

产单核李斯特菌的改良分子信标荧光 PCR-磁捕获快速检测体系的建立

王冰¹, 扈庆华¹, 石晓路¹, 李庆阁², 郑琳琳², 林一曼¹, 段永翔³

摘要: [目的] 建立改良分子信标荧光 PCR-磁捕获快速检测产单核李斯特菌 (LMO) 的体系, 应用于食品中 LMO 的污染状况调查及食物中毒快速诊断。[方法] 根据 GenBank 公布的 LMO hlyA 基因的保守序列, 设计引物和改良分子信标探针, 建立改良分子信标荧光 PCR 检测体系。运用磁捕获材料对 PCR 检测阳性的增菌液进一步处理后划平皿做分离培养。[结果] 改良分子信标-实时 PCR 反应体系 DNA 灵敏度为 110 fg, 菌液灵敏度为 99 cfu/ml 或 4 cfu/PCR 反应体系, 无交叉反应。以此反应体系检测 28 株 LMO, 均出现特异的荧光信号。对 228 份食品进行 LMO 检测, 8 份增菌液 LMO 实时荧光 PCR 阳性。用磁捕获材料处理此 8 份增菌液, 全部细菌培养阳性, 高于国标法的 6 份阳性。[结论] 改良分子信标-实时 PCR 反应体系快速、灵敏度高, 特异性强, 运用磁捕获试剂能有效提高培养阳性率。应用该检测系统能提高 LMO 的检出率和准确性。该系统可应用于 LMO 食品污染状况调查及食物中毒的快速诊断。

关键词: 产单核李斯特菌; 改良分子信标; 实时 PCR; 检测; 免疫磁珠捕获

ESTABLISHMENT OF RAPID DETECTION SYSTEM OF LISTERIA MONOCYTOGENES WITH MODIFIED MOLECULAR BEACONS PCR_ IMMUNOMAGNETIC BEADS CAPTURE WANG Bin, HU Qing-hua, SHI Xiao-lu, et al. (Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518020, China)

Abstract: [Objective] To establish rapid detection system of *Listeria monocytogenes* using modified molecular beacons and real-time PCR_ immunomagnetic beads capture. The established method was applied to investigate the infectious status of *Listeria monocytogenes* in food and LMO food poisoning. [Methods] One set of primer was designed based on the core sequence of hlyA gene published on GenBank to detect LMO. The corresponding modified molecular beacons labeled with FAM were designed. The modified molecular beacons and real-time PCR assay were applied to detect the LMO in food. On the basis of the above experiments, immunomagnetic beads capture was used to isolate and culture the LMO in the above positive samples. [Results] For the modified molecular beacons based real time PCR assay, the sensitivity achieved 110 fg or 4 cfu/PCR reaction. There was no cross reaction with other bacteria as control. The real-time PCR assay was used to detect 28 LMO strains, no false signals were observed. The detection time was reduced from at least five days to only one day. A total of 228 food poisoning samples were tested, 8 were found LMO positive by real-time PCR. Among the tested positive samples, all were LMO positive by immunomagnetic beads capture method, 6 were LMO positive by modified traditional method. [Conclusion] The modified molecular beacons based real-time PCR assay is rapid, sensitive and specific. Immunomagnetic beads capture method can effectively enhance positive rate in the culture. Using this system in LMO detection can improve the detection rate and veracity. It could be applied in the rapid diagnosis of LMO food poisoning and investigation of the infectious status in food.

Key words: *Listeria monocytogenes*; Modified molecular beacon; Real-time PCR; Detection; Immunomagnetic beads capture

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30300281); 广东省卫生厅资助项目 (A2003709); 深圳市科技局资助项目 (200404139)

作者简介: 王冰 (1977-), 女, 双学士, 主管技师, 研究方向: 微生物检验

通讯作者: 扈庆华, 主任技师, E-mail: huqinghua03@163.com

作者单位: 1.深圳市疾病预防控制中心, 深圳, 518020; 2.厦门大学生命科学学院; 3.深圳市南山区疾病预防控制中心

产单核细胞李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, 以下简称 LMO) 属于李斯特氏菌属 (*Listeria*), 能引起人和动物脑膜炎, 败血症, 流产等症状, 死亡率达 20%~30%^[1]。目前, 国际上对其研究非常重视, 已将其列为 90 年代食品 4 大致病菌 (致病性大肠杆菌、肉毒梭菌、亲水气单胞菌和 LMO) 之一^[2]。自 1926 年首次报道李斯特氏病以来, 欧美等国食源性 LMO 病暴发的报道日益增多^[3]。目前, 我国尚无食源性 LMO 病暴发的报道, 但是动物中的 LMO 病的暴发流行和禽肉中 LMO 的

污染情况已见报道^[4]。

目前 LMO 的检验仍以传统培养法为主, 但操作繁琐, 耗时长, 且阳性率低。随着分子生物学技术的发展, 人们采用 PCR 技术应用于细菌的快速诊断, 然而传统 PCR 技术易污染, 造成检测失败。自 1995 年美国 PE 公司提出实时 PCR 检测原理后, 实时 PCR 以其快速、定量、无需后电泳、无交叉污染等突出优点而被广泛采用。改良分子信标是我们分子信标探针基础上提出的一种新型分子探针, 以它为基础建立的实时荧光 PCR 技术, 可以更好地实现多重实时 PCR 检测多种致病菌。本文采用改良分子信标技术建立 LMO 的实时 PCR 方法, 并与磁捕获方法联合使用, 形成改良分子信标荧光 PCR-磁捕获快速检测系统。将该系统与国家标准检测方法进行比较, 评价新方法的准确性和灵敏度, 并应用于深圳市食品中 LMO 的污染状况调查。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 样品 采自深圳市各类样品共 5 类 7 个品种 228 份。每份样品均无菌采样, 无菌独立包装, 每件样品约 200 g (ml), 放 4℃ 保存, 8 h 内送达实验室进行检测。

1.1.2 试剂 李斯特增菌肉汤基础、1% 盐酸 γ 吡啶黄、1% 萘啶酮酸钠盐、SIM 琼脂、三糖铁琼脂均由北京陆桥技术有限公司提供; API LISTERIA 鉴定试剂条由法国梅里埃公司提供; Taq E 由大连宝生公司提供; 荧光 PCR 引物与探针由上海生工生物工程公司合成并标记; LMO 标准株 (编号: 54001-4、54007-2) 由卫生部药品生物制品检定所提供; Dynabeads anti-Listeria (抗 LMO 免疫磁性分离套装) 由挪威 Dynal 公司提供。

1.2 主要仪器及设备 iCycler 实时 PCR 扩增仪 (美国 Bio-Rad 公司出品); 低温恒温培养箱 (型号: KB-115; 德国 WTB-Binder 公司); Ultraspec2000 紫外可见光蛋白核酸分析仪 (Pharmacia 公司)。

1.3 实验用菌株

28 种细菌共 83 株菌株, 分别来自中国药品生物制品检定所、军事医学科学院以及本实验室从食品中分离。菌株类别包括: 甲型副伤寒沙门菌、乙型副伤寒沙门菌、丙型副伤寒沙门菌、伤寒沙门菌、蜡样芽孢杆菌、弗劳地枸橼酸杆菌、肉毒梭菌、产芽孢梭菌、阴沟肠杆菌、大肠埃希菌、产单核李斯特菌、奇异变形杆菌、普通变形杆菌、粘质沙雷氏菌、鲍式志贺菌、痢疾志贺菌、福氏志贺菌、宋内氏志贺菌、金黄色葡萄球菌、粪链球菌、乙型溶血性链球菌、副溶血弧菌、霍乱弧菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌、产单核李斯特菌、灰色李斯特菌、无害李斯特菌、韦尔西梅氏李斯特菌。

1.4 菌株的分离和鉴定

李斯特氏菌的分离鉴定参照 GB/T4789.30-2003 以及 API LISTERIA 鉴定试剂盒说明书进行检测。

1.5 模板提取

(1) 菌株模板 DNA 提取: 菌株经 LB1 增菌培养过夜后, 菌体用 500 μl TE buffer 悬浮, 加入终浓度为 50 μg/μl 溶菌酶, 37℃ 作用 1 h, 然后再加入终浓度为 1% SDS 和 0.2 μg/μl 的蛋白酶 K, 55℃ 作用 1 h 后, 用酚-氯仿抽提 DNA。(2) 取 1 ml 菌液, 离心沉淀, 制备菌悬液, 煮沸, 离心, 取上清液 5

μl 即可用于实时 PCR 反应。

1.6 样品模板 DNA 提取

将食品样品用 LB1 增菌过夜后, 取 1 ml 增菌液于 EP 管, 12 000 r/min 离心 2 min, 弃去上清, 加 1 000 μl 灭菌三蒸水洗涤, 12 000 r/min 离心 2 min, 加 100 μl 灭菌三蒸水混匀, 100℃ 干浴器中裂解 10 min, 10 000 r/min 离心 1 min, 取 5 μl 加入荧光 PCR 体系。

1.7 改良分子信标检测体系的建立

1.7.1 引物和探针设计 根据 GenBank 公布的 LMO 溶血素基因 (hlyA) 序列进行比较分析, 自行设计一对引物和探针。探针 5' 端标记 FAM, 3' 端标记 DBCYE。引物和探针均由上海 Sangon 公司合成。

1.7.2 PCR 反应条件 反应总体积为 25 μl, 内含 5 μl 模板, 2.5 μl 10×PCR 缓冲液, 1.5 mmol MgCl₂, 0.25 mmol/L dNTP, 1 U Taq 酶, 25 pmol 引物, 25 pmol 探针。实时 PCR 反应参数为: 94℃ 预变性 5 min, 40 个循环中 94℃ 变性 20 s, 52℃ 退火 25 s, 72℃ 延伸 20 s。采用退火阶段检测荧光。

1.7.3 特异性检测 抽提 1.3 所列细菌的 DNA, 对 hlyA 基因进行改良分子信标实时 PCR 扩增。

1.7.4 灵敏度分析 选一株 LMO (编号为 54001-4) 作为灵敏度分析的代表株。包括 DNA 灵敏度分析和菌液灵敏度分析。DNA 灵敏度分析: 按常规 DNA 提取方法提取模板 DNA。用 Ultraspec2000 紫外可见光蛋白核酸分析仪测 DNA 的浓度。然后进行 5 倍稀释, 每个稀释度取 1 μl 用于实时 PCR 反应。菌液灵敏度分析: 菌株经 LB1 增菌过夜后, 进行 10 倍稀释, 共做 10 个稀释度, 然后依次取 10 个稀释度的 1 ml 菌液进行实时 PCR 反应。同时参照 GB/T4789.2-2003 做细菌总数计数。

1.7.5 实时 PCR 反应体系的应用 以国标方法作为对照 (生化鉴定部分采用 API LISTERIA 鉴定试剂条), 运用于 228 份各类食品的检测。

1.8 改良分子信标荧光 PCR-磁捕获检测体系的建立

1.8.1 磁捕获检测 取 1 ml LB1 24 h 增菌肉汤于 EP 管, 加 20 μl 的免疫磁珠, 上下混匀 3 min, 使免疫磁珠与增菌液中 LMO 充分结合。将小管置于 Dynal MPC_S 磁架上 3 min, 使免疫磁珠吸附于管壁。小心移出管中液体, 加入 PBS 洗涤液同上操作洗涤 3 次。弃去洗涤液, 加入 50 μl PBS 使管中的免疫磁珠重新悬浮。将带有 LMO 的悬浮液分离于 PALACM 平板。其余培养鉴定步骤见 GB/T 4789.30-2003。

1.8.2 改良分子信标荧光 PCR-磁捕获检测体系的建立 将食品样品用 LB1 增菌过夜后, 取 1 ml 增菌液于 EP 管, 按照 1.7 步骤进行预处理, 然后按照 1.7.2 设置反应并检测荧光。以样本 0≤Ct 值≤35 为阳性。对于阳性的样品, 取对应的 LB1 增菌液 1 ml 于 EP 管, 按照 1.8.1 的步骤操作。30℃ 培养 24 h 后, 凡荧光 PCR 显示阳性而磁捕获培养阴性的样品, 再次用磁捕获处理 LB1 增菌液 2~3 ml, 继续培养。

2 结果

2.1 LMO 改良分子信标体系的检测结果

2.1.1 特异性分析 28 种菌株经改良分子信标体系检测, 只有 LMO 有荧光信号, 其余菌株均无荧光信号。

2.1.2 灵敏度结果 DNA 灵敏度为 110 fg, 菌液灵敏度为 80

cfu/ml 或 4 cfu/PCR 反应体系。

2.2 应用

在受检的 5 类食品共 228 份中, 国标法检测出阳性标本 6

份, 改良分子信标荧光 PCR-磁捕获体系检测出阳性标本 8 份, 总污染率为 3.5% (8/228)。荧光 PCR-磁捕获法检出率高于国标法, 且未出现漏检。见表 1。

表 1 5 类食品 LMO 检出情况 ($\times 10^{-2}$)

类别	检测份数	阳性份数		污染率	
		国标法	荧光 PCR-磁捕获法	国标法	荧光 PCR-磁捕获法
生肉	96	0	0	0.00	0.00
冻肉	25	1	2	4.00	8.00
冻禽	51	3	3	5.88	5.88
生奶	40	0	0	0.00	0.00
速食类冻品	16	2	3	12.50	18.70
总数	228	6	8	2.63	3.50

由于荧光 PCR-磁捕获法是针对荧光 PCR 反应阳性的样品反复富集目标菌, 所以检出率高于国标法。同时, 由于去掉了二次增菌, 故检测时间缩短 1 d。用荧光 PCR 初筛增菌液, 可以减少后续工作量, 从表 1 可知, 有 96.5% 的样品经荧光 PCR 初筛后呈阴性, 可以不做进一步检测。

3 讨论

改良分子信标探针是为了提高杂交效率, 在原来分子信标原理基础上提出的。改良分子信标的突出特点是将分子信标的臂部分也作为靶识别序列, 而不仅仅是用于形成发夹结构的无关添加序列。对于同样长度的检测靶序列, 改良分子信标比分子信标更短, 而且由于臂序列不再悬空, 因而与靶序列的结合更趋紧密。已经证明, 改良分子信标比分子信标更易设计且成功率更高, 同时对扩增条件要求不严, 因此对于多个靶序列的同时检测, 改良分子信标的优势更加明显。本实验在改良分子信标技术的基础上, 建立了实时 PCR 检测细菌的方法。

LMO 的毒力是由多基因决定的, 主要已发现的致病因子分为两大类, 即由 *prfA* 基因产物协同调节的毒力因子, 如 *prfA*、LMO 溶血素 (LLO)、磷脂酰肌醇特异的磷脂酶 C (PI2PLC)、卵磷脂酶操纵子和不为 *prfA* 调控的毒力因子, 如 p60 蛋白质、内毒素 *inlAB* 操纵子及其他毒力因子^[5-7]。LMO 溶血素 (LLO) 是单增李氏菌的必要致病因子。溶血实验是 LMO 与英诺克李斯特菌区别的重要生化项目。临床分离的 LMO 致病菌株全部溶血, 不溶血的菌株无毒性。LMO 溶血素 (LLO) 由 *hlyA* 基因编码, 该基因是致病性李斯特菌普遍存在的毒力基因^[8-10]。从该基因选择合适片段可作为克隆杂交分析的引物和探针, 这表明所选取的引物和探针对 LMO 特异性很高^[5]。对 28 株经 API LISTERIA 试剂条鉴定为 LMO 的菌株和 2 株标准 LMO 菌株进行荧光 PCR 检测, 结果均为阳性, 与生化鉴定结果吻合。证明运用荧光 PCR 做样品初筛和菌株鉴定, 结果可信。

将磁捕获技术与改良分子信标技术联合应用, 先用改良分子信标技术对增菌液进行初筛, 然后对初筛结果呈现阳性的增菌液用磁捕获试剂进行洗涤和浓缩, 有利于目标菌的分离和培养。与国标法相比, 经过处理的增菌液在 MMA 平板上很少杂菌生长, 容易找到目标菌落。对于个别含 LMO 较少的增菌液, 通过磁捕获试剂的浓缩作用, 降低了漏检的可能性。作者对

228 份 LB1 增菌肉汤进行荧光实时 PCR 检测, 有 8 份样品呈现阳性, 全部通过磁捕获技术分离到 LMO 菌株, 而国标法只能分离到其中的 6 份。说明通过初筛可降低工作量, 而富集能够有针对性的捕获目标, 更有利于将有限的精力用在可疑样品上。

由于荧光 PCR 灵敏度高于传统检验方法, 并将检测时间由原来的至少 5 d 缩短至 1 d, 因此在检测食品中 LMO 时, 可先用荧光 PCR 进行快速筛选, 以节省人力物力, 缩短检验时间。此法也可通过检测食品、病人呕吐物和排泄物等, 快速诊断单增李斯特菌食物中毒。

参考文献:

- [1] Flening DW, Coshi SL, MacDonald KL, et al. Pasteurized milk as vehicle of infection in an outbreak of listeriosis [J]. *New Engl J Med*, 1985, 312 (1): 404-407.
- [2] 杜蕾. 内化素基因扩增技术检测生肉中单核增生性李斯特氏菌 [J]. 首都报, 1995, 1 (专刊): 87.
- [3] WHO. Food borne Listeriosis Report of a WHO Informal Working Group [R]. Geneva: WHO, 1988.
- [4] 肖义泽, 任丽娟, 王玉, 等. 云南省首次动物性李斯特菌暴发的流行病学调查 [J]. *中华流行病学杂志*, 2000, 21 (3): 236.
- [5] 雷祚荣. 细菌毒素分子生物学 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1993. 190-200.
- [6] 陈宁庆. 实用生物毒素学 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2001. 92-104.
- [7] 姜永强. 产单核细胞李氏菌毒力因子的分子遗传学研究进展 [J]. *国外医学微生物学分册*, 1996, 19 (3): 23-25.
- [8] Datta AR, Wentz BA, Hlu W E. Detection of hemolytic *Listeria monocytogenes* by using DNA colony hybridization [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1987, 53 (9): 2256-2259.
- [9] Vines A, Swaminathan B. Nucleotide sequence analysis of two virulence-associated genes in *Listeria monocytogenes* serotype 1/2b and comparison with the same genes in other serotypes important in human disease [J]. *Lett Appl Microbiol*. 1997, 24 (3): 166-168.
- [10] Vicente MF, F Baquero. Cloning and expression of the *Listeria monocytogenes* haemolysin in *E.coli* [J]. *FEM S Microbiol Lett*, 1985, 30 (3): 77-79.

(收稿日期: 2008-08-28)