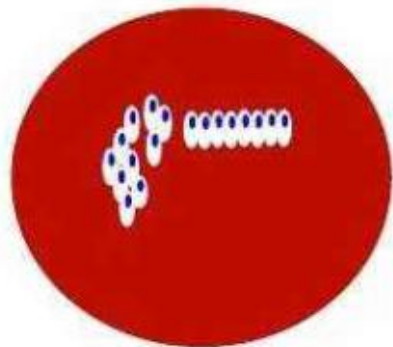
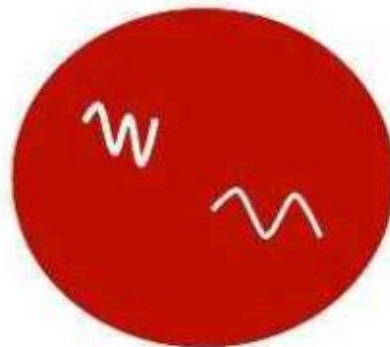


食品中微生物的快速检验

食品中的微生物检验



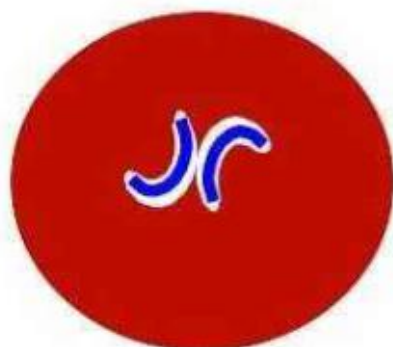
Cocc 球菌



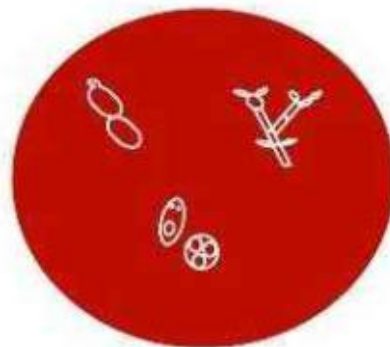
Spirillum 螺旋菌



Bacillus 杆菌



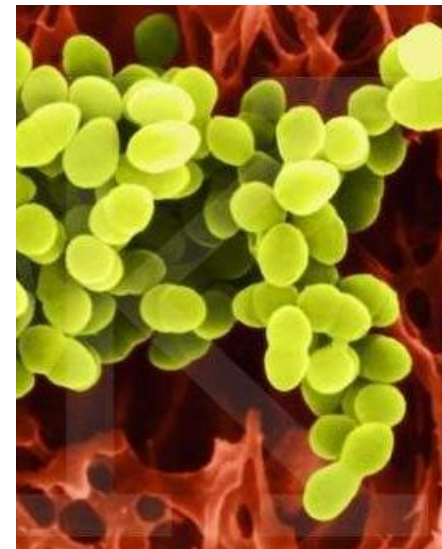
Vibro 弧菌



Yeast 酵母

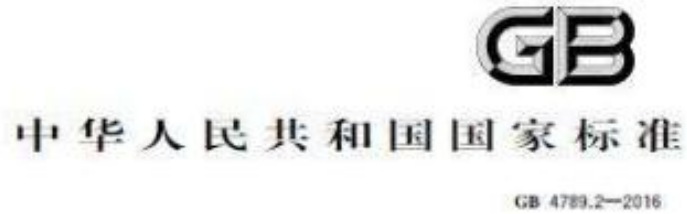


Molds 霉菌



金黄色葡萄球菌

食品中的微生物检验

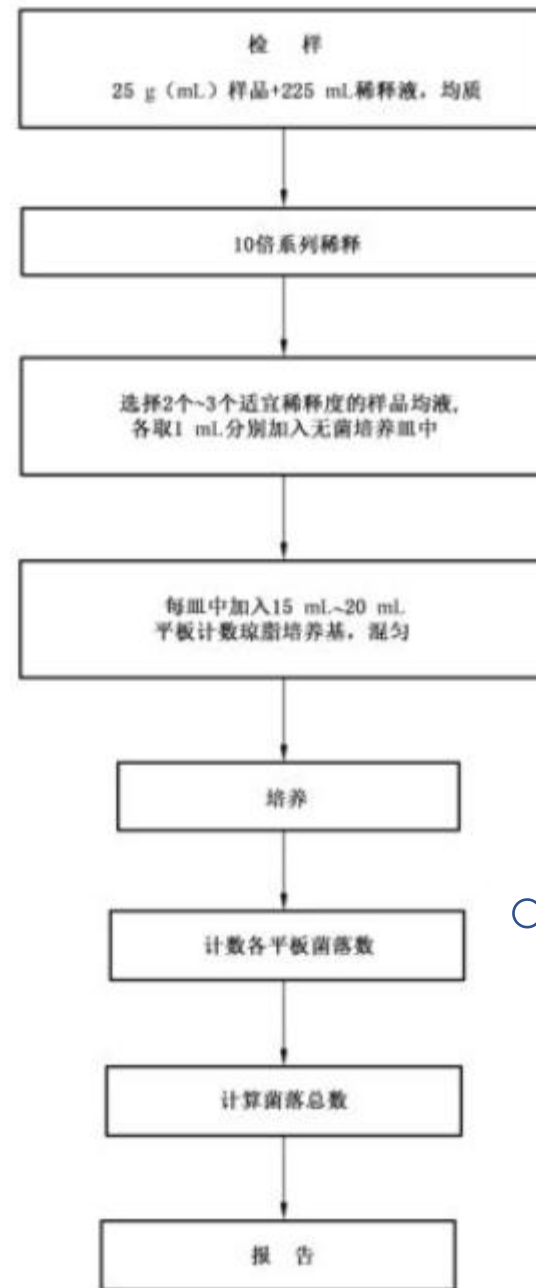


食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定

2016-12-23 发布

2017-06-23 实施

中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会
国家食品药品监督管理总局 发布



测定菌落总数
能不能分辨出
细菌的组成和
类别?

图 1 菌落总数的检验程序

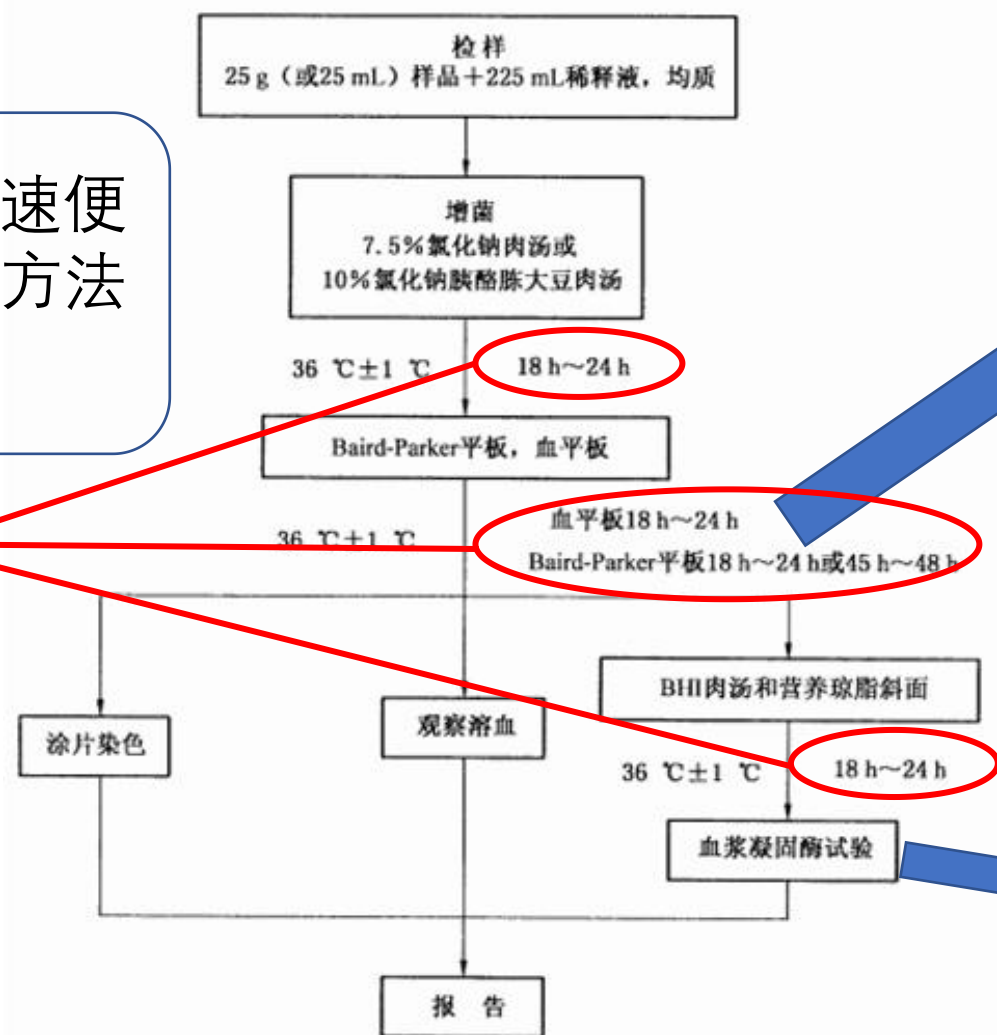
食品中的微生物检验

GB 中华人民共和国国家标准 GB 4789.3—2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群计数	GB 中华人民共和国国家标准 GB 4789.10—2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验	GB 中华人民共和国国家标准 GB 4789.31—2013 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌、志贺氏菌和致泻大肠埃希氏菌 诊断	ICS 07.100.30 C 53 GB 中华人民共和国国家标准 GB/T 4789.6—2003 代替 GB/T 4789.6—1994 食品卫生微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验 Microbiological examination of food hygiene— Examination of diarrheogenic <i>Escherichia coli</i>
2016-12-23 发布 中华人民共和国国家卫生和 国家食品药品监督管理总局 GB 中华人民共和国国家标准 GB 4789.35—2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 乳酸菌检验	GB 中华人民共和国国家标准 GB 4789.40—2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)检验	GB 中华人民共和国国家标准 GB XXXX-XXXX 食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数 (征求意见稿)	
2016-12-23 发布 2017-06-23 实施 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会 国家食品药品监督管理总局 发布	2016-12-23 发布 2017-06-23 实施 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会 国家食品药品监督管理总局 发布	XXXX-XX-XX发布 XXXX-XX-XX实施 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会 发布	

食品中金黄色葡萄球菌检验

有没有更快速便捷且准确的方法呢？

耗时3天



阴性反应

阳性反应

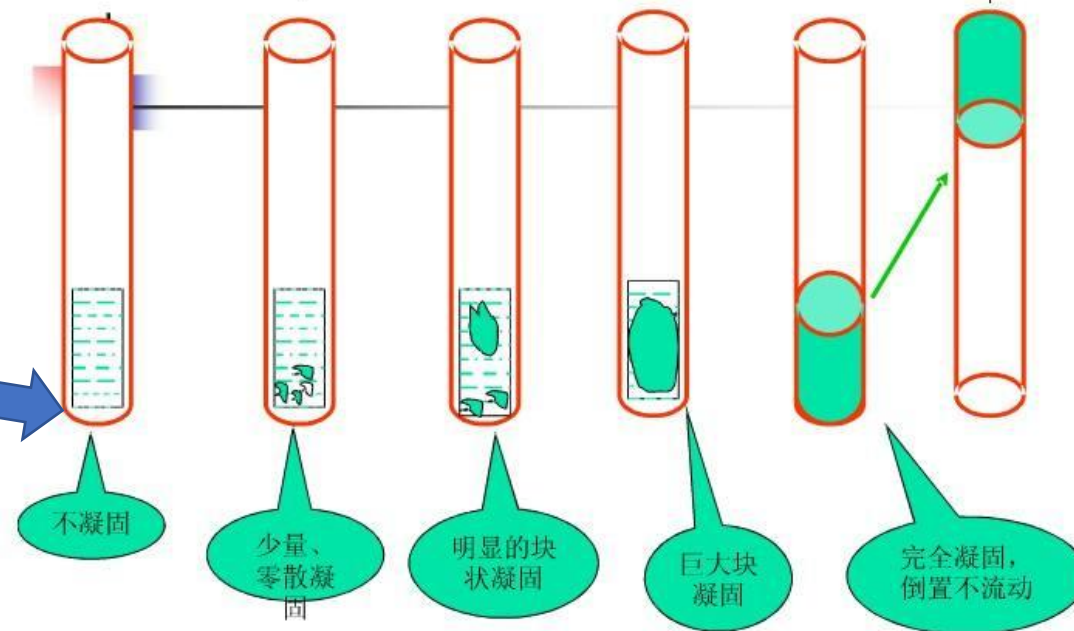
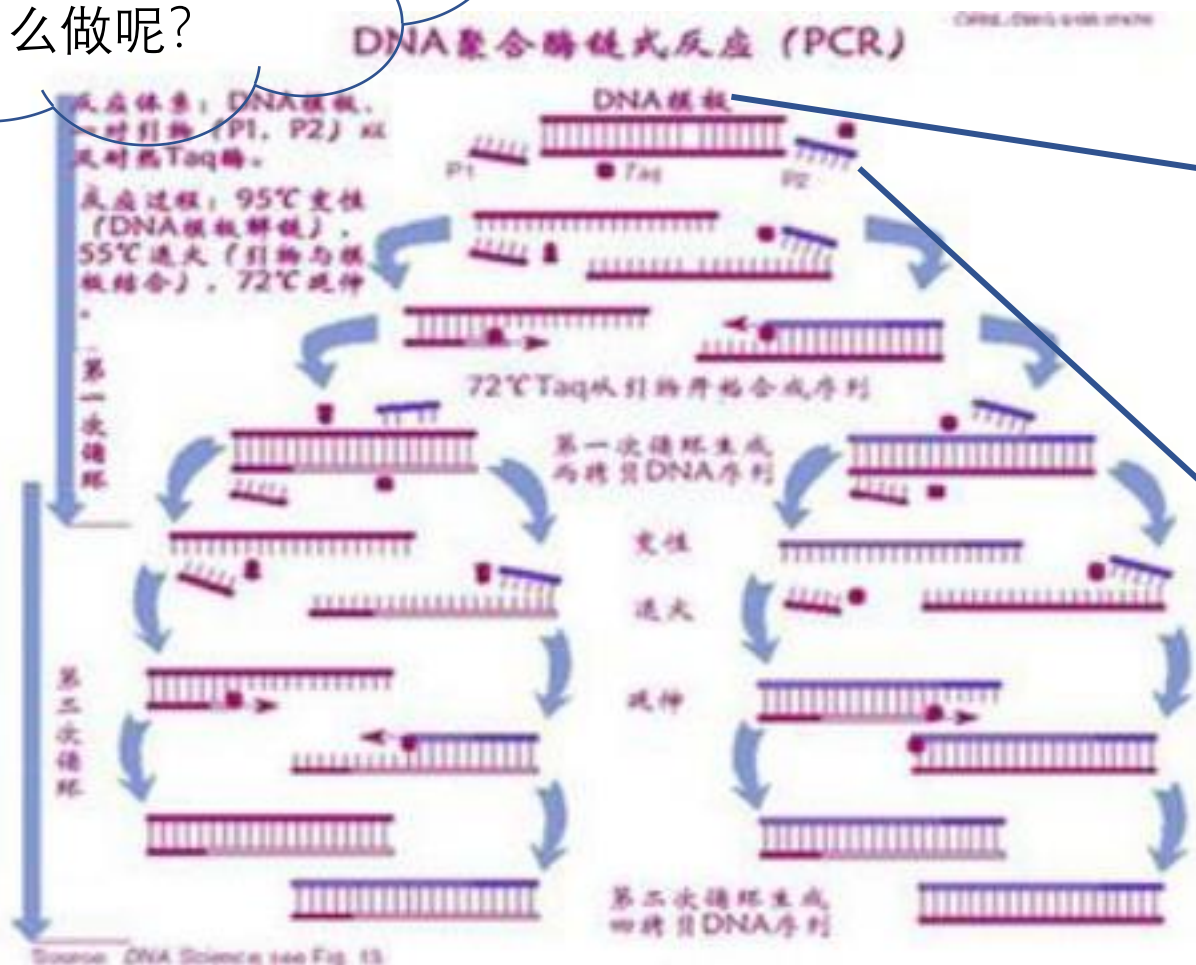


图 1 金黄色葡萄球菌检验程序

利用分子生物学方法进行食品微生物检验—以金黄色葡萄球菌为例

利用PCR技术进行金黄色葡萄球菌的检测，我们应该怎么做呢？

PCR技术



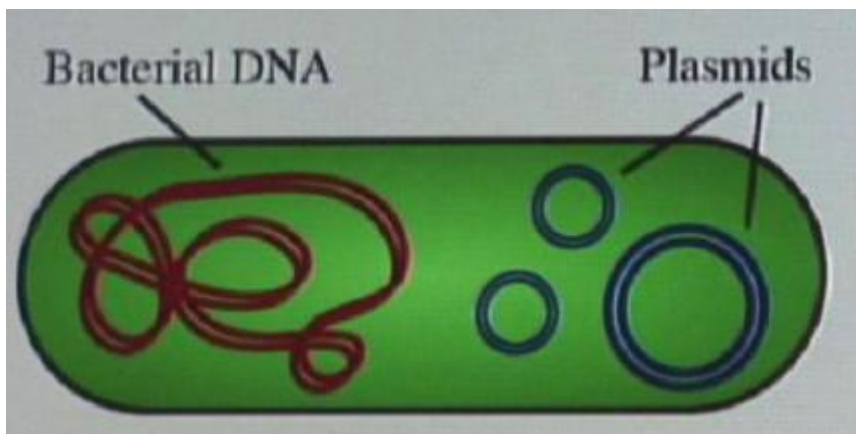
1、需要有细菌的DNA

2、需要有能够特异性识别的引物

1、细菌DNA怎么来？

细菌-----没有细胞核的原核生物，DNA大多数集中在细胞质中低电子密度区，称为**核质体**。

细菌中除了核质体区的基因组DNA，还有哪种能自主复制的遗传因子？



核质体：浅绿色区域

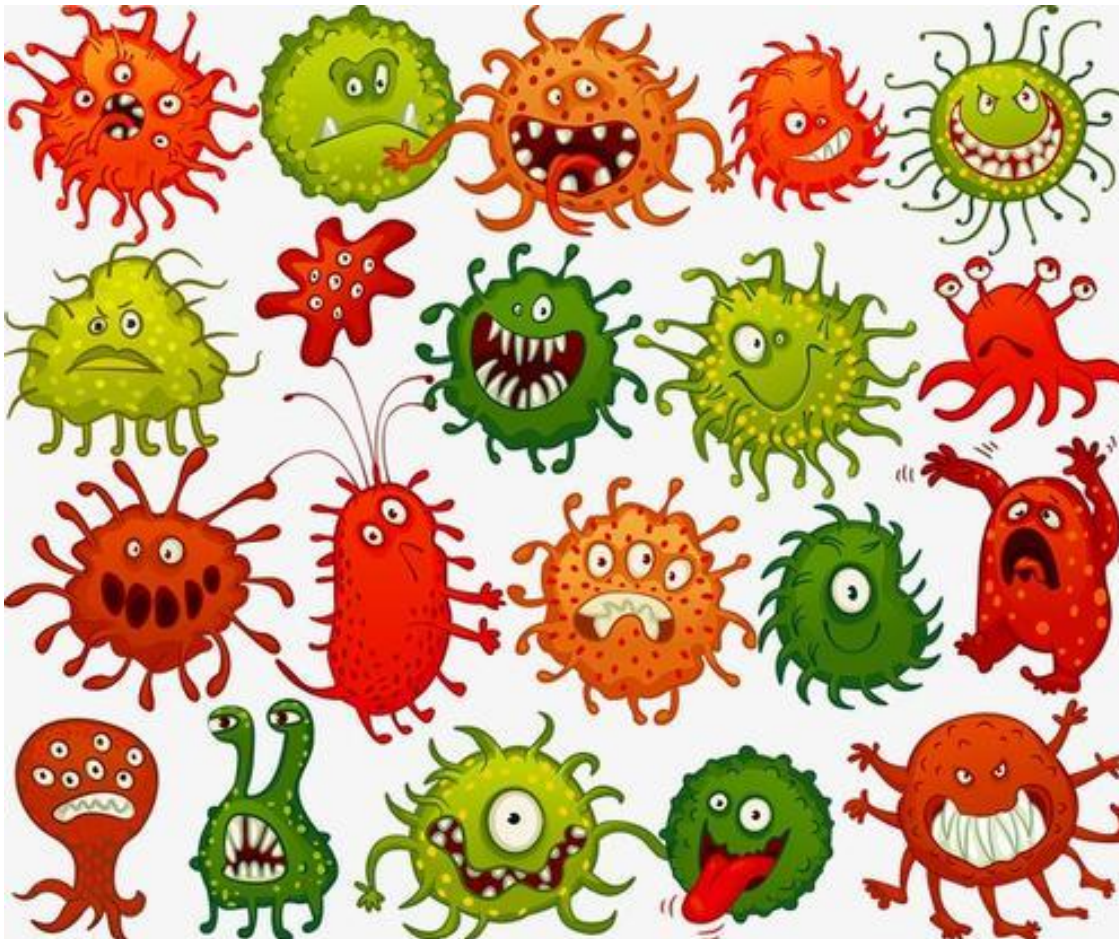
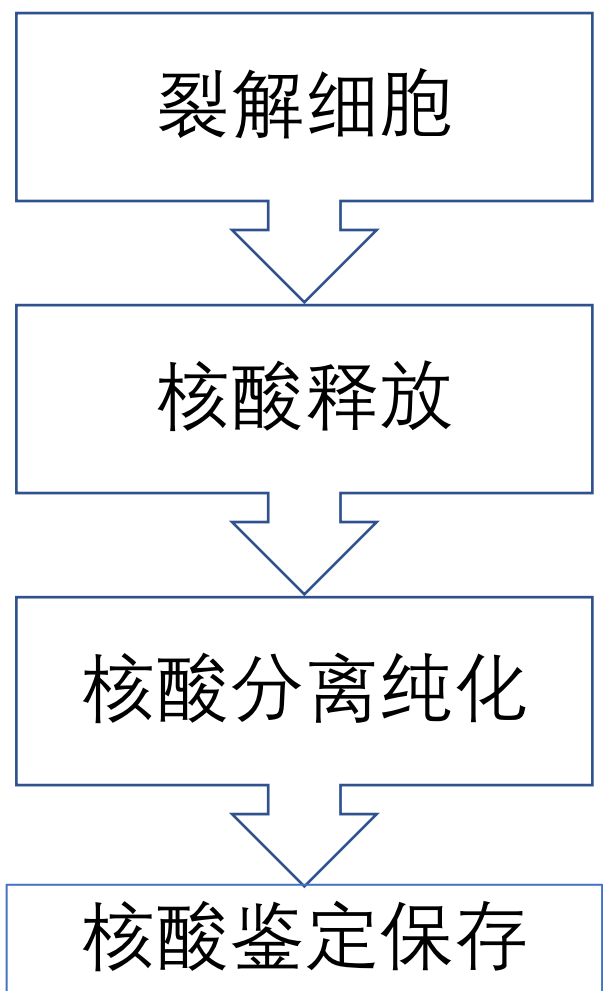
1、细菌DNA怎么来？

提取细菌基因组DNA的总原则：

- (1) 保证核酸一级结构的完整性；
- (2) 尽量去除其他分子（如蛋白质、多糖、脂类等），降低污染；
- (3) 尽量去除其他核酸分子（RNA）；
- (4) 不应含有对PCR反应有抑制作用的有机溶剂或较高浓度的金属离子。



1、细菌DNA怎么来？



裂解细胞

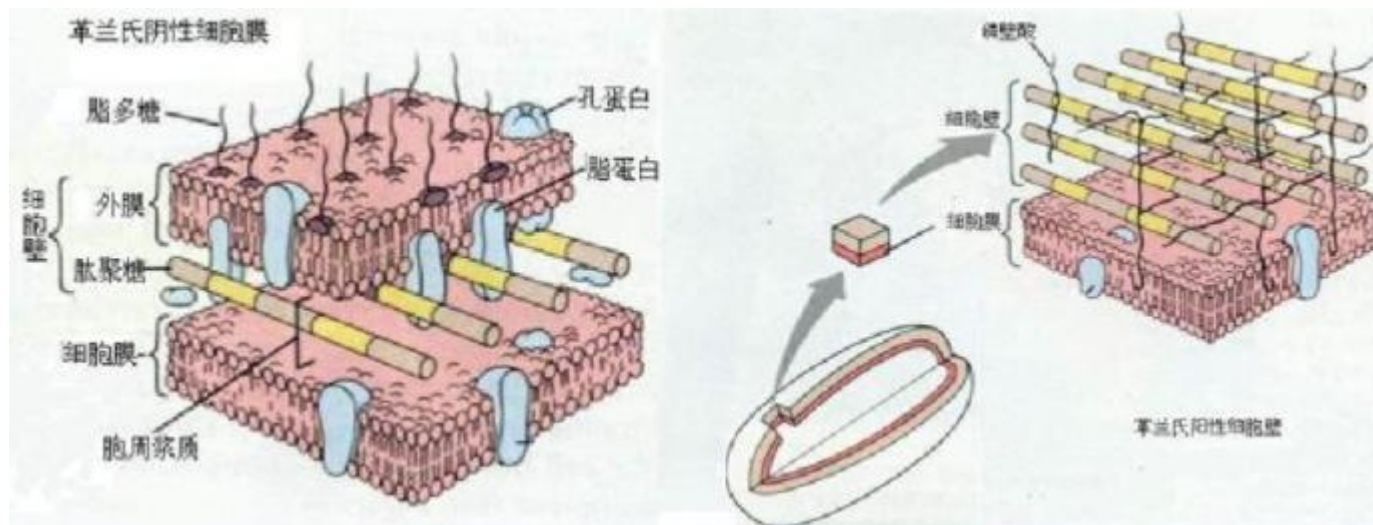
破裂细胞壁

革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌的区别是什么？

由于G⁻和G⁺细胞壁组成不同，厚度也会有所差别。

G⁻：细胞壁较薄，肽聚糖仅2-3层，容易破裂；

G⁺：细胞壁较厚，有15-50层肽聚糖、磷壁酸和少量蛋白质。



裂解细胞

常用裂解细菌细胞壁的方法：

(1) 机械法：

高压匀浆破碎法

振荡珠击破碎法

高速搅拌珠研磨破碎法

超声波破碎法

(2) 非机械法：

渗透压冲击破碎法

冻融破碎法

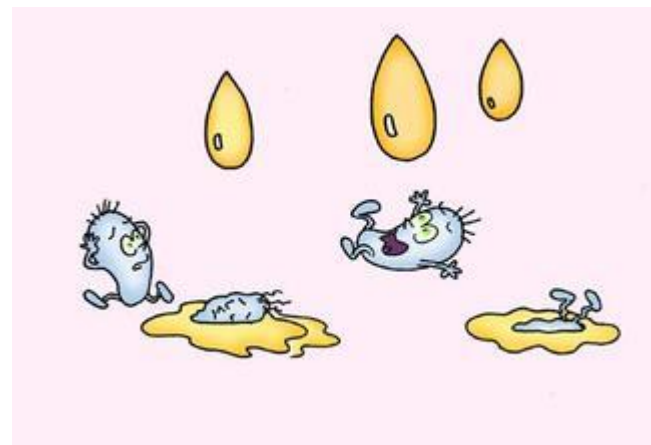
酶溶破碎法

化学破碎法

去垢剂破碎法

实验室常用
方法

溶菌酶：胞壁质酶，能够水解细菌中的黏多糖，导致细胞壁破裂



核酸释放—提它！ 提它！ 提它！

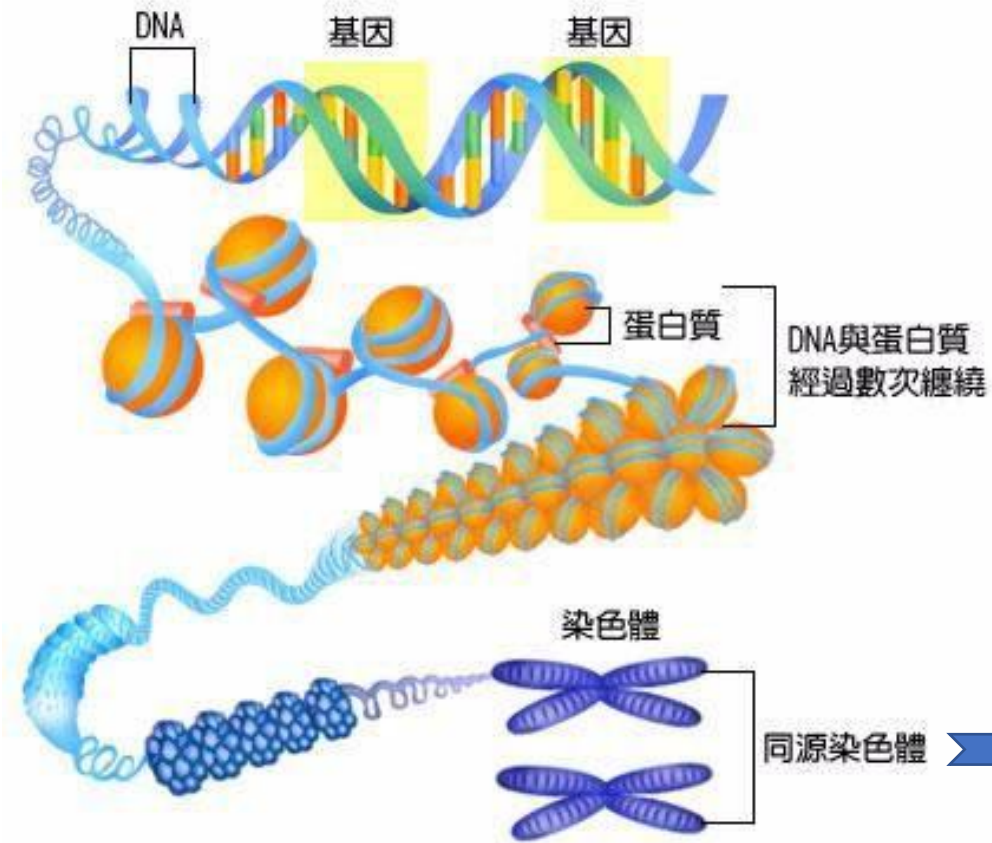
组成生物体的化合物：



细胞破裂后，释放出来的只有DNA吗？

需要从复杂化合物的混合物中，提取出DNA，并纯化

核酸释放—提它！ 提它！ 提它！



DNA与蛋白质“纠缠”在一起，怎样才能使DNA释放出来？

利用**SDS**（十二烷基硫酸钠）或**CTAB**（十六烷基三甲基溴化铵），破坏DNA与蛋白质的静电结合或使蛋白质变性，分离DNA和蛋白质。

核酸释放—提它！ 提它！ 提它！

蛋白质：苯酚：氯仿：异戊醇（体积比） 25:24:1

氯仿：异戊醇（体积比） 24:1

RNA：利用Rnase消化



分离后，混合物中有什么？我们需要怎么把DNA单独分离出来？

相似相溶原理

核酸释放—提它！ 提它！ 提它！

去除其他杂质后，DNA溶解在溶液中，
需要沉淀纯化出来

利用预冷的无水乙醇进行沉淀，DNA可
沉淀出白色絮状物

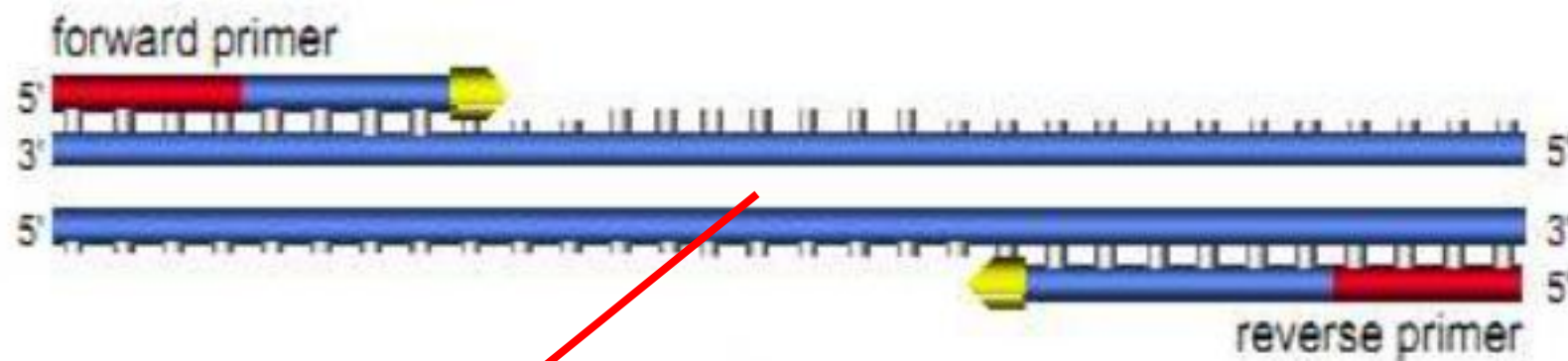
利用70%乙醇洗涤、干燥后，利用TE溶
解DNA



这里的DNA是
某一种细菌的
DNA还是很多
种细菌的混合
物？

2、引物怎么办？

引物：一般是一对（两条引物）：其中一条引物与目的基因一端的一条DNA模板链互补，另一条与目的基因另一端的另一条DNA模板链互补。

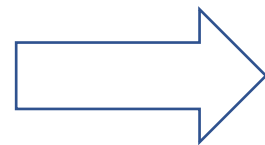


这一段就是我们的目的基因了！

2、引物怎么办？

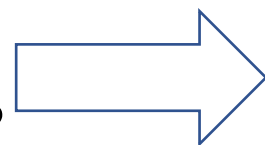


(1) 提取出的DNA中有很多不同的细菌，我们怎么去挑选引物呢？



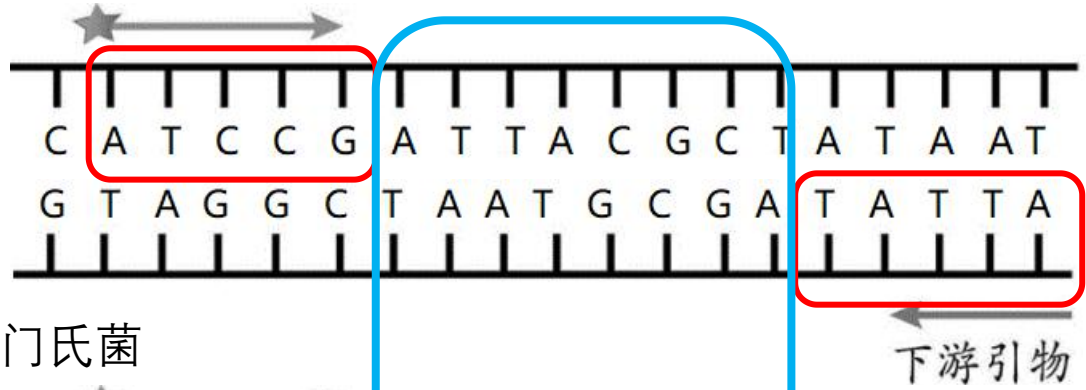
提取出来的可能有大肠杆菌、沙门氏菌、单增李斯特菌等等，我们只想看看是不是有金黄色葡萄球菌，怎么办？

(2) 我们挑选出的引物，能不能是很多细菌都有的？

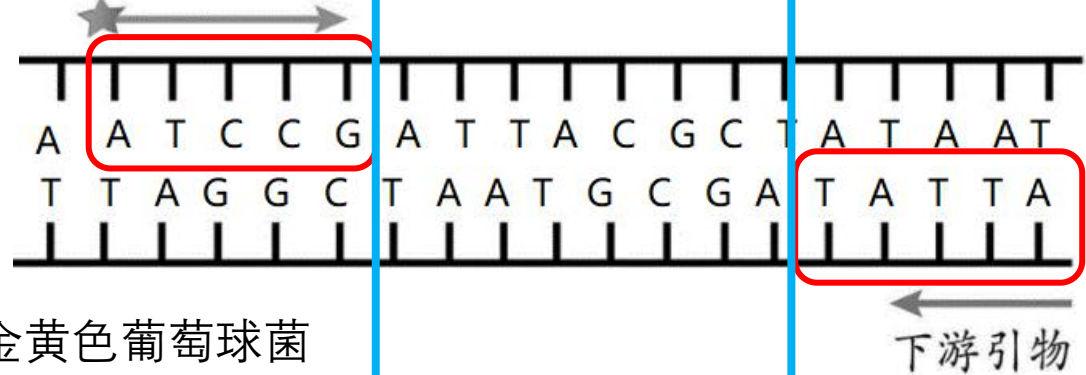


如果我们选择的引物是许多细菌都共有的，会发生什么情况？

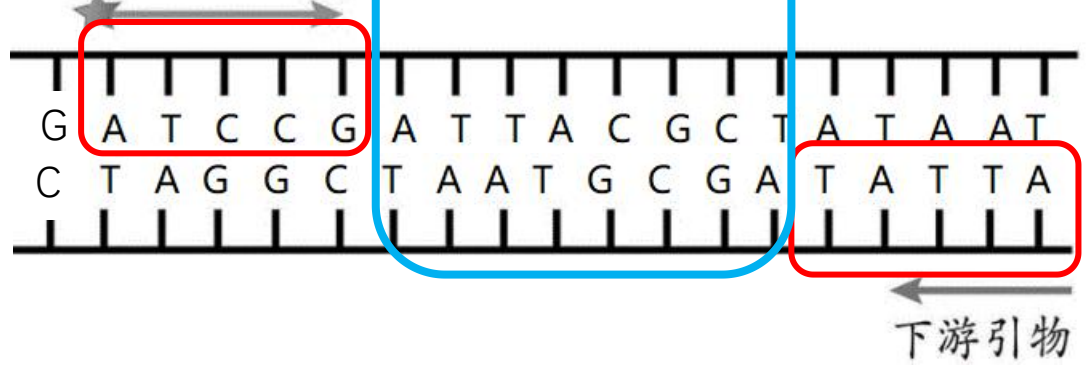
大肠杆菌



沙门氏菌



金黄色葡萄球菌



引物需要具备**特异性**



2、引物怎么办？

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

The image shows the NCBI (National Center for Biotechnology Information) homepage. At the top, there is a navigation bar with 'NCBI', 'Resources', and 'How To' links, along with a 'Sign in to NCBI' button. Below this is a search bar with a dropdown menu set to 'All Databases' and a 'Search' button. The main content area is divided into several sections:

- NCBI Home**: A sidebar menu on the left listing various resources such as 'Resource List (A-Z)', 'All Resources', 'Chemicals & Bioassays', 'Data & Software', 'DNA & RNA', 'Domains & Structures', 'Genes & Expression', 'Genetics & Medicine', 'Genomes & Maps', 'Homology', 'Literature', 'Proteins', 'Sequence Analysis', 'Taxonomy', 'Training & Tutorials', and 'Variation'.
- Welcome to NCBI**: A central section with a description of the center's mission and links to 'About the NCBI', 'Mission', 'Organization', and 'NCBI News & Blog'.
- Submit**: A section with an upward arrow icon and the text 'Deposit data or manuscripts into NCBI databases'.
- Download**: A section with a downward arrow icon and the text 'Transfer NCBI data to your computer'.
- Learn**: A section with a book icon and the text 'Find help documents, attend a class or watch a tutorial'.
- Develop**: A section with a bar chart icon and the text 'Use NCBI APIs and code libraries to build applications'.
- Analyze**: A section with a line graph icon and the text 'Identify an NCBI tool for your data analysis task'.
- Research**: A section with a microscope icon and the text 'Explore NCBI research and collaborative projects'.
- Popular Resources**: A list of popular resources including PubMed, Bookshelf, PubMed Central, PubMed Health, BLAST, Nucleotide, Genome, SNP, Gene, Protein, and PubChem.
- NCBI News & Blog**: A section with news items, including 'PubMed Labs is now part of NCBI Labs' (dated 03 Oct 2017), 'October 11 NCBI Minute: Introducing the New RefSeq Functional Elements Project' (dated 02 Oct 2017), and 'October 4th NCBI Minute: Create, link and share your bibliography (PubMed & ORCID)' (dated 27 Sep 2017).

通过NCBI网站，
检索金黄色葡萄球菌
(*Staphylococcus aureus*) 的序列

检索到金黄色葡萄球菌nuc基因的一段序列（EF529608），这段序列是金黄色葡萄球菌特有的。

GTATGGCAATTGTTTCAATGTTACTTATAGGGATGGCTATCAGTAATGTTTCGAAAGGGCAATACGCAAA
GAGGTTTTTCTTTTTCGCTACTAGTTGCTTAGTGTTAACTTTAGTTGTAGTTTCAAGTCTAAGTAGCTCA
GCAAATGCATCACAAACAGATAACGGCGTAAATAGAAGTGGTTCTGAAGATCCAACAGTATATAGTGCAA
CTTCAACTAAAAAATTACATAAAGAACCTGCGACTTTAATTAAAGCGATTGATGGTGATACGGTTAAATT
AATGTACAAAGGTCAACCAATGACATTCAGACTATTATTGGTTGATACACCTGAAACAAAGCATCCTAAA
AAAGGTGTAGAGAAATATGGTCCTGAAGCAAGTGCATTTACGAAAAAAATGGTAGAAAATGCAAAGAAAA
TTGAAGTCGAGTTTGACAAAGGTCAAAGAACTGATAAATATGGACGTGGCTTAGCGTATATTTATGCTGA
TGGAAAAATGGTAAACAAAGCTTTAGTTTCGTCAAGGCTTGGCTAAAGTTGCTTATGTTTATAAACCTAAC
AATACACATGAACAACCTTTTAAGAAAAAGTGAAGCACAAAGCGAAAAAAGAGAAATTAAATATTTGGAGCG
AAGACAACGCTGATTCAG

Primer3 (v. 0.4.0) Pick primers from a DNA sequence.	Checks for mispriming in template.	disclaimer	Primer3 Home
	Primer3plus interface	cautions	FAQ/WIKI

There is a newer version of Primer3 available at <http://primer3.ut.ee>

Paste source sequence below (5'→3', string of ACGTNacgtn -- other letters treated as N -- numbers and blanks ignored). FASTA format ok. Please N-out undesirable sequence (vector, ALUs, LINEs, etc.) or use a [Mispriming Library \(repeat library\)](#):
NONE ▾

☒ Pick left primer, or use left primer below:	☐ Pick hybridization probe (internal oligo), or use oligo below:	☒ Pick right primer, or use right primer below (5' to 3' on opposite strand):

[Pick Primers](#) [Reset Form](#)

Sequence Id:		A string to identify your output.	
Targets:		E.g. 50,2 requires primers to surround the 2 bases at positions 50 and 51. Or mark the source sequence with [and]: e.g. ...ATCT[CCCC]TCAT.. means that primers must flank the central CCCC.	
Excluded Regions:		E.g. 401,7 68,3 forbids selection of primers in the 7 bases starting at 401 and the 3 bases at 68. Or mark the source sequence with < and >: e.g. ...ATCT<CCCC>TCAT.. forbids primers in the central CCCC.	
Product Size Ranges	150-250 100-300 301-400 401-500 501-600 601-700 701-850 851-1000		
Number To Return	5	Max 3' Stability	9.0
Max Repeat Mispriming	12.00	Pair Max Repeat Mispriming	24.00
Max Template Mispriming	12.00	Pair Max Template Mispriming	24.00

[Pick Primers](#) [Reset Form](#)

General Primer Picking Conditions

Primer Size	Min: 18	Opt: 20	Max: 27	
Primer Tm	Min: 57.0	Opt: 60.0	Max: 63.0	Max Tm Difference: 100.0 Table of thermodynamic parameters: Breslauer et al. 1986 ▾
Product Tm	Min:	Opt:	Max:	
Primer GC%	Min: 20.0	Opt:	Max: 80.0	
Max Self Complementarity:	8.00	Max 3' Self Complementarity:	3.00	
Max #N's:	0	Max Poly-X:	5	
Inside Target Penalty:		Outside Target Penalty:	0	Note: you can set Inside Target Penalty to allow primers inside a target.

利用该网站进行引物设计

经过一系列操作后，网站给出引物设计结果：

GTATGGCAATTGTTTCAATGTTACTTATAGGGATGGCTATCAGTAATGTTTCGAAAGGGCAATACGCAAA
GAGGTTTTTCTTTTTCGCTACTAGTTGCTTAGTGTTAACTTTAGTTGTAGTTTCAAGTCTAAGTAGCTCA
GCAAATGCATCACAAACAGATAACGGCGTAAATAGAAGTGGTTCTGAAGATCCAACAGTATATAGTGCAA
CTTCAACTAAAAAATTACATAAAGAACCTGCGACTTTAATTAAAGCGATTGATGGTGATACGGTTAAATT
AATGTACAAAGGTCAACCAATGACATTCAGACTATTATTGGTTGATACACCTGAAACAAAGCATCCTAAA
AAAGGTGTAGAGAAATATGGTCCTGAAGCAAGTGCATTTACGAAAAAAATGGTAGAAAATGCAAAGAAAA
TTGAAGTCGAGTTTGACAAAGGTCAAAGAACTGATAAATATGGACGTGGCTTAGCGTATATTTATGCTGA
TGGAAAAATGGTAAACAAAGCTTTAGTTCGTCAAGGCTTGGCTAAAGTTGCTTATGTTTATAAACCTAAC
AATACACATGAACAACCTTTTAAGAAAAAGTGAAGCACAAAGCGAAAAAAGAGAAATTAAATATTTGGAGCG
AAGACAACGCTGATTCAG

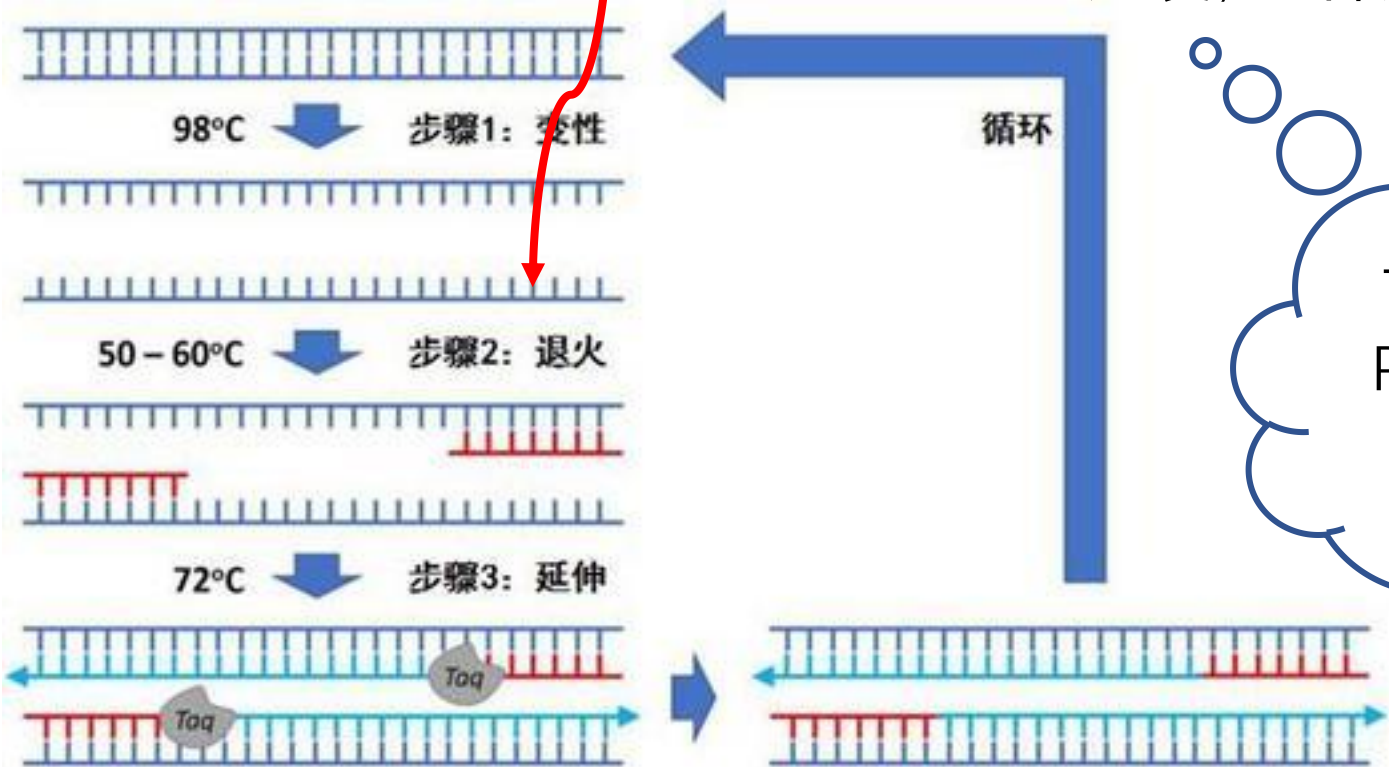
目的片段

我们要进行扩增的是双链DNA，那么引物的序列应该是怎样的？请大家把右侧引物的序列写出来

2、引物怎么办？

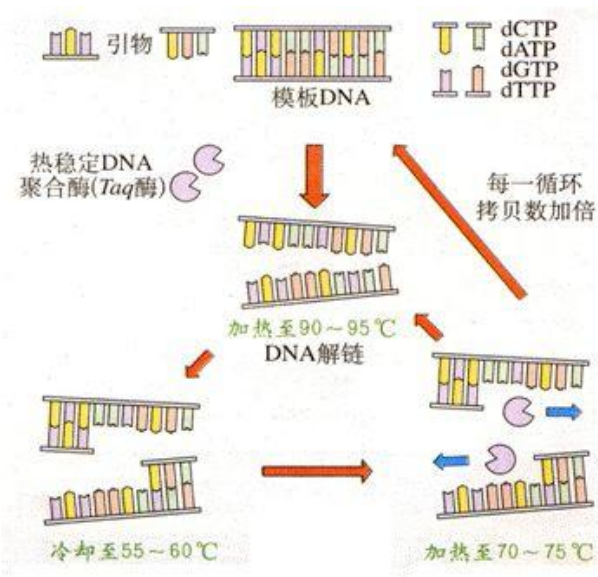
名称	起始位点	Tm	目标片段长度
左侧引物 (F)	255	58.13	222bp
右侧引物 (R)	476	58.13	

Tm: 退火温度, 引物与模板链结合



Tm的高低对
PCR有什么影
响？

解决了模板DNA、引物问题，下面就可以P它了！



看看结果



这一结果代表
了什么意思?

目的片段大小在100~
250bp区间内



上述所讲的过程只是一个理想状态

在实际工作中

(1) 引物的选择：一般的，会参考国内外知名杂志中已发表的引物。但同时也会自行设计几对引物，同时进行实验，再根据自己实验的需求，选择合适的引物；

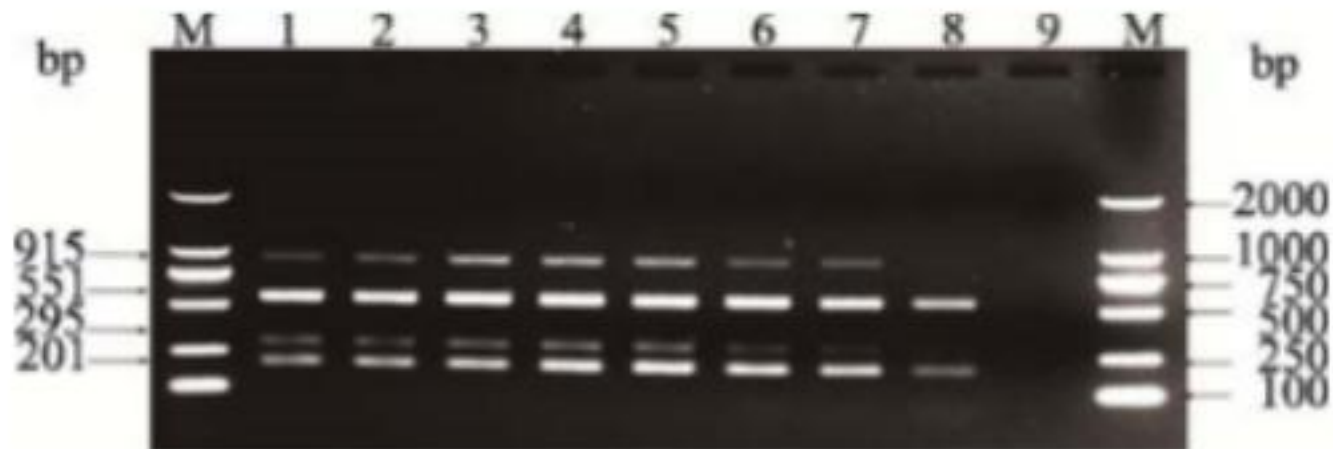
(2) PCR体系和 T_m 的选择：在实际工作中，由于模板DNA浓度各异，因此PCR体系不会一成不变，需要根据DNA浓度及其他因素进行各组分体积的调整，以达到最佳效果；同时， T_m 的选择影响PCR结果，需要进行 T_m 的筛选，获得最佳效果。



一次PCR只能检测一种微生物，有些浪费；有没有办法能够一次做多种微生物的检测呢？

多重PCR (multiplex PCR, mPCR)

必须有！



多重PCR： 在同一PCR反应体系中加入两对以上的引物，同时扩增多个核酸片段的PCR反应。

- 1、市场中购买的肉糜、肉丸，是不是纯肉丸？还是夹杂了其他肉类成分？
- 2、食品检验中提取的细菌DNA，是不是包含了多种不同的食源性致病菌？
- 3、果汁中是否包含了其他果蔬的成分？



多重PCR

其基本原理、操作过程、反应试剂等均与常规PCR相同，但其也有自身的特点

(1) 高效性： 一次就可以进行多种目的基因的扩增

(2) 系统性： 适用于易污染相同食品的一组病原菌进行分析

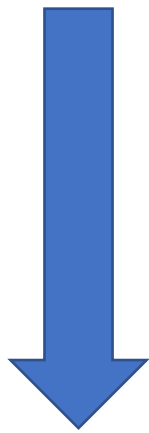
(3) 经济简便性： 节省人力、时间及试剂



多重PCR

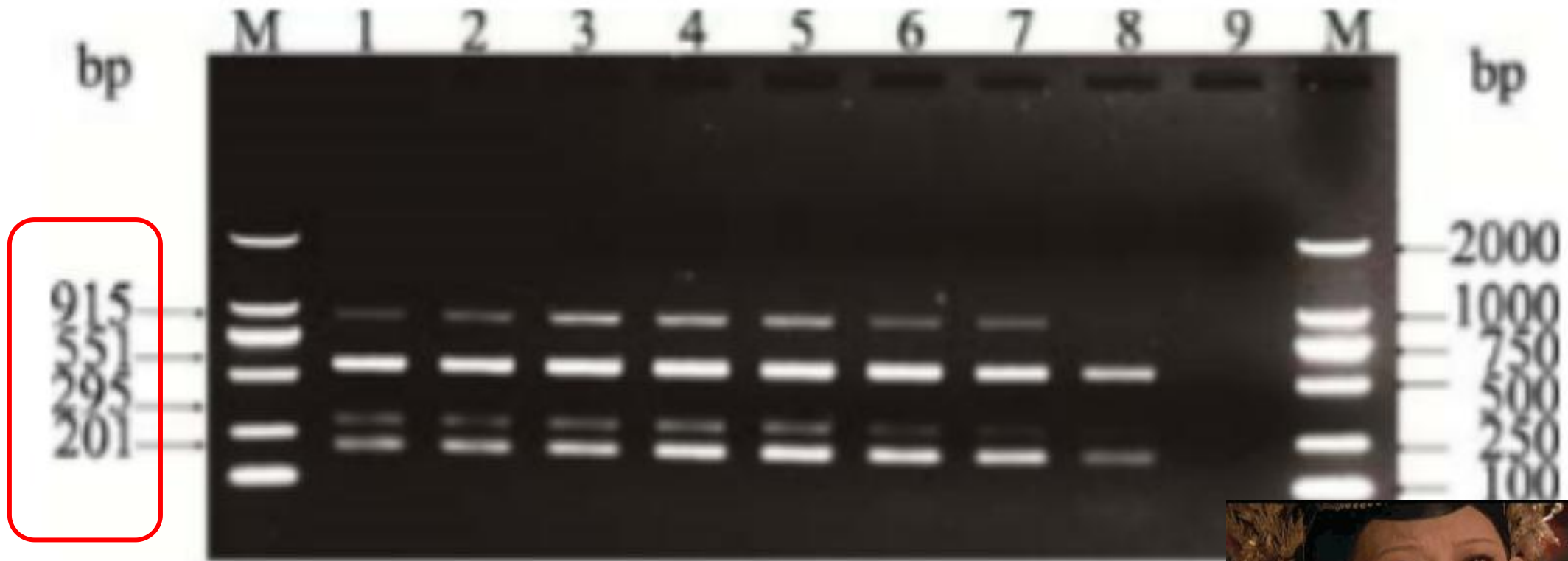
前提

每个物种都有与其他物种**完全不同的****高度保守的**核酸（DNA和RNA）序列



我们所设定的目的DNA片段长度有什么要求？可以长度一致吗？

根据这些完全不同的保守序列进行PCR扩增，就可以得到不同物种的不同目的DNA片段



3种不同血清型沙门氏菌的多重PCR结果

- 1、在这个多重PCR体系中，我们一共使用了几组引物？4组
- 2、每组引物对应的目的基因的片段大小是多少？
- 3、为什么要这样进行引物设计？

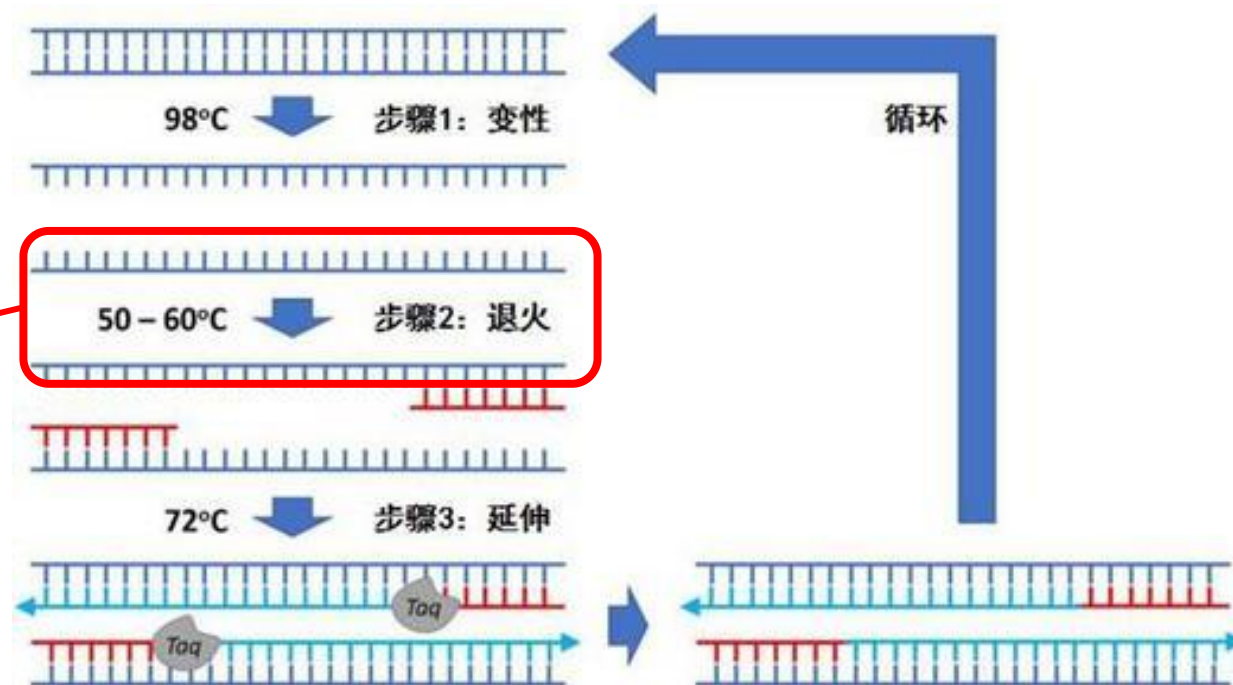


915bp, 551bp, 295bp, 201bp
片段大小太接近，就看不出来了！



除了目的基因片段长度需要有100-200bp的差异外，
还要注意什么问题呢？

退火温度！ T_m !





图片来源：拍信 Paixin.com

永远噩梦的小明利用引物设计软件选择出了下面2套进行三重PCR的引物，你认为哪一套实用性更强？

引物	Tm (°C)
Primer1	64
Primer2	58
primer3	50

温度差异过大，
Tm很难选择，容
易引起结果假阴性
或假阳性

引物	Tm (°C)
Primer1	58
Primer2	56
primer3	60

对比项目	传统培养	分子检测
检测时间	费时，至少需要3-4d	从样品采集到结果检出，在1d左右
检测内容	微生物培养、凝血、产气等，涉及内容多	提取DNA、进行PCR，有时需要电泳检测
技术要求	微生物学基本操作	分子生物学操作
是否可定量	定性、定量操作方式不同	可利用荧光定量PCR直接定性及定量