

食品中沙门氏菌 FTA 膜 结合跨越式滚环等温扩增检测方法的建立

庄梦晴¹, 张先舟¹, 卢鑫², 郭威¹, 马晓燕¹, 张伟^{1,2,3}

(1. 河北农业大学食品科技学院, 河北保定 071001) (2. 河北农业大学理工学院, 河北沧州 061100)

(3. 河北农业大学生命科学学院, 河北保定 071001)

摘要: 为实现食品中沙门氏菌的简便和快速现场检测, 本研究采用 FTA 膜 (Flinders technology associates, FTA) 结合跨越式滚环等温扩增 (Saltatory rolling circle amplification, SRCA) 方法 (FTA-SRCA) 建立一种新型的沙门氏菌检测方法。利用 FTA 膜快速提取模板 DNA, 根据沙门氏菌的 *invA* 基因设计及筛选引物, 建立 FTA-SRCA 反应体系。扩增反应在能够实现集约化检测的凹孔板中进行, 反应结束后添加荧光染料观察结果。确定了该方法的特异性、灵敏度和人工污染样品的检出限, 并对 60 个实际样品进行检测, 评估其敏感性、特异性和符合率。结果表明: 检测的 17 株沙门氏菌均为阳性结果, 29 株非沙门氏菌均为阴性结果, 特异性良好。FTA-SRCA 方法的灵敏度为 6.81×10^0 CFU/mL, 比 PCR 方法高 100 倍, 比 SRCA 方法高 10 倍。对于人工污染的牛奶样品检测, FTA-SRCA 方法的检出限为 3.22×10^0 CFU/mL, 比 PCR 方法低 1000 倍, 比 SRCA 方法低 10 倍。检测实际样品的敏感性、特异性和符合率分别为 100.00%, 94.64%, 95.00%。本研究建立的 FTA-SRCA 方法具有操作简便快速、成本低廉、特异性强、灵敏度高、检出限低等优点, 可用于食品中沙门氏菌的大批量集约化快速现场检测。

关键词: FTA 膜; 跨越式滚环等温扩增 (SRCA); 沙门氏菌; 可视化; *invA* 基因

文章编号: 1673-9078(2021)04-275-283

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.4.0903

Development of Detection Method of *Salmonella* in Food by Saltatory Rolling Circle Amplification Combined with FTA Card

ZHUANG Meng-qing¹, ZHANG Xian-zhou¹, LU Xin², GUO Wei¹, MA Xiao-yan¹, ZHANG Wei^{1,2,3}

(1. College of Food Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

(2. College of Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Cangzhou 061100, China)

(3. College of Life Sciences, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: In order to achieve the simple and rapid on-site detection of *Salmonella* in food, saltatory rolling circle amplification (SRCA) method combined with FTA card (FTA-SRCA) was used to establish a new detection method for *Salmonella*. The template DNA was extracted by FTA card quickly. According to the specific *invA* gene of *Salmonella*, primers were designed and screened. Based on the above, the FTA-SRCA reaction system was established. The reaction was amplified in the well plate which can achieve intensification. After the reaction, fluorescent dyes were added to observe the results. Its specificity, sensitivity and detection limit of artificial contaminated samples were determined. Furthermore, 60 actual samples were tested to evaluate relative sensitivity, specificity and accuracy. The results indicated that the 17 strains of *Salmonella* tested were all positive, and the 29 strains of non-*Salmonella* were negative. Therefore, the method had good specificity. The sensitivity of the FTA-SRCA was 6.81×10^0 CFU/mL, which was 100 times that of the PCR method and 10 times that of the SRCA method.

引文格式:

庄梦晴,张先舟,卢鑫,等.食品中沙门氏菌 FTA 膜结合跨越式滚环等温扩增检测方法的建立[J].现代食品科技,2021,37(4):275-283

ZHUANG Meng-qing, ZHANG Xian-zhou, LU Xin, et al. Development of detection method of *Salmonella* in food by saltatory rolling circle amplification combined with FTA card [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(4): 275-283

收稿日期: 2020-09-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(31371772); 河北省自然科学基金重点项目(G2019204342); 河北省重点研发计划项目(18275501D)

作者简介: 庄梦晴(1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全检测

通讯作者: 张伟(1963-), 男, 教授, 研究方向: 食品安全检测

For the detection of artificially contaminated milk samples, the detection limit of the FTA-SRCA was 3.22×10^0 CFU/mL, which was 1000 times that of the PCR method and 10 times that of the SRCA method. The sensitivity, specificity and accuracy of FTA-SRCA were 100.00%, 94.64% and 95.00%, respectively. The FTA-SRCA method established in this study had the advantages of simple and rapid operation, low cost, strong specificity, high sensitivity, and low detection limit, which can be used for the intensive and rapid on-site detection of *Salmonella* in food.

Key words: FTA card; saltatory rolling circle amplification (SRCA); *Salmonella*; visual; *invA* gene

沙门氏菌是一种人畜共患的致病菌。由沙门氏菌引起的食物中毒大多是由于其穿透胃肠粘膜致使细胞死亡造成的^[1]，根据临床表征可以分为胃肠炎型、类伤寒型、类霍乱型、类感冒型和败血症型^[2]。在所有食源性致病菌引起的食物中毒事件中，沙门氏菌引起的食品安全事件居首位，具有高检出率、高发病率和死亡率高死亡率的特点^[3]。数据调查发现，全球各个国家均存在不同程度的沙门氏菌污染问题^[4,5]，由此引发的沙门氏菌相关疾病，对公众安全产生了严重的威胁，造成了巨大的经济损失^[6]。

微生物的传统培养方法检测时间较长，对实验操作人员、周围背景及设备的无菌环境都有很高的要求，并且无法实现现场检测^[7]。当细菌处于活的不可培养（Viable but non culturable, VBNC）状态时，会造成结果误判^[8]。免疫学方法特异性抗体的制备复杂^[9]，当出现抗原或抗体的相似结构时，会影响检测的特异性和重复性^[10]，甚至造成最终结果的误判^[11]。随着核酸体外扩增技术的不断发展，逐步建立了聚合酶链式反应（Polymerase chain reaction, PCR）^[12]、多重PCR（Multiplex PCR）^[13]、实时荧光定量PCR（Quantitative real-time PCR, qPCR）^[14]等变温扩增技术，这些技术均需要复杂的热循环系统，仪器昂贵，限制了其在基层现场检测中的应用。为克服上述技术的缺点，研究

人员创新性的发展了滚环扩增（Rolling circle amplification, RCA）和环介导等温扩增（Loop-mediated isothermal amplification, LAMP）等核酸等温扩增技术。但是，RCA技术需要锁式探针、连接酶和探针环化过程，反应时间较长（约4 h）^[15]；LAMP技术存在引物设计复杂、需要多对引物^[16]、产物间易相互作用造成非特异扩增^[17]、无法通过测序验证扩增结果的正确性等问题。

近年来，本研究团队发现了跨越式滚环等温扩增（Saltatory rolling circle amplification, SRCA）新方法，并逐渐在致病菌检测领域实现应用^[18-20]。该方法仅需一对引物，在恒温条件下依靠*Bst* DNA聚合酶即可实现线性DNA的扩增。原理如图1所示。正向引物（Forward primer, FWP）与模板DNA结合后，按照引物5'→3'方向延伸，当延伸至模板链的5'端时，在*Bst* DNA聚合酶作用下通过添加若干个核苷酸跨过线性DNA两端的缺口，继而将先前合成的互补链置换下来，继续如“滚环”般循环往复的扩增。先前合成的互补链不断延伸，暴露出越来越多的反向引物（Reverse primer, RVP）结合位点，RVP与之结合并进行延伸。周而复始，最终得到许多不同长度的串联重复线性双链DNA。

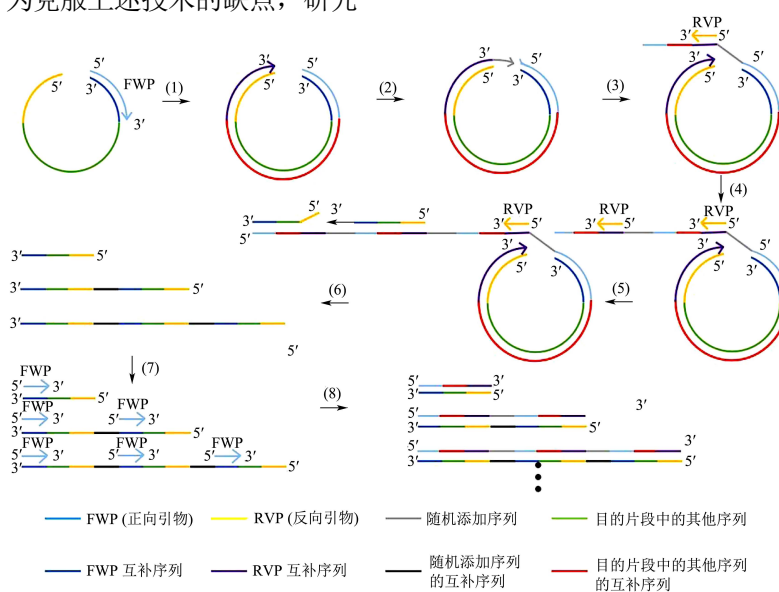


图1 SRCA 反应原理图

Fig.1 The schematic diagram of SRCA assay

FTA膜 (Flinders technology associates, FTA) 是经特殊的螯合剂和变性剂处理的棉纤维卡片, 作为Whatman公司的一项专利技术创新性的应用于室温下核酸的采集、运输、纯化和储存^[21]。当细胞接触FTA膜时, 细胞膜裂解, 核酸暴露同时被吸附固定在FTA膜上, 经特定纯化试剂和缓冲溶液的洗涤干燥, 即可直接作为模板。洗脱前后电镜图如图2所示。该方法操作简单, 大大节省了检测时间和检测成本。FTA技术已经广泛应用于人类DNA处理、法医学、野生动植物DNA样品、食源性致病菌、寄生虫和病原体的检测中^[22,23]。

本研究利用FTA膜吸附固定核酸的方法快速提取模板DNA, 根据沙门氏菌的*invA*基因设计及筛选引物, 向扩增产物中加入荧光染料进行结果的判定。扩增反应在凹孔板中进行, 从而有望实现食品中沙门氏菌的大批量集约化快速检测。

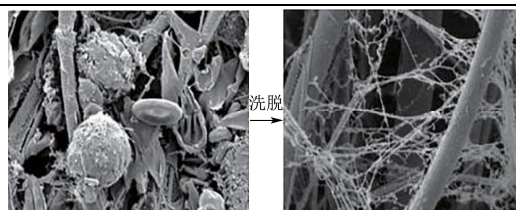


图2 FTA膜洗脱前后电镜图

Fig.2 Electron micrographs of FTA card before and after elution

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验菌株

本研究选取46株菌株作为研究对象, 其中17株为沙门氏菌, 29株为非沙门氏菌, 进行引物特异性的探究。研究所需菌种如表1所示。

表1 本研究所用菌种

Table 1 Bacterias in this study

序号	菌株名称	拉丁名	菌株来源
1	猪霍乱沙门氏菌 (孔成道夫变种)	<i>Salmonella cholerae-suis</i> var. <i>kunzendorf</i>	CICC 21494
2	乙型副伤寒沙门氏菌	<i>Salmonella paratyphi-B</i>	CICC 21495
3	鸭沙门氏菌	<i>Salmonella anatum</i>	CICC 21498
4	鼠伤寒沙门氏菌	<i>Salmonella typhimurium</i>	CMCC 50115
5	鼠伤寒沙门氏菌	<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028
6	甲型副伤寒沙门氏菌	<i>Salmonella paratyphi-A</i>	CICC 21501
7	甲型副伤寒沙门氏菌	<i>Salmonella paratyphi-A</i>	CICC 24167
8	火鸡沙门氏菌	<i>Salmonella meleagridis</i>	CICC 21511
9	海德尔堡沙门氏菌	<i>Salmonella heidelberg</i>	CICC 21487
10	肠炎沙门氏菌	<i>Salmonella enteritidis</i>	CMCC 50041
11	肠沙门氏菌肠亚种	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	CICC 21513
12	丙型副伤寒沙门氏菌	<i>Salmonella paratyphi-C</i>	CICC 21512
13	阿贡纳沙门氏菌	<i>Salmonella agona</i>	CICC 21586
14	沙门氏菌	<i>Salmonella</i>	LPNo.1
15	沙门氏菌	<i>Salmonella</i>	LPNo.2
16	沙门氏菌	<i>Salmonella</i>	LPNo.3
17	沙门氏菌	<i>Salmonella</i>	LPNo.4
18	大肠埃希氏菌	<i>Escherichia coli</i>	CICC 10032
19	大肠埃希氏菌	<i>Escherichia coli</i>	CMCC 44752
20	肠道致病性大肠埃希氏菌	<i>Escherichia coli</i> EPEC O127:K63	CICC 10411
21	肠道出血性大肠埃希氏菌	<i>Escherichia coli</i> EHEC O157:H7	CICC 21530
22	肠道致病性大肠埃希氏菌	<i>Escherichia coli</i> EPEC O26:K60	CICC 10372
23	产肠毒素大肠埃希氏菌	<i>Escherichia coli</i> ETEC O78:K80	CICC 10421
24	小肠结肠炎耶尔森氏菌	<i>Yersinia enterocolitica</i>	CMCC 52302
25	小肠结肠炎耶尔森氏菌	<i>Yersinia enterocolitica</i>	CICC 21669

转下页

接上页			
26	铜绿假单胞菌	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CICC 21636
27	无害李斯特氏菌	<i>Listeria innocua</i>	CICC 10297
28	格氏李斯特氏菌	<i>Listeria grayi</i>	CICC 21670
29	伊氏李斯特氏菌	<i>Listeria ivanovii</i>	CICC 21663
30	斯氏李斯特氏菌	<i>Listeria seeligeri</i>	CICC 21671
31	威氏李斯特氏菌	<i>Listeria welshimeri</i>	CICC 21672
32	单核细胞增生李斯特氏菌	<i>Listeria monocytogenes</i>	CMCC 54001
33	福氏志贺氏菌	<i>Shigella flexneri</i>	CMCC 51107
34	福氏志贺氏菌	<i>Shigella flexneri</i>	CICC 21678
35	痢疾志贺氏菌	<i>Shigella dysenteriae</i>	CICC 23829
36	鲍氏志贺氏菌	<i>Shigella bogdii</i>	CICC 21680
37	鲍氏志贺氏菌	<i>Shigella bogdii</i>	CMCC 51522
38	宋内氏志贺氏菌	<i>Shigella sonnei</i>	CICC 21535
39	宋内氏志贺氏菌	<i>Shigella sonnei</i>	CMCC 51334
40	副溶血性弧菌	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	CICC 21617
41	副溶血性弧菌	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	CICC 21528
42	丙二酸克罗诺杆菌	<i>Cronobacter malonaticus</i>	CICC 21551
43	都柏林克罗诺杆菌	<i>Cronobacter dublinensis</i>	CICC 21564
44	广泛克罗诺杆菌	<i>Cronobacter universalis</i>	CICC 21570
45	莫氏克罗诺杆菌	<i>Cronobacter moysii</i>	CICC 23943
46	香料克罗诺杆菌	<i>Cronobacter condimenti</i>	CICC 24184

注: ATCC: 美国模式菌种收集中心 (America Type Culture Collection); CMCC: 中国医学细胞保藏管理中心 (China Medical Culture Collection); CICC: 中国工业微生物菌种保藏管理中心 (China Center of Industrial Culture Collection); LP: 实验室保藏。

表 2 沙门氏菌 *invA* 基因的引物

Table 2 Primers of *invA* gene in *Salmonella*

基因名称	引物序列	引物长度	目的序列长度
<i>invA</i>	FWP: AGGCCGGTATATTGATGC	19 bp	60 bp
	RVP: TTTCCCTTCCAGTACGCTT	20 bp	

1.1.2 材料与试剂

引物, 华大基因公司; 6×DNA Loading Buffer、dNTPs Mixture, 北京博迈德公司; SYBR Green I (10,000×)、TE缓冲液 (pH 8.0), 北京索莱宝公司; 2×Taq PCR Master Mix, 北京全式金生物技术公司; Bst DNA聚合酶、DNA Marker DL2000, 大连宝生物公司; FTA膜、FTA纯化试剂, Whatman公司。

检测的食品样品包括肉类 38 份, 蛋类 8 份, 奶类 14 份, 共计 60 份。

1.1.3 仪器与设备

2720 Thermal cycler 核酸扩增仪, 美国 Applied biosystems 公司; DYY-8C 电泳仪, 北京六一仪器厂; JY04S-3E 凝胶成像分析系统, 北京乾明基因技术有限公司; DK-8D 三孔电热恒温水槽, 上海一恒科学仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株的培养

挑取鼠伤寒沙门氏菌 (CMCC 50115) 菌株传代培养 3 次。挑取典型单菌落接种到营养肉汤中, 37 °C 过夜培养, 使菌体富集, 用以提取基因组 DNA。

1.2.2 基因组 DNA 的提取

通过试剂盒法以及 FTA 膜法进行沙门氏菌基因组 DNA 的提取。试剂盒法按照操作说明进行提取 DNA。FTA 膜法: 取 40 μL 过夜培养的菌液滴加至 2.00 mm 的 FTA 膜上, 55 °C~60 °C 干燥 10 min, FTA 纯化试剂冲洗 2 次, TE 缓冲液冲洗 2 次, 55 °C~60 °C 干燥 10 min, 将得到的吸附有沙门氏菌基因组 DNA 的 FTA 膜直接作为反应的模板。

1.2.3 引物的设计与筛选

本研究选择沙门氏菌高度特异性和保守性的 *invA* 基因进行引物设计^[14,24]。通过使用 Primer 5.0 和 DNAMAN 软件设计沙门氏菌的特异性引物, 引物序列如表 2 所示。

1.2.4 FTA-SRCA、SRCA 和 PCR 的反应体系和反应条件

FTA-SRCA 的反应体系为: 2.00 μL 正反向引物 (0.50 μM), 12.00 μL dNTPs (0.75 mM), 3.00 μL 10×Thermopol Reaction Buffer (0.75×), 6.00 μL Mg²⁺ (3.00 mM), 2.00 μL *Bst* DNA 聚合酶 (大片段), 无菌去离子水补足至 40 μL。62 °C 反应 30 min, 80 °C 灭酶 5 min。向扩增产物中滴加 2.00 μL SYBR Green I (50×) 染料进行颜色观察, 从而实现结果的判定。

SRCA 的反应条件与 FTA-SRCA 反应相同, 在 FTA-SRCA 反应体系的基础上, 增加了 3.00 μL 模板 DNA (3.10 ng/μL)。结果通过凝胶电泳法进行观察。

PCR 反应引物与 SRCA 方法相同。PCR 的反应体系为: 11.00 μL 2×EasyTaq PCR SuperMix, 1.00 μL 正反向引物 (0.50 μM), 1.00 μL 模板 DNA (3.10 ng/μL), 无菌去离子水补足至 25 μL。反应程序: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 45 s, 共 30 个循环; 72 °C 再延伸 1 min 终止反应。

1.2.5 FTA-SRCA 扩增反应的测序分析

反应产物进行凝胶电泳后, 按照胶回收试剂盒操作说明进行纯化, 并按照基因克隆试剂盒操作说明进行连接转化, 将菌液送至测序公司进行测序。

1.2.6 引物特异性分析

利用 FTA 膜法提取表 1 中 46 株菌的基因组 DNA 作为模板, 分别进行 SRCA 反应。通过向反应产物中添加荧光染料的方法, 进行引物特异性分析。

1.2.7 灵敏度分析

将沙门氏菌菌液十倍梯度稀释后进行平板计数, 测得菌液浓度为 6.81×10⁷~6.81×10¹ CFU/mL。利用试剂盒法提取不同浓度菌液的模板 DNA 后, 分别利用 SRCA 和 PCR 方法进行扩增反应; 同时利用 FTA 膜法提取模板 DNA 后, 进行 FTA-SRCA 反应, 并比较分析三种方法的灵敏度。

1.2.8 人工污染的牛奶样品中沙门氏菌的检出限分析

向已证实不含有沙门氏菌的牛奶样品中加入不同浓度的沙门氏菌菌悬液, 均质液中菌液浓度为 3.22×10⁷~3.22×10¹ CFU/mL。利用试剂盒法提取基因组 DNA 后, 分别进行 SRCA 和 PCR 反应; 同时利用 FTA 膜法提取模板 DNA 后^[25], 进行 FTA-SRCA 反应, 并比较分析三种方法的检出限。

1.2.9 FTA-SRCA 方法的实际应用与评价

为了评估 FTA-SRCA 方法在实际样品检测中的可行性以及准确性, 本研究对 60 份样品, 分别用 PCR 方法、SRCA 方法、FTA-SRCA 方法及国家标准方法 GB 4789.4-2016^[26]进行检测, 计算得到各个方法的敏感性、特异性和符合率^[27]。

$$\text{敏感性} = \frac{\text{真阳性}}{\text{真阳性} + \text{假阴性}} \times 100\%$$

$$\text{特异性} = \frac{\text{真阴性}}{\text{真阴性} + \text{假阳性}} \times 100\%$$

$$\text{符合率} = \frac{\text{真阳性} + \text{真阴性}}{\text{真阳性} + \text{假阴性} + \text{真阴性} + \text{假阳性}} \times 100\%$$

1.2.10 数据处理

本研究中 PCR 和 SRCA 反应结果均通过琼脂糖凝胶电泳图谱分析, FTA-SRCA 反应结果通过观察扩增产物的荧光信号颜色变化进行分析。每个实验重复 3 次。

2 结果与讨论

2.1 FTA-SRCA 扩增产物的测序分析

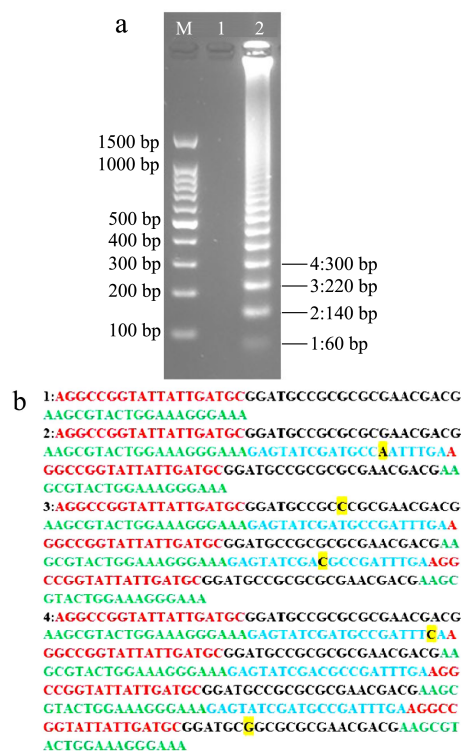


图 3 沙门氏菌 FTA-SRCA 扩增产物测序分析

Fig.3 Sequencing analysis of FTA-SRCA amplification products of *Salmonella*

注: a: FTA-SRCA 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图; b: FTA-SRCA 扩增产物测序结果; M: 100 bp DNA Ladder; 1: 阴性对照; 2: 阳性扩增结果; 红色: 正向引物; 绿色: 反向引物的反向互补序列; 蓝色: 添加的核苷酸片段; 黄色: 错配碱基。

将 FTA-SRCA 反应的扩增产物进行测序分析,验证其是否按照 SRCA 反应原理进行扩增,测序结果如图 3 所示。由图 3a 可知,扩增产物呈现明显的梯形条带。由图 3b 可知,第一条扩增片段长度为 60 bp,第二条扩增片段包括两段 60 bp 长度的目的片段以及添加片段,添加片段为正向引物的上游片段,长度为 20 bp,因此,第二条扩增片段的总长度为 140 bp。第三条扩增片段包括三段 60 bp 长度的目的片段以及两段添加片段,总长度为 220 bp。以此类推,第四条扩增片段总长度为 300 bp。其中,出现的错配基因可能由于扩增反应发生错配造成的。理论结果与实际测得的结果相同,因此,FTA-SRCA 方法的扩增结果正确。

2.2 引物特异性分析

本研究共采用 46 株菌株对引物进行特异性试验,结果如图 4 所示。17 株沙门氏菌均成功扩增,荧光由橙色变为黄绿色;29 株非沙门氏菌均没有发生扩增反应,仍为橙色。因此,针对 *invA* 基因设计的引物特异性极强,适用于沙门氏菌的检测。



图 4 沙门氏菌引物特异性分析

Fig.4 The primer specificity analysis of *Salmonella*

注: N: 阴性对照; P: 阳性对照; 1~46: 试验所用菌株见表 1 (1~46 号菌株)。

2.3 灵敏度分析

对不同核酸提取方法以及扩增方法进行灵敏度比较分析,结果如图 5 所示。由图 5a 可知,利用试剂盒法提取模板进行 PCR 反应,当菌液浓度降低至 6.81×10^1 CFU/mL 时不再产生扩增条带。因此,PCR 方法的灵敏度为 6.81×10^2 CFU/mL。由图 5b 可知,利用试剂盒法提取模板进行 SRCA 反应,当菌液浓度降低至 6.81×10^0 CFU/mL 时为阴性扩增结果。因此,SRCA 方法的灵敏度为 6.81×10^1 CFU/mL,比 PCR 方法高 10 倍。向 FTA-SRCA 扩增产物中加入 SYBR Green I 荧光染料,由图 5c 可知,当 FTA 膜处理的菌液浓度为 $6.81 \times 10^7 \sim 6.81 \times 10^0$ CFU/mL 时,荧光颜色均由橙色

变为黄绿色,为阳性结果;当浓度为 6.81×10^{-1} CFU/mL 时,荧光颜色仍为橙色,为阴性结果。因此,FTA-SRCA 方法的灵敏度为 6.81×10^0 CFU/mL。FTA-SRCA 方法的灵敏度比 PCR 方法高 100 倍,比 SRCA 方法高 10 倍。现有研究中,FTA-PCR 检测单核细胞增生李斯特氏菌的灵敏度为 1.10×10^2 CFU/mL^[28],FTA-LAMP 检测阪崎肠杆菌的灵敏度为 1.00×10^3 CFU/mL^[29]。综上所述,FTA-SRCA 方法具有更高的灵敏度。

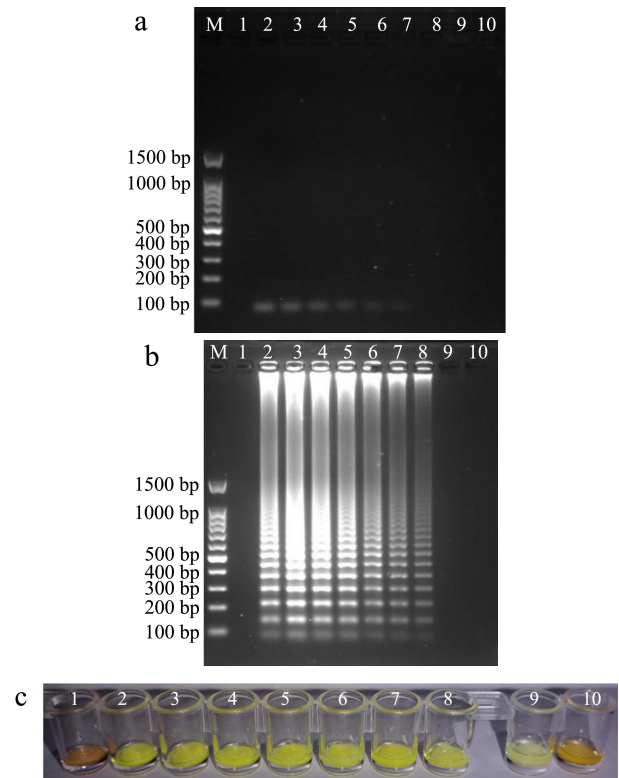
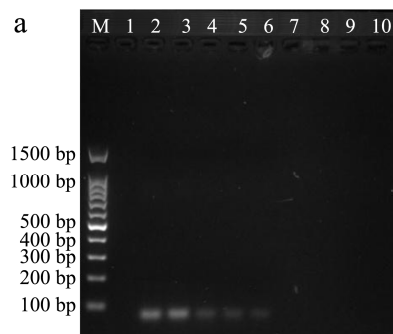


图 5 灵敏度分析

Fig.5 The sensitivity analysis

注: a: PCR 方法的灵敏度分析; b: SRCA 方法的灵敏度分析; c: FTA-SRCA 方法的灵敏度分析; M: 100 bp DNA Ladder; 1: 阴性对照; 2~10: 菌液浓度为 $6.81 \times 10^7 \sim 6.81 \times 10^{-1}$ CFU/mL

2.4 人工污染的牛奶样品中沙门氏菌的检出限分析



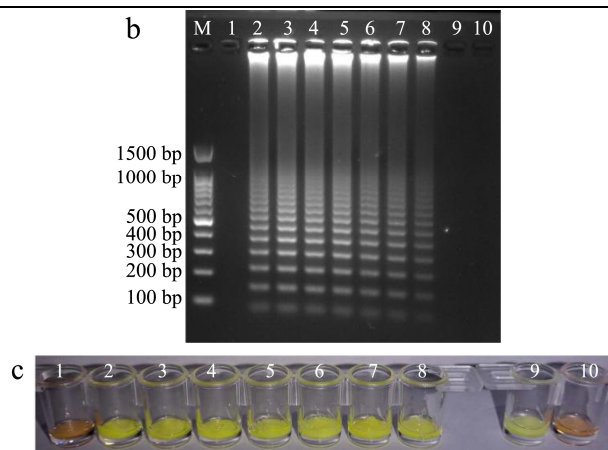


图6 检出限分析

Fig.6 The detection limit analysis

注: a: PCR方法的灵敏度分析; b: SRCA方法的灵敏度分析; c: FTA-SRCA方法的灵敏度分析; M: 100 bp DNA Ladder; 1: 阴性对照; 2~10: 菌液浓度为 $3.22 \times 10^7 \sim 3.22 \times 10^1$ CFU/mL

分别采用PCR、SRCA和FTA-SRCA方法检测人工污染的牛奶样品中的沙门氏菌,对检出限进行比较分析,结果如图6所示。由图6a可知,当样品中沙门氏菌浓度降低至 3.22×10^2 CFU/mL,不再产生扩增条带。因此,PCR方法的检出限为 3.22×10^3 CFU/mL。由图6b可知,当样品中沙门氏菌浓度降低至 3.22×10^0 CFU/mL,为阴性扩增结果。因此,SRCA方法的检出限为 3.22×10^1 CFU/mL。向FTA-SRCA扩增产物中加入SYBR Green I 荧光染料,由图6c可知,当样品中沙门氏菌菌液浓度为 $3.22 \times 10^7 \sim 3.22 \times 10^0$ CFU/mL时,

荧光颜色均由橙色变为黄绿色。当浓度为 3.22×10^1 CFU/mL时,荧光颜色仍为橙色,为阴性结果。FTA-SRCA方法的检出限为 3.22×10^0 CFU/mL,比PCR方法低1000倍,比SRCA方法低10倍。已报道的FTA-PCR检测沙门氏菌方法的检出限为 1.00×10^1 CFU/mL^[25],FTA-SRCA方法的检出限比其低1个数量级。原因可能是试剂盒法提取的模板DNA中含有蛋白质、脂肪等抑制因子,对扩增反应产生了抑制作用,大大降低了PCR检测牛奶中沙门氏菌的灵敏程度,故PCR方法的检出限比灵敏度低一个数量级。而因SRCA反应的灵敏度比PCR高,一定程度上抵消了部分抑制作用,故SRCA反应的灵敏度和检出限在同一数量级。FTA膜提取方法一定程度上降低了杂质含量,从而减小了抑制作用^[30]。

2.5 FTA-SRCA方法的实际应用与评价

本研究分别用PCR方法、SRCA方法、FTA-SRCA方法及国家标准方法GB 4789.4-2016对60份样品进行检测,结果如表2所示。结果显示,与国标相比,PCR、SRCA和FTA-SRCA方法均出现更多的阳性结果,原因在于传统培养方法灵敏度较低,且不能检测出VBNC状态的菌株,而这些状态的菌体仍具有致病的潜在危害。对分子扩增方法而言,食品中不同状态的沙门氏菌均含有基因组DNA,但其含量有所差异。SRCA扩增方法的灵敏度比PCR高,可以检测的沙门氏菌的检出限更低;对核酸提取方法而言,FTA膜法核酸提取的效果优于试剂盒法,故检测出的阳性结果更多。

表2 实际样品检测结果

Table 2 The results of actual sample detection

方法	真阳性	真阴性	假阳性	假阴性	敏感性	特异性	符合率	检出率
GB 4789.4-2016	4/60	56/60	0/60	0/60	-	-	-	6.67%
PCR	4/60	55/60	1/60	0/60	100.00%	98.21%	98.33%	8.33%
SRCA	4/60	54/60	2/60	0/60	100.00%	96.43%	96.67%	10.00%
FTA-SRCA	4/60	53/60	3/60	0/60	100.00%	94.64%	95.00%	11.67%

3 结论

3.1 本研究建立了一种FTA膜结合跨越式滚环等温扩增技术(FTA-SRCA)检测食品中沙门氏菌的方法。与传统培养方法相比,操作简单,节省了时间和成本;与变温扩增方法相比,无需复杂昂贵的变温仪器,无需对操作人员较高的技术要求;与等温扩增方法LAMP相比,引物设计简单,扩增结果可通过测序验证,利用荧光可视法进行结果的判定,避免了繁琐的电泳过程;与RCA方法相比,无需探针环化过程,节省时间和成本。与试剂盒提取DNA的SRCA方法相比,

核酸提取步骤简单,成本降低约1/2,时间减少约3/4,利用凹孔板可实现对大批量样品的集约化快速检测。

3.2 综上所述,本研究建立的检测食品中沙门氏菌的FTA-SRCA方法切实可行。该方法操作简便快速、成本低廉、特异性好、灵敏度高、检测限低。利用FTA膜提取的基因组DNA吸附固定在膜上,经过FTA纯化试剂和TE缓冲液的冲洗,在一定程度上可以消除蛋白质、油脂等杂质对扩增反应的抑制作用的影响。反应在凹孔板中恒温进行,可实现大批量样品的集约化检测。上述优势为该技术在基层检测机构中的应用和推广奠定了基础。

3.3 目前, 本研究所建立的 FTA-SRCA 方法仅适用于定性检测, 试验所用的 FTA 标准膜将 DNA 固定在其纤维基质上, 导致无法实现定量分析。可采用 FTA 洗脱膜洗脱 DNA, 实现 FTA-SRCA 方法的定量检测。另外, 该方法无法区分死活菌, 后续研究可将 PMA 方法与 FTA-SRCA 技术相结合, 实现死活菌的识别和定量。FTA-SRCA 方法也可用于寄生虫、动植物病毒、转基因食品和过敏原等方面的检测, 以期扩大大方法的应用范围并实现其应用价值。

参考文献

- [1] Jenings E, Tlm T, Holden D W. *Salmonella* SPI-2 type III secretion system effectors: molecular mechanisms and physiological consequences [J]. *Cell Host & Microbe*, 2017, 22(2): 217-231
- [2] Bell R L, Zheng J, Burrows E, et al. Ecological prevalence, genetic diversity, and epidemiological aspects of *Salmonella* isolated from tomato agricultural regions of the Virginia eastern shore [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 415
- [3] Silva N F D, Freire C, Delerue-Matos C. Electrochemical biosensors for *Salmonella*: state of the art and challenges in food safety assessment [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2018, 99: 667-682
- [4] U.S. Food & Drug Administration. Outbreaks of Foodborne Illness [R]. U.S.: FDA, 2020
- [5] 孙向华. 北京生猪屠宰场猪肉产品食源性致病菌污染状况调查与研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2019
SUN Xiang-hua. A survey of the infection status of foodborne pathogens for pork products from pig slaughterhouse in Beijing [D]. Beijing: Agricultural University of China, 2019
- [6] Deng X Y, Den Bakker H C, Hendriksen R S. Genomic epidemiology: whole - genome - sequencing - powered surveillance and outbreak investigation of foodborne bacterial pathogens [J]. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2016, 7(1): 353-374
- [7] 谢雪钦. 4 种不同方法检测审核样本中沙门氏菌的比较研究[J]. *食品科技*, 2015, 40(4): 381-384
XIE Xue-qin. A comparative study on four different methods in detection of *Salmonella* from measurement audit sample [J]. *Food Science and Technology*, 2015, 40(4): 381-384
- [8] Liu Y, Zhong Q, Wang J, et al. Enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* in VBNC state by PMA-combined real-time quantitative PCR coupled with confirmation of respiratory activity [J]. *Food Control*, 2018, 91(1): 85-91
- [9] Wielkoszynski T, Moghaddam A, Backman A, et al. Novel diagnostic ELISA test for discrimination between infections with *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* [J]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2018, 37(12): 2301-2306
- [10] Karoonuthaisiri N, Charlermroj R, Uawi setwathana U, et al. Development of antibody array for simultaneous detection of foodborne pathogens [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 24(6): 1641-1648
- [11] 王安, 岳鹏, 杜欣悦, 等. 酶联免疫吸附试验在食品检测中的应用[J]. *食品安全导刊*, 2018, 12: 107
WANG An, YUE Peng, DU Xin-yue, et al. The application of enzyme-linked immunosorbent assay in food detection [J]. *Food Safety Guide*, 2018, 12: 107
- [12] 宫强, 李战丽, 牛明福, 等. 鼠伤寒沙门氏菌 *ompC* 基因 PCR 的检测方法[J]. *食品科学*, 2015, 36(16): 251-254
GONG Qiang, LI Zhan-li, NIU Ming-fu, et al. Establishment of PCR detection method for *Salmonella typhimurium* based on *ompC* gene [J]. *Food Science*, 2015, 36(16): 251-254
- [13] 冯可, 胡文忠, 姜爱丽, 等. 鲜切果蔬中 4 种病原微生物多重 PCR 检测技术[J]. *食品科学*, 2018, 39(6): 276-283
FENG Ke, HU Wen-zhong, JIANG Ai-li, et al. Multiplex PCR method for detection of four foodborne pathogens on fresh-cut fruits and vegetables [J]. *Food Science*, 2018, 39(6): 276-283
- [14] 杜雄伟, 李叶, 江洁, 等. 肉制品中沙门氏菌 *invA* 基因实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. *食品工业科技*, 2013, 12: 68-70
DU Xiong-wei, LI Ye, GANG Jie, et al. Establishment of real-time fluorescent PCR detection method of *invA* gene in *Salmonella* [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2013, 12: 68-70
- [15] Hao L, Gu H, Duan N, et al. An enhanced chemiluminescence resonance energy transfer aptasensor based on rolling circle amplification and WS₂ nanosheet for *Staphylococcus aureus* detection [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2017, 959: 83-90
- [16] Liu N W, Zou D Y, Dong D R, et al. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification method for the simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 119-125
- [17] 范安妮, 余之蕴, 张娟, 等. 环介导等温扩增技术在食品安全检测领域的应用研究进展[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(10): 330-334
FAN An-ni, SHE Zhi-yun, ZHANG Juan, et al. Application

- research progress on loop-mediated isothermal amplification in food safety detection [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(10): 330-334
- [18] Zhang Y, Yang Q, Li C, et al. Sensitive and visual detection of *Cronobacter* spp. in powdered infant formula by saltatory rolling circle amplification method [J]. LWT, 2019, 107: 41-48
- [19] 苑宁,张蕴哲,张海娟,等.可视化跨越式滚环扩增技术检测食品中单增李斯特氏菌[J/OL].食品科学,1-11 [2020-09-04]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20200313.1010.018.html>
- YUAN Ning, ZHANG Yun-zhe, ZHANG Hai-juan, et al. Detection of *Listeria monocytogenes* in food by visual saltatory rolling circle amplification [J/OL]. Food Science, 1-11[2020-09-04]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20200313.1010.018.html>
- [20] Yuan N, Zhang Y Z, Xu H, et al. Development of the saltatory rolling circle amplification assay for rapid and visual detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(15): 4538-4545
- [21] Harvey M A, Kremer R D, Burghoff R L, et al. Methods and devices for collecting and storing clinical samples for genetic analysis: US, 5939259 [P/OL] 1999-08-17[2020-09-17]. <https://www.freepatentsonline.com/5939259.html>
- [22] Chukwunonso O N, Abraham G C, Silvia G Q, et al. A rapid molecular diagnosis of cutaneous Leishmaniasis by colorimetric malachite green-loop-mediated isothermal amplification (LAMP) combined with an FTA card as a direct sampling tool [J]. Acta Tropica, 2016, 153: 116-119
- [23] Franck B, Ikhlass E B, Vanessa H, et al. Use of FTA® card methodology for sampling and molecular characterization of *Echinococcus granulosus sensu lato* in Africa [J]. Experimental Parasitology, 2017, 173: 29-33
- [24] Liu Y J, Singh P, Mustapha A. Multiplex high resolution melt-curve real-time PCR assay for reliable detection of *Salmonella* [J]. Food Control, 2018, 91: 225-230
- [25] 李伟昊.FTA 滤膜用于 PCR 检测肉中的沙门氏菌[D].保定:河北农业大学,2009
- LI Wei-hao. Filter-based template preparation for rapid and sensitive PCR detection of *Salmonella* in meat [D]. Baoding: Agricultural University of Hebei, 2009
- [26] 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]
- GB 4789.4-2016, National Food Safety Standard-Food Microbiological Examination-*Salmonella* [S]
- [27] Garrido-Maestu A, Fucinos P, Azinheiro S, et al. Systematic loop-mediated isothermal amplification assays for rapid detection and characterization of *Salmonella* spp, *Enteritidis* and *Typhimurium* in food samples [J]. Food Control, 2017, 80: 297-306
- [28] 李慧,张会彦,马晓燕,等.改良 FTA-PCR 快速检测单核细胞增生李斯特氏菌研究[J].食品科学,2009,30(6):196-198
- LI Hui, ZHANG Hui-yan, MA Xiao-yan, et al. Improved flinders technology associates (FTA) filter paper- based DNA extraction with polymerase chain reaction (PCR) for rapid detection of *Listeria monocytogenes* [J]. Food Science, 2009, 30(6): 196-198
- [29] 任立松,陈梦馨,陈卓,等.环介质等温扩增技术快速检测阪崎肠杆菌的方法[J].食品科学,2013,34(12):296-299
- REN Li-song, CHEN Meng-xin, CHEN Zhuo, et al. Rapid detection of *Cronobacter sakazakii* using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay [J]. Food Science, 2013, 34(12): 296-299
- [30] 刘景武.PCR 技术检测肉及肉制品中金黄色葡萄球菌研究[D].保定:河北农业大学,2006
- LIU Jing-wu. Study on polymerase chain reaction assay for detection of *Staphylococcus aureus* in meat products [D]. Baoding: Agricultural University of Hebei, 2006