

志贺菌 *ipaH* 基因 PCR 检测方法的建立及应用

文英, 何永彩 (青海大学农牧学院, 青海西宁 810006)

摘要 为了掌握青海省4种食源性动物体内志贺菌的分布情况, 针对志贺菌属侵袭性质粒抗原H基因(*invasive plasmid, ipaH*)设计1对特异性引物, 建立志贺菌的PCR检测方法, 优化反应体系, 检测该方法的敏感性和特异性, 并将该方法应用于临床样本检测。结果表明, 建立的PCR方法能特异性扩增志贺菌*ipaH*基因, 而沙门氏菌、大肠杆菌、葡萄球菌、枯草杆菌、变形杆菌等均未扩增出条带; 最低检测限值为1.8 pg/ μ L。在临床样本检测中, 100株疑似菌株的阳性率为62.00%, 其中牦牛源75.00%(3/4), 鸡源35.29%(12/34), 羊源44.44%(8/18), 猪源88.64%(39/44); 新鲜鸡粪和羊粪的阳性率分别为91.67%(11/12)和90.91%(10/11)。这说明试验所建立的PCR方法具有良好的敏感性和特异性, 可应用于志贺菌的实验室诊断; 4种动物体内均不同程度带菌, 在临床诊断和治疗时不可忽视该菌的致病作用。

关键词 志贺菌; 聚合酶链式反应(PCR); *ipaH* 基因

中图分类号 R 378.2 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2020)21-0103-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.21.027



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Establishment and Application of PCR Detection Method for *ipaH* Gene of *Shigella* sp.

WEN Ying, HE Yong-cai (College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining, Qinghai 810006)

Abstract In order to grasp the distribution of 4 kinds of food-borne *Shigella* sp. in animals in Qinghai Province, a pair of specific primers were designed according to *Shigella* invasive plasmid antigen H gene(*invasive plasmid, ipaH*) to establish PCR detection method for *Shigella* sp.. The reaction system was optimized, and the sensitivity and specificity of the method were detected. And this method was applied to detect the clinical samples. The results showed that the PCR method established by the experiment could specifically amplify the *ipaH* gene of *Shigella* sp., but *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp., *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*, etc. did not amplify the specific band. The minimum detection limit was 1.8 pg/ μ L. Among the detected clinical samples, the positive rate of 100 suspected strains was 62.00%. And the positive rate of yak-borne, chicken-borne, sheep-borne, pig-borne *Shigella* sp. were 75.00%(3/4), 35.29%(12/34), 44.44%(8/18) and 88.64%(39/44) respectively. The positive rates of fresh chicken manure and sheep manure were 91.67%(11/12) and 90.91%(10/11), respectively. The results showed that PCR method established by the experiment had good sensitivity and specificity, and the method could be applied in the laboratory diagnosis of *Shigella* sp.. The four kinds of animals carried pathogen in different degrees, so the pathogenic role of *Shigella* sp. could not be ignored in clinical diagnosis and treatment.

Key words *Shigella* sp.; Polymerase chain reaction(PCR); *ipaH* gene

志贺菌为革兰阴性兼性厌氧菌, 在自然界中分布广泛, 是一类具有高度传染性和危害严重的肠道致病菌。志贺菌属(*Shigella*)是从多个独立的大肠杆菌(*Escherichia coli*)起源并经过趋同进化而形成的, 可分为4个种群^[1]。国内外大量研究表明, 志贺菌不仅感染人类, 而且也会感染多种动物, 包括鸡、牛、猪、兔、犬、狐狸和猴等多种动物, 以腹泻和肠道病变为主要症状, 尤其是幼龄动物的发病率和死亡率均很高。该病不仅严重危害了动物健康, 而且给畜牧养殖业造成了巨大的经济损失^[1-9]。

为摸清青海省4种食源性动物体内志贺菌的分布情况, 根据GenBank数据库已发表的志贺菌属侵袭性质粒抗原H(*invasive plasmid, ipaH*)编码基因序列, 设计1对特异性引物, 建立PCR检测方法, 并对不同动物源样本进行志贺菌的PCR检测, 以期丰富青海地区志贺菌流行病学资料, 也可对相关疾病的防治提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品 志贺菌标准菌株, 购自北京百欧博伟生物技术有限公司; 100株疑似志贺菌菌株、沙门氏菌、大肠杆菌、金

黄色葡萄球菌、枯草杆菌、变形杆菌等由青海大学农牧学院微生物平台实验室II保存; 23份新鲜粪样, 鸡粪11份、羊粪12份, 采自养殖场。

1.1.2 培养基 营养肉汤、营养琼脂、LB肉汤、SS琼脂等, 均购自青岛高科园海博技术有限公司。

1.1.3 主要试剂 粪便基因组提取试剂盒、细胞基因组提取试剂盒、6 $\times$ DNA Loading Buffer、2 $\times$ Taq PCR Master Mix、DNA Marker D2000、GeneGreen 核酸染料等, 均购自TIANGEN公司; 琼脂糖, 购自上海贝晶生物技术有限公司。

1.1.4 主要仪器 立式高压蒸汽灭菌锅, 购自上海申安医疗器械厂; 电子天平, 购自梅特勒-托利仪器(上海)有限公司; 生化培养箱、恒温摇床, 购自上海一恒科学仪器有限公司; PCR扩增仪, 购自美国Bio-Rad(伯乐)中国有限公司; 电泳仪, 购自北京市六一仪器厂; 台式高速离心机, 购自德国希格玛实验室离心机公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 按照GenBank数据库已发表的志贺菌*ipaH*基因序列, 使用Primer Premier 5.0软件设计1对特异性引物, 预计扩增片段大小为383 bp。引物序列如下: 上游引物为5'-TGAGAGCTGTGAGGACCGT-3', 下游引物为5'-CATGCCATGGTCCCCAGAGG-3', 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2.2 细菌DNA提取 无菌操作将保存在-20℃下的标准

基金项目 青海省农业农村厅项目(NMSY-2017-03)。

作者简介 文英(1974—), 女, 青海西宁人, 副教授, 硕士, 从事预防兽医学研究。

收稿日期 2020-03-12

志贺菌接种至营养肉汤,37℃下培养 18~24 h 后转接 SS 琼脂确保菌株完全复苏。将完全复苏的菌株接至营养肉汤,摇床 37℃下 170 r/min 培养 12~16 h;取 1.0 mL 菌液 12 000 r/min 离心 1 min,弃上清液,用 DNA 提取试剂盒提取模板 DNA 或加入 50 μL 蒸馏水重悬后煮沸 5 min,吸取 45 μL 上清液移至-20℃下保存备用。

1.2.3 PCR 扩增条件优化。PCR 扩增体系如下:12.5 μL 2×Taq PCR MasterMix,上、下游引物各 1 μL,最佳模板量,ddH₂O 补足至 25 μL。PCR 扩增程序如下:95℃预变性 5 min;95℃变性 1 min,最佳退火温度下 1 min,72℃延伸 30 s,共 35 个循环;72℃延伸 10 min,4℃下保存。扩增产物于 1%的琼脂糖凝胶中电泳观察结果。利用建立的 PCR 方法,在 50~60℃下进行 PCR 扩增,确定最佳退火温度。模板量选择 0.5、1.0、2.0、3.0 μL 4 种不同体积,筛选最佳模板量。

1.2.4 特异性试验。采用优化的反应条件对标准志贺菌、沙门氏菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、变形杆菌

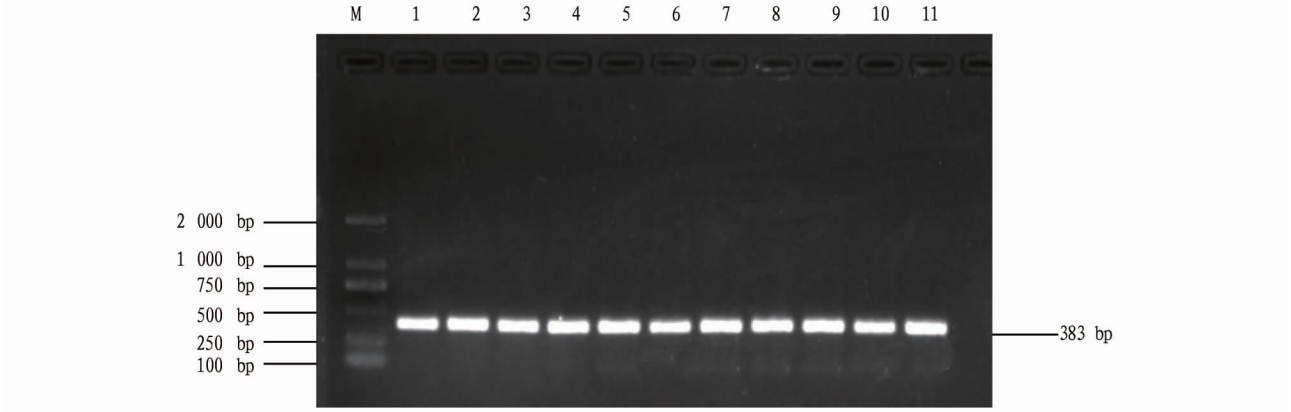
等进行 PCR 扩增,以检测该方法的特异性。

1.2.5 敏感性试验。使用核酸测定仪测定标准志贺菌模板 DNA 浓度,10 倍倍比稀释后,每个梯度进行 PCR 扩增,检测该方法的敏感性。

1.2.6 临床样本的检测。对于实验室保存的不同动物源疑似志贺菌菌株,采用常规法分离纯化,样本经增菌后挑取增菌液划线接种于 SS 平板,收集符合志贺菌菌落形态的菌株共 100 株。细菌 DNA 提取方法同“1.2.2”,用已优化的 PCR 方法进行检测;无菌采集的 11 份鸡粪和 12 份羊粪样本,用粪便基因组提取试剂盒提取模板 DNA,采用已优化的 PCR 方法进行检测。

2 结果与分析

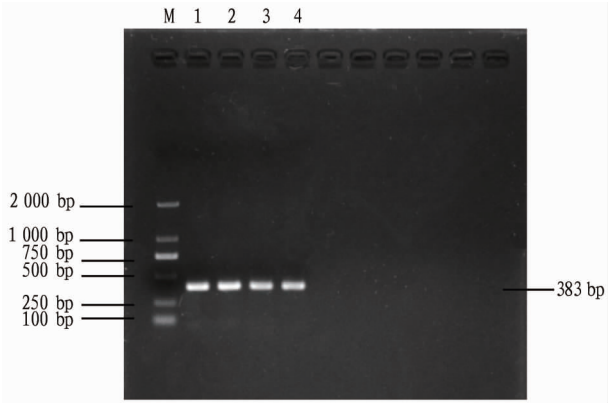
2.1 PCR 反应条件的优化 在 50~60℃下进行 PCR 扩增,结果显示各条带间无明显差异,最终确定最佳退火温度为 55℃;不同体积模板扩增结果显示,当模板量为 1 μL 时扩增效果最佳,说明 1 μL 为最佳模板量。PCR 扩增的目的片段约 383 bp,与预期目的条带大小一致(图 1~2)。



注:M. DL-2 000 Marker;1,50℃;2,51℃;3,52℃;4,53℃;5,54℃;6,55℃;7,56℃;8,57℃;9,58℃;10,59℃;11,60℃

图1 退火温度优化结果

Fig. 1 Optimization results of annealing temperature



注:M. DL-2 000 Marker;1,0.5 μL;2,1.0 μL;3,2.0 μL;4,3.0 μL

图2 模板量优化结果

Fig. 2 Optimization results of template size

2.2 特异性试验 从电泳结果可以看出,除标准志贺菌基因组 DNA 能扩增出与预期片段大小相同的条带外,其他菌株扩增结果均为阴性(图 3)。

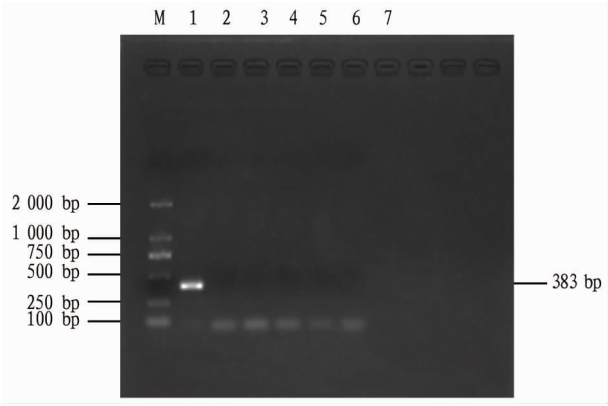
2.3 敏感性试验 用核酸测定仪测得 DNA 模板浓度为

180 ng/μL,对不同稀释度的模板进行 PCR 扩增,当模板浓度达到 1.8 pg/μL 时可扩增出相应条带,由此可见该 PCR 检测方法最低可检出 1.8 pg/μL 的志贺菌 DNA(图 4)。

2.4 临床样本检测

2.4.1 不同动物源疑似志贺菌的 PCR 检测。运用建立的 PCR 方法对 100 株疑似菌株进行检测,结果发现 62 株菌扩增出目的条带,检出率为 62.00%。不同动物的检出率各不相同,牦牛源为 75.00%(3/4),鸡源为 35.29%(12/34),羊源为 44.44%(8/18),猪源为 88.64%(39/44),且猪源带菌率明显高于其他 3 种动物。对扩增阳性菌株进行测序,测序结果与鲍氏志贺菌(登录号 CP026865.1)同源性达到 96.81%、与痢疾志贺菌(登录号 CP02678.1)同源性达到 97.35%、与宋内氏志贺菌(登录号 CP037997.1)同源性达到 95.22%、与福氏志贺菌(登录号 CP037996.1)同源性达到 95.22%,证实该试验检出的阳性菌株为志贺菌(图 5~8)。

2.4.2 粪样本中志贺菌的 PCR 检测。运用建立的 PCR 方法检测 11 份鸡粪和 12 份羊粪样本,结果发现 10 份鸡粪样

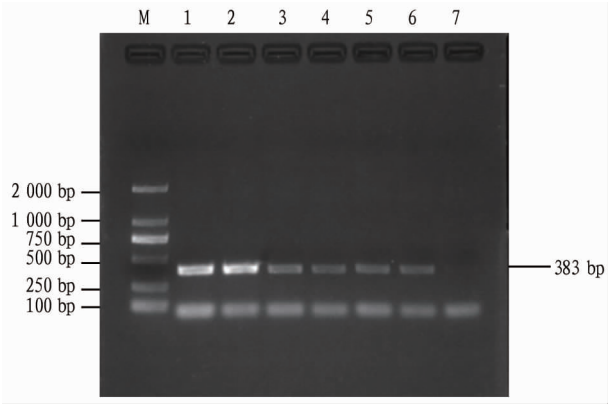


注: M. DL-2 000 Marker; 1. 志贺菌; 2. 沙门氏菌; 3. 大肠杆菌; 4. 金黄色葡萄球菌; 5. 枯草杆菌; 6. 变形杆菌; 7. 阴性对照

Note: M. DL-2 000 Marker; 1. *Shigella* sp.; 2. *Salmonella* sp.; 3. *Escherichia coli*; 4. *Staphylococcus aureus*; 5. *Bacillus subtilis*; 6. *Proteus vulgaris*; 7. Negative control

图 3 特异性试验结果

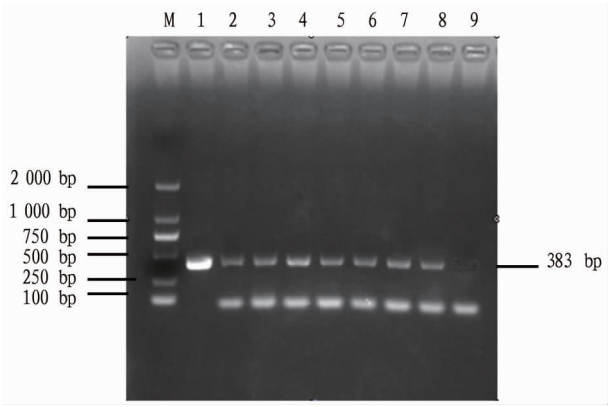
Fig. 3 The results of specificity test



注: M. DL-2 000 Marker; 1, 180 ng/μL; 2, 18 ng/μL; 3, 1.8 ng/μL; 4, 0.18 ng/μL; 5, 18 pg/μL; 6, 1.8 pg/μL; 7, 0.18 pg/μL

图 4 敏感性试验结果

Fig. 4 Results of sensitivity test



注: M. DL-2 000 Marker; 1. 标准菌株; 2~8. 猪源样本; 9. 阴性对照

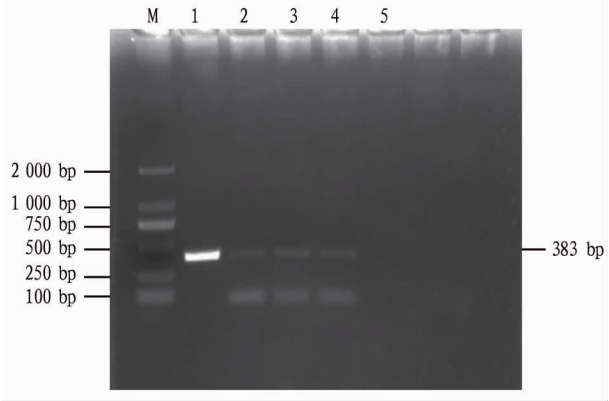
Note: M. DL-2 000 Marker; 1. Standard strain; 2-8. Pig-borne samples; 9. Negative control

图 5 部分猪源样本的检测结果

Fig. 5 Detection results of some samples from pigs

本、11 份羊粪样本扩增出目的条带, 阳性检出率分别为

90.91%和 91.67%(图 9~10)。

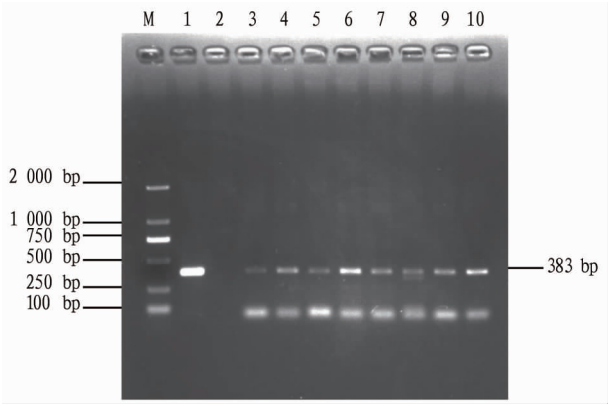


注: M. DL-2 000 Marker; 1. 标准菌株; 2~4. 牦牛源样本; 5. 阴性对照

Note: M. DL-2 000 Marker; 1. Standard strain; 2-4. Yak-borne samples; 5. Negative control

图 6 牦牛源样本的检测结果

Fig. 6 Detection results of samples from yak

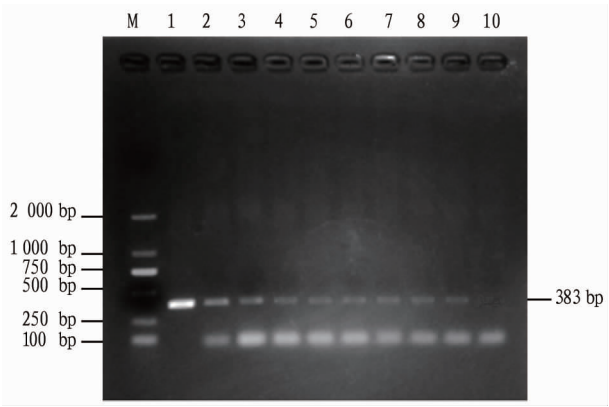


注: M. DL-2 000 Marker; 1. 标准菌株; 2. 阴性对照; 3~10. 羊源样本

Note: M. DL-2 000 Marker; 1. Standard strain; 2. Negative control; 3-10. Sheep-borne samples

图 7 部分羊源样本的检测结果

Fig. 7 Detection results of some samples from sheep

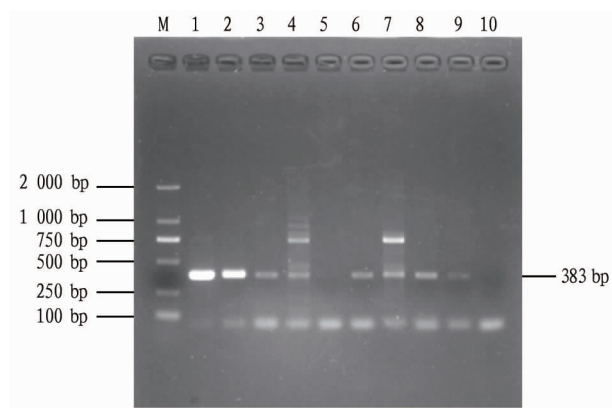


注: M. DL-2 000 Marker; 1. 标准菌株; 2~9. 鸡源样本; 10. 阴性对照

Note: M. DL-2 000 Marker; 1. Standard strain; 2-9. Chicken-borne samples; 10. Negative control

图 8 部分鸡源样本的检测结果

Fig. 8 Detection results of some samples from chicken

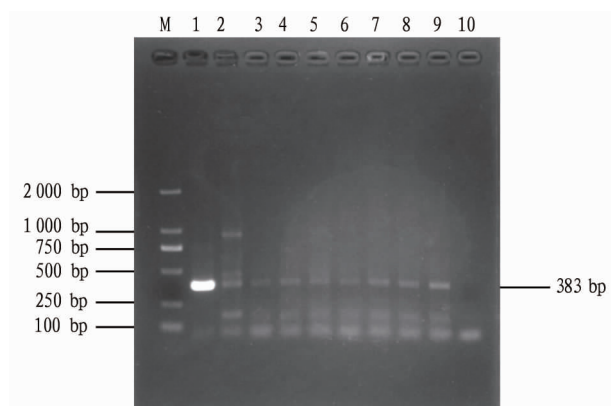


注: M. DL-2 000 Marker; 1. 标准菌株; 2~9. 鸡粪样本; 10. 阴性对照

Note: M. DL-2 000 Marker; 1. Standard strain; 2~9. Chicken manure samples; 10. Negative control

图9 部分鸡粪样本检测结果

Fig. 9 Detection results of some feces samples from chicken



注: M. DL-2 000 Marker; 1. 标准菌株; 2~9. 羊粪样本; 10. 阴性对照

Note: M. DL-2 000 Marker; 1. Standard strain; 2~9. Sheep fecal samples; 10. Negative control

图10 部分羊粪样本检测结果

Fig. 10 Detection results of some feces samples from sheep

3 讨论

志贺菌侵袭性质粒抗原 H 同时存在于染色体和侵袭性大质粒上,不随传代而丢失。大量研究^[10-12]表明,基于 *ipaH* 基因建立 PCR 方法能够鉴定志贺菌,且适用于志贺菌的 4 个血清型。该试验也针对 *ipaH* 基因建立 PCR 检测方法,并应用于不同的临床样本。结果发现,建立的 PCR 方法能够扩增出与预期片段大小一致的目的条带,而沙门氏菌、大肠杆菌、葡萄球菌、枯草杆菌、变形杆菌等均未扩增出条带,表明建立的方法具有良好的特异性,最低检出目的菌株基因组 DNA 浓度为 1.8 pg/μL,说明该方法具有较好的敏感性。临床样本检测中,100 株疑似菌株中 62 株为阳性,检出率为 62.00%。不同动物的检出率各不相同,牦牛源为 75.00% (3/4),鸡源为 35.29% (12/34),羊源为 44.44% (8/18),猪源为 88.64% (39/44),且猪源样本带菌率明显高于其他 3 种动物。许多报道显示^[1-3,13-14],临床样本中志贺菌的分离率并

不高,原因与粪便中其他菌群占优势,而目的菌群处于劣势,在菌株分离纯化的过程中没有被分离出来;志贺菌不同种间及同种不同菌株间生化特性有差异,常规分离鉴定易造成丢菌^[15],且样品长时间冻存也会导致分离率的下降有关,因此该试验避开了常规分离鉴定的不足,仅收集在 SS 培养基上符合志贺菌菌落形态的菌株,直接用 PCR 方法进行检测,一定程度上提高了检出率,省时省力,并可为后续的分鉴定工作带来方便。杨小蓉等^[16]报道,当人粪便样本中人工接种菌量在 10⁴ CFU/mL 以上时,不需要增菌,可直接从粪便样本中检出志贺菌。该试验采集动物新鲜粪便后直接提取 DNA 进行了 PCR 检测,结果阳性检出率(鸡源 90.91%、羊源 91.67%)很高,说明建立的 PCR 方法在动物临床样本中志贺菌的快速检测方面具有一定的应用前景,可为预防和控制由志贺菌感染疾病的流行提供技术手段。

检测结果也显示,在 4 种食品动物体内均不同程度携带志贺菌,虽然大多数动物临床上并没有腹泻症状,但还可检测出志贺菌,提示在不同种动物腹泻病和非腹泻病的临床诊断和治疗时不可忽视该菌的致病作用。鉴于志贺菌对公共健康的严重威胁,加强食源性动物健康带菌的监测及规范屠宰加工、运输、储存等环节的操作也十分重要。

参考文献

- [1] 宋海霞. 河南省鸡腹泻重要病原菌的分离鉴定与耐药性及 PCR 检测方法的研究[D]. 郑州:河南农业大学,2010.
- [2] 朱阵. 牛肠道菌群携带耐药基因分析与志贺菌分离、分型及耐药性研究[D]. 北京:中国农业科学院,2018.
- [3] 马明,方福平,朱喜玲,等. 贵州地区紫云花猪腹泻病原菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 畜牧与兽医,2019,51(7):96-99.
- [4] PRIAMUKHINA N S, KILESSO V A, TIKHOMIROV E D. Animal carriers of *Shigella* and their possible epidemiological importance[J]. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol, 1984, 11: 20-24.
- [5] 杨雪,郭定宗,祝海宝,等. 某猪场断奶腹泻仔猪致病菌的调查[J]. 中国畜牧兽医,2007,34(8):114-116.
- [6] 蒋建军,王鹏雁,刘根强,等. 集约化兔场高致病性痢疾志贺菌的分离与鉴定[J]. 黑龙江畜牧兽医,2006(8):66-67.
- [7] 高凤山,胡桂学. 幼犬志贺氏菌感染的微生物学诊断[J]. 安徽农学通报,2007,13(3):118,142.
- [8] 冉丹丹,于学辉,汤承,等. 牦牛源鲍氏志贺菌的鉴定及对 BALB/C 小鼠的致病性[J]. 畜牧兽医学报,2013,44(1):145-151.
- [9] ONYANGO D M, WANDILI S, KAKAI R, et al. Isolation of *Salmonella* and *Shigella* from fish harvested from the Winam Gulf of Lake Victoria, Kenya [J]. J Infect Dev Ctries, 2009, 3(2):99-104.
- [10] GAUDIO P A, SETHABUTR O, ECHEVERRIA P, et al. Utility of a polymerase chain reaction diagnostic system in a study of the epidemiology of shigellosis among dysentery patients, family contacts, and well controls living in a shigellosis-endemic area[J]. Journal of infectious diseases, 1997, 176(4):1013-1018.
- [11] COIMBRA R S, LENORMAND P, GRIMONT F, et al. Molecular and phenotypic characterization of potentially new *Shigella dysenteriae* serotype [J]. Journal of clinical microbiology, 2001, 39(2):618-621.
- [12] 许龙岩,李志勇,王志强,等. PCR 方法检测志贺氏菌的研究[J]. 检验检疫科学,2003,13(5):28-29.
- [13] 张兴民,张焕容,毛从剑,等. 四川部分地区山羊腹泻病主要病原菌的分离鉴定及耐药性检测[J]. 黑龙江畜牧兽医,2019(4):78-82.
- [14] 文英. 不同动物源志贺菌的分离鉴定及耐药性检测[J]. 畜牧与兽医, 2018, 50(8):59-63.
- [15] 杨永珍,许兰菊,张丹鹤,等. 河南省部分地区鸡志贺氏菌病原分离鉴定及药敏试验[J]. 河南农业科学,2011,40(3):134-139.
- [16] 杨小蓉,赵晋,张元群,等. PCR 检测粪便中志贺菌[J]. 预防医学情报杂志,2008,24(11):913-915.