

食品中单核增生性李斯特菌的 PCR 快速检测研究

冯家望 吴小伦 黄云君 王小玉 薄清如 陈静静
(珠海出入境检验检疫局,广东 珠海 519015)

摘 要:为提高食品中单增李斯特菌的检测水平,针对单增李斯特菌中多个稳定的特异性基因 *hlyA*、*plcB*、*prfA*、*iap*,设计并筛选出 7 对引物组成多重-巢式 PCR 联合检测体系,并结合高灵敏性的聚丙烯酰胺凝胶电泳,对单增李斯特菌进行快速检测,多重 PCR 的灵敏度达到 1×10^2 CFU/ml,巢式 PCR 的灵敏度达到 1×10 CFU/ml。结果表明该检测体系具有快速可靠、灵敏准确及特异性好的特点,而且有效缩短了检验周期,从传统的 7~14 d 缩短到 1~2 d。

关键词: 利斯特氏菌;单核细胞增生;食品;聚合酶链反应

Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in food by PCR

FENG Jia-wang, WU Xiao-lun, HUANG Yun-jun, WANG Xiao-yu, BO Qing-ru, CHEN Jing-jing
(Zhuhai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of the PRC, Guangdong Zhuhai 519015, China)

Abstract: According to the *Listeria monocytogenes* stable specific genes (*hlyA*, *plcB*, *prfA* and *iap*), the authors designed and screened out seven primer pairs to compose the multiplex-nested PCR combined detection system, and combined highly sensitive polyacetylamide gel eletrophoresis (PAGE) to detect *Listeria monocytogenes*. Sensitivity of the multiplex-PCR was 1×10^2 CFU/ml, and that of the nested-PCR was 1×10 CFU/ml. The results show that this detection system is rapid, sensitive accurate and highly specific. It can shorten the detection time from 7~14 days to 1~2 days.

Key Words: *Listeria monocytogenes*; Food; Polymerase Chain Reaction

单核细胞增生性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, 下称单增李斯特菌) 是食源性疾病的重要病原菌,被 WHO 列为 20 世纪 90 年代食品中 4 大致病菌之一^[1]。近年来,在法国、美国、加拿大等国多次引起食物中毒^[2,3],引起了各国对从食品中检测该菌的高度关注^[4]。长期以来,单增李斯特菌的检验方法一直为传统的培养法^[5],鉴定采用以表型特征为特点的生化反应和血清反应。表型特征易因环境的变化而发生变异,给鉴定带来困难,血清分型对不同来源的单增李斯特菌鉴别能力也有限。培养法操作复杂,耗时长,不能适应快速检测(特别是出入境口岸)的要求,因而,建立一种快速准确、经济方便的检测方法,对食源性单增李斯特菌的检测至关重要。

本研究针对单增李斯特菌中稳定的特异性基因 *hlyA* (李斯特菌溶血素 O 基因)、*plcB* (磷酸酯酶 C 基因)、*prfA* (转录激活调节蛋白基因)、*iap* (侵入关联

蛋白基因),在基因库中查到序列,依据引物设计的原则^[6,7],并考虑到复合扩增的动力学和反应条件的要求,在 Primer5.0 软件的辅助下,设计并筛选出 6 对引物组成多重 PCR、2 对引物组成巢式 PCR,其中 1 对 LMZ 为共用引物。单增李斯特菌能因基因突变造成一个或更多毒力基因缺失^[8],出现假阴性结果,多基因多重 PCR 能大大降低假阴性出现的可能性,同时,巢式 PCR 能有效放大并验证第一次 PCR 的结果,使检测结果更加可靠。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 PCR 引物 由上海博亚生物技术有限公司合成,序列、产物长度等详见表 1。

1.1.2 试验用菌

1.1.2.1 菌种 共 22 种。单增李斯特菌标准菌株

This work was supported by the Research Funds of State General Administration of the People's Republic of China for Quality Supervision and Inspection and Quarantin(2002IK002 - 08)

基金项目:国家质量监督检验检疫总局科研项目(2002IK002 - 08)

作者简介:冯家望 男 硕士



表1 PCR引物表

引物名称	靶基因	上游引物序列 5'→3'	下游引物序列 5'→3'	产物长度(bp)
LM2	<i>hly</i>	GCATCTGCATTCAATAAAGA	TGTCACCTGCATCTCCGTGGT	174
LM3	<i>hly</i>	TGTCACCTGCATCTCCGTGGT	TCAATTTTCATCCATGGCACCC	150
LM4	<i>iap</i>	CAAACCTGCTAACACAGCTACT	GCACTTGAATTGCTGTTATTG	353
LM5	<i>prfA</i>	ACCAATGGGATCCACAAGA	CA.GCTGAGCTATGTCCGAT	468
LM7	<i>prfA</i>	CCCAAGTACGACGGACATGCTAA	GGTATCACAAA.GCTCACCAG	571
LM8	<i>hly</i>	ATTTTCCTTTCACGATTGC	CACTCAGCATTTGATTGCGA	274
LM9	<i>plcB</i>	ACCTGCCAAA.GTTTGCTGTGA	GCAAGTGTCTAGTCTTTCGGG	795

来自中国微生物菌种保藏管理委员会医学细菌中心和中国典型培养物保藏中心。李斯特菌属其它菌：默氏李斯特菌、西尔李斯特菌、格氏李斯特菌、绵羊李斯特菌、英诺克李斯特菌、威尔斯李斯特菌来自中国典型培养物保藏中心。其它菌：乙型副伤寒沙门菌、肠炎沙门菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌、铜绿假胞杆菌、嗜热链球菌、大肠杆菌、出血性大肠杆菌 O157 H7、产气肠杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、粪产碱杆菌来自中国典型培养物保藏中心。丙型链球菌、福氏志贺菌、肺炎克雷伯菌来自中国微生物菌种保藏管理委员会医学细菌中心。副溶血性弧菌来自中国科学院广州微生物研究所。

1.1.2.2 试验用混合菌 混合菌 A:在食品中人工污染上述 22 种菌,制成每种菌含量为 1×10^3 个/ml 的混合菌液(含单增李斯特菌),取 1 ml 混合菌液 1 000 r/min 离心 10 min,取上清液 8 000 r/min 离心 10 min,取沉淀加 1 ml DNA 裂解提取液,作为 PCR 反应的 DNA 模板。混合菌 B:李斯特菌属各菌的混合液(含单增李斯特菌)混合方法、浓度同上。混合菌 C:除李斯特菌属外的各种菌混合液(含单增李斯特菌)。混合菌 D:李斯特菌属各菌(不含单增李斯特菌)的混合液。混合菌 E:除单增李斯特菌外的各种菌的混合液。混合菌 F:除李斯特菌属外的各种菌混合液(不含单增李斯特菌)。

1.1.2.3 灵敏度测定用菌 稀释单增李斯特菌单菌落,用比浊法、血球板计数法、平皿计数法确定其浓度约为 1×10^5 CFU/ml,然后梯度稀释。

1.1.3 试剂 DNA 裂解提取液、HS - Taq DNA 聚合酶为珠海科登生物有限公司产品;克隆试剂盒 pMD18 - T Vector、DNA Marker DL 2000、100 bp DNA Ladder Marker 为 TaKaRa 公司产品。

1.1.4 仪器设备 PCR 仪、高速台式离心机、凝胶图像分析管理系统为珠海黑马公司产品;ND - 1000 型 DNA 浓度测定仪,美国 NanoDrop 公司产品;微量连续进样器,德国 Eppendorf 公司产品;气浴恒温摇床,美国 ENVIRON 公司产品;MS1 型旋涡混合器,德国 IKA 公司产品;电泳仪及电泳槽,北京六一仪器厂产品。

1.2 方法

1.2.1 模板 DNA 制备 用 DNA 裂解提取液直接

裂解制备。

1.2.2 DNA 浓度测定 提取的模板 DNA、克隆用 PCR 产物用 DNA 浓度测定仪确定浓度。

1.2.3 多重 PCR 反应体系 设 25 μ l 反应体积,每一反应含 5 $\times$ PCR 反应混合液 5 μ l,每个靶基因的 5 μ m 上、下游引物各 0.25 μ l,模板 DNA 1 μ l,HS - Taq DNA 聚合酶 0.5 μ l,用无菌双蒸水补足到 25 μ l。引物为:LM2、LM4、LM5、LM7、LM8、LM9。

1.2.4 多重 PCR 反应条件 95 预变性 2 min;然后 94 40 s,59 50 s,72 60 s,35 个循环;72 延伸 7 min。每次扩增,设阳性模板对照、阴性模板对照和空白对照各 1 管。

1.2.5 巢式 PCR 可结合多重 PCR 进行,巢式 PCR 的第 2 次模板加入量减为 0.5 μ l;引物分别为:第 1 次 LM2,第 2 次 LM3。反应条件等同 1.2.3、1.2.4。

1.2.6 PCR 产物的电泳 琼脂糖电泳用 1.5 %琼脂糖凝胶,溴化乙锭染色,100 V 电泳 30 min,置紫外透射仪观察电泳结果,摄影记录。聚丙烯酰胺凝胶电泳用 6 %聚丙烯酰胺凝胶,600 V 电泳 1 h,经固定、染色、显色,而后置于普通光透射仪观察电泳结果,摄影记录。

1.2.7 PCR 产物克隆、测序 用大肠杆菌 JM109 进行感受态细胞的制备^[9,10],连接、转化等参照说明书进行。测序委托上海博亚生物技术有限公司进行。

2 结果

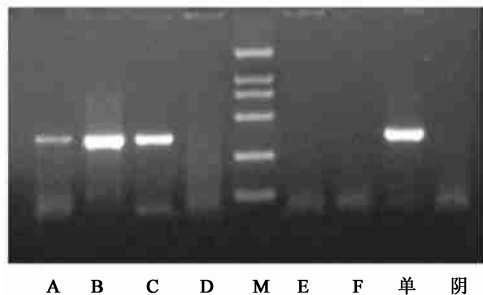
2.1 PCR 的检测结果

2.1.1 特异性 各引物分别进行 PCR 反应,均能扩增出相应长度的片段,混合菌中,只要含有单增李斯特菌的均能扩增出相应的特异性片段,不含单增李斯特菌的混合菌均无相应的片段,也无非特异性的其它条带。下面以引物 LM4 的图像为例进行说明,LM4 扩增出的片段长度为 353 bp(详见图 1)。

2.1.2 灵敏度 各引物经 PCR 反应,产物在 1.5 %琼脂糖中电泳,均能分辨出含 5×10 CFU/ml 的条带。下面以引物 LM4 的图像为例(详见图 2)。

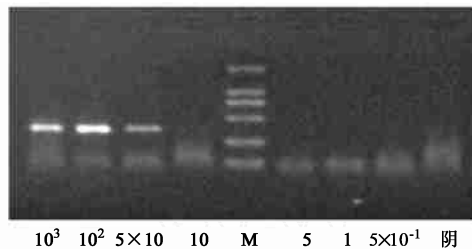
2.2 多重 PCR

2.2.1 特异性 引物 LM2、LM8、LM4、LM5、LM7、LM9 在同一 PCR 反应体系中扩增出长度(bp) 174、274、353、468、571、795 的 6 条片段。混合菌中,只要



M:DNA Marker DL2000,从下向上片段依次为 100、250、500、750、1 000、2 000 bp;A、B、C、D、E、F 分别为混合菌 A、B、C、D、E、F;单:单增李斯特菌;阴:阴性对照。

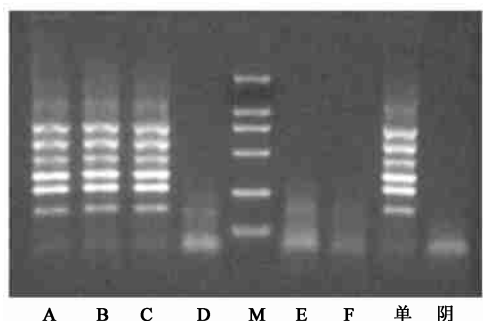
图 1 LM4 的 PCR 电泳图



数字等为单增李斯特菌的浓度(CFU/ml)。M:DNA Marker DL2000。阴:阴性对照。

图 2 LM4 的灵敏度图

含有单增李斯特菌均能扩增出特异性的 6 条片段,不含单增李斯特菌的混合菌均无片段(详见图 3、4)。



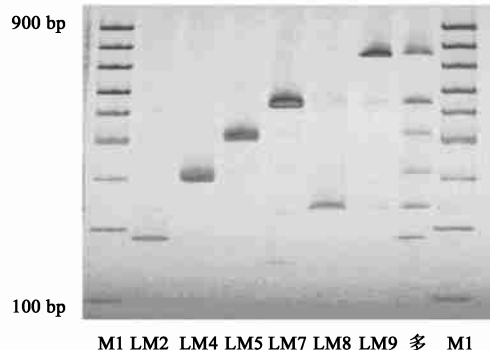
多重 PCR 扩增片段从下向上依次为 LM2 174 bp、LM8 274 bp、LM4 353 bp、LM5 468 bp、LM7 571 bp、LM9 795 bp。

图 3 多重 PCR 的琼脂糖电泳图

2.2.2 灵敏度 引物 LM2、LM8、LM4、LM5、LM7、LM9 在同一 PCR 反应体系中与含 1×10^2 CFU/ml 的单增李斯特菌扩增,产物在 1.5 %琼脂糖中电泳,能分辨出 174、274、353、468、571、795 bp 的 6 条带(详见图 5)。聚丙烯酰胺凝胶电泳能分辨出含 $5 \times 10 \sim 1 \times 10$ CFU/ml 的单增李斯特菌的条带(详见图 6),其灵敏度明显高于琼脂糖电泳。

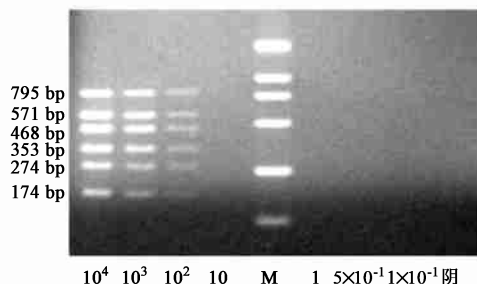
2.3 巢式 PCR 检测

2.3.1 特异性 引物 LM3 对多重 PCR 的产物或 LM2 的 PCR 产物进行扩增,能扩增出长度 150 bp 的片段。混合菌中,只要含有单增李斯特菌,经巢式 PCR 后均能扩增出特异性的 150 bp 片段,不含单增李斯特菌的混合菌均无 150bp 片段,也无非特异



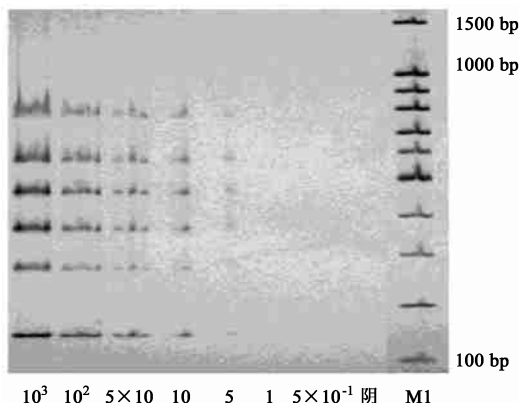
M1:100 bp DNA Ladder Marker,从下向上片段依次为 100、200、300、400、500、600、700、800、900 bp;LM2 为引物 LM2 的 PCR 产物,,多:多重 PCR 扩增片段从下向上依次为 LM2 174 bp、LM8 274 bp、LM4 353 bp、LM5 468 bp、LM7 571 bp、LM9 795 bp。

图 4 混合菌 A 多重 PCR 聚丙烯酰胺凝胶电泳图



数字为单增李基特菌的浓度(CFU/ml)。M:DNA Marker DL2000。阴:阴性对照。

图 5 多重 PCR 的琼脂糖电泳灵敏度图



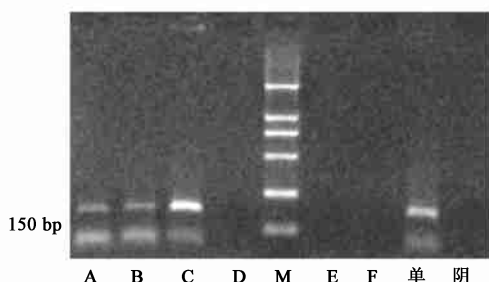
数字为单增李基特菌的浓度(CFU/ml)。阴:阴性对照。M1:100 bp DNA Ladder Marker。

图 6 多重 PCR 的聚丙烯酰胺凝胶电泳灵敏度图

性的其它条带片段(详见图 7)。

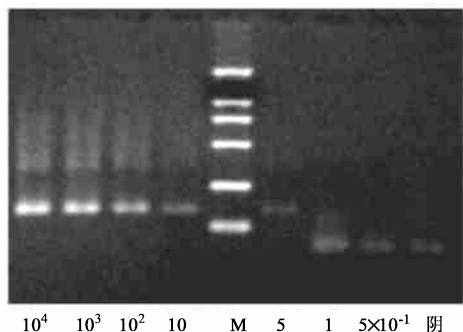
2.3.2 灵敏度 经巢式 PCR 反应,产物在 1.5 %琼脂糖中电泳,能分辨出含 $5 \sim 1 \times 10$ CFU/ml 单增李斯特菌的条带(详见图 8)。

2.4 测序结果 对 LM2、LM4、LM5、LM7、LM8、LM9、LM3 的 PCR 产物进行克隆测序,测序结果与基因库中的 *hlyA* 基因序列(M24199)、*iap* 基因序列(M80351)、*prfA* 基因序列(X61210)、*plcB* 基因序列(X59723)进行比对,相关序列的符合率分别为



单:单增李基特菌。阴:阴性对照。

图7 巢式 PCR 的琼脂糖电泳图谱



数字为单增李基特菌的浓度(CFU/ml)。M:DNA Marker DL2000。
阴:阴性对照

图8 巢式 PCR 的灵敏度图

100.0 %、98.9 %、99.4 %、99.3 %、99.6 %、99.9 %、
100.0 %。

3 结论和讨论

食品中单增李斯特菌的传统检测方法是将增菌培养分离后的可疑菌落进行生化反应、动物实验、动力试验等鉴定,被确定为李斯特菌后进一步进行血清型分析^[5]。此方法操作复杂,费时费力且灵敏度不高,不能适应快速检测(特别是出入境口岸)的要求,有必要研究寻找一种快速、稳定、灵敏的检测方法。单增李斯特菌易发生一至多个毒力基因变异缺失现象^[8],普通 PCR、荧光 PCR 检测单基因易呈现假阴性结果,本研究采用多基因(*hlyA*、*plcB*、*prfA*、*iap*)复合扩增多重 PCR 能大大降低假阴性出现的可能性,同时,将多重 PCR 的反应产物再进行巢式 PCR,能有效放大并验证多重 PCR 的结果,使检测结果更加可靠。另外,结合高敏感性的聚丙烯酰胺凝胶电泳能明显提高检测灵敏度。多重 PCR 的灵敏度达到 1×10^2 CFU/ml,巢式 PCR 的灵敏度达到 1×10 CFU/ml。

食品中的某些成分对 PCR 反应有一定的干扰,同样浓度的单增李斯特菌污染不同的食品,其检测灵敏度可能相差 10 倍,主要原因可能是残留的食品成分对 PCR 反应有干扰,因而从食品中获得较纯的

单增李斯特菌的 DNA 模板至关重要。对于一般食品,二次离心方法简单并能获得合格的 DNA 模板,但对于一些较特殊的食品,如脂肪含量高的食品,建议采用相关的 DNA 提纯试剂盒,能获得较纯的 DNA 模板。

进一步前增菌能大大提高单增李斯特菌 DNA 模板的数量和质量,有利于提高检出率,并能有效确定单增李斯特菌的存活状况。

PCR 产物片段较长的引物,如 LM9,在实际检测中其灵敏度要低于短片段引物,可能是因为片段长,合成效率相对较低,受干扰的可能性增大的缘故。

聚丙烯酰胺凝胶电泳比琼脂糖凝胶电泳的灵敏度高 10 倍左右^[11],能更有效地分辨阳性结果,特别是当 DNA 模板浓度低时,优点更为明显。一般而言,食品的带菌量都较低,用聚丙烯酰胺凝胶电泳能有效提高灵敏度,获得更准确的结果。

用二次离心加 DNA 提取液的方法获得模板 DNA,然后采用复合扩增多重 PCR,用琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,在 6 h 内能出结果,如果结合巢式 PCR,则在 9 h 内能出结果,如果采用一步前增菌,则需 2 d,比传统方法的 7 ~ 14 d 具有明显的快速优势。

参考文献

- [1] Ryser T, Elmer H M. *Listeriosis and food safety*[J]. Marcel Dekke Inc, 1991, 6(2): 214-216.
- [2] Schlech W F, Lavigne P M, Bortolussi R A. Epidemic *Listeriosis*: evidence or transmission by food[J]. N J Med, 1983, 308: 203-206.
- [3] 刘秀峰, 陈平, 吴护华. 单核细胞增生性李斯特菌病研究近况[J]. 实用预防医学, 2001, 8(1): 79-81.
- [4] 郁庆福. 现代卫生微生物学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995, 119.
- [5] GB/T 4789.30—2003. 食品卫生微生物学检验 单核细胞增生性李斯特氏菌检验[S].
- [6] C W 迪芬巴赫, G S 德维克斯勒, 著. 黄培堂, 汪嘉玺, 朱厚础, 等译. PCR 技术实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2002, 88-94, 380-393.
- [7] 卢圣栋, 主编. 现代分子生物学实验技术[M]. (第 2 版). 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999, 458-459.
- [8] 金莉莉, 王芳, 郭振坤, 等. 食品中单核增生李斯特氏菌检测研究进展[J]. 微生物学杂志, 2001, 21(2): 36-38.
- [9] F 奥斯伯, R E 金斯顿, R 布伦特, 等著. 颜子颖, 王海洋, 译. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2001, 22-23, 104-105.
- [10] J 萨姆布鲁克, D W 拉塞尔著. 黄培堂, 汪嘉玺, 朱厚础, 等译. 分子克隆实验指南[M]. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002, 68-105, 618-628.
- [11] 杨素. 聚丙烯酰胺凝胶电泳在转基因食品检测中的应用研究[J]. 食品科技, 2002, 11: 61-63.

[收稿日期: 2004 - 10 - 08]

中图分类号: R15; Q939.122 文献标识码: B 文章编号: 1004 - 8456(2005)03 - 0234 - 04