

• 论 著 •

不同方法检测食源性致病菌的对比研究

罗宇鹏

(成都市第五人民医院检验科,成都温江区 611130)

摘要:目的 探讨基因芯片技术和多重 PCR 技术用于检测和筛查食源性致病菌的可行性。方法 通过设计靶细胞引物序列,采用生物素标记反向引物 5' 端,氨基基团标记寡核苷酸探针 5' 端。将探针在固相载体上点样,制备基因芯片,PCR 产物与芯片点制探针区域进行杂交,并对 PCR 杂交反应的体系进行优化。结果 基因芯片技术可以同时检测志贺氏菌、沙门氏菌、肺炎克雷伯菌、布鲁氏菌、奇异变形菌、金黄色葡萄球菌和空肠弯曲菌等多种病原菌,操作简便,特异性强。细菌纯培养物灵敏度为 5.0×10^2 CFU/mL,DNA 检测灵敏度为 0.1 pg,检测分离菌株符合率为 100%。利用引物建立和优化了 PCR 检测体系,分别确定了 Mg²⁺ 浓度和退火温度 Tm 值为 1.5 mmol/L 和 56 °C,检测灵敏度达到 10 pg,此灵敏度下可以扩增出全部特异性引物条带。

结论 通过基因芯片技术和多重 PCR 技术可以有效检测食源性致病菌,为高通量筛查检测病原菌提供了新思路,值得在食品安全领域推广应用。

关键词:食品安全; 食源性致病菌; 多重 PCR; 基因芯片

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.07.023

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)07-0918-03

Comparative study of different methods for detecting foodborne pathogens

Luo Yupeng

(Department of Clinical Laboratory, Chengdu Fifth People's Hospital, Chengdu, Sichuan 611130, China)

Abstract: Objective To investigate the feasibility of the gene chip technique and multiplex PCR technique for detecting and screening foodborne pathogens. **Methods** The primer sequences were designed to target cells, the biotin was adopted to label the reverse primer 5' end and the amino group was adopted to label oligonucleotide probe 5' end. The probe spotted on a solid support for preparing microarray, PCR product was hybridized with microarray probe region, PCR and hybridization reaction system was optimized. **Results** The microarray technique could simultaneously detect multiple pathogens of Shigella, Salmonella, Klebsiella pneumoniae, Brucella, Proteus mirabilis, Staphylococcus aureus, Campylobacter jejuni, etc., which was easy to operate and had strong specificity. The sensitivity of bacterial pure cultures was 5.0×10^2 CFU/mL, the sensitivity of DNA detection was 0.1 pg, the coincidence rate for detecting isolated bacteria was 100 %. The PCR detection system was established and optimized by using primers, the concentration of Mg²⁺ and the annealing temperature Tm value of 1.5 mmol/L and 56 °C were determined, the detection sensitivity reached to 10 pg, all the specific primers amplified bands could be amplified under this sensitivity. **Conclusion** The gene chip technique and multiplex PCR technique can effectively detect foodborne pathogens, which provide a new idea for detecting pathogens with the high-throughput screening and are worth popularization and application in the field of food safety.

Key words: food security; foodborne pathogens; multiplex PCR; gene chip

近年来,随着食品安全恶性事件的频繁发生,食源性疾病已位居各类疾病发病率的前列^[1]。食源性疾病的主要致病微生物为食源性致病菌^[2]。食源性致病菌主要包括沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、志贺氏菌和空肠弯曲杆菌等,是严重危害人类健康和食品安全的主要因素^[3]。如何快速地鉴定食源性致病菌是有效防控此类疾病的前提条件。本文采用基因芯片技术和多重 PCR 技术检测食源性致病菌,旨在提高目前食源性致病菌的检测效率,报道如下。

1 材料与方法

1.1 基因芯片技术

1.1.1 试剂 10% SDS、20×SSC、TE 缓冲液、1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)、10×PBS、芯片预杂交液、50×TAE 贮存液和芯片洗液均参照配方配制。基因芯片购自华大基因公司。

1.1.2 仪器 PCR 扩增仪 (Bio-Rad, 美国)、分光光度计 (Nanodrop Technologies, 美国)、芯片点样仪 (GeneMachines, 美国)、荧光扫描仪 (Axon Instruments, 美国) 和晶芯多样品芯片围栏 (博奥生物有限公司, 北京)。

1.1.3 实验菌株 志贺氏菌、沙门氏菌、肺炎克雷伯菌、布鲁氏菌、奇异变形菌、金黄色葡萄球菌和空肠弯曲菌等标准菌株购自中国医学细菌保藏管理中心,具体详见表 1。

表 1 标准菌株及其标号

序号	菌种	菌株编号	拉丁名
1	志贺氏菌	12022	Shigella
2	沙门氏菌	43975	salmonella
3	肺炎克雷伯菌	CMCC (B) 46114	Klebsiella pneumoniae
4	布鲁氏菌	210301	Brucella
5	奇异变形菌	CMCC (B) 49003	Proteus mirabilis
6	金黄色葡萄球菌	11632	staphylococcus aureus
7	产气肠杆菌	CMCC (B) 45103	enterobacter aerogenes
8	弗氏枸橼酸杆菌	CMCC (B) 48016	Citrobacter freundii
9	空肠弯曲菌	33560	campylobacter jejuni
10	蜡样芽孢杆菌	51189	Bacillus cereus

1.1.4 方法 设计细菌通用引物,生物素标记反向引物 5' 端(上海超世生物技术有限公司合成)和氨基基团标记寡核苷酸探针 5' 端(上海超世生物技术有限公司合成)。采用试剂盒进行样本 DNA 提取,参照试剂盒说明书进行操作。取合成的探针和点样液加于 384 孔板中点样,参数按照说明书设置。芯片水合 30 min 后,自然干燥。0.2% SDS 冲洗掉未结合的 DNA,晾干后待用。不对称双重 PCR 扩增,具体反应条件如下:94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 56 °C 1 min, 72 °C 1 min, 循环 35 次。PCR 结束后,取杂交液与 PCR 产物混匀,加入芯片点制探针区域,放入杂交盒中滴水保湿,之后水浴 1 h。洗液漂洗 3 次,加入 POD 作用 10 min,再加入 TMB 避光显色 5 min。观察结果。

1.2 多重 PCR 技术

1.2.1 试剂 培养基、rTaqDNA 聚合酶、PCR 缓冲液、dNTP、MgCl₂ 购自宝生物工程(大连)有限公司。TE 缓冲液:1 mmol/L EDTA (pH 8.0) 和 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0),高温灭菌后保存于 4 °C 冰箱。上样缓冲液:40% 蔗糖水溶液和 0.25% 溴酚蓝。

1.2.2 仪器 PCR 扩增仪(Bio-Rad,美国)、移液器(RAIN-IN,美国)、制冰机(博尔晟制冷有限公司,无锡)、超纯水系统(MILLIPORE,美国)、恒温混匀器(黑马医学仪器有限公司,珠海)、涡旋振荡器(凌初环保仪器有限公司,上海)、恒温培养箱(Thermo Scientific,美国)和微量离心机(贺默仪器科技有限公司,上海)。

1.2.3 方法 Mg²⁺ 浓度、引物浓度和退火温度对试验影响较大,因此首先进行单因素优化试验,以提高扩增效率。在引物浓度 0.4 μmol/L,退火温度 56 °C 条件下,Mg²⁺ 浓度设置为 1.5、2.0、2.5、3.0 和 3.5 mmol/L。在 Mg²⁺ 浓度 1.5 mmol/L,退火温度 56 °C 条件下,引物浓度设置为 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 μmol/L。在 Mg²⁺ 浓度 1.5 mmol/L,引物浓度 0.4 μmol/L 条件下,退火温度设置为 55.0、55.5、56.0、56.5、57.5、58.0 和 58.5 °C。食源性致病菌在 37 °C 恒温培养箱中培养 10 h 后提取 DNA,反应体系中分别加入 2 μL 10×PCR 缓冲液、25 mmol/L dNTP、MgCl₂、引物、1 μL DNA 模板和 2.5 U rTaq DNA 聚合酶,反应总体积为 50 μL。设置 PCR 扩增条件为:首先 94 °C 预变性 5 min,之后 94 °C 30 s,56 °C 30 s,72 °C 30 s 循环 30 次,结束后再进行 72 °C 延伸 10 min,4 °C 保存。

2 结 果

2.1 基因芯片杂交结果 由表 2 结果可知,基因芯片技术可以同时检测志贺氏菌、沙门氏菌、肺炎克雷伯菌、布鲁氏菌、奇异变形菌、金黄色葡萄球菌和空肠弯曲菌等多种病原菌,操作简便,特异性强。细菌纯培养物灵敏度为 5.0 × 10² CFU/mL, DNA 检测灵敏度为 0.1 pg,检测分离菌株符合率为 100%,见表 2 和图 1。

表 2 基因芯片杂交结果

致病菌	基因芯片阳性/细菌培养阴性		合计
	细菌培养阴性	细菌培养阳性	
志贺氏菌	4	0	4
副溶血弧菌	9	2	11
金黄色葡萄球菌	9	2	11
大肠杆菌	3	0	3
阴性结果	6	0	6
合计	31	4	35

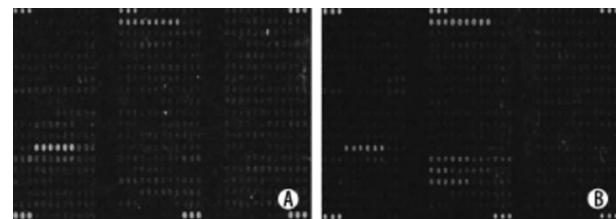


图 1 基因芯片检测结果

2.2 多重 PCR 技术检测结果 利用引物建立和优化了 PCR 检测体系,分别确定了 Mg²⁺ 浓度和退火温度 Tm 值为 1.5 mmol/L 和 56 °C,检测灵敏度达到 10 pg,此灵敏度下可扩增出全部特异性引物条带,见图 2。

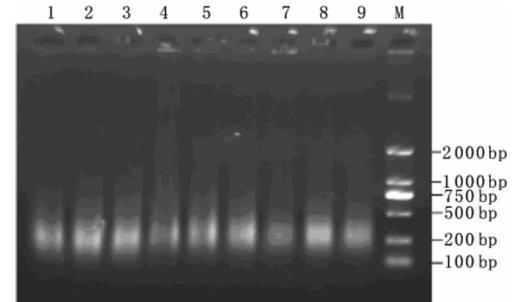


图 2 细菌随机扩增产物电泳结果

3 讨 论

食品安全与人类健康息息相关,受到全世界的高度关注。影响食品安全的一个重要因素就是由病原微生物引起的食源性疾病^[4]。食源性致病菌在全世界范围内危害巨大。因此,如何快速鉴定病原菌,同时有效防控病原传播是防止食物中毒的重要前提。传统的致病菌检测技术周期长,步骤繁琐,不能实时监测,因而难以适应现代化的快速检测要求,其他检测方法也难以满足多元化的检测需求^[5]。因此,本文旨在研究多重 PCR 技术和基因芯片技术检测食源性致病菌的效果。

PCR 技术具有特异性强、敏感性高的特点,在食品微生物检测中应用广泛^[6]。尤其是近年来出现了一种可同时检测多种病原菌的检测方法—多重 PCR 技术。多重 PCR 是一种新型 PCR 技术,在常规 PCR 基础上加入多对引物同时扩增多条目的 DNA 片段,因而可检测多种病原微生物^[7]。多重 PCR 具有诸多优势:(1)高效性:一次检测多种病原微生物;(2)准确性:与单重 PCR 相比可检查漏检的发生;(3)系统性:适合于检测成组病原微生物。正因为其高效、经济、简便的特点广泛应用于食品检测。研究显示,采用多重 PCR 技术检测大肠杆菌、沙门氏菌和李斯特菌,增菌后检测其灵敏度达到 40 CFU/kg。此外,有学者根据金黄色葡萄球菌 nuc 基因序列、沙门氏菌 invA 基因序列以及大肠杆菌 phoA 基因序列设计 3 对特异性引物,多重 PCR 检测显示 DNA 敏感性为 102.0 pg 和 10.2 pg、10.2 pg。但是,多重 PCR 技术也有一些不足,尤其是污染问题,当有极少量外源性 DNA 污染,即出现假阳性结果。另外,若条件控制不当,在扩增多对引物时还会出现非特异性产物。靶序列选择不恰当或引物设计不合理都会降低灵敏度。

基因芯片技术是一种全新的微量分析技术,通过微电子和微加工技术将大量基因片段高密度、有序地排列在载体(纤维膜、玻璃片)上的一种信息检测芯片^[8-9]。基因芯片技术特异性强,快速简便,可高通量并行检测。因而,近年来用于食品常见致病菌检测的研究报道有很多^[10]。研究人员通过基因芯片技术检测伤寒杆菌、大肠埃希菌和空肠弯曲菌(下转第 922 页)

问题,另一方面也可弥补游离核心抗原表达时间短的固有缺陷,这对于血透患者而言显然具有独特的应用价值。

根据本研究的结果显示,在抗体阴性组中发现了 3 例抗原阳性标本和 4 例 RNA 阳性标本,可以推断这种情况的出现还是因为血透患者抗体检测窗口期延长所造成的;而在对于 RNA 阳性标本的 Ab、Ag、Ab+Ag 3 种检测方案的检出率比较中显示联合检测的方案检出率最高,说明联合检测可提高 HCV 感染的检出率,其中有 1 例的漏检,可能其对于 RNA 低拷贝数的标本还有检出能力缺陷。在对 Ag 阳性标本 S/CO 值与 RNA 拷贝数的相关性分析中,发现二者存在显著的正相关关系,说明 HCV-Ag 的检测在一定程度上具备了用于早期现症感染诊断的临床价值,可作为 Ab 已表达阳性血透患者 HCV 再次感染的监测指标,当然检测的频率应相应增加。在将 58 例 Ab 阳性标本分为 RNA 阳性与阴性组后,进行 S/CO 值的组间均数比较时未发现显著差异,其量值变化无规律可循,也证实了 Ab 水平的高低无法区分 HCV 现症感染还是既往感染。

综上所述,对于免疫力低下或被抑制的血透患者而言,在使用 HCV 抗原抗体联合检测时可有效弥补在单测抗体时因其抗体检测窗口期延长造成漏检的不足,有助于提高 HCV 感染的检出率并缩短窗口期,降低患者之间的交互感染的潜在风险,同时对于已检出抗体阳性的患者可作为监测其再次感染 HCV 的指标之一。我们认为,这些发现对于没有条件开展核酸检测的基层医院来说具有显著的临床应用价值。

参考文献

- [1] Masao O, Tatsuo K, Ming-Lung Y, et al. APASL Consensus Statements and Management Algorithms for Hepatitis C Virus Infection[J]. Hepatol Int, 2012, 6(4): 409-435.
- [2] 中华医学会肝病学分会,中华医学会传染病与寄生虫病学分会.

(上接第 919 页)

等,结果显示其灵敏度高于传统方法,同时节省时间,极大提高了诊断效率。另有研究显示,采用基因芯片技术检测水中常见致病菌,其敏感性可高达 5.6×10^5 个/mL。但是,基因芯片仍有诸多需要改进的地方,包括简化样品制备过程、提高检测特异性和建立标准化程序等。

本研究结果显示基因芯片技术可以同时检测多种病原菌,操作简便,特异性强。细菌纯培养物灵敏度为 5.0×10^2 CFU/mL,DNA 检测灵敏度为 0.1 pg。优化了多重 PCR 检测体系,确定了 Mg²⁺ 浓度和退火温度 Tm 值为 1.5 mmol/L 和 56 °C,检测灵敏度达到 10 pg,此灵敏度下可扩增出全部特异性引物条带。Mg²⁺ 浓度为 1.5 和 2.0 mmol/L 时,均可得到一条清晰的扩增条带,为防止出现非特异性扩增条带,选用低值 1.5 mmol/L。除引物浓度、Mg²⁺ 浓度和模板浓度外,退火温度也十分重要,决定着 PCR 的特异性和产量,本研究确定 56 °C 时得到的目的片段最为理想。但是,在今后实际样品检测时还应根据样品情况适当调整反应条件。综上所述,多重 PCR 技术和基因芯片技术可有效检测食源性致病菌,为高通量筛查检测病原菌提供了新思路。

参考文献

- [1] 徐君飞,张居作. 2001~2010 年中国食源性疾病暴发情况分析

丙型肝炎防治指南[J]. 中华内科杂志, 2004, 43(5): 551-555.

- [3] 中华人民共和国卫生部. 卫生部发布 2012 年 1 月及 2011 年度全国法定传染病疫情概况[EB/OL]. 2012. <http://www.moh.gov.cn/publicfiles/business/htmlfiles/mohjbyfkzj/s3578/201202/54106.htm>
- [4] Cano H, Candela MJ, Lozano ML, et al. Application of a new enzyme-linked immunosorbent assay for detection of total hepatitis C Virus core antigen in blood donors[J]. Transfus Med, 2003, 13(2): 259-266.
- [5] Raker CA, Tabor E, Okayama A, et al. HCV core antigen as an alternative to NAT to detect HCV viremia[J]. Transfusion, 2004, 44(2): 307-308.
- [6] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 406-408.
- [7] Deterding K, Wiegand J, Gruner N, et al. The German Hep-Net acute hepatitis C cohort: impact of viral and host factors on the initial presentation of acute hepatitis C virus infection[J]. Z Gastroenterol, 2009, 47(5): 531-540.
- [8] 李行勇. 血液透析患者 HCV 感染率与输血的关系[J]. 实用医技杂, 2005, 12(1): 69-71.
- [9] 杨朝国,陈川. 丙型病毒性肝炎感染的实验室检测及临床应用[J]. 国外医学临床生物化学与检验医学分册, 2004, 25(4): 379-381.
- [10] 朱阳泉,徐长根,李浩. 丙型肝炎病毒及其检测的实验研究进展[J]. 中国输血杂志, 2007, 20(5): 427-429.
- [11] Moreiral RC, Lemos ME, Longui CA, et al. Hepatitis C and Hemodialysis: A Review[J]. Braz J Infect Dis, 2005, 9(3): 269-275.
- [12] 许方,李晓兰,祝琳. 丙肝病毒核心抗原检测对于丙型肝炎诊断的价值[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(5): 713-715.

(收稿日期:2014-12-08)

[J]. 中国农学通报, 2012, 28(2): 313-316.

- [2] 樊永祥,刘秀梅,鲍一丹. 餐饮业引发食源性疾病的主要危险因素[J]. 中华预防医学杂志, 2011, 45(6): 543-546.
- [3] 姜侃,张东雷,金燕飞,等. 四种食源性致病菌多重 PCR 检测方法的建立[J]. 卫生研究, 2011, 40(6): 761-764.
- [4] 李宁,杨大进,郭云昌,等. 我国食品安全风险监测制度与落实现状分析[J]. 中国食品学报, 2011, 11(1): 5-8.
- [5] 封莉,黄继超,刘欣,等. 食源性致病菌快速检测技术研究进展[J]. 食品科学, 2012, 33(2): 332-339.
- [6] 宋艳,李建林,郑铁松. 食源性致病菌 PCR 检测中常用的靶基因及其参考引物[J]. 食品工业科技, 2011, 3(1): 97-99.
- [7] 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, 28(3): 308-313.
- [8] 高兴,曲险峰,孙伟,等. 多种食源性致病菌的基因芯片检测技术[J]. 解放军医学杂志, 2012, 37(8): 765-769.
- [9] 任莉莉,从彦丽. 用于食源性疾病病原菌诊断的基因芯片研究及评价[J]. 食品科学, 2011, 32(2): 208-211.
- [10] 魏子淏,李汴生. 食源性致病微生物的快速检测方法及其研究现状[J]. 现代食品科技, 2013, 29(4): 438-442.

(收稿日期:2014-11-18)