

多重 PCR 技术同时检测四种肠道致病菌方法的建立与初步应用

陈琼¹, 周昱^{2,3}, 孔繁德^{3*}, 吴德峰², 赵冉¹, 徐淑菲³, 连玉华¹, 杨涛¹

(1. 厦门市农产品质量安全检验检测中心, 厦门 361012; 2. 福建农林大学动物科学学院, 福州 351002;
3. 厦门出入境检验检疫局, 厦门 361026)

摘要: **目的** 建立同时检测 4 种食源性肠道致病菌的多重 PCR 方法。**方法** 分别依据沙门氏菌(*Salmonella spp*) 的 *fimA* 基因、弗氏枸橼酸杆菌(*Citrobacter freundii*) 的 *ldh* 基因、奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*) 的 *idsC* 基因、迟缓爱德华菌(*Edwardsiella tarda*) 的 *fimA* 基因设计 4 对特异性引物, 并对多重 PCR 反应条件进行优化。**结果** 建立的多重 PCR 方法具有结果可靠、灵敏度高、方便快捷的优点。**结论** 本研究为研发快速检测以上 4 种食源性肠道致病菌的试剂盒提供了重要技术保障。

关键词: 多重 PCR; 沙门氏菌; 弗氏枸橼酸杆菌; 奇异变形杆菌; 迟缓爱德华菌

Establishment and primary application of multiplex polymerase chain reaction for synchronous detection of four food-borne pathogens

CHEN Qiong¹, ZHOU Yu^{2,3}, KONG Fan-De^{3*}, WU De-Feng², ZHAO Ran¹, XU Shu-Fei³,
LIAN Yu-Hua¹, YANG Tao¹

(1. Xiamen Agricultural Product Quality and Safety Testing Center, Xiamen 3610092, China; 2. Animal Science College, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 3. Xiamen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Xiamen 361026, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for detection of four species of food-borne pathogens synchronously by multiplex PCR. **Methods** Four pairs of suitable primers were designed according to the specific gene *fimA* of *Salmonella spp*, gene *ldh* of *Citrobacter freundii*, gene *idsC* of *Proteus mirabilis*, and gene *fimA* of *Edwardsiella tarda*. The reaction conditions of multiplex PCR were optimized as well. **Results** The detection for real samples proved that the multiplex PCR method had the advantages of reliability, sensitivity and rapidness. **Conclusion** This method can provide a key technical support for developing a kit that detects the four species of food-borne pathogens rapidly.

KEY WORDS: multiplex PCR; *Salmonella spp*; *Citrobacter freundii*; *Proteus mirabilis*; *Edwardsiella tarda*

在对食品安全给予高度重视的当今文明社会, 仍有许多能引起人类疾病的高危致病菌通过在不同

食物间传播而引发疾病, 并且发病率和死亡率都在不断增加。在整个世界范围内, 与食源性疾病相关的

基金项目: 厦门市科技计划项目(3502Z20124011)

Fund: Supported by Science and Technology Project of Xiamen City of Fujian Province of China (3502Z20124011)

*通讯作者: 孔繁德, 博士, 研究员, 主要研究方向为动物疫病检测技术研究。E-mail: Kongfd@xmciq.gov.cn

*Corresponding author: KONG Fan-De, Professor, Technology Center of Xiamen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No.2165, Hai-cang Jian-gang Road, Xiamen 361026, China. E-mail: Kongfd@xmciq.gov.cn

花销每年要达到数十亿美元。不得不说,防治食源性致病菌在公共安全问题上有着重要地位^[1]。

本研究涉及的沙门氏菌、弗氏枸橼酸杆菌、奇异变形杆菌、迟缓爱德华菌这4种菌广泛分布于自然环境中,同时,它们还普遍存在于人和许多动物(包括哺乳类、鸟类、爬行类、两栖类)的肠道中,常在粪便材料或被粪便污染的地方分离,因此习惯将它们作为环境和食品等的粪源性污染的卫生细菌学指标^[2]。以上所提到的4种菌均可引起食物中毒^[3,4,5,6,7]。除了沙门氏菌具有广泛的致病性外,弗氏枸橼酸杆菌和奇异变形杆菌还是重要的医院内感染菌,常引起尿道和机体的其他部位感染^[8,9]。迟缓爱德华菌还可引起水生动物多种类型的感染症,给全球的水产养殖业造成很大损失^[10]。

目前,我国对以上致病菌的检验仍多采用传统鉴定方法,检验周期长,耗费大量人力和物力,检验敏感度还不高。鉴于此,建立准确、敏感、高效的检验方法对于采取有效的预防和防治措施是很有实用意义的。

本研究以沙门氏菌的 *fimA* 基因^[1]、弗氏枸橼酸杆菌 *ldh* 基因、奇异变形杆菌的 *idsC* 基因^[11]和迟缓爱德华菌的 *fimA* 基因^[12]为检测的目的基因,建立单管多重PCR方法用以同时检测以上4种病原菌。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 菌 株

实验所用菌株均为厦门出入境检验检疫局技术中

心动物检验检疫实验室已分离鉴定的保存菌株(表1)。

1.1.2 试剂和仪器

PCR 试剂盒(内含 MgCl₂、10×PCR Buffer、TaqDNA 聚合酶、dNTP); DL-1500 DNA Marker(宝生物工程大连有限公司); TE 缓冲液(pH 8.0,上海生工生物工程有限公司); 营养肉汤培养基、碱性蛋白胨培养基、营养琼脂培养基、亚硫酸铋琼脂培养基(BS)、DHL 培养基,均购于北京陆桥技术有限责任公司; 琼脂糖(Biowest 公司)。其余试剂均为国产分析纯。稳压稳流电泳仪、PCR 扩增仪(PTC200)和凝胶成像仪(GelDocXR),均为美国 Bio-Rad 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 模板 DNA 的制备^[13]

水煮裂解法:将实验菌株在营养琼脂平板上划线分离,之后在平板上挑取单个菌落接种于营养肉汤增菌液中,于 37 °C、120 r/min 摇床过夜。取增菌后的菌液 1 mL 于 1.5 mL 离心管中,12000 r/min 离心 2 min,弃去上清液,将沉淀用 TE 缓冲液洗涤两次,洗净培养液。于离心管中加入 100 μL TE 缓冲液,100 °C 水浴 10 min,立即冰浴 5 min,震荡裂解释放核酸,13000 r/min 离心 10 min,取上清分装后-20 °C 保存以作为实验模板。

1.2.2 引物设计

选择沙门氏菌的 *fimA* 基因(M18283)、弗氏枸橼酸杆菌的 *ldh* 基因(DQ991236.1)、奇异变形杆菌的 *idsC* 基因(EU635876)、迟缓爱德华菌的 *fimA* 基因(AF491964) 序列,应用 Primer 5.0 软件设计 4 对特异性引物(表 2)。

表 1 实验用标准菌株
Table 1 Reference strains used in this work

菌名	编号	缩写
沙门氏菌 <i>Salmonella spp</i>	ATCC C316	SS
弗氏枸橼酸杆菌 <i>Citrobacter freundii</i>	CF20060301	CF
奇异变形杆菌 <i>Proteus mirabilis</i>	PM20050506	PM
迟缓爱德华菌 <i>Edwardsiella tarda</i>	ET20040705	ET
铜绿假单胞杆菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PA20070604	PA
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	EC20100509	EC
溶藻弧菌 <i>Vibrio alginolyticus</i>	VA20090810	VA
副溶血弧菌 <i>Vibrio Parahemolyticus</i>	VP20120804	VP
阴沟肠杆菌 <i>Enterobacter cloacae</i>	EC20060807	EC

注:表中菌株出沙门氏菌为标准菌株外,其余菌株均为自己分离鉴定菌株,采用细菌分离和飞行时间质谱结合进行鉴定

表2 多重PCR引物设计
Table 2 Designed primers of multiplex PCR

病原菌	引物序列(5'→3')	T _m (°C)	目的片段长度(bp)
沙门氏菌	GCCGGTAAACTACACGATGA	60	526
(<i>Salmonella spp</i>)	GAGTTACTGAACCAACAGCT	58	
弗氏枸橼酸杆菌	AACATAGCGATGGACAACCTGA	55.9	161
(<i>Citrobacter freundii</i>)	TTAGCAAAAATTTAAGCCGGT	56.8	
奇异变形杆菌	TTTATCAATAGCCTCAAACCCT	55	396
(<i>Proteus mirabilis</i>)	TGCGTCACCCTCTAACTCATCC	58	
迟缓爱德华菌	CAGGTGAGTGGTGATTCAAAAA	55	330
(<i>Edwardsiella tarda</i>)	GTAACCGTATCGGCGTAAGAGC	57	

1.2.3 单重PCR引物特异性实验

以表1所列的相应菌株为阳性对照,其余菌株作阴性对照,分别使用表2中所列的引物进行PCR扩增,测定单基因PCR的特异性。反应体系:模板DNA 1 μL,上、下游引物各0.5 μL(20 μmol/L),MgCl₂(25 mmol/L) 0.75 μL,10×PCR Buffer(Mg²⁺free)1.25 μL,dNTP Mixture(2.5 mmol/L)1 μL,Taq 酶0.6 μL,双蒸水补足,总体积12.5 μL。PCR扩增条件:94 °C预变性4 min,94 °C变性30 s,60 °C退火40 s,72 °C延伸45 min(这3步进行35个循环);最后72 °C延伸7 min。通过琼脂糖凝胶电泳回收4种菌的产物,测序,与NCBI上的相应序列比对,判断实验结果。

1.2.4 单重PCR灵敏度实验

取4种目的菌的隔夜培养菌液各1 mL,参照国标法(GB/T 4789.2-2003)计算细菌个数,用水煮裂解法提取DNA作为模板,按1~1×10⁷梯度稀释原始菌液后提取DNA模板,将模板用1.2.3所述体系进行扩增,观察单重PCR的灵敏度。

1.2.5 多重PCR反应条件优化^[15]

对多重PCR反应条件中的主要影响因素,如退火温度、镁离子浓度、引物浓度、dNTP浓度进行优化,从而确定多重PCR的最优反应条件。

1.2.5.1 退火温度的优化

PCR反应体系中各成分浓度不变,梯度退火温度设定为58、59、60、61、62、63、64 °C,从中选择扩增效果最佳的温度作为最佳退火温度。

1.2.5.2 Mg²⁺浓度的优化

PCR反应体系为12.5 μL,退火温度为上述确定温度,保持各成分浓度不变,设计25 mmol/L Mg²⁺梯度为1.25、1.5、1.75、2.0、2.25 μL,从中选择扩增效果最佳的浓度作为最佳Mg²⁺浓度。

1.2.5.3 引物浓度的优化

先对比各个引物的扩增效率,再对引物浓度进行优化,设计加入混合引物的体积梯度为0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0、2.2 μL,从中选出最佳浓度。

1.2.5.4 dNTP浓度的优化

PCR反应体系中各成分浓度不变,退火温度和镁离子浓度为上述确定,设计dNTP体积为1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 μL,从中选择扩增效果最佳的浓度作为最佳dNTP浓度。

1.2.6 多重PCR反应敏感度实验

取已计数的4种目的菌的隔夜培养菌液各1 mL,混合后用水煮裂解法提取DNA作为模板,按1×10⁰~1×10⁶梯度将模板稀释后用已优化的PCR体系扩增,测定PCR反应的敏感性。

1.2.7 人工染菌实验

分别将隔夜培养的沙门氏菌、弗氏枸橼酸杆菌、奇异变形杆菌、迟缓爱德华菌的菌液梯度稀释10³~10⁶倍,取每个稀释度的菌液0.1 mL加入冻肉样品中,再将样品进行预培养,时间为10 h,分别提取培养菌液的DNA进行多重PCR检测,观察结果。

2 结果与分析

2.1 单重PCR引物特异性分析

将表1所列菌株的模板DNA加入多重PCR反应体系,使用包含表2所列4对引物的混合引物进行反应,通过琼脂糖凝胶电泳观察扩增结果。通过结果可知,只有沙门氏菌、弗氏枸橼酸杆菌、奇异变形杆菌、迟缓爱德华菌4种模板出现与目的条带大小相符的亮带,其余模板均未出现扩增条带(图1)。这说明本实验设计的4对引物具有良好的特异性,可以进行之后的优化。

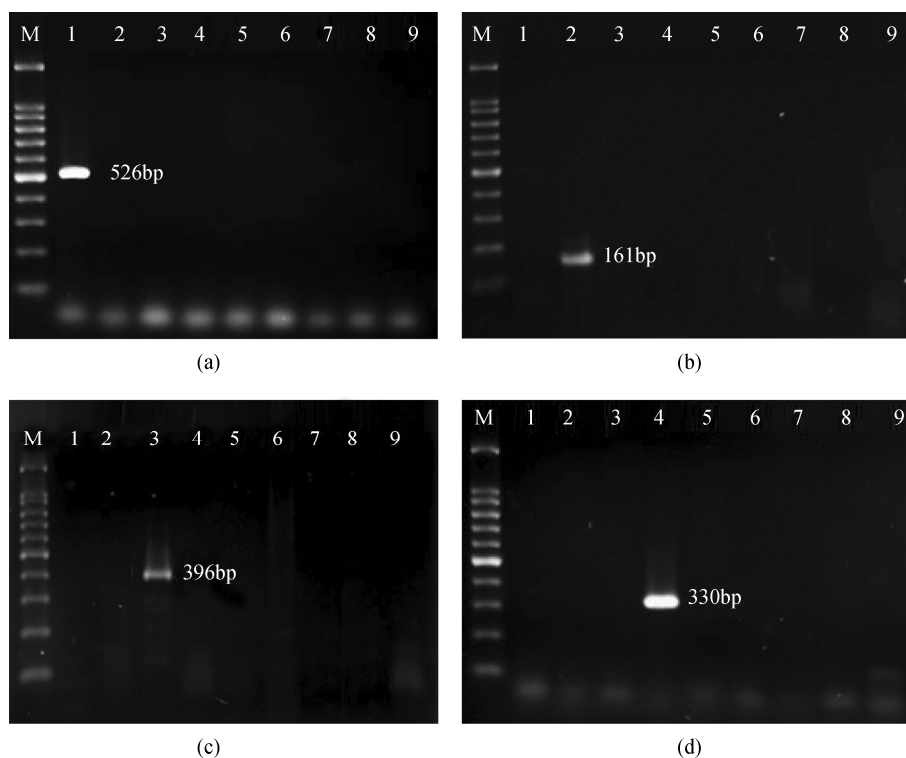


图1 单重PCR引物特异性分析

Fig.1 Analysis of single PCR primer specificity

(A) 沙门氏菌 *fimA* 基因; (B) 弗氏枸橼酸杆菌 *ldh* 基因; (C) 奇异变形杆菌 *idsC* 基因; (D) 迟缓爱德华菌 *fimA* 基因Fig. 1 (A) gene *fimA* of *Salmonella* spp; (B) gene *ldh* of *Citrobacter freundii*; (C) gene *idsC* of *Proteus mirabilis*; (D) gene *fimA* of *Edwardsiella tarda*

注: M. DL 1500; 1. 沙门氏菌; 2. 弗氏枸橼酸杆菌; 3. 奇异变形杆菌; 4. 迟缓爱德华菌; 5. 绿脓杆菌; 6. 大肠杆菌; 7. 溶藻弧菌; 8. 副溶血弧菌; 9. 阴沟肠杆菌

2.2 单重PCR灵敏度实验

通过国标法计算隔夜培养的4种目的菌的个数:沙门氏菌, 8.9×10^8 cfu/mL; 弗氏枸橼酸杆菌, 7.2×10^8 cfu/mL; 奇异变形杆菌, 5.7×10^8 cfu/mL; 迟缓爱德华菌, 6.4×10^8 cfu/mL。结果显示,单重PCR的检测灵敏度为:沙门氏菌 89 cfu (2A), 弗氏枸橼酸杆菌 72 cfu (2B), 奇异变形杆菌 6 cfu (2C), 迟缓爱德华菌 7 cfu (2D)。

2.3 多重PCR引物特异性分析

分别提取沙门氏菌、弗氏枸橼酸杆菌、奇异变形杆菌、迟缓爱德华菌、大肠杆菌、铜绿假单胞杆菌、溶藻弧菌、副溶血弧菌、阴沟肠杆菌各菌株的DNA模板,用混合引物进行PCR扩增。可以从琼脂糖凝胶电泳图中清晰的看到,分别在161、330、396、526 bp有4条扩增带,表明所设计的引物是特异性的,可用于后续实验(图3)。

2.4 多重PCR反应条件的优化

经过优化,多重PCR体系的最佳反应条件为:退火温度 60°C ; 体系总体积 $12.5 \mu\text{L}$, 其中包含混合模板DNA $4 \mu\text{L}$ 、浓度为 $20 \mu\text{mol/L}$ 的4对引物(加入量分别为沙门氏菌 $0.3 \mu\text{L}$, 弗氏枸橼酸杆菌 $0.125 \mu\text{L}$, 奇异变形杆菌 $0.1 \mu\text{L}$, 迟缓爱德华菌 $0.25 \mu\text{L}$)、 MgCl_2 (25 mmol/L) $2.0 \mu\text{L}$ 、 $10 \times \text{PCR Buffer (Mg}^{2+}\text{free)}$ $1.25 \mu\text{L}$ 、 $\text{dNTP Mixture (} 2.5 \text{ mmol/L)}$ $3.5 \mu\text{L}$ 、 Taq 酶 $0.75 \mu\text{L}$ 、双蒸水补足。PCR扩增条件: 94°C 预变性 4 min, 94°C 变性 35 s、 58°C 退火 40 s、 72°C 延伸 45 s (这3步扩增 35 个循环); 最后 72°C 延伸 7 min。产物通过3%琼脂糖凝胶电泳判断实验结果。

2.4.1 退火温度

图4显示, 60°C 、 61°C 和 62°C 的时候扩增效果较好,考虑到特异性和扩增效率,最终选定 62°C 为最佳退火温度。

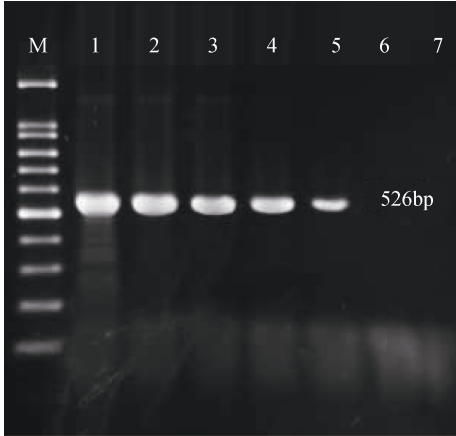


图 2A 沙门氏菌 *fimA* 基因检测灵敏度

Fig. 2A Sensitivity of detecting gene *fimA* of *Salmonella* spp
 M. DL 1500; 1~6. 菌液 $10^1 \sim 10^6$ 倍稀释提取的模板核酸; 7. 阴性对照
 M. DL 1500; 1~6. template nucleic acid extraction from bacteria liquid $10^1 \sim 10^6$ times diluted ; 7. Negative control

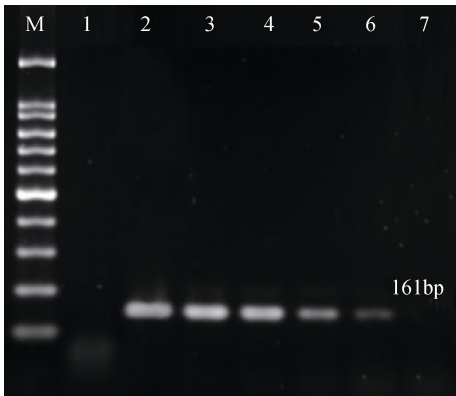


图 2B 弗氏枸橼酸杆菌 *ldh* 基因检测灵敏度

Fig.2B Sensitivity of detecting gene *ldh* of *Citrobacter freundii*
 M. DL 1500; 1. 阴性对照; 2~7. 菌液 $10^1 \sim 10^6$ 倍稀释提取的模板核酸
 M. DL 1500; 1. Negative control; 2~7. template nucleic acid extraction from bacteria liquid $10^1 \sim 10^6$ times diluted

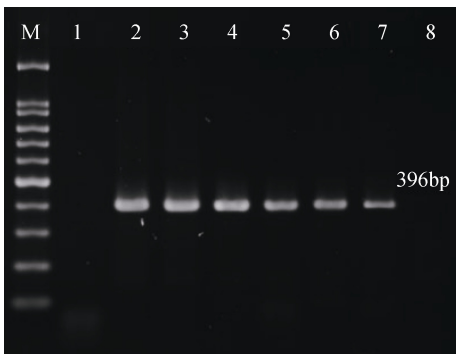


图 2C 奇异变形杆菌 *idsC* 基因检测灵敏度

Fig. 2C Sensitivity of detecting gene *idsC* of *Proteus mirabilis*
 M. DL 1500; 1. 阴性对照; 2~8. 菌液 $10^1 \sim 10^7$ 倍稀释提取的模板核酸
 M. DL 1500; 1. Negative control ; 2~8. template nucleic acid extraction from bacteria liquid $10^1 \sim 10^7$ times diluted

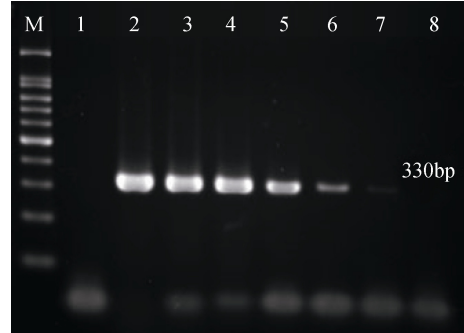


图 2D 迟缓爱德华菌 *fimA* 基因检测灵敏度

Fig. 2D Sensitivity of detecting gene *fimA* of *Edwardsiella tarda*
 M. DL 1500; 1. 阴性对照; 2~8. 菌液 $10^1 \sim 10^7$ 倍稀释提取的模板核酸
 M. DL 1500; 1. Negative control; 2~8. template nucleic acid extraction from bacteria liquid $10^1 \sim 10^7$ times diluted

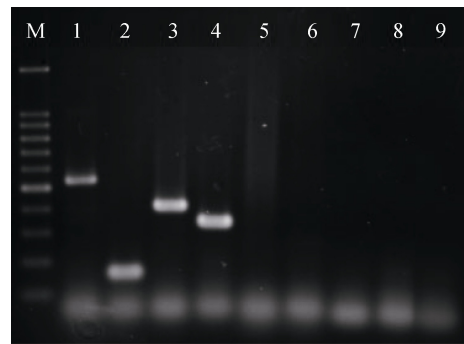


图 3 多重 PCR 引物特异性实验

Fig. 3 The detection of specificity of primers in multiplex polymerase chain reaction (M-PCR)
 注: M. DL 1500; 1. 沙门氏菌; 2. 弗氏枸橼酸杆菌; 3. 奇异变形杆菌; 4. 迟缓爱德华菌; 5. 绿脓杆菌; 6. 大肠杆菌; 7. 溶藻弧菌; 8. 副溶血弧菌; 9. 阴沟肠杆菌
 Notes: M. DL 1500; 1. *Salmonella* spp; 2. *Citrobacter freundii*; 3. *Proteus mirabilis*; 4. *Edwardsiella tarda*; 5. *Pseudomonas aeruginosa*; 6. *Escherichia coli*; 7. *Vibrio alginolyticus*; 8. *Vibrio Parahemolyticus*; 9. *Enterobacter cloacae*

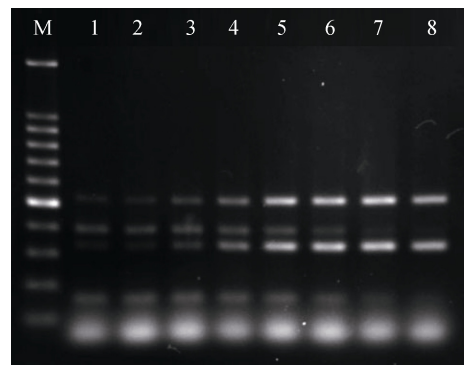


图 4 多重 PCR 反应退火温度优化

Fig. 4 The optimization of annealling temperature in multiplex polymerase chain reaction (M-PCR)
 注: M. DL1500; 1. 58 °C; 2. 59 °C; 3. 60 °C; 4. 61 °C; 5. 62 °C; 6. 63 °C; 7. 64 °C; 8. 65 °C
 Notes: M. DL1500; 1. 58 °C; 2. 59 °C; 3. 60 °C; 4. 61 °C; 5. 62 °C; 6. 63 °C; 7. 64 °C; 8. 65 °C

2.4.2 Mg^{2+} 浓度的优化

结果显示, Mg^{2+} 加入体积为 2.0 μL 的时候, 扩增效果最好(图 5)。

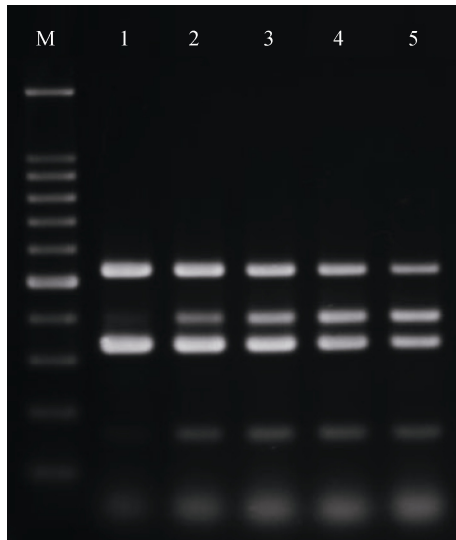


图 5 多重 PCR 反应镁离子浓度优化

Fig 5 The optimization of Mg^{2+} concentration in multiplex polymerase chain reaction (M-PCR)

注: M. DL1500; 1. 1.25 μL ; 2. 1.5 μL ; 3. 1.75 μL ; 4. 2.0 μL ; 5. 2.5 μL
Notes: M. DL1500; 1. 1.25 μL ; 2. 1.5 μL ; 3. 1.75 μL ; 4. 2.0 μL ; 5. 2.5 μL

2.4.3 引物的浓度

通过对比各个引物的扩增效率, 再对引物浓度优化, 最终确定各引物组分浓度如下: 沙门氏菌上、下游引物添加量为 0.72 μL , 在体系中浓度为 1.152 pmol/ μL ; 弗氏枸橼酸杆菌上、下游引物添加量为 0.21 μL , 在体系中浓度为 0.336 pmol/ μL ; 奇异变形杆菌上、下游引物添加量为 0.21 μL , 在体系中浓度为 0.336 pmol/ μL ; 迟缓爱德华菌上、下游引物添加量为 0.54 μL , 在体系中浓度为 0.864 pmol/ μL (图 6)。

2.4.4 dNTP 体积优化

由结果可知, 2.5 μL 为 dNTP 最佳加入体积(图 7)。

2.5 多重 PCR 敏感性测定

从结果中可知, 体系的检测灵敏度为: 沙门氏菌 89 cfu, 弗氏枸橼酸杆菌 7 cfu, 奇异变形杆菌 57 cfu, 迟缓爱德华菌 6 cfu(图 8)。

2.6 体系稳定性测定

为了测定本体系检测性能的稳定性的, 将除模板外的体系组分预先混合后分装于 PCR 管中, 于

-20 $^{\circ}C$ 保存, 每隔 30 d 取出进行反应。9 个月内未发现扩增条带有明显减弱, 说明本体系具有稳定性好的优点。

2.7 人工染菌实验

结果显示, 4 份人工染菌的检测结果都为阳性, 这说明本体系结果可靠。

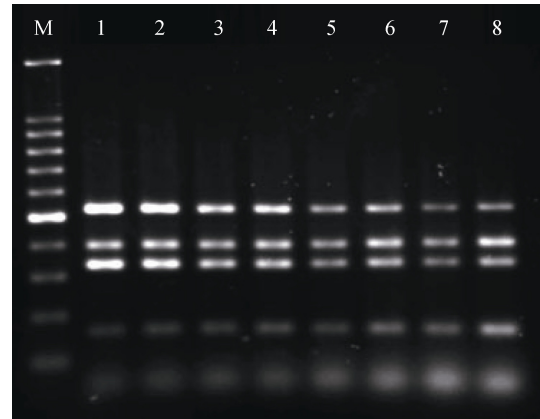


图 6 多重 PCR 引物体积优化

Fig. 6 Optimization of capacity of primers in multiplex polymerase chain reaction (M-PCR)

注: M. DL1500; 1. 0.8 μL ; 2. 1.0 μL ; 3. 1.2 μL ; 4. 1.4 μL ;
5. 1.6 μL ; 6. 1.8 μL ; 7. 2.0 μL ; 8. 2.2 μL
Notes: M. DL1500; 1. 0.8 μL ; 2. 1.0 μL ; 3. 1.2 μL ; 4. 1.4 μL ;
5. 1.6 μL ; 6. 1.8 μL ; 7. 2.0 μL ; 8. 2.2 μL



图 7 多重 PCR 体系 dNTP 体积优化

Fig. 7 The optimization of capacity of dNTP in multiplex polymerase chain reaction (M-PCR)

注: M. DL1500; 1. 1.0 μL ; 2. 1.5 μL ; 3. 2.0 μL ; 4. 2.5 μL ;
5. 3.0 μL ; 6. 3.5 μL
Notes: M. DL1500; 1. 1.0 μL ; 2. 1.5 μL ; 3. 2.0 μL ; 4. 2.5 μL ;
5. 3.0 μL ; 6. 3.5 μL

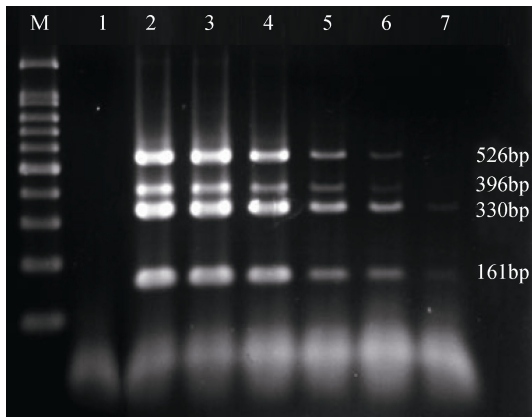


图8 多重PCR体系灵敏度实验

Fig. 8 The detection of sensitivity in multiplex polymerase chain reaction (M-PCR)

注: M. DL 1500; 1. 阴性对照; 2~7. 菌液 $10^1 \sim 10^6$ 倍稀释提取的模板核酸

Notes: M. DL 1500; 1. Negative control; 2~7. template nucleic acid extraction from bacteria liquid $10^1 \sim 10^6$ times diluted

3 讨论

多重PCR技术是在PCR技术的基础上发展起来的, 它所具有的优点非常明显, 即减少劳动强度并缩短检测时间。当前已广泛应用于病原微生物检测中。

基于分子生物学原理, 检测的靶基因直接决定了检测的可靠性, 引物的设计则决定了检测体系的灵敏度。本研究选择沙门氏菌的 *fimA* 基因、弗氏枸橼酸杆菌的 *ldh* 基因、奇异变形杆菌的 *idsC* 基因以及迟缓爱德华菌的 *fimA* 基因, 通过比对可知它们的序列都是目的菌的高度保守序列, 具有良好的特异性, 适合用来设计引物。通过仔细筛选, 得到了文中所列的4对引物, 这在体系的特异性实验中得到了证实。

文中对多重PCR体系中起主要作用的因素进行了优化, 由于多重体系存在多对引物, 各对引物之间存在相互竞争。本实验不仅优化了混合引物的加入量, 还对各对引物的加入比例进行了优化。反应体系中的原料是多对引物共享的, 如 dNTP。如果实检样品中的目的菌数目相差极大, 就可能造成优势扩增, 影响结果的准确性, 所以我们建议对样品进行预增菌, 一来可以避免上述现象, 二来也可以提高检出率^[14]。

在实际检测中应用, 从样品制备到得到结果只需要5 h, 若把预先增菌时间也考虑在内, 也不会超过1 h时间, 这极大提高了检测效率, 很符合当前入

境口岸快速检验的要求, 具有实际应用价值^[16]。

参考文献

- [1] Cohen JH, Mechanda MS, Lin W. PCR amplification of the *fimA* sequence of *Salmonella typhimurium*, a specific method for detection of *Salmonella* spp [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62: 4303-4308.
- [2] 刘秀梅, 陈艳, 樊永祥, 等. 2003年中国食源性疾病暴发的监测资料分析[J]. *卫生研究*, 2006, 35(2): 201-204.
Liu XM, Chen Y, Fan YX, *et al.* Foodborne diseases occurred in 2003-report of the national foodborne diseases surveillance system, China [J]. *J Hyg Res*, 2006, 35(2): 201-204.
- [3] 黄玉柳. 食品中沙门氏菌污染状况及预防措施[J]. *广东农业科学*, 2010, 6: 225-226.
Huang YL. Status of *Salmonella* contamination in food and its preventive measures [J]. *Guangdong Agr Sci*, 2010, 6: 225-226.
- [4] 焦凤兰, 石淑霞, 李永强. 一起弗劳地枸橼酸杆菌引起的食物中毒调查[J]. *预防医学论坛*, 2009, 4(4): 224-226.
Jiao FL, Shi SX, Li YQ. Investigation on a case of food poisoning caused by *Citrobacter freundii* [J]. *Prev Med Forum*, 2009, 4(4): 224-226.
- [5] 左翠瑛. 一起由弗劳地枸橼酸杆菌引起的食物中毒[J]. *中国卫生检验杂志*, 2005, 15(3): 403.
Zuo CY. A case of food poisoning caused by *Citrobacter freundii* [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2005, 15(3): 403.
- [6] 王勇, 张辉, 宋宏彬, 等. 一起由奇异变形杆菌引起的食物中毒调查[J]. *中华流行病学杂志*, 2007, 28(1): 91.
Wang Y, Zhang H, Song HB, *et al.* Investigation of food poisoning of *Proteus* from food [J]. *Chin J Epidemiol*, 2007, 28(1): 91.
- [7] 陈和周, 陈尚文. 一起缓慢爱德华菌引起食物中毒的调查报告[J]. *预防医学情报杂志*, 2004, 20(2): 197.
Chen HZ, Chen SW. Investigation of food poisoning caused by *Edwardsiella tarda* [J]. *J Prev Med Inform*, 2004, 20(2): 197.
- [8] 于滨, 董晓光. 弗劳地枸橼酸杆菌眼内炎一例[J]. *中华眼科杂志*, 2007, 43(1): 68-69.
Yu B, Dong XG. A case of *Citrobacter freundii* endophthalmitis [J]. *J Chin Ophthalmol*, 2007, 43(1): 68-69.
- [9] 陈淑惠. 奇异变形杆菌致败血症1例[J]. *检验医学与临床*, 2011, 8(6): 763, 768.
Chen SH. 1 cases of septicemia caused by *Bacillus proteus* [J]. *Lab Med Clin*, 2011, 8(6): 763, 768
- [10] 肖克宇, 黄志坚, 金斐理, 等. 牛蛙爱德华氏菌病原菌的鉴定和致病因素的研究[J]. *水产学报*, 1997, 21(3): 316-321.
Xiao KY, Hang ZJ, Jin XL, *et al.* Studies on the pathogenicities and biologic characteristics of the pathogens causing the Edwardsiellosis of the bullfrog [J]. *J Fish China*, 1997, 21(3):

- 316-321.
- [11] Gibbs KA, Wenren LM, Greenberg EP. Identity gene expression in proteus mirabilis [J]. J Bacteriol, 2011, 7: 3286-3292.
- [12] 江云, 李寿崧, 王寿昆, 等. 致病性迟钝爱德华菌毒力基因的 PCR 检测[J]. 中国食品学报, 2008, 8(4): 123-129.
Jiang Y, Li SS, Wang SK, *et al.* Detection of the Virulence Genes of Pathogenic Edwardsiella Tarda by PCR Assay [J]. J Chin Food, 2008, 8(4): 123-129.
- [13] 马新红, 亢娟娟, 康相涛, 等. 鸡基因组 DNA 不同提取方法的比较研究[J]. 江西农业大学学报, 2010, 32(1): 181-184.
Ma XH, Kang JJ, Kang XT, *et al.* A Comparative Study on Different Methods Extraction Of Gallus Genomic DNA [J]. J Jiangxi Agr Univ (Natural Sci), 2010, 32(1): 181-184.
- [14] 牟凯, 陈智, 王春民, 等. 同时检测四种病原菌的 PCR 方法研究[J]. 山东农业大学, 2011, 41(2): 253-257.
Mou K, Chen Z, Wang CM, *et al.* Study on multiplex PCR for simultaneous detection of four pathogenic bacteria [J]. J Shandong Agr Univ (Nat Sci), 2010, 41(2): 253-257.
- [15] 李岩, 崔洪斌, 刘玉红. PCR 技术检测沙门氏菌反应条件的优化[J]. 肉类研究, 2010, 3: 58-61.

- LI Y, Cui HB, Liu YH. Conditions of PCR Assay for Detection of Salmonella spp [J]. Meat Res, 2010, 3: 58-61.
- [16] 黄银花, 胡晓湘, 徐慰倬, 等. 影响多重 PCR 扩增效果的因素 [J]. 遗传, 2003, 25(1): 65-68.
Huang YH, Hu XX, Xu WZ, *et al.* Effect factors of multiplex PCR amplification effect [J]. Heredity, 2003, 25(1): 65-68.

(责任编辑: 赵静)

作者简介



陈琼, 研究员, 硕士, 主要研究方向为动物防疫和微生物检测技术。
E-mail: chenq66@163.com



孔繁德, 博士, 研究员, 主要研究方向为动物疫病检测技术。
E-mail: Kongfd@xmcq.gov.cn

“转基因食品安全”专题征稿

在过去的 30 年里, 科学家已经成功培育出多种转基因动植物。近年来, 转基因食品的研发迅猛发展, 产品品种及产量也成倍增长, 有关转基因食品的问题日渐凸显, 其致敏性、安全性、抗药性等问题引起了科学家和公众的广泛关注。我国于 2001 年颁布《农业转基因生物安全管理条例》, 对转基因食品进行科学监管, 之后又发布了一系列管理办法。

鉴于此, 本刊特别策划了“转基因食品安全”专题, 由上海交通大学张大兵教授担任专题主编, 张大兵教授现为上海交通大学生命科学技术学院副院长, 国家杰出青年基金获得者、教育部长江学者奖励计划特聘教授, 担任国家农业转基因生物安全委员会委员, 长期从事转基因生物分子特征等方面研究, 发表 SCI 论文近百篇, 获授权专利 14 项; 制定国家 ISO 技术标准 4 项, 制定国家标准 20 余项。本专题主要围绕**转基因食品成分检测、监测与溯源、安全性分析评价, 转基因食品管理法律法规、监管现状及问题**等或您认为本领域有意义的问题进行论述, 计划在 2014 年 1 月出版。

本刊编辑部特邀请您为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述、实验报告、研究论文均可, 请在 2013 年 10 月 31 日前通过网站或 Email 投稿。我们将快速处理并优先发表。

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

Email: jfoodsq@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部