



黄翠,单宏,李莉莉,等.实时荧光PCR法与国标法检测单增李斯特菌比较[J].黑龙江农业科学,2023(1):57-61.

# 实时荧光PCR法与国标法检测单增李斯特菌比较

黄翠<sup>1</sup>,单宏<sup>1</sup>,李莉莉<sup>1</sup>,朱秋明<sup>1</sup>,孙娜<sup>2</sup>,张瑞英<sup>1</sup>

(1.黑龙江省农业科学院农产品质量安全研究所/农业农村部农产品质量安全风险评估实验室(哈尔滨),黑龙江哈尔滨150086;2.黑龙江省华测检测技术有限公司,黑龙江哈尔滨150025)

**摘要:**单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)是食源性致病菌之一,可引起人和动物患病。对食品中单增李斯特菌进行检验,对保障食品安全至关重要。为明确实时荧光PCR法在食源性单增李斯特菌检测中的最低检出限以及在不同食品类型中的检出效率,对实时荧光PCR法检测单增李斯特菌的最低检出浓度进行了摸索与验证,对人工污染单增李斯特菌的豆粉、饼干、生菜、猪肉4种食品,在不同培养时间点取样采用实时荧光PCR法检测,同时与国标法GB 4789.30-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验》检测进行了比较。结果表明,实时荧光PCR法具有检测速度快、灵敏度高的优点,可在快速检测中应用,但因其死菌可以产生假阳性问题,而国标法检测可以分离得到污染菌株用于后续研究,因此,建议对于实时荧光PCR法检测阳性的样品用国标方法复检确认。

**关键词:**单增李斯特菌;快速检验;实时荧光PCR

单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)简称单增李斯特菌,是一种常见的食源性致病菌,它广泛存在于自然界中,是食品和农产品中致病菌污染的主要来源之一,其在冰箱环境中仍能生长,被称为“冰箱杀手”,严重威胁冷藏乳制品、肉制品及生鲜食品安全<sup>[1-4]</sup>。误食单增李斯特菌污染的食物,轻则可引起肠胃炎、发热、头痛等症状,重则导致败血症和脑膜炎,还可以导致孕妇流产和死胎,具有较高的病死率,是重要的食源性致病菌之一<sup>[5]</sup>。近年来,欧美等国家由单增李斯特菌引发的食物中毒事件时有发生<sup>[6]</sup>。食品在生产 and 流通多个环节存在单增李斯特菌污染的风险<sup>[7]</sup>,因此,加强监测是保证食品安全的有效手段。

目前单增李斯特菌的检测方法有免疫磁珠、数字PCR、生物传感器等<sup>[8-10]</sup>,多数因成本较高而未能广泛推广。国标法和实时荧光PCR法是应用最普遍的两种方法。国标法(GB 4789.30-2016)检测单增李斯特菌需分离纯化菌株,根据生化试验判别,结果准确,但至少需4d时间能出结果,这种方法在食品生产实时监测中具有局限性。实时荧光PCR法(SN/T 1870-2016)检测单增李斯特菌不需分离菌株,利用分子生物技术,检测

速度快,但其最低检出限量与不同类型食品中扩增效果鲜见比较和报道。

为了确定全面快速的检测方案,本研究对PCR法检测单增李斯特菌的最低检出限量及在不同食品类型中的扩增效果进行了验证,并与国标法检测单增李斯特菌进行了比较分析,以判断实时荧光PCR法是否可用于食品生产快速检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 仪器 ABI 7500 实时荧光PCR仪,离心机(转速 $\geq 12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ),恒温培养箱,高压灭菌锅,恒温水浴锅,天平(感量0.01g)。

1.1.2 试剂 李氏增菌肉汤LB<sub>1</sub>、LB<sub>2</sub>(北京陆桥技术股份有限公司),Chelex 100(SigmaAldrich有限公司),2×M5 GoldStar TaqMan Mixture(with UNG and ROX)(北京聚合美生物科技有限公司),dUTP(赛默飞世尔科技),PALCAM培养基(北京陆桥技术股份有限公司),李斯特菌显色培养基(法国科玛嘉有限公司),半固体琼脂培养基(北京陆桥技术股份有限公司),羊血琼脂平板(北京陆桥技术股份有限公司),单增李斯特菌生化检测试剂盒(北京陆桥技术股份有限公司),均在有效期范围内。

1.1.3 标准菌株 单增李斯特菌ATCC19115、伊氏李斯特菌CICC21663、英诺克李斯特菌ATCC33090、金黄色葡萄球菌ATCC6538、沙门氏菌14028。

收稿日期:2022-10-30

基金项目:农业农村部农产品质量安全风险评估计划(GJFP 201900505)。

第一作者:黄翠(1989—),女,博士,助理研究员,从事微生物检测研究。E-mail:478464034@qq.com。

## 1.2 实时荧光 PCR 法检测食品中单增李斯特菌

1.2.1 增菌 为验证 PCR 作为快速检测方法的可行性,采用一次增菌即提取 DNA 模板进行 PCR 反应的方法,即依据 GB 4789.30—2016《食品安全国家标准食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验》,无菌称取 25 g 样品加入 225 mL LB<sub>1</sub> 增菌液的均质袋中,均质器拍打 1 min,于 30 ℃ 培养 24 h 后,吸取 1 mL 增菌液用于 DNA 模板提取。

1.2.2 DNA 提取及 PCR 反应 依据 SN/T 1870—2016《出口食品中食源性致病菌检测方法 实时荧光 PCR 法》,取一次增菌液 1 mL 于 1.5 mL 无菌离心管中,8 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,弃上清,加入 50 μL 0.1% chelex,混匀后沸水浴煮 5 min,12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,取上清作为 PCR 反应 DNA 模板。

实时荧光 PCR 反应体系为引物对各 1 μL、探针 0.5 μL、dUTP 1 μL、DNA 模板 2 μL,2×M5 GolaStar TaqMan Mixture 10 μL,共 25 μL。反应程序为 95 ℃ 预变性 3 min,94 ℃ 变性 5 s,60 ℃ 退火延伸 40 s,进行 40 个循环。引物及探针序列为:上游引物:5'-CTGAATCTCAAG-CAAAACCTGGT-3';下游引物:5'-CGCGAC-CGAAGCCAACTA-3';探针:5'-ATACGATA-ACATCCACGGCTCTCTGGCTGG-3'。

对于荧光 PCR 反应结果,Ct 值≥40.0,即无扩增曲线,判定结果为阴性;Ct 值≤35.0,判定结果为阳性;Ct 值>35.0 而<40.0 时,重做 PCR,重做结果 Ct≥40.0,判定结果为阴性,否则为阳性。

## 1.3 国标法检测食品中单增李斯特菌

根据说明书对 PALCAM 培养基、李斯特显色培养基和半固体琼脂培养基进行配制及灭菌。依据 GB 4789.30—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验》,

无菌称取 25 g 样品加入 225 mL LB<sub>1</sub> 增菌液的均质袋中,均质器拍打 1 min,于 30 ℃ 培养 24 h 后,移取 0.1 mL 接种于 LB<sub>2</sub> 增菌液中,30 ℃ 培养 24 h 后,在显色平板和 PALCAM 平板上划线,取可疑菌落做动力、溶血和生化试验。

动力试验:挑取纯菌落穿刺半固体琼脂,于 30 ℃ 培养 5 d,观察生长状态。

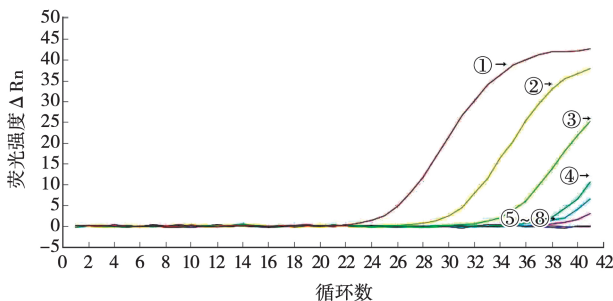
溶血试验:挑取纯菌落在羊血平板穿刺接种,36 ℃ 培养 48 h 于明亮处观察。

生化试验:根据生化检测试剂盒说明书,挑取纯菌落至适量无菌水中,制成 0.5 麦氏浊度的均一菌液。(1)甲基红试验:接种 200 μL 菌液,培养 24 h 后滴加 2 滴甲基红试剂,观察结果;(2)VP 试验:接种 200 μL 菌液,培养 24 h 后,滴加甲液 3 滴,乙液 1 滴,30 min 后观察结果;(3)葡萄糖、麦芽糖、鼠李糖和木糖试验:在相应反应孔中加入糖发酵剂,每孔接种 200 μL 菌液,培养 24 h 后观察反应颜色;(4)甘露醇和七叶苷试验:每孔接种 200 μL 菌液,培养 24 h 后观察反应颜色。

## 2 结果与分析

### 2.1 实时荧光 PCR 法在食源性单增李斯特菌检测中的验证

2.1.1 灵敏性 取一个标准单增李斯特菌的菌落于 1 mL 生理盐水中,菌液浓度为 1×10<sup>8</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>,将该菌液继续稀释得到 1×10<sup>7</sup>,1×10<sup>6</sup>,1×10<sup>5</sup>,1×10<sup>4</sup>,1×10<sup>3</sup>,1×10<sup>2</sup> 和 10 CFU·mL<sup>-1</sup> 浓度的菌液,分别取 1 mL 稀释菌液制备模板 DNA 和进行实时荧光 PCR 反应。其扩增曲线和 Ct 值如图 1 和表 1 所示,虽然菌液浓度在 1×10<sup>4</sup> CFU·mL<sup>-1</sup> 时,有 Ct 值,但考虑 Ct 值高于 35,扩增不稳定,最终选择 1×10<sup>5</sup> CFU·mL<sup>-1</sup> 作为单增李斯特菌的实时荧光 PCR 反应的最低检出限量,并以 1 mL 此浓度菌液添加在食品样品中验证实时荧光 PCR 法在不同食品中单增李斯特菌检测情况。



①~⑦. 1×10<sup>7</sup>, 1×10<sup>6</sup>, 1×10<sup>5</sup>, 1×10<sup>4</sup>, 1×10<sup>3</sup>, 1×10<sup>2</sup> 和 10 CFU·mL<sup>-1</sup> 单增李斯特菌液; ⑧. 阴性对照。

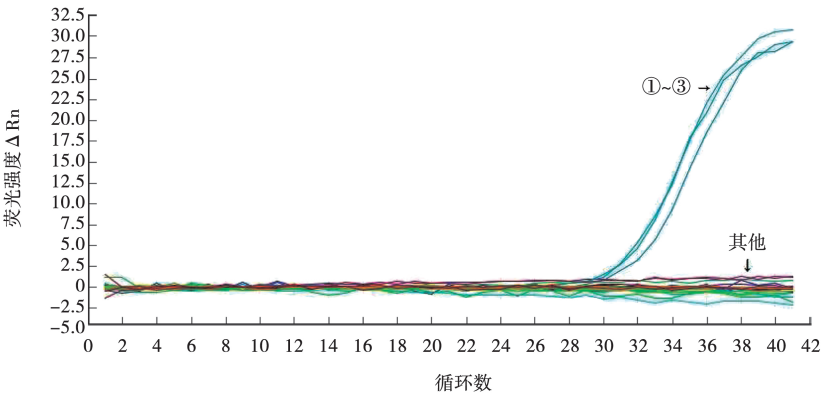
图 1 不同浓度单增李斯特菌实时荧光 PCR 反应扩增图谱

表 1 不同浓度单增李斯特菌实时荧光 PCR  
反应扩增结果

菌液浓度/(CFU·mL <sup>-1</sup> )	Ct 值	PCR 结果
0	-	阴性
10	-	阴性
1×10 <sup>2</sup>	-	阴性
1×10 <sup>3</sup>	-	阴性
1×10 <sup>4</sup>	35.44	阳性
1×10 <sup>5</sup>	29.64	阳性
1×10 <sup>6</sup>	23.83	阳性
1×10 <sup>7</sup>	19.77	阳性

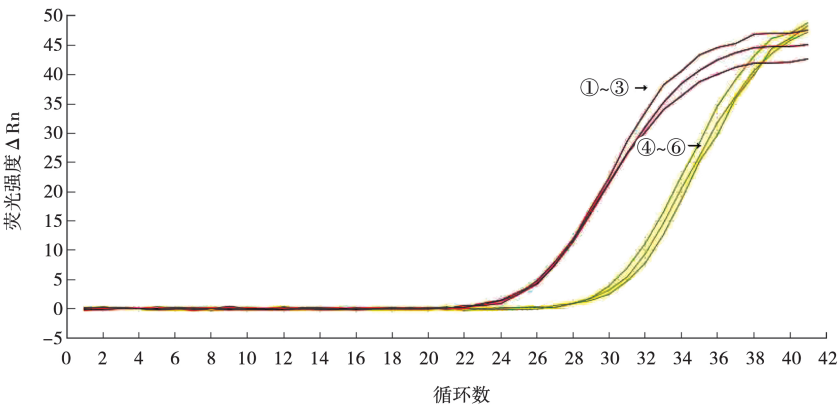
2.1.2 特异性与重复性 对单增李斯特菌、伊氏李斯特菌、英诺克李斯特菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌进行 PCR 反应,结果表明除单增李斯特菌有很好的扩增曲线,其他均无扩增曲线(图 2),说明该方法对单增李斯特菌有很好的特异性。

对 1×10<sup>7</sup> 和 1×10<sup>6</sup> CFU·mL<sup>-1</sup> 浓度单增李斯特菌做 PCR 扩增反应,每个浓度 3 个复孔,其 Ct 值分别为 19.91,19.22,20.19 和 23.23,24.16,24.09,表明 PCR 反应重复性良好,扩增曲线如图 3 所示。



①~③. 单增李斯特菌 ATCC19115;其他. 伊氏李斯特菌 CICC21663、英诺克李斯特菌 ATCC33090、金黄色葡萄球菌 ATCC6538、沙门氏菌 14028 和阴性对照。

图 2 实时荧光 PCR 法检测单增李斯特菌特异性验证



①~③. 1×10<sup>7</sup> CFU·mL<sup>-1</sup> 浓度单增李斯特氏菌液;④~⑥. 1×10<sup>6</sup> CFU·mL<sup>-1</sup> 浓度单增李斯特菌。

图 3 实时荧光 PCR 法检测单增李斯特菌重复性验证

2.1.3 验证 分别无菌称取 25 g 饼干、蔬菜、豆粉、猪肉于均质袋中,加入 225 mL LB<sub>1</sub> 增菌液,均质器拍打 1 min,并分别加入 1 mL 1×10<sup>5</sup> CFU·mL<sup>-1</sup> 单增李斯特菌,每隔 2 h,吸取 1 mL 增菌液,进行

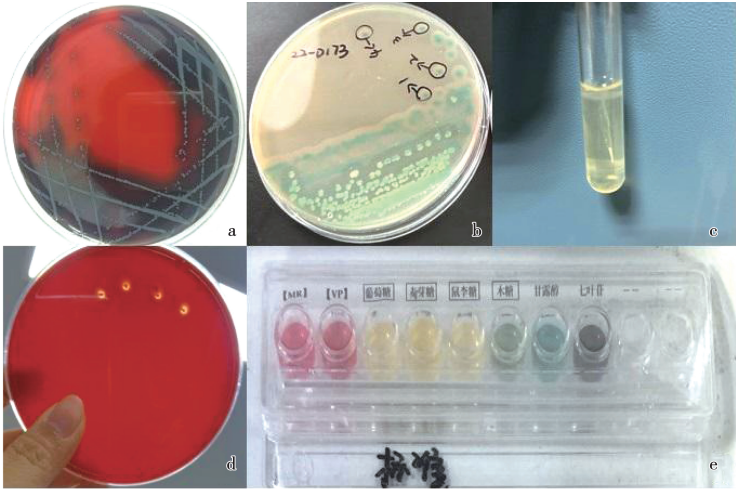
DNA 提取及实时荧光 PCR 反应,复孔 3 个,其 Ct 值平均值如表 2 所示。饼干和蔬菜中增菌当时即能稳定扩增单增李斯特菌,而豆粉和猪肉分别于增菌 24 和 16 h 才能稳定扩增。

表 2 不同食品样品中添加单增李斯特菌后不同  
时间点荧光定量 PCR 结果

增菌 时间/h	Ct 值			
	饼干	蔬菜	豆粉	猪肉
0	30.6	32.4	无扩增	无扩增
2	30.7	32.6	无扩增	无扩增
4	29.6	29.8	无扩增	无扩增
6	28.7	28.4	无扩增	无扩增
8	28.7	28.2	无扩增	无扩增
10	30.1	27.4	无扩增	无扩增
12	28.4	27.7	无扩增	无扩增
14	28.6	27.6	无扩增	无扩增
16	28.1	25.5	无扩增	29.6
18	18.7	25.7	无扩增	27.8
20	17.6	23.4	无扩增	26.8
22	16.8	24.1	无扩增	24.5
24	16.4	23.7	29.7	22.4
26	15.2	22.4	29.0	20.1

2.2 国标法检测食源性单增李斯特菌

如图 4 所示,单增李斯特菌在 PALCAM 平板上为圆形灰绿色菌落,周围有黑色水解圈(图 4a);在科玛嘉显色平板上为蓝色菌落,周围有白色晕环(图 4b);在半固体琼脂培养基上,单增李斯特菌呈现散状生长(图 4c);在羊血琼脂平板上穿刺培养后,呈现狭窄、清晰、明亮的溶血圈(图 4d);生化反应中,经培养,甲基红与 VP 试验显红色,为阳性反应;葡萄糖、麦芽糖和鼠李糖显黄色,为阳性反应;木糖和甘露醇显蓝绿色,为阴性反应;七叶苷显棕黑色,为阳性反应(图 4e),符合单增李斯特菌可发酵葡萄糖、麦芽糖、鼠李糖产生酸性物质,不能利用木糖和甘露醇,能水解七叶苷的生化特点,可判定为单增李斯特菌。



a.PALCAM培养基; b.单增李斯特显色平板; c.半固体琼脂培养基; d.羊血琼脂平板; e.单增李斯特生化试剂条。

图 4 国标法检测单增李斯特菌

3 讨论

本研究参照 SN/T 1870—2016《出口食品中食源性致病菌检测方法 实时荧光 PCR 法》对单增李斯特菌进行了 PCR 快速检测方法验证。结果表明,单增李斯特菌实时荧光 PCR 法特异性与重复性均良好,其最低检出限为  $1 \times 10^5$  CFU·mL<sup>-1</sup>。而在翁文川等<sup>[11]</sup>的研究中,采用 Triton-X 水煮法提取 DNA,其最低检出限在  $1 \times 10^6$  CFU·mL<sup>-1</sup>。这说明用 0.1% chelex 做 DNA 提取液,提取效率更高。李莉莉等<sup>[12]</sup>对沙门氏菌的研究中,同样用 0.1% chelex 做 DNA 提取液,其荧光 PCR 法最低检测限在  $1 \times 10^4$  CFU·mL<sup>-1</sup>。这种检出限的不同,可能因为单增李斯特菌是革兰氏阳性菌,而沙门氏菌为革兰氏阴性菌,革兰氏阳性菌细胞壁比阴性菌要厚,DNA 提取效率也比阴性菌低导致

的。将等量( $1 \times 10^5$  CFU·mL<sup>-1</sup>)的单增李斯特菌,添加到饼干、蔬菜、豆粉和猪肉中,扩增所需的最少时间不同,饼干和蔬菜样品,添加即能稳定扩增,而猪肉和豆粉样品则分别需要 16 h 和 24 h 才能扩增。这可能是肉或豆粉中的脂肪和蛋白质等抑制了 PCR 反应<sup>[13]</sup>,只有菌浓度扩增到足够大,提取 DNA 浓度足够高的时候才能满足 PCR 反应。实时荧光 PCR 法只需一次增菌,不需分离纯化,可在 36 h 内判定单增李斯特菌污染,而国标法至少需 4 d 时间才能判定,说明实时荧光 PCR 法在时效性上具有很大的优势。但该方法问题在于,死菌也会产生阳性结果。针对该问题,周阳等<sup>[14]</sup>研究发现叠氮溴化丙锭(PMA)可以结合并修饰死菌 DNA,抑制 PCR 反应,而活菌因有细胞膜保护不受影响,因此用 1.0 mg·mL<sup>-1</sup> PMA 处理食品可以增加 PCR 结果的可靠性。也

有学者提出基于 mRNA 的 RT-PCR 法检测食品中致病菌<sup>[15]</sup>,如检测婴幼儿奶粉中的克罗诺杆菌<sup>[16]</sup>及 O157:H7 活菌<sup>[17]</sup>,但是 mRNA 提取步骤复杂,易降解,也给快速检测增加了难度。虽然实时荧光 PCR 法有死菌造成的假阳性问题,但也说明了污染风险实际存在。所以该法仍然是目前最优的快速检测方法。而国标法检测单增李斯特氏菌虽然速度慢,但优势在于分离纯化得到的污染菌株,可用于后续遗传和毒力研究等。

## 4 结论

实时荧光 PCR 法检测具有灵敏快速等优点,可以用于食品生产快速检测。如需获得污染菌株后续研究,可采用国标法分离确认。

### 参考文献:

[1] 徐进,韩宏伟.莫让冰箱变“菌箱”[J].饮食科学,2022(5):16.  
[2] 苏荣镇,范琨,邹颜秋硕,等.云南省牛乳中单核细胞增生李斯特氏菌的分布特征、耐药性及毒力研究[J].食品安全质量检测学报,2021,12(3):1192-1199.  
[3] 李可维,刘思洁,赵薇,等.9274 份肉及肉制品食源性致病菌监测结果分析[J].食品安全质量检测学报,2020,11(23):9033-9038.  
[4] 马金晶,李凤琴,黄敏毅,等.鲜切果蔬中食源性致病菌污染研究进展[J].食品安全质量检测学报,2021,12(7):2591-2599.  
[5] 郝歌,钱映,李蓉,等.单核细胞增生李斯特氏菌毒力基因及其致病机制的研究进展[J/OL].中国食品卫生杂志:1-10(2022-10-21)[2022-12-18].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3156.R.20221021.1133.002.html>.  
[6] SELF J L, CONRAD A, STROIKA S, et al. Multistate outbreak of listeriosis associated with packaged leafy green salads, United States and Canada, 2015-2016[J]. Emerging Infectious Diseases,

2019,25(8):1461-1468.

[7] FAGERLUND A, MRETR T, HEIR E, et al. Cleaning and disinfection of biofilms composed of *Listeria monocytogenes* and background microbiota from meat processing surfaces[J]. American Society for Microbiology, 2017(17):e01046-17.  
[8] 史文静,姜慧玲,齐玉梅,等.单核细胞增生李斯特菌检测技术研究进展[J].动物医学进展,2022,43(3):95-98.  
[9] 赵梦迪,李靖,凌志婷,等.食源性单核细胞增生李斯特菌快速检测技术研究进展[J].中国家禽,2021,43(10):94-100.  
[10] 胡仲皓,单兴根,何晓花,等.基于单核细胞增生李斯特菌 ACTA 基因的环介导等温扩增技术快速检测方法的建立[J].中国预防兽医学报,2022,44(1):47-52.  
[11] 翁文川,杨汝德,焦红,等.免疫磁分离-荧光 PCR 应用在肉类单增李斯特氏菌的检测[J].中国人兽共患病学报,2006(6):547-550.  
[12] 李莉莉,单宏,张瑞英,等.食源性沙门氏菌 Real-time PCR 技术快速检测方法的建立及初步应用[J].黑龙江农业科学,2020(12):93-98.  
[13] 陈伟,李正国,杨平,等.肉制品中志贺氏菌 DNA 的快速提取方法[J].食品与发酵工业,2009,35(5):12-15.  
[14] 周阳,罗岚,唐泰山,等.叠氮溴化丙锭对食品中单增李斯特氏菌检测结果的影响[J].江苏农业学报,2014,30(3):640-644.  
[15] TECHATHUVANAN C, D' SOUZA D H. Propidium monoazide for viable *Salmonella enterica* detection by PCR and LAMP assays in comparison to RNA-based RT-PCR, RT-LAMP, and culture-based assays[J]. Journal of Food Science, 2020,85(10):3509-3516.  
[16] 孙晶莹,李宏铎,孙丽君,等.RT-PCR 快速检测婴幼儿奶粉中的克罗诺杆菌活菌研究[J].食品安全质量检测学报,2018,9(3):598-602.  
[17] 黄偌颖,张娟胜,吕红亮,等.改良 RNA 提取法应用于 RT-PCR 检测 O157:H7 活菌[J].现代预防医学,2014,41(9):1658-1661.

# Comparison of Real-Time Fluorescent PCR and National Standard Method for Detection of *Listeria monocytogenes*

HUANG Cui<sup>1</sup>, SHAN Hong<sup>1</sup>, LI Lili<sup>1</sup>, ZHU Qiuming<sup>1</sup>, SUN Na<sup>2</sup>, ZHANG Ruiying<sup>1</sup>

(1. Quality and Safety Institute of Agricultural Products, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences/Agricultural Products Quality and Safety Risk Assessment Laboratory (Harbin), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, P. R. China, Harbin 150086, China; 2. Centre Testing International Group, Harbin 150025, China)

**Abstract:** *Listeria monocytogenes* is a foodborne pathogenic bacteria which can cause human and animal diseases. Monitoring and testing *Listeria monocytogenes* in food is very important. In order to determine the minimum detection limit of real-time fluorescent PCR in the detection of food borne *Listeria monocytogenes* and the detection efficiency in different food types, the limit of detection of real-time fluorescent PCR method for *Listeria monocytogenes* were verified in this paper. *Listeria monocytogenes* was added in four kinds of foods, namely soybean meal, biscuit, lettuce and pork, and was detected by real-time fluorescent PCR method at different time points. Through comparing and analyzing with the national standard method, the real-time fluorescent PCR method has the advantages of fast and high sensitivity, and can be applied in rapid detection. However, considering that the dead bacteria can cause false positive problems, the national standard method can separate the contaminated bacterial strain for further research, it is recommended to recheck and confirm the positive samples using national standard method after PCR detection.

**Keywords:** *Listeria monocytogenes*; rapid test; real-time fluorescent PCR