

肽核酸荧光原位杂交技术快速检测食品中的 李斯特菌属及单增李斯特菌

王云霞, 崔艳梅, 刘宁*, 牟妍, 段效辉

(烟台出入境检验检疫局, 烟台 264000)

摘要: **目的** 建立利用肽核酸荧光原位杂交技术(PNA-FISH)快速检测食品中李斯特菌属及单增李斯特菌的方法。**方法** 针对李斯特菌属、单增李斯特菌分别设计合成2份PNA探针lis-16S-1、lm-16S-2, 并建立荧光原位杂交技术, 优化杂交条件, 对选取的13株李斯特菌和其他9株非李斯特菌进行检测, 验证探针的特异性和灵敏度, 并对118份食品样品用LB肉汤2次增菌培养后进行PNA-FISH检测。**结果** 探针灵敏度和特异性均为100%, 从118份食品中检出14株李斯特菌和8株单增李斯特菌, 结果与API方法和VITEK方法鉴定结果一致。**结论** PNA-FISH方法可靠易行, 对从食品中检测致病性单增李斯特菌有较高的实用性。

关键词: 肽核酸; 荧光原位杂交技术; 李斯特菌; 单增李斯特菌

Determination of *Listeria* genus and *Listeria monocytogenes* in foods by peptide nucleic acid-fluorescence *in situ* hybridization

WANG Yun-Xia, CUI Yan-Mei, LIU Ning*, MOU Yan, DUAN Xiao-Hui

(Yantai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Yantai 264000, China)

ABSTRACT: Objective To develop a method of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) using peptide nucleic acid (PNA) probes for the rapid detection of *Listeria* genus and *Listeria monocytogenes* in foodstuffs. **Method** Two PNA probes of lis-16S-1 and lm-16S-2 were synthesized for specific identification of *Listeria* genus and *Listeria monocytogenes* respectively, the PNA-FISH method was developed, and then the optimal reaction conditions were definitely explored. Thirteen strains of *Listeria* and 9 other bacterial species were detected to evaluate the sensitivity and specificity of the method, and 118 foodstuffs were detected using PNA-FISH after cultured by LB broth for 2 times. **Results** The sensitivity and specificity of PNA probes were both 100%. Fourteen strains of *Listeria* and 8 strains of *Listeria monocytogenes* were detected from 118 copies of foodstuffs, in coincidence with the methods of API and Vitek. **Conclusion** The method of PNA-FISH was reliable and suitable for the rapid identification of *Listeria* genus and *Listeria monocytogenes* in foodstuffs.

KEY WORDS: peptide nucleic acid; fluorescence *in situ* hybridization; *Listeria* genus; *Listeria monocytogenes*

基金项目: 质检总局科技计划项目(2015IK195,2015IK200)、山东检验检疫局科技计划项目(SK201419)

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 (2015IK195,2015IK200) and the Scientific and Technological Project of Shandong Exit-Entry Inspection and Quarantine Bureau (SK201419)

*通讯作者: 刘宁, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: liuning52@126.com

*Corresponding author: LIU Ning, Engineer, Yantai Exit-Entry Inspection and Quarantine Bureau, No.59 Xinhaiyang Road, Zhifu Zone, Yantai 264000, China. E-mail: liuning52@126.com

1 引言

李斯特菌(*Listeria*)属包含单增李斯特菌、伊氏李斯特菌、英诺克李斯特菌、威氏李斯特菌、西尔李斯特菌、格氏李斯特菌、*L. marthii* 和 *L. rocourtiae* 8 个种。在这些菌种中,单增李斯特菌和伊氏李斯特菌对动物有致病性,但只有单增李斯特菌能引起人类感染。人类感染单增李斯特菌能导致呕吐、腹泻、流产、脑膜炎、败血症及脑炎^[1]。单增李斯特菌在环境中分布广泛,对未加工原料、部分加工食品及发酵食品等都具有潜在危害。人类感染主要是由于食用了被污染的即食性和生鲜食品如血、牛奶、肉类和海产品等^[2]。

在李斯特菌的检测中,目前最常用的是传统的培养基培养法即 GB 4789.30-2010 和国际标准化组织 ISO 11290 标准,但其操作繁琐,费时费力;除此之外,还出现了许多运用生物化学、免疫学和分子生物学快速检测李斯特菌属的方法^[2-4],其中最常用的是 PCR 法,但它需要提取 DNA,对操作的要求较高,扩增条件要求也较高,且酸水解及溶菌酶消化等处理过程也需要较长时间。

肽核酸(peptide nucleic acid, PNA)是 1991 年由丹麦化学家 Nielsen 等人工合成的一种以中性酰胺键为骨架的全新 DNA 类似物,它可以选择序列特异性地与 rRNA 结合,其骨架为电中性,不存在静电排斥力,具有极好的生物稳定性;PNA 探针可在低盐浓度下进行杂交,具有不被蛋白酶和核酸酶识别的特点,因此在杂交亲和性、特异性及热稳定性等方面均优于 DNA 探针^[5,6]。在微生物学研究中,16S 和 23S rRNA 以其遗传稳定性、高拷贝数和表达不易受生长环境影响的特性^[7],被广泛用作荧光原位杂交(FISH)检测的靶序列^[8,9]。Ercolini 等^[10]建立了一种基于 16S rRNA 的检测奶酪中微生物的荧光原位杂交检测方法。谭亚芳等^[11]利用 PNA-FISH 技术检测样品中的鼠疫菌。Fuchizawa 等^[12]应用 16S rRNA 探针或 23S rRNA 探针检测李斯特菌属的荧光原位杂交方法也已经获得成功。PNA-FISH 技术具有良好的杂交特异性和杂交动力特性,在检测鉴定细菌的同时能够维持细菌固有的形态^[13]。PNA-FISH 技术操作简单,类似于革兰染色或抗酸染色技术,故也被称为快速诊断感染性疾病的智能染色技术^[14]。本研究建立一种应用荧光 PNA 探针快速、准确检测李斯特菌属及单增李斯特菌的 PNA-FISH 方法。

2 材料与方 法

2.1 菌 株

本研究所用 22 株菌株均为本实验室购买或从样品中分离得到,具体菌株信息列于表 1,其中 13 株李斯特菌,9 株其他菌属菌株。将所有的菌株在脑心浸液肉汤(BHI)中培养。

然后再置于 120 r/min 的摇床上,37 °C 恒温震荡培养 24 h。

2.2 仪器与试剂

李氏增菌肉汤(LB 肉汤)、胰蛋白胍大豆琼脂(TSA)、PALCAM 培养基均购自北京陆桥技术公司;李斯特显色培养基购自上海科玛嘉公司;API 李斯特试剂条、VITEK GP 试剂卡购自法国梅里埃公司;甲酰胺、聚乙烯吡咯烷酮、硫酸葡聚糖、Tris、Tris-HCl、Triton X-100、NaCl、聚蔗糖、乙醇等均为分析纯,购自美国 Sigma 公司;Na₂EDTA、焦磷酸钠购自德国 Merck 公司。

2.3 PNA 探针的设计与合成

本研究所用的 PNA 探针为 lis-16S-1 及 lm-16S-2,根据文献报道合成^[15]。lis-16S-1 探针序列为 5'ACTGTTGTTA GAGAAG-3',探针位点为 400-455(FJ434468);lm-16S-2 探针序列为 5'TAGTACAAAGGGTCG-3',探针位点为 1247-1261(FJ434468)。从 NCBI 数据库中选取了涵盖李斯特菌属 8 个种的 27 条 16S rRNA 基因片段,通过 ClustalV 法进行基因比对选择可能的位点,Cluster W 程序可从欧洲生物信息所网站获得^[16]。探针设计时要满足高 GC 含量、无自身互补等条件,解链温度通过 Bostonprobes 网站在线预测^[16],一般应高于 50 °C。使用 Silva.rRNA 数据库的 ProbeCheck 程序对探针的特异性和灵敏度进行评估判断^[17]。特异性用 $nT/(TnT)*100$ 计算, nT 表示未与探针反应的非靶标菌株的数量, TnT 表示检测到的非靶标菌株的总数量。灵敏度用 $T/(TT)*100$ 计算, T 表示探针检测到靶标菌株的数量, TT 表示数据库中靶标菌株的总数量。

所有的探针都由 Panagene 公司合成,并由羧基荧光素(FAM)进行荧光标记。

2.4 PNA-FISH 杂交程序

2.4.1 涂片固定

将菌悬液或增菌液 2000 r/min 离心 5 min,收集细菌细胞,用 pH 7.4 的 PBS 缓冲液(7 mmol/L Na₂HPO₄, 7 mmol/L NaH₂PO₄, 130 mmol/L NaCl)清洗,然后在 PBS 缓冲液中悬浮,使菌液 OD₆₀₀ 接近 1.0。每种菌液取 10 μL 置于 98%乙醇洗过的载玻片(1 cm×1 cm)上涂匀,火焰固定,然后将玻片用 80%的乙醇干燥固定 15 min,风干。

2.4.2 杂 交

加入 25 μL pH 7.5 的杂交缓冲液(10%(W:V)硫酸葡聚糖(Sigma); 10 mmol/L NaCl; 30%(W:V)甲酰胺(Sigma); 0.1%(W:V)焦磷酸钠(Merck); 0.2%(W:V)聚乙烯吡咯烷酮(Sigma); 0.2%(W:V)聚蔗糖(Sigma); 5 mmol/L Na₂EDTA(Merck); 0.2%(V:V)Triton X-100(Sigma); 50 mmol/L Tris-HCl (Sigma)和 300 nmol/L PNA 探针(Panagene)),盖上盖玻片,57 °C 孵育 30 min。同时设阴性对照,即加入不含 PNA 探针的杂交缓冲液。

表 1 试验菌株
Table 1 Bacterial strains for detection

菌株名称及编号	菌株来源	拉丁文名	杂交结果(+; 阳性; —: 阴性)	
			Lis-16S-1	Lm-16S-2
单增李斯特菌	ATCC19111	<i>Listeria monocytogenes</i>	+	+
单增李斯特菌	ATCC19115	<i>Listeria monocytogenes</i>	+	+
单增李斯特菌	NCTC11994	<i>Listeria monocytogenes</i>	+	+
单增李斯特菌 Li01	样品分离	<i>Listeria monocytogenes</i>	+	+
单增李斯特菌	CMCC54002	<i>Listeria monocytogenes</i>	+	+
单增李斯特菌	CMCC54006	<i>Listeria monocytogenes</i>	+	+
伊氏李斯特菌	ATCC19119	<i>Listeria ivanovii</i>	+	-
伊氏李斯特菌	ATCC49025	<i>Listeria ivanovii</i>	+	-
英诺克李斯特菌	ATCC33090	<i>Listeria innocua</i>	+	-
英诺克李斯特菌	ATCC1603	<i>Listeria innocua</i>	+	-
威氏李斯特菌 Li03	样品分离	<i>Listeria welshimeri</i>	+	-
西尔李斯特菌 Li04	样品分离	<i>Listeria seeligeri</i>	+	-
格氏李斯特菌 Li05	样品分离	<i>Listeria grayi</i>	+	-
创伤弧菌	ATCC27562	<i>V. vulnificus</i>	-	-
大肠杆菌 O157	ATCC35150	<i>Escherichia coli</i>	-	-
沙门氏菌	ATCC9150	<i>S. paratyphi</i>	-	-
副溶血弧菌	ATCC17802	<i>V. parahaemolyticus</i>	-	-
马红球菌	ATCC6939	<i>Rhodococcus equi</i>	-	-
志贺氏菌	ATCC9199	<i>Shigella</i>	-	-
绿脓杆菌	ATCC9027	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-
金黄色葡萄球菌	ATCC25923	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
溶藻弧菌	ATCC17749	<i>Vibrio alginolyticus</i>	-	-

2.4.3 洗涤

移开盖玻片, 用预热到 55 °C 的冲洗液(5 mmol/L Tris base(Sigma); 15 mmol/L NaCl; 0.1%(V:V)Triton X-100 (Sigma), pH=10)冲洗 2 次, 每次冲洗 10 min, 风干。

2.4.4 显微镜观察

滴 1 滴无荧光媒介油, 用 Nikon Eclipse 80i 荧光显微镜检测。如不能立即观察, 需保存于暗处, 24 h 内观察。

2.5 杂交条件优化

影响杂交的因素包括细菌培养时间、菌体的固定、杂交缓冲液的组成、PNA 的浓度、杂交时间、温度、pH 值等。其中关键因素为菌体的固定、PNA 的浓度、杂交温度、杂交时间及缓冲液的关键成份的含量。

条件优化方案: 分别用 50%和 80%乙醇固定菌体; 杂交缓冲液中 PNA 浓度分别设计为 100、200、300、400 和 500 nmol/L; 杂交缓冲液中 TritonX-100 含量分别为 0.1%、0.2%、0.3%和 0.4%; 杂交温度分别用 53、55、57 和 59 °C

进行测试; 杂交时间分别为 30、45、60 和 90 min。

2.6 PNA-FISH 杂交对李斯特菌属及其他属细菌的检测

按照优化好的杂交体系分别对李斯特菌属及其他属菌株进行检测, 同时设阴性对照和阳性对照, 分析该检测方法的特异性及灵敏度, 检测菌株见表 1。

2.7 食品中李斯特菌的检测

本研究所用 118 份食品样本为 2015 年从烟台市进出口企业无菌采样所得, 根据 GB 4789.30-2010 方法对食品样本进行处理, 即将 25 mL 样本接种于 225 mL LB1 肉汤中进行前增菌, 30 °C 培养 24 h, 增菌液取 1 mL 再接种于 9 mL LB2 肉汤中进行二次增菌, 用 PNA-FISH 法进行检测, 同时菌液接种 PALCAM 平板及李斯特显色平板, TSA 平板纯化分离并用 API 试剂条和 VITEK 法进行鉴定比较(见表 2)。

表2 PNA-FISH、API和VITEK法对食品中李斯特菌的检测
Table 2 Detection of *Listeria* in foodstuffs by the methods of PNA-FISH, API and VITEK

试验样品	数量	PNA-FISH(阳性数量)		API 李斯特法(阳性数量)			VITEK 法(阳性数量)		
		李斯特菌属	单增李斯特菌	单增李斯特菌	英诺克李斯特菌	伊氏李斯特菌	单增李斯特菌	英诺克李斯特菌	伊氏李斯特菌
冷冻鸡肉	19	3	2	2	0	1	2	0	1
冷冻蔬菜	16	1	0	0	1	0	0	1	0
乳及乳制品	16	1	0	0	1	0	0	1	0
熟肉及制品	22	3	2	2	0	1	2	0	1
冰鲜鱼类	23	3	2	2	0	1	2	0	1
冷冻鱼类	22	3	2	2	1	0	2	1	0
总数	118	14	8	8	3	3	8	3	3

3 结果与分析

3.1 PNA 探针的选择

比对李斯特菌属 8 个种的 16S rRNA 序列,并参考文献设计了 4 种探针^[16],然后用 ProbeCheck 程序进一步评估 PNA 探针的特异性和灵敏度^[17]。用 4 种探针数据库中的 204 个李斯特菌属的菌株和 30 个非目标菌株进行检测, lis-16S-1 和 lm-16S-2 探针的特异性、灵敏度均达到 100%。lm-16S-3 和 lm-16S-4 探针在检测数据库中的单增李斯特菌时,灵敏度偏低,分别为 73.3%和 80.2%。最终选择 lis-16S-1 探针、lm-16S-2 探针作为检测用探针。

3.2 杂交过程的优化

在 Azevedo^[18]所述的操作规范基础上进行了一些杂交过程优化。在 PBS 缓冲液悬液中可以检测到一系列的细菌细胞密度,在菌液 OD₆₀₀ 值介于 0.8~1.2 之间时结果较好,本研究选择 OD₆₀₀ 值为 1.0。杂交溶液 Triton X-100 在 0.1%、0.2%、0.3%和 0.4% 4 个添加浓度条件下, Triton-100 的 0.2%添加浓度下可以得到较好的信噪比(当 Triton X-100 添加浓度为 0.3%或 0.4%时,会导致细胞变形和信号模糊),所以我们选择 0.2%的添加浓度。杂交时间在 30~90 min 之间做了相关实验,结果显示杂交 30 min 时信号强度最好。另外冲洗步骤也很重要,为了保证更好的信噪比,冲洗时间为 20 min。

在固相 PNA-FISH 技术的基础上, Perry O'Keefe 等^[19]建立了一种可用于荧光显微镜的液相 PNA-FISH 新方法; Byron 等^[20]用液相 PNA-FISH 方法可以检测李斯特菌属中的 6 种李斯特菌。本研究通过相关试验,发现液相 PNA-FISH 杂交样品在显微镜下镜检时,存在菌体粘连现象且荧光背景较高,所观察图片不清晰,所以我们选择了固相 PNA-FISH 技术做本次实验。

3.3 探针的特异性和灵敏度

检测李斯特菌的理想探针应该是仅与李斯特菌属反

应,且可以与李斯特菌属的所有 8 个种反应的探针^[18]。除了 *L.marthii* 和 *L. Rocourtiae* 2 种外, lis-16S-1 探针可以与李斯特菌属中其余 6 种所有的 13 株李斯特菌进行杂交。lm-16S-2 探针只与 6 株单增李斯特菌强烈反应,而与其他李斯特菌没有杂交反应(见表 1)。为了进一步考察每一种探针的特异性,用 9 株非目标菌对 lis-16S-1、lm-16S-2 2 个探针进行考察,与 BLAST 和 ProbeCheck 的预测结果一样,2 个探针均未与非目标菌进行杂交反应。以上结果表明,本次实验所选探针的特异性和灵敏度均达到了 100%。

3.4 食品中李斯特菌的检测

用 lis-16S-1 探针从 118 份食品中检测出 14 株李斯特菌属菌株。这 14 株菌株中用 lm-16S-2 探针检测出 8 株单增李斯特菌,检测结果与 VITEK 法及 API 试剂条的检测结果一致,证明了 PNA-FISH 方法的可行性和准确性。用 API 试剂条和 VITEK 法鉴定出其他的李斯特菌分别为 3 株英诺克李斯特菌,3 株伊氏李斯特菌(见表 2)。

4 结论和展望

PNA-FISH 技术用于细菌的检测具有用时短、操作简单、特异性强及灵敏度高独特优势,对李斯特菌的检测具有一定的实用价值。本研究使用的 PNA 探针可以检测李斯特属及单增李斯特菌,与理论预测符合。但还存在一些问题,比如部分菌株可能因为个体特性的差异导致杂交效率有所下降,从而直接影响其检出率;采用 PNA-FISH 法进行细菌检测时不进行选择性富集,会影响目标菌的生长。在本研究的基础上还应进一步优化其他杂交条件,如 pH、杂交缓冲液中增加某些辅助探针穿透的成份等,并在此基础上设计多条可以区分不同种的 PNA 探针并分别用不同的荧光素标记,建立多重荧光原位杂交技术,结合免疫吸附、电子传感等系统来检测不同种的李斯特菌,并用于食品及食品加工环境中李斯特菌的污染检测,从而为食品安全提供强有力的保障。

参考文献

- [1] denBakker H C, Cummings C A, Ferreira V, *et al.* Comparative genomics of the bacterial genus *Listeria*: genome evolution is characterized by limited gene loss [J]. BMC Genom, 2010, 2(11): 688.
- [2] Volokhov D, Rasooly A, Chumakov K, *et al.* Identification of *Listeria* species by microarray-based assay [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(12): 4720-4728.
- [3] Allerberger E, Dierich M, Petranyi G, *et al.* Nonhemolytic strains of *Listeria monocytogenes* detected in milk products using VIDAS immunoassay kit [J]. Int J Hyg Environ Med, 1997, 200(2-3): 189-195.
- [4] Zeng H, Zhang X, Sun Z, *et al.* Multiplex PCR identification of *Listeria monocytogenes* isolates from milk and milk-processing environments [J]. J Sci Food Agric, 2006, 86: 367-371.
- [5] Hartmann H, Stender H, Schfer A, *et al.* Rapid identification of *Staphylococcus aureus* in blood cultures by a combination using peptidenucleic acid probes and flow cytometry [J]. Clin Microbiol, 2005, 43(4): 4855-4857.
- [6] Cerqueira L, Azevedo NF, Almeida C, *et al.* DNA mimics for the rapid identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridization(FISH) [J]. Int J Mol Sci, 2008, 9(10): 1944-1960.
- [7] 王继华, 李集临, 郭长虹. 小麦-黑麦易位系的鉴定[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2002, 36(4): 138-139.
Wang JH, Li JL, Guo CH. Identification of wheat rye translocation lines [J]. J Harbin Med Univ, 2002, 36(4): 138-139.
- [8] Amann R, Fuchs B M. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques [J]. Nat Rev Microbiol, 2008, 6(5): 339-348.
- [9] Almeida C, Azevedo N F, Fernandes R M. Fluorescence in situ hybridization method using a peptide nucleic acid probe for identification of *Salmonella* spp.in a broad spectrum of samples [J]. Appl Environ Microbiol, 2010, 76(13): 4476-4485.
- [10] Ercolini D, Hill P J, Dodd C E. Development of a fluorescence in situ hybridization method for cheese using a 16S rRNA probe[J]. J Microbiol Methods, 2003, 52(2): 267-271.
- [11] 谭亚芳, 杜宗敏, 何晓晓, 等. 应用肽核酸探针检测鼠疫耶尔森氏菌[J]. 生物技术通讯, 2006, 17(3): 370-373.
Tan YF, Du ZM, He XX, *et al.* Application of peptide nucleic acid probes for detection of *Yersinia pestis* [J]. Biotechnol Newsletter, 2006, 17(3): 370-373.
- [12] Fuchizawa I, Shimizu S, Ootsubo M. Specific and rapid quantification of viable *Listeria monocytogenes* using fluorescence in situ hybridization in combination with filter cultivation [J]. Microbes Environ JSME, 2009, 24(3): 273-275.
- [13] 王沛. 肽核酸荧光原位杂交技术在临床微生物快速鉴定中的应用进展[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(7): 825-827.
Wang P. Application of peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization in the rapid identification of clinical microorganisms [J]. Chin J Lab Med, 2009, 32(7): 825-827.
- [14] Stender H. PNA-FISH: an intelligent stain for rapid diagnosis of infectious diseases [J]. Expert Rev Mol Diagn, 2003, 3(11): 649-655.
- [15] Brehm-Stecher BF, Hyldig-Nielsen JJ, Johnson EA. Design and evaluation of 16 *SrRNA*-targeted peptide nucleic acid probes for whole-cell detection of members of the genus *Listeria* [J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(9): 5451-5457.
- [16] Almeida C, Azevedo NF, Fernandes RM, *et al.* Fluorescence in situ hybridization method using a peptide nucleic acid probe for identification of *Salmonella* spp.in a broad spectrum of samples [J]. Appl Environ Microbiol, 2010, 76(13): 4476-4485.
- [17] Loy A, Arnold R, Tischler P, *et al.* Probe check-a-central resource for evaluating oligonucleotide probe coverage and specificity [J]. Environ Microbiol, 2008, 10: 2894-2896.
- [18] Azevedo NF, Vieira MJ, Keevil CW. Establishment of a continuous model system to study *Helicobacter pylori* survival in potable water biofilms [J]. Water Sci Technol, 2003, 47(5): 155-160.
- [19] Perry O, Keefe H, Stender H, *et al.* Filter-based PNA in situ hybridization for rapid detection, identification and enumeration of specific micro-organisms [J]. J Appl Microbiol, 2001, 90(2): 180-189.
- [20] Byron-Stecher BF, Hyldig-Nielsen JJ, Johnson EA. Design and evaluation of 16S rRNA-targeted peptide nucleic acid probes for whole-cell detection of members of the genus *Listeria* [J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(9): 5451-5457.

(责任编辑: 姚菲)

作者简介



王云霞, 助理工程师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: wyx20022359@163.com



刘宁, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: liuning52@126.com