

高分辨率溶解曲线检测 9 种食源性致病菌方法的建立

胡双芳¹, 余以刚¹, 李蓉², 庄平¹, 夏杏洲³, 肖性龙¹, 杨慧宁¹

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640) (2. 中山出入境检验检疫局, 广东中山 528400)

(3. 广东海洋大学食品科技学院, 广东湛江 524094)

摘要: 当今食源性疾病已成为一个全球关注的食品卫生问题, 常见的细菌性食物中毒的病原菌有: 致病性大肠杆菌 (特别是出血性大肠杆菌 O157:H7)、沙门氏菌、志贺氏菌、致病性弧菌 (包括霍乱弧菌和副溶血弧菌)、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌、空肠弯曲菌以及阪崎克罗诺杆菌等。单独检测一种致病菌已无法满足现今社会对同时高效检测多种致病菌的要求, 为建立一种同时对上述 9 种食品中常见致病菌的检测方法, 本研究分别以上述 9 种菌的特异性基因为靶基因, 创新性地结合一对通用引物, 建立能同时检测多种食源性致病菌的多重 HRM-real time PCR 检测体系。结果表明该多重 HRM-real time PCR 检测体系通过两管 PCR 反应可对上述 9 种食品中常见致病菌进行有效的检测与区分, 且具有良好的特异性和灵敏度。

关键词: 高分辨率溶解曲线; 致病菌; 检测; 多重 PCR

文章编号: 1673-9078(2016)3-271-280

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.3.043

Simultaneous Detection of Nine Foodborne Pathogenic Bacteria Using High-resolution Melting Analysis

HU Shuang-fang¹, YU Yi-gang¹, LI Rong², ZHUANG Ping¹, XIA Xing-zhou³, XIAO Xing-long¹, YANG Hui-ning¹

(1. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Zhongshan Entry-Exit inspection and Quarantine Bureau, Zhongshan, 528400, China)

(3. College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524094, China)

Abstract: Foodborne diseases have become a global food safety concern. Common bacterial pathogens involved in food poisoning include pathogenic *Escherichia coli* (especially enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7), *Salmonella*, *Shigella*, pathogenic *Vibrio* (including *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus*), *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, and *Cronobacter sakazakii*. Species-specific detection for one type of pathogen cannot meet the requirements of modern society for multiple-pathogen detection. In order to establish a method that can simultaneously detect the above-mentioned nine pathogenic bacteria in food, a multiple high-resolution melting (HRM) real-time polymerase chain reaction (PCR) assay for the simultaneous detection of multiple foodborne pathogens was established, using the specific genes of the nine aforementioned bacteria as target genes and a novel pair of universal primers. The results showed that this multiple HRM-real time PCR detection system could effectively detect and distinguish these nine common pathogenic bacteria in food via a two-tube PCR reaction, with good specificity and sensitivity.

Key words: high resolution melting; pathogen; detection; multiplex polymerase chain reaction

食源性致病菌是指在食品加工和流通过程中引入的病原菌, 这些病原菌在食品中存活、生长代谢引起食品的变质和破坏, 同时有些病原菌分泌有毒物质, 直接或间接导致人患病。常见细菌性食物中毒的病原

收稿日期: 2015-04-15

基金项目: 国家自然科学基金 (31271867); 广东省省部产学研合作重大专项 (2013A090100014); 广东省科技计划项目 (2013B021100005 和 2014A040401011)

作者简介: 胡双芳 (1990-), 女, 博士在读, 研究方向: 致病菌快速检测

通讯作者: 肖性龙 (1977-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 食品安全与检测

菌有: 致病性大肠杆菌 (特别是出血性大肠杆菌 O157:H7)、沙门氏菌、志贺氏菌、致病性弧菌 (包括霍乱弧菌和副溶血弧菌)、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌和空肠弯曲菌等。由于食源性致病菌引起的食品安全事件时有发生, 给食品工业以及人民生命安全造成了巨大的威胁, 我国对上述致病菌规定均不得检出。近年来, 由于阪崎克罗诺杆菌引起的婴幼儿奶粉中毒事件亦时有发生^[1], 给食品行业和消费者生命安全带来巨大威胁。因此, 发展新的快速检测与鉴定食源性致病菌的方法是及时有效地控制和预防致病菌传播的前提。

目前食源性致病菌的检测方法主要包括传统培养法与生理生化检验, 以及包括酶联免疫法、分子生物学方法等快速检测技术。传统的检测方法无法对难培养或不可培养的致病菌进行检测, 而且耗时费力, 获得结果通常需要几天的时间, 不能实现有效的监测、预防作用。且单独检测一种致病菌已无法满足现今社会对致病菌检测的高效率的要求。多重 PCR 是在同一 PCR 反应管中同时完成多种致病菌的高效 PCR 扩增, 从而实现多种致病菌 DNA 的同步快速检测的技术^[2]。由于多重 PCR 可降低致病菌检测过程中样本、工作台、物资、试剂、人工等占用的空间, 多重 PCR 技术在降低检测成本方面显得非常经济^[3]。高分辨率溶解曲线 (High Resolution Melting, HRM) 是一种基于单核苷酸溶解温度不同而形成不同形态溶解曲线的基因分析新技术, 通常与实时荧光 PCR 相结合, 可以实时监测温度上升时双链 DNA 的解链过程。HRM 技术以其高特异性、高通量、高灵敏性、低成本、快速等优势, 在临床诊断及基因分析上得到迅速的发展, 已成为生命科学中的热点技术^[4], 利用 HRM 能针对每一种细菌的固定 DNA 序列产生精确的 T_m 值, 可将 HRM 分析技术应用于致病菌的多重检测中。

本文利用高分辨率溶解曲线分析技术针对 9 种常见致病菌 (沙门氏菌、空肠弯曲菌、单增李斯特氏菌、大肠杆菌 O157: H7、志贺氏菌、金黄色葡萄球菌、副溶血弧菌、霍乱弧菌、阪崎克罗诺杆菌) 进行检测。分别以上述 9 种菌的特定基因为靶基因, 创新性地结合一对通用引物, 建立多重 HRM-real time PCR 检测体系, 应用于 9 种目标菌的检测中。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与样品

本文使用菌种列表详见表 1, 共 9 种目标菌的 61 株菌, 为沙门氏菌 (n=10)、空肠弯曲菌 (n=5)、单增李斯特氏菌 (n=12)、大肠杆菌 O157: H7 (n=2)、志贺氏菌 (n=4)、金黄色葡萄球菌 (n=14)、副溶血弧菌 (n=3)、霍乱弧菌 (n=8)、阪崎克罗诺杆菌 (n=3), 以及种非目标菌株细菌 12 株、真菌 9 株, 共 21 株, 所试菌株均为中山进出口检验检疫局提供。

表 1 菌种列表

Table 1 Reference strains used in this study

中文名	拉丁名	菌株编号
沙门氏菌(n=10)		
沙门氏菌	<i>Salmonella Enteritidis</i>	CMCC(B)47731

沙门氏菌	<i>Salmonella Enteritidis</i>	ATCC 14028
沙门氏菌	<i>Salmonella Typhimurium</i>	ATCC 14028
沙门氏菌	<i>Salmonella Typhimurium</i>	CMCC 50013
沙门氏菌	<i>Salmonella choleraesuis</i>	ATCC 13312
沙门氏菌	<i>Salmonella paratyphi</i>	SZCIQ spe109
沙门氏菌	<i>Salmonella paratyphi</i>	GZCDC wb21
沙门氏菌	<i>Salmonella paratyphi</i>	GZCDC wb21S
沙门氏菌	<i>Salmonella pullorum</i>	GZCDC se18
沙门氏菌	<i>Salmonella pullorum</i>	GZCDC se32
单增李斯特菌		
(n=12)		
单增李斯特菌	<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 19117
单增李斯特菌	<i>L. monocytogenes</i>	CMCC 54002
单增李斯特菌	<i>L. monocytogenes</i>	GZCDC Lm341
单增李斯特菌	<i>L. monocytogenes</i>	GZCDC Lm342
单增李斯特菌	<i>L. monocytogenes</i>	GZCDC Lm343
单增李斯特菌	<i>L. monocytogenes</i>	GZCDC Lm344
单增李斯特菌	<i>L. monocytogenes</i>	SZCIQ rm23
单增李斯特菌	<i>L. monocytogenes</i>	SZCIQ rm24
单增李斯特菌	<i>L. monocytogenes</i> 157	GZCDC Lm349
单增李斯特菌	<i>L. monocytogenes</i> sV5 (serotype 1/2a)	CMCC 34761
单增李斯特菌	<i>L. monocytogenes</i> 157	ADCPC Lsy-14
单增李斯特菌	<i>L. monocytogenes</i> 157	ADCPC Lsy-15
金黄色葡萄球菌		
(n=14)		
金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	CMCC 41002
金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	CMCC 26003
金黄色葡萄球菌	<i>Methicillin-resistant</i>	GZCDC 130R
(耐甲氧西林)	<i>Staphylococcus aureus</i>	
金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 12598
金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	CMCC 41002
金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	CMCC 26003
金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	CGMCC 1.128
金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	CGMCC 1.89
金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	CGMCC 1.1476
金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	GZCDC sal08
金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	GZCDC sal11
金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 43300
金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	SZCIQ HE13R
金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	SZCIQ HE6R
空肠弯曲菌(n=5)		
空肠弯曲菌	<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 29428
空肠弯曲菌	<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33291

转下页

接上页		
空肠弯曲菌	<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33560
空肠弯曲菌	<i>Campylobacter jejuni</i>	SZCIQ Cam-65j
空肠弯曲菌	<i>Campylobacter jejuni</i>	SZCIQ Cam-62
肠出血型大肠杆菌(n=2)		
大肠杆菌	<i>E. coli</i> O157:H7	SZCIQ 13813
大肠杆菌	<i>E. coli</i> O157:H7	ADCPC 931
志贺氏菌(n=4)		
志贺氏菌	<i>Shigella flexneri</i>	GZCDC sf719
志贺氏菌	<i>Shigella dysenteriae</i>	SZCIQ 4376
志贺氏菌	<i>Shigella boydii</i>	GZCDC d24-6j
志贺氏菌	<i>Shigella sonnei</i>	GZCDC ig42
霍乱弧菌(n=8)		
霍乱弧菌	<i>Vibrio cholerae</i> O1	ATCC 51352
霍乱弧菌	<i>Vibrio cholerae</i> O139	SZCIQ 5144
霍乱弧菌	<i>Vibrio cholerae</i>	GZCDC 3626
霍乱弧菌	<i>Vibrio cholerae</i>	GZCDC 3925
霍乱弧菌	<i>Vibrio cholerae</i>	GZCDC 4886
霍乱弧菌	<i>Vibrio cholerae</i>	GZCDC 5724
霍乱弧菌	<i>Vibrio cholerae</i>	GZCDC 9166
霍乱弧菌	<i>Vibrio cholerae</i>	GZCDC 9168
副溶血弧菌(n=3)		
副溶血弧菌	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	GZCDC VP3
副溶血弧菌	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17802
副溶血弧菌	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	LM5312
阪崎克罗诺杆菌(n=3)		
阪崎克罗诺杆菌	<i>Cronobacter Sakazakii</i>	SZCDC ES2
阪崎克罗诺杆菌	<i>Cronobacter Sakazakii</i>	ATCC 29544
阪崎克罗诺杆菌	<i>Cronobacter Sakazakii</i>	ATCC BAA-894
其他细菌(n=12)		
结肠炎耶尔森菌	<i>Yersinia enterocolitica</i>	SHCDC ye23
军团菌	<i>Legionella pneumophila</i>	ADCPC 239
创伤弧菌	<i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC 27562
粪肠球菌	<i>Enterococcus faecalis</i>	ADCPC 013
假单胞菌	<i>Pseudomonas cocovenenans</i>	ADCPC wha-45
假单胞菌	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SZCDC pa52
变形杆菌	<i>Proteus vulgaris</i>	SHCDC pall-k
大肠杆菌	<i>Escherichia coli</i>	SZCIQ eco5
大肠杆菌	<i>Escherichia coli</i>	SZCIQ jm109
猪链球菌 2 型	<i>Streptococcus suis</i> serotype 2	SZCIQ 553
蜡芽芽孢杆菌	<i>Bacillus cereus</i>	CMCC 70331
枯草芽孢杆菌	<i>Bacillus subtilis</i>	GZCDC WE2-aj
真菌(n=9)		

酿酒酵母	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HG SC1
毕赤酵母	<i>Pichia farinosa</i>	HGpf 1
假丝酵母	<i>Candida utilis</i>	HG CU 2
红酵母	<i>Rhodotorula pallida</i>	HGRP1
米曲霉	<i>Aspergillus oryzae</i>	HGAO1
华根霉	<i>Rhizopus chinensis Sato</i>	HG rc 2
卷枝毛霉	<i>Mucor circinelloides</i>	HG mc 2
米黑根毛霉	<i>Rhizomucor miehei</i>	HG RM 1
白地霉	<i>Geotrichum candidum</i>	HG gc 1

1.1.2 主要试剂

Premix Ex Taq (宝生物工程(大连)有限公司), 细菌 DNA 提取试剂盒、玻璃珠法柱式真菌 DNA 提取试剂盒(北京天恩泽基因科技有限公司), 缓冲蛋白胍水(BPW)、LB 培养基、碱性氯化钠蛋白胍水、布氏肉汤培养基、DEPC 水。

1.1.3 主要仪器

LightCycler 480 (上海罗氏诊断产品有限公司)、Thermo 微量超速离心机(上海托莫斯科学仪器有限公司)、FA2004B 电子天平(上海精密仪器科学仪器有限公司)、YXQ-LS-18S1 高压灭菌锅(上海博讯实业有限公司)、SPX-250B 生化培养箱(上海博讯实业有限公司)、QL-866 旋涡振荡仪(江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

检索文献, 确定靶基因, 从 GeneBank 下载所有靶基因的序列, 针对每种致病菌用生物软件进行序列比对, 截取最一致的序列进行引物设计, 将设计好的引物在 GeneBank 上进行 Blast 比对, 验证引物的保守性。其中, 引物分别设计在沙门氏菌基因组中 *fimY* 基因^[5]相对保守且高度特异的序列, 单增李斯特菌 *hly* 基因^[6]相对保守且高度特异的序列, 空肠弯曲菌 *orfC* 基因^[7]相对保守且高度特异的序列, 大肠杆菌 O157:H7 的 *rfaE* 基因^[8]相对保守且高度特异的序列, 志贺氏菌的 *ipaH* 基因^[9]相对保守且高度特异的序列, 金黄色葡萄球菌的 *sa442* 基因^[10]相对保守且高度特异的序列, 副溶血弧菌的 *toxR* 基因^[11]相对保守且高度特异的序列, 霍乱弧菌的 *hlyA* 基因^[12]相对保守且高度特异的序列, 阪崎克罗诺杆菌的 *cgcA* 基因^[13]相对保守且高度特异的序列。在上述特异性引物 5' 端加上通用引物序列, 其中上游引物为 Bacunpf:5' TAGCACACGCA GAGTACGTAGCT 3', 下游引物为 Bacunpr:5' CGAGA CAGCAGTCAATACCGTC 3', 从而得到包含通用引物序列与特异性引物序列的长引物, 引物对序列见表 2。

所有引物由上海辉瑞生物科技有限公司合成, 随后进 使用的引物的兼容性和效率。
一步实验筛选出最佳引物组合, 以确定为本方法中所

表 2 引物序列及扩增片段

Table 2 Sequences of primers and amplified fragments

目标菌	基因	含通用引物序列的长引物 (5'-3')	特异性引物	扩增片段长度 /GC%	理论 <i>T_m</i> 值/实际 <i>T_m</i> 值	扩增片段
副溶血弧菌	toxR	VPPF5'TAGCACACG CAGAGTACGTAGCT GCGACCTTTCTCTG AAATATTAATTGT3'	VP1231:5'-GCGACCTTTCTC TGAAATATTAATTGT-3'	124bp	81.04	CGAGACAGCAGTCAATA CCGTCCATTGCGGTGGCA AACATCAAACCTGTTGCGA CAAGGCTCGACGGCTGA
		VPPR5'CGAGACAGC AGTCAATACCGTCC ATTCGCGTGGCAAA CATC3'	VP1286: 5'-CATTCGCGTGGCAAACA TC-3'	49.19%	85.41	ATCGACAATTAATATTTCA GAGAAAGGTCGCAGCTA CGTACTCTGCGTGTGCTA
单增李斯特菌	hly	LMPF5'TAGCACACG CAGAGTACGTAGCT TTCATCCATGGCAC CACCA 3'	LM108-126: 5'-TTCATCCATGGCACCAC CA-3'	131bp	81.43	TAGCACACGCAGAGTAC GTAGCTTTCATCCATGGC ACCACCAGCATCTCCGCC TGCAAGTCCTAAGACGCC
		LMPF5'CGAGACAGC AGTCAATACCGTCA CACGCGGATGAAAT CGATAAGTATA3'	Lm168-193:5'ACACGCGGAT GAAATCGATAAGTATA-3'	49.62%	82.23	AATCGAAAAGAAACACG CGGATGAAATCGATAAGT ATAGACGGTATTGACTGC TGCTCTCG
肠弯曲菌	orfC	CJUPF5'TAGCACACG CAGAGTACGTAGCT CACACCTGAAGTAT GAAGTGGTCTAAGT 3'	CJU1273-1300:5'CACACCTG AAGTATGAAGTGGTCTAA GT 3'	161bp	78.09	TAGCACACGCAGAGTAC GTAGCTCACACCTGAAGT ATGAAGTGGTCTAAGTCT TGAAAAAGTGGCATATTC
		CJUPR5'CGAGACAG CAGTCAATACCGTC TTGGTATGGCTATAG GAACTCTATAGCT 3'	CJU1360-1388:5'TTGGTATG GCTATAGGAACTCTTATAG CT 3'	39.75%	81.64	TCCTGCTAAATAATTTAAA TTAGGATATGCCATTTGA AAAGCTATAAGAGTTCCT ATAGCCATACCAAGACGG TATTGACTGCTGTCTCG
霍乱弧菌	hlyA	VCPF5'TAGCACACG CAGAGTACGTAGCT GCT TTATTG TTC GAT GCG TTAAAC3'	VCPF1053: 5'-GCTTTATTGTTTCGATGCG TTAAAC-3	233bp	82.46	CGAGACAGCAGTCAATA CCGTGATGCCAAAATTG TGCGTATCAGCCTAGATG ATGACAGCACGGGAGCC GGCATT CATCTGAATGAT CAACTCGTTATCGTCAG TTTGGAGCCAGTTATACG ACGTTAGATGCCATTTCC GTGAGTGGTCAACCGATG CGATTGCCAAAGATTATC GCTTCGTGTTTAAACGCAT CGAAACAATAAAGCAGCTA CGTACTCTGCGTGTGCTA
		VCPR5'CGAGACAGC AGTCAATACCGTC GAT GCCAAAATT GTGCGTATCA 3'	VCPR1189:5'-GATGCCAAAA TTGTGCGTATC A-3'	48.07%	82.45	

转下页

接上页							
沙门氏菌	fimY	SaPF5'TAGCACACGC					
		AGAGTACGTAGCTG CGGCGTTGGAGAGT GATA3'	SalF714:5'-GCGGCGTTGGAG AGTGATA-3'	112bp	82.77	TAGCACACGCAGAGTAC GTAGCTGCGGCGTTGGA GAGTGATAACGGCAGGC GCAGTCTTTGGCATTCTT AAACGGCGGTGTCTTTCC CTGACGGTATTGACTGCT GTCTCG	
金黄色葡萄球菌	Sa442	SaPR5'CGAGACAGC AGTCAATACCGTCA GGGAAAGACACCG CCGTTTAAGAAATG 3'	Salr796:5'-AGGGAAAGACA CCGCGGTTTAAGAAATG-3'	54.46%	86.44		
		STAPF5'TAGCACACGC CAGAGTACGTAGCT TTCTTCACGACTAA ATAAACGCTCA3'	Sa442pf:5'-TTCTTCACGACT AAATAAACGCTCA-3'	192bp	77.67	TAGCACACGCAGAGTAC GTAGCTTTCTTCACGACT AAATAAACGCTCATTTCGC GATTTTATAAATGAATGTT GATAACAATGTTGTATTAT CTACTGAAATCTCATTAC GTTGCATCGGAAACATTG TGTTCTGTATGTAAAAGC CGTCTTGATAATCTTTAGT AGTACCGACGGTATTGAC TGCTGTCTCG	
志贺氏菌	ipaH	STAPR5'CGAGACAG CAGTCAATACCGTC GGTACTACTAAAGA TTATCAAGACGGCT 3'	Sa442pr:5'-GGTACTACTAAA GATTATCAAGACGGCT-3'	37.50%	81.50		
		SgPF5'TAGCACACGC AGAGTACGTAGCTC GCAATACCTCCGGA TTCC3'	Sgpf944:5'-CGCAATACCTC CGGATTCC-3'	110bp	83.09	TAGCACACGCAGAGTAC GTAGCTCGCAATACCTCC GGATTCCGTGAACAGGTC GCTGCATGGCTGGAAAA ACTCAGTGCCTCTGCGGA GACGGTATTGACTGCTGT CTCG	
阪崎肠杆菌	cgcA	SgPR5'CGAGACAGC AGTCAATACCGTCT CCGCAGAGGCACTG AGTT3'	Sgpr1008:5'-TCCGCAGAGG CACTGAGTT-3'	55.45%	86.70		
		CSPF5'TAGCACACGC CAGAGTACGTAGCT TTGATCAGGTCGTC AGAATCTACGGGT3'	CSPB803:5'TTGATCAGGTC GTCAGAATCTACGGGT3'	134bp	83.81	TAGCACACGCAGAGTAC GTAGCTTTGATCAGGTCG TCAGAATCTACGGGTTTG CGCGCTCGACGCGTTACC CGATTGTCGTGGTGGCCG GGTATGACAAAGACAATC TGCGCGACGGTATTGACT GCTGTCTCG	
大肠O157:H7	rfbE	CSPR5'CGAGACAGC AGTCAATACCGTCG CAGATTGTCTTTGTC ATACCCG3'	CSPR890:5'GCAGATTGTCT TTGTCATACCCG3'	55.22%	86.33		
		O157PF5'TAGCACAC GCAGAGTACGTAGC TTCCTCAGCTATAGG GTGCTTTTG3'	O157PF104:5'-TCCTCAGCTA TAGGGTGCTTTTG-3'	128bp	80.21	TAGCACACGCAGAGTAC GTAGCTTCTCAGCTATA GGGTGCTTTTGATATTTTT CCGAGTACATTGGCATCG TGTGGACAGGGTAAAAA ACTGGCCTTGTTTCGATG ACGGTATTGACTGCTGTC TCG	
		O157PR5'CGAGACAG CAGTCAATACCGTC ATCGAAACAAGGCC AGTTTTTTAC3'	O157PR186:5'-ATCGAAACA AGGCCAGTTTTTTAC-3'	46.88%	84.08		

1.2.2 DNA 模板的提取

沙门氏菌、单增李斯特氏菌、大肠杆菌 O157:H7、志贺氏菌、金黄色葡萄球菌以及阪崎肠杆菌等采用液体 LB 培养基在 37 °C 下培养 24 h, 霍乱弧菌和副溶血弧菌采用 3% 的碱性氯化钠蛋白胨水在 37 °C 下培养 24 h, 空肠弯曲菌采用布氏肉汤培养基 42 °C 下培养 24 h, 真菌采用 YPD 液体培养基在 30 °C 下培养 72 h, 然后分别取 1 mL 菌液依照 DNA 提取试剂盒说明书提取 DNA, 提取 DNA 后均作为反应模板贮存于 -20 °C 备用。

1.2.3 单重 HRM-real time PCR 反应体系的建立

根据 takara Premix Ex Taq 试剂盒说明书要求, 每 20 μ L 的 PCR 反应体系包含 10 μ L Premix Ex Taq (2 \times), 0.5 μ L 上游引物 (10 μ M), 0.5 μ L 下游引物 (10 μ M), 1.25 μ L Evagreen 染料 (20 \times), 2 μ L Template (反应组以基因组 DNA 为模板, 对照组的模板为无菌去离子水)。

单重 HRM-real time PCR 反应程序均为: 95 °C 预变性 1 min; 以 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 40 s 扩增 40 个循环。PCR 产物进行高分辨率溶解曲线分析, 溶解程序为: 95 °C 2 min, 60 °C 2 min; 60 °C 1 s, 然后升温至 95 °C (溶解速率为 0.2 °C/s), 最后 50 °C 冷却。程序设置: reporter dye: SYBR; quencher: none; passive reference dye: ROX。

1.2.4 多重 HRM-real time PCR 反应体系的建立

在单重 HRM-real time PCR 反应体系建立的基础上, 根据不同目标基因扩增片段 T_m 值不同以及引物对之间的相互影响将引物对分为 A、B、C 三组。以单重 HRM-real time PCR 反应体系为框架, 在同一反应管中, 加入对应的多种目标菌的特异性引物对及通用引物对, 如表 3 所示。其中多重 HRM-real time PCR 反应程序与单重 HRM-real time PCR 反应一致, 如 1.2.3 所述。

表 3 多重 HRM-real time PCR 反应体系

Table 3 Multiplex HRM real-time PCR reaction system

组分	含量
A 组	空肠弯曲菌、志贺氏菌、副溶血弧菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌引物对各 0.1 μ L
B 组	阪崎克罗诺杆菌、沙门氏菌、O157:H7、霍乱弧菌引物对各 0.1 μ L
C 组	空肠弯曲菌、志贺氏菌、副溶血弧菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌、阪崎克罗诺杆菌、沙门氏菌、O157:H7、霍乱弧菌引物对各 0.1 μ L
其他组分	10 μ L Premix Ex Taq (2 \times), 0.2 μ L BSA (20 mg/mL), 通用引物对 0.6 μ L (10 μ M), 1.25 μ L Evagreen 染料 (20 \times), 2 μ L Template, 以 DPEC 补充至 20 μ L

1.2.5 多重 HRM-real time PCR 反应特异性

在多重 HRM-real time PCR 反应体系建立的基础上, 以目标菌和非目标菌株的基因组 DNA 为模板进行多重 HRM-real time PCR 反应, 检验所建立体系的特异性。其中对表 1 所示沙门氏菌 (n=10)、空肠弯曲菌 (n=5)、单增李斯特氏菌 (n=12)、大肠杆菌 O157:H7 (n=2)、志贺氏菌 (n=4)、金黄色葡萄球菌 (n=14)、副溶血弧菌 (n=3)、霍乱弧菌 (n=8)、阪崎克罗诺杆菌 (n=3), 以及种非目标菌株细菌 12 株、真菌 9 株, 共 21 株, 进行了特异性检验。

1.2.6 多重 HRM-real time PCR 反应灵敏度

将上述 9 种食源性致病菌按 1.2.2 的方法进行培养, 然后按 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 梯度稀释, 取 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 涂板计数, 涂板的菌液量为 100 μ L/平板。并将 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 五个梯度菌液然后分别取 1 mL 菌液依照 DNA 提取试剂盒说明书提取 DNA, 提取 DNA 后均作为反应模板贮存于 -20 °C 备用。用 1.2.5 中建立的多重

HRM-real time PCR 反应条件与反应体系进行实验, 每个梯度重复 3 次, 检测多重 HRM-real time PCR 的灵敏度。

2 结果与讨论

2.1 引物的设计

理想情况下, 反应体系中使用一对引物即可检测多种致病菌。但是目前使用 HRM 进行致病菌检测与分型的研究主要集中在利用共同保守基因序列设计引物对。在研究初始阶段曾尝试从 9 种致病菌的 16S rRNA 基因中寻找保守序列进行引物设计, 但由于 9 种致病菌跨种属过大, 难以进行设计。因此本文以 9 种致病菌的特异性基因片段设计 9 种对应的特异性引物, 依据目的 PCR 扩增产物理论 T_m 值有无明显差异, 挑选出用于多重 HRM-real time PCR 反应的引物对。将上述 9 种对应的特异性引物结合通用型引物, 相互结合形成一套新型有效的引物组合, 能同时对 9 种致

病菌进行快速有效的检测与鉴定,其原理如图 1 所示。在溶解曲线中,目标扩增 DNA 片段的长度和 GC 含量都对 T_m 值有影响。表 2 中 9 个目标菌扩增产物理论 T_m 值跨度在 77.67 至 83.81 范围内,对 9 个目标菌扩增产物的 GC 含量、片段长度等参数进行了比较。由上表可以清楚的看出, T_m 值与 GC 在目标扩增 DNA 片段中的百分比成正相关。在 9 种致病菌的扩增片段中,志贺氏菌(理论 T_m 值 83.09, G+C% 为 55.45%)和阪崎克罗诺杆菌(理论 T_m 值 83.31, G+C% 为 55.22%)的 GC 含量均超过 55%,其理论 T_m 值均超过了 83;空肠弯曲菌(理论 T_m 值 78.09, G+C% 为 39.75%)和金黄色葡萄球菌(理论 T_m 值 77.67, G+C% 为 37.50%)的 GC 含量均低于 40%,其理论 T_m 值均低于 79;沙门氏菌(理论 T_m 值 82.77, G+C% 为 54.46%)、单增李斯特菌(理论 T_m 值 81.43, G+C% 为 49.62%)、副溶血弧菌(理论 T_m 值 81.04, G+C% 为 49.19%)和 O157(理论 T_m 值 80.21, G+C% 为 46.88%)的 T_m 值则随着扩增片段 GC 含量的增加而递增,这说明 GC 含量是影响 T_m 值的关键,而非 bp 数量。但当扩增片段长度明显增加时,也能显著影响扩增片段理论 T_m 值,如霍乱弧菌扩增片段为 233bp,尽管其 GC 含量只占 48.07%,也能显著升高 T_m 值至 82.77。

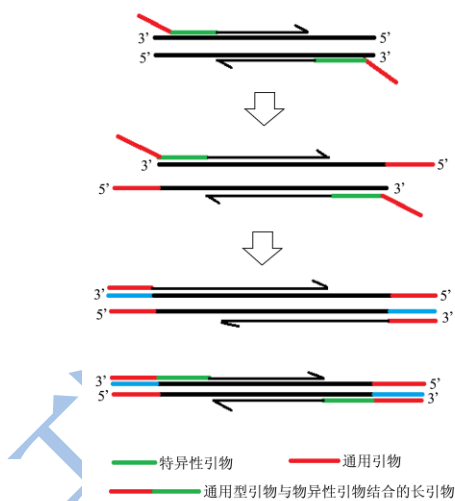


图 1 PCR 反应示意图
Fig.1 Schematic diagram of PCR

2.2 单重 HRM-real time PCR 反应建立

单重 PCR 反应体系分别扩增出了 9 种致病菌对应的 9 条特异性高分辨率溶解曲线和熔点峰,具有典型的“S”形扩增曲线,CT 值在 28-30 之间。如图 2 所示,所对应的金黄色葡萄球菌 *sa442* 基因的实际 T_m 值为 81.50,理论 T_m 值为 77.67;空肠弯曲菌 *ofc* 基因的

实际 T_m 值为 81.64,理论 T_m 值为 78.09;阪崎克罗诺杆菌 *cgcA* 基因的实际 T_m 值为 83.33,理论 T_m 值为 83.81;单增李斯特菌 *hly* 基因的实际 T_m 值为 82.23,理论 T_m 值为 81.43;O157:H7 的 *rfbE* 基因的实际 T_m 值为 84.08,理论 T_m 值为 80.21;副溶血弧菌 *toxR* 基因的实际 T_m 值为 85.41,理论 T_m 值为 81.04;沙门氏菌 *fimY* 基因的实际 T_m 值为 86.44,理论 T_m 值为 82.77;霍乱弧菌 *hlyA* 基因的实际 T_m 值为 86.60,理论 T_m 值为 82.45;志贺氏菌 *ipaH* 基因的实际 T_m 值为 86.70,理论 T_m 值为 83.09。实际值与理论 T_m 值相比均存在一定的差距,但实际 T_m 值与预期大小相符。

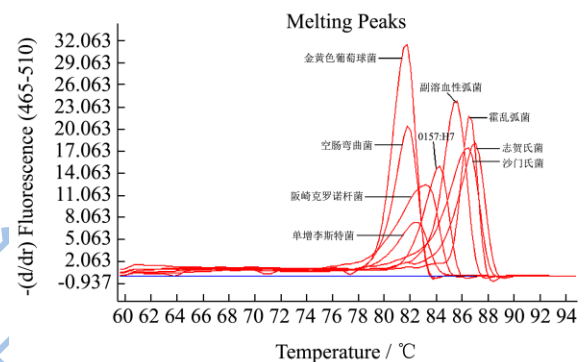


图 2 单重 HRM-real time PCR 的溶解曲线图
Fig.2 Melt curve of HRM real-time PCR

2.3 多重 HRM-real time PCR 反应建立

通过单重 HRM-real time PCR 反应可知,9 种目标致病菌在退火温度为 60 °C 时均能够获得良好的扩增结果,故选 60 °C 作为多重反应程序的退火温度。但若直接将单重体系中的模板及引物对浓度简单的混合在一起进行多重 HRM-real time PCR 反应,则扩增效果不是很理想,溶解曲线峰不明显,因此需要对多重反应体系组分进行分组实验并初步优化。且预实验发现,在多重 HRM-real time PCR 反应体系中加入 BSA,可提高反应的灵敏度,扩增结果要明显好于不加 BSA。

常规的基因分型技术需要进行荧光探针的标记,HRM 技术可以在没有荧光探针标记的情况下,根据高分辨率溶解曲线的形状进行基因分型,结果准确可靠。通过单重 HRM-real time PCR 反应可知,9 种目标致病菌的 T_m 值有一定的相似性,在进行多重 HRM-real time PCR 时可能存在相互影响难以区分。经过预实验,将 9 种致病菌分为 3 组如表 3 所示,其中 C 组结果显示 9 种目标菌的引物对同在一个反应管中进行多重 PCR 反应时存在相互干扰,无法区分不同目标菌(未附图)。因此要实现 9 种目标菌的同时检测,

至少需分两个反应管完成,其中 A 组多重 PCR 反应结果如图 3 所示,B 组多重 PCR 反应结果如图 4 所示。

如图 3 所示,所对应的金黄色葡萄球菌 *sa442* 基因的实际 T_m 值为 81.81 ± 0.024 ;空肠弯曲菌 *orfC* 基因的实际 T_m 值为 81.31 ± 0.035 ;单增李斯特菌 *hly* 基因的实际 T_m 值为 81.60 ± 0.041 ;副溶血弧菌 *toxR* 基因的实际 T_m 值为 85.55 ± 0.071 ;志贺氏菌 *ipaH* 基因的实际 T_m 值为 86.88 ± 0.082 。由于高分辨率溶解曲线的特异性与高分辨率,对于不同的 T_m 值相差超过 1°C 以上的片段,其差距一般大于 SD 的三倍以上,可以清晰的进行区分。但由于金黄色葡萄球菌、空肠弯曲菌以及单增李斯特菌扩增片段的 T_m 值较为接近,需要进行计算。根据 Slinger 等^[4]的研究,当以三倍 SD 为 cutoff 值时金黄色葡萄球菌 *sa442* 基因的 T_m 值范围为 $81.738 \sim 81.882$;空肠弯曲菌 *orfC* 基因的 T_m 值范围为 $81.205 \sim 81.415$;单增李斯特菌 *hly* 基因的 T_m 值范围为 $81.477 \sim 81.723$,三者 T_m 值明显并不重叠,这表明本方法建立的多重 HRM-real time PCR 能对上述三种菌株进行有效区分。

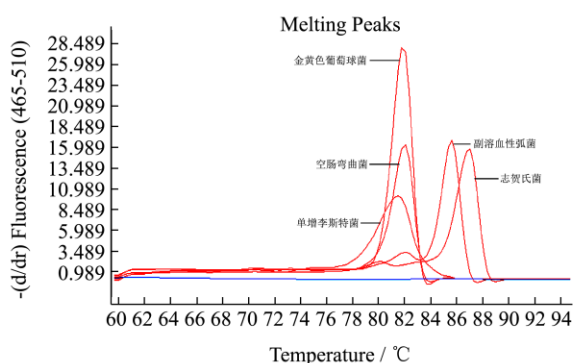


图 3 多重 HRM-real time PCR 的溶解曲线图(A组)

Fig.3 Melt curve of multiplex HRM real-time PCR (group A)

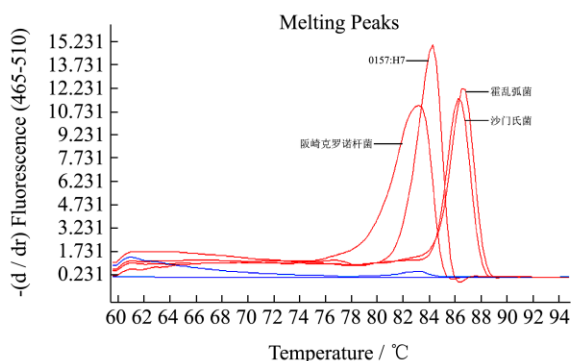


图 4 多重 HRM-real time PCR 的溶解曲线图(B组)

Fig.4 Melt curve of multiplex HRM real-time PCR (group B)

如图 4 所示,所对应的阪崎克罗诺杆菌 *cgcA* 基因的实际 T_m 值为 82.70 ± 0.068 ; O157:H7 的 *rfbE* 基因的实际 T_m 值为 84.08 ± 0.091 ;沙门氏菌 *fimY* 基因的实际 T_m 值为 86.29 ± 0.035 ;霍乱弧菌 *hlyA* 基因的实际

T_m 值为 86.58 ± 0.041 。其中沙门氏菌与霍乱弧菌的 T_m 值较为接近,根据 Slinger 等^[4]的研究,当以三倍 SD 为 cutoff 值时沙门氏菌 *fimY* 基因的 T_m 值范围为 $86.185 \sim 86.395$,霍乱弧菌 *hlyA* 基因的 T_m 值范围为 $86.457 \sim 86.703$ 。两者 T_m 值明显并不重叠,这表明本方法建立的多重 HRM-real time PCR 能对上述三种菌株进行有效区分。

2.4 多重 HRM-real time PCR 反应特异性

多重 PCR 反应体系特异性检验结果表明,所有目标菌均出现阳性扩增,而其他非目标菌株,均未出现扩增。表明多重 PCR 反应体系具有良好的特异性。其中 A 组能有效扩增所试的所有空肠弯曲菌、志贺氏菌、副溶血弧菌、金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌; B 组有效扩增所试的所有阪崎克罗诺杆菌、沙门氏菌、O157:H7 和霍乱弧菌; A 组与 B 组均不能扩增其他非目标菌株。

2.5 多重 HRM-real time PCR 反应灵敏度

多重 HRM-real time PCR 反应结果表明,随着稀释梯度的不断增加,即菌浓度的不断减少,其 Ct 值对应增大,直至稀释至 10^2 CFU/mL 时达到检出限,其平均 Ct 值为 $33.14 \sim 34.88$ 之间,标准差为 $0.12 \sim 0.22$ 之间。结合平板计数结果显示,空肠弯曲菌、志贺氏菌、副溶血弧菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌、阪崎克罗诺杆菌、沙门氏菌、O157:H7 和霍乱弧菌的检测灵敏度分别为 3.4×10^2 、 5.2×10^2 、 4.6×10^2 、 3.3×10^2 、 2.1×10^2 、 5.5×10^2 、 3.7×10^2 、 2.4×10^2 和 2.7×10^2 CFU/mL。结果表明上述多重 HRM-real time PCR 体系对上述 9 种食源性致病菌的检测均具有良好的灵敏度。

3 结论

3.1 综上所述,本研究所构建的实时荧光定量 PCR 探针法具有操作简单、快速、特异性强等优点,为食品中多种致病菌污染的快速检测提供了新的手段,有望发展为快速同时检测食品中多种致病菌污染的有效手段。目前运用单重或多重 PCR 方法,对一种或多种食源性致病菌进行检测的研究很多^[4-13],但由于多重 PCR 反应中容易发生各套引物非特性结合或者扩增的问题,因此很难实现超过 3 种目标基因同时检测的目标。通过多重 PCR 方法,能实现同时对 9 种食源性致病菌进行检测的方法还未见报道。本研究采用大量通用引物结合少量特异性引物的方法,避免了不同特异性引物之间发生的非特性结合或者扩增的问题,从而实现了该多重 HRM-real time PCR 检测体系通过两

管 PCR 反应可对上述 9 种食品中常见致病菌进行有效的检测与区分, 并具有良好的特异性和灵敏度。多重 HRM-real time PCR 反应体系见表 5。

表 4 多重 HRM-real time PCR 反应灵敏度

Table 4 Sensitivity of multiplex HRM real-time PCR

菌种名	原始浓度 (CFU/mL)	Ct 值								灵敏度 (CFU/mL)
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	
空肠弯曲菌	3.4×10 ⁸	17.27±0.12	20.61±0.16	24.24±0.14	27.53±0.31	30.647±0.22	33.57±0.21	-	-	3.4×10 ²
志贺氏菌	5.2×10 ⁸	17.63±0.23	20.55±0.11	24.74±0.12	27.63±0.25	30.47±0.14	34.77±0.16	-	-	5.2×10 ²
副溶血弧菌	4.6×10 ⁸	17.86±0.14	20.98±0.25	24.65±0.21	27.76±0.14	30.47±0.23	33.94±0.22	-	-	4.6×10 ²
金黄色葡萄球菌	3.3×10 ⁹	15.85±0.31	18.45±0.12	21.51±0.16	24.94±0.23	28.47±0.25	32.12±0.23	34.88±0.13	-	3.3×10 ²
单增李斯特菌	2.1×10 ⁸	17.11±0.22	20.61±0.09	24.75±0.11	28.02±0.27	31.22±0.12	34.17±0.14	-	-	2.1×10 ²
阪崎克罗诺杆菌	5.5×10 ⁹	15.77±0.14	18.35±0.17	21.76±0.22	25.13±0.12	28.41±0.23	31.03±0.31	34.21±0.22	-	5.5×10 ²
沙门氏菌	3.7×10 ⁸	17.55±0.25	20.78±0.23	24.53±0.21	27.64±0.14	30.39±0.29	33.14±0.12	-	-	3.7×10 ²
O157:H7	2.4×10 ⁹	16.22±0.23	18.93±0.14	22.17±0.22	25.95±0.16	29.17±0.11	32.53±0.21	34.57±0.21	-	2.4×10 ²
霍乱弧菌	2.7×10 ⁷	19.89±0.27	24.12±0.12	27.53±0.21	30.64±0.16	33.57±0.14	-	-	-	2.7×10 ²

注: -, 表示未检测到荧光信号。

表 5 多重 HRM-real time PCR 反应体系

Table 5 Multiplex HRM real-time PCR reaction system

组分	含量
A 组引物对	空肠弯曲菌、志贺氏菌、副溶血弧菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌引物对各 0.1 μl。
B 组引物对	阪崎克罗诺杆菌、沙门氏菌、O157: H7、霍乱弧菌引物对各 0.1 μl。
其他组分	10 μl Premix Ex Taq (2X), 0.2 μl BSA (20 mg/ml), 通用引物对 0.6 μl (10 μM), 1.25 μl Evagreen (20X) 染料, 2 μl Template, 以 DPEC 补充至 20 μl。

3.2 9 种食源性致病菌多重 HRM-real time PCR 检测体系和检测程序:

95 °C 预变性 1 min; 以 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 40 扩增 40 个循环。PCR 产物进行高分辨率溶解曲线分析, 溶解程序为: 95 °C 2 min, 60 °C 2 min; 60 °C 1 s, 然后升温至 95 °C (溶解速率为 0.2 °C/s), 最后 50 °C 冷却。程序设置: reporter dye: SYBR; quencher: none; passive reference dye: ROX。

参考文献

[1] Pina-Pérez M C, Rodrigo D, Martínez A. Non-Thermal Inactivation of *Cronobacter Sakazakii* in Infant Formula Milk: A Review [J]. Critical Reviews In Food Science And Nutrition, 2014 (just-accepted)

[2] Garrido A, Chapela M J, Román B, et al. A new multiplex real-time PCR developed method for *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* detection in food and environmental samples [J]. Food Control, 2013, 30(1): 76-85

[3] Singh J, Batish V K, Grover S. Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in dairy products using real time PCR-melt curve analysis [J]. Journal of Food Science and Technology, 2012, 49(2): 234-239

[4] Maurischat S, Szabo I, Baumann B, et al. Rapid real-time PCR methods to distinguish *Salmonella* Enteritidis wildtype field isolates from vaccine strains Salmovac SE/Gallivac SE and AviPro *Salomonella* VAC E [J]. Journal of Microbiological Methods, 2015, 112: 92-98

[5] Wang K C, Hsu Y H, Huang Y N, et al. FimY of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium functions as a DNA-binding protein and binds the finZ promoter [J]. Microbiological Research, 2014, 169(7): 496-503

[6] Tamburro M, Sammarco M L, Ammendolia M G, et al. Evaluation of transcription levels of inlA, inlB, hly, bsh and prfA genes in *Listeria monocytogenes* strains using quantitative reverse-transcription PCR and ability of invasion into human CaCo-2 cells [J]. FEMS Microbiology Letters, 2015, 362(6): 1-7

[7] Miljković-Selimović B, Babić T, Kocić B, et al. Identification of *campylobacter* species isolates with phenotypic methods and polymerase chain reaction [J]. Srpski Arhiv Za Celokupno Lekarstvo, 2014, 142(11-12): 708-712

[8] Yang X, Cheng H W, Chen L, et al. A duplex SYBR Green I real-time quantitative PCR assay for detecting *Escherichia*

- coli* O157: H7 [J]. Genetics And Molecular Research: GMR, 2013, 12(4): 4836
- [9] Liew P S, Teh C S J, Lau Y L, et al. A real-time loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Shigella* species [J]. Tropical Biomedicine, 2014, 31(4): 709-720
- [10] Nijhuis R H T, van Maarseveen N M, van Hannen E J, et al. A rapid and high-throughput screening approach for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* based on the combination of two different real-time PCR assays[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2014, 52(8): 2861-2867
- [11] He P, Chen Z, Luo J, et al. Multiplex real-time PCR assay for detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* strains [J]. Molecular and Cellular Probes, 2014, 28(5): 246-250
- [12] Park J Y, Jeon S, Kim J Y, et al. Multiplex Real-time Polymerase Chain Reaction Assays for Simultaneous Detection of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio vulnificus* [J]. Osong Public Health and Research Perspectives, 2013, 4(3): 133-139
- [13] Carter L, Lindsey L A, Grim C J, et al. Multiplex PCR assay targeting a diguanylate cyclase-encoding gene, *cgcA*, to differentiate species within the genus *Cronobacter* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(2): 734-737
- [14] Slinger R, Bellfooy D, Desjardins M, et al. High-resolution melting assay for the detection of *gyrA* mutations causing quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovars Typhi and Paratyphi [J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2007, 57(4): 455-458

现代食品科技