

## · 基础论著 ·

# 聚合酶链反应-高分辨率溶解曲线技术在常见沙门菌分型中的应用研究

盛翔宇<sup>1</sup> 张智杰<sup>2</sup> 薛文成<sup>1</sup> 周连庆<sup>1</sup> 梁雪妮<sup>1</sup> 刘蒙蒙<sup>1</sup> 孟冬娅<sup>1</sup>

**【摘要】目的** 建立沙门菌的聚合酶链反应-高分辨率溶解曲线(PCR-HRM)分型方法,结合DNA测序方法,比较PCR-HRM分型方法和血清学分型方法的一致性,评价该方法的临床应用价值。**方法** 对全部32株沙门菌,先用传统的血清学分型技术进行分型,然后选择fljB、gyrB和ycfQ 3个基因为目的基因,用PCR-HRM技术对其进行分型,最后通过扩增上述3个目的基因并测序作为分型的金标准,比较血清学分型技术和PCR-HRM技术分型的一致率和正确率,分析两种方法不一致的可能原因。**结果** 对32株所测沙门菌,血清学分型技术分出6个血清型,PCR-HRM分型技术分出5个曲线型,血清学分型技术和PCR-HRM分型技术的一致率为84.4%;以测序结果作为金标准,血清学分型技术的正确分型率为84.4%,PCR-HRM技术的正确分型率为96.9%,两种方法比较差异尚无统计学意义( $P = 0.156$ ),但在本研究中PCR-HRM技术具有更高的分型正确率。**结论** PCR-HRM分型方法具有简单、快速、灵敏度高和正确率高的优点,与传统的血清学分型方法具有良好的一致性,在建立标准操作规程之后,PCR-HRM技术在沙门菌分型中具有良好的应用价值。

**【关键词】** 聚合酶链反应; 高分辨率溶解曲线; 沙门菌; 分型

**Clinical value of polymerase chain reaction high-resolution melting-curve technique in frequent *Salmonella* typing** Sheng Xiangyu<sup>1</sup>, Zhang Zhijie<sup>2</sup>, Xue Wencheng<sup>1</sup>, Zhou Lianqing<sup>1</sup>, Liang Xueni<sup>1</sup>, Liu Mengmeng<sup>1</sup>, Meng Dongya<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Department of Clinical Laboratory, The General Hospital of Shenyang Military Region, Shenyang 110016, China; <sup>2</sup>Department of Clinical Laboratory, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China

Corresponding author: Meng Dongya, Email: mengdongya@hotmail.com

**【Abstract】 Objective** To establish a polymerase chain reaction-high resolution melting curve (PCR-HRM) typing method for *Salmonella*, and to compare the consistency of PCR-HRM typing method and serological typing method combined with DNA sequencing method, then evaluate the clinical applying value of the method. **Methods** Total of 32 cases of *Salmonella*, typed by traditional serotyping method firstly, then selected fljB, gyrB and ycfQ as the target genes and typed by PCR-HRM technique, the three target genes were finally amplified and sequenced as gold standard. The consistent rate and correct rate of serotyping method and PCR-HRM technique were compared and the possible inconsistent causes of the two methods were analyzed. **Results** For 32 cases of tested *Salmonella*, 6 serotypes were separated by serotyping method and 5 curve types were separated by PCR-HRM typing method. The consistency of serotyping method and PCR-HRM typing method was 84.4%. After compared with the sequencing results, the correct typing rate of serotyping method and PCR-HRM typing method were 84.4% and 96.9%, respectively, with no significant differences ( $P = 0.156$ ), but PCR-HRM typing method had a higher typing accuracy in this study. **Conclusions** The simple, fast, sensitive and exact PCR-HRM technique had good consistency with traditional serotyping method in *Salmonella* typing, after established standard operating procedures (SOP), PCR-HRM technique had a good applying value in *Salmonella* typing.

**【Key words】** Polymerase chain reaction; High-resolution melting-curve; *Salmonella*; Typing

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2015.03.029

基金项目: 辽宁省科技攻关计划 (No. 2011225021)

作者单位: 110016 沈阳市, 沈阳军区总医院检验科<sup>1</sup>; 110004 沈阳市, 中国医科大学附属盛京医院检验科<sup>2</sup>

通讯作者: 孟冬娅, Email: mengdongya@hotmail.com

沙门菌是全球范围内最重要的食物源性病原菌之一, 每年, 有上百万的食物中毒和肠热症病例发生, 导致数以万计的患者死亡<sup>[1]</sup>。目前, 临床常用的沙门菌分型方法为细菌培养、生化鉴定加传统的血清学分型, 该方法存在检测周期长, 所用试剂繁多、费时费力和灵敏度低等缺陷, 开发新的分型方法具有广阔的应用前景<sup>[2-4]</sup>。

高分辨率溶解曲线 (high-resolution melting-curve, HRM) 分析是近年发展起来的用于单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 和突变检测的技术, 可用于DNA序列分析和突变扫描, 从2003年问世以来得到了迅速发展<sup>[5]</sup>。本文对沙门菌的PCR-HRM分型方法进行探讨, 并与传统的血清学分型方法进行比较, 现报道如下。

## 材料与方法

### 一、实验菌株

收集2013年沈阳军区总医院和盛京医院分离的32株沙门菌, 经生化鉴定属于肠炎沙门菌肠炎亚种, 作为实验菌株, 见表1。

### 二、主要设备

Roche Light Cycler 480实时荧光定量PCR仪 (瑞士罗氏公司); DY-A电泳仪 (上海生化所), DYY-III型电泳仪槽 (北京六一仪器厂)。

### 三、主要试剂

PCR-HRM试剂: Light CyclerR480 High Resolution Melting Master, Version 06 (瑞士罗氏公司); 沙门菌属诊断血清 (丹麦SSI, 批号608D-H6); 琼脂糖凝胶电泳试剂 (TaKaRa)。

### 四、方法

1. 实验菌株的复苏、传代及革兰染色镜检: 从-70℃冰箱中取出沙门菌复苏, 连续转种3代, 获得抗原结构较稳定的菌株, 涂片做革兰染色后镜检, 观察实验菌株的染色性及形态, 符合要求的菌落用于后续实验。

2. 血清学分型: 操作方法详见试剂说明书。

3. PCR-HRM分型: (1) 引物合成: 选择沙门菌的3个基因 (fljB、gyrB和ycfQ) 进行三重PCR-HRM分析。上、下游引物序列<sup>[1]</sup>, 产物长度见表2。引物合成由上海生工生物有限公司完成。

(2) 反应体系: 在总体积为20 μl的反应体系中, PCR-HRM反应混合液包含Master Mix 10 μl, MgCl<sub>2</sub> 2.4 μl, gyrB-F和gyrB-R各0.2 μl, fljB-F和fljB-R各0.15 μl, ycfQ-F和ycfQ-R各0.15 μl, 加模板1 μl, 最后加双蒸水5.6 μl补足20 μl<sup>[6-7]</sup>。

(3) 反应条件: 在Light CyclerR480实时荧光定量PCR仪上PCR-HRM反应程序如下: ①95℃预变性10 min。②45个循环的荧光定量Touchdown PCR程序如下: 变性95℃、10 s, 退火65℃、15 s, 每

表1 实验菌株编号及血清学分型、HRM分型和测序结果

菌株编号	血清学分型	PCR-HRM分型	测序结果
1	肠炎	1	肠炎
2	肠炎	1	肠炎
3	肠炎	1	肠炎
4	肠炎	1	肠炎
5	肠炎 <sup>a</sup>	2	鼠伤寒
6	肠炎 <sup>a</sup>	2	鼠伤寒
7	鼠伤寒	2	鼠伤寒
8	鼠伤寒	2	鼠伤寒
9	鼠伤寒	2	鼠伤寒
10	肠炎	1	肠炎
11	肠炎	1	肠炎
12	肠炎	1	肠炎
13	肠炎	1	肠炎
14	肠炎	1	肠炎
15	肠炎	1	肠炎
16	婴儿	3	婴儿
17	鼠伤寒	2	鼠伤寒
18	肠炎	1	肠炎
19	鼠伤寒	2	鼠伤寒
20	婴儿	3	婴儿
21	肠炎	1	肠炎
22	肠炎 <sup>a</sup>	5 <sup>b</sup>	鼠伤寒
23	肠炎	1	肠炎
24	肠炎	1	肠炎
25	肠炎	1	肠炎
26	肠炎	1	肠炎
27	肠炎	1	肠炎
28	伤寒	4	伤寒
29	婴儿	3	婴儿
30	犹太 <sup>a</sup>	1	肠炎
31	肠炎	1	肠炎
32	拉古什 <sup>a</sup>	2	鼠伤寒

注: <sup>a</sup> 血清学分型结果与测序结果不相符; <sup>b</sup> PCR-HRM分型结果与测序结果不相符

循环下降0.5℃,至53℃,延伸72℃、20s,每次延伸完成后获取一次荧光信号。③HRM程序如下:95℃、1min,40℃、1min,60℃~95℃,每秒上升0.02℃,每上升1℃获取25个信号,获得溶解曲线。④40℃冷却10s,实验完成并关机。

4. 目的基因测序分析: (1) 扩增体系和扩增程序: 将上述3个目的基因(fliB、gyrB和ycfQ)分别进行扩增,扩增体系如下: 反应终体积为20μl,包含Master Mix 10μl, MgCl<sub>2</sub> 2.4μl, 上游和下游引物各0.4μl, 加模板1μl, 最后补水5.8μl至20μl。扩增程序如下: ①95℃预变性30s。②95℃变性30s, 55℃退火30s, 72℃延伸1min, 共45个循环。③40℃冷却10s。扩增产物送生工生物(上海)进行测序。

(2) 序列比对: 将获得的基因序列在PubMed网站的BLAST中进行序列比对, 选择序列相似度最高的细菌名称作为待测菌株的名称, 结合3个基因的比对结果做出最终判断, 以此作为分子分型的金标准。

#### 五、统计学处理

采用SPSS17.0软件进行统计分析, 以测序分析为金标准, 比较血清学分型和PCR-HRM分型的差异, 对计数资料采用四格表的Fisher确切概率法进行统计学处理, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

### 结 果

#### 一、血清学分型结果以及PCR-HRM分型结果和测序结果

对32株待测菌株, 血清学分型分出6个血清型

(见表1); PCR-HRM分型产生5种HRM曲线型(见图1和表1), 每一条曲线代表一个分型结果, 用曲线型1、2、3、4和5表示, 其中曲线型1代表肠炎血清型, 曲线型2代表鼠伤寒血清型, 曲线型3代表婴儿血清型, 曲线型4代表伤寒血清型, 另外有一株鼠伤寒血清型产生不同于其他鼠伤寒血清型的HRM曲线型5(错误分型); 测序结果见表1。

#### 二、PCR-HRM分型方法和血清学分型方法的比较

对32株沙门菌, 有27株菌两种分型方法结果一致, 一致率为84.4%。共有5株菌两种方法分型结果不一致, 与测序结果对比, 这5株菌血清学分型均不正确, PCR-HRM分型除编号为22的1株鼠伤寒型产生不同于其他鼠伤寒型的溶解曲线外, 其余分型结果与测序结果相符, 血清学分型技术的正确分型率为84.4%, PCR-HRM分型技术的正确分型率为96.9%。

#### 三、统计学分析结果

采用Fisher确切概率法比较血清学分型结果和PCR-HRM分型结果的差异, 四格表资料见表3,  $P$ 值为0.156, 两种分型方法比较差异尚无统计学意义( $P > 0.05$ )。

### 讨 论

沙门菌广泛存在于自然界中, 主要寄生在人类和动物肠道内, 是一种重要的食物源性细菌<sup>[8]</sup>。目前, 血清学分型方法作为沙门菌传统分型方法的金标准得到了广泛应用, 但该方法有其自身的限制。

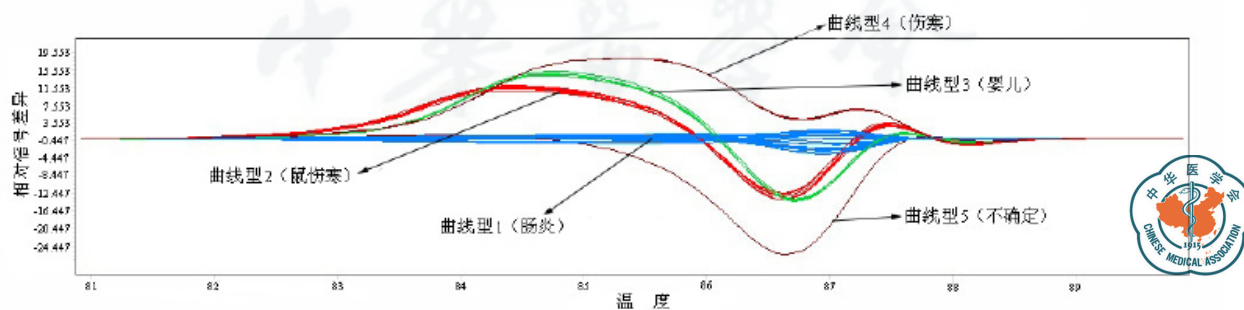


图1 32株沙门菌的PCR-HRM曲线图

表2 PCR-HRM分型方法所用引物序列及产物长度

基因名称	引物序列(5'→3')	产物长度(bp)
fliB	F: GTGAAAGATACAGCAGTAACAACG R: ACAAAGTACTTGTATTATCTGCG	170
gyrB	F: AAACGCCGATCCACCCGA R: TCATCGCCGCACGGAAG	171
ycfQ	F: GCCTACTCTATATGCGGAATTCAC R: GATATCGCGCAGGAGGCG	241

表3 两种方法对沙门菌的分型结果

血清学分型结果	PCR-HRM分型结果		合计
	正确分型	错误分型	
正确分型	27	0	27
错误分型	4	1	5
合计	31	1	32



首先,通过免疫动物制备的抗血清的特异性和效价需要良好的保证,即使获得了高质量的抗血清,针对某些血清型的脂多糖抗原的抗体与肠杆菌科中的其他细菌也容易产生交叉反应,尤其是大肠埃希菌,这种交叉反应是无法避免的,由此导致的假阳性会极大地影响沙门菌的鉴定和分型工作;其次,血清学分型方法以抗原模式为基础,无法从基因水平分析菌株之间的相关性,也无法分析菌株间的同源性;再次,这个方法费时费力,并需要操作熟练的技术员进行实验<sup>[9]</sup>。

高分辨率溶解曲线(HRM)技术从2003年问世以来得到了迅速发展,它可用于SNP及突变检测。HRM技术优势显著,其费用较低,简单方便;全程闭管操作可避免交叉污染;灵敏度高,理论上可检出一个碱基差异;在建立标准的SOP文件之后,其重复性亦能得到良好保证<sup>[10-11]</sup>。开发快速、简单、灵敏和准确的细菌鉴定和分型工具一直是临床微生物工作者的追求。目前,质谱技术已经应用于临床微生物检验,其能直接从培养物中挑取菌落进行鉴定,满足了临床对细菌鉴定微量、快速的要求。若能开发HRM分型技术并应用于临床微生物分型,将其与质谱鉴定技术联合应用,将会大大推进临床微生物学的发展<sup>[12-13]</sup>。

在本实验中,对32株待测菌株共分出6个血清型,均为临床常见血清型,其中有21株为肠炎血清型,5株为鼠伤寒血清型,3株为婴儿血清型,1株为伤寒血清型,1株为犹太血清型,1株为拉古什血清型。32株待测菌中有27株血清学分型结果和PCR-HRM分型结果一致,一致率达到了84.4%,具有良好的-致性,在实际应用中,两种方法可以相互验证、相互补充。在分型的正确性方面,与测序结果比较后,血清学分型正确率为84.4%。在血清学分型中有5株菌分型不正确,分析原因可能有两点:其一是沙门菌外膜抗原的变异,如S-R变异(菌体表面特异多糖抗原丢失)、H-O变异(鞭毛丢失)、位相变异、V-W变异(Vi抗原丢失)等,这些抗原的丢失或不表达均会导致血清学分型结果错误。其二是抗血清的特异性问题,由于抗血清是将沙门菌中提纯的抗原免疫温血动物(如家兔)制备而来,抗原的纯度,不同动物对抗原的反应性均会影响抗血清的质量,从而影响分型结果。

本实验对32株沙门菌进行PCR-HRM分型,共产生5种HRM曲线型,每一条曲线代表一个分型结果。本实验中主要对PCR-HRM分型的实验条件进行摸索,包括反应体系如镁离子浓度、引物浓度、模板量及反应条件的优化等。本实验中选择了3个

基因片段进行三重PCR和HRM分析,能增加供检测的序列和突变的数量,更多的序列差异以供检测。分型结果与测序结果比较后,31株菌均能正确进行分型,分型正确率为96.9%,显示了该技术良好的正确性,但在实验前期的摸索阶段,细微的实验条件差异均会导致实验结果的较大变化,如镁离子浓度,经系列稀释对比后,确定3 mmol/L为其最适浓度,同样还有引物浓度和比例及模板量的多少等。反应条件的优化同样重要,HRM分析要求扩增达到平台期后再进行,为保证扩增反应的高效性和完全性,PCR每步的温度和持续时间以及循环数均需要进行仔细摸索比较<sup>[2, 5, 11]</sup>。在分型正确性方面比较血清学方法和PCR-HRM方法,虽然PCR-HRM分型正确率更高,但两者分型正确率的差异尚无统计学意义,且该结果是从本实验中较小样本量结果分析而来,在今后更多大样本量的实验中或许不一样。本实验中有1例测序验证为鼠伤寒血清型的菌株产生不同于其他鼠伤寒型的溶解曲线,分析原因可能为模板不纯,其源头可能为混合菌群,导致所提取的模板中含有几种不同DNA。由此可见,想要获得良好的PCR-HRM分型结果,必须建立全套的标准操作规程,并对不同的HRM实验摸索出适合各自特点的反应条件<sup>[14-15]</sup>。

综上所述,HRM技术是一种简单、快速、高通量、高灵敏度和低成本的新技术,在SNP和基因突变检测中具有广阔的前景,在细菌的分子分型中也将具有重要地位,有必要对其进行深入研究。

## 参考文献

- 1 Zeininger J, Pietzka AT, Stoger A, et al. One-step triplex high-resolution melting analysis for rapid identification and simultaneous subtyping of frequently isolated *Salmonella* serovars[J]. Appl Environ Microbiol, 2012, 78(9): 3352-3360.
- 2 Bratchikov M, Mauricas M. Development of a multiple-run high-resolution melting assay for *Salmonella* spp. genotyping[J]. Diagnostics, 2011, 71(3): 192-200.
- 3 Herrmann MG, Durtschi JD, Bromley LK, et al. Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: cross-platform comparison of instruments and dyes[J]. Clin Chem, 2006, 52(3): 494-503.
- 4 Yang S, Ramachandran P, Rothman R, et al. Rapid identification of biothreat and other clinically relevant bacterial species by use of universal PCR coupled with high-resolution melting analysis[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(7): 2252-2255.
- 5 Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, et al. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen[J]. Clin Chem, 2003, 49(6): 853-860.
- 6 Martino A, Mancuso T, Rossi AM. Application of high-resolution melting to large-scale, high-throughput SNP genotyping: a comparison with the TaqMan® method[J]. J Biomol Screen, 2010, 15(6): 623-629.
- 7 沈兰, 王锐萍, 史海涛, 等. PCR技术在快速检测沙门氏菌中的应用[J]. 医学检验杂志(网络版), 2012, 1(1): 1-6.
- 8 Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, et al. *Salmonella*

- nomenclature[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(7): 2465-2467.
- 9 张代涛, 阚飙. 沙门菌属分子分型技术研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(5): 465-468.
- 10 于静波, 孟冬娅, 薛文成. PCR-HRM技术在微生物鉴定中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(7): 1988-1989.
- 11 Liew M, Pryor R, Palais R, et al. Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons[J]. Clin Chem, 2004, 50(7): 1156-1164.
- 12 Soler-Garcia AA, De Jesus AJ, Taylor K, et al. Differentiation of *Salmonella* strains from the SARA, SARB and SARC reference collections by using three genes PCR-RFLP and the 2100 Agilent Bioanalyzer[J]. Front Microbiol, 2014, 5(417): 1-19.
- 13 Bachmann NL, Petty NK, Szubert JM, et al. Genome analysis and CRISPR typing of *Salmonella enterica* serovar virchow[J]. BMC Genomics, 2014, 15(389): 1-14.
- 14 王庆忠, 姜崢, 宣瑛. 病原菌分子分型方法研究进展[J]. 检验医学, 2009, 24(5): 397-400.
- 15 夏季, 邓少丽, 陈鸣. 分子生物学技术应用于病原微生物分子分型的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(11): 1278-1279.

(收稿日期: 2014-09-13)

(本文编辑: 孙荣华)

盛翔宇, 张智杰, 薛文成, 等. 聚合酶链反应-高分辨率溶解曲线技术在常见沙门菌分型中的应用研究 [J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2015, 9(3): 409-413.

