

四种食源性致病菌多重 PCR 检测方法的建立

姜侃 张东雷 金燕飞 陈小珍

浙江省质量技术监督检测研究院, 杭州 310013



摘要:目的 建立一种多重 PCR 检测方法同时检测食品中沙门菌、志贺菌、金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌。方法 参考沙门菌侵袭蛋白 A (*invA*) 基因序列,志贺菌侵袭性质粒抗原 (*ipaH*) 基因序列,金黄色葡萄球菌引物设计参考耐热核酸酶 (*nuc*) 基因序列,单增李斯特菌引物设计参考溶血素蛋白 (*hly*) 基因序列设计引物,通过多重 PCR 对 4 种食源性致病菌的目的基因进行扩增,并对反应体系进行优化。结果 对 15 株目标菌和 17 株非目标菌的检测未出现假阳性和假阴性结果,产物分子量与预期一致;4 种菌的检测灵敏度分别至少达到 $10\text{pg}/\mu\text{l}$;对产物的测序分析表明所得序列与目的基因序列吻合;对 319 份样品的检测结果显示,其中 4 份生鲜乳中检出金黄色葡萄球菌,1 份生猪肉中检出沙门菌。结论 该方法具有良好的检测特异性,可供食源性致病菌的快速检测。

关键词: 食源性致病菌 沙门菌 志贺菌 金黄色葡萄球菌 单增李斯特菌 多重 PCR 食品安全
中图分类号: R155.51 文献标识码: A

Establishment of a multiplex PCR detection method for four foodborne pathogens

JIANG Kan, ZHANG Donglei, JIN Yanfei, CHEN Xiaozhen

Zhejiang Test Academy of Quality and Technical Supervision, Hangzhou 310013, China

Abstract: Objective To establish a multiplex PCR method for simultaneous detection of *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in food. **Method** The primers were designed according to the sequences of *invA* gene of *Salmonella*, *ipaH* gene of *Shigella*, *nuc* gene of *Staphylococcus aureus* and *hly* gene of *Listeria monocytogenes*, and the reaction system was optimized. **Results** No false positive and false negative results occurred during the test of 15 target strains and 17 non-target strains of bacteria, and the molecular weight of PCR products were consistent with expected. The detection limits for each pathogen were at least $1\text{pg}/\mu\text{l}$. The sequence analysis of PCR products showed the same sequences with target genes. The test result of 319 samples showed that 4 raw milk samples were contaminated by *staphylococcus aureus*, and 1 raw pork sample by *Salmonella*. **Conclusion** The established method showed good specificity, and provided an important method for the rapid detection of foodborne pathogens.

Key words: foodborne pathogen, *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, multiplex PCR, food safety

食品安全是各国关注的重大问题,而其中食源性致病菌是影响食品安全的主要原因之一。根据现行国家食品安全监管体系,沙门菌 (*Salmonella* spp)、志贺菌 (*Shigella* spp)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和单增李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 均属重点关注的食源性致病菌。目前对这几种致病菌的检测主要采用传统培养法^[1-3],但存在着操作繁琐、时间长、灵敏度低、出现假阴性等缺点,并受到检测人员专业、经验等多种因素限制,在应对突发公共卫生事件上

不能够满足及时诊断的要求。

多重 PCR 技术能在同一 PCR 反应体系内实现对多种病原体 DNA 的同步快速扩增,为病原微生物的鉴定提供了快速、灵敏、特异、经济的方法。本实验分别以沙门菌侵袭蛋白 A (*invA*) 基因、志贺菌侵袭性质粒抗原 (*ipaH*) 基因、金黄色葡萄球菌耐热核酸酶 (*nuc*) 基因,单增李斯特菌溶血素蛋白 (*hly*) 基因为靶基因,建立一种稳定、高灵敏度和特异性的多重 PCR 体系同时检测食品中沙门菌、志贺菌、金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌,为食品安全检测提供重要技术手段。

基金项目: 浙江省科技厅优先主题重点社会发展项目 (No. 2009C13013)

作者简介: 姜侃,男,硕士,研究方向: 免疫学与微生物学

1 通讯作者: 张东雷, E-mail: fyzd1@163.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 沙门菌 6 株,志贺菌 4 株,金黄色葡萄球菌 3

株,单增李斯特菌 2 株,阴性对照菌株 17 株(见表 1)。

表 1 实验菌株
Table 1 Strains for testing

序号	菌种	菌种编号
1	鼠伤寒沙门菌(<i>Salmonella typhimurium</i>)	ATCC 14028
2	猪霍乱沙门菌(<i>Salmonella cholerae-suis</i>)	CICC 21493
3	亚利桑纳沙门菌(<i>Salmonella arizona</i>)	CICC 21506
4	甲型副伤寒沙门菌(<i>Salmonella paratyphi-A</i>)	CICC 21501
5	乙型副伤寒沙门菌(<i>Salmonella paratyphi-B</i>)	CICC 21495
6	丙型副伤寒沙门菌(<i>Salmonella paratyphi-C</i>)	CICC 21512
7	福氏志贺菌(<i>Shigella flexneri</i>)	ATCC 12022
8	痢疾志贺菌(<i>Shigella dysenteriae</i>)	ATCC 51252
9	宋内志贺菌(<i>Shigella sonnei</i>)	ATCC 25931
10	鲍氏志贺菌(<i>Shigella boydii</i>)	ATCC 9207
11	金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>)	ATCC 6538
12	金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>)	ATCC 25923
13	金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>)	ATCC 27217
14	单增李斯特菌(<i>Listeria monocytogenes</i>)	ATCC 19114
15	单增李斯特菌(<i>Listeria monocytogenes</i>)	ATCC 19115
16	无害李斯特菌(<i>Listeria innocua</i>)	ATCC 33090
17	威氏李斯特菌(<i>Listeria welshimeri</i>)	CICC 21672
18	斯氏李斯特菌(<i>Listeria seeligeri</i>)	CICC 21671
19	伊氏李斯特菌(<i>Listeria ivanovii</i>)	CICC 21663
20	格氏李斯特菌(<i>Listeria grayi</i>)	CICC 21670
21	表皮葡萄球菌(<i>Staphylococcus epidermidis</i>)	ATCC 12228
22	腐生葡萄球菌(<i>Staphylococcus saprophyticus</i>)	ATCC 49453
23	粪肠球菌(<i>Enterococcus faecalis</i>)	CICC 23536
24	屎肠球菌(<i>Enterococcus faecium</i>)	CICC 21605
25	副溶血弧菌(<i>Vibrio parahaemolyticus</i>)	CICC 21528
26	铜绿假单胞菌(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	ATCC 15442
27	大肠埃希菌(<i>Escherichia coli</i>)	ATCC 25922
28	阪崎肠杆菌(<i>Enterobacter sakazakii</i>)	ATCC 51329
29	奇异变形杆菌(<i>Proteus mirabilis</i>)	CICC 23676
30	杨氏柠檬酸杆菌(<i>Citrobacter youngae</i>)	CICC 21596
31	蜡样芽孢杆菌(<i>Bacillus cereus</i>)	ATCC 11778
32	乙型溶血性链球菌(<i>Streptococcus hemolytic-β</i>)	CMCC 32210

表 2 多重 PCR 检测引物组
Table 2 Primers for multiplex PCR

菌种	引物名称	序 列	位置 (bp)	引物长度 (bp)	产物长度 (bp)
沙门菌	invA-31	CGATATTGCTGTTTATGGGGTCGT	143 ~ 166	24	430
	invA-21	TTCATCGCACCGTCAAAGGAACCG	572 ~ 549	24	
志贺菌	ipaH-12	GGATTCCTGAAACAGGTCG	153 ~ 171	19	595
	ipaH-23	CGCTCAGACCTGATGCTTTCA	747 ~ 727	21	
金黄色葡萄球菌	nuc-14	TTACATAAAGAACCTGCGACATT	256 ~ 278	23	254
	nuc-22	TACGCTAAGCCACGTCCAT	509 ~ 491	19	
单增李斯特菌	hly-11	ATCTCCGCTGCAAGTCCT	129 ~ 147	19	973
	hly-22	GGGTAAGTCTCCGAGTTGC	1101 ~ 1082	20	

1.2.4 多重 PCR 反应 多重反应体系为 25 μl,组分详见表 3。多重 PCR 的反应条件为 95℃ 5min; 95℃ 30s, 63℃ 30s, 72℃ 100s, 35 个循环; 72℃ 7min 4℃ 保存。

1.2.5 特异性验证 用 15 株目标菌和 17 株非目标菌基因组 DNA 分别进行 PCR 反应,验证该方法检测沙门菌、志贺菌、金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌的特异性。在验证多重检测特异性时,将鼠伤寒沙门菌(ATCC 14028)、福氏志贺菌

1.1.2 试剂 细菌基因组 DNA 抽提试剂盒、PCR 产物胶回收试剂盒为 Qiagen 公司产品,沙门菌、金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌复合增菌液(SSL 肉汤复合增菌液)^[3]、营养肉汤、葡萄糖肉浸液肉汤、缓冲蛋白胍水、GN 增菌液、7.5% 氯化钠肉汤、李斯特菌增菌液等培养基均为青岛海博生物技术有限公司产品,10 × PCR Buffer(含 Mg²⁺ 2mmol)、Ex Taq DNA 聚合酶和 Marker DL2000 为 TAKARA 公司产品,dNTP 为 Promega 公司产品,琼脂糖为 Biowest 公司产品,BigDye 测序试剂盒为 AB 公司产品。

1.1.3 仪器 基础电泳仪、自动凝胶电泳成像系统均为 Bio-Rad 产品,Veriti 梯度 PCR 仪、3730DNA 测序仪为 AB 公司产品,DU800 核酸蛋白分析仪为 Beckman 公司产品。

1.1.4 引物 沙门菌引物设计参考 *invA* 基因序列(Genebank NC_003198.1),志贺菌引物设计参考 *ipaH* 基因序列(Genebank AY206449.1),金黄色葡萄球菌引物设计参考 *nuc* 基因序列(Genebank NC_002952.2),单增李斯特菌引物设计参考 *hly* 基因序列(Genebank NC_003210.1),具体引物序列详见表 2,引物序列均经 blast 验证。所有引物均由 Invitrogen 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 菌种纯化 将各菌株分别接种于营养肉汤(乙型溶血性链球菌接种于葡萄糖肉浸液肉汤,李斯特菌接种于李斯特菌增菌液)中,36℃ 培养 24h 进行增菌,分别提取增菌液培养产物 DNA。

1.2.2 细菌 DNA 提取及混合 DNA 模板液的制备 细菌 DNA 提取采用 QIAGEN 细菌 DNA 提取试剂盒,操作步骤严格按照试剂盒说明书。将鼠伤寒沙门菌(ATCC 14028)、福氏志贺菌(ATCC 12022)和金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)、单增李斯特菌(ATCC 19114)基因组 DNA 提取液等比例混合,作为标准混合 DNA 模板。

1.2.3 引物工作液配制 将各引物配制成浓度为 10 μmol/L 的溶液,备用。

(ATCC 12022)、金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)和单增李斯特菌(ATCC 19114)基因组 DNA 提取液分别组合,并以英诺克李斯特菌、表皮葡萄球菌、粪肠球菌、副溶血弧菌、大肠埃希菌 DNA 混合液为干扰背景,从而进一步验证该方法的特异性。

1.2.6 产物测序分析 将反应体系扩大至 100 μl,加入标准混合 DNA 模板进行多重 PCR 扩增,对反应产物进行电泳后,

表 3 多重 PCR 反应体系组成
Table 3 Composition of multiplex PCR

组分	量
引物 <i>invA</i> -31 和 <i>invA</i> -21 (10 μ mol/L)	各 0.1 μ l
引物 <i>ipaH</i> -12 和 <i>ipaH</i> -23 (10 μ mol/L)	各 0.1 μ l
引物 <i>nuc</i> -14 和 <i>nuc</i> -22 (10 μ mol/L)	各 0.5 μ l
引物 <i>hly</i> -11 和 <i>hly</i> -22 (10 μ mol/L)	各 0.25 μ l
混合 DNA 模板	4 μ l
Taq DNA 聚合酶	1U
10 \times PCR 缓冲液	2.5 μ l
dNTP 混合液(10mmol/L)	2 μ l
无菌超纯水	补足至 25 μ l

分别割胶回收各电泳条带,并分别应用扩增引物对相应分子量的目的片段进行测序分析,确证该方法的检测特异性。

1.2.7 检测灵敏度分析 将鼠伤寒沙门菌(ATCC 14028)、福氏志贺菌(ATCC 12022)、金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)和单增李斯特菌(ATCC 19114)基因组 DNA 提取液分别进行梯度稀释,使 DNA 浓度分别约为 100ng/ μ l、10ng/ μ l、1ng/ μ l、100pg/ μ l、10pg/ μ l、1pg/ μ l、100fg/ μ l,应用以上的 DNA 模板分别应用多重 PCR 体系进行 PCR 反应,电泳观察结果,判断对各目标菌的检测灵敏度。

1.2.8 模拟阳性样品的比对试验 以无菌牛奶为基质,将鼠伤寒沙门菌(ATCC 14028)、福氏志贺菌(ATCC 12022)和金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)、单增李斯特菌(ATCC 19114)分别污染食品样品获取模拟阳性样品,目标菌污染量均为 2000cfu/25g。将模拟阳性样品分别按照本实验方法和 GB/T 4789—2003、GB 4789—2010 方法进行检测,并对二者检测结果进行比对。按照本实验方法检测时,分别称取 25g 样品至 GN 增菌液和 SSL 复合增菌液,36 $^{\circ}$ C 增菌 24h,分别提取 DNA,并将 GN 增菌液和复合增菌液的 DNA 提取液按 1:3 体积混合,作为多重 PCR 检测的 DNA 模板。

1.2.9 真实样品的检测 应用该四重 PCR 方法,对本实验室在检的 164 份乳粉、76 份生猪肉、34 份生鸡蛋、24 份生鸡肉进行检测。具体检测方法为:每份样品分别称取 25g 样品至 GN 增菌液和 SSL 肉汤复合增菌液,37 $^{\circ}$ C 增菌 24h,分别提取 DNA,并将 GN 增菌液和 SSL 增菌液的 DNA 提取液按 1:3 体积混合,作为多重 PCR 检测的 DNA 模板;同时将这 298 份样品按照国家标准方法 GB/T 4789—2003、GB 4789—2010 分别检测沙门菌、志贺菌、金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌,并对两种方法的检测结果进行比较。

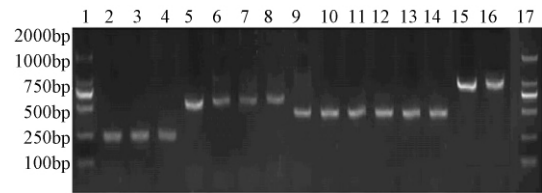
2 结果

2.1 多重 PCR 扩增

对 15 株目标菌基因组 DNA 及混合 DNA 模板进行多重 PCR 扩增。对目标菌基因组 DNA 的扩增产物电泳检测结果如图 1 所示,各目标条带清晰,分子量与预期吻合,扩增结果与预期一致。对各种组合混合 DNA 模板的扩增产物电泳检测结果如图 2 所示,所获得的扩增片段与预期一致。

2.2 特异性试验

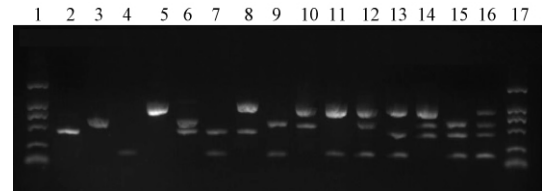
17 株非目标菌未扩增出条带,未出现假阳性结果;在非目标菌混合 DNA 干扰情况下,无论是单一目标菌 DNA 或混合目标菌 DNA 均能良好扩增,扩增片段与预期一致。对多重 PCR 产物的测序结果显示,各产物序列与预期吻合,沙门菌、志贺



1 和 17: DNA marker; 2~4: 金黄色葡萄球菌扩增产物; 5~8: 志贺菌扩增产物; 9~14: 沙门菌 DNA 扩增产物; 15 和 16: 单增李斯特菌 DNA 扩增产物。

图 1 对单一目标菌 DNA 多重 PCR 产物电泳分析

Figure 1 Electrophoresis of multiplex PCR products for single target bacteria DNA



1 和 17: DNA marker; 2~5: 加入 1 种目标菌 DNA 的扩增结果; 6~11: 加入 2 种目标菌 DNA 的扩增结果; 12~15: 加入 3 种目标菌 DNA 的扩增结果; 16: 加入 4 种目标菌 DNA 的扩增结果

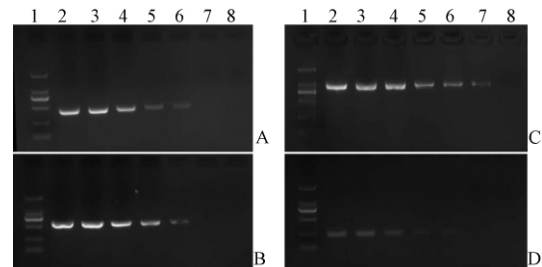
图 2 不同组合目标菌 DNA 多重 PCR 产物电泳分析

Figure 2 Electrophoresis of multiplex PCR products for combined target bacteria DNA

菌、金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌的序列同源度分别为 99%、99%、98% 和 98%。说明本方法对沙门菌、志贺菌、金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌有良好的检测特异性和准确性。

2.3 灵敏度试验

以不同的目标菌 DNA 模板浓度对 PCR 方法的检测灵敏度进行测试。其中沙门菌、志贺菌和金黄色葡萄球菌的检测灵敏度约为 10pg/ μ l,单增李斯特菌的检测灵敏度约为 1pg/ μ l (见图 3),呈现较好的检测灵敏度。



A: 沙门菌; B: 志贺菌; C: 单增李斯特菌; D: 金黄色葡萄球菌。

1: DNA marker 2~8: 100ng/ μ l、10ng/ μ l、1ng/ μ l、100pg/ μ l、10pg/ μ l、1pg/ μ l、100fg/ μ l DNA 模板浓度

图 3 4 种致病菌的检测灵敏度

Figure 3 Sensitivity of multiplex PCR for 4 foodborne pathogens

2.4 模拟样品比对试验

GN 增菌液联合 SSL 肉汤复合增菌液获得良好的增菌效果。应用本方法对模拟样品多重 PCR 检测结果与预期完全一致,且与国标方法的检测结果完全吻合,无假阳性或假阴性结果出现,说明该方法具有较好的特异性和实用性。

2.5 真实样品检测结果

对本实验室在检的 164 份乳粉、76 份生猪肉、34 份生鸡

蛋、24 份生鸡肉和 21 份生鲜乳的检测结果显示,在 4 份生鲜乳中检出金黄色葡萄球菌,1 份猪肉中检出沙门菌,鸡蛋和鸡肉中未检出上述 4 种食源性致病菌,并与国家标准方法检测结果一致。

3 讨论

食源性致病菌是引起食源性疾病的主要因素之一,在世界食品安全领域中备受关注,其中,沙门菌、志贺菌、金黄色葡萄球菌以及单增李斯特菌普遍存在于多种食物中,是引起食品污染的重要因素^[4-6]。根据现行国家食品安全监管体系,沙门菌、志贺菌和金黄色葡萄球菌是众多食品标准中的检测项目,要求不得检出,而单增李斯特菌也是世界各国重点关注的食品高风险因子。

虽然荧光 PCR 方法因其污染小、灵敏度高等优势成为分子生物学检测的重要手段,但由于荧光 PCR 的反应体系更为复杂,引物、探针之间的干扰难以预测,且荧光探针价格昂贵,故多重荧光 PCR 方法的建立较为困难,其实用性也受影响。因此目前大量的多重检测方法研究仍应用普通 PCR 方法。

依据相关研究, *invA*、*ipaH*、*nuc* 和 *hly* 基因各为沙门菌、志贺菌、金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌特有的毒力因子基因,且序列高度保守^[7-10]。本研究正是针对这 4 个基因序列设计引物。同时,由于多重 PCR 影响因素复杂,不同的引物、模板、引物浓度、模板浓度、 Mg^{2+} 浓度、dNTP 浓度及其比例等会产生复杂的综合效应,因此需对引物进行筛选,并对反应体系进行优化。最终优化的反应体系对选取的目的菌株和非目的菌株同时进行 PCR 扩增,结果目的菌株均显示出特异扩增,而所有实验的非目的菌株均未出现扩增,结合对扩增产物的测序分析结果,说明本反应体系稳定,引物特异性良好。在灵敏度的测试过程中,本实验采用单管多重 PCR 体系对 4 种致病菌的检测灵敏度进行单独测试,其中沙门菌、志贺菌和金黄色葡萄球菌的检测灵敏度约为 $10\text{pg}/\mu\text{l}$,单增李斯特菌的检测灵敏度约为 $1\text{pg}/\mu\text{l}$,取得了满意的检测灵敏度。但当体系中存在混合 DNA 模板时会降低检测灵敏度^[11],因此通过增菌获得更高的 DNA 模板量显得尤为重要。本实验在针对模拟样品和真实样品进行检测时,应用 GN 增菌液联合 SSL 肉汤复合增菌液分别对样品进行增菌,获得了较理想的增菌效果。这种增菌方式简化了增菌步骤,并能在 24h 甚至更短的时间内使目标菌数量满足分子生物学检测要求。对于污染程

度较高的样品,直接提取样品稀释液中提取的细菌 DNA 作为模板即可获得准确的检测结果。对真实样品的检测结果显示金葡菌仍是生鲜乳中最主要的食源性致病菌,而沙门菌在生猪肉中也有检出。

综上所述,本方法在实际应用过程中体现出较好的特异性和灵敏度,为食品中食源性致病菌的快速筛查提供了一种重要技术手段。

参考文献

- 1 卫生部. GB/T 4789—2003 食品卫生微生物学检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- 2 卫生部. GB 4789—2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- 3 刘园园, 肖性龙, 余以刚. 一种能同时富集沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌的培养基[J]. 微生物学报, 2009, 49(10): 1389-1396.
- 4 SCALLAN E, HOEKSTRA R M, ANGULO F J, et al. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens [J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17(1): 7-15.
- 5 李慧艳, 陈倩, 张正. 北京 2008 年奥运会相关餐饮业食源性致病菌监测分析[J]. 现代预防医学, 2010, 37(3): 447-448.
- 6 刘秀梅, 陈艳, 樊永祥, 等. 2003 年中国食源性疾病暴发的监测资料分析[J]. 卫生研究, 2006, 35(2): 201-204.
- 7 WORRAL L J, VUCKOVIC M, STRYNADKA N C. Crystal structure of the C-terminal domain of the *Salmonella* type III secretion system export apparatus protein InvA [J]. Protein Sci, 2010, 19(5): 1091-1096.
- 8 RIYAZ-UL-HASSAN S, SYED S, JOHRI S, et al. Application of a multiplex PCR assay for the detection of *Shigella*, *Escherichia coli* and Shiga toxin-producing *Esch. coli* in milk [J]. J Dairy Res, 2009, 76(2): 188-194.
- 9 SASAKI T, TSUBAKISHITA S, TANAKA Y, et al. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive *staphylococci* [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(3): 765-769.
- 10 KIM H J, CHO J C. Rapid and sensitive detection of *Listeria monocytogenes* using a PCR-enzymelinked immunosorbent assay [J]. J Microbiol Biotechnol, 2008, 18(11): 1858-1861.
- 11 凌霞, 沙丹, 肖勇, 等. 空肠弯曲菌、单增李斯特菌和大肠杆菌 O157 多重 PCR 分子检测研究[J]. 检验医学, 2009, 24(2): 101-105.

收稿日期: 2011-02-23