

# S.Heidelberg 血清型特异性基因筛选及 PCR 检测方法 的建立与应用

Mining of serotype specific genes and establishment of a PCR for  
detection *Salmonella enterica* serovar Heidelberg

翟立公 郭元新 王俊颖 王蓓蓓

ZHAI Li-gong GUO Yuan-xin WANG Jun-ying WANG Bei-bei

(安徽科技学院,安徽 滁州 233100)

(Anhui Science and Technology University, Chuzhou, Anhui 233100, China)

**摘要:**海德堡沙门氏菌(*Salmonella enterica* serovar Heidelberg, SH)是沙门氏菌属内重要的致病性血清型。通过对 SH 基因组序列进行 BLAST 比对和 PCR 验证,筛选出了 4 个 SH 血清型特异性基因(*SeHA\_C2639*、*SeHA\_C2640*、*SeHA\_C3259* 和 *SeHA\_C3258*)。以 *SeHA\_C3258* 作为靶点设计引物 pHAm8(350 bp)和沙门氏菌属特异性引物 139-141(284 bp),建立 SH 的 PCR 检测方法,并对其应用效果进行评价。结果表明,经 55 株不同血清型的沙门氏菌和其他常见食源性致病菌证明,该检测体系具有较好的特异性,纯菌菌落灵敏度为  $6.1 \times 10^2$  CFU/mL。以浓度为  $N \times 10^5 \sim N \times 10^1$  CFU/mL 的大肠杆菌或鼠伤寒沙门氏菌为干扰菌时,该体系对  $10^2$  CFU/mL 的 SH 检测结果无影响。人工污染 SH 的牛奶样品,经 8 h 培养,检测限达 1.52 CFU/mL。该检测方法能快速、准确检测出食品中的 SH,有利于在食品安全领域中的应用。

**关键词:**海德堡沙门氏菌;血清型特异性基因;聚合酶链式反应

**Abstract:** *Salmonella enterica* serovar Heidelberg, (SH) is pathogenic serotypes within *Salmonella*. Using BLAST and PCR validation for all CDSs of SH, four serovar-specific genes were identified including *SeHA\_C2639*, *SeHA\_C2640*, *SeHA\_C3259* and *SeHA\_C3258*. A PCR protocol was developed by pHAm8 (350 bp) of SH-specific primer and 139-141 (284 bp) of *Salmonella*-specific primer and evaluated for the detection of SH. The result showed that the 55 strains of

serotype of *Salmonella* and other common foodborne pathogens proved that the PCR assay had very good specificity for the detection of SH. The detection limit was  $6.1 \times 10^2$  CFU/mL in pure culture. It was shown that *S. Typhimurium* and *Escherichia coli* as interfering bacteria up to concentrations of  $N \times 10^5 \sim N \times 10^1$  CFU/mL, respectively, did not interfere with PCR detection of SH. In artificially contaminated milk, the protocol could detect less than 1.52 CFU/mL after 8 h enrichment. The detection method could quickly and accurately detect food SH, application in the field of food safety in favor.

**Keywords:** S. Heidelberg; serotype-specific genes; PCR

沙门氏菌(*Salmonella*)属于肠杆菌科的革兰氏阴性菌,是公认的重要食源性致病菌之一<sup>[1]</sup>。近年来中国沙门氏菌在畜禽制品中检出率高达 20%,相比欧美地区形势更为严峻<sup>[2-4]</sup>。虽然沙门氏菌的血清型较多,已经达到 2 600 多种,但污染食品并且造成食源性疾病的主要集中在肠炎沙门氏菌亚种的部分血清型当中。经研究<sup>[5-6]</sup>发现,食品中污染沙门氏菌的血清型根据地域、年份和食品种类不同而存在变化。据报道<sup>[1,7]</sup>,深圳地区鸡肉中德比沙门氏菌和海德尔堡沙门氏菌(SH)检出率较高,分别达到 37.9%和 20.7%;广西地区水产品中海德尔堡沙门氏菌(SH)检出率为 1.35%。因此,针对沙门氏菌优势血清型的检测具有更重要的意义。

针对沙门氏菌血清型的检测,目前主要采用传统培养的方法(GB/T 4789.4—2016),包括增菌培养、选择性增菌培养、显示培养、生化鉴定和血清型分型,需经过 7 d 左右才能获得检测报告,很难满足现今社会的需要,如果血清的特异性不强或凝集反应较为迟缓,将会对分型造成极大的影响<sup>[8]</sup>。利用分子检测技术(PCR)一般能在 1~2 d 内获得结果,而且具有操作过程简单、成本低、检测结果容易判断等优势<sup>[9-10]</sup>。对于食源性致病菌的分子检测技术来说目的靶点

**基金项目:** 高校优秀青年人才支持计划重点项目(编号: gxyqZD2016219);安徽科技学院人才引进项目(编号: SPYJ201602)

**作者简介:** 翟立公,男,安徽科技学院讲师,博士。

**通信作者:** 郭元新(1971—),男,安徽科技学院教授,博士。

E-mail: guoyuanxiner@163.com

**收稿日期:** 2018-01-18

的特异性就成为检测效果的核心问题。Collette Fitzgerald 等<sup>[11]</sup>利用沙门氏菌 O 抗原合成 *rfb* 基因簇的各基因为靶点,建立了沙门氏菌血清群和甲型副伤寒沙门氏菌的 PCR 的检测技术,经验证准确率达到 94.3%。由于沙门氏菌的抗原结构呈现多样性,以此作为靶点对血清型的鉴定需要设计多对引物或多个 PCR 程序,将造成引物之间的干扰,影响整个体系的检测灵敏度。有研究<sup>[12]</sup>报道可以通过微生物基因组信息及比较基因组方法筛选目的菌株的特异性基因作为检测靶点。该方法获得靶基因较为准确,而且在沙门氏菌其他血清型的检测过程中已经被应用。Yin Ngan 等<sup>[13]</sup>利用该方法获得了甲型副伤寒沙门氏菌的血清型特异性基因,并以此为靶点设计多重 PCR 检测体系。随着生物信息学的不断发展,美国国立生物技术信息中心(NCBI)公布的沙门氏菌不同血清型的全基因组序列越来越多,更有利于沙门氏菌血清型特异性基因的筛选。

沙门氏菌是一类常见的食源性致病菌,随着近年来对沙门氏菌污染状况和血清型调查<sup>[3-4]</sup>发现,沙门氏菌污染事件大多均是一个或几个血清型的污染爆发为主,其中 SH 为禽蛋肉奶制品的优势血清型,而且该血清型的分子检测靶点尚未被报道。本研究拟以 S.Heidelberg(SH)为研究对象,利用 GenBank 数据库中的 SH 菌株基因组信息及 BLAST 系统,筛选 SH 血清型特异性基因,并以此为检测靶点建立 SH 检测的 PCR 体系。为 SH 在食品中的快速检测和疫情爆发的追溯提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

营养肉汤、营养琼脂培养基等:北京陆桥技术股份有限公司;

Genview 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(GV-B-DNA-50):广州鼎国生物技术有限公司;

DNA 标准分子量 DS2000、Taq DNA 聚合酶和 2×Taq Master:广州东盛生物科技有限公司;

引物:上海生工生物工程有限公司;

牛奶及其制品:市售;

PCR 扩增仪:Life Touch 型,杭州博日科技有限公司;

数码凝胶成像分析仪:JS-1075 型,上海培清科技有限公司;

二级生物安全柜:BSC-1100 II A2-X 型,济南鑫贝西生物技术有限公司;

本试验共涉及 55 株菌株(包括 44 株不同血清型的沙门氏菌和 11 株非沙门氏菌):菌株来源及数量见表 1。

### 1.2 试验方法

1.2.1 特异性基因筛选 从 NCBI(National Center for Biotechnology Information)获取 SH 血清型 SL476 菌株(NC\_011083.1)的全基因组序列数据。对 SH 的每个基因编码序列进行 BLASTN 核酸序列对比,与沙门氏菌目的血清型不同菌株的同源性完全一致,并且在其他生物中不具有同源性的基因编码序列为 SH 的准特异性基因。基因 BLASTN 比

对过程中,当 Query cover(覆盖率)值为 100%,同时 E 值趋近于 0(E 值<10<sup>-200</sup>)时,作为 SH 的血清型准特异性基因。

1.2.2 DNA 提取 按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒(DP302)说明书操作和热裂解法<sup>[14]</sup>提取微生物基因组 DNA,并将获取的基因组 DNA 置于-20℃冰箱保存备用。

1.2.3 SH 血清型特异性引物设计及验证 以获得 SH 的准特异性基因作为模板,设计引物(Oligo 6.0 和 Primer 5.0 等软件)。要求引物自身无发夹结构,引物之间不形成二聚体结构,引物扩增的目的产物长度在 1 000 bp 以下,上下游引物的退回温度接近且为 60℃左右,BLASTN 验证所选引物的特异性,作为 SH 血清型的特异性引物。

PCR 反应体系(25 μL):2×Taq Master 12.5 μL、上下游引物(10<sup>-5</sup> mol)各 1 μL、TaqDNA 聚合酶(2.5 U/μL)0.5 μL、模板(表 1 中 55 株菌株)1 μL、ddH<sub>2</sub>O 9 μL;

PCR 反应程序:95℃预变性 5 min; 95℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 45 s,30 个循环; 72℃后延伸 10 min。

1.2.4 SH 血清型特异性引物灵敏度评价 提取 SH 的基因组 DNA 测定浓度,并进行 10 倍梯度稀释,达到 10<sup>-8</sup>的稀释度。每个稀释度取 1 μL 作为模板,以上述引物进行 PCR 扩增,验证各个引物的灵敏度。

1.2.5 建立 SH 血清型 PCR 检测体系 将获得特异性和灵敏度均较好的 SH 血清型特异性引物与沙门氏菌属特异性引物 139-141 共同建立 SH 血清型 PCR 检测体系(优化过程略)。最终确定 PCR 的反应体系为:2×Taq Master 12.5 μL、TaqDNA 聚合酶(2.5 U/μL)1 μL、模板 3 μL、ddH<sub>2</sub>O 2.5 μL、引物 139-141(10<sup>-5</sup> mol)各 1.5 μL 和引物 pHAm8(10<sup>-5</sup> mol)各 1.5 μL。优化后的 PCR 反应条件:94℃预变性 10 min; 94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 60 s,30 个循环; 72℃后延伸 10 min。PCR 产物通过 2.0%的琼脂糖凝胶进行电泳。

1.2.6 特异性和菌落灵敏度评价 提取沙门菌属内各血清型菌株和常见非沙门菌-食源性致病菌的全基因组 DNA,并以此为模板,使用 SH 血清型检测 PCR 体系进行扩增,验证其特异性。

将 SH 接种到 LB 液体培养基上,37℃培养 12 h,平板菌落计数获得菌液的初始浓度。通过无菌的生理盐水进行 10 倍梯度稀释,各稀释度取 1 mL,利用热裂解法提取基因组 DNA 作为模板,验证 PCR 检测体系的灵敏度。

1.2.7 抗干扰性评价 选取与沙门菌同源性较高的属外大肠杆菌 ATCC35150 及 SH 血清型同一血清群的鼠伤寒沙门菌 CMCC51005 作为检测体系的干扰菌。过夜培养,通过平板菌落计数法获得 2 种菌液的初始浓度,浓度梯度稀释到  $N \times 10^5 \sim N \times 10^1$  CFU/mL,并分别与浓度为  $N \times 10^2$  CFU/mL 的 SH 菌共同接种于 LB 培养基中,37℃培养 10 h,提取基因组 DNA 进行 PCR 验证,电泳判断 PCR 检测体系抗杂菌的干扰能力。

1.2.8 人工污染样品检测 过夜培养 SH(CICC21487),采用平板菌落计数法获得菌液的初始浓度,生理盐水进行 10 倍梯度稀释,将不同稀释度的菌液,各取 1 mL 转接入 24 mL

表 1 试验菌株及引物特异性检测结果<sup>†</sup>  
Table 1 Strains used in the test of specificity

| 菌株                                 | 来源        | 数量 | <i>SeHA_C2639</i><br>(pHAm1) | <i>SeHA_C2640</i><br>(pHAm3) | <i>SeHA_C3258</i><br>(pHAm8) | <i>SeHA_C3259</i><br>(pHAm9) | <i>invA</i><br>(139-141) |
|------------------------------------|-----------|----|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------|
| <i>S. Heidelberg</i>               | CICC21487 | 1  | +                            | +                            | +                            | +                            | +                        |
| <i>S. Heidelberg</i> * 1           |           | 5  | +                            | +                            | +                            | +                            | +                        |
| <i>S. Paratyphi A</i>              | CMCC50001 | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | +                        |
| <i>S. Saintpaul</i>                | CICC21486 | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | +                        |
| <i>S. Paratyphi B</i>              | CICC21495 | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | +                        |
| <i>S. Typhimurium</i>              | CVCC3384  | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | +                        |
| <i>S. Typhimurium</i> * 2          |           | 3  | —                            | —                            | —                            | —                            | +                        |
| <i>S. Bredeney</i> * 2             |           | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | +                        |
| <i>S. Derby</i> * 2                |           | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | +                        |
| <i>S. Paratyphi C</i>              | CICC21512 | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | +                        |
| <i>S. Montevideo</i>               | CICC21588 | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | +                        |
| <i>S. Jerusalem</i>                | CICC21651 | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | +                        |
| <i>S. Bonn</i>                     | CICC21677 | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | +                        |
| <i>S. Choleraesuis</i>             | ATCC13312 | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | +                        |
| <i>S. Thompson</i>                 | CICC21480 | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | +                        |
| <i>S. Potsdam</i>                  | CICC21500 | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | +                        |
| <i>S. Braenderup</i>               | ATCC19812 | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | +                        |
| <i>S. Bonariensis</i>              | CICC21496 | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | +                        |
| <i>S. Bovismorbificans</i>         | CICC21499 | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | +                        |
| <i>S. Kentucky</i>                 | CICC21488 | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | +                        |
| <i>S. Bazenheid</i>                | CICC21587 | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | +                        |
| <i>S. Thphi</i>                    | CMCC50071 | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | +                        |
| <i>S. Enteritidis</i>              | CMCC50071 | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | +                        |
| <i>S. Enteritidis</i> * 2          |           | 2  | —                            | —                            | —                            | —                            | +                        |
| <i>S. Dublin</i>                   | CICC21497 | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | +                        |
| <i>S. Miami</i>                    | CICC21509 | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | +                        |
| <i>S. Eastbourne</i>               | CICC21508 | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | +                        |
| <i>S. Anatum</i>                   | CICC21498 | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | +                        |
| <i>S. Mleagridis</i>               | CICC21511 | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | +                        |
| <i>S. London</i> * 2               |           | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | +                        |
| <i>S. Senftenberg</i>              | CICC21502 | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | +                        |
| <i>S. Aberdeen</i>                 | CICC21492 | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | +                        |
| <i>S. Blockley</i>                 | CICC21489 | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | +                        |
| <i>S. Adelaide</i>                 | CICC21505 | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | +                        |
| <i>S. Wandsworth</i>               | CICC21504 | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | +                        |
| <i>S. Dakar</i>                    | CICC21507 | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | +                        |
| <i>S. Agona</i>                    | CICC21586 | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | +                        |
| <i>Escherichia coli</i>            | ATCC35150 | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | —                        |
| <i>Enterococcus.faecalis</i>       | ATCC12953 | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | —                        |
| <i>Enterococcus.faecalis</i>       | ATCC29212 | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | —                        |
| <i>Enterococcus.avium</i>          | ATCC14025 | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | —                        |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>       | ATCC13884 | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | —                        |
| <i>Staphylococcus aureus</i>       | ATCC29213 | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | —                        |
| <i>Serratia marcescens</i>         | CICC10187 | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | —                        |
| <i>Bacillus pumilus</i>            | CMCC63202 | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | —                        |
| <i>Bacillus cereus</i> * 2         |           | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | —                        |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> * 2 |           | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | —                        |
| <i>Listeria monocytogenes</i>      | CICC21662 | 1  | —                            | —                            | —                            | —                            | —                        |

† \* 1 实验室分离的 *S. Heidelberg* ; \* 2 实验室分离的非 *S. Heidelberg*。

牛奶样品(市售,无菌),混匀,再转入 225 mL LB 液体培养基中,37 ℃ 增菌分别培养 6,8,10 h,分别提取基因组 DNA,进行检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 SH 血清型特异性基因筛选及相关引物灵敏度评价

通过 BLASTN 系统对 SH 的全基因组序列数据进行分析,并通过 PCR 验证(表 1),最终鉴定 4 个 SH 血清型特异性基因(表 2)。通过分析以上基因的功能注释,发现 4 个基

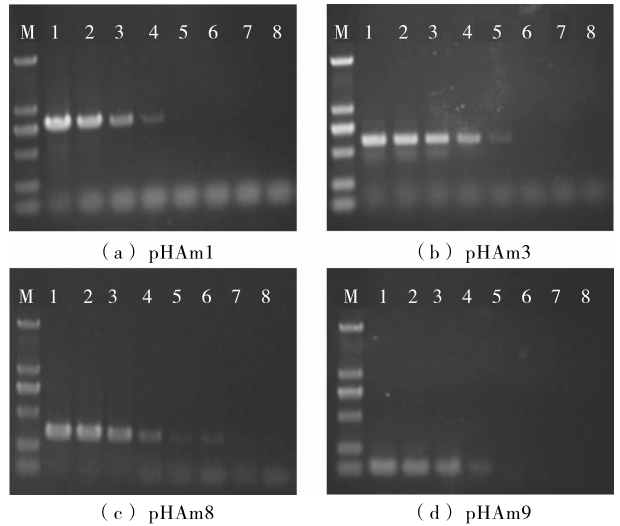
因编码的蛋白均具有生物学活性,无编码假设蛋白。

以上述 4 个基因为模板分别设计 SH 血清型 DNA 检测引物,引物序列见表 2。提取过夜培养的 SH(CICC21487)基因组 DNA,无菌水梯度稀释,各稀释度取 1 μL,相同条件下进行 PCR 扩增,比较不同引物的模板灵敏度。图 1 表明,pHAm1 和 pHAm9 引物的 DNA 灵敏度为 14 pg/μL,pHAm3 引物的为 1.4 pg/μL;当模板浓度达到 140 fg/μL 时,只有 pHAm8 引物能获得目的条带。因此,选取 pHAm8 引物作为 SH 血清型 PCR 检测特异性引物。

表 2 引物序列及 PCR 产物大小

Table 2 Primer sequences and the length of PCR

| 特异性基因      | 引物名称    | 引物序列(5'~3')                   | PCR 产物/bp | T <sub>m</sub> /℃ |
|------------|---------|-------------------------------|-----------|-------------------|
| SeHA_C2639 | pHAm1-f | ACAACCCAAGAGGACGATGC          | 788       | 59.6              |
|            | pHAm1-r | ATTACTTTTGTATTGGATTGTATTGCTAT |           | 59.1              |
| SeHA_C2640 | pHAm3-f | ATAGTGGTTTTAGATGTTGGGATAGAT   | 598       | 58.9              |
|            | pHAm3-r | TTTACCTTAGTATTCCTTTTTCGTGAG   |           | 60.0              |
| SeHA_C3258 | pHAm8-f | TAACCAGGTCTTTTTGTTCGGC        | 350       | 61.2              |
|            | pHAm8-r | AGGTTATCACTGTTGTATGTTTCGC     |           | 59.9              |
| SeHA_C3259 | pHAm9-f | GTCACCAACCCCTACTCAGCC         | 121       | 60.8              |
|            | pHAm9-r | TGTCATACCAGGCATCAACGA         |           | 59.5              |
| invA       | 139     | GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA   | 284       | 60.0              |
|            | 141     | TCACGCACCGTCAAGGAACC          |           | 60.0              |



M. DS2000 (100, 250, 500, 750, 1 000, 2 000 bp) 1. 14 ng/μL 2. 1.4 ng/μL 3. 140.0 pg/μL 4. 14.0 pg/μL 5. 1.4 pg/μL 6. 140.0 fg/μL 7. 14.0 fg/μL 8. 1.4 fg/μL

图 1 PCR 检测海德堡沙门氏菌(DNA)灵敏度  
Figure 1 Detection sensitivity (DNA) of PCR for S. Heidelberg

### 2.2 SH 血清型 PCR 检测特异性评价

将实验室保存的 44 株沙门菌和 11 株非沙门菌提取全基因组 DNA 进行 PCR 检测,对该体系的特异性进行验证,结果见图 2 和表 1。结果表明,当检测样品中有 SH 菌时,能同时获得 2 条扩增条带(284,350 bp);当检测非 SH 的沙门菌时,只能得到 284 bp 的扩增条带;当检测非沙门氏菌时,

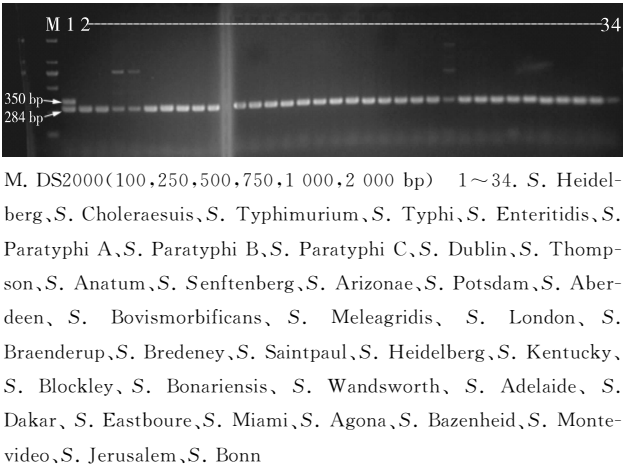
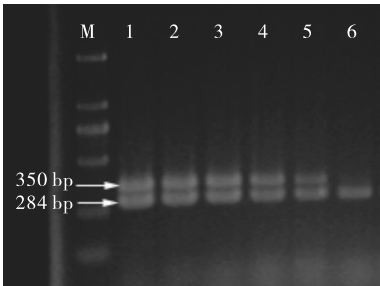


图 2 双重 PCR 检测特异性  
Figure 2 Specificity of double PCR for detecting Salmonella strains

无任何 PCR 扩增条带产生。该结果与 Park 等<sup>[15]</sup>报道的结果一致,对 SH 均能表现较好的特异性,但检测体系中涉及的引物及检测靶点均不一样。

### 2.3 SH 血清型 PCR 检测灵敏度评价

将过夜培养的 SH 菌液,用无菌水进行梯度稀释得到浓度为 6.1×10<sup>6</sup>~61 CFU/mL 的稀释液。各梯度取 1 mL 菌悬液,提取基因组 DNA,在最优 PCR 体系下进行扩增(图 3)。结果表明,该 PCR 反应体系中 pHAm8 引物对 SH 的检测为 6.1×10<sup>2</sup> CFU/mL,139-141 引物对沙门菌的检测限能达到 61 CFU/mL。



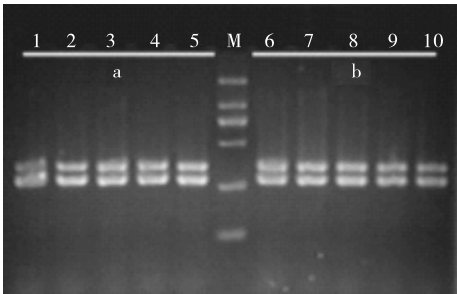
M. DS2000(100,250,500,750,1 000,2 000 bp) 1~6. SH 菌液浓度分别为  $6.1 \times 10^6$ ,  $6.1 \times 10^5$ ,  $6.1 \times 10^4$ ,  $6.1 \times 10^3$ ,  $6.1 \times 10^2$ ,  $6.1 \times 10^1$  CFU/mL

图 3 双重 PCR 检测体系活菌灵敏度

Figure 3 Sensitivity of double PCR for detection of viable cells

2.4 SH 血清型 PCR 检测抗干扰能力评价

为检测该双重 PCR 反应体系在干扰菌存在时的扩增效果,取不同浓度的鼠伤寒沙门氏菌(CMCC51005)和大肠杆菌(ATCC35150)作为干扰菌与 SH 共同培养,再提取基因组 DNA 进行 PCR 验证。将鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌分别稀释为  $3.2 \times 10^5 \sim 3.2 \times 10^1$  CFU/mL 和  $6.9 \times 10^5 \sim 6.9 \times 10^1$  CFU/mL,每个稀释度中分别接入浓度为  $7.4 \times 10^2$  CFU/mL 的 SH 菌悬液,37 ℃ 培养 8 h,提取混合菌液的 DNA 进行 PCR 检测,结果见图 4。当鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌的浓度在所取菌悬液浓度范围时,该反应体系的双重 PCR 结果的 2 对引物(139-141 和 pHAm8)均可获得清晰的目的条带产物,不会影响最终检测结果的判断。表明该双重 PCR 检测体系针对于大肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌具有一定的抗干扰能力。



1~5. 鼠伤寒沙门氏菌菌液浓度分别为  $3.2 \times 10^5$ ,  $3.2 \times 10^4$ ,  $3.2 \times 10^3$ ,  $3.2 \times 10^2$ , 32 CFU/mL 6~10. 大肠杆菌菌液浓度分别为  $6.9 \times 10^5$ ,  $6.9 \times 10^4$ ,  $6.9 \times 10^3$ ,  $6.9 \times 10^2$ , 69 CFU/mL

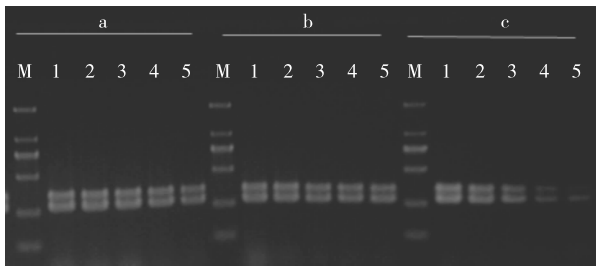
图 4 双重 PCR 抗干扰性评价

Figure 4 Anti-interference of double PCR for detection of S. Heidelberg

2.5 SH 血清型 PCR 检测人工污染评价

将过夜培养的 SH 菌悬液,梯度稀释为  $1.52 \times 10^4 \sim 1.52$  CFU/mL 等浓度,每个稀释度各取 1 mL 接入市售牛奶(24 mL),再转接到 225 mL TSB 液体培养基中分别进行 6, 8, 10, 12 h 的增菌培养,试剂盒法提取基因组 DNA,PCR 扩增进行检测,结果见图 5。当扩大培养 6 h 时,初始含菌量为  $1.52 \times 10^2$  CFU/mL 的牛奶样品中能够检测出 SH;牛奶样品初始 SH 污染量为 1.52 CFU/mL,需增加培养 8 h 以上才能

获得阳性检测结果。该反应体系在牛奶样品中的检测限略低于 Kim 等<sup>[16]</sup>针对于沙门氏菌多个血清型建立的多重 RT-PCR 检测体系在食品样品中的检测限。



(a) 扩大培养 10 h (b) 扩大培养 8 h (c) 扩大培养 6 h 1~5. SH 菌液浓度分别为  $1.52 \times 10^4$ ,  $1.52 \times 10^3$ ,  $1.52 \times 10^2$ , 15.2, 1.52 CFU/mL

图 5 人工污染牛奶样品 SH 双重 PCR 检测结果

Figure 5 Detection results of artificially contaminated milk of S. Heidelberg

3 结论

本研究利用分子信息学和比较基因组技术,筛选到了 4 个 SH 的血清型特异性基因,分别是 *SeHA\_C2639*, *SeHA\_C2640*, *SeHA\_C3259* 和 *SeHA\_C3258*。同时 *SeHA\_C3258* 作为 SH 血清型特异性基因设计引物 pHAm8(扩增 350 bp)和沙门氏菌属特异性引物 139-141(284 bp)共同建立 SH 检测的双重 PCR 检测方法。通过对该检测方法的特异性、灵敏度、抗干扰能力和人工污染评价,表明该方法具有较高的灵敏度和特异性,相较于传统培养方法能够节省大量的成本和时间,具有较好的应用价值。但随着现代食品工业的快速发展,对微生物检测的时效性和现场检测的要求越来越高,利用筛选的靶基因建立更快速的核酸恒温扩增检测技术将是未来的发展方向。

参考文献

[1] LIN Da-chuan, YAN Mei-ying, LIN Song, et al. Increasing prevalence of hydrogen sulfide negative *Salmonella* in retail meats[J]. Food Microbiology, 2014, 43: 1-4.  
[2] YANG Bao-wei, XI Mei-li, WANG Xin, et al. Prevalence of *Salmonella* on Raw Poultry at Retail Markets in China[J]. Journal of Food Protection, 2011, 74(10): 1 724-1 728.  
[3] WANG Ye-ru, CHEN Qian, CUI Sheng-hui, et al. Enumeration and Characterization of *Salmonella* Isolates from Retail Chicken Carcasses in Beijing, China[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2014, 11(2): 126-132.  
[4] 朱冬梅, 彭珍, 刘书亮, 等. 肉鸡屠宰加工过程中沙门氏菌的污染情况及其耐药性分析[J]. 食品科学, 2014, 35(17): 214-219.  
[5] 韩晗, 韦晓婷, 魏映, 等. 沙门氏菌对食品的污染及其导致的食源性疾病[J]. 江苏农业科学, 2016(5): 15-20.  
[6] 方欣, 李春. 安徽地区腹泻病人粪便标本中沙门菌分离及其血清型鉴定[J]. 中国人兽共患学报, 2015(2): 135-138.  
[7] 吕素玲, 韦程媛, 姚雪婷, 等. 2010 年广西食品中沙门氏菌污染状况和血清型分布及耐药谱的研究[J]. 应用预防医学, 2012 (3): 137-141, 170.

(下转第 57 页)

表 2 3 种禁用物质气相色谱—质谱检测方法的线性方程、相关系数、线性范围、检出限以及定量限  
Table 2 Linear equations, correlation coefficients, linear ranges, detection limits and quantitation limits  
for the GC-MS analysis method

| 化合物            | 线性方程                                     | 相关系数 $R^2$ | 线性范围/<br>( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) | 检出限/<br>( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) | 定量限/<br>( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) |
|----------------|------------------------------------------|------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| 香叶腈            | $y = 3.75\text{E}+07x - 3.29\text{E}+05$ | 0.997 5    | 0.000 5~0.100 0                               | 0.005                                          | 0.015                                          |
| 2-戊基-2-环戊烯-1-酮 | $y = 3.14\text{E}+07x - 9.32\text{E}+03$ | 0.999 2    | 0.000 5~0.100 0                               | 0.005                                          | 0.015                                          |
| 苯氰             | $y = 7.33\text{E}+07x + 1.18\text{E}+04$ | 0.999 2    | 0.000 5~0.100 0                               | 0.005                                          | 0.015                                          |

表 3 气相色谱—质谱检测方法的回收率与精密度  
Table 3 Recovery and precision for the GC-MS analysis  
method ( $n=6$ ) %

| 化合物            | 1 $\mu\text{g/mL}$ |     | 2 $\mu\text{g/mL}$ |     |
|----------------|--------------------|-----|--------------------|-----|
|                | 回收率                | 精密度 | 回收率                | 精密度 |
| 香叶腈            | 103~112            | 5.4 | 102~107            | 4.8 |
| 2-戊基-2-环戊烯-1-酮 | 104~116            | 4.7 | 105~110            | 4.7 |
| 苯氰             | 90~99              | 4.2 | 96~101             | 4.9 |

2.3 检测方法的应用

将建立的 GC-MS 方法应用到薄荷香精样品中香叶腈、2-戊基-2-环戊烯-1-酮、苯氰 3 种禁用物质的分析检测,结果显示:不同来源、不同批次的 10 个薄荷香精样品中均未检测到这 3 种禁用物质。

3 结论

本研究建立了同时检测香精中香叶腈、2-戊基-2-环戊烯-1-酮、苯氰的气相色谱—质谱方法,具有简便快速、灵敏度高等特点,并且检测低限、回收率和精密度均满足国内外对香精中禁用物质检测的相关要求,适用于香精中禁用物质的监测。

参考文献

[1] BRAIN K R, GREEN D M, LALKO J, et al. In-vitro human skin penetration of the fragrance material geranyl nitrile[J]. Toxicology in Vitro, 2007, 21(1): 133-138.

[2] 邵仕香, 刘珂, 孙宝红, 等. 微波催化合成 2-戊基环戊-2-烯酮的研究[J]. 天津理工学院学报, 2001, 17(3): 101-103.

[3] ZENG Yuan, LUO Jian-yong, FAN Ya-ming, et al. Detection of flavor components in ethanol extract from kelp using GC-MS method[J]. Food Science & Technology, 2015, 40(10): 279-283.

[4] LISKO J G, STANFILL S B, WATSON C H. Quantitation of ten flavor compounds in unburned tobacco products [J]. Analytical Methods Advancing Methods & Applications, 2014, 6(13): 4 698-4 704.

[5] WU Ping-qu, ZHANG Li-qun, SHEN Xiang-hong, et al. Determination of ethyl Carbamate in Chinese yellow rice wine by diatomaceous earth extraction and GC/MS method[J]. Journal of Aoac International, 2015, 98(3): 834-838.

[6] 曾莉, 张熠, 刘丹, 等. 气相色谱-质谱法同时测定肉制品中的 12 种多环芳烃[J]. 中国卫生检验杂志, 2017(17): 2 486-2 488.

[7] 范文来, 胡光源, 徐岩. 顶空固相微萃取-气相色谱-质谱法测定药香型白酒中萜烯类化合物[J]. 食品科学, 2012, 33(14): 110-116.

(上接第 54 页)

[8] SCHRADER K, FERNANDEZ C, CHEYNG W, et al. Evaluation of commercial antisera for *Salmonella* serotyping [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2008, 46(2): 685-658.

[9] ANEJO J, ISA S, AUDU O, et al. Isolation and polymerase chain reaction detection of virulence *invA* gene in *Salmonella* spp. from poultry farms in Jos, Nigeria[J]. Journal of Medicine in the Tropics, 2016, 18(2): 98.

[10] SAEKI E, ALVES J, BONFANTE R, et al. Multiplex PCR (mPCR) for the Detection of *Salmonella* spp. and the Differentiation of the Typhimurium and Enteritidis Serovars in Chicken Meat[J]. Journal of Food Safety, 2013, 33(1): 25-29.

[11] FITZGERALD C, COLLINS M, DUYNE S, et al. Multiplex, bead-based suspension array for molecular determination of common *Salmonella* serogroups[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2007, 45(10): 3 323-3 334.

[12] LIU Bin, ZHOU Xiu-juan, ZHANG Li-da, et al. Development of a novel multiplex PCR assay for the identification of *Salmonella* enterica Typhimurium and Enteritidis[J]. Food Control, 2012, 27(1): 87-93.

[13] YIN N, NG L, LIN R, et al. Development of a novel multiplex PCR for the detection and differentiation of *Salmonella* enterica serovars Typhi and Paratyphi A[J]. Research in Microbiology, 2010, 161(4): 243-248.

[14] RAHN K, DEGRANDIS S, CLARKE R, et al. Amplicification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella* [J]. Molecular and Cellular Probes, 1992, 6(4): 271-279.

[15] PARK S, RICKE S. Development of multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Salmonella* genus, *Salmonella* subspecies I, Salm. Enteritidis, Salm. Heidelberg and Salm. Typhimurium[J]. Journal of Applied Microbiology, 2015, 118(1): 152-160.

[16] KIM T, HWANG H, KIM J. Development of a novel, rapid multiplex polymerase chain reaction assay for the detection and differentiation of *Salmonella* enterica serovars enteritidis and typhimurium using ultra-fast convection polymerase chain reaction[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2017, 14(10): 580-586.