

实验技术与方法

五种食源性致病菌多重 PCR 的条件优化和检出限分析

陈娟,唐俊妮,李键,陈丽君

(西南民族大学生命科学与技术学院,四川 成都 610041)

摘要:目的 对沙门菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌 O157:H7、单核增生李斯特菌和福氏志贺菌 5 种食源性致病菌的多重 PCR 反应条件进行优化并分析方法的 DNA 检测限。方法 根据沙门菌的 *invA* 基因、金黄色葡萄球菌的 16S rDNA 基因、大肠杆菌 O157:H7 的 *eaeA* 基因、单核增生李斯特菌的 *hlyA* 基因和福氏志贺菌的 *ipaH* 基因设计 5 对特异性引物进行多重 PCR,对反应条件包括镁离子浓度、引物浓度和退火温度进行优化试验,并确定该检测方法的检出限。结果 最佳反应条件为金黄色葡萄球菌、沙门菌和福氏志贺菌引物浓度为 0.25 $\mu\text{mol/L}$,单核增生李斯特菌引物浓度为 0.4 $\mu\text{mol/L}$,大肠杆菌 O157:H7 引物浓度为 0.3 $\mu\text{mol/L}$, Mg^{2+} 浓度为 2.25 mmol/L,退火温度为 60 $^{\circ}\text{C}$;在此条件下金黄色葡萄球菌、肠炎沙门菌、大肠杆菌 O157:H7、单核增生李斯特菌、福氏志贺菌的多重 PCR 的 DNA 检出限分别为 6.4、32、32、800 和 160 pg。结论 通过对 5 种引物的 PCR 条件进行优化和检出限的分析,为食品中该 5 种致病菌的快速检测奠定基础,对实际应用具有指导意义。

关键词:多重 PCR; 扩增条件; 优化; 检出限; 食源性致病菌; 食品安全

中图分类号:R155; R155.5; TS207.4; R378 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2014)02-0137-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2014.02.008

Optimization of multiplex PCR method for five food-borne pathogens and analysis of its detection limit

CHEN Juan, TANG Jun-ni, LI Jian, CHEN Li-jun

(College of life science and technology, Southwest University for Nationalities, Sichuan Chengdu 610041, China)

Abstract: Objective To optimize the reaction conditions and to analyze the DNA detection limit of a multiplex PCR method for simultaneous detection of *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Shigella*. **Methods** Based on the *invA* gene of *Salmonella*, the 16S rDNA gene of *Staphylococcus aureus*, the *eaeA* gene of *Escherichia coli* O157:H7, the *hlyA* gene of *Listeria monocytogenes* and the *ipaH* gene of *Shigella flexneri*, five pairs of primers were designed for multiplex PCR amplification. The reaction conditions were optimized and the detection limit was confirmed. **Results** The optimal concentration of primers for *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* and *Shigella flexneri* was 0.25, 0.4 $\mu\text{mol/L}$ for *Listeria monocytogenes*, and 0.3 $\mu\text{mol/L}$ for *Escherichia coli* O157:H7. The optimal magnesium ion concentration was 2.25 mmol/L, the annealing temperature was 60 $^{\circ}\text{C}$. The DNA detection limit of this method was 6.4 pg for *Staphylococcus aureus*, 32 pg for *Salmonella enteritidis*, 32 pg for *Escherichia coli* O157:H7, 800 pg for *Listeria monocytogenes* and 160 pg for *Shigella Flexnei*, respectively. **Conclusion** Through optimization of reaction conditions and analysis of detection limit, the results provided a basis for the simultaneous detection of these five pathogens and had a significant prospect for application.

Key words: Multiplex PCR; amplification conditions; optimization; detection limit; food-borne pathogens; food safety

世界范围内,食物中毒事件每年都在频繁暴

发。据统计资料显示,在病原清楚的暴发事件中,我国由微生物引起的食源性疾病暴发事件数和患者数最多,分别占 42.4% 和 58.2%。可见,由微生物引起的食源性疾病是目前主要的食品安全问题^[1]。其中,又以沙门菌(*Salmonella*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌 O157:H7(*Escherichia coli* O157:H7)、志贺菌(*Shigella*)和单核增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)等为主要食

收稿日期:2013-07-09

基金项目:教育部新世纪人才支持计划(NCET-11-0847);国家自然科学基金(31371781);国家科技重大专项(201203009)

作者简介:陈娟 女 高级实验师 研究方向为食品微生物与食品安全
E-mail:chenj1221@126.com

通讯作者:唐俊妮 女 副研究员 研究方向为食品安全
E-mail:junneytang@aliyun.com

源性致病菌。对这些致病菌的检测与鉴定以前主要依赖传统的细菌学培养方法,操作繁琐、耗时、费力^[2]。随着分子生物学理论和技术不断发展,PCR技术因其特异性强、灵敏度高、操作简便等优点已越来越多地应用于食品致病菌的检测。目前,多重PCR技术是食源性致病菌快速检测技术的重要研究方向。多重PCR是在常规PCR基础上改进并发展起来的一种技术,可以满足在一个反应体系中同时检测多种目的基因的需要,具有高效快捷、试验成本低等优点,但是影响多重PCR结果准确性的因素很多,并非将多对特异性引物简单混合在同一反应体系就可以进行多重PCR扩增^[3]。因此,需要探索最佳反应条件并分析方法的检出限,这是多重PCR方法建立的前提和基础。本研究通过优化多重PCR反应条件与分析方法的检出限,为建立能同时检测沙门菌、金黄色葡萄球菌、志贺菌、大肠杆菌O157:H7和单核增生李斯特菌5种致病菌的多重PCR方法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标准菌株

金黄色葡萄球菌(ATCC 6538)和单核细胞增生李斯特氏杆菌(ATCC 19111)均由实验室保藏,福氏志贺菌(CICC 1.1868)、肠炎沙门菌(CICC 21482)和肠出血性大肠埃希菌O157:H7(CICC 21530)均购自中国工业微生物菌种保藏管理中心。

1.1.2 主要仪器与试剂

TSNENEN031445 PCR仪、Gel Doc XR S. N76S/03894 凝胶成像仪、SmartSpec™ Plus 均购自美国BIO-RAD,电泳仪,超净工作台,冷冻离心机,隔水式恒温培养箱,振荡培养箱。

酵母提取物、胰化蛋白胨均购自英国OXOID,琼脂糖(Agarose G-10,中国香港Biowest),PCR扩增试剂(*Taq* DNA聚合酶、dNTPs、MgCl₂、10×PCR buffer)、100~2 000 bp DNA Ladder Marker、RNase(1 mg/ml)、溶菌酶(20 mg/ml)、蛋白酶K(10 mg/ml)、6×上样buffer均购自大连TaKaRa公司,琼脂粉、NaCl、无水乙醇、EDTA、SDS、苯酚、氯仿、异戊醇、醋酸钠均购自成都市科龙化工试剂厂。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

根据沙门菌编码侵染上皮细胞表面蛋白的*invA*基因、金黄色葡萄球菌的16S rDNA基因、大肠杆菌O157:H7编码外膜黏附素的*eaeA*基因、单核细胞增生李斯特菌编码李斯特氏溶血素O的*hlyA*基因,福

氏志贺菌侵袭性质粒抗原H的*ipaH*基因共设计5对特异性引物,引物序列和扩增片段长度详见文献[4]。引物由上海生工公司合成。

1.2.2 模板DNA的提取

革兰氏阳性菌DNA的提取采用文献[5]的方法;革兰氏阴性菌DNA的提取采用文献[6]的方法。

1.2.3 多重PCR扩增条件的优化

为使多重PCR体系中各对引物都能得到高效扩增,在预试验和查阅文献的基础上,确定dNTPs浓度、*rTaq* DNA聚合酶浓度、循环次数等影响较小因素,而Mg²⁺浓度、引物浓度和退火温度3个因素对试验影响较大,因此对它们进行单因素优化试验,以达到提高扩增效率的目的。

1.2.3.1 Mg²⁺浓度的优化

在退火温度60℃,5种引物浓度均为0.4 μmol/L的条件下,Mg²⁺浓度分别设置为1.0、1.25、1.5、1.75、2.0、2.25和2.5 mmol/L。

1.2.3.2 引物浓度的优化

在退火温度60℃,Mg²⁺浓度为2.25 mmol/L条件下,引物浓度分别设置为①*ipaH*、*invA*和16S浓度均为0.25 μmol/L,*hlyA*和*eaeA*浓度均为0.3 μmol/L;②*ipaH*、*invA*和16S浓度均为0.25 μmol/L,*hlyA*和*eaeA*浓度均为0.4 μmol/L;③*ipaH*、*invA*和16S浓度均为0.25 μmol/L,*hlyA*浓度为0.4 μmol/L,*eaeA*浓度为0.3 μmol/L;④5种引物浓度均为0.2 μmol/L;⑤5种引物浓度均为0.4 μmol/L;⑥5种引物浓度均为0.6 μmol/L。

1.2.3.3 退火温度的优化

在Mg²⁺浓度为2.25 mmol/L,5种引物浓度均为0.4 μmol/L条件下,退火温度分别设置为56.2、57.2、58.2、59.3、60.2、61.0和61.5℃。

1.2.3.4 多重PCR反应体系及条件

多重PCR反应体系:2 μl 10×PCR缓冲液(无Mg²⁺),150 μmol/L dNTPs(25 mmol/L),1.5 U *rTaq* DNA聚合酶(5 U/μl),模板浓度、Mg²⁺浓度和引物浓度根据优化方法添加,最后用超纯水补充至总体积20 μl。多重PCR反应条件:95℃预变性10 min;95℃变性30 s,退火温度50 s,72℃延伸50 s,进行35个循环;最后72℃延伸10 min,4℃保存。扩增后的PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测,凝胶成像系统观察结果并拍照。

1.2.4 DNA检出限分析

1.2.4.1 单重PCR的DNA检出限

分别提取每种目标菌纯培养物的DNA作为单模板,做一系列10倍稀释梯度,将不同稀释梯度的DNA分别做单重PCR扩增,确定单重PCR的DNA最低检

测浓度。采用 SmartSpec™ Plus 测定 DNA 浓度。

1.2.4.2 多重 PCR 的 DNA 检出限

以 5 种 DNA 单模板等量混合作为混合模板,然后做一系列 5 倍稀释,将不同稀释梯度的 DNA 分别做多重 PCR 扩增,确定多重 PCR 的 DNA 最低检测浓度。DNA 浓度测定同 1.2.4.1。

2 结果与分析

2.1 多重 PCR 反应条件的优化结果

2.1.1 Mg²⁺ 浓度对多重 PCR 反应的影响

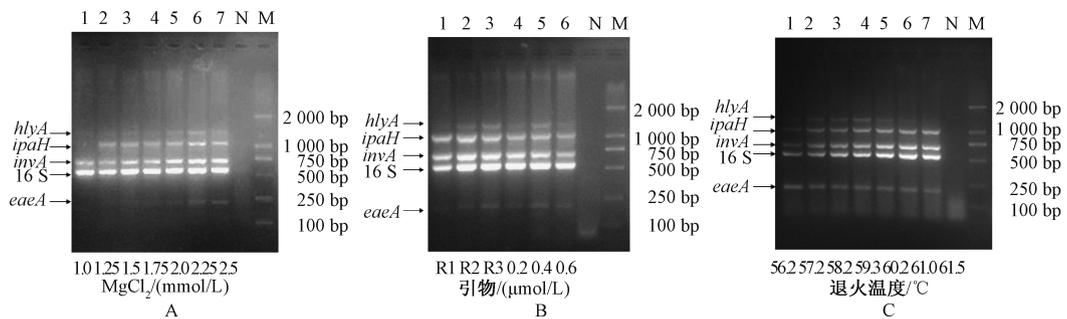
在退火温度为 60 ℃,5 种引物浓度均为 0.4 μmol/L 的条件下,不同浓度的 Mg²⁺ 对扩增的影响见图 1 中 A。当 Mg²⁺ 浓度为 2.25 和 2.5 mmol/L 时,均可以得到 5 条清晰的扩增条带,为防止非特异性扩增条带的出现,选用较小值 2.25 mmol/L 进行后续优化试验。

2.1.2 引物浓度对多重 PCR 反应的影响

如图 1 中 B 所示,在退火温度为 60 ℃,Mg²⁺ 浓度为 2.25 mmol/L 条件下,加入 6 种不同浓度的引物,扩增得到的条带都很整齐,但亮度存在一定差异,16S、*invA* 和 *ipaH* 基因的扩增条带比较亮,*hlyA* 和 *eaeA* 基因的扩增条带比较暗。当 *ipaH*、*invA*、16S、*hlyA* 和 *eaeA* 浓度分别为 0.25、0.25、0.25、0.4 和 0.3 μmol/L 时,5 条扩增条带均能达到理想的效果。

2.1.3 退火温度对多重 PCR 反应的影响

在 Mg²⁺ 浓度为 2.25 mmol/L,5 种引物浓度均为 0.4 μmol/L 的条件下,设置不同梯度的退火温度,结果见图 1 中 C。在设置的退火温度下(56.2 ~ 61.5 ℃),没有出现非特异性片段,说明退火温度的设置范围适宜;低退火温度时扩增效率下降,5 条扩增条带都变暗,随着退火温度不断升高,*hlyA* 基因的扩增效率开始下降,扩增条带变暗。因此,退火温度在 59.3 和 60.2 ℃ 时,各扩增条带亮且均匀,为方便起见,最终选择 60 ℃ 为最优退火温度。



注:A 为 Mg²⁺ 浓度对多重 PCR 反应的影响;B 为引物浓度对多重 PCR 反应的影响(第 1 泳道 R1:*ipaH*、*invA*、16S、*hlyA* 和 *eaeA* 浓度分别为 0.25、0.25、0.25、0.3 和 0.3 μmol/L;第 2 泳道 R2:*ipaH*、*invA*、16S、*hlyA* 和 *eaeA* 浓度分别为 0.25、0.25、0.25、0.4 和 0.4 μmol/L;第 3 泳道 R3:*ipaH*、*invA*、16S、*hlyA* 和 *eaeA* 浓度分别为 0.25、0.25、0.25、0.4 和 0.3 μmol/L;第 4 泳道:5 种引物浓度均为 0.2 μmol/L;第 5 泳道:5 种引物浓度均为 0.4 μmol/L;第 6 泳道:5 种引物浓度均为 0.6 μmol/L;C 为退火温度对多重 PCR 反应的影响;A ~ C 中 M 为 2 000 bp marker,N 为阴性对照

图 1 多重 PCR 反应条件的优化

Figure 1 Optimization of multiplex PCR reaction conditions

2.2 DNA 检出限分析

2.2.1 单重 PCR 的 DNA 检出限

从图 2 中 A ~ E 可知,金黄色葡萄球菌、大肠杆菌 O157:H7、单核增生李斯特菌、福氏志贺菌、肠炎沙门菌单重 PCR 的 DNA 检出限分别为 5.89 × 10⁻³、17.4、543、73.35 × 10⁻³ 和 22 pg。

2.2.2 多重 PCR 的 DNA 检出限

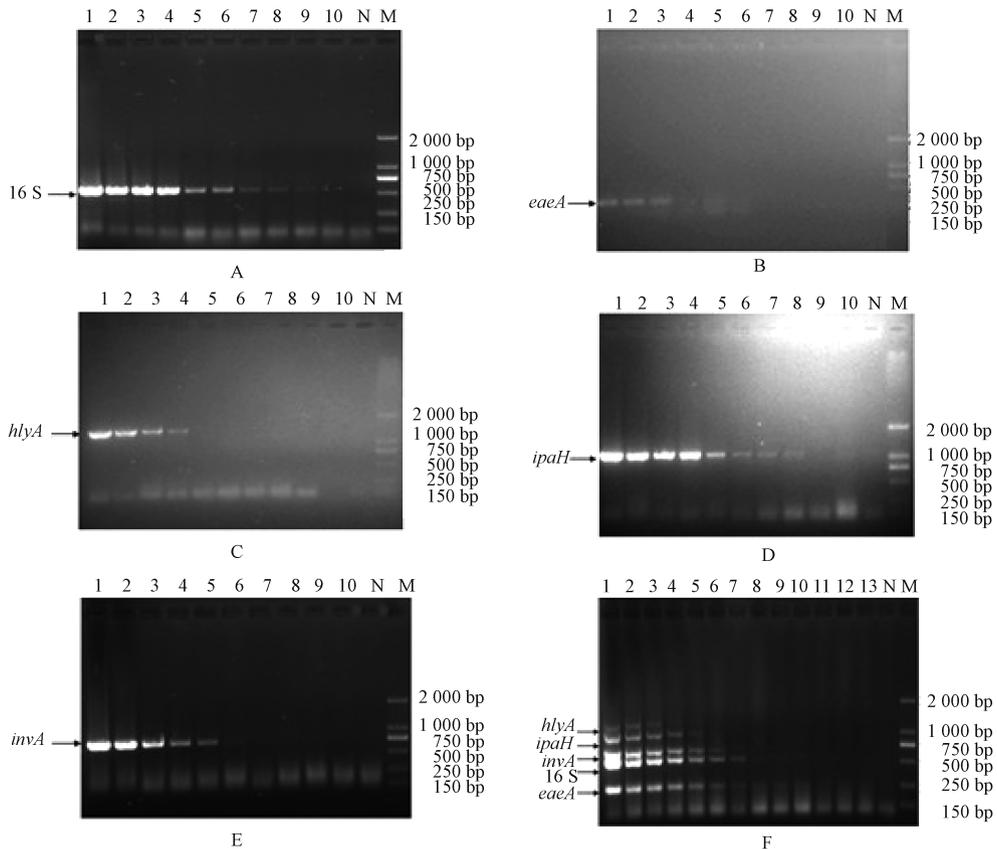
从图 2 中 F 可知,金黄色葡萄球菌、大肠杆菌 O157:H7、单核增生李斯特菌、福氏志贺菌、肠炎沙门菌多重 PCR 的 DNA 检出限分别为 6.4、32、800、160 和 32 pg。

3 讨论

多重 PCR 技术实现了对多种致病菌的同步检测,节省时间和成本,是快速检测致病菌的重要研

究方向。但多重 PCR 技术在食品微生物的检测中存在一定的问题和缺陷,例如多对引物之间的相互抑制,引物与非靶序列的结合产生非特异性扩增。与常规 PCR 相比,多重 PCR 由于同时涉及到了多对引物,因此在多重 PCR 应用中,如何合理设计引物,优化最佳多重 PCR 体系及反应条件十分重要,直接关系到检测结果的特异性与灵敏度。

本研究采用的引物经美国国立生物技术信息中心(NCBI)检索获得,并进行了特异性验证试验,结果见文献[4]。在优化引物浓度时,首先采用等量添加方案,再进行调整。因为初次进行多重 PCR 反应时,各种引物按相等的摩尔数添加确有必要,其结果将会揭示哪些引物浓度需要调整,过高引物浓度易引起错配,增加非特异性扩增,还易形成引物二聚体,出现条带弥散或拖尾现象;过低引物浓



注:A为金黄色葡萄球菌DNA的单重PCR灵敏度检测结果(1~10;589 ng~0.589 fg);B为大肠杆菌O157:H7 DNA的单重PCR灵敏度检测结果(1~10;174 ng~0.174 fg);C为单核增生李斯特菌DNA的单重PCR灵敏度检测结果(1~10;543 ng~0.543 fg);D为福氏志贺菌DNA的单重PCR灵敏度检测结果(1~10;733.5 ng~0.733 5 fg);E为肠炎沙门菌DNA的单重PCR灵敏度检测结果(1~10;2.2 μg~2.2 fg);F为5种目标致病菌多重PCR灵敏度检测结果(1~10;100 ng~0.409 6 fg);A~F中M为2 000 bp Marker,N为阴性对照

图2 5种目标致病菌单重PCR和多重PCR的灵敏度检测结果

Figure 2 Sensitivity results by using the monoplex-PCR and the multiplex-PCR for five target pathogens

度易造成扩增产物太少而使条带过弱或消失^[7]。在添加0.2、0.4和0.6 μmol/L等量浓度引物时,金黄色葡萄球菌、肠炎沙门菌和福氏志贺菌的扩增条带很亮,但亮度没有随着引物浓度的增加而加深;而大肠杆菌O157:H7和单核增生李斯特菌的扩增条带偏暗。由于引物之间存在竞争性抑制,造成同一管内产物量不等,电泳条带亮度相差较大。因此,将金黄色葡萄球菌、肠炎沙门菌和福氏志贺菌3种目标菌的引物浓度确定为0.25 μmol/L的前提下,进一步调整其他两种目标菌的引物浓度。通过上述调整方案,确定最优的引物浓度,虽然条带亮度仍不一致但有很大改善。

从Mg²⁺浓度对多重PCR反应的影响结果可以看出,Mg²⁺浓度为2.25和2.5 mmol/L时,均可得到5条清晰的扩增条带,为防止非特异性扩增条带的出现,选用较小值(2.25 mmol/L)。在多重PCR的影响因素中,除了引物浓度、Mg²⁺浓度、模板浓度之外,退火温度也十分重要,其决定PCR的特异性和产量。已有的研究中有些多重PCR反应条件采用

1个退火温度,亦有在1个反应体系中采用多个退火温度^[8]。本研究运用梯度PCR探索退火温度,最终确定60℃退火温度时可得到理想的目的片段。值得注意的是,在以后针对实际样品进行检测时,由于样品中各种菌数量不等,该反应条件需要根据实际情况进行适当调整。

从DNA检出限结果可以看出,5种目标菌单重PCR的DNA检出限均低于多重PCR的DNA检出限。尤其是金黄色葡萄球菌和福氏志贺菌,各自单重PCR的DNA检出限比在多重PCR中的DNA检出限低了10³倍。该结果与王艳君等^[9]的研究结果相符,尽管如此,样品经过适当的增菌培养后,仍可以满足多重PCR方法的检测要求。综上,本研究对于今后这5种病原微生物的快速检测具有实际应用指导意义。

参考文献

- [1] 陈艳,郭云昌,王竹天,等. 2006年中国食源性疾病暴发的监测资料分析[J]. 卫生研究,2010,39(3):331-334.
- [2] 刘继超,姜铁民,陈历俊,等. 多重PCR检测原料乳中沙门氏

- 菌、无乳链球菌和金黄色葡萄菌的研究[J]. 中国食品学报, 2010, 10(6):173-179.
- [3] 郝玉芹,孙皆宜,李艾,等. 正交优化多重 PCR 反应体系检测 3 种食源性致病菌的研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(2):602-605.
- [4] CHEN J, TANG J N, LIU J, et al. Development and evaluation of a multiplex PCR for simultaneous detection of five foodborne pathogens [J]. Journal of Applied Microbiology, 2012, 112(4):823-830.
- [5] TANG J N, SHI X M, SHI C L, et al. Characterization of a duplex PCR assay for the detection of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology, 2006, 14(3):201-217.
- [6] Fratamico P M, Strobaugh T P. Simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 1998, 21(3):92-98.
- [7] 赵邦荣,张香改,齐娜娜,等. 优化多重 PCR 扩增效果的实验研究[J]. 河北医药, 2011, 33(11):1674-1675.
- [8] Herbergs J M, Siwek A P M A, Crooijmans J J, et al. Multicolour fluorescent detection and mapping of AFLP markers in chicken (*Gallus domesticus*) [J]. Animal Genetics, 1999, 30:274-285.
- [9] 王艳君,张春晖,王玉芬,等. 多重 PCR 检测冷却肉中的 3 种致病菌[J]. 食品发酵与工业, 2007, 33(3):111-114.

实验技术与方法

多重 PCR-变性高效液相色谱快速检测单核细胞增生李斯特菌毒力基因方法的建立

钱云开,王海洋,肖艳霞,高飞,李琳,张会敏,吴曦,张进杰
(秦皇岛出入境检验检疫局,河北 秦皇岛 066004)

摘要:目的 建立单增李斯特菌的多个靶基因快速检测手段,提高检测的准确性。方法 根据单增李斯特菌 4 个毒力基因(*hly*、*prfA*、*inlA*、*inlB*)设计引物,通过优化引物浓度和引物组合,进行多重 PCR 扩增,产物经变性高效液相色谱(DHPLC)进行快速检测。结果 出峰顺序依次为 *inlB*、*hly*、*inlA*、*prfA*, 扩增片段大小为 146、210、255、388 bp,此方法具有良好的特异性,灵敏度可达到 280 cfu/ml。结论 本方法可以满足实际工作中食品微生物检测的要求。

关键词:单增李斯特菌; 毒力基因; 变性高效液相色谱; 多重聚合酶链式反应; 食源性致病菌; 食品安全

中图分类号:R155; R155.5; R446.5; O657.7⁺2 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2014)02-0141-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2014.02.009

Development of a multiplex PCR-DHPLC method for the rapid detection of enterotoxins genes in food-borne *Listeria monocytogenes*

QIAN Yun-kai, WANG Hai-yang, XIAO Yan-xia, GAO Fei, LI lin,
ZHANG Hui-min, WU Xi, ZHANG Jin-jie

(Qinhuangdao Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Hebei Qinhuangdao 066004, China)

Abstract: Objective To establish a quick checking method of enterotoxins genes in food-borne *Listeria monocytogenes* by multiplex polymerase chain reaction (MPCR) and denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). **Methods**

Primers for detection of *hly*, *prfA*, *inlA* and *inlB* were designed and PCR system was optimized. Products were detected by DHPLC for quick detection. Thirty-two strains were tested with PCR method, sensitivity was determined with various concentration of standard strains. **Results** The peak order of PCR products was *inlB*, *hly*, *inlA*, *prfA*, and amplified fragment size was 146, 210, 255 and 388 bp respectively. This method has good specificity, and the lowest amount of detecting was 280 cfu/ml. **Conclusion** This method can well meet the requirements of actual food microbe testing.

Key words: *Listeria monocytogene*; virulence gene; DHPLC; MPCR; food-borne pathogen; food safety

收稿日期:2013-09-13

作者简介:钱云开 男 工程师 研究方向为食品生物安全 E-mail:qyk-1@163.com

通讯作者:王海洋 男 工程师 研究方向为食品生物安全 E-mail:why9601@163.com