

应用 PCR 检测单核细胞 增多症李氏菌的研究*

杨百亮 聂向庭 马海利 杨兴周
(山西农业大学动医系, 太谷 030801)

周志江 徐克诚 张让堂 刘纯杰
(解放军兽医大学卫检系, 吉林 长春)

摘要 以一对位于单核细胞增多症李氏菌 β -溶血素基因内的26-bp寡核苷酸为引物,用PCR对单核细胞增多症李氏菌进行了检测,结果所有株单核细胞增多症李氏菌均扩增出186-bp的特异条带,其它种李氏菌和细菌均呈阴性反应。本方法可测出模拟肉样中少至92个细菌,模拟奶样中少至18个细菌,其特异性和敏感性不受其它污染杂菌DNA的影响。对市售猪肉和牛奶的检测结果表明,PCR法优于传统的分离培养法,具有快速、简便和敏感的优点。

关键词 PCR, 单核细胞增多症李氏菌, 检测

单核细胞增多症李氏菌 (*Listeria monocytogenes*) 是一种危害严重的人畜共患病原菌。近年来,世界各地,特别是北美和西欧均发现经食品感染单核细胞增多症李氏菌病患者呈增加趋势^[1,2]。国内食品中也有李氏菌的污染,使我国人民的生命安全同样受到李氏菌病的威胁^[3,4],因而食品中单核细胞增多症李氏菌的研究引起了广泛关注,但其检测都需先增菌,然后分离培养,费时费工,往往需要几周时间。因此,建立一种快速、灵敏、特异的检测食品中单核细胞增多症李氏菌的方法有着重要意义。

国外已有通过菌落杂交将DNA探针用于快速鉴定单核细胞增多症李氏菌的报道^[5,6],但仍需对本菌先进行培养获得菌落。最近, Bessesen等^[7]和 Deneer等^[8]将PCR技术用于检测单核细胞增多症李氏菌,极大地提高了敏感性,缩短了检测时间,但前者采用了标记的内部寡核苷酸探针,后者采用了双扩增(Reamplification)模式,均增加了实验的复杂性,而且都没有对食品样品进行检测。我们用简化的PCR方法对单核细胞增多症李氏菌和食品样品进行了检测,获得满意结果,见报告如下。

1 材料与方 法

1.1 菌株 试验所用标准菌株分别由北京生物制品检定所,中国兽医药品监察所,中国进出口商品检验技术研究所,解放军兽医大学卫检系和加拿大 Saskatchewan 大学的 Deneer

* 本试验为山西省青年科学基金资助课题。

** 收稿日期 1992-10-29。

博士提供。

1.2 **主要试剂** Taq DNA 聚合酶, dNTP, 琼脂糖, 蛋白酶-K 购自华美生物工程公司。

1.3 **引物序列** 在 Deneer 等^[8]设计的引物5'一端分别添加 Sau3A 酶切接头和两个保护碱基后由中国科学院微生物所合成一对引物, 其核苷酸序列分别为: 5' TGGATCGCATCTGC-ATTCAATAAAGA3' (Lis-1), 5' TCGATCTGTCACTGCATCTCCGTGGT3' (Lis-2), 扩增片段为单核细胞增多症李氏菌 β -溶血素基因5'端的130—303bp, 总长度为186-bp。

1.4 **DNA 提取** 全部菌株均接种于 LB 培养基, 37°C 过夜培养。染色体 DNA 按 Deneer 等^[8]描述的方法提取。

1.5 **PCR 反应条件** 总反应体积为50 μ l; 4种三磷酸核苷 (dNTP) 各200 μ M/L; 引物各1 μ M/L; DNA 溶液5 μ l; 1 \times PCR 缓冲液; TaqDNA 聚合酶4U, 加水补至50 μ l。反应按95°C 1 min (变性), 55°C 1 min (退火), 72°C 1 min (延伸) 顺序, 用上海复日生物实验技术研究所生产的 FR-300型 DNA 扩增仪反复进行35次。

1.6 **扩增产物分析** 取10 μ l PCR 产物直接经2%琼脂糖凝胶分离。用溴化乙锭染色后在紫外灯下观察结果。

1.7 **模拟样品的制备及 PCR 敏感性测定** 无菌称取无李氏菌污染的鲜猪肉50g, 加450ml Butterfield 缓冲液 (pH7.2) 研碎。分别取此匀浆液和市售无李氏菌污染鲜乳9ml, 加入计数后的 *L. monocytogenes* D20 1ml, 混匀后10倍系列稀释至 10^{-14} , 每个稀释度取1ml于9000r/min, 离心15min收集菌体, 按上述方法提取 DNA, 进行 PCR。

1.8 **样品的采集处理及细菌的分离培养** 市售猪肉样品采自长春市某市场零售肉, 鲜牛奶是长春市奶站收购的个体户鲜乳。取研碎猪肉1g, 鲜乳1ml 分别加入改良的 Fraser 增菌液中, 37°C 过夜培养, 收集菌体, 抽提 DNA。细菌的分离培养与鉴定, 按柳增善等^[4]描述的方法进行。

2 结果

2.1 **PCR 的特异性试验** 以从5种李氏菌 (*L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. welshimeri*), 化脓链球菌, 肠球菌, 金黄色葡萄球菌, 普通变形杆菌, 猪丹毒杆菌 (1a、1b、2型), 巴氏杆菌 (A、B、D型), 大肠杆菌44815, 沙门氏菌141, 副溶血弧菌和耶尔森氏菌提取的 DNA 做模板, 分别进行 PCR, 其产物经电泳分析, 结果都没有产生特异性扩增产物带, 但12株不同血清型单核细胞增多症李氏菌 [35152, '58 (1/2b血清型), 15313, Small boy, D20 (4b血清型), 54006 (4a血清型), 54005 (3血清型), 54004 (2血清型)] 的DNA 模板, 经 PCR 扩增, 均产生特异性扩增产物条带 (图1)。



图1 单核细胞增多症李氏菌及其它种李氏菌 PCR 产物分析

A: DNA 标准物; B-F: 单核细胞增多症李氏菌35152, '58, 15313, D20, *Small boy*; G-K: *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. welshimeri*.

Fig. 1 Agarose gel (2%) electrophoretic analysis of PCR-amplified product from DNA from various *Listeria* species. Lanes: A, molecular size markers with sizes, in base pairs, given on the left; B, *L. monocytogenes* 35152, C, *L. monocytogenes* '58; D, *L. monocytogenes* 15313; E, *L. monocytogenes* D20; F, *L. monocytogenes* small boy; G, *L. ivanovii*; H, *L. innocua*; I, *L. seeligeri*; J, *L. grayi*; K, *L. welshimeri*.

2.2 PCR 的灵敏度试验 用含不同浓度单核细胞增多症李氏菌的模拟肉样和乳样提取的DNA做模板进行PCR, 结果含92个细菌的肉样(图2)和18个细菌的奶样(图3)经扩增后, 仍能产生清晰可见的扩增产物带。

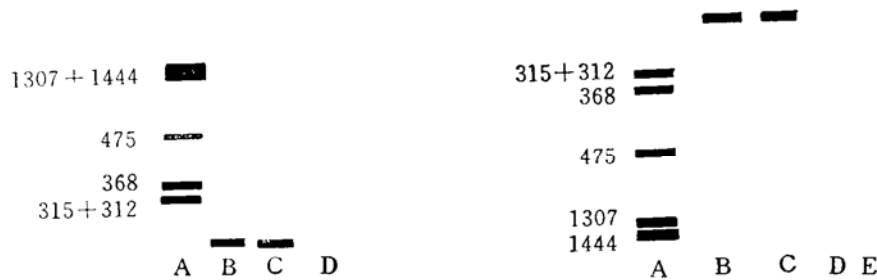


图2 模拟肉样 PCR 扩增产物分析

A, DNA 标准物; B, 9.18×10^2 个细菌; C, 9.18×10^1 个细菌; D, 9.18 个细菌

Fig. 2 Agarose gel (2%) electrophoretic analysis of PCR-amplified products from DNA derived from serially diluted *L. monocytogenes* D20 in simulated pork samples. Lanes: A, molecular size markers with sizes, in base pairs, given on the left; B, 9.18×10^2 bacterial cells; C, 9.18×10^1 bacterial cells; D, 9.18 bacterial cells.

图3 模拟乳样 PCR 扩增产物分析

A, DNA 标准物; B, 1.84×10^3 个细菌; C, 1.84×10^2 个细菌; D, 1.84×10^1 个细菌; E, 1.84 个细菌

Fig. 3 Agarose gel (2%) electrophoretic analysis of PCR-amplified products from DNA derived from serially diluted *L. monocytogenes* D20 in simulated milk samples. Lanes: A, molecular size markers with sizes as given in the legend to Figure 1; B, 1.84×10^3 bacterial cells; C, 1.84×10^2 bacterial cells; D, 1.84×10^1 bacterial cells; E, 1.84 bacterial cells.

2.3 杂菌干扰下的扩增结果 将 10^5 个单核细胞增多症李氏菌54007与 10^5 个大肠杆菌44815和 10^5 个沙门氏菌141混合后提取DNA, 同样提取 10^5 个猪丹毒杆菌1a型, 10^5 个巴氏杆菌A型和 10^5 个变形杆菌的混合DNA, 再提取 10^5 个单核细胞增多症李氏菌DNA。以上述提

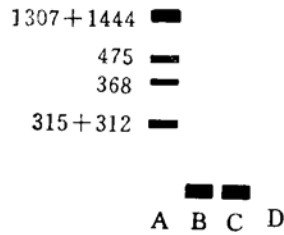


图4 杂菌 DNA 存在下单核细胞增多症李氏菌 DNA 的扩增结果

A, DNA 标准物; B, 单核细胞增多症李氏菌 DNA; C, 单核细胞增多症李氏菌, 大肠杆菌和沙门氏菌混合 DNA; D, 猪丹毒杆菌, 巴氏杆菌和变形杆菌混合 DNA。

Fig. 4 Amplification of *L. monocytogenes* 54007 DNA in the presence of nonlisterial DNA. Lanes: A,

molecular size markers; B, amplified product obtained from DNA from *L. monocytogenes* cells; C, amplified product obtained from DNA from *L. monocytogenes* cells mixed with *E. coli* and *salmonella* cells; D, amplification of mixed DNA from *Proteus*, *Pasteurella* and *Erysipelothrix rhusiopathiae* cells.

取的 DNA 分别做模板, 进行 PCR, 结果杂菌 DNA 的存在没有对单核细胞李氏菌 DNA 的扩增造成影响 (图4)。

2.4 市售猪肉和牛奶的检测 用 PCR 法和分离培养法同时对68份市售猪肉和70份市售牛奶进行了分析。对肉样, PCR 的检出率为41.2% (28/68), 培养法的检出率为17.6% (12/68), 两法的符合率为76.5% (52/68); 对乳样, PCR 的检出率为24.3% (17/70), 培养法的检出率为14.3% (10/70), 两法的符合率为90% (63/70)。培养法对肉样和乳样的总检出率为15.9% (22/138), PCR 法高达32.6% (45/138), 经统计学处理, $P < 0.01$, 两法差异有非常显著意义 (表1)。

表1 PCR法和培养法检测猪肉和牛奶样品的比较

Table 1 Comparison of PCR with culture methods in the detection of *L. monocytogenes* in milk and pork samples

样品 Sample	PCR 检测阳性 Positive	PCR 检测阴性 Negative
分离培养阳性 Culture positive		
猪肉 Pork (12)	12	0
牛奶 Milk (10)	10	0
分离培养阴性 Culture negative		
猪肉 Pork (56)	16	40
牛奶 Milk (60)	7	53

* 括号内的数字为样品数; Number of samples.

3 讨论

PCR 技术是近年生物技术中的一项重要创举, 它的最大特点是极为灵敏, 已迅速用于临床医学的诊断和病原微生物的检测。Deneer 等^[8]选择在单核细胞增多症李氏菌致病过程

中起关键作用的 β -溶血素基因5'端130~149bp和284~303bp两个片段作为引物,其PCR检测单核细胞增多症李氏菌时具有高度种特异性。为便于克隆,我们在该对引物的5'端分别添加Sau3A酶切接头和保护碱基后设计成本试验引物,其特异性没有受到影响,从而在基因水平上为PCR法在检测单核细胞增多症李氏菌时保持种特异性奠定了基础,其扩增产物经Sau3A酶切、重组转化后建立DNA克隆。此构建的重组质粒,用限制酶酶切回收即可得到作探针的DNA片段,为单核细胞增多症李氏菌DNA探针研究提供极大方便。

Deneer等^[8]报道,用PCR扩增技术可检出5.4~54个细菌。Bessesen等^[7]用标记的内部探针检测扩增产物,其敏感性水平为4~440个细菌。本试验通过降低退火温度(55℃),增加引物浓度(1 μ M),明显提高了检测的敏感性,虽没有采用双扩增模式和内部寡核苷酸探针,但其敏感性水平和特异性仍与上述报道相当,模拟肉样达到92个细菌,乳样达到18个细菌,而且简化了试验程序,缩短了检测时间,节省了费用。

PCR检测技术,除了要达到应有的特异性外,其敏感性至少应与常规的分离培养法相当,而且应不受污染杂菌的影响。本试验中用PCR和常规分离培养法对猪肉和牛奶样品中单核细胞增多症李氏菌检测的结果显示,PCR技术的敏感性明显高于分离培养法($P < 0.01$),而且检测时间从分离培养法的几周缩短到24h之内。大量杂菌DNA的存在对单核细胞增多症李氏菌DNA扩增的特异性和敏感性也无任何影响。另外,我们采用PCR前操作和PCR后操作隔开,PCR产物与试剂分开保存及每次检测设阳性和阴性对照等办法避免了扩增产物的污染,消除了假阳性。由于单核细胞增多症李氏菌多存在于自然环境中,容易导致食品的污染和我们采取的样品都是卫生状况差的体表肉、碎肉及牛奶,所以本试验中样品的阳性率偏高。必须指出,从食品安全的观点着眼,对PCR检测结果的解释必须谨慎,因为PCR不但能检出活细菌,而且能检出死细菌。我们认为,PCR技术是一项特异、敏感、快速和简便的方法,可用于食品中单核细胞增多症李氏菌的检测,有推广应用价值,对医学和兽医学临床工作者也有参考价值。

参 考 文 献

- [1] Schlech W F et al. Epidemic Listeriosis—evidence for transmission by food. *N Engl J M*, 1983, 308:203~206.
- [2] Mclauchlin J et al. Listeriosis and food-borne transmission. *Lancet*, 1988, i:177~178.
- [3] 陈淑敏等. 北京市肉与肉制品中李氏菌的检出及血清型浅析. *肉品卫生*, 1991, 总第90期: 5~6.
- [4] 柳增善等. 动物食品中单核白细胞增多症李氏菌的检测. *兽医大学学报*, 1991, 11:275~279.
- [5] Datta A R et al. Detection of hemolytic *Listeria monocytogenes* by using DNA colony hybridization. *Appl Environ Microbiol*, 1987, 53:2256~2259.
- [6] Datta A R et al. Synthetic oligodeoxyribonucleotide probes for detection of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*, 1988, 54:2933~2937.
- [7] Bessesen M T et al. Detection of *Listeria monocytogenes* by using the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56:2930~2932.
- [8] Deneer H G et al. Species-specific detection of *Listeria monocytogenes* by DNA amplification. *Appl Environ Microbiol*, 1991, 57:606~609.

- [9] Riley L K et al. A method for biotinylating oligonucleotide probes for use in molecular hybridization. DNA, 1986, 333~337.

SPECIES-SPECIFIC DETECTION OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* BY USING THE POLYMERASE CHAIN REACTIN

Yang Bailiang, Nie Xiangting, Ma Haili, Yang Xingzhou
(Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi, P. R. of China)
Zhou Zhijiang, Xu Kecheng, Zhang Rangtang, Liu Chunjie
(Changchun Yeterinary University, Changchun, Jilin China)

Abstract

The polymerase chain reaction was used to detect virulent *Listeria monocytogenes*. A 186-bp DNA fragment was shown to be specifically amplified in *L. monocytogenes* but not in other species of *Listeria* or in a number of other gram-positive and gram-negative bacteria. As few as 92 bacteria in the simulated pork sample and 18 bacteria in the simulated milk sample could be detected. The presence of nonlisterial bacteria has no effect on the sensitivity and specificity of the method. The overall utility of the polymerase chain reaction was also assessed by direct testing of pork and milk samples collected in the market.

Key words Polymerase chain reaction, *Listeria monocytogenes*, Detection