

食品中单增李斯特氏菌检测 PCR-免疫胶体金试纸条方法的建立

庞璐, 宋喆, 吴冬雪, 张海英, 赵良娟, 刘培, 蔡国瑞, 李宗梦, 赵宏, 张宏伟*
(天津出入境检验检疫局动植物与食品检测中心, 天津 300461)

摘要: **目的** 建立食品中单核增生李斯特氏菌快速检测 PCR-免疫胶体金试纸条法。**方法** 通过设计特异性引物建立单增李斯特氏菌检测 PCR 方法并使用免疫胶体金技术建立 PCR 产物快速检测试纸条; 用试验菌株检测 PCR-免疫胶体金试纸条方法的检测特异度与敏感度。使用新建方法对市售肉制品和乳制品中单核增生李斯特氏菌进行检测, 验证该方法在食品检测中的可行性。**结果** PCR-免疫胶体金法具有良好的特异度, 敏感度比标准琼脂糖凝胶电泳法高 100 倍。采集乳品样品 131 份, 阳性样品 1 份, 检出率 1.53%; 肉制品 224 份, 阳性样品 4 份, 检测率 1.79%。**结论** 建立的单增李斯特氏菌检测 PCR-免疫胶体金试纸条法特异度好, 敏感度高, 适用于食品中单增李斯特氏菌的检测。

关键词: 单增李斯特氏菌; 快速检测; PCR; 免疫胶体金

PCR-immunogold method for detection of *Listeria monocytogenes* in food

PANG Lu, SONG Zhe, WU Dong-Xue, ZHANG Hai-Ying, ZHAO Liang-Juan, LIU Pei, CAI Guo-Rui,
LI Zong-Meng, ZHAO Hong, ZHANG Hong-Wei*

(Animal, Plant and Foodstuffs Inspection Center, Tianjin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Tianjin 300461, China)

ABSTRACT: Objective To establish the PCR-immunogold method for detection of *Listeria monocytogenes* in food. **Methods** The PCR method for *Listeria monocytogenes* detection was built through the design of specific primers and the rapid test immunogold strip for detection of PCR products was established. Then the specificity and sensitivity of the new method were tested using the test bacterial strains and *Listeria monocytogenes* in milk and meat products was detected using the PCR-immunogold strip method to verify whether this method is appropriate to food samples test. **Results** The method established is specific and the sensitivity is higher than that of the agarose gel electrophoresis by 100 times. We screened 131 milk samples and 224 meat samples totally and found 1 (1.53%) of milk samples and 4 (1.79%) of meat samples carrying *Listeria monocytogenes*. **Conclusion** The new method has high specificity and sensitivity and is suitable for the detection of *Listeria monocytogenes* in food.

KEY WORDS: *Listeria monocytogenes*; rapid detection; PCR; immunogold method

基金项目: 国家质检总局科技计划项目(2013IK181、2014IK222)

Fund: Supported by the Scientific and Technological Project of the General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China (2013IK181, 2014IK222)

*通讯作者: 张宏伟, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: zhanghw1@tjciq.gov.cn

*Corresponding author: ZHANG Hong-Wei, Professor, Animal, Plant and Foodstuffs Inspection Center of Tianjin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No.158, Jingmen Road, Baoshui District, Tianjin, 300461, China. E-mail: zhanghw1@tjciq.gov.cn

1 引言

单增李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)是李斯特菌属中唯一能引起人类疾病的, 为一种人畜共患病的病原菌。它能引起人、畜的李斯特菌病, 感染后主要表现为败血症、脑膜炎和单核细胞增多。健康人粪便中单增李氏菌的携带率为 0.6%~16.0%, 4%~8%的水产品、5%~10%的奶及其产品、30%以上的肉制品及 15%以上的家禽均被该菌污染^[1]。人主要通过食入软奶酪、未充分加热的鸡肉、未再次加热的热狗、鲜牛奶、巴氏消毒奶、冰激凌、生牛排、羊排等而感染, 约占 85%~90%的病例是由被污染的食品引起的^[2]。

在传统的食品生产、质量监督和进出口检验检疫中常规的细菌培养及鉴定方法, 检验步骤繁琐, 检验周期长, 同时对于有些细菌仍无法给出快速和准确的鉴定, 不能完全满足农产品及进出口检验检疫的检测要求。基于核酸扩增的方法检测对象是来自病原微生物的 DNA, 经特异性扩增后用免疫胶体金的方法进行产物鉴定, 这类方法因其敏感度高, 特异性好, 耗时少而发展迅速^[3,4]。本研究根据单增李斯特氏菌特异性基因片段设计引物, 进行 PCR 扩增, 并对扩增产物采用免疫胶体金试纸条方法进行快速检测。

2 材料与试剂

2.1 菌株

实验用菌株见表 1。

表 1 试验菌株
Table 1 Bacterial strains for detection

| 编号 | 菌株名称 | 来源 |
|----|-----------|------------|
| 1 | 单增李斯特菌 | CICC21633 |
| 2 | 绵羊李斯特氏菌 | 野生株, 分离自牛肉 |
| 3 | 西尔李斯特氏菌 | 野生株, 分离自牛肉 |
| 4 | 威尔斯李斯特氏菌 | 野生株, 分离自牛肉 |
| 5 | 格氏李斯特氏菌 | 野生株, 分离自牛肉 |
| 6 | 金黄色葡萄球菌 | ATCC25923 |
| 7 | 志贺氏菌 | ATCC12022 |
| 8 | 大肠杆菌 O157 | ATCC35150 |

2.2 试剂

细菌基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技), dNTP mixture(TaKaRa), 10×PCR buffer(Mg²⁺ Plus)(TaKaRa), Taq DNA polymerase(TaKaRaTagTM), ddH₂O, 琼脂糖(Biowest), 1×TAE 缓冲液, gelred 染液(Biotium), Loading buffer(Solarbio), DNA 分子量标准(天根生化科技)。

2.3 设备

PCR 扩增仪(Bio-Rad T00, 美国)、离心机(Eppendorf 5417R, 德国)、电泳仪(Biometra P25, 德国)、凝胶成像仪(Bio-Rad XR+, 美国)。

3 方法

3.1 DNA 的提取

将表 1 中实验菌株分别接种于 10 mL 营养肉汤中, 37 °C 培养 24 h, 取 1 mL 菌液使用试剂盒进行 DNA 提取^[5]。

3.2 引物序列及标记分子

利用单增李斯特氏菌特异性基因序列设计特异性引物: 上游引物 5'-CCAAGATACAGAAACATCG GT TGG-3', 下游引物 5'-CGAGTACATTGGCATC GTG-3'。上下游引物分别用异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)和地高辛(Digoxin)标记^[6]。

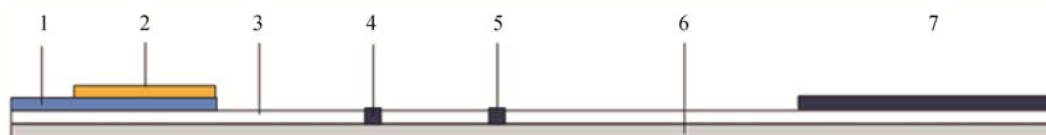
3.3 PCR 反应体系及反应条件

PCR 反应体系为: 模板 DNA 10 μL, Primer F/R 0.8 μL, dNTP mixture 2.0 μL, 10×PCR buffer(Mg²⁺ Plus) 2.0 μL, Taq DNA polymerase 0.2 μL, ddH₂O 4.2 μL, 总体积 20 μL。反应条件为 95 °C 5 min, 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 80 s, 30 个循环后转入 72 °C 5 min^[7]。

3.4 标准试纸条的建立

将标准的通用抗体 FITC 抗体(兔源)与胶体金颗粒交联, 在颗粒表面形成包被的抗体, 将抗地高辛抗体以线条状固定于膜上形成检测线^[8,9], 质控线, 制成试纸条如图 1 所示。

用于核酸序列检测的展开液成分为: 10 mmol/L Tris、1% BSA、1%(v/v) Tween20 以及浓度为 0.05~0.50 mol/L 的 NaOH, 该展开液可以减少引物二聚体对实验结果的干扰。



1: 吸水滤纸垫; 2: 结合物垫, 附有 FITC 抗体 (免源) 与胶体金颗粒的交联体; 3: 侧向层析基质 (硝酸纤维素膜); 4: 检测带, 附有地高辛的抗体; 5: 质控带, 附有可结合免源抗体的抗体; 6: 衬底; 7: 吸水垫

图 1 试纸条的基本结构

Fig. 1 Basic structure of test strip

3.5 结果检测

利用建立的 PRC 体系对单增李斯特氏菌 ATCC12022 和绵羊李斯特氏菌进行扩增, 并使用 ddH₂O 作为空白对照。取 3 μL PCR 扩增产物滴于试纸条样品垫, 加入到 97 μL 展开液中进行检测, 5 min 后观察结果。质控带出现红色为有效结果, 检测带出现红色为阳性结果。

3.6 方法特异性及敏感度

利用建立起来的 PCR 反应体系对表 1 中所列试验菌株进行扩增, 使用 ddH₂O 作为空白对照。同时将单增李斯特氏菌过夜培养菌液做菌落计数并将菌液以 1、1/10、1/10²、1/10³、1/10⁴、1/10⁵、1/10⁶、1/10⁷、1/10⁸、1/10⁹ 的比例稀释后, 制作 DNA 模板按已建立的 PCR 体系进行扩增。

取 5 μL PCR 产物用于琼脂糖凝胶电泳。凝胶电泳条件为: 1×TBE 缓冲液, 电压 100 V, 电泳时间 30 min。同时分别取 3 μL 用于核酸试纸条检测, 取 3 μL 样品点于样品垫, 加入到 97 μL 展开液中进行检测, 5 min 后观察结果。

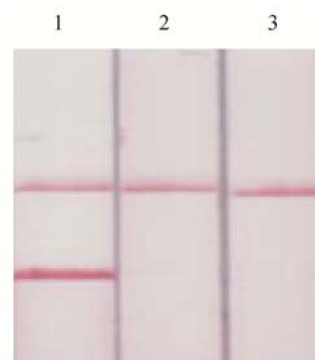
3.7 样品检测

采集市售乳制品和肉制品, 使用 PCR-免疫胶体金试纸条方法对样品进行检测。

4 结果与分析

4.1 试纸条检测结果

使用建立的 PCR-免疫胶体金试纸条方法对单增李斯特氏菌、绵羊李斯特氏菌及空白对照(ddH₂O)进行检测的结果如图 2 所示。单增李斯特氏菌的检测试纸条质控带与检测带均为红色, 为阳性结果。绵羊李斯特氏菌和空白对照只有质控带显示红色, 为阴性结果。



1: 单增李斯特氏菌; 2: 绵羊李斯特氏菌; 3: 空白对照(ddH₂O)

图 2 试纸条检测结果示意图

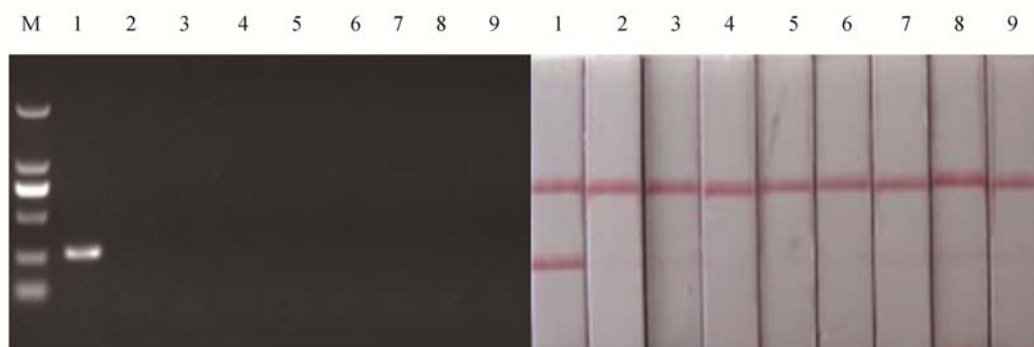
Fig. 2 Results of strip tests

4.2 方法特异性

用 PCR-标准电泳的方法和 PCR-免疫胶体金试纸条方法同时对表 1 中的试验菌株进行检测的结果如图 3 所示。单增李斯特氏菌的检测带为红色, 结果阳性, 其他菌均只有质控带为红色, 说明该方法特异性良好, 可以从多类常见食源性致病菌中特异性检出单增李斯特氏菌。

4.3 方法敏感度

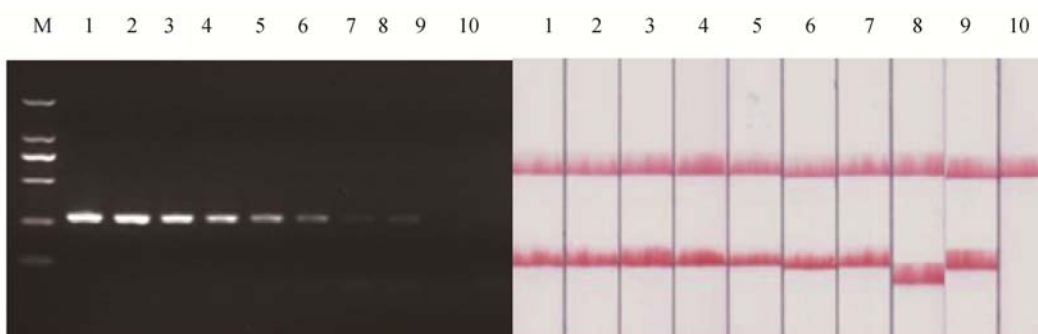
过夜培养的单核增生李斯特氏菌 CICC21633 菌液计数结果为 6.8×10^8 CFU/mL。将 10 倍系列稀释的菌液制作 DNA 模板, 利并同时用 PCR-标准琼脂糖凝胶电泳和 PCR-免疫胶体金试纸条方法进行检测, 结果如图 4 所示。琼脂糖凝胶电泳结果在菌液 1/10⁶ 倍稀释后条带明显模糊, 电泳结果已无法判断其阳性, 可见 PCR-琼脂糖凝胶电泳法的菌液检测敏感度为 10² CFU/mL。在 PCR-免疫胶体金试纸条检测方法中, 菌液稀释倍数为 1/10⁸ 时, 检测带变色明显, 可明确判断其阳性结果, 可见使用 PCR-免疫胶体金试纸条方法的菌液检测敏感度为 10⁰ CFU/mL, 比 PCR-标准琼脂糖凝胶电泳方法灵敏度高 10² 倍。



1: 单增李斯特氏菌; 2: 绵羊李斯特氏菌; 3: 西尔李斯特氏菌; 4: 威尔斯李斯特氏菌; 5: 格氏李斯特氏菌; 6: 金黄色葡萄球菌; 7: 志贺氏菌; 8: 大肠杆菌 O157; 9: 空白对照(水); M: DNA ladder

图 3 试纸条检测特异度

Fig. 3 Specificity of strip test



1~10 的 DNA 模板稀释倍数分别为 1, 1/10, 1/10², 1/10³, 1/10⁴, 1/10⁵, 1/10⁶, 1/10⁷, 1/10⁸, 1/10⁹; M: DNA ladder

图 4 试纸条检测灵敏度

Fig. 4 Sensitivity of strip test

4.4 样品检测

使用 PCR-免疫胶体金试纸条方法对市售肉制品和乳制品进行检验, 共采集乳品样品 131 份, 阳性样品 1 份, 检出率 1.53%; 肉制品 224 份, 阳性样品 4 份, 检测率 1.79%。

5 结 论

本方法以标记的特异性引物扩增适当长度的基因片段, 能够保证检测的高度特异性, 从而保证了检测结果的准确性。创新之处在于避免了扩增产物稀释和探针杂交等流程, 保持了免疫胶体金(试纸条)技术直观、快速、方便、成熟、廉价等优点, 又具备 PCR 扩增方法高度敏感度、高度特异性的特点。通过对乳制品和肉制品进行检测, 分离率与以往报道接近

[10,11], 可见该方法适用于食品样品的检测。因此, 本方法是一种理想的单增李斯特氏菌检测手段。

PCR-免疫胶体金试纸条检测方法大大简化核酸扩增后的检测程序。结果判读简单明了、直观^[12]。只需要把核酸扩增后的样品直接滴到核酸试剂检测板上即可, 不需要专业人员操作, 便于推广至现场检测; 检测快速, 检测 5 min 后判读结果; 与琼脂糖凝胶电泳相比, 检测灵敏度提高约 100 倍; 由于在检测过程中加使用的为特异性标志引物, 使结果更加准确; 价格低廉, 试纸条成本仅 2 元人民币, 费用大大低于传统的凝胶电泳和 ELISA 检测^[13-16]。

作为一个核酸扩增产物检测的通用技术平台, 本方法及其试纸条可以广泛用于食源性病原微生物临床检测, 农牧业和食品工业, 海关检验检疫, 环境检测等领域。

参考文献

- [1] Fraser, Judy A, Sperber, *et al.* Rapid detection of *Listeria* spp. in food and environmental samples by esculin hydrolysis [J]. *J Food Protect*, 1998, 11(10): 762–820.
- [2] Swaminathan B, Feng P. Rapid detection of food-borne pathogenic bacteria [J]. *Ann Rev Microbiol*, 1994, 48(4): 401–426.
- [3] 何金林. 胶体金免疫结合试验在疾病预防控制领域检验中的应用[J]. *中国预防医学杂志*, 2008, 9(11): 1012–1014.
He JL. Immunogold binding assays used in the field of prevention and control of diseases inspection [J]. *Chin Pre Med*, 2008, 9(11): 1012–1014.
- [4] 徐晓可, 吴清平, 张菊梅, 等. PCR 技术检测食源性致病菌的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2007, 34(5): 970–972.
Xu XK, Wu QP, Zhang JM, *et al.* Review of foodborne pathogenic bacteria detected by PCR [J]. *Microbiol China*, 2007, 34(5): 970–972.
- [5] Drake M, Small C, Spence K, *et al.* Rapid detection and identification of *Lactobacillus* spp. in dairy products by using the polymerase chain reaction [J]. *J Food Protect*, 1996, 10: 1023–1137.
- [6] Josefsen MH, Jacobsen NR, Hoorfa J, *et al.* Enrichment followed by quantitative PCR both for rapid detection and as a tool for quantitative risk assessment of food-borne *Thermotolerant campylobacters* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(6): 3588–3592.
- [7] Lone R, Pernille N, Kim H, *et al.* Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions [J]. *Int J Food Microbiol*, 1992, 17(1): 37–45.
- [8] 刘培, 张海滨, 张霞, 等. 肉制品中的肠出血性大肠杆菌 O157:H7 快速检测方法的建立[J]. *食品研究与开发*, 2009, 30(3): 139–140.
Liu P, Zhang HB, Zhang X, *et al.* Constitute the method for determination of entero-hemorrhagic *E. coli* O157:H7 in meats [J]. *Food Res Dev*, 2009, 30(3): 139–140.
- [9] 陈燕, 刘杰, 李玉兰, 等. 食源性致病菌快速检测技术研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2013, 41(5): 2252–2253, 2256.
Chen Y, Liu J, Li YL, *et al.* Rapid Detection technology of foodborne pathogen [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2013, 41(5): 2252–2253, 2256.
- [10] Rambabu N, Kaiser J. Rapid detection of food-borne pathogens by using molecular techniques [J]. *J Med Microbiol*, 2005, 54(2): 151–154.
- [11] Justin O, Margaret R, Sara S, *et al.* Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in food using culture enrichment combined with real-time PCR [J]. *Food Microbiol*, 2006, 26(1): 4–7.
- [12] 杨晋传, 景怀琦, 李洪卫, 等. 用免疫胶体金快速诊断卡初筛粪便中的 O157: H7 大肠杆菌[J]. *疾病监测*, 2000, 16(9): 327–329.
Yang JC, Jing HQ, Li HW, *et al.* Screening fecal samples for *Escherichia coli* O157:H7 by rapid immunogold detection card[J]. *Dis Surveill*, 2000, 16(9): 327–329.
- [13] Liju Y, Rashid B. Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria [J]. *Biotechnol Adv*, 2008, 26(2): 135–150.
- [14] Xihong Z, Yanmei L, Li W, *et al.* Development and application of a loop-mediated isothermal amplification method on rapid detection *Escherichia coli* O157 strains from food samples [J]. *Mol Biol Rep*, 2010, 37(5): 2183–2188.
- [15] Rees CE, Dodd CE. Phage for rapid detection and control of bacterial pathogens in food [J]. *Adv Appl Microbiol*, 2006, 59(1): 159–186.
- [16] Zhu F, Snezna R, Thomas L, *et al.* Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 by immunomagnetic separation and real-time PCR [J]. *Int J Food Microbiol*, 2005, 99(1): 47–57.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



庞 璐, 助理工程师, 主要研究方向: 食品安全检测。
E-mail: pangl@tjciq.gov.cn



张宏伟, 研究员, 主要研究方向: 食品安全检测。
E-mail: zhanghw1@tjciq.gov.cn