

十二种食源性致病菌可见光基因芯片检测方法的建立

黎昊雁 章国祥

(浙江出入境检验检疫局 浙江杭州 310012)

摘要 [目的]利用可见光基因芯片技术,针对12种常见食源性致病菌,建立快速、准确、高通量的诊断方法。[方法]设计靶细菌16S rDNA和23S rDNA的通用引物,反向引物5'端标记生物素;特异寡核苷酸探针设计在两端引物之间的可变区,5'端标记氨基基团。将探针点样于固相载体制备基因芯片,优化PCR反应体系后,PCR产物与芯片点制探针区域进行杂交,然后通过化学显色直接观察结果,并评价反应体系的特异性、灵敏度、重复性等指标。收集临床样本28例,同时制备双盲模拟污染样本10例,对检测方法进一步评价。[结果]本试验所建立的基因芯片方法可同时检测志贺菌、耶尔森氏菌、沙门菌、蜡样芽孢杆菌、空肠弯曲菌、金黄色葡萄球菌、霍乱弧菌、副溶血性弧菌、单增李氏菌、布鲁氏菌、变形杆菌、肠出血性大肠杆菌O157:H7等12种食源性致病菌,特异性高,操作简便;针对纯培养食源性致病菌反应体系的灵敏度为 10^3 cfu/mL,模拟样本的灵敏度为 10^4 cfu/mL;重复性好;采用可见光基因芯片方法检测28例临床样本,26例与常规培养方法结果完全一致,符合率达到92.9%;双盲模拟样本的检测符合率达到100%。

关键词 可见光;基因芯片;食源性致病菌;检测

中图分类号 TS207.4

Establishment of Assay for Detecting Twelve Foodborne Pathogens by Using Visualized DNA Microarray

Li Haoyan, Zhang Guoxiang

(Zhejiang Entry - Exit Inspection and Quarantine Bureau, Hangzhou, Zhejiang, 310012, China)

Abstract: It is to develop an accurate, rapid, and high-throughput assay based on visualized DNA microarray for detecting twelve foodborne pathogens. The 16S rDNA and 23S rDNA genes were chosen simultaneously as targets for screening of specific probes and designing universal primers to detect and identify twelve foodborne pathogens. Biotin-labeled universal primers for amplification of bacterial 16S rDNA and 23S rDNA were used to amplify extracted genome DNA. The twelve foodborne pathogens were identified by hybridization of the PCR product with immobilized specific probes labeled with amino group on glass slide. Color development was achieved by adding POD and TMB. PCR reactions were optimized. Then the specificity, sensitivity and reproducibility were evaluated, and 28 clinical specimens and 10 double-blind samples were detected. The target pathogens detected by this assay described here were *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Proteus* spp., *B. nuceila* spp., *Escherichia coli* O157:H7, *Yersinia* spp. and *Vibrio cholera*. The assay was specific, rapid and simple. The minimum detection limit of DNA microarray was approximately 10^3 cfu/mL. The limit for detecting mock samples such as food was 10^4 cfu/mL. Among 28 clinical samples, 26 samples were positive for foodborne pathogens by the visualized DNA microarray method, which was the same to the results obtained from the conventional assays. The coincidence rate was 92.9%; when 10 double-blind samples were detected by using visualized DNA microarray, the results were in accordance with that of conventional methods. The coincidence was 100%.

Key words: Visualized; DNA microarray; Foodborne pathogens; Detection

1 前言

食源性细菌感染引发的疾病是当前一种最普遍的公共卫生问题^[1~2],而快速、灵敏、特异性强的检测方法是预防和控制这类疾病的重要保证。目前,许多分子生物学技术被应用于食源性致病菌检

测,如酶联免疫分析技术、荧光定量PCR技术、基因测序等^[3~5]。这些方法不但技术要求高、需要昂贵的特殊仪器设备,而且无法进行高通量的检测。

基因芯片技术具有快速、准确、高通量等优点,既可广泛应用于基因序列分析、杂交、基因突变的

分析、多态性分析和疾病基因诊断等领域,也适用于食源性致病菌的检测^[6~7]。本试验共选取 12 种食品安全监测中常见的食源性致病菌作为检测靶细菌,利用可见光基因芯片技术建立了操作简便、试验周期较短的检测体系,以期为食品检验、临床诊断、疾病预防控制、卫生监督等工作中致病菌的检测提供一种新思路,为快速、准确对多种食源性致病菌进行鉴定搭建可靠的分子生物学技术平台。

2 材料

2.1 试剂

PCR 缓冲液、DNA 聚合酶、dNTPs、MgCl₂ 等均

购自宝生物工程(大连)有限公司;基因芯片基片购自基因公司。

2.2 仪器

电泳槽(北京东方仪器厂)、Gene Amp PCR System 9600(美国 Perkin - Elmer 公司)、台式高速冷冻离心机(美国贝克曼)、伯乐 2003 凝胶成像系统(美国 BioRad 公司)。

2.3 标准菌株

试验所用标准菌株(表 1)购自中国药品生物制品检定所和中国菌种保藏中心。

表 1 参考标准菌株

序号	菌种	拉丁名	菌号
1	沙门氏菌	<i>Salmonella</i> spp.	43975, 13314, 6017, 35640, 9720, 10708, 15611, 13311, 12002
2	出血性大肠杆菌 O157: H7	<i>E. coli</i> O157: H7	35150, 43889
3	单增李斯特氏菌	<i>Listeria monocytogenes</i>	54003, 54005, 54006, 54007, 7644
4	英诺克李斯特氏菌	<i>Listeria innocua</i>	33090
5	西尔李斯特氏菌	<i>Listeria seeligeri</i>	35967
6	格氏李斯特氏菌	<i>Listeria grayi</i>	25401
7	威尔李斯特氏菌	<i>Listeria welshimeri</i>	35897
8	志贺氏菌	<i>Shigella</i> spp.	12022, 9199, 25931
9	副溶血性弧菌	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	17802, 20511
10	霍乱弧菌 O1	<i>Vibrio cholerae</i> O1	569B, 16017
11	霍乱弧菌 O139	<i>Vibrio cholerae</i> O139	M045
12	金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	11632, 12702, 25923, 25913, 29737
13	变形杆菌	<i>Proteus</i> spp.	49132, 13315, 12453, 25933
14	腊样芽孢杆菌	<i>Bacillus cereus</i>	51189, 11778, 33019
15	产气荚膜梭菌	<i>Clostridium perfringens</i>	12916, 13124
16	小肠结肠炎耶尔森氏菌	<i>Yersinia enterocolitica</i>	23715, 27729, 9610
17	布鲁氏菌	<i>B. melitensis</i> spp.	210301, 210401, 210105
18	空肠弯曲菌	<i>Campylobacter jejuni</i>	33560, 43430
19	结肠弯曲菌	<i>Campylobacter coli</i>	43478
20	嗜水气单胞菌	<i>Aeromonas hydrophila</i>	35654, 49140
21	粪肠球菌	<i>Enterococcus faecalis</i>	14506, 19433, 29212, 33186
22	枸橼酸杆菌	<i>Citrobacter freundii</i>	CMCC (B) 48016
23	产气肠杆菌	<i>Enterobacter aerogenes</i>	CMCC (B) 45103
24	甲型副伤寒沙门氏菌	<i>Salmonella paratyphi</i> A	CMCC (B) 50001
25	粘质沙雷氏菌	<i>Serratia marcescens</i>	CMCC (B) 41002
26	弗氏枸橼酸杆菌	<i>Citrobacter freundii</i>	CMCC (B) 48016
27	肺炎克雷伯氏菌	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CMCC (B) 46114
28	奇异变形菌	<i>Proteus mirabilis</i>	CMCC (B) 49003

3 方法

3.1 引物与探针的设计与合成

根据文献^[8]设计细菌 16S rDNA 和 23S rDNA 的通用引物,反向引物 5' 端标记生物素;寡核苷酸

探针设计在每种病原菌基因组两对引物之间的可变区,在 5' 端标记氨基基团(表 2)。引物和探针在上海超世生物技术有限公司合成。

表 2 基因芯片引物与探针序列

引物或探针	核酸序列 (5' 3')
Primer16S - F	CGCTGGCGGCA GGCCTAACACA TGC
Primer16S - R	B D - CGCGGCTGCTGGCACGGA GTTAGCC
Primer23S - F	ACCGA TAGTAACCA GTACCGTGAG
Primer23S - R	B D - TTAATA TGA TGCTGCTTCTAA GCC
Probe - Uni	NH ₂ - (T) ₁₂ CACACTGGAAC TGA GACACGGTCGA GACTCC TACGGGA
Probe - O157: H7	NH ₂ - (T) ₁₂ TCACCCCA TAAAA GA GGCTCCCACTGC
Probe - P10	NH ₂ - (T) ₁₂ CGA GCGGTAACA GGA GAAA GCTTGCTTTCTTGCT
Probe - Bru	NH ₂ - (T) ₁₂ CGTACCA TTTGCTACGGA A TAACTCA GGGAAACTTGTG
Probe - lis	NH ₂ - (T) ₁₂ GAA GAACAA GGA TAA GA GTAACTGCTTGTCCC
Probe - Vp	NH ₂ - (T) ₁₂ AAACGA GTTA TCTGAACCTTCGGGGAACGA TAA C
Probe - VC	NH ₂ - (T) ₁₂ CAGCACAGA GGAAC TGTTCCTTGGGTGGCGA
Probe - sta	NH ₂ - (T) ₁₂ ACA TA TGTGTAA GTAACTGTGCACA TCTTGACGGT
Probe - cam	NH ₂ - (T) ₁₂ TTICTTIA GGGAA G AA TTCTGACGGTACCTAA GG
Probe - bac	NH ₂ - (T) ₁₂ TGCTAGTGTAA TAA GCTGGCACCTTGACG
Probe - sal	NH ₂ - (T) ₁₂ GGGAGTAAA GTTAA TACCTTTGCTCA TTGA
Probe - shi	NH ₂ - (T) ₁₂ GGTGTTGTGGTTAA TAACCGCAGCAA TTGA
Probe - ye	NH ₂ - (T) ₁₂ GCGGCA GCGGGAA GTA GTTACTACTTTGCC
Probe - sal - shi - e	NH ₂ - (T) ₁₂ GGTTTCA GGTTC TTTTTCAC TCCCTCGCCG
Probe - Neg	NH ₂ - (T) ₁₂ CCGCTGTA TCACAA GGGCTGGTACC

注: Primer:引物; 16S: 16S rDNA; 23S: 23S rDNA; Probe:探针; Uni:细菌通用探针; O157: H7:肠出血性大肠杆菌 O157: H7探针; P10:变形杆菌探针; Bru:布鲁氏菌探针; lis:单核李斯特菌探针; Vp:副溶血性弧菌探针; VC:霍乱弧菌探针; Sta:金黄色葡萄球菌探针; cam:空肠弯曲菌探针; bac:腊样芽孢杆菌探针; Sal:沙门菌探针; Shi:志贺菌探针; Ye:耶尔森氏菌探针; sal - shi - e:沙门 - 志贺 - 大肠共有探针; Neg:阴性对照探针。

3.2 基因组 DNA 提取

样本处理及 DNA 提取采用 Q Iamp DNA stool Mini Kit(Q iagen)试剂盒,细菌基因组 DNA 提取采用 Q Iamp DNA Mini Kit(Q iagen)试剂盒,按试剂盒说明书操作。

3.3 芯片的制备与处理

取点样液与合成的探针(终浓度 20μmol/L)各 8μL及空白对照 1份(1 ×Spotting solution溶液)于 384孔板中用于点样。点样用基因芯片点样器按照点样的程序完成,温度、湿度等参数均按说明书设置,各条探针点间距 500μm。点样完毕,芯片经过 30min 的水合,室温放置 1h进行自然干燥。干燥好的芯片用 0.2%的 SDS冲洗一些未共价结合上的 DNA,后用双蒸水冲掉残余的 SDS,自然晾干,待用。按照上述的点样程序点制基因芯片,点样模式图见图 1。

uni	lis	ye	cam
sal - shi - e	shi	sal	O157: H7
sta	bac	bru	Vp
VC	p10	Neg	C

图 1 基因芯片点样模式图

注:图中标记与表 2中一致,其中 C是空白点样液对照

3.4 不对称 PCR 扩增

采用不对称双重 PCR 进行扩增,5.0μL 10 × buffer,3.0μL 25mmol/L Mg²⁺,4.0μL 2.5mmol/L dNTPs,0.06μmol/L 上游引物(23S - F和 16S - F),0.3μmol/L 下游引物(16S - R和 16S - R),1.25U Taq酶(TakaRa);2.0μL 模板 DNA,加去离子水至 50μL。反应条件为,94 5min;94 30s,56 1min,72 1min,35个循环。

3.5 基因芯片杂交与结果判断

取 10μL PCR 产物与 10μL 杂交液混匀后加入基因芯片上点制探针区域,将基因芯片放入杂交盒中,在杂交盒边缘加几滴水保持湿度,55 水浴 1h。采用洗液(0.2 ×SSC)将基因芯片漂洗 3次后,加入 POD作用 10min,然后加入 TMB避光显色 5min。在通用探针位置出现信号,阴性对照无斑点则示为实验有效,根据其他斑点出现的相应位置判断结果。

3.6 临床标本收集和双盲模拟样本制备

采集 28例腹泻患者的粪便标本,平行采集两份,一份用于可见光基因芯片检测,另一份用于常规培养鉴定。选取果汁作为模拟样本基质,在双盲状态下,混入不同的食源性致病菌,其中含有 2例混

合细菌,制备 10 例模拟样本。

4 结果

4.1 基因芯片特异性评价结果

本试验尽可能收集与 12 种靶致病菌相关的近源属和远源属标准菌,提取基因组 DNA,进行不对称 PCR 扩增后与基因芯片进行杂交;从结果(图 2)可以明显看出特异性杂交点仅出现在其对应的位置,在其他位置未出现,同时阳性对照出现信号,阴性对照和点样液空白对照均无特异性信号产生,表明该方法能够准确检测出这 12 种食源性致病菌。

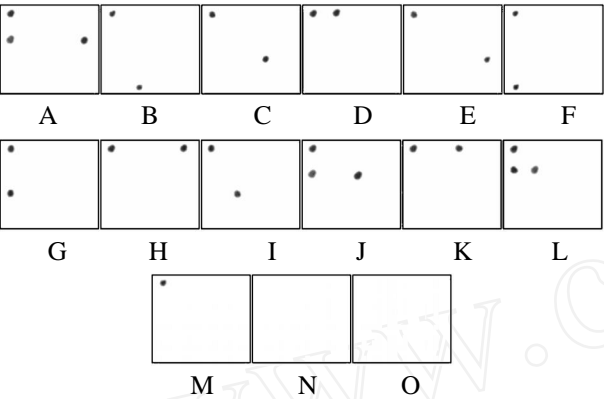


图 2 12 种食源性致病菌标准菌株可见光基因芯片杂交特异性结果

A: 肠出血性大肠杆菌 O157: H7; B: 变形杆菌; C: 布鲁氏菌; D: 单增李氏菌; E: 副溶血性弧菌; F: 霍乱弧菌; G: 金黄色葡萄球菌; H: 空肠弯曲菌; I: 腊样芽孢杆菌; J: 沙门菌; K: 耶尔森氏菌; L: 志贺菌; M: 其他细菌; N: 阴性对照; O: 空白对照。

4.2 基因芯片灵敏度评价结果

4.2.1 纯培养细菌灵敏度评价结果

本试验选取单增李氏菌为对象,对纯培养细菌的灵敏度进行评价。将单增李氏菌增菌液以 10 倍递增稀释,一份进行 DNA 提取和不对称 PCR 扩增,一份用于菌落计数,每个梯度实验重复 3 次。试验结果见图 3。从结果可以看出,纯培养食源性致病菌反应体系的灵敏度为 10^3 cfu/mL,浓度为 10^2 cfu/mL 时无杂交信号出现。

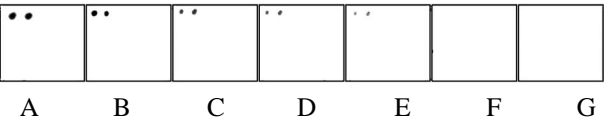


图 3 纯培养单增李氏菌基因芯片灵敏度评价结果

A: 10^7 cfu/mL; B: 10^6 cfu/mL; C: 10^5 cfu/mL; D: 10^4 cfu/mL; E: 10^3 cfu/mL; F: 10^2 cfu/mL; G: 空白对照

4.2.2 模拟样本灵敏度评价结果

针对上述纯培养细菌灵敏度评价结果,采用液体食品样本掺入已知浓度的单增李氏菌,制备 3 个浓度: 10^5 cfu/mL、 10^4 cfu/mL、 10^3 cfu/mL。结果显示

模拟样本的灵敏度为 10^4 cfu/mL。比纯培养细菌灵敏度低一个数量级。结果见图 4。



图 4 模拟样本单增李氏菌基因芯片灵敏度评价结果

A: 10^5 cfu/mL; B: 10^4 cfu/mL; C: 10^3 cfu/mL; D: 空白对照

4.3 基因芯片重复性评价结果

本试验选取单增李氏菌为对象,评价重复性,对基因芯片检测结果的可靠性进行进一步验证。共选取 4 个不同批次的基因芯片进行杂交,图 5 显示了基因芯片重复性检测结果。从结果可以看出,本试验所建立的可见光基因芯片检测方法的重复性良好,结果可靠。

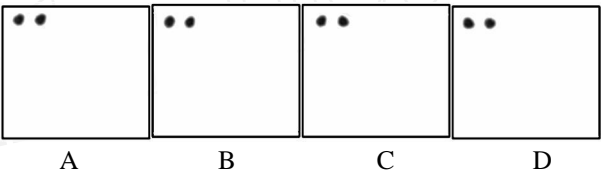


图 5 基因芯片重复性结果

4.4 临床样本检测结果

本试验采用可见光基因芯片检测方法对临床收集的 28 例样本进行检测,并与常规培养方法进行比较。DNA 提取和基因芯片杂交均按照前述流程操作。试验结果表明 26 例样本与常规培养方法结果完全一致,符合率达到 92.9%;其它 2 例,基因芯片检测结果为阳性,但是培养结果为阴性。检测结果见表 3。

表 3 基因芯片杂交结果与细菌培养检测临床标本结果

致病菌	基因芯片阳性 / 细菌培养阳性	基因芯片阳性 / 细菌培养阴性	合计
金黄色葡萄球菌	8	1	9
志贺氏菌	3	0	3
大肠杆菌 O157: H7	2	0	2
副溶血弧菌	8	1	9
阴性结果	5	0	5
合计	26	2	28

4.5 模拟样本检测结果

本试验对 10 例制备的双盲模拟食品污染的样本进行检测,结果与掺入靶致病菌的种类相比,评价该基因芯片方法对实际食品污染样本检测的能力。通过试验表明,模拟样本的基因芯片检测符合率达到 100%。本试验所建立的基因芯片方法完全可以对食品中的致病菌进行准确检测。

5 讨论

本试验选取 16S rDNA、23S rDNA 的保守区域设计通用引物,采用两重对称 PCR 技术简化实验操作,缩短试验周期,实现大量目的菌株的同时检测。针对保守区域之间的序列可变区设计各种靶细菌特异性的探针,不仅具有很高的特异性,还大大提高了实验效率。本试验所建立的可见光基因芯片技术可以同时检测 12 种食品安全监测中常见的食源性致病菌,整个操作过程仅需 3h 左右。并且该方法又不同于其它基因芯片技术,不需要扫描仪等特殊判读仪器,肉眼便可直接观察结果。

本试验针对纯培养食源性致病菌反应体系的灵敏度为 10^3 cfu/mL,针对模拟样本的灵敏度为 10^4 cfu/mL,具有较好的重复性。采用可见光基因芯片检测方法检测 28 例临床样本,26 例样本与常规培养方法结果完全一致,符合率达到 92.9%;双盲模拟样本的检测符合率达到 100%。出现基因芯片检测阳性而细菌培养阴性的结果可能有两方面的原因,一是样本中的致病菌为非活性菌,基因芯片方法能检测细菌的 DNA,但培养的方法却无法鉴定;二是样本中致病菌的含量少,细菌培养的方法很难将其从众多的杂菌中分纯、克隆。

综上所述,本试验建立的 12 种食源性致病菌可见光基因芯片检测方法具有快速、准确、高通量等

特点,重复性、特异性良好,灵敏度高,可作为食品安全监测、进出口检验检疫、临床诊断、疾病预防控制、卫生监督等领域快速、有效的诊断手段,同时对流行病学调查、控制疫情暴发和应急预防也具有重要意义。

参考文献

- [1] 何欣荣. 食品安全与食源性疾病控制研究进展 [J]. 安徽预防医学杂志, 2002, 8 (6): 384 ~ 387.
- [2] 杨金萍. 食品安全与食源性疾病 [J]. 国外医学卫生学分册, 2003, 30 (2): 124 ~ 126.
- [3] Rudolf A, Gbeckner FO, Neef A. Modern Methods in Subsurface Microbiology. In situ Identification of Microorganisms with Nucleic Acid Probes. FEMS Microbiology Reviews, 1997, 20 (3 ~ 4): 191 ~ 200.
- [4] AOAC. Official Methods of Analysis. 15th ed, Arlington VA, 1990, 194 ~ 200.
- [5] Fratamico PM, KA Bhunia, L J Smith. Food pathogens: Microbiology and Molecular Biology. Norwich, Caister Academic Press, 2005, 395 ~ 410.
- [6] 裴敏燕,李瑶,谢毅,毛裕民. 基因芯片技术及其应用 [J]. 第二军医大学学报, 2001, 22 (6): 534 ~ 537.
- [7] Schena M. Microarray Biochip Technology. Eaton Publishing, 2000, Natick, MA, USA.
- [8] D Z Jin, S Y Wen, S H Chen, et al. Detection and identification of intestinal pathogens in clinical specimens using DNA microarrays. Molecular and Cellular Probes, 2006, 20: 337 ~ 347.

Excel在细菌生化筛选和鉴定系统中的应用

贾俊涛 唐静 袁涛 金燕 赵丽青 雷质文 刘云国 房保海

(山东出入境检验检疫局 山东青岛 266002)

摘要 使用 Excel 编制了细菌筛选和鉴定系统 (Bacterial Screening and Identification System, BaSIS), 该系统以《伯杰氏细菌鉴定手册》、《伯杰氏细菌系统手册》和其他商业化鉴定系统等为参考基础, 确定了 58 个属 288 个分类单元, 是目前包括细菌种类最多的手工生化鉴定系统, 所选用的 20 项生化项目可任意组合, 在缺失某些项目的情况下, 也可进行初步判别。该系统可方便实验室日常检测, 节约成本, 简化工作, 并为细菌鉴定和筛选系统的进一步的完善奠定了基础。

关键词 细菌; 筛选; 鉴定; Excel

中图分类号 Q93 - 331

Application of Excel for Bacterial Screening and Identification System

Jia Juntao, Tang Jing, Yuan Tao, Jin Yan, Zhao Liqing, Lei Zhiwen, Liu Yunguo, Fang Baohai

(Shandong Entry - Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao, Shandong, 266002, China)

Abstract: The bacterial screening and identification system (BaSIS) has been compiled with Excel. This system which was accurate, convenient and rapid developed with reference of *Bergey's manual of determinative bacteriology*, *Bergey's manual of systematic bacteriology* and other commercialization identification systems. This system in-