

活的非可培养状态沙门菌 RT-PCR 检测

李影¹, 王伟利², 孟庆峰², 钱爱东¹

(1 吉林农业大学 动物科学技术学院, 吉林 长春 130118;

2 吉林出入境检验检疫局 检验检疫技术中心, 吉林 长春 130062)

摘要:依据沙门菌 *Salmonella* 活的非可培养状态(VBNC)差异基因序列设计特异性引物 C1 和 C5,并对处于 VBNC 的沙门菌模型开展 RT-PCR 检测.结果表明,引物 C1 和 C5 可从模型中分别扩增出 198 和 137 bp 的目的片段,这些片段与差异基因的核苷酸序列相似性均大于 99%.而且所获得的电泳图谱也不同于正常状态的沙门菌、霍乱弧菌 *Vibrio cholerae* 等一些食源性致病菌.另外,2 对引物的最低 cDNA 检出量分别为 30.65 和 3.065 pg/ μ L.由此证明,引物 C1 和 C5 具有较好的特异性和敏感性,可用于建立 VBNC 沙门菌的检测方法.

关键词:沙门菌;活的非可培养状态;差异基因;RT-PCR

中图分类号:S851.34

文献标志码:A

文章编号:1001-411X(2013)01-0098-03

RT-PCR for Viable but Non-culturable *Salmonella*

LI Ying¹, WANG Weili², MENG Qingfeng², QIAN Aidong¹

(1 College of Animal Science, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2 Jilin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Changchun 130062, China)

Abstract: Viable but non-culturable *Salmonella* was detected by RT-PCR with primers designed according to the differential viable but non-culturable (VBNC) genes, *ybbB* and *rhIB*. The results showed that primers C1 and C5 respectively amplified fragments about 198 and 137 bp, their nucleotide sequence homology with *ybbB* and *rhIB* was both over 99%, and the electrophoretogram form VBNC *Salmonella* was different from that of normal *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, et al. The lowest cDNA detection level with primers C1 and C5 in VBNC *Salmonella* was respectively 30.65 and 3.065 pg/ μ L. Primers C1 and C5 with specificity and sensibility were applied to establish the detection method in VBNC *Salmonella*.

Key words: *Salmonella*; viable but non-culturable; differential gene; RT-PCR

沙门菌 *Salmonella* 是一类重要的食源性致病菌,严重危及食品安全和公众健康.近年来由该菌引发的肉、蛋、奶、水等污染事件更是屡见不鲜^[1-4].2008年,国际食品网站上公布,在 25 260 起食品安全事件中,由沙门菌引发的为 8 310 起,占总数的 32.89%^[5].而美国疾病预防控制中心 2009 年的统计结果也显示,1998—2000 年,沙门菌污染事件平均每年发生 974 起,2004—2006 年,平均每年为 692 起^[6].在这些事件中,人们最为担忧的是那些处于活

的非可培养状态(Viable but non-culturable, VBNC)的沙门菌.因为 VBNC 沙门菌丧失了平板生长繁殖能力^[7],不但不死亡,反而能保留毒力和致病性^[8-9],成为下次污染事件的隐性传染源^[10-11].因此,建立针对 VBNC 沙门菌的检测方法尤为重要.

本试验依据前期研究所获得的沙门菌 VBNC 差异基因序列(HM037251 和 HM037252),设计特异性引物,对 VBNC 沙门菌模型实施 RT-PCR 检测,旨在评估引物的作用,以及据此引物建立可行的检测方

收稿日期:2012-07-20 网络出版时间:2013-01-11

网络出版地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20130111.0925.003.html>

作者简介:李影(1977—),女,副教授,博士;通信作者:王伟利(1968—),研究员,博士,E-mail: wang wei-li@163.com

基金项目:国家质检总局科技计划项目(2009IK168);“十二五”吉林省教育厅科学技术研究项目(201148)

法,从而为最终制订进出口检验检疫行业标准奠定基础.

1 材料与方法

1.1 试验菌株

鸡白痢沙门菌 CVCC578 参考株,购自中国兽医药品监察所. VBNC 沙门菌模型按文献[12]诱导.

1.2 试剂

SS 培养基为日本荣研化学株式会社产品, LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (13152) 为 Probes MoLecuLar 公司产品. RNAiso Reagent、AMV 反转录酶、RNA 酶抑制剂、Ex-TaqDNA 聚合酶、pMD18-T Vector 等,均为 TaKaRa 公司(日本)产品.

1.3 引物

根据文献[13]所列 2 个差异基因的 cDNA 序列设计引物(表 1),引物由 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司合成.

表 1 VBNC 沙门菌差异基因 PCR 引物
Tab.1 The PCR primers of VBNC *Salmonella* differential genes

引物名称	引物序列	扩增片段大小/bp
C1	C1-1:5'-GCAGCACCTCCTCG-3'	198
	C1-2:5'-TGCCGCTTTCGTTA-3'	
C5	C5-1:5'-CAGCAGGTTTACAGT-3'	138
	C5-2:5'-AGTTCGTCAGATAG-3'	

1.4 反转录合成 cDNA

取正常和 VBNC 沙门菌各 20 mL, 4 ℃, 6 000 r/min, 离心 10 min, 弃上清液, 使用 RNAiso Reagent 提取细菌总 RNA. 在总 RNA 中依次加入下列成分进行反转录: RNA 酶抑制剂(40 U/μL) 0.5 μL, 5 × RT-Buffer 2 μL, AMV 酶(5 U/μL) 0.5 μL, dNTP(10 mmol/L) 2 μL, 引物(20 pmol/μL) 0.5 μL, 补水至 20 μL. 轻弹混合, 瞬间离心, 42 ℃ 作用 45 min, 再 95 ℃ 作用 5 min, 最后冰浴 5 min.

1.5 PCR 扩增

在 50 μL 体系中加入下列各成分: cDNA 模板 3 μL, dNTP(25 mmol/L) 2 μL, 10 × Buffer (MgCl₂) 2 μL, 引物(20 pmol/μL) 各 1 μL, Ex-Taq 酶(10 U/μL) 1 μL, 补水至 50 μL. 反应程序: 95 ℃ 预变性 3 min, 进入 PCR 循环, 95 ℃ 1 min, 50 ℃ 40 s, 72 ℃ 1 min, 共 30 个循环后, 72 ℃ 延伸 5 min.

1.6 RT-PCR 产物鉴定

取 3 μL 回收纯化后的 PCR 产物与 1 μL pMD18-T 载体和 5 μL 连接液混匀, 16 ℃ 连接过夜, 转化

DH5α 感受态细胞, 鉴定为阳性的转化菌送 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司测序.

1.7 特异性试验

选择肺炎克雷伯菌 *Klebsiella oxytoca*, 黏质沙雷菌 *Serratia marcescen*, 霍乱弧菌 *Vibrio cholerae*, 阴沟肠杆菌 *Enterobacter cloacae*, 奇异变形杆菌 *Proteus mirabilis*, 大肠埃希菌 *Escherichia coli* 作为对照试验组试验菌株. 按“1.4”提取各种细菌总 RNA 并反转录, 于同一 PCR 反应条件下进行扩增, 以检测该方法的特异性.

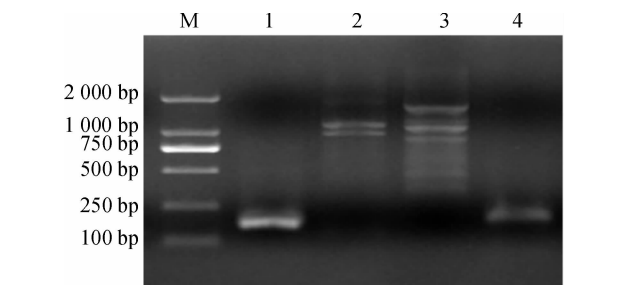
1.8 敏感性试验

将 VBNC 沙门菌总 RNA 反转录成 cDNA, 再将 cDNA 模板进行 10 倍梯度稀释, 采用“1.5”反应条件进行 PCR 扩增, 以检测敏感性.

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 产物鉴定

应用引物 C1 和 C5 对 VBNC 沙门菌进行 PCR, 可分别扩增出大小为 198 和 137 bp 的目的片段. 而正常状态沙门菌则扩出多条片段, 片段大小多集中在 500 ~ 2 000 bp 处, 如图 1 所示.



M: DNA marker DL2000; 1: C5 对 VBNC 沙门菌扩增产物; 2: C5 对正常沙门菌扩增产物; 3: C1 对正常沙门菌扩增产物; 4: C1 对 VBNC 沙门菌扩增产物.

图 1 RT-PCR 扩增结果

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR product

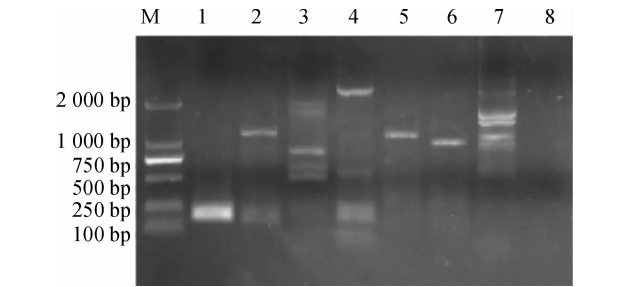
2.2 测序鉴定

引物 C1 和 C5 均可对 VBNC 沙门菌实现特异性扩增, 而对正常沙门菌则为非特异扩增. 并且测序结果也表明, 引物 C1 和 C5 的扩增产物序列与 NCBI 注册的基因序列(HM037251 和 HM037252)的核苷酸序列相似性均为 99%, 表明 2 引物扩增序列正确.

2.3 特异性试验

应用引物 C1 和 C5 进行 PCR 时, VBNC 沙门菌电泳图谱与其他各菌存在差异. 图 2 所示, VBNC 沙门菌只在 198 bp 存在 1 条条带, 而霍乱弧菌、黏质沙雷菌、阴沟杆菌和奇异变形杆菌的电泳图谱则显示为多条带. 尽管大肠埃希菌与克雷伯菌也只扩出 1 条条带, 但片段大小与目的条带不符; 图 3 所示, 引

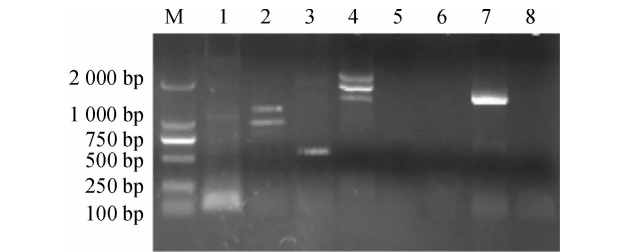
物 C5 从 VBNC 沙门菌扩增出 137 bp 的目的片段,而从霍乱弧菌、黏质沙雷菌、阴沟杆菌和奇异变形杆菌未能扩出目的条带,并且从大肠埃希菌和克雷伯菌也未扩增出任何产物. 上述结果表明,引物 C1 和 C5 可以较好地排除多种食源性病菌的干扰,可用于建立 VBNC 沙门菌的检测方法.



M: DNA marker DL2000; 1: VBNC 沙门菌; 2: 霍乱弧菌; 3: 黏质沙雷菌; 4: 阴沟杆菌; 5: 大肠埃希菌; 6: 克雷伯菌; 7: 奇异变形杆菌; 8: 阴性对照.

图 2 引物 C1 的特异性试验

Fig. 2 Identification of specificity of primer C1



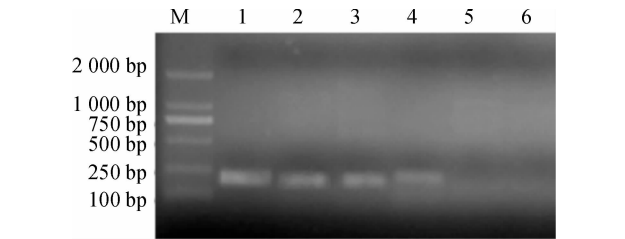
M: DNA marker DL2000; 1: VBNC 沙门菌; 2: 霍乱杆菌; 3: 黏质沙雷菌; 4: 阴沟杆菌; 5: 大肠埃希菌; 6: 克雷伯菌; 7: 奇异变形杆菌; 8: 阴性对照.

图 3 引物 C5 的特异性试验

Fig. 3 Identification of specificity of primer C5

2. 4 敏感性试验

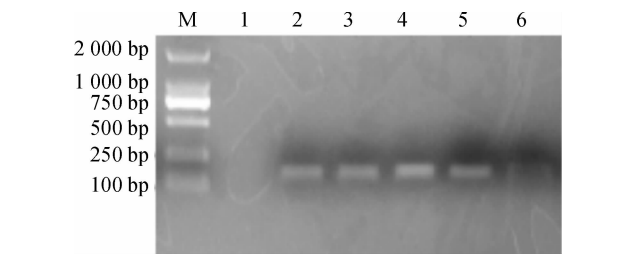
经测量, VBNC 沙门菌的 cDNA 质量浓度为 306. 5 ng/ μ L. 图 4、5 显示, 引物 C1 所能扩增出 10^4 倍稀释物, 其最低 cDNA 量为 30. 65 pg/ μ L. 而 C5 则能扩增出 10^5 倍稀释物, 其最低 cDNA 量为 3. 065 pg/ μ L. 结果表明, 2 对引物均具有较好的敏感性, 均可用于建立 VBNC 沙门菌的检测方法.



M: DNA marker DL2000; 1 ~ 5: $10^1 \sim 10^5$ 倍稀释的 VBNC 沙门菌 cDNA; 6: 阴性对照.

图 4 引物 C1 的敏感性试验

Fig. 4 Identification of sensibility of primer C1



M: DNA marker DL2000; 1: 阴性对照; 2 ~ 6: $10^1 \sim 10^5$ 倍稀释的 VBNC 沙门菌 cDNA.

图 5 引物 C5 的敏感性试验

Fig. 5 Identification of sensibility of primer C5

3 讨论

目前, 人们已在分子水平上对细菌 VBNC 有了进一步的了解和认识. 多数观点认为: 与 VBNC 发生相关的基因是一组基因群, 这组基因群因诱导因素 (温度、营养、pH 值、药物等) 的不同而启动不同的基因, 并且不同菌的 VBNC 发生相关基因群亦不相同^[14-16]. VBNC 可能是由 1 个或 1 组基因控制的, 这些基因在生长快速且未暴露在任何压力下, 表达水平较低甚至不表达, 但是在自然环境或人为不良环境中时却能被大量诱导表达. 因而, 选定 VBNC 的特异性基因是建立核酸检测方法的关键. 李影等^[13]通过 mRNA 差异显示技术获得了只在 VBNC 下高量表达的鸡白痢沙门菌的差异基因 (HM037251 和 HM037252), 经分析是 *ybbB* 和 *rhIB* 基因的部分序列. 为了建立有关 VBNC 沙门菌的 RT-PCR 检测方法, 本研究通过试验评估了依据 2 个差异基因所设计的引物, 该引物能排除霍乱弧菌等一些常见的食源性病原菌的干扰, 具有较好的特异性和敏感性. 然而对于建立检测方法和制订行业标准而言, 除了目标基因和引物外, RT-PCR 反应体系的稳定性及实际适用性都亟待解决, 而这些都将成为本试验进一步研究的主要内容.

参考文献:

[1] PLYM L, WIERUP M. *Salmonella* contamination: A significant challenge to the global marketing of animal food products[J]. Rev Sci Tech, 2006, 25(2): 541-554.

[2] WHITE P L, NAUGLE A L, JACKSON C R, et al. *Salmonella enteritidis* in meat, poultry, and pasteurized egg products regulated by the U. S. Food Safety and Inspection Service, 1998 through 2003[J]. J Food Prot, 2007, 70(3): 582-591.

- [4] LANGSETH W, RUNDBERGET T. Instrumental methods for determination of nonmacrocyclic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures[J]. *Chromatogr A*, 1998, 815(1):103-121.
- [5] MATEO J J, MATEO R, HIONJO M J, et al. Liquid chromatographic determination of toxigenic secondary metabolites produced by *Fusarium* strains[J]. *Chromatogr A*, 2002, 955(2):245-256.
- [6] ROSENBERG E, KRSKA R, WISSIACK R, et al. HPLC-APCI-MS as a new tool for the determination of the mycotoxin zearalenone in food and feed[J]. *Chromatogr A*, 1998, 819(1/2): 277-288.
- [7] JIMENZE M, MATEO R. Determination of mycotoxins produced by *fusarium* isolates from banana fruits by capillary gas chromatography and high-performance liquid chromatography[J]. *Chromatogr A*, 1997, 778(1/2): 363-372.
- [8] PALLARONI L, HOLST C. Determrination of zearalenone from wheat and corn by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry[J]. *Chromatogr A*, 2003, 993(1/2): 39-45.
- [9] ZOLLNER P, BERNER D, JODLBAUER J, et al. Determination of zearalenone and its metabolites α - and β -zearalenone in beer samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Chromatogr B*, 2000, 738(2): 233-241.
- [10] 隋凯, 李军, 卫锋, 等. 谷物中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的高效液相色谱检测及质谱确证[J]. *分析化学研究简报*, 2005, 33(11): 1643-1646.
- [11] 陈杖榴, 杨桂香, 曾振灵, 等. 兽药残留的毒性与生态毒理研究进展[J]. *华南农业大学学报*, 2001, 22(1): 88-91.
- [12] BERTHILLER F, SCHUHMACHER R, BUTTINGER G, et al. Rapid simultaneous determination of major type A- and B-trichothecenes as well as zearalenone in maize by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Chromatogr A*, 2005, 1062(2):209-216.
- [13] 卢培成, 邓衍柏, 邹新华, 等. 猪胃组织中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的液质联用检测[J]. *广东农业科学*, 2011, 114(9):114-116.
- [14] 梁颖, 刘邻渭, 张春晖. 液质联用同时检测小麦中三种镰刀菌毒素[J]. *中国粮油学报*, 2006, 21(6):160-162.

【责任编辑 柴 焰, 霍 欢】

(上接第 100 页)

- [3] NAUGLE A L, BARLOW K E, EBLEN D R, et al. U. S. Food Safety and Inspection Service testing for *Salmonella* in selected raw meat and poultry products in the United States, 1998 through 2003: Analysis of set results[J]. *J Food Prot*, 2006, 69(11):2607-2614.
- [4] MATARAGAS M, SKANDAMIS P N, DROSINOS E H. Risk profiles of pork and poultry meat and risk ratings of various pathogen/product combinations[J]. *Int J Food Microbiol*, 2008, 126(1/2):1-12.
- [5] OzFoodNet Working Group. Monitoring the incidence and causes of diseases potentially transmitted by food in Australia: Annual report of the OzFoodNet Network, 2008[J]. *Commun Dis Intell*, 2009, 33(4):389-413.
- [6] Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance for foodborne disease outbreaks—United States, 2006[J]. *Morb Mortal Weekly Rep*, 2009, 58(22):609-615.
- [7] OLIVER J D. The viable but nonculturable state in bacteria[J]. *J Microbiol*, 2005, 43(S):93-100.
- [8] SAROJ S, SHASHIDHAR R, BANDEKAR J. Gamma radiation used as hygienization technique for foods does not induce viable but non-culturable state (VBNC) in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium[J]. *Curr Microbiol*, 2009, 59(4):420-424.
- [9] XU H, LEE H Y, AHN J. Cross-protective effect of acid-adapted *Salmonella enterica* on resistance to lethal acid and cold stress conditions[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2008, 47(4):290-297.
- [10] OLIVER J D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2009, 34(4):415-425.
- [11] SUN Fengrong, CHEN Jixiang, ZHONG Linhong, et al. Characterization and virulence retention of viable but non-culturable *Vibrio harveyi* [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2008, 64(1):37-44.
- [12] 李影, 段锐, 孙晓媛. 鸡白痢沙门氏菌 CVCC578 标准株 VBNC 研究模型的建立及鉴定[J]. *中国预防兽医学报*, 2010, 32(3):179-182.
- [13] 李影, 段锐, 孙晓媛. 鸡白痢沙门氏菌活的非可培养状态相关基因 *ybbB* 和 *rhIB* 的鉴定[J]. *中国预防兽医学报*, 2011, 33(9):689-693.
- [14] COUTARD F, LOZACH S, POMMEPUY M, et al. Real-time reverse transcription-PCR for but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus* after recovery of culturability[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(16):5183-5189.
- [15] ABE A, OHASHIA E, RENB H, et al. Isolation and characteriazation of a cold-induced nonculturable suppression mutant of *Vibrio vulnificus*[J]. *Microbiol Res*, 2007, 162(2):130-138.
- [16] LAI Chenjiang, CHEN Shuying, LIN Hong, et al. Change of protein profiles in the induction of the viable but nonculturable state of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Int J Food Microbiol*, 2009, 135(2):118-124.

【责任编辑 柴 焰, 霍 欢】