

蒋 玥,衣服德,许 华,等. 4 种血清型沙门氏菌多重 PCR 检测方法建立及应用[J]. 江苏农业科学,2021,49(13):59-63.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.13.011

4 种血清型沙门氏菌多重 PCR 检测方法建立及应用

蒋 玥^{1,2}, 衣服德³, 许 华⁴, 李贵阳⁴, 卜仕金^{1,2}

(1. 扬州大学兽医学院, 江苏扬州 225009; 2. 江苏高校动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏扬州 225009;
3. 青岛市畜牧兽医研究所, 山东青岛 266000; 4. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东青岛 266000)

摘要:为检测鉴别鸡白痢、肠炎、鼠伤寒、伤寒 4 种养禽业中常见的沙门氏菌血清型, 利用每种血清型的特异基因位点, 建立多重 PCR (polymerase chain reaction) 检测方法, 并通过试验对多重 PCR 法的特异性、灵敏度进行验证。结果显示, 所建立的检测方法特异性强, 与非沙门氏菌无交叉反应, 灵敏度高。鸡白痢沙门氏菌的最低检测限度 13.1 pg/mL, 肠炎沙门氏菌最低检测限度达 12.5 pg/mL, 鼠伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌的最低检测限度 13.7 pg/mL, 伤寒沙门氏菌最低检测限度 12.3 pg/mL。结果表明, 此方法准确可靠、特异性强、灵敏度高, 有望成为以后检测沙门氏菌的有效工具。

关键词: 鸡白痢沙门氏菌; 肠炎沙门氏菌; 鼠伤寒沙门氏菌; 伤寒沙门氏菌; 多重 PCR

中图分类号: S852.61 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)13-0059-05

目前, 已发现的沙门氏菌血清型有 2 000 多种^[1]。其中, 鸡白痢沙门氏菌、肠炎沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌这几种血清型的沙门氏菌在我国部分地区感染率较高^[2]。有资料显示这几种血清型的沙门氏菌基因组相近^[3], 想要检测鉴别这几种沙门氏菌血清型, 可通过培养为前提的传统检测方法和分子生物学检测方法^[4]。传统检测方法包括平板上鉴别培养^[5], 生化检测以及血清分

型等^[3]。这些方法虽然结果清晰、准确, 但是存在检测时间长^[5]、特异性差、操作过程繁琐等缺点, 不适用于大批量的临床样本检测^[6]。分子生物学检测技术包括聚合酶链反应技术 PCR (polymerase chain reaction)、恒温核酸扩增技术、脉冲场凝胶电泳、基因探针技术等, 本试验用到的检测技术是聚合酶反应技术 PCR 中的多重 PCR 检测技术^[6]。

多重 PCR 检测技术可以同时扩增多个目的片段, 实现高通量的目的基因检测。本研究用多重 PCR 检测技术检测鉴别鸡白痢沙门氏菌、肠炎沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌 4 种养禽业中常见的沙门氏菌血清型。这个技术相比沙门氏菌传统的检测方法既快速、高效, 也简单易操作^[3-7], 并适用于规模化养殖中大量的样本检测。因此这个方法的建立能及时发现生产养殖中出现的沙门氏菌感染, 为沙门氏菌的防控奠定基础。

收稿日期: 2021-01-12

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项 (编号: CARS-41); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (编号: PAPD); 青岛英赛特生物科技有限公司企业创新项目。

作者简介: 蒋 玥 (1994—), 女, 江苏盐城人, 硕士研究生, 研究方向为兽医药理学及毒理学。E-mail: 1148260634@qq.com。

通信作者: 李贵阳, 研究员, 主要从事微生物与生物信息学研究, E-mail: liguiyang410@126.com; 卜仕金, 教授, 主要从事兽医药理学与毒理学研究, E-mail: pushijin@aliyun.com。

[9] 孔倩倩, 李志辉, 王 琼, 等. 纳米基因载体在植物遗传转化中的应用[J]. 生物技术通报, 2010, 6: 6-12.

[10] 袁刚强. 单壁碳纳米管材料 (SWCNTs) 对水稻的植物毒性效应的研究[D]. 湖南大学, 2015: 50-51.

[11] 王玮玮, 刘瑞琪, 吴勇延, 等. CRISPR/Cas9 基因编辑系统研究进展及其在动物基因编辑研究中的应用[J]. 畜牧兽医学报, 2019, 7: 1299-1305.

[12] Demirer G S, Zhang H, Matos J L, et al. High aspect ratio nanomaterials enable delivery of functional genetic material without DNA integration in mature plants [J]. Nat Nanotechnol, 2019, 14 (5): 456-464.

[13] Demirer G S, Zhang H, Goh N S, et al. Carbon nanotube-mediated DNA delivery without transgene integration in intact plants [J]. Nature Protocols, 2019, 14(10): 1-24.

[14] 丁莉萍, 张杰伟, 马 艳, 等. CRISPR/Cas 基因组编辑技术研究进展及其在植物中的应用[J]. 植物生理学报, 2019, 55(4): 411-424.

[15] 马兴亮, 刘耀光. 植物 CRISPR/Cas9 基因组编辑系统与突变分析[J]. 遗传, 2016, 38(2): 118-125.

[16] 徐 旋. 柑橘原生质体瞬时转化体系优化及利用 CRISPR/Cas9 技术定点突变山金柑基因[D]. 武汉: 华中农业大学, 2018: 43-46.

1 材料与方法

1.1 试验材料

细菌基因组核酸提取试剂盒(GB50)及试验中所需的酶(IE-PME),均购自青岛英赛特生物科技有限公司,引物由青岛生工生物科技有限公司合成。样本主要包括:肠炎沙门氏菌标准株 CMCC(B)50071、鼠伤寒沙门氏菌标准菌株 ATCC14028、伤寒沙门氏菌标准菌株 CMCC(B)50071、鸡白痢沙门氏菌阳性菌等(表 1)。临床样品在 2017 年 5 月至 2019 年 11 月从山东各地采集,采集的沙门氏菌临床样品数为 128 份。

表 1 试验菌株信息及检测结果

细菌名称	来源	检测结果
肠炎沙门氏菌标准株 CMCC(B)50071	中国医学微生物菌种保藏管理中心(CMCC)	+
鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028	美国典型菌种保藏中心(ATCC)	+
伤寒沙门氏菌标准株 CMCC(B)50071	中国医学微生物菌种保藏管理中心(CMCC)	+
鸡白痢沙门氏菌	笔者所在实验室储存	+
耶尔森菌	笔者所在实验室储存	-
大肠杆菌	笔者所在实验室储存	-
志贺杆菌	笔者所在实验室储存	-
产气荚膜梭菌	笔者所在实验室储存	-
奇异变形杆菌	笔者所在实验室储存	-
克雷伯杆菌	笔者所在实验室储存	-
阴沟肠杆菌	笔者所在实验室储存	-

表 2 引物序列信息及产物大小

引物名称	NCBI accession	起始位点	序列(5'→3')	片段长度(bp)
鼠伤寒沙门氏菌	P051284.1	995689→995846	TTCAGTCTTAACGATAATCCGCAACG;GATAAACCGTGAGCAACGACAGTA	158
肠炎沙门氏菌	CP050721.1	995689→995846	AGACACTGACAACGACGAAT;GGATTACAACGAATACCA	331
伤寒沙门氏菌	CPO53702.1	995689→995846	CGGTTGCGTAGTCGGAATCT;CGGTGCTTCTGCTGGTGTT	707
鸡白痢沙门氏菌	CP022963.1	995689→995846	CTGGTTCAGGAACCGTGATA;CTGGTTCAGGAACCGTGATA	1 025

表 3 多重 PCR 各引物组浓度优化

试验组号	引物浓度(μmol/L)			
	肠炎沙门氏菌(F,R)	鸡白痢沙门氏菌(F,R)	伤寒沙门氏菌(F,R)	鼠伤寒沙门氏菌(F,R)
1	0.20	0.20	0.20	0.20
2	0.20	0.20	0.20	0.28
3	0.28	0.20	0.20	0.24
4	0.28	0.28	0.20	0.24
5	0.28	0.28	0.20	0.20
6	0.28	0.36	0.20	0.24

1.2 核酸模板提取

沙门氏菌的液体样本用 MH 肉汤培养^[8]。取 1 mL 菌液,按照基因组提取试剂盒的说明书,完成试验所需不同沙门氏菌基因组 DNA 提取。

1.3 试验方法

1.3.1 引物设计与条件优化 从 GenBank 获取沙门氏菌的基因序列,利用 Bioedit 软件对序列进行比对,具体的引物序列信息见表 2。由表 2 可知,以提取的肠炎沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌和鸡白痢沙门氏菌的基因组 DNA 作为模板,用对应的引物检测。首先用每对引物分别对每个目的基因进行扩增,反应体系为 MIX 12.5 μL,每对引物上下游各 0.5 μL,模板各 1.0 μL,ddH₂O 4.5 μL(总体系 25.0 μL)。反应条件为:94 ℃ 预变性 2 min;98 ℃ 变性 10 s,64 ℃ 退火 90 s,循环 30 次。根据目的基因扩增结果,由表 3 可知,优化多重反应的引物浓度比例和温度等条件,最终 PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测(121 V,20 min),每组试验重复 3 次。

1.3.2 多重 PCR 特异性验证 用肠炎沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌标准株、鸡白痢沙门氏菌的阳性菌和金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、志贺杆菌、产气荚膜梭菌、奇异变形杆菌、云南微球菌、副溶血弧菌基因组作为 DNA 模板,多重 PCR 反应体系分别扩增这几种菌。PCR 的反应体系为: MIX 12.5 μL,肠炎沙门氏菌上下游引物各 0.7 μL;

鸡白痢沙门氏菌上下游引物各 0.7 μL;伤寒沙门氏菌上下游引物各 0.5 μL,鼠伤寒沙门氏菌上下游引物各 0.6 μL,H₂O 3.0 μL(总体系 25.0 μL);反应条件为:94 ℃ 预变性 2 min;98 ℃ 变性 10 s,64 ℃ 退火 90 s,扩增循环数为 30 个循环。

1.3.3 多重 PCR 灵敏性检测 对涉及的核酸基因组 DNA,分别进行 10~10⁶ 倍的梯度稀释,将稀释的核酸基因 DNA 放入配制好的多重 PCR 反应体系,分析扩增出的多重敏感性试验结果图,并分析

得出方法的最低检测限。

1.4 临床样本的应用

将山东各地采集的 128 份沙门氏菌临床样本,接种到蛋白胨缓冲水中 37 ℃ 培养 24 h^[5]。利用建好的多重 PCR 方法对 128 份沙门氏菌临床样本进行检测。

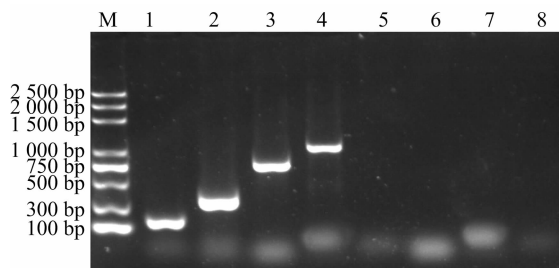
1.5 多重 PCR 方法准确性验证

采用单一 PCR 法对沙门氏菌临床样本进行检测,将得到的检测结果与多重 PCR 法的检测结果进行比较,从而验证本试验方法的准确性。

2 结果与分析

2.1 单重模板 PCR 扩增结果

使用相对应的引物分别对 4 种沙门氏菌进行扩增。由图 1 可知,扩增后的 DNA 片段大小和预期结果完全一致,证明了各组引物对靶基因检测的可行性。



M—DL 2500 Marker; 1—鼠伤寒沙门氏菌; 2—肠炎沙门氏菌; 3—伤寒沙门氏菌; 4—鸡白痢沙门氏菌; 5—鼠伤寒沙门氏菌阴性对照; 6—肠炎沙门氏菌阴性对照; 7—伤寒沙门氏菌阴性对照; 8—鸡白痢沙门氏菌阴性对照

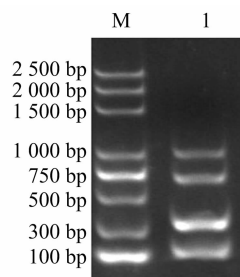
图1 单重模板 PCR 扩增结果

2.2 多重 PCR 方法建立及条件优化

在单重模板扩增试验结果的基础上,对多重 PCR 方法可行性进行验证。由图 2 可知,试验条带与目的条带大小一致,由此证明该方法对 4 种目的基因检测的可行性。为实现各个目的条带检测效率最佳,本试验对各组引物浓度和温度的条件进行优化,由图 3 和图 4 可分析得出,肠炎沙门氏菌、鸡白痢沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌最佳的上下游引物浓度分别是 0.28、0.28、0.20、0.24 $\mu\text{mol/L}$ 。最终的反应条件为:94 ℃ 预变性 2 min;98 ℃ 变性 10 s,64 ℃ 退火 90 s,扩增循环数为 30 个循环。

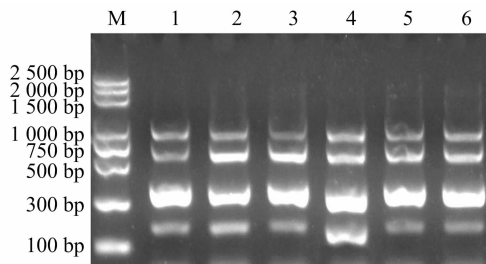
2.3 多重 PCR 特异性和敏感性试验结果

在最佳的引物比例条件下,对本试验所建多重 PCR 方法的特异性进行验证。由图 5 可知,只有鼠伤寒沙门氏菌 + 肠炎沙门氏菌 + 伤寒沙门氏菌 +



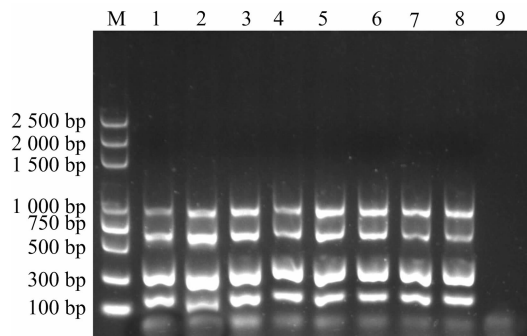
M—DL 2500 Marker; 1—肠炎沙门氏菌+鸡白痢沙门氏菌+伤寒沙门氏菌+鼠伤寒沙门氏菌

图2 多重 PCR 混合模板扩增结果



M—DL 2500 Marker; 1~6—肠炎沙门氏菌、鸡白痢沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌上下游引物的浓度分别是 0.2 $\mu\text{mol/L}$ +0.2 $\mu\text{mol/L}$ +0.2 $\mu\text{mol/L}$ +0.2 $\mu\text{mol/L}$; 0.2 $\mu\text{mol/L}$ + 0.2 $\mu\text{mol/L}$ + 0.28 $\mu\text{mol/L}$; 0.28 $\mu\text{mol/L}$ + 0.2 $\mu\text{mol/L}$ + 0.2 $\mu\text{mol/L}$ + 0.24 $\mu\text{mol/L}$; 0.28 $\mu\text{mol/L}$ + 0.2 $\mu\text{mol/L}$ + 0.2 $\mu\text{mol/L}$ + 0.24 $\mu\text{mol/L}$; 0.28 $\mu\text{mol/L}$ + 0.36 $\mu\text{mol/L}$ + 0.2 $\mu\text{mol/L}$ + 0.24 $\mu\text{mol/L}$

图3 多重 PCR 混合模板引物浓度优化结果



M—DL 2500 Marker; 1~8—退火温度分别是 59、60、61、62、63、64、65、66℃; 9—阴性对照

图4 多重 PCR 不同退火温度扩增结果

鸡白痢沙门氏菌的混合模板 DNA 及鼠伤寒沙门氏菌 DNA、肠炎沙门氏菌 DNA、伤寒沙门氏菌 DNA、鸡白痢沙门氏菌 DNA 出现条带,而非沙门氏菌的基因 DNA 不发生扩增反应,证明了该方法具有较强的特异性,可以实现沙门氏菌复杂血清型的分离分辨。由图 6 可知,多重 PCR 反应体系对混合模板 DNA 的最低检测限分别是:鸡白痢沙门氏菌 13.1 $\mu\text{g/mL}$;肠炎沙门氏菌 12.5 $\mu\text{g/mL}$;鼠伤寒沙门氏菌 13.7 $\mu\text{g/mL}$;伤寒沙门氏菌 12.3 $\mu\text{g/mL}$ 。因此,在检测过程中只需要少量的临床组织病料样品即可检测出是否感染相关的沙门氏菌血清型。

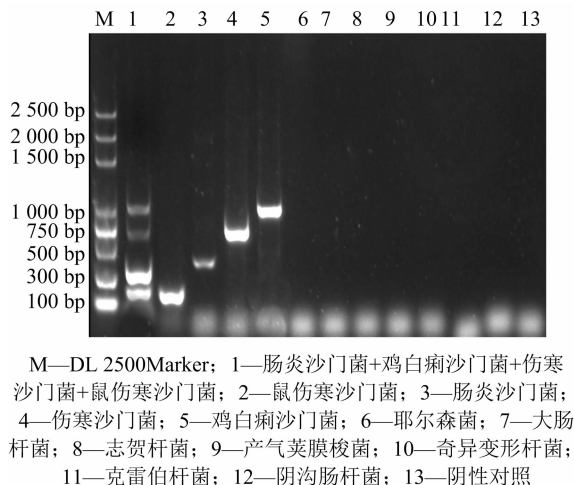


图5 多重 PCR 特异性扩增结果

2.4 临床样本检测结果

利用建好的多重 PCR 法对 128 份沙门氏菌阳性样本进行鉴定,部分临床样本检测结果见图 7,检测出肠炎沙门氏菌 78.0%,鸡白痢沙门氏菌 3.9%,

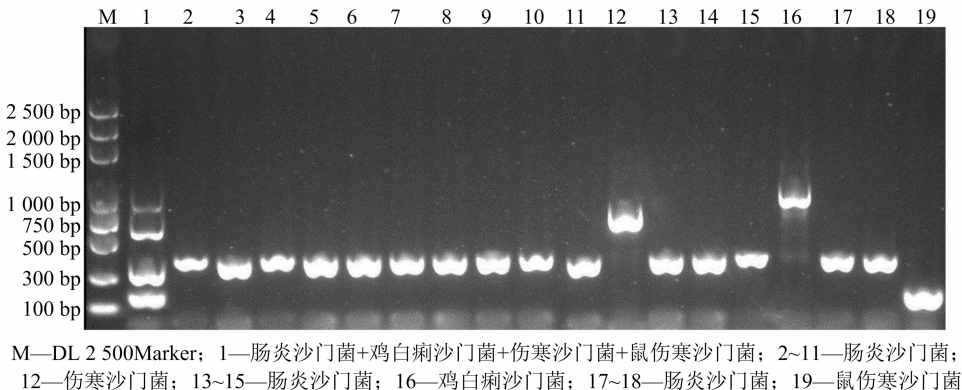


图7 多重 PCR 法检测部分临床样本

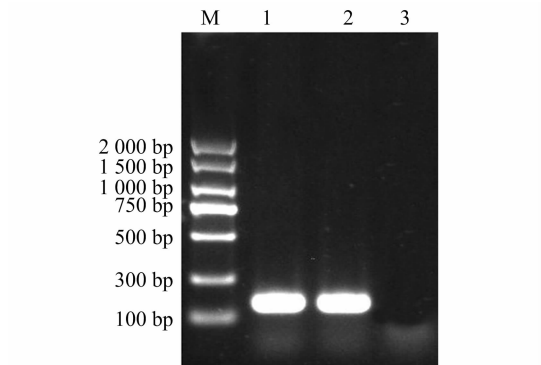


图8 单重 PCR 法检测鼠伤寒沙门菌临床样本

伤寒沙门氏菌 0.8%,鼠伤寒沙门氏菌 1.6%,其他占 15.7%。

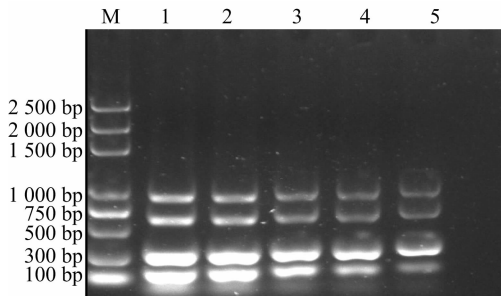


图6 多重 PCR 混合模板灵敏度检测结果

2.5 多重 PCR 准确性验证结果

单重 PCR 法对沙门氏菌临床样本进行扩增,结果见图 8 至图 11。对 2 种方法的检测结果进行比较(表 4),可以看出 2 种检测方法的结果完全一致。因此,本试验所用的多重 PCR 检测法准确性较高。

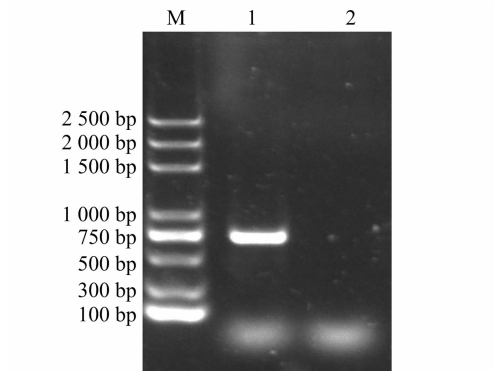
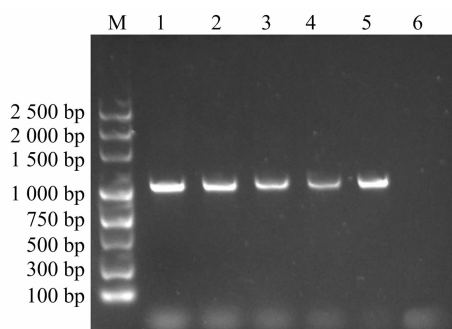


图9 单重 PCR 法检测伤寒沙门菌临床样本

3 讨论

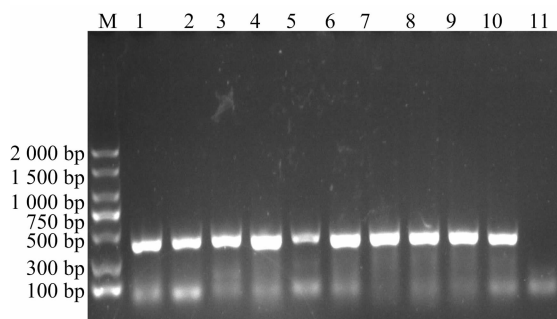
沙门氏菌可导致人畜共患的细菌性疾病。禽类感染沙门氏菌后不但对自身健康造成影响,使得

生产力下降;还会通过禽类食品传播给人^[9],要想控制沙门氏菌,建立有效检测方法是很关键的环节。有研究报道,鸡白痢、肠炎、伤寒及鼠伤寒这 4 种沙门氏菌血清型不但常见多发且对养殖业危害



M—DL 2500Marker; 1~5—鸡白痢沙门菌; 6—阴性对照

图10 单重 PCR 法检测鸡白痢沙门菌临床样本



M—DL 2000Marker; 1~10—肠炎沙门菌; 11—阴性对照

图11 单重 PCR 法检测部分肠炎沙门菌临床样本

表4 临床样本 PCR 检测结果统计

血清型	多重 PCR 检测法 数量	单一 PCR 检测法 数量
肠炎沙门氏菌	100	100
鸡白痢沙门氏菌	5	5
伤寒沙门氏菌	1	1
鼠伤寒沙门氏菌	2	2
其他	20	20

较大^[2]。因此,建立相关沙门氏菌的检测鉴别方法具有实际应用意义。

PCR 检测沙门氏菌具有简单、快速、灵敏等优点,特别是多重 PCR 检测技术,相比普通的单重 PCR,可实现多通量的靶基因检测^[10]。目前,沙门氏菌血清型的检测大多数是基于三重 PCR 检测技术,而四重 PCR 法鉴别沙门氏菌血清型的报道却相对较少。龚建森在禽源沙门氏菌的分析筛选研究报道中,利用三重 PCR 法鉴别肠炎、伤寒、鼠伤寒沙门氏菌^[11]。而本研究则是采用四重 PCR 法鉴别鸡白痢、肠炎、伤寒以及鼠伤寒这 4 种沙门氏菌。

在李红等关于禽沙门氏菌多重 PCR 检测方法的建立与应用的研究过程中,证实了多重 PCR 检测技术具有特异性好、准确性高、灵敏度强的特点^[5]。本试验的结果也同样验证了此方法具备这些优点。

因而,本试验的检测方法可完成实验室和规模化养殖场对沙门氏菌的检测鉴别。

但多重 PCR 技术也有不足之处,如会对试验结果产生消极影响的引物二聚体、各组引物扩增效率不一样^[12]等问题。想要解决这些问题,让多重 PCR 检测技术更好地应用于各种病原体的检测,是日后试验研究的重点。

4 结论

本研究建立了一种检测鉴别鸡白痢、肠炎、鼠伤寒、伤寒这 4 种沙门氏菌的多重 PCR 检测方法,用于筛查实际生产中出现的这 4 种沙门氏菌。通过试验表明,此方法具备准确可靠、特异性强、灵敏度高优点,可完成实际生产中相关沙门氏菌的监测。

参考文献:

- [1] Lim H, Lee K H, Hong C H, et al. Comparison of four molecular typing methods for the differentiation of *Salmonella* spp. [J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 105 (3): 411 - 418.
- [2] Wang X, Wang H, Li T, et al. Characterization of *Salmonella* spp. isolated from chickens in central China [J]. BMC Veterinary Research, 2020, 16 (1): 299.
- [3] 李劲锋, 罗 铭, 张耀平. 沙门氏菌检测技术现状 & 进展 [J]. 医学动物防制, 2020, 36 (10): 953 - 956.
- [4] Davies R, Breslin M, Corry J E, et al. Observations on the distribution and control of *Salmonella* species in two integrated broiler companies [J]. The Veterinary Record, 2001, 149 (8): 227 - 232.
- [5] 李 红, 刘成倩, 孙凤萍, 等. 禽沙门菌多重 PCR 检测方法的建立与应用 [J]. 上海畜牧兽医通讯, 2019 (4): 18 - 21.
- [6] 董 蕾, 黄晓波, 刘静璇. 多重 PCR 技术在食品检测中的应用与展望 [J]. 安徽农业科学, 2020, 48 (11): 15 - 18.
- [7] Salvat G, Guyot M, Salmonella P M, et al. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in traditional free - range 'Abel rouge' broiler production: a 23 - year survey programme [J]. Journal of Applied Microbiology, 2016, 122 (1): 248.
- [8] Threlfall E J. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food - and water - borne infections [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2002, 26 (2): 141 - 148.
- [9] 刘红云, 许世富, 张 莉, 等. 饲料中沙门氏菌的快速检测方法 & 预防措施 [J]. 现代农业科技, 2020 (14): 205, 207.
- [10] 钟泽澄, 王进, 张师音. 多重 PCR 技术研究进展 [J]. 生物工程学报, 2020, 36 (2): 171 - 179.
- [11] 龚建森, 庄林林, 陆光武, 等. 禽源沙门菌多重 PCR 检测方法的建立与应用 [J]. 中国家禽, 2016, 38 (4): 14 - 18.
- [12] 郑玉玺, 韩 明, 李崇高, 等. 3 种血清型沙门氏菌多重 PCR 检测方法的建立 [J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11 (3): 866 - 874.