

实验技术与方法

应用 LAMP 方法检测动物源性食品中沙门菌

何翠华¹ 刘志强¹ 王丹云¹ 孙启明² 黄纪徽¹

(1. 海南出入境检验检疫局检验检疫技术中心,海南 海口 570311;

2. 海口市疾病预防控制中心,海南 海口 570203)

摘要:目的 运用两种方法对动物源性食品中沙门菌进行检测,找出一种更加快速、敏感、特异、简便的检验方法。方法 采集 60 份市售的禽、畜等生肉及 60 份奶制品,分别采用 LAMP 方法和国家标准方法 GB/T 4789.4—2008 对沙门菌进行分离与鉴定。结果 120 份采集样品中,LAMP 方法检出 2 例,阳性率 1.67%;国家标准方法检出 1 例,阳性率 0.83%。LAMP 方法的符合率为 99.2%,敏感性为 100%,特异性为 99.2%。结论 LAMP 检测法快速、特异、简便,该方法与国标法的阳性率差异无显著性。

关键词:环介导等温扩增技术;沙门菌;动物源性食品

中图分类号:R378.22;R155.55 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2010)05-0411-04

Application of LAMP to Detect *Salmonella* in Animal Derived Foods

HE Cui-hua, LIU Zhi-qiang, WANG Dan-yun, SUN Qi-ming, HUANG Ji-hui
(Hainan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau Inspection and Quarantine
Technology Center, Hainan Haikou 570311, China)

Abstract: Objective Using two methods of *Salmonella* in animal derived foods were detected, to find a more rapid, sensitive, specific, simple testing method. **Method** Collected from 60 commercial poultry, livestock and other raw meat and 60 dairy products, respectively using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method and the national standard method GB/T 4789.4—2008 to separate and identify of *Salmonella*. **Results** In the 120 samples, LAMP method detected two cases, the positive rate of 1.67%; national standard method detected one case, the positive rate of 0.83%. LAMP method of compliance was 99.2%, a sensitivity of 100% and specificity of 99.2%. **Conclusion** LAMP detection method is rapid, specific, simple. This method and the positive rate of national standard was no significant difference.

Key words: LAMP Method; *Salmonella*; Animal Derived Foods

沙门菌是最常见的食源性细菌病原体,引起沙门菌食物中毒的最主要原因是吃了未煮透的病死禽、畜肉或在屠宰后其他环节污染的禽、畜肉等。传统的沙门菌检测方法,由于其检测周期长、程序复杂等缺点已不能满足现代检测要求,因此研究沙门菌快速、有效的检测方法显得尤其重要。环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)方法是一种简便、快速、高效的基因扩增法,与 PCR 反应相比,LAMP 反应最明显的优势是,在一般恒温条件下进行,所用设备简单、花费少,普通水浴锅或其他有稳定热源的装置就可以采用,不需要 PCR 所必需的精密温度循环装置,同时它的检测

灵敏度和特异性又能满足快速鉴定病原微生物的需要,可以节约成本^[1]。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品

对海口市区的多家农贸市场市售的食品进行采样,共采集 60 份禽、畜等生肉及 60 份奶制品。冰块保存样品 2 h 内送达实验室,放置 4℃ 冰箱保存不超过 4 h。

1.1.2 培养基和试剂

缓冲蛋白胨水(BPW)、亚硒酸盐胱氨酸(SC)增菌液、四硫磺酸盐煌绿(TTB)增菌液、亚硫酸铋(BS)琼脂、HE 琼脂、三糖铁(TSI)琼脂、营养肉汤和营养琼脂购自北京陆桥技术有限公司,GNI⁺鉴定卡为法国生物梅里埃公司产品,沙门菌(A-F)O 多价

收稿日期:2010-05-06

作者简介:何翠华 女 助理工程师 研究方向为食品微生物检验

E-mail: hecuihua1203@163.com

血清为兰州生物制品研究所产品,LAMP试剂盒(含Sal反应液和Bst酶)为广州华峰生物有限公司产品,均在有效期内使用。

1.1.3 标准菌株

鼠伤寒沙门菌 CMCC50115,福氏志贺菌 CMCC6120513,金黄色葡萄球菌 CMCC26003,单核细胞增生李斯特菌 CMCC(B)54002-5,购自广东环凯微生物科技有限公司。

肠炎沙门菌 ATCC13076,伤寒沙门菌 ATCC14028,购自上海汉尼有限公司。

1.1.4 仪器

全自动微生物生化鉴定仪(VITEK-32)(法国生物梅里埃公司),高速冷冻离心机(德国Hettich公司),数显恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 样品的制备和选择性增菌

依据GB/T 4789.4—2008《食品微生物学检验 沙门氏菌检验》方法进行样品制备和选择性增菌。

1.2.2 传统培养法

依据GB/T 4789.4—2008《食品微生物学检验 沙门氏菌检验》进行分离、分纯、生化反应、血清学试验。

1.2.3 LAMP法

LAMP法按照试剂盒提供的检测程序进行。吸取1.2.1的增菌液1ml进行10 000 r/min离心2 min,弃上清;加入80 μ l DNA提取液,混匀后沸水浴10 min,置冰上10 min;10 000 r/min离心2 min,上清即为核酸模板。PCR反应管中加入Sal反应液和Bst酶的混合液22.5 μ l,再往反应管中加入30 μ l稳定液。往上述反应管内(稳定液面下)分别加入阴性对照、待检模板和阳性对照各2.5 μ l。置65 $^{\circ}$ C水浴恒温反应60 min。取出冷却至室温后加入2 μ l显色液,轻轻混匀即可观察。

1.2.4 人工污染食品中沙门菌检测

1.2.4.1 不同浓度菌液的制备 挑取3株不同的沙门菌标准菌株至营养肉汤中增菌,37 $^{\circ}$ C培养24 h,用生理盐水制成菌悬液,用比浊仪调整至约0.4麦氏单位,此液视为相当于 10^8 CFU/ml。依次再用无菌生理盐水10倍梯度稀释至 10^5 、 10^4 、 10^3 CFU/ml。

1.2.4.2 人工污染样的制备 将生猪肉及盒装牛奶2种食品样品按GB/T 4789.4—2008方法制成1:10稀释液。吸取1.2.4中制备好的 10^5 、 10^4 、 10^3 CFU/ml菌悬液各2.5 ml加入每一组1:10稀释液中,匀质后即成 10^3 、 10^2 、 10^1 CFU/ml 3个浓度水

平的接种样,37 $^{\circ}$ C培养24 h后进行传统培养法及LAMP方法的检测。

1.2.5 特异性试验

1.2.5.1 菌悬液的制备 取鼠伤寒沙门菌、志贺菌、金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特菌按1.2.4.1的方法制成终浓度为 10^3 CFU/ml的菌悬液。

1.2.5.2 干扰样的制备 在100 ml的营养肉汤中分别按以下组合添加1.2.5.1菌悬液:鼠伤寒沙门菌+福氏志贺菌;鼠伤寒沙门菌+金黄色葡萄球菌;单核细胞增生李斯特菌+鼠伤寒沙门菌;志贺菌;鼠伤寒沙门菌。37 $^{\circ}$ C培养24 h后进行LAMP方法的检测。

2 结果与分析

2.1 培养情况

样品分离菌在BS琼脂上棕褐色带金属光泽,周围培养基呈褐色;在HE琼脂上蓝绿色,中心带黑色;在TSI琼脂上,斜面产碱,底层产酸, H_2S 阳性。

2.2 染色镜检

革兰染色为革兰氏阴性杆菌,无芽孢、荚膜。

2.3 生化反应

标准菌株(鼠伤寒沙门菌 CMCC50115)和样品分离菌的VITEK-32鉴定结果均为“很好的鉴定结果,沙门菌属,建议血清检测”。

2.4 血清学试验

标准菌株与生理盐水无凝集,与沙门菌(A-F)O多价血清发生凝集;样品分离菌做生理盐水对照无凝集,与沙门菌(A-F)O多价血清发生凝集。

2.5 LAMP试验

阴性对照反应管液体为橙色;阳性对照反应管液体为绿色的条件。样品反应管液体呈橙色则未检出沙门菌;样品反应管液体呈绿色则检出沙门菌。阴、阳性对照反应管符合检测判断的条件,本次试验结果有效。

2.6 人工污染食品样中沙门菌检测结果

从表1可见,采用LAMP方法检测生猪肉和盒装牛奶中的沙门菌,与传统方法相比,该方法检测沙门菌灵敏度可达到 10^2 CFU/ml。

2.7 特异性试验结果见表2

2.8 自然样品的检测结果

120份样品中,LAMP方法检出阳性样品2份,阳性率1.67%;国家标准方法检出1份,阳性率0.83%。LAMP方法与传统方法比较,差异无统计学意义。LAMP方法的符合率为99.2%,敏感性为100%,特异性为99.2%。见表3、表4。

表 1 人工污染食品样检测结果

沙门菌	浓度 (CFU/ml)	生猪肉		盒装牛奶	
		GB/T 4789. 4	LAMP 方法	GB/T 4789. 4	LAMP 方法
鼠伤寒沙门菌 CMCC50115	10 ³	检出	阳性	检出	阳性
	10 ²	检出	阳性	检出	阳性
	10 ¹	检出	阳性	检出	阳性
肠炎沙门菌 ATCC13076	10 ³	检出	阳性	检出	阳性
	10 ²	检出	阳性	检出	阳性
	10 ¹	未检出	阴性	未检出	阴性
伤寒沙门菌 ATCC14028	10 ³	检出	阳性	检出	阳性
	10 ²	检出	阳性	检出	阳性
	10 ¹	检出	阳性	检出	阳性

表 2 特异性实验结果

	鼠伤寒沙门菌 + 志贺菌	鼠伤寒沙门菌 + 金黄色葡萄球菌	单核细胞增生李斯特菌 + 鼠伤寒沙门菌	鼠伤寒沙门菌	志贺菌
LAMP 结果	阳性	阳性	阳性	阳性	阴性

表 3 LAMP 方法与传统方法结果统计

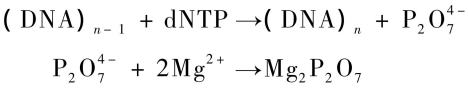
动物源性食品	数量(份)	传统方法		LAMP	
		阳性	阴性	阳性	阴性
生肉	60	1	59	2	58
乳制品	60	0	60	0	60
共计	120	1	119	2	118
检出率		0. 83% (1/120)		1. 67% (2/120)	

表 4 LAMP 方法的符合率、敏感性、特异性

传统方法阳性， LAMP 阴性(假阴)	传统方法阴性， LAMP 阳性(假阳)	传统方法阳性， LAMP 阳性(真阳性)	符合率(%)	敏感性(%)	特异性(%)
0	1	1	99. 2% (1 + 118) /120	100% 1/(1 + 0)	99. 2% 119/(119 + 1)

3 讨论

结果观察容易。LAMP 方法产物生成的反应式为



传统培养法受检测人员的主观因素(对选择性平板上菌落的判断) 影响, 易出现漏检; 而 LAMP 方法扩增形成白色的焦磷酸镁盐沉淀, 产物量大, 结果观察十分方便, 本次试验中使用的试剂盒则是添加了 Syber Green I 染料, 通过直接观察荧光来判断是否有扩增产物出现, 反应结束后混合液无沉淀时的颜色为橙色, 生成沉淀时颜色会由橙色变为绿色。

LAMP 方法的敏感性高, 特异性高。用 LAMP 方法在样品中检测出的沙门菌比传统方法多 1 株, 即有 1 例假阳性, 原因有两种可能: 一是与分子生物学的高灵敏度有关, 试验使用的 LAMP 试剂盒中说明书标明其检测的灵敏度为 15 CFU/test, 本试验最终灵敏度达到 10² CFU/ml。目前的 PCR 方法检测沙门菌属大多将 *invA* 基因作为靶序列来设计引物, 来达到减少沙门菌属内漏检的可能性^[2]。LAMP 方法也是基于分子生物学建立起的一种快速检测方法, 该技术依赖于能够识别靶序列上 6 个特异区域的 4 条特异引物和一种具有链置换特性的 DNA 聚

合酶, 在恒温条件(65 ℃左右) 下可高效、快速、高特异地扩增靶序列。Ohtsuka 等^[3]利用 LAMP 方法检测鸡蛋中的沙门菌, 试验证明, LAMP 方法比培养计数法和 PCR 方法检测的效率都高, 110 个样本中, 有 10% 的阳性样本 PCR 方法漏检, 而 LAMP 方法对沙门菌阳性样本的检出率是 100%。二是传统培养只能检出活菌, 而该方法只能确定样品中存在扩增片段, 不能证实存在活菌, 因此当结果为阳性时需通过培养法确认。鲁玉侠等^[4]应用 EMA 与 LAMP 相结合的方法区分死菌与活菌, EMA-LAMP 技术是通过设计两对特定的引物即可检测样品中是否有活菌存在, EMA-LAMP 方法的灵敏度比 EMA-PCR 高 100 倍, 为快速检测方法提供了一种新的思路。今后食品微生物检测技术的发展方向是: ①提高检测效率, 即方便、快速和大批量; ②试验条件标准化; ③检测的高精度和高灵敏度^[5]。三是该方法为基因扩增方法, 在检测过程可由于中器材的污染而出现假阳性。

检测周期短。传统方法对阴性样品检测最短也需要 4 d; 而 LAMP 方法包括两次增菌在内只需 2 d。LAMP 方法从加样到观察结果只需不到 2 h, 而张如胜等^[6]更指出还可通过设计 2 条环引物可使反应速度提升 1/3 ~ 1/2。

仪器设备简单、价廉。PCR 方法需要热循环,需要使用热循环反应和结果分析等精密、贵重的仪器设备,对实验条件要求苛刻;LAMP 方法为等温扩增,只需一个简单的恒温器,无需电泳,结果分析通过肉眼观察,适合现场的快速筛选和应急事件的处理。

目前所使用的沙门菌传统分离培养方法,操作繁琐、费时,不适于食品和水源的卫生监测等;传统 PCR 检测方法对试验条件和检测人员技术要求较高,且存在扩增后电泳造成实验环境的污染。LAMP 方法作为一种快速检测沙门菌的方法具有快速、特异、简便的优点,在与传统方法的比较中 $P > 0.05$,说明该方法与国标法的阳性率差异无显著性,但亦存在一定的缺陷,只能作为一种初筛方法。

参考文献

- [1] 王丽,李琳,石磊. 食源沙门菌 DNA 环介导恒温核酸扩增法检测[J]. 中国公共卫生, 2009, 25(2): 255-256.
- [2] 欧新华,张如胜,宋克云,等. 环介导等温扩增(LAMP)技术检测沙门菌属方法的建立[J]. 实用预防医学, 2008, 15(6): 1945-1947.
- [3] 王丽,石磊,李琳. DNA 环介导的恒温扩增法在快速鉴定病原微生物中的应用[J]. 生命的化学, 2006, 26(5): 462-464.
- [4] 鲁玉侠,郭祀远,石磊,等. EMA-LAMP 方法快速检测死/活的食源性沙门氏菌[J]. 食品科学, 2009, 30(22): 324-327.
- [5] 杨小龙,陈朝琼. 食品微生物快速检测技术研究进展[J]. 河北农业科学, 2008, 12(12): 51-53.
- [6] 张如胜,魏泉. LAMP 技术在病原微生物检测中的应用[J]. 华南预防医学, 2007, 33(5): 45-49.

实验技术与方法

利用毛细管电泳法测定乳品中 β -乳球蛋白含量的研究

孙国庆 康小红 刘卫星

(内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司研发中心,内蒙古 呼和浩特 011500)

摘要:目的 用毛细管电泳技术检测乳品中 β -乳球蛋白含量。方法 将样品经缓冲液处理,选择直径为 70 μm ,有效长度 600 mm 的未涂层石英毛细管柱;柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$;缓冲溶液为柠檬酸缓冲液(pH 为 3.0 ± 0.2);工作电压为 27 kV;检测波长为 214 nm;进样时间为 5 s,进行检测。结果 β -乳球蛋白回收率为 75.2% ~ 105.2%,相对标准偏差(RSD)为 1.09% ~ 3.10%;最低检出限为 0.001 mg/ml。结论 该方法简便、准确、灵敏度高,是快速检测乳品中 β -乳球蛋白含量较适合的分析方法。

关键词:毛细管电泳法; β -乳球蛋白; 乳制品

中图分类号: R446. 62; TS252 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2010)05-0414-04

Detection of β -Lacto Globulin in Milk Products by Capillary Electrophoresis

SUN Guo-qing, KANG Xiao-hong, LIU Wei-xing

(Inner Mongolia Meng Niu Dairy Industry (Group) Co., Ltd R&D Center,
Inner Mongolia Huhhot 011500, China)

Abstract: **Objective** To establish a capillary electrophoresis method for detecting the content of β -lacto globulin in dairy products. **Method** Samples were handled with buffers; an uncoated neutral capillary column in the diameter of 70 μm and the effective length of 600 mm was used. The samples were detected under the condition of capillary temperature at 40 $^{\circ}\text{C}$; citric acid buffer solution at pH 3.0 ± 0.2 , operating voltage at 27 kV, detection wavelength at 214 nm, and injection time for 5 s. **Results** The average recovery was 75.2% ~ 105.2% and the relative standard deviation (RSD) was 1.09% ~ 3.10% for β -lacto globulin. The detection limit was 0.001 mg/ml. **Conclusion** The method is simple, accurate and sensitive. It is suitable for fast screening and quantitative monitoring β -lacto globulin in dairy products.

收稿日期: 2010-03-29

作者简介: 孙国庆 男 研发员 研究方向为乳制品研究与开发 E-mail: sgqvictor@163.com

通信作者: 康小红 女 工程师