微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
48(7)：941~946; 4 July 2008
ISSN 0001-6209; CN11-1995/Q
http://journals.im.ac.cn

食品中沙门氏菌分子检测靶点的筛选与评价

向雪菲[1]，刘斌[1]，张利达[1]，史贤明[1,2*]

（[1]上海交通大学农业与生物学院食品科学系，陆伯勋食品安全研究中心，上海 200240）
（[2]上海食品安全工程技术研究中心，上海 201203）

摘要：【目的】发掘新的沙门氏菌分子检测靶点，筛选检测性能优秀的引物。【方法】利用 BLAST 程序比较沙门氏菌属内基因组 DNA 序列的同源性以及沙门氏菌与非沙门氏菌基因组 DNA 序列之间的特异性，发掘出 100 多个检测沙门氏菌属的特异性片段，并从中随机挑选出 15 个片段作为候选靶点，一共设计了 27 对引物（FS1~FS27），对它们的特异性、灵敏度加以评价，从中筛选检测性能最好的引物。【结果】在 27 对引物中，检测性能最优的引物为 FS23，采用该引物对供试菌株的相应检测靶点进行 PCR 扩增，44 株沙门氏菌都能扩增到一条 492 bp 特异性片段，而 22 株非沙门氏菌则不能扩增出这一特异性片段。以 FS23 为引物建立 PCR 方法检测猪霍乱沙门氏菌基因组 DNA 的灵敏度为 11.9 fg/μL，细菌纯培养物灵敏度为 4.9×10^2 cfu/mL；用猪霍乱沙门氏菌人工污染牛奶样品，如果接种起始菌量为 100 cfu/25 mL 时，只需要增菌 5 h，采用上述方法即能检测出沙门氏菌。【结论】引物 FS23 对应的基因序列是一个性能优良的新分子检测靶点，具备很高的特异性和灵敏性，能够广泛应用于食品中沙门氏菌的快速检测。

关键词：沙门氏菌；PCR；靶点；筛选；评价
中图分类号：TS207.7　　文献标识码：A　　文章编号：0001-6209 (2008) 07-0941-06

沙门氏菌（*Salmonella*）是自然界普遍存在的一种致病菌，在世界各地的食物中毒中，沙门氏菌引起的中毒病例占第一位或第二位[1]。它引起的疾病主要分为两大类：一类是伤寒等烈性传染病，另一类是急性肠胃炎[2]。常见的肉类食品和奶蛋类食品都可以被沙门氏菌污染，其中鼠伤寒沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、肠炎沙门氏菌等是常见的污染菌，它们是引起人类沙门氏菌食物中毒的主要致病菌，已对食品安全构成了严重威胁。

目前，我国食品检测部门大多仍采用传统的培养方法来检测致病菌，操作复杂且所需时间长，一般为 4~5 d，远远不能满足当今食品检测的需要，而基于聚合酶链式反应（PCR）的检测方法由于具备快速、灵敏、准确的特点，广泛应用于沙门氏菌的检测。PCR 检测方法的特异性与灵敏度主要取决于相应检测靶点的选择。目前，沙门氏菌 PCR 方法所用的检测靶点，大多数是国外学者在 2000 年前发掘的，主要是以毒力基因为主：编码吸附和侵袭上皮细胞表面蛋白的基因 *invA*[3]、菌毛的编码基因 *fimA*[4]、肠毒素基因 *stn*[5]、侵袭基因正调节蛋白的编码基因 *hilA* [6]和质粒毒力相关的 *SPV* 基因[7]等。目前，大多研究者仍沿用这些早期提供的常用检测靶点来建立沙门氏菌的 PCR 检测方法，近五年内尚未见有关新检测靶点系统筛选与评价的报道。

随着生物信息学技术的发展和基因测序工作的完善，特别是有 5 株沙门氏菌（*S. paratphi* A ATCC9150, *S. typhi* Ty2, *S. typhimurium* LT2, *S. typhi* CT18 和 *S. choleraesuis* SC-B67）[8]基因组序列测定工作已完成并被收集在 GenBank 中，为新检测靶点

基金项目：自然科学基金(30771792)；国家“十一五”科技支撑计划课题(2006BAK02A14)
*通讯作者。Tel: +86-21-34206616; E-mail: xmshi@sjtu.edu.cn
作者简介：向雪菲(1983–)，女，湖南人，硕士研究生，主要研究方向为食品安全。E-mail: xiangxf@sjtu.eud.cn
收稿日期：2008-01-16；修回日期：2008-02-25

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

的筛选提供了生物信息。本研究用基因比对方法来发掘沙门氏菌的特异性 DNA 片段，并对特异性、灵敏度等参数进行生物学评价，以便为建立 PCR 检测方法提供优质的检测靶点。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器：*Taq* DNA 聚合酶（上海晶美生物技术有限公司），100 bp DNA Ladder（北京天根生化科技有限公司），Primer Premier 5.0 软件（Premier Biosoft International），PCR 扩增仪（MJ Research Minicycle PTC-200），紫外核酸与蛋白质分析仪（Beckman Coulter DU800），电泳仪（Amersham Biosciences RAD300）。

1.1.2 菌株：如表 1 所示，选择 44 株沙门氏菌（阳性菌株）及 22 株非沙门氏菌（阴性菌株）作为实验菌株，其中标准菌株购买于中国科学院微生物研究所和中国医学微生物菌种保藏中心，其余菌株为上海交通大学陆伯勋食品安全研究中心的食品安全与微生物研究室保存菌株。

表 1 菌株及各引物的特异性

Table 1 Bacterial strains and the detection specificity of various primers

Bacterial species	Strain No.	No. of strains	PCR results				
			FS10	FS12	FS21	FS23	139-141
Salmonella typhi	CMCC50098	1	+	+	+	+	+
Salmonella choleraesuis	AS1.1190	1	+	+	+	+	+
Salmonella paratphi A	CMCC50001	1	+	+	+	+	+
Salmonella paratphi B	CMCC50004	1	+	+	+	+	+
Salmonella hirschfeldii	CMCC50017	1	+	+	+	+	+
Salmonella enteritidis	CMCC50335	1	+	+	+	+	–
Salmonella gallinarum	CMCC50770	1	+	+	+	+	+
Salmonella typhimurium	AS1.1174	1	+	+	+	+	–
Salmonella typhi	Laboratory strain	1	+	+	+	+	+
Salmonella paratphi A	Laboratory strain	1	+	+	+	+	+
Salmonella spp.	Laboratory strain	5	+	+	+	+	–
Salmonella spp.	Laboratory strain	29	+	+	+	+	+
Listeria murrayi	AB97017	1	–	–	–	–	–
Listeria seeligeri	AB97018	1	–	–	–	–	–
Listeria grayi	AB97019	1	–	–	–	–	+
Listeria monocytogenes	Laboratory strain	1	–	–	–	–	–
Shigella sonnei	CMCC51334	1	–	–	–	–	+
Shigella dysenteriae	AS1.1869	1	–	–	–	–	–
Shigella flexneri	AS1.1868	1	–	–	–	–	+
Shigella spp.	Laboratory strain	1	–	–	–	–	–
Staphylococcus aureaus	Laboratory strain	3	–	–	–	–	–
Escherichia coli	Laboratory strain	1	–	–	–	–	+
Escherichia coli	Laboratory strain	1	–	–	–	–	+
Proteus mirabilis	Laboratory strain	2	–	–	–	–	–
Citrobacter spp.	Laboratory strain	1	–	–	–	–	+
Enterobacter cloacae	Laboratory strain	1	–	–	–	–	+
Vibrio vulnificus	Laboratory strain	1	–	–	–	–	–
Vibrio fluvialis	ATCC33810	1	–	–	–	–	–
Vibrio parahaemolyticus	ATCC17802	1	–	–	–	–	–
Vibrio alginolyticus	Laboratory strain	1	–	–	–	–	–
Vibrio mimicus	Laboratory strain	1	–	–	–	–	–

* Results of PCR positive (+) & negative (–) indicate the presence and absence of amplification products against various primers; 139–141 is a set of control primers which was commonly used previously.

1.2 PCR 反应

1.2.1 引物设计：从 GenBank 数据库中收集所有相关细菌全基因组序列，通过比较各属间及沙门氏菌属内的基因组 DNA 序列，找出所有沙门氏菌属内序列保守性好、且相对于非沙门氏菌基因组特异的多个候选片段，并从中随机挑选出 15 个候选片段，利用 Primer Premier 5.0 软件进行引物设计，一共设计了 27 对引物（FS1~FS27）。同时本文选取沙门氏菌常用的检测基因 *invA* 所设计的引物 139–141[3]为对照。所有引物均由上海生工生物技术服务公司合成。序列如表 2 所示：

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

表 2 重要引物及其序列

Table 2 Primers and its sequences used in this study

Primers	Length /bp	Sequences(5′→3′)	Sequence location of targets	Amplification product/bp
FS10	20	CGCCTGTATTCCTGAGCAGA	895533~897532	821
	20	CTTGATGCAGTGGTCGAGTT		
FS12	20	GCCATTTGCGTCAGGAAGTT	1696205~1698701	606
	20	GACGCTATGCGGTAACGAGA		
FS21	20	TGGCTATCCGGTCGATACTC	2706996~2708995	522
	20	TCTCCTTAATCGGCAAAACG		
FS23	20	GGCGTTAACCCACTCCAGTA	1696205~1698701	492
	20	TTACTGTGGGGAGAGCAACC		
139-141	26	GTGAAATTATCGCCACGTTCGGGCAA	2991894~2994069	284
	22	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC		

* Sequence location of targets is the sequence numbers of the target start and end sites in *S. choleraesuis* SC-B67 genome (AE017220.1).

1.2.2 PCR 反应：PCR 反应采用 25 μL 体系，循环参数： 94℃ 3 min；94℃ 30 s，60℃ 30 s，72℃ 30 s，35 个循环；72℃ 10 min。反应产物用 2%琼脂糖凝胶电泳检测，用凝胶成像仪成像并观察结果。

1.3 特异性评价

从表 1 中列出的 44 株沙门氏菌和 22 株非沙门氏菌中提取基因组 DNA 作为模板，用已建立的 PCR 反应体系，对各个引物进行 PCR 扩增，同时以引物 139-141 做为对照。

1.4 灵敏度评价

对特异性优越的各引物进行基因组 DNA 灵敏度和细菌纯培养物灵敏度评价，同时以引物 139–141 作为对照。基因组 DNA 灵敏度评价方法为：提取猪霍乱沙门氏菌 AS1.1190 基因组 DNA[9]并测定其浓度，做 10 倍系列梯度稀释，每个稀释度各取 5 μL 为模板进行 PCR 扩增。细菌纯培养物灵敏度评价方法为：猪霍乱沙门氏菌 AS1.1190 经 6 h 纯培养后，用无菌水做 10 倍系列梯度稀释，并选择 10^{-6}、10^{-7} 和 10^{-8} 这 3 个稀释度做平板计数，以此计算原始菌落数[10]。同时每个稀释度各取 1 mL，提取 DNA[9]，取 5 μL 为模板进行 PCR 扩增。

1.5 抗干扰能力的评价

PCR 反应体系抵抗其他杂菌干扰能力的评价，主要是通过测定干扰菌对检测沙门氏菌灵敏度的影响程度来实现。选取奇异变形杆菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌（见表 1）作为干扰菌株并设置相同的起始浓度，并分别设置低（N×10^4 cfu/mL），中（N×10^6 cfu/mL）和高（N×10^8 cfu/mL）3 种水平[11]。将干扰菌混合菌液分别与三组 10 倍系列梯度稀释的猪霍乱沙门氏菌 AS1.1190 菌液进行混合，低中高每个水平浓度的干扰菌分别混合一组梯度稀释的沙门氏菌液。随后每个稀释度各取菌液 1 mL，提取 DNA，取 5 μL 作为模板进行 PCR 扩增。最后将混合菌液增菌 12 h 后，每个稀释度各取 1 mL，提取 DNA，取 5 μL 作为模板进行 PCR 扩增。

1.6 在人工污染食品样品检测中的应用

污染食品样品为牛乳，取 10 份无菌牛乳样品，每份 25 mL，分别接入猪霍乱沙门氏菌 0、0、5、5、10、10、20、20、100、100 cfu，然后分别转接到 225 mL 的缓冲蛋白胨水增菌液(BPW)中，37℃，150 r/min 增菌培养 12 h[12]。在培养期间(12 h)每隔 1 h 取 1 mL 增菌液，提取 DNA，进行 PCR 检测。

2 结果

2.1 特异性评价

用 27 对引物分别对 44 株沙门氏菌和 22 株非沙门氏菌进行 PCR 检测，如表 1 所示，FS10，FS12，FS21，FS23 四对引物均表现出良好的特异性，未出现假阴性、假阳性情况，而其他引物特异性不佳，其详尽数据本文未列出。如图 1 所示，用 FS23 进行 PCR 检测，以沙门氏菌的基因组 DNA 为模板能扩增出 492bp 特异性条带，而以非沙门氏菌基因组 DNA 为模板则没有特异性条带。

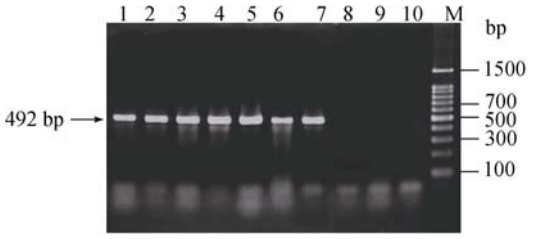

图 1 FS23 扩增沙门氏菌与非沙门氏菌的特异性评价

Fig. 1 Detection Specificity of PCR for *Salmonella* and non-*Salmonella* strains using primer FS23. Lane 1~7: *Salmonella* strains. Lane 8~10: non-*Salmonella* strains. Lane M: 100 bp DNA ladder.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

2.2 灵敏度评价

在设置的浓度系列中，DNA 浓度为 11.9 fg/μL 时引物为 FS23 的 PCR 扩增有特异性条带，而 1.19 fg/μL 时没有特异性条带(图 2-A)，表明引物 FS23 检测沙门氏菌基因组 DNA 的灵敏度为 11.9 fg/μL。经平板菌落计数猪霍乱沙门氏菌 AS1.1190 起始菌液浓度为 4.9×10^8 cfu/mL。细菌纯培养物灵敏度评价结果显示，菌液浓度为 4.9×10^2 cfu/mL 时 PCR 扩增有特异性条带，而菌液浓度为 4.9×10 cfu/mL 时没有特异性条带（图 2-B），表明引物 FS23 检测沙门氏菌细菌纯培养物的灵敏度为 4.9×10^2 cfu/mL。采用类似的方法对 FS10，FS12，FS21 这 3 对引物和对照引物 139-141 进行灵敏度评价，结果见表 3，从中可以看出引物 FS23 的基因组 DNA 灵敏度与细菌纯培养物灵敏度均优于其它 3 对引物与对照引物。

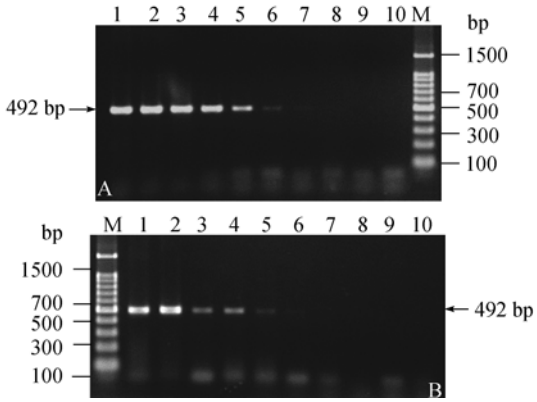

图 2　FS23 检测猪霍乱沙门氏菌的基因组 DNA(A)和细菌纯培养物(B)灵敏度评价

Fig. 2　Detection sensitivity of genome DNA (A) and whole cells (B) of PCR for *Salmonella choleraesuis* AS1.1190 using primer FS23. (A): Land 1~10: 11.9 ng/μL, 1.19 ng/μL, 119 pg/μL, 11.9 pg/μL, 1.19 pg/μL, 119 fg/μL, 11.9 fg/μL, 1.19 fg/μL, 0.119 fg/μL, and negative control. (B): Lane 1~10: 4.9×10^7 cfu/mL, 4.9×10^6 cfu/mL, 4.9×10^5 cfu/mL, 4.9×10^4 cfu/mL, 4.9×10^3 cfu/mL, 4.9×10^2 cfu/ mL, 4.9×10 cfu/mL, 4.9 cfu/mL, 0.49 cfu/mL and negative control. Lane M: 100 bp DNA ladder.

表 3　不同引物检测猪霍乱沙门氏菌的灵敏度

Table 3　Detection sensitivity of PCR for *Salmonella choleraesuis* AS1.1190 using various primers

Primers	Sensitivity of genome DNA (fg/μ)	Sensitivity of whole cells (cfu/mL)
FS10	1.19×10^3	1.6×10^7
FS12	119	1.6×10^7
FS21	119	4.9×10^3
FS23	11.9	4.9×10^2
139-141	119	4.9×10^5

2.3 抗干扰能力评价

在干扰菌以低中高 3 种不同起始浓度出现时，评价引物FS23检测猪霍乱沙门氏菌AS1.1190的细菌纯培养物灵敏度，结果（表 4）显示，干扰菌株对沙门氏菌的细菌纯培养物灵敏度检测存在影响，加入干扰菌株之后，引物 FS23 检测细菌纯培养物的灵敏度下降 3~4 个数量级。

表 4　引物 FS23 检测猪霍乱沙门氏菌的抗干扰能力

Table 4　Detection of *Salmonella choleraesuis* AS1.1190 in the presence of background flora

Initial concentration of interferefering bacteria (cfu/mL)	Sensitivity in the absence of background flora (cfu/mL)	Sensitivity in the presence of background flora (cfu/mL)
低($N\times10^4$)	4.9×10^2	3.7×10^5
中($N\times10^6$)	4.9×10^2	3.7×10^5
高($N\times10^8$)	4.9×10^2	3.7×10^6

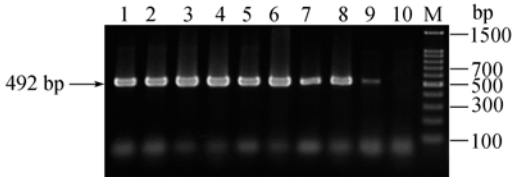

图 3　增菌 12 h 后，引物 FS23 检测猪霍乱沙门氏菌细菌纯培养物灵敏度

Fig. 3　Detection sensitivity (whole cells) of PCR for *Salmonella choleraesuis* AS1.1190 using primer FS23 after 12 h enrichment. Lane 1~10: 3.7×10^7 cfu/mL, 3.7×10^6 cfu/mL, 3.7×10^5 cfu/mL, 3.7×10^4 cfu/mL, 3.7×10^3 cfu/mL, 3.7×10^2 cfu/mL, 3.7×10 cfu/mL, 3.7 cfu/mL, 0.37 cfu/mL and negative control. Lane M: 100 bp DNA ladder.

增菌 12h 后，干扰影响就会降低，并能够提高灵敏度。当干扰菌株起始浓度为 $N\times10^8$ cfu/mL 时，如果增菌 12 h，引物 FS23 的起始检测限达到 0.37 cfu/mL（图 3）。

2.4 人工污染食品样品的检测

当猪霍乱沙门氏菌 AS1.1190 起始菌浓度为 100 cfu/25 mL 时，增菌 5 h 取样提取 DNA 后，用引物 FS23 建立的 PCR 体系扩增有特异性条带，而增菌 4 h ，则无特异性条带（图 4-A）。这表明，在一定的污染菌量下，用引物 FS23 检测受到沙门氏菌污染的牛奶样品，只需要增菌 5 h，即能检测出沙门氏菌。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

增菌培养 12 h 后，引物 FS23 PCR 检测的结果，除对照外，不同起始菌量的样品均有特异性条带（图 4-B），阳性检出率达到 100%。

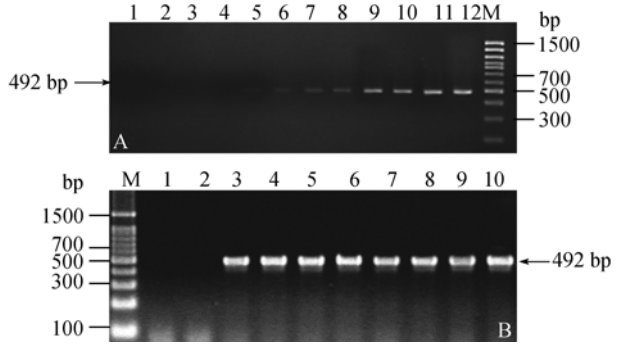

图 4 不同增菌时间(A)和不同污染起始菌量(B)条件下，引物 **FS23** 检测人工污染样品结果比较

Fig. 4 Detection for *Salmonella choleraesuis* AS1.1190 from artificially contaminated samples using primer FS23 (A) after enrichment for various hours or (B) with various levels of contaminates. (A): Lane 1~12: 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h, 8 h, 9 h, 10 h, 11 h, 12 h. M: 100 bp DNA ladder. (B): Lane 1~10: 0 cfu/25 mL, 0 cfu/25 mL, 5 cfu/25 mL, 5 cfu/25 mL, 10 cfu/25 mL, 10 cfu/25 mL, 20 cfu/25 mL, 20 cfu/25 mL, 100 cfu/25 mL, 100 cfu/25 mL. M: 100 bp DNA ladder. * (A): every sample was artificially contaminated by *Salmonella choleraesuis* AS1.1190 at 100 cfu/25 mL; (B): every sample has been enriched for 12h.

3 讨论

PCR 检测方法的特异性与灵敏度主要取决于检测靶点和检测引物的特异性，一个引物能否应用于 PCR 检测，最重要的是特异性，所以本文根据特异性对候选靶点所设计的这些引物进行初筛。在初筛过程中，发现有相当一部分引物特异性很差，不能扩增出特异性条带，根据 15 个候选检测靶点设计的 27 对引物中，只筛选出 4 对特异性好的引物，说明如果先进行特异性初筛，有利于提高筛选效率。寻找高灵敏度的引物是降低 PCR 检测限的重要手段。检测性能优秀的引物必须在保证特异性好的前提下，灵敏度最优化。在对引物灵敏度的评价过程中，发现存在引物的灵敏度和特异性互相矛盾的情况，往往是特异性较好的引物灵敏度较差，甚至根据同一检测靶点不同位点所设计的两对引物 FS12 和 FS23（表 2），二者特异性相当，但灵敏度却有很大的差别（表 3）。因此，在筛选引物的过程中，必须在保证特异性的情况下，尽可能的提高灵敏度，达到两者的协调性与统一性。本文经过灵敏度评价后，从 4 对特异性好的引物中只选择出 1 对灵敏度最高的引物 FS23。从表 1 和表 3 可以看出，引物 FS23 所表现出的特异性和灵敏度与目前最常用的 *invA* 基因为检测靶点所设计的 139-141 引物[3]相比，检测性能比后者优秀。引物 FS23 检测沙门氏菌的灵敏度已优于其他文献报道中 Yang 根据 *invA* 基因[13]、Konstantia 根据 *sdiA* 基因[14]、Pathmanathan 根据 *hilA* 基因[15]所设计的一些引物。

用筛选后的引物建立的 PCR 体系能否应用于实际样品中检测，还需要进一步的生物学评价。用引物 FS23 建立的 PCR 反应体系检测人工污染食品样品，若人工污染牛奶样品接种起始菌量为 100 cfu/25 mL 时，只需要增菌 5 h，即能检出沙门氏菌。这一结果表明在相同数量级的污染起始菌量下对牛奶进行检测，增菌时间少于 Agarwal 等 [16]所报道的时间，且污染起始菌量也小于 Guo 等 [17]所报道的污染菌量。通常食品中的沙门氏菌含量非常少，需要一个增菌过程，有时甚至部分沙门氏菌以“亚致死”状态存在，所以增菌培养是十分必要的，但如能尽可能的缩短增菌时间，就可更快速准确地检测出沙门氏菌。

经过筛选后得出的引物 FS23 是一对灵敏的、特异的检测引物，其检测性能已经与国内外常用的一些检测引物相当，甚至要优于它们。它不仅可用于实际食品中沙门氏菌的快速检测，其对应的特异性序列也是沙门氏菌一个新的分子检测靶点。通过 BLAST 序列分析，其检测靶点所对应的基因 *srfC*，功能可能是受转录因子 SsrB 调节的一种毒力效应蛋白，但此功能还需要得到进一步的实验验证。

在今后的研究中，继续用上述评价方法筛选本文尚未进行评价的其它检测靶点，有望找出更多更优秀的沙门氏菌检测靶点。本文所建立的靶点发掘及评价方法也为全面系统筛选与评价微生物的检测靶点提供了一种新思路。

参 考 文 献

[1] Manzano M, Cocolin L, Astori G, *et al*. Development of a PCR microplate-capture hybridization method for simple, fast and sensitive detection of *Salmonella* serovars in food. *Molecular and Cellular Probes*, 1998, 12: 227–234.

[2] 吴斌, 秦成. 畜产品中沙门氏菌的风险评估. 大连轻工业学院学报(*Journal of Dalian Institute of Light Industry*), 2004, 23(3): 226–228.

[3] Rahn K, Grandis SA, Clarke RC, *et al*. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and Cellular Probes*, 1992, 6(4): 271–279.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

[4] Cohen HJ, Mechanda S. PCR Amplification of the *fimA* Gene sequence of *Salmonella typhimurium*, a specific method for Detection of *Salmonella* spp.. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(12): 4303–4308.

[5] Dinjus U, Hanel I, Bauerfeind R, *et al*. Detection of the induction of *Salmonella enterotoxin* gene expression by contact with epithelial cells with RT-PCR. *FEMS Microbiol Lett*, 1997, 146(2): 175–179.

[6] Kubori TY, Matsushima. Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science*, 1998, 280: 602–605.

[7] Mahon J, Lax AJ. A quantitative polymerase chain reaction method for the detection in avian faeces of *Salmonella* carrying the *spvR* gene. *Epidemiological Infection*, 1993, 111: 455–464.

[8] http: // www. ncbi. nlm. nih. gov/

[9] 刘斌, 史贤明. 扩增内标在沙门氏菌 PCR 检测方法中的应用. 微生物学通报(*Microbiology*), 2006, 33(2): 156–161.

[10] 郭涛, 孙香彬, 侯君, 等. 食品微生物检验中菌落总数测定的注意事项. 微生物学杂志(*Journal of Microbiology*), 2007, 27(3): 111–112.

[11] Burkhard M, Jeffrey H, Marta H, *et al.* Interlaboratory diagnostic accuracy of a *Salmonella* specific PCR-based method. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 3: 241–249.

[12] Pina M. Comparison of culture, polymerase chain reaction (PCR), TaqMan *Salmonella*, and Transia Card *Salmonella* assaysfor detection of *Salmonella* spp. in naturally-contaminated ground chicken, ground turkey, and ground beef. *Molecular and Cellular Probes*, 2003, 6: 215–221.

[13] Yang YG, Song MK, Park SJ, *et al.* Direct detection of *Shigella flexneri* and *Salmonella typhimurium* in human feces by real-time PCR. *Journal Microbiol Biotechnol*, 2007, 17(10): 1616–1621.

[14] Konstantia H, Ioannis O, Maria L, *et al*. PCR detection of *Salmonella* spp. using primers targeting the quorum sensing gene *sdiA*. *FEMS Microbiol Lett*, 2006, 259(2): 201–207.

[15] Pathmanathan S, Cardona N, Sanchez J, *et al.* Simple and rapid detection of *Salmonella* strains by direct PCR amplification of the *hilA* gene. *Journal of Medical Microbiology*, 2003, 52(9): 773–776.

[16] Agarwal A, Makker A, Goel SK. Application of the PCR technique for a rapid, specific and sensitive detection of *Salmonella* spp. in foods. *Molecular and Cellular Probes*, 2002, 16: 243–250.

[17] Guo X, Chen J, Beuchat LR. *et al*. PCR detection of *Salmonella* enterica serotype Montevideo in and on raw tomatoes using primers derived from *hilA*. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(12): 5248–5252.

Evaluation of new specific molecular targets for the PCR detection of *Salmonella* spp. in foods

Xuefei Xiang[1], Bin Liu[1], Lida Zhang[1], Xianming Shi[1,2*]

([1]*Department of Food Science and Bor Luh Food Safety Center*, *School of Agriculture and Biology*, *Shanghai Jiao Tong University*, *Shanghai* 200240, *China*)

([2]*Shanghai Engineering Research Center of Food Safety*, *Shanghai* 201203, *China*)

Abstract: [Objective] The purpose of this study is to find new molecular targets for the detection of *Salmonella*. **[Methods]** Homology comparison of genomic sequences in GenBank among *Salmonella* serovars and the specificity comparison among *Salmonella* and non-*Salmonella* strains were done with the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool Program). We randomly selected 15 target sequences to design and synthesize 27 sets of primers for the evaluation of specificity and sensitivity and development of PCR methods. **[Results]** Primer FS23 was the best in specificity and sensitivity among these 27 sets of primers. The 44 *Salmonella* strains produced a specific 492-bp amplification band, whereas 22 non-*Salmonella* strains did not using primer FS23 for PCR detection. The detection sensitivity of FS23 was 11.9 fg/μL for DNA templates and 4.9×10^2 cfu/mL for whole cells. *Salmonella* could be detected successfully by the PCR method developed in this study after 5 h enrichment when the milk samples were artificially contaminated by this organism at 100 cfu/25 mL. **[Conclusion]** The sequences against FS23 is a new and excellent molecular target for the detection of *Salmonella*. The FS23-based PCR assay is sensitive and specific, and can be used for rapid detection of *Salmonella* in foods.

Keywords: *Salmonella*; PCR; molecular target; primer; screening; evaluation

Supported by the the Programs of Chinese National Natural Science Foundation(30771792) and the Key Project of Scientific and Technical Supporting Programs in the 11th Five-Year-Plan of Ministry of Science and Technology (2006BAK02A14)

*Corresponding author. Tel: +86-21-34206616; E-mail: xmshi@sjtu.edu.cn

Received: 16 January 2008/ Revised: 25 February 2008

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn