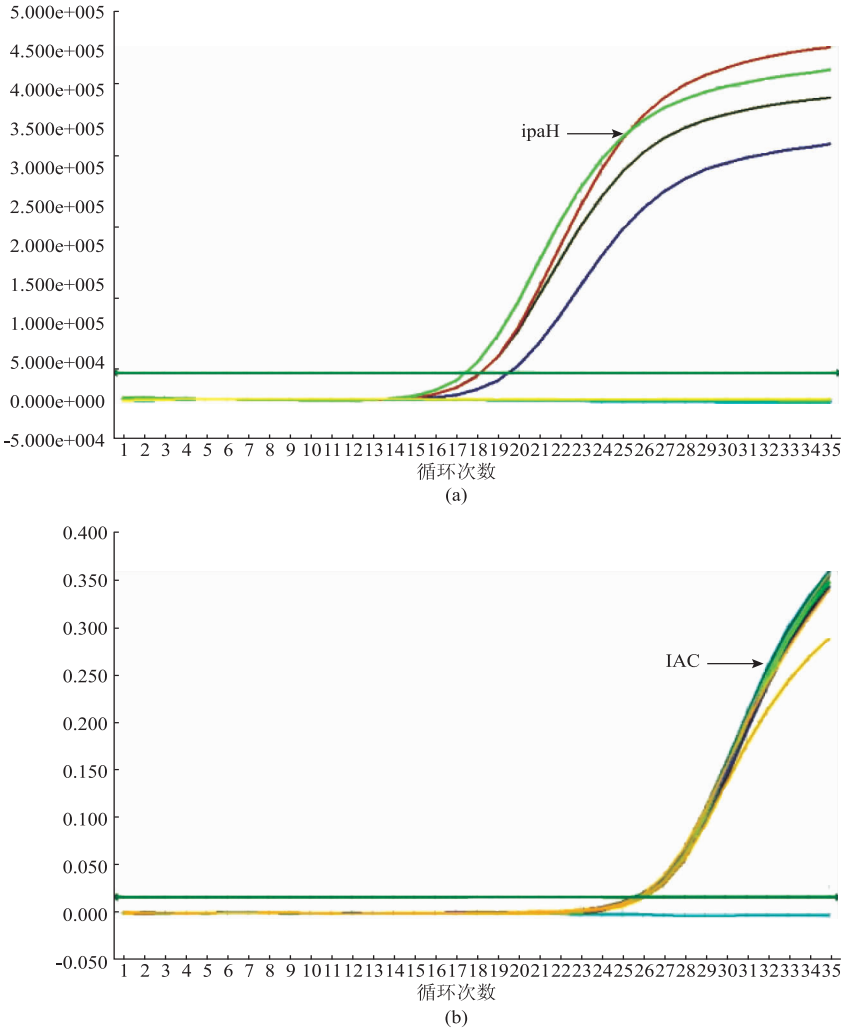
分别以 10 倍梯度稀释的志贺氏菌基因组 DNA 为模板进行实时荧光定量 PCR 反应,结果显示无论反应体系中是否加入 IAC,对靶基因的扩增均没有任何影响,灵敏度结果未发生改变,35 个循环之内,检测灵敏度为 1 pg。结果如图 5 所示。

在志贺氏菌检测反应中,无论是否添加 IAC,反应体系的灵敏度没有变化,均为 1 pg 基因组 DNA。

通过梯度稀释平板计数,以水煮法提取各梯度基因组 DNA,通过 ipaH –IAC 实时荧光定量 PCR 检测靶基因,在添加 IAC 的情况下,各个梯度基因组 DNA 均有扩增曲线,表明此建立的方法对于水煮 DNA 提取方法提取的核酸均可检测。在 35 个循环时,该方法对志贺氏菌的检测限为 9×10^3 CFU/mL。结果如图 6 所示。

3.6 质粒 DNA 标准曲线的建立

如图 9 和 10 所示,ipaH 实时荧光定量 PCR 反应所建立的标准曲线,斜率为–3.167,反应效率为 1.069,r^2 为 0.999,接近 1;ipaH–IAC 实时荧光定量 PCR 反应所建立的标准曲线,斜率为–3.242,反应效



(a)反应体系中添加 10^5 copies IAC 后,反应特异性没有变化;(b)所有反应体系中 IAC 均扩增良好

图 4　ipaH–IAC 实时荧光定量 PCR 特异性试验

Fig. 4　Specific test of ipaH–IAC real–time PCR

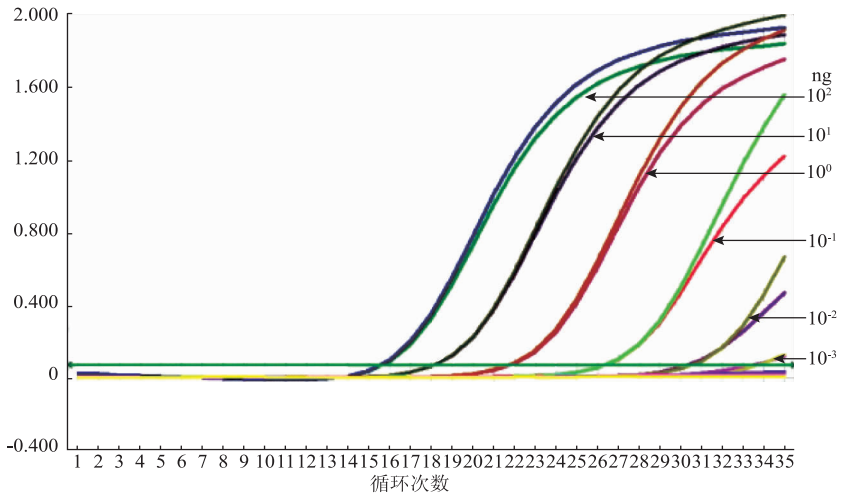
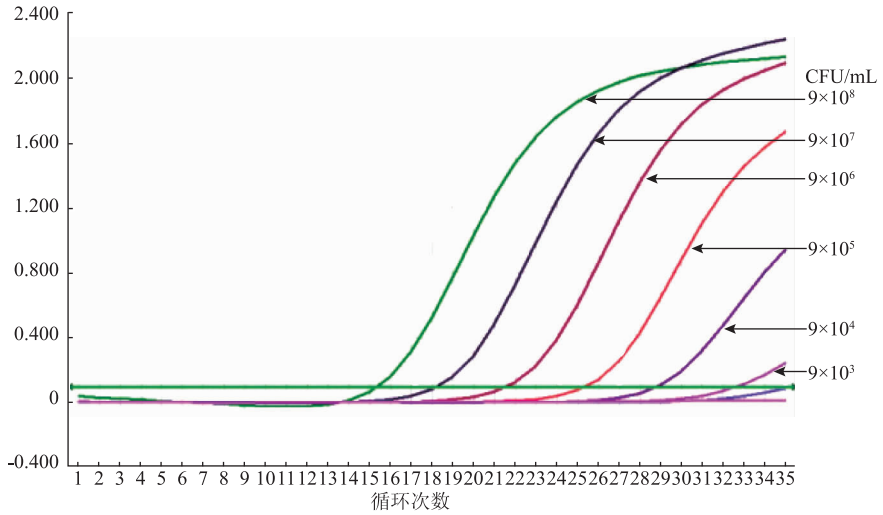


图 5　IAC 对志贺氏菌检测灵敏性的影响

Fig. 5　IAC detection sensitivity effects on *Shigella*

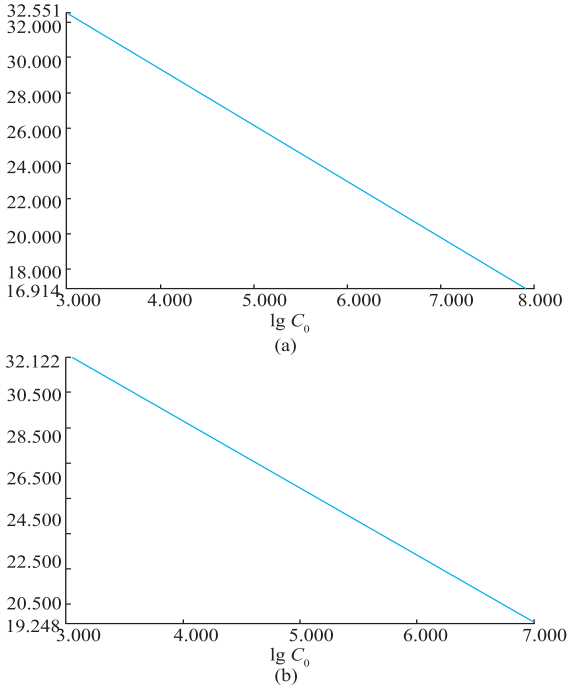


所建立的检测方法在 35 个循环时,对志贺氏菌的最小检出限为 9×10³ CFU/mL

图 6　ipaH–IAC 实时荧光定量 PCR 方法对志贺氏菌的定量检测结果

Fig. 6　Quantitative results of ipaH–IAC real–time PCR for *Shigella*

率为 1.035,r^2 为 0.999,接近 1。结果表明无论是否添加 IAC,不同浓度模板拷贝数的对数与 Ct 值均呈良好的线性关系,IAC 的添加不影响整个反应的精确度,最低检测极限可以达到 10^3 考贝/uL。



(a)ipaH 实时荧光定量 PCR 反应标准曲线,浓度分别为 10^8、10^7、10^6、10^5、10^4、10^3 copies,曲线方程 Y=–3.167lg$X$+42.033;(b)ipaH–IAC 实时荧光定量 PCR 反应标准曲线,浓度分别为 10^7、10^6、10^5、10^4、10^3copies,曲线方程 Y=–3.242lg$X$+42.026

图 7　志贺氏菌实时荧光定量 PCR 反应标准曲线

Fig. 7　Real–time PCR standard curve of *Shigella*

3.7　ipaH–IAC 实时荧光定量 PCR 重复性和稳定性实验

重复性实验结果表明,重复实验 *Ct* 值的标准差均小于 1,*Ct* 值变异系数<4.0%(见表 4),说明检测结果重复性好。稳定性实验结果显示,作者配制的检测试剂在–20℃保存 6 个月后,灵敏性和定量范围不变,稳定性良好。

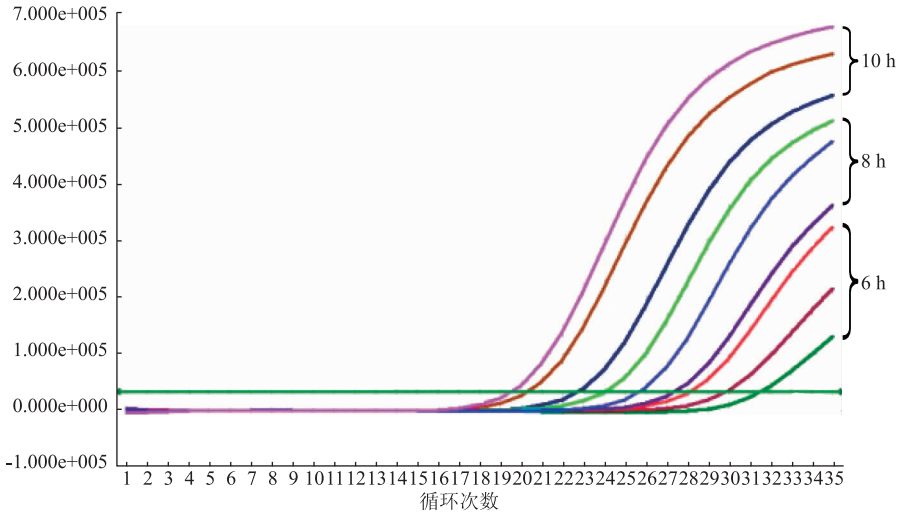
表 4　ipaH–IAC 实时荧光定量 PCR 方法重复性实验

Table 4　Repeatability test of ipaH–IAC real–time PCR

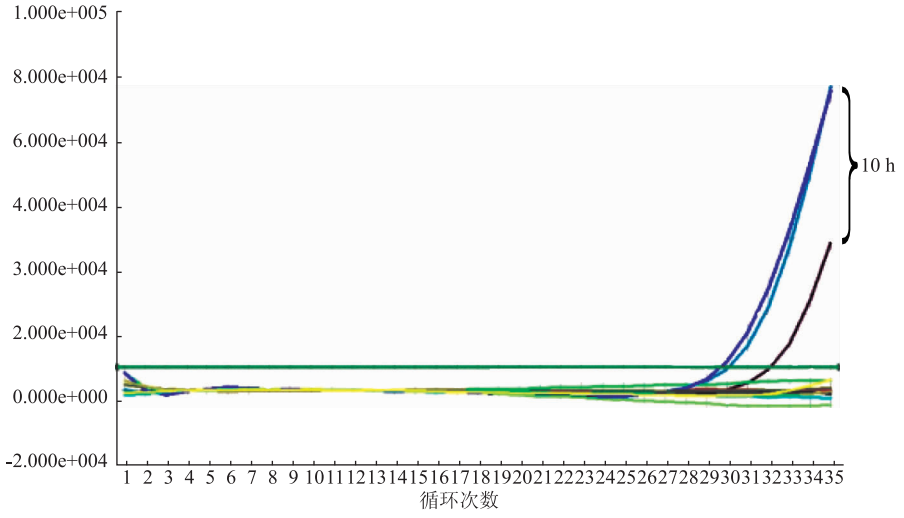
纯培养物稀释倍数	*Ct*(均值)	*Ct*(SD)	CV/%
原液	15.08	0.28	1.8
10^1	17.26	0.57	3.3
10^2	20.88	0.83	4.0
10^3	25.43	0.73	2.9

3.8　ipaH–IAC 实时荧光定量 PCR 方法对志贺氏菌人工污染样本的检测

结果表明,采取水洗加试剂盒法提取人工污染样品中志贺氏菌 DNA 时,当样本中接菌量为 25 g 中 10 CFU 时,增菌时间为 6 h 时,反应体系中 IAC 扩增均为阳性,志贺氏菌即可检出。结果见图 8(a)。而采取水煮法提取人工污染样品中志贺氏菌 DNA 时,当样本中接菌量为 25 g 中 10 CFU 时,增菌时间为 10 h 时,反应体系 IAC 扩增均为阳性,志贺氏菌即可检出。结果见图 8(b)。传统培养方法结果表明,3 次重复试验的人工污染样品均检出志贺氏菌,表明建立的 ipaH–IAC 与传统方法结果相一致。



(a)



(b)

A,水洗加试剂盒法提取基因组 DNA。当初始菌量分别为 10、28、50 CFU/25 g,前增菌 6、8、10 h 后,通过试剂盒方法提取志贺氏菌 DNA 作为模板,所建立的 ipaH–IAC 实时荧光定量 PCR 方法均能检测到志贺氏菌。

B,水煮法提取基因组 DNA。当初始菌量分别为 10、28、50 CFU/25 g,前增菌 6、8、10 h 后,通过水煮法提取志贺氏菌 DNA 作为模板,所建立的 ipaH–IAC 实时荧光 PCR 方法在 10h 时能检测到志贺氏菌,而 6、8 h 均未检测到。

图 8　ipaH–IAC 实时荧光定量 PCR 方法对羊肉中志贺氏菌的检测

Fig. 8　ipaH–IAC real–time PCR for detection of *Shigella* in mutton

作者建立的 ipaH–IAC 实时荧光定量 PCR 方法，采取水洗加试剂盒法提取 DNA，在样品经 6 h 增菌后，可以从起始菌量为 0.4 CFU/g 羊肉样品中检测到志贺氏菌。而采用水煮法提取 DNA 时,则需要至少 10 h 增菌才能从起始菌量为 0.4 CFU/g 羊肉样品中检测到志贺氏菌。在样品 10 h 增菌后,不同 DNA 提取方法的检测结果见表 5,*Ct* 值均为 3 次试验的平均值。

4 讨　论

荧光定量 PCR 技术具有灵敏度高、重复性好、反应高效、准确性高等优点,已广泛应用于生物学和医学领域研究。作者选取志贺氏菌特异性靶基因 ipaH 设计探针和引物，通过在反应体系中添加 IAC，利用靶基因和 IAC 的同时扩增来防止假阴性结果的产生。IAC 在反应体系中可以监控 PCR 抑

制、实验操作的错误等。如果实际样品检测过程中出现靶基因检测为阴性,而 IAC 也没有扩增信号,说明整个试验不成立,PCR 反应是无效的,存在 PCR 抑制反应等,需要查找原因重新进行检测,以保证检测结果的准确性和可靠性。同时为满足出入境口岸"检得出、检得快、检得准"的迫切需求,作者设置 35 个循环,以达到快速检测大批量样品的目的,弥补传统培养方法的不足。

ipaH-IAC 实时荧光定量 PCR 的 r^2 与扩增效率 E 决定荧光定量的检测能力[15]。实验结果表明,ipaH-IAC 标准曲线 *Ct* 值与拷贝数的对数呈良好的线性关系,灵敏性和定量范围的结果显示,无论反应中是否加入 10^5 拷贝数的 IAC,模板浓度与 *Ct* 值均呈现良好的线性关系,灵敏度和定量均不受影响,最低能检测到 1 pg/uL 的模板 DNA。系列梯度稀释志贺氏菌液进行水煮法细菌 DNA 提取后,检测限为 9×10^3 CFU/mL。

模拟样品检测结果显示,采取水洗加试剂盒法提取志贺氏菌 DNA 时,对于初始菌量为 0.4 CFU/g 的羊肉样品,前增菌 6 h 后均能检测到靶基因。这与国内陈伟等[16]建立的志贺氏菌 PCR 检测方法(最低检出限为 5 CFU/ g 猪肉)检出限要低,检测时间均小于 8 h。采取水煮法提取志贺氏菌 DNA 时,对于初始菌量为 0.4 CFU/g 的羊肉样品,前增菌 10 h 后才能检测到靶基因。对于两种细菌 DNA 提取方法,不同增菌时间、不同初始添加量时的检测反应中,IAC 内参均出现典型扩增曲线。在实际样品检测时,如果采用水煮法提取志贺氏菌 DNA,建议前增菌时间大于 10 h。

作者对两种细菌 DNA 提取方法对实时荧光 PCR 检出限的影响分析表明,对于不同初始菌量的样品,采用试剂盒方法提取志贺氏菌 DNA 时,前增菌 6 h 后均能检出;而采用水煮法提取志贺氏菌 DNA 时,则至少需要前增菌 10 h 才能检出。两种 DNA 提取方法的最低检出限均为 0.4 CFU/g,同时所有反应体系中 IAC 均出现典型扩增,表明两种方法提取细菌 DNA 作为模板均可采用。水煮法花费时间稍长,费用低,而水洗加试剂盒方法提取的核酸纯度较水煮法高,杂质少,经多次试验证明该方法对于肉制品中其他致病菌 DNA 的提取同样适用,尤其是比较复杂的基质样品,方法可靠,可以进行推广和应用。因而在实际样品检测中,建议根据针对不同基质样品和食品检测需求选择提取方法[17]。

总之,作者所建立的基于内参的志贺氏菌实时荧光定量 PCR 方法,既能快速检测样品中的志贺氏菌,又能实时监控 PCR 体系以防止假阴性结果的发生,为食品中志贺氏菌的快速检测提供了可靠的方法。

参考文献:

[1] 王晓萌,有田世乃,增田志高,等. 肠道致病菌暴发事件中分子分型技术的应用[J]. 中华预防医学杂志,2006,40(2):39-42.
WANG Xiaomeng,Alida Younan,Masuda Takashi,et al. Application of pulse field gel electrophoresis in molecular typing method on dealing with the outbreak of intestinal pathogen [J]. **Chinese Journal of Preventive Medicine**,2006,40(2):39-42.(in Chinese)

[2] 蒋鸿超,黄海林,苏敏,等. 小儿细菌性痢疾147 例志贺菌菌型及耐药性分析[J]. 儿科药学杂志,2013,19(2):43-46.
JIANG Hongchao,HUANG Hailin,SU Min,et al. Analysis of distribution and antibiotic resistance of 147 strains of Shigella in children with bacillary dysentery[J]. **Journal of Pediatric Pharmacy**,2013,19(2):43-46.(in Chinese)

[3] 邱亚群, 林一曼, 张倩, 等. 深圳市食品、公共场所从业人员志贺氏菌属带菌情况分析 [J]. 实用预防医学,2004,11(2):175-176.
DI Yaqun,LIN Yiman,ZHANG Qian,et al. Shigella carrier analysis of food and public employees in Shenzhen [J]. **Practical Preventive Medicine**,2004,11(2):175-176.(in Chinese)

[4] 康燕明. 怒江州 2006-2010 年志贺氏菌菌型分布及耐药性变迁分析[J]. 中国卫生产业,2012,34:136.
KANG Yanming. Bacteria distribution and drug resistance change in Nujiang from 2006 to 2010 [J]. **China Health Industry**,2012,34:136.(in Chinese)

[5] 严睿,朱凤才. 志贺菌分子生物学检测技术研究进展[J]. 中国病原生物学杂志,2008,3(6):464-470.
YAN Rui,ZHU Fengcai. Advanced on the molecular detection techniques of Shigella[J]. **Journal of Pathogen Biology**,2008,3(6):464-470.(in Chinese)

[6] Niyogi S K. Shigellosis[J]. **J Micr Obiol**,2005,43(2):133-43.

[7] Pfeiffer M L,DuPont H L,Ochoa T J. The patient presenting with acute dysentery a systematic review[J]. **J Infect**,2012,64(4):374-386.

[8] Boschi-Pinto C,Velebit L,Shibuya K. Estimating child mortality due to diarrhoea in developing countries [J]. **Bull World Health**,2008,86(9):710-717.

[9] Mei Qu,Xin Zhang,Guirong Liu,et al. An eight-year study of Shigella species in Beijing,China:serodiversity,virulence genes,and antimicrobial resistance[J]. **J Infect Dev Ctries**,2014,8(7):904-908.

[10] 钟青萍，葛萃萃，张世伟，等. 检测食品中志贺氏菌的双抗夹心 ELISA 方法的研究 [J]. 食品科技,2007,32(10):199-202.
ZHONG Qingping,GE Cuicui,ZHANG Shiwei,et al. Study on the double-antibody dandwich ELISA for detecting Shigella sp.in food[J]. **Food Science and Technology**,2007,32(10):199-202.(in Chinese)

[11] Kenia B J,Clyde B M,Rosario A. Detection of shigella in lettuce by the use of a rapid molecular assay with increased sensitivity [J]. **Brazilian Journal of Microbiology**,2010,41(4):993-1000.

[12] Barletta F,Mercado E H,Lluque A,et al. Multiplex real-time PCR for detection of campylobacter,salmonella,and shigella[J]. **Journal of Clinnical Microbiology**,2013,51(9):2822-2829.

[13] Zhang C,Li Q,Liu T,et al. Cardiac catheterization and pulmonary vasoreactivity testing in children with idiopathic pulmonary arterial hypertension[J]. **Zhonghua Er Ke Za Zhi**,2014,52(6):468-472.

[14] Siebert P D,Larrick J W. PCR MIMICS:competitive DNA fragments for use as internal standards in quantitative PCR [J]. **Biotechnique**,1993,14(2):244-249.

[15] 苏裕心,高珊,康琳,等. 荧光定量 PCR 快速检测金黄色葡萄球菌方法的建立[J]. 军事医学科学院院刊,2010,34(1):25-29.
SU Yuxin,GAO Shan,KANG Lin,et al. Establishment of real-time quantitative PCR-based methods for detection of Staphylococcus aurous in food[J]. **Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences**,2010,34(1):25-29.(in Chinese)

[16] 陈伟,李正国,杨平,等. 肉制品中志贺氏菌 DNA 的快速提取方法[J]. 食品与发酵工业,2009,35(5):12-15.
CHEN Wei,LI Zhengguo,YANG Ping,et al. The study on rapid DNAextraction method of Shigella from meat products[J]. **Food and Fermentation Industries**,2009,35(5):12-15.(in Chinese)

[17] 周阳，祝长青，郭云昌，等. 不同食品基质中单核细胞增生李斯特氏菌核酸提取方法的比较 [J]. 食品与生物技术学报,2013,32(11):1205-1211.
ZHOU Yang,ZHU Changqing,GUO Yunchang,et al. Comparative study of nucleic acid extraction method of L. monocytogenes in the different kinds of food matrix[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2013,32(11):1205-1211.(in Chinese)

会　议　信　息

会议名称(中文)：第五届中国食品与农产品安全检测技术与质量控制国际论坛

开始日期：2016-03-28　　结束日期：2016-03-30

所在城市：北京市　朝阳区　　具体地点：北京国际会议中心

主办单位：中国仪器仪表学会分析仪器分会 中国仪器仪表行业协会分析仪器分会 中国质量检验协会

会议主席：陈洪渊院士　　组织委员会主席：刘长宽　　联系人：于健、蒋士强、刘长宽

联系电话：010-82967491　　E-MAIL：cfas@lanneret.com.cn

会议网站：http://www.cfaschina.com/