

# 多重 PCR 检测冷却肉中的 3 种致病菌\*

王艳君<sup>1</sup>, 张春晖<sup>2</sup>, 王玉芬<sup>2</sup>, 吴 坤<sup>1</sup>

1(河南农业大学生命科学学院, 河南郑州, 450002) 2(双汇集团技术中心, 河南漯河, 462000)

**摘 要** 分别针对沙门氏菌 (*Salmonella choleraesuis* subs. *choleraesuis*, S) 编码 DNA 结合蛋白的基因 *hns*、大肠 O157:H7 (*Escherichia coli* O157:H7, E) 编码外膜蛋白紧密素的基因 *eaeA* 和单核细胞增生李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*, L) 溶血素 O 基因 *Hly* 设计 3 对引物, 建立同步检测肉制品中 3 种致病菌的多重 PCR 方法。通过对多重 PCR 特异性和灵敏度进行分析, 对多重 PCR 反应条件进行优化, 结果表明, 此方法简便、快速, 可使混菌检测灵敏度达到  $10^3$  cfu/mL。

**关键词** 多重 PCR, 致病菌, 冷却肉

在全世界所有的食源性疾病爆发的案例中, 66% 以上为细菌性致病菌所致<sup>[1]</sup>。其中, 沙门氏菌、大肠 O157:H7 和单增李斯特是 3 种典型的致病菌, 已被列入国家常规检测项目中。

长期以来人们对它的检测几乎一直依赖于实验室细菌的培养, 生化反应和血清学鉴定等常规方法, 这些方法费事费力且易污染。随着分子生物学的发展, PCR 技术已广泛应用于食品微生物、动植物疫病、饲料成分及转基因成分的检测领域, 使食源性致病菌的快速检验发展到一个崭新的高度。多种致病菌的 PCR 检测方法已被建立起来, 如沙门氏菌<sup>[2,3]</sup>、大肠 O157:H7<sup>[4]</sup>、单核细胞增生李斯特氏菌<sup>[5]</sup>等。针对检测部门普遍工作量大、时间紧的现状, 在单一 PCR 的基础上发展了多重 PCR 技术, 目前, 同时检测多种<sup>[6,7]</sup>致病菌的多重 PCR 技术已经有了很大发展。如西北大学焦豫良等<sup>[7]</sup>已用多重 PCR 技术实现了对肠毒性大肠埃希菌、大肠埃希菌 O157:H7、沙门菌属、霍乱弧菌、蜡样芽胞杆菌和志贺菌属 6 种菌的同时检测。

多重 PCR 技术实现了对多种菌的同步检测, 更加节省时间和成本, 是快速检测致病菌的重要研究方向<sup>[8]</sup>。为了实现对冷却肉中的多种致病菌的监控和检验, 实验旨在探索同时检测冷却肉中沙门氏菌、大肠 O157:H7 和单增李斯特的多重 PCR 方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 菌 株

表 1 实验菌株

菌株	来源及编号
<i>Salmonella choleraesuis</i> subs. <i>choleraesuis</i> (沙门氏菌)	ASI. 1859
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (大肠 O157:H7)	NICPB 44752
<i>Listeria monocytogenes</i> (单核细胞增生李斯特氏菌)	NICPB 54001
<i>Staphylococcus aureus</i> (金黄色葡萄球菌)	ASI. 1861
<i>Bacillus cereus</i> (蜡样芽胞杆菌)	ASI. 230
<i>Shigella</i> (志贺氏菌)	ASI. 1868
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (副溶血性弧菌)	ASI. 1997
<i>Clostridium perfringens</i> (产气荚膜梭菌)	NICPB 64711

注: 以 AS 编号的菌株来源于中国微生物菌种保藏委员会普通微生物中心, 以 NICPB 编号的菌株来源于中国药品生物制品检定所。

#### 1.1.2 试 剂

DNA100bp 分子量 Ladder; Taq 酶; dNTP; 凝胶加样缓冲液 (0.25% 溴酚蓝 0.25% 二甲基苯青 FF, 15% 蔗糖); syber green 染料;  $0.5 \times$  Tris-乙酸缓冲液 (TAE) 等。

#### 1.1.3 仪 器

梯度 PCR 仪 (德国, T gradient 96 型)、凝胶成像分析系统 (法, Infinity 008)、水平电泳系统 (德国, P25T Horizon11.14)、冷冻离心机 (德国, MIKRO 200R)。

## 1.2 方 法

### 1.2.1 引物设计

根据国内外文献报道<sup>[9~12]</sup>, 应用 Primer 5、DNASTAR 和 Oigo 引物设计和分析软件设计了 3 对特异性引物, 见表 2, 引物由上海生工公司合成。

### 1.2.2 模板的提取

(1) 增菌培养, 取 1 mL 于离心管中, 8 000 g 离心 3 min, 弃上清液;

(2) 加 DNA 抽提液 500  $\mu$ L, 65  $^{\circ}$ C 水浴 30 min 以上;

(3) 加入等体积酚/CHCl<sub>3</sub>, 混匀, 12 000 g 离心 10 min, 取上清液;

第一作者: 硕士研究生 (张春晖为通讯作者)。

\* 河南省重大科技攻关计划“食品安全关键技术”(042031200)

收稿日期: 2006-09-21, 改回日期: 2006-11-08

(4)加入 2 倍体积无水乙醇, -20℃ 冰箱放置 30 min 以上, 12 000 g 离心 15 min, 弃上清液, 倒置晾干 20 min 左右, 加入 30μL 水或 TE 溶解, 用于 PCR 分析。

表 2 引物序列及其产物

菌 种	引物序列	长度	G+ C %	扩增基因	扩增片段
单增李斯特菌	5'- CCATTGCGTTTCATCTTTAG - 3'	20	40. 0	<i>hly</i> <sup>[10]</sup>	273bp
	5'- TGGCGTCTTAGGACTTGC - 3'	18	55. 6		
沙门氏菌	5'- GCGACAGACGGTGAGTAT- 3'	18	55. 6	<i>hns</i> <sup>[11]</sup>	534bp
	5'- CCAGTCCAGGTTTTAGTTT - 3'	19	42. 1		
大肠杆菌 O157	5'- CGTGATGATGTTGAGTTG - 3'	18	44. 5	<i>eaeA</i> <sup>[12]</sup>	420bp
	5'- AGATTGGTTGGCATTACTG - 3'	19	42. 1		

1. 2. 3 PCR 反应体系及条件

(1) 反应体系: 1. 25U Taq 酶; 250μmol/L dNTP; 3mmol/L MgCl<sub>2</sub>; 10 × PCR buffer 2. 5μL ; 2μmol/L 引物; 总体积为 25μL。

(2) 反应条件: 94℃ 预变性 5 min 后进入循环, 94℃ 1 min ; 58℃ 1 min ; 72℃ 1 min ; 共循环 35 个反应; 72℃ 延伸 10 min; 4℃ 保存。

(3) 反应结果检测: 取 5~8μL PCR 扩增产物, 用 1. 5 % (w/ v) 琼脂糖凝胶, 100V 电压电泳, 用 syber green 染料染色及 UV I 凝胶成像系统观察分析结果。

1. 2. 4 单重 PCR 检测

分别以标准菌株 S (AS1. 1859)、E (NICPB 44752) 和 L (NICPB 54001) 提取的 DNA 作为模板, 加入各自相应的引物, 进行 PCR 的检测。

1. 2. 5 多重 PCR 检测

以上述 3 种菌提取的混合 DNA 为模板, 同时加入 3 对引物, 进行 PCR 扩增及检测, 同时对退火温度及时间进行优化。

1. 2. 6 人工接种对样品进行检测

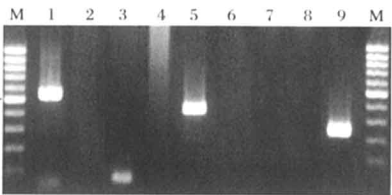
将每种肉样取 2. 5g 放入无菌样品袋内, 同时接种 22. 5 mL 经 10 倍稀释法进行稀释的每种细菌的菌液。匀质后于 37℃ 振荡培养过夜。抽提 DNA 进行 PCR 扩增。

2 结果与分析

2. 1 特异性分析

2. 1. 1 单重 PCR 特异性分析

对 3 种目标菌做单重 PCR, 验证引物的特异性, 结果 (见图 1) 目标菌株仅对其对应引物有特异性反应, 在相应位置出现了特征条带, 而对其他菌的引物没有扩增现象。说明引物对其特定菌有很高的特异性。



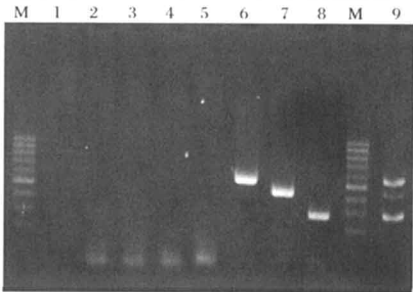
M-100bp DNA Ladder; 1, 2, 3-依次为 E、L 的单一 DNA 模板, 加入 S 引物的扩增结果; 4, 5, 6-依次为 S、E、L 的单一 DNA 模板, 加入 E 引物的扩增结果; 7, 8, 9-依次为 S、E、L 的单一 DNA 模板, 加入 L 引物的扩增结果

图 1 S、E、L 的单重 PCR 产物的凝胶电泳结果

2. 1. 2 多重 PCR 特异性分析

(1) 引物对致病菌的特异性分析

提取 3 种目标菌的混合 DNA 为模板, 分别加入 S、E、L 的单对引物进行扩增; 另外分别以金黄色葡萄球菌、志贺氏菌、蜡样芽孢杆菌、副溶血性弧菌和产气荚膜梭菌提取的单一 DNA 为模板, 同时加入 3 对引物进行扩增 (见图 2)。



M-100bp DNA Ladder, 1~5-分别是以提取的金黄色葡萄球菌、志贺氏菌、蜡样芽孢杆菌、副溶血性弧菌和产气荚膜梭菌单一 DNA 为模板, 加入 3 对引物的扩增结果, 6~8-提取的 3 种目标菌的混合 DNA 为模板, 分别加入 S、E、L 的单对引物的扩增结果 9 多重 PCR 扩增结果

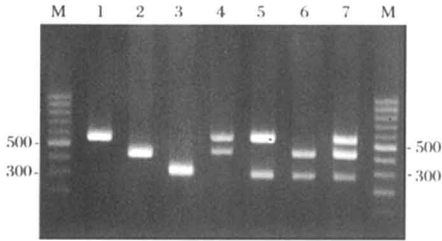
图 2 引物对致病菌的特异性分析实验

由图 2, 引物仅与其特定目标菌株 DNA 反应, 而本实验设计的 3 对引物与目标菌株以外的金黄色葡萄球菌、志贺氏菌、蜡样芽孢杆菌、副溶血性弧菌和产气荚膜梭菌均没有扩增现象。结果表明, 引物对致病

菌具有极高的特异性。

## (2) 致病菌对引物的特异性分析

以 3 种标准菌株提取的单一 DNA、两两混合及 3 种混合为模板,分别加入 3 对引物进行扩增(见图 3)。结果无论是单菌还是混菌对引物都具有极高的特异性。



M—100bp DNA Ladder; 1—3—分别以 S、E、L 的单一 DNA 为模板,加入 3 对引物的扩增结果; 4—以 S、E 二者混合 DNA 为模板,加入 3 对引物的扩增结果; 5—以 S、L 二者混合 DNA 为模板,加入 3 对引物的扩增结果; 6—以 E、L 二者混合 DNA 为模板,加入 3 对引物的扩增结果; 7—多重 PCR 扩增结果

图 3 致病菌对引物的特异性分析实验

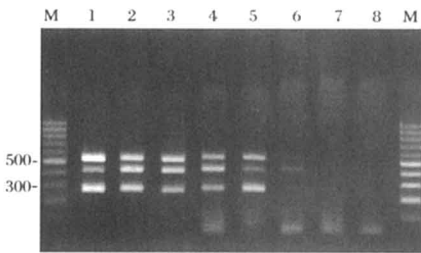
## 2.2 灵敏度分析

### 2.2.1 单重 PCR 灵敏度分析

分别将 3 种标准菌株的培养液以 10 倍稀释法进行梯度稀释,提取 DNA,进行 PCR 检测。并将最后 3 个梯度的稀释液进行平板记数。结果显示 S 灵敏度可达到 5 cfu/mL, E 达到 5 cfu/mL, L 达到 6 cfu/mL。

### 2.2.2 多重 PCR 的灵敏度分析

等量混合 3 种菌液,使每种菌的含量达到  $10^8$  cfu/mL,以 10 倍稀释法进行梯度稀释,分别提取 DNA 后进行多重 PCR 检测;同时将  $10^8$  cfu/mL 至 10 cfu/mL 菌液分别接种到 5g 肉糜上,进行多重 PCR 检测,灵敏度可达  $10^3$  cfu/mL。结果见图 4。



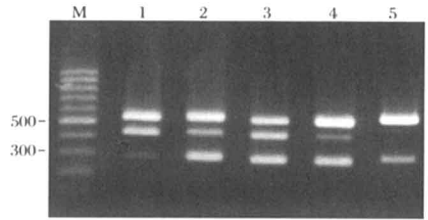
M—100bp DNA Ladder; 1— $10^8$ ; 2— $10^7$ ; 3— $10^6$ ; 4— $10^5$ ; 5— $10^4$ ; 6— $10^3$ ; 7— $10^2$ ; 8— $10^1$

图 4 冷却肉中多重 PCR 的灵敏度(cfu/mL 混合菌液)

## 2.3 反应条件的优化

PCR 反应的影响因素很多,其中 1 个重要参数就是退火温度。首先利用梯度 PCR 仪,优化退火温

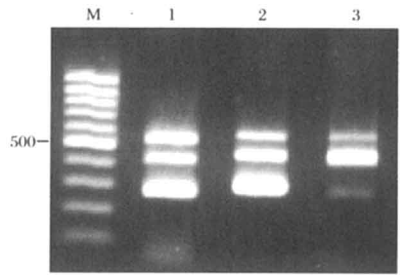
度(见图 5)和退火时间(见图 6),在最佳的退火温度下再根据条带的亮暗调整引物浓度,同时调整循环数(见图 7)以便在最短的时间内达到最佳的效果。



M—100bp DNA Ladder; 1—53.5; 2—55℃; 3—56.5℃; 4—58℃; 5—59.5℃

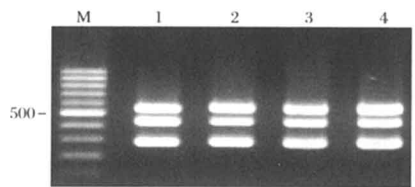
图 5 退火温度/℃

由图 5 可知,温度过高,引物则不能有效退火;温度低了,则会影响其特异性。而在 56.5℃ 扩增时条带均能达到最佳效果,退火时间一般为 30~60,足以使引物与模板之间完全结合。由图 6,退火时间为 60 s 时条带最亮且最均匀。



M—100bp. DNA Ladder; 1—60; 2—45; 3—30

图 6 退火时间/s



M—100bp DNA Ladder; 1—35; 2—33; 3—31; 4—29

图 7 循环数

循环次数决定 PCR 扩增程度。一般的循环次数选在 30~40 次之间,循环次数越多,非特异性产物的量亦随之增多。由图 7 显示,30 个循环即可得到最好的效果。

综上,优化后的 PCR 反应条件为:94℃ 预变性 5 min 后进入循环,94℃ 1 min; 56.5℃ 1 min; 72℃ 1 min; 共循环 30 个反应;72℃ 延伸 10 min;4℃ 保存。

## 2.4 样品的 PCR 检测

取 5g 冷却肉放入灭菌三角瓶中,同时接种经 10

倍稀释过的每种细菌培养液及其混合液,提取 DNA 进行 PCR 扩增,同时倒计数平板进行计数。多次实验证明人工污染的样品可被准确的检测出来,该多重 PCR 体系对 S、E、L 有很高的特异性。

### 3 讨论

文中研究的多重 PCR 技术具有很高的特异性,可在 5 h 内完成对 3 种菌的检测,在很大程度上简化了操作步骤,节省试剂,并节省时间和费用,具有重要的研究意义和应用价值。

本实验检测灵敏度可达  $10^3$  cfu/mL,低于单一 PCR 的  $10^1$  cfu/mL 2 个滴度,说明多种因素对多重 PCR 的灵敏度有影响,包括引物的相互影响、引物退火温度等。此外,该实验中引物及膜板是等量加入的,而在实际情况中各种菌的含量并不一样,所以在实际应用中要根据具体情况对优化体系略做调整。对于细菌量较少的检测标本,要经过增菌,避免多重 PCR 出现假阴性结果。文献中指出<sup>[13]</sup>,大多数致病菌的感染剂量大于  $10^3$  cfu/mL,因而,该方法的建立对冷却肉中致病菌的检测和监控具有重要的意义。

### 参 考 文 献

- 张敏,童华荣,张丽平. 动物性食品安全现状及其对策[J]. 食品工业科技,2005(5):182~186
- 魏麟,黎晓英. PCR 技术检测饲料中沙门氏菌的应用研究[J]. 中国饲料,2005(4):32~33
- 汪琦,张昕,张惠媛,等. 利用 PCR 方法快速检测食品中的沙门氏菌[J]. 检验检疫科学,2005(6):26~28
- 郑桂丽,廖绍安. 大肠杆菌 O157 特异基因的 PCR 检测方法[J]. 中国卫生检验杂志,2005(10):183~185
- Becker B, Jordan S, Holzapfel W H. Rapid and specific detection of *Listeria monocytogenes*[J] in smoked salmon with BAX-PCR[J]. Food Control, 2005,16:717~721
- 杨小鹏,吴清平. 多重 PCR 检测无公害畜禽肉和水产品中 4 种致病菌[J]. 微生物学通报,2005 32(3):95~101
- 焦豫良,张兴群. 6 种食品致病菌的多重 PCR 检测[J]. 临床检验杂志,2005,23(4):256~258
- Avijit Roy, Amer Fayad, G Barthe, et al. A multiplex polymerase chain reaction method for reliable, sensitive and simultaneous detection of multiple viruses in citrus trees[J]. Journal of Virological Methods, 2005,129:47~55
- 蒋鲁岩,陈光哲. PCR 技术同步检测动物产品中的 4 种致病菌[J]. 检验检疫科学,2003,13(4):7~9
- 张明,陈玉真,陈敏,等. 应用 PCR 技术检测李斯特氏菌致病基因[J]. 中国公共卫生,2002,18(3):370
- 李莉,蒋作明. PCR 技术在食品沙门氏菌检测中的应用[J]. 食品科技,2002(4):60~62
- 金慧英,陈华标. 分子生物学技术在大肠杆菌 O157:H7 检测中的应用[J]. 中国人兽共患病杂志,2002,18(5):87~89
- 贺晓龙,张桂芝,方维焕,等. 动物性食品中大肠埃希氏菌 O157:H7 特异性二重 PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医科技,2005,35(8):626~629

## A Multiplex PCR Method for Simultaneous Detecting Three Pathogens in Chilled Meat

Wang Yanjun<sup>1</sup>, Zhang Chunhui<sup>2</sup>,

Wang Yufen<sup>2</sup>, Wu Kun<sup>1</sup>

1( Life Science College of Henan Agricultural University, Zheng zhou 450002, China)

2(Shineway Group Technical Center, Luohe 462000, China)

**ABSTRACT** To develop a multiplex PCR assay to detect *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in meat, three pairs of primers were designed from *hns* gene of *Salmonella*, intimin gene (*eaeA*) of *Escherichia coli* O157:H7, and hemolysis gene (*Hly*) of *Listeria monocytogenes*. This method is simple and quick with specificity and sensitivity. The detection limit is  $10^3$  cfu/mL.

**Key words** Multiplex PCR, pathogens, chilled meat