

doi:10.3969/j.issn.2095-6002.2015.06.007

文章编号:2095-6002(2015)06-0040-06

引用格式:王建昌,胡连霞,段永生,等.志贺氏菌实时荧光单引物等温扩增方法的建立及应用[J].食品科学技术学报,2015,33(6):40-45.



WANG Jianchang, HU Lianxia, DUAN Yongsheng, et al. Establishment and application of real-time fluorescence single primer isothermal amplification for *Shigella*[J]. Journal of Food Science and Technology, 2015,33(6):40-45.

志贺氏菌实时荧光单引物等温扩增方法的建立及应用

王建昌,胡连霞,段永生,李静,王金凤*

(河北出入境检验检疫局检验检疫技术中心,河北石家庄050051)

摘要:以志贺氏菌 ipaH 基因特异序列为靶序列,设计 RNA-DNA 组合引物和链终止序列,优化反应体系,建立实时荧光单引物等温扩增检测志贺氏菌的方法,反应时间为 44 min。通过对 4 株不同群志贺氏菌和 12 株其他食源性致病菌进行实时荧光单引物等温扩增检测,结果表明,除 4 株志贺氏菌外,其他细菌均未扩增出荧光曲线。进一步研究表明,采用普通热裂解法提取 DNA,实时荧光检测福氏志贺氏菌 DNA 的灵敏度为 1.16 fg/ μ L,纯培养菌液的灵敏度为 1.3 CFU/mL;对牛奶模拟样品中福氏志贺氏菌的检出限是 1.8 CFU/mL。研究结果表明,实时荧光单引物等温扩增检测志贺氏菌灵敏度高、特异性强、耗时短、方法简便。

关键词:实时荧光单引物等温扩增;志贺氏菌;ipaH 基因

中图分类号:TS207.4;R117

文献标志码:A

志贺氏菌(*Shigella*)是人类细菌性痢疾最为常见的病原菌,通称痢疾杆菌,是一类具有高度传染性和危害严重的革兰氏阴性杆菌,长约 2~3 μ m,不形成芽孢,无荚膜,无鞭毛,有菌毛。志贺氏菌病常为食物爆发型或经水传播^[1],人类对志贺氏菌普遍易感,每年全球有 1.6 亿人患病,约有 110 万人死亡,绝大多数为 5 岁以下儿童^[2],10~100 CFU/mL 细菌即可致病^[3]。在发展中国家,由福氏志贺氏菌引起的感染性腹泻疾病高居首位^[4]。中国自 2005 年开始,在全国范围内开展菌痢的监测,该病的报告病例数一直高居全国甲乙类法定传染病的前 5 位^[5]。

目前,食品中志贺氏菌的传统检测方法主要依据国家标准 GB 4789.5—2012^[6],需要厌氧培养、分离、筛选和生化鉴定,检测结果虽准确,但操作烦琐、检测周期长,满足不了快速检测的需求。分子生物学技术因具有检测灵敏度高、特异性强、操作简便等

优点,在食源性致病菌的检测中发挥了巨大的作用,也被应用于志贺氏菌的检测。随着食品安全检测标准的提高,寻找更加快速、准确、便捷的检测技术显得至关重要。

志贺氏菌属分为痢疾志贺氏菌(*S. dysenteriae*)、福氏志贺氏菌(*S. flexneri*)、鲍氏志贺氏菌(*S. boydii*)和宋内氏志贺氏菌(*S. sonnei*)4 个群。编码侵袭性质粒相关抗原 H 的片段基因(ipaH),决定志贺氏菌对大肠黏膜的上皮细胞侵袭能力,同时,多拷贝存在于染色体和侵袭性大质粒上,不随传代而丢失。以志贺氏菌 ipaH 基因保守序列为靶基因可将其与其他致病菌种属区分开,又可以全部检测出志贺氏菌 4 个群。

单引物等温扩增技术(single primer isothermal amplification, SPIA)是近年报道的一种新型线性核酸等温扩增技术。该技术主要是通过一条 3'端是 DNA 片段、5'端是 RNA 片段的组合引物、RNase H

收稿日期:2015-03-04

基金项目:质检公益性科研专项项目(201210128;201310126)。

作者简介:王建昌,男,兽医师,博士,主要从事食源性微生物、动物疫病病原分子生物学研究;

*王金凤,女,兽医师,硕士,主要从事食源性微生物、动物疫病病原分子生物学研究。通信作者。

及具有强链置换活性的 DNA 聚合酶实现 DNA 的体外线性等温扩增,经过 RNA 降解、新引物结合、链置换的循环过程,实现模板互补序列的快速扩增,最终扩增出大量的具有高度忠实性的 cDNA 单链^[7-8]。

目前,国内外关于 SPIA 方法的报道比较少,利用实时荧光 PCR 仪进行实时监测,建立实时荧光 SPIA 检测志贺氏菌方法,更未见到报道。Potash 等^[9]曾应用逆转录 SPIA 技术研究从生物样品中扩增全基因组 cDNA,并对重组病毒 EcoHIV 感染小鼠后感染应激基因进行了成功表达。Whitworth 等^[10]在分析猪胚胎不同发育阶段基因表达差异时,应用美国 NuGEN 公司开发的 Ribo-SPIA 试剂盒进行了 mRNA 的扩增和转录。该 Ribo-SPIA 试剂盒能够从低至 1ng 的总 RNA 模板中扩增出 10⁶ 的 cDNA 产

物。而本研究运用 SPIA 技术基本原理,针对志贺氏菌 ipaH 基因保守序列设计特异性的 RNA/DNA 组合引物和终止序列 Blocker,并在反应体系中加入特异性结合单链 DNA 的 Sybergreen II 荧光染料,建立检测志贺氏菌的实时荧光单引物等温扩增 (real-time SPIA) 方法,与实时荧光 PCR 方法相比,该方法灵敏度高,对模板质量要求不高,扩增时间短,适合于食品中致病菌现场快速筛选。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株

本实验所用菌株见表 1。

表 1 实验用菌株

Tab. 1 Strains in this study

菌株编号	菌种名称	菌种来源
1	福氏志贺氏菌 (<i>Shigella flexneri</i>)	CICC21678
2	宋内志贺氏菌 (<i>Shigella sonnei</i>)	CICC21679
3	鲍氏志贺氏菌 (<i>Shigella boydii</i>)	CICC 21680
4	痢疾志贺氏菌 (<i>Shigella dysenteriae</i>)	CICC 10983
5	单核细胞增生李斯特氏菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	ATCC19114
6	鼠伤寒沙门氏菌 (<i>Salmonella typhimurium</i>)	CICC22956
7	大肠杆菌 O157:H7 (<i>Escherichia coli</i> O157:H7)	CICC21530
8	蜡样芽孢杆菌 (<i>Bacillus cereus</i>)	CICC10468
9	小肠结肠炎耶尔森氏菌 (<i>Yersinia enterocolitica</i>)	CICC21609
10	大肠埃希氏菌 (<i>Escherichia coli</i>)	CMCC44102
11	金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	ATCC6538
12	弗氏柠檬酸杆菌 (<i>Citrobacter freundii</i>)	ATCC 10787
13	粪肠球菌 (<i>Enterococcus faecalis</i>)	ATCC 29212
14	乙型溶血性链球菌 (<i>Streptococcus hemolytic-β</i>)	CMCC10373
15	地衣芽孢杆菌 (<i>Bacillus licheniformis</i>)	ATCC 21424
16	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>)	ATCC 17485

ATCC,美国典型菌种保藏中心;CICC,中国工业微生物菌种保藏管理中心;CMCC,中国医学微生物菌种保藏管理中心

1.1.2 主要试剂

BstDNA 聚合酶、RNase H、RNA 酶抑制剂、MgCl₂、dNTPs、SYBER Green II 等,购自上海生工生物工程有限公司;基因组 DNA 提取试剂盒,购自北京天根生化科技有限公司;实验中所有培养基均购自北京陆桥有限责任公司;实验中所用到的牛奶样品购自当地超市。

1.1.3 主要设备

ABI7500 型扩增仪,美国 AB 公司;Whatman T Gradient 基因扩增仪,德国 Biometra 公司;Biopho-

tometer plus 核酸蛋白分析仪,德国 Eppendorf 公司。

1.1.4 RNA/DNA 组合引物和 Blocker 的设计和合成

根据 Genebank 中志贺氏菌 ipaH 基因 (EU340151) 已知序列,对其进行同源性分析,确定其保守序列,用 Primer Premier 5.0 设计组合引物和相应链终止序列,如表 2。所有组合引物和 Blocker 均由大连 Takara 公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 志贺氏菌的培养

取保藏的福氏志贺氏菌、宋内志贺氏菌、鲍氏志

表2 实时荧光 SPIA 设计的引物

Tab.2 Real-time fluorescence SPIA primer design

引物名称	序列(5' to 3')	修饰
Pzm2	GCUUAGUGA-TTTGATGGTGTCTC	5'端9nt为RNA,3'端12nt为DNA
Blocker2	TTAGATAATGTGCTA	3'端用生物素修饰,中间随机加上5个XNA修饰

XNA,即LNA,又称“锁核酸”(Locked nucleic acid,LNA),是一种经过修饰的类寡核苷酸衍生物,包括A,C,G,T,U,mC六种碱基

贺氏菌、痢疾志贺氏菌在XLD琼脂培养基中进行划线,培养箱36℃培养12h,传代培养2次。挑取传代培养菌落接种至新鲜无菌的营养肉汤培养基中,36℃过夜培养。

1.2.2 基因组DNA的提取

1)普通热裂解法。取1mL菌液5000~8000 r/min,离心5min,弃上清液。加入200μL无菌DEPC水,振荡混匀,5000~8000 r/min,离心5min,弃上清,重复操作一次。加入100μL无菌DEPC水,振荡混匀,100℃水浴10min,12000 r/min离心10min,取上清液,-20℃保存备用。

2)天根试剂盒法。按试剂盒说明书进行基因组DNA的提取,并测定DNA浓度。

1.2.3 志贺氏菌实时荧光SPIA检测方法的建立

建立志贺氏菌实时荧光SPIA反应体系,总体积为25μL,对反应体系中RNA/DNA组合引物、Blocker、Bst DNA polymerase、RNaseH、dNTPs、MgCl₂、RNase Inhibitor和SYBER Green II的使用浓度进行优化,确定各组分最佳工作浓度,建立志贺氏菌实时荧光SPIA优化反应体系。

将志贺氏菌基因组DNA模板、组合引物、Blocker及反应缓冲液的混合液经99℃,90s处理后降温至60℃,迅速加入RNase H和Bst DNA聚合酶,在ABI7500实时荧光PCR仪上55~65℃,反应30~60min,反应过程中实时监测荧光信号,以期确定最佳反应温度,建立志贺氏菌实时荧光SPIA检测方法。

1.2.4 志贺氏菌实时荧光SPIA检测方法的特异性分析

取表1中19株过夜培养菌悬液1mL,用热裂解法提取基因组DNA作为模板,根据1.2.3中所建立的反应体系和条件进行检测,对所建立的实时荧光SPIA方法进行特异性分析。

1.2.5 两种基因组DNA提取方法对实时荧光SPIA检测结果的影响

使用1.2.2中两种方法提取4株不同群志贺氏菌基因组DNA,每种方法各3个平行,作为模板进

行实时荧光SPIA检测,分析不同的DNA提取方法对检测结果的影响。

1.2.6 志贺氏菌实时荧光SPIA检测方法的灵敏性分析

以福氏志贺氏菌为检测对象,对1.2.3中所建立方法的灵敏性进行分析。挑取营养琼脂上36℃培养12h的福氏志贺氏菌单菌落,制备成一定浓度菌悬液。用生理盐水进行10倍系列稀释,采用稀释平板法,测定其纯培养物活菌数为 1.3×10^8 CFU/mL;同时取1mL纯培养物采用试剂盒法提取福氏志贺氏菌基因组DNA,测得DNA质量浓度为116mg/L,用灭菌DEPC水进行10倍系列稀释,进行志贺氏菌实时荧光SPIA方法的灵敏性试验。

1.2.7 志贺氏菌实时荧光SPIA检测方法在模拟样品中检出限分析

在牛奶中添加福氏志贺氏菌作为模拟污染样品进行检出限分析。进行添加前,牛奶样品已按GB 4789.5—2012^[6]常规检验法证实志贺氏菌阴性。挑取在营养琼脂36℃培养12h的福氏志贺氏菌单菌落,制备成一定浓度菌悬液,用生理盐水进行10倍系列稀释后,选取系列稀释浓度菌悬液1mL分别添加到99mL牛奶样品中,混匀,分别取1mL模拟样品,采用稀释平板法,测定其活菌添加范围为 $1.8 \times 10^5 \sim 1.8 \times 10^{-2}$ CFU/mL,直接用热裂解法提取志贺氏菌基因组DNA,进行志贺氏菌实时荧光SPIA方法对模拟污染牛奶样品的检出限分析。本实验重复3次。

2 结果与分析

2.1 志贺氏菌实时荧光SPIA反应体系和反应条件的建立

通过对反应体系、反应条件、组合引物及Blocker(Pzm 2 + Blocker 2)的优化,志贺氏菌出现典型的扩增曲线,如图1。最终确定反应条件为59.0℃,1s;58.0℃,32s;80个循环,反应时间为44min。反应体系为RNA/DNA组合Primer 5.6μmol/L、

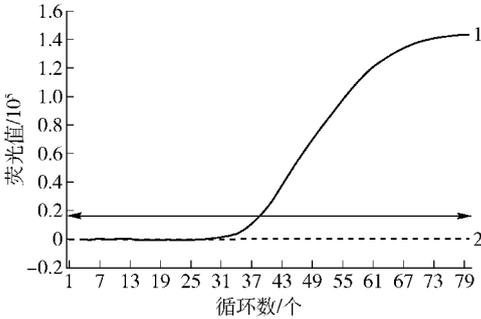
Blocker 0.36 $\mu\text{mol/L}$ 、 $10 \times \text{Bst Buffer}$ 2.5 μL 、 $\text{Bst DNA polymerase}$ 20 U、 $10 \times \text{RNaseH Buffer}$ 2.5 μL 、 RNaseH 5 U、 dNTPs 0.2 mmol/L、 MgCl_2 3.5 mmol/L、 RNase Inhibitor 16 U、DNA 模板 1 μL 、 SYBER Green II 0.3 μL (300 \times 稀释),其余用灭菌 DEPC 水补足体系。

平行实验,均出现典型的扩增曲线, C_t 值没有明显差异,结果如表 3。表 3 表明,实时荧光 SPIA 方法检测志贺氏菌对模板质量要求不苛刻,能适应广大的基层和现场检测。

表 3 不同模板 DNA 提取方法对志贺氏菌实时荧光 SPIA 检测结果的影响

Tab.3 Effects of different DNA extraction methods on results of real-time SPIA for *Shigella*

细菌名称	平均 C_t 值	
	热裂解法	试剂盒法
福氏志贺氏菌	49.40	46.37
鲍氏志贺氏菌	53.27	48.70
宋内志贺氏菌	51.00	50.82
痢疾志贺氏菌	52.36	50.16



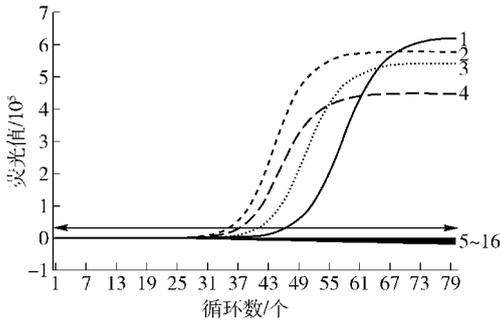
1. Pzm 2 + Blocker 2; 2. DEPC H₂O

图 1 Pzm 2 和 Blocker 2 的实时荧光 SPIA 反应结果

Fig.1 Results of real-time fluorescence SPIA with Pzm 2 Primer and Blocker 2

2.2 志贺氏菌实时荧光 SPIA 检测方法的特异性分析

建立的志贺氏菌实时荧光 SPIA 检测方法具有良好的特异性,检测结果如图 2。由图 2 可见,4 株志贺氏菌均出现典型的荧光扩增曲线,其他细菌检测均未产生扩增曲线。



1. 福氏志贺氏菌; 2. 鲍氏志贺氏菌; 3. 宋内志贺氏菌; 4. 痢疾志贺氏菌; 5. 单核细胞增生李斯特氏菌; 6. 鼠伤寒沙门氏菌; 7. 大肠埃希氏菌 O157:H7; 8. 蜡样芽孢杆菌; 9. 小肠结肠炎耶尔森氏菌; 10. 大肠埃希氏菌; 11. 金黄色葡萄球菌; 12. 弗氏柠檬酸杆菌; 13. 粪肠球菌; 14. 乙型溶血性链球菌; 15. 地衣芽孢杆菌; 16. 恶臭假单胞菌

图 2 志贺氏菌实时荧光 SPIA 引物特异性检测结果

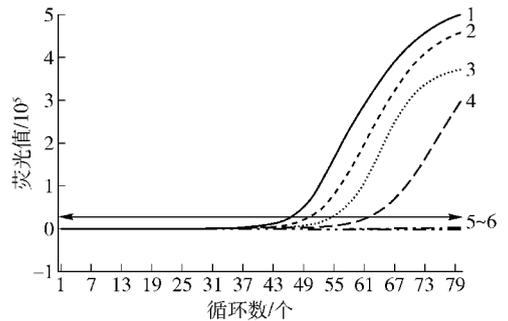
Fig.2 Specificity of real-time fluorescence SPIA for *Shigella*

2.3 不同模板 DNA 提取方法对志贺氏菌实时荧光 SPIA 检测结果的影响

分别用热裂解法、试剂盒法提取志贺氏菌模板 DNA,应用实时荧光 SPIA 检测,每种方法各做 3 个

2.4 志贺氏菌实时荧光 SPIA 检测方法的灵敏度分析

根据 2.1 建立的实时荧光 SPIA 检测方法,进行志贺氏菌实时荧光 SPIA 检测方法的灵敏性实验,结果如图 3。由图 3 可见,当 DNA 模板用量为 $1.16 \times 10^3 \sim 1.16 \text{ fg}/\mu\text{L}$ 时,即志贺氏菌浓度为 $1.3 \times 10^3 \sim 1.3 \text{ CFU}/\text{mL}$ 时,均出现典型的扩增曲线;当模板用量为 $0.116 \text{ fg}/\mu\text{L}$,即志贺氏菌浓度为 $0.13 \text{ CFU}/\text{mL}$ 时,则无扩增曲线。因此,志贺氏菌 DNA 的检测灵敏度为 $1.16 \text{ fg}/\mu\text{L}$,对志贺氏菌菌液的检测灵敏度为 $1.3 \text{ CFU}/\text{mL}$ 。



DNA 模板用量/($\text{fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 1. 1.16×10^3 ; 2. 1.16×10^2 ; 3. 1.16×10^1 ; 4. 1.16; 5. 0.116; 6. DEPC H₂O

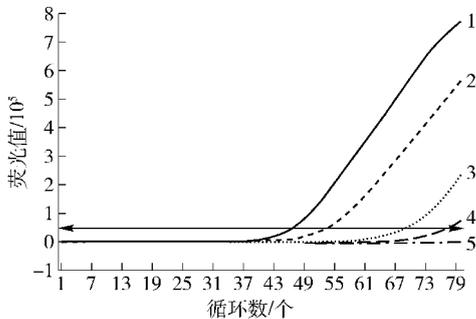
图 3 志贺氏菌实时荧光 SPIA 检测方法的灵敏性实验结果

Fig.3 Sensitivity of real-time fluorescence SPIA detection of *Shigella*

2.5 志贺氏菌实时荧光 SPIA 检测方法在牛奶模拟样品中的检出限分析

根据 2.1 建立的实时荧光 SPIA 检测方法,进行

牛奶模拟样品的检出限分析,结果如图4。由图4可见,当牛奶样品中志贺氏菌浓度为1.8 CFU/mL时,出现典型的扩增曲线;当牛奶样品中志贺氏菌浓度为0.18 CFU/mL时,则无扩增曲线。因此,志贺氏菌实时荧光SPIA检测方法在牛奶模拟样品中检出限为1.8 CFU/mL。3次重复实验结果一致。



志贺氏菌浓度/(CFU·mL⁻¹) 1. 1.8×10^3 ; 2. 1.8×10^2 ; 3. 1.8×10^1 ; 4. 1.8; 5. 0.18

图4 志贺氏菌实时荧光SPIA检测方法对模拟样品中志贺氏菌的检出限分析结果

Fig. 4 Detection limit of real-time fluorescence SPIA detection of *Shigella* in simulated sample

3 结论

志贺氏菌属的菌群分布在各地之间存在差异,在同一地区的不同年份其菌群分布也不尽相同。国外在20世纪40年代以前是A群占优势,50年代以B群为主,而1965年后D群为主要菌群。自2005年以来,我国大部分省市分离的志贺氏菌以福氏志贺氏菌为主,而从2010—2011年的监测数据来看,宋内志贺氏菌成了优势菌群,检出率分别为70.59%和67.86%,远远超过福氏志贺氏菌^[11]。以志贺氏菌属ipaH基因4个群保守序列,设计组合引物和链终止序列,建立的实时荧光SPIA检测方法对志贺氏菌属的4个群均能检出,检测灵敏度较高,同时对模板DNA要求较低,能够满足各个地区和国家普及和推广。

Igor等^[12]研究发现,10~100 CFU/mL的志贺氏菌就可引发严重的炎症反应,引起幼儿急性中毒性菌痢,而且死亡率高。我国吴平芳等^[13]建立的改良分子信标-实时PCR反应体系,对志贺氏菌DNA灵敏度为93 fg/ μ L,对其菌液灵敏度为64 CFU/mL。胡建华等^[14]对培养液中及牛奶阳性样品中的志贺氏菌采用常规PCR和实时定量PCR相结合进行检

测,在20 h内检测敏感度可达到2 CFU/mL。曾桂芬等^[15]所建立的志贺氏菌LAMP检测方法,对细菌纯培养物和模拟食品的灵敏度分别为53, 68 CFU/mL。本研究所建立的志贺氏菌实时荧光SPIA方法,对志贺氏菌纯培养的灵敏度为1.3 CFU/mL,对牛奶模拟污染样品的检出限是1.8 CFU/mL。因此,灵敏性和检出限要高于实时荧光PCR和LAMP方法。

本研究依据SPIA的原理,在普通SPIA的基础上,采用加入特异性结合单链DNA的荧光染料SYBER Green II,利用荧光PCR仪进行实时监测扩增情况,建立了实时荧光SPIA检测方法。本方法省去烦琐的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测过程,比普通SPIA技术和PCR技术省时省力,成为可以替代PCR的核酸扩增新技术。本研究所建立的实时荧光SPIA方法反应时间仅为44 min,对志贺氏菌纯培养的灵敏度为1.3 CFU/mL,在检测牛奶模拟污染样品时其检出限是1.8 CFU/mL,比LAMP法对志贺氏菌灵敏度和检出限高1个数量级,且对模板DNA质量要求不高,所以易于在基层和现场快速检测。

随着对SPIA技术研究的不断深入,我们将不断完善、发展这种新型的技术,使之在食源性致病菌检测方面发挥更大优势,得到更全面的应用。单引物等温扩增技术在食源性致病菌的快速检测方面将具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Fan He, Ke Han, Lunguang Liu, et al. Shigellosis outbreak associated with contaminated well water in a rural elementary school: Sichuan Province, China, June 7 - 16, 2009 [J]. PLoS One, 2012, 7(10): e47239.
- [2] Ashkenazi S. *Shigella* infections in children: new insights [J]. Seminars in Pediatric Infectious Diseases, 2004, 15(4): 246 - 252.
- [3] Kotloff K L, Winickoff J P, Ivanoff B, et al. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies [J]. Bull World Health Organ, 1999, 77(8): 651 - 666.
- [4] Bhattattacharya D, Suqunan A P, Bhattacharjee H, et al. Antimicrobial resistance in *Shigella*-rapid increase & widening of spectrum in Andaman Islands, India [J]. Indian Journal of Medical Research, 2012, 135(3): 365 - 370.

- [5] 隋吉林,张静,孙军玲,等. 2009年中国细菌性痢疾监测分析[J]. 疾病监测, 2010, 25(12): 947-950.
- [6] 中华人民共和国卫生部. GB 4789.5—2012 食品微生物学检验 志贺氏菌检验[S]. 北京:中国标准出版社, 2012.
- [7] Kurn N, Chen P, Heath J D, et al. Novel isothermal, linear nucleic acid amplification system for highly multiplexed applications[J]. Clinical Chemistry, 2005, 51(10): 1973-1981.
- [8] Gill P, Ghaemi A. Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review[J]. Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 2008, 27(3): 224-243.
- [9] Potash M J, Chao W, Bentsman G, et al. A mouse model for study of systemic HIV-1 immune responses and neuroinvasiveness [J]. Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America, 2005, 102(10): 3760-3765.
- [10] Whitworth K M, Agca C, Kim J G, et al. Transcriptional profiling of pig embryogenesis by using a 15K member unigene set specific for pig reproductive tissues and embryos[J]. Biol Reprod, 2005, 72(6): 1437-1451.
- [11] 张华一,王素萍,石燕. 青海省2005—2009年细菌性痢疾监测结果分析[J]. 疾病预防控制, 2012, 39(8): 2052-2059.
- [12] Igor G, Anders S, Alexander M, et al. A method for allelic replacement in *Francisella tularensis* [J]. FEMS microbiology letters, 2003, 222(2): 273-280.
- [13] 吴平芳,石晓路,郑琳琳,等. 改良分子信标-实时PCR快速检测志贺菌[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(4): 394-395.
- [14] 胡建华,李洁莉,马兆飞,等. 牛奶样品中志贺氏菌的快速PCR检测技术研究[J]. 食品科学, 2007, 28(8): 433-437.
- [15] 曾桂芬,龙北国,姜蓉,等. LAMP和PCR法检测痢疾志贺菌的特异性和灵敏性比较[J]. 热带医学杂志, 2012, 12(5): 547-549.

Establishment and Application of Real-time Fluorescence Single Primer Isothermal Amplification for *Shigella*

WANG Jianchang, HU Lianxia, DUAN Yongsheng, LI Jing, WANG Jinfeng*
(Technical Center of Inspection and Quarantine, Hebei Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: Based on the *Shigella* ipaH gene, the RNA-DNA primers and Blockers were designed and synthesized, and the real-time fluorescence single primer isothermal amplification (real-time fluorescence SPIA) for the detection of *Shigella* was established. The reaction time of the method was 44 min. After detection of the 4 different *Shigella* group strains and 12 other food borne bacteria by the real-time fluorescent SPIA, the results showed that only the *Shigella* could be detected and showed the typical fluorescence curve. Further studies show that the sensitivity of the detection method for *Shigella flexneri* in pure culture was 1.16 fg/ μ L and 1.3 CFU/mL. The detection limit of *Shigella flexneri* in milk was 1.8 CFU/mL. The results demonstrate that the real-time fluorescence SPIA detection method for *Shigella* is highly sensitive, strong specific and much more convenient.

Key words: real-time fluorescence single primer isothermal amplification; *Shigella*; ipaH gene

(责任编辑:叶红波)