

## 实时荧光 PCR 同时检测金黄色葡萄球菌和大肠杆菌 O157:H7

吴海娟<sup>1</sup>, 扈庆华<sup>2</sup>, 李庆阁<sup>3</sup>, 石晓路<sup>2</sup>, 兰全学<sup>2</sup>, 刘涛<sup>2</sup>, 林一曼<sup>2</sup>

**摘要:** **目的** 建立改良分子信标-双重实时荧光 PCR 同时检测金黄色葡萄球菌和大肠杆菌 O157:H7, 应用于细菌性食物中毒的快速诊断。 **方法** 根据 GeneBank 公布的金黄色葡萄球菌 *nuc* 基因序列和大肠杆菌 O157:H7 *rfbE* 基因序列, 设计引物和改良分子信标探针, 建立改良分子信标-双重实时 PCR 检测体系。 **结果** 双重荧光 PCR 反应体系检测 151 株金黄色葡萄球菌和 27 株大肠杆菌 O157:H7, 均出现特异的荧光信号, 两种细菌检测互不干扰。对 8762 份大便、食品等标本进行检测, 315 份标本金黄色葡萄球菌实时荧光 PCR 阳性, 其中 286 份金黄色葡萄球菌培养阳性, 31 份标本大肠杆菌 O157:H7 实时荧光 PCR 阳性, 其中 26 份大肠杆菌 O157:H7 培养阳性。从样品处理到检测结果仅需要时间 2h~1d。 **结论** 改良分子信标-多重实时荧光 PCR 检测体系快速、灵敏度高、特异性强, 可用于金黄色葡萄球菌和大肠杆菌 O157:H7 食物中毒的快速诊断和肠道传染病的初筛, 为食源性疾病的分子流行病学调查提供新的检测手段。

**关键词:** 金黄色葡萄球菌; 大肠杆菌 O157:H7; 荧光 PCR; 同步检测

**中图分类号:** R378 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-9727(2009)5-814-02

**The development of modified molecular beacon real-time PCR assay for rapid detection of *Staphylococcus aureus* and *E.coli* O157: H7.** WU Hai-juan, HU Qing-hua, LI Qing-ge, et al. (1. Buji Health Care Service Center, Longgang District, Shenzhen 518112 Guangdong, P. R. China; Corresponding author: HU Qing-hua, E-mail: huqinghua03@163.com)

**Abstract: Objective** To develop modified molecular beacon real-time PCR assay for the simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and *E.coli* O157:H7. The method would be applied to the rapid diagnosis of *Staphylococcus aureus* and *E.coli* O157:H7 in food poisoning. **Methods** Based on the sequences of *nuc* gene of *Staphylococcus aureus* and *rfbE* gene of *E.coli* O157:H7 published on GeneBank respectively, primers and modified molecular beacon probes were designed. Molecular beacon probes were labeled by different fluorescence. Then real-time PCR assay for the simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and *E.coli* O157:H7 was developed. **Results** The dual real-time PCR were tested against 151 *Staphylococcus aureus* strains and 27 *E.coli* O157:H7 strains. There no cross-reaction and false signals were observed. 8762 stools and food samples were detected using dual real-time PCR, 315 samples were *Staphylococcus aureus* positive, while 286 samples were positive by traditional culture method. 31 samples were *E.coli* O157:H7, while 26 samples were positive by traditional culture method. The overall test could be finished within 2 hours to one day. **Conclusion** The modified molecular beacon dual real-time PCR was rapid, sensitive and specific. It could be applied to the rapid diagnosis of *Staphylococcus aureus* and *E.coli* O157:H7 food poisoning and intestinal diseases. It provided a method for the molecular epidemiological investigation.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*; *E. coli* O157:H7; Real-time PCR; Simultaneous detection

食品污染致病菌是引起食源性疾病发生的主要因素之一, 快速检测食品中病原菌是及时有效预防传播及食物中毒爆发的重要前提。目前病原菌的检测主要依靠常规的细菌学培养方法, 一般需 4~7d, 操作繁琐, 费时耗力。近年来, 随着分子生物学技术的快速发展, 逐步应用 PCR 技术进行细菌的快速诊断, 但常规的 PCR 技术容易污染, 检出的假阳性率较高, 所以不易推广。上世纪九十年代美国 PE 公司研究推出了荧光定量 PCR 检测技术, 荧光 PCR 具有不需要后电泳、无交叉污染、快速、可定量、可靠等优点。1996 年有学者提出分子信标探针<sup>[1]</sup>, 其原理是在扩增退火阶段, 分子信标探针与靶序列结合发生荧光, 随着

循环次数的增加, 与靶序列结合的分子信标的量亦增加, 荧光强度与模块量成正相关。改良的分子信标是分子信标探针的基础上提出的一种新型的探针<sup>[2]</sup>, 以此为基础建立起实时 PCR 技术, 应用于多重荧光 PCR 技术检测多种致病菌, 取得了良好的结果。本方法试图采用改良的分子信标技术, 建立同时检测金黄色葡萄球菌及大肠杆菌 O157:H7 的荧光 PCR 方法。

### 1 材料与与方法

1.1 实验用菌株 选择 12 种细菌共 188 株, 包括: 1 株大肠杆菌 O157:H7 标准菌株, 1 株金黄色葡萄球菌标准菌株, 1 株伤寒沙门菌标准菌株, 1 株福氏志贺菌标准菌株, 1 株蜡样芽胞杆菌

\* 基金项目: 广东省自然科学基金(815802003000006)

作者单位: 1. 深圳市龙岗区布吉预防保健所卫生监督所, 广东 深圳 518112; 2. 深圳市疾病预防控制中心, 广东 深圳 518020; 3. 厦门大学生命科学院, 福建 厦门 315300

作者简介: 吴海娟, 女, 大学本科, 主管检验师, 主要从事卫生微生物检验工作。

通讯作者: 扈庆华, huqinghua03@163.com

标准菌株、1 株单核细胞增生李斯特菌标准菌株、1 株大肠埃希氏菌标准菌株、1 株肠产毒性大肠杆菌标准菌株、1 株肠致病性大肠杆菌标准菌株、1 株肠侵袭性大肠杆菌标准菌株、1 株副溶血弧菌标准菌株、1 株普通变形杆菌标准菌。标准菌株购自中国药品生物制品检定所。26 年大肠杆菌 157:H7 临床分离株和 150 株金黄色葡萄球菌临床分离株都是从深圳市历年食物中毒或肠道门诊分离。

1.2 菌株的分离培养与鉴定 按照中华人民共和国颁布的《食品微生物检验标准》国家检验标准操作。

1.3 反应模板的制备

1.3.1 菌株 DNA 模板的提取 菌株经 LB 增菌培养后, 菌体用 500μL TE buffer 悬浮, 加入终浓度为 50μg/ul 溶菌酶, 37℃作用 1h, 然后再加入终浓度为 1%SDS 和 0.2μg/ul 的蛋白酶 K, 55℃作用 1h 后, 用酚—氯仿抽提 DNA。

1.3.2 样品 DNA 模板的提取 呕吐物、粪便样本 取呕吐物或粪便少许, 用 100~200ul 生理盐水悬浮, 煮沸, 10 000r/min 离心 2min, 取 5ul 上清液用于实时荧光定量 PCR 实验。食品样本用 7.5%NaCl 肉汤或改良 EC 肉汤增菌液培养 6~8h, 取 1ml 菌液富集, 加水 100ul 煮沸, 离心吸取 5ul 上清液进行实时荧光定量 PCR 反应。

1.4 单一细菌改良分子信标检测体系的建立

1.4.1 单一金黄色葡萄球菌改良分子信标检测体系 引物和探针设计: 根据 GenBank 公布的金黄色葡萄球菌肠毒素基因的序列并比较分析, 我们自行设计了一对引物和改良分子信标探针, 用 FAM 标记探针, 用于金黄色葡萄球菌的检测, 扩增片段为 124bp, 引物与探针均由上海 Sangon 公司合成。

1.4.2 单一大肠杆菌 0157:H7 改良分子信标检测体系 引物和探针设计: 根据 GenBank 公布的大肠埃希氏菌 0157:H7 基因的序列并比较分析, 我们自行设计了一对引物和改良分子信标探针, 扩增片段为 169bp, 探针用 ROX 标记, 用于大肠杆菌 0157:H7 的检测。引物与探针均由上海 Sangon 公司合成。

1.4.3 PCR 反应条件 反应总体积为 25ul, 内含 5ul 模块, 2.5ul 10×PCR 缓冲液, 1.5mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.25mmol/L dNTP, 1U Taq 酶, 25pmol 引物, 25pmol 探针。实时 PCR 反应参数为: 94℃变性 5min, 40 个循环中 94℃, 变性 20s, 52℃退火 25s, 72℃延伸 20s。采用退火阶段检测荧光。

1.4.4 特异性检测 选择伤寒沙门菌、福氏志贺菌、普通变性杆菌、蜡样芽胞杆菌、副溶血弧菌、李斯特菌、溶血性弧菌等细菌的 DNA 作对照, 对金黄色葡萄球菌及大肠杆菌 0157:H7 进行改良分子信标实时 PCR 扩增。

1.4.5 灵敏度检测 选取 1 株金黄色葡萄球菌标准菌株(菌号: 26001)作为灵敏度分析的代表菌株, 同时作 DNA 灵敏度的分析及菌液灵敏度的分析。

DNA 灵敏度分析 按常规 DNA 提取方法提取 DNA 模块, 用 Ultraspec-2000 紫外可见光蛋白核酸分析仪(pharmacia 公司)测定 DNA 的浓度。然后进行 5 倍梯度稀释, 每个稀释度取 1ul 用于实时 PCR 反应。

菌液灵敏度分析 金黄色葡萄球菌标准菌株经 7.5%NaCl 肉汤增菌后, 进行 10 倍梯度稀释, 共做 10 个稀释度, 然后依次取 10 个稀释度的 1ml 菌液经简易处理后, 进行实时 PCR 反应。同时相对应的按中华人民共和国颁布的《食品微生物检验标准》

(GB/T4789-2003)做细菌总数计数。选 1 株大肠杆菌 0157:H7 标准菌株(菌号: 44752)作为灵敏度分析的代表株。包括 DNA 灵敏度的分析及菌液灵敏度的分析, 其分析方法与金黄色葡萄球菌的灵敏度分析方法相同。

1.5 多重改良分子信标实时 PCR 反应体系的建立 在上述建立的单一检测体系的基础上, 优化反应条件, 建立起双色多重实时荧光定量 PCR, 反应总体积为 25ul, 内含 2.5ul 10×PCR 缓冲液, 1.5mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.5mmol/L dNTP, 1U Taq 酶, 25pmol 引物, 25pmol 探针; 实时 PCR 扩增和检测条件同上, 并用于 8 762 份样本的检测, 包括 2 402 份食物中毒样本(肛拭子、呕吐物或剩余食品)和 6360 份肠道传染病样品。

2 结果

2.1 金黄色葡萄球菌改良分子信标体系检测 取 12 种细菌经改良分子信标体系进行特异性检测, 只有金黄色葡萄球菌有荧光信号, 其余细菌均无荧光信号。DNA 灵敏度为 10.2fg/ul, 菌液的灵敏度为 2cfu/PCR 体系, 原始样本菌液灵敏度为 32cfu/ml。

2.2 大肠杆菌 0157:H7 改良分子信标体系检测 12 种细菌经改良分子信标体系进行特异性分析检测, 只有大肠杆菌 0157:H7 有荧光信号, 其余细菌均无荧光信号。DNA 灵敏度为 102fg/ul, 菌液的灵敏度为 3cfu/PCR 体系, 原始样本菌液灵敏度为 64cfu/PCR。

2.3 改良分子信标—多重实时 PCR 检测体系应用 对 8762 份各类标本, 用改良分子信标—多重实时荧光定量 PCR 同时检测金黄色葡萄球菌和大肠埃希氏菌 0157:H7, 共检出金黄色葡萄球菌阳性标本 315 份, 其中 286 份分离出金黄色葡萄球菌。检出 31 份大肠杆菌 0157:H7, 其中 26 份分离出大肠杆菌 0157:H7(见表 1)。该检测体系灵敏度高, 检出率高于传统分离方法, 检测时间仅需 2h<sup>[3]</sup>。通过统计学分析, 其灵敏度均为 100%, 特异性均超过 98%以上(见表 2), 说明多重荧光 PCR 可用于细菌性食物中毒的早期诊断。对 8762 份各类标本, 用改良分子信标—多重实时荧光定量 PCR 反应体系稳定, 灵敏度高、特异性强, 两种细菌检测互不干扰, 无交叉反应。

表 1 改良分子信标—多重实时荧光定量 PCR 方法的应用

样品来源	样品份数	金黄色葡萄球菌		大肠埃希氏菌 0157:H7	
		荧光PCR 阳性数	培养阳性数	荧光PCR 阳性数	培养阳性数
食物中毒样品	2 402	223	201	16	12
肠道传染病样品	6 360	92	85	15	14
合计	8 762	315	286	31	26

表 2 实时荧光定量 PCR 法评价

菌分类	荧光 PCR	细菌培养		合计	灵敏度	特异性
		阳性	阴性			
金黄色葡萄球菌	阳性	286	29	315	100%	99.7%
	阴性	0	8 447	8 447		
	合计	286	8 476	8 762		
大肠杆菌 0157:H7	阳性	26	5	31	100%	99.9%
	阴性	0	8 731	8 731		
	合计	26	8 736	8 762		

3 讨论

我们在改良分子信标技术研究的基础上, 建立了双重实时荧光定量 PCR 法同时检金黄色葡萄球菌及大(下转第 811 页)

段(图 1 的 1、2、3、4、5 泳道),19# 嗜水气单胞菌则没有扩增得到相应的 DNA 片段(图 1 的 6 泳道)。

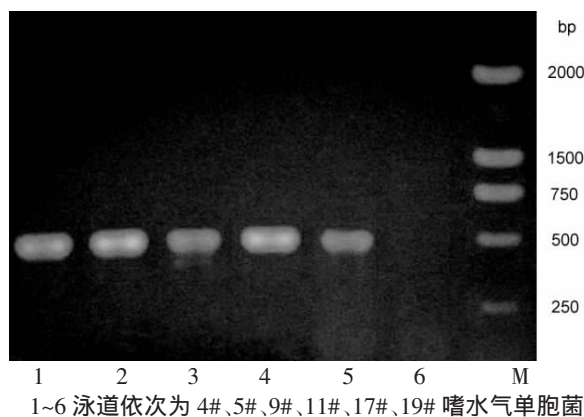


图 1 部分菌株 aer 基因 PCR 产物电泳图

2.3 嗜水气单胞菌 aer 基因携带率 10 株嗜水气单胞菌分离株中,PCR 法检测结果证实 5 株细菌携带有 aer 基因,aer 基因携带率为 50%(5/10)。

### 3 讨论

嗜水气单胞菌广泛存在淡水、土壤和水生动物中,寄生宿主范围广,是一种重要的人、畜、鱼共患病病原菌,可引起多种水产动物败血症和人类腹泻,给人类健康带来较大危害<sup>[1]</sup>。

本研究从三角帆蚌体内分离到 18 株细菌,根据细菌的染色性、形态学特性、培养特性、生理生化特性等实验,确定 10 株细菌为嗜水气单胞菌。PCR 法扩增 aer 基因试验表明,其中的 5 株嗜水气单胞菌携带气溶素基因,气溶素基因携带率达 50%。轻度感染的三角帆蚌表现为粘液分泌增多,蚌喷水无力,蚌壳微张开,肠道及肝脏病变不明显;严重感染的三角帆蚌闭壳肌

失去功能,两壳张开,肠道水肿,腹水增多,肝脏呈糜烂状,斧足苍白,鳃暗黄。本研究观察到,分离自感染症状严重的三角帆蚌体内的 5 株嗜水气单胞菌携带气溶素基因,分离自轻度感染的三角帆蚌体内的 5 株嗜水气单胞菌未检测到气溶素基因,提示气溶素是嗜水气单胞菌的重要毒力因子,这与国内外报道相一致<sup>[2,3]</sup>。

值得重视的是,嗜水气单胞菌引起的人、畜共患病可能造成耐药性的扩散。在淡水养殖业中,环丙沙星、青霉素、庆大霉素以及氯霉素等抗菌药物常被应用于鱼类感染性疾病的防治。随着这些抗菌药物的广泛使用或滥用,嗜水气单胞菌耐药株大量出现,这些耐药性嗜水气单胞菌引起的人类感染,将会给临床治疗带来巨大挑战。为此,我们应该重视抗菌药物在水产养殖业中的合理使用并加强监管,以保证人类用药的有效性。

(致谢:本文得到邵圣文和顾福萍老师的热情指导与帮助,谨表诚挚谢意)

### 参考文献:

- [1] 沈锦玉.嗜水气单胞菌的研究进展[J].浙江海洋学院学报(自然科学版) 2008,27(1):79-82.
- [2] 李刚山,范泉水,徐庆,等.嗜水气单胞菌分离株的鉴定与菌株肠毒素及致病性研究[J].中国热带医学,2008,8(3):374-375.
- [3] Pollard DR,Johnson WM,Lior H,et al. Detection of the aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* by the polymerase chain reaction[J].J Clin Microbiol,1990,28(11):2477-2481.
- [4] Zhu D,Li A,Wang J,et al. Cloning,expression and characterization of aerolysin from *Aeromonas hydrophila* in *Escherichia coli* [J]. Indian J Biochem Biophys,2007,44(4):204-208.

收稿日期 2008-11-26

修回日期 2009-03-24

(上接第 815 页)

肠埃希氏菌 O157:H7 的方法,经实验研究表明,此方法优点在于:方法的灵敏度高、特异性强,与对照组 10 种细菌无交叉反应出现,即类似的肠道致病菌均为阴性。操作方法简单,结果观察表明,可一次性检测 96 份标本(含阴阳性对照)。

适用于金黄色葡萄球菌及大肠杆菌 O157:H7 的快速检测和大量样品的检测。样品处理简单、快速,大便、呕吐物及食物中毒的样品快速处理仅需 2h,食品物品仅需要 1d 时间(包括样品前处理及增菌过程)。在多重实时荧光定量 PCR 研究的基础上,实现多重实时荧光定量 PCR 同时诊断 10 种食源性致病菌,满足常见细菌性食物中毒快速诊断的要求。

改良分子信标探针是为了提高杂交效率,在原来分子信标原理基础上提出的,改良分子信标的突出特点是将分子信标的臂部分也作为靶识别序列,而不仅仅是用于形成发夹结构的无关添加序列。对于同样长度的检测靶序列,改良分子信标的分子信号更强,而且由于臂序列不再是空,因而与靶序列的结合更趋紧密。实验证明,改良分子信标比分子信标更易设计且成功率更高,同时对扩增条件不严,因此对于多个靶序列的同时检测,改良分子信标的优势更加明显。本研究中特别注意了两对引物在同一管内容易发生引物二聚体,发生非特异扩增的问题,在引物的设计上给予了特别的注意。

目前,国外采用 TaqMan 技术分别检测肠道致病菌的文献报导<sup>[4]</sup>,但主要为单一荧光体系检测某一种单一细菌,未见多重

实时荧光定量 PCR 同时检测多种细菌的文献报导。随着突发性公共卫生事件的多发,食物中毒时有发生,需及时、快速的同时检测多种细菌才能确定病源,以尽快控制疾病发生流行,及时治疗病人,争取时间。这就对快速诊断技术提出了更高的要求:又快又能同时检测多种病原微生物。多重实时荧光定量 PCR 检测方法的建立和在实际工作中的应用表明,该方法具有灵敏度高、检测快速、操作简单、准确性高、极少漏检等优点,是国家标准方法的有力补充。随着多通道荧光 PCR 仪的不断普及和发展,同管检测 10 种致病菌的多重实时 PCR 法技术,是未来发展的趋势。

### 参考文献:

- [1] Tyagi S,Kramer FR. Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization[J]. Nature Biotechnology,1996,14:303.
- [2] Li Q,Lang J,Luan G,et al. Molecular beacon-based homogeneous fluorescence PCR assay for the diagnosis of infectious diseases [J]. Analsci,2000,16:245-248.
- [3] 许一平.沙门菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的多重 PCR 检测[J].微生物学通报,2006(6):89-94.
- [4] Daum LT,Barns WJ,McAvin JC,et al. Real-time PCR detection of *Salmonella* in suspect foods from a gastroenteritis outbreak in Kerr County,Texas[J].J Clin Microbiol,2002,40:3050-3052.

收稿日期 2008-11-12