

基于双启动寡聚核苷酸引物的沙门菌、志贺菌、弯曲杆菌、耶尔森菌多重实时荧光 PCR 方法的建立^{*}

梁 红, 李 明, 贾 昕, 许军强(华美生物工程有限公司, 河南洛阳 471003)

【摘要】 目的 建立多重实时荧光 PCR 同时检测沙门菌、志贺菌、弯曲杆菌、耶尔森菌的方法。**方法** 通过设计针对沙门菌、志贺菌、弯曲杆菌和耶尔森菌的双寡聚核苷酸引物, 来建立这 4 种病原体的多重 PCR 检测体系。**结果** 建立的多重 PCR 体系可同时特异性扩增 4 种病原体的 DNA 片段。沙门菌和弯曲杆菌的特异性和敏感度都是 100.0%, 志贺菌和耶尔森菌的敏感度是 100.0%, 特异性分别是 99.3% 和 98.6%。最低检测限均为 10^3 copies/mL。**结论** 该体系可快速、有效、准确检测出样品中 4 种病原体的存在, 可用于肠胃道相关病原体感染的辅助评价。

【关键词】 多重实时荧光 PCR; 沙门菌; 志贺菌; 弯曲杆菌; 耶尔森菌

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.20.011 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)20-2997-03

Establishment of multiplex real-time fluorescence PCR for *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* and *Yersinia enterocolitica* basing on dual priming oligonucleotide system* LIANG Hong, LI Ming, JIA Xin, XU Jun-qiang (Sino-American Biotechnology Co., Ltd., Luoyang, He'nan 471003, China)

【Abstract】 Objective To establish a multiplex real-time fluorescence PCR assay for simultaneously detecting *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* and *Yersinia enterocolitica*. **Methods** Dual priming oligonucleotide (DPO) was designed for these four pathogens. A multiplex RT-PCR assay system was developed using DPO primers. **Results** The specific DNA fragments of 4 kinds of pathogen were amplified simultaneously and specifically by this established PCR assay system. The specificity and sensitivity of the assay for detecting *Salmonella* and *Campylobacter* all were 100.0%, the sensitivities for detecting *Shigella* and *Yersinia enterocolitica* were 100.0% and the specificities were 99.3% and 98.6% respectively. The limit of detection (LOD) was 10^3 copies/mL. **Conclusion** This multiplex RT-PCR system can detect the existence of these four kinds of pathogen rapidly, effectively and accurately and can be used the auxiliary evaluation of gastrointestinal related pathogen infection.

【Key words】 multiplex real-time PCR; *Salmonella*; *Shigella*; *Campylobacter*; *Yersinia enterocolitica*

沙门菌、志贺菌、弯曲杆菌、耶尔森菌是感染性腹泻的常见致病菌, 可导致细菌性痢疾、食物中毒、伤寒等肠道传染病^[1-2]。在我国, 70%~80% 细菌性食物中毒是由沙门菌引起的^[3]。志贺菌是细菌性痢疾的主要病原体, 人群普遍易感, 全球每年约有 100 万人死于此病, 在我国的发病率一直处于较高水平, 尤其以婴儿和儿童更为易感^[4-5]。弯曲杆菌广泛分布于自然界, 可通过食物、水传播, 其感染率近些年来在世界各地呈普遍上升趋势, 在一些发达国家, 弯曲杆菌感染引起的腹泻甚至超过了沙门菌和志贺菌, 成为最常见的腹泻致病菌^[6]。耶尔森菌是人兽共患性细菌, 也是一种危害严重的食源性致病菌, 在发达国家和发展中国家都有非常高的流行性。因此, 建立快速、经济、灵敏、特异的检测方法对于疾病的防治具有十分重要的意义。

多重 PCR 技术是在常规 PCR 技术的基础上发展的新型技术, 可在同一体系同时扩增多个病原体核酸片段。目前国内对外对病原体的研究已广泛采用多重 PCR 方法^[7-9], 相较于常规的培养法、血清学方法, 它更加方便、灵敏、省时, 但国内研究中并未见这 4 种病原体同时检测的报道。本研究建立同时检测沙门菌、志贺菌、弯曲杆菌、耶尔森菌的多重 PCR 方法, 采用实

时荧光 TaqMan 探针和双启动寡聚核苷酸 (DPO) 技术, 有效提高扩增的特异性和扩增效率, 结果判断实时、安全, 达到快速准确同时检测沙门菌、志贺菌、弯曲杆菌、耶尔森菌的目的, 对于胃肠道菌群的鉴别检测具有很好的实用价值。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 沙门菌、志贺菌、空肠弯曲菌、小肠结肠炎耶尔森菌、乳酸杆菌和双歧杆菌来自美国典型菌种保存中心 (ATCC)。

1.2 标本来源 145 份临床标本来源于郑州大学第一附属医院和河南科技大学第一附属医院。

1.3 仪器与试剂 细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自 Qiagen 公司 (QIAamp DNA Stool Kit); 分子生物学试剂、Taq DNA 聚合酶、dNTP 由华美生物工程有限公司提供; 引物、探针由上海 Invitrogen 公司合成; PCR 产物纯化试剂盒和 T-A 克隆试剂盒购自大连 Takara 公司; 培养基购自英国 Oxoid 公司。ABI 7500 荧光定量 PCR 仪购自美国 Lifetechnology 公司。

1.4 方法

1.4.1 DPO 引物和 Taqman 探针的设计 本体系中需同时检测 4 段目的基因, 若采用普通引物, 引物间极易形成二聚体,

* 基金项目: 河南省洛阳市科技发展计划项目 (1301068A)。

作者简介: 梁红, 女, 本科, 高级工程师, 主要从事分子诊断研究。

特异性低,且体系不易调配至适合所有目的基因的扩增。故本体系将采用退火温度范围宽且特异性强的 DPO 引物。检索 GenBank 中相关基因序列,做同源性对比后,最终选择在以下基因中选择各病原体的靶序列,见表 1。并根据 Chun 等^[9]来设计 DPO 引物,先确定短 3'端,长度为 6~15 bp,GC 水平为 40%~80%,反向延伸 18~25 bp 为其 5'端,Tm>65℃。在其中序列设计出相应的 Taqman 探针,并以不同荧光标记区分,序列见表 2。

表 2 DPO 引物和探针设计结果

病原体	碱基序列(5'~3')	荧光通道	片段大小(bp)
沙门菌	上游引物:CGTGAAGGTAGTCAGGAAGT IIIII CACGAAT	CY5	120
	下游引物:TTGTTATCCACCACCACAAT IIIII GCCATCTT		
	探针:GTCTGTGCAACCATTGCGATA		
志贺菌	上游引物:CTGGGCGCGGCAGAAGA IIIII GCAGAAG	ROX	139
	下游引物:TAAATCTGCTGTTCAGTCTCA IIIII CGCATCAC		
	探针:GAGGGTGGCTGACCGGCT		
弯曲杆菌	上游引物:TCAATCGTGGTTCAGGT IIIII GGAAGTG	FAM	114
	下游引物:TACAACATTTTGCATATCAGGA IIIII CGAATCTTG		
	探针:ATTTCTCAACTTAATGA		
耶尔森菌	上游引物:CAATTGCGTCTGTTAATGTGTA IIIII TGCCGAAGG	VIC	196
	下游引物:ATAAGTTTGAATCCGTCAAC IIIII AGATTCCTC		
	探针:GATATGCTCAAAGTCGTGTC		

1.4.2 质粒标准品的构建 将已知阳性目的菌培养物用细菌 DNA 提取试剂提取 DNA,并以其为模板进行常规 PCR 扩增,产物用 PCR 产物纯化试剂盒和 T-A 克隆试剂盒分别回收目的扩增片段,并将其克隆入 pMD19-T 载体中,转化于大肠杆菌 JM109 感受态细胞中,培养后收集菌体,碱变性法提取质粒,然后由上海 Invitrogen 公司测序。

1.4.3 样本的制备 培养物:将培养物转移至生理盐水中,5 000 r/mim 离心 10 min,弃上清液后溶解于 200 μL 生理盐水中,按 DNA 提取试剂盒说明书步骤提取 DNA。临床标本:收集的粪便标本置-20℃保存待用。处理及 DNA 提取均按核酸提取试剂盒说明书步骤进行。收集洗脱体积为 50 μL,10 μL 用于 PCR 扩增。

1.4.4 PCR 扩增体系设定 PCR 扩增试剂采用一步法预混试剂,反应体系共 25 μL,包括:2×PCR Buffer 12.5 μL(20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 100 mmol/L KCl, 6 mmol/L MgCl₂, 0.002%明胶,400 μmol/L dNTPs),5 μmol/L 各引物探针混合物 1.5 μL,2 U Taq DNA 聚合酶 1.0 μL,待测样品 10 μL。PCR 反应条件:95℃预变性 10 min,40 个循环步骤包括 95℃变性 8 s,60℃退火和延伸 34 s。

1.4.5 结果判定 反应结束后,根据荧光图谱确定各目的基因的基线和阈值,所有阴性对照曲线低于阈值线,样本扩增曲线与阈值线的交叉值记录样本的 Ct 值,若反应曲线呈对数增长,而且 Ct<33,则表明为阳性,否则判为阴性。

2 结 果

2.1 特异性

2.1.1 引物和探针 引物与探针经过 BLAST 检索,具有针对病原体唯一性。

表 1 各病原体引物的靶基因

病原体	靶基因
沙门菌	tetrathionate subunit B(ttr B) gene
志贺菌	invasion plasmid antigen H gene
弯曲杆菌	membrane protein gene
耶尔森菌	attachment invasion locus(ail) protein gene

2.1.2 培养物检测 (1)将肠道正常菌群(乳酸杆菌、双歧杆菌)培养物(4 种目标菌阴性)进行特异性评价,用本体系引物探针分析,均无荧光扩增信号(图 1)。显示特异性良好。(2)分别采用已知沙门菌、志贺菌、空肠弯曲菌或小肠结肠炎耶尔森菌阳性的培养物材料进行分析,扩增显示单一条带,所有阳性结果符合(图 2)。(3)将 4 种菌培养产物随机 2 种、3 种等量混合,取样品抽提 DNA 后,用本体系引物探针分析,所有阳性、阴性符合(图 3、4)。(4)将 4 种菌培养产物等量混合,取样品抽提 DNA 后,用本体系引物探针分析,所有阳性符合,显示 4 条荧光扩增信号,且曲线形态标准、平滑(图 5)。

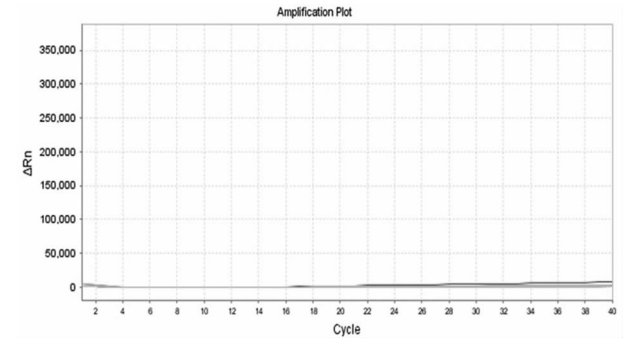


图 1 阴性样本检测荧光图谱

表 3 质粒最低检出量(Ct)

病原体	10 ⁶ copies/mL	10 ⁵ copies/mL	10 ⁴ copies/mL	10 ³ copies/mL
沙门菌	22.46	25.74	29.18	32.20
志贺菌	22.69	25.94	29.31	32.53
弯曲杆菌	22.67	25.47	28.82	32.46
耶尔森菌	23.01	25.79	28.87	33.05

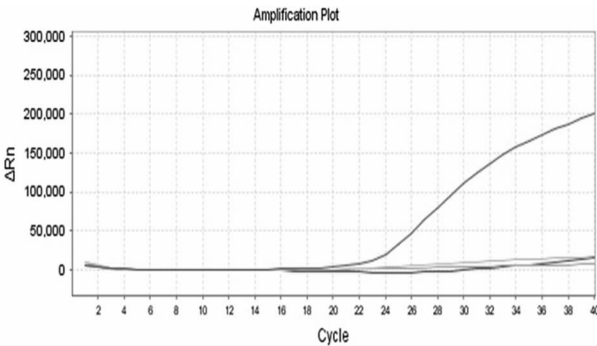


图 2 弯曲杆菌样本检测荧光图谱

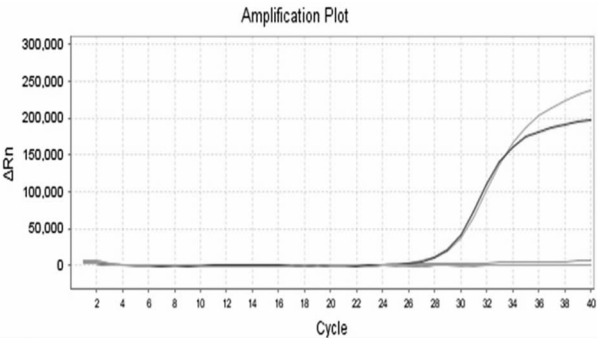


图 3 弯曲杆菌和沙门菌混合样本检测荧光图谱

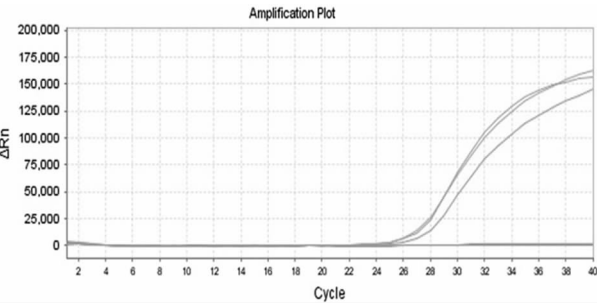


图 4 沙门菌、志贺菌、耶尔森菌混合样本检测荧光图谱

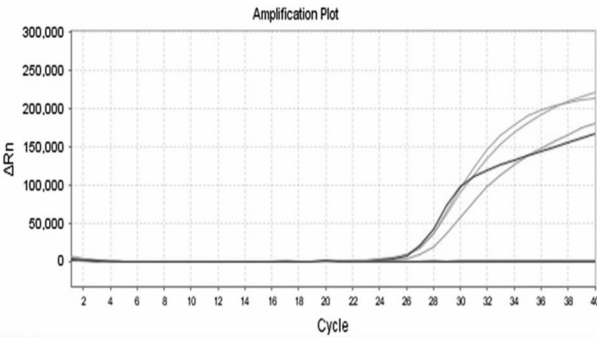


图 5 4 种病原体混合样品检测荧光图谱

2.2 灵敏度 最低检出量采用已知浓度质粒 DNA 进行梯度稀释($10^2\sim10^9$ copies/mL)来确定,检测最低 4 个稀释度重复 10 次,最低检出量均为 10^3 copies/mL,见表 3。

2.3 标准曲线 多重 PCR 体系检测标准品质粒稀释度线性范围 $10^3\sim10^6$ copies/mL。 $r^2>0.97$,重复性好,各项参数均在偏差范围内。各质粒标准曲线参数见表 4。

2.4 临床标本检测 145 份临床标本分别用培养法和多重实时荧光 PCR 法进行检测,沙门菌和弯曲杆菌的特异性和敏感度都是 100.0%,志贺菌和耶尔森菌的敏感度是 100.0%,特异性分别是 99.3%和 98.6%。

表 4 各病原体质粒标准曲线参数

病原体	Slope 斜率	Y-inter 截距	r^2	Eff%扩增效率
沙门菌	-3.095	38.001	0.996	110.452
志贺菌	-3.339	41.832	0.991	99.272
耶尔森菌	-2.945	41.298	0.970	108.577
弯曲杆菌	-3.088	40.904	0.993	110.787

3 讨 论

细菌性肠胃炎是临床最常见的疾病,每年夏、秋季是其发作的高峰期,由于温度、湿度大,食物易腐败、变质,导致细菌极易欺辱肠胃,临床表现多为恶心、呕吐、腹痛、腹泻、发热等。临床鉴别是哪种细菌感染需做细菌培养、生化检测、血清鉴定等,至少需 24 h 才能得到结果。而多重实时荧光 PCR 可实现一管多检,可缩短检测时间至 3 h,大大提高了检测效率。但多重 PCR 体系中难以克服的问题是,多引物间会形成二聚体,与单重 PCR 相比,引物与模板的错配概率大大增加。双启动寡核苷酸技术是将 PCR 引物分为两段独立的特异性区域,中间由寡聚次黄嘌呤碱基进行桥接,增强了引物间的兼容性,减少非特异性,能有效地提高 PCR 反应的敏感度与特异性,还可极大提高扩增效率^[10]。

本研究所建立的多重实时荧光 PCR 体系,4 种细菌质粒的最低检测限为 10^3 copies/mL;扩增效率为 99%~110%;回归系数接近 1.00;相较于同类方法文献[11-12]数据一致,结果可靠。特定细菌组合检测未有非特异性结果产生;经临床标本验证,与金标准培养法相比,沙门菌和弯曲杆菌检测的特异性都为 100.0%,志贺菌为 99.3%,耶尔森菌为 98.6%,阳性检出率高于培养法,灵敏度为 100.0%。该方法的优势在于它不同于常规 PCR 扩增,不需要进行反应后凝胶电泳分析,在反应进行中即可通过特定标记荧光值实时监测反应情况,可避免开管检测,有效降低污染风险;同时敏感度高、特异性好、检测耗时短的特点,使得操作更加简便、直观、安全、可靠。该方法的应用将有助于临床上快速鉴别特定细菌感染,进行针对性防治,使得其临床应用前景十分广阔,为多重实时荧光 PCR 方法在细菌性肠胃炎检测的商品化奠定了良好的基础。

参考文献

[1] Gascón J. Epidemiology, etiology and pathophysiology of traveler's diarrhea[J]. Digestion, 2006, 73(Suppl 1): 102-108.

[2] Gadewar S, Fasano A. Current concepts in the evaluation, diagnosis and management of acute infectious diarrhea [J]. Curr Opin Pharmacol, 2005, 5(6): 559-565.

[3] 曾晓芳. 畜产品中沙门氏菌污染的检测与控制[J]. 四川畜牧兽医, 2003, 30(4): 28-29.

[4] Zuckerman JN, Rombo L, Fisch A. The true burden and risk of cholera; implications for prevention and control [J]. Lancet Infect Dis, 2007, 7(8): 521-530.

[5] Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, et al. Global burden of Shigella infections; implications for vaccine development and implementation of control strategies [J]. Bull World Health Organ, 1999, 77(8): 651-666.

[6] Robort VT. Incidence, trends and source(下转第 3002 页)

血管内膜损伤,改善基底膜胶原蛋白的生物合成。本研究中,治疗组与对照组治疗后的 Cr 与 BUN 水平均明显降低($P<0.05$),同时治疗后治疗组的 Cr 与 BUN 水平明显低于对照组($P<0.05$),说明了羟苯磺酸钙可降低糖尿病肾病的慢性肾功能不全的 Cr 与 BUN 水平,其作用机制尚需进一步研究。同时治疗后治疗组的血清 ET 水平明显降低,NO 水平明显升高($P<0.05$),与治疗后对照组对比差异也有统计学意义($P<0.05$),表明羟苯磺酸钙可能通过促进血管内皮细胞合成或释放 NO 合成实现对肾脏的保护作用,也可能与羟苯磺酸钙降低血清 ET 水平有关,因为 ET 与 NO 二者相互制约。

维生素 D 是一种脂溶性维生素,在肝脏中转化为 25-羟基维生素 D,在肾脏进一步羟化成为 1,25-羟基维生素 D,通过活性形式 1,25-羟基维生素 D 发挥其生物学功能^[15]。研究显示维生素 D 的基因多态性与 2 型糖尿病有关,维生素 D 可以通过调节胰岛 B 细胞内的维生素 D 受体以及胰腺组织中的维生素 D 来源的钙结合蛋白促进 B 细胞合成和分泌胰岛素^[16]。本研究中,治疗后两组的血清 25-羟基维生素 D 表达明显增加($P<0.05$),同时治疗后治疗组的血清 25-羟基维生素 D 表达明显高于对照组($P<0.05$)。

综上所述,羟苯磺酸钙在糖尿病肾病患者中的应用可能通过纠正 ET 与 NO 表达紊乱,提升血清 25-羟基维生素 D 表达的作用来减轻肾脏损伤,从而有效发挥治疗作用。

参考文献

- [1] 康辉,马丹,李岩. 羟苯磺酸钙治疗早期糖尿病肾病的临床观察[J]. 中国现代药物应用,2014,8(1):143-144.
- [2] 康辉,李岩. 前列地尔联合羟苯磺酸钙治疗慢性肾衰竭的疗效观察[J]. 中国民康医学,2014,26(2):45-47.
- [3] Zhang XL, Guo YF, Song ZX, et al. Vitamin D prevents podocyte injury via regulation of macrophage M1/M2 phenotype in diabetic nephropathy Rats[J]. Endocrinology, 2014, 155(12):4939-4950.
- [4] 朱圣群,陈接强,骆丞. 羟苯磺酸钙联合贝那普利治疗早期糖尿病肾病的疗效与安全性[J]. 中国临床药理学杂志,2014,7(12):565-567.
- [5] 孙晓茹. 糖尿病肾病患者血清 25-羟基维生素 D 和 C-反应蛋白变化及意义[J]. 中国实用医刊,2014,41(21):52-54.
- [6] 赵颖. 羟苯磺酸钙联合激光治疗对糖尿病视网膜病患者血管内皮生长因子和胰岛素样生长因子-1 的影响[J]. 中国基层医药,2014,20(7):3131-3133.
- [7] Koh GY, Whitley EM, Mancosky K, et al. Dietary resistant starch prevents urinary excretion of vitamin D metabolites and maintains circulating 25-hydroxycholecalciferol concentrations in Zucker diabetic fatty rats[J]. J Nutr, 2014, 144(11):1667-1673.
- [8] 王玉林,杨自君,王刘伟,等. 缬沙坦联合舒洛地特对糖尿病肾病的疗效观察[J]. 中国实用医刊,2014,41(10):41-42.
- [9] Zhang X. Therapeutic effects of calcium dobesilate on diabetic nephropathy mediated through reduction of expression of PAI-1[J]. Exp Ther Med, 2013, 5(1):295-299.
- [10] 李立定,周华丽,王鹏. 羟苯磺酸钙联合川芎嗪对糖尿病视网膜病变患者脂质过氧化物及超氧化物歧化酶的影响[J]. 医学综述,2014,20(4):747-749.
- [11] 虞艳红,郑卫华,马特安. 羟苯磺酸钙对维持性腹膜透析患者微炎症状态的影响[J]. 医学研究杂志,2014,43(6):147-149.
- [12] Song Z, Guo Y, Zhou M, et al. The PI3K/p-Akt signaling pathway participates in calcitriol ameliorating podocyte injury in DN rats[J]. Metabolism, 2014, 63(10):1324-1333.
- [13] 范乐平,林静娜. 维生素 D 与糖尿病肾病的研究进展[J]. 转化医学杂志,2014,3(1):59-62.
- [14] 宋志霞,郭银凤,周敏,等. 活性维生素 D 对糖尿病肾病大鼠足细胞损伤的抑制作用及其机制研究[J]. 中华肾脏病杂志,2014,30(10):777-783.
- [15] Zhang X, Song Z, Guo Y, et al. The novel role of TRPC6 in vitamin D ameliorating podocyte injury in STZ-induced diabetic rats[J]. Mol Cell Biochem, 2015, 399(11):155-165.
- [16] 张伟,张浩,易斌,等. 维生素 D 核受体在糖尿病肾病中的保护作用[J]. 中华肾脏病杂志,2014,30(4):313-317.

(收稿日期:2015-01-25 修回日期:2015-04-26)

(上接第 2999 页)

- of campylobacteriosis in developed countries[M]. Geneva:WHO,2000:42-43.
- [7] Liu J, Gratz J, Maro A, et al. Simultaneous detection of six diarrhea-causing bacterial pathogens with an in-house PCR-luminex assay[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(1):98-103.
- [8] Cunningham SA, Sloan LM, Nyre LM, et al. Three-hour molecular detection of Campylobacter, Salmonella, Yersinia, and Shigella species in feces with accuracy as high as that of culture[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(8):2929-2933.
- [9] Chun JY, Kim KJ, Hwang IT, et al. Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene[J]. Nucle-

ic Acids Res, 2007, 35(6):e40.

- [10] Horii T, Ohtsuka H, Osaki M, et al. Use of a dual priming oligonucleotide system to detect multiple sexually transmitted pathogens in clinical specimens[J]. Lett Appl Microbiol, 2009, 49(1):46-52.
- [11] Barletta F, Mercado EH, Luque A, et al. Multiplex real-time PCR for detection of Campylobacter, Salmonella, and Shigella[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(9):2822-2829.
- [12] Buchan BW, Olson WJ, Pezewski M, et al. Clinical evaluation of a real-time PCR assay for the identification of Salmonella, Shigella, Campylobacter (C. jejuni and C. coli), and Shiga toxin producing E. coli in stool specimens[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(12):4001-4007.

(收稿日期:2015-02-15 修回日期:2015-05-05)