

重组酶介导扩增技术快速检测沙门菌方法的建立

张小平¹, 郑乐怡¹, 魏莹¹, 郭利川², 应清界², 吕沁风¹, 吴忠华¹, 郑伟¹

1. 浙江出入境检验检疫局, 浙江 杭州 310016; 2. 江苏齐天基因生物科技有限公司

摘要:目的 采用重组酶介导核酸扩增方法(Recombinase aided amplification, RAA), 建立沙门菌快速检测方法。方法 根据沙门菌的 *invA* 基因设计引物和探针, 通过构建含目的基因片段的质粒分析 RAA 方法的灵敏度, 通过检测大肠杆菌、志贺菌验证方法的特异性, 并检测沙门菌阳性样本进行验证。结果 建立的方法在 39℃ 下进行, 检测时间在 20 min 以内, 检测下限为 10² 拷贝/μl, 与大肠杆菌、志贺菌无交叉反应, 特异性良好。结论 建立的 RAA 检测方法具有快速、灵敏、特异以及操作简便等特点, 适用于沙门菌的快速检测。

关键词: 沙门菌; 重组酶介导扩增; 分子检测

中图分类号: R378.2+2, V448.15+1 文献标识码: A DOI: 10.16408/j.1004-9770.2017.05.004

Establishment of a Recombinase aided amplification assay for *Salmonella* detection

ZHANG Xiao-ping*, ZHENG Le-yi, WEI Ying, GUO Li-chuan, YING Qing-jie,

LV Qin-feng, WU Zhong-hua, ZHENG Wei

*Zhejiang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Hangzhou, Zhejiang 310016, China

Abstract: Objective To establish a rapid detection assay for *Salmonella* based on Recombinase aided amplification (RAA). **Methods** Primers and probes were designed according to the sequences of *invA* gene. The *invA* gene was cloned into the plasmid for quantification and sensitivity detection. The strains of *Escherichia coli* and *Shigella* were used to test specificity. The *Salmonella* strains was detected to confirm the validity of the method. **Results** RAA assay established in this study was performed at 39℃ with a short detection time (≤20 min) and high sensitivity (10² copies/μl). The cross reaction with *Escherichia coli* and *Shigella* was not observed. **Conclusion** The RAA assay was rapid, sensitive and specific. It can be used for rapid detection of *Salmonella*.

Key words: *Salmonella*; Recombinase aided amplification; Molecular detection

沙门菌(*Salmonella*)是一种寄生于人和动物肠道内的革兰阴性无芽胞杆菌, 绝大多数有鞭毛并能运动, 对营养要求不高, 对外界的抵抗力较强, 在自然界中广泛存在^[1]。大多数沙门菌能引起家畜、鼠类和禽类疾病, 也能引起人类伤寒、副伤寒和食物中毒等。其血清型多, 分布广泛, 是世界上引起食物中毒最多的食源性细菌^[2-5]。

目前, 沙门菌的实验室检测方法主要包括分离培养、免疫学以及分子生物学方法等。传统的沙门菌检测方法由于周期长、漏检率高、程序复杂、所需试剂繁多等缺点, 已经远远不能满足现代的检测要求。分子生物学方法如 PCR、核酸探针技术、基因芯片技术以及环介导等温核酸扩增(LAMP)方法已经建立, 且得到较好的应用, 大大缩短了检测时间^[6-9]。

但这些方法需要使用复杂的仪器, 对操作人员要求较高, LAMP 方法的引物设计困难且假阳性率较高。重组酶介导的等温核酸扩增(RAA)技术的基本原理是利用重组酶代替 PCR 的高温解链, 在 39℃ 的条件下完成对双链的解链, 采用单链结合蛋白防止解链的 DNA 复性, 由 DNA 聚合酶实现链的延伸, 实现 DNA 的扩增, 整个反应 20 min 内完成。本研究选取沙门菌的 *invA* 基因为目的基因, 以 RAA 为基础建立快速、灵敏的沙门菌检测方法。

1 材料与方法

1.1 菌株 沙门菌标准菌株(ATCC 15611), 从污染食品中分离并鉴定的沙门菌菌株(9320, 567), 大肠杆菌标准菌株(ATCC 25922), 志贺菌标准菌株(ATCC 12022)。

基金项目: 国家质量基础的共性技术研究与应用专项(2016YFF0203200), 国家生物安全关键技术研发专项(2016YFC1202700), 浙江出入境检验检疫局科研计划项目(ZK2015013)

通讯作者: 郑伟, E-mail: zwei@zqi.gov.cn

1.2 仪器与试剂 全自动核酸提取仪 (KinFisher Flex, 美国), DNA 提取试剂盒 (Ambion 1840, 批号: 1507056), RAA 荧光检测仪 (QT-RAA-6100) 及 RAA 基础扩增试剂盒、RAA 荧光检测试剂盒。

1.3 方法

1.3.1 细菌基因组 DNA 提取 取沙门菌、大肠杆菌、志贺菌菌株样本, 分离的沙门菌培养液各 70 μ l, 提取并纯化 DNA, 保存于 -80 $^{\circ}$ C 备用, 作为模板。

1.3.2 引物和探针设计 从 NCBI 数据库中检索沙门菌 *invA* 序列, GenBank 号分别为 M90846.1、DQ644631.1、DQ644630.1、DQ644628.1、DQ644627.1、DQ644624.1、DQ644622.1、DQ644621.1、Q644620.1、DQ644617.1、U43273.1、U432471.1、U43251.1、U43250.1、U43248.1、U43246.1、U43245.1、EU348365.1、EU348369.1、EU348368.1、EU348367.1、EU348366.1。用 DNAMAN7.0 进行序列比对, 在保守区域设计引物和探针。

1.3.3 RAA 扩增体系和条件 按 RAA 荧光试剂盒说明书配制反应体系。反应体系为 50 μ l, 包括反应缓冲液 25 μ l、双蒸水 16.7 μ l、2.1 μ l 420 nmol/L 正向引物、2.1 μ l 420 nmol/L 反向引物、0.6 μ l 120 nmol/L 探针、1 μ l DNA 模板, 混匀后加到 RAA 反应单元冻干粉中, 使之溶解均匀, 瞬时离心。将 2.5 μ l 280 mmol/L 醋酸镁溶液加到反应体系中, 混匀并瞬时离

心, 将 RAA 荧光检测仪条件设置成 39 $^{\circ}$ C, 总反应时间为 20 min, 将上述反应管加入检测仪器中进行检测。阴性对照为双蒸水代替 DNA 作为模板。

相比 RAA 荧光反应体系, RAA 基础扩增体系中少了探针的使用, 其余操作同 RAA 荧光反应体系。37 $^{\circ}$ C 水浴 40 min, 反应结束后, 取 10 μ l 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳。

1.3.4 灵敏度检测 合成含有待检测沙门菌 *invA* 序列的质粒, 稀释成 6 个梯度进行灵敏度检测, 分别为 10² 拷贝/ μ l, 10³ 拷贝/ μ l、10⁴ 拷贝/ μ l、10⁵ 拷贝/ μ l、10⁶ 拷贝/ μ l、10⁷ 拷贝/ μ l, 利用 RAA 荧光体系进行测定, 考察方法的灵敏度。

1.3.5 特异性检测 以从食品中分离并鉴定的沙门菌、大肠杆菌、志贺菌菌株基因组为模板, 利用沙门菌引物进行扩增, 评价 RAA 方法的特异性, 方法同 1.3.3。

1.3.6 测序和序列分析 为检验目的扩增片段与靶标序列是否一致, 将 RAA 基础扩增产物进行测序, 与 GenBank 中其他菌株序列进行 BLAST 同源性对比。

2 结果

2.1 沙门菌引物探针设计 经过分析比对, 设计了正向引物 F、反向引物 R 和探针 P, 扩增片段长度为 133 bp (表 1)。

表 1 本研究设计的沙门菌 RAA 引物和探针

引物/探针	序列(5'-3')
F	ATTGCCGATAGCCTGGCRGTGGGTTTTGTTGT
R	TACCGGGCATAACCATCCAGAGAAAACGCGCCGC
P	CTCKATTGTCACKGTGTYCAGTTTATCG(FAM-dT)T(THF)T(BHQ-dT)ACCAAAGGTTCA(phosphate)

2.2 灵敏度 将含有 *invA* 基因片段的质粒 DNA 稀释成 6 个梯度, 检测不用拷贝数的质粒 DNA 的扩增。如图 1 所示, 浓度为 10⁷ 拷贝/ μ l 时在 4 min 时即可观

察到扩增, 不同拷贝数的扩增均可以在 20 min 之内完成; 随着拷贝数的降低, 扩增起峰时间也随之延迟, 最低可以检测出 10² 拷贝/ μ l 的质粒 DNA。

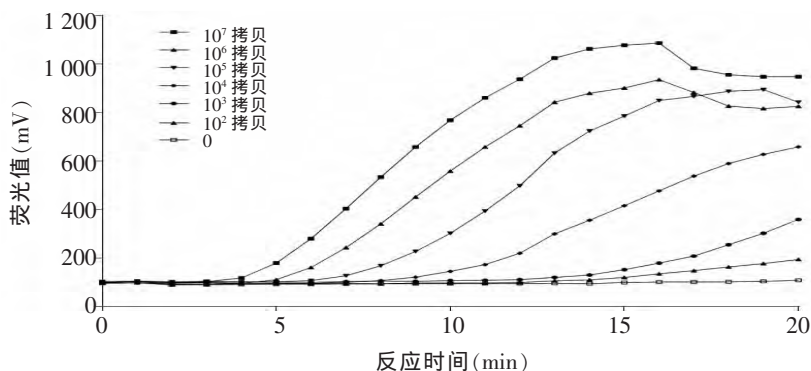


图 1 不同拷贝数的扩增结果

2.3 特异性 分别对沙门菌标准菌株 ATCC 15611、从食品中分离鉴定的沙门菌株 9320 和 567、大肠杆菌标准菌株、志贺菌标准菌株进行荧光反应

检测和 RAA 基础扩增。结果表明, 只有沙门菌标准菌株和分离的沙门菌株检测出相应的特异性扩增曲线, 其他细菌未见有相应的扩增, 无交叉反应 (图 2)。

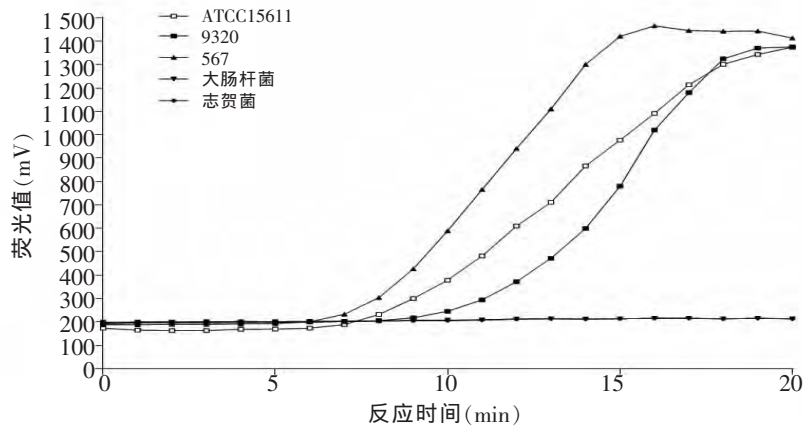
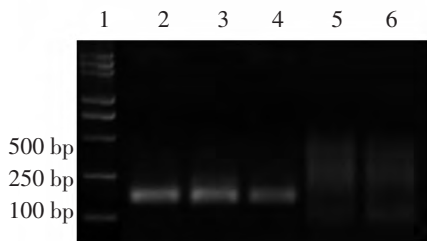


图 2 RT-RAA 特异性荧光检测结果

RAA 基础扩增结果表明,特异性检测结果与 RAA 荧光反应检测结果一致,只有沙门菌标准菌株和分离的沙门菌扩增出目的条带(图 3)。将目的条带进行割胶回收测序,与 GenBank 中沙门菌 *invA* 基因序列同源率为 100%,表明该方法具有良好的特异性。



1. DNA 分子量标准;2. 沙门菌 ATCC 15611;3. 沙门菌 9320; 4. 沙门菌 567;5. 大肠杆菌;6. 志贺菌

图 3 特异性电泳检测结果

3 讨论

本研究选取沙门菌 *invA* 基因为目的基因,建立了检测沙门菌的 RAA 法。*invA* 基因高度保守,几乎存在于所有沙门菌血清型中,其编码吸附和侵袭上皮细胞的表面蛋白,决定沙门菌对肠粘膜细胞的侵袭力,与致病性显著相关,国内外许多学者利用该基因作为靶基因对沙门菌进行检测^[10-11]。本研究中,以质粒为模板时检测下限为 10^2 个拷贝/ μl ,且具有很强的特异性。

与传统的沙门菌检测方法相比,RAA 法检测时间短(20 min)、程序简单、漏检率低,费用减少。与传统 PCR 法相比,RAA 法是在等温条件下进行反应,反应时间短(PCR 法检测时间需要 1.5~2 h),效率高(PCR 法灵敏度为 1000 拷贝),操作简单,适用于大样本量检测和现场检测。LAMP 虽然也是恒温核酸扩增反应,但与 RAA 法相比,其反应温度偏高(60~

65 $^{\circ}\text{C}$),反应时间偏长(30~60 min),引物复杂(需要多对引物且对靶基因的要求较高)^[12]。与以往沙门菌检测方法相比,RAA 法具有简便、快速、灵敏特异等特点,值得应用和推广。

参考文献

- [1] Hensel M. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enteric* [J]. Int J Med Microbiol, 2004, 294(2-3): 95-102.
- [2] Carrique-Mas JJ, Davies RH. Sampling and bacteriological detection of *Salmonella* in poultry and poultry premises: a review [J]. Rev Sci Tech, 2008, 27(3): 665-677.
- [3] 张嫒. 我国微生物危险性评估的最新进展及未来发展方向[J]. 食品与发酵科技, 2008, 44(3): 37-40.
- [4] Toyofuku H. Epidemiological data on food poisonings in Japan focused on *Salmonella*, 1998-2004[J]. Food Addit Contam, 2008, 25(9): 1058-1066.
- [5] Altier C. Genetic and environmental control of *Salmonella* invasion [J]. J Microbiol, 2005, (43): 85-92.
- [6] 王高产, 孙振钧. 沙门氏菌的检测方法[J]. 猪业科学, 2009, 26(12): 30-31.
- [7] 张也, 刘以祥. 酶联免疫技术与食品安全快速检测 [J]. 食品科学, 2003, 24(8): 200-204.
- [8] 文其乙, 焦新安, 刘秀梵, 等. 直接 ELISA 检测沙门氏菌方法的建立及其应用研究[J]. 中国兽医学报, 1995, 15(2): 105-111.
- [9] Kumar S, Balakrishna K, Batra HV. Enrichment-ELISA for detection of *Salmonella typhi* from food and water samples [J]. Biomed Environ Sci, 2008, 21(2): 137-143.
- [10] Pusterla N, Byrne BA, Hodzic E, et al. Use of quantitative real-time PCR for the detection of *Salmonella* spp in fecal samples from horses at a veterinary teaching hospital[J]. Vet J, 2010, 186(2): 252-255.
- [11] 胡玉山, 胡肖娟, 刘俊华, 等. 沙门菌 *invA* 基因荧光定量 PCR 检测 [J]. 中国公共卫生, 2009, 25(12): 1485-1486.
- [12] Poon LL, Wong BW, Ma EH, et al. Sensitive and inexpensive molecular test for falciparum malaria: detecting *Plasmodium falciparum* DNA directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplification [J]. Clin Chem, 2006, 52(2): 303-306.

收稿日期 2017-07-20