

5 种食源性致病菌多重 PCR 检测方法的建立

程晓艳^{1,2} 刘庆慧^{1*} 黄 捷¹

(¹农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(²中国海洋大学, 青岛 266003)

摘 要 本研究建立一种同时特异性地检测 5 种常见食源性致病菌的多重 PCR 方法。根据目前食品中常见病原菌副溶血弧菌 *Vibrio parahaemolyticus*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、单核细胞增生性李斯特菌 *Listeria monocytogenes*、肠炎沙门氏菌 *Salmonella enteritidis*、福氏志贺氏菌 *Shigella flexneri* 的相关毒力基因, 选择具有特异性的副溶血弧菌不耐热溶血毒素基因、金黄色葡萄球菌的耐热核酸酶基因、单核细胞增生性李斯特菌编码溶血素 O 基因、沙门氏菌侵袭蛋白 A 基因及志贺氏菌侵袭性质粒抗原 H 基因, 设计 5 对特异性引物进行多重 PCR 检测, 对反应条件进行优化并评价了其特异性和灵敏度。通过对 48 份实际样品检测, 验证了此多重 PCR 体系具有很好的可靠性和实用性。

关键词 多重 PCR 食源性病原菌 检测

中图分类号 S917.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2012)02-0097-07

Multiplex PCR for the detection of five major foodborne pathogens

CHENG Xiao-yan^{1,2} LIU Qing-hui^{1*} HUANG Jie¹

(¹Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(² Ocean University of China, Qingdao 266003)

ABSTRACT A multiplex polymerase chain reaction was developed for the simultaneous detection of five major foodborne pathogens, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, and *Shigella flexneri*. Five pairs of specific primers were designed according to the thermolabile hemolysin gene of *V. parahaemolyticus*, the heat stable nuclease gene of *S. aureus*, the Listeriolysin O gene of *L. monocytogenes*, the invasion protein A gene of *S. enteritidis*, the invasion plasmid antigen H gene of *S. flexneri*. The reaction conditions were optimized, and the specificity and sensitivity of this method were tested. The detecting results of 48 samples also proved its reliability and practicability.

KEY WORDS Multiplex PCR Food borne pathogens Detection

近年来,由食品致病菌引起的食源性疾病已成为当前世界面临的公共卫生问题(White *et al.*, 2002),已

国家自然科学基金(30871942)和对虾行业专项(201103034)课题共同资助

* 通讯作者。E-mail: liuqh@ysfri. ac. cn

收稿日期: 2011-04-03; 接受日期: 2011-05-25

作者简介: 程晓艳(1985-), 女, 硕士研究生, 主要从事病原微生物检测方面的研究。E-mail: cxy5182@126. com

引起国家领导的高度重视和人们的广泛关注。WHO 将大肠杆菌 O157、沙门氏菌、志贺氏菌及单核细胞增生李斯特菌依次列为四大重要的食源性致病菌(Liu 2008),并且列为中国进出口产品的必检项目。在我国,沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌为食物中毒常见病原菌(贺连华等 2005)。据统计,我国每年发生的细菌性食物中毒占食物中毒事件总数的 30%~90%,中毒人数占食物中毒总人数的 60%~90%(陈建琳等 2002)。这些致病菌的存在严重威胁着人类健康,快速检测食品中的致病菌是保障食品质量安全、预防食源性疾病暴发的有效手段。

目前对食品致病菌的检测主要依赖于生化鉴定,其检测时间长、操作复杂,不能满足食品安全快速检测的需求。随着现代生命科学技术的发展,PCR、实时定量 PCR 及基因芯片等技术以其灵敏度高、检测快速而被应用到食品致病菌的检测(许拉等 2008; Omiccioli *et al.* 2009; Suo *et al.* 2010)。对多种致病菌进行多重 PCR 检测的研究也有报道,但多集中于两种、3 种、4 种致病菌的检测(杨小鹏等 2005; Kim *et al.* 2006; Ramesh *et al.* 2002)。范宏英等(2005)运用多重 PCR,成功地将沙门氏菌、志贺氏菌、肠出血性大肠杆菌 O157、绿脓杆菌和副溶血弧菌 5 种饮用水不得检出的致病菌同时快速检出。本研究探索建立一种可以同时检测食品中的副溶血弧菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、志贺氏菌及单核细胞增生性李斯特菌的单管多重 PCR 检测方法,达到一次性快速检测多种食源性致病菌的目的。

1 材料与方法

1.1 试验材料

副溶血弧菌 *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC17802)、单核细胞增生性李斯特菌 *Listeria monocytogenes* (ATCC54005)、肠炎沙门氏菌 *Salmonella enteritidis* (ATCC13076)、福氏志贺氏菌 *Shigella flexneri* (NICBP51572) 由山东出入境检验检疫局惠赠;鳃弧菌 *Vibrio anguillarum*、灿烂弧菌 *Vibrio splendidus*、费氏弧菌 *Vibrio fischeri*、哈维氏弧菌 *Vibrio harveyi*、溶藻胶弧菌 *Vibrio alginolyticus*、嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila*、大肠杆菌 *Escherichia coli*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* (ATCC25923)、蜡样芽孢杆菌 *Bacillus cereus*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 均为本实验室(中国水产科学研究院黄海水产研究所海水养殖生物疾病控制与分子病理学实验室)保种;实际样品检测用海产品采自青岛各大市场和各超市。

1.2 细菌培养及模板制备

鳃弧菌、灿烂弧菌、费氏弧菌、哈维氏弧菌、溶藻胶弧菌、嗜水气单胞菌均采用 2216E 海水培养基,固体培养基添加 2% 琼脂粉,30℃ 摇床培养过夜;其余的实验菌株均培养于 LB 培养基,37℃ 摇床培养过夜。采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取细菌 DNA(天根公司),用超微量核酸蛋白测定仪(美国 NanoDrop)测定 DNA 浓度和纯度,冻存于 -20℃,备用作多重 PCR 扩增模板。

1.3 引物的设计

在 GenBank 下载金黄色葡萄球菌耐热核酸酶基因(Heat stable nuclease gene, *nuc*)、沙门氏菌侵袭蛋白 A 基因(Invasion protein A gene, *invA*)、副溶血弧菌不耐热溶血毒素基因(Thermolabile hemolysin gene, *tlh*)、单核细胞增生性李斯特菌编码溶血素 O 基因(Listeriolysin O gene, *hlyA*)及志贺氏菌侵袭性质粒抗原 H 基因(Invasion plasmid antigen H gene, *ipaH*)序列,通过 Accelrys Gene 2.5 比对分析,选用序列 EF529606.1、U43273.1、AY578148.1、CP000266.1 及 HM589604.1,设计出 5 对引物,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。引物序列及扩增片段大小见表 1。

1.4 多重 PCR 反应条件的优化

1.4.1 退火温度的优化

25 μ l 反应体系包括 *tlh*、*nuc*、*hlyA*、*invA* 及 *ipaH* 的 5 对引物,每条引物各 0.2 μ mol/L;10 \times PCR Buffer

(含 Mg^{2+}), $2.5 \mu\text{l}$; 2.5 mmol/L dNTP, $5 \text{ U}/\mu\text{l}$ rTaq (TaKaRa), $0.3 \mu\text{l}$ 。副溶血弧菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生性李斯特菌、肠炎沙门氏菌、福氏志贺氏菌的基因组 DNA 各 $1 \mu\text{l}$ 混合后做模板。扩增程序设为: 94°C 预变性 5 min ; 94°C 30 s , 退火温度梯度设为: 53°C 、 54°C 、 55°C 、 56°C 、 57°C 45 s , 72°C 60 s , 35 个循环; 72°C 延伸 15 min 。1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 以确定最佳退火温度。

表 1 实验中所用的引物

Table 1 Sequences of the primers used in this experiment

菌株 Strain	扩增基因 Gene	引物序列(5'→3') Sequence of primers	扩增片段大小(bp) Length of amplified fragment (bp)
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	<i>nuc</i>	F-GGATGGCTATCAGTAATGTTTCGR- AAGTTGTTTCATGTGTATTGTTAGG	548
肠炎沙门氏菌 <i>S. enteritidis</i>	<i>invA</i>	F-CAGCATCCGCATCAATAATACCR- TGTTTCGTCATTCCATTACCTACC	426
副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tlh</i>	F-TGAGTTGCTGTTGTTGGATGCR- GTTGATGACACTGCCAGATGC	357
福氏志贺氏菌 <i>S. flexneri</i>	<i>ipaH</i>	F-GTCCATCAGGCATCAGAAGGR- AGGTCATTTGCTGTCACTCC	245
单核细胞增生性李斯特菌 <i>L. monocytogenes</i>	<i>hlyA</i>	F-GACGAAATGGCTTACAGTGAATCR- AATCTGGAAGGTCTTGTAGGTTCC	185

1.4.2 延伸时间的优化

$25 \mu\text{l}$ 反应体系参照 1.4.1。设置延伸时间分别为 1、1.5、2、2.5 min, 扩增程序其他参数参照 1.4.1。1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 以确定最佳延伸时间。

1.5 多重 PCR 的特异性试验

$25 \mu\text{l}$ 反应体系包括 *tlh*、*nuc*、*hlyA*、*invA* 及 *ipaH* 的 5 对引物, 每条引物各 $0.2 \mu\text{mol/L}$; 分别用金黄色葡萄球菌、肠炎沙门氏菌、副溶血弧菌、福氏志贺氏菌、单核细胞增生性李斯特菌、鳗弧菌、灿烂弧菌、费氏弧菌、哈维氏弧菌、溶藻胶弧菌、嗜水气单胞菌、大肠杆菌、蜡样芽孢杆菌及枯草芽孢杆菌基因组 DNA $1 \mu\text{l}$ 做模板及 5 种目的菌 DNA 各 $1 \mu\text{l}$ 随机混合后做模板; 其他成分参照 1.4.1。扩增程序为: 94°C 预变性 5 min ; 94°C 30 s , 55°C 45 s , 72°C 60 s , 35 个循环; 72°C 延伸 15 min 。1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 并对副溶血弧菌的 *tlh*、金黄色葡萄球菌的 *nuc*、单核细胞增生性李斯特菌的 *hlyA*、肠炎沙门氏菌的 *invA* 及福氏志贺氏菌的 *ipaH* PCR 产物测序(济南力戈测序公司)。

1.6 多重 PCR 的灵敏度评价

分别对已知浓度的标准菌株副溶血弧菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生性李斯特菌、肠炎沙门氏菌、福氏志贺氏菌的基因组 DNA, 用无菌水进行一系列 $10\times$ 梯度稀释, 再依次取 $1.0 \mu\text{l}$ 组合做模板。 $25 \mu\text{l}$ 反应体系参照 1.4.1。扩增程序参照 1.5。1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 检测其灵敏度。

1.7 实际样品检测

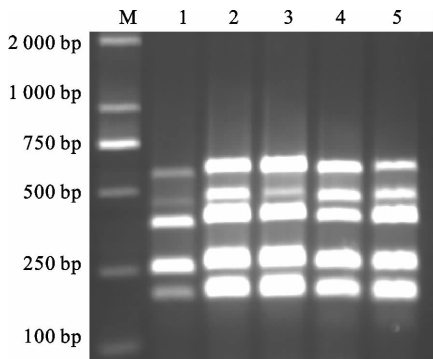
从青岛各大市场和各超市共采购 48 份海产品样品, 包括扇贝 18 份、牡蛎 10 份和蛤蜊 10 份。每份随机取样 10 g , 研碎后加入到 90 ml LB 培养基中, 37°C 摇床培养 12 h , 取 1 ml 培养物(尽量不要取固体肉样)煮沸法提取 DNA, 用建立的多重 PCR 体系进行检测, 并将阳性样品的扩增产物测序(上海生工生物工程技术有限公司)。同时采用传统检测方法(参照国标 GB/T4789.10-2010、GB/T4789.4-2010、GB/T4789.7-2008、GB/

T4789.5-2003 及 GB/T4789.30-2010 分别检测金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、副溶血弧菌、志贺氏菌及单核细胞增生性李斯特菌)进行验证。

2 结果

2.1 多重 PCR 条件的优化

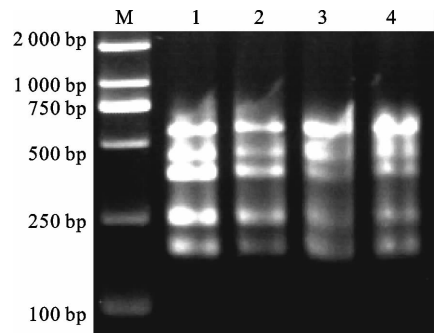
以副溶血弧菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生性李斯特菌、肠炎沙门氏菌、福氏志贺氏菌的基因组 DNA 各 1 μ l 混合后做模板,进行反应条件的优化。配制好的反应体系在不同退火温度(53、54、55、56 和 57 $^{\circ}$ C)条件下的扩增结果如图 1 所示。当退火温度在 53~57 $^{\circ}$ C 之间均能得到 5 条目的带,但 53 $^{\circ}$ C 时条带不清晰且扩增产物的量不大。扩增产物量最大且条带最清晰的退火温度是 54 $^{\circ}$ C。因此,54 $^{\circ}$ C 作为多重 PCR 的最佳退火温度。同样,实验对比了不同延伸时间(1、1.5、2.0、2.5 min)对多重 PCR 的影响,结果如图 2 所示。延伸时间 1~2.5 min 都可得到清晰的 5 条特异性条带,但为了获得最大扩增产物的量,得到更好的检测结果,1 min 作为最好的延伸时间。扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 45s,72 $^{\circ}$ C 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 15 min。



M:DL 2000 DNA Marker;1~5 泳道:退火温度 53 $^{\circ}$ C、54 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C、56 $^{\circ}$ C、57 $^{\circ}$ C 的多重 PCR 扩增结果
M:DL 2000 DNA Marker;1~5 lanes;Annealing temperature used in multiplex PCR as 53 $^{\circ}$ C、54 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C、56 $^{\circ}$ C and 57 $^{\circ}$ C, respectively

图 1 退火温度的优化

Fig. 1 Optimization of annealing temperature in multiplex PCR



M:DL 2000 DNA Marker;1~4 泳道:延伸时间 1、1.5、2、2.5 min 的多重 PCR 扩增结果;
M:DL 2000 DNA Marker;1~4 lanes;Extention time used in multiplex PCR as 1、1.5、2 and 2.5 min, respectively

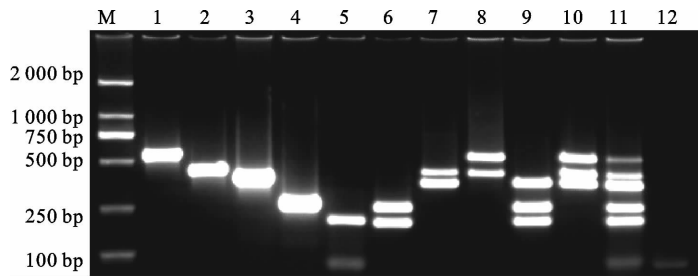
图 2 延伸时间的优化

Fig. 2 Optimization of extention time in multiplex PCR

2.2 多重 PCR 的特异性测定

图 3 中的 1~5 泳道分别以金黄色葡萄球菌、肠炎沙门氏菌、副溶血弧菌、福氏志贺氏菌及单核细胞增生性李斯特菌基因组 DNA 做模板的 PCR 扩增结果。结果表明,本实验建立的多重 PCR 方法成功地扩增出 *nuc*、*invA*、*tlh*、*ipaH*、*hlyA* 5 条目的片段,扩增长度分别为 548、426、357、245、185bp。表 2 为本实验检测菌株及本实验室现有的 9 株其他细菌 DNA 做模板时的多重 PCR 扩增结果,只有金黄色葡萄球菌、肠炎沙门氏菌、副溶血弧菌、福氏志贺氏菌及单核细胞增生性李斯特菌呈阳性扩增结果,其他细菌均呈阴性扩增,证明引物均有很好的特异性。

将扩增出的 *tlh*、*nuc*、*hlyA*、*invA* 及 *ipaH* 5 条基因片段的测序结果在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 上比对,发现与 GenBank 中公布的基因序列相比,同源性均在 99%~100% 之间。



M:2000bp DNA Marker;泳道 1~5 分别为金黄色葡萄球菌、肠炎沙门氏菌、副溶血弧菌、福氏志贺氏菌、单核细胞增生性李斯特菌基因组 DNA;泳道 6~8 分别为单核细胞增生性李斯特菌与福氏志贺氏菌基因组 DNA 混合物、副溶血弧菌与肠炎沙门氏菌基因组 DNA 混合物、肠炎沙门氏菌与金黄色葡萄球菌基因组 DNA 混合物;泳道 9~10 分别为单核细胞增生性李斯特菌、福氏志贺氏菌及副溶血弧菌基因组 DNA 混合物,副溶血弧菌、肠炎沙门氏菌及金黄色葡萄球菌基因组 DNA 混合物;泳道 11 为金黄色葡萄球菌、肠炎沙门氏菌、副溶血弧菌、福氏志贺氏菌、单核细胞增生性李斯特菌基因组 DNA 混合物;泳道 12 为阴性对照

Lane M, 2000bp DNA Marker; Lanes 1~5: DNA of *S. aureus*, *S. enteritidis*, *V. parahaemolyticus*, *S. flexneri*, *L. monocytogenes*. Lanes 6~8: mixed DNA of *L. monocytogenes* and *S. flexneri*, mixed DNA of *V. parahaemolyticus* and *Salmonella*, mixed DNA of *S. enteritidis* and *S. aureus*. Lanes 9~10: mixed DNA of *L. monocytogenes*, *S. flexneri* and *V. parahaemolyticus*, mixed DNA of *V. parahaemolyticus*, *S. enteritidis* and *S. aureus*. Lanes 11: mixed DNA of *S. aureus*, *S. enteritidis*, *V. parahaemolyticus*, *S. flexneri* and *L. monocytogenes*. Lanes 12: Negative control

图 3 特异性检测

Fig. 3 Specificity of multiplex PCR assay

表 2 多重 PCR 引物特异性供试菌株

Table 2 The strains for specificity of multiplex PCR assay

试验菌株	Strain	来源或序列号 Source or GenBank ID	菌株数 Number of strain	多重 PCR 扩增结果 Amplification results of multiplex PCR
鳃弧菌	<i>V. anguillarum</i>	本实验室保存鉴定	1	—
灿烂弧菌	<i>V. splendidus</i>	本实验室保存鉴定	1	—
费氏弧菌	<i>V. fischeri</i>	本实验室保存鉴定	1	—
哈维氏弧菌	<i>V. harveyi</i>	本实验室保存鉴定	1	—
溶藻胶弧菌	<i>V. alginolyticus</i>	本实验室保存鉴定	1	—
嗜水气单胞菌	<i>A. hydrophila</i>	本实验室保存鉴定	1	—
大肠杆菌	<i>E. coli</i>	本实验室保存鉴定	1	—
蜡样芽孢杆菌	<i>B. cereus</i>	本实验室保存鉴定	1	—
枯草芽孢杆菌	<i>B. subtilis</i>	本实验室保存鉴定	1	—
金黄色葡萄球菌	<i>S. aureus</i>	ATCC25923	1	+
肠炎沙门氏菌	<i>S. enteritidis</i>	ATCC13076	1	+
副溶血弧菌	<i>V. parahaemolyticus</i>	ATCC17802	1	+
福氏志贺氏菌	<i>S. flexneri</i>	NICBP51572	1	+
单核细胞增生性李斯特菌	<i>L. monocytogenes</i>	ATCC54005	1	+

注:(+) 多重 PCR 阳性结果,(-) 多重 PCR 阴性结果

Note:“+”means positive result;“-”means negative result

2.3 多重 PCR 的灵敏度测定

测得所提取副溶血弧菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生性李斯特菌、肠炎沙门氏菌及福氏志贺氏菌基因组 DNA 的浓度分别为 211.2、270.8、90.4、385.0、668.7 ng/μl。当稀释倍数为 10² 时,即混合模板中含有副溶

血弧菌基因组 DNA 2.112 ng、金黄色葡萄球菌基因组 DNA 2.708 ng、单核细胞增生性李斯特菌基因组 DNA 0.904 ng、肠炎沙门氏菌基因组 DNA 3.85 ng、福氏志贺氏菌基因组 DNA 6.687 ng 时,各细菌相应的目的条带均有扩出。而当稀释倍数为 10^3 与 10^4 时,均只有副溶血弧菌 *tlh* 和福氏志贺氏菌 *ipaH* 扩出(图4)。所以本研究建立的多重 PCR 检测体系的最低检出限分别为:副溶血弧菌基因组 DNA 21.12 pg、金黄色葡萄球菌基因组 DNA 2.708 ng、单核细胞增生性李斯特菌基因组 DNA 904pg、肠炎沙门氏菌基因组 DNA 3.85ng、福氏志贺氏菌基因组 DNA 66.87pg。

2.4 实际样品的检测结果

进行了48份海产品实际样品检测。对检测结果采用了传统培养鉴定方法和测序验证进行比较:多重PCR检出金黄色葡萄球菌阳性的样品6份,沙

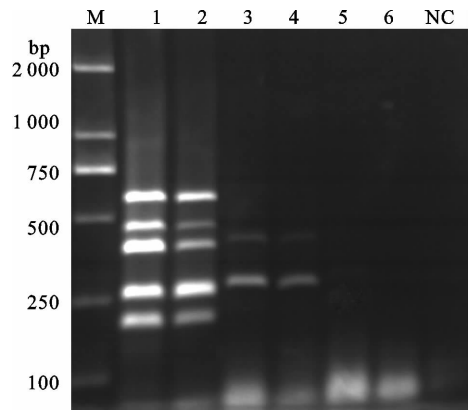
门氏菌阳性的样品9份,副溶血弧菌阳性的样品27份,志贺氏菌阳性的样品23份,单核细胞增生性李斯特菌阳性的样品19份,与国标检测方法的结果均一致。将阳性样品的扩增产物进行测序,结果显示,与标准菌株的同源性均达到99%以上。说明所建立的多重PCR切实可行。

3 讨论

多重PCR最早由Chamberlian等在1988年提出,其原理与常规PCR相同,只是能够在在一个PCR体系中扩增出多个基因片段。它以快速、低成本及较高通量等优势,被广泛应用于生物、医学及食品等各个领域,具有很高的实用价值。本研究利用该技术同时检测5种食品致病菌,研究发现,它具有良好的实用性,可为食品中致病菌的检测提供一种有效手段。

特异性是建立本方法的关键,与所选的靶基因和筛选的引物密切相关。由于本研究所检测细菌与其种属内其他细菌之间的遗传关系很近,因此在选择靶基因时要严格筛选。根据现有资料确定了 *tlh*、*nuc*、*hlyA*、*invA* 及 *ipaH* 5个靶基因(牟恺等 2010; 郝玉芹等 2010),其中 *tlh*、*nuc*、*ipaH* 分别为副溶血弧菌、金黄色葡萄球菌和单核细胞增生性李斯特菌种水平上的特异性毒力基因,*invA* 和 *ipaH* 分别为沙门氏菌和志贺氏菌属水平上的特异性毒力基因。针对这5个靶基因,设计5对最优的引物,在GenBank上进行BLAST比对分析,各引物均有很高的特异性。通过检测实验室现有的8个属的14株细菌,验证了5对引物具有高特异性。

灵敏度是评价该方法的重要指标之一。由于在多重PCR反应体系中不同引物扩增效率不同,多对引物之间及引物与模板之间的相互干扰,不同浓度模板之间产生竞争性抑制等问题,灵敏度会稍逊于单重PCR,而且引物对和模板种类越多,灵敏度也会随之下降。本试验通过对退火温度、延伸时间两个重要参数进行优化,多重PCR检测灵敏度为副溶血弧菌基因组DNA 21.12pg、金黄色葡萄球菌基因组DNA 2.708ng、单核细胞增生性李斯特菌基因组DNA 904pg、肠炎沙门氏菌基因组DNA 3.85ng、福氏志贺氏菌基因组DNA 66.87pg。这一结果除了金黄色葡萄球菌与肠炎沙门氏菌的检测灵敏度比李晨等(2010)建立的3种水产病原菌的多重PCR方法、沙丹等(2009)检测3种食源性致病菌的多重PCR方法检测灵敏度低一个数量级外,副溶血弧菌、福氏志贺氏菌及单核细胞增生性李斯特菌检测结果与其均相似。本实验所建立的多重PCR灵敏度虽然没有实时定量PCR(刘宗晓等 2008)、环介导等温扩增方法(徐芊等 2008)的灵敏度高,但是此方法相对这些方法及其他生化、免疫学方法依然具有高效、低成本、较高通量等优点。本研究将建立的多重PCR检测技术与传统检测方法作对比,对48份海产品样品进行了5种食品致病菌检测。检测结果表明,多重PCR的阳性检



M:DL 2000 DNA Marker;1~6 泳道是稀释 $10^1 \sim 10^6$ 倍后的混合模板多重PCR扩增的结果;NC泳道是阴性对照
M:DL 2000 DNA Marker;1~6 lanes:Amplification results of multiplex PCR against various concentrations of mixed DNA templates with dilution of $10^1 \sim 10^6$ fold;NC lane:Negative control

图4 多重PCR灵敏度试验

Fig.4 Sensitivity of multiplex PCR assay

出率与传统检测法一致。该检测方法在食品检测的初步应用中得到了稳定、清晰的结果,对食品中致病菌的检测及预防具有重要的意义,可推广应用于食品卫生监督、环境检测等领域。

参 考 文 献

- 许拉,黄捷,戈蕾,杨冰. 2008. 同时检测两种对虾病毒和4种弧菌的同步PCR方法的建立. 海洋水产研究,29(04):39~45
- 刘宗晓,刘荃,史秀杰,高隆英,岳志芹,吕建强,何俊强,江育林,谢从新. 2008. 杀鲑气单胞菌的实时定量PCR检测方法的建立和应用. 海洋水产研究,29(05):83~88
- 牟恺,陈智,王春民,李栋刚,于建辉,王凤明,赵宏坤. 2010. 同时检测四种病原菌的PCR方法研究. 山东农业大学学报(自然科学版),41(02):253~257
- 沙丹,凌霞,肖勇,吴家林,张敬平. 2009. 三种食源性致病菌多重PCR检测方法的建立及初步应用. 检验医学,24(03):177~181
- 陈建琳,刘明辉. 2002. 细菌性食物中毒流行趋势及预防对策. 中国卫生检验杂志,68(04):481
- 李晨,王秀华,黄捷. 2010. 3种主要水产病原菌多重PCR检测方法的建立. 渔业科学进展,31(03):100~106
- 杨小鹏,吴清平,张菊梅,吴慧清. 2005. 多重PCR检测无公害畜禽肉和水产品中4种致病菌. 微生物学通报,32(03):95~101
- 范宏英,吴清平,吴若菁,寇晓霞,张菊梅,吴慧清. 2005. 饮用水中5种致病菌多重PCR技术检测研究. 微生物学通报,32(03):102~107
- 郝玉芹,孙皆宜,李艾,杨国兴,张伟. 2010. 正交优化多重PCR反应体系检测3种食源性致病菌的研究. 安徽农业科学,38(02):602~605
- 贺连华,吴平芳,刘涛,王瑞端,陈妙玲. 2005. 深圳市熟食中食源性致病菌污染状况的调查研究. 中国热带医学,5(02):357~358
- 徐芊,孙晓红,赵勇,潘迎捷. 2008. 利用环介导等温扩增技术快速检测水产品中的副溶血弧菌. 农业生物技术学报,16(05):780~786
- Kim, J., Demeke, T., Clear, R. M., and Patrick, S. K. 2006. Simultaneous detection by PCR of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* in artificially inoculated wheat grain. International Journal of Food Microbiology, 111(1):21~25
- Liu, D. 2008. Preparation of *Listeria monocytogenes* specimens for molecular detection and identification. International Journal of Food Microbiology, 122(3):229~242
- Omiccioli, E., Amagliani, G., Brandi, G., and Magnani, M. 2009. A new platform for Real-Time PCR detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 in milk. Food Microbiology, 26(6):615~622
- Ramesh, A., Padmapriya, B. P., Chrashekar, A., and Varadaraj, M. C. 2002. Application of a convenient DNA extraction method and multiplex PCR for the direct detection of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* in milk samples. Molecular and Cellular Probes, 16(4):307~314
- Suo, B., He, Y., Paoli, G., Gehring, A., Tu, S. I., and Shi, X. 2010. Development of an oligonucleotide-based microarray to detect multiple food-borne pathogens. Molecular and Cellular Probes, 24(2):77~86
- White, D. G., Zhao, S., Simjee, S., Wagner, D. D., and Mcdermott, P. F. 2002. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. Microbes and Infection, 4(4):405~412