

PCR 技术检测动物源性食品中沙门菌的应用研究

刘佩红¹ 王 建¹ 焦新安² 黄金林² 卢 军¹ 沈萍莉¹

(1. 上海市畜牧兽医站,上海 201103; 2. 扬州大学生物科学与技术学院,江苏 扬州 225009)

摘 要:为快速准确检测动物源性食品中的沙门菌,将建立并优化的沙门菌 PCR 检测试剂盒应用于动物源性食品的检测,并于国标法进行了比较。对上海地区 238 份鸡蛋、685 份原料牛奶、283 份猪肉、314 份牛肉和 58 份虾仁样品的沙门菌检测表明,PCR 法的敏感性和特异性均为 100%,与国标法的符合率亦为 100%,且检测时间仅为 2 d,较国标法大为缩短。该方法可用于动物源性食品中沙门菌的检测,并具有快速、特异、敏感等优点。

关键词:沙门菌属;聚合酶链反应;肉制品;微生物学技术

Development of PCR Method for Rapid Detection of

Salmonella spp. from Foods of Animal Origin

LIU Pei-hong, WANG Jian, JIAO Xin-an, HUANG Jin-lin, LU Jun, SHEN Li-ping

(Shanghai Animal Husbandry and Veterinary Station, shanghai 201103, China)

Abstract: In this study, a polymerase chain reaction method (PCR) was used to detect *Salmonella* spp. from samples of foods of animal origin (egg 238, meat 283, beef 314, shrimp meat 58 and milk 685). The results indicated that the sensitivity and specificity of the PCR method reached 100% and the coincidence of the results of the PCR method and those of the National Standard method reached 100% too. The PCR method only took 2 days to get results. So, the PCR method was highly specific, sensitive and quick. It would be very useful for the rapid detection of *Salmonella* spp. from foods of animal origin.

Key word: Salmonella; Polymerase Chain Reaction; Meat products; Microbiological techniques

沙门菌是一群寄生于人和动物肠道内的无芽孢革兰阴性直杆菌,其菌型繁多,分布广泛,是一种重要的人畜共患病原菌^[1],它不仅能导致鸡白痢、鸡伤寒、副伤寒、仔猪副伤寒、流产等多种动物疾病,而且在世界各地的食物中毒中,沙门菌引起的中毒病例占首位或第 2 位。严重威胁着消费者的身体健康和畜牧业的健康发展,因而人和动物沙门菌的检测一直是一个世界性的问题^[2]。

目前,沙门菌的检测大都沿用传统的细菌培养、生化反应、血清学实验,费时费力,难以适应快速简便的要求。PCR 技术是一种快速、简便、特异、灵敏的检测沙门菌的方法,已成为应用生物技术的基础性工具,并已从实验室逐步走向实际临床检测中。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 肠炎沙门菌(*Salmonella enteritidis*)由扬州大学畜禽传染病学农业部重点开放实验室惠赠。大肠杆菌(*Escherichia coli*),购自上海市疾病预防控制中心,由上海市畜牧兽医站保存。

作者简介:刘佩红 女 高级兽医师 博士

1.1.2 试剂 引物由上海生物工程公司合成,dNTPs、Taq 酶、低分子量 PCR Marker 购自华美生物工程公司,常规试剂为国产分析纯试剂。

1.1.3 培养基 普通营养琼脂、胆硫乳琼脂(DHL)、缓冲蛋白胨水(BPW)、三糖铁琼脂(TSI)、亚硒酸盐胱氨酸培养基(SC)均按国标方法配制或购自杭州天和公司;M-肉汤参照 Sperber 方法配制^[3]。

1.1.4 仪器 PCR 仪(UNO, Biometra)、电泳仪(ELITE 3000 Bio-Rad)、凝胶成像系统(Kodak EDAS 290)。

1.1.5 样品 2004 年 2 月~2004 年 8 月份从上海地区不同市场及超市中购买不同批次的鲜鸡蛋 238 份、生鲜猪肉 283 份、生鲜牛肉 314 份和冻虾仁 58 份;从上海地区 28 个奶牛场中无菌采集生鲜原料牛奶 685 份。

1.2 方法

1.2.1 试样前处理 鸡蛋、牛奶试样无菌取 25 ml,猪肉、牛肉试样无菌取 25 g 分别加入 250 ml SC 增菌液或 M-肉汤增菌液中,37℃ 振荡培养 18~24 h,供提取 DNA 用。

1.2.2 引物设计合成 参照文献[4,5]沙门菌组

氨酸转运操纵子基因序列设计一对引物,长度为 25 bp,两引物间核苷酸长度为 495 bp。引物由上海生物工程公司合成。

引物 P1 5'-ACTGCGGTTATCCCTTTCTCTGGTG-3'

引物 P2 5'-ATGTTGTCCTGCCCTGGTAAAGAGA-3'

1.2.3 PCR 试剂盒组成 经试验筛选,组装 PCR 试剂盒,组份包括 PCR 反应管、PCR 反应液、琼脂糖、溴化乙锭、溴酚兰点样缓冲液、Taq 酶、阳性对照、阴性对照、液体石蜡。

1.2.4 试剂盒操作步骤 取试样 SC 增菌液或 M-肉汤增菌液细菌培养液 1 ml,置于 Eppendorf 管中,离心收集菌体,用灭菌蒸馏水洗涤 2 次,最后用 1 ml 蒸馏水悬浮,隔水煮沸 15 min,8 000 r/min 离心 15 min,取上清,即成 DNA 模板溶液。

PCR 反应体系总体积为 50 μ l,其中 10 \times PCR buffer 5 μ l, dNTPs (2.5 μ mol/L) 4 μ l,引物 和引物 (5 μ mol/L) 各 2.5 μ l,模板溶液 7.5 μ l, Taq 酶 (3 U/ μ l) 0.7 μ l,三蒸水 27.8 μ l,最后加 50 μ l 石蜡油覆盖。

PCR 循环参数 94 预变性 5 min;94 变性 45 s,60 退火 45 s,72 延伸 5 min,经 32 个循环,最后 72 保温 10 min。配制 2% 琼脂糖溶液,按 0.5 mg/L 加溴化乙锭 (EB) 制胶,取 5 μ l PCR 产物点样,用 PCR Marker 作对照,60 V 电泳 2 h。取出凝胶,置紫外灯下观察,在 Kodak 凝胶成像系统成像^[6-8]。

1.2.5 敏感性试验 采用平板计数法,确定沙门菌细菌数量为 10⁶ CFU/ml,然后将沙门菌和大肠杆菌按 1 1、1 10、1 100、1 1 000、1 10 000 混合,分别取混合物 1 ml 用 PCR 方法进行检测。

1.2.6 试样常规检验和联合快速检测 按国标方法进行常规检验,PCR 试验同步进行。取阳性菌株进行血清学试验和生化试验^[7],并将 2 种方法的结果进行比较。

1.2.7 数据分析 与国标法相比检出试验的敏感性、特异性和符合率分别按下列公式进行计算。

敏感性 = 真阳性数 / (真阳性数 + 假阴性数)

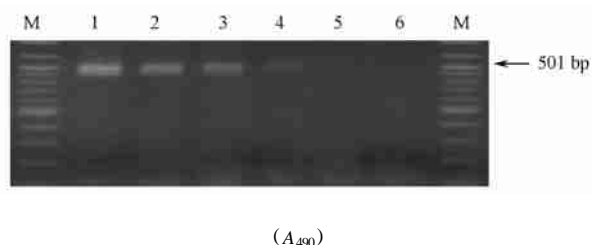
特异性 = 真阴性数 / (真阴性数 + 假阳性数)

符合率 = (真阳性数 + 真阴性数) / 被检总数

2 结果

2.1 PCR 法敏感性试验检测结果 将沙门菌和大肠杆菌不同比例混合,PCR 法的检测试验结果见表 1。沙门菌与大肠杆菌组成比例为 1 1 000 时,用 PCR 法仍能检出。

2.2 沙门菌检测方法的平行试验结果 采集牛场



1~5 分别为沙门菌和大肠杆菌 1 1、1 10、1 100、1 1 000、1 10 000 混合物,6 为 *E. coli*,M 为 PCR marker

图 1 人工混合样品 PCR 扩增产物电泳图谱

原料奶、市场和超市鸡蛋、牛肉、猪肉和虾仁等样品,共 1 578 份。采用 PCR 法和国标方法同步进行检测,结果见表 1。

表 1 沙门菌检测方法的平行试验结果

样品	样品数	PCR 法		国标法	
		阳性数	阳性率 (%)	阳性数	阳性率 (%)
鸡蛋	238	2	0.84	2	0.84
牛肉	314	47	15.00	47	15.00
猪肉	283	40	14.10	40	14.10
牛奶	685	60	8.76	60	8.76
虾仁	58	5	8.62	5	8.62
合计	1578	154		154	

结果显示,PCR 法检测出 154 份阳性样品,国标法亦检测出 154 份阳性样品,且均为 PCR 法检出的阳性样品。

PCR 方法的敏感性和特异性均为 100%,与国标法的符合率为 100%。

3 讨论

3.1 目前,包括我国在内的许多国家对沙门菌的检验普遍采用传统培养方法,报告检验结果大致需 4~5 d。繁杂的各类生化反应型,使常规检验程序复杂繁琐、耗时费力,不仅给检验部门带来沉重的负担,而且还使生产部门产品运转和仓储的时间延长,费用增加。

3.2 应用本研究所建立并完善的沙门菌 PCR 快速检测试剂盒,对生鲜鸡蛋、生鲜猪肉、生鲜牛肉、冻虾仁和生鲜原料牛奶等动物源性食品的沙门菌检测,该法与国标法的特异性和敏感性一致,且检测时间仅需 2 d,为沙门菌的检测提供了一种快速、敏感、特异的检测方法,具有广泛的经济和社会价值,应用前景广阔。

3.3 据有关文献报道,PCR 技术在大量样品的应用过程中,会产生一定数量的假阳性,另外,PCR 技术需要特定的仪器,在某些地区应用尚有一定的困难。

3.4 在本次所检测的动物源性食品中,均存在沙门

食品中金属污染物 GB/T 5009—2003 分析方法与 CAC 推荐方法之比较

常迪¹ 王竹天²

(1. 中国协和医科大学公共卫生学院,北京 100021;
2. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021)

摘要:为给我国修订理化检验方法提供借鉴,比较了食品中 8 种无机污染物在我国标准理化检验方法 GB/T 5009—2003 与 CAC 推荐的分析方法之间存在的差异,主要是分析方法的种类和参数的比较。我国现有的分析方法与 CAC 推荐的方法基本接轨,铅、砷、汞、镉、锡、铜、锌 7 种元素分析方法的种类略多于 CAC;我国标准检验方法普遍缺乏必要的技术参数;原子荧光法为我国特有的分析方法。建议按国际上通行的方法建立我国分析方法的参数;积极完善和推广原子荧光法;增加元素价态分析和同时检测多种元素的现代仪器分析技术。

关键词:食品污染;金属;化学;分析;食品法典

Comparison between Methods of GB/T 5009—2003 and CAC for Detecting Metal Pollutants in Foods

CHANG Di, WANG Zhu-tian

(Institute of Public Health, Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

Abstract: To provide reference for revision of Chinese analytic standards, the methods in the national standard GB/T 5009—2003 and those recommended by CAC, were compared. It was found that the domestic and international analytic methods were basically identical, and there were more analytic methods for Pb, As, Cd, Sn, Cu and Zn in GB/T 5009—2003 than in the recommendations by CAC. Most analytic methods lack necessary technical parameters in Chinese national standard and the atomic fluorometry spectrophotometry (AFS) was an analytic method being used for this purpose only in China. It is necessary to establish

菌不同程度污染的状况,尤其是生鲜肉食品,与国内相关报道的阳性检出率接近,故应引起高度重视,加大对动物源性食品生产、加工、运输、储藏和销售等各个环节的有效管理。

参考文献

- [1] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 北京:中国农业出版社, 2001:223.
- [2] 张艳红,吴延功,杜元钊,等. 沙门菌快速检测方法研究进展[J]. 动物医学进展,2001,22(2):39-41.
- [3] Cloak O M, Duffy G, Sheridan J J, et al. Development of a surface adhesion immunofluorescent technique for the rapid detection of *Salmonella* spp. from meat and poultry [J]. Journal of Applied Microbiology,1999,4:583-590.
- [4] Cohen N D, Wallis D E, Neibergs H L, et al. Comparison of the polymerase chain reaction using genus specific oligonucleotide primers and microbiology culture for the detection of *Salmonella* in drag swabs from poultry houses [J]. Poultr Sci, 1994, 73 (8) : 1276-1281.
- [5] Cohen N D, Mcgruder E D, Neibergs H L, et al. Detection of *Salmonella* enteritidis in feces from poultry using booster polymerase chain reaction and oligonucleotide primers specific for all members of the genus *Salmonella*[J]. Poultr Sci, 1994, 73: 354-357.
- [6] 文其乙. 沙门菌的基因分型和指纹图谱分析及其在分子流行病学中的应用[J]. 中国畜禽传染病,1994, (6) : 57-59.
- [7] 黄金林,焦新安,文其乙,等. 应用聚合酶链反应快速检测沙门菌[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2002,23(3):5-7.
- [8] 黄金林,焦新安,刘佩红,等. PCR 快速检测沙门菌试剂盒的研制与应用[J]. 中国公共卫生,2004,20(4):451-452.
- [9] GB 4789.31,4~8—2003. 食品卫生微生物检验,沙门菌检验[S].

[收稿日期:2005-11-14]

中图分类号:R15;R378.22 文献标识码:B 文章编号:1004-8456(2006)03-0223-03

作者简介:常迪 女 硕士生