

SD-PMA-qPCR 快速检测冷冻肉制品中活性沙门氏菌的研究

庄平¹, 余以刚¹, 周冬根², 李亚茹¹, 胡双芳¹, 肖性龙¹

(1. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510640)(2. 宁波检验检疫科学技术研究院, 浙江宁波 315012)

摘要: 为实现冷冻肉制品中活性沙门氏菌的快速检测与控制, 本文利用 PMA (叠氮溴化丙锭) 和 SD (脱氧胆酸钠) 消除死菌和损伤菌的影响, 建立了运用 SD-PMA-qPCR 法检测活性沙门氏菌的反应体系和反应条件, 并进行人工染菌样品检测试验。SD 的最佳浓度确定为 0.1%, 最佳孵育时间为 20 min。对 -20 °C 低温冷冻处理 3~4 d 的沙门氏菌处理液, 使用平板计数法、qPCR、PMA-qPCR 和 SD-PMA-qPCR 进行计数, 结果发现 qPCR 与 PMA-qPCR 二者检测值接近且明显高于平板计数值, 而 SD-PMA-qPCR 检测值与平板计数值相近, 这表明 SD 和 PMA 的联合使用能有效的消除死菌和损伤菌的影响。人工染菌样品试验表明, 沙门氏菌检出限在 10² CFU/g, 同时 10⁶ CFU/g 大肠杆菌 O157:H7 的存在不会影响检测结果。本研究所建立的 SD-PMA-qPCR 检测方法特异性好、灵敏度高, 有望成为快速检测冷冻肉制品中活性沙门氏菌的新方法, 具有很好的研究价值和应用前景。

关键词: 活性沙门氏菌; 叠氮溴化丙锭-荧光定量核酸扩增检测系统; 脱氧胆酸钠

文章编号: 1673-9078(2017)7-289-294

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.7.040

Rapid Detection of Viable *Salmonella* spp. in Frozen Meat Products Using Sodium Deoxycholate, Propidium Monoazide, and Real-time Quantitative PCR

ZHUANG Ping¹, YU Yi-gang¹, ZHOU Dong-gen², LI Ya-ru¹, HU Shuang-fang¹, XIAO Xing-long¹

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

(2. Ningbo Academy of Inspection and Quarantine, Ningbo 315012, China)

Abstract: In order to realize rapid detection of viable *Salmonella* spp. in frozen meat products, a novel sodium deoxycholate-propidium monoazide-quantitative polymerase chain reaction (SD-PMA-qPCR) method was established using PMA and SD to eliminate interference from dead and injured cells. The reaction conditions were optimized, and an artificially infected sample was tested. The results showed that the optimal SD concentration was 0.1% and the optimal incubation time was 20 min. The numbers of bacterial survivors were compared using plate count, qPCR, PMA-qPCR, and SD-PMA-qPCR assays after the cell suspensions were cryogenically frozen at -20 °C for 3~4 d. The results showed that the numbers of viable *Salmonella* spp. obtained from qPCR and PMA-qPCR were similar and significantly higher than that from the plate count method. The result from SD-PMA-qPCR was close to that from the plate count method, indicating that a combination of PMA and SD could effectively eliminate the impact of dead and injured bacteria. The artificial infection test results showed that the detection limit of *Salmonella* spp. was 10² CFU/g, and the presence of 10⁶ CFU/g *Escherichia coli* O157:H7 did not affect the measurement results. The SD-PMA-qPCR method developed in this study has good specificity and high sensitivity. It is expected to be used as a new method for the rapid detection of viable *Salmonella* spp. in frozen meat products, and has good research value and application prospects.

Key words: viable *Salmonella* spp.; propidium monoazide-quantitative polymerase chain reaction; sodium deoxycholate (SD)

收稿日期: 2017-01-12

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (2016A030313449); 广东省科技计划项目 (2015A030401025); 浙江省自然科学基金项目 (LY16H260004)

作者简介: 庄平 (1991-), 男, 硕士, 研究方向: 食品安全与检测

通讯作者: 肖性龙 (1977-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 食品安全与检测

在中国由微生物引起的食源性疾病中, 沙门氏菌占总数的 10.2%, 是导致食源性疾病的第二大病原菌^[1], 且在畜禽肉中污染最严重。沙门氏菌生存能力极强, 能在 -20 °C 的低温环境下存活。因此, 活性沙门氏菌的快速准确检测对于由该菌引起的食源性疾病的预防和控制具有十分重要的意义。

沙门氏菌的传统检测方法,包括增菌培养、选择性培养基分离纯化、鉴定及血清鉴定与确认,而菌的鉴定通常需要 3~6 d,耗费大量的人力和物力,并且存在容易出现假阴性或假阳性的缺点。PMA-qPCR 检测技术是近年来兴起的活菌检测技术,其原理是设计细胞膜不透性同时具有 DNA 高亲和力的光反应染料 PMA,渗入细胞膜受损的细胞,使 PMA 嵌入双链 DNA,暴露在强烈的可见光下形成共价键修饰的 DNA,抑制其在 PCR 反应中的扩增,以达到区分死、活菌检测的目的。PMA-qPCR 检测技术已经被报道用于大肠杆菌 O157:H7^[2]、副溶血性弧菌^[3]、金黄色葡萄球菌^[4]、单增李斯特菌^[5]和沙门氏菌^[6]等食源性致病菌的检测。杨显琴^[7]等使用 PMA-qPCR 技术检测经较低温度杀菌的活性大肠杆菌时发现 PMA-qPCR 技术检测得到的结果明显高于实际活菌值, Lee 和 Levin^[8]在监测冷冻处理后活性创伤弧菌的研究发现用 EMA-qPCR 技术(EMA 与 PMA 设计原理相同,但大量文献表明 PMA 的使用效果优于 EMA)的检测结果高于实际活菌值,这意味着存在部分非活菌的 DNA 在荧光定量 qPCR 反应中完成了扩增。PMA-qPCR 和 EMA-qPCR 检测技术在检测经低温处理的活菌时不能有效区分活菌和死菌,易出现检测值偏高,检测结果不准确的情况。Lee 和 Levin^[8]发现样品在 EMA 处理前经脱氧胆酸钠(SD)的预处理可使检测结果与实际活菌值的差异减小。

本研究将根据现有的活菌 PMA-qPCR 检测技术,尝试结合 SD 的前处理过程,建立低温杀菌的活菌 SD-PMA-qPCR 检测方法,并进行人工染菌样品的初步检测,以期建立快速准确检测冷冻肉制品中活性沙门氏菌的方法提供新途径。

表 1 菌种列表和 PCR 检测结果

Table 1 Bacterial strains used in this study and results of qPCR

菌株	编号/来源	荧光 PCR 检测结果
<i>Salmonella typhimurium</i>	CCTCC 94018	+
<i>Salmonella typhimurium</i>	CICC 10420	+
<i>Salmonella typhimurium</i>	CMCC 5013	+
<i>Salmonella choleraesuis</i>	CMCC 50337	+
<i>Salmonella choleraesuis</i>	CMCC 50732	+
<i>Enterobacter cloace</i>	ATCC 13047	-
<i>Enterbacter cloacae</i>	CICC 21539	-
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 12900	-
<i>E. coli</i> O157:H7	CICC 21530	-
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 9637	-
<i>Enterbacter aerogenes</i>	CICC 10293	-

<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13408	-
<i>Bacillus cereus</i>	CMCC 70331	-
<i>Bacillus cereus</i>	CCTCC AB92023	-
<i>Shigella sonnei</i>	CMCC 51592	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	CMCC 54002	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19117	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	CCTCC 97021	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CICC 6149	-
<i>Bacillus subtilis</i>	CICC 20533	-
<i>Bacillus thuringiensis</i>	CICC 23706	-
<i>Lactobacillus reuteri</i>	CICC 6119	-
<hr/>		
<i>Lactobacillus pentosus</i>	CGMCC 5172	-
DMDL 9010		
<hr/>		
<i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC 27562	-
<i>Bacillus cereus</i>	CMCC 70331	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	CMCC 41002	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	CMCC 26003	-

注: ATCC 为美国典型菌种保藏中心; CMCC 为中国医学细菌保藏管理中心; CICC 为中国工业微生物菌种保藏管理中心; CGMCC 为中国普通微生物菌种保藏管理中心; NCTC 为英国典型菌种保藏中心; CCTCC 为中国典型培养物保藏中心; “+”代表阳性,“-”代表阴性。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

冷冻肉制品中最常见的致病菌为沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌、副溶血性弧菌、大肠杆菌以及志贺氏菌。本文使用的 27 株菌株详见表 1。

Premix Ex Taq(Probe qPCR) (宝生物工程(大连)有限公司); 细菌 DNA 提取试剂盒(北京天恩泽基因科技有限公司); 引物、探针(上海辉瑞生物科技有限公司合成); 大豆酪蛋白琼脂培养基(TSA)、胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB)、木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂(XLD)、LB 培养基(广东环凯微生物科技有限公司); 脱氧胆酸钠 SD(上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 叠氮溴化丙锭 PMA (Biotium 公司), DEPC 水。

ABI 7500 Real Time PCR System、Thermo 微量超速离心机, HYG-A 全温摇瓶柜, 生化培养箱, Biophotometer 分光光度计(Eppendorf), Thermo 微量移液器, 卤钨灯(650 W), 高压蒸汽灭菌锅。

1.2 方法

1.2.1 qPCR 体系的建立

所有细菌用液体 LB 培养基在 37 °C 下培养 12 h

后,测 OD 值,估计细菌浓度。然后分别取 1 mL 菌液依照 DNA 提取试剂盒说明书提取 DNA,提取的 DNA 作为反应模板贮存于-20 °C 备用。

按照 Malomy^[9]设计引物和探针,根据 takara Premix Ex Taq 试剂盒说明书要求,每 20 μL 的 PCR 反应体系包含 10 μL 2 \times Premix Ex Taq (Probe qPCR)、0.2 μL ROX Reference Dye II、1.0 μL 上游引物(10 μM)、1.0 μL 下游引物(10 μM)、0.5 μL 探针(10 μM)、2 μL Template (反应组使用备用 DNA 模板,对照组使用 DEPC 水),于 ABI 7500 Real Time PCR System 进行实时荧光 PCR 扩增。反应程序:95 °C 变性 1 min;以 95 °C、5 s,60 °C、40 s 扩增 40 个循环(收集荧光)。

提取上述步骤的 DNA 模板在建立的反应条件与反应体系进行 qPCR 特异性实验。判断研究方法的特异性,避免出现假阳性或假阴性。

1.2.2 各状态沙门氏菌的制备

取生长至对数平台期的沙门氏菌菌液 30 mL 于 50 mL 无菌离心管中,12000 r/min 离心 2 min,弃上清。用 20 mL 无菌去离子水重悬洗涤菌体三次后,0.1% (m/V) 缓冲蛋白胨水重悬于 1 L 锥形瓶,调整菌液浓度为约 10^7 CFU/mL,即为活性沙门氏菌。

取 1 mL 活性沙门氏菌液于 1.5 mL 离心管,转移至-20 °C 冰箱冷冻 3~4 d 后于 4 °C 环境融解,即得冷冻处理沙门氏菌;另取 1 mL 活性沙门氏菌于 1.5 mL 离心管,转移至沸水浴中处理 90 s 后立即放入冰盒中冷却,即得热灭活沙门氏菌。

1.2.3 SD 浓度和孵育时间的选择

取 SD 溶解于步骤 1.2.2 制取的冷冻处理沙门氏菌,充分混匀得到浓度为 0、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、2.5% 和 5% 的 SD 菌体液(SD/冷冻处理沙门氏菌液),转移至 180 r/min 37 °C 培养 30 min,于 XLD 和 TSA 平板计数。其中浓度为 0.1% SD 菌体液混匀后培养 0、10、20、30、50、100 min,于 XLD 和 TSA 平板计数。所有试验重复三次。

1.2.4 PMA-qPCR 与 SD-PMA-qPCR 检测

按照肖性龙^[10]的方法进行 PMA-qPCR 的检测。取 1 mg PMA 溶解于 200 μL 、20% 的二甲基亚砜(DMSO)溶液得到 5 mg/mL 的母液,于-20 °C 下避光保存,PMA 母液 10 倍稀释即得到 PMA 工作液。分别取活性沙门氏菌 500 μL 于编号为 1、2、3 的 1.5 mL 离心管,冷冻处理沙门氏菌 500 μL 于编号为 4、5、6 的 1.5 mL 离心管,热灭活沙门氏菌 500 μL 于编号为 7、8、9 的 1.5 mL 离心管,12000 r/min 离心 2 min,等体积无菌水重悬。

往编号为 2、5 和 8 的离心管分别加入 1 μL 5% 的

SD,形成终浓度为 0.01% 的 SD 菌体液,转移至 180 r/min 37 °C 摇床培养 20 min。然后与 3、6 和 9 号菌液一起进行如下处理。分别往菌液中加入 5 mg/mL 的 PMA 储备液 1 μL 使菌液中 PMA 终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$,充分混匀后,于室温暗处孵育 10 min。打开离心管盖子距离 650 W 卤钨灯 18 cm 照射 5 min,离心管置于旋转的碎冰上,保证充分光照的同时防止局部光照引起的升温。

取上述处理后的 1~9 号菌液按照步骤 1.2.1 的方法提取 DNA,作为 qPCR 反应模板。所有试验重复三次。

1.2.5 检测方法的初步应用

取市售猪肉,根据 GB 4789.40-2010^[11]证明无沙门氏菌污染,于高压蒸汽灭菌锅 121 °C、15 min 高压灭菌。取活性沙门氏菌于装有 25 g 猪肉样品的无菌均质袋中,充分混匀,转移至冰箱冷冻 3~4 d,形成活菌量为 $10^0\sim 10^6$ CFU/g 样品。

以 0.1% (m/V) 缓冲蛋白胨水反复清洗冷冻后的猪肉样品,取清洗液 12000 r/min 离心 10 min,小心挑去上层脂肪,再以 500 μL 、0.1% (m/V) 缓冲蛋白胨水重悬于 1.5 mL 离心管。取两组重悬液,其中一组加入 500 μL 、 10^6 CFU/mL 的大肠杆菌 O157:H7,另一组加入 500 μL 蒸馏水。按步骤 1.2.4 方法对两组样品中的每个浓度进行 SD+PMA 前处理,提取 DNA。根据前述所建立 PCR 反应条件进行荧光 PCR 检测,并用 DEPC 水作为阴性对照。所有实验重复三次。

2 结果与讨论

2.1 qPCR 的特异性

用荧光定量 PCR 检测收集到的沙门氏菌和其他代表性菌株,特异性实验结果显示,仅沙门氏菌出现阳性“S”型扩增曲线,其他菌株均无扩增为阴性,在选定的菌株范围内,荧光定量 PCR 检测结果的特异性为 100%。

2.2 SD 浓度和孵育时间的确定

损伤菌和活菌都能在 TSA 上生长,仅活菌能在 XLD 上生长,死菌在 TSA 和 XLD 上都不能生长。

活菌(%)=XLD 计数值/TSA 计数值

损伤菌(%)=1-活菌(%)

如图 1a 所示,SD 浓度为 0 时即冷冻处理后活菌占比约 2%,损伤菌占比约为 98%。加入一定量的 SD 不会影响沙门氏菌的生长,而当混合液中 SD 浓度超过 5% 时沙门氏菌的生长明显受到抑制,同时混合液

中 SD 浓度为 0~0.1% 时, 沙门氏菌的生长状况最好。由此可见 0.1% 的 SD 不会影响冷冻处理沙门氏菌的生长。如图 1b 所示, 以 0.1% 的 SD 孵育冷冻处理沙门氏菌细胞时间在 20 min 以内时, XLD 涂板显示活菌数在逐渐升高, 在 20 min 时达到稳定且不再增加, 而各孵育时间段 TSA 涂板显示菌落数无明显差异。这些结果显示, 0.1% 的 SD 孵育 20 min 可作为 PMA-PCR 前处理的最佳组合。

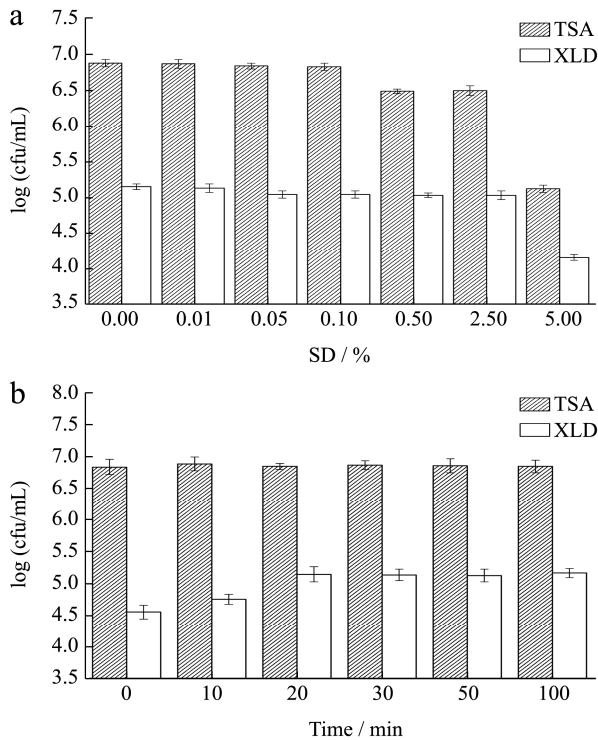


图1 确定 SD 的浓度和孵育时间

Fig.1 Optimization of the concentration and incubation time of sodium deoxycholate (SD)

2.3 qPCR、PMA-qPCR 和 SD-PMA-qPCR 标准曲线

标准曲线

为了定量检测样本中的活性沙门氏菌, 对 qPCR、PMA-qPCR 和 SD-PMA-qPCR 分别做标准曲线。培养至对数平台期的沙门氏菌活菌约 10^9 CFU/mL, 将未经 PMA 处理的活菌、经 PMA 处理的活菌及经 SD+PMA 处理的活菌分别提取 DNA 后进行梯度稀释, 依次为 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} , 以不同浓度的 DNA 稀释液为模板作标准曲线。如图 2 所示, 细胞浓度均随着 Ct 值的增大而减小, 细菌菌落数与 Ct 值呈线性负相关, R^2 分别为 0.9990、0.9965 和 0.9929, 斜率分别为 -3.37、-3.20 和 -3.21。

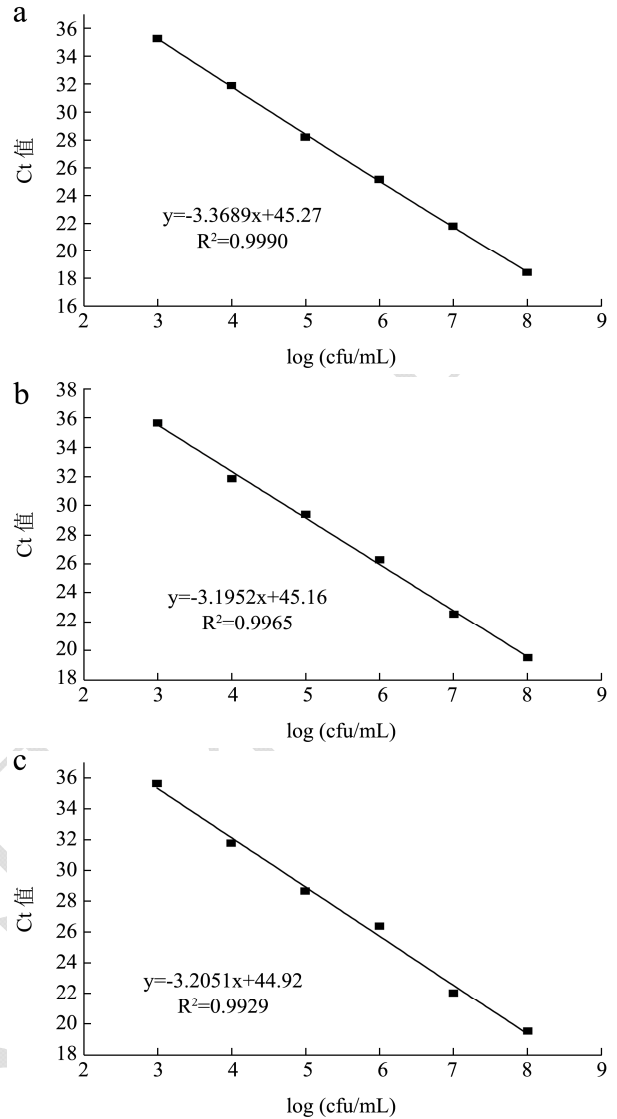


图2 活性沙门氏菌的 qPCR (a)、PMA-qPCR (b) 和 SD-PMA-qPCR (c) 标准曲线

Fig.2 qPCR (a), PMA-qPCR (b), and SD-PMA-qPCR (c) standard curves of viable *Salmonella* spp.

2.4 qPCR、PMA-qPCR 和 SD-PMA-qPCR 检测结果

检测结果

细菌细胞经 SD+PMA, PMA 或者未经 PMA 三种方法处理后, 提取基因组 DNA 并进行荧光定量 PCR 的检测。如图 3 示, 1、2 和 3 号离心管为沙门氏菌对数期活菌, 由 XLD 平板计数知离心管中活菌数为 6.9 个 log 值, qPCR、PMA-qPCR 和 SD-PMA-qPCR 三种检测方法的 Ct 值相差较小, 依次为 22.38、23.45 和 23.48。由步骤 2.3 标准曲线可知离心管中细胞数依次为 6.79、6.79 和 6.71 个 log 值, 三种检测方法结果与

实际值接近,这说明 SD 和 PMA 的前处理过程并不影响 qPCR 的检测准确性,4、5 和 6 号离心管为热灭活死菌液,由 XLD 平板计数知离心管中活菌数为 3.5 个 log 值,qPCR、PMA-qPCR 和 SD-PMA-qPCR 三种检测方法的 Ct 值依次为 22.32、34.24 和 34.34,由步骤 2.3 标准曲线可知离心管中细胞数依次为 6.81、3.42 和 3.30 个 log 值。显然经 PMA 或 SD+PMA 处理,DNA 扩增被抑制 ($\Delta_{PMA}Ct=11.92$ 和 $\Delta_{SD+PMA}Ct=12.02$),PMA-qPCR 和 SD-PMA-qPCR 检测值与真实值接近,qPCR 与 PMA-qPCR 联用可以有效的区分热灭活的死菌和活菌,有效避免检测出现的假阳性;7、8 和 9 号离心管为冷冻处理沙门氏菌,由 XLD 平板计数知离心管中活菌数为 5.2 个 log 值,qPCR、PMA-qPCR 和 SD-PMA-qPCR 三种检测方法的 Ct 值依次为 22.28、24.32 和 27.75,由步骤 2.3 标准曲线可知离心管中细胞数依次为 6.82、6.52、5.35 个 log 值,qPCR 和 PMA-qPCR 两种方法检测结果与实际值偏差较大,SD-PMA-qPCR 检测的细胞数比实际活菌值略大 0.15 个 log 值,差异较小。与直接提取基因组 DNA 进行荧光定量 qPCR 检测相比,PMA 前处理使 Ct 值上升了 2.04 个循环,而 SD+PMA 前处理则上升了 5.47 个循环,这说明 SD 的存在有利于 PMA 进入细胞,从而抑制 DNA 在 PCR 反应中的扩增。

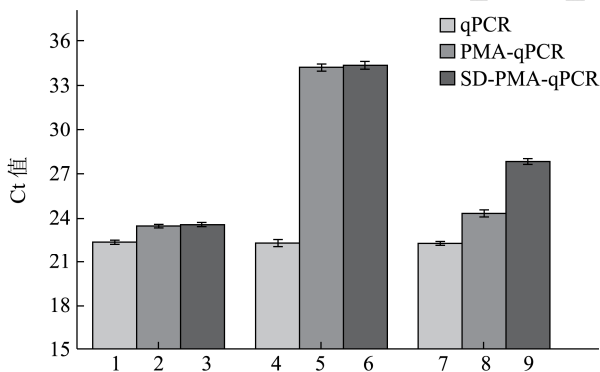


图3 沙门氏菌不同状态的检测结果

Fig.3 Detection results of different states of *Salmonella* spp.

2.5 SD-PMA-qPCR 快速检测人工染菌冷冻猪肉样品中的活性沙门氏菌

结果如图 4a 所示,SD-PMA-qPCR 可以检测样品中活菌浓度低至 2.2×10^2 CFU/g 的沙门氏菌,而不受死菌和受损菌的影响。如图 4b 所示,作为非目标菌的大肠杆菌 O157:H7 加入样品后,其检测下限并未发生改变,依然为 10^2 CFU/g,这说明非目标菌的存在并不会影响检测体系的稳定性。

结果如图 4a 所示,SD-PMA-qPCR 可以检测样品中活菌浓度低至 2.2×10^2 CFU/g 的沙门氏菌,而不受死菌和受损菌的影响。如图 4b 所示,作为非目标菌的大肠杆菌 O157:H7 加入样品后,其检测下限并未发生改变,依然为 10^2 CFU/g,这说明非目标菌的存在并不会影响检测体系的稳定性。

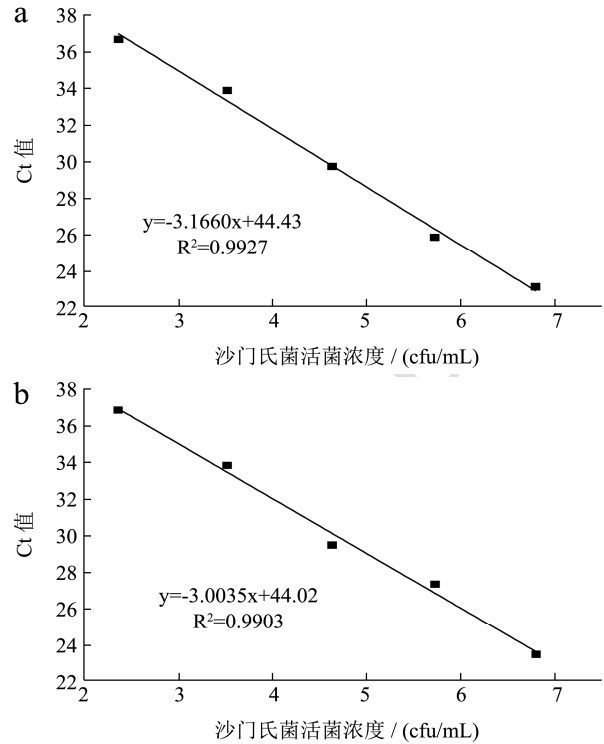


图4 冷冻猪肉样品中活性沙门氏菌的 SD-PMA-qPCR 标准曲线

Fig.4 SD-PMA-qPCR standard curves of viable *Salmonella* spp. from frozen meat

注: a 表示对照组; b 表示添加 10^6 CFU/g 大肠杆菌 O157:H7。

3 结论

3.1 冷冻肉制品中的沙门氏菌,存在活菌、损伤菌和死菌三种状态,但是只有活菌能直接产生致病性,危害人体健康。PMA-qPCR 检测技术被广泛证明能用于区分活菌和死菌^[2],其区分能力实际上是通过判断细胞膜的完整性来实现的,由于“死细胞”不具有完整的细胞膜,因此 PMA 能进入“死细胞”与 DNA 发生共价结合,从而使其 DNA 在 PCR 反应中不能完成扩增。而具有完整细胞膜的活细胞,其 DNA 在处理中不会被修饰,因而能够在 PCR 中完成扩增。王立军在快速检测低温冷冻处理的活性大肠杆菌 O157:H7 的研究中,一定时间的 SD 孵育,结合 PMA-qPCR 技术检测发现结果与平板计数值接近,他认为 SD 的预处理破坏了损伤菌和死菌的细胞外膜,增强了 PMA 的渗透力^[12]。

3.2 大量研究表明,脱氧胆酸钠能够使细胞膜稳定性下降,流动性增强,膜结构的有序性降低^[13]。我们发现以 0.1% SD 处理样品 20 min,不会影响沙门氏菌在非选择性 TSA 和选择性 XLD 培养基上的生长繁殖,同时经 SD 预处理的样品使用 PMA-qPCR 技术检测得到的结果与平板计数法相近。我们认为 SD-PMA-

qPCR 的检测体系中引入的 SD 通过溶解膜蛋白裂解细胞^[14], 一定程度破坏了细胞膜, 从而帮助 PMA 进入损伤菌和死菌细胞中, 间接抑制了 DNA 在后续 PCR 反应中的扩增, 完成对“死菌”和活菌的区分。在冷冻肉制品活性沙门氏菌的检测中, 引入 SD 预处理可以有效避免 PMA-qPCR 检测时出现的假阳性, 提高准确性。

3.3 为实现冷冻肉制品中常见污染菌活性沙门氏菌的快速检测与控制, 本文根据 Malorny^[9]设计的特异性探针和引物, 建立了 SD-PMA-qPCR 检测方法, 并对该法的特异性、灵敏度及适用性进行试验。在选定的菌株范围内, 荧光检测结果特异性达 100%, 并且具有极高的灵敏度, 检出限在 10^2 CFU/mL。研究建立的 SD-PMA-qPCR 检测方法人工染菌冷冻样品试验中, 其准确性不受非目标菌存在的影响, 灵敏度也稳定在 10^2 CFU/g 的下限, 相比于 PMA-qPCR 具有更高的准确性。

3.4 综上所述, 本研究所构建的 SD-PMA-qPCR 检测方法具有操作简单、快速、特异性强及灵敏性高等优点, 为冷冻肉制品中活性沙门氏菌的检测提供了新的手段, 有望发展为快速检测活性沙门氏菌的有效手段。

参考文献

- [1] Yan H, Li L, Alam M J, et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in retail foods in northern China [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 143(3): 230-234
- [2] Liu Y, Mustapha A. Detection of viable *Escherichia coli* O157: H7 in ground beef by propidium monoazide real-time PCR [J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 170: 48-54
- [3] Zhu R G, Li T P, Jia Y F, et al. Quantitative study of viable *Vibrio parahaemolyticus* cells in raw seafood using propidium monoazide in combination with quantitative PCR [J]. Journal of Microbiological Methods, 2012, 90(3): 262-266
- [4] Zhang Z, Liu W, Xu H, et al. Propidium monoazide combined with real-time PCR for selective detection of viable *Staphylococcus aureus* in milk powder and meat products [J]. Journal of Dairy Science, 2015, 98(3): 1625-1633
- [5] Pan Y, Breidt F. Enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cells by real-time PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(24): 8028-8031
- [6] Xiao L, Zhang Z, Sun X, et al. Development of a quantitative real-time PCR assay for viable *Salmonella* spp. without enrichment [J]. Food Control, 2015, 57: 185-189
- [7] Yang X, Badoni M, Gill C O. Use of propidium monoazide and quantitative PCR for differentiation of viable *Escherichia coli* from E. coli killed by mild or pasteurizing heat treatments [J]. Food Microbiology, 2011, 28(8): 1478-1482
- [8] Lee J L, Levin R E. Discrimination of viable and dead *Vibrio vulnificus* after refrigerated and frozen storage using EMA, sodium deoxycholate and real-time PCR [J]. Journal of Microbiological Methods, 2009, 79(2): 184-188
- [9] 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
- [10] Xiao X, Tian C, Yu Y, et al. Detection of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157: H7 using propidium monoazide treatments and qPCR [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2012, 59(3): 157-163
- [11] GB 4789.40-2010, 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验[S]
GB 4789.40-2010, National food safety standard food microbiological examination: *Salmonella* [S]
- [12] Wang L, Li P, Zhang Z, et al. Rapid and accurate detection of viable *Escherichia coli* O157: H7 in milk using a combined IMS, sodium deoxycholate, PMA and real-time quantitative PCR process [J]. Food Control, 2014, 36(1): 119-125
- [13] Almgren M. Mixed micelles and other structures in the solubilization of bilayer lipid membranes by surfactants [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2000, 1508(1): 146-163
- [14] 李正卿, 马捷. 构建组织工程瓣膜支架中 3 种去垢剂的比较 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(8): 1349-1352
LI Zheng-qing, MA Jie. Construction of tissue-engineering heart valve scaffold with three cell detergents [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2010, 14(8): 1349-1352