

扩增内标及其在食源性致病菌 PCR 检测中的应用

何晓华¹, 史贤明^{1, 2*}

(¹ 上海交通大学农业与生物学院食品科学系, 陆伯勋食品安全研究中心, 上海 200240)

(² 上海食品安全工程技术研究中心, 上海 201203)

摘要:虽然 PCR 技术不断地得到了发展和改进, 但检测结果容易出现假阴性而影响检测准确性的现象一直没有得到很好的解决。现在大多数学者普遍认为, 在 PCR 体系中加入扩增内标(即一段人工构建合成的 DNA 序列或者是一段致病菌的看家基因序列)能有效指示假阴性现象的出现, 是 PCR 检测技术标准化的措施之一。本文将从 PCR 检测方法中假阴性出现的原因、扩增内标的构建以及扩增内标在 PCR 检测方面的应用三方面进行综合评述, 并结合本实验室的工作基础, 介绍扩增内标的简捷构建过程和应用要点, 希望在不影响检测灵敏度的前提下, 发挥扩增内标对假阴性的指示作用。

关键词: 扩增内标; PCR 检测; 假阴性

中图分类号: TS207.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 02-0141-07

PCR 技术的建立起始于 20 世纪 70 年代早期, 发展至今已有 30 多年的历史。在这一发展过程中, PCR 技术得到了不断发展、改进, 但近来的一些应用实践显示, PCR 反应结果常常会呈现假阴性现象, 究其原因, 主要是目的序列的扩增反应受到抑制剂的影响所致。因此, 在 PCR 检测中出现假阴性的现象就成为研究者所最为关心的问题之一, 但是这一问题却一直没有得到很好的解决。一些研究者认为, 在 PCR 反应体系中放置一条能够指示假阴性的扩增内标是完善 PCR 技术非常必要的手段之一^[1]。

扩增内标 (Internal Amplification Control, IAC) 是添加到 PCR 反应体系中用以指示假阴性现象的一段人工构建 DNA 序列或者是一段致病菌的看家基因序列。扩增内标作用的主要原理是: 将扩增内标添加到 PCR 反应体系中, 使之与目标基因序列共同进行扩增, 如果在反应体系中存在一些抑制因素, 则扩增内标和目的序列的扩增反应都将受到抑制,

从而达到指示 PCR 反应假阴性的目的^[2]。1992 年, Telenti 等人在检测 HIV 前病毒的 DNA 时, 首次将人工构建的一条扩增内标加入到 PCR 检测体系中, 并且在这篇文献中也明确指出, 在 PCR 检测体系中添加扩增内标是指示抑制剂的一种灵敏手段^[3]。随后扩增内标作为假阴性反应的指示剂开始逐渐应用于 PCR 检测技术中。本文侧重介绍扩增内标在致病菌 PCR 检测技术中的应用。

1 PCR 检测结果出现假阴性的原因

PCR 检测结果出现假阴性, 一般是指由于 PCR 反应体系中存在抑制因素及其他相关原因致使原来应该为阳性的结果却呈现阴性的现象。除抑制剂以外, 其他原因主要有 PCR 仪故障、PCR 检测体系不恰当、DNA 聚合酶失活以及人为操作失误等。

样品中存在的化学物质或者是在样品进行前处理(如增菌培养、菌体收集、DNA 提取等)各环节出

基金项目: 国家自然科学基金项目(30972485); 上海市科委项目(08142200700, 08DZ0504200)

* 通信作者。Tel: +86-21-34206616; E-mail: xmshi@sjtu.edu.cn

作者简介: 何晓华(1984-), 女, 浙江人, 硕士研究生, 主要研究方向为食品安全。E-mail: hexiehua123456@163.com

收稿日期: 2009-08-20; 修回日期: 2009-10-01

现的抑制因子都会导致 PCR 检测结果出现假阴性。(1)某些食品中存在抗生素、重金属离子等会抑制增菌培养过程中致病菌的生长;同样在食品加工过程中,由于受生产、包装、贮存等条件的影响,使致病菌易出现细胞壁、细胞膜受损,酶活性减弱及动力变异等非致死性损伤,这就形成了一个具有不同生长特性的细胞群-亚致死细胞,在一般增菌培养过程中不能生长^[4],这些情况均可使 PCR 检测结果出现假阴性。(2)在菌体收集过程中,不同的菌体收集方法最后的损失率也不同,有的菌体收集方法损失率高达 91%^[5],所以不适当的菌体收集方法也会间接使 PCR 结果出现假阴性。(3)在 DNA 提取过程中,不同的样品及不同的提取方法均可使最后所提

取的 DNA 的浓度与纯度不同^[6],纯度或者是浓度过低,提取过程中损失较多都会造成 PCR 结果中假阴性的出现,而且不论哪种提取方法,如果在最后所提取的 DNA 中残留的一部分抑制剂,也可使 PCR 结果出现假阴性。

增菌培养、菌体收集、DNA 提取这 3 个步骤中将抑制因子残留在 DNA 模板中的方式有多种,从而可导致假阴性现象的产生(见表 1)。研究表明,这些抑制因素主要通过影响 DNA 模板和 *Taq* 酶,致使 PCR 扩增能力下降或丧失,从而出现假阴性检测结果。同时,在 PCR 检测过程中由于人为操作的失误、试剂以及 PCR 体系中酶失活等因素,均可使检测结果出现假阴性。

表 1 食物中的抑制成分和解决办法^[7]

Table 1 Inhibitors in food samples and their treatment methods^[7]

Food types	Target bacteria	Inhibitory components	Solutions
Soft cheese	<i>L. monocytogenes</i>	Food residue	Column purification
Milk	<i>L. monocytogenes</i>	Ca ²⁺	Mg ²⁺ chelation
Milk	<i>S. aureus</i>	Bacterial debris	Phenol-chloroform extraction
Oyster	<i>Hepatitis A</i>	Polysaccharide, Glycogen	CTAB and PEG extraction
Meat	<i>B. thermosphacta</i>	Fetuin	Column purification
Blood	<i>L. monocytogenes</i>	Immuglobulin G	Anion-exchange chromatographic
Smoked salmon	<i>L. monocytogenes</i>	Ovalbumin	Ether extraction or column purification

2 扩增内标的构建方法

制备扩增内标的方法有很多,根据不同的实验目的和要求采用不同的制备方法。通常情况下是利用克隆技术将目标序列的 PCR 产物通过替换、删除或者插入一段 DNA 序列等手段处理后制备的。此外,还有借用 β 肌动蛋白(β -actin)的基因序列或者是杂合序列,以及一些细胞中的看家基因作为扩增内标。通过上述方法制备扩增内标,检测时除要设计目标引物外还需设计内标的扩增引物。构建扩增内标的方法从分子克隆技术的角度来说,一般可分为重组法和非重组法。在重组法中,根据用于构建扩增内标的序列与目的基因序列是否同源又可分为同源重组法和非同源重组法。以重组法构建的扩增内标有竞争性的扩增内标,也有非竞争性的扩增内标。非重组法所构建的扩增内标是非竞争性的,它在 PCR 检测体系中不与目的基因片段共用引物。

用重组法构建的扩增内标,若将其添加到 PCR 检测体系中,则在含扩增内标的 PCR 检测体系中存在以下组分:两种 DNA 模板——目的基因片段和扩增内标;一对引物,该引物既能与目标基因片段结合,也可与扩增内标结合。为了使结果比较直观化,

能直接从琼脂糖凝胶电泳图上看出来,同时又不影响扩增效率,一般设计目的产物与扩增内标产物大小差异为 150 - 200 bp。在扩增内标与目标片段的共同扩增系统中,如果存在抑制现象,内标的 PCR 扩增也将被抑制,从而达到指示假阴性的目的。

非重组法构建的扩增内标均为非竞争性的扩增内标,这就要求所构建的扩增内标与目的基因片段在扩增时使用不同的引物,而且要求在同一 PCR 检测体系中两个不同的扩增反应同时进行,这两个反应不会因为竞争引物而受到影响。

对于利用非重组法构建的扩增内标,在设计内标扩增引物时,要针对一段人工构建的 DNA 序列(如扩增内标质粒 DNA)或者是针对一些存在于任何微生物中且比目的基因片段拷贝数更高的基因片段(如 rRNA 编码基因、16S 核糖体基因、23S 核糖体基因、看家基因等)进行设计^[8-10]。用这种方法构建的扩增内标,添加到 PCR 检测体系中时要通过控制内标的引物浓度来控制内标的扩增,以避免或尽量减少扩增内标与目的基因片段竞争 dNTP 和 DNA 聚合酶^[2]。由于用非重组法所构建的扩增内标目前应用的还比较少,所以本文以介绍用重组法来构建扩增内标。

2.1 DNA 片段突变重组法

DNA 片段突变重组法是利用克隆技术将目标序列的 PCR 产物通过替换、删除或者插入一段基因序列等手段处理后制备的^[11-13], 再将最后产物连接到质粒载体并转化到大肠杆菌中。

通过替换的手段处理后得到的扩增内标, 由于其与目标产物片段相差不大, 与目标片段同源性很高, 不能通过凝胶电泳来区分, 因此主要用于含检测探针的 PCR 反应, 且制备过程繁琐; 通过删除的手段处理后得到的扩增内标, 其片段大小比目的基因片段小, 虽可在琼脂糖凝胶电泳中区分开, 但对检测灵敏度的影响却比较显著; 通过插入的手段处理后得到的扩增内标, 其片段大小比目的基因片段大, 这样既可在凝胶电泳上区分开, 同时对检测灵敏度的影响又不大, 所以相对而言, 用这种手段处理后得到的扩增内标应用性强于前两者, 但如果将这几种处理手段结合起来使用的话, 结果会更优一些。

2.2 复合引物重组法

复合引物重组法是一种构建过程相对简单的方法。首先选择一段与目标基因同源性较低的内参基因, 针对这段内参基因序列设计一对扩增引物, 然后在这对扩增引物的 5' 末端分别连接目标片段的扩

增引物, 形成一对约 40 bp 的长引物, 接着, 用这对长引物对内参基因序列进行扩增, 并将扩增产物连接到质粒载体上^[14-15]。

通过复合引物法构建的扩增内标与目标片段可通过普通的琼脂糖凝胶电泳加以区分, 并且内参基因的选择灵活, 具有很强的实用性。

用复合引物重组法还可以用于构建多重扩增内标 (IACs), 此多重扩增内标可添加到多个单一的 PCR 检测体系中, 以指示假阴性现象的出现^[2,16]。

2.3 重叠 PCR 重组法

重叠 PCR 重组技术是采用具有互补末端的引物用于 PCR 反应, 使 PCR 产物能形成重叠链, 从而在随后的扩增反应中通过重叠链的延伸, 将不同来源的扩增片段重叠拼接起来 (如图 1)。根据重叠 PCR 的原理将人工设计的扩增内标序列分解成首尾相连的几段, 然后通过几轮 PCR 扩增将其连接成一条完整的扩增内标序列, 并插入到质粒载体上^[17]。通过重叠 PCR 技术可以合成任意需要的 DNA 序列, 具有很强的灵活性, 但是合成序列长度一般在 150 bp 左右, 适用于荧光定量 PCR 检测中的扩增内标。

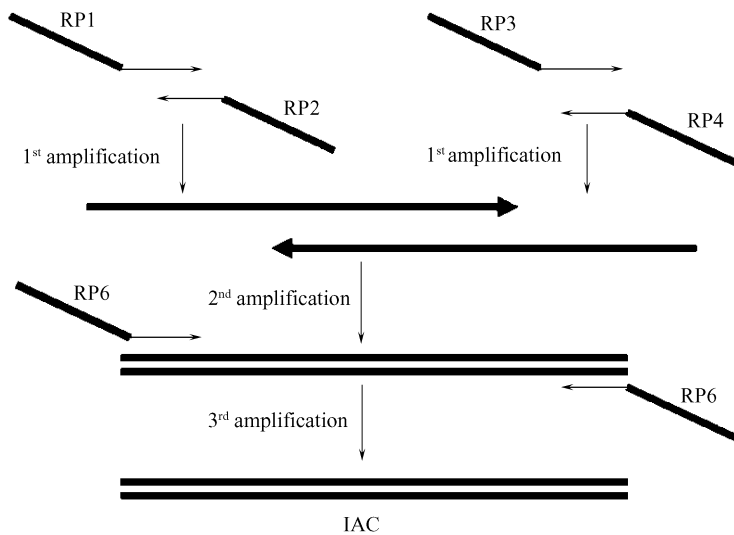


图 1 重叠 PCR 方法构建扩增内标的示意图

Fig. 1 Scheme of IAC construction by overlap-extension PCR.

2.4 RT-PCR 重组法

RT-PCR 法是将构建过程分成两个阶段, 在第一阶段, 产生一条与目的基因序列同源性很低并且含有目的基因扩增引物的双链 DNA 序列, 同时, 这条双链 DNA 序列的 5' 末端又带有 T7 RNA 聚合酶黏合序列; 在第二阶段, 以上述 DNA 为模板, 通过

T7 RNA 聚合酶的作用, 最后得到 RNA 转录子, 然后用 DNA 酶去除 DNA 模板。这样得到的 RNA 就是扩增内标^[18]。

3 扩增内标的种类

从扩增内标与目的序列在扩增时是否存在竞争

性的角度,可分为两类:竞争性扩增内标与非竞争性扩增内标。竞争性扩增内标是指在同一 PCR 反应体系中与目的基因序列共用同一对引物进行扩增反应的一段基因序列。用竞争性扩增内标可以避免在同一 PCR 检测体系中使用多对引物,这样就可以避免引物间的相互作用,但是使用竞争性扩增内标会降低检测灵敏度,然而,也有的专家认为,当扩增内标的片段小于 500bp 时不会影响原检测方法的灵敏度^[19]。再者,从理论上讲,PCR 体系的反应动力学是朝着优先产生小片段的方向进行的,所以在构建竞争性扩增内标时,应尽量使构建的扩增内标片段长度大于目的产物片段,尽可能的避免检测灵敏度的降低。同时也应该控制好扩增内标的浓度,以减少扩增内标与目的基因序列对引物的竞争,否则它不但不能起到指示假阴性的作用,反而,自身变成了产生假阴性的抑制因子。非竞争性扩增内标则是指在 PCR 扩增反应中不与目的基因序列共用同一对引物的一段序列。非竞争性扩增内标的最大优点之一在于所构建的扩增内标能应用于多个 PCR 检测体系,同时对检测灵敏度的影响也不是很明显,但是,用非竞争性扩增内标由于使用的引物不同,可能会导致扩增反应不能准确的反映原始目的基因序列,所以在构建扩增内标时要考虑好扩增内标的片段大小,使其能与目的产物很好的区分开,同时还应尽量避免引物间的相互作用,而且在建立最优反应条件时,也要考虑同时满足扩增内标和目的基因两个反应的最优条件。然而,两个反应最优化条件在实际中难以达到一致,这时一般是优先考虑目的基因序列的最适扩增反应条件,内标的扩增反应条件次之。此外,虽然非竞争性的扩增内标不会同目的基因竞争引物,但会竞争 dNTP 和 DNA 聚合酶等,所以,要避免这种情况的发生,那么控制好体系中扩增内标的起始添加量及其扩增引物的起始浓度便显得十分重要^[2]。

4 扩增内标在 PCR 检测技术中的应用

为了解决常规 PCR 与荧光 PCR 中普遍存在的假阴性问题,近几年在 PCR 扩增体系中引入了扩增内标。欧洲标准化委员会(The European Standardization Committee, CEN)与国际标准化组织(International Standard Organization, ISO)联合制定了针对食源性致病菌的 PCR 检测标准(EN ISO 22174: 2005),其中就规定了检测体系中必须添加

扩增内标。

4.1 扩增内标在荧光 PCR 检测技术中的应用

由于最初构建扩增内标是为了建立一种能够确定 PCR 检测中样品所含的 DNA 起始剂量的定量 PCR 检测方法,所以这种 PCR 定量技术大多的是应用于 RT-PCR 的定量检测,特别是对临床样品的定量检测。

1991 年,Stieger 等人采用核酸内标与目标序列进行竞争扩增的方法建立了检测 HIV-1 的定量 PCR 检测方法。核酸内标与目标序列区分是通过在目标序列中加入一个新的限制性酶切位点。这一方法可用于含有 HIV-1 序列的质粒和艾滋病病人血细胞中 HIV-1 的 DNA 或 RNA 定量^[20]。1992 年,Telenti 等人检测 HIV 前病毒的 DNA 时,构建了一条新的扩增内标,将目标序列经过人工修改之后插入到质粒中就形成了扩增内标,可以与天然的目标序列同时用同一引物扩增出来,形成大小不同的两个片段,而不再需要依靠添加新的限制性酶切位点来区分,因而,用相同的杂交探针就可以定量了。并且,这项研究结果显示,在 PCR 检测中使用扩增内标对于指示抑制剂是一种灵敏手段。在随后的研究中逐渐发现扩增内标可以指示假阴性。1998 年,Stauffer 等人利用 PCR 技术建立了从基因水平上鉴定临床样品中分枝杆菌的方法,在检测的 870 份样品中,用扩增内标检测到 6.7% 的样品呈假阴性^[21]。2000 年, Van Der Pol 等人研究沙眼衣原体的检测方法时,通过扩增内标发现有 2.4% 的样品受到了抑制^[22]。Stöcher 等于 2003 年建立了一种用于荧光定量检测的多重扩增内标合成方法,该方法运用复合引物技术将针对 EBV、CMV、VZV、HSV 和 HBV 的特异性检测引物序列依次添加到一段扩增内标序列上,构建了同时含这五种病毒检测引物序列的多重扩增内标,并成功的运用于 5 种病毒的荧光定量 PCR 检测^[23]。

过去,在食品检测中,很少用到扩增内标。然而,近些年来研究表明,采用 PCR 方法检测食品中的致病菌时,常常会受到来自环境因素和食品样品理化性质的干扰,特别是一些能够阻碍 PCR 反应的抑制物,会使检测结果呈假阴性。因此,一些学者认为,采用 PCR 方法检测食品样品时,在体系中添加扩增内标是必要的。

1998 年,Schwab 等人利用 RT-PCR 检测技术研究诺沃克病毒(NLVs)在贝类动物中的分布时,利用 RNA 作为扩增内标来指示抑制剂的存在,而且将所

建立的检测体系应用到检测一个大学食堂的食品样品中,证明了添加有扩增内标的检测体系是快速、简单和准确的^[24]。Rodríguez-Lázaro 于 2005 年将扩增内标应用于单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 的荧光定量 PCR 检测方法中,研究中根据 *hly* 基因序列设计了检测引物与探针,同时根据 *BnACCg8* 的基因序列设计合成了相应的扩增内标序列,通过对 49 株单核细胞增生李斯特菌和 96 株非单核细胞增生李斯特菌的检测,结果显示,该检测方法具有很好的特异性,检测灵敏度达到 8cfu/PCR^[25]。2007 年, Nordstrom 等人在用多重荧光定量 PCR 检测牡蛎中的致病性副溶血弧菌时,将一条人工构建的扩增内标添入检测体系中,用以指示假阴性,其结果显示:虽然假阴性率只有 2.3% (7/306),但添加了扩增内标使检测结果更加准确,能很好地排除 PCR 检测结果中的假阴性^[26]。

4.2 扩增内标在常规 PCR 检测技术中的应用

由于常规 PCR 技术不能用于定量检测,只能用来判断被检样品中是否存在待检物质,所以添加有扩增内标的常规 PCR 检测技术用于临床样品的检测并不是非常广泛。因此,本文介绍扩增内标在常规 PCR 检测技术中的应用时,主要叙述其在食品样品检测中的应用。

2003 年, Malorny 等在沙门氏菌的 PCR 检测体系中添有用于指示假阴性的扩增内标。当反应体系中添加的扩增内标的浓度为 300 拷贝 / PCR 时,检测菌悬液的浓度为 10⁴ cfu/mL,准确率能够达到 100%。并且,有 16 个实验室参加了对 28 份样品进行的双盲检测试验,检测结果表明,准确率可以达到 98%^[17]。

近几年,我国的研究工作者也逐步展开扩增内标的研究,并应用于实践中。刘斌等人于 2006 年根据沙门氏菌 *stn* 基因的一段特异 DNA 序列运用复合引物技术构建了扩增内标,并用于沙门氏菌的常规 PCR 检测,结果显示,所有沙门氏菌都能扩增到一条 *invA* 基因中的 374 bp 特异性片段,而模板来源于非沙门氏菌时则只能扩增到一条 513 bp 扩增内标片段,其添加有扩增内标的沙门氏菌纯 DNA 模板的检测灵敏度为 12.8 fg/μL,通过检测 80 份人工污染的样品,证实此方法可以有效地排除假阴性,提高检测准确率^[1]。2008 年,龙飞等人在检测单核细胞增生李斯特菌时将扩增内标进行了进一步的完善,构建了活菌内标,使得所构建的扩增内标不仅仅在 PCR 扩增反应中能起到指示假阴性的作用,而且在

增菌培养、菌体收集、DNA 提取及 PCR 扩增等所有过程都能指示假阴性的出现^[27]。

5 展望

近年来,构建扩增内标的方法不断得到改进和完善,出现多种构建方法,使得所构建的扩增内标日益完善,出现了较为完善的扩增内标——活菌内标,能达到在对样品检测的全过程中指示假阴性的目的^[27]。应用实践表明,添加扩增内标的 PCR 检测体系能很好的指示假阴性现象的出现,对提高 PCR 检测准确率也是非常显著的,但在以下几个方面仍存在问题:(1)构建扩增内标的方法复杂,构建扩增内标的步骤比较多,同时用于构建扩增内标序列的筛选也比较繁琐,这需考虑多方面的因素;(2)扩增内标还没有得到广泛使用;(3)添加有扩增内标的 PCR 检测体系,其检测灵敏度会有所降低,如果扩增内标的浓度过高,其自身就可能是导致假阴性现象出现的抑制剂。因此,建立一种构建过程简捷,能全程指示假阴性现象出现,又不影响 PCR 检测灵敏度的添加有扩增内标的 PCR 快速检测技术是发展方向。

参考文献

- [1] 刘斌, 史贤明. 扩增内标在沙门氏菌 PCR 检测方法中的应用. 微生物学通报 (*Microbiology*), 2006, 33 (2): 156-161.
- [2] Hoorfar J, Malorny B, Abdulmawjood A, et al. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42 (5): 1863-1868.
- [3] Telenti A, Imboden P, Germann D. Competitive polymerase chain reaction using an internal standard: application to the quantitation of viral DNA. *Journal of Virology Methods*, 1992, 39 (3): 259-268.
- [4] 金莉莉, 王芳. 食品中单核增生李斯特氏菌检测研究进展. 微生物学杂志 (*Journal of Microbiology*), 2001, 21: 36-38.
- [5] Isonhood J, Drake M, Jaykus LA. Upstream sample processing facilitates PCR detection of *Listeria monocytogenes* in mayonnaise-based ready-to-eat (RTE) salads. *Food Microbiology*, 2006, 23 (6): 584-590.
- [6] Amagliani G, Giammarini C, Omiccioli E, et al. Detection of *Listeria monocytogenes* using a commercial PCR kit and different DNA extraction methods. *Food Control*, 2007, 18 (9): 1137-1142.

- [7] Abu al-Soud W, Radstrom P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39 (2) : 485-493.
- [8] Trafny EA, Kozłowska K, Szpakowska M. A novel multiplex PCR assay for the detection of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in human faeces. *Letters in Applied Microbiology*, 2006, 43 (6) : 673-679.
- [9] Bojesen AM, Vazquez ME, Robles F, et al. Specific identification of *Gallibacterium* by a PCR using primers targeting the 16S rRNA and 23S rRNA genes. *Veterinary Microbiology*, 2007, 123 : 262-268.
- [10] Pacheco LGC, Pena RR, Castro TLP, et al. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. *Journal of Medical Microbiology*, 2007, 56 (4) : 480-486.
- [11] Cone RW, Hobson AC, Huang ML. Coamplified positive control detects inhibition of polymerase chain reactions. *Journal of Clinical Microbiology*, 1994, 32 (10) : 2633.
- [12] Herwegh S, Carnoy C, Wallet F, et al. Development and use of an internal positive control for detection of *Bordetella pertussis* by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43 (5) : 2462-2464.
- [13] King DP, Reid SM, Hutchings GH, et al. Development of a TaqMan® PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. *Journal of Virological Methods*, 2003, 107 (1) : 53-61.
- [14] Basto AP, Portugal RS, Nix RJ, et al. Development of a nested PCR and its internal control for the detection of African swine fever virus (ASFV) in *Ornithodoros erraticus*. *Archives of Virology*, 2006, 151 (4) : 819-826.
- [15] Hoorfar J, Ahrens P, Radstrom P. Automated 5' nuclease PCR assay for identification of *Salmonella enterica*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38 (9) : 3429-3435.
- [16] Maaroufi Y, de Bruyne JM, Duchateau V, et al. Development of a multiple internal control for clinical diagnostic real-time amplification assays. *Fems Immunology and Medical Microbiology*, 2006, 48 (2) : 183-191.
- [17] Malorny B, Hoorfar J, Bunge C, et al. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69 (1) : 290-296.
- [18] Rodriguez-Lazaro D, D'Agostino M, Pla M, et al. Construction strategy for an internal amplification control for real-time diagnostic assays using nucleic acid sequence-based amplification: Development and clinical application. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43 (2) : 1012-1012.
- [19] Abdulmawjood A, Roth S, Bulte M. Two methods for construction of internal amplification controls for the detection of *Escherichia coli* O157 by polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes*, 2002, 16 (5) : 335-339.
- [20] Stieger M, Demolliere C, Ahlborn-Laake L, et al. Competitive polymerase chain reaction assay for quantitation of HIV-1 DNA and RNA. *Journal of Virological Methods*, 1991, 34 (2) : 149-160.
- [21] Stauffer F, Haber H, Rieger A, et al. Genus level identification of mycobacteria from clinical specimens by using an easy-to-handle *Mycobacterium*-specific PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998, 36 (3) : 614-617.
- [22] Van der Pol B, Quinn TC, Gaydos CA, et al. Multicenter evaluation of the AMPLICOR and automated COBAS AMPLICOR CT/NG tests for detection of *Chlamydia trachomatis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38 (3) : 1105-1112.
- [23] Stöcher M, Leb V, Berg J. A convenient approach to the generation of multiple internal control DNA for a panel of real-time PCR assays. *Journal of Virological Methods*, 2003, 108 (1) : 1-8.
- [24] Schwab KJ, Neill FH, Fankhauser RL, et al. Development of methods to detect "Norwalk-like viruses" (NLVs) and hepatitis A virus in delicatessen foods: Application to a food-borne NLV outbreak. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66 (1) : 213-218.
- [25] Rodríguez-Lázaro D, Pla M, Scortti M, et al. A novel real-time PCR for *Listeria monocytogenes* that monitors analytical performance via an internal amplification control. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 (12) : 9008-9012.
- [26] Nordstrom JL, Vickery MCL, Blackstone GM, et al. Development of a multiplex real-time PCR assay with an internal amplification control for the detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007 73 (18) : 5840-5847.
- [27] Long F, Zhu XN, Zhang ZM, et al. Development of a quantitative polymerase chain reaction method using a live bacterium as internal control for the detection of *Listeria monocytogenes*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2008, 62 (4) : 374-381.

Internal amplification control and its applications in PCR detection of foodborne pathogens

Xiaohua He¹, Xianming Shi^{1, 2*}

(¹Department of Food Science and Bor Luh Food Safety Center, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

(²Shanghai Engineering Research Center of Food Safety, Shanghai 201203, China)

Abstract: Despite the improvement of PCR technology, false-negative results from PCR detection remain as an unresolved issue, which may reduce the detection accuracy. To address this problem, an internal amplification control, which is a non-target DNA fragment, is sometime suggested at present to be included into a PCR detection system to be co-amplified with the target sequence so as to indicate the PCR inhibitors in the samples and false negative results in the detection. This is also necessary for the standardization of PCR detection system. The purpose of this article was to provide a review on the IAC-PCR in three aspects: the causes of the false-negative results appearing, the construction strategies of internal amplification controls and the applications of IAC-PCR. In addition, a brief introduction of related research work on IAC-PCR in our laboratory will be mentioned in this review, which might be helpful to develop an easy method for the construction of IAC, which could indicate the false-negative results without the decrease of detection sensitivity.

Keywords: Internal amplification control; PCR detection; false-negative results

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30972485) and the Grants from the Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (08142200700, 08DZ0504200)

* Corresponding author. Tel: +86-21-34206616; E-mail: xmshi@sjtu.edu.cn

Received: 20 August 2009/Revised: 1 October 2009

《微生物学报》2010 年栏目调整

近年来,随着期刊建设的需要、以及期刊的编辑出版出现的问题,在 2010 年对《微生物学报》的栏目进行调整。

1. 设立一个新的栏目——“专论”

随着期刊建设的需要,为了丰富学报的内容,编辑部需要争取一些特约稿。这些稿件的内容会有别于本刊 57 年来贯有的模式,另立一个“专论”栏目,与“研究报告”和“研究简报”并列。将不定期试行,欢迎国内、外微生物研究领域的专家们为本刊撰文! 这个栏目的稿件来源如下:

(1) 本刊新增的“专论”栏目,作者范围定位在:① 国内、外的知名专家;② 国家基金委等部门的管理者;③ 国家 973、863 等重大项目专家组的专家。邀请他们结合自己的研究领域、各自的工作为学报撰文。

(2) 考虑到“编委投稿综述”计划,也接受编委个人撰写的另外形式的文章,不必按照《微生物学报》综述要求的撰写。

2. 将每月一篇的“学科先贤”变更为每两个月刊出一篇

(1) 创建过程:为了让人们了解我国微生物领域的开拓者,从 2005 年 4 月开始《微生物学报》增加了一个新的栏目——“学科先贤”,每期刊出一篇人物传记。这个栏目出现后倍受人们的关注。

(2) 变更原因:从 2008 年开始《微生物学报》改为月刊(每期 144 页),已运行两年。先贤的简介内容虽说只有短短 4000 多字,但是其内容涵盖了先贤们详尽的历史资料,特约撰稿人需要通过多方渠道搜集,每个月完成一篇实属不易。因此编辑部决定进行调整,由每月一篇变更为两个月一篇,在偶数期上刊出。