

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2023.12.018

亚甲基蓝介导的电化学传感界面 PCR 鼠伤寒沙门氏菌检测方法

高 洁¹, 陈 伟¹, 洪 婷², 姚帮本², 姚 丽¹, 徐建国¹

(1. 合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601; 2. 安徽省产品质量监督检验研究院, 安徽 合肥 230051)

摘 要:文章研究一种可用于快速检测牛奶中鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)的方法,通过在聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增体系中加入嵌入式氧化/还原指示剂亚甲基蓝可以实现对扩增产物的电化学检测。文中所提出的基于丝网印刷电极的电化学检测方法可在 120 min 内完成对鼠伤寒沙门氏菌的检测,线性范围为 $3 \times 10^1 \sim 3 \times 10^7$ CFU/mL,且不受牛奶基质影响。该方法快速、简便、特异性好,有望应用于食源性致病菌现场快速检测。

关键词:鼠伤寒沙门氏菌;亚甲基蓝;聚合酶链式反应(PCR)扩增;电化学;快速检测

中图分类号:TS207.7

文献标志码:A

文章编号:1003-5060(2023)12-1706-05

Methylene blue mediated polymerase chain reaction on electrochemical sensing interface for detection of *Salmonella typhimurium*

GAO Jie¹, CHEN Wei¹, HONG Ting², YAO Bangben², YAO Li¹, XU Jianguo¹

(1. School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China; 2. Anhui Institute of Product Quality Supervision and Inspection, Hefei 230051, China)

Abstract: This paper proposed a method for rapid detection of *Salmonella typhimurium* in milk. The target amplified products of *Salmonella typhimurium* can be measured by polymerase chain reaction(PCR) amplification on the electrochemical sensing interface with the assistance of intercalating redox reporter methylene blue. The proposed screen-printed electrode based electrochemical detection can be completed within 120 min with a linear range of $3 \times 10^1 - 3 \times 10^7$ CFU/mL and it is not affected by the milk matrix. This method is fast and simple and specific, which is expected to be used in the on-site rapid detection of foodborne pathogens.

Key words: *Salmonella typhimurium*; methylene blue; polymerase chain reaction(PCR) amplification; electrochemistry; rapid detection

0 引 言

食源性致病菌污染是食品安全的一个重大问题,其中微生物性因素导致的食品不合格问题在国家食品安全抽检总体检测不合格项目中占比高达 18.78%,是我国头号的安全问题^[1]。

沙门氏菌(*Salmonella*)是最常见的食源性致病菌之一,70%~80%的细菌性食物中毒由沙门氏菌引起^[2]。我国每年有 900 多万人次因感染沙门氏菌患病,导致近 800 人死亡^[3]。沙门氏菌有 2 650 多种血清型,其中鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)感染发病率居沙门

收稿日期:2022-09-08;修回日期:2022-11-11

基金项目:国家自然科学基金资助项目(32172295);安徽省自然科学基金资助项目(2208085QB56)和广东省食品质量与安全重点实验室开放基金资助项目(2020KF001)

作者简介:高 洁(1998—),女,安徽合肥人,合肥工业大学硕士生;

陈 伟(1982—),男,江苏海安人,博士,合肥工业大学教授,博士生导师,通信作者,E-mail:chenweishnu@126.com.

氏菌感染的首位,约占人源沙门氏菌感染的40%~80%,且对外界环境具有较强的抵抗力^[4-5]。感染者轻则表现为呕吐、脱水腹泻、肠胃炎,严重者可能发展为败血症以及全身性器官感染^[6]。

目前,沙门氏菌的常规检测方法主要有传统的平板培养和生化鉴定法^[7]、免疫学检测方法^[8]等。这些常规方法都需要复杂的前处理以及大型的专业仪器,且检测时间长达数天乃至一个星期,不能满足食品安全现场筛查需求^[9]。近年来开发出各种新型检测技术,如生物传感器技术^[10]、微流控技术^[11]、分子生物学检测方法^[12-13]等。该类型检测方法对检测仪器高度依赖,存在成本高、步骤多等缺点,因此急需开发一种快速、灵敏且微型化的检测方法,可以实现目标沙门氏菌的快速精准检测。电化学方法具有快速、简便、灵敏的优点^[14]。丝网印刷电极与传统电极相比更易于操作,且能够大规模低成本制造,并具有广泛的修饰范围,具有极大的经济效益^[15]。

本文提出在聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)体系中加入电化学信号分子亚甲基蓝,利用丝网印刷电极对扩增产物进行快速、灵敏检测。通过优化反应体系确保得到最佳的电化学信号。在此基础上建立牛奶中鼠伤寒沙门氏菌的快速检测方法。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

实验所用菌种均来自于安徽省产品质量监督检验研究院食品化工所。其中:阳性对照为鼠伤寒沙门氏菌 ATCC14028;阴性对照为粪链球菌 ATCC29212、大肠埃希氏菌 O157 CICC10907、金黄色葡萄球菌 ATCC6538、单增李斯特菌 ATCC19111、副溶血性弧菌 ATCC17802、铜绿假单胞菌 ATCC15442。

所用的引物序列购于通用生物(安徽)股份有限公司,预期扩增片段大小为220 bp,上游引物序列:GTGGTTTTTAAGCGTACTCTTCT;下游引物序列:CAAGTTGAGCTTTTTCCAGATC。

无水乙醇购于国药集团化学试剂有限公司;TE缓冲液、琼脂糖(低电渗)、4S Red Plus 核酸染料、ddH₂O、PCR Mix 均购于上海生工生物股份有限公司;亚甲基蓝购于百灵威科技有限公司;丝网印刷电极购于北京铭泰佳信科技有限公司。

1.2 仪器与设备

FA1104B型电子天平(上海精天电子仪器有限

公司)、KQ218型超声仪(昆山市超声仪器有限公司)、Pico12高速冷冻离心机(赛默飞世尔科技(中国)有限公司)、MixTable微型涡旋混合仪(合肥艾本森科学仪器有限公司)、SW-CJ-2D型单人单面净化工作台(苏州净化设备有限公司)、DYY-6C型电泳仪(北京八一生物科技有限公司)、LG2020型凝胶成像仪(杭州朗基科学仪器有限公司)、LHP-160型生化培养箱(上海三发科学仪器有限公司)、Microcloth抛光布以及CHI650D电化学工作站(上海辰华仪器有限公司)。

1.3 方 法

1.3.1 菌悬液的制备

菌液取出后充分涡旋混匀,5 000 r/min离心5 min后弃去上清液,加入等量无菌生理盐水重悬,重复2次即得到菌悬液。取30 mL菌悬液加入270 mL无菌生理盐水后充分混匀,重复上述操作对菌悬液进行10倍浓度梯度稀释。

1.3.2 模板DNA的制备

取1 mL不同浓度鼠伤寒沙门氏菌8 000 r/min离心10 min,弃去上清液,向沉淀中加入500 μ L SDS裂解液和60 μ L蛋白酶K,涡旋混匀后室温放置30 min,100 $^{\circ}$ C加热10 min后12 000 r/min离心10 min,所得的上清液即为DNA模板,4 $^{\circ}$ C保存备用。

1.3.3 PCR扩增

PCR扩增体系包括PCR Mix 25 μ L,上下游引物各0.8 μ L(10 μ mol/L),DNA模板2 μ L, ddH₂O 11.4 μ L,亚甲基蓝10 μ L(10 μ mol/L)。PCR预扩增条件为:95 $^{\circ}$ C预变性5 min;94 $^{\circ}$ C变性30 s,59 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,共35个循环;72 $^{\circ}$ C再延伸2 min。反应结束后取5 μ L扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳中,观察扩增条带。剩余PCR产物于4 $^{\circ}$ C保存备用。

1.3.4 丝网印刷电极的预处理

在无水乙醇溶液中超声1 min后取出,纯水冲洗后,氮气吹干,在0.5 mol/L硫酸溶液中用循环伏安法(cyclic voltammerty, CV), (50 mV/s, -0.2 ~ +1.2 V)扫描确认无杂峰后,纯水冲洗,氮气吹干,干燥密闭保存备用^[16]。

1.3.5 电化学的检测

取30 μ L反应后的PCR产物滴加到丝网印刷电极表面直接检测,差分脉冲伏安法(differential pulse voltammetry, DPV)工作参数如下:电压-0.1 ~ -0.5 V,电位增量0.004 V,振幅0.05 V,脉冲宽度0.05 s,采样间隔0.016 7 s,脉冲周期

0.5 s, 静置 2 s。

1.3.6 实验参数的优化

在扩增过程中,加入不同体积(0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 μL)的引物,确定引物最优量;设计不同的退火温度,确定最适退火温度;加入不同浓度的亚甲基蓝,确定指示剂最优量。

1.3.7 标准曲线的绘制

取 10 倍稀释的不同浓度的鼠伤寒沙门氏菌(3×10^1 、 3×10^2 、 3×10^3 、 3×10^4 、 3×10^5 、 3×10^6 、 3×10^7 CFU/mL)进行扩增,取 5 μL 扩增产物电泳观察,取 30 μL 扩增产物电化学检测。根据电化学信号值与细菌浓度关系确定线性范围,绘制标准曲线。

1.3.8 特异性验证

提取粪链球菌 ATCC29212、大肠杆菌 CICC10899、金黄色葡萄球菌 ATCC6538、单增李斯特菌 ATCC19111、副溶血性弧菌 ATCC17802、铜绿假单胞菌 ATCC15442、阪崎肠杆菌 ATCC29544 的 DNA 模板作为干扰组,验证本方法的特异性。

1.4 实际样本的制备

从当地超市购入预包装牛奶样品,在无菌环境中进行加标操作。将 1 mL 各浓度的鼠伤寒沙门氏菌原液添加于 9 mL 牛奶样品中,涡旋震荡充分混匀后取 1 mL 样品用于提取 DNA 模板^[17]。将 1 mL 无菌水添加于 9 mL 牛奶样品中作为阴性对照。采用本实验建立并优化的鼠伤寒沙门氏菌电化学检测方法对扩增产物进行检测,并对结果进行分析。

2 结果与分析

2.1 检测原理

检测原理如图 1 所示。

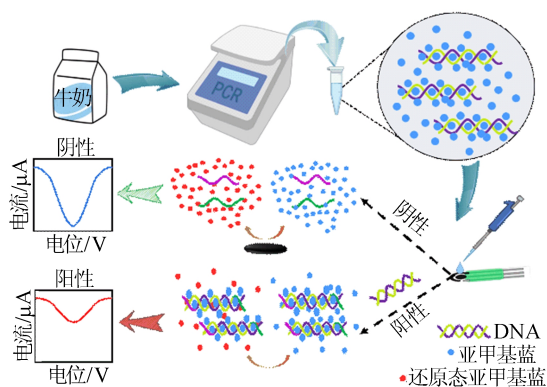


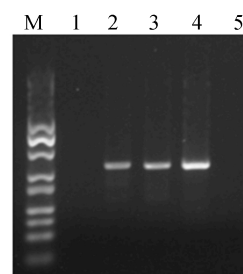
图 1 实验原理

DNA 是一条含磷酸酯键的长链聚阴离子,能

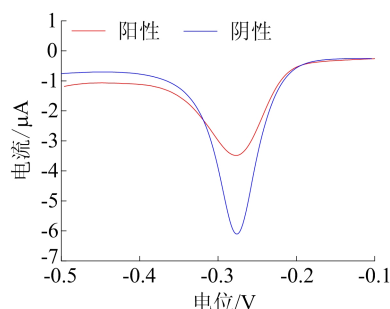
够与很多电活性金属阳离子作用。在扩增前加入的亚甲基蓝是嵌入式氧化/还原指示剂,随着 PCR 的进行,氧化/还原标记嵌入到生成的双链中,与 DNA 结合前后的电化学反应速率之间的差异导致扩增的阳性产物被检测到的电流变小^[18]。通过检测氧化/还原电流的变化,就能实现核酸扩增产物的电化学检测^[19]。阴性样本不含有 DNA 模板,不存在大量扩增的 DNA,亚甲基蓝游离于溶液中,测得的电流值将明显大于阳性对照组。

2.2 可行性验证

可行性验证电泳结果如图 2a 所示,图 2a 中:泳道 M 为 Marker(25~500 bp);泳道 1 为阴性对照;泳道 2 为 220 bp 的阳性扩增产物;泳道 3 为含 10 $\mu\text{mol/L}$ 亚甲基蓝的阳性对照组,条带与泳道 2 相比均无区别;泳道 4 的亚甲基蓝浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$;泳道 5 的亚甲基蓝浓度为 1 mmol/L,由图 2a 可知,亚甲基蓝浓度过高时抑制扩增。可行性验证电化学检测结果如图 2b 所示。由图 2b 可知,亚甲基蓝浓度为 30 $\mu\text{mol/L}$ 时阳性对照组的电流值明显低于阴性对照组,可以实现电化学方法对扩增产物的检测。



(a) 电泳结果



(b) 电化学检测结果

图 2 可行性验证电泳和电化学检测结果

2.3 PCR 扩增体系优化

引物量影响扩增效率。引物量偏低时,扩增产物浓度低,会导致阴阳对照组电信号值区别不明显;引物量偏高时,可能会产生大量二聚体,亚甲基蓝也可以嵌入二聚体条带中,不利于检测扩

增产物。因此要选取合适的引物量,引物量优化结果如图3a所示。泳道1~泳道5引物量分别为0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 μL ,泳道6为阴性对照组。由图3a可知,当引物量为0.8~1.2 μL 时扩增既不明显,二聚扩增产物也较多;当引物量大于1.2 μL 时,电泳条带亮度不再增加,表明引物量为1.2 μL 时扩增及检测结果较好。从经济性结果考虑,选择1.2 μL 为引物最佳添加量。

退火温度是影响PCR扩增特异性的重要参数,优化退火温度可以保证引物同目的序列有效退火,减少非特异性结合,退火温度优化结果如图3b所示。泳道1~泳道7退火温度为62.0、61.5、60.5、59.0、57.2、55.9、54.8 $^{\circ}\text{C}$,泳道8为阴性对照。当退火温度低于59.0 $^{\circ}\text{C}$ 时,扩增产物条带明显较暗,因此选择59 $^{\circ}\text{C}$ 为最佳退火温度。

亚甲基蓝浓度过高或过低时都会导致阴阳对照组电信号值差别较小,不利于检测。亚甲基蓝浓度优化结果如图3c所示,当亚甲基蓝浓度为30 $\mu\text{mol/L}$ 时,阳性对照组电信号下降值最大,因此选择30 $\mu\text{mol/L}$ 为亚甲基蓝的最佳浓度。

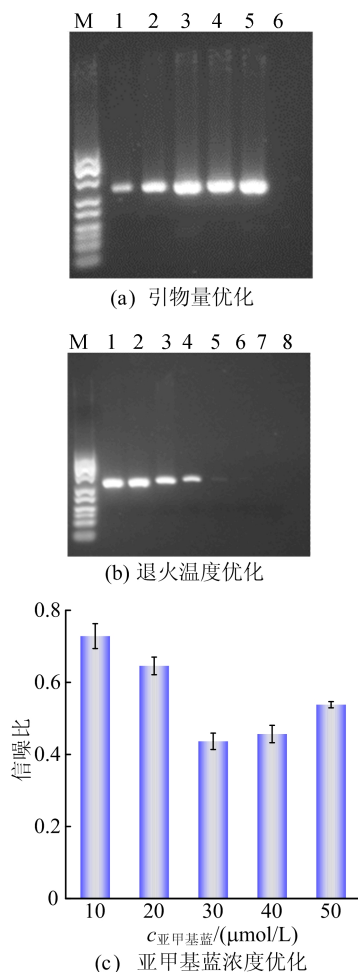


图3 PCR扩增体系优化结果

2.4 标准曲线绘制分析

电泳结果和根据最佳反应条件所得的标准曲线如图4所示。图4a中,泳道1~泳道8为 3×10^7 、 3×10^6 、 3×10^5 、 3×10^4 、 3×10^3 、 3×10^2 、 3×10^1 CFU/mL,泳道8为阴性对照。由图4a可知,随着沙门氏菌浓度降低,扩增产物条带逐渐减弱。由图4b可知,相应的电化学检测结果表明随着沙门氏菌浓度降低,电信号的减弱也越来越少。沙门氏菌浓度在 $3 \times 10^1 \sim 3 \times 10^7$ CFU/mL之间时,电化学检测结果有良好的线性关系。

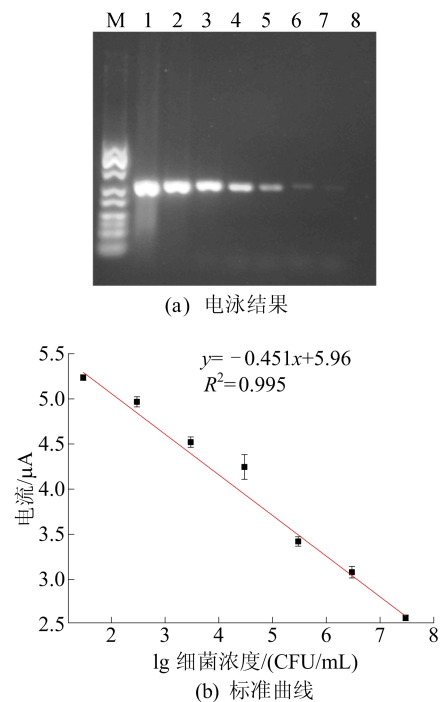


图4 电泳结果和标准曲线

2.5 特异性验证结果分析

特异性验证结果如图5所示。

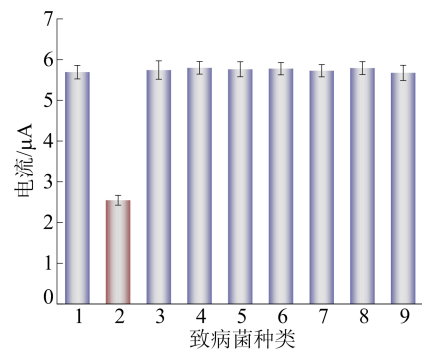


图5 特异性实验结果

图5中:1为阴性;2为阳性;3为粪链球菌;4为大肠埃希氏菌;5为金黄色葡萄球菌;6为单

增李斯特菌;7 为副溶血性弧菌;8 为铜绿假单胞菌;9 为对照菌种混合组。结果表明只有在存在目标物时电信号才会明显降低,特异性良好。

2.6 牛奶样品的检测结果

牛奶样品中的标准曲线如图 6 所示,由图 6 可知,沙门氏菌浓度在 $3 \times 10^1 \sim 3 \times 10^7$ CFU/mL 之间时,其检测结果有良好的线性关系。表明该方法适用于复杂基质的实际样品,有望实现实际应用。

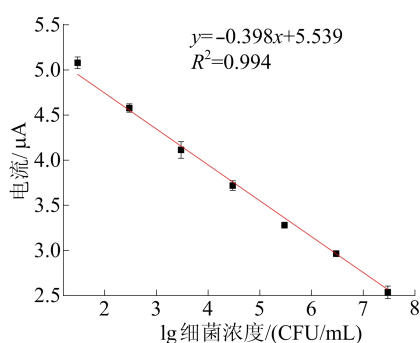


图 6 实际样品实验结果

3 结 论

本文通过在扩增体系中加入电化学信标分子亚甲基蓝实现了对扩增产物的电化学检测。所提出的模板提取方法快捷、可行,结合 PCR 扩增可在 120 min 内实现对鼠伤寒沙门氏菌快速灵敏的检测,适用于牛奶样品的快速检测。

本文所建立的电化学检测方法快速、灵敏,有望应用于现场快速检测。在此基础上开发细菌快速裂解办法和等温扩增技术并结合微流控芯片等设备,可以将检测用时缩短 1/2 且集成到便携式设备中,有望在未来实现电化学分子扩增实时监测,可以使食品安全预警前移,扩大食品安全控制范围,为现场快速检测奠定了良好的基础。

[参 考 文 献]

- [1] 宋心怡,明双喜,王华伟,等. 食源性致病菌生物快速检测技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报,2021,12(21): 8582-8589.
- [2] 段星星,曾晓琮,周露. 沙门氏菌检验及鉴定方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报,2020,11(16): 5364-5370.
- [3] 顾雨熹,王锦,陈帅,等. 食品中两种沙门氏菌检测方法的比较[J]. 粮食储藏,2022,51(2): 35-40.
- [4] 吴有雪,吴美娇,田亚晨,等. 沙门氏菌检测生物传感器研究进展[J]. 食品科学,2021,42(3): 339-345.
- [5] COSSETTINI A,VIDIC J,MAIFRENI M,et al. Rapid detection of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Campylobacter spp.*, and *Escherichia coli* in food using biosensors[J]. Food Control,2022,137: 1-10.
- [6] 谭燕,肖紫鸣,李小林,等. 多重 PCR 技术检测食品中鼠伤寒沙门氏菌 3 种毒力基因[J]. 食品研究与开发,2021,42(12): 171-176.
- [7] 孙娜,燕如娟. 生化鉴定在食品微生物检测中的应用[J]. 现代食品,2022,28(9): 28-30,34.
- [8] LIN L,ZHENG Q,LIN J,et al. Immuno and nucleic acid-based current technique for *Salmonella* detection in food[J]. European Food Research and Technology,2020, 246(3): 373-395.
- [9] 王紫璇,孙洁芳,邵兵. 食物中典型致病菌的快速检测研究进展[J]. 中国食品卫生杂志,2022,34(2): 382-389.
- [10] JIANG R,LU L,CAO X,et al. A low-background aptasensor based on enzyme-linked multifunctional carbon nanosheets for the detection of *Salmonella*[J]. Sensors and Actuators B: Chemical,2022,370: 1-8.
- [11] GUO R,XUE L,JIN N,et al. Power-free microfluidic biosensing of *Salmonella* with slide multivalve and disposable syringe[J]. Biosensors and Bioelectronics,2022, 213: 1-10.
- [12] 刘慧慧,张先舟,张蕴哲,等. 基于 G-四链体的 PCR-RCA 双重扩增技术检测沙门氏菌[J]. 食品科学,2022,43(12): 325-333.
- [13] 吕新,刘兰英,陈丽华,等. 沙门氏菌 LAMP 检测方法的建立及其在蔬菜栽培土壤中的应用[J]. 福建农业学报, 2021,36(2): 236-242.
- [14] WU Q,ZHANG Y,YANG Q,et al. Review of electrochemical DNA biosensors for detecting food borne pathogens[J]. Sensors,2019,19(22): 1-32.
- [15] JADON N,JAIN R,SHARMA S,et al. Recent trends in electrochemical sensors for multianalyte detection;a review[J]. Talanta,2016,161: 894-916.
- [16] XING X,YAO B,WU Q,et al. Continual and accurate home monitoring of uric acid in urine samples with uricase-packaged nanoflowers assisted portable electrochemical uricometer[J]. Biosensors and Bioelectronics,2022,198: 1-8.
- [17] 聂文芳,宋清,腾军,等. 空肠弯曲菌多重毒力基因检测方法的建立[J]. 合肥工业大学学报(自然科学版),2021, 44(5): 700-705.
- [18] KUMAR M S,NANDESHWAR R,LAD S B,et al. Electrochemical sensing of SARS-CoV-2 amplicons with PCB electrodes[J]. Sensors and Actuators B: Chemical,2021,343: 1-9.
- [19] FANG T H,RAMALINGAM N,XIAN-DUI X D,et al. Real-time PCR microfluidic devices with concurrent electrochemical detection[J]. Biosensors and Bioelectronics,2009, 24(7): 2131-2136.

(责任编辑 张 镛)