

食品中单核细胞增生性李斯特氏菌 PCR 快速检测方法

王环宇 李业鹏 杨 军 刘秀梅 计 融

(中国疾控中心营养与食品安全所,北京 100021)

摘要:为建立食品中单核细胞增生性李斯特氏菌(单增李斯特氏菌)的快速、敏感、特异的 PCR 检测方法,选取 hlyA 基因作为靶序列设计一对引物,用该引物对 63 株从国内食品中分离的李斯特氏菌(进行传统方法验证)和 20 株非李斯特氏菌进行 PCR 扩增,并用此方法对人工污染食品进行检测,扩增片段表现出极好的单增李斯特氏菌种特异性,人工污染的生肉、冷冻虾仁、卷心菜的检出限为 39 cfu/g,为食品中单增李斯特氏菌的快速、敏感并且特异的检测方法。

关键词:食品;李斯特氏菌;单核细胞增生;聚合酶链反应

Development of a rapid, sensitive and specific polymerase chain reaction (PCR) method for detection of *Listeria monocytogenes* (LM) in foods

Wang Huanyu, et al.

(National Institute for Nutrition and Food Safety, China CDC, Beijing 100021)

Abstract: Objective: To establish a rapid, sensitive and specific polymerase chain reaction (PCR) method for detection of *Listeria monocytogenes* (LM) in foods. **Methods:** A pair of oligonucleotide primers were designed with hlyA gene as target sequence. Using the designed primers, sixty-three strains of LM isolated from different foods in different areas of chain, 3 strains of *Listeria innocua* and 20 strains of other bacteria were amplified by the PCR method, and the method was used to detect LM seeded onto fresh meat, frozen shrimp, and cabbage. **Results:** Amplified fragment showed excellent features of LM. Limit of detection for fresh meat, frozen shrimp and cabbage was 10 cfu/g. **Conclusions:** A rapid, sensitive and specific PCR method was established for detection of LM in food.

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

单核细胞增生性李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*, LM) 是一种重要的人畜共患病致病菌,能引起人和动物脑膜炎、败血症及孕妇流产等,且死亡率极高,可达 30% ~ 70%。^[1] LM 广泛存在于土壤、动物、水产品等中,主要通过食物(如奶及奶制品、蔬菜、水产品、肉制品等)传播。20 世纪 80 年代以来,单增李斯特氏菌在美国、加拿大、德国、瑞士、意大利等国曾多次发生流行或暴发流行,^[2] 其食源性病人日渐增多。我国亦有食品污染单增李斯特氏菌的报道,辽宁和福建等省多次报道本菌在畜禽中引起暴发的事件。^[3,4] 该菌已被列为 90 年代 4 大食品致病菌之

一,^[5] 成为许多国家食品卫生的必检项目。但传统的 LM 生化鉴定方法全过程至少需要 4 ~ 7 d,检出限仅为 1×10^4 cfu/mL (g),费时费力,不能满足食品中致病菌及时、快速、灵敏的检测需要,不利于食物中毒突发事件的处理。因此,建立一种快速、特异、灵敏的 LM 检测方法迫在眉睫。

国内外许多学者致力于该菌的快速检测方法的研究工作,其中的 PCR 技术较成熟,检验灵敏性高、特异性好且操作简便、出结果快。我们针对单增李斯特氏菌的重要毒力基因 - hlyA 基因设计引物,优化该菌的 PCR 检测条件,检测了生肉、冷冻虾仁、卷

基金项目:国家“十五”科技攻关项目(2001BA804A03)。

作者简介:王环宇 女 中国医科大学与中国疾控中心营养与食品安全所联合培养硕士研究生

This work was supported by the Grant from National Science and Technology Program Funds of Ministry of Science and Technology, China. (2001BA804A03)

心菜等人工模拟污染食品,建立了食品中单增李斯特氏菌 PCR 检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器和设备 PTC-200 核酸扩增仪 美国 MJ 公司,5415D 微量台式离心机 德国 eppendorf 公司, BIO-RAD300 电泳仪 美国伯乐公司, HZQ-C 恒温振荡器 哈尔滨市东联电子技术开发有限公司,微波炉 Galanz 公司, VD2 5132 凝胶成像系统 法国 VL 公司,微量进样器 法国吉尔森公司, PL5243 纯水仪 美国 PALL 公司, QF100 制冰机 斯科特罗公司, MS-2 涡旋振荡器 德国 IKA 公司, PYX-DHS-50 ×65-1 隔水式电热恒温培养箱 上海跃进医疗器械厂, CC1 水浴锅 HUBER 公司。

1.1.2 试剂 溶菌酶、RNA 酶、DNA 提取试剂盒、PCR 反应试剂盒均为 Promega 公司产品。

1.1.3 引物合成 针对单增李斯特氏菌的 hlyA 基因设计特异性引物,委托上海生物工程技术服务有限公司合成,其序列如下:

上游引物 5'-GCCTGCAAGTCTCTAAGACGCCAATC-3'

下游引物 5'-CTTGCAACTGCTCTTTAGTAA-CAGC-3'

1.1.4 菌种 单增李斯特氏菌标准菌株购于中国药品生物制品检定所;63 株李斯特氏菌自备菌株来自中国疾病预防控制中心营养与食品安全所;20 株非李斯特氏菌株来源于 WHO、中国药品生物制品鉴定所及北京市卫生防疫站。

1.1.5 样品 散装生猪肉馅、冷冻虾仁、卷心菜均购自北京某超市。

1.2 方法

1.2.1 模板 DNA 制备 按 DNA 提取试剂说明书进行。

1.2.2 PCR 扩增条件的优化 PCR 反应条件的优化主要包括镁离子浓度和退火温度的选择,采用棋盘滴定的方法,选择 1.500、1.875、2.500、3.125、3.750、5.0、500.625、6.250 mmol/L 8 个 $MgCl_2$ 浓度,退火温度选择为 50 ~ 70。

1.2.3 PCR 结果的电泳检测 用 0.5 ×TBE 缓冲液配制 1.2% 琼脂糖凝胶,将 PCR 扩增产物与溴化乙锭(EB,终浓度为 0.5 $\mu g/mL$)混合物及 100 bp marker,分别上样 5 μL ,电泳 1 ~ 5 V/cm,100 V,60 min。用凝胶成像系统观察电泳结果,并对其进行分析。

1.2.4 菌种准备 单增李斯特氏菌培养 取 WHO 标准菌株平板划线,31 培养 48 h,挑取单个菌落接

种于李斯特氏菌增菌肉汤中,31 过夜振荡培养。

李斯特氏菌的分离与鉴定 按 GB4789.30—1994^[5]进行。

非李斯特菌株培养 取经传统方法鉴定的菌株平板划线,37 培养 24 h,挑取单个菌落接种于普通营养肉汤中,37 过夜振荡培养。

1.2.5 试样及其前处理 根据 GB 4789.30—1994,以无菌操作将待检试样 25 g 放于含有 225 mL 的李斯特氏菌增菌肉汤的无菌均质袋中均质成 1:10 的均匀稀释液作为单增李斯特氏菌的培养基备用。

1.2.6 灵敏性检测 以无菌操作将单增李斯特氏菌标准菌株的过夜培养液按 10 倍递增稀释至 $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^{-8}$ 浓度,提取 DNA,进行 PCR 检测。

1.2.7 特异性检测 选择本实验室已经过传统方法验证的 60 株单增李斯特氏菌和 3 株英诺克李斯特氏菌株进行 PCR 特异性检测。

选择经传统方法鉴定的 20 株非李斯特氏菌株进行 PCR 特异性验证。

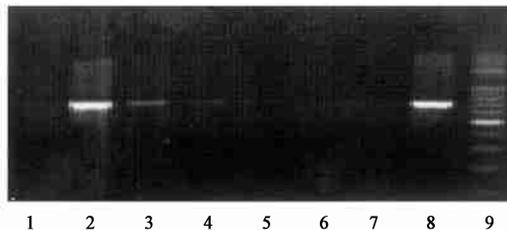
1.2.8 人工染菌 以无菌操作将单增李斯特氏菌标准菌株的过夜培养液按 10 倍递增稀释至 $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^{-8}$ 浓度,并选择 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} 3 个稀释度作细菌菌落计数,同时 10 倍稀释于待检试样均质液中,31 振荡培养,并于培养后不同时间段分别取 1 mL 菌液,提取模板 DNA(提取方法同前)。设空白对照组。抑菌剂采用丫啶黄素和萘啶酮酸。

1.3 反应体系 模板 DNA 1.0 μL (20 ~ 50 ng)、10 $\mu mol/L$ 上下游引物各 0.5 μL 、2 mmol/L dNTP 2.0 μL 、2.5 U/ μL Taq 酶 0.2 μL 、25 mmol/L Mg^{++} 2.0 μL 、10 倍缓冲液 2.0 μL 、去离子水 11.8 μL ,总体积 20 μL 。

1.4 循环参数 预变性 95 ,5 min;变性 95 ,60 s;退火 62 ,60 s;延长 72 ,60 s;30 个循环;再延长 72 ,8 min。

2 结果与讨论

2.1 方法的灵敏性



1:阴性对照; 2: 1×10^8 cfu/mL; 3: 1×10^7 cfu/mL; 4: 1×10^6 cfu/mL; 5: 1×10^5 cfu/mL; 6: 1×10^4 cfu/mL; 7: 1×10^3 cfu/mL; 8: 阳性对照; 9:100 bp marker。

图 1 单增李斯特氏菌 PCR 灵敏性的扩增结果

图1表明标准菌株经纯培养,PCR的最小检出量为 1×10^6 cfu/mL。

2.2 方法的特异性

2.2.1 李斯特氏菌 利用PCR方法对从食品中分离出来的60株单增李斯特氏菌和3株英诺克李斯特氏菌进行检测,结果表明60株单增李斯特氏菌均为阳性,阳性率为100%,3株英诺克李斯特氏菌均为阴性(16株单增李斯特氏菌、3株英诺克李斯特氏菌)结果见图2。

2.2.2 非李斯特氏菌 对20株非李斯特氏菌利用PCR方法进行检测,结果均为阴性(见图3)。



1:100 bp marker; 2~17:单增李斯特氏菌; 18~20:英诺克李斯特氏菌; 21:hly 阳性引物; 22:阴性引物。

图2 食品中分离出来的李斯特氏菌 PCR 扩增结果



1:100 bp marker; 2:表皮金黄色葡萄球菌; 3:肺炎克雷伯氏菌; 4:蜡样芽胞杆菌; 5:鼻臭克雷伯氏菌; 6:副溶血性弧菌; 7~9:肠炎沙门氏菌; 10:产肠毒素大肠杆菌; 11:侵袭性大肠杆菌; 12:致病性大肠杆菌; 13:出血性大肠杆菌; 14:宋内氏志贺氏菌; 15:鲍氏型志贺氏菌; 16:痢疾型志贺氏菌; 17:奇异变形杆菌; 18:雷极氏变形杆菌; 19:小肠结肠炎耶尔森氏菌; 20:粘质沙雷氏菌; 21:蜂房哈夫尼亚菌; 22:hly 阳性对照; 23:阴性对照。

图3 非李斯特氏菌 PCR 扩增结果

2.2.3 人工污染 LM 的自然食品的检出限

2.2.3.1 人工污染 LM 的散装猪肉馅的 PCR 检验方法的检出限 过夜培养的单增李斯特氏菌菌液的起始菌量为 3.9×10^8 cfu/mL,肉馅匀浆液(10 mL 匀浆液相当于 1 g 试样的量)中含有单增李斯特氏菌 3.9 、 39 、 3.9×10^2 cfu/mL,该 PCR 检测系统在 3.9×10^2 cfu/mL 肉馅匀浆液增菌 10 h, 39 cfu/mL 肉馅匀浆液增菌 12 h, 3.9 cfu/mL 肉馅匀浆液增菌 14 h 后可检出单增李斯特氏菌。即肉馅中单增李斯特氏菌菌量达 39 cfu/g,增菌 14 h 时,该检验方法可以检出单增李斯特氏菌(见图 4)。

2.2.3.2 人工污染 LM 的冰冻虾仁的 PCR 检验方法的检出限 过夜培养的单增李斯特氏菌菌液的起

始菌量为 3.9×10^8 cfu/mL,含有单增李斯特氏菌 3.9 、 39 、 3.9×10^2 cfu/mL 的虾仁匀浆液(10 mL 匀浆液相当于 1 g 样品的量),用 PCR 检测系统,在 3.9×10^2 cfu/mL 虾仁匀浆液增菌 14 h, 39 cfu/mL 虾仁匀浆液增菌 18 h, 3.9 cfu/mL 虾仁匀浆液增菌 22 h 后可检出。即虾仁中单增李斯特氏菌菌量达 39 cfu/g,增菌 22 h 时,该检验方法可以检出(见图 5)。

23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39



1,23:100 bp marker; 2:过夜培养起始菌 DNA; 3:起始菌 10 倍稀

释; 4:起始菌 1×10^2 倍稀释; 5:起始菌 1×10^3 倍稀释; 6: 3.9×10^2 cfu/mL,振荡培养 6 h; 7: 39 cfu/mL,振荡培养 6 h; 8: 3.9 cfu/mL,振荡培养 6 h; 9: 3.9×10^2 cfu/mL,振荡培养 8 h; 10: 39 cfu/mL,振荡培养 8 h; 11: 3.9 cfu/mL,振荡培养 8 h; 12: 3.9×10^2 cfu/mL,振荡培养 10 h; 13: 39 cfu/mL,振荡培养 10 h; 14: 3.9 cfu/mL,振荡培养 10 h; 15: 3.9×10^2 cfu/mL,振荡培养 12 h; 16: 39 cfu/mL,振荡培养 12 h; 17: 3.9 cfu/mL,振荡培养 12 h; 18: 3.9×10^2 cfu/mL,振荡培养 14 h; 19: 39 cfu/mL,振荡培养 14 h; 20: 3.9 cfu/mL,振荡培养 14 h; 24: 3.9×10^2 cfu/mL,振荡培养 16 h; 25: 39 cfu/mL,振荡培养 16 h; 26: 3.9 cfu/mL,振荡培养 16 h; 27: 3.9×10^2 cfu/mL,振荡培养 18 h; 28: 39 cfu/mL,振荡培养 18 h; 29: 3.9 cfu/mL,振荡培养 18 h; 30: 3.9×10^2 cfu/mL,振荡培养 20 h; 31: 39 cfu/mL,振荡培养 20 h; 32: 3.9 cfu/mL,振荡培养 20 h; 33:空白对照,振荡培养 6 h; 34:空白对照,振荡培养 10 h; 35:空白对照,振荡培养 14 h; 36:空白对照,振荡培养 18 h; 37:空白对照,振荡培养 20 h; 21,38:阳性对照; 22,39:阴性对照。

图4 人工污染的散装生猪肉馅中单增李斯特氏菌 PCR 扩增结果

2.2.3.3 人工污染 LM 的卷心菜的 PCR 检验方法的结果 过夜培养的单增李斯特氏菌菌液的起始菌量为 3.9×10^8 cfu/mL,含有单增李斯特氏菌 3.9 、 39 、 3.9×10^2 cfu/mL 的卷心菜匀浆液(10 mL 匀浆液相当于 1 g 试样的量),用 PCR 检测系统,将 3.9×10^2 cfu/mL 卷心菜匀浆液增菌 20 h, 39 cfu/mL 卷心菜匀浆液增菌 24 h, 3.9 cfu/mL 卷心菜匀浆液增菌 24 h 后可检出。即卷心菜中单增李斯特氏菌菌量达 39 cfu/g,增菌 24 h 时,该检验方法可以检出(见图 6)。

本实验针对单核细胞增生性李斯特氏菌特异毒力基因序列李氏溶血素(Listeriolysin O)设计特异引物,优化 PCR 反应条件,对 60 株单增李斯特氏菌、3 株英诺克李斯特氏菌和 20 株非单增李斯特氏菌进行检测,结果表明,扩增具有良好的单增李斯特氏菌种特异性,且与传统方法的检测结果完全相符。



1:22:100 bp marker; 2:过夜培养起始菌 DNA; 3:起始菌 10 倍稀释; 4:起始菌 1×10^2 倍稀释; 5:3.9 $\times 10^2$ cfu/mL, 振荡培养 8 h; 6:39 cfu/mL, 振荡培养 8 h; 7:3.9 cfu/mL, 振荡培养 8 h; 8:3.9 $\times 10^2$ cfu/mL, 振荡培养 10 h; 9:39 cfu/mL, 振荡培养 10 h; 10:3.9 cfu/mL, 振荡培养 10 h; 11:3.9 $\times 10^2$ cfu/mL, 振荡培养 12 h; 12:39 cfu/mL, 振荡培养 12 h; 13:3.9 cfu/mL, 振荡培养 12 h; 14:3.9 $\times 10^2$ cfu/mL, 振荡培养 14 h; 15:39 cfu/mL, 振荡培养 14 h; 16:3.9 cfu/mL, 振荡培养 14 h; 17:3.9 $\times 10^2$ cfu/mL, 振荡培养 16 h; 18:39 cfu/mL, 振荡培养 16 h; 19:3.9 cfu/mL, 振荡培养 16 h; 20:3.9 $\times 10^2$ cfu/mL, 振荡培养 18 h; 21:39 cfu/mL, 振荡培养 18 h; 22:3.9 cfu/mL, 振荡培养 18 h; 23:3.9 $\times 10^2$ cfu/mL, 振荡培养 20 h; 24:39 cfu/mL, 振荡培养 20 h; 25:3.9 cfu/mL, 振荡培养 20 h; 26:3.9 $\times 10^2$ cfu/mL, 振荡培养 22 h; 27:39 cfu/mL, 振荡培养 22 h; 28:3.9 cfu/mL, 振荡培养 22 h; 29:3.9 $\times 10^2$ cfu/mL, 振荡培养 24 h; 30:39 cfu/mL, 振荡培养 24 h; 31:3.9 cfu/mL, 振荡培养 24 h; 32:3.9 $\times 10^2$ cfu/mL, 振荡培养 24 h; 33:39 cfu/mL, 振荡培养 24 h; 34:3.9 cfu/mL, 振荡培养 24 h; 35:空白对照, 振荡培养 8 h; 36:空白对照, 振荡培养 12 h; 37:空白对照, 振荡培养 16 h; 38:空白对照, 振荡培养 20 h; 39:空白对照, 振荡培养 24 h; 40:阳性对照; 41:阴性对照。

图5 人工污染的冷冻虾仁中单增李斯特氏菌 PCR 扩增结果



1:100 bp marker; 2:过夜培养起始菌 DNA; 3:起始菌 10 倍稀释; 4:起始菌 1×10^2 倍稀释; 5:3.9 $\times 10^2$ cfu/mL, 振荡培养 8 h; 6:39 cfu/mL, 振荡培养 8 h; 7:3.9 cfu/mL, 振荡培养 8 h; 8:3.9 $\times 10^2$ cfu/mL, 振荡培养 18 h; 9:39 cfu/mL, 振荡培养 18 h; 10:3.9 cfu/mL, 振荡培养 18 h; 11:3.9 $\times 10^2$ cfu/mL, 振荡培养 20 h; 12:39 cfu/mL, 振荡培养 20 h; 13:3.9 cfu/mL, 振荡培养 20 h; 14:3.9 $\times 10^2$ cfu/mL, 振荡培养 22 h; 15:39 cfu/mL, 振荡培养 22 h; 16:3.9 cfu/mL, 振荡培养 22 h; 17:3.9 $\times 10^2$ cfu/mL, 振荡培养 24 h; 18:39 cfu/mL, 振荡培养 24 h; 19:3.9 cfu/mL, 振荡培养 24 h; 20:空白对照, 振荡培养 8 h; 21:空白对照, 振荡培养 12 h; 22:空白对照, 振荡培养 18 h; 23:空白对照, 振荡培养 24 h; 24:阳性对照; 25:阴性对照。

图6 人工污染的卷心菜中单增李斯特氏菌 PCR 扩增结果

我国于 1994 年颁布了食品中 LM 国家标准检测方法 (GB 4789.30—1994): 将试样增菌后进行分离培养, 对可疑菌落进行生化反应、动物实验 (小鼠的致病力试验)、典型运动等一系列实验鉴定, 对结

果进行综合判定, 确定为李斯特菌属后再进行血清型分析 (协同溶血试验), 全过程至少需要 4~7 d 才能得出明确的鉴定结果, 而且检出限为 1×10^4 cfu/mL (g)。本实验建立的 PCR 方法, DNA 提取 6 h, PCR 反应 2 h, 电泳 1 h, 当菌量 $> 1 \times 10^6$ cfu/mL 时, 直接提取 DNA, 进行 PCR 检测, 10 h 即可得到检测结果; 当菌量 $< 1 \times 10^6$ cfu/mL 时, 需先进行增菌, 不同食品、不同初始菌量增菌时间各有不同 (最多 24 h), 加上提取 DNA、PCR、电泳, 整个过程也可在 34 h 内出结果, 比传统方法检出时间快得多, 可快速检出食品中的 LM, 为李斯特氏菌引起的食品中毒的确定、治疗争取宝贵时间。

目前, 单增李斯特氏菌的 PCR 检测方法的研究多集中在实验室方法的探索上, 真正从应用的角度对食品中单增李斯特氏菌的 PCR 检测方法的研究报道较少, 本实验应用建立的 PCR 方法检测容易受 LM 污染的肉类、海产品、蔬菜等食品, 经过增菌, 上述食品中 LM 的最低检出限为 39 cfu/g, 比传统方法的检出限 1×10^4 cfu/mL (g) 灵敏得多。不同食品由于其营养成分不相同, 为 LM 提供的生长环境也不相同, 使含相同菌量的食品的增菌时间各不相同, 生肉中的 LM 生长快, 增菌时间短, 含 39 cfu/g LM 的生肉增菌 14 h 后即可检出。卷心菜中的 LM 生长慢, 增菌时间长, 含 39 cfu/g LM 的卷心菜增菌 24 h 后才可检出。含同样菌量冷冻虾仁增菌 22 h 后可检出 LM。

本实验建立的食品中单核细胞增生李斯特氏菌的 PCR 检测方法操作简便, 检测周期短, 特异性好, 检出限低, 检测结果准确、稳定, 适应食品微生物检验发展的需要, 具有较高的使用推广价值, 但由于所检测的食品种类有限, 所以还需在实践中进一步的验证。

参考文献:

- [1] 王连秀, 赵维勇, 牛桓彩, 等. 食品中单核细胞增生性李斯特氏菌调查及毒力研究 [J]. 中国食品卫生杂志, 2001, 13(2): 16.
- [2] 刘孝, 张庆坤. 奶牛李氏杆菌病的诊断 [J]. 中国兽医传染病学, 1994, 3: 39.
- [3] 丘星辉, 郭抑霖. 李氏杆菌病的诊断 [J]. 中国兽医传染病学, 1994, 2: 39—40.
- [4] 李朝伟, 张顺合. 李斯特氏菌分离方法的研究 [J]. 中国公共卫生, 1991, 7(7): 289—292.
- [5] GB 4789.30—1994. 单核细胞增生李斯特氏菌的检验方法 [S].

[收稿日期: 2003-10-18]

中图分类号: R15; Q939.122; R378.994 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2004)01-0010-04