

3 种致病菌多重 PCR 检测体系的建立及应用*

陈 伟, 杨迎伍, 邓 伟, 李正国

(重庆大学生物工程学院, 重庆大学基因工程研究中心, 重庆市高校功能基因与调控新技术重点实验室, 重庆, 400044)

摘 要 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA)、单核细胞增生性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM)和蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*, BC)是食品中重要的致病菌, 建立其多重 PCR 的快速检测体系, 对开发食源性致病微生物快速检测试剂盒具有重要意义。根据 SA 的 *nuc* 基因、LM 的 *hly* 基因和 BC 的 *hemolysin* 基因, 设计合成 3 对特异性引物, 然后进行单基因 PCR 反应特异性验证。在此基础上建立了 3 种致病菌的多重 PCR 检测体系, 并应用于食品检测中, 同时以国标法进行对比验证。结果表明, 建立的多重 PCR 检测方法简单、快速、灵敏度高, 检测灵敏度可达到 1 cfu/mL, 整个检测时间在 16 h 以内, 具有较大的应用价值, 可广泛应用于食品卫生检测以及临床检验等领域。

关键词 食源性致病菌, 多重 PCR, 食品, 检测

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA)、单核细胞增生性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM)和蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*, BC)分布广泛, 是一类常见的具有高度传染性和危害严重的革兰氏阳性致病菌, 主要通过乳制品和水产品感染人类, 导致细菌性食物中毒, 严重危害着人们的身体健康。然而目前常规的检测方法通常以细菌培养计数的方式进行, 周期长(一般需要 5~7 d), 灵敏度低以及操作繁琐, 因此迫切需要更为快速准确的检测方法。近年来, 随着微生物分子生物学检测的发展, 尤其是在常规 PCR 的基础上发展起来的多重 PCR 检测技术, 为实现多种食源性致病菌的快速同时检测提供了广阔的发展空间。本研究通过优化 PCR 条件, 建立了 SA、LM 和 BC 的多重 PCR 检测体系, 实现了 3 种致病菌的同时快速检测, 为食品中多种致病菌的同时快速检测奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌 种

单核细胞增生性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, ATCC7644)、2 株绵阳李斯特菌(*Listeria ivanovii*)、2 株英诺李斯特菌(*Listeria innocua*)、4 株李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, 检出)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, ATCC6538)、1 株表

皮金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*, ATCC12228)、5 株金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, 检出)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*, ATCC11778)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、2 株蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*, 检出)、沙门氏菌(*Salmonella*, ATCC13076)、志贺氏菌(*Shigella*, ATCC12022)、大肠杆菌 O157:H7(*Escherichia coli* O157:H7, ATCC35150)分别由重庆出入境检验检疫局、第三军医大学西南医院和重庆师范大学微生物菌种保藏中心惠赠。

1.1.2 主要试剂

LB 培养基, 重庆市高校功能基因与调控新技术重点实验室配制。

dNTPs、Taq 酶、DNA Marker 等, 购自 Promega 公司。

1.1.3 仪器设备

PCR 仪、电泳仪、凝胶成像系统, 美国 BIO-RAD 公司; DU640 紫外分光光度计, 美国 Beckman 公司。

1.2 方 法

1.2.1 细菌的培养和模板的制备

分别挑取 SA、LM 和 BC 三株标准菌单菌落接种于 LB 培养基, 37℃ 振荡过夜培养。DNA 的提取采用改良异硫氰酸胍法^[1], 用 DU640 紫外分光光度计测定浓度, -20℃ 保存备用。

1.2.2 引物设计

根据 SA 的 *nuc* 基因、LM 的 *hly* 基因、BC 的 *hemolysin* 基因序列, 利用 Primer 5.0 软件设计各种菌特异性 PCR 引物, 引物序列见表 1。

第一作者: 硕士研究生(李正国教授为通讯作者)。

* 重庆市科委自然科学基金重点项目(CSTC, 2007BA1005)

收稿日期: 2008-04-01, 改回日期: 2008-06-13

表 1 引物序列

菌 名	目的基因	引物序列(5'-3')	产物大小
<i>Staphylococcus aureus</i> (SA)	<i>nuc</i>	SA-1: aagcgattgatgtgatacgggt	380 bp
		SA-2: tttagccaagccttgacgaact	
<i>Listeria monocytogene</i> (LM)	<i>hly</i>	LM-1: aacatatccagggtgctctcg	192 bp
		LM-2: ctttcactaatgtatttactgcg	
<i>Bacillus cereus</i> (BC)	<i>hemolysin</i>	BC-1: aacagcgttgaaacagtggtg	444 bp
		BC-2: atttggtggaagagggtattac	

1.2.3 PCR 特异性验证

以 SA、LM 和 BC 三株标准菌 DNA 为模板,分别进行 PCR 检测。经优化的反应体系为:2.5 μ L 10 \times PCR buffer,1.5 mmol/L MgCl₂,0.5 μ L 10 mmol/L dNTPs,各引物 0.3 μ mol/L,Taq 酶(2.5U),1 μ L 模板,加 ddH₂O 至 25 μ L;扩增程序:(A)94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;(B)94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,57 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 个循环;(C)72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。经凝胶电泳分析后,分别将 3 个 PCR 产物进行纯化,送往上海生工测序。此外,将 SA、LM 和 BC 三株标准菌混合引物,分别以 1.1.1 中的 23 株菌种的基因组 DNA 为模板进行单重 PCR 扩增,验证其特异性。

1.2.4 多重 PCR 体系的建立及优化

通过多次试验,首先确定 PCR 反应体系:2.5 μ L 10 \times PCR buffer、0.7 μ L 10 mmol/L dNTPs、1.5~4.0 mmol/L MgCl₂、2.5U Taq 酶、3 μ L 模板,加 ddH₂O 至 25 μ L;扩增程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min;94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,51 $^{\circ}$ C~56 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1~2 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。加入等浓度 SA、LM 和 BC 的 3 对引物,优化退火温度和延伸时间,再在扩增效果最佳的条件下,根据条带的模糊程度以及亮度差别,调整各引物的浓度,优化 Mg²⁺ 的浓度,确定多重 PCR 检测体系。

1.2.5 多重 PCR 灵敏性验证

将已测定浓度的 SA、LM 和 BC 的模板 DNA 按 10⁰~10⁻⁵ 梯度进行 10 倍稀释后分别混合,在优化的多重 PCR 体系下进行扩增,观察多重 PCR 扩增的灵敏度。

1.2.6 人工模拟奶制品的验证

分别将 SA、LM 和 BC 3 株标准菌过夜培养,利用平板倾注法计数后,用生理盐水梯度稀释,同时以生理盐水作为空白对照,按照以下方式进行感染:

(1)牛乳检测中的应用:将 3 种菌随机组合感染(感染量约为 1 \times 10⁹ cfu/mL)牛奶,利用有机溶剂抽提和 PBS 洗涤后^[2],提取 DNA 进行 PCR 检测。

(2)牛乳检测中灵敏度的验证:将 3 种菌分别以 10² cfu/mL,10¹ cfu/ mL,10⁰ cfu/ mL 不同浓度等量混合后感染牛奶,37 $^{\circ}$ C,250 r/min,振荡培养 10~12 h 后,利用有机溶剂抽提和 PBS 洗涤后^[2],提取 DNA,利用优化的多重 PCR 体系进行检测。

1.2.7 市售食品的验证

在市场上采集不同来源的牛乳、酸乳、猪肉、牛肉、虾肉各 15 份(共 75 份),模拟食用过程,在室温条件下或 4 $^{\circ}$ C 冰箱里保藏 2d,然后无菌操作取样品 25 g (mL)均质,加入到 225 mL LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养。按照上述方法提取 DNA 进行多重 PCR 检测,同时参照国标法对比,以验证建立的多重 PCR 检测方法的可行性与准确性。

2 结果与分析

2.1 引物特异性分析

根据所设计的 3 对特异性引物对 23 株菌进行 PCR 检测,结果表明,6 株 SA、5 株 LM 和 3 株 BC 全部呈现阳性,而其他 9 株菌均呈阴性,从而说明所设计的引物具有很强的特异性(图 1)。

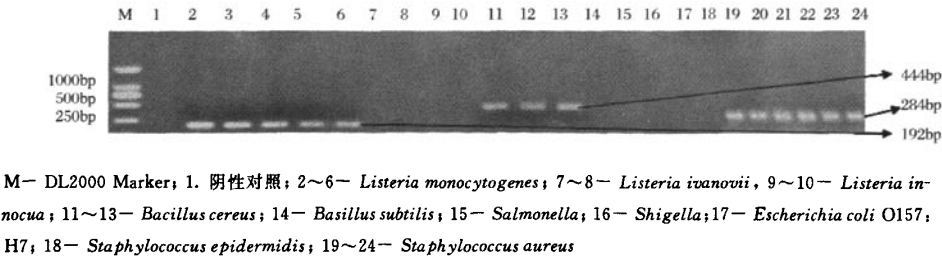


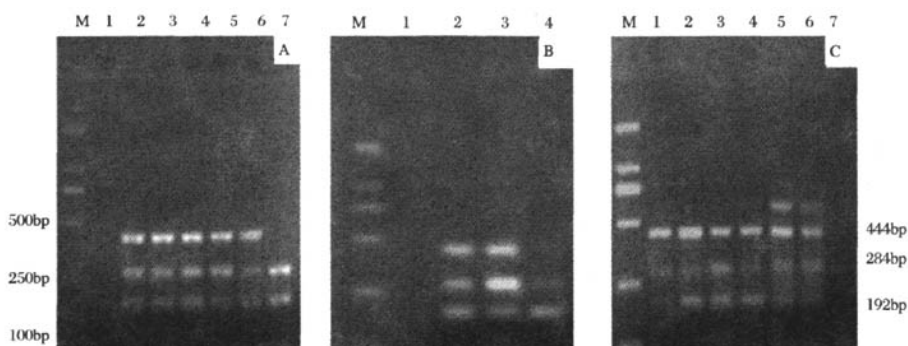
图 1 引物特异性检测

PCR 产物经测序,结果通过 BLAST 与 GenBank 中的其它序列对比,SA 同源性达 100%,LM 同源性为 99%,BC 同源性为 99%,表明该扩增产物与目标基因一致。所建立的单一 PCR 体系具有高度特异性。

2.2 多重 PCR 体系的优化

通过试验确定,多重 PCR 反应的退火温度在 52℃ 或 53℃ (图 2A),延伸时间为 1.5 min 时 (图 2B)

效果最佳; $C_{[Mg^{2+}]}$ 为 2.5 mmol/L 时 (图 2C) 能够扩增条带清晰。因此,优化的多重 PCR 反应体系:2.5 μ L 10 \times PCR buffer, 2.5 mmol/L $MgCl_2$, 0.7 μ L 10 mmol/L dNTPs, SA 引物 0.3 μ mol/L, LM 引物 0.2 μ mol/L, BC 引物 0.4 μ mol/L, Taq 酶 (2.5U), 3 μ L 模板,加 ddH₂O 至 25 μ L;扩增程序:(A)94℃ 预变性 4 min;(B)94℃ 变性 45 s,53℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 1.5 min,35 个循环;(C)72℃ 延伸 7 min。



(A)退火温度: M— DL2000 Marker; 1— 阴性对照; 2— 51℃; 3— 52℃; 4— 53℃; 5— 54℃; 6— 55℃; 7— 56℃

(B)延伸时间: M— DL2000 Marker; 1— Negative control; 2— 2.0 min; 3— 1.5 min; 4— 1.0 min

(C) $MgCl_2$: M— DL2000 Marker; 1— 1.5 mmol/L; 2— 2.0 mmol/L; 3— 2.5 mmol/L; 4— 3.0 mmol/L;

5— 3.5 mmol/L; 6— 4.0 mmol/L; 7— 阴性对照

图 2 多重 PCR 体系的优化(A, B, C)

2.3 多重 PCR 灵敏度分析

经测定,SA、LM 和 BC 的 DNA 浓度分别为: 0.753 μ g/ μ L, 0.322 μ g/ μ L, 0.816 μ g/ μ L。经梯度稀释后,由 PCR 检测结果 (图 3) 可看出,稀释到 10^{-4} 即 SA 浓度为 75.3 pg/ μ L, BC 浓度为 81.6 pg/ μ L 和 LM 浓度为 32.2 pg/ μ L 时,LM 没有扩出条带,而 SA 和 BC 仍能看到很微弱的条带;在 10^{-5} 时,则 3 种

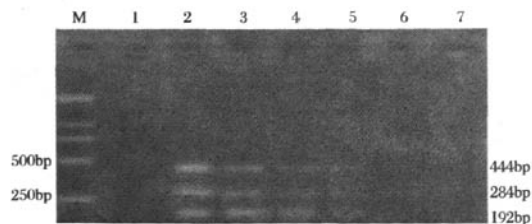
菌均无条带出现。因此,该多重 PCR 检测体系最低检出浓度为: SA 75.3 pg/ μ L, BC 81.6 pg/ μ L, LM 322 pg/ μ L。

2.4 模拟试验分析

3 种致病菌随机组合后人工感染牛乳,进行多重 PCR 检测,结果出现相应的条带并且未发生交叉影响,特异性强,从而证明该多重 PCR 检测体系具有较好的稳定性和实用价值 (图 4A)。经过富集培养后,3 种致病菌在牛奶中的最低检出限可达到 1 CFU/mL (图 4B)。

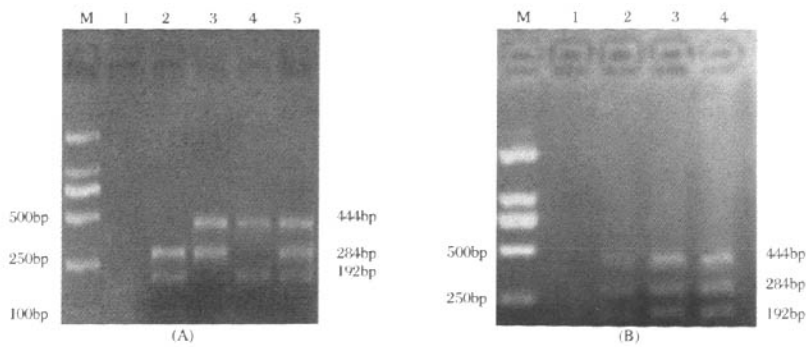
2.5 市售食品的试验分析

在所检测的 75 份样品中,多重 PCR 检测方法的阳性率为 4%,国标法的阳性率为 2.7%。结果表明,该多重 PCR 检测结果准确可靠,与国标法基本一致,尚未出现漏检现象。



M— DL2000 Marker; 1— 阴性对照; 2— 10^0 ;
3— 10^{-1} ; 4— 10^{-2} ; 5— 10^{-3} ; 6— 10^{-4} ; 7— 10^{-5}

图 3 多重 PCR 检测的灵敏度



(A)人工接种致病菌牛奶多重 PCR 检测的特异性: M- DL2000 Marker; 1- 阴性对照;
2- SA 和 LM; 3- SA 和 BC; 4- BC 和 LM; 5- BC,SA 和 LM
(B)人工接种致病菌牛奶中的多重 PCR 检测灵敏度: M- DL2000 Marker; 1- 阴性对照;
2-10⁰ cfu/mL; 3- 10¹ cfu/mL; 4- 10² cfu/mL

图4 人工接种各致病菌牛奶中的多重 PCR 检测

表2 多重 PCR 检测结果与国标法检测结果的对比

样 品	多重 PCR 检测		传统培养	
	阳性	阴性	阳性	阴性
牛乳(15)	1	14	1	14
酸乳(15)	0	15	0	15
猪肉(15)	0	15	0	15
牛肉(15)	0	15	0	15
虾(15)	2	13	1	14

3 讨 论

目的基因的选择,对于多重 PCR 技术检测的特异性尤为重要。关于目的基因的选择,很多研究报道采用不同的基因。本研究采用 SA 的 *nuc* 基因、LM 的 *hly* 基因和 BC 的 *hemolysin* 基因作为各自 PCR 检测的目的基因,它们特异性强,能够保证检测的准确性和特异性^[3~7]。

多重 PCR 扩增时,任何一种试验条件控制不当,都将很容易导致非特异性的产物甚至扩增失败^[8]。在 PCR 反应条件中退火温度是影响 PCR 特异性的较重要因素,退火温度过低,将导致非特异性扩增而降低特异性扩增效率,退火温度过高影响引物与模板的结合而降低 PCR 扩增效率。此外,Mg²⁺ 对 PCR 扩增的特异性和产量有显著的影响,Mg²⁺ 浓度过高,反应特异性降低,出现非特异扩增,浓度过低会降低 Taq 酶的活性,使反应产物减少。本研究通过优化影响 PCR 的主要条件,建立了稳定的多重 PCR 反应体系。同时,采用低引物浓度(0.1~0.4 μmol/L),避免了非特异性产物和大量引物二聚体的形成,提高了扩增效率。

在食品样品检测过程中,由于多重 PCR 敏感性极高,会扩增出已死亡致病菌的 DNA,从而造成假阳性。因此建议在实际工作中,先利用多重 PCR 方法对样品进行初筛,然后再结合国标法验证,从而减轻工作量,提高工作效率。

通过优化多重 PCR 反应条件,建立了 SA、LM 和 BC 快速检测的多重 PCR 体系,特异性强、灵敏度高、缩短了检测时间、简化了操作步骤,其最低检测限可达 1 cfu/mL,整个检测时间在 16 h 以内,具有较强的应用价值。进一步规范后可研制成检测试剂盒,从而为食品中食源性致病微生物检测试剂盒的推广应用奠定基础。

参 考 文 献

- 1 杨 平,杨迎伍,陈 伟,等. 食品中 4 种致病微生物的多重 PCR 快速检测技术研究[J]. 西南大学学报, 2007, 29(5): 90~94
- 2 Riffon R, Sayasith K, Khalil H, et al. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR [J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(7):2 584~2 589
- 3 Kim C H, Khan M, Morin D E, et al. Optimization of the PCR for detection of *Staphylococcus aureus* *nuc* gene in bovine [J]. J Dairy Sci, 2001, 84(1):74~83
- 4 Hansen B M, Leser T D, Hendriksen N B, et al. Polymerase chain reaction assay for detection of *Bacillus cereus* group cells [J]. FEMS Microbiol Lett, 2001, 202(2):209~213
- 5 Hansen B M, Hendriksen N B. Detection of enterotoxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(1):185~189

- 6 Aznar R, Alarcon B. On the specificity of PCR detection of *Listeria monocytogenes* in food; a comparison of published primers [J]. Syst Appl Microbiol, 2002, 25(1): 109~119
- 7 Jung Y S, Frank J F, Brackett R E. Polymerase chain re-

- action detection of *Listeria monocytogenes* on frankfurters using oligonucleotide primers targeting the genes encoding internalin AB [J]. J Food Prot, 2003, 66(2): 237~241
- 8 黄银花, 胡晓湘, 占利, 等. 影响多重 PCR 扩增效果的因素[J]. 遗传, 2003, 25(1): 65~68

Establishment and Application of Multiplex PCR for Detection of Pathogenic Microorganism

Chen Wei, Yang Yingwu, Deng Wei, Li Zhengguo

(Genetic Engineering Research Center, Bio-Engineering College, Chongqing University; Key Lab of Functional Gene and New Regulation Technologies under Chongqing Municipal Education Commission, Chongqing 400044, China)

ABSTRACT *Staphylococcus aureus* (SA), *Listeria monocytogenes* (LM) and *Bacillus cereus* (BC) are important food-borne pathogens in food. The establishment of the multiplex PCR detection method is very important for developing the food-borne pathogenic microorganism detection kit. Three pairs of primers were designed according to nuc gene of SA, *hly* gene of LM and *hemolysin* gene of BC, and then the PCR was performed to detect their specificities using the conventional methods as control. The results showed that the multiplex PCR method was simple, rapid and sensitive. The sensitivity achieved was as low as 1 CFU/mL and the total detection time was less than 16 hours. It could be widely applied to many fields such as food sanitation detection, clinical inspection and so on.

Key words food-borne pathogenic microorganism, multiplex PCR, food, detection

企
訊

Thermo Scientific 和 Fisher Scientific 同台亮相

赛默飞世尔科技(Thermo Fisher Scientific)于2008年9月23~25日参加了在上海举行的2008 Analytica China(慕尼黑生化展),同台展示了Thermo Scientific的行业解决方案和Fisher Scientific的国际实验室设计理念与实验室安全防护。同期,赛默飞世尔科技召开新闻发布会,并开放其位于金桥的客户实验演示中心供大家参观交流。通过全方位多渠道的方式充分展示了赛默飞世尔科技作为分析仪器领域市场领导者的卓越实力,倍受广大行业用户及国内外专家学者的瞩目。

由于最新发布的TSQ Vantage系统以及赛默飞世尔的许多仪器均可很好的用于三聚氰胺检测而备受媒体关注。赛默飞世尔就食品安全检测和三聚氰胺检测等热点问题与各媒体进行了交流。

在发生的三鹿奶粉事件后,赛默飞世尔人在第一时间作出了响应。赛默飞世尔对此次事件的高度重视和快速反应受到了国家质检总局专家的感谢和好评。目前在国家和地方多个检测机构均安装有赛默飞世尔的气质联用仪、液质联用仪等可用于三聚氰胺检测的分析仪器。

除三聚氰胺检测外,赛默飞世尔此次在2008 Analytica China上海还展出了NANOPure超纯水系统和Thermo Scientific Heraeus Pico 21微量台式离心机。NANOPure Diamond第6代优化超纯水系统综合考虑各种水质标准,得出高于所有行业标准的自己的水质标准,充分满足各种使用的需求。Thermo Scientific Heraeus Pico & Fresco微量台式离心机提供2种离心规格,其无碳刷频率感应电机可真正实现宁静、无震动运转,完全意义上的免维护,是各类分子生物、医学实验室理想的离心工具。

赛默飞世尔科技还展示了与水质分析应用相关的仪器,包括可测量pH、离子、溶解氧、电导率、盐度、TDS、COD、温度、比色、浊度在内的各参数可同时满足实验室测量及在线监测的需求。此次展出的Eutech(优特)旗下2008年最新型号EcoTestr pH 1和pH 2而非简单满足于符合高级pH监测的基本要求。Fisher Scientific在本届展会上首次与Thermo Scientific同台亮相。作为全球科研工作者值得信任的合作伙伴,为更好地服务于中国实验室市场,Fisher Scientific于2008年4月推出了第一版中文实验室常用产品目录,并全面启用了中文网站及400服务热线。经过半年来的摸索和实践,目前目录内的产品由原先的1万种扩大到超过2万种,开始系统化的服务业务,并和国内众多的著名院校及科研机构如复旦大学,中科院建立了良好的合作关系。

为了帮助客户更好地了解Fisher Scientific的全新业务及服务理念,在此次2008慕尼黑上海生化展期间,Fisher Scientific将举办国际实验室设计理念与实验室安全防护的滚动讲座,同时推出了实验室色谱分析应用和实验室设备耗品的展示。

继续关注中国市场,加大在中国市场的投资和发展,成为真正的科学服务的领导者,将是赛默飞世尔科技一直努力的方向。