

鲜切果蔬中4种病原微生物多重PCR检测技术

冯可^{1,2}, 胡文忠^{1,*}, 姜爱丽¹, 萨仁高娃^{1,2}, 徐永平², 司琦¹, 马新秀¹

(1.大连民族大学生命科学学院, 生物技术与资源利用教育部重点实验室, 辽宁 大连 116600;

2.大连理工大学生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116024)

摘要: 研发可同时检测鲜切果蔬中的单核细胞性李斯特菌、鼠伤寒沙门菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌O157:H7的多重聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 检测方法。根据单核细胞性李斯特菌*inlA*基因、鼠伤寒沙门菌*invA*基因、大肠杆菌O157:H7 *wzy*基因、金黄色葡萄球菌*nuc*基因设计并筛选出4对引物。对多重PCR体系及条件进行优化。该方法对单核细胞性李斯特菌、鼠伤寒沙门菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌O157:H7的检出限分别为 3.5×10^6 、 1.6×10^5 、 2.4×10^5 、 4.8×10^5 CFU/mL。将优化的多重PCR方法对不同接种量富集后验证, 结果表明, 经过9 h富集后, 该方法检出限为1 CFU/mL。该方法在鲜切莴苣、鲜切黄瓜、鲜切木瓜、鲜切哈密瓜中应用同样可扩增出4条目标菌。因此, 利用所建立的多重PCR方法对鲜切果蔬中侵染的病原菌检出限可达到1 CFU/g。该方法相较于传统的培养检测方法具有节约大量的劳力、试剂、时间等优点, 检测时间也由原来的5~7 d缩短至9~11 h, 对于企业或分析检验中心大批量样品的监测具有指导意义。

关键词: 多重PCR; 快速检测; 食源性病原微生物; 鲜切果蔬

Multiplex PCR Method for Detection of Four Foodborne Pathogens on Fresh-Cut Fruits and Vegetables

FENG Ke^{1,2}, HU Wenzhong^{1,*}, JIANG Aili¹, Sarengaowa^{1,2}, XU Yongping², SI Qi¹, MA Xinxiu¹

(1. Key Laboratory of Biotechnology and Bioresources Utilization, Ministry of Education,

College of Life Science, Dalian Minzu University, Dalian 116600, China;

2. School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: The objective of this study is to establish a multiplex PCR assay for the detection *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 on fresh-cut fruits and vegetables. Four pairs of specific primers were designed according to the *inlA* gene of *L. monocytogenes*, the *invA* gene of *S. typhimurium*, the *nuc* of *S. aureus* and the *wzy* gene of *E. coli* O157:H7, respectively. The limits of detection (LODs) for *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*, *S. aureus* and *E. coli* O157:H7 were 3.5×10^6 , 1.6×10^5 , 2.4×10^5 , and 4.8×10^5 CFU/mL, respectively. This assay was advantageous for saving labor, reagents and time (9–11 h vs. 5–7 d) over traditional culture method. The present method can provide a significant guidance for enterprises or analytical and testing centers to monitor massive samples.

Keywords: multiplex PCR; rapid detection; foodborne pathogen; fresh-cut fruits and vegetables

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201806043

中图分类号: TS207.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2018) 06-0276-08

引文格式:

冯可, 胡文忠, 姜爱丽, 等. 鲜切果蔬中4种病原微生物多重PCR检测技术[J]. 食品科学, 2018, 39(6): 276-283.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201806043. <http://www.spkx.net.cn>

FENG Ke, HU Wenzhong, JIANG Aili, et al. Multiplex PCR method for detection of four foodborne pathogens on fresh-cut fruits and vegetables[J]. Food Science, 2018, 39(6): 276-283. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201806043. <http://www.spkx.net.cn>

鲜切果蔬又称最少加工果蔬、半加工果蔬、轻度加工果蔬等, 它是指以新鲜果蔬为原料, 经分级、清洗、

整修、去皮、切分、保鲜、包装等一系列处理后, 再经过低温运输进入冷柜销售的即食或即用果蔬制品。鲜切

收稿日期: 2017-07-13

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项 (2016YFD0400903); 国家自然科学基金面上项目 (31471923; 31172009); “十二五”国家科技支撑计划项目 (2012BAD38B05)

第一作者简介: 冯可 (1985—), 男, 博士研究生, 研究方向为食品安全检测。E-mail: fengkessky@sina.com

*通信作者简介: 胡文忠 (1959—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品科学。E-mail: wenzhongh@sina.com

果蔬既保持了果蔬原有的新鲜状态,又经过加工使产品清洁卫生,属于净菜范畴。天然、营养、新鲜、方便以及可利用度高(100%可食用),满足了人们追求快节奏,健康等生活方式的需求^[1]。目前,在各大超市中,鲜切果蔬制品随处可见,但是,由于其缺少果皮的保护,果肉中的营养成分以及活性成分直接暴露于空气中或是与空气间接接触,会与氧气发生生理生化反应,导致细胞较易氧化、易褐变及易受微生物污染^[2]。

据世界卫生组织统计,世界每年食源性病例多达数十亿,其中有220万人因此而丧生^[3]。已将大肠杆菌O157:H7、鼠伤寒沙门菌、单核细胞性李斯特菌及金黄色葡萄球菌列为重要的食源性致病菌^[4-5],并且列为中国进出口产品的必检项目。在我国每年发生的细菌性食物中毒占中毒事件的30%~90%,中毒人数占食物中毒总人数的60%~90%^[6-7]。调查表明,单核细胞性李斯特菌可以在鲜切哈密瓜、鲜切西瓜、鲜切木瓜^[8]、鲜切芹菜^[9]以及9种不同类型的鲜切蔬菜,如茼蒿、菠菜、豆苗、芝麻菜、胡萝卜、沙拉等^[10]上繁殖。葡萄球菌食源性疾病是金黄色葡萄球菌肠毒素引起食物中毒的最常见的食源性疾病之一。金黄色葡萄球菌同样能够在鲜切火龙果、鲜切芒果、鲜切木瓜上快速繁殖^[11]。大肠杆菌O157:H7和沙门菌引起病原微生物食物中毒事件约占微生物引起中毒事件总额的42.9%及34.3%^[12]。

目前,常规国标病原微生物检测手段存在操作步骤繁琐,耗时长等缺点,难以满足市场需求。因此,建立能够对鲜切果蔬中多种病原微生物同时快速检测的技术显得尤为重要,多重聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术作为一种能够快速、准确检测多种病原微生物的技术已引起越来越多的重视^[13-14]。本实验在建立一共能够同时、快速检测鲜切果蔬中常见病原微生物多重PCR检测方法。对促进鲜切果蔬产业的发展及保障人类生命安全具有重要意义^[15]。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

茼蒿、黄瓜、木瓜、哈密瓜购自大连市华润万家超市。

鼠伤寒沙门菌(*Salmonella typhimurium*) (CICC 21484)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) (CICC 23656)、大肠杆菌O157:H7(*Escherichia coli* O157:H7) (CICC 10907)、单核细胞性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*) (CICC 21633)、伊氏李斯特菌(*L. ivanovii*) (CICC 21663)、格氏李斯特菌(*L. grayi*) (CICC 21670)、斯氏李斯特菌(*L. seeligeri*) (CICC 21671)、威氏李斯特菌(*L. welshimeri*) (CICC 21672)、英诺克李斯特菌(*L. innocua*)

(ATCC 10417)、肠侵袭性大肠杆菌(*E. coli* EIEC) (CICC 10661)、乙型副伤寒沙门菌(*S. paratyphi* β) (CICC 10437)、肠道沙门菌肠道亚种伤寒血清型(*S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi) (CICC 10871)、奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*) (CICC 21516)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) (CICC 23832)、大肠埃希氏菌(*E. coli*) (CICC 10389)、志贺毒性大肠埃希氏菌(*E. coli* STEC) (CICC 10668)、副溶血性弧菌(*V. parahaemolyticus*) (CICC 21617)、霍乱弧菌(*Vibrio cholera*) (CICC 23794)、铜绿色假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) (CICC 20236)、空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*) (CICC 22936)、福氏志贺菌(*Shigella flexneri*) (CICC 10865)、宋内志贺菌(*S. sonnei*) (CICC 21679)、荧光假单胞菌(*P. fluorescens*) (CICC 20225)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*) (CICC 10002) 中国工业微生物菌种保藏管理中心(China Center of Industrial Culture Collection, CICC)。

10×PCR Buffer (Mg^{2+} free)、 $MgCl_2$ (25 mmol/L)、dNTP Mixture (2.5 mmol/L)、RNase-Free Water、exTaq DNA Polymerase (5 U/ μ L)、6×DNA loading Buffer、DL1000 DNA Marker 大连宝生物有限公司;琼脂糖西班牙Biowest公司;GelRed染料 上海拜力生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

BagMixer-400W均质器 法国Interscience公司;Scientific Arctic Thermo热循环仪 美国Thermo Fisher Scientific公司;PCR洁净工作台 苏州苏净化设备有限公司;D1008E型旋涡混合器 江苏天翎仪器有限公司;BioSpectrum 310凝胶成像系统 美国UVP公司。

1.3 方法

1.3.1 菌悬液制备

将实验室保存的单核细胞性李斯特菌、鼠伤寒沙门菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌O157:H7分别接种于TSA固体培养基中,36℃培养24 h,分别挑取单菌落接种于5 mL TSB培养基中,36℃静止培养18~24 h。取1 mL菌悬液(约为 10^8 CFU/mL)进行DNA提取。

1.3.2 DNA提取

纯培养菌液1 mL于离心管中,12 000 r/min离心2 min,弃上清液,按照细菌基因组DNA提取试剂盒操作方法进行提取。提取的模板储备液通过Thermo酶标仪得到OD_{260 nm}、OD_{280 nm}以确定提取的DNA浓度及纯度。

1.3.3 引物设计

利用Premier 5.0和Oligo 6.0软件对目的基因进行引物设计以及评价^[16],选取4对不同片段大小及相近退火温度的特异性引物,经过BLAST分别将引物与目的基因同源性进行比对,确定引物序列^[17-18]见表1。

表1 多重PCR引物序列

Table 1 Primer pairs designed for multiplex PCR

| 细菌 | 引物序列 (5'-3') | 产物/bp |
|-------------|---|-------|
| 鼠伤寒沙门菌 | <i>invA</i> -F: CTTTATGATGCATTCTACCAACGACTG | 121 |
| | <i>invA</i> -R: CCGAATCACCCTGTAGGA | |
| 金黄色葡萄球菌 | <i>nuc</i> -F: TTCGCTACTAGTTGCTTA | 159 |
| | <i>nuc</i> -R: CGCAGGTTCTTTATGTAA | |
| 大肠杆菌O157:H7 | <i>wzy</i> -F: GTTCCATATGTTGTTTCTGA | 193 |
| | <i>wzy</i> -R: CTGCTCCATACGTAAGTA | |
| 单核细胞性李斯特菌 | <i>inlA</i> -F: GAGCTAACCAATAAGTAACA | 285 |
| | <i>inlA</i> -R: AGGTCGCTAATTTGGTTA | |

1.3.4 多重PCR引物浓度优化

多重PCR总体积为25 μL，其中终浓度分别为1×Ex *Taq* Buffer、MgCl₂ 2 mmol/L、dNTPs Mixture 0.2 mmol/L、*exTaq*酶1 U/μL，引物浓度按照表2进行四因素四水平正交优化。将鼠伤寒沙门菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌O157:H7和单核细胞性李斯特菌的DNA等比例混合后，加入4 μL作为模板；每组实验加ddH₂O补足至25 μL。反应条件：95℃预变性3 min；94℃变性30 s，56℃复性30 s，72℃延伸30 s，40个循环；72℃后延伸10 min。扩增产物检测：经3 mg/100 mL的琼脂糖凝胶电泳后，采用凝胶成像分析系统观察结果。将扩增产物送到宝生物工程（上海）有限公司进行测序。

表2 四因素四水平L₁₆ (4⁴) 正交试验设计

Table 2 Orthogonal array design L₁₆ (4⁴)

| 试验号 | 引物浓度/ (μmol/L) | | | |
|-----|----------------|------------|-------------|------------|
| | <i>inv</i> | <i>wzy</i> | <i>inlA</i> | <i>nuc</i> |
| 1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 |
| 2 | 0.1 | 0.2 | 0.2 | 0.2 |
| 3 | 0.1 | 0.3 | 0.3 | 0.3 |
| 4 | 0.1 | 0.4 | 0.4 | 0.4 |
| 5 | 0.2 | 0.1 | 0.2 | 0.3 |
| 6 | 0.2 | 0.2 | 0.1 | 0.1 |
| 7 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.2 |
| 8 | 0.2 | 0.4 | 0.3 | 0.2 |
| 9 | 0.3 | 0.1 | 0.3 | 0.3 |
| 10 | 0.3 | 0.2 | 0.4 | 0.3 |
| 11 | 0.3 | 0.3 | 0.1 | 0.2 |
| 12 | 0.3 | 0.4 | 0.2 | 0.1 |
| 13 | 0.4 | 0.1 | 0.4 | 0.2 |
| 14 | 0.4 | 0.2 | 0.3 | 0.1 |
| 15 | 0.4 | 0.3 | 0.2 | 0.4 |
| 16 | 0.4 | 0.4 | 0.1 | 0.3 |

1.3.5 多重PCR反应液浓度优化^[19]

多重PCR总体积为25 μL，其中终浓度分别为1×Ex *Taq* Buffer；其他反应液成分按照表3进行三因素三水平正交试验优化，影响因素分别为MgCl₂ (25 mmol/L)，优化水平2.0、2.5、3.0 mmol/L；dNTPs Mixture (2.5 mmol/L)，优化水平0.15、0.20、0.25 mmol/L；*exTaq*酶 (5 U/μL)，优化水平0.5、1.0、1.5 U。

表3 三因素三水平L₉ (3³) 正交试验设计

Table 3 Orthogonal array design L₉ (3³)

| 试验号 | Mg ²⁺ 浓度/ (mmol/L) | dNTP浓度/ (mmol/L) | <i>exTaq</i> 活力/U |
|-----|-------------------------------|------------------|-------------------|
| 1 | 2.0 | 0.15 | 0.5 |
| 2 | 2.0 | 0.20 | 1.0 |
| 3 | 2.0 | 0.25 | 1.5 |
| 4 | 2.5 | 0.15 | 1.0 |
| 5 | 2.5 | 0.20 | 1.5 |
| 6 | 2.5 | 0.25 | 0.5 |
| 7 | 3.0 | 0.15 | 1.5 |
| 8 | 3.0 | 0.20 | 0.5 |
| 9 | 3.0 | 0.25 | 1.0 |

反应条件：95℃预变性3 min；94℃变性30 s，56℃复性30 s，72℃延伸30 s，40个循环；72℃后延伸10 min。扩增产物检测：经质量浓度为3 g/100 mL的琼脂糖凝胶电泳后，采用凝胶成像分析系统观察结果。将扩增产物送到宝生物工程（上海）有限公司进行测序。

1.3.6 多重PCR退火温度优化

多重PCR反应总体积为25 μL，包括1×Ex *Taq* Buffer；MgCl₂ (25 mmol/L)、dNTPs Mixture (2.5 mmol/L)、*exTaq*酶 (5 U/μL)、引物浓度均为优化后结果，将鼠伤寒沙门菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌O157:H7和单核细胞性李斯特菌的DNA等比例混合后，加入4 μL作为模板，每组实验加ddH₂O补足至25 μL。反应条件：95℃预变性3 min；94℃变性30 s，退火温度的优化分别为52.0、52.2、52.6、53.2、54.1、55.2、56.6、57.8、58.6、59.4、59.8、60.0℃复性30 s，72℃延伸30 s，32个循环；72℃后延伸10 min；每组实验加ddH₂O补足至25 μL。扩增产物检测：经质量浓度为3 g/100 mL的琼脂糖凝胶电泳后，采用凝胶成像分析系统观察结果。将扩增产物送到宝生物工程（上海）有限公司进行测序。

1.3.7 多重PCR延伸时间优化

多重PCR总体积为25 μL，包括1×Ex *Taq* Buffer、MgCl₂ (25 mmol/L)、dNTPs Mixture (2.5 mmol/L)、*exTaq*酶 (5 U/μL)、引物浓度均为优化后结果，将鼠伤寒沙门菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌O157:H7和单核细胞性李斯特菌的DNA等比例混合后，加入4 μL作为模板，每组实验加ddH₂O补足至25 μL。反应条件：95℃预变性3 min；94℃变性30 s，退火温度为优化后结果，复性30 s，72℃延伸时间分别为15、30、45、60、75、90 s，32个循环；72℃后延伸10 min；每组实验加ddH₂O补足至25 μL。扩增产物检测：经质量浓度为3 g/100 mL的琼脂糖凝胶电泳后，采用凝胶成像分析系统观察结果。将扩增产物送到宝生物工程（上海）有限公司进行测序。

1.3.8 多重PCR引物间特异性验证

为确定所建立多重PCR方法的特异性,按照多重PCR体系与条件随机组合添加模板DNA,每组按照表4进行扩增反应,根据扩增产物分析有无反应内交叉错配现象^[20]。

表 4 特异性验证实验

Table 4 Experimental design for validation of PCR specificity

| 试验号 | 鼠伤寒沙门菌 | 金黄色葡萄球菌 | 大肠杆菌O157:H7 | 单核细胞性李斯特菌 |
|-----|--------|---------|-------------|-----------|
| 1 | + | + | - | - |
| 2 | + | - | + | - |
| 3 | + | - | - | + |
| 4 | - | + | + | - |
| 5 | - | + | - | + |
| 6 | - | - | + | + |
| 7 | + | + | + | - |
| 8 | + | + | - | + |
| 9 | - | + | + | + |
| 10 | + | - | + | + |
| 11 | + | + | + | + |
| 12 | - | - | - | - |

注: +.在反应体系中添加相应的模板; - .在反应体系内不含相应的模板。

1.3.9 多重PCR菌间特异性验证

利用优化得到的多重PCR检测方法对非目标菌DNA模板进行扩增。对建立的反应体系进行特异性验证^[21]。选择伊氏李斯特菌、格雷李斯特菌、斯氏李斯特菌等20种非目标菌作为阴性对照,并用ddH₂O作为空白对照。

1.3.10 多重PCR检出限检测

将菌悬液用0.1%无菌蛋白胨水10倍梯度稀释至 $3(\lg(\text{CFU/mL}))$ ，菌悬液和每个稀释梯度的菌液各取1 mL，用细菌DNA提取试剂盒对目标菌进行提取，以获得DNA模板，按最佳反应体系与反应条件进行实验。同时对目标菌按照涂布法进行菌落计数。

1.3.11 预富集培养

将4种目标菌悬液用0.1%无菌蛋白胨稀释至 10^0 、 10^3 、 10^6 CFU/mL,以TSB为基础的改良的共增菌培养基,共增菌培养基配方如下:胰蛋白胨17 g/L、蛋白胨3 g/L、氯化钠10 g/L、磷酸氢二钠2.5 g/L、葡萄糖2.5 g/L。预富集培养3、6、9 h,菌悬液各取1 mL,用细菌DNA提取试剂盒对目标菌进行提取,以获得DNA模板,按最佳反应体系与反应条件进行实验。

1.3.12 人工接种鲜切果蔬验证

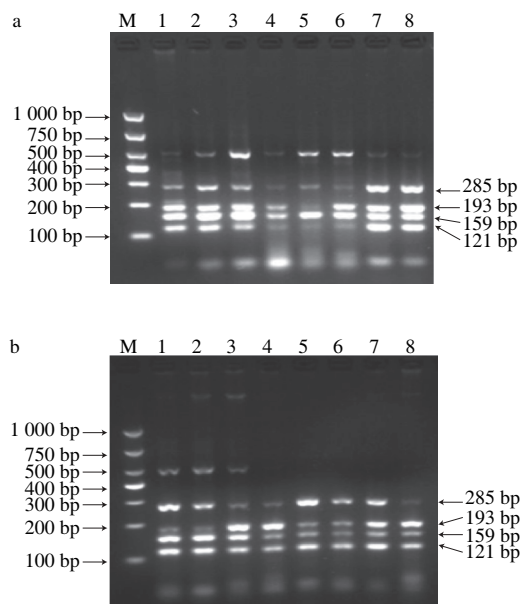
制备4种致病菌悬液,用0.1%无菌蛋白胨水稀释至10 CFU/mL,取1 mL菌悬液分别侵染至清洗后的鲜切莴苣、鲜切黄瓜、鲜切木瓜、鲜切哈密瓜表面,样品质量约10 g,片状样品规格约0.5 cm×0.5 cm,块状样品规格约0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm。在安全柜中吹干1 h,将其分别浸泡于90 mL共增菌培养基中培养至可检出的时间、

37 ℃^[22]。采用已建立的多重PCR技术对其进行验证, 以确定该技术在鲜切果蔬中应用的有效性。

2 结果与分析

2.1 多重PCR引物浓度优化结果

各引物对在多重PCR过程中呈相互抑制的关系,适当的调节引物浓度配比可以有效避免目标条带漏检的现象,是影响多重PCR有效扩增目标条带的关键因素^[23]。多重PCR引物浓度优化结果如图1所示,不同比例的引物浓度扩增的结果有所不同,引物浓度用量较低时,会出现目标条带未被扩增的现象。而当引物用量过高时,会导致单一目标条带过于明亮且弥散。当4种目标菌的引物浓度配比不同时,易出现杂带扩增的现象。由图1中泳道1~3所示,均有杂带扩增的现象。图1b中泳道4和泳道8,由于*inlA*引物浓度含量较低,因此扩增的相应条带较暗。而在图1b中泳道5~7,均可扩增出4条清晰、明亮且特异性良好的条带。考虑到条带明亮度的均一性及最大限度的提高扩增效率,则选择泳道7中*inv*引物浓度为0.4 μmol/L, *wzy*引物浓度为0.3 μmol/L, *inlA*引物浓度为0.2 μmol/L, *nuc*引物浓度为0.4 μmol/L时为最终引物浓度配比进行后续实验。

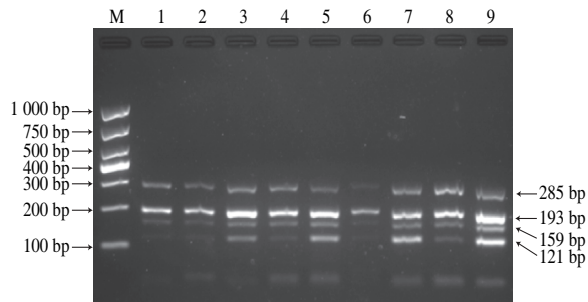


M. 1 000 bp DNA Marker; a: 1~8.引物*inv:wzy:inlA:nuc*浓度比分别为0.1:0.1:0.1:0.1、0.1:0.2:0.2:0.2、0.1:0.3:0.3:0.3、0.1:0.4:0.4:0.4、0.2:0.1:0.2:0.3、0.2:0.2:0.1:0.1、0.2:0.3:0.4:0.2、0.2:0.4:0.3:0.2; b: 1~8.引物*inv:wzy:inlA:nuc*浓度比分别为0.3:0.1:0.3:0.3、0.3:0.2:0.4:0.3、0.3:0.3:0.1:0.2、0.3:0.4:0.2:0.1、0.4:0.1:0.4:0.2、0.4:0.2:0.3:0.1、0.4:0.3:0.2:0.4、0.4:0.4:0.1:0.3。

图 1 多重PCR引物浓度优化结果

Fig. 1 Optimization of primer concentrations for multiplex PCR

2.2 多重PCR体系优化结果



M. 1 000 bp DNA Marker; 1. Mg^{2+} (2.0 mmol/L)、dNTP (0.15 mmol/L)、*exTaq* (0.5 U); 2. Mg^{2+} (2.0 mmol/L)、dNTP (0.20 mmol/L)、*exTaq* (1.0 U); 3. Mg^{2+} (2.0 mmol/L)、dNTP (0.25 mmol/L)、*exTaq* (1.5 U); 4. Mg^{2+} (2.5 mmol/L)、dNTP (0.15 mmol/L)、*exTaq* (1.0 U); 5. Mg^{2+} (2.5 mmol/L)、dNTP (0.20 mmol/L)、*exTaq* (1.5 U); 6. Mg^{2+} (2.5 mmol/L)、dNTP (0.25 mmol/L)、*exTaq* (0.5 U); 7. Mg^{2+} (3.0 mmol/L)、dNTP (0.15 mmol/L)、*exTaq* (1.5 U); 8. Mg^{2+} (3.0 mmol/L)、dNTP (0.25 mmol/L)、*exTaq* (1.5 U); 9. Mg^{2+} (3.0 mmol/L)、dNTP (0.25 mmol/L)、*exTaq* (1.0 U)。

图2 PCR体系优化结果

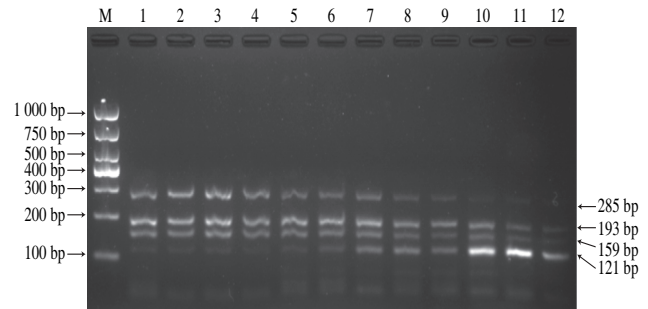
Fig. 2 Optimization of reaction system for multiplex PCR

如图2所示, 不同比例的反应体系, 如 Mg^{2+} 、dNTP、*exTaq* 浓度不同, 扩增的结果有所不同。当反应体系中各因素无法满足扩增需求时, 会出现漏检目标条带的现象^[24]。如图2中泳道1、2、4、6、8所示, 均无法扩增出4条目标条带。其原因可能是泳道1和泳道2中 Mg^{2+} 浓度为2.0 mmol/L, 相对含量较低的 Mg^{2+} 浓度影响了 *Taq* DNA聚合酶与其结合效率, 从而降低了大肠杆菌 O157:H7 和金黄色葡萄球菌目标条带的扩增。泳道6和泳道8中相应DNA聚合酶活性为0.5 U, 其酶活性过低因此影响了扩增效率。泳道4中, 可隐约扩增4条目标条带, 由于dNTP浓度为0.15 mmol/L, 含量较低无法为反应提供充足的游离碱基, 因此影响了扩增效率。而图2中泳道3、5、7、9均可扩增出4条目标条带, 其条带清晰, 且无杂带扩增。其中, 泳道9中反应体系各组分含量较高, 因此, 为了最大限度地保障反应过程的扩增效率, 选择泳道9中的反应体系 Mg^{2+} 浓度为3.0 mmol/L, dNTP浓度为0.25 mmol/L, *exTaq* 酶活力为1.0 U作为反应条件, 进行后续实验。

2.3 多重PCR退火温度优化结果

退火温度过低, 可致非特异性扩增而降低特异性扩增效率, 退火温度过高影响引物与模板的结合而降低PCR扩增效率。在鼠伤寒沙门菌 *inv* 引物浓度为0.4 μ mol/L、大肠杆菌 O157:H7 *wzy* 引物浓度为0.3 μ mol/L、单核细胞增生李斯特菌 *inlA* 引物浓度为0.2 μ mol/L、金黄色葡萄球

菌 *nuc* 引物浓度为0.4 μ mol/L时, Mg^{2+} 浓度为3.0 mmol/L, dNTP浓度为0.25 mmol/L, *exTaq* 活力为1.0 U时对多重PCR退火温度进行优化, 结果如图3所示。



M. 1 000 bp DNA Marker; 1~12.退火温度分别为52.0、52.2、52.6、53.2、54.1、55.2、56.6、57.8、58.6、59.4、59.8、60.0 $^{\circ}$ C。

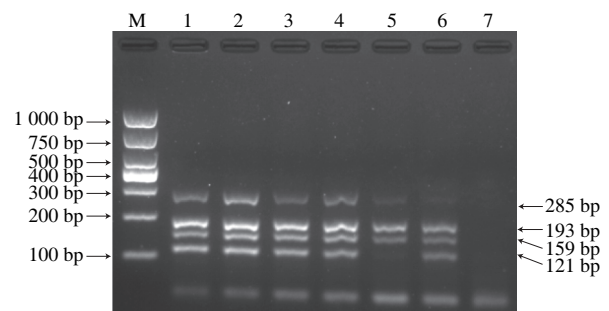
图3 多重PCR退火温度优化结果

Fig. 3 Optimization of annealing temperature for multiplex PCR

在52~60 $^{\circ}$ C范围内扩增的目标条带明显不同, 当退火温度较低时如泳道1、2, 鼠伤寒沙门菌目标条带几乎无法扩增, 随着退火温度升高, 如图3泳道6~9所示, 扩增条带逐渐呈现清晰可见的现象。而当退火温度为58.6、59.4、59.8、60.0 $^{\circ}$ C时, 单核细胞性李斯特菌 *inlA* 基因则呈无法扩增的现象, 这是由于退火温度过高导致扩增效率显著降低的结果^[25]。综合而言, 泳道7中4条目标条带清晰、明亮, 因此选择退火温度为56.6 $^{\circ}$ C进行后续实验。

2.4 多重PCR延伸时间优化结果

在退火温度为56.6 $^{\circ}$ C条件下, 对反应条件中延伸时间优化结果如图4所示, 随着延伸时间的延长, 扩增效率呈下降趋势。延伸时间在30~60 s时, 如图4泳道2~4所示, 均可扩增出清晰条带, 考虑到缩短扩增时间, 则选择泳道2中延伸时间为30 s进行后续扩增。程晓艳等^[26]对5种病原微生物多重PCR延伸时间优化结果同样表明, 当延伸时间从1 min增加到2.5 min时多重PCR扩增效率呈现下降趋势。



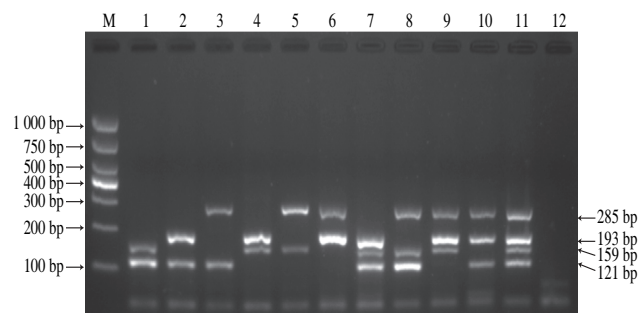
M. 1 000 bp DNA Marker; 1~6.延伸时间分别为15、30、45、60、75、90 s; 7. ddH₂O。

图4 多重PCR延伸时间优化结果

Fig. 4 Optimization of extension time for multiplex PCR

2.5 多重PCR引物间特异性验证

利用已建立的多重PCR体系对目标菌进行引物间特异性的检测,检测结果如图5所示。泳道1~6则可有效扩增出两两随机组合的目标病原菌,泳道7~10可分别有效扩增出随机组合的3种目标病原菌,泳道11中含有4种目标菌。均无非特异性扩增条带出现。阴性对照无扩增条带。该结果与Germini等^[21]建立的大肠杆菌O157:H7、沙门菌属以及单核细胞性李斯特菌多重PCR检测技术引物间特异性验证结果一致。Xu Yigang等^[27]同样将弧菌属中的5种食源性病原微生物随机侵染于海产品中,验证了其建立的多重PCR技术扩增任意目标菌的有效性。



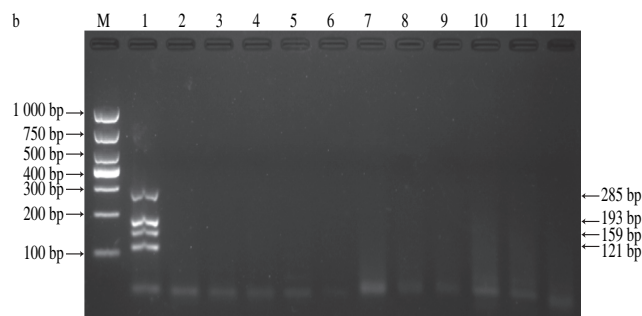
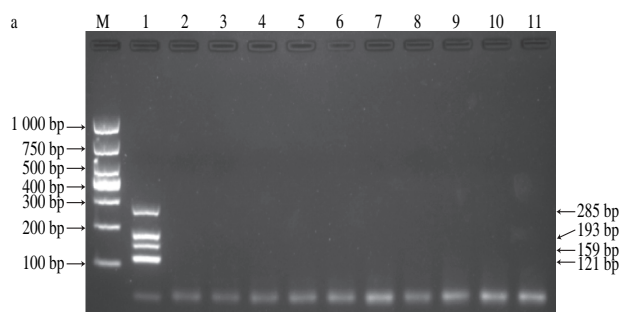
M. 1 000 bp DNA Marker; 1.鼠伤寒沙门菌、金黄色葡萄球菌; 2.鼠伤寒沙门菌、大肠杆菌O157:H7; 3.鼠伤寒沙门菌、单核细胞性李斯特菌; 4.金黄色葡萄球菌、大肠杆菌O157:H7; 5.金黄色葡萄球菌、单核细胞性李斯特菌; 6.大肠杆菌O157:H7、大肠杆菌O157:H7; 7.鼠伤寒沙门菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌O157:H7; 8.鼠伤寒沙门菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞性李斯特菌; 9.金黄色葡萄球菌、大肠杆菌O157:H7、单核细胞性李斯特菌; 10.鼠伤寒沙门菌、大肠杆菌O157:H7、单核细胞性李斯特菌; 11.鼠伤寒沙门菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌O157:H7、单核细胞性李斯特菌; 12. ddH₂O。

图5 多重PCR引物间特异性验证结果

Fig. 5 specific verification among primers in multiplex PCR

2.6 多重PCR体系中菌间特异性检测

如图6所示,在同一反应管中可同时扩增得4种目的基因片段,3 g/100 mL的琼脂糖凝胶电泳显示在285、193、159 bp和121 bp处均有条带出现,且没有引物二聚体形成,没有非特异性条带出现。图6泳道2~11为非目标菌扩增结果,与对照组一致无条带扩增,表明其特异性良好。

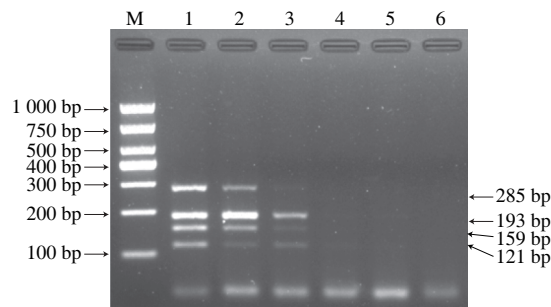


M. 1 000 bp DNA Marker; a: 1.鼠伤寒沙门菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌O157:H7、单核细胞性李斯特菌; 2~11.伊氏李斯特菌、格雷李斯特菌、斯氏李斯特菌、威氏李斯特菌、英诺克李斯特菌、肠侵袭性大肠杆菌、甲型副伤寒沙门菌B型、肠道沙门菌肠道亚种伤寒血清型、奇异变形杆菌、蜡样芽孢杆菌; b: 1.鼠伤寒沙门菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌O157:H7、单核细胞性李斯特菌; 2~11.大肠埃希氏菌、志贺毒性大肠埃希氏菌、副溶血性弧菌、霍乱弧菌、铜绿色假单胞菌、空肠弯曲菌、福氏志贺菌、宋内志贺菌、荧光假单胞菌、枯草芽孢杆菌; 12. ddH₂O。

图6 多重PCR菌间特异性验证结果

Fig. 6 Specificity of multiplex PCR

2.7 多重PCR检出限验证结果



M. 1 000 bp DNA Marker; 1~5.单核细胞性李斯特菌 (3.5×10^7 、 3.5×10^6 、 3.5×10^5 、 3.5×10^4 、 3.5×10^3 CFU/mL)、大肠杆菌O157:H7 (4.8×10^7 、 4.8×10^6 、 4.8×10^5 、 4.8×10^4 、 4.8×10^3 CFU/mL)、金黄色葡萄球菌 (2.4×10^7 、 2.4×10^6 、 2.4×10^5 、 2.4×10^4 、 2.4×10^3 CFU/mL) 和鼠伤寒沙门菌 (1.6×10^7 、 1.6×10^6 、 1.6×10^5 、 1.6×10^4 、 1.6×10^3 CFU/mL); 6. ddH₂O。

图7 多重PCR检出限验证结果

Fig. 7 Detection limits of multiplex PCR

将4种致病菌的菌悬液进行梯度稀释后,进行菌落数确定,单核细胞性李斯特菌的菌落数为 3.5×10^7 CFU/mL,大肠杆菌O157:H7的菌落数为 4.8×10^7 CFU/mL,金黄色葡萄球菌的菌落数为 2.4×10^7 CFU/mL,鼠伤寒沙门菌的菌落数为 1.6×10^7 CFU/mL。分别将稀释后提取的DNA等比例进行混合,用优化好的多重PCR体系进行检测验证,结果如图7所示,4种目标菌的检测限分别为单核细胞性李斯特菌为 3.5×10^6 CFU/mL,大肠杆菌O157:H7为 4.8×10^5 CFU/mL,金黄色葡萄球菌为 2.4×10^5 CFU/mL,鼠伤寒沙门菌为 1.6×10^5 CFU/mL。钱志伟等^[29]利用多重PCR技术特异性扩增金黄色葡萄球菌的nuc基因,单核细胞性李斯特菌的prs基因,沙门菌的invA基因,经优化

后,其检测水平为3.8、5.1、7.6 pg/ μ L,该技术可用于牛乳中这3种菌的检测。陈娟等^[22]建立了检测金黄色葡萄球菌、肠炎沙门菌、大肠杆菌O157:H7、单核增生李斯特菌、福氏志贺菌5种目标菌的多重PCR检测技术,其检出限分别为6.4、32、32、800 pg和160 pg。

2.8 病原微生物预富集多重PCR验证结果

利用已建立的多重PCR方法对不同接种量,单核细胞性李斯特菌(1 、 3.8×10^3 、 3.8×10^6 CFU/mL),大肠杆菌O157:H7(1 、 1.8×10^3 、 1.8×10^6 CFU/mL),鼠伤寒沙门菌(1 、 5.4×10^3 、 5.4×10^6 CFU/mL),金黄色葡萄球菌(1 、 2.1×10^3 、 2.1×10^6 CFU/mL)。在0、3、6、9 h富集后进行验证。如图8所示,泳道1和泳道4所示,1 CFU/mL接种量在0、3 h富集后无条带扩增,泳道10中,在9 h富集后可有效扩增出4条特异性条带。 10^3 CFU/mL接种后,泳道2所示,0 h无扩增条带,富集3 h后,泳道5所示,均可扩增出4条目标条带,在 10^6 CFU/mL接种0 h后,泳道3所示,可扩增出4条目标条带。综上所述,结果表明,其实接种量低至1 CFU/mL时,富集9 h后均可扩增出4条目标条带。

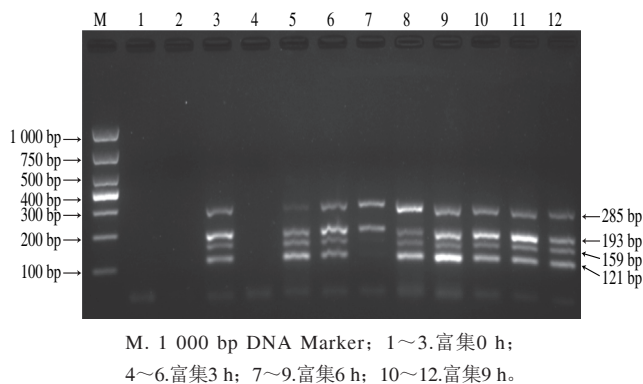


图8 多重PCR预富集检测验证结果

Fig. 8 Detection limits of multiplex PCR with pre-enrichment

2.9 人工污染鲜切果蔬样品验证结果

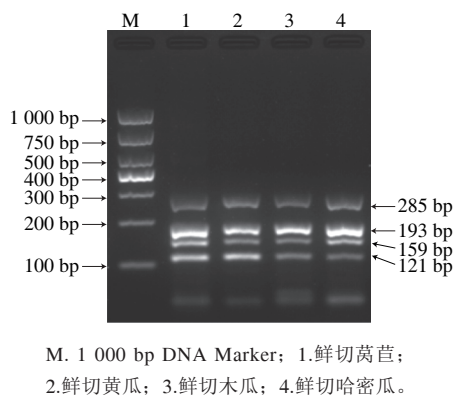


图9 鲜切果蔬样品检测结果

Fig. 9 Multiplex PCR detection of fresh-cut fruit and vegetables

利用已建立的多重PCR方法对染菌量为1 CFU/g的鲜切莴苣、鲜切黄瓜、鲜切木瓜、鲜切哈密瓜,进行富集培养9 h后进行验证。如图9所示,对4种样品验证均可有效扩增出4条目标条带,其条带大小与预计大小相符,阴性对照无条带扩增。其中,泳道1~2条带清晰明亮,而泳道3和4中鼠伤寒沙门菌条带较暗,可能是由于鲜切木瓜和鲜切哈密瓜中杂质较多对多重PCR的扩增效率产生了一定的影响。综上所述,鲜切果蔬产品受病原菌侵染后,预富集9 h,利用所建立的多重PCR技术对鲜切果蔬产品的检出限可达到1 CFU/g。

3 结论

针对单核细胞性李斯特菌*inlA*基因、鼠伤寒沙门菌*invA*基因、大肠杆菌O157:H7 *wzy*基因、金黄色葡萄球菌的*nuc*基因设计及筛选出4对引物,引物特异性强,互不干扰。

建立了一种能够同时检测单核细胞性李斯特菌、大肠杆菌O157:H7、鼠伤寒沙门菌、金黄色葡萄球菌4种致病菌的多重PCR检测方法,其检出限分别为 3.5×10^6 、 4.8×10^5 、 1.6×10^5 、 2.4×10^5 CFU/mL。

鲜切莴苣、鲜切黄瓜、鲜切木瓜和鲜切哈密瓜4种产品受病原菌侵染,预富集9 h后,利用所建立的多重PCR技术对鲜切果蔬产品的检出限可达到1 CFU/g。

方法的建立相较于传统的培养检测方法可节约大量的劳力、试剂、时间等,检测时间由原来的5~7 d,缩短至9~11 h,对于企业或分析检验中心大批量样品的监测具有指导意义。

参考文献:

- [1] 李超,冯志宏,陈会燕,等.鲜切果蔬保鲜技术的研究进展[J].保鲜与加工,2010,10(1):3-6.
- [2] 高雪丽,高愿军.鲜切果蔬加工与微生物控制[J].食品工程,2006(2):11-13.
- [3] SCALLAN E, HOEKSTRA R M, ANGULO F J, et al. Foodborne illness acquired in the united states major pathogens[J]. Emerging Infectious Diseases, 2011, 17(1): 7-15. DOI:10.3201/eid1701.P11101.
- [4] 曾德兴,黄思思,陈应坚.细菌性食物中毒病原菌调查与预防对策分析[J].现代诊断与治疗,2016(8):1518-1520.
- [5] 冯可,胡文忠,姜爱丽,等.单核细胞增生性李斯特菌分子生物学检测技术的研究进展[J].食品工业科技,2014,35(4):392-396. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2014.04.044.
- [6] 侯君,陈玉凤,梁明春,等.2009—2012年大连市食品中食源性致病细菌污染状况调查[J].医学动物防制,2015(1):7-9. DOI:10.7629/yxdwzfz201501003.
- [7] 崔燕,梁效成.2011—2013年甘肃省食源性疾病暴发事件分析[J].疾病预防控制通报,2015(1):76-78. DOI:10.13215/j.cnki.jbyfkztb.1408015.
- [8] PENTEADO A L, LEITAO M F F. Growth of *Listeria monocytogenes* in melon, watermelon and papaya pulps[J]. International

- Journal Food Microbiology, 2004, 92(1): 89-94. DOI:10.1016/j.jfoodmicro.2003.08.020.
- [9] JOSHUA P V, DI L, LINDA J H, et al. Fate of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* on fresh-cut celery[J]. Food Microbiology, 2013, 34(1): 151-157. DOI:10.1016/j.fm.2012.11.016.
- [10] SANT'ANA A S, MATHEUS S B, MARIA T D, et al. Growth potential of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in nine types of ready-to-eat vegetables stored at variable temperature conditions during shelf-life[J]. International Journal Food Microbiology, 2012, 157(1): 52-58. DOI:10.1016/j.jfoodmicro.2012.04.011.
- [11] FENG K, HU W Z, JIANG A L, et al. Growth potential of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* on fresh-cut tropical fruits[J]. Journal of Food Science, 2015, 80(11): M2548-M2554. DOI:10.1111/1750-3841.13089.
- [12] NUESCH-INDERBINEN M, STEPHAN R. Fresh fruit and vegetables as vehicles of bacterial foodborne disease: a review and analysis of outbreaks registered by proMED-mail associated with fresh produce[J]. Journal of Food Safety and Food Quality-Archiv für Lebensmittelhygiene, 2016, 67(2): 32-39. DOI:10.2376/0003-925X-67-32.
- [13] DÍAZ-LÓPEZ A, CANTÚ-RAMÍREZ R C, GARZAGONZÁLEZ E, et al. Prevalence of foodborne pathogens in grilled chicken from street vendors and retail outlets in Reynosa, Tamaulipas, Mexico[J]. Journal of Food Protection, 2011, 74(8): 1320-1323. DOI:10.4315/0362-028X.JFP-11-014.
- [14] 杨柳, 胡文忠, 姜爱丽, 等. 分子生物学方法检测沙门氏菌的研究进展[J]. 食品工业科技, 2016, 37(9): 372-379. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2016.09.065.
- [15] CHEN J, TANG J, LIU J, et al. Development and evaluation of a multiplex PCR for simultaneous detection of five foodborne pathogens[J]. Journal of Applied Microbiology, 2012, 112(4): 823-830. DOI:10.1111/j.1365-2672.2012.05240.x.
- [16] YAN W. Multiplex PCR primer design for simultaneous detection of multiple pathogens[J]. Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.), 2015, 1275: 91-101. DOI:10.1007/978-1-4939-2365-6_6.
- [17] 冯可, 胡文忠, 姜爱丽, 等. 多重PCR法检测鲜切哈密瓜中3种食源性致病菌[J]. 食品科学, 2017, 38(6): 295-302. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201706046.
- [18] FENG K, HU W Z, JIANG A L, et al. A dual filtration-based multiplex PCR method for simultaneous detection of viable *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* on fresh-cut cantaloupe[J]. PLoS ONE, 2016, 11(12): e0166874. DOI:10.1371/journal.pone.0166874.
- [19] 王如景, 王羽, 李英军, 等. 双正交优化多重PCR检测食源性致病菌的研究[J]. 食品科技, 2012, 37(8): 308-313. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2012.08.071.
- [20] KIM J H, RHIM S R, KIM K T, et al. Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus* in low-fatted milk by multiplex PCR[J]. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 2014, 34(5): 717-723. DOI:10.5851/kosfa.2014.34.5.717.
- [21] NARI L, KYUNG Y K, SU K O, et al. A multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* in Korean ready-to-eat food[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2014, 11(7): 574-580. DOI:10.1089/fpd.2013.1638.
- [22] YU Q, ZHAI L Z, BIE X M, et al. Survey of five food-borne pathogens in commercial cold food dishes and their detection by multiplex PCR[J]. Food Control, 2016, 59: 862-869. DOI:10.1016/j.foodcont.2015.06.027.
- [23] 孙鸿燕. 四种食源性致病菌多重PCR检测方法的建立[D]. 长春: 吉林大学, 2011: 37.
- [24] 郝玉芹, 孙皆宜, 李艾, 等. 正交优化多重PCR反应体系检测3种食源性致病菌的研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(2): 602-605. DOI:10.13989/j.cnki.0517-6611.2010.02.009.
- [25] YANG I, KIM Y, BYUN J, et al. Use of multiplex polymerase chain reactions to indicate the accuracy of the annealing temperature of thermal cycling[J]. Analytical Biochemistry, 2005, 338(2): 192-200. DOI:10.1016/j.ab.2004.09.035.
- [26] 程晓艳, 刘庆慧, 黄健. 5种食源性致病菌多重PCR检测方法的建立[J]. 渔业科学进展, 2012, 33(2): 97-103.
- [27] GERMINI A, MASOLA A, CARNEVALI P, et al. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O175:H7, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* by multiplex PCR[J]. Food Control, 2009, 20: 733-738. DOI:10.1016/j.foodcont.2008.09.010.
- [28] XU Y G, SUN L M, WANG Y S, et al. Simultaneous detection of *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in seafood using dual priming oligonucleotide (DPO) system-based multiplex PCR assay[J]. Food Control, 2017, 71: 64-70. DOI:10.1016/j.foodcont.2016.06.024.
- [29] 钱志伟, 孙新城. 食品中3种致病菌多重PCR检测体系的建立及初步应用[J]. 食品科学, 2011, 32(16): 236-239.
- [30] 陈娟, 唐俊妮, 李键, 等. 五种食源性致病菌多重PCR的条件优化和检出限分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(2): 137-141. DOI:10.13590/j.cjfh.2014.02.008.