

# PCR 方法检测食品中沙门氏菌研究进展

汪月霞, 赵会杰, 赵一丹 (河南农业大学生命科学学院, 河南郑州 450002)

**摘要** 对目前出现的一些具有代表性的食品中沙门氏菌的 PCR 检测方法做一综述, 由此可以得出, 目前开发出的检测食品中沙门氏菌的 PCR 方法正逐渐以多种 PCR 方法相结合、多重 PCR 技术以及食品样品预处理方法等为主, 以开发出更快速、灵敏、简便、实时、低廉的食源性沙门氏菌 PCR 检测方法。

**关键词** 沙门氏菌; 多重逆转录 PCR; 毛细管 PCR; 荧光定量 PCR; DNA 环介导的恒温扩增法  
**中图分类号** TS201.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)24-11435-02

## Research Progress in Food-borne *Salmonella* spp. Detection by PCR Technique

WANG Yue-xia et al (College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002)

**Abstracts** Some recently developed and representative PCR methods for detecting food-borne *Salmonella* spp. were reviewed. As shown, the recently developed PCR methods mainly headed down to the integration of different PCR methods, multiplex PCR, and the pretreatment method on food samples, which were mainly aimed to develop more rapid, sensitive, convenient, real-time and cheap food-borne *Salmonella* detection methods.

**Key words** *Salmonella* spp.; Reverse transcription - multiplex PCR; Capillary PCR; Real-time PCR; LAMP

微生物食品安全是当前消费者与食品工业共同关注的课题, 食品中致病菌的快速、准确、简便检测, 对于食品安全质量控制以及食品链中致病性细菌的溯源追踪具有重要作用<sup>[1]</sup>。而沙门氏菌能造成全身感染、食品中毒以及非常重要的动物性传播疾病——沙门氏菌病<sup>[2-4]</sup>。据美国疾病预防控制中心的统计, 沙门氏菌在引起食物中毒的病原菌中一直占据首位或第 2 位<sup>[5]</sup>。鉴于沙门氏菌严重威胁人类生命健康, 国内外学者一直致力于此细菌检测技术的研究, 为了诊断食源性细菌以及防止其对食品的污染和食源性细菌的爆发, 快速检测方法非常重要。目前普遍采用的传统微生物学检测方法, 如检测食品中沙门氏菌的 ISO 方法 6579, 需要经过前增菌、选择性培养以及生化和血清学鉴定等步骤, 至少要 5 d 才能得到阳性结果<sup>[6]</sup>, 而且灵敏度很低, 不适用于低度污染的食品样品<sup>[7]</sup>。如今已建立了众多的快速检测技术, 如以抗原-抗体反应为基础的酶联免疫反应等, 但目前这些检测技术仍存在着检测特异性不高, 操作复杂以及较难实现高通量检测等缺点。核酸的分子生物学检测技术因其具有高灵敏度、高特异性以及操作简便等特点, 目前已被广泛应用于食源性致病菌检测技术的研究与开发, 聚合酶链反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 技术就是其中具有广泛应用前景的检测技术之一。PCR 技术是 1985 年诞生的一项体外扩增 DNA 的方法, 具有特异性强、灵敏度高、快速准确、自动化程度高等特点, 目前在食源性沙门氏菌检测领域得到了广泛的应用, 并不断开发出多种新的基于 PCR 技术的检测方法。

### 1 多重逆转录 PCR (Reverse transcription-multiplex PCR)

逆转录 PCR 先用逆转录酶将 mRNA 逆转录成 cDNA, 再以此 cDNA 作为模板, 使用特异性引物对特定序列进行 PCR 扩增。使用这种方法可有效检测出只具有活性的菌株, 防止假阳性的结果出现。而多重 PCR 是指同一反应体系中含有两对或两对以上引物, 同时扩增多个核酸片段, 具有高效、系统性

以及经济简便等优点。Morin 等将这 2 种方法结合起来, 能在一个反应体系中同时检出具有活性的 *E. coli* O157:H7, *V. cholerae* O1 和 *Salmonella* Typhi, 大大提高了检测效率<sup>[8]</sup>。

### 2 毛细管 PCR (Capillary PCR)

毛细管 PCR 与普通 PCR 不同, 其反应体系是在一个 25  $\mu$ l 硼硅玻璃毛细管柱中, 通过 DNA 空气热循环仪完成 PCR 扩增。该方法由于是在热空气中进行的, 变性、退火和延伸过程中温度的变化在数秒内即可完成。这就减少了扩增反应的时间和错配的产生, 显著增加特异性扩增产物的量<sup>[9]</sup>。Gunaydin 等<sup>[10]</sup>采用该方法从 TTB、RVB、SCB 3 种培养基中分别能检出 *Salmonella enterica* spp. enterica serovar Enteritidis 64K, 在 3 种培养基中的检测限分别为:  $6.6 \times 10^1$  和  $6 \times 10^4$ , 从鸡肉和火鸡肉中该菌的检出率分别为 8% 和 6%。

### 3 DNA 环介导的恒温扩增法 (loop-mediated isothermal amplification of DNA, LAMP)

2000 年, Notomi 等开发出一种新的 DNA 环介导的恒温扩增法<sup>[11]</sup>。DNA 环介导的恒温扩增 LAMP 反应, 是分子生物学领域的一个新概念, 它可以在恒温 (60 ~ 65  $^{\circ}$ C) 条件下, 30 ~ 60 min 内将只有几个拷贝的靶核算扩增到  $10^8$  水平。该方法的一大特色是可以通过反应副产物——白色焦磷酸镁沉淀的产生与否判断靶基因的存在。因此, 该方法对病原微生物的鉴定具有高效率、高特异性、高敏感性等特点。Ohtsuka 等采用此方法能有效的从全部的 110 份蛋类样品中检出沙门氏菌, 与传统的培养检测方法相比, 耗时大大缩短, 而普通 PCR 方法的漏检率则达到 10%<sup>[12]</sup>。

### 4 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR)

常规的 PCR 方法需要对扩增后的产物进行凝胶电泳分析, 以确定所要检测的目标菌株的存在, 而实时荧光定量 PCR 建立在荧光信号强弱的基础上, 在 PCR 过程中即可检测目标菌株的存在, 不需要 PCR 后的处理, 这样就减少了由于试验操作而导致的假阳性的结果。因此在沙门氏菌的快速检测、实时监控过程中具有广泛的应用前景。Patel 等采用实时定量 PCR 方法能快速灵敏的从经过流体压 (HDP) 处理的鸡肉中检出沙门氏菌, 检测限为  $(2 \pm 1)$  cfu/25 g。同时该

**基金项目** 高层次人才启动科研项目。

**作者简介** 汪月霞 (1980 - ), 女, 安徽安庆人, 从事植物生理生态以及植物与微生物相互作用研究。

**收稿日期** 2009-04-10

试验也证明了 HDP 方法并不能有效的从鸡肉中完全去除沙门氏菌<sup>[13]</sup>。

### 5 PCR 方法检测食品中沙门氏菌的发展趋势

食源性致病细菌的 PCR 检测迄今为止仍未成为一种常规的方法,其主要原因是由于细菌在食品中浓度很低以及食品中存在着影响 PCR 扩增反应的物质。早期开发出的 PCR 检测方法也越来越不能满足现代快速、实时、高灵敏度检测的需要,目前所开发出的 PCR 检测食源性致病微生物的方法正逐渐倾向于将多种 PCR 方法相结合,PCR 方法与培养或分离微生物的方法相结合等,以期开发出灵敏度高、检测速度快、操作方便、成本较低的 PCR 检测方法。

(1) 多重 PCR 检测技术。传统的 PCR 检测技术是基于一对目的菌株高度特异性的单核苷酸引物,一次 PCR 扩增反应只能检测一种目的致病细菌<sup>[14]</sup>。多重 PCR 检测体系中含有多种目标菌株的特异性检测引物,可以同时扩增多个目的片段<sup>[15-17]</sup>,一次 PCR 反应能完成多个检测目的,大大提高了检测的效率,节省了检测的人力、物力和财力。目前已开发出多种基于多重 PCR 技术的检测方法用于常见食源性致病细菌的同时检测<sup>[18]</sup>,并被应用于肉类、海产品<sup>[19]</sup>、速冻食品<sup>[20]</sup>等样品中。

目前虽然也有报道将多重 PCR 方法用于食品中沙门氏菌、大肠杆菌 O157:H7 以及单核增生李斯特菌等致病细菌的同时检测<sup>[19-22]</sup>,但目前所开发的以多种细菌的同时检出为目的的多重 PCR 检测方法大多以这几种细菌的初步检出为目的,并不能同时得出所检测沙门氏菌的血清型、毒素分泌类型等,也就是说只能检测到属,无法得出更详细的检测结果。采用多重 PCR 方法对食品中的沙门氏菌进行检测的同时能得出分型的结果,对于食品中沙门氏菌的检测、预防与控制具有重要意义。类似的报道在沙门氏菌的多重检测中已有报道,O Regan 等人采用多重 TaqMan Real-time PCR 的方法能同时从食品中检出 Enteritidis, Gallinarum, Typhimurium, Kentucky 和 Dublin 等沙门氏菌的血清型<sup>[23]</sup>。

(2) 沙门氏菌的 PCR 检测需要新型的选择性增菌方法。目前,有人研究不通过增菌的方法直接从样品中检出目的细菌的方法,如根据 Guy 等人研究报道,屠宰后的畜体和环境中的沙门氏菌在不需要增菌培养的条件下,采用真空抽滤法将细菌浓缩在棉签上后采用实时荧光定量 PCR 方法在 4 h 内即可得到检测结果<sup>[24]</sup>,然而该类检测方法用于食品样品的检测时,通常都无法达到较好的检测灵敏度。因此,以选择性增菌为基础的样品预处理方法仍是食品中致病细菌快速检测方法开发的首选。

虽然通过基因芯片<sup>[25-26]</sup>、多重 PCR<sup>[18-19,21-22,27]</sup>等多种高通量检测方法可以同时检测包括沙门氏菌、大肠杆菌 O157:H7 以及单核增生李斯特菌等在内的多种食源性致病细菌,但由于这些研究方法大多采用非选择性培养基对待测样品中的目的菌进行增菌,如通用预增菌培养液 (UPB)<sup>[28]</sup>、LB<sup>[22]</sup>、17 号增菌液<sup>[21]</sup>等。这些增菌培养液虽然也能使得目的菌株得到一定的生长<sup>[29-30]</sup>,但当食品样品中微生物含量较为复杂时,目的检测菌的生长受到抑制而导致假阴性的情况就会时有发生<sup>[31]</sup>。由于不同细菌的生长速率、营养需求

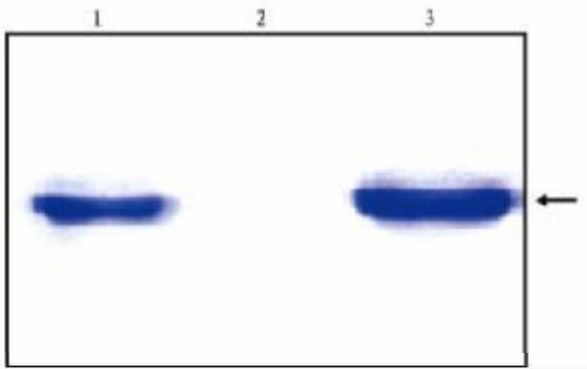
不同,选择性增菌的培养基、培养条件有差异。传统选择性培养基虽然能允许某一种或一类致病细菌的生长,抑制其他致病细菌的生长<sup>[32-33]</sup>,但也满足不了多重检测方法对同时增菌培养多种致病细菌的需要。因此,研究并开发出可选择性培养食品中沙门氏菌、大肠杆菌 O157:H7 以及单核增生李斯特菌等多重增菌培养液以及含有多种目标菌株的特异性检测引物的多重 PCR 技术,成为多重致病细菌的同时检测技术的开发与应用的趋势,这也成为食品安全研究工作者今后的研究重点。

### 参考文献

- [1] BHAGWAT A A. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* strains by real-time PCR [J]. *Int J Food Microbiol*, 2003, 84: 217-224.
- [2] JUNEJA V K, EBLE N B S, RANSOM G M. Thermal inactivation of *Salmonella* spp. in chicken broth, beef, pork, turkey, and chicken: determination of D- and Z-values [J]. *Journal of Food Science*, 2001, 66: 146-152.
- [3] FIELDING J E, SNELL P, MILAZZO A, et al. An outbreak of *Salmonella* Typhimurium phage type 4 linked to cold set cheesecake [J]. *Commun Dis Intell*, 2003, 2: 513-514.
- [4] ETHELBERG S, LISBY M, TORPDAHL M, et al. Prolonged restaurant-associated outbreak of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium among patients from several European countries [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2004, 10: 904-910.
- [5] Centers for Disease Control and Prevention. Preliminary food net data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food - 10 states [J]. *Morb Mortal Wkly Rep*, 2006, 55: 392-395.
- [6] MATSUI T, SUZUKI S, TAKAHASHI H, et al. *Salmonella* Enteritidis outbreak associated with a school-lunch dessert: cross-contamination and a long incubation period [J]. *Epidemiol Infect*, 2004, 132: 873-879.
- [7] ANONYMOUS. Microbiology of food and animal feeding stuffs-horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. International Standardization Organisation document [M]. Switzerland: International Standardization Organisation, Geneva, 2002: 6579.
- [8] MORIN N J, GONG Z, LI X F. Reverse transcription-multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio cholerae* O1, and *Salmonella* Typhi [J]. *Clin Chem*, 2004, 50: 2037-2044.
- [9] WITWER C T, GARLING D J. Rapid cycle DNA amplification: time and temperature optimization [J]. *Biotechniques*, 1990, 10: 76-83.
- [10] GUNAYDIN E, EYIGOR A, CARLI K T. A capillary polymerase chain reaction for *Salmonella* detection from poultry meat [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2007, 44: 24-29.
- [11] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28 (12): E63.
- [12] OHTSUKA K, YANAGAWA K, TAKATORI K, et al. Detection of *Salmonella enterica* in naturally contaminated liquid eggs by loop-mediated isothermal amplification, and characterization of *Salmonella* isolates [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71: 6730-6735.
- [13] PATEL J R, BHAGWAT A A, SANGLAY G C, et al. Rapid detection of *Salmonella* from hydrodynamic pressure-treated poultry using molecular beacon real-time PCR [J]. *Food Microbiology*, 2006, 23: 39-46.
- [14] HALATSI K, OIKONOMOU L, LAMBIRI M, et al. PCR detection of *Salmonella* spp. using primers targeting the quorum sensing gene *sdhA* [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2006, 259: 201-207.
- [15] MALORNY B, HOORFAR J, BUNGE C, et al. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69: 290-296.
- [16] HARA-KUDO Y, YOSHINO M, KOJIMA T, et al. Loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of *Salmonella* [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, 253: 155-161.
- [17] KIM H J, PARK S H, LEE T H, et al. Identification of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium using specific PCR primers obtained by comparative genomics in *Salmonella serovars* [J]. *J Food Prot*, 2006, 69: 1653-1661.
- [18] SHARMA V K. Real-time reverse transcription-multiplex PCR for simultaneous and specific detection of *rfbE* and *eae* genes of *Escherichia coli* O157:H7 [J]. *Mol Cell Probes*, 2006, 20: 298-306.
- [19] LEI I F, ROFFEY P, BLANCHARD C, et al. Development of a multiplex PCR method for the detection of six common foodborne pathogens [J]. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2008, 16: 37-43.

## 2 结果与分析

**2.1 拟南芥热激因子 HSF1 的表达** 将能表达拟南芥热激因子大肠杆菌 *E. coli* M15 (pQE32/ His<sub>6</sub>- HSF1, pREP4) 和不表达拟南芥热激因子的 *E. coli* TG1 (PQE30 空载体) 扩增至  $OD_{600} = 0.7 \sim 0.9$ , 加终浓度为 0.5 mmol/L IPTG, 在 37 °C 诱导表达 4 h. 超声波破碎细胞后, SDS - PAGE 检测表达蛋白. 由图 1 可知, 经 IPTG 处理的 *E. coli* M15 (pQE32/His<sub>6</sub>-HSF1, pREP4) 与 *E. coli* TG1 (PQE30 空载体) 细胞粗提物的表达蛋



注: 1 为拟南芥 HSF1 (正对照); 2 为经 IPTG 诱导的 *E. coli* TG1 (PQE30 空载体) 的纯化产物 (负对照); 3 为经 IPTG 诱导的 *E. coli* M15 (pQE32/ His<sub>6</sub>- HSF1, pREP4) 的纯化产物; 箭头显示 HSF1 表达蛋白的纯化产物的位置。

Notes: 1. HSF1 of *Arabidopsis thaliana* (positive control); 2. The purified products harvested from *E. coli* TG1 (PQE30 empty vector) by IPTG-induced (negative control); 3. The purified products of recombinant His<sub>6</sub>-tagged full-length HsfA1a expressed from *Escherichia coli* M15 (pQE32/ His<sub>6</sub>- HsfA1a, pREP4) by IPTG-induced; arrow shows the location of expressed HSF1.

图 2 拟南芥热激因子 HSF1 的纯化

Fig. 2 Purification of Heat Shock Factor HSF1 in *Arabidopsis thaliana*

白存在明显差异, 差异蛋白与拟南芥 HSF1 (正对照) 分子量一致, 表明拟南芥 HSF1 被诱导表达。

**2.2 拟南芥热激因子 HSF1 的纯化** 由于表达蛋白具有 6 个组氨酸, 因此采用镍亲和和层析进行纯化, 取 10 μg 纯化蛋白样品进行 SDS - PAGE 检测. 由图 2 可知, *Escherichia coli* M15 (pQE32/ His<sub>6</sub>- HSF1, pREP4) 表达蛋白纯化后有 1 条明显蛋白条带, 但 *E. coli* TG1 (PQE30 空载体) 在相应位置则没有条带, 这条带与拟南芥 HSF1 (正对照) 分子量一致, 说明表达拟南芥热激因子 HSF1 已被纯化。

## 3 结论

热激因子是真核生物热激反应的中心调控因子. 逆境胁迫诱导 HSF 与靶基因启动子区的热激元件特异性结合, 以调控靶基因的转录表达, 从而控制生理功能<sup>[4]</sup>. 该研究在诱导 HSF1 表达的过程中, 对大肠杆菌浓度、IPTG 浓度和处理时间均设定不同的处理条件, 结果显示, 大肠杆菌培养基中培养至  $OD_{600} = 0.7 \sim 0.9$ , 直接加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 诱导表达 4 h 的效果最好, 获得表达的 HSF1 蛋白. 对表达的 HSF1 蛋白进行镍亲和层析纯化, 研究发现, 咪唑终浓度为 400 mmol/L 的缓冲液洗脱效果最好, 获得了纯化的 HSF1 蛋白, 为进一步全面认识 HSF1 作用机理和生理功能奠定基础。

## 参考文献

- [1] SABEHAT A, WEISS D, LURIE S. Heat-shock proteins and cross-tolerance in plants [J]. *Physiol Plant*, 1998, 103: 437 - 441.
- [2] SCHÖFFL F, PRANDL R, REINDL A. Regulation of the heat shock response [J]. *Plant Physiol*, 1998, 117: 1135 - 1141.
- [3] GURLEY W B, KEY J L. Transcriptional regulation of heat-shock response: a plant perspective [J]. *Biochemistry*, 1991, 30: 1 - 11.
- [4] WU C. Heat shock transcription factors: structure and regulation [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1995, 11: 441 - 469.
- [5] GUO L H, CHEN S N, LIU K H et al. Isolation of heat shock factor HsfA1a-binding sites in vivo revealed variations of heat shock elements in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2008, 49 (9): 1306 - 1315.

(上接第 11436 页)

- [20] KAWASAKI S, FRATAMICO P M, HORIKOSHI N, et al. Evaluation of a multiplex PCR system for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 in Foods and in Food Subjected to Freezing [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2009, 6 (1): 81 - 89.
- [20] LEI I F, ROFFEY P, BLANCHARD C, et al. Development of a multiplex PCR method for the detection of six common foodborne pathogens [J]. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2008, 16: 37 - 43.
- [20] KIM H J, PARK S H, LEE T H, et al. Identification of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium using specific PCR primers obtained by comparative genomics in *Salmonella serovars* [J]. *J Food Prot*, 2006, 69: 1653 - 1661.
- [21] KAWASAKI S, HORIKOSHI N, OKADA Y, et al. Multiplex PCR for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157: H7 in meat samples [J]. *J Food Prot*, 2005, 68: 551 - 556.
- [22] KIM J S, LEE G G, PARK J S, et al. A novel multiplex PCR assay for rapid and simultaneous detection of five pathogenic bacteria: *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *J Food Prot*, 2007, 70: 1656 - 1662.
- [23] OREGAN E, MCCABE E, BURGESS C, et al. Development of a real-time multiplex PCR assay for the detection of multiple *Salmonella* serotypes in chicken samples [J]. *BMC Microbiol*, 2008, 8: 156.
- [24] GUY R A, KAPOOR A, HOLICKA J, et al. A rapid molecular-based assay for direct quantification of viable bacteria in slaughter houses [J]. *Journal of Food Protection*, 2006, 69: 1265 - 1272.
- [25] WANG X W, ZHANG L, JIN L Q, et al. Development and application of an oligonucleotide microarray for the detection of food-borne bacterial pathogens [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 76: 225 - 233.
- [26] KIM H J, PARK S H, LEE T H, et al. Microarray detection of food-borne pathogens using specific probes prepared by comparative genomics [J]. *Biosens Bioelectron*, 2008, 24: 238 - 246.
- [27] THOMPSON D E, RAJAL V B, DE BATX S, et al. Detection of *Salmonella* spp. in water using magnetic capture hybridization combined with PCR or real - time PCR [J]. *Journal of Water and Health*, 2006, 4: 67 - 75.
- [28] JIANG J, LARKIN C, STEELE M, et al. Evaluation of universal preenrichment broth for the recovery of foodborne pathogens from milk and cheese [J]. *J Dairy Sci*, 1998, 81: 2798 - 2803.
- [29] GOUWS P A, VISSER M, BROZEL V S. A polymerase chain reaction procedure for the detection of *Salmonella* spp. within 24 h [J]. *J Food Prot*, 1999, 61: 1039 - 1042.
- [30] MYINT M S, JOHNSON Y J, TABLANTE N T, et al. The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated *Salmonella* in raw poultry compared to conventional culture [J]. *Food Microbiology*, 2006, 23: 599 - 604.
- [31] ORAVCOVA K, TRNČIKOVA T, KUČHTA T, et al. Limitation in the detection of *Listeria monocytogenes* in food in the presence of competing *Listeria innocua* [J]. *J Appl Microbiol*, 2008, 104: 429 - 437.
- [32] FRICKER M, REISSBRODT R, EHLING-SCHULZ M. Evaluation of standard and new chromogenic selective plating media for isolation and identification of *Bacillus cereus* [J]. *Int J Food Microbiol*, 2008, 121: 27 - 34.
- [33] HUSSEIN H S, BOLLINGER L M. Influence of selective media on successful detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food, fecal, and environmental samples [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2008, 5: 227 - 244.