

实时荧光环介导等温扩增技术检测猪肉中的假单胞菌

李宁^{1,2}, 张友雄², 吴清平², 古其会², 张银志¹, 王加生^{1,3}, 孙秀兰¹, 张菊梅²

(1. 江南大学食品学院, 食品科学与技术国家重点实验室, 国家功能食品工程技术研究中心, 食品安全协同创新中心, 食品安全国际联合研究实验室, 江苏无锡 214122) (2. 广东省微生物研究所, 省部共建华南应用微生物国家重点实验室, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广东广州 510070)

(3. 佐治亚大学公共卫生学院环境健康科学系, 美国佐治亚州雅典 30602)

摘要: 根据假单胞菌 16S rDNA 基因序列设计引物, 并向反应体系中加入饱和型核酸染料 Eva Green, 利用实时荧光检测仪, 建立假单胞菌属实时荧光环介导等温扩增技术 (LAMP)。研究中对 62 株假单胞菌的 16S rDNA 基因通过 DNAMAN 软件进行序列比对后, 针对共有片段设计扩增引物。对扩增体系进行了优化, 优化结果经电泳鉴定。通过 12 株假单胞菌和 23 株非假单胞菌进行特异性验证, 并比较了实时荧光 LAMP 与普通 LAMP 的灵敏度, 对人工污染样品的检出限进行了测定。结果表明, 特异性验证中 12 株假单胞菌为阳性, 23 株非假单胞菌为阴性。实时荧光 LAMP 检测纯菌的灵敏度为 36 CFU/mL, 是普通 LAMP 灵敏度的 10 倍。人工污染样品的检出限为 1.73×10^3 CFU/g。本研究建立了一种检测冷鲜猪肉中假单胞菌属的方法, 实现了多个菌种的同时检测, 避免了一菌种检测的局限性, 该方法快速、准确、灵敏度高, 可在 2 h 内完成冷鲜猪肉中假单胞菌的检测。

关键词: 实时荧光环介导等温扩增; 假单胞菌; 检测; 猪肉

文章编号: 1673-9078(2019)06-264-272

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.6.035

Detection of *Pseudomonas* in Pork by Real-Time Fluorescence Loop-Mediated Isothermal Amplification Method

LI Ning^{1,2}, ZHANG You-xiong², WU Qing-ping², GU Qi-hui², ZHANG Yin-zhi¹, WANG Jia-sheng^{1,3}, SUN Xiu-lan¹, ZHANG Ju-mei²

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, National Engineering Research Center for Functional Foods, Synergetic Innovation Center of Food Safety, Joint International Research Laboratory on Food Safety, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China) (2. State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China)

(3. Univ Georgia, Dept Environm Hlth Sci, Athens, GA 30602, USA)

Abstract: In this work, a real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay was established to detect *Pseudomonas* in pork. Based on the published 16S rDNA gene sequence, the 16S rDNA genes of 62 strains of *Pseudomonas* were sequenced by DNAMAN software to obtain the consensus fragment, which was used to design primers. The saturated nucleic acid dye Eva Green was added to the reaction system, which allowed amplification products to be measured by real-time fluorescence platforms. The amplification system was optimized and the optimization results were identified by electrophoresis. The specificity and sensitivity was compared with ordinary LAMP, and the detection limit of artificially contaminated pork was determined. The results showed that 12 strains of *Pseudomonas* are positive in the specific verification and 23 strains of non-*Pseudomonas* are negative. The sensitivity for *Pseudomonas* is 36 CFU/mL in pure cultures, which is 10 times more sensitive than the ordinary LAMP. The detection limit of artificially contaminated samples is 1.73×10^3 CFU/g. In this work, a

收稿日期: 2019-02-20

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2016YFD0401204); 广东省科技计划项目 (2016A010105012); 广东省科学院创新驱动发展能力建设专项 (2017GDASCX-0201)

作者简介: 李宁 (1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全检测与评价

通讯作者: 孙秀兰 (1976-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全检测与评价; 张菊梅 (1968-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 食品微生物安全监测与控制

method for detecting *Pseudomonas* in refrigerated pork was established, which can simultaneously detect *Pseudomonas spp.* and avoid the limitations of single species detection. The real-time fluorescent LAMP detection technology established in this work is less time-consuming, accurate and has high specificity and sensitivity. *Pseudomonas* in fresh pork could be detected within 2 hours by this method.

Key words: real-time fluorescent loop-mediated isothermal amplification; *Pseudomonas*; detection; pork

冷鲜猪肉是我国肉类产品中主要的消费对象^[1], 据《食品工业发展报告(2016年度)》指出, 猪肉在肉类总产量中所占的比例为62%。导致生鲜肉腐败的微生物主要来源于环境, 如养殖场的生态水平和植被情况、屠宰和加工过程的用具以及包装和储运的条件^[2]。冷鲜肉营养丰富, 富含水(71%~76%)、蛋白质(20%~22%)、脂质(3%~8%)等^[3], 这些为耐低温微生物的生长提供了有利的条件, 从而导致冷鲜肉极易腐败。据统计, 我国的肉类和水产品腐败率高达10%~15%, 造成巨大的经济损失^[4]。由于微生物造成的污染不可避免, 因此对生鲜肉中的微生物进行实时的检测显得尤为重要。

常见的腐败微生物包括假单胞菌、沙雷氏菌、不动杆菌、热杀索丝菌等^[5-7], 其中假单胞菌是有氧储存和气调包装冷鲜肉中常见的腐败微生物^[5,8]。假单胞菌不仅会造成冷鲜肉的腐败, 而且某些菌株还是常见的食源性致病菌, 比如铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putid*)等^[9]。造成食品腐败的假单胞菌并非单一菌种作用的结果, 而是多种假单胞菌共同作用的结果, 因此, 对冷鲜肉中的假单胞菌进行属水平上的检测非常重要。

目前微生物的检测方法主要包括两大类, 一是基于培养基的传统培养法, 二是基于非培养基的检测法, 主要包含 ATP 生物发光检测技术、聚合酶链式反应(PCR)检测技术、流式细胞仪检测技术、电化学检测技术以及环介导等温扩增技术(LAMP)等方法^[10-14]。ATP 生物发光检测技术可以对微生物总数进行计数, 但是该方法易受背景信号的影响。PCR 检测技术快速灵敏, 但是由于食品中存在较多的 PCR 抑制剂, 因此该技术需要高纯度的 DNA 作为模板^[15]。流式细胞仪检测技术具有高分辨能力, 可以对微生物进行精确的鉴定, 但是该技术成本高、对样品种类具有局限性^[16]。电化学检测法可以实现自动化的检测, 但灵敏度低、检测成本高^[17]。LAMP 技术是在等温条件下(60~65 °C)对 DNA 进行扩增, 通过四条引物特异性地识别目标片段的六个不同区域^[18], 扩增效率高, 特异性强。而且该技术检测冷鲜猪肉中假单胞菌属的方法还未曾报道。

本研究应用 Eva Green 核酸饱和染料, 建立检测

假单胞菌属的实时荧光环介导等温扩增技术, 快速准确地检测冷鲜猪肉中假单胞菌属, 为延长冷鲜肉的货架期提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

实验中所用菌株均为本实验室保存。

1.1.2 材料与试剂

NB 肉汤, 购自广东环凯微生物科技有限公司; 假单胞菌 CFC 选择性培养基, 购自青岛海博生物技术有限公司; 氯化钠, 购自广州化学试剂厂; Bst 2.0 WarmStart[®] DNA 聚合酶、100 mM MgSO₄ 溶液、10× Isothermal Amplification Buffer, 均购自新西兰 Biolabs 公司; 10 mM dNTPs, 购自广州东盛生物科技有限公司; 5 M 甜菜碱(Betaine), 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; Eva Green 荧光染料, 购自上海翊圣生物科技有限公司; DNA 提取试剂盒 HiPure Bacterial DNA kit, 购自广州美基(Magen)生物科技有限公司; 引物, 购自广州擎科生物技术有限公司。

1.1.3 仪器设备

PowerPac Basic 电泳仪, 美国 Bio-Rad 公司; Tanon-2500 凝胶图像处理系统, 上海天能科技有限公司; CP 0710 无菌均质袋、SHP-250 型生化培养箱、HK-C2S 型垂直洁净工作台、WBK-4B 型电热恒温水浴锅, 广东环凯微生物科技有限公司; Microfuge[®]16 台式离心机, 美国 Beckman Coulter 公司; JJ500 型电子天平, 常熟市双杰测试仪器厂; SD-JR08D 型绞肉机, 三的电器制造有限公司; Biometra TOne 96G 普通 PCR 仪, 德国耶拿分析仪器股份有限公司; Light Cycler[®]96 荧光定量扩增仪, 罗氏诊断产品有限公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

针对假单胞菌属的 16S rDNA 基因, 采用 DNAMAN 8 软件对 62 株假单胞菌, 包括 40 个种, 进行序列比对。对假单胞菌属 16S rDNA 共有片段在线设计(<http://primerexplorer.jp/e>)引物, 包括两条外引物(F3/B3), 两条内引物(FIP/BIP), 一条环引物

(LF)。引物由广州擎科生物技术有限公司合成。引物信息详见表1。

表1 环介导等温扩增引物

Table 1 Primers used in the LAMP

| 引物 | 序列 (5'-3') |
|-----|---|
| F3 | GGTGACAAACCGGAGGAAG |
| B3 | AGGCCCGGAACGTATT |
| FIP | ACCGACCATTGTAGCACGTGTG-GTGGGGATGACGTCAAGTCA |
| BIP | CAAGCCGCGAGGTGGAGCTAAT-CGAGTTGCAGACTGCGATC |
| F2 | GTGGGGATGACGTCAAGTCA |
| F1c | ACCGACCATTGTAGCACGTGTG |
| B2 | CGAGTTGCAGACTGCGATC |
| B1c | CAAGCCGCGAGGTGGAGCTAAT |
| LF | GGCCGTAAGGGCCATGA |

表2 实验用菌株

Table 2 Bacterial strains used in this study

| 项目 | 序号 | 菌名 | 拉丁文 | 菌株 |
|-------|----|------------|--------------------------------------|--------------|
| 假单胞菌 | 1 | 铜绿假单胞菌 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC15442 |
| | 2 | 铜绿假单胞菌 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC27853 |
| | 3 | 铜绿假单胞菌 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | CMCC10104 |
| | 4 | 铜绿假单胞菌 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC9027 |
| | 5 | 铜绿假单胞菌 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | GIM1.46 |
| | 6 | 荧光假单胞菌 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | GIM1.49 |
| | 7 | 产碱假单胞菌 | <i>Pseudomonas alcaligenes</i> | CGMCC1.1805 |
| | 8 | 类产碱假单胞菌 | <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> | CGMCC1.1806 |
| | 9 | 恶臭假单胞菌 | <i>Pseudomonas putida</i> | GIM1.57 |
| | 10 | 施氏假单胞菌 | <i>Pseudomonas stutzeri</i> | CGMCC1.1803 |
| | 11 | 门多萨假单胞菌 | <i>Pseudomonas mendocina</i> | CGMCC1.1804 |
| | 12 | 恶臭假单胞菌分离株 | <i>Pseudomonas putida</i> | 1805p |
| 非假单胞菌 | 13 | 普通变形杆菌 | <i>Proteus vulgaris</i> | CMCC(B)49027 |
| | 14 | 阴沟肠杆菌 | <i>Enterobacter cloacae</i> | CMCC(B)45301 |
| | 15 | 产气肠杆菌 | <i>Enterobacter aerogenes</i> | ATCC13048 |
| | 16 | 产气肠杆菌 | <i>Enterobacter aerogenes</i> | CMCC45103 |
| | 17 | 粘质沙雷氏菌 | <i>Serratia marcescens</i> | CMCC41002 |
| | 18 | 奇异变形杆菌 | <i>Proteus mirabilis</i> | CMCC49005 |
| | 19 | 福氏志贺氏菌 | <i>Shigella flexneri</i> | ATCC12022 |
| | 20 | 硝酸盐不动杆菌 | <i>Acinetobacter nitrate</i> | NICPBP25001 |
| | 21 | 鲍曼不动杆菌 | <i>Acinetobacter baumannii</i> | ATCC19606 |
| | 22 | 金黄色葡萄球菌 | <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC25923 |
| | 23 | 单增李斯特菌 | <i>Listeria monocytogenes</i> | ATCC19115 |
| | 24 | 小肠结肠炎耶尔森氏菌 | <i>Yersinia enterocolitica</i> | CMCC52204 |
| | 25 | 大肠杆菌 | <i>Escherichia coli</i> | ATCC25922 |
| | 26 | 肠炎沙门氏菌 | <i>Salmonella enteritidis</i> | CMCC50335 |
| | 27 | 鼠伤寒沙门氏菌 | <i>Salmonella typhimurium</i> | ATCC14028 |
| | 28 | 宋氏志贺氏菌 | <i>Shigella sonnei</i> | CMCC(B)51592 |

转下页

接上页

| | | | |
|----|------------|-------------------------------|-----------|
| 29 | 金黄色葡萄球菌 | <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC29213 |
| 30 | 阪崎肠杆菌 | <i>Enterobacter Sakazakii</i> | ATCC29544 |
| 31 | 粪肠球菌 | <i>Enterococcus faecalis</i> | ATCC29212 |
| 32 | 阪崎肠杆菌分离株 | <i>Enterobacter Sakazakii</i> | 2864c1 |
| 33 | 阪崎肠杆菌分离株 | <i>Enterobacter Sakazakii</i> | 2991w |
| 34 | 阪崎肠杆菌分离株 | <i>Enterobacter Sakazakii</i> | 1541 A1-1 |
| 35 | 金黄色葡萄球菌分离株 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 2868B2 |

1.2.2 实验菌株与菌株基因组 DNA 提取

实验中所用菌株均为实验室保存与分离的菌株, 实验中所用的假单胞菌与非假单胞菌如表 2 所示。将活化的菌株接种于 3 mL NB 肉汤中, 37℃、200 r/min 培养过夜, 取 1 mL 菌液于 1.5 mL 离心管中, 12000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 使用无菌水洗涤沉淀两次, 弃上清, 往沉淀中加入 100 μ L 无菌水, 100℃加热裂解菌体 20 min, 12000 r/min 离心 15 min 取上清, 作为 DNA 模板。

1.2.3 LAMP 扩增反应体系及条件优化

实验中 LAMP 反应体系为 25 μ L, 包括: Bst2.0 WarmStart® DNA 聚合酶, MgSO₄, 10× Isothermal Amplification Buffer, dNTPs, 甜菜碱, 外引物 F3/B3, 内引物 FIP/BIP, 环引物 LF, 模板 DNA 1 μ L, 无菌超纯水补足体系。在恒温条件 (60~65℃) 下扩增一定时间后, 85℃灭活 10 min。扩增产物通过 2% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定。模板 DNA 采用 Magen 细菌 DNA 提取试剂盒进行提取。

对影响 LAMP 扩增反应的条件进行梯度优化, 包括 Mg²⁺浓度 (2、4、6、8、10、12 mM), dNTPs 浓度 (0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0 mM), 甜菜碱浓度 (0、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4 M), 内外引物浓度比 (F3/B3: FIP/BIP=1:1、1:2、1:4、1:8、1:10、1:12、1:16, 其中, 1=0.2 μ M/L, LF: FIP/BIP=1:2), 扩增时间 (20、30、40、50、60、70 min), 退火温度 (58、59、60、61、62、63、64、65、66、67℃)。不同条件优化的结果通过凝胶电泳进行验证。

1.2.4 LAMP 扩增反应特异性

按照步骤 1.2.2 中 DNA 的提取方法, 对 12 株假单胞菌和 23 株非假单胞菌 DNA 提取, 以无菌超纯水作为空白对照, 进行 LAMP 扩增反应。扩增结果通过 2% 的琼脂糖凝胶电泳验证。

1.2.5 实时荧光 LAMP 扩增反应体系及灵敏度

实时荧光环介导等温扩增反应体系为 25 μ L, 包括: 普通 LAMP 体系中各成分 (各成分浓度为步骤 1.2.3 中优化后的最优浓度), 5×EvaGreen 饱和染料 1

μ L, 无菌超纯水补足体系。由于实时荧光 LAMP 扩增反应中煮沸法提取的模板量和纯度不如优化验证所使用试剂盒提取的模板 DNA, 因此反应体系的扩增时间设置为 90 min。

接种铜绿假单胞菌标准菌株 ATCC 27853 于 NB 肉汤中, 37℃过夜培养至菌落数约 10⁸ CFU/mL, 于假单胞菌 CFC 选择性培养基进行菌落计数, 用 0.85% 的无菌生理盐水对菌液进行 10 倍梯度稀释, 采用 1.2.2 中的方法提取每个稀释度菌液的基因组 DNA, 按照上述实时荧光环介导等温扩增反应条件进行扩增。灵敏度检测重复 3 次。

1.2.6 普通 LAMP 扩增反应的灵敏度

按照 1.2.3 优化后的 LAMP 扩增体系, 对 1.2.5 中提取的各稀释度的铜绿假单胞菌 ATCC 27853 的 DNA 模板进行普通 LAMP 扩增反应, 扩增时间为 90 min。扩增产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳验证扩增结果, 电泳条件: 120 V 恒压 30 min。灵敏度检测重复 3 次。

1.2.7 人工污染新鲜猪肉样品

新鲜猪肉样品从当地超市获得。在无菌条件下, 用无水乙醇洗涤新鲜猪肉的表面并灼烧后, 用无菌刀片切除表面, 该操作重复三次, 以减少猪肉中最初的微生物污染^[19]。取处理好的 3 片猪肉肉片 10 g 放入 3 个无菌平皿中, 通过 NA 培养基铺板检测猪肉中是否还存在微生物, 培养结果未检出微生物^[19]。称取处理好的猪肉 25 g, 绞碎后置于装有 225 mL 无菌生理盐水 (0.85%) 的无菌均质袋中, 并加入 12 株假单胞菌 (如表 2 所示) 纯培养物的混合物, 均质 1 min, 于假单胞菌 CFC 选择性培养基进行菌落计数。用无菌生理盐水 (0.85%) 对均质液进行 10 倍梯度稀释, 以制备含假单胞菌浓度为 10⁸~10¹ CFU/mL 的人工污染模拟样品。从每个稀释度样品中取 1 mL, 900 g 离心 1 min 去除猪肉组织^[20], 将上清液转移到新的 1.5 mL 离心管中, 12000 r/min 离心 5 min 去上清。加入 100 μ L 无菌水充分悬浮菌体沉淀, 100℃加热裂解菌体 20 min, 菌体裂解液 12,000 r/min 离心 15 min, 取上清即为粗提的细菌 DNA 模板。进行 3 组独立的加标实验, 按照 1.2.5 中实时荧光 LAMP 扩增条件进行扩增。

2 结果与讨论

2.1 LMAP 扩增体系建立与条件优化

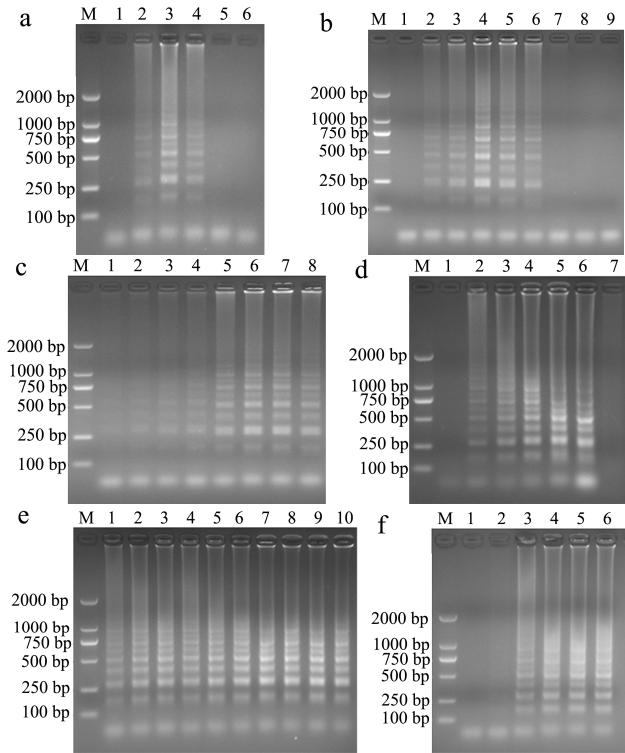


图1 环介导等温扩增条件优化电泳图

Fig.1 Optimization of LAMP reaction conditions by agarose gel electrophoresis

注: M 表示 DL2000 DNA Marker; 图 a 中 1~6 泳道代表 Mg^{2+} 的浓度依次为 2、4、6、8、10、12 mM; 图 b 中 1~9 泳道代表 dNTPs 的浓度依次为 0.4、0.6、0.8、1、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0 mM; 图 c 中 1~8 泳道代表甜菜碱的浓度依次为 0、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35、0.4 M; 图 d 中 1~7 泳道代表 F3/B3:FIP/BIP 的比依次为 1:1、1:2、1:4、1:8、1:10、1:12、1:16 ($1=0.2 \mu\text{M/L}$); 图 e 中 1~10 泳道代表扩增温度依次为 58、59、60、61、62、63、64、65、66、67 $^{\circ}\text{C}$; 图 f 中 1~6 泳道代表扩增时间依次为 20、30、40、50、60、70 min。

表3 环介导等温扩增体系

Table 3 The LAMP reaction mix

| 扩增体系 | 最佳工作浓度 |
|------------------|---------------------------------|
| Mg^{2+} | 6 mM |
| dNTPs | 1 mM |
| 甜菜碱 | 0.3 M |
| F3/B3:LF:FIP/BIP | 1:4:8 ($1=0.2 \mu\text{M/L}$) |
| 退火温度 | 65 $^{\circ}\text{C}$ |
| 扩增时间 | 60 min |

LAMP 扩增条件优化的结果通过琼脂糖凝胶电泳图中条带的有无与清晰度来确定最佳工作浓度。根据

图 1 的电泳结果, 我们得出 LAMP 扩增体系中 Mg^{2+} 、dNTPs、甜菜碱、F3/B3: LF: FIP/BIP、退火温度、扩增时间的最佳工作条件如表 3 所示。

2.2 LAMP 检测假单胞菌属的特异性

LAMP 扩增反应的特异性通过 12 株假单胞菌和 23 株非假单胞菌验证。如图 2 所示, 12 株假单胞菌株均有阶梯形的 LAMP 扩增条带, 而 23 株非假单胞菌和空白对照均无扩增条带产生。结果表明本研究建立的 LAMP 扩增体系特异性好。

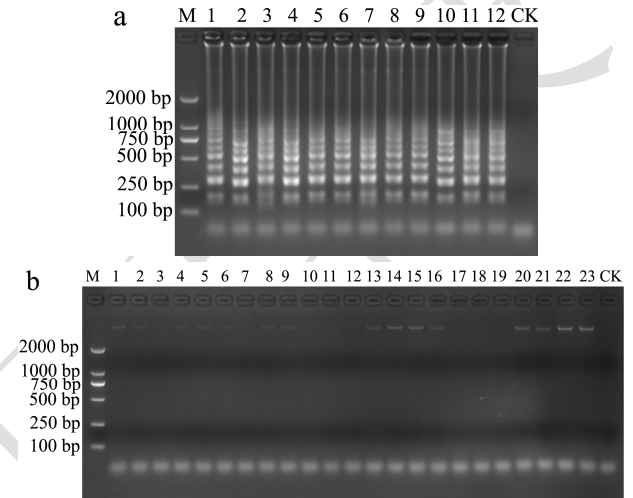


图2 LAMP 反应特异性检测结果

Fig.2 Specificity of LAMP reaction

注: M 表示 DL2000 DNA Marker; 图 a 为假单胞菌 LAMP 扩增反应结果, 1~12 泳道依次代表表 2 中的假单胞菌菌株; 图 b 为非假单胞菌 LAMP 扩增反应结果, 1~23 泳道依次代表表 2 中非假单胞菌菌株; CK 表示空白对照。

表4 实时荧光 LAMP 和普通 LAMP 检测假单胞菌纯培养物灵敏度结果

Table 4 Sensitivity of the real-time fluorescence LAMP and LAMP when detecting *Pseudomonas* in pure culture

| 假单胞菌培养物浓度 (CFU/mL) | 扩增结果 ^a | |
|-----------------------|-------------------|---------|
| | 实时荧光 LAMP | 普通 LAMP |
| 3.16×10^8 | 3/3 | 3/3 |
| 3.16×10^7 | 3/3 | 3/3 |
| 3.16×10^6 | 3/3 | 3/3 |
| 3.16×10^5 | 3/3 | 3/3 |
| 3.16×10^4 | 3/3 | 3/3 |
| 3.16×10^3 | 3/3 | 3/3 |
| 3.16×10^2 | 3/3 | 3/3 |
| 3.16×10^1 | 2/3 | 0/3 |
| 3.16×10^0 | 0/3 | 0/3 |

注: a: 3 个反应中阳性扩增结果。

2.3 实时荧光 LAMP 与普通 LAMP 扩增反应的灵敏度比较

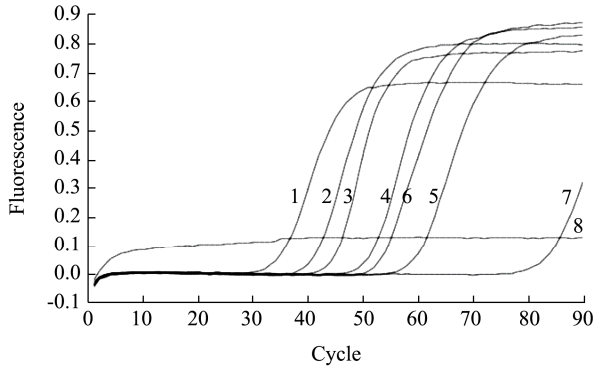


图3 实时荧光 LAMP 检测假单胞菌纯培养物灵敏度结果

Fig.3 Sensitivity of the real-time fluorescence LAMP when detecting *Pseudomonas* in pure culture

注：1~7 培养浓度为 3.16×10^8 、 3.16×10^7 、 3.16×10^6 、 3.16×10^5 、 3.16×10^4 、 3.16×10^3 、 3.16×10^2 CFU/mL；8 为空白对照。

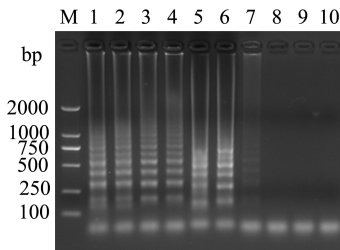


图4 普通 LAMP 检测假单胞菌纯培养物灵敏度结果

Fig.4 Sensitivity of the LAMP when detecting *Pseudomonas* in pure culture

注：1~9 培养浓度为 3.16×10^8 、 3.16×10^7 、 3.16×10^6 、 3.16×10^5 、 3.16×10^4 、 3.16×10^3 、 3.16×10^2 、 3.16×10^1 、 3.16×10^0 CFU/mL；10 为阴性对照；M 表示 DL2000 DNA Marker。

假单胞菌 CFC 选择性培养基计数结果显示原始菌液浓度为 3.16×10^8 CFU/mL，10 倍梯度稀释后进行实时荧光 LAMP 和普通 LAMP 灵敏度检测，检测结果如图 3、图 4 中所示。图 3 显示，1~7 号管出现扩增峰，为阳性扩增，空白对照管（8 号管）未出现扩增；对于 3.16×10^1 CFU/mL 的模板，三次扩增结果中

两次出现阳性扩增（表 4），因此实时荧光 LAMP 扩增反应的灵敏度为 3.16×10^1 CFU/mL。图 4 显示，当模板浓度为 3.16×10^2 CFU/mL 时，电泳结果显示为微弱的扩增条带；当模板浓度为 3.16×10^1 CFU/mL 时无扩增条带，表明普通 LAMP 扩增反应的灵敏度为 3.16×10^2 CFU/mL。灵敏度比较结果显示本实验中实时荧光 LAMP 扩增灵敏度比普通 LAMP 扩增灵敏度高 10 倍。

2.4 实时荧光 LAMP 检测人工污染新鲜猪肉中假单胞菌属微生物的检出限

假单胞菌 CFC 选择性培养基计数结果显示人工污染三个样品的原始菌液浓度分别为 2.39×10^8 CFU/mL、 1.73×10^8 CFU/mL、 1.78×10^8 CFU/mL，经 10 倍梯度稀释后进行实时荧光 LAMP 扩增反应，扩增结果如图 5 所示，1~7 号管出现扩增峰，为阳性扩增。如表 5 所示，三次独立加标实验的检出限均为 10^2 CFU/mL，说明本实验中实时荧光 LAMP 扩增反应检测人工污染新鲜猪肉中假单胞菌属微生物的检出限为 1.73×10^2 CFU/mL，即 1.73×10^3 CFU/g。本实验中人工污染的样品未进行预增菌。

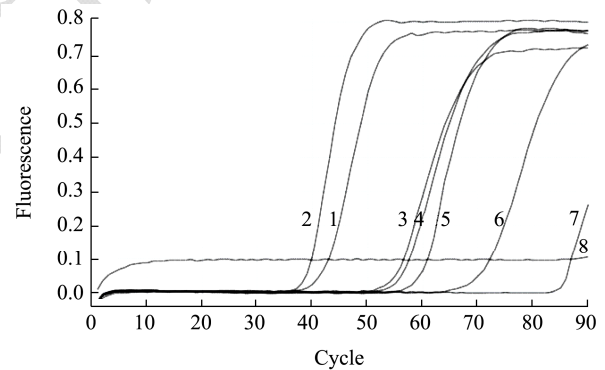


图5 实时荧光 LAMP 检测人工污染新鲜猪肉的检出限

Fig.5 Determination of detection limit of real-time fluorescence LAMP for artificially contaminated fresh pork

注：1~7 污染浓度为 2.39×10^8 、 2.39×10^7 、 2.39×10^6 、 2.39×10^5 、 2.39×10^4 、 2.39×10^3 、 2.39×10^2 CFU/mL；8 为空白对照。

表 5 实时荧光 LAMP 检测人工污染新鲜猪肉

Table 5 Detection of real-time fluorescence LAMP for artificially contaminated fresh pork

| 假单胞菌培养物浓度/(CFU/mL) | 假单胞菌培养物浓度/(CFU/g) | 实时荧光 LAMP 扩增结果 ^a |
|--|--|-----------------------------|
| 2.39×10^8 、 1.73×10^8 、 1.78×10^8 | 2.39×10^9 、 1.73×10^9 、 1.78×10^9 | 3/3 |
| 2.39×10^7 、 1.73×10^7 、 1.78×10^7 | 2.39×10^8 、 1.73×10^8 、 1.78×10^8 | 3/3 |
| 2.39×10^6 、 1.73×10^6 、 1.78×10^6 | 2.39×10^7 、 1.73×10^7 、 1.78×10^7 | 3/3 |
| 2.39×10^5 、 1.73×10^5 、 1.78×10^5 | 2.39×10^6 、 1.73×10^6 、 1.78×10^6 | 3/3 |

转下页

接上页

| | | |
|--|--|-----|
| 2.39×10^4 、 1.73×10^4 、 1.78×10^4 | 2.39×10^5 、 1.73×10^5 、 1.78×10^5 | 3/3 |
| 2.39×10^3 、 1.73×10^3 、 1.78×10^3 | 2.39×10^4 、 1.73×10^4 、 1.78×10^4 | 3/3 |
| 2.39×10^2 、 1.73×10^2 、 1.78×10^2 | 2.39×10^3 、 1.73×10^3 、 1.78×10^3 | 3/3 |
| 2.39×10^1 、 1.73×10^1 、 1.78×10^1 | 2.39×10^2 、 1.73×10^2 、 1.78×10^2 | 0/3 |

3 结论

3.1 由于营养物质丰富以及冷藏与冷冻的温度并不能完全抑制微生物的生长,使得冷鲜猪肉易腐败,据报道我国近年来生鲜产品的腐败率超过 35%,其中肉类和水产品占据了 10%~15%^[4],因此需要建立一种快速的检测方法,做好冷鲜猪肉新鲜度的监控,及时做出相应的措施,从而减少经济损失。

3.2 生鲜产品的腐败变质主要是由于微生物的代谢活动引起的^[21,22],当微生物的数量达到一定值时则会引起食品的腐败^[23],如感官颜色的变化、腐臭味、粘液等,研究表明假单胞菌属是新鲜肉类产品中主要的腐败菌,如荧光假单胞菌、草莓假单胞菌、恶臭假单胞菌等。针对假单胞菌的环介导等温扩增技术主要用于单独检测铜绿假单胞菌、荧光假单胞菌、丁香假单胞菌、香鱼假单胞菌、恶臭假单胞菌等,应用领域涉及医疗、食品等,其中,食品基质包括番茄、牛奶、鱼等^[24-28]。目前,环介导等温扩增技术是基于种水平上检测假单胞菌,而基于属水平上对假单胞菌的检测未曾有报道。此外,由于冷鲜肉的腐败是多种微生物共同作用的结果,因此,建立一种属水平上检测微生物的方法,对减少冷鲜肉腐败造成的经济损失具有重要意义。

3.3 近年来,LAMP 扩增技术在食品安全检测中的应用越来越广泛,在普通 LAMP 扩增的基础上逐渐开发出实时荧光 LAMP 扩增技术。在体系中加入荧光染料,可以实时监测扩增反应,避免了普通 LAMP 需开盖检测产生的污染,同时还避免了扩增反应结束后加入荧光染料进行判断时产生的视觉误差,其实际应用备受关注。Haifeng^[1]等人利用实时荧光 LAMP 检测牡蛎中的创伤弧菌,在不富集的条件下可检测到 6.4×10^4 CFU/g,比本研究结果的灵敏度低 10 倍;贾雅菁等人^[29]对实时荧光 LAMP 与普通 LAMP 检测牛乳中的蜡芽孢杆菌进行了比较,结果显示实时荧光 LAMP 在 20 min 内可达 8.2 CFU/mL 的灵敏度,是普通 LAMP 灵敏度的 10 倍;Ye 等人^[30]利用实时荧光 LAMP 对牛奶中的单增李斯特菌进行了检测,其检测限为 10^3 CFU/mL,比单增李斯特菌 API 鉴定条和实时荧光 PCR 简单、快速,特异性高;Wang 等人^[31]通过设计新的扩增引物,使实时荧光 LAMP 检测食品

中的金黄色葡萄球菌的检测限为 10 fg/反应,灵敏度高于先前的研究。由于食品基质中存在许多影响分子扩增的物质,如肉类中存在的脂肪、蛋白质、酶等都会抑制扩增的效率,从而影响灵敏度。因此预增菌成为分子检测中提高灵敏度常用的方法,如王瑾等人^[32]经预增菌 4 h 后,实时荧光 LAMP 检测鸡肉中沙门氏菌的灵敏度达到了 450 CFU/g,因此如何对样品进行前处理以减少分子扩增的抑制剂对提高检测速度具有重要意义。

3.4 本研究建立的实时荧光环介导等温扩增反应,是针对用于物种鉴定的 16S rDNA 进行引物设计,经实验验证,该引物特异性高,仅能扩增出假单胞菌属的微生物。同时,体系中加入通用的 Eva Green 染料,该方法除可通过实时荧光定量 PCR 仪进行检测之外,也适用于其他能监测荧光信号的扩增仪。本研究建立了一种用于检测生鲜猪肉中假单胞菌属的环介导等温扩增技术,可以实时监测扩增结果,该方法的灵敏度是普通 LAMP 灵敏度的 10 倍,在非预增菌的条件下人工污染样品的检出限为 1.73×10^3 CFU/g,可在 2 h 内完成目标菌的检测。

3.5 实时荧光环介导等温扩增反应为检测食品中的假单胞菌微生物提供了新的检测方向,但是目前该方法只能用于定性检测。由于该方法在扩增反应过程中具有随机性,因此对于如何准确定量检测目标菌是该方法进一步研究的方向。

参考文献

- [1] Haifeng Zhang, Jun Wang, Wayne Martin. Factors affecting households' meat purchase and future meat consumption changes in China: A demand system approach [J]. *Journal of Ethnic Foods*, 2018, 5(1): 24-32
- [2] Stéphane Chaillou, Aurélie Chaulot-Talmon, Hélène Caekebeke, et al. Origin and ecological selection of core and food-specific bacterial communities associated with meat and seafood spoilage [J]. *Isme Journal*, 2015, 9(5): 1105-1118
- [3] Lambert A D, Smith J P, Dodds K L. Shelf life extension and microbiological safety of fresh meat-a review [J]. *Food microbiology*, 1991, 8(4): 267-297
- [4] 王永锋.生鲜产品在途配送质量控制及可追溯系统关键技术研究[D].重庆:重庆大学,2012

- WANG Yong-feng. Research on key technologies about quality control of fresh product distribution in road and traceability system [D]. Chongqing: Chongqing University, 2012
- [5] Guang-yu Wang, Hu-hu Wang, Yi-wei Han, et al. Evaluation of the spoilage potential of bacteria isolated from chilled chicken *in vitro* and *in situ* [J]. Food Microbiology, 2017, 63: 139-146
- [6] Liang Rongrong, Yu Xiaoqiao, Wang Renhuan, et al. Bacterial diversity and spoilage-related microbiota associated with freshly prepared chicken products under aerobic conditions at 4 °C [J]. Journal of Food Protection, 2012, 75(6): 1057-1062
- [7] Pennacchia C, Ercolini D, Villani F. Spoilage-related microbiota associated with chilled beef stored in air or vacuum pack [J]. Food Microbiology, 2011, 28(1): 84-93
- [8] Yang X, Zhu L, Zhang Y, et al. Microbial community dynamics analysis by high-throughput sequencing in chilled beef *longissimus* steaks packaged under modified atmospheres [J]. Meat Science, 2018, 141: 94-102
- [9] Andreani, N A, Fasolato L. Pseudomonas and Related Genera [M]. Cambridge: Woodhead Publtd, 2017
- [10] Chunxing Wang, Bin Zhang, Xiaomei Zhuang. A biochemical system of rapidly detecting bacteria based on ATP bioluminescence technology [J]. European Food Research and Technology, 2013, 236(1): 41-46
- [11] Leona Wunderlichová, Leona Buňková, Marek Koutný, et al. Novel touchdown-PCR method for the detection of putrescine producing Gram-negative bacteria in food products [J]. Food Microbiology, 2013, 34(2): 268-276
- [12] Yamaguchi N, Ohba H, Nasu M. Simple detection of small amounts of Pseudomonas cells in milk by using a microfluidic device [J]. Letters in Applied Microbiology, 2010, 43(6): 631-636
- [13] Abdalhai M H, Fernandes A M, Bashari M, et al. Rapid and sensitive detection of foodborne pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*) using an electrochemical DNA genomic biosensor and its application in fresh beef [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(52): 12659-12667
- [14] Domesle K J, Yang Q, Hammack T S, et al. Validation of a Salmonella loop-mediated isothermal amplification assay in animal food [J]. International Journal of Food Microbiology, 2018, 264: 63-76
- [15] Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, et al. PCR inhibitors-Occurrence, properties and removal [J]. Journal of Applied Microbiology, 2012, 113(5): 1014-1026
- [16] LI Ping, WEN Ping-wei, XU Heng-yi, et al. Research progress in application of flow cytometry in detection of foodborne pathogen [J]. Science & Technology of Food Industry, 2013, 34(14): 375-379
- [17] Yang Liju, Bashir Rashid. Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria [J]. Biotechnology Advances, 2008, 26(2): 135-150
- [18] Zhang X, Lowe S B, Gooding J J. Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP) [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2014, 61: 491-499
- [19] Pennacchia C, Ercolini D, Villani F. Development of a Real-Time PCR assay for the specific detection of *Brochothrix thermosphacta* in fresh and spoiled raw meat [J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 134(3): 230-236
- [20] Han F, Ge B. Quantitative detection of *Vibrio vulnificus* in raw oysters by real-time loop-mediated isothermal amplification [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 142(1-2): 60-66
- [21] Kodogiannis V S, Pachidis T, Kontogianni E. An intelligent based decision support system for the detection of meat spoilage [J]. Engineering Applications of Artificial Intelligence, 2014, 34: 23-36
- [22] Nidhi G, Colin H, Ross P R, et al. The prevalence and control of bacillus and related spore-forming bacteria in the dairy industry [J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6
- [23] Jones Rhys J. Observations on the succession dynamics of lactic acid bacteria populations in chill-stored vacuum-packaged beef [J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 90(3): 273-282
- [24] Takano C, Seki M, Kim D W, et al. Development of a novel loop-mediated isothermal amplification method to detect guiana extended-spectrum (GES) beta-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10
- [25] Chen Z, Chai A, Li B, et al. New loop-mediated isothermal amplification primer set useful for detecting *Pseudomonas syringae* pv. Tomato and diagnosis of tomato bacterial spot disease, CN108411017-A [P/OL]. <Go to ISI>://DIIDW: 2018665366
- [26] Xin L, Zhang L W, Meng Z X, et al. Development of a novel loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of lipolytic *Pseudomonas fluorescens* in raw cow

- milk from north China [J]. Journal of Dairy Science, 2017, 100(10): 7802-7811
- [27] Zhou T, Wang G, Zhang J. Loop mediated isothermal amplification kit, useful for detecting *Pseudomonas* bacteria in large yellow croaker fish, comprises buffer solution, magnesium sulfate, deoxynucleotidetriphosphate solution and forward inner primer solution, CN102952884-A; CN102952884-B [P/OL]. <Go to ISI>://DIIDW:2013J53217.
- [28] Mao Z J, Qiu Y Y, Zheng L, et al. Development of a visual loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of the bacterial pathogen *Pseudomonas putida* of the large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) [J]. Journal of Microbiological Methods, 2012, 89(3): 179-184
- [29] 贾雅菁,付博宇,王羽,等.实时荧光环介导等温扩增技术检测牛乳中的蜡样芽孢杆菌[J].食品科学,2016,37(6):184-189
JIA Ya-jing, FU Bo-yu, WANG Yu, et al. Detection of *Bacillus cereus* in milk by real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification method [J]. Food Science, 2016, 37(6): 184-189
- [30] Ye L, Li Y, Zhao J, et al. Development of a real-time loop-mediated isothermal amplification assay for the sensitive and rapid detection of *Listeria monocytogenes* [J]. Letters in Applied Microbiology, 2015, 61(1): 85-90
- [31] Wang D. Novel primers for increased specificity and sensitivity for the detection of *Staphylococcus aureus* by real-time LAMP [J]. Cyta-Journal of Food, 2016, 14(1): 88-91
- [32] 王瑾,林丽萍,郜彦彦,等.实时荧光环介导等温扩增快速检测鸡肉中沙门氏菌[J].食品科学,2016,37(24):170-174
WANG Jin, LIN Li-ping, GAO Yan-yan, et al. Development and application of a real-time loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Salmonella enterica* ser. enteritis retrieved from chicken [J]. Food Science, 2016, 37(24): 170-174

(上接第 176 页)

- [17] Gietz R D, Woods R A. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method [J]. Methods in Enzymology, 2002, 350: 87-96
- [18] Lilly M, Bauer F F, Lambrechts M G, et al. The effect of increased yeast alcohol acetyltransferase and esterase activity on the flavour profiles of wine and distillates [J]. Yeast, 2006, 23: 641-659
- [19] 李潇,董胜胜,付肖蒙,等.转录因子 MSN2 基因过表达对酿酒酵母耐受性的影响[J].现代食品科技,2018,34(9):95-102
LI Xiao, DONG Sheng-sheng, FU Xiao-meng, et al. Investigation on stress tolerance of *saccharomyces cerevisiae* of overexpression of transcription factor MSN2 gene [J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(9): 95-102
- [20] Zhang C Y, Liu Y L, Qi Y N, et al. Increased esters and decreased higher alcohols production by engineered brewer's yeast strains [J]. European Food Research and Technology, 2013, 236(6): 1009-1014
- [21] Pfisterer E, Hancock I, Garrison I. Effects of fermentation environment on yeast lipid synthesis [J]. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 1977, 35(2): 49-54
- [22] Zhang C Y, Liu Y L, Qi Y N, et al. Increased esters and decreased higher alcohols production by engineered brewer's yeast strains [J]. European Food Research and Technology, 2013, 236(6): 1009-1014

(上接第 307 页)

- [15] Sowa I, Wójciak-Kosior M, Strzemski M, et al. Silica modified with polyaniline as a potential sorbent for matrix solid phase dispersion (MSPD) and dispersive solid phase extraction (d-SPE) of plant samples [J]. Materials, 2018, 11(4): 467-473
- [16] Saito I. The viewpoint and approach for regulation of Japanese positive list system for agricultural chemical residues in foods as one cooperative federation [J]. *Shokuhinseigaku zasshi* Journal of the Food Hygienic Society of Japan, 2007, 48(4): 418-425
- [17] Rigos G, Troisi G M. Antibacterial Agents in mediterranean finfish farming: a synopsis of drug pharmacokinetics in important Euryhaline fish species and possible environmental implications [J]. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 2005, 15(1-2): 53-73
- [18] Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Organization W H. Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants: Seventy-third Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives [M]. World Health Organization, 2011