

# Taqman MGB PCR 定量检测水产品中沙门氏菌的方法建立

麻丽丹<sup>1</sup>, 王殿夫<sup>2</sup>, 巴中华<sup>1</sup>, 李春丽<sup>3</sup>

(1. 丹东出入境检验检疫局, 辽宁 丹东 118000; 2. 辽东学院动物科学系, 辽宁 丹东 118000;

3. 玉溪农业职业技术学院, 云南 玉溪 653106)

**摘要:** 建立采用 Taqman MGB 实时荧光 PCR 法快速定量检测水产品中沙门氏菌。根据沙门氏菌 *fimY* 基因保守序列, 设计引物和 Taqman MGB 探针, 建立 Taqman MGB 实时 PCR 定量检测体系。采用本方法对 24 株共 14 种血清型沙门氏菌和 17 株与沙门氏菌亲缘关系比较近, 以及在样品中能同时存在的常见食源性致病菌菌株进行 PCR 扩增。结果显示: 所有的沙门氏菌菌株结果均为阳性, 而非沙门氏菌菌株检测结果均为阴性, 反应特异性为 100%。本方法的纯菌最低检测限为 13CFU/ml, 样品江瑶贝和蚬子肉中添加肠炎沙门氏菌的最低检测限为 130CFU/ml; 香螺肉中添加肠炎沙门氏菌的最低检测限为 1300CFU/ml。定量关系式为  $y = -3.381418\ln x + 45.115715$ ,  $R^2 = 0.964878$ 。整个实验 2h 即可完成, 可应用于水产品中沙门氏菌污染状况调查及快速检测。

**关键词:** 实时荧光 PCR; 定量检测; 沙门氏菌; *fimY* 基因; Taqman MGB 探针; 水产品

## Real-time Fluorescent Quantitative PCR Assay of *Salmonella* in Seafood Using Taqman MGB Probe

MA Li-dan<sup>1</sup>, WANG Dian-fu<sup>2</sup>, BA Zhong-hua<sup>1</sup>, LI Chun-li<sup>3</sup>

(1. Dandong Exit-Entry Inspection and Quarentine Bureau, Dandong 118000, China; 2. Department of Animal Science, Eastern Liaoning University, Dandong 118000, China; 3. Yuxi Agriculture Vocation-Technical College, Yuxi 653106, China)

**Abstract:** A real-time fluorescent PCR array using the optimal combination of primer and Taqman MGB probe designed from the *fimY* conserved sequence of *Salmonella* was developed for the rapid and quantitative detection of *Salmonella* in seafood. Totally 24 strains of 14 serotypes of *Salmonella* and its 17 close relatives as well as common foodborne pathogenic bacteria coexisting in a sample were subjected to detection using the method. Results were positive for all *Salmonella* strains and negative for all other species tested with a specificity of 100%. The sensitivity of the method was sufficient to detect 13 CFU/ml of *Salmonella* in pure cultures, 130 CFU/ml of *S. enteritidis* spiked in shell ligament or shigimi meat, and 1300 CFU/ml of *S. enteritidis* spiked in moon snail meat. This method exhibited a quantification regression equation of  $y = -3.381418\ln(x) + 45.115715$ ,  $R^2 = 0.964878$ , and could be completed within 2 h, thereby providing a useful approach for the rapid detection of *Salmonella* in seafood without prior isolation and characterization of strains which are needed in traditional microbiological methods.

**Key words:** real-time fluorescent PCR; quantification; *Salmonella*; *fimY* sequence; Taqman MGB probe; seafood  
中图分类号: TS254.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2009)20-0303-05

沙门氏菌(*Salmonella*)属肠杆菌科, 革兰阴性无芽孢杆菌, 是一种广泛分布于自然界的危害极大的肠道致病菌, 可引起人类的伤寒、副伤寒、感染性腹泻、食物中毒和医院内感染。据世界卫生组织不完全统计, 每年大约有 1600 万病例, 导致死亡约 60 万。自 1880 年 Eberth 在病人的组织中观察到伤寒杆菌以来, 世界各国的微生物学家对沙门氏菌的研究一直持续至今<sup>[1]</sup>。沙门

氏菌引起的沙门氏菌病无论在发达国家还是发展中国家都是最频繁报道的食源性疾病之一。我国 1991~1996 年共报告沙门氏菌食物中毒 731 起, 占食物中毒总数的 9.89%; 中毒人数 39181 人, 占 19.73%; 死亡 40 人, 占 2.44%, 其中中毒起数和人数均居微生物性食物中毒首位<sup>[2-3]</sup>。因此, 寻找快速有效的沙门氏菌检测方法, 对控制由其引起的食源性疾病意义重大。

收稿日期: 2008-07-31

基金项目: 辽宁出入境检验检疫局资助项目(LK43-2007)

作者简介: 麻丽丹(1976—), 女, 工程师, 硕士, 主要从事食品微生物检测研究。E-mail: 2212097@163.com

本研究选取沙门氏菌的 *fimY* 基因为设计目标, 利用引物探针设计软件设计多对引物和 Taqman MGB 探针组合, 并通过在 Genbank 上利用 BLSATN 比对和检测条件实验优化, 以期获得最佳引物探针组合, 并建立检测水产品中沙门氏菌的 PCR 反应体系<sup>[4-5]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

本实验所采用的菌株分别购于美国 ATCC、北京药品生物制品检定所、军事医学科学院流行病研究所以及在实测样品中分离出的菌株。所用菌株的名称、菌种数见表 1。

表1 本实验用菌种及菌株数  
Table 1 Bacterial strains used in this study

株数	菌种	拉丁名	菌号
1	单增李斯特氏菌	<i>L.monocytogenes</i>	ATCC 15313
1	单增李斯特氏菌	<i>L.monocytogenes</i>	样品中分离的菌株
1	金黄色葡萄球菌	<i>S.aureus</i>	ATCC 49444
1	金黄色葡萄球菌	<i>S.aureus</i>	样品中分离的菌株
1	溶藻弧菌	<i>V.alginolyticus</i>	ATCC 17749
1	嗜水气单胞菌	<i>A.hydrophilia</i>	ATCC 7966
1	副溶血性弧菌	<i>V.parahaemolyticus</i>	ATCC 17802
2	副溶血性弧菌	<i>V.parahaemolyticus</i>	样品中分离的菌株
1	拟态弧菌	<i>V.mimicus</i>	样品中分离的菌株
1	创伤弧菌	<i>V.vulnificus</i>	样品中分离的菌株
1	弗尼斯弧菌	<i>V.furnissii</i>	样品中分离的菌株
2	大肠杆菌	<i>E.coli</i>	ATCC 25922
1	肠炎沙门氏菌	<i>S.enteritidis</i>	样品中分离的菌株
2	肠炎沙门氏菌	<i>S.enteritidis</i>	样品中分离的菌株
1	肠炎沙门氏菌	<i>S.enteritidis</i>	ATCC 13076
1	伤寒沙门氏菌	<i>S.typhimurium</i>	50096
1	猪霍乱沙门氏菌	<i>S.cholerae suis</i>	样品中分离的菌株
1	亚利桑那沙门氏菌	<i>S.arizona</i>	ATCC 13314
1	茨昂威沙门氏菌	<i>S.tshiongwe</i>	样品中分离的菌株
1	巴黎沙门氏菌	<i>S.paris</i>	样品中分离的菌株
2	波那雷恩沙门氏菌	<i>S.bonariensis</i>	样品中分离的菌株
2	波那雷恩沙门氏菌	<i>S.bonariensis</i>	样品中分离的菌株
2	火鸡沙门氏菌	<i>S.meleagridis</i>	样品中分离的菌株
1	波茨坦沙门氏菌	<i>S.potsdam</i>	样品中分离的菌株
2	阿贡纳沙门氏菌	<i>S.agona</i>	样品中分离的菌株
1	阿贡纳沙门氏菌	<i>S.agona</i>	样品中分离的菌株
1	鼠伤寒沙门氏菌	<i>S.typhimurium</i>	样品中分离的菌株
1	鼠伤寒沙门氏菌	<i>S.typhimurium</i>	ATCC 49416
1	沙门氏菌	<i>Salmonella</i>	样品中分离的菌株
1	都柏林沙门氏菌	<i>S.dublin</i>	样品中分离的菌株
1	阿巴特图巴沙门氏菌	<i>S.abaetetuba</i>	ATCC 35640
1	阪崎肠杆菌	<i>E.sakazakii</i>	TCC 51329
1	志贺氏菌	<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 12022
1	O1 群霍乱弧菌	<i>V.cholerae</i> O1 group	购自流行病研究所

Taqman GEx 酶预混液 美国应用生物系统公司; 细菌培养基 美国 DB 公司; DNase 酶 美国 Promega 公司。

DNA 提取试剂 1: 称取 0.1g chelex100 粉末, 加入 100ml 灭菌蒸馏水中, 摇匀即可; DNA 提取试剂 2: 购自美国应用生物系统公司, 也可使用宝生物公司生产的商业化 DNA 提取试剂盒。

引物序列: 上游引物 5'-CCGTATGGCTGGGCGTTT-3', 下游引物 5'-AGTACGGCTAAAGCTTTCCGATAAG-3', 探针 5'-FAM-CAGAGGCCAGATTTT-3'(MGB), 3' 端连接 MGB, 探针的 5' 端标记 FAM。由美国应用生物系统公司合成。

高速冷冻离心机; ABI7300 实时荧光 PCR 仪; 紫外可见分光光度计。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 菌株的培养、分离和鉴定

沙门氏菌的制备及增菌培养参照国家标准 GB/T 4789.4—2008 方法进行, 在此略述。

#### 1.2.2 细菌基因组 DNA 提取方法的研究

建立煮沸提取法和试剂盒提取法两种方法提取细菌基因组 DNA, 并以两种方法提取 DNA 分别作为反应模板, 进行实时 PCR 反应。

#### 1.2.3 实时荧光 PCR 反应体系的建立及优化

按照试剂厂家推荐的反应体系, 进行实时荧光 PCR 检测; 通过调整模板 DNA、引物、探针的加入量, 最佳退火温度筛选, 优化实时荧光 PCR 反应体系, 最终建立稳定的实时荧光 PCR 反应程序。

##### 1.2.3.1 反应体系

反应体积为 20  $\mu$ l: 2  $\times$  PCR 酶预混液 10  $\mu$ l、引物对 (18  $\mu$ mol/L) 和探针 (5  $\mu$ mol/L) 共 0.5  $\mu$ l、灭菌双蒸馏水 18.5  $\mu$ l、模板 DNA 1  $\mu$ l。

##### 1.2.3.2 反应条件

95  $^{\circ}$ C 预变性 10min, 95  $^{\circ}$ C 变性 20s, 62  $^{\circ}$ C 退火延伸 1min, 同时收集荧光信号, 进行 40 个循环。

##### 1.2.3.3 结果判断

$C_t$  值  $\geq 40$ , 可判断样品结果为阴性, 可直接报告未检出相应致病菌;  $C_t$  值  $\leq 35.0$ , 可判断该样品结果为阳性;  $35.0 < C_t$  值  $< 40$ , 建议重做样本。重做结果  $C_t$  值  $\geq 40$  者为阴性, 否则为阳性。对于阳性结果, 应参见行标做进一步的生化鉴定和报告。

#### 1.2.4 特异性实验

将所有库存的菌株, 选取有代表性的病原菌, 经过选择性增菌培养后, 提取模板 DNA, 建立模板库, 用相应的荧光 PCR 检测方法检测特异性。

#### 1.2.5 灵敏度实验

取食品病原菌标准菌株于选择性培养基中培养一定时间, 以 OD 值法估其菌数, 将菌液浓度稀释到  $10^{-7}$ ,

取 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 菌液进行平板计数,各稀释度重复3个,按照相应的方法培养后进行菌落计数取平均值确定其真实的菌密度。同时每个稀释液各取1ml菌液于2ml离心管中并作3管重复,用于提取DNA测其 $OD_{260nm}/OD_{280nm}$ 值并进行实时荧光PCR检测,确定反应体系的灵敏度。

### 1.2.6 定量实验

取已知菌液浓度的致病菌标准菌株的DNA进行十倍递增梯度稀释并进行实时荧光PCR检测,确定反应体系的定量线性关系。

### 1.2.7 用于提取DNA的增菌液提DNA之前添加DNase酶实验

取1.2.1节中培养的相应致病菌增菌液1ml于2ml离心管中;以13000r/min离心3min,吸弃上清液;然后加入DNase酶10U,10×DNase缓冲液100μl,灭菌蒸馏水890μl,振荡混匀并置36℃孵育30min后加入反应终止液10μl,最后在65℃保温10min以终止酶活性。再以13000r/min离心3min,吸弃上清液,加入100μl DNA提取液;混匀后沸水浴10min,13000r/min离心3min;取上清液到1.5ml离心管中保存于-20℃备用。

### 1.2.8 水产品中添加沙门氏菌的灵敏度实验

选用已经确认沙门氏菌均为阴性的江瑶贝、蚬子肉和香螺肉,分别取10g样品加入100ml增菌液中同时添加已知菌浓度的沙门氏菌,均质后取1ml均质液的3个重复提取DNA,用于灵敏度实验,确定水产品中添加沙门氏菌的灵敏度。同时取阴性样品均质液1ml提DNA用于PCR检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 细菌基因组DNA提取方法建立:沸提取法和试剂盒提取法

比较了DNA提取试剂1和DNA提取试剂2,结果发现用DNA提取试剂1提取的DNA容易出现非特异性扩增, $C_t$ 值在37~40之间,说明提取的DNA纯度不高,而用DNA提取试剂2则没有这种现象,因此本研究采用DNA提取试剂2进行DNA的提取。也可采用宝生物工程(大连)有限公司生产的DNA提取试剂盒(货号DV810A)并按其操作说明进行。

### 2.2 实时荧光PCR实验结果

#### 2.2.1 引物探针组合筛选

到目前为止,用PCR法检测沙门氏菌所采用的基因有:*agfA*、*fimA*、*hin*、*H-li*、*iagAB*、*IS200*、*invA*、*iroB*、*mkfA*、*ompC*、*oriC*、*spvR*以及*viaB*等基因。但是采用这些基因一般都存在一些问题,例如采用IS200会产生假阳性,可以扩增志贺氏菌等,采用*invA*

基因则既可造成假阳性也可以造成假阴性,漏检圣保罗沙门氏菌、利齐菲尔德沙门氏菌,而且它还会扩增一些大肠杆菌,造成假阳性。另外,上述有些基因只适用于检测某些沙门氏菌,而非沙门氏菌属,显然也不应采用。根据沙门氏菌*fimY*基因序列与Genbank等网络数据库中登录的所有物种核苷酸序列进行比对的结果,以及生物信息学方法证明,该基因在沙门氏菌内高度保守,而相对于其他物种则具有高度特异性。结合文献研究成果,以*fimY*基因为设计目标,设计的引物探针经BLAST验证具有高度保守性,特异性强,作为本方法中的引物和探针。它们在沙门氏菌*fimY*基因上的排列情况如图1所示。

1	atgcgcagcg	taccatgcag	ggaaagacac	cgccgtttaa	gaaatgccaa	agactgcgcc
61	tgccgttatt	actctccaac	gccgcagata	tttgatgcc	ttgagtact	gaaccaacag
121	ctaaattatg	ccttgccggt	tggtatcatt	tctcaggcaa	taattacaac	tgataactac
181	ctcgctatt	cattgagta	ctactattt	tccgaaac	gtaccgcage	attccgctca
241	ttgatgaca	tttctttgtg	gattgaaaag	gggtcgctca	gacaactgat	tgtagatatg
301	gagacgtac	ctgtctcctg	tattgaggcg	cttaaccagc	tacacgcgct	cagttggcaa
361	caaagcgata	tcagatttta	cctgctgcta	tcagataaaa	cccccgctat	agctcagttt
421	atccgtatgg	ctggcgcttt	tttgcctg	tcgcagcac	aaaatctggc	ctctgtacgc
481	gaagcctgtg	tatcagccgc	cgaacctcgc	ttatcggaac	gcttagcgcc	tactgactgg
541	ttgatgattg	aaactttagc	gcaaggtgcc	tccttaaaag	aaatagcacg	tcagcaaaag
601	gtacctatc	atcgtgtggt	ttaccggctt	aaacaactta	tcacctcctc	taaccttccc
661	cacagcgaac	gctttcttcg	gctgatccag	cagctaaacg	ttactttcca	cgacattttt
721	taa					

图1 引物和探针在伤寒沙门氏菌*fimY*基因(基因库序列号为AE014613)上的排列

Fig.1 Primers and probe sequences in the *S.typhimurium fimY* gene (Genbank Acc.no.AE014613)

### 2.2.2 反应体系的优化

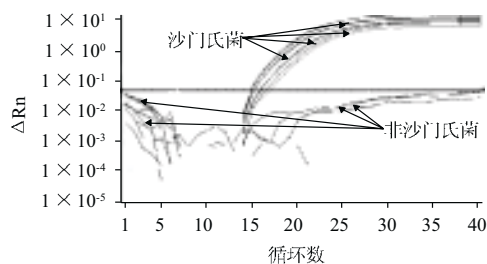


图2 沙门氏菌反应体系优化扩增曲线

Fig.2 Optimized amplification curve for *Salmonella* quantification

经过优化实验,反应体积为20μl:2×PCR酶预混液10μl、引物对(18μmol/L)和探针(5μmol/L)共0.5μl、灭菌双蒸水18.5μl、模板DNA1μl。反应条件为95℃预变性10min,95℃变性20s,62℃退火延伸1min,同时收集FAM荧光信号,共进行40个循环。优化结果见图2。图中横坐标是扩增反应循环数,纵坐标是荧光

报告基团的荧光发射强度与参比染料的荧光发射强度的比值扣除基线后得到的标准化结果,即相对荧光信号强度。从图中可以看出,所有沙门氏菌都能被有效扩增,所有非沙门氏菌均没有扩增。

### 2.2.3 特异性实验

用本研究设计的引物和探针对24株共14种血清型沙门氏菌和17株与沙门氏菌亲缘关系比较近以及在样品中能同时存在的常见食源性致病菌菌株进行PCR扩增,扩增结果显示:所有的沙门氏菌菌株结果均为阳性,而非沙门氏菌菌株检测结果均为阴性,反应特异性为100%。特异性实验结果见图3。

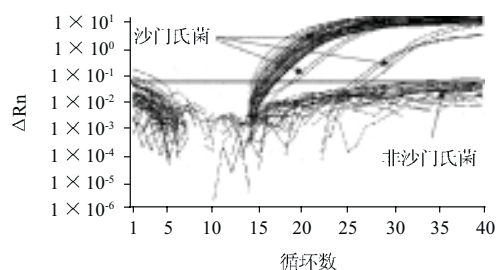


图3 沙门氏菌特异性实验扩增曲线

Fig.3 Specificity determination for *Salmonella* quantification

### 2.2.4 灵敏度实验和定量实验结果

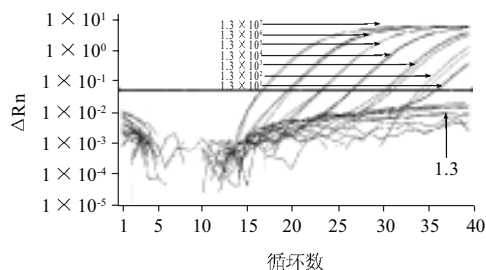


图4 沙门氏菌灵敏度实验扩增结果

Fig.4 Sensitivity determination for *Salmonella* quantification

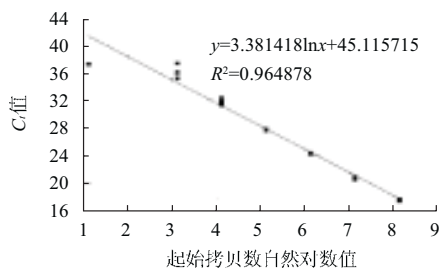


图5 沙门氏菌定量实验结果

Fig.5 Regression curve for *Salmonella* quantification

采用肠炎沙门氏菌(ATCC 13076;  $1.3 \times 10^8$  CFU/ml)进行灵敏度和定量实验研究,荧光PCR可检测出至  $10^{-7}$ , 对

应的菌落数为13CFU/ml, DNA浓度为7pg。定量关系式为:  $y = -3.381418 \ln x + 45.115715$ ,  $R^2 = 0.964878$ , 式中  $x$  表示肠炎沙门氏菌起始拷贝数,  $y$  表示  $C_t$  值。

灵敏度实验结果和定量实验结果见下图4和图5。

### 2.2.5 用于提取DNA的增菌液提DNA之前添加DNase酶实验

根据一些文献报道,提DNA之前在增菌液中添加DNase酶可以破坏死菌的DNA而对活菌没有任何影响,从而可以区分死菌和活菌。本研究采用肠炎沙门氏菌(ATCC 13076;  $1.3 \times 10^8$  CFU/ml)进行DNase酶实验研究,取1ml增菌液直接提取DNA作为对照实验,同时取1ml增菌液添加DNase酶处理后再提取DNA进行实验。结果发现用DNase酶处理的增菌液DNA反而具有更高的DNA浓度和更低的  $C_t$  值,结果见表2。

表2 提取DNA前用DNase酶处理增菌液实验结果  
Table 2 Effectiveness of DNase in elimination of nonviable *Salmonella* cells prior to DNA extraction

菌株	处理	菌落数(CFU/ml)	$C_t$ 值
肠炎沙门氏菌	未处理	$1.3 \times 10^8$	16.64; 16.63; 16.87
(ATCC13076)	DNase酶处理	$2.2 \times 10^8$	16.17; 16.03; 16.08

### 2.2.6 香螺、江瑶贝和蚬子肉中添加肠炎沙门氏菌的灵敏度实验结果

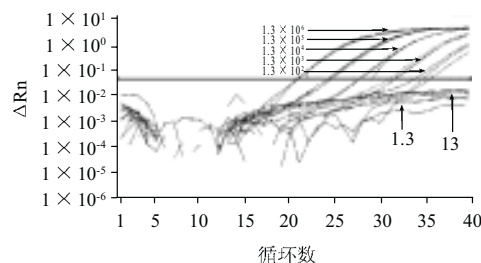


图6 江瑶贝中添加肠炎沙门氏菌灵敏度实验扩增结果

Fig.6 Sensitivity determination for shell ligament spiked with *S. enteritidis*

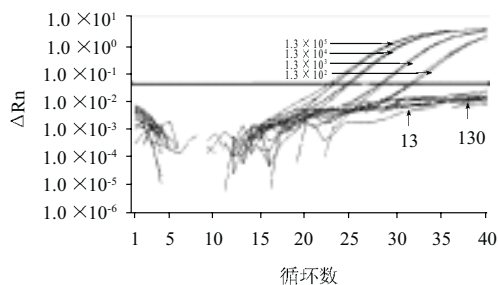


图7 香螺肉中添加肠炎沙门氏菌灵敏度实验扩增结果

Fig.7 Sensitivity determination for moon snail meat spiked with *S. enteritidis*

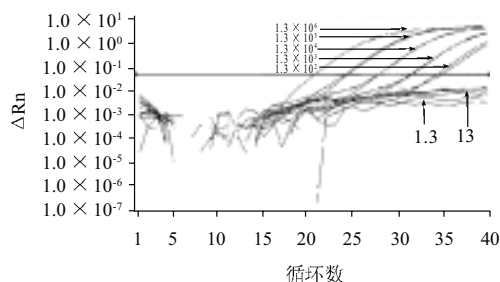


图8 蚬子肉中添加肠炎沙门氏菌灵敏度实验扩增结果  
Fig.8 Sensitivity determination for shigimi meat spiked with *S. enteritidis*

从下面的三个图可以看出, 香螺中添加肠炎沙门氏菌荧光PCR可检测出至 $10^5$ , 对应的菌落数为1300CFU/ml; 江瑶贝和蚬子肉中添加肠炎沙门氏菌荧光PCR可检测出至 $10^5$ , 对应的菌落数为130CFU/ml。

### 3 结论与讨论

在Taqman MGB探针技术的基础上, 建立了实时PCR检测沙门氏菌的方法。研究表明: 该方法特异性强, 与对照组17种细菌均无交叉反应, 即类似的肠道致病菌均呈阴性; 此方法灵敏度高, 纯菌最低检测低限为13CFU/ml, 样品江瑶贝和蚬子肉中添加肠炎沙门氏菌的最低检测低限为130CFU/ml; 香螺肉中添加肠炎沙门氏菌的最低检测低限为1300CFU/ml; 定量关系式为:  $y = -3.381418 \ln x + 45.115715$ ,  $R^2 = 0.964878$ ; 通过添加DNase酶处理, 结果发现用DNase酶处理的增菌液DNA反而具有更高的DNA浓度和更低的 $C_i$ 值, 因此进行定量实验时不建议使用DNase酶处理; 建立了煮

沸提取法提取DNA, 整个PCR实验2h即可完成。可见本反应体系快速、灵敏度高、特异性强, 能提高沙门氏菌的检出率和准确性, 可应用于水产品中沙门氏菌污染状况调查及食物中毒的快速检测。

Taqman MGB探针是在Taqman探针基础上提出的一种新型分子探针, 它的荧光淬灭基团是一种基本无荧光本底的小沟结合物, 降低了本底, 可以用较短的探针达到更好地分辨效果, 增加了对指定目标检测的可靠性, 可以更好的实现多重实时PCR检测多种致病菌。本研究的研制成功及推广应用对提高进出口水产品中沙门氏菌的检测效率、降低检测成本和提升我国进出口水产品检验检疫水平都具有十分重要的意义。同时, 所建立的方法还可以应用于食品中沙门氏菌的监测和快速检测, 具有巨大的经济和社会效益<sup>[6]</sup>。

### 参考文献:

- [1] 曹陈娟. 食品微生物学与现代检测技术[M]. 大连: 辽宁师范大学出版社, 2006: 150-154; 258.
- [2] 吴斌. 畜产品中沙门氏菌的风险评估[J]. 大连轻工业学院学报, 2004, 23(3): 226-228.
- [3] 裴晓燕. 食源性致病菌定量检测方法研究进展[J]. 国外医学卫生学分册, 2004, 31(5): 257-264.
- [4] HEID C A, STEVENS J, LIVAK K J, et al. Real time quantitative PCR[J]. Genome Res, 1996, 6: 986-994.
- [5] YEH K S, CHEN T H, LIAO C W, et al. PCR amplification of the *Salmonella typhimurium fimY* gene sequence to detect the *Salmonella* species[J]. International Journal of Food Microbiology, 2002, 78: 227-234.
- [6] MALORNY B, HOORFAR J, BUNGE C, et al. Multicenter validation of the analytical accuracy of *salmonella* PCR: towards an International Standard[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(1): 290-296.