

单核细胞增生李斯特氏菌 实时荧光 SPIA 方法的建立

王建昌, 胡连霞*, 孙晓霞, 李 静

(河北出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 河北石家庄 050051)

摘要:以单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*, *L.monocytogenes*) *hlyA* 基因为靶序列, 设计 5' 端为 RNA 序列, 3' 端为 DNA 序列的嵌合引物和链终止 Blocker 序列, 经过优化, 建立实时荧光单引物等温扩增 (Real-time fluorescence SPIA) 方法, 进行特异性、检出限实验, 并对不同 DNA 提取方法进行比较。结果显示, 确定荧光染料 SPIA 法的最佳反应温度为 58 ℃, 反应 30 min, 引物特异性良好, 只有 4 株不同来源的 *L.monocytogenes* DNA 产生典型的 S 型荧光扩增曲线。对 *L.monocytogenes* 纯培养 DNA 的检出限为 3.6×10^1 fg/ μ L, 相应菌液浓度为 1.2×10^1 CFU/mL; Real-time fluorescence SPIA 检测试剂盒法、水煮法、溶菌酶-蛋白酶 K 法、饱和酚提取法四种方法提取 DNA, 均产生典型的扩增曲线, Ct 值没有明显差异。对人工添加猪肉火腿样品中的 *L.monocytogenes*, 采用水煮法提取 DNA 的检出限为 1.1×10^2 CFU/g。结果表明, 所建立的 *L.monocytogenes* 的 Real-time fluorescence SPIA 新型等温扩增方法, 特异性强、灵敏度高、不受 DNA 纯度的影响、快速、简便。

关键词:单引物等温扩增, 荧光, 单核细胞增生李斯特氏菌, *hlyA* 基因

Establishment of real time fluorescence single primer isothermal amplification for *Listeria monocytogenes*

WANG Jian-chang, HU Lian-xia*, SUN Xiao-xia, LI Jing

(The Technical Center of Inspection and Quarantine, Hebei Entry-Exit Inspection
and Quarantine Bureau, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: In order to establish and apply a real-time fluorescence single primer isothermal amplification (real-time fluorescence SPIA) for *Listeria monocytogenes* (*L.monocytogenes*), the RNA/DNA primers and Blockers were designed, which based on *hlyA* gene of *L.monocytogenes*. The real-time fluorescence SPIA was established to detect the *L.monocytogenes* after the optimization of the reaction system and reaction conditions, which specificity and detection limit were tested. To detect and compare the DNA of different extraction methods. The results showed that the optimum reaction temperature of fluorescence dye SPIA method was 58 ℃ and the specificity of the primers was good in 30 min, only 4 different sources of *L.monocytogenes* DNA produced a typical S type fluorescence amplification curve. The detection limit of real-time fluorescent SPIA for *L.monocytogenes* DNA was 3.6×10^1 fg/ μ L and the concentration of corresponding bacteria was 1.2×10^1 CFU/mL in pure culture. The DNA was extracted by four methods, which were kit method, boiling method, lysozyme protease K method, and saturated phenol method were detected by the real-time fluorescence SPIA. There was no significant difference of the four amplification curves Ct value. The detection limit of real-time fluorescent SPIA for *L.monocytogenes* DNA was 1.1×10^2 CFU/g for DNA from pork ham samples was extracted by boiling method. The results demonstrate that the new real-time fluorescence SPIA method for *Listeria monocytogenes*, which has high specificity and high sensitivity, is not affected by the purity of DNA.

Key words: single primer isothermal amplification; fluorescence; *Listeria monocytogenes*; *hlyA*

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2017)16-0275-06

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2017.16.052

单核细胞增生李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*, *L.monocytogenes*) 是一种重要的食源性致病菌, 能引起易感人群如新生儿、孕妇、老年人等^[1-2]以脑膜炎、败血症、单核细胞增多、流产等为主要特征的疾病。 *L.monocytogenes* 主要污染原料奶、

肉、鱼、蔬菜、奶酪、冰激凌、高盐类即食食品^[3-4]。在我国, *L.monocytogenes* 的传播呈逐年升高的趋势^[5]。在美国和欧洲, *L.monocytogenes* 在食源性致病菌致死因中高居第二位^[6]。

食品中 *L.monocytogenes* 污染量一般较低, 而且即

收稿日期: 2017-01-05

作者简介: 王建昌 (1981-), 男, 博士, 高级兽医师, 研究方向: 动物疫病病原、食源性致病菌的分子生物学, E-mail: jianchangwang1225@126.com。

* 通讯作者: 胡连霞 (1972-), 女, 博士, 高级工程师, 研究方向: 有害微生物监测与控制, E-mail: hulianxia168@163.com。

基金项目: 质检公益项目 (201310126)。

表1 实验用菌株
Table 1 Strains in this study

菌株编号	菌株名称	来源
1	单核细胞增生李斯特氏菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	ATCC 19114
2	单核细胞增生李斯特氏菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	ATCC 19111
3	单核细胞增生李斯特氏菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	CICC 21536
4	单核细胞增生李斯特氏菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>)	CICC 23929
5	绵羊李斯特菌 (<i>Listeria.ivanvii</i>)	CICC 10416
6	西尔李斯特菌 (<i>Listeria.seeligeri</i>)	CICC 21671
7	英诺克李斯特菌 (<i>Listeria.innocna</i>)	CICC 10417
8	金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	ATCC 6538
9	弗氏柠檬酸杆菌 (<i>Citrobacter freundii</i>)	ATCC 10787
10	粪肠球菌 (<i>Enterococcus faecalis</i>)	ATCC 29212
11	乙型溶血性链球菌 (<i>Streptococcus hemolytic-β</i>)	CMCC10373
12	奇异变形杆菌 (<i>Proteus mirabilis</i>)	ATCC 29906
13	福氏志贺氏菌 (<i>Shigella flexneri</i>)	CICC21678
14	鼠伤寒沙门氏菌 (<i>Salmonella typhimurium</i>)	CICC22956
15	大肠埃希氏菌 O157: H7 (<i>Escherichia coli</i> O157: H7)	CICC21530
16	小肠结肠炎耶儿森氏菌 (<i>Yersinia enterocolitica</i>)	CICC21609
17	蜡样芽胞杆菌 (<i>Bacillus cereus</i>)	CICC10468
18	大肠埃希氏菌 (<i>Escherichia coli</i>)	CMCC44102

注:ATCC 美国典型菌种保藏中心;CICC 中国工业微生物菌种保藏管理中心;CMCC 中国医学微生物菌种保藏管理中心。

使细胞受损,也具有潜在的感染能力^[7],因此快速、特异、灵敏的检测方法至关重要。目前传统的分离培养方法检测周期长,费力且结果易受到同属其他李斯特氏菌的影响^[8]。分子生物学技术的发展,在*L.monocytogenes*检测的快速性和灵敏性方面具有极大优势,但容易受到食品复杂基质的影响,出现“假阴性”结果。

单引物等温扩增技术(Single primer isothermal amplification, SPIA)是近几年报道的一种新型线性核酸等温扩增技术^[9-12],最终扩增出大量的具有高度忠实性的cDNA单链^[9]。具有操作设备简单、高忠实性、高效率 and 有效防污染等优点。Whitworth等^[13]应用美国NuGEN公司开发的Ribo-SPIA进行mRNA的扩增和转录成功分析了猪胚胎不同发育阶段基因表达差异。Potash等^[14]也采用Ribo-SPIA技术扩增全基因组cDNA来研究重组病毒EcoHIV感染小鼠后感染应激基因表达。本研究针对*L.monocytogenes*溶血素O(Listeriolysin O, LLO)编码基因hlyA设计特异性的RNA/DNA嵌合单引物和链终止序列Blocker,通过荧光仪收集,荧光染料SYBER Green II实时与反应扩增的产物cDNA单链结合产生的荧光信号,生成荧光扩增曲线,建立能够在30 min内,检测*L.monocytogenes*的实时荧光单引物等温扩增(Real Time Fluorescence Single Primer Isothermal Amplification, real-time fluorescence SPIA)方法。本研究方法比普通SPIA技术省去了繁琐的PAGE凝胶检测过程,灵敏度又与环介导等温扩增方法相当^[15],实现荧光单引物等温扩增(SPIA)方法检测*L.monocytogenes*,具有不受食品中复杂基质的影响,特异性强,灵敏度高,操作简单,用时少等优点,达到国际、国内领先水平。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

本实验所用4株单核细胞增生李斯特氏菌和14株非单核细胞增生李斯特氏菌的具体信息如表1所示;猪肉火腿样品 当地超市;Bst DNA大片段链置换聚合酶、核糖核酸酶H、核糖核酸酶抑制剂、氯化镁、四种脱氧核糖核苷三磷酸混合液、荧光染料SYBER Green II 上海生工生物工程有限公司;细菌基因组DNA提取试剂盒 北京天根生化科技有限公司;培养基 北京陆桥有限责任公司。

7500 实时荧光 PCR 仪 美国,ABI;PCR 扩增仪 德国,Whatman T Gradient;核酸蛋白分析仪 德国,Eppendorf Biophotometer plus。

1.2 实验方法

1.2.1 RNA/DNA 组合引物和 Blocker 的设计合成 根据 GeneBank 中*L.monocytogenes* hlyA 基因(AF253320.1)已知序列,对其进行同源性分析,确定其保守序列,用Primer premier 5.0 设计组合引物和相应链终止序列如表2所示。组合引物和Blocker由大连TAKARA公司合成。

表2 荧光 SPIA 引物和链终止序列
Table 2 The sequence of real-time fluorescence SPIA primer and blocker

序列名称	序列(5'-3')
引物(Plm1)	AACCUAC-AAGACCTTCCAG
链终止序列(Blocker1)	GCTGCCGTAAGTGGA

注:Blocker1:序列3'端用生物素修饰。序列中间随机加上两个XNA修饰,即“锁核酸”(Locked nucleic acid, LNA)修饰。

1.2.2 细菌的培养及基因组 DNA 的提取 取四株单核细胞增生李斯特氏菌接种至新鲜的李斯特氏菌增菌肉汤 LB1 中, 36 °C 培养过夜。空肠弯曲菌接种至 Bolton 肉汤中, 36 °C 微需氧培养过夜; 产气荚膜梭菌接种至庖肉肉汤中, 36 °C 厌氧培养过夜; 蜡样芽孢杆菌和粪肠球菌接种至胰蛋白胨大豆肉汤中, 30 °C 培养过夜; 其他 14 株非李斯特氏菌接种至胰蛋白胨大豆肉汤中, 37 °C 培养过夜。取过夜培养菌液, 按照试剂盒说明进行细菌基因组 DNA 的提取。

1.2.3 SPIA 反应体系的优化和反应温度的确定 优化反应体系中 RNA-DNA 组合引物、Blocker 链终止序列、Bst DNA 聚合酶、RNaseH、dNTPs、MgCl₂、RNase 抑制剂和 SYBER Green II 的浓度, 建立 25 μL *L.monocytogenes* 实时荧光 SPIA 最佳反应体系。

将 *L.monocytogenes* 反应体系混合液经 99 °C, 90 s 处理后降温至 60 °C, 加入 RNase H 和 Bst DNA 聚合酶后, 于 ABI7500 实时荧光 PCR 仪上进行 55~65 °C 系列温度反应, 30 min 反应过程中实时监测荧光信号, 以确定最佳反应温度, 建立 Real-time fluorescence SPIA 检测 *L.monocytogenes* 的方法。

1.2.4 Real-time fluorescence SPIA 方法的特异性分析 用试剂盒法提取的基因组 DNA 作为模板, 根据 1.2.3 中所建立的反应体系和条件进行检测, 对所建立的 *L.monocytogenes* 实时荧光 SPIA 方法进行特异性分析。

1.2.5 不同 DNA 提取方法对 Real-time fluorescence SPIA 扩增的影响 分别采用试剂盒法、水煮法^[13]、溶菌酶-蛋白酶 K 法^[14]、饱和酚提取法^[15] 四种方法提取 *L.monocytogenes* ATCC 19114 基因组 DNA, 具体操作如下。用于 Real-time fluorescence SPIA 检测并比较其起峰时间, 每种方法各设三个平行。

1.2.5.1 试剂盒法 按照 TIANamp Bacteria DNA KIT 试剂盒说明书进行。

1.2.5.2 水煮法 取 1 mL 隔夜培养的菌悬液于 1.5 mL Eppendorf 离心管中, 12000 r/min 离心 10 min, 弃上清; 加入 200 μL 灭菌 DEPC 水, 振荡混匀, 100 °C 水浴 10 min; 12000 r/min 离心 10 min, 取上清于 -20 °C 保存备用。

1.2.5.3 溶菌酶-蛋白酶 K 法 取 1 mL 隔夜培养的菌悬液于 1.5 mL Eppendorf 离心管中, 12000 r/min 离心 10 min, 弃上清; 沉淀加蛋白酶 K 消化液 100 μL, 混匀, 55 °C 水浴 1~3 h; 加等体积的饱和酚抽提 2 次, 再加等体积的氯仿/异戊醇 (49:1) 抽提一次; 上清中加 1/10 体积, 4 °C 预冷的 3 mol/L NaAc (pH5.2), 加 2.5 倍体积预冷的无水乙醇或等体积的异丙醇, -20 °C 放置 5~10 min, 12000 r/min 离心 15 min; 小心弃去上清, 加 75% 冰冷乙醇 12000 r/min 离心 5 min 洗涤 2 次; 弃上清, 室温干燥后加 DEPC 水溶解, -20 °C 保存备用。

1.2.5.4 饱和酚提取法 取 1 mL 隔夜培养的菌悬液于 1.5 mL Eppendorf 离心管中, 12000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加入裂解液 50 μL, 100 °C 水浴 15 min, 12000 r/min 离心 10 min; 取上清, 加入等体积饱和酚混匀, 室温 15 min, 稍加振荡, 4 °C,

12000 r/min 离心 30 min; 吸取上层水相, 此水相反复用酚抽提二次后, 吸水相加入 0.1 mL, 3 mol/L 醋酸钠 (pH5.5) 及 0.2 mL 20 °C 预冷的无水乙醇, 混匀后放置于 20 °C, 至少 1 h; 4 °C, 12000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加入灭菌 DEPC 水溶解 DNA, -20 °C 保存备用。

1.2.6 Real-time fluorescence SPIA 方法灵敏度的确定 取过夜培养的 *L.monocytogenes* ATCC 19114 菌液, 使用生理盐水进行 10 倍系列稀释, 采用稀释平板法, 测定其活菌数为 1.2×10^7 CFU/mL; 同时取 1 mL 采用试剂盒法提取基因组 DNA, 测得 DNA 浓度为 3.6×10^1 ng/μL, 用灭菌 DEPC 水进行 10 倍系列稀释, 并以之作为模板, 进行 *L.monocytogenes* 纯培养的 Real-time fluorescence SPIA 检出限实验。实验重复 3 次。

1.2.7 Real-time fluorescence SPIA 方法标准曲线的建立 利用 Real-time fluorescence SPIA 对 *L.monocytogenes* DNA 系列浓度 3.6×10^4 , 3.6×10^3 , 3.6×10^2 , 3.6×10^1 , 3.6×10^0 , 3.6×10^{-1} fg/μL 进行灵敏度检测。根据 *L.monocytogenes* DNA 初始浓度对数值和 Time 值 (即 Ct 值, 1 个 Ct 值 = 1.5 min), 生成标准曲线, 并利用 Excel 2007 软件进行线性回归分析。

1.2.8 Real-time fluorescence SPIA 方法人工添加的检出限 按照 1.2.2 制备 *L.monocytogenes* ATCC 19114 菌悬液。将 25 g 猪肉火腿样品 (已经采用传统培养方法 GB 4789.30 - 2010^[16] 检测为 *L.monocytogenes* 阴性) 加入 225 mL 李氏增菌肉汤 LB1 中匀浆。选取 10 倍系列稀释浓度菌悬液 1 mL 分别添加到 250 mL 火腿匀浆中, 混匀, 分别取 1 mL 模拟样品匀液, 采用稀释平板法, 测定其活菌添加范围为 $1.1 \times 10^4 \sim 1.1 \times 10^0$ CFU/g。用水煮法提取 *L.monocytogenes* 基因组 DNA, 进行模拟样品中人工添加 *L.monocytogenes* 的 Real-time fluorescence SPIA 检出限实验。实验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 Real-time fluorescence SPIA 检测 *L.monocytogenes* 方法的建立

经过反应体系和条件的优化, Real-time fluorescence SPIA 对 *L.monocytogenes* 扩增出典型 S 扩增曲线, 如图 1 所示, 其 25 μL 最佳反应体系为: Pln1 2.4 μmol/L、Blocker1 0.6 μmol/L、10 × Bst Buffer 2.5 μL、Bst DNA polymerase 24 U、10 × RNaseH Buffer 2.5 μL、RNaseH 7.5 U、dNTPs 0.2 mmol/L、MgCl₂ 3.0 mmol/L、RNase Inhibitor 9.6 U、DNA 模板 1 μL、SYBER Green II 0.3 μL (300 倍稀释), 用灭菌 DEPC 水补足体系; 最佳反应条件: 59.0 °C, 1 s; 58.0 °C, 89 s; 20 个循环 (即反应时间为 30 min), 于 58.0 °C, 89 s 收集荧光信号, 通道选择 SYBR。

2.2 Real-time fluorescence SPIA 引物的特异性实验结果

Real-time fluorescence SPIA 扩增 4 株 *L.monocytogenes*, 均出现 S 典型的荧光扩增曲线; 检测其他同属、不同属细菌菌株 DNA 均未产生典型的 S

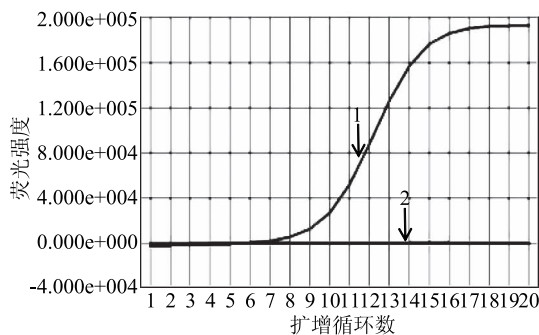


图1 Real-time fluorescence SPIA 检测 *L.monocytogenes* 结果

Fig.1 Detection result of real-time fluorescence

SPIA for *L.monocytogenes*

注:1:单核细胞增生李斯特氏菌 DNA;2:DEPC H₂O。

型扩增曲线,如图2所示。结果表明建立的 Real-time fluorescence SPIA 方法检测 *L.monocytogenes* 具有良好的特异性。

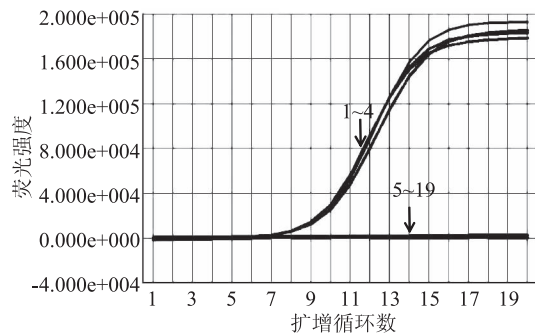


图2 Real-time fluorescence SPIA 方法

特异性检测 *L.monocytogenes* 结果

Fig.2 The specificity detection results of the

real-time fluorescence SPIA for *L.monocytogenes*

注:1~4:单核细胞增生李斯特氏菌;5:绵羊李斯特氏菌;6:西尔李斯特氏菌;7:英诺克李斯特氏菌;8:福氏志贺氏菌;9:鼠伤寒沙门氏菌;10:大肠杆菌;11:大肠埃希氏菌;12:小肠结肠炎耶儿森氏菌;13:蜡样芽胞杆菌;14:金黄色葡萄球菌;15:弗氏柠檬酸杆菌;16:粪肠球菌;17:乙型溶血性链球菌;18:奇异变形杆菌;19:DEPC H₂O。

2.3 不同 DNA 提取方法对 Real-time fluorescence SPIA 检测结果的影响

使用四种方法提取的 *L.monocytogenes* 基因组 DNA 作为模板,均出现典型的扩增曲线,起峰时间相差不大,Ct 值没有明显差异。如表3所示,不同方法提取的模板 DNA 均能满足 Real-time fluorescence SPIA 的要求。由于其扩增产物是大量的具有高度忠实性的 cDNA 单链,所以不受模板 DNA 基质的影响,对模板 DNA 纯度没有要求。

2.4 Real-time fluorescence SPIA 方法的灵敏度

当 DNA 浓度为 $3.6 \times 10^4 \sim 3.6 \times 10^1$ fg/ μ L 时,即 *L.monocytogenes* 为 $1.2 \times 10^4 \sim 1.2 \times 10^1$ CFU/mL 时,均出现典型的扩增曲线,如图3曲线1~4所示;当模板浓度为 3.6×10^0 fg/ μ L 时,即 *L.monocytogenes* 为 1.2×10^0 CFU/mL 时则无扩增曲线,如图3曲线5所示。因此,建立的 Real-time fluorescence SPIA 方法对

表3 Real-time fluorescence SPIA

检测不同方法提取 *L.monocytogenes* DNA 的结果

Table 3 The detection results of real-time SPIA using DNA of *L.monocytogenes* extracted with different methods

提取方法	循环数 (Ct)	起峰时间 (min)
试剂盒法	11.97	17.95
水煮法	12.80	19.20
溶菌酶-蛋白酶 K 法	11.29	16.93
饱和酚提取法	11.98	17.98

L.monocytogenes 纯培养 DNA 的检出限为 3.6×10^1 fg/ μ L,对 *L.monocytogenes* 纯培养菌液的检出限为 1.2×10^1 CFU/mL。

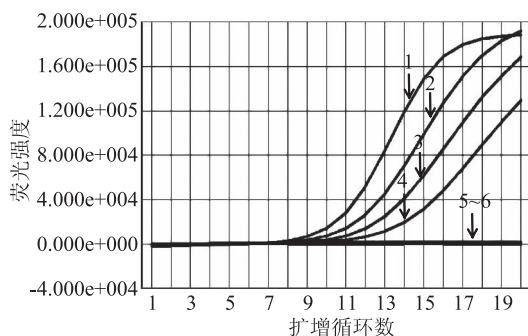


图3 荧光 SPIA 方法检测

L.monocytogenes 纯培养的检出限实验

Fig.3 Detection limit of real-time fluorescence

SPIA for *L.monocytogenes* in the pure culture

注:1: 3.6×10^4 fg/ μ L;2: 3.6×10^3 fg/ μ L;3: 3.6×10^2 fg/ μ L;
4: 3.6×10^1 fg/ μ L;5: 3.6×10^0 fg/ μ L;6:DEPC H₂O。

2.5 Real-time fluorescence SPIA 标准曲线的建立

将检测的 10 倍系列稀释 *L.monocytogenes* DNA 浓度 $3.6 \times 10^4 \sim 3.6 \times 10^1$ fg/ μ L 取对数,绘制的标准曲线,呈良好的线性关系,如图4所示,线性方程为 $y = -2.43x + 27.977$ ($R^2 = 0.9986$, $p < 0.001$),其中 y 为扩增时间(min),x 为 *L.monocytogenes* DNA 初始浓度对数值。

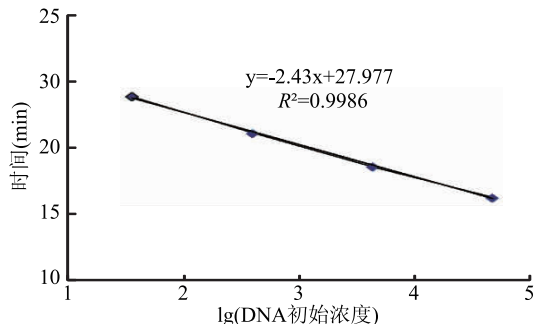


图4 Real-time fluorescence SPIA 检测

L.monocytogenes DNA 的标准曲线

Fig.4 The standard curve of real-time fluorescence SPIA assay detection of *L.monocytogenes* DNA

2.6 Real-time fluorescence SPIA 方法人工添加的检出限

当猪肉火腿样品中添加 *L.monocytogenes* 菌液浓度为 1.1×10^2 CFU/g 时,反应出现典型的荧光扩增曲线,如图 5 曲线 3 所示;当猪肉火腿样品中 *L.monocytogenes* 浓度为 1.1×10^1 CFU/g 时,则无扩增曲线,如图 5 曲线 4 所示。因此荧光 SPIA 方法对人工添加火腿样品中的 *L.monocytogenes* 检出限为 1.1×10^2 CFU/g。三次重复实验结果一致。

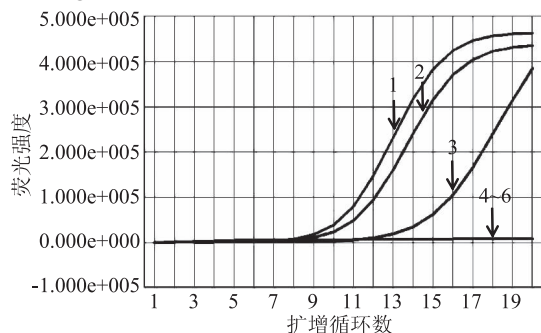


图5 荧光 SPIA 方法对猪肉火腿样品中 *L.monocytogenes* 的检出限

Fig.5 Detection limit of real-time fluorescence SPIA for *L.monocytogenes* in the sample of pork ham

注:1: 1.1×10^4 CFU/g;2: 1.1×10^3 CFU/g;3: 1.1×10^2 CFU/g;4: 1.1×10^1 CFU/g;5: 1.1×10^0 CFU/g;6:DEPC H₂O。

3 讨论

L.monocytogenes 的致病性与多种毒力因子有关,其中溶血素 O (Listeriolysin O, LLO) 是其主要毒力因子,存在于所有的致病性 *L.monocytogenes* 中。LLO 是一种能结合胆固醇、可被巯基活化的细胞溶解素,由作为 *L.monocytogenes* 毒力标志的 *hlyA* 基因编码^[17]。本研究以 *L.monocytogenes* 的 *hlyA* 基因设计组合引物和链终止序列,达到种鉴定水平。

食品中的 *L.monocytogenes* 含量较低,且在食品的加工过程会对 *L.monocytogenes* 细胞造成不同程度的损伤,但即使细胞受损,也具有潜在的感染能力^[7],因此,这更要求检测方法要灵敏、特异。徐德顺等^[18]针对 *L.monocytogenes* 的 *hly* 基因设计特异性引物和探针,建立的 real-time PCR 在纯菌条件下定量检测下限为 19 CFU/mL,袁耀武等^[19]针对 *L.monocytogenes* 的 *hly* 基因进行 LAMP 扩增,在纯菌液和鸡肉中的检出限分别为 7.3×10^1 CFU/mL 和 8.9×10^1 CFU/g。Shan Xiao-xiao 等^[20]建立的 LAMP 方法,采用水煮法提取 *L.monocytogenes* 的基因组 DNA,检出限可达到 6 CFU/反应。本研究在普通 SPIA 的基础上,利用荧光仪进行实时监测荧光染料 SYBER Green II 不断结合扩增产物产生的荧光强度,生成扩增曲线。本方法可省去烦琐的凝胶电泳检测过程,比 PCR 技术省时省力,成为可以替代普通 PCR 的核酸扩增新技术。实时荧光 SPIA 方法在 30 min 内,对 *L.monocytogenes* 纯培养 DNA 的检出限为 3.6×10^1 fg/ μ L,相应菌液的检出限为 1.2×10^1 CFU/mL;对火腿模拟污染样品的检出限是 1.1×10^2 CFU/g。

4 结论

本研究建立的 *L.monocytogenes* 实时荧光单引物等温扩增 (Real-time fluorescence SPIA) 方法,只需采用低成本、操作简便、省时省力的水煮法提取 *L.monocytogenes* 的 DNA,就能满足 Real-time fluorescence SPIA 对 DNA 模板的要求。此研究方法扩增检测一管一步完成,具有特异性强、灵敏度高、操作简单、用时少、有效防止污染的特点,更适合大通量和现场检测,具有较大的推广及应用价值。

参考文献

- [1] Recourt J, Jacquet C, Reilly A. Epidemiology of human listeriosis and seafoods [J]. International Journal of Food Microbiology, 2000, 62(3): 197-209.
- [2] Laksanalamai P, Joseph L A, Silk B J. Genomic characterization of *Listeria monocytogenes* strains involved in a multi-state *Listeriosis* outbreak associated with cantaloupe in US [J]. Plos One, 2012, 7(7): e42448.
- [3] Berrada H, Soriano JM, Pico Y, et al. Quantification of *Listeria monocytogenes* in salads by real time PCR [J]. International Journal of Food Microbiology, 2006, 107(2): 202-206.
- [4] Choi KH, Yoon Y. The effects of sodium chloride on the physiological characteristics of *Listeria monocytogenes* [J]. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 2013, 33(3): 395-402.
- [5] Chen J, Zhang X, Mei L, et al. Prevalence of *Listeria* in chinese food products from 13 provinces Between 2000 and 2007 and virulence characterization of *Listeria monocytogenes* isolates [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2009, 6(1): 7-14.
- [6] Allerberger F, Wagner M. *Listeriosis*: a resurgent food borne infection [J]. Clinical Microbiology and Infection, 2010, 16(1): 16-23.
- [7] Portocarrero SM, Newman M, Mikel B. Reduction of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *Escherichia coli* O157: H7 during processing of country-cured hams [J]. Journal of Food Science, 2002, 67(5): 1892-1898.
- [8] Cornu M, Kalmokoff M, Flandrois JP. Modelling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in enrichment broths [J]. International Journal of Food Microbiology, 2002, 73: 261-274.
- [9] 彭涛. 核酸等温扩增技术及其应用 [M]. 北京: 科学出版社, 2009: 47-57.
- [10] Kurn N, Chen P, Heath JD, et al. Novel isothermal, linear nucleic acid amplification system for highly multiplexed applications [J]. Clinical Chemistry, 2005, 51(10): 1973-1981.
- [11] Gill P, Ghaemi A. Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review [J]. Nucleosides Nucleotides & Nucleic acids, 2008, 27(3): 224-243.
- [12] Potash MJ, Chao W, Bentsman G, et al. A Mouse model for study of systemic HIV-1 immune responses, and neuroinvasiveness [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(10): 3760-3765.
- [13] Whitworth K M, Agca C, Kim J G, et al. Transcriptional profiling of pig embryogenesis by using a 15K member unigene set specific for pig reproductive tissues and embryos [J]. Biology of Reproduction, 2005, 72(6): 1437-1451.

(下转第 308 页)

降。通过对小鼠血清和肝组织的检测进一步发现苦丁茶黄酮能够提高 D-半乳糖导致衰老小鼠的 T-AOC 水平和降低 MDA、NO 水平,同时也能提高 SOD 和 GSH-Px 酶活力。通过 RT-PCR 实验证明,苦丁茶黄酮可上调衰老小鼠肝组织中 nNOS、eNOS、Mn-SOD、Cu/Zn-SOD、CAT 的 mRNA 表达和下调 iNOS 表达。以上的实验结果充分证实了苦丁茶黄酮具有很好的衰老预防作用,且效果优于同浓度的维生素 C。通过本研究的结果将为进一步对苦丁茶黄酮的纯化和抗衰老作用的临床研究提供支持。

参考文献

- [1] 宋朝春,魏冉磊,樊晓兰,等.衰老及抗衰老药物的研究进展[J].中国生化药物杂志,2015,35(1):163-170.
- [2] 刘俊平.衰老及相关疾病细胞分子机制研究进展[J].生物化学与生物物理进展,2014,41(3):215-230.
- [3] 赵露露,邓乾春,安杰,等.天然植物及其护肤功效[J].当代化工,2016,45(7):1540-1542.
- [4] Zhao X, Wang Q, Qiao Y, et al. Ilex kudingcha C.J. Tseng (Kudingcha) has *in vitro* anticancer activities in MCF-7 human breast adenocarcinoma cells and exerts anti-metastatic effects *in vivo* [J]. *Oncology Letters*, 2013, 5(5):1744-1748.
- [5] 冯霞,赵欣.苦丁茶对 SD 大鼠的胃损伤预防效果[J].现代食品科技,2014,30(4):21-25.
- [6] 王睿,赵欣.苦丁茶香气成分分析和体外功能性效果研究[J].食品工业科技,2013,35(8):131-134.
- [7] 刘佳,焦士蓉,唐远谋,等.苦丁茶多酚的提取及抗氧化活性[J].食品科学,2011,32(14):134-138.
- [8] 金亚香,孙晶,李洪军.大叶苦丁茶抗氧化成分的提取及活性的比较研究[J].食品工业科技,2015,36(4):151-158.
- [9] 赵欣,王睿,庞谅,等.苦丁茶黄酮通过 caspases 活化诱导人 HSC-3 口腔癌细胞凋亡的效果[J].现代食品科技,2015,31(4):1-7.
- [10] 吕雨晴,许海丹,鲍洁.不同方法提取苦丁茶黄酮及其抗氧化活性研究[J].食品与发酵科技,2016,52(4):37-40,60.
- [11] 黄爱玲.黄酮类化合物药理作用研究进展[J].安徽农学通报,2007,13(10):71-72.
- [12] 张倩茹,南莹,娄方明,等.女贞属苦丁茶中总黄酮的含量测定[J].遵义医学院学报,2011,34(1):79-81.
- [13] 冯霞,赵欣.不同容器发酵水豆豉预防 CCl₄ 诱导肝损伤的研究[J].现代食品科技,2016,37(7):338-342.

- [14] 邵承斌,张玲,黄娟,等.大孔吸附树脂分离纯化川明参茎叶中的总黄酮[J].华西药理学杂志,2009,24(6):576-579.
- [15] 张静泽,陈虹,白淑芳.大孔吸附树脂在中草药活性成分研究中的应用[J].辽宁中医学院学报,2004,6(4):290-291.
- [16] 杨立刚,孙桂菊,付为琳,等.大孔吸附树脂分离纯化杭白菊黄酮及其成分鉴定[J].食品工业科技,2010,31(8):125-128.
- [17] 季文静,张翠平,魏文挺,等.蜂王浆酶解产物对 D-半乳糖模型小鼠体内抗衰老的作用[J].中国食品学报,2016,16(1):18-25.
- [18] 景波,吕程,李顺旭,等.苜蓿多糖对 D-半乳糖致衰老小鼠的抗衰老作用[J].中药材,2015,38(12):2563-2567.
- [19] 钟萍,李萍,张昕蕾.当归多糖对小鼠化学性肝损伤抗氧化酶及一氧化氮含量的影响[J].现代预防医学,2011,38(22):4725-4727.
- [20] 万全,王艳梅,林琳,等.黄缘盒龟多肽对 D-半乳糖致亚急性衰老小鼠抗氧化能力的影响[J].现代食品科技,2013,29(9):2075-2080.
- [21] 胡志红,林搏浩,王晓娜,等.山茱萸果核水提取物对 D-半乳糖致衰老模型小鼠抗氧化能力的影响[J].中国老年学杂志,2016,36(16):3906-3908.
- [22] 周意,栾洁,蒋静娴,等.玛咖多糖对 D-半乳糖衰老模型小鼠免疫器官的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(19):121-125.
- [23] 吴晓强,王琰萍,余波,等.丰富环境对快速衰老小鼠行为及一氧化氮合成酶表达的影响[J].中国实用神经疾病杂志,2015,18(24):4-6.
- [24] Wultsch T, Chourbaji S, Fritzen S, et al. Behavioural and expressional phenotyping of nitric oxide synthase-I knockdown animals[J]. *Journal of Neural Transmission. Supplementum*, 2007, 72(72):69-85.
- [25] Austin SA, Santhanam AV, Katusic ZS. Endothelial nitric oxide modulates expression and processing of amyloid precursor protein[J]. *Circulation Research*, 2010, 107(12):1498-502.
- [26] Darra E, Rungtatscher A, Carcereri De Prati A, et al. Dual modulation of nitric oxide production in the heart during ischaemia/reperfusion injury and inflammation[J]. *Thrombosis and Haemostasis*, 2010, 104(2):200-206.
- [27] 吕翠岩,张胜容,徐瞰海,等.中药复方糖痹康改善氧化应激的分子机制探讨[J].中华中医药学刊,2016(3):529-531.

(上接第 279 页)

- [14] Potash M J, Chao W, Bentsman G, et al. A mouse model for study of systemic HIV-1 immune responses, and neuroinvasiveness[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, 102(10):3760-3765.
- [15] 彭帅,石磊.环介导恒温扩增法快速检测海产品中的副溶血弧菌[J].生物技术通报,2011(2):184-186.
- [16] Sreenivas R K. Detection of *Listeria monocytogenes* in pigs and pork [J]. *Journal of Food Protection*, 2002, 65(9):1470-1474.
- [17] 邱阳,王刚,卢行安. PCR 技术检测食品中金黄色葡萄球菌肠毒素 B 基因[J].中国微生态学杂志,2004,16(2):115-116.
- [18] 张喆,吕淑霞,祝儒刚,等.单增李斯特菌基因组 DNA 提取方法比较[J].江苏农业科学,2011,39(2):67-69.

- [19] GB 4789.30-2010.食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验[S].中华人民共和国卫生部,2010.
- [20] Vazquez-Boland J A, Kuhn M, Berche P, et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2001, 14(3):584-640.
- [21] 徐德顺,查赞峰.食品中单核细胞增生李斯特菌实时荧光 PCR 快速检测方法的建立[J].中国人兽共患病学报,2007,23(4):380-383.
- [22] 袁耀武,张亚爽,马晓燕,等. LAMP 检测单核细胞增生性李斯特氏菌的研究[J].中国食品学报,2009,9(3):168-173.
- [23] Shan X X, Zhang Y Q, Zhang Z G. Rapid detection of food borne *Listeria monocytogenes* by real-time quantitative Loop-mediated isothermal amplification [J]. *Food Science and Biotechnology*, 2012, 21(1):101-106.