

- 京:中国标准出版社,2010.
- [5] 崔焕忠,张辉,王兴龙. 单增李斯特菌单克隆抗体的制备及胶体金试纸的研制[J]. 中国兽医科学,2010,40(1):45-50.
- [6] 段霞. 单核细胞增生李斯特氏菌胶体金免疫层析方法的建立[D]. 南昌:南昌大学,2011.
- [7] 李峰. 应用胶体金免疫层析技术检测单核细胞增生李斯特菌[D]. 长春:吉林大学,2012.
- [8] 罗立新,缪珑,潘力,等. 快速检测产单核李斯特菌免疫胶体金层析法的研究[J]. 中国卫生检验杂志,2006,16(2):154-156.
- [9] 罗雁非,贾芙蓉,丁旭,等. 胶体金标记单克隆抗体测定单增李斯特菌试剂盒制备[J]. 中国实验诊断学,2009,13(9):1231-1234.
- [10] 谢士嘉,王静,王振国. 利用胶体金免疫层析技术快速定量检测单增李斯特菌方法的建立[J]. 中国国境卫生检疫杂志,2010,33(2):126-129.
- [11] 熊国华,于丽,曹际娟,等. 单增李斯特菌免疫胶体金试纸条快速检测[J]. 中国公共卫生,2008,24(2):248-249.
- [12] 喻翠翠,孟宪荣,栗绍文,等. 猪结合珠蛋白克隆、原核表达及单克隆抗体制备[J]. 中国兽医学报,2010,30(9):1245-1247.
- [13] 彭珍,魏华,万翠香,等. 单核增生李斯特菌 Internalin A 的克隆表达及单克隆抗体制备[J]. 中国微生态学杂志,2009,21(12):1073-1076.
- [14] Cossart P. Illuminating the landscape of host-pathogen interactions with the bacterium *Listeria monocytogenes* [J]. PNAS,2011,108(49):19484-19491.

## 论著

# 多重 PCR 鉴定动物源空肠弯曲菌和结肠弯曲菌方法的建立

盖文燕,王君玮,王娟,曲志娜,黄秀梅,赵思俊,李玉清,翟海华

(中国动物卫生与流行病学中心 农业部畜禽产品质量安全风险评估实验室(青岛),山东 青岛 266032)

**摘要:**目的 建立鉴定空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的多重 PCR(mPCR)方法。方法 分别以 16S rRNA、马尿酸酶和 16S-23S rRNA 基因为靶序列设计特异性引物,建立多重 PCR 方法检测 37 株菌株样品,同时采用<sup>m</sup>gene CAM nested PCR 检测试剂盒检测验证,进行结果比较分析。结果 该多重 PCR 方法可扩增出空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的特异性条带,其他对照菌株均未扩增出条带,具有较好的特异性;检测敏感性可达 0.81 pg/μl 空肠弯曲菌 DNA,0.93 pg/μl 结肠弯曲菌 DNA。多重 PCR 方法和试剂盒检测结果的符合率为 100%,二者与国标 GB/T 4789.9—2008 方法的符合率达 97% 以上。结论 本试验建立的多重 PCR 方法操作快速方便、节约试验成本,具有较好的特异性、敏感性和重复性,可用于弯曲菌的鉴定。

**关键词:**空肠弯曲菌;结肠弯曲菌;多重 PCR;鉴定;动物源性致病菌;食源性致病菌;食品安全

中图分类号:R155;R378;TS207.4 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2014)02-0119-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2014.02.004

## A multiplex PCR assay for animal origin *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*

GAI Wen-yan, WANG Jun-wei, WANG Juan, QU Zhi-na, HUANG Xiu-mei,

ZHAO Si-jun, LI Yu-qing, ZHAI Hai-hua

(China Animal Health and Epidemiology Center, Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Livestock and Poultry Products (Qingdao), Ministry of Agriculture, Shandong Qingdao 266032, China)

**Abstract: Objective** To establish a multiplex PCR (mPCR) method to identify *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Methods** Specific primer pairs were designed based on the sequence of 16S rRNA gene, hippuricase gene and 16S-23S rRNA gene. 37 strains were detected by the mPCR and <sup>m</sup>gene CAM nested PCR assay kit. **Results** The results showed that the species-specific product could be detected after amplification of the DNA template of *C. jejuni* and *C. coli*, while other strains could not be detected. The sensibility for detection of *C. jejuni* and *C. coli* was 0.81 and 0.93 pg/μl, respectively. The coincidence rate mPCR method and nested PCR assay kit was 100%. Coincidence of the two methods with the national standard method were also over 97%. **Conclusion** This new method was rapid, convenient, highly specific, sensitive and repeatable. It could be used for rapid identification of *Campylobacter* spp. .

收稿日期:2013-10-11

基金项目:农业部“引进国际先进农业科学技术”重点项目—948 项目(2011-G14(2))

作者简介:盖文燕 女 助理研究员 研究方向为动物源性食品安全 E-mail:gaiwenyan0929@163.com

通讯作者:王君玮 男 研究员 研究方向为动物源性食品安全与疫病控制 E-mail:yffs2000@sina.com

**Key words:** *Campylobacter jejuni*; *Campylobacter coli*; multiplex PCR; identify; animal origin pathogen; food-borne pathogen; food safety

弯曲菌 (*Campylobacter*) 主要为空肠弯曲菌 (*C. jejuni*) 和结肠弯曲菌 (*C. coli*), 是重要的人兽共患病源菌, 主要通过饮水、食物等方式传染给人类, 是全球范围内胃肠炎的主要病因, 其感染人的病例数已经超过李斯特菌病、沙门菌病和志贺菌病<sup>[1-2]</sup>。可使人致病的弯曲菌中 99% 是空肠弯曲菌, 其次是结肠弯曲菌, 其他弯曲菌也偶尔致病<sup>[3]</sup>。弯曲菌的主要传染源为动物及其污染的动物产品, 其广泛分布在各种动物体内, 其中家禽、家畜、宠物是弯曲菌的常见宿主, 因此研究动物源弯曲菌具有重要的公共卫生意义。建立弯曲菌快速而特异性的分离和检测方法, 是有效提高检出率和诊断水平的关键所在。弯曲菌的生长条件比较苛刻, 常规检测及鉴定方法繁琐耗时, 而且一些初步的生化试验项目不能鉴别出空肠弯曲菌和结肠弯曲菌。随着分子生物学技术的发展, 逐步建立了以基因为基础的检测方法取得了长足的发

展, 它具有快速简单、特异性强和敏感性高等特点。越来越多的基因用于弯曲菌的检测中, 16S rRNA 基因为弯曲菌属的保守序列; 马尿酸酶基因为空肠弯曲菌 (包括空肠亚种和德莱亚种) 所特有<sup>[4]</sup>, 它可以有效区分空肠弯曲菌和结肠弯曲菌; 而 16S-23S rRNA 基因 (*Cc*) 是结肠弯曲菌的保守序列。因此本研究在参考比较国外研究的基础上, 选择弯曲菌 16S rRNA 基因、马尿酸酶基因 (*Jej*) 和 16S-23S rRNA 基因 (*Cc*) 为靶序列, 设计特异性引物, 建立多重 PCR 方法用于空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的鉴别。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

本研究使用 6 株标准菌株和 2 株本实验室鉴定保存的菌株作为对照菌株, 编号及来源详见表 1。

表 1 菌株的编号及来源

Table 1 Number and source of strains

菌株名称	菌株编号	来源	菌株数量/株
空肠弯曲菌	33560	美国 ATCC	1
结肠弯曲菌	7709	中国农业科学院上海兽医研究所	1
大肠埃希菌	25922	美国 ATCC	1
金黄色葡萄球菌	25923	美国 ATCC	1
鸡白痢沙门菌	CVCC 526	中国兽医药品监察所	1
副溶血性弧菌	17802	中国兽医药品监察所	1
空肠弯曲菌	QD2012-2-CJ	本实验室鉴定保存	1
结肠弯曲菌	QD2012-19-CC	本实验室鉴定保存	1

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

核酸电泳仪、凝胶成像系统、PCR 仪均购自美国 Bio-Rad, 紫外分光光度计, 离心机。

弯曲菌选择性培养基 (美国 Sigma)、哥伦比亚血琼脂基础培养基 (英国 Oioid)、绵羊血 (青岛高科园海博生物科技有限公司)、2 × *Taq* PCR Master Mix (上海生工生物工程公司)、低分子量 PCR Marker (大连 TaKaRa 公司)、*in* gene CAM nested PCR 鉴别检测试剂盒 (西班牙 Ingenasa)、其他常规试剂为国产分析纯。

## 1.2 方法

### 1.2.1 引物设计

根据 Keramas 等<sup>[5]</sup>、Giessen 等<sup>[6-7]</sup> 的报道分别设计 16S rRNA 基因、马尿酸酶基因和 16S-23S rRNA 基因序列合成 3 对 PCR 引物: 弯曲菌属的特异引物对 16S-F 和 16S-R; 空肠弯曲菌的特异性引物对 *Jej*-F 和 *Jej*-R; 结肠弯曲菌的特异性引物对 *Cc*-F 和 *Cc*-R, 见表 2。引物由上海生工生物技术有限公司合成。

### 1.2.2 多重 PCR 方法的建立

在哥伦比亚血琼脂平板上挑取灰色或黄色湿润的、有金属光泽的弯曲菌典型菌落置于盛有 200 μl 超纯水的离心管中, 斡旋混匀, 取出冰浴 10 min, 12 000 r/min 室温离心 10 min, 于 -20 °C 保存备用。

PCR 反应体系: 2 × *Taq* PCR Master Mix 12.5 μl, DNA 模板 2 μl, 上、下游引物 (10 nmol/L) 各 0.5 μl, 灭菌超纯水补足至 25 μl。PCR 循环条件: 95 °C 变性 10 min; 95 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 90 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。取 5 μl PCR 产物于 1.0% 琼脂糖凝胶 (含 0.5 mg/L 溴化乙锭) 进行电泳鉴定。

### 1.2.3 特异性试验

用水煮法分别对 6 株标准菌株和 2 株本实验室鉴定保存的菌株进行基因组 DNA 的提取, 提取 DNA 作为模板进行 PCR 检测, 高压过滤的超纯水作为空白对照, 以确定方法的特异性。

表2 引物的名称、特异性、序列和扩增产物大小

Table 2 The name, specificity, sequences and product sizes of primers

引物名称	细菌种属	引物序列	产物长度/bp
16S-F	弯曲杆菌属	5'-GCCAAGAACCTACCYGGRCTTGATA-3'	314
16S-R		5'-TCGCGRTATTGCGTCTCATTGTATATG-3'	
Jej-F	空肠弯曲杆菌	5'-CATCTTCCCTAGTCAAGCCT-3'	774
Jej-R		5'-GCAAAGGCAAAGCATCCATA-3'	
Cc-F	结肠弯曲杆菌	5'-GTTAAGAGTCACAAGCAAGT-3'	194
Cc-R		5'-CTAAAAATATCTAAACTAAGTCG-3'	

#### 1.2.4 敏感性试验

用紫外分光光度计测定空肠弯曲菌和结肠弯曲菌模板 DNA 含量,然后分别做 10 倍梯度稀释,每个稀释度的 DNA 各取 2  $\mu$ l 进行 PCR 扩增,电泳后观察条带亮度,直至不出现扩增条带为止,确定出现条带的最大稀释度。

#### 1.2.5 不同方法的符合试验

选取分离鉴定的动物源弯曲菌 32 株(其中 20 株 *C. jejuni* 菌株、12 株 *C. coli* 菌株),另取 5 株实验室保存的大肠杆菌菌株作为阴性样品。用水煮法提取模板 DNA 后,用建立的多重 PCR、<sup>m</sup> gene CAM nested PCR 检测试剂盒和 GB/T 4789.9—2008《食品卫生微生物学检验 空肠弯曲菌》<sup>[8]</sup> 三种方法进行比较检测。<sup>m</sup> gene CAM nested PCR 按照试剂盒说明书进行操作和结果判定,计算三种方法的符合率。符合率为两种方法检测同为阴性的样品数加同为阳性的样品数之和与样品总数的比值。

#### 1.2.6 方法的初步应用

从农贸市场、屠宰场和动物医院随机采集生鲜鸡肉样品(87 份)、盲肠拭子样品(31 份)共计 118 份,进行分离培养。挑取哥伦比亚血琼脂平板上的菌落,提取基因组 DNA 做模板,用建立的多重 PCR 进行检测,考查所建立方法的应用效果。

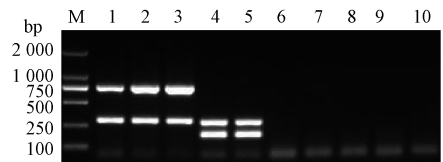
## 2 结果与分析

### 2.1 多重 PCR 反应条件的优化

试验比较了加入不同体积的模板、引物、2  $\times$  *Taq* PCR Master Mix 的反应结果,并根据不同的退火温度摸索出最佳的 PCR 反应体系及反应条件。在 25  $\mu$ l 反应体系中,加入 2  $\times$  *Taq* PCR Master Mix 12.5  $\mu$ l, DNA 模板 2  $\mu$ l,上下游引物各 0.5  $\mu$ l,灭菌超纯水 7.5  $\mu$ l。

### 2.2 特异性试验结果

电泳结果显示,空肠弯曲菌分别在 314 和 774 bp 处扩增出属特异性条带和种特异性条带,结肠弯曲菌分别在 314 和 194 bp 处扩增出属特异性条带和种特异性条带,而检测的大肠杆菌、鸡白痢沙门菌、金黄色葡萄球菌和副溶血弧菌均未出现特异性条带(见图 1)。



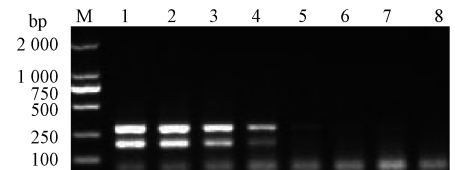
注:M;DNA Marker;1:空肠弯曲菌标准株;2,3:空肠弯曲菌分离株;4:结肠弯曲菌标准株;5:结肠弯曲菌分离株;6:大肠杆菌;7:鸡白痢沙门菌;8:金黄色葡萄球菌;9:副溶血弧菌;10:空白对照

图1 多重 PCR 的特异性扩增结果

Figure 1 Specificity amplification results of mPCR

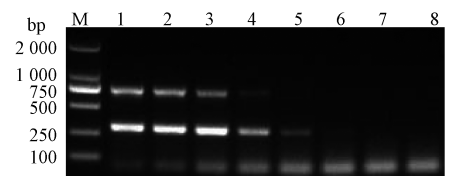
### 2.3 敏感性试验结果

分光光度计测得空肠弯曲菌模板 DNA 的浓度为 8.1 ng/ $\mu$ l, 结肠弯曲菌模板 DNA 浓度为 9.3 ng/ $\mu$ l。不同稀释度的模板经过多重 PCR 扩增后,结肠弯曲菌和空肠弯曲菌均可在  $10^{-4}$  稀释度时检测到特异性条带(见图 2 和 3)。由此可见,该方法检测空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的敏感性分别为 0.81 和 0.93 pg/ $\mu$ l 的 DNA。



注:M;DNA Marker;1~8:稀释度分别为  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$

图2 多重 PCR 检测结肠弯曲菌的敏感性试验结果

Figure 2 Sensitivity test results of mPCR for detection of *C. coli*

注:M;DNA Marker;1~8:稀释度分别为  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$

图3 多重 PCR 检测空肠弯曲菌的敏感性试验结果

Figure 3 Sensitivity test results of mPCR for detection of *C. jejuni*

### 2.4 符合性试验结果

对选取的 37 份菌株样品分别进行检测,比较

结果表明,所建立的多重 PCR 方法与<sup>m</sup>gene CAM nested PCR 检测试剂盒符合率为 100%,二者与国

标 GB/T 4789.9—2008 方法的符合率均达 97% 以上,见表 3。

表3 多重 PCR、<sup>m</sup>gene CAM nested PCR 与国标方法的符合率比较结果

Table 3 Coincidence comparison of mPCR, <sup>m</sup>gene CAM nested PCR and GB standard method

方法	菌株数/株	阳性数 (结肠弯曲菌/ 空肠弯曲菌)	阴性数 (结肠弯曲菌/ 空肠弯曲菌)	多重 PCR	<sup>m</sup> gene CAM nested PCR
GB/T 4789.9—2008	37	12/20	25/17	100% <sup>a</sup> /97.3% <sup>b</sup>	100% <sup>a</sup> /97.3% <sup>b</sup>
多重 PCR	37	12/19	25/18		100% <sup>a</sup> /100% <sup>b</sup>
<sup>m</sup> gene CAM nested PCR	37	12/19	25/18	100% <sup>a</sup> /100% <sup>b</sup>	

注:a为两种方法检测空肠弯曲杆菌的符合率,b为两种方法检测结肠弯曲杆菌的符合率

### 2.5 临床样品检测结果

118 份临床样品经初步细菌分离培养后,进行生化鉴定,同时应用建立的多重 PCR 方法进行检测。结果显示,23 份样品为空肠弯曲菌,12 份样品为结肠弯曲菌,与生化鉴定结果一致。结果见表 4。

表4 样品的来源及检测结果

Table 4 Samples source and result

采样地点	样品数/份	空肠弯曲菌		结肠弯曲菌	
		阳性数/份	阳性率/%	阳性数/份	阳性率/%
青岛	63	17	26.98	9	14.29
济南	24	3	12.50	2	8.33
上海	31	3	9.68	1	3.23

### 3 讨论

弯曲菌一直是动物源性食品安全监测的主要细菌之一。弯曲菌检测主要是生化鉴定,但是生化鉴定试验存在操作繁琐、检测周期长、假阳性高、不能区分空肠弯曲菌和结肠弯曲菌等问题。随着分子生物学的发展,逐步建立了一些以基因为基础的检测方法。杨毓环等<sup>[9]</sup>以鞭毛蛋白基因 *flaA* 为靶基因,建立检测空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的 PCR 方法,该法有较好的特异性,但不能对空肠弯曲菌和结肠弯曲菌进行鉴别;何蕊等<sup>[10]</sup>以 *mapA* 基因和 *ceuE* 基因为靶基因,建立了针对弯曲菌的多重 PCR 方法,但 *mapA* 基因的特异性不强,并非所有的空肠弯曲菌都能扩增出 589 bp 的 *mapA* 基因的特异性片段;娜仁高娃等<sup>[11]</sup>以 *hipO* 为靶基因,建立的多重 PCR 方法,对分离的结肠弯曲菌扩增的特异性不强;Yamazak 等<sup>[12]</sup>建立的环介导等温扩增(LAMP)方法用于鸡肉中空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的检测,LAMP 方法对环境的要求非常苛刻,容易出现极高的假阳性。

本研究建立的多重 PCR 方法具有较强的特异性,分别扩增出空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的特异条带,而其他参考菌株均未扩增出条带,这表明该多重 PCR 方法具有很强的特异性。敏感性试验结果显示,该方法最低可检测空肠弯曲菌和结肠弯曲菌敏感性分别为 0.81 和 0.93 pg/μl 的 DNA,与何蕊

等<sup>[10]</sup>报道 0.925 和 1.050 pg/μl 的结果相近,说明该方法的敏感性较高。同时应用建立的多重 PCR 对临床采集的 118 份样品进行检测,结果显示 23 份样品为空肠弯曲菌,12 份样品为结肠弯曲菌,与普通 PCR 结果一致,但是整个过程只用了 4 h,具有简洁快速的优点。该方法对环境的要求不高,假阳性几率低,实现了弯曲菌属和种特异性的扩增,并且条带大小相差较大,肉眼可区分样品的种属。

<sup>m</sup>gene CAM nested PCR 检测试剂盒是用巢氏 PCR 方法对水、土壤、粪便和肉类样品中弯曲菌进行检测,并且可以对空肠弯曲菌和结肠弯曲菌进行鉴别,具有较高的敏感性,但价格较高,不适合基层临床检测。本研究应用<sup>m</sup>gene CAM nested PCR 检测试剂盒与国标 GB/T 4789.9—2008 方法对所建立的多重 PCR 方法进行比较,结果显示多重 PCR 方法与<sup>m</sup>gene CAM nested PCR 检测试剂盒的符合率为 100%,二者与国标 GB/T 4789.9—2008 方法的符合率也均达 97% 以上,说明建立的多重 PCR 准确性和可靠性较高。

总之,本研究建立的多重 PCR 方法具有特异性强、敏感性高、快速方便等特点,适用于弯曲菌临床快速鉴别检测,为动物及动物产品中弯曲菌的检测鉴别提供了一种简洁快速的方法。

### 参考文献

[1] CHAO H C, CHEN C C, CHEN S Y, et al. Bacterial enteric infections in children; etiology, clinical manifestations and antimicrobial therapy [J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2006, 4(4): 629-638.

[2] Sonnevend A, Rotimi V O, Kolodziejek J, et al. High level of ciprofloxacin resistance and its molecular background among *Campylobacter jejuni* strains isolated in the United Arab Emirates [J]. J Microbiol, 2006, 15(Pt 11): 1533-1538.

[3] Lastovica A J, Skirrow M B. Clinical significance of *Campylobacter* and related species other than *Campylobacter jejuni* and *C. coli* [M] // Nachamkin I, Blaser M J. *Campylobacter*: 2nd eds. Washington: ASM Press, 2000: 139-153.

[4] Slater E R, Owen R J. Restriction fragment length polymorphism analysis shows that the hippuricase gene of *Campylobacter jejuni* is highly conserved [J]. Lett Appl Microbiol, Lett Appl Microbiol, 1997, 25(4): 274-278.

- [ 5 ] Keramas G, Bang D D, Lund M, et al. Development of a sensitive DNA microarray suitable for rapid detection of *Campylobacter* spp. [J]. Mol Cell Probes, 2003, 17(4): 187-196.
- [ 6 ] Van de Giessen A W, Tilburg J J, Ritmeester W S, et al. Reduction of *Campylobacter* infections in broiler flocks by application of hygiene measures [J]. Epidemiol Infect, 1998, 121(1): 57-66.
- [ 7 ] Vandamme P, Van Doorn L J, al Rashid S T, et al. *Campylobacter hyoilei* Alderton et al. 1995 and *Campylobacter coli* Véron and Chatelain 1973 are subjective synonyms [J]. Int J Syst Bacteriol, Int J Syst Bacteriol, 1997, 47(4): 1055-1060.
- [ 8 ] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 4789. 9—2008 食品卫生微生物学检验 空肠弯曲菌[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [ 9 ] 杨毓环, 洪锦春, 张巧姬. 空肠和结肠弯曲菌鞭毛蛋白基因 *flaA* 的检测 [J]. 中国食品卫生杂志, 2007, 19(4): 315-317.
- [ 10 ] 何蕊, 黄金林, 许海燕, 等. 弯曲菌多重 PCR 检测方法的建立及其初步应用 [J]. 扬州大学学报, 2007, 28(1): 5-8.
- [ 11 ] 娜仁高娃, 陈霞, 吴聪明. 鸡源空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的临床分离及多重 PCR 鉴定 [J]. 中国兽医杂志, 2010, 46(1): 38-39.
- [ 12 ] Yamazaki W. Sensitive and rapid detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* using loop-mediated isothermal amplification [J]. Methods Mol Biol, 2013, 943: 267-277.

## 论著

# 实时荧光 PCR 法检测奶制品中常见谷物成分

刘小艳<sup>1</sup>, 傅春玲<sup>1</sup>, 李培<sup>2</sup>, 丁洪流<sup>2</sup>, 金萍<sup>2</sup>

(1. 苏州大学医学部公共卫生学院, 江苏 苏州 215123; 2. 苏州市产品质量监督检验所, 江苏 苏州 215128)

**摘要:**目的 建立 Taqman 实时荧光 PCR 法对奶制品中掺加物大米、玉米、小麦、高粱、大麦等谷物源性成分的首筛检测体系。方法 以常见掺加物大米、玉米、小麦、高粱、大麦等谷物的叶绿体 *rbcL* 基因作为靶基因, 通过 BLAST 软件比对, 选择其同源保守区域设计引物和探针。经通用性、特异性、灵敏性试验对探针和引物可行性进行验证, 并通过模拟含谷物奶粉及市售奶类制品检测对其实际检测能力进行验证。结果 所建立体系可扩增大米、玉米、小麦、高粱、大麦等常见的谷物掺加物的 DNA 提取物, 与市售奶制品的主成分牛奶、羊奶以及其常见添加物香蕉、红枣、菠萝、草莓、西红柿、花生、大豆等动植物源性成分无交叉扩增 ( $Ct > 35$ )。对小麦纯 DNA 提取物检出限为 0.01 ng。对分别掺加 5 种谷物成分的模拟奶制品检出限均可达 0.5%, 对市售的 14 份奶类食品中的谷类成分的检测结果均与食品标签相符。结论 本研究建立的 Taqman 实时荧光 PCR 体系具有通用、相对特异、灵敏、实用等优点, 可用于奶制品中掺加或掺杂掺假谷物源性成分的快速定性检测。

**关键词:** Taqman 实时荧光 PCR; *rbcL* 基因; 谷物源性成分; 奶制品; 掺杂掺假; 食品安全

中图分类号: R155; R155.57; TS207.3 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2014)02-0123-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2014.02.005

## Detection of common cereal ingredients in dairy products by real-time PCR method

LIU Xiao-yan, FU Chun-ling, LI Pei, DING Hong-liu, JIN Ping

(School of Public Health, Medical College of Soochow University, Jiangsu Suzhou 215123, China)

**Abstract: Objective** A Taqman real-time PCR was developed to detect cereal-derived ingredients adulterated in dairy products. **Methods** The universal primers and probe for cereals were designed according to the homogeneous region of *rbcL* gene by blasting the *rbcL* gene of rice, maize, wheat, sorghum and barley. And the assay was evaluated by universality and sensitivity test. Meanwhile, its practicability was verified using simulated samples and market samples. **Results** implicated that the primers-probe system could detect DNA fragments of rice, maize, wheat, sorghum and barley with no cross-reaction to banana, jujube, pineapple, strawberry, tomato, peanut, soybean, bovine, ovine which may occur in dairy products ( $Ct > 35$ ). The detection limit was 0.01 ng for pure wheat DNA and 0.5% for each of five cereals in dairy mixtures. 14 market dairy samples were analyzed for cereal ingredients, and were all consistent with their food labels.

**Conclusion** The study suggested that the developed Taqman real-time PCR method was a rapid, sensitive and efficacious

收稿日期: 2013-09-12

基金项目: 苏州市科技支撑计划项目 (SS201126)

作者简介: 刘小艳 女 硕士生 研究方向为食品卫生 E-mail: girl\_liu@126.com

通讯作者: 傅春玲 女 副教授 研究方向为营养与食品卫生 E-mail: fuchunling@suda.edu.cn