

应用SYBR Green I 溶解曲线 检测食源性单增李斯特菌

王昊宇, 张公亮, 侯红漫*

(大连工业大学食品学院, 辽宁大连 116034)

摘要:基于单增李斯特菌 $hlyA$ 基因和李斯特菌属的 $16sRNA$ 基因分别合成两对引物,确立SYBR Green I 荧光PCR检测单增李斯特菌两个特异性基因的最佳反应体系及条件,反应液经凝胶电泳验证,验证结果显示,扩增出的两条不同大小、不同 T_m 值的核酸片段,分别对应两条荧光PCR溶解曲线上的两个独立波峰。基于单增李斯特菌 $hlyA$ 基因建立标准曲线,相关系数为0.996,最低检出限约为89CFU/mL。为检验方法的可行性,对鲜活白蚬子样品中分离出的疑似菌株进行实际检测,所得阳性结果经国家标准方法(GB 4789.30-2010)验证,验证结果表明,SYBR Green I 荧光PCR实际检测阳性结果与GB 4789.30-2010检测结果一致。

关键词:单增李斯特菌, SYBR Green I 荧光PCR, 溶解曲线, 白蚬子

Detection of *Listeria monocytogenes* in foods by SYBR Green I melting curve

WANG Hao-yu, ZHANG Gong-liang, HOU Hong-man*

(School of Food, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

Abstract: Two pairs of specific primers were composited based on the $hlyA$ gene of *L. monocytogenes* and the $16sRNA$ gene of the genus *Listeria*. Optimal reaction system and condition of the SYBR Green I fluorescent PCR were established, respectively, which could detect two specific genes. The reaction solution was verified by the method of gel electrophoresis. The result showed that two target fragments possessed different sizes and T_m values which were amplified corresponded two separate peaks. The standard curve based on the *L. monocytogenes hlyA* gene was established and the correlation coefficient was 0.996. The minimal detection limit was 89CFU/mL. Moreover, suspicious strain isolated from white clams son was tested by using this method so as to study the feasibility. The positive result was evaluated with the National Standard Methods (GB 4789.30-2010). The verified result indicated that the positive result of SYBR Green I fluorescent PCR matched with the GB 4789.30-2010 exactly.

Key words: *Listeria monocytogenes*; SYBR Green I fluorescent PCR; melting curve; white clams son

中图分类号: TS201.6

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)10-0077-04

单增李斯特菌是人畜共患病致病菌,该菌能在食品冷藏温度下生长繁殖,除可污染牛奶、肉制品等动物性食品外,还存在于蔬菜等植物性食品中^[1]。食用该菌污染后的食品易引起脑膜炎、骨髓炎、心肌炎、败血病、孕妇流产等,病死率高达30%以上^[2],WHO已将其列为四大食源性致病菌之一^[3]。单增李斯特菌的传统检测方法包括两步增菌、分离、鉴定三个环节,得到阳性结果需要6~7d左右时间^[4],受主观人为因素影响大^[5],不符合新鲜食品快速检测的要求。随着分子生物学的快速发展,由于SYBR Green I 荧光PCR技术具有无需设计探针、初始成本低且通过熔点曲线的分析即可检验反应特异性等优点,越来越多的应用于食源性致病菌的检测中:曹琛福等^[6]

应用荧光PCR SYBR Green I 溶解曲线同时检测沙门氏菌和单增李斯特菌,建立了不用核酸探针即可同时检测两种致病菌的简单、经济、快速的多重荧光PCR检测方法。孙晞等^[7]选择单增李斯特菌特异性基因Listeriolysin O基因为靶基因,建立SYBR Green实时定量PCR检测体系,特异性良好,标准曲线相关系数为0.9521,定量检测人工污染牛奶结果与传统细菌培养计数结果相比较,两者相关系数为0.839。目前针对单增李斯特菌单一基因建立的SYBR Green I 荧光PCR方法较多,如果目的毒力因子发生变异或丢失,易出现假阴性结果^[8]。本研究将以此为切入点,通过对溶解曲线的分析同时检测单增李斯特菌 $hlyA$ 基因^[9-10]和李斯特菌属的 $16sRNA$ 基因^[11-12],所得检测结果准确性更高,并将此快速检测方法应用于实际检测中,旨在建立快速、准确、敏感、经济实用的SYBR Green I 荧光PCR检测方法,以加强对食品中单增李斯特菌污染的监管。

收稿日期:2013-01-04 * 通讯联系人

作者简介:王昊宇(1987-),女,研究生,研究方向:食品安全与检测。

基金项目:辽宁省农业攻关计划项目(2011205001)。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

菌种 单增李斯特菌标准株为本实验室保存菌株;样品 2012年7月随机挑选市售鲜活白蚬子购自大连农贸市场;试剂药品 李斯特菌显色培养基、单增李斯特氏菌成套生化鉴定管、李氏增菌肉汤(LB1, LB2)基础、萘啶酮酸、吡啶黄素等购自青岛高科园海博生物有限公司;细菌基因组DNA提取试剂盒以及DNA Marker、溶菌酶、蛋白酶K、RNaseA等 购自北京天根生化有限公司;SYBR[®] Premix Ex Taq[™](含耐热性RNaseH) 购自宝生物工程(大连)有限公司;荧光PCR引物 根据文献[13]基于单增李斯特菌*hlyA*基因和李斯特菌属的*16sRNA*基因分别合成一对引物,引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成,所用引物序列见表1。

IQ5[™]荧光PCR仪、VersaDoc凝胶成像系统 美国伯乐(Bio-Rad)公司;JM-250电泳仪 大连捷迈科贸有限公司;Centrifuge 5418高速离心机 德国艾本德(eppendorf)股份公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细菌培养与计数 单增李斯特菌标准株接种于含0.6%酵母浸膏的胰酪胨大豆肉汤培养基(TSB-YE)中,35℃振荡培养24h,取三个稀释度为 10^{-6} 的细菌培养液100 μ L分别涂布于TSA-YE上,35℃培养24h后计算菌落平均数,推算初始菌液浓度。

1.2.2 模板的制备 取1mL菌液按照细菌基因组DNA提取试剂盒说明书步骤进行DNA抽提,溶于100 μ L TE缓冲液中,并于-20℃下保存。

1.2.3 SYBR Green I 荧光PCR检测反应体系及条件优化 最佳反应体系:SYBR Premix Ex Taq: 12.5 μ L;模板DNA: 4 μ L; 10倍稀释上、下游引物(10 μ mol/L)各0.3 μ L;用无菌双蒸水补足至25 μ L。阴性对照用无菌ddH₂O 4 μ L代替模板加入反应体系。

最佳反应条件:95℃预变性30s;95℃变性5s,63.3℃退火25s,72℃延伸15s,80℃ 15s检测荧光,循环35次。并在上述扩增条件后增加60~95℃的溶解曲线分析步骤。

1.2.4 灵敏度检测^[14] 取单增李斯特菌标准株初始菌液的DNA溶液10 μ L进行十倍梯度稀释,取8个不同稀释梯度的DNA样品各4 μ L按照最佳反应体系及条件进行荧光PCR反应,标准曲线由iQ5检测系统自动生成,确定SYBR Green I 荧光PCR检测灵敏度。

1.2.5 验证SYBR Green I 荧光PCR实际检测结果

将所取鲜活白蚬子样品装入无菌塑封袋,4℃冰盒取样4h内送到实验室检验。无菌条件下去壳、收集全部的软组织和体液匀浆25g,于灭菌搅拌均质器中搅拌均匀,加入225mL李氏增菌肉汤LB₁中30℃增菌24h,取0.1mL一次增菌液加入10mL LB₂中30℃二次增菌24h,接菌环挑取二次增菌液,划线于李斯特菌显色培养基上,35℃培养24h,挑选典型的周围有白色晕圈的蓝绿色菌落,划线于TSA-YE培养基上分离纯化。最终挑取可疑菌株活化培养并抽提菌液DNA,按照最佳反应体系及条件进行SYBR Green I 荧光PCR检测,同时应用GB 4789.30-2010验证SYBR Green I 荧光PCR实际检测阳性结果。

2 结果与分析

2.1 生成标准曲线(*hlyA*基因)及灵敏度检测结果

根据菌落计数结果计算出单增李斯特菌标准株的初始菌液浓度为 8.9×10^8 CFU/mL,取初始菌液的DNA溶液10 μ L进行十倍梯度稀释,则8个不同稀释度(10^{-1} ~ 10^{-8})的10 μ L模板DNA溶液分别代表的菌液浓度为: 8.9×10^7 、 8.9×10^6 、 8.9×10^5 、 8.9×10^4 、 8.9×10^3 、 8.9×10^2 、89、8.9CFU/mL,以10 μ L不同稀释度DNA溶液所

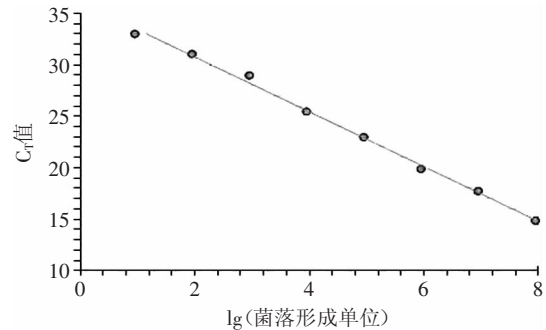


图1 荧光PCR标准曲线(*hlyA*基因)

Fig.1 Standard curve of the fluorescent PCR (*hlyA* gene)

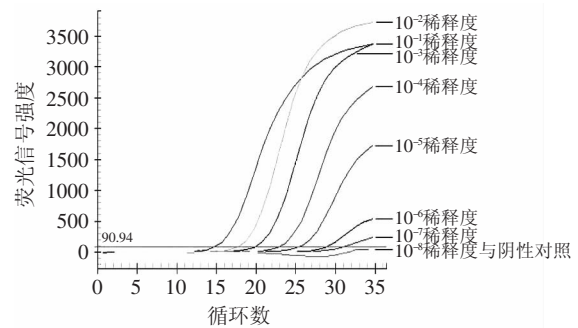


图2 标准曲线扩增图(*hlyA*基因)

Fig.2 Amplification curve of the standard curve (*hlyA* gene)

表1 目的基因与对应引物序列

Table 1 Target genes and corresponding primer sequences

特异基因	序列(5'→3')
<i>hlyA</i> 基因	上游引物(<i>hlyA</i> 1): 5'-CCTAAGACGCCAATCGAA-3'
	下游引物(<i>hlyA</i> 2): 5'-AAGCGCTTGCAACTGCTC-3'
<i>16sRNA</i> 基因	上游引物(U1): 5'-CTCCATAAAGGTGACCCT-3'
	下游引物(U2): 5'-CAGCAGCCGCGTAATTC-3'

注:其中引物对*hlyA* 1、*hlyA* 2及引物对U1、U2以下分别简称为引物1和引物2。

代表的不同浓度菌液中细菌菌落形成单位的对数为横坐标,以 C_T 值为纵坐标生成标准曲线 $y=-2.658x+36.073$ (见图1),标准曲线相关系数为 $R^2=0.996$,相关性良好。扩增曲线见图2,由图2可以看出,对 $4\mu\text{L}$ 稀释度分别为 $10^{-1}\sim 10^{-7}$ 的模板DNA溶液扩增时,均得到一条S型曲线,而对稀释度为 10^{-8} 的模板DNA溶液(对应菌液浓度为 8.9CFU/mL)扩增时,扩增曲线基本与空白对照持平,均在背景阈值线以下,表明在该浓度下不能对 $hlyA$ 基因进行有效检测。该SYBR Green I 荧光PCR检测方法的最低检出限为 89CFU/mL 。

2.2 SYBR Green I 荧光PCR实际应用及阳性结果验证

在SYBR Green I 荧光PCR最佳反应条件和体系下检测白蝇子样品中分离得到的疑似菌株,并与单增李斯特菌标准株做对照,通过分析溶解曲线图(见图3)可知,3号管与5号管的波峰重叠,所对应的 T_m 值为 81.5°C ,4号管与6号管波峰重叠,所对应的 T_m 值为 87.5°C 。即疑似菌株与单增李斯特菌标准株分别在两个相同的溶解温度下出峰,说明两者扩增出两个相同目的基因。阴性对照溶解曲线也出现波峰,但根据波峰形状及对应的 T_m 值,可判断其产物为非特异性引物,即引物二聚体。扩增曲线(见图4)显示,阴性对照均在背景阈值线以下,消除引物二聚体对SYBR

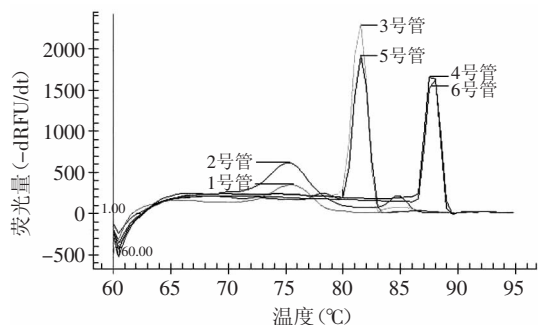


图3 单增李斯特菌标准株与可疑菌株溶解曲线图

Fig.3 Melting curves of the *Listeria monocytogenes* and the suspicious strain

注:1号管:引物1阴性对照;2号管:引物2阴性对照;3号管:引物1阳性对照;4号管:引物2阳性对照;5号管:引物1扩增疑似菌株模板DNA的反应液;6号管:引物2扩增疑似菌株模板DNA的反应液;图4~图6同。

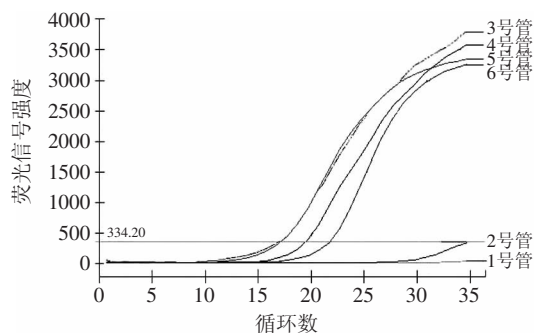


图4 单增李斯特菌标准株与可疑菌株扩增曲线图

Fig.4 Amplification curves of the *Listeria monocytogenes* and the suspicious strain

Green I 荧光PCR检测的影响。

将荧光PCR产物(1~4号管)分别进行凝胶电泳分析(见图5),并应用常规PCR方法检测白蝇子样品中疑似菌株模板DNA(见图6),通过图5、图6的对比分析可知SYBR Green I 荧光PCR溶解曲线的两个独立峰型,分别对应单增李斯特菌的两个特异性基因。其中单增李斯特菌 $hlyA$ 基因对应 T_m 值为 81.5°C 的独立波峰,李斯特菌属 $16sRNA$ 基因对应 T_m 值为 87.5°C 的独立波峰。将此疑似菌株经国家标准方法(GB 4789.30-2010)鉴定,结果仍呈阳性,与SYBR Green I 荧光PCR检测结果相同。

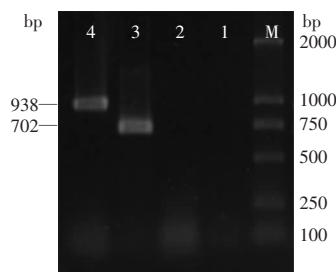


图5 荧光PCR反应液电泳检测结果

Fig.5 The electrophoresis results of fluorescence PCR reaction solution

注:M:DL 2000;泳道1:1号管;泳道2:2号管;泳道3:3号管;泳道4:4号管;图6同。

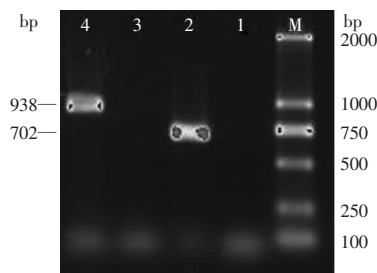


图6 常规PCR检测疑似菌株

Fig.6 The conventional PCR detection of the suspicious strain

3 讨论

在应用SYBR Green I 荧光PCR检测实际样品时,为了避免食品样品中的复杂成分影响溶解曲线的生成,检测前最好先对样品进行增菌处理^[15-16]。本研究采用二次增菌结合李斯特菌显色培养基完成对单增李斯特菌的初筛,再对疑似菌株的菌液DNA进行检测。样品的前处理过程一来可将荧光PCR反应有干扰的成分稀释,二来也可有效地将样品中受损单增李斯特菌复活,提高目标菌株DNA浓度,避免漏检现象。

另外,SYBR Green I 荧光PCR溶解曲线检测目的片段是否扩增是通过相应 T_m 值处是否出现波峰判断,然而影响荧光PCR溶解曲线图形的因素比较复杂,主要有:引物特异性、不同扩增片段的解链温度及溶解曲线的升温速率等,因此要反复实验从而建立稳定性高的最佳溶解曲线出峰条件。本研究采用四步法消除了SYBR Green I 荧光PCR中引物二聚体

(下转第88页)

到抑制;添加25% TPLs组淀粉消化则被促进。

参考文献

- [1] Englyst H N, Kingman S M, Cummings J H. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions[J]. *Eur J Clin Nutr*, 1992, 46(2): S33-S50.
- [2] 王文君, 姚江武, 陶涛. 红茶和绿茶多酚对猪胰腺 α -淀粉酶抑制效果的动力学研究[J]. *口腔医学研究*, 2008, 25(4): 442-446.
- [3] Hara Yukihiko, Honda Miwa. The inhibition of α -amylase by tea polyphenols[J]. *Agric Biol Chem*, 1990, 54: 1939-1945.
- [4] Young-in Kwon, Emmanouil Apostolids, Kalidas Shetty. Inhibitory potential of wine and tea against α -amylase and α -glucosidase for management of hyperglycemia linked to type 2 diabetes[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2008, 32: 15-31.
- [5] Qiang He, Yuanping Lv, Kai Yao. Effects of tea polyphenols on the activities of α -amylase, pepsin, trypsin and lipase[J]. *Journal of Food Chemistry*, 2006, 101: 1178-1182.
- [6] Koh L W, Wong L L, Loo Y Y. Evaluation of different teas

against starch digestibility by mammalian glycosidases[J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(1): 148-154.

- [7] Grussu D, D Stewart, G J McDougall, Berry Polyphenols. Inhibit α -Amylase in Vitro: Identifying Active Components in Rowanberry and Raspberry[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(6): 2324-2331.
- [8] 陈国珍, 黄贤智, 许金钧, 等. 荧光分析法[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1990: 123.
- [9] Oki T, Matsui T, Osajima Y. Inhibitory effect of α -glucosidase inhibitors varies according to its origin[J]. *J Agric Food Chem*, 1999, 47(2): 550-553.
- [10] Wang H, Du Y-J, Song H-C. α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of guava leaves[J]. *Journal of Food Chemistry*, 2010, 123(1): 6-13.
- [11] Bhandari M R, Jong-Anurakkun N, Hong G. α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of Nepalese medicinal herb Pakhanbhed(*Bergenia ciliata*, Haw.)[J]. *Journal of Food Chemistry*, 2008, 106(1): 247-252.

(上接第79页)

的影响^[7]。

4 结论

本研究建立的应用SYBR Green I 荧光PCR溶解曲线检测食品中单增李斯特菌方法,最低检出限约为89CFU/mL,除保留常规PCR检测的特异性和敏感性外,整个过程由电脑控制,从加样到得到结果只需2h左右,满足大批新鲜样品的快速检测要求。另外此检测方法将针对单增李斯特菌 $hlyA$ 基因和李斯特菌属的 $16sRNA$ 基因的两对特异引物组合应用,增加了结果可靠性,一定程度上避免了由于某一目的基因的变异和缺失而导致的假阴性结果^[8],可作为食品中单增李斯特菌的快速检测方法。

参考文献

- [1] Chan Y C, Wiedmann M. Physiology and genetics of *Listeria monocytogenes* survival and growth at cold temperature[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2009, 49(3): 237-253.
- [2] Büla C J, Bille J, Glauser M P. An epidemic of food-borne listeriosis in western Switzerland: description of 57 cases involving adults[J]. *Clin Infect Dis*, 1995, 20(1): 66-72.
- [3] 周晓辉, 焦新安. 产单核细胞李斯特菌的分子鉴定与亚分型研究[J]. *中国人兽共患病杂志*, 2003, 19(5): 44-47.
- [4] 郭桂萍, 葛红梅, 王匀, 等. 单增李斯特菌检测技术研究进展[J]. *中国食物与营养*, 2011, 17(3): 12-15.
- [5] 苏靖华. 不同方法检测食品中单核细胞增生李斯特菌比较[J]. *上海预防医学杂志*, 2009, 21(8): 283-284.
- [6] 曹琛福, 花群义, 秦智峰, 等. 应用SYBR Green I 荧光PCR溶解曲线同时检测两种致病菌[J]. *动物医学进展*, 2009, 30(2): 12-15.
- [7] 孙晔, 吴建中, 张宁, 等. 荧光实时定量PCR检测单核李斯特菌方法学建立及应用[J]. *实用预防医学*, 2005, 12(3): 496-497.
- [8] 吴晓薇, 徐成刚, 李贺, 等. 使用二重PCR方法快速检测单

核细胞增生性李斯特氏菌的研究[J]. *中国动物检疫*, 2011, 28(9): 35-37.

- [9] Souza S M, Brasileiro I S, de Carvalho A F, et al. Using nested PCR to detect the $hlyA$ gene of *Listeria monocytogenes* in Minas Fresca Cow's Milk Cheese[J]. *J Food Prot*, 2012, 75(7): 1324-1327.
- [10] Aznar R, Alarcón B. PCR detection of *Listeria monocytogenes*: a study of multiple factors affecting sensitivity[J]. *J Appl Microbiol*, 2003, 95(5): 958-966.
- [11] Wang R F, Cao W W, Johnson M G. 16S rRNA-based probes and polymerase chain reaction method to detect *Listeria monocytogenes* cells added to foods[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58(9): 2827-2831.
- [12] Somer L, Kashi Y. A PCR method based on 16S rRNA sequence for simultaneous detection of the genus *Listeria* and the species *Listeria monocytogenes* in food products[J]. *J Food Prot*, 2003, 66(9): 1658-1665.
- [13] 王海艳, 刘中学, 刘虹, 等. 食品中单增李斯特菌快速、敏感、特异PCR检测方法的建立[J]. *检验检疫科学*, 2006, 16(1): 3-6.
- [14] 刘仲敏, 郑鸣, 王永芬. 食源性单增李斯特菌的实时定量PCR检测[J]. *食品与发酵工业*, 2007, 33(5): 100-104.
- [15] 冯家望, 吴小伦, 黄云君, 等. 食品中单核增生性李斯特菌的PCR快速检测研究[J]. *中国食品卫生杂志*, 2005, 17(3): 234-237.
- [16] 刘红玉, 李岩, 崔洪斌. 肉中4种致病菌的PCR快速检测方法的建立[J]. *食品科学*, 2011, 32(6): 213-216.
- [17] 张驰宇, 张高红, 杨敏, 等. 四步法消除SYBR Green I 实时定量RT-PCR中引物二聚体的影响[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2004, 20(3): 387-392.
- [18] 陈倩, 付萍. 应用两对引物PCR检测速冻食品中单核细胞增多性李斯特菌[J]. *食品科学*, 1998, 19(12): 40-41.