

隆抗体与重组或天然过敏原进行结合实验,可以鉴定过敏原交叉结构,为临床症状的诊断提供基础^[9]。本研究的过敏原交叉实验结果显示 1B5 和 1G3 2 株抗体与虾和大豆致敏原有交叉现象,提示 parvalbumin 和虾、大豆 2 类过敏原可能存在交叉表位。因此,1B5 和 1G3 虽然不能用于过敏原检测,但可以在 parvalbumin 与虾和大豆蛋白过敏原交叉表位的研究中发挥重要作用。

参考文献

- (1) Sampson HA. Update on food allergy [J]. *Allergy Clin Immunology*, 2004, 113(5): 805-819.
- (2) Wild LG, Lehrer SB. Fish and shellfish allergy [J]. *Curr Allergy Asthma Rep* 2005(1): 74-79.
- (3) 伊芳,汪宁,吴涛. 水产品中过敏原的研究进展 [J]. *畜牧与饲料科学* 2010, 31(10): 91-92.
- (4) 刘光明,梁银龙. 鲤鱼小清蛋白的纯化及其过敏原性鉴定 [J]. *食品科学* 2009, 30(3): 188-191.
- (5) 李荔,吴曾闵,刘志刚. 紫红笛鲷过敏原小清蛋白基因克隆及序列分析 [J]. *中国公共卫生* 2008, 24(9): 1078-1080.
- (6) 詹政科,刘萍. 双抗体夹心 ELISA 法测定食物中牛奶过敏原蛋白成分 [J]. *中国乳品工业* 2009, 37(5): 44-47.
- (7) Burks AM. Peanut allergy [J]. *Lancet* 2008, 371(13): 1538-1546.
- (8) Barre A, Borges JP, Culerrice R, et al. Homology modelling of the major peanut allergen Ara h 2 and surface mapping of IgE-binding epitopes [J]. *Immunology Letters* 2005, 100: 153-158.
- (9) Justus A. Cat IgA representative of new carbohydrate cross-reactive allergens [J]. *Allergy Clin Immunology* 2007, 119(3): 640-645.

收稿日期: 2011-03-04

(解学魁编辑 宋艳萍校对)

【检验技术】

志贺菌依赖解旋酶 DNA 恒温扩增技术建立*

王建广^{1,2}, 雷质文¹, 刘云国¹, 张健¹, 姜英辉¹, 祝素珍¹, 房保海¹, 石琰璟²

摘要: 目的 利用依赖解旋酶 DNA 恒温扩增技术(HDA),建立一种快速检测志贺菌(*Shigella*)的新方法。方法 根据志贺菌的 ipaH 基因序列设计特异性引物,优化反应体系和反应条件;并对方法进行特异性和灵敏度评价。结果 对 21 株实验菌株检测,3 株志贺菌均为阳性,其余 18 株非志贺菌均为阴性,灵敏度为 5.1×10^3 cfu/mL,与普通 PCR 方法检测结果相当。结论 HDA 法检测志贺菌具有特异、灵敏及仪器要求低等特点,具有广阔的应用前景。

关键词: 志贺菌; 检测; 恒温扩增

中图分类号: R 378.2⁺⁵

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)04-0550-03

Detection of *Shigella* with helicase-dependent isothermal DNA amplification technology WANG Jian-guang, LEI Zhi-wen, LIU Yun-guo, et al. *Department of Microorganism Detection Technical Center, Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau (Qingdao 266042, China)*

Abstract: **Objective** To establish a new rapid method to detect *Shigella* based on helicase-dependent isothermal DNA amplification (HDA). **Methods** A highly specific set of primers was synthesized to target ipaH gene of *Shigella* and then HDA condition and the reaction system were optimized simultaneously. Specificity and sensitivity of the method were evaluated. **Results** The results of all three strains of *Shigella* were positive and the others were negative. The sensitivity was 5.1×10^3 cfu/mL, which was similar to the result of PCR method. **Conclusion** Detecting *Shigella* with HDA is specific and sensitive as PCR method and has lower instrumental requirement.

Key words: *Shigella*; detection; isothermal amplification

志贺菌属(*Shigella*)细菌通称痢疾杆菌,是一类具有极高传染性和危害严重的革兰阴性肠道致病菌。据报道,志贺菌属每年造成全球约 1.6 亿人患病,近 110 万人死亡,绝大多数为 <5 岁儿童^[1-2]。在中国感染性腹泻病原菌中志贺菌属致病率居于首位,因此志贺菌的检测是食品、饮料和饮用水卫生检验的一个重要检测指标。Vincent 等^[3]于 2004 年发明了依赖解旋酶 DNA 恒温扩增(helicase-dependent isothermal DNA amplification, HDA)技术,目前, HDA 方法已经应用于一些病原菌的检测。本研究建立了快速检测志贺菌的 HDA 新方法。结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株 宋氏志贺菌 [CMCC (B) 51592], 痢疾志贺菌 [CMCC (B) 51252], 福氏志贺菌 [CMCC (B) 51572], 鼠伤寒沙门菌 (ATCC 25241), 肠炎沙门菌 (ATCC 13067), 甲型副伤寒沙门菌 (ATCC 9150), 鸭沙门菌 (ATCC 9270), 小肠结肠炎耶尔森菌 [CMCC (B) 52207], 大肠埃希菌 (ATCC 25922), 弗氏柠檬酸杆菌 (ATCC 43864), 布氏柠檬酸杆菌 (ATCC 43162), 克氏柠檬酸杆菌 (ATCC 27156), 产酸克雷伯菌 (ATCC 43165), 河生肠杆菌 (ATCC 51816), 阴沟肠杆菌 (ATCC 700323), 产气肠杆菌 (ATCC 13048), 气味沙雷菌 (ATCC 33077), 液化沙雷菌 (ATCC 27592), 奇异变形杆菌 (ATCC 25933), 普通变形杆菌 (ATCC 49132), 副溶血性弧菌 (ATCC 17802) 各 1 株, 共 21 株菌株。试验菌株分别购自美国典型菌种保藏中心 (American Type Culture Collection, 简称 ATCC) 和中国医学细菌保藏管理中心 (National Center For

* 基金项目: 国家质检总局科研项目 (2008IK140); 山东出入境检验检疫局科研项目 (SK200821)

作者单位: 1. 山东出入境检验检疫技术中心微生物科, 青岛 266002; 2. 青岛科技大学

作者简介: 王建广 (1981-) 男, 山东聊城人, 硕士在读, 研究方向: 生物化工。

通讯作者: 雷质文, E-mail: leizhw@sohu.com

Medical Culture Collection ,MCC)。

1.1.2 主要试剂与仪器 大肠杆菌 UvrD 解旋酶(上海富众生物科学有限公司); Bst polymerase、MutL protein、T4 gp32 (美国 NEB 公司) DK-8DX 型电热恒温水槽(上海森信实验仪器有限公司); DYY-8C 型电泳仪(北京六一仪器厂); Infinity3000 型凝胶成像分析系统(法国 VILBER INFINITY 公司)。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 本研究根据美国国家生物信息中心(National Center for Biotechnology Information ,NCBI) 上已公布的志贺菌的侵袭性质粒抗原 H(invasive plasmid ,ipaH) 基因序列(M76445) ,采用 Primer Premier 5.0 引物设计软件, 设计 1 对特异性扩增引物如下: (P1: 5'-TGCCTTCTATG-GCGTGT-3' ,P2: 5'-CCCAGAGGGAGAACCAGTC-3') ,预计扩增片段大小为 108 bp。引物由宝生物工程(大连) 有限公司合成。

1.2.2 模板制备 按传统培养方法分别增菌培养 1.1.1 中的 21 株实验菌株。取实验菌株的细菌培养液 1 mL ,采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(TIANamp Bacteria DNA Kit) 根据试剂盒说明书提取细菌 DNA ,保存于 -20 ℃ 备用。所制备的模板 ,用于特异性和灵敏度等试验。

1.2.3 HDA 方法的建立及优化 参考文献(3-4) 建立反应体系: 根据引物 Tm 值 ,分别在 49、50、51、52、53、54℃ 进行实验 ,确定最佳反应温度。分别把反应时间定为 30、45、60、90、120 min ,确定最佳反应时间。按照建立及优化的反应体系和反应条件对 3 株 *Shigella* 阳性菌株进行检测 ,以验证所建方法的可行性。

1.2.4 普通 PCR 扩增体系 PCR 反应体系(50 μL) 为: 2 × Taq PCR MasterMix 25 μL、2 条引物(10 μmol/L) 各 2 μL、模板 DNA 2 μL、ddH₂O 19 μL。PCR 反应程序为: 94 ℃ 预变性 4 min ,94 ℃ 变性 15 s ,51 ℃ 退火 20 s ,72 ℃ 延伸 20 s ,进行 35 个循环; 72 ℃ 延伸 5 min ,4 ℃ 保存反应产物。

1.2.5 特异性实验 用已建立的 HDA 方法对 1.2.2 中制备的 21 株实验菌株模板按照 1.2.3 中确定的 HDA 扩增条件进行扩增 ,电泳观察结果。

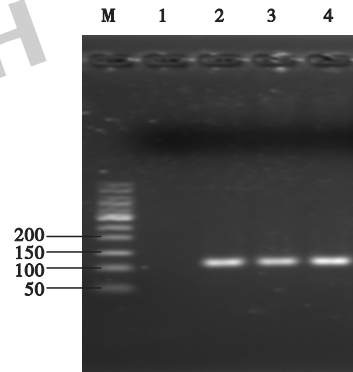
1.2.6 灵敏度实验 将经过增菌培养的 *Shigella* 标准菌株 CMCC(B) 51592 ,用 0.85% 生理盐水做成菌悬液进行平板计数并提取 DNA。对所提取 DNA 进行 10 倍梯度稀释 ,对各梯度 DNA 进行 HDA 扩增 ,2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测产物 ,确定灵敏度。

1.2.7 HDA 方法与普通 PCR 方法比较 取 1.2.6 中提取的 *Shigella* 标准菌株 CMCC(B) 51592 的各梯度 DNA 进行普通 PCR 扩增 ,2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测产物。为增加可比性 ,2 种方法采用相同的反应体积。普通 PCR 的引物与 HDA 方法引物相同。

2 结果

2.1 建立及优化反应体系和反应条件 反应体系为 50 μL ,采用两步法反应: 反应液 I: 2 μL 模板 DNA ,引物(10 μmol/L) 各 2 μL ,10 × buffer [350 mmol/L Tris-HAc(pH 7.5) 、100 mmol/L 二硫苏糖醇、1 mg/mL 牛血清白蛋白(bovine serum albumin ,BSA) 、100 mmol/L MgAc₂] 2.5 μL ,用 ddH₂O 补至 25 μL。反应液 II: 10 × buffer [350 mmol/L Tris-HAc(pH 7.5) 、100 mmol/L 二硫苏糖醇、1 mg/mL 牛血清白蛋白(bovine serum albumin ,BSA) 、100 mmol/L MgAc₂] 2.5 μL ,三磷酸腺苷(adenosine triphosphate ,ATP) (100 mmol/L) 1.5 μL ,dNTPs (10 mmol/L) 2 μL ,Bst polymerase(8000 U/mL) 2.5 μL ,UvrD helicase(100 mg/L) 1 μL ,MutL protein(600 mg/L) 1 μL ,T4 gp32(10 mg/ml) 0.5 μL ,用 ddH₂O 补至 25 μL。反应液 I 在 95 ℃ 中水浴 4 min ,自然冷却到常温 ,将反应液 II 加入反应液 I 混匀 ,置 51 ℃ 恒温扩增 90 min。2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测产物。

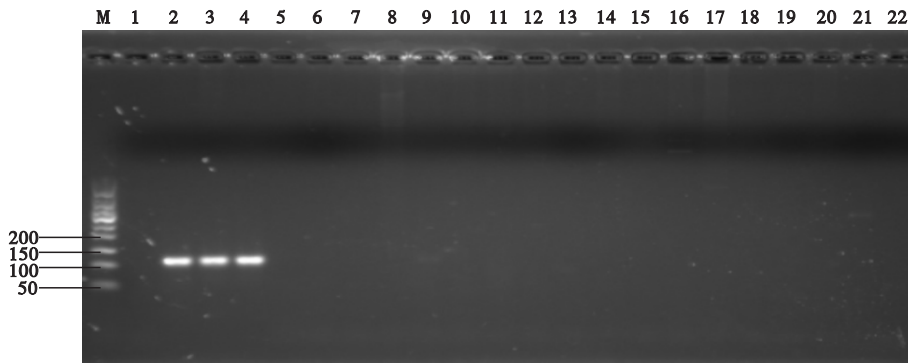
2.2 HDA 方法验证(图 1) 电泳结果显示 3 株 *Shigella* 阳性菌株均出现阳性条带(图 1) ,初步表明该方法可用于 *Shigella* 的检测。



注: M: DNA Marker; 1: 空白对照; 2: 宋氏志贺菌; 3: 痢疾志贺菌; 4: 福氏志贺菌。

图 1 *Shigella* 的 HDA 检测结果

2.3 特异性实验(图 2) 用已建立的 HDA 方法对 1.2.2 中

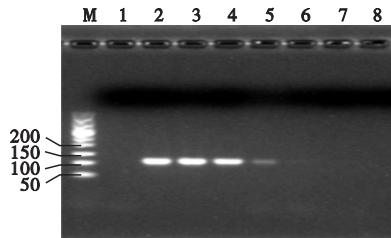


注: M: DNA Marker; 1: 空白对照; 2: 宋氏志贺菌; 3: 痢疾志贺菌; 4: 福氏志贺菌; 5: 鼠伤寒沙门菌; 6: 肠炎沙门菌; 7: 甲型副伤寒沙门菌; 8: 鸭沙门菌; 9: 小肠结肠炎耶尔森菌; 10: 大肠埃希菌; 11: 弗氏柠檬酸杆菌; 12: 布氏柠檬酸杆菌; 13: 克氏柠檬酸杆菌; 14: 产酸克雷伯菌; 15: 河生肠杆菌; 16: 阴沟肠杆菌; 17: 产气肠杆菌; 18: 气味沙雷氏菌; 19: 液化沙雷氏菌; 20: 奇异变形杆菌; 21: 普通变形杆菌; 22: 副溶血性弧菌。

图 2 志贺菌特异性检测结果电泳图谱

制备的 21 株实验菌株模板检测的电泳结果表明,宋氏志贺菌 CMCC(B) 51592、痢疾志贺菌 CMCC(B) 51252、福氏志贺菌 CMCC(B) 51572 均呈阳性,其他肠杆菌科和非肠杆菌科实验菌株均呈阴性。检测结果表明该 HDA 方法对于志贺菌具有较好的特异性。

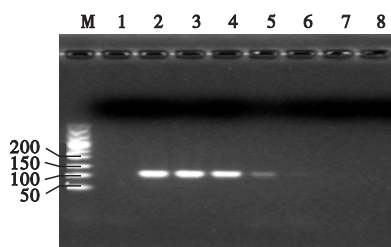
2.4 灵敏度实验(图 3) 由计数结果可知,各梯度 DNA 对应菌浓度为: 5.1×10^6 、 5.1×10^5 、 5.1×10^4 、 5.1×10^3 、 5.1×10^2 、 5.1×10^1 、 5.1×10^0 cfu/mL。电泳结果显示,随着模板浓度的降低,条带逐渐变淡,至稀释度 5.1×10^2 cfu/mL 时无扩增产物, HDA 方法的最低检测限为 5.1×10^3 cfu/mL。



注: M: DNA Marker; 1: 空白对照; 2: 5.1×10^6 cfu/mL; 3: 5.1×10^5 cfu/mL; 4: 5.1×10^4 cfu/mL; 5: 5.1×10^3 cfu/mL; 6: 5.1×10^2 cfu/mL; 7: 5.1×10^1 cfu/mL; 8: 5.1×10^0 cfu/mL。

图 3 不同稀释度 CMCC(B) 51592DNA HDA 方法检测电泳图谱

2.5 HDA 方法与普通 PCR 方法比较(图 4) 由各梯度 DNA 对应的菌浓度及电泳结果可见,普通 PCR 方法的最低检测限为 5.1×10^3 cfu/mL。由此可以看出,本研究所建立的 HDA 方法的灵敏度与普通 PCR 方法的灵敏度相当。



注: M: DNA Marker; 1: 空白对照; 2: 5.1×10^6 cfu/mL; 3: 5.1×10^5 cfu/mL; 4: 5.1×10^4 cfu/mL; 5: 5.1×10^3 cfu/mL; 6: 5.1×10^2 cfu/mL; 7: 5.1×10^1 cfu/mL; 8: 5.1×10^0 cfu/mL。

图 4 PCR 方法检测不同稀释度 CMCC(B) 51592DNA 的电泳图谱

3 讨论

HDA 检测方法有一步法和两步法 2 种反应程序⁽⁴⁾, Vincent 等⁽³⁾ 经过试验比较发现,一步法反应程序的产物比两步法反应程序的产物低 40%~60%。本研究采用的是两步法反应程序。Buysse 等⁽⁵⁾ 发现志贺菌含有特有的侵袭性质粒抗原 H(invasive plasmid ipaH),该抗原在志贺菌不同菌种间具有一定的保守相似性,同时多拷贝存在于染色体和侵袭质粒上,且不随传代丢失。在本研究中选取侵袭性质粒抗原 H

基因序列作为检测靶基因。在方法建立过程中,对反应温度和反应时间进行了优化;采用近源及非近源共 21 株菌株进行了特异性验证;在灵敏度方面与普通 PCR 方法进行了对比。结果表明,所建立的 *Shigella* 的 HDA 检测方法具有较高的特异性和灵敏度。同时所建立的 *Shigella* 的 HDA 检测方法在操作的简便性和检测的快捷性上还存在不足,本研究的下一步工作将对此进行改进,使 HDA 检测方法基本适合现场快速检测的需要。

现有的实验室检测方法中,传统的细菌培养和生化鉴定方法⁽⁶⁾、酶联免疫技术⁽⁷⁾、PCR⁽⁸⁻⁹⁾ 及荧光定量 PCR 技术⁽⁹⁻¹⁰⁾ 等方法均存在各自的不足,难以普及应用。HDA 技术诞生以后,Chow 等⁽¹¹⁾ 利用 tHDA(thermostable HDA) 技术对引起腹泻的艰难梭状芽孢杆菌进行了检测; Gill 等⁽¹¹⁾ 建立了 tHDA-ELISA 方法对临床样品中的幽门螺旋杆菌进行了检测;美国 NEB 公司已经开发出一系列基于 HDA 技术的反应试剂盒⁽¹¹⁾,展现出良好的发展势头。随着商品化解旋酶种类的增多和技术的进一步完善, HDA 检测方法有望成为一种常规检测手段。

参考文献

- Warren BR, Parish ME, Schneider KR. *Shigella* as a foodborne pathogen and current methods for detection in food [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2006 46(7): 551-567.
- Koutsotoli AD, Papassava ME, Maipa VE, et al. Comparing *Shigella* waterborne outbreaks in four different areas in Greece: common features and differences [J]. *Epidemiology and Infection*, 2006, 134: 157-162.
- Vincent M, Xu Y, Kong H. Helicase-dependent isothermal DNA amplification [J]. *EMBO Rep* 2004 5(8): 795-800.
- 刘洵,程天印,常小斌,等. 赖解旋酶恒温基因扩增技术的原理、应用和展望 [J]. *长沙大学学报* 2007 21(2): 29-31.
- Buysse JM, Hartman AB, Strockbine N, et al. Genetic polymorphism of the ipaH multicopy antigen gene in *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* [J]. *Microb Pathog*, 1995, 19(5): 335-349.
- 郑幸福,江智辉,周良君,等. 生化快速检测法鉴定沙门菌和志贺菌 [J]. *现代预防医学* 2005 32(5): 495-503.
- 张杰,王崑,张玲,等. 血痕中乙型肝炎病毒 DNA 检测 [J]. *中国公共卫生* 2010 26(8): 983-985.
- 胡玉山,王鸣,杜琳,等. 副溶血性弧菌流行群特异多重 PCR 鉴定 [J]. *中国公共卫生* 2007 23(5): 581-582.
- 李盛丰,赵姣,钟名华,等. 单增李斯特菌不同 PCR 快速检测方法比较 [J]. *中国公共卫生* 2008 24(8): 1021-1023.
- 茅海燕,卢亦愚,陈寅,等. 腺病毒荧光定量 PCR 快速检测方法建立 [J]. *中国公共卫生* 2010 26(1): 95-96.
- 彭涛. 核酸等温扩增技术及其应用 [M]. 北京: 科学出版社, 2009: 58-66.

收稿日期: 2010-09-03

(宋艳萍编校)