

汪 沐,谢 鹏,唐梦君,等. 荧光原位杂交和流式细胞术结合(FISH-FCM)对肉食品中肠杆菌科细菌的快速定量检测[J]. 江苏农业科学, 2016,44(7):336-338.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.07.099

# 荧光原位杂交和流式细胞术结合(FISH-FCM) 对肉食品中肠杆菌科细菌的快速定量检测

汪 沐<sup>1</sup>, 谢 鹏<sup>2</sup>, 唐梦君<sup>2</sup>, 卜 柱<sup>2</sup>

(1. 江苏省淮安市农业委员会, 江苏淮安 223001; 2. 中国农业科学院家禽研究所, 江苏扬州 225125)

**摘要:**为建立一种新的荧光原位杂交与流式细胞术相结合(FISH-FCM)的方法,以快速鉴定肉食品中的肠杆菌科细菌,采用与肠杆菌科细菌 16S rRNA 保守序列互补的探针 Enter1432 并验证其特异性。结果表明:6 种肠杆菌科细菌与探针 Enter1432 杂交率均在 90% 以上,而 5 种非肠杆菌科细菌与探针杂交率均低于 1%;与 SN/T 0738—1997《出口食品中肠杆菌科检验方法》传统培养法相比,FISH-FCM 定量检测法全程约需 4~5 h,检测 8 份猪肉样品中肠杆菌科细菌数为 1.4 万~640 万个/g,4 份鸡肉样品中肠杆菌科细菌数为 5.0 万~21 万个/g,检出率为 100%。综上所述,研究建立的 FISH-FCM 法可快速检测肉品中的肠杆菌科细菌,适于食品卫生、临床实验室推广使用。

**关键词:**荧光原位杂交;流式细胞术;肠杆菌科;快速定量检测

**中图分类号:** TS207.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)07-0336-03

肠杆菌科(Enterobacteriaceae)细菌是一类分布极为广泛的革兰氏阴性菌,包括对人致病性较强的埃希菌属、志贺菌属、沙门菌属、耶尔森菌属细菌<sup>[1]</sup>。肠杆菌作为欧盟各国食品卫生检查中重要的指标细菌,是国际间食品微生物学实验室质量控制、水平测试的必测项目之一。目前,我国仍以大肠菌群、粪大肠菌群作为食品卫生指标菌。以肠杆菌科菌替代大肠菌群、粪大肠菌群作为检测指标可消除因后者产气特性随检验方法、试验条件不同而造成结果的不准确性<sup>[2]</sup>。由于我国农产品生产管理不当,出口畜禽产品中肠杆菌科细菌检测超标现象时有发生,易被欧盟发达国家市场拒绝,进而形成所谓的贸易壁垒。我国进出口商检局经过多次修订,制定了针对畜禽等农产品中肠杆菌检测的行业标准 SN/T 0738—1997《出口食品中肠杆菌科检验方法》。该标准以传统的细菌培养方法为基础,包括分离培养、生化判定,其步骤繁琐,时间冗长,工作量大,得到报告结果通常需要 3 d 左右。过长的检验时间使得生产部门延误时间,增加成本,造成一定的经济损失,而且无法应对紧急情况。因此,各级食品卫生防疫部门迫切需要一种快速准确定量检测肠杆菌的方法。本研究通过利用荧光原位杂交与流式细胞术相结合(FISH-FCM)对畜禽肉产品中肠杆菌科细菌进行定量检测,并与传统行标方法进行比较,探讨 FISH-FCM 在食品安全卫生领域中应用的可

行性。

## 1 材料与方法

### 1.1 待检样品

本试验检测的 8 份猪肉样品、4 份鸡肉鲜样品分别随机取自江苏省扬州市 A、B、C、D 等 4 个不同的农贸市场。

### 1.2 菌种

本试验中所采用的部分细菌(大肠杆菌、福氏志贺氏菌、宋氏志贺氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、普通变形杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌)由中国农业科学院家禽研究所唐梦君老师、龚建森老师提供。

### 1.3 寡核苷酸探针

根据 Sghir 等报道<sup>[3]</sup>,试验采用肠杆菌科细菌特异性探针 Enter1432,序列为 5'-CTTTTGAACCCACT-3'。其中 5'端由异硫氰酸酯荧光素 FITC(Abs/Em=494/520)标记,由宝生物工程(大连)有限公司合成并标记探针。

### 1.4 FISH-FCM 法验证探针的特异性

将大肠杆菌、福氏志贺氏菌、宋氏志贺氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、普通变形杆菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、嗜水气单胞菌、屎肠球菌 11 种菌株按照常规划线培养法获得单菌落,在液体培养基中培养,将细菌浓度调整为 0.1 亿个/mL,杂交方法参照 Vahtovuo 等的报道<sup>[4-5]</sup>并有所改进:(1)取 200  $\mu$ L 菌液,用等体积 8% 多聚甲醛溶液于 4  $^{\circ}$ C 固定 1 h;(2)固定完毕后,将样品于 12 000 g 高速离心 10 min,用 PBS 缓冲液洗涤 3 次;(3)取 10  $\mu$ L 固定的菌液,加入 85  $\mu$ L 预热的杂交缓冲液(0.9 mol/L NaCl, pH 值 7.2 的 20 mmol/L Tris-HCl, 0.1% SDS)中,加入 5  $\mu$ L 100 ng/ $\mu$ L 探针,50  $^{\circ}$ C 杂交 2 h;(4)在 1 mL PBS 缓冲液中加入 50  $\mu$ L 杂交溶液,涡旋振荡;(5)将溶液上流式细胞仪(BD FACSCalibur™, Becton Dickinson, 美国),对每个样品分析

收稿日期:2015-06-19

资助项目:江苏省特色水产繁育工程实验室开放基金(编号: CASB1302);江苏省大型科学仪器设备共享服务平台分析测试技术及方法研究课题(编号:BZ201303);江苏省淮安市科技支撑计划(编号:SN130036)。

作者简介:汪 沐(1987—),女,江苏淮安人,博士,工程师,研究方向为微生物。E-mail:hawangmu@163.com。

通信作者:谢 鹏,博士,助理研究员,从事畜牧学研究。E-mail:pengxiejqs@126.com。

2 000 个物体。

1.5 FISH – FCM 法检测样品

鲜肉样品前处理步骤同 SN/T 0738—1997《出口食品中肠杆菌科检验方法》，制备成稀释 10 倍的肉样液。取 1 mL 肉样液，80 g 低速离心 1 min，去除杂质。其余杂交方法同上，制备“1.4”节步骤(5)中的液体，加入 10 μL 0.5 mg/mL 碘化丙啶，37 ℃ 避光孵育 20 min。加入 50 μL 1 000 个/μL 荧光微球(CountBright™, Invitrogeon, 美国)。混合溶液上样于流式细胞仪分析，每个样品分析 10 000 个物体。

1.6 培养法检测样品

按照 SN/T 0738—1997《出口食品中肠杆菌科检验方法》中相应方法检测样品。

1.7 试验方法

用 CellQuest Pro 软件(版本 5. 2. 1, Becton Dickinson, 美国)分析。在 dot plot 图上, x 轴表示杂交结合荧光探针的目的细菌的荧光强度, y 轴表示 DNA 染料的荧光强度。按照以下公式计算肉样品中的细菌数量:

$$\frac{A}{B} \times \frac{C}{D} \times 10^4 = \text{测定样本的细菌浓度。}$$

式中: A 为目的细菌所占比例, %; B 为荧光微球所占比例, %; C 为测定样本中的荧光数量, 个; D 为测定样本的体积或质量, g/μL。

2 结果与分析

2.1 FISH – FCM 法验证探针 Enter1432 的有效性

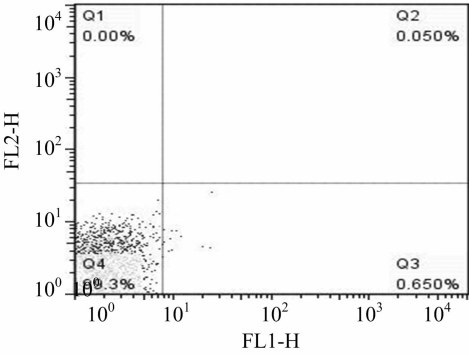
由图 1 – A 可知, 目标菌株几乎未与探针 Enter1432 结合, 在 dot plot 散点图上处于 Q4 区域, 呈阴性结果; 由图 1 – B 可知, 目标菌株大部分与探针 Enter1432 结合, 在 dot plot 散点图上处于 Q3 区域, 呈阳性结果。由表 1 可知, 6 种肠杆菌科细菌与探针 Enter1432 的杂交率为 91. 9% ~ 95. 7%, 而 5 种非肠杆菌科细菌与探针的杂交率均低于 1%。

2.2 FISH – FCM 法与传统培养法比较检测肉样品中的肠杆菌科细菌

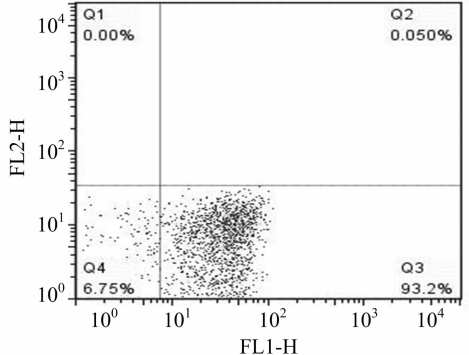
由图 2、表 2 可知, 按照 SN/T 0738—1997《出口食品中肠杆菌科检验方法》传统培养方法检测 8 份猪肉样品中肠杆菌科细菌数量为 0. 63 万 ~ 53 万 CFU/g, 4 份鸡肉样品中肠杆菌科细菌数量为 0. 10 万 ~ 1. 5 万 CFU/g。用 FISH – FCM 法检测 8 份猪肉样品中肠杆菌科细菌数量为 1. 4 万 ~ 640 万个/g, 4 份鸡肉样品中肠杆菌科细菌数量为 5. 0 万 ~ 21 万个/g。

3 结论与讨论

荧光原位杂交(FISH)法鉴定微生物最初应用于医学领域<sup>[6-8]</sup>, 荧光素标记的核酸探针可与目的细菌结合, 使其在荧光显微镜下显示出相应颜色, 该方法具有特异性高、直观的特点, 但是由于通常情况下为保证统计结果的准确性, 操作人员需要选择多达数十个视野进行分析, 这无疑增加了工作量, 降低了试验效率。流式细胞术是一种能够对单细胞或其他生物粒子进行理化、免疫及分子生物学等多参数性状检测的现代分析技术, 具有速度快、精度高、准确性好等优点。已有研究将 FISH 与 FCM 相结合用于分析活性淤泥、海水样品中目标菌群的数量变化<sup>[9-10]</sup>。此外, 近年来研究人员通过 FISH –



A. 阴性结果



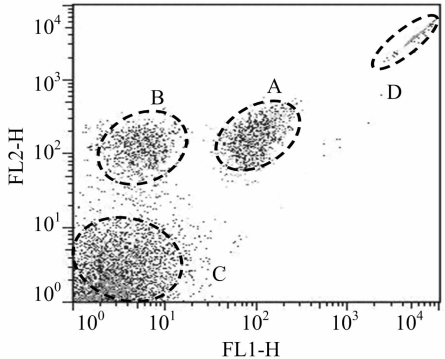
B. 阳性结果

x、y轴数据为荧光强度的相对值(对数形式)。图2同

图1 荧光原位杂交与流式细胞术相结合(FISH–FCM)验证探针Enter1432的有效性

表 1 名菌株与探针 Enter1432 的杂交率

菌株	与探针 Enter1432 杂交率(%)
大肠杆菌	93.2
福氏志贺氏菌	94.5
宋氏志贺氏菌	95.7
鼠伤寒沙门氏菌	92.1
猪霍乱沙门氏菌	91.9
普通变形杆菌	93.0
金黄色葡萄球菌	0.8
枯草芽孢杆菌	0.6
地衣芽孢杆菌	0.6
嗜水气单胞菌	0.9
屎肠球菌	0.5



A—目的细菌; B—其他细菌; C—非细菌物质; D—荧光微球  
图2 荧光原位杂交与流式细胞术相结合法(FISH–FCM)检测肉样中的肠杆菌科细菌

表 2 行标 SN/T0738—1997 法与 FISH - FCM 法比较测定  
鲜肉样品中的肠杆菌科细菌

样品	行标 SN/T 0738—1997 法检测细菌数(CFU/g)	FISH - FCM 法检 测细菌数(万个/g)
猪肉样品 A1	$6.3 \times 10^3$	5.1
猪肉样品 A2	$9.0 \times 10^3$	1.4
猪肉样品 B1	$3.4 \times 10^4$	58
猪肉样品 B2	$5.3 \times 10^5$	640
猪肉样品 C1	$2.2 \times 10^4$	39
猪肉样品 C2	$6.0 \times 10^4$	41
猪肉样品 D1	$7.3 \times 10^3$	6.7
猪肉样品 D2	$1.5 \times 10^5$	310
鸡肉样品 A	$4.5 \times 10^3$	5.0
鸡肉样品 B	$1.5 \times 10^4$	21
鸡肉样品 C	$5.4 \times 10^3$	11
鸡肉样品 D	$1.0 \times 10^3$	17

FCM 法分析人体或动物排出粪样中有害菌、有益菌的数量变化,以监测其健康<sup>[11-12]</sup>。环境中的物质及人或动物的肠道内容物十分复杂,不仅含有大量细菌,还含有许多非细菌物质,包括食物残渣、有机碎屑以及脱落细胞等。虽然目前 FISH - FCM 尚未被应用于食品安全领域的检测,但是该技术可应用于上述如此复杂成分物质的微生物分析检测,笔者认为对于食品而言,该项技术应该存在较强的可行性,并具有广阔的应用前景。

在本试验中 Enter1432 探针与 6 种肠杆菌科细菌杂交率均在 90% 以上,而非肠杆菌科细菌的杂交率均在 1% 以内,说明 Enter1432 探针在鉴定肠杆菌科细菌上具有较高的特异性,这与前人的研究结果<sup>[4,13]</sup>一致。在检测猪、鸡鲜肉样品中肠杆菌科细菌数量方面,经 SN/T 0738—1997《出口食品中肠杆菌科细菌检验方法》法检测发现,12 份样品中均检测到肠杆菌科细菌,检出率为 100%,且肠杆菌科细菌数量在 0.1 万 ~ 53 万 CFU/g 之间,不同样品检测结果差异较大。根据瑞士联邦兽医局 1981 年的标准,生碎肉制品中肠杆菌科细菌含量的上限是 500 万 CFU/g,而近年欧盟对猪胴体的肠杆菌科细菌作出了更加严格且上限为 3 lg CFU/cm<sup>2</sup> 的规定,由此可见本试验中部分样本肠杆菌科细菌污染较为严重。笔者推测,由于本试验中所采集的鲜肉样本均来自传统集市商贩,肉品在经过屠宰、加工、运输等各个环节中均存在污染的可能。由于欧盟对动物屠宰过程的卫生要求较高,对其加工过程控制进行可追溯且肉品包装后须急冻处理,从而抑制细菌繁殖,后期肉品多经大型超市出售给消费者,而我国目前大多数以摊贩为主要特征的集市贸易手段在上述各个环节中对肉品的卫生控制程度不高,细菌的繁殖滋生现象可能较为明显,因此本试验采集的肉样品存在较高的肠杆菌科细菌检出率、检出数量。

本试验采用 FISH - FCM 法检测肉样品中的肠杆菌科细菌数量值是 SN/T 0738—1997《出口食品中肠杆菌科细菌检验方法》中相应检测法的 8.1 ~ 20.7 倍。由于传统培养方法只针对活的目标细菌,对于已死亡或者弱活力细菌在培养操作过程中无法检测出,而 FISH - FCM 法针对目标细菌的 DNA 进行定

量,因此无论细菌的生存状态如何,其均能被检测出。其次,由于单个细菌、若干同类细菌在培养过程中均能形成单一菌落,而 FISH - FCM 针对的是细菌数。基于上述原因,FISH - FCM 法检测出的细菌数要比培养法检测出的菌落数高。

综上所述,鉴于传统的培养法耗时长、工作量大的特点,本研究建立的 FISH - FCM 法可快速检测肉品中的肠杆菌科细菌,适于食品卫生和临床实验室推广使用。

参考文献:

[1] 房海,陈翠珍,张晓君. 肠杆菌科病原细菌[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2011.

[2] Stiles M E, Ng L K. Enterobacteriaceae associated with meats and meat handling[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1981, 41(4): 867 - 872.

[3] Sghir A, Gramet G, Suau A, et al. Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(5): 2263 - 2266.

[4] Vaahotvuo J, Korkeamäki M, Munukka E, et al. Microbial balance index—a view on the intestinal microbiota[J]. Pigs & Poultry, 2007, 109(1): 174 - 178.

[5] 姜云涛,梁景平,李超伦,等. 荧光原位杂交技术和流式细胞仪在菌斑中致龋性变形链球菌定量检测中的应用[J]. 口腔医学研究, 2006, 22(1): 1 - 4.

[6] Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, et al. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1994, 32(2): 335 - 351.

[7] Jansen G J, Mooibroek M, Idema J, et al. Rapid identification of bacteria in blood cultures by using fluorescently labeled oligonucleotide probes[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2000, 38(2): 814 - 817.

[8] 何永贵,王沛,郭家平,等. 荧光原位杂交法快速鉴定血培养阳性葡萄球菌的临床应用[J]. 检验医学, 2005, 20(4): 297 - 299.

[9] Thurnheer T, Gmür R, Guggenheim B. Multiplex FISH analysis of a six - species bacterial biofilm [J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 56(1): 37 - 47.

[10] 朱琳. 环境硝化细菌荧光原位杂交检测方法的建立及其应用[D]. 南京:东南大学, 2005.

[11] Kalliomäki M, Collado M C, Salminen S, et al. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2008, 87(3): 534 - 538.

[12] Xie P, Wang Y, Wang C, et al. Effect of different fat sources in parental diets on growth performance, villus morphology, digestive enzymes and colorectal microbiota in pigeon squabs[J]. Archives of Animal Nutrition, 2013, 67(2): 147 - 160.

[13] Tsuruta T, Inoue R, Iwanaga T, et al. Development of a method for the identification of S - IgA - coated bacterial composition in mouse and human feces[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2010, 74(5): 968 - 973.