

## 实验技术与方法

# 实时荧光 PCR 定量检测食品中单增李斯特菌

熊国华<sup>1</sup> 于莉<sup>1</sup> 杨海龙<sup>3</sup> 曹远银<sup>1</sup> 曹际娟<sup>2</sup>

(1. 沈阳农业大学, 辽宁 沈阳 110161; 2. 辽宁出入境检验检疫局, 辽宁 大连 116001;

3. 丹东农业科学院, 辽宁 丹东 118109)

**摘要:**目的 建立快速、敏感、特异的食物中单增李斯特菌检测方法。方法 针对单增李斯特菌溶素 A 基因 (*hlyA*) 设计一对引物和一条探针,并用该引物和探针运用实时荧光 PCR 技术对单增李斯特菌的 DNA、细胞、质粒和样品进行实时荧光 PCR 定量检测。结果 利用实时荧光 PCR 技术,建立了 DNA 校正曲线、细胞校正曲线和质粒校正曲线, DNA 校正曲线在 1~32 CFU/ml、细胞校正曲线在 32~320 CFU/ml、质粒校正曲线在 1~37 Copies/ml, 线性关系良好,且三种校正曲线检测样品得出的结果基本吻合。结论 本试验建立起来的实时荧光 PCR 定量检测单增李斯特菌的方法灵敏度高、特异性好、准确,可应用于食品中单增李斯特菌的检测。

**关键词:** 李斯特菌, 单核细胞增生; 实时荧光聚合酶链反应; 评价研究; 食品

### Development of Real-time PCR Method for Quantitative Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods

XIONG Guo-hua, YU Li, YANG Hai-long, CAO Yuan-yin, CAO Ji-juan

(Shenyang Agricultural University, Liaoning Shenyang 110161, China)

**Abstract:** **Objective** To establish a rapid, sensitive and specific method for detection of *Listeria monocytogenes* (*Lm*) in the import and export foods. **Method** A pair of oligonucleotide primers and a probe were designed with listeriolysin A (*hlyA*) gene as target sequence DNA, cell, plasmid of *Lm* were amplified by real-time PCR technique. **Results** This trial established DNA standard curve, cell standard curve and plasmid standard curve by real-time PCR technique. The results obtained by the three standard curves were mainly the same. **Conclusion** Real-time PCR can be used as a sensitive, specific and accurate method for detection of *Lm*. The inspection system developed in this experiment can be used to do *Listeria monocytogenes* inspection work in the department of inspection and quarantine.

**Key word:** *Listeria monocytogenes*; Real-time Polymerase Chain Reaction; Evaluation Studies; Food

传统分离和鉴定单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, 简称单增李斯特菌) 的方法既费时又不可靠,免疫学和以核酸为基础的分子生物学方法比传统的方法迅速有效,但需要富集菌体才能达到所需的检测浓度<sup>[1-3]</sup>。常规 PCR 只能确定样品中的核酸类型,而且还需大量的扩增后处理<sup>[4]</sup>。实时定量 PCR 能克服以上的弱点,检测在一个密闭的试管中进行,无需任何纯化或分离步骤,无污染和 PCR 处理后的风险<sup>[3,4,7]</sup>,可以准确、可靠地目标核糖核酸检测,达到定量检测食品中单增李斯特菌的目的。

## 1 材料与方

### 1.1 材料

1.1.1 试验菌种 供试菌株分别购于北京药品生

物制品鉴定所、军事医学科学院流行病学研究所、北京陆桥商检新技术公司以及由其他检验检疫局提供和本实验室在实测样品中分离出的菌株。其中单增李斯特菌菌株均采用 SN 0184—1993 方法(进出口食品中单核细胞增生李斯特菌检验方法)鉴定为单增李斯特菌。供试菌种及编号如表 1 所示。

1.1.2 试剂 改良蛋白胨水(MBP)、李斯特菌增菌液(EB)、营养肉汤、胰酪胨大豆琼脂(TSA)、胰酪胨大豆琼脂(TSB)、营养琼脂等购于北京陆桥商检新技术公司;Fraser 肉汤、牛津琼脂(OXA)购于法国梅里埃公司,其余试剂(盒)均购自宝生物工程(大连)有限公司。引物和探针由宝生物工程(大连)有限公司合成。

### 1.2 主要仪器

TaKaRa Smart cycler<sup>TM</sup> 定量 PCR 仪、超纯水发生器(美国 Millipore 公司)、高速冷冻离心机(BEAKMAN 公司)。

### 1.3 方法

1.3.1 模拟污染样品的制备 样品的制备及增菌

作者简介:熊国华 男 硕士生

通讯作者:曹际娟 女 研究员 博士



表 1 试验菌种及其编号

序号	菌种	拉丁学名	菌种来源及编号
1	单增李斯特菌	<i>L. monocytogenes</i>	54004
2	单增李斯特菌	<i>L. monocytogenes</i>	54003
3	单增李斯特菌	<i>L. monocytogenes</i>	自备菌株
4	单增李斯特菌	<i>L. monocytogenes</i>	自备菌株
5	单增李斯特菌	<i>L. monocytogenes</i>	自备菌株
6	英诺克李斯特菌	<i>Listeria innocua</i>	ATCC33090
7	绵羊李斯特菌	<i>Listeria ivanovii</i>	ATCC19119
8	甲型副伤寒沙门菌	<i>Salmonella paratyphi A</i>	CMCC(B)50001
9	粘质沙雷菌	<i>Serratia marcescens</i>	CMCC(B)41002
10	弗氏枸橼酸杆菌	<i>Citrobacter freundii</i>	CMCC(B)48016
11	肺炎克雷伯菌	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CMCC(B)46114
12	奇异变形菌	<i>Proteus mirabilis</i>	CMCC(B)49003
13	摩尔根菌	<i>Morganella morganii</i>	CMCC(B)49087
14	产气肠杆菌	<i>Enterobacter aerogenes</i>	CMCC(B)45103
15	蜡样芽胞杆菌	<i>Bacillus cereus</i>	CMCC(B)63305
16	金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	26001
17	粪链球菌	<i>Enterococcus faecalis</i>	32220 - (4)
18	弗劳地枸橼酸杆菌	<i>Citrobacter freundii</i>	48068
19	大肠杆菌 O157 H7	<i>Escherichia coli O157</i>	ATCC43889
20	肠炎沙门菌	<i>Salmonella enteritidis</i>	50041
21	伤寒沙门菌	<i>Salmonella typhimurium</i>	50096
22	沙门菌	<i>Salmonella</i>	自备菌株
23	志贺菌	<i>Shigella</i>	自备菌株
24	副溶血性弧菌	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC17803
25	霍乱弧菌	<i>Vibrio cholerae</i>	自备菌株
26	霍乱弧菌	<i>Vibrio cholerae</i>	自备菌株

培养参照 SN 0184—1993 进出口食品中单核细胞增生李斯特菌检验方法,略加改动。取经改良蛋白胨水活化的单增李斯特菌菌种 1 ml 加入到单增李斯特菌阴性的鸡肉中,冷冻 5 d,均匀取 10 g 加入到 90 ml Fraser 肉汤中培养 24 h,取增菌液备用。其他李斯特菌增菌用 Fraser 肉汤,纯培养用牛津琼脂(OXA),培养温度为 28 ℃。

1.3.2 单增李斯特菌的记数 单增李斯特菌在 TSA 培养基(加 0.6% YE)上生长,37 ℃ 振荡培养,在 A 600 nm 达到 1.0 后进行集菌。用 TSB 培养基把收集好的单增李斯特菌分别稀释 10、10<sup>2</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>6</sup>、10<sup>7</sup>、10<sup>8</sup>、10<sup>9</sup> 倍,再用菌落记数试纸进行记数。

1.3.3 模板 DNA 的提取 增菌后,用 DNA 提取试剂盒提取菌的 DNA。

1.3.4 检测单增李斯特菌的引物和探针 正向引物:5' - CTGAATCTCAAGCAAACCTGGT - 3',反向引物:5' - CGCGACCGAAGCCAACTA - 3',探针:5' - FAM - ATACGATAACAATCCACGGCTCTGGCTGG - TAMRA - 3'。

1.3.5 实时荧光 PCR 检测食品中的单增李斯特菌 反应体系: Premix Ex Taq™ (2 ×) 12.5 μl,正向和反向混合引物(10 μmol/L) 1.0 μl,DNA 模板 2.0 μl,荧光探针溶

液(5 μmol/L) 1.0 μl,ROX Reference Dye (50 ×) 0.5 μl,dH<sub>2</sub>O(灭菌蒸馏水)8.0 μl,总体积为 25 μl。

反应参数:50 ℃ /2 min,预变性 95 ℃ /3 min,95 ℃ /15 s,60 ℃ /1 min,40 个循环。

## 2 结果与分析

2.1 单增李斯特菌扩增靶序列和检测引物特异性的 BLAST 分析 选取 GenBank 中单增李斯特菌溶素 A 基因(*hlyA*)设计引物。通过 GenBank 的 BLAST 功能进行同源性分析。分析结果表明本试验所选的靶序列基因和设计的检测引物具有很高的特异性,与其他基因的同源性很小。

2.2 单增李斯特菌的实时荧光 PCR 检测 取 10 g 人工污染单增李斯特菌的模拟样品加入到 90 ml Fraser 肉汤中,28 ℃ 培养 24 h,直接取增菌液,用 DNA 提取试剂盒提取 DNA。

2.2.1 单增李斯特菌的实时荧光 PCR 定性检测 在扩增 *hlyA* 基因目标靶序列的适宜位点设计 Taqman 探针,进行实时荧光 PCR 的检测。结果如图 1 所示。

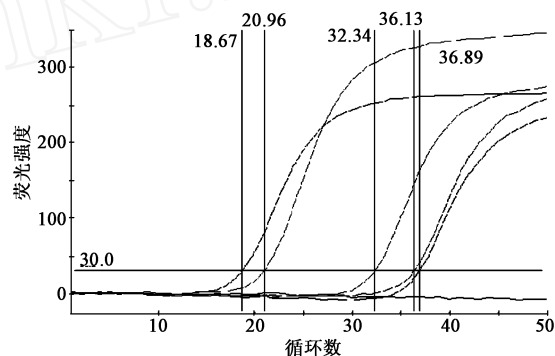


图 1 单增李斯特菌 *hlyA* 基因的实时荧光 PCR 检测

图 1 显示表 1 所列的 5 株单增李斯特菌均有荧光信号的增长,而表 1 中其他非单增李斯特菌和水未见荧光信号的增长。说明引物对单增李斯特菌的特异性极高,完全可以作为食品中单增李斯特菌的检测的引物。

2.2.2 单增李斯特菌实时荧光 PCR 的定量检测 用 3 类模板进行实时荧光 PCR 扩增并绘制 3 类校正曲线。

DNA 校正曲线的建立 取 3.2 × 10<sup>5</sup> CFU/ml 单增李斯特菌细胞用于 DNA 提取,提取的 DNA 再分别稀释成 3.2 × 10<sup>4</sup>、3.2 × 10<sup>3</sup>、3.2 × 10<sup>2</sup>、3.2 × 10 CFU/ml,用这 5 个梯度同时进行实时荧光 PCR 扩增。结果如图 2、图 3 所示。

从图 2 可以看出由高浓度到低浓度的 Ct 值分别为 20.89、24.55、28.06、31.32、34.50,该方法的检测低限在 1~32 CFU/ml 之间,从图 3 可以看出 DNA

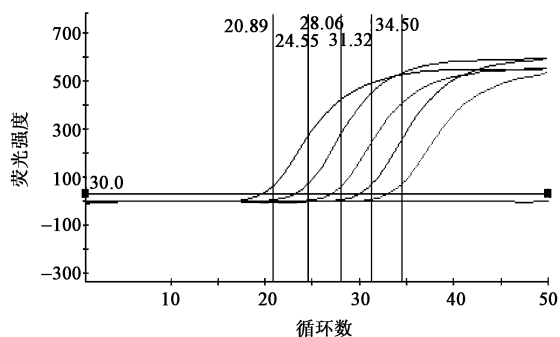


图2 不同浓度的DNA扩增增幅曲线

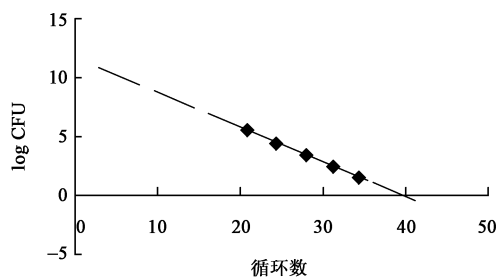


图3 不同浓度的DNA扩增校正曲线

含量和循环数(Ct值)之间呈线性关系,与进行平行试验所得的结论相同。

**细胞校正曲线的建立** 取  $3.2 \times 10^5$  CFU/ml 单增李斯特菌细胞液,再稀释成  $3.2 \times 10^4$ 、 $3.2 \times 10^3$ 、 $3.2 \times 10^2$ 、 $3.2 \times 10$  CFU/ml,提取这5个梯度的DNA,进行实时荧光PCR扩增。结果如图4、图5所示。

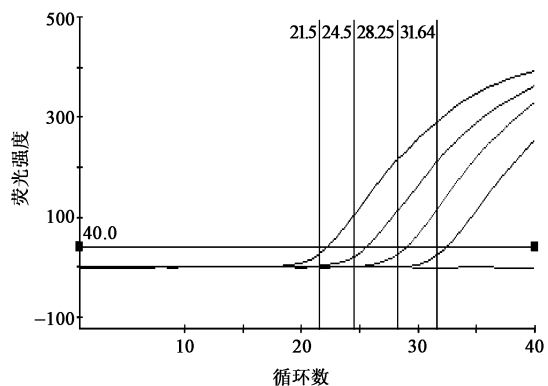


图4 不同浓度的细胞扩增增幅曲线

从图4可以看出,由高浓度到低浓度的Ct值分别为21.5、24.5、28.25、31.64, $3.2 \times 10$  CFU/ml未见扩增。可见该方法的检测低限在32~320 CFU/ml之间,从图5可以看出细胞量和Ct值之间呈线性关系,与进行平行试验所得的结论相同。

**质粒校正曲线的建立** 制备单增李斯特菌的质粒,提取质粒DNA,检测质粒DNA的含量,将其稀释成  $3.7 \times 10^5$ 、 $3.7 \times 10^4$ 、 $3.7 \times 10^3$ 、 $3.7 \times 10^2$ 、 $3.7 \times 10$  Copies/ml,进行荧光PCR扩增,结果如图6、图7所示。

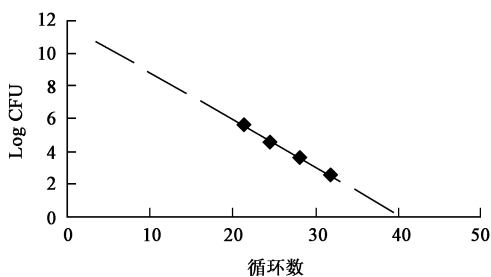


图5 不同浓度的细胞扩增校正曲线

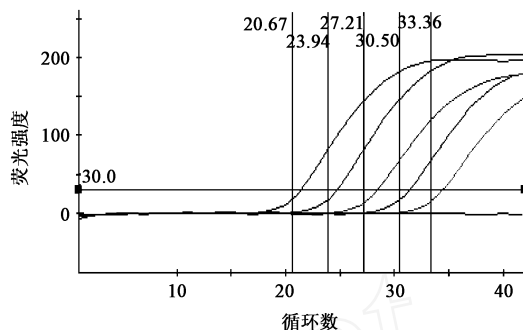


图6 不同浓度的质粒DNA扩增增幅曲线

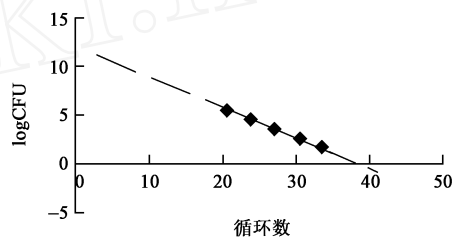


图7 不同浓度的质粒DNA扩增校正曲线

从图6可以看出由高浓度到低浓度的Ct值分别为20.67、23.94、27.21、30.53、33.36。可见该方法的检测低限在1~37 Copies/ml之间,从图7可以看出质粒DNA的含量和Ct值之间呈线性关系,与进行平行试验所得的结论相同。

**3种校正曲线检测结果的比较** 取5份不同的单增李斯特菌液试样,每份试样均用3种校正曲线进行2次检测。结果如表2。试样检测结果的比较如图8所示。

表2 不同校正曲线检测单增李斯特菌的结果比较

样品编号	DNA校正曲线 (CFU/ml)	细胞校正曲线 (CFU/ml)	质粒校正曲线 (Copies/ml)
1	$3.6 \times 10^4$	$3.5 \times 10^4$	$3.3 \times 10^4$
2	$2.1 \times 10^4$	$2.0 \times 10^4$	$2.2 \times 10^4$
3	$1.8 \times 10^4$	$1.8 \times 10^4$	$1.6 \times 10^4$
4	$1.4 \times 10^4$	$1.2 \times 10^4$	$1.3 \times 10^4$
5	$1.2 \times 10^4$	$1.0 \times 10^4$	$1.1 \times 10^4$

注:结果均为2次测量结果的平均值。

## 实验技术与方法

## 快速检测大肠埃希菌 O157 H7 免疫层析试纸条的研制

谌志强 王新为 金 敏 李君文

(军事医学科学院卫生学环境医学研究所,天津 300050)

**摘要:**目的 建立一种快速、特异性强、方法简便和经济实用的检测大肠埃希菌 O157 H7 的免疫学方法。方法 微波炉法制备胶体金,自制的大肠埃希菌 O157 H7 多克隆抗体包被胶体金制备探针,通过免疫渗滤法检测大肠埃希菌 O157 H7。结果 制备的胶体金颗粒均一、稳定性好,此法检测的灵敏度为  $3.1 \times 10^6$  CFU/ml,特异性强,假阳性率为 2.5%,检测时间只需 3~5 min。结论 该方法简单、快速,无需特殊的仪器设备,适合现场检测之用。

**关键词:**胶体金;大肠杆菌 O157;免疫层析;免疫测定

肠出血性大肠埃希菌 (*Enterohemorrhagic Escherichia coli*, O157 H7) 是新出现的肠道致病菌,可引起人腹泻、出血性肠炎、血栓性血小板减少性紫癜和溶血性尿毒综合症。自 1982 年在美国报道出现此菌引起的食物中毒以来<sup>[1]</sup>,已在世界范围内多次爆发流行。我国也于 1986 年在徐州发现感染病人<sup>[2]</sup>。近年来,由该菌引起的食物中毒有明显上升的趋势,为此,建立一种快速、特异性强、简便的检测方法十分必要。

## 1 材料与方法

1.1 试剂和仪器 氯化金、氢氧化钠,分析纯,天津市化学试剂三厂;盐酸,分析纯,天津翔宁科技贸易公司;柠檬酸三钠,分析纯,上海化学试剂中心;氯化钠,分析纯,天津市塘沽化学试剂厂;碳酸钾,分析纯,天津市四通化工厂;叠氮钠,分析纯,上海化学试剂采购供应站;牛血清白蛋白(BSA),美国 sigma 公司;金黄色葡萄球菌白蛋白 A(SPA),美国 sigma 公司;DEAE 纤维素(DE-32),英国 whatman 公司。硝

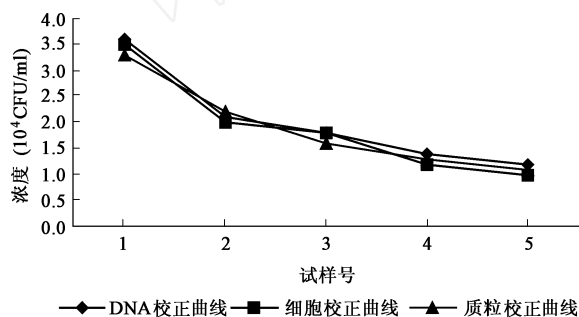


图 8 不同校正曲线检测单增李斯特菌的平均结果比较

结果表明,3 种线性校正曲线定量方法,在  $1 \sim 10^5$  CFU 或 Copies/ml 线性范围内对样品的检测结果保持高度的一致性。

## 参考文献

[1] 张顺合. 单核细胞增生李斯特氏菌在食品中的污染[J]. 中国公共卫生杂志, 2000, 6 (16): 564-566.

- [2] 李郁,魏建忠,王桂军. 产单核李斯特菌的研究进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 8 (15): 1018-1020.
- [3] KESSH J S V, KARN S J S, GORSKI L, et al. Prevalence of *Salmonellae*, *Listeria monocytogenes*, and fecal coliforms in bulk tank milk on US dairies[J]. J Dairy Sci, 2004, 87: 2822-2830.
- [4] 金大智,谢明杰,曹际娟. 食品中单增李氏菌实时荧光 PCR 检测鉴定方法的建立[J]. 辽宁师范大学学报(自然科学版), 2003, 3 (26): 73-76.
- [5] 蔡刚,李闻捷,沈茜. 实时定量 PCR 应用中的问题及优化方案[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2003, 24 (6): 330-332.
- [6] 罗勇军,刘昕. 实时荧光定量 PCR 标准品的制备及应用[J]. 重庆医学, 2005, 3 (24): 414-415.
- [7] GITIKA PANICKER, MICHAEL L, MYERS, et al. Rapid detection of *Vibrio vulnificus* in shellfish and gulf of mexico water by real-time PCR[J]. Applied and environmental microbiology, 2004, 1: 498-507.

[收稿日期:2006-10-10]

中图分类号:R15;Q939.122;O655

文献标识码:B

文章编号:1004-8456(2007)03-0248-04

作者简介:谌志强 男 助理实验师

通讯作者:李君文 男 研究员