

水产品中4种常见致病菌多重PCR检测方法的建立及评价

翁思聪, 朱军莉, 励建荣*

(浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江工商大学食品研究院,
浙江省食品安全重点实验室, 浙江 杭州 310012)

摘要: 根据金黄色葡萄球菌的耐热核酸酶基因 *nuc*、沙门氏菌的侵袭蛋白基因 *invA*、志贺氏菌的侵袭性质粒抗原 H 基因 *ipaH* 和副溶血性弧菌的毒力表达调控基因 *toxR* 设计引物, 建立一种快速检测水产品中上述 4 种常见食源性致病菌的多重 PCR 方法。结果显示, 沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、志贺氏菌及副溶血性弧菌的多重 PCR 扩增片段产物大小分别为 549、426、348 和 243 bp, 该检测方法具有良好的特异性和灵敏度。设计优化了可用于水产样品中 4 种目标致病菌的共增菌培养基, 该方法应用于 35 份实际水产样品的检测, 并与国标方法对比验证, 4 种致病菌的整体符合率达 94% 以上, 两种检测方法无显著性差异 ($P > 0.05$)。可见, 该多重 PCR 方法可应用于水产品中沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌及志贺氏菌 4 种食源性致病菌的快速检测和分子流行病学调查。

关键词: 食源性致病菌; 多重 PCR; 水产品; 检测

中图分类号: X 836; S 917

文献标识码: A

近几年我国水产品消费量不断上升, 而水产品在水产养殖、捕捞、储藏、加工、运输、销售等环节容易受到病原微生物的污染^[1], 因此病原微生物检测是水产品及其加工品卫生检测中的一项重要工作, 关系到消费者的健康及生命安全。其中沙门氏菌、金黄色葡萄球菌 (*Escherichia coli*)、副溶血性弧菌和金黄色葡萄球菌被认为是重要的污染水产品的致病菌^[2-6], 已引起各个国家卫生检测部门的广泛重视。我国标准 DB11/519-2008《生食水产品卫生要求》规定沙门氏菌 (*Salmonella* spp.)、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、志贺氏菌 (*Shigella* spp.) 等不得检出。严格的食品微生物检验是保障食品安全的重要环节。然而, 传统致病菌检测方法检测时间长, 一般检测周期在 5~10 d, 检测程序繁琐, 工作量大, 很难适应现代化食品安全快速检测的需要, 因此亟需建立一种操作简便、快速准确、灵敏

度和特异性都较高的现代化检测方法。

分子生物学检测技术的发展为病原微生物快速检测提供了良好的技术平台, 如基因探针^[7]、NASBA^[8] (核酸序列依赖性扩增法)、ATP 生物发光法^[9] 以及 PCR 等技术已逐渐被研究并完善以用于病原微生物的检测当中。其中多重 PCR (multiplex-PCR) 技术不同于传统 PCR 技术只能检测单一靶基因, 其是通过在同一 PCR 反应体系里加入多对特征引物, 同时扩增出多个目标核酸片段的 PCR 反应, 可用于多种病原微生物的同时快速检测或鉴定^[10-12]。GERMINI 等^[13] 根据沙门氏菌的 *invA* 基因, 单核细胞增生李斯特菌的 *prfA* 基因, 大肠杆菌 O157:H7 的 *eaeA* 基因以及细菌的 16S rRNA 基因设计引物, 应用多重 PCR 技术对全蛋液进行测定, 特异性地检出上述菌种, 灵敏度高, 检测效果稳定。国内陈伟等^[14] 对肉品中的沙门氏菌、志贺氏菌及大肠杆菌 O157:H7 3 种致病菌建立了多重 PCR 检测体系, 检测灵敏度

收稿日期: 2010-09-25 修回日期: 2010-11-20

资助项目: 浙江省科技厅重大科技专项与优先主题项目 (2009C03017-5); 国家“八六三”高技术研究发展计划 (2007AA091806)

通讯作者: 励建荣, Tel: 0571-88056656, E-mail: lijianrong@zjgsu.edu.cn

可达 1 CFU/mL,可在 24 h 内完成检测工作,并集成了快速检测试剂盒。

本研究旨在利用多重 PCR 技术系统地建立水产品及其加工制品中沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌和志贺氏菌 4 种常见食源性致病菌的快速检测方法,为水产品微生物检测及安全控制行业提供一种快速准确、高效经济的检测手段。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

菌株 甲型副伤寒沙门氏菌 (*Salmonella paratyphi* A), CMCC50093, 中国医学细菌保藏管理中心; 福氏志贺氏菌 (*Shigella flexneri*), ATCC12022、金黄色葡萄球菌, ATCC6538、副溶血性弧菌, ATCC17802, 中国普通微生物菌种保藏管理中心; 鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、柠檬色葡萄球菌 (*Staphylococcus citreus*)、痢疾志贺氏菌 (*Shigella dysenteriae*)、拟态弧菌 (*Vibrio mimicus*)、河弧菌 (*Vibrio fluvialis*)、创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*)、溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、阪崎肠杆菌 (*Enterobacter sakazakii*)、侵袭性大肠埃氏杆

菌 (*Enteroinvasive Escherichia coli*)、大肠杆菌 O157 (*Escherichia coil* O157), 均为实验室分离株。

试剂 Taq DNA 聚合酶, 10 × PCR Buffer, MgCl₂, dNTP mixture, DL2000 DNA Marker, 大连宝生物工程有限公司; 琼脂糖、Rnase A、Biospin 细菌 DNA 基因组抽提试剂盒、所有培养基及生化鉴定管, 杭州昊天生物技术有限公司; 多重 PCR 引物合成, 上海生工生物工程有限公司。

仪器 微量移液器、Mastercycler gradient PCR 扩增仪, 德国 Eppendorf 公司; Milli-Q 超纯水仪, 美国 MILLIPORE 公司; UV-2500 紫外分光光度计, 日本 SHIMADZU 公司; 高速离心机, 美国 Sigma 公司; 凝胶成像系统, 美国 BIO-RAD 公司; DELTA 320 pH 计, 瑞士 METTLER-TOLEDO 公司。

1.2 方法

多重 PCR 引物设计与合成 选择金黄色葡萄球菌的耐热核酸酶基因 *nuc*、沙门氏菌的侵袭蛋白基因 *invA*、志贺氏菌的侵染性质粒抗原 H 基因 *ipaH*、副溶血性弧菌的毒力表达调控基因 *toxR* 作为特征靶基因, 利用 Primer premier 5.0 及 Oligo 6.0 软件设计 4 对引物。引物由上海生工生物工程公司合成, 序列见表 1。

表 1 目的基因引物序列
Tab. 1 Primer sequences for multiplex-PCR amplification

细菌 pathogenic bacteria	目的基因 target gene	引物序列(5'-3') primer sequence(5'-3')	T_m (°C)	产物大小(bp) product size
沙门氏菌 <i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i>	F-GGTCGTCGTTGGGACTGATTGG	66.1	549
		R-CCGTGGCATGTCTGAGCACTTC	65.1	
贺氏菌 <i>Shigella</i> spp.	<i>ipaH</i>	F-GCTCGAAACGGGCTGTGCTAATG	67.9	348
		R-ACGGTATCGGAAAGCGGTCAA	67.5	
副溶血性弧菌 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>toxR</i>	F-CTGATAACAATGACGCCTCTGCTAAT	63.5	243
		R-TCTGATACTCACCAATCTGACGGAAC	64.7	
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>nuc</i>	F-AACGGCAATACGCAAAGAGG	59.6	426
		R-TATACGCTAAGCCACGTCCATA	58.3	

细菌 DNA 提取 所有菌株分别接种于营养肉汤, 其中副溶血性弧菌需接种于含 3% NaCl 的营养肉汤中, 振荡培养过夜后, 提取细菌 DNA 基因组。其中酚/氯仿抽提法参照《分子克隆实验指南》^[15]; CTAB/NaCl 提取法参考 LEE 等^[16]的方法; 试剂盒法则采用 Biospin 细菌 DNA 基因组抽提试剂盒, 按说明书要求提取。紫外分光光度计测定模板 DNA 的浓度与纯度。

多重 PCR 反应条件的优化 将 4 种菌的 DNA 模板等量混合后, 对影响多重 PCR 反应效果的引物浓度、Mg²⁺ 浓度、Taq 酶浓度以及退火温度这 4 个反应体系条件和参数进行调整和优化, 确定最佳反应条件。

引物特异性的验证 从鼠伤寒沙门氏菌、甲型副伤寒沙门氏菌、福氏志贺氏菌、痢疾志贺氏菌、金黄色葡萄球菌、柠檬色葡萄球菌、副溶

血性弧菌、拟态弧菌、河弧菌、创伤弧菌、溶藻弧菌、枯草芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、阪崎肠杆菌、侵袭性大肠埃氏杆菌、大肠杆菌 O157 中提取 DNA 模板,进行四重 PCR 扩增,检验引物特异性。

多重 PCR 灵敏度的测定 将 4 种目标菌株分别培养至对数期,普通平板计数琼脂(PCA)计数(其中副溶血性弧菌的计数琼脂需加 3% NaCl),将各菌样以 10^8 CFU/mL 等体积混合后,用无菌生理盐水以十倍稀释使菌液从 10^8 CFU/mL 到 10^0 CFU/mL,各梯度取 1 mL 菌液,采用试剂盒提取 DNA 模板,检测多重 PCR 方法的灵敏度。

共增菌培养基的优化 4 种目标致病菌中金黄色葡萄球菌为耐盐菌,副溶血性弧菌为嗜盐菌,而志贺氏菌和沙门氏菌不耐盐。为使 4 种菌能在同一培养体系中正常生长,以提高模板 DNA 提取效率,故在缓冲蛋白胨水(BPW)的基础上,增加营养物质和促进剂,对影响 4 种目标菌能否在同一体系中共同生长的关键因素—NaCl 的浓度进行优化。通过提取不同 NaCl 浓度培养下 4 种菌的总 DNA 模板,进行多重 PCR 扩增,确定最适盐浓度条件。

多重 PCR 方法和国标方法对水产样品的检测 购买杭州文二路农贸市场常见海鲜及浙江省兴业集团有限公司的鱼糜制品共 35 份样品,通过上述优化的共增菌培养基进行前增菌 8 h,提取总细菌 DNA 模板,应用多重 PCR 方法与国标方法 GB/T 4789. 5 - 2003, GB/T 4789. 7 - 2008, GB/T 4789. 10 - 2010, GB/T 4789. 4 - 2010 对上述样品进行检验,通过符合率、敏感性、灵敏性等指标以及显著性差异分析对两种方法进行比较评价。

2 结果与分析

2.1 多重 PCR 反应条件的优化

引物浓度的优化 添加 4 对正反引物(20 μ mol/mL)各 0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 μ L 进行多重 PCR 扩增(图 1-A),结果显示,当引物添加量为 1.2 μ L 时,沙门氏菌和副溶血性弧菌的扩增条带清晰明亮,扩增量适宜;当引物添加量到 1.6 μ L 时志贺氏菌和金黄色葡萄球菌的扩增效果最为理想,而引物浓度过高在凝胶电泳图中表现为条带

过亮过粗,影响结果观察,更会增加错配机率而产生非特异性扩增条带。故沙门氏菌、副溶血性弧菌、志贺氏菌和金黄色葡萄球菌的最适引物添加量分别为 1.2、1.2、1.6、1.6 μ L。

Mg^{2+} 浓度的优化 Mg^{2+} 可以提高引物-模板复合物的稳定性,通过优化 Mg^{2+} 浓度以获得最大 PCR 反应产量。反应体系中的 Mg^{2+} (25 mmol/L) 的添加量依次为 1、1.5、2、2.5、3、3.5、4 μ L,从中优化出适宜 Mg^{2+} 浓度(图 1-B)。结果显示, Mg^{2+} 添加量为 3.5 μ L 时条带明亮清晰,条带之间互不干扰,无拖尾,无非特异性扩增条带,但随着 Mg^{2+} 浓度的增加,会导致非特异性扩增并降低 PCR 的保真性,故确认最适 Mg^{2+} 添加量为 3.5 μ L。

Taq 酶浓度的优化 多重 PCR 反应体系中同时进行多个扩增反应,不同反应之间对 Taq DNA 聚合酶存在竞争,将会使效率相对较低的 DNA 扩增受到抑制。在多重 PCR 体系中加入适量 Taq DNA 聚合酶可以减弱抑制作用。本研究中 Taq 酶(5 U/ μ L)添加量依次递增为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 μ L(图 1-C)。结果显示, Taq 酶添加量为 0.6 μ L 时扩增的条带效果最为理想,而聚合酶浓度过高同样会导致非特异性扩增,故最适酶添加量为 0.6 μ L。

退火温度的优化 退火温度决定 PCR 特异性与产量,退火温度过高会导致引物不能与模板牢固结合, DNA 扩增效率下降;退火温度低, PCR 反应的产量提高,但过低可造成引物与模板错配,易出现非特异性扩增。本研究根据引物-模板复合物解链温度 T_m 的大小设计梯度 PCR 反应程序,退火温度依次为 52.9、54.0、55.2、56.7、58.1、59.6、61.2 $^{\circ}$ C,从中优化出适宜退火温度(图 1-D)。结果显示,退火温度在 58.1 $^{\circ}$ C 时条带最为明亮清楚,表明该温度时多重 PCR 扩增产量最大,且无非特异性扩增。故最适退火温度为 58.1 $^{\circ}$ C。

优化后的多重 PCR 反应体系条件及参数:总反应体系 50 μ L, Mg^{2+} (25 mmol/L) 3.5 μ L, dNTP(各 2.5 mmol/L) 4 μ L, Taq 酶(5 U/ μ L) 0.6 μ L, PCR Buffer 5 μ L, 引物(20 μ mol/L) 沙门氏菌、副溶血性弧菌正反向各 1.2 μ L, 金黄色葡萄球菌、志贺氏菌正反向各 1.6 μ L, DNA 模板 (A_{260}/A_{280} 比值为 1.8 ± 0.1) 各 1 μ L, 灭菌双蒸水

补足 50 μL 。采用冷启动, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 退火 58.1 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。
 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 30 个循环, 终延伸 72

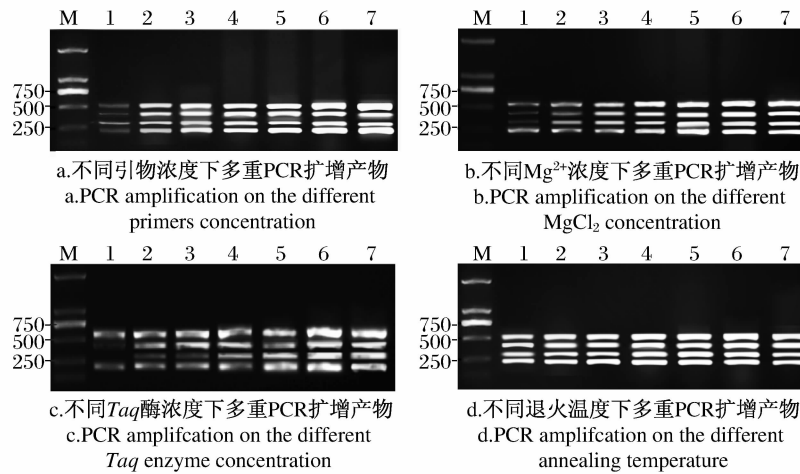


图1 多重PCR反应条件的优化

Fig. 1 Optimization of reaction condition for multiplex-PCR

2.2 多重PCR的引物特异性

对鼠伤寒沙门氏菌、甲型副伤寒沙门氏菌、福氏志贺氏菌、痢疾志贺氏菌、金黄色葡萄球菌、柠檬色葡萄球菌、副溶血性弧菌、拟态弧菌、河弧菌、创伤弧菌、溶藻弧菌、枯草芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、阪崎肠杆菌、侵袭性大肠埃氏杆菌、大肠杆菌 O157 的 DNA 模板进行多重 PCR 扩增(图2)。扩增结果显示, 沙门氏菌在 549 bp

处出现扩增条带, 金黄色葡萄球菌在 426 bp 处出现扩增条带, 志贺氏菌在 348 bp 处出现扩增条带, 副溶血性弧菌在 243 bp 处出现扩增条带, 条带清晰, 无拖尾, 也未发现由于引物二聚体或者错配引起的非特异性扩增条带, 其他细菌 DNA 则均无扩增条带出现, 表明 4 对引物特异性好, 无相互干扰。

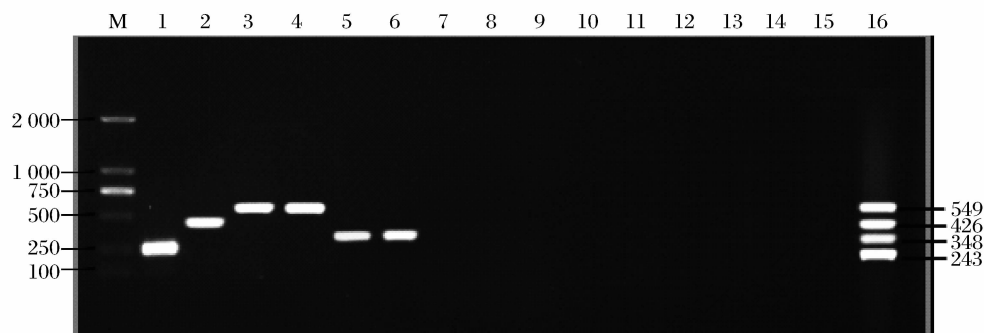


图2 多重PCR检测的特异性

M. DL 2000TM DNA Marker; 1. 副溶血性弧菌; 2. 金黄色葡萄球菌; 3. 甲型副伤寒沙门氏菌; 4. 鼠伤寒沙门氏菌; 5. 痢疾志贺氏菌; 6. 福氏志贺氏菌; 7. 柠檬色葡萄球菌; 8. 拟态弧菌; 9. 创伤弧菌; 10. 河弧菌; 11. 大肠杆菌 O157; 12. 侵袭性大肠埃氏杆菌; 13. 蜡状芽孢杆菌; 14. 阪崎肠杆菌; 15. 阴性对照; 16. 阳性对照。

Fig. 2 The specificity of detection by multiplex-PCR

Lane M. DL 2000TM DNA Marker; 1. *V. parahaemolyticus*; 2. *S. aureus*; 3. *S. paratyphi* A; 4. *S. typhimurium*; 5. *S. dysenteriae*; 6. *S. flexneri*; 7. *S. citreus*; 8. *V. mimicus*; 9. *V. vulnificus*; 10. *V. fluvialis*; 11. *E. coli* O157; 12. Enteroinvasive *E. coli*; 13. *B. cereus*; 14. *E. sakazakii*; 15. negative control; 16. positive control.

2.3 多重 PCR 反应的灵敏度

不同稀释倍数的菌悬液提取 DNA 后进行多重 PCR 扩增(图 3),菌液从 10^8 CFU/mL 稀释至 10^{-6} 倍时,志贺氏菌和金黄色葡萄球菌的 DNA 模板进行扩增后依然出现条带,而稀释至 10^{-7} 倍时无条带出现,可确定该多重 PCR 方法中志贺氏菌和金黄色葡萄球菌的最低检出限为

10^2 CFU/mL;当菌液从 10^{-8} CFU/mL 稀释到 10^{-7} 倍时,沙门氏菌和副溶血性弧菌的 DNA 模板进行扩增后依然出现条带,而稀释至 10^{-8} 倍时无条带出现,可确定该多重 PCR 方法中沙门氏菌和副溶血性弧菌的最低检出限为 10 CFU/mL。

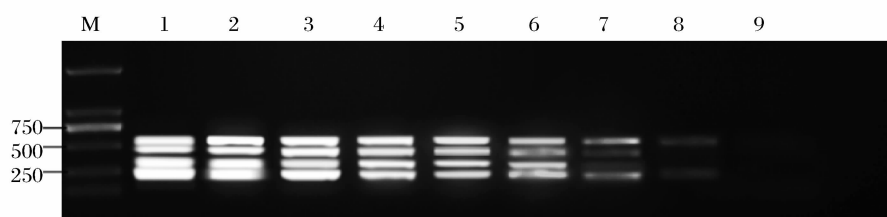


图 3 多重 PCR 检测的灵敏度

M. DL 2000™ DNA Marker; 1~9. 致病菌浓度从 10^8 CFU/mL 到 10^0 CFU/mL。

Fig. 3 The sensitivity of detection by multiplex-PCR

Lane M. DL 2000™ DNA Marker; Lanes 1-9. representative of pathogens concentration from 10^8 to 10^0 CFU/mL.

2.4 共增菌培养基

基于缓冲蛋白胨水(BPW)20 g/L 上,添加酵母浸膏 5 g/L,胰蛋白胨 2 g/L,葡萄糖 1.5 g/L,甘露醇 1 g/L,设计梯度 NaCl 浓度,依次为 1.2%、1.4%、1.6%、1.8%、2.0%,调节 pH 至 7.0 ± 0.2 ,接种 4 种目标菌,振荡培养 4 h 后,进行多重 PCR 扩增(图 4),其中金黄色葡萄球菌为耐盐菌,其生长情况基本不受盐浓度的影响,扩增结果稳定;副溶血性弧菌为嗜盐菌,其在低盐环境下无法正常生长,当 NaCl 浓度低于 1.4% 时无扩增条带出现;志贺氏菌和沙门氏菌均不耐盐,细菌生长随盐浓度增加而受到抑制,并导致 DNA 模板量减少而影响扩增效果,2.0% NaCl 时两种细菌的扩增条带很微弱。可见,在 1.8% NaCl 浓度培养下的 4 种菌均能扩增出较为清晰的条带,说明在该盐浓度下 4 种菌都能较为正常生长,故共增菌培养基中最适 NaCl 浓度为 1.8%。

2.5 多重 PCR 与国标方法对水产品检测结果比较

来自于水产品市场上及水产品加工企业的实际 35 份水产样品同时通过多重 PCR 方法(图 5)以及国标方法进行检测(表 2),其中国标方法检出沙门氏菌阳性样品 23 份,金黄色葡萄球菌阳性样品 14 份,志贺氏菌阳性样品 17 份,副溶血性弧菌阳性样品 24 份;多重 PCR 方法检出沙门氏

菌阳性样品 23 份,金黄色葡萄球菌阳性样品 16 份,副溶血性弧菌阳性样品 24 份,志贺氏菌阳性样品 16 份。

以此进一步评价了建立的多重 PCR 方法在水产品实际样品中的检测效果(表 3)。与食品卫生检验国标方法比较,该多重 PCR 方法对水产样品检测,4 种致病菌的整体符合率达 95% 以上,利用 SPSS 13.0 统计软件进行配对样本 *t* 检验,两种方法无显著性差异($P > 0.05$);检测特异性和敏感性都较高,且具有在一天内同时完成 4 种致病菌的检测的优点,故可应用于大批量水产实际样品的分析。

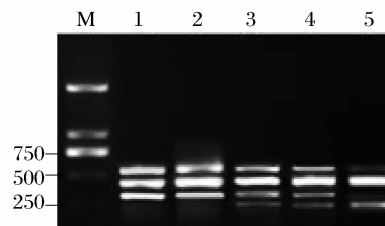


图 4 共增菌培养基 NaCl 浓度的优化

M. DL 2000™ DNA Marker; 1~5. 盐浓度依次为 1.2%、1.4%、1.6%、1.8%、2.0%。

Fig. 4 Optimization of NaCl concentration in the enrichment broth

Lane M. DL 2000™ DNA Marker; Lane 1-5, representative of NaCl concentration of 1.2%, 1.4%, 1.6%, 1.8%, 2.0%.

表 2 水产品中致病菌的国标方法检测结果
 Tab. 2 Results of detection for pathogens from aquatic products by national standard methods

水产样品 seafood samples	菌种检出 the detected bacteria			
	沙门氏菌 <i>Salmonella</i> spp.	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	志贺氏菌 <i>Shigella</i> spp.	副溶血性弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>
1. 虾蛄 <i>mantis shrimp</i>	+	+	-	+
2. 龙虾 <i>lobster</i>	+	+	+	+
3. 褐菖鲉 <i>Sebastes marmoratus</i>	+	-	-	+
4. 鸦片鱼 <i>bastard halibut</i>	-	-	+	+
5. 马鲛 <i>Scomberomorus niphonius</i>	+	-	+	+
6. 鳓 <i>ilisha elongata</i>	+	+	+	+
7. 鲷 <i>Hilsa reevesi</i>	+	-	+	-
8. 橡皮鱼 <i>Navodon septentrionalis</i>	+	+	+	+
9. 大菱鲆 <i>Scophthalmus maximus</i>	+	-	+	-
10. 银鱼 <i>whitebait</i>	+	-	-	+
11. 梭子蟹 <i>portunid</i>	+	-	+	+
12. 海蜇 <i>jelly fish</i>	-	-	-	+
13. 蛏子 <i>razor clam</i>	+	-	+	+
14. 三文鱼 <i>Salmon</i>	+	+	+	+
15. 鲷 <i>Pomfrets</i>	+	-	-	+
16. 鱼糜原料 <i>Surimi raw material</i>	+	+	-	+
17. 鱼丸 <i>fish balls</i>	-	+	-	+
18. 蟹肉棒 <i>crab sticks</i>	-	+	-	-
19. 虾肉卷 <i>shrimp roll</i>	+	+	-	-
20. 鱼肠 <i>fish sausage</i>	-	-	-	-
21. 扇贝 <i>scallops</i>	-	-	-	+
22. 白姑鱼 <i>Argyrosomus argentatus</i>	+	-	-	-
23. 鲐 <i>Pneumatophorus japonicus</i>	+	-	-	+
24. 鱿鱼 <i>squid</i>	+	-	-	+
25. 虾干 <i>dried prawn</i>	-	-	-	-
26. 鳀 <i>Katsuwonus pelamis</i>	+	+	+	+
27. 海瓜子 <i>Ruditapes variegatus</i>	-	-	-	+
28. 秋刀鱼 <i>Cololabis saira</i>	-	-	+	+
29. 三文鱼片 <i>salmon fillets</i>	+	-	-	-
30. 草鱼 <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	+	-	+	-
31. 目鱼卷 <i>squid roll</i>	-	-	-	-
32. 毛蚶 <i>Scapharca subcrenata</i>	+	+	+	+
33. 蟹浆 <i>crab paste</i>	+	-	-	-
34. 小黄鱼 <i>Larimichthys polyactis</i>	-	+	-	+
35. 大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	-	+	+	+

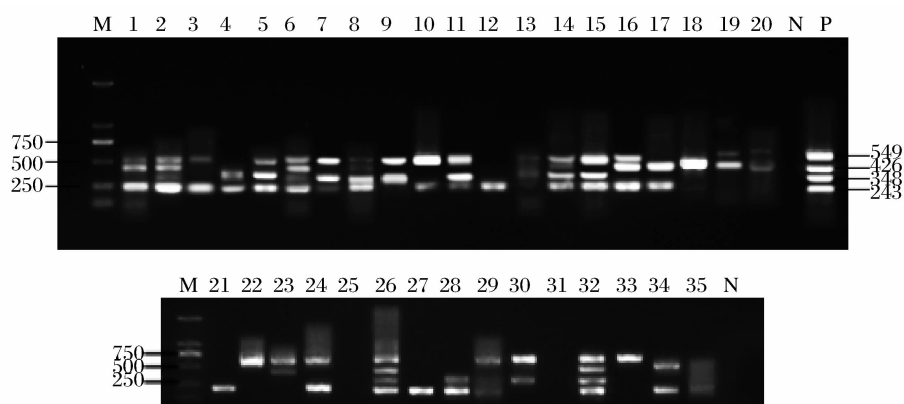


图 5 水产品中致病菌的多重 PCR 检测结果

M. DL 2000™ DNA Marker; 1. 虾蛄; 2. 龙虾; 3. 褐菖鲉; 4. 鸦片鱼; 5. 马鲛; 6. 鳙; 7. 鲷; 8. 橡皮鱼; 9. 大菱鲆; 10. 银鱼; 11. 梭子蟹; 12. 海蜇; 13. 蛭子; 14. 三文鱼; 15. 鲟; 16. 鱼糜原料; 17. 鱼丸; 18. 蟹肉棒; 19. 虾仁卷; 20. 鱼肠; 21. 扇贝; 22. 白姑鱼; 23. 鲈; 24. 鱿鱼; 25. 虾干; 26. 鳗; 27. 海瓜子; 28. 秋刀鱼; 29. 三文鱼片; 30. 草鱼; 31. 目鱼卷; 32. 毛蚶; 33. 蟹浆; 34. 小黄鱼; 35. 大黄鱼; N. 阴性对照; P. 阳性对照。

Fig. 5 Results of detection for pathogens form aquatic products by multiplex-PCR

Lane M. DL 2000™ DNA Marker; 1. mantis shrimp; 2. lobster; 3. *S. marmoratus*; 4. bastard halibut; 5. *S. niphonius*; 6. *I. elongata*; 7. *H. reevesi*; 8. *N. septentrionalis*; 9. *S. maximus*; 10. whitebait; 11. portunid; 12. jelly fish; 13. razor clam; 14. Salmon; 15. pomfrets; 16. Surimi raw material; 17. fish balls; 18. crab sticks; 19. shrimp roll; 20. fish sausage; 21. scallops; 22. *A. argentatus*; 23. *P. japonicus*; 24. squid; 25. dried prawn; 26. *K. pelamis*; 27. *R. variegatus*; 28. *C. saira*; 29. salmon fillets; 30. *C. idellus*; 31. squid roll; 32. *S. subcrenata*; 33. crab paste; 34. *L. polyactis*; 35. *L. crocea*; N. negative control; P. positive control.

表 3 多重 PCR 方法评价

Tab. 3 Evaluation of multiplex-PCR compared with national standard methods

多重 PCR 方法 multiplex-PCR method	目标菌种 target pathogenic bacteria			
	沙门氏菌 <i>Salmonella</i> spp.	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	志贺氏菌 <i>Shigella</i> spp.	副溶血性弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>
符合率(%) coincidence rate	100	94.3	97.1	100
特异性(%) specificity	100	91.3	100	100
敏感性(%) sensitivity	100	100	94.4	100
显著性差异 significant difference	$P = 0.890$			
检测时间(d) detecting period	1			

注:其中符合率 = (真阴性数 + 真阳性数)/被检总数,特异性 = 真阴性数/(真阴性数 + 假阳性数),敏感性 = 真阳性数/(真阳性数 + 假阴性数)^[17-18]。

Notes: the sum of true-negative and true-positive numbers divided by total detected numbers is equal to coincidence rate, true-negative numbers divided by the sum of true-negative numbers and false-positive is equal to specificity rate, true-positive numbers divided by the sum of true-positive and false-negative numbers is equal to sensitivity rate^[17-18].

3 讨论

为解决传统方法中由于反复增菌、菌落分离及多种生化、血清型鉴定而导致检测周期长,不宜大批量检测及成本高等问题,水产品致病菌的快速检测技术不断得到发展,其中尤以商品化显色培养基和 ELISA 等免疫学检测技术的应用最为成熟广泛^[19-21]。这两种检测方法检出结果准确可靠、特异性强,但同时也存在无法同时分析多种成分的缺陷。随着 PCR 技术的飞速发展,多重

PCR 技术正好克服了上述不足而得到发展和应用。本研究建立的多重 PCR 方法实现了对水产品中沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌和志贺氏菌的同时快速检测,整个过程包括共增菌、总 DNA 提取、PCR 扩增和电泳分析,可在一天时间内完成,符合水产品及其加工品现代化大批量检测的需求,具有广泛的应用前景。此外,多重 PCR 方法还可与其他检测技术联用,以达到定量检测或者提高检测精确性等目的。WANG 等^[22]利用多重 PCR 方法与基因芯片技术联用对炭疽

芽胞杆菌进行了鉴定和分类。WEI 等^[23]利用多重 PCR 方法结合实时 PCR 技术定量检测了革兰氏阴性菌的四环素释放基因。所以该方法的系统建立也为后续技术方法延伸发展提供了坚实的研究基础。

影响多重 PCR 反应效果的因素较多,其中引物设计的好坏直接关系到 PCR 扩增的特异性和成功与否。然后还需要通过调整优化多重 PCR 反应体系和条件参数以使多重 PCR 检测效果得到最佳^[24]。本研究对多重 PCR 反应体系引物浓度、Mg²⁺ 浓度、Taq 酶浓度以及反应条件中的退火温度进行了优化,并得到理想结果。此外 dNTP 浓度、DNA 模板浓度以及 PCR 循环数都会对多重 PCR 反应效果产生影响。

实验中设计的复合型增菌培养基可以使 4 种目标致病菌在同一培养基中生长,减少了培养基对 PCR 检测的影响,避免了实际样品检测过程中需分别培养以获得目标致病菌 DNA 模板的问题,从而大幅提高检测效率。另一方面,本研究检测的 4 种致病菌由于生长特点各不相同,从而其在共增菌培养基也具有不同生长速率。研究主要优化了氯化钠浓度,在 1.8% 最佳盐度下,耐盐菌金黄色葡萄球菌条带明显,而不耐盐的志贺氏菌和嗜盐菌副溶血性弧菌的条带相对较弱,表明 4 种菌在接种量相同的条件下,细菌的生长速度不同而导致 DNA 模板量的差异。在实际样品检验中,如志贺氏菌的初始菌较少,在加工和贮藏过程又有损伤,则必然影响到其生长速度,并导致检测中假阴性的出现。在后续工作中,还有待于对共增菌培养条件进一步完善。

在实际样品检测过程当中,一方面由于 PCR 检测方法本身易污染,且无法分辨死菌和活菌,故与国标方法相比时会出现假阳性的情况,在试验中就发现鲳、鱼肠样品中金葡菌检测就出现假阳性的现象,可能与样品中存在一定量死菌有关;另一方面不当的细菌基因组 DNA 提取过程会导致 DNA 无法正常释放或者受到损伤,从而在 PCR 过程中出现假阴性。同时传统的电泳手段通过肉眼观察判断条带位置,多重 PCR 过程中同一泳道中亮条带的光带或拖尾会对分辨其周围弱条带造成视觉上的影响,在统计时也会导致假阴性的产生。综上所述,今后多重 PCR 检测技术的发展将通过引入新的 PCR 产物检测手段以及计算机技

术向全封闭、自动化、高通量的一体化检测系统方向发展,从而极大避免了假阴性和假阳性的产生。

参考文献:

- [1] LINDKVIST K B, TRONDSSEN T, XIE J H. Restructuring the Chinese seafood industry, global challenges and policy implications [J]. *Marine Policy*, 2008, 32(3) : 432 - 441.
- [2] SU Y C, LIU C C. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety [J]. *Food Microbiology*, 2007, 24(6) : 549 - 558.
- [3] NORHANA M N W, POOLE S E, DEETH H C, et al. Prevalence, persistence and control of *Salmonella* and *Listeria* in shrimp and shrimp products: A review [J]. *Food Control*, 2010, 21(4) : 343 - 361.
- [4] MAHMOND S M B. Effect of X-ray treatments on inoculated *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri* and *Vibrio parahaemolyticus* in ready-to-eat shrimp [J]. *Food Microbiology*, 2009, 26(8) : 860 - 864.
- [5] FELDHUSEN F. The role of seafood in bacterial foodborne diseases [J]. *Microbes and Infection*, 2000, 2(13) : 1651 - 1660.
- [6] SIMON S S, SANJEEV S. Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in fishery products and fish processing factory workers [J]. *Food Control*, 2007, 18(12) : 1565 - 1568.
- [7] GREEN D H, LEWIS G D, RODTONG S, et al. Detection of faecal pollution in water by an *Escherichia coli uidA* gene probe [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1991, 13(3) : 207 - 214.
- [8] COOK N. The use of NASBA for the detection of microbial pathogens in food and environmental samples [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 53(2) : 165 - 174.
- [9] LEE S J, PARK J S, IM H T, et al. A microfluidic ATP-bioluminescence sensor for the detection of airborne microbes [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2008, 132(2) : 443 - 448.
- [10] MONTSERRAT E, MIROSLAVA A, JUAN M V, et al. Validation of a method for the detection of five species, serogroups, biotypes and virulence factors of *Vibrio* by multiplex PCR in fish and seafood [J]. *Food Microbiology*, 2010, 27(1) : 122 - 131.
- [11] KONG R Y C, LEE S K Y, LAW T W F, et al. Rapid detection of six types of bacterial pathogens in

- marine waters by multiplex PCR [J]. *Water Research*, 2002, 36(11) : 2802 – 2812.
- [12] SETTANNI L, CORSETTI A. The use of multiplex PCR to detect and differentiate food-and beverage-associated microorganisms: A review [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 69(1) : 1 – 22.
- [13] GERMINI A, MASOLA A, CARNEVALI P, *et al.* Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157 : H7, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* by multiplex PCR [J]. *Food Control*, 2009, 20 (8) : 733 – 738.
- [14] 陈伟, 李正国, 杨平, 等. 肉品中致病菌的多重 PCR 检测及固相化试剂盒的研究 [J]. *食品科学*, 2008, 29(6) : 255 – 258.
- [15] 萨姆布鲁克, 拉塞尔. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002 : 27 – 36.
- [16] LEE C Y, PANICKER G, BEJ A K. Detection of pathogenic bacteria in shellfish using multiplex PCR followed by CovaLink™ NH microwell plate sandwich hybridization. [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 53(2) : 199 – 209.
- [17] FIELDING A H, BELL J F. *Environmental conservation* [M]. UK: Cambridge University Press, 1997 : 38 – 49.
- [18] NOORDHOEK G T, KOLK A H, BJUNE G, *et al.* Sensitivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a blind comparison study among seven laboratories [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1994, 32(2) : 277 – 284.
- [19] SWAMINATHAN B, FENG P. Rapid detection of food-borne pathogenic bacteria [J]. *Annual Review of Microbiology*, 1994, 48(1) : 40 – 426.
- [20] YUKIKO H K, TOKUHIRO N, HIROSHI N, *et al.* Improved method for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67 (12) : 5819 – 5823.
- [21] 樊景凤, 梁玉波, 宋立超, 等. 凡纳滨对虾红体病原菌间接 ELISA 快速检测方法的研究 [J]. *水产学报*, 2006, 30(1) : 113 – 117.
- [22] WANG S H, WENG J K, ZHOU Y F, *et al.* Identification and characterization of *Bacillus anthracis* by multiplex PCR on DNA chip [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2004, 20 (4) : 807 – 813.
- [23] WEI F, HAMILTON H, MIKELJON P N, *et al.* Multiplex real-time SYBR Green I PCR assay for detection of tetracycline efflux genes of Gram-negative bacteria [J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2007, 21(4) : 245 – 256.
- [24] HENEGARIU O, HEEREMA N A, DLOUHY S R, *et al.* Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol [J]. *Bio Techniques*, 1997, 23 (5) : 504 – 511.

Establishment and evaluation on a multiplex-PCR method for detection of four pathogenic bacteria in aquatic products

WENG Si-cong, ZHU Jun-li, LI Jian-rong*

(Food Safety Key Lab of Zhejiang Province, College of Food Science and Biotechnology,
Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310012, China)

Abstract: A rapid multiplex-PCR method was established in order to detect four common foodborne pathogenic bacteria including *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Shigella* spp. in aquatic products. Four pairs of oligonucleotide primers were designed for multiplex-PCR amplification according to gene coding invasion protein A of *Salmonella* spp., gene coding heat stable nuclease of *Staphylococcus aureus*, gene toxin regulatory protein of *V. parahaemolyticus* and invasion plasmid antigen H gene of *Shigella* spp. The amplified fragment sizes of these four bacteria were 549 bp, 426 bp, 348 bp, 243 bp, respectively. Then four main factors of multiplex-PCR system were optimized, also the specificity and sensitivity of this method was detected. The final 50 μL reaction mixture contained 1.2 μL *nuc* primers, 1.2 μL *ipaH* primers, 1.6 μL *toxR* primers, 1.6 μL *invA* primers, 0.6 μL *Taq* enzyme, 3.5 μL Mg^{2+} , 4 μL dNTP and 1 μL DNA template for each bacterium. The sensitivity was as low as 10 CFU/mL for *Salmonella* spp., *Vibrio parahaemolyticus* and 10^2 CFU/mL for *Shigella* spp., *S. aureus*. A general enrichment broth was optimized to allow simultaneous growth of these four bacteria in samples. The multiplex-PCR method was used to analyze 35 aquatic product samples compared with national standard methods, the coincidence rate of two methods was greater than 95% and there was no significant difference between these two methods ($P > 0.05$). Therefore, it was suggested that the method developed in this study had high sensitivity and specificity, and could be applied for the rapid detection and molecular epidemiology survey of foodborne pathogenic bacteria in aquatic products.

Key words: foodborne pathogenic bacteria; multiplex-PCR; aquatic products; detection

Corresponding author: LI Jian-rong. E-mail: lijianrong@zjgsu.edu.cn