

# 食源性病原微生物快速检测技术应用分析

刘璟璇

(商南县疾病预防控制中心 陕西 商洛 726300)

**摘要:**食物在加工和运输等过程中容易遭受病原微生物的污染,而带来食品安全问题,如何提高对食源性病原微生物的检测能力成为有关领域重点研究的方向。基于此,本文建立了一种基于荧光 PCR 的快速检测技术用于食源性病原微生物的检测,并对其进行了实际应用,该方法稳定且重复性好,能够满足实际检测的需要,对于相关检测工作有着重要的现实意义。

**关键词:**病原微生物;快速检测;检测技术

**前言:**目前,由于各种原因,因病原微生物引发食物中毒的情况仍然时有发生,显然,如何提升对食品中病原微生物的检测效率和检测准确度,仍是一项值得研究的问题。在以往的检测方法中,多采用传统检测方法,需要对病原微生物进行分离、培养和鉴定,其不仅效率偏低,且准确性也较低,由此,研究人员开始采用 PCR 快速检测技术进行检测。

## 1 实验材料和设备

本次实验主要针对食品样品中的沙门氏菌进行检测,样品选用鸡肉样品,对样品进行培养后,提取沙门氏菌样本及其 DNA,在-20℃保存待用。

同时,本次实验主要使用的仪器为荧光定量基因扩增仪,并使用 Bio-Rad 凝胶成像分析系统对实验进行检测。

## 2 实验方法

### 2.1 引物设计与合成

在本次引物设计过程中,参照 GenBank 中的沙门氏菌 DNA 序列,再使用 Prime Express 5.0 对引物进行设计,其上游引物位于 DNA 序列的第 17-37 位,其下游引物则位于 DNA 序列的 279-295 位,共计扩增 279bp。

### 2.2 采样和 DNA 提取

本实验所使用的鸡肉样品分别来源于某地超市和农贸市场,其中,样品分为鲜肉和冻肉,冻肉为刚进入冰柜时所采集,鲜肉则为货品刚上架时所采集。在使用无菌棉签采集后,放入培养基进行培养。在将样品培养一段时间后,对样品进行离心处理,取上层清液再进行离心和水浴加热,后置于一20℃条件下备用。

### 2.3 PCR 扩增

本次实验,经过优化后,PCR 反应体系为:SYBR Premix Ex Taq 12.5 μL,上下游引物分别为 1 μL,模板 DNA 为 1 μL。

在 PCR 反应过程中,先将样品在 94℃ 下进行一定时间的预变性处理,而后分别在 55℃ 和 72℃ 下进行反应,该反应周期重复循环 40 次之后,再在 72℃ 下进行延伸处理后停止反应,在计算机软件界面上观察反应结果,并根据得到的数据信息来进行后续的分析。

### 2.4 绘制标准曲线

在常规的肉汤培养基中培养沙门氏菌,并用涂板法对沙门氏菌液的浓度进行测定。先用煮沸法提取 DNA,再将 DNA 液体逐步稀释到 10<sup>6</sup>CFU/mL,最后将稀释完成的 DNA 液体进行 PCR 扩增,实验结果用于标准曲线的绘制,在绘制过程中,设置 DNA 液体浓度为横坐标,PCR 反应的循环数(Ct)为纵坐标。

### 2.5 组织样品检测

将采集到的鸡肉样品进行培养,并提取其中的 DNA,采用上文所述的 PCR 快速检测方法进行检测,根据反应后的 Ct 值判断样品中是否存在沙门氏菌。

## 3 结果与讨论

### 3.1 沙门氏菌引物的设计和检测

通过对相关引物进行 PCR 扩增和电泳处理后,形成如图 1 所示的单带,为 279bp,完全符合预期的基因片段大小。再对该片段的碱基序列进行测定,与 NCBI 中的标准沙门氏菌基因序列相对比发现,二者具有 100% 的相似度。

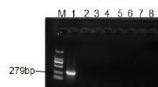


图 1 电泳检测结果

### 3.2 引物特异性检测

以稀释后的沙门氏菌 DNA 为模板进行定量 PCR 检测,其具体检测结果如表 1 所示。

表 1 定量 PCR 检测结果

浓度 梯度	101	102	103	104	105	106
Ct 值	25	23	21	18	14	11

(其中,浓度梯度单位为 CFU/mL)

根据表 1 中的数据不难发现,二者呈现出良好的线性关系,经计算,其拟合曲线方程为  $Y=-2.65X+27.94$ ,相关系数为 0.984,拟合度较好。

同时,在 PCR 检测中,未发现其他常见菌类,诸如金黄色葡萄球菌、奇异变形杆菌、链球菌等的阳性曲线,这表明沙门氏菌引物具有较强特异性,可继续应用于后续的实验检测。

### 2.3 重复性实验结果

按照 10 倍梯度稀释的方法稀释沙门氏菌 DNA,后选取两个不同浓度的 DNA 液体,对其采用 PCR 反应,重复反应三次,根据反应后得到的 Ct 值,计算组内的变异系数,计算后,从表 2 中的数据可以得知,两个浓度的 Ct 值变异系数为 0.3%,符合实际要求,这表明本次实验所建立的 PCR 快速检测方法稳定性较好。

表 2 沙门氏菌 Ct 值变异系数

样品稀 释度	Ct 值			标准差	变异系数 (%)
	1st	2nd	3rd		
10 <sup>6</sup>	10.17	10.10	10.14	0.029	0.3
10 <sup>4</sup>	13.52	13.57	13.47	0.041	0.3

(其中,样品稀释度单位为 CFU/mL)

### 2.3 PCR 快速检测方法的实际应用

使用灭菌棉签涂抹鸡肉样品表面后,将其放置于肉汤培养基中,培养一段时间后,使用上文中相同的煮沸法提取 DNA,再使用已经建立的 PCR 检测方法进行检测,如出现 Ct 值,则证明检测出沙门氏菌的 DNA,经全面检测后发现,所有样品中,有约 80% 的鸡肉样品中检出沙门氏菌。这表明该地区的鸡肉类产品的食品安全情况不容乐观,仍需要采取进一步的应对措施<sup>[1-3]</sup>。

**结束语:**在本次研究中,建立了效率和准确度均较高的荧光定量 PCR 检测方法,与以往所建立的快速检测方法相比,进一步降低了检测时间,且准确度也相应提升,更为高效准确,对于实际应用而言有着重要的意义。预计,未来随着科学技术的进一步发展,该检测方法也将得到进一步优化,为后续食源性病原微生物快速检测工作奠定更好的基础。

### 参考文献

- [1]王俊涛,沈静雯,陆利霞,卢一辰,刘元键,熊晓辉.食源性病原菌的富集与检测复合技术研究进展[J].食品工业科技:1-11[2021-05-07].
- [2]倪阳.实时荧光定量 PCR 在食品致病菌检测中的应用[J].食品安全导刊,2020(21):161.
- [3]关玉婷.牛乳中三种致病菌基因快速检测方法的建立[D].吉林大学,2020.