

# 加工鳗鱼制品中单增李斯特氏菌的 基因探针鉴定及分析

陈 彬, 黄晓蓉, 汤敏英, 邵碧英, 郑 晶  
(福建出入境检验检疫局, 福建 福州 350003)

**摘 要** 从10份鳗鱼制品中分离到4株单增李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)的可疑菌株, 应用Accuprobe基因探针方法进行快速鉴定, 鉴定结果与 API *Listeria* 方法的鉴定结果进行比较。结果表明, 基因探针鉴定方法更简便、快速、准确, 缩短了检验鉴定周期。检测鉴定结果也表明, 加工过的鳗鱼产品仍然存在被单增李斯特氏菌污染的可能, 应引起生产及监管部门的高度重视, 防止食物中毒的爆发流行。

**关键词** 基因探针; 鳗鱼制品; 单增李斯特氏菌

## Identification and Analysis of *Listeria monocytogenes* with Gene Probe Method in Eel Products

CHEN Bin, HUANG Xiao-rong, TANG Min-ying, SHAO Bi-ying, ZHENG Jing  
(Fujian Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Fuzhou 350003, China)

**Abstract:** Four strains of *Listeria monocytogenes* were isolated from 10 eel product samples and identified quickly with gene probe method. The identification result was compared with that of API *Listeria* method. The gene probe method was simpler, quicker and more accurate. The results of detection and identification also showed that even processed eel products could still be contaminated by *Listeria monocytogenes*, so the producer and supervising division should pay enough attention to prevent the outbreak of food poisoning.

**Key words** gene probe method; eel product; *Listeria monocytogenes*

中图分类号 TS207.4

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2005)11-0062-04

单核细胞增生李斯特氏菌简称单增李斯特氏菌, 是李斯特氏菌属中唯一能引起人畜共患病的病原菌, 致死率很高, 可达30%~70%, 是目前最重要的人类食源性病原菌之一<sup>[1]</sup>。我国和其他许多国家将单增李斯特氏菌列为进出口食品的必检项目。传统的单增李斯特氏菌的检测方法, 检测工作程序复杂、周期长, 费时费力,

不能适应快速检测的要求。近年来随着检测技术不断完善, 核酸探针、PCR等有着高特异性和敏感性的快速检测方法被应用于食源性病原的检测。本文在2004年6月至9月, 分别从2批共10份鳗鱼制品中各检出2株共4株单增李斯特氏菌的可疑菌, 应用Accuprobe基因探针法<sup>[2]</sup>进行了快速鉴定, 并对照API *Listeria*方法的鉴定

收稿日期: 2004-11-17

作者简介: 陈彬(1969-), 女, 工程师, 主要从事食品微生物和毒理的检测与研究。

- [11] 谢卫华, 姚菊芳, 袁勤生. 连苯三酚自氧化法测定超氧化物歧化酶活性的改进[J]. 医药工业, 1988, 19(5): 217-219.
- [12] 赵保路. 氧自由基和天然抗氧化剂[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 52-56.
- [13] Clare D A, Blum J, Fridowich I. A hybrid superoxide dismutase containing both functional iron and manganese[J].

J Biol Chem, 1984, 259: 5932-5940.

- [14] Martin M E. A streptococcus mutans superoxide dismutase that is active with either manganese or iron as a cofactor[J]. J Biol Chem, 1986, 261: 9361-9370.

- [15] 吴立. 刺梨超氧化物歧化酶的定性检测[J]. 贵州农学院学报, 1987, (2): 33-36.

结果, 比较 2 种方法的优劣, 分析了加工鳗鱼制品中单增李斯特氏菌的污染情况。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品、菌株

送检的 2 批共 10 份加工鳗鱼制品均为同一食品公司生产的冷冻蒲烧烤鳗; 编号为 L30、L31、L32 和 L33 的 4 个菌株由本实验室自行分离并保存, L30 是从英国中心科学实验室组织的食品检验水平测试(FEPAS)提供的鸡肉考核样中分离的英诺克李斯特氏菌, L31 是 2003 年从该食品公司生产的蒲烧烤鳗中分离的单增李斯特氏菌, L32 是从去头虾中分离的单增李斯特氏菌, L33 是从去头虾中分离的英诺克李斯特氏菌。

### 1.2 培养基、试剂

mBP、Fraser 肉汤为陆桥公司产品; 血平板、单增李斯特氏菌显色板均为博赛生物工程公司产品; PALCAM 平板为默克公司产品; miniVIDAS 单增李斯特氏菌(LMO<sub>2</sub>)试剂条、API Listeria 试验条及试剂和 Accuprobe 单增李斯特氏菌基因探针试剂盒均为法国生物梅里埃公司产品。以上培养基及试剂均在有效期内使用。

### 1.3 主要仪器设备

miniVIDAS 全自动酶联荧光免疫分析仪、API LAB 鉴定系统 V4.0 和 GENEPROBE 发光仪均为法国梅里埃公司产品。

### 1.4 单增李斯特氏菌的初筛

取 25g 样品, 加到 225ml mBP 中, 均质, 30℃培养 24h。取 1ml 增菌液, 加到 10ml Fraser 肉汤中, 30℃培养 24h, 观察肉汤是否变黑和混浊。若肉汤为澄清透明, 可初步判定为阴性。变黑的 Fraser 肉汤于 100℃水浴 15min, 冷却至室温, 取 500μl 加到 VIDAS(LMO<sub>2</sub>)试剂条中, 于 miniVIDAS 全自动酶联荧光免疫分析仪中检测。miniVIDAS 初筛结果为阳性的样品, 取其未灭活的变黑的 Fraser 肉汤, 划线于单增李斯特氏菌显色板或 PALCAM 平板上, 30℃培养 24h。

### 1.5 单增李斯特氏菌的基因探针鉴定

在 Accuprobe 探针试管内加 50μl 裂解液, 用接种环从单增李斯特氏菌显色板或 PALCAM 平板上挑取典型菌落加入到探针管内, 充分混匀, 37℃孵育 5min 溶解细胞后, 加 50μl 杂交缓冲液, 60℃孵育 15min, 再加 300μl 选择试剂, 用振荡器充分混匀, 60℃孵育 5min, 室温冷却 5min, 经 GENEPROBE 发光仪测定, 打印出阴性或阳性的判定结果。

### 1.6 单增李斯特氏菌的 API Listeria 鉴定

从单增李斯特氏菌显色板或 PALCAM 平板上挑取典型菌落, 接种至血平板, 30℃培养 24h, 观察 β-溶血环。并将血平板上可疑菌落制成菌悬液, 按 API Listeria

试剂盒中使用说明滴加到 API Listeria 试验条上, 37℃孵育 18~24h, 在 DIM 生化孔滴加 ZYM 试剂, 判读结果后查编码表鉴定到种。

## 2 结果与分析

### 2.1 烤鳗中单增李斯特氏菌的 miniVIDAS 初筛结果

送检的 2 批共 10 个冷冻烤鳗样品中有 4 个样品的单增李斯特氏菌 miniVIDAS 检测结果为阳性, 其余为阴性。从这 4 个阳性样品中分离的单增李斯特氏菌可疑菌株分别标记为 L0401、L0402、L0403 和 L0404。4 个可疑菌株在单增李斯特氏菌显色平板上的菌落均呈浅蓝色且带晕轮; 在 PALCAM 平板上的菌落周围都有黑色的环; 从 PALCAM 平板上挑取典型菌落接种于血平板上, 30℃培养 24h 后, 菌落都呈窄小的 β-溶血环。

### 2.2 单增李斯特氏菌的基因探针鉴定结果

基因探针鉴定结果(表 1)显示, 4 个可疑菌株的相对光单位(RLU)都远远大于判定为阳性的 RLU 值(49999), 因此判为阳性, 即 4 个可疑菌株均为单增李斯特氏菌。

表 1 4 个可疑菌株的基因探针鉴定结果

Table 1 The identification result of four dubious strain with gene probe method

菌株	相对光单位(RLU)	结果
L0401	374104	阳性
L0402	593189	阳性
L0403	153134	阳性
L0404	309830	阳性

注: RLU 值大于 49999 为阳性; RLU 值小于 40000 为阴性; RLU 值在 40000~49999 范围为可疑。

### 2.3 单增李斯特氏菌的 API Listeria 鉴定结果

4 个可疑菌株的 API Listeria 试剂条生化反应结果见表 2, 查数字图谱表, 4 个可疑菌株数字图谱编码均为 6510, 判定为单增李斯特氏菌。

### 2.4 单增李斯特氏菌的基因探针与 API Listeria 鉴定结果比较

将 4 个可疑菌株的基因探针鉴定结果与 API Listeria 鉴定结果进行比较, 2 种鉴定结果完全一致。为了增加这 2 种鉴定方法结果的可比性, 我们还用本实验室自行分离的 2 株英诺克李斯特氏菌和 2 株单增李斯特氏菌进行验证, 结果也完全一致(表 3)。

### 2.5 Accuprobe 基因探针法和 API Listeria 法鉴定单增李斯特氏菌的优缺点比较

基因探针法与 API Listeria 法均是快速鉴定方法, Accuprobe 基因探针法在分离纯化, 在所需鉴定时间及结果判定上, 比 API Listeria 更简单、快速、准确, 但基因探针法需要借助昂贵的仪器, Accuprobe 单增李斯特氏菌基因探针试剂盒只能鉴定单增李斯特氏菌, 对

表2 4个可疑菌株的API Listeria生化反应结果  
Table 2 The identification result of four dubious strain with API Listeria method

项目	L0401			L0402			L0403			L0404		
	结果	数字图谱		结果	数字图谱		结果	数字图谱		结果	数字图谱	
DIM	-	1	6	-	1	6	-	1	6	-	1	6
ESC	+	2		+	2		+	2		+	2	
$\alpha$ MAN	+	4		+	4		+	4		+	4	
DARL	+	1	5	+	1	5	+	1	5	+	1	5
XYL	-	2		-	2		-	2		-	2	
RHA	+	4		+	4		+	4		+	4	
MDG	+	1	1	+	1	1	+	1	1	+	1	1
RIB	-	2		-	2		-	2		-	2	
GIP	-	4		-	4		-	4		-	4	
TAG	-	1	0	-	1	0	-	1	0	-	1	0

注: DIM—鉴定 无害李斯特氏菌/单增李斯特氏菌; ESC—七叶苷水解;  $\alpha$ MAN— $\alpha$ -甘露苷酶; DARL—D-阿拉伯糖醇酸; XYL—D-木糖酸; RHA—鼠李糖酸; MDG— $\alpha$ -甲基-D-葡萄糖苷酸; RIB—核糖酸; GIP—葡萄糖-1-磷酸盐酸; TAG—塔格糖酸。

表3 Accuprobe基因探针法与API Listeria法鉴定结果比较  
Table 3 Compare the identification result of gene probe method with that of API Listeria method

菌株编号	菌株来源	鉴定结果		结果一致性
		基因探针法	API 鉴定	
L0401	蒲烧烤鳗	阳性	单增李斯特氏菌	一致
L0402	蒲烧烤鳗	阳性	单增李斯特氏菌	一致
L0403	蒲烧烤鳗	阳性	单增李斯特氏菌	一致
L0404	蒲烧烤鳗	阳性	单增李斯特氏菌	一致
L30	FEPAS的鸡肉考核样	阴性	英诺克李斯特氏菌	一致
L31	蒲烧烤鳗	阳性	单增李斯特氏菌	一致
L32	去头虾	阳性	单增李斯特氏菌	一致
L33	去头虾	阴性	英诺克李斯特氏菌	一致

李斯特氏菌属中的其他种都不能鉴定,均表示为阴性,而API Listeria法不需要仪器,可鉴定李斯特氏菌属的所有种。二者之间的优缺点比较见表4。

表4 Accuprobe基因探针法和API Listeria法鉴定单增李斯特氏菌的优缺点比较

项目	Accuprobe基因探针法	API Listeria法
分离纯化	无需次代培养及重新分离	需次代培养及重新分离
鉴定时间	30min	大于24h
结果判定	直接,准确	间接,易产生误差
仪器	需要	不需要
适用范围	单增李斯特氏菌	李斯特氏菌属的所有种

## 2.6 蒲烧烤鳗中单增李斯特氏菌污染情况分析

从以上检测鉴定结果可以看出,该食品公司生产的冷冻蒲烧烤鳗的单增李斯特氏菌污染相当严重,10份鳗鱼制品中就有4份被检出,检出率高达40%。2003年度也曾经从该食品公司生产的烤鳗中检出1株单增李斯特氏菌,因此可以从看出加工过的鳗鱼制品也存在单增李斯特氏菌污染问题。从烤鳗中分离的这5株单增李斯特氏菌是否为同一来源,有待于进一步研究。但有

关生产及监督部门应引起高度重视,加强生产过程的监控,查找并切断污染源,防止由于单增李斯特氏菌对产品的污染而引起食物中毒的爆发流行,提高该产品的卫生安全。

## 3 讨论

单增李斯特氏菌广泛存在于动植物食品中,不易被冻融,在4℃冰箱保存的食品中也可生长繁殖,故其危害性进一步增大<sup>[3]</sup>。因此,含有单增李斯特氏菌的食品冷藏时间越长,危险性越大。世界各国均将其列为进出口食品必检项目。目前,国内绝大多数检测机构都在使用传统的单增李斯特氏菌检测方法,因存在检测周期长、程序复杂、所需试剂繁多、检测精度低等缺点,这些传统方法已远远不能满足现代检测的要求。引入Accuprobe基因探针法可简便、快速、准确鉴定单增李斯特氏菌,缩短了检测周期。

研究表明,用miniVIDAS初步筛选后,再进行API Listeria法鉴定,可比较精确检测出产品中的李斯特氏菌属,该联用方法将检测周期从传统方法的10d缩减到5d<sup>[4]</sup>。但API Listeria鉴定法,不能直接挑取选择性平板如PALCAM上的菌落,需转接到TSAYE或血平板上进行纯化,因为在PALCAM平板上分离菌落时可能混有不可见的受抑微生物<sup>[4]</sup>,需培养24h后,挑取纯化平板上的典型菌落制成菌悬液,进行API Listeria鉴定实验,还需培养24h,才得到鉴定结果。Accuprobe基因探针法是用荧光素标记的单增李斯特氏菌特异性的DNA探针与待检样品中的单增李斯特氏菌的rRNA序列进行杂交,形成RNA:DNA杂交体,破坏未结合的探针,用GENEPROBE发光仪读取450nm处的吸收值,吸收值大于临界值则表明待检样品中存在单增李斯特氏菌。Accuprobe基因探针只针对目标基因片段,因此有很高的特异性,可准确检测鉴定出样品中的单增李斯特

# 固体培养蛹虫草核苷类次生代谢物的产率

温 鲁<sup>1</sup>, 夏 敏<sup>2</sup>, 宋虎卫<sup>1</sup>, 张 乐<sup>1</sup>, 周 昊<sup>1</sup>, 蒋 洁<sup>1</sup>, 袁丞墅<sup>1</sup>

(1. 淮阴师范学院生物系, 江苏 淮安 223300 2. 淮阴师范学院分析测试中心, 江苏 淮安 223300)

**摘 要:** 为提高固体培养蛹虫草核苷类代谢物的产率, 用高效液相色谱法对培养物的虫草素和腺苷含量进行检测, 从菌株、氮源、氮源水平、加水量、培养时间和光照等方面进行研究, 在以 20% 豆粉为氮源、按 1:1 加营养液、接种 Cm-2 菌株、遮光培养 35d 的条件下, 培养物的虫草素含量可达 5.49mg/g, 高于蛹虫草全草, 为保健食品增加了新品种和新原料。

**关键词:** 大米; 蛹虫草; 虫草素; 腺苷; 固体培养; 高效液相色谱法; 保健食品

## Yield of Nucleotides Secondary Metabolite in Cordyceps militaris by Corn Culture

WEN Lu<sup>1</sup>, XIA Min<sup>2</sup>, SONG Hu-wei<sup>1</sup>, ZHANG Le<sup>1</sup>, ZHOU Hao<sup>1</sup>, JIANG Jie<sup>1</sup>, YUAN Cheng-shu<sup>1</sup>

(1. Department of Biology, Huaiyin Normal College, Huai'an 223300, China

2. Center of Analysis and Testing, Huaiyin Normal College, Huai'an 223300, China)

**Abstract:** In order to increase the yield of nucleotide metabolite in Cordyceps militaris by corn culture, the strains, nitrogen resources and levels, water supply, culture period and illumination were assayed by determining the contents of cordycepin and adenosine in the culture produce by HPLC. The results showed that under 20% bean powder as nitrogen resource, adding nutrient solution of equal volume, inoculating Cm-2 strain with light covering and culturing for 35 days, the content of cordycepin in the culture produce reached 5.49mg/g, significantly higher than that of the whole Cordyceps militaris. Therefore this study added new

收稿日期: 2004-11-16

作者简介: 温鲁(1947-), 男, 副教授, 研究方向为食用菌与相关保健品。

氏菌。应用 Accuprobe 基因探针法鉴定, 可直接从选择性平板上挑选典型菌落, 无需次代培养及重新分离纯化, 鉴定过程仅需 30min, 而从前增菌、VIDAS 初筛到选择性平板划线纯化仅需 72h, 比用 API Listeria 鉴定法缩短了 2d, 更比用常规方法大大缩短了整个检测鉴定周期。但基因探针鉴定法也存在缺点, 检测一种菌就需要制备一种探针, 尚未建立所有致病菌的探针; 由于样品中待检菌量若含有复杂成分的杂质会限制探针检测的敏感性, 样品中的单增李斯特氏菌的数量一般低于  $10^2$ cfu/g, 而基因探针检测极限为  $10^3 \sim 10^5$ cfu/g<sup>[5]</sup>, 因此一般仍需前增菌、划线培养和挑取典型菌落等步骤。但当增菌肉汤检测极限达到  $7.5 \times 10^7$ cfu/g 时, 也可直接用基因探针法检测肉汤, 整个检测时间仅需 2d<sup>[6]</sup>。

为适应日益扩大的对外贸易的发展, 提高日常工作的检出率, 防止受恶性细菌污染的食品出入境, 保障消费者的食品安全, 在口岸引进简便、快速、准确的检验方法势在必行。基因探针法明显提高了细菌的诊断

水平, 大大缩短了检测周期, 随着核酸杂交技术的不断发展和研究的不断深入, 基因探针法必将在食源性病原的检测鉴定上得到越来越广泛的应用。

### 参考文献:

- [1] Foodborne Listeriosis Report of a WHO Informel Working Group[M]. Geneva, 1988. 15-19.
- [2] Afnor Validation BIO'procedure for the detection of Listeria monocytogenes"[M]. France, 1995.
- [3] 张子平. 李斯特氏菌—一种适冷性食物中毒细菌[J]. 肉类工业, 2000, 226(4): 34.
- [4] 翁文川, 覃文. 联用 VIDAS 法和 API Listeria 法对食品中李斯特氏菌检验及分类[J]. 食品科学, 2000, 21(4): 59-62.
- [5] 陈森, 辛显桐, 金蓉培. 食品中单增李斯特氏菌及快速检测[J]. 中华预防医学杂志, 1995, 29(1): 49-50.
- [6] 翁文川, 李志勇, 胡科锋, 等. 基因探针快速检测食品中单增李斯特氏菌[J]. 食品科技, 2003, (1): 75-77.