

等温扩增技术在食品中沙门氏菌检测中的应用

高琳, 王淞, 刘国红, 温华蔚, 王禹, 刘掘茫, 张霞*

(天津出入境检验检疫局, 天津 300461)

摘要: **目的** 针对沙门氏菌肠侵袭蛋白基因设计适合交叉引物等温扩增法及环介导等温扩增法的特异性引物及探针, 并进行应用评估。 **方法** 用 19 株沙门氏菌, 35 株近源菌进行特异性试验; 通过定量 DNA、纯菌液计数检测进行检测低限验证, 与环介导等温扩增法进行比较; 对 6 类 18 种食品根据 ISO 5725-2:1994 标准要求, 以现行国家标准为基准方法对 2 种等温扩增法进行灵敏度、特异性、假阳性率、假阴性率及相对准确度等 5 方面验证。 **结果** 交叉引物等温扩增法与环介导等温扩增法具有相同的特异性, 检测灵敏度较高于环介导等温扩增法, 与基准方法比较的各项性能指标符合 ISO 的要求。 **结论** 该方法不需要复杂仪器, 可作为食品中沙门氏菌快速定性检测方法使用, 对口岸快速筛查、基层或偏远经济不发达地区顺利开展检测具有实际意义。

关键词: 沙门氏菌; 交叉引物等温扩增法; 环介导等温扩增法

Application of isothermal amplification technique in the detection of *Salmonella* in food

GAO Lin, WANG Song, LIU Guo-Hong, WEN Hua-Wei, WANG Yu, LIU Jue-Mang, ZHANG Xia*

(Tianjin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Tianjin 300461, China)

ABSTRACT: Objective To design the specific primers and probes on the basis of sequence analysis of *Salmonella*, and evaluate the application of isothermal amplification methods (cross-priming amplification and loop-mediated isothermal amplification, CPA and LAMP) in the detection of *Salmonella* in food. **Method** The specificity of the method was evaluated by 19 strains of *Salmonella* and 35 negative strains of Enterobacteriaceae. The sensitivity of the CPA method was evaluated by testing the quantitative DNA and pure bacteria count compared with the LAMP method. According to the ISO standard, 2 isothermal amplification methods were confirmed from the aspects of sensitivity, specificity, false positive rate, false negative rate and relative accuracy with the current national standard as the reference method. **Result** The CPA method had the same specificity as the LAMP method, was more sensitive than the LAMP method. The performance of methods could meet the requirements of ISO which compared with the reference method. **Conclusion** This method is highly sensitive, specific, and does not require any complex equipment, which can be used as a rapid qualitative detection method for *Salmonella* in food. It has practical significance for the rapid screening in the ports, and the detection in grassroots areas or the economically underdeveloped areas in remote areas.

KEY WORDS: *Salmonella*; cross-priming amplification; loop-mediated isothermal amplification

基金项目: 国家质检总局科研项目(2011IK241)

Fund: Supported by the AQSIQ Projects (2011IK241)

*通讯作者: 张霞, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: zhangxia_75@126.com

*Corresponding author: ZHANG Xia, Senior Engineer, Technical Center of Tianjin Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau, No.158, Jingmen Road, Free Trade Zone, Tianjin Port, Tianjin 300461, China. E-mail: zhangxia_75@126.com

1 引 言

沙门氏菌是一种引发人食物中毒的重要食源性病原菌, 据统计, 无论世界各国还是我国内陆地区细菌性食物中毒事件中, 均以沙门氏菌感染为首位^[1-4], 所以针对食品、产品原料等进行沙门氏菌检测是各国食品监管部门及企业必不可少的技术。

随着分子生物学技术的发展, 除经典的常规生化检测方法和简便实用的胶体金测试条法外, 相继开发出 PCR 法、实时荧光 PCR 法、环介导等温扩增法(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)等分子生物学方法^[5-7]。目前国家标准检测方法是传统分离培养、生化血清鉴定, 约需 5 d 左右^[8], 其他快速检测方法优缺点各有侧重。

等温扩增检测方法, 由于其灵敏、便于操作、仪器需求低、便于推广的优点, 又开发出一种新型等温扩增方法——交叉引物等温扩增法(cross-priming amplification, CPA)^[9], 引物设计原理及检测结果手段不同于环介导等温扩增法, 其既有不需要任何复杂仪器的优点, 又避免了环介导等温扩增法结果观察需要电泳或滴加荧光染料步骤, 排除 PCR 方法常见的产物气溶胶污染的可能性, 更适用于

基层实验室和现场快速筛查检测。国内外利用该技术已建立了单增李斯特氏菌、耐药金黄色葡萄球菌、阪崎克罗诺杆菌及志贺氏菌的检测方法^[10-13], 应用在食品致病菌快筛领域。

本研究将已建立的沙门氏菌交叉引物等温扩增法与环介导等温扩增法以国家标准《食品卫生微生物学检验沙门氏菌检验》为基准方法, 进行灵敏度、特异性参数比较, 依据国家标准有关确定标准测量方法重复性与再现性规定, 确认交叉引物等温扩增法能否满足沙门氏菌定性检测需求。

2 材料与方 法

2.1 主要材料与试剂

10×Bst buffer(New England Biolabs 公司); MgSO₄ (Sigma 公司); Bst DNA polymerase large fragment (New England Biolabs 公司); dNTPs (Fermentas); betaine (Sigma 公司); 10×loading buffer(大连宝生物工程公司); 琼脂糖 (Sigma 公司); 核酸检测试纸条(杭州优思达公司); DNA ladder II(北京天为时代科技有限公司); 5×TBE(大连宝生物工程公司)。

阳性对照菌株 19 株(4 株 CMCC 标准菌株、15 株不同国家的野生株), 阴性对照菌株 35 株, 详见表 1。

表 1 试验菌株

Table 1 Experimental bacterial strains

菌名	菌号	来源	菌名	菌号	来源
肠炎沙门氏菌	50041	CMCC	蜂房哈夫尼亚菌	45201	CMCC
猪霍乱沙门氏菌	50019	CMCC	弗劳地枸橼酸杆菌	48021	CMCC
鼠伤寒沙门氏菌	50115	CMCC	鼻硬结克氏杆菌	46116	CMCC
伤寒沙门氏菌	50096	CMCC	单增李斯特氏菌	L.mon6801	样品
山夫登堡沙门氏菌	S.senf5810	中国	产酸克雷伯氏菌	49334	ATCC
肯塔基沙门氏菌	S.kent5712	中国	肺炎克雷伯氏菌	46114	CMCC
马流产沙门氏菌	S.abo5905	中国	痢疾志贺氏菌	51252	CMCC
沙门氏菌	SAL 5729	日本	鲍氏志贺菌	51250	CMCC
沙门氏菌	SAL 51024	印度	弗氏志贺菌	51175	CMCC
沙门氏菌	SAL 51107	荷兰	宋内志贺菌	51334	CMCC
沙门氏菌	SAL 51227	新西兰	假结核耶尔森氏菌	53501	CMCC
沙门氏菌	SAL 51229	澳大利亚	小肠结肠炎耶尔森氏菌	52301	CMCC
沙门氏菌	SAL6607	爱尔兰	差异柠檬酸杆菌	27156	ATCC
沙门氏菌	SAL70115	法国	肺炎克雷伯氏菌	46104	CMCC
沙门氏菌	SAL70216	中国	粪肠球菌	ENF5329	样品
沙门氏菌	SAL70307	波兰	大肠杆菌 O157: H7	PTS001	样品
沙门氏菌	SAL71123	加拿大	粘质沙雷氏菌	13880	ATCC
沙门氏菌	SAL 100323	阿根廷	气味沙雷氏菌	33077	ATCC
沙门氏菌	SAL 081013	澳大利亚	液化沙雷氏菌	Serliq5123	样品
大肠杆菌	E . coli0856	样品	聚团肠杆菌	entagg5624	样品
绿脓杆菌	pesaer6310	样品	大肠杆菌	43046	CMCC
阴沟肠杆菌	E.clo6929-1	样品	阴沟肠杆菌	45301	CMCC
普通变形杆菌	49027	CMCC	产气肠杆菌	45103	CMCC
奇异变形杆菌	49005	CMCC	中间肠杆菌	E.int51231	样品

2.2 仪器与设备

PCR 仪(T gradient, 德国 Biometra 公司); 高速冷冻离心机(5417R, 德国 Eppendorf 公司); 紫外分光光度仪(UVmini-1240, 日本岛津公司); 电泳仪(PS3000, 美国 Hoefer 公司); 凝胶成像仪(T2A, 美国 Bio-Rad 公司)。

2.3 等温扩增引物及探针

利用沙门氏菌决定侵袭力的肠侵袭蛋白 invasion protein (invA) 基因特异保守序列^[14]设计交叉引物等温扩增及环介导等温扩增的引物及探针序列。

2.3.1 交叉引物等温扩增法引物及探针

SALF: 5'-GCGGAAGTCGCGGCCCG;
SALB: 5'-TCGCACCGTCAAAGGAACC;
SALCPR:

5'-AGATGAGTATTGATGCCGATTTGTCAGTACGCTTCG
CCGTTTCGC;

SALDF: 5'-FITC-AGGCCGGTATTATTGATGC;
SALDB: 5'-BIOTIN-TTTCTCTGGATGGTATGC。

2.3.2 环介导等温扩增法引物序列

FIP	5'-GACGACTGGTACTGATCGATAGTTTT CAACGTTTCTCGCG
BIP	5'-CCGGTGAAATTATCGCCACACAAAAC CCACCGCCAGG
F3	5'-GGCGATATTGGTGTATGTTATGGGG
B3	5'-AACGATAAACTGGACCACGG
Loop F	5'-GACGAAAAGAGCGTGGTAATTAAC
Loop B	5'-GGGCAATTCGTTATTGGCGATAG

2.4 检测方法

2.4.1 反应体系

(1)交叉引物等温扩增体系

在 50 μL 反应体系中各试剂浓度分别为 dNTP 0.16 mmol/L, MgSO_4 1.6 mmol/L, Betaine 0.2 mol/L, Bst DNA pol 0.16 U/ μL , SALF/SALB 40 pmol/L, SALCPR 160 pmol/L, SALD/SALDB 320 pmol/L, 模板 1 μL 。

反应条件: 63 $^{\circ}\text{C}$ 反应 60 min。

(2)环介导等温扩增体系

反应体系 50 μL , 各试剂浓度为: dNTP 0.8 mmol/L, MgSO_4 2 mmol/L, Betaine 1 mol/L, Bst DNA pol 0.16 U/ μL , FIP/BIP 各 160 pmol/L, F3/B3 各 1.28 $\mu\text{mol/L}$, Loop F/Loop B 0.64 $\mu\text{mol/L}$, 模板 2 μL 。

反应条件: 60 $^{\circ}\text{C}$ 反应 60 min。

2.4.2 特异性试验

对表 1 中 19 株阳性菌提取核酸进行试验, 证明检测方法通用性; 对 35 株阴性菌 DNA 样本进行特异性检测。

2.4.3 检测低限试验

以提取的肠炎沙门氏菌 CMCC50041DNA 为模板进行 DNA 检测低限试验。对肠炎沙门氏菌 CMCC50041 纯菌液进行计数, 10 倍稀释浓度至 10^0 CFU/mL, 进行菌液检测

低限试验, 试验重复 3 次检测。

2.5 检测方法评价

2.5.1 选择样品基质

对肉制品、鱼类和海产品、巧克力和面包制品、乳制品、水果与蔬菜制品、杂品等 6 个食品种类, 选择重度污染、中度污染和轻度污染 3 个食品类型, 每一类型测试 10 个样品。

2.5.2 样品检测

同时采用 3 种方法进行检测, 其中国家标准 GB 4789.4 作为其他两种方法评价的基准方法, 交叉引物等温扩增法及环介导等温扩增法按照国标方法进行第一、二步均质、前增菌, 选择性增菌后, 取 1 mL 增菌液提取 DNA, 扩增检测。

2.5.3 方法参数

方法参数评价主要针对特异性(p-)、灵敏度(p+), 相对准确度、假阳性率(pf+), 假阴性率(pf-)5 个参数, 将 2 种等温扩增法对每个样品得到的检验结果数据按照国标 GB/T 6379.2 《测量方法与结果的准确度(正确度与精密度)第 2 部分: 确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法》^[15] 规定, 确定待确认方法和基准方法测试结果的一致程度, 评估 2 种等温扩增检测体系可操作性及准确率。

3 结果与分析

3.1 特异性试验

54 株实验菌株用两种等温扩增法检测, 19 株阳性对照株检测全部为阳性, 图 1、图 2 是交叉引物等温扩增法及环介导等温扩增法检测结果; 35 株阴性对照菌检测全部为阴性, 见图 3(部分阴性菌试验结果)。结果说明两种等温扩增法特异性好, 对沙门氏菌无漏检, 具有较好的通用性。

3.2 检测低限试验

3.2.1 DNA 检测

紫外分光光度计检测沙门氏菌(CMCC 50041)DNA 浓度为 68.44 $\mu\text{g/mL}$, 梯度稀释, 2 种等温扩增法检测, 重复 3 次, 结果见表 2, 结果说明交叉引物等温扩增法比环介导等温扩增法灵敏, 灵敏度高一个数量级, 交叉引物可以稳

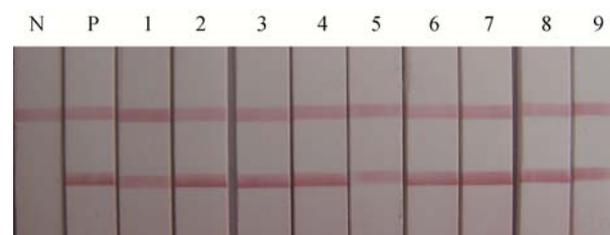


图 1 交叉引物等温扩增法检测沙门氏菌结果

Fig.1 Detection of *Salmonella* strains by CPA

注: N: 阴性对照; P: 阳性对照; 1~9: 沙门氏菌阳性菌株

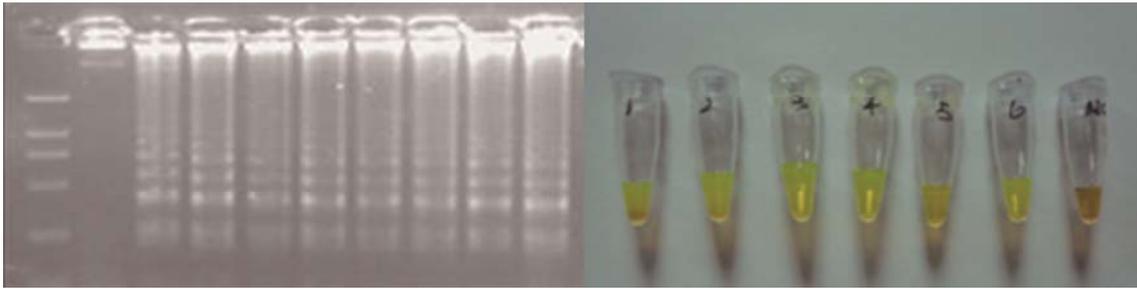


图 2 环介导等温扩增法检测沙门氏菌结果
Fig. 2 Detection of *Salmonella* strains by LAMP
注: CK: 空白对照; 1~6 沙门氏菌阳性菌株

表 2 沙门氏菌 DNA 灵敏度试验结果
Table 2 Sensitivity of detecting *Salmonella* DNA

DNA 浓度	6.84 ng	684 pg	684 pg	6.84 pg	684 fg	68.44 fg	6.84 fg	0.684 fg
方法	CPA/LAMP							
第 1 次	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-	-
第 2 次	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/-	-
第 3 次	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/-	-	-
总结	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+(+/-)	+/-	-

注: “+”检测结果为阳性;“-”检测结果为阴性

表 3 沙门氏菌液灵敏度试验
Table 3 Sensitivity of detecting *Salmonella*

细菌数 CFU/mL	6.0×10^7	6.0×10^6	6.0×10^5	6.0×10^4	6.0×10^3	6.0×10^2	6.0×10^1	6.0×10^0
LAMP	+	+	+	+	+	+	+	-
CPA	+	+	+	+	+	+	+	-

注: “+”检测结果为阳性;“-”检测结果为阴性。



图 3 交叉引物等温扩增检测阴性对照菌
Fig. 3 Detection of negative control strains by CPA
注: N: 阴性对照; P: 阳性对照; 1-9: 阴性对照菌株

定达到 10^1 fg/反应, 环介导 10^1 fg/反应浓度时, 3 个检测出现 2 个阳性。

3.2.2 纯菌液检测

沙门氏菌(CMCC 50041)过夜培养菌液浓度 6.0×10^8

CFU/mL, 用 PBS 进行倍比稀释到 6.0×10^0 CFU/mL, 取 1 mL 进行 DNA 提取, 两种等温扩增法灵敏度为 10^1 CFU/mL, 结果见表 3。

3.3 方法参数评价

收集 6 种共 180 个食品样品, 与国标基准方法进行比较检测, 确定两种等温扩增法的各项参数指标。样品类型选择重度污染(如未经加工的食品)、中度污染(未经高温处理的食品)和轻度污染(深加工食品)3 个类型, 如生肉、生菜、生鱼虾, 带壳鸡蛋, 核桃、杏仁、酱油、香肠、腊肠、炸鱼排、巧克力、蛋糕、全脂奶粉、冰淇淋等, 两种检测方法结果大致相符, 基准方法检测结果阳性样品 22 个, 交叉引物等温扩增法检测结果阳性 27 个, 环介导等温扩增法检出阳性 26 个, 具体性能指标参数见表 4 和表 5。

表 4 性能指标结果(交叉引物等温扩增法)
Table 4 Results of the performance (CPA)

样品情况 ^a	检验结果 ^b		总数
	阳性	阴性	
阳性	22	0	N1=22
阴性	5	153	N2=158
总数	N1= 27	N2= 153	N=180
显著性差异(χ^2)	$\chi^2=3.20$, 自由度(df)=1		
灵敏度(p+)	100%		
特异性(p-)	96.8%		
假阴性率(pf-)	0		
假阳性率(pf+)	3.2%		
相对准确度	97.2%		

注: a 由基准方法检验得到的结果。

b 检验结果由待确认方法检验得到的结果。灵敏度的计算使用确认后的结果。

表 5 性能指标结果(环介导等温扩增法)
Table 5 Results of the performance (LAMP)

样品情况 ^a	检验结果 ^b		总数
	阳性	阴性	
阳性	22	0	N1=22
阴性	4	154	N2=158
总数	N1= 26	N2= 154	N=180
显著性差异(χ^2)	$\chi^2=2.25$, 自由度(df)=1		
灵敏度(p+)	100%		
特异性(p-)	97.5%		
假阴性率(pf-)	0		
假阳性率(pf+)	2.5%		
相对准确度	97.8%		

注: a 由基准方法检验得到的结果。

b 检验结果由待确认方法检验得到的结果。灵敏度的计算使用确认后的结果。

4 结 论

随着对外贸易经济的快速发展,国民食品安全意识提高,无论企业还是食品监管部门面临的压力都越来越大,不但要保证检测质量,而且要加快检测速度,缩短检测流程。微生物学利用 PCR 技术建立快速检测方法,随着等温扩增技术发展,摆脱对昂贵检测仪器的依赖,通过国际及国家标准对新方法的准确度进行严格验证,微生物学检测朝着快速简便、灵敏性高、特异性强且经济的方向发展,开

始适用于现场检测及经济不发达地区。

沙门氏菌交叉引物等温扩增及环介导等温扩增 2 种方法,通过选择 19 株目标微生物菌株和 35 株竞争菌株, DNA、菌液检测来分析方法的检测低限和特异性,结果表明对于菌液检测低限两种等温扩增法均为 10^1 CFU/mL,没有明显差别;但 DNA 检测结果表明建立的交叉引物等温扩增法检测沙门氏菌较环介导等温扩增法灵敏,灵敏度高一个数量级,交叉引物等温扩增法可以稳定达到 10^1 fg/反应,环介导等温扩增法 10^1 fg/反应浓度时,3 个检测出现 2 个阳性。

通过两种等温扩增法与沙门氏菌检测的国家标准比较, $\chi^2 < 3.84$, 说明对阳性菌株的确诊率与基准方法比较没有差异;特异性参数环介导等温扩增法特异性强于交叉引物等温扩增法,考虑与引物设计有关,就原理而论,交叉引物等温扩增法较环介导等温扩增法灵敏,在 DNA 灵敏度检测中可以体现出,但引物设计难度较大,容易产生假阳性结果;相应的其他 3 个参数,假阴性率二者相当、假阳性率及相对准确度性能指标环介导等温扩增法均强于交叉引物等温扩增法。但是二者均符合 ISO 对待确证方法准确度的要求,能够满足定性微生物方法要求,可以作为初筛方法使用。

参 考 文 献

- [1] Bean NH, Griffin PM. Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973-1987: pathogens, vehicles, and trends [J]. J Food Prot, 1990, 53: 804-816.
- [2] Dargatz DA, Wells SA, Fedorka-Cray PJ, et al. The veterinarian's role in diagnosis, treatment, and prevention of multidrug resistant *Salmonella* typhimurium DT104 [J]. Bovine Pract, 1998, 32: 1-6.
- [3] Murray MJ. Salmonellosis in horses [J]. J Am Vet Med Ass, 1996, 209: 558-560.
- [4] Wells SJ, Ott SL, Seitzinger AH. Key health issues for dairy cattle-new and old [J]. J Dairy Sci, 1998, 81: 3029-3035.
- [5] Bej AK, Mahbubani MH, Boyce MJ, et al. Detection of *Salmonella* spp. in oysters by PCR [J]. Appl Environ Microbiol 1994, 60: 368-373.
- [6] Rasmussen SR, Rasmussen HB, Larsen MR, et al. Combined polymerase chain reaction-hybridization microplate assay used to detect bovine leukemia virus and *Salmonella* [J]. Clin Chem, 1994, 40: 200-205.
- [7] Widjoatmodjo MN, Fluit AC, Torensma R, et al. Evaluation of the magnetic immuno PCR assay for rapid detection of *Salmonella* [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1991, 10: 935-938.
- [8] GB/T4789.4 食品卫生微生物学检验 沙门氏菌检验[S]. GB/T4789.4 Food microbiological examination: *Salmonella* [S].
- [9] Fang R, Li X, Hu L, et al. Cross-priming amplification for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47: 845-847.
- [10] Zhao Y, Zhang X, Zhang H, et al. Rapid and sensitive detection of *Enterobacter sakazakii* by cross-priming amplification combined with immuno-blotting analysis [J]. Mol Cell Prob, 2010, 24(2): 396-400.
- [11] 张 霞, 吴冬雪, 曲 鹏, 等. 一种新的等温扩增技术检测阪崎肠杆菌[J].

食品科学, 2013, 34(2): 187-190.

Zhang X, Wu DX, Qu P, *et al.* A new isothermal amplification detection of *Enterobacter sakazakii* [J]. Food Sci, 2013, 34(2): 187-190.

- [12] 刘旸, 张海英, 刘国红, 等. 单增李斯特氏菌快速检测方法的建立[J]. 食品研究与开发. 2012, 33(9): 134-136.

Liu Y, Zhang HY, Liu GH, *et al.* Rapid detection of *Listeria monocytogenes* [J]. Food Res Devel, 2012, 33(9): 134-136.

- [13] 祁军, 张霞, 蒋刚强, 等. 交叉引物等温扩增技术检测志贺氏菌[J]. 食品研究与开发. 2013, 34(11): 65-68.

Qi J, Zhang X, Jiang GQ, *et al.* A cross prime amplification detection of *Shigella* [J]. Food Res Dev, 2013, 34(11): 65-68.

- [14] Liu C, Zheng W, Zhang H, *et al.* Selective and rapid detection of *Salmonella* in infant formula by loop-mediated isothermal amplification method [J]. J Food Saf, 2009, 29: 83-94.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



高 琳, 工程师, 主要研究方向为食品安全。

E-mail: gaol@tjciq.gov.cn



张 霞, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: zhangxia_75@126.com