



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.

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

李莉莉,单宏,张瑞英,黄翠

(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)

摘要:近年来分子生物学检测技术发展迅速,本研究通过优化建立了食源性沙门氏菌的 Real-time PCR 检测方法,并对其结果的特异性、灵敏度、重复性等进行验证,以及初级农产品添加实验的适用性和一致性进行比对。结果表明:优化后的 Real-time PCR 检测条件为:95 ℃,5 min,95 ℃,30 s;然后 65 ℃,30 s,72 ℃,30 s,此步骤为 40 个循环;最后 72 ℃,5 min。总反应体系为 20 μ L,其中上下游引物的添加量分别为 1 μ L。建立的 Real-time PCR 快速检测方法特异性强,重复性好,灵敏度高而且不需要前增菌,较传统检测方法大大缩短了检测时间,整个试验操作过程可在 6 h 内完成。将此方法应用于人工污染的初级农产品中沙门氏菌的检测,结果表明生鲜猪肉、即食蔬菜和即食水果样品中沙门氏菌的检测灵敏度均较高。通过与微生物传统计数方法的检测结果进行比较,结果显示与传统方法的一致性为 100%,可用于食品中沙门氏菌的检测。

关键词:Real-time PCR;沙门氏菌;快速检测;初级农产品

近年来,我国食品安全事件频发,传统分析方法已经远不能满足食品检测的需要,迫切需要灵敏度更高、特异性更强、简便快捷的食品安全检测技术和方法。食源性致病菌是影响食品安全的主要因素,引起全社会的广泛关注,传统的细菌分离培养与鉴定繁琐复杂、周期较长、难以适应食源性疾病预防控制的需要^[1-4]。实时荧光定量 PCR 检测技术作为现代分子生物学手段应用于食源性致病菌检测,克服了传统微生物检测方法的缺点和不足,而且还具有操作简单、检测周期短、检测成本低等优点^[5-7]。为此,本研究开展了食源性致病菌-沙门氏菌的 Real-time PCR 检测方法,为快速检测食源性致病菌奠定基础。

本课题以致病微生物——沙门氏菌为研究对象,研究并建立检测该菌的 Real-time PCR 反应体系,并初步应用于人为加标的实际样品检测,并与国标法进行一致性比对。本研究对预防食物中毒、有效控制致病菌传播、减少食源性疾病事件的发生具有重要意义^[8-9]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株 鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*) ATCC14028、金黄色葡萄球菌 ATCC6538、单核细胞增生李斯特氏菌 ATCC15313、福氏志贺氏菌 ATCC12022、大肠埃希氏菌 ATCC25922 均购于美国典型菌种保藏中心,由本实验室定期传代使用。生鲜猪肉、生菜和黄瓜均购买自当地超市。

1.1.2 试验主要仪器及试剂 SHP-160 智能生化培养箱(上海三发科学仪器有限公司),HFsafe-1200 生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司),GI54DS 高压灭菌锅(致微仪器有限公司),DYY-12 型电泳仪(北京市六一仪器厂),凝胶成像系统(Alpha Innotech),高速冷冻离心机(eppendorf)。BPW、SC、TTB、BS 琼脂、HE 琼脂、XLD 琼脂(北京陆桥技术责任有限公司),沙门氏菌显色培养基(法国科马嘉),API 20E(梅里埃),Tap 酶(Invitrogen)。

1.2 方法

1.2.1 沙门氏菌菌株的培养 无菌条件下挑取实验室传代保存的沙门氏菌菌株,进行菌株活化及复壮,然后将沙门氏菌接种到营养琼脂平板上,36 \pm 1 ℃培养 18~24 h,得到单个菌落。挑取平板上的单菌落于 1.5 mL 离心管中,加入 100 μ L 0.1% chelex 水溶液,用枪吹打使菌混匀。沸水

收稿日期:2020-07-09

基金项目:国家农产品质量安全风险评估项目(GJFP 201900505)。

第一作者:李莉莉(1989-),女,硕士,助理研究员,从事微生物检测与风险评估研究。E-mail:leelily201@163.com。

通信作者:单宏(1971-),女,硕士,研究员,从事微生物检测与风险评估研究。E-mail:ningjing8139@sina.com。

煮 5 min,取出后 12 000 r·min⁻¹离心 5 min,取上清液,4 ℃保存备用。

1.2.2 引物及探针序列 引物和探针均由 Thermo Fisher 公司合成,序列信息详见表 1。

表 1 引物与探针序列

Table 1 Sequence of primers and probes		
引物 Primers	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	扩增片段长度 Amplified fragment length/bp
上游引物	GCGGCGTTGGAGAGTGATA	
下游引物	AGCAATGGAAGCAGGATG	284
探针	CATTTCTTAAACGGCGGT- GTCTTTCCCT	

1.2.3 PCR 反应体系条件优化 沙门氏菌 Real-time PCR 反应条件详见表 2,该反应条件为根据试验反复探索最终优化的试验条件。

表 2 PCR 反应程序

Table 2 PCR reaction program			
程序 Program	温度 Temperature/℃	时间 Time	循环 Cycle
预变性	95	5 min	35
扩增	95	30 sec	
	65	30 sec	
	72	30 sec	
后延伸	72	5 min	
保存	4		

沙门氏菌 Real-time PCR 反应体系详见表 3,每组扩增实验以沙门氏菌的基因组 DNA 作为阳性对照模板,以 ddH₂O 代替 DNA 模板作为阴性对照。

表 3 PCR 反应体系

Table 3 PCR reaction system	
试剂 Reagent	用量 Dosage/ μ L
2×M5 GolaStar TaqMan Mixture	10.0
上游引物(1 μ mol·L ⁻¹)	1.0
下游引物(1 μ mol·L ⁻¹)	1.0
Probe	0.5
dUTP	1.0
沙门氏菌 DNA	2.0
ddH ₂ O	4.5
总量	20.0

1.2.4 沙门氏菌的人工污染试验 取生鲜猪肉、黄瓜和生菜,在无菌条件下制备样品,各自取得 25 g 加入 225 mL 缓冲蛋白胨水(BPW),然后加入一定浓度的沙门氏菌菌液,得到人工污染的猪肉、黄瓜和生菜样品。设定增菌时间为:0,2,4,6,8,10,12,14,16,18,20,22 和 24 h。在每个时刻分别制备模板 DNA 用于荧光定量 PCR 扩增,如阳性对照出现典型扩增曲线,Ct 值<30,空白对照无扩增曲线,Ct 值 \geq 40 则为试验有效,反之即为试验无效。

1.2.5 沙门氏菌 Real-time PCR 快速检测法与传统法的一致性 沙门氏菌检测的传统微生物学方法是首先要预增菌,称取 25 g(mL)样品,放入装有 225 mL BPW 的无菌均质袋内,以 10 000 r·min⁻¹放入均质器内均质 90 s,于 36 \pm 1 ℃培养 8~18 h。接下来继续增菌,目的了为了修复受损的沙门氏菌,轻轻摇动培养过的样品混合物,取 1 mL 转接于 10 mL TTB 内,于 42 \pm 1 ℃培养 18~24 h,同时另外取 1 mL 转接于 10 mL SC 内,于 36 \pm 1 ℃培养 18~24 h,TTB 和 SC 的选择性不一样,目的都是为了更大可能地检出沙门氏菌。然后进行分离培养,分别取 TTB 和 SC 增菌液混合物 1 环划线接种 BS 琼脂和沙门氏菌显色培养基,BS 琼脂于 36 \pm 1 ℃培养 40~48 h,沙门氏菌显色培养基于 36 \pm 1 ℃培养 18~24 h,观察各个平板上菌落的生长情况,可疑菌落继续进行生化试验,生化试验结果可疑的还要结合血清学鉴定结果进行判定。

2 结果与分析

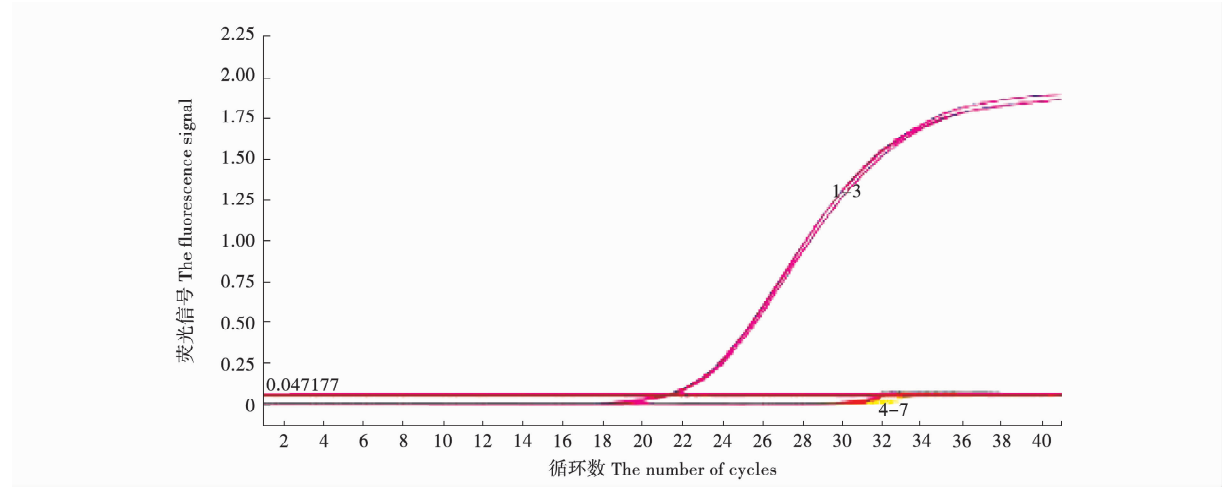
2.1 特异性检测结果

阳性菌株为鼠伤寒沙门氏菌,非沙门氏菌采用本实验室传代保存的金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特氏菌和志贺氏菌,阴性对照为大肠埃希氏菌 ATCC25922,采用 1.3.1 方法分别制备模板 DNA 进行 Real-time PCR,试验结果见图 1。结果显示仅沙门氏菌检测到荧光信号,而其他对照菌株(非沙门氏菌菌株)和阴性对照检测结果均为阴性,表明该方法有很强的特异性。

2.2 灵敏度检测结果

经试验测定,一个沙门氏菌单菌落的带菌量约为 1 \times 10⁷ CFU,通过稀释得到浓度为 10,1 \times 10²,1 \times 10³,1 \times 10⁴,1 \times 10⁵,1 \times 10⁶ 和 1 \times 10⁷ CFU·mL⁻¹的沙门氏菌菌悬液,制备模板 DNA 进行荧光定量 PCR,得出沙门氏菌检出限的最低浓

度,具体试验结果见图 2。当浓度为 $10\sim 1\times 10^3$ CFU·mL⁻¹ 时,CT 值均为 36 左右,无明显差异,扩增曲线效率较低,当浓度为 1×10^4 CFU·mL⁻¹ 时,CT 值升高至 34 左右,扩增效率有所提高,但这个灵敏度相对来说较低,后续试验会进一步探索其原因,提高检测灵敏度。

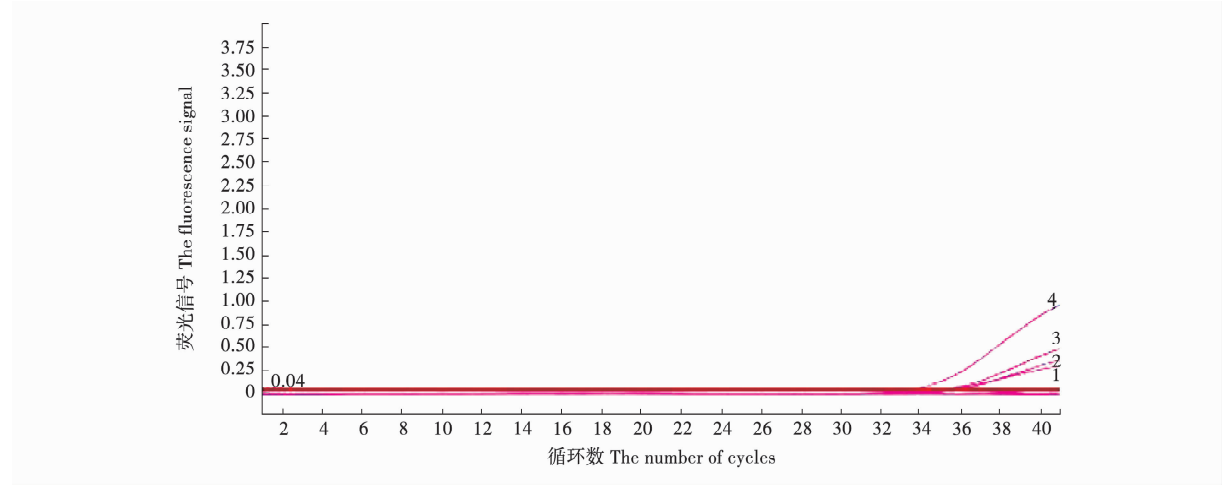


1~3: 沙门氏菌;4~6: 非沙门氏菌(金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特氏菌、志贺氏菌);7: 阴性对照
1~3: *Salmonella*;4~6: non-*Salmonella* (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella*);7: Negative control

图 1 Real-time PCR 特异性试验

Fig. 1 The specificity test of Real-time PCR

考虑到后期人工添加试验,由于菌体附着于不同食品表面,而食品表面不规则或者由于其疏水性原因,使所有菌体不能完全分离出来,灵敏度还会有所降低,因此添加浓度选择为 1×10^4 CFU·mL⁻¹ 用于下一步人工污染样品试验。



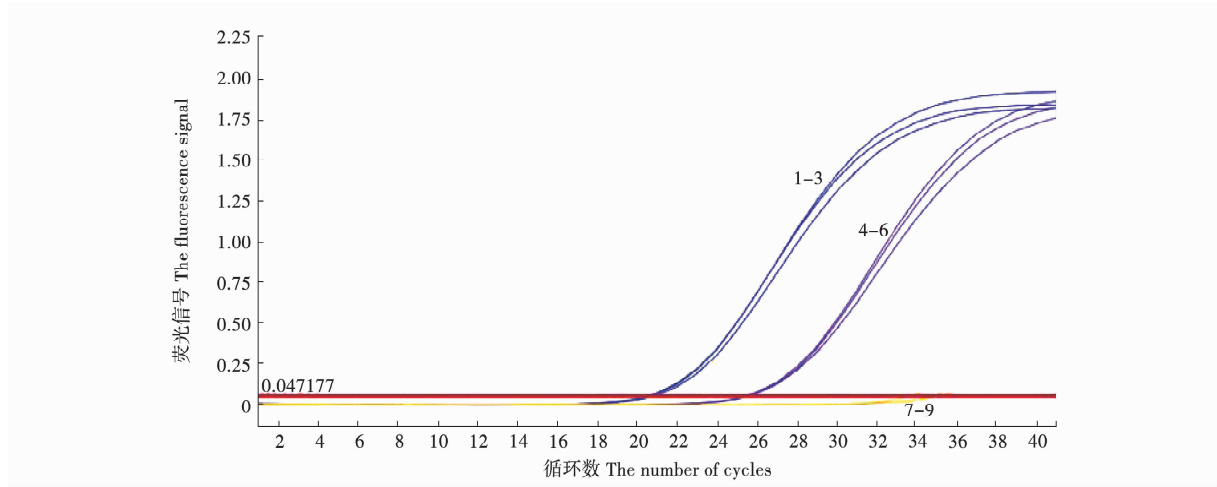
1:10 CFU·mL⁻¹ 沙门氏菌菌悬液;2:1×10² CFU·mL⁻¹ 沙门氏菌菌悬液;3:1×10³ CFU·mL⁻¹ 沙门氏菌菌悬液;4:1×10⁴ CFU·mL⁻¹ 沙门氏菌菌悬液
1: 10 CFU·mL⁻¹ bacterial suspension of *Salmonella*;2:1×10² CFU·mL⁻¹ bacterial suspension of *Salmonella*;3:1×10³ CFU·mL⁻¹ bacterial suspension of *Salmonella*;4:1×10⁴ CFU·mL⁻¹ bacterial suspension of *Salmonella*

图 2 Real-time PCR 灵敏度试验

Fig. 2 The sensitivity test of Real-time PCR

2.3 重复性检测结果

重复性试验选择浓度相对较高的菌液进行,分别为 1×10^5 和 1×10^6 CFU·mL⁻¹,每个浓度分别重复 3 次进行 Real-time PCR 检测,试验结果见图 3。检测结果显示浓度为 1×10^5 和 1×10^6 CFU·mL⁻¹ 的沙门氏菌 CT 值平均值分别为 25.25 和 20.70,浓度越大对应的 CT 值越小,扩增效果越好,表面该方法具有良好的重复性。



1~3: 1×10^6 CFU·mL⁻¹ 沙门氏菌菌悬液; 4~6: 1×10^5 CFU·mL⁻¹ 沙门氏菌菌悬液; 7~9: 阴性对照
1~3: 1×10^6 CFU·mL⁻¹ bacterial suspension of *Salmonella*; 4~6: 1×10^5 CFU·mL⁻¹ bacterial suspension of *Salmonella*; 7~9: Negative control

图 3 Real-time PCR 重复性试验
Fig. 3 The repeatability test of Real-time PCR

2.4 不同人工污染样品不同时间点荧光定量 PCR 结果

2.4.1 生鲜猪肉不同增菌时间试验结果 生鲜肉类样品是沙门氏菌污染率较高的一类初级农产品,本试验通过人工添加沙门氏菌,模拟被污染后的猪肉样品,首先,向猪肉样品中添加沙门氏菌,浓度为 1×10^4 CFU·mL⁻¹,此时为 0 h,然后进行增菌培养,从 2 h 至 24 h,每隔 2 h 进行一次 DNA 模板制备,然后进行荧光定量 PCR 扩增,通过荧光定量 PCR 方法对其进行检测,得出最短检测时间,并与传统法进行对比验证。由表 4 试验结果可以看出,生鲜猪肉样品仅需 6 h 就可扩增出阳性结果,而且各个时间段的 CT 值相对较平稳,说明该方法用于生鲜肉类的检测是可行的,而且与传统方法相比缩短了 5~6 d 的时间。

2.4.2 黄瓜不同增菌时间试验结果 黄瓜样品是比较有代表性的一类初级农产品,由于黄瓜是可以作为即食类蔬菜直接食用,因此致病菌的快速检测意义重大,如果疑似感染沙门氏菌的样品用该方法可以大大节约时间。由表 5 检测结果可以看出,4 h 就可以检测出沙门氏菌了,而且 CT 值相对较高,说明该方法在缩短检测时间上是有很大优势的。

2.4.3 生菜不同增菌时间试验结果 生菜样品由于本身褶皱相对较多,很适合微生物的生长和繁殖,但是一旦污染致病菌,将对食用者身体产生极大的伤害,因此选择生菜作为人工污染的第三

种样品进行荧光定量 PCR 方法的研究,由表 6 结果可以看出,当培养 2 h 时,制备模板 DNA,荧光 PCR 法就能将其检测出来,虽然 CT 值较高,但也能判定其阳性扩增曲线。

表 4 生鲜猪肉样品中不同增菌时间 Real-time PCR 结果
Table 4 Real-time PCR results of different enrichment time in fresh pork samples

时间 Time/h	荧光定量 PCR 结果 Real-time PCR results	CT 值 CT value
0	阴性	-
2	阴性	-
4	阴性	-
6	阳性	23.62
8	阳性	18.70
10	阳性	21.45
12	阳性	23.83
14	阳性	20.04
16	阳性	20.81
18	阳性	20.59
20	阳性	15.60
22	阳性	28.43
24	阳性	22.73

表 5 黄瓜样品中不同增菌时间
Real-time PCR 结果
Table 5 Real-time PCR results of different
enrichment time in cucumber samples

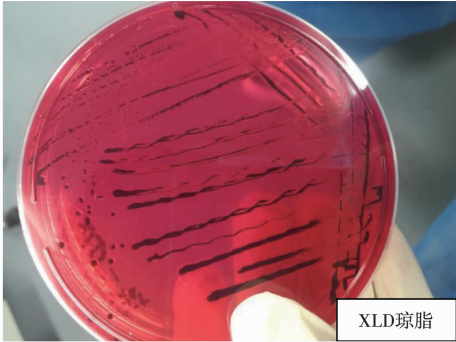
时间 Time/h	荧光定量 PCR 结果 Real-time PCR results	CT 值 CT value
0	阴性	36.08
2	阴性	36.76
4	阳性	30.03
6	阳性	22.75
8	阳性	21.87
10	阳性	12.15
12	阳性	18.73
14	阳性	19.41
16	阳性	18.65
18	阳性	17.63
20	阳性	18.39
22	阳性	17.34
24	阳性	30.27

表 6 生菜样品中不同增菌时间
Real-time PCR 结果
Table 6 Real-time PCR results of different
enrichment time in lettuce samples

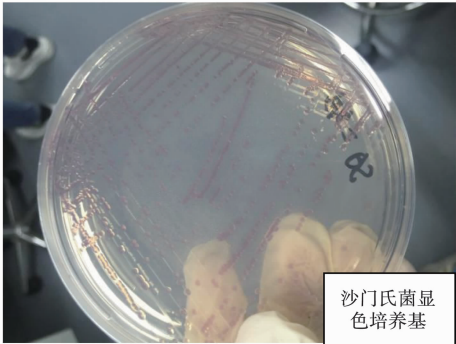
时间 Time/h	荧光定量 PCR 结果 Real-time PCR results	相对应 CT 值 CT value
0	阴性	36.93
2	阳性	35.49
4	阳性	32.02
6	阳性	25.13
8	阳性	21.57
10	阳性	20.50
12	阳性	18.16
14	阳性	19.43
16	阳性	18.48
18	阳性	20.19
20	阳性	18.95
22	阳性	21.05
24	阳性	21.40

2.5 Real-time PCR 结果与微生物传统法的一致性
将选定的具有代表性的 3 种样品污染沙门氏

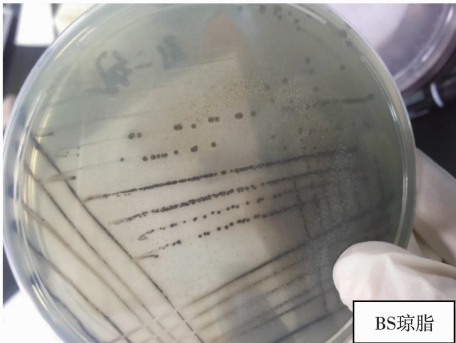
菌后,同时采用荧光定量 PCR 方法和传统方法进行检测,3 种样品采用荧光定量 PCR 方法检测结果均为阳性,且猪肉样品最快检测时间为 6 h,黄瓜样品的最快检测时间为 4 h,生菜样品的最快检测时间仅为 2 h,而传统微生物检测结果也全部都为阳性,具体阳性菌落形态如图 4,在检测时间传统法上远远不如荧光 PCR 方法,所以该试验研究的荧光定量 PCR 方法具有快速、精准、灵敏等特点。



XLD琼脂



沙门氏菌显色培养基



BS琼脂

图 4 沙门氏菌在不同培养基上的菌落形态
Fig. 4 The colony morphology of *Salmonella* on different media

3 结论与讨论

快速检测食源性致病菌是及时有效控制和预防致病菌传播、预防食物中毒的重要方法。如果是阳性样品用沙门氏菌传统方法检测至少需要

7 d以上的时间,而且生化试验鉴定复杂,所需试剂繁多且昂贵,对人员的专业背景要求较高^[10-12]。本试验建立了一种基于核酸的方法快速检测食源性致病菌沙门氏菌的 Real-time PCR 方法,大大缩短检测时间,快速定性获取结果,用该方法检测的人工污染样品与传统方法相对比,验证检验结果的一致性为 100%。

本试本试验建立的沙门氏菌 Real-time PCR 快速检测方法初步应用于初级农产品的检测中,灵敏度均较高,较适合即食生鲜食品的快速检测工作。

参考文献:

- [1] 方婷子,史贤明,施春雷.沙门氏菌血清型快速 PCR 鉴定方法的建立[J].中国食品学报,2017,17(2):212-218.
- [2] 石秀清,周秀娟,施春雷,等.沙门氏菌属特异性检测靶点碱基差异位点的识别及其血清型决定力的分析[J].食品科学,2017(6):1-9.
- [3] 罗丽珠,陈婉娃,许小妹.能力验证中沙门氏菌的分离鉴定与血清分型[J].食品安全质量检测学报,2018,9(5):1117-1121.
- [4] 王璇,袁园,张志成,等.树鼯粪便中沙门氏菌 LAMP 检测方法建立及应用[J].中国比较医学杂志,2018,28(2):90-97.
- [5] 李轲,郭会清,郭华麟,等.一种快速检测纺织品中沙门氏菌

的方法[J].棉纺织技术,2017,45(12):32-37.

- [6] 李倩茹,胡霏,杨悦熙,等.基于荧光微球的免疫层析法结合免疫磁珠分离技术快速定量检测鼠伤寒沙门氏菌[J].现代食品科技,2018(3):1-6.
- [7] 刘光富,马磊,付贤树,等.PMA-qPCR 快速检测畜禽肉类中沙门氏菌活菌方法的建立[J].中国计量大学学报,2018,29(4):362-366.
- [8] Selvam E M,Sridevi T A. A case of *Salmonella* enterica serovar typhi tubo ovarian abscess[J]. The Journal of Obstetrics and Gynecology of India,2015,65(4):278-280.
- [9] Foti D,Zhang L,Biswas P,et al. Matrix Extension Study: Validation of the ANSR *Salmonella* method for detection of *Salmonella* spp. in pasteurized egg products[J]. Journal of AOAC International,2014,97(5):1374-1383.
- [10] Wang H,Gill V S,Cheng C-M,et al. Evaluation and comparison of rapid methods for the detection of *Salmonella* in naturally contaminated pine nuts using different pre-enrichment media[J]. Food Microbiology,2015,46:58-65.
- [11] Zheng Q,Miks-Krajnik M,DSouza C,et al. Growth of healthy and sanitizer-injured *Salmonella* cells on mung bean sprouts in different commercial enrichment broths[J]. Food Microbiology,2015,52:159-168.
- [12] Ali M E,Razzak M A,Hamid S B A. Multiplex PCR in species authentication: probability and prospects-a review[J]. Food Analytical Methods,2014,7(10):1933-1949.

Establishment and Preliminary Application of Real-time PCR Technology for Rapid Detection of Foodborne *Salmonella*

LI Li-li,SHAN Hong,ZHANG Rui-ying,HUANG Cui

(Quality and Safety Institute of Agricultural Products, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Agro-products (Harbin), Ministry of Agriculture, Habin 150086, China)

Abstract: In recent years, molecular biology detection technology has developed rapidly. In this study, we established a nucleic acid-based fluorescent quantitative PCR detection method, verified the specificity, sensitivity and repeatability of the method, and compared with the results of the experiment of adding the primary agricultural product. The results showed that, the conditions of optimized fluorescence quantitative PCR detection were 95 °C, 5 min; 95 °C, 30 s, 65 °C, 30 s, 72 °C, 30 s for 40 cycles and the final 72 °C, 5 min. The total reaction system was 20 μL with the addition amount of the upstream and downstream primers 1 μL respectively. The established Real-time PCR rapid detection method had strong specificity, good reproducibility, high sensitivity and does not require pre-enrichment. Compared with traditional detection methods, the detection time was greatly shortened, and the entire experimental operation process could be completed within 6 hours. This method was applied to the detection of *Salmonella* in artificially contaminated primary agricultural products. The results showed that the detection sensitivity of *Salmonella* in fresh pork, ready-to-eat vegetables and ready-to-eat fruit samples was high. The consistency with the traditional microbial counting method was 100%, which could be used for the detection of *Salmonella* in food.

Keywords: real-time PCR; *Salmonella*; rapid detection; primary agricultural products