

实验技术与方法

GeXP 多重聚合酶链式反应法检测 5 种常见食源性致病菌

杨梦婕¹, 任佳², 李洋¹, 马学军¹

(1. 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 北京 102206;

2. 郑州大学第一附属医院, 河南 郑州 450052)

摘要:目的 建立一种基于 GeXP (GenomeLab™ eXpress Profiling) 遗传分析系统的 5 种常见食源性致病菌检测的新技术。方法 针对 5 种常见食源性致病菌 (沙门菌、大肠埃希菌 O157:H7、单核细胞增生李斯特菌、志贺菌和副溶血性弧菌) 分别进行基因序列比对 (*invA*、*rfbE*、*PfrA*、*IpaH*、*tlh* 基因), 设计特异性引物, 建立并优化 GeXP 多重聚合酶链式反应 (PCR) 体系, 评价其特异性和灵敏性, 并初步应用于未知菌株和人工污染样品的检测。结果 GeXP 多重 PCR 法可实现在 5 h 内同时对 5 种常见食源性致病菌进行检测, 且检测灵敏度可低至 10^3 CFU/mL。多重体系中各引物对各目标菌有较强特异性, 未检出其他非目标菌。结论 本方法可有效提高检测效率, 为食源性致病菌的快速高通量检测提供了参考思路。

关键词: GeXP 多重聚合酶链式反应; 沙门菌; 大肠埃希菌 O157:H7; 单核细胞增生李斯特菌; 志贺菌; 副溶血性弧菌; 检测

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2020)04-0386-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2020.04.007

Detection of 5 kinds of common foodborne pathogens by GeXP multiplex polymerase chain reaction

YANG Mengjie¹, REN Jia², LI Yang¹, MA Xuejun¹

(1. National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; 2. The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Henan Zhengzhou 450052, China)

Abstract: Objective To establish a new and rapid GeXP (GenomeLab™ eXpress Profiling) based multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of five common foodborne pathogens. **Methods** Nucleotide sequences of specific gene (*invA*, *rfbE*, *PfrA*, *IpaH*, *tlh*) of the five pathogens (*Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Shigella*, *Vibrio parahaemolyticus*) were obtained and compared. The primers were then designed and the multiplex PCR assay was evaluated. Optimized assay was further validated with the detection of the unknown strains and artificially contaminated samples. **Results** The GeXP multiplex PCR with five sets of specific primers can be used to detect five foodborne pathogens simultaneously within 5 hours. The specificity was examined by specimens confirmed previously. The detection limit was 10^3 CFU/mL. **Conclusion** The results suggested this GeXP multiplex PCR assay was a fast, high throughput test for foodborne bacterial pathogens.

Key words: GeXP multiplex polymerase chain reaction; *Salmonella*; *Escherichia coli* O157:H7; *Listeria monocytogenes*; *Shigella*; *Vibrio parahaemolyticus*; detection

食品安全问题是世界范围内举足轻重的公共卫生问题, 直接关系到人们的身体健康和安危。引

起食品安全的危害因子中食源性致病菌以来源多样、能在食品中迅速繁殖为特点而成为首要的食品安全危害因子^[1], 因此建立快速敏感和特异的检测方法对于预防控制食源性致病菌引起的疾病是非常必要的。沙门菌作为人畜共患的肠道致病菌, 其导致的食物中毒数量一直处于世界食物中毒病例前列^[2]; 志贺菌通称痢疾杆菌, 是引起人类细菌性痢疾的主要病原菌, 全球每年因其感染而死亡的人数多达百万人, 2/3 为 5 岁以下儿童^[3]; 副溶血性弧

收稿日期: 2020-04-26

基金项目: 国家传染病重大专项 (2017ZX10104001-002, 2018ZX10711001, 2018ZX10713-002)

作者简介: 杨梦婕 女 助理研究员 研究方向为病原体检测

E-mail: mjiangok@163.com

通信作者: 马学军 男 研究员 研究方向为病原体核酸检测新技术 E-mail: maxj@ivdc.chinacdc.cn

菌被认为在其存在下,摄入生的或未煮熟的海产品是诱发人类疾病的一个危险因素^[4];单核细胞增生李斯特菌广泛存在于水、土壤、食品、动物和人类等多种环境中,易导致全熟食品在后续加工和保藏过程中受其污染^[5];大肠埃希菌 O157:H7 是以牛、羊、猪和鸡等家畜家禽为主要宿主的一种食源性致病菌,可感染任何年龄段的健康人群,致病性强、致死率高,对人们的健康造成了巨大的威胁^[6]。

目前食品致病菌传统的检测方法主要是采用选择性培养基分离培养、生化反应鉴定等方法,耗时费力,难以适应现代食品生产的检验需要。GeXP (GenomeLab™ eXpress Profiling) 遗传分析系统是主要用于研究多基因表达定量分析的技术平台,其毛细管电泳可以区分相差 5 bp 的 PCR 产物,故可以同时检测多达 30 个基因的表达丰度,目前已广泛用于多基因表达调控、癌症早期诊断研究^[7-8]等。鉴于其通量高的优势,本试验基于该系统建立一种可以同时检测沙门菌、大肠埃希菌 O157:H7、单核细胞增生李斯特菌、志贺菌和副溶血性弧菌的多重聚合酶链式反应(PCR)方法,以期为食源性疾病暴发和食物中毒应急处置提供新的检测技术支持。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株来源

5 株目标菌株:沙门菌标准菌株[CMCC(B) 50115]、志贺菌标准菌株[CMCC(B) 51592]、副溶血性弧菌标准菌株(ATCC 17082)、单核细胞增生李斯特菌标准菌株(ATCC 19115)、大肠埃希菌 O157:H7 标准菌株(CI21530CC),以及金黄色葡萄球菌标准菌株(ATCC 13565)和 12 份未知菌株,均由上海 SCIEX 公司提供。所有菌株由 SN/T 2641—2010《食品中常见致病菌检测 PCR-DHPLC》^[9]方法确认。

1.1.2 主要仪器与试剂

PCR 扩增仪(美国 Thermo),GeXP 遗传分析系统及配套试剂耗材均购自美国贝克曼库尔特。细菌基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司),营养肉汤、琼脂等均购自青岛海博生物技术有限公司,Ex Taq 酶(RR001A,日本 TaKaRa)。

1.2 方 法

1.2.1 引物的设计与特异性验证

引物序列参考 SN/T 2641—2010^[9],在所有正向引物和反向引物的 5' 端分别加入一段非同源性特异序列构成特异性引物,该非同源性特异序列作为通用引物(Tag)。Tag 序列为 Tag-F: 5'-AGGTG

ACACTATAGAATA-3' 和 Tag-R: 5'-GTACGACTCAC TATAGGGA-3',其中 Tag-F 的 5' 端标记荧光染料 Cy5,即 Cy5-Tag-F。本试验所用引物均由上海英潍捷基公司合成,其中 Cy5-Tag-F 采用高效液相色谱(HPLC)纯化方式,其他引物均采用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)纯化。

采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒按照产品说明书抽取菌液基因组 DNA。分别用 5 种目标菌的菌液 DNA 作为模板,金黄色葡萄球菌 DNA 为阴性对照,双蒸水作为空白对照,用常规 PCR 法进行各型目的基因的 PCR 扩增。PCR 反应体系(25 μ L): Ex Taq 酶 0.125 μ L,10 \times Buffer 2.5 μ L,dNTP 2 μ L,正反向特异性引物(10 μ mol/L)各 3 μ L,DNA 模板 2 μ L,灭菌双蒸水补足至 25 μ L。扩增条件:98 $^{\circ}$ C 变性 10 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 个循环;4 $^{\circ}$ C 保存。取 PCR 产物分别放入 GeXP CE analyzer 中进行毛细管电泳进行片段分析,确定各目的基因扩增片段的实际大小与预期是否一致。

1.2.2 GeXP 多重 PCR 体系的建立及特异性分析

将 5 种目标菌株及内参基因 *gapdh* 的正反向特异性引物分别取等量进行混合配制多重特异性混合引物,使其终浓度为 1 μ mol/L。该多重体系中,多重特异性混合引物浓度和通用引物浓度及反应条件经过多次优化及反复验证后,最终确定采用 50 μ L PCR 反应体系:Ex Taq 酶 0.25 μ L,多重特异性混合引物 2 μ L,正反向通用序列引物(10 μ mol/L)各 2 μ L,DNA 模板 1 μ L,灭菌双蒸水补足至 50 μ L。扩增条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 15 s;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,10 个循环;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,65 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,10 个循环;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,48 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,20 个循环;4 $^{\circ}$ C 保存。将沙门菌、志贺菌、副溶血性弧菌、单核细胞增生李斯特菌、大肠埃希菌 O157:H7、金黄色葡萄球菌和人基因组 7 种 DNA 混合作为模板,用该多重特异性混合引物进行多重 PCR 扩增,扩增结束后取 1 μ L PCR 产物放入 GeXP CE analyzer 中进行毛细管电泳分析。

1.2.3 GeXP 多重 PCR 体系的灵敏度分析

为了测试本方法可以实现单管同时检测 5 种目标菌株,将上述 5 种目标菌的菌悬液(10^6 CFU/mL)各 1 mL 混合,10 倍梯度稀释后进行基因组 DNA 提取,用优化过的 GeXP 多重 PCR 进行最低检测限的分析。检测体系和反应条件同 1.2.2。

1.2.4 GeXP 多重 PCR 体系应用于未知菌株及人工模拟样品检测

以不含 5 种目标菌的牛奶、苹果汁和鸡肉作为

载体,将已经计数的5种目标菌以随机组合方式分别添加到上述3种载体,构建人工污染样品40份,致病菌浓度为 $10^3 \sim 10^6$ CFU/mL。对40份污染样品及12株未知菌株进行基因组DNA提取,进行GeXP多重PCR法扩增,检测体系和反应条件同1.2.2,检测结果与实际人工污染情况进行比较。

2 结果与分析

2.1 引物设计及特异性验证

本试验所用引物序列和产物大小详见表1。分

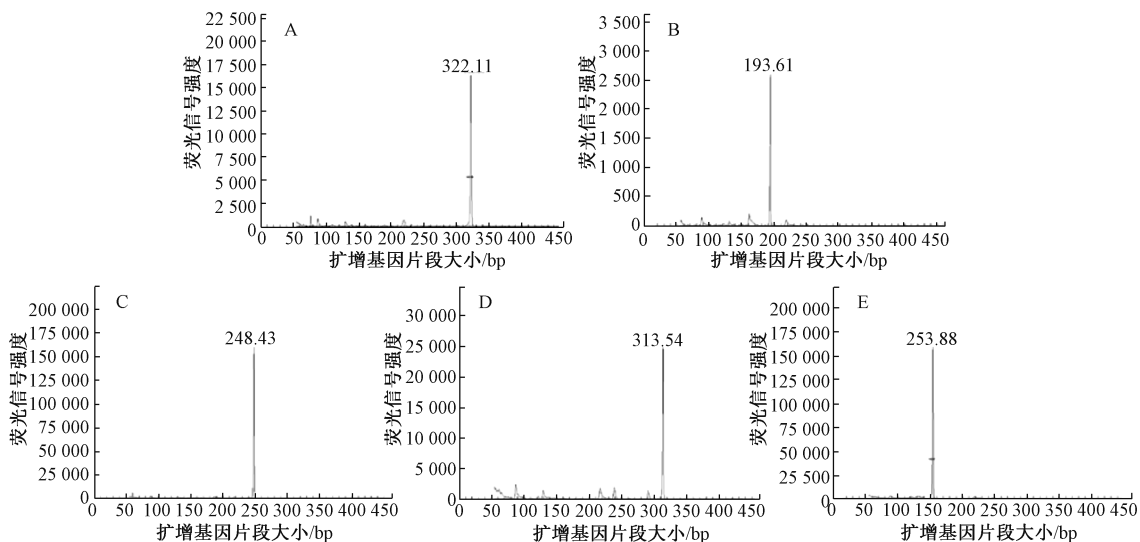
别以沙门菌、志贺菌、副溶血性弧菌、单核细胞增生李斯特菌、大肠埃希菌 O157:H7 的基因组 DNA 作模板,用金黄色葡萄球菌基因组 DNA 作为阴性对照,双蒸水作空白对照,进行 PCR 扩增,结果表明,沙门菌、志贺菌、副溶血性弧菌、单核细胞增生李斯特菌、大肠埃希菌 O157:H7 五种目标菌各自的 PCR 产物大小与设计完全一致,且每种菌的特异性引物只针对该种菌,与金黄色葡萄球菌均无交叉反应,且5种目标菌之间亦无交叉反应,说明引物的特异性好,结果见图1。

表1 引物序列与目的扩增产物大小

Table 1 Sequences of the primers and the size of the PCR products

目的基因	引物序列(5'-3')	产物大小/bp
<i>invA</i>	F: <u>AGGTGACACTATAGAATATCATCGCACCGTCAAAGGAACC</u> R: <u>GTACGACTCACTATAGGGAGTGAATTATCGCCACGTTGGGCCAA</u>	322
<i>IpaH</i>	F: <u>AGGTGACACTATAGAATAAGAGGGAGAACCAGTCCGTAA</u> R: <u>GTACGACTCACTATAGGGACCAGACCATGCTCGCAGA</u>	195
<i>tlh</i>	F: <u>AGGTGACACTATAGAATAAAAGCGGATTATGCAGAAGCACTG</u> R: <u>GTACGACTCACTATAGGGAACGTGATGTGTAAACCTTGCCTT</u>	250
<i>PfrA</i>	F: <u>AGGTGACACTATAGAATAAGTGAATCTTGATGCCATCAG</u> R: <u>GTACGACTCACTATAGGGAGATACAGAAACATCGGTTGGC</u>	313
<i>rfbE</i>	F: <u>AGGTGACACTATAGAATAAGTCTGGACTCAACGTGGATTTC</u> R: <u>GTACGACTCACTATAGGGAAGCAACCGTCCATTACTACAG</u>	155
<i>gapdh</i>	F: <u>AGGTGACACTATAGAATAAAGCTGAGTCATGGGTAGTTGG</u> R: <u>GTACGACTCACTATAGGGAAGGAGTGGGAGCACAGGTAAG</u>	390

注:下划线表示上、下游通用引物序列



注:A~E 分别表示沙门菌、志贺菌、副溶血性弧菌、单核细胞增生李斯特菌、大肠埃希菌 O157:H7

图1 5种目标菌的PCR引物特异性验证结果

Figure 1 Specificity of primers for 5 species of target pathogens

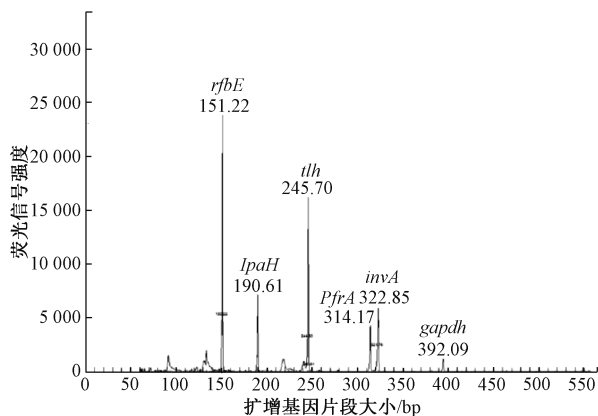
2.2 GeXP 多重 PCR 检测体系的建立及特异性验证

以沙门菌、志贺菌、副溶血性弧菌、单核细胞增生李斯特菌、大肠埃希菌 O157:H7、金黄色葡萄球菌和人基因组7种DNA混合作为模板,用6对引物(除金黄色葡萄球菌外)混合液做多重PCR扩增,

结果同时扩增出6个特异性峰,未出现非特异性峰扩增,表明本试验所用多重检测体系可同时检测5种目标菌且特异性好,结果见图2。

2.3 GeXP 多重 PCR 检测体系的灵敏度

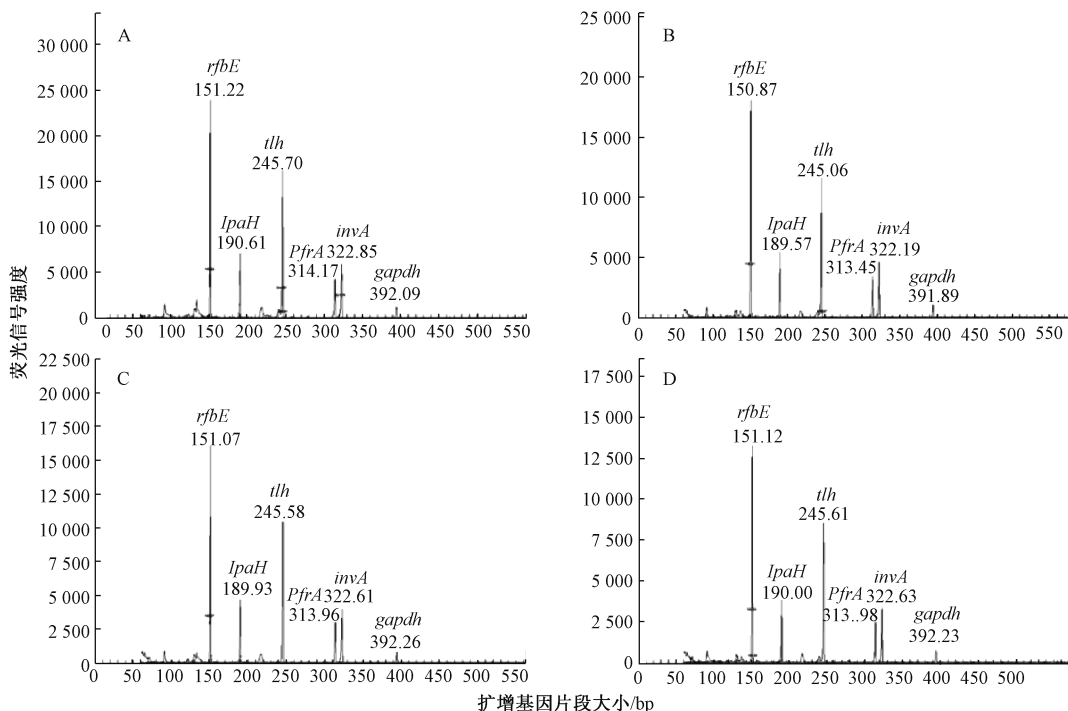
按照优化好的 GeXP 多重 PCR 反应条件,以沙门菌、志贺菌、副溶血性弧菌、单核细胞增生李斯特



注:6 个峰从左到右依次为大肠埃希菌 O157:H7、志贺菌、副溶血性弧菌、单核细胞增生李斯特菌、沙门菌、内参基因

图 2 GeXP 多重 PCR 检测体系特异性分析

Figure 2 Specificity results of GeXP multiplex PCR system



注:A~D 分别为混合模板量为 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 CFU/mL 的多重 PCR 扩增结果

图 3 GeXP 多重 PCR 的灵敏度检测

Figure 3 Sensitivity results of GeXP multiplex PCR system

结果显示,所建立的 GeXP 多重 PCR 法对 40 份人工污染样品的检出率均为 100%,未出现假阳性或假阴性,说明本方法对食品中上述 5 种致病菌的同时检测有良好的特异性。

3 讨论

目前,国家行业标准中对本试验中 5 种常见食源性致病菌(沙门菌、大肠埃希菌、单核细胞增生李斯特菌、志贺菌和副溶血性弧菌)的检测主要依靠传统的细菌培养、生化鉴定的方法,步骤复杂,检测周期长(3~7 d),灵敏度有限,无法满足食源性疾

菌、大肠埃希菌 O157:H7 浓度分别为 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 CFU/mL 的 DNA 混合液作为待检样品,进行该方法的灵敏度分析。结果表明,在 10^3 CFU/mL 水平可以同时特异检测出 5 种目标菌。每个浓度均在非同日重复三次,获得的结果相同(变异系数 < 10%),结果见图 3。

2.4 GeXP 多重 PCR 体系初步应用于未知菌株及人工模拟样品检测

12 株未知菌株检测出沙门菌 2 株,单核细胞增生李斯特菌、大肠埃希菌 O157:H7、志贺菌各 1 株,阴性 7 株(即非 5 种目标菌),以上阳性结果均由 SN/T 2641—2010^[9] 验证,结果完全一致。将 5 种致病菌随机组合的人工污染牛奶、苹果汁和鸡肉样品 40 份提取基因组 DNA 进行 GeXP 多重 PCR 检测,

暴发和食物中毒应急处置应对检测方法快速、准确、高效的要求。多重 PCR 因快捷、经济及检测通量等方面的优势,近年来在感染性疾病领域中得以广泛应用,成为识别病毒、细菌、真菌的有效方法,已有学者将其运用到食源性致病菌方面的检测。但常规的多重 PCR 存在引物间相互干扰、非特异扩增、扩增偏爱性、扩增产物需要相差一定大小才能区分而导致的相对通量低等问题。而本试验建立的 GeXP 多重 PCR 是基于 GeXP 基因表达谱定量分析平台^[10],该平台是基于多重 PCR 技术、毛细管电泳分离技术与高灵敏激光诱导荧光技术的一种检

测分析系统^[11],具有以下优势:将荧光标记的通用引物与特异性引物按照一定的比例同时加入一个PCR反应体系,数个反应循环后,由占主导地位的通用引物引发后续扩增,有效避免扩增偏爱性问题;毛细管电泳分离检测多重PCR产物,根据片段大小判断不同目的基因,根据荧光信号强度不同显示模板含量的差别;高通量基因表达,每次反应可以分析多达30种基因^[12]。本实验室在前期工作中已运用该技术检测了基因多态性与先天性疾病的相关性^[13]、人乳头瘤病毒(HPV)^[14]和转基因食品^[15]等。

本试验建立的常见5种食源性致病菌的GeXP多重PCR检测法,特异性好,仅扩增5种目标菌,扩增时单管闭合操作,降低了交叉污染的可能性,且同时单管检测5种目标菌的检测限为 10^3 CFU/mL,与文献报道^[16]相似,同时对40份人工污染样品进行检测,未出现假阳性或假阴性,检测结果与实际污染状况相符。下一步拟继续优化反应体系以期进一步提高灵敏度并扩大致病菌检测范围,争取实现更高通量的检测,有效地提升食品安全工作的质量和工作效率在食品安全监管等领域具有较强的实际应用价值。

参考文献

- [1] VELUSAMY V, ARSHAK K, KOROSTYNSKA O, et al. An overview of foodborne pathogen detection: in the perspective of biosensors[J]. *Biotechnol Adv*, 2010, 28(2): 232-254. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2009.12.004.
- [2] MAZUREK J, SALEHI E, PROPES D, et al. A multistate outbreak of *Salmonella enterica* serotype typhimurium infection linked to raw milk consumption-Ohio, 2003[J]. *J Food Prot*, 2004, 67(10): 2165-2170. DOI: 10.4315/0362-028x-67.10.2165.
- [3] 祝寒松,洪荣涛,欧剑鸣,等.福建省2005—2011年细菌性痢疾流行病学分析[J]. *中国预防医学杂志*, 2013, 14(4): 288-291.
- [4] CECCARELLI D, HASAN N A, HUQ A, et al. Distribution and dynamics of epidemic and pandemic *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2013, 3(97): 97. DOI: 10.3389/fcimb.2013.00097.
- [5] WALKER S J, ARCHER P, BANKS J G. Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures [J]. *J Appl*

Bacteriol, 1990, 68(2): 157-162. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1990.tb02561.x.

- [6] TORSO L M, VOORHEES R E, FOREST S A, et al. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak associated with restaurant beef grinding[J]. *J Food Prot*, 2015, 78(7): 1272-1279. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-14-545.
- [7] RAI A J, KAMATH R M, GERALD W, et al. Analytical validation of the GeXP analyzer and design of a workflow for cancer-biomarker discovery using multiplexed gene-expression profiling[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 393(5): 1505-1511. DOI: 10.1007/s00216-008-2436-7.
- [8] QIN M, WANG D Y, HUANG F, et al. Detection of pandemic influenza A H1N1 virus by multiplex reverse transcription-PCR with a GeXP analyzer[J]. *J Virol Methods*, 2010, 168(1/2): 255-258. DOI: 10.1016/j.jviromet.2010.04.031.
- [9] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫局. 食品中常见致病菌检测 PCR-DHPLC 方法: SN/T 2641—2010 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [10] YUAN Y X, WU H L, WANG N, et al. FIT interacts with AtbHLH38 and AtbHLH39 in regulating iron uptake gene expression for iron homeostasis in *Arabidopsis* [J]. *Cell Res*, 2008, 18(3): 385-397. DOI: 10.1038/cr.2008.26.
- [11] CHAMBERLAIN J S, GIBBS R A, RANIER J E, et al. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification [J]. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16(23): 11141-11156. DOI: 10.1093/nar/16.23.11141.
- [12] 胡凌, 林星宇, 王印, 等. GeXP 多重基因表达分析系统研究进展[J]. *畜牧与兽医*, 2016, 48(1): 128-131.
- [13] 冯志山, 赵梦川, 王乐, 等. GeXP 多重分析技术对四氢叶酸还原酶基因多态性与先天性心脏病相关性的研究[J]. *河北医药*, 2016, 38(8): 1143-1146.
- [14] YANG M J, LUO L, NIE K, et al. Genotyping of 11 human papillomaviruses by multiplex PCR with a GeXP analyzer[J]. *Journal of Medical Virology*, 2012, 84(6): 957-963. DOI: 10.1002/jmv.23275.
- [15] 芦春斌, 杨梦婕, 吴希阳, 等. 多重基因表达遗传分析系统在转基因食品检测中的应用[J]. *中华预防医学杂志*, 2011, 45(4): 359-361. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2011.04.015.
- [16] CHIANG Y C, TSEN H Y, CHEN H Y, et al. Multiplex PCR and a chromogenic DNA macroarray for the detection of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterobacter sakazakii*, *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp. and *Pseudomonas fluorescens* in milk and meat samples [J]. *J Microbiol Methods*, 2012, 88(1): 110-116. DOI: 10.1016/j.mimet.2011.10.021.