

## 食品中沙门菌 PCR 检测方法的建立

李业鹏 钟 凯 杨宝兰 李志刚 刘秀梅 计 融  
(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021)

**摘要:**为建立食品中快速检测沙门菌的 PCR 方法。选取沙门菌属侵袭性抗原保守基因 *invA* 基因上的靶序列设计一对引物,选择最适  $Mg^{++}$  浓度和退火温度,建立最适 PCR 反应体系,用 2% 琼脂糖,5  $\mu$ l 反应产物(包括 EB),100 V,40 min 进行电泳,显像。用该引物对已经传统方法鉴定的 22 种 77 株沙门菌和 24 种 24 株非沙门菌进行特异性检测,并对人工污染的食品进行检测条件的研究。 $Mg^{++}$  浓度和退火温度对该反应体系的影响较小,稳定性较好;经传统方法鉴定的 22 种 77 株沙门菌和 24 种 24 株非沙门菌验证了该检验方法具有很好的特异性;该检测方法可以在 19 h 内检出含有沙门菌  $10^2$  CFU/g 的食品(火腿肠、鸡蛋、散装肉馅)。与传统方法比较,该方法快速、敏感、特异,能在较短的时间内对大量样品同时进行检测,适用于食品中沙门菌的快速、敏感、特异检测。

**关键词:**聚合酶链反应;沙门氏菌属;食品;基因

## Polymerase Chain Reaction (PCR) Method for Detection of Salmonella in Foods

LI Ye-peng, ZHONG Kai, YANG Bao-lan, LI Zhi-gang, LIU Xiu-mei, JI Rong

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100050, China)

**Abstract:** To establish a rapid detection technique for Salmonella in foods by polymerase chain reaction (PCR). Amplification of nucleotide sequences within the *invA* gene of Salmonella was evaluated as a means of detecting Salmonella. A collection of 77 strains of Salmonella, isolated mostly from humans and animals in China, and a collection of 24 genera of non-Salmonella bacteria were used for the research of detecting Salmonella in foods by the PCR. Results: (1) The PCR method of detecting Salmonella was established, including sample preparation, amplification of Salmonella, DNA extraction, amplification of the DNA and detection of the amplification products. The result showed that the PCR method had good stability because the  $Mg^{++}$  and the annealing temperature had little impact on the PCR reaction. (2) All the Salmonella strains could be amplified into 284 bp products while none of the non-Salmonella genera yielded specific amplification product. (3) The assay allowed detection of Salmonella from foods containing  $10^2$  CFU/g of the bacteria within 19 hours. In contrast to the conventional culture technique, the PCR method is more rapid, sensitive and specific. (4) The assay was able to detect Salmonella from a lot of food at the same time in a shorter period. The method deserves spreading. A rapid, sensitive and specific PCR method is established to detect Salmonella in foods.

**Key word:** Polymerase Chain Reaction; Salmonella; Food; genes

目前沙门菌的检测方法仍为依靠生化反应和血清学实验<sup>[1,2]</sup>。近年来,分子生物学技术中的 PCR 技术以其敏感、特异、简便、快速、可以定量等优点被越来越多地应用。本文针对沙门菌属侵袭性抗原保守基因(*invA* gene)设计引物,优化了 PCR 检测条件,建立了检测沙门菌属的 PCR 检测方法,并进行了人工污染沙门菌的食品(生肉、鸡蛋、火腿肠等)中沙门菌 PCR 检测方法的应用性研究。

## 1 材料与方

## 1.1 材料

1.1.1 主要仪器 PTC-200 核酸扩增仪(美国基因公司)、5415D 离心机(德国 eppendorf 公司)、BIO-

RAD300 电泳仪(美国伯乐公司)、SW22 恒温摇床( $\mu$ LABO 公司)、VD2 5132 凝胶成像系统(法国 VL 公司)、微量进样器(法国吉尔森公司)、PYX-DHS 培养箱(上海跃进医疗器械厂)。

1.1.2 主要试剂(化学试剂均为分析纯) Tris、HCl、NaCl、蔗糖、EDTA、低熔点琼脂糖、EB、硼酸、RNA 酶、DNA 提取试剂盒(Promega 公司)、PCR 反应试剂盒(Promega 公司)、各种培养基(陆桥公司)。

1.1.3 引物合成 根据参考文献[3],利用沙门菌属侵袭性抗原保守基因(*invA* gene, Rahn, 1992)设计引物,委托上海生物工程技术有限公司合成,其序列如下。

5'-GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GCC AA-3';  
5'-TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C-3'

该引物产生 284 bp 的扩增产物。

1.1.4 菌种 选择肠炎沙门菌和鼠伤寒沙门菌的

基金项目:国家“十五”科技攻关项目(2001BA804A03)

作者简介:李业鹏 女 副研究员

WHO 考核菌株为沙门菌代表菌。77 株沙门菌和 24 株非沙门菌来源于中国药品生物制品检定所、北京市疾病预防控制中心、中国疾病预防控制中心营养

与食品安全所、北京市临床药品研究所、中国疾病预防控制中心传染病研究所。详细情况见表 1。

表 1 菌种及 PCR 结果一览表

菌种名称	来源	PCR 结果	菌种名称	来源	PCR 结果	菌种名称	来源	PCR 结果
<i>EHEC O157: H7</i>	c	-	<i>S. aberdeen</i>	a	+	<i>S. enteritidis</i>	b 2029 #	+
Enterotoxigenic <i>E. coli</i>	e	-	<i>S. anatum</i>	a	+	<i>S. enteritidis</i>	吉林省 39 #	+
Enteroinvasive <i>E. coli</i>	e	-	<i>S. arizona</i>	a	+	<i>S. agona</i>	吉林省 48 #	+
Enterohemorrhagic <i>E. coli</i>	e	-	<i>S. choleraesuis</i>	a	+	<i>S. reading</i>	吉林省 49 #	+
Enteropathogenic <i>E. coli</i>	e	-	<i>S. dublin</i>	a	+	<i>S. reading</i>	吉林省 51 #	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	浙江省	-	<i>S. kisangani</i>	a	+	<i>S. derby</i>	吉林省 53 #	+
<i>L. monocytogenes</i>	a	-	<i>S. kottbus</i>	a	+	<i>S. derby</i>	吉林省 57 #	+
<i>S. aureus</i>	a	-	<i>S. muenster</i>	a	+	<i>S. derby</i>	吉林省 58 #	+
<i>B. cereus</i>	d	-	<i>S. newport</i>	a	+	<i>S. derby</i>	吉林省 59 #	+
<i>K. pneumoniae</i>	d	-	<i>S. paratyphi A</i>	a	+	<i>S. enteritidis</i>	吉林省 65 #	+
<i>Bacteroides</i>	d	-	<i>S. paratyphi B</i>	a	+	<i>S. anatum</i>	湖北省 72 #	+
<i>Escherichia coli</i>	d	-	<i>S. paratyphi C</i>	a	+	<i>S. muenster</i>	湖北省 73 #	+
<i>S. sonnei</i>	d	-	<i>S. serftenberg</i>	a	+	<i>S. derby</i>	湖北省 74 #	+
<i>S. flexneri</i>	d	-	<i>S. thompson</i>	a	+	<i>S. anatum</i>	湖北省 76 #	+
<i>S. boydii</i>	d	-	<i>S. typhi</i>	a	+	<i>S. derby</i>	湖北省 80 #	+
<i>S. dysenteriae</i>	d	-	<i>S. typhimurium</i>	a	+	<i>S. derby</i>	湖北省 81 #	+
<i>P. mirabilis</i>	d	-	<i>S. typhimurium</i>	WHO	+	<i>S. agona</i>	福建省 83 #	+
<i>Y. enterocolitica</i>	d	-	<i>S. enteritidis</i>	WHO	+	<i>S. agona</i>	福建省 84 #	+
<i>E. cloacae</i>	d	-	<i>S. tsiongw</i>	c	+	<i>S. agona</i>	浙江省 92 #	+
<i>H. alvei</i>	d	-	<i>S. newlands</i>	c	+	<i>S. enteritidis</i>	湖北省 95 #	+
<i>K. ozaenae</i>	d	-	<i>S. stanleyville</i>	c	+	<i>S. enteritidis</i>	湖北省 99 #	+
<i>S. marcescens</i>	d	-	<i>S. enteritidis</i>	河南省 163	+	<i>S. derby</i>	浙江省 101 #	+
<i>C. freundii</i>	d	-	<i>S. derby</i>	河南省 165 #	+	<i>S. enteritidis</i>	重庆市 127 #	+
<i>P. rettgeri</i>	d	-	<i>S. enteritidis</i>	河南省 168 #	+	<i>S. derby</i>	重庆市 129 #	+
			<i>S. enteritidis</i>	河南省 170 #	+	<i>S. agona</i>	重庆市 131 #	+
			<i>S. enteritidis</i>	河南省 171 #	+	<i>S. enteritidis</i>	重庆市 134 #	+
			<i>S. enteritidis</i>	河南省 172 #	+	<i>S. enteritidis</i>	重庆市 135 #	+
			<i>S. enteritidis</i>	河南省 182 #	+	<i>S. agona</i>	河南省 139 #	+
			<i>S. enteritidis</i>	河南省 190 #	+	<i>S. enteritidis</i>	河南省 148 #	+
			<i>S. enteritidis</i>	b 2018 #	+	<i>S. enteritidis</i>	河南省 154 #	+
			<i>S. enteritidis</i>	b 2020 #	+	<i>S. enteritidis</i>	河南省 155 #	+
			<i>S. enteritidis</i>	b 2021 #	+	<i>S. enteritidis</i>	河南省 156 #	+
			<i>S. enteritidis</i>	b 2022 #	+	<i>S. enteritidis</i>	河南省 157 #	+
			<i>S. enteritidis</i>	b 2023 #	+	<i>S. enteritidis</i>	河南省 158 #	+
			<i>S. enteritidis</i>	b 2024 #	+	<i>S. enteritidis</i>	河南省 159 #	+
			<i>S. enteritidis</i>	b 2025 #	+	<i>S. enteritidis</i>	河南省 160 #	+
			<i>S. enteritidis</i>	b 2026 #	+	<i>S. enteritidis</i>	河南省 161 #	+
			<i>S. enteritidis</i>	b 2027 #	+	<i>S. enteritidis</i>	河南省 162 #	+
			<i>S. enteritidis</i>	b 2028 #	+			

注:a - 中国药品生物制品检定所 b - 北京市疾病预防控制中心 c - 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所  
d - 北京市临床药品研究所 e - 中国疾病预防控制中心传染病研究所  
来源处标注省名的均为该菌为该省从食品中分离出来,并经过血清学鉴定。

1.1.5 食品 真空包装的双汇火腿肠、生鸡蛋、散装猪肉馅均购自超市。

1.2.1 菌种准备 将菌种在营养琼脂平板上划线,37 培养 16 h,挑取典型单个菌落接种于 LB 肉汤中,37 过夜振荡培养。

1.2 方法

1.2.2 模板 DNA 制备(酚提法) 取过夜振荡培养的菌悬液1 ml,快速酚提法按 DNA 提取试剂说明书进行。

1.2.3 PCR 扩增反应 PCR 反应条件的优化主要包括最适  $Mg^{++}$  浓度、退火温度的选择,选择 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0、5.0 mmol/L 8 个  $MgCl_2$  浓度,退火温度选择为 50 ~ 60 ,进行棋盘滴定测试。

用 0.5 ×TBE 电泳缓冲液配制 2.0% 琼脂糖凝胶,溴化乙锭(EB, 0.5 μg/ml)为嵌合剂,上样量为 5 μl,电泳电压为 100 V,40 min。用凝胶成像系统观察电泳结果并进行分析。

1.2.5 灵敏性检测 以无菌操作将菌株的过夜培养液按 10 倍递增稀释  $10^{-1} \sim 10^{-4}$ ,进行菌落计数,同时提取 DNA,进行 PCR 检测后,计算检出限。

1.2.6 特异性检测

1.2.6.1 对经传统方法验证的 22 种 77 株沙门菌进行 PCR 特异性检测。

1.2.6.2 利用经传统方法鉴定的 24 种 24 株非沙门菌株进行 PCR 特异性验证。

1.2.7 人工污染食品的制备(按 GB 4789.4<sup>[3]</sup>进行)

1.2.7.1 菌种的准备 肠炎沙门菌 WHO 标准菌株。在 LB 肉汤中,37 过夜振荡培养,菌落计数,确定起始菌含量。

1.2.7.2 污染菌食品匀浆液的制备 以无菌操作将食品 25 g 放入含有 225 ml 增菌液(1 9)的无菌均质袋中,均质成食品匀浆液。(即 10 ml 食品匀浆液相当于 1 g 食品)。

使用四硫酸钠煌绿(TIB)增菌液或肠道增菌液 + 0.15% 煌绿对食品试样进行增菌。

将肠炎沙门菌过夜培养液 1 ml,加入到 9 ml 食品匀浆液(1 9)中,制备成污染的食品匀浆液。(每 10 ml 污染的食品匀浆液相当于 0.9 g 的食品,约为 1 g 食品)。

将污染的食品匀浆液按 10 倍递增稀释体系,分别取第 3,4,5 管或第 4、5、6、7 管各 1 ml,分别加入到 9 ml 食品匀浆液中。同一种增菌液制备成含有不同菌量的食品匀浆液。

结果分析 将含不同菌量的食品匀浆液,37 或 42 振荡培养,于第 0、2、4、7、9 h,分别取 1 ml 菌悬液用酚提法提取 DNA,进行 PCR 检测;同时按 10 倍递增体系稀释,分别取 0.1 ml 合适稀释浓度的菌悬液在营养琼脂平板上进行菌落计数。记录不同时间的菌量及 PCR 扩增情况。

## 2 结果

2.1 菌种名录及 PCR 检测结果一览表 见表 1。

2.2 PCR 检测体系优化结果

2.2.1 反应体系 实验结果表明:在 0.5 ~ 5.0 mmol/L  $Mg^{++}$ ,退火条件 50 ~ 60 , 30 s 的条件下均可扩增。

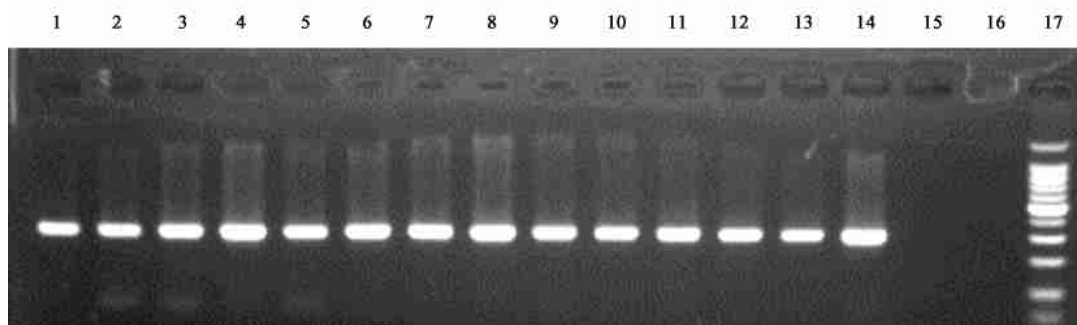
2.2.2 方法的灵敏性 从图 1 可见,本系统最小检出量为  $10^6$  CFU/ml 培养液。



1. DNA marker (100 bp) 2. 阴性对照 3. 培养液菌量为  $10^9$   
4. 培养液菌量为  $10^8$  5. 培养液菌量为  $10^7$  6. 培养液菌量为  $10^6$  7. 培养液菌量为  $10^5$

图 1 沙门菌属 PCR 方法灵敏度的检测结果

2.2.3 方法的特异性 从表 1、图 2、图 3 可见,经传统方法鉴定的 22 种 77 株沙门菌全部扩增出 284 bp 的产物,而 24 种 24 株非沙门菌均未扩增出 284 bp 的特异性产物。



1. 肠炎沙门菌(*S. enteritidis*) 2. 鼠伤寒菌(*S. typhimurium*) 3. 鸭沙门菌(*S. anatum*) 4. 亚利桑那(*S. arizona*) 5. 猪霍乱(*S. choleraesuis*)  
6. 都柏林(*S. dublin*) 7. 基桑加尼(*S. kisingani*) 8. 科特布斯(*S. kottbus*) 9. 明斯特(*S. muenster*) 10. 纽波特(*S. newport*)  
11. 阿柏丁(*S. aberdeen*) 12. 阿贡纳(*S. agona*) 13. 德尔卑(*S. derby*) 14. 甲型副伤寒(*S. paratyphi A*)  
15. 霍乱弧菌 16. 阴性对照 17. DNA marker (100 bp)

图 2 不同型沙门菌 PCR 检测结果

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25



1. ETEC 2. EIEC 3. EHEC 4. EPEC 5. 普通大肠杆菌 6. 单增李斯特菌 7. 金黄色葡萄球菌 8. 蜡样芽孢杆菌 9. 肺炎克雷伯菌  
10. 副溶血性弧菌 11. 福氏 2b 志贺菌 12. 宋内志贺菌 13. 痢疾 1 型志贺菌 14. 鲍氏 4 型志贺菌 15. 拟杆菌 16. 奇异变形杆菌  
17. 小肠结肠炎耶尔森菌 18. 雷极变形杆菌 19. 蜂房哈夫尼亚菌 20. 臭鼻克雷伯菌 21. 粘质沙雷菌 22. 弗劳地枸橼酸杆菌 23. 肠炎沙门菌(阳性对照) 24. 阴性对照 25. DNA marker (100 bp)

图 3 不同种非沙门菌 PCR 检测结果

### 2.3 人工污染食品中沙门菌 PCR 检测方法的应用研究结果

#### 2.3.1 人工污染的火腿肠中沙门菌 PCR 检测结果

肠炎沙门菌过夜培养液含菌量为  $7.2 \times 10^8$  CFU/ml, 污染食品后增菌, 第 3、4、5 管不同时间的菌量及 PCR 检出情况见表 2。由表 2 可见: 含有沙门菌  $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$  CFU/g 的火腿肠的匀浆液, 在增菌 8 h 后, 增菌液中沙门菌菌量可增至  $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$  CFU/ml。该 PCR 检测系统可在含有  $10^7$  CFU/ml 增菌液中检出沙门菌, 即在含有  $10^2$  CFU/ml 以上的火腿肠中检出沙门菌。

#### 2.3.2 人工污染的鸡蛋中沙门菌 PCR 检测结果

35.2 g 鸡蛋(1 个)与 317.8 ml 肠道增菌液 + 0.15% 煌绿在无菌条件下制备成鸡蛋匀浆液(即 10 ml 鸡蛋匀浆液相当于 1 g 鸡蛋)。

肠炎沙门菌过夜培养液含菌量为  $3.0 \times 10^9$  CFU/ml, 污染食品后增菌, 第 5、6、7 管不同时间的菌量及 PCR 检出情况见图 4。由图 4 可见: 含有沙门菌  $1$ 、 $10$ 、 $10^2$  CFU/ml, 在增菌 10 h 后, 增菌液中沙门菌菌量可增至  $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$  CFU/ml。该 PCR 检测系统可在含有  $10^7$  CFU/ml 增菌液中检出沙门菌, 即在含有 10 CFU/g 以上的鸡蛋中检出沙门菌。

表 2 不同时间菌量的增长情况和 PCR 扩增情况

TTB 增菌液	0 h		2 h		4 h		6 h		8 h	
	菌落计数	PCR	菌落计数	PCR	菌落计数	PCR	菌落计数	PCR	菌落计数	PCR
第 3 管	$7.2 \times 10^4$	-	$4.5 \times 10^5$	-	$2.9 \times 10^6$	-	$1.3 \times 10^7$	+	$1.3 \times 10^8$	+
第 4 管	$7.2 \times 10^3$	-	$1.0 \times 10^4$	-	$3.5 \times 10^5$	-	$1.0 \times 10^6$	-	$1.0 \times 10^7$	+
第 5 管	$7.2 \times 10^2$	-	$1.0 \times 10^3$	-	$5.0 \times 10^4$	-	$7.0 \times 10^5$	-	$2.3 \times 10^6$	-



1. 第 5 管 培养 4 h, 菌落总数为  $3.0 \times 10^4$  CFU/ml  
2. 第 5 管 培养 6 h, 菌落总数为  $8.3 \times 10^5$  CFU/ml  
3. 第 5 管 培养 8 h, 菌落总数为  $1.7 \times 10^7$  CFU/ml  
4. 第 5 管 培养 10 h, 菌落总数为  $2.1 \times 10^8$  CFU/ml  
5. 第 6 管 培养 4 h, 菌落总数为  $1.0 \times 10^3$  CFU/ml  
6. 第 6 管 培养 6 h, 菌落总数为  $5.6 \times 10^4$  CFU/ml  
7. 第 6 管 培养 8 h, 菌落总数为  $1.0 \times 10^6$  CFU/ml  
8. 第 6 管 培养 10 h, 菌落总数为  $2.1 \times 10^7$  CFU/ml  
9. 第 7 管 培养 4 h, 菌落总数为  $1.0 \times 10^2$  CFU/ml  
10. 第 7 管 培养 6 h, 菌落总数为  $2.0 \times 10^3$  CFU/ml  
11. 第 7 管 培养 8 h, 菌落总数为  $7.0 \times 10^4$  CFU/ml  
12. 第 7 管 培养 10 h, 菌落总数为  $1.0 \times 10^6$  CFU/ml  
13. 菌落总数为  $3.0 \times 10^7$  CFU/ml  
14. 阴性对照  
15. 肠炎沙门菌阳性对照  
16. 鼠伤寒沙门菌阳性对照  
17. DNA marker (100 bp)

图 4 污染不同菌量沙门菌鸡蛋的 PCR 检测结果

2.3.3 人工污染的散装猪肉馅中沙门菌 PCR 检验结果 肠炎沙门菌过夜培养液含菌量为  $1.3 \times 10^9$  CFU/ml, 污染食品后增菌, 第 5、6、7 管不同时间的菌量及 PCR 检出情况见表 3。由表 3 可见: 含有沙门

菌  $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$  CFU/ml 的肉馅, 在增菌 10 h 后, 增菌液中沙门菌菌量可增至  $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$  CFU/ml。该 PCR 检测系统可在含有  $10^6$  CFU/ml 增菌液中检出沙门菌, 即在含有 10 CFU/g 以上的肉馅中检出沙门菌。

表 3 不同时间菌量的增长情况和 PCR 扩增情况

肠道增菌液	0 h		4 h		6 h		8 h		10 h		CFU/ml
	菌落计数	PCR	菌落计数	PCR	菌落计数	PCR	菌落计数	PCR	菌落计数	PCR	
第 5 管	$1.3 \times 10^3$	-	$7.5 \times 10^4$	-	$1.0 \times 10^6$	-	$4.6 \times 10^7$	+	$8.2 \times 10^8$	+	
第 6 管	$1.3 \times 10^2$	-	$2.1 \times 10^3$	-	$7.9 \times 10^4$	-	$1.2 \times 10^6$	+	$7.0 \times 10^7$	+	
第 7 管	$1.3 \times 10$	-	$1.0 \times 10^2$	-	$3.0 \times 10^3$	-	$8.4 \times 10^4$	-	$1.4 \times 10^6$	+	

2.3.4 人工混合菌污染的散装猪肉馅中沙门菌 PCR 检验方法的研究

人工污染肠炎沙门菌和致病性大肠杆菌混合菌的食品匀浆液的制备 25 g 散装与 225 ml 四硫磺酸钠煌绿增菌液无菌条件下制备成肉馅匀浆液(即 1 g 的肉馅制备成 10 ml 肉馅匀浆液)。

将肠炎沙门菌过夜培养液 1.2 ml 和致病性大肠杆菌过夜培养液 1.2 ml, 加入到 9.6 ml 肉馅匀浆液中, 制备成混合菌污染的肉馅匀浆液。(即每 10 ml 污染的肉馅匀浆液相当于 0.9 g 的肉馅, 约为 1 g

肉馅)。

肠炎沙门菌过夜培养液含菌量为  $1.75 \times 10^9$  CFU/ml, 致病性大肠杆菌过夜培养液含菌量为  $1.80 \times 10^9$  CFU/ml, 污染食品后增菌, 第 4、5、6、7 管不同时间的菌量及 PCR 检出情况见图 5。由图 5 可见: 含菌量  $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$  CFU/ml 的肉馅匀浆液, 在增菌 10 h 后, 增菌液中沙门菌菌量可增至  $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$  CFU/ml。该 PCR 检测系统可在含有  $10^7$  CFU/ml 增菌液中检出沙门菌, 即在含有  $10^2$  CFU/g 以上的肉馅中检出沙门菌。



1. 第 4 管, 培养 4 h, 菌落总数为  $4.5 \times 10^6$  CFU/ml
2. 第 4 管, 培养 6 h, 菌落总数为  $8.2 \times 10^7$  CFU/ml
3. 第 4 管, 培养 8 h, 菌落总数为  $7.3 \times 10^8$  CFU/ml
4. 第 4 管, 培养 10 h, 菌落总数为  $2.4 \times 10^9$  CFU/ml
5. 第 5 管, 培养 4 h, 菌落总数为  $5.2 \times 10^4$  CFU/ml
6. 第 5 管, 培养 6 h, 菌落总数为  $1.0 \times 10^6$  CFU/ml
7. 第 5 管, 培养 8 h, 菌落总数为  $7.8 \times 10^7$  CFU/ml
8. 第 5 管, 培养 10 h, 菌落总数为  $1.6 \times 10^9$  CFU/ml
9. 第 6 管, 培养 4 h, 菌落总数为  $6.0 \times 10^3$  CFU/ml
10. 第 6 管, 培养 6 h, 菌落总数为  $7.5 \times 10^5$  CFU/ml
11. 第 6 管, 培养 8 h, 菌落总数为  $2.4 \times 10^7$  CFU/ml
12. 第 6 管, 培养 10 h, 菌落总数为  $1.6 \times 10^8$  CFU/ml
13. 第 7 管, 培养 4 h, 菌落总数为  $7.5 \times 10^2$  CFU/ml
14. 第 7 管, 培养 6 h, 菌落总数为  $1.4 \times 10^4$  CFU/ml
15. 第 7 管, 培养 8 h, 菌落总数为  $2.9 \times 10^6$  CFU/ml
16. 第 7 管, 培养 10 h, 菌落总数为  $4.0 \times 10^7$  CFU/ml
17. 菌落总数为  $1.7 \times 10^8$  CFU/ml
18. 菌落总数为  $1.7 \times 10^7$  CFU/ml
19. 本底对照 10 h 菌液
20. 阴性对照
21. 阳性对照
22. DNA marker (100 bp)

图 5 不同菌量混合菌污染猪肉馅的 PCR 检测结果

### 3 讨论

目前, 国际上食品中沙门菌的检测方法和我国沙门菌检验国标方法, 均是以 1966 年诞生的 White-Kauffmann 抗原表为基础, 依靠生化反应和血清学实验进行鉴定。整个试验需要 5~6 d, 检出限为  $10^5 \sim 10^7$  CFU/ml (g) 食品。

在沙门菌 PCR 检测技术中使用最多的引物来源于沙门菌属侵袭性抗原保守基因(即 *invA* gene)。

*invA* 基因是沙门菌侵入上皮细胞的要点, 是产生致病性的关键因子。Galan JE(1989) 提出了沙门菌进入肠上皮细胞是沙门菌致病力所必需的, 1991 年又证实了伤寒沙门菌的 *invA* 的突变株丧失了进入哺乳类细胞的能力<sup>[4]</sup>。Nolan LK(1995)<sup>[5]</sup>等在沙门菌的毒力基因测定中发现, *invA* 基因占 94.2%。Rahn K<sup>[6]</sup>、Bulte M(1995)<sup>[7]</sup>、Tuchili LM(1995)<sup>[8]</sup>、Carli(2001)<sup>[9]</sup>等均利用该基因引物扩增了 284 bp 片段。

王军<sup>[10]</sup> (1999) 直接检测粪便中沙门菌, 检出率为 15.9%, 明显高于粪便培养的检出率 9.5%。利用该引物扩增了 284 bp 的 PCR 产物。1995 年, 卢强<sup>[11]</sup> 利用 *invA* gene 扩增出 300 bp 的片段的产物。本研究结果表明,  $Mg^{++}$  浓度和退火温度对该反应体系的影响较小, 稳定性较好。

该反应体系与传统鉴定试验比较具有 100% 的一致性 (77 株沙门菌和 24 株非沙门菌)。该引物 PCR 反应体系特异性较好。

本研究还进行了食品中沙门菌 PCR 检测体系的应用性研究。很多资料表明, 食品中含有大量的抑制 PCR 反应的因素, 如果直接对食品中沙门菌进行提取并进行 PCR 检测, 其检出率远低于常规分离检验<sup>[20]</sup>。所以本研究采用食品样品经增菌培养一定时间后, 再进行食品中沙门菌的 PCR 检测。通过用肠炎沙门菌污染火腿肠、鸡蛋、散装肉馅及混合菌 (肠炎沙门菌和致病性大肠杆菌) 污染散装肉馅, 不同污染菌量经过不同时间增菌后, 菌量的变化动态与 PCR 检出情况的研究, 可以看出, 含有沙门菌  $10^2$  CFU/ml 以上的食品, 经过 10 h 增菌后进行 DNA 提取, 再进行核酸扩增, 可以检出 284 bp 的扩增产物。对食品中含有  $10^3$  CFU/ml 的肉制品, 在经过 6 h 增菌后, 即可检出。该检测系统可以在 19 h 内, 从食品中检出含有沙门菌  $10^2$  CFU/g 的食品。与传统方法比较, PCR 检测方法灵敏、快速、特异, 对食物中毒病原的快速确定, 可起到积极的作用。由于 PCR 检测极度敏感, 在操作过程中容易发生核酸污染, 导致假阳性, 但随着 CLP 实验室的建立, 自动化仪器的 (Real-time PCR 仪及 BAX system 等) 出现, 核酸污染的问题可以得到解决, 其方法标准化将不难实现。

## 参考文献

[1] AOAC/BAM (Bacteriological Analytical Manual, FDA). 伯杰

细菌鉴定手册[M].

- [2] GB 4789.4—2003. 食品卫生微生物学检验沙门菌检验[S].
- [3] Ranh K, Grandis S A De, Clarke R C, et al. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as specific method of detection of *Salmonella*[J]. Mol Cell Probes, 1992, 6(4): 271-279.
- [4] Kary Mullis. Enzymatic amplification of beta - globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia[J]. Science, 1985, 230(4732): 1350-1354.
- [5] Galan J E, Curtiss R 3rd. Distribution of the *invA*, - B, - C, and - D genes of *Salmonella typhimurium* among other *Salmonella* serovars: *invA* mutants of *Salmonella typhi* are deficient for entry into mammalian cells [J]. Infect Immun, 1991, 59(9): 2901-2908.
- [6] Nolan L K, Giddings C W, Brown J. The distribution of *invA*, *pagC* and *spvC* gene among *Salmonella* isolates from animals[J]. Vet Res Commun, 1995, 19(3): 167-177.
- [7] Bulte M, Jakob P. The use of a PCR-generated *invA* probe for the detection of *Salmonella spp.* in artificially and naturally contaminated foods[J]. Int J Food Microbiol, 1995, 26(3): 335-344.
- [8] Tuchili L M, Kodama H, Iamamoto Y, et al. Detection of *Salmonella gallinarum* and *S. typhimurium* DNA in experimentally infected chicks by PCR[J]. J Vet Med Sci, 1995, 57(1): 59-63.
- [9] Carli K T. Detection of *Samonellae* in chicken feces by a combination of tetrathionate broth enrichment, capillary PCR, and capillary gel electrophoresis [J]. Journal of clinical microbiology, 2001, 1871-1876.
- [10] 王军, 张为国, 虞爱华, 等. 聚合酶链反应对沙门氏菌肠炎快速诊断的初步应用[J]. 中国人兽共患病杂志, 1999, 15(1): 45-46.
- [11] 卢强, 陈贵连, 林万明. 应用 PCR - ECL 技术检测食品中的沙门氏菌[J]. 中国公共卫生, 1995, 11(4): 189.

[收稿日期: 2005 - 10 - 24]

中图分类号: R15; Q939. 121; R378. 22 文献标识码: A 文章编号: 1004 - 8456(2006)01 - 0017 - 06

## 冷链决定食品价值

国际制冷企业向中国食品业建言: 冷链决定食品价值。

丹麦丹佛斯公司的董事长雍根·柯劳森: 在工业发达国家, 冷链总损耗在 30% 以下, 而中国 60% 以上。

低碳啤酒: 碳水化合物含量低的啤酒。

淡啤酒(light): 淡色啤酒。