

## 技术与方法

## 多重 PCR 检测无公害畜禽肉和水产品中 4 种致病菌\*

杨小鹏<sup>1,2</sup> 吴清平<sup>1\*\*</sup> 张菊梅<sup>1</sup> 吴慧清<sup>1</sup>(广东省微生物研究所广东省菌种保藏与应用重点实验室 广州 510070)<sup>1</sup>(中国科学院南海海洋研究所 广州 510301)<sup>2</sup>

**摘要:** 建立无公害畜禽肉和水产品中肠出血性大肠杆菌 (EHEC)、沙门氏菌、副溶血性弧菌 (VP) 和单核细胞增生性李斯特氏菌 (LM) 的多重 PCR 检测方法, 为这些致病菌的快速诊断提供实验依据。选择分别针对 EHEC 溶血素基因 *hlyAB*、副溶血性弧菌属保守序列 *toxR* 基因、沙门氏菌侵袭基因 *invA* 和 LM 的 *iap* 基因特异的 4 对引物, 先分别进行单重 PCR 扩增, 再同时加入 4 对引物进行多重 PCR 扩增, 扩增产物经测序验证。建立的多重 PCR 方法可简便、快速、灵敏地实现对 EHEC、LM、沙门氏菌和 VP 的同时检测, 在畜禽肉和水产品中的检测灵敏度达到  $10^3$  cfu/mL。

**关键词:** 食源性致病菌, 多重 PCR, 无公害畜禽肉和水产品

**中图分类号:** TS207.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 03-0095-07

### Simultaneous Detection of Common Food-borne Bacterial Pathogens in Innocuous Poultry and Seafood by Multiplex PCR Assay

YANG Xiao-Juan<sup>1,2</sup> WU Qing-Ping<sup>1\*\*</sup> ZHANG JU-Mei<sup>1</sup> WU Hui-Qing<sup>1</sup>(Guangdong Institute Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070)<sup>1</sup>(South China Sea Institute of Oceanology, CAS, Guangzhou 510301)<sup>2</sup>

**Abstract:** To develop a multiplex PCR assay to detect Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), *Vibrio parahaemolyticus* (VP), *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* (LM) in innocuous poultry and seafood simultaneously, four pairs of primers were designed from hemolysis gene (*hlyAB*) of EHEC, *toxR* gene of VP, *invA* gene of *Salmonella* spp. and *iap* gene of LM. They were detected by conventional PCR and multiplex PCR assay. DNA sequencing was used to examine PCR products. This multiplex PCR method was a highly specific, rapid and sensitive method which could simultaneously detect EHEC, VP, *Salmonella* spp. and LM. The detection level was  $10^3$  cfu/mL.

**Key words:** Food-borne bacterial pathogens, Multiplex PCR, Poultry and seafood

过去几十年因进食被沙门氏菌、空肠弯曲菌、肠出血性大肠杆菌污染的食品而引起的食源性疾病的发病率居高不下, 发达国家每年约有 1/3 的人患食源性疾病, 美国每年约有 7,600 万例食源性病患者, 引起国际社会对食品安全尤其是食品中含有害微生物问题的关注。食品生产模式及饮食方式的改变、消费者中对食源性病原菌易感

\* 广东省重大科技攻关项目 (No. 2003A20507)

\*\* 通讯作者 Tel/Fax: 020-87688132, E-mail: wuqp@gdas.ac.cn

收稿日期: 2004-10-27, 修回日期: 2004-11-22

人群的增加、发展中国家对畜禽肉和水产品的需求量增加等因素是导致食源性疾病发病率升高的主要原因。因此加大畜禽肉和水产品的检验检疫, 保证其食用安全, 是预防食源性疾病暴发的重要途径。肠出血性大肠杆菌 (*Enterohemorrhagic Escherichia coli*, EHEC)、单核细胞增生性李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*, LM)、沙门氏菌 (*Salmonella* spp.) 和副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, VP) 是常见的引起畜禽肉和水产品污染的重要致病菌, 在我国现行国家卫生标准中, 这 4 种菌被列为致病菌的常规检验项目。

近年来, 随着以核酸为基础的微生物分子检测的发展, 特别是 PCR 技术的应用, 使致病菌检验发展到一个新的水平。多种致病菌的 PCR 快速检验方法被建立起来, 如沙门氏菌<sup>[1,2]</sup>, 单核细胞增生性李斯特氏菌<sup>[3,4]</sup>, 致泻性大肠杆菌<sup>[5]</sup>等。然而在食品生产和流通中, 企业和政府监管部门均需对大批食品进行致病菌的检测, 样本量大、时间急, 单一致病菌的 PCR 检测技术和一般方法显然不能满足这些部门不断发展的需要。针对这种情况, 在常规单重 PCR 的基础上发展了多重 PCR 技术, 目前针对一种<sup>[6]</sup>、两种<sup>[7]</sup>或多种<sup>[8]</sup>致病菌的多重 PCR 已在很大程度建立起来。2002 年香港城市大学的 Kong 等<sup>[8]</sup>通过多重 PCR 实现了海水中气单胞菌、志贺氏菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌、沙门氏菌、霍乱弧菌和副溶血性弧菌 6 种病原菌的同时快速检测。多重 PCR 同时检测多种微生物更节省成本和时间, 将是食源性致病菌快速检测技术的重要开发方向。

针对这些情况, 为了能够更快速地实现对无公害畜禽肉和水产品中的多种致病菌的诊检和监控, 本实验将对建立多重 PCR 技术, 一次性检测无公害畜禽肉和水产品中的 EHEC、LM、沙门氏菌和 VP 进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 28 株实验菌株分别是 7 株沙门氏菌, 4 株副溶血性弧菌, 10 株大肠杆菌, 7 株李斯特氏菌 (见表 1)。

表 1 实验菌株及引物特异性验证

Strain	Source	<i>invA</i>	<i>hlyAB</i>	<i>iap</i>	<i>toxR</i>
<i>Salmonella typhi</i>	NICBP50098-14	+	-	-	-
<i>S. typhimurium</i>	NICBP50115	+	-	-	-
<i>S. typhi</i>	NICBP50071	+	-	-	-
<i>S. paratyphi A</i>	NICBP50093	+	-	-	-
<i>Salmonella</i>	GIM-S1	+	-	-	-
<i>Salmonella</i>	GIM-S2	+	-	-	-
<i>Salmonella</i>	GIM-S3	+	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> O157: H7	ATCC43889	-	+	-	-
<i>E. coli</i>	NICBP44113	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	ATCC8739	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	ATCC25922	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	8099	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	NICBP 44102	-	-	-	-
<i>E. coli</i> O157: H7	GDCIQ O157-p	-	+	-	-

续表 1

<i>E. coli</i> O157: H7	GDCIQ O157-h	-	+	-	-
<i>E. coli</i> EHEC	GDCIQ EHEC-1	-	+	-	-
<i>E. coli</i> EHEC	GDCIQ EHEC-2	-	+	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	NICBPB54002	-	-	+	-
<i>L. monocytogenes</i>	GDCIQ LM-1	-	-	+	-
<i>L. monocytogenes</i>	GDCIQ LM-2	-	-	+	-
<i>L. welshimeri</i>	GDCIQ LW-1	-	-	-	-
<i>L. murrayi</i>	GIM-1	-	-	-	-
<i>L. murrayi</i>	GIM-2	-	-	-	-
<i>L. murrayi</i>	GIM-3	-	-	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	VPLA-90	-	-	-	+
<i>V. parahaemolyticus</i>	GDCIQ VP-1	-	-	-	+
<i>V. parahaemolyticus</i>	GDCIQ VP-2	-	-	-	+
<i>V. parahaemolyticus</i>	GDCIQ VP-3	-	-	-	+

注：NICBPB (National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, 中国医学细菌保藏管理中心), ATCC (American Type Culture Collection, 美国标准菌种保藏中心), GDCIQ (Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, 广州出入境检验检疫局), GIM (Guangdong Institute of Microbiology, 广东省微生物研究所), VPLA-90 (上海疾病控制中心来源菌种)

1.1.2 试剂：Taq 酶、dNTP 购自北京天为时代公司，引物由生工公司合成。

1.1.3 仪器：凝胶成像分析系统 UV I (英国)、PCR 仪 PE2400 (德国)、梯度 PCR 仪 (美国)、核算蛋白分析仪 DU640 (BECKMEN)。

1.2 方法

1.2.1 引物设计：参照文献 [3, 6, 7, 12] 的引物，优化设计这 4 对引物，使它们具有相近的退火温度，使多重 PCR 产物能在凝胶电泳中分离开来。引物和产物大小详见表 2。

表 2 4 对引物及 PCR 扩增产物大小

Bacteria	Target gene	Sequence of primers	Product (bp)	Reference
<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i>	上游: 5' -ATC GGC GTT ATC CCT TTC TCT GGT G -3' 下游: 5' -ATG TTG TCC TGC CCC TGG TAA GAG A -3'	495	2
EHEC	<i>hlyAB</i>	上游: 5' -CAC ACG GAG CTT ATA ATA TTC TGT -3' 下游: 5' -GAC ATC ATT TGA CTC ATT AAA -3'	335	5
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>iap</i>	上游: 5' -CAA ACT GCT AAC ACA GCT ACT-3' 下游: 5' -TTA TAC GCG ACC GAA GCC AAC-3'	660	4
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>toxR</i>	上游: 5' -GTC TTC TGA CGC AAT CGT TG-3' 下游: 5' -ATA CGA GTG GTT GCT GTC ATG-3'	368	9

1.2.2 PCR 模板的制备：(1) 采用煮沸法提取纯菌 DNA。(2) 样品 DNA 提取，采用参考文献 [10] 的 CTAB 法，略做修改。

1.2.3 单重 PCR 检测：以标准菌株 *Salmonella typhi* 50098-14、*Escherichia coli*

ATCC43889、*Listeria monocytogenes* NICPBP54002 和 *Vibrio parahaemolyticus* VPLA-90 培养物提取的 DNA 为模板，分别进行单重 PCR 检测。

(1) 扩增反应体系：10 × PCRbuffer 2.5 μL，2mmol/LMgCl<sub>2</sub>，200 μmol/LdNTP，100nmol/L 引物，2.5uTaq 酶，反应体系 25 μL。

(2) 扩增反应条件：94℃ 预变性 5min；94℃ 变性 1min、58℃ 退火 1min、70℃ 延伸 1min，共进行 30 个循环；72℃ 延伸 10min；于 4℃ 下保存。

(3) 扩增反应结果：扩增产物于 12g/L 琼脂糖凝胶电泳检测及 UV I 凝胶成像系统分析结果。

(4) DNA 序列测定：将 PCR 产物经琼脂糖凝胶回收，纯化 DNA 片段，由上海博亚公司用 3730,377 测序进行测序。

1.2.4 多重 PCR 检测：以 4 种标准菌株提取的混合 DNA 为模板，同时加入 4 对引物进行多重 PCR 检测，对多重 PCR 各反应参数进行优化，确定最佳的反应模式，并进行多重 PCR 特异性和灵敏性实验。

2 结果

2.1 PCR 扩增产物序列测定

测序结果与 GenBank 中序列比较，同源性达 98%、100%（见图 1A 和表 3）。

2.2 引物的特异性

在收集的全部菌株的范围内进行单重 PCR，进一步评价和验证引物的特异性。结果表明 4 对引物仅对它们的目标生物特异（见表 1）。

表 3 扩增产物测序结果

Sequences deposited	GenBank sequences	Homology rate (BLASTn) (%)
<i>Salmonella typhi</i> 50098-14 invA 基因	AE008806	100
<i>Escherichia coli</i> ATCC43889 hlyAB 基因	X79839	100
<i>Listeria monocytogenes</i> NICPBP54002 iap 基因	AF532235	98
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> VPLA-90 toxR 基因	AB029914	100

2.3 单重 PCR 灵敏度

分别将 4 种标准菌株的培养液以 10 倍稀释法进行梯度稀释，提取 DNA，进行 PCR 检测。并将最后 3 个梯度的稀释液进行平板记数。结果显示 4 种致病菌的单重 PCR 检测灵敏度都可达到 10cfu/mL。分别为 EHEC 5.0 cfu/mL，VP 3.0 cfu/mL，沙门氏菌 4.7 cfu/mL，LM 5.0 cfu/mL。

2.4 多重 PCR

2.4.1 多重 PCR 特异性：为进一步验证本实验设计的多重 PCR 的特异性，分别以 4 种标准菌株提取的单一 DNA 为模板，同时加入 4 对引物进行扩增；再以 4 种标准菌株提取的混合 DNA 为模板，分别加入单对引物扩增，结果表明多重 PCR 具有高特异性（见图 1B）。

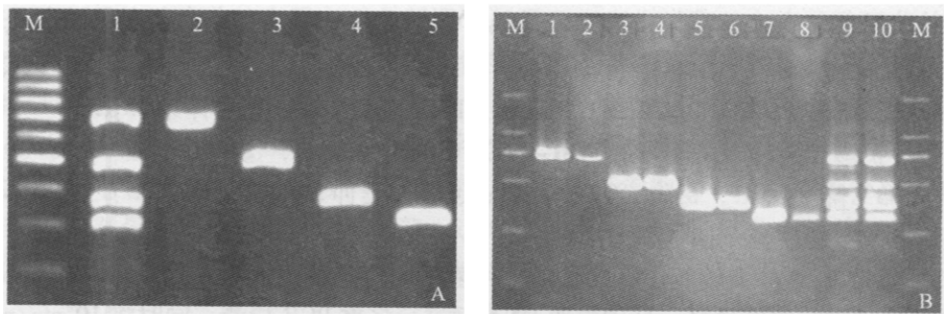


图 1 多重 PCR 及其特异性实验

A: M 100bp DNA Ladder, 1 多重 PCR 扩增结果, 2 LM 扩增产物 660bp, 3 沙门氏菌扩增产物 495bp, 4 VP 扩增产物 368bp, 5 EHEC 扩增产物 335bp  
B: M DL2000 DNA Ladder, 1 3 5 7 4 种菌的混合 DNA 为模板, 分别以 LM、沙门氏菌、VP、EHEC 单一引物扩增结果, 2 4 6 8 分别是 LM、沙门氏菌、VP、EHEC 单一模板, 同时加入 4 对引物扩增结果, 9 10 多重 PCR 对照

2.4.2 多重 PCR 反应模式的优化: 加入等量各引物, 利用梯度 PCR 仪, 优化退火温度, 在扩增效果最好的条件下, 根据条带的亮暗来调整各引物的浓度, 再配合其它参数的调节得到最优化的多重 PCR 扩增反应体系 (见图 2)。

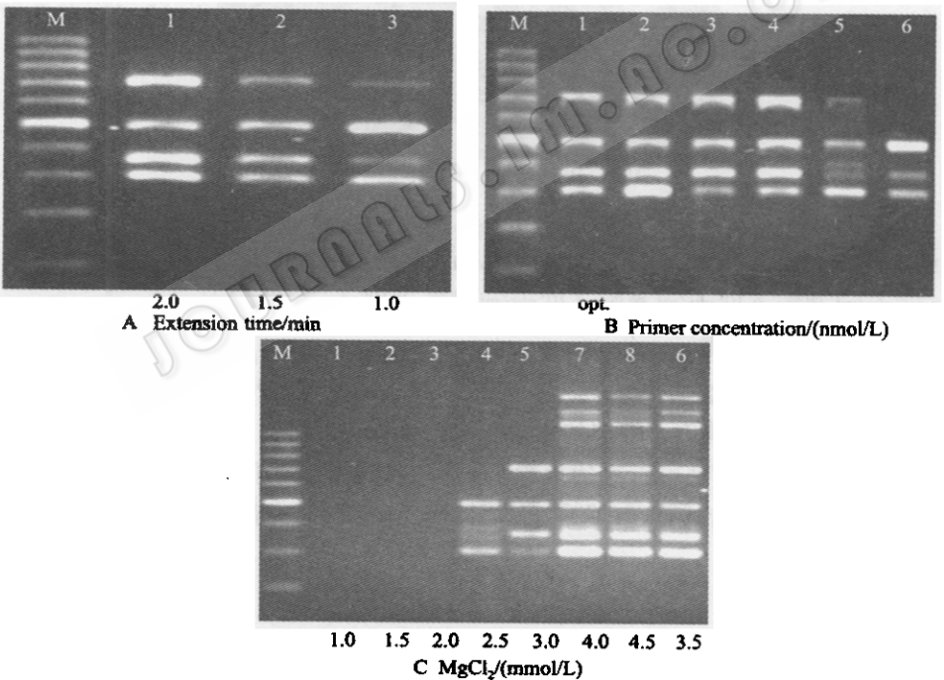


图 2 多重 PCR 的优化 (A, B, C)

A: 退火时间优化, M 100bp DNA ladder, 1 2.0min, 2 1.5min, 3 1.0min  
B: 引物浓度优化, M 100bp DNA ladder, 1 最优化的引物浓度: LM 200nmol/L、沙门氏菌 40nmol/L、VP 60 nmol/L、EHEC 80nmol/L, 2 LM 200nmol/L、沙门氏菌 40nmol/L、VP 60nmol/L、EHEC 200nmol/L, 3 LM 200 nmol/L、沙门氏菌 40nmol/L、VP 60nmol/L、EHEC60nmol/L, 4 LM 200nmol/L、沙门氏菌 40nmol/L、VP 80nmol/L、EHEC80nmol/L, 5 同 3 没采用降落 PCR 程序, 6 引物浓度都为 40nmol/L 没有采用降落 PCR 程序  
C: MgCl<sub>2</sub> 浓度优化. M 100bp DNA ladder, 1 1.0nmol/L, 2 1.5nmol/L, 3 2.0nmol/L, 4 2.5nmol/L, 5 3.0nmol/L, 6 3.5nmol/L, 7 4.0nmol/L, 8 4.5nmol/L

(1) 优化的多重 PCR 反应体系:  $10 \times$  PCR buffer  $2.5 \mu\text{L}$ ,  $1.5 \text{ mmol/L}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $250 \mu\text{mol/L}$  dNTP each, 引物浓度分别为: LM  $200 \text{ nmol/L}$ 、沙门氏菌  $40 \text{ nmol/L}$ 、VP  $60 \text{ nmol/L}$ 、EHEC  $80 \text{ nmol/L}$ ,  $1.3 \text{ U}$  Taq 酶, DNA 模板  $2 \mu\text{L}$ , 反应体系  $25 \mu\text{L}$ 。

(2) 扩增反应程序采用降落 PCR: ①  $94^\circ\text{C}$  预变性  $5 \text{ min}$ ; ②  $94^\circ\text{C}$  变性  $1 \text{ min}$ ; ③ 退火  $2 \text{ min}$  从  $63^\circ\text{C}$  降到  $55^\circ\text{C}$ , 每降  $1^\circ\text{C}$  2 个循环; ④  $70^\circ\text{C}$  延伸  $2 \text{ min}$ ; ⑤ 最后  $55^\circ\text{C}$  上循环 30 个反应; ⑥  $72^\circ\text{C}$  延伸  $10 \text{ min}$ ; ⑦  $4^\circ\text{C}$  下保存。

**2.4.3 多重 PCR 的灵敏度:** 等量混合 4 种菌液, 使每种菌的含量达到  $10^8 \text{ cfu/mL}$ , 以 10 倍稀释法进行梯度稀释, 分别提取 DNA 后进行多重 PCR 检测; 同时将  $10^8 \text{ cfu/mL}$  至  $10^1 \text{ cfu/mL}$  菌液分别接种到  $2 \text{ g}$  碎猪肉上, 培养一段时间后进行多重 PCR 检测。结果显示, 纯菌菌液的检测灵敏度可以达到  $10^2 \text{ cfu/mL}$ , 与 Kong 等<sup>[8]</sup>建立的灵敏度为  $10^2 \text{ cfu/mL}$  检测水中 6 种致病菌的多重 PCR 技术相同。致病菌接种肉样后, 检测灵敏度仅可以达到  $10^3 \text{ cfu/mL}$  (见图 3)。

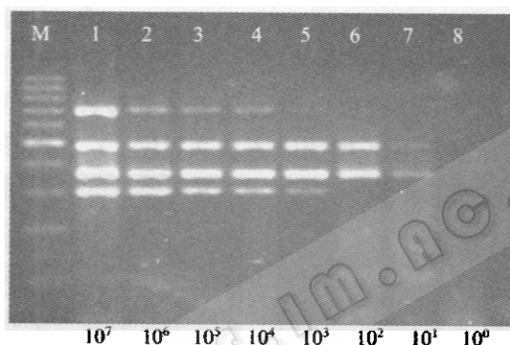


图 3 肉样中多重 PCR 灵敏度

M 100bp DNA Ladder, 1  $10^7 \text{ cfu/mL}$  菌液, 2  $10^6 \text{ cfu/mL}$  菌液, 3  $10^5 \text{ cfu/mL}$  菌液, 4  $10^4 \text{ cfu/mL}$  菌液, 5  $10^3 \text{ cfu/mL}$  菌液, 6  $10^2 \text{ cfu/mL}$  菌液, 7  $10^1 \text{ cfu/mL}$  菌液, 8  $10^0 \text{ cfu/mL}$  菌液

## 2.5 人工模拟样品检测

将 4 种菌培养液任意两种、3 种、4 种等量混合, 使每种菌的含量  $> 10^4 \text{ cfu/mL}$ , 接种于盛有  $2 \text{ g}$  碎猪肉、鸡肉、虾肉的三角瓶中, 培养一段时间后进行多重 PCR 检测。实验证明人工污染的肉样都可以准确地检测出所接种的致病菌, 无非特异性扩增, 证明该多重 PCR 对肉品中存在的 EHEC、LM、沙门氏菌和 VP 有很好的特异性。

## 3 讨论

本研究建立的多重 PCR 方法有较好的特异性, 可在  $8 \sim 9 \text{ h}$  内完成对 EHEC、VP、沙门氏菌和 LM 的检测, 比常规的细菌学诊断快速简便经济, 有较大的应用价值。研究发现, 多重 PCR 的优化, 主要是优化引物的合适配比、 $\text{MgCl}_2$  浓度、退火时间和退火温度。

多重 PCR 的扩增灵敏度比单重 PCR 低, 说明多对引物同时扩增对灵敏度有较大的影响。因此发现多重 PCR 虽然可以简化操作, 节省时间和费用, 但对于细菌量较少的检测样品, 如果不经扩增, 采用多重 PCR 有可能出现假阴性结果。肉品中的致病菌和纯菌检测的灵敏度相比, 略低, 可能是因为肉类食品中含有的油脂等杂质抑制 Taq 酶活性, 影响 PCR 反应的正常进行。如果时间和情况允许, 可以适当延长扩增时间,

来提高样品中致病菌的含量,避免假阴性的发生。有报道称,大多数致病菌的感染剂量都大于  $10^3$  cfu/mL (g)<sup>[11]</sup>,因此,该多重 PCR 的检测灵敏度在致病菌的感染剂量以内,对致病菌的监测具有一定的意义。

由于本研究中 4 种致病菌是等量混合加入的,但实际样品中存在的微生物多数情况下是不等量的。不等量模板的加入,再加上各循环参数和 4 对引物竞争扩增的影响,有可能要对最优化模式进行适当调整,这时可以运用该多重 PCR 方法建立过程中掌握的针对这 4 种菌的多重 PCR 优化规律进行微调。

### 参考文献

- [1] Hoorfar J, Ahrens P, Radstrom P. *J Clin Microbiol*, 2000, **38**: 3429 ~ 3435.
- [2] Cohen N D, Neiberger H L, Megruder E D. *J Vet Diagn Invest*, 1993, **5**: 368 ~ 371.
- [3] Wieckowska M, Kotlowski R. *Med-Dogw-Microbiol*, 1998, **50**: 251 ~ 257.
- [4] Bubert A, Hein I, Rauch M. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**: 4688 ~ 4692.
- [5] 徐建国, 黄力保, 吴纪民. *中华医学检验杂志*, 1995, **18** (4): 225 ~ 228.
- [6] F 静, 杨瑞馥, 郭兆彪. *卫生研究*, 2001, **30** (5): 310 ~ 312.
- [7] 金慧英, 陈华标, 陶开华. *解放军预防医学杂志*, 2003, **21** (4): 252 ~ 253.
- [8] Kong R Y C, Lee S K Y, Law T W F, et al. *Water Research*, 2002, **36**: 2802 ~ 2812.
- [9] Kim Y B, Okuda J, Matsumoto C. *J Clin Microbiol*, 1999, **37**: 1173 ~ 1177.
- [10] Dooley J J, Paine K E, Garrett S D. *Meat Science*, 2004, **68**: 431 ~ 438.
- [11] US EPA. Guidelines for water reuse. United States Environmental Protection agency, Washington, 1992.