

重组酶介导扩增技术快速检测食品中 单核细胞增生李斯特菌

崔荣飞¹, 赵义良^{1*}, 田梅¹, 赵永坡², 曹楠¹, 王丽娟³, 郭利川⁴

(1. 石家庄市畜产品和兽药饲料质量检测中心, 石家庄 050041; 2. 石家庄市农林科学研究院, 石家庄 050000;
3. 河北省动物卫生监督所, 石家庄 050000; 4. 江苏奇天基因生物科技有限公司, 无锡 214000)

摘要: **目的** 建立重组酶介导扩增技术(recombinase aided amplification, RAA)快速检测单核细胞增生李斯特菌的方法。**方法** 以单核细胞增生李斯特菌的 *hlyA* 基因作为靶序列, 设计引物和探针, 通过构建含目的基因片段的重组质粒, 评价 RAA 方法的灵敏度, 通过检测沙门氏菌核酸、金黄色葡萄球菌核酸、副溶血性弧菌核酸、溶血性链球菌核酸、志贺氏菌核酸基因组 DNA, 评价其特异性。**结果** 建立的 RAA 方法可在 39 °C、20 min 内, 检测重组质粒中 *hlyA* 基因片段, 最低可检出的质粒拷贝数为 10 拷贝/反应, 且与沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌、溶血性链球菌、志贺氏菌基因组 DNA 无交叉反应。**结论** 建立的 RAA 方法具有灵敏度高和特异性强的特点, 可用于单核细胞增生李斯特菌的快速检测。

关键词: 单核细胞增生李斯特菌; 重组酶介导扩增; 分子检测

Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by recombinase aided amplification method

CUI Rong-Fei¹, ZHAO Yi-Liang^{1*}, TIAN Mei¹, ZHAO Yong-Po², CAO Nan¹,
WANG Li-Juan³, GUO Li-Chuan⁴

(1. Shijiazhuang Animal Products and Veterinary Medicine Feed Quality Testing Center, Shijiazhuang 050041, China;
2. Shijiazhuang Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050000, China; 3. Institute of Animal Health Supervision, Shijiazhuang 050000, China; 4. Jiangsu Qitian Gene Biotechnology Co., Ltd, Wuxi 214000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a recombinase aided amplification (RAA) method for detection of *Listeria monocytogenes*. **Methods** The primers and probe were designed according the specific *hlyA* gene sequence of *Listeria monocytogenes*. The sensitivity of RAA method was evaluated using a recombinant plasmid containing *hlyA* gene fragment. The specificity was performed by amplification of genomic DNA of *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio Parahemolyticus*, *Streptococcus hemolyticus* and *Shigella*. **Results** RAA method can be used to detect *hlyA* gene fragment in the recombinant plasmid at a copy number as low as 10 copies per reaction within 20 min at 39 °C with no cross-reaction with *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio Parahemolyticus*, *Streptococcus hemolyticus* and *Shigella*. **Conclusion** RAA method has the characteristics of high sensitivity and specificity, and can be used for rapid detection of *Listeria monocytogenes*.

基金项目: 河北省重点研发计划项目(19227503D)

Fund: Supported by Key Research and Development Projects of Hebei Province(19227503D)

*通信作者: 赵义良, 研究员, 主要研究方向为动物卫生监督、畜产品质量安全。E-mail: sjz86822295@163.com

*Corresponding author: ZHAO Yi-Liang, Professor, Shijiazhuang Inspection Center of Animal Products and Veterinary Drug Feed Quality, No.3, Yixi Street, Chang'an District, Shijiazhuang 050041, China. E-mail: sjz86822295@163.com

KEY WORDS: *Listeria monocytogenes*; recombinase aided amplification; molecular detection

0 引言

单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)简称“单增李斯特菌”，是一种常见的土壤中的腐生菌，革兰氏反应为阳性，兼性厌氧，是目前国际上确认的 7 种李斯特菌中唯一能引起人畜共患病的食源性致病菌，该菌属在食源性细菌中毒案例中占主要地位^[1]。主要通过乳及乳制品、蔬菜、水产品、肉制品等传播，使人和动物患脑膜炎、脑炎、败血症、单核细胞增多及造成孕妇流产、死胎等疾病，病死率高达 20%~30%^[2-3]。WTO 已将其列为 20 世纪 90 年代食品中四大致病菌之一^[4]。单增李斯特菌的生长对营养要求不高，且有较强的抵抗力，能在不同的环境条件下生长，在自然界中分布广泛，尤其在冷藏食品中很常见，是威胁人类健康的主要病原菌之一^[5]。

目前，单增李斯特菌的检测方法包括传统的检测方法、免疫学检测以及分子生物学检测方法等。传统的单增李斯特菌检测方法由于检测周期长、漏检率高、程序复杂、所需试剂繁多等缺点，已经远远不能满足现代的检测要求，这不仅给检验部门带来沉重的负担，而且还使生产部门产品运转和仓储的时间延长，费用增加。随着免疫学及分子生物学的发展，酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、DNA 探针和 PCR 等检测方法也不断应用到检验中^[6-10]，但是这些方法检测时间较长，不适用于单增李斯特菌的快速检测。重组酶介导的扩增(recombinase aided amplification, RAA)技术在分子诊断领域的应用也多有报道^[11-13]。RAA 技术可在等温条件下(一般为 37~42 °C)，5~20 min 内实现对目的基因片段的扩增，具有操作简便、快速扩增及可对结果进行实时监测等优势，已经用于多种人体、食品及环境病原菌的检测，如乙型肝炎病毒(hepatitis B virus)^[14]、呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus)^[15]、沙门氏菌(*Salmonella*)^[16]等。

本研究基于 RAA 反应原理建立单增李斯特菌特异性基因检测方法，并评估该方法的敏感性及特异性，以期为单增李斯特菌的检测及诊断提供一种新的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株

供试菌株为石家庄市畜产品和兽药饲料质量检测中心保存，信息如下：单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes* ATCC19115)、沙门氏菌(*Salmonella enteritidis* ATCC15611)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*

ATCC25922)、副溶血性弧菌(*Vibrio Parahemolyticus* ATCC17802)、溶血性链球菌(*Streptococcus hemolyticus* ATCC1059)、福氏志贺氏菌(*Shigella flexneri* ATCC12022)。

1.1.2 仪器与试剂

RAA-F1620 恒温核酸扩增检测仪(江苏奇天基因生物科技有限公司)。

细菌基因组提取试剂盒(DP302)、质粒提取试剂盒(DP103)(北京天根生化科技有限公司)；引物及探针由生工生物工程(上海)股份有限公司进行合成；RAA 荧光基础扩增试剂盒(F00001, 江苏奇天基因生物科技有限公司)。

鲜牛奶采购自石家庄君乐宝乳业有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 提取

质粒 DNA、细菌基因组 DNA 和土壤基因组 DNA 的提取均按照试剂盒说明书操作。

1.2.2 引物和探针设计

利用 DNAMAN 8.0 软件，通过比对 NCBI 数据库中多条单增李斯特 *hlyA* 基因序列的保守区域，设计特异性引物 F/R 和探针 P。

1.2.3 质粒构建

将合成的 *hlyA* 基因序列片段(262 bp)克隆到 pUC57 质粒，构建质粒 pUC57-*hlyA*(2710 bp)。*hlyA* 基因序列片段为：5'-GATGAAGTAAATTATGATCCTGAAGGTAACGAAATTGTTCAACATAAAAACTGGAGCGAAAACAATAAAGCAAGCTAGCTCATTTCACATCGTCCATCTATTTGCC TGGAACGCGAGAAATATTAATGTTTACGCTAAAGAA TGCCTGGTTTAGCTTGGGAATGGTGGAGAACGGTAA TTGATGACCGGAACCTACCCTTGTGAAAAATAGAAA TATCTCCATCTGGGGCACCACGCTTTATCCGAAATATA GTAATA-3'，由上海生物工程有限公司合成。

1.2.4 反应体系

按 RAA 荧光基础试剂盒使用说明书操作。RAA 反应体系(50 μL)：缓冲液 25 μL，双蒸水 16.7 μL，引物 F 和 R 各 420 nmol/L，探针 P 120 nmol/L，DNA 模板 1 μL。上述组份充分混合，加入到 RAA 反应单元冻干粉中，使之溶解，并瞬时离心，向反应管盖中加入 280 mmol/L 醋酸镁溶液 2.5 μL，混匀、瞬时离心，放入到恒温核酸扩增检测仪中进行扩增。扩增条件：39 °C，20 min。

1.2.5 灵敏度检测

将 1.2.3 中的质粒进行系列 10 倍稀释($10^1 \sim 10^3$ 拷贝/μL)，采用 1.2.4 的反应体系，检测 RAA 方法的灵敏度。

1.2.6 特异性评价

分别提取单增李斯特菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌、溶血性链球菌、福氏志贺氏菌基因组 DNA，并以此为模板分别进行 RAA 扩增，评价 RAA

方法的特异性。

1.2.7 模拟污染牛奶的检测

将单增李斯特菌接种至 LB 液体培养基中, 37 °C 过夜培养, 将培养液分别用生理盐水进行 10 倍梯度稀释, 取 5 mL 接种到 45 mL 牛奶中, 采用稀释平板进行计数。污染的牛奶模拟物用细菌基因组提取试剂盒提取 DNA, 进行 RAA 检测。

2 结果与分析

2.1 引物和探针设计

通过比对 NCBI 数据库多条单增李斯特菌 *hlyA* 基因序列, 共设计了 9 对检测单增李斯特菌 RAA 引物, 通过引物的筛选和评估, 最终获得一对特异性引物 F/R 和探针 P(表 1)。扩增片段大小为 112 bp。

2.2 灵敏度检测

以不同拷贝数的重组质粒为模板进行 RAA 法检测, 结果显示, 荧光信号出现的时间随着重组质粒的拷贝数增加而提前, 0 min 到 20 min 内所有样品均出现明显扩增, 随着拷贝数的降低, 检测到明显增加的荧光信号所需的时间

逐渐延长, 最低可检测到含有 10 拷贝/ μL 重组质粒的荧光信号。阴性对照反应荧光信号无明显增加(图 1), 说明方法灵敏度高。

2.3 特异性检测

特异性检测以单增李斯特菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌、溶血性链球菌、志贺氏菌的基因组 DNA 为模板进行 RAA 扩增, 仅单增李斯特菌的 DNA 为模板的反应在 10 min 内检测到明显增加的荧光信号, 结果为阳性。其他样本反应的荧光信号均未检测到明显增加, 结果为阴性, 无交叉反应(图 2), 说明方法特异性较强。

2.4 模拟样品检测

由于目前国内对奶制品的监管很严格, 本中心未有单增李斯特污染的实际样本, 因此采用模拟污染的牛奶样本进行检测。将菌液与牛奶混合后, 进行基因 DNA 提取, 以此为模板进行 RAA 反应, 结果如图 3 所示, 经计算, 李斯特原液的初始浓度为 8.62×10^8 CFU/mL, 最低检测限为 8.62×10^2 CFU/mL, 表明此方法可以应用在实际样本的检测中

表 1 RAA 引物和探针序列
Table 1 The primer and probe of RT-RAA

引物名称	引物序列(5'-3')
正向引物 F	CTAGCTCATTTCACATCGTCCATCTATTTGC
反向引物 R	CATCAATTACCGTCTCCACCATTCCAAGC
探针 P	CGTCCATCTATTTGCCWGGTAACGCRAGAAA-T(FAM)A-(THF)-T(BHQ1)AATGTTTACGCYAAAG-C3 Spacer

注: FAM: 6-羧基荧光素; THF: 四氢呋喃; BHQ: 黑洞淬灭探针; C3 Spacer: 3'阻断延伸。

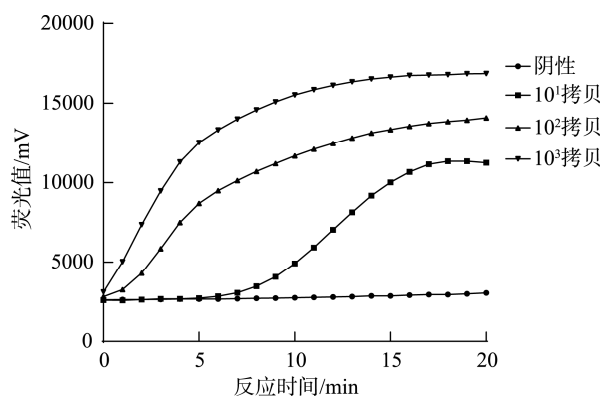


图 1 RAA 灵敏度检测结果
Fig.1 Sensitivity of RAA method

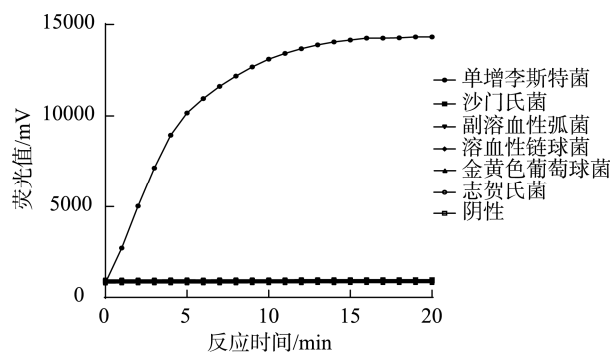


图 2 RAA 方法特异性
Fig.2 Specificity of RAA method

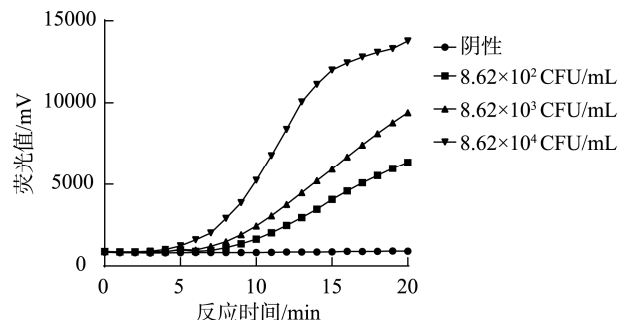


图3 模拟污染牛奶的检测灵敏度

Fig.3 Detection sensitivity of simulated contaminated milk

3 结论与讨论

本研究选取单增李斯特菌的 *hlyA* 基因为目的基因,建立了快速检测单增李斯特菌的 RAA 方法, *hlyA* 基因高度保守,已经被许多学者用来作为检测单增李斯特菌的靶基因^[3,17-18]。在本研究中,以含有 *hlyA* 基因片段的重组质粒,可以得到 10 拷贝/反应的检测下限,并且检测时间随着模板浓度的延长而延长,两者之间可能存在一定的线性关系,可通过引物筛选或调解优化来寻找这种线性关系,从而对样本进行定量或者半定量,这是下一步的研究方向。本方法所取得的结果且与沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌、溶血性链球菌、志贺氏菌无交叉反应。本方法灵敏度和特异性较强,可用于单核细胞增生李斯特菌的快速检测。

参考文献

- 韩斌, 刘战民, 高海燕, 等. 单核细胞增生李斯特菌的检测技术[J]. 中国生物工程杂志, 2008, (6): 125-128.
HAN B, LIU ZM, GAO HY, *et al.* Advance on the detection assays of *Listeria monocytogenes* [J]. China Biotechnol, 2008, (6): 125-128.
- 吴清平, 李善志, 张菊梅, 等. 单核细胞增生李斯特菌检测技术研究进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, (15): 888-890.
WU QP, LI SZ, ZHANG JM, *et al.* Advances in detection of *Listeria monocytogenes* [J]. China J Health Lab Technol, 2005, (15): 888-890.
- 王海艳, 刘中学, 刘虹, 等. 食品中单增李斯特菌快速、敏感、特异 PCR 检测方法的建立[J]. 检验检疫科学, 2006, 16(1): 3-6.
WANG HY, LIU ZX, LIU H, *et al.* Establishment of a rapid sensitive and specific PCR detection method of *Listeria monocytogenes* in food [J]. Insp Quar Sci, 2006, 16(1): 3-6.
- NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucl Acid Res, 2000, 28(12): 63.
- KATHARIOU S. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective [J]. J Food Protect, 2002, (65): 1811-1829.
- 姜迪来, 凌宗帅, 王克刚, 等. SPA-ELISA 用于单核细胞增生性李斯特菌检验的应用研究[J]. 肉类研究, 2006, 31(6): 47-50.
- JIANG DL, LING ZS, WANG KG, *et al.* Application of SPA-ELISA in detection of *Listeria monocytogenes* [J]. Meat Res, 2006, 31(6): 47-50.
- 李盛丰, 赵姣, 钟名华, 等. 单增李斯特菌不同 PCR 快速检测方法比较[J]. 中国公共卫生, 2008, 24(8): 1021-1023.
LI SF, ZHAO J, ZHONG MH, *et al.* Comparison of different PCR methods for rapid detection of *Listeria monocytogenes* [J]. China J Publ Health, 2008, 24(8): 1021-1023.
- 金大智, 曹际娟, 张政, 等. 实时荧光 RT-PCR 检测活性单核细胞增生李斯特菌方法的建立[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2008, 28(10): 941-945.
JIN DZ, CAO JJ, ZHANG Z, *et al.* Detection and identification of viable *Listeria monocytogenes* by real-time PCR [J]. Chin J Microbiol Immunol, 2008, 28(10): 941-945.
- 刘仲敏, 郑鸣, 王永芬. 食源性单增李斯特菌的实时定量 PCR 检测[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(5): 100-104.
LIU ZM, ZHENG M, WANG YF. Study on detection of food-borne *Listeria monocytogene* by the real-time quantitative PCR [J]. Food Ferment Ind, 2007, 33(5): 100-104.
- 刘燕艳. 免疫磁珠—实时荧光 PCR 联用技术快速检测食品中单增李斯特菌的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
LIU YY. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in food by immunomagnetic beads real time PCR [D]. Hangzhou: Zhengjiang University, 2014.
- LI J, MACDONALD J. Advances in isothermal amplification: Novel strategies inspired by biological processes [J]. Biosens Bioelectron, 2015, (64): 196-211.
- 赵松, 刘燕红, 李婷, 等. 结合重组酶介导的核酸等温扩增和荧光探针快速检测日本血吸虫基因片段[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2019, 37(1): 23-27.
ZHAO S, LIU YH, LI T, *et al.* Rapid detection of *Schistosoma japonicum* specific gene fragment by recombinase aided isothermal amplification combined with fluorescent probe [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2019, 37(1): 23-27.
- 倪碧娟, 吴小珉, 刘燕红, 等. 重组酶介导的隐孢子虫属特异性等温核酸扩增方法的建立及评价[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2019, (4): 388-392.
NI BX, WU XM, LIU YH, *et al.* Establishment and evaluation of recombinant enzyme mediated isothermal nucleic acid amplification for cryptosporidium [J]. Chin J Schistosomiasis Control, 2019, (4): 388-392.
- SHEN XX, QIU FZ, SHEN LP, *et al.* A rapid and sensitive recombinase aided amplification assay to detect hepatitis B virus without DNA extraction [J]. BMC Infect Dis, 2019, 19(1): 229.
- YAN TF, LI XN, WANG L, *et al.* Development of a reverse transcription recombinase-aided amplification assay for the detection of coxsackievirus A10 and coxsackievirus A6 RNA [J]. Arch Virol, 2018, 163(6):

1455-1461.

- [16] LI JL, MA B, FANG JH, *et al.* Recombinase polymerase amplification (RPA) combined with lateral flow immunoassay for rapid detection of *Salmonella* in food [J]. *Foods*, 2020, 9(1): 27.
- [17] 翁文川, 焦红, 胡科锋, 等. 应用荧光 PCR 方法检测食品中的单核细胞增生李斯特氏菌[J]. *检验检疫科学*, 2005, 15(z1): 41-43.
- WENG WC, JIAO H, HU KF, *et al.* Detection of *Listeria monocytogenes* in food by fluorescence PCR [J]. *Insp Quar Sci*, 2005, 15(z1): 41-43.
- [18] WANG L, LI Y, CHU J, *et al.* Development and application of a simple loop-mediated isothermal amplification method on rapid detection of *Listeria monocytogenes* strains [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, (39): 445-449.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介

崔荣飞, 高级兽医师, 主要研究方向为动物医学。

E-mail: sjzcrf@126.com

赵义良, 研究员, 主要研究方向为动物卫生监督、畜产品质量安全。

E-mail: sjz86822295@163.com



“保健食品的研发与检测”专题征稿函

保健食品是指具有特定保健功能或者以补充维生素、矿物质为目的的食品。保健食品亦称功能性食品, 是特定的食品种类, 有调节人体功能的作用。

本刊特别策划了“保健食品的研发与检测”专题, 由北京联合大学 闫文杰副教授 担任专题主编。专题围绕但不限于保健食品的开发、功能性活性成分提取与检测、新型保健食品研发、功能性食品添加剂、保健食品配料、保健功能性物质(肽与蛋白质、功能性油脂、多糖、微量元素、维生素等)应用、研发与检测等方面等方面, 或您认为有意义的相关领域开展论述和研究。

鉴于您在该领域丰富的研究经历和突出的学术造诣, 本刊主编吴永宁研究员、专题主编闫文杰副教授及编辑部全体成员特别邀请您为本专题撰写稿件。研究论文、综述、研究简报均可, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。

本专题计划于 2021 年 5~6 月出版, 请您于 2021 年 3 月 31 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

希望您通过各种途径宣传此专题, 并积极为本专题推荐稿件和约稿对象。

同时, 希望您能够推荐该领域的相关专家并提供电话和 E-mail。

感谢您的参与和支持!

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com(注明保健食品的研发与检测专题)

E-mail: jfoodsq@126.com(注明保健食品的研发与检测专题)

《食品安全质量检测学报》编辑部