

基因芯片技术检测 3 种食源性致病 微生物方法的建立

陈 昱¹ 潘迎捷^{1*} 赵 勇¹ 金维荣² 秦红友² 徐晓晶² 唐明未²

(1. 上海海洋大学食品学院 上海 200090)

(2. 上海生物芯片有限公司 上海 201203)

摘要: 建立一种运用多重 PCR 和基因芯片技术检测和鉴定志贺氏菌、沙门氏菌、大肠杆菌 O157 的方法, 为 3 种食源性致病菌的快速检测和鉴定提供了准确、快速、灵敏的方法。分别选取编码志贺氏菌侵袭性质粒抗原 H 基因(*ipaH*)、沙门氏菌肠毒素(*stn*)基因和致泻性大肠杆菌 O157 志贺样毒素(*slt*)基因设计引物和探针, 进行三重 PCR 扩增, 产物与含特异性探针的芯片杂交。对 7 种细菌共 26 株菌进行芯片检测, 仅 3 种菌得到阳性扩增结果, 证明此方法具有很高的特异性。3 种致病菌基因组 DNA 和细菌纯培养物的检测灵敏度约为 8 pg。对模拟食品样品进行直接检测, 结果与常规细菌学培养结果一致, 检测限为 50 CFU/mL。结果表明: 所建立的基因芯片检测方法特异性好, 灵敏度高, 为食源性致病菌的检测提供了理想手段, 有良好的应用前景。

关键词: 基因芯片, 多重 PCR, 微生物, 检测

Detection of Three Foodborne Pathogenic Microorganisms by DNA Microarray

CHEN Yu¹ PAN Ying-Jie^{1*} ZHAO Yong¹ JIN Wei-Rong² QIN Hong-You²
XU Xiao-Jing² TANG Ming-Wei²

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China)

(2. Shanghai Biochip Co. Ltd, Shanghai 201203, China)

Abstract: A rapid, sensitive and specific method of DNA microarray combined with multiplex PCR that allow the simultaneous detection and identification of *Shigella dysenteriae*, *Salmonella* spp. and *E. coli* O157. The invasion-associated plasmid antigen H of *S. dysenteriae*(*ipaH*), *Salmonella* spp. enterotoxin gene(*stn*) and *Escherichia coli* O157 Shiga-Toxin gene(*slt*) were used as target genes, and then three pairs of primers and captured oligonucleotide probes were designed and synthesized. The multiplex PCR products were hybridized with DNA microarray, which contained specific probes of three foodborne pathogenic microorganisms. Genomic DNAs from 26 bacterial strains were detected, and only 3 index bacteria were positive. The detection limit of this assay was around 8 pg genomic DNA. In addition, this method was applied to detect artificially contaminated food samples, and the detection limit was 50 CFU/mL for non-cultured samples.

基金项目: 上海市科技兴农重点攻关项目(No. 沪农科攻字 2006 第 10-5 号); 江苏检验检疫局科技项目(No. 2008KJ25)

* 通讯作者: Tel: 86-21-65710860; ✉: yjpan@shfu.edu.cn

收稿日期: 2008-06-24; 接受日期: 2008-09-11

These results suggested that detection of pathogenic microorganisms by DNA microarray is an effective procedure with high specificity and sensitivity. The DNA microarray assay developed in this study could provide an informative supplement to conventional microbiological methods for routine monitoring of food.

Keywords: DNA microarray, Multiplex PCR, Microorganism, Detection

细菌性食物中毒是一个十分重要的公共卫生问题^[1], 其发生率占食源性疾病的首位^[2], 据统计我国每年发生的细菌性食物中毒事件占食物中毒事件总数的 30%~90%, 人数占食物中毒总人数的 60%~90%^[3], 因此, 食品中病原性细菌检测是食品卫生安全检测中一个重要的方面。细菌对食品污染, 不但会造成巨大的经济损失, 致病细菌的存在还会严重威胁人类的健康^[4]。

许多常见微生物如志贺氏菌引起人和动物腹泻或痢疾^[5], 沙门氏菌是重要的人类致病菌, 感染后的主要症状为恶心、呕吐、腹绞痛、腹泻等^[6], 大肠杆菌 O157 引起的临床症状严重, 感染剂量极低, 食入不足 10 个细菌就可引起疾病^[7]。

目前, 包括我国在内的许多国家对这些致病菌的检验大多仍沿用传统的细菌培养及鉴定方法, 检测周期长、操作繁琐、灵敏度低, 而且每次只能检测出一种致病菌, 面对日益增加的多重混合污染, 目前的诊断方法显得严重滞后。因此, 建立快速敏感和特异的检测方法对于尽快明确致病因素和采取有效预防和治疗措施都是非常必要的。基因芯片技术是近年发展起来的一种高新生物技术, 其突出的特点是可以对多种靶基因同时检测和鉴定, 以其快速、高通量、平行化等其他技术无法比拟的优势得到广泛的应用^[8]。本研究运用基因芯片技术结合多重 PCR 的方法, 同时对志贺氏菌、沙门氏菌和大肠杆菌 O157 进行检测和鉴定, 为及时有效地预防、控制和治疗食源性传染病提供技术保障, 期望能为食源性致病菌监测技术的更进一步发展提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 共 26 株。志贺氏菌 6 株、沙门氏菌 6 株、大肠杆菌和大肠杆菌 O157 2 株、副溶血弧菌 3 株, 购自中国科学院微生物研究所, 大肠杆菌 O157 2 株和李斯特菌 3 株购自广东省微生物研究所。霍乱弧菌 2 株、金黄色葡萄球菌 2 株为上海疾病预防控制中心保藏菌种。

1.1.2 试剂: *Taq* 酶、引物和探针均有宝生物工程(大连)有限公司合成并进行标记修饰, 探针点样液购自上海百傲科技有限公司, 磁珠法 DNA 提取试剂盒购于杭州优思达生物技术有限公司。

1.1.3 仪器: 凝胶成像分析系统(GIS2010, 国产天能)、PCR 仪(PTC-100, 美国 Bio-rad)、梯度 PCR 仪(PTC-200, 美国 Bio-rad)、微阵列点样仪(OmniGrid 100, 美国 Genomic Instrumentation Service)、基因芯片扫描仪(GenePix 4000B, 美国 Axon 公司)。

1.2 DNA 抽提

采用文献[9]的方法, 略做修改。1) 1.5 mL 菌液, 13000 r/min, 去上清; 2) 取沉淀加浓度为 50 g/L 的溶菌酶 100 μ L, 悬浮菌液, 37°C, 2 h; 3) 加入 TE 385 μ L, 20% SDS 15 μ L, 煮沸 10 min; 4) 用等体积的酚氯仿抽提, 充分振荡混匀, 13000 r/min 离心 5 min, 将上清移至干净离心管; 5) 加 1 mL 冰无水乙醇, -20°C 放 30 min 以上, 沉淀 DNA; 6) 以 13000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 冰无水乙醇洗涤 1 次, 75%乙醇洗涤 2 次, 溶解于 100 μ L ddH₂O, -20°C 保存。

1.3 多重 PCR 检测及优化

以志贺氏菌编码侵袭性质粒抗原 H 基因(*ipaH*)、沙门氏菌肠毒素(*stn*)基因和致泻性大肠杆菌 O157 志贺样毒素(*slt*)基因作为靶基因, 设计引物和探针(见表 1)。以标准菌株提取的等量 DNA 为模板, 同时加入 4 对引物进行多重 PCR 扩增, 对多重 PCR 各反应条件进行优化, 建立最优化反应模式。扩增产物经 2%琼脂糖凝胶电泳检测, 并于凝胶成像系统分析结果。

1.4 基因芯片的制备和杂交

将制备的探针用点样液稀释至终浓度为 25 μ mol /L, 各取 10 μ L 置于 384 孔板, 用微阵列点样仪点到醛基化玻片上, 每点体积约为 0.2 nL, 直径约 300 μ m, 间距 400 μ m, 重复 3 次; 同时设立不含寡核苷酸片段点样液的空白对照, 点样的模式图(见表 2)。点样时保持相对湿度为 70%、温度为 37°C。将点样后的芯片于室温放置过夜。

将 PCR 产物于 PCR 扩增仪上 95°C 变性 2 min,

表 1 基因的引物和探针序列
Table1 Sequence of the primers and probes for the genes

Bacteria	Target gene	Sequence of the primers and probes	Product (bp)
<i>Shigella</i> sp.	<i>ipaH</i>	F: 5'-CGGAATCCGGAGGTTTGC-3'	6
		R: 5'-CCTTTTCCGCGTTCC TTGA-3'	
		Probe: 5'-CGCCTTTCCGATCCGTCTCTGCA-3'	
<i>Salmonella</i>	<i>stn</i>	F: 5'-GCCATGCTGTTTCGATGAT-3'	120
		R: 5'-GTTACCGATAGCGGAAAGG-3'	
		Probe: 5'-GGGCTGGCKGTGTGCAAAA-3'	
<i>E. coli</i> O157	<i>stx</i>	F: 5'-TCAGTCATTATTAATGTCAC-3'	270
		R: 5'-ATGAAGAAGATGTTATGGCG-3'	
		Probe: 5'-CAAAGTGCTCAATTGACAGG-3'	
16S rDNA		F: 5'-GCCTAAYACATGCAGTGMGA-3'	500
		R: 5'-TGGCAGKAGTTAGTCG-3'	
		Probe: 5'-TTACTCACCCGTCGCCRCT-3'	

迅速置于 0°C 的冰上 5 min; 取变性后的 PCR 产物 7.75 μ L, 16S rDNA 的 PCR 产物 0.5 μ L (0.5 μ m) 与 1.75 μ L 杂交液 (1.5 μ L 20 \times SSC, 0.25 μ L 10% SDS) 混匀, 将 10 μ L 混合液转移至芯片的杂交区域。将芯片置于杂交盒炉中, 45°C 保温 1 h。将杂交后的芯片依次在洗液 (2 \times SSC, 0.1% SDS)、洗液 (1 \times SSC, 0.1% SDS) 和洗液 (0.5 \times SSC) 中各洗涤 5 min。将杂交后的芯片置于基因芯片扫描仪上, 用分析软件 GenePix Pro 6.0 扫描图像。

表 2 基因芯片点样模式图
Table2 Spotting model of the microarray

<i>ipaH</i>	<i>ipaH</i>	<i>ipaH</i>
<i>stn</i>	<i>stn</i>	<i>stn</i>
<i>slt</i>	<i>slt</i>	<i>slt</i>
Negative control	Negative control	Negative control
Blank	Blank	Blank
Positive control	Positive control	Positive control

1.5 芯片特异性实验

用建立的芯片方法分别对 26 株实验菌株进行

检测, 经 PCR 扩增和芯片检测, 验证方法特异性。

1.6 芯片灵敏度实验

取志贺氏菌、沙门氏菌、大肠杆菌 O157 的标准菌株, 分别 10 倍倍比稀释 DNA 原液和模拟食品样品的菌液至 $10^{-1} \sim 10^{-9}$, 判断 3 种靶细菌检测的灵敏度。

1.7 样品的检测

样品取自上海肉菜市场 and 超市, 随机取样 1 g 猪肉或 1 mL 牛奶, 接入 1 mL 已知浓度的志贺氏菌、沙门氏菌、大肠杆菌 O157 的标准菌株, 混匀作为食品样品原样, 之后 10 倍倍比稀释原样至 $10^{-1} \sim 10^{-9}$, 各取 1 mL 用磁珠吸附试剂盒提取 DNA, 之后进行芯片检测。

2 结果

2.1 PCR 扩增产物序列测定

以标准菌株为模板的 PCR 的扩增产物测序结果与 GenBank 中序列比较, 同源性达 99%~100% (见表 3)。

表 3 扩增产物测序结果
Table 3 Sequencing results of PCR products

Sequences deposited	GenBank accession number	Homology rate (Blastn, %)
<i>Shigella flexneri ipaH</i> gene	CP000266	100
<i>S. paratyphi A stn</i> gene	AL627279	100
<i>E. coli</i> O157 <i>stx</i> gene	AB290938	99

2.2 多重 PCR 扩增优化

多重 PCR 中的引物浓度比例等因素直接影响着 PCR 扩增效率和杂交信号强弱。为了得到理想的基因芯片杂交结果, 分别对 3 对引物之间的浓度、模板量、退火温度和镁离子浓度进行了优化。多重 PCR 扩增最佳反应体系 (50 μ L): 10 \times PCR buffer 5 μ L, 2 mmol/L MgCl₂, 200 μ mol/L dNTPs, 1.25U Taq DNA 聚合酶。在 3 种模板 DNA 的量相同时, 各组分最优参数为: 正反向引物比例都为 10:1, *ipaH*、*stn* 和 *slt* 基因的 3 对引物正反向的量分别为 0.4/0.04 μ mol/L, 0.6/0.06 μ mol/L, 0.4/0.06 μ mol/L。扩增条件为: 95°C 预变性 5 min; 95°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 35 个循环; 72°C 延伸 10 min, 4°C 下保存。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

2.3 芯片特异性实验

检测了志贺氏菌(包括福氏志贺氏菌、宋内志贺氏菌、鲍氏沙门氏菌、痢疾志贺菌)、沙门氏菌(包括伤寒沙门氏菌、甲副伤寒沙门氏菌、乙副伤寒沙门氏菌、肠炎沙门氏菌和猪霍乱沙门氏菌)大肠杆菌、大肠杆菌 O157、副溶血弧菌、李斯特菌(包括单核细胞增生李斯特菌、英诺克李斯特菌、威尔氏李斯特菌)、霍乱弧菌和金黄色葡萄球菌,共 26 株菌株(见表 3),其中 6 株志贺氏菌均检测到 *ipaH* 基因,5 株沙门氏菌均检测到 *stm* 基因,3 株大肠杆菌 O157 均检测到 *slt* 基因,而副溶血弧菌、大肠杆菌、李斯特菌、霍乱弧菌和金黄色葡萄球菌等 12 株菌株均未见特异性条带。

将上述 PCR 产物与芯片杂交,结果显示,除志贺氏菌、沙门氏菌和致泻性大肠杆菌 O157:H7 能出现各自的阳性荧光信号外,而其他细菌均为阴性(图 1),结果表明该芯片可以准确地检测出所接种的致病菌,无非特异性扩增。

2.4 芯片灵敏度实验

2.4.1 芯片纯菌 DNA 检测灵敏度的测定: 分别将志贺氏菌、沙门氏菌和大肠杆菌 O157 的标准菌株抽提 DNA,将 3 种 DNA 等量混合后(混合后 3 种菌 DNA 浓度都为 800 ng/ μ L),10 倍倍比稀释 DNA 原液进行多重 PCR。多重 PCR 电泳检测,基因组 DNA 的检测限约为 16 pg(图 2),之后芯片检测,结果显示 3 种菌的基因组 DNA 的检测极限为 8 pg(图 3)。

2.4.2 人工污染品检测灵敏度的测定: 将志贺氏菌、沙门氏菌、大肠杆菌 O157 三种菌的标准菌株的培养液(平板计数结果为 5×10^8 CFU/mL)等量混合后,做 10 倍梯度稀释,然后将各个梯度稀释液分别接种于 1 g 猪肉和 1 mL 牛奶,充分混匀后用磁珠吸附法提取 DNA,之后进行芯片检测。结果显示可检测的最高稀释度为 10^{-7} ,即检测限为 50 CFU/mL(图 4)。

表 4 实验菌株及芯片特异性验证
Table 4 Bacterial strains for the specificity of DNA microarray

Strain	Source	<i>ipH</i>	<i>tn</i>	<i>slt</i>	<i>tc</i>	<i>R</i>
<i>Shigella flexneri</i>	CMCC51173	-	-	-	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	CMCC51100	-	-	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	CMCC51184	-	-	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	CMCC51102	-	-	-	-	-
<i>Shigella boydii</i>	CMCC51113	-	-	-	-	-
<i>Shigella dysenteriae</i>	CMCC51137	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	CMCC50037	-	+	-	-	-
<i>S. paratyphi</i>	CMCC50001	-	+	-	-	-
<i>S. paratyphi</i>	CMCC50004	-	+	-	-	-
<i>S. choleraesuis</i>	CMCC50007	-	+	-	-	-
<i>S. enteritidis</i>	CMCC50041	-	+	-	-	-
<i>E. coli</i> O157	GIM 2012	-	-	+	-	-
<i>E. coli</i> O157	GIM 2011	-	-	+	-	-
<i>E. coli</i> O157	ATCC4389	-	-	+	-	-
<i>E. coli</i>	ATCC2592	-	-	-	-	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	ATCC3386	-	-	-	-	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	ATCC3387	-	-	-	-	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	ATCC1782	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	AB9109	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	AB9314	-	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	GIM 1.228	-	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	GIM 1.229	-	-	-	-	-
<i>Listeria innocua</i>	GIM 1.220	-	-	-	-	-
<i>Listeria welshimeri</i>	GIM 1.221	-	-	-	-	-
<i>V. cholerae</i>	VC-1	-	-	-	-	-
<i>V. cholerae</i>	VC-6	-	-	-	-	-

Note: CMCC(National Center for Medical Culture of Collections, 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); GIM(Guangdong Institute of Microbiology, 广东省微生物研究所); AB91093/ AB93147/ VC-1/ VC-6(上海疾病预防控制中心保藏菌种)。

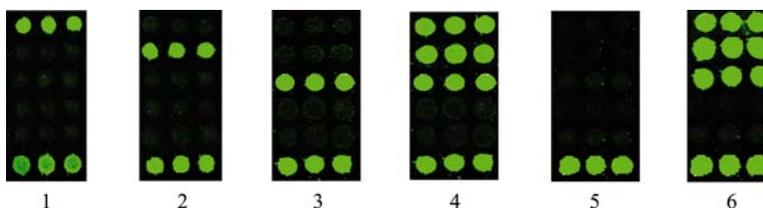


图 1 芯片特异性实验结果

Fig. 1 Species identification based on different pathogenicity genes of *Shigella*, *Salmonella* and *E. coli* O157

Note: 1: *Shigella flexneri*(CMCC51573); 2: *S. enteritidis* (CMCC50041); 3: *E. coli* O157 (ATCC43889); 4: Bacterial DNAs were amplified by one-tube multiplex PCR. The multiplex PCR was performed in the presence of the *ipaH*-, *stm*-, *slt*-specific primers; 5: Negative control; 6: All the bacterial DNAs were amplified in the presence of the *ipaH*-, *stm*-, *slt*-specific primers, including *Shigella flexneri*(CMCC51573), *S. enteritidis*(CMCC50041), *E. coli* O157 (ATCC43889) and *V. parahaemolyticus* (ATCC33846), *Staphylococcus aureus* (AB91093), *Listeria monocytogenes* (GIM 1.228) and *V. cholerae*.

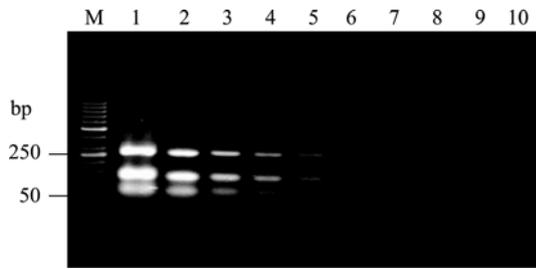


图 2 多重 PCR 灵敏度实验结果

Fig. 2 Sensitivity of the multiplex PCR assay in detecting mixture DNA from *Shigella*, *Salmonella* and *E. coli* O157
 M: 50 bp DNA ladder; 1: Positive control; 2: 80 ng; 3: 8 ng; 4: 800 pg; 5: 80 pg; 6: 32 pg; 7: 16 pg; 8: 8 pg; 9: 0.8 pg; 10: Negative control.

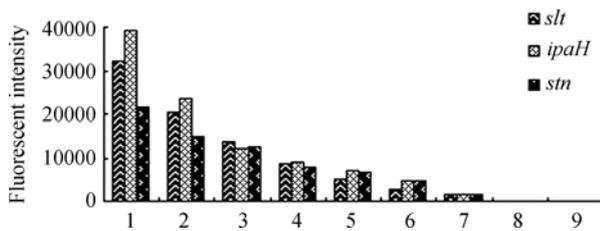


图 3 芯片灵敏度实验结果

Fig. 3 Sensitivity of the microarray in detecting mixture DNA from *Shigella*, *Salmonella* and *E. coli* O157
 1: 80 ng; 2: 8 ng; 3: 800 pg; 4: 80 pg; 5: 32 pg; 6: 16 pg; 7: 8 pg; 8: 0.8 pg; 9: Control.

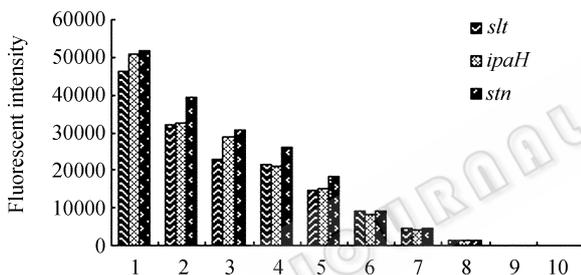


图 4 人工污染品芯片灵敏度实验结果

Fig. 4 Detecting sensitivity of the microarray in contaminated samples
 1: 5×10^8 CFU/mL *Shigella*, *Salmonella* and *E. coli* O157; 2~9: Serial 10-fold dilution of in milk and meat were processed for microarray; 10: Control.

2.5 样品检测

2.5.1 人工模拟样品检测: 为了验证芯片在样品环境中的特异性, 进行人工模拟样品的检测。实验证明人工污染的猪肉和牛奶都可以准确地检测出所接种的致病菌, 并无非特异性扩增, 证明该芯片对猪肉和牛奶中存在的志贺氏菌、沙门氏菌、大肠杆菌 O157 有很好的特异性。

2.5.2 实际样品检测: 进行了 29 份实际样品的检测, 包括猪肉 18 份(猪肉、猪肝)、牛奶 11 份。芯片检测志贺氏菌阳性的 1 份样品, 沙门氏菌阳性的 3 份

样品, 大肠杆菌 O157 阳性的 2 份样品, 将阳性样品的扩增产物进行测序, 显示与 GenBank 中标准菌株的同源性达 98%、99%。(表 5)。经细菌学与血清学的鉴定^[10-12], 1 份福氏 2a 志贺氏菌阳性样品, 3 份肠炎沙门氏菌阳性样品, 2 份肠出血性大肠艾希氏 EHEC O157(表 6), 结果与芯片检测方法一致。

表 5 扩增产物测序结果
 Table 5 Sequencing results of PCR products

Sequences deposited	GenBank accession number	Homology rate (Blastn, %)
<i>Shigella flexneri ipaH</i> gene	CP000266	99
<i>S. paratyphi A stn</i> gene	AE014613.1	98
<i>E. coli</i> O157 <i>slt</i> gene	EU754732.1	99

表 6 阳性菌株的细菌学与血清学鉴定结果
 Table 6 The positive sample detected by bacteriology and serology

<i>Shigella flexneri</i> 2a(GB/T 4789.5-2008)	Result
TSI producing acid from bottom	+
TSI producing alkali from inclined plane	+
Producing H ₂ S	-
Gas production	-
Motility	-
Agglutination test of the serum 3,4	+
Agglutination test of the serum 6	-
Agglutination test of the serum 7,8	-
5% Lactose fermentation	-
Mannose fermentation	+
Raffinose fermentation	+
Glycerol fermentation	-
Indole	+
<i>S. enteritidis</i> (GB/T 4789.4-2003)	Result
TSI producing alkali from inclined plane	-
TSI producing acid from bottom	+
Producing H ₂ S	+
Gas production	+
Indole	-
Urea pH 7.2	-
KCN	-
Lysine decarboxylase	+
<i>E. coli</i> O157(GB/T 4789.6-2003)	Result
TSI producing alkali from inclined plane	+
TSI producing acid from bottom	+
Producing H ₂ S	-
Urea pH 7.2	-
KCN	-
Oxidase test	-
Negative bacilli tested by gram stain	+

3 讨论

基因芯片技术是近年发展起来的分子生物学技术平台, 以其快速、准确、高通量、自动化等特点被广泛应用于生物学的各个领域, 如细菌分子流行病学调查、细菌基因鉴定、基因突变及多态性分析、基因表达谱分析、DNA 测序等。在病原微生物的检测方面已经被大量使用, 基于各种不同的靶基因已经建立了多种检测方法。基因芯片结合多重 PCR 技术检测和鉴定多种病原微生物是结合了二者诸多优点的一种高通量鉴定手段, 已被广泛使用^[13-16]。本研究建立的基于多重 PCR 的芯片检测方法, 可以在一个反应体系中同时鉴定志贺氏菌、沙门氏菌和大肠杆菌 O157 三种致病菌, 经证明是一种非常有用的方法, 为食品中致病菌的检测提供了较好的手段。

基因芯片的特异性是本方法的关键, 与所选取的靶基因和筛选的引物、探针密切相关。由于本实验所检测靶细菌中包含的志贺氏菌、沙门氏菌和大肠杆菌 O157 三种致病菌分别与其种属内其他细菌的遗传关系相近, 因此在选择靶基因时需要严格筛选, 而且探针的特异性越高越好。同时选取细菌 16S rDNA 基因中的约 500 bp 片段作为阳性对照, 用于监控由于 DNA 提取过程中出现的问题或者样本中致病菌浓度不够造成的假阳性结果。针对 *ipaH*、*stn* 和 *slt* 基因, 经过对大量寡核苷酸探针进行筛选, 每个基因都筛选出了对应的 1 条检测探针。将实验中的探针和引物在 GenBank 进行 BLAST 比对, 每条引物和探针序列均具有很高的特异性; 同时选取大量阴性和阳性标准菌株对其特异性进一步进行评价, 结果显示 16S rDNA 对应的探针每次实验均出现阳性信号, 说明整个实验的操作是正常的; 而对于 3 条特异性探针, 除了对应的阳性菌株外, 其他阴性菌均无阳性结果出现, 说明本实验建立的检测方法是可用的。

基因芯片检测的灵敏度是建立一种鉴定方法的重要评价指标之一。本实验通过多重不对称 PCR 和基因芯片技术建立的 3 病原菌检测方法, 对于每种靶细菌的灵敏度均可以达到 50 CFU/mL, 基因组 DNA 的检测限约为 8 pg, 在实验中也进行了多重 PCR 电泳检测, 检测的灵敏度可达到 500 CFU/mL, 基因组 DNA 的检测限约为 16 pg, 可见基因芯片的

灵敏度比电泳方法高, 这也与目前报道的其他一些基因芯片检测方法的灵敏度一致^[16,17]。对于基因组 DNA 的检测限约为 8 pg, 对于细菌纯培养物检测限约为 50 CFU/mL, 这一结果低于文献^[18]报道的多重 PCR 检测沙门氏菌和大肠杆菌 O157 的检测限, 也明显低于文献^[19]报道的芯片检测沙门氏菌、痢疾杆菌和单核细胞增生利斯特菌的检测限 10³ CFU/mL 细菌纯培养物, 同时也灵敏于其他一些基因芯片检测方法的灵敏度^[16,17]。

利用基因芯片技术可以不通过扩增片段的长度来对结果进行判断, 因此更适于复杂基质样本致病菌的检测和鉴定。本研究正是综合了多重 PCR 和基因芯片技术的优势, 通过一次实验获得大量数据, 可实现对多种病原菌、多个样本的同时检测, 为流行病学调查和突发性传染病的早期诊断提供了一种有效的检测手段。本研究建立的基因芯片结合多重 PCR 技术可同时对志贺氏菌、沙门氏菌和大肠杆菌 O157 进行检测, 具有较好的特异性, 在 4 h~5 h 内可以完成实验操作, 比常规的细菌学诊断更快速、简便、经济和实用, 为临床诊断提供了较好的手段, 有较大的应用价值。

病原微生物检测是目前研究的一个热点, 建立简单、快速、高通量的, 可同时对大量样本进行鉴定的方法是摆在研究者面前的一项难题。随着生物芯片应用范围的不断扩大, 这一难题有望借助该技术得以解决。对所有的病原微生物进行鉴定无疑是一项复杂并且艰巨的浩大工程, 需要各方面知识的不断融合, 积累。我们建立的对 3 种病原微生物进行检测和鉴定的基因芯片方法只是对基因芯片在食源性致病微生物检测中应用的初步探讨, 希望能为基因芯片技术在检测和鉴定致病微生物方面的广泛应用提供一些借鉴。

参 考 文 献

- [1] 俞志祥. 细菌性食物中毒检测流程的研究. 现代预防医学, 2003, 30(6): 907-908.
- [2] 汪清, 葛秀清, 黄祖华. 细菌性食物中毒的现状及检验. 中国动物检疫, 2004, 21(4): 20-22.
- [3] 陈建琳, 刘明辉. 细菌性食物中毒流行趋势及预防对策. 中国卫生检验杂志, 2002, 1(4): 481.
- [4] Linton D, Lawson AJ. PCR detection, identification to species level, and finger printing of *Campylobacter jejuni*

- and *Campylobacter coil* direct from diarrheic samples. *J Clin Microbiol*, 1997, **35**(10): 2568–2572.
- [5] 盘宝进, 韦梅良, 汪文龙, 等. 应用聚合酶链反应快速检测试验猴沙门氏菌和志贺氏菌. 现代农业科技, 2007, **13**: 170.
- [6] 张河战, 辜清吾. 沙门氏菌分类、命名及中国沙门氏菌菌型分布. 微生物学免疫学进展, 2003, **30**(2): 74.
- [7] Rappuoli R, Covacci A. Reverse vaccinology and genomics. *Science*, 2003, **302** (5645): 602.
- [8] 金大智, 文思远, 王升启. 基因芯片技术在检测肠道致病菌方面的应用. 微生物学报, 2006, **46**(2): 500.
- [9] 夏 涵, 府伟灵, 陈 鸣, 等. 快速提取细菌 DNA 方法的研究. 现代预防医学, 2005, **32**(5): 571–573.
- [10] 中国国家标准化管理委员会. 中华人民共和国国家标准(GB/T 4789.4-2003, 食品卫生微生物学检验: 沙门氏菌检验). 北京: 中国标准出版社, 2003, pp.19–31.
- [11] 中国国家标准化管理委员会. 中华人民共和国国家标准(GB/T 4789.5-2003, 食品卫生微生物学检验: 志贺氏菌检验). 北京: 中国标准出版社, 2003, pp.33–38.
- [12] 中国国家标准化管理委员会. 中华人民共和国国家标准(GB/T 4789.6-2003, 食品卫生微生物学检验: 致泻大肠埃希氏菌检验). 北京: 中国标准出版社, 2003, pp.39–46.
- [13] Woo- Sung J, Serka K, Suk- In H, *et al.* DNA probe chip system for multiple detection of food poisoning microorganisms. *Material Sci Engineering*, 2004, **24**: 47.
- [14] Al- Khaldi SF, Doralis V, Vladimir C. Identification and characterization of *Clostridium perfringens* using single target DNA microarray chip. *Inter J Food Microbiol*, 2004, **91**: 289.
- [15] Gonza' lez SF, Krug MJ. Simultaneous detection of marine fish pathogens by using multiplex PCR and a DNA microarray. *J Clin Microbiol*, 2004, **42**(4): 1414.
- [16] Call DR, Brockman FJ, Chandler DP. Detecting and genotyping *Escherichia coli* O157: H7 using multiplexed PCR and nucleic acid microarrays. *Int J Food Microbiol*, 2001, **67**: 71–80.
- [17] Woo- Sung J, Serka K, Suk-In H, *et al.* DNA probe chip system for multiple detection of food poisoning microorganisms. *Material Sci Engineering*, 2004, **24**: 47.
- [18] 杨小鹏, 吴清平, 张菊梅, 等. 畜禽肉沙门氏菌和大肠杆菌 O157 多重 PCR 检测研究. 微生物学通报, 2008, **35**(3): 470–474.
- [19] 李 禾, 徐 琦, 吴忠华, 等. 基因芯片技术检测 3 种肠道病原微生物方法的建立. 生物技术通讯, 2007, **18**(3): 441–445.

征订启事

《光明中医》杂志 2009 年征订征稿启事

《光明中医》杂志是国家中医药管理局主管、中华中医药学会主办的国家级中医药科技综合期刊, 刊号 CN11-1592/R, ISSN-8914。国内外公开发行, 每月 20 日在北京出版。以广大基层中医药临床工作者、中医爱好者、科技、教学工作及中医药院校师生为主要读者对象。系中国科技核心期刊(遴选)数据库、中国学术期刊(光盘版)、科技部万方数据库、中文科技期刊数据库全文收录期刊。

《光明中医》杂志是国家级综合性中医药学术期刊, 本刊以“寓医理于临床”为办刊宗旨, 以“面向临床”、“面向科研”、“面向社区”为办刊方针, 实用性强, 读者群广。主要栏目: 论著、实验研究、薪火传承、硕博论坛、针灸探骊、中西医结合、临床研究、医案医话、方药纵横、民族医药、教管研究、社区医药、护理研究、科研进展等。

《光明中医》杂志为月刊, 大 16 开, 内文 168 页, 每册定价 8.0 元, 全年定价 96.0 元, 邮发代号: 82-525。各地邮局均可办理订购。若当地邮局订购有困难, 亦可直接与本刊广告发行部订购。欢迎广大读者、作者、赐稿订阅。

本刊全国唯一专用的投稿、汇款、通联信箱: 北京 105 信箱(相当于通函地址)邮编: 100036。电话 010-51813510/3503(传真)

本刊唯一指定官方网站: <http://bjgmzy.com>; 本刊唯一指定的在线投稿信箱: gmzyzy@sina.com

本刊社址: 北京市复兴门南大街甲 2 号知医堂配楼 102 室

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>