

## 论著

## 双重荧光定量 PCR 检测沙门菌和单核细胞增生李斯特菌方法的建立

王振东<sup>1</sup>,吉尚志<sup>1</sup>,杨宇<sup>2</sup>,王静<sup>2</sup>

(1. 沈阳农业大学生物科学技术学院,辽宁 沈阳 110161; 2. 中国检验检疫科学研究院,北京 100123)

**摘要:**目的 建立双重荧光定量 PCR 方法,快速检测沙门菌和单核细胞增生李斯特菌。方法 通过设计特异性引物和探针,扩增沙门菌的 *fimY* 基因和单核细胞增生李斯特菌的 *hly* 基因,采用倍比梯度稀释法检测该体系的灵敏度,以另外 7 株肠道致病菌评价检测体系的特异性;建立了沙门菌和单核细胞增生李斯特菌感染小鼠的检测模型以验证方法的适用性。结果 建立了同时检测沙门菌和单核细胞增生李斯特菌的双重荧光定量 PCR 方法,从 DNA 提取到检测完毕仅需 2.5 h。检测两种病原菌的灵敏度分别为 11 和 12.8 copies/ $\mu$ l,特异性为 100%,符合率为 93.3%。结论 该法缩短了检测时间,并具有良好的灵敏性和特异性,在疾病防控及食品卫生行业中很有应用前景。

**关键词:**沙门菌;单核细胞增生李斯特菌;双重荧光定量 PCR

中图分类号:R378.9 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2011)04-0289-04

Development of a duplex real-time PCR method for the detection of  
*Salmonella* and *Listeria monocytogenes*

Wang Zhendong, Ji Shangzhi, Yang Yu, Wang Jing

(College of Bioscience and Biotechnology, Shenyang Agricultural University,  
Shenyang 110161, China)

**Abstract: Objective** To develop a duplex real-time PCR array for rapid detection of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. **Methods** The specific primers and probes were designed to amplify the *fimY* gene of *Salmonella* and the *hly* gene of *Listeria monocytogenes*. The sensitivity of the system was detected by a multiple proportional dilution method. In order to examine the specificity of the system, other seven intestinal bacteria strains were assayed simultaneously. *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* infected mice model were reproduced for evaluating the applicability of the method. **Results** A highly sensitive and specific duplex real-time PCR assay for the detection of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* was established. The sensitivity was 11 copies/ $\mu$ l for *Salmonella* and 12.8 copies/ $\mu$ l for *Listeria monocytogenes*. The specificity was 100% and the accuracy was 93.3%. The whole detection procedure can be finished within 2.5 h. **Conclusion** The duplex real-time PCR detection method is efficient in detecting *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in foods with good sensitivity and specificity. Due to the simultaneous detection of these two pathogens, the detection time was reduced significantly. There is a good prospect of this method applying in disease prevention and food industry.

**Key words:** *Salmonella*; *Listeria monocytogenes*; duplex real-time PCR

沙门菌(*Salmonella*)和单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)是两种重要的人兽共患病原菌,可以感染人及多种动物,包括家畜和家禽类,多种野兽、野禽、啮齿类动物<sup>[1]</sup>。沙门菌污染不仅能导致鸡白痢、仔猪副伤寒、流产等动物疾病,还能使人类发生伤寒、副伤寒、败血症、胃肠炎和食物中

毒。在我国内陆地区,由沙门菌引起的食物中毒屡居首位。据资料统计,在我国细菌性食物中毒中,70%~80%由沙门菌引起,而在引起沙门菌中毒的食品中,90%以上是肉类等动物性产品。单核细胞增生李斯特菌在绝大多数食品中都能找到,如肉类、蛋类、禽类、海产品、乳制品、蔬菜等,且已被证实能引起脑膜炎、败血症等多种疾病<sup>[2,3]</sup>,如最近俄罗斯有儿童因食用被鼠类啃噬的胡萝卜而发病的报道。因此建立一种同时快速检测沙门菌和单核细胞增生李斯特菌的方法,在食品卫生安全、公共卫生安全及口岸卫生检疫中都有重要意义。

收稿日期:2010-12-30

基金项目:质检公益性行业科研专项(2007GYJ025;2007GYJ023)

作者简介:王振东 男 博士 教授 研究方向为动物细胞与分子生物学 E-mail:zhendongwang1212@yahoo.com.cn

通信作者:王静 女 博士 研究员 研究方向为卫生检疫

E-mail:wangjing0115@126.com

## 1 材料和方法

### 1.1 仪器与试剂

美国 Cepheid Smartcycler 荧光定量 PCR 仪, 美国 ABI7500 荧光定量 PCR 仪, 美国 NanoDrop ND-1000 超微量分光光度计。

Premix EX Taq™ ×2、无核酶 H<sub>2</sub>O、DNA 回收试剂盒、pMD19-T 载体及连接酶, 均购自宝生物工程(大连)有限公司; QiagenDNA 提取试剂, 购自 Qiagen 试剂公司。

### 1.2 菌种与动物

肠炎沙门菌[CMCC(B) 50335]、甲型副伤寒沙门菌(CMCC 50073)、乙型副伤寒沙门菌(CMCC 50004)、鼠伤寒沙门菌(CMCC 500013)单核细胞增生李斯特菌(XFL 0605)、金黄色葡萄球菌[CMCC(B) 26001]、产气荚膜梭菌(CVCC 44)及绿脓杆菌[CMCC(B) 10101], 均为本实验室保存; 威尔斯李

斯特菌(ATCC 35897)、西尔李斯特菌(ATCC 735967)、格氏李斯特菌(ATCC 25401)、绵羊李斯特菌(ATCC 19119)、英诺克李斯特菌(ATCC 33090)为中国检验检疫科学研究院食品所赠送; 大肠埃希菌(ACCC 12069)、蜡样芽孢杆菌[CMCC(B) 63301]和痢疾志贺菌[CMCC(B) 51252], 均购自中国药品生物制品检定所; 粪链球菌[CMCC(B) 32220]购自中国兽医药品监察所。

BALB/c 雄性健康小鼠 15 只, 7~8 周龄, 体重约 20 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

### 1.3 引物和探针

沙门菌依据 *fimY* 序列<sup>[4]</sup>, 单核细胞增生李斯特菌依据 *hly* 序列<sup>[5]</sup>设计(见表 1), 二者经 DNASTAR 的 primerselect 进行引物评价, 在理论上符合双重反应条件。

表 1 双重荧光定量 PCR 所用的引物和探针序列及基因名称

Table 1 Target genes and primer and probe sequences used for duplex real-time PCR

基因名称	上游引物序列	下游引物序列	探针序列
<i>fimY</i>	tgtcattccattactacc	aaacgttgaaactgagga	CY5-ctgggtgatttcgatcgca-BHQ3
<i>hly</i>	catggcaccaccagcatct	atccgcgtgtttcttcga	Texasred-cgcctgcaagtcctaaagcgcga-BHQ2

### 1.4 标准品的制备

分别将两种病原菌的 *fimY* 及 *hly* DNA 片段上游和下游各延长 50 bp, 经 PCR 扩增后, 用 DNA 回收试剂盒回收扩增片段。依据试剂盒说明书, 将纯化的目的 DNA 片段连接到 pMD19-T 载体上, 以 T 载体克隆的目的 DNA 片段作为标准 DNA 模板。使用 BeckmanDu640 核酸定量仪测定 DNA 模板量, 并做 10<sup>-1</sup> ~ 10<sup>-5</sup> 梯度倍比稀释, 作为绝对定量标准品。

### 1.5 荧光定量 PCR 体系的建立

先对每种病原体做单体系定性反应, 在此基础上对双重荧光定量 PCR 反应的引物浓度、探针浓度和 T<sub>m</sub> 进行优化, 建立最佳反应体系。

### 1.6 方法灵敏性测试

取沙门菌、单核细胞增生李斯特菌标准品各 5 μl 均匀混合, 然后做 10<sup>-1</sup> ~ 10<sup>-5</sup> 梯度稀释, 每一梯度取 10 μl 作为模板, 做 3 个重复的荧光定量 PCR 反应。

### 1.7 感染标本的检测

用双重荧光定量 PCR 体系, 检测用沙门菌和单核细胞增生李斯特菌感染的小鼠肠道 DNA。

### 1.8 特异性测试

选取 4 株沙门菌、1 株致病单核细胞增生李斯特菌和 5 株非致病单核细胞增生李斯特菌、1 株金黄色葡萄球菌、1 株粪链球菌、1 株产气荚膜梭菌、1 株绿脓杆菌、1 株大肠埃希菌、1 株蜡样芽孢杆菌

和 1 株痢疾志贺菌等肠道致病菌, 用该方法进行特异性检测。该特异性检测试验在 ABI7500 荧光定量 PCR 仪上进行。

### 1.9 沙门菌、单核细胞增生李斯特菌感染小鼠模型的建立

用沙门菌和单核细胞增生李斯特菌腹腔感染 15 只体重约为 20 g 的 BALB/c 雄性健康小鼠, 每只注射 0.15 ml 菌液(0.45 × 10<sup>6</sup> CFU/ml 菌体)。于感染后第 10 d 脱颈处死, 摘取部分肠道组织, 用 QiagenDNA 提取试剂盒提取肠道组织 DNA 作为检测模板, 具体操作详见说明书。

### 1.10 用建立的双重荧光定量 PCR 体系检测小鼠肠道 DNA

PCR 采用 25 μl 反应体系。各取 2.5 μl 沙门菌和单核细胞增生李斯特菌作为模板, 引物和探针的工作浓度均为 10 μmol/L, 上游引物和下游引物各加入 1.25 μl, 探针各加入 0.25 μl, MIX 加入 14.5 μl。PCR 条件为 95 °C 2 min; 95 °C 15 s, 60~30 s, 73~30 s; 45 个循环。实时荧光定量 PCR 检测在 Smartcycler 荧光定量 PCR 仪上进行。

## 2 结果

### 2.1 荧光定量 PCR 灵敏度试验结果

沙门菌灵敏度测试结果见图 1 和图 2。由图 1 可知该灵敏度的最低检测限 CT = 37.4, 虽然该 CT

值接近 40,但仍有明显的扩增曲线,可以判定该 CT 值有效。图 2 是根据沙门菌标准品的 CT 值和标准品起始拷贝数的对数存在线性关系所绘制的标准曲线,通过该标准曲线只要知道要扩增标准品的 CT 值,就可以计算出拷贝数。按照公式拷贝数 =  $[DNA/RNA \text{ 浓度} (g/ml) \times 6.02 \times 10^{23} (copies/mol)] / 340 \times \text{单链碱基数} (g/mol)$ ,可知沙门菌的灵敏度检测限为 11 copies/ $\mu\text{l}$ 。该标准曲线的相关值 ( $r$ ) = 0.994,说明该标准曲线的各个点呈明显的线性相关性,梯度稀释很好。标准品每个梯度重复做 3 次,通过图 1 和图 2 可知,每个梯度的 CT 值变化很小,说明该实验具有很好的重复性。

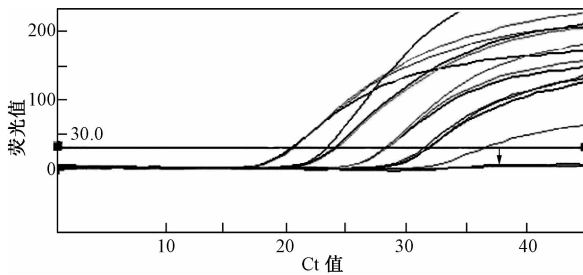


图 1 沙门菌的灵敏度曲线  
Figure 1 Sensitivity curve of *Salmonella*

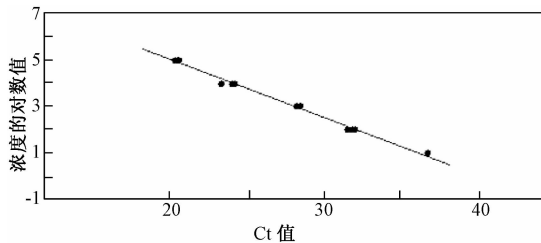


图 2 沙门菌标准曲线  
Figure 1 The standard curve of *Salmonella*

单核细胞增生李斯特菌的灵敏度测试结果见图 3 和图 4。由图 3 可知该灵敏度的最低检测限 CT = 34.7,有明显的扩增曲线,可以判定该 CT 值有效。图 4 是根据单核细胞增生李斯特菌标准品的 CT

值和标准品起始拷贝数的对数存在线性关系所绘制的标准曲线,通过该标准曲线只要知道要扩增标准品的 CT 值,就可以计算出拷贝数。按照公式拷贝数 =  $[DNA/RNA \text{ 浓度} (g/ml) \times 6.02 \times 10^{23} (copies/mol)] / 340 \times \text{单链碱基数} (g/mol)$ ,可知沙门菌的灵敏度检测限为 12.8 copies/ $\mu\text{l}$ 。该标准曲线的相关值 ( $r$ ) = 0.996,说明该标准曲线的各个点呈明显的线相关性,梯度稀释很好。标准品每个梯度重复做 3 次,通过图 3 和图 4 可知,每个梯度的 CT 值变化很小,说明该实验具有很好的重复性。

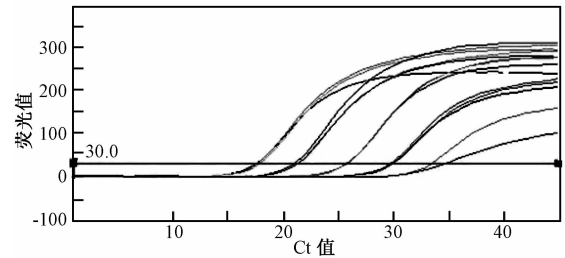


图 3 单核细胞增生李斯特菌灵敏度曲线  
Figure 3 Sensitivity curve of *Listeria monocytogenes*

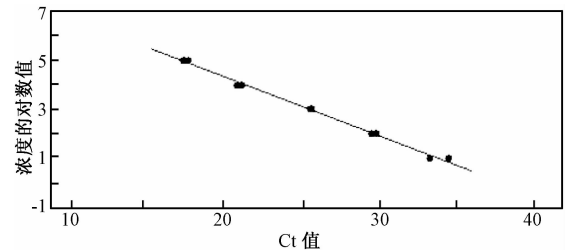


图 4 单核细胞增生李斯特菌标准曲线  
Figure 4 The standard curve of *L. monocytogenes*

2.2 荧光定量 PCR 特异性试验结果

特异性检测结果显示 4 株沙门菌有明显扩增曲线,为阳性(见图 5)。致病性单核细胞增生李斯特菌有明显扩增曲线,为阳性(见图 6),其余 5 株非致病单核细胞增生李斯特菌和肠道致病菌均为阴性。具有高度的特异性。

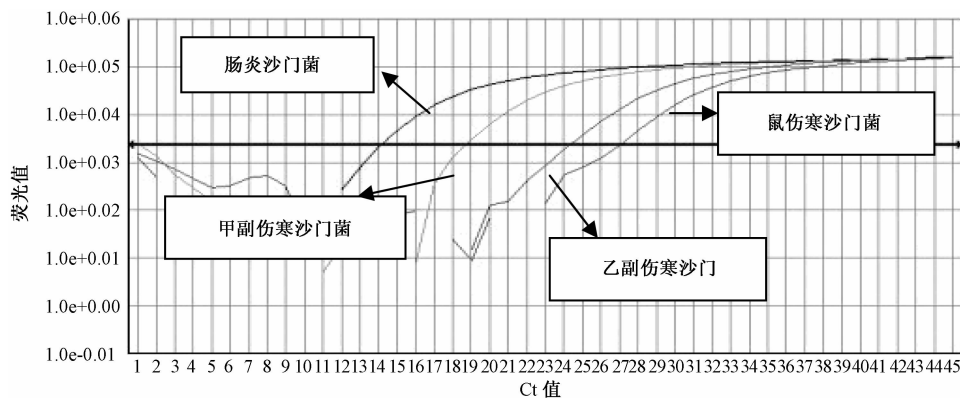


图 5 沙门菌特异性检测阳性结果  
Figure 5 The positive result of specific detection of *Salmonella*

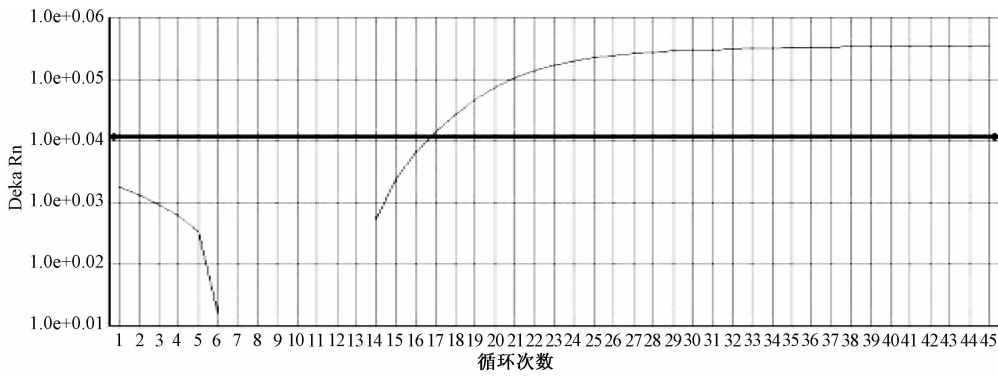


图6 单核细胞增生李斯特菌特异性检测阳性结果

Figure 6 The positive result of specific detection of *Listeria monocytogenes*

### 2.3 感染标本的检测结果

用该方法检测 15 只实验感染沙门菌和单核细胞增生李斯特菌的小鼠肠道样本,14 只阳性,1 只阴性,检测符合率为 93.3%。

### 3 讨论

本试验采用双重荧光定量 PCR 方法同时检测沙门菌和单核细胞增生李斯特菌,该方法进行全封闭反应,避免了模板污染隐患,具有特异性强、灵敏度高和操作安全等优点,检测的灵敏度分别为 11 和 12.8 copies/ $\mu$ l,特异性 100%,并且实现了实时监测荧光量变化,使定量更准确可靠,从 DNA 的提取到反应结束仅需 2.5 h,缩短了反应时间,提高了检测效率,适应快速检测疑似样品的要求。

本试验对沙门菌和单核细胞增生李斯特菌感染的小鼠动物模型进行检测,符合率为 93.3%,有很好的适用性。该方法可以广泛应用于以动物为

宿主的沙门菌和单核细胞增生李斯特菌的快速检测,同时也可以应用于食品安全领域和公共卫生安全的快速检测。

### 参考文献

- [ 1 ] 谭炳乾. 单核细胞增多李斯特菌 PCR 和 PCR-ELISA 检测方法的建立[D]. 武汉:华中农业大学,2007.
- [ 2 ] 黄金林,焦新安,文其乙,等. 直接 ELISA 和 PCR 相结合快速检测样品中的沙门氏菌[J]. 中国人兽共患病杂志,2004,20(4):321-327.
- [ 3 ] CHARLES M, DOZOIS S, POURBAKHS A, et al. Expression of pand type 1 ( F1) fimbriae in pathogenic Escherichia. coli from poultry [J]. Vet Microbiol, 1995, 45(4):297-309.
- [ 4 ] 李光伟. 沙门菌氏荧光实时定量 PCR 检测试剂的研制及应用[J]. 微生物学通报,2007,34(3):436-499.
- [ 5 ] RODRÍGUEZ-LA'ZARO D. Quantitative detection of Listeria monocytogenes and Listeria innocuaby real-time PCR: Assessment of hly, iap, and lin02483 targets and amplifluor technology [J]. Appl Environ Microbiol, 2004(3):1366-1377.

## 公告栏

### 关于食品中百草枯等 54 种农药最大残留限量的公告

2011 年 第 2 号

根据《食品安全法》规定,经食品安全国家标准审评委员会审查通过,现发布食品安全国家标准《食品中百草枯等 54 种农药最大残留限量》(GB26130—2010),自 2011 年 4 月 1 日起实施。

特此公告。

附件:2011 年第 2 号公告文本(略)

卫生部  
二〇一一年一月二十一日