

食品中沙门氏菌恒温隔绝式 PCR 检测方法的建立

杨若璇^{1,2}, 佟尧^{1,2}, 赵燕英^{2,3}, 汤承^{2,3}, 刘骥^{1,2}, 朱成林¹, 曾英杰¹, 于基成⁴, 唐俊妮^{1,2*}

(1. 西南民族大学食品科学与技术学院, 四川成都 610041) (2. 西南民族大学青藏高原动物遗传资源保护与利用教育部重点实验室, 四川成都 610041) (3. 西南民族大学畜牧兽医学院, 四川成都 610041) (4. 大连民族大学生物技术资源利用教育部重点实验室, 沈阳大连 116600)

摘要: 为弥补传统培养方法耗时长和现场检测步骤繁琐等缺陷, 该研究建立了一种针对食品中沙门氏菌的恒温隔绝式 PCR 快速检测方法。根据沙门氏菌的 *invA* 基因设计特异性引物和探针, 通过水浴法快速提取细菌 DNA, 优化引物、探针以及模板用量, 建立了一种基于恒温隔绝式 PCR 快速检测沙门氏菌的方法, 并对方法的特异性和灵敏度及稳定性进行评价, 最后对比建立的方法与传统 PCR 方法、传统分离培养法对实际食品样品中沙门氏菌污染的检测效果。建立的恒温隔绝式 PCR 检测方法特异性好, 灵敏度高且与其他细菌无交叉反应, 最低检出限可达 75 CFU/mL, 可在 6 h 内完成检测实际食品样品中污染的沙门氏菌, 传统 PCR 方法至少需 12 h 才能达到与之相同的检测效果, 传统培养法验证了建立方法的准确性和可靠性。本研究建立的恒温隔绝式 PCR 方法更快速, 且操作简便, 适用于现场检测食品中污染的沙门氏菌。

关键词: 沙门氏菌; *invA* 基因; 恒温隔绝式 PCR; 快速检测

文章编号: 1673-9078(2021)09-285-293

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.9.0080

Establishment of Insulated Isothermal PCR Detection Method for *Salmonella* in Food

YANG Ruo-xuan^{1,2}, TONG Yao^{1,2}, ZHAO Yan-ying^{2,3}, TANG Cheng^{2,3}, LIU Ji^{1,2}, ZHU Cheng-lin¹, ZENG Ying-jie¹, YU Ji-cheng⁴, TANG Jun-ni^{1,2*}

(1. College of Food Sciences and Technology, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China)

(2. Key Laboratory of Qinghai-Tibetan Plateau, Animal Genetic Resource Reservation and Utilization of Ministry of Education, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China)

(3. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China)

(4. Key Laboratory of Biotechnology and Bioresources Utilization, Dalian Minzu University, Dalian 116600, China)

Abstract: In order to make up for the shortcomings of traditional culture method such as long time-consuming and cumbersome on-site detection steps, an insulated isothermal PCR (iiPCR) rapid detection method for *Salmonella* in food was established. Specific primers and probes were designed according to the *invA* gene of *Salmonella*; bacterial DNA was quickly extracted by the water bath method; the amount of primers, probes and templates was also optimized. Then, a method for rapid detection of *Salmonella* based on iiPCR was established. The specificity, sensitivity and stability of the established method were evaluated. At the same time, the established method was compared with the traditional PCR method and the traditional culture method for detecting *Salmonella* contamination in actual food samples. The established iiPCR detection method had good specificity, high sensitivity, and no cross-reaction with other bacteria. The lowest detection limit could reach 75

引文格式:

杨若璇, 佟尧, 赵燕英, 等. 食品中沙门氏菌恒温隔绝式 PCR 检测方法的建立[J]. 现代食品科技, 2021, 37(9): 285-293

YANG Ruo-xuan, TONG Yao, ZHAO Yan-ying, et al. Establishment of insulated isothermal PCR detection method for *Salmonella* in food [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(9): 285-293

收稿日期: 2021-01-23

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0500500); 四川省科技计划项目(2019YJ0261; 2019JDJQ0017); 生物技术与资源利用教育部重点实验室开放课题(KF2020008); 西南民族大学中央高校基本科研业务费专项资金资助(2020NTD04)

作者简介: 杨若璇(1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全专业, E-mail: 1255474486@qq.com

通讯作者: 唐俊妮(1971-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全与食品微生物, E-mail: junneytang@aliyun.com

CFU/mL. The established iiPCR method could detect *Salmonella* contaminated in actual food samples within 6 hours, while the same detection effect was achieved by traditional PCR methods at least 12 hours. The accuracy of iiPCR method was verified by the traditional culture method. The established iiPCR method for detecting *Salmonella* contaminated in food is suitable for field detection, more quickly and simpler.

Key words: *Salmonella*; *invA* gene; insulated isothermal PCR; rapid detection

沙门氏菌 (*Salmonella*) 是一种革兰氏阴性的杆状细菌, 属肠杆菌科, 是常见的食源性病原菌。自1885年首次被分离出来, 沙门氏菌血清型已发展到2637种。沙门氏菌是一种严重危害动物和人类健康的病原菌, 在人类及畜禽中均曾有过沙门氏菌病爆发的记录^[1]。由沙门氏菌感染而引发的病症有败血症、伤寒及肠胃炎等, 婴儿、老年人及免疫力低下者还可能出现菌血症, 少数还会伴随脑膜炎或骨髓炎。全球每年有1600万沙门氏菌感染病例, 其中约60万死亡, 据相关报道, 国内外沙门氏菌污染引起食物中毒的人数频占首位^[2]。近年来, 许多分离菌株出现了抗生素高度耐药, 给公众健康带来了巨大健康威胁^[3]。因此, 对沙门氏菌的检测非常重要。

对食品中沙门氏菌进行检测是预防沙门氏菌感染的有效手段。目前, 沙门氏菌的检测方法主要有传统检测方法、免疫学方法、分子生物学方法以及生物传感器检测的方法等。传统检测方法依据 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》^[4]的标准方法, 检测步骤为预增菌、增菌、分离培养、生化实验以及血清学鉴定分型等, 存在耗时长, 操作繁琐等缺点^[5]。近年来, 学者们一直在寻找更快速的检测方法, 如李倩影等^[6]利用pH响应比色酶联免疫吸附法检测牛奶中猪霍乱沙门氏菌, 所构建的比色ELISA方法适用于牛奶中不同浓度的猪霍乱沙门氏菌快速定量检测。Li等^[7]用荧光DNAzyme和通用封堵连接剂、超聚合酶链反应形成视觉生物传感器, 实现信号放大来检测沙门氏菌等。虽然这些方法快速, 但也存在一定缺陷, 如免疫学方法易出现假阳性或者假阴性, 生物传感器在稳定性和精确度上还有待改善, 并且对设备的要求非常高^[8,9]。乐振穹等^[10]用等温多自配引发扩增技术 (Isothermal Multiple Self-matching-initiated Amplification, IMSA), 建立了检测沙门氏菌的IMSA法, 适合用于食品中沙门氏菌快速检测。相比较而言, 分子生物学具有特异性好、灵敏度高、快速准确等优点, 已经广泛应用于微生物检测中^[11,12]。但是目前存在最大问题是适用于现场快速检测方法还比较匮乏。因此, 针对沙门氏菌探索适用于现场快速检测的方法非常有必要。

恒温隔绝式PCR技术 (Insulated isothermal PCR, iiPCR) 是一种新型的分子生物学快速检测技术, 基于

Rayleigh-Benard的对流原理, 通过反应管底部液体持续加热产生上部液体与下部液体的温度差, 控制散热的速率与对流的时间, 在反应管内部形成稳定温度梯度, 从而提供PCR扩增所需的反应条件^[13]。该技术最早在2002年, 由Krishnan^[14]首次报道, 结合POCKITTM系列手持式核酸检测仪, 体积小、自带电源, 加样后一键操作, 反应时间短, 灵敏度高, 方便快捷, 可达到现场快速检测的目的。

当前国内外报道iiPCR技术的文献主要应用于虾白斑病毒^[15]、尖孢镰刀菌^[16]、滑膜支原体^[17]、无乳链球菌^[18]、猪流行性腹泻病毒^[19]、牛冠状病毒^[20]等。利用该技术对食源性病原菌的研究还较少。本实验的目的是基于恒温隔绝式PCR技术建立一种快速检测沙门氏菌的方法, 并应用于实际食品样品检测, 为沙门氏菌现场快速检测平台建设提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株

本研究所用到的沙门氏菌 H9812、单增李斯特菌 ATCC19115、金黄色葡萄球菌 ATCC6538、大肠杆菌 ATCC25922、蜡样芽孢杆菌 ATCC11778 均由本实验室保存。

1.2 主要试剂与仪器

亚硒酸盐胱氨酸增菌液 (SC)、亚硫酸铋琼脂 (BS)、缓冲蛋白胨水 (BPW)、胰蛋白胨大豆琼脂 (TSA)、1%亚碲酸钾卵黄增菌液, 青岛海博生物技术有限公司; Premix Ex Taq (Probe qPCR)、TB Green Premix Ex Taq II、核酸染料, GELVIEW 宝生物工程 (大连)有限公司; 50 bp DNA Ladder、Taq PCR Master Mix (2x, blue dye), 北京擎科新业生物技术有限公司; 氯化钠, 天津市致远化学试剂有限公司; G-10 电泳琼脂糖凝胶, Biowest 公司; Tris-HCl、EDTA, 北京博奥拓科技有限责任公司。

POCKITTM 小型智能型核酸分析仪、R-tube (48), 厦门金瑞鸿捷生物科技有限公司; CFX96 荧光定量PCR仪、VerSaDoc2000 凝胶成像系统, 美国 Bio-Rad 有限公司; PCR 仪, TSNENEN031445 基因 (美国) 有限公司; Galanz WD800B 型微波炉, 顺德市格兰仕

微波炉电器有限责任公司; SC-15 数控超级恒温槽, 宁波新芝生物科技股份有限公司; Eppendorf 5804R 型

冷冻离心机, Eppendorf 公司; DYY-6C 电泳仪, 北京六一仪器厂。

表 1 *invA* 特异性引物和探针基本信息

Table 1 *invA* specific primers and probes

引物名称	引物序列 (5'-3')	扩增产物长度/bp	参考文献
<i>invA</i> -iiF	AGCGTACTGGAAAGGGAAAG	72	本研究设计
<i>invA</i> -iiR	ATACCGCCAATAAAGTTCACAAAG		
<i>invA</i> -Pb	6-FAM-CGTCACCTTTGATAAACTTCATCGCA-BHQ1	-	
<i>invA</i> -F	TCCCTTTGCGAATAACATCC	786	[23]
<i>invA</i> -R	ATTACTTGTGCCGAAGAGCC		

1.3 引物及探针的设计与合成

选取沙门氏菌的 *invA* 基因作为目标基因, 利用 Primer Premier 5 软件设计一对引物及探针, 并对引物与探针进行 BLAST 比对。另一对常规 PCR 引物参考 Chen 等^[21], 详细引物信息见表 1。引物和探针均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.4 模板 DNA 的提取

本实验参考陈光丽等^[22]水浴提取法提取细菌 DNA。

1.5 引物及探针的验证

采用实时荧光定量 PCR 仪(CFX96)对沙门氏菌、单增李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌及大肠杆菌及阴性对照进行扩增检测, 以验证引物和探针的可行性。反应体系及条件: 总反应体积为 20 μ L: 10 μ L Premix Ex Taq, 1.2 μ L 探针(10 μ mol/L), 上、下游引物各 0.4 μ L(10 μ mol/L), 1.0 μ L DNA 模板, 其余用无菌水补齐。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min 30 s, 以 95 $^{\circ}$ C 5 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s 扩增 40 个循环, 在 55 $^{\circ}$ C 结束开始收集荧光信号。

1.6 iiPCR 反应体系的摸索

以李凡等^[20]建立的牛冠状病毒 iiPCR 方法进行参考, 采 25 μ L 体系分别对已知浓度的 Taq 酶(预混酶) 5 U/ μ L (11~13.5 μ L) 上下游引物 10 μ mol/ μ L (0.5~2 μ L)、探针 10 μ mol/ μ L (0.25~1 μ L)、模板 DNA (1~4 μ L)、无菌水的用量进行条件探索, 确定各自用量的最佳值。

1.7 特异性试验

采用上述扩增体系, 结合 POCKITTM 手持式核酸分析仪对上述提取的沙门氏菌和其他细菌的 DNA 作为模板进行检测, 判定方法的特异性。

1.8 灵敏性试验

将纯培养的沙门氏菌菌液, 通过十倍梯度稀释, 稀释成不同的浓度梯度 (10^0 ~ 10^9), 并同时平板计数, 实验设置三个平行。采用 POCKITTM 手持式核酸分析仪进行样品的检测, 确定最低检出限。

1.9 稳定性试验

参考刘健新等^[23]荧光定量 RT-PCR 检测方法, 分别对过夜培养液的 3 个稀释度 (10^6 、 10^7 、 10^8) 提取的模板 DNA 采用 POCKITTM 手持式核酸分析仪进行三次重复性试验, 以评价该方法的稳定性。

1.10 实际食物样品的采集

市场上采集 14 份食品样品, 样品采集信息见表 2。

表 2 样品采集信息

Table 2 The sample collection information

样品编号	样品名称	样品编号	样品名称
1 号	冷藏三明治	8 号	凉拌蔬菜
2 号	速食鸡蛋	9 号	生里脊肉
3 号	火腿肠	10 号	生猪肉 1 号
4 号	鲜牛奶	11 号	生猪肉 2 号
5 号	蜂蜜蛋糕	12 号	生猪肉 3 号
6 号	卤猪耳	13 号	雪糕 1 号
7 号	凉拌鸡爪	14 号	雪糕 2 号

1.11 食物样品前增菌培养时长探索

将食物样品按照每份 10 g 直接分装至缓冲蛋白胨水中富集培养, 于培养第 2 h 开始, 平均每隔 1 h 采集一次培养液, 直至第 8 h, 采集前需静置 5 min, 利用 iiPCR 和传统 PCR 对上述采集点的培养液进行检测, 探索实际样品最小培养时长。

传统 PCR 反应体系及反应条件: Taq PCR Master Mix (2 \times , blue dye) 10 μ L、上游引物 0.4 μ L、下游引物 0.4 μ L、模板 DNA 1 μ L、无菌超纯水补足至 20 μ L

体系；反应扩增条件：95℃预变性 5 min、95℃变性 40 s，54℃退火 50 s，72℃延伸 40 s，35 个循环；72℃延伸 10 min。产物于 4℃保存或进行凝胶电泳检测。

产物的琼脂糖电泳检测：配置的琼脂糖凝胶的浓度为 3%，取 4.5 μL 扩增产物进行点样，90 V、72 A 条件下电泳 40 min，在凝胶成像系统下观察结果。

1.12 实际采集食物样品检测

针对市场上采集的 14 份食品样品，采用传统 PCR 方法、iiPCR 方法对样品进行检测，比较其检出率，同时采用传统培养法对结果进行验证。并将建立的 iiPCR 方法，与国标法、传统 PCR 方法和荧光定量 PCR 从样品采集到结果检出整个流程制作流程图对比。

1.13 数据处理

数据采用 Microsoft Excel、SPSS 25 软件进行分析处理。

2 结果与分析

2.1 引物及探针验证结果

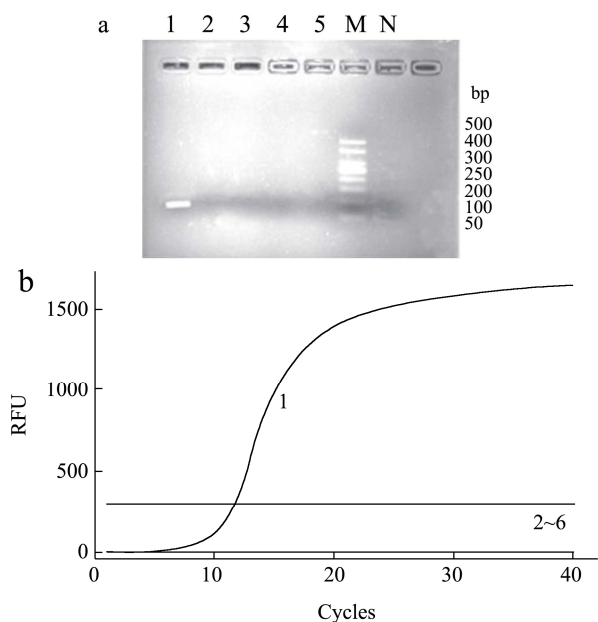


图 1 沙门氏菌的引物、探针验证结果

Fig.1 The primer and probe verification for *Salmonella*

注：图 a：传统 PCR；图 b：荧光定量 PCR。图 a：1~5 泳道：沙门氏菌、单增李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、蜡样芽孢杆菌；M：50 bp DNA Ladder；6 泳道：阴性对照；图 b：1：沙门氏菌；2~6：单增李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、蜡样芽孢杆菌及阴性对照。

成功建立 iiPCR 检测方法的前提是选择合适的靶基因和探针设计^[24]，因此，本实验的引物和探针设计

至关重要。肠侵袭蛋白与沙门氏菌的侵袭能力紧密相关^[25]，其中 *invA* 是主要的毒力因子，可以作为沙门氏菌的特异性基因^[26]。因此，本实验选择 *invA* 基因作为研究的靶基因。通过本实验设计引物和探针，采用传统 PCR 和实时荧光定量 PCR，分别对沙门氏菌、单增李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌及大肠杆菌进行扩增，结果见图 1，从图中可以看出只有沙门氏菌能够出现特异性扩增，其他 4 株菌未见任何扩增，证明设计的沙门氏菌引物与探针具有良好的特异性。

2.2 反应体系优化探索结果

通过对上、下游引物区间范围用量、探针区间范围用量、模板区间范围用量进行优化筛选，摸索出沙门氏菌 iiPCR 最终反应体系为：5 U/μL Taq 酶（预混酶）12.5 μL，10 μmol/μL 上、下游引物各 1 μL，10 μmol/μL 探针 0.5 μL，模板 2 μL，补足无菌水至 25 μL。

2.3 特异性试验结果

进一步将沙门氏菌、单增李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、蜡样芽孢杆菌的 DNA 按上述程序进行 iiPCR 扩增，结果见图 2，图中 POCKIT™ 手持式核酸分析仪界面上显示只有沙门氏菌检出为阳性 (+)，单增李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、蜡样芽孢杆菌和阴性对照均检出为阴性 (-)，初步表明针对沙门氏菌建立的 iiPCR 检测方法特异性良好。

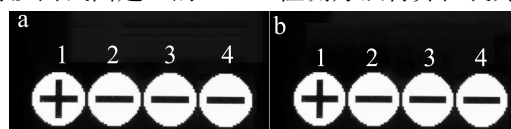


图 2 沙门氏菌特异性试验

Fig.2 Specific test for *Salmonella*

注：图 a：1~4 通道：1 为沙门氏菌，2 为单增李斯特氏菌，3 为大肠杆菌，4 为阴性对照；图 b：1~4 通道：1 为沙门氏菌，2 为金黄色葡萄球菌，3 为蜡样芽孢杆菌，4 为阴性对照。

2.4 灵敏度和稳定性试验结果



图 3 沙门氏菌稳定性和灵敏度试验

Fig.3 The stability and sensitivity test evaluation for *Salmonella*

注：图 a、b、c 的 1~4 通道：1: 7.5×10^2 CFU/mL；2: 7.5×10^1 CFU/mL；3: 7.5 CFU/mL；4: 阴性对照。

将纯培养浓度为 7.5×10^8 CFU/mL 沙门氏菌菌液，通过梯度稀释至不同的浓度，然后采用上述扩增体系

对不同稀释浓度的培养液 (7.5×10^2 CFU/mL、 7.5×10^1 CFU/mL、7.5 CFU/mL) 进行检测, 从图 3 中可以看出, POCKIT™ 手持式核酸分析仪界面上 3 号孔显示为阴性(-), 1 号孔和 2 号孔显示为阳性(+), 三次重复实验的结果一致, 表明所建立的 iiPCR 方法稳定性良好, 对沙门氏菌纯培养液的最低检出限为 75 CFU/mL。

进一步将纯培养浓度为 7.5×10^8 CFU/mL 的沙门氏菌菌液通过十倍梯度稀释培养液, 分别采用传统 PCR 方法及实时荧光定量 PCR 方法进行灵敏度检测对比, 结果见图 4a 和 4b。由图 4a 可得, 传统 PCR 方法对沙门氏菌的最低检出限为泳道 6 中的 7.5×10^3 CFU/mL; 由图 4b 可得, 实时荧光定量 PCR 方法对沙门氏菌的最低检出限为 7.5×10^2 CFU/mL; 而本研究建立的 iiPCR 方法对沙门氏菌的最低检出限为 75 CFU/mL, 灵敏度比传统 PCR 灵敏 100 倍, 比实时荧光定量 PCR 灵敏 10 倍。

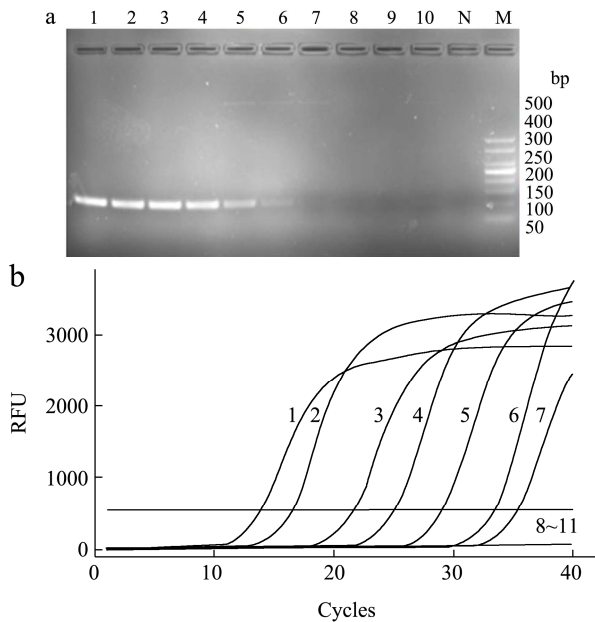


图 4 沙门氏菌的传统 PCR 和实时荧光定量 PCR 敏感性试验

Fig.4 Sensitivity test by traditional PCR and real-time fluorescence quantitative PCR for *Salmonella*

注: 4A: 1~10 泳道分别为: 7.5×10^8 CFU/mL、 7.5×10^7 CFU/mL、 7.5×10^6 CFU/mL、 7.5×10^5 CFU/mL、 7.5×10^4 CFU/mL、 7.5×10^3 CFU/mL、 7.5×10^2 CFU/mL、 7.5×10^1 CFU/mL、 7.5×10^0 CFU/mL、 7.5×10^{-1} CFU/mL; M: 50bp DNA Ladder; N 泳道: 阴性对照; 4B: 1-10: 7.5×10^8 CFU/mL、 7.5×10^7 CFU/mL、 7.5×10^6 CFU/mL、 7.5×10^5 CFU/mL、 7.5×10^4 CFU/mL、 7.5×10^3 CFU/mL、 7.5×10^2 CFU/mL、 7.5×10^1 CFU/mL、 7.5×10^0 CFU/mL、 7.5×10^{-1} CFU/mL; 11: 阴性对照。

2.4 食物样品前增菌培养时长的探索结果

对实际采集的阳性样品在缓冲蛋白胨水 (BPW)

中进行预增菌, 通过对 2、3、4、5、6、7 和 8 h 时的培养液进行检测, 结果见图 5。由图 5a 可以看出, 采用传统 PCR 检测, 在 8 h 预增菌的培养点上可以检测出阳性条带。由图 5b 可以看出, iiPCR 在 5 h、6 h、7 h 和 8 h 的预增菌培养点上都可以检测出阳性结果, 说明建立的 iiPCR 方法检测的灵敏度更高。

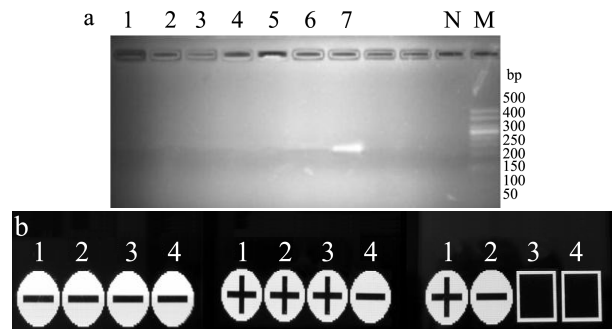


图 5 实际样品前增菌培养时间探索

Fig.5 Exploring the pre-enrichment and cultivation time for actual samples detection

注: 图 a: 传统 PCR; 图 b: iiPCR。图 a: 1~7 泳道: 2、3、4、5、6、7 和 8 h 增菌培养点; M: 50bp DNA Ladder; N: 阴性对照; 图 b: 左: 1~3 通道为: 2、3、4 h 培养点; 4 通道为阴性对照; 中: 1~3 通道为: 5、6、7 h 培养点; 4 通道为阴性对照; 右: 1 通道为 8 h 培养点; 2 通道为阴性对照。

2.5 方法的初步应用

采用建立的 iiPCR 方法对采集的 14 份实际样品进行检测, 在 5 h 增菌培养点, iiPCR 方法扩增结果见图 6, iiPCR 方法对 2 份样品检出沙门氏菌呈阳性结果, 检出率为 14% (2/14)。

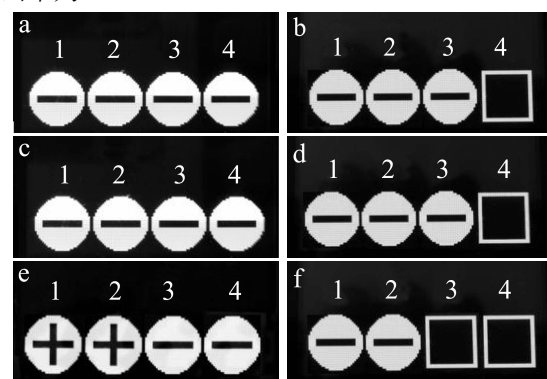


图 6 食品样品 iiPCR 在 5 h 培养点的检出结果

Fig.6 The iiPCR detection results for food samples at 5 h

注: a: 1~4 通道: 1 号、2 号、3 号、阴性; b: 1~3 通道: 4 号、5 号、阴性; c: 1~4 通道: 6 号、7 号、8 号、阴性; d: 1~3 通道: 9 号、10 号、阴性; e: 1~4 通道: 11 号、12 号、13 号、阴性; f: 1~2 通道: 14 号、阴性。

2.6 三种检出方法的比较及检测流程对比

表 3 三种检测方法的比较

Table 3 The comparison of three detection methods

样品编号	iiPCR 法	传统 PCR 法	传统培养法
1 号	-	-	-
2 号	-	-	-
3 号	-	-	-
4 号	-	-	-
5 号	-	-	-
6 号	-	-	-
7 号	-	-	-
8 号	-	-	-
9 号	-	-	-
10 号	-	-	-
11 号	+	+	+
12 号	+	+	+
13 号	-	-	-
14 号	-	-	-

注：“+”表示检出为阳性；“-”表示未检出。

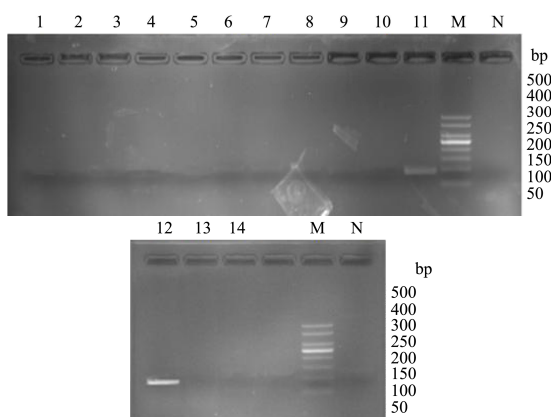


图 7 食品样品经过 8 h 预增菌的 PCR 检出结果 (沙门氏菌)

Fig.7 Food sample detection results of traditional PCR by 8 h pre-enrichment culture (*Salmonella*)

注: 1~14 泳道: 实际样品 1~14 号; M: 50bp DNA Ladder; N: 阴性对照。

采用建立的 iiPCR 方法与传统 PCR 方法以及传统培养分离法对采集样品进行检出结果比较, 结果统计见表 3。在 8 h 培养点时传统 PCR 方法扩增结果见图 7, 传统 PCR 方法也可对 2 份样品 (11 号和 12 号) 检出沙门氏菌阳性结果, 检出率为 14% (2/14)。根据 GB 4789.4-2016 对 18 h 培养点的样品进行分离鉴定, 结果见图 8a, 发现所检出的 2 份阳性样品分离的菌落, 可在 BS 培养基上生长为圆形、呈黑色并带有金属光泽的菌落, 在传统培养法分离的菌落进行常规 PCR 鉴定, 检测结果见图 8b, 图中也显示只有 11 号和 12 号

检测结果呈阳性, 其余均为阴性, 与 5 h 培养点时的 iiPCR 方法检测出阳性结果一致。

对建立的 iiPCR 方法和传统培养法、传统 PCR 方法、荧光定量 PCR 进行对比, 从样品的采集到结果的检出, 传统培养法整个鉴定检测流程至少需要 4~6 d^[27], 传统 PCR 方法检测整个流程需 12~16 h 甚至更久, 荧光定量 PCR 方法检测整个流程需 10~12 h 左右, 而 iiPCR 方法检测整个流程可在 6~8 h 完成, 比其他检测方法节省很多时间, 并且可直接得出结果, 操作更便捷, 如图 9。

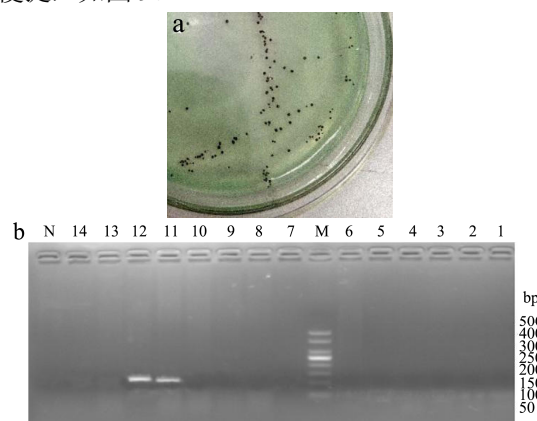


图 8 传统培养法分离的菌落 (a) 和分离细菌的 PCR 鉴定结果 (b)

Fig.8 The traditional culture method validation (a) and PCR identification results (b)

注: 1~14 泳道: 实际样品 1 号~14 号; M: 50 bp DNA Ladder; N: 阴性对照。

细菌在接种培养后, 前 1~4 h 生长一般迟缓, 繁殖数量较少, 迟缓期后, 进入对数期, 这个时期细菌开始大量繁殖。本研究通过探索对于食品样品中沙门氏菌前增菌培养时间, 只需在缓冲蛋白胨水中培养 5 h 后配合水浴法提取模板 DNA, 利用建立的 iiPCR 方法即可检测出样品中是否含有沙门氏菌。研究结果和 Tsen 等^[28]及 Du 等^[29]探索结果相似, Tsen 等^[28]针对鸡肉中沙门氏菌检测, 验证鸡肉样品经过富集以及 DNA 提取步骤, 可利用 iiPCR 在 8 h 内完成检测结果。Du 等^[29]针对餐饮中的沙门氏菌和志贺氏菌进行 iiPCR 方法的开发和评估, 说明该技术对食品污染致病菌的检测应用是可行的。本实验建立的 iiPCR 方法灵敏度比 Du 等建立的 iiPCR (最低检出限 10^3 CFU/mL) 灵敏度高, 本实验检出限为 75 CFU/mL。结合 POCKITTM 系列手持式核酸检测仪 42 min 的反应和结果显示, 大大节省时间, 从目标细菌富集, 细菌模板 DNA 提取, 靶特异性基因扩增, 到检测结果显示, 整个检测流程可在 6~8 h 左右完成。

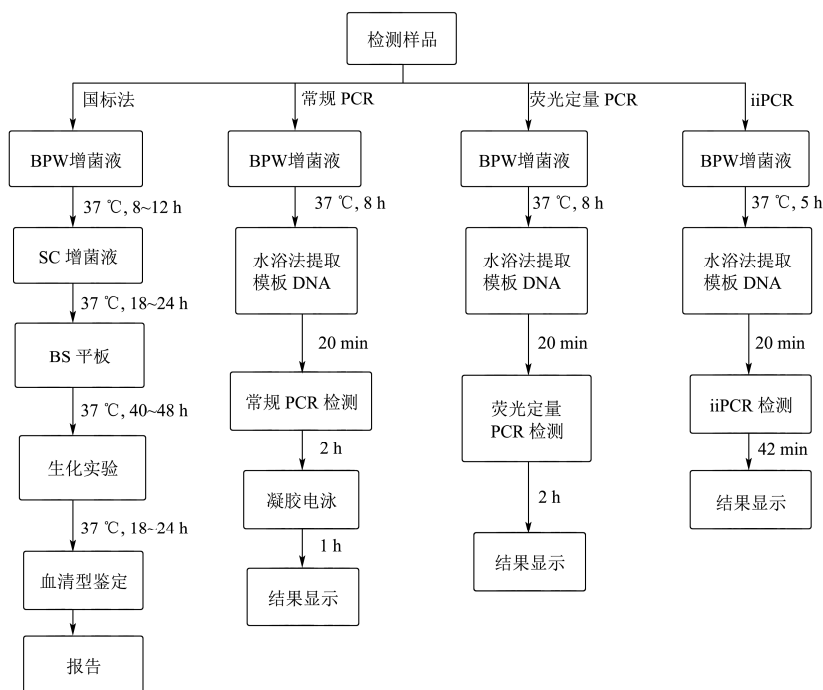


图9 iiPCR 方法和其他检测方法对比流程图

Fig.9 The comparison flow chart of iiPCR and other detection methods

3 结论

3.1 本研究建立了检测沙门氏菌的 iiPCR 方法，克服了仪器昂贵、不方便携带、操作人员要求高等缺点。选择沙门氏菌 *invA* 基因作为本方法的靶基因，设计了引物和探针，对 iiPCR 反应体系进行优化，获得最佳反应体系。经实验得出建立的 iiPCR 方法灵敏度高，沙门氏菌的最低检出限可达 75 CFU/mL，采用 iiPCR 检测其他细菌（单增李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、蜡样芽孢杆菌等）结果无交叉反应，说明特异性良好。并分别对沙门氏菌培养液的三个稀释度进行了三次重复实验，结果完全一致，说明建立的 iiPCR 方法稳定性良好。

3.2 利用上述建立的方法对实际采集食品样品进行应用检测，将采集的 14 份食品样品直接在缓冲蛋白胨水中富集培养，采集 2、3、4、5、6、7、8 h 的培养液，同时采用建立的 iiPCR 方法和传统 PCR 方法进行样品检测和比对，结果表明在 5 h 的培养点，建立的 iiPCR 方法能对 2 份样品可检测出沙门氏菌阳性结果，检测率为 14% (2/14)；而采用传统 PCR 方法在 8 h 培养点时才能对这 2 份样品检测出阳性结果，检出率为 14% (2/14)。虽然实时荧光定量 PCR 灵敏度要高于传统 PCR 2~3 个数量级，但本研究建立的 iiPCR 方法比实时荧光定量 PCR 的灵敏度高 10 倍，且基于 4 通道 POCKIT™ 手持核酸分析仪，自带电源，体型小，方便携带并且一键操作，加样后直接反应，检测

过程仅 42 min，反应后结果直接显示于液晶屏，省去分析及凝胶电泳等繁琐过程，整体耗时要远比传统 PCR 和荧光定量 PCR 检测方法少。可见，针对实际样品的检测，建立的 iiPCR 更加快捷、灵敏和实用。但本研究也存在不足，特别是方法中涉及的阳性菌株和阴性菌株数量不够多，为更好地评价建立的 iiPCR 方法的特异性和灵敏度，我们会在后续的研究中进一步增加食品样品采集数量，并与传统法和荧光实时定量 PCR 方法进行比较，以达到方法的推广使用。

3.3 综上，本研究建立的一种基于恒温隔绝式 PCR 技术检测沙门氏菌的方法，对方法进行部分应用，初步证明该方法灵敏度高，特异性好，稳定性好。将该方法结合水浴法快速提取模板 DNA 以及 POCKIT™ 手持式核酸分析仪，通过设计特异性引物和探针，可实现对沙门氏菌现场快速检测。从目标细菌富集，到模板 DNA 提取，特异性基因扩增到出现检测结果，整个过程可在 6~8 h 完成。相比其它检测方法，至少节省 6 h 检测时间，省去凝胶电泳过程，操作更便捷。

参考文献

[1] John A Crump, John Wain. *Salmonella* [J]. Reference Module in Biomedical Sciences, 2017: 425-433
 [2] 冯兰,安添午,崔鹏飞,等.牦牛德尔卑沙门氏菌的分离、鉴定及致病性研究[J].四川大学学报(自然科学版),2020,57(5): 1022-1028
 FENG Lan, AN Tian-wu, CUI Peng-fei, et al. Isolation,

- identification and pathogenicity experiment of *Salmonella enterica* Serovar Derby from yaks (*Poephagus grunniens*) with diarrhea in Tibetan Qiang autonomous prefecture of Ngawa, China [J]. Journal of Sichuan University (Natural Science Edition), 2020, 57(5): 1022-1028
- [3] Yan T, Liang L, Yin P, et al. Application of a novel phage LPSEYT for biological control of *Salmonella* in foods [J]. Microorganisms, 2020, 8(3): 400
- [4] 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]
- [5] 赵平,杨光,丁松乔,等.食品中沙门氏菌检测研究进展[J].食品安全导刊,2016,15:100-101
ZHAO Ping, YANG Guang, DING Song-qiao, et al. Research progress in the detection of *Salmonella* in food [J]. Journal Article, 2016, 15: 100-101
- [6] 李倩影,张抗抗,周耀锋,等.pH 响应比色酶联免疫吸附法检测牛奶中猪霍乱沙门氏菌[J].食品工业科技,2021,42(1): 227-232
LI Qian-ying, ZHANG Kang-kang, ZHOU Yao-feng, et al. Detection of *Salmonella cholerae* in milk by pH-responsive colorimetric enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Food and Machinery, 2021, 42(1): 227-232
- [7] Li ST, Zhang Y, Tian J J, et al. Luminescent DNAzyme and universal blocking linker super polymerase chain reaction visual biosensor for the detection of *Salmonella* [J]. Food Chemistry, 2020, 324: 126859
- [8] 杨柳,胡文忠,姜爱丽,等.分子生物学方法检测沙门氏菌的研究进展[J].食品工业科技,2016,37(9):372-375,379
YANG Liu, HU Wen-zhong, JIANG Ai-li, et al. Research progress in molecular biology methods for detection of *Salmonella* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(9): 372-375, 379
- [9] 乌日娜,李建科.生物传感器在农药残留分析中的研究现状及展望[J].食品与机械,2005,2:54-56,76
WU Ri-na, LI Jian-ke. Advances and prospects of biosensor research on pesticide residue analysis [J]. Food and Machinery, 2005, 2: 54-56, 76
- [10] 乐振穹,陈东才,张细玲,等.IMSA 技术快速检测沙门氏菌方法的建立及应用[J].生物技术,2020,30(3):255-261,274
YUE Zhen-qiao, CHEN Dong-cai, ZHANG Xi-ling, et al. Establishment and application of IMSA technology in the rapid detection on *Salmonella* [J]. Biotechnology, 2020, 30(3): 255-261, 274
- [11] 李杰,丁承超,翟续昭,等.沙门氏菌检测技术研究进展[J].微生物学杂志,2017,37(4):126-132
LI Jie, DING Cheng-chao, ZHAI Xu-zhao, et al. Advances in *Salmonella* detection techniques [J]. Journal of Microbiology, 2017, 37(4): 126-132
- [12] 黄静玮,汪铭书,程安春.沙门氏菌分子生物学研究进展[J].中国人兽共患病学报,2011,27(7):649-652
HUANG Jing-wei, WANG Ming-shu, CHENG An-chun. Advances in molecular biology of *Salmonella* [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2011, 27(7): 649-652
- [13] Chang H F, Tsai Y L, Tsai C F, et al. A thermally baffled device for highly stabilized convective PCR [J]. Biotechnology Journal, 2012, 7(5): 662-666
- [14] Krishnan M, Ugaz V M, Burns M A. PCR in a Rayleigh-Bénard convection cell [J]. Science, 2002, 298(5594): 793
- [15] Tsai Y L, Wang H C, Lo C F, et al. Validation of a commercial insulated isothermal PCR-based POCKIT test for rapid and easy detection of white spot syndrome virus infection in *Litopenaeus vannamei* [J]. Plos One, 2014, 9(3): 90545
- [16] Lin Y H, Lin Y J, Chang T D, et al. Development of a TaqMan probe-based insulated isothermal polymerase chain reaction (iiPCR) assay for detection of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 4 [J]. Plos One, 2016, 11(7): 0159681
- [17] Kuo H C, Lo D Y, Chen C L, et al. Rapid and sensitive detection of *Mycoplasma synoviae* by an insulated isothermal polymerase chain reaction-based assay on a field-deployable device [J]. Poultry Science, 2017, 96(1): 35-41
- [18] 王娟,卞国志,贾坤,等.无乳糖链球菌恒温热隔绝式 PCR 快速检测方法的建立[J].中国预防兽医学报,2017,39(9):731-733, 745
WANG Juan, BIAN Guo-zhi, JIA Kun, et al. Establishment of insulated isothermal PCR assay of *Streptococcus agalactiae* [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2017, 39(9): 731-733, 745
- [19] 于新友,李天芝,吴信明,等.基于恒温隔绝式荧光 PCR 技术的猪流行性腹泻病毒检测方法的建立及应用[J].畜牧与兽医,2018,50(10):78-81
YU Xin-you, LI Tian-zhi, WU Xin-ming, et al. Establishment and application of a method for detection of porcine epidemic diarrhea virus based on insulated isothermal PCR [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2018, 50(10): 78-81
- [20] 李凡,岳华,邱莞思,等.基于恒温隔绝式荧光 PCR 技术现场检测牛轮状病毒方法的建立及应用[J].畜牧兽医学报,2017,

- 48(6):1092-1098
- LI Fan, YUE Hua, QIU Wan-si, et al. development and application of an insulated isothermal pcr (iipcr) for on-site detecting bovine rotavirus [J]. *Acta Veterinaria Et Zootechnica Sinica*, 2017, 48(6): 1092-1098
- [21] Chen J, Tang J, Bhunia A K, et al. Development of a multi-pathogen enrichment broth for simultaneous growth of five common foodborne pathogens [J]. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2015, 61(6): 224-231
- [22] 陈光丽,刘海林,马健.煮沸法提取细菌 DNA 在布病病原检测中的应用[J].畜牧兽医科技信息,2015,1:28-29
- CHEN Guang-li, LIU Hai-lin, MA Jian. Application of bacterial DNA extraction by boiling method in pathogen detection of brucellosis [J]. *Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2015, 1: 28-29
- [23] 刘建新,查云峰,鲁荣,等.猪塞尼卡病毒荧光定量RT-PCR检测方法的建立及初步应用[J].中国兽医科学,2019,49(3): 274-279
- LIU Jian-xin, ZHA Yun-feng, LU Rong, et al. Establishment and primary application of real-time RT-PCR for the detection of porcine *Senecavirus* [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2019, 49(3): 274-279
- [24] Tsai Y L, Lin Y C, Chou P H, et al. Detection of white spot syndrome virus by polymerase chain reaction performed under insulated isothermal conditions [J]. *Journal of Virological Methods*, 2012, 181(1): 134-137
- [25] 陈金顶,索青利,廖明,等.沙门氏菌的 *invA* 基因序列分析与分子检测[J].中国人兽共患病杂志,2004,10:868-871
- CHEN Jin-ding, SUO Qing-li, LIAO Ming, et al. DNA sequence analysis and molecular detection of *invA* gene from *salmonella* spp [J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2004, 10: 868-871
- [26] 宋东晓.多重 PCR 检测牛肉中沙门氏菌、单增李斯特菌和大肠杆菌 O157:H7 的研究[D].泰安:山东农业大学,2014
- SONG Dong-xiao. Detection of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichiacoli* O157:H7 in beef by multiplex PCR [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2014
- [27] 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]
- [28] Tsen H Y, Shih C M, Teng P H, et al. Detection of *Salmonella* in chicken meat by insulated isothermal PCR [J]. *Journal of Food Protection*, 2013, 76(8): 1322-1329
- [29] Du T, Lin J H, Zhao J H, et al. Development and evaluation of an iiPCR assay for *Salmonella* and *Shigella* detection on a field-deployable PCR system [J]. *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology*, 2020, 2020(4): 9373984

(上接第 144 页)

- [43] 赵昱瑄,张敏,姜雪,等.不同贮藏温度结合热处理对黄瓜品质及生理生化指标的影响[J].安徽农业大学学报, 2020,47(6):1023-1030
- ZHAO Yu-xuan, ZHANG Min, JIANG Xue, et al. Effects of different storage temperature combined with heat treatment on quality and physiological-biochemical indexes of cucumbers [J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2020, 47(6): 1023-1030
- [44] Cai F, Yang C O, Duan P P, et al. Purification and characterization of a novel thermal stable peroxidase from *Jatropha curcas* leaves [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2012, 77: 59-66
- [45] 郭丹,韩英群,魏鑫,等.鲜切苹果冷藏期间品质与褐变生理变化关系[J].河南农业科学,2020,49(8):173-180
- GUO Dan, HAN Ying-qun, WEI Xin, et al. Relationship between quality and browning physiological changes of fresh-cutting apples during cold storage period [J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2020, 49(8): 173-180
- [46] 白永亮,余铭,袁根良,等.大蕉后熟期的褐变相关性及其褐变底物鉴定[J].食品科学,2012,33(4):271-275
- BAI Yong-liang, YU Ming, YUAN Gen-liang, et al. Correlations between browning degree and PPO or POD activity of Dajiao banana (*Musa paradisiaca* ABB cv. *dajiao*) and preliminary identification of browning substrates during postharvest ripening [J]. *Food Science*, 2012, 33(4): 271-275
- [47] 苏艳丽,杨健,田永真,等.梨果实发育过程中褐变相关生理指标的变化[J].果树学报,2018,35(增刊):118-124
- SU Yan-li, YANG Jian, TIAN Yong-zhen, et al. Study on the changes of physiological indexes related to browning during fruit development in pears [J]. *Journal of Fruit Science*, 2018, 35(Supplement): 118-124