

采用荧光定量PCR方法快速检测蔬菜中沙门氏菌

郭蕾, 江洁*, 武晓松

(大连民族大学 生命科学学院, 辽宁 大连 116600)

摘要: 为快速检测蔬菜中的沙门氏菌, 建立一种荧光定量 PCR 检测方法。筛选出特异性引物可稳定的扩增沙门氏菌特异性基因 *invA*。利用循环次数 C_q 值和菌落数对数的线性关系得出荧光定量 PCR 方法对沙门氏菌检出最低浓度为 18 cfu/mL。利用建立的荧光定量 PCR 检测方法对大连开发区 3 个地点采样 10 种蔬菜共 60 份样品进行检测, 检测结果显示, 在 60 份样品中有 5 份样品确定存在沙门氏菌, 检出率为 8.33%。试验证明, 荧光定量 PCR 检测方法具有快速简便和高效特异等优势, 并可定量分析, 可用于蔬菜中沙门氏菌的快速检测。

关键词: 沙门氏菌; 蔬菜; 荧光定量 PCR

Real Time Fluorescence Quantitative PCR Method for Rapid Detection *Salmonella* in Vegetables

GUO Qiang, GANG Jie*, WU Xiao-song

(College of Life Science, Dalian Nationalities University, Dalian 116600, Liaoning, China)

Abstract: For the rapid detection of *Salmonella* in vegetables, a kind of Real Time PCR method had been established. The *invA* gene was screened as stable *Salmonella*-specific gene. The minimum test concentration of Real Time PCR detection for *Salmonella* was 18 cfu/mL by linear relationship between the Cycles (C_q) and colony count logarithm. 60 samples were detected of 10 kinds of vegetables from Dalian Development Zone by the Real Time PCR method. The results showed that there were 5 samples to determine *Salmonella* in the 60 sam-

基金项目:“十二五”农村领域国家科技计划课题(2012BAD38B05);2014 年度研究生创新基金项目(YCX20141034)

作者简介:郭蕾(1991—),女(汉),硕士研究生,研究方向:食品安全检测。

* 通信作者:江洁(1965—),女(满),教授,博士,研究方向:食品生物技术。

含量差异可能是由于不同品种的种植条件和生长环境等因素造成的。另外苹果果实不同部位,多酚含量也存在明显差异,果皮组明显高于果皮加果肉组,这一试验结果与王皎等^[11]的研究结果是相一致的,以期后续果汁厂果渣中苹果多酚研究与开发提供一定理论基础。

参考文献:

- [1] 韩菊,高洪潮,魏福祥,等. 苹果多酚的性能研究[J]. 食品科技, 2008(10):139-142
- [2] 孙红男,孙爱东,苏雅静,等. 苹果多酚抑菌效果的研究[J]. 北京林业大学学报, 2010, 32(4):280-283
- [3] Y Lu, L Y Foo. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace[J]. Food Chemistry, 2000, 68(1): 81-85

- [4] S calbert A, Williamson G. Dietary Intake and Bioavailability of polyphenols[J]. Journal of Nutrition, 2000, 130(8): 2073-2085
- [5] 曲恩超,魏福祥. 苹果多酚的研究进展[J]. 河北化工, 2006, 29(1): 5-8
- [6] 梁峙. 苹果多酚的功效研究与应用[J]. 农牧产品开发, 1998(6):18
- [7] 孙平平. 苹果多酚的研究概况[J]. 科技创新导报, 2011(7):7,10
- [8] 杨薇. 苹果多酚的提取纯化及抗龋齿活性研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2010:12-14
- [9] 石碧,狄莹. 植物多酚[M]. 北京: 科学出版社, 2000:30-31
- [10] A Picinelli, Belén Sua’Rez, Juan José Mangas. Analysis of polyphenols in apple products[J]. European Food Research and Technology, 1997, 204(1):48-51
- [11] 王皎,高颖,赵丽敏,等. 测定不同品种苹果果皮和果肉中总多酚的含量[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(20):87-89

收稿日期:2016-01-21

ples, so the detection rate was 8.33%. Experiments showed that the fluorescent quantitative PCR detection method was simple and easy and efficient specific advantages, such as rapid and quantitative analysis, can be used for rapid detection of *Salmonella* in vegetables.

Key words: *Salmonella*; vegetables; Real time quantitative polymerase chainreaction

沙门氏菌作为常见的人兽共患病原菌之一,不仅会引起各种动物疾病,而且与人类多种疾病有关,其中,由沙门氏菌引起的食物中毒显得尤为突出^[1]。沙门氏菌(*Salmonella* spp.)属肠道菌科细菌^[2],革兰氏阴性直杆菌,属兼性厌氧菌^[3]。目前已知的沙门氏菌有2500多个血清型,在中国发现了200多个血清型^[4-5]。沙门氏菌中毒症状一般为出现恶心、呕吐、头痛、发热、腹泻等症状,潜伏期4h~8h不等^[6],欧洲每年有16万多人感染沙门氏菌^[7-8]。同时美国每年也有约140万人感染沙门氏菌^[7-9],占总食源性疾病的30%^[10]。沙门氏菌引起的食物中毒事件经常高居榜首^[11]。因此沙门氏菌检测早在20世纪80年代已得到国内外相关领域的研究和重视。

传统检测沙门氏菌的方法可分为预增菌、选择性增菌及分离鉴定3个不同阶段,全过程至少需要4d~7d才能得出检测结果^[12]。在实际检测中周期较长、工作量大,对致病菌的检测特异性不高、灵敏度低、操作繁琐耗时,不能实现及时有效的监测^[13-14]。实时荧光定量PCR(Real Time PCR)是建立在PCR技术本身的荧光信号的强弱的基础上的检测技术,具体指在PCR反应体系中加入特定的荧光基团作为染料标记,利用荧光基团的荧光信号积累对整个PCR进程进行实时监测,之后通过标准曲线对未知模板的DNA进行定量分析的方法^[15-17]。Real-time PCR技术具有特异性强、准确性高、假阳性低;灵敏度高、可定量检测、误差小;操作简单、自动化程度高、产物的扩增和检测闭管一步完成、交叉污染和污染环境机会少等优点^[18-19]。在荧光定量PCR过程中即可得到目标菌株是否存在的检测结果而不需要常规PCR之后的凝胶电泳处理,因此,荧光定量PCR技术在沙门氏菌检测方法中运用越来越广泛。

近年来沙门氏菌污染蔬菜引起的食物中毒事件屡次发生,得到社会广泛关注,国内外相关研究领域亦开始重视对沙门氏菌污染蔬菜的研究,但是国内相关文献中鲜见有关蔬菜中沙门氏菌检测的报道。本试验成功建立了沙门氏菌Real Time PCR快速检测方法,并通过大连市售蔬菜中沙门氏菌污染情况进行检测证明该检测方法可行有效。

1 材料与方法

1.1 试验材料

检测菌株:鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*, ATCC 14028),伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*, CMCC(B)50071),乙型副伤寒沙门氏菌(*Salmonella paratyphoid B*, CMCC(B)50094)。

营养肉汤(NB)固体培养基:蛋白胨10g,牛肉膏5g,氯化钠(NaCl)5g,蒸馏水1000mL,琼脂15g,调节pH7.2,121℃灭菌30min密封备用。

营养肉汤(NB)液体培养基:蛋白胨10g,牛肉膏5g,氯化钠(NaCl)5g,蒸馏水1000mL,调节pH7.2,121℃灭菌30min密封备用。

对照菌株:金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, ATCC 6538),单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, ATCC 19115),大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*, ATCC 8739),大肠埃希氏菌O157:H7(*Escherichia coli* O157:H7, NCTC 12900),痢疾志贺氏菌(*Shigella dysentery*, CMCC(B)51105),蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*, CMCC(B)63301)。

本试验引物设计参考相关文献^[20],由大连宝生物公司合成(表1)。

表1 引物序列及PCR产物

Table 1 Primer sequence and Product of PCR

扩增基因	引物名称	引物序列	产物大小/bp
hilA 基因	hilA-F	5'-CTGCCCGCAGTGTAAAGGATA-3'	490
	hilA-R	5'-CTGTCGCCTTAATCGCATGT-3'	
hns 基因	hns-1	5'-TACCAAAGCTAACCGCCAGCT-3'	152
	hns-2	5'-TGATCAGGAAATCTTCCAGTTGC-3'	
hut 基因	hut-1	5'-ACTGGCGTTATCCCTTTCTCTGCTG-3'	495
	hut-2	5'-ATGTTGTCCTGCCCTGGTAAAGAGA-3'	
invA 基因	invA-1	5'-GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGCAA-3'	284
	invA-2	5'-TCATCGCACCGTCAAAGGAACC-3'	

1.2 试验方法

1.2.1 Real Time PCR 试验方法建立

Real Time PCR反应体系的DNA模板使用磁珠提取法制备^[21]。

Real Time PCR反应体系(DR075S)由大连宝生物公司提供,体系主要包括:每20μL反应体系 MightA

mp for Real Time (SYBR plus)(2×) 10 μ L, PCR Forward Primer(10 μ mol/L)、PCR Reverse Primer(10 μ mol/L)各 1 μ L (终始浓度 0.2 μ mol/L), DNA 模板 2 μ L, ddH₂O 加至 20 μ L。Real Time PCR 反应条件: 热盖温度 105 $^{\circ}$ C; 98 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min; 4 $^{\circ}$ C 低温保存。

1.2.2 沙门氏菌的目标引物特异性检测

采用 Real Time PCR 方法对 1.1 中 3 种沙门氏菌和 6 种阴性对照菌株的 DNA 对 *invA* 目标引物进行 Real Time PCR 扩增, 得到扩增曲线。

1.2.3 Real Time PCR 检测鼠伤寒沙门氏菌的检出限

NB 液体培养基 37 $^{\circ}$ C 恒温 80 r/min 振荡液体培养鼠伤寒沙门氏菌 8 h, 取 1 mL 菌悬液倍比稀释, 稀释液在 NB 固体培养基上均匀涂布, 37 $^{\circ}$ C 恒温培养 24 h 数菌落数; 取 1 mL 菌悬液磁珠提取法提取 DNA, 将 DNA 提取液配比稀释, 以 *invA* 引物片段作为目标基因, 采

用 1.2.1 方法进行 Real Time PCR 检测。

1.2.4 应用 Real Time PCR 检测方法调查市售蔬菜中沙门氏菌污染情况

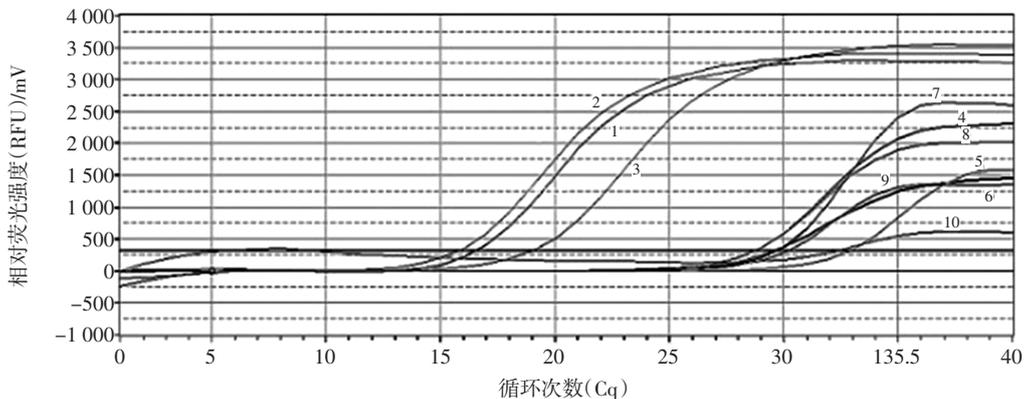
为验证上述研究 Real Time PCR 检测方法和条件是否可以运用到蔬菜样品的实际检测中, 对大连开发区新玛特超市、金马商场、马桥子农贸市场 3 个售卖地点的蔬菜进行取样调查。本调查自大连开发区 3 个地点采样 10 种蔬菜共 60 份样品, 进行 Real Time PCR 快速检测。

2 结果与分析

2.1 沙门氏菌的目标引物特异性检测

采用 1.2.1 方法对 1.1 中 3 种沙门氏菌和 6 种阴性对照菌株的 DNA 对 *invA* 目标引物进行 Real Time PCR 扩增, 所得结果如图 1 所示。

经 10 次以上重复试验, 3 种沙门氏菌均在 26 循



1. 鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*, ATCC 14028); 2. 伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*, CMCC(B)50071); 3. 乙型副伤寒沙门氏菌(*Salmonella paratyphoid B*, CMCC(B) 50094); 4. 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, ATCC 6538); 5. 单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, ATCC 19115); 6. 大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*, ATCC 8739); 7. 大肠埃希氏菌 O157:H7(*Escherichia coli* O157:H7, NCTC 12900); 8. 痢疾志贺氏菌(*Shigella dysentery*, CMCC(B) 51105); 9. 蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*, CMCC(B) 63301); 10. 灭菌超纯水。

图 1 特异性引物的 Real Time PCR 检测结果

Fig.1 Initial Real Time PCR test results of specific primers genes

环之前出现荧光现象, 而其他隐形对照菌株和灭菌超纯水均在 26 循环之后出现荧光现象, 出现此种情况, 主要原因可能是荧光染料与双链 DNA 的结合非特异性, 即荧光染料与样品中所有解链 DNA 均可结合, 产生引物二聚体和非特异性扩增产物, 影响荧光检测结果, 但这一干扰因素可以借助分析溶解曲线排除。通过比较溶解曲线峰值高度得知, 沙门氏菌(1 号~3 号)峰值高度达 2 800 以上, 远大于其他阴性对照菌株和灭菌超纯水(4 号~10 号)的峰值高度(400~1 500), 因此该检测结果并不影响对引物的特异性判断。10 次以上重复试验表明, 在 26 个循环之前出现荧光现象且峰值高度达到 2 800 以上的可认定为沙门氏菌, 26 个循环之后的出现荧光现象且峰值高度小于 2 800 的可认定为非沙门氏菌。试验表明, *invA* 目标

引物对沙门氏菌有特异性, 且检测过程应在 26 循环之前出现荧光信号。

2.2 Real Time PCR 检测鼠伤寒沙门氏菌的检出限

NB 液体培养基 37 $^{\circ}$ C 恒温 80 r/min 振荡液体培养鼠伤寒沙门氏菌 8 h, 取 1 mL 菌悬液倍比稀释, 稀释液在 NB 固体培养基上均匀涂布, 37 $^{\circ}$ C 恒温培养 24 h 数菌落数; 取 1 mL 菌悬液磁珠提取法提取 DNA, 将 DNA 提取液配比稀释, 以 *invA* 引物片段作为目标基因, 采用 1.2.1 方法进行检测, 结果如图 2 和图 3 所示。

平板计数显示稀释程度 10^5 菌悬液浓度为 20 cfu/mL, Real Time PCR 的 C_q 结果显示菌株模板浓度与 C_q 值之间呈良好的线性关系, 线性系数(R^2)为 0.996, 线性方程为:

$$y = -2.86x + 29.876$$

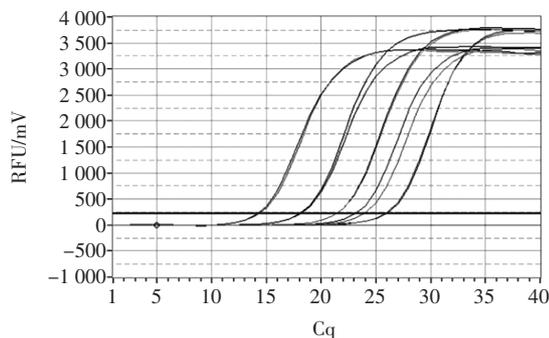


图2 鼠伤寒沙门氏菌 Real Time PCR 检出限检测结果

Fig.2 The experimental results of detection limit of *Salmonella typhimurium* by Real Time PCR technique

式中: y 为 C_q 值; x 为菌液浓度的对数。最低检测浓度为 18 cfu/mL,检测准确率为 90%。

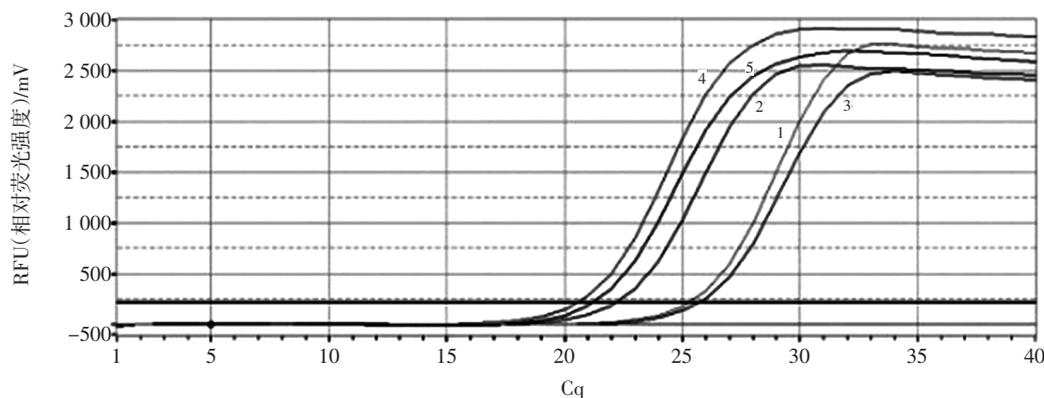
Real Time PCR 检测方法的最低检出浓度远低于普通 PCR 检测方法检出限,可达到 101 级,因此,采用此方法进行样品检测无需对样品进行预增菌,大大缩短了检测耗时,且可得到沙门氏菌具体含量(菌落数),做到通过两步(检测、计算)即可得到定量分析结果。

表2 样品中沙门氏菌 Real Time PCR 技术检测结果

Table 2 The detection results of *Salmonella* on samples by Real Time PCR technology

产品种类	C_q						是(+)-否(-)存在沙门氏菌
	A		B		C		
韭菜	28.14	29.97	27.2	27.83	25.65	26.51	+(C)
大葱	27.91	-	30.12	27.91	20.5	27.05	+(C)
香菜	30.4	27.51	26.96	25.23	21.18	27.77	+(B,C)
芹菜	31.15	27.39	-	27.39	28.52	30.13	-
苦苣	28.19	-	-	28.02	28.49	28.88	-
生菜	-	29.21	28.02	22.15	27.41	-	+(B)
大白菜	-	-	27.51	30.05	-	29.3	-
小白菜	-	28.83	27.05	27.35	27.83	26.51	-
樱桃番茄	-	31.29	-	-	-	31.2	-
菠菜	27.39	-	28.34	30.3	-	27.91	-

注:A 为大连开发区新玛特超市;B 为金马商场;C 为马桥子农贸市场;-表示无数据。



1. 香菜(B);2. 生菜(B);3. 韭菜(C);4. 大葱(C);5. 香菜(C)。

图4 Real Time PCR 检出样品

Fig.4 The test results of samples by Real Time PCR

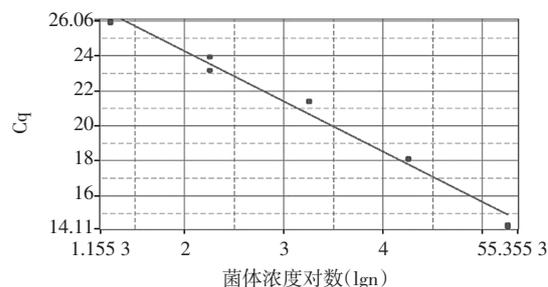


图3 Real Time PCR 检测标准曲线

Fig.3 The standard curve of Real Time PCR

2.3 应用 Real Time PCR 检测方法调查市售蔬菜中沙门氏菌污染情况

为验证上述研究 Real Time PCR 检测方法和条件是否可以运用到蔬菜样品的实际检测中,对大连开发区新玛特超市、金马商场、马桥子农贸市场 3 个售卖地点的蔬菜进行取样调查。本调查自大连开发区 3 个地点采样 10 种蔬菜共 60 份样品(每个采样地点每种样品采样 2 份)按照 1.2.1 中方法检测,检测结果如表 2 和图 4 所示。

检测结果显示,60份样品中5份样品确定存在沙门氏菌,检出率为8.33%,通过计算可得出,检出样品和沙门氏菌检出量分别为金马商场的香菜36 cfu/g、生菜501 cfu/g和马桥子农贸市场的韭菜30 cfu/g、大葱1 905 cfu/g和香菜1 096 cfu/g。由表2可知,一部分样品也可在检测中起峰,但由试验分析可得,SYBR法因荧光染料与双链DNA的结合非特异性而存在一定误差,因此C_q值在26以后的试验结果不予计算,该试验结果可说明Real Time PCR方法检测更加精确便捷,且可对沙门氏菌数做出定量分析。

3 结论

利用荧光定量PCR(Real Time PCR)技术建立沙门氏菌快速检测方法,经10次重复试验可以证明invA基因为沙门氏菌的特异性基因。本研究采用沙门氏菌DNA提取液代替合成质粒,借助沙门氏菌菌悬液浓度的测量结果绘制标准曲线,进行绝对定量,结果可直接换算成C_q值与菌落数的比例关系,便于计算。由C_q结果和标准曲线可知,Real Time PCR对沙门氏菌检出最低浓度为18 cfu/mL,菌株模板浓度与C_q值之间呈良好的线性关系,线性系数(R²)为0.996,检出准确率为90%。

借助分析溶解曲线排除荧光染料与样品中所有解链DNA均可结合而产生引物二聚体和非特异性扩增产物的干扰因素,通过重复试验得出结论,在26个循环之前出现荧光现象可认定为沙门氏菌,26个循环之后的荧光现象可认定为非沙门氏菌。

利用Real Time PCR检测方法对大连开发区3个地点采样10种蔬菜共60份样品进行检测,检测结果显示,60份样品中5份样品确定存在沙门氏菌,检出率为8.33%,通过计算可得出,检出样品和沙门氏菌检出量分别为金马商场的香菜36 cfu/g、生菜501 cfu/g和马桥子农贸市场的韭菜30 cfu/g、大葱1 905 cfu/g和香菜1 096 cfu/g。试验结果表明,与普通PCR检测方法相比,Real Time PCR检测方法因无需对样品预增菌和对PCR产物电泳而减少耗时,只需通过公式进行一步计算即可定量分析,检测方法更加简单快捷,结果更加精准,是可用于蔬菜中沙门氏菌的快速检测。

参考文献:

[1] 郭立明,张雪,历华明.沙门氏菌检测方法的研究进展[J].生物技术世界,2014(9):97

[2] Calvó L,Asunción M P,Joana P B, et al.New Real-Time PCR Assay for the Specific Detection of Salmonella spp. Targeting the bipA[J].

Gene Food Anal Methods, 2008(1): 236-242

[3] 江树勋,吴圣静,李寿崧,等.PCR检测沙门氏菌 invA 基因的灵敏度[J].食品科技,2006,10(3): 251-253

[4] 曹冬梅,袁暮云,史媛媛,等.食品中伤寒沙门氏菌 TaqMan 探针实时 PCR 检测方法[J].检验检疫学刊,2014,3(4):32-36

[5] 黄金海,孙跃辉,陈瑞,等.食品中沙门氏菌 LAMP 快速检测方法的建立[J].天津大学学报,2012, 45(5):468-472

[6] 郑秋月,赵彤彤,袁慕云,等.实时荧光 PCR 检测食品中丙型副伤寒沙门氏菌和猪霍乱沙门氏菌[J].食品科技,2014,39(2):297-301

[7] 徐桂云,樊世杰.家禽沙门氏菌感染现状及不同国家的防治策略[J].中国家禽, 2012, 34(9):7-12

[8] 张中昌,聂鸿雁.鼠伤寒沙门氏菌所致食物中毒的调查[J].宜春学院学报,2003,25(4):103

[9] 刘喆,张书萧,王少辉,等.沙门氏菌的检测技术进展[J].中国动物传染病学报, 2012,20(2): 81-86

[10] Opet N J,Levin R E. Use of β -cyclodextrin and activated carbon for quantification of Salmonella enteritidis from ground beef by conventional PCR without enrichment[J]. Food Microbiology, 2014(38):75-79

[11] 王勇.食品中三种致病菌的快速检测方法研究[D].吉林:吉林大学,2014:1-128

[12] 耿士忠,潘志明,刘杰.猪及猪肉中沙门氏菌快速检测的研究进展[J].猪业科学,2010,6(7):100-105

[13] 韦丽琴.沙门菌实验室检测技术研究进展[J].中国农村卫生事业管理,2014,34(8):962-964

[14] 何丽,王新为.常见食源性致病菌 PCR 快速检测技术建立[J].中国公共卫生,2014,30(11):1487-1489

[15] Hong Y, Berrang M E, Liu T, et al. Rapid detection of Campylobacter coli, C. jejuni, and Salmonella enterica on poultry carcasses by using PCR-enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(6): 3492-3499

[16] 宋丽萍,薛晨玉.应用实时荧光 PCR 技术定量检测羊肉中的猪肉成分[J].食品科技,2014,39(10):319-322

[17] Vincenzina Fusco, Grazia Marina Quero, Maria Morea, et al. Rapid and reliable identification of Staphylococcus aureus harbouring the enterotoxin gene cluster (egc) and quantitative detection in raw milk by real time PCR[J]. International Journal of Food Microbiology,2011, 144(3):528-537

[18] 吕艳芳,马春颖,励建荣.实时荧光定量 PCR 技术在食源性致病菌检测中的应用[J].食品与发酵科技, 2014, 50(2):80-84

[19] 赵卫东,郑文杰,贺艳.植物源性食品 DNA 提取方法的建立及几种方法比较[J].食品科技,2012,37(9):306-310

[20] 王鑫,闰磊,曾庆祝.沙门氏菌的检测技术与方法[J].现代食品科技, 2007,23(5):82-85

[21] Philippe Corbisier, Wim Brootharets, Sabrina Gioria. Toward Metrological Traceability for DNA Fragment Ratios in GM Quantification. 1. Effect of DNA Extraction Methods on the Quantitative Determination of Bt176 Corn by Real-Time PCR[J]. Agricultural and Food Chemistry,2007,55(9):3249-3257