

餐饮食品中 6 病原菌叠氮丙啶-定量聚合酶链反应检测方法开发与检验数据分析

柯振华*

(福建省产品质量检验研究院国家加工食品质量监督检验中心(福州), 福州 350000)

摘 要: **目的** 建立叠氮丙啶-定量聚合酶链反应法(propidium monoazide-quantitative polymerase chain reaction, PMA-qPCR)快速检测餐饮食品中 6 病原菌的方法。**方法** 开发 6 种病原菌前增菌通用型培养基, 采用热裂解方法提取样品 DNA, 采用 PMA 技术鉴别活菌与死菌, 运用分子生物学技术检测样品中目标菌的特异性基因片段, 建立病原菌的 PMA-qPCR 检测方法, 开展餐饮食品样品病原菌筛查检测。**结果** 本方法特异性良好, 灵敏度较高, 1533 份餐饮食品样品中检出病原菌 71 株, 检出率为 4.63% (71/1533)。**结论** 本研究运用 PMA-qPCR 开展病原菌活菌检测技术研究, 所建立研究方法可广泛应用于餐饮食品及相关食品中病原菌的快速筛查检测, 具有较好的应用前景和现实意义。

关键词: 叠氮丙啶-定量聚合酶链反应; 餐饮食品; 沙门氏菌; 金黄色葡萄球菌; 副溶血性弧菌; 单核细胞增生李斯特氏菌; 蜡样芽胞杆菌; 大肠埃希氏菌 O157:H7

Development and data analysis of propidium monoazide-quantitative polymerase chain reaction for detection of 6 pathogenic bacteria in catering food

KE Zhen-Hua*

(National Centre for Quality Supervision and Testing of Processed Food (Fuzhou), Fujian Inspection and Research Institute for Product Quality, Fuzhou 350000, China)

ABSTRACT: Objective To establish the method for rapid detection of 6 pathogenic bacteria in catering products by propidium monoazide-quantitative polymerase chain reaction (PMA-qPCR). **Methods** Six kinds of common culture media for preproliferation of pathogenic bacteria were developed, sample DNA was extracted by thermal lysis method, and PMA technology was used to identify living and dead bacteria. Molecular biology technology was used to detect specific gene fragments of target bacteria in the samples. A PMA-qPCR method for detection of pathogenic bacteria was established to carry out pathogen screening and detection of catering food samples. **Results** This method had good specificity and high sensitivity, and 71 strains of pathogenic bacteria were detected in 1533 catering food samples, with a detection rate of 4.63% (71/1533). **Conclusion** The established method can be widely used in the rapid screening and detection of pathogenic bacteria in catering food and related food and has a good application

基金项目: 福建省科技计划项目(2018Y0019)

Fund: Supported by Science and Technology Project of Fujian Province (2018Y0019)

*通讯作者: 柯振华, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品分子生物学检验检测。E-mail: 153372390@qq.com

*Corresponding author: KE Zhen-Hua, Master, Engineer, Fujian Inspection and Research Institute for Product Quality, Fuzhou 350000, China. E-mail: 153372390@qq.com

prospect.

KEY WORDS: propidium monoazide-quantitative polymerase chain reaction; catering food; *Salmonella*; *Staphylococcus aureus*; *Vibrio parahaemolyticus*; *Listeria monocytogenes*; *Bacillus cereus*; *Escherichia coli* O157:H7

1 引言

餐饮食品指通过即时制作加工、商业销售和服务性劳动,向消费者提供的食品。餐饮食品的加工制作过程多以手工作业为主,自动化程度低,且生产管理的标准化、规范化程度不高,存在较高的食品安全风险。相关数据显示^[1-5],在餐饮服务环节发生的食源性疾病占食源性疾病总数的 60%以上,餐饮服务环节已成为食品安全控制的重点环节。

食源性病原菌是引起食源性疾病的主要因素之一,在食品安全领域中备受关注。WHO 报告表明,全球每年发生 35~60 亿例食源性疾病,其中约 70% 是因病原菌污染食品所致^[6,7]。发展中国家每年约有 180 万人口死于食源性疾病,即使是在发达国家,每年亦有 10% 以上的人群感染食源性疾病,我国多地的食源性致病菌监测结果表明餐饮食品环节的病原菌污染情况较为严重^[8-13]。目前世界公认的能引起食源性疾病的重要病原菌,如沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌等广泛存在于奶制品、蔬菜、水产品、肉制品等多种食物中,是引起食品污染,导致食源性感染事件的重要因素。

食源性病原菌检测技术是食源性疾病预防与控制的关键技术环节,目前,我国虽然已经制定了相关食源性病原菌的标准检验方法,如国家标准 GB 4789.4-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》^[14]等,但标准方法主要依赖于传统的微生物学培养方法,存在检测流程耗时长、操作步骤多等问题,细菌分离、培养、鉴定通常需要 4~7 d 左右的时间,难以满足公共卫生事件应急处理与餐饮食品快速检测时限需求,急需开发更加灵敏高效高通量的检验方法。

在病原微生物检测与鉴定过程中,如何区分死菌与活菌是一项重要的挑战。对于病原微生物而言,具有新陈代谢活性和增殖能力的活菌才具有潜在的致病风险。区分活细菌与不可逆损伤死亡细菌的最重要标准为细胞膜的完整性。DNA 染料易透过死菌或膜损伤菌的细胞膜,活菌因具有完整细胞膜,可隔绝 DNA 染料,从而与死菌区分开来。叠氮丙啶(propidium monoazide, PMA)作为一种与核酸具有亲和性的光敏性染料,它可通过死亡细胞的细胞膜进入细胞内,在可见光作用下, PMA 与 DNA 发生共价交联反应,对胞内 DNA 进行不可逆修饰,使其不能进行扩增。而活细胞由于细胞膜具有选择透过性,可完全阻止 PMA 进

入胞内,因此活细胞的 DNA 扩增不受影响。通过对细胞膜完整性的辨识,并与荧光定量(fluorescence quantitative PCR)技术相结合, PMA-PCR 可以实现只针对活菌细胞进行特异性的筛选检测,消除了死菌细胞的干扰,避免出现假阳性结果^[15-19]。

荧光定量(fluorescence quantitative)PCR 是荧光定量聚合酶链式反应(fluorescence quantitative polymerase chain reaction)的简称,简称 qPCR。它是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号的积累实时监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。与常规 PCR 相比, qPCR 具有特异性更强、灵敏度更高、检测周期更短,能有效解决 PCR 污染问题且自动化程度高^[20-26]。

为了节约检测时间、提高检测效率,本文首先优化建立了病原菌的通用型培养基,研究建立了病原菌的 DNA 提取方法,再针对沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌、副溶血性弧菌、大肠埃希氏菌 O157:H7 与单核细胞增生李斯特氏菌等 6 种常见病原菌设计了特异性的引物与探针,利用 PMA-qPCR 进行特异性基因扩增。技术路线主要包括无菌采样、培养基预增菌、热裂解方法提取 DNA、PMA-PCR 检测等步骤。以期推广应用于多种食品特别是餐饮食品中病原菌的快速筛查检测。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

2.1.1 标准菌株

沙门氏菌(*Salmonella*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、大肠埃希氏菌 O157:H7 (*Escherichia coli* O157:H7)、单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)、阴性对照菌株大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) [中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC)或美国模式生物保藏中心(ATCC),由本实验室菌种室保藏]。

2.1.2 样品采集

餐饮食品等样品购自市场中各大超市、餐馆、集体食堂、快餐店与小吃店等。采用无菌抽样方式采集样品,每份样品独立包装并做好唯一性编号标记,每份样品至少采集 200 g (mL), 冷藏(4 °C)条件下 4 h 内送至实验室进行检验。

2.1.3 试剂

缓冲蛋白胨水(buffered peptone water, BPW)等培养基

(北京陆桥技术股份有限公司); PCR 预混液[生工生物工程(上海)股份有限公司]; DNA 提取试剂盒[德国凯杰公司(QIAGEN)]; DMSO(日本 Sigma 公司); PMA(溶解于 200 μ L 20%的 DMSO 溶液, 得到 5 μ g/ μ L 的储备液, 于-20 $^{\circ}$ C 避光保存。使用时, 将 PMA 储备液稀释 10 倍后为 PMA 工作液)(美国 Biotium 公司)。

DNA 提取液配方(1 L, pH 8.0): 1 mol/L Tris-HCl 25.0 mL; 5 mol/L NaCl 5.0 mL; 0.5 mol/L EDTA 25.0 mL; 20% SDS 25.0 mL, ddH₂O 定容到 1.0 L。

本研究所用引物探针均委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

2.2 仪器与设备

ABI 7500 实时荧光定量 PCR 检测系统(美国 Life Tech 公司); Mini spin 小型离心机(德国 Eppendorf 公司); IKA MS3 basic 涡旋混合器(上海琪特分析仪器有限公司); Steril GARD III Advance 生物安全柜(美国贝克公司); VITEK compact II 全自动微生物鉴定药敏系统(法国梅里埃公司); SILVER 拍击式均质器(西班牙 IUL 公司); HVE50 高压灭菌器(日本 Hirayama 公司); 64251 卤钨灯(德国 OSRAM 公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 通用型前增菌培养基的研制方法与结果

根据 6 种病原菌(沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽胞杆菌、副溶血性弧菌、大肠埃希氏菌 O157:H7 与单核细胞增生李斯特氏菌)的不同菌株特性以及不同的生长条件, 选择沙门氏菌、金黄色葡萄球菌的共增菌培养基为基础成分。基础培养基的配方为: 蛋白胨 10 g; 磷酸二氢钾 2.5 g; 牛肉膏 5 g; 葡萄糖 2 g。通过反复实验比较, 氯化钠的浓度对菌株生长的影响最大, 当氯化钠浓度为 1.0%、2.0%时, 5 株病原菌都能正常生长, 但当氯化钠浓度达到 3.0%时, 金黄色葡萄球菌与副溶血性弧菌生长良好, 但沙门氏菌等其他菌株生长受抑制, 所以将该通用型前增菌培养基的氯化钠浓度调整为 2.0%。低浓度氯化锂和丙酮酸钠对多株菌的生长影响不大, 甘氨酸对金黄色葡萄球菌的影响比较大, 亚碲酸钾在所有实验浓度中, 对沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的影响不明显, 对单核细胞增生李斯特氏菌的影响比较明显。

综合上述实验, 本实验建立的通用型前增菌培养基配方为(1 L): 蛋白胨: 10 g, 磷酸二氢钾: 2.5 g, 牛肉膏: 5 g, 葡萄糖: 2 g, 氯化钠: 2.0%, 氯化锂: 0.3%, 丙酮酸钠: 0.3%, 甘氨酸: 0.5%, 亚碲酸钾: 0.30 mg/L。

2.3.2 细菌培养、热灭活菌的制备以及 PMA 处理

用接种环沾取甘油管保存的菌液, 在营养琼脂平板表面上划线, 于 37 $^{\circ}$ C 下培养 24 h。挑取单菌落接种于通用型前增菌培养基, 37 $^{\circ}$ C 培养至对数生长期。取 500 μ L 菌液沸水浴 10 min 后, 37 $^{\circ}$ C 条件下温育 20 min 后, 用 35.0 μ g/mL

的 PMA 处理, 混合均匀后暗处孵育 15 min, 将离心管置于 500 W 卤钨灯下 20 cm 处曝光 15 min(管口朝上, 置于冰上), 每隔 5 min 混匀数次, 使样品溶液曝光均匀。

2.3.3 细菌 DNA 提取

在 DNA 制备方法的选择上, 本研究主要比较了热裂解方法与试剂盒方法在餐饮食品样品菌液 DNA 制备中的应用效果, 具体步骤如下:

(1) 热裂解方法提取 DNA

预增菌后, 用移液器移取 1.0 mL 预增菌培养液用于 DNA 制备提取。取增菌液 1.0 mL 加到 1.5 mL 无菌离心管中, 9000 r/min 离心 5 min。吸弃上清, 加入 300 μ L DNA 提取液, 振荡混匀后沸水浴 5 min。冷却至室温, 9000 r/min 离心 5 min, 小心移取上清至无菌离心管中, 即为本实验所用菌液 DNA 模板。

(2) 试剂盒方法提取 DNA

按照 QIAGEN 试剂盒说明书提取 DNA。

(3) DNA 保存

将提取好的菌液 DNA 做好标记后置于冰箱中保存, 利用 7500 实时荧光定量 PCR 系统进行检测。

2.3.4 引物与探针的设计与合成

根据目标病原菌基因组保守序列设计特异性的引物与探针, 引物与探针序列见表 1。

2.3.5 实时荧光 PCR 反应体系与反应参数

实时荧光 PCR 反应体系: 在 30 μ L PCR 体系中, PCR 预混液 15 μ L, 上游、下游引物各 1 μ L, 探针 0.5 μ L, 模板 DNA 溶液 2.5 μ L, 灭菌蒸馏水补足体积至 30 μ L。

实时荧光 PCR 反应参数: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环。

综合考虑 6 种病原菌的致病风险, 以金黄色葡萄球菌作为代表菌确定本研究方法的检测限、灵敏度与特异性。

2.3.6 不同比例活菌 PMA 处理结果比较

配制活菌比例分别为 100%、50%、25%、10%、0% 的金黄色葡萄球菌菌悬液, 分别取 500 μ L 于 1.5 mL 离心管中, 用 35.0 μ g/mL PMA 处理, 混合均匀后暗处孵育 15 min, 将离心管置于卤钨灯下 20 cm 处曝光 15 min, 按照热裂解方法提取基因组 DNA, 进行 qPCR 检测。

2.3.7 PMA-qPCR 检测目标病原菌的灵敏度

将 1.1×10^6 CFU/mL 的金黄色葡萄球菌依次稀释 10 倍, 制得浓度分别为 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 CFU/mL 梯度的菌液, 在优化条件下, 进行 PMA-qPCR 分析检测。

2.3.8 PMA-qPCR 方法的抗干扰性与特异性

取非金黄色葡萄球菌菌株 5 株(沙门氏菌、大肠埃希菌、副溶血性弧菌、单增李斯特氏菌、蜡样芽胞杆菌), 经培养后菌落浓度达到 10^6 CFU/mL, 将上述 5 株干扰菌和 10^6 CFU/mL 金黄色葡萄球菌混合, 在优化条件下, 进行 PMA-qPCR 检测, 分析评价方法的抗干扰性与特异性。

表 1 引物和探针序列
Table 1 Sequences of primers and probes

病原菌	目标基因	序列方向(5'-3')	荧光标记探针
金黄色葡萄球菌	<i>gltS</i>	TTCTTCACGACTAAATAAACGCTCA GGTACTACTAAAGATTATCAAGACGGCT Probe: CAGAACACAATGTTTCCGATGCAACGT	5'FAM 3'BHQ
沙门氏菌	<i>fimY</i>	GCGGCGTTGGAGAGTGATA AGCAATGGAAAAAGCAGGATG Probe: CATTTCTTAAACGGCGGTGTCTTCCCT	5'ROX 3'TAMRA
副溶血性弧菌	<i>toxS</i>	GCGACCTTTCTCTGAAATATTAATTGT CATTCGCGTGGCAAACATC Probe: CGCACAAGGCTCGACGGCTGA	5'HEX 3'BHQ
单核细胞增生李斯特氏菌	<i>Dans</i>	CTGAATCTCAAGCAAAACCTGGT CGCGACCGAAGCCAACTA Probe: ATACGATAACATCCACGGCTCTGGCTGG	5'FAM 3'TAMRA
大肠埃希氏菌 O157:H7	<i>Olt</i>	TCCTCAGCTATAGGGTGCTTTTG ATCGAAACAAGGCCAGTTTTTTAC Probe: TATTTTTCCGAGTACATTGGCATCGTGTGG	5'HEX 3'TAMRA
蜡样芽胞杆菌	<i>Cls</i>	CAGAACAACCAGAATTTATGAAAGAGT ATCATCTACAACCACTCGGTTT Probe: CAGCGCGTATCGGTTCGTTCACTCGG	5'ROX 3'BHQ

2.3.9 餐饮食品样品的 PMA-qPCR 检测分析

餐饮食品种类繁多，我们通过随机抽样的方式一共抽取了 10 种主要类型的餐饮食品，共 1533 份样品，主要包括快餐盒饭、奶茶、冰块、熟肉制品、生食水产品等类型。在优化条件下，经过 PMA 处理之后，进行 qPCR 检测。

3 结果与分析

3.1 最佳 PMA 浓度的优化与 PMA 处理死菌的效果

通过配制一系列不同浓度的 PMA 进行前处理，综合评价不同 PMA 浓度对于死菌与活菌检测的影响，对于死菌扩增而言，随着 PMA 浓度的增大，死菌 DNA qPCR 扩增的 Ct 值明显升高，当 PMA 浓度超过 35.0 μg/mL 时，反应体系的 Ct 值几乎不再发生变化。当 PMA 浓度为 40.0 μg/mL 时，相比空白对照(不加 PMA)而言，活菌 DNA qPCR 扩增的 Ct 值增加，可能原因是高浓度 PMA 影响了活菌 DNA 的 qPCR 扩增，综上，本研究选用 35.0 μg/mL PMA 作为最佳处理浓度。

通过配制一系列不同浓度梯度的菌液进行 PMA 处理，结果显示，10⁸ CFU/mL 热损伤细菌经过 PMA 处理之后，其 Ct 值显著高于未经 PMA 处理的对照组，说明 PMA 可渗透进入死菌细胞膜，从而和 DNA 共价交联，阻止了死菌 DNA 的 PCR 扩增。

活菌细胞中的 DNA 由于细胞膜的屏障作用不容易受到 PMA 的影响，在细胞裂解后也不会与失活的 PMA 反应。通过这种方法，最终使死菌细胞中的 DNA 在核酸扩增中被选择性剔除。

3.2 最佳曝光时间的优化

在 0~25 min 时间范围内，随着光照时间的增加，体系的 Ct 值迅速升高，光照时间超过 25.0 min 后，体系的 Ct 值不再发生明显变化，本研究选取 25.0 min 作为最佳曝光时间。

3.3 PMA-qPCR 检测不同比例金黄色葡萄球菌的线性曲线

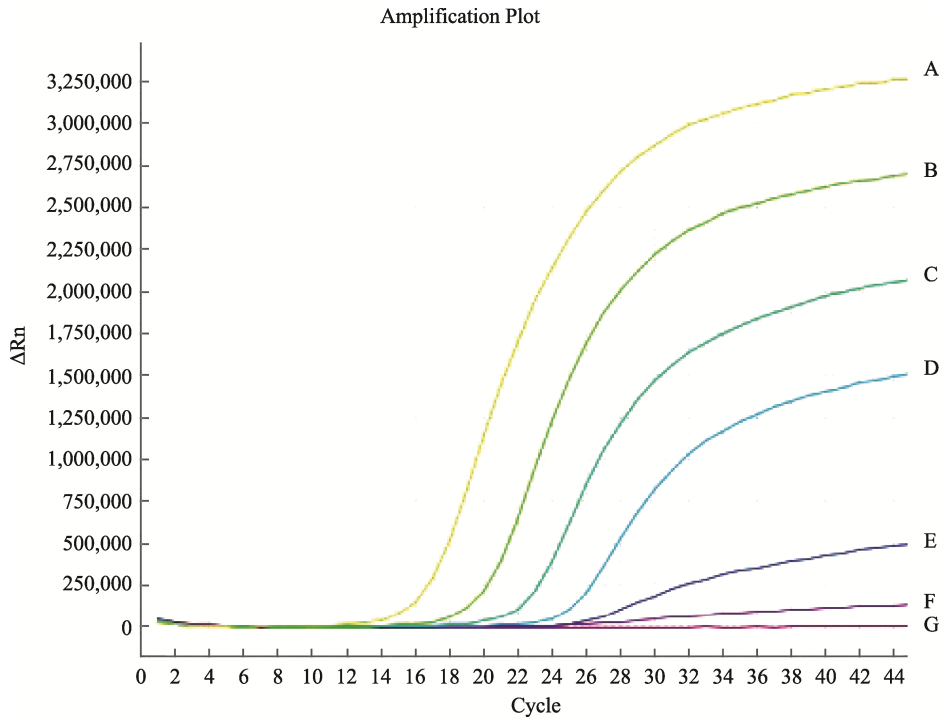
配制活菌比例分别为 100%、50%、25%、10%、0% 的金黄色葡萄球菌菌悬液，在 PMA 浓度为 35.0 μg/mL 的条件下，利用 qPCR 进行了金黄色葡萄球菌的检测。随着金黄色葡萄球菌含量的增加，Ct 值明显降低，金黄色葡萄球菌的浓度在 10²~10⁸ CFU/mL 范围内，Ct 值呈现良好的线性关系，其线性回归方程为:Y=-2.8354X+35.548, r²=0.9918, 方程中 Y 代表 DNA qPCR 扩增的 Ct 值, X 代表金黄色葡萄球菌浓度的对数值。

3.4 PMA-qPCR 检测沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽胞杆菌、副溶血性弧菌、大肠埃希氏菌 O157:H7、单核细胞增生李斯特氏菌的灵敏度

将菌液浓度分别为 3.3×10⁷ CFU/mL 的沙门氏菌、6.1×10⁷ CFU/mL 的金黄色葡萄球菌、2.5×10⁷ CFU/mL 的蜡样芽胞杆菌、4.7×10⁷ CFU/mL 的副溶血性弧菌、2.1×10⁷ CFU/mL 的大肠埃希氏菌 O157:H7、3.4×10⁷ CFU/mL 的单核细胞增生李斯特氏菌分别进行 10 倍系列稀释，进行 PMA-qPCR 检测，通过重复实验与平行实验确认，不同浓度沙门氏菌的 PMA-qPCR 检测限见图 1。沙门氏菌的检测

限为 10^2 CFU/mL ($S/N=3$)、金黄色葡萄球菌的检测限为 10^2 CFU/mL ($S/N=3$)、副溶血性弧菌的检测限为 10^3 CFU/mL ($S/N=3$)、蜡样芽胞杆菌的检测限为 10^3 CFU/mL ($S/N=3$)、

大肠埃希氏菌 O157:H7 的检测限为 10^2 CFU/mL ($S/N=3$)、单核细胞增生李斯特氏菌的检测限为 10^3 CFU/mL ($S/N=3$)。



注: A: 10^7 CFU/mL; B: 10^6 CFU/mL; C: 10^5 CFU/mL; D: 10^4 CFU/mL; E: 10^3 CFU/mL; F: 10^2 CFU/mL; G:10 CFU/mL

图 1 不同浓度沙门氏菌的 PMA-qPCR 检测限

Fig.1 Limits of detection of *Salmonella* with PMA-qPCR

3.5 PMA-qPCR 检测目标病原菌的方法特异性与抗干扰性

在 5 株 10^8 CFU/mL 非金黄色葡萄球菌(沙门氏菌、大肠埃希氏菌 O157:H7、副溶血性弧菌、蜡样芽胞杆菌、单增李斯特氏菌)存在的情况下,针对金黄色葡萄球菌的引物和探针只在金黄色葡萄球菌中出现扩增曲线,而其他非目标菌中均未见扩增曲线,且 PMA-qPCR 方法在干扰菌存在情况下,检测金黄色葡萄球菌得到的结果与单独检测金黄色葡萄球菌所得实际结果 Ct 值相近。

以类似的方法也对其他 5 种病原菌的方法特异性与抗干扰性进行了验证,也得到了类似的实验结果。这些结果充分说明,本研究方法所建立的 PMA-qPCR 应用于 6 种目标病原菌检测的特异性良好,抗干扰能力较强。

3.6 PMA-qPCR 检测人工污染样品中沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌、蜡样芽胞杆菌、大肠埃希氏菌 O157:H7、单核细胞增生李斯特氏菌

以奶粉、牛肉、米饭等食品作为基质评价本研究方法在食品等复杂基质中检测目标病原菌的能力。对不同人工污染菌量的奶粉、牛肉、米饭等样品先进行前增菌,前增

菌完成后进行 PMA-qPCR 检测,通过多次重复实验,沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌、蜡样芽胞杆菌、大肠埃希氏菌 O157:H7、单核细胞增生李斯特氏菌的人工污染菌的检测限均为 10^2 CFU/mL。

3.7 餐饮食品中沙门氏菌等 6 种病原菌的实时荧光 PCR 检测结果

为了调查市场餐饮食品中 6 种病原菌的实际污染状况,同时为了充分验证本研究方法的适用性,一共从市场中随机采集了 1533 批次餐饮食品样品开展 6 种病原菌检验工作,共检出病原菌 71 株,总体检出率为 4.63% (71/1533)。病原菌检出率由高到低排序分别是蜡样芽胞杆菌 1.63% (25/1533)、副溶血性弧菌 1.17% (18/1533)、金黄色葡萄球菌 0.65% (10/1533)、大肠埃希氏菌 O157:H7 0.52% (8/1533)、单核细胞增生李斯特氏菌 0.39% (6/1533) 和沙门氏菌 0.26% (4/1533)。通过检出率,可以看出餐饮食品污染较为严重的病原菌是蜡样芽胞杆菌与副溶血性弧菌,另外几种病原菌也都有检出。

3.8 方法间比对实验

在应用 PMA-qPCR 检测样品中的沙门氏菌等 6 种病

原菌时,本文应用国家标准 GB 4789.4-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验沙门氏菌检验》、GB 4789.14-2014《食品安全国家标准 食品微生物学检验蜡样芽胞杆菌检验》^[27]等标准作为参照方法同时开展检验工作,检验结果表明,PMA-qPCR 检验结果与国家标准方法检验结果相吻合。对于病原菌检验结果为阳性的样本,本研究进一步运用全自动微生物鉴定药敏系统进行鉴定,鉴定结果与 PMA-qPCR 检验结果相吻合。

综上,本研究通过将 PMA-qPCR 与国家标准方法以及微生物鉴定药敏系统方法进行比对,方法间比对结果充分说明本研究所建立 PMA-qPCR 方法的可靠性与有效性。

4 讨论与结论

食品安全一直是国家及人民关注的焦点,随着外卖的兴起以及人们对于食品口味风味的不同追求,餐饮食品受到越来越多人的青睐,餐饮食品需求量在近几年大幅增长。但是我们需要注意到,餐饮食品由于其加工储运条件的特殊性,在给人们带来便利的同时,若在加工、运输、储存等过程中未能有效防护,易受微生物污染,也给人们带来了较大的食品安全风险,导致食源性疾病。同时,考虑到餐饮食品保质期短、一般即食等特点,这些因素都对餐饮食品的质量安全以及病原菌的高通量快速筛查检测提出了很高的要求。

目前,国内对于餐饮食品中病原菌的调查与研究不多,本研究开发了基于分子生物学技术的 qPCR 技术用于开展餐饮食品等样品中病原菌的高通量快速筛查检验,并通过 PMA 技术鉴别活菌与死菌,在建立稳定高效的检测方法后,针对市场餐饮食品中 6 种病原菌进行了抽样调查检验,获得了较为详实的检验数据,掌握餐饮食品中 6 种常见病原菌的污染情况。

在检验时间与效率方面,我国现行国家标准如 GB 4789.4-2016 对于沙门氏菌的检验需要 4~7 d,难以满足餐饮食品对于检验时效性的要求。利用本研究所建立的 PMA-qPCR 技术可以在 18 h 内完成样品中 6 种病原菌的检测工作,大幅缩短了检验时间,显著提升了检验效率。在检验灵敏度方面,本研究方法可成功检测奶粉、牛肉等食品样品中人为污染的病原菌,检出限可低至 10^2 CFU/mL,与传统的国家标准方法相比,本研究方法具有耗时短、准确度高、灵敏度强等优点。

针对模板 DNA 的制备,本研究探索并分析比较了热裂解方法与试剂盒方法在细菌 DNA 提取中的应用差异。针对同一份增菌液,本研究同时采用热裂解方法与试剂盒方法进行 DNA 提取。PCR 结果表明,2 种方法所提取菌液 DNA 都能扩增出目标基因序列,2 种提取方法所提取的 DNA 扩增曲线的 Ct 值无显著性差异。然而试剂盒成本较

高,且提取步骤多、耗时长,针对大批量样品 DNA 的制备,试剂盒方法适用性不强。而采用热裂解方法提取菌液 DNA 时,只需加入 DNA 提取裂解液,通过高温加热等方式裂解病原菌,之后通过离心方式收集菌液 DNA,操作步骤简单,耗时较短,一次性可以完成大批量样品的处理。综合考虑时间与成本等因素,本研究抽样检验的餐饮食品样品主要采取热裂解方法提取 DNA。

本文以目标病原菌如沙门氏菌 *fimY* 基因等为靶基因序列,设计并合成特异性的引物与探针,PCR 特异性实验结果显示,所设计引物探针仅针对目标菌 DNA 有扩增曲线,针对其他菌株 DNA 均未见扩增曲线,说明本研究所设计引物与探针的特异性良好,抗干扰能力强。同时,本研究通过实验不断筛选和优化引物探针浓度、退火温度等条件,从而保证 PMA-qPCR 方法的稳定性和检测结果的可重复性。

在市场中随机抽样采集了 1533 份餐饮食品样品,病原菌的检出率分别为蜡样芽胞杆菌 1.63% (25/1533)、副溶血性弧菌 1.17% (18/1533)、金黄色葡萄球菌 0.65% (10/1533)、大肠埃希氏菌 O157:H7 0.52% (8/1533)、单核细胞增生李斯特氏菌 0.39% (6/1533)和沙门氏菌 0.26% (4/1533),说明餐饮食品中病原菌的污染情况较为严重,应引起足够重视。

本文将 DNA 热裂解提取法与 PMA-qPCR 检测技术相结合,应用于餐饮食品中沙门氏菌等 6 种病原菌的筛查检测中,建立了完整的由样品前处理、预增菌、DNA 提取到 PMA-qPCR 检测的方法,所建立方法简便快捷,在 18 h 内即可完成所有检测工作,检出限可低至 10^2 CFU/mL,特别适用于大批量样品中沙门氏菌等病原菌的快速筛查检测,具有较好的推广应用前景。同时,针对餐饮食品及相关食品如面食制品、乳制品、肉制品等病原菌筛查检测,本研究方法也具有较高的实用和推广价值。

参考文献

- [1] 徐潇,甘辛,崔生辉,等.我国餐饮服务食品中致病菌污染及检验现状分析[J].中国药事,2012,26(6): 545-547.
- [2] Xu X, Gan X, Cui SS, et al. Analysis of pathogenic bacteria contamination and inspection in food service in China [J]. Chin Pharm Aff, 2012, 26(6): 545-547.
- [3] 罗海波,何来英,叶伟杰,等.2004-2013 年中国大陆食物中毒情况分析[J].中国食品卫生杂志,2015,27(1): 45-49.
- [4] Luo HB, He LY, Ye WJ, et al. 2004-2013 Chinese mainland food poisoning analysis [J]. China J Food Hyg, 2015, 27(1): 45-49.
- [5] 苏春娟.2006-2011 年全国食物中毒流行病学分析及防控措施[J]现代预防医学,2014,41(18): 3313-3315.
- [6] Su CJ. 2006-2011 National epidemiological analysis and prevention measures for food poisoning [J]. Mod Prev Med, 2014, 41(18): 3313-3315.
- [7] Chai SJ, Cole D, Nisler A, et al. Poultry: The most common food in outbreaks with known pathogens, United States, 1998-2012 [J]. Epidemiol

- Infect, 2017, 145(2): 316–325.
- [5] 丘增萍, 谢强, 况伟, 等. 2013 年梅州市餐饮业自制食品微生物污染检测与分析[J]. 中国药事, 2015, 29(4): 353–356.
- Qiu ZP, Xie Q, Kuang W, et al. 2013 Meizhou city restaurant industry homemade food microbial pollution detection and analysis [J]. Chin Pharm Aff, 2015, 29(4): 353–356.
- [6] 王建平, 罗建忠. 2013–2015 年新疆兵团食品中食源性病原菌监测结果分析[J]. 现代预防医学, 2016, 43(12): 2167–2170.
- Wang JP, Luo JZ. Analysis of the results of the monitoring results of foodborne stenosis in food in Xinjiang Corps 2013–2015 [J]. Mod Prev Med, 2016, 43(12): 2167–2170.
- [7] 王君, 韩蓓, 陈小宁, 等. 铜川市 2011–2015 年市售食品食源性病原菌污染状况分析[J]. 中国热带医学, 2017, 17(10): 991–996.
- Wang J, Han Y, Chen XN, et al. Analysis of foodborne stenosis contamination of food-borne foods sold in the city of Copper river from 2011 to 2015 [J]. Chin Trop Med, 2017, 17(10): 991–996.
- [8] 符天晓, 陈婉娃, 梁书敏. 2014 年海南省市县餐饮食品微生物污染检测结果分析[J]. 首都食品与医药, 2016, 23(1): 18–19.
- Fu TX, Chen WW, Liang SM. Analysis of the results of the 2014 test results of food and beverage microbial contamination in Hainan province and county [J]. Capital Food Med, 2016, 23 (1): 18–19.
- [9] 胡惠秋, 满朝新, 董鑫悦, 等. PMA–LAMP 方法检测灭菌乳中金黄色葡萄球菌的研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(21): 300–308.
- Hu HY, Man CX, Dong XY, et al. The PMA–LAMP method detects the study of *Staphylococcus aureus* in sterilized milk [J]. Food Ind Technol, 2012, 33(21): 300–308.
- [10] 王静, 刘玉敏, 李春喜, 等. SD–PMA–ddPCR 检测食品中单核细胞增生李斯特氏菌[J]. 微生物学通报, 2016, 43(10): 2306–2313.
- Wang J, Liu YM, Li CX, et al. Detection of *Listeria monocytogenes* cells in food based on SD–PMA–ddPCR [J]. Microbiol Bull, 2016, 43(10): 2306–2313.
- [11] 王静, 张慧敏, 魏玮, 等. SD–PMA–ddPCR 检测食品中沙门氏菌的研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(10): 67–71.
- Wang J, Zhang HM, Wei Wei, et al. Study on SD–PMA–ddPCR detection of *Salmonella* in food [J]. Food Ind Technol, 2016, 37(10): 67–71.
- [12] 王静, 崔凤杰, 秦燕, 等. PMA 与 ddPCR 结合检测单核细胞增生李斯特氏菌[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(21): 114–118.
- Wang J, Cui FJ, Qin Y, et al. *Listeria monocytogenes* detected by PMA and ddPCR combination [J]. Food Res Dev, 2016, 37(21): 114–118.
- [13] 於颖. PMA–qPCR 定量检测畜禽肉类中食源性致病菌活菌的研究[D]. 上海: 东华大学, 2015.
- Yu Y. Study on PMA–qPCR and quantitative detection of live bacteria from foodborne pathogens in livestock and poultry meat [D]. Shanghai: Donghua University, 2015.
- [14] GB 4789.4—2016 食品安全国家标准食品微生物学检验沙门氏菌检验[S].
- GB 4789.4—2016 Food safety national standard-Food micro test *Salmonella* [S].
- Elizaquivel P, Sanchez G, Aznar R. Application of propidium monoazide quantitative PCR for selective detection of live *Escherichia coli* O157: H7 in vegetables after inactivation by essential oils [J]. Int J Food Microbiol, 2012, (159): 115–121.
- [15] 祝儒刚, 宋立峰. 肉及肉制品中沙门氏菌活细胞的 PCR 检测研究[J]. 食品科学, 2012, (16): 199–203.
- Zhu RG, Song LF. Study on PCR detection of *Salmonella* living cells in meat and meat products [J]. Food Sci, 2012, (16): 199–203.
- [16] Martin B, Raurich S, Garriga M, et al. Effect of amplicon length in propidium monoazide quantitative PCR for the enumeration of viable cells of *Salmonella* in cooked ham [J]. Food Anal Methods, 2012, 6(2): 683–690.
- [17] 罗剑飞, 林炜铁, 郭勇. PMA 与 PCR 结合的细菌活细胞检测方法[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2010, 38(9): 142–146.
- Luo JF, Lin WT, Guo Y. Methods for PMA and PCR detection of living cells of bacteria [J]. J South China Univ Technol (Nat Sci Ed), 2010, 38(9): 142–146.
- [18] Yang X, Badoni M, Gill CO. Use of propidium monoazide and quantitative PCR for differentiation of viable *Escherichia coli* from *E. coli* killed by mild or pasteurizing heat treatments [J]. Food Microbiol, 2011, 28(8): 1478–1482.
- [19] Sha Q, Vattam DA, Forstner MRJ, et al. Quantifying *Salmonella* population dynamics in water and biofilms [J]. Microbiol Ecology, 2013, (65): 60–67.
- [20] Pasquali F, Cesare AD, Valero A, et al. Improvement of sampling plans for *Salmonella* detection in pooled table eggs by use of real-time PCR [J]. Int J Food Microbiol, 2013, 184: 31–34.
- [21] Delibato E, Rodriguez-Lazaro D, Gianfranceschi M, et al. European validation of real-time PCR method for detection of *Salmonella* spp. in pork meat [J]. Int J Food Microbiol, 2014, 184: 134–138.
- [22] 郑小严, 柯振华, 李晨熙. 餐饮食品中金黄色葡萄球菌的实时荧光 PCR 检测方法[J]. 质量技术监督研究, 2018, 60(6): 2–5.
- Zheng XY, Ke ZH, Li CZ. Real-time fluorescence PCR detection of *Staphylococcus aureus* in food in food and beverage quality [J]. Technical Supervision Res, 2018, 60(6): 2–5.
- [23] Lovdal T, Hovda MB, Björklom B, et al. Propidium monoazide combined with real-time quantitative PCR underestimates heat-killed *Listeria innocua* [J]. J Microbiol Methods, 2011, 85(2): 164–169.
- [24] 柯振华. 餐饮食品中蜡样芽孢杆菌的实时荧光 PCR 检测方法研究[J]. 福建经协, 2020, (4): 19–23.
- Ke ZH. Study on real-time fluorescence PCR detection of *Bacillus cereus* in food [J]. Fujian Textile, 2020, (4): 19–23.
- [25] Liang N, Dong J, Luo L, et al. Detection of viable *Salmonella* in lettuce by propidium monoazide real-time PCR [J]. J Food Sci, 2011, 76(4): 234–237.
- [26] GB 4789.14-2014 食品安全国家标准 食品微生物学检验 蜡样芽孢杆菌检验[S].
- GB 4789.14-2014 National standard for food safety-Food microbiological examination-*Bacillus cereus* [S].

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



柯振华, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品分子生物学检验检测。
E-mail: 153372390@qq.com