

3 种血清型沙门氏菌多重 PCR 检测方法的建立

郑玉玺, 韩 明, 李崇高, 张 挺, 董 蕾*

(广州城市职业学院食品系, 广州 510640)

摘 要: 目的 建立多重聚合酶链式反应(multiplex polymerase chain reaction, mPCR)法检测 3 种常见血清型沙门氏菌的分析方法。**方法** 以肠炎沙门氏菌 *Hat* 基因、鼠伤寒沙门氏菌 *Stm-4495* 基因、乙型副伤寒沙门氏菌 *sdfl* 基因设计合成特异性引物, 提取沙门氏菌基因组 DNA 为扩增模板, 验证引物特异性, 优化多重 PCR 退火温度及引物浓度, 检测方法特异性及检出限, 并利用该方法对人工污染冷鲜鸡肉进行检测。**结果** 3 对引物特异性强且无交叉影响; 25 μL 多重反应体系中, 引物 STM、HAT、SDF 最佳终浓度分别为: 0.5、0.5、0.4 $\mu\text{mol/L}$, 最佳退火温度为 60 $^{\circ}\text{C}$; 11 株阴性对照菌无目标条带检出, 方法特异性良好, 以 3 种血清型沙门氏菌纯培养物 DNA 混合物为模板, 检出限低至 DNA 质量浓度 1 $\text{pg}/\mu\text{L}$; 人工污染鸡肉经过 12 h 增菌, 能同时检测出 3 种血清型沙门氏菌的检测限为: 肠炎沙门氏菌(4.0 \pm 1.0) CFU/g、鼠伤寒沙门氏菌(8.0 \pm 0.9) CFU/g、乙型副伤寒沙门氏菌(8.0 \pm 0.6) CFU/g。**结论** 本方法特异性强、检测限低, 对食品中 3 种常见血清型沙门氏菌快速检测具有重要意义。

关键词: 多重 PCR; 血清型; 沙门氏菌

Establishment of multiplex PCR methods for determination of 3 kinds of *Salmonella* serotypes

ZHENG Yu-Xi, HAN Ming, LI Chong-Gao, ZHANG Ting, DONG Lei*

(Guangzhou City Polytechnic, Food Department, Guangzhou 510640, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of for 3 common serotypes of *Salmonella* by multiplex polymerase chain reaction (mPCR). **Methods** *S. enteritidis Hat* gene, *S. typhimurium Stm-4495* gene, and *S. paratyphi B sdfl* gene were used as target gene to design specific primers. *Salmonella* genomic DNA was extracted as an amplification template to verify the specificity of primers. The primer concentration and annealing temperature were optimized and the specificity and limit of detection of method were determined to develop detection method of mPCR. **Results** Three pairs of primers could amplify target genes with great specificity and no-cross effect. The optimal final concentrations of primers STM, HAT, SDF were 0.5, 0.5, 0.4 $\mu\text{mol/L}$, respectively, and the optimum annealing temperature was 60 $^{\circ}\text{C}$. Eleven negative control bacteria were detected without target bands. The detection limit of 3 serotypes of *Salmonella* was as low as 1 $\text{pg}/\mu\text{L}$. The detection limits of 3 serotypes *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* and *S. Paratyphi B* were (4.0 \pm 1.0) CFU/g, (8.0 \pm 0.9) CFU/g and (8.0 \pm 0.6) CFU/g respectively after 12 h

基金项目: 广州市教育局高校科研项目(201831787)、广东省普通高校青年创新人才类项目(2018GkQNCX074)、2019 广东大学生科技创新培育专项(pdjh2019b0840)、广州市科技计划项目(156300065)

Fund: Supported by the University Scientific Research Project of Guangzhou Municipal Bureau of Education (201831787), Young Innovative Talents Project of Guangdong Province (2018gkqncx074), 2019 Special Fund of Scientific and Technological Innovation and Cultivation of Guangdong University Students (pdjh2019b0840) and Science and Technology Plan Project of Guangzhou (156300065)

***通讯作者:** 董蕾, 助理研究员, 博士, 主要研究方向为食品生物技术。E-mail: 23024458@qq.com

***Corresponding author:** DONG Lei, Research Assistant, Food Department, Guangzhou City Polytechnic, No. 511 Guangyuan Zhonglu, Baiyun District, Guangzhou 610640, China. E-mail: 23024458@qq.com

enrichment in contaminated chilled chicken. **Conclusion** This method has high specificity and low detection limit and is of great significance for rapid detection of 3 common serotypes of *Salmonella*.

KEY WORDS: multiplex PCR; serotypes; *Salmonella*

1 引言

沙门氏菌作为一种常见的食源性致病菌主要通过污染的水体、食品及与病原菌直接接触传播给人类^[1,2],从而可能引起肠胃炎、痢疾、伤寒及败血症等疾病,甚至致人死亡^[3-5]。截至目前,沙门氏菌可分为2600多种血清型^[6],不同血清型沙门氏菌在侵袭力^[7]、毒素系统^[8]、耐药性^[9]等方面均具有不同特征。陈玲等^[10]对我国南方代表性地区400份食品研究表明:同一份食品被多种血清型沙门氏菌污染的现象较为明显,其中肠炎沙门氏菌(*S. enteritidis*)、鼠伤寒沙门氏菌(*S. typhimurium*)及乙型副伤寒沙门氏菌(*S. Paratyphi B*)是沙门氏菌食物中毒事件中最常见的3种血清型^[11],因此同步快速检测食品中上述3种血清型沙门氏菌显得尤为重要。

传统沙门氏菌检测方法主要依靠纯培养、生化鉴定、血清分型等繁琐步骤完成,检测周期较长,同时检测过程中杂菌干扰、噬菌体污染及质粒转移等原因极易导致假阳性或假阴性现象出现^[12]。依靠核酸扩增的单重PCR方法虽然能快速定性甚至定量检测食品中沙门氏菌^[13,14],但是无法实现不同血清型沙门氏菌的多重检测。

多重PCR检测技术由于能同时检测食品中多种食源性致病菌,大大提高检测效率,近年来已成为食品安全检测领域的研究热点^[15-18]。目前较多研究均集中在不同属间食源性致病菌的多重PCR检测方法,对于同种致病菌不同血清型的多重PCR检测方法研究较少,仅有王娟芳等^[19]基于多重PCR方法检测禽致病菌性大肠杆菌O1、O2和O78 3种血清型,而针对食品中沙门氏菌不同血清型的多重PCR方法却鲜见报道。本研究旨在建立肠炎沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌及乙型副伤寒沙门氏菌的多重PCR检测方法,对食品中沙门氏菌检测及溯源均具有重要意义。

2 材料与方 法

2.1 材料与仪器

样品: 鲜冷鸡肉, 购于广州市白云区家乐福超市, 散装称重, 4℃保存。

实验菌株信息如表1所示。

材料: Luria-Bertani(LB)琼脂、缓冲蛋白胨水(buffer peptone water, BPW)、脑心浸萃液、营养肉汤、营养琼脂(广东环凯生物科技有限公司); ExTaq HSDNA Polymerase (5 U/μL)、10×Ex Taq Buffer (20 mmol/L Mg²⁺ plus)、dNTP Mixture (2.5 mmol/L)(大连宝生物有限公司); 细菌基因组提

取试剂盒、6×DNA loading Buffer、DL2000 DNA Marker(天根生化科技有限公司); 琼脂糖(美国Sigma公司)。

仪器: HN-08 无菌均质器(上海汗诺仪器有限公司); SW-CJ-2FD 洁净工作台(上海博讯事业有限公司医疗设备厂); SQ510C 立式高压蒸汽灭菌锅(重庆雅马拓科技有限公司); SHP-150 生化培养箱(广东环凯微生物科技有限公司); BSC-1300II A2 生物安全柜(江苏苏净安泰有限公司); HC-2518R 高速冷冻离心机(安徽中科科技有限公司); HH-S4 恒温水浴锅(浙江金坛仪器设备有限公司); DYY-8c 电泳仪(北京六一生物有限公司); T100 核酸扩增仪、721BR14980 凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司); MILLI-Q 超纯水仪(美国Millipore公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 菌株活化及DNA提取

实验菌株接种于脑心浸萃液并涂布LB平板划线, 挑取单菌落于10 mL营养肉汤中, 静置培养24 h, 4℃冷藏备用。1 mL菌液置于1.5 mL无菌离心管, 4℃、12000 r/min高速冷冻离心2 min, 弃上清液, 按细菌基因组试剂盒方法提取细菌基因组DNA, 超微量分光光度计检测DNA浓度(调整终浓度至50 ng/μL)及OD₂₆₀/OD₂₈₀值(比值在1.8~2.0之间), -20℃保存。

2.2.2 引物设计

NCBI搜索比较3种沙门氏菌全基因组序列并筛选特异性靶点, 最终选取肠炎沙门氏菌 *sdjI* 基因、鼠伤寒沙门氏菌 *stm-4495* 基因、乙型副伤寒沙门氏菌 *Hat* 基因作为靶基因, primer 5.0 及 Beacon Designer 8 进行引物设计及评价, 选取3对产物大小相差100~150 bp及退火温度相近的特异性引物, Primer-Blast 进行同源性比对, 最终引物序列见表2。

2.2.3 引物特异性验证

以 INV 为沙门氏菌属通用引物, 分别验证引物 STM、HAT、SDF 特异性。PCR 扩增体系: 设置1~6号PCR反应管分别加入10×Ex Taq Buffer(20 mmol/L Mg²⁺ plus)4 μL, dNTP Mixture 2 μL, Taq 酶 (5 U/μL) 0.25 μL, INV 上下游引物各 0.5 μL, 另1~3管中分别加入 STM、HAT 和 SDF 上下游引物各 1 μL, 1~5号管依次加入鼠伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、肠炎沙门氏菌、甲型副伤寒沙门氏菌及猪霍乱沙门氏菌的DNA各1 μL为模板, 6号管加1 μL ddH₂O为对照, 各管加 ddH₂O 补足至25 μL。反应程序为: 94℃预变性10 min; 94℃变性30 s, 58℃退火30 s, 72℃延伸1 min, 33个循环; 72℃延伸10 min。产物经2%(m/m)琼脂糖凝胶电泳后, 采用凝

胶成像系统分析。

2.2.4 多重 PCR 反应条件建立及优化

参考冯可等^[20]的实验方法,初步建立多重 PCR 反应体系: $10\times$ Ex Taq Buffer(20 mmol/L Mg^{2+} plus)4 μ L, dNTP Mixture 2 μ L, Taq 酶 (5 U/ μ L) 0.25 μ L, INV 上下游引物各 0.5 μ L, STM、HAT 和 SDF 上下游引物各 1 μ L(终浓度 0.4 μ mol/L), 鼠伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌及肠炎沙门氏菌的 DNA 各 1 μ L 为模板, ddH₂O 为对照, 加 ddH₂O 补足至 25 μ L。反应程序为: 94 °C 预变性 10 min; 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 33 个循环; 72 °C 延伸 10 min。产物经 2%(m/m)琼脂糖凝胶电泳后, 采用凝胶成像系统分析。

(1) 退火温度优化

对多重 PCR 反应退火温度进行优化, 分别取 54.0、54.7、55.9、57.8、60.1、62.0、63.2 和 64.0 °C 共 8 个水平进行。产物经 2%(m/m)琼脂糖凝胶电泳后, 采用凝胶成像系统分析, 确定最优退火温度。

(2) 引物终浓度优化

在优化退火温度后, 为确定多重 PCR 体系中最佳引物浓度, 将 SDF、STM 和 HAT 3 对引物添加量作为 3 个因素, 每个因素设置 3 个水平(以终浓度计): 0.3、0.4、0.5 μ mol/L, 以此 3 种浓度进行正交设计 $L_9(3^3)$, 如表 3 所示, 优化确定最佳引物浓度。

2.2.5 多重 PCR 特异性验证

为验证多重 PCR 的特异性, 将表 1 所列食品中常见的非目标沙门氏菌及非沙门氏菌属致病菌作为样品, 按照 2.2.4 优化后的多重 PCR 进行反应, 验证方法特异性。

2.2.6 多重 PCR 检测限检测

灭菌 ddH₂O 依次梯度稀释 3 种沙门氏菌的基因组 DNA 终浓度为: 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} ng/ μ L, 取相同稀释度的 3 种沙门氏菌 DNA 各 1 μ L 混合作为模板, 按照 2.2.4 优化后的多重 PCR 进行反应, 确定可同时检测出 3 种血清型沙门氏菌的检测限。

2.2.7 人工污染样品检测

冷鲜鸡肉切块后生理盐水冲洗, 超净台晾干, 紫外照射 15~20 min, 经 GB4789.4-2016^[21]方法检测, 无沙门氏菌检出。肠炎沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌纯菌液等体积混合后梯度稀释为 $10^1\sim 10^8$ CFU/mL, 适量鸡腿肉无菌操作绞碎, 分为 4 组, 每组 8 份, 每份 10 g 于装有 90 mL 无菌生理盐水的无菌三角瓶中, 每组鸡肉样品依次接入 $10^1\sim 10^8$ CFU/mL 的混菌液 3 mL, 混匀, 室温静置 20 min。对第 1 组每个稀释度中肠炎沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌分别进行平板计数, 第 2、3 组为平行试验。第 4 组鸡肉样品进行增菌, 分别在 37 °C 条件下培养, 在培养

第 6、12 h 取样, 提取沙门氏菌基因组 DNA, 按照 2.2.4 优化后的多重 PCR 反应条件进行检测。

3 结果与分析

3.1 引物特异性验证

以表 1 中 5 种沙门氏菌 DNA 为模板, 以 INV 为沙门氏菌属通用引物, 分别验证引物 STM、HAT、SDF 特异性, 扩增产物经 2%(m/m)琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 1 所示。

如图 1 所示, 各泳道条带明亮均匀, 未出现非特异性扩增, 条带测序数据显示 1~5 泳道目的片段长度分别为 915/201 bp、551/201 bp、295/201 bp、201 bp 和 201 bp, 各序列与 NCBI 数据库 Blast 比对相似性均在 99% 以上。结果表明 3 对引物均能扩增出目的条带, 且特异性良好, 无交叉影响, 具备构建多重 PCR 基础。

3.2 多重 PCR 反应条件优化

3.2.1 退火温度优化

初步建立的多重 PCR 反应在 54.0、54.7、55.9、57.8、60.1、62.0、63.2 和 64.0 °C 共 8 个退火温度条件下进行扩增, 产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 2 所示, 除第 8 泳道外, 其余泳道均能扩增出 4 条目标条带, 其中第 5 泳道(60.1 °C)目标条带相对清晰明亮, 因此选取 60 °C 作为多重 PCR 反应的最佳退火温度。

3.2.2 引物最佳浓度优化

SDF、STM 和 HAT 3 对引物按照表 3 正交试验设计搭配进行了 9 组多重 PCR 扩增, 结果如图 3 所示, 9 条泳道均能扩增出 4 条目标条带, 无非特异性条带出现, 表明 3 对引物特异性较强, 且无交叉影响。其中第 9 泳道条带相对清晰明亮, 因此最终确定肠炎沙门氏菌(SDF)、鼠伤寒沙门氏菌(STM)、乙型副伤寒(HAT)沙门氏菌引物最佳终浓度分别为 0.5、0.5、0.4 μ mol/L。

3.3 多重 PCR 特异性

以表 1 中 3 株非目标血清型沙门氏菌及 8 株非沙门氏菌属致病菌为阴性对照, 按照优化后的多重 PCR 进行扩增, 验证多重 PCR 的特异性, 结果如图 4 所示。

1~4 泳道为目标沙门氏菌, 5、6、7 泳道为非目标血清型沙门氏菌菌株, 虽不是目标菌株, 但基因组中均含有 *invA* 基因, 因此扩增出 201 bp 条带, 与预期相符; 而 8~15 泳道非沙门氏菌属致病菌既不含有目标基因序列, 也不含有 *invA* 基因序列, 因此无条带出现。结果表明本研究构建的多重 PCR 方法特异性良好, 无非特异性扩增出现, 适用于鼠伤寒沙门氏菌、肠炎沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌的多重 PCR 检测。

表 1 实验菌株及引物特异性验证
Table 1 Specificity of primers for different bacterial strains

菌株	菌株编号	来源	靶基因			
			<i>sdjI</i>	<i>Stm-4995</i>	<i>Hat</i>	<i>invA</i>
肠炎沙门氏菌(<i>S. enteritidis</i>)	CMCC(B)50335	中国医学细菌菌种保藏管理中心	+	-	-	+
鼠伤寒沙门氏菌(<i>S. typhimurium</i>)	CMCC(B)50115	中国医学细菌菌种保藏管理中心	-	+	-	+
乙型副伤寒沙门氏菌(<i>S. paratyphi B</i>)	CMCC(B)50094	中国医学细菌菌种保藏管理中心	-	-	+	+
甲型副伤寒沙门氏菌(<i>S. paratyphi A</i>)	CMCC(B)50093	中国医学细菌菌种保藏管理中心	-	-	-	+
猪霍乱沙门氏菌(<i>S. choleraesuis</i>)	ATCC10708	美国典型菌株保藏中心	-	-	-	+
鸭沙门氏菌(<i>S. anatum</i>)	ATCC9270	美国典型菌株保藏中心	-	-	-	+
大肠杆菌 O157:H7(<i>E. coli O157:H7</i>)	NCTC12900	英国国家典型菌株保藏中心	-	-	-	-
金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>)	ATCC25923	美国典型菌株保藏中心	-	-	-	-
单增李斯特菌(<i>Listeria monocytogenes</i>)	ATCC19115	美国典型菌株保藏中心	-	-	-	-
蜡样芽孢杆菌(<i>Bacillus cereus</i>)	ATCC14579	美国典型菌株保藏中心	-	-	-	-
福氏志贺氏菌(<i>Shigella Flexner</i>)	ATCC29903	美国典型菌株保藏中心	-	-	-	-
宋内氏志贺氏菌(<i>Shigella sonnei</i>)	ATCC25931	美国典型菌株保藏中心	-	-	-	-
副溶血性弧菌(<i>Vibrio parahaemolyticus</i>)	ATCC17802	美国典型菌株保藏中心	-	-	-	-
小肠结肠炎耶尔森菌(<i>Yersinia enterocolitica</i>)	CMCC(B)52204	中国医学细菌菌种保藏管理中心	-	-	-	-

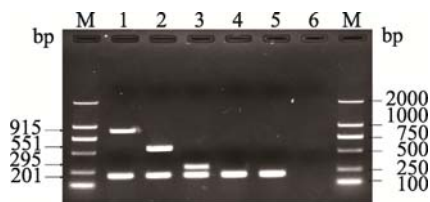
注: (1) 菌株均以 30%(V/V)甘油管形式-80 °C保藏; (2) “+”表明验证结果为阳性;“-”表明验证结果为阴性。

表 2 多重 PCR 引物序列及参数
Table 2 Sequences and parameters of the primers for mPCR

目标菌	靶基因	引物名称	引物序列(5'-3')	产物大小
肠炎沙门氏菌	<i>sd1</i>	SDF	F: TGT TTT ATCTG ATGCA AAGAGGG R: CGTTCGTTCTTCTGGTACTTACG	295 bp
鼠伤寒沙门氏菌	<i>stm-4495</i>	STM	F: GGTGGCAAGGGAATGAA R: CGCAGCGTAAAGCAACT	915 bp
乙型副伤寒沙门氏菌	<i>Hat</i>	HAT	F: ACTCAGGCTTCCCGTAACGC R: GCTTCATACAGACCATCTTTAGTTG	551 bp
沙门氏菌通用引物	<i>invA</i>	INV	F: TAAAACCAGCAAAGGCGAGC R: CGCACGCCATAATCAATAAAG	201 bp

表 3 三因素三水平 $L_9(3^3)$ 正交试验设计
Table 3 Three levels of three factors used in orthogonal array design

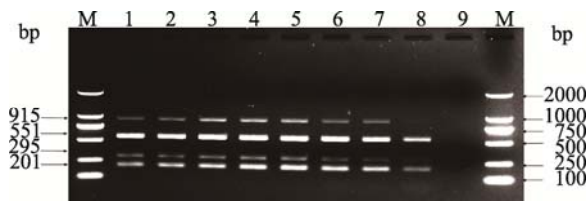
管号	引物终浓度/($\mu\text{mol/L}$)		
	SDF	STM	HAT
1	0.3	0.3	0.3
2	0.3	0.4	0.4
3	0.3	0.5	0.5
4	0.4	0.3	0.4
5	0.4	0.4	0.5
6	0.4	0.5	0.3
7	0.5	0.3	0.5
8	0.5	0.4	0.3
9	0.5	0.5	0.4



注: M: 2000 bp DNA Marker; 1: 鼠伤寒沙门氏菌, 引物: INV/STM; 2: 乙型副伤寒沙门氏菌, 引物: INV/HAT; 3: 肠炎沙门氏菌, 引物: INV/SDF; 4: 甲型副伤寒沙门氏菌, 引物: INV; 5: 猪霍乱沙门氏菌, 引物: INV; 6: ddH₂O, 引物: INV。

图 1 引物特异性验证

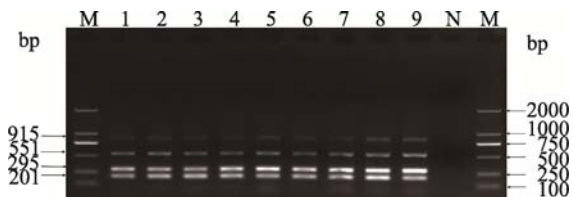
Fig.1 Specificity of primers for PCR



注: M: 2 000bp DNA Marker; 1~8 退火温度为 54.0、54.7、55.9、57.8、60.1、62.0、63.2 和 64.0 °C; 9: ddH₂O。

图 2 退火温度的优化

Fig.2 Optimization of annealing temperature



注: M: 2 000bp DNA Marker; 1~9: SDF/STM/HAT 引物终浓度 ($\mu\text{mol/L}$) 为 0.3/0.3/0.3、0.3/0.4/0.4、0.3/0.5/0.5、0.4/0.3/0.4、0.4/0.4/0.5、0.4/0.5/0.3、0.5/0.3/0.5、0.5/0.4/0.3、0.5/0.5/0.4; N: ddH₂O。

图 3 多重 PCR 引物浓度优化

Fig.3 Optimization of primer concentrations



注: M: DNA Marker DL 2000; 1: 鼠伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、肠炎沙门氏菌; 2: 鼠伤寒沙门氏菌; 3: 乙型副伤寒沙门氏菌; 4: 肠炎沙门氏菌; 5: 甲型副伤寒沙门氏菌; 6: 猪霍乱沙门氏菌; 7: 鸭沙门氏菌; 8: 大肠杆菌 O157:H7; 9: 金黄色葡萄球菌; 10: 单增李斯特菌; 11: 蜡样芽孢杆菌; 12: 福氏志贺氏菌; 13: 宋内氏志贺氏菌; 14: 副溶血性弧菌; 15: 小肠结肠炎耶尔森菌; 16: ddH₂O。

图 4 多重 PCR 特异性验证

Fig.4 Specificity of mPCR

3.4 多重 PCR 检测限检测

3 种血清型沙门氏菌基因组 DNA 经 10 倍梯度稀释后, 以优化后的多重 PCR 反应体系进行检测限检测, 结果如图 5 所示。1~5 泳道可见各目标菌特异性条带出现, 从第 6 泳道开始部分目标条带肉眼已很难辨识, 第 7 泳道仅见模糊的 551 bp 条带, 第 8 泳道无特异性条带出现。因此能同时检测到 3 种目标菌的最低模板质量浓度为 10^{-3} ng/ μL (即 1 pg/ μL)。



注: M: DNA Marker DL 2000; 1: 10^1 ng/L; 2: 10^0 ng/L; 3: 10^{-1} ng/ μL ; 4: 10^{-2} ng/ μL ; 5: 10^{-3} ng/ μL ; 6: 10^{-4} ng/ μL ; 7: 10^{-5} ng/ μL ; 8: 10^{-6} ng/ μL ; 9: ddH₂O。

图 5 多重 PCR 检测限检测

Fig.5 Sensitivity of mPCR

3.5 人工污染冷鲜鸡肉检测限

3 种血清型沙门氏菌混合菌液($10^1 \sim 10^8$ CFU/mL)污染冷鲜鸡肉后分别进行平板计数, 确定鸡肉中每种沙门氏菌初始污染水平, 而后经 6 h、12 h 增菌处理, 提取鸡肉中沙门氏菌 DNA, 以优化后的多重 PCR 反应体系进行扩增, 确定该多重 PCR 方法在实际样品中的检测限, 结果如表 4 所示。

表 4 沙门氏菌人工污染鲜鸡肉的多重 PCR 检测限结果
Table 4 Sensitivity of mPCR in artificially contaminated chilled chicken

编号	平板计数/(CFU/g)										
	肠炎沙门氏菌		鼠伤寒沙门氏菌		乙型副伤寒沙门氏菌		肠炎沙门氏菌		多重 PCR		
	6 h	12 h	6 h	12 h	6 h	12 h	6 h	12 h	6 h	12 h	
1	$(2.1 \pm 0.8) \times 10^7$	$(5.6 \pm 1.3) \times 10^7$	$(3.4 \pm 0.3) \times 10^7$	+	+	+	+	+	+	+	+
2	$(1.1 \pm 0.3) \times 10^6$	$(2.5 \pm 0.4) \times 10^6$	$(6.5 \pm 1.9) \times 10^6$	+	+	+	+	+	+	+	+
3	$(4.5 \pm 1.3) \times 10^5$	$(7.8 \pm 1.5) \times 10^5$	$(4.4 \pm 2.2) \times 10^5$	+	+	+	+	+	+	+	+
4	$(4.6 \pm 0.7) \times 10^4$	$(3.5 \pm 1.1) \times 10^4$	$(2.9 \pm 0.7) \times 10^4$	+	+	+	+	+	+	+	+
5	$(1.5 \pm 0.8) \times 10^3$	$(3.7 \pm 0.7) \times 10^3$	$(6.4 \pm 0.2) \times 10^3$	+	+	+	+	+	+	+	+
6	$(4.7 \pm 1.7) \times 10^2$	$(2.9 \pm 0.4) \times 10^2$	$(3.1 \pm 1.1) \times 10^2$	+	+	+	+	+	+	+	+
7	$(5.6 \pm 2.2) \times 10^1$	$(5.1 \pm 1.7) \times 10^1$	$(6.1 \pm 0.5) \times 10^1$	+	+	+	+	+	+	+	+
8	4.0±1.0	8.0±0.9	8.0±0.6	-	-	-	-	-	-	-	-

注：“+”为检出沙门氏菌，“-”为未检出沙门氏菌；6 h：增菌 6 h；12 h：增菌 12 h。

结果表明,人工污染冷鲜鸡肉经过6 h 增菌后,多重PCR方法能同时检测出鸡肉中3种血清型沙门氏菌的检测限为:肠炎沙门氏菌 $(5.6\pm 2.2)\times 10^1$ CFU/g、鼠伤寒沙门氏菌 $(5.1\pm 1.7)\times 10^1$ CFU/g、乙型副伤寒沙门氏菌 $(6.1\pm 0.5)\times 10^1$ CFU/g;而经过12 h 增菌,检测限可达肠炎沙门氏菌 (4.0 ± 1.0) CFU/g、鼠伤寒沙门氏菌 (8.0 ± 0.9) CFU/g、乙型副伤寒沙门氏菌 (8.0 ± 0.6) CFU/g。

4 结论与讨论

传统沙门氏菌检测一般分为属的鉴定和血清分型两个环节,其中血清分型主要是通过玻片凝集试验完成,该技术存在操作繁杂,耗时长,分辨率低等问题^[22]。本研究筛选肠炎沙门氏菌 *sdhA* 基因、鼠伤寒沙门氏菌 *stm-4495* 基因、乙型副伤寒沙门氏菌 *Hat* 基因作为靶标片段设计出引物 SDF、STM 和 HAT,建立了3种血清型沙门氏菌的多重PCR检测方法,有效将食品中沙门氏菌属的鉴定和血清分型统一在一个PCR检测体系中,提高了检测效率。

王瑾等^[23]利用实时荧光环介导等温扩增技术检测鸡肉中沙门氏菌,检测灵敏度达450 CFU/g,但是无法判断沙门氏菌血清型。本研究中人工污染鸡肉经过12 h 增菌,能同时检测出3种血清型沙门氏菌的检测限为:肠炎沙门氏菌 (4.0 ± 1.0) CFU/g、鼠伤寒沙门氏菌 (8.0 ± 0.9) CFU/g、乙型副伤寒沙门氏菌 (8.0 ± 0.6) CFU/g,不仅提高了检测灵敏度,而且可实现常见3种沙门氏菌的血清分型。

本研究建立了食品中3种常见血清型沙门氏菌的多重PCR检测方法,对食品中沙门氏菌的检测和溯源具有重要的现实意义,但也存在一定的局限,如:无法区别样品中的死菌与活菌,因此下一步将在此方向做深入研究,将磁珠免疫吸附或能区分细胞状态的染料等技术与多重PCR联用,以获得更加实用、更加有针对性的多重PCR技术。

参考文献

- [1] Iveson JB, Bradshaw SD, How RA, et al. Human migration is important in the international spread of exotic *Salmonella* serovars in animal and human populations [J]. *Epidemiol Infect*, 2014, 142(11): 2281–2296.
- [2] Rahman HS, Othman HH. *Salmonella* infection: the common cause of human food poisoning [J]. *Prog Biosci Bioeng*, 2017, (1): 29269.
- [3] Qi XL, Wang HX, Bu SR, et al. Incidence rates and clinical symptoms of *Salmonella*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Shigella* infections in China, 1998–2013 [J]. *J Infect Dev Countr*, 2016, 10(2): 127–133.
- [4] Ford L, Glass K, Veitch M, et al. Increasing incidence of *Salmonella* in Australia, 2000–2013 [J]. *PLoS One*, 2016, 11(10): e0163989.
- [5] Chen YX, Glass K, Liu B, et al. *Salmonella* infection in middle-aged and older adults: Incidence and risk factors from the 45 and up study [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2016, 13(12): 689–694.
- [6] Xiong D, Song L, Geng S, et al. One-step PCR detection of *Salmonella pullorum/Gallinarum* using a novel target: the flagellar biosynthesis gene *flhB* [J]. *Front Microbiol*, 2016, (7): 1863.
- [7] Lee KM, Runyon M, Herrman TJ, et al. Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety [J]. *Food Control*, 2015, (47): 264–276.
- [8] Crump JA, Sjölund-Karlsson M, Gordon MA, et al. Epidemiology, clinical presentation, laboratory diagnosis, antimicrobial resistance, and antimicrobial management of invasive *Salmonella* infections [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2015, 28(4): 901–937.
- [9] Di Cesare A, Losasso C, Barco L, et al. Diverse distribution of toxin-antitoxin ii systems in *Salmonella enterica* serovars [J]. *Sci Rep*, 2016, (6): 28759.
- [10] 陈玲, 张菊梅, 杨小鹏, 等. 南方食品中沙门氏菌污染调查及分型[J]. *微生物学报*, 2013, 53(12): 1326–1333.
Chen L, Zhang JM, Yang XJ, et al. Prevalence and characterization of *Salmonella* spp. from foods in south China [J]. *Acta Microbiol Sin*, 2013, 53(12): 1326–1333.
- [11] Lai J, Wu C, Wu C, et al. Serotype distribution and antibiotic resistance of *Salmonella* in food-producing animals in Shandong Province of China, 2009 and 2012 [J]. *Inter J Food Microbiol*, 2014, (180): 30–38.
- [12] Yang B, Xi M, Wang X, et al. Prevalence of *Salmonella* on raw poultry at retail markets in China [J]. *J Food Prot*, 2011, 74(10): 1724–1728.
- [13] 熊苏玥, 米瑞芳, 陈曦, 等. 多重PCR同时检测食品中4种细菌与常见霉菌[J]. *食品科学*, 2019, 40(4): 305–311.
Xiong SY, Mi RF, Chen X, et al. Multiplex PCR for simultaneous detection of four food-borne bacteria and common mold [J]. *Food Sci*, 2019, 40(4): 305–311.
- [14] 李亚茹, 周冬根, 夏杏洲, 等. 免疫磁珠分离-实时荧光PCR快速检测虾中沙门氏菌[J]. *现代食品科技*, 2017, 33(11): 235–242.
Li YR, Zhou DG, Xia XZ, et al. Rapid detection of *Salmonella* in shrimp using real-time PCR combined with immunomagnetic separation [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2017, 33(11): 235–242.
- [15] Ranieri ML, Shi C, Switt AIM, et al. Comparison of typing methods with a new procedure based on sequence characterization for *Salmonella* serovar prediction [J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(6): 1786–1797.
- [16] Ogunremi D, Nadin-Davis S, Dupras AA, et al. Evaluation of a multiplex PCR assay for the identification of *Salmonella* serovars *enteritidis* and *typhimurium* using retail and abattoir samples [J]. *J Food Prot*, 2017, 80(2): 295–301.

- [17] Settanni L, Corsetti A. The use of multiplex PCR to detect and differentiate food-and beverage-associated microorganisms: a review [J]. *J Microbiol Meth*, 2007, 69(1): 1–22.
- [18] 姜华, 焦阳, 李远宏, 等. 多重 PCR 检测婴幼儿配方奶粉中 3 种食源性致病菌[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(14): 213–218.
Jiang H, Jiao Y, Li YH, *et al.* Multiplex PCR for the detection of three foodborne pathogens in powdered infant formula [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2018, 39(14): 213–218.
- [19] 王娟芳, 戴建君, 姜敏, 等. 禽致病性大肠杆菌 O1, O2, O78 血清型三重 PCR 检测方法的建立 [J/OL]. *南京农业大学学报*, <http://kns.cnki.net/kcms/detail/32.1148.2.20190520.0928.002.html>.
Wang JF, Dai JJ, Jiang M, *et al.* Triplex PCR to identify avian pathogenic *Escherichia coli* O1, O2 and O78 serotypes [J/OL]. *J Nanjing Agric Univ*, <http://kns.cnki.net/kcms/detail/32.1148.2.20190520.0928.002.html>.
- [20] 冯可, 胡文忠, 姜爱丽, 等. 多重 PCR 法检测鲜切哈密瓜中 3 种食源性致病菌[J]. *食品科学*, 2017, 38(6): 295–302.
Feng K, Hu WZ, Jiang AL, *et al.* Establishment of multiplex PCR detection method for three foodborne pathogens on fresh-cut cantaloupe [J]. *Food Sci*, 2017, 38(6): 295–302.
- [21] GB 4789.4-2016 食品安全国家标准 食品微生物检验 沙门氏菌检验 [S].
GB 4789.4-2016 National food safety standard-Food microbiological examination- *Salmonella* spp [S].
- [22] 张文成, 朱丽臻, 李富强, 等. 沙门氏菌血清型研究进展[J]. *齐鲁工业大学学报*, 2019(05): 33(5): 10–14.
Zhang WC, Zhu LZ, Li FQ, *et al.* Progress in serotype of *Salmonella* [J]. *J Qilu Univ Technol*, 2019, 33(5): 10–14.
- [23] 王瑾, 林丽萍, 郜彦彦, 等. 实时荧光环介导等温扩增快速检测鸡肉中沙门氏菌[J]. *食品科学*, 2016, 37(24): 170–174.
Wang J, Lin LP, Gao YY, *et al.* Development and application of a real-time loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Salmonella enterica* ser. enteritis retrieved from chicken [J]. *Food Sci*, 2016, 37(24): 170–174.

(责任编辑: 李磅礴)

作者简介



郑玉玺, 硕士, 实验师, 主要研究方向为食品生物技术。

E-mail: icefox1984@aliyun.com



董蕾, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为食品生物技术。

E-mail: 23024458@qq.com