

## 基于免疫磁分离的三重荧光定量 PCR 检测食品中沙门氏菌、志贺氏菌和金黄色葡萄球菌

马凯 李宝明 白羽 陈尔凝 刘杰 武会娟 高丽娟\*

(北京市理化分析测试中心 北京 100089)

**摘要:**【目的】开发一种同时对食品中沙门氏菌、志贺氏菌和金黄色葡萄球菌快速、灵敏、准确的检测方法。【方法】利用特异性免疫磁球,在 37 °C 条件下从 250 mL 猪肉增菌液体系中边富集边循环捕获目标菌。快速提取 DNA 后,利用特异性的引物与探针,对 3 种食源性致病菌进行三重荧光定量 PCR 检测。【结果】针对沙门氏菌、志贺氏菌和金黄色葡萄球菌的检测限分别达到 2.0、6.8 和 9.6 CFU/g。方法总体灵敏度、特异性和准确度达到 99.2%、100% 及 99.5%。对 151 份实际样品进行检测,与国标(GB/T 4789.4-2010、GB 4789.5-2012 和 GB/T 4789.10-2010)方法的检测结果相比,金黄色葡萄球菌有一例阴性偏差。【结论】开发的基于免疫磁分离的三重荧光定量 PCR 方法,能够在 8 h 内完成对食品中 3 种致病菌检测,并且灵敏度高、特异性好、检测准确,可以作为快速应对此类食品安全突发事件的检测手段。

**关键词:** 免疫磁分离, 多重荧光定量 PCR, 沙门氏菌, 志贺氏菌, 金黄色葡萄球菌

## Rapid and simultaneous detection of *Salmonella*, *Shigella*, and *Staphylococcus aureus* in food using a multiplex RT-PCR assay based on immunomagnetic separation

MA Kai LI Bao-Ming BAI Yu CHEN Er-Ning LIU Jie WU Hui-Juan GAO Li-Juan\*

(Beijing Centre for Physical and Chemical Analysis, Beijing 100089, China)

**Abstract:** [Objective] This study aimed to develop a rapid and simultaneous detection method for *Salmonella*, *Shigella*, and *Staphylococcus (S.) aureus* in food. [Methods] Magnetic beads coated with specific antibodies were used to capture target pathogens from 250 mL at 37 °C. After quick DNA extraction, multiplex RT-PCR was applied to detect the target pathogens with three sets of specific primers and probes. [Results] The limit of detections of immunomagnetic separation (IMS)-multiplex real-time PCR (RT-PCR) method were 2.0 CFU/g for *Salmonella*, 6.8 CFU/g for *shigella* and 9.6 CFU/g for *S. aureus*. The sensitivity, specificity, and accuracy of this method were 99.2%, 100%, and 99.5%, respectively. One hundred fifty-one samples were tested using the IMS-multiplex RT-PCR and GB methods, and only one negative deviation was detected. [Conclusion] The IMS-multiplex RT-PCR method with high sensitivity, specificity and accuracy

基金项目: 北京市科技新星项目(No. 2008B31)

\*通讯作者: Tel: 86-10-58717639; Fax: 86-10-58717638; ✉: aglj889@163.com

收稿日期: 2014-02-09; 接受日期: 2014-04-02; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-04-15

could enable the simultaneous detection of *Salmonella*, *Shigella*, and *S. aureus* in food within 8 h and offers the opportunity for a quick response in an emergency when these bacteria are detected.

**Keywords:** Immunomagnetic separation, Multiplex real-time PCR, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus*

食品中存在的沙门氏菌、志贺氏菌和金黄色葡萄球菌导致的食源性疾病呈逐年上升趋势, 给人们健康带来很大的潜在威胁。由沙门氏菌<sup>[1-2]</sup>、志贺氏菌<sup>[3]</sup>和金黄色葡萄球菌<sup>[4]</sup>在全球范围内引发的食源性疾病导致大量人员死亡, 造成数十亿美元损失<sup>[5]</sup>。相关监测显示, 2011年我国平均6个半人中就有1人次罹患食源性疾病<sup>[6]</sup>。

目前应对食品安全突发事件的手段一般为采集样品后送到相关检测机构进行传统分离培养, 经生理生化实验后进行确认或排除。此方法培养时间长、工作量大、实验步骤繁琐, 在很多突发事件中不能及时反映准确的数据。常规PCR方法检测时间短, 但其灵敏度和可能带来的污染是必须考虑的问题<sup>[7]</sup>。免疫磁分离技术是将特异性抗体与一定大小的磁珠偶联, 利用特异性抗体能与细胞表面抗原相结合的原理, 将磁珠与细胞结合, 在外磁场的作用下, 将磁珠-细胞复合物从环境中分离出来, 达到获取目标细胞的一项技术<sup>[8]</sup>。其已经被证实是一种有效地分离多种致病菌的方法<sup>[9-11]</sup>。TaqMan探针法多重实时荧光定量PCR技术采用了封闭式反应体系, 采用多组特异性引物及探针, 针对多组目标菌进行同时扩增检测<sup>[12-14]</sup>。

目前应用免疫磁分离-多重荧光定量PCR对食品中的沙门氏菌、志贺氏菌和金黄色葡萄球菌进行三重检测还少有报道。本研究使用3种特异性免疫磁球同时捕获沙门氏菌、志贺氏菌和金黄色葡萄球菌, 使用3种特异性引物及探针, 实现对沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和志贺氏菌的同时检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、培养基与样品

本实验中使用到的37株菌见表1, 其中3株乳酸菌购自日本微生物保藏中心、日本技术评价研究所生物资源中心, 其余均购于中国科学院微生物

研究所和中国医学微生物菌种保藏中心。沙门氏菌、志贺氏菌和金黄色葡萄球菌培养基配制参考国标 GB/T 4789.4-2010<sup>[15]</sup>、GB 4789.5-2012<sup>[16]</sup>和 GB/T 4789.10-2010<sup>[17]</sup>, 营养肉汤培养基(NB)均购自北京路桥技术有限责任公司。实验所用的猪肉样品均购自北京市各大超市。

### 1.2 仪器和试剂

7500 Fast 荧光定量PCR仪, 美国ABI (Applied Biosystem)公司; 免疫磁分离系统, 英国 Matrix Pathatrix 公司; 离心机, 德国 Eppendorf 5804R 公司; Biospec-nano 核酸分析仪, 日本岛津公司。

细菌基因组DNA提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司; 超顺磁性纳米微球购自上海澳润 AllMag 公司; 沙门氏菌、志贺氏菌和金黄色葡萄球菌多克隆抗体购自 Meridian 公司; 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)购自 Sigma 公司; TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2×)购自 Applied Biosystems 公司。

### 1.3 引物及探针的合成

本研究中沙门氏菌<sup>[18]</sup>、志贺氏菌<sup>[19-20]</sup>和金黄色葡萄球菌<sup>[21]</sup>的引物及探针参照相关文献(表2), 并交由上海英骏生物技术有限公司合成。

### 1.4 免疫磁球的制备及特异性验证

**1.4.1 免疫磁球的制备:** 600 μL 磷酸盐吐温缓冲液(PBST, pH 7.4)洗涤200 μg 磁球3次, 磁分离后移除上清; 加入新配制的15 μL 5 g/L EDC和15 μL 5 g/L NHS 溶液到离心管中, 振荡混匀, 37 °C 活化60 min, 600 μL PBST 洗涤3次, 800 μL 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)重悬磁球。加入50 μg 细菌多克隆抗体, 37 °C 结合3 h。磁分离后弃上清, 600 μL PBST 洗涤3次, 300 μL 1%牛血清白蛋白(BSA)重悬磁球, 37 °C 封闭30 min。磁分离后弃上清, 600 μL PBS 洗涤3-5次。向制备好的致病菌磁球中加入100 μL PBST。4 °C 保存待用。

表 1 荧光定量 PCR 检测引物特异性  
Table 1 Specificity of the multiplex real-time PCR primers for different bacterial strains

Bacterial strains	Source	RT-PC results <sup>a</sup>		
		Salm	Shig	Stap
<i>Salmonella</i> sp.	ATCC 14028	+	-	-
	CGMCC 1.1552	+	-	-
	CGMCC 1.1859	+	-	-
	CGMCC 1.1174	+	-	-
	CMCC 50094	+	-	-
<i>Shigella</i> sp.	ATCC 12022	-	+	-
	CGMCC 1.1868	-	+	-
	CGMCC 1.1869	-	+	-
	CMCC 51218	-	+	-
	CMCC 51120	-	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	-	-	+
	CGMCC 1.1476	-	-	+
	CGMCC 1.8000	-	-	+
	CMCC 26001	-	-	+
	CMCC 26003	-	-	+
	CMCC 26112	-	-	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	CMCC 54003	-	-	-
	CMCC 54004	-	-	-
	CMCC 54005	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	CMCC 44113	-	-	-
	CMCC 44001	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	CMCC 63301-5a	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	CMCC(B) 63501	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	CGMCC 1.2135	-	-	-
<i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>griseus</i>	CGMCC 4.139	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	CMCC 28001	-	-	-
<i>Pseudomonas aerug</i>	CMCC 10104	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	JCM 1149	-	-	-
<i>Lactobacillus fermentum</i>	JCM 1173	-	-	-
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	NBRC 15889	-	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i>	CGMCC 1.91	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp.	CICC 20071	-	-	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	CICC 10398	-	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	CGMCC 1.1997	-	-	-
<i>Streptococcus hemolyticus</i>	CMCC 32004-7a	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CMCC 10104	-	-	-
<i>Clostridium sporogenes</i>	CICC 10385	-	-	-

Note: <sup>a</sup>: Salm: *Salmonella* sp.; Shig: *Shigella* sp.; Stap: *Staphylococcus aureus*; +: Positive; -: Negative.

表 2 多重荧光定量 PCR 扩增用特异引物及探针序列

Table 2 Primers and probes for multiplex RT-PCR detection of *Salmonella*, *Shigella* and *Staphylococcus aureus*

Bacteria	Primers/probes (5'→3')	Product sizes (bp)	Genes	References
<i>Salmonella</i> sp.	GCTATTTTCGTCGGCATGA	261	NA <sup>a</sup>	[18]
	GCGACTATCAGGTTACCGTGGA			
	<b>FAM-TAGCCAGCGAGGTGAAAACGACAAAAGG-BHQ1</b>			
<i>Shigella</i> sp.	CTTGACCGCCTTTCCGATA	117	<i>ipaH</i>	[19-20]
	AGCGAAAGACTGCTGTCAAG			
	<b>CY3-AACAGGTCGCTGCATGGCTGGAA-BHQ1</b>			
<i>S. aureus</i>	TTCTTCACGACTAAATAAACGCTCA	160	<i>Sa442</i>	[21]
	GGTACTACTAAAGATTATCAAGACGGCT			
	<b>CY5-CAGAACACAATGTTTCCGATGCAACGT-BHQ2</b>			
<i>Salmonella</i> sp.	GCTATTTTCGTCGGCATGA	261	NA <sup>a</sup>	[18]

Note: NA<sup>a</sup>: Not available.

**1.4.2 免疫磁分离捕获:** 25 g 样品加入 225 mL NB, 均质后接种 10 倍稀释的不同浓度菌液, 制备成 250 mL 体系。将 250 mL 体系放置到免疫磁分离系统上进行循环富集 30 min。最后得到终体积为 1.5 mL 菌体-磁球复合物悬液, 取 200  $\mu$ L 涂布计数, 剩余全部用于 DNA 提取。

### 1.5 DNA 提取

纯菌 DNA 提取: 菌种按 1:50 (体积比) 比例接种至 5 mL NB, 37  $^{\circ}$ C 培养 24 h 后, 再次按 1:50 接种, 37  $^{\circ}$ C 培养 8 h, 取 1 mL 菌悬液做 10 倍梯度稀释, 各取 1 mL 使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒分别提取基因组 DNA, 测定  $OD_{260}/OD_{280}$ 、DNA 浓度, 剩余置于 -20  $^{\circ}$ C 保存备用。另取 1 mL 菌悬液做 10 倍梯度稀释, 取 100  $\mu$ L 适当的几个稀释倍数的培养物涂布于 NB 平板, 37  $^{\circ}$ C 过夜培养后, 计数初始培养物中每毫升培养物中的菌落形成单位(CFU)。

菌体-磁球复合物悬液的 DNA 提取: 使用高速低温离心机 12 000 r/min 将菌体-磁球复合物离心弃上清后, 使用上述试剂盒提取 DNA。

### 1.6 三重荧光定量 PCR

三重荧光定量 PCR 反应体系为 20  $\mu$ L: 10 mL TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2 $\times$ ), 3 种探针(2.5  $\mu$ mol/L)各 0.5–1.0  $\mu$ L (沙门氏菌 1.0  $\mu$ L、志贺

氏菌 0.5  $\mu$ L 和金黄色葡萄球菌 0.5  $\mu$ L), 3 种引物 (10  $\mu$ mol/L) 0.5–1.0  $\mu$ L (沙门氏菌 1.0  $\mu$ L、志贺氏菌 0.5  $\mu$ L、金黄色葡萄球菌 0.5  $\mu$ L), DNA 模板 1.0  $\mu$ L (检测限实验中 3 种菌 DNA 溶液各 1.0  $\mu$ L; 猪肉样品 DNA 提取实验中得到 DNA 溶液上样量为 1.0  $\mu$ L; 引物特异性实验中菌株 DNA 模板为 1.0  $\mu$ L), 补水至 20  $\mu$ L。反应条件: 95  $^{\circ}$ C 20 s; 95  $^{\circ}$ C 3 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。

以纯菌 DNA 做 10 倍梯度稀释后的 DNA 为模板进行荧光定量 PCR 扩增, 使用 SDS v1.4 软件分析数据, 以浓度的对数为横坐标,  $C_t$  值为纵坐标制作标准曲线。

### 1.7 特异性检测

**1.7.1 引物及探针特异性检测:** 使用表 1 中 37 种标准菌株(包括 16 株目标菌和 21 株非目标菌), 按照 1.6 的方法分别进行三重荧光定量 PCR 检测。

从沙门氏菌、志贺氏菌和金黄色葡萄球菌中提取 DNA 进行 PCR 扩增检测引物特异性。

**1.7.2 免疫磁球特异性检测:** 取沙门氏菌、志贺氏菌和金黄色葡萄球菌悬液, 做 10 倍梯度稀释至适当浓度, 使用一种免疫磁球分别去捕获 3 种菌株。条件如下: 将一种菌液 1 mL 加入到装有一种免疫磁球的离心管中, 室温结合 30 min, 磁分离 30 min, 弃悬浮液, 1 mL PBS 洗涤磁球-细菌复合

体 3 次,加入 1 mL 1×PBS 使离心管中的磁球充分分散,分别取洗涤后的上清和最终磁球悬液 400  $\mu$ L,涂布,37  $^{\circ}$ C 培养 24 h 后观察。用以进行特异性验证的菌株是表 1 中沙门氏菌 ATCC 14028、志贺氏菌 ATCC 12022 和金黄色葡萄球菌 ATCC 25923。

### 1.8 检测限的测定

取 3 种菌株经国标方法检验证实均为阴性的 40 份猪肉样品平均分成 4 组,并被分别接种  $10^0$ – $10^3$  CFU/g 浓度不同的 3 种菌(表 3),并按照材料与方法中的描述进行免疫磁分离捕获与 DNA 提取,RT-PCR 检测。每一组添加 1 份样品作为空白对照不接种菌株,使用相同方法检测。用以进行检测限测定的菌株是同 1.7.2 实验所用的菌株。

### 1.9 方法的相对灵敏度、特异性和准确度的评价

除用以测定检测限的样品外,另取 30 份样品分为 3 组,分别接种沙门氏菌、志贺氏菌和金黄色葡萄球菌(表 3),所用菌种与检测限测定用菌种相同。每一组添加 1 份样品作为空白对照不接种菌株,使用相同方法检测。参考 ISO 关于微生物学

方法比较的相关评价标准<sup>[22]</sup>,33 份样品,连同检测限实验的样品,一起被用以计算本研究方法的灵敏度、特异性和准确度。具体方法如下:接种目标菌的样品,该目标菌的 RT-PCR 检测结果为阳性,记为阳性;没有接种目标菌的样品,该目标菌的 RT-PCR 检测结果为阴性,记为阴性;没有接种目标菌的样品,但该目标菌的 RT-PCR 检测结果为阳性,记为阳性偏差;接种目标菌的样品,但该目标菌的 RT-PCR 检测结果为阴性,记为阴性偏差。使用接种有目标菌的样品占该目标菌 RT-PCR 检测结果也为阳性的样品的比例来表示方法的灵敏度;使用没有接种目标菌的样品占该目标菌 RT-PCR 检测结果也为阴性的样品的比例来表示方法的特异性;所有接种情况与 RT-PCR 检测结果一致的样品占到所有样品的比例记为灵敏度,即灵敏度=[检测阳性总数/(检测阳性总数+阴性偏差总数)] $\times$ 100%,特异性=[检测阴性总数/(检测阴性总数+阳性偏差总数)] $\times$ 100%,准确度=[(检测阳性总数+检测阴性总数)/样品总数] $\times$ 100%。

表 3 检测限以及灵敏度、特异性和准确度评价实验  
Table 3 Determination of LOD and estimation of SE, SP and AC

Inoculation Strains	Concentration level of strains (CFU/g)	No. of samples	RT-PCR results		
			Salm	Shig	Stap
<i>Salmonella</i> sp.	$10^1$	10	+	ND	ND
–	–	1	ND	ND	ND
<i>Shigella</i> sp.	$10^1$	10	ND	+	ND
–	–	1	ND	ND	ND
<i>S. aureus</i>	$10^1$	10	ND	ND	+
–	–	1	ND	ND	ND
<i>Salmonella</i> sp., <i>Shigella</i> sp., <i>S. aureus</i> <sup>b</sup>	$10^0$	10	+ <sup>a</sup>	ND	ND
–	–	1	ND	ND	ND
<i>Salmonella</i> sp., <i>Shigella</i> sp., <i>S. aureus</i> <sup>b</sup>	$10^1$	10	+	+	+ <sup>c</sup>
–	–	1	ND	ND	ND
<i>Salmonella</i> sp., <i>Shigella</i> sp., <i>S. aureus</i> <sup>b</sup>	$10^2$	10	+	+	+
–	–	1	ND	ND	ND
<i>Salmonella</i> sp., <i>Shigella</i> sp., <i>S. aureus</i> <sup>b</sup>	$10^3$	10	+	+	+
–	–	1	ND	ND	ND
Total		77			

Note: <sup>a</sup>: *Salmonella* was detected only in 3 samples, and this group was not used for calculating LOD, SE, SP and AC; <sup>b</sup>: Used for limit of detection test; <sup>c</sup>: Negative deviations detected; ND: Not detected; –: Negative control.

### 1.10 实际样品检测

从北京各大超市购买的 151 份猪肉样品, 25 g 添加 225 mL 改良营养肉汤(营养肉汤中加入 1% 甘氨酸)制备 250 mL 体系后, 37 °C、150 r/min 非选择性增菌 5 h, 然后使用 IMS-RT-PCR 进行检测。同时另取样品使用 GB 方法对沙门氏菌、志贺氏菌和金黄色葡萄球菌分别进行检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 特异性检测

**2.1.1 引物及探针特异性验证结果:** 三重荧光定量 PCR 检测验证引物特异性实验中, 沙门氏菌、志贺氏菌和金黄色葡萄球菌检测 RT-PCR 结果为阳性, 其余非目标菌均为阴性, 见表 1。

**2.1.2 免疫磁球特异性验证实验:** 实验结果显示沙门氏菌、志贺氏菌和金黄色葡萄球菌的特异性免疫磁球均具有理想的特异性(表 4), 平均值分别达到 95.93%、96.25% 和 97.97%, 并没有明显的非特异性吸附。

### 2.2 三重荧光定量 PCR 标准曲线

根据  $C_t$  值与初始菌液的浓度对数值绘制标准曲线, 沙门氏菌标曲  $R^2$  为 0.995 ( $y=-3.41x+41.66$ ), 志贺氏菌标曲  $R^2$  为 0.993 ( $y=-3.48x+40.82$ ),  $R^2$

为 0.992 ( $y=-3.55x+40.47$ )。表明在此 DNA 浓度的稀释范围内, 浓度与  $C_t$  值有很好的线性关系(图 1A、B)。

### 2.3 检测限的测定

4 组样品按照 1.4.2 方法接种梯度稀释的沙门氏菌、志贺氏菌和金黄色葡萄球菌, 250 mL 体系中沙门氏菌的终浓度为 0.2–2 000.0 CFU/g, 志贺氏菌的终浓度分别为 0.68–6 800.00 CFU/g, 金黄色葡萄球菌的终浓度为 0.96–9 600.00 CFU/g。接种最低浓度(0.20 CFU/g 沙门氏菌、0.68 CFU/g 志贺氏菌、0.96 CFU/g 金黄色葡萄球菌)的一组中, 只有 3 份样品检测出沙门氏菌, 均没有检出志贺氏菌和金黄色葡萄球菌, 故不作为检测限的有效数据使用。沙门氏菌、志贺氏菌和金黄色葡萄球菌的检测限分别达到 2.0、6.8 和 9.6 CFU/g。

### 2.4 方法的检测灵敏度、特异性和准确度的评价

60 个接种样品(检测限实验 30 个, 方法评估实验 30 个)和 7 个空白对照样品(检测限实验 4 个, 方法评估实验 3 个)被用以计算本研究方法的灵敏度、特异性和准确度, 见表 5。所有检测中只有在金黄色葡萄球菌的检测中发现一例阴性偏差; 3 种菌均没有阳性偏差的检出。

表 4 免疫磁球特异性实验  
Table 4 Specificity detection of IMBs

IMBs	Group	Strains								
		<i>Salmonella</i> sp.			<i>Shigella</i> sp.			<i>S. aureus</i>		
		No. 1 <sup>a</sup>	No. 2 <sup>a</sup>	Capture rate (%) <sup>b</sup>	No. 1	No. 2	Capture rate (%)	No. 1	No. 2	Capture rate (%)
Anti- <i>Salmonella</i> sp. IMBs	1	3	135	<b>97.83</b>	136	4	2.86	97	10	9.35
	2	4	159	<b>97.55</b>	130	2	1.52	100	4	3.85
	3	8	124	<b>93.94</b>	105	2	1.87	96	21	17.95
	4	7	118	<b>94.40</b>	107	2	1.83	100	2	1.96
Anti- <i>Shigella</i> sp. IMBs	1	225	22	8.91	5	124	<b>96.12</b>	280	10	3.45
	2	214	21	8.94	4	118	<b>96.72</b>	258	19	6.86
	3	215	34	13.65	5	127	<b>96.21</b>	226	17	7.00
	4	247	22	8.18	5	119	<b>95.97</b>	222	23	9.39
Anti- <i>S. aureus</i> IMBs	1	152	25	14.12	123	2	1.60	8	230	<b>96.64</b>
	2	192	16	7.69	119	3	2.46	6	247	<b>97.63</b>
	3	203	39	16.12	127	0	0.00	2	232	<b>99.15</b>
	4	219	22	9.13	108	0	0.00	4	254	<b>98.45</b>

Note: <sup>a</sup>: No. 1: Total number of colonies in supernatant (CFU/400  $\mu$ L); No. 2: Total number of colonies in sediment (CFU/400  $\mu$ L). <sup>b</sup>: Capture rate=No. 2/(No. 1 + No. 2).

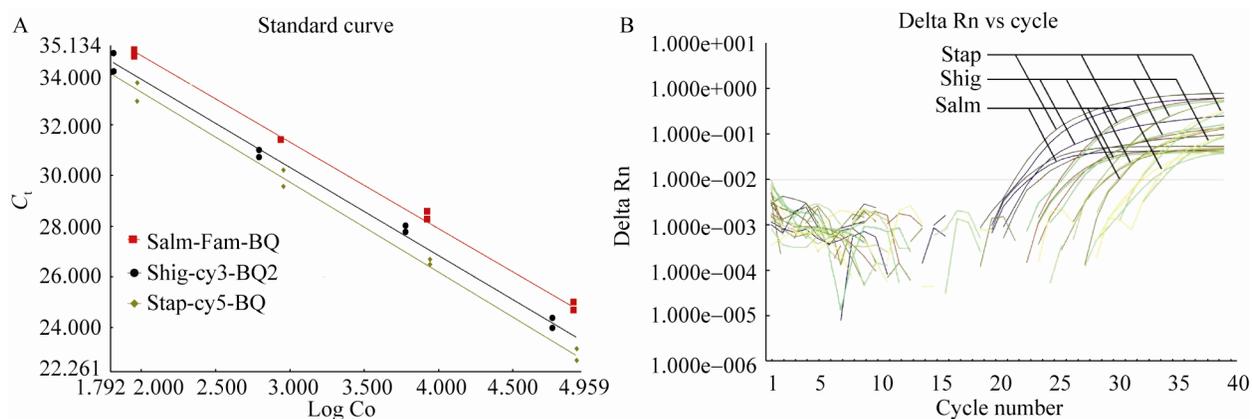


图 1 多重荧光定量 PCR 标准曲线(A)和扩增曲线(B)

Figure 1 Standard curve (A) and amplification curve (B) for multiplex RT-PCR

表 5 方法的灵敏度、特异性和准确度  
Table 5 SE, SP and AC of the IMS-multiplex RT-PCR method

Items	Strains			IMS-multiplex RT-PCR
	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Shigella</i> sp.	<i>S. aureus</i>	
Positive agreement	40	40	39	
Negative agreement	27	27	27	
Positive deviation	0	0	0	
Negative deviation	0	0	1	
Total number of samples	67	67	67	
Sensitivity <sup>a</sup> (%)	100	100	97.5	99.2
Specificity <sup>a</sup> (%)	100	100	100	100
Accuracy <sup>a</sup> (%)	100	100	98.5	99.5

Note: <sup>a</sup>: SE=[PA/(PA+ND)]×100%; SP=[NA/(NA+PD)]×100%; AC=[(PA+NA)/N]×100%.

## 2.5 实际样品检测

使用 GB 方法以及本研究的方法对 151 份猪肉样品进行的检测结果显示, GB 方法检出沙门氏菌阳性 2 例, RT-PCR 对此 2 份样品的检测结果也为阳性, 两种方法对其余样品中沙门氏菌的检测结果均为阴性。两种方法均未检测到志贺氏菌。GB 方法检出金黄色葡萄球菌阳性 8 例, RT-PCR 的检测结果为 9 例, 其中 1 例为阳性偏差: GB 方法检测为阴性, RT-PCR 检测为阳性。

## 3 讨论

食品中的复杂成分、培养基成分以及 DNA 提取过程中提取液的残留成分等都是 PCR 反应的潜在抑制因子, 会影响检测结果的准确性<sup>[23]</sup>。包被

有特异性免疫多克隆抗体的磁球能够与目标菌株特异性结合, 既能够保证对目标菌的高效富集, 又能够通过磁分离技术有效地将目标菌株与猪肉中的杂质分离, 实现对目标菌株的捕获。本研究使用的纳米免疫磁球在 180 nm 左右, 具有表面积大、溶液稳定性好、磁分离效率高等特点。3 种特异性多克隆抗体的特异性都高达 95% 以上。在提取革兰氏阳性菌 DNA 时要额外加入溶菌酶进行破壁处理, 为了提高金黄色葡萄球菌的 DNA 提取效率, 在增菌阶段特别加入 1% 甘氨酸, 甘氨酸对金黄色葡萄球菌的细胞壁生长有一定的抑制作用<sup>[24-26]</sup>。荧光定量 PCR 探针淬灭基团的选择大多为 TAMRA, 其本身发射的荧光会干扰实验; 而 BHQ 系列为非

荧光染料,淬灭报告基团时,自身不发射荧光,探针荧光本底比 TAMRA 低,检测灵敏度更高<sup>[27]</sup>。通过对富集条件、DNA 提取效率、PCR 反应条件的优化,本研究针对 3 种食源性致病菌的检测限均能够达到 10 CFU/g 及以下。目前食源性致病菌检测研究中通常使用检出率对不同方法进行比对,不够全面也不够科学。使用灵敏度、特异性和准确度 3 个参数来衡量本方法,更能体现本方法的可靠性,更具科学性。

对市场采购样品的检测当中,3 种致病菌的初始数量是不确定的,为了能够降低背景的影响,提高致病菌的数量,本研究采用一步增菌的方法,对菌株数量进行适量放大。通过 5 h 在改营养肉汤中的增菌,有效提高了目标菌的浓度,有利于后续 DNA 的提取。对从北京地区各大超市购买的 151 个鲜猪肉样品的检测结果显示,相比 GB 方法,本方法针对沙门氏菌和志贺氏菌的检测灵敏度、特异性和准确度均达到 100%。虽然针对金黄色葡萄球菌检测过程中发现一例阴性偏差,在超市购买的鲜猪肉样品的检测中也发现了一例假阳性,但是金黄色葡萄球菌的检测灵敏度、特异性和准确度都在 97%以上。这些实验结果显示本研究方法在针对鲜猪肉中沙门氏菌、志贺氏菌和金黄色葡萄球菌的同时检测中可以作为一种可靠的检测手段。

### 参考文献

- [1] Kotzekidou P. Survey of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 in raw ingredients and ready-to-eat products by commercial real-time PCR kits[J]. Food Microbiology, 2013, 35(2): 86-91.
- [2] Singh P, Mustapha A. Multiplex TaqMan detection of pathogenic and multi-drug resistant *Salmonella*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 166(2): 213-218.
- [3] Thiem VD, Sethabutr O, von Seidlein L, et al. Detection of *Shigella* by a PCR assay targeting the *ipaH* gene suggests increased prevalence of shigellosis in Nha Trang, Vietnam[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42(5): 2031-2035.
- [4] Schmelcher M, Korobova O, Schischkova N, et al. *Staphylococcus haemolyticus* prophage ΦSH2 endolysin relies on cysteine, histidine-dependent amidohydrolases/peptidases activity for lysis 'from without'[J]. Journal of Biotechnology, 2012, 162(2/3):

- 289-298.
- [5] Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins[J]. International Journal of Food Microbiology, 2000, 61(1): 1-10.
- [6] 陈君石. 食源性疾病成为我国头号食品安全问题[J]. 中国科技信息, 2012(9): 7.
- [7] 毛雪丹, 胡俊峰, 刘秀梅. 2003-2007年中国1060起细菌性食源性疾病流行病学特征分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2010, 22(3): 224-228.
- [8] 栗冬梅, 宋秀平, 王君, 等. TaqMan-MGB 探针检测文森巴尔通体博格霍夫亚种实时荧光定量 PCR 方法的建立及应用[J]. 微生物学报, 2013, 53(9): 976-983.
- [9] Yang K, Jenkins DM, Su WW. Rapid concentration of bacteria using submicron magnetic anion exchangers for improving PCR-based multiplex pathogen detection[J]. Journal of Microbiological Methods, 2011, 86(1): 69-77.
- [10] Taha EG, Mohamed A, Srivastava K, et al. Rapid detection of *Salmonella* in chicken meat using immunomagnetic separation, CHROMagar, ELISA and real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)[J]. International Journal of Poultry Science, 2010, 9(9): 831-835.
- [11] Xiao X, Yang X, Liu T, et al. Preparing a highly specific inert immunomolecular-magnetic beads for rapid detection and separation of *S. aureus* and group G *Streptococcus*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 75(5): 1209-1216.
- [12] Zhao Y, Ye M, Chao Q, et al. Simultaneous detection of multifood-borne pathogenic bacteria based on functionalized quantum dots coupled with immunomagnetic separation in food samples[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 57(2): 517-524.
- [13] Elizaquível P, Gabaldón JA, Aznar R. Quantification of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in non-spiked food products and evaluation of real-time PCR as a diagnostic tool in routine food analysis[J]. Food Control, 2011, 22(2): 158-164.
- [14] Garrido A, Chapela MJ, Román B, et al. Development of a multiplex real-time PCR method for simultaneous detection of *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri* and *Listeria monocytogenes* in processed food samples[J]. European Food Research and Technology, 2012, 234(4): 571-580.
- [15] Omiccioli E, Amagliani G, Brandi G, et al. A new platform for Real-Time PCR detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 in milk[J]. Food Microbiology, 2009, 26(6): 615-622.
- [16] GB/T 4789.4-2010. 食品安全国家标准-食品微生物学检验-沙门氏菌检验[S].
- [17] GB/T 4789.5-2012. 食品安全国家标准-食品微生物学检验-志贺氏菌检验[S].
- [18] GB/T 4789.10-2010. 食品安全国家标准-食品微生物学检验-金黄色葡萄球菌检验[S].
- [19] Wang LX, Li Y, Mustapha A. Rapid and simultaneous quantitation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*,

- and *Shigella* in ground beef by multiplex real-time PCR and immunomagnetic separation[J]. *Journal of Food Protection*, 2007, 70(6): 1366-1372.
- [20] Hartman AB, Venkatesan M, Oaks E, et al. Sequence and molecular characterization of a multicopy invasion plasmid antigen gene, *ipaH*, of *Shigella flexneri*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172(4): 1905-1915.
- [21] Thong K, Hoe S, Puthuchery SD, et al. Detection of virulence gene malaysian *Shigella* species by multiplex PCR assay[J]. *BMC Infectious Diseases*, 2005, 5(1): 8.
- [22] 徐义刚, 李苏龙, 李丹丹, 等. 食品中金黄色葡萄球菌 DNA 环介导恒温扩增快速检测方法的建立与应用[J]. *中国农业科学*, 2010, 43(8): 1655-1663.
- [23] ISO 16140. Protocol for the validation of alternative microbiological methods[S].
- [24] Fan W, Hamilton T, Webster-Sesay S, et al. Multiplex real-time SYBR Green I PCR assay for detection of tetracycline efflux genes of Gram-negative bacteria[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2007, 21(4): 245-256.
- [25] Okanishi M, Katagiri K, Furumai T, et al. Basic techniques for DNA cloning and conditions required for streptomycetes as a host[J]. *The Journal of Antibiotics (Tokyo)*, 1983, 36(2): 99-108.
- [26] Sagara Y, Fukui K, Ota F, et al. Rapid formation of protoplasts of *Streptomyces griseoflavus* and their fine structure[J]. *Japanese Journal of Microbiology*, 1971, 15(1): 73.
- [27] 吴胜, 夏焕章, 程杉. 黑暗链霉菌原生体制备、再生及其 DNA 转化条件的研究[J]. *沈阳药科大学学报*, 2001, 18(3): 4.

## 征 稿 简 则

### 1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、病毒学、酶工程、发酵工程、代谢工程等领域的最新研究成果, 产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究和改革等。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、名课讲堂、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

### 2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿, 凡不符合(投稿须知)要求的文稿, 本部恕不受理。

### 3 写作要求

来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

#### 3.1 图表

文中的图表须清晰简明, 文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm (占半栏), 大图的宽度应小于 17 cm (通栏)。

#### 3.2 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前、名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整, 不用缩写, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

期刊: [1] 刘杰, 成子强, 史宣玲. SARS 冠状病毒 *nsp14* 基因的克隆和表达[J]. *微生物学通报*, 2007, 34(2): 1-3.

[2] Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, et al. Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(39): 36514-36519.

图书: [3] 钱存柔, 黄仪秀. *微生物实验教程*[M]. 北京: 北京大学出版社, 2000: 4.

[4] 董志扬, 张树政, 方宣钧, 等. 海藻的生物合成及抗逆机理//华珞等. *核农学进展*[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 115-120.

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金项目(No. )

\*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2014-00-00; 接受日期: 2014-00-00; 优先数字出版日期([www.cnki.net](http://www.cnki.net)): 2014-00-00

(下转 p.2387)