

生物素标记寡核苷酸探针检测 和鉴定单核细胞增多症李氏菌的研究*

杨百亮 丁 伟 马海利 周志江 徐克诚 张让堂

(山西农业大学动医系, 太谷 030801)

(中国人民解放军农牧大学, 长春 130062)

摘 要 采用寡核苷酸生物素探针进行了斑点杂交试验。结果表明, 12 株单核细胞增多症李氏菌均与探针呈杂交阳性, 其它种李氏菌和细菌无一与探针杂交。探针检测靶 DNA 的敏感性为 10ng, 过夜增菌培养, 可提高敏感性 $10^3 \sim 10^4$ 倍, 测出样品中少至 150 个细菌, 探针法检测市售猪肉和牛奶的阳性率高于分离培养法, 具有推广应用价值。

关键词 生物素 DNA 探针 斑点杂交 单核细胞增多症李氏菌 检测 鉴定

单核细胞增多症李氏菌是一种危害严重的食源性致病菌。食品中单核细胞增多症李氏菌的检测, 一般以分离培养出菌体为依据, 其检样均需先增菌, 而后分离培养, 往往需要几周时间。因此, 建立一种快速、灵敏、特异的检测和鉴定食品中单核细胞增多症李氏菌的方法具有重要意义。

国外已有用同位素标记克隆和寡核苷酸探针及 PCR 检测食品中单核细胞增多症李氏菌的报道^[1~4]。本文报道用生物素标记的寡核苷酸探针检测和鉴定食品中单核细胞增多症李氏菌的研究结果。

1 材料和方法

1.1 材料

菌株 试验用菌株分别由北京生物制品检定所、中国兽医药品监察所、中国进出口商品检验技术研究所, 加拿大 Saskatchewan 大学的 Deneer 博士和解放军农牧大学卫检系提供。

主要试剂 Bio-11-d UTP, 链亲和素, 生物素-碱性磷酸酶复合物, NBT, BCIP (北京医科大学药学院)。

寡核苷酸片段及其标记 该片段位于单核细胞增多症李氏菌溶血素基因内, 核苷酸序列为: TGACAGCGTGTGTAGTAGCA, 由中国科学院微生物研究所合成, 其末端标记按文献 [5] 推荐的方法进行。

1993-07-12 收稿。

* 山西省青年科学基金资助项目。

1.2 方法

DNA 提取 全部菌株接种于 LB 培养基上, 37℃ 过夜培养。染色体 DNA 按 Deneer 等^[1]的方法提取。

斑点杂交膜制备 将待检 DNA 样品经热变性后点在 6×SSC 浸泡过的硝酸纤维膜上, 室温晾干后, 于 80℃ 干烤 2h, 即可与探针杂交。

模拟样品的制备 无菌称取无李氏菌污染的鲜猪肉 50g, 加 450ml Butterfield 缓冲液 (pH7.2) 研碎。分别取此匀浆液和市售无李氏菌污染鲜乳 9ml, 加入计数后的单核细胞增多症李氏菌 D20 1ml, 混匀后 10 倍系列稀释, 然后直接从各稀释度取 5ml, 抽提 DNA, 剩余 5ml 加入 Fraser 增菌液过夜培养, 抽提 DNA。

样品的采集、处理及细菌的分离培养 市售猪肉样品采自长春市某市场, 鲜牛奶是长春市奶站收购的个体户鲜乳。取研碎猪肉 1.0g, 鲜乳 1.0ml, 分别加入 9ml 改良的 Fraser 增菌液中, 37℃ 过夜培养, 收集菌体, 抽提 DNA。细菌的分离培养与鉴定, 按柳增善等^[6]的方法进行。

预杂交及杂交 将准备好的样品膜放在杂交袋内, 加入预杂交液 (6×SSC, 5×Denhearts, 0.5% SDS, 200μg/ml 变性小牛胸腺 DNA), 50℃ 孵育 2h, 然后将膜转入新的含热变性生物素探针 (100~200ng/ml) 的预杂交液中, 50℃ 水浴保温 30min。杂交膜经用足量 2×SSC~0.1% SDS 50℃ 漂洗 2 次, 每次 5 min 和 0.2×SSC~0.1% SDS 溶液, 室温漂洗 2 次, 每次 5min 后, 按文献^[5]的方法封膜与显色。

2 结果与分析

2.1 寡核苷酸生物素探针的特异性

以从单核细胞增多症李氏菌, 其它种李氏菌和细菌提取的总核酸做点杂交。结果表明, 探针与所有血清型和不同株的单核细胞增多症李氏菌杂交, 但与其它种李氏菌和细菌无杂交现象 (表 1)。

表 1 寡核苷酸生物素探针与不同种李氏菌及其它细菌杂交结果

菌 株	杂交结果	菌 株	杂交结果
单核细胞增多症李氏菌	+	<i>Listeria innocua</i>	—
54004 (2 血清型)	+	<i>Listeria seeligeri</i>	—
54005 (3 血清型)	+	<i>Listeria grayi</i>	—
54006 (4a 血清型)	+	<i>Listeria welshimeri</i>	—
54007 (4b 血清型)	+	化脓链球菌	—
G53-4	+	肠球菌	—
G53-5	+	金黄色葡萄球菌	—
C1	+	普通变形杆菌	—
35152	+	猪丹毒杆菌 (1a、1b、2 型)	—
' 58 (1/4b 血清型)	+	巴氏杆菌 (A、B、D 型)	—
D20 (4b 血清型)	+	大肠杆菌 44815	—
15313	+	沙门氏菌 141	—
Small boy	+	副溶血弧菌	—
<i>Listeria ivanovii</i>	—	耶尔森氏菌	—

2.2 寡核苷酸生物素探针的敏感性

用探针与相应的靶序列 DNA 做斑点杂交。本实验条件下, 其敏感性为 10ng 左右。模拟样品增菌后, 可提高敏感性 $10^3 \sim 10^4$ 倍, 测出样品中少至 150 个细菌。

2.3 杂菌干扰下的杂交结果

按下述方式提取

(1) 10^5 单核细胞增多症李氏菌 D20 与 10^5 大肠杆菌 44814 和 10^5 沙门氏菌 141 的总核酸;

(2) 10^5 大肠杆菌 44814, 10^5 沙门氏菌 141 和 10^5 猪丹毒杆菌 1a 型总核酸;

(3) 单核细胞增多症李氏菌总核酸。

分别取上述的总核酸做点杂交试验。结果探针与单核细胞增多症李氏菌核酸及含单核细胞增多症李氏菌核酸的大肠杆菌和沙门氏菌混合核酸呈阳性杂交反应, 而与大肠杆菌、沙门氏菌和猪丹毒杆菌的混合核酸无杂交现象。

2.4 市售猪肉和牛奶的检测

用生物素标记的寡核苷酸探针和分离培养法同时对 68 份市售猪肉和 70 份市售牛奶进行了分析。结果 12 份肉样两法均为阳性; 6 份探针杂交阳性, 细菌分离阴性; 10 份牛奶两种方法皆为阳性, 5 份探针杂交阳性, 细菌分离阴性。

3 讨论

本试验中制备探针的寡核苷酸片段位于单核细胞增多症李氏菌的溶血素基因内, 与其它种李氏菌和细菌没有同源序列, 具有高度的种特异性。目前国外对寡核苷酸片段都采用放射性同位素³²P 标记, 该探针半衰期只有 14.5 天, 并且价格昂贵, 易污染环境。生物素探针操作简便, 不污染环境, 试剂稳定, 可保存 1~2 年, 克服了放射性同位素半衰期短和具有放射污染的缺点。但其局限性是敏感性差, 容易出现非特异性杂交。我们曾将生物素探针用于菌落杂交, 虽然采用蛋白酶 K、RNase 和溶菌酶等严格条件处理滤膜, 可消除非特异性杂交, 但程序烦琐, 耗时长, 试剂用量大。通过采取较简便的抽提细菌 DNA, 进行点杂交的办法, 我们成功地克服了非特异性杂交, 这可能是由于通过 DNA 抽提排除了细菌细胞中某些能与亲和素蛋白产生非特异性结合的天然组分的结果。

本试验条件下, 生物素探针检测靶 DNA 的敏感性在 10ng 左右, 显然不适于对食品样品的检测。我们通过选用优良的增菌培养基 (如改良 Fraser 增菌液), 先对待测样品进行增菌培养, 然后抽提 DNA 进行杂交, 使敏感性提高了 $10^3 \sim 10^4$ 倍, 可测出样品中少至 150 个细菌, 达到了检测样品时所需的敏感性。

用斑点杂交和常规分离培养法对 68 份猪肉和 70 份牛奶样品检测的结果表明, 探针杂交的检出率高于分离培养法, 而且检测时间缩短在 2 天以内。大量杂菌的存在对杂交的敏感性和特异性无明显影响。此外, 含有探针的杂交液可反复使用几次。因此, 生物素寡核苷酸探针杂交法在食品中单核细胞增多症李氏菌的检测和鉴定中具有应用价值。

参 考 文 献

- 1 Datta AR et al. Detection of hemolytic *L. monocytogenes* by using DNA colony hybridization. Appl Environ Microbiol, 1987, 53 (9): 2256~2259
- 2 Datta AR et al. Synthetic oligodeoxyribonucleotide probes for detection of *L. monocytogenes*. Appl Environ Microbiol, 1988, 54 (12): 2933~2937
- 3 Bessesen MT et al. Detection of Listeria by using the polymerase chain reaction. Appl Environ Microbiol, 1990, 56 (9): 2930~2932
- 4 Deneer HG et al. Species-specific detection of *L. monocytogenes* by DNA amplification. Appl Environ Microbiol, 1991, 57 (2): 606~609
- 5 Riley LK et al. A method for biotinylating oligonucleotide probes for use in molecular hybridization. DNA, 1986, 5: 333~337
- 6 柳增善等. 动物食品中单核细胞增多症李氏菌的检测. 兽医大学学报, 1991 (11): 275~279

Biotin-labeled Oligonucleotide Probe for Detection and Identification of *L. monocytogenes*

Yang Bailiang Ding Wei Ma Haili

(Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801)

Zhou Zhijiang Xu Kecheng Zhang Rangtang

(Veterinary College of PLA, Changchun 130062)

Abstract A novel and practical dot blot hybridization assay was developed for detection and identification of *L. monocytogenes*. The biotin-labeled synthetic oligonucleotide probe was considered specific for the listeriolysin gene of *L. monocytogenes*. Using the probe, we were able to detect as little as 10 ng of DNA and as few as 150 bacterial cells in the simulated samples cultured overnight. It reacted with all 12 strains of *L. monocytogenes* tested, and no cross-reaction with other species of Listeria and bacteria took place. Dot blot hybridization got more positive results than bacterial cultures in detection of *L. monocytogenes* in the pork and milk samples obtained from the market. It is concluded that this method is applicable to detect *L. monocytogenes* in animal food.

Key words: Biotin; DNA probe; Dot blot hybridization; *L. monocytogenes*; Detection; Identification