

基于 *ttr* 基因的 mini-MPN-qLAMP 法快速定量检测食品中沙门氏菌

章小洪¹, 郑连宝^{2,3*}, 陈卫平¹, 王伟影¹, 贺云鹏¹, 方芳⁴, 胡彤²

(1. 丽水市质量检验检测研究院, 浙江丽水 323000) (2. 浙江工业大学生物工程学院, 浙江杭州 310032)

(3. 德清县食品药品检验检测中心, 浙江湖州 313200) (4. 衢州市食品药品检验研究院, 浙江衢州 324000)

摘要: 该研究通过 3 管型微量 MPN 计数法 (Mini Most Probable Number, mini-MPN) 建立了一种快速定量检测食源性沙门氏菌的荧光定量环介导等温扩增 (Quantitative Loop-Mediated Isothermal Amplification, qLAMP) 方法。依据沙门氏菌属 *ttr* 基因设计了 qLAMP 和荧光定量 PCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR) 引物, 结合 5 h BPW 增菌和 MPN 计数法建立了 mini-MPN-qLAMP 沙门氏菌快速定量检测方法; 使用两种人工污染样品对 mini-MPN-qLAMP 法进行验证, 使用 Bland-Altman 分析比较不同检测方法检测结果的一致性。结果表明, 建立的 qLAMP 法与 qPCR 法反应特异性均良好, 纯培养时 qLAMP 法检出限为 500 CFU/mL。通过 Bland-Altman 分析表明所建立的 mini-MPN-qLAMP 法在速冻乌米饭中检测结果与 mini-MPN-qPCR、mini-MPN 计数法、平板计数法相比均具有较高的一致性, $r^2 \geq 0.994$, 检出限为 -0.44 lg MPN/mL; 而在速冻鸡胸肉中该法检测结果与 mini-MPN-qPCR 结果一致性最佳, $r^2 = 0.990$, 检出限为 -0.64 lg MPN/mL。肉制品中腐败杂菌会影响 mini-MPN 计数和平板计数结果, mini-MPN-qLAMP 可排除肉制品中腐败杂菌对检测结果的影响。该研究所建立的 mini-MPN-qLAMP 法简单易行, 准确度高, 可用于食品中沙门氏菌的快速定量检测。

关键词: 沙门氏菌; *ttr* 基因; mini-MPN; 荧光定量环介导等温扩增 (qLAMP); 荧光定量聚合酶链式反应 (qPCR)

文章编号: 1673-9078(2023)01-343-351

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.1.0163

Rapid and Quantitative Detection of *Salmonella* in Food by mini-MPN-qLAMP Based on *ttr* Gene

ZHANG Xiaohong¹, ZHENG Lianbao^{2,3*}, CHEN Weipin¹, WANG Weiyong¹, HE Yunpeng¹, FANG Fang⁴, HU Tong²

(1. Lishui Institute for Quality Inspection and Testing, Lishui 323000, China) (2. College of Biotechnology and Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China) (3. Deqing Food and Drug Inspection and Testing Center, Huzhou, 313200, China) (4. Quzhou institute for Food and Drug Control, Quzhou 324000, China)

Abstract: In this study, the 3-tube mini most probable number (mini-MPN) counting method was used to establish a fluorescence quantitative loop-mediated isothermal amplification (qLAMP) method for rapid and quantitative detection of food-borne *Salmonella*. According to the *ttr* gene sequence of *Salmonella*, the primers for qLAMP and quantitative polymerase chain reaction (qPCR) were designed, and in combination with the 5h BPW amplification and MPN counting, a rapid and quantitative detection method by mini-MPN-qLAMP for *Salmonella* was established, and the consistency between the analysis results obtained by different assays was compared using the Bland-Altman analysis. The mini-MPN-qLAMP method was validated using two artificially contaminated samples, The results showed that the established qLAMP method and the qPCR method had good specificity. The pure culture experiments revealed the detection limit of qLAMP of

引文格式:

章小洪, 郑连宝, 陈卫平, 等. 基于 *ttr* 基因的 mini-MPN-qLAMP 法快速定量检测食品中沙门氏菌[J]. 现代食品科技, 2023, 39(1): 343-351

ZHANG Xiaohong, ZHENG Lianbao, CHEN Weipin, et al. Rapid and quantitative detection of salmonella in food by mini-MPN-qLAMP based on *ttr* gene [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(1): 343-351

收稿日期: 2022-02-18

基金项目: 浙江省市场监督管理局科研计划项目 (20210177); 浙江省市场监督管理局科研计划项目 (ZC2021B107)

作者简介: 章小洪(1985-), 男, 硕士, 工程师, 研究方向: 食品微生物和分子生物学检测。E-mail: hong232321@126.com

通讯作者: 郑连宝(1986-), 男, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 食品微生物学检测。E-mail: 214680949@qq.com

500 CFU/mL. The Bland-Altman analysis revealed that in the quick-frozen black rice, the established mini-MPN-qLAMP method had a relatively high consistency with the mini-MPN-qPCR, the mini-MPN counting and plate counting method, with the R^2 not lower than 0.994, and the detection limit being -0.44 lg MPN/mL. In quick-frozen chicken breast, the mini-MPN-qLAMP method had the highest consistency with the mini-MPN-qPCR, with the R^2 being 0.990 and detection limit being -0.64 lg MPN/mL. The spoilage bacteria in the meat products could affect the mini-MPN counting and plate counting results, whilst the mini-MPN-qLAMP method could eliminate the interference of spoilage bacteria in meat products. Accordingly, the mini-MPN-qLAMP method established in this study is simple, easy to be used and accurate, thus can be used for rapid and quantitative detection of *Salmonella* in food.

Key words: *Salmonella*; *ttr* gene; mini-MPN; quantitative loop-mediated isothermal amplification (qLAMP); quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

沙门氏菌是一种重要的食源性致病菌, 该菌主要污染的食品有肉、蛋、乳等禽肉类制品和速冻食品。一旦发生沙门氏菌污染的情况, 食品生产环境中残留的沙门氏菌不易控制, 存在交叉污染的安全隐患^[1,2]。消费者食用了被沙门氏菌污染的食品容易引起腹泻甚至败血症等食物中毒的现象。全球细菌性食物中毒事件中, 沙门氏菌引起的食物中毒长期占据榜首^[3]。GB 4789.4^[4]中, 沙门氏菌的检验程序繁琐, 需要 4~6 d 才能确认结果, 当前急需一种高效、低成本的快速沙门氏菌检测方法。因此, 开发新的沙门氏菌检测方法一直是一个热点研究方向^[5]。近年来核酸检测技术的迅速发展带动了食品检测技术的进步, 其中荧光定量 PCR (Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR) 技术被应用于食品中沙门氏菌的检验^[6]。荧光定量环介导等温扩增技术 (Quantitative Loop-Mediated Isothermal Amplification, qLAMP)、重组聚合酶扩增等技术在沙门氏菌检测中也取得了重要进展^[7,8]。这些等温扩增技术一方面减少了昂贵的 PCR 仪器使用, 另外也将沙门氏菌的检测效率大大提高了。

在食品微生物的定量检测中, MPN (Most Probable Number, MPN) 计数法是一种基于概率计算的计数方法, 相比平板计数法具有更高的灵活性, 且检出限可根据加样量进行调整, 因此广泛用于食品中大肠菌群、金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌等微生物的定量检测。国家标准 GB 4789.4 中只对沙门氏菌规定了定性检测方法^[5], 但沙门氏菌的研究通常需要定量方法的辅助。美国分析化学家协会 (AOAC)、美国环保局 (EPA) 等机构制定的国际标准中均运用了该方法^[9,10], 可见 MPN 计数法对于沙门氏菌的定量研究具有重要意义。

invA 基因编码位于沙门氏菌致病岛上的入侵蛋白, 是侵袭宿主细胞所需的毒力因子。现有商业化检测试剂盒均以 *invA* 基因作为靶标基因^[11], 但近年来发现有 12.3% 的 *S. enterica* serovar Kentucky 分离菌株无法检测出 *invA* 基因^[12], 且 *S. enterica* serovar Litchfield 和 Senftenberg 等菌株在自然界中也存在丢失 *invA* 基因的

可能^[13]。*ttrRSBCA* 转座子是沙门氏菌无氧代谢过程中重要的基因, Malorny B 等开发了基于 *ttrRSBCA* 转座子检测食品中沙门氏菌属的 qPCR 方法^[14]。近年来, Kreitlow 等^[15]发现 *ttr* 基因在沙门氏菌中的特异性最高, 其包容性和排他性均为 100%, 而 *invA* 基因在沙门氏菌的特异性次之, 排他性 100%, 包容性为 97.6%, 证明了 *ttr* 基因在沙门氏菌的检测中优于 *invA* 基因。

本研究针对 *ttrRSBCA* 基因座建立一种快速检测食品中沙门氏菌的 qLAMP 技术, 并结合 mini-MPN 和短时间增菌技术, 即沙门氏菌的 mini-MPN-qLAMP 法, 并与已建立的 mini-MPN-qPCR 法^[16]比较, 以确定所建立的 mini-MPN-qLAMP 方法的可靠性, 为食品中沙门氏菌快速定量检测提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器设备

U445 超低温保存箱, 西班牙泰事达科技公司; QuantStudio5 荧光定量 PCR 仪、LEGEND MICRO21 离心机, 美国赛默飞世尔科技公司; IN260 生化培养箱, 德国美墨尔特有限公司; HF-Safe-1200JE 生物安全柜, 上海力申科学仪器有限公司。

1.1.2 主要材料和试剂

鸡胸肉购置于本地超市, 庆元乌米饭购自本地市场; 缓冲蛋白胨水 (BPW)、XLT-4 琼脂, 购于青岛海博生物技术有限公司; ThermoPol 缓冲液、*Bst* 2.0 DNA 聚合酶 (8 U/ μ L)、 $MgSO_4$ (100 mmol/L)、LAMP 荧光染料, 购于 NEB 北京公司; TBGreen Premix Ex Taq、ROX 参比荧光染料、dNTP Mixture (10 mmol/L), 购于宝生物工程有限公司。

1.1.3 菌种和引物

引物: 依据沙门氏菌属稳定表达的 *ttr RSBCA* 转座子基因序列 (AF282268.1), LAMP 引物使用 NEB LAMP Primer Design Tool (<https://lamp.neb.com/>) 软件

设计, 经实验筛选得到引物; qPCR 引物使用 PrimerQuest (<https://sg.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index>) 软件设计, 引物序列详见表 1。所有引物均使

用 BLAST 进行比对, 由上海生工生物工程有限公司合成。菌种: 实验主要测试菌株为鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028, 具体特异性验证菌株详见表 2。

表 1 实验用引物

Table 1 The primers used in this experiment

引物种类	引物名称	引物序列 (5'→3')
qLAMP	<i>ttr-F3</i>	CGGCAATAGCGTCACCTT
	<i>ttr-B3</i>	CGGCCCGATTCTCTCTGG
	<i>ttr-FIP</i>	GAACGGCGAAGCGTACTGGACATCGCACCGTCAAAGGAA
	<i>ttr-BIP</i>	GCGCGCATCCGCATCAATATGCCCGGTAAACAGATGAGT
	<i>ttr-LF</i>	AGGGAAAGCCAGCTTTACG
	<i>ttr-LB</i>	CCGGCCTTCAAATCGGCATC
qPCR	<i>ttr-F</i>	TGAAAGAGGCGGCAGAAA
	<i>ttr-R</i>	TTACGTCCGTGACTGGTAAAG

1.2 实验方法

1.2.1 菌液制备与核酸提取

菌液制备: 将待测菌株接种于 BPW 中 36 °C 培养 16 h 得到新鲜菌液。

核酸提取: 采用煮沸法提取核酸。吸取 1 mL 样液于 12 000 r/min 离心 5 min, 小心移去上清液 900 μ L, 加入 1 mL 无菌水后混匀再 12 000 r/min 离心 5 min, 小心移去上清液 900 μ L, 置于 100 °C 电热板中煮沸 15 min, 迅速冷却后 12 000 r/min 离心 1 min, 移取上清液直接用于 qPCR 和 qLAMP 实验。

1.2.2 qLAMP 和 qPCR 的反应条件

LAMP 反应体系: 10 X ThermoPol Buffer 2 μ L, MgSO₄ 1.2 μ L, dNTP Mixture 2.8 μ L, 50 X LAMP 荧光染料 0.2 μ L, ROX 参比荧光染料 0.2 μ L, 10 X Primers Mix 2 μ L, *Bst* 2.0 WarmStart DNA 聚合酶 0.8 μ L, DNA 粗提液 5 μ L, 加无菌水至 20 μ L。反应条件: 65 °C 保温反应 40 min, 以 1 min 作 1 个循环检测荧光值, 结束后测定溶解曲线(65~95 °C, 0.2 °C/s)。

qPCR 反应体系参照文献^[16]。

1.2.3 qLAMP 和 qPCR 的特异性实验和纯培养检出限测定

特异性检测: 参照 1.2.1 提取表 2 中各菌株核酸, 使用建立的 qLAMP 法和 qPCR 法对方法的特异性进行检测。

检出限检测: 参照 1.2.1 制备鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028 菌液, 使用 PBS 进行 10 倍系列稀释, 得到 5×10^7 、 5×10^6 、 5×10^5 、 5×10^4 、 5×10^3 、 5×10^2 、 5×10^1 、 5×10^0 CFU/mL 稀释液, 每个浓度取 1 mL 分别进行核酸提取和 qLAMP、qPCR 实验, 确定方法检出限, 并进行溶解曲线分析。同时取适宜浓度 100 μ L 样液进行

XLT-4 平板涂布计数。

1.2.4 平板计数法定量检测沙门氏菌

使用 PBS 进行 10 倍系列稀释, 取 3 个适宜稀释梯度, 分别吸取 100 μ L 稀释菌液, 涂布于 XLT-4 平板, 36 °C 培养 24 h。然后对典型菌落进行计数, 并依据 GB 4789.4-2016 进行后续鉴定工作。

1.2.5 mini-MPN-qLAMP、mini-MPN-qPCR 和 mini-MPN 法定量检测沙门氏菌

使用 BPW 对样液进行 10 倍系列稀释, 每个梯度浓度取 1.2 mL 至 48 孔板, 每个浓度加 3 孔, 置于 36 °C 增菌 5 h 后分别从 48 孔板中取 1 mL 增菌液, 提取核酸, 进行 qPCR 和 qLAMP 鉴定实验, 剩余增菌液继续置于 36 °C 增菌至 18 h, 然后在 XLT-4 平板划线, 依据 GB 4789.4 进行鉴定。依据不同浓度阳性孔数进行 MPN 查表计数^[17]。

1.2.6 人工污染鸡胸肉混合液和冷冻乌米饭定量检测

从当地市场购置鸡胸肉和乌米饭, 置于无菌均质袋中, 送入实验室, 适度均质后置于冰箱中冷冻保存。参照 GB 4789.4-2016 进行检验, 确认无沙门氏菌污染后, 再制备成样品混合液 (即人工添加 $10^2 \sim 10^8$ CFU/mL 不同浓度的沙门氏菌稀释液) 待平板计数法、mini-MPN 法、mini-MPN-qPCR 法和 mini-MPN-qLAMP 法定量检测。

1.2.7 数据统计与处理

以上实验均设 3 个平行, 使用 SigmaPlot 14.0 进行数据统计和 Bland-Altman 相关性分析。

2 结果与分析

2.1 qLAMP 和 qPCR 检测方法确立

实验测定的标准曲线和溶解曲线如图 1, qPCR 实验获得的相对标准曲线方程为 $y = -3.02x + 36.61$, $r^2 = 0.997$, PCR 扩增效率为 100%, 检出限为 50 CFU/mL, 溶解曲线分析表明溶解温度为 86.1 °C; qLAMP 实验获得的相对标准曲线方程为 $y = -2.39x + 12.51$, $r^2 = 0.949$, PCR 扩增效率为 151%, 检出限为 500 CFU/mL, 溶解曲线分析表明溶解温度为 87.4 °C。与本项目组之前基于 *invA* 基因建立的 qPCR 法和 qLAMP 法相比, 本研究建立的两种方法检出限具有一致性^[16,18]。并且 qPCR 法建立的标准曲线相对 qLAMP 法标准曲线稳定性更好。当使用 qLAMP

法对低浓度的沙门氏菌进行检测时, 曲线线性易受到影响, 本实验多次测试结果表明, 低浓度下 LAMP 的扩增不稳定, Ct 值容易出现较大波动, 这与 Youn^[19] 等研究得到的结果一致。同时, 本研究中 qLAMP 法检出限与 Fang 等^[20]建立的 qLAMP 法检出限相似。

为了验证所建立的 qLAMP 和 qPCR 方法的特异性, 本研究使用 15 株沙门氏菌菌株和 21 株非沙门氏菌菌株进行 qLAMP 和 qPCR 实验。如表 2, qLAMP 和 qPCR 均特异性良好, 15 株沙门氏菌菌株均能扩增出 *ttr* 基因片段, 而 21 株非沙门氏菌菌株均未检出 *ttr* 基因, 故实验结果符合沙门氏菌特异性鉴定的要求。

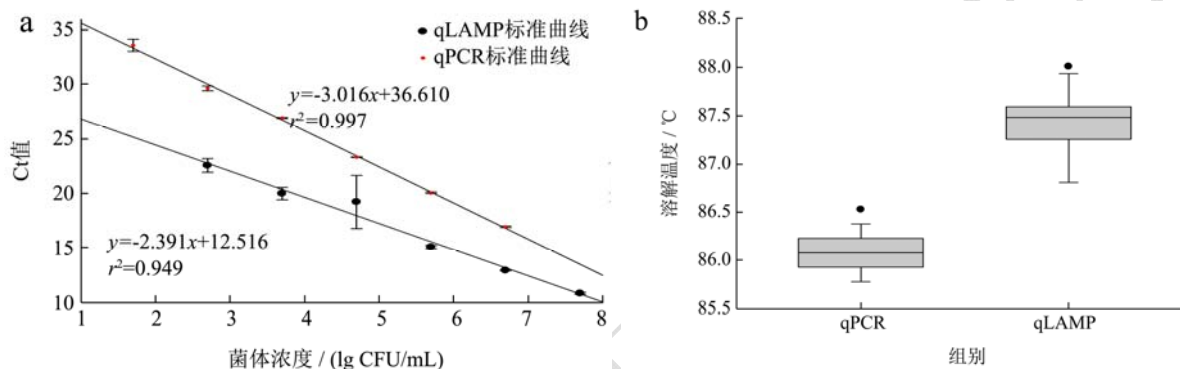


图 1 qLAMP 和 qPCR 检出限测定和溶解温度分析

Fig.1 The detection limit and melting temperature analysis of qLAMP and qPCR

注: 图 a 为 qLAMP 和 qPCR 实验的标准曲线, 图 b 为 qLAMP 和 qPCR 溶解温度箱线图。

表 2 qLAMP 和 qPCR 的特异性实验

Table 2 Specificity of qPCR and qLAMP

菌株编号	特异性	菌株编号	特异性
鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028	+	大肠埃希氏菌 O157:H7 NCTC12900	-
甲型副伤寒沙门氏菌 CMCC(B)50093	+	大肠埃希氏菌 EPEC CICC24189	-
乙型副伤寒沙门氏菌 CMCC(B)50094	+	大肠埃希氏菌 EAEC CICC24188	-
火鸡沙门氏菌 CICC21511	+	大肠埃希氏菌 ETEC CICC24187	-
婴儿沙门氏菌 CICC21649	+	大肠埃希氏菌 EHEC CICC24186	-
病牛沙门氏菌 CICC21499	+	单核增生李斯特氏菌 ATCC19115	-
肯塔基沙门氏菌 CICC21488	+	马红球菌 ATCC6939	-
肠炎沙门氏菌 CICC10982	+	英诺克李斯特菌 ATCC33090	-
沙门氏菌属亚利桑那亚种*	+	蜡样芽孢杆菌 ATCC11778	-
德尔卑沙门氏菌*	+	莱斯曼氏乳杆菌 ATCC14485	-
沙门氏菌属 2009*	+	植物乳杆菌 ATCC8014	-
沙门氏菌属 2010*	+	鼠李糖乳杆菌 ATCC15967	-
沙门氏菌属 2018*	+	金黄色葡萄球菌 CICC21600	-
沙门氏菌属 2078*	+	乙型溶血性链球菌 ATCC21059	-
都柏林沙门氏菌*	+	产气肠杆菌 ATCC35028	-
副溶血性弧菌 ATCC10782	-	粪链球菌 ATCC29212	-
福氏志贺氏菌 ATCC 12022	-	铜绿假单胞菌 ATCC27853	-
阪崎肠杆菌 ATCC 29544	-	产气荚膜梭菌 ATCC13124	-

注: +表示阳性, -表示阴性; *为实验室自行分离验证的沙门氏菌菌株。

2.2 人工污染速冻乌米饭混合液的定量检测

实验使用初始浓度为 5×10^8 CFU/mL 的沙门氏菌菌液进行 10 倍稀释后, 每个浓度分别取 1 mL 至 25 g 乌米饭样品中均质, 加入 225 mL BPW 稀释后, 得到终浓度为 6.30、5.30、4.30、3.30、2.30、1.30、0.30、-0.70 lg CFU/mL 稀释液, 分别使用 mini-MPN-qLAMP、mini-MPN-qPCR、mini-MPN 计数法和平板计数法对速冻乌米饭中沙门氏菌进行定量检测, 结果如表 3 所示。平板计数法最低检出浓度为 1.46 lg CFU/mL, 而基于 MPN 的方法最低可检出 -0.44 lg MPN/mL 的沙门氏菌, 相较平板计数法检出限显著降低。从表中得出, 基于 MPN 的 mini-MPN-qLAMP、mini-MPN-qPCR、mini-MPN 法计数结果相近。其中 mini-MPN-qLAMP 和 mini-MPN-qPCR 法的结果平均差异为 0.02 lg MPN/mL,

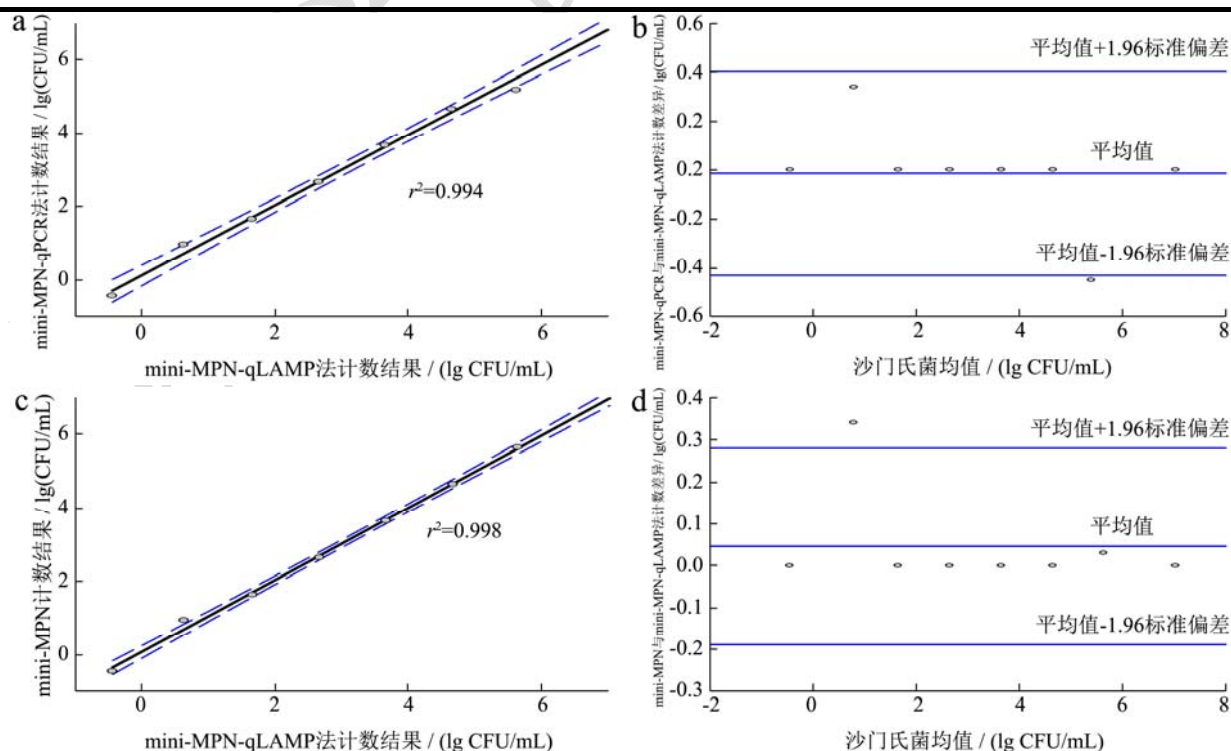
最大差异为 0.28 lg MPN/mL。所有计数结果均在 mini-MPN-qLAMP 的 95% 置信区间内。实验结果显示 mini-MPN-qLAMP 法的检出限为 -0.44 lg MPN/mL。

为验证 mini-MPN-qLAMP 的有效性, 实验将 mini-MPN-qLAMP 法和其它定量检测方法的结果进行 Bland-Altman 相关性比较分析, 结果见图 2。mini-MPN-qPCR、mini-MPN 和平板计数法的定量结果与 mini-MPN-qLAMP 结果一致性程度较高。平板计数法与 mini-MPN-qLAMP 的相关系数 $r^2=0.997$, 而 mini-MPN 与 mini-MPN-qLAMP 的相关系数 $r^2=0.998$, 具有更好的线性关系。从图中可以看出, mini-MPN 和 mini-MPN-qLAMP 法的 95% 置信区间上差异为 -0.19 和 0.28 lg MPN/mL 之间, 这两种方法在 95% 置信区间差异不超过 0.15 lg MPN/mL, 因此, 与已被广泛认可的 MPN 计数法相比, mini-MPN-qLAMP 法为沙门氏菌定量检测提供了一种可靠的替代方法。

表 3 速冻乌米饭的沙门氏菌定量检测结果

Table 3 The quantitative detection of *Salmonella* in frozen black rice

测试	mini-MPN-qLAMP 法/(lg MPN/mL)			mini-MPN-qPCR 法/(lg MPN/mL)			mini-MPN 法/ (lg MPN/mL)	平板计数法/ (lg CFU/mL)	理论值/ (lg CFU/mL)
	MPN	95%置信下限	95%置信上限	MPN	95%置信下限	95%置信上限			
1	-0.44	-0.85	0.58	-0.44	-0.85	0.58	-0.44	<1	-0.70
2	0.63	0.26	1.62	0.97	0.26	1.62	0.97	<1	0.30
3	1.66	0.95	2.30	1.66	0.95	2.30	1.66	1.46	1.30
4	2.66	1.95	3.30	2.66	1.95	3.30	2.66	2.53	2.30
5	3.66	2.95	4.30	3.66	2.95	4.30	3.66	3.41	3.30
6	4.66	3.95	5.30	4.66	3.95	5.30	4.66	4.36	4.30
7	5.63	4.95	6.26	5.18	4.57	6.62	5.66	5.51	5.30
8	7.04	6.26	7.61	7.04	6.26	7.61	7.04	6.58	6.30



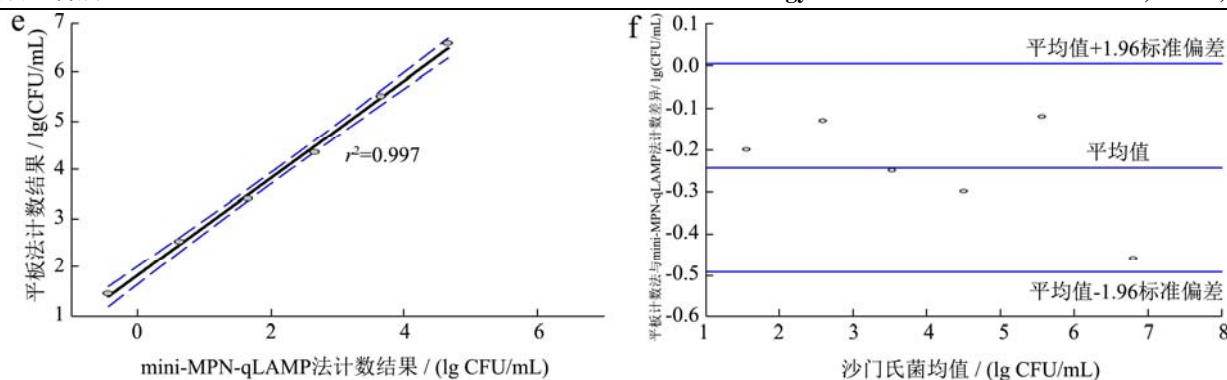


图2 在速冻乌米饭应用中 mini-MPN-qLAMP 法与其他方法的 Bland-Altman 比较分析

Fig.2 Bland-Altman analysis of mini-MPN-qLAMP and other quantitative methods in frozen black rice

注: 图 a、b 为 mini-MPN-qLAMP 和 mini-MPN-qPCR 结果 Bland-Altman 分析, 图 c、d 为 mini-MPN-qLAMP 和 mini-MPN 结果 Bland-Altman 分析, 图 e、f 为 mini-MPN-qLAMP 和平板计数法结果 Bland-Altman 分析。

2.3 人工污染速冻鸡胸肉混合液的定量检测

实验使用浓度 4×10^8 CFU/mL 菌液进行 10 倍稀释后, 稀释液分别取 1 mL 至 25 g 鸡胸肉样品中均质, 加入 225 mL BPW 稀释后得到终浓度为 6.20、5.20、4.20、3.20、2.20、1.20、0.20、-0.80 lg CFU/mL 稀释液, 分别使用 mini-MPN-qLAMP、mini-MPN-qPCR、mini-MPN 法和平板计数法对速冻鸡胸肉中沙门氏菌进行定量检测, 结果见表 4 所示。基于 MPN 的方法在检出限方面相比平板计数法同样更具优势。mini-MPN-qLAMP 和 mini-MPN-qPCR 法的结果平均差异为 0.51 lg MPN/mL, 最大差异为 1.03 lg MPN/mL。相较于速冻乌米饭, 在速冻鸡胸肉中 mini-MPN-qPCR、mini-MPN-LAMP、mini-MPN 和平板计数法四种方法的结果一致性程度较低, 原因可能是生肉制品中存在大量的腐败假单胞菌^[21]对结果造成的干扰。另外, 通过平板计数法发现鸡胸肉中存在大量大肠菌群等干扰菌, 这些细菌容易对常规的 mini-MPN 法和平板计数

的结果造成干扰。在增菌过程中, 大肠菌群等细菌大量繁殖, 而 mini-MPN 法的增菌时间偏长, 大肠菌群属于优势菌种, 导致 mini-MPN 法的结果存在较大偏差。这些结果与本课题组对山泉水中沙门氏菌的检测结果相似^[18]。实验结果显示 mini-MPN-qLAMP 法的检出限为 -0.64 lg MPN/mL。

实验将 mini-MPN-qLAMP 法和其它定量检测方法的结果进行 Bland-Altman 相关性分析, 结果见图 3。平板计数法与 mini-MPN-qLAMP 的相关系数 $r^2=0.963$, mini-MPN 与 mini-MPN-qLAMP 的相关系数 $r^2=0.970$ 。mini-MPN-qPCR 与 mini-MPN-qLAMP 相关性最好, $r^2=0.990$ 。如图所示, mini-MPN-qLAMP 法和其他检测方法的 95% 置信区间上差异普遍偏大, mini-MPN-qPCR 与 mini-MPN-qLAMP 的结果在 95% 置信区间上差异为 -0.40 和 1.18 lg MPN/mL 之间。相比而言, 在高污染杂菌的条件下, mini-MPN-qLAMP 法为沙门氏菌定量检测提供了一种可靠的检测方法, 具有较好的定量检测能力。

表 4 鸡胸肉混合液的沙门氏菌定量检测结果

Table 4 The quantitative detection of *Salmonella* in chicken breast rinsate

测试	mini-MPN-qLAMP 法/(lg MPN/mL)			mini-MPN-qPCR 法/(lg MPN/mL)			mini-MPN 法/ (lg MPN/mL)	平板计数法/ (lg CFU/mL)	理论值/ (lg CFU/mL)
	MPN	95%置信下限	95%置信上限	MPN	95%置信下限	95%置信上限			
1	-0.64	-1.34	-0.03	-0.64	-0.80	-0.03	-0.64	<1	-0.80
2	-0.37	-1.05	0.26	-0.37	0.20	0.26	-0.03	<1	0.20
3	1.38	0.51	2.00	1.66	1.20	2.30	0.97	1.26	1.20
4	2.38	1.51	3.00	2.66	2.20	3.30	1.63	2.28	2.20
5	2.97	2.26	3.62	3.66	3.20	4.30	2.63	3.30	3.20
6	3.63	2.95	4.26	3.63	4.20	4.26	3.63	4.32	4.20
7	4.63	3.95	5.26	5.66	5.20	6.30	4.97	5.18	5.20
8	5.88	5.23	6.30	6.66	6.20	7.30	6.38	6.32	6.20

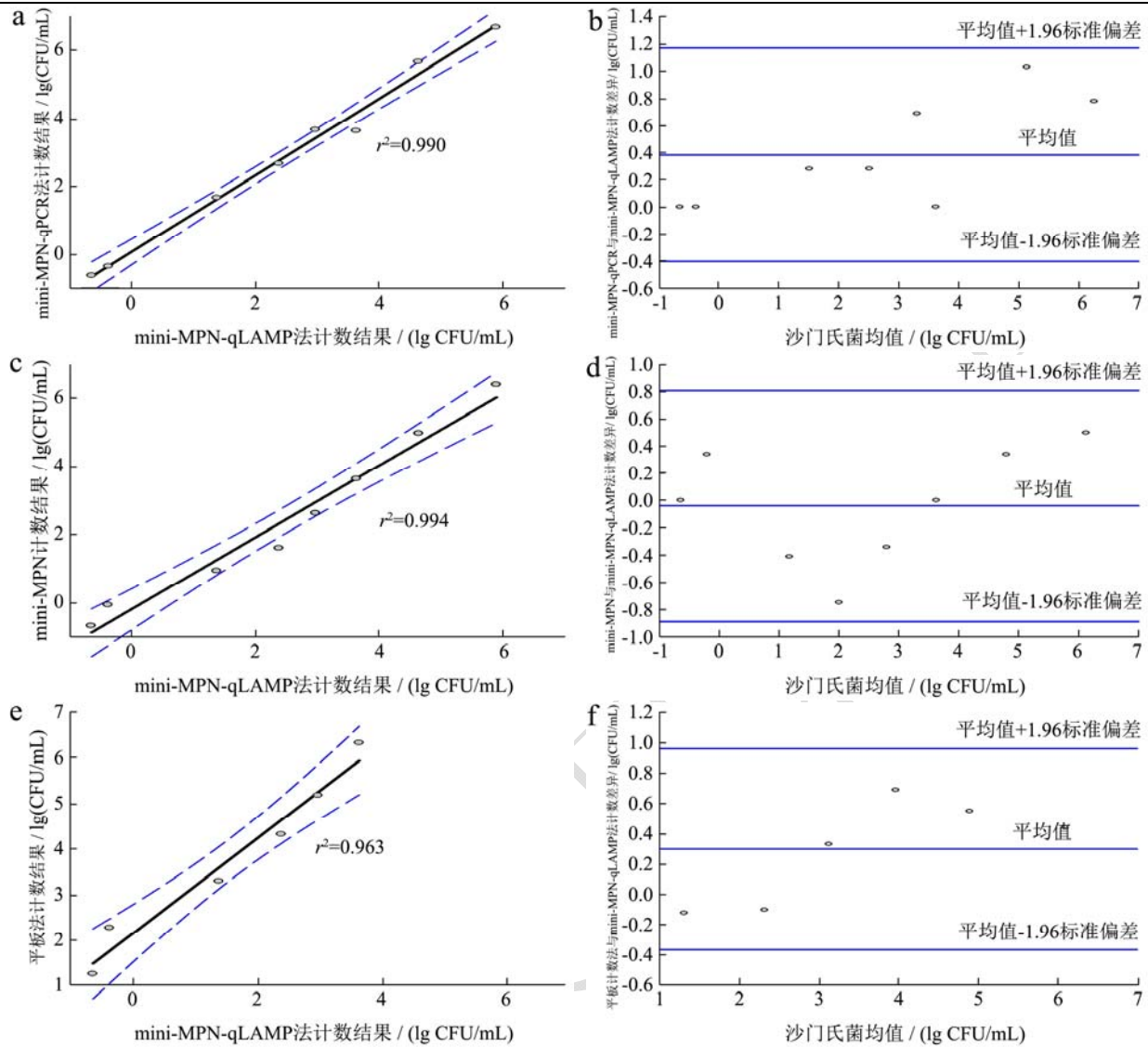


图3 在鸡胸肉检测应用中 mini-MPN-qLAMP 法与其他方法的 Bland-Altman 分析

Fig.3 Bland-Altman analysis of mini-MPN-qLAMP and other quantitative methods in chicken breast rinsate

注: 图 a、b 为 mini-MPN-qLAMP 和 mini-MPN-qPCR 结果 Bland-Altman 分析, 图 c、d 为 mini-MPN-qLAMP 和 mini-MPN 结果 Bland-Altman 分析, 图 e、f 为 mini-MPN-qLAMP 和平板计数法结果 Bland-Altman 分析。

3 讨论

由于不同食品对于沙门氏菌的检测影响较大, 考虑到沙门氏菌普遍易感的两种食品速冻面食和生制肉制品, 本实验选取速冻乌米饭和速冻鸡胸肉进行不同污染程度食品沙门氏菌定量检测方法的验证。常用的定量检测方法有平板计数法, MPN 计数法。其中平板计数法由于取样量少, 存在检出限高的问题, 并且对于污染严重的样品可能无法直接计数。

与平板计数法相比, MPN 计数法可以显著降低定量方法的检出限。虽然通过概率计算可能带入误差^[22], 但 MPN 值与平板计数法结果之间存在正相关^[23]。根据 MPN 计算公式, MPN 法的误差与加样量和发酵管数相关。发酵管数越多, MPN 计数结果越准确, 但这

将实验成本升高, 操作变得复杂。为了控制实验成本, 减少实验工作量, 项目组使用体积小, 容量大的 48 孔板作为多管发酵容器, 可实现每孔加样量 1.2 mL, 使用 3 管稀释法大大降低了传统 MPN 计数对人力和物力成本需求, 可实现快速简便定量检测, 并且通过 MPN 统计表中的 95% 置信区间减少误差。

基于 mini-MPN 计数法, 本实验建立了 mini-MPN-qLAMP 和 mini-MPN-qPCR 法。其中 mini-MPN-qPCR 法具有良好的定量检测能力^[16,24], 但该方法需要昂贵的荧光定量 PCR 仪。qLAMP 技术对设备要求更低, 只需等温条件即可进行实时荧光检测。另外, qLAMP 是基于荧光的 LAMP 技术, 具有特异性强、灵敏度高、反应快的特点, 也可使用显色反应进行检测。LAMP 技术对于引物设计的要求较高,

需要设计合理引物防止出现假阳性现象。而且 LAMP 显色技术容易受到核酸提取方法的影响,因此,本研究使用 qLAMP 法对 LAMP 过程进行监控,检测结果更加可靠,后续可增加基于显色反应的 LAMP 技术进行检测,进一步降低仪器要求,实现现场检测。

项目组同时设计了 mini-MPN-qLAMP、mini-MPN-qPCR、mini-MPN 和平板计数法定量测定沙门氏菌,通过 Bland-Altman 分析对两种方法的检测结果的一致性进行评价。两种检测方法的结果差异用结果的差值平均值进行估计,平均值的变异情况则用差值的标准差来描述。当测量结果的差值服从正态分布时,95%的差值位于平均值 ± 1.96 标准差之间,则可认为这两种方法测量结果具有较好的一致性^[25]。本实验使用两种不同污染程度的食品对所建立的 mini-MPN-qLAMP 法进行定量检测验证,发现 mini-MPN-qLAMP 可以通过基因检测消除初始杂菌对实验的影响,项目组后续考虑检验结果区分死菌活菌的能力,配合 PMA 等检测方法进行进一步研究^[26]。

4 结论

本研究旨在建立一种准确度高、操作简便的沙门氏菌定量等温扩增检测方法。研究使用 *ttr* 基因替代传统的 *invA* 基因作为检测靶点建立了 qLAMP 和 qPCR 定性检测方法,并使用 15 株沙门氏菌菌株和 21 株非沙门氏菌菌株进行特异性验证,仅沙门氏菌检测呈阳性结果。qLAMP 和 qPCR 纯培养检出限分别为 500 CFU/mL 和 50 CFU/mL,建立的定性检测方法可行。研究进一步使用基于 48 孔板的 3 孔微量多管发酵法和短时间增菌技术建立了 mini-MPN-qLAMP 法和 mini-MPN-qPCR 法实现了定量检测。通过 Bland-Altman 分析表明,经过 5 h BPW 增菌后所建立的 mini-MPN-qLAMP 法在速冻乌米饭中检测结果与 mini-MPN-qPCR、mini-MPN 计数法、平板计数法相比均具有较高的一致性, $r^2 \geq 0.994$, 检出限为 -0.44 lg MPN/mL; 而在速冻鸡胸肉中该法检测结果与 mini-MPN-qPCR 结果一致性最佳, $r^2 = 0.990$, 检出限为 -0.64 lg MPN/mL。肉制品中腐败杂菌会影响 mini-MPN 计数和平板计数结果,mini-MPN-qLAMP 可排除肉制品中腐败杂菌对检测结果的影响。

综上所述,本实验建立的 mini-MPN-qLAMP 法是一种准确度高、操作简便的沙门氏菌定量检测方法,无需特定 PCR 仪器即可进行沙门氏菌的快速检测,可大幅度提高检测效率,可在食品的沙门氏菌检测领域予以推广。

参考文献

- [1] Oscar T P. Process risk model for *Salmonella* and ground chicken [J]. Journal of Applied Microbiology, 2019, 127(4): 1236-1245
- [2] Wu Y N, Liu P, Chen J S. Food safety risk assessment in China: Past, present and future [J]. Food Control, 2018, 90: 212-221
- [3] Xiao X, Wang W, Zhang J, et al. A quantitative risk assessment model of *Salmonella* contamination for the yellow-feathered broiler chicken supply chain in China [J]. Food Control, 2021, 121(6): 107612
- [4] Yang X, Huang J, Zhang Y, et al. Prevalence, abundance, serovars and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from retail raw poultry meat in China [J]. Science of the Total Environment, 2020, 713: 136385
- [5] GB 4789.4-2016,食品安全国家标准食品微生物学检验沙门氏菌检验[S]
- [6] SN/T 1059.7-2010,进出口食品中沙门氏菌检测方法实时荧光 PCR 法[S]
- [7] Yang Q, Domesle K J, Ge B, et al. Loop-mediated isothermal amplification for *Salmonella* detection in food and feed: Current applications and future directions [J]. Foodborne Pathogen and Disease, 2018, 15(6): 309-331
- [8] Liu H B, Zang Y X, Du X J, et al. Development of an isothermal amplification-based assay for the rapid visual detection of *Salmonella* bacteria [J]. Journal of Dairy Science, 2017, 100(9): 7016-7025
- [9] Method 1682, *Salmonella* in sewage sludge (biosolids) by modified semisolid rappaport-vassiliadis (MSRV) medium [S]
- [10] Method 994.04, *Salmonella* in dry foods refrigerated pre-enrichment and selective enrichment broth culture methods [S]
- [11] Garrido-maestu A, Azinheiro S, Carvalho J, et al. Combination of microfluidic loop-mediated isothermal amplification with gold nanoparticles for rapid detection of *Salmonella* spp. in food samples [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 2159
- [12] Turki Y, Ouzari H, Mehri I, et al. Biofilm formation, virulence gene and multi-drug resistance in *Salmonella* Kentucky isolated in Tunisia [J]. Food Research International, 2012, 45(2): 940-946
- [13] Kreitlow A, Becker A, Schotte U, et al. Establishment and validation of a loop-mediated isothermal amplification

- (LAMP) assay targeting the *trRSBCA* locus for rapid detection of *Salmonella* spp. in food [J]. *Food Control*, 2021, 126(6): 107973
- [14] Malorny B, Paccassoni E, Fach P, et al. Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(12): 7046-7052
- [15] Kreitlow A, Becker A, Schotte U, et al. Evaluation of different target genes for the detection of *Salmonella* spp. by loop-mediated isothermal amplification [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2021, 72(4): 420-426
- [16] 章小洪,张维波,姜川,等. 荧光定量环介导等温扩增法快速检测食品中沙门氏菌[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(20):8056-8061
- [17] Blodgett R. BAM Appendix 2: Most Probable Number from Serial Dilutions [EB/OL]. (2020-10-9) [2021-12-26]. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-appendix-2-most-probable-number-serial-dilutions>
- [18] 章小洪,陈卫平,王伟影,等. mini-MPN-STE-qPCR 法快速定量检测食品中沙门氏菌[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12 (18):7246-7253
- [19] Youn S Y, Jeong O M, Choi B K, et al. Application of loop-mediated isothermal amplification with propidium monoazide treatment to detect live *Salmonella* in chicken carcasses [J]. *Poultry Science*, 2017, 96(2): 458-464
- [20] Fang J, Wu Y, Qu D, et al. Propidium monoazide real-time loop-mediated isothermal amplification for specific visualization of viable *Salmonella* in food [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2018, 67(1): 79-88
- [21] 张若煜,董鹏程,朱立贤,等. 生鲜肉中假单胞菌致腐机制的研究进展[J]. *食品科学*, 2020, 41(17):291-297
- [22] Cho K H, Han D, Park Y, et al. Evaluation of the relationship between two different methods for enumeration fecal indicator bacteria: colony-forming unit and most probable number [J]. *Journal of Environment Science*, 2010, 22(6): 846-850
- [23] Gronewold A D, Wolpert R L. Modeling the relationship between most probable number (MPN) and colony-forming unit (CFU) estimates of fecal coliform concentration [J]. *Water Research*, 2008, 42(13): 3327-3334
- [24] Kim S A, Park S H, Lee S I, et al. Development of a rapid method to quantify *Salmonella* Typhimurium using a combination of MPN with qPCR and a shortened time incubation [J]. *Food Microbiology*, 2017, 65: 7-18
- [25] NÖ Doğan. Bland-Altman analysis: A paradigm to understand correlation and agreement [J]. *Turkish Journal of Emergency Medicine*, 2018, 18(4): 139-141
- [26] Techathuvanan C, D'Souza D H. Propidium monoazide for viable *Salmonella enterica* detection by PCR and LAMP assays in comparison to RNA-based RT-PCR, RT-LAMP, and culture-based assays [J]. *Journal of Food Science*, 2020, 85(10): 3509-3516