食品中单核细胞增生性李斯特氏菌PCR快速检测

张 辉[1,2]，王兴龙[2,*]
(1.吉林大学农学部畜牧兽医学院，吉林 长春 130062；
2.军事医学科学院军事兽医研究所，吉林 长春 130062)

摘 要：通过扩增*hly*基因建立检测单核细胞增生性李斯特氏菌(*Lm*)的PCR方法。该方法具有较强的特异性，35株经传统方法鉴定的菌株PCR结果均为阳性，而其他三种同属异种菌，包括英诺克李斯特氏菌、绵羊李斯特氏菌和威尔斯李斯特氏菌及非李斯特氏菌均未扩增出特异性的片段。PCR方法对*Lm*纯培养物的最低检测限为7.3CFU/μl，对模拟污染的生猪肉和蔬菜的检测低限为4CFU/g，牛奶为4CFU/ml。应用该方法对285份食品样品检测，17份样品*Lm*呈阳性，结果与常规的分离培养方法完全一致。该种方法具有敏感、特异、快速及准确的优点，可用于食品中*Lm*的快速检测。

关键词：食品；单核细胞增生性李斯特氏菌；聚合酶链式反应；检测

Rapid Detection of *Listeria monocytogenes* in Food by PCR

ZHANG Hui[1,2], WANG Xing-long[2,*]
(1.College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China;
2.Military Veterinary Institute, Academy of Military Medical Sciences of PLA, Changchun 130062, China)

Abstract: A polymerase chain reaction (PCR) assay targeting the *hly* gene was developed to detect *Listeria monocytogenes*. The PCR product was detected in 35 *L monocytogenes* strains and not in other *Listeria* spp, including *innocua*, *ivanovii* and *welshimer* and also not in non-*Listeria* species, indicating that this method was highly specific for *L. monocytogenes*. The detection limit of the PCR assay was 7.3 CFU/μl of pure cell culture. The PCR assay could detect 4 CFU of *L. monocytogenes* in the contaminated pork and vegetable (1g) and milk (1ml). From 285 samples, 17 samples were proved positive for *L. monocytogenes* by the PCR method, and the results were quite consisted with those detected by conventional biochemical testing. The PCR assay is highly sensitive, specific, rapid and accurate and can be used for rapid detection of *L. monocytogenes* in food.

Key words: food; *Listeria monocytogenes*; PCR; detection
中图分类号：TS207.4 文献标识码：A 文章编号：1002-6630(2008)04-0324-04

单核细胞增生性李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*，*Lm*)，是一种重要的人兽共患病病原体，也是最为常见的食源性病原菌。WHO将其列为20世纪90年代食品中四大致病菌之一[1]。该菌在自然界中分布广泛，极易污染食品而引起食物中毒和李氏杆菌病的暴发。长期以来，*LM*的检验方法一直为常规的分离培养法，该种方法操作复杂，检测周期长，不能满足快速检测的要求[2]。免疫学检测方法具有操作简单，检测通量大的优点，但是由于该菌与同属异种菌具有交叉抗原，因而免疫学方法不能进行李斯特氏菌种间特异性鉴定[3]。因此需要建立一种快速、敏感、特异的检测方法，以加强食源性*LM*的检测及监测，避免由该菌引起的食物中毒事件的发生。本研究通过PCR方法扩增*hly*基因710bp片段，快速检测食品中单增李氏菌。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 供试菌种与试剂

LM标准菌株(54002)、金黄色葡萄球菌(26001)、大

收稿日期：2007-04-08
作者简介：张辉(1973-)，女，兽医师，博士，研究方向为分子免疫学。E-mail：huizhang01525@163.com
*通讯作者：王兴龙(1959-)，男，教授，研究方向为分子免疫学。E-mail：wangxl-2006@163.com

肠埃希氏菌(44102)、肠炎沙门氏菌(50041)、蜡样芽孢杆菌(63301)和痢疾志贺氏菌(51252)标准菌株　中国药品生物制品检定所；35 株 LM、1 株英诺克李斯特氏菌、1 株绵羊李斯特氏菌及 2 株威尔斯李斯特氏菌　本实验室分离保存。

Ex Taq DNA 聚合酶、DL2000 标样　TAKRA 公司；胰酪胨大豆酵母浸膏肉汤(TSB)及胰酪胨大豆酵母浸膏琼脂(TSA)　北京陆桥有限公司；OXA 牛津琼脂　法国梅里埃公司。

1.1.2　样品

肉制品、乳制品、水产品、蔬菜和冷饮等市购。

1.1.3　仪器

TGRADIENT 96阶梯PCR仪　德国Whatman Biometra 公司；MUVB-20 凝胶成像系统　美国 Bio-Rad 公司。

1.2　方法

1.2.1　细菌 DNA 的提取

采用碱裂解法[4]。取培养于 TSA 血平板上的菌落混悬于裂解液中(含 0.05mol/L NaOH、0.0125% SDS、0.001mol/L EDTA、0.01mol/L Tris-HCl)，充分振荡混匀，置 100℃水浴 15～20min，冷却至室温后，分别用等体积的酚/氯仿/异戊醇及氯仿抽提 2 次，加入 2 倍体积的预冷无水乙醇充分混匀后室温沉淀 10min，离心后用 5 倍体积预冷 70% 乙醇洗涤 2 次，室温放置 5min，用二馏水溶解 DNA，4 ℃保存备用。

1.2.2　PCR 引物和扩增条件

引物序列为 hlyA-1：5′，-CATTAGTGGAAAGATGGAATG-3′，hlyA-2：5′，-GTATCCTCCAGAGTGATCGA-3′，由上海生工生物工程公司合成。PCR 扩增体系溶液体积为 25μl，其中 dH_2O 17.5μl、缓冲液 2.5μl、$MgCl_2$(25mmol/L)1.0μl、dNTPs(2.5mmol/L)2.0μl、hlyA-1 和 hlyA-2(25pmol/μl)各 0.5μl、Taq 酶(5U/μl)0.25μl、模板 DNA1.0μl。 94.0℃预变性 2min；再按 94.0℃变性 1min，60℃退火 1min，72℃延伸 1min，共进行 30 个循环；最后 72℃延伸 5min。PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳，凝胶成像观察结果。

1.2.3　特异性检测

对实验室保存的经传统方法鉴定的 35 株 *Lm* 以及英诺克李斯特氏菌等四株三种同属异种菌进行 PCR 特异性检测。选择金黄色葡萄球菌等五种非李斯特氏菌进行 PCR 特异性验证。

1.2.4　灵敏度检测

将 *Lm* 的 TSB 培养物稀释成不同倍数，对不同稀释倍数的菌悬液进行细菌菌落计数，同时取 200μl 稀释的菌悬液制备模板 DNA，进行 PCR 检测。

1.2.5　干扰实验

分别在 *Lm* 的 TSB 纯培养液中加入终浓度为 10^7CFU/ml 的大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌的肉汤培养液，按照上述 1.2.1 方法提取模板 DNA，进行 PCR 检测。

1.2.6　模拟样品检测

无菌操作分别取 25g 生猪肉、25g 卷心菜和 25ml 牛奶，加入 225ml TSB 增菌液，高速均质 1～2min。将 *Lm* 标准菌株的 TSB 过夜培养液进行 10 倍递增稀释，10 倍稀释于待检试样均质液中，加入抑菌剂丫啶黄素和萘啶酮酸，30℃振荡培养 18h 后，分别取 1ml 菌液，12000r/min 离心 1min，弃上清，将菌体重悬于裂解液中，按照 1.2.1 方法提取模板 DNA。

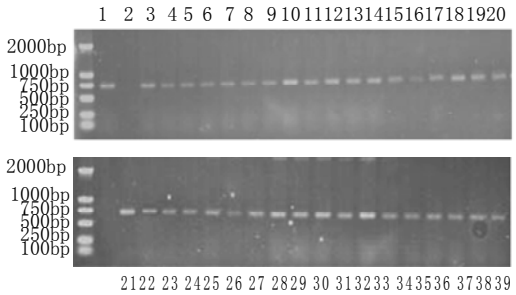
1.2.7　食品样品检测

无菌操作取 25g 供试样品，加入 225ml TSB 增菌液，高速均质 1～2min，30℃培养 24h 后，接种于 OXA 平板，置 35℃培养 24h，选择典型的 *Lm* 菌落进行 PCR 鉴定，并按照 GB4789.30－1994[5]的方法进行生化鉴定。

2　结果与分析

2.1　特异性结果

35 株实验室分离的 LM PCR 检测全部呈阳性，而其它四株三种同属异种菌以及大肠杆菌等五种异属菌均未出现特异条带，电泳结果见图 1 、2 。



M.DL-2000 标样；1.阳性对照；2.阴性对照；3～20.*Lm* 分离株；21.阴性对照；22.阳性对照；23～39.*Lm* 分离株。

图 1　*Lm* 分离株 PCR 结果

Fig.1　PCR result of isolated strains of *Lm*

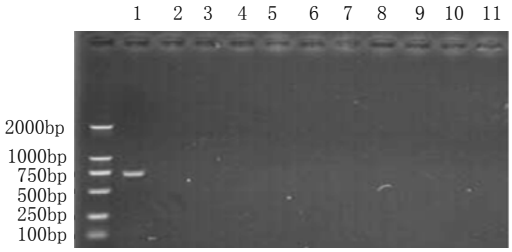
2.2　灵敏度结果

将 LM 的 TSB 过夜培养物进行不同倍数稀释，进行 PCR 检测，结果如图 3 所示，菌液浓度为 69.5、43.6、27.2、12.0、7.3 CFU/μl 均可扩增出目的条带，PCR 检测的最低菌悬液浓度为 7.3 CFU/μl。

2.3　干扰实验结果

在大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌的干扰下，仍能特异的扩增出目的条带，表明所建立的方法不受其他杂菌干扰。

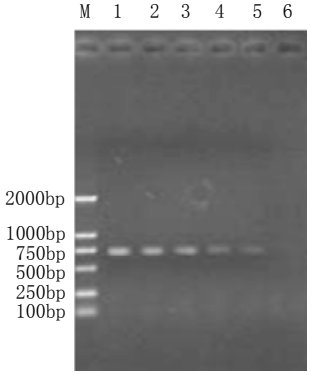
2.4　模拟样品结果



M.DL-2000 标样；1.阳性对照；2.阴性对照；3.英诺克李斯特氏菌；4.绵羊李斯特氏菌；5～6.威尔斯李斯特氏菌；7.金黄色葡萄球菌；8.大肠艾希氏菌；9.肠炎沙门氏菌；10.蜡样芽孢杆菌；11.痢疾志贺氏菌。

图2 同属异种菌及非李斯特氏菌特异性实验结果

Fig.2 Specificity results of other *Listeria* spp and non-*Listeria* species



M.DL-2000 标样；1.69.5CFU/μl；2.43.6CFU/μl；3.27.2CFU/μl；4.12.0CFU/μl；5.7.3CFU/μl；6.6.4CFU/μl。

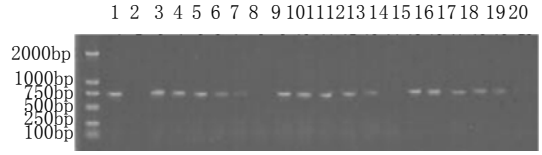
图3 PCR灵敏度试验结果

Fig.3 PCR result of sensitivity

*Lm*的TSB过夜培养物的起始菌量为10^8CFU/ml，实验结果如图4所示，污染的生猪肉和卷心菜样品，添加稀释倍数为10^{-5}的菌悬液(相当于样品染菌浓度为4CFU/g)仍可检出*Lm*，污染牛奶样品的最低检出限达4CFU/μl。

2.4 食品样品检测结果

285份食品样品增菌后，分别用新建PCR方法和常规方法进行平行比对实验，实验结果如表1所示，285份食品样品，17份样品为*Lm*阳性，阳性率为5.96%，检测结果与常规方法完全一致。



M.DL-2000 标样；1.阳性对照；2.阴性对照；3～8.猪肉模拟样品，菌液浓度依次为4×10^4、4×10^3、4×10^2、4×10、4和0.4CFU/g；9～14.卷心菜模拟样品，菌液浓度依次为4×10^4、4×10^3、4×10^2、4×10、4和0.4CFU/g；15～20.牛奶模拟样品，菌液浓度依次为4×10^4、4×10^3、4×10^2、4×10、4和0.4CFU/ml。

图4 模拟样品PCR检测结果

Fig.4 PCR results of simulative samples

表1 285份食品检测结果

Table 1 Detection results of 285 food samples

种类	数量	阳性数	
		PCR方法	传统生化鉴定方法
猪肉	20	1	1
牛肉	10	0	0
禽类	135	12	12
熟食	50	4	4
水产品	20	0	0
乳及乳制品	20	0	0
蔬菜	20	0	0
冷饮	10	0	0
合计	285	17	17

3 讨 论

*Lm*是引起人和动物的脑膜炎、败血症及流产等疾病的食源性病原体。发病率虽低但临床死亡率高达30%[6]。以*Lm*通过食品感染的病例在欧美国家经常发生[7-9]。到目前为止，我国还未见有食源性*Lm*感染人的报道，但食品中污染率较高。2001年上海市食品中污染率达8.28%[10]，2004年扬州市市售散装熟食*Lm*检出率为13.06%[11]。由*Lm*引起的食源性感染及其疾病日益引起世界各国的重视，对此病原进行快速准确的检测势在必行。

*Lm*的毒力由多种基因决定的，主要有*hly*基因、*inl*基因、*prfA*基因、*mpl*基因及*actA*基因等。李氏杆菌溶血素为*Lm*的主要致病因子，由*hly*基因编码[12]，hly基因在*Lm*中是保守的，是致病性李斯特氏菌的毒力标志基因[13-14]。利用*hly*基因可特异的检测食品中的*Lm*[15]，本试验选取*Lm hly*基因作为扩增靶序列，建立PCR方法检测*Lm*。通过对英诺克李斯特氏菌、绵羊李斯特氏菌及威尔斯李斯特氏菌三种同属异种菌检测结果表明，该种方法具有较强的特异性，可用于李斯特氏菌种的鉴定。

用所建立的PCR方法与常规方法对不同食品样品进行平行比对试验，两种方法检测结果完全一致，新建立的PCR法用于检测食品中的*Lm*结果准确、可靠。采用PCR方法可快速检测食品中*Lm*，整个检测过程只需24h，而常规培养方法需要5～10d，PCR方法大大缩短了检验鉴定周期，更加适合于食品快速检测的需要。本实验建立的食品中单增李氏菌的PCR检测方法操作简便，特异性强，敏感性高，检测周期短，对食品中*Lm*的检测具有较高的使用及推广价值，有望替代传统分离鉴定方法，在食品快速检验中得以应用。

参考文献：

[1] 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.

[2] 寇运同, 马洪明, 刘晨光. 用PCR 技术快速检测食品中的单核细胞增生性李斯特菌[J]. 食品科学, 2001, 22(5): 52-55.

[3] 巢国祥, 徐勤, 周晓辉, 等. 单核细胞增生性李斯特菌PCR快速检测方法建立及应用[J]. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20(9): 797-800.

[4] KARPISLOVA R. Application of a chromogenic medium and the PCR method for the rapid confirmation of *L. monocytogenes* in foodstuffs[J]. Journal of Microbiological Methods, 2000, 41: 267-271.

[5] GB4789. 30—94单核细胞增生性李斯特氏菌的检测方法[S].

[6] GUILBAUD M, COPPET P, BOURION F, et al. Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in biofilms by real-time PCR[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(4): 2190-2194.

[7] DE VALK H, VAILLANT V, JACQUET C. Two consecutive nation-wide outbreaks of *Listeriosis* in France, October 1999-February 2000[J]. Am J Epidemiol, 2001, 154(10): 944-950.

[8] DAWSON S, EVANS M, WILLBY D. *Listeria* outbreak associated with sandwich consumption from a hospital retail shop, United Kingdom [J]. Euro Surveill, 2006, 11(6): 89-91

[9] BILLE J, BLANC D, SCHMID H. Outbreaks of human *Listeriosis* associated with tome cheese in northwest Switzerland, 2005[J]. Euro Surveill, 2006, 11(6): 91-93.

[10] 陈敏, 王颖, 顾其芳. 食品中单核细胞增生李斯特氏菌快速检测方法的研究[J]. 上海预防医学杂志, 2002, 14(5): 210-211.

[11] 巢国祥, 徐勤, 周晓辉, 等. 市售熟食单核细胞增生李斯特菌流行病学分析[J]. 中国人兽共患病杂志, 2005, 21(9): 793-796.

[12] CHOI W S, HONG C H. Rapid enumeration of *Listeria monocytogenes* in milk using competitive PCR[J]. International Journal of Food Microbiol, 2003, 84(1): 79-85

[13] AZNAR R, ALARCON B. PCR detection *Listeria monocytogenes*: a study of multiple factors affecting sensitivity[J]. Appl Microbiol, 2003, 95 (5): 958-966.

[14] 任艳红, 李一经, 王新生, 等. 单核细胞增生性李斯特氏菌溶血素基因克隆及序列分析[J]. 东北农业大学学报, 2004, 35(1): 46-48.

[15] KLEIN P G, JUNEJA V K. Sensitive detection of viable *Listeria monocytogenes* by reverse transcription-PCR[J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63: 4441-4448.