

【论著】

改良分子信标 - 实时 PCR 快速检测产单核李斯特菌

王冰¹, 扈庆华¹, 石晓路¹, 李庆阁², 郑琳琳², 林一曼¹, 贺连华¹, 张顺祥¹

(1. 广东省深圳市疾病预防控制中心, 广东深圳 518020; 2. 厦门大学生命科学学院, 福建厦门 361005)

[摘要] 目的: 建立改良分子信标 - 实时 PCR 检测产单核李斯特菌 (LMO) 的快速方法, 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 - 实时 PCR 检测体系, 应用于食品中 LMO 检测。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。上述方法可将检测时间由原来的至少 4 d 缩短至 1 d, 对 228 份食品进行 LMO 检测, 8 份增菌液 LMO 实时荧光 PCR 阳性, 其中 6 份 LMO 细菌培养阳性。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, 能提高 LMO 的检出率和准确性, 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

[中图分类号] R378.99⁺4

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-8685(2006)06-0644-03

Rapid simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* using modified molecular beacons and real-time PCR

Wang Bin¹, Hu Qing-hua¹, Shi Xiaolu¹, Li Qing-ge², Zheng Lin-lin², Lin Yi-man¹, He Lian-hua¹, Zhang Shun-xiang¹

(1. Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518020, China; 2. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

[Abstract] **Objective** Rapid detection of *Listeria monocytogenes* (LMO) using modified molecular beacons and real-time PCR was developed. The established method was applied to an investigation of the infectious status of *Listeria monocytogenes* in food and LMO food poisoning. **Methods** One set of primers 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. **Results** For the modified molecular beacons-based real-time PCR assay, the sensitivity achieved was 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, 6 were LMO positive by modified traditional method. The detection rate of LMO in food in Shenzhen was 2.63%. **Conclusion** The modified molecular beacons-based real-time PCR assay is rapid, sensitive and specific. It could be applied to the rapid diagnosis of LMO food poisoning and investigation of the infectious status of it in food.

[Key words] *Listeria monocytogenes*; Modified molecular beacon; Real-time PCR; Detection

产单核李斯特菌 (*L. monocytogenes*, 以下简称 LMO) 广泛分布于自然界, 是一种人畜共患病的病原菌, 它能引起败血症、脑膜炎以及流产等疾病, 病死率高达 30%^[1]。WHO 已将其列为 90 年代食品四大致病菌之一^[2]。自 1926 年首次报道李斯特氏病以来, 欧美等国食源性 LMO 病爆发的报道日益增多^[3]。目前, 我国尚无食源性 LMO 病爆发流行的报道, 但是动物中的 LMO 病的爆发流行和禽肉中 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 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, 和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。

[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, 大学本科, 技师, 主要从事微生物检验研究。

1 材料与方 法

1.1 试剂

李斯特增菌肉汤基础、1% 盐酸丫 啶黄、1% 萘啶酮酸钠盐、SM 琼脂、三糖铁琼脂均由北京陆桥技术有限公司提供;羊血平板由惠安生物科技公司提供; APILISTER IA 鉴定试剂条由法国生物梅里埃公司提供; 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。

1.2 主要仪器

iCycler 实时 PCR 扩增仪 (美国 Bio-Rad 公司出品); 荧光显微镜 (型号: BX50-32E01; 日本奥林巴斯公司); Ultraspcc2000 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。详见表 1。

表 1 实验用菌株

菌株名称及菌号	英文名称	菌株数	菌株来源
甲型副伤寒沙门菌 (50001)	<i>S. paratyphi A</i>	1	检定所
乙型副伤寒沙门菌 (50004)	<i>S. paratyphi B</i>	1	检定所
丙型副伤寒沙门菌 (50007)	<i>S. paratyphi C</i>	1	检定所
伤寒沙门菌 (47727)	<i>S. typhi</i>	1	检定所
蜡样芽孢杆菌 (63301)	<i>Bacillus cereus</i>	1	检定所
弗劳地枸橼酸杆菌 (48001)	<i>Citrobacter freundii</i>	1	检定所
肉毒梭菌 (64203)	<i>Clostridium botulinum</i>	1	检定所
产芽孢梭菌 (64941)	<i>Clostridium sporogenes</i>	1	检定所
产气肠杆菌 (45103)	<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	检定所
阴沟肠杆菌 (45301)	<i>Enterobacter cloacae</i>	1	检定所
大肠埃希菌 (44104)	<i>Escherichia coli</i>	1	检定所
产单核李斯特菌 (54001-4 54007-2)	<i>Listeria monocytogenes</i>	2	检定所
奇异变形杆菌 (49003)	<i>Proteus mirabilis</i>	1	检定所
普通变形杆菌 (49001)	<i>Proteus vulgaris</i>	1	检定所
粘质沙雷氏菌 (41002)	<i>Serratia marcescens</i>	1	检定所
鲍式志贺菌 (51265)	<i>Shigella boydii</i>	1	检定所
痢疾志贺菌 (51376)	<i>Shigella dysenteriae</i>	1	检定所
福氏志贺菌 (51093)	<i>Shigella flexneri</i>	1	检定所
宋内氏志贺菌 (51081)	<i>Shigella sonnei</i>	1	检定所
金黄色葡萄球菌 (26001)	<i>Staphylococcus aureus</i>	1	检定所
粪链球菌 (33219)	<i>Streptococcus</i>	1	检定所
乙型溶血性链球菌 (32210)	<i>Streptococcus hemolyticus-β</i>	1	检定所
副溶血弧菌 (20001)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1	检定所
霍乱弧菌 (16001)	<i>Vibrio cholera</i>	1	检定所
小肠结肠炎耶尔森氏菌 (5201)	<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	检定所
产单核李斯特菌	<i>Listeria monocytogenes</i>	10	蛇口检验检疫局
产单核李斯特菌	<i>Listeria monocytogenes</i>	12	军事医学科学院
格氏李斯特菌		1	军事医学科学院
威氏李斯特菌		1	本次调查分离
英诺克李斯特菌		27	本次调查分离
产单核李斯特菌	<i>Listeria monocytogenes</i>	6	本次调查分离

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 APILISTER IA 鉴定试剂盒说明书进行检测。

1.5 模板提取

(1)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/ml 溶菌酶, 37℃ 作用 1 h, 然后再加入终浓度为 1% SDS 和 0.2 μg/ml 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

采自深圳市某肉菜市场、深圳市某超市、深圳市某牛奶厂、深圳市进出口检疫局蛇口分局、深圳市各商场及食品厂家等各类样品共 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), 在 4℃ 保存, 4 h 内送达实验室 (如不马上增菌则放置 -20℃ 保存)。

1.7 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, 重复用灭菌三蒸水洗涤三次, 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。

1.8 改良分子信标检测体系的建立

1.8.1 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。

1.8.2 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/L MgCl₂, 0.25 mmol/L dNTP, 1 U Taq 酶, 25 μmol 引物, 25 μmol 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。

1.8.3 特异性检测 抽提表一列细菌的 DNA, 对 hlyA 基因进行改良分子信标实时 PCR 扩增。

1.8.4 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 Ultraspcc2000 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。

1.9 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 APILISTER IA 鉴定试剂条), 运用于 228 份各类食品的检测。

2 结果与分析

2.1 IMO 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 IMO 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 cfu 菌液灵敏度为 80 cfu/ml 或 4 cfu/PCR 反应体系。

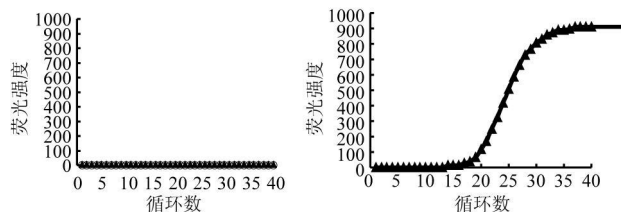


图 1 分子信标-荧光 PCR检测 LMO hlyA

左图: 空白; 右图: hlyA(+)

2.1.3 灵敏度结果 DNA 灵敏度为 110 fg 菌液灵敏度为 99 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, 荧光 PCR 法检测出阳性标本 8 份, 总污染率为 2.63% (6/228)。

表 2 5 类食品 LMO 检出情况

类别	检测份数	阳性份数		污染率	
		国标法	荧光 PCR 法	国标法	荧光 PCR 法
生肉	96	0	0	0	0
冻肉	25	1	2	4%	8%
冻禽	51	3	3	5.88%	5.88%
生奶	40	0	0	0	0
速食类冻品	16	2	3	12.5%	18.7%
总数	228	6	8	2.63%	3.5%

3 讨论

我们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。研究表明: (1)此方法灵敏度高, 每毫克或每毫升样品含 99 cfu 细菌, 即可检出。(2)特异性强, 与对照组 27 种细菌无交叉反应, 即类似的肠道致病菌均呈阴性。(3)操作简单, 结果观察直观明了, 可一次检测 96 份标本 (含阴阳性对照)。(4)适用于 LMO 食物中毒的快速诊断和大量样品的检测。检测食品标本需 1 天半时间 (包括样品的增菌和前期处理)。传统的细菌学检验方法主要是细菌培养和生化鉴定法, 需要 4 天完成, 而且操作繁琐, 检出率低。而实时 PCR 检测时间短, 检出率高, 在实时 PCR 研究的基础上, 可进一步实现双重或多重实时 PCR, 同时诊断 10 种食源性致病菌, 满足常见细菌性食物中毒快速诊断的要求。

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。

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、内化素 inlA 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针对 LMO 特异性很高^[5]。

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, 其中 6 份样品能通过国标法分离到 LMO 菌株。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。

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] Fleming DW, Cosh 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] 韩怀忠. 食源性李斯特氏菌病 [J]. 中国食品卫生杂志, 1993, 8(5): 49.
- [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, Hu WE. 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, Baquero CB. Isolation and expression of the *Listeria monocytogenes* haemolysin in *E. coli* [J]. FEM S Microbiol Lett 1985, 30(3): 77-79.

(收稿日期: 2006-03-03)