

FTA 滤膜用于多重 PCR 检测豆制品中 3 种食源性致病菌的研究

周 巍, 周 正, 康素芬, 刘 东, 穆燕魁

(河北省食品质量监督检验研究院, 河北省食品安全实验室, 河北 石家庄 050051)

摘 要: 为建立豆制品中金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、福氏志贺氏菌的多重 PCR 检测方法, 采用 FTA 滤膜从豆制品中直接提取模板 DNA, 根据金黄色葡萄球菌的 *nuc* 基因、沙门氏菌的 *phoP* 基因、福氏志贺氏菌的 *ipaH* 基因, 设计 3 对特异性引物进行多重 PCR, 并对反应条件进行优化。结果表明: 3 对引物能特异性扩增出 280、409、326bp 的目的条带; 不增菌的情况下, 多重 PCR 同时检测 3 种致病菌的灵敏度分别是 10^1 、 10^1 、 10^2 CFU/ml, 检测时间 4h。建立的三重 PCR 具有准确、快速、高效的特点, 为同时检测豆制品中金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、福氏志贺氏菌提供了新的方法。

关键词: 多重 PCR; 食源性致病菌; 检测; FTA 滤膜

FTA Filter-based Multiplex PCR Detection of Three Species of Food-borne Pathogens in Soybean Products

ZHOU Wei, ZHOU Zheng, KANG Su-fen, LIU Dong, MU Yan-kui

(Hebei Food Safety Laboratory, Hebei Institute of Food Quality Supervision, Inspection and Research, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: To establish a multiplex PCR method for the simultaneous detection of pathogens (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp, and *Shigella flexneri*) in soybean products, FTA filter was used to directly extract the template DNAs from soybean products. On the basis of *nuc* gene of *Staphylococcus aureus*, *phoP* gene of *Salmonella* spp, *ipaH* gene of *Shigella flexneri*, three pairs of specific primers were designed for the multiplex PCR detection, and the reaction conditions were optimized. The results showed that three targeted genes of 280, 409, and 326 bp could be specifically amplified using the three pairs of primers. Without bacterial enrichment, the sensitivities of the multiplex PCR for detecting *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp, and *Shigella flexneri* were 10^1 , 10^1 , and 10^2 CFU/ml, respectively, and the detection could be finished within 4 h. This multiplex PCR method is accurate, fast and effective, thereby providing a new approach for the detection of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp, and *Shigella flexneri* in soybean products.

Key words: multiplex PCR; food-borne pathogen; detection; FTA filter

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)18-0317-04

随着人们生活水平的提高, 人们对食品安全问题越来越重视, 食源性致病菌引起的食物中毒也成为一个问题^[1]。食物中毒事件每年都在世界范围内频繁爆发^[2-4], 其中大部分是食品中污染致病菌引起的。据统计, 这些致病菌中最常见的主要是沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、福氏志贺氏菌、单核增生李斯特氏菌等^[5-6]。由于这些致病菌的传统检测方法, 检测时间长, 检测程序繁琐, 因此, 急需建立一种快速有效的检测方法。

近年来, PCR 针对某一种或一类致病菌的检验方法被逐渐建立起来, 如金黄色葡萄球菌^[7]、单核增生李斯

特氏菌^[8]、大肠杆菌 O157^[9]等, 但是一旦检测方向有误就会造成时间和药品的浪费。多重 PCR 技术实现了对多种菌的同步检测, 更加节省时间和成本, 是快速检测致病菌的重要研究方向^[10]。

本研究根据国标中豆制品卫生标准选择三种致病菌, 对金黄色葡萄球菌的 *nuc* 基因、沙门氏菌的 *phoP* 基因、福氏志贺氏菌的 *ipaH* 基因设计 3 对特异性引物进行多重 PCR, 以期建立准确、快速、高效的三重 PCR 检测方法, 为同时检测食品中金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、福氏志贺氏菌方法的研究提供理论指导。

收稿日期: 2008-09-22

作者简介: 周巍(1983—), 男, 助理工程师, 硕士, 主要从事食源性致病菌的研究。E-mail: william19830106@163.com

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 菌种

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC6538、1.800、1.1476、20063、ATCC25923、ATCC13565、ATCC14458、ATCC8095; 沙门氏菌(*Salmonella* spp.) 50041、50001、50004、50115; 福氏志贺氏菌(*Shigella* spp.) 51571、51107, 均购自中国医学细菌保藏管理中心。

1.1.2 PCR 引物的设计和合成

利用 Array Designer 2.0 设计多重 PCR 引物, 由上海生工生物工程有限公司合成。

表1 多重PCR靶基因及引物

Table 1 Primer sequences used for PCR amplification and the expected amplicon sizes

引物名称	引物序列(5'→3')	目的基因	产物长度(bp)	致病菌
St-nuc-F	AAAGCGATTGATGGTGATACGG	nuc	280	<i>Staphylococcus aureus</i>
St-nuc-R	CCAAGCCTTGACGAACAAAGC			
Sa-phoP-F	AGGTTTCAGCTCCAGGATTCAGG	phoP	409	<i>Salmonella</i> spp.
Sa-phoP-R	AACGCCGTGAGTTTGATGACC			
Sh-ipaH-F	GTTGCTGCTGATGCCACTGAG	ipaH	326	<i>Shigella</i> spp.
Sh-ipaH-R	GTGCGGAGGTCAATTGCTGTC			

1.1.3 培养基

营养肉汤培养基、营养琼脂培养基、Baird-Park 培养基均购自北京市陆桥技术有限公司。

1.1.4 材料

豆腐、卤制豆制品 市售。

10 × PCR buffer、dNTPs、TaKaRa Taq、DNA Marker DL2000 大连宝生物工程公司; 引物(正向引物, 反向引物) 上海生工生物工程公司; 无水乙醇、石油醚、氯仿、氨水、糖原、乙酸乙酯为国产分析纯; 10% SDS; TE 缓冲液: 10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA; FTA 滤膜片(使用 Harris 打孔器将 FTA 滤膜打成直径 2.00mm 的圆片); FTA 专用缓冲液 Whatman 公司。

1.1.5 仪器与设备

PCR 仪 Eppendorf 公司; DXY-33A 型电泳仪 北京市六一厂; UVP GelDoc-IT 凝胶成像系统 美国 UVP 公司; 2.00mm 微孔打孔器 Whatman 公司。

1.2 方法

1.2.1 细菌的培养和基因组 DNA 的提取

将金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、福氏志贺氏菌接种于营养肉汤过夜培养, 利用 FTA 滤膜提取 DNA^[11]: 吸取菌液 20 μl, 加入直径 2.00mm FTA 滤膜片, 吸出

菌液, 然后 56℃ 干燥, 干燥后的 FTA 滤膜片加入 10% SDS 溶液 200 μl 煮沸 10min, 用 FTA 专用缓冲液洗涤两次, 然后再用 TE 缓冲液洗涤两次, 56℃ 干燥后, 可作为 PCR 反应的模板。

1.2.2 单重 PCR 扩增

PCR 反应采用冷启动。PCR 反应程序为 94℃ 预变性 5min; 按照 94℃ 90s, 56.8℃ 60s, 72℃ 90s 进行 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 5min。PCR 反应体系: 总反应体系 50 μl, 包括 5 μl 10 × PCR buffer, 4 μl dNTPs 混合物, 0.5 μl 10pmol 正向引物(三种各 0.5 μl), 0.5 μl 10pmol 反向引物(三种各 0.5 μl), 1 μl (5U/μl) Taq, 吸附 DNA 的 FTA 滤膜。电泳检测: 取 5 μl PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 利用凝胶成像系统观察结果。

1.2.3 引物特异性的检验

以从每一种标准菌液提取的 DNA 和 3 种标准菌混合液提取的 DNA 作模板, 分别同时加入多重 PCR 反应体系中, 以去离子水作为阴性对照, 检验引物的特异性。

1.2.4 多重 PCR 反应条件的优化

初步条件下, 在同一离心管中同时扩增 3 种目的基因片段, 结果在 280、326、409bp 处出现三条明显的平行条带。对不同引物用量(0.5、1.0、1.5、2.5 μl)、退火温度(52.4、53.6、55.8、56.8、57.7、58.3、58.8℃)、dNTPs(2.0、3.0、4.0、5.0 μl)条件下的产物进行电泳, 确定多重 PCR 反应条件。

1.2.5 多重 PCR 反应的灵敏度

取菌悬液, 然后分别稀释到 1~10⁹CFU/ml。利用 FTA 滤膜提取 DNA^[11], 进行多重 PCR 反应, 检测反应的灵敏度。

1.3 豆制品中三种致病菌的多重 PCR 检测

1.3.1 豆制品的人工污染

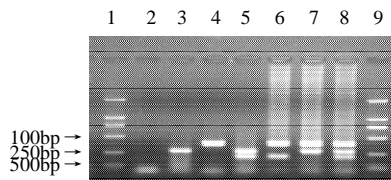
豆腐、卤制豆制品人工污染前均按照国标法检测证实不含有食源性致病菌。将三种食源性致病菌人工污染到上述两种豆制品中: 取 25g 样品加入 225ml 生理盐水均质, 然后将菌液污染到匀浆液中, 污染的浓度依次为 1、10¹、10²、10³、10⁴、10⁵、10⁶、10⁷、10⁸CFU/ml。

1.3.2 豆制品中模板 DNA 的提取^[11]

取 10ml 匀浆以 500r/min 离心 10min。吸取上清液加入另一灭菌离心管中以 14000r/min 离心 10min, 沉淀用 500 μl 生理盐水悬浮, 加入 0.25 倍体积的乙酸乙酯, 振荡器混匀 2min, 然后以 17000r/min 离心 10min。去掉上清液, 沉淀用 20 μl 生理盐水悬浮, 加入直径 2.00mm 滤膜片, 然后 56℃ 干燥, 干燥后的滤膜片, 加入 10% SDS 溶液 200 μl 煮沸 10min, 用滤膜专用缓冲液洗涤两次, 然后再用 TE 缓冲液洗涤两次, 56℃ 干燥后即可作为 PCR 反应的模板。

2 结果与分析

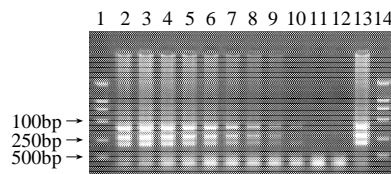
2.1 三重 PCR 结果



泳道 1 和 9 为 Marker DL2000; 泳道 2 为去离子水阴性对照; 泳道 3 为福氏志贺氏菌; 泳道 4 为沙门氏菌; 泳道 5 为金黄色葡萄球菌和福氏志贺氏菌; 泳道 6 为金黄色葡萄球菌和沙门氏菌; 泳道 7 为福氏志贺氏菌和沙门氏菌; 泳道 8 为金黄色葡萄球菌、福氏志贺氏菌和沙门氏菌。

图 1 多重 PCR 扩增电泳图

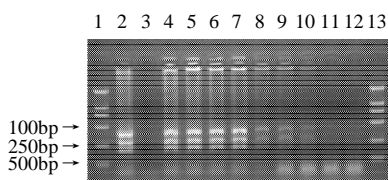
Fig.1 Electrophoretogram of amplification products obtained using the multiplex PCR assay developed for the simultaneous detection of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. and *Shigella flexneri*.



泳道 1 和 14 为 Marker DL2000; 泳道 2 到 11 为金黄色葡萄球菌、沙门氏菌和福氏志贺氏菌的混合物, 浓度从 10^9 逐级降低到 1CFU/ml; 泳道 12 为去离子水阴性对照; 泳道 13 为阳性对照。

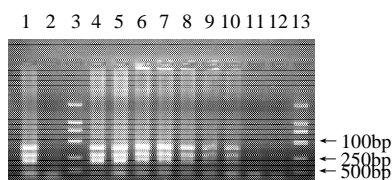
图 2 金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、福氏志贺氏菌纯菌检出限

Fig.2 Sensitivity of multiplex PCR detection of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. and *Shigella flexneri* in pure-culture bacterial suspensions.



泳道 1 和 13 为 Marker DL2000; 泳道 2 为去离子水阴性对照; 泳道 3 为阳性对照; 泳道 4 到 12 为金黄色葡萄球菌、沙门氏菌和福氏志贺氏菌的混合物, 浓度从 10^8 逐级降低到 1CFU/ml。

图 3 豆腐中金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、福氏志贺氏菌的检出限
Fig.3 Sensitivity of multiplex PCR detection of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. and *Shigella flexneri* in tofu



泳道 1 为阳性对照; 泳道 2 为去离子水阴性对照; 泳道 3 为阳性对照; 泳道 4 到 12 为金黄色葡萄球菌、沙门氏菌和福氏志贺氏菌的混合物, 浓度从 10^8 逐级降低到 1CFU/ml; 泳道 3 和 13 为 Marker DL2000。

图 4 卤制豆制品中金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、福氏志贺氏菌的检出限
Fig.4 Sensitivity of multiplex PCR detection of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. and *Shigella flexneri* in brined soybean products

表 2 豆制品中多重 PCR 检测金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、福氏志贺氏菌的检出限

Table 2 Detection limits of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. and *Shigella flexneri* in soybean products by multiplex PCR assay

浓度(CFU/ml)	10^8	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	1
金黄色葡萄球菌	+	+	+	+	+	+	+	-	-
沙门氏菌	+	+	+	+	+	+	+	-	-
福氏志贺氏菌	+	+	+	+	+	+	+	-	-

注: +.PCR 检测结果阳性; -.PCR 检测结果阴性。

本研究建立的多重 PCR 技术, 利用 FTA 滤膜直接从金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、福氏志贺氏菌的菌悬液提取金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、福氏志贺氏菌的 DNA, 成功的检测出了金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、福氏志贺氏菌, 确定了反应条件为 $5\mu\text{l}$ $10\times$ PCR buffer, $4\mu\text{l}$ dNTPs 混合物, $1\mu\text{l}$ 10pmol 正向引物(三种各 $1\mu\text{l}$), $1\mu\text{l}$ 10pmol 反向引物(三种各 $1\mu\text{l}$), $1\mu\text{l}$ ($5\text{U}/\mu\text{l}$) Taq 酶, 水补足至 $50\mu\text{l}$, 退火温度 56.8°C 为最优体系。由图 2 可知, 纯菌的检出限为金黄色葡萄球菌 $10\text{CFU}/\text{ml}$ 、沙门氏菌 $10\text{CFU}/\text{ml}$ 、福氏志贺氏菌 $10^2\text{CFU}/\text{ml}$ 。利用 FTA 滤膜直接从人工污染的豆制品匀浆中提取金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、福氏志贺氏菌的 DNA 进行 PCR 检测, 由表 2 可知在人工污染的豆制品匀浆中, 金黄色葡萄球菌检出限是 $10^2\text{CFU}/\text{ml}$ 、沙门氏菌 $10^2\text{CFU}/\text{ml}$ 、福氏志贺氏菌 $10^2\text{CFU}/\text{ml}$ 。虽然有拖尾现象, 但不影响检测结果(图 2~4)。

2.2 PCR 产物鉴定

表 3 金黄色葡萄球菌扩增片段的比对结果

Table 3 Homology of amplified DNA fragment of 5 *Staphylococcus aureus* strains to the counterpart in Genbank

基因库序列号	物种	同源性(%)
EF529608.1	金黄色葡萄球菌 2513	99
EF529605.1	金黄色葡萄球菌 G26	99
EF529603.1	金黄色葡萄球菌 G15	99
EF529602.1	金黄色葡萄球菌 G14	99
EF529601.1	金黄色葡萄球菌 G13	99

表 4 沙门氏菌扩增片段的比对结果

Table 4 Homology of amplified DNA fragment of 5 *Salmonella* spp. strains to the counterpart in Genbank

基因库序列号	物种	同源性(%)
CP001120.1	肠炎沙门氏菌 SL47	99
CP001113.1	肠炎沙门氏菌 SL254	99
CP000886.1	肠炎沙门氏菌 SPB	99
DQ644811.1	肠炎沙门氏菌 CNM3556	99
DQ644810.1	肠炎沙门氏菌 CNM1374	99

由上海生工生物工程公司对 PCR 扩增产物进行 DNA 测序。PCR 扩增产物 DNA 序列分别与 NCBI 中的序列进行同源性比对, 结果分别为 99%、99%、99%, 证明

PCR 扩增产物确为目的扩增产物(表 3~5)。

表 5 福氏志贺氏菌片断的比对结果
Table 5 Homology of amplified DNA fragment of 5 *Shigella flexneri* strains to the counterpart in Genbank

基因库序列号	物种	同源性(%)
CP001063.1	鲍氏志贺氏菌 CDC3083	99
CP001062.1	鲍氏志贺氏菌 CDC3083	99
CP000266.1	福氏志贺氏菌 8401	99
EU743832.1	鲍氏志贺氏菌	99
AE005674.1	福氏志贺氏菌 2a301	99

3 讨论

多重 PCR 技术具有高效、高产、低成本、速度快等优点, 目前已在多种病原微生物的检测中得到了初步应用^[12], 是食源性致病菌快速检测技术的重要开发方向。Lantz 等^[13]利用多重 PCR 技术检测猪肉样品中小肠结肠炎耶尔森氏菌, 该方法对样品进行增菌后, 使检测灵敏度达到 10^2 CFU/ml。Jinneman 等^[14]利用多重 PCR 扩增技术检测原料奶、牛肉等样品中 *E. coli* O157:H7 的 DNA, 也是利用增菌来提高检测的灵敏度。虽然增菌提高了检测灵敏度, 但也延长了检测时间, 一般可延长 12~24h。

本研究建立的多重 PCR 检测方法, 无需增菌, 直接从豆制品中提取 DNA, 利用多重 PCR 技术对金黄色葡萄球菌的 *nuc* 基因、沙门氏菌的 *phoP* 基因、福氏志贺氏菌的 *ipaH* 基因进行扩增以检测这三种致病菌。该方法可直接从人工污染的豆制品中同时检出三种致病菌, 金黄色葡萄球菌最低检出限为 10^2 CFU/ml、沙门氏菌为 10^2 CFU/ml、福氏志贺氏菌为 10^2 CFU/ml, 从对样品的处理到检测结束约需 4h, 比目前常用的 PCR 检测方法缩短了 12~24h。该方法对于同时检测豆制品中金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、福氏志贺氏菌是一种快速、有效的方法, 省略了样品增菌的过程, 大大缩短了检测时间, 更加符合快速检测的要求。

参考文献:

- [1] KÄFERSTEIN F, ABDUSSALAM M. Food safety in the 21st century [J]. Bull World Health Organ, 1999, 77(4): 347-351.
- [2] BRESEE J S, WIDDOWSON M A, MONROE S S, et al. Foodborne viral gastroenteritis: challenges and opportunities[J]. Clin Infect Dis, 2002, 35: 748-753.
- [3] DANIELS N A, MACKINNON L, ROWE S M, et al. Foodborne disease outbreaks in United States schools[J]. Pediatr Infect Dis, 2002, 21: 623-628.
- [4] MEAD P S, SLUTSKER L, DIETZ V, et al. Food-related illness and death in the United States[J]. Emerg Infect Dis, 1999, 5(5): 607-625.
- [5] SWAMINATHAN B, FENG P. Rapid detection of food-borne pathogenic bacteria[J]. Annu Rev Microb, 1994, 48: 401-426.
- [6] de BOER E, BEUMER R R. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms[J]. Microorganisms Internat J Food Microb, 1999, 50(1/2): 119-130.
- [7] KIM C H, KHANT M, MORIN D E, et al. Optimization of the PCR for detection of *Staphylococcus aureus nuc* gene in bovine milk[J]. Journal of Dairy Science, 2001, 84: 74-83.
- [8] AGERSBERG A, DAHL R, MARTINEZ I. Sample preparation and DNA extraction procedures for PCR identification of *Listeria monocytogenes* in sea-foods[J]. Int J Food Microbio, 1997, 35(3): 275-280.
- [9] GOODING C M, CHOUDARY P V. Rapid and sensitive immunomagnetic separation-PCR method for the detection of *Escherichia coli* O157: H7 in raw milk and ice cream[J]. Dairy Res, 1997, 64(1): 87-93.
- [10] AVIJIT R, AMER F, BARTHE G, et al. A multiplex polymerase chain reaction method for reliable, sensitive and simultaneous detection of multiple viruses in citrus trees[J]. Journal of Virological Methods, 2005, 129: 47-55.
- [11] 刘景武, 张伟, 何俊萍, 等. FTA 滤膜用于 PCR 检测肉中的金黄色葡萄球菌[J]. 生物工程学报, 2005, 21(6): 327-331.
- [12] MEKONNEN K, DIVIND E, RUTH-ANNE S, et al. A multiplex polymerase chain reaction assay for genus group and species-specific detection of mycobacteria[J]. Diag Microbiol Infect Dis, 2004, 49: 99-104.
- [13] LANTZ P G, KNUTSSON R, BLIXT Y, et al. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in enrichment media and pork by a multiplex PCR: a study of sample preparation and PCR-inhibitory components[J]. Int J Food Microbiol, 1998, 45(2): 93-105.
- [14] JINNEMAN K C, TROAST P A, HILL W E, et al. Comparison of template preparation methods from foods for amplification of *Escherichia coli* O157 shiga-like toxins type I and type II DNA by multiplex polymerase chain reaction[J]. J Food Prot 1995, 58(7): 722-726.