

基于 PCR 技术的食品微生物快速检测方法应用探讨

陈敏

第一师阿拉尔市食品药品检验所 新疆阿拉尔市 843300

【摘要】食品安全是关系到人民群众身体健康和生命安全的重大民生问题,而食品微生物污染是导致食品安全问题的重要因素之一。本文围绕基于PCR技术的食品微生物快速检测方法展开研究,系统阐述PCR技术的原理、特点及其在食品微生物检测中的应用,旨在为进一步推动PCR技术在食品微生物检测领域的高效应用提供理论参考和实践指导,保障食品安全,提升食品质量监管水平。

【关键词】PCR技术;食品微生物;快速检测

Application of PCR-based Rapid Detection Methods for Food Microorganisms

Chen Min

Alar City Food and Drug Inspection Institute, 1st Division, Alar City, Xinjiang 843300

【Abstract】 Food safety is a critical public health issue that directly impacts people's well-being and lives, with food microbial contamination being a major contributor to food safety hazards. This study investigates PCR-based rapid detection methods for food microorganisms, systematically explaining the principles, characteristics, and practical applications of PCR technology in microbial analysis. The research aims to provide theoretical references and practical guidance for advancing the efficient use of PCR technology in food microbiology, thereby ensuring food safety and enhancing quality supervision standards.

【Key words】 PCR technique; food microorganism; rapid detection

引言

食源性致病菌、腐败微生物等微生物的存在,不仅会影响食品的品质和保质期,还可能引发食源性疾病,严重威胁公众健康。传统的食品微生物检测方法,如培养法、生化鉴定法等,虽然具有操作简单、成本较低等优点,但存在检测周期长、灵敏度低、特异性差等不足,难以满足现代食品行业快速发展对微生物检测时效性和准确性的要求。PCR技术作为一种高效的核酸扩增技术,具有灵敏度高、特异性强、检测速度快等显著优势,能够在短时间内对微量的目标微生物核酸进行大量扩增,从而实现了对食品中微生物的快速、准确检测。自PCR技术诞生以来,在食品微生物检测领域也展现出巨大的应用潜力。本文将对基于PCR技术的食品微生物快速检测方法的应用进行深入探讨。

1 PCR 技术

PCR技术是体外扩增特定DNA片段的分子生物学技术。PCR反应的基本原理是基于DNA的半保留复制过程,通过特异性引物和热稳定DNA聚合酶等反应组分在一定热循环条件下进行多轮扩增,实现从极少量的DNA样本中获

得大量特定DNA序列。在PCR反应步骤中,需将反应温度降至50~65℃,以使设计好的特异性引物与模板DNA的互补序列特异性相结合,从而形成引物-模板复合物,确保引物能高效且特异性地与目标序列结合,同时避免与非特异性序列的结合。DNA聚合酶在适宜温度下(通常为72℃),可通过添加4种脱氧核糖核苷酸(dNTPs)将引物延伸,合成新的DNA链,从而使每个引物-模板复合物都能生成新的双链DNA,完成一个完整的扩增周期。

2 PCR 技术在食品微生物安全检测中的优势

2.1 高灵敏度和特异性

PCR技术的高灵敏度体现为其能检测到样品中极微量的目标DNA。由于致病菌在食品中的含量很低,传统检测方法往往难以检测到这些微量的致病菌,此时PCR技术的重要性就尤为突出。PCR技术可使原本微量的DNA实现大量复制,从而提高微生物检测的灵敏度。在检测沙门氏菌、大肠埃希氏菌O157和李斯特氏菌等常见食源性致病菌时,PCR技术能够在数小时内提供准确的检测结果,而传统培养方法则可能需要花费数天的时间。特异性指PCR技术能准确识别并扩增特定的目标DNA序列,且与其他非目标序

列发生非特异性结合。特异性结合确保了 PCR 反应只扩增目标 DNA 片段, 而不会扩增非目标序列, 避免了非特异性扩增带来的假阳性结果。PCR 技术通过设计特异性引物, 能够准确检测出食品中的沙门氏菌、大肠埃希氏菌 O157 等特定致病菌, 并使检测结果更为准确可靠, 减少假阳性和假阴性结果的出现。

2.2 快速检测

PCR 技术通过体外扩增特定 DNA 片段, 可在短时间内实现对目标微生物的检测和鉴定。典型的 PCR 反应仅需数小时便可完成, 有利于对食品生产和质量控制环节的实时监测, 从而可以快速、有效地应对潜在的食源性疾病暴发风险。这一快速检测能力提升了食品安全监控的效率, 也显著降低了检测过程中的二次污染风险。在实际应用过程中, PCR 技术可直接从样品中提取 DNA, 无需经过复杂的富集和培养步骤, 加快了检测速度, 也减少了操作过程中的人为误差和污染风险。具体来说, PCR 技术能实时监测生产加工过程中的各个环节, 快速筛查原料, 检测环境和产品的微生物状况, 有效提高食品安全检测的效率和可靠性, 为食品生产企业和监管机构提供快速制订应对措施的科学依据。

3 PCR 技术在食品微生物快速检测中的具体应用

3.1 检测大肠埃希氏菌

大肠埃希氏菌是肠道微生物群落中的重要组成部分, 普遍存在于人类及动物的肠道系统内。它的传播途径除了受污染的水源、土壤之外, 还可以通过食品加工过程中的交叉污染对各类食品如生食的蔬菜水果、未经烹煮至熟的肉类等造成污染。大肠埃希氏菌在食品中的检出标志着食品可能已受到肠道病原体的潜在污染, 甚至某些特定的大肠埃希氏菌菌株如 O157: H7, 具有产生有害毒素的能力, 对人类健康构成直接且重大的威胁, 能够导致食物中毒及一系列其他严重疾病的发生。采用 PCR 技术对大肠埃希氏菌实施检测时, 关键在于首先根据大肠埃希氏菌独有的基因特征, 例如编码 β -葡萄糖苷酶的 uidA 基因, 精心设计出具有高度特异性的引物。这些专门设计的引物, 在 PCR 扩增过程中, 能够精确靶向并结合大肠埃希氏菌的特定 DNA 序列。随后, 通过精密调控的热循环步骤, 促使这些 DNA 目标区域实现高效的指数级增长。此外, 在实时荧光定量 PCR (qPCR) 体系中, 还需巧妙引入荧光探针, 使其紧密绑定于目标 DNA 分子。随着 DNA 扩增反应的持续进行, 荧光信号逐渐累积增强, 从而实现了对 DNA 初始拷贝数的精确量化测定。具体而言, 大肠埃希氏菌的高效检测流程, 细致且严谨, 涉及样品预处理、DNA 提取纯化、PCR 反应体系的搭建与执行, 以及对最终结果的深入解析等多个步骤。首先, 在样品预处

理阶段, 需对样本实施必要的物理破碎处理, 例如均质化或研磨, 旨在打破细胞壁, 释放并暴露出内部的微生物细胞。随后, 进入 PCR 反应体系的搭建环节, 需精确无误地添加经精心设计的特异性引物、高效的 DNA 聚合酶、核苷酸原料及其他所有必需的反应试剂, 并在先进的 PCR 扩增仪中精确调控并运行反应。最终, 依据 PCR 产物的生成特性, 特别是结合实时荧光定量 PCR (qPCR) 技术监测到的荧光信号动态变化, 进行详尽的分析与判断, 以确定样品中大肠埃希氏菌的存在与否, 并精确评估数量级, 从而达成大肠埃希氏菌高效检测的目标。

3.2 检测沙门氏菌

沙门氏菌是常见的一种食源性致病性微生物。传播途径广泛, 尤以受污染的未充分加热处理的食品为甚, 包括乳制品、禽蛋、肉类及他相关食品。感染沙门氏菌后, 患者往往会患上沙门氏菌病, 临床症状多样, 主要包括腹泻、腹部疼痛、全身发热 (尤其是头部) 以及呕吐等。而在特定高风险群体中, 例如老年人群、儿童群体及免疫力低下群体等, 沙门氏菌感染可能迅速恶化, 引发更为严重的并发症, 对个体健康构成严重威胁。在食品沙门氏菌的检测领域, PCR 技术的流程与大肠埃希氏菌检测相似, 核心在于利用 PCR 技术对沙门氏菌特有的 DNA 序列进行高度特异性的扩增。检测流程精密而有序, 依次为样品的预处理、DNA 的提取、PCR 反应体系的科学配置、DNA 的有效扩增与精准检测, 以及最终结果的深入分析。整个检测过程因 PCR 技术的高度自动化与卓越特异性而变得迅速、精确且操作便捷。值得一提的是, 通过设计如 invB、invE、invA、invC 及 spvD 等特异性引物, 能够实现对食品中极低浓度沙门氏菌的检测, 为食品安全的早期预警与有效控制提供至关重要的技术支撑。

3.3 检测金黄色葡萄球菌

金黄色葡萄球菌传播的主要途径是摄取受污染的食物, 尤其是那些加工不当的乳制品、沙拉品、肉类品 (包含二次加工) 及蛋类产品 (包含二次加工) 等。该致病菌之所以被视为食品安全的一大威胁, 主要归因于具备产生肠毒素的能力, 能够诱导食物中毒的发生, 患者常伴随有恶心、腹痛、腹泻乃至呕吐等多种临床症状。鉴于上述危害, 对食品样本进行快速且准确的金黄色葡萄球菌检测, 对于维护食品安全防线、保障公众健康具有举足轻重的意义。在检测金黄葡萄球菌时, PCR 技术流程与前述微生物检测流程大致相仿。该技术的核心机制在于, 通过特异性地扩增金黄葡萄球菌的 DNA 序列来达到检测目的。这一过程中, 首先需对金黄葡萄球菌的特定基因, 例如 nuc 基因 (负责热稳定性核酸酶编码) 进行精确识别与设计。紧接着, 利用精心设计的特异性引物精准地与目标基因序列相结合, 随后在严格的热循环条件下, 驱动 DNA 的高效扩增。最终, 借助高灵敏度的荧光

探针技术,实现对金黄色葡萄球菌数量的精确测定。相较于其他食源性病原体检测手段,PCR技术在检测金黄色葡萄球菌上优势显著。它能高度特异性识别特定致病基因,精准区分金黄色葡萄球菌与表皮葡萄球菌等。因金黄色葡萄球菌分泌的肠毒素威胁人体健康,PCR技术在 *ent* 基因等毒素基因检测中表现突出,可有效验证其存在并评估致病潜能,助力食品污染的早期预警与防控。

3.4 检测副溶血性弧菌

副溶血性弧菌,作为食源性疾病病原菌中的重要一员,主要集中于海产品领域,尤其是鱼类、软体类、贝类及甲壳类海产品,检出率普遍较高。一旦人类食用了被副溶血性弧菌污染的海产品,急性肠胃炎便可能随之而来。这种污染程度不仅与海域环境条件紧密相关,同时也受到海产品种类等多种因素的共同影响。近年来,淡水产品中副溶血性弧菌的检出率正呈现出显著上升的趋势,且污染特征日益复杂,包括季节性变化、多环节传播以及跨物种感染等,这些均对食品安全提出了新的挑战。副溶血性弧菌的检测手段也在不断创新,如PCR-探针法等一系列新型检测技术,不仅具有强的特异性,操作起来也简便,而且检测的速度快。现阶段对食品中该类致病菌进行检测的技术(方法)多达22种,如液相色谱法(PCR-变性高效,基于分子生物学应用机理)等以PCR技术为主的检测方法都在检测实践中得到了广泛应用。

4 PCR技术在食品微生物检测应用的措施

4.1 优化样本前处理技术

研发高效、简便、通用的样本前处理方法是解决PCR检测样本前处理难题的关键。一方面,利用纳米材料、磁珠等新技术开发新型DNA提取方法。例如,基于磁性纳米颗粒的DNA提取技术,通过将磁性纳米颗粒表面修饰特定的官能团,使其能够特异性吸附DNA,然后利用磁场分离技术快速分离DNA,该方法具有操作简便、提取效率高、耗时短等优点,可有效减少样本中杂质对PCR反应的影响。另一方面,加强对商业化DNA提取试剂盒的优化和改进,针对不同类型的食品样本,开发专用的DNA提取试剂盒,提高试剂盒的适用性和提取效果。

参考文献

- [1] 龚慧雯.快速检测片技术在食品微生物检测中的运用[J].现代食品, 2024, 30(20): 198-200.
- [2] 陆金虎, 管玉雯, 李晓静, 等.食品微生物快速检测技术的现状及应用[J].中国食品工业, 2024, (19): 79-81.
- [3] 刘运其, 田运佳.食品中微生物快速检测与鉴定技术的研发与应用[J].食品安全导刊, 2024, (22): 121-123.
- [4] 陆春甜.基于PCR技术的食品微生物快速检测方法研究[J].中国食品工业, 2024, (11): 113-115.
- [5] 王旭.食品微生物快速检测技术的现状分析及应用[J].食品工程, 2023, (03): 4-6.

4.2 降低假阳性和假阴性风险

为减少假阳性结果,应加强实验室管理,建立严格的实验室分区制度,将样本处理区、试剂准备区、PCR扩增区和产物分析区严格分开,避免不同区域之间的交叉污染。同时,定期对实验室进行清洁和消毒,使用专门的防气溶胶污染设备,如带滤芯的吸头、负压通风系统等,防止气溶胶污染。在引物设计方面,利用生物信息学软件对引物序列进行优化,提高引物的特异性,减少非特异性结合。

针对假阴性问题,优化PCR反应条件,通过正交试验等方法对引物浓度、DNA聚合酶用量、退火温度、循环次数等反应参数进行优化,提高扩增效率。同时,采用巢式PCR、多重PCR等技术,提高检测的灵敏度和特异性。巢式PCR通过两轮PCR扩增,使用两对引物对目标DNA进行扩增,可显著提高检测的灵敏度;多重PCR则在同一反应体系中加入多对引物,同时扩增多个目标基因片段,能够在一次检测中同时检测多种微生物,提高检测效率。

4.3 降低检测成本

在仪器设备方面,鼓励国内企业加大研发投入,开发具有自主知识产权的PCR检测仪器,降低仪器成本。同时,推动仪器设备的小型化、便携化发展,使其更适合基层检测机构 and 现场检测使用。在试剂方面,通过技术创新降低引物、DNA聚合酶等试剂的生产成本,如利用基因工程技术大规模生产DNA聚合酶,提高生产效率,降低成本。此外,建立资源共享平台,实现检测仪器和试剂的共享使用,降低单个检测机构的设备和试剂采购成本。加强专业技术人员培训,提高人员的操作技能和检测效率,减少因操作失误导致的重复检测,从而降低人力成本。

结束语

PCR技术凭借其高灵敏度、特异性强、检测速度快等优势,在食品微生物检测领域具有广阔的应用前景。通过优化样本前处理技术、降低假阳性和假阴性风险、降低检测成本等改进对策,能够进一步提高PCR技术在食品微生物检测中的应用水平,为保障食品安全、提升食品质量监管能力提供强有力的技术支持。