

PMA-qPCR 方法用于监测超声波 灭菌效率的适用性及其应用

李聪聪¹, 余以刚¹, 邱杨², 肖性龙¹, 郭毅岱¹

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640) (2. 东莞出入境检验检疫局, 广东东莞 523072)

摘要: 为研究 PMA-qPCR 方法的适用性问题, 本文以超声波制备膜损伤细菌, 用 PMA-qPCR 方法进行检测, 并与平板计数的结果进行比较, 证明该方法适用于监测超声波法灭菌率的监测。将该方法用于检测不同因素对超声波灭菌效率的影响, 表明在温度和超声频率一定的条件下, 处理时间和功率对灭菌效率的影响比较明显, 而占空比对其影响较小。

关键词: PMA-qPCR; 超声波; 灭菌率

文章编号: 1673-9078(2012)4-409-411

Capability and Application of PMA-qPCR Method for Monitoring the Ultrasonic Sterilization Rate

LI Cong-cong¹, YU Yi-gang¹, QIU Yang², XIAO Xing-long¹, GUO Yi-dai¹, WU Hui¹

(1. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Dongguan entry-exit inspection and quarantine bureau of the PRC, Dongguan 523072, China)

Abstract: To evaluate the capability of PMA-qPCR method to monitor the sterilization rate of ultrasound, the cultures were treated with ultrasound and then subjected to PMA-qPCR or plate counting. The dates showed that the PMA-qPCR method was quite effective and applicable. Evaluation of the influence of different factors on the sterilization rate showed that the treatment time and the power were the most important parameters at certain temperature and ultrasonic frequency, while the duty ratio showed little influence on the sterilization rate.

Key words: PMA-qPCR; ultrasound; sterilization rate

超声波是指频率大于 20 kHz 的声波^[1], 应用于食品工业可避免传统灭菌工艺造成的食品营养成分损失和对风味物质的破坏, 以及减少食品防腐剂的使用, 是一种具有较广泛应用前景且值得深入研究开发的非热杀菌技术^[2]。

一定强度的超声波作用于液体时会产生空化现象。液体中的微小气泡(空化核)在声场的作用下会经历生长-震荡-崩溃的过程。在空化泡崩溃的瞬间, 在其微小空间产生高达 5000 °C 以上的高温和 10⁹ k/s 的温度变化率及 10⁸ N/s 的强大冲击波^[3]。由空化效应所产生的瞬时高温及温度变化、瞬时高压与压力变化,

收稿日期: 2011-01-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101279); 东莞市高等院校科研机构和医疗卫生单位科技计划项目(201010810110); 广东省科技计划项目(2011B020314004); 中央高校基本科研业务费项目(2011ZM0101); 华南理工大学 SRP 项目

作者简介: 李聪聪(1987-), 女, 硕士研究生, 主要从事食品质量与安全研究

通讯作者: 肖性龙(1977-), 男, 讲师, 博士, 主要从事食品安全检测研究

将破坏微生物菌体细胞壁和细胞膜, 导致胞质溶出; 同时由空化作用激发产生的大量自由基, 亦可达到使病毒失活和细菌致死的效果^[4]。

食源性致病菌检测对于食品安全非常重要, 致病菌与非致病菌所造成的污染是有效监测食源性致病菌的关键环节。目前, 包括分离培养鉴定、ATP 生物发光法、基于 mRNA 的 RT-PCR 体外扩增、EMA-PCR 等活菌检测技术等都存在一定的不足。近年来发展起来的 EMA/PMA 结合 qPCR 检测复杂环境样品中活菌的方法得到了一定的发展^[5,6], 并具有巨大的发展潜力。

本文将核酸结合染料 PMA 的细胞膜选择透过性与 qPCR 的快速、高效、特异性结合起来, 实现了对超声波灭菌效率的有效监控, 并以该技术对影响超声波灭菌效率的各种因素进行探讨。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验菌株及培养基

本实验所用大肠杆菌 *E.coli* O157:H7 (ATCC6589), 为华南理工大学食品质量与安全检测中心保藏菌株。

LB 液体培养基 (1 L): 蛋白胨 10 g、酵母粉 5 g、NaCl 10 g, pH 调至 7.0, 用于大肠杆菌的培养。在液体培养基中添加 1.5% 的琼脂粉即为相应的固体培养基。121 °C, 30 min 灭菌后使用。

1.1.2 试剂及仪器

PMA (1 mg, biotium 公司) 溶解于 200 μ L 20% 的 DMSO 溶液, 得到 5 μ g/ μ L 的储备液, 于 -20 °C 避光保存。使用时, 将 PMA 储备液稀释 10 倍后为 PMA 工作液。

PCR Amplification Kit, TaKaRa 公司; DMSO, Sigma 公司; 荧光 PCR 反应所需 Taq 酶, Ferments 公司; ABI 7500 荧光定量 PCR 仪器, 美国应用生物系统公司; 紫外分光光度计及台式高速冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; 卤钨灯 (650 W), 德国 OSRAM 公司; SCIENTZ-II D (950 W) 超声波细胞粉碎机。

1.2 试验方法

1.2.1 细菌培养

用接种环沾取甘油管保存的菌液, 在 LB 固体培养基上划线, 于 37 °C 培养 24 h。挑取单菌落接种于 LB 液体培养基, 37 °C 培养至对数生长期 ($A_{600} \approx 1.0$)。

1.2.2 超声波处理条件

本实验选取频率为 20 kHz 的超声波进行试验。取培养至对数期的细菌 30 mL 于大离心管中, 以 2 mm 探头深入液面下 1 cm 进行超声处理。

为研究影响超声波灭菌效率的因素, 本文从超声功率, 时间, 占空比三个方面进行实验。功率选择为 95、285、475、665、855 W; 总的作用时间梯度为 0、5、10、15、20、25、30 min; 占空比为 1:1、5:3、2:1、5:2、3:1。

1.2.3 微生物检测

灭菌效率以 PMA-qPCR 方法进行定量, 同时参考 GB 4789.3-2010 食品安全国家标准食品微生物学检验大肠菌群计数^[7]进行平板计数。

1.2.4 PMA 处理

参照 Nocker^[8]的方法对菌液进行 PMA 处理。将 5 μ L PMA 工作液加入到 495 μ L 菌液中, 混匀后置于暗处常温孵育 5 min, 将离心管盖打开, 管口朝上, 置于 650 W 卤钨灯下方 15 cm 处光照 5 min, 以去除培养基中的游离 DNA 及膜损伤细菌 DNA。

1.2.5 细菌 DNA 提取及荧光 PCR 检测

本实验采用粗提法得到基因组 DNA。将 500 μ L 待提取样品于沸水浴中煮沸 15 min, 冷却至室温,

12000 r/min 离心 5 min, 小心吸取上清液至无菌离心管中。

利用 ABI 7500 荧光 PCR 仪进行检测。参考 Fratamico^[9]等的实验合成引物。上游引物 (Pf) 为: 5'-CTACAGGTGAAGGTGGAATGGT-3' (22 bp), 下游引物 (Pr) 为:

5'-GTAGCCTATAACGTCATGCCAAT-3' (23 bp), Taqman 探针 (Pb) 为:

5'-FAM-TCACGAATGACAAAACACTTTATGAC-BHQ1。反应体系 (25 μ L) 为: 10 \times (NH₄)₂SO₄ buffer 2.5 μ L, 25 mM MgCl₂ 3.5 μ L, 25 mM dNTPs 1 μ L, 前、后引物各 1 μ L, 探针 0.5 μ L, Taq DNA 聚合酶 2.5 U, DNA 模板 2 μ L, 补加 ddH₂O 至 25 μ L。反应条件为: 95 °C 预变性 2 min, 每个循环为 95 °C, 5 s, 60 °C, 40 s (收集荧光信号), 共 40 个循环, 反应结束后于 40 °C 保温 10 min。

2 结果与讨论

2.1 PMA-qPCR 方法的有效性

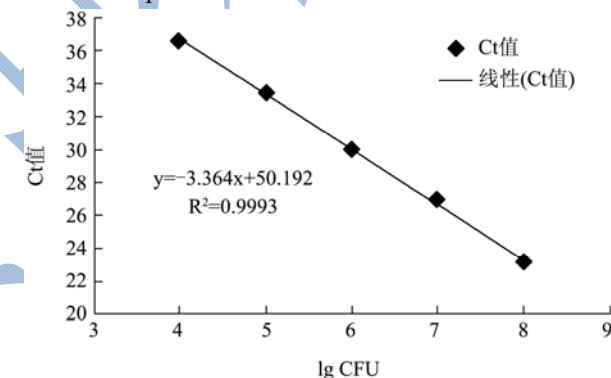


图1 标准曲线

Fig.1 The standard curve

标准曲线见图 1, 是由未经超声处理的菌液梯度稀释后提取 DNA 进行荧光 PCR 得到的。符合荧光定量试验的要求。

原始浓度为 10⁹ CFU/mL 菌液经 20 kHz, 功率为 665 W, 占空比 5:2 的超声波处理 10 min 后, 进行梯度稀释, 然后分别用 PMA-qPCR 方法和平板计数方法进行测定, 对二者的结果进行比较 (见表 1)。

表 1 PMA-qPCR 定量结果与平板计数结果比较

Table 1 Comparison of different quantification methods (plate counts, qPCR and PMA-qPCR) for evaluating ultrasound inactivation effect on *E.coli* O157:H7

稀释度	10 ⁻⁴	0.5 \times 10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	0.5 \times 10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
PMA-qPCR 定量结果	972.1	473.6	91.2	48.3	0
平板计数结果	968.5	480.1	97.7	44.7	0

表1结果表明, PMA-qPCR方法计数结果与平板计数结果无显著差异, 证明该方法可用于检测超声波灭菌效率的监测。

2.2 超声功率对杀菌率的影响

原始浓度为 10^9 CFU/mL 液经 20 kHz, 功率分别为 95、285、475、665、855W, 占空比为 1:1, 处理时间为 5 min 的超声处理后, 利用 PMA-qPCR 定量, 结果见图 2。

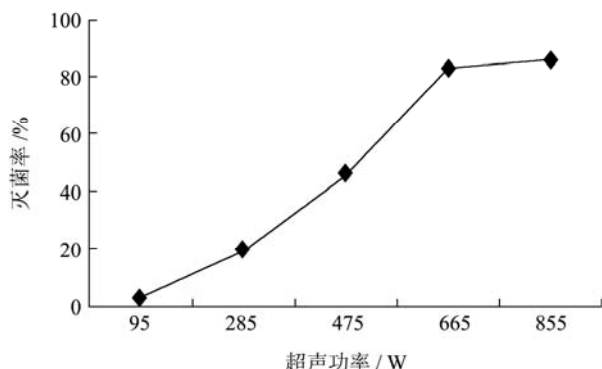


图2 超声功率对灭菌率的影响

Fig.2 The influence of power on sterilization rate

由图2可知: 功率是影响灭菌率的重要因素, 在超声功率 ≤ 665 W时, 灭菌率随功率的增加迅速增大, 达约 83.6%; 超声功率继续增大对灭菌率的影响不大。

2.3 超声处理时间对灭菌率的影响

原始浓度为原始浓度为 10^9 CFU/mL 菌液经 20 kHz, 665 W, 间歇比为 5:2 的超声处理不同时间 (0、5、10、15、20、25、30 min), 利用 PMA-qPCR 方法检测其灭菌效果 (见图 3)。

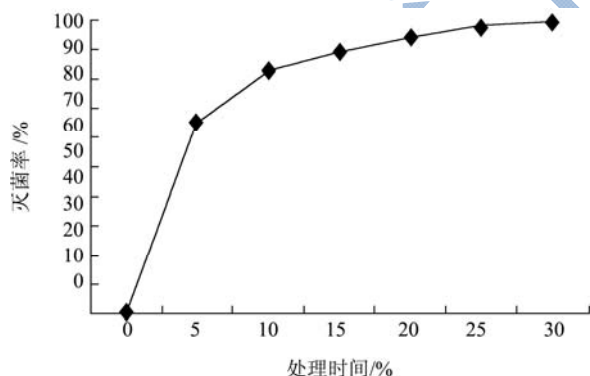


图3 处理时间对灭菌率的影响

Fig.3 The influence of treatment time on sterilization rate

由图3可知, 在超声处理的开始阶段, 灭菌率随时间增长而迅速增加, 处理 10 min 即达到 82.5%; 10 min 后稳步增长, 25 min 后达到 97.3%; 随后灭菌率随时间的变化不明显, 最终的灭菌率为 98.7%。

2.4 超声处理间歇比对杀菌率的影响

原始浓度为原始浓度为 10^9 CFU/mL 的菌液, 以 20 kHz, 665 W, 不同占空比 (1:1, 5:3, 2:1, 5:2,

3:1) 处理 10 min, 占空比对灭菌率的影响结果见图 4。

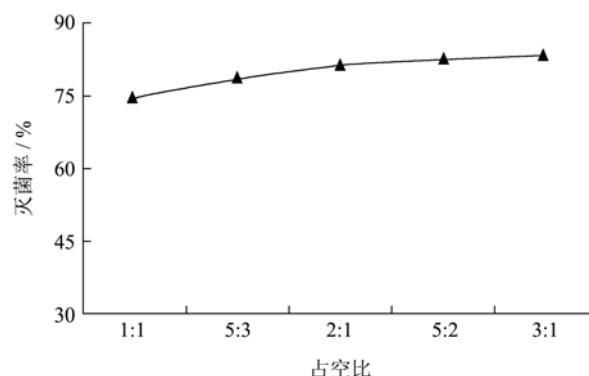


图4 占空比对灭菌率的影响

Fig.4 The influence of the duty ratio on sterilization rate

由图4可知, 当处理时间固定时, 灭菌率随占空比增大有增大的趋势, 但增大的幅度不明显。

2.5 灭菌效果的评价

综合以上结果可知, 在温度和超声频率固定的条件下, 处理时间及超声功率对灭菌率的影响比较明显, 而占空比对灭菌率的影响不大。

在本实验条件下, 所得到的灭菌率偏低, 难以满足商业标准的要求。在实践中可结合其他影响灭菌方法如高温, 紫外照射或磁化联合等方法, 以达到将致病菌完全杀灭或商业无菌的目的^[10]。

3 结论

3.1 将核酸染料 PMA 与 qPCR 相结合的方法, 与活菌检测的“金标准”平板计数的结果无显著差异, 准确率高, 且克服了传统活菌检测所需时间长、重复性差的缺陷, 可实现对特定微生物的检测, 因此该方法可用于对超声波灭菌效率的监测。

3.2 将 PMA-qPCR 方法用于食品加工工业, 可实现对食品原料及食品加工过程的实时监测, 从而保证产品质量, 降低食源性疾病发生的风险。

参考文献

- [1] Butz P and Tauscher B. Emerging technologies: chemical aspects [J]. Food Research International, 2002, 35(2/3): 279-284
- [2] 李汴生, 阮征. 非热杀菌技术与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004
- [3] 李儒荀, 袁锡昌, 工跃进, 等. 超声波-激光联合杀菌的研究[J]. 包装与食品机械, 2002, 16(3): 11-12
- [4] Fellows P. Food Processing Technology: Principles and Practice [M]. New York: Woodhead Publishing, 2009
- [5] Rudi K, Naterstad K, Dromtorp SM, et al. Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* on gouda-like cheeses by

- real-time PCR [J]. Letters in Applied Microbiology, 2005, 40: 301-306
- [6] Garcia-Cayuela T, Tabasco R, Pelaez C, et al. Simultaneous detection and enumeration of viable lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented milk by using propidium monoazide and real-time PCR [J]. International Dairy Journal, 2009, 19: 405-409
- [7] GB 4789.3-2010, 食品安全国家标准食品微生物学检验大肠菌群计数[S]
- [8] Nocker A, Cheung CY, Camper AK. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells [J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 67: 310-320
- [9] Fratamico PM, Sackitey SK, Wiedmann M, et al. Detection of Escherichia coli O157:H7 by multiplex PCR [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1995, 33(8): 2188-2191
- [10] 宋国胜, 胡松青, 李琳. 超声波技术在食品科学中的应用与研究[J]. 现代食品科技, 2008, 24(6): 609-612