

病以及预防用药提供理论依据。

## 参考文献

- [1] 张昕,王子军,冉陆. 2008年全国突发公共卫生事件网络报告食物中毒事件分析[J]. 疾病监测, 2010, 25(5):406-409.
- [2] 王洋,周帼萍. 蜡状芽胞杆菌食物中毒死亡案例分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2011, 23(2):191-194.
- [3] 郁庆福. 现代卫生微生物学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1995:122-131.
- [4] 周帼萍,袁志明. 蜡状芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)污染及其对食品安全的影响[J]. 食品科学, 2007, 28(3):357-361.
- [5] 中华人民共和国卫生部. GB/T 4789. 14—2003 食品卫生微生物学检验/蜡状芽胞杆菌检验国家标准[S]. 北京:中国标准出版社, 2004:95-100.
- [6] M. A. Rather, R. S. Aulakh, J. P. S. Gill, et al. Direct detection of *Bacillus cereus* and its enterotoxigenic genes in meat and meat products by polymerase Chain reaction[J]. Journal of Advanced Veterinary Research, 2011(1):99-104.
- [7] Monika Ehling-Schulz, Martina Fricker, Siegfried Scherer.

- Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004(232):189-195.
- [8] Sanjoy Das, P. K. Surendran, Nirmala Thampuran. PCR-based detection of enterotoxigenic isolates of *Bacillus cereus* from tropical seafood. Indian [J]. MedRes, 2009, 129:316-320.
- [9] 杨媛,陈庆森,吴海清. 原料乳中蜡状芽胞杆菌部分致病基因的鉴定及毒力评价[J]. 食品科学, 2009, 30(22):236-239.
- [10] 王利国,王琦,齐俊生. 几种芽胞杆菌溶血素 BL 基因及其溶血素的检测[J]. 微生物学杂志, 2007, 27(3):21-23.
- [11] Chon J W, Kim J H, Lee S J, et al. Toxin profile, antibiotic resistance and phenotypic and molecular characterization of *Bacillus cereus* in Sunsik[J]. Food Microbiol, 2012, 32(1):217-222.
- [12] Aragon-Algero L C, Palcich G, Lopes G V, et al. Enterotoxigenic and genetic profiles of *Bacillus cereus* strains of food origin in Brazil[J]. Journal of Food Protection, 71(10):2115-2118.
- [13] 张经访,李晓亮. 昆明地区五类食品中蜡状芽胞杆菌的生物学、血清学及其药物抗性的调查[J]. 昆明医学院学报, 1989, 10(3):44-48.

## 论著

# PCR-焦磷酸测序检测单核细胞增生李斯特氏菌研究

许龙岩<sup>1</sup>, 袁慕云<sup>1</sup>, 唐勤<sup>2</sup>, 阳静<sup>1</sup>, 相大鹏<sup>1</sup>

(1. 广东出入境检验检疫局技术中心, 广东 广州 510623; 2. 南方医科大学, 广东 广州 510515)

**摘要:**目的 建立结合 PCR-焦磷酸测序检测单核细胞增生李斯特氏菌的方法。方法 根据单核细胞增生李斯特氏菌的 *hly* 基因设计扩增引物和测序引物, 特异性地扩增目的片段, 再制备单链模板, 在测序引物引导下进行焦磷酸测序, 通过测序结果与 GenBank 中的 *hly* 基因序列的比对进行鉴定。结果 扩增引物和测序引物表现出良好的特异性, 16 株单核细胞增生李斯特氏菌株均扩增出大小 249 bp 的 DNA 片段, 焦磷酸测序结果与 *hly* 基因序列 100% 匹配, 而阴性对照菌株均未扩增出 DNA 条带, 焦磷酸测序结果为阴性。结论 建立的方法特异性高, 是快速从 DNA 序列水平上检测单核细胞增生李斯特氏菌的有效手段。

**关键词:** PCR-焦磷酸测序; 单核细胞增生李斯特氏菌; DNA 碱基序列; *hly* 基因

中图分类号: TS201.3 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2013)03-0201-04

## Detection of *Listeria monocytogenes* by PCR-pyrosequencing

Xu Longyan, Yuan Muyun, Tang Qin, Yang Jing, Xiang Dapeng

(Guangdong Inspection and Quarantine Technology Center, Guangzhou Guangdong 510623, China)

**Abstract: Objective** To establish a method to detect *Listeria monocytogenes* (LMO) by PCR-pyrosequencing. **Methods** A pair of PCR primers and a sequencing primer were designed according to the *hly* gene of LMO. The target gene was amplified by PCR specifically and single-stranded DNA templates for pyrosequencing were prepared from the PCR products. Finally, pyrosequencing was performed under the guidance of the sequencing primer. The strains were identified by aligning the sequencing results to the *hly* gene sequence in GenBank. **Results** PCR primers and sequencing primers showed good specificity. The results showed that a 249 bp DNA fragment was amplified from 16 LMO strains and the

收稿日期: 2013-03-10

基金项目: 广东省科技项目计划(2010B020316007); 广东出入境检验检疫局科研项目(2011GDK15)

作者简介: 许龙岩 男 高级工程师 研究方向为食源性病原菌分子检测 E-mail: xlyciq@126.com

pyrosequencing results perfectly matched the *hly* gene sequence, while the control strains were both negative. **Conclusion**

This new established method is accurate and effective for rapid detection of LMO.

**Key words:** PCR-pyrosequencing; *Listeria monocytogenes*; DNA base sequence; *hly* gene

单核细胞增生李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*, LMO) 是主要食源性致病菌之一<sup>[1]</sup>, 能引起人和动物的李斯特菌病, 临床死亡率可达 30% 以上<sup>[2-3]</sup>。随着分子生物学的发展, 已有用普通 PCR 或荧光 PCR 检测 LMO 的报道<sup>[4-6]</sup>, 虽然这些方法具有快速、高通量的特点, 却无法获得分子诊断的黄金标准—DNA 碱基序列, 因此有出现假阳性的可能。焦磷酸测序 (pyrosequencing) 技术是近年来发明的一项实时进行短片段 DNA 测序技术, 该技术在 DNA 序列分析时不需要电泳和荧光标记, 直接测定测序引物后面的碱基序列, 通过提供可靠的序列信息来确认 PCR 产物, 同时由于主要分析 PCR 产物双链中的一条链的序列, 避免了由于 DNA 链的二级结构造成的人工假象, 使测序结果更加准确<sup>[7]</sup>。本研究根据 LMO 的 *hly* 基因 (GenBank: DQ 054589), 设计扩增引物和测序引物, 建立了结合 PCR-焦磷酸测序检测 LMO 的方法, 达到从 DNA 碱基序列水平上快速、准确检测 LMO 的目的。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株信息

LMO 共 16 株, 其中单核细胞增生李斯特氏菌标准菌株 1 株 (ATCC 19115), 食品中分离菌株 15 株, 菌株信息见表 1。阴性对照株 12 株, 分别为英诺克李斯特氏菌 (CICC 10417)、伊氏李斯特氏菌 (CICC 21663)、格氏李斯特氏菌 (CICC 21670)、斯氏李斯特氏菌 (CICC 21671)、阪崎肠杆菌 (ATCC 29544)、大肠杆菌 (ATCC 25922)、痢疾志贺氏菌 (NICPBP 51252)、金黄色葡萄球菌 (CMCC 26003)、粪链球菌 (ATCC 29212)、藤黄微球菌 (CMCC 28001)、肺炎克雷伯氏菌 (CMCC 46102)、小肠结肠炎耶尔森氏菌 (CMCC 52221)。标准菌株分别购自中国普通微生物菌种保藏管理中心、中国药品生物制品鉴定所、中国工业微生物菌种保藏管理中心和广东出入境检验检疫局技术中心。所有菌株均经单核细胞增生性李斯特氏菌微量生化鉴定试剂条 API *Listria* 进行确证。

#### 1.1.2 主要仪器和试剂

PyroMark ID 检测系统 (瑞典 Biotage 公司), PCR 扩增仪 9700 型 (美国 PE 公司), 全自动核酸纯化系统 12GC (日本 PSS 公司), PCR 所用试剂 [宝生物工程 (大连) 有限公司], 焦磷酸测序用试剂

表 1 单核细胞增生李斯特氏菌食品分离菌株信息

Table 1 *Listeria monocytogenes* isolates from food information

菌株编号	样品来源	菌株编号	样品来源	菌株编号	样品来源
LMO1	冻章鱼	LMO2	冻整壳夏夷贝	LMO3	紫石房蛤
LMO4	冻蟹子	LMO5	冻章鱼	LMO6	冻章鱼
LMO7	猪肉	LMO8	冰鲜三文鱼	LMO9	鹅爪
LMO10	冻猪耳	LMO11	冻猪耳	LMO12	冻凤爪
LMO13	冻墨鱼	LMO14	冻猪后脚	LMO15	冻章鱼

(Qiagen 上海办事处), 单核细胞增生李斯特氏菌增菌液 LB1、LB2 (北京陆桥有限公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 引物设计

根据 LMO 的 *hlyA* 基因序列中的保守区域, 用 PyroMark Assay Design 2.0 软件设计扩增引物和测序引物, 上游引物 F: AGTATACCAC GGAGATGCAG TGA, 下游引物 R: GGCAAATCAA TGCTGAGTGT T, 测序引物 S: AATTTTCGAGC CTAACCT, 扩增片段为 249 bp, 下游引物 5' 端标记生物素, 引物合成和生物素标记委托宝生物工程 (大连) 有限公司完成。

### 1.2.2 模板制备

所有菌株均用 LB1 增菌液在 (30 ± 1) °C 培养条件下培养 24 h, 移取 LB1 增菌液培养后得到的菌悬液 0.1 ml 转种于 LB2 增菌液内, 于 (30 ± 1) °C 培养条件下培养 18 ~ 24 h。取经过 LB1 和 LB2 逐次培养后得到的菌悬液 1 ml 移入离心管中, 12 000 r/min 离心 5 min 去除上清液, 用 1 ml 去离子水漂浮沉淀, 12 000 r/min 离心 3 min 去上清, 重复两次, 最后加 200 μl 去离子水在全自动核酸纯化系统上提取 DNA, 用于 PCR 扩增。

### 1.2.3 PCR 扩增

扩增体系 50 μl, PCR Mix Buffer 25 μl, Taq 酶 5 μl, MgCl<sub>2</sub> 1 μl, 10 μmol/L 上、下游引物各 2 μl, 模板 1 μl, 去离子水 14 μl。循环参数为, 95 °C 预变性 4 min; 95 °C 15 s, 65 °C 30 s, 72 °C 30s, 43 个循环; 72 °C 12 min, 4 °C 保存。PCR 扩增产物一部分在 2% 琼脂糖凝胶上电泳, 另一部分用于焦磷酸测序。

### 1.2.4 单链模板制备及焦磷酸测序

将 15 μl PCR 产物转移至 96 孔 PCR 板中, 加入 2 μl 磁珠 (sepharose beads)、20 μl 结合缓冲液 (binding buffer) 和 43 μl 纯水, 常温震荡混 20 min; 打开真空泵, 将真空预装工具 (prep tool) 在高纯水中清洗 30 s, 将 prep tool 移到 96 孔 PCR 板中, 抓取其中的磁珠, 待磁珠基本抓取完毕后将携带有磁珠的 prep tool 放入 70% 乙醇中 5 s, 再分别在变性缓冲

液 (denaturation buffer) 和洗涤缓冲液 (washing buffer) 中各清洗 20 ~ 30 s, prep tool 放在装有退火预混液 PSQ 96 板 (预先加入 43  $\mu$ l 退火缓冲液和 2  $\mu$ l 测序引物) 的上方, 关掉真空泵, 轻轻摇动释放磁珠, 将 PSQ 96 板在 80  $^{\circ}$ C 放置 5 min, 自然冷却至室温后进行焦磷酸测序反应。测序程序采用 SQA 模式, 按 ATCG 的碱基排列顺序, 依次循环加入 15 次, 根据软件给出的剂量在试剂仓中加入底物混合物、酶混合物和 4 种脱氧核糖核苷酸, 将 PSQ 96 孔板和试剂仓放入 PyroMark ID 系统中进行焦磷酸测序。测序峰及相应的 DNA 碱基序列由仪器 SQA 软件自动分析产生。

### 1.2.5 模拟样品检测

用均质袋分别称取猪肉、对虾各 25 g (根据 GB 4789.30—2010 检测, 确认 LMO 阴性), 分别加入 1 ml 已调好浓度的  $10^2$  cfu/ml LMO ATCC 19115 菌悬液, 搅匀, 再加 225 ml LB1 增菌液, 经拍击式均质器上连续均质 1 ~ 2 min 后, 在  $(30 \pm 1)$   $^{\circ}$ C 培养条件下培养 24 h, 移取经 LB1 增菌液培养后得到的菌悬液 0.1 ml 转种于 10 ml LB2 增菌液内, 于  $(30 \pm 1)$   $^{\circ}$ C 培养条件下培养 18 ~ 24 h。然后取部分经过 LB1 和 LB2 逐次培养后得到的菌按 1.2.4 所述进行焦磷酸测序, 另一部分按 GB 4789.30—2010《食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验》继续进行检测。

## 2 结果

### 2.1 PCR 扩增与焦磷酸测序结果

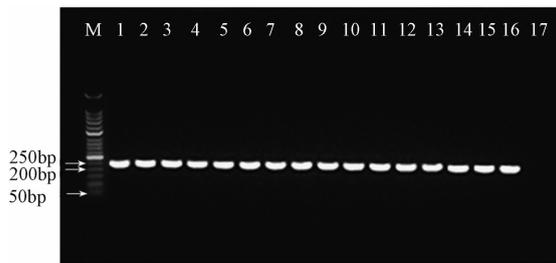
#### 2.1.1 *hly* 基因 PCR 扩增结果

16 株 LMO 均扩增出 249 bp 大小的 DNA 扩增条带 (图 1), 而其他非 LMO 菌株未见扩增条带 (图 2, 3)。图 2 可见, 第 5 泳道的金黄色葡萄球菌在 250 bp 附近有扩增带, 其扩增产物用焦磷酸测序, 结果为 ATCCAGGTGC TCTCAGTAAA GCAGTATTGCTAG TAA GTTA AGTAAAG (图 4), 该序列与 ATCCAGG TGC TCTCGTAAAA G 比对, 匹配的 DNA 碱基数仅为 14 个, 即: ATCCAGGTGC TCTC, 因此判定为非 LMO。

经过 NCBI 网站的 BLAST 反复比对分析, 发现 *hly* 基因测序引物后的 21 bp 连续 DNA 序列可达到鉴定 LMO 的目的。因此, 本研究判断结果的依据为测序的 21 个 DNA 碱基序列与上述序列 100% 匹配。

#### 2.1.2 焦磷酸测序结果

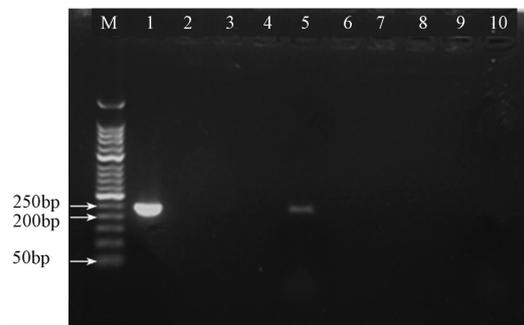
通过测序结果与 *hly* 基因测序引物后的 DNA 碱基序列 (ATCCAGGTGC TCTCGTAAAA GACGAA TTCG AATTATGATA AAATC) 的比对进行结果判断。测序碱基序列与 *hly* 基因测序引物后的 21 个



注: M: 50 bp maker; 1: LMO; 2-16: LMO1 ~ LMO15; 17: 去离子水。

图 1 LMO *hly* 基因 PCR 扩增电泳图

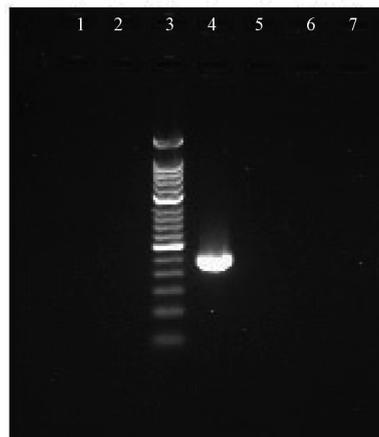
Figure 1 PCR-electrophoresis results of LMO *hly* gene



注: M: 50 bp maker; 1: LMO; 2: 阪崎肠杆菌; 3: 大肠杆菌; 4: 痢疾志贺氏菌; 5: 金黄色葡萄球菌; 6: 粪链球菌; 7: 藤黄微球菌; 8: 肺炎克雷伯氏菌; 9: 小肠结肠炎耶尔森氏菌; 10: 去离子水。

图 2 LMO 特异性试验 PCR 扩增电泳图 a

Figure 2 PCR-electrophoresis results Of LMO specificity test a



注: 1: 英诺克李斯特氏菌; 2: 格氏李斯特氏菌; 3: M: 50 bp maker; 4: LMO; 5: 斯氏李斯特氏菌; 6: 伊氏李斯特氏菌; 7: 去离子水。

图 3 LMO 特异性试验 PCR 扩增电泳图 b

Figure 3 PCR-electrophoresis results Of LMO specificity test b

DNA 碱基序列 (ATCCAGGTGC TCTCGTAAAA G) 100% 匹配, 则判断为 LMO。

16 株 LMO 的焦磷酸测序结果根据模板浓度等条件的不同, 均测出 37 ~ 64 bp 大小不等的 DNA 序列 (表 2, 图 5、6, 本文只列出 LMO1 和 LMO ATCC 19115 的测序结果图), 测序结果分别与测序引物后的 DNA 序列比对, 发现 100% 匹配的碱基数为 21 ~

39 bp,所有有效测序结果均超过 21 个碱基,表明 *hly* 基因扩增引物和测序引物特异性较好,反应体系

优化也较好,并且可用 ATCCAGGTGC TCTCGT AAAA G 碱基序列特异性地检测 LMO。

表 2 单核细胞增生李斯特氏菌焦磷酸测序结果  
Table 2 Sequencing test results of *Listeria monocytogenes*

菌株编号	检测的 DNA 碱基序列	匹配百分数 (%)
ATCC 19115	ATCCAGGTGCTCTCGTAAAAGCGAATTCGGAATTAATAACAAATC	77.8 (35/45)
LM01	ATCCAGGTGCTCTCGTAAAAGCGAATTCGGAATTAGTAG	100.0 (39/39)
LM02	ATCCAGGTGCTCTCGTAAAAGCGAATTCGGAATTAGATAAGAAAATCAAC CGTGTCTCC ATCG	56.3 (35/64)
LM03	ATCCAGGTGC TCTCGTAAAAGCGAATTGC A ATTAGTAGAA AA	64.2 (27/42)
LM04	ATCCAGGTGC TCTCGTAAA GCGAATTCGG AATTAGTAG	100.0 (39/39)
LM05	ATCCAGGTGC TCTCGTAAA GCGAATTCGG AATTA GTAG	100.0 (39/39)
LM06	ATCCAGGTGC TCTCGTAAA GCGAATTCGG AATTA GTAG	100.0 (39/39)
LM07	ATCCAGGTGCTCTCGTAAAAGCGAATTCGAATTATGATAA AATC	46.7 (21/45)
LM08	ATCCAGGTGC TCTCGTAAA A GACGAATCGAT AATA AAC	55.3 (21/38)
LM09	ATCCAGGTGCTCTCGTAAAAGCGAATTCGGAATTATGATA ACAAATC	43.8 (21/48)
LM010	ATCCAGGTGCTCTCGTAAAAGATCGAATTCGGAATTGAATG ATAATCAAAT CC	39.6 (21/53)
LM011	ATCCAGGTGCTCTCGTAAA A GACGAATCGAT AATAAAC	55.3 (21/38)
LM012	ATCCAGGTGCTCTCGTAAAAGATCGAATTCGGAATTATGAT AATCGAAATC	41.2 (21/51)
LM013	ATCCAGGTGC TCTCGTAAA A GACGAATCGAT AAAAAAC	56.8 (21/37)
LM014	ATCCAGGTGC TCTCGTAAA GCGAATTCGGAATTA G ATAGA AATC	80.0 (36/45)
LM015	ATCCAGGTGCTCTCGTAAAAGCGAATTCGGAATTATGATA ACAAATC	43.6 (21/48)

注:加“\_\_\_”序列部分表示测序结果不可靠。

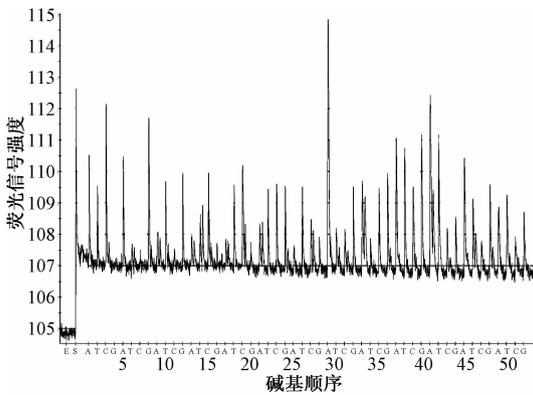


图 4 金黄色葡萄球菌焦磷酸测序结果图

Figure 4 Sequencing test results of *Staphylococcus aureus*

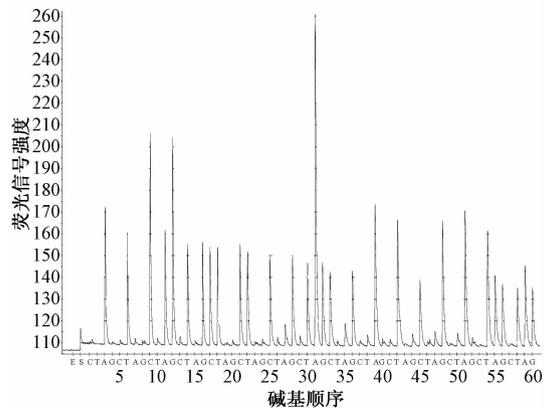


图 6 LMO 焦磷酸测序结果图

Figure 6 Sequencing test results of LMO

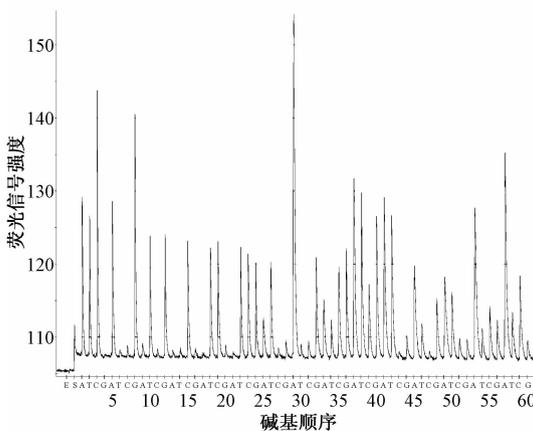


图 5 LMO1 焦磷酸测序结果图

Figure 5 Sequencing test results of LMO1

## 2.2 模拟样品焦磷酸测序检测结果

焦磷酸测序结果与传统检测方法一致,但焦磷酸测序方法第一次增菌 24 h、第二次增菌 18~24 h,核酸提取、PCR 扩增和焦磷酸测序 3~4 h,整个试验 45~48 h 可完成,简便快捷,而且通过 DNA 碱基序列水平上检测 LMO,避免了单纯 PCR 扩增检测易污染造成的假阳性结果,准确性高。

## 3 讨论

LMO 通过溶血素 (LLO) 和磷脂酰肌醇特异性磷脂酶的裂解作用,逃离吞噬小体进入细胞质摄取营养成分进行增殖, LLO 是由 *hly* 基因编码,而且可

用于 LMO 的特异性检测<sup>[8-10]</sup>。焦磷酸测序是待测序列中分别加入 4 种核苷酸,延伸过程中释放的焦磷酸在 ATP 硫酸化酶和荧光酶的偶联反应中释放荧光,检测器通过检测相应的荧光强度而获得样本中的核苷酸序列,是一种非常实用的短序列实时测序技术,目前应用于基因表达、病毒检测、SNP 分析、耐药基因检测、真菌鉴定、DNA 甲基化分析等多个领域<sup>[11-16]</sup>。

本研究以 LMO 的 *hly* 基因设计扩增引物和测序引物,建立了 PCR-焦磷酸测序检测 LMO 的方法。遗憾的是,研究中部分 LMO 测序结果与测序引物后的碱基序列匹配的碱基数较少,PyroMark ID 系统软件可自动对测序结果给出评价,表 2 中除 4 株菌株(LMO1、LMO4、LMO5、LMO6)的测序结果与测序引物后的序列 100% 匹配外,其他 LMO 的测序结果均有加“\_\_\_\_\_”显示的部分,与测序引物后的序列匹配的碱基数在 39.6%~80.0% 之间,虽然上述结果不影响 LMO 的检测,但在今后的工作中需继续优化反应条件,提高测序的准确率和可靠性。

## 参考文献

- [1] 祝仁发. 单核细胞增生李斯特菌的毒力因子[J]. 中国食品卫生杂志, 2007,9(2):158-161.
- [2] 宫照龙,祝仁发,叶长芸,等. 118 株单核细胞增生李斯特菌的毒力基因检测[J]. 疾病监测,2007,22(5):299-301.
- [3] 杨洋,付萍,郭云昌,等. 2005 年中国食源性单核细胞增生李斯特菌毒力基因分布[J]. 中华预防医学杂志,2010,44(12):1097-1011.
- [4] 于丰宇,李林,王红,等. 应用 PCR 技术快速测定食品中单核细胞增生李斯特氏菌毒力[J]. 食品科学,2010,31(23):164-168.
- [5] 许龙岩,袁慕云,高秀洁,等. 基于 Taqman 探针双重实时荧光 PCR 检测单增李斯特菌[J]. 中国卫生检验杂志,2011,21(8):1949-1951.

- [6] 熊国华,于莉,杨海龙,等. 实时荧光 PCR 定量检测食品中单增李斯特菌[J]. 中国食品卫生杂志,2007,19(3):248-251.
- [7] 陈之遥,周国华. 焦磷酸测序技术的研究进展[J]. 现代生物医学进展,2008,8(8):1573-1598.
- [8] 于丰宇,李林,王红,等. 应用 PCR 技术快速测定食品中单核细胞增生李斯特菌毒力[J]. 食品科学,2010,31(23):164-168.
- [9] Dussurget O, Pizarro-Cerda J, Cossart P, Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2004,58:587-610.
- [10] Chico-Calero I, Suarez M, Gonzalez-Zorn, et al. Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose-6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in *Listeria* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 2002,99(1):431-436.
- [11] ZHANG X D, WU H P, CHEN Z Y, et al. Differential Gene Expression Analysis by Combining Sequence-Tagged Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction with Pyrosequencing [J]. *Chinese Journal Of Analytical Chemistry*, 2009, 37(8):1107-1112.
- [12] WANG W P, WU H P, ZHOU G H. Detection of Avian Influenza A Virus Using Pyrosequencing [J]. *Chinese Journal Of Analytical Chemistry*, 2008,36(6):775-780.
- [13] K. Bender, C. Nehlich, C. Harrison, et al. A multiplex SNP typing approach for the DNA pyrosequencing technology [J]. *International Congress Series*, 1288(2006):73-75.
- [14] JIN R Z, YU J B, QING H Z, et al. Pyrosequencing-based approach for rapid detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2005,51:135-137.
- [15] Baback G, Michael A, Nader N, et al. Methodological improvements of pyrosequencing technology [J]. *Journal of Biotechnology*, 124(2006)504-511.
- [16] Uhlmann K, Brinckmann A, Toliat M. R., et al. Evaluation of a potential epigenetic biomarker by quantitative methyl-single nucleotide polymorphism analysis [J]. *Electrophoresis*, 2002,23:4072-4079.

· 请示批复 ·

## 关于食品配料胶原蛋白肠衣标示问题的复函

卫办监督函〔2013〕285号

河南省卫生厅:

你厅《关于请求界定食品安全标准有关问题的函》(豫卫函监督〔2013〕3号)收悉。经研究,现函复如下:

胶原蛋白肠衣属于食品复合配料,已有相应的国家标准和行业标准。根据《预包装食品标签通则》(GB7718-2011)4.1.3.1.3的规定,对胶原蛋白肠衣加入量小于食品总量25%的肉制品,其标签上可不标示胶原蛋白肠衣的原始配料。

专此函复。

国家卫生和计划生育委员会办公  
二〇一三年四月十二日