

技术与方法

用 PCR 法快速测定食物中毒病原菌

曹泽虹 李勇

(彭城大学食品工程系 徐州 221008)

摘要: 介绍近年来 PCR 法在快速测定食物中毒病原菌中的大肠杆菌、沙门氏菌、弧菌等应用研究。

关键词: PCR 法, DNA, 引物, DNA 聚合酶

中图分类号: TS 201.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 04-0073-04

国内外食品厂家在食品生产过程中,对食品进行科学的卫生管理时,已普遍使用 HACCP (危害分析与关键控制点) 控制系统。HACCP 是 1971 年美国一食品公司生产宇航食品时开发的品质管理系统,它是在每个生产工序上为防止细菌性食物中毒,确实实施“不染菌”、“细菌不增殖”及“杀菌”的技术管理。

在实施 HACCP 管理时,要对生产环节进行病原微生物的检测,若使用常规培养法,检测时间长,难以达到及时监控的目的,对此,以微生物特异遗传因子作为指标来测定微生物数量的 PCR 法具有很高的应用价值。它具有特异性强、灵敏度高和快速准确的优点。

1 PCR 的基本原理

PCR (Poly merase China Reaction) 法是根据 DNA 模板的特性,模仿体内的复制过程,在体外适合条件下,以单链 DNA 为模板,以人工设计与合成的寡核苷酸为引物,利用热稳定的 DNA 聚合酶,依 5'→3' 方向掺入单核苷酸来特异性地扩增 DNA 片断的技术。这一 DNA 增殖技术是选择想要检出微生物遗传因子的特异碱基排列,在试管内培养,从而合成 DNA 的方法。合成时使用引物把两端碱基排列明显的二条 DNA 链片断结合起来,由 DNA 聚合酶合成相对的 DNA 链。把二条单链合成一条双链,以加热、保温、引物结合及相对链合成的过程,每一个周期约需 3~5min,反复操作 20~40 次之后,目标 DNA 片断能增加 10 万~100 万倍。增殖后的 DNA,用琼脂糖凝胶电泳后,若用菲啶溴红 (EB) 染色,就可以在紫外光下检出微生物的数量。

2 PCR 所具备的条件

2.1 引物的构造 (1) 嘌呤碱、嘧啶碱为随机排列,长度在 15~30 碱基之间。(2) 引物内不能形成发夹结构。(3) 两种引物之间 (特别是 3' 末端附近) 不能互补。(4) GC 含量为 40%~60%,二种引物间 GC 含量没有太大差异。

近年来,考虑到上述注意事项而选用的最适引物是有自动选择功能的 OligoTM-MAC、OligoTM-windows, N. B. I (日本宝酒株式会社生产),利用它们可以简单地完成构型。

2.2 操作过程与参数控制 (1) 操作与参数: PCR 法检出食品中微生物的模式图如下。

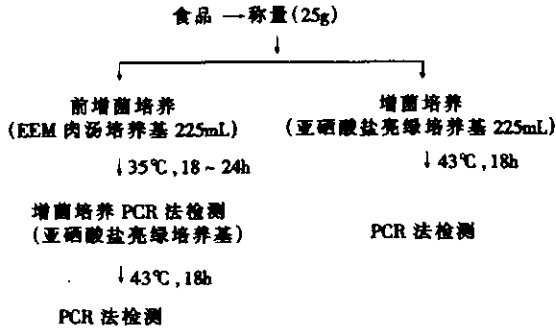


图 1 PCR 法检出食品微生物模式图

PCR 反应的前处理过程如下：增菌培养液 0.01mL 注入 1.5mL 微试管中→加入 90mL TE 缓冲液 (10ml mol/L Tris-HCl, 0.1ml mol/L EDTA pH 8.0 混合) →95°C, 加热 5min 离心分离 (12, 000r/min, 4°C, 10min) →上清液→供 PCR 反应。

PCR 法即将 DNA 的热变性、引物缓慢冷却、伸长反应这 3 个步骤 (3 个温度区间) 进行反复操作。各反应温度和时间随所增 DNA 碱基排列、长度及引物的大小不同而不同。

(2) 操作上的注意点：①DNA 的热变性：把双链 DNA 在 94°C 下处理 15 ~ 30s, 就能分解为单链 DNA；②引物的缓慢冷却：若把热处理后成为单链的 DNA 在引物存在的情况下降低温度, 二条引物和其各自互补的一条链组成 DNA, 同时缓慢冷却。缓慢冷却最适温度和时间决定于引物的碱基排列和其长度。经实验确定, 当引物为 20 ~ 25 圈左右时, 通常缓慢冷却应为 55°C, 冷却 30 ~ 60s。③伸长反应：在 4 种基质 (dNTP) 共存情况下, 用 DNA 合成酶进行催化, 进行引物的伸长反应。伸长反应所需要时间受单链 DNA 的浓度、扩增 DNA 的大小、反应温度等因素的影响, 一般认为使用水生栖热菌分泌的 TaqDNA 合成酶时, 作为大致的标准 72°C, 在 1min 约伸长 1kb 就可以了。在 PCR 中, 12 个周期标准的排列计算应为 2ⁿ 倍, 实际比此数小, 其原因是 DNA 合成酶的失活及由于增幅断片的增加, 导致酶分子/单链 DNA 比值减小; 缓慢冷却速度变大; 焦磷酸的积蓄, 对酶促反应起到阻碍作用等。

一般进行 25 ~ 35 个循环操作的反应, 产物浓度不断增加, 这样其本身易产生成为引物的二次反应, 产生非特异的 DNA 增幅, 这样会影响检测结果, 因此尽量控制循环操作不必要的增加。为了防止多种引物的形成, 控制非特异增幅断片生成, 把反应液在冰上 (低温) 调制, 冷却到反应之前, 然后立即进行 PCR 操作, 有较好的效果。

3 PCR 法在食品微生物检验中的应用

如图 1 所示流程, 把培养液用无菌水稀释后, 在 95°C 下让 DNA 溶出, 能够进行 PCR 反应。

前培养不仅为了提高灵敏度, 而且为了区别死菌和活菌, 即使前培养也能在 2d 检出结果, 可直接用电泳进行观察。

如下表所示, 对每种想检出的微生物, 若用不同的引物, 同样的操作就可检测各种各样的微生物。

表 1 病原微生物检出用 Primer set (日本宝酒造)

产 品 名	检出细菌名称	增幅 DNA (bp)
肠炎弧菌		
耐热性溶血毒遗传因子检出用 Primer set VPD-1, -2	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	251
耐热性溶血毒类似毒素遗传因子 (trh1) 检出用 Primer set VPS-1, -2		210
耐热性溶血毒类似毒素遗传因子 (trh18c2) 检出用 primer set VPD-1, -2		250
毒素原性大肠杆菌		
LT 遗传因子检出用 primer set ELT-1, -2	enterotoxigenic	263
STh 遗传因子检出用 primer set ESH-1, -2	<i>Escherichia coli</i> :	131
STP 遗传因子检出用 primer set Esp-1, -2	EIEC	123
肠道出血性大肠杆菌		
VT1 遗传因子检出用 Primer set EVT-1, -2	enterohemorrhagic	349
VT2 遗传因子检出用 primer set EVS-1, -2	<i>Escherichia coli</i> :	404
VT 遗传因子检出用 primer set EVC-1, -2	EHEC (Verocytotoxin-producing <i>Escherichia coli</i> : VTEC)	171
金黄色葡萄球菌		
葡萄球菌肠毒素 A 遗传因子检出用 Primer set SEA-1, -2		423
葡萄球菌肠毒素 B 遗传因子检出用 Primer set SEB-1, -2	<i>Staphylococcus aureus</i>	391
葡萄球菌肠毒素 C 遗传因子检出用 Primer set SEZ-1, -2		146
葡萄球菌肠毒素 D 遗传因子检出用 Primer set SED-1, -2		499
葡萄球菌肠毒素 E 遗传因子检出用 Primer set SEE-1, -2		557
毒素性休克症候群毒素遗传因子检出用 primer set TST-1, -2		228
弧菌毒素遗传因子检出用 primer set VCT-1, -2	<i>Vibrio cholerae</i>	307
痢疾杆菌和肠道侵入性大肠杆菌 (EIEC)		
invE 遗传因子检出用 Primer set INV-1, -2	enteroinvasive	293
cpaH 遗传因子检出用 Primer set IPA-1, -2	<i>Escherichia coli</i> : EIEC	242
沙门氏菌		
invA 遗传因子检出用 Primer set SIN-1, -2	<i>Salmonella typhimurium</i>	378
葡萄球菌肠毒素遗传因子检出用 Primer set STN-1, -2		264
产气荚膜菌毒素遗传因子检出用 Primer set CPE-1, -2	<i>Clostridium perfringens</i>	456
肉毒梭菌		
A 型毒素遗传因子检出用 Primer set BAS-1, -2	<i>Clostridium botulinum</i>	284
B 型毒素遗传因子检出用 Primer set BBS-1, -2		314
C 型毒素遗传因子检出用 Primer set BCS-1, -2		290
D 型毒素遗传因子检出用 Primer set BDS-1, -2		497
E 型毒素遗传因子检出用 Primer set BES-1, -2		266
F 型毒素遗传因子检出用 Primer set BFS-1, -2		332
G 型毒素遗传因子检出用 Primer set BGS-1, -2		488

4 病原微生物的检出

4.1 肠道出血性大肠杆菌 (O-157) O-157 为首的肠道出血性大肠杆菌 (EHEC: *enterohemorrhagic*, *Escherichia coli*) 是引起伴有血便和剧烈腹痛的出血性大肠炎、溶血性尿毒症的大肠菌的一类。原来的检测时间需要一个星期, 其操作过程如下: 增殖培养一夜→试样前处理 30min→目的 DNA 扩增 25h→电泳检测 DNA30min→得到结果。

而使用 one shot PCR screening kit (按图 1), 可以快速检出 EHEC, 使用 PCR 法检出 EHEC 产生的 Vero 毒素遗传因子, 可迅速检出 EHEC, 反应物中有 10 个菌存在即可检

出,灵敏度也很高。即把 PCR 必要的试剂全部分别注入 0.2mL PCR 微试管中,把热处理后的增菌培养液注入微试管中,就可开始 PCR 反应,进行菌数检出。

4.2 沙门氏菌 在日本的食物中毒中,最多的是沙门氏菌。沙门氏菌是温、冷血动物的肠道菌,分布范围广泛。成为食物中毒原因的沙门氏菌的血清型以前多为 *S. typhimurium*,最近多为 *S. enteritidis*。

若使用组合的 PCR 法检出,前增菌培养是必要的,一般 6~12h 就可以,然后从其菌体中抽出 DNA 需 1h,PCR 需要的时间约 3h,总共需要 10~16h 就可知道结果。据报道,25g 食肉中有一个沙门氏菌,经 8h 的增菌培养即可以检测出来。

另外,若被测物中有 10 个菌存在,约在 6h 的前增菌培养中就可以检出。若延长前培养时间,10 个以下的菌也可以检出。在使用 PCR 法中,被检品中即使混有其他微生物(如大肠杆菌),也能检出沙门氏菌的含量。

几乎所有的沙门氏菌都具有侵人性相关遗传因子 (*irvA*),以此遗传因子为目标的沙门氏菌 primer PCR screening kit 由日本宝酒造株式会社在市场销售,用它不需要特别的技术,就可以高灵敏度地检出沙门氏菌遗传因子,从而检出沙门氏菌。

4.3 弧菌 肠炎弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*): 是三大食物中毒菌之一,夏季在日本由鱼类而引起的食物中毒大多由此菌引起。

以前检测法是把样品放在食盐多粘菌素肉汤中在 37℃ 条件下培养 18h,从其上层取出两环,涂在 TCBS 琼脂培养基上,在 37℃ 条件下培养 18h。肠炎弧菌能产生蔗糖非分解性青绿色的菌落,可以和霍乱等的蔗糖分解菌的黄色菌落区别开来。若使用 PCR 法时,从耐热性溶血毒素遗传因子和耐热性溶血毒素的毒素遗传因子为增幅目标的引物已经有售(日本宝酒造)。

4.4 金黄色葡萄球菌 金黄色葡萄球菌使用常规培养法至少需要 4d 以上的时间,若使用前增菌培养和 PCR 法结合,2d 即可检出结果。

用 PCR 法检出金黄色葡萄球菌,可使用葡萄球菌肠毒素 A-E 遗传因子或毒素性休克症候群素遗传因子作为检出目标。

5 PCR 法的缺点

PCR 法非常简单,是短时、高灵敏度的检测方法,但也有如下缺点:(1) 样品间的交叉污染或由于时间延长 PCR 产物带有假阳性产生。(2) 从各种各样食品原料中高效率的 DNA 抽出方法有待于开发。(3) 由于培养基带入的 PCR 反应阻碍作用。因此为防止污染, DNA 抽出场所和 PCR 产物处理场所应分开,用专用吸管及装有棉塞的试管等措施。

有关 DNA 抽出,由于培养基对 PCR 阻碍作用,如前述的 O-157 one shot PCR screening kit,解决这类问题的纯化制品也开始有销售。不仅是 O-157,在其他病原菌的检出菌中也期待同样的 kit 产品的开发。

参考文献

- [1] 向井博之. シュパンフードサイエンス, 1997, (4): 39~46.
- [2] 佐藤静夫. シュパンフードサイエンス, 1998, (4): 33~38.
- [3] 高桥秀臣. ニューフードインダストリー, 1997, (10): 31~40.
- [4] 赤羽壮哉. シュパンサイエンス, 1998 (4): 26~32.