

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20241017002

引用格式: 肖艳霞, 董志军, 杨林军, 等. 基质辅助激光解吸飞行时间质谱技术快速检测水产品中 5 种致病菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(1): 28–35.

XIAO YX, DONG ZJ, YANG LJ, *et al.* Rapid determination of 5 kinds of pathogenic bacteria in aquatic products by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(1): 28–35. (in Chinese with English abstract).

基质辅助激光解吸飞行时间质谱技术快速 检测水产品中 5 种致病菌

肖艳霞¹, 董志军², 杨林军², 朱家强², 潘娟³, 钱云开^{1*}

(1. 秦皇岛海关技术中心, 秦皇岛 066004; 2. 北京鑫汇普瑞科技发展有限公司, 北京 102200;

3. 天津国际旅行卫生保健中心, 天津 300456)

摘要: **目的** 建立水产品中 5 种常见致病菌的自动化快速高分辨检测手段, 提高水产品致病微生物检测的效率和准确性。**方法** 设计引物对霍乱弧菌、副溶血性弧菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特氏菌的特异基因 *owpW*、*tlh*、*invA*、*femA*、*prfA* 进行多重聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR) 扩增; 设计特异探针以 PCR 产物为模板进行单碱基延伸, 延伸产物在基质辅助激光解吸飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)上进行检测。基因 *owpW*、*tlh*、*invA*、*femA*、*prfA* 的探针分子量分别为 4848、5435、5890、6560、7096 Da, 单基因延伸后探针的分子量分别为 5119 Da(加 A)、5697 Da(加 T)、6137 Da(加 C)、6822 Da(加 T)、7383 Da(加 G)。最终确定的体系方法通过重现性试验、特异性试验、灵敏度试验、人工污染水产样本检测试验进行验证。**结果** 以混合 5 种菌 DNA 的样本为模板做核酸质谱检测, 对应的 5 个探针可以同时延伸, 延伸效率大于 80%, 在以干扰菌为模板的样本中不会检出上述 5 种菌, 检出沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特菌、副溶血性弧菌、霍乱弧菌的灵敏度分别可达到 150、350、160、130、180 CFU/mL。**结论** 此方法展现出良好的重现性、特异性和灵敏度, 可以满足一次反应同时检测水产品中上述 5 种微生物的需求。

关键词: 致病菌; 基质辅助激光解吸飞行时间质谱技术; 单碱基延伸

Rapid determination of 5 kinds of pathogenic bacteria in aquatic products by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry

XIAO Yan-Xia¹, DONG Zhi-Jun², YANG Lin-Jun², ZHU Jia-Qiang²,
PAN Juan³, QIAN Yun-Kai^{1*}

(1. Technology Center of Qinhuangdao Customs, Qinhuangdao 066004, China;

2. Beijing XinhuiPro Science and Technology Co., Ltd., Beijing 102200, China;

3. Tianjin International Travel Healthcare Center, Tianjin 300456, China)

收稿日期: 2024-10-17

基金项目: 河北省重点研发计划项目(213777109D); 海关总署科研项目(2024HK119, 2024HK264)

第一作者: 肖艳霞(1976—), 女, 工程师, 主要研究方向为食品生物安全检验。E-mail: xiaoyanxia1976@163.com

*通信作者: 钱云开(1982—), 男, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品生物安全检验。E-mail: qyk-1@163.com

ABSTRACT: Objective To establish an automatic, fast and high-resolution detection method for 5 kinds of common pathogenic bacteria in aquatic products, and improve the efficiency and accuracy of detecting pathogenic microorganisms in aquatic products. **Methods** Genes of *owpW*, *tlh*, *invA*, *femA*, and *prfA* from *Vibrio cholera*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria monocytogenes* were amplified by multiple polymerase chain reaction (PCR). PCR products were used as templates for single nucleotide extension and molecular weight of the extended probes was detected on the mass spectrometer. The molecular weight of probes for genes *owpW*, *tlh*, *invA*, *femA* and *prfA* were 4848, 5435, 5890, 6560 and 7096 Da. The molecular weights of the extended probes were 5119 Da (plus A), 5697 Da (plus T), 6137 Da (plus C), 6822 Da (plus T) and 7383 Da (plus G), respectively. This finally determined system was verified by reproducibility test, specificity test, sensitivity test and detection test of artificially contaminated aquatic samples. **Results** Using a sample of mixed DNA from 5 kinds of different bacteria as a template for nucleic acid mass spectrometry detection, the corresponding 5 kinds of probes could be extended simultaneously with an extension efficiency greater than 80%. The above 5 kinds of bacteria would not be detected in samples using interfering bacteria as templates. The sensitivity for detecting *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio cholerae* could reach 150, 350, 160, 130, and 180 CFU/mL, respectively. **Conclusion** This method demonstrates good reproducibility, specificity, and sensitivity, and has a high degree of automation, which can meet the detection needs of the above 5 kinds of microorganisms in aquatic products simultaneously.

KEY WORDS: pathogenic bacteria; matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; single nucleotide extension

0 引言

进入 21 世纪以来,我国人民的生活水平有了显著提高,民众的饮食更加丰富多样,其中水产品由于营养丰富、口味鲜美深受人们的喜爱,我国本土的水产销售份额以及进口份额同步快速增长^[1-2]。水产品在养殖、运输、销售各个环节都极易受到病原微生物的污染^[3],随之而来的食品安全问题也成了关注的焦点。市场随机检测结果显示市场水产品中病原微生物的检出率高,这给人民群众的身体健康和生命安全带来很大的隐患^[4-5]。副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholera*)、单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、沙门氏菌(*Salmonella*),这 5 种菌是水产品卫生安全监测中常见的污染致病菌检测项目^[6-7]。开发应用新型检测技术,丰富食品安全检测手段对食品安全管理具有重要意义。

随着科学技术的进步,近 20 年来致病菌检测有了飞速的发展,各种技术手段如表型鉴定、免疫学鉴定、分子鉴定、生物传感器鉴定等层出不穷^[8]。传统的病原菌检测依赖微生物的形态学和生长特性,须通过分离培养后经形态学、生化检测,虽然检测结果准确且灵敏度高,但过程复杂,时间长,对操作人员要求高^[8]。近年来基于微生物特异基因的分子生物学在食品微生物检测中的应用发展迅速,其中包括多重聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,

PCR)、实时定量 PCR^[9-10]、数字 PCR^[11]、基因芯片^[12]等。不同的方法拥有各自的优势,多重 PCR 时间快,实时定量 PCR 准确度高,数字 PCR 灵敏度高,基因芯片通量高,但也不可避免地存在自身无法避免的缺陷。多重 PCR 的准确度较低,特别是样本存在干扰物质影响时,其准确性更容易受影响;实时定量 PCR 和数字 PCR 通量有限,且检测成本高;基因芯片虽然通量高,但操作烦琐、成本高。

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)利用激光激发基质与分散在基质中的样品形成的共结晶,使得基质-样品之间发生电荷转移样品带电,带电样品在电场作用下进入真空飞行管中,通过计算飞行时间,测得样品分子量。MALDI-TOF MS 具有操作简单、快速、高灵敏度、高特异性的特点,可以同时对生物大分子蛋白质、核酸进行检测,性能优越^[13]。在蛋白质质谱方面,通过建立微生物的蛋白指纹图谱数据库, MALDI-TOF MS 已经被广泛应用于微生物检测^[14-16]。同时 MALDI-TOF MS 在肿瘤标志物检测中也有大量研究报道^[17-18]。在核酸质谱方面,利用 MALDI-TOF MS 检测探针单碱基延伸后的分子量已经被用于基因遗传突变检测^[19-20]、药物代谢基因 SNP 位点检测^[21-23]、病原菌耐药性检测^[24]、病原菌分型^[25-27]及多重病原体检测等领域^[28-30]。核酸质谱技术以其特有的高通量、快速的优势,已经广泛应用于临床,然而在食品检测领域的应用基本处于空白。本研究以水产品中常见 5 种致病微生物副溶血性弧菌、

霍乱弧菌、单核细胞增生李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌为研究对象,建立 PCR 联合 MALDI-TOF MS 检测技术,以期实现水产品中 5 种常见病原微生物的同时快速准确检测。

1 材料与方法

1.1 菌株与培养基

标准菌株大肠埃希氏杆菌(*Escherichia coli*, ATCC 8739)、副溶血性弧菌(CICC 21617)、肠沙门氏菌肠炎血清型(*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis, CICC 21523)、单核细胞增生李斯特氏菌(CICC 21633)、金黄色葡萄球菌(CICC 10384)、霍乱弧菌(CICC 23794)、肠道致病性大肠埃希氏菌(*Escherichia coli* EPEC, CICC 24189)、阿氏肠杆菌(*Enterobacter asburiae*, CICC 10013)、费氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*, CICC 10404)、奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*, CICC 21516)、宋内氏志贺氏菌(*Shigella sonnei*, CICC 21535)、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*, CICC 22914)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, CICC 10868)、小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*, CICC 21669)各 1 株,通过中国工业微生物菌种保藏管理中心购买。

增菌培养基:缓冲蛋白胨水(buffered peptone water, BPW)用于沙门氏菌、霍乱弧菌的前增菌培养;7.5%氯化钠肉汤金用于黄色葡萄球菌前增菌培养;李氏增菌肉汤(*listeria enrichment broth*, LB1, LB2)基础用于单核细胞增生李斯特氏菌前增菌培养;3%氯化钠碱性蛋白胨水(alkaline peptone water, APW)用于副溶血性弧菌增菌培养及营养琼脂。以上培养基均购自北京陆桥技术有限责任公司。

1.2 材料、仪器与试剂

1.2.1 仪器

Tone 96 基因扩增仪(德国耶拿 Biometra 公司);CPRO-180 飞行时间质谱系统(北京鑫汇普瑞科技发展有限公司);DYY-6D 型电泳仪(北京六一生物科技有限公司);Gel Doc XR+凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 伯乐公司);HPX-9082MBE 电热恒温培养箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);BSC-150011A-2-X 生物安全柜(济南鑫贝西生物技术有限公司);1.5 mL 微量离心管、0.2 mL PCR 单管(江苏康宁生命科学有限公司)。

1.2.2 试剂与材料

甲酸、三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA)、乙腈(acetonitrile, ACN)、无水乙醇、 α -氰-4-羟基肉桂酸(alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid, CHCA)(美国 Fisher Chemical 公司);PCR 检测的引物及探针(上海生工生物工程有限公司);细菌基因组 DNA 提取试剂盒(M3223660)、

2×高保真 PCR 预混液(10103ES03)(上海翌圣生物科技股份有限公司);核酸质谱反应试剂盒(XH202220,北京鑫汇普瑞科技发展有限公司)。

三文鱼(京东京鲜采专营店)。

1.3 试验方法

1.3.1 基质溶液的配制

在 1.5 mL 离心管中混合 500 μ L 乙腈、500 μ L 去离子水、250 μ L TFA,称取 10 mg CHCA 融入上述混合液中充分溶解。

1.3.2 细菌基因组 DNA 的提取

取细菌培养液 1.0 mL,用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA,保存于-20 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

1.3.3 引物和 PCR 扩增条件

使用现行标准中标注的 5 种致病菌的特异基因为目的基因,分别设计扩增引物,组合进行多重 PCR 反应,筛选有效的引物组合。引物序列见表 1。为了避免引物对后期质谱检测探针时造成干扰,在引物的 5'端加 10 bp 碱基的接头序列,使引物的分子量大于 9000 Da,在探针的分子量范围之外。分别使用 54、56、58、60、62、64 $^{\circ}$ C 作为退火温度反应测试扩增效率,在保证有效扩增的基础上使用较高的退火温度 60 $^{\circ}$ C,预防非特异扩增。

多重 PCR 反应体系如下:5 种致病菌 DNA 模板各 10 ng,10 μ mol/L 的 5 对上下游引物各 0.1 μ L,共 1 μ L;2.5 μ L Premix Taq;无菌超纯水补充至总体积 5 μ L。

PCR 反应条件:98 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火及延伸 30 s,进行 45 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min,16 $^{\circ}$ C 保存。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

引物名称	引物序列
<i>ompW-F</i>	ACGTTGGATGCTAGCCGTACTTGC AGCCCTAAGCT
<i>ompW-R</i>	ACGTTGGATGTTTGTAGGTTGCCGTTGT
<i>tlh-F</i>	ACGTTGGATGTGGGCAAAAAACGAAGAT
<i>tlh-R</i>	ACGTTGGATGCAGTTGTAGAGCGGAAGG
<i>prfA-F</i>	ACGTTGGATGGATACAGAAACATCGGTTGGC
<i>prfA-R</i>	ACGTTGGATGGTGTAACTCTTGATGCCATCAG
<i>invA-F</i>	ACGTTGGATGGTAACGCATGAAGAGGGGGA
<i>invA-R</i>	ACGTTGGATGTTAACAAACGCTGCAAAACT
<i>femA-F</i>	ACGTTGGATGAACAAGCGAGATAACTTACAAC
<i>femA-R</i>	ACGTTGGATGTAACCTCCGGCAAAATGACGGA

注:引物序列中的斜体碱基为接头序列。

1.3.4 多重 PCR 联合 MALDI-TOF MS 技术的建立

核酸质谱检测步骤包括:多重 PCR 扩增、虾碱性磷酸酶(staphylococcus aureus protease, SAP)消化、单碱基延伸、树脂纯化去盐、点样(取 0.5 μ L 基质点于靶板上,待晾干后

再点 0.5 μL 纯化产物覆盖其上并继续晾干)、上机采集样本谱图, 然后根据峰图判定检测结果。

(1)多重 PCR 扩增

如表 2 所示, 配制 PCR 反应液, 按表 3 进行 PCR 扩增。也可以根据需要等比例扩大 PCR 体系。

表 2 多重 PCR 反应体系 Table 2 Multiplex PCR reaction system	
组分名称	反应液体积
模板	每种菌模板 10.0 ng
PCR 扩增预混液	2.5 μL
引物	1.0(每条引物 0.1 μL)
总计	水补足 5.0 μL

表 3 PCR 扩增反应热循环程序 Table 3 PCR amplification reaction thermal cycling program			
程序	温度/℃	时间	循环数/次
预变性	98	3 min	1
变性	98	20 s	45
退火/延伸	60	30 s	
终延伸	72	5 min	1
终止	4	维持	

(2)虾碱性磷酸酶消化

取 5.0 μL PCR 扩增产物加入虾碱性磷酸酶, 37 ℃消化。其中各试剂组分比例如表 4, 反应程序如表 5。

表 4 SAP 消化反应体系 Table 4 SAP digestion reaction system	
组分名称	反应液体积/μL
PCR 产物	5.0
缓冲液	0.2
SAP 酶	0.5
水	1.3
总计	7.0

表 5 SAP 消化反应程序 Table 5 SAP digestive reaction program			
程序	温度/℃	时间	循环数/次
消化	37	30 min	1
灭活	65	5 min	1
终止	4	维持	

表 8 延伸引物碱基序列及分子量 Table 8 Base sequence and molecular weight extension primer				
检测基因	探针序列	探针分子量/Da	延伸单碱基	延伸后分子量/Da
<i>ompW-P</i>	TGAAGTCCTCGCTGCT	4848	A	5119
<i>tlh-P</i>	TACTTCACCATTCACGGC	5435	T	5697
<i>prfA-P</i>	ATTTAGAAGTCATTAGCGAACAG	7096	G	7383
<i>invA-P</i>	TTGGCTATGTGTTGCGGAA	5890	C	6137
<i>femA-P</i>	AAAGATTGAAGAAGGTAAACG	6560	T	6822

(3)单碱基延伸

如表 6 所示, 配制延伸反应液, 按表 7 程序所示进行延伸反应。延伸引物碱基序列及分子量见表 8。

表 6 延伸反应体系 Table 6 Extention reaction system	
组分名称	反应液体积/μL
SAP 产物	7.0
延伸缓冲液	0.3
单碱基延伸酶	0.5
链终止核苷酸	0.5
探针混合物	1.7
总体积	10.0

表 7 延伸反应程序 Table 7 Extention reaction program			
程序	温度/℃	时间	循环数/次
预变性	94	30 s	1
变性	94	5 s	40
退火	52	5 s	
延伸	80	5 s	
终延伸	72	3 min	1
终止	4	维持	

(4)树脂纯化去盐

延伸反应完毕后, 在产物分析区向每支 PCR 管/孔延伸产物中加入 16 μL 已混合好的湿树脂, 颠倒混匀静置 5 min, 之后用迷你桌面离心机短暂离心 30 s。

(5)点样

取 0.5 μL 基质点加到靶板上, 干燥后, 将 0.5 μL 纯化后的纯化产物点样基质上晾干。

(6)上机检测

将靶板送入质谱仪舱内, 利用 CPRO-180 实时工作站系统 XH-TOF 获得产物分子量谱图(参数设置为 SP1 电压 20 kV, SP2 电压 5 kV, 聚焦电压 10 kV, 检测器电压 2.7 kV, 脉冲延迟 600 ns, 脉冲宽度 200 ns, 激光频率 20 Hz, 激光能量 50%), 用单碱基延伸分析软件(鑫汇核酸质谱检测系统)计算得出延伸结果。

1.3.5 特异性试验

取菌株肠道致病性大肠埃希氏菌、阿氏肠杆菌、费氏柠檬酸杆菌、奇异变形杆菌、宋内氏志贺氏菌、肺炎克雷伯氏菌、嗜水气单胞菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌, 经培养后, 各取 1×10^8 CFU/mL 菌液提取基因组并建立一个模板库。按照 1.3.4 的 PCR-MALDI-TOF MS 方法对模板库检测, 检测非目标菌是否会产生假阳性结果。

1.3.6 灵敏度试验

将 5 种致病菌标准菌株用双蒸水 10 倍梯度稀释成 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10^1 CFU/mL 的浓度, 提取基因组为模板, 进行 PCR-MALDI-TOF MS 检测, 建立方法的灵敏性, 测定 5 种致病菌检出限。将 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10^1 CFU/mL 的菌液进行平板计数, 涂布 3 个平板, 取平均值确定菌液准确浓度。

1.3.7 人工污染食品样品的检测

取三文鱼样品各 25.0 g, 同 5 种致病菌混合后分别加入到 225 mL 增菌培养基中(初始含菌量为 1×10^2 CFU/mL 的模拟样品), 培养 18 h。取菌悬液 1.0 mL, 提取样本 DNA, 进行核酸质谱检测。

1.4 数据处理

所有试验数据为至少重复 3 次后得出的一致结果。使用 WPS Office 2023 制作表格, 使用 Adobe Illustrator 2020、Photoshop 2018 绘图。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增产物单碱基延伸结果

将霍乱弧菌、副溶血性弧菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特菌的特异基因 *owpW*、*tlh*、*invA*、*femA*、*prfA* 进行多重 PCR 扩增。在 PCR 产物中, 加入探针进行单碱基延伸, 延伸前的探针质谱检测结果如图 1。4848 Da 为霍乱弧菌特异基因 *owpW* 探针分子量, 5435 Da 为副溶血性弧菌特异基因 *tlh* 探针分子量, 5890 Da 为沙门氏菌特异基因 *invA* 探针分子量, 6560 Da 为金黄色葡萄球菌特异基因 *femA* 探针分子量, 7096 Da 为单核细胞增生李斯特氏菌特异基因 *prfA* 探针分子量。延伸后的探针上质谱检测结果如图 2, 5119 Da 为霍乱弧菌 4848 分子量探针加 A 延伸而成, 5697 Da 为副溶血性弧菌 5435 分子量探针加 T 延伸而成, 6137 Da 为沙门氏菌 5889 分子量探针加 C 延伸而成, 6822 Da 为金黄色葡萄球菌 6560 分子量探针加 T 延伸而成, 7383 Da 单增 7095 分子量探针加 G 延伸而成, 5 条对应探针可以同时延伸, 且延伸效率大于 80%。

2.2 特异性试验

取肠道致病性大肠埃希氏菌、阿氏肠杆菌、费氏柠檬酸杆菌、奇异变形杆菌、宋内氏志贺氏菌、肺炎克雷伯氏菌、嗜水气单胞菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌 8 种非目标菌, 提取基因组 DNA 进行 PCR-MALDI-TOF MS 检测, 结果如图 3,

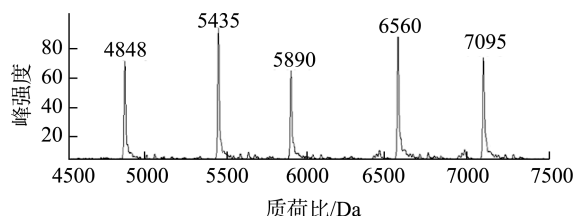


图 1 初始探针质谱图

Fig.1 Mass spectrum of initial probe

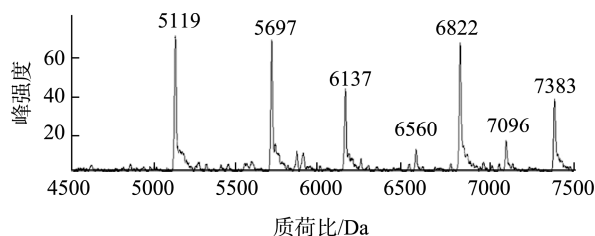


图 2 探针延伸后质谱图

Fig.2 Mass spectrum after probe extension

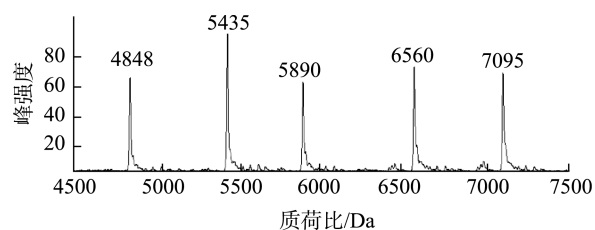


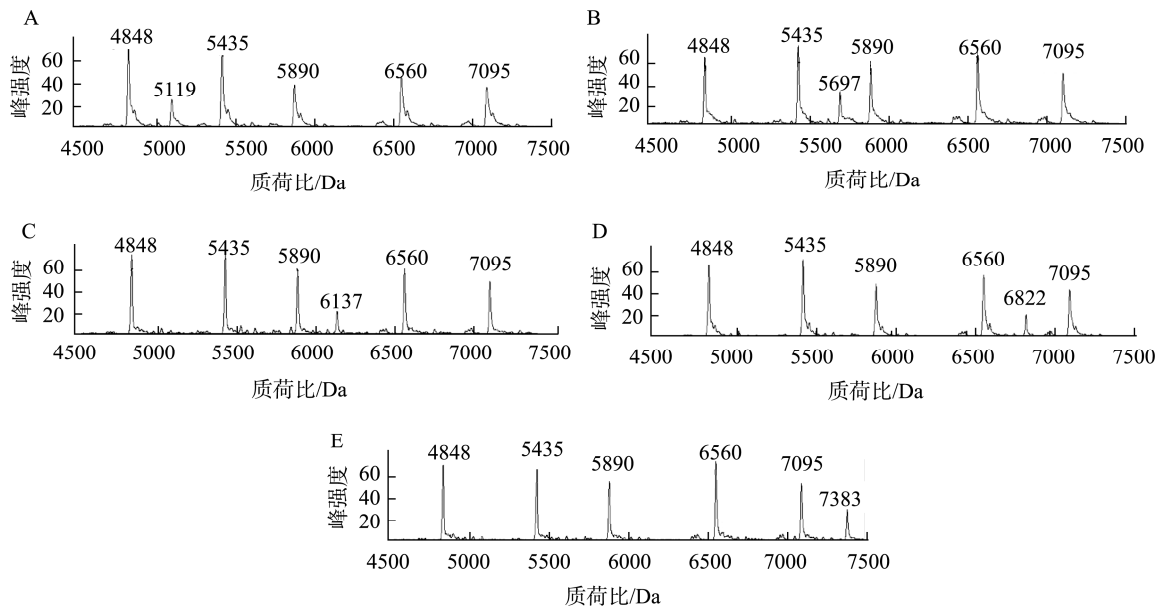
图 3 干扰菌检测结果

Fig.3 Detection results of interfering bacteria

结果显示 5 种致病菌的探针都没有延伸。试验结果表明: 本研究开发的 5 种致病菌 MALDI-TOF MS 快速检测技术有很好的特异性。为了将核酸质谱技术和多重 PCR 检测进行比较, 将以干扰菌株为模板进行的多重 PCR 扩增产物进行了电泳检测, 结果发现有数条微弱的条带。当干扰菌株的 DNA 模板浓度高, 随着凝胶成像仪曝光强度提高, 多重 PCR 可以看到扩增条带。核酸质谱的结果显示良好的特异性, 证明这些条带都是非特异性扩增。因此, 可以得出与单纯的多重 PCR 电泳检测相比, 核酸质谱技术有更好的特异性。

2.3 灵敏度试验结果分析

5 种致病菌的 1×10^2 CFU/mL 浓度及以上菌液提取的 DNA 都能检测到相应分子量探针的延伸, 其探针延伸产物的峰强超过 20, 结果可信。5 种菌霍乱弧菌、副溶血性弧菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特氏菌 1×10^2 CFU/mL 浓度梯度样本 PCR-MALDI-TOF MS 检测结果如图 4。部分菌的 10 CFU/mL 梯度稀释菌液提取的 DNA 也能检测到相应分子量探针的延伸, 但峰强低于 20。根据培养皿上的菌落计数结果确定的准确细菌浓度, 本研究所建立的方法可检出沙门氏菌、金黄色葡



注: A. 菌霍乱弧菌; B. 副溶血性弧菌; C. 沙门氏菌; D. 金黄色葡萄球菌; E. 单核细胞增生李斯特氏菌。

图 4 灵敏度检测结果

Fig.4 Results of sensitivity detection

萄球菌、单核细胞增生李斯特菌、副溶血性弧菌、霍乱弧菌的灵敏度分别可达到 150、350、160、130、180 CFU/mL。将相同用量 DNA 的做模板用多重 PCR 扩增经电泳检测, 在低曝光下几乎看不到电泳条带, 高曝光下只能检测到微弱的电泳条带, 显示核酸质谱技术的灵敏度要比多重 PCR 高。

2.4 人工污染感染食品检测结果分析

人工污染感染食品检测结果显示实际样品感染 5 种致病菌后, PCR-MALDI-TOF MS 检测结果如图 5, 结果显示准确检出 5 种致病菌。同时依据 GB 4789.4—2024《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》中传统生化方法对人工污染食品中的沙门氏菌进行了检测, 沙门氏菌检测结果为阳性。传统生化检测约需要 4 d, 检测过程烦琐, 试剂成本高, 且一个项目检出一种微生物; 相比核酸质谱技术降低检测成本、缩短检测时间, 且一次性检测 5 种致病微生物, 提高了检测的效率。

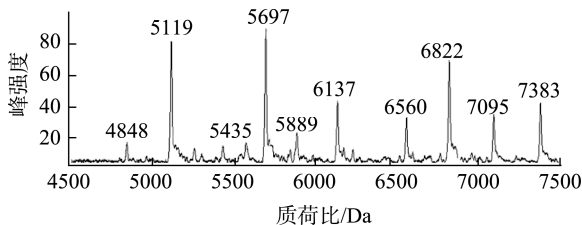


图 5 污染样本检测结果

Fig.5 Results of pollution sample detection

3 结 论

核酸质谱技术以多重 PCR 技术为基础, 提高了检测的通量, 同时质谱技术能准确测定产物的特异分子量, 因此核酸质谱技术的准确度高。核酸质谱技术有快速、准确、高通量的特点。本研究使用国产核酸质谱仪器和试剂, 建立了基于 PCR-MALDI-TOF MS 的沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特氏菌、副溶血性弧菌、霍乱弧菌 5 种常见致病菌同时检测的技术。另外鱼虱、异尖线虫、传染性鲑鱼贫血病毒也是水产品中常见的致病生物^[31-32], 由于样本来源的问题, 本研究暂时没能建立同时对水产品中 5 种微生物、2 种虫及 1 种病毒的检测。核酸质谱技术完全可以满足水产品多种生物检测的要求, 未来会进一步建立水产品中 8 种致病生物的核酸质谱检测方法, 提高水产品致病生物检测的效率和准确性。

参考文献

[1] 马光霞. 中国水产品市场形势分析与展望[J]. 农业展望, 2009, 5(9): 14-18.
MA GX. Analysis and prospect of China's aquatic products market situation [J]. Agricultural Outlook, 2009, 5(9): 14-18.
[2] 沈辰, 张静宜, 刘景景. 近期中国水产品市场形势分析与展望[J]. 农业展望, 2016, 12(11): 16-20.
SHEN C, ZHANG JY, LI JJ. Analysis and prospect of the recent situation in China's aquatic products market [J]. Agricultural Outlook, 2016, 12(11): 16-20.

- [3] 潘煜辰, 郑翌, 施敬文, 等. 我国水产品质量安全管理现状与发展建议[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(7): 2272–2279.
- PAN YC, ZHENG Y, SHI JW, *et al.* The status and proposal of quality safety management to aquatic products in China [J]. Journal of Food Safety & Quality 2014, 5(7): 2272–2279.
- [4] 余小庆, 许娟, 彭文秋, 等. 三水区生食水产品中病原微生物污染状况与危害知晓率调查[J]. 中国卫生检验杂志, 2019, 29(14): 1766–1769, 1772.
- YU XQ, XU J, PENG WQ, *et al.* Contamination of pathogenic microorganisms in raw aquatic products in Sanshui District and public awareness of the dangerous of eating sashimi [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2019, 29(14): 1766–1769, 1772.
- [5] 许娟, 余小庆, 彭文秋, 等. 180 份生食水产品中病原微生物污染状况分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2018, 28(17): 2078–2081.
- XU J, YU XQ, PENG WQ, *et al.* Analysis of pathogenic microorganisms contamination in 180 raw aquatic products [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2018, 28(17): 2078–2081.
- [6] 钱云开, 苑静, 高飞, 等. 水产品中常见 5 种致病菌的多重 PCR-DHPLC 快速检测方法的建立[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(14): 2014–2016.
- QIAN YK, YUAN J, GAO F, *et al.* Development of a multiplex PCR-DHPLC method for rapid detection of five common pathogens in aquatic products [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2014, 24(14): 2014–2016.
- [7] 刘忠梅, 曾繁华, 罗佳, 等. 靶序列富集多重 PCR 结合 DHPLC 同时检测 5 种食源性致病菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(6): 2275–2282.
- LIU ZM, ZENG FH, LUO J, *et al.* Target enriched multiplex PCR coupled with denaturing high-performance liquid chromatography assay for simultaneous detection of 5 foodborne pathogens [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2015, 6(6): 2275–2282.
- [8] 秦俊莲, 徐宁宁. 食品微生物检测技术和方法研究进展[J]. 食品安全导刊, 2021(31): 174–176.
- QIN JL, XU NN. Study on technology and methods of food microbial detection [J]. China Food Safety Magazine, 2021(31): 174–176.
- [9] 戴陈伟, 童琳, 武昌俊, 等. 实时荧光定量 PCR 技术快速检测志贺氏菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(23): 8037–8041.
- DAI CW, TONG L, WU CJ, *et al.* Rapid detection of *Shigella* by real-time fluorescence quantitative PCR [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 10(23): 8037–8041.
- [10] 王春梅. 实时荧光定量技术在食品微生物检测和研究中的应用[J]. 食品安全导刊, 2022(13): 126–128.
- WANG CM. Application of real-time fluorescence quantitative technology in detection and research of food microorganisms [J]. Food Safety Magazine, 2022(13): 126–128.
- [11] 刘可, 李梦霞, 张亮, 等. 数字 PCR 技术在食品检测中的应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2021, 42(4): 319–324.
- LIU K, LI MX, ZHANG L, *et al.* Research progress of digital PCR technology and its application in food detection [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(4): 319–324.
- [12] 祝儒刚, 李拖平, 宋立峰. 应用基因芯片技术检测肉及肉制品中 5 种致病菌[J]. 食品科学, 2012, 33(14): 211–215.
- ZHU RG, LI TP, SONG LF, *et al.* Rapid detection of five pathogens in meat and meat products by DNA microarray [J]. Food Science, 2012, 33(14): 211–215.
- [13] 孙畅. 基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱在高分子研究中的应用[J]. 现代科学仪器, 2011(4): 109–111.
- SUN C. Applications of matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in study of macromolecules [J]. Modern Scientific Instruments, 2011(4): 109–111.
- [14] SINGHAL N, KUMAR M, KANAUIA PK, *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis [J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 791.
- [15] 任婷, 史敏, 刘聪慧, 等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱在食源性致病菌鉴定中的应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(5): 62–68.
- REN T, SHI M, LIU CH, *et al.* Application of matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry in identification of foodborne pathogens [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(5): 62–68.
- [16] 张浩然, 孙冰清, 徐汀, 等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术在病原微生物鉴定中的应用[J]. 中国兽医杂志, 2022, 58(1): 106–109.
- ZHANG HR, SUN BQ, XU T, *et al.* Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry technology application in identification of pathogenic microorganisms [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2022, 58(1): 106–109.
- [17] 管明秀, 张文成, 王宝占, 等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术在肿瘤诊断及微生物鉴定中的应用[J]. 实用医药杂志, 2020, 37(12): 1133–1137.
- GUAN MX, ZHANG WC, WANG BZ, *et al.* Application of matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry in tumor diagnosis and microbial identification [J]. Practical Journal of Medicine Pharmacy, 2020, 37(12): 1133–1137.
- [18] ZAMBONIN C, ARESTA A. MALDI-TOF/MS Analysis of non-invasive human urine and saliva samples for the identification of new cancer biomarkers [J]. Molecules, 2022, 27(6): 1925.
- [19] 金孝华, 黄莎莎, 庞珊珊, 等. 飞行时间质谱技术在中国人常见耳聋基因检测中的应用[J]. 生殖医学杂志, 2022, 31(10): 1373–1379.
- JIN XH, HUANG SS, PANG SS, *et al.* Application of time-of-flight mass spectrometry in detection of common deafness genes in Chinese [J]. Journal of Reproductive Medicine, 2022, 31(10): 1373–1379.
- [20] 黄盛文, 许吟, 吴炯, 等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术在新生儿 β -地中海贫血筛查中的应用[J]. 临床检验杂志, 2015, 33(5): 341–343.
- HUANG SW, XU Y, WU X, *et al.* Application of matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry technology in screening for neonatal β -thalassemia [J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2015, 33(5): 341–343.

- [21] 常亮, 任妮妮, 焦利萍, 等. 飞行时间质谱与荧光定量法检测叶酸代谢基因多态性的比较[J]. 中国计划生育学杂志, 2021, 29(7): 1411–1413, 1417, 1541.
- CHANG L, REN DN, JIAO LP, *et al.* Comparison of MALDI TOF MS and fluorescent quantitation for folate metabolism enzymes SNPs detection [J]. Chinese Journal of Family Planning, 2021, 29(7): 1411–1413, 1417, 1541.
- [22] 叶阿里, 张海燕, 窦亚玲, 等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术检测药物代谢酶基因多态性平台的建立[J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(5): 30–33.
- YE AL, ZHANG HY, DOU YL, *et al.* Establishment of MALDI TOF-MS technique platform for detecting cytochrome P450 gene polymorphism [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016, 31(5): 30–33.
- [23] 郭俊, 李小燕, 蔡伦, 等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术检测华法林代谢酶基因多态性[J]. 临床检验杂志, 2014, 32(6): 410–413.
- GUO J, LI XY, CAI L, *et al.* Development and application of MALDI-TOF-MS for detection of genetic polymorphism of warfarin metabolizing enzymes [J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2014, 32(6): 410–413.
- [24] 余艳芳, 赵开顺, 屠春林, 等. 核酸质谱检测结核分枝杆菌耐药方法的建立[J]. 临床肺科杂志, 2021, 26(1): 74–81.
- YU YF, ZHAO KS, TU CL, *et al.* Establishment of MassARRAY system for detection of drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Journal of Clinical Pulmonary Medicine, 2021, 26(1): 74–81.
- [25] 罗红学, 卞苏环, 杜辉, 等. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱和 HPV 基因测序分型检测阴道自取样本用于子宫颈癌筛查的有效性研究[J]. 中国妇产科临床杂志, 2017, 18(2): 120–123.
- LUO HX, BIAN SH, DU H, *et al.* Evaluation of vaginal self-sampling in combination with MALDI-TOF and SEQ HPV test for cervical cancer screening [J]. Chinese Journal of Clinical Obstetrics and Gynecology, 2017, 18(2): 120–123.
- [26] ZHAO F, LU J, LU B, *et al.* A novel strategy for the detection of SARS-CoV-2 variants based on multiplex PCR-mass spectrometry minisequencing technology [J]. Microbiol Spectrum, 2021, 9(3): e0126721.
- [27] ZHAO F, ZHANG J, WANG X, *et al.* A multisite SNP genotyping and macrolide susceptibility gene method for mycoplasma pneumoniae based on MALDI-TOF MS [J]. iScience, 2021, 24(5): 102447.
- [28] ZHAO H, YANG Y, LYU J, *et al.* Development and application of a method to detect 27 respiratory pathogens using multiplex RT-PCR combined with MassARRAY technology [J]. BMC Infectious Diseases, 2021, 21(1): 870.
- [29] 宋士琦, 裴慧, 陈吴健, 等. 基于基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱的猪呼吸道病毒多目标鉴定方法的建立和应用[J]. 微生物学报, 2023, 63(7): 2713–2727.
- SONG SQ, QIU H, CHEN WJ, *et al.* Establishment and application of multi-target identification method for porcine respiratory viruses based on matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(7): 2713–2727.
- [30] LIU N, WANG L, CAI G, *et al.* Establishment of a simultaneous detection method for ten duck viruses using MALDI-TOF mass spectrometry [J]. Journal of Virological Methods, 2019, 273: 113723.
- [31] 叶兵, 孙忠清, 宋旭岩, 等. 山东青岛市市售海鱼异尖线虫幼虫感染调查[J]. 医学动物防制, 2017, 33(9): 985–986.
- YE B, SUN ZQ, SONG XY, *et al.* Investigation on the infection of heterodyne nematode larvae in sea fish sold in Qingdao, Shandong Province [J]. Journal of Medical Pest Control, 2017, 33(9): 985–986.
- [32] 蒋守富, 张小萍, 何艳燕. 食品寄生虫快速检测技术的应用进展[J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(1): 95–100.
- JIANG SF, ZHANG XP, HE YY. Application progress on rapid detection technology of parasites in food [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2014, 26(1): 95–100.

(责任编辑: 安香玉 韩晓红)