

实验技术与方法

多重荧光定量 PCR 法检测海产品中副溶血性弧菌、
沙门菌和单增李斯特菌胡兴娟¹, 沈彪¹, 余辉², 周秀锦¹, 张静¹, 邵宏宏¹

(1. 舟山出入境检验检疫局, 浙江 舟山 316021; 2. 浙江海洋学院, 浙江 舟山 316021)

摘要:目的 建立检测海产品中副溶血性弧菌、沙门菌和单增李斯特菌的多重荧光定量 PCR 体系。方法 针对副溶血性弧菌 *tlh* 基因, 沙门菌 *Ompc* 基因和单增李斯特菌 *hly* 基因设计引物和 *TaqMan* 探针, 建立多重荧光定量 PCR 体系, 进行特异性与敏感性研究; 利用该体系检测海产品中的副溶血性弧菌、沙门菌和单增李斯特菌。结果 副溶血性弧菌、沙门菌和单增李斯特菌可得到特异性扩增, 而共存于海产品中的其他细菌均未见扩增曲线。敏感性试验显示, 该体系对副溶血性弧菌、沙门菌和单增李斯特菌的最低检测限分别为 72、40、80 cfu/ml。对舟山采集的 150 份样品进行检测, 检出 32 份副溶血性弧菌、11 份沙门菌、5 份单增李斯特菌, 与国标法检测结果一致。结论 本研究建立的基于 *TaqMan* 探针的多重荧光定量 PCR 检测方法可以特异、灵敏、简单快速地对海产品中副溶血性弧菌、沙门菌和单增李斯特菌的检测。

关键词: 海产品; 副溶血性弧菌; 沙门菌; 单增李斯特菌; *TaqMan* 探针; 多重荧光 PCR; 食源性致病菌

中图分类号: R155 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-8456(2016)04-0440-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2016.04.007

Detection of *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in seafoods using multiplex real-time quantitative PCR

HU Xing-juan, SHEN Biao, YU Hui, ZHOU Xiu-jin, ZHANG Jing, SHAO Hong-hong

(Zhoushan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhejiang Zhoushan 316021, China)

Abstract: Objective To develop a multiplex real-time quantitative PCR assay for detection *Vibrio parahaemolyticus* (Vp), *Salmonella* (Sal) and *Listeria monocytogenes* (Lmo) in seafood. **Methods** The primers and *TaqMan* probes were designed with *tlh*, *Ompc* and *hly* gene as target sequence, corresponding *V. parahaemolyticus*, *Salmonella* and *L. monocytogenes* for the multiplex real-time PCR assay, and its specificity and sensitivity were then tested. 150 samples collected from Zhoushan were screened for *V. parahaemolyticus*, *Salmonella* and *L. monocytogenes* using this method compared with national standard. **Results** Only *V. parahaemolyticus*, *Salmonella* and *L. monocytogenes* strains exhibited typical signal curves while other bacteria often concurred with them in seafoods were not amplified, and did not interfere with the detection, indicating the specificity of this assay. The detection limit of this method was 72 cfu/ml (Vp), 40 cfu/ml (Sal) and 80 cfu/ml (Lmo). In the 150 samples collected from Zhoushan, 32 samples were positive for Vp, 11 positive for Sal, 5 positive for Lmo which was consistent with national standard. **Conclusion** This method is specific, sensitive, rapid and easy for detection of *V. parahaemolyticus*, *Salmonella* and *L. monocytogenes* in seafoods.

Key words: Seafoods; *Vibrio parahaemolyticus*; *Salmonella*; *Listeria monocytogenes*; *TaqMan* probe; multiplex real-time quantitative PCR; foodborne pathogens

海产品原料本身、生产加工过程以及包装、运输、销售的各个环节都存在被细菌污染的风险, 其中的一些致病菌往往带来严重的后果, 它危害人们的生命安全, 同时造成重大经济损失。目前, 多重荧光定量 PCR 技术在食品和疾控检测中已经非常

成熟, 相对于传统的检测方法有着快速、特异、灵敏等绝对的优越性^[1]。多重荧光 PCR 将这一技术推向更高的台阶, 它是在荧光定量 PCR 的基础上, 通过使用多对引物和相应的探针, 实现在同一个反应体系中对多个目标序列进行同时检测^[2]。这就意味着应用多重荧光 PCR 能够同时对食品中多种细菌进行检测, 检测过程更加简便、快速、高效、经济。

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, Vp), 沙门菌 (*Salmonella*, Sal) 和单增李斯特菌 (*Listeria*

收稿日期: 2016-01-26

基金项目: 浙江省分析测试科技计划项目 (2014C38108)

作者简介: 胡兴娟 女 工程师 研究方向为微生物与食品安全

E-mail: shxhj@aliyun.com

monocytogenes, Lmo) 是海产品中的重要致病菌,对于这 3 种致病菌的检验,虽然已有多种快速检测方法如实时荧光定量 PCR^[3-4]、DNA 芯片技术^[5]、多重 PCR 检测技术^[6]、环介导等温扩增技术(LAMP)^[7]、核酸序列依赖性扩增法(NASBA)^[8]、悬浮芯片技术^[9]等,食品监督部门仍然普遍采用传统微生物检验方法,耗时较长,难以满足水产企业,特别是出口厂家检测期较短的需求。本研究旨在建立一种快速、准确、特异、灵敏、经济的副溶血性弧菌、沙门菌和单增李斯特菌的多重荧光定量 PCR 检测方法,以应用于市场上海产品的检验,有效地解决传统分离鉴定法中存在的费时、费力等问题及其他快速检测方法中存在的检测成本高、漏检等诸多问题。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

本研究共用到 24 株参考菌株,见表 1。

1.1.2 主要仪器与试剂

7500 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI)、离心机、荧光定量 PCR 八连管(美国 Axygen);细菌基因组 DNA 提取试剂盒(美国 Invitrogen)、THUNDERBIRD Probe qPCR Mix 试剂盒(日本 TOYOBO)、PCR 反应板(美国 ABI)。

1.2 方法

1.2.1 引物与 TaqMan 探针设计与合成

使用 NCBI 的 Primer Blast 功能,筛选 GenBank 中登录的副溶血性弧菌 *tlh* 基因、沙门菌 *Ompc* 基因

表 1 试验所用参考菌株

序号	菌株	拉丁学名	菌株编号
1	副溶血性弧菌	<i>V. parahaemolyticus</i>	ATCC 17802
2	沙门菌	<i>Salmonella</i>	CMCC 50115
3	单增李斯特菌	<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 19115
4	大肠杆菌	<i>E. coli</i>	ATCC 25922
5	金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
6	霍乱弧菌	<i>V. cholera</i>	H4-3
7	创伤弧菌	<i>V. vulnificus</i>	ZS200909
8	志贺菌	<i>Shigella</i>	ATCC 51597
9	大肠杆菌 O157: H7	<i>E. coli</i> O157: H7	ATCC 43889
10	溶藻弧菌	<i>V. alginolyticus</i>	ATCC 17749
11	威尔斯李斯特菌	<i>L. welshimeri</i>	ATCC 35897
12	英诺克李斯特菌	<i>L. innocua</i>	ATCC 33090
13	塞氏李斯特菌	<i>L. seeligeri</i>	LSZ6
14	格氏李斯特菌	<i>L. grayi</i>	LG Y006
15	伊氏李斯特菌	<i>L. ivanovii</i>	LWYD
16	弗氏柠檬酸杆菌	<i>Citrobacter freundii</i>	CF001
17	肠球菌	<i>Enterococcus</i>	ATCC 33186
18	拟态弧菌	<i>V. minicus</i>	VM
19	阪歧杆菌	<i>Enterobater sakazakii</i>	ATCC 51329
20	河弧菌	<i>V. fluvialis</i>	VFLU
21	美人鱼弧菌	<i>V. damsela</i>	VDAM
22	哈维弧菌	<i>V. harveyi</i>	VH
23	产气荚膜梭菌	<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 13124
24	枯草芽胞杆菌	<i>Bacillus cereus</i>	CMCC(B) 28001

和单增李斯特菌 *hly* 基因的保守序列,选用美国 IDT DNA 公司网上设计软件,根据 *tlh*、*Ompc* 和 *hly* 设计引物和探针,控制互补和发卡结构的产生,特别避免其产生在 3'端。再通过 GenBank 中的 Blast 检测引物和探针的特异性,引物和 TaqMan 探针由上海英潍捷基生物公司合成和荧光标记,序列见表 2, Blast 结果见表 3。

表 2 本研究所用的引物与 TaqMan 探针

Table 2 Primers and TaqMan probes were used in the study

菌株	引物/探针	序列(5'-3')	长度/bp	荧光标记探针
Vp	<i>tlh</i> -F	GTGCGAAAGTGCTTGAGATG	112	5'FAM 3'BHQ1
	<i>tlh</i> -R	AGAAGTTAGCGTCTGGAACAAG		
	<i>tlh</i> -probe	CGAGTTCATCAAGGCACAAGCGA		
Sal	<i>Ompc</i> -F	GCGAATGCGGCTGAAATTTAT	93	5'TAMRA 3' BHQ3
	<i>Ompc</i> -R	GCCTTTGTCCTCAGAGAAGTAG		
	<i>Ompc</i> -probe	ACCTGTTCCGTAAGGTTGATGGCCT		
Lmo	<i>hly</i> -F	TTAGCTTGGGAATGGTGGAG	121	5'TEXAS RED 3' BHQ2
	<i>hly</i> -R	TTGGGATAAAGCGTAGTGCC		
	<i>hly</i> -probe	TTGATGACCGGAACCTTACCACTTGTGA		

1.2.2 细菌培养及模板 DNA 的提取

取 1 ml 细菌纯培养液或样品增菌液,用细菌基因组抽提试剂盒提取基因组 DNA,建立菌株 DNA 模板库,保存于 -20 ℃。

1.2.3 多重荧光 PCR 扩增

多重荧光定量 PCR 反应体系为 20 μl,体系组成:10 × Probe qPCR mix 10 μl,上下游两个引物(10 μmol/L)各 0.6 μl,探针 0.4 μl,模板 DNA

2 μl,加水至 20 μl。7500 实时荧光定量 PCR 仪反应参数:95 ℃ 预变性 1 min; 95 ℃ 变性 15 s,60 ℃ 退火并延伸 45 s,40 个循环,在每个循环的 60 ℃ 退火并在延伸阶段收集荧光信号。

1.2.4 特异性试验

按 1.2.3 中的反应体系,对与副溶血性弧菌、沙门菌和单增李斯特菌及其他细菌进行多重荧光定量 PCR 检测。同时,将副溶血性弧菌、沙门菌和单

表3 引物和探针同源性 BLAST 分析

Table 3 Primers and probes analysis by the BLAST homology program

引物/探针	菌株	登录号	相似度/%	E 值
<i>tlh</i> -F	<i>Fomitiporia mediterranea</i>	XM_007268474.1	100	0.18
<i>tlh</i> -F	<i>Vibrio tubiashii</i>	JX262979.1	100	0.18
<i>tlh</i> -F	<i>Bacillus cereus</i>	CP012483.1	100	2.8
<i>tlh</i> -R	<i>Vibrio diabolus</i>	JX262986.1 JX262984.1	100	0.18
<i>tlh</i> -R	<i>Oceanimonas</i> sp.	AY578147.1	100	0.018
<i>tlh</i> -probe	<i>Photobacterium damsela</i>	JX262980.1	100	0.004
<i>tlh</i> -probe	<i>Vibrio alginolyticus</i>	CP013485.1 CP006719.1	96	1.1
<i>tlh</i> -probe	<i>Vibrio vulnificus</i>	CP009985.1	95	4.3
<i>Ompc</i> -F	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	CP013990.1	100	0.046
<i>Ompc</i> -F	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	CP013338.1	100	0.046
<i>Ompc</i> -F	<i>Citrobacter freundii</i>	CP012554.1 CP011657.1	100	0.046
<i>Ompc</i> -R	—	—	—	—
<i>Ompc</i> -probe	<i>Citrobacter koseri</i>	LK931336.1	96	0.12
<i>hly</i> -F	<i>Listeria ivanovii</i>	KC808537.1	100	4e ⁻⁰⁵
<i>hly</i> -R	<i>Listeria innocua</i>	KC808544.1	100	4e ⁻⁰⁵
<i>hly</i> -probe	<i>Listeria innocua</i>	GU810922.1	100	4e ⁻⁰⁵

注:—表明未发现与其相似的非目标菌

增李斯特菌混合,取混合 DNA 进行多重荧光定量 PCR 检测。

1.2.5 敏感性试验

将菌株过夜增菌培养,提取 DNA 模板,同时用菌落总数计数方法测定细菌浓度。将 DNA 模板做 10 倍系列稀释,分别进行多重荧光 PCR 试验。选取 5~6 个适当 DNA 浓度,以其对应的初始细菌浓度对数值与 Ct 值制作标准曲线(由仪器配套软件自动生成)。

1.2.6 多重荧光 PCR 重复性分析

将同一浓度的混合模板进行 3 次分析,比较结果的重复性。

1.2.7 海产品中副溶血性弧菌、沙门菌和单增李斯特菌的检测

2015 年 7~8 月,将本研究所建立的多重荧光定量 PCR 方法对采集自舟山菜场、工厂的 150 份水产样品进行检测,按常规方法将样品制成 1:10 匀浆,置于(36±1)℃培养 6 h 后提取 DNA,用多重荧光 PCR 方法同步检测副溶血性弧菌、沙门菌和单增李斯特菌,均同时采用相关国家标准(GB 4789.7—2013《食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验》^[10]、GB 4789.4—2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》^[11]、GB 4789.30—2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验》^[12])进行检测结果比对,验证该检测方法的可靠性和实用性。

2 结果

2.1 特异性试验结果

多重荧光 PCR 方法对 24 株标准菌株和参考菌株的检测结果见表 2 和图 1。只有相对应的所要检

测的菌株出现阳性扩增反应,其他非对应菌株均为阴性反应。说明针对这 3 种致病菌建立的多重荧光 PCR 方法特异性良好,可以用来检测海产品中副溶血性弧菌、沙门菌和单增李斯特菌。

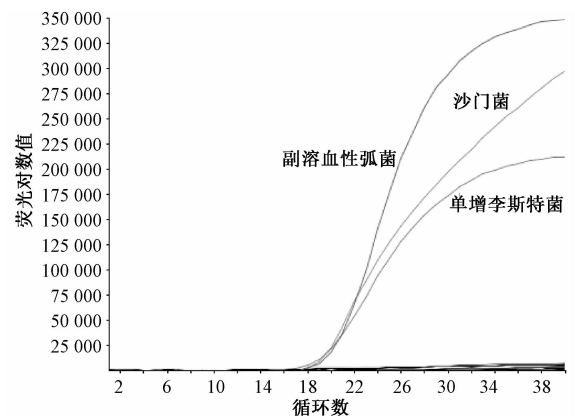


图1 多重荧光定量 PCR 检测副溶血性弧菌、沙门菌和单增李斯特菌的特异性试验

Figure 1 Specificity of detection of *V. parahaemolyticus*, *Salmonella* and *L. monocytogenes* using multiplex real-time PCR with *TaqMan* probes

2.2 敏感性试验结果

副溶血性弧菌、沙门菌和单增李斯特菌的基因组 DNA 经梯度稀释后,按 1.2.3 反应体系进行多重荧光定量 PCR 检测。

在本试验建立的多重荧光定量 PCR 体系中,当 3 种细菌 DNA 浓度比例相当时,DNA 最低检测限分别为 72 cfu/ml (Vp)、40 cfu/ml (Sal)、80 cfu/ml (Lmo),见图 2。标准曲线的 r^2 分别为 0.999、0.999、0.998,表明 Ct 值与被测 DNA 浓度的对数值的线性关系良好,本试验中所建立的多重荧光定量 PCR 检测体系试验过程与结果准确可靠,见图 3。

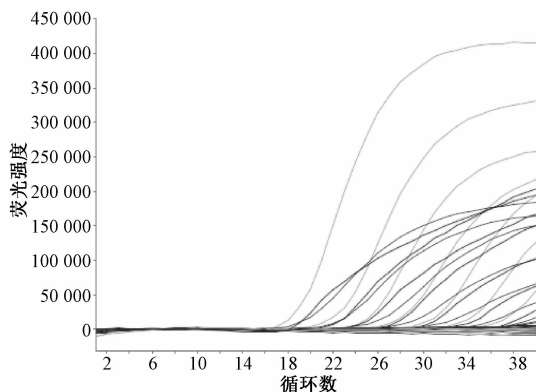


图2 副溶血性弧菌、沙门菌和单增李斯特菌多重荧光定量 PCR 反应的敏感性试验

Figure 2 Sensitivity for detection of *V. parahaemolyticus*, *Salmonella* and *L. monocytogenes* using multiplex real-time PCR with TaqMan probes on serial dilutions of extracted bacterial DNA

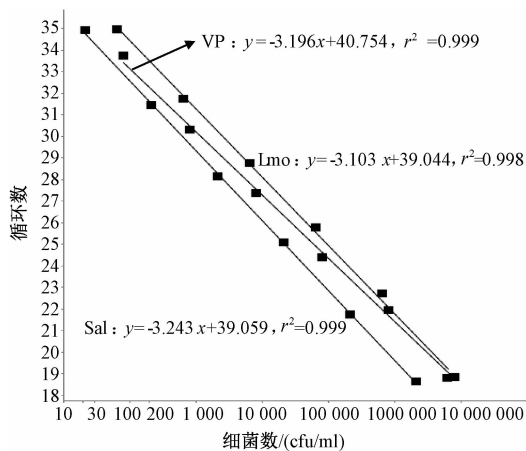


图3 副溶血性弧菌、沙门菌和单增李斯特菌 DNA 浓度与基因 Ct 值的标准曲线

Figure 3 Standard curves for amounts of purified DNA of *V. parahaemolyticus*, *Salmonella* and *L. monocytogenes* versus Ct values of the fluorescent signals

2.3 重复性试验结果

采用已建立的方法重复 3 次测定同一浓度的模板 DNA,测定的扩增曲线基本吻合。因此,所建立的荧光定量 PCR 方法有很好的可重复性,测试结果稳定可靠,见图 4。

2.4 海产品实际样品的检测

利用建立的多重荧光定量 PCR 检测方法对采自舟山水产品加工厂和舟山市场的 150 份水产品进行检测,同时采用国家标准方法进行验证。结果见表 4,共检出副溶血性弧菌 32 株,沙门菌 11 株,单增李斯特菌 5 株,多重荧光定量 PCR 与国家标准检出结果一致,但所需检测时间较国家标准大大缩短。这表明所建立的检测方法切实可行,可以灵敏、特异、快速简单地实现对海产品中副溶血性弧

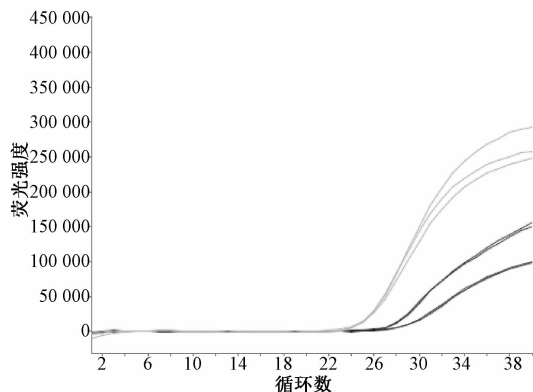


图4 多重荧光定量 PCR 重复性

Figure 4 Repeatability of multiplex fluorescence quantitative PCR

菌、沙门菌和单增李斯特菌的检测。

表4 两种方法同时检测海产品中的副溶血性弧菌、沙门菌和单增李斯特菌

Table 4 Two methods were simultaneously used to detect *V. parahaemolyticus*, *Salmonella* and *L. monocytogenes* in seafoods

检测方法	检出率/%			时间 ^a
	Vp	Sal	Lmo	
实时荧光 PCR	21.3(32/150)	7.3(11/150)	3.3(5/150)	8 h
国标方法	21.3(32/150)	7.3(11/150)	3.3(5/150)	2~3 d

注:a 为从样品处理到结果所需的最少时间

3 讨论

为解决传统方法中由于反复增菌、菌落分离和多种生化、血清型鉴定而导致的检测周期长,不宜大批量检测及成本高等问题,海产品中致病菌的快速检测技术不断得到发展,多重荧光定量 PCR 正是克服了许多不足而得到了发展与应用。实时荧光定量 PCR 技术 (real-time quantitative PCR, qPCR) 是采用荧光染料或探针技术进行目的基因的特异性扩增,同时所采取的荧光信号的强弱程度和扩增产物之间成正比关系,从而能够实现对目的基因的精确定量。由于可使用多对引物和相应的探针,多重荧光定量 PCR 能实现在同一个反应体系中对多个目标序列进行同时检测^[13]。

国内外已有针对致病菌的多重荧光定量 PCR 研究^[14-15],但还没有针对副溶血性弧菌、沙门菌和单增李斯特菌的多重荧光定量 PCR 报道。本研究以副溶血性弧菌、沙门菌和单增李斯特菌为代表,探讨应用多重荧光定量 PCR 技术检测海产品中致病菌。通过对副溶血性弧菌 *tlh*、沙门菌 *Ompc* 和单增李斯特菌 *hly* 基因的分析,设计特异性的引物与探针,建立海产品中副溶血性弧菌、沙门菌和单增李斯特菌的多重荧光定量 PCR 快速检测方法。结果表明,多重荧光定量 PCR 具有很好的稳定性,且

在不同浓度的 DNA 检测中 *tlh*、*Ompc* 和 *hly* 基因扩增效率基本相同,且 3 种荧光信号的收集不会相互干扰,且方法针对目标致病菌具有良好的特异性,检测限可达 72 cfu/ml(Vp)、40 cfu/ml(Sal)、80 cfu/ml(Lmo)。

也有文献报道,多重荧光定量 PCR 技术在大量样品的应用过程中,会产生一定数量的假阳性^[16],有可能是样品干扰成分复杂或有大量死菌存在,导致假阳性的发生。因此对于 PCR 阳性的样品还需要分离培养法来验证,即使这样利用多重荧光定量 PCR 方法也已经节省了绝大多数样品需要转种、划线接种等常规分离步骤的时间,将 PCR 初筛结果为阴性的直接略过,使得检测目标更明确,针对性更强。因此,应用多重荧光定量 PCR 同时对海产品中多种污染菌进行检测是可行的。而且相对于常规的单重荧光 PCR 来说,多重荧光定量 PCR 是在同一反应体系下进行的,不仅大大节约试剂、材料,而且使试验操作程序更加精简、便捷。

参考文献

- [1] Park H J, Kim H J, Park S H, et al. Direct and quantitative analysis of *Salmonella enterica* serovar typhimurium using real-time PCR from artificially contaminated chicken meat [J]. J Microbiol Biotechnol, 2008, 18(8) : 1453-1458.
- [2] 李金峰,赵芳,赵俊龙,等.肉食品中 3 种食源性致病菌多重荧光 PCR 检测[J].中国公共卫生,2009,25(8):990-991.
- [3] 姚大伟,江芸,徐幸莲,等.生鲜猪肉中沙门氏菌的分离、鉴定及耐药性检测[J].食品科学,2012,33(24):210-214.
- [4] 胡朝友,洪志强,张梦寒.实时荧光定量 PCR 法快速检测食品中大肠埃希菌[J].中国食品卫生杂志,2015,27(4):399-403.
- [5] 祝儒刚,李拖平,宋立峰.应用基因芯片技术检测肉及肉制品中 5 种致病菌[J].食品科学,2012,33(14):211-215.
- [6] Germint A, Masola A, Carnevali P, et al. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* by multiplex PCR [J]. Food Control, 2009, 20(8) : 733-738.
- [7] Abdullah J, Saffie N, Sjasri F A, et al. Rapid detection of *Salmonella typhi* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method [J]. Braz J Microbiol, 2015, 45 (4) : 1385-1391.
- [8] Fykse E M, Nilsen T, Nielsen A D, et al. Real-time PCR and NASBA for rapid and sensitive detection of *Vibrio cholerae* in ballast water [J]. Mar Pollut Bull, 2012, 64(2) : 200-206.
- [9] SUN Z Y, NING B A, SU P, et al. High-throughput suspension array for detecting four pathogens [J]. Anal Methods, 2012, 8(4) : 2528-2536.
- [10] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 4789. 7—2013 食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验 [S]. 北京:中国标准出版社,2013.
- [11] 中华人民共和国卫生部. GB 4789. 4—2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验 [S]. 北京:中国标准出版社,2010.
- [12] 中华人民共和国卫生部. GB 4789. 30—2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验 [S]. 北京:中国标准出版社,2010.
- [13] 邵彪,黄伟东,周鸣镛,等.多重荧光定量 PCR 检测食品污染菌 [J]. 中国食品学报,2012,12(1) : 176-181.
- [14] 金玉娟,陈应坚,刘渠,等.多重实时荧光 PCR 检测三种致泻性大肠埃希菌和志贺菌方法的建立 [J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(1) : 103-108.
- [15] Park J Y, Jeon S, Kim J Y, et al. Multiplex real-time polymerase chain reaction assays for simultaneous detection of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio vulnificus* [J]. Osong Public Health Res Perspect, 2013, 4(3) : 133-139.
- [16] 马凯,李宝明,白羽,等.基于免疫磁分离的三重荧光定量 PCR 检测食品中沙门氏菌、志贺氏菌和金黄色葡萄球菌 [J]. 微生物学通报,2014,41(11) : 2369-2377.

· 资讯 ·

欧盟食品安全局评估孔雀石绿用于水产品的安全性

7月27日欧盟食品安全局评估了孔雀石绿(MG)用于水产品中的安全性问题。研究了鱼、甲壳类水产品中孔雀石绿与其主要代谢物隐色孔雀绿(LMG)的限量问题。经过评估,欧盟食品安全局得出结论认为,孔雀石绿与其主要代谢物隐色孔雀绿(LMG)在水产品限量 2 μg/kg 不存在健康问题。(来源:食品伙伴网) (相关链接:<http://news.foodmate.net/2016/08/389607.html>)