

·论 著·

TaqMan 探针实时荧光 PCR 快速检测奶粉中沙门氏菌的研究

程洁萍, 谭翰清*, 朱颖梅

肇庆市疾病预防控制中心, 广东 肇庆 526060

摘要:目的 建立快速、灵敏地检测奶粉中沙门氏菌的 TaqMan 探针实时荧光 PCR 方法。方法 根据沙门氏菌的 *invA* 基因序列设计引物与 TaqMan 探针, 建立并评价实时荧光 PCR 反应体系的特异性, 制备鼠伤寒沙门菌标准株 (CMCC 50115) 10 倍梯度稀释的菌液, 检测对纯菌液的灵敏度, 制备染菌量分别为 $1.4 \times (10^0 \sim 10^5)$ CFU/25 g 奶粉的样本进行人工染菌量试验, 在增菌 0、4、8、12、16、20、24、36 和 48 h 时各取 1 mL 培养液, 提取 DNA 进行 TaqMan 实时荧光 PCR 检测, 同步进行传统细菌分离, 比较 2 种方法对人工染菌标本的最低检测限。结果 建立的沙门氏菌 TaqMan 探针实时荧光 PCR 仅需 40 min 即可完成检测, 与志贺氏菌、大肠埃希氏菌等非目标细菌无交叉反应, 对纯菌检测下限为 1.4 CFU/mL, 对染菌量为 1.4×10^0 CFU/25 g 奶粉的检测下限仅需增菌 16 h 即可检测出来, 而要达到这个检测限, 传统方法则需要 36 h。结论 沙门氏菌 TaqMan 探针实时荧光 PCR 快速、特异、灵敏, 可用于婴幼儿奶粉中沙门氏菌的快速筛查, 提高食品安全风险监测的速度和灵敏度。

关键词: 沙门氏菌; 实时荧光 PCR; TaqMan 探针; 食品安全风险监测

中图分类号: R378.22 文献标识码: A 文章编号: 1009-9727(2015)10-1165-04 DOI: 10.13604/j.cnki.46-1064/r.2015.10.03

The rapid detection of *Salmonella* from milk powder by TaqMan probe-based real-time PCR technique

CHENG Jie-ping, TAN Han-qing, ZHU Ying-mei

Zhaoqing Municipal Center for Disease Control and Prevention, Zhaoqing 526060, Guangdong, P.R. China

Corresponding author: TAN Han-qing, E-mail: 76148170@qq.com

Abstract: Objective To establish a rapid and sensitive TaqMan probe-based real-time PCR assay for the detection of *Salmonella* in milk powder. Methods Based on the conservative sequence of *invA* gene of *Salmonella*, specific primers and TaqMan-based probe were designed, and the specificity of rapid real-time PCR assay was established and optimized. The sensitivity was tested by the 10 times gradient diluted pure bacterium fluid of *Salmonella* typhimurium (CMCC 50115). Artificially contaminated experiment was done with artificially-inoculated samples containing final concentration of *Salmonella* typhimurium $1.4 \times 10^0 \sim 1.4 \times 10^5$ CFU/25g milk powder, respectively. One mL of all the artificially-inoculated samples were detected by TaqMan probe-based real-time PCR and traditional method for the detection minimum limit at the point of incubated times at 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 36 and 48 hours, respectively. Results The TaqMan probe-based real-time PCR for *Salmonella* could be finished in 40 minutes, and had no crossing reaction with other non-targeted bacteria like *Shigella* and *E. coli*. The detected minimum limit could be reached 1.4 CFU/mL for pure bacterium fluid, and 1.4×10^0 CFU/25g milk powder for artificially contaminated sample after 16 hours of enrichment, however, the traditional method required 36 hours. Conclusion The TaqMan probe-based real-time PCR assay for *Salmonella* was rapid, specific and sensitive. The technique could be used in the screening and identification of *Salmonella* and the improving the sensitivity and speed of food safety and risk monitoring.

Key words: *Salmonella*; Real-time PCR; TaqMan based probe; Food safety risk monitoring

沙门氏菌是引起细菌性食物中毒最常见的致病菌, 传统的分离培养方法需时 4~7d, 且操作繁琐, 难以应对繁重的食品安全风险监测任务^[1]。沙门氏菌快速检测方法较多, 主要有 PCR^[2]、SYBR Green I 荧光 PCR^[3]、TaqManTM 实时荧光 PCR^[4]、LAMP^[5] 等方法, 其中实时荧光 PCR 具有快速、特异、灵敏等特点^[6], 本实验拟探讨针对 *invA* 基因建立的 TaqMan 探针实时荧光

PCR 快速检测奶粉中的沙门氏菌的效果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株 鼠伤寒沙门菌 (CMCC 50115)、肠炎沙门菌 (CMCC 50338)、伤寒沙门菌 (CMCC 50071)、乙型副伤寒沙门菌 (CMCC 50094)、痢疾志贺菌 (CMCC 51105)、福氏志贺菌 (CMCC 51572)、单核

基金项目: 广东省肇庆市科技创新计划项目 (No.2013E1810)

作者简介: 程洁萍 (1975—), 女, 本科, 主管技师, 研究方向: 病原微生物检测。

*通讯作者: 谭翰清, E-mail: 76148170@qq.com

增生李斯特菌(ATCC 19115)、大肠埃希菌(ATCC 25922)、金黄色葡萄球菌(ATCC 6538)、普通变形杆菌(CMCC49027)、弗劳地枸橼酸杆菌(ATCC 43864)、粘质沙雷菌(CMCC 41002)均为本实验室保存。克罗诺杆菌标准株(ATCC 29544)、致病性大肠杆菌(44138)、产毒性大肠杆菌(44815)、侵袭性大肠杆菌(44484)、迟钝爱德华菌(ATCC 15947)由广东省疾病预防控制中心病原微生物检验所提供。

1.1.2 仪器与试剂 实时荧光PCR仪(美国ABI7500fast)、高速冷冻离心机(德国Hettich220)等;

Premix Ex Taq™(Probe qPCR)试剂盒(大连TaKaRa公司),TTB、SC、BS琼脂平板、XLD琼脂平板、HE琼脂平板、沙门氏菌属显色培养基平板、肠杆菌生化鉴定试剂盒由广东环凯生物技术有限公司生产,血清诊断试剂盒由宁波天润生物药业有限公司生产。

1.2 方法

1.2.1 引物和TaqMan探针 根据沙门氏菌invA基因高保守序列,利用Primer Express 3.0、Primer 5.0等软件进行引物和TaqMan探针的设计与评价,委托上海生物工程技术有限公司合成,序列见表1。

表1 沙门氏菌引物及TaqMan探针序列

Table 1 Sequence of primers and TaqMan probe-based for invA gene of *Salmonella*

引物和探针 Primers and probe	序列(5'-3') Sequence	Tm	位置 Position	长度 Length
Forward Primer	ACCATGCTGACCATTGGTGAT	61	673-693	21
Reverse Primer	AACCGGCACTAATCGCAATC	60	743-723	20
Probe	FAM-TCTTGTGCGCCAGATCCCCGC-BHQ1	70	696-716	21

注:引物、探针位置以SGU43273序列为参考。Note:Sequence SGU43273 was refrence of position of primer.

1.2.2 核酸DNA提取 采用本实验室建立的氯仿振荡3 000 rpm离心前处理、TE-SDS煮沸法^[7],对纯菌液和前增菌液进行核酸提取,上清为核酸DNA。

1.2.3 TaqMan探针实时荧光PCR的建立 采用Takara公司的Premix Ex Taq™(Probe qPCR)试剂盒,反应体积为20 μL,DNA模板5 μL,实时荧光PCR循环参数:95℃预变性20s;95℃变性5s、60℃延伸30s(末端收集荧光),40个循环。应用矩阵法优化筛选引物、探针最佳浓度组合,以同时达到较高的荧光强度增加值(ΔRn)和最小的Ct值者为好。

1.2.4 菌落计数 用新鲜培养的鼠伤寒沙门菌(CMCC 50115)制备悬菌液,10倍梯度稀释至10⁻⁸,每个稀释度进行琼脂平板计数,算出初始纯菌液的浓度;同时每个稀释度各取1 mL提取DNA,用于确定实时荧光PCR对纯菌液的检测下限。

1.2.5 人工染菌量试验 分别称取25g奶粉样本于225 mL的缓冲蛋白胨水中,共7份。用1.2.4中的10⁻⁸~10⁻³的新鲜稀释菌液分别接种6份样本各1 mL,使菌含量分别约10⁰~10⁵CFU/25 g奶粉,1份为不染菌为背景对照,于37℃温箱培养,在增菌24h后取0.1 mL的培养液,转入10 mL的TTB增菌液,进行二次增菌,继续培养18~24h,在总增菌的0、4、8、12、16、20、24、36和48h分别取各染菌量下的培养液1 mL提取DNA,进行TaqMan探针实时荧光PCR,确定反应体系的对人工染菌样本最低检测限所需时间。

1.2.6 传统分离培养 按照GB 4789.4-2010^[8],对人工染菌量试验的标本进行前增菌、选择性增菌、平板划线分离、TSI筛选、肠杆菌生化试剂盒鉴定、血清学

反应等步骤,进行沙门氏菌分离培养鉴定。

2 结果

2.1 反应体系的优化结果 经矩阵法优化,当反应体系中引物和探针的终浓度分别为0.6和0.4 μmol/L,在如下反应条件下:95℃预变性30s;95℃变性5s、58℃延伸30s(末端收集荧光),40个循环,ΔRn值和Ct值达到最佳的反应组合,见表2。

表2 引物、探针浓度优化的Ct和ΔRn值结果(μmol/L)

Table 2 Ct and ΔRn result for primers and probes opitimization

引物终浓度 Primer concentration (μmol/L)	探针终浓度(μmol/L)Probe concentration			
	0.2	0.4	0.6	0.8
0.2	22.25/1.35	22.42/1.38	22.32/1.43	22.38/1.41
0.4	19.87/1.72	19.87/1.76	20.21/1.66	20.67/1.62
0.6	19.32/1.73	18.23/1.98	20.08/1.81	20.97/1.79
0.8	20.53/1.47	20.45/1.68	20.12/1.76	20.82/1.72
1.0	20.62/1.39	20.56/1.69	20.23/1.77	20.12/1.87

2.2 反应体系特异性试验结果 对13株非目标菌株和16株沙门氏菌的DNA模板进行的实时荧光PCR检测,结果反应体系仅对16株沙门氏菌有特异性扩增,而非目标菌均无特异性扩增曲线,见图1。

2.3 菌落计数及反应体系对纯菌液的检测灵敏度 鼠伤寒沙门菌(CMCC 50115)悬液经营养琼脂平板计数,原始悬液浓度为1.4×10⁸ CFU/mL。对10⁰~10⁻⁸梯度稀释的鼠伤寒沙门菌悬液灵敏度试验结果显示,该反应体系至少能检测到1.4×10⁰ CFU/mL,见图2。

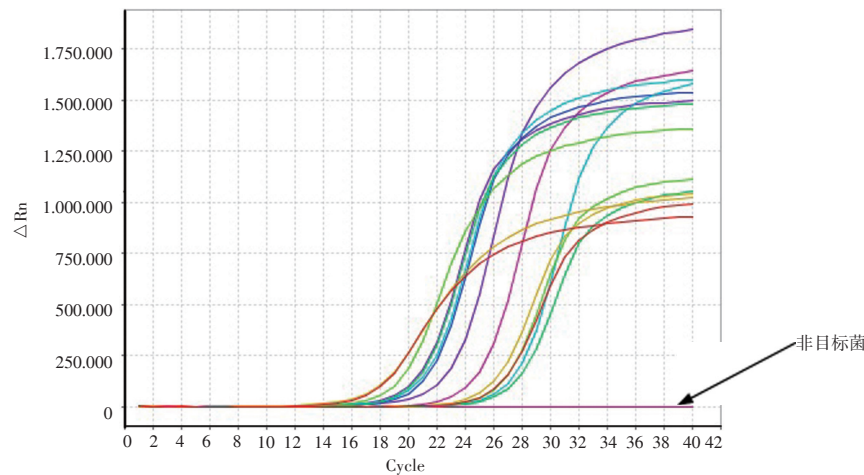


图1 16株沙门氏菌TaqMan探针实时荧光PCR特异性扩增图

Fig.1 The specificity amplification plot of TaqMan probe-based real-time PCR for the 16 strains of Salmonella.

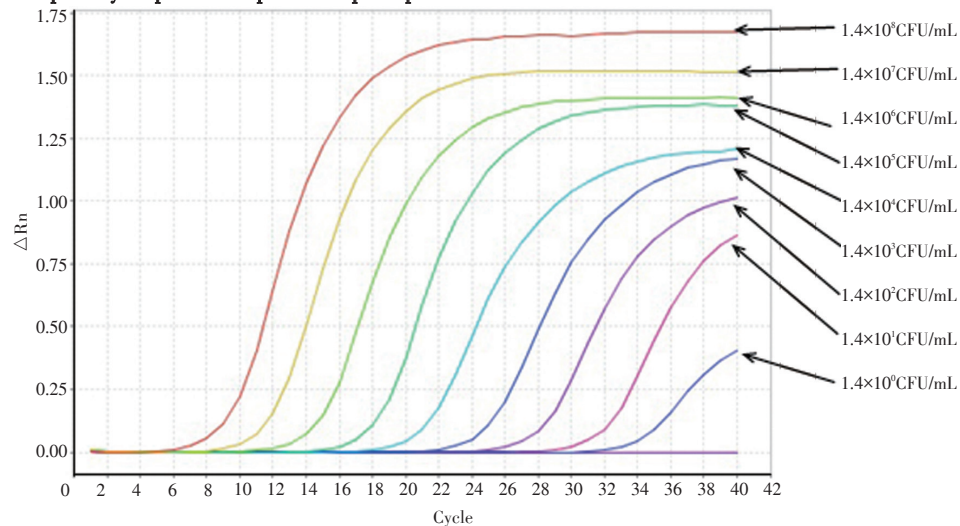


图2 TaqMan实时荧光PCR对纯菌液的灵敏度试验结果

Fig. 2 Sensitivity for pure bacterium fluid by TaqMan probe-based real-time PCR

表3 TaqMan探针实时荧光PCR与传统分离方法对人工染菌标本最低检测限结果比较

Table 3 Comparison of the detected limit of artificially contaminated samples between TaqMan probe-based real-time PCR and traditional method		
培养时间(h) Cultural time	TaqMan 探针实时荧光 PCR(CFU /25g)	传统分离培养方法 (CFU /25 g) Traditional method
0	1.4×10^5	—
4	1.4×10^4	—
8	1.4×10^3	—
12	1.4×10^2	—
16	1.4×10^0	—
20	1.4×10^0	—
24	1.4×10^0	—
36	1.4×10^0	1.4×10^0
48	1.4×10^0	1.4×10^0

注：“—”表示“未检出”Note: — refers to undetected.

2.4 两种方法对人工染菌量试验的检测 鼠伤寒沙门菌(CMCC 50115)悬液经营养琼脂平板计数, $10^{-8} \sim 10^{-3}$ 稀释度的人工染菌量样本则分别为 $1.4 \times 10^0 \sim 1.4 \times 10^5$ CFU/25g 奶粉, 分别在培养0、4、8、12、16、24、36、48h时间点取1 mL提取核酸, TaqMan 探针实时荧光PCR可对增菌16h后的每25g样本最低检测限达 1.4×10^0 CFU, 而要达到这个检测限, 传统分离培养方法则需要增菌培养36h, 见表3。

3 讨论

婴幼儿配方奶粉易受沙门氏菌污染^[9]。已有研究者针对沙门菌的 invA、hut、gyrB 等特异基因建立了快速检测方法, 提高了检测速度和灵敏度。刘书花^[2]等针对沙门氏菌 invA 基因建立的PCR对纯培养液检测极限为72个细菌; 杜雄伟^[10]等针对 invA 基因建立SYBR Green 实时荧光PCR, 检测下限为10 CFU/mL; 张巧艳^[11]等针对沙门氏菌 invA 基因建立SYBR Green

I 荧光定量 PCR, 采用煮沸裂解法快速提取总 DNA, 生乳沙门氏菌检出限为 10^2 CFU/mL, 乳制品沙门氏菌经 16h 增菌后检出限达到 1CFU/25g (mL), 检测一个样品需 3h; 马凯^[12]等利用特异性免疫磁球富集增菌液中的沙门氏菌后快速提取 DNA, 进行荧光 PCR 检测, 检测限达到 2 CFU/g; 陈贤林^[4]等针对沙门氏菌的 hut 基因建立 TaqMan™ 实时荧光 PCR, 能在 1h 内完成整个检测过程; 洪艳^[5]等选取沙门氏菌 gyrB 基因建立 LAMP, 灵敏度为 6.8×10^1 CFU/mL, 反应时间仅需 1h。

本研究针对沙门氏菌 invA 基因设计特异的引物与 TaqMan 探针, 建立和优化了实时荧光 PCR, 检测仅需 40 min, 对纯菌的灵敏度可达 1.4×10^0 CFU/mL。人工染菌量试验检测限结果表明, 本研究的 TaqMan 探针实时荧光 PCR 达到 1.4×10^0 CFU/25g 样本的最低检测限仅需增菌 16h, 而要达到这个检测限, 传统分离培养法需要 36h 后才可以达到。本研究建立的针对沙门氏菌 invA 基因 TaqMan 探针实时荧光 PCR 比已见报道的 PCR、SYBR Green I 荧光 PCR、TaqMan™ 实时荧光 PCR、LAMP 等方法更加灵敏和快速。

在婴幼儿奶粉食品安全风险监测的实际应用中, 采用本实验室建立的氯仿振荡前处理、TE-SDS 煮沸法对培养 16h 的前增菌液进行快速、高效核酸提取, 结合 TaqMan 探针实时荧光 PCR, 整个检测时限仅需 17h, 即可完成快速筛查, 可快速、高效、灵敏、特异地发现婴幼儿奶粉中的低含量的沙门氏菌, 提高食品安全风险监测体系的灵敏度和速度, 及时预警, 保障食品安全, 降低对婴幼儿的健康危害。

参考文献

- [1] 汤旭, 阮红. 浅析食品中沙门氏菌的几种快速检验方法[J]. 疾病预防控制通报, 2013, 30(2): 89-90.
- [2] 刘书花, 张瑞凌, 丁尚志, 等. 3 类食品中沙门氏菌 PCR 快速检测方法的建立[J]. 现代农业科技, 2010, 39(23): 324-325.
- [3] 耿蕊, 刘继超. SYBR Green I 荧光定量 PCR 方法快速检测沙门氏菌[J]. 食品工业科技, 2015, 36(3): 147-150.
- [4] 陈贤林, 滕毅, 杨纯, 等. TaqMan™ 实时荧光 PCR 快速检测沙门氏菌的初步研究[J]. 现代预防医学, 2011, 38(23): 4927-4929.
- [5] 洪艳, 贺凡, 王晓闻, 等. LAMP 检测沙门氏菌方法的建立[J]. 山西农业科学, 2014, 42(4): 340-342.
- [6] 孟双, 李娟, 王艳, 等. 阪崎肠杆菌实时荧光双重 TaqMan PCR 快速检测体系的建立[J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(10): 857-860.
- [7] 谭翰清, 谭海芳, 蔡建生, 等. 婴幼儿奶粉中克罗诺杆菌 DNA 快速提取方法的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(11): 1609-1611, 1618.
- [8] 中华人民共和国卫生部. GB 4789.4—2010 食品安全国家标准 食品微生物学检验—沙门氏菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [9] 钟凌, 黄健利, 姚海燕, 等. 婴幼儿配方粉的微生物污染情况研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(12): 2705, 2710.
- [10] 杜雄伟, 李叶, 江洁, 等. 肉制品中沙门氏菌 invA 基因实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 食品工业科技, 2013, 34(12): 68-70, 80.
- [11] 张巧艳, 陈亭亭, 陈笑芸, 等. 基于 SYBR Green I 荧光定量 PCR 建立生乳及乳制品沙门氏菌快速检测技术[J]. 浙江农业学报, 2012, 24(5): 914-921.
- [12] 马凯, 李宝明, 白羽, 等. 基于免疫磁分离的三重荧光定量 PCR 检测食品中沙门氏菌、志贺氏菌和金黄色葡萄球菌[J]. 微生物学通报, 2014, 41(11): 2369-2377.

收稿日期: 2015-05-28 编辑: 符式刚

文字和标点符号编排规范

1、严格执行《出版物汉字使用管理规定》, 以 1986 年 10 月国家语言文字工作委员会重新发布的《简化字总表》和 1988 年 3 月国家语言文字工作委员会和新闻出版署发布的《现代汉语通用字表》为准。

2、除特殊需要, 不得使用已废除的繁体字、异体字。但中医古籍整理及文献考证的文章, 向境外发行的期刊例外。

3、应根据 GB/T 15834—1995《标点符号用法》正确使用标点符号。以下为使用标点符号需要注意的几点: ①表示数值范围的连接号以采用“~”为宜。但在参考文献表中表示文献页码起止范围时, 应一律采用连字符。连接复合词、重叠词的两个部分的连接号, 用连字符。②省略号应采用 2 个三连点“……”, 其后不写“等”字及其他标点符号。③撰写外文文章时应遵循外文习惯使用标点符号, 如英文无顿号“、”, 应使用逗号“,”; 无浪纹连接号“~”, 应使用连字符“-”; 无书名号“《》”, 书名、刊名用斜体排印。

本刊编辑部