

应用可视芯片技术检测食品中 常见产毒微生物的方法研究

朱许强¹, 冯家望², 王小玉², 邝筱珊², 胡松楠², 丁焕中¹

(1 华南农业大学 兽医学院, 广东, 广州 510642; 2 珠海出入境检验检疫局, 广东 珠海, 519015)

摘要:为建立一种运用可视芯片技术快速、准确检测食品中肠出血性大肠埃希菌 *Escherichia coli* O157:H7、志贺菌 *Shigella*、沙门菌 *Salmonella*、单核细胞增生李斯特菌 *Listeria monocytogenes* 的方法。分别选取肠出血性大肠埃希菌 O157:H7 中编码脂多糖 O157 抗原的基因 (rfbE)、沙门菌中编码侵袭蛋白的基因 (invA)、志贺菌中编码侵袭性质粒抗原 H 基因 (ipaH)、单核细胞增生李斯特菌中编码 PrfA 蛋白基因 (PrfA) 设计引物和探针, 探针 5' 标记一段 polyT, 下游引物 5' 端标记生物素, 进行 PCR 扩增, 将扩增产物与固定于可视芯片的特异性探针进行杂交分析。在均一的杂交条件下, 能一一检测肠出血性大肠埃希菌 O157:H7、志贺菌、沙门菌、单核细胞增生李斯特菌; 以志贺菌为对象, 该方法的检测灵敏度可达到 670 cfu/mL。可以准确而稳定地实现对 4 种常见产毒微生物的通用检测。

关键词:可视芯片; 产毒微生物; 检测

中图分类号: Q789

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2011)03-0068-05

Detection and Identification of Foodborne Toxigenic Microbial by Using Thin-Film Biosensor Chips

ZHU Xu-qiang¹, FENG Jia-wang², WANG Xiao-yu², KUANG Xiao-shan², HU Song-nan², DING Huan-zhong¹

(1 College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 Zhuhai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhuhai 519015, China)

Abstract: In order to develop a rapid and accurate assay, based on the thin-film biosensor chips for the detection and identification of *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* in food. rfbE (lipopolysaccharide O157 of *S. E. coli*), invA (invasion protein of *S. Salmonella*), ipaH (invasion-associated plasmid antigen H of *S. Shigella*) and PrfA (PrfA protein of *S. L. monocytogenes*) were used as target genes to design primers and probes. Thus, all the oligonucleotide probes were labeled with 5' polyT group whereas the reverse primers were labeled with biotin. The genes were amplified and hybridized with probes on chip surface. Under the same condition, the detected "target" pathogens were *E. coli* O157:H7, *Shigella*, *Salmonella*, *L. monocytogene*. Detection sensitivity of this system was upto 670 cfu/mL for *Shigella*. This method can be used rapidly and accurately to detect four species foodborne toxigenic microbial.

Key words: thin-film biosensor chips; toxigenic microbial; identification

微生物毒素主要由产毒微生物生长过程中分泌以及死亡后体内的物质释放而产生的, 可以分为细

收稿日期: 2010-11-01

作者简介: 朱许强 (1985—), 男, 硕士研究生; 通信作者: 丁焕中 (1969—), 男, 副教授, 博士, E-mail: hzd Ding@scau.edu.cn

基金项目: 国家质检总局科技计划项目 (2010IK171)

菌毒素和真菌毒素。常见的细菌毒素有金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 毒素、大肠埃希菌 *Escherichia coli* 肠毒素、志贺菌 *Shigella* 毒素、沙门菌 *Salmonella* 毒素等。常见真菌毒素有黄曲霉 *Aspergillus flavus* 毒素、伏马菌 *Fumonisin* 素等。随着天然食物生产的全球化、新食品生产工艺的应用、人们饮食习惯的改变等在一定程度上增加了产毒微生物感染的途径,造成各种产毒微生物引起大规模中毒事件屡屡发生。因此发展产毒微生物的快速检测、鉴定方法成为国际上研究的热点。目前,国内外对上述产毒细菌检测的方法很多,主要有传统生化培养鉴定法、免疫分析法、PCR 法和普通基因芯片法等^[1]。前几种方法虽然操作比较简便,灵敏度高,特异性强,但一次只能鉴定一种或少数几种病原菌,普通基因芯片技术又因为操作复杂,还需要专业的扫描仪器分析结果,这样就大大限制了它在常规实验室的使用^[2-5]。可视芯片是一种新型的基因芯片,它可以广泛地在只有 PCR 仪之类的基本分子生物学设备的个体实验室或研究站投入使用^[6],与传统芯片相比,它具有可视的芯片表面特征,所以通过肉眼就可以观察到芯片杂交的信号。这是因为在酶的催化作用下会产生沉淀沉积在芯片表面,使芯片的厚度改变,致使反射在芯片上的光的波长发生改变,并因此可以通过芯片上颜色的改变来观察到试验结果^[7-8]。本试验针对肠出血性大肠埃希菌 O157:H7、志贺菌、沙门菌、单核细胞增生李斯特菌 *Listeria monocytogenes* 等 4 种食品中常见的产毒微生物,研究可视芯片技术检测的条件和参数。由于可视芯片不需要专业的信号分析装置,通过肉眼就可直接判断检测结果,从而更有利于在基层实验室的推广使用。本研究旨在建立一种快速、准确、方便可同时检测多种食品中常见产毒微生物的方法。

1 材料与方法

1.1 菌种

志贺菌(51334-20)、沙门菌(CMCC(B)50017)由中国微生物菌种保藏管理委员会医学细菌中心(北京)提供。肠出血性大肠埃希菌 O157:H7(NCTC12900)、单核增生李斯特菌(54004-2)由中国科学院广州微生物研究所提供。

1.2 主要试剂

DNA 提取液(LOT0522295),珠海科登生物有限公司产品。Ex Taq 酶(DR001A)、DL2000 Ladder

Marker,宝生物工程(大连)有限公司产品。Gold-View™ 核酸染料,北京赛百盛基因技术有限公司产品。细菌基因组 DNA 提取试剂盒(DP302-02),天根生化科技(北京)有限公司产品。

1.3 主要仪器

梯度 PCR 仪 Mastercycler pro S,德国 Eppendorf 公司。电泳仪 Power Pac300,美国 Bio-rad 公司。凝胶成像分析系统 Aphaimage HP,美国 Alpha 公司。芯片点样仪 Fast Spot、芯片杂交仪 DR. Mini Oven、芯片扫描仪 DR. AIM READER,台湾晶宇生物技术有限公司,紫外交联仪 SCIENTZ 03-II,新芝生物科技股份有限公司。

1.4 试验菌株的培养及 DNA 的提取

挑取已活化并通过生物鉴定的单个菌落,接种于相应的增菌培养基中,37℃ 过夜培养后,取 1 mL 菌液于离心管中 12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,取沉淀的菌体进行基因组 DNA 的提取。革兰阴性细菌直接采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取;革兰阳性细菌利用溶菌酶破壁后采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取。

1.5 引物和探针的设计与合成

本试验设计的引物来自于各产毒微生物的产毒基因或种特异性基因。选取能够代表目标微生物的种或属特异性基因,从 GenBank 中分别检索得到各细菌不同株或型的基因序列,利用 Clustal X 分析软件进行多重序列比对,选择保守性好的区域,然后利用 Primer 5.0 软件在保守区域设计引物。

引物确定后,在 2 对引物之间序列设计针对每段待测靶基因的检测探针,长度为 20~40 bp,探针序列在 NCBI 网站上提供的 BLAST 功能进行分析,与其他细菌、真菌或病毒等无相似性。

根据芯片的反应原理,下游引物 5'端以生物素标记,探针 5'端标记一段 polyT,引物和探针由上海英俊生物公司合成。引物和探针序列见表 1。

1.6 PCR 反应

50 μL 的 PCR 反应体系中,含有 10×PCR 缓冲液 5.0 μL, dNTPs(各 2.5 mmol/L)4.0 μL,5 U/μL Ex taq 酶 0.25 μL,引物 Mix(10 pmol/L)2 μL,细菌 DNA 模板 2 μL,补加灭菌蒸馏水至 50 μL。PCR 循环反应参数:首先 94℃ 预变性 2 min,然后以 94℃ 变性 30 s、退火(肠出血性大肠埃希菌 O157:H7 和单核细胞增生李斯特菌为 55℃,沙门菌为 64℃,志贺菌为 65℃)45 s、72℃ 延伸 1 min,用温度梯度 PCR 仪扩增 35 个循环。

表 1 产毒微生物特异性引物和探针

Tab. 1 Specific primers and probes of toxigenic microbial

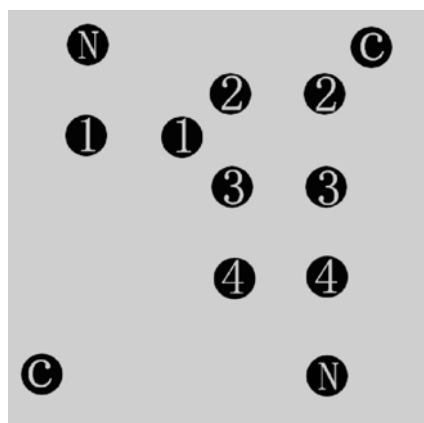
菌名	引物(探针)序列	长度/bp	参考基因序列号
肠出血性大肠埃希菌 O157:H7	rfbE-F:ATTGCGCTGAAGCCTTTG	499	CP001368
	rfbE-R:CGAGTACATTGGCATCGTG		
	Probe:GTGACAACCATTCCACCTTC		
沙门菌	invA-F:GTGAAATTATCGCCACGTTCTGGGCAA	284	EU348367
	invA-R:TCATCGCACCGTCAAAGGAACC		
	Probe:AATACCGGCCTTCAAATCGG		
志贺菌	ipaH-F:GTTCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC	629	EU743832
	ipaH-R:GCCGGTCAGCCACCTCTGAGAGTAC		
	Probe1:CATTGCCCGGGATAAAGTCA		
	Probe2:CACATGGAACAATCTCCGGA		
单核细胞增生李斯特菌	PrfA-F:GATACAGAAACATCGGTTGGC	274	EU294567
	PrfA-R:GTGTAATCTTGATGCCATCAG		
	Probe:GATTAACGGGAAGCTTGGCT		

1.7 PCR 产物测序

将 PCR 产物回收测序,并将测序结果与设计
所用序列利用 Clustal X 软件进行比对,验证试验
结果是否与设计相符.测序工作由上海英骏公司完成.

1.8 基因芯片的制备与杂交

1.8.1 芯片点样及后处理 将合成的探针稀释至
30 pmol/ μ L,加入等体积的 2 $\times$ 点样缓冲液,按照图 1
的方案加入探针溶液盘中,每孔加入约 15 μ L.按操
作说明使用 DR. Fast Spot 点样仪点制芯片,点样完
毕后目测点样区,检测是否漏点,形状是否规则.点
制好的芯片室温静置 10 min,在紫外交联仪中 254
nm 交联 700 s,加 500 μ L 超纯水冲洗 5 min 重复 2
次.加 100 μ L 体积分数为 95%乙醇 20 s 后,放入 50
 $^{\circ}$ C 干燥箱中干燥 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存备用.



N:阴性对照;C:芯片质控;1:肠出血性大肠埃希菌 O157:H7; 2:志贺菌; 3:沙门菌; 4:单核细胞增生李斯特菌.

图 1 基因芯片点阵点样图

Fig. 1 Gene chip design and the probes spotting map

1.8.2 基因芯片的杂交 吸取 1 ~ 25 μ L PCR 扩增
产物和 200 μ L DR. HybTM Buffer 混合于离心管中,
100 $^{\circ}$ C 变性 5 min,迅速冰浴 5 min.把所有的杂交混
合液转移到芯片凹槽中,避免产生气泡.置于 51 $^{\circ}$ C
杂交箱中杂交 45 min.去除杂交液.加 250 μ L Wash
Buffer 到芯片凹槽中,去除洗液,重复 2 次.加封闭液
(0.2 μ L Strep-AP 与 200 μ L Blocking Reagent 混合
液)到芯片凹槽中,室温(25 ~ 35 $^{\circ}$ C)反应 30 min.去
除封闭液,加 250 μ L Wash Buffer 到杂交室,去除洗
液,重复 2 次.将芯片在吸水纸上拍打,以吸出残留
的洗液.加显色液(4 μ L NBT/BCIP 与 196 μ L Detec-
tion Buffer 混合液)到芯片凹槽中,避光室温反应 5 ~
10 min.去除显色液,用超纯水冲洗芯片,并读取
结果.

1.9 特异性试验

分别按照 1.8.2 所述杂交过程检测肠出血性大
肠埃希菌 O157:H7、志贺菌、沙门菌、单核细胞增生
李斯特菌等 4 种标准菌株.

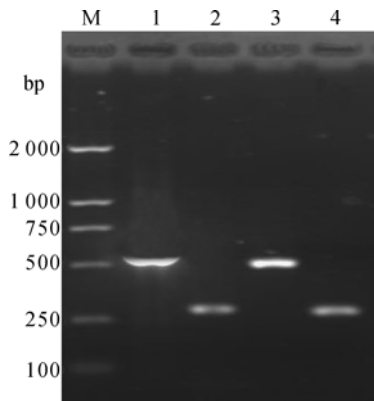
1.10 灵敏度试验

以副氏志贺菌为研究对象,取过夜培养的标准
菌株,制备 1/10 系列稀释菌液,每个稀释度分别取 1
mL 菌液做平板计数;另取 1 mL 提取 DNA 作为模
板,PCR 扩增,杂交过程同 1.8.2.

2 结果

2.1 PCR 扩增结果

将 PCR 扩增的产物用 0.02 kg/L 的琼脂糖凝胶
进行电泳检测,观察 PCR 扩增效果(图 2).



M: DNA marker DL2000; 1: 志贺菌; 2: 沙门菌; 3: 肠出血性大肠埃希菌 O157:H7; 4: 单核细胞增生李斯特菌。

图2 PCR 扩增产物凝胶电泳

Fig. 2 Gel electrophoresis of PCR amplified products

从图2可见, 试验所采用的 PCR 条件对不同致病菌的扩增都是有效的, PCR 扩增产物条带显示清

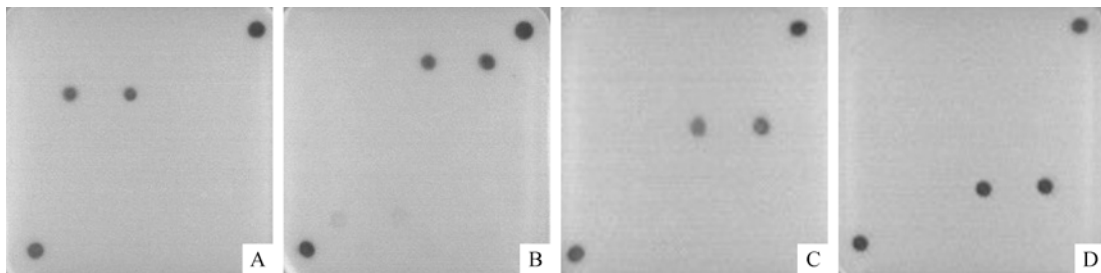
晰, 特异性好, 这为下一步的探针特异性杂交打下了良好的基础。

2.2 测序结果分析

在对 PCR 测序结果进行比对后发现, 试验中实际扩增的 PCR 产物测序序列与设计时预期的结果基本吻合, 其中沙门菌和单核细胞增生李斯特菌的测序序列与试验设计所用序列完全吻合, 这就保障了试验的可靠性。对测序结果分别进行了 BLAST 检索, 结果表明每个测序序列都只具有该致病菌的特异性, 没有其他菌的序列与测序序列匹配。

2.3 特异性试验结果

以与阳性对照亮度的信号为特异性反应标志, 通过4种产毒微生物的杂交结果可视信号照片(图3)可以看出, 目的探针都呈现明显的信号, 背景非常干净, 没有能影响试验结果的背景污染。所设计的探针反应明显, 与试验的设计完全一致。



A: 肠出血性大肠埃希菌 O157:H7; B: 志贺菌; C: 沙门菌; D: 单核细胞增生李斯特菌

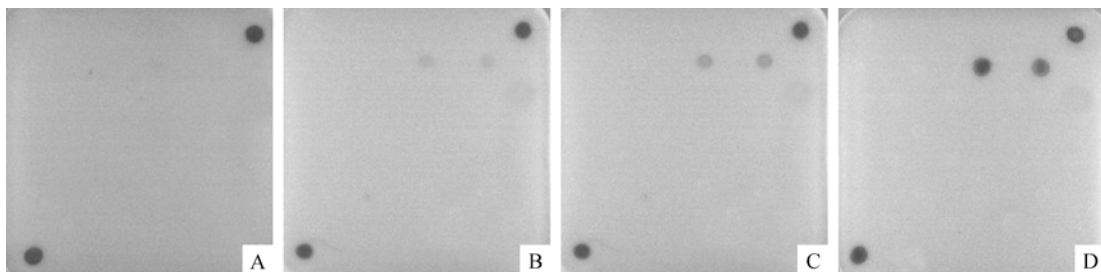
图3 4种产毒微生物芯片特异性试验

Fig. 3 The thin-film biosensor chip's specific experiment for four species toxigenic microbial

2.4 菌液检测灵敏度试验结果

如图4所示, 对于志贺菌, 在菌液浓度为 7.3×10^1 cfu/mL 时, 芯片就有微弱的杂交信号; 当浓度为

6.7×10^2 cfu/mL 时, 反应结果与阳性对照接近。因此, 本芯片的最低检测浓度为 6.7×10^2 cfu/mL。



菌液检测浓度从 A ~ D 分别是 0、 7.3×10^1 、 6.7×10^2 、 7.2×10^3 cfu/mL。

图4 志贺菌检测灵敏度试验

Fig. 4 Result of *Shigella* detection sensitivity experiment

3 讨论

运用可视芯片技术检测食品中主要产毒微生物是一种较理想的检测和鉴定方法, 具有很高的推广

和应用价值。本研究选用的 rfbE 基因是 O157:H7 的特异性基因, 编码脂多糖 O157 抗原, 是鉴定 O157:H7 的必需指标^[9]; invA 基因编码侵袭蛋白, 与沙门菌的入侵有关, 属于沙门菌的主要毒力因子并且是

沙门菌高度特异性基因^[10];ipaH 毒力基因编码侵袭性质粒抗原 H,多拷贝地存在于所有志贺菌的侵袭性质粒和染色体上,较稳定且不易丢失,是侵袭力的特异标志^[11];单核细胞增生李斯特菌检测靶基因 PrfA 编码 PrfA 蛋白,是一种转录因子,对于许多毒力因子的等位表达起关键调控因子作用^[12];选用这 4 个基因对相应产毒微生物的检测从基因水平上判断待检菌的致病性,而且能降低假阳性出现的几率,大大提高检测的特异性。

杂交图谱还受到很多杂交条件的影响,例如杂交温度、杂交时间、标记生物素引物与非标记生物素引物的比例等,本试验选用 45、48、51、54℃ 4 个杂交温度,30、45、60 min 3 个杂交时间和不同的引物比例,在反复试验权衡了特异性和灵敏性得失的基础上确定了最佳的杂交温度是 51℃,最佳的杂交时间是 45 min,最佳的引物比例是 1:1。这样既保证了每种产毒微生物都能在此条件下检出,又能降低非特异性信号的强度和缩短检测时间。另外,所使用的可视芯片试验结果也可以直接通过肉眼进行判定,而无需使用专业的信号分析处理装置进行信号分析,从而节省了昂贵的仪器成本。整个试验过程仅需要普通的 PCR 仪之类的基本分子生物学设备即可,所以可以在仪器缺乏的个体试验室或研究站推广使用。

基因芯片检测的灵敏度主要由 PCR 和显色方法的灵敏度所决定。本试验所用的显色方法是化学标记生物素法,最终确定的检测灵敏度为 6.7×10^2 cfu/mL。这一结果与 BAI 等^[13]建立的 11 种食源性致病菌的可视芯片检测灵敏度相一致。而且在实际检测中样品经过增菌液过夜培养更是可以达到检测要求的灵敏度,因为即使检测的样品中只含有单个拷贝的细菌,在进行过夜增菌后,浓度也至少可以达到 10^5 cfu/mL,远远高于本芯片系统的灵敏度,因此本方法应用于食品中产毒微生物的检测是比较理想的,同时也为食品检测和食源性感染的诊断提供了有效的技术手段和方法依据。

参考文献:

- [1] 朱俊友,李玉峰.蛋白质芯片技术及其在食品致病菌检测中的应用[J].中国卫生检验杂志,2006,16(7):780-781.
- [2] YE R,WANG T,BEDZYK L,et al. Applications of DNA microarrays in microbial systems[J]. J Microbiol Methods, 2001,47:257-272.
- [3] SCHENA M. Microarray Biochip Technology[M]. Natick: Eaton Publishing,2000:19-63.
- [4] CALL D R,BORUCHI M K,LOGE F J. Detection of bacterial pathogens in environmental samples using DNA microarrays[J]. Journal of Microbiological Methods, 2003, 53:235-243.
- [5] 赵金毅,白素兰,黄文圣,等.应用可视芯片技术检测食品中常见致病菌的方法研究[J].分析与检测,2008,34(8):141-144.
- [6] JENISON R,YANG S,HAEBERLI A,et al. Interference-based detection of nucleic acid targets on optically coated silicon[J]. Nat Biotechnol,2001,19(1):62-65.
- [7] JENISON R,LA H,HAEBERLI A,et al. Silicon-based biosensors for rapid detection of protein or nucleic acid targets[J]. Clinical Chemistry,2001,47(10):1894-1900.
- [8] ZHONG Xiao-bo,REYNOLDS R,KIDD J R, et al. Single-nucleotide polymorphism genotyping on optical thin-film biosensor chips[J]. Proc Natl Acad Sci, 2003, 100(20): 11559-11564.
- [9] DESMARCHELIER P M,BILGE S S,FEGAN N,et al. A PCR specific for *Escherichia coli* O157 based on the rfb locus encoding O157 lipopolysaccharide[J]. J Clin Microbiol,1998,36(6):1801-1804.
- [10] ZHAO S,QAIYUMI S,FRIEDMAN S,et al. Characterization of *Salmonella enterica* serotype newport isolated from humans and food animals[J]. J Clin Microbiol,2003,41(12):5366-5371.
- [11] 李向阳,李方去,杨锦红. ipaH 基因扩增诊断志贺菌和肠侵袭性大肠埃希菌[J]. 中华检验医学杂志,2001(3):167.
- [12] WONG K K,FREITAG N E. A novel mutation within the central *Listeria monocytogenes* regulator PrfA that results in constitutive expression of virulence gene products[J]. J Bacteriol,2004,186(18):6265-6276.
- [13] BAI Su-lan,ZHAO Jin-yi,ZHANG Yao-chuan,et al. Rapid and reliable detection of 11 food-borne pathogens using thin-film biosensor chips[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2010,86:983-990.

【责任编辑 柴 焰】