

# 应用微芯片电泳仪 MultiNA

## 检测食品中的毒菌、病毒和霉



### 1

#### 前言

食物中毒是由于食用了附着造成食物中毒的细菌、病毒等的食品或含有有害微生物、化学物质的食品所引起的健康损害。另外，由霍乱菌、赤痢菌等引起的具有传染性的感染症也是通过食品传染的健康损害，因此被视为食物中毒。附着食物中毒菌、病毒等并没有引起食品在“味”、“香”方面的变化，因此，人们在食用食品时，往往没有注意食品已被微生物等污染，从而引起食物中毒。多

数的食物中毒菌引起腹痛、呕吐、腹泻等胃肠障碍。另外，食品上生的霉在食品中繁殖产生引起食物中毒的霉菌毒素。霉菌毒素不仅是造成食物中毒的原因，还是引发癌症的原因。在食品相关行业的卫生管理运营上，必须严密监视、管理这些造成食物中毒的细菌、病毒、霉等。不仅在食品相关行业，在化妆品、医药品相关行业也非常重视包括食物中毒菌在内的所有微生物。

### 2

#### 岛津解决方案概述

岛津对于食品中的食物中毒菌、病毒和霉检测应用的是普通PCR加电泳法，首先对样品进行总DNA提取，根据食物中毒菌、病毒和霉其特异性序列设计PCR引物，进行PCR反应，岛津微芯片电泳仪MultiNA检测PCR扩增产物片段长度，依据是否获得特定长度的

预期性DNA片段来检测所含的食物中毒菌、病毒和霉的种类。应用此方法检测时，可以同时加入多种食物中毒菌、病毒和霉的特异性引物，根据MultiNA检测得到片段的长度，一次性判断出所持有的多种食物中毒菌、病毒和霉的种类。通量高，操作简便。

# 3

## 实验结果和讨论

### 3.1 检测食物中毒菌

表1所示为将10种食物中毒菌相关的基因作为目标分析物。

表1 被检测的食物中毒菌相关基因

名称	片段长度/bp
肠炎弧菌耐热性溶血毒素类似毒素基因 (trh1&2)	250
黄色葡萄球菌肠毒素A基因	423
黄色葡萄球菌毒素性休克症候群毒素基因	228
沙门氏菌invA基因	378
毒素原性大肠菌LT基因	263
毒素原性大肠菌STh基因	131
毒素原性大肠菌STp基因	123
肠管出血性大肠菌VT1基因	349
肠管出血性大肠菌VT2基因	404
肠管出血性大肠菌VT1, VT2基因	171

10种样品的食物中毒菌相关的目标基因区域检测结果如图1所示。所有的食物中毒菌相关的基因都被检测到。MCE-202 MultiNA的分析结果同时得到凝胶图和电泳图。根据标准样品 (Ladder) 制作的标准曲线, 可计算得到未知样品的尺寸和浓度, 可简单、可靠地评估PCR扩增产物。

### 3.2 检测诺如病毒

将以诺如病毒试剂盒G1/G2处理过的样品使用微芯片电泳MultiNA进行分析, 分析结果如图2所示。在G1与G2阳性样品中, 结果检测到来自86 bp (G1) 和142 bp (内标), 以及98 bp (G2) 和205bp (内标) 的扩增产物。MultiNA结果比琼脂糖凝胶电泳结果清晰, 并且给出数字化结果。

### 3.3 检测霉菌与酵母

图3显示的得到的霉菌和酵母基因ITS区域的分析结果。霉菌和酵母的特异性基因的扩增产物被清晰地检测到。MultiNA检测到了测量结果, 同时给出凝胶图和电泳图。另外, 通过已知片段长度的标准品 (Ladder) 得到一条标准曲线, 样品的尺寸通过这条标准曲线计算出来。样品的浓度时通过以一个已知浓度的高分子内标物作为标准得到。因此, 使用MultiNA来测定目标扩增产物较琼脂糖凝胶电泳更可靠和便利。

图1 食物中毒菌相关基因的分析结果

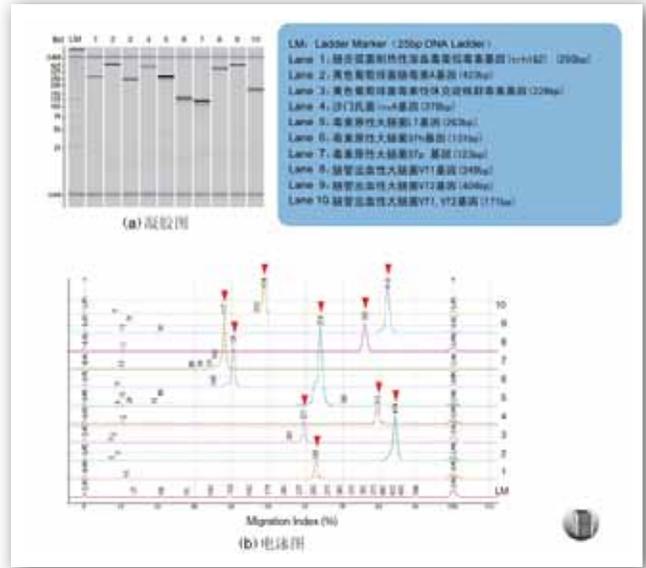


图2 微芯片电泳MultiNA检测使用诺如病毒G1/G2扩增试剂盒的扩增样品电泳图

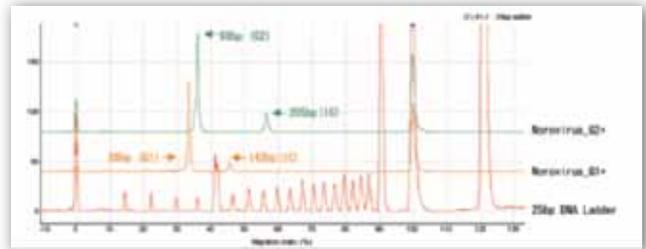
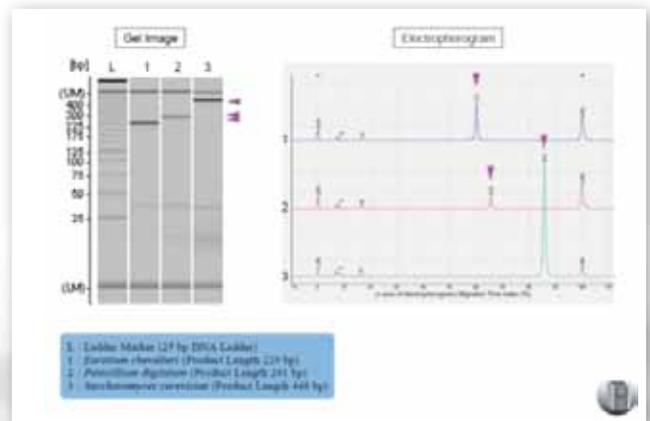


图3 MultiNA分析霉菌和酵母的结果



# 4

## 实验方法

### 4.1 检测食物中毒菌

#### 4.1.1 试剂

Ampdirect® Plus ( For International ) ( WAKO pure chem ) 604-21469; ( Shimadzu corp. ) S241-08800-99

DNA-500 Reagent Kit for MultiNA ( 岛津制作所 ) 292-27910-91

SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain ( Invitrogen ) S-11494

25 bp DNA Ladder ( Invitrogen ) 10597-011

#### 4.1.2 分析步骤

样品使用从菌株提取、纯化的DNA。使用本公司的基因扩增用试剂“Ampdirect® Plus”进行PCR，以MultiNA分析获得的PCR扩增产物，实验过程如图4所示。

图4 食物中毒相关基因分析的实验过程



### 4.2 检测诺如病毒

#### 4.2.1 试剂

检测诺如病毒G1 RNA的直接RT-PCR试剂盒 ( 岛津制作所 ) 241-08905-91

检测诺如病毒G2 RNA的直接RT-PCR试剂盒 ( 岛津制作所 ) 241-08905-91

DNA-500 Reagent Kit for MultiNA ( 岛津制作所 ) 292-27910-91

SYBR® Gold nucleic acid gel stain ( Invitrogen ) S-11494

25bp DNALadder ( Invitrogen ) 10597-011

( 注 ) 有关诺如病毒G1/G2扩增试剂盒的详细信息，请参照试剂盒的操作手册。

样品:

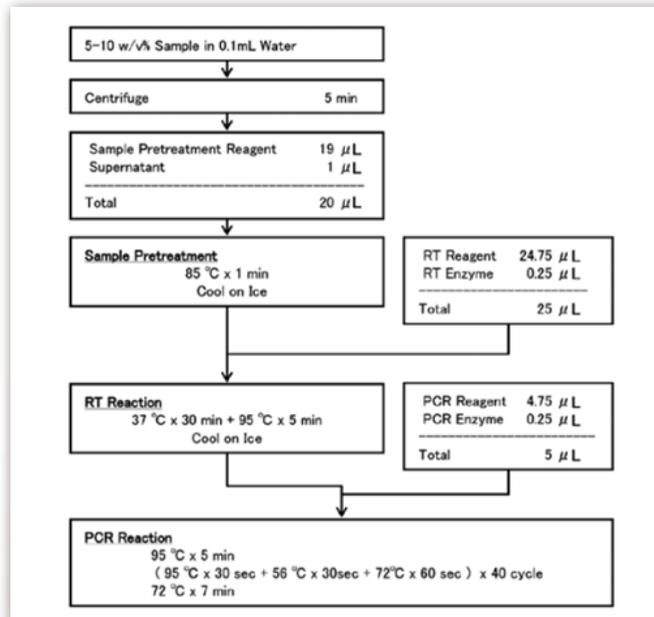
G1+: G1扩增试剂盒处理过的诺如病毒G1阳性样品

G2+: G2扩增试剂盒处理过的诺如病毒G2阳性样品

#### 4.2.2 分析步骤

样品准备及实验方法见图5。

图5 诺如病毒检测样品准备及实验方法



## 4.3 检测霉菌与酵母

### 4.3.1 试剂

Ampdirect® Plus Enzyme Set ( 岛津制作所 ) 241-08890-92  
 DNA-500 Reagent Kit for MultiNA ( 岛津制作所 ) 292-27910-91  
 SYBR® Gold nucleic acid gel stain ( Invitrogen ) S-11494  
 25bp DNALadder ( Invitrogen ) 10597-011

### 4.3.2 分析步骤

4.3.2.1 样品包含两种霉菌和一种酵母，如表2所示。Eurotium是一种霉菌，它生长在干燥食物上，例如干货，面包，调理面包，及果酱等。Penicillium，也称“青霉”是一种霉菌，它发生在多种食物中，例如柑橘，谷物，奶制品等。青霉素有很多种，范围从对食物有益的种类（例：生产奶酪）到很多有害的种类（例：有毒的霉菌）。Saccharomyces cerevisiae属于出芽酵母，包括面包师酵母，红酒酵母和清酒酵母。

4.3.2.2 对于PCR反应，使用岛津公司的“Ampdirect® Plus Enzyme Set”试剂进行PCR扩增，PCR的反应条件列在使用手册中。生长在琼脂媒介上霉菌和酵母被附着到微量移液管上，之后悬浮于PCR反应液中，实施PCR反应（图6）。实施PCR时，引物（ITS引物为针对真菌设计的引物，参照日本药典中通过基因分析进行快速鉴定微生物）被用来检测ITS区域。

4.3.2.3 MultiNA分析PCR产物，如图7所示。

表2 霉菌和酵母样品

类别	名称
霉菌	Eurotium chevalieri
霉菌	Penicillium digitatum
酵母	Saccharomyces cerevisiae

图6 直接PCR方法



图7 霉菌和酵母基因分析流程



# 5

## 成本核算

成本核算如表3所示。

表3 成本核算

实验过程	试剂名称	生产公司和货号	每个样品分析成本 ( 元 )
样品前处理	Ampdirect® Plus	WAKO Pure Chem 605-21411	6
	合计		6
微芯片电泳MultiNA分析	DNA-500 Reagent Kit for MultiNA	( 岛津制作所 ) 292-27910-91	1.25
	SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain	( Invitrogen ) S-11494	0.004
	25 bp DNA Ladder	( Invitrogen ) 10597-011	0.03
	合计		1.284

本成本核算仅供参考。