

高分辨溶解曲线技术结合荧光实时 PCR 法 同时检测鸡肉中 4 种食源性致病菌

张静, 周倩, 唐梦君, 张小燕, 唐修君, 陆俊贤, 高玉时, 顾荣
(江苏省家禽科学研究所, 江苏扬州 225125)

摘要: 建立高分辨溶解曲线技术同时快速检测鸡肉中沙门氏菌、单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌和空肠弯曲菌。本研究分别以上述 4 种菌的 *fimY*、*hly*、*nuc* 和 *orfC* 特异性基因为靶基因, 建立能同时检测多种食源性致病菌的多重 HRM-real time PCR 检测体系, 并对反应的特异性、灵敏度、重复性以及人工染菌样品进行了评价。所建立的 HRM-real time PCR 检测体系对沙门氏菌、单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌和空肠弯曲菌均产生特异性溶解曲线, T_m 值分别为 82.2 °C、78.2 °C、75.5 °C 和 73.5 °C; 多重 HRM-real time PCR 反应体系检测单一致病菌菌液的灵敏度均为 10^2 拷贝数/mL, 检测多种致病菌菌液的灵敏度为 10^2 拷贝数/mL; 该反应体系重复性的试验内 CV 值在 0.03%~0.32% 之间, 试验间 CV 值在 0.45%~2.12%; 人工染菌样本对 4 种菌的检测限均能达到 5 CFU/25 g。结果表明该多重 HRM-real time PCR 检测体系可对上述 4 种禽肉中常见致病菌进行有效的检测与区分, 特异性强, 灵敏度高, 反应重复性好, 有望在食源性致病菌检测分析中发挥作用。

关键词: 高分辨溶解曲线; 食源性致病菌; 荧光 PCR; 鸡肉

文章编号: 1673-9078(2021)06-296-303

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.6.0908

High-resolution Melting Curve Analysis Coupled with Fluorescence Real-time PCR for Simultaneous Detection of Four Food-borne Pathogenic Bacteria in Chicken

ZHANG Jing, ZHOU Qian, TANG Meng-jun, ZHANG Xiao-yan, TANG Xiu-jun, LU Jun-xian, GAO Yu-shi,
GU Rong

(Jiangsu Institute of Poultry Sciences, Yangzhou 225125, China)

Abstract: A high-resolution melting curve analysis (HRM) technique was established for simultaneous and rapid detection of *Salmonella*, *Listeria monocytogene*, *Campylobacter Staphylococcus aureus* and *Campylobacter jejuni* in chicken meat. In this study, the *fimY*, *hly*, *nuc* and *orfC* specific genes of the above four bacteria were used as target genes to establish a multiple HRM-real time PCR detection system that can simultaneously detect a variety of food-borne pathogens. The specificity, sensitivity and reproducibility of the reaction and the artificially infected samples were evaluated. The established HRM-real time PCR detection system produced specific melting curves for *Salmonella*, *Listeria monocytogene*, *Staphylococcus aureus* and *Campylobacter jejuni*, with the T_m values being 82.2 °C, 78.2 °C, 75.5 °C and 73.5 °C, respectively. The sensitivity of the multiple HRM-real time PCR reaction system was 10^2 copies/mL for single pathogenic bacterium solution

引文格式:

张静,周倩,唐梦君,等.高分辨溶解曲线技术结合荧光实时 PCR 法同时检测鸡肉中 4 种食源性致病菌[J].现代食品科技,2021,37(6): 296-303

ZHANG Jing, ZHOU Qian, TANG Meng-jun, et al. High-resolution melting curve analysis coupled with fluorescence real-time PCR for simultaneous detection of four food-borne pathogenic bacteria in chicken [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(6): 296-303

收稿日期: 2020-09-29

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31700005); 扬州市社会发展项目(YZ2020060); 江苏省属公益类科研院所自主科研经费(BM2018026); 江苏省现代农业产业技术体系建设专项资金资助(JATS[2020]359)

作者简介: 张静(1987-), 女, 硕士研究生, 助理研究员, 研究方向: 食品质量安全

通讯作者: 高玉时(1967-), 男, 博士研究生, 研究员, 研究方向: 分子育种和食品质量安全

and 10^2 copies/mL for multiple pathogenic bacteria solution. The intra-CV value in the repeatability test of the reaction system was good between 0.03% and 0.32%, and the inter-CV value was between 0.45% and 2.12. The detection limits of the four bacteria for the artificially infected samples all reached 5 cfu/25 g. The results showed that the multiple HRM real-time PCR system can effectively detect and distinguish the above four common food-borne pathogens in poultry meat. The method has high specificity and sensitivity and good response repeatability, thus, is expected to play a role in the detection of food-borne pathogens.

Key words: high-resolution melting curve analysis; food-borne pathogen; fluorescence real-time PCR; chicken

食品安全是关系到民生的重大事件, 目前由于食源性致病菌引起的疾病在各国都引起重视, 特别是微生物食物中毒事件^[1]。国内目前在禽肉食品中常见的食源性致病菌主要有沙门氏菌^[2,3]、单增李斯特菌^[4-6]、金黄色葡萄球菌^[5,7]和空肠弯曲菌^[8,9]。由于禽肉产品中的高携带率和污染状况, 建立能同时检测上述 4 种菌快速检测与鉴定方法是及时有效地控制和预防致病菌传播的前提。

目前食源性致病菌的检测方法主要包括传统培养法与生理生化检验, 以及包括酶联免疫法、分子生物学方法等快速检测技术。传统的检测方法无法对难培养或不可培养的致病菌进行检测, 且耗时费力, 获得结果通常需要几天的时间, 不能实现有效的监测和预防作用。且单独检测一种致病菌已无法满足现今社会对致病菌检测高效率的要求。多重 PCR 是在同一反应管中同时完成多种致病菌的高效 PCR 扩增, 从而实现多种致病菌 DNA 的同步快速检测的技术。由于多重 PCR 可降低致病菌检测过程中样本、物资、试剂、工作量等占用的时间和空间, 多重 PCR 技术在降低检测成本方面显得非常经济^[10]。高分辨溶解曲线分析技术 (High Resolution Melting, HRM) 是一种基于单核苷酸熔解温度不同而形成不同溶解曲线的基因分析技术, 通过与实时荧光 PCR 相结合, 可以实时监测温度上升时双链 DNA 的解链过程。且该技术达到了真正的闭管操作, 避免传统荧光操作和凝胶分离步骤, 降低交叉污染的可能性及整体分析时间^[11]。HRM 技术以其高特异性、高通量、高灵敏度、低成本、快速等优势, 在临床诊断及基因分析上得到迅速发展, 已成为生命科学研究中的热点技术^[12-20], 利用 HRM 技术能针对每一种细菌的固定 DNA 序列产生精确的 T_m 值, 可将 HRM 分析技术应用于多种致病菌的检测中。因此, 本文利用 *fimY*、*hly*、*nuc* 和 *orfC* 为靶基因, 建立多重 HRM-real time PCR 检测体系, 采用高分辨溶解曲线分析技术同时检测 4 种禽肉中常见的食源性致病菌 (沙门氏菌、单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌和空肠弯曲菌), 并进行了评价和初步应用。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与样本

本实验选取 *S. Enterica* CMCC50041, *L. monocytogenes* ATCC19115、*S. aureus* ATCC12598 和 *C. jejuni* ATCC33560 这四株菌株作为目标试验菌株 (本实验室自有或购买)。10 份不含上述四种菌的空白鸡肉样本已经过检验。

1.1.2 主要试剂

MeltDoctor TM HRM Master mix, 美国 Thermo 公司; 细菌 DNA 提取试剂盒, 宝生物工程 (大连) 有限公司; CCDA 培养基和 MH 培养基, 英国 OXOID 公司; 营养琼脂培养基、LB 培养基和脱纤维绵羊血, 青岛海博生物技术有限公司; DEPC 水, 混合气 (5% O_2 、10% CO_2 和 85% N_2), 南京特种气体厂有限公司。

1.1.3 主要仪器

生物安全柜 (A2), 日本 ESCO 公司; 生化培养箱 (HPS-150), 太仓市华美生化仪器厂; 高压灭菌锅 (SANYO MLS-3750), 日本; 三用恒温水槽 (XMTD-204), 金坛市文化仪器有限公司; 离心机 (XT15R), 日本 HITACHI; 超纯水分离系统 (Milli-Q Advantage A10), 美国 Millipore 公司; 超低温冰箱 (DW-86L828), 海尔; 低温冰柜 (BC/BD-318HD), 海尔; 电子天平 (XS105), 瑞士 METTLER TOLEDO 公司; TM-EXB5002S, 南京汤姆斯衡器有限公司; 移液枪, 德国 Eppendorf 公司; 恒温磁力搅拌器 (HJ-3), 江苏金坛市环宇科学仪器厂; 涡旋混匀器 (VTX-3000L), 比利时 LMS 公司; QuantStudio™ 6 Flex 全功能定量 PCR 仪, 美国 ABI 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

广泛查阅资料, 搜索目标菌株内保守、其他菌株间特异的基因片段, 分别选取高度保守区域 *fimY*、*hly*、*nuc* 和 *orfC* 作为沙门氏菌、单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌和空肠弯曲菌的 PCR 扩增靶基因。在 GeneBank 上查询并下载所有靶基因序列, 采用 DNASTar 软件中的 seqman 进行同源性分析, 用生物

软件 Primer Express V2.0 对上述保守片段设计引物。所有引物对的可行性经由 NCBI 上进行 BLAST 比对,

验证引物的保守性。所有引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。引物序列见表 1。

表 1 用于多重 HRM-real time PCR 的引物

Table 1 The primers of multiplex HRM-real time PCR

细菌名称	靶基因	序列号	引物序列(5'-3')	目标产物	
				Size/bp	GC/%
肠炎沙门氏菌	<i>fimY</i>	M90677.1	P1: GCGCTACCTGTCTCCTGTATTGAG P2: TTGGAGGCTGATAACAAGGCTTCG	200	54.17
单增李斯特菌	<i>hly</i>	JN703919	P1: TGCTGCCGTAAGTGGGAAAT P2: AGCAATGGGAACCTCTGGTG	199	55.00
金黄色葡萄球菌	<i>nuc</i>	DQ507382	P1: AGCGATTGATGGTGATACGGT P2: TGCACCTTGCTTCAGGACCAT	133	47.62
空肠弯曲菌	<i>orfC</i>	MH574896	P1: GCGGCGTTGGAGAGTGATA P2: GGGAAAGACACCGCCGTTTAAGAAATG	161	47.56

1.2.2 细菌的培养

取保藏于-80 °C 的甘油保藏菌种, 肠炎沙门氏菌、单增李斯特菌和金黄色葡萄球菌用接种环蘸取少许菌液划线接种至营养琼脂平板上, 37 °C 培养 24 h, 复活菌种后接种环蘸取少许菌液混入 LB 营养肉汤中, 37 °C 160 r/min 恒温振荡器培养 16 h; 空肠弯曲菌用接种环蘸取少许菌液接种于 CCDA 平板微需氧条件下 42 °C 培养 36 h 后富集培养于 MH 血平板。富集培养后的细菌置于 4 °C 冰箱冷藏备用。

多重 HRM-real time PCR 法对食品样本检测后的增菌步骤用 SSL 复合增菌培养基进行增菌。

1.2.3 DNA 模板的提取

肠炎沙门氏菌、单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌采用液体 LB 培养基 37 °C 过夜培养, 然后分别取 1.5 mL 菌液依照 DNA 提取试剂盒说明书提取 DNA, 空肠弯曲菌将 MH 血平板纯化培养的细菌用无菌棉签刮下洗入 PBS 缓冲溶液, 离心后去除上层液体。单增李斯特菌和金黄色葡萄球菌按革兰氏阳性菌提取, 沙门氏菌和空肠弯曲杆菌按革兰氏阴性菌提取, 所提取的 DNA 模板作为反应体系于-20 °C 贮存。

1.2.4 单重 HRM-real time PCR 反应体系的建立

根据 MeltDoctor™ HRM Master mix, 每 20 μL 的 PCR 反应体系包含 10.0 μL MeltDoctor™ HRM Master mix, 1.2 μL 上游引物 (5 μmol/L), 1.2 μL 下游引物 (5 μmol/L), 1.0 μL Template (反应组以基因组 DNA 为模板, 对照组的模板为无菌去离子水), 其余以无菌去离子水补齐。

单重 HRM-real time PCR 反应程序均为: 95 °C 预变性 1 min; 以 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 1 min 扩增 40 个循环。PCR 产物进行高分辨率熔解曲线分析, 熔

解程序为: 95 °C 10 s, 60 °C 1 min, 0.025 °C/s 的速率升至 95 °C 维持 15 s, 60 °C 15 s。程序设置: instrument type: QuantStudio™ 6 Flex System; block: Fast 96-Well (0.1 mL); experiment type: High Resolution Melt; reagents: MeltDoctor™ HRM Reagents; properties: Standard。

1.2.5 多重 HRM-real time PCR 反应体系的建立

在单重 HRM-real time PCR 反应体系建立的基础上, 在同一反应管中, 加入 3 对相应的目标菌的特异性引物对各 0.1 μL, 其他成分和 PCR 反应程序与单重 HRM-real time PCR 反应一致, 如 1.2.4 所示。

1.2.6 多重 HRM-real time PCR 反应特异性

在多重 HRM-real time PCR 反应体系建立的基础上, 以目标菌和非目标菌株的基因组 DNA 为模板进行多重 HRM-real time PCR 反应, 检验所建立体系的特异性。选取大肠杆菌、志贺氏菌、副溶血弧菌、霍乱弧菌、结肠弯曲杆菌为非目标菌株, 以肠炎沙门氏菌、空肠弯曲菌、单增李斯特菌和金黄色葡萄球菌标准菌株为阳性对照, 去离子水为阴性对照, 进行特异性检验。

1.2.7 多重 HRM-real time PCR 反应灵敏度

选取 *S. Enterica* CMCC50041、*L. monocytogenes* ATCC19115、*S. aureus* ATCC12598 和 *C. jejuni* ATCC33560 四种菌株作为 HRM-real time PCR 反应体系敏感性试验的模板 DNA 来源。将四种菌株分别接种于营养肉汤液体培养基中, 37 °C 180 r/min 振荡过夜培养。使用国标法测定菌液浓度, 取菌液浓度为 10⁸ 拷贝数/mL 的菌液, 用生理盐水按十倍梯度递增稀释, 制备浓度分别为 10⁸ 拷贝数/mL~10³ 拷贝数/mL 8 个浓度梯度的菌悬液。每个稀释度分别取 1.5 mL 依照 DNA

提取试剂盒说明书提取 DNA。

1.2.7.1 多重 HRM-real time PCR 反应体系检测单一致病菌菌液的灵敏度

分别将四种目标检测菌 10^8 拷贝数/mL~ 10^3 拷贝数/mL 浓度菌液的基因组 DNA 作为检测模板, 进行多重 HRM-real time PCR 反应, 从而验证该多重体系对单一目标菌的检测灵敏度。每个浓度制备至少 3 个重复样本, 只有所有 3 个重复样本都被检测为阳性的时候该样本才能被判定为阳性。

1.2.7.2 多重 HRM-real time PCR 反应体系检测多种致病菌菌液的灵敏度

将 10^8 拷贝数/mL~ 10^3 拷贝数/mL 的四种目标菌菌悬液中同浓度的混合, 进行细菌 DNA 的提取, 制备肠炎沙门氏菌、单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌和空肠弯曲菌四联 DNA 模板, 进行多重 HRM-real time PCR 反应。每个浓度制备至少 3 个重复样本, 只有所有 3 个重复样本都被检测为阳性的时候该样本才能被判定为阳性。

1.2.8 多重 HRM-real time PCR 反应重复性

对多重 HRM-real time PCR 反应体系的稳定性考察包括试验间稳定性和试验内稳定性。以敏感性试验中的 *S. Enterica* CMCC50041, *L. monocytogenes* ATCC19115、*S. aureus* ATCC12598 和 *C. Jejuni* ATCC33560 基因组 DNA 为检测样本, 选取 10^8 拷贝数/mL~ 10^3 拷贝数/mL 6 个 10^* 浓度梯度, 每个浓度一式三份。同一样本在同一试验中扩增 3 次, 用以评估该体系的批内重复性, 同一样本分开 3 次不同时间进行 3 次试验, 以评估该体系的批间重复性。收集并计算每个稀释度下检测得到目标扩增产物 T_m 值得平均值、标准差 (SD) 和变异系数 (CV 值=standard deviation)。

1.2.9 人工染菌样本的应用

分别取 37 °C 过夜培养的 *S. Enterica* CMCC50041, *L. monocytogenes* ATCC19115、*S. aureus* ATCC12598 和 *C. jejuni* ATCC33560 菌悬液各 1 mL, 用生理盐水按 10^{-1} ~ 10^{-6} 梯度进行 10 倍稀释, 制备浓度梯度菌悬液。然后将每个浓度的四种菌悬液各 1 mL, 同时接种到 25 g 鸡肉样本中, 设置 5 CFU/25 g、10 CFU/25 g 和 20 CFU/25 g 鸡肉样本三种接种浓度。接种后的样本置于 20 °C 存放 1 h 后, 加入 200 mL SSL, 均质 $10\text{ s}^{[21]}$ 。所有样本经 37 °C 过夜培养后, 样本 1000 g 离心 5 min, 并用滤袋 (Tekmar, Cincinnati, ohio) 过滤除去粗糙的食物残渣后, 用试剂盒提取菌体 DNA, 多重 HRM-real time PCR 体系进行检测。

2 结果与分析

2.1 单重 HRM-real time PCR 反应建立

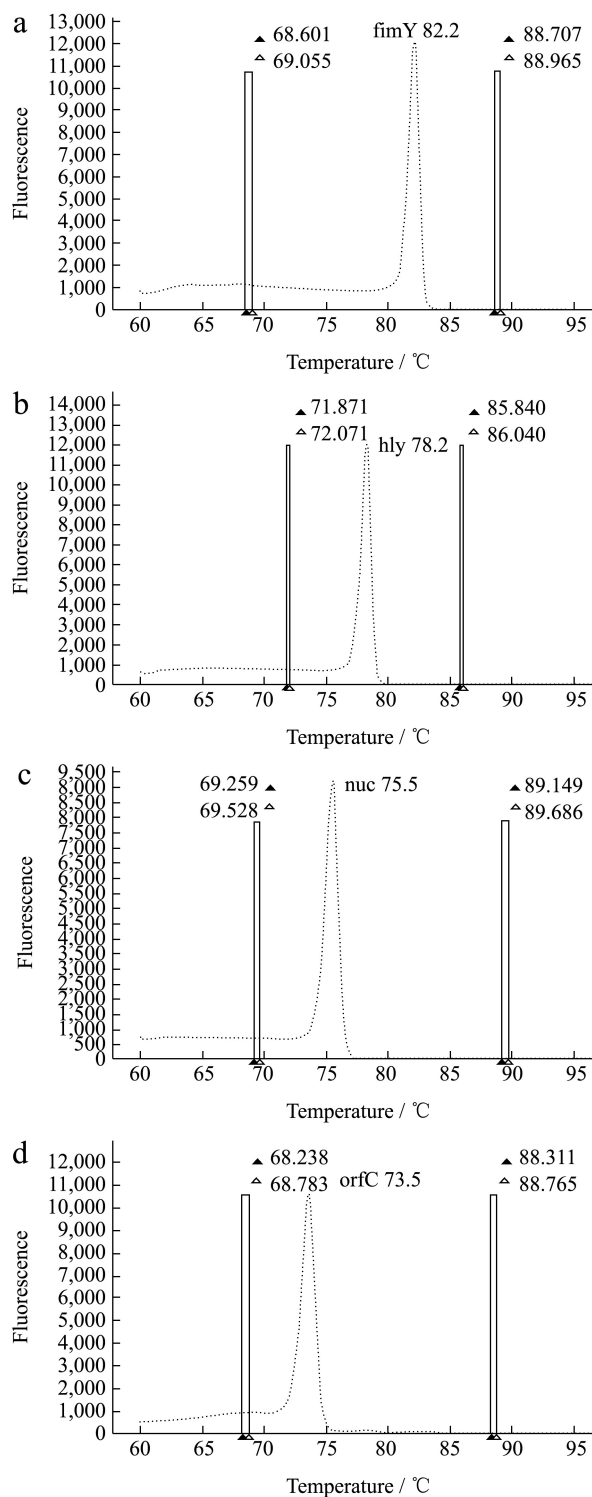


图1 四种菌单重 HRM-real time PCR 溶解曲线图

Fig.1 Four melt curve of HRM-real time PCR

注: a: 沙门氏菌; b: 单增李斯特菌; c: 金黄色葡萄球菌; d: 空肠弯曲杆菌。

表2 多重 HRM-real time PCR 反应检测单一致病菌的灵敏度

Table 2 Sensitivity of multiplex HRM-real time PCR in simple bacterium

菌种	原始浓度		稀释倍数						灵敏度 拷贝数/mL
			10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	
沙门	2.9×10 ⁸	Tm/°C	82.2±0.05	82.2±0.11	82.2±0.24	82.2±0.08	82.2±0.15	82.1±0.21	2.9×10 ²
		Ct 值	17.9±0.11	18.6±0.21	21.9±0.43	25.7±0.32	28.4±0.43	30.8±0.19	
单增	8.3×10 ⁷	Tm/°C	78.2±0.04	78.2±0.08	78.2±0.14	78.3±0.08	78.3±0.11	78.2±0.17	8.3×10 ²
		Ct 值	16.2±0.15	17.0±0.17	19.9±0.32	23.1±0.25	25.8±0.33	28.1±0.25	
金葡	5.6×10 ⁸	Tm/°C	75.4±0.44	75.5±0.07	75.4±0.11	75.5±0.02	75.3±0.21	75.4±0.14	5.6×10 ²
		Ct 值	18.9±0.05	19.6±0.19	23.1±0.22	26.2±0.23	28.9±0.27	29.7±0.44	
空弯	3.2×10 ⁸	Tm/°C	73.6±0.07	73.5±0.23	73.6±0.11	73.5±0.09	73.5±0.12	73.8±0.48	3.2×10 ²
		Ct 值	17.8±0.16	19.4±0.22	22.9±0.19	26.4±0.18	29.0±0.22	29.9±0.58	

表3 多重 HRM-real time PCR 反应检测多种致病菌的灵敏度

Table 3 Sensitivity of multiplex HRM-real time PCR in four bacterium

浓度	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	灵敏度拷贝数/mL
Tm/°C	沙门	82.1±0.10	82.1±0.07	82.2±0.05	82.2±0.04	82.0±0.18	82.2±0.07
	单增	78.2±0.09	78.3±0.07	78.3±0.04	78.3±0.04	78.2±0.14	78.3±0.06
	金葡	75.3±0.34	75.3±0.04	75.3±0.06	75.3±0.02	75.4±0.52	75.2±0.19
	空弯	73.7±0.44	73.9±0.06	73.8±0.25	73.8±0.24	73.6±0.18	73.6±0.56
Ct 值	14.6±0.30	17.6±0.48	21.0±0.96	24.2±0.11	27.5±0.11	30.3±0.38	1.0×10 ²

单重 PCR 反应分别扩增出了 4 种致病菌对应的 4 条特异性高分辨率熔解曲线和熔点峰, 具有典型的扩增曲线, CT 值在 16.2~19.0 之间, RSD 值在 0.28%~0.94% 之间。如图 1 所示, 所对应的沙门氏菌 *fimY* 基因的实际 Tm 值为 82.2±0.019 °C, 单增李斯特菌 *hly* 基因的实际 Tm 值为 78.2±0.022 °C, 金黄色葡萄球菌 *nuc* 基因的实际 Tm 值 75.5±0.036 °C, 空肠弯曲菌 *orfC* 基因的实际 Tm 值为 73.5±0.052 °C。四种食源性致病菌 Tm 值之间均相互错开, 为多重 HRM-real time PCR 反应体系的建立奠定基础。与 Hoseinpour^[22]等建立的检测空肠弯曲杆菌的 Tm 值为 76.72±0.164 °C 相比, 误差更小。

2.2 多重 HRM-real time PCR 反应建立

通过单重 HRM-real time PCR 反应可知, 4 种目标致病菌在退火温度为 60 °C 和熔解速率 0.025 °C/s 时均能够获得良好的扩增结果, 故选 60 °C 和熔解速率 0.025 °C/s 作为多重反应程序的退火温度和熔解速率。但若直接将单重体系中的模板及引物对简单的混合进行多重 HRM-real time PCR 反应, 则扩增效果不是很理想, 熔解曲线峰不明显, 因此需要对多重反应体系组分进行分组实验并初步优化。经对不同模板浓度 (1.0×10⁸ 拷贝数/mL、1.0×10⁹ 拷贝数/mL) 和引物浓度 (10 μmol/L、5 μmol/L) 的选择, 按照低浓度优先原则, 建立了可扩增出 4 个不同 Tm 值高分辨熔解

曲线峰的多重 HRM-real time PCR 反应体系, 熔解曲线如图 2 所示。

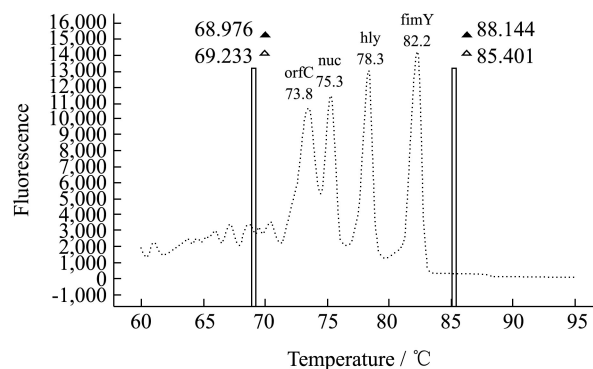


图2 多重 HRM-real time PCR 熔解曲线图

Fig.2 Melt curve of multiplex HRM-real time PCR

2.3 多重 HRM-real time PCR 反应特异性

多重 PCR 反应体系特异性检验结果表明, 所有目标菌均出现阳性扩增, 而其他非目标菌株, 均未出现扩增。表明多重 PCR 反应体系具有良好的特异性。

2.4 多重 HRM-real time PCR 反应灵敏度

多重 HRM-real time PCR 反应灵敏度结果见表 2。表 2 表明, 随着稀释梯度的不断增加, 即菌浓度的不断减少, 其对应 Ct 值增大, 各食源性致病菌 Tm 值保持稳定, 直至稀释至 10² 拷贝数/mL 时达到检出限, 其平均 Ct 值为 16.2~30.8 之间, 标准差在 0.05~0.58

之间。结合平板计数结果显示,沙门氏菌、单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌和空肠弯曲菌的检测灵敏度分别为 10^2 拷贝数/mL,结果表明上述多重HRM-real time PCR体系对上述4种单一食源性致病菌的检测均具有良好的灵敏度。

表3是反应体系同时检测四种食源性致病菌结果,随着稀释梯度的不断增加,即菌浓度的不断减少,其Ct值对应增大,4种食源性致病菌Tm值保持稳定且都能检出,直至稀释至 10^2 拷贝数/mL时达到检出限,其平均Ct值为14.4~30.3之间,标准差为0.17~0.96之间。对比两个结果,发现Ct值无显著差异,表明多种菌混合并不会降低HRM-realtime PCR反应的灵敏度,反应体系稳定性良好。对比类似体系,该多重检测体系达到的灵敏度高于Forghani^[23]等运用该方法所建立的检测蜡样芽孢杆菌、李斯特菌(3.7×10^3 CFU/mL),周千渝^[24]等利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱快速检测并鉴定从鲜食蔬菜中分离到的5种食源性致病菌($10^6 \sim 10^9$ CFU/mL),杨梦婕^[25]等利用GeXP多重聚合酶链式反应法检测沙门菌、大肠埃

希菌O157:H7、单核细胞增生李斯特菌、志贺菌和副溶血性弧菌(10^3 CFU/mL)和杨国兴^[26]等利用多重PCR快速检测肉制品中金黄色葡萄球菌和沙门氏菌(10^3 CFU/mL);与鞠鹤鹏^[27]等利用结合环介导等温扩增和微流控芯片技术检测沙门氏菌、大肠杆菌O157、金黄色葡萄球菌三种食源性致病菌灵敏度接近(100 CFU/mL)。

2.5 多重HRM-real time PCR反应重复性

多重HRM-real time PCR反应重复性结果见表4。 10^8 拷贝数/mL~ 10^3 拷贝数/mL 6个稀释浓度的Tm值表明,多重HRM-real time PCR反应体系具有高度的重复性。Tm值的试验内CV值为:沙门氏菌0.03%~0.12%,单增李斯特菌0.03%~0.12%,金黄色葡萄球菌0.06%~0.32%,空肠弯曲菌0.03%~0.21%;试验间CV值为:沙门氏菌0.55%~1.12%,单增李斯特菌0.53%~2.12%,金黄色葡萄球菌0.45%~2.02%,空肠弯曲菌0.66%~2.01%。组内和组间Tm值的CV值均较低,提示该体系具有较高的重复性。

表4 多重HRM-real time PCR体系的重复性

Table 4 Reproducibility of multiplex HRM-real time PCR

菌液浓度(拷贝数/mL)	试验内 CV/%				试验间 CV/%			
	沙门	单增	金葡	空弯	沙门	单增	金葡	空弯
10^8	0.03	0.03	0.08	0.04	0.62	0.87	0.92	0.66
10^7	0.11	0.12	0.07	0.03	0.77	1.12	0.45	0.98
10^6	0.05	0.11	0.06	0.21	1.12	0.99	1.14	1.21
10^5	0.04	0.09	0.11	0.11	0.89	1.21	0.98	0.94
10^4	0.11	0.04	0.21	0.05	0.55	0.53	2.02	1.98
10^3	0.12	0.07	0.32	0.21	1.01	2.12	1.69	2.01

表5 多重HRM-real time PCR体系对人工感染样本敏感度

Table 5 Tm value of artificially-inoculated samples in multiplex HRM-real time PCR

感染浓度	人工感染样本 Tm/°C			
	沙门氏菌	单增李斯特菌	金黄色葡萄球菌	空肠弯曲菌
5 CFU/25 g	82.1±0.14	78.2±0.13	75.4±0.18	73.4±0.21
10 CFU/25 g	82.2±0.12	78.1±0.15	75.5±0.21	73.5±0.18
20 CFU/25 g	82.2±0.13	78.2±0.15	75.5±0.19	73.5±0.11

2.6 人工染菌样本的检测

阳性对照中沙门氏菌、单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌和空肠弯曲菌Tm值分别为82.20 °C、78.24 °C、75.45 °C和73.45 °C。实验表明,在Tm值上,5 CFU/25 g、10 CFU/25 g和20 CFU/25 g三种感染浓度下,10份鸡肉样本中四种目标菌的目标扩增产物Tm值与直接从目标菌株菌液中提取出来的的Tm值对比,无显著差异。在灵敏度上,感染样本在进行37 °C

24 h的增菌后,对沙门氏菌、单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌和空肠弯曲菌,多重HRM-real time PCR法均能达到5 CFU/25 g的检测限,结果见表5。在人工染菌样品的检出限高于Germini A^[28]等利用多重PCR检测全蛋中大鼠伤寒沙门氏菌、单增李斯特菌和大肠杆菌O157:H7的检出限(10 CFU/25 g)。

3 结论

综上所述,相较于胡双芳^[29]等所建立的食源性致

病菌检测方法, 本研究所构建的实时荧光定量 PCR 结合高分辨溶解曲线方法能在一个体系中同时检测沙门氏菌、单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌和空肠弯曲菌, 具有操作简单、快速、特异性强等优点, 为食品中多种致病菌污染的快速检测提供了新的手段, 有望发展为快速同时检测食品中多种致病菌污染的有效手段。

参考文献

- [1] Furst T, Keiser J, Utzinger J. Global burden of human food-borne trematodiasis: a systematic review and meta-analysis [J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2012, 12(3): 210-221
- [2] 赵建梅, 李月华, 张青青, 等. 2008-2017 年我国部分地区禽源沙门氏菌流行状况及耐药分析[J]. *中国动物检疫*, 2019, 36(8): 27-35
ZHAO Jian-mei, LI Yue-hua, ZHANG Qing-qing, et al. Analysis on the prevalence and antimicrobial resistance of poultry *Salmonella* in some regions of China during 2008 to 2017 [J]. *China Animal Health Inspection*, 2019, 36(8): 27-35
- [3] 高付敏, 陈培超, 陈伟鑫, 等. 上海市嘉定区生禽畜类食品中沙门氏菌污染情况及血清学研究[J]. *上海预防医学*, 2018, 30(9): 755-758
GAO Fu-min, CHEN Pei-chao, CHEN Wei-xin, et al. *Salmonella* contamination and its serologic research with raw poultry and livestock foodstuff in Jiading district of Shanghai [J]. *Shanghai Journal of Preventive Medicine*, 2018, 30(9): 755-758
- [4] 田明胜, 王颖, 陈波, 等. 上海市售肉制品中单核细胞增生李斯特氏菌污染监测和定量分析[J]. *生物加工过程*, 2020, 18(3): 392-396
TIAN Ming-sheng, WANG Ying, CHEN Bo, et al. Contaminant monitoring and quantitative analysis of *Listeria monocytogenes* in retail meat products in Shanghai municipality [J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2020, 18(3): 392-396
- [5] 钟舒红, 李军, 周庆安, 等. 2015 年-2016 年广西部分地区生鲜畜禽肉中食源性致病菌污染状况调查[J]. *动物医学进展*, 2018, 39(4): 132-136
ZHONG Shu-hong, LI Jun, ZHOU Qing-an, et al. Investigation contamination of food-borne pathogens in raw livestock and poultry meats in part of Guangxi from 2015 to 2016 [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2018, 39(4): 132-136
- [6] 沈托, 焦莉萍, 李通情, 等. 2011-2015 年渭南市市售食品中单核细胞增生李斯特菌污染状况监测与分析[J]. *实用预防医学*, 2018, 25(1): 66-69
SHEN Tuo, JIAO Li-ping, LI Tong-qing, et al. Contamination status of *Listeria monocytogenes* in market-sold food in Weinan city, 2011-2015 [J]. *Practical Preventive Medicine*, 2018, 25(1): 66-69
- [7] 李兵兵, 刘靓, 李双姝, 等. 淮南市禽畜肉中金黄色葡萄球菌污染及其病原学特征分析[J]. *中国食品卫生杂志*, 2019, 31(3): 217-221
LI Bing-bing, LIU Liang, LI Shuang-shu, et al. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* in meats of animal origin in Huai'an [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2019, 31(3): 217-221
- [8] 邓义贞, 顾一心, 何利华, 等. 规模化养殖肉鸡泄殖腔拭子弯曲菌分离及 PFGE 分型分析[J]. *中国兽医学报*, 2016, 36(5): 778-783, 789
DENG Yi-zhen, GU Yi-xin, HE Li-hua, et al. Detection and subtyping of *Campylobacter* from broilers reared in intensive farms [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2016, 36(5): 778-783, 789
- [9] 张小燕, 周倩, 唐梦君, 等. 江苏地区鸡源弯曲杆菌分离鉴定及耐药性研究[J]. *中国家禽*, 2017, 39(18): 23-27
ZHANG Xiao-yan, ZHOU Qian, TANG Meng-jun, et al. Isolation, identification and antimicrobial susceptibility profiles of *Campylobacter* isolates from chickens in Jiangsu province [J]. *China Poultry*, 2017, 39(18): 23-27
- [10] Tamburro M, Sammarco M L, Ammendolia M G, et al. Evaluation of transcription levels of *inlA*, *inlB*, *hly*, *bsh* and *prfA* genes in *Listeria monocytogenes* strains using quantitative reverse-transcription PCR and ability of invasion into human CaCo-2 cells [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2015, 362(6): 1-7
- [11] LIAO Yi-qun, WANG Xiao-bo, SHA Chao, et al. Combination of fluorescence color and melting temperature as a two-dimensional label for homogeneous multiplex PCR detection [J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(7): e76
- [12] 岳苑, 周梦诗, 徐娟, 等. 基于高分辨率溶解曲线分析鉴别食品中的 3 种李斯特氏菌[J]. *现代食品科技*, 2020, 36(6): 285-290, 171
YUE Yuan, ZHOU Meng-shi, XU Juan, et al. Identification of three *Listeria* species in foods based on high resolution melting curve analysis [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2020, 36(6): 285-290
- [13] 闫李侠, 黄至澄, 徐黔宁, 等. 实时荧光多重聚合酶链反应-高分辨率溶解曲线分析鉴别 6 种致腹泻性大肠埃希菌的研究[J]. *浙江医学*, 2018, 40(6): 577-581, 599

- YAN Li-xia, HUANG Zhi-cheng, XU Qian-ning, et al. Identification of diarrheagenic *Escherichia coli* strains by real-time fluorescence-based multiplex PCR and high resolution melting-curve analysis (PCR-HRM) [J]. Zhejiang Medical Journal, 2018, 40(6): 577-581, 599
- [14] 陈焱森,沈永巧,祁梦凡,等.应用高分辨溶解曲线(HRM)技术分析猪微卫星多态性[J].畜牧与兽医,2018,50(1):9-14
CHEN Yan-sen, SHEN Yong-qiao, QI Meng-fan, et al. Application of high-resolution melting curve analysis on polymorphism of SSR markers in pigs [J]. Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2018, 50(1): 9-14
- [15] 王姣,尤崇革.高分辨率溶解曲线技术及应用新进展[J].兰州大学学报(医学版),2016,42(5):55-61
WANG Jiao, YOU Chong-ge. Application advances of high resolution melting technology [J]. Journal of Lanzhou University (Medical Sciences), 2016, 42(5): 55-61
- [16] Mautischat S, Szabo I, Baumann B, et al. Rapid real-time PCR methods to distinguish *Salmonella enteritidis* wildtype field isolates from vaccines strains salmovac SE/Gallivsc SE and AviPro *Salmonella* VAC E [J]. Journal of Microbiological Methods, 2015, 112: 92-98
- [17] HE Pei-yan, CHEN Zhong-wen, LUO Jian-yong, et al. Multiplex real-time PCR assay for detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* strains [J]. Molecular and Cellular Probes, 2014, 28(5-6): 246-250
- [18] Singh J, Batish V K, Grovrt S. Simultaneous of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in dairy products using real time PCR-melt curve analysis [J]. Journal of Food Science and Technology, 2012, 49(2): 234-239
- [19] Rahimi H M, Pourhosseingholi M A, Yadegar A, et al. High-resolution melt curve analysis: a real-time based multipurpose approach for diagnosis and epidemiological investigations of parasitic infections [J]. Comparative Immunology, Microbiology and Infection Diseases, 2019, 67: 101364
- [20] Ohshima C, Takahashi H, Iwakawa A, et al. A novel typing method for *Listeria monocytogenes* using high-resolution melting analysis (HRMA) of tandem repeat regions [J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 253: 36-42
- [21] 章丽.高分辨率溶解曲线法检测食品中致病菌的方法研究[D].广州:华南理工大学,2014
ZHANG Li, Simultaneous detection of foodborne pathogens by high resolution melting analysis [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2014
- [22] Hoseinpour F, Foroughi A, Nomanpour B, et al. Identification and differentiation of *Campylobacter* species by high-resolution melting curve analysis [J]. Microbial Pathogenesis, 2017, 108: 109-113
- [23] Forghani F, Wei S, Oh D H. A rapid multiplex real-time PCR high-resolution melt curve assay for the simultaneous detection of *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* in food [J]. Journal of Food Protection, 2016, 79(5): 810-815
- [24] 周千渝,张延国,黄成才,等.食源性致病菌MALDI-TOF MS检测方法的建立与应用[J].食品工业科技,2015,36(18):59-64
ZHOU Qian-yu, ZHANG Yan-guo, HUANG Cheng-cai, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification and detection of foodborne pathogens [J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(18): 59-64
- [25] 杨梦婕,任佳,李洋,等. GeXP 多重聚合酶链式反应法检测 5 种常见食源性致病菌[J].中国食品卫生杂志,2020,32(4): 386-390
YANG Meng-jie, REN Jia, LI Yang, et al. Detection of 5 kinds of common foodborne pathogens by GeXP multiplex polymerase chain reaction [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2020, 32(4): 386-390
- [26] 杨国兴,杨立新,李伟昊.多重 PCR 检测 4 种常见食源性致病菌[J].食品安全质量检测学报,2019,10(18):6289-6295
YANG Guo-xing, YANG Li-xin, LI Wei-hao. Detection of four common foodborne pathogens by multiplex PCR [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 10(18): 6289-6295
- [27] 鞠鹤鹏,戴菁,谢逸欣,等.LAMP 微流控芯片快速检测三种食源性致病菌[J].解放军预防医学杂志,2018,36(3):309-313
JU He-peng, DAI Jing, XIE Yi-xin, et al. Quick detection of three food-borne pathogens by LAMP micro fluidic chip [J]. Journal of Preventive Medicine of Chinese People's Liberation Army, 2018, 36(3): 309-313
- [28] Germini A, Masola A, Carnevali P, et al. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O175: H7, *Salmonella* spp., and *Listeria monocytogenes* by multiplex PCR [J]. Food Control, 2009, 20(8): 733-738
- [29] 胡双芳,余以刚,李蓉,等.高分辨率溶解曲线检测 9 种食源性致病菌方法的建立[J].现代食品科技,2016,32(3):271-280
HU Shuang-fang, YU Yi-gang, LI Rong, et al. Simultaneous detection of nine foodborne pathogenic bacteria using high-resolution melting analysis [J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(3): 271-280