

- [ 8 ] SHELBY M D. Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of *in vitro* and *in vivo* assays [J]. *Environ Health Perspect*, 1996, 104:1296-1300.
- [ 9 ] WINUTHAYANON W, PIYACHATURAWAT P, SUKSAMRAM A, et al. Diarylheptanoid phytoestrogens isolated from the medicinal plant *Curcuma comosa*: biologic actions *in vitro* and *in vivo* indicate estrogen receptor-dependent mechanisms [J]. *Environ Health Perspect*, 2009, 117(7):1151-1161.
- [ 10 ] LIU Jin, HUANG Huiling, ZHANG Wenchang, et al. Cadmium-induced increase in uterine wet weight and its mechanism [J]. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 2010, 89(1):43-49.

## 论著

# 聚合酶链式反应-变性高效液相色谱法检测 5 种食源性致病菌

杨福江<sup>1</sup> 王玉平<sup>1</sup> 吴永宁<sup>2</sup> 沈建忠<sup>3</sup>

(1. 邢台医学高等专科学校, 河北 邢台 054000; 2. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100021; 3. 中国农业大学, 北京 100193)

**摘要:**目的 建立聚合酶链式反应与变性高效液相色谱 (polymerase chain reaction-denaturing high-performance liquid chromatography, PCR-DHPLC) 相结合的方法, 快速检测 5 种食源性致病菌 (沙门菌、副溶血性弧菌、福氏志贺菌、大肠埃希菌 O157:H7 和单核细胞增生李斯特菌)。方法 针对 16S rRNA 基因保守区设计引物, PCR 扩增产物用变性高效液相色谱仪检测, 并进行敏感性、特异性、检出率等指标测定。结果 柱温 61.4 °C 时, 5 种致病菌 PCR 产物分别呈现特异 DHPLC 色谱图, 保留时间均为 7 min 左右。对沙门菌、副溶血性弧菌和单核细胞增生李斯特菌检出限均为 5~10 CFU/ml, 福氏志贺菌和大肠埃希菌 O157:H7 均为 1~5 CFU/ml。对 83 株目的分离株的检出符合率为 100%, 38 株非目的分离株检测均为阴性; 对人工污染食品中的 5 种致病菌均可正确检出。结论 该 PCR-DHPLC 方法具有较高的敏感性和特异性, 可用于食品中 5 种食源性致病菌的高通量快速检测。

**关键词:** 变性高效液相色谱; 聚合酶链式反应; 食源性致病菌; 16S rRNA 基因

中图分类号: R155.5; TS207.4 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2010)05-0389-04

## Detection of Five Foodborne Bacterial Pathogens by Using PCR-DHPLC

YANG Fu-jiang, WANG Yu-ping, WU Yong-ning, SHEN Jian-zhong  
(Xingtai Medical College, Hebei Xingtai 054000, China)

**Abstract: Objective** To establish a PCR-DHPLC (polymerase chain reaction-denaturing high-performance liquid chromatography) method for the detection of five foodborne bacterial pathogens (*Salmonella* spp., *Vibrio parahaemolyticus*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes*). **Method** The primer sets for the conserved region of 16S rRNA gene were designed and used for PCR amplification. PCR products were detected by DHPLC, and the sensitivity and specificity of this method were tested as well. **Results** The five PCR products were shown as specific peak profiles with the retention time of 7 min at an oven temperature of 61.4 °C. The detection limits of *Salmonella* spp., *Vibrio parahaemolyticus*, and *Listeria monocytogenes* were 5-10 CFU/ml, while that of *Shigella flexneri* and *Escherichia coli* O157:H7 were 1-5 CFU/ml. All 83 target bacteria isolates tested were correctly identified and all 38 non-target strains tested were negative. The five pathogens in artificially contaminated food samples were also correctly identified by this method. **Conclusion** The PCR-DHPLC method was specific and sensitive for the detection of these five bacterial pathogens and could be used for quickly detecting a large number of samples.

**Key words:** Denaturing High-Performance Liquid Chromatography; Polymerase Chain Reaction; Foodborne Bacterial Pathogen; 16S rRNA Gene

收稿日期: 2010-01-29

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划课题 (2006BAK02A03)

作者简介: 杨福江 男 副教授 研究方向为预防医学 E-mail: yangxuanguod@126.com

通信作者: 王玉平 女 博士 研究方向为营养与食品卫生学

沙门菌、副溶血性弧菌、单核细胞增生李斯特菌(李斯特菌)、大肠埃希菌 O157:H7 和福氏志贺菌等所导致的食源性疾病已成为影响世界食品安全的主要问题之一,快速准确鉴定病原是预防和控制食源性疾病的重要环节。传统的细菌检测主要依靠血清学、生物化学、细菌形态学及细菌培养等方法进行分类鉴定,敏感性和特异性不高,费时费力,阳性率偏低。变性高效液相色谱(denaturing high-performance liquid chromatography, DHPLC)是 20 世纪 90 年代发展的一种新的核酸片段分析技术,已广泛用于微生物鉴定及分型研究<sup>[1-3]</sup>。以 16S rRNA 为目的基因的 DHPLC 法已成功用于炭疽杆菌和耶尔森菌的检测<sup>[1,4]</sup>,但国内外用 DHPLC 法同时检测上述 5 种致病菌的报道尚未见到。本研究利用 16S rRNA 基因,建立检测食品中 5 种常见食源性致病菌的 PCR-DHPLC 法,为食源性致病菌的快速和高通量检测,提供了较为理想的检测手段,同时弥补了国内外此项研究的不足。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株 大肠埃希菌 O157:H7(标准菌 CMCC 882364、分离株 10 株),副溶血性弧菌(ATCC 17802、分离株 18 株),福氏志贺菌(ATCC 12022、分离株 6 株),李斯特菌(CMCC 54004、分离株 15 株),沙门菌(肠炎沙门菌 CMCC 50041、分离株 16 株,鼠伤寒沙门菌 CMCC 50115、分离株 13 株,猪霍乱沙门菌分离株 5 株);大肠埃希菌(ATCC 25922、分离株 21 株),金黄色葡萄球菌(ATCC 29213、分离株 17 株)。前 5 种为目的菌株(分离株共 83 株),后 2 种为非目的菌株(分离株共 38 株)。

所有菌株均用显色培养基及鉴别培养基和 API® 细菌诊断金标准进行生化鉴定。鉴定过的菌株于 30%~50% 甘油冻存液中保存于 -80℃ 备用。

1.1.2 细菌培养及诊断试剂 通用预富集肉汤(北京兰伯瑞生物技术有限公司),法国科玛嘉显色培养基(郑州博赛生物技术研究),法国梅里埃 API® 细菌诊断金标准(北京威泰科生物技术有限公司)。

1.1.3 DHPLC 试剂 三乙基胺醋酸盐(triethylammonium acetate, TEAA),乙腈,水,均为色谱纯,购于美国 Transgenomic 公司。

洗脱液 A:0.1 mol/L TEAA,0.025% (V/V)乙腈。

洗脱液 B:0.1 mol/L TEAA,25% (V/V)乙腈。

1.1.4 分子生物学试剂 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, *Taq* DNA 聚合酶(2.5 U/μl), dNTPs

(10 mmol/L),购于天根生化科技(北京)有限公司。

1.1.5 主要仪器 WAVE 核苷酸片段分析系统, WAVEMAKER Software Version 4.1, DNASep 柱,紫外检测器为美国 Transgenomic 公司产品。

### 1.2 方法

1.2.1 引物设计和合成 选择 16S rRNA 基因作为目的基因,设计通用引物。引物由上海生工公司合成。引物序列如下:

上游引物:5'-ATT AGA TAC CCT GGT AGT CCA CGC-3'。

下游引物:5'-TTG CGG GAC TTA ACC CAA C-3',产物 316 bp。

1.2.2 PCR 扩增 DNA 模板提取 取纯培养的标准菌株菌悬液 50 μl,加入 3 ml LB 肉汤中 37℃、150 r/min 振荡培养 8 h,然后按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明,提取模板 DNA。

PCR 反应体系 DNA 模板 150 ng、上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μl、dNTPs(10 mmol/L) 2.0 μl、10×PCR Buffer 2.5 μl、*Taq* DNA 聚合酶 2.5 U,加去离子水至 25 μl。

PCR 反应条件 95℃ 预变性 10 min;94℃ 30 s,57℃ 30 s,72℃ 60 s,30 个循环;72℃ 延伸 10 min。

1.2.3 琼脂糖凝胶电泳 用 1% 琼脂糖凝胶电泳初步鉴定 PCR 产物纯度及产物大小。

1.2.4 测序和序列比对 为了确证 16S rRNA 基因产物可变区序列,对 5 种菌的 PCR 产物进行测序和序列比对(采用 DNAMAN5.2.2 软件)。

1.2.5 PCR 产物异源双链杂交 选择肠炎沙门菌标准菌株作为杂交双链源,将其 16S rRNA 基因的 PCR 产物与其他实验菌株(建立参照图谱时使用标准菌株)的 16S rRNA 基因的 PCR 产物等量混合(各 10 μl),PCR 仪中形成杂交双链;95℃ 预变性 5 min,然后以 0.02℃/s 的速度降低,在约 50 min 内缓慢降温到 35℃。

1.2.6 DHPLC 分析 将 PCR 杂交产物用 DHPLC 检测,上样量 5 μl,柱温 61.4℃,流速 0.9 ml/min,起始梯度(0.5 min) A 液 45%、B 液 55%,终末梯度(5.0 min) A 液 36%、B 液 64%,洗脱和平衡时 A 液和 B 液均为 50%,从上样至平衡共用时 5.4 min。建立标准参照图谱。

1.2.7 方法的敏感性和特异性 敏感性 将纯培养的标准菌株悬浮液用 LB 液体培养基做 2 倍或 10 倍梯度稀释,使其浓度在 1~1 000 CFU/ml(以普通营养琼脂平板计数确认),然后在 37℃、150 r/min 振荡培养 8 h,按照常规方法进行 DNA 提取、PCR 扩

增后,杂交双链合成,用 DHPLC 进行检测。

特异性 用 DHPLC 色谱图的特异性来评价方法的特异性。

1.2.8 临床分离株检测 对临床分离的 83 株目的菌株和 38 株非目的菌株分别用上述建立的 DHPLC 方法检测。通过样品色谱峰与标准参照图谱峰型对比,确定样品中含有的致病菌种类。上述临床分离株样品测试中,用鉴定正确的菌株数除以检测菌株总数,计算符合率。

1.2.9 人工污染食品样品的检测 取磨碎的生鱼肉样品 25 g,加入到 225 ml 1% 的通用预富集肉汤中,充分混匀。取纯培养的甘油保存的标准菌株 500  $\mu$ l,加入到预富集肉汤中,37  $^{\circ}$ C 振荡培养 18 h。取菌悬液 50  $\mu$ l,置于 LB 肉汤中 37  $^{\circ}$ C、150 r/min 振荡培养 8 h,然后进行 DNA 模板提取,其余过程同前,根据 DHPLC 峰型比对结果确定检测的细菌。

## 2 结果

### 2.1 16S rRNA 基因 PCR 产物电泳鉴定

检测的所有菌株,均在 320 bp 左右处出现单一电泳条带,见图 1。因此,用电泳方法无法鉴别不同种属致病菌及不同血清型沙门菌。

### 2.2 PCR 产物测序及序列比对

对扩增的 16S rRNA 基因片段测序并比对,结

鼠伤寒沙门菌CMCC50115	GACATCCACAGAAGAATCCAGAGATGGATTGGTGCCTTC--GGGAAGTGTGAGACAG
肠炎沙门菌CMCC50041	GACATCCACAGAAGAATCCAGAGATGGATTGTGCCTTC--GGGAAGTGTGAGACAG
猪霍乱沙门分离株	GACATCCACGGAAGAATCCAGAGATGGATTGGTGCCTTC--GGGAAGTGTGAGACAG
O157:H7 CMCC882364	GACATCCACGGAAGTTTTCAGAGATGAGAATGTGCCTTC--GGGAACCGTGAGACAG
副溶血性弧菌CMCC54004	GACATCCAGAGAACTTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTC--GGGAAGTGTGAGACAG
李斯特菌ATCC17802	GACATCCTTTGACCACTCTGGAGACAGAGCTTTCCTTC--GGGGACAAAGTGACAG
金黄色葡萄球菌ATCC29213	GACATCCTTTGACAACCTAGAGATAGAGCCTTCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAG
	***** ** * ***** ** ** * *****

图 2 食源性致病菌 16S rRNA 基因部分序列比对结果

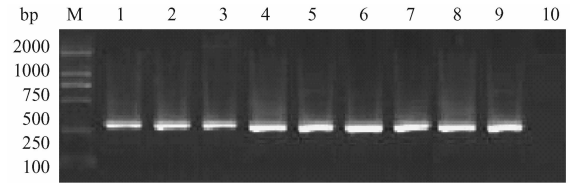
5 种致病菌和 3 个血清型沙门菌色谱峰均特异,非目的分离株的色谱图与目的分离株也各不相同(图 3),可以有效区分,故本方法具有较高特异性。

### 2.5 样品检测

临床分离株和人工污染样品中致病菌的色谱峰均可与标准色谱峰分别重叠。检出符合率:通过对 5 种菌共计 83 株目的分离株和 2 个菌属的 38 株非目的菌株的检测,83 株菌的检出符合率为 100%,38 株非目的分离株检测均为阴性。

## 3 讨论

以 PCR 为基础的寡核苷酸探针杂交技术<sup>[5]</sup>和实时 PCR<sup>[6]</sup>方法已用于检测食源性致病菌,但是这



注:M 为 DNA 分子量标准,1 为鼠伤寒沙门菌,2 为肠炎沙门菌,3 为猪霍乱沙门菌,4 为大肠埃希菌 O157:H7,5 为李斯特菌,6 为副溶血性弧菌,7 为福氏志贺菌,8 为金黄色葡萄球菌,9 为大肠杆菌 ATCC 25922,10 为阴性对照。

图 1 16S rRNA 基因 PCR 产物电泳图谱

果表明不同种属致病菌其可变区序列差别较大,金黄色葡萄球菌碱基数目多 2 个,3 个血清型沙门菌也有 1 至 2 个碱基的不同,见图 2。

### 2.3 DHPLC 检测

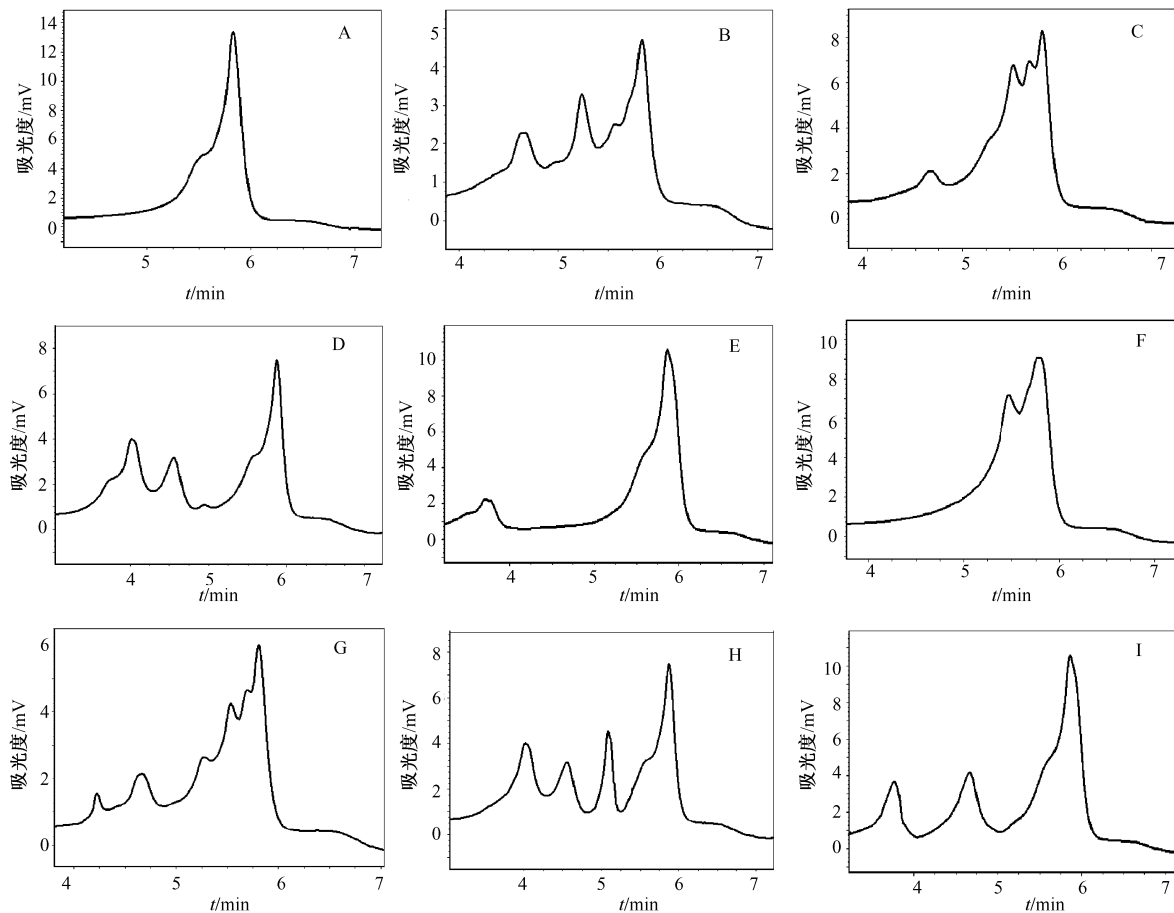
PCR 杂交产物用 DHPLC 在部分变性条件下检测,建立参照图谱,见图 3。

不同种属致病菌和 3 个血清型沙门菌均具有其特异的 DHPLC 色谱图(保留时间、峰形和峰的数量各不相同)。每株菌的检测时间约 7 min。

### 2.4 方法的敏感性和特异性

部分变性条件下(柱温 61.4  $^{\circ}$ C),对沙门菌、副溶血性弧菌和李斯特菌检出限均为 5~10 CFU/ml,福氏志贺菌和大肠埃希菌 O157:H7 均为 1~5 CFU/ml。

两种方法相对较复杂、成本较高又费时,而且放射性同位素限制了探针杂交作为实验室常规方法的使用。凝胶电泳分辨率较低,无法区分大小相似的电泳条带。PCR-DHPLC 方法已成功用于微生物群落分析<sup>[3,7]</sup>,与上述方法相比,具有快速、灵敏、准确、无污染、全自动、高通量的优点。在部分变性条件下通过分析 16S rRNA 基因成功用于鉴定致病菌<sup>[1,4]</sup>。本研究通过不同菌属 16S rRNA 基因的序列比对,选择了基因保守区设计引物,扩增子中间跨越了高度可变区。由于不同菌属的 PCR 产物碱基构成不尽相同,在部分变性温度条件下解链程度不同(不互补的碱基首先解链),导致保留时间乃至峰形的差别,可将不同菌属甚至不同血清型一一区分



注:A为肠炎沙门菌;B为猪霍乱沙门菌;C为鼠伤寒沙门菌;D为副溶血性弧菌;E为大肠埃希菌 O157:H7;  
F为福氏志贺菌;G为李斯特菌;H为金黄色葡萄球菌;I为大肠埃希菌 ATCC 25922。

图3 PCR产物DHPLC标准参照图谱

开来。通过测序证明,不同菌属和不同血清型沙门菌其16S rRNA基因可变区序列的确有不同碱基数目的差别,这是DHPLC鉴定的基础。

因为使用的是通用引物,因而这种方法也可用于其他细菌(如金黄色葡萄球菌)甚至未知细菌的检测,值得进一步研究。DHPLC方法具有高通量的特点,一次可检测 $96 \times 2$ 甚至更多样品,并且本方法具有较高敏感性和特异性,在30 h内可检测出5种致病菌,适合于大批样品的快速检测,具有良好的应用前景。

#### 参考文献

- [1] HURTLE W, SHOEMAKER D, HENCHAL E, et al. Denaturing HPLC for identifying bacteria [J]. Biotechniques, 2002, 33: 386-391.
- [2] GOLDENBERG O, HERRMANN S, ADAM T, et al. Use of denaturing high-performance liquid chromatography for rapid detection and identification of seven *Candida* species [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43: 5912-5915.
- [3] BARLAAN E A, SUGIMORI M, FURUKAWA S, et al. Profiling and monitoring of microbial populations by denaturing high-performance liquid chromatography [J]. J Microbiol Methods, 2005, 61: 399-412.
- [4] HURTLE W, BODE E, KAPLAN R S, et al. Use of denaturing high-performance liquid chromatography to identify *Bacillus anthracis* by analysis of the 16S-23S rRNA interspacer region and *gyrA* gene [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41 (10): 4758-4766
- [5] CHIANG Y C, YANG C Y, LI C, et al. Identification of *Bacillus* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp. and *Vibrio* spp. with 16S ribosomal DNA-based oligonucleotide array hybridization [J]. Int J Food Microbiol, 2006, 107: 131-137.
- [6] BHAGWAT A A. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* strains by real-time PCR [J]. Int J Food Microbiol, 2003, 84: 217-224.
- [7] GOLDENBERG O, HERRMANN S, MARJORAN G, et al. Molecular monitoring of the intestinal flora by denaturing high-performance liquid chromatography [J]. J Microbiol Methods, 2007, 68: 94-105.