

# 免疫磁珠分离-实时荧光 PCR 快速检测虾中沙门氏菌

李亚茹<sup>1</sup>, 周冬根<sup>2</sup>, 夏杏洲<sup>3</sup>, 曹怡芳<sup>1</sup>, 杨慧宁<sup>1</sup>, 胡双芳<sup>1</sup>, 肖性龙<sup>1</sup>

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)(2. 宁波检验检疫科学技术研究院, 浙江宁波 315012)  
(3. 广东海洋大学食品科技学院, 广东湛江 524094)

**摘要:** 建立了免疫磁珠分离 (Immunomagnetic separation, IMS) 联合实时荧光 PCR (real time PCR) 快速、灵敏地检测虾中沙门氏菌的方法。用纳米磁珠与抗沙门氏菌多克隆抗体制备免疫磁珠, 优化反应条件, 建立 IMS 方法。同时针对沙门氏菌 *ttr* 基因合成探针和引物, 构建 real time PCR 体系, 选 4 株代表性的沙门氏菌检测其特异性和灵敏度。结果显示, 免疫磁珠的最适添加量为 100  $\mu$ L, 免疫磁珠与样品菌液的最佳反应时间为 30 min。建立的免疫磁珠分离-实时荧光 PCR (IMS-real time PCR) 方法特异性高, 对于虾中沙门氏菌的检测限为鼠伤寒沙门氏菌  $5 \times 10^1$  CFU/25 g, 猪霍乱沙门氏菌  $5 \times 10^2$  CFU/25 g, 肠炎沙门氏菌和甲型副伤寒沙门氏菌  $1 \times 10^2$  CFU/25 g, 检测全程可在 6 h 内完成。对 40 份实际样品, IMS-real time PCR 方法与国标法检测结果完全一致。建立的 IMS-Real time PCR 方法用时短、灵敏度高, 为水产品中沙门氏菌的快速检测提供了技术支撑, 对沙门氏菌引起的食源性疾病的预防和控制具有现实意义。

**关键词:** 免疫磁珠分离; 实时荧光 PCR; 沙门氏菌; 检测

文章编号: 1673-9078(2017)11-235-242

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.11.034

## Rapid Detection of *Salmonella* in Shrimp by Immunomagnetic Separation Combined with Real-time PCR

LI Ya-ru<sup>1</sup>, ZHOU Dong-gen<sup>2</sup>, XIA Xing-zhou<sup>3</sup>, CAO Yi-fang<sup>1</sup>, YANG Hui-ning<sup>1</sup>, HU Shuang-fang<sup>1</sup>,  
XIAO Xing-long<sup>1</sup>

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

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

(3.College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524094, China)

**Abstract:** A rapid and sensitive detection method of immunomagnetic separation (IMS) combined with real-time PCR for *Salmonella* in shrimp was established. The immunomagnetic beads were prepared by coupling anti-*Salmonella* polyclonal antibody to magnetic beads and the reaction conditions were optimized to establish the IMS method, and a probe and primers were synthesized for *ttr* gene of *Salmonella* to construct the real-time PCR system. The specificity and sensitivity of four representative *Salmonella* strains were examined. The results showed that the optimal dosage of immunomagnetic beads was 100  $\mu$ L, and the optimal reaction time of immunomagnetic beads with sample bacteria was 30 min. The proposed IMS-real time PCR had a high specificity and the limits of detection were  $5 \times 10^1$  CFU/25 g for *Salmonella typhimurium*,  $5 \times 10^2$  CFU/25 g for *Salmonella choleraesuis* and  $1 \times 10^2$  CFU/25 g for both *Salmonella enteritidis* and *Salmonella paratyphi A*, respectively, and the detection process could be completed within 6 h. The test results of IMS-real time PCR were same with those of the national standard for 40 collected shrimp samples. The established IMS-real time PCR need less time and had a high sensitivity, which provided technical support for the rapid detection of *Salmonella* in aquatic products as well as the practical significance for the prevention and control of foodborne diseases caused by *Salmonella*.

**Key words:** immunomagnetic separation; real-time polymerase chain reaction; *salmonella*; detection

收稿日期: 2017-05-20

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); 广东省省部产学研合作重大专项 (2013A090100014)

作者简介: 李亚茹 (1992-), 女, 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

虾因其味道鲜美且富含营养受到广大消费者的喜爱, 同时也是亚州南部和东南部最为重要的水产品之一<sup>[1]</sup>。但水产品在养殖、捕捞、加工、运输及销售的各个环节均易受到食源性致病菌的污染, 若不能及时发现, 严格把控, 则不仅对消费者的健康造成威胁, 也会给经济发展带来损失。沙门氏菌就是污染水产品的重要病原菌之一, 已成为世界各国卫生检测和疾病

防控等部门关注的重点<sup>[2]</sup>。对于沙门氏菌,基于培养的传统检测一直被视为“金标准”,但该方法整个过程耗时长,工作量大,步骤繁琐<sup>[3]</sup>,在面对食品安全的突发事件时,不能及时提供准确数据,无法满足一些基层执法部门对产品大批量、快速检测的要求。因此快速、准确且灵敏的检测方法是有效预防和控制食源性疾病发生的关键。

实时荧光 PCR (real time PCR) 技术,灵敏度高且特异性强,不仅可以对扩增产物进行实时定量检测,同时反应是在密闭体系中进行的,可避免交叉污染,是被应用较多的快速检测沙门氏菌的方法之一。但食品基质复杂,其中一些成分对 PCR 扩增有一定的抑制作用,实时荧光 PCR 可能会因此出现漏检或假阴性<sup>[4,5]</sup>。免疫磁珠分离 (Immunomagnetic Separation, IMS) 技术,是用目标菌抗体包被磁珠而制得免疫磁珠,而后与样品中的目标菌发生抗原抗体结合,再经磁场作用使目标菌从各种复杂的食品基质中快速分离出来<sup>[6-9]</sup>。将免疫磁珠分离技术与实时荧光 PCR 技术结合,可以发挥两种技术的优点,实现高效灵敏的快速检测。但由于实际食品基质非常复杂,对不同种类的食品,其食源性致病菌的富集和检测条件也有所不同,需要相关实验为检测方法提供理论依据。目前已有利用免疫磁分离-实时荧光 PCR (IMS-Real time PCR) 方法对牛奶、猪肉、鸡胸肉和豆芽等食品中的沙门氏菌进行检测的报道<sup>[9-12]</sup>,但以虾为基质对多株沙门氏菌进行 IMS-Real time PCR 检测的研究甚少。

本研究将制备的沙门氏菌免疫磁珠的使用添加量及与样品菌液的反应时间进行了优化,同时选取 4 株代表性的沙门氏菌评价免疫磁珠的捕获能力及特异性。另选择沙门氏菌的 *ttr* 基因为靶基因构建实时荧光 PCR 体系,进而建立检测虾中沙门氏菌的 IMS-Real time PCR 方法,以期进一步缩短检测时间,为水产品中沙门氏菌的监控提供准确高效的检测手段。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 实验菌株及样品

鼠伤寒沙门氏菌 (CMCC50115)、猪霍乱沙门氏菌 (ATCC10708)、甲型副伤寒沙门氏菌 (ATCC9150)、肠炎沙门氏菌 (ATCC13076)、大肠埃希菌 O157:H7 (ATCC36844)、阪崎肠杆菌 (ATCC29544)、大肠杆菌 (ATCC25922)、空肠弯曲菌 (ATCC33291)、副溶血型弧菌 (ATCC17802)、单增李斯特菌 (ATCC19115)、金黄色葡萄球菌 (ATCC29213),均

为实验室保存;沙门氏菌标准菌株 (ATCC14028),购自中国检验检疫科学研究院菌种保藏中心;实验所用生虾样品,购自广州当地水产市场。

#### 1.1.2 主要试剂

胰蛋白胨大豆肉汤培养基 (TSB)、胰酪胨大豆琼脂 (TSA)、木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂 (XLD),购自青岛海博科技公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒,购自北京天根生化科技有限公司;AllMagPM3-2 磁珠 (180 nm),购自上海奥润微纳新材料科技有限公司;BacTrace<sup>®</sup> anti-Salmonella 多克隆抗体,购自美国 KPL 公司;1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC)、N-羟基丁二酰亚胺 (NHS),购自北京百灵威科技有限公司;牛血清白蛋白 (BSA),购自美国 GeneMay 公司;沙门氏菌国标法检测所需培养基,参考国标 GB/T 4789.4-2010<sup>[13]</sup> 配制。

#### 1.1.3 主要仪器

7500 Fast 荧光定量 PCR 仪,购自美国 ABI (Applied Biosystem) 公司;磁力架,购自天津倍思乐色谱技术开发中心;台式高速冷冻离心机,购自德国 Eppendorf 公司;HZQ-F100 恒温振荡培养箱,购自哈尔滨市东联生化仪器有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 免疫磁珠制备

磁珠选用上海奥润微纳新材料科技有限公司的纳米级磁珠 AllMagPM3-2。抗体选用美国 KPL 公司的 BacTrace<sup>®</sup> 亲和纯化的羊抗沙门氏菌抗体 (CSA-1) 抗体,该抗体是由多种不同血清型沙门氏菌免疫的山羊血清中分离纯化而得,属于多克隆抗体,可特异性结合血清型 A, B, C, D, E, G 的沙门氏菌。磁珠和抗体均按其说明书,储存备用。

取 1 mg 磁珠于 1.5 mL 离心管中,用 1 mL PBS 缓冲液洗涤 2 次后,重悬于 100  $\mu$ L PBS 缓冲液中;加入 400  $\mu$ L 新配制的 5 mg/mL EDC 和 5 mg/mL NHS 混合溶液,充分混合,37  $^{\circ}$ C 活化磁珠 30 min, PBS 缓冲液洗涤 2 次。将活化好的磁珠与 50  $\mu$ g 多克隆抗体混合,37  $^{\circ}$ C 偶联 2.5 h,偶联完成后移去多余液体,加 1% BSA 于 37  $^{\circ}$ C 封闭 30 min, PBS 缓冲液洗涤 2 次,用 200  $\mu$ L PBS 缓冲液重悬。

### 1.2.2 免疫磁珠富集条件优化

#### 1.2.2.1 免疫磁珠最适添加量的确定

实际生活中样品所受污染常常是由多种不同血清型的沙门氏菌造成的。本文选取 4 株较为代表性的沙门氏菌,鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella Typhimurium*, S.T)、猪霍乱沙门氏菌 (*Salmonella Choleraesuis*, S.C)、

肠炎沙门氏菌 (*Salmonella Enteritidis*, S.E) 和甲型副伤寒沙门氏菌 (*Salmonella Paratyphi A*, S.P), 用其分别培养后的等量混合菌液进行免疫磁珠富集条件的优化。

用接种环分别沾取甘油管保存的 4 株沙门氏菌, 在 TSA 平板上划线, 于 37 °C 培养 24 h。各挑取单菌落接种于 TSB 中, 37 °C 180 r/min 过夜培养, 用无菌水将菌液浓度调整至 10<sup>4</sup> CFU/mL 后等量混合。分别取制备的沙门氏菌免疫磁珠 20、50、80、100、120、150 μL, 加入到 1 mL 菌液中, 充分混匀后于 37 °C, 80 r/min 富集 30 min, 将离心管插到磁力架上翻转 5 min, 然后静止 3 min, 待磁珠充分被吸附在管壁上, 弃上清液; 加入无菌的 PBS-Tween 20 1 mL, 洗涤免疫磁珠复合物, 重复 2 次; 最后用 1 mL 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 重悬。免疫磁珠作用前和作用后的菌液分别经适当梯度稀释后, 吸取 100 μL 涂布于 XLD 平板, 37 °C 培养 24 h, 通过平板计数法计算菌液浓度, 按下列公式计算捕获率。

免疫磁珠捕获率 (%) = (磁分离后的菌落总数/磁分离前菌落总数) × 100%

#### 1.2.2.2 免疫磁珠与菌液最佳反应时间的确定

取沙门氏菌免疫磁珠各 100 μL, 分别加入到 1 mL 浓度调整为 10<sup>4</sup> CFU/mL 的菌液中, 充分混匀后 37 °C, 80 r/min 分别富集 15、30、45、60 min, 将离心管插到磁力架上翻转 5 min, 然后静止 3 min, 待磁珠充分被吸附在管壁上, 弃上清液; 加入无菌的 PBS-Tween20 1 mL, 洗涤免疫磁珠复合物, 重复 2 次; 最后用 1 mL 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 重悬。经适当梯度稀释后, 吸取 100 μL 涂布于 XLD 平板, 37 °C 培养 24 h, 观察菌落并计数。

#### 1.2.3 免疫磁珠捕获率

##### 1.2.3.1 免疫磁珠对 4 株沙门氏菌捕获率的比较

鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella Typhimurium*, S.T)、猪霍乱沙门氏菌 (*Salmonella Choleraesuis*, S.C)、肠炎沙门氏菌 (*Salmonella Enteritidis*, S.E) 和甲型副伤寒沙门氏菌 (*Salmonella Paratyphi A*, S.P) 分别接种至 TSB 中, 37 °C 过夜培养, 用无菌水将菌液浓度调整为 10<sup>4</sup> CFU/mL。分别取 1 mL 菌液加入免疫磁珠, 按上述优化所得条件富集目的菌, 涂 XLD 平板进行菌落计数, 计算捕获率。

##### 1.2.3.2 背景菌对免疫磁珠捕获率的影响

将鼠伤寒沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、甲型副伤寒沙门氏菌和肠炎沙门氏菌分别接种至 TSB 中, 37 °C 过夜培养, 用无菌水进行梯度稀释, 得浓度为 10<sup>6</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>2</sup> CFU/mL 的菌悬液。大肠埃希菌

O157:H7、副溶血型弧菌、单增李斯特菌和金黄葡萄球菌分别接种至 TSB 中, 37 °C 过夜培养, 用无菌水将浓度调整为 10<sup>6</sup> CFU/mL, 各取 1 mL 混合均匀, 得浓度为 10<sup>6</sup> CFU/mL 的杂菌悬液。将 4 株沙门氏菌不同浓度的菌悬液与杂菌悬液等体积混合, 分别取 1 mL 混合菌液加入免疫磁珠, 按上述优化所得条件富集目的菌, 涂 XLD 平板进行菌落计数, 计算捕获率。

#### 1.2.4 实时荧光 PCR 检测

##### 1.2.4.1 DNA 模板制备及引物、探针的合成

样品菌液经免疫磁珠富集分离后, 参照 DNA 提取试剂盒的说明制备 DNA 模板, -20 °C 保存。

选择沙门氏菌 *ttr* 位点为靶基因<sup>[14]</sup>, 由上海辉睿生物科技有限公司合成引物和探针。上游引物 (Pf): 5'-CTCACCAGGAGATTACAACATGG-3', 下游引物 (Pr): 5'-AGCTCAGACCAAAAAGTGACCATC-3', TaqMan 探针 (Pb): FAM-5'-CACCGACGCGGAGACCGACTTT-3'-BHQ1。用无菌超纯水稀释成 10 μmol/L, -20 °C 保存备用。

##### 1.2.4.2 实时荧光 PCR 反应体系

采用 20 μL 的反应体系, 其中 2×PremixTaq (TaKaRa) 10 μL, 上、下游引物各 0.2 μmol/L, TaqMan 探针 0.35 μmol/L, DNA 2 μL, 补齐 ddH<sub>2</sub>O 至 20 μL。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。每次检测时均设阴性对照、阳性对照和空白对照。

#### 1.2.5 免疫磁珠-实时荧光 PCR 方法特异性

将鼠伤寒沙门氏菌, 大肠埃希菌 O157:H7、阪崎肠杆菌、大肠杆菌、空肠弯曲菌、副溶血型弧菌、单增李斯特菌、金黄葡萄球菌、猪霍乱沙门氏菌、甲型副伤寒沙门氏菌、肠炎沙门氏菌分别接种于 TSB 中, 37 °C 过夜培养, 用建立的 IMS-Real time PCR 方法检测。

#### 1.2.6 免疫磁珠-实时荧光 PCR 方法灵敏度

将鼠伤寒沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、甲型副伤寒沙门氏菌和肠炎沙门氏菌分别接种至 TSB 中, 37 °C 过夜培养, 用无菌水梯度稀释, 取合适梯度涂 TSA 平板进行计数, 调整菌液浓度; 同时取 25 g 从水产市场购买的刀额新对虾于无菌均质袋中, 将 1 mL 浓度调整为 10<sup>0</sup>~10<sup>4</sup> CFU/mL 的菌悬液分别接种至虾上, 静置 15 min, 使菌附着于虾上。实验所用虾样品已经国标法鉴定不含沙门氏菌。将接种后的虾用 TSB 以 1:2 进行稀释, 37 °C 增菌 3 h, 用建立的 IMS-Real time PCR 方法检测, 确定该方法检测虾中沙门氏菌的检测限。

#### 1.2.7 实际样品检测

从广州当地各水产市场购买 40 份生虾样品并编号, 置于 2~8 °C 采样箱中送实验室检验。用建立的 IMS-Real time PCR 方法和国标法进行检测, 对比结果。

## 2 结果与讨论

### 2.1 免疫磁珠最适添加量的确定

按 1.2.2.1 中操作, 添加不同量的免疫磁珠, 观察细菌生长状态的实验结果如表 1 所示。一般实际样品中沙门氏菌的污染水平较低, 为更接近现实生活中食品沙门氏菌的污染水平, 同时基于后续实验建立的 IMS-Real time PCR 方法有短暂增菌过程的考虑, 选择

较低浓度  $10^4$  CFU/mL 的目标菌对免疫磁珠的富集条件进行优化。从实验数据可以看出, 随着免疫磁珠添加量的增加, 该反应对细菌数的吸附能力也逐渐增强, 细菌的生长状态在免疫磁珠的添加量为 100  $\mu$ L 时达到最好; 若继续增加过量的免疫磁珠, 则会导致非特异性反应的增加, 而影响对目标细菌的特异吸附和细菌的生长状态。故选用 100  $\mu$ L 作为免疫磁珠的最适添加量。

### 2.2 免疫磁珠与菌液最佳反应时间的确定

按 1.2.2.2 中操作, 免疫磁珠与菌液进行不同时间的反应, 观察的细菌生长状态的实验结果如表 2 所示。

表 1 免疫磁珠的最适添加量

Table 1 Optimal addition amount of immunomagnetic bead

免疫磁珠添加量/ $\mu$ L	磁分离前菌落总数/(CFU/mL)	磁分离后菌落总数/(CFU/mL)	捕获率/(%)
20	$2.85 \times 10^4$	$4.1 \times 10^3$	14.5 $\pm$ 0.5
50	$2.85 \times 10^4$	$1.12 \times 10^4$	39.4 $\pm$ 0.9
80	$2.85 \times 10^4$	$1.66 \times 10^4$	58.3 $\pm$ 1.1
100	$2.85 \times 10^4$	$2.4 \times 10^4$	84.4 $\pm$ 1.1
120	$2.85 \times 10^4$	$2.14 \times 10^4$	75.3 $\pm$ 2
150	$2.85 \times 10^4$	$1.37 \times 10^4$	48.2 $\pm$ 1.5

表 2 免疫磁珠与菌液的最佳反应时间

Table 2 Optimal reaction time of salmonella and immunomagnetic beads

反应时间/min	磁分离前菌落总数/(CFU/mL)	磁分离后菌落总数/(CFU/mL)	捕获率/(%)
15	$3.17 \times 10^4$	$1.61 \times 10^4$	50.9 $\pm$ 1.2
30	$3.17 \times 10^4$	$2.62 \times 10^4$	82.9 $\pm$ 0.7
45	$3.17 \times 10^4$	$2.42 \times 10^4$	76.4 $\pm$ 1
60	$3.17 \times 10^4$	$1.95 \times 10^4$	61.6 $\pm$ 0.5

免疫磁珠对目标菌的富集是基于抗原抗体的结合, 需要一段时间的充分接触和反应, 反应时间过短或是过长都不利于目标菌的富集。免疫磁珠与菌液反应的时间过短, 细菌与免疫磁珠结合不充分; 若反应时间过长, 则可能由于整个过程都在轻摇振荡而使细菌与免疫磁珠脱离, 同时也可能增加非特异性反应。从上述结果看, 免疫磁珠与菌液反应时间为 30 min 时, 细菌的生长状态最佳, 随着反应时间延长, 免疫磁珠与目标菌的特异性反应受到一定影响。故确定免疫磁珠与菌液反应的最佳时间为 30 min。

### 2.3 免疫磁珠对 4 株沙门氏菌的捕获率比较

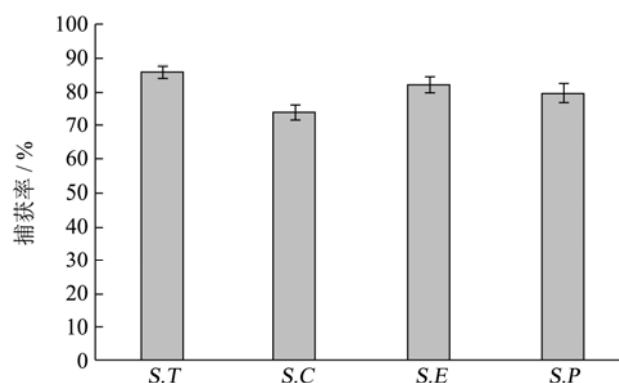


图 1 不同菌株捕获率比较

Fig.1 Comparison of the capture rates of different strains

制备免疫磁珠所用抗体为多克隆抗体。因多克隆抗体中不同的抗体分子可以不同的亲和能力与抗原分子表面的抗原决定簇相结合,故免疫磁珠对不同菌株的沙门氏菌的捕获能力有所不同。为探究免疫磁珠的捕获能力,本实验选取了鼠伤寒沙门氏菌、肠炎沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌和甲型副伤寒沙门氏菌等4株代表性的沙门氏菌,过夜培养,调整浓度为 $10^4$  CFU/mL后加入免疫磁珠进行捕获,结果如图1所示。捕获率由大到小依次为鼠伤寒沙门氏菌(S.T)86.3%、肠炎沙门氏菌(S.E)82.2%、甲型副伤寒沙门氏菌(S.P)79.5%及猪霍乱沙门氏菌(S.C)74.6%。

### 2.4 背景菌对免疫磁珠捕获率的影响

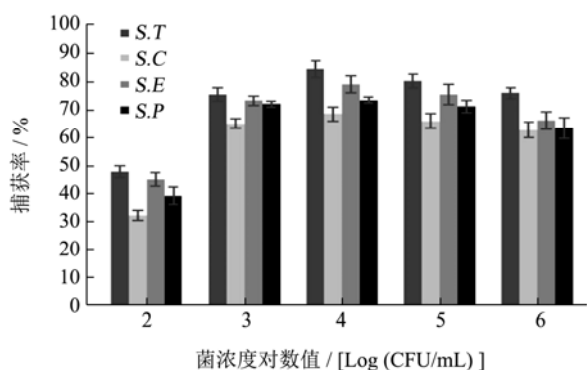


图2 相同背景菌浓度下不同菌浓度捕获率比较

Fig.2 Comparison of the capture rates of different concentration of *Salmonella* with the same concentration of background bacteria

食品基质较为复杂,一般所检测目标菌与其他背景杂菌共存,背景菌可能会对免疫磁珠的特异性吸附造成一定影响,对不同菌株、不同菌浓度影响有所不同。从图2可以看出,在 $10^6$  CFU/mL高浓度背景菌存在的条件下,免疫磁珠对 $10^2$  CFU/mL目标菌的捕获可能由于目标菌与背景菌的浓度悬殊较大,有一定的非特异性吸附且目标菌富集清洗过程中有损失,其捕获率较低(36.2%~47.9%),但仍能有效分离出目标菌。随着目标菌浓度的增大,免疫磁珠的捕获率逐渐升高,当目标菌浓度达到 $10^4$  CFU/mL时免疫磁珠的捕获率趋于稳定,对4株沙门氏菌的捕获率均达68%以上;再增大目标菌浓度,背景菌对捕获率的影响不大,这说明免疫磁珠对目标菌的特异性吸附具有饱和性,在非饱和状态下,目标菌浓度增加,磁珠的吸附菌量也会提升,达到饱和后的吸附率不随目标菌浓度的增高而增加。免疫磁珠对各浓度下4株不同沙门氏菌的捕获能力也不同,其中对鼠伤寒沙门氏菌的捕获率最高,47.9%~84.8%;对猪霍乱沙门氏菌的捕获率最低,36.2%~68.6%。

### 2.5 IMS-Real time PCR 方法的特异性

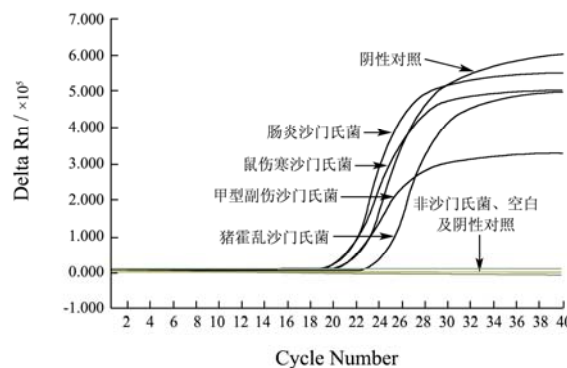


图3 IMS-Real time PCR 方法的特异性

Fig.3 Specificity of IMS-real time PCR

注:阳性对照:沙门氏菌标准菌株 DNA;阴性对照:大肠杆菌 DNA;空白对照: ddH<sub>2</sub>O。

将4株沙门氏菌和7株非沙门氏菌分别培养,用建立的IMS-Real time PCR方法检测,结果如图3所示,4株沙门氏菌均有强烈扩增信号,7株非沙门氏菌则没有扩增信号,这说明该方法对于沙门氏菌有很好的特异性,能够特异性检测沙门氏菌。免疫磁珠富集是利用抗原抗体的特异性反应消除基质干扰,实现从复杂样品中富集目标菌<sup>[7]</sup>。实时荧光PCR技术是一种在DNA扩增反应中,以荧光化学物质测每次PCR循环后产物总量的方法,是利用DNA杂交的高特异性和光谱技术的高精确性,使其具有更高的特异性。故建立的IMS-Real time PCR检测方法的特异性主要取决于相应检测靶基因的选择。目前,在沙门氏菌的PCR检测中被作为检测靶基因广泛应用的主要有*sal*基因、*rjb*基因、*hilA*基因及位于沙门氏菌毒力岛1(SPI-1)上的*invA*基因、质粒毒力相关的*spv*基因等<sup>[10,15,16]</sup>,但同时有报道称有些会因这些毒力基因的丢失而导致PCR检测结果出现假阳性、假阴性<sup>[14,17]</sup>。而本研究建立的IMS-Real time PCR方法选择*ttr*基因作为检测靶基因,是由于*ttr*基因与沙门氏菌特征性的连四硫酸盐呼吸相关,是沙门氏菌生命周期中不可缺少的,在遗传上稳定存在于所有沙门氏菌菌株中<sup>[14]</sup>,从而具有一定的优势。实验结果证实了以*ttr*基因为靶基因设计建立的IMS-Real time PCR方法对沙门氏菌的检测具有较好的特异性。

### 2.6 IMS-Real time PCR 方法检测虾中沙门氏菌检测限的确定

取过夜培养的各沙门氏菌菌悬液,用无菌水调整菌液浓度至 $1 \times 10^8$  CFU/mL,再稀释成浓度为 $10^0 \sim 10^4$

CFU/mL 的菌液, 取 1 mL 各菌株不同浓度的菌液按 1.2.6 中的描述接种至虾样品中, 用建立的 IMS-Real time PCR 方法检测, 能检测到的各菌株的最低浓度即为该方法对应的检测限。检测结果以  $C_t$  值显示, 其中

$C_t$  值小于等于 35, 且曲线有明显的指数期增长, 则测定结果有效, 可直接报告样本阳性;  $C_t$  值大于 35 且小于 38, 需重复验证; 检测不到或  $C_t$  值达 38, 报告样本阴性。报告如表 3 所示。

表 3 免疫磁珠分离-实时荧光 PCR 人工污染样品检测结果

Table 3 Detection results of IMS-real time PCR for *Salmonella* in shrimp

样品染菌浓度/(CFU/mL)	菌株			
	鼠伤寒沙门氏菌(S.T)	猪霍乱沙门氏菌(S.C)	肠炎沙门氏菌(S.E)	甲型副伤寒沙门氏菌(S.P)
$1 \times 10^4$	+	+	+	+
$5 \times 10^3$	+	+	+	+
$2.5 \times 10^3$	+	+	+	+
$1 \times 10^3$	+	+	+	+
$5 \times 10^2$	+	+	+	+
$2.5 \times 10^2$	+	-	+	+
$1 \times 10^2$	+	-	+	+
$5 \times 10^1$	+	-	-	-
$2.5 \times 10^1$	-	-	-	-
$1 \times 10^1$	-	-	-	-
$5 \times 10^0$	-	-	-	-
$2.5 \times 10^0$	-	-	-	-
0	-	-	-	-

注: +: 阳性结果; -: 阴性结果。

结果显示, 当样品中目标菌的初始达  $5 \times 10^2$  CFU/25 g 时, 4 株沙门氏菌均可被建立的 IMS-Real time PCR 方法检测到。4 株沙门氏菌对应的该方法的检测限稍有不同, 鼠伤寒沙门氏菌的最低,  $5 \times 10^1$  CFU/25 g; 肠炎沙门氏菌和甲型副伤寒沙门氏菌的次之,  $1 \times 10^2$  CFU/25 g; 猪霍乱沙门氏菌的为  $5 \times 10^2$  CFU/25 g。建立的 IMS-Real time PCR 方法检测过程中对样品进行了 3 h 的增菌, 检测全程可在 6 h 内完成, 相比于传统平板法和普通 PCR 等检测方法, 其检测时间明显缩短, 检测灵敏度有所提高。

IMS-Real time PCR 方法结合了免疫磁珠分离技术和实时荧光 PCR 技术两种技术的优点, 既大大缩短了时间又提高了检测的灵敏度。目前国内外已有多篇关于 IMS-real time PCR 检测食品中沙门氏菌的报道。杨小鹏等<sup>[18]</sup>将免疫磁珠分离技术与荧光定量 PCR 技术相结合, 对 150 份食源样品进行沙门氏菌检测, 结果比传统方法多检出 13 份阳性样品, 全程用时约 8 h。张东方等<sup>[19]</sup>建立了检测鸡肉中沙门氏菌的免疫磁捕获-实时荧光 PCR 方法, 能在 16 h 内检测出鸡肉中  $10^4$  CFU/mL 的沙门氏菌。Bakthavathsalam 等<sup>[20]</sup>用 IMS-real time PCR 检测牛奶和柠檬汁中的沙门氏菌, 3 h~4 h 内可检测  $10^3$  CFU/mL 的沙门氏菌。Zheng 等<sup>[21]</sup>联合荧光定量 PCR 和免疫磁珠分离技术建立的

PCR-IMS 方法, 分别经 7 h 和 14 h 的增菌后可检测鸭翅中  $10^1 \sim 10^0$  CFU/25 g 正常的沙门氏菌和热受损的沙门氏菌。与上述方法相比, 本文主要探究了以虾作食品基质时所建立的 IMS-real time PCR 方法对 4 株常见沙门氏菌的捕获能力、检测特异性及灵敏度; 同时建立的 IMS-real time PCR 方法中用 TSB 对样品进行 1:2 稀释、增菌代替一般方法中以营养肉汤或蛋白胨水对样品进行的 1:10 稀释、增菌, 相应增大了免疫磁珠富集时所取的 1 mL 样品菌液中目标菌含量, 从而相对提高了检测灵敏度, 缩短了增菌时间。

## 2.7 实际样品检测结果比较

将从当地水产市场购得的 40 份样品按品种编号, 每份均用建立的 IMS-real time PCR 方法和国标法(GB 4789.4-2010) 两种方法检测。IMS-real time PCR 方法的检测结果的判断标准同上述 2.6, 国标法的结果按 GB 4789.4-2010 中所述进行判定, 即用亚硒酸盐胱氨酸(SC) 增菌液和四硫磺酸钠煌绿(TTB) 增菌液选择性增菌后, 分别划线于木糖赖氨酸脱氧胆盐(XLD) 琼脂平板和亚硫酸铋(BS) 琼脂平板, 挑取可疑菌落用三糖铁(TSI) 琼脂, 蛋白胨水、靛基质试剂, 尿素琼脂(pH 7.2), 氰化钾(KCN) 培养基和赖氨酸脱羧酶试验培养基等进行生化鉴定。两种检测方法的结果比

较见表 4。

从表 4 中可知, IMS-real time PCR 方法的检测结果为 2 份阳性, 分别是 12 号的斑节虾和 28 号的南美

白对虾, 与国标法对比, 检测结果完全一致, 验证了 IMS-real time PCR 方法的准确性。

表 4 40 份实际生虾样品的两种检测方法检测结果比较

Table 4 Comparison of the two methods in 40 raw shrimp samples

生虾样品编号及品种	IMS-real time PCR 法检测	国标 GB/T 4789.4-2010 法检测
1~8 (刀额新对虾)	-	-
9~11 (斑节虾)	-	-
12 (斑节虾)	+	+
13~16 (斑节虾)	-	-
17~24 (青虾)	-	-
25~27 (南美白对虾)	-	-
28 (南美白对虾)	+	+
29~32 (南美白对虾)	-	-
33~40 (白虾)	-	-

注: +: 阳性结果; -: 阴性结果。

### 3 结论

3.1 免疫磁珠分离技术与实时荧光 PCR 联用可以充分发挥两种技术的优点, 在食品检测中得到广泛应用。免疫磁珠是利用自身偶联的抗体与目标菌结合来实现对目标菌的富集, 其过程受样品基质、反应时间、磁珠添加量等多种因素的影响。实际应用中免疫磁珠的捕获性能可能因检测样品的种类不同, 检测的目标菌不同而有所差别; 同时免疫磁珠制备多采用多克隆抗体, 而靶细胞表面有多个抗原决定簇, 对同一菌属的不同菌株都会有不同程度的吸附作用。目前有关报道多是对一种沙门氏菌免疫磁珠-实时荧光 PCR 检测的研究, 对多种沙门氏菌进行系统研究的较少。本实验对制备的沙门氏菌免疫磁珠的富集条件进行优化后, 选取了 4 株代表性的沙门氏菌对免疫磁珠的捕获性能进行评价, 对较低浓度  $10^4$  CFU/mL 的目标菌均有较好的捕获能力, 捕获率分别为鼠伤寒沙门氏菌 86.3%、肠炎沙门氏菌 82.2%、甲型副伤寒沙门氏菌 79.5% 及猪霍乱沙门氏菌 74.6%; 在浓度为  $10^6$  CFU/mL 背景杂菌存在下, 仍能有效分离出低浓度的目标菌。建立的 IMS-real time PCR 方法对 4 株沙门氏菌都有高度特异性, 经过 3 h 增菌后, 在虾中的检测限为鼠伤寒沙门氏菌  $5 \times 10^1$  CFU/25 g, 肠炎沙门氏菌和甲型副伤寒沙门氏菌  $1 \times 10^2$  CFU/25 g, 猪霍乱沙门氏菌  $5 \times 10^2$  CFU/25 g, 检测全程可在 6 h 内完成, 与传统方法相比, 大大缩短了检测时间, 检测灵敏度有所提高, 同时实际样品的检测结果验证了该方法准确性。

3.2 本研究建立的 IMS-real time PCR 检测方法快速、灵敏、准确且易操作, 可作为食品质量安全监控的一

种检测手段, 为监控虾或其他水产品中沙门氏菌的污染情况以及突发公共卫生事件快速诊断和防控提供了科学的技术支撑, 对控制因沙门氏菌污染而引起食源性疾病的暴发流行、保障经济的发展有一定的现实意义。

### 参考文献

- [1] Wang J J, Sun W S, Jin M T, et al. Fate of *Vibrio parahaemolyticus* on shrimp after acidic electrolyzed water treatment [J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 179(22): 50-56
- [2] Amagliani G, Brandi G, Schiavano G F. Incidence and role of *Salmonella* in seafood safety [J]. Food Research International, 2012, 45(2): 780-788
- [3] Ma K, Deng Y, Bai Y, et al. Rapid and simultaneous detection of *Salmonella*, *Shigella*, and *Staphylococcus aureus* in fresh pork using a multiplex real-time PCR assay based on immunomagnetic separation [J]. Food Control, 2014, 42(3): 87-93
- [4] Lusk T S, Strain E, Kase J A. Comparison of six commercial DNA extraction kits for detection of *Brucella neotomae* in Mexican and Central American-style cheese and other milk products [J]. Food Microbiol., 2013, 34(1): 100-105
- [5] Park S H, Aydin M, Khatiwara A, et al. Current and emerging technologies for rapid detection and characterization of *Salmonella* in poultry and poultry products [J]. Food Microbiol., 2014, 38(4): 250-262
- [6] Foddai A, Elliott C T, Grant I R. Maximizing capture efficiency and specificity of magnetic separation for

- Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis cells [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2010, 76(22): 7550-7558
- [7] Fedio W M, Jinneman K C, Yoshitomi K J, et al. Detection of *E. coli* O157:H7 in raw ground beef by Pathatrix? immunomagnetic-separation, real-time PCR and cultural methods [J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 148(2): 87-92
- [8] Shields M J, Hahn K R, Janzen T W, et al. Immunomagnetic capture of *Bacillus anthracis* spores from food [J]. Journal of Food Protection. 2012, 75(7): 1243-1248
- [9] Hyeon J, Deng X. Rapid detection of *Salmonella* in raw chicken breast using real-time PCR combined with immunomagnetic separation and whole genome amplification [J]. Food Microbiology, 2017, 63: 111-116
- [10] Zheng Q, Mikš-Krajnik M, Yang Y, et al. Evaluation of real-time PCR coupled with immunomagnetic separation or centrifugation for the detection of healthy and sanitizer-injured *Salmonella* spp. on mung bean sprouts [J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 222: 48-55
- [11] Mercanoglu B, Griffiths M W. Combination of immunomagnetic separation with real-time PCR for rapid detection of *Salmonella* in milk, ground beef, and alfalfa sprouts [J]. J. Food Prot, 2005, 68(3): 557-561
- [12] Rodriguez-Lazaro D, Gonzalez-García P, Delibato E, et al. Next day *Salmonella* spp. detection method based on real-time PCR for meat, dairy and vegetable food products [J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 184(4): 113-120
- [13] 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]
- [14] Malorny B, Paccassoni E, Fach P, et al. Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2004, 70(12): 7046-7052
- [15] Gonzalez-Escalona N, Hammack T S, Russell M, et al. Detection of live *Salmonella* sp. cells in produce by a TaqMan-based quantitative reverse transcriptase real-time PCR targeting *invA* mRNA [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2009, 75(11): 3714-3720
- [16] McCabe E M, Burgess C M, O'Regan E, et al. Development and evaluation of DNA and RNA real-time assays for food analysis using the *hlyA* gene of *Salmonella enterica* subspecies *enteric* [J]. Food Microbiol., 2011, 28(3): 447-456
- [17] Kim H J, Park S H, Lee T H, et al. Identification of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium using specific PCR primers obtained by comparative genomics in *Salmonella* serovars [J]. Journal of Food Protection., 2006, 69(7): 1653-1661
- [18] 杨小鹏,李海刚,吴清平等.免疫磁捕获-荧光定量 PCR 快速检测食品中沙门氏菌[J].食品工业科技,2014,35(24):79-83  
YANG Xiao-juan, LI Hai-gang, WU Qing-ping, et al. Rapid detection of *Salmonella* in food by immunomagnetic separation-real-time PCR assay [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(24): 79-83
- [19] 张东方,袁飞,王娉等.免疫磁捕获-实时荧光 PCR 快速检测鸡肉中沙门氏菌[J].食品与发酵工业,2011,37(8):142-147  
ZHANG Dong-fang, YUAN Fei, WANG Ping, et al. Rapid detection of *Salmonella* in chicken by immunomagnetic separation-real-time PCR assay [J]. Food and Fermentation Industries, 2011, 37(8): 142-147
- [20] Bakthavathsalam P, Rajendran V K, Saran U, et al. Immunomagnetic nanoparticle based quantitative PCR for rapid detection of *Salmonella* [J]. Microchimica Acta, 2013, 180(13-14): 1241-1248
- [21] Zheng Q, Mikš-Krajnik M, Yang Y, et al. Real-time PCR method combined with immunomagnetic separation for detecting healthy and heat-injured *Salmonella* Typhimurium on raw duck wings [J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 186: 6-13