

- 菌、无乳链球菌和金黄色葡萄菌的研究[J]. 中国食品学报, 2010, 10(6):173-179.
- [3] 郝玉芹,孙皆宜,李艾,等. 正交优化多重 PCR 反应体系检测 3 种食源性致病菌的研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(2):602-605.
- [4] CHEN J, TANG J N, LIU J, et al. Development and evaluation of a multiplex PCR for simultaneous detection of five foodborne pathogens [J]. Journal of Applied Microbiology, 2012, 112(4):823-830.
- [5] TANG J N, SHI X M, SHI C L, et al. Characterization of a duplex PCR assay for the detection of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology, 2006, 14(3):201-217.
- [6] Fratamico P M, Strobaugh T P. Simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 1998, 21(3):92-98.
- [7] 赵邦荣,张香改,齐娜娜,等. 优化多重 PCR 扩增效果的实验研究[J]. 河北医药, 2011, 33(11):1674-1675.
- [8] Herbergs J M, Siwek A P M A, Crooijmans J J, et al. Multicolour fluorescent detection and mapping of AFLP markers in chicken (*Gallus domesticus*) [J]. Animal Genetics, 1999, 30:274-285.
- [9] 王艳君,张春晖,王玉芬,等. 多重 PCR 检测冷却肉中的 3 种致病菌[J]. 食品发酵与工业, 2007, 33(3):111-114.

实验技术与方法

多重 PCR-变性高效液相色谱快速检测单核细胞增生李斯特菌毒力基因方法的建立

钱云开,王海洋,肖艳霞,高飞,李琳,张会敏,吴曦,张进杰
(秦皇岛出入境检验检疫局,河北 秦皇岛 066004)

摘要:目的 建立单增李斯特菌的多个靶基因快速检测手段,提高检测的准确性。方法 根据单增李斯特菌 4 个毒力基因(*hly*、*prfA*、*inlA*、*inlB*)设计引物,通过优化引物浓度和引物组合,进行多重 PCR 扩增,产物经变性高效液相色谱(DHPLC)进行快速检测。结果 出峰顺序依次为 *inlB*、*hly*、*inlA*、*prfA*, 扩增片段大小为 146、210、255、388 bp,此方法具有良好的特异性,灵敏度可达到 280 cfu/ml。结论 本方法可以满足实际工作中食品微生物检测的要求。

关键词:单增李斯特菌; 毒力基因; 变性高效液相色谱; 多重聚合酶链式反应; 食源性致病菌; 食品安全

中图分类号:R155; R155.5; R446.5; O657.7⁺2 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2014)02-0141-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2014.02.009

Development of a multiplex PCR-DHPLC method for the rapid detection of enterotoxins genes in food-borne *Listeria monocytogenes*

QIAN Yun-kai, WANG Hai-yang, XIAO Yan-xia, GAO Fei, LI lin,
ZHANG Hui-min, WU Xi, ZHANG Jin-jie

(Qinhuangdao Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Hebei Qinhuangdao 066004, China)

Abstract: Objective To establish a quick checking method of enterotoxins genes in food-borne *Listeria monocytogenes* by multiplex polymerase chain reaction (MPCR) and denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). **Methods**

Primers for detection of *hly*, *prfA*, *inlA* and *inlB* were designed and PCR system was optimized. Products were detected by DHPLC for quick detection. Thirty-two strains were tested with PCR method, sensitivity was determined with various concentration of standard strains. **Results** The peak order of PCR products was *inlB*, *hly*, *inlA*, *prfA*, and amplified fragment size was 146, 210, 255 and 388 bp respectively. This method has good specificity, and the lowest amount of detecting was 280 cfu/ml. **Conclusion** This method can well meet the requirements of actual food microbe testing.

Key words: *Listeria monocytogene*; virulence gene; DHPLC; MPCR; food-borne pathogen; food safety

收稿日期:2013-09-13

作者简介:钱云开 男 工程师 研究方向为食品生物安全 E-mail:qyk-1@163.com

通讯作者:王海洋 男 工程师 研究方向为食品生物安全 E-mail:why9601@163.com

单核细胞增生李斯特菌 (*L. monocytogenes*, 以下简称单增李斯特菌) 是人畜共患病的致病菌, 侵袭性胞内寄生, 能穿越宿主的肠道、血脑和胎盘三道屏障^[1], 可导致胃肠炎、脑膜炎、败血症、流产等, 病死率高达 20% ~ 30%^[2]。单增李斯特菌在环境和生物体内分布广泛, 其生存温度、pH 范围较宽, 在冰箱冷藏室内亦能缓慢生长繁殖, 因此是冷冻食品中常见的食源性致病菌, 易被其污染的食品包括巴氏杀菌乳、奶酪、水产品、肉类、蔬菜、冷饮、沙拉等^[3]。近年来随着对冷藏、速冻食品消费需求的快速增长, 食品中单增李斯特菌的潜在风险性也越来越高, 世界范围内由单增李斯特菌引起的食物中毒情况日趋严重, 所造成的食品污染程度和感染病例已大大超过沙门菌^[4]。目前, 国际上对食品中单增李斯特菌的污染重视程度明显提高, 单增李斯特菌检测已列为食品卫生标准中常规检测项目。

单增李斯特菌普遍具有毒力基因, 存有潜在的爆发风险, 但不同来源的单增李斯特菌毒力差异较大^[5], 准确、快速筛查食品中具有致病毒力的单增

李斯特菌可有效地限制李斯特菌病的传播, 准确监控食品安全, 追溯污染源, 减少不必要的商品召回^[6]。变性高效液相色谱 (denaturing high-performance liquid chromatography, DHPLC) 是近年在食品微生物等领域建立的快速、自动化核酸分析的新方法^[7]。多重 PCR 将多个靶基因的多重毒力基因同时检测, 可以弥补普通分子检测方法在快速检测过程中由非特异性扩增产生的假阳性问题以及目标靶基因丢失或变异造成的假阴性问题, 增加检测的准确性。为此, 本研究建立了多重 PCR-DHPCL 快速检测单核细胞增生李斯特菌毒力基因的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株

单增李斯特菌标准菌株通过中国工业微生物菌种保藏中心、中国微生物菌种网购买, 其他菌株为本实验室的分离株和中国检验检疫科学院赠送, 见表 1。

表 1 试验菌种及其编号

Table 1 Test strains and their number

菌株名称	拉丁名	菌株编号	来源	数量/株
单核细胞增生李斯特菌	<i>Listeria monocytogenes</i>	CICC 21639	中国工业微生物菌种保藏中心	1
单核细胞增生李斯特菌	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115	中国微生物菌种网	1
单核细胞增生李斯特菌	<i>Listeria monocytogenes</i>	QHDC 130304-130313	本实验室分离株	10
伊氏李斯特菌	<i>Listeria ivanovii</i>	CICC 21663	中国工业微生物菌种保藏中心	1
英诺克李斯特菌	<i>Listeria innocua</i>	CICC 10417	中国工业微生物菌种保藏中心	1
威尔斯李斯特菌	<i>Listeria welshimeri</i>	IQCC 22261	检科院赠送	1
西尔李斯特菌	<i>Listeria seeligeri</i>	IQCC 22229	检科院赠送	1
格氏李斯特菌	<i>Listeria grayi</i>	IQCC 22228	检科院赠送	1
金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	CICC 21676	中国工业微生物菌种保藏中心	1
表皮葡萄球菌	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CICC 23664	中国工业微生物菌种保藏中心	1
鼠伤寒沙门菌	<i>Salmonella typhimurium</i>	CICC 10420	中国工业微生物菌种保藏中心	1
亚利桑那沙门菌	<i>Salmonella arizonae</i>	CICC 21506	中国工业微生物菌种保藏中心	1
宋氏志贺菌	<i>Shigella sonnei</i>	CICC 21535	中国工业微生物菌种保藏中心	1
出血性大肠埃希菌 O157:H7	<i>Enterohemorrhagic Escherichia coli</i>	CICC 21530	中国工业微生物菌种保藏中心	1
肠炎沙门菌	<i>Salmonella enteritidis</i>	50041-15	中国微生物菌种网	1
副溶血弧菌	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17802	中国微生物菌种网	1
创伤弧菌	<i>Vibrio vulnificus</i>	IQCC 12306	检科院赠送	1
猪霍乱沙门菌	<i>Salmonella choleraesuis</i>	IQCC 10502	检科院赠送	1
粪链球菌	<i>Streptococcus faecalis</i>	IQCC 42204	检科院赠送	1
阪崎肠杆菌	<i>Enterobacter sakazakii</i>	IQCC 10403.17	检科院赠送	1
嗜热链球菌	<i>Streptococcus thermophilus</i>	IQCC 22113	检科院赠送	1
蜡样芽孢杆菌	<i>Bacillus cereus</i>	IQCC 22711	检科院赠送	1
铜绿假单胞菌	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	IQCC 12625	检科院赠送	1

1.1.2 主要仪器与试剂

PCR System 9700 基因扩增仪 (美国 ABI)、WAVE 4500 变性高效液相色谱仪 (美国 Transgenomie)。

细菌基因组 DNA 提取试剂盒 TIANamp Bacteria

DNA Kit (天根公司), 单重 PCR 试剂 Premix Taq、多重 PCR 试剂 Multiplex PCR Assay Kit、DNA 标准 (DL2000) 均购自大连 TaKaRa 公司, 三乙胺乙酰胺 (TEAA, 色谱纯, 美国 Transgenomie), 乙睛 (色谱纯,

美国 Fisher), 100 bp DNA Ladder(华美生物工程公司)。单增李斯特菌 PCR-DHPLC 检测的引物序列见表 2, 引物由大连 TaKaRa 公司合成。

表 2 多重 PCR 引物的序列及目的产物长度

Table 2 Primer of multiplex polymerase chain reaction

基因	引物	引物序列	产物长度 /bp	参考 文献
<i>inlA</i>	<i>inlA</i> -F	CCTAGCAGGTCTAACCGCAC	255	[6]
	<i>inlA</i> -R	GTGTAAGATCGCTAATTTGG		
<i>inlB</i>	<i>inlB</i> -F	AAAGCAGCATTTTCATGGGAG	146	[6]
	<i>inlB</i> -R	ACATAGCCTTGTGGTGGC		
<i>hly</i>	<i>hly</i> -A	CGCAACAACTGAAGCAAAGG	210	[8]
	<i>hly</i> -R	TTGGCGGCACATTTGTCTAC		
<i>prfA</i>	<i>prfA</i> -F	GAATGTAACTTCGGCGGAATCAG	388	[9]
	<i>prfA</i> -R	GCCGTCGATGATTGAACTTCATC		

1.2 方法

1.2.1 菌株 DNA 的提取

吸取细菌培养液 1 ml, 采用细菌 DNA 提取试剂盒提取细菌 DNA, -20 °C 保存待检测。

1.2.2 引物筛选与反应体系优化

参考文献[6、8、9]与 SN/T 2641—2010《食品中常见致病菌检测 PCR-DHPLC 法》^[10]中单增李斯特菌毒力基因扩增引物序列信息, 筛选可能的适合多重 PCR 的引物, 以同一模板, 将备选的引物在同等条件下反应, 调整引物量以及引物浓度比值, 选出扩增效果最佳的引物组合。然后进行扩增试剂体系和扩增条件优化, 最后得出最佳反应条件。

单重 PCR 反应体系: 模板 DNA 1.5 μl、10 μmol/L 上、下游引物各 1 μl、Premix Taq 12.5 μl, 无菌超纯水补充至总体积 25 μl。多重 PCR 反应体系: 模板 DNA 3 μl、10 μmol/L 上、下游引物共 8 μl (4 对引物各 2 μl)、Multiplex PCR Mix 2 为 12 μl、Multiplex PCR Mix 1 为 0.12 μl, 无菌超纯水补充至总体积 25 μl。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 60 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 7 min, 4 °C 保存反应产物。

1.2.3 DHPLC 条件

配制缓冲液: 缓冲溶液 A 为 50 ml TEAA, 250 μl 乙腈, 去离子水定容至 1 L; 缓冲溶液 B 为 50 ml TEAA, 250 ml 乙腈, 去离子水定容至 1 L。

采用 PS-DVB & C₁₈ DNASep 色谱柱 (4.6 mm × 50 mm, 粒度 3 μm), 柱温 50 °C, 梯度洗脱条件见表 3, 流速为 0.9 ml/min, 洗脱的 DNA 在 260 nm 进行紫外吸收检测, 上样量为 PCR 产物 10 μl。

1.2.4 特异性试验

取表 1 中所列的除单增李斯特菌标准菌株和分离菌株外的 20 株试验菌株, 经培养后, 建立 1 个模板库, 按照 1.2.2 和 1.2.3 进行 PCR-DHPLC 特异性试验。

表 3 DHPLC 梯度洗脱程序

Table 3 Program of gradient elution of DHPLC

时间/min	缓冲液 A/%	缓冲液 B/%
0.0	55.0	45.0
0.5	50.2	49.8
3.6	41.8	58.2
6.8	38.2	61.8
9.9	36.3	63.7
13.0	35.0	65.0

1.2.5 重现性试验

取表 1 中所列的 10 株单增李斯特菌分离菌株, 经培养后, 按照 1.2.2 和 1.2.3 进行 PCR-DHPLC 重现性试验。

1.2.6 灵敏度试验

取单增李斯特菌标准菌株 (ATCC 19115) 36 °C 培养 24 h, 测其 OD 值, 估计菌液浓度, 然后按 10 倍梯度稀释, 将上述梯度的菌液进行平板计数, 重复 3 次, 取平均值确定菌液浓度。每个梯度菌液采用试剂盒提取法制备模板 DNA, 进行 PCR-DHPLC 检测, 将检测结果与平板计数结果比较, 确定方法的灵敏度。

1.2.7 人工污染食品样品的检测

取冷冻扇贝柱、冻热加工鸡肉制品、浓缩大豆蛋白样品各 25 g, 加入到 225 ml LB1 增菌液中, 充分混匀。取甘油保存的标准菌株 500 μl, 加入到增菌液中, 37 °C 振荡培养 18 h。取菌悬液 1 ml 进行 DNA 模板按照 1.2.1 方法提取, PCR 反应按照 1.2.2 方法, DHPLC 条件按照 1.2.3 方法进行。

2 结果

2.1 PCR 扩增产物 DHPLC 分离结果

将单增李斯特菌毒力基因 *hly* (210 bp)、*prfA* (388 bp)、*inlA* (255 bp)、*inlB* (146 bp) 分别进行单重和多重 PCR 扩增, 扩增产物的 DHPLC 分离结果见图 1, a 的 4 个峰分别与 b、c、d、e 的出峰时间一致, 出峰顺序依次为 *inlB*、*hly*、*inlA*、*prfA*。对照 DNA 标准, 扩增片段大小与预期相符。

取 5 μl 单重和多重 PCR 反应产物在 3% 琼脂糖凝胶中进行验证比对 (见图 2), *hly*、*prfA*、*inlA*、*inlB* 分别在 210、388、255、146 bp 处出现扩增条带, 条带清晰, 无拖尾, 未发现由于引物二聚体或者错配引起的非特异性扩增条带。1~4 泳道单重 PCR 扩增条带, 5 泳道多重 PCR 的几个扩增条带均与目的片段一致, 且 1~5 泳道与图 1 的 e、c、b、d、a 峰图一一对应, 说明 DHPLC 的分离结果准确。

2.2 特异性试验结果

供试的 32 株参考菌株中, 仅单增李斯特菌检测出扩增吸收峰, 其他非单增李斯特菌均呈阴性。将

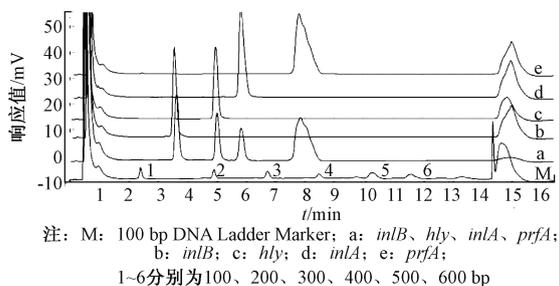


图1 单增李斯特菌毒力基因单重和多重 PCR 扩增产物 DHPLC 分离结果

Figure 1 The result of virulence genes that detected by DHPLC

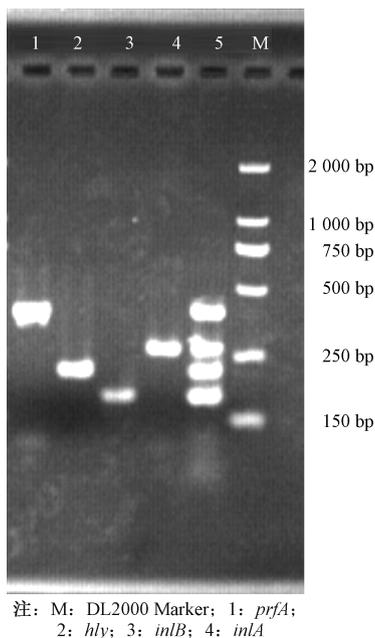


图2 3% 琼脂糖凝胶电泳分析单重和多重 PCR 扩增产物
Figure 2 PCR amplification products analyzed by agarose gel electrophoresis

所得 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳比对,其他细菌的 DNA 均无扩增条带出现,4 对引物特异性良好,无相互干扰。试验结果表明,所设计的引物可以特异性扩增、检测单增李斯特菌中 *hly*、*prfA*、*inlA*、*inlB* 基因,具有良好的单增李斯特菌鉴定特异性。

2.3 重现性试验结果

5 株单增李斯特菌经 DHPLC 检测均出现扩增吸收峰,且出峰时间和峰型重现性良好,以英诺克李斯特菌为阴性对照,无扩增信号出现。

2.4 灵敏度试验结果

本研究所建立的方法可检测出单增李斯特菌标准菌株的 10^{-5} 浓度梯度,即检测灵敏度可达到 280 cfu/ml。

2.5 人工模拟感染食品检测结果

对冷冻扇贝柱、冻热加工鸡肉制品、浓缩大豆蛋白人工感染单增李斯特菌后,多重 PCR 检测结果

均为阳性检出。试验结果表明,各种状态、成分的样品以及增菌液对后续检测不存在影响,本研究所建立的方法适用于食品中单增李斯特菌检测。

3 讨论

PCR 技术因其高效快速、操作简便、特异性强等特点,已被广泛应用于多种致病菌的检测。但是基于某 1 个靶基因的快速检测,由非特异性扩增产生的假阳性以及靶基因丢失和变异产生的假阴性很难避免。尽管多数研究表明只需要检测到 1 个单增李斯特菌特异性的靶基因即可判断污染^[9],但多个靶基因的检测可以增加检测的精确性,避免检测中假阳性和假阴性带来的错误信息和判断。目前多重 PCR 技术已在多种病原微生物的检测中得到了初步应用,成为食源性致病菌快速检测技术的重要发展趋势。

常规琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 扩增产物,因电泳分辨率小制约了多重 PCR 的引物设计,从而限制了多重 PCR 的应用。而 DHPLC 技术分析双链 DNA 片段大小分辨率高于 $1/100$ ^[9],一次可以同时分析数百个样品,极大地提高了微生物检测的自动化程度,达到快速检测食源性致病菌的目的,并且避免了配制和使用溴化乙锭造成的污染,更加环保。荧光 PCR 检测致病菌方法^[11]同样快速、简便,但扩增片段大小受限,而且多重标记成本很高。

本研究建立了简单、快速、特异的多重 PCR-DHPLC 方法,可以一次性检测单增生李斯特菌的 4 种毒力基因,在食品中单增生李斯特菌的快速筛查方面具有良好的应用前景。多个毒力基因的同时检测也为菌株特征、污染模式和流行病学调查提供更多的有用信息,为单增生李斯特菌的防控和流行病学研究奠定基础。

参考文献

- [1] 李欣华. 食源性单核增生性李斯特氏菌毒力基因分布及致病力的研究[D]. 保定:河北农业大学,2012.
- [2] Vazquez-Boland J A, Kuhn M, Berche P, et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants [J]. Clin Microbiol Rev, 2001, 14(3):584-640.
- [3] 柳增善. 食品病原微生物学[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2007:258.
- [4] Goulet V, De Valk H, Pierre O, et al. Effect of prevention measures on incidence of human listeriosis, France, 1987-1997 [J]. Emerging Infections, 2001, 7(6):983-989.
- [5] JIANG L L, CHEN J S, XU J J, et al. Virulence characterization and genotypic analyses of *Listeria monocytogenes* isolates from food and processing environments in eastern China [J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 121(1):53-59.
- [6] 于丰宇, 李林, 王红, 等. 应用 PCR 技术快速测定食品中单核细胞

- 增生李斯特氏菌毒力[J]. 食品科学,2010,31(23):164-168.
- [7] 杨大伟,刘云国,谭乐义,等. 食品中A型肉毒梭菌PCR-DHPLC检测方法的建立[J]. 食品工业科技,2011,32(6):398-400.
- [8] 郑秋月. 热加工食品和水产品中致病菌检测技术体系建立[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2009.
- [9] 曹际娟,闰平平,徐君怡,等. 单核细胞增生李斯特氏菌PCR-DHPLC检测新技术的建立[J]. 生物技术通报,2008(增刊):415-419.
- [10] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T 2641—2010 食品中常见致病菌检测PCR-DHPLC法[S]. 北京:中国标准出版社,2011.
- [11] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T 1870—2007 食品中致病菌检测方法 实时PCR法[S]. 北京:中国标准出版社,2007.

实验技术与方法

蛋白质芯片快速诊断铁缺乏的准确性分析

殷继永,孙静,黄建,霍军生

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100050)

摘要:目的 对蛋白质芯片检测平台快速诊断铁缺乏人群的准确性与发现铁储量不足的能力进行分析。方法 采用免疫比浊法与蛋白质芯片法进行血清铁蛋白与可溶性转铁蛋白受体的方法学对照试验。计算蛋白质芯片法的灵敏度、特异度、阳性似然比、阴性似然比、约登指数及 Kappa 值。对两种方法所得铁储量进行配对比较 t 检验。结果 蛋白质芯片法诊断铁缺乏与比浊法相比,灵敏度较高、特异性较好、具有较高的诊断价值与真实性;其判断铁缺乏的能力与比浊法具有高度的一致性。但蛋白质芯片法筛查出更多有可能铁储量不足的情况,能更好地起到快速筛查的作用。结论 蛋白质芯片法作为快速筛查工具能同时检测 SF 和 sTfR,对铁缺乏的诊断准确性较高,可用于进一步的应用研究。

关键词:蛋白质芯片;铁缺乏;准确性

中图分类号:R155;R556.3;R151 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2014)02-0145-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2014.02.010

Accuracy analysis of orotein microarray in iron deficiency rapid diagnosis

YIN Ji-yong, SUN Jing, HUANG Jian, HUO Jun-sheng

(Institute of Nutrition and Food Safety, Chinese Centre for Disease Prevent and Control, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective To analyze the ability and accuracy of protein microarray for body iron stores (BIS) and iron deficiency diagnosis. **Methods** The protein microarray was compared with commercially available traditional tests for serum ferritin and soluble transferrin receptor, evaluated by indicator including the sensitivity, specificity, Youden's index, likelihood ratio, Kappa index. The BIS results were compared between protein microarray and immunoturbidimetry by paired t test. **Results** The protein microarray showed higher sensitivity, better specificity and coherence with immunoturbidimetry on iron deficiency estimates. At the same time, more BIS insufficient were discovered by protein microarray. **Conclusion** The protein microarray, a new rapid diagnosis technique, could be used to simultaneously detect SF and sTfR, opposed high diagnosis potencial on iron deficiency estimates and it was valuable for more application research.

Key words: Protein microarray; iron deficiency; accuracy ability

铁缺乏(iron deficiency, ID)会引发成年人生理

活力减低、儿童大脑发育受损等一系列营养性疾病^[1]。血清铁蛋白(serum ferritin, SF)与转铁蛋白受体(soluble transferrin receptor, sTfR)是目前评价铁状况的两个最佳参数^[2],通过检测机体 SF 与可溶性 sTfR 可准确地反应机体铁储量的相关信息^[3]。传统的酶联免疫法、免疫比浊法是目前检测 SF 与 sTfR 的主要方法,但都无法实现 SF 和 sTfR 的同时

收稿日期:2013-12-11

基金项目:863 计划(2010AA023004)

作者简介:殷继永 男 助理研究员 研究方向为营养与食品卫生学

E-mail:jjyin7579@163.com

通讯作者:霍军生 男 研究员 研究方向为营养与食品卫生学

E-mail:jshuo@263.net.cn