

火腿肠细菌总数 FISH 检测技术的优化

何庆, 罗剑飞, 林炜铁, 井洪珍

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

摘要: 为了建立快速的火腿肠中细菌检测和计数方法, 本文采用细菌通用探针EUB338作为标记, 优化了荧光原位杂交 (FISH) 技术检测火腿肠中细菌的方法。比较了三种细胞固定方法, 结果表明最佳的样品预处理方法为: 4℃ 4%多聚甲醛固定15 min, 46℃热固定2 h; 最佳的杂交条件: 杂交温度为46℃, 杂交时间为3 h, 杂交洗脱液浓度为225 mmol/L; 优化的FISH方法应用于火腿肠样品的总菌数的检测, 并且将FISH方法对火腿肠样品的细菌计数与传统平板计数方法进行比较, 结果显示FISH方法相较于平板计数方法检出数高, 而且所需时间大大缩短, 操作起来更加方便、简捷。本实验充分体现了FISH快速定量的优势, FISH可以作为食品微生物快速检测的一种有效工具。

关键字: 荧光原位杂交; 细菌检测与计数; 火腿肠

文章篇号: 1673-9078(2013)2-422-425

Optimization of Fluorescence in Situ Hybridization for the Detection of Bacteria in Sausage Samples

HE Qing, LUO Jian-fei, LIN Wei-tie, JIN Hongzhen

(College of bioscience and bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006)

Abstract: In order to develop a method that rapidly detect and enumerate the bacteria in sausage samples. The Fluorescence in situ hybridization (FISH) technique with EUB338 probe was established and optimized. Three different cell-fixing methods were contrasted and results showed that the optimal conditions for sample preparation were 4% paraformaldehyde, fixed time 15 min, at 4℃ and heat fixed time 2 h at 46℃. The optimal condition for hybridization was 3 h hybridized at 46℃ with 225 mmol/L NaCl concentration in washing buffer. Compared to the Plate count method, the optimized FISH method was more sensitive and quicker while used to enumerate the bacteria in sausage samples. The FISH method can be used as an effective and convenient tool for the detection and enumeration of bacteria in food samples.

Key words: fluorescence in situ hybridization; detection and enumeration of bacteria; sausage samples

在食品生产、加工、储存、运输、销售等各个环节中都有微生物污染的可能, 一旦污染, 微生物将大量繁殖而引起食品腐败变质, 或导致食源性感染和食物中毒。传统的检测方法, 主要包括形态和生化方法, 其准确性、灵敏性均较低, 而且涉及的实验操作繁琐、耗时长等。

荧光原位杂交(FISH)技术是20世纪80年代初期在原有的放射性原位杂交技术的基础上发展起来的一种非放射性原位杂交技术, Bauman将RNA标记上荧光后作为探针进行DNA检测^[1]。其基本原理是用已知的标记单链核酸为探针, 按照碱基互补的原则, 与待检材料中未知的单链核酸进行异性结合, 形成可被检测的杂交双链核酸; 以rRNA作为目标设计探针, 可以具体到不同的分类水平, 荧光原位杂交已经成功应用到

非培养微生物的检测以及细菌群落的多样性分析^[2-5]。目前, FISH技术已应用于海洋底泥的微生物群落多样性^[6], 废水处理系统中的细菌检测^[7-8], 奶酪、牛奶等发酵食品以及饮用水中的微生物检测和计数^[9]。

本研究采用FISH结合细菌通用探针EUB338的方法, 优化了FISH技术在火腿肠中细菌的检测和计数方法, 并将优化的方法应用于几种市售火腿肠样品的检测, 旨在建立一套更加迅速、简捷方便的食物中菌落总数的检测体系。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验室保藏的大肠杆菌; 市场购买的 SH 肉花肠样品、YR 火腿肠样品和 JL 火腿肠样品。

1.2 实验仪器

称量天平、TGL-16H 型高速离心机、SANYO MLS-3750 型高压蒸汽灭菌锅、烘箱、水浴锅、

收稿日期: 2012-10-08

作者简介: 何庆 (1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向为微生物酶学与发酵工程

OLYMPUS BX51 型荧光显微镜等。

1.3 方法

1.3.1 探针的选用

根据细菌的16S rRNA设计的EUB338探针是FISH中最常用的探针,可以用于检测环境中的细菌细胞^[11]。其序列为(5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'、5'端荧光标记TAMRA,终浓度5 ng/μL)。

1.3.2 荧光原位杂交方法检测细菌总数

1.3.2.1 玻片处理

用热肥皂水刷洗载玻片和盖玻片,蒸馏水冲洗3~5次,1%(质量分数)的盐酸浸泡24 h,取出玻片,蒸馏水浸泡1 min,然后冲洗3次。然后制备0.1g明胶溶于50~80mL蒸馏水,加热搅拌,溶解后,稀释至100 mL,保持60℃,玻片放入明胶中浸泡10 min,60℃烘干备用^[12~13]。

1.3.2.2 样品预处理

大肠杆菌菌液制备:挑单菌落的大肠杆菌于2mL EP管,用PBS稀释成5个梯度,备用;火腿肠样品制备:每个样品取25 g小样,研磨,然后加入225 mL磷酸盐缓冲液或生理盐水,150 rpm震荡二十分钟。

1.3.2.3 样品的固定^[8,10,13]

分别用3种方法固定样品:a)热固定2 h:用油性笔在玻片的背面描画边长为1 mm正方形,取10 μL洗涤三次的样品溶液涂至正方形内,置于46℃烘箱内放置2 h;b)多聚甲醛(Paraformaldehyde, PFA)固定:取1 mL样品,12500 rpm离心3 min,加入三倍体积的含有4%多聚甲醛溶液(4% paraformaldehyde (w/v) solution in PBS)的PBS缓冲液,固定2 h,固定好的细胞冲洗两次(1 mL PBS, 12500 rpm离心3 min),然后用油性笔标记,涂10 μL样,其余同上;c)多聚甲醛固定加热固定:4%多聚甲醛固定15 min后再46℃热固定2 h。

1.3.2.4 杂交

将固定于玻片上的样品溶液用50%, 80%, 98%体积(v/v)的乙醇溶液依次脱水4 min,晾干,加入20 μL预热杂交缓冲液,1 μL浓度为5 ng/μL的EUB338探针溶液,将玻片置于湿盒中杂交,杂交时间和温度由正交试验确定。杂交液的配制:0.9 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl (pH=7.4), 0.01% SDS, 20%去离子甲酰胺^[14~15]。

1.3.2.5 洗脱

杂交完毕后从杂交盒中取出载玻片,用预热到48℃的杂交洗脱液冲洗两次,置于洗脱液中洗脱20 min,用ddH₂O漂洗两次,自然晾干,滴加5 μL的封片试剂,覆上盖玻片等待荧光显微镜观察。洗脱液的配制:20 mmol/L Tris-HCl (pH=7.4), 0.01% SDS, NaCl

溶液的浓度由正交试验确定^[14,9,12]。

1.3.2.6 镜检和计数

玻片在OLYMPUS BX51型荧光显微镜下观察,滤玻片为G光源。结合探针的细菌细胞显红色或橙红色荧光。每张玻片的视场数FN为22,每个视场观测10个视野并拍摄,样品中细菌丰度公式由公式(1)^[13]计算:

$$E=N*A*S_1*(s_2*V)^{-1}$$

注: E为细菌丰度(cells/mL), N为稀释倍数, A为视野中荧光细胞平均数, S₁为样品面积(mm²), S₂为视野面积(mm²), 视场直径F=视场数/物镜放大倍数=0.55 mm, 视野面积S₂=π*(F*0.5)², V为样品体积。

上述实验过程的阴性对照指杂交时不加探针,其它步骤与实验均一样的对照;阳性对照对大肠杆菌菌液进行相同处理,验证杂交情况。

1.3.3 杂交条件的优化

杂交过程中杂交温度、杂交时间、还有洗脱液浓度是影响杂交效果的关键因素,因此,利用L₉(3⁴)正交表分别对这3个实验条件进行优化,各因素水平具体见表1。

表1 杂交条件因素正交试验水平表

Table 1 Factors and levels of the orthogonal test for hybrid optimization

水平	因素		
	A(杂交温度/℃)	B(杂交时间/h)	C[洗脱液NaCl浓度/(mmol/L)]
1	37	1	60
2	46	3	180
3	55	5	225

2 结果与分析

2.1 原位杂交固定方法的比较

比较了三种细胞固定的方法,结果如表2。采用4℃下4%多聚甲醛固定15 min再进行46℃热固定2 h的固定方法获得的荧光细胞数是最多的,说明此固定方法是最优的。

表2 样品固定方法的比较结果表

Table 2 Comparison of three different cell-fixing method

固定方法	荧光细胞数/(×10 ⁹ cell/mL)
4℃下4%多聚甲醛固定2 h	4.62
46℃下热固定2 h	6.22
4% PFA固定15 min后再46℃热固定2 h	12.60

2.2 杂交反应优化实验结果

参考文献记载的常用水平,对杂交温度、杂交时间以及洗脱液中盐浓度3个因素进行杂交优化实验。使用正交助手 II 软件设计 $L_9(3^4)$ 正交表,如表3所示。通过极差分析法分析可知:对于杂交温度, $k_1 < k_3 < k_2$,即杂交温度为46℃效果最佳。对于杂交时间, $k_1 < k_3 < k_2$,杂交时间为3h效果最佳。对于洗脱液NaCl的浓度, $k_2 < k_1 < k_3$,因此,洗脱液NaCl浓度为225 mmol/L的浓度最佳。分析极差R可知, $R_1 > R_2 > R_3$,杂交温度和杂交时间对实验结果的影响大于洗脱液的浓度。其中又以杂交温度的影响最大。综合以上三个因素,当杂交温度为46℃,杂交时间为3h,杂交洗脱液浓度为225 mmol/L的时候杂交效果最佳。

表3 杂交条件优化—直观分析表

Table 3 Intuitive analysis for hybrid optimization

因素	A	B	C	空列	实验结果E ($\times 10^9$ cell/mL)
1	1	1	1	1	1.806
2	1	2	2	2	2.016
3	1	3	3	3	1.974
4	2	1	2	3	3.990
5	2	2	3	1	9.492
6	2	3	1	2	4.410
7	3	1	3	2	1.890
8	3	2	1	3	2.646
9	3	3	2	1	1.806
k1	1.932	2.562	2.954	4.368	
k2	5.964	4.718	2.604	2.772	
k3	2.114	2.730	4.452	2.87	
R	4.032	2.156	1.848	1.596	

2.3 FISH 检测方法的确立

利用大肠杆菌纯菌液为阳性供试菌,采用上述较优实验方案,检测上述方案中荧光原位杂交的细菌杂交效果,如图1所示:大肠杆菌发出红色荧光,大肠杆菌分布均匀,杂交率较高。

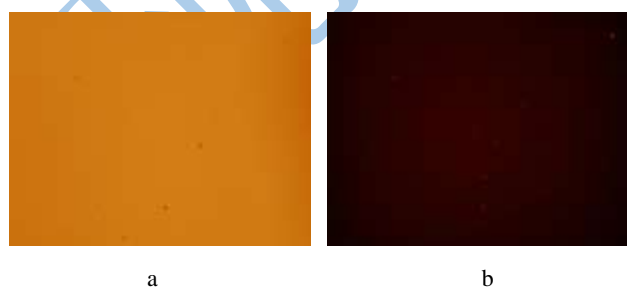


图1 为大肠杆菌的检测照片 (a: 自然光, b: 荧光)

Fig.1 Photographs of *E. coli* (a: optical photo; b: fluorescence photo)

2.4 火腿肠样品的荧光原位杂交方法菌落计数结果

采用上述所确立的细菌荧光原位杂交的计数方法对市面上的 JL 火腿肠、SH 肉花肠、和 YR 火腿肠的细菌总菌数进行检测,如图2所示,样品分散较为均匀,发出红色荧光的点则为杂交上的细菌。并且通过 FISH 计数和国标中的 LB 平板计数比较可知:FISH 计数较平板计数结果偏高,具体结果如表4示。



图2 SH火腿肠样品的FISH细菌检测的照片

Fig 2 Fluorescent microscopic view of bacteria hybridized with EUB338 probe

表4 火腿肠样品细菌的FISH计数与平板计数结果

Table 4 Enumeration of bacteria in sausage samples by Plate counting method and FISH method

样品	FISH 计数 (10^5 cell/g)	LB 平板计数 (10^4 cell/g)
JL 火腿肠	4.284	5
SH 肉花肠	2.226	4
YR 火腿肠	3.822	4

3 讨论

FISH一般包括四个步骤:样品处理、细胞固定、杂交以及洗脱。标准的固定方法采用的固定剂通常为4%的多聚甲醛,4%多聚甲醛(PFA)固定时间太短不能很好的保持细胞内的RNA,但过度延长固定时间会引起细胞内生物大分子的过度交联,影响探针的穿透力,降低杂交效率。废水处理系统中的FISH的4%多聚甲醛固定时间很多都采用过夜处理^[8-16];食品病原菌检测也有用多聚甲醛固定1~2h的^[10],但是也有文献通过优化实验证实4%的多聚甲醛固定时间为15 min的固定效果比较好^[13]。另外,热固定可以使细胞有效地粘附在明胶上,防止细胞流失^[17]。多聚甲醛处理结合热固定的方法得到的样品中微生物细胞固定效果更好。

杂交条件对FISH定量至关重要,常见的杂交温度是37℃,46℃,55℃或60℃^[9,10]。不同的探针以及杂交体系所需要的杂交温度不同,在一定温度范围内提高杂交温度可以提高探针特异性,但是温度太高会对细胞造成形态学损伤,可以通过在杂交液中加入甲酰胺来降低双链核酸的稳定性,从而降低杂交温度,减少形态学损伤。加入不同浓度的甲酰胺对杂交条件尤其是杂交温度会有一些影响,本研究中在杂交缓

冲液中加入20%甲酰胺时,杂交温度为46℃时的杂交效果较好。另外杂交时间也是比较重要的因素,杂交时间过短会造成探针结合不完全,杂交时间过长会增加非特异性着色^[18]。

传统的食品微生物检测大多采用培养分离的方法,食品中菌落总数测定采用平板计数法获得结果需要1-2 d,致病菌的检测包括前增菌、选择性增菌、镜检以及血清学验证等一系列的检测程序大概需要5~7 d。FISH技术与传统方法相比,具有快速、简便的优点,但针对复杂的固体样品该方法有一定的局限性:

(1)样品的预处理会一定程度地影响FISH计数;(2)FISH方法检测出的微生物还包括了少数死亡的微生物细胞;(3)食品中样品成分较为复杂,即使经过研磨、震荡以及多次清洗后仍然还是存在食品成分的自发荧光的干扰。

本研究中FISH方法对火腿肠复杂样品的计数较传统的平板培养计数的结果高一个数量级,这一结果即反映了该技术的灵敏性,也在一定程度上反映了FISH的局限性。因此,要解决这些问题,可采用超声波处理将样品尽可能的分散^[19];结合激光共聚焦显微技术减少自发荧光的影响,同时可以通过设定荧光强度的阈值,排除较弱荧光的干扰^[20];利用分子信标取代线性的寡核苷酸探针具有更好的区分能力,可减少细胞的凝集成团和损失,有助于更精确的计数^[21]。

4 结论

4.1 确定了FISH方法检测食品中总细菌数的最佳的样品固定方法为:4℃下4%多聚甲醛固定15 min再进行46℃热固定2 h的固定方法,以及最佳的杂交条件为:杂交温度为46℃,杂交时间为3 h,杂交洗脱液浓度为225 mmol/L。

4.2 应用FISH方法检测火腿肠样品中的总菌数,其检测结果能够在数小时后得到,并且灵敏度较高。但是对于复杂食品样品而言,FISH方法还存在一定的问题,需要进一步解决。

参考文献

[1] Bauman J G, Wiegant J, Borst P, et al. A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochromelabelled RNA [J]. *Exp. Cell Res*, 1980, 128(2): 485-90

[2] Amann R I, Krumholz L and Stahl D A. Fluorescent oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology [J]. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172: 762-

770

[3] Amann R I, Ludwig W and Schleifer K-H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. *Microbiological Reviews*, 1995, 59: 143-169

[4] Amann R I, Snaidr J, Wagner M, Ludwig W. and Schleifer K-H, 1996. In situ visualization of high genetic diversity in a natural microbial community [J]. *Journal of Bacteriology*, 178: 3496-3500

[5] Amann R, Fuchs B M, Behrens S. The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridization [J]. *Current Opinion Biotechnol*, 2001, 12: 231-236

[6] Llobet-Brossa E, Rossello-Mora R, Amann R. Microbial community composition of Wadden Sea sediments as revealed by fluorescence *in situ* hybridization [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64: 2691-2696

[7] Whiteley A S, Bailey M J. Bacterial community structure and physiological state within an industrial phenol bioremediation system [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66: 2400-2407

[8] 聂英进,孙晓莹等.活性污泥样品荧光原位杂交实验方法研究[J].*四川环境*,2011,30(4):5-8

[9] 王建龙等.荧光原位杂交(FISH)技术检测水体中大肠菌群研究[J].*中国生物工程杂志*,2004,24(2):70-73

[10] R.M.U.S.K. Rathnayaka et al. Effect of Sample Pre-enrichment and Characters of Foods Samples on the Examination for the Salmonella by Plate Count Method and Fluorescent *in-situ* Hybridization Technique[J]. *American Journal of Food Technology*, 2011(9): 851-856

[11] 王晓丹.EUB338探针对真细菌细胞的检测灵敏性分析[J].*安徽农业科学*.2011,39(33):20310-20311,20315

[12] 朱琳,尹立红等.荧光原位杂交法检测环境硝化细菌实验条件优化及应用[J].*东南大学学报*,2005,35(2):266-270

[13] 张星,林炜铁等.FISH技术定量解析亚硝酸盐氧化菌的条件优化[J].*环境科学学报*,2009,29(4):716-722

[14] 陈瑛,任南琪等.微生物荧光原位杂交(FISH)实验技术[J].*哈尔滨工业大学学报*,2008,40(4):546-549

[15] 罗思音,张方可,张立秋.荧光原位杂交技术检测污水处理中微生物的生理生态[J].*水科学与工程学报*,2001,2:27-29

[16] 王晓丹.土壤细菌荧光原位杂交对比染色技术的构建[J].*环境科学与技术*,2011,34(12):175-178

[17] 张明.硝化细菌应用技术研究[D].上海:华东师范大学,2005

[18] Beatty B, Mai S, Squire S等.荧光原位杂交技术[M].王瑛等

- 译.天津:天津科技翻译出版社,2002
- [19] 张方可,罗思音等.超声波对荧光原位杂交技术检测氨氧化菌的影响[J].中国给水排水,2010,26(2):89-92
- [20] Bouchez T, Dabert P, Wagner M, et al. Quantification of bacterial populations in complex ecosystems using fluorescent in situ hybridization, confocal scanning microscopy and image analysis [J]. Genet Sel Evol, 2001, 33: 307-318
- [21] Lenaerts J, Lappin-Scott H M, Poer J. Improved fluorescent in situ hybridization method for detection of bacteria from activated sludge and river water by using DNA molecular beacons and flow cytometry [J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73: 2020-2023

现代食品科技